

Synthese von Prätubulysin und weiteren Biosynthese- Intermediaten von Tubulysin D

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Angelika Ullrich

Saarbrücken

2008

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2005 bis November 2008 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Kazmaier am Institut für Organische Chemie der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes angefertigt.

Tag des Kolloquiums:	20. Februar 2009
Dekan:	Prof. Dr. U. Müller
Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Kazmaier
	Prof. Dr. T. Eicher

Abstract

Tubulysins are natural products from myxobacteria *Angiococcus disciformis* An d48 and *Archangium gephyra* Ar315 with exceptional high antimitotic effect on cancer cells in picomolar range by interfering with microtubule dynamics.^[1] Structurally, they are tetrapeptides consisting of natural Ile and three unnatural amino acids. Sandmann *et al.* identified the tubulysin gene cluster of *A. disciformis* An d48 and proposed a biosynthetic pathway *via* a polyketide synthase-nonribosomal polypeptide synthetase (PKS/NRPS) multienzyme 'assembly line'.^[2]

This PhD-work makes a synthetic contribution for the investigation of the biosynthetic pathway of tubulysin in collaboration with the group of Prof. Dr. R. Müller (Department of Pharmaceutical Biotechnology, Saarland University) by preparing postulated biosynthetic intermediates for feeding experiments. First target structure was deuterated pipercolic acid, the postulated starting unit of biosynthesis. Next, proposed peptide intermediates of NRPS/PKS-hybrid were synthesized as deuterium labelled SNAC thioesters. A total synthesis of pretubulysin, the proposed first enzyme-free intermediate in the pathway, was developed to compare synthetic pretubulysin with biosynthetic material. Furthermore some derivatives of pretubulysin were synthesized for cytotoxicity assays and SAR-studies.

Kurzfassung

Tubulysine sind Naturstoffe aus den Myxobakterien *Angiococcus disciformis* An d48 und *Archangium gephyra* Ar315 mit außergewöhnlich hoher antimitotischer Wirkung auf Krebszellen, indem sie die Mikrotubulidynamiken stören.^[1] Sie bestehen als Tetrapeptide aus natürlich vorkommendem Ile und drei unnatürlichen Aminosäuren. Sandmann *et al.*^[2] konnten den Tubulysin-Gencluster in *A. disciformis* An d48 identifizieren und dadurch einen Biosyntheseweg über einen Polyketidsynthase-/Nichtribosomale Peptidsynthetase-Multienzymkomplex (PKS/NRPS) vorschlagen.

Diese Doktorarbeit leistet einen synthetischen Beitrag zur Untersuchung des Biosyntheseweges von Tubulysin D in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Müller (Institut für Pharmazeutische Biotechnologie an der Universität des Saarlandes), indem die postulierten Biosynthese-Intermediate für Fütterungsexperimente bereitgestellt wurden. Erste Zielstruktur stellte deuterierte Pipercolinsäure als postulierte Starteinheit der Biosynthese dar. Als nächstes wurden die Peptidzwischenstufen des PKS/NRPS-Hybridsystems als Deuterium-markierte SNAC-Ester synthetisiert. Zudem wurde eine Totalsynthese für Prätubulysin entwickelt, dem ersten vom Multienzymkomplex abgespaltenen Intermediat, um synthetisches Prätubulysin mit biosynthetischem Material vergleichen zu können. Daneben wurden einige Prätubulysin-Derivate für Cytotoxizitätstests und SAR-Studien synthetisiert.

[1] F. Sasse, H. Steinmetz, J. Heil, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 879-885.

[2] A. Sandmann, F. Sasse, R. Müller, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1071-1079.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand	5
2.1	Mikrotubuli als Target für antimittotische Wirkstoffe	5
2.2	Untersuchungen zum Wirkmechanismus und zur biologischen Evaluierung von Tubulysin A	11
2.3	Struktur der Tubulysine	15
2.4	Synthese von Tubulysin-Derivaten	17
2.4.1	Synthese der unnatürlichen Aminosäuren Tuv und Tup nach Friestad	17
2.4.2	Synthese von N^{14} -Desacetytubulysin H nach Wipf	19
2.4.3	Synthesen zu Tubulysin U und V nach Dömling/Wessjohann und Zanda	23
2.4.4	Synthese von Tubulysin D nach Ellman	28
2.5	Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Tubulysin-Analoga	30
2.6	Folsäure-Konjugate von Tubulysin und seinen Hydraziden	35
2.7	Biosynthese bakterieller Naturstoffe durch Polyketidsynthasen und nichtribosomale Peptidsynthetasen	38
2.7.1	Funktionsweise von Polyketidsynthasen	39
2.7.2	Funktionsweise von nichtribosomalen Peptidsynthetasen	42
2.7.3	Biosyntheseweg von Tubulysin	44
3	Aufgabenstellung	47
4	Ergebnisse und Diskussion	49
4.1	Herstellung von deuterierten Biosynthese-Zwischenstufen	49
4.1.1	Synthese von Baikiain als Vorstufe von deuterierter Pipecolinsäure (d_2 -Pip)	49
4.1.2	Synthese von deuterierter <i>N</i> -Methylpipecolinsäure (d_1 -Mep)	56
4.1.3	Untersuchungen zu den Deuterierungsreaktionen	57
4.1.4	Synthese der deuterierten Peptid-Intermediate	60
4.2	Thioveresterung der Biosynthese-Zwischenstufen	72
4.2.1	Bereitstellung von <i>N</i> -Acetylcysteamin	72
4.2.2	Synthese der Pip- und Mep-Thioester	73
4.2.3	Thioveresterung der deuterierten Peptid-Zwischenstufen	76

4.3	Untersuchungen zur Synthese von Tubuphenylalanin	79
4.3.1	Syntheseversuche durch katalytische Hydrierung	79
4.3.2	Syntheseversuche durch Enolat-Alkylierung	81
4.3.3	Synthese von Tubuphenylalanin über Diastereomerentrennung	83
4.4	Synthese von Prätubulysin und Derivaten	85
4.4.1	Synthese von Prätubulysin	85
4.4.2	Derivate von Prätubulysin	86
4.5	Weitere Biosynthese-Produkte – die Glycerol-Ester von Tubulysin D und Prätubulysin	89
4.6	Biologische Studien	91
4.6.1	Fütterungsexperimente mit deuterierter Pipecolinsäure d ₂ -11	91
4.6.2	Identifizierung von Prätubulysin als Biosynthese-Intermediat	92
4.6.3	Biologische Aktivität von Prätubulysin und Derivaten	92
5	Experimenteller Teil	96
5.1	Allgemeine Angaben	96
5.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	98
5.3	Synthese der Verbindungen	101
6	Zusammenfassung	205
7	Literaturverzeichnis	210
8	Anhang	217

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenylierungs-Domäne	DIC	<i>N,N'</i> -Di- <i>iso</i> -propyl-carbonyldiimid
Å	Ångström	DIPA	Di- <i>iso</i> -propylamin
AA	Aminosäure	DIPEA	Di- <i>iso</i> -propylethylamin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift	DKP	Diketopiperazin
abs.	absolut	DMAP	4-Dimethylaminopyridin
Ac	Acetyl	DMF	Dimethylformamid
ACP	Acyl-Carrier-Protein-Domäne	DMP	Dimethoxypropan
AMP	Adenosinmonophosphat	DMSO	Dimethylsulfoxid
Äq.	Äquivalent	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AT	Acyltransferase-Domäne	dr	Diastereomerenverhältnis (<i>diastereomeric ratio</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	ds	Diastereoselektivität
ATP	Adenosintriphosphat	DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
bp	Basenpaare	d. Th.	der Theorie
BEMT	2-Brom-3-ethyl-4-methyl-thiazolium-tetrafluoroborat	E	Epimerisierungsdomäne
BEP	2-Brom-1-ethyl-pyridinium-tetrafluoroborat	EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid
BINAP	2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl)	ee	Enantiomerenüberschuss (<i>enantiomeric excess</i>)
Bmt	(4 <i>R</i>)-4-[(<i>E</i>)-2-Butenyl]-4-methyl- <i>L</i> -threonin	EE	Essigsäureethylester
Bn	Benzyl	EI	Elektronenstoßionisation
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl	ER	Enoylreduktase-Domäne
BOP-Cl	Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)-phosphinsäurechlorid	Et	Ethyl
C	Kondensations-Domäne	Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol	FR	Folatzeptor
CI	Chemische Ionisation	FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer
C-MT	C-Methyltransferase-Domäne	GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
COSY	<i>CORrelated Spectroscopy</i>	GC	Gaschromatographie
3-CR	Dreikomponentenreaktion	GI ₅₀	50 % <i>growth inhibition activity</i>
CoA	Coenzym A	GTP	Guanosintriphosphat
Cy	Cyclohexyl	h	Stunde
d	Duplett, Tag	HATU	<i>N</i> -(Dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-yl-methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat
δ	Chemische Verschiebung	HC	Heterocyclisierungsdomäne
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid	HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
DBU	1,8-Diaza-bicyclo[5.4.0]undec-7-en	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
DC	Dünnschichtchromatographie	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexyl-carbonyldiimid		
DCE	Dichlorethan		
DCU	Dicyclohexylharnstoff		
DEPBT	3-(Diethoxy-phosphoryloxy)-3 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazin-4-on		
DH	β-Hydroxy-Dehydratase		
DIBALH	Di- <i>iso</i> -butylaluminiumhydrid		

HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>	ORTEP	Darstellung von Elektronenverteilungen
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>	Ox	Oxidations-Domäne
HV	Hochvakuum	PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung	PEA	Phenylethylamin
<i>i</i> Bu	<i>iso</i> -Butyl	P-gp	P-Glycoprotein
IC ₅₀	<i>50 % inhibitory concentration</i>	PFP	Pentafluorphenol
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -Propyl	Ph	Phenyl
<i>J</i>	Kopplungskonstante	Piv	Pivaloyl
KHMDS	Kalium-hexamethyldisilazid	PKS	Polyketidsynthase
KR	β -Ketoacylreduktase-Domäne	PLE	Schweineleberesterase (<i>porc liver esterase</i>)
KS	β -Ketoacylsynthase-Domäne	PMHS	Polymethylhydrosiloxan
LDA	Lithium-di- <i>iso</i> -propylamid	<i>p</i> NP	<i>para</i> -Nitrophenol
LHMDS	Lithium-hexamethyldisilazid	ppan	Phosphopantetheinyl
LRMS	<i>Low Resolution Mass Spectrometry</i>	PP _i	Pyrophosphat (anorganisches Diphosphat)
M	Molar, Molarität	ppm	parts per million
m	Multipllett	PPTase	Phosphopantetheinyl-transferase
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein	pTsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
Mbp	Megabasenpaare	PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tripyrrolidino-phosphonium-hexafluoro-phosphat
Me	Methyl	PyBroP	Brom-tripyrrolidino-phosphonium-hexafluoro-phosphat
Mep	<i>N</i> -Methyl-Pipecolinsäure	PyCloP	Chlor-tripyrrolidino-phosphonium-hexafluoro-phosphat
MHz	Megahertz	Pyr	Pyridin
min	Minute(n)	q	Quartett
MPA	α -Methoxy-phenylelessigsäure	R	Rest
MS	Massenspektroskopie, Molsieb	<i>rac</i>	racemisch
MT	Methyltransferase-Domäne	RCM	<i>ring closing metathesis</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid	R	Reduktions-Domäne
N	Normal, Normalität	R _f	Retentionsfaktor
NAC	<i>N</i> -Acetylcysteamin	RFC	<i>Reduced Folate Carrier</i>
NADH	reduziertes Nicotinamid-adenindinukleotid	RNA	Ribonukleinsäure
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenindinukleotid-phosphat	RT	Raumtemperatur
NaHMDS	Natrium-hexamethyldisilazid	S	Spacer-Region
n.b.	nicht bestimmt	s	Singulett
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium	SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrid	Sar	Sarcosin (<i>N</i> -Methylglycin)
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin	SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)	Sdp.	Siedepunkt
N-MT	<i>N</i> -Methyltransferase-Domäne	SG	Schutzgruppe
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase	sh	Signalhaufen
OCD	Ornithin-cyclodeaminase	SNAC	<i>N</i> -Acetylcysteamin-thioester
<i>orf</i>	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)	t	Triplett
		TBAF	Tetrabutylammonium-fluorid
		TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl

TBDPS	<i>tert.</i> -Butyldiphenylsilyl	Tub	Tubulysinthesen
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uronium-tetrafluoroborat	<i>tub</i>	Gene, die für Tub kodieren
<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -Butyl	Tup	Tubuphenylalanin
TE	Thioesterase-Domäne	Tut	Tubutyrosin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-oxyl	Tuv	Tubuvalin
TES	Triethylsilyl	„Tuv“	(<i>R</i>)-2-[3-(Methylamino)-4-methyl-pentyl]-thiazol-4-carbonsäure
Tf	Trifluormethylsulfonyl	UV	Ultraviolett
TFA	Trifluoressigsäure, Trifluoracetyl-	Z	Benzyloxycarbonyl
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid	° C	Grad Celsius
THF	Tetrahydrofuran		
TMP	2,4,6-Trimethylpyridin		
TMS	Trimethylsilyl		
<i>t</i> _R	Retentionszeit		

1 Einleitung

Naturstoffe treten meist als Sekundärmetabolite von marinen Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen auf, wo ihre biologische Aktivität seit Millionen von Jahren optimiert wurde. Sie spielen eine große Rolle in der medizinischen Chemie als Wirkstoffe oder als Leitstrukturen. Vor über 30 Jahren startete das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)^[a] in Braunschweig ein Forschungsprojekt über Naturstoffe aus Bakterien, in dessen Rahmen mehr als 7000 Myxobakterienstämme auf der Suche nach biologisch aktiven Verbindungen untersucht wurden, wobei bisher mehr als 100 Grundstrukturen mit über 500 Derivaten entdeckt wurden.^[1] Manche dieser Verbindungen sind komplett neu und haben oft einen interessanten und ungewöhnlichen Wirkmechanismus, denn Myxobakterien scheinen sich auf Wirkmechanismen spezialisiert zu haben, die extrem selten bei anderen Produzenten auftreten.

Myxobakterien^[2] sind faszinierende und einzigartige Mikroorganismen mit ungewöhnlichem Verhalten. Neben ihrer außergewöhnlichen Fähigkeit zur Produktion von Sekundärmetaboliten mit biologischer Aktivität ist die Ausbildung von Fruchtkörpern ein weiterer interessanter Aspekt ihres Lebenszyklus, was eher eine Eigenschaft von eukaryotischen Myxomyceten oder Pilzen als von prokaryotischen Bakterien ist. Myxobakterien sind Gram-negative, stäbchenförmige, gleitende Bodenbakterien von 4-12 μm Länge und 0.7-1.2 μm Breite. Phylogenetisch gehören sie zu der δ -Gruppe der Proteobakterien. Sie treten ubiquitär auf, vor allem in semiariden, warmen Gebieten. Ihr bevorzugter Lebensraum befindet sich im Boden, auf verrottendem Pflanzenmaterial, Dung und Baumrinde,^[2] vor einigen Jahren wurden Myxobakterien aber auch im Meerwasser gefunden.^[3] Durch Gleiten oder Kriechen gelingt ihnen als schleimige Schwarmkolonie die Fortbewegung auf Oberflächen. Sie besitzen ein außergewöhnliches Sozialverhalten und ein hoch entwickeltes Kommunikationssystem, das ihnen auch dazu dient, sich in Zeiten von Nährstoffmangel zu Aggregaten zu vereinigen und Fruchtkörper zu bilden. Diese bestehen aus 10^3 - 10^6 Zellen und haben eine Größe von 20-1000 μm , so dass sie zum Teil schon mit bloßem Auge erkennbar sind. Je nach Myxobakterienart können die Fruchtkörper verschiedene Farben (von gelb, orange über rot und braun bis hin zu schwarz) und verschiedene Formen (z. B. Kugel- oder Palmenform) haben. Ein Teil der vegetativen Zellen im Fruchtkörper differenziert sich zu Myxosporen, die in eine Art Ruhezustand verfallen, so dass die Bakterien in der Lage sind, mehrere Jahre zu überdauern, um unter günstigeren Umweltbedingungen wieder auszukeimen.

[a] Früher Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF).

Ein weiteres auffälliges Merkmal der Myxobakterien ist, dass ihr Genom das größte unter Bakterien bekannte ist (meist 9.5-10 Mbp). 2007 konnte das Genom von *Sorangium cellulosum* vollständig sequenziert werden, es hat sogar eine Größe von 13.04 Mbp^[4] und ist somit etwa dreimal so groß wie das von *E. coli*.

Die Mehrzahl der biologisch aktiven, von Myxobakterien produzierten Stoffe wirken gegen Pilze oder Bakterien, was nicht weiter verwunderlich ist, denn in ihrem natürlichen Lebensraum sind sie einem ständigen Konkurrenzkampf um Nahrung ausgesetzt. Cellulose-abbauende Myxobakterien (z. B. *Sorangium*) müssen sich mit Holz-zersetzenden Pilzen messen, während sich proteolytische Myxobakterien (z. B. *Myxococcus*) gegen andere Mikroorganismen durchsetzen müssen, die auch verwesendes organisches Material abbauen. Unter diesen antibakteriellen und fungiziden Substanzen (Abbildung 1.1) finden sich z. B. Elektronentransport-Inhibitoren wie Melithiazol, Stigmatellin und Myxalamid, Inhibitoren von Nukleinsäurepolymerasen wie Sorangicin und Ripostatin und ein Inhibitor der Acetyl-CoA-Carboxylase von Pilzen (Soraphen A_{1α}). Eine weitere Gruppe von Sekundärmetaboliten (Abbildung 1.2) interagiert spezifisch mit dem Cytoskelett von eukaryotischen Zellen, wodurch sie eine Stagnation des Zellcyclus und letztlich den programmierten Zelltod (Apoptose) bewirken. Einige Substanzen wie Rhizopodin^[a,5] und Chondramid haben Auswirkungen auf die Aktinfasern, andere wie Epothilon und Disorazol auf das Mikrotubuli-Netzwerk.^[2,6]

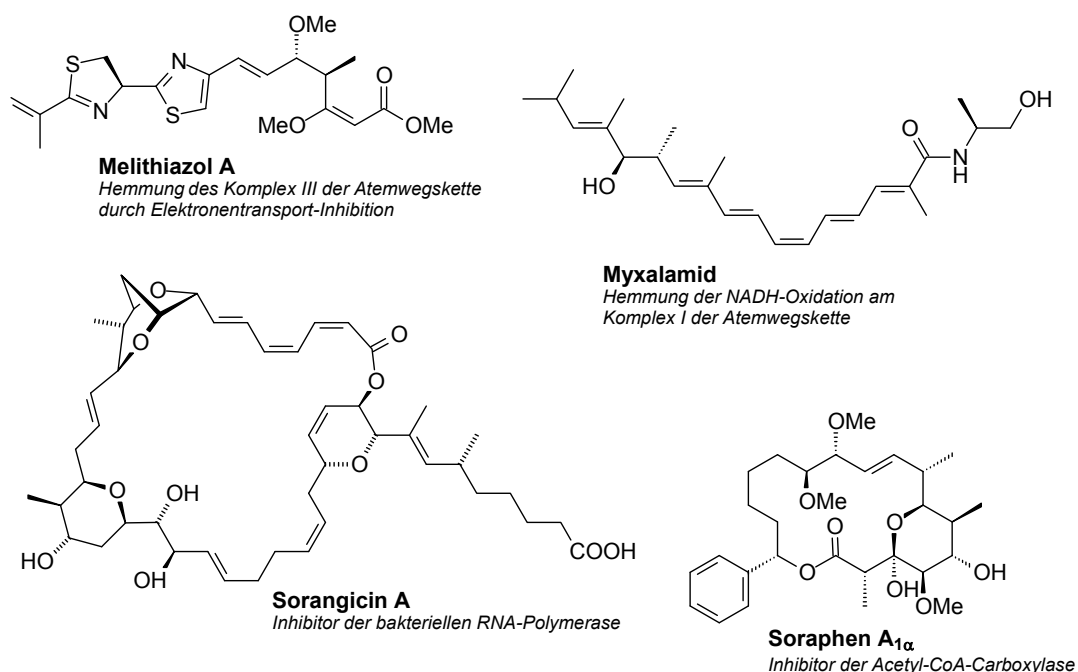


Abbildung 1.1 Ausgewählte Naturstoffe aus Myxobakterien und ihre Aktivität

[a] Die Struktur musste kürzlich zum dimeren Dilacton revidiert werden.^[5]

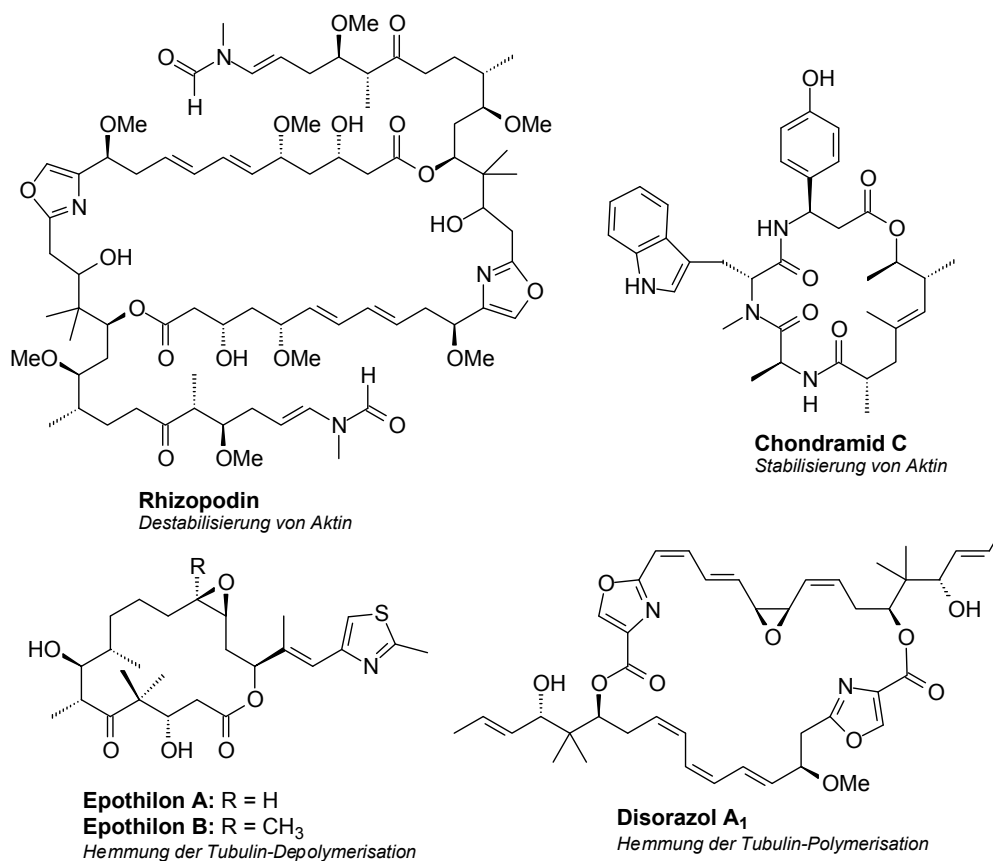


Abbildung 1.2 Ausgewählte Naturstoffe aus Myxobakterien mit Wirkung auf das Cytoskelett

Strukturell betrachtet haben die meisten myxobakteriellen Substanzen eine Polyketid- oder eine Peptidstruktur, oft mit sehr ungewöhnlichen Aminosäuren, teilweise finden sich auch beide Strukturelemente. Biosynthetisiert werden sie an Multienzymkomplexen, Polyketidsynthasen (PKS) oder Nichtribosomalen Polypeptidsynthetasen (NRPS) bzw. an einem Hybridsystem aus beiden. Hieraus resultiert eine Vielfalt an Verbindungsklassen wie z. B. Polyether, Polyene, Makrolide, Peptide oder Peptolide.

Während eines Screenings nach neuen biologisch aktiven Metaboliten von Myxobakterien wurden zwei Stämme, *Archangium gephyra* Ar 315 und *Angiococcus disciformis* An d48, aufgrund ihrer hohen cytotoxischen Aktivität gegenüber L-929-Mausfibroblasten identifiziert. Hierfür wurde eine neue Substanzfamilie, die Tubulysine (Abbildung 1.3), verantwortlich gemacht.^[7] Untersuchungen der biologischen Aktivität von isoliertem Tubulysin A und B ergaben, dass Tubulysine keine antimikrobielle Wirkung auf Bakterien und Hefen besitzen und nur geringe Aktivität gegenüber Pilzen zeigen. Interessant ist dagegen ihre starke cytostatische Wirkung auf Säugerzellkulturen ($IC_{50}(\text{Tubulysin A}) = 0.2 \text{ ng/ml}$, $IC_{50}(\text{Tubulysin D}) = 0.02 \text{ ng/ml}$ in KB-3-1^[a]). Sie sind auch gegenüber multiresistenten Krebszellen

[a] KB-3-1-Zelllinie: Humanes Cervix-Karzinom (DSMZ ACC 158).

(z. B. IC_{50} (Tubulysin D) = 0.08 ng/ml in KB-V1^[a]) sehr wirksam. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie^[b] konnte beobachtet werden, dass Tubulysine das Mikrotubuli-Netzwerk von inkubierten Zellen stark schädigen, da sie den Abbau der Mikrotubuli fördern und somit den Mikrotubulizerfall induzieren.

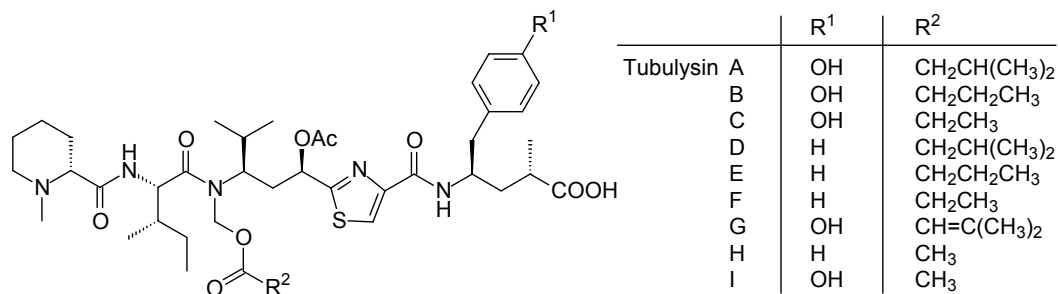


Abbildung 1.3 Tubulysine A-I^[8]

Myxobakterien produzieren nur geringe Mengen an Tubulysin (4 mg/l Tubulysin A in *Ar. gephyra*, 1 mg/l Tubulysin D in *An. disciformis*). Aufgrund ihres hohen antimittotischen Potentials besteht jedoch großes Interesse an einem verbesserten Zugang zu Tubulysinen. Sandmann *et al.* konnten bereits den Biosynthesegencluster identifizieren, analysieren und darauf basierend Rückschlüsse auf eine mögliche Biosynthese ziehen.^[9] Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch Synthese der postulierten Biosynthese-Intermediate, insbesondere des durch ein NRPS-/PKS-Hybridsystem gebildeten Zwischenprodukts Prä-tubulysin (Abbildung 1.4), ein synthetischer Beitrag zur weiteren Aufklärung der Biosynthese geleistet werden.

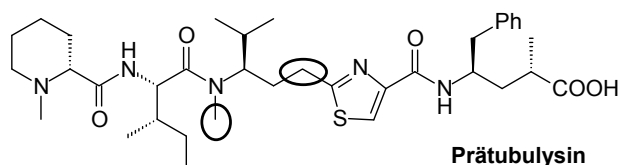


Abbildung 1.4 Postuliertes Biosynthese-Intermediat von Tubulysin D (Prä-tubulysin)

[a] KB-V1-Zelllinie: multiresistenter Klon von KB-3-1 (DSMZ ACC 149).

[b] Bei der Immunfluoreszenz- oder Antikörperfärbung wird ein bestimmtes Protein mit Hilfe eines Antikörpers (Immunglobulin) markiert und durch einen zweiten Antikörper, der mit einem Farbstoff gekoppelt und auf den ersten Antikörper gerichtet ist, sichtbar gemacht.

2 Kenntnisstand

2.1 Mikrotubuli als Target für antimittotische Wirkstoffe^[10]

Ein essentieller Teil aller eukaryotischen Zellen ist das Cytoskelett, welches aus drei verschiedenen Faserarten besteht: Mikro- oder Aktinfilamente (7-9 nm), Intermediärfilamente (10 nm) und Mikrotubuli (24 nm). Es dient der Gestaltung der Zellform und dem Transport von Organellen, zudem ist es bei wichtigen Zellvorgängen wie Signalübertragung und Mitose von großer Bedeutung.

Mikrotubuli sind lange faserartige, röhrenförmige Protein-Polymere, die sich aus Heterodimeren zusammensetzen und einige μm lang werden können. Diese Dimere bestehen aus den miteinander verbundenen globulären Proteinen α - und β -Tubulin, die jeweils einen Durchmesser von etwa 4 nm besitzen. An jedes Tubulin bindet ein GTP-Molekül, wobei die Bindung des α -Tubulins an GTP irreversibel, die des β -Tubulins hingegen reversibel ist. Zudem ist am β -Tubulin die Hydrolyse des GTP zu GDP möglich. Ihre funktionelle Vielfalt erlangen Mikrotubuli durch Regulatorproteine und MAPs (Mikrotubuli-assoziierte Proteine), durch posttranslationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierung, Glutamylierung oder Acetylierung) und dadurch, dass je nach Zelle und Gewebe verschiedene Tubulin-Isotypen exprimiert werden (beim Menschen gibt es 6 Formen von α -Tubulin und 7 Formen von β -Tubulin).

Die Polymerisation von Mikrotubuli verläuft nach einem Nukleations-Elongationsmechanismus, wobei sich in der Nukleationsphase relativ langsam Polymerisationskerne bilden. In der Elongationsphase lagern sich die Tubulindimere sehr schnell reversibel und nichtkovalent an die Enden der Mikrotubuli an. Dadurch entsteht ein Hohlraum-Zylinder aus 13 Protofilamenten mit einem Außendurchmesser von 24 nm, am sogenannten (+)-Ende befindet sich β -Tubulin, am (-)-Ende α -Tubulin. (Abbildung 2.1)

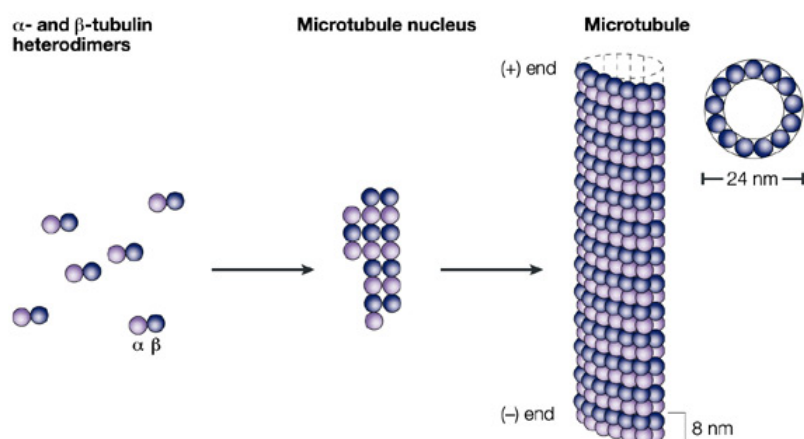


Abbildung 2.1 Polymerisation der Mikrotubuli^[10]

Mikrotubuli sind keine einfachen Gleichgewichts-Polymere, sondern weisen komplexe Polymerisationsdynamiken auf, die durch GTP-Hydrolyse freigesetzte Energie verwenden, sobald sich Tubulin mit gebundenem GTP an ein Mikrotubuli-Ende anlagert. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unterliegen die Mikrotubuli zwei Arten von Nichtgleichgewichtsdynamiken, dynamische Instabilität und *Treadmilling*. Bei der dynamischen Instabilität (Abbildung 2.2a) wechselt jedes Ende zwischen Wachstums- und Abbauphasen, jedoch verhalten sich die beiden Enden nicht gleich. Das (+)-Ende wächst und verkürzt sich viel schneller als das (-)-Ende. Zudem wechseln sich lange langsame Wachstumsphasen, kurze Phasen schnellen Abbaus und Perioden verlangsamter Dynamik bzw. Pausen, während denen weder Wachstum noch Abbau detektierbar ist, ab. Unter dem zweiten dynamischen Verhalten, dem *Treadmilling* (Abbildung 2.2b), wird das Nettowachstum am (+)-Ende und dem im gleichen Maße erfolgenden Abbau am anderen Ende verstanden, wobei die Tubulin-Untereinheiten vom (-)- zum (+)-Ende der Mikrotubuli fließen. Diese Dynamik wird durch Unterschiede in den kritischen Konzentrationen^[a] der Untereinheiten am anderen Mikrotubuli-Ende hervorgerufen. Beide Verhalten sind kompatibel, so dass Mikrotubuli-Populationen die eine oder die andere Dynamik zeigen können oder auch beide. Zwar ist noch nicht vollständig verstanden, wann Populationen sich nach der einen oder der anderen Dynamik verhalten, wahrscheinlich ist dies aber von der Tubulin-Isotypen-Zusammensetzung, dem Grad der posttranslationalen Modifikation und der Wirkung der Regulatorproteine abhängig.

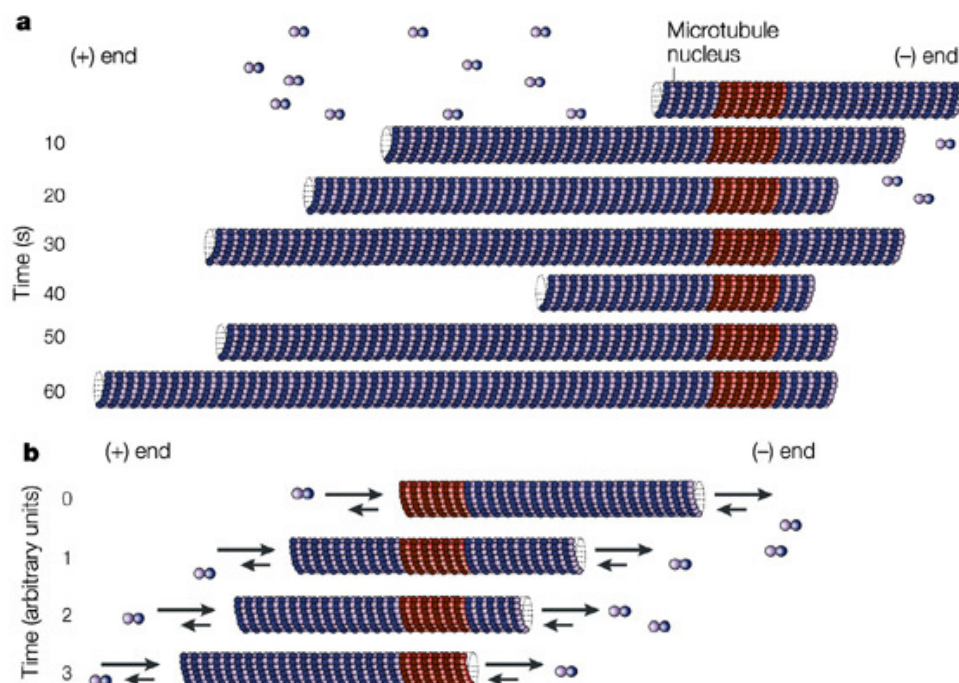


Abbildung 2.2 a) Dynamische Instabilität, b) *Treadmilling*^[10]

[a] Unter der kritischen Konzentration der Untereinheiten werden die Konzentrationen an freien Tubulin-Untereinheiten verstanden, die im Gleichgewicht mit den Mikrotubuli-Enden stehen.

Mikrotubuli sind durch ihre besondere Dynamik äußerst wichtig und entscheidend für eine erfolgreiche Mitose. Während der Interphase findet nur ein langsamer Austausch mit freiem Tubulin statt. Während der Mitose wird das Mikrotubuli-Netzwerk der Interphase durch eine neue Mikrotubuli-Population ersetzt, die viel dynamischer ist. Die hochdynamischen Mikrotubuli in den Spindeln werden in allen Phasen der Mitose benötigt. (Abbildung 2.3)

- Prophase** Während zu Beginn der Mitose im Zellkern die Chromosomenkondensation abläuft, bildet sich im Cytoplasma die Mitosespindel, indem sich Mikrotubuli sternenförmig um die Centrosomen anordnen. Die Mikrotubuli bleiben über ihr (-)-Ende mit dem Centrosom assoziiert und wachsen am (+)-Ende. Indem sich die Centrosomen möglichst weit voneinander weg bewegen, entsteht die bipolare Mitosespindel.
- Prometaphase** Nachdem sich die Kernhülle aufgelöst hat, müssen die Mikrotubuli den Spindelapparat mit den Kinetochoren am Centromer der Chromosomen verbinden. Hierzu wachsen die dynamischen Mikrotubuli auf der Suche nach den Chromosomen 5-10 μm durch das Cytoplasma, verkürzen sich und wachsen wieder in eine andere Richtung, bis sie auf ein Kinetochor treffen. (Abb. 2.3a)
- Metaphase** Die Mikrotubuli-Spindelfasern richten die Chromosomen von beiden Polen aus in der Äquatorplatte aus. (Abb. 2.3b)
- Anaphase** Die beiden Chromatiden eines Chromosoms teilen sich, durch Verkürzen der Kinetochorfasern wandern die Chromatiden zu den Polen. Gleichzeitig mit der Depolymerisation der Kinetochorfasern wachsen die Spindel-Mikrotubuli zwischen den Polen, so dass sich der Abstand zwischen den Polen vergrößert. (Abb. 2.3c)
- Telophase** Sobald die Chromatiden die Spindelpole erreicht haben, werden eine neue Zellwand und die neuen Kerne mit Kernhülle und Nukleolus gebildet und der Spindelapparat aufgelöst. (Abb. 2.3d)

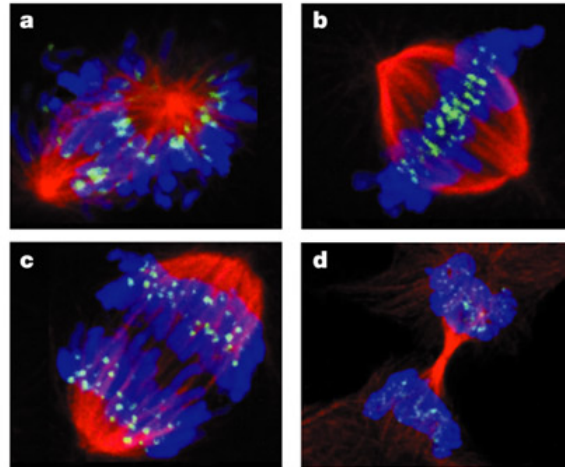


Abbildung 2.3 Humane Osteosarkoma-Zelle in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus: a) Prometaphase, b) Frühe Metaphase, c) Anaphase, d) Telophase (Mikrotubuli in rot, Chromosomen in blau und Kinetochore in grün)^[10]

Antimitotische Verbindungen, die an Tubulin binden, greifen in die Polymerisationsdynamiken der Spindelmikrotubuli ein und verhindern somit, dass der Spindelapparat ordentlich funktioniert. Die Wirkstoffe können in zwei Gruppen unterteilt werden. Mikrotubuli-destabilisierende Stoffe inhibieren bei hoher Substratkonzentration die Mikrotubuli-Polymerisation. Zu ihnen gehören beispielsweise die *Vinca*-Alkaloide (Vinblastin, Vinchristin, Vinorelbin, etc.), Colchicin, Rhizoxin, Phomopsin (Abbildung 2.4), Tubulysin und Disorazol (Abbildung 1.2 und Abbildung 1.3). Dahingegen stabilisieren Stoffe der zweiten Gruppe die Mikrotubuli und stimulieren bei hoher Konzentration die Polymerisation der Mikrotubuli. Die Gruppe umfasst Wirkstoffe wie z. B. Paclitaxel (Taxol[®]), Docetaxel (Taxotere[®]), Epothilon (Abbildung 1.2), Discodermolid und Laulimalid (Abbildung 2.4).

Die Wirkung dieser Naturstoffe resultiert jedoch weniger aus der tatsächlichen Zerstörung der Mikrotubuli bzw. deren übermäßiger Polymerisation, sondern vielmehr aus einer „kinetischen Stabilisierung“ der Dynamik der Spindel-Mikrotubuli, was zu einer verlangsamten oder verhinderten Mitose im Meta-/Anaphase-Stadium und schließlich zur Apoptose führt. Dies zeigt sich daran, dass sowohl die stabilisierenden wie auch die destabilisierenden Wirkstoffe ihre antimitotische Wirkung bereits in Konzentrationen entfalten, in denen die Nettomasse der Mikrotubuli nicht beeinflusst wird.

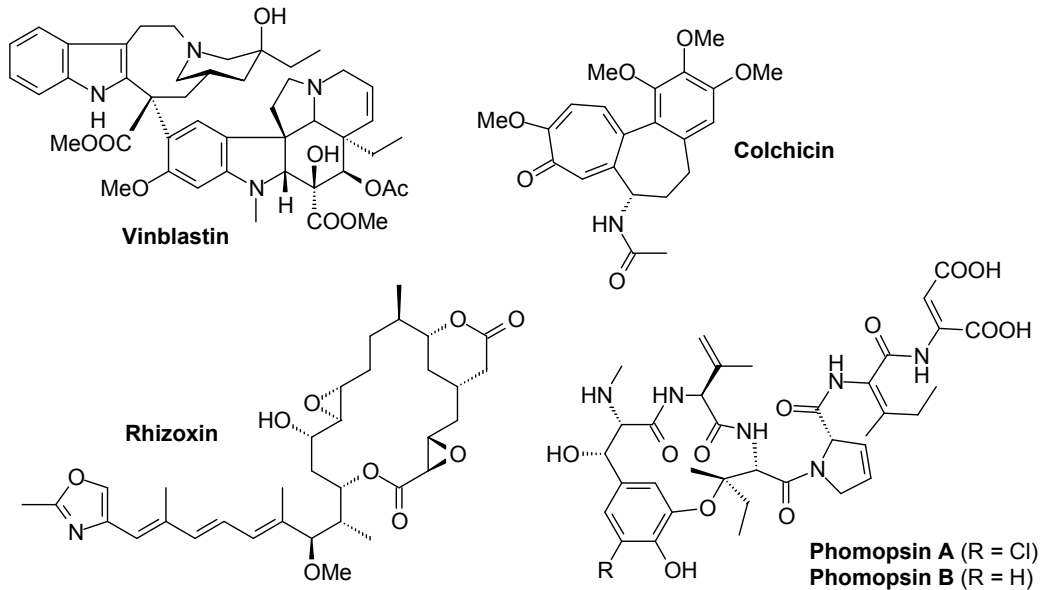
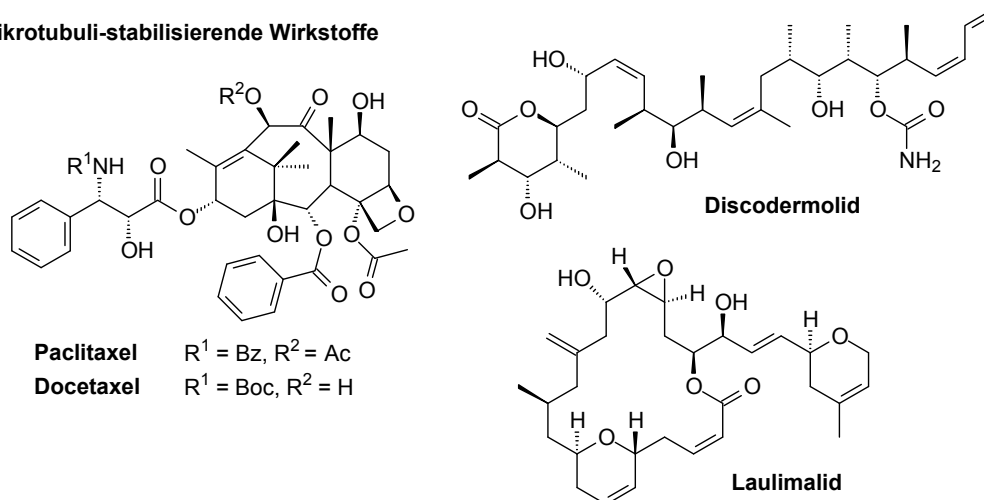
Mikrotubuli-destabilisierende Wirkstoffe**Mikrotubuli-stabilisierende Wirkstoffe**

Abbildung 2.4 Mikrotubuli-destabilisierende und -stabilisierende Wirkstoffe

Vinblastin, das schon seit 40 Jahren in der klinischen Anwendung ist, bindet an eine Region der β -Untereinheit der Tubulin-Dimere, die *Vinca*-Domäne genannt wird. Die Bindung von Vinblastin an Tubulin in Lösung ist schnell und reversibel, an die Mikrotubuli bindet Vinblastin mit hoher Affinität an das (+)-Ende. (Abb. 2.5a) 1-2 Moleküle pro Mikrotubulus reichen aus, um beide Dynamiken um etwa 50 % zu reduzieren, ohne nennenswerte Depolymerisation zu verursachen. Die extrem verlangsamte Dynamik verhindert eine normale Bildung der Mitosespindel und reduziert die Spannung an den Kinetochoren der Chromosomen. Die Mitose wird in einem Metaphase-artigen Zustand unterbrochen, in dem die Chromosomen oft an den Spindelpolen kleben, unfähig sich an der Äquatorialplatte zu versammeln. Da kein Zellcyclus-Signal abgegeben wird, um von der Metaphase in die Anaphase fortzuschreiten, sterben die Zellen schließlich durch Apoptose.

Die Taxane binden weniger gut an gelöstes als an Mikrotubuli-gebundenes Tubulin. Die Bindungsstelle für Paclitaxel befindet sich an der β -Untereinheit, auf der inneren Oberfläche der Mikrotubuli (Abb. 2.5c). Die Taxan-Bindungsstelle konnte durch eine Elektronenkristallstruktur genau lokalisiert werden.^[11] Eine geringe Anzahl an Paclitaxel-Molekülen pro Mikrotubulus reicht aus, die Mikrotubuli-Dynamik durch „kinetische Stabilisierung“ zu stören und so, wie auch die *Vinca*-Alkaloide, zur Apoptose zu führen.

Im Unterschied zu den obigen Mechanismen bindet Colchicin zunächst an Tubulin in Lösung, induziert eine langsame Konformationsänderung im Tubulin und bildet schließlich einen kaum reversiblen Tubulin-Colchicin-Komplex. Dieser wird in die Mikrotubuli eingebaut, wodurch die Enden zwar langsam weiterwachsen können, aber die Dynamik auch hier unterdrückt ist. (Abb. 2.5b)

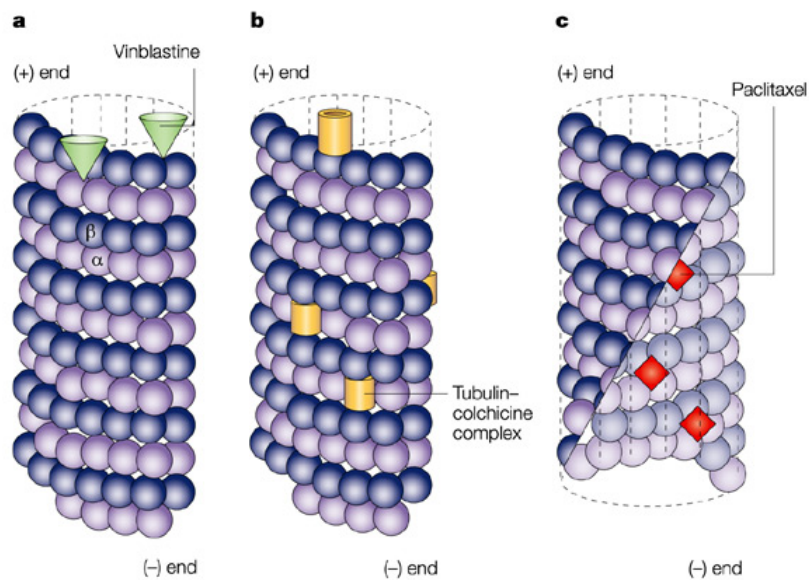


Abbildung 2.5 Bindestellen von Vinblastin, Colchicin und Paclitaxel^[10]

2.2 Untersuchungen zum Wirkmechanismus und zur biologischen Evaluierung von Tubulysin A

Wie bereits von Sasse *et al.* gezeigt,^[7] wirken Tubulysine stark cytotoxisch auf Krebszellen. Ihre Wirkung im picomolaren Bereich (IC_{50} -Werte von Tubulysin A-I liegen zwischen 0.68 und 0.011 ng/ml in L-929 Zellen)^[8] ist um einige Größenordnungen höher, als die der bekannten und zum Teil auf dem Markt befindlichen Naturstoffe mit Wirkung auf die Mikrotubuli (Abbildung 2.6). Aufgrund ihrer außergewöhnlich hohen Aktivität könnten sie zur Entwicklung von Antikrebsmedikamenten dienen.

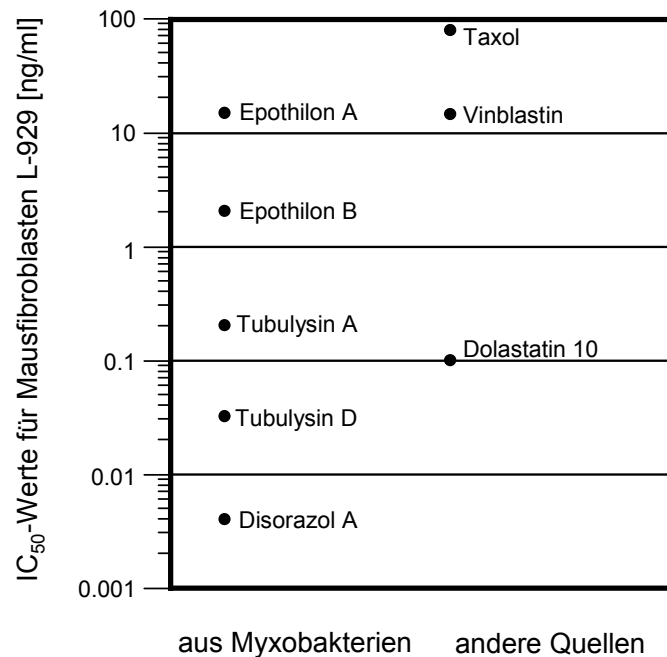


Abbildung 2.6 Vergleich der IC_{50} -Werte in L-929 Mausfibroblasten der Tubulysine A und D mit verschiedenen anderen mit Tubulin interagierenden Verbindungen^[7,12,13,25]

Khalil *et al.* untersuchten den Wirkmechanismus von Tubulysin A genauer, indem sie die Effekte der Tubulysine auf lebende Zellen und isoliertes Tubulin analysierten, die Induktion von Apoptose nachwiesen und sich mit der Interaktion von Tubulysin und Tubulin befassten.^[14]

Zellkulturanalysen zeigten nach Inkubation von kultivierten PtK2-Zellen^[a] mit Tubulysin A eine Auflösung der Mikrotubuli, auch wenn die Zellen zuvor mit Mikrotubulistabilisierenden Substanzen wie Epothilon B oder Paclitaxel behandelt worden waren. Das Mikrotubuli-Netzwerk erholte sich nicht, wenn das Kulturmedium nach 24 h durch frisches Medium ohne Inhibitor ersetzt wurde.

[a] PtK2-Zelllinie: Zellen aus den Nieren einer männlichen australischen Beutelratte (*Potorous tridactylis*).

Untersuchungen an L-929-Fibroblasten zeigten, dass die Zellen nach Inkubation mit Tubulysin A (48 h) in der G₂/M-Phase des Zellcyclus akkumulierten (76 %), während sich die meisten der unbehandelten Kontrollzellen in der G₁-Phase (57 %) und nur 10 % in G₂/M-Phase befanden.

Die Polymerisation von isoliertem Tubulin wurde nach Zugabe von Tubulysin A elektronenmikroskopisch untersucht. In Anwesenheit von MAPs, GTP und Mg²⁺ (Bedingungen, die eine Mikrotubuli-Polymerisation fördern) bildeten sich bereits in substöchiometrischer Konzentration an Tubulysin A oligomere Strukturen wie Ringe, Doppelringe und Schaufelräder. Ohne MAP konnten nur amorphe Aggregate, einige Ringe und Ringfragmente beobachtet werden.

Bindungsexperimente zeigten, dass Tubulysin A die Bindung von Vinblastin an Tubulin stark nichtkompetitiv hemmt, die Bindung von Colchicin jedoch nur teilweise hindert. Ähnlich verhalten sich auch andere peptidische Antimitotika (Dolastatin 10, Phomopsin A, Hemiasterlin), kompetitive Bindungsmuster mit Vinblastin weisen hingegen Macrolid-Antimitotika (Maytansin, Rhizoxin, Disorazol) auf. Daher wurde vorgeschlagen, dass es zwei Bindungsstellen im Bereich der *Vinca*-Domäne des β -Tubulins gibt, die nahe beieinander liegen: eine *Vinca*-Stelle (Bindung der *Vinca*-Alkaloide, Maytansin und Rhizoxin) und eine Peptidstelle (Dolastatin 10 und Phomopsin A).^[15] Die Ergebnisse dieser Studie lassen annehmen, dass Tubulysin wie auch Phomopsin, Hemiasterlin und Dolastatin an der Peptidstelle der *Vinca*-Domäne bindet.

Typische Anzeichen für Apoptose sind DNA-Fragmentierung, Chromatin-Kondensation, Abschnüren von Membranvesikeln (*blebbing*), sowie Schrumpfen der Zellen. Hauptverantwortlich für die Zellabläufe während der Apoptose sind Caspasen^[a], welche innerhalb der Zellen in inaktiver Proform (Zymogene) existieren. Bei Induktion von Apoptose werden die Zymogene in aktive Enzyme gespalten, welche dann DNA-Reparaturenzyme inhibieren, DNAsen aktivieren und Strukturproteine des Nukleus abbauen, woraus eine Fragmentierung der DNA in nukleosomale Einheiten erfolgt.^[16,17] Khalil *et al.* untersuchten daher die Aktivität der Caspase-3 und die DNA-Fragmentierung. Sie stellten eine erhöhte Caspase-3-Aktivität in KB-3-1-Zellen 24 bzw. 48 h nach Zugabe von Tubulysin A fest. Die DNA aus U-937-Zellen^[b], die für 24 h mit Tubulysin A inkubiert waren, wurde isoliert und in einem Agarosegel aufgetrennt, wobei ein typisches Leitermuster (apoptotische Leiter)^[c] erhalten wurde.

[a] Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Proteine C-terminal von Aspartat spalten.

[b] U-937-Zelllinie: Humanes histiocytisches Lymphom.

[c] Durch Endonukleasen wird die genomische DNA in Bruchstücke zerlegt, die eine Länge von 180 bp oder ein Vielfaches davon haben (nukleosomale Einheiten).

Am amerikanischen *National Cancer Institute* (NCI) wurden in Kooperation mit *Morphochem AG* und *Morphochem Inc.* Studien zur biologischen Evaluierung von Tubulysin A betrieben.^[18]

Das Profil von Tubulysin A wurde in einem 60-Krebszelllinien-Panel^[19] vom NCI erstellt. Tubulysin A erwies sich als sehr wirksam, so dass die Minimum-Testkonzentration nicht immer niedrig genug war, um den GI_{50} -Wert zu bestimmen (geschätzt <12 nM). Daher wurde Tubulysin A in wenigen Zelllinien (HL-60, HCT-116, HCT-15)^[a] nochmals getestet und mit anderen Antimikrotubuli-Wirkstoffen (Paclitaxel, Vinblastin) verglichen, wobei Tubulysin A in allen drei Zelllinien eine höhere Aktivität als die Referenzsubstanzen zeigte. HCT-15 und HCT-116 wurden gewählt, da HCT-15 eine hohe Expression von P-gp (P-Glycoprotein) verglichen mit HCT-116 hat. P-gp ist eine zelluläre Transmembranpumpe, die durch einen ATP-abhängigen Transport Wirkstoffe aus den Zellen schleust (Effluxpumpe), dadurch die Wirkstoffanreicherung in den Zellen verringert und somit eine typische *multidrug resistance* (MDR) hervorruft.^[20] Desweiteren entstehen Multiresistenzen z. B. durch Überexpression von Proteinen, die eine große Rolle bei der Apoptose spielen (Bcl-2,^[b] Bcl-xL, Survivin^[c]),^[21,22] sowie durch posttranslationale Modifikationen und Expression von verschiedenen Tubulin-Isotypen. Bei Tubulysin A ist der Aktivitätsunterschied in diesen beiden Zelllinien relativ gering (Faktor 15, $GI_{50} = 0.007$ nM in HCT-116, $GI_{50} = 0.1$ nM in HCT-15), bei Paclitaxel und Vinblastin, die bekanntermaßen Substrate für P-gp sind, ist der Aktivitätsabfall bedeutend größer (Paclitaxel: Faktor 2000, Vinblastin: Faktor 200). Daher scheint Tubulysin A kein Substrat für P-gp zu sein.

Bei einer Krebsbehandlung ist es nicht ausgeschlossen, dass Kombinationen von verschiedenen Medikamenten verabreicht werden, welche sich möglichst nicht negativ beeinflussen sollten. CYPs (Cytochrom P450-Enzyme)^[23] stellen eine Superfamilie von Isoformen dar, die eine wichtige Rolle im oxidativen Metabolismus von Wirkstoffen spielen. Bei gleichzeitiger Anwendung von CYP-Inhibitoren und Arzneistoffen, die über dieses Enzymsystem abgebaut werden und somit um die gleiche Bindungsstelle am Enzym konkurrieren, kann deren Abbau verlangsamt und damit Wirkung und Nebenwirkungen verstärkt werden. Um solche unerwünschten Arzneimittelwechselwirkungen zu vermeiden, ist es wünschenswert, einen neuen Wirkstoffkandidaten zu entwickeln, der kein starker CYP-Inhibitor ist. Die Hemmwirkung von Tubulysin A wurde von Kaur *et al.* gegenüber drei bedeutenden CYPs getestet (CYP1A2, CYP3A4 und CYP2D6). Die Ergebnisse zeigten, dass Tubulysin A, wie auch Paclitaxel und Vinblastin, ein geringes Potential zur Hemmung dieser

[a] HL-60: Humane akute myeloische Leukämie, HCT-116: Humanes Kolon-Karzinom, HCT-15: Humanes Kolon-Adenokarzinom

[b] Bcl-2-Proteine (*B cell lymphoma 2*) stellen eine Proteinfamilie dar, die bei der Regulation der Apoptose eine Rolle spielt. Einige Mitglieder der Familie fördern Apoptose, während andere sie verhindern. Bcl-2 und Bcl-xL gehören zu den anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen.

[c] Survivin ist ein Apoptose-hemmendes Protein, das zur IAP-Familie (*inhibitor of apoptosis protein*) gehört.

CYPs aufweist. Sie deuten somit auch an, dass diese Verbindungsklasse den Metabolismus anderer Wirkstoffe nicht verändern sollte, wenn sie in Kombination bei einer Krebsbehandlung angewendet werden.

Damit ein Tumor sich ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen kann, benötigt er ein ständig mitwachsendes Netz an Blutgefäßen (Tumor-induzierte Angiogenese). Antiangiogenetische Therapieansätze zielen darauf ab, die Gefäßversorgung und damit die Durchblutung eines Tumors zu reduzieren oder zu blockieren. Tubulin-bindende Wirkstoffe wie Paclitaxel, 2ME2^[a] und CA4 Prodrug^{® [b]} haben bereits exzellente antiangiogenetische Eigenschaften gezeigt^[24] und befinden sich derzeit in klinischen Studien. *In vitro* konnten Kaur *et al.* auch für Tubulysin A hohe antiangiogenetische Aktivität in HUVEC-Zellen^[c] zeigen, Tubulysin A erwies sich sogar als weitaus wirksamer als die Positivkontrollen (TNP-470^[d] und Paclitaxel). Möglicherweise eignet sich Tubulysin also auch als antiangiogenetischer Wirkstoff, was in präklinischen Modellen evaluiert werden muss.

Kaur *et al.* führten einen ersten *in vivo*-Test mit Tubulysin A durch. Sie verwendeten 12 verschiedene humane Krebszelllinien in einem Hohlfaser-Assay (HFA, *hollow fibre assay*) an Mäusen. Das HFA-System ist eine schnelle Methode, um Antitumor-Wirkstoffe zu testen, da nur etwa 7-10 Tage benötigt werden. Die Krebszellen werden in inerte Polyvinylidenfluorid-Hohlfasern (ca. 1 mm Innendurchmesser) eingebracht, die für Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 500 000 durchlässig sind. Diese Fasern werden den Mäusen intraperitoneal und subkutan implantiert und wieder entnommen, nachdem die Mäuse 4-5 Tage mit der Testverbindung behandelt worden sind. Der Effekt der Testverbindung auf die Zellen in den Hohlfasern wird anschließend *in vitro* durch kolorimetrische Assays (z. B. MTT) untersucht. Tubulysin A inhibierte das Zellwachstum bei 33 % der getesteten Proben und fällt damit unter die Top-5 % von 3290 Verbindungen, die in ähnlicher Weise am NCI getestet wurden.

Die *in vitro*- und *in vivo*-Daten von Khalil *et al.* und Kaur *et al.* deuten an, dass Tubulysin A eine wirksame, antiproliferative Verbindung mit *in vivo*-Aktivität und möglichen antiangiogenetischen Eigenschaften ist, deren weitere präklinische Entwicklung lohnenswert ist.

[a] 2ME2: 2-Methoxyestradiol.

[b] CA4 Prodrug[®]: Combrestatin A-4-phosphat.

[c] HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*): Humane, venöse Nabelschnurendothelzellen.

[d] TNP-470: *O*-(Chloracetylcarbamoyl)-fumagillol.

2.3 Struktur der Tubulysine

Die Struktur der Tubulysine (Abbildung 2.7) wurde zunächst aus der Elementarzusammensetzung und aus 2D-NMR-Spektren hergeleitet. Die absolute Konfiguration konnte durch saure Hydrolyse, Abbau und GC-Vergleich der Bruchstücke mit synthetisierten Bausteinen bestimmt werden.^[25] Letzte Zweifel bezüglich der Konfiguration an Position C² und C¹¹ wurden durch eine Röntgenstruktur von Tubulysin A (Abbildung 2.8) ausgeräumt.^[8] Die Tubulysine sind lineare Tetrapeptide, jedoch ist Isoleucin die einzige natürlich vorkommende Aminosäure. Weitere Aminosäuren sind *N*-Methylpipercolinsäure (Mep), sowie die unnatürlichen, zuvor unbekanntenen Aminosäuren Tubuvalin (Tuv) und Tubutyrosin (Tut) bzw. Tubuphenylalanin (Tup). Tut findet sich in Tubulysin A-C, G und I, Tup hingegen in Tubulysin D-F und H. Tubuvalin ist eine komplexe, ein Thiazol beinhaltende Aminosäure und besitzt ebenso wie die γ -Aminosäuren Tubutyrosin und Tubuphenylalanin zwei Stereozentren. An der N¹⁴-Position im Tubuvalinpart befindet sich die größte Besonderheit der Tubulysine, ein gegenüber Säuren und Basen labiles *N,O*-Acetal. In der Natur wurden solche *N,O*-Acetale erst zweimal gefunden, als Methylether in 5-Brompyrrol-2-(*N*-methoxymethyl)-carboxamid, welches aus dem Schwamm *Agelas nakamurai* isoliert wurde,^[26] und als *O*-Glykosid in Macrozamin und Cycasin, die toxische Bestandteile von gewissen Palmgewächsen sind.^[27] Im Gegensatz zur Hydroxy-Gruppe im Tubuvalin, die in den Tubulysinen A-I immer acetyliert ist, ist das *N,O*-Acetal mit verschiedenen kurzkettigen Säuren verestert (von Essigsäure bis zu 3-Methylbuttersäure). Steinmetz *et al.* stellten fest, dass Fütterung mit spezifischen Fettsäuren keinen signifikanten Einfluss auf das Acylgruppenmuster hat, was darauf hindeutet, dass die Acylgruppen aus einem Pool von Fettsäure-CoA-Estern stammen, die durch Aminosäure-Abbau entstanden sind.

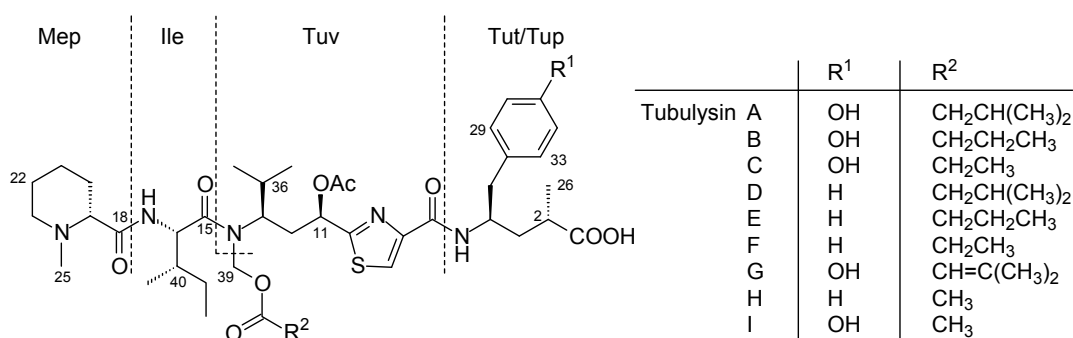


Abbildung 2.7 Struktur von Tubulysin A-I

Auf den ersten Blick scheint eine Totalsynthese der Tubulysine eine einfache Aufgabe zu sein, sie stellt jedoch eine unerwartet hohe Herausforderung dar. Nicht ohne Grund wurde erst 2006 von Peltier *et al.* die erste und bis heute auch die einzige Totalsynthese von Tubulysin D veröffentlicht.^[28] Ein Hindernis stellt das *N,O*-Acetal dar, das aufgrund seiner Labilität mit den meisten Schutzgruppenstrategien nicht kompatibel ist. Des Weiteren wird eine Synthese

durch die Anhäufung mehrerer Gruppen mit hohem sterischem Anspruch im Zentrum der Struktur erschwert. In Abbildung 2.8 ist diese hohe Raumauffüllung im Bereich von Ile und Val, sowie dem Acylrest des *N,O*-Acetals gut zu erkennen. Zudem sind 2-Alkylthiazole C-H-acide Verbindungen, die durch Basen am α -C-Atom der Alkylgruppe relativ leicht deprotoniert werden können.^[29] Es ist daher möglich, dass das Stereozentrum an C¹¹ konfiguratив nicht stabil ist.

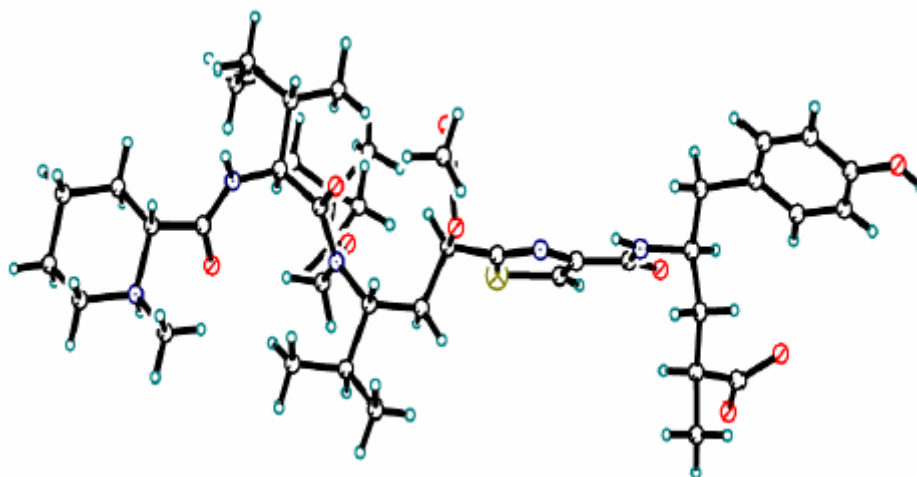


Abbildung 2.8 Röntgenstruktur von Tubulysin A (ORTEP Plot, H-Atome sind zugefügt)^[8]

Interessanterweise ähneln die Tubulysine in struktureller und biosynthetischer Hinsicht dem Dolastatin 10, das von Pettit *et al.* aus einer marinen Schnecke, dem Seehasen *Dolabella auricularia*, isoliert worden ist.^[30] Beide Substanzen sind ungewöhnliche Peptide von ähnlicher Größe und Zusammensetzung (Abbildung 2.9), beide inhibieren die Tubulin-Polymerisation. Biosynthetisch scheinen sie von NRPS-PKS-Hybrid-Systemen aufgebaut zu werden, die in beiden Fällen Valin, Isoleucin, Cystein, Phenylalanin, Acetat und Propionat verwenden, wenn auch in unterschiedlicher Reihenfolge. Zudem ist Cystein in beiden Verbindungen zum Thiazol cyclisiert und oxidiert, und jeweils die erste und die dritte Aminosäure sind *N*-methyliert. All diese Gemeinsamkeiten weisen auf gemeinsame Vorfahren der Biosynthesegene von Dolastatin 10 und Tubulysin hin, welche unabhängig voneinander zur Synthese zweier verschiedener Substanzen mit Affinität zu Tubulin optimiert wurden. Diese These der gemeinsamen Gen-Vorfahren erscheint umso wahrscheinlicher, seitdem die Gruppe von Moore entdeckt hat, dass Dolastatin 10 eigentlich von marinen Cyanobakterien (*Symploca* sp. VP642) produziert wird.^[31] Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten kann davon ausgegangen werden, dass beide Verbindungen die gleiche Bindungsstelle am Tubulin besetzen, so dass die Teile der Strukturen, die sich unterscheiden, offen für Modifikationen sind, im Tubulysin also der *C*-Terminus und die Seitenkette am *N,O*-Acetal.

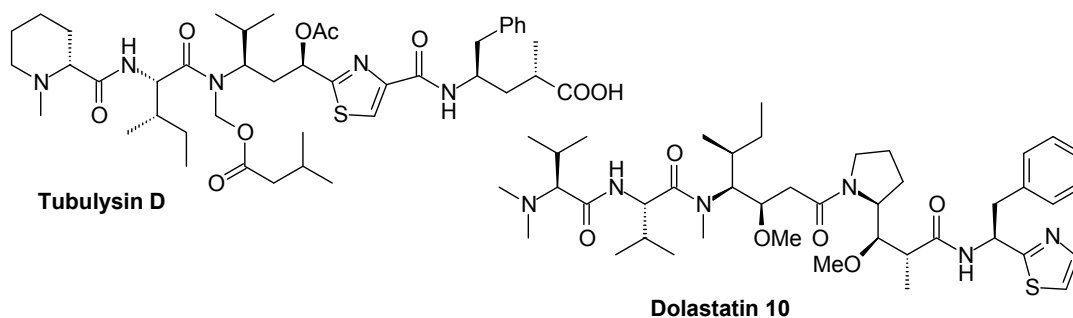


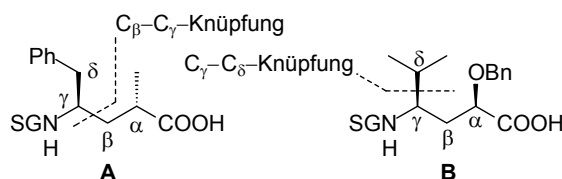
Abbildung 2.9 Vergleich der Strukturen von Tubulyisin D und Dolastatin 10

2.4 Synthese von Tubulyisin-Derivaten

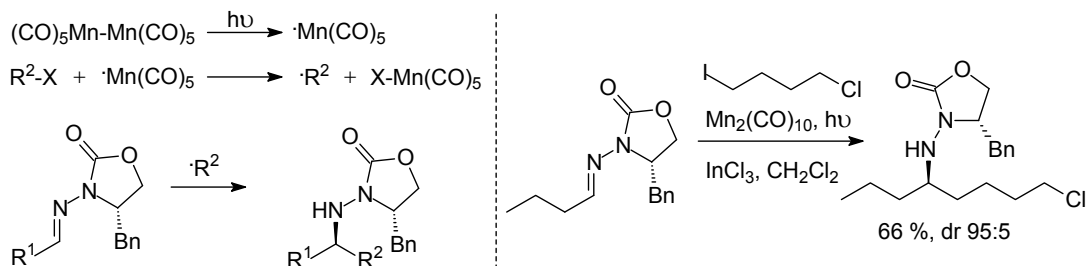
2.4.1 Synthese der unnatürlichen Aminosäuren Tuv und Tup nach Friestad

In Tubulyisin D finden sich zwei ungewöhnliche Aminosäuren, Tubuvalin und Tubuphenylalanin, die bisher nur in der Tubulyisin-Familie entdeckt worden sind. Beide sind α,γ -substituierte γ -Aminosäuren, wobei Tubuphenylalanin eine α -Methyl- γ -aminosäure **A** ist und Tubuvalin als α -Hydroxy- γ -aminosäure **B** mit als Thiazol maskierter Säurefunktion aufgefasst werden kann (Abbildung 2.10).

Friestad *et al.*^[32] wollten eine neue, generelle und vielseitige Methode zur Synthese von γ -Aminosäuren etablieren, bei welcher der chirale Aminrest über eine C-C-Bindungsknüpfung eingeführt wird. Um eine möglichst vielseitige Reaktion zu entwickeln, sollten die γ -Aminosäuren über die C_β - C_γ - und über die C_γ - C_δ -Bindung je nach Verfügbarkeit und Reaktivität der Vorstufen aufgebaut werden können (Abbildung 2.10).

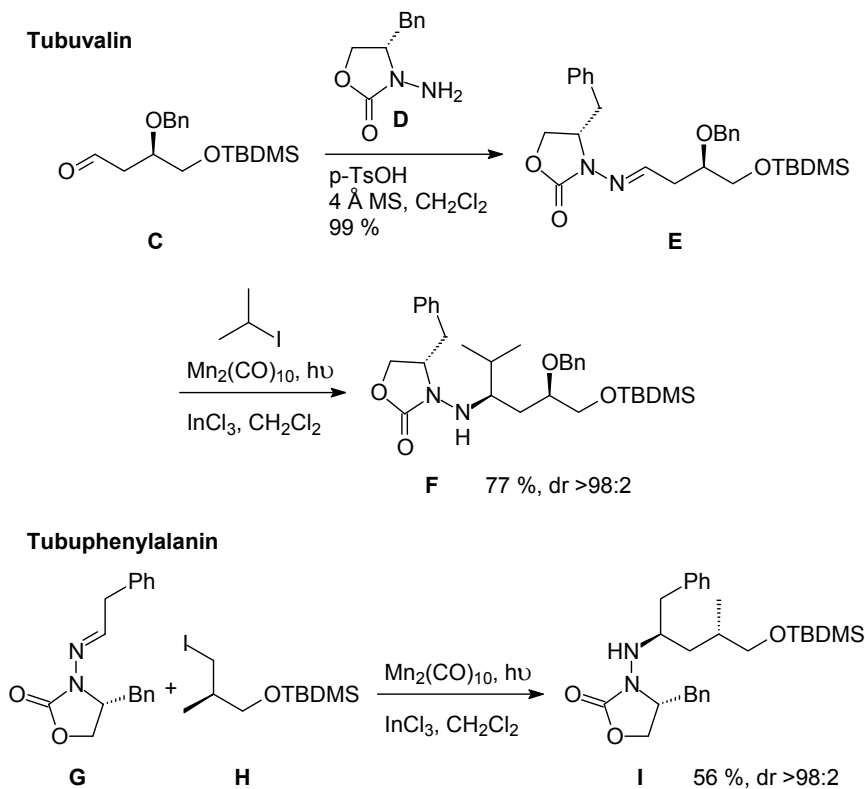
Abbildung 2.10 Synthese von γ -Aminosäuren über C_β - C_γ - und C_γ - C_δ -Bindungsknüpfung

Zur Generierung von chiralen Aminen über asymmetrische C-C-Bindungsknüpfung wurde von Friestad *et al.* bereits eine stereoselektive intermolekulare Addition von Alkylradikalen an C=N-Bindungen von chiralen *N*-Acylhydrazonen entwickelt.^[33] Durch Photolyse der Mn-Mn-Bindung von $Mn_2(CO)_{10}$ entsteht $\cdot Mn(CO)_5$, welches Alkylradikale aus Alkylhalogeniden R-X generieren kann und die Knüpfung von *N*-Acylhydrazonen mit primären Iodiden sogar dann erlaubt, wenn eine zusätzliche Halogenfunktion im Molekül vorhanden ist (Schema 2.1).



Schema 2.1 Stereoselektive Mn-vermittelte Knüpfung von funktionalisierten Iodiden und Hydrazonen

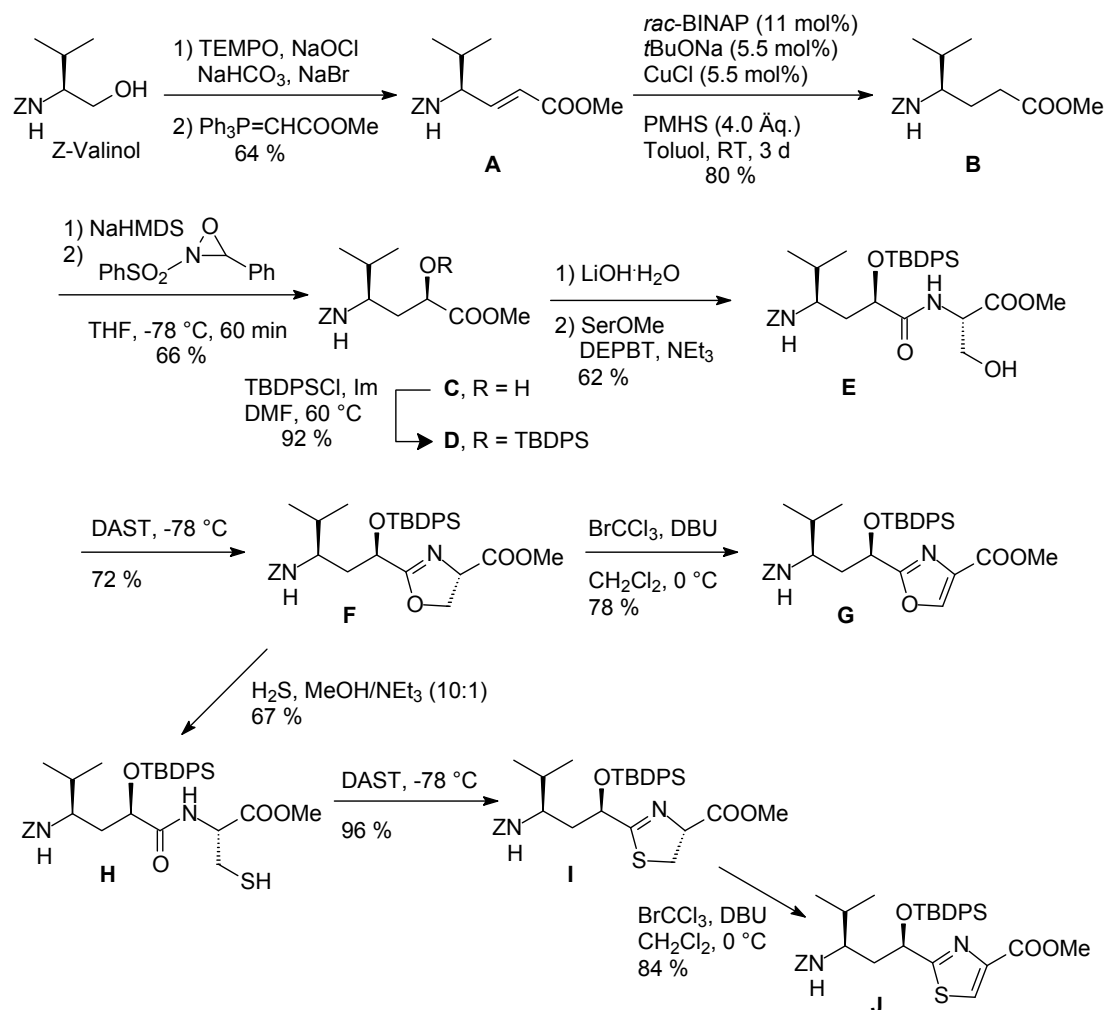
Zur Synthese der Tubuvalin-Vorstufe **B** wurde zunächst das *N*-Acylhydrazone **E** durch Kondensation des Aldehyds **C** mit (*S*)-*N*-Amino-oxazolidinon (*S*)-**D** hergestellt (Schema 2.2). Dieses wurde in die oben beschriebene Mn-Radikalreaktion (Schema 2.1) eingesetzt und ergab mit Isopropyljodid das gewünschte Addukt **F** in sehr hoher Diastereoselektivität. Die Tubuphenylalanin-Vorstufe **I** konnte durch Umsetzung von (*R*)-*N*-Acylhydrazone **G** mit Iodid **H** in der Mn-Reaktion in mäßiger Ausbeute, jedoch mit hoher Diastereoselektivität erhalten werden (Schema 2.2). Um die entstandenen Hydrazine in die entsprechenden Amine zu überführen, wurden **F** und **I** am NH mit Trifluoressigsäureanhydrid TFA-geschützt und die dadurch aktivierte N-N-Bindung mit SmI_2 reduktiv gespalten. Die Konfiguration der erhaltenen Stereozentren konnte durch Überführung der Produkte in Boc-Phenylglycinamid-Derivate über eine $^1\text{H-NMR}$ -Methode von Riguera^[34] überprüft werden.



Schema 2.2 Synthese von Tubuvalin und Tubuphenylalanin nach Friestad

2.4.2 Synthese von N^{14} -Desacetytubulylin H nach Wipf

Wipf *et al.* planten eine Bibliothek von Tubulylin-Analoga mit verbesserten physikochemischen Eigenschaften, die sie auf Tubuvalin-Derivaten aufbauen wollten. Diese sollten sich durch unterschiedliche Heterocyclen (neben Thiazol auch Thiazolin, Oxazol und Oxazolin) auszeichnen.^[35] Gemeinsame Vorstufe für Oxazolin-, Thiazolin-, Oxazol- und Thiazol-Derivate von Tubuvalin stellt die α -Hydroxy- γ -aminosäure **C** dar, welche durch Davis-Oxidation^[36] von γ -Aminosäure **B** zugänglich sein sollte (Schema 2.3).

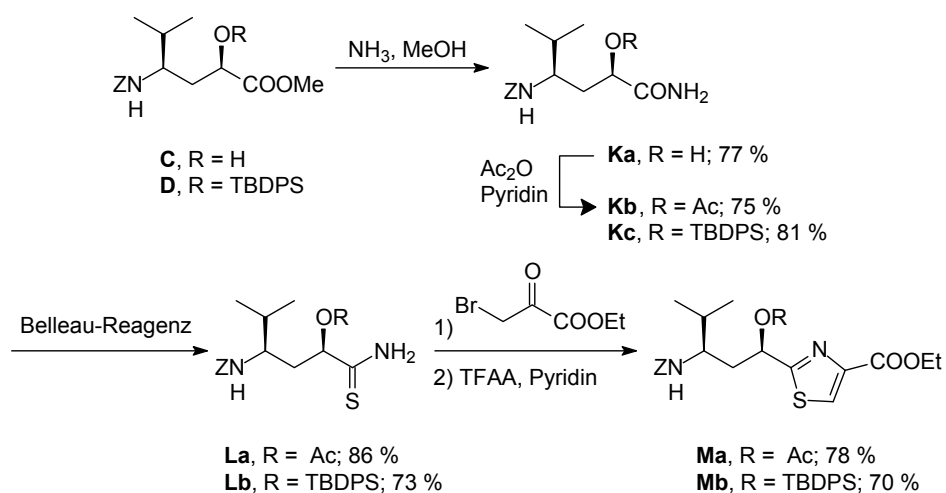


Schema 2.3 Synthese von Oxazolin-, Thiazolin-, Oxazol- und Thiazol-Tubuvalin-Derivaten

Der α,β -ungesättigte Ester **A** wurde durch Wittig-Homologisierung des entsprechenden Aldehyds synthetisiert (Schema 2.3). Im nächsten Schritt musste die Doppelbindung reduziert werden, was sich aber aufgrund der Schutzgruppenwahl als nicht gerade einfach gestaltete, da bei Hydrierungen auch die *Z*-Schutzgruppe gespalten werden kann und die freie Aminfunktion eine starke Tendenz zur γ -Lactambildung zeigt. Doch durch Verwendung einer von Buchwald *et al.* entwickelten Kupfer-katalysierten Reduktion^[37] gelang eine selektive

Reduktion des α,β -ungesättigten Esters zu **B** ohne *Z*-Entschützung. Da hier kein stereoselektives, sondern ein chemoselektives Problem vorlag, konnte *rac*-BINAP anstelle eines chiralen Liganden verwendet werden. Die α -Hydroxylierung von **B** gelang mit NaHMDS in THF bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ und dem achiralen Davis-Reagenz^[a], das α -Hydroxy-Derivat **C** wurde in 66 % Ausbeute als einziges Diastereomer gebildet. Bei Verwendung anderer Basen wie KHMDS, LHMDS und LDA entstand **C** in geringeren Ausbeuten (37-50 %), wie auch bei der α -Hydroxylierung von Boc- bzw. TFA-geschützten γ -Aminosäuren. Nach TBDPS-Schützung des Alkohols zu **D** und Verseifung des Esters wurde mit (*L*)-Serin-methylester zum Dipeptid **E** geknüpft. Cyclodehydratisierung mit DAST lieferte das Oxazolin **F** in 72 % Ausbeute, welches mit BrCCl_3 und DBU zum Oxazol **G** oxidiert werden konnte. Die schwefelhaltigen Analoga wurden dadurch zugänglich, dass **F** einer gesättigten H_2S -Lösung ausgesetzt wurde. Das dabei durch Thiolyse entstandene Dipeptid **H** konnte nun ebenfalls durch Cyclisierung mit DAST in das Thiazolin **I** und durch weitere Oxidation in das Thiazol **J** überführt werden.

Tubuvalin konnte auch auf einem direkteren Weg erhalten werden. Dazu wurden **C** bzw. **D** in das jeweilige Amid **K** überführt, nach Acetylierung des freien Alkohols von **Ka** zu **Kb** konnten durch Umsetzung mit dem Belleau-Reagenz^[b] die Thioamide **La** und **Lb** generiert werden. Über ein modifiziertes Hantzsches Protokoll waren die Thiazole **Ma** und **Mb** zugänglich (Schema 2.4).

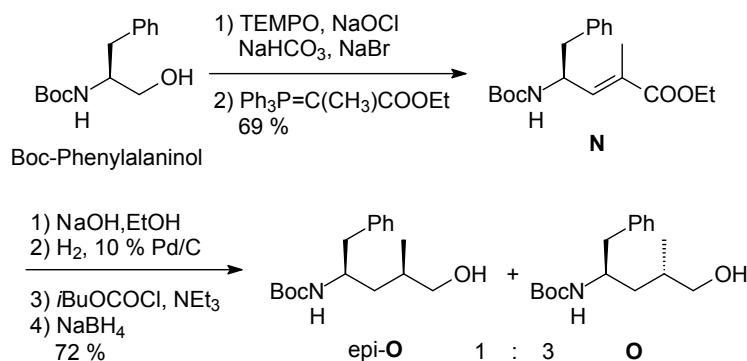


Schema 2.4 Synthese von Tubuvalin-Derivaten **Ma** und **Mb**

[a] Davis-Reagenz: 2-(Phenylsulfonyl)-3-phenyloxaziridin.

[b] Belleau-Reagenz: 2,4-Bis-(4-phenoxyphenyl)-1,3-dithia-2,4-phosphetan-2,4-disulfid, eine besser lösliche Version des Lawesson-Reagenzes.

Um den Tubuphenylalanin-Baustein zu erhalten, verlängerten Wipf *et al.* Boc-Phenylalaninal über eine Wittig-Reaktion zu **N** (Schema 2.5). Beim Versuch, das Stereozentrum am α -Zentrum über eine diastereoselektive Hydrierung mit Ru-BINAP-Katalysator zu erzeugen, hatten sie keinen Erfolg. Daher verseiften sie zunächst den ungesättigten Ester **O**, hydrierten die α,β -ungesättigte Säure und reduzierten das gemischte Anhydrid mit Natriumborhydrid zum Alkohol **O**, welcher in einem Diastereomerenverhältnis von 1:3 (*epi*-**O**:**O**) zu Gunsten des gewünschten Diastereomers erhalten wurde und säulenchromatographisch getrennt werden konnte.



Schema 2.5 Synthese des Tubuphenylalaninols **O**

Eine weitere Überlegung von Wipf *et al.* war, dass es möglich sein sollte, das labile *N,O*-Acetal der Tubuly sine am N¹⁴ durch eine einfache *N*-Alkylgruppe zu ersetzen, wobei deren außergewöhnliche Aktivität beibehalten, die Bioverfügbarkeit jedoch gesteigert werden sollte. Daher haben sie das Tubuly sin-Derivat N¹⁴-Desacetoxytubuly sin H (Abbildung 2.11) synthetisiert.^[38]

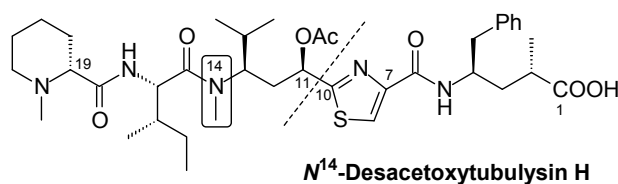
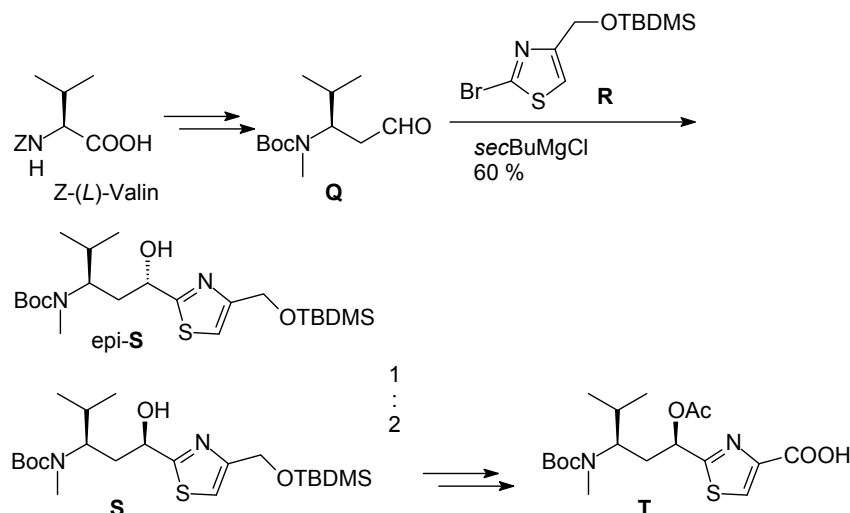


Abbildung 2.11 N¹⁴-Desacetoxytubuly sin H

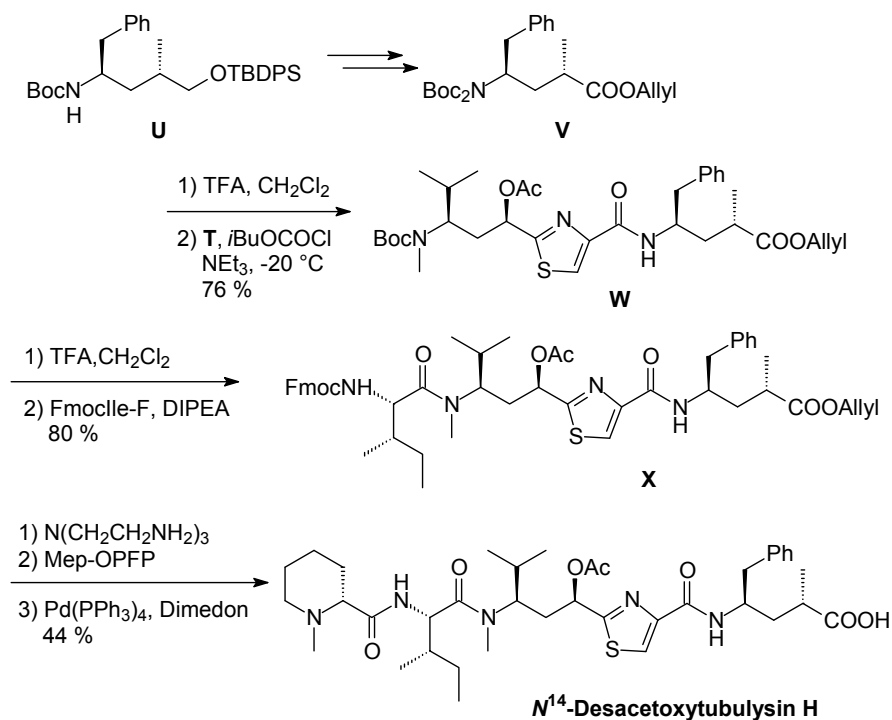
Die in Schema 2.4 beschriebene Synthese von Tubuvalin wurde neu überdacht und eine attraktivere Strategie entwickelt, bei der die Knüpfungsstelle zwischen C¹⁰ und C¹¹ liegt (Abbildung 2.11). Boc-*N*-Me-Homovalinal **Q** konnte durch Arndt-Eistert-Homologisierung von *Z*-Valin über Reduktion des entstandenen Esters zum Alkohol, *N*-Methylierung und Oxidation des Alkohols zum Aldehyd erhalten werden (Schema 2.6). Da die *Z*-Entschützung des Tubuvalins **M** (Schema 2.4) Probleme bereitete, fand ein Wechsel zur Boc-Schutzgruppe statt. Das 2-Bromthiazol **R** konnte ausgehend von Thioharnstoff in 4 Stufen dargestellt werden, durch Austausch mit *sec*-Butylmagnesium-chlorid wurde ein Thiazol-Grignard-

Reagenz generiert, das mit dem Aldehyd **Q** in einer sauberen 1,2-Addition zu den trennbaren Epimeren *epi-S* und **S** (Verhältnis 1:2) reagierte. Die Konfiguration des neu gebildeten Stereozentrums wurde durch eine doppelte Derivatisierungsmethode von Riguera^[39] mit α -Methoxy-phenyllessigsäure (MPA) überprüft. Das gewünschte Hauptdiastereomer konnte an der neu entstandenen Alkoholfunktion acetyliert werden, wonach der silylierte Alkohol entschützt und zur Carbonsäure **T** oxidiert wurde.



Schema 2.6 Synthese des Tubuvalinbausteins **T**

Bei der Oxidation der Alkoholfunktion von **U** nach TBAF-Entschützung bildete sich ein γ -Lactam. Um dies zu verhindern, wurde der Stickstoff ein zweites Mal Boc-geschützt. Nun konnte der Alkohol entschützt und ohne Probleme zur Carbonsäure oxidiert werden, welche in den Allylester **V** überführt wurde (Schema 2.7). Entschützung mit TFA und Knüpfung mit dem gemischten Anhydrid von **T** lieferte das Dipeptid **W**. Probleme bereitete die Bildung des Tripeptids **X**, was auf den hohen sterischen Anspruch der Knüpfungspartner und die geringe Reaktivität des *N*-methylierten Amins zurückgeführt wurde. Da die Knüpfung von Boc- bzw. Fmoc-Isoleucin mit dem Boc-entschützten Dipeptid **W** unter Verwendung verschiedenster Knüpfungsreagenzien wie DEPBT, BEP, HATU, TBTU, PyBOP und BOP-Cl immer in unvollständiger Umsetzung und geringen Ausbeuten resultierte, wurde schließlich das Säurefluorid Fmoc-Ile-F verwendet und so das Tripeptid **X** in 80 % Ausbeute erhalten. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe und Knüpfen des Tripeptids mit dem Pentafluorphenol-ester der *N*-Methyl-Pipecolinsäure (Mep) konnte der Allylester durch Pd(PPh₃)₄ in Gegenwart von Dimedon als Allylkation-Fänger zum Zielmolekül *N*¹⁴-Desacetoxytubulylin **H** gespalten werden.



Schema 2.7 Synthese von N¹⁴-Desacetoxytubulysin H

2.4.3 Synthesen zu Tubulysin U und V nach Dömling/Wessjohann und Zanda

Tubulysine U, V und Z (Abbildung 2.12) sind Derivate ohne *N,O*-Acetal und teilweise auch ohne Acetylrest. Im Unterschied zu Wipfs N¹⁴-Desacetoxytubulysin H ist die Ile-Tuv-Bindung eine normale Amidbindung. Diese Tubulysine fanden erstmals 2006 bei Dömling *et al.* Erwähnung.^[40] Ob es sich um isolierte Tubulysine handelt oder um semisynthetische Derivate bleibt unklar. Sie sind weniger aktiv, aber die Cytotoxizität einiger dieser Tubulysine liegt noch im Bereich von Taxol oder Epothilon. Neben Dömling und Wessjohann^[40] beschäftigte sich auch die Gruppe von Zanda^[41] mit der Synthese der Tubulysine U und V.

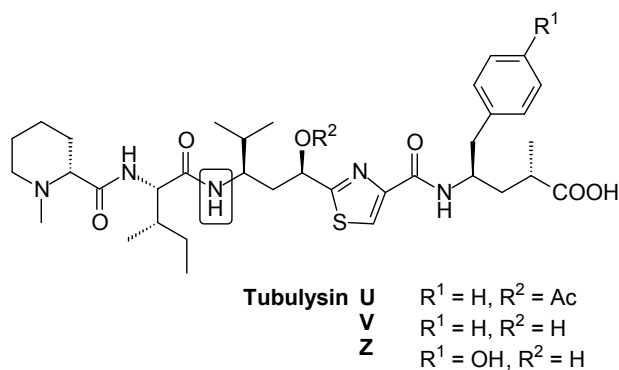
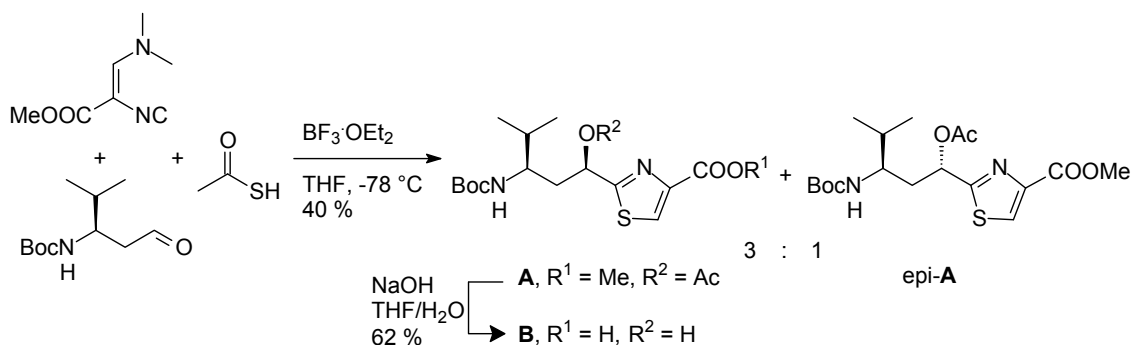


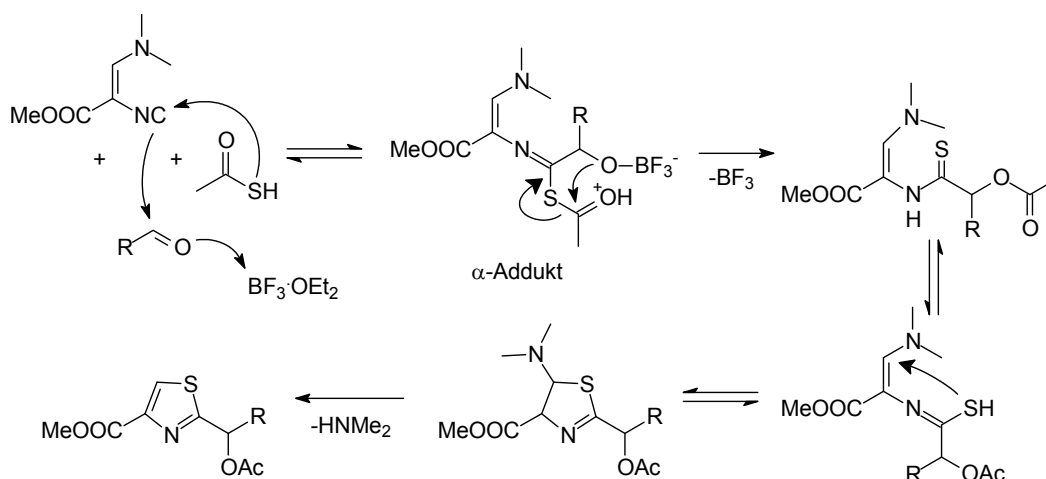
Abbildung 2.12 Tubulysine U, V und Z

Dömling *et al.* entwickelten eine 3-Komponentenreaktion (3-CR, Passerini-Thiazol-Reaktion) zur Synthese von 2-Hydroxymethylthiazolen.^[42] Diese Methode lässt sich sehr gut auf die Darstellung von Tubuvalin anwenden (Schema 2.8). Hierzu wurden Boc-geschütztes Homovalinal, Thioessigsäure und β -Dimethylamino- α -isocyano-acrylsäureester (Schöllkopf-Isonitril) miteinander umgesetzt und Tubuvalin **A** in einem Diastereomerenverhältnis von 3:1 zu Gunsten des gewünschten Diastereomers in 40 % Ausbeute erhalten.^[40]



Schema 2.8 Darstellung von Tubuvalin über eine Passerini-Thiazol-Reaktion

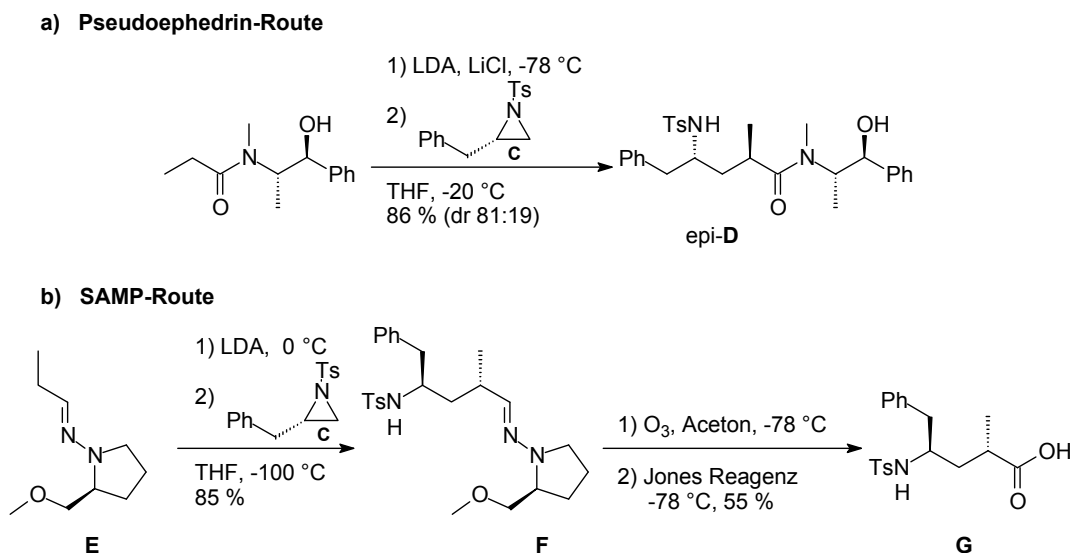
Die Passerini-Reaktion läuft nach folgendem, in Schema 2.9 dargestellten Mechanismus ab: Der durch die Lewis-Säure $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ aktivierte Aldehyd wird nucleophil von dem Isocyanid angegriffen, welches wiederum selbst von der Thioessigsäure angegriffen wird. Das so gebildete α -Addukt kann als Heteroanalogon eines Säureanhydrids aufgefasst werden. Durch Transacylierung entsteht ein Thioamid, das mit einem Iminothiolen im Gleichgewicht steht. Dieses Iminothiolen kann in einer intramolekularen Michael-Addition an den Acrylsäureester zum Thiazolin cyclisieren. Durch Eliminierung von Dimethylamin findet eine Aromatisierung zum Thiazol statt.^[42,43]



Schema 2.9 Möglicher Mechanismus der Passerini-Thiazol-Reaktion

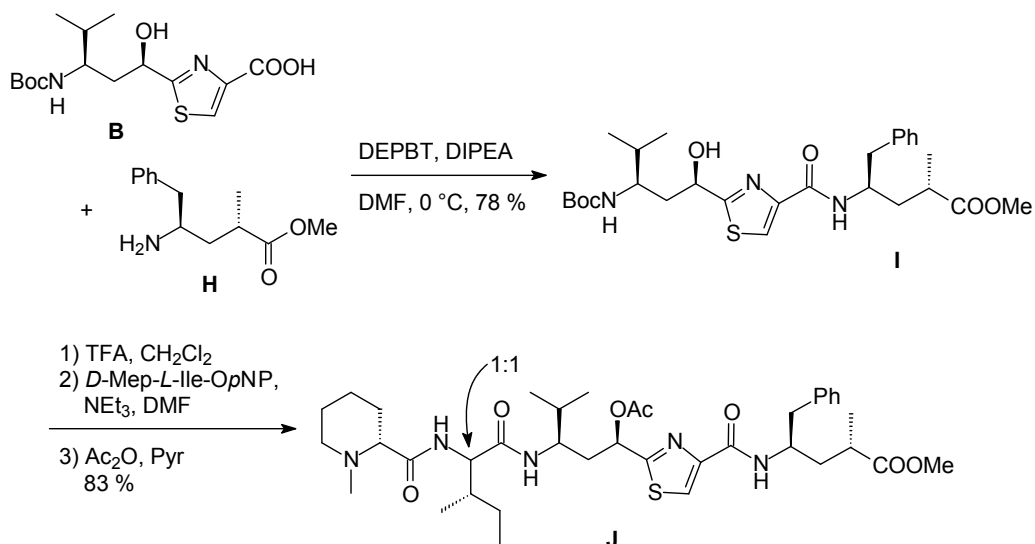
Zur Synthese von Tubuphenylalanin über eine auxiliarkontrollierte Aziridinöffnung durch ein Enolat verwendeten Dömling *et al.* zunächst Pseudoephedrin als Auxiliar (Schema 2.10a).^[40] Sie führten die Reaktion analog zu einer von Vicario *et al.*^[44] beschriebenen Methode durch und nahmen daher an, dass das neue Stereozentrum am α -C-Atom von Tubuphenylalanin in der richtigen Konfiguration gebildet wird. M. Zanda arbeitete etwa zeitgleich an der Synthese von Tubulylin U und V^[41] und konnte durch Vergleich mit seinen experimentellen Daten zu Tubuphenylalanin, darunter auch eine Röntgenstruktur, zeigen, dass bei der Reaktion von Dömling das Tup-Epimer *epi-D* entstanden war.

Daraufhin wiederholte die Gruppe um Dömling ihre Tubuphenylalanin-Synthese,^[45] wobei sie bei der Wahl des Auxiliars auf Enders SAMP zurückgriff (Schema 2.10b). Bei der Umsetzung des Enolats von Hydrazon **E** mit dem (*S*)-Aziridin **C** entstand das richtige Epimer **F**, welches durch Ozonolyse und nachfolgender Oxidation in die Säure **G** überführt werden konnte.

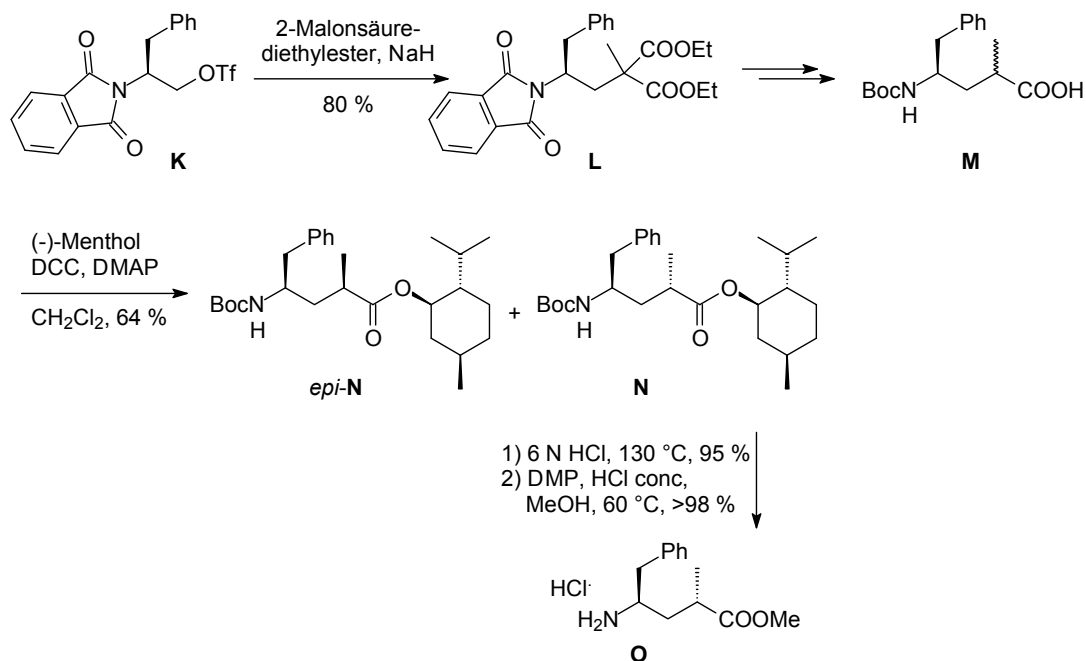


Schema 2.10 Darstellung von Tubuphenylalanin durch auxiliarkontrollierte Aziridinöffnung

Das Dipeptid Tuv-Tup **I** konnte mit Hilfe von DEPBT aus **B** und **H** dargestellt werden. Da das Tetrapeptid bei der schrittweisen Verlängerung von **I** um Ile und Mep nur in 10 % Ausbeute erhalten werden konnte, wurde das Dipeptid **I** mit dem als *para*-Nitrophenolester aktivierten Dipeptid Mep-Ile in guter Ausbeute zu Tetrapeptid **J** geknüpft, jedoch epimerisierte das α -Zentrum des Isoleucins (Schema 2.11).

Schema 2.11 Peptidknüpfungen zu Tetrapeptid **J**

Die Arbeitsgruppe von Zanda entwickelte eine Syntheseroute zu Tubulylin U und V, die sehr effektiv, flexibel und modular ist und die den Naturstoff in größerem Maßstab liefern kann. Zudem können verschiedene Tubulylin-Stereoisomere synthetisiert werden.^[41]

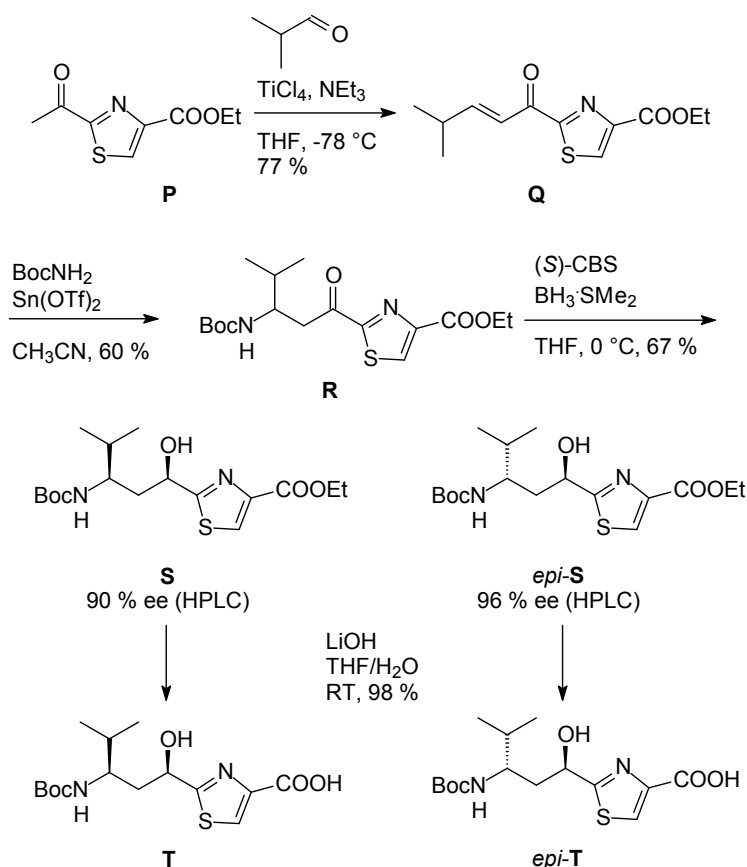


Schema 2.12 Tubuphenylalanin-Synthese nach Zanda

Das ausgehend von Phenylalaninol dargestellte Triflat **K** konnte in einer S_N2-Reaktion mit 2-Methyl-malonsäure-diethylester und Natriumhydrid zu **L** umgesetzt werden (Schema 2.12). Durch simultane Entschützung und Decarboxylierung mit Salzsäure und anschließenden Schützungsstufen wurde das Boc-geschützte, epimere Tubuphenylalanin **M** erhalten, welches als (-)-Mentholester durch Säulenchromatographie in die Diastereomere *epi*-**N** und **N**

getrennt werden kann. Die Konfiguration der Diastereomere konnte durch eine Röntgenstruktur von *epi-N* eindeutig belegt werden. Mit Salzsäure konnte **N** komplett entschützt und mit 2,2-Dimethoxypropan in den Methylester **O** überführt werden.

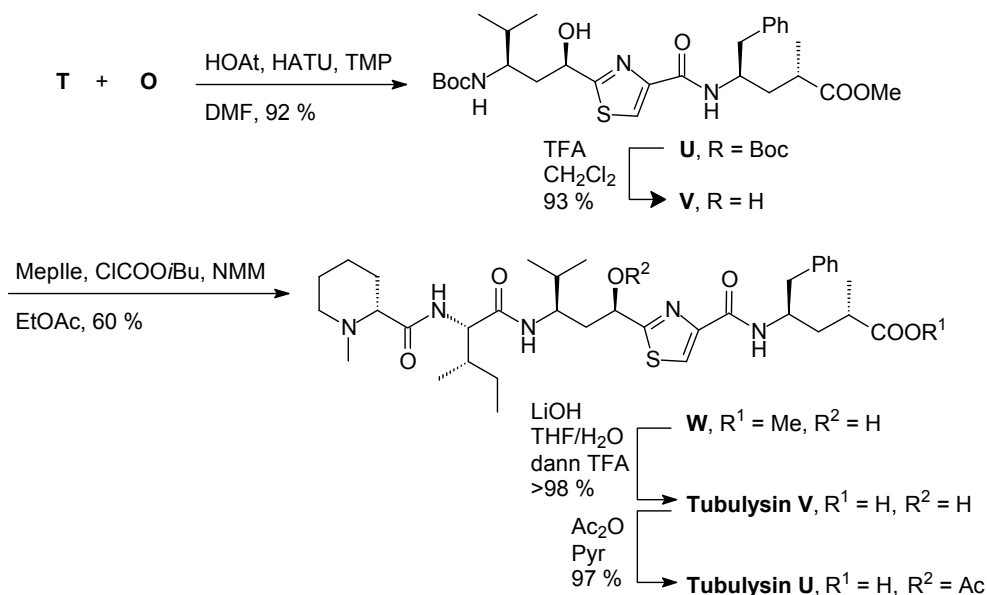
Die Synthese von Tubuvalin (Schema 2.13) begannen sie mit Thiazol **P**, welches durch Kondensation von Cystein mit Pyruvaldehyd (2-Oxopropanal) und durch Oxidation des Thiazolidins mit MnO_2 dargestellt werden kann. Durch Aldolkondensation mit Isobutyraldehyd und Michael-Addition mit Boc-NH_2 kann racemisches **R** erhalten werden. Die Carbonylgruppe von **R** wurde stereoselektiv über die Methode von Corey, Bakshi und Shibata^[46] mit (*S*)-CBS reduziert, wobei die säulenchromatographisch trennbaren epimeren Alkohole **S** und *epi-S* mit hohen ee-Werten erhalten wurden. Die relative Konfiguration konnte durch eine Röntgenstruktur von racemischem *epi-S* bestimmt werden. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde mit dem von Wipf synthetisierten *Z*-Tuv-OEt **Ma** (Schema 2.4) verglichen. Die übrigen Diastereomere sind durch Reduktion mit (*R*)-CBS zugänglich.



Schema 2.13 Tubuvalin-Synthese nach Zanda

Erste Überlegungen zur Peptidknüpfung waren auch hier die schrittweise Knüpfung vom *C*- zum *N*-Terminus. Es gelang jedoch nicht, Mep an das Ile-Tuv-TupOMe-Tripeptid zu kuppeln. Daher wurde die Knüpfung der Dipeptide MepIle und Tuv-Tup-OMe **V** untersucht, welche aufgrund der Neigung des Isoleucin- α -Zentrums zur Epimerisierung eine große

Herausforderung darstellt, was auch Dömling *et al.* bereits feststellen mussten (Schema 2.11). Schließlich konnte mit Chlorameisensäure-*iso*-butylester und *N*-Methylmorpholin in Essigsäureethylester über das gemischte Anhydrid von MepIle eine Methode gefunden werden, bei der das Tetrapeptid **W** in guter Ausbeute und nur mit geringer Epimerisierung (< 5 %) gebildet wird (Schema 2.14).



Schema 2.14 Peptidknüpfungen zu Tubulysin U und V

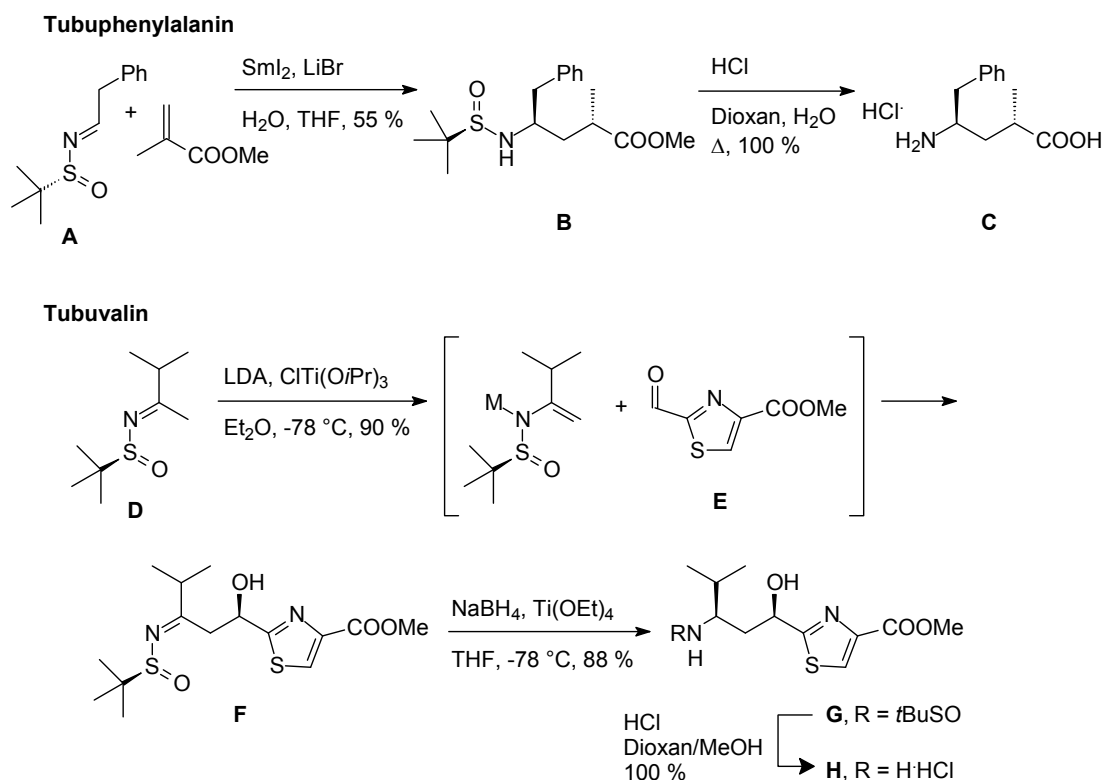
2.4.4 Synthese von Tubulysin D nach Ellman

Bei den bisher aufgezeigten Synthesen wurden vereinfachte Tubulysin-Derivate hergestellt, denen allen gemeinsam ist, dass auf das labile *N,O*-Acetal am Tubuvalin verzichtet wurde. Erst 2006 ist es der Gruppe von J. A. Ellman als erster und bis jetzt auch als einziger gelungen, die Herausforderung zu meistern und Tubulysin D zu synthetisieren.^[28]

Zur Synthese der beiden unnatürlichen Aminosäuren Tubuphenylalanin und Tubuvalin wurden *tert*-Butansulfinamid-Methoden von Peltier *et al.* entwickelt. Der Schlüsselschritt in der Synthese von Tup (Schema 2.15) ist die reduktive Knüpfung von Phenylacetaldimin **A** mit 2-Methyl-acrylsäuremethylester durch SmI_2 zu **B**. Auf der Suche nach geeigneten Lösemitteln und Additiven zeigte sich, dass Wasser und LiBr wichtig für hohe Ausbeuten und gute Stereoselektivitäten (80:15:3:2) sind. Nach Säulenchromatographie konnte **B** in diastereomerenreiner Form erhalten werden, die relative und absolute Konfiguration wurden durch Röntgenstrukturanalyse belegt. **B** konnte durch Erhitzen in wässriger HCl komplett zu Tup-Hydrochlorid **C** entschützt werden.

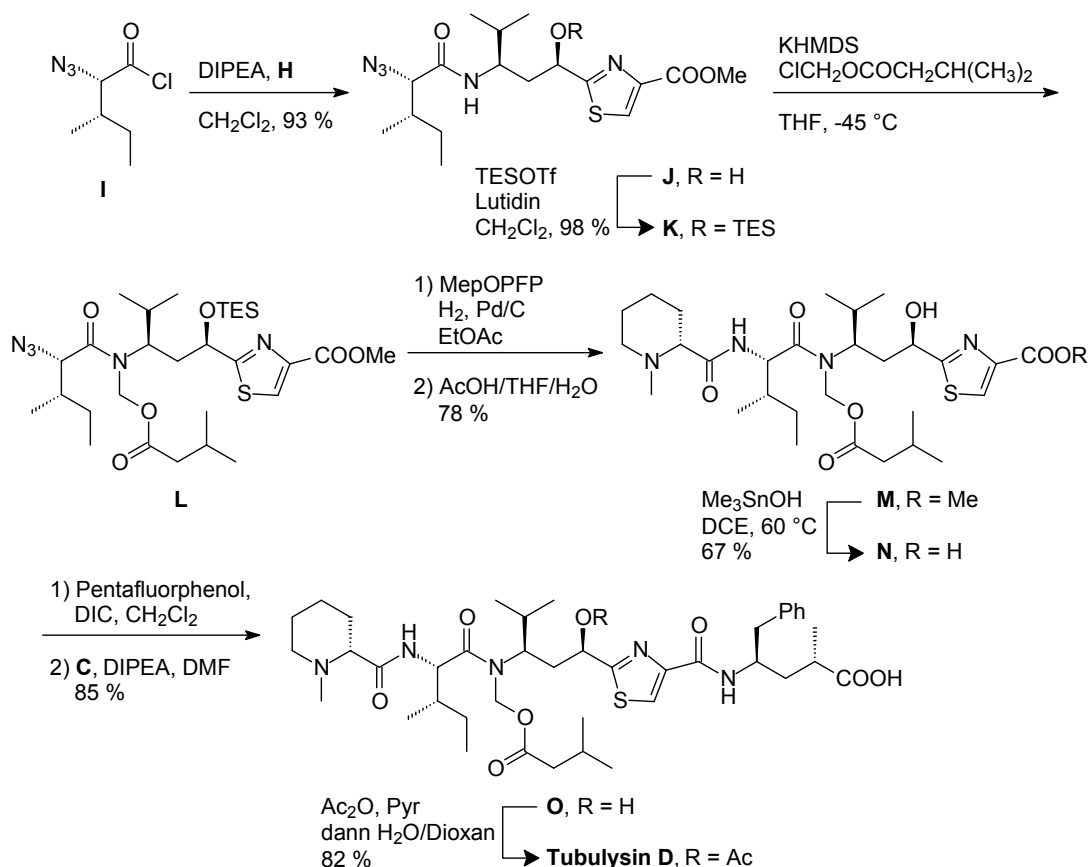
Die Synthese von Tubuvalin (Schema 2.15) beginnt mit einer Addition des von Ketimin **D** stammenden Metalloenamins an Thiazolaldehyd **E**. In früheren Arbeiten erwiesen sich Zn

und Mg als gute Gegenionen,^[47] hier lieferten sie das Additionsprodukt **F** jedoch nur in 1:1-Diastereoselektivität. In diesem Fall wurden bessere Resultate mit Ti als Gegenion und Ether als Lösemittel erzielt (92:8). Durch säulenchromatographische Reinigung konnte **F** als einziges Diastereomer in hoher Ausbeute erhalten werden. Stereoselektive Reduktion des Imins lieferte den gewünschten 1,3-Aminoalkohol **G** in gutem Diastereomerenverhältnis (91:9), nach Säulenchromatographie wurde **G** in diastereomerenreiner Form isoliert. Entschützen mit HCl in Dioxan/MeOH ergab Tubuvalin-methylester als Hydrochlorid **H**.



Schema 2.15 Darstellung von Tup und Tuv ausgehend von *tert*-Butansulfinamiden

Der Tubuvalin-methylester **H** wurde mit einem α -Azidosäurechlorid **I** geknüpft (Schema 2.16). Die Azid-Gruppe sollte das Ile-Amin maskieren, um eine selektive Einführung des *N,O*-Acetals am Tubuvalin zu gewährleisten. Bei einer Carbamat-Schützung von Ile wäre es sehr wahrscheinlich, dass auch dessen Stickstoff alkyliert würde. Nach TES-Schützen des Alkohols **J** zu **K** gelang die Etablierung des *N,O*-Acetals mit KHMDS und Isovaleriansäurechloromethylester in guter Ausbeute. Das Azid zeigte einen weiteren Vorteil, da **L** unter neutralen Bedingungen zum Amin reduziert werden konnte. Die Hydrierung wurde in Gegenwart von Mep-pentafluorphenolester durchgeführt und anschließend wurde der Silylether des Tripeptids mit AcOH/THF/H₂O zu **M** entschützt. Im nächsten Schritt musste der Methylester unter Erhalt des *N,O*-Acetals gespalten werden. Dies gelang mit Me₃SnOH in Dichlorethan bei 60 °C mit geringer Acetalspaltung (<5 %). Das Tripeptid **N** wurde als Pentafluorphenolester aktiviert, mit Tubuphenylalanin-Hydrochlorid **C** zu **O** geknüpft und mit Acetanhydrid zu Tubulysin D acetyliert.



Schema 2.16 Synthese von Tubulysin D nach Ellman

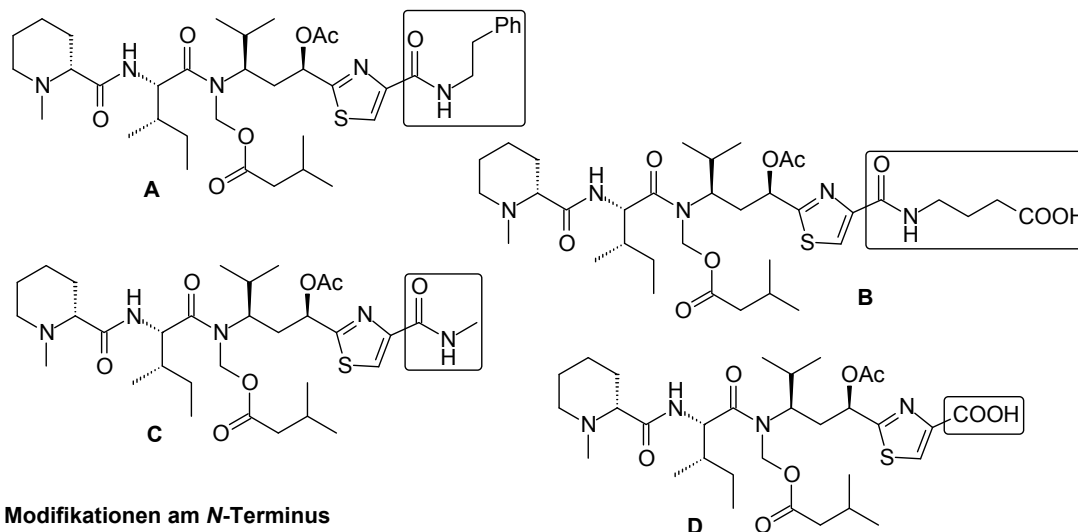
2.5 Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Tubulysin-Analoga

Die Gruppe von Ellman, die als erste eine Totalsynthese von Tubulysin D vorstellte,^[28] hat einige zu Tubulysin D analoge Strukturen **A-I** (Abb. 2.13) synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität getestet, um mehr über die Bindungseigenschaften der Tubulysine zu erfahren. Durch ihre Studien konnten Verbindungen von geringerem Molekulargewicht und höherer Stabilität gefunden werden, die einen Großteil der Aktivität, die Tubulin-Polymerisation zu inhibieren, beibehalten haben.^[48]

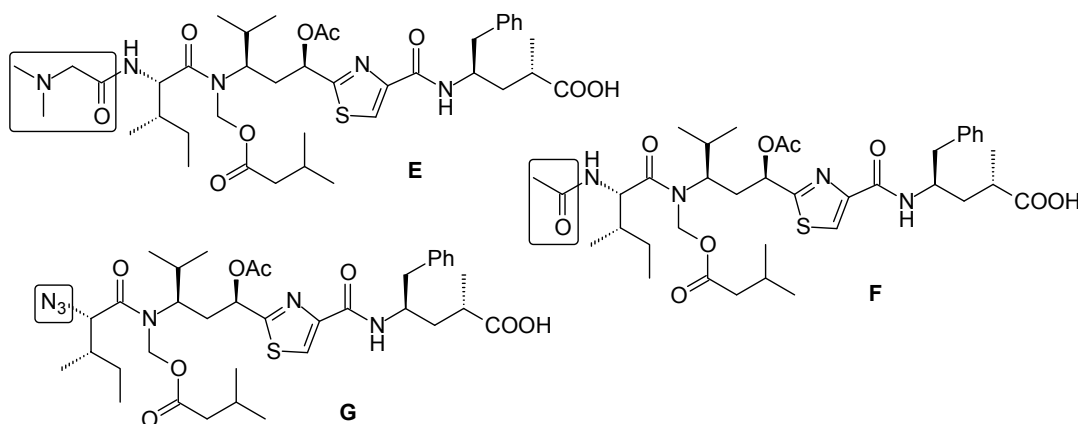
Es wurden Verbindungen mit modifiziertem C-Terminus (**A-D**) hergestellt, während an **E-G** Abwandlungen des N-Terminus untersucht wurden. Die Derivate **H** und **I** wurden konzipiert, um die Bedeutung der beiden labilsten Stellen (die Acetylgruppe an C¹¹ und das N,O-Acetal am N¹⁴ am Tubuvalin) im Molekül festzustellen. Anstelle des N,O-Acetals wurde in **I**^[a] eine Methylgruppe eingebaut, um das tertiäre Amid und somit dessen *cis*- und *trans*-Konformation zu erhalten.

[a] **I** entspricht dem von Wipf *et al.* bereits vorgestellten N¹⁴-Desacetoxytubulysin H.^[38]

Modifikationen am C-Terminus



Modifikationen am N-Terminus



Weitere Modifikationen

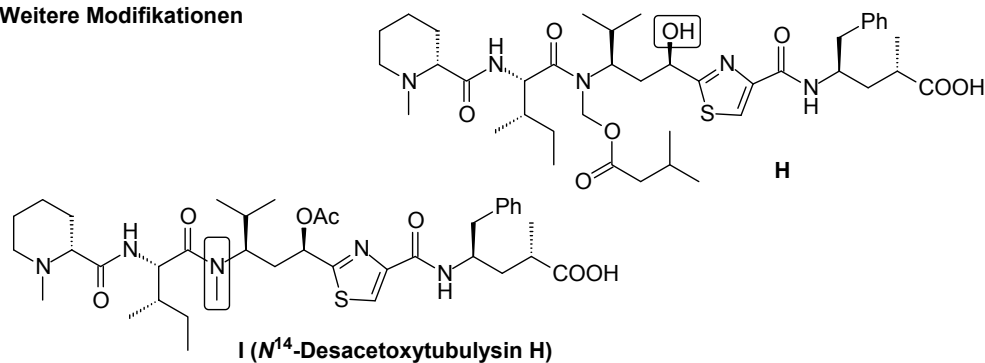


Abbildung 2.13 Tubulysin D-Analoga A-J nach Ellman

Die Aktivität der Verbindungen wurde durch Messung der Inhibition des Zellwachstums von etablierten Säugerzelllinien in einem MTT-Assay^[a] bestimmt (Tabelle 2.1). Sie variierte dabei von 0.05-120 ng/ml in L-929 Maus-Fibroblasten, wobei viele der Derivate eine bedeutende Aktivität beibehielten.

[a] Der MTT-Test ist eine Methode zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen. Er beruht auf der kolorimetrisch verfolgbaren Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT zum Formazan.

Tabelle 2.1 Biologische Aktivität der Verbindungen **A-J**

Verbindung	IC ₅₀ [ng/ml]		
	L-929 ^a	SW-480 ^b	KB-3-1 ^c
Tubulysin D ^d	0.056	0.022	0.07
A	0.24	0.30	0.25
B	3.5	0.91	1.8
C	0.3	0.35	0.22
D	2.2	0.35	1.5
E	0.040	0.010	0.029
F	120	15	80
G	45	8.8	40
H	0.25	0.057	0.22
I	0.23	0.016	0.13
J	1.7	0.50	1.2

[a] Maus-Fibroblasten (DSMZ ACC 2), [b] Humanes Kolon-Adenokarzinom (ATCC CCL-228), [c] Humanes Cervix-Karzinom (DSMZ ACC 158), [d] Synthetisches Tubulysin D^[28], die IC₅₀-Werte von isoliertem Tubulysin D lagen zwischen 0.01-0.03 ng/ml in L-929- und bei 0.02 ng/ml in KB-3-1-Zellen.

Die Untersuchungen zeigten, dass am *C*-Terminus von Tubulysin D (**A-D**) eine Reihe von Modifikationen möglich sind. Die beachtliche Toleranz an dieser Stelle für große (**A** und **B**) und kleine Reste (**C** und **D**), sowie für hydrophobe (**A**) als auch für hydrophile Funktionen (**B** und **D**) ist von großer Bedeutung, denn dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der *C*-Terminus, wie bereits in Kapitel 2.3 vermutet, eine geeignete Stelle im Tubulysin ist, um Modifikationen vorzunehmen und Moleküle wie z. B. Antikörper oder fluoreszierende Stoffe anzubringen. Die Modifikationen am *N*-Terminus zeigten, dass ein basisches Amin an dieser Stelle sehr wichtig ist, da der Austausch von Mep durch Acetat einen deutlichen Aktivitätsverlust zur Folge hatte (**F**). Allerdings ist es möglich, Mep durch das kleinere, achirale *N,N*-Dimethylglycin zu ersetzen, da **E** sich als gleich wirksam wie Tubulysin D erwiesen hat. Am meisten überraschten **H** und **I**. Beide zeigten nur geringfügigen Aktivitätsabfall, was klar darauf hindeutet, dass weder die *O*-Acetylgruppe, noch das *N,O*-Acetal notwendig für die cytotoxische Wirkung der Tubulysine sind.

Als nächstes synthetisierten Patterson *et al.* ein Derivat **J** (Abb. 2.14), das die Vereinfachungen von **C** und **I** kombiniert, da herausgefunden werden sollte, ob die zuvor bestimmten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) additiv sind. Mit einem IC₅₀-Wert von 1.7 ng/ml zeigt **J** eine hohe Wirksamkeit, ist mit einem Molekulargewicht von 551 g/mol bedeutend leichter als Tubulysin D (827 g/mol) und wegen dem Austausch des *N,O*-Acetals durch die *N*-Methylgruppe um einiges stabiler und leichter zu synthetisieren. Für die Derivate

I und **J** wurde daher eine verbesserte Synthese entwickelt,^[49] da die erste Synthese stark von der durch das *N,O*-Acetal bedingten Schutzgruppen-Problematik geprägt war.

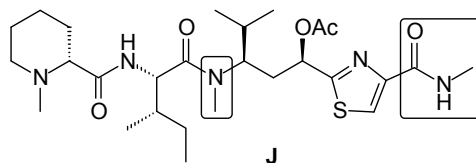
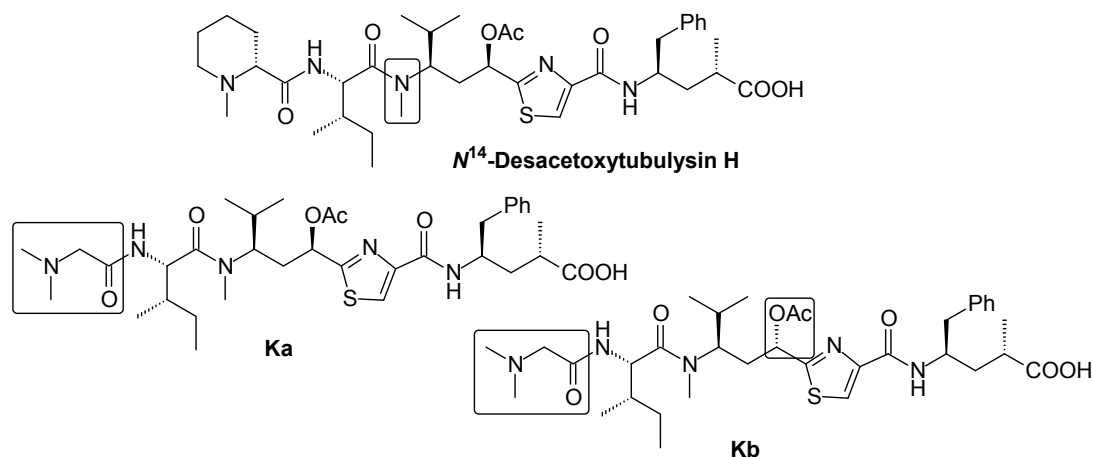


Abbildung 2.14 Tubulysin D-Analogon **J**

Wipf *et al.* berichteten bereits von der Synthese des von ihnen ¹⁴N-Desacetyoxytubulysin **H** genannten Derivats **I**.^[38] Ferner synthetisierten sie noch zwei Derivate **Ka** und **Kb** (Abbildung 2.15), die sich von **I** dadurch unterscheiden, dass Mep durch das einfachere *N,N*-Dimethylglycin ausgetauscht wurde.^[50] Da sie auch mehr über die Bedeutung der Acetatgruppe an C¹¹ herausfinden wollten, die ein labiles Stereozentrum in die Struktur bringt und somit auch die Synthese der Tubulysine erschwert, unterscheiden sich **Ka** und **Kb** in der Konfiguration an C¹¹. Die durchgeführten Tests an T98G-Zellen^[a] ergaben, dass das labile *N,O*-Acetal, wie auch von der Ellman-Gruppe gezeigt, nicht essentiell für die biologische Aktivität der Tubulysine ist. Der für **I** bestimmte GI₅₀-Wert^[b] liegt bei 1.6 nM, **I** weist also auch hier noch eine hohe biologische Aktivität auf. Im Gegensatz zu **E**, das noch etwa gleich wirksam wie Tubulysin D ist (Tabelle 2.1), führt hier der Austausch von Mep durch *N,N*-Dimethylglycin in **Ka** zu einem signifikanten Aktivitätsverlust. Werden die Effekte auf isoliertes Tubulin betrachtet, macht sich der Konfigurationsunterschied an C¹¹ in **Ka** und **Kb** deutlich bemerkbar (die natürliche (*R*)-Konfiguration in **Ka** wird deutlich bevorzugt), die Unterschiede in den GI₅₀-Werten von **Ka** und **Kb** sind dagegen unbedeutender (GI₅₀(**Ka**) = 350 nM, GI₅₀(**Kb**) = 400 nM).

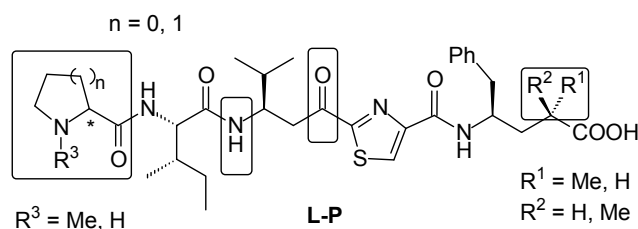


[a] T98G-Zelllinie: Humane Glioblastom-Zellen

[b] GI₅₀: 50 % growth inhibitory concentration. Beim GI₅₀ wird der hemmende Effekt auf das Nettowachstum betrachtet, beim IC₅₀ wird er auf das gesamte Zellwachstum bezogen.

Abbildung 2.15 Tubulysin-Derivate nach Wipf

Die Gruppe von Fecik beschäftigte sich auch mit Struktur-Aktivitätsstudien von vereinfachten Tubulysin-Derivaten **L-P** mit dem Ziel, die minimalen Anforderungen der Struktur für ihre Cytotoxizität herauszufinden (Abb. 2.16). Das *N,O*-Acetal sowie das *O*-Acetat wurden als nicht notwendig erachtet und durch ein normales NH bzw. durch eine Carbonyl-Gruppe ersetzt. Die Effekte auf Veränderungen der *N*-Methylpipercolinsäure (Mep) wie Ringgröße ($n = 0,1 \rightarrow$ Pro und Pip), *N*-Substitution ($R^3 = \text{Me, H} \rightarrow$ MePro/Mep und Pro/Pip) und Konfiguration (*, (*R*) und (*S*)) sollten untersucht werden.^[51] Zudem wurde in einigen Strukturen Tubuphenylalanin durch Eliminieren des Stereozentrums vereinfacht, indem Tup mit gleichen Resten R^1 und R^2 ($R^1 = R^2 = \text{H, Me}$) synthetisiert und eingebaut wurde.^[52]

Abbildung 2.16 Tubulysin-Derivate **L-P** nach Fecik

Die Cytotoxizität der Tubulysin-Derivate **La-Pb** wurde als IC_{50} -Wert in 1A9 Ovarial-Krebszellen gemessen (Tabelle 2.2). Als Positivkontrolle diente das Hemiasterlin-Analogon HTI-286 (SPA110),^[53] welches ebenfalls ein Inhibitor der Tubulin-Polymerisation ist. Vergleich der Ergebnisse für **La-Ld** und **Ma-Mb** zeigt, dass am *N*-Terminus ein tertiäres Amin nötig ist. Verbindungen mit (*S*)-konfigurierter Aminosäure an dieser Stelle (**Lb** und **Ld**) sind etwa zwanzigfach weniger aktiv als Verbindungen mit (*R*)-konfigurierter Aminosäure (**La** und **Lc**). Die Ringgröße von Mep kann variiert werden, die Wirksamkeit von Verbindung **La** mit *N*-Methyl-*D*-Prolin ist in etwa genauso hoch wie die von Verbindung **Lc** mit *N*-Methyl-*D*-Pipercolinsäure. Die Cytotoxizitäten von **La** und **Lc** zeigen zudem, dass Veränderungen im Tuv-Teil des Tubulysins möglich sind. Das tertiäre Amid ist nicht unbedingt nötig und die *O*-Acetyl-Gruppe kann durch ein Keton ersetzt werden. Jedoch sollte bei diesen Betrachtungen beachtet werden, dass sich die IC_{50} -Werte dieser Verbindungen (**La-Ld**) im mikromolaren bis oberen nanomolaren Bereich bewegen, während die Werte der Tubulysin D-Analoga (**A-J**, mit Ausnahme von **F** und **G**) eher im unteren nanomolaren bis picomolaren Bereich liegen. Um die Substanzen **La-Ld** und **A-I** jedoch wirklich miteinander vergleichen zu können, müssten die Cytotoxizitäten nach der gleichen Methode, mit den gleichen Zelllinien und unter identischen Bedingungen bestimmt werden.

An Verbindungen **Na-Ob**, die keine Methylgruppe an C^2 tragen, kann ebenfalls erkannt werden, dass *N*-Methylgruppe und *D*-Konfiguration entscheidend sind und die Ringgröße mit geringem Aktivitätsverlust von Pip zu Pro variiert werden kann. Verbindungen mit geminaler

Dimethylgruppe im Tup **Pa** und **Pb** zeigten ebenfalls eine um den Faktor 10 geringere Wirksamkeit beim Wechsel von Pip zu Pro. Die IC_{50} -Werte liegen im gleichen Bereich wie die der entsprechenden monomethylierten Derivate **L**, die der α -unsubstituierten Tup-Derivate **Na** und **Nc** sind etwa um eine Zehnerpotenz weniger aktiv.

Tabelle 2.2 Biologische Aktivität der Verbindungen **L-P**

Verbindung	R ¹	R ²	R ³	n	abs. Konf. (*)	IC_{50} [μ M] ^[a]
La	Me	H	MeHCl	1	<i>R</i>	0.8 ^[b]
Lb	Me	H	MeHCl	1	<i>S</i>	18 ^[b]
Lc	Me	H	MeHCl	2	<i>R</i>	0.2 ^[b]
Ld	Me	H	MeHCl	2	<i>S</i>	25 ^[b]
Ma	Me	H	H ⁺ HCl	1	<i>R</i>	>33 ^[b]
Mb	Me	H	H ⁺ HCl	1	<i>S</i>	>33 ^[b]
Mc	Me	H	H ⁺ HCl	2	<i>R</i>	23 ^[b]
Md	Me	H	H ⁺ HCl	2	<i>S</i>	24 ^[b]
Na	H	H	MeHCl	1	<i>R</i>	24 ^[c]
Nb	H	H	MeHCl	1	<i>S</i>	50 ^[c]
Nc	H	H	MeHCl	2	<i>R</i>	4 ^[c]
Nd	H	H	MeHCl	2	<i>S</i>	>50 ^[c]
Oa	H	H	H ⁺ HCl	2	<i>R</i>	>50 ^[c]
Ob	H	H	H ⁺ HCl	2	<i>S</i>	>50 ^[c]
Pa	Me	Me	MeHCl	1	<i>R</i>	3.2 ^[c]
Pb	Me	Me	MeHCl	2	<i>R</i>	0.3 ^[c]
HTI-286 (SPA110)						0.03 nM ^[b]
						0.3 nM ^[c]

[a] IC_{50} in 1A9 Ovarial-Krebszellen bestimmt. [b] Bei einer maximalen Wirkstoffkonzentration von 33 μ M in DMSO. [c] Bei einer maximalen Wirkstoffkonzentration von 50 μ M in DMSO.

2.6 Folsäure-Konjugate von Tubulysin und seinen Hydraziden

Tubulysine sind außergewöhnlich wirksame cytotoxische Moleküle. Ihre Fähigkeit, das Zellwachstum zu inhibieren, übersteigt die von Etoposid, Paclitaxel und Vinblastin um das 20- bis 1000-fache. Jedoch gerade wegen der starken Wirkung ist natürliches Tubulysin allein nicht unbedingt geeignet für die klinische Entwicklung (sehr enges therapeutisches Fenster).

Eine Möglichkeit, die Effizienz von Cytostatika zu steigern und Nebenwirkungen durch Beeinträchtigung gesunder Zellen zu mindern, ist die gezielte Anreicherung des Wirkstoffs in

der Tumorzelle, ein Prozess, der als *drug targeting* bezeichnet wird. Hierbei wird der Wirkstoff mit Hilfe unterschiedlicher Träger (Vektoren) an seinen Zielort gebracht. Als Träger dienen beispielsweise monoklonale Antikörper, Peptide, Polysaccharide, Lipid- oder Nanopartikel. Krebszellen überexprimieren häufig tumorspezifische Antigene, Zuckerstrukturen oder Wachstumsfaktorrezeptoren an ihrer Oberfläche. Diese Eigenschaften können beim *drug targeting* genutzt werden, indem Arzneistoffe an Vektormoleküle mit hoher Affinität zu diesen Strukturen gekoppelt werden.

Einen geeigneten Wirkstoffträger stellt das Vitamin Folsäure dar.^[54] Es bindet mit hoher Affinität an ein in der Zelloberfläche verankertes Glycoprotein, den in Krebszellen überexprimierten Folatrezeptor (FR), und wird durch FR-vermittelte Endocytose in die Zelle transportiert. Da Folsäure-Konjugate gleichermaßen in die Zelle aufgenommen werden, kann Folsäure als molekulares „Trojanisches Pferd“ für den gezielten Transport von kovalent gebundenen, biologisch aktiven Molekülen betrachtet werden. Nach Anbindung an den Rezeptor umschließt die Plasma-Membran den Folsäure-Konjugat/Rezeptor-Komplex und bildet durch Umstülpen ein frühes Endosom, ein Vesikel in der Zelle. Spezielle Protonenpumpen in der Membran des Endosoms erniedrigen den pH des Vesikellumens und bewirken somit ein Loslösen des im Endosom gebundenen Folsäure-Konjugats vom FR. Der Rezeptor wird in einem exocytischen Vorgang wieder aus der Zelle geschleust, während das Folsäure-Konjugat in der Zelle verbleibt (Abb. 2.17).

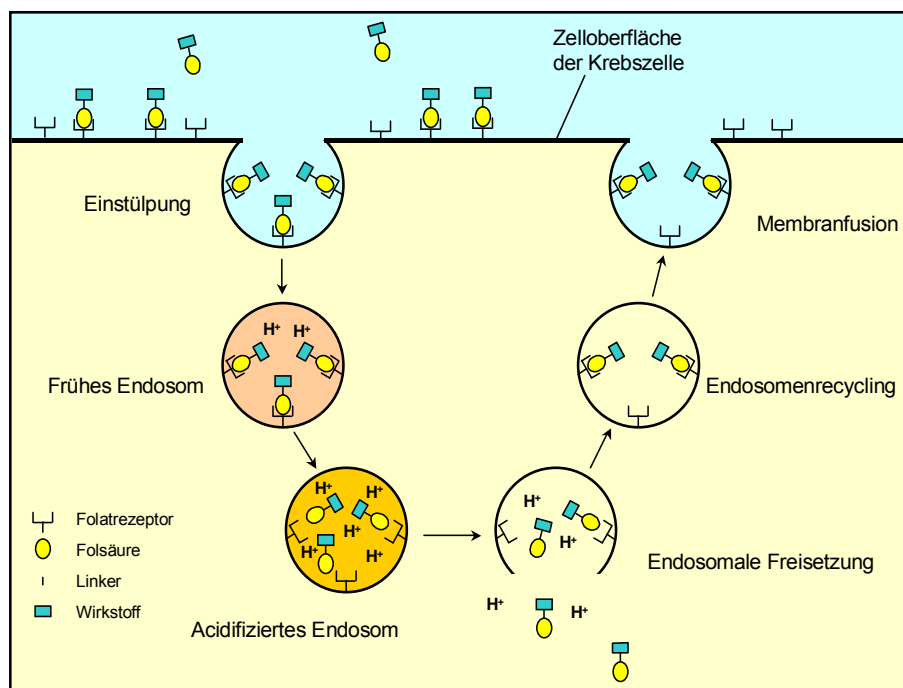


Abbildung 2.17 Folsäure-vermittelter Transport von therapeutischen Wirkstoffen zu FR-positiven Krebszellen^[54]

Folsäure wird für den C¹-Transfer in einigen Stoffwechselreaktionen benötigt. Vor allem ist sie essentiell für die Biosynthese von Nukleobasen, so dass sich stark teilende Zellen einen

hohen Bedarf an Folsäure haben. Normale Zellen werden durch zwei Membran-assoziierte Proteine, dem *Reduced Folate Carrier* (RFC) und dem Folatrezeptor (FR) mit Folsäure versorgt. RFC ist in nahezu allen Zellen vorhanden und stellt somit den Hauptweg der Folsäureaufnahme dar. FR findet sich hauptsächlich an polarisierten Epithelzellen und aktivierten Makrophagen. Für normale Zellen reicht eine geringe Konzentration von RFC vermutlich aus, Krebszellen hingegen überexprimieren FR häufig, um die erhöhte Nachfrage nach Folsäure decken zu können. Zudem qualifiziert sich der FR als Tumor-spezifische Zielscheibe, weil er im Allgemeinen erst für intravenöse Wirkstoffe zugänglich ist, nachdem die Zelle bösartig geworden ist.^[54]

Die amerikanische Firma *Endocyte Inc.* synthetisierte Folsäure-Konjugate von Tubulysin (**A** und **B**) und Tubulysin-Hydraziden (**C** und **D**) (Abb. 2.18).^[55] Tubulysin A oder B (bzw. deren Hydrazide) sind über einen sich selbst opfernden Linker, der eine reduzierbare Disulfidbindung enthält (Disulfid-Linker), und einem Tetrapeptid als Zwischenstück (Peptid-Spacer) mit Folsäure verknüpft. Mit Hilfe der FRET-Technik^[a] (Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer) konnte bereits an lebenden Zellen gezeigt werden, dass die Reduktion der Disulfidbrücke des Folsäure-Konjugat-Linkers und somit die Freisetzung des Substrats in den Endosomen von Krebszellen stattfindet.^[56] Der Peptid-Spacer zwischen Folsäure und Disulfid-Linker besteht aus sauren (Asp) und basischen Aminosäuren (Arg), um für eine gute Wasserlöslichkeit des Wirkstoff-Konjugats unter physiologischen Bedingungen zu sorgen.

Neben Tubulysin haben Vlahov *et al.* bereits ein Vinblastin-Derivat als Folsäure-Konjugat entwickelt,^[57] welches sich derzeit unter der Bezeichnung EC145 in klinischer Phase II befindet. Die Tubulysin-Konjugate **A-D** scheinen auch vielversprechend zu sein, denn die Ergebnisse aus Tests gegen eine Vielzahl von FR-positiven Zelllinien und aus Tierversuchen von Tubulysin B-Hydrazid-Konjugat **D** zeigen, dass dieses dauerhaft und spezifisch auf Tumoren und ohne signifikante Toxizität auf die Maus, die das Tumormimplantat trägt, wirkt.^[58]

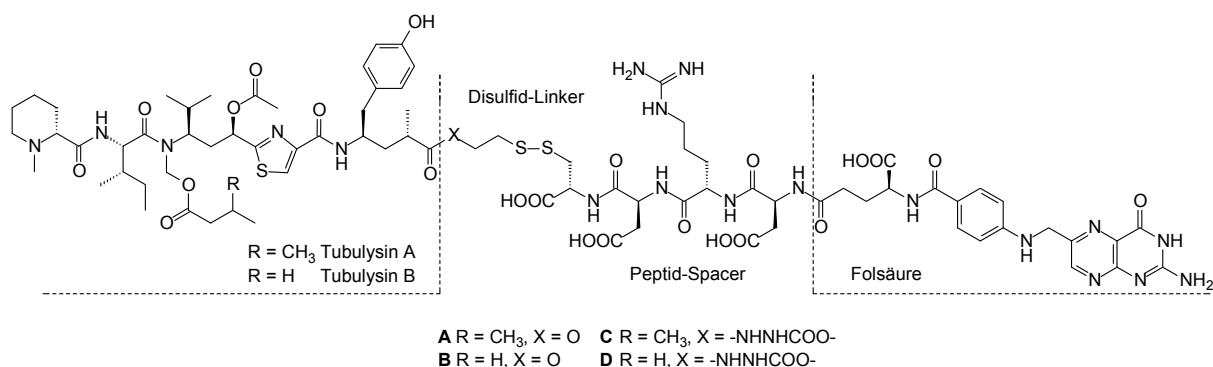


Abbildung 2.18 Tubulysin-Folsäure-Konjugate

[a] Mit Hilfe von FRET kann die Entfernung zwischen zwei Teilen eines Proteins gemessen werden. FRET basiert auf der Tatsache, dass die Anregungsenergie von einer fluoreszierenden Gruppe (Donator) auf eine andere (Akzeptor) übertragen werden kann, sofern sich die beiden Gruppen in nächster Nähe zueinander befinden (ca. 1-10 nm).

2.7 Biosynthese bakterieller Naturstoffe durch Polyketidsynthetasen und nichtribosomale Peptidsynthetasen

Viele Sekundärmetabolite zeichnen sich durch ein Polyketid- oder Polypeptid-Grundgerüst aus und werden von Megaenzymen, den Polyketidsynthetasen (PKS) und den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), gebildet. In Abbildung 2.19 sind einige solcher Polyketide und Peptide gezeigt, die zum Teil auch durch ein PKS-NRPS-Hybridsystem synthetisiert werden.

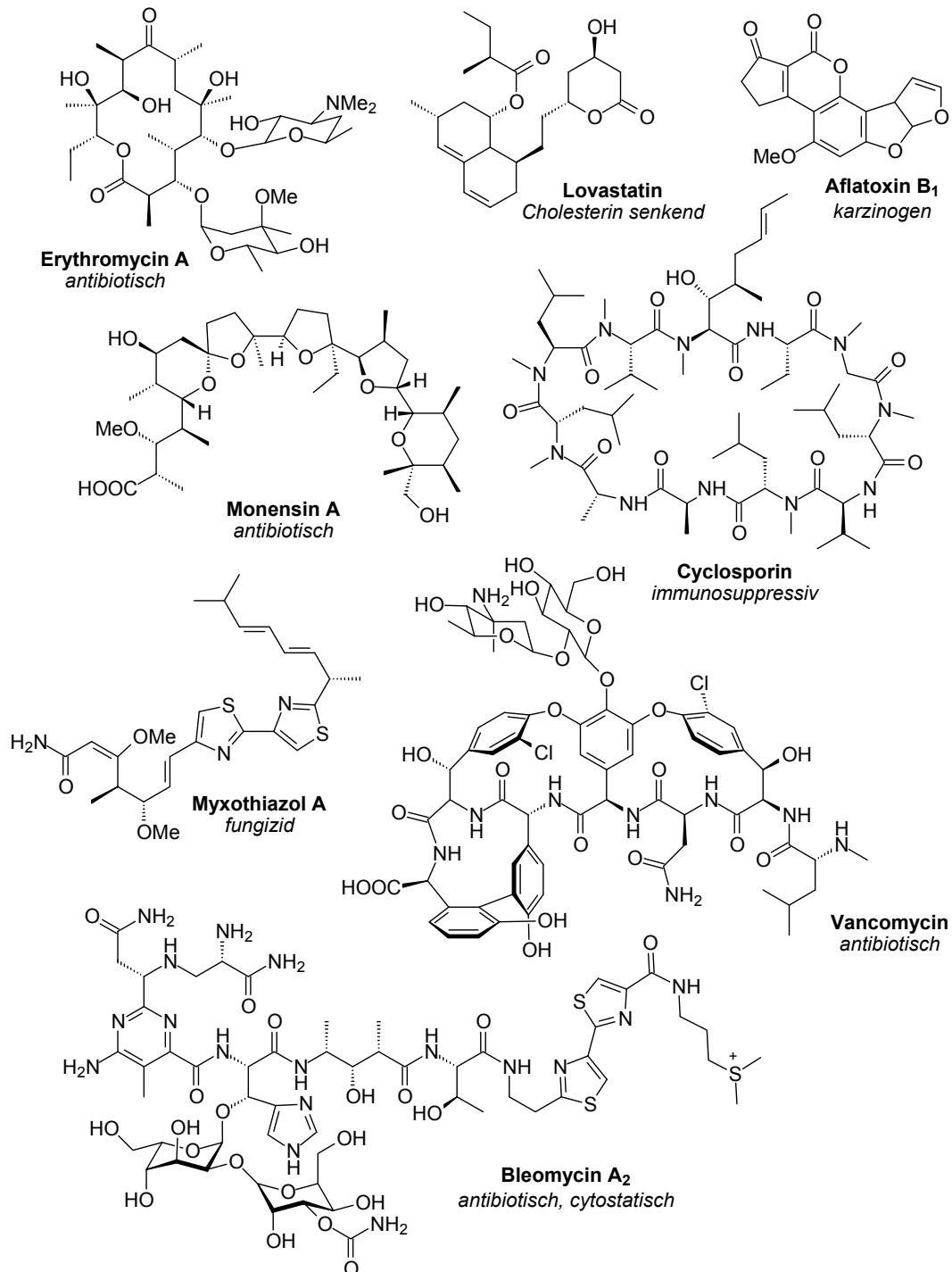


Abbildung 2.19 Einige Polyketide und Polypeptide mit biologischer Aktivität

2.7.1 Funktionsweise von Polyketidsynthasen^[59]

Die Biosynthese von Polyketiden ähnelt der Fettsäurebiosynthese, jedoch wird dadurch, dass die Reduktion der Ketogruppe optional ist, eine große Strukturdiversität erzielt. Bakterielle Polyketidsynthasen können in drei Typen (I-III) unterteilt werden.

Polyketidsynthasen des Typ I sind multifunktionale Proteine, die modular aufgebaut sind. Ein Modul ist eine funktionelle Einheit, die für Auswahl, Einbau und Modifizierung zuständig ist. Die Untereinheiten eines Moduls, essentielle und eventuell optionale Domänen, katalysieren die einzelnen Teilschritte zur Verlängerung der wachsenden Molekülkette. Jedes Modul wird im Verlauf der Biosynthese nur einmal genutzt. Nach Einbau des letzten Monomers wird das lineare Intermediat durch Hydrolyse oder Cyclisierung vom Protein abgespalten, was von der Thioesterase-Domäne (TE) katalysiert wird. Die für die einzelnen Module kodierenden Gene befinden sich nah beieinander in einem Gencluster.

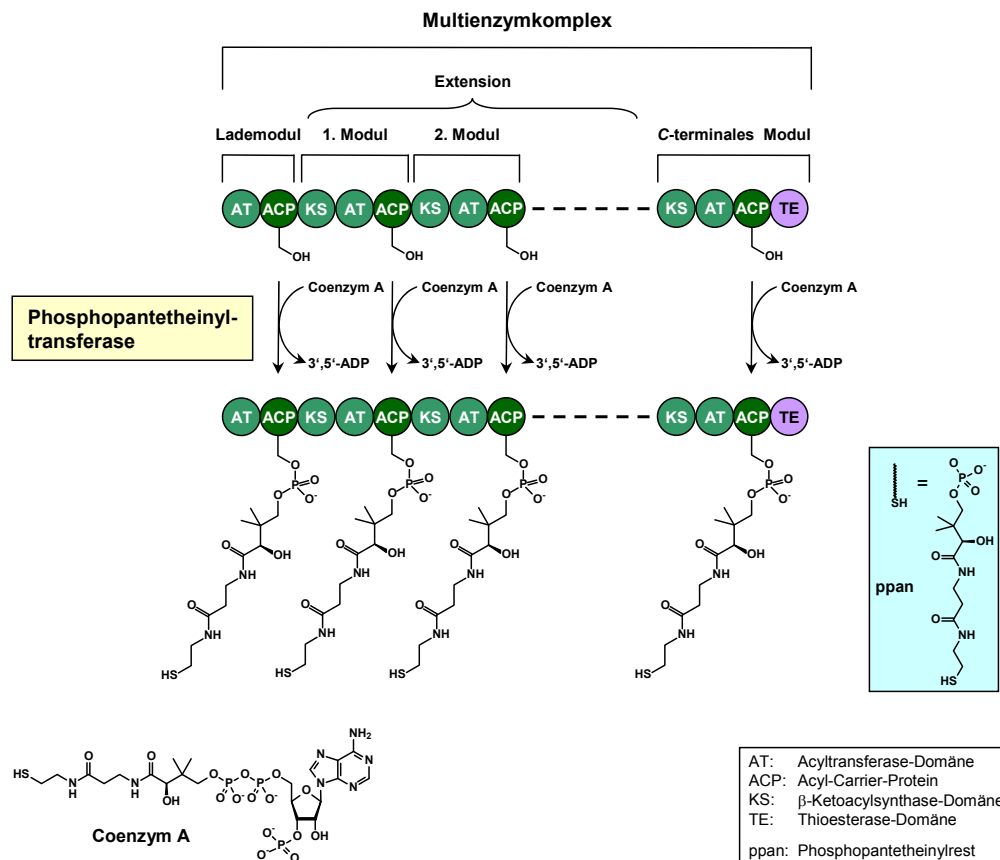


Abbildung 2.20 Posttranslationale Aktivierung des Multienzymkomplexes durch Übertragung eines Phosphopantetheinylrestes (ppan) auf die ACP-Domänen

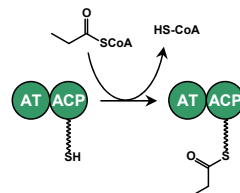
Das wachsende Intermediat ist während der ganzen Biosynthese kovalent an den Multienzymkomplex gebunden. Verantwortlich für die Verknüpfung und die Übertragung der Intermediate von einem Modul auf das nächste ist die Acyl-Carrier-Protein-Domäne (ACP). Bei den nichtribosomalen Peptidsynthetasen findet sich eine Domäne mit vergleichbaren

Funktionen, die Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP). Diese Domänen müssen posttranslational modifiziert werden, um ihre Aufgaben ausführen zu können (Abbildung 2.20). Um ein Carrier-Protein von der inaktiven Apo- in die aktive Holo-Form zu überführen, überträgt eine Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) unter Abspaltung von 3',5'-ADP einen Phosphopantetheinylrest (ppan) von Coenzym A auf einen konservierten Serinrest der Carrier-Protein-Domäne (ACP bzw. PCP).^[60] Über die Thiolgruppe des Phosphopantetheinylarms werden die Kettenverlängerungseinheiten als Thioester gebunden. In der Modellvorstellung fungiert der Phosphopantetheinylrest als schwingender Arm, der die Intermediate von einem zum nächsten Modul weiterreicht.

Außer der ACP-Domäne gehören auch eine Acyltransferase- (AT), sowie eine β -Ketoacylsynthase-Domäne (KS) zur Grundausrüstung eines Moduls (Abbildung 2.20). Diese drei Kerndomänen werden für die Verlängerung der wachsenden Ketidkette um einen C_2 -Baustein benötigt. Das Lademodul besteht im Gegensatz zu den Extensionsmodulen nur aus einer AT- und einer ACP-Domäne.

Zu Beginn der Biosynthese werden die ACP-Domänen substratspezifisch von den AT-Domänen beladen (Abbildung 2.21). Beim Lademodul dienen dazu CoA-Thioester kurzkettiger Carbonsäuren (Acetyl- oder Propionyl-CoA), bei den Extensionsmodulen Malonyl-CoA oder Methylmalonyl-CoA. Die β -Ketoacylsynthase-Domäne (KS) katalysiert die Verknüpfung der einzelnen Carbonsäuren, indem sie mit einem Cysteinrest der KS des ersten Verlängerungsmoduls am Thioester der Startereinheit angreift und den Acylrest ebenfalls als Thioester bindet. Durch Decarboxylierung der am nächsten ACP gebundenen α -Dicarbonsäure entsteht ein Carbanion, welches am Thioester der KS-Domäne nucleophil angreift. Das Diketid dient nun bei der Kettenverlängerung im nächsten Modul als Donor. Die Reaktionsfolge wiederholt sich, bis alle Module durchlaufen worden sind und das fertige Polyketid von der Thioesterase-Domäne (TE) vom Enzymkomplex abgespalten wird.

Beladen der Acyl Carrier Protein (ACP) Domäne – Start der Polyketidbiosynthese



Die Ketoacylsynthase (KS) katalysiert die Ketidbildung – Kettenverlängerungsphase während der Polyketidbiosynthese

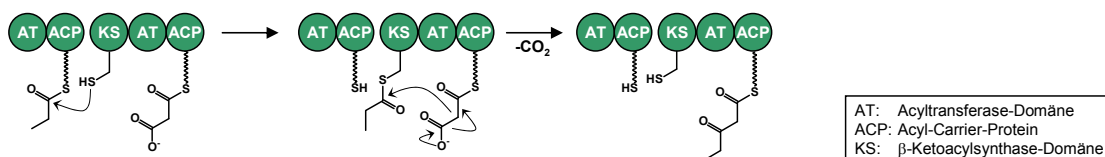


Abbildung 2.21 Reaktionsabfolge der Polyketidbiosynthese

Die entstandenen β -Carbonylgruppen des Polyketids können durch optionale Domänen reduziert werden (Abbildung 2.22). Diese Domänen befinden sich im jeweiligen Modul und bilden eine „reduktive Schleife“. Eine NADPH-abhängige β -Ketoacylreduktase-Domäne (KR) kann die β -Ketogruppe zum sekundären Alkohol reduzieren, welcher durch eine β -Hydroxy-Dehydratase-Domäne (DH) unter Wasserabspaltung zum Enoyl umgesetzt werden kann. Mit Hilfe von NADPH kann eine Enoylreduktase-Domäne (ER) das Enoyl zum Alkanoyl reduzieren. Im Gegensatz zur Fettsäurebiosynthese, bei der immer eine komplette Reduktion auf die Alkanoylstufe erfolgt, können im entstandenen Polyketid sämtliche Reduktionsstufen auftreten.

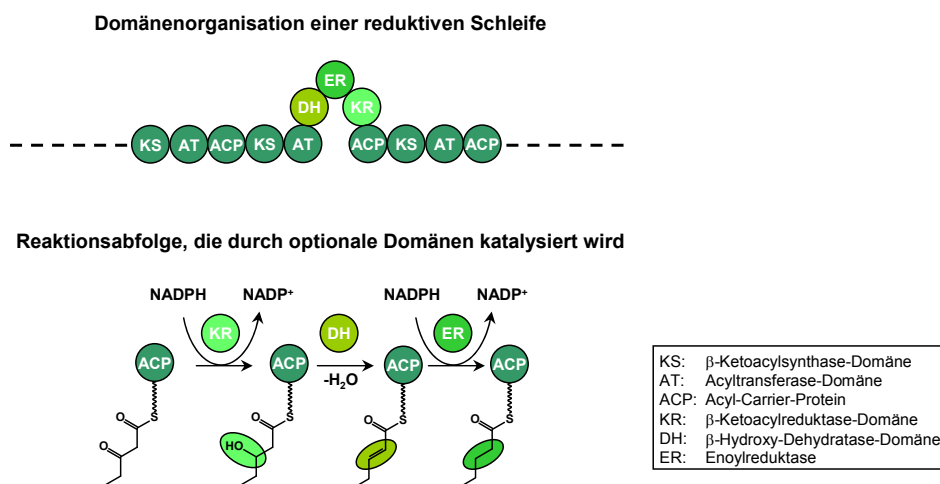


Abbildung 2.22 Optionale Domänen der Polyketidsynthesen

Im Unterschied zur bakteriellen Typ I PKS werden die Module der PKS Typ I in Pilzen iterativ genutzt. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass Pilze kein Methylmalonyl-CoA einbauen, eine Methylgruppe in 2-Position wird stattdessen durch eine S-Adenosyl-Methionin-(SAM)-abhängige Methyltransferase eingeführt. Ein Beispiel für ein Typ I Polyketid aus Pilzen ist Lovastatin (Abbildung 2.19).

Bei Polyketidsynthesen vom Typ II verlängert eine iterativ genutzte Minimal-PKS das wachsende Intermediat, wobei ausschließlich Malonyl-CoA verwendet wird. Die Minimal-PKS besteht aus Ketosynthase α (KS_{α}), Ketosynthase β (KS_{β}) und Acyl-Carrier-Protein (ACP), im Unterschied zu Polyketidsynthesen vom Typ I gibt es keine optionale „reduktive Schleife“. Aus den Poly- β -ketosäuren entstehen über Cyclisierungen und Enolisierungen aromatische, häufig polycyclische Polyketide (z. B. Tetracenomycin, Chrysophanol).

Bakterielle Polyketidsynthesen vom Typ III ähneln pflanzlichen Chalconsynthesen.^[61] Von dieser Enzymklasse werden ebenfalls CoA-Einheiten durch decarboxylierende Kondensation verknüpft. Allerdings werden keine an einen Phosphopantetheinrest gebundenen Intermediate, sondern freie CoA-Ester als Substrate verwendet.

2.7.2 Funktionsweise von nichtribosomalen Peptidsynthetasen^[62]

Nichtribosomale Peptidsynthetasen sind ähnlich wie Polyketidsynthetasen aufgebaut.^[63] Ebenso wie bei diesen besteht der multifunktionale Enzymkomplex aus aneinander gereihten Modulen, die für die Verlängerung des wachsenden Intermediats benötigt werden. Neben den proteinogenen Aminosäuren werden auch zahlreiche nichtproteinogene Aminosäuren als Synthesebausteine verwendet. Ein typisches Minimalmodul setzt sich aus Adenylierungsdomäne (A), Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP) und Kondensationsdomäne (C) zusammen (Abbildung 2.23).

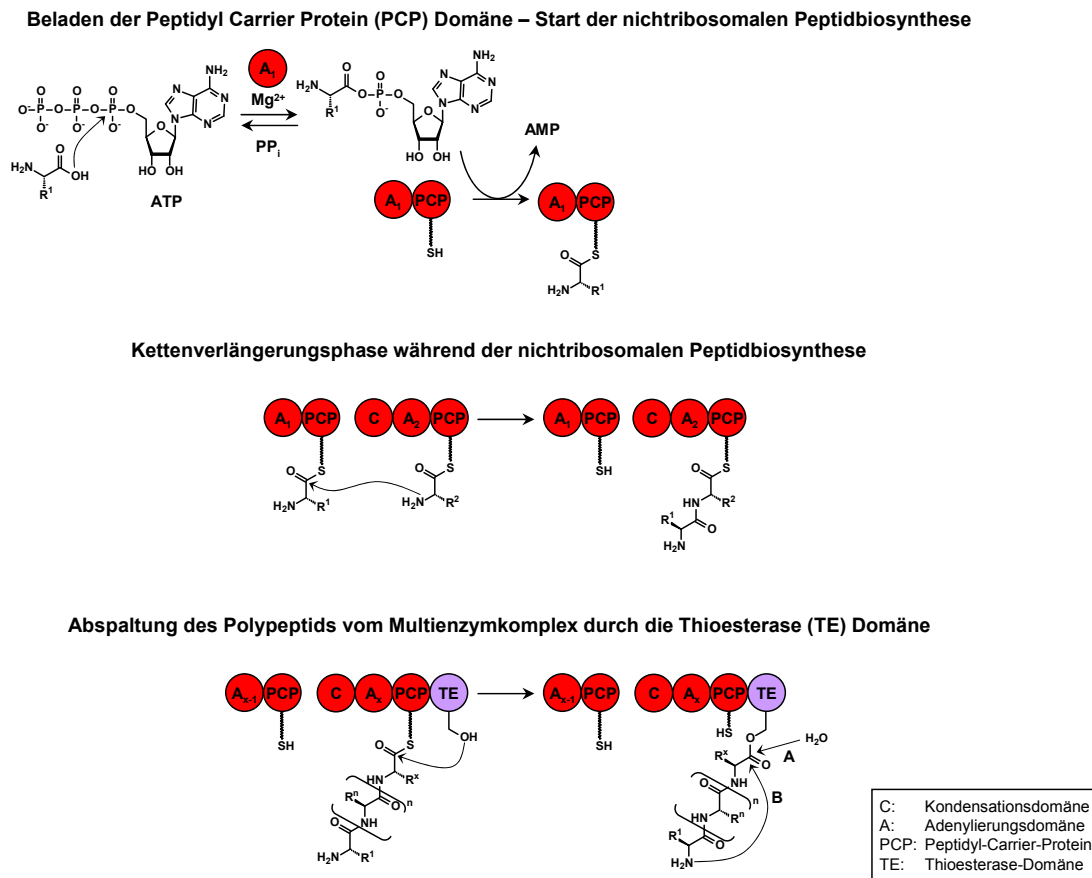


Abbildung 2.23 Reaktionsabfolge der nichtribosomalen Peptidbiosynthese

Wie bei den Polyketidsynthetasen besteht das Lademodul nur aus einer A- und einer PCP-Domäne. Die A-Domäne ist für die spezifische Substraterkennung und dessen ATP-abhängige Aktivierung als energiereiches Aminoacyladenylat zuständig. Die Substratspezifität der A-Domäne wird von acht nicht konservierten Aminosäuren innerhalb der hydrophoben Bindetasche bestimmt.^[64] Durch Vergleich dieser Aminosäuren von ungefähr 150 A-Domänen konnte der Spezifitätsschlüssel der A-Domänen entschlüsselt werden,^[65] so dass eine Vorhersage der Substratspezifität möglich wurde. Die aktivierten Aminosäuren werden dann auf den Phosphopantetheinylrest der PCP-Domäne transferiert und dort als aktivierte Thioester kovalent gebunden. Die C-Domäne katalysiert den nucleophilen Angriff

der Aminogruppe eines Aminoacylrestes auf die Carbonylgruppe des am vorgelagerten Modul gebundenen Peptidyl- oder Aminoacylrestes, wodurch die Peptidbindung entsteht. In dieser Verlängerungsreaktion wächst die Peptidkette um einen Baustein. Am letzten Modul ist eine Thioesterase (TE) lokalisiert, welche das lineare Polypeptid durch Hydrolyse (Möglichkeit A) oder durch Makrolactamisierung (Möglichkeit B) vom Multienzymkomplex abspaltet.

Die enorme strukturelle Vielfalt der nichtribosomal synthetisierten Peptide wird durch modifizierende Domänen hervorgerufen, die optional in den Modulen auftreten können (Abbildung 2.24). Hierzu gehören beispielsweise Epimerisierungsdomänen (E), Methyltransferase-Domänen (MT), Heterocyclisierungsdomänen (HC) und Oxidations- oder Reduktionsdomänen (Ox) bzw. (R). Die Epimerisierungsdomänen (E) katalysieren die Racemisierung eines enzymgebundenen Aminoacyl-Adenylats und sorgen so für die Integration von *D*-konfigurierten Aminosäuren. Methyltransferasen (MT) übertragen eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf ein Kohlenstoff-, Sauerstoff- oder Stickstoffatom des Intermediats. Heterocyclisierungsdomänen (HC) ersetzen in den Modulen die C-Domäne, katalysieren zunächst die Peptidbindung mit Cystein oder Serin bzw. Threonin und die anschließende Heterocyclisierung zum entsprechenden Thiazolin bzw. Oxazolin. Diese können durch Oxidationsdomänen (Ox), die Bestandteile von A-Domänen sind oder sich C-terminal am PCP-Bereich des entsprechenden Moduls anschließen, in die vollständig ungesättigten Thiazole bzw. Oxazole überführt werden. Eine durch Reduktionsdomänen (R) katalysierte Reaktion führt zu den entsprechenden vollständig gesättigten Thiazolidinen bzw. Oxazolidinen. Diese R-Domänen sind jedoch keine integralen Bestandteile der Module, sondern externe Enzyme.

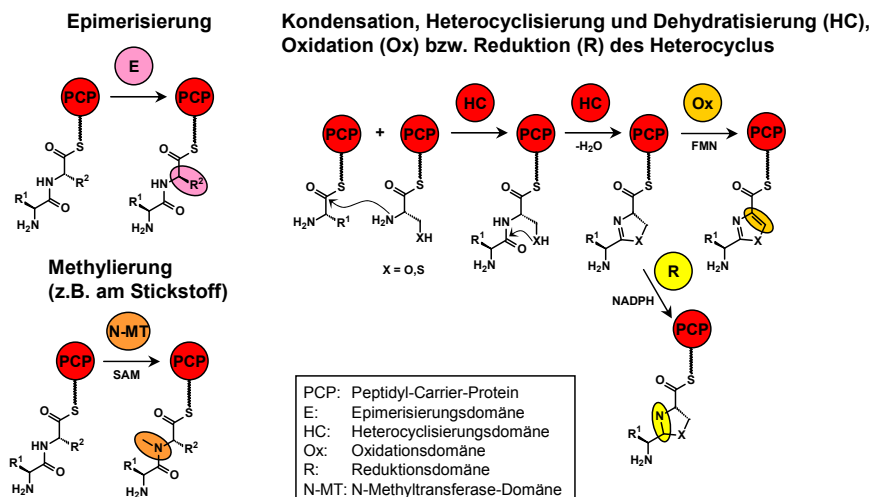


Abbildung 2.24 Optionale Domänen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen

2.7.3 Biosyntheseweg von Tubulyisin

Es gelang Sandmann *et al.*, den Tubulyisin-Biosynthesegencluster in *A. disciformis* An d48 zu identifizieren.^[9] Durch eine detaillierte Sequenzanalyse des Genclusters konnten sie Rückschlüsse auf den möglichen Biosyntheseweg von Tubulyisin ziehen (

Abbildung 2.25). Der Gencluster zeigt einen für Typ I PKS-/NRPS-Hybridcluster charakteristischen modularen Aufbau. In diesen Systemen verläuft die Biosynthese colinear, d. h. jedes Modul ist für den Einbau einer bestimmten Einheit in den Naturstoff verantwortlich. Zum Teil wurde eine Anordnung einiger Domänen gefunden, die von der bislang in der Literatur bekannten Domänenorganisation abweicht.

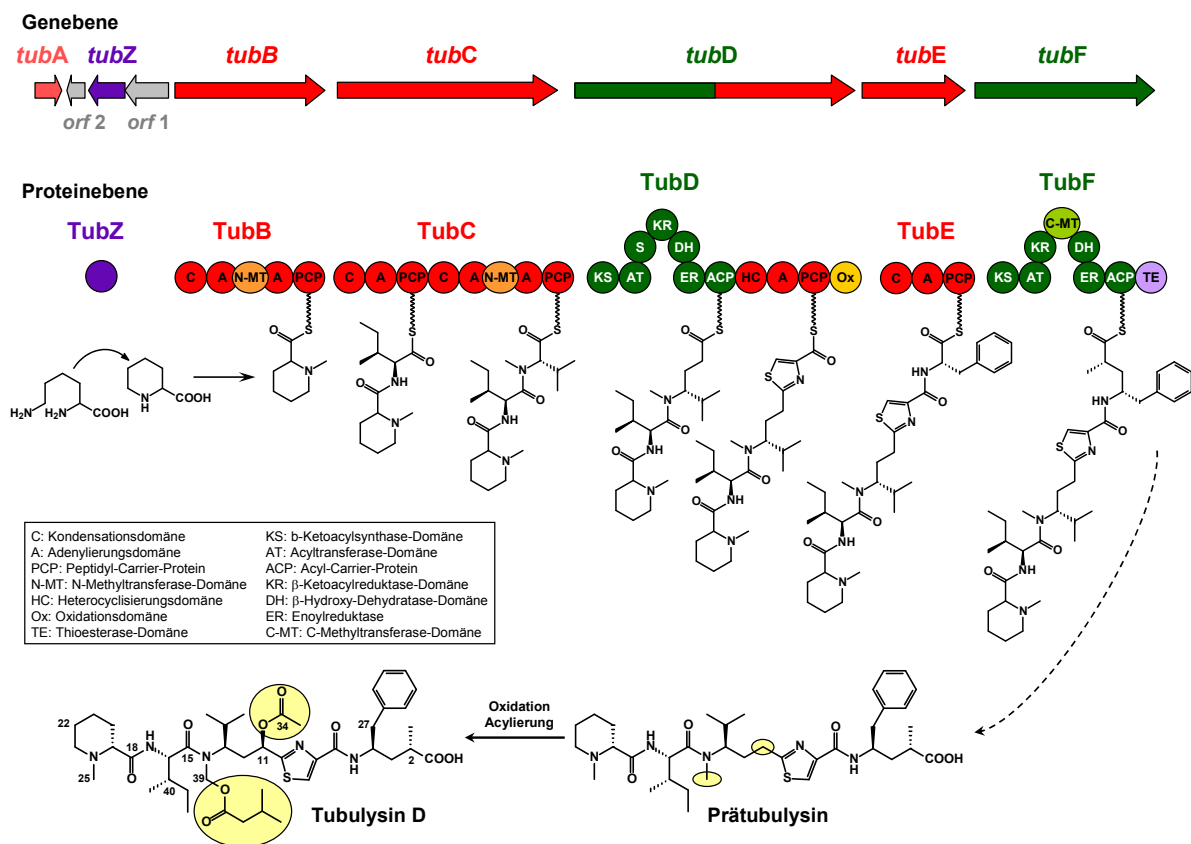
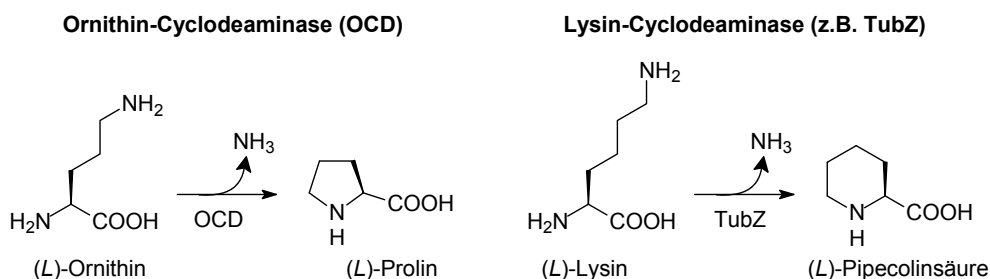


Abbildung 2.25 Modell der Tubulyisin-Biosynthese

Zu Beginn der Biosynthese wird Pipecolinsäure (Pip) gebildet. Es wird angenommen, dass *tubZ* für eine Lysin-Cyclodeaminase kodiert (Lysin \rightarrow Pipecolinsäure, Schema 2.17), da es ebenso wie *rapL* eine hohe Sequenzhomologie zu Ornithin-Cyclodeaminasen (Ornithin \rightarrow Prolin) aufweist. *rapL* wurde im Rapamycin-Biosynthesegencluster gefunden und ist für die Biosynthese der Pipecolinsäure des Rapamycins zuständig.^[66]

Pipecolinsäure als Startereinheit wird von der A-Domäne in TubB erkannt, auf das PCP des ersten NRPS-Moduls (Lademodul) transferiert und zudem N-methyliert. Innerhalb der A-Domäne befindet sich ein Proteinabschnitt, der homolog zu einem konservierten Motiv von S-

Adenosyl-Methionin-(SAM)-Bindestellen ist, und daher wohl als N-MT-Domäne fungiert. Normalerweise befindet sich die N-MT-Domäne zwischen A- und PCP-Domäne, es gibt aber auch Ausnahmen. Des Weiteren ist ungewöhnlich, dass im Lademodul eine zusätzliche C-Domäne gefunden wurde, deren Funktion unklar ist, möglicherweise spielt sie eine Rolle bei einer späteren Acylierung.



Schema 2.17 Ornithin-Cyclodeaminase und Lysin-Cyclodeaminase

tubC kodiert für zwei NRPS-Extensionsmodule, welche die *N*-methylierte Pipecolinsäure (Mep) um *L*-Isoleucin und *L*-Valin verlängern. Diese Extensionsmodule bestehen jeweils aus C-, A- und PCP-Domänen. Innerhalb der zweiten, Valin-spezifischen A-Domäne liegt eine N-MT-Domäne, welche der in TubB ähnelt und die *N*-Methylierung von Valin katalysiert.

Das Tripeptid wird nun an TubD weitergereicht, ein PKS-/NRPS-Hybrid. Das erste Modul ist eine PKS mit vollständiger „reduzierender Schleife“, welche ein Malonat verwendet, um das Intermediat um eine Acetat-Einheit zu verlängern. In der „reduktiven Schleife“ wurde eine im Vergleich zu Literatur-bekanntem Systemen veränderte Domänenorganisation gefunden. Ungewöhnlicherweise folgt die Domänenanordnung dem biochemischen Reaktionsverlauf von KR über DH zu ER, sonst liegen die Domänen meist in der Reihenfolge DH, ER, KR vor. Auch in der PKS TubF wurde die gleiche untypische Domänenorganisation gefunden. In der „reduktiven Schleife“ von TubD findet sich zudem noch eine „Spacer-Region“ S, von der angenommen wird, dass sie weniger eine katalytische als eine strukturelle, stabilisierende Funktion erfüllt. Dieser Spacer liegt auch nicht an der für ihn typischen Stelle zwischen DH und KR, sondern zwischen AT und KR. Die besondere Anordnung der Domänen in der „reduktiven Schleife“ muss eine Rolle in der dreidimensionalen Struktur von PKS- bzw. insbesondere von PKS-/NRPS-Hybrid-Systemen spielen und spiegelt die enorme Flexibilität dieser Multienzymkomplexe wider.

Das zweite Modul von TubD ist ein NRPS-Modul, bestehend aus HC-, einer Cystein-spezifischen A-, einer PCP- und einer Ox-Domäne. Die HC-Domäne überträgt das Intermediat auf die mit Cystein beladene PCP-Domäne und katalysiert die Bildung eines Thiazolins. Dieses wird von der hinter dem PCP liegenden Ox-Domäne zum Thiazol oxidiert.

Das nächste, von *tubE* kodierte NRPS-Modul besteht aus C-, A- und PCP-Domäne. Bei der A-Domäne konnte keine Präferenz für eine bestimmte Aminosäure festgestellt werden. Da die bislang identifizierten Tubulysine sich in ihrer Struktur an dieser Stelle durch den Einbau

von Tyrosin (Tubulylin A, B, C, G und I) und Phenylalanin (Tubulylin D, E, F und H) unterscheiden, scheint die A-Domäne aus TubE eine erweiterte Substraterkennung (Tyrosin und Phenylalanin) zu besitzen.

Für das letzte Modul der Tubulylin-Biosynthese kodiert *tubF*. Dabei handelt es sich um eine PKS, die aus KS, AT, ACP, sowie einer vollständigen „reduktiven Schleife“ besteht. Bei der „reduktiven Schleife“ sind die Domänen wie im PKS-Modul von TubD, also abweichend von Literatur bekannten Domänenorganisationen, angeordnet. Zusätzlich tritt zwischen KR und DH ein Proteinabschnitt auf, der Ähnlichkeiten zu (SAM)-abhängigen C-MT-Domänen aufweist. Diese C-MT-Domäne dient der Methylierung des β -Keto-Intermediats in α -Position. Prinzipiell wäre auch denkbar, dass statt der nachträglich methylierten Acetat-Einheit direkt Methylmalonyl-CoA als Substrat für die PKS dient. Durch Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markiertem Methionin konnten Steinmetz *et al.* jedoch schon zeigen, dass sowohl die Methylgruppe in α -Position zum C-Terminus sowie die N-Methylgruppen an Pipecolinsäure und Valin durch S-Adenosylmethionin-(SAM)-abhängige Methyltransferasen eingebaut werden (Abbildung 2.26).^[8] Zudem führte Fütterung von ^{13}C -markiertem Acetat zum Einbau von drei $^{13}\text{C}_2$ -Gruppen.

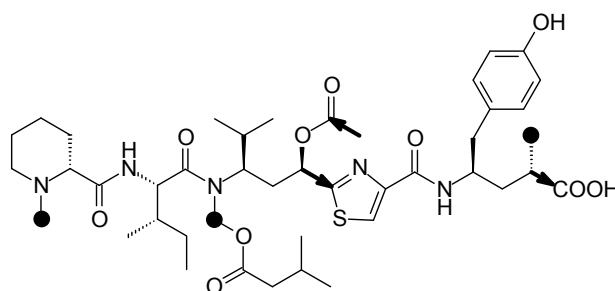


Abbildung 2.26 Tubulylin A, markierte Stellen: [$^{13}\text{CH}_3$]-Methionin (●), [$^{13}\text{C}_2$]-Acetat (→)

Eine am C-Terminus von TubF lokalisierte TE-Domäne katalysiert die Abspaltung des Intermediats vom Multienzymkomplex als freie Säure. Dieses hypothetische Zwischenprodukt der Tubulylin-Biosynthese (Prätubulylin) muss noch an Position C^{11} und C^{39} hydroxyliert und an den gebildeten OH-Gruppen zu Tubulylin acyliert werden. Für die Oxidationsschritte werden P_{450} -Monooxygenasen erwartet, innerhalb des Biosynthesegenclusters und in angrenzenden Bereichen konnten jedoch keine entsprechenden Gene gefunden werden. Möglicherweise befinden sich die für die Monooxygenasen kodierenden Gene an einer anderen Stelle des Genoms oder die Hydroxylierungen werden durch unspezifische Monooxygenasen katalysiert.

Die Acyltransferasen, die zur Bildung des Endprodukts nötig sind, konnten ebenfalls noch nicht lokalisiert werden. Das stromabwärts vom Biosynthesegencluster liegende *tubG* zeigte zwar Homologien zu Acyltransferasen, durch Inaktivierung konnte aber gezeigt werden, dass es keine Funktion bei der Tubulylin-Biosynthese besitzt.

3 Aufgabenstellung

Tubulysine haben aufgrund ihrer Tubulin-auflösenden Fähigkeit, die wie in Kapitel 2.2 beschrieben bereits gründlich *in vitro* und *in vivo* untersucht wurde, ein hohes Potential für die Krebstherapie. Probleme bereitet jedoch die Verfügbarkeit, denn die Ausbeuten bei der fermentativen Herstellung sind nicht sehr hoch (≤ 4 mg/l).^[7] Aber auch der synthetische Ansatz hat sich bisher nicht einfach gestaltet, erst eine Arbeitsgruppe berichtete über die Synthese eines natürlich vorkommenden Tubulysin-Derivats, Tubulysin D.^[28] Ein besseres Verständnis der Biosynthese könnte dazu dienen, die fermentative Tubulysin-Produktion zu erhöhen und durch Gentechnik Tubulysin-Derivate herzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten postulierte Biosynthese-Intermediaten **A-G** (Abb. 3.1) für Fütterungsexperimente in der Arbeitsgruppe von Prof. Müller am Institut für Pharmazeutische Biotechnologie der Universität des Saarlandes synthetisiert werden, um den von Sandmann *et al.* bereits vorgeschlagenen Biosyntheseweg^[9] zu belegen und eingehender untersuchen zu können (Kapitel 2.7.3). Die Verbindungen sollten mit Deuterium markiert werden, um Tubulysine mit inkorporierten Intermediaten bei der Analyse der Zellextrakte durch einen Massenshift im LC-MS identifizieren zu können. Während der Biosynthese am NRPS-/PKS-Multienzymkomplex sind sowohl die Substrate zur Kettenverlängerung als auch die Intermediate über einen Phosphopantetheinlinker (ppan) an die Carrier Proteine (PCP, ACP) des Multienzymkomplex gebunden. Um diese Situation zu imitieren, die Erkennung der gefütterten Substrate zu erleichtern und eine leichte Umesterung zu ermöglichen, sollten die Intermediate als SNAC-Ester synthetisiert werden (Abb. 3.2).

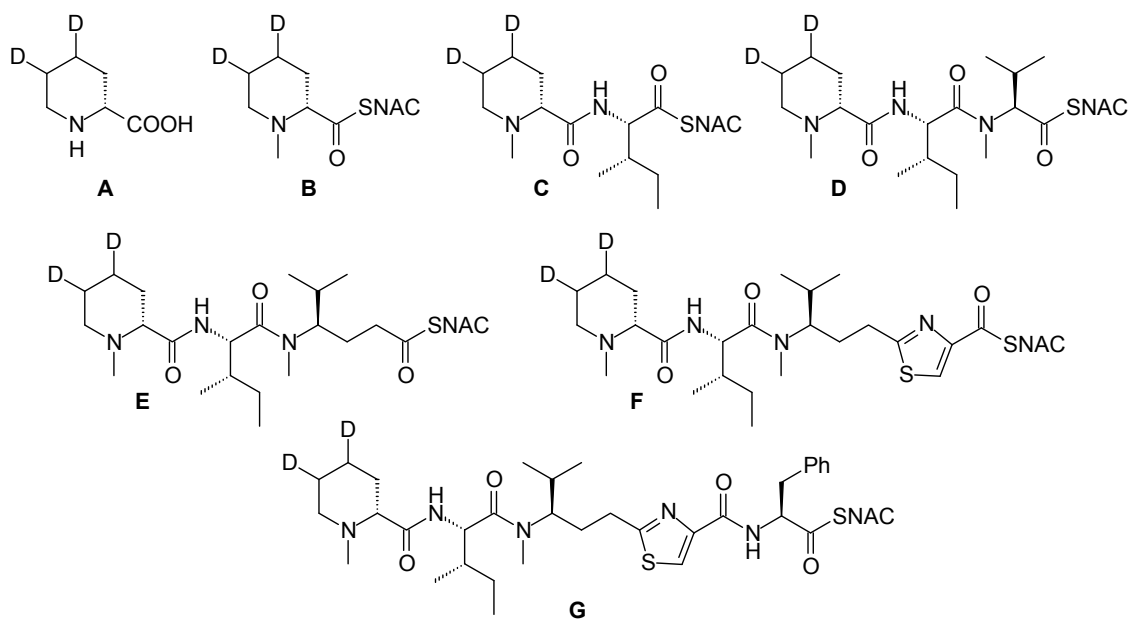


Abbildung 3.1 Zielverbindungen für Fütterungsexperimente

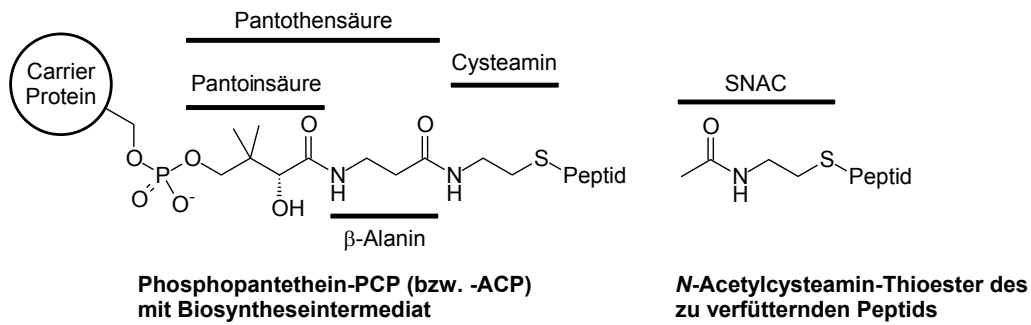


Abbildung 3.2 Natürliche Biosyntheseintermediate im Vergleich mit den zu fütternden Peptid-SNAC-Estern

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Totalsynthese von Prätubulysin (Abb. 3.3), dem vorgeschlagenen Produkt der Biosynthese am Multienzymkomplex, welches erst nach Abspaltung durch die Thioesterase zu Tubulysin oxidiert und acyliert wird. Durch Vergleich von MS-Fragmentierungsmustern und NMR-Spektren des synthetischen Prätubulysins mit einer aus Zellextrakten gewonnenen Substanz sollte die Existenz dieses Intermediats und somit auch ein Teil der Biosynthese bewiesen werden. Ein semisynthetischer Ansatz zur Tubulysin D-Synthese sollte die Synthese der vereinfachten Vorstufe Prätubulysin, die ohne labiles *N,O*-Acetal und *O*-Acetat auskommt, in Verbindung mit einer Biotransformation durch einen Tubulysin-Produzenten darstellen (Abb. 3.3).

Es ist anzunehmen, dass Prätubulysin cytotoxische Eigenschaften besitzt, da mittlerweile vereinfachte Tubulysin-Analoga, die ebenfalls kein *N,O*-Acetal besitzen, synthetisiert und erfolgreich getestet wurden (Kapitel 2.5). Im Laufe der Arbeit entwickelte sich daher das Ziel, Prätubulysin-Derivate zu synthetisieren, die zusammen mit Prätubulysin in der Arbeitsgruppe Müller bezüglich ihrer Cytotoxizität untersucht werden sollten.

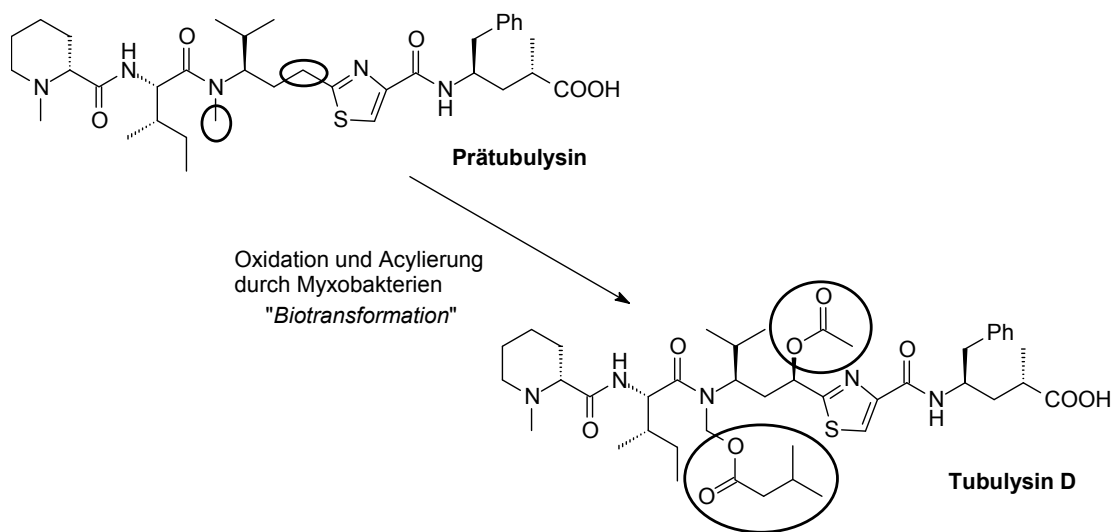


Abbildung 3.3 Prätubulysin, Biotransformation zu Tubulysin D

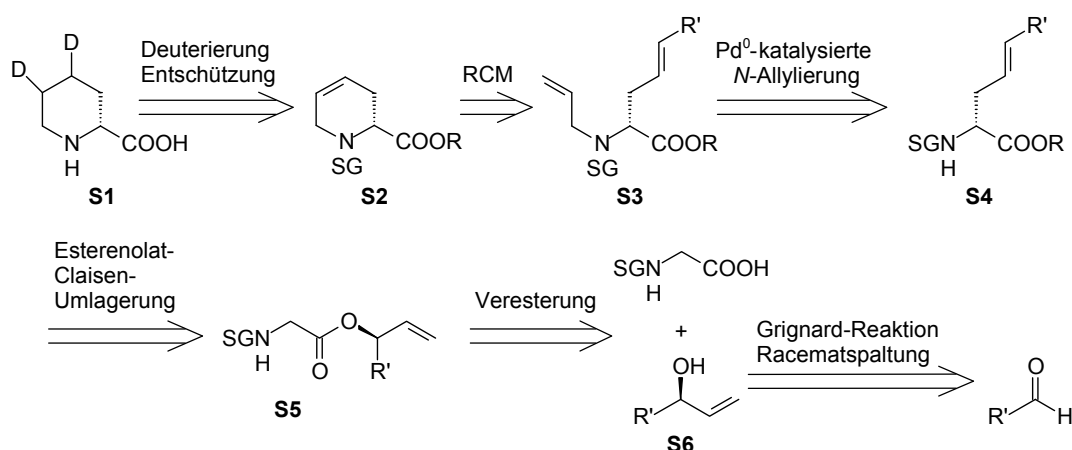
4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Herstellung von deuterierten Biosynthese-Zwischenstufen

4.1.1 Synthese von Baikiain als Vorstufe von deuterierter Pipecolinsäure (d₂-Pip)

4.1.1.1 Retrosynthetische Betrachtung

Pipecolinsäure bildet die Starteinheit der Tubulysin-Biosynthese und ist somit auch in allen weiteren Zwischenstufen wiederzufinden. Daher bietet es sich an, die Deuteriummarkierung bereits in der Pipecolinsäure einzuführen. Hierzu sollte 4,5-ungesättigte Pipecolinsäure **S2** (Baikiain^[67]) enantioselektiv synthetisiert und durch katalytische Hydrierung zu **S1** deuteriert werden (Schema 4.1). **S2** ist durch Ringschlussmetathese (RCM) des *N,C*-diallylierten Glycinderivats **S3** zugänglich. Zur Einführung der beiden Allylreste sollten im Arbeitskreis entwickelte Methoden zur Synthese unnatürlicher Aminosäuren verwendet werden. Der *N*-Allylrest kann über eine milde Pd⁰-katalysierte *N*-Allylierung eingebracht werden. Die γ,δ -ungesättigte Aminosäure **S4** kann ausgehend vom chiralen Glycinallylester **S5** über eine Esterenolat-Claisen-Umlagerung synthetisiert werden. Diese zeichnet sich durch einen exzellenten Chiralitätstransfer aus. Der zur Veresterung mit Glycin benötigte chirale Allylalkohol **S6** kann durch Grignard-Reaktion eines Aldehyds mit Vinylmagnesiumbromid und durch anschließende kinetische Racematspaltung des racemischen Allylalkohols dargestellt werden. Ein Vorteil dieser Reaktionssequenz ist, dass beide Enantiomere der Pipecolinsäure durch Verwendung des entsprechenden Allylalkohols erhalten werden können.



Schema 4.1 Retrosynthetische Betrachtung deuterierter Pipecolinsäure

4.1.1.2 Synthese des chiralen Allylkohols

Zur enzymatischen Racematspaltung des über eine Grignard-Reaktion erhaltenen Allylkohols **1** wurde Novozym[®] 435 verwendet. Dabei handelt es sich um eine immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica*, einem aus dem antarktischen Vandasee stammenden alkalophilen Organismus. Die Immobilisierung bietet den Vorteil, dass das Enzym in organischen Lösemitteln und auch bei höheren Temperaturen (bis etwa 70 °C) verwendet und zudem durch Filtration leicht vom Reaktionsgemisch abgetrennt, gereinigt und wieder verwendet werden kann.

Bei Verwendung von Novozym[®] 435 in Vinylacetat findet eine enantioselektive Veresterung ungesättigter sekundärer Alkohole zum Acetat statt.^[68] Diese läuft nach der von Kazlauskas vorgeschlagenen, empirischen Regel ab, wonach in Abhängigkeit von der Größe ihrer Reste zwei enantiomere Alkohole unterschiedlich schnell reagieren (Abbildung 4.1).^[69] Steht der größere der beiden Reste auf der linken Seite, so reagiert der Alkohol schneller, dessen Hydroxygruppe nach hinten zeigt. Wichtig ist der Größenunterschied zwischen den beiden Resten, so dass nur einer der Alkohole in die Enzymtasche passt.

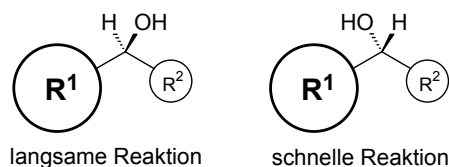


Abbildung 4.1 Kazlauskas-Regel

Zu Beginn der Reaktionssequenz musste also ein Aldehyd stehen, dessen Rest R größer als ein Vinylrest ist. Zunächst wurde ein Phenylrest gewählt, der auch den Vorteil bieten sollte, dass bei der späteren Ringschlussmetathese der Grubbs-Katalysator $[\text{RuCl}_2(=\text{CHPh})(\text{PCy}_3)_2]$ durch den entstehenden Benzylidenrest immer wieder regeneriert würde.

Die enzymatische Racematspaltung lief sehr gut, (*S*)-Alkohol **1a** und (*R*)-Acetat **2a** konnten in guten Ausbeuten und in sehr hohen Enantiomerenüberschüssen erhalten werden (Tabelle 4.1). Probleme bereitete jedoch die Verseifung des Acetats zum (*R*)-Alkohol **1a**, bei der ein ee-Verlust von 20 % beobachtet wurde. Neben der Umsetzung mit Kaliumcarbonat in Methanol wurden auch enzymatische Verseifungen getestet. Mit Novozym[®] in EtOH/H₂O^[70] wurde auch bei Erwärmen keine Reaktion beobachtet und mit PLE^[71] fand zwar eine langsame Reaktion statt, der ee-Wert des (*R*)-Alkohols **1a** betrug jedoch nur 64 %. Der Verlust an chiraler Information lässt sich nur so erklären, dass die Verseifung nicht nur an der Carbonylfunktion des Acetats, sondern auch über eine Konkurrenzreaktion (S_N2) an der Alkoholfunktion abläuft, begünstigt durch Phenyl- und Vinylrest in direkter Nachbarschaft.

Daher wurde beschlossen, mit einem anderen, aliphatischen Rest zu arbeiten. Hierzu wurde der Allylkohol *rac*-**1b** aus Isovaleraldehyd und Vinylmagnesiumbromid synthetisiert und mit Novozym[®] in Vinylacetat umgesetzt. Die etwas niedrigeren Ausbeuten bei den

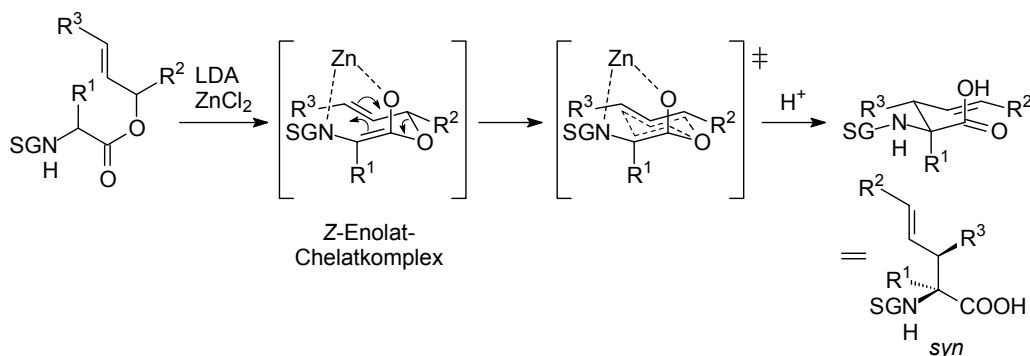
Alkoholen lassen sich darauf zurückführen, dass dieser Alkohol sehr leichtflüchtig ist. Die Racematspaltung stoppt nicht bei vollständigem Verbrauch des (*S*)-Alkohols **1b**, so dass die Veresterung des (*R*)-Alkohols **1b** bei Abbruch der Reaktion schon begonnen hat und dadurch der Enantiomerenüberschuss des (*S*)-Acetats **2b** etwas niedriger ist. Die Verseifung des (*S*)-Acetats **2b** verläuft ohne ee-Verlust glatt zum (*S*)-Alkohol **1b**.

Tabelle 4.1 Grignard-Reaktion und enzymatische Racematspaltung

Eintrag	Substrat	R	Ausbeute [%]	ee-Wert [%]
1	(<i>S</i>)-Alkohol 1a	Ph	39	> 99
2	(<i>R</i>)-Alkohol 1b	<i>i</i> Bu	31	> 99
3	(<i>R</i>)-Acetat 2a	Ph	49	98
4	(<i>S</i>)-Acetat 2b	<i>i</i> Bu	46	84
5	(<i>R</i>)-Alkohol 1a	Ph	90	79
6	(<i>S</i>)-Alkohol 1b	<i>i</i> Bu	89	84

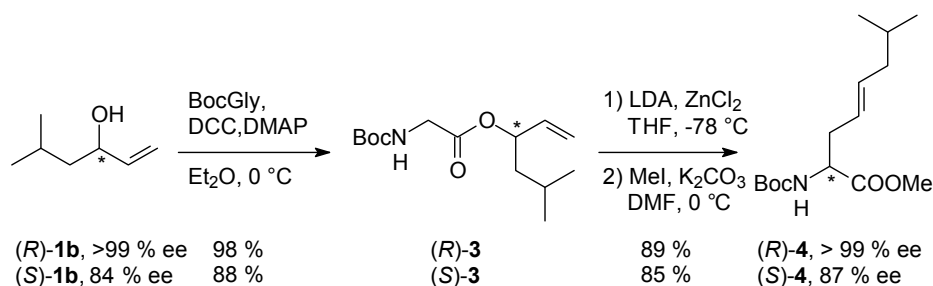
4.1.1.3 Synthese der γ,δ -ungesättigten Aminosäure *via* Esterenolat-Claisen-Umlagerung

Die Esterenolat-Claisen-Umlagerung von geschützten Aminosäureallylestern ermöglicht einen einfachen Zugang zu γ,δ -ungesättigten Aminosäuren (Schema 4.2).^[72] Dabei wird der *N*-geschützte Aminosäureallylester mit einer Base (z. B. LDA) bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ deprotoniert und durch Zugabe eines Metallsalzes (z. B. ZnCl_2) transmetalliert, wodurch sich der *Z*-Enolat-Chelatkomplex und somit eine fixe Enolatgeometrie bildet. Darüber hinaus verläuft die Reaktion bevorzugt über einen sesselförmigen Übergangszustand mit äquatorialer Anordnung der Reste R^2 und R^3 , was in einer hohen Diastereoselektivität zugunsten des *syn*-Diasteromers und dem Erhalt der *E*-Doppelbindung resultiert. Zudem liefern Ester chiraler Allylalkohole optisch aktive Aminosäuren, da durch den konzertierten Reaktionsmechanismus ein Chiralitätstransfer vom Ester auf das α -Zentrum der Aminosäure erfolgt.



Schema 4.2 Esterenolat-Claisen-Umlagerung

Die Möglichkeit des Chiralitätstransfers von der Alkoholgruppe eines Aminosäureallylesters auf das α -Zentrum der Aminosäure sollte hier genutzt werden. Dazu wurde der Allylkohol (*R*)-**1b** in einer DCC-Knüpfung nach Steglich^[73] mit Boc-Glycin zum Ester (*R*)-**3** umgesetzt. Anschließend erfolgte die Esterenolat-Claisen-Umlagerung mit LDA als Base und ZnCl_2 als chelatisierendem Metallsalz, sowie Veresterung der erhaltenen freien Säure zum Methylester (*R*)-**4**. Ebenso wurde der Allylkohol (*S*)-**1b** eingesetzt, so dass die γ,δ -ungesättigten Aminosäuren (*R*)-**4** und (*S*)-**4** in guter Ausbeute und exzellenter Selektivität erhalten werden konnten (Schema 4.3).



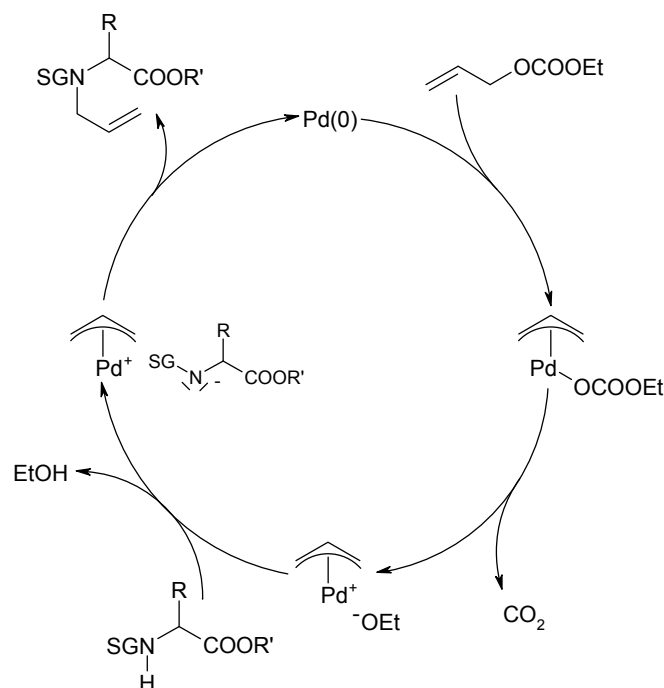
Schema 4.3 Veresterung nach Steglich und chelatisierte Esterenolat-Claisen-Umlagerung des Aminosäureallylesters

4.1.1.4 Synthese von Baikiain und Pipecolinsäure über Pd^0 -katalysierte *N*-Allylierung und Ringschlussmetathese

Eine in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode bietet die Möglichkeit, geschützte Aminosäuren unter milden, neutralen Reaktionsbedingungen am Stickstoff zu allylieren,^[74,75] wobei auf einer Arbeit von Tsuji et al. aufgebaut wurde.^[76] Darin wird berichtet, dass Palladium-katalysierte allylische Substitutionen unter annähernd neutralen Bedingungen ablaufen können, wenn Allylcarbonate als allylierende Agenzien verwendet werden. Im Verlauf dieser Reaktion addiert das Allylcarbonat unter Ausbildung des π -Allyl-Palladium-Komplexes oxidativ an $\text{Pd}(0)$. Dabei werden CO_2 und Alkoholat freigesetzt. Letzteres ist in

der Lage, ein ausreichend acids Pronukleophil zu deprotonieren und somit das eigentliche Nukleophil für den Angriff am Allylkomplex zu generieren (Schema 4.4).

Bei unserer Methode werden Allylethylcarbonat, sowie Tosyl- oder Trifluoracetylgeschützte Aminosäuren verwendet, um eine ausreichende Acidität der Amidprotonen zu gewährleisten. Sie werden in Gegenwart von Allylpalladiumchlorid-Dimer als Katalysator und Triphenylphosphin als Ligand umgesetzt. Die Tos-Schutzgruppe erwies sich der TFA-Schutzgruppe etwas überlegen, da bei Raumtemperatur gearbeitet werden kann. Bei Verwendung TFA-geschützter Aminosäureester sind hingegen Reaktionstemperaturen von 50 °C notwendig, um vergleichbare Ausbeuten zu erzielen. Bemerkenswert ist, dass die Reaktion vollständig und sauber abläuft, obwohl nur Spuren des Elektrophils und des Nukleophils (maximal 2 mol%) in der Reaktionslösung vorhanden sind.

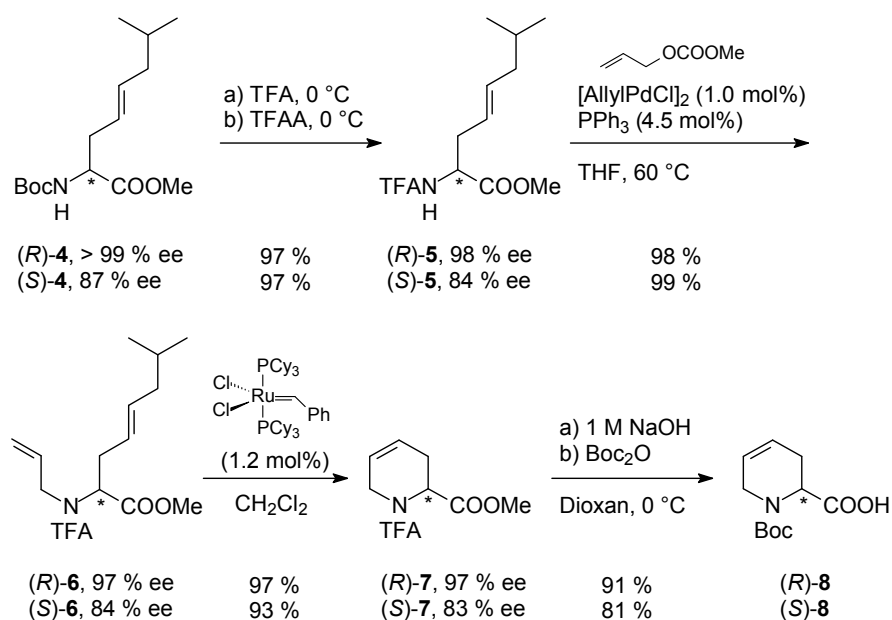


Schema 4.4 Pd⁰-katalysierte *N*-Allylierung

Zur *N*-Allylierung der hier synthetisierten γ,δ -ungesättigten Aminosäuren (*R*)-4 und (*S*)-4 musste zunächst noch ein Wechsel von der Boc- auf die TFA-Schutzgruppe stattfinden, um ein ausreichend acids Amidproton zu haben. Es wurde die TFA-Gruppe gewählt, da diese leichter als die Tos-Schutzgruppe wieder abspaltbar ist. Die Umschützung gelang in sehr hoher Ausbeute mit Trifluoressigsäure zum Entschützen der Boc-Gruppe und mit Trifluoressigsäureanhydrid zur TFA-Schützung (Schema 4.5). Um diesen Schritt zu vermeiden, ist auch TFA-geschütztes Glycin in der Veresterung zum Allylester und der Esterenolat-Claisen-Umlagerung getestet worden. Es zeigte sich, dass die Veresterung nicht sauber ablief und der Allylester maximal mit einer Ausbeute von 73 % erhalten werden konnte. Zudem trat auch ein Chiralitätsverlust von etwa 20 % ee auf, so dass Veresterung und Umlagerung bevorzugt mit Boc-geschützten Aminosäuren durchgeführt und der zusätzliche Schritt der Umschützung in

Kauf genommen wurden. Die *N*-Allylierung der γ,δ -ungesättigten Aminosäuren (*R*)-**5** und (*S*)-**5** verlief sehr sauber und nahezu quantitativ. Um eine mögliche partielle Umesterung (Me \rightarrow Et-Ester) zu vermeiden, wurde statt Allylethylcarbonat das entsprechende Methylcarbonat verwendet.

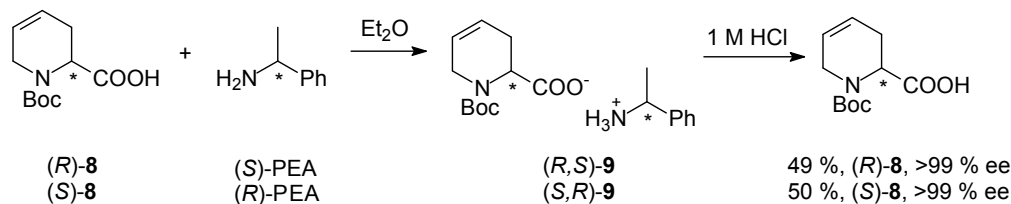
Die *N*-allylierten γ,δ -ungesättigten Aminosäuren (*R*)-**6** und (*S*)-**6** konnten nun mit dem Grubbs-Katalysator der ersten Generation^[77] in einer Ringschlussmetathese zum ungesättigten Pipecolinsäure-Derivat Baikiain (*R*)-**7** bzw. (*S*)-**7** umgesetzt werden (Schema 4.5).^[78] Die Schutzgruppenwahl erwies sich als nicht-orthogonal, d. h. es konnte keine Methode gefunden werden, die TFA-Gruppe unter Erhalt des Methylesters zu spalten. Daher wurde beschlossen, Baikiain **7** mit Natronlauge komplett zu entschützen und durch Zugabe von Di-*tert*-butyldicarbonat am *N*-Terminus wieder Boc zu schützen, wodurch Boc-Baikiain **8** in guter Ausbeute erhalten wurde.



Schema 4.5 Synthese von Boc-geschütztem Baikiain **8**

In ersten Fütterungsexperimenten in der Arbeitsgruppe Müller sollte festgestellt werden, ob (*R*)- oder (*S*)-Pipecolinsäure in die Biosynthese eingeht. Die Frage stellt sich, da zum einen im finalen Tubulylin die *D*-konfigurierte Aminosäure gefunden worden ist,^[25] und zum anderen die Pipecolinsäure durch eine Lysinaminase hergestellt wird,^[9] die hierbei auch *L*-Pipecolinsäure produzieren könnte. Die bei der Baikiainsynthese erzielten Enantiomerenreinheiten von 97 bzw. 83 % reichten für die Tests nicht aus, denn auch nur wenige Prozent des zweiten Enantiomers könnten das Ergebnis verfälschen bzw. zu einem nicht eindeutigen Ergebnis führen. Durch Fällung und Umkristallisation mit Phenylethylamin (PEA) gelang es, die Enantiomerenreinheit von (*R*)-**8** und (*S*)-**8** jeweils auf über 99 % zu erhöhen (Schema 4.6). Bei der Umkristallisation fiel leider nur etwa die Hälfte des Ammoniumsalzes **9** wieder aus,

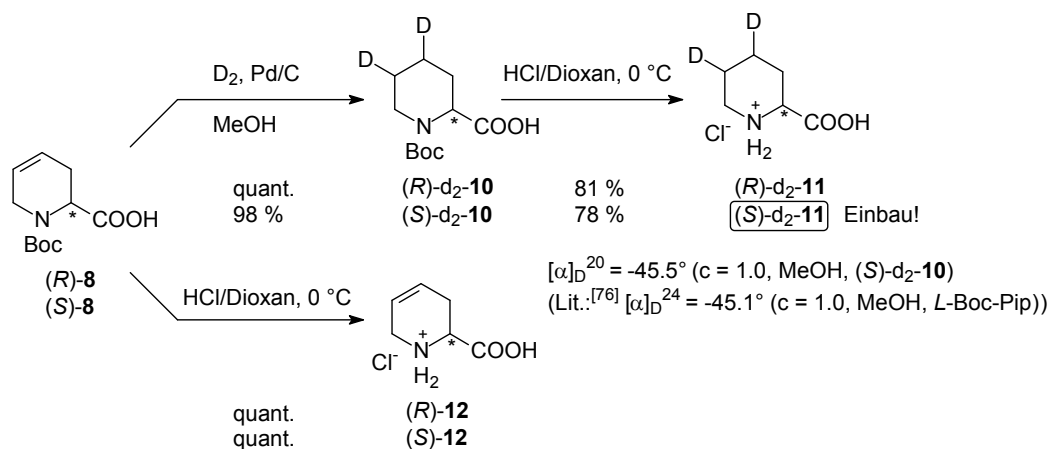
übriges Boc-Baikiain **8** kann jedoch aus der Mutterlauge der Umkristallisation wieder zurückgewonnen werden.



Schema 4.6 Enantiomerenanreicherung von Boc-Baikiain **8**

Die enantiomerenreinen Boc-geschützten Baikiain-Enantiomere **8** wurden zu den Pipecolinsäuren $d_2\text{-10}$ deuteriert und die Boc-Schutzgruppe mit einer HCl-Dioxan-Lösung abgespalten. Die absolute Konfiguration der Pipecolinsäure konnte durch Vergleich der optischen Drehwerte von $d_2\text{-10}$ mit Literaturwerten^[79,80] bestätigt werden (Schema 4.7). Durch Boc-Entschützung von **8** konnte mit HCl/Dioxan Baikiain **12** erhalten werden (Schema 4.7). Dieses sollte auch in Fütterungsversuchen eingesetzt werden, um die akzeptierte Substratbreite der A-Domäne in TubB zu untersuchen. Die so erhaltene Doppelbindung im Endprodukt könnte nach der Biosynthese durch Dihydroxylierung, Epoxidierung o. ä. zu Tubulysinderivaten mit veränderten Eigenschaften, zum Beispiel bezüglich der Wasserlöslichkeit, weiter modifiziert werden.

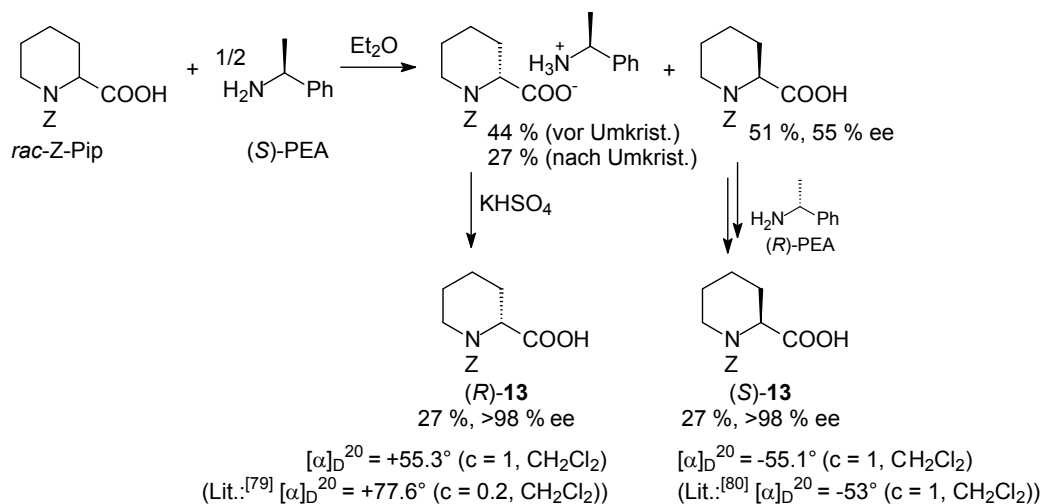
Durch Fütterungsexperimente im Arbeitskreis Müller konnte gezeigt werden, dass deuterierte (S) -Pipecolinsäure $(S)\text{-}d_2\text{-11}$ in Tubulysin eingebaut wird. Die A-Domäne in TubB scheint eine hohe Substratspezifität zu besitzen, da weder $(R)\text{-}d_2\text{-11}$ noch Baikiain (R) - bzw. $(S)\text{-12}$ von ihr verwendet und somit nicht erkannt wurden. Der Einbau von $(S)\text{-}d_2\text{-11}$ bedeutet, dass die Lysinaminase TubZ zu Beginn der Biosynthese L -Pipecolinsäure bildet und es somit innerhalb der Biosynthese eine Epimerase geben muss, welche das L - in das finale D -Enantiomer umwandelt.



Schema 4.7 Fütterungssubstrate $d_2\text{-11}$ und **12**

4.1.2 Synthese von deuterierter *N*-Methylpipercolinsäure (d_1 -Mep)

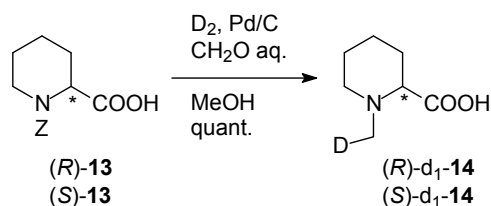
Da die Synthese von Baikiain und Pipercolinsäure einige Zeit in Anspruch nimmt, wurde darüber nachgedacht, racemische Pipercolinsäure käuflich zu erwerben und diese in ihre Enantiomeren aufzuspalten. Zunächst wurde eine Trennung durch präparative HPLC in Betracht gezogen. Da jedoch nur eine semipräparative chirale Säule zur Verfügung stand, über die maximal 20 mg pro Lauf getrennt werden konnten, entsprach diese Methode nicht den gestellten Anforderungen, enantiomerenreine Pipercolinsäure im Gramm-Maßstab bereitzustellen. Kristallisation von *Z*-Pipercolinsäure mit einem chiralen Amin wie Phenylethylamin erfüllte die Vorstellungen schon eher. Analog wie bei U. Beutler^[81] beschrieben, wurde racemische *Z*-Pipercolinsäure mit (*S*)-Phenylethylamin ausgefällt (Schema 4.8). Das (*R,S*)-*Z*-Pipercolyl-phenylethylammonium-Salz wurde noch einmal aus Essigsäureethylester umkristallisiert, da der ee-Wert der (*R*)-*Z*-Pipercolinsäure (*R*)-**13** erst etwa 60 % betrug. Durch saure Aufarbeitung konnte die (*R*)-*Z*-Pipercolinsäure (*R*)-**13** von sehr hohem ee-Wert (>98 %) erhalten werden. Aus dem Filtrat der ersten Fällung konnte (*S*)-*Z*-Pipercolinsäure (*S*)-**13** bereits enantiomeren-angereichert (55 % ee) isoliert werden. Durch Fällung mit (*R*)-Phenylethylamin, anschließender Umkristallisation, sowie saurer Aufarbeitung wurde sie ebenfalls von sehr hohem ee-Wert (>98 %) erhalten. Durch Vergleich der optischen Rotation mit Literaturdaten konnte die Konfiguration der *Z*-Pipercolinsäuren (*R*)- bzw. (*S*)-**13** belegt werden.^[82,83] Die restliche *Z*-Pipercolinsäure, sowie die eingesetzten Phenylethylamine können aus den Filtraten der Umkristallisationen bzw. aus den wässrigen Phasen durch basische Aufarbeitung reisoliert und nochmals umgesetzt werden.



Schema 4.8 Enantiomerentrennung von *Z*-Pip

In der Literatur wurde eine Methode gefunden, *L*-Prolin in einer Stufe durch reduktive Aminierung mit Formaldehyd in Gegenwart eines heterogenen Palladium-Katalysators unter Wasserstoffatmosphäre in *N*-Methylprolin zu überführen.^[84] Ebenso lässt sich die *N*-Methylgruppe bei Pipercolinsäure einführen, was sich auch andere Gruppen zu Nutze gemacht

haben.^[28,40] Dieses Verfahren wurde aufgegriffen und weiterentwickelt. Die durch Racematspaltung erhaltene *Z*-geschützte (*R*)- bzw. (*S*)-Pipicolinsäure (*R*)- bzw. (*S*)-**13** kann im Eintopfverfahren durch katalytische Hydrierung entschützt und im Anschluss durch Zugabe einer Formaldehyd-Lösung reaktiv aminiert werden. Ebenso ist es auch möglich, die Reaktion unter Deuteriumatmosphäre durchzuführen, so dass monodeuterierte *N*-Methyl-pipicolinsäure (*d*₁-Mep) *d*₁-**14** auf schnelle und einfache Weise erhalten werden kann (Schema 4.9).



Schema 4.9 Einführung der *N*-Deuteromethylgruppe

4.1.3 Untersuchungen zu den Deuterierungsreaktionen

In den ¹H-NMR-Spektren der deuterierten Pipicolinsäure (*d*₂-**11**) konnte anhand der Integrationen von 4-H und 5-H erkannt werden, dass die Deuterierung nicht vollständig verlaufen war (Abbildung 4.2a). Es ist zu erwarten, dass die katalytische Deuterierung von beiden Seiten der Doppelbindung stattgefunden hat, so dass sich Deuterium in axialer und äquatorialer Stellung an Position 4 und 5 befindet. Die Signale von 4-H_{ax} und 5-H_{ax} überlagern sich, die Integration des Signalhaufens beträgt 1.21 statt wie zu erwarten 1.0, ebenso lässt sich der Signalhaufen von 4-H_{eq} und 5-H_{eq} nur mit 1.30 statt 1.0 integrieren. Bei Betrachtung des Deuteriumspektrums der Verbindung *d*₂-**11** (Abbildung 4.2b) konnte festgestellt werden, dass die Deuterierung nicht nur an der ursprünglichen Doppelbindung, die sich zwischen C-4 und C-5 befunden hat, stattgefunden hat, sondern dass auch in geringem Maße die äquatoriale Position an C-3, sowie die axiale Position an C-6 deuteriert worden ist. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass ein σ-Pd-C-Komplex durch β-Hydrid-Eliminierung, als Konkurrenzreaktion zur reduktiven Eliminierung, eine Wanderung der Doppelbindung verursacht hat.

Eine Berechnung des Deuteriumgehaltes aus den Integrationen im ¹H-NMR-Spektrum ergibt, dass an C-4 und C-5 jeweils 37.5 % Deuterium zu finden ist (Abbildung 4.2c); C-3 ist zu 7 % deuteriert, C-6 zu 5 %. Insgesamt ergibt sich daraus, dass die Deuterierung nur zu 87 % erfolgreich war. Eine Aussage über das Verhältnis von dideuterierter zu monodeuterierter und undeuterierter Pipicolinsäure (*d*₂-**11**:*d*₁-**11**:*d*₀-**11**) lässt sich hieraus nicht treffen.

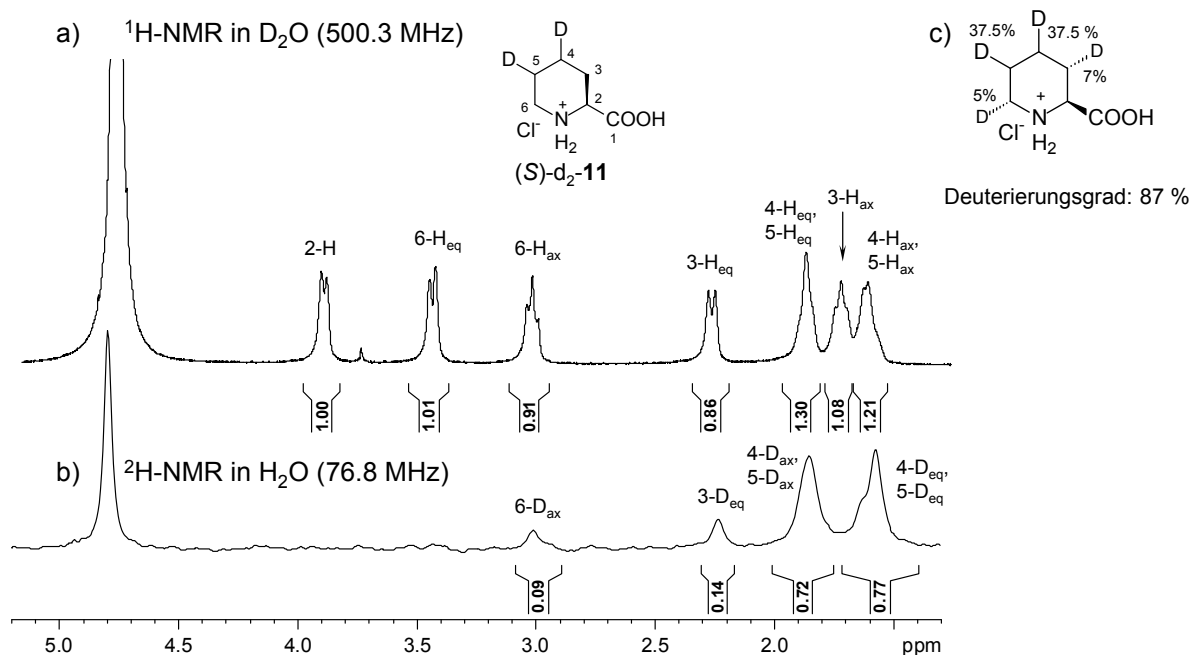
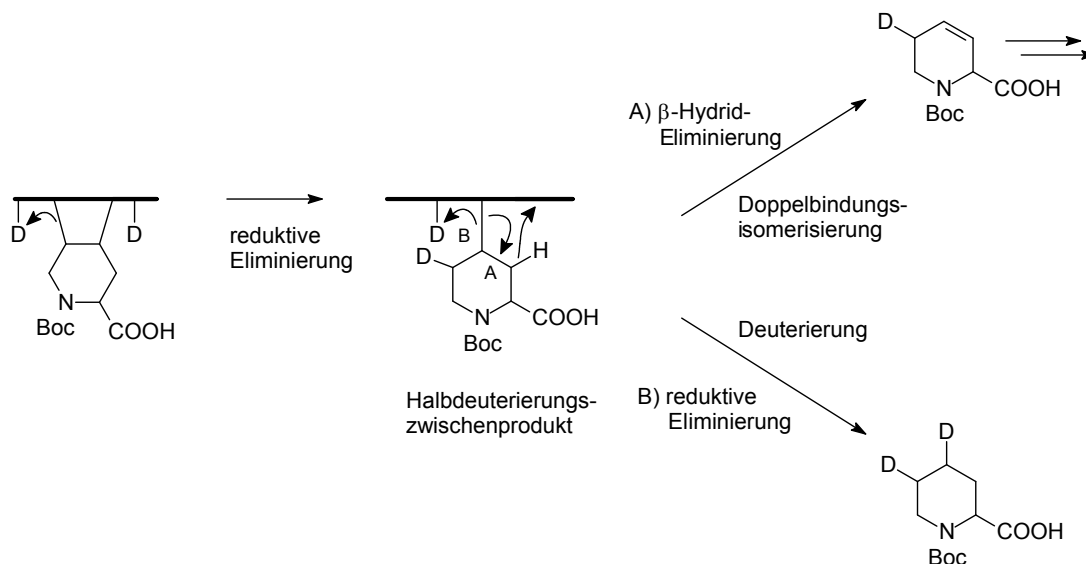


Abbildung 4.2 Vergleich von Protonen- und Deuterium-NMR-Spektren der deuterierten Pipecolinsäure $\text{d}_2\text{-11}$: a) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, b) $^2\text{H-NMR}$ -Spektrum; c) Deuteriumgehalt an den jeweiligen Kohlenstoffen

Massenspektrometrische Untersuchung^[a] hingegen zeigen, dass die Pipecolinsäure $\text{d}_2\text{-11}$ zu 7 % undeutert, 26 % monodeutert, 49 % dideutert und sogar zu 17 % trideutert vorliegt, woraus sich ebenfalls ein Deuterierungsgrad von 87,5 % ergibt. Das Vorhandensein der dreifach deuterierten Pipecolinsäure bekräftigt die Vermutung, dass β -Hydrid-Eliminierungen stattfinden. Die Dreifachdeuterierung sowie die Doppelbindungswanderung können durch den Horiuti-Polanyi-Mechanismus^[85] erklärt werden, in dessen Verlauf eine Reihe sukzessiver Hydrierungs-Dehydrierungsschritte erfolgt: In einer $\text{Di-}\sigma$ -adsorption bilden die Kohlenstoffatome der Doppelbindung zwei direkte σ -Bindungen zur Katalysatoroberfläche. Eine erste Halbdeuterierung führt zu einem oberflächengebundenem Reaktionszwischenprodukt, das im nächsten Schritt entweder Doppelbindungswanderung (verbunden mit einem H-D-Austausch) oder Hydrierung erfahren kann. Durch eine β -Hydrid-Eliminierung (Schema 4.10, Weg A) kann wieder eine Doppelbindung gebildet werden, wobei in diesem Fall zwei Eliminierungsrichtungen (zur ursprünglichen 4,5-Position oder zur 3,4- bzw. 5,6-Position) möglich sind, oder das Intermediat kann in einer reduktiven Eliminierung (Schema 4.10, Weg B) ein zweites Deuterium aufnehmen. Die in Weg A regenerierte Doppelbindung kann wiederum angegriffen und deuteriert werden.

[a] Vergleich der Signalintensitäten von deuterierter und undeuterierter Pipecolinsäure in LRMS-Spektren (Ionisierung: EI) unter Berücksichtigung der natürlichen Isotope.



Schema 4.10 Erklärung für Doppelbindungsisomerie und Dreifachdeuterierung nach dem Horiuti-Polanyi-Mechanismus

Auch die reduktive Aminierung durch katalytische Deuterierung von **13** zu d_1 -**14** scheint nicht vollständig verlaufen zu sein, denn neben dem Methylensignal der *N*-Deuteromethylgruppe von d_1 -**14** ist im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 4.3a) ein weiteres Signal zu sehen, das einem Methylsignal einer undeuterierten *N*-Methylgruppe zugeordnet werden kann.^[a] Im Deuteriumspektrum von d_1 -**14** (Abbildung 4.3b) wird deutlich, dass d_1 -**14** nur an C-7 deuteriert ist und somit keine Doppelbindungsisomerie stattgefunden hat. Ein Integrationsvergleich der Methylen- bzw. Methylgruppe an C-7 ergibt, dass monodeuterierte *N*-Deuteromethylpipercolinsäure d_1 -**14** im Verhältnis 87:13 zur undeuterierten *N*-Methylpipercolinsäure d_0 -**14** gebildet worden ist.

Zur katalytischen Deuterierung wurden die gleichen Bedingungen wie bei katalytischen Hydrierungen angewandt, so dass als Lösemittel Methanol (nicht wasserfrei) verwendet wurde. Kurita *et al.* beschreiben einen Pd/C katalysierten H_2 - D_2 -Austausch unter Verwendung von $\text{H}_2/\text{D}_2\text{O}$ und 10 % Pd/C bei Raumtemperatur.^[86] Eine mögliche Erklärung für die hier unvollständigen Deuterierungen könnte also darin liegen, dass das protische Lösemittel Methanol, vielleicht aber auch das vorhandene Wasser oder die freie Säure im Molekül in einer umgekehrt zu der von Kurita beschriebenen Reaktion H-Pd-D-Spezies generieren könnte, wodurch neben Deuterium auch Wasserstoff auf die Substrate übertragen werden könnten. Zudem gelangen im Fall von d_2 -**11** Wasserstoffatome auch durch β -Hydrid-Eliminierungen an die Katalysatoroberfläche.

[a] Das Methylsignal einer undeuterierten Verbindung konnte auch bei Peptiden, die auf diese Weise *N*-deuteromethyliert wurden (siehe Folgekapitel), beobachtet werden.

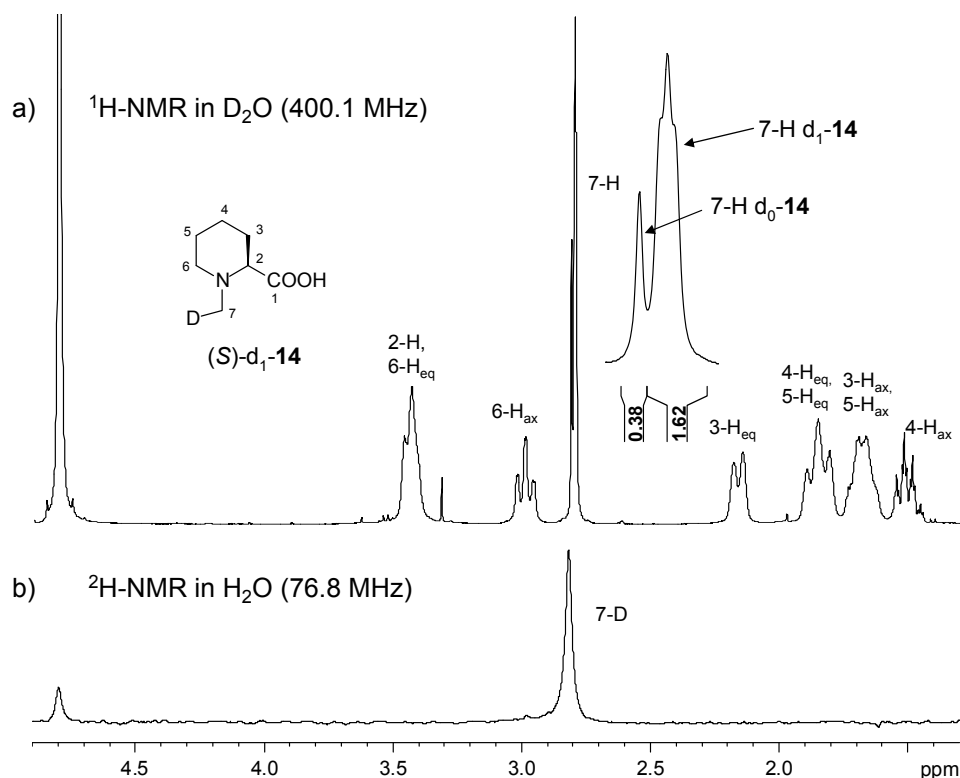
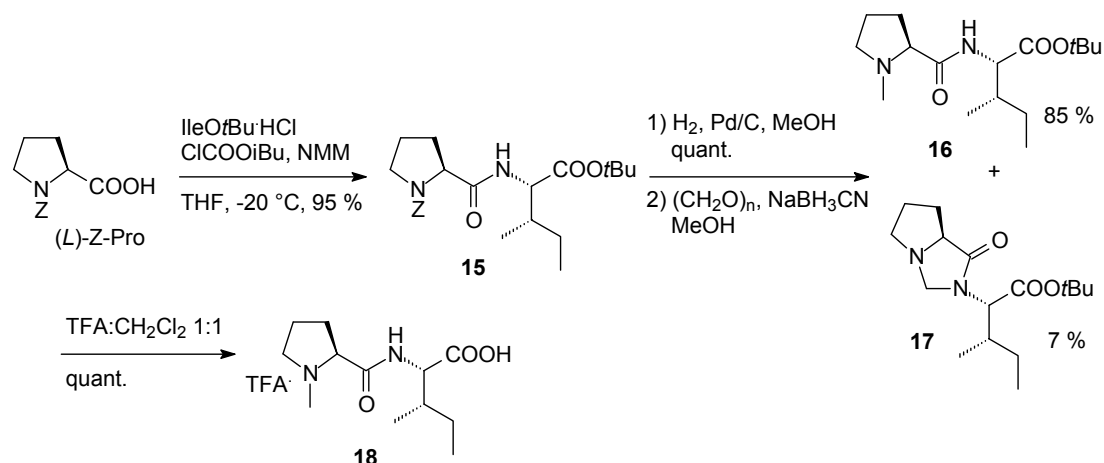


Abbildung 4.3 Vergleich von Protonen- und Deuterium-NMR-Spektren der deuterierten *N*-Methylpipercolinsäure $\text{d}_1\text{-14}$: a) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, b) $^2\text{H-NMR}$ -Spektrum

4.1.4 Synthese der deuterierten Peptid-Intermediate

4.1.4.1 Synthese des Dipeptids $\text{d}_1\text{-MepIle}$

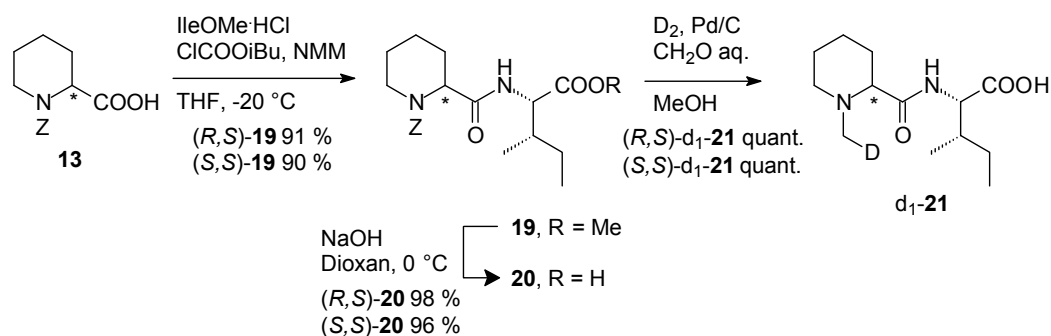
Bei ersten Untersuchungen zur Synthese des Dipeptids *N*-Methylpipercolinsäure-Isoleucin (MepIle) wurde zunächst Prolin als Testsubstrat eingesetzt (Schema 4.11). *Z*-Prolin wurde über ein gemischtes Anhydrid mit Isoleucin-*tert*-butylester in sehr guter Ausbeute zum Dipeptid **15** geknüpft. Der *tert*-Butylester wurde gewählt, da bei der Entschützung des *N*-Terminus durch katalytische Hydrierung ein freies Amin entsteht, welches intramolekular an der Esterfunktion des *C*-Terminus angreifen und somit den Diketopiperazinring schließen könnte, der *tert*-Butylester aber im Gegensatz zu einem Methyl ester relativ inert gegen solche Angriffe ist. Das freie Amin konnte in guter Ausbeute mit Paraformaldehyd und Natriumcyanoborhydrid zu **16** reaktiv aminiert werden, es entstand jedoch auch ein Nebenprodukt **17**, bei dem der Amidstickstoff des Isoleucins das Iminiumion am Prolin angegriffen und so einen Pyrrolidino-[1,2-*c*]-imidazolidin-1-on-Heterocyclus gebildet hat. Zum Schluss konnte der *tert*-Butylester mit Trifluoressigsäure entschützt und das Trifluoressigsäuresalz des *N*-Methylprolin-Isoleucin-Dipeptids **18** in quantitativer Ausbeute erhalten werden.



Schema 4.11 Testsubstrat ProIleOtBu

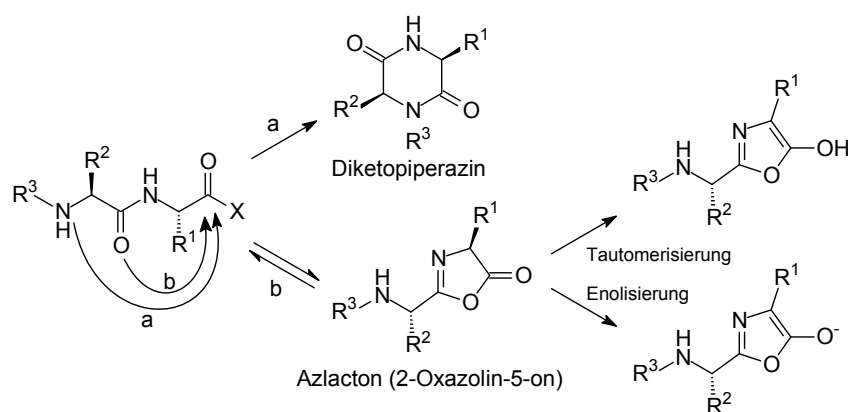
Zwischenzeitlich war die in Schema 4.9 beschriebene Methode zur Einführung der Deuteromethylgruppe entwickelt worden, so dass die Überlegung reifte, sie auch am Dipeptid zu testen. Hierzu wurde *Z*-geschützte Pipecolinsäure **13** mit Isoleucinmethylester *via* gemischtes Anhydrid zum Dipeptid **19** geknüpft, wobei kein Verlust chiraler Information beobachtet wurde. Nach Verseifen des Methylesters wurde das *Z*-geschützte Dipeptid **20** wie die Aminosäure **13** unter Deuteriumatmosphäre in Gegenwart von Palladium auf Aktivkohle entschützt, und nach Zugabe von Formaldehyd entstand das deuterierte Produkt d_1 -**21** der reduktiven Aminierung (Schema 4.12).

Bislang ist noch nicht geklärt, an welcher Stelle der Biosynthese die Epimerisierung des Stereozentrums der Pipecolinsäure stattfindet. Es ist aber anzunehmen, dass dies am Anfang geschieht, da es sich mit fortschreitender Synthese immer weiter vom Multienzymkomplex entfernt. Daher wurden das Dipeptid d_1 -MepIle d_1 -**21**, sowie das einfachste Tripeptid d_1 -MepIleMeVal d_1 -**30** mit beiden Enantiomeren der Pipecolinsäure synthetisiert.

Schema 4.12 Darstellung des monodeuterierten Dipeptids d_1 -MepIle d_1 -**21**

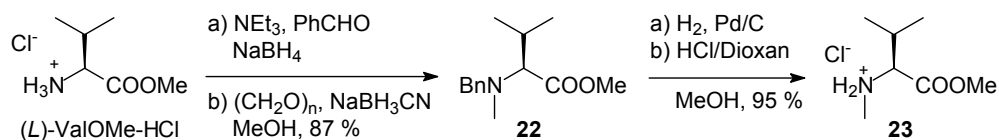
4.1.4.2 Synthese des Tripeptids d₁-MepIleMeVal

Bei ribosomaler sowie enzymatischer Biosynthese von Polypeptiden findet eine Kettenverlängerung der Aminosäuren vom *N*- zum *C*-Terminus statt. Diese Vorgehensweise eignet sich jedoch nicht zur Peptidsynthese in Lösung oder an fester Phase, da während der Aktivierung der Carbonsäure die Gefahr der Diketopiperazinbildung (Schema 4.13, Weg a) sowie der Epimerisierung an der *C*-terminalen Aminosäure über das Azlacton (2-Oxazolin-5-on) durch Enolisierung oder Tautomerisierung besteht (Schema 4.13, Weg b).^[87] Aus diesen Gründen werden Peptide im Allgemeinen in *C*→*N*-Richtung schrittweise synthetisiert, was bei der Synthese der Tubulyisin-Tripeptide befolgt wurde.



Schema 4.13 Mögliche Probleme bei *C*-terminaler Aktivierung von Peptiden

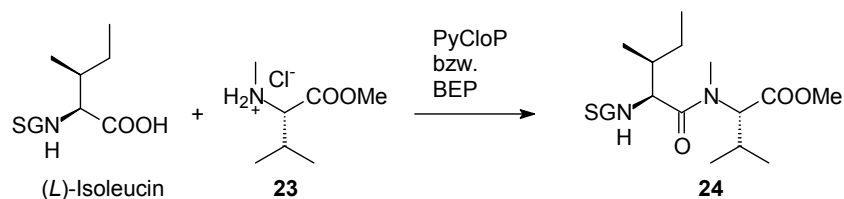
Somit musste zunächst *N*-Methylvalin-methylester bereitgestellt werden, welcher durch reduktive Aminierung dargestellt werden kann. Um eine Dimethylierung des Stickstoffs auszuschließen, musste (*L*)-Valinmethylester-Hydrochlorid mit Benzaldehyd und Natriumborhydrid erst Benzyl-geschützt werden,^[88] danach konnte mit Paraformaldehyd und Natriumcyanoborhydrid zu **22** *N*-methyliert werden.^[89] Beide Reaktionen konnten auch nacheinander im Eintopf durchgeführt werden. Die Benzylgruppe konnte durch katalytische Hydrierung entfernt werden, das freie Amin erwies sich jedoch als relativ leichtflüchtig, so dass es durch Zugabe von HCl in Dioxan als Hydrochlorid **23** abgefangen wurde.



Schema 4.14 Bereitstellung von MeValOMe-Hydrochlorid **23**

Erste Knüpfungsversuche von Boc-Isoleucin und *N*-Methylvalinmethylester-Hydrochlorid **23** über gemischte Anhydride (ClCOO*t*Bu/NMM; PivCl/NEt₃) bzw. mit Hilfe von DCC/HOBt lieferten das Dipeptid Boc-IleMeValOMe in nicht befriedigenden Ausbeuten. Daher wurde in der Literatur nach anderen Peptiden gesucht, die *N*-methylierte Aminosäuren beinhalten. Ein klassisches Beispiel ist Cyclosporin (Abbildung 4.4), wobei es sich um ein

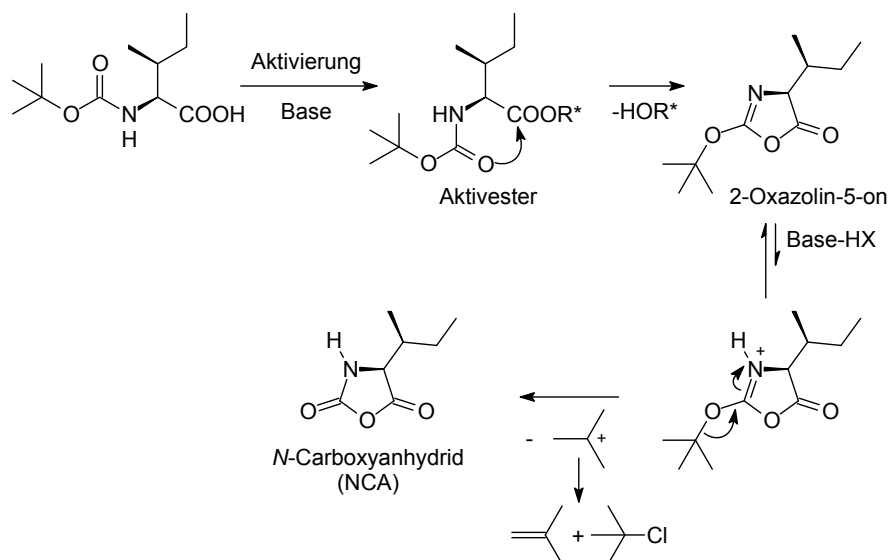
Tabelle 4.2 Dipeptidknüpfung IleMeVal



Eintrag	SG	Knüpfungsreagenz	Ausbeute [%]	dr (2 <i>S</i> :2 <i>R</i> -Ile)
1	Boc	PyCloP ^a	35	n.b.
2	Boc	BEP ^b	50	n.b.
3	Z	PyCloP ^a	89	98.2:1.8
4	Z	BEP ^b	83	98.9:1.1

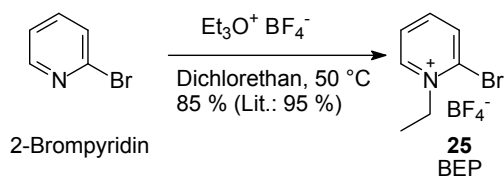
Reaktionsbedingungen: a) PyCloP, DIPEA, CH₂Cl₂, 0 °C, b) BEP, DIPEA, CH₂Cl₂, -10 °C

Die unbefriedigenden Ausbeuten bei Verwendung von Boc-geschütztem Isoleucin lassen sich dadurch erklären, dass das während der Aktivierung gebildete Azlacton (2-Oxazolin-5-on) Boc-geschützter Aminosäuren, welches durch das Hydrochlorid der zur Aktivierung eingesetzten Base protoniert werden kann, viel leichter durch Abspaltung eines *tert*-Butylkations zu *N*-Carboxyanhydrid-Derivaten zerfallen kann, als dies bei Fmoc- oder Z-geschützten Aminosäuren der Fall ist (Schema 4.15).^[92]

Schema 4.15 *N*-Carboxyanhydrid-Bildung bei Boc-geschützten Aminosäuren

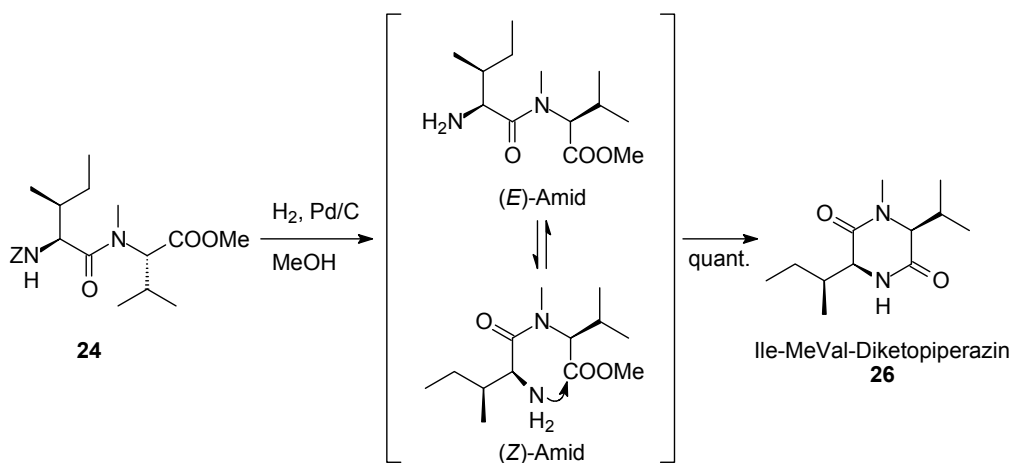
Obwohl die Knüpfung von *Z*-Isoleucin und *N*-Methylvalinmethylester-Hydrochlorid mit PyCloP eine etwas höhere Ausbeute geliefert hatte als mit BEP (89 % vs. 83 %), wurde BEP als Reagenz der Wahl für weitere Knüpfungsschritte mit *N*-Methyl-Aminosäuren verwendet. Die Gründe hierfür liegen darin, dass BEP (**25**) im Vergleich zu anderen Knüpfungs-

reagenzien sehr viel leichter synthetisiert werden kann (Schema 4.16). Durch *N*-Alkylierung von 2-Brompyridin mit Triäthylxonium-tetrafluorborat lässt es sich in sehr guter Ausbeute darstellen.^[93,94]



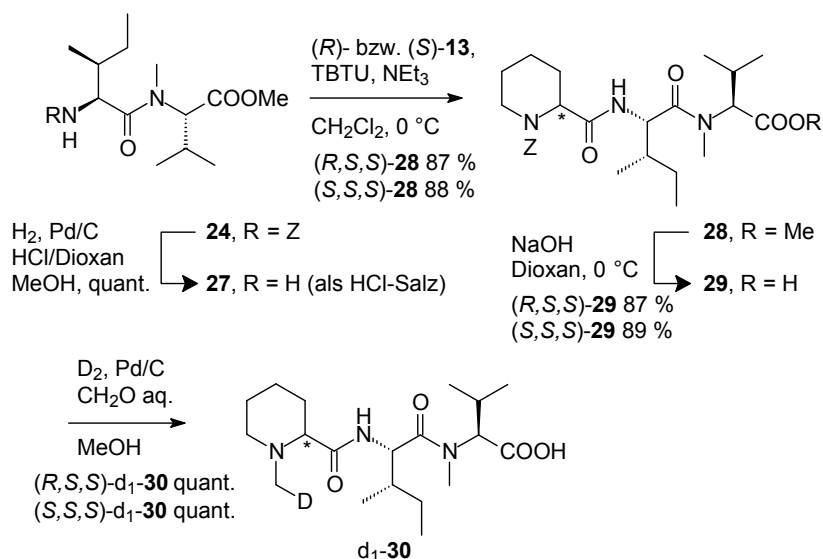
Schema 4.16 Synthese von BEP

Bei der Entschützung des Dipeptids *Z*-IleMeValOMe **24** am *N*-Terminus durch katalytische Hydrierung konnte leider nicht das gewünschte freie Amin isoliert werden, da sich das Isoleucin-Methylvalin-Diketopiperazin (IleMeVal-DKP) **26** in quantitativer Ausbeute gebildet hatte. Diketopiperazine treten häufiger bei *N*-Alkylpeptiden auf als bei normalen Peptiden, da die Amidfunktion in einem höheren Anteil als (*Z*)-Konformer vorliegt, in der es der Aminfunktion durch die räumliche Nähe sehr leicht fällt, intramolekular am *C*-Terminus anzugreifen (Schema 4.17).



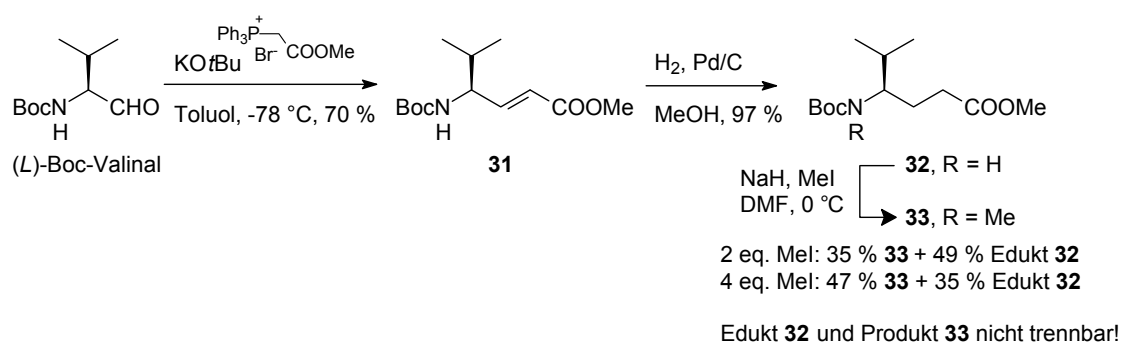
Schema 4.17 Entschützung des Dipeptids **24**

Um die Diketopiperazinbildung bei der Entschützung des *N*-Terminus zu vermeiden, wurde bei der katalytischen Hydrierung der *Z*-Schutzgruppe eine Lösung von HCl in Dioxan zugesetzt, so dass das freie Amin als Hydrochlorid **27** abgefangen wird (Schema 4.18). Als Knüpfungsreagenz zum Tripeptid wurde TBTU verwendet, womit das (*R,S,S*)- bzw. (*S,S,S*)-Tripeptid *Z*-PipIleMeVal **28** in guten Ausbeuten erhalten werden konnte. Verseifung des Methylesters zu **29** und anschließende Entschützung am *N*-Terminus gefolgt von der reduktiven Deuteromethylierung lieferten die Tripeptide (*R,S,S*)-d₁-**30** und (*S,S,S*)-d₁-**30**.

Schema 4.18 Darstellung des monodeuterierten Tripeptids d_1 -MepIleMeVal d_1 -**30**

4.1.4.3 Synthese des Tripeptids mit C_2 -verlängerter Valineinheit

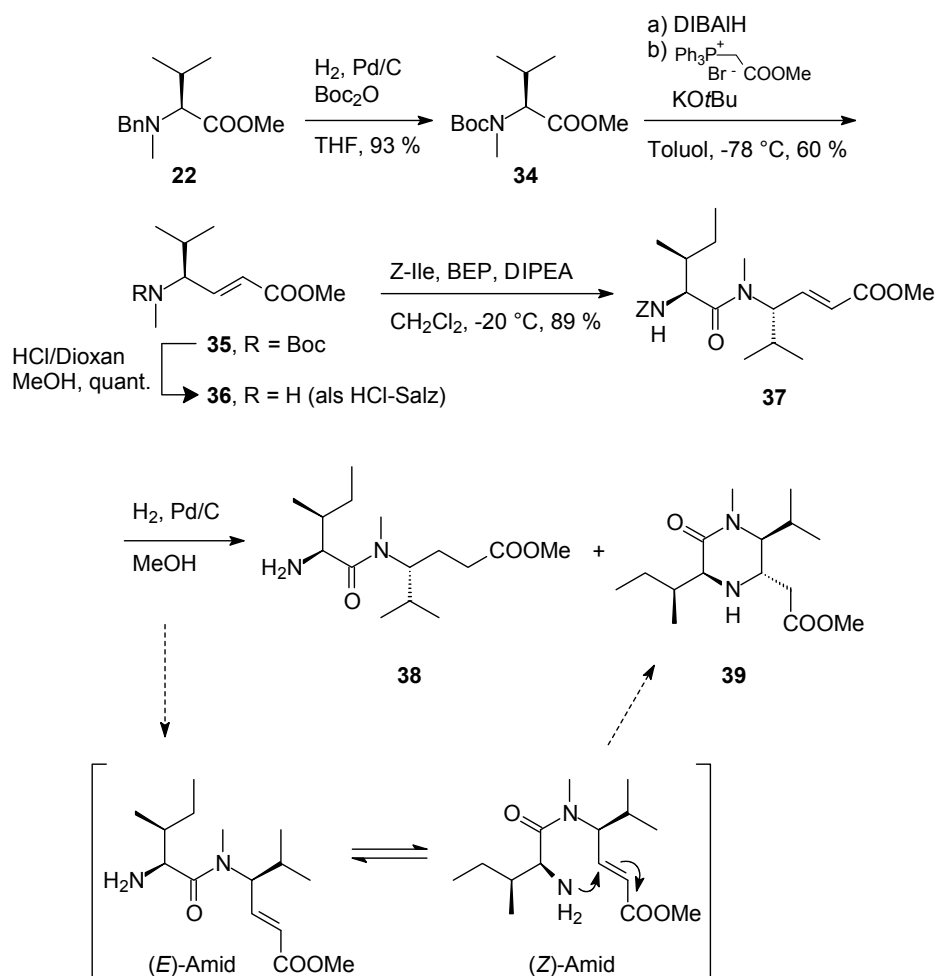
Zur Synthese des nächsten Tripeptids mit verlängerter C -terminaler Aminosäure musste zunächst diese N -methylierte von Valin abgeleitete γ -Aminosäure hergestellt werden. Hierzu konnte Boc-Valinal über eine Wittig-Reaktion zur ungesättigten γ -Aminosäure **31** verlängert werden, die nach Hydrieren der Doppelbindung mit Hilfe von Natriumhydrid und Methyljodid N -methyliert werden sollte (Schema 4.19). Die Einführung der N -Methylgruppe verlief jedoch nicht vollständig, so dass bei der Reaktion ein nicht trennbares Gemisch aus N -methylierter γ -Aminosäure **33** und nicht- N -methyliertem Edukt **32** entstand. Auch eine Verwendung von vier Äquivalenten Methyljodid verbesserte das Produkt-Edukt-Verhältnis nicht wesentlich.

Schema 4.19 Verlängerung von Valin und spätere Einführung der N -Methylgruppe

Daher wurde beschlossen, die N -Methylgruppe schon vor der Verlängerung in das Molekül einzubringen. Der durch reduktive Aminierung erhaltene Benzyl- N -Methylvalinmethylester **22** wurde in Gegenwart von Boc_2O hydriert und so in den Boc-geschützten N -Methylvalinmethylester **34** überführt, welcher mit DIBALH zum Aldehyd reduziert und *in situ*

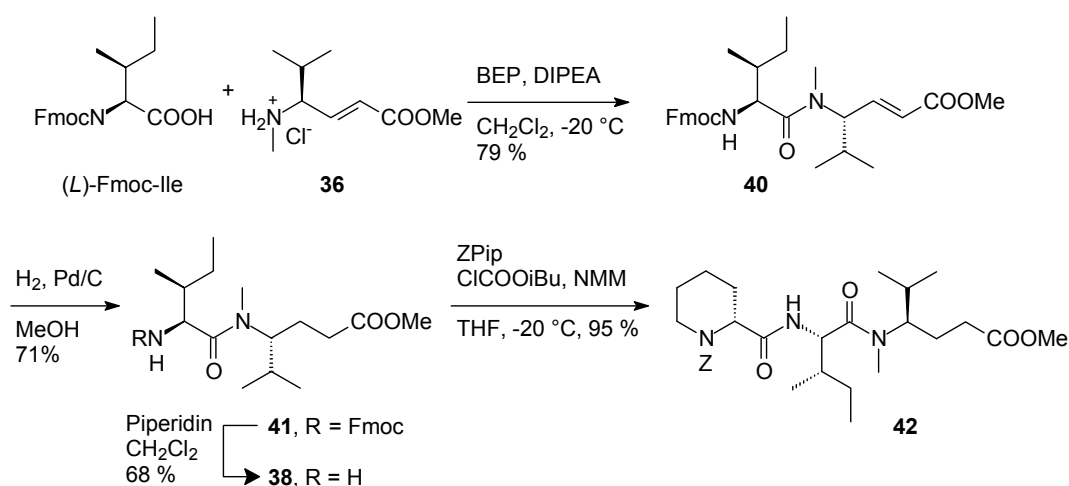
mit dem Wittig-Reagenz zum verlängerten *N*-Methylvalin-Derivat **35** umgesetzt wurde (Schema 4.20). Nach Abspalten der Boc-Schutzgruppe mit einer HCl-Dioxan-Lösung wurde das Hydrochlorid **36** mit *Z*-*L*-Isoleucin unter Verwendung von BEP zum Dipeptid **37** geknüpft. Die Doppelbindung in der verlängerten Aminosäure wurde bewusst beibehalten, um eine intramolekulare Lactambildung während der Peptidknüpfung zu verhindern. Sie sollte im nächsten Schritt gleichzeitig mit der *Z*-Schutzgruppe am Isoleucin hydriert werden.

Bei der Hydrierung des Dipeptids **37** entstand nicht nur das gewünschte Produkt **38**, sondern auch das Produkt **39** einer intramolekularen Michael-Addition (Schema 4.20). Diese kann ablaufen, wenn die Aminfunktion des Isoleucins bereits entschützt vorliegt, die Doppelbindung des verlängerten Valins jedoch noch nicht reduziert ist. Zudem wird dieser Schritt durch die (*Z*)-Amidstruktur der *N*-Methyl-Peptidbindung begünstigt. Interessant ist hierbei, dass im NMR-Spektrum nur ein Diastereomer des Michael-Produkts zu erkennen ist.



Schema 4.20 Verlängerung von Boc-MeValOMe **34**

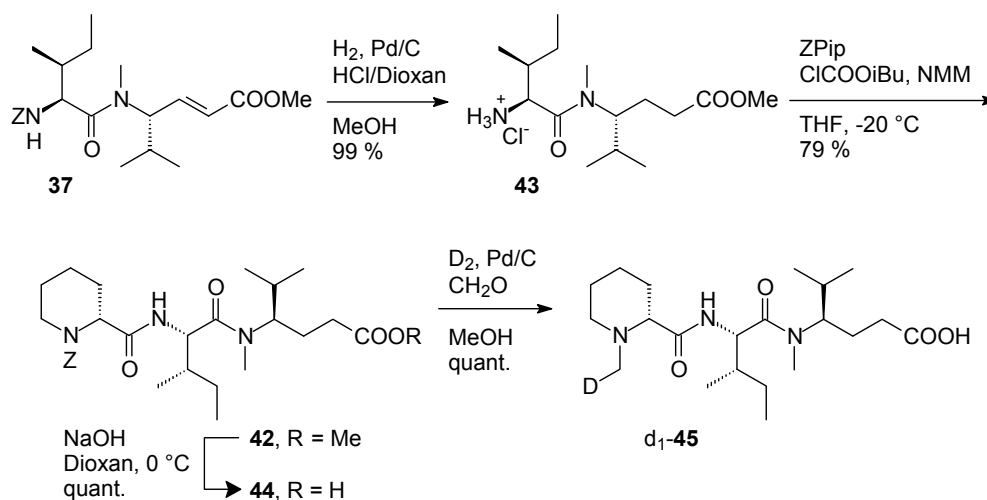
Um diese unerwünschte Nebenreaktion zu verhindern, wurden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen, zum einen eine Änderung der Schutzgruppe, zum anderen der Zusatz einer HCl-Lösung bei der Hydrierung des *Z*-geschützten Dipeptids.



Schema 4.21 Synthese des Tripeptids **42** über die Fmoc-Route

Bei der Schutzgruppenänderung sollte die Doppelbindung nach der Peptidknüpfung und vor der Entschützung hydriert werden können. Als Schutzgruppe wurde hierfür Fmoc ausgewählt, da Fmoc-Isoleucin im Gegensatz zu Boc-Isoleucin (siehe Schema 4.15, Kapitel 4.1.4.2) auch gute Ergebnisse bei der Peptidknüpfung mit der *N*-methylierten Aminosäure *via* BEP liefern sollte.^[90] Dies wurde auch bestätigt, leider verliefen die Hydrierung der Doppelbindung von **40** und die Fmoc-Entschützung von **41** nicht überragend gut (Schema 4.21). Möglicherweise lässt sich die mäßige Ausbeute bei der Hydrierung dadurch erklären, dass die Schutzgruppe schon zum Teil abgespalten wurde, da auf dem DC ein stark UV-absorbierender, unpolarer Spot beobachtet wurde, der von einem abgespaltenen Fluorenylrest stammen könnte.

Durch Zusatz einer HCl-Dioxan-Lösung bei der Hydrierung von Doppelbindung und *Z*-Schutzgruppe des Dipeptids **37** konnte das Hydrochlorid des entschützten Dipeptids in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten werden, ohne dass eine Nebenreaktion beobachtet wurde (Schema 4.22).

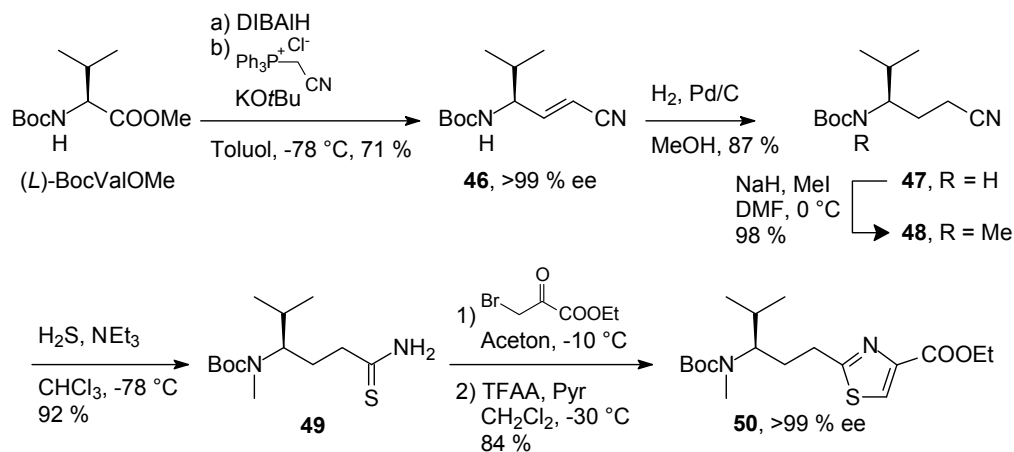


Schema 4.22 Synthese des Tripeptids **42** über die *Z*-Route

Vorteile dieses Weges gegenüber der Fmoc-Route (Schema 4.21) liegen in der um einen Schritt kürzeren Sequenz und in den im Allgemeinen höheren Ausbeuten. Nur bei der Knüpfung zum Tripeptid **42** ergab die Verwendung des freien Amins **38** in der Fmoc-Route eine höhere Ausbeute als die Verwendung des Hydrochlorids **43**. Abschließend wird der Methylester zu **44** verseift und der *N*-Terminus entschützt, sowie unter Deuteriumatmosphäre reaktiv zu **d₁-45** deuteromethyliert.

4.1.4.4 Synthese des Tripeptids **d₂-MepIle**, „Tuv“

Für das nächste Tripeptid musste die Thiazolaminosäure „Tubuvalin“^[a] synthetisiert werden. Dazu wurde ebenfalls Boc-Valinmethylester eingesetzt und nach DIBALH-Reduktion zum Aldehyd *in situ* über eine Wittig-Reaktion zu **46** verlängert (Schema 4.23). Im Gegensatz zur γ -Aminosäure **31** wurde hier eine Nitrilfunktion am *C*-Terminus statt eines Esters eingeführt. Die Doppelbindung wurde durch katalytische Hydrierung entfernt, anschließend konnte in **47** die *N*-Methylgruppe mit Natriumhydrid und Methyljodid ohne Probleme in sehr hoher Ausbeute eingeführt werden. Die Nitrilfunktion in **48** wurde mit Hilfe von H₂S in eine Thioamid-Gruppe überführt,^[95] so dass **49** in einer abgewandelten Hantzsch Thiazol-synthese mit Brombrenztraubensäureethylester über ein Hydroxythiazolin als Zwischenstufe zum „Tubuvalin“ **50** umgesetzt werden konnte.^[96,35] Eine Betrachtung der ee-Werte von **46** und **50** zeigte, dass während der ganzen Reaktionssequenz kein Verlust an chiraler Information auftrat.

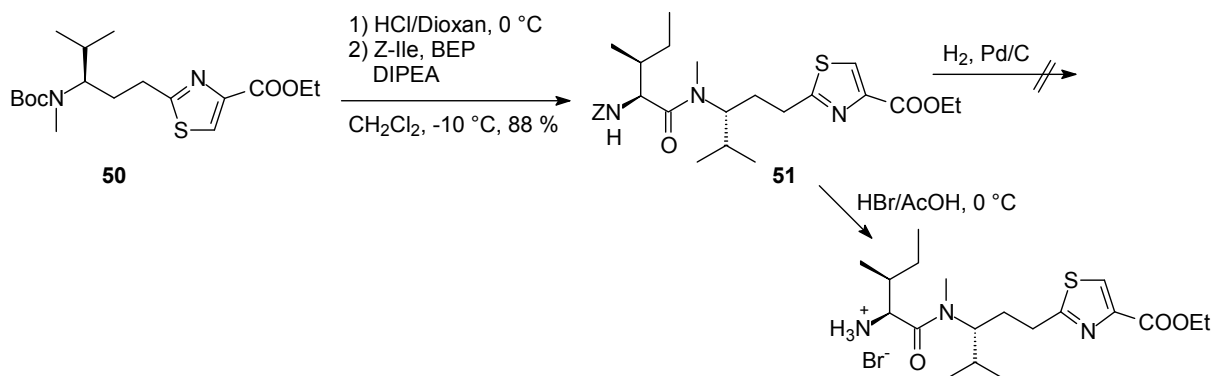


Schema 4.23 Synthese von „Tubuvalin“ „Tuv“

[a] Mit „Tubuvalin“ („Tuv“) wird im Folgenden das Tubuvalin-Derivat Desacetoxy-*N*-methyl-Tubuvalin ((*R*)-2-[3-(Methylamino)-4-methyl-pentyl]-thiazol-4-carbonsäure) bezeichnet.

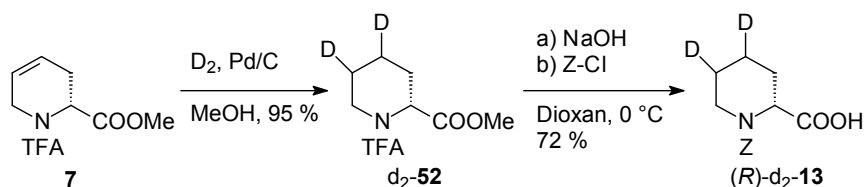
Nach Entschützen des Stickstoffs mit einer HCl-Dioxan-Lösung konnten **50** und *Z*-Isoleucin über die bewährte BEP-Methode in guter Ausbeute zum Dipeptid **51** geknüpft werden (Schema 4.24). Wipf *et al.* verwendeten zur Knüpfung von Boc- bzw. Fmoc-Ile und Tubuvalin-Tubuphenylalanin-Allylester neben DEPBT, HATU, TBTU, PyBOP und BOP-Cl auch BEP, sie erhielten jedoch keinen vollständigen Umsatz und nur geringe Ausbeuten (Kapitel 2.4.2).^[38] Das Problem lag hier möglicherweise an der Schutzgruppenwahl des Isoleucins.

Als Nächstes sollte das Dipeptid **51** am *N*-Terminus entschützt werden, um es mit Pipecolinsäure zu knüpfen. Die *Z*-Schutzgruppe ließ sich leider nicht durch katalytische Hydrierung mit Palladium abspalten, da vermutlich der Schwefel des Thiazolrings an Pd koordiniert, so dass dieses nicht mehr zur C-O-Bindungsspaltung zur Verfügung steht. Alternativ kann die *Z*-Schutzgruppe mit Bromwasserstoff in Eisessig entfernt werden.



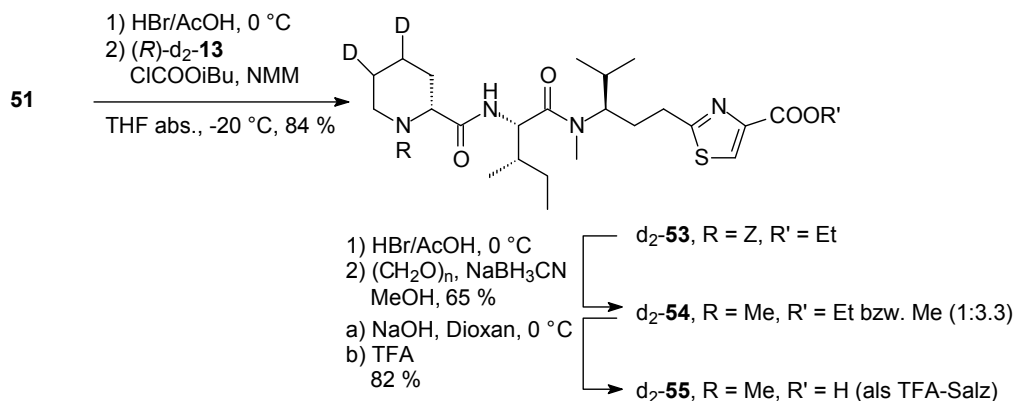
Schema 4.24 Dipeptidknüpfung zu *Z*-Ile-,Tuv“OEt **51**

Da der heterogene Palladium-Katalysator zum Hydrieren der *Z*-Schutzgruppe nicht mehr verwendet werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass er auch nicht mehr zur *N*-Methylierung bzw. *N*-Deuteriomethylierung, wie bei den einfacheren Peptiden beschrieben (siehe z. B. Schema 4.12), eingesetzt werden kann. Die Deuteriummarkierung musste auf eine andere Weise ins Molekül eingebracht werden. Es erwies sich als vorteilhaft, dass zuvor schon die ungesättigte Pipecolinsäure (*R*)-**7** synthetisiert worden war, die zu (*R*)-d₂-**52** deuteriert werden und zur deuterierten *Z*-Pipecolinsäure (*R*)-d₂-**13** umgeschützt werden kann (Schema 4.25).



Schema 4.25 Darstellung von (*R*)-d₂-*Z*-Pipecolinsäure (*R*)-d₂-**13**

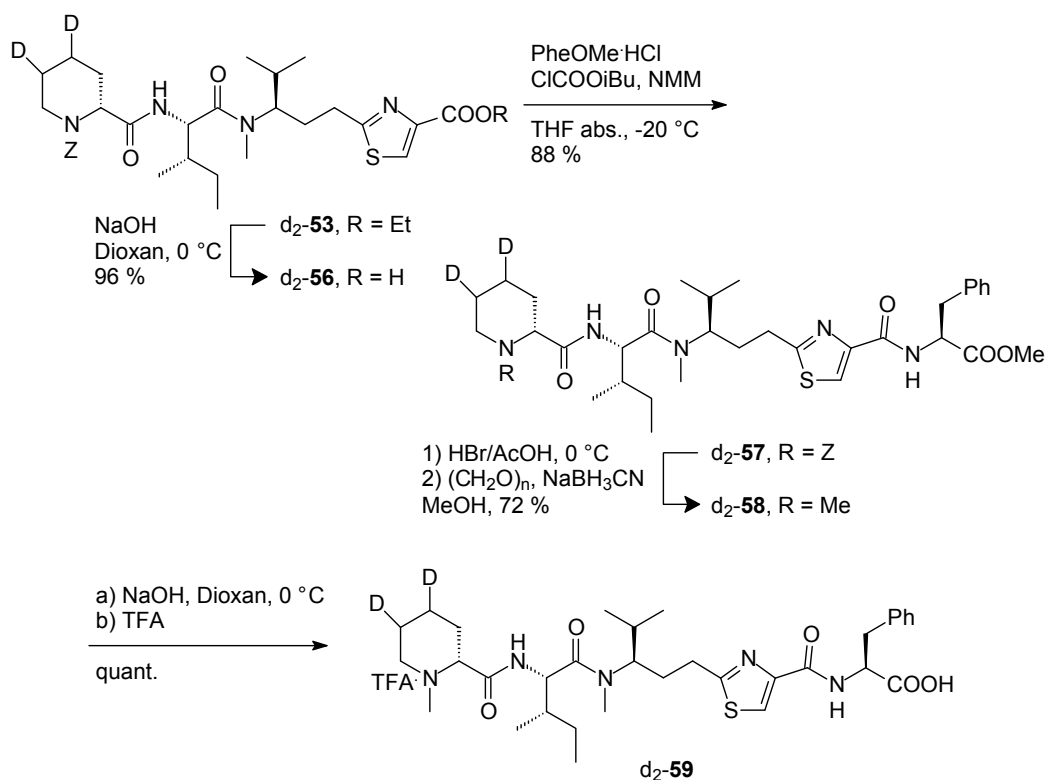
Das Dipeptid **51** konnte mit HBr in Eisessig am *N*-Terminus entschützt werden. Das entstandene Hydrobromid wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert, so dass das freie Amin des Dipeptids **51** in die Peptidknüpfung zum Tripeptid **53** mit der deuterierten *Z*-Pipicolinsäure (*R*)-*d*₂-**52** eingesetzt werden konnte (Schema 4.26). Nach Abspaltung der *Z*-Schutzgruppe der Pipicolinsäure mit Bromwasserstoffsäure wurde das freigesetzte Amin mit Hilfe von Paraformaldehyd und Natriumcyanoborhydrid reaktiv aminiert. Dabei lief eine teilweise Umesterung des Ethylesters ab, so dass *d*₂-**54** als Gemisch des Ethyl- und Methyl-esters im Verhältnis 1:3.3 erhalten wurde. Um dies zu verhindern, wurde versucht, die Reaktion in Ethanol statt Methanol durchzuführen, wobei jedoch eine geringere Ausbeute erzielt wurde. Da der Ester im nächsten Schritt sowieso verseift werden sollte, wurde nicht weiter versucht, die Reaktion zu optimieren. Mit Natronlauge konnte das Tripeptid *d*₂-**54** verseift und durch Ansäuern mit Trifluoressigsäure als TFA-Salz *d*₂-**55** isoliert werden.



Schema 4.26 Synthese des deuterierten Tripeptids *d*₂-**55**

4.1.4.5 Synthese des Tetrapeptids *d*₂-MepIle,*Tuv*“Phe

Das zuvor schon synthetisierte Tripeptid *d*₂-**53** konnte mit 1 M Natronlauge in Dioxan zu **56** verseift werden, so dass am *C*-Terminus mit Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid über die Methode des gemischten Anhydrids weiter zum Tetrapeptid *d*₂-**57** geknüpft werden konnte (Schema 4.27). Das Tetrapeptid wurde am *N*-Terminus mit Bromwasserstoffsäure *Z*-entschützt und mit Paraformaldehyd und Natriumcyano-borhydrid zum *N*-methylierten Tetrapeptid *d*₂-**58** reaktiv aminiert. Ebenso wie das Tripeptid konnte auch hier der Methyl-ester mit Natronlauge verseift und das Produkt durch Aufarbeitung mit Trifluoressigsäure als TFA-Salz *d*₂-**59** isoliert werden.

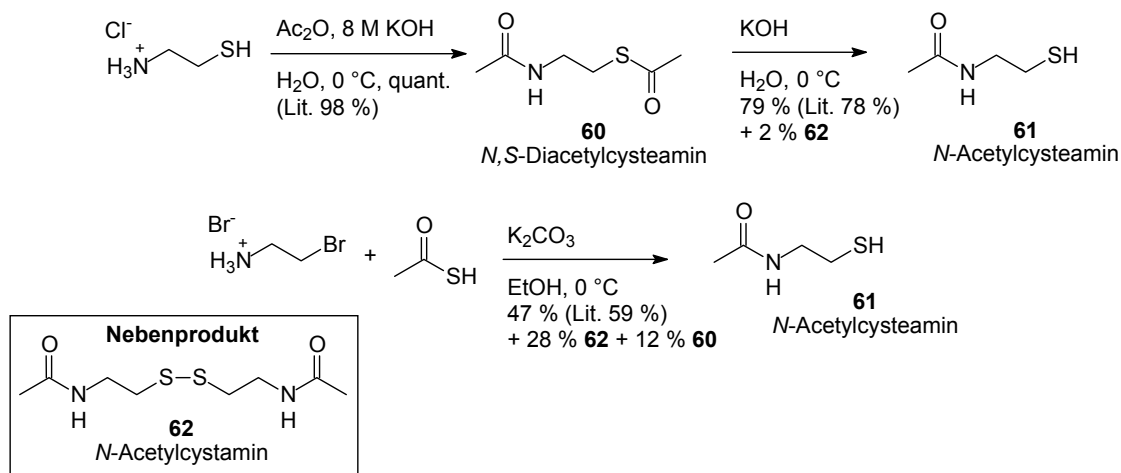

 Schema 4.27 Synthese des deuterierten Tetrapeptids d₂-59

4.2 Thioveresterung der Biosynthese-Zwischenstufen

4.2.1 Bereitstellung von *N*-Acetylcysteamin

Das zur Thioestersynthese benötigte Thiol *N*-Acetylcysteamin (NAC) **61** ist zwar kommerziell erhältlich, kann aber auch selbst hergestellt werden. Hierzu wurden zwei Methoden getestet (Schema 4.28). Bei der ersten wird Cysteamin-Hydrochlorid mit Acetanhydrid sowohl am Stickstoff, als auch am Schwefel zum *N,S*-Diacetylcysteamin **60** acetyliert, der Thioester lässt sich aber einfach wieder mit KOH zum *N*-Acetylcysteamin **61** verseifen.^[97] Die zweite Methode geht von 2-Bromethylamin-Hydrobromid aus, welches mit Thioessigsäure umgesetzt wird.^[98] Hierbei entstand ein Produktgemisch aus dem gewünschten *N*-Acetylcysteamin **61**, dem zweifach acetylierten **60** sowie dem Dithiol *N*-Acetylcysteamin **62**^[a]. Die erste Synthese wurde bevorzugt verwendet, da hierbei nur eine geringe Menge des Dithiols *N*-Acetylcysteamin **62** und keine weiteren Nebenprodukte entstehen, zudem ist sie geruchsärmer. Das *N*-Acetylcysteamin **61** hat keinen charakteristischen Thiolgeruch, die Geruchsbelästigung bei der zweiten Reaktion lässt sich auf die Thioessigsäure zurückführen.

[a] Das Dithiol **62** entsteht durch Oxidation an der Luft, daher ist zur Handhabung des Thiols **61** zu beachten, dass Aufbewahrung und Reaktionen unter Schutzgas stattfinden sollten.



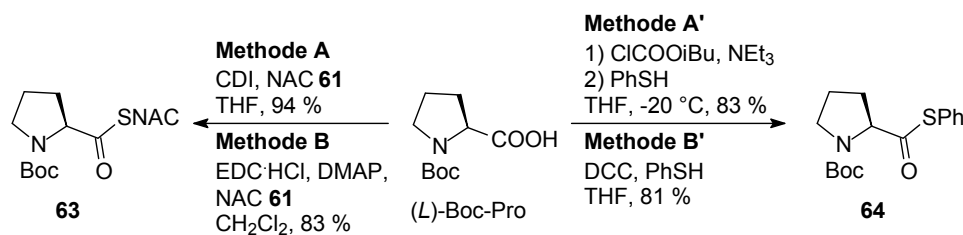
Schema 4.28 Bereitstellung des Thiols *N*-Acetylcysteamin (NAC) **61**

4.2.2 Synthese der Pip- und Mep-Thioester

Neben SNAC-Estern, die den terminalen Teil des Phosphopantetheinarms am PCP imitieren und so für eine enzymatische Erkennung des Substrats sorgen, haben sich auch Thiophenolester in Fütterungsstudien bewährt. Thiophenolester sind sehr reaktiv, da sich Thiophenol aufgrund der Mesomeriestabilisierung des Thiophenolats gut als Abgangsgruppe eignet. Sie haben sich daher bei der Enzymacylierung in manchen Fällen den SNAC-Estern als überlegen erwiesen.^[99] Für die Fütterungsstudien sollten zunächst Substrate in beiden Thioestervarianten synthetisiert werden, um feststellen zu können, welcher Thioester sich für das Tubulysin-NRPS/PKS-System besser eignet.

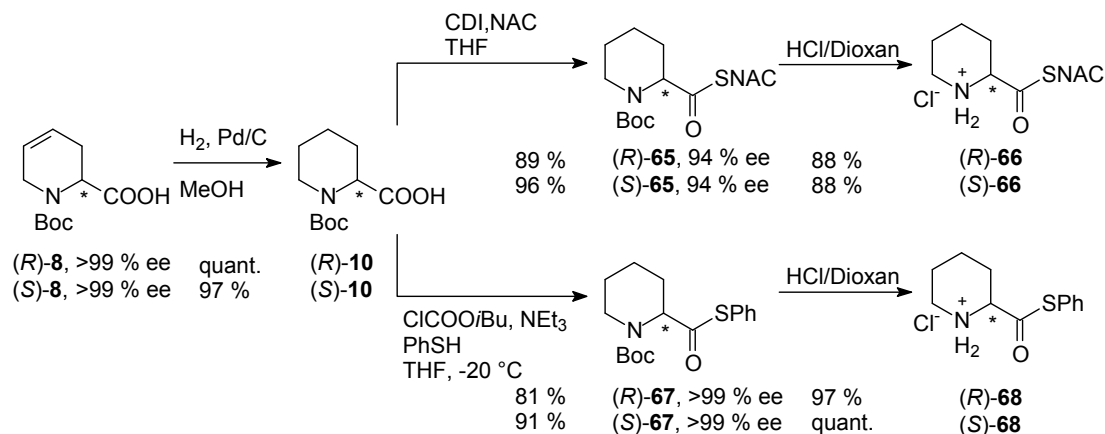
(*L*)-Boc-Prolin wurde zunächst als Testsubstrat verwendet, um geeignete Methoden zur Thioveresterung zu finden (Schema 4.29). Zur Bildung des SNAC-Esters **63** wurden CDI (Methode A)^[100] und EDC/DMAP (Methode B)^[101] getestet. Methode A mit CDI lieferte eine etwas höhere Ausbeute und wurde daher im Folgenden bevorzugt angewandt. Des Weiteren ist auch eine Thioveresterung mit DCC^[102] möglich, problematisch ist hierbei jedoch, dass der Boc-Prolin-SNAC-Ester sehr polar ist und daher der entstandene Harnstoff nicht vollständig abgetrennt werden konnte.

Der Thiophenolester **64** konnte über ein gemischtes Anhydrid mit Chlorameisensäure-*iso*-butylester und NEt₃ (Methode A')^[103] und mit Hilfe von DCC (Methode B')^[103] erhalten werden. Auf beiden Wegen werden etwa gleich hohe Ausbeuten erzielt, Methode A' wurde aber bevorzugt, da bei der Aufarbeitung kein unangenehmer Geruch nach Thiophenol mehr vorhanden war. Eine Erklärung hierfür ist, dass überschüssiges Thiophenol als PhSCOO*i*Bu abgefangen wird, welches in geringen Mengen isoliert werden konnte.



Schema 4.29 Testreaktionen zu den Thioveresterungen

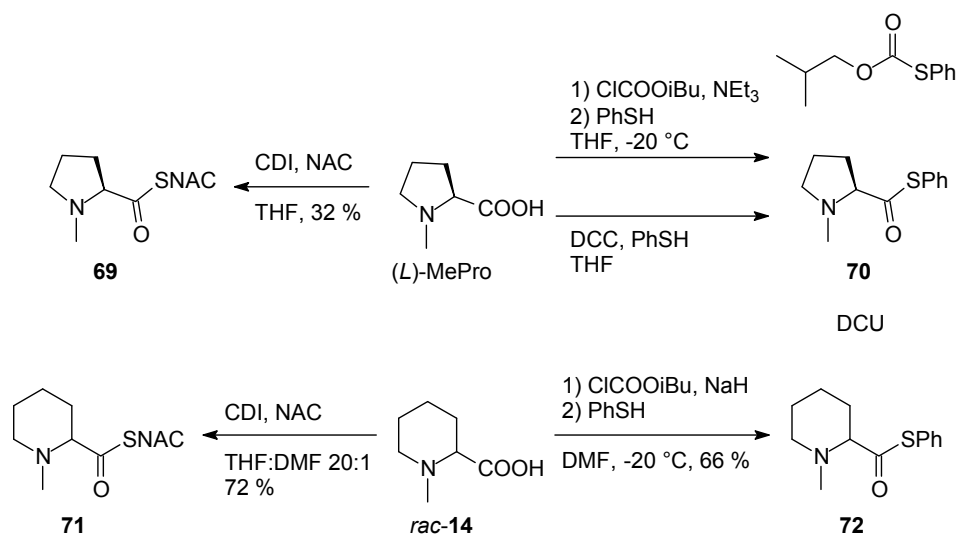
Zur Synthese der Pipecolinsäurethioester wurde das zuvor hergestellte, enantiomerenreine Boc-Baikiain **8** zur Boc-Pipecolinsäure **10** hydriert, welches mit CDI und *N*-Acetylcysteamin zum Boc-Pipecolinsäure-SNAC-Ester **65** und mit ClCOO*i*Bu/NEt₃ und Thiophenol zum Boc-Pipecolinsäurethiophenolester **67** umgesetzt wurde (Schema 4.30). Bei der Thiophenolveresterung wurde kein Verlust an Chiralität beobachtet, bei der SNAC-Veresterung kam es zu einem geringen Verlust an Enantiomerenreinheit (der ee-Wert sank auf 94 %). Die Boc-Schutzgruppe konnte jeweils mit einer HCl-Dioxan-Lösung gespalten werden.

Schema 4.30 Synthese von Pipecolinsäurethioestern **66** und **68**

Die Pipecolinsäurethioester-Hydrochloride **66** und **68** wurden in der Arbeitsgruppe Müller einer *tubZ* negativen Mutante zugefüttert. Diese kann kein Lysin mehr zu Pipecolinsäure cyclisieren und somit kein Tubulylin produzieren. Deshalb sollte es bei der Mutante möglich sein, undeuterte Substrate zuzugeben. Es konnte jedoch kein Einbau festgestellt werden. Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen: (1) entweder konnten die Pipecolinsäurethioester **66** und **68** nicht in die Zellen gelangen, (2) sie wurden nicht von der A-Domäne des TubC erkannt und akzeptiert, oder (3) sie dimerisierten zu Diketopiperazinen, sobald sie in den gepufferten Zelllösungen nicht mehr als Hydrochloride vorlagen. Die Erklärung der Diketopiperazinbildung kann dadurch gestützt werden, dass beispielsweise *L*-ProSNAC in einer Pufferlösung eine Halbwertszeit von nur 15 min besitzt.^[104]

Die Thioveresterung von (*L*)-*N*-Methylprolin ist im Gegensatz von (*L*)-Boc-Prolin etwas problematisch. Bei der SNAC-Veresterung zu **69** wurden nur 32 % Ausbeute erhalten, bei der Thiophenolveresterung entstanden auf beiden Wegen (Methode A' und B') nur geringe

Mengen an Thiophenolester **70**, es wurden hauptsächlich Nebenprodukte wie Thiophenylcarbonat bzw. Dicyclohexylharnstoff (DCU) gebildet (Schema 4.31). Der Grund für die schlechten Ausbeuten scheint in der schlechten Löslichkeit von MePro in THF zu liegen.

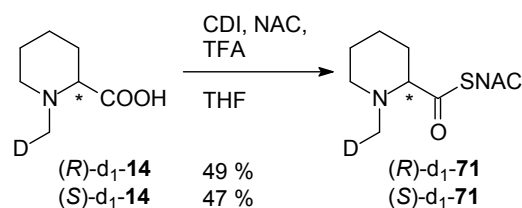


Schema 4.31 Testreaktionen mit (*L*)-MePro und *rac*-**14**

Bei der SNAC-Veresterung von racemischer *N*-Methylpipercolinsäure (Mep) *rac*-**14** zu **71** konnte durch Verwendung eines Lösemittelgemisches (THF:DMF 20:1) eine wesentlich höhere Ausbeute von 72 % erreicht werden (Schema 4.31). Im Fall der Thiophenolveresterung zu **72** erwies es sich als hilfreich, die Säurefunktion zur Bildung des Anhydrids zunächst mit Natriumhydrid zu deprotonieren, zudem wurde die Reaktion in DMF durchgeführt. Die Verwendung von NaH führt jedoch bei Verwendung enantiomerenreiner *N*-Methylpipercolinsäure zu gewaltigen Chiralitätsverlusten.

Bei Fütterungsexperimenten mit racemischem MepSNAC **71** konnte kein Einbau festgestellt werden, mit racemischem MepSPh **72** gab es Probleme mit den Zellen. Daher wurde im Weiteren auf die Synthese der Thiophenolester verzichtet. Zudem wurden wieder deuterierte Substrate synthetisiert, die zum Vergleich auch im Wildtyp eingesetzt werden können.

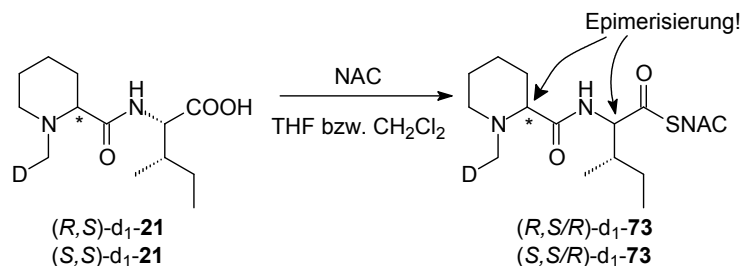
Die SNAC-Veresterung mit enantiomerenreiner *N*-Methylpipercolinsäure **14** lieferte **71** in viel geringerem Maße als bei Verwendung von racemischer Mep (25 % (*R*)-**71** bzw. 19 % (*S*)-**71** vs. 72 % *rac*-**71**). Das Problem liegt in der schlechten Löslichkeit von **14**, denn auch wenn ein höherer Anteil an DMF verwendet wurde, blieb **14** suspendiert und konnte zu 41 % bzw. 54 % wieder zurückgewonnen werden. Über eine andere Syntheseroute wurde d₂-Mep als TFA-Salz erhalten. Bei dessen Thioveresterung konnte beobachtet werden, dass sich das TFA-Salz der Aminosäure besser in THF löst als die freie Aminosäure, die wahrscheinlich als Zwitterion vorliegt. Daher wurde bei der SNAC-Veresterung der enantiomerenreinen d₁-Mep d₁-**14** 1 Äquivalent TFA zugegeben, wodurch die Ausbeute von d₁-**71** auf fast 50 % gesteigert werden konnte (Schema 4.32).



Schema 4.32 Synthese des d_1 -Mep-SNAC-Esters **71**

4.2.3 Thioveresterung der deuterierten Peptid-Zwischenstufen

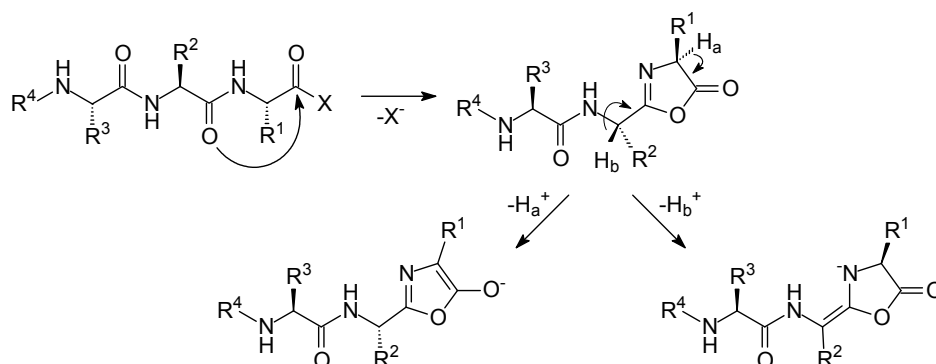
Die SNAC-Veresterung des Dipeptids d_1 -**21** mit CDI gelang zwar in guter Ausbeute, jedoch epimerisierte das α -Zentrum der C-terminalen Aminosäure Isoleucin. Da bei der Reaktion mit CDI Imidazol freigesetzt wird, das als Base für die Epimerisierung verantwortlich sein könnte, wurden auch andere Knüpfungsreagenzien wie DCC und DCI getestet, bei denen keine basischen Intermediate entstehen. Hierbei wurde jedoch sogar eine deutliche Epimerisierung der, vom C-Terminus aus gesehen, vorletzten Aminosäure, der Pipecolinsäure, beobachtet (Tab. 4.3, Eintrag 3 und 4). Die Epimerisierung der Pipecolinsäure sollte möglichst vermieden werden, da in den Fütterungsexperimenten untersucht werden soll, ob auf der Stufe des Dipeptids schon eine Epimerisierung der Pipecolinsäure ((*L*) zu (*D*)) stattgefunden hat. Eine Epimerisierung des Isoleucin- α -Zentrums ist hingegen nicht weiter dramatisch, da im Multienzymkomplex nur das (*L*)-Derivat erkannt, eingebaut und zum nächsten Modul weitergereicht werden sollte. Bei genauerer Betrachtung der NMR-Spektren fiel jedoch auch bei den ersten Reaktionen mit CDI (Tab. 4.3, Eintrag 1 und 2) eine geringe Epimerisierung des α -Zentrums von Mep von weniger als 5 % auf. Es bleibt abzuwarten, ob mit diesen Verbindungen aussagekräftige Ergebnisse bei Fütterungsstudien erhalten werden können oder ob weitere Methoden zur Unterdrückung der Mep-Epimerisierung gefunden werden müssen.

Tabelle 4.3 SNAC-Veresterung des Dipeptids d₁-21

Eintrag	Edukt	Reagenz	Ausbeute	(<i>R,S</i>):(<i>R,R</i>):(<i>S,R</i>):(<i>S,S</i>)-d ₁ -73 ^[a]
1	(<i>R,S</i>)-d ₁ -21	CDI	73 %	2.3 : 1 : 0.07 : 0.1
2	(<i>S,S</i>)-d ₁ -21	CDI	66 %	0.05 : 0.05 : 1 : 1.9
3	(<i>R,S</i>)-d ₁ -21	DCC	n.b.	1.2 : 1 : 0.3 : 0.4
4	(<i>R,S</i>)-d ₁ -21	DIC	n.b.	2.1 : 1 : 0.3 : 0.4

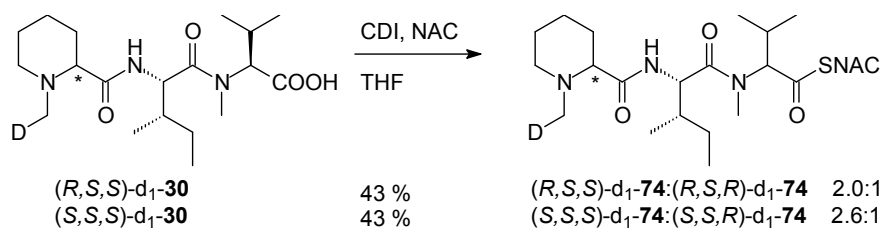
[a] Verhältnisse aus ¹H-NMR-Spektren bestimmt.

Zu Epimerisierungen im Peptid kann es kommen, wenn sich durch Aktivierung des C-Terminus das Azlacton (2-Oxazolin-5-on) bildet, welches an der α -Position der letzten (H^a von AA¹), aber auch an der α -Position der vorletzten Aminosäure (H^b von AA²) deprotoniert werden kann (Schema 4.33).^[87]

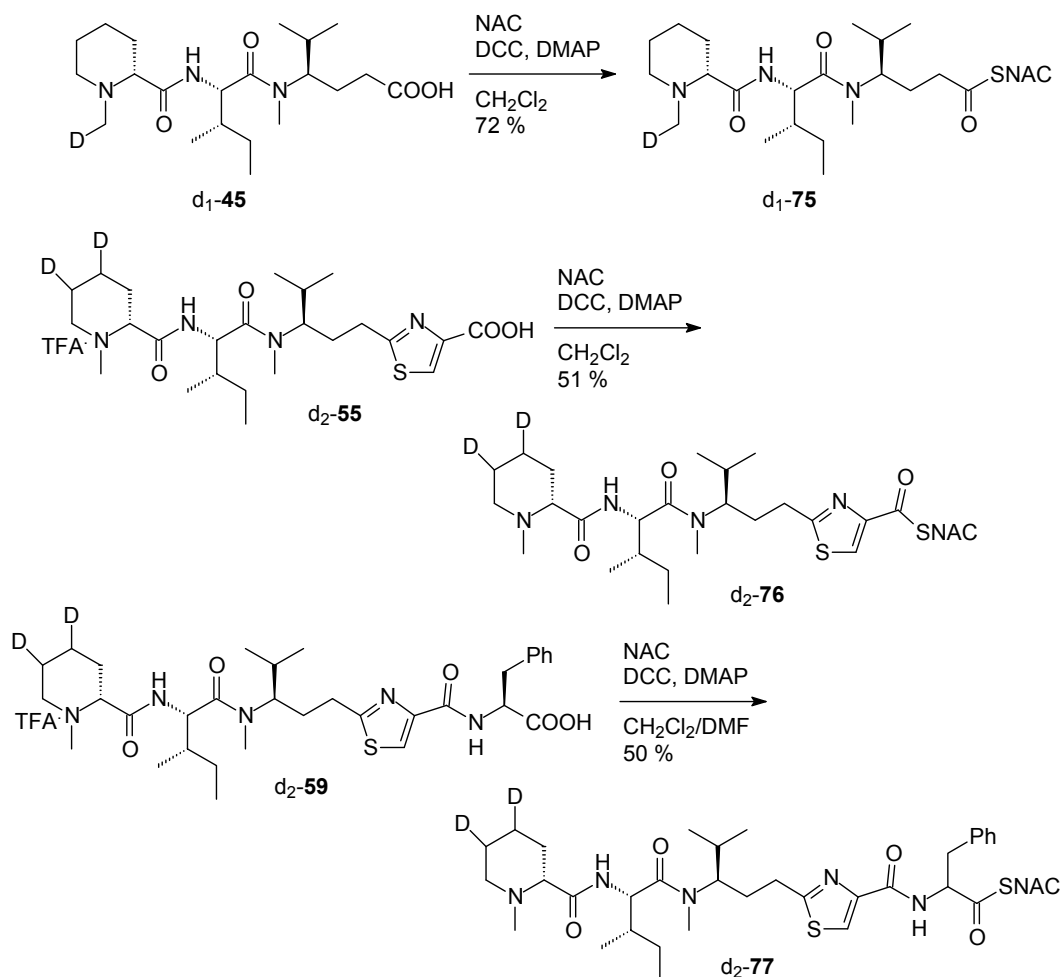


Schema 4.33 Epimerisierung der letzten (AA¹) bzw. der vorletzten Aminosäure (AA²) eines Peptids

Bei der Thioveresterung des Tripeptids d₁-30 (Schema 4.34) wurde ebenfalls eine Epimerisierung am α -Zentrum der letzten (MeVal), jedoch nicht der vorletzten Aminosäure (Ile) beobachtet. Als Knüpfungsreagenzien wurden sowohl CDI als auch DCC verwendet, wobei sich die Ausbeuten nicht sehr unterschieden. Die Epimerisierung war bei Verwendung von DCC allerdings etwas höher ((*S,S,S*)-d₁-74:(*S,S,R*)-d₁-74 1.5:1).

Schema 4.34 SNAC-Veresterung des Tripeptids $d_1\text{-}30$

Auch bei dem Tripeptid $d_1\text{-}45$ mit C_2 -verlängertem Valin wurden beide Methoden (CDI und DCC/DMAP) zur Thioveresterung getestet. Bei Verwendung von CDI konnte $d_1\text{-}75$ mit weniger als 50 % Ausbeute erhalten werden. Der Einsatz von DCC zur Veresterung lieferte $d_1\text{-}75$ hingegen mit mehr als 70 % Ausbeute (Schema 4.35). Eine Epimerisierung fand nicht statt, da sich am C-Terminus keine α -Aminosäure befindet.

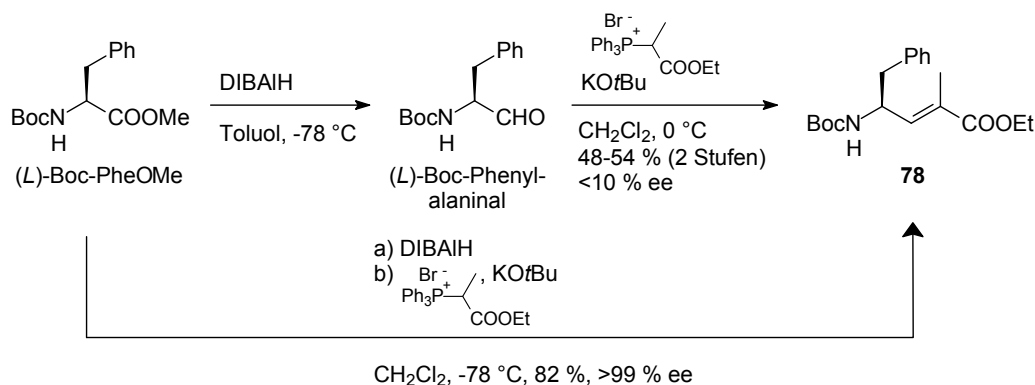
Schema 4.35 SNAC-Veresterung von $d_1\text{-}45$, $d_2\text{-}55$ und $d_2\text{-}59$

Da sich DCC als Knüpfungsreagenz bewährt hatte, wurde es auch zur Thioveresterung von $d_2\text{-}55$ und $d_2\text{-}59$ eingesetzt (Schema 4.35). Die SNAC-Ester $d_2\text{-}76$ und $d_2\text{-}77$ konnten nur in Ausbeuten um die 50 % erhalten werden, was möglicherweise daran lag, dass die Edukte $d_2\text{-}55$ und $d_2\text{-}59$ als TFA-Salze vorlagen. Wie zu erwarten epimerisierte das α -Zentrum von Phe in $d_2\text{-}77$.

4.3 Untersuchungen zur Synthese von Tubuphenylalanin

4.3.1 Syntheseveruche durch katalytische Hydrierung

Das Substrat für die Tubuphenylalanin-Synthese sollte das ausgehend von der natürlichen Aminosäure Phenylalanin über Reduktion zum Aldehyd und Wittig-Verlängerung dargestellte **78** sein (Schema 4.36), welches auch schon von Wipf *et al.* ausgehend von (*L*)-Boc-Phenylalaninol synthetisiert worden ist (Schema 2.5).^[35] Über beide Stufen konnte eine Ausbeute von ca. 50 % erzielt werden, das Stereozentrum racemisierte allerdings fast vollständig. Das Problem liegt wohl in der Isolierung des Aldehyds, da die Neigung von α -Aminoaldehyden zur Epimerisierung bekannt ist. Beide Reaktionen wurden daher nacheinander im Eintopf durchgeführt, wodurch die Ausbeute bedeutend gesteigert werden konnte, zudem wurde die Racemisierung des Stereozentrums umgangen.



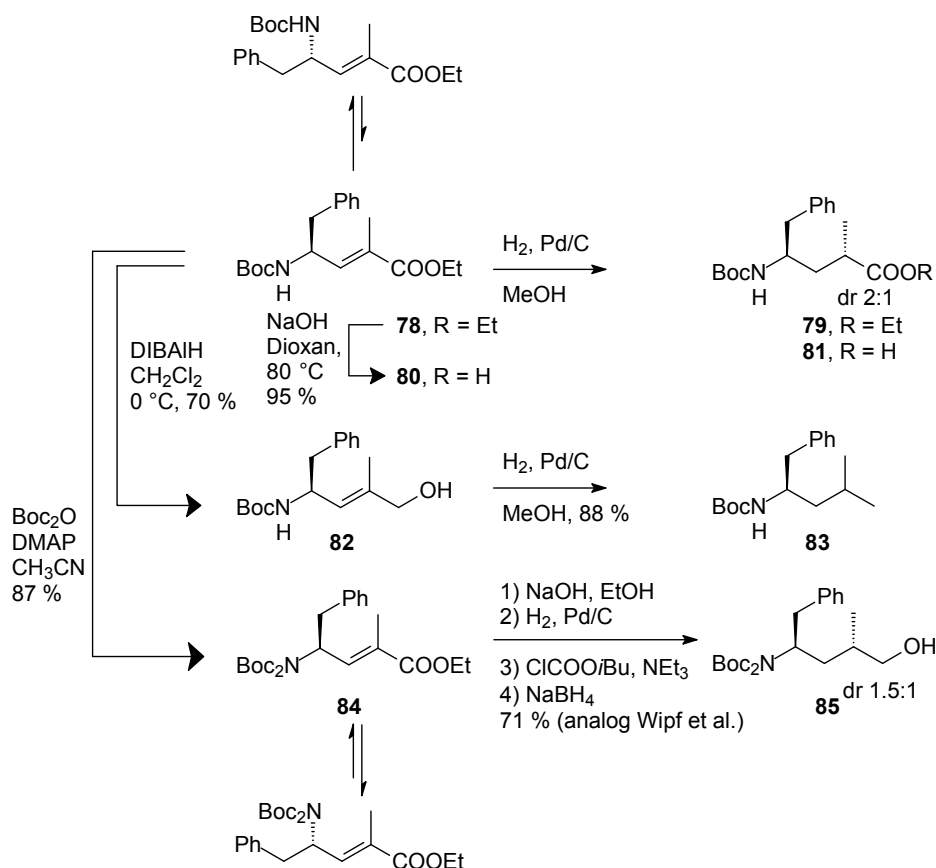
Schema 4.36 C_2 -Verlängerung von Phenylalanin

Bei Hydrierung der Doppelbindung von **78** konnte Tubuphenylalanin **79** in einem Diastereomerenverhältnis 2:1 erhalten werden (Schema 4.37). Zum Vergleich wurde die freie Säure **80** ebenfalls hydriert, da in der Reaktionssequenz von Wipf *et al.* die freie Säure hydriert und anschließend zum Alkohol reduziert wird, auf dessen Stufe eine Trennung der Diastereomeren durch Säulenchromatographie möglich ist. Wipf *et al.* erhielten die Alkohole in einem 3:1 Verhältnis, was aber wohl darauf zurückzuführen ist, dass sie während den Reaktionsschritten etwas von dem *epi*-Alkohol „verloren“ haben, da die Hydrierung der freien Säure **80** nicht selektiver als die des Esters **78** erfolgt.

Der α,β -ungesättigte Ester **78** wurde mit DIBALH zum Allylalkohol **82** reduziert und dann hydriert, wobei jedoch nicht der gewünschte gesättigte Alkohol entstand, sondern die Deoxyverbindung **83**. Scheinbar hat Pd hier die Allyl-C-O-Bindung reduziert wie das von Benzyl-C-O-Bindungen bekannt ist. In der Literatur finden sich einige wenige Beispiele, in denen Allylalkohole auf diese Weise reduziert wurden.^[105]

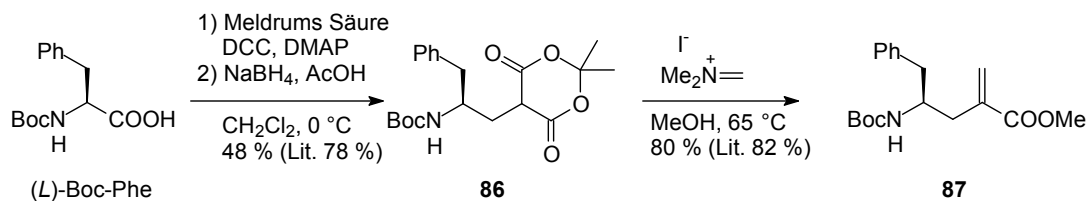
Die Hydrierung des Esters zeigte zumindest eine geringe Selektivität zugunsten des gewünschten Diastereomers, was dadurch erklärt werden kann, dass **78** möglicherweise als

Zickzack-Kette vorliegt, bei der die Aminogruppe nach hinten steht und durch die Boc-Gruppe der Angriff von H_2/Pd von hinten etwas abgeschirmt wird. In einem nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob eine zweite Boc-Schutzgruppe am Stickstoff die Diastereoselektivität durch höheren sterischen Anspruch positiv beeinflussen kann. Dem war leider nicht so, die zweifach Boc-geschützte ungesättigte γ -Aminosäure **84** wurde analog Wipf *et al.* hydriert und zum Alkohol **85** reduziert, welcher in einem Diastereomerenverhältnis von 1.5:1 erhalten wurde. Wahrscheinlich ist die zweifach-geschützte Aminfunktion zu groß, so dass die Verbindung **84** in geringerem Maße als **78** in der Zickzackform vorliegt (Schema 4.37).



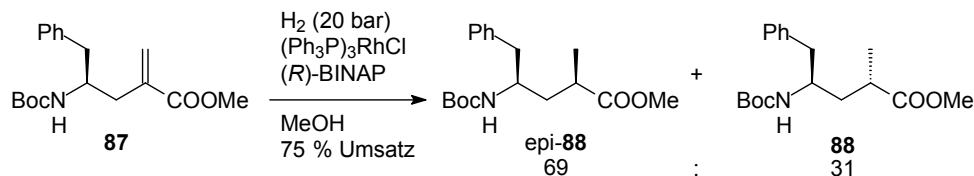
Schema 4.37 Heterogene Hydrierungsversuche

Des Weiteren wurde getestet, ob durch homogene Katalyse bessere Diastereoselektivitäten bei der Hydrierung von ungesättigten Tubophenylalanin-Vorstufen erzielt werden können. Bei der Hydrierung von **78** konnte bei Verwendung des Wilkinson-Katalysators $(Ph_3P)_3RhCl$ kein Umsatz festgestellt werden, was darauf zurückzuführen ist, dass die Doppelbindung hochsubstituiert und somit für den Katalysator schwer zu erreichen ist. Daher wurde **87** mit *exo*-ständiger Doppelbindung synthetisiert. Hierzu wurde Boc-Phenylalanin mit Meldrums Säure^[106] geknüpft, die Ketofunktion mit Natriumborhydrid zur CH_2 -Gruppe reduziert^[107] und die 5-monosubstituierte Meldrums Säure **86** mit Eschenmosersalz zum α -substituierten Acrylsäureester **87** umgesetzt (Schema 4.38).^[108]



Schema 4.38 Darstellung der Tubophenylalanin-Vorstufe mit *exo*-ständiger Doppelbindung

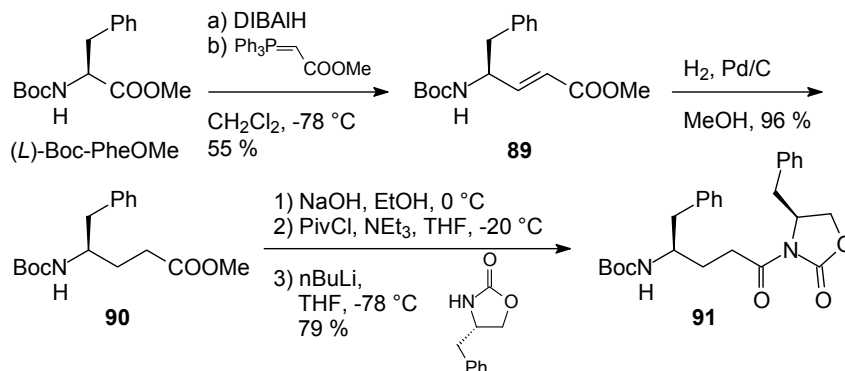
Beim Versuch, das Stereozentrum in α -Position am Tubophenylalanin **87** durch asymmetrische Hydrierung mit Wilkinson-Katalysator und (*R*)-BINAP als chiraalem Liganden zu erzeugen, entstand bevorzugt das Diastereomer *epi*-**88** (69:31 *epi*-**88**:**88**, Schema 4.39). Um auszuschließen, dass es sich um eine *mismatched*-Situation handelt, wurde die Hydrierung mit (*S*)-BINAP wiederholt. Der Umsatz lag nach einem Tag bei einem Wasserstoffdruck von 30 bar bei nur etwa 30 %, *epi*-**88** wurde aber auch hierbei nur in geringem Überschuss gebildet (55:45 *epi*-**88**:**88**).



Schema 4.39 Homogener Hydrierversuch mit Wilkinson-Katalysator

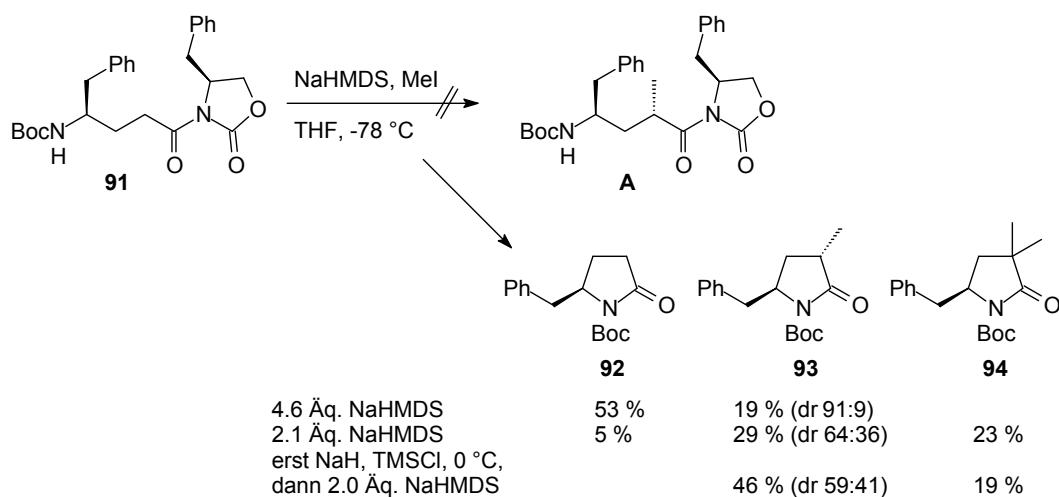
4.3.2 Syntheseveruche durch Enolat-Alkylierung

Eine weitere Idee zur Einführung des neuen Stereozentrums am Tubophenylalanin bestand in einer asymmetrischen, z. B. durch das Evans Auxiliar gesteuerten, α -Alkylierung von **91**. Hierzu wurde Boc-Phenylalaninmethylester mit DIBALH zum Aldehyd reduziert und in einer Wittig-Reaktion zu **89** verlängert (Schema 4.40). Nach Reduktion der Doppelbindung wurde der Ester **90** verseift und die freie Säure über ein gemischtes Anhydrid mit (*S*)-4-(Phenylmethyl)-2-oxazolidinon zu **91** geknüpft.



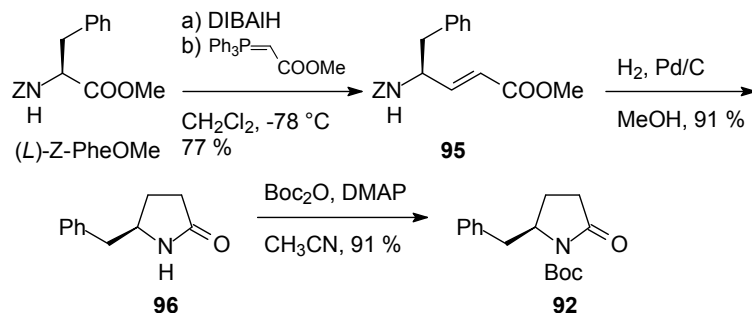
Schema 4.40 Edukt für die asymmetrische α -Alkylierung

Deprotonierung von **91** mit NaHMDS und anschließende Zugabe von Methyljodid zur Alkylierung ergab nicht das gewünschte Produkt **A** (Schema 4.41). Durch die Base wird nicht nur die α -Position zur Acylgruppe deprotoniert, sondern auch der Carbamatstickstoff, welcher nun nucleophil an der Carbonylfunktion angreift und unter Abspaltung des Oxazolidinons ein γ -Lactam bildet. In einer ersten Reaktion wurde versehentlich zuviel Base verwendet, als Produkte konnten das nicht-methylierte Lactam **92** und das einfach-methylierte **93** isoliert werden, zwar mit guter Diastereoselektivität aber mit bescheidener Ausbeute. Wurden nur 2.1 Äquivalente NaHMDS verwendet, entstand neben **92** und **93** auch das zweifach-methylierte Lactam **94**. Es wurde versucht, die Lactambildung zu unterdrücken, indem das Carbamatproton zuerst mit Natriumhydrid deprotoniert werden und der Stickstoff mit TMSCl abgefangen werden sollte. Es wurde aber auch hierbei nur mono- und dimethyliertes Lactam gefunden.

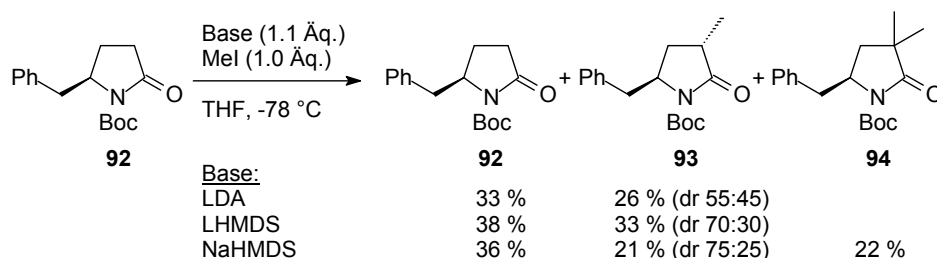


Schema 4.41 Enolat-Alkylierungsversuche

Da das Evans-Auxiliar durch die intramolekulare Lactamisierung abgespalten und somit keinen Einfluss auf die Diastereoselektivität der Alkylierung hat, wurde direkt das Lactam **92** synthetisiert, bei dem die Benzylgruppe die eine Seite des Lactams abschirmen könnte. Hierzu wurde *Z*-Phenylalaninmethylester zu **95** verlängert, welches nach *N*-Entschützung und Reduktion der Doppelbindung unter Wasserstoffatmosphäre in Gegenwart von Pd/C spontan zum ungeschützten **96** lactamisierte (Schema 4.42). Dieses konnte mit Boc₂O und DMAP in Acetonitril zu **92** Boc-geschützt werden.

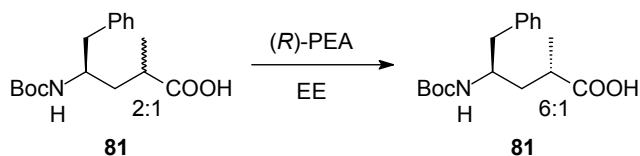
Schema 4.42 Gezielte Lactamsynthese von **92**

Zur Enolisierung des Lactams wurden verschiedene Basen (LDA, LHMDS und NaHMDS) getestet, ein Äquivalent an Base sollte prinzipiell ausreichen. In allen Fällen wurde jedoch Edukt **92** zurückgewonnen, die besten Diastereoselektivitäten für **93** konnten mit NaHMDS erzielt werden (75:25), leider entstand hier auch das dialkylierte Lactam **94** (Schema 4.43). Eine mögliche Erklärung für dessen Bildung ist, dass ein intermediäres Enol statt mit MeI zu reagieren ein gerade entstandenes monoalkyliertes Produkt deprotoniert. Da die Route der Enolatalkylierung weder bezüglich Ausbeute noch Diastereoselektivität befriedigenden Ergebnisse lieferte, wurde sie nicht weiterverfolgt. Raghavan *et al.* hingegen synthetisierten Tubuvalin auch über diese Route und erhielten unter optimierten Bedingungen mit NaHMDS als Base 52 % des monoalkylierten Produkts (dr 10:1) neben 12 % des dialkylierten Lactams.^[51]

Schema 4.43 Enolat-Alkylierung des Lactams **92**

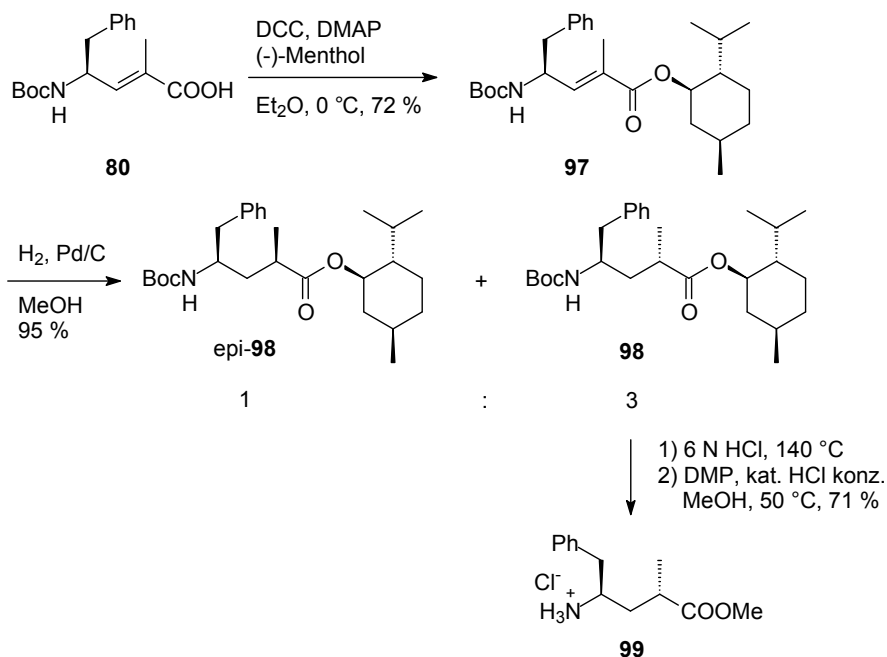
4.3.3 Synthese von Tubuphenylalanin über Diastereomerentrennung

Mit Phenylethylamin konnten zuvor schon gute Erfahrungen bei der Trennung von Enantiomeren gesammelt werden, weshalb auch hier versucht wurde, das Diastereomerenverhältnis der freien Säure **81** (dr 2:1) durch Umkristallisation mit dem chiralen Amin zu erhöhen. Bei der Zugabe von (*S*)-PEA fiel kein Salz aus, mit (*R*)-PEA konnte **81** nach Umkristallisation in einem etwas erhöhten Diastereomerenverhältnis von 6:1 gewonnen werden (Schema 4.44).



Schema 4.44 Erhöhung des Diastereomerenverhältnisses durch Umkristallisation mit PEA

Zanda *et al.* stellten am α -C-Atom racemisches **81** her und konnten die beiden Diastereomere nach Veresterung mit (-)-Menthol säulenchromatographisch trennen (Schema 2.12).^[41] Diese Methode wurde aufgegriffen, im Unterschied zu Zanda *et al.* wurde die ungesättigte Säure **80** mit (-)-Menthol zu **97** verestert (Schema 4.45). Bei der anschließenden katalytischen Hydrierung der Doppelbindung entstanden *epi*-**98** und **98** im Verhältnis 1:3^[a] und konnten säulenchromatographisch getrennt werden. **98** wurde wie bei Zanda *et al.* beschrieben mit 6 N HCl-Lösung komplett entschützt und mit Dimethoxypropan in den Methyl-ester **99** überführt.^[41] Leider konnte die hohe Ausbeute von 99 % nicht reproduziert werden.



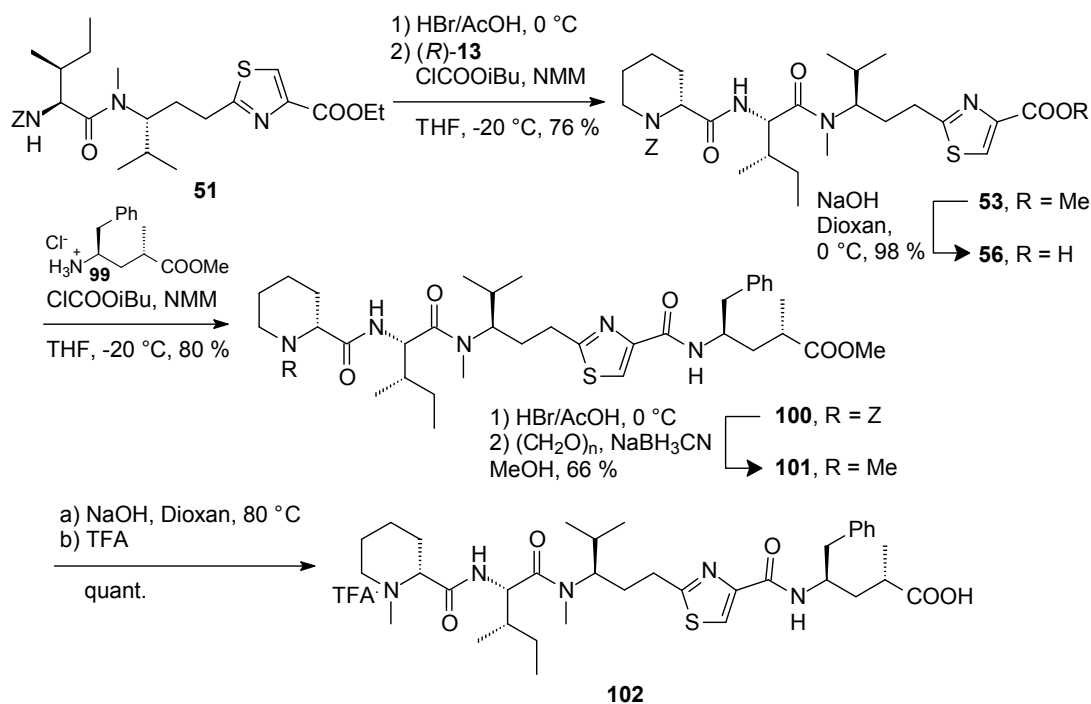
Schema 4.45 Trennung der Diastereomere als Menthylester **98**

[a] Das Verhältnis wurde aus dem NMR-Rohspektrum bestimmt.

4.4 Synthese von Prätubulysin und Derivaten

4.4.1 Synthese von Prätubulysin

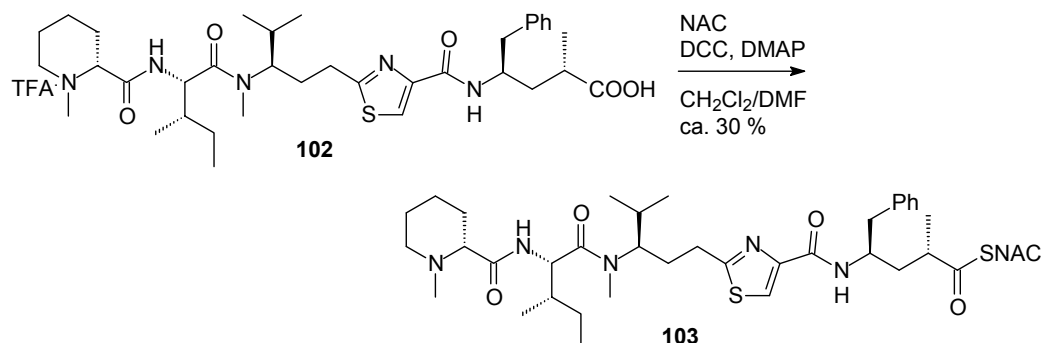
Wie bereits in Schema 4.26 (Kapitel 4.1.4.4) bei der Synthese des deuterierten Tripeptids d_2 -**53** beschrieben, wurde auch hier das Dipeptid **51** mit HBr in Eisessig entschützt und mit (*R*)-*Z*-Pipicolinsäure (*R*)-**13** zum Tripeptid **53** geknüpft (Schema 4.46). Dieses wurde am *C*-Terminus zu **56** verseift und mit Tubuphenylalaninmethylester-Hydrochlorid **99** zum Tetrapeptid **100** umgesetzt. Hierbei wurde zunächst mit TBTU/NET₃ gearbeitet, wobei nur eine Ausbeute von 67 % erzielt werden konnte. Über die Methode des gemischten Anhydrids (ClCOO*i*Bu/NMM) konnte die Ausbeute auf 80 % gesteigert werden. Problem bei der Reaktion ist möglicherweise eine intramolekulare Lactambildung von **99**, sobald es nicht mehr als Hydrochlorid vorliegt und zu langsam an TBTU-aktiviertem **56** angreift. Abschließend wurde der *N*-Terminus entschützt und über reduktive Aminierung zu **101** *N*-methyliert, der *C*-Terminus wurde mit NaOH verseift, wobei durch saure Aufarbeitung mit Trifluoressigsäure das TFA-Salz von Prätubulysin **102** erhalten wurde.



Schema 4.46 Synthese von Prätubulysin **102**

Erste Versuche zur Biotransformation von **102** in der Arbeitsgruppe Müller führten noch nicht zu Tubulysin D, so dass dieser Schritt weiterer Optimierung bedarf. Es kam des Weiteren die Idee auf, die Abspaltung von Prätubulysin vom Multienzymkomplex durch die Thioesterase zu untersuchen. Für Versuche mit isolierter Thioesterase sollte der Prätubulysin-SNAC-Ester **103** synthetisiert werden, der ACP-gebundenes Prätubulysin imitieren soll. Die

Thioveresterung von **102** zu **103** gelang mit Hilfe von DCC und DMAP in etwa 30 % Ausbeute (Schema 4.47).



Schema 4.47 Prätubulysin-SNAC-Ester (**103**)

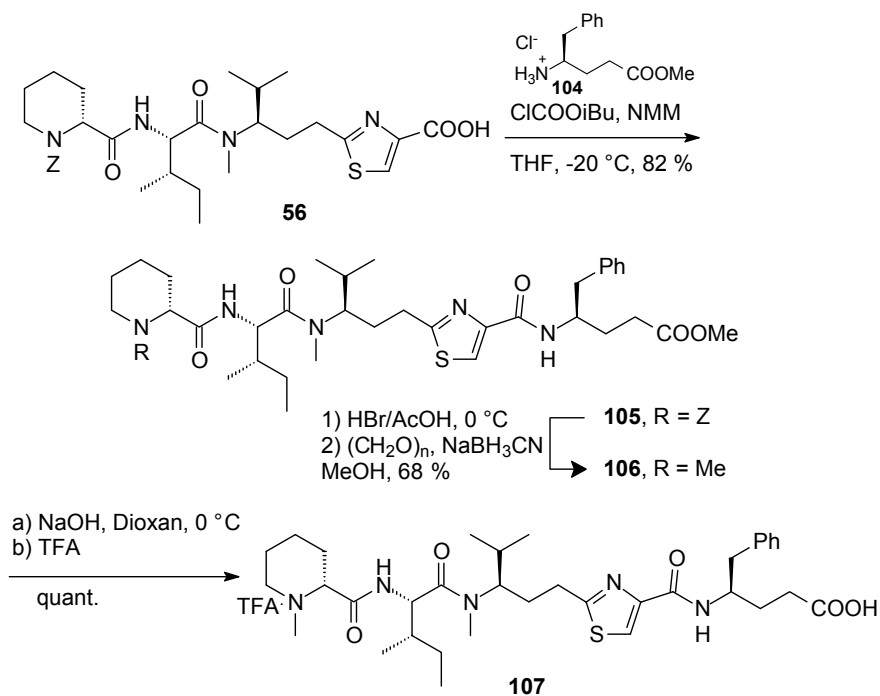
4.4.2 Derivate von Prätubulysin

Es wurden einige Prätubulysin-Derivate synthetisiert, die neben Prätubulysin auf mögliche cytotoxische Eigenschaften in der Arbeitsgruppe Müller untersucht werden sollten. Zuvor wurde bereits in SAR-Studien von der Gruppe von Ellman gezeigt, dass Tubulysin D vor allem am Tubuphenylalanin-Teil variiert werden kann (Kapitel 2.5).^[48] Daher wurde auch Prätubulysin verstärkt am C-Terminus verändert. Zum einen wurde ein Derivat (**107**) synthetisiert, dem die Methylgruppe am α -C-Atom des Tubuphenylalanins fehlt, zum anderen wurden die nächstkürzeren Zwischenstufen der postulierten Biosynthese, das Tetrapeptid **59** mit Phenylalanin am C-Terminus, sowie das Tripeptid **55**, hergestellt, welche auch schon als deuterierte Verbindungen synthetisiert worden sind (Kapitel 4.1.4.4 und 4.1.4.5).

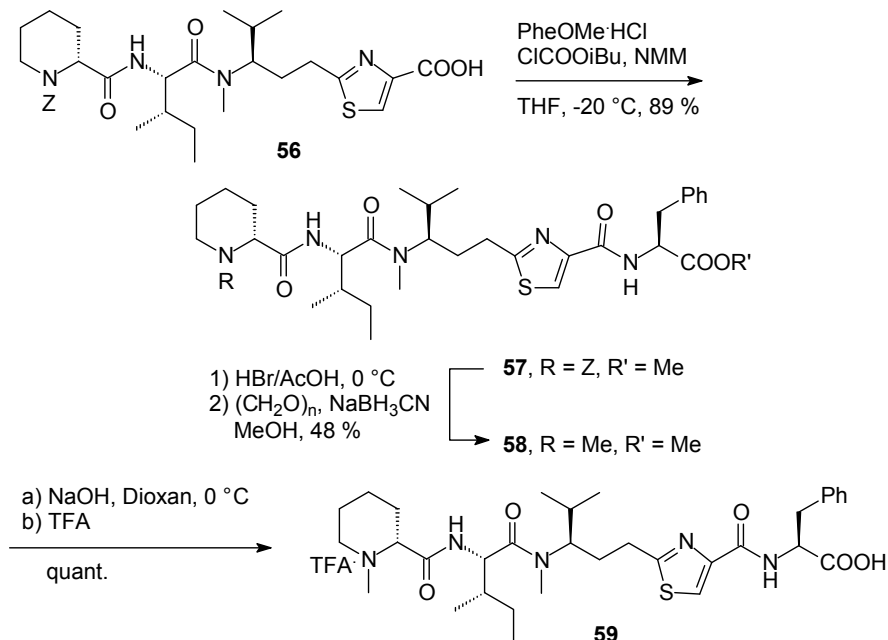
Am N-Terminus scheint die basische Funktion des tertiärenamins eine Rolle zu spielen,^[48] so dass die Struktur hier nur durch Ersetzen der Pípecolinsäure durch *N,N*-Dimethylglycin und somit durch Verzicht auf das Stereozentrum, jedoch nicht auf das tertiäre Amin, vereinfacht wurde (**111**).

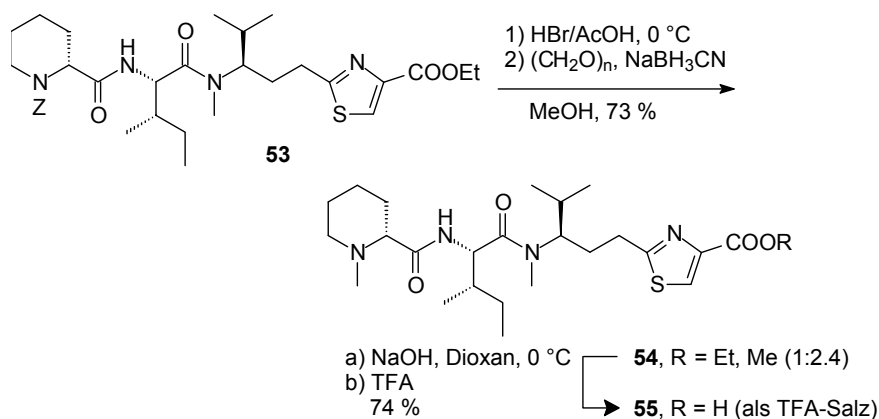
4.4.2.1 Vereinfachungen am C-Terminus von Prätubulysin

Die Knüpfung des Tripeptids **56** mit der γ -Aminosäure **104**, welche durch Boc-Entschützung des zuvor schon über Wittig-Reaktion synthetisierten **90** erhalten werden konnte, mit Hilfe von Chlorameisensäure-*iso*-butylester und *N*-Methylmorpholin lieferte in guter Ausbeute das Tetrapeptid **105** (Schema 4.48). Ebenso wie bei der Knüpfung mit Tubuphenylalanin **99** konnten bei Verwendung von TBTU nur 57 % Ausbeute erhalten werden. Nach *N*-Entschützung und *N*-Methylierung wurde der Methylester verseift und das Prätubulysin-Derivat **107** erhalten.

Schema 4.48 2-Desmethyl-Prätubulysin-Derivat **107**

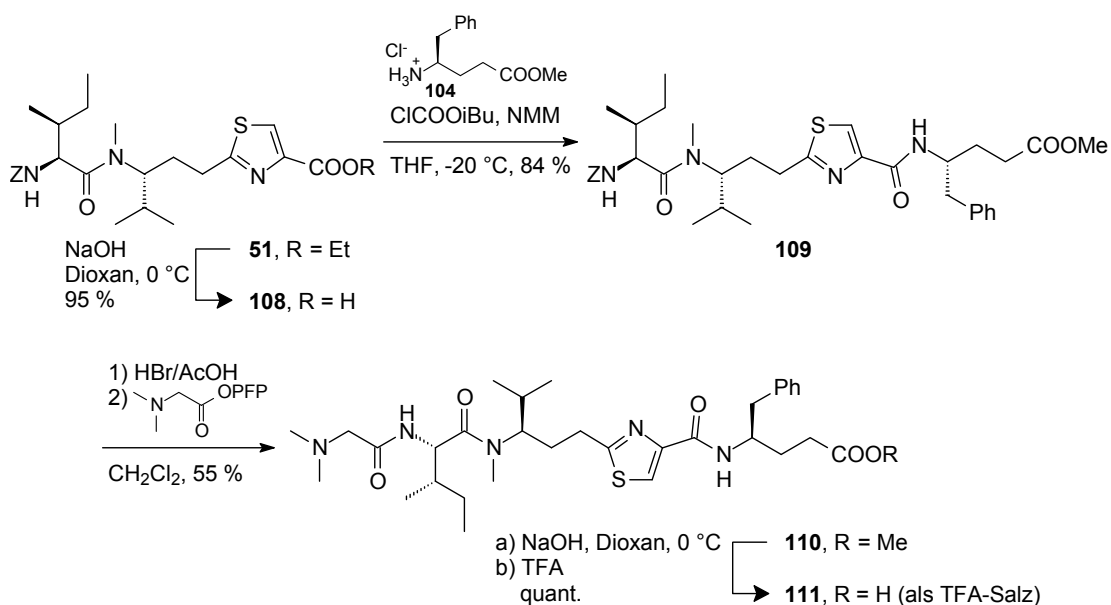
Wie bereits als deuterierte Verbindungen d_2 -**55** und d_2 -**59** (Schema 4.26 und Schema 4.27) wurden nun die nicht-deuterierten Prätubulysin-Derivate **59** (Schema 4.49) und **55** (Schema 4.50) dargestellt.

Schema 4.49 Verkürztes Prätubulysin-Derivat **59**

Schema 4.50 Verkürztes Prätubulysin-Derivat **55**

4.4.2.2 Vereinfachungen am *N*-Terminus von Prätubulysin

Das Dipeptid **51** wurde mit NaOH am *C*-Terminus zu **108** entschützt und mit der γ -Aminosäure 2-Desmethyltubuphenylalaninmethylester **104** zum Tripeptid **109** geknüpft (Schema 4.51). Es wurde die vereinfachte Tubuphenylalanin-Aminosäure verwendet, da diese einfacher zu synthetisieren ist und der Methylgruppe nicht so große Effekte bezüglich der Cytotoxizität beigemessen wurden. Hier konnte über das gemischte Anhydrid sowie mit TBTU eine gute Ausbeute (84 % vs. 80 %) erzielt werden. Die *Z*-Schutzgruppe am Isoleucin wurde abgespalten und das entschützte Tripeptid mit *N,N*-Dimethylglycin, aktiviert als Pentafluorphenolester, zum Tetrapeptid **110** umgesetzt, welches anschließend am *C*-Terminus zu **111** entschützt wurde.

Schema 4.51 Prätubulysin-Derivat **111**

4.5 Weitere Biosynthese-Produkte – die Glycerol-Ester von Tubulysin D und Prätubulysin

In der Arbeitsgruppe von Professor Müller wurden neue Tubulysin-Derivate mit molaren Massen von 902 bzw. 744 g/mol gefunden, welche auf die Glycerol-Ester von Tubulysin D bzw. Prätubulysin passen (Abbildung 4.6). Fütterungsversuche mit ^{13}C -markiertem Glycerol verstärken diese Vermutung. Der Prätubulysin-Glycerol-Ester sollte nun synthetisiert werden, um die Fragmentierungsmuster der Massenspektren zu vergleichen und die Cytotoxizität des Esters zu bestimmen.

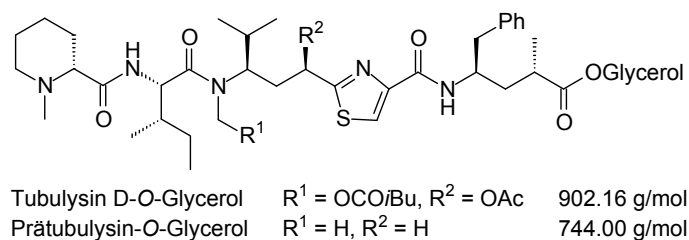
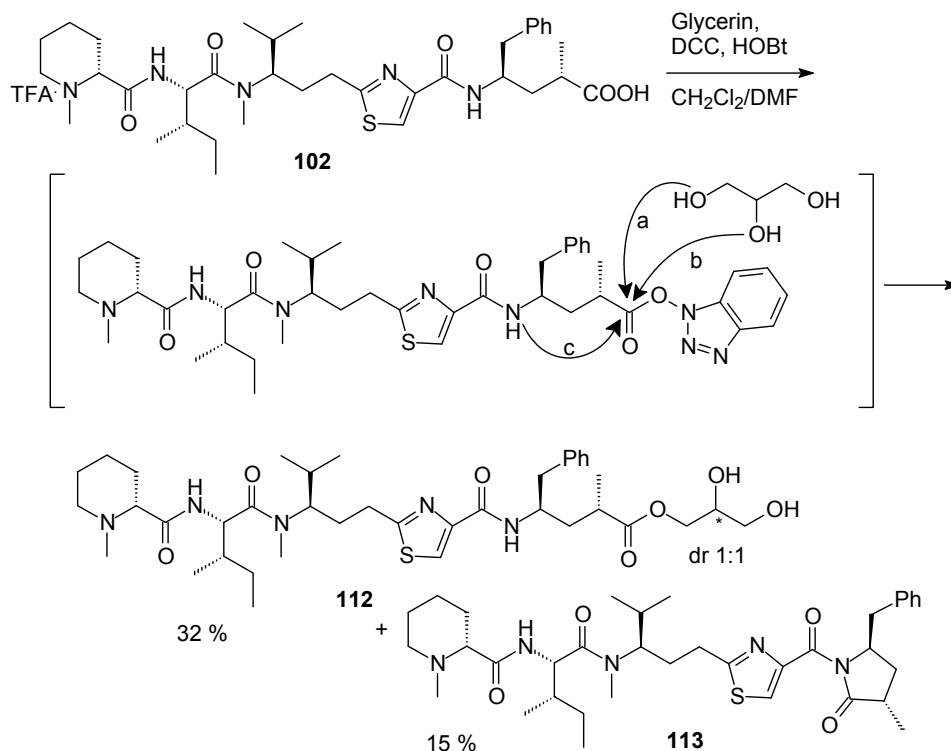
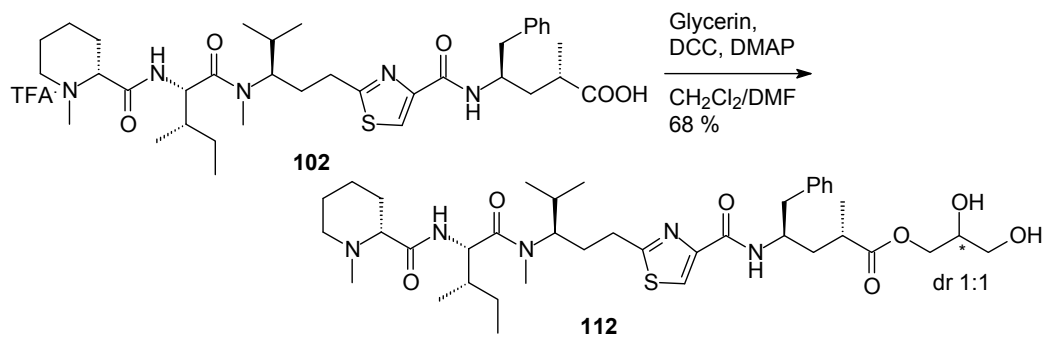


Abbildung 4.6 Glycerolester von Tubulysin D und Prätubulysin

Aus den Untersuchungen in der Gruppe von Prof. Müller ging nicht hervor, ob Glycerol über einen der beiden primären Alkohole als linearer Ester oder über den sekundären Alkohol als verzweigter Ester mit Tubulysin bzw. Prätubulysin verknüpft ist. Daher wurde ungeschütztes Glycerol in einer Veresterungsreaktion mit DCC/HOBt eingesetzt,^[109] wobei in Kauf genommen wurde, dass das lineare (Weg a) und das verzweigte (Weg b) Regioisomere entstehen (Schema 4.52). Es bildete sich jedoch nur der lineare Ester **112** in 32 % Ausbeute, wie zu erwarten als 1:1-Diastereomergemisch, da die Acylierung zu einer Desymmetrisierung des Glycerols führt. Zudem wurden 15 % eines Nebenprodukts **113** gefunden, das in einer Konkurrenzreaktion zur Veresterung durch intramolekulare Lactamisierung (c) des aktivierten Esters gebildet worden ist. Diese Nebenreaktion konnte auch nicht verhindert werden, wenn mit der Glycerolzugabe nicht erst 30 min bis zur Aktivester-Bildung gewartet wurde, sondern Glycerol direkt nach DCC und HOBt zum Reaktionsgemisch gegeben wurde.

Schema 4.52 Prätubulysin-Glycerolester **112**

Mit DCC und DMAP (Schema 4.53) gelang die Knüpfung in guter Ausbeute (68 %) und ohne Bildung des Nebenproduktes **113**. Hierbei wurde ebenfalls nur der lineare Ester **112** gebildet.



Schema 4.53 Verbesserte Glycerolester-Knüpfung

4.6 Biologische Studien

4.6.1 Fütterungsexperimente mit deuterierter Pipecolinsäure d₂-11

Wie bereits in Kapitel 4.1.1.4 erläutert, stellt sich die Frage, ob *D*- oder *L*-Pipecolinsäure die Starteinheit der Biosynthese darstellt, da das finale Produkt die *D*-Pipecolinsäure beinhaltet, die Lysincyclodeaminase TubZ jedoch große Ähnlichkeiten zur Lysincyclodeaminase RapL des Rapamycin-Biosyntheseweges hat, welche ausschließlich *L*-Pipecolinsäure bildet. Die Analyse von Experimenten der Arbeitsgruppe Müller, bei denen (*S*)-d₂-11 bzw. (*R*)-d₂-11 dem Kulturmedium des Wildtyps (*A. disciformis* An d48) zugeführt wurde, ergab, dass nur *L*-Pipecolinsäure ((*S*)-d₂-11) in Tubulyisin D eingebaut wird.^[110] Die in Abbildung 4.7 dargestellten hochaufgelösten Massenspektren von Tubulyisin D zeigen, dass es nur bei Fütterung von (*S*)-d₂-11 zu einer Massenverschiebung von +2 kommt (Abbildung 4.7b). Untersuchungen bezüglich einer notwendigen Epimerase sind im Gange.

Zudem konnten weitere Biosyntheseprodukte in der Arbeitsgruppe Müller gefunden und identifiziert werden, deren Verwandtschaft zu Tubulyisin D unter anderem durch Fütterung von (*S*)-d₂-11 bzw. (*R*)-d₂-11 belegt werden konnte.^[110]

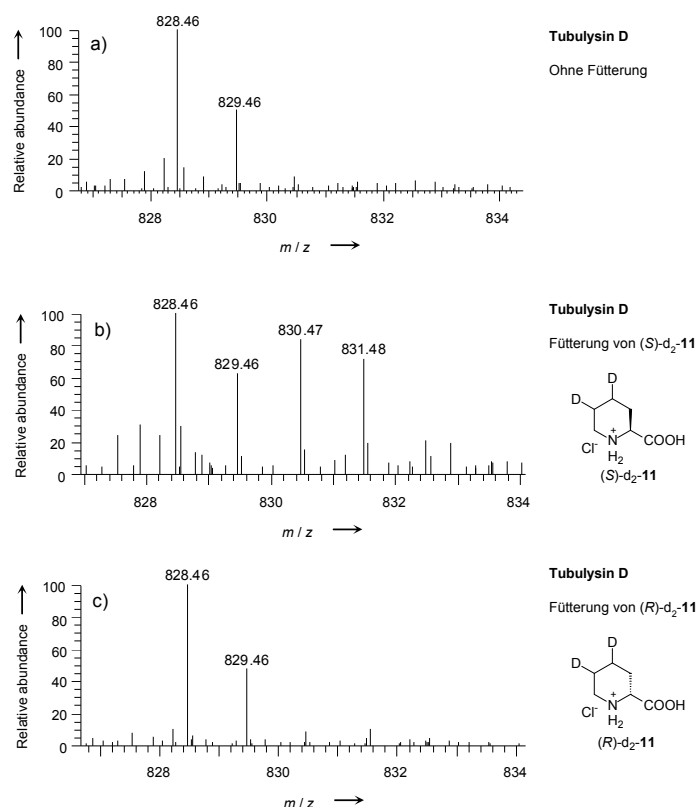


Abbildung 4.7 Hochaufgelöste Massenspektren von Tubulyisin D: a) ohne Fütterung, b) Fütterung von (*S*)-d₂-11, c) Fütterung von (*R*)-d₂-11. Die Spektren wurden am Institut für Pharmazeutische Biotechnologie mit einem Thermo LTQ Orbitrap Hybrid FT Massenspektrometer aufgenommen und von Y. Chai (Arbeitsgruppe Müller) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.^[110]

4.6.2 Identifizierung von Prätubulylin als Biosynthese-Intermediat

Die Existenz des Biosynthese-Intermediats Prätubulylin, welches als Produkt des NRPS-PKS-Multienzymkomplexes postuliert worden ist,^[9] konnte durch Gegenüberstellung von synthetischem **102** und biosynthetischem Material belegt werden. Hierzu wurden die jeweiligen Fragmentierungsmuster, welche durch Tandem-Massenspektrometrie (MS²-MS⁶) erhalten wurden, miteinander verglichen.^[110] Abbildung 4.8 zeigt den Vergleich von synthetischem (**102**) und biosynthetischem Prätubulylin bezüglich MS (Abbildung 4.8 a,b) und MS² (Abbildung 4.8 c,d). Bisher konnte noch nicht genügend biosynthetisches Prätubulylin isoliert werden, um auch einen NMR-Vergleich durchzuführen.

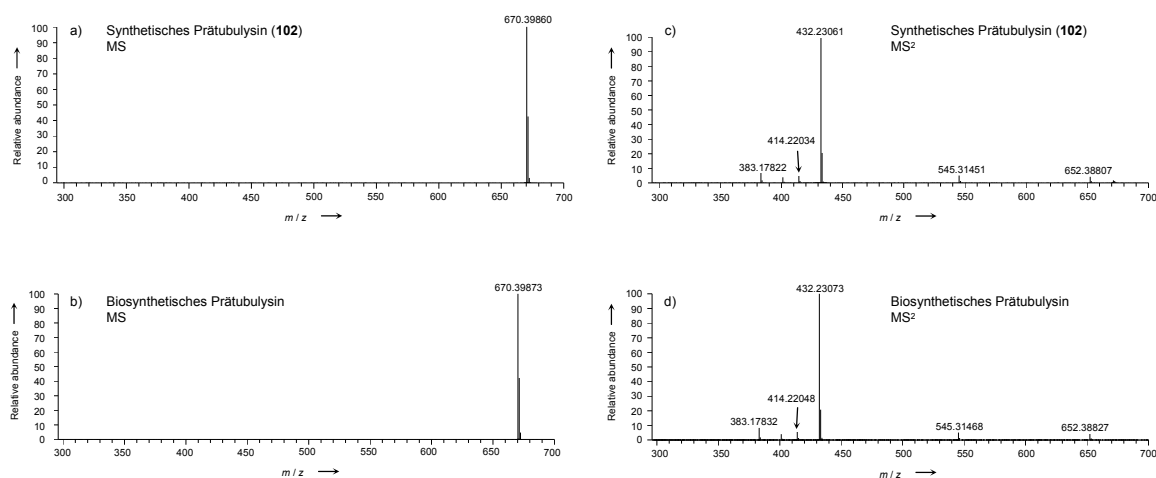


Abbildung 4.8 Vergleich von synthetischem und biosynthetischem Prätubulylin; a) Hochaufgelöste MS-Analyse von synthetischem Prätubulylin (**102**), b) Hochaufgelöste MS-Analyse von biosynthetischem Prätubulylin, c) Hochaufgelöste MS²-Analyse von synthetischem Prätubulylin (**102**), d) Hochaufgelöste MS²-Analyse von biosynthetischem Prätubulylin. Die Spektren wurden am Institut für Pharmazeutische Biotechnologie mit einem Thermo LTQ Orbitrap Hybrid FT Massenspektrometer aufgenommen und von Y. Chai (Arbeitsgruppe Müller) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.^[110]

4.6.3 Biologische Aktivität von Prätubulylin und Derivaten

In der Arbeitsgruppe Müller wurden Prätubulylin **102**, die synthetisierten Derivate (**55**, **59**, **107** und **111**), sowie der Prätubulylin-Glycerolester **112** (Abbildung 4.9) mit Hilfe des MTT-Tests bezüglich ihrer cytotoxischen Eigenschaften untersucht. Dabei handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen. Das Tetrazoliumsalz MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] wird von den Zellen aufgenommen und mit NADH in einer durch Dehydrogenasen katalysierten, irreversiblen Reaktion zum unlöslichen, violetten Formazan reduziert, welches sich in Form feiner Nadeln in der Zelle bildet (Schema 4.54). Es wird in Isopropanol gelöst und die Absorption der

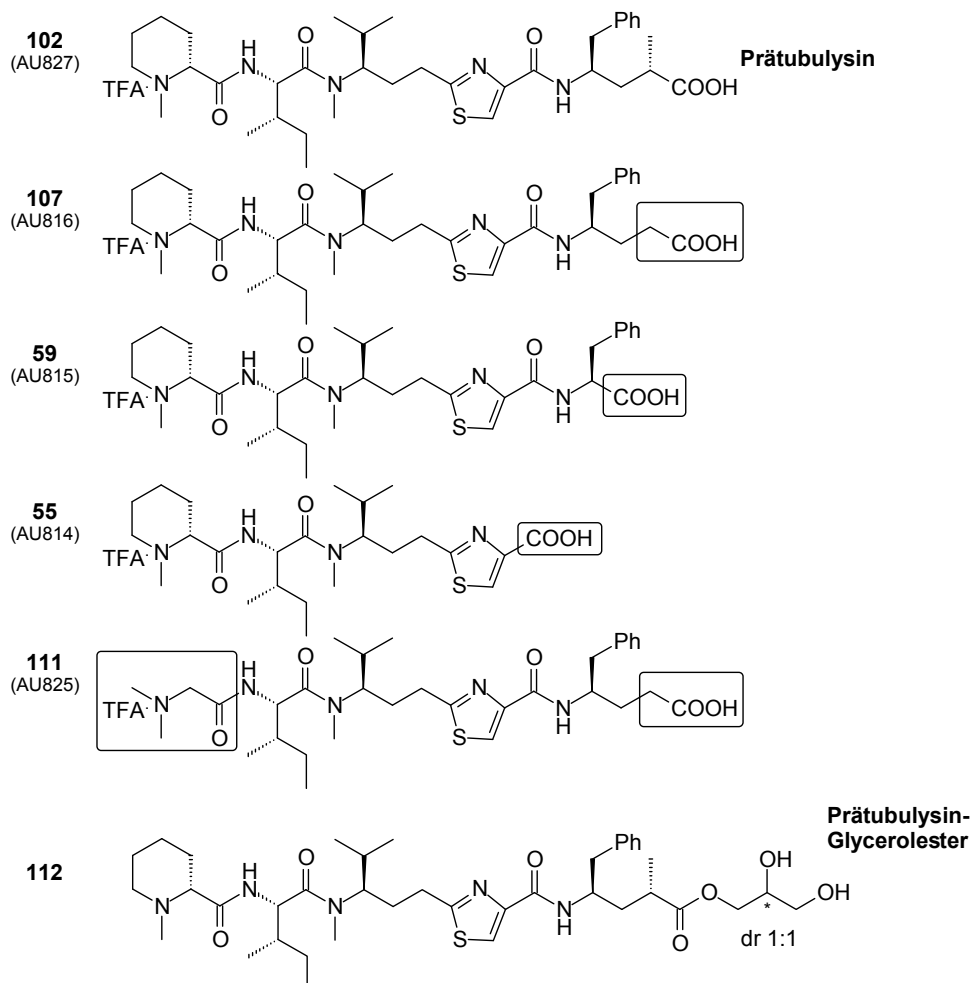


Abbildung 4.9 Synthetisiertes Prätubulysin und Derivate

In der Arbeitsgruppe Müller wurden auch der Einfluss von Prätubulysin **102** (AU827) und 2-Desmethyl-Prätubulysin **107** (AU816) auf die Mikrotubuli von PtK2-Beutelrattenzellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden die Zellkerne mit DAPI^[a] angefärbt und die Mikrotubuli durch Immunfluoreszenzfärbung^[b] sichtbar gemacht. Abbildung 4.10 zeigt Fluoreszenzaufnahmen des Mikrotubulinetzwerks (grün) von PtK2-Zellen. Bei der Kontrolle ist das Netz der Mikrotubuli, das die Zelle ausgehend von einem stark gefärbten Zentrum, dem Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC), strahlenförmig durchzieht, gut zu erkennen. Die Zellkerne (blau) erscheinen normal in ihrer rundlich bis ovalen Form.

Die weiteren Bilder in Abbildung 4.10 zeigen die Wirkung von 2.5 µg/ml **102** (AU827) bzw. **107** (AU816) auf die Mikrotubuli nach 24 h. Bei **102** (AU827) ist das Mikrotubulinetzwerk verschwunden, und es sind keine filamentösen Strukturen mehr zu sehen. Zu

[a] DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von DNA eingesetzt wird.

[b] Bei der Immunfluoreszenz- oder Antikörperfärbung wird ein bestimmtes Protein mit Hilfe eines Antikörpers (hier: anti- α -Tubulin) markiert und durch einen zweiten Antikörper, der mit einem Farbstoff gekoppelt und auf den ersten Antikörper gerichtet ist (hier: anti-Maus Alexa488), sichtbar gemacht.

beobachten ist nur noch eine diffuse Fluoreszenz um die Zellkerne herum und eine beginnende Kernfragmentierung. Bei **107** (AU816) ist der Prozess noch nicht ganz so weit fortgeschritten wie bei **102** (AU827), aber auch hier ist das Mikrotubuli-Netzwerk bereits stark gestört. Die Mikrotubuli haben ihre normale filamentöse Form und ihre strahlenförmige Anordnung verloren und sind besonders im Bereich der Zellkerne als Tubulinansammlungen oder Aggregaten zu finden.

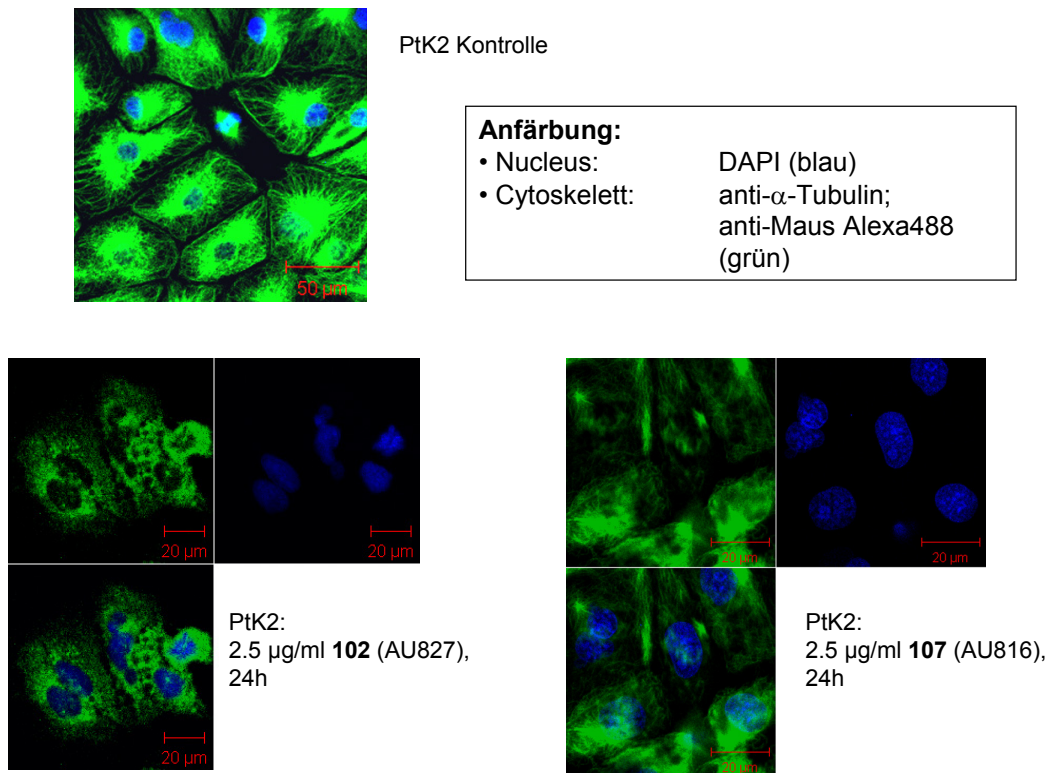


Abbildung 4.10 Immunfluoreszenzaufnahmen von PtK2-Zellen nach Inkubation mit Prätubulysin **102** (AU827) bzw. 2-Desmethyl-Prätubulysin **107** (AU816). Die Aufnahmen wurden von J. Herrmann (Arbeitskreis Müller) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Angaben

Zur **Dünnschichtchromatographie** wurden *Polygram[®] SIL G/UV₂₅₄*- bzw., sofern erwähnt, *Polygram[®] Alox N/UV₂₅₄*-Fertigfolien der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht und Kaliumpermanganat als Tauchreagenz.

Zur **Säulenchromatographie** wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit Kieselgel gepackte Säulen verwendet (MN Kieselgel 60, 0.063-0.2 mm/70-230 mesh ASTM der Firma *Macherey-Nagel*).

¹H-NMR-Spektren wurden mit 500 MHz-Kernresonanzspektrometern (*Bruker DRX 500* bzw. *Bruker AV 500*) und einem 400 MHz-Gerät (*Bruker AVII 400*) aufgenommen. Als Lösemittel wurde, soweit nicht anders erwähnt, Deuteriochloroform verwendet. Die Kalibrierung wurde auf das Lösemittel vorgenommen (CDCl₃: $\delta = 7.24$). Die Auswertung erfolgte nach erster Ordnung mittels *WinNMR*-Software der Firma *Bruker*. Bedeutung der Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, sh = Signalhaufen, bs = breites Singulett, sowie Kombinationen davon wie z. B. ddt = Dublett von Dublett von Triplett. Die chemischen Verschiebungen sind δ -Werte und werden in ppm angegeben.

¹³C-NMR-Spektren wurden ebenfalls mit oben genannten Spektrometern aufgenommen (*DRX 500* und *AV 500*: Messfrequenz 125 MHz; *AV 400*: Messfrequenz 100 MHz). Die Kalibrierung erfolgte in Bezug auf das Lösemittelsignal (CDCl₃: 77.0 ppm). Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben, die Messungen erfolgten breitbandentkoppelt. Bedeutung der Abkürzungen: s = Singulett (quartäres C-Atom), d = Dublett (CH-Gruppe), t = Triplett (CH₂-Gruppe), q = Quartett (CH₃-Gruppe). Mit * gekennzeichnete Verschiebungen wurden aus ¹³C- bzw. HSQC-Spektren abgeschätzt. Zur korrekten Zuordnung der ¹H- und ¹³C-Signale wurden 2-dimensionale Messmethoden wie **H,H-COSY**, **HSQC** und **HMBC** zu Hilfe genommen. Die 2D-Spektren wurden mit der *XWinNMR*- und der *Topspin 2.0*-Software von *Bruker* ausgewertet.

Schmelzpunkte wurden unkorrigiert in offenen Glaskapillaren mittels einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur *MEL-TEMP II* der Firma *Laboratory Devices* gemessen.

Optische Drehwerte wurden mit einem Polarimeter der Firma *PerkinElmer* (Modell 341) in einer thermostatisierten (20 °C \pm 0.1 °C) 1 dm-Küvette gemessen. Als Strahlungsquelle diente eine Natriumdampflampe ($\lambda = 589$ nm). Nach Eingabe der Konzentration wurde die spezifische Rotation ($[\alpha]_D^{20}$ -Werte) vom Messgerät berechnet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) erfolgte an einem Gerät der Firma *Shimadzu* (Modell 10A VP). Als chirale Trennphasen dienten eine *Reprosil 100 Chiral-NR*-Fertigsäule (250 x 4.6 mm, Korngröße 8 µm) der Firma *Trentec Analystechnik* Gerlingen, sowie eine *Chiralcel OD-H* (250 x 4.6 mm) der Firma *Daicel Chemical Industries*. Als achirale Kieselgelsäule wurde eine *LiChrosorb Si-60* (250 x 4 mm, Korngröße 5 µm) der Firma *Phenomenex* benutzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *Class VP*-Software (*Shimadzu*).

Zur **Gaschromatographie (GC)** wurde der Gaschromatograph *Shimadzu GC-2010* verwendet. Als stationäre Phase diente eine *Chirasil-Dex-CB-Säule* (25 m x 25 µm Filmdicke, 0.25 mm Innendurchmesser) der Fa. *Varian*. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *GC Solution*-Software der Fa. *Shimadzu*. Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet.

Elementaranalysen wurden am Institut für Organische Chemie der Universität des Saarlandes von Frau Heike Roeser an einem Gerät der Fa. *Leco* (Modell *CHN900*) gemessen.

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden an der Universität des Saarlandes von Herrn Rudi Thomes an einem *MAT 95Q*-Gerät der Fa. *Finnigan* aufgenommen. Die Fragmentierung erfolgte durch chemische Ionisierung (CI).

Lösungsmittel wurden von dem zentralen Chemikalienlager der Universität des Saarlandes bezogen und vor Verwendung destilliert.

Wasserfreie Lösungsmittel wurden nach den üblichen Verfahren absolutiert (THF über Lithiumaluminiumhydrid, Diethylether und Toluol über Natrium, Dichlormethan über Calciumhydrid) und unter Schutzgasatmosphäre gelagert. Versuche mit wasserfreien Lösungsmitteln wurden grundsätzlich in zuvor am Hochvakuum ausgeheizten Glasgeräten unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: *Peptidknüpfung via gemischtes Anhydrid*

Ein Äquivalent der Säurekomponente (n mmol) wurde in absolutem THF gelöst (10 ml/mmol) und mit 1.1 Äquivalenten *N*-Methylmorpholin (NMM) versetzt. Bei -20 °C wurden 1.1 Äquivalente Chlorameisensäure-*iso*-butylester zugetropft. Nach 10 min wurde entweder direkt das freie Amin (1.0 Äq.), gelöst in $2n$ ml THF abs., zugetropft oder es wurden erst weitere 1.1 Äquivalente NMM zugegeben, gefolgt von dem Amin (1.0 Äq.) als Hydrochlorid-Salz. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt.

Zur Aufarbeitung wurde das ausgefallene NMM-Hydrochlorid abfiltriert und das Filtrat einrotiert. Der Rückstand wurde in H_2O/EE aufgenommen, die wässrige Phase mit EE extrahiert und die vereinigte organische Phase mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen sowie über Na_2SO_4 getrocknet.

AAV 2: *Peptidknüpfungen *N*-methylierter Aminosäuren mit Hilfe von BEP^[90]*

Zu einer Lösung aus *N*-methyliertem Aminosäuremethylester als Hydrochlorid (1.0 Äq.), *Z*-geschütztem Isoleucin (1.1 Äq.) und 2-Brom-1-ethyl-pyridinium-tetrafluorborat (BEP, 1.1 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (10 ml/mmol) wurde bei -10 °C Di-*iso*-propylethylamin (DIPEA, 3.0 Äq.) zugetropft. Nach 20 min wurde das Kältebad entfernt und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt.

AAV 3: *Esterverseifung mit NaOH-Lösung*

Eine Lösung von einem Äquivalent des Esters (n mmol) in $10n$ ml Dioxan wurde bei 0 °C mit 1.1 Äquivalenten 1 M NaOH-Lösung versetzt und bis zur vollständigen Entschützung gerührt (DC-Kontrolle). Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel abrotiert und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Bei Verseifung von Dipeptiden und Aminosäuren wurde die wässrige Phase vor dem Ansäuern noch mit Essigsäureethylester extrahiert und die Essigester-Phase wurde verworfen. Die wässrige Phase wurde, sofern nicht anders erwähnt, mit 1 M HCl auf pH 2 gebracht und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

AAV 4: *Boc-Entschützung mit HCl in Dioxan*

Ein Äquivalent der Boc-geschützten Aminosäure wurde bei 0 °C mit 10 Äquivalenten einer 4 M HCl-Lösung in Dioxan versetzt. Nach vollständiger Abspaltung der Boc-Schutzgruppe (DC-Kontrolle) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Hydrochlorid-Salz wurde im Hochvakuum getrocknet.

AAV 5: Z-Entschützung mittels HBr/AcOH

Zu einem Äquivalent des Z-geschützten Peptids wurden bei 0 °C 4 bzw. 10 Äquivalente einer Lösung von HBr in Eisessig (33 Gew%) gegeben. Nach 1-2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde Diethylether zum Reaktionsgemisch gegeben, wobei das entstandene Hydrobromid als orange-gefärbter Feststoff ausfiel. Der Ether wurde abdekantiert und der Rückstand erneut mit Ether versetzt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Um das freie Amin in weiteren Reaktionen einsetzen zu können, wurde das Hydrobromid mit gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mehrfach mit Ether extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das freie Amin wurde als Rohprodukt in Folgereaktionen wie Peptidknüpfung (AAV 1) oder reduktive Aminierung (AAV 7) eingesetzt.

AAV 6: Reduktive Aminierung durch katalytische Deuterierung

Ein Äquivalent des Substrats (n mmol) wurde in 10n ml Methanol gelöst, mit 10 Gew.% eines Pd-Katalysators auf Aktivkohle (10 %) versetzt und unter Deuteriumatmosphäre gerührt, bis kein Z-geschütztes Edukt mehr vorhanden war (DC-Kontrolle). Es wurden 2.0 Äquivalente wässrige Formaldehyd-Lösung (37 %) zugegeben und über Nacht unter Deuteriumatmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt.

AAV 7: Reduktive Aminierung

Das am N-Terminus entschützte Peptid (1.0 Äq., n mmol) wurde in 10n ml MeOH gelöst und mit 1.0 Äq. Paraformaldehyd 3-4 h bei Raumtemperatur vorgerührt, wonach 1.05 Äq. Natriumcyanoborhydrid zugegeben wurden. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, klare Lösung) wurde das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigte organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet.

AAV 8: Hydrierung bzw. Deuterierung einer Doppelbindung

Ein Äquivalent des Substrats (n mmol) wurde in 5n ml Methanol gelöst, mit 10 Gew.% eines Pd-Katalysators auf Aktivkohle (5 %) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bzw. Deuteriumatmosphäre bis zum vollständigen Umsatz gerührt (DC-Kontrolle). Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt.

AAV 9: Aminosäureverlängerung durch kombinierte DIBALH-Reduktion/Wittig-Reaktion

Zu der Lösung eines Boc-geschützten Aminosäuremethylesters (1.0 Äq., n mmol) in absolutem Toluol (3 ml/mmol) wurde bei -78 °C langsam eine 1 M Di-*iso*-butylaluminiumhydrid-Lösung (DIBALH, 2.0 Äq.) zugetropft. Während das Reaktionsgemisch für 30 min bei -78 °C gerührt wurde, wurde eine Ylid-Lösung aus Phosphoniumsalz (2.0 Äq.) und KO^tBu

(2.0 Äq.) in 2n ml absolutem Toluol bei Raumtemperatur zubereitet. Das Ylid wurde bei –78 °C zur Aldehydlösung getropft, nach einer Stunde wurde das Kühlbad entfernt und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsgemisch wurde in 15n ml gesättigte K-Na-tartrat-Lösung gegossen und 30 min kräftig gerührt. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigte organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet.

AAV 10: *SNAC-Veresterung mit CDI*^[100]

Zu einer 0.1 M Lösung der Säurekomponente (Aminosäure bzw. Peptid, 1.0 Äq.) in THF abs. wurde 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI, 1.7 Äq.) in fester Form bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 10 min wurde *N*-Acetylcysteamin^[97] (NAC, 1.4 Äq.) zugetropft, wonach über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in EE/Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit NaCl gesättigt und mit EE extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet.

AAV 11: *SNAC-Veresterung mit DCC/DMAP*^[102]

Zu einer 0.1 M Lösung von Säurekomponente (1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin^[97] (NAC, 1.4 Äq.) und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP, katalytische Menge) in absolutem Dichlormethan wurde *N,N'*-Dicyclohexylcarbonyldiimid (DCC, 1.1 Äq.) fest zugegeben, und das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt.

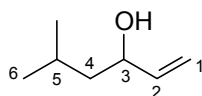
5.3 Synthese der Verbindungen

(R)-5-Methyl-1-hexen-3-ol^[112] ((R)-**1b**), **(S)-5-Methyl-1-hexen-3-ol**^[112] ((S)-**1b**)

(S)-5-Methyl-1-hexen-3-acetat^[112] ((S)-**2b**)

Grignard-Reaktion

Bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden 21.6 ml Isovaleraldehyd (200 mmol), gelöst in 40 ml absolutem Diethylether, zu 400 ml einer 0.5 M Vinylmagnesiumbromid-Lösung (200 mmol, 1.0 Äq.) getropft. Nach 3 h wurde das Kältebad entfernt und das Reaktionsgemisch weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt, wonach es mit 1 M KHSO_4 -Lösung auf pH 1 angesäuert wurde. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether extrahiert und die vereinigte organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Destillation über eine Vigreux-Kolonne (Sdp. $140\text{--}145\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden 18.3 g des racemischen Allylalkohols **1b** (160 mmol, 80 % d. Th.) als farbloses Öl von charakteristischem Geruch erhalten.



1b

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

$\delta = 0.91$ (d, $^3J_{6,5} = 6.6$ Hz, 3 H, 6-H), 0.91 (d, $^3J_{6',5} = 6.6$ Hz, 3 H, 6'-H), 1.31 (ddd, $^2J_{4a,4b} = 13.9$ Hz, $^3J_{4a,3} = 7.9$ Hz, $^3J_{4a,5} = 5.7$ Hz, 1 H, 4-H_a), 1.45 (ddd, $^2J_{4b,4a} = 13.9$ Hz, $^3J_{4b,5} = 7.9$ Hz, $^3J_{4b,3} = 6.3$ Hz, 1 H, 4-H_b), 1.52 (bs, 1 H, OH), 1.73 (m, 1 H, 5-H), 4.15 (ddd, $^3J_{3,2} \approx ^3J_{3,4a} \approx ^3J_{3,4b} = 6.8$ Hz, 1 H, 3-H), 5.07 (ddd, $^3J_{1cis,2} = 10.1$ Hz, $^2J_{1cis,1trans} \approx ^4J_{1cis,3} = 1.3$ Hz, 1 H, 1-H_{cis}), 5.20 (ddd, $^3J_{1trans,2} = 17.3$ Hz, $^2J_{1trans,1cis} \approx ^4J_{1trans,3} = 1.3$ Hz, 1 H, 1-H_{trans}), 5.84 (ddd, $^3J_{2,1trans} = 17.3$ Hz, $^3J_{2,1cis} = 10.4$ Hz, $^3J_{2,3} = 6.3$ Hz, 1 H, 2-H).

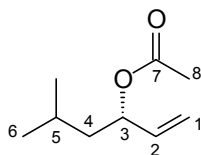
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3):

$\delta = 22.3$ (q, C-6), 23.0 (q, C-6'), 24.5 (d, C-5), 46.2 (t, C-4), 71.5 (d, C-3), 114.3 (t, C-1), 141.7 (d, C-2).

Racematspaltung^[68]

Es wurden 16.1 g des racemischen Allylalkohols **1b** (141 mmol) in 65 ml Vinylacetat (702 mmol, 5 Äq.) gelöst, mit 966 mg Novozym[®] 435 (6 Gew.%), einer immobilisierten Lipase aus *Candida antarctica*, versetzt und bei Raumtemperatur geschüttelt. Bis zum Ende der Reaktion wurde sie gaschromatographisch verfolgt. Anschließend wurde das immobilisierte Enzym abfiltriert und durch Waschen mit Diethylether regeneriert. Nach Abdestillieren des Vinylacetats über eine Vigreux-Kolonne wurden das entstandene Acetat und der nicht umgesetzte Alkohol säulenchromatographisch (CH_2Cl_2) voneinander getrennt und zur Reinigung jeweils noch über eine Vigreux-Kolonne destilliert. So wurden 10.1 g (S)-Acetat

(*S*)-**2b** (64.9 mmol, 46 % d. Th., 84 % ee; Sdp. 74-78 °C, 50 mbar) und 4.95 g (*R*)-Alkohol (*R*)-**1b** (43.4 mmol, 31 % d. Th., >99 % ee) erhalten.



(*S*)-**2b**

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 0.89 (d, ³*J*_{6,5} = 6.7 Hz, 3 H, 6-H), 0.90 (d, ³*J*_{6',5} = 6.3 Hz, 3 H, 6'-H), 1.37 (ddd, ²*J*_{4a,4b} = 13.6 Hz, ³*J*_{4a,3} = 7.6 Hz, ³*J*_{4a,5} = 5.7 Hz, 1 H, 4-H_a), 1.53-1.67 (sh, 2 H, 4-H_b, 5-H), 2.03 (s, 3 H, 8-H), 5.13 (ddd, ³*J*_{1cis,2} = 10.4 Hz, ²*J*_{1cis,1trans} ≈ ⁴*J*_{1cis,3} = 1.3 Hz, 1 H, 1-H_{cis}), 5.21 (ddd, ³*J*_{1trans,2} = 17.0 Hz, ²*J*_{1trans,1cis} ≈ ⁴*J*_{1trans,3} = 1.3 Hz, 1 H, 1-H_{trans}), 5.29 (ddd, ³*J*_{3,2} ≈ ³*J*_{3,4a} ≈ ³*J*_{3,4b} = 6.8 Hz, 1 H, 3-H), 5.74 (ddd, ³*J*_{2,1trans} = 17.0 Hz, ³*J*_{2,1cis} = 10.4 Hz, ³*J*_{2,3} = 6.6 Hz, 1 H, 2-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 21.3 (q, C-8), 22.4 (q, C-6), 22.8 (q, C-6'), 24.5 (d, C-5), 43.2 (t, C-4), 73.3 (d, C-3), 116.4 (t, C-1), 136.9 (d, C-2), 170.3 (s, C-7).

Verseifung des Acetats

Zu einer Lösung von 10.1 g des bei der Racematspaltung entstandenen (*S*)-Acetats (*S*)-**2b** (64.7 mmol) in 65 ml Methanol wurden 1.79 g Kaliumcarbonat (13.0 mmol, 0.2 Äq.) gegeben und das Gemisch über Nacht gerührt. Das Methanol wurde über eine Vigreux-Kolonnen destillativ entfernt, der Rückstand in 1 M KHSO₄-Lösung und Diethylether aufgenommen und die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Destillation über eine Vigreux-Kolonnen ergab 6.62 g des (*S*)-Alkohols (*S*)-**1b** (57.7 mmol, 89 % d. Th., 84 % ee).

GC: Säule: *Chirasil-Dex-CB*, Trennung im Gradientenprogramm: T₀ [3 min] = 80 °C, 2 °C/min bis T = 200 °C [3 min], Injektor: 250 °C, Detektor: 275 °C.

(*R*)-Acetat (*R*)-**2b**: t_R = 15.02 min

(*S*)-Acetat (*S*)-**2b**: t_R = 16.73 min

(*R*)-Alkohol (*R*)-**1b**: t_R = 20.70 min

(*S*)-Alkohol (*S*)-**1b**: t_R = 21.36 min

(*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-glycin-3-(5-methyl-1-hexenyl)-ester ((*S*)-**3**)

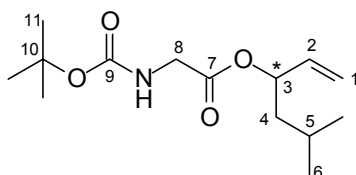
(*R*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-glycin-3-(5-methyl-1-hexenyl)-ester ((*R*)-**3**)

Eine Lösung von 4.00 g (*S*)-Allylalkohol (*S*)-**1b** (35 mmol, 1.0 Äq.), 6.74 g Bocgeschütztes Glycin (38.5 mmol, 1.1 Äq.) und 429 mg DMAP (3.51 mmol, 0.1 Äq.) in 130 ml

Diethylether wurde bei 0 °C mit 7.94 g DCC (38.5 mmol, 1.1 Äq.) versetzt und über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt.^[73] Der ausgefallene Harnstoff wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 9:1, 8:2) wurden 8.33 g (30.7 mmol, 88 % d. Th.) eines farblosen Öls (*S*)-**3** erhalten.

Der entsprechende (*R*)-konfigurierte Ester (*R*)-**3** konnte durch Veresterung des (*R*)-Allylkohols (*R*)-**1b** erhalten werden (98 % d. Th.).

$R_f(\mathbf{3}) = 0.43$ (Hexan:EE 8:2)



3

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

$\delta = 0.89$ (d, $^3J_{6,5} = 6.3$ Hz, 3 H, 6-H), 0.90 (d, $^3J_{6',5} = 6.3$ Hz, 3 H, 6'-H), 1.39 (m, 1 H, 4-H_a), 1.43 (s, 9 H, 11-H), 1.53 - 1.68 (sh, 2 H, 4-H_b, 5-H), 3.89 (m, 2 H, 8-H), 4.97 (bs, 1 H, NH), 5.15 (d, $^3J_{1\text{cis},2} = 10.4$ Hz, 1 H, 1-H_a), 5.24 (d, $^3J_{1\text{trans},2} = 17.0$ Hz, 1 H, 1-H_{trans}), 5.35 (td, $^3J_{3,4} = 6.9$ Hz, $^3J_{3,2} = 6.7$ Hz, 1 H, 3-H), 5.74 (ddd, $^3J_{2,1\text{trans}} = 17.0$ Hz, $^3J_{2,1\text{cis}} = 10.4$ Hz, $^3J_{2,3} = 6.7$ Hz, 1 H, 2-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

$\delta = 22.4$ (q, C-6), 22.7 (q, C-6'), 24.4 (d, C-5), 28.3 (q, C-11), 42.6 (t, C-8), 43.1 (t, C-4), 74.7 (d, C-3), 79.9 (s, C-10), 117.1 (t, C-1), 136.3 (d, C-2), 155.6 (s, C-9), 169.7 (s, C-7).

Es konnte keine geeignete Trennmethode zur Bestimmung der ee-Werte mittels HPLC oder GC gefunden werden.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -15.6^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃, (*S*)-**3**)
 $[\alpha]_D^{20} = +15.5^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃, (*R*)-**3**)

Elementaranalyse:

C ₁₄ H ₂₅ NO ₄	Ber.	C 61.97	H 9.29	N 5.16
(271.36)	Gef.	C 62.18	H 9.33	N 5.58

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₄ H ₂₆ NO ₄ [M+H] ⁺	272.1861	272.1890

(2*S*,4*E*)-2-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-7-methyl-4-octensäure-methylester ((*S*)-4)**(2*R*,4*E*)-2-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-7-methyl-4-octensäure-methylester ((*R*)-4)***Bereitung der Basen-Lösung (LDA)*

Bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden 55 ml *n*-BuLi (1.6 M in Hexan, 88 mmol, 2.9 Äq.) zu einer Lösung von 12.6 ml DIPA (89.7 mmol, 3.0 Äq.) in 90 ml absolutem THF getropft. Es wurde noch 20 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt.

Chelat-Esterenolat-Claisen-Umlagerung^[72]

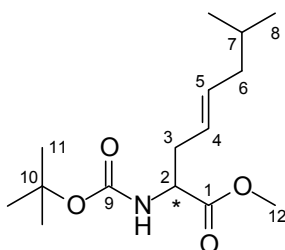
Zu einer Lösung von 8.13 g des Boc-geschützten Glycinallylesters (*S*)-**3** (30.0 mmol, 1.0 Äq.) in 120 ml absolutem THF wurde eine Lösung von 4.91 g ZnCl₂ (36.0 mmol, 1.2 Äq.), welches zuvor gut ausgeheizt wurde, in 30 ml trockenem THF gegeben. Nachdem die Lösung auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt wurde, wurde die zuvor zubereitete, nun ebenfalls auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlte LDA-Lösung über eine Transferkanüle zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde mit Diethylether verdünnt und mit 1 M KHSO₄-Lösung auf pH 1-2 angesäuert. Die wässrige Phase wurde mehrfach mit Ether extrahiert, die vereinigte organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und der Ether am Rotationsverdampfer destillativ entfernt.

Herstellung des Methylesters

Das Umlagerungsrohprodukt wurde in 100 ml DMF gelöst und bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 4.89 g K₂CO₃ (35.4 mmol, 1.2 Äq.) und 5.6 ml Methyljodid (90.0 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Nach 3 h wurde das Reaktionsgemisch in 400 ml Wasser gegossen, mit 50 ml gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und 30 min kräftig gerührt. Anschließend wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Durch säulenchromatographische Reinigung (Hexan:EE 9:1) wurden 7.31 g des Produktes (*S*)-**4** (25.6 mmol, 85 % d. Th., 87 % ee) als farbloses Öl erhalten.

Entsprechend konnte die (*R*)-Aminosäure (*R*)-**4** durch Umlagerung des (*R*)-Boc-Glycinallylesters (*R*)-**3** erhalten werden (89 % d. Th., >99 % ee).

R_f(4) = 0.45 (Hexan:EE 8:2)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 0.84 (d, $^3J_{8,7}$ = 6.6 Hz, 3 H, 8-H), 0.85 (d, $^3J_{8',7}$ = 6.7 Hz, 3 H, 8'-H), 1.42 (s, 9 H, 11-H), 1.57 (m, 1 H, 7-H), 1.86 (m, 2 H, 6-H), 2.40 (ddd, $^2J_{3a,3b}$ = 14.2 Hz, $^3J_{3a,4}$ = 7.3 Hz, $^3J_{3a,2}$ = 6.0 Hz, 1 H, 3-H_a), 2.47 (ddd, $^2J_{3b,3a}$ = 14.2 Hz, $^3J_{3b,4}$ = 7.3 Hz, $^3J_{3b,2}$ = 6.0 Hz, 1 H, 3-H_b), 3.71 (s, 3 H, 12 H), 4.32 (dt, $^3J_{2,NH}$ = 7.0 Hz, $^3J_{2,3}$ = 6.0 Hz, 1 H, 2-H), 4.98 (d, $^3J_{NH,2}$ = 7.0 Hz, 1 H, NH), 5.24 (dt, $^3J_{4,5}$ = 15.1 Hz, $^3J_{4,3}$ = 7.3 Hz, 1 H, 4-H), 5.49 (dt, $^3J_{5,4}$ = 15.1 Hz, $^3J_{5,6}$ = 7.3 Hz, 1 H, 5-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 22.2 (q, C-8), 28.3 (q, C-11), 28.3 (d, C-7), 35.7 (t, C-3), 41.9 (t, C-6), 52.2 (q, C-12), 53.2 (d, C-2), 79.8 (s, C-10), 124.5 (t, C-4), 134.3 (d, C-5), 155.2 (s, C-9), 172.8 (s, C-1).

HPLC: *Reprosil 100 Chiral-NR* 8 μ m, Hexan:*i*PrOH 97:3, 2 ml/min

(*R*)-4: t_R = 3.42 min

(*S*)-4: t_R = 3.88 min

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ = +23.9° (c = 1.0, CHCl₃, (*S*)-4, 87 % ee)
 $[\alpha]_D^{20}$ = -27.9° (c = 1.0, CHCl₃, (*R*)-4, >99 % ee)

Elementaranalyse:

C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	Ber.	C 63.13	H 9.54	N 4.91
(285.39)	Gef.	C 62.76	H 9.64	N 5.30

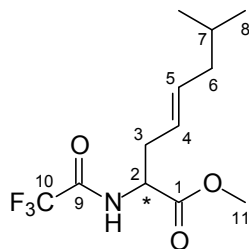
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₅ H ₂₈ NO ₄ [M+H] ⁺	286.2018	286.2022

(2*S*,4*E*)-7-Methyl-2-(trifluoracetyl)amino-4-octensäure-methylester ((*S*)-5)**(2*R*,4*E*)-7-Methyl-2-(trifluoracetyl)amino-4-octensäure-methylester ((*S*)-5)**

Zu 7.17 g der durch Umlagerung erhaltenen Boc-Aminosäure (*S*)-4 (25.1 mmol, 1.0 Äq.) wurden bei 0 °C 19 ml Trifluoressigsäure (247 mmol, 9.8 Äq.) gegeben. Nach etwa 30 min war die Boc-Abspaltung beendet (DC-Kontrolle) und es wurden 24 ml Trifluoressigsäureanhydrid (125 mmol, 5.0 Äq.) bei 0 °C zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Das TFA/TFAA-Gemisch wurde im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigte organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Durch säulenchromatographische Reinigung (Hexan:EE 9:1) des Rohprodukts wurden 6.86 g des Produktes (*S*)-5 (24.4 mmol, 97 % d. Th., 84 % ee) als farbloses Öl erhalten.

Die TFA-geschützte (*R*)-Aminosäure (*R*)-4 konnte auf gleiche Weise aus der Boc-geschützten (*R*)-Aminosäure (*R*)-5 erhalten werden (97 % d. Th., 98 % ee).

R_f (5) = 0.43 (Hexan:EE 8:2)



5

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 0.84 (d, $^3J_{8,7}$ = 6.6 Hz, 3 H, 8-H), 0.84 (d, $^3J_{8',7}$ = 6.7 Hz, 3 H, 8'-H), 1.56 (m, 1 H, 7-H), 1.87 (dd, $^3J_{6,5} \approx ^3J_{6,7}$ = 7.0 Hz, 2 H, 6-H), 2.53 (ddd, $^2J_{3a,3b}$ = 14.5 Hz, $^3J_{3a,4} \approx ^3J_{3a,2}$ = 6.7 Hz, 1 H, 3-H_a), 2.61 (ddd, $^2J_{3b,3a}$ = 14.5 Hz, $^3J_{3b,4} \approx ^3J_{3b,2}$ = 6.7 Hz, 1 H, 3-H_b), 3.78 (s, 3 H, 11 H), 4.63 (dt, $^3J_{2,NH}$ = 7.6 Hz, $^3J_{2,3}$ = 5.6 Hz, 1 H, 2-H), 5.20 (dt, $^3J_{4,5}$ = 15.1 Hz, $^3J_{4,3}$ = 7.4 Hz, 1 H, 4-H), 5.53 (dt, $^3J_{5,4}$ = 15.1 Hz, $^3J_{5,6}$ = 7.3 Hz, 1 H, 5-H), 6.79 (bs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 22.1 (q, C-8), 28.2 (q, C-7), 34.8 (t, C-3), 41.8 (t, C-6), 52.2 (q, C-11), 52.9 (d, C-2), 115.6 (q, $^1J_{10,F}$ = 286.1 Hz, C-10), 122.9 (t, C-4), 135.8 (d, C-5), 156.5 (q, $^2J_{9,F}$ = 38.2 Hz, C-9), 170.7 (s, C-1).

HPLC: *Reprosil 100 Chiral-NR 8 μ m*, Hexan:*i*PrOH 97:3, 2 ml/min

(*R*)-**5**: t_R = 3.39 min

(*S*)-**5**: t_R = 3.78 min

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ = +60.6 ° (c = 1.0, CHCl₃, (*S*)-**5**, 84 % ee)
 $[\alpha]_D^{20}$ = -66.0 ° (c = 1.0, CHCl₃, (*R*)-**5**, 98 % ee)

Elementaranalyse:

C ₁₂ H ₁₈ F ₃ NO ₃	Ber.	C 51.24	H 6.45	N 4.98
(281.28)	Gef.	C 51.06	H 6.34	N 5.43

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₂ H ₁₉ F ₃ NO ₃ [M+H] ⁺	282.1317	282.1279

(2*S*,4*E*)-2-[Allyl-(trifluoroacetyl)amino]-7-Methyl-4-octensäure-methylester ((*S*)-6**)**

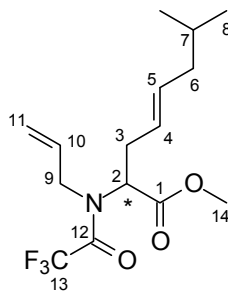
(2*R*,4*E*)-2-[Allyl-(trifluoroacetyl)amino]-7-Methyl-4-octensäure-methylester ((*R*)-6**)**

Zur Zubereitung der Katalysatorlösung wurden 87 mg Allylpalladiumchlorid-Dimer (0.238 mmol, 1.0 mol%) und 279 mg Triphenylphosphin (1.06 mmol, 4.5 mol%) in 20 ml absolutem THF gelöst. Nach 30-minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurden 5.48 g Allylmethylcarbonat (47.2 mmol, 2.0 Äq.), welches zuvor analog zum Allylethylcarbonat^[113] hergestellt worden war, zugetropft. Es wurde nochmals 30 min bei Raumtemperatur gerührt, wonach die Katalysatorlösung zu einer Lösung von 6.67 g des TFA-geschützten Aminosäuremethylesters (*S*)-**5** (23.7 mmol, 1.0 Äq.) in 100 ml absolutem THF getropft wurde. Das

Reaktionsgemisch wurde über Nacht auf 60 °C erwärmt.^[74,75] Nach Abdestillieren des Lösemittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan:EE 9:1) gereinigt, so dass 7.62 g des Produktes (*S*)-**6** (23.5 mmol, 99 % d. Th., 84 % ee) als farbloses Öl erhalten wurden.

Umsetzung des TFA-geschützten (*R*)-Aminosäuremethylesters (*R*)-**5** lieferte das entsprechende (*R*)-konfigurierte Produkt (*R*)-**6** (98 % d. Th., 97 % ee).

$R_f(\mathbf{6}) = 0.45$ (Hexan:EE 8:2)



6

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 0.84$ (d, $^3J_{8,7} = 6.5$ Hz, 6 H, 8-H), 1.56 (m, 1 H, 7-H), 1.86 (dd, $^3J_{6,5} \approx ^3J_{6,7} = 7.0$ Hz, 2 H, 6-H), 2.66-2.80 (sh, 2 H, 3-H_a, 3-H_b), 3.69 (s, 3 H, 14 H), 3.91 (dd, $^2J_{9a,9b} = 16.1$ Hz, $^3J_{9a,10} = 6.6$ Hz, 1 H, 9-H_a), 4.09-4.16 (sh, 2 H, 2-H, 9-H_b), 5.23-5.33 (sh, 3 H, 4-H, 11-H), 5.50 (dt, $^3J_{5,4} = 15.1$ Hz, $^3J_{5,6} = 7.3$ Hz, 1 H, 5-H), 5.79 (ddt, $^3J_{10,11trans} = 17.1$ Hz, $^3J_{10,11cis} = 10.4$ Hz, $^3J_{10,9} = 6.6$ Hz, 1 H, 10-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.83$ (d, $^3J_{8,7} = 6.5$ Hz, 6 H, 8-H), 2.48 (ddd, $^2J_{3a,3b} = 14.8$ Hz, $^3J_{3a,2} \approx ^3J_{3a,4} = 7.6$ Hz, 1 H, 3-H_a), 3.70 (s, 3 H, 14 H), 4.03 (dd, $^2J_{9b,9a} = 15.2$ Hz, $^3J_{9b,10} = 6.3$ Hz, 1 H, 9-H_b), 4.51 (dd, $^3J_{2,3a/b} = 8.6$ Hz, $^3J_{2,3a/b} = 6.3$ Hz, 1 H, 2-H), 5.16 (dd, $^3J_{11cis,10} = 10.1$ Hz, $^2J_{11cis,11trans} = 1.2$ Hz, 1 H, 11-H_{cis}), 5.18 (dd, $^3J_{11trans,10} = 17.4$ Hz, $^2J_{11trans,11cis} = 1.2$ Hz, 1 H, 11-H_{trans}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 22.2$ (q, C-8), 28.3 (q, C-7), 31.4 (t, C-3), 41.9 (t, C-6), 51.7 (q, $^4J_{9,F} = 3.6$ Hz, C-9), 52.5 (d, C-14), 60.1 (d, C-2), 116.2 (q, $^1J_{13,F} = 285.8$ Hz, C-13), 119.8 (t, C-11), 125.5 (t, C-4), 132.3 (d, C-10), 133.9 (d, C-5), 156.9 (q, $^2J_{12,F} = 35.7$ Hz, C-12), 169.6 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 22.2$ (q, C-8), 28.2 (q, C-7), 32.9 (t, C-3), 41.8 (t, C-6), 47.6 (t, C-9), 52.6 (d, C-14), 59.7 (d, C-2), 118.2 (t, C-11), 124.2 (t, C-4), 131.9 (d, C-10), 134.8 (d, C-5), 169.7 (s, C-1).

HPLC: *Chiralcel OD-H*, Hexan:*i*PrOH 99:1, 1 ml/min

(*R*)-**6**: $t_R = 4.81$ min

(*S*)-**6**: $t_R = 6.11$ min

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -56.5^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl₃, (*S*)-**6**, 84 % ee)
 $[\alpha]_D^{20} = +65.6^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl₃, (*R*)-**6**, 97 % ee)

Elementaranalyse:

C ₁₅ H ₂₂ F ₃ NO ₃	Ber.	C 56.07	H 6.90	N 4.36
(321.34)	Gef.	C 56.53	H 6.65	N 4.65

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₅ H ₂₃ F ₃ NO ₃ [M+H] ⁺	322.1630	322.1669

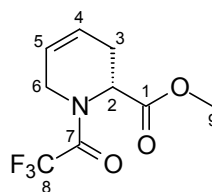
(*S*)-*N*-(Trifluoracetyl)-baikiain-methylester ((*S*)-7**)**

(*R*)-*N*-(Trifluoracetyl)-baikiain-methylester ((*R*)-7**)**

Eine Lösung von 198 mg des Grubbs-Katalysators [RuCl₂(=CHPh)(PCy₃)₂] (0.241 mmol, 1.2 mol%) in 20 ml absolutem Dichlormethan wurde zu einer Lösung von 6.44 g *N*-Allylprodukt (*S*)-**6** (20.0 mmol) in 380 ml absolutem Dichlormethan gegeben und über Nacht gerührt.^[77,78] Nach Abdestillieren des Lösemittels wurde das Produkt zuerst säulenchromatographisch (Hexan:EE 9:1, 8:2), dann durch Destillation am Kugelrohr (150 °C, 1.5·10⁻¹ mbar) gereinigt. Es wurden 4.39 g eines farblosen Öls (*S*)-**7** (18.5 mmol, 93 % d. Th., 83 % ee) erhalten.

Die entsprechende (*R*)-Aminosäure (*R*)-**7** wurde durch Ringschlussmetathese des *N*-Allylprodukt (*R*)-**6** erhalten (97 % d. Th., 97 % ee).

$R_f(\mathbf{7}) = 0.35$ (Hexan:EE 8:2)



7

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 2.51$ (m, 1 H, 3-H_a), 2.76 (d, ²*J*_{3b,3a} = 17.7 Hz, 1 H, 3-H_b), 3.72 (s, 3 H, 9-H), 4.16 (m, 1 H, 6-H_a), 4.23 (d, ²*J*_{6b,6a} = 17.7 Hz, 1 H, 6-H_b), 5.43 (dd, ³*J*_{2,3a} = 6.7 Hz, ³*J*_{2,3b} = 1.0 Hz, 1 H, 2-H), 5.63 (dddd, ³*J*_{5,4} = 10.4 Hz, ³*J*_{5,6a} ≈ ³*J*_{5,6b} ≈ ⁴*J*_{5,3a} = 2.9 Hz, 1 H, 5-H), 5.84 (m, 1 H, 4-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 2.56$ (m, 1 H, 3-H_a), 2.75 (d, $^2J_{3b,3a} = 17.7$ Hz, 1 H, 3-H_b), 3.74 (s, 3 H, 9-H), 3.85 (d, $^2J_{6a,6b} = 18.0$ Hz, 1 H, 6-H_a), 4.39 (m, 1 H, 6-H_b), 5.81 (d, $^3J_{2,3a} = 6.0$ Hz, 1 H, 2-H), 5.71 (dddd, $^3J_{5,4} = 10.4$ Hz, $^3J_{5,6a} \approx ^3J_{5,6b} \approx ^4J_{5,3a} = 2.9$ Hz, 1 H, 5-H), 5.79 (m, 1 H, 4-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 25.8$ (t, C-3), 42.5 (q, $^4J_{6,F} = 4.5$ Hz, C-6), 50.7 (d, C-2), 52.8 (q, C-9), 116.4 (q, $^1J_{8,F} = 286.1$ Hz, C-8), 122.1 (d, C-5), 123.2 (d, C-4), 157.2 (q, $^2J_{7,F} = 37.2$ Hz, C-7), 169.9 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 26.9$ (t, C-3), 41.9 (t, C-6), 53.0 (q, C-9), 53.7 (q, $^4J_{2,F} = 2.9$ Hz, C-2), 116.2 (q, $^1J_{8,F} = 287.0$ Hz, C-8), 122.1 (d, C-4), 123.1 (d, C-5), 169.9 (s, C-1).

HPLC: *Reprosil 100 Chiral-NR 8 μm* , Hexan:*i*PrOH 95:5, 2 ml/min

(*R*)-7: $t_R = 4.14$ min

(*S*)-7: $t_R = 4.72$ min

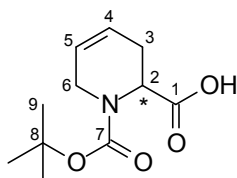
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -5.3^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃, (*S*)-7, 83 % ee)
 $[\alpha]_D^{20} = +5.7^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃, (*R*)-7, 97 % ee)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₉ H ₁₁ F ₃ NO ₃ [M+H] ⁺	238.0691	239.0661

(*S*)-*N*-tert.-Butoxycarbonyl-baikiain ((*S*)-8)**(*R*)-*N*-tert.-Butoxycarbonyl-baikiain ((*R*)-8)**

Eine Lösung von 4.29 g TFA-geschütztem (*S*)-Baikiain-methylester (*S*)-7 (18.1 mmol) in 80 ml Dioxan wurde bei 0 °C mit 57 ml 1 M NaOH-Lösung (57 mmol, 3.0 Äq.) versetzt und bis zur vollständigen Entschützung gerührt (DC-Kontrolle). Zur Boc-Schützung wurden 4.62 g Boc₂O (21.2 mmol, 1.1 Äq.) bei 0 °C zugegeben, und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Dioxans wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die Essigester-Phase wurde verworfen, die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl auf pH 2 gebracht und erneut mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ und Abdestillieren des Lösemittels wurden 3.34 g des Produktes (*S*)-8 (14.7 mmol, 81 % d. Th.) als weißer Feststoff erhalten.

Das entsprechende (*R*)-Boc-Baikiain (*R*)-8 konnte aus (*R*)-7 erhalten werden (91 % d. Th.).



8

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 1.46 (s, 9 H, 9-H), 2.49 (d, $^2J_{3a,3b}$ = 17.2 Hz, 1 H, 3-H_a), 2.64 (dd, $^2J_{3b,3a}$ = 17.2 Hz, $^3J_{3b,2}$ = 5.6 Hz, 1 H, 3-H_b), 3.79 (d, $^2J_{6a,6b}$ = 20.2 Hz, 1 H, 6-H_a), 4.03 (d, $^2J_{6b,6a}$ = 20.2 Hz, 1 H, 6-H_b), 5.07 (d, $^2J_{2,3b}$ = 5.6 Hz, 1 H, 2-H), 5.63 (dd, $^3J_{5,4}$ = 10.1 Hz, $^3J_{5,6a/b}$ = 1.9 Hz, 1 H, 5-H), 5.73 (m, 1 H, 4-H), 10.64 (bs, 1 H, COOH).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.44 (s, 9 H, 9-H), 2.61 (d, $^2J_{3b,3a}$ = 18.3 Hz, 1 H, 3-H_b), 3.74 (d, $^2J_{6a,6b}$ = 20.9 Hz, 1 H, 6-H_a), 4.07 (d, $^2J_{6b,6a}$ = 20.9 Hz, 1 H, 6-H_b), 4.88 (d, $^2J_{2,3b}$ = 6.3 Hz, 1 H, 2-H), 5.67-5.78 (sh, 2 H, 4-H, 5-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 26.4 (t, C-3), 28.4 (q, C-9), 42.1 (t, C-6), 50.8 (d, C-2), 80.6 (s, C-8), 122.3 (d, C-4), 124.1 (d, C-5), 155.9 (s, C-7), 177.4 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 26.5 (t, C-3), 28.3 (q, C-9), 41.8 (t, C-6), 52.1 (d, C-2), 121.7 (d, C-4), 124.6 (d, C-5), 155.0 (s, C-7), 177.5 (s, C-1).

Erhöhung der Enantiomerenreinheit von Boc-Baikiaiin (8) mit PEA

Zu einer Lösung von 1.50 g (*S*)-Boc-Baikiaiin (*S*)-**8** (6.60 mmol) wurden 0.9 ml (*R*)-Phenylethylamin (6.68 mmol, 1.0 Äq.) zugetropft, woraufhin ein weißer Feststoff auszufallen begann. Am nächsten Tag wurde das Ammoniumsalz (*S,R*)-**9** abfiltriert und aus Essigsäureethylester umkristallisiert. Mit Hilfe von 1 M HCl-Lösung wurde die Säure wieder protoniert und mit Diethylether extrahiert. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurden 743 mg (*S*)-Boc-Baikiaiin (*S*)-**8** (3.27 mmol, 50 % d. Th., >99 % ee) erhalten.

Auf die gleiche Weise konnte die Enantiomerenreinheit von (*R*)-Boc-Baikiaiin (*R*)-**8** mit Hilfe von (*S*)-Phenylethylamin erhöht werden (49 % d. Th., >99 % ee).

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurden (S)- bzw. (R)-8 mit Diazomethan zum Methylester (S)- bzw. (R)-8-OMe verestert.

HPLC: *Reprosil 100 Chiral-NR 8 μm*, Hexan:*i*PrOH 97:3, 2 ml/min

(*R*)-**8**-OMe: $t_R = 4.65$ min

(*S*)-**8**-OMe: $t_R = 5.30$ min

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +9.7^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH, (*S*)-**8**)
 $[\alpha]_D^{20} = -9.9^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH, (*R*)-**8**)

Schmelzpunkt: 106 °C

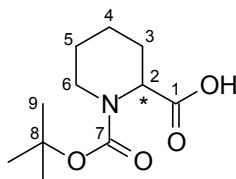
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$C_{11}H_{18}NO_4 [M+H]^+$	228.1236	228.1227

(*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-pipecolinsäure^[79] ((*S*)-**10**)

(*R*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-pipecolinsäure^[80] ((*R*)-**10**)

162 mg (*S*)-Boc-Baikiain (*S*)-**8** (0.713 mmol, >99 % ee) wurden nach **AAV 8** mit 16 mg Katalysator unter Wasserstoffatmosphäre zu 159 mg Boc-geschützter (*S*)-Pipecolinsäure (*S*)-**10** (0.694 mmol, 97 % d. Th.) umgesetzt.

Entsprechend wurde das (*R*)-Pipecolinsäurederivat (*R*)-**10** erhalten (quant.).



10

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 1.28$ (ddd, $^2J_{4ax,4eq} \approx ^3J_{4ax,3ax} \approx ^3J_{4ax,5ax} = 13.8$ Hz, 1 H, 4-*H*_{ax}), 1.40 (m, 1 H, 5-*H*_{ax}), 1.44 (s, 9 H, 9-*H*), 1.55-1.72 (sh, 3 H, 3-*H*_{ax}, 4-*H*_{eq}, 5-*H*_{eq}), 2.21 (m, 1 H, 3-*H*_{eq}), 2.95 (dd, $^2J_{6ax,6eq} \approx ^3J_{6ax,5ax} = 12.7$ Hz, 1 H, 6-*H*_{ax}), 3.91 (d, $^2J_{6eq,6ax} = 12.0$ Hz, 1 H, 6-*H*_{eq}), 4.92 (s, 1 H, 2-*H*), 10.34 (bs, 1 H, COOH).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 2.87$ (dd, $^2J_{6ax,6eq} \approx ^3J_{6ax,5ax} = 12.8$ Hz, 1 H, 6-*H*_{ax}), 4.00 (d, $^2J_{6eq,6ax} = 12.0$ Hz, 1 H, 6-*H*_{eq}), 4.75 (s, 1 H, 2-*H*).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 20.7$ (t, C-4), 24.7 (t, C-5), 26.6 (t, C-3), 28.3 (q, C-9), 42.1 (t, C-6), 53.5 (d, C-2), 80.3 (s, C-8), 156.1 (s, C-7), 177.9 (s, C-1).

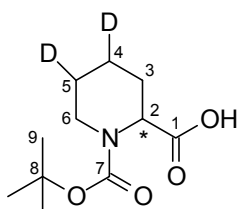
Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 24.5$ (t, C-5), 41.0 (t, C-6), 54.7 (d, C-2), 155.5 (s, C-7).

(S)-N-tert.-Butoxycarbonyl-4,5-dideutero-pipecolinsäure ((S)-d₂-10)**(R)-N-tert.-Butoxycarbonyl-4,5-dideutero-pipecolinsäure ((R)-d₂-10)**

186 mg (S)-Boc-Baikiain (S)-**8** (0.818 mmol, >99 % ee) wurden nach **AAV 8** mit 24 mg Katalysator unter Deuteriumatmosphäre zu 185 mg deuterierter, Boc-geschützter (S)-Pipecolinsäure (S)-d₂-**10** (0.803 mmol, 98 % d. Th.) umgesetzt.

Entsprechend wurde das (R)-Pipecolinsäurederivat (R)-d₂-**10** erhalten (quant.).

**d₂-10**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 1.27 (m, 0.5 H, 4-H_{ax}(1/2)), 1.41 (m, 0.5 H, 5-H_{ax}(1/2)), 1.43 (s, 9 H, 9-H), 1.56-1.73 (sh, 2 H, 3-H_{ax}, 4-H_{eq}(1/2), 5-H_{eq}(1/2)), 2.19 (bs, 1 H, 3-H_{eq}), 2.93 (bs, 1 H, 6-H_{ax}), 3.90 (d, ²J_{6eq,6ax} = 10.8 Hz, 1 H, 6-H_{eq}), 4.90 (s, 1 H, 2-H), 10.00 (bs, 1 H, COOH).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 2.89 (bs, 1 H, 6-H_{ax}), 3.97 (bs, 1 H, 6-H_{eq}), 4.74 (bs, 1 H, 2-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 20.4* (m, C-4), 24.3* (m, C-5), 26.5 (t, C-3), 28.3 (q, C-9), 42.0 (t, C-6), 53.5 (d, C-2), 80.3 (s, C-8), 156.2 (s, C-7), 177.5 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 41.0 (t, C-6), 54.7 (d, C-2), 155.5 (s, C-7), 177.4 (s, C-1).

Optische Drehung:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -45.5^\circ$ (c = 1.0, MeOH, (S)-d₂-**10**)

Lit.^[79] $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -45.1^\circ$ (c = 1.0, MeOH, L-Boc-Pip)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +41.2^\circ$ (c = 1.0, MeOH, (R)-d₂-**10**)

Lit.^[80] $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +43.6^\circ$ (c = 0.96, MeOH, D-Boc-Pip)

Schmelzpunkt:

104 °C

HRMS (CI)

Berechnet

Gefunden

C₁₁H₁₈D₂NO₄ [M+H]⁺

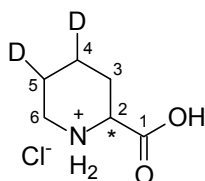
232.1518

232.1519

(S)-4,5-Dideutero-pipecolinsäure-Hydrochlorid ((S)-d₂-11)**(R)-4,5-Dideutero-pipecolinsäure-Hydrochlorid ((R)-d₂-11)**

Bei 0 °C wurden 4 ml einer 4 M HCl-Dioxan-Lösung (16 mmol, 19.9 Äq.) zu 185 mg (S)-d₂-10 (0.803 mmol) gegeben. Nach vollständiger Entschützung wurde die entstandene Suspension zentrifugiert (6000 rpm, 15 min) und die HCl-Dioxan-Lösung abdekantiert. Das Produkt (S)-d₂-11 wurde nach Trocknen am HV als weißer Feststoff erhalten (107 mg, 0.642 mmol, 78 % d. Th.).

Ebenso wurde (R)-d₂-11 als weißer Feststoff erhalten (0.654 mmol, 81 % d. Th.).

**d₂-11**

¹H-NMR (400 MHz, D₂O):

δ = 1.58-1.73 (sh, 1 H, 4-H_{ax}(1/2), 5-H_{ax}(1/2)), 1.78 (m, 1 H, 3-H_{ax}), 1.87-1.98 (sh, 1 H, 4-H_{eq}(1/2), 5-H_{eq}(1/2)), 2.31 (ddd, ²J_{3eq,3ax} = 14.5 Hz, ³J_{3eq,2} ≈ ³J_{3eq,4ax/4eq} = 3.9 Hz, 1 H, 3-H_{eq}), 3.06 (m, 1 H, 6-H_{ax}), 3.48 (dd, ²J_{6eq,6ax} = 12.8 Hz, ²J_{6eq,5ax/5eq} = 3.8 Hz, 1 H, 6-H_{eq}), 3.96 (dd, ³J_{2,3ax} = 11.8 Hz, ³J_{2,3eq} = 3.5 Hz, 1 H, 2-H).

²H-NMR (76.8 MHz, H₂O):

δ = 1.58 (sh, 0.77 D, 4-D_{ax}(1/2), 5-D_{ax}(1/2)), 1.86 (sh, 0.72 D, 4-D_{eq}(1/2), 5-D_{eq}(1/2)), 2.24 (bs, 0.14 D, 3-D_{eq}), 3.01 (bs, 0.09 D, 6-D_{ax}).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O):

δ = 21.0 (m, C-4, C-5), 25.7 (t, C-3), 43.8 (t, C-6), 57.0 (d, C-2), 172.0 (s, C-1).

Optische Drehung:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6.3^{\circ} \quad (c = 1.0, \text{MeOH}, (S)\text{-d}_2\text{-11})$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +6.2^{\circ} \quad (c = 1.0, \text{MeOH}, (R)\text{-d}_2\text{-11})$$

Schmelzpunkt:

240 °C (Zers.)

Elementaranalyse:

C ₆ H ₁₀ D ₂ ClNO ₂	Ber.	C 42.99	H/D 8.41	N 8.36
(167.60)	Gef.	C 43.18	H/D 8.60	N 8.34

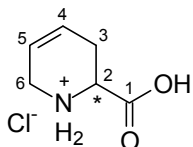
HRMS (CI)

	Berechnet	Gefunden
C ₆ H ₁₀ D ₂ NO ₂ [M+H] ⁺	132.0993	132.1002

(S)-Baikiain-Hydrochlorid^[67, 114] ((S)-12), **(R)-Baikiain-Hydrochlorid** ((R)-12)

Umsetzung von 178 mg Boc-geschütztes Baikiain (S)-8 (0.783 mmol) mit 3.9 ml einer 4 M Lösung von HCl in Dioxan (15.6 mmol, 20 Äq.) gemäß AAV 4 lieferte 129 mg (S)-Baikiain (S)-12 (0.789 mmol, quant.) als Hydrochlorid-Salz.

Ebenso konnte (R)-Baikiain-Hydrochlorid (R)-12 erhalten werden (quant.).

**12**

¹H-NMR (500 MHz, D₂O):

δ = 2.55 (ddddt, $^2J_{3a,3b}$ = 18.6 Hz, $^3J_{3a,2}$ = 10.8 Hz, $^3J_{3a,4} \approx ^4J_{3a,5} \approx ^5J_{3a,6}$ = 2.9 Hz, 1 H, 3-H_a), 2.78 (ddddt, $^2J_{3b,3a}$ = 18.6 Hz, $^3J_{3b,2} \approx ^3J_{3b,4}$ = 5.2 Hz, $^4J_{3b,5} \approx ^5J_{3b,6}$ = 1.9 Hz, 1 H, 3-H_b), 3.82 (m, 2 H, 6-H), 4.20 (dd, $^3J_{2,3a}$ = 10.8 Hz, $^3J_{2,3b}$ = 5.6 Hz, 1 H, 2-H), 5.82 (m, 1 H, 5-H), 6.02 (m, 1 H, 4-H).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O):

δ = 24.8 (t, C-3), 41.8 (t, C-6), 53.4 (d, C-2), 119.7 (d, C-5), 124.4 (d, C-4), 171.7 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ = -160.4 ° (c = 1.0, MeOH, (S)-12)

$[\alpha]_D^{20}$ = +161.0 ° (c = 1.0, MeOH, (R)-12)

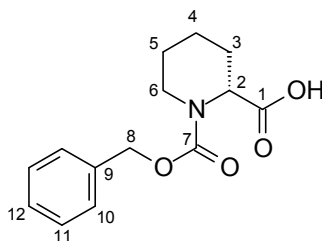
Schmelzpunkt: 225 °C (Zers.)

(R)-N-Benzoyloxycarbonyl-pipecolinsäure ((R)-13)**(S)-N-Benzoyloxycarbonyl-pipecolinsäure ((S)-13)***Enantiomerentrennung von Z-Pipecolinsäure*^[81]

Es wurden 30 g racemische Z-Pipecolinsäure^[115,116] (114 mmol) in 66 ml Diethylether gelöst. Bei 30 °C wurden 7.67 ml (S)-Phenylethylamin (57.0 mmol, 0.5 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur belassen, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert und mit Ether gewaschen. Im Filtrat fanden sich 15.3 g angereicherte (S)-Z-Pipecolinsäure (58.2 mmol, 51 % d. Th., 55 % ee), welche zu einem späteren Zeitpunkt mit (R)-Phenylethylamin umgesetzt wurde, um enantiomerenreine (S)-Z-Pipecolinsäure zu erhalten. Das abfiltrierte Phenylethylammoniumsalz der (R)-Z-Pipecolinsäure wurde aus Essigsäureethylester umkristallisiert. Das isolierte Salz wurde in Diethylether suspendiert, mit einer 1 M KHSO₄-Lösung versetzt und kräftig gerührt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether extrahiert, die vereinigte organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Es konnten 7.97 g (R)-Z-Pipecolinsäure (R)-13 (30.3 mmol, 27 % d. Th., >98 % ee) als weißer Feststoff isoliert werden.

Um (*S*)-*Z*-Pipicolinsäure enantiomerenrein zu erhalten, wurden die aus dem Filtrat gewonnenen 15.3 g (*S*)-**13** (58.1 mmol, 55 % ee) in 58 ml Diethylether gelöst und mit 6.0 ml (*R*)-Phenylethylamin (44.6 mmol) ausgefällt. Nach Umkristallisation des Phenylethylammoniumsalzes und Freisetzung der Säure mit 1 M KHSO₄-Lösung wurden 8.00 g (*S*)-*Z*-Pipicolinsäure (*S*)-**13** (30.4 mmol, 27 % d. Th., >98 % ee) als weißer Feststoff erhalten.

Die restliche *Z*-Pipicolinsäure, sowie die eingesetzten Phenylethylamine konnten aus den Filtraten der Umkristallisationen bzw. aus den wässrigen Phasen durch basische Aufarbeitung reisoliert werden.

**13**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 1.31$ (ddd, $^2J_{4ax,4eq} \approx ^3J_{4ax,3ax} \approx ^3J_{4ax,5ax} = 13.6$ Hz, 1 H, 4-*H*_{ax}), 1.43 (m, 1 H, 5-*H*_{ax}), 1.59-1.76 (sh, 3 H, 3-*H*_{ax}, 4-*H*_{eq}, 5-*H*_{eq}), 2.26 (d, $^2J_{3eq,3ax} = 13.8$ Hz, 1 H, 3-*H*_{eq}), 3.06 (dd, $^2J_{6ax,6eq} \approx ^3J_{6ax,5ax} = 13.1$ Hz, 1 H, 6-*H*_{ax}), 4.04 (d, $^2J_{6eq,6ax} = 13.0$ Hz, 1 H, 6-*H*_{eq}), 4.99 (d, $^3J_{2,3eq} = 4.0$ Hz, 1 H, 2-*H*), 5.15 (s, 2 H, 8-*H*), 7.25-7.39 (sh, 5 H, arom.-*H*), 10.19 (bs, 1 H, COOH).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 2.22$ (d, $^2J_{3eq,3ax} = 13.3$ Hz, 1 H, 3-*H*_{eq}), 2.98 (dd, $^2J_{6ax,6eq} \approx ^3J_{6ax,5ax} = 13.2$ Hz, 1 H, 6-*H*_{ax}), 4.11 (d, $^2J_{6eq,6ax} = 12.3$ Hz, 1 H, 6-*H*_{eq}), 4.89 (bs, 1 H, 2-*H*).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 20.7$ (t, C-4), 24.6 (t, C-5), 26.5 (t, C-3), 41.9 (t, C-6), 54.2 (d, C-2), 67.5 (t, C-8), 127.8 (d, C-10/11), 128.0 (d, C-12), 128.5 (d, C-10/11), 136.5 (s, C-9), 156.7 (s, C-7), 177.4 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 24.5$ (t, C-5), 26.7 (t, C-3), 41.7 (t, C-6), 54.4 (d, C-2), 67.4 (t, C-8), 155.9 (s, C-7).

Schmelzpunkt: 103-104 °C

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +45.8^{\circ}$ ($c = 1.0$, MeOH, (*R*)-**13**, >98 % ee)
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -45.8^{\circ}$ ($c = 1.0$, MeOH, (*S*)-**13**, >98 % ee)
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +55.3^{\circ}$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂, (*R*)-**13**, >98 % ee)
 Lit.^[82] $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +77.6^{\circ}$ ($c = 0.2$, CH₂Cl₂, (*R*)-Z-Pip)
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -55.1^{\circ}$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂, (*S*)-**13**, >98 % ee)
 Lit.^[83] $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -53.0^{\circ}$ ($c = 1$, CH₂Cl₂, (*S*)-Z-Pip)

HPLC: *Reprosil 100 Chiral-NR 8 μm*, Hexan:*i*PrOH 9:1 + 0.1 % AcOH, 2 ml/min

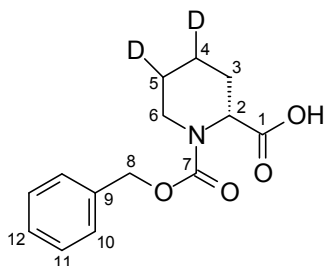
(*R*)-**13**: $t_{\text{R}} = 7.96$ min

(*S*)-**13**: $t_{\text{R}} = 9.79$ min

(*R*)-*N*-Benzyloxycarbonyl-4,5-dideutero-pipecolinsäure ((*R*)-d₂-**13**)

Eine Lösung von 334 mg TFA-geschütztem, deuterierten (*R*)-Pipecolinsäuremethylester (1.38 mmol) (*R*)-d₂-**52** in 7 ml Dioxan wurde bei 0 °C mit 4.5 ml 1 M NaOH-Lösung (4.5 mmol, 3.3 Äq.) versetzt und bis zur vollständigen Entschützung gerührt (DC-Kontrolle). Zur Z-Schützung wurden 205 μl Chlorameisensäurebenzylester (1.44 mmol, 1.0 Äq.) bei 0 °C zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wurde das Dioxan abrotiert, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die Essigester-Phase wurde verworfen, die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl auf pH 1 gebracht und mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ und Abdestillieren des Lösemittels wurden 265 mg des Produktes (*R*)-d₂-**13** (0.999 mmol, 72 % d. Th.) als weißer Feststoff erhalten.



(*R*)-d₂-**13**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 1.29$ (m, 0.5 H, 4-H_{ax}(1/2)), 1.41 (bs, 0.5 H, 5-H_{ax}(1/2)), 1.57-1.76 (sh, 2 H, 3-H_{ax}, 4-H_{eq}(1/2), 5-H_{eq}(1/2)), 2.26 (d, ²J_{3eq,3ax} = 14.0 Hz, 1 H, 3-H_{eq}), 3.05 (m, 1 H, 6-H_{ax}), 4.03 (d, ²J_{6eq,6ax} = 13.3 Hz, 1 H, 6-H_{eq}), 4.98 (s, 1 H, 2-H), 5.15 (s, 2 H, 8-H), 7.25-7.38 (sh, 5 H, arom.-H), 11.3 (bs, 1 H, COOH).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 2.21$ (d, $^2J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.5$ Hz, 1 H, 3- H_{eq}), 2.98 (m, 1 H, 6- H_{ax}), 4.10 (d, $^2J_{6\text{eq},6\text{ax}} = 12.0$ Hz, 1 H, 6- H_{eq}), 4.88 (bs, 1 H, 2-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 20.2$ (m, C-4), 24.2 (m, C-5), 26.4 (t, C-3), 41.8 (t, C-6), 54.2 (d, C-2), 67.5 (t, C-8), 127.8 (d, C-10/11), 128.0 (d, C-12), 128.4 (d, C-10/C-11), 136.4 (s, C-9), 156.7 (s, C-7), 177.4 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 26.5$ (t, C-3), 41.6 (t, C-6), 54.3 (d, C-2), 67.4 (t, C-8), 156.0 (s, C-7).

Schmelzpunkt: 104 °C

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +39.8^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH, (*R*)- d_2 -**13**, 97 % ee)

Elementaranalyse:

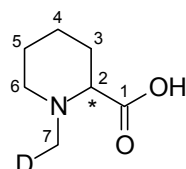
$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{D}_2\text{NO}_4$	Ber.	C 63.38	H/D 7.22	N 5.28
(265.31)	Gef.	C 63.08	H/D 7.58	N 5.43

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{D}_2\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	266.1361	266.1321

(*S*)-*N*-Deuteromethyl-pipecolinsäure ((*S*)- d_1 -14**)****(*R*)-*N*-Deuteromethyl-pipecolinsäure ((*R*)- d_1 -**14**)**

Gemäß **AAV 6** wurden 129 mg *Z*-geschützte (*S*)-Pipecolinsäure (*S*)-**13** (0.490 mmol, >98 % ee) mit Hilfe von 13 mg Pd/C (10 %) entschützt und durch Zugabe von 97 μl einer 37 %igen Formaldehydlösung (1.20 mmol, 2.4 Äq.) *N*-deuteromethyliert. Es wurden 71 mg der deuterierten (*S*)-Methylpipecolinsäure (*S*)- d_1 -**14** (0.49 mmol, quant.) als weißer Feststoff erhalten.

Durch entsprechende Umsetzung wurde die deuterierte (*R*)-Methylpipecolinsäure (*R*)- d_1 -**14** quantitativ erhalten.

 **d_1 -**14****

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O):

$\delta = 1.50$ (dddd, $^2J_{4\text{ax},4\text{eq}} \approx ^3J_{4\text{ax},3\text{ax}} \approx ^3J_{4\text{ax},5\text{ax}} = 12.5$ Hz, $^3J_{4\text{ax},3\text{eq}} \approx ^3J_{4\text{ax},5\text{eq}} = 3.4$ Hz, 1 H, 4- H_{ax}), 1.59 - 1.74 (sh, 2 H, 3- H_{ax} , 5- H_{ax}), 1.78 - 1.93 (sh, 2 H, 4- H_{eq} , 5- H_{eq}), 2.24 (d, $^2J_{3\text{eq},3\text{ax}} =$

14.0 Hz, 1 H, 3-H_{eq}), 2.80 (t, $^2J_{7,D} = 1.2$ Hz, 2 H, 7-H), 2.99 (ddd, $^2J_{6ax,6eq} \approx ^3J_{6ax,5ax} = 12.5$ Hz, $^3J_{6ax,5eq} = 2.2$ Hz, 1 H, 6-H_{ax}), 3.37-3.49 (sh, 2 H, 2-H, 6-H_{eq}).

Bei einer Verschiebung von 2.81 ppm ist das Signal von 7-H der undeuterten Verbindung **14** als Singulett zu sehen.

$^2\text{H-NMR}$ (76.8 MHz, H₂O):

$\delta = 2.82$ (bs, 7-D).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D₂O):

$\delta = 20.9$ (t, C-4), 22.6 (t, C-5), 28.0 (t, C-3), 42.1 (t, $^1J_{7,D} = 27.3$ Hz, C-7), 54.3 (t, C-6), 68.9 (d, C-2), 174.2 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -46.7^\circ$ (c = 1.0, MeOH, (S)-d₁-**14**)
 $[\alpha]_D^{20} = +45.3^\circ$ (c = 1.0, MeOH, (R)-d₁-**14**)

Schmelzpunkt: 204-206 °C

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₇ H ₁₃ DNO ₂ [M+H] ⁺	145.1087	145.1110

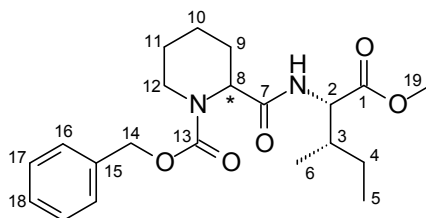
N-Benzyloxycarbonyl-(*R*)-pipecolyl-(*S*)-isoleucinmethylester ((*R,S*)-**19**)

N-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-pipecolyl-(*S*)-isoleucinmethylester ((*S,S*)-**19**)

Durch Umsetzung von 658 mg (*R*)-*Z*-Pipicolinsäure (*R*)-**13** (2.50 mmol, >98 % ee) mit 360 µl Chlorameisensäure-*iso*-butylester (2.78 mmol, 1.1 Äq.), 2 x 300 µl NMM (5.46 mmol, 2.2 Äq.) und 454 mg *L*-Isoleucinmethylester-Hydrochlorid (2.50 mmol, 1.0 Äq.) gemäß **AAV 1** wurden nach Säulenchromatographie (Hexan:EE 8:2) 888 mg des Dipeptids (*R,S*)-**19** (2.27 mmol, 91 % d. Th., >99 % de) als farbloses Öl erhalten.

Umsetzung von (*S*)-*Z*-Pipicolinsäure (*S*)-**13** (>98 % ee) lieferte das (*S,S*)-Dipeptid (*S,S*)-**19** (90 % d. Th., 99 % de).

R_f(19) = 0.14 (Hexan:EE 8:2)



19

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃):

(*R,S*)-**19** Hauptrotamer

$\delta = 0.74$ - 0.93 (sh, 6 H, 5-H, 6-H), 1.03 (bs, 1 H, 4-H_a), 1.22- 1.70 (sh, 6 H, 4-H_b, 9-H_{ax}, 10-H, 11-H), 1.85 (bs, 1 H, 3-H), 2.29 (m, 1 H, 9-H_{eq}), 2.95 (dd, $^2J_{12ax,12eq} \approx ^3J_{12ax,11ax} = 12.7$ Hz,

1 H, 12-H_{ax}), 3.69 (s, 3 H, 19-H), 4.13 (bs, 1 H, 12-H_{eq}), 4.55 (dd, $^3J_{2,\text{NH}} = 8.7$ Hz, $^3J_{2,3} = 4.7$ Hz, 1 H, 2-H), 4.85 (bs, 1 H, 8-H), 5.18 (s, 2 H, 14-H), 6.51 (bs, 1 H, NH_{IIe}), 7.26-7.41 (sh, 5 H, arom.-H).

(R,S)-**19** Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 4.19$ (bs, 1 H, 12-H_{eq}), 6.35 (bs, 1 H, NH_{IIe}).

(S,S)-**19** Hauptrotamer

$\delta = 0.85$ (d, $^3J_{6,3} = 6.8$ Hz, 3 H, 6-H), 0.87 (t, $^3J_{5,4} = 7.3$ Hz, 3 H, 5-H), 1.07 (ddq, $^2J_{4a,4b} = 13.6$ Hz, $^3J_{4a,3} = 9.0$ Hz, $^3J_{4a,5} = 7.3$ Hz, 1 H, 4-H_a), 1.35 (dq, $^2J_{4b,4a} = 13.6$ Hz, $^3J_{4b,5} = 7.3$ Hz, $^3J_{4b,3} = 4.8$ Hz, 1 H, 4-H_b), 1.43 (bs, 1 H, 11-H_{ax}), 1.49-1.70 (sh, 4 H, 9-H_{ax}, 10-H, 11-H_{eq}), 1.86 (dqdd, $^3J_{3,4a} = 9.0$ Hz, $^3J_{3,6} = 6.8$ Hz, $^3J_{3,2} \approx ^3J_{3,4b} = 4.8$ Hz, 1 H, 3-H), 2.22 (bs, 1 H, 9-H_{eq}), 2.89 (bs, 1 H, 12-H_{ax}), 3.69 (s, 3 H, 19-H), 4.10 (bs, 1 H, 12-H_{eq}), 4.55 (dd, $^3J_{2,\text{NH}} = 8.0$ Hz, $^3J_{2,3} = 4.8$ Hz, 1 H, 2-H), 4.81 (bs, 1 H, 8-H), 5.16 (s, 2 H, 14-H), 6.54 (bs, 1 H, NH_{IIe}), 7.26-7.37 (sh, 5 H, arom.-H).

(S,S)-**19** Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 4.18$ (bs, 1 H, 12-H_{eq}), 6.36 (bs, 1 H, NH_{IIe}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

(R,S)-**19** Hauptrotamer

$\delta = 11.5$ (q, C-5), 15.6 (q, C-6), 20.4 (t, C-10), 24.8 (t, C-11), 25.0 (t, C-4), 25.1* (t, C-9), 37.5 (d, C-3), 42.2 (t, C-12), 52.0 (q, C-19), 54.6* (d, C-8), 56.4 (d, C-2), 67.7 (t, C-14), 127.9 (d, C-16/17), 128.1 (d, C-18), 128.5 (d, C-16/17), 136.2 (s, C-15), 170.6 (s, C-7), 172.3 (s, C-1).

Das Signal von C-13 ist nicht zu sehen.

(S,S)-**19** Hauptrotamer

$\delta = 11.5$ (q, C-5), 15.6 (q, C-6), 20.3 (t, C-10), 24.9 (t, C-11), 25.1 (t, C-4), 25.5* (t, C-9), 37.8 (d, C-3), 42.2 (t, C-12), 52.1 (q, C-19), 54.4* (d, C-8), 56.4 (d, C-2), 67.7 (t, C-14), 127.9 (d, C-16/17), 128.1 (d, C-18), 128.5 (d, C-16/17), 136.4 (s, C-15), 170.8 (s, C-7), 172.0 (s, C-1).

Das Signal von C-13 ist nicht zu sehen.

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +84.0^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃, *(R,S)*-**19**)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -60.0^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃, *(S,S)*-**19**)

HPLC: Reprosil 100 Chiral-NR 8 μm , Hexan:iPrOH 9:1, 2 ml/min

(R)-**19**: $t_{\text{R}} = 17.21$ min

(S)-**19**: $t_{\text{R}} = 23.61$ min

Elementaranalyse:

C ₂₁ H ₃₀ N ₂ O ₅	Ber.	C 64.60	H 7.74	N 7.17
(390.48)	Gef.	C 64.26	H 7.71	N 7.21

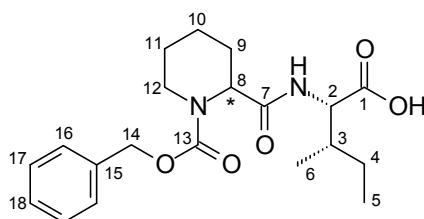
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₁ H ₃₁ N ₂ O ₅ [M+H] ⁺	391.2233	391.2274

***N*-Benzyloxycarbonyl-(*R,S*)-pipecolyl-(*S*)-isoleucin ((*R,S*)-20)**

***N*-Benzyloxycarbonyl-(*S,S*)-pipecolyl-(*S*)-isoleucin ((*S,S*)-20)**

Nach **AAV 3** wurden 660 mg (*R,S*)-Z-PipIleOMe (1.69 mmol) (*R,S*)-**19** mit 1.9 ml 1 M NaOH (1.9 mmol, 1.1 Äq.) verseift, wodurch 626 mg (*R,S*)-Z-PipIle (*R,S*)-**20** (1.66 mmol, 98 % d. Th.) erhalten wurden.

Ebenso wurde (*S,S*)-Z-PipIleOMe (*S,S*)-**19** zu (*S,S*)-Z-PipIle (*S,S*)-**20** verseift (97 % d. Th.).



20

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

(*R,S*)-**20** *Hauptrotamer*

δ = 0.79-0.94 (sh, 6 H, 5-H, 6-H), 1.06 (m, 1 H, 4-H_a), 1.31-1.69 (sh, 6 H, 4-H_b, 9-H_{ax}, 10-H, 11-H), 1.90 (bs, 1 H, 3-H), 2.21 (m, 1 H, 9-H_{eq}), 3.08 (bs, 1 H, 12-H_{ax}), 4.09 (bs, 1 H, 12-H_{eq}), 4.59 (bs, 1 H, 2-H), 4.89 (bs, 1 H, 8-H), 5.15 (bs, 2 H, 14-H), 6.60 (bs, 1 H, NH_{Ile}), 7.26-7.37 (sh, 5 H, arom.-H), 8.52 (bs, 1 H, COOH).

(*S,S*)-**20** *Nebenrotamer (ausgewählte Signale)*

δ = 2.35 (bs, 1 H, 9-H_{eq}), 2.90 (bs, 1 H, 12-H_{ax}), 4.16 (bs, 1 H, 12-H_{eq}), 6.70 (bs, 1 H, NH_{Ile}).

(*S,S*)-**20** *Hauptrotamer*

δ = 0.88 (d, ³J_{5,4} = 7.3 Hz, 3 H, 5-H), 0.89 (t, ³J_{6,3} = 6.8 Hz, 3 H, 6-H), 1.09 (ddq, ²J_{4a,4b} = 13.8 Hz, ³J_{4a,3} = 9.2 Hz, ³J_{4a,5} = 7.1 Hz, 1 H, 4-H_a), 1.34-1.70 (sh, 6 H, 4-H_b, 9-H_{ax}, 10-H, 11-H), 1.92 (m, 1 H, 3-H), 2.25 (bs, 1 H, 9-H_{eq}), 2.89 (bs, 1 H, 12-H_{ax}), 4.10 (bs, 1 H, 12-H_{eq}), 4.57 (bs, 1 H, 2-H), 4.84 (bs, 1 H, 8-H), 5.15 (s, 2 H, 14-H), 6.60 (bs, 1 H, NH_{Ile}), 7.23-7.39 (sh, 5 H, arom.-H), 8.76 (bs, 1 H, COOH).

(*S,S*)-**19** *Nebenrotamer (ausgewähltes Signal)*

δ = 4.17 (bs, 1 H, 12-H_{eq}).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3):

(R,S)-**20** Hauptrotamer

$\delta = 11.6$ (q, C-5), 15.5 (q, C-6), 20.1 (t, C-10), 24.7 (t, C-11), 24.8 (t, C-4), 25.9* (t, C-9), 37.2 (d, C-3), 42.2 (t, C-12), 56.3 (d, C-2), 67.9 (t, C-14), 127.9 (d, C-16/17), 128.2 (d, C-18), 128.6 (d, C-16/17), 136.2* (s, C-15), 156.4 (s, C-13), 171.9* (s, C-7), 175.1 (s, C-1).

Das Signal von C-8 ist nicht zu sehen.

(S,S)-**20** Hauptrotamer

$\delta = 11.5$ (q, C-5), 15.6 (q, C-6), 20.3 (t, C-10), 24.8 (t, C-11), 25.0 (t, C-4), 25.8* (t, C-9), 37.5 (d, C-3), 42.3 (t, C-12), 54.4* (d, C-8), 56.4 (d, C-2), 67.9 (t, C-14), 127.9 (d, C-16/17), 128.2 (d, C-18), 128.5 (d, C-16/17), 136.1* (s, C-15), 156.9 (s, C-13), 171.2* (s, C-7), 175.3 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +84.2^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3 , *(R,S)*-**20**)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -51.7^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3 , *(S,S)*-**20**)

Schmelzpunkt: 93°C *(S,S)*-**20**, *(R,S)*-**20** ist ein zähes Öl

Elementaranalyse:

$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$	Ber.	C 63.81	H 7.50	N 7.44
(376.46)	Gef.	C 63.63	H 7.48	N 7.42

HRMS (CI) Berechnet Gefunden

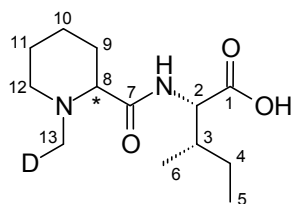
$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 377.2077 377.2093

***N*-Deuteromethyl-*(R)*-pipecolyl-*(S)*-isoleucin (*(R,S)*-**d**₁-**21**)**

***N*-Deuteromethyl-*(S)*-pipecolyl-*(S)*-isoleucin (*(S,S)*-**d**₁-**21**)**

Gemäß **AAV 6** wurden 605 mg *(R,S)*-Z-PipIle *(R,S)*-**20** (1.61 mmol) mit 61 mg Pd/C (10 %) unter Deuteriumatmosphäre entschützt und durch Zugabe von 200 μl 37%iger wässriger Formaldehyd-Lösung (2.46 mmol, 1.5 Äq.) *N*-deuteromethyliert. Es wurden 431 mg des Dipeptids *(R,S)*-**d**₁-MepIle *(R,S)*-**d**₁-**21** in quantitativer Ausbeute als weißer schaumiger Feststoff erhalten.

Durch analoge Umsetzung von *(S,S)*-Z-PipIle *(S,S)*-**20** konnte das Dipeptid *(S,S)*-**d**₁-MepIle *(S,S)*-**d**₁-**21** erhalten werden (quant.).



d₁-**21**

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

(R,S)-d₁-21

δ = 0.85 (t, ³J_{5,4} = 7.3 Hz, 3 H, 5-H), 0.86 (d, ³J_{6,3} = 7.0 Hz, 3 H, 6-H), 1.10-1.30 (sh, 2 H, 4-H_a, 10-H_{ax}), 1.34-1.57 (sh, 3 H, 4-H_b, 9-H_{ax}, 11-H_{ax}), 1.57-1.79 (sh, 3 H, 9-H_{eq}, 10-H_{eq}, 11-H_{eq}), 1.83 (m, 1 H, 3-H), 2.15-2.30 (sh, 3 H, 12-H_{ax}, 13-H), 2.80 (bs, 1 H, 8-H), 2.98 (d, ²J_{12eq,12ax} = 9.8 Hz, 1 H, 12-H_{eq}), 4.18 (dd, ³J_{2,NH} = 8.0 Hz, ³J_{2,3} = 5.8 Hz, 1 H, 2-H), 7.83 (bs, 1 H, NH_{lle}).

(S,S)-d₁-21

δ = 0.84 (t, ³J_{5,4} = 7.3 Hz, 3 H, 5-H), 0.84 (d, ³J_{6,3} = 6.8 Hz, 3 H, 6-H), 1.07-1.26 (sh, 2 H, 4-H_a, 10-H_{ax}), 1.33-1.63 (sh, 4 H, 4-H_b, 9-H_{ax}, 11-H), 1.68 (d, ²J_{10eq,10ax} = 12.8 Hz, 1 H, 10-H_{eq}), 1.74 (d, ²J_{9eq,9ax} = 11.5 Hz, 1 H, 9-H_{eq}), 1.83 (m, 1 H, 3-H), 2.06 (ddd, ²J_{12ax,12eq} ≈ ³J_{12ax,11ax} = 11.3 Hz, ³J_{12ax,11eq} = 2.0 Hz, 1 H, 12-H_{ax}), 2.15 (s, 2H, 13-H), 2.55 (d, ³J_{8,9ax} = 11.0 Hz, 1 H, 8-H), 2.91 (d, ²J_{12eq,12ax} = 11.6 Hz, 1 H, 12-H_{eq}), 4.19 (dd, ³J_{2,NH} = 8.5 Hz, ³J_{2,3} = 5.5 Hz, 1 H, 2-H), 7.58 (d, ³J_{NH,2} = 8.5 Hz, 1 H, NH_{lle}).

Bei einer Verschiebung von 2.17 ppm ist das Signal von 13-H der undeuterten Verbindung (S,S)-21 als Singulett zu sehen.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

(R,S)-d₁-21

δ = 11.2 (q, C-5), 15.6 (q, C-6), 22.3 (t, C-10), 24.2 (t, C-11), 24.7 (t, C-4), 29.4 (t, C-9), 36.4 (d, C-3), 43.0 (t, ¹J_{13,D} = 20.4 Hz, C-13), 54.6 (t, C-12), 56.1 (d, C-2), 67.8 (d, C-8), 171.5, 172.7 (2 s, C-1, C-7).

Bei einer Verschiebung von 43.3 ppm ist das Signal von C-13 der undeuterten Verbindung (S,S)-21 zu sehen.

(S,S)-d₁-21

δ = 11.2 (q, C-5), 15.7 (q, C-6), 21.1 (t, C-10), 22.7 (t, C-11), 24.6 (t, C-4), 29.9 (t, C-9), 36.5 (d, C-3), 43.3 (t, ¹J_{13,D} = 20.4 Hz, C-13), 54.8 (t, C-12), 55.8 (d, C-2), 68.8 (d, C-8), 172.3, 173.0 (2 s, C-1, C-7).

Bei einer Verschiebung von 43.6 ppm ist das Signal von C-13 der undeuterten Verbindung (S,S)-21 zu sehen.

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +23.6^\circ$ (c = 1.0, MeOH, (R,S)-d₁-21)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -35.5^\circ$ (c = 1.0, MeOH, (S,S)-d₁-21)

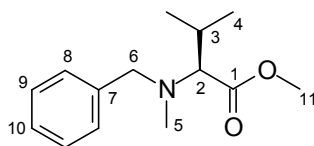
Schmelzpunkt: 54 °C ((R,S)-d₁-21), 171-173 °C ((S,S)-d₁-21)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₃ H ₂₄ DN ₂ O ₃ [M+H] ⁺	258.1928	258.1938

***N*-Benzyl-*N*-methyl-(*L*)-valinmethylester^[117] (22)**

8.40 g (*L*)-Valinmethylester-Hydrochlorid (50.1 mmol) wurden in 50 ml Methanol gelöst und mit 7.04 ml NEt_3 (50.1 mmol, 1.0 Äq.) versetzt, wobei Triethylamin-Hydrochlorid ausfiel. Bei 0 °C wurden 5.32 g Benzaldehyd (50.1 mmol, 1.0 Äq.) zugetropft. Nach zwei-stündigem Rühren bei 0 °C wurden 3.79 g NaBH_4 (100 mmol, 2.0 Äq.) innerhalb einer halben Stunde portionsweise zugeben. Nach einer weiteren Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit 4.51 g Paraformaldehyd (50.1 mmol, 1.0 Äq.) versetzt und über Nacht gerührt. Bei 0 °C wurden 3.31 g Natriumcyanoborhydrid (52.7 mmol, 1.05 Äq.) portionsweise zugegeben, und das Kühlbad wurde nach 5 min entfernt. Nach 2 h wurde das Methanol abrotiert und der Rückstand in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ aufgenommen. Die Dichlormethan-Phase wurde nochmals mit H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Hexan:EE 95:5, 9:1) ergab 9.98 g (*L*)-BnMeValOMe **22** (42.4 mmol, 85 % d. Th.) als farbloses Öl.

$R_f(\mathbf{22}) = 0.59$ (Hexan:EE 8:2)

**22**

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3):

$\delta = 0.85$ (d, $^3J_{4,3} = 6.6$ Hz, 3 H, 4-H), 1.03 (d, $^3J_{4',3} = 6.6$ Hz, 3 H, 4'-H), 2.09 (m, 1 H, 3-H), 2.19 (s, 3 H, 5-H), 2.84 (d, $^3J_{2,3} = 10.8$ Hz, 1 H, 2-H), 3.46 (d, $^2J_{6a,6b} = 13.9$ Hz, 1 H, 6-H_a), 3.72 (d, $^2J_{6b,6a} = 13.9$ Hz, 1 H, 6-H_b), 3.72 (s, 3 H, 11-H), 7.21 (tt, $^3J_{10,9} = 7.0$ Hz, $^4J_{10,8} = 1.6$ Hz, 1 H, 7.26-7.33 (sh, 4 H, 8-H, 9-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl_3):

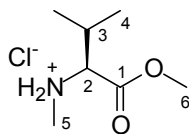
$\delta = 19.4$ (q, C-4), 19.9 (q, C-4'), 27.4 (d, C-3), 37.8 (q, C-5), 50.5 (q, C-11), 58.5 (t, C-6), 73.0 (d C-2), 126.8 (d, C-10), 128.2, 128.5 (2d, C-8, C-9), 139.7 (s, C-7), 172.3 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -92.8^\circ$ (c = 1.0, CHCl_3)

***N*-Methyl-(*L*)-valinmethylester-Hydrochlorid^[92] (23)**

Eine Lösung von 4.70 g (*L*)-BnMeValOMe **22** (20.0 mmol) in 40 ml Methanol wurde mit 237 mg Palladium-Katalysator (5 % Pd/C) versetzt und 3 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators über Celite wurden bei 0 °C 10 ml einer 4 M HCl-Dioxan-Lösung (40 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Nach 1 h wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit Essigsäureethylester versetzt und nochmals einrotiert.

Es wurden 3.58 g (*L*)-MeValOMe-Hydrochlorid **23** (19.7 mmol, 99 % d. Th.) als weißer Feststoff erhalten.

**23**

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 0.92 (d, $^3J_{4,3}$ = 7.0 Hz, 3 H, 4-H), 1.02 (d, $^3J_{4',3}$ = 7.3 Hz, 3 H, 4'-H), 2.34 (m, 1 H, 3-H), 2.54 (s, 3 H, 5-H), 3.78 (s, 3 H, 6-H), 3.95 (bs, 1 H, 2-H), 9.26 (bs, 1 H, NH), 9.70 (bs, 1 H, NH').

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 18.9 (q, C-4), 19.2 (q, C-4'), 28.5 (d, C-3), 32.0 (q, C-5), 52.8 (q, C-6), 65.3 (d, C-2), 168.2 (s, C-1).

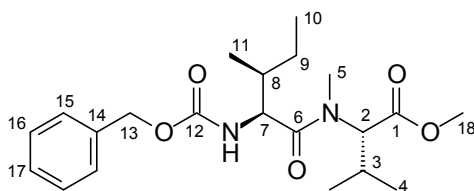
Schmelzpunkt: 133 °C

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ = +30.0 ° (c = 1.0, MeOH)

N-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-isoleucyl-*N*-methyl-(*S*)-valinmethylester (**24**)

Gemäß **AAV 2** wurden 3.64 g (*L*)-*Z*-Isoleucin (13.7 mmol, 1.1 Äq.) und 2.20 g (*L*)-*N*-Methylvalinmethylester-Hydrochlorid **23** (12.1 mmol, 1.0 Äq.) mit 3.68 g BEP (13.4 mmol, 1.1 Äq.) und 6.2 ml DIPEA (36.5 mmol, 3.0 Äq.) umgesetzt, wobei nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 8:2) 4.44 g des Dipeptids *Z*-IleMeValOMe **24** (11.3 mmol, 93 %, 98 % ds) als farbloses Öl erhalten wurden.

R_f(24) = 0.49 (Hexan:EE 1:1)

**24**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.80 (d, $^3J_{4,3}$ = 6.5 Hz, 3 H, 4-H), 0.86 (t, $^3J_{10,9}$ = 7.4 Hz, 3 H, 10-H), 0.91 (d, $^3J_{11,8}$ = 6.8 Hz, 3 H, 11-H), 0.99 (d, $^3J_{4',3}$ = 6.5 Hz, 3 H, 4'-H), 1.11 (ddq, $^2J_{9a,9b}$ = 13.6 Hz, $^3J_{9a,8}$ = 9.4 Hz, $^3J_{9a,10}$ = 7.3 Hz, 1 H, 9-H_a), 1.54 (dq, $^2J_{9b,9a}$ = 13.6 Hz, $^3J_{9b,10}$ = 7.5 Hz, $^3J_{9b,8}$ = 3.1 Hz, 1 H, 9-H_b), 1.72 (m, 1 H, 8-H), 2.19 (m, 1 H, 3-H), 3.04 (s, 3 H, 5-H), 3.67 (s, 3 H,

18-H), 4.52 (dd, $^3J_{7,\text{NH}} = 9.0$ Hz, $^3J_{7,8} = 7.8$ Hz, 1 H, 7-H), 4.92 (d, $^3J_{2,3} = 10.5$ Hz, 1 H, 2-H), 5.06 (s, 2 H, 13-H), 5.39 (d, $^3J_{\text{NH},7} = 9.0$ Hz, 1 H, NH), 7.25-7.38 (sh, 5 H, arom.-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.02$ (d, $^3J_{4,3} = 6.5$ Hz, 3 H, 4-H'), 2.86 (s, 3 H, 5-H), 3.58 (s, 3 H, 18-H), 4.64 (dd, $^3J_{7,\text{NH}} = 9.6$ Hz, $^3J_{7,8} = 6.5$ Hz, 1 H, 7-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 11.1$ (q, C-10), 15.3 (q, C-11), 18.6 (q, C-4), 19.8 (q, C-4'), 24.1 (t, C-9), 27.0 (d, C-3), 31.4 (q, C-5), 37.8 (d, C-8), 51.8 (q, C-18), 55.1 (d, C-7), 61.4 (d, C-2), 66.8 (t, C-13), 127.9, 128.1, 128.5 (3d, C-15, C-16, C-17), 136.3 (s, C-14), 156.4 (s, C-12), 171.2 (s, C-1), 173.3 (s, C-6).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.4$ (q, C-10), 16.1 (q, C-11), 19.0 (q, C-4), 21.0 (q, C-4'), 23.6 (t, C-9), 27.5 (d, C-3), 30.9 (q, C-5), 38.1 (d, C-8), 52.1 (q, C-18), 55.4 (d, C-7), 60.4 (d, C-2), 65.1 (t, C-13).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -88.3^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3)

HPLC: *Reprosil 100 Chiral-NR* 8 μm , Hexan:*i*PrOH 97:3, 2 ml/min

(*S,S*)-**24**: $t_{\text{R}} = 8.88$ min

(*R,S*)-**24**: $t_{\text{R}} = 12.61$ min

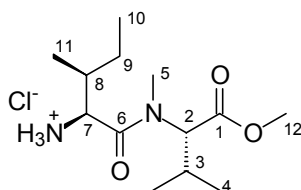
Elementaranalyse:

$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$	Ber.	C 64.26	H 8.22	N 7.14
(392.50)	Gef.	C 64.38	H 8.48	N 7.07

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5$ [M+H] ⁺	393.2390	393.2391

(*S*)-Isoleucyl-*N*-methyl-(*S*)-valinmethylester-Hydrochlorid (**27**)

1.03 g *Z*-IleMeValOMe **24** (2.62 mmol) wurden in 26 ml Methanol gelöst, mit 103 mg Pd/C (10 %) und 3.3 ml einer 4 M HCl-Lösung (13.2 mmol, 5.0 Äq.) in Dioxan versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre zum Hydrochlorid **27** entschützt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeengt. Der entstandene gelbe Feststoff wurde mehrfach mit Et_2O gewaschen, wonach 771 mg des Produktes **27** (2.61 mmol, quant.) als weißer Feststoff erhalten wurden.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

Hauptrotamer

δ = 0.84 (d, ³J_{4,3} = 6.8 Hz, 3 H, 4-H), 0.84 (t, ³J_{10,9} = 7.5 Hz, 3 H, 10-H), 0.92-0.98 (sh, 6 H, 4'-H, 11-H), 1.12 (ddq, ²J_{9a,9b} = 13.5 Hz, ³J_{9a,8} = 10.0 Hz, ³J_{9a,10} = 7.1 Hz, 1 H, 9-H_a), 1.49 (dq, ²J_{9b,9a} = 13.5 Hz, ³J_{9b,10} = 7.4 Hz, ³J_{9b,8} = 3.3 Hz, 1 H, 9-H_b), 1.81 (m, 1 H, 8-H), 2.19 (m, 1 H, 3-H), 2.96 (s, 3 H, 5-H), 3.62 (s, 3 H, 12-H), 4.23 (d, ³J_{7,8} = 5.2 Hz, 1 H, 7-H), 4.71 (d, ³J_{2,3} = 10.3 Hz, 1 H, 2-H), 8.34 (bs, 3 H, NH₃⁺).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.00 (d, ³J_{4',3} = 6.8 Hz, 3 H, 4-H'), 2.83 (s, 3 H, 5-H), 3.69 (s, 3 H, 12-H), 4.12 (d, ³J_{2,3} = 10.5 Hz, 1 H, 2-H), 4.19 (d, ³J_{7,8} = 5.0 Hz, 1 H, 7-H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

Hauptrotamer

δ = 11.3 (q, C-10), 14.5 (q, C-11), 18.8 (q, C-4), 19.7 (q, C-4'), 23.2 (t, C-9), 26.2 (d, C-3), 31.4 (q, C-5), 35.9 (d, C-8), 51.8 (q, C-12), 53.6 (d, C-7), 61.6 (d, C-2), 169.4, 170.2 (2s, C-1, C-6).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 15.2 (q, C-11), 18.5 (q, C-4), 19.0 (q, C-4'), 22.5 (t, C-9), 27.2 (d, C-3), 28.7 (q, C-5), 52.3 (q, C-12), 54.2 (d, C-7), 64.0 (d, C-2).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -82.3^\circ$ (c = 1.0, MeOH)

Schmelzpunkt: 141-143 °C

Elementaranalyse:

C ₁₃ H ₂₇ ClN ₂ O ₃	Ber.	C 52.96	H 9.23	N 9.50
(294.82)	Gef.	C 52.46	H 9.71	N 9.25

HRMS (CI) Berechnet Gefunden

C ₁₃ H ₂₇ N ₂ O ₃ [M+H] ⁺	259.2021	259.1986
--	----------	----------

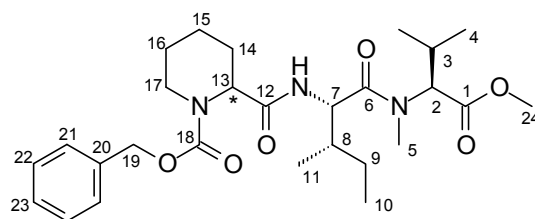
***N*-Benzyloxycarbonyl-*(R)*-pipecolyl-*(S)*-isoleucin-*N*-methyl-*(S)*-valinmethylester
N-Benzyloxycarbonyl-*(S)*-pipecolyl-*(S)*-isoleucin-*N*-methyl-*(S)*-valinmethylester
 ((*R,S,S*)-**28**) und ((*S,S,S*)-**28**)**

Zu einer Lösung von 434 mg *Z*-geschützte (*R*)-Pipecolinsäure (*R*)-**13** (1.65 mmol, 1.1 Äq., >98 % ee) in 15 ml absolutem Dichlormethan wurden bei 0 °C 530 mg TBTU (1.65 mmol, 1.1 Äq.) fest zugegeben und 840 µl Triethylamin (5.98 mmol, 4.0 Äq.) zugetropft. Nach 20 min wurden 442 mg (*S*)-Isoleucyl-*N*-methyl-*(S)*-valinmethylester-Hydrochlorid **27** (1.50 mmol, 1.0 Äq.) fest zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wurde mit Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 M

KHSO₄-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 8:2, 1:1) wurden 656 mg (*R,S,S*)-**28** (1.30 mmol, 87 % d. Th., 97 % ds) als farbloses zähes Öl erhalten.

Das Tripeptid (*S,S,S*)-**28** konnte auf gleiche Weise erhalten werden (88 % d. Th., 99 % ds).

$R_f((R,S,S)\text{-28}) = 0.49$ (Hexan:EE 1:1); $R_f((S,S,S)\text{-28}) = 0.46$ (Hexan:EE 1:1)



28

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

(*R,S,S*)-**28** Hauptrotamer

$\delta = 0.78$ (d, $^3J_{4,3} = 6.8$ Hz, 3 H, 4-H), 0.81 (m, 3 H, 10-H), 0.88 (d, $^3J_{11,8} = 6.2$ Hz, 3 H, 11-H), 0.98 (d, $^3J_{4',3} = 6.3$ Hz, 3 H, 4'-H), 1.05 (m, 1 H, 9-H_a), 1.19-1.66 (sh, 6 H, 9-H_b, 14-H_{ax}, 15-H, 16-H), 1.75 (m, 1 H, 8-H), 2.19 (m, 1 H, 3-H), 2.27 (d, $^2J_{14eq,14ax} = 13.5$ Hz, 1 H, 14-H_{eq}), 2.83 (ddd, $^2J_{17ax,17eq} \approx ^3J_{17ax,16ax} = 13.9$ Hz, $^3J_{17ax,16eq} = 2.4$ Hz, 1 H, 17-H_{ax}), 3.06 (s, 3 H, 5-H), 3.66 (s, 3 H, 24-H), 4.08 (bs, 1 H, 17-H_{eq}), 4.76 (dd, $^3J_{7,NH} \approx ^3J_{7,8} = 8.4$ Hz, 1 H, 7-H), 4.84 (m, 1 H, 13-H), 4.91 (d, $^3J_{2,3} = 10.6$ Hz, 1 H, 2-H), 5.12 (d, $^2J_{19a,19b} = 12.6$ Hz, 1 H, 19-H_a), 5.17 (d, $^2J_{19b,19a} = 12.6$ Hz, 1 H, 19-H_b), 6.52 (bs, 1 H, NH_{IIc}), 7.25-7.40 (sh, 5 H, arom.-H).

(*R,S,S*)-**28** Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.94$ (d, $^3J_{4,3 \text{ o. } 11,8} = 6.8$ Hz, 3 H, 4-H o. 11-H), 1.03 (d, $^3J_{4',3} = 6.5$ Hz, 3 H, 4'-H), 2.86 (s, 3 H, 5-H), 4.76 (dd, $^3J_{7,NH} = 9.7$ Hz, $^3J_{7,8} = 6.3$ Hz, 1 H, 7-H), 4.94 (dd, $^3J_{7,NH} = 9.3$ Hz, $^3J_{7,8} = 6.8$ Hz, 1 H, 7-H), 4.17 (bs, 1 H, 17-H_{eq}), 6.49 (bs, 1 H, NH_{IIc}).

(*S,S,S*)-**28** Hauptrotamer

$\delta = 0.79$ (m, 3 H, 4-H), 0.83 (t, $^3J_{10,9} = 7.4$ Hz, 3 H, 10-H), 0.90 (d, $^3J_{11,8} = 6.8$ Hz, 3 H, 11-H), 0.98 (d, $^3J_{4',3} = 6.6$ Hz, 3 H, 4'-H), 1.04 (m, 1 H, 9-H_a), 1.32-1.71 (sh, 6 H, 9-H_b, 14-H_{ax}, 15-H, 16-H), 1.77 (m, 1 H, 8-H), 2.11-2.24 (sh, 2 H, 3-H, 14-H_{eq}), 2.92 (bs, 1 H, 17-H_{ax}), 3.04 (s, 3 H, 5-H), 3.66 (s, 3 H, 24-H), 4.08 (bs, 1 H, 17-H_{eq}), 4.73 (bs, 1 H, 13-H), 4.80 (dd, $^3J_{7,NH} = 9.0$ Hz, $^3J_{7,8} = 7.5$ Hz, 1 H, 7-H), 4.90 (d, $^3J_{2,3} = 10.6$ Hz, 1 H, 2-H), 5.15 (s, 2 H, 19-H), 6.55 (bs, 1 H, NH), 7.25-7.39 (sh, 5 H, arom.-H).

(*S,S,S*)-**28** Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.01$ (d, $^3J_{4',3} = 6.2$ Hz, 3 H, 4'-H), 2.24-2.35 (sh, 2 H, 3-H, 14-H_{eq}), 2.82 (s, 3 H, 5-H), 4.18 (bs, 1 H, 17-H_{eq}), 6.48 (bs, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

(R,S,S)-**28** Hauptrotamer

$\delta = 10.9$ (q, C-10), 15.2 (q, C-11), 18.6 (q, C-4), 19.7 (q, C-4'), 20.5 (t, C-15), 24.4 (t, C-9), 24.7* (t, C-16), 25.5* (t, C-14), 27.0 (d, C-3), 31.4 (q, C-5), 37.4 (d, C-8), 42.3* (t, C-17), 51.8 (q, C-24), 53.8 (d, C-7), 54.9* (d, C-13), 61.4 (d, C-2), 67.6 (t, C-19), 127.8 (d, C-21/22), 128.1 (d, C-23), 128.5 (d, C-21/22), 136.4 (s, C-20), 155.9* (s, C-18), 170.6 (s, C-12), 171.2 (s, C-1), 173.1 (s, C-6).

(R,S,S)-**28** Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.3$ (q, C-10), 16.1 (q, C-11), 19.3 (q, C-4), 19.9 (q, C-4'), 23.6 (t, C-9), 27.8 (d, C-3), 29.2 (q, C-5), 52.1 (q, C-24), 55.4 (d, C-13), 60.3 (d, C-2).

(S,S,S)-**28** Hauptrotamer

$\delta = 11.0$ (q, C-10), 15.5 (q, C-11), 18.6 (q, C-4), 19.8 (q, C-4'), 20.4 (t, C-15), 24.4 (t, C-9), 24.8* (t, C-16), 25.8* (t, C-14), 27.0 (d, C-3), 31.4 (q, C-5), 37.6 (d, C-8), 42.3 (t, C-17), 51.8 (q, C-24), 53.1 (d, C-7), 54.9* (d, C-13), 61.5 (d, C-2), 67.7 (t, C-19), 127.9 (d, C-21/22), 128.1 (d, C-23), 128.5 (d, C-21/22), 136.4 (s, C-20), 156.4 (s, C-18), 170.8 (s, C-12), 171.2 (s, C-1), 172.8 (s, C-6).

(S,S,S)-**28** Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.2$ (q, C-10), 16.3 (q, C-11), 29.0 (q, C-5), 64.9 (d, C-2), 67.8 (t, C-19).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -44.1^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3 , *(R,S,S)*-**28**)
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -134.3^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3 , *(S,S,S)*-**28**)

HPLC: Reprosil 100 Chiral-NR 8 μm , Hexan:*i*PrOH 9:1, 2 ml/min

(R,S,S)-**28**: $t_{\text{R}} = 12.98$ min

(S,S,S)-**28**: $t_{\text{R}} = 14.93$ min

Elementaranalyse:

$\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_6$	Ber.	C 64.39	H 8.21	N 8.34
(503.64)	Gef.	C 64.24	H 8.45	N 8.62

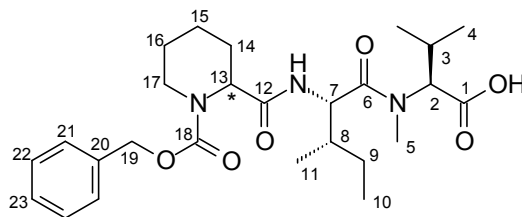
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	504.3074	504.3074

***N*-Benzyloxycarbonyl-(*R*)-pipicolyl-(*S*)-isoleucin-*N*-methyl-(*S*)-valin ((*R,S,S*)-**29**)**

***N*-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-pipicolyl-(*S*)-isoleucin-*N*-methyl-(*S*)-valin ((*S,S,S*)-**29**)**

Durch Verseifung von 527 mg *(R,S,S)*-**28** (1.05 mmol) mit 1.15 ml 1 M NaOH (1.15 mmol, 1.1 Äq.) nach **AAV 3** wurde die freie Säure *(R,S,S)*-**29** (447 mg, 0.913 mmol, 87 % d. Th.) als weißer Feststoff erhalten.

Durch Verseifung von *(S,S,S)*-**28** konnte entsprechend *(S,S,S)*-**29** (89 % d. Th.) erhalten werden.



29

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

(R,S,S)-29 Hauptrotamer

δ = 0.75-0.94 (sh, 9 H, 4-H, 10-H, 11-H), 1.02 (d, $^3J_{4',3} = 6.5$ Hz, 3 H, 4'-H), 1.05 (m, 1 H, 9-H_a), 1.21-1.66 (sh, 6 H, 9-H_b, 14-H_{ax}, 15-H, 16-H), 1.77 (m, 1 H, 8-H), 2.17-2.30 (sh, 2 H, 3-H, 14-H_{eq}), 2.84 (m, 1 H, 17-H_{ax}), 3.13 (s, 3 H, 5-H), 4.06 (bs, 1 H, 17-H_{eq}), 4.72-4.91 (sh, 2 H, 2-H, 13-H), 4.78 (dd, $^3J_{7,NH} \approx ^3J_{7,8} = 8.5$ Hz, 1 H, 7-H), 5.12 (d, $^2J_{19a,19b} = 12.2$ Hz, 1 H, 19-H_a), 5.17 (d, $^2J_{19b,19a} = 12.2$ Hz, 1 H, 19-H_b), 6.78 (bs, 1 H, NH_{ile}), 7.26-7.38 (sh, 5 H, arom.-H).

(R,S,S)-29 Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.08 (d, $^3J_{4',3} = 6.5$ Hz, 3 H, 4'-H), 2.85 (s, 3 H, 5-H), 4.16 (bs, 1 H, 17-H_{eq}).

(S,S,S)-29 Hauptrotamer

δ = 0.80 (m, 3 H, 4-H), 0.82 (t, $^3J_{10,9} = 7.3$ Hz, 3 H, 10-H), 0.89 (d, $^3J_{11,8} = 6.8$ Hz, 3 H, 11-H), 1.02 (d, $^3J_{4',3} = 6.5$ Hz, 3 H, 4'-H), 1.05 (m, 1 H, 9-H_a), 1.32-1.69 (sh, 6 H, 9-H_b, 14-H_{ax}, 15-H, 16-H), 1.79 (m, 1 H, 8-H), 2.10-2.29 (sh, 2 H, 3-H, 14-H_{eq}), 2.96 (m, 1 H, 17-H_{ax}), 3.11 (s, 3 H, 5-H), 4.07 (bs, 1 H, 17-H_{eq}), 4.69-4.87 (sh, 2 H, 2-H, 13-H), 4.80 (dd, $^3J_{7,NH} \approx ^3J_{7,8} = 8.4$ Hz, 1 H, 7-H), 5.13 (s, 2 H, 19-H), 6.83 (bs, 1 H, NH_{ile}), 7.23-7.39 (sh, 5 H, arom.-H).

(S,S,S)-29 Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.06 (d, $^3J_{4',3} = 6.5$ Hz, 3 H, 4'-H), 2.84 (s, 3 H, 5-H), 4.17 (bs, 1 H, 17-H_{eq}), 6.95 (bs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

(R,S,S)-29 Hauptrotamer

δ = 10.8 (q, C-10), 14.2 (q, C-11), 18.9 (q, C-4), 19.8 (q, C-4'), 20.4 (t, C-15), 24.4 (t, C-9), 24.6* (t, C-16), 25.9* (t, C-14), 27.0 (d, C-3), 32.9 (q, C-5), 37.1 (d, C-8), 42.4* (t, C-17), 53.3 (d, C-7), 55.2* (d, C-13), 63.1* (d, C-2), 67.7 (t, C-19), 127.8 (d, C-21/22), 128.1 (d, C-23), 128.5 (d, C-21/22), 136.4 (s, C-20), 156.4* (s, C-18), 170.9 (s, C-12), 173.5 (s, C-6), 174.0 (s, C-1).

(R,S,S)-29 Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 16.2 (q, C-11), 19.4 (q, C-4), 20.0 (q, C-4'), 20.6 (t, C-15), 24.1 (t, C-9), 27.6 (d, C-3), 37.8 (d, C-8), 65.8 (d, C-2), 67.8 (t, C-19).

(S,S,S)-**29** Hauptrotamer

δ = 10.9 (q, C-10), 15.4 (q, C-11), 18.8 (q, C-4), 19.9 (q, C-4'), 20.3 (t, C-15), 24.5 (t, C-9), 24.8* (t, C-16), 26.3* (t, C-14), 27.1 (d, C-3), 32.7 (q, C-5), 37.2 (d, C-8), 42.2 (t, C-17), 53.3 (d, C-7), 54.9* (d, C-13), 63.0 (d, C-2), 67.6 (t, C-19), 127.9 (d, C-21/22), 128.0 (d, C-23), 128.5 (d, C-21/22), 136.4 (s, C-20), 156.6 (s, C-18), 171.1 (s, C-12), 173.6 (s, C-6), 173.8 (s, C-1).

(S,S,S)-**29** Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.0 (q, C-10), 16.3 (q, C-11), 19.2 (q, C-4), 20.6 (t, C-15), 65.5 (t, C-19), 127.9 (d, C-21/22), 128.1 (d, C-23), 128.5 (d, C-21/22), 171.8, 175.8 (2 s, C-1/6/12).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -35.9^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃, (*R,S,S*)-**29**)
 $[\alpha]_D^{20} = -129.7^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃, (*S,S,S*)-**29**)

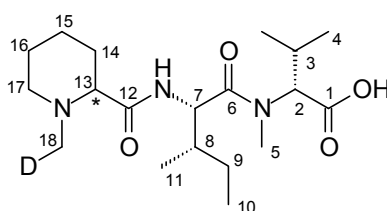
Schmelzpunkt: 60 °C ((*R,S,S*)-**29**), 56 °C ((*S,S,S*)-**29**)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₆ H ₄₀ N ₃ O ₆ [M+H] ⁺	490.2917	490.2891

N-Deuteromethyl-(*R*)-pipicolyl-(*S*)-isoleucin-*N*-methyl-(*S*)-valin ((*R,S,S*)-d₁-**30**)*N*-Deuteromethyl-(*S*)-pipicolyl-(*S*)-isoleucin-*N*-methyl-(*S*)-valin ((*S,S,S*)-d₁-**30**)

Gemäß **AAV 6** wurden 436 mg (*R,S,S*)-Z-PipIleMeVal (*R,S,S*)-**29** (0.891 mmol) mit 43 mg Pd/C (10 %) unter Deuteriumatmosphäre entschützt und durch Zugabe von 87 µl 37%iger wässriger Formaldehyd-Lösung (1.07 mmol, 1.2 Äq.) *N*-deuteromethyliert. Es wurden 350 mg des Tripeptids (*R,S,S*)-MepIleMeVal (*R,S,S*)-d₁-**30** in quantitativer Ausbeute als leicht gelblich gefärbter Feststoff erhalten.

Ebenso konnte (*S,S,S*)-MepIleMeVal (*S,S,S*)-d₁-**30** als leicht gelblich gefärbter, fester Schaum in quantitativer Ausbeute erhalten werden.

**d₁-30**

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

(R,S,S)-d₁-**30** Hauptrotamer

δ = 0.68 (d, $^3J_{4,3} = 6.5$ Hz, 3 H, 4-H), 0.81 (t, $^3J_{10,9} = 7.3$ Hz, 3 H, 10-H), 0.82 (d, $^3J_{11,8} = 6.5$ Hz, 3 H, 11-H), 0.94 (d, $^3J_{4',3} = 6.6$ Hz, 3 H, 4'-H), 1.04-1.23 (sh, 2 H, 9-H_a, 15-H_{ax}), 1.30-1.68 (sh, 6 H, 9-H_b, 14-H, 15-H_{eq}, 16-H), 1.81 (m, 1 H, 8-H), 1.98 (ddd, $^2J_{17ax,17eq} \approx ^3J_{117ax,16ax} = 11.4$ Hz, $^3J_{17ax,16eq} = 2.3$ Hz, 1 H, 17-H_{ax}), 2.05 (s, 2 H, 18-H), 2.09 (m, 1 H, 3-H),

2.52 (m, 1 H, 13-H), 2.84 (d, ${}^2J_{17\text{eq},17\text{ax}} = 11.6$ Hz, 1 H, 17- H_{eq}), 3.02 (s, 3 H, 5-H), 4.54 (dd, ${}^3J_{7,\text{NH}} \approx {}^3J_{7,8} = 9.0$ Hz, 1 H, 7-H), 4.67 (d, ${}^3J_{2,3} = 10.6$ Hz, 1 H, 2-H), 7.74 (d, ${}^3J_{\text{NH},7} = 8.6$ Hz, 1 H, NH_{IIe}).

Bei einer Verschiebung von 2.07 ppm ist das Signal von 18-H der undeuterten Verbindung (R,S,S)-**30** als Singulett zu sehen.

(R,S,S)-d₁-**30** Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.87$ (d, ${}^3J_{11,8} = 6.8$ Hz, 3 H, 11-H), 1.02 (d, ${}^3J_{4',3} = 6.5$ Hz, 3 H, 4'-H), 2.72 (s, 3 H, 5-H).

(S,S,S)-d₁-**30** Hauptrotamer

$\delta = 0.68$ (d, ${}^3J_{4,3} = 6.8$ Hz, 3 H, 4-H), 0.81 (t, ${}^3J_{10,9} = 7.3$ Hz, 3 H, 10-H), 0.82 (d, ${}^3J_{11,8} = 7.0$ Hz, 3 H, 11-H), 0.94 (d, ${}^3J_{4',3} = 6.6$ Hz, 3 H, 4'-H), 1.04-1.22 (sh, 2 H, 9- H_{a} , 15- H_{ax}), 1.34-1.60 (sh, 4 H, 9- H_{b} , 14- H_{ax} , 16-H), 1.61-1.70 (sh, 2 H, 14- H_{eq} , 15- H_{eq}), 1.80 (m, 1 H, 8-H), 1.95 (ddd, ${}^2J_{17\text{ax},17\text{eq}} \approx {}^3J_{117\text{ax},16\text{ax}} = 11.0$ Hz, ${}^3J_{17\text{ax},16\text{eq}} = 2.3$ Hz, 1 H, 17- H_{ax}), 2.00 (s, 2 H, 18-H), 2.09 (m, 1 H, 3-H), 2.43 (d, ${}^3J_{13,14\text{ax}} = 10.0$ Hz, 1 H, 13-H), 2.85 (d, ${}^2J_{17\text{eq},17\text{ax}} = 11.3$ Hz, 1 H, 17- H_{eq}), 3.01 (s, 3 H, 5-H), 4.59 (dd, ${}^3J_{7,\text{NH}} \approx {}^3J_{7,8} = 9.2$ Hz, 1 H, 7-H), 4.67 (d, ${}^3J_{2,3} = 10.3$ Hz, 1 H, 2-H), 7.61 (d, ${}^3J_{\text{NH},7} = 8.8$ Hz, 1 H, NH_{IIe}).

Bei einer Verschiebung von 2.02 ppm ist das Signal von 18-H der undeuterten Verbindung (S,S,S)-**30** als Singulett zu sehen.

(S,S,S)-d₁-**30** Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.87$ (d, ${}^3J_{11,8} = 6.8$ Hz, 3 H, 11-H), 1.02 (d, ${}^3J_{4',3} = 6.5$ Hz, 3 H, 4'-H), 2.72 (s, 3 H, 5-H).

${}^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

(R,S,S)-d₁-**30** Hauptrotamer

$\delta = 10.4$ (q, C-10), 14.7 (q, C-11), 18.4 (q, C-4), 19.9 (q, C-4'), 22.7 (t, C-15), 24.3 (t, C-9), 24.7 (t, C-16), 26.4 (d, C-3), 29.5 (t, C-14), 31.2 (q, C-5), 36.1 (d, C-8), 43.3 (t, ${}^1J_{18,\text{D}} = 20.8$ Hz, C-18), 52.0 (d, C-7), 54.7 (t, C-17), 61.1 (d, C-2), 68.0 (d, C-13), 171.8, 172.4, 172.5 (3 s, C-1, C-6, C-12).

Bei einer Verschiebung von 43.6 ppm ist das Signal von C-18 der undeuterten Verbindung (R,S,S)-**30** zu sehen.

(R,S,S)-d₁-**30** Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 10.9$ (q, C-10), 19.2 (q, C-4'), 29.7 (t, C-14), 30.9 (q, C-5).

(S,S,S)-d₁-**30** Hauptrotamer

$\delta = 10.5$ (q, C-10), 14.7 (q, C-11), 18.4 (q, C-4), 19.9 (q, C-4'), 22.9 (t, C-15), 24.2 (t, C-9), 24.9 (t, C-16), 26.3 (d, C-3), 29.9 (t, C-14), 31.3 (q, C-5), 36.2 (d, C-8), 43.3 (t, ${}^1J_{18,\text{D}} = 20.1$ Hz, C-18), 51.7 (d, C-7), 54.8 (t, C-17), 61.1 (d, C-2), 68.9 (d, C-13), 171.7, 172.5, 172.7 (3 s, C-1, C-6, C-12).

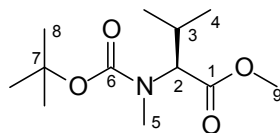
Bei einer Verschiebung von 43.6 ppm ist das Signal von C-18 der undeuterten Verbindung (S,S,S)-**30** zu sehen.

Optische Drehung:	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -90.8^{\circ}$ ($c = 1.0$, MeOH, (<i>R,S,S</i>)- d ₁ - 30)	
	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -135.9^{\circ}$ ($c = 1.0$, MeOH, (<i>S,S,S</i>)- d ₁ - 30)	
Schmelzpunkt:	78-80 °C ((<i>R,S,S</i>)- d ₁ - 30), 98-100 °C ((<i>S,S,S</i>)- d ₁ - 30)	
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₉ H ₃₅ DN ₃ O ₄ [M+H] ⁺	371.2769	371.2751

***N*-tert.-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-(*S*)-valinmethylester^[118] (**34**)**

4.70 g (*L*)-BnMeValOMe **22** (20.0 mmol) wurden in 100 ml THF gelöst, mit 4.58 g Di-*tert.*-butyldicarbonat (21.0 mmol, 1.05 Äq.) und 235 mg Pd/C (5 %) versetzt und über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 95:5, 9:1) wurden 4.79 g des Boc-geschützten (*L*)-Methylvalinmethylesters **34** (19.5 mmol, 97 %) als farbloses Öl erhalten.

R_f(34) = 0.45 (Hexan:EE 8:2)



34

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 0.86$ (d, $^3J_{4,3} = 6.0$ Hz, 3 H, 4-H), 0.94 (d, $^3J_{4',3} = 6.3$ Hz, 3 H, 4'-H), 1.43 (s, 9 H, 8-H), 2.15 (m, 1 H, 3-H), 2.79 (s, 3 H, 5-H), 3.68 (s, 3 H, 9-H), 4.43 (d, $^3J_{2,3} = 10.4$ Hz, 1 H, 2-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 2.82$ (s, 3 H, 5-H), 4.07 (d, $^3J_{2,3} = 10.1$ Hz, 1 H, 2-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 18.7$ (q, C-4), 19.7 (q, C-4'), 27.6 (d, C-3), 28.3 (q, C-8), 30.3 (q, C-5), 51.7 (q, C-9), 63.0 (d, C-2), 80.0 (s, C-7), 156.3 (s, C-6), 172.1 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

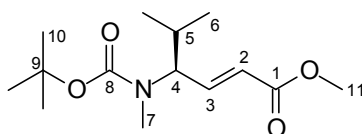
$\delta = 19.0$ (q, C-4), 20.0 (q, C-4'), 27.6 (d, C-3), 30.7 (q, C-5), 65.0 (d, C-2), 80.2 (s, C-7), 171.6 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -98.9^{\circ}$ ($c = 1.0$, CHCl₃)

(4*S*,2*E*)-4-(*tert.*-Butoxycarbonyl-methylamino)-5-methyl-2-hexensäure-methyl-ester (35)

497 mg *L*-Boc-*N*-methylvalinmethylester **34** (2.03 mmol, 1.0 Äq.) wurden nach **AAV 9** mit 2.5 ml einer 1 M DIBALH-Lösung in Hexan (2.5 mmol, 1.2 Äq.) zum Aldehyd reduziert, welcher in situ mit einer Ylid-Lösung umgesetzt wurde. Diese wurde zuvor aus 2.53 g Methoxy-carbonylmethyl-triphenylphosphonium-bromid^[119] (6.09 mmol, 3.0 Äq.) und 687 mg KO*t*Bu (6.12 mmol, 3.0 Äq.) hergestellt. Das Wittig-Produkt **35** wurde durch Säulenchromatographie (Hexan: EE 9:1) gereinigt und zu 329 mg (1.21 mmol, 60 % d. Th.) als farbloses Öl erhalten.

$R_f(\mathbf{35}) = 0.36$ (Hexan:EE 8:2)

**35**

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 0.89$ (d, $^3J_{6,5} = 6.3$ Hz, 3 H, 6-H), 0.92 (d, $^3J_{6',5} = 6.3$ Hz, 3 H, 6-H'), 1.43 (s, 9 H, 10-H), 2.68 (bs, 3 H, 7-H), 3.72 (s, 3 H, 11-H), 4.36 (bs, 1 H, 4-H), 5.87 (d, $^3J_{2,3} = 15.6$ Hz, 1 H, 2-H), 6.88 (dd, $^3J_{3,2} = 15.6$ Hz, $^3J_{3,4} = 7.0$ Hz, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewähltes Signal)

$\delta = 4.06$ (bs, 1 H, 4-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 19.3$ (q, C-6), 20.1 (q, C-6'), 28.4 (q, C-10), 29.2 (d, C-5), 29.5 (q, C-7), 51.6 (q, C-11), 62.0 (d, C-4), 79.8 (s, C-9), 122.7 (d, C-2), 145.3 (d, C-3), 156.0 (s, C-8), 166.8 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewähltes Signal)

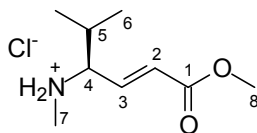
$\delta = 63.8$ (d, C-4).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -44.5$ °(c = 1.0, CHCl_3)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	272.1862	272.1886

(4*S*,2*E*)-5-Methyl-4-(methylamino)-2-hexensäure-methylester-Hydrochlorid (36)

Durch Umsetzung von 316 mg **35** (1.16 mmol) mit 3 ml einer 4 M HCl in Dioxan-Lösung (3.0 mmol, 9.9 Äq.) nach **AAV 4** wurde das Boc-entschützte Produkt **36** in quantitativer Ausbeute (240 mg, 1.16 mmol) als weißer Feststoff erhalten.

**36****¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.06 (d, $^3J_{6,5}$ = 6.8 Hz, 3 H, 6-H), 1.08 (d, $^3J_{6',5}$ = 6.5 Hz, 6'-H), 2.46 (m, 1 H, 5-H), 2.62 (s, 3 H, 7-H), 3.39 (m, 1 H, 4-H), 3.75 (s, 3 H, 8-H), 6.12 (d, $^3J_{2,3}$ = 15.8 Hz, 1 H, 2-H), 6.82 (dd, $^3J_{3,2}$ = 15.8 Hz, $^3J_{3,4}$ = 9.3 Hz, 1 H, 3-H), 9.75, 9.82 (2 bs, 2 H, NH₂⁺).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 17.4 (q, C-6), 19.8 (q, C-6'), 30.5 (d, C-5), 32.0 (q, C-7), 52.0 (q, C-8), 67.1 (d, C-4), 128.7 (d, C-2), 137.6 (d, C-3), 164.8 (s, C-1).

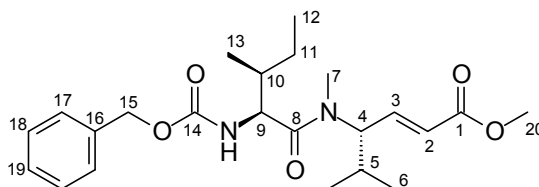
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ = +1.5 °(c = 1.0, MeOH)**Schmelzpunkt:** 159-160 °C**Elementaranalyse:**

C ₉ H ₁₈ ClNO ₂	Ber.	C 52.05	H 8.74	N 6.74
(207.70)	Gef.	C 51.79	H 9.19	N 6.80

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₉ H ₁₈ NO ₂ [M+H] ⁺	172.1338	172.1343

(4S,2E)-4-[(N-Benzyloxycarbonyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-5-methyl-2-hexensäuremethylester (37)

Gemäß **AAV 2** wurden 188 mg **36** (0.905 mmol) und 266 mg *L-Z*-Isoleucin (1.00 mmol, 1.1 Äq.) mit 274 mg BEP (1.00 mmol, 1.1 Äq.) und 620 µl DIPEA (3.65 mmol, 4.0 Äq.) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 7:3) wurden 336 mg des Dipeptids **37** (0.803 mmol, 89 % d. Th.) als farbloses Öl erhalten.

R_f(37) = 0.60 (Hexan:EE 1:1)**37****¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):*Hauptrotamer*

δ = 0.81 (d, $^3J_{6,5}$ = 6.5 Hz, 3 H, 6-H), 0.86 (t, $^3J_{12,11}$ = 7.3 Hz, 3 H, 12-H), 0.91 (d, $^3J_{13,10}$ = 6.8 Hz, 3 H, 13-H), 0.95 (d, $^3J_{6',3}$ = 6.5 Hz, 3 H, 6'-H), 1.10 (ddq, $^2J_{11a,11b}$ = 13.6 Hz, $^3J_{11a,10}$ =

9.5 Hz, ${}^3J_{11a,12} = 7.3$ Hz, 1 H, 11-H_a), 1.53 (ddq, ${}^2J_{11b,11a} = 13.6$ Hz, ${}^3J_{11b,12} = 7.5$ Hz, ${}^3J_{11b,10} = 3.2$ Hz, 1 H, 11-H_b), 1.71 (m, 1 H, 10-H), 1.89 (m, 1 H, 5-H), 2.96 (s, 3 H, 7-H), 3.72 (s, 3 H, 20-H), 4.48 (dd, ${}^3J_{9,NH} = 9.3$ Hz, ${}^3J_{9,10} = 7.3$ Hz, 1 H, 9-H), 4.86 (dd, ${}^3J_{4,5} = 9.8$ Hz, ${}^3J_{4,3} = 7.3$ Hz, 1 H, 4-H), 5.07 (s, 2 H, 15-H), 5.39 (d, ${}^3J_{NH,9} = 9.3$ Hz, 1 H, NH_{IIe}), 5.88 (dd, ${}^3J_{2,3} = 15.6$ Hz, ${}^4J_{2,4} = 1.3$ Hz, 1 H, 2-H), 6.87 (dd, ${}^3J_{3,2} = 15.6$ Hz, ${}^3J_{3,4} = 7.3$ Hz, 1 H, 3-H), 7.25-7.36 (sh, 5 H, arom.-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.02$ (d, ${}^3J_{6',3} = 6.6$ Hz, 3 H, 6'-H), 2.81 (s, 3 H, 7-H), 3.68 (s, 3 H, 20-H), 4.14 (dd, ${}^3J_{4,5} = 9.8$ Hz, ${}^3J_{4,3} = 7.3$ Hz, 1 H, 4-H), 5.28 (d, ${}^3J_{NH,9} = 10.0$ Hz, 1 H, NH_{IIe}), 5.93 (d, ${}^3J_{2,3} = 15.8$ Hz, 1 H, 2-H).

${}^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 11.1$ (q, C-12), 15.7 (q, C-13), 19.1 (q, C-6), 19.9 (q, C-6'), 24.1 (t, C-11), 28.6 (d, C-5), 30.7 (q, C-7), 37.8 (d, C-10), 51.7 (q, C-20), 55.3 (d, C-9), 60.3 (d, C-4), 66.9 (t, C-15), 123.6 (d, C-2), 127.9 (d, C-17/18), 128.1 (d, C-19), 128.5 (d, C-17/18), 136.4 (s, C-16), 144.6 (d, C-3), 156.4 (s, C-14), 166.5 (s, C-1), 172.9 (s, C-8).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.3$ (q, C-12), 16.2 (q, C-13), 20.1 (q, C-6), 28.4 (d, C-5), 29.7 (q, C-7), 38.0 (d, C-10), 55.1 (d, C-9), 64.1 (d, C-4), 143.5 (d, C-3), 158.0 (s, C-14).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -73.9^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

Elementaranalyse:

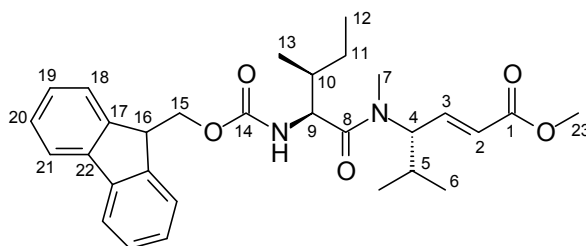
C ₂₃ H ₃₄ N ₂ O ₅	Ber.	C 66.01	H 8.19	N 6.69
(418.54)	Gef.	C 65.58	H 7.98	N 6.83

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₃ H ₃₅ N ₂ O ₅ [M+H] ⁺	419.2546	419.2561

(4*S*,2*E*)-4-[(*N*-9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-*S*)-isoleucyl]-methylamino]-5-methyl-2-hexensäure-methylester (40)

Gemäß **AAV 2** wurden 249 mg **36** (1.20 mmol) und 468 mg *L*-Fmoc-Isoleucin (1.32 mmol, 1.1 Äq.) mit 361 mg BEP (1.32 mmol, 1.1 Äq.) und 820 μ l DIPEA (4.82 mmol, 4.0 Äq.) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 7:3) wurden 490 mg des Dipeptids **40** (0.942 mmol, 79 % d. Th.) als farbloses Öl erhalten, das zu einem weißen Feststoff erstarrte.

$R_f(\mathbf{40}) = 0.58$ (Hexan:EE 1:1)



40

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.82 (d, $^3J_{6,5} = 6.8$ Hz, 3 H, 6-H), 0.88 (t, $^3J_{12,11} = 7.4$ Hz, 3 H, 12-H), 0.92 (d, $^3J_{13,10} = 7.0$ Hz, 3 H, 13-H), 0.95 (d, $^3J_{6',5} = 6.5$ Hz, 3 H, 6'-H), 1.13 (m, 1 H, 11-H_a), 1.55 (m, 1 H, 11-H_b), 1.75 (m, 1 H, 10-H), 1.91 (m, 1 H, 5-H), 2.96 (s, 3 H, 7-H), 3.72 (s, 3 H, 23-H), 4.19 (t, $^3J_{16,15} = 6.9$ Hz, 1 H, 16-H), 4.34 (m, 2 H, 15-H), 4.49 (dd, $^3J_{9,NH} = 9.4$ Hz, $^3J_{9,10} = 7.5$ Hz, 1 H, 9-H), 4.88 (dd, $^3J_{4,5} = 10.2$ Hz, $^3J_{4,3} = 7.2$ Hz, 1 H, 4-H), 5.42 (d, $^3J_{NH,9} = 9.4$ Hz, 1 H, NH_{IIe}), 5.89 (dd, $^3J_{2,3} = 15.8$ Hz, $^4J_{2,4} = 1.0$ Hz, 1 H, 2-H), 6.88 (dd, $^3J_{3,2} = 15.8$ Hz, $^3J_{3,4} = 7.2$ Hz, 1 H, 3-H), 7.28 (ddd, $^3J_{20,19} \approx ^3J_{20,21} = 7.4$ Hz, $^4J_{20,18} = 1.2$ Hz, 2 H, 20-H), 7.37 (dd, $^3J_{19,18} \approx ^3J_{19,20} = 7.4$ Hz, 2 H, 19-H), 7.56 (d, $^3J_{18,19} = 7.5$ Hz, 2 H, 18-H), 7.74 (d, $^3J_{21,20} = 7.6$ Hz, 2 H, 21-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.01 (d, $^3J_{6',5} = 6.5$ Hz, 3 H, 6'-H), 2.84 (s, 3 H, 7-H), 3.47 (s, 3 H, 23-H), 6.32 (d, $^3J_{NH,9} = 10.0$ Hz, 1 H, NH_{IIe}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 11.1 (q, C-12), 15.7 (q, C-13), 19.1 (q, C-6), 19.9 (q, C-6'), 24.1 (t, C-11), 28.7 (d, C-5), 30.7 (q, C-7), 37.8 (d, C-10), 47.2 (d, C-16), 51.7 (q, C-23), 55.3 (d, C-9), 60.4 (d, C-4), 67.0 (t, C-15), 119.9 (d, C-2), 123.6 (d, C-21), 125.1 (d, C-18), 127.0 (d, C-20), 127.7 (d, C-19), 141.3, 143.9 (2 s, C-17, C-22), 144.5 (d, C-3), 156.4 (s, C-14), 166.5 (s, C-1), 172.9 (s, C-8).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.3 (q, C-12), 20.1 (q, C-6), 21.0 (q, C-6'), 23.9 (t, C-11), 28.4 (d, C-5), 29.6 (q, C-7), 38.0 (d, C-10), 51.5 (q, C-23), 55.1 (d, C-9), 64.2 (d, C-4), 143.4 (d, C-3), 143.8 (s, C-17/22).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -63.3^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

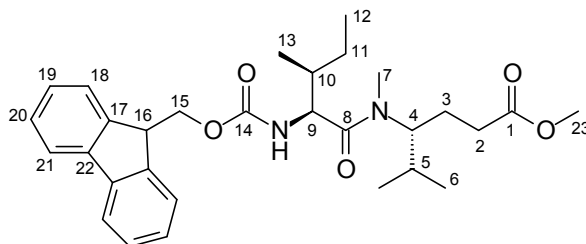
Schmelzpunkt: 47-49 °C

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₀ H ₃₉ N ₂ O ₅ [M+H] ⁺	507.2859	507.2823

(4R)-4-[(N-9H-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-(S)-isoleucyl]-methylamino]-5-methylhexansäure-methylester (41)

Die Doppelbindung im Dipeptid **40** wurde durch Umsetzung von 479 mg **40** (0.945 mmol) gemäß **AAV 8** in Gegenwart von 48 mg Pd/C (5%) unter Wasserstoffatmosphäre reduziert. Das Produkt **41** wurde nach Säulenchromatographie (Hexan:EE 8:2, 7:3, 1:1) als weißer Feststoff erhalten (347 mg, 0.668 mmol, 71 % d. Th.).

$R_f(\mathbf{41}) = 0.52$ (Hexan:EE 1:1)

**41**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 0.75$ (d, $^3J_{6,5} = 6.5$ Hz, 3 H, 6-H), 0.90 (t, $^3J_{12,11} = 7.4$ Hz, 3 H, 12-H), 0.96 (d, $^3J_{13,10} = 6.5$ Hz, 3 H, 13-H), 0.97 (d, $^3J_{6',5} = 6.2$ Hz, 3 H, 6'-H), 1.12 (m, 1 H, 11-H_a), 1.45-1.89 (sh, 4 H, 3-H_a, 5-H, 10-H, 11-H_b), 1.99-2.26 (sh, 3 H, 2-H, 3-H_b), 2.87 (s, 3 H, 7-H), 3.64 (s, 3 H, 23-H), 4.19 (t, $^3J_{16,15} = 6.9$ Hz, 1 H, 16-H), 4.22 (m, 1 H, 4-H), 4.32 (dd, $^2J_{15a,15b} = 10.7$ Hz, $^3J_{15a,16} = 7.3$ Hz, 1 H, 15-H_a), 4.36 (dd, $^2J_{15b,15a} = 10.7$ Hz, $^3J_{15b,16} = 7.5$ Hz, 1 H, 15-H_b), 4.51 (dd, $^3J_{9,\text{NH}} = 9.5$ Hz, $^3J_{9,10} = 6.8$ Hz, 1 H, 9-H), 5.45 (d, $^3J_{\text{NH},9} = 9.5$ Hz, 1 H, NH_{He}), 7.28 (ddd, $^3J_{20,19} \approx ^3J_{20,21} = 7.5$ Hz, $^4J_{20,18} = 1.2$ Hz, 2 H, 20-H), 7.37 (dd, $^3J_{19,18} \approx ^3J_{19,20} = 7.5$ Hz, 2 H, 19-H), 7.56 (d, $^3J_{18,19} = 7.5$ Hz, 2 H, 18-H), 7.73 (d, $^3J_{21,20} = 7.6$ Hz, 2 H, 21-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.04$ (d, $^3J_{6',5} = 6.5$ Hz, 3 H, 6'-H), 2.73 (s, 3 H, 7-H), 3.43 (s, 3 H, 23-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 11.2$ (q, C-12), 16.0 (q, C-13), 19.6 (q, C-6), 20.0 (q, C-6'), 23.8 (t, C-11), 24.4 (t, C-3), 29.2 (q, C-7), 30.1 (d, C-5), 31.0 (t, C-2), 37.6 (d, C-10), 47.2 (d, C-16), 51.6 (q, C-23), 55.7 (d, C-9), 58.9 (d, C-4), 67.0 (t, C-15), 119.9 (d, C-21), 125.1 (d, C-18), 127.0 (d, C-20), 127.6 (d, C-19), 141.3, 143.9 (2 s, C-17, C-22), 156.4 (s, C-14), 173.2, 173.5 (2 s, C-1, C-8).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.3$ (q, C-12), 16.2 (q, C-13), 20.3 (q, C-6), 20.5 (q, C-6'), 30.2 (d, C-5), 29.6 (q, C-7), 38.0 (d, C-10), 55.1 (d, C-9), 67.1 (t, C-15), 125.1 (d, C-18), 143.8 (s, C-17 o. C-22).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -24.2^\circ$ (c = 1.0, CHCl_3)

Schmelzpunkt: 106 °C

Elementaranalyse:

C ₃₀ H ₄₀ N ₂ O ₅	Ber.	C 70.84	H 7.93	N 5.51
(506.65)	Gef.	C 70.78	H 7.97	N 5.43

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₀ H ₄₁ N ₂ O ₅ [M+H] ⁺	509.3016	509.2962

(4*R*)-4-((*S*)-Isoleucyl-methylamino)-5-methyl-hexansäure-methylester (38)

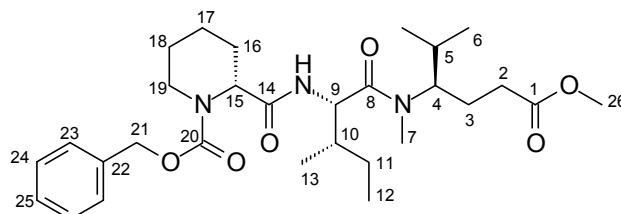
293 mg des Fmoc-geschützten Dipeptids **41** (0.576 mmol) wurden in 1.4 ml Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 285 µl Piperidin (2.88 mmol, 5.0 Äq.) versetzt. Nach 4 h wurde das Reaktionsgemisch mit 8 ml einer 5%-igen Zitronensäurelösung versetzt (pH 5) und mit Essigsäureethylester extrahiert, um das bei der Reaktion gebildete 1-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyl)-piperidin zu entfernen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M NaOH auf pH 10 gebracht und erneut mit Essigsäureethylester extrahiert, die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurden 113 mg des freien Amins **38** (0.395 mmol, 68 % d. Th.) als schwach gelbliches Öl erhalten.

Das Amin wurde ohne weitere Aufreinigung in die Peptidknüpfung mit *Z*-(*R*)-Pipicolinsäure (*R*)-**13** gemäß **AAV 1** (jedoch nur mit der halben Menge an NMM) zum Tripeptid **42** (95 % d. Th.) eingesetzt.

(4*R*)-4-[(*N*-Benzyloxycarbonyl-(*R*)-pipicolyl-(*S*)-isoleucyl)-methylamino]-5-methyl-hexansäure-methylester (42)

Es wurden gemäß **AAV 1** 188 mg **43** (0.581 mmol) und 181 mg (*R*)-*Z*-Pipicolinsäure (*R*)-**13** (0.687 mmol, 1.2 Äq., >98 % ee) mit 89 µl Chlorameisensäure-*iso*-butylester (0.686 mmol, 1.2 Äq.) und zweimal 76 µl NMM (1.38 mmol, 2.4 Äq.) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 1:1) wurden 244 mg des Tripeptids **42** (0.459 mmol, 79 % d. Th.) als farbloses Öl erhalten.

R_f(42) = 0.39 (Hexan:EE 1:1)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):*Hauptrotamer*

δ = 0.73 (d, $^3J_{6,5}$ = 6.5 Hz, 3 H, 6-H), 0.83 (m, 3 H, 12-H), 0.91 (m, 3 H, 13-H), 0.96 (d, $^3J_{6',5}$ = 6.5 Hz, 3 H, 6'-H), 1.02 (m, 1 H, 11-H_a), 1.20-1.83 (sh, 9 H, 3-H_a, 5-H, 10-H, 11-H_b, 16-H_{ax}, 17-H, 18-H), 1.97-2.24 (sh, 3 H, 2-H, 3-H_b), 2.29 (d, $^2J_{16eq,16ax}$ = 13.3 Hz, 1 H, 16-H_{eq}), 2.82 (ddd, $^2J_{19ax,19eq} \approx ^3J_{19ax,18ax}$ = 13.1 Hz, $^3J_{19ax,18eq}$ = 3.3 Hz, 1 H, 19-H_{ax}), 2.90 (s, 3 H, 7-H), 3.64 (s, 3 H, 26-H), 4.08 (m, 1 H, 19-H_{eq}), 4.21 (ddd, $^3J_{4,3a} \approx ^3J_{4,5}$ = 9.5 Hz, $^3J_{4,3b}$ = 2.8 Hz, 1 H, 4-H), 4.77 (dd, $^3J_{9,10} \approx ^3J_{9,NH}$ = 8.2 Hz, 1 H, 9-H), 4.88 (m, 1 H, 15-H), 5.12 (d, $^2J_{21a,21b}$ = 12.3 Hz, 1 H, 21-H_a), 5.17 (d, $^2J_{21b,21a}$ = 12.3 Hz, 1 H, 21-H_b), 6.55 (bs, 1 H, NH_{IIc}), 7.26-7.39 (sh, 5 H, arom.-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.05 (d, $^3J_{6',5}$ = 6.5 Hz, 3 H, 6'-H), 2.70 (s, 3 H, 7-H), 3.51 (m, 1 H, 4-H), 3.59 (s, 3 H, 26-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):*Hauptrotamer*

δ = 11.0 (q, C-12), 15.9 (q, C-13), 19.6 (q, C-6), 19.9 (q, C-6'), 20.5 (t, C-17), 24.1 (t, C-11), 24.4 (t, C-3), 24.9* (t, C-18), 25.5* (t, C-16), 29.1 (q, C-7), 30.1 (d, C-5), 31.0 (t, C-2), 37.2 (d, C-10), 42.3* (t, C-19), 51.6 (q, C-26), 53.6 (d, C-9), 55.0* (d, C-15), 58.7 (d, C-4), 67.6 (t, C-21), 127.9 (d, C-23 o. C-24), 128.1 (d, C-25), 128.5 (d, C-23 o. C-24), 136.4 (s, C-22), 156.3 (s, C-20), 170.4 (s, C-14), 173.1 (s, C-8), 173.5 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.3 (q, C-12), 16.2 (q, C-13), 20.3 (q, C-6), 20.5 (q, C-6'), 23.5 (t, C-11), 27.7 (q, C-7), 31.4 (t, C-2), 38.0 (d, C-10), 53.0 (d, C-9), 62.4 (d, C-4), 170.2 (s, C-1/C-8/C-14).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +11.7^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

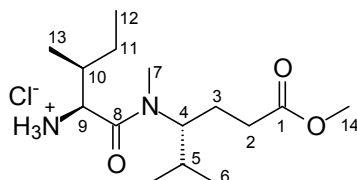
Elementaranalyse:

C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₆	Ber.	C 65.51	H 8.53	N 7.90
(531.70)	Gef.	C 65.21	H 8.59	N 8.09

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₆ H ₅₂ N ₃ O ₆ [M+C ₇ H ₇] ⁺	622.3856	622.3886

(4R)-4-((S)-Isoleucyl-methylamino)-5-methyl-hexansäure-methylester-Hydrochlorid (43)

370 mg des Dipeptids **37** (0.884 mmol) wurden mit 37 mg Pd/C-Katalysator (10 %) und 440 μ l einer 4 M HCl-Lösung in Dioxan (1.76 mmol, 2.0 Äq.) unter Wasserstoffatmosphäre zum gesättigten, entschützten Dipeptid **43** in Form seines Hydrochlorids umgesetzt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Es wurden 281 mg (0.871 mmol, 99 %) eines zähen Öls erhalten.



43

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 0.86$ (d, $^3J_{6,5} = 5.8$ Hz, 3 H, 6-H), 0.91 (t, $^3J_{12,11} = 6.8$ Hz, 3 H, 12-H), 0.96 (d, $^3J_{6',5} = 6.3$ Hz, 3 H, 6'-H), 1.23 (d, $^3J_{13,10} = 5.8$ Hz, 3 H, 13-H), 1.28 (m, 1 H, 11-H_a), 1.50 - 1.76 (sh, 3 H, 3-H_a, 5-H, 11-H_b), 1.88 (bs, 1 H, 10-H), 1.97 - 2.20 (sh, 3 H, 2-H, 3-H_b), 2.86 (s, 3 H, 7-H), 3.62 (s, 3 H, 14-H), 4.15 (m, 1 H, 4-H), 4.41 (bs, 1 H, 9-H), 8.37 (bs, 3 H, NH_3^+).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.77$ (d, $^3J_{6,5} = 6.3$ Hz, 3 H, 6-H), 1.03 (d, $^3J_{6',5} = 6.3$ Hz, 3 H, 6'-H), 2.76 (s, 3 H, 7-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 11.8$ (q, C-12), 16.3 (q, C-13), 20.0 (q, C-6), 20.1 (q, C-6'), 22.9 (t, C-11), 24.3 (t, C-3), 29.5 (q, C-7), 29.9 (d, C-5), 30.8 (t, C-2), 36.3 (d, C-10), 51.7 (q, C-14), 56.0 (d, C-9), 60.0 (d, C-4), 169.2 (s, C-8), 173.3 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

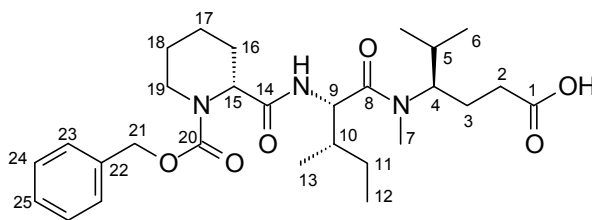
$\delta = 11.6$ (q, C-12), 20.1 (q, C-6), 20.3 (q, C-6'), 22.1 (t, C-11), 28.0 (q, C-7), 35.7 (d, C-10).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +28.7^\circ$ (c = 1.0, MeOH)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	287.2335	287.2324

(4R)-4-[(N-Benzoyloxycarbonyl-(R)-piperocolyl)-(S)-isoleucyl]-methylamino]-5-methylhexansäure (44)

Nach **AAV 3** wurden 209 mg des Tripeptids **42** (0.393 mmol) mit 470 μl 1 M NaOH (0.47 mmol, 1.2 Äq.) verseift. Es entstanden 203 mg der freien Säure **44** (0.393 mmol, quant.) als zähes farbloses Öl.



44

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.72 (m, 3 H, 6-H), 0.83 (m, 3 H, 12-H), 0.90 (m, 3 H, 13-H), 0.95 (d, ³J_{6',5} = 6.5 Hz, 3 H, 6'-H), 1.06 (m, 1 H, 11-H_a), 1.26-1.89 (sh, 9 H, 3-H_a, 5-H, 10-H, 11-H_b, 16-H_{ax}, 17-H, 18-H), 2.03 (dtd, ²J_{3b,3a} = 13.8 Hz, ³J_{3b,2} = 7.4 Hz, ³J_{3b,4} = 3.5 Hz, 1 H, 3-H_b), 2.19 (dd, ³J_{2,3a} = 8.8 Hz, ³J_{2,3b} = 7.4 Hz, 2 H, 2-H), 2.27 (d, ²J_{16eq,16ax} = 13.8 Hz, 1 H, 16-H_{eq}), 2.85 (m, 1 H, 19-H_{ax}), 2.94 (s, 3 H, 7-H), 3.98-4.30 (sh, 2 H, 4-H, 19-H_{eq}), 4.77 (dd, ³J_{9,NH} ≈ ³J_{9,10} = 8.5 Hz, 1 H, 9-H), 4.83 (m, 1 H, 15-H), 5.11 (d, ²J_{21a,21b} = 12.3 Hz, 1 H, 21-H_a), 5.16 (d, ²J_{21b,21a} = 12.3 Hz, 1 H, 21-H_b), 6.83 (bs, 1 H, NH_{lle}), 7.25-7.38 (sh, 5 H, arom.-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.03 (d, ³J_{6',5} = 6.5 Hz, 3 H, 6'-H), 2.71 (s, 3 H, 7-H), 5.09 (d, ²J_{21a,21b} = 12.5 Hz, 1 H, 21-H_a), 5.16 (d, ²J_{21b,21a} = 12.5 Hz, 1 H, 21-H_b), 6.93 (bs, 1 H, NH_{lle}).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 10.9 (q, C-12), 15.8 (q, C-13), 19.6 (q, C-6), 19.9 (q, C-6'), 20.4 (t, C-17), 24.2 (t, C-11), 24.3 (t, C-3), 24.8 (t, C-18), 25.9* (t, C-16), 29.3* (q, C-7), 30.1 (d, C-5), 31.0 (t, C-2), 36.8* (d, C-10), 42.1* (t, C-19), 53.7 (d, C-9), 55.2* (d, C-15), 59.1* (d, C-4), 67.6 (t, C-21), 127.8, 128.0, 128.5 (3 d, C-23, C-24, C-25), 136.4 (s, C-22), 156.5* (s, C-20), 170.7 (s, C-14), 173.6 (s, C-8), 176.8 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +8.2^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

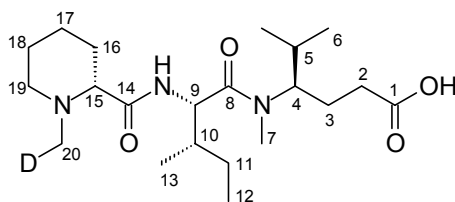
Elementaranalyse:

C ₂₈ H ₄₃ N ₃ O ₆	Ber.	C 64.97	H 8.37	N 8.12
(517.67)	Gef.	C 64.73	H 8.03	N 7.85

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₈ H ₄₄ N ₃ O ₆ [M+H] ⁺	518.3230	518.3226

(4R)-4-[(N-Deuteromethyl-(R)-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-5-methylhexansäure (d₁-45)

Gemäß **AAV 6** wurden 163 mg des Tripeptids **44** (0.315 mmol) mit 16 mg Pd/C (10 %) unter Deuteriumatmosphäre geschützt und durch Zugabe von 51 µl 37%iger wässriger Formaldehyd-Lösung (0.628 mmol, 1.5 Äq.) N-deuteromethyliert. Es wurden 125 mg des Tripeptids d₁-**45** (0.314 mmol, quant.) als weißer, schaumiger Feststoff erhalten.

d₁-45

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

Hauptrotamer

δ = 0.63 (d, $^3J_{6,5} = 6.8$ Hz, 3 H, 6-H), 0.82 (t, $^3J_{12,11} = 7.3$ Hz, 3 H, 12-H), 0.84 (d, $^3J_{13,10} = 6.8$ Hz, 3 H, 13-H), 0.90 (d, $^3J_{6',5} = 6.5$ Hz, 3 H, 6'-H), 1.07 (ddq, $^2J_{11a,11b} = 13.8$ Hz, $^3J_{11a,10} = 8.8$ Hz, $^3J_{11a,12} = 7.3$ Hz, 1 H, 11-H_a), 1.15 (dddd, $^2J_{17ax,17eq} \approx ^3J_{17ax,16ax} \approx ^3J_{17ax,18ax} = 12.3$ Hz, $^3J_{17ax,16eq} \approx ^3J_{17ax,18eq} = 3.3$ Hz, 1 H, 17-H_{ax}), 1.33 (dddd, $^2J_{16ax,16eq} \approx ^3J_{16ax,15} \approx ^3J_{16ax,17ax} = 12.6$ Hz, $^3J_{16ax,17eq} = 3.5$ Hz, 1 H, 16-H_{ax}), 1.35-1.72 (sh, 7 H, 3-H_a, 5-H, 11-H_b, 16-H_{eq}, 17-H_{eq}, 18-H), 1.74-2.12 (sh, 5 H, 2-H, 3-H_b, 10-H, 19-H_{ax}), 2.05 (s, 2 H, 20-H), 2.46 (dd, $^3J_{15,16ax} = 10.4$ Hz, $^3J_{15,16eq} = 2.7$ Hz, 1 H, 15-H), 2.83 (ddd, $^2J_{19eq,19ax} = 11.3$ Hz, $^3J_{19eq,18ax} \approx ^3J_{19eq,18eq} = 2.8$ Hz, 1 H, 19-H_{eq}), 2.87 (s, 3 H, 7-H), 4.07 (m, 1 H, 4-H), 4.56 (dd, $^3J_{9,NH} \approx ^3J_{9,10} = 9.0$ Hz, 1 H, 9-H), 7.59 (d, $^3J_{NH,9} = 9.3$ Hz, 1 H, NH_{IIc}).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 0.98 (d, $^3J_{6',5} = 6.5$ Hz, 3 H, 6'-H), 1.90 (s, 2 H, 20-H), 2.61 (s, 3 H, 7-H), 7.47 (d, $^3J_{NH,9} = 9.8$ Hz, 1 H, NH_{IIc}).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆):

Hauptrotamer

δ = 10.6 (q, C-12), 15.4 (q, C-13), 19.4 (q, C-6), 20.0 (q, C-6'), 22.8 (t, C-17), 23.7 (t, C-3), 24.0 (t, C-11), 24.8 (t, C-18), 28.7 (q, C-7), 29.4 (d, C-5), 29.7 (t, C-16), 30.6 (t, C-2), 35.8 (d, C-10), 43.6 (t, $^1J_{20,D} = 19.6$ Hz, C-20), 52.4 (d, C-9), 54.7 (t, C-19), 57.9 (d, C-4), 68.3 (d, C-15), 172.5, 172.5, 174.0 (3 s, C-1, C-8, C-14).

Bei einer Verschiebung von 43.9 ppm ist das Signal von C-20 der undeuterten Verbindung 45 zu sehen.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -13.6^\circ$ (c = 1.0, MeOH)

Schmelzpunkt: 60-61 °C

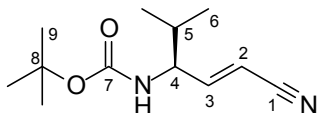
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₁ H ₃₉ DN ₃ O ₄ [M+H] ⁺	399.3082	399.3108

(4*S*,2*E*)-4-(tert.-Butoxycarbonylamino)-5-methyl-2-hexennitril (46)

Nach AAV 9 wurden 1.74 g *L*-Boc-valinmethylester (7.52 mmol, 1.0 Äq.) mit 15 ml einer 1 M DIBALH-Lösung in Hexan (15 mmol, 2.0 Äq.) zum Aldehyd reduziert, welcher in situ mit einer Ylid-Lösung umgesetzt wurde. Diese wurde zuvor aus 4.67 g Cyanomethyl-

triphenyl-phosphonium-chlorid^[120] (13.8 mmol, 1.8 Äq.) und 1.55 g KO^tBu (13.8 mmol, 1.8 Äq.) hergestellt. Durch säulenchromatographische Reinigung (Hexan: EE 9:1, 8:2) wurden 1.20 g des Wittig-Produktes **46** (5.35 mmol, 71 % d. Th., >99 % ee) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f(\mathbf{46}) = 0.29$ (Hexan:EE 8:2)



46

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

$\delta = 0.90$ (d, ³J_{6,5} = 6.7 Hz, 3 H, 6-H), 0.93 (d, ³J_{6',5} = 6.7 Hz, 1 H, 6'-H), 1.43 (s, 9 H, 9-H), 1.84 (m, 1 H, 5-H), 4.11 (bs, 1 H, 4-H), 4.50 (bs, 1 H, NH), 5.47 (dd, ³J_{2,3} = 16.5 Hz, ⁴J_{2,4} = 1.6 Hz, 1 H, 2-H), 6.62 (dd, ³J_{3,2} = 16.5 Hz, ³J_{3,4} = 5.5 Hz, 1 H, 3-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

$\delta = 18.0$ (q, C-6), 18.8 (q, C-6'), 28.3 (q, C-9), 32.0 (d, C-5), 57.4 (d, C-4), 80.2 (s, C-8), 100.4 (d, C-2), 117.1 (s, C-1), 154.0 (d, C-3), 155.1 (s, C-7).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -5.7^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

Schmelzpunkt: 62 °C

HPLC: Reprosil 100 Chiral-NR 8 μ m, Hexan:iPrOH 95:5, 2 ml/min

(*R*)-**46**: $t_R = 5.91$ min

(*S*)-**46**: $t_R = 6.94$ min

Elementaranalyse:

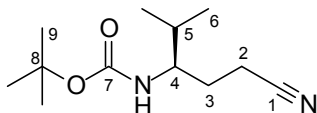
C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₂	Ber.	C 64.26	H 8.99	N 12.49
(224.30)	Gef.	C 64.04	H 9.25	N 12.86

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₂ [M+H] ⁺	225.1603	225.1564

(4*R*)-4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-5-methyl-hexannitril (**47**)

Eine Lösung von 2.77 g **46** (12.3 mmol) in 40 ml MeOH wurde in Gegenwart von 138 mg Pd/C (10 %) unter Wasserstoffatmosphäre bis zum vollständigen Umsatz (DC-Kontrolle) gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators über Celite und säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 8:2) wurden 2.41 g **47** (10.6 mmol, 87 % d. Th.) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f(\mathbf{47}) = 0.19$ (Hexan:EE 8:2)



47

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 0.88 (d, $^3J_{6,5}$ = 6.8 Hz, 3 H, 6-H), 0.91 (d, $^3J_{6',5}$ = 6.8 Hz, 3 H, 6'-H), 1.42 (s, 9 H, 9-H), 1.59 (m, 1 H, 3-H_a), 1.71 (m, 1 H, 5-H), 1.89 (m, 1 H, 3-H_b), 2.35 (ddd, $^2J_{2a,2b}$ = 16.9 Hz, $^3J_{2a,3a/b}$ = 8.3 Hz, $^3J_{2a,3a/b}$ = 7.0 Hz, 1 H, 2-H_a), 2.41 (ddd, $^2J_{2b,2a}$ = 16.9 Hz, $^3J_{2b,3a/b}$ = 8.8 Hz, $^3J_{2a,3a/b}$ = 6.4 Hz, 1 H, 2-H_b), 3.43 (dddd, $^3J_{4,3a/b} \approx ^3J_{4,NH}$ = 10.3 Hz, $^3J_{4,5}$ = 5.5 Hz, $^3J_{4,3a/b}$ = 3.5 Hz, 1 H, 4-H), 4.32 (d, $^3J_{NH,4}$ = 8.8 Hz, 1 H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ = 14.6 (t, C-2), 17.8 (q, C-6), 19.1 (q, C-6'), 28.3 (q, C-9), 29.2 (t, C-3), 32.3 (d, C-5), 55.2 (d, C-4), 79.6 (s, C-8), 119.8 (s, C-1), 156.0 (s, C-7).

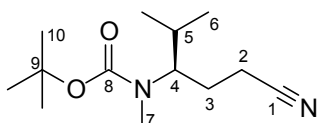
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +5.1^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)**Schmelzpunkt:** 65 °C**Elementaranalyse:**

C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₂	Ber.	C 63.69	H 9.80	N 12.38
(226.32)	Gef.	C 63.62	H 9.36	N 12.59

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₂ H ₂₃ N ₂ O ₂ [M+H] ⁺	227.1759	227.1747

(4R)-4-(tert.-Butoxycarbonyl-methylamino)-5-methyl-hexannitril (48)

Eine Lösung von 2.39 g **47** (10.6 mmol) in 40 ml absolutem DMF wurde mit 2.6 ml Methyljodid (41.8 mmol, 3.9 Äq.) versetzt. Bei 0 °C wurde eine Suspension von 964 mg Natriumhydrid (55-65%, 22.1-26.1 mmol, 2.1-2.5 Äq.) in 10 ml DMF abs. zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt, in 200 ml Wasser und 50 ml gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen und nach kräftigem Rühren mit Essigsäureethylester extrahiert. Säulenchromatographische Reinigung (Hexan:EE 8:2) ergab 2.51 g des Produktes **48** (10.4 mmol, 98 %) als farbloses Öl.

R_f(48) = 0.18 (Hexan:EE 8:2)

48

Das Rotamerenverhältnis bei Raumtemperatur beträgt etwa 1:1.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 0.83 (d, ³J_{6,5} = 7.0 Hz, 3 H, 6-H), 0.85 (d, ³J_{6,5} = 6.8 Hz, 3 H, 6'-H), 0.93 (d, ³J_{6',5} = 6.5 Hz, 3 H, 6'-H), 0.94 (d, ³J_{6',5} = 6.5 Hz, 3 H, 6'-H), 1.43 (s, 9 H, 10-H), 1.45 (s, 9 H, 10-H), 1.62-1.75 (sh, 4 H, 3-H_a, 5-H), 1.91-2.03 (sh, 2 H, 3-H_b), 2.12-2.34 (sh, 4 H, 2-H_a, 2-H_b), 2.64 (s, 6 H, 7-H), 3.62 (bs, 1 H, 4-H), 3.68 (ddd, ³J_{4,3a/b} ≈ ³J_{4,5} = 10.8 Hz, ³J_{4,3a/b} = 3.3 Hz, 1 H, 4-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 14.5 (t, C-2), 19.6, 19.8, 20.0, 20.1 (4 q, C-6, C-6'), 25.9 (t, C-3), 28.4 (q, C-10), 28.8 (q, C-7), 30.3, 30.5 (2 d, C-5), 60.8, 61.1 (2 d, C-4), 79.7, 80.2 (2 s, C-9), 119.3, 119.7 (2 s, C-1), 156.3, 156.6 (2 s, C-8).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +7.0^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

Elementaranalyse:

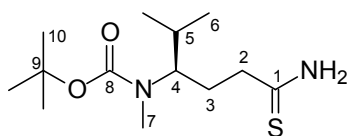
C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₂	Ber.	C 64.97	H 10.06	N 11.66
(240.35)	Gef.	C 65.14	H 9.91	N 11.50

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₃ H ₂₅ N ₂ O ₂ [M+H] ⁺	241.1916	241.1922

(4R)-4-(tert.-Butoxycarbonyl-methylamino)-5-methyl-hexanthioamid (49)

Durch eine Lösung von 1.85 g Nitril **48** (7.70 mmol) und 5.4 ml Triethylamin (38.4 mmol, 5.0 Äq.) in 15 ml Chloroform wurde bei -78 °C H₂S 1 h lang durchgeleitet.^[95] Das Reaktionsgefäß wurde fest verschlossen, über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt und mehrere Tage bei Raumtemperatur gerührt, wobei es sich gelb bis grün färbte. Zur Aufarbeitung wurde mit 1 M HCl-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Hexan:EE 1:1) ergab 1.94 g Thioamid **49** (7.07 mmol, 92 % d. Th.) als weißen Feststoff.

R_f(**49**) = 0.33 (Hexan:EE 1:1)



49

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.82 (d, ³J_{6,5} = 6.5 Hz, 3 H, 6-H), 0.93 (d, ³J_{6',5} = 6.8 Hz, 3 H, 6'-H), 1.44 (s, 9 H, 10-H), 1.60 (m, 1 H, 5-H), 1.70 (dddd, ²J_{3a,3b} = 14.6 Hz, ³J_{3a,4} = 12.3 Hz, ³J_{3a,2b} = 6.8 Hz, ³J_{3a,2a} = 3.5 Hz, 1 H, 3-H_a), 2.04 (dddd, ²J_{3b,3a} = 14.6 Hz, ³J_{3b,2a} = 11.0 Hz, ³J_{3b,2b} ≈ ³J_{3b,4} = 3.0 Hz,

1 H, 3-H_b), 2.39 (ddd, $^2J_{2a,2b} = 12.6$ Hz, $^3J_{2a,3b} = 11.0$ Hz, $^3J_{2a,3a} = 3.5$ Hz, 1 H, 2-H_a), 2.61 (s, 3 H, 7-H), 2.73 (dddd, $^2J_{2b,2a} = 12.6$ Hz, $^3J_{2b,3a} = 6.8$ Hz, $^3J_{2b,3b} = 3.5$ Hz, $^4J_{2b,4} = 1.5$ Hz, 1 H, 2-H_b), 3.68 (ddd, $^3J_{4,3a} = 12.3$ Hz, $^3J_{4,5} = 10.3$ Hz, $^3J_{4,3b} = 2.5$ Hz, 1 H, 4-H), 7.48 (bs, 1 H, NH), 8.71 (bs, 1 H, NH').

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.42$ (s, 9 H, 10-H), 2.24 (m, 1 H, 3-H_b), 2.43-2.57 (sh, 2 H, 2-H_a, 2-H_b), 2.65 (s, 3 H, 7-H), 3.61 (bs, 1 H, 4-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 19.9$ (q, C-6), 20.2 (q, C-6'), 27.9 (q, C-7), 28.4 (q, C-10), 28.7 (t, C-3), 29.8 (d, C-5), 41.9 (t, C-2), 60.0 (d, C-4), 80.2 (s, C-9), 158.0 (s, C-8), 210.4 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 19.9$ (q, C-6), 28.5 (q, C-10), 41.5 (t, C-2), 79.8 (s, C-9), 153.3 (s, C-8), 211.6 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20.7^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

Elementaranalyse:

C ₁₃ H ₂₆ N ₂ O ₂ S	Ber.	C 56.90	H 9.55	N 10.21
(274.42)	Gef.	C 57.04	H 9.25	N 10.10

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₃ H ₂₇ N ₂ O ₂ S [M+H] ⁺	275.1793	275.1769

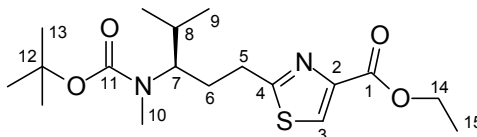
(R)-2-[3-(tert.-Butoxycarbonyl-methylamino)-4-methyl-pentyl]-thiazol-4-carbonsäureethylester (50)

Zu einer Lösung von 1.37 g Thioamid **49** (4.99 mmol, 1.0 Äq.) in 7.5 ml trockenem Aceton wurden 770 μl Brom-brenztraubensäure-ethylester (90 %, 5.52 mmol, 1.1 Äq.) bei -10°C zugetropft.^[35] Nach 1.5 h wurde das Reaktionsgemisch in eine kräftig rührende Mischung aus Dichlormethan und gesättigter KHCO₃-Lösung (je 25 ml) gegossen und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Dichlormethan am Rotationsverdampfer entfernt.

Das Hydroxythiazolin-Zwischenprodukt wurde in 6 ml trockenem Dichlormethan gelöst und bei -20°C mit 890 μl Pyridin (11.0 mmol, 2.2 Äq.) versetzt, anschließend wurden 1.05 ml Trifluoressigsäureanhydrid (5.49 mmol, 1.1 Äq.) zugetropft.^[35] Das Reaktionsgemisch wurde innerhalb von 2 h auf 0°C erwärmt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Dichlormethan verdünnt und zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigte organische Phase wurde mit 1 M KHSO₄-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet.

Das Thiazol **50** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 8:2, 7:3, 1:1) als schwach gelbliches Öl erhalten (1.56 g, 4.22 mmol, 84 % d. Th., >99 % ee).

$R_f(\mathbf{50}) = 0.49$ (Hexan:EE 1:1); 0.23 (Hexan:EE 7:3)



50

Das Rotamerenverhältnis beträgt bei Raumtemperatur 54:46.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

1. Rotamer

$\delta = 0.83$ (d, $^3J_{9,8} = 6.8$ Hz, 3 H, 9-H), 0.93 (d, $^3J_{9',8} = 6.5$ Hz, 3 H, 9'-H), 1.38 (t, $^3J_{15,14} = 7.2$ Hz, 3 H, 15-H), 1.44 (s, 9 H, 13-H), 1.65 (m, 1 H, 8-H), 1.82 (m, 1 H, 6-H_a), 2.12 (m, 1 H, 6-H_b), 2.63 (s, 3 H, 10-H), 2.95 (t, $^3J_{5,6} = 8.1$ Hz, 2 H, 5-H), 3.82 (m, 1 H, 7-H), 4.40 (q, $^3J_{14,15} = 7.2$ Hz, 2 H, 14-H), 8.03 (s, 1 H, 3-H).

2. Rotamer (zum Teil liegen die Signale unter denen des 1. Rotamers)

$\delta = 0.94$ (d, $^3J_{9',8} = 6.8$ Hz, 3 H, 9'-H), 1.38 (t, $^3J_{15,14} = 7.0$ Hz, 3 H, 15-H), 1.41 (s, 9 H, 13-H), 2.68 (s, 3 H, 10-H), 2.94 (t, $^3J_{5,6} = 7.9$ Hz, 2 H, 5-H), 3.63 (bs, 1 H, 7-H), 4.39 (q, $^3J_{14,15} = 7.0$ Hz, 2 H, 14-H), 8.01 (s, 1 H, 3-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

1. Rotamer

$\delta = 14.4$ (q, C-15), 19.6 (q, C-9), 19.9 (q, C-9'), 28.2 (q, C-10), 28.5 (q, C-13), 30.0 (t, C-6), 30.5 (d, C-8), 30.7 (t, C-5), 60.3 (d, C-7), 61.4 (t, C-14), 79.6 (s, C-12), 128.6 (d, C-3), 147.0 (s, C-2), 156.6 (s, C-11), 161.4 (s, C-1), 171.7 (s, C-4).

Ausgewählte Signale des 2. Rotamers

$\delta = 20.1$ (q, C-9), 20.3 (q, C-9'), 30.1 (t, C-6), 30.7 (t, C-5), 30.8 (d, C-8), 61.4 (t, C-14), 79.2 (s, C-12), 126.9 (d, C-3), 146.8 (s, C-2), 156.4 (s, C-11), 161.5 (s, C-1), 171.4 (s, C-4).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -13.3^\circ$ (c = 1.0, CHCl_3)

HPLC: Chiralcel OD-H, Hexan:iPrOH 9:1, 1 ml/min

(S)-**50**: $t_R = 6.91$ min

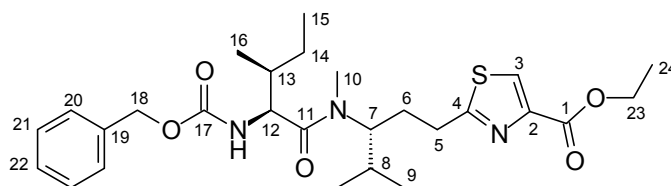
(R)-**50**: $t_R = 9.12$ min

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$	371.2004	371.1964

(R)-2-{3-[(N-Benzyloxycarbonyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonsäureethylester (51)

Nach **AAV 4** wurden 1.11 g der Boc-geschützten Thiazol-aminosäure **50** (3.00 mmol) entschützt und anschließend mit 876 mg *Z*-*L*-Isoleucin (3.30 mmol, 1.1 Äq.), 905 mg BEP (3.30 mmol, 1.1 Äq.) und 2.04 ml DIPEA (12.0 mmol, 4.0 Äq.) nach **AAV 2** umgesetzt. Säulenchromatographische Reinigung (Hexan:EE 7:3, 1:1) ergab 1.42 g des Dipeptids **51** (2.64 mmol, 88 % d. Th.) als gelbes Öl.

$R_f(\mathbf{51}) = 0.34$ (Hexan:EE 1:1)

**51**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 0.75$ (d, $^3J_{9,8} = 6.5$ Hz, 3 H, 9-H), 0.86 (t, $^3J_{15,14} = 7.4$ Hz, 3 H, 15-H), 0.95 (d, $^3J_{16,13} = 6.5$ Hz, 3 H, 16-H), 0.96 (d, $^3J_{9',8} = 6.5$ Hz, 3 H, 9'-H), 1.11 (ddq, $^2J_{14a,14b} = 13.6$ Hz, $^3J_{14a,13} = 9.7$ Hz, $^3J_{14a,15} = 7.3$ Hz, 1 H, 14-H_a), 1.37 (t, $^3J_{24,23} = 7.0$ Hz, 3 H, 24-H), 1.57 (dq, $^2J_{14b,14a} = 13.6$ Hz, $^3J_{14b,15} = 7.6$ Hz, $^3J_{14b,13} = 3.0$ Hz, 1 H, 14-H_b), 1.63-1.79 (sh, 2 H, 8-H, 13-H), 1.88 (m, 1 H, 6-H_a), 2.14 (m, 1 H, 6-H_b), 2.83 (dt, $^2J_{5a,5b} = 15.2$ Hz, $^3J_{5a,6} = 6.3$ Hz, 1 H, 5-H_a), 2.89 (dt, $^2J_{5b,5a} = 15.2$ Hz, $^3J_{5b,6} = 6.3$ Hz, 1 H, 5-H_b), 2.94 (s, 3 H, 10-H), 4.32 (m, 1 H, 7-H), 4.39 (q, $^3J_{23,24} = 7.0$ Hz, 1 H, 23-H), 4.52 (dd, $^3J_{12,\text{NH}} = 9.5$ Hz, $^3J_{12,13} = 6.8$ Hz, 1 H, 12-H), 5.05 (d, $^2J_{18a,18b} = 12.4$ Hz, 1 H, 18-H_a), 5.08 (d, $^2J_{18b,18a} = 12.4$ Hz, 1 H, 18-H_b), 5.40 (d, $^3J_{\text{NH},12} = 9.5$ Hz, 1 H, NH_{lle}), 7.18-7.36 (sh, 5-H, arom.-H), 8.01 (s, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.04$ (d, $^3J_{9',8} = 6.8$ Hz, 3 H, 9'-H), 2.23 (m, 1 H, 6-H_a), 2.74 (s, 3 H, 10-H), 3.58 (ddd, $^3J_{7,6a/b} \approx ^3J_{7,8} = 10.2$ Hz, $^3J_{7,6a/b} = 3.3$ Hz, 1 H, 7-H), 4.57 (dd, $^3J_{12,\text{NH}} = 9.6$ Hz, $^3J_{12,13} = 6.3$ Hz, 1 H, 12-H), 7.98 (s, 1 H, 3-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 11.2$ (q, C-15), 14.3 (q, C-24), 16.0 (q, C-16), 19.5 (q, C-9), 20.0 (q, C-9'), 23.8 (t, C-14), 29.4 (q, C-10), 29.7 (t, C-6), 30.1 (d, C-8), 30.6 (t, C-5), 37.4 (d, C-13), 55.7 (d, C-12), 59.1 (d, C-7), 61.3 (t, C-23), 66.7 (t, C-18), 126.9 (d, C-3), 127.8 (d, C-20/21), 128.0 (d, C-22), 128.4 (d, C-20/21), 136.4 (t, C-19), 146.9 (s, C-2), 156.4 (s, C-17), 161.3 (s, C-1), 170.9 (s, C-4), 173.3 (s, C-11).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.3$ (q, C-15), 16.1 (q, C-16), 20.3 (q, C-9), 20.4 (q, C-9'), 23.5 (t, C-14), 27.3 (q, C-10), 29.8 (t, C-6), 31.3 (t, C-5), 37.8 (d, C-13), 55.2 (d, C-12), 62.6 (d, C-7), 66.9 (t, C-18), 128.4 (d, C-20/21), 136.3 (t, C-19), 156.2 (s, C-17), 170.5 (s, C-4), 172.5 (s, C-11).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -22.9^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3)

Elementaranalyse:

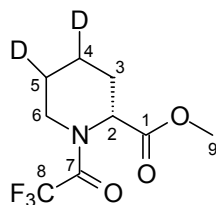
$\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	Ber.	C 62.64	H 7.59	N 8.12
(517.68)	Gef.	C 62.30	H 7.61	N 8.24

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_5\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$	518.2689	518.2721

(R)-N-(Trifluoracetyl)-4,5-dideutero-pipecolinsäure-methylester ((R)-d₂-52)

Nach **AAV 8** wurden 356 mg des TFA-geschützten Baikiain-methylester (*R*)-**7** (1.50 mmol, 97 % ee) mit 36 mg Pd/C (5 %) unter Deuteriumatmosphäre umgesetzt. Es wurden 344 mg (1.43 mmol, 95 % d. Th.) der deuterierten Pipecolinsäure (*R*)-d₂-**52** als farbloses Öl erhalten.

$R_f(\mathbf{52}) = 0.36$ (Hexan:EE 8:2)

**(R)-d₂-52**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 1.35$ (m, 0.5 H, 4- $\text{H}_{\text{ax}}(1/2)$), 1.47 (m, 0.5 H, 5- $\text{H}_{\text{ax}}(1/2)$), 1.64-1.79 (sh, 2 H, 3- H_{ax} , 4- $\text{H}_{\text{eq}}(1/2)$, 5- $\text{H}_{\text{eq}}(1/2)$), 2.31 (d, $^2J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.3$ Hz, 1 H, 3- H_{eq}), 3.30 (dd, $^2J_{6\text{ax},6\text{eq}} \approx ^3J_{6\text{ax},5\text{ax}} = 13.6$ Hz (falls 5- D_{eq}) bzw. dd, $^2J_{6\text{ax},6\text{eq}} = 13.5$ Hz, $^3J_{6\text{ax},5\text{eq}} = 3.0$ Hz (falls 5- D_{ax}), 1 H, 6- H_{ax}), 3.74 (s, 3 H, 9-H), 3.91 (d, $^2J_{6\text{eq},6\text{ax}} = 13.8$ Hz, 1 H, 6- H_{eq}), 5.23 (d, $^3J_{2,3\text{ax}} = 5.5$ Hz, 1 H, 2-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 2.93$ (dd, $^2J_{6\text{ax},6\text{eq}} \approx ^3J_{6\text{ax},5\text{ax}} = 13.3$ Hz (falls 5- D_{eq}) bzw. d, $^2J_{6\text{ax},6\text{eq}} = 13.5$ Hz (falls 5- D_{ax}), 1 H, 6- H_{ax}), 3.76 (s, 3 H, 9-H), 4.44 (d, $^2J_{6\text{eq},6\text{ax}} = 13.6$ Hz, 1 H, 6- H_{eq}), 4.69 (d, $^3J_{2,3\text{ax}} = 5.5$ Hz, 1 H, 2-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 20.2$ bzw. 20.4 (t, $^1J_{4,D} = 19.7$ Hz, C-4), 24.5 bzw. 24.7 (t, $^1J_{5,D} = 19.7$ Hz, C-5), 26.3 (t, C-3), 43.6 (m, C-6), 52.6 (q, C-9), 53.4 (d, C-2), 116.4 (q, $^1J_{8,F} = 286.6$ Hz, C-8), 157.0 (q, $^2J_{7,F} = 35.7$ Hz, C-7), 170.2 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 27.3$ (t, C-3), 41.1 (t, C-6), 52.8 (q, C-9), 56.0 (d, C-2), 170.1 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +82.0^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3 , 97 % ee)

Elementaranalyse:

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{D}_2\text{F}_3\text{NO}_3$	Ber.	C 44.82	H/D 5.85	N 5.81
(241.21)	Gef.	C 44.98	H/D 5.74	N 6.17

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_8\text{H}_7\text{D}_2\text{F}_3\text{NO}_2$ $[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$	210.0711	210.0706

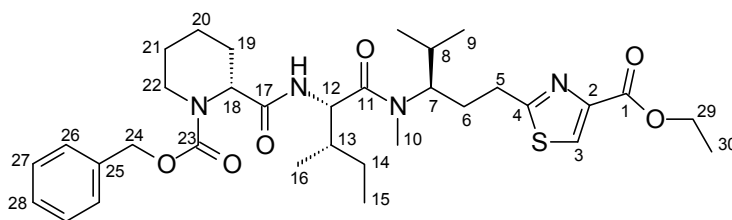
(R)-2-{3-[(N-Benzyloxycarbonyl-(R)-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonsäure-ethylester (53)

(R)-2-{3-[(N-Benzyloxycarbonyl-(R)-4,5-dideutero-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonsäure-ethylester (d_2 -53)

Mit HBr in Eisessig wurden 779 mg des Z-geschützten Dipeptids **51** (1.50 mmol) nach **AAV 5** entschützt. Das freie Amin wurde mit 434 mg Z-(R)-Pipercolinsäure (R)-**13** (1.65 mmol, 1.1 Äq., >98 % ee), 198 μl NMM (1.80 mmol, 1.2 Äq.) und 214 μl Chlorameisensäure-*iso*-butylester (1.65 mmol, 1.1 Äq.) gemäß **AAV 1** zum Tripeptid umgesetzt. Es wurden nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 6:4, 1:1, 3:7) 720 mg des Produktes **53** (1.15 mmol, 76 % d. Th., >99 % ds) als zähes Öl erhalten.

Ebenso konnte durch Verwendung von Z-(R)-4,5-Dideuteropipercolinsäure (R)- d_2 -**13** das deuterierte Tripeptid d_2 -**53** erhalten werden (84 % d. Th.).

$R_f(\mathbf{53}) = 0.18$ (Hexan:EE 1:1)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):*Hauptrotamer*

$\delta = 0.73$ (d, $^3J_{9,8} = 6.8$ Hz, 3 H, 9-H), 0.81 (m, 3 H, 15-H), 0.90 (m, 3 H, 16-H), 0.93 (d, $^3J_{9',8} = 6.8$ Hz, 3 H, 9'-H), 1.01 (m, 1 H, 14-H_a), 1.25-1.41 (sh, 2 H, 20-H_{ax}, 21-H_{ax}), 1.36 (t, $^3J_{30,29} = 7.2$ Hz, 3 H, 30-H), 1.41-1.63 (sh, 4 H, 14-H_b, 19-H_{ax}, 20-H_{eq}, 21-H_{eq}), 1.67 (m, 1 H, 8-H), 1.73 (m, 1 H, 13-H), 1.87 (m, 1 H, 6-H_a), 2.14 (m, 1 H, 6-H_b), 2.27 (d, $^2J_{19eq,19ax} = 12.8$ Hz, 1 H, 19-H_{eq}), 2.77-2.86 (sh, 2 H, 5-H_a, 22-H_{ax}), 2.89 (ddd, $^2J_{5b,5a} = 15.1$ Hz, $^3J_{5b,6a/b} = 6.2$ Hz, $^3J_{5b,6a/b} = 3.3$ Hz, 1 H, 5-H_b), 2.96 (s, 3 H, 10-H), 4.07 (bs, 1 H, 22-H_{eq}), 4.32 (m, 1 H, 7-H), 4.37 (q, $^3J_{29,30} = 7.2$ Hz, 2 H, 29-H), 4.78 (dd, $^3J_{12,NH} \approx ^3J_{12,13} = 8.3$ Hz, 1 H, 12-H), 4.87 (bs, 1 H, 18-H), 5.11 (d, $^2J_{24a,24b} = 11.6$ Hz, 1 H, 24-H_a), 5.15 (d, $^2J_{24b,24a} = 12.3$ Hz, 1 H, 24-H_b), 6.55 (bs, 1 H, NH_{lle}), 7.22-7.40 (sh, 5 H, arom.-H), 8.00 (s, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.03$ (d, $^3J_{9',8} = 6.3$ Hz, 3 H, 9'-H), 2.73 (s, 3 H, 10-H), 3.61 (m, 1 H, 7-H), 4.17 (bs, 1 H, 22-H_{eq}), 4.92 (dd, $^3J_{12,NH} = 9.6$ Hz, $^3J_{12,13} = 6.0$ Hz, 1 H, 12-H), 5.06 (d, $^2J_{24a,24b} = 12.6$ Hz, 1 H, 24-H_a), 7.95 (s, 1 H, 3-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):*Hauptrotamer*

$\delta = 11.0$ (q, C-15), 14.3 (q, C-30), 15.9 (q, C-16), 19.5 (q, C-9), 19.9 (q, C-9'), 20.4 (t, C-20), 24.1 (t, C-14), 24.7* (t, C-21), 25.9* (t, C-19), 29.3 (q, C-10), 29.7 (t, C-6), 30.1 (d, C-8), 30.6 (t, C-5), 37.1 (d, C-13), 42.2* (t, C-22), 53.6 (d, C-12), 55.2* (d, C-18), 58.9 (d, C-7), 61.3 (t, C-29), 67.6 (t, C-24), 126.9 (d, C-3), 127.8 (d, C-26/27), 128.0 (d, C-28), 128.5 (d, C-26/27), 136.3 (s, C-25), 146.9 (s, C-2), 156.4 (s, C-23), 161.3 (s, C-1), 170.3 (s, C-17), 170.8 (s, C-4), 173.2 (s, C-11).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.2$ (q, C-15), 15.2 (q, C-30), 16.2 (q, C-16), 20.3 (q, C-9), 20.5 (q, C-9'), 23.4 (t, C-14), 27.4 (q, C-10), 29.9 (d, C-8), 31.3 (t, C-5), 53.0 (d, C-12), 61.3 (t, C-29), 62.7 (d, C-7), 67.5 (t, C-24), 126.9 (d, C-3), 146.8 (s, C-2), 171.0 (s, C-4/11/17).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +3.8^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

HPLC: Lichrosorb Si-60 5 μ , Hexan:EE 8:2 – 6:4, 2 ml/min

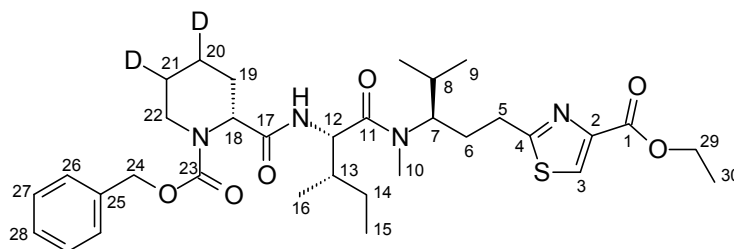
(*R,S,R*)-**53**: $t_R = 26.04$ min

(*S,S,R*)-**53**: $t_R = 28.22$ min

Elementaranalyse:

C ₃₃ H ₄₈ N ₄ O ₆ S	Ber.	C 63.03	H 7.69	N 8.91
(628.83)	Gef.	C 63.07	H 7.36	N 9.16

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₃ H ₄₉ N ₄ O ₆ S [M+H] ⁺	629.3373	629.3327

d₂-53

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.72 (d, $^3J_{9,8}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9-H), 0.80 (m, 3 H, 15-H), 0.90 (m, 3 H, 16-H), 0.93 (d, $^3J_{9',8}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9'-H), 1.02 (m, 1 H, 14-H_a), 1.27-1.39 (sh, 1 H, 20-H_{ax}(1/2), 21-H_{ax}(1/2)), 1.35 (t, $^3J_{30,29}$ = 7.2 Hz, 3 H, 30-H), 1.40-1.61 (sh, 3 H, 14-H_b, 19-H_{ax}, 20-H_{eq}(1/2), 21-H_{eq}(1/2)), 1.66 (m, 1 H, 8-H), 1.74 (m, 1 H, 13-H), 1.85 (m, 1 H, 6-H_a), 2.13 (m, 1 H, 6-H_b), 2.26 (d, $^2J_{19eq,19ax}$ = 13.6 Hz, 1 H, 19-H_{eq}), 2.80 (m, 1 H, 22-H_{ax}), 2.85 (m, 2 H, 5-H), 2.95 (s, 3 H, 10-H), 4.01 (m, 1 H, 22-H_{eq}), 4.31 (m, 1 H, 7-H), 4.36 (q, $^3J_{29,30}$ = 7.2 Hz, 2 H, 29-H), 4.78 (dd, $^3J_{12,NH} \approx ^3J_{12,13}$ = 8.2 Hz, 1 H, 12-H), 4.86 (bs, 1 H, 18-H), 5.10 (d, $^2J_{24a,24b}$ = 11.9 Hz, 1H, 24-H_a), 5.15 (d, $^2J_{24b,24a}$ = 11.9 Hz, 1 H, 24-H_b), 6.55 (bs, 1 H, NH_{IIe}), 7.23-7.39 (sh, 5 H, arom.-H), 7.99 (s, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.03 (d, $^3J_{9',8}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9'-H), 2.73 (s, 3 H, 10-H), 3.60 (m, 1 H, 7-H), 4.92 (dd, $^3J_{12,NH}$ = 9.3 Hz, $^3J_{12,13}$ = 6.0 Hz, 1 H, 12-H), 7.95 (s, 1 H, 3-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 11.0 (q, C-15), 14.3 (q, C-30), 15.9 (q, C-16), 19.5 (q, C-9), 19.9 (q, C-9'), 20.0* (m, C-20), 24.1 (t, C-14), 24.3* (m, C-21), 25.7* (t, C-19), 29.3 (q, C-10), 29.6 (t, C-6), 30.0 (d, C-8), 30.6 (t, C-5), 37.1 (d, C-13), 42.0* (t, C-22), 53.5 (d, C-12), 55.1* (d, C-18), 58.9 (d, C-7), 61.3 (t, C-29), 67.6 (t, C-24), 126.9 (d, C-3), 127.8 (d, C-26/27), 128.0 (d, C-28), 128.4 (d, C-26/27), 136.3 (s, C-25), 146.9 (s, C-2), 156.3* (s, C-23), 161.3 (s, C-1), 170.3 (s, C-17), 170.8 (s, C-4), 173.2 (s, C-11).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.2 (q, C-15), 16.1 (q, C-16), 20.3 (q, C-9), 20.5 (q, C-9'), 23.4 (t, C-14), 27.3 (q, C-10), 29.5 (t, C-6), 29.9 (d, C-8), 30.7 (t, C-5), 37.9 (d, C-13), 53.0 (d, C-12), 61.2 (t, C-29), 62.6 (d, C-7), 67.5 (t, C-24).

Elementaranalyse:

C ₃₃ H ₄₆ D ₂ N ₄ O ₆ S	Ber.	C 62.83	H/D 7.99	N 8.88
(630.84)	Gef.	C 62.34	H/D 8.17	N 8.73

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₄₀ H ₅₃ D ₂ N ₄ O ₆ S [M+C ₇ H ₇] ⁺	721.3968	721.3946

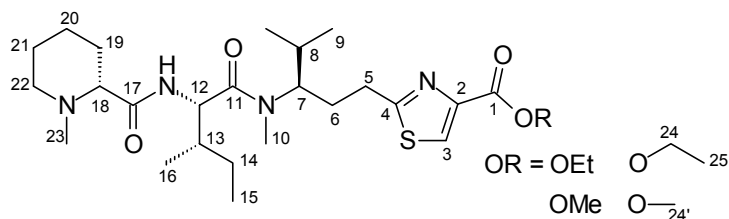
(R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonsäure-ethylester bzw. methylester (54)

(R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-4,5-dideutero-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonsäure-ethylester bzw. methylester (d₂-54)

Nach **AAV 5** wurden 155 mg Tripeptid **53** (0.246 mmol) mit 340 µl HBr/AcOH (33 Gew.%, 1.97 mmol, 8.0 Äq.) entschützt und anschließend am *N*-Terminus nach **AAV 7** mit 22.3 mg Paraformaldehyd (0.248 mmol, 1.0 Äq.) und 17.0 mg Natriumcyanoborhydrid (0.271 mmol, 1.1 Äq.) *N*-methyliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:MeOH 99:1, 98:2, 9:1) wurden 89 mg des Produkts **54** (0.178 mmol, 73 % d. Th.) als gelbliches Öl erhalten. Es entstand als ein Gemisch aus Ethyl- und Methylester (Verhältnis ~1:2.4).

Das deuterierte Produkt d₂-**54** wurde durch entsprechende Umsetzung von d₂-**53** erhalten (65 % d. Th., Verhältnis Ethylester:Methylester ~1:3.3).

R_f(53) = 0.19 (CH₂Cl₂:MeOH 9:1)



54

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.73 (d, ³J_{9,8} = 6.8 Hz, 3 H, 9-H), 0.88 (t, ³J_{15,14} = 7.4 Hz, 3 H, 15-H), 0.94 (d, ³J_{16,13} = 6.5 Hz, 3 H, 16-H), 0.95 (d, ³J_{9',8} = 6.8 Hz, 3 H, 9'-H), 1.08-1.20 (sh, 2 H, 14-H_a, 20-H_{ax}), 1.32 (m, 1 H, 19-H_{ax}), 1.37 (t, ³J_{25,24} = 7.2 Hz, theor. 3 H, hier 1 H, 25-H), 1.44-1.72 (sh, 5 H, 8-H, 14-H_b, 20-H_{eq}, 21-H), 1.76 (d, ²J_{19eq,19ax} = 13.0 Hz, 1 H, 19-H_{eq}), 1.80-1.91 (sh, 2 H, 6-H_a, 13-H), 1.98 (ddd, ²J_{22ax,22eq} ≈ ³J_{22ax,21ax} = 11.6 Hz, ³J_{22ax,21eq} = 2.8 Hz, 1 H, 22-H_{ax}), 2.13 (m, 1 H, 6-H_b), 2.20 (s, 3 H, 23-H), 2.45 (dd, ³J_{18,19ax} = 10.9 Hz, ³J_{18,19eq} = 2.7 Hz, 1 H, 18-H), 2.82-2.92 (sh, 3 H, 5-H, 22-H_{eq}), 2.98 (s, 3 H, 10-H), 3.91 (s, theor. 3 H, hier 2 H, 24'-H), 4.33 (m, 1 H, 7-H), 4.39 (q, ³J_{24,25} = 7.2 Hz, theor. 2 H, hier 0.6 Hz, 24-H), 4.74 (dd, ³J_{12,NH} = 9.5 Hz, ³J_{12,13} = 8.4 Hz, 1 H, 12-H), 7.00 (d, ³J_{NH,12} = 9.5 Hz, 1 H, NH_{Ile}), 8.01 (OEt) bzw. 8.04 (OMe) (s, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.04$ (d, $^3J_{9,8} = 6.5$ Hz, 3 H, 9'-H), 2.76 (s, 3 H, 10-H), 3.64 (m, 1 H, 7-H), 3.90 (s, theor. 3 H, 24'-H), 4.93 (dd, $^3J_{12,\text{NH}} = 9.9$ Hz, $^3J_{12,13} = 6.3$ Hz, 1 H, 12-H), 7.13 (d, $^3J_{\text{NH},12} = 9.9$ Hz, 1 H, NH_{IIe}), 7.98 (OEt) bzw. 8.00 (OMe) (s, 1 H, 3-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

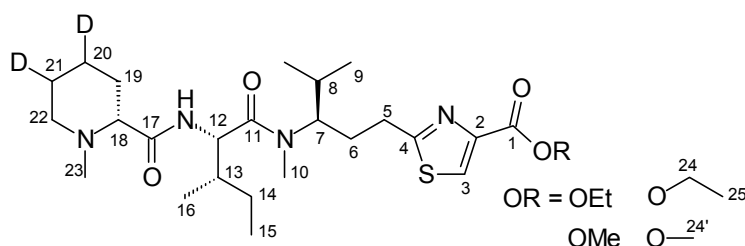
$\delta = 10.9$ (q, C-15), 14.3 (q, C-25), 16.0 (q, C-16), 19.5 (q, C-9), 20.0 (q, C-9'), 23.2 (t, C-20), 24.6 (t, C-14), 25.1 (t, C-21), 29.4 (q, C-10), 29.8 (t, C-6), 30.1 (d, C-8), 30.4 (t, C-19), 30.7 (t, C-5), 37.0 (d, C-13), 44.8 (q, C-23), 52.4 (q, C-24'), 53.0 (d, C-12), 55.4 (t, C-22), 59.0 (d, C-7), 61.4 (t, C-24), 69.7 (d, C-18), 126.9 (OEt) bzw. 127.2 (OMe) (d, C-3), 146.5 (s, C-2), 161.8 (s, C-1), 171.2 (s, C-4), 173.3 (s, C-11), 174.3 (s, C-17).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.4$ (q, C-15), 20.3 (q, C-9), 20.6 (q, C-9'), 24.1 (t, C-14), 27.4 (q, C-10), 62.8 (d, C-7), 127.7 (d, C-3), 146.9 (s, C-2), 161.4 (s, C-1).

HRMS (CI)

	Berechnet	Gefunden
-OMe C ₂₅ H ₄₃ N ₄ O ₄ S [M+H] ⁺	495.3005	495.2987
-OEt C ₂₆ H ₄₅ N ₄ O ₄ S [M+H] ⁺	509.3161	509.3132

**d₂-54**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 0.73$ (d, $^3J_{9,8} = 6.5$ Hz, 3 H, 9-H), 0.88 (t, $^3J_{15,14} = 7.4$ Hz, 3 H, 15-H), 0.94 (d, $^3J_{16,13} = 6.5$ Hz, 3 H, 16-H), 0.95 (d, $^3J_{9',8} = 6.8$ Hz, 3 H, 9'-H), 0.97-1.21 (sh, 1.5 H, 14-H_a, 20-H_{ax(1/2)}), 1.32 (m, 1 H, 19-H_{ax}), 1.37 (t, $^3J_{25,24} = 7.0$ Hz, theor. 3 H, hier ~0.8 H, 25-H), 1.47 (m, 0.5 H, 21-H_{ax(1/2)}), 1.52-1.71 (sh, 3 H, 8-H, 14-H_b, 20-H_{eq(1/2)}, 21-H_{eq(1/2)}), 1.72-1.92 (sh, 3 H, 6-H_a, 13-H, 19-H_{eq}), 1.97 (dd, $^2J_{22\text{ax},22\text{eq}} \approx ^3J_{22\text{ax},21\text{ax}} = 11.9$ Hz (falls 21-D_{eq}) bzw. dd, $^2J_{22\text{ax},22\text{eq}} = 11.3$ Hz, $^3J_{22\text{ax},21\text{eq}} = 3.0$ Hz (falls, 21-D_{ax}), 1 H, 22-H_{ax}), 2.13 (m, 1 H, 6-H_b), 2.19 (s, 3 H, 23-H), 2.44 (dd, $^3J_{18,19\text{ax}} = 11.0$ Hz, $^3J_{18,19\text{eq}} = 3.3$ Hz, 1 H, 18-H), 2.81-2.92 (sh, 3 H, 5-H, 22-H_{eq}), 2.97 (s, 3 H, 10-H), 3.91 (s, theor. 3 H, hier 2.3 H, 24'-H), 4.33 (dd, $^3J_{7,8} \approx ^3J_{7,6\text{a/b}} = 9.5$ Hz, 1 H, 7-H), 4.38 (q, $^3J_{24,25} = 7.0$ Hz, theor. 2 H, hier ~0.5 Hz, 24-H), 4.74 (dd, $^3J_{12,\text{NH}} = 9.6$ Hz, $^3J_{12,13} = 8.2$ Hz, 1 H, 12-H), 6.99 (d, $^3J_{\text{NH},12} = 9.6$ Hz, 1 H, NH_{IIe}), 8.01 (OEt) bzw. 8.03 (OMe) (s, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.04$ (d, $^3J_{9',8} = 6.5$ Hz, 3 H, 9'-H), 1.36 (t, $^3J_{25,24} = 7.0$ Hz, theor. 3 H, 25-H), 2.76 (s, 3 H, 10-H), 3.61 (m, 1 H, 7-H), 3.90 (s, theor. 3 H, 24'-H), 4.92 (dd, $^3J_{12,\text{NH}} = 9.7$ Hz, $^3J_{12,13} = 5.8$ Hz, 1 H, 12-H), 7.12 (d, $^3J_{\text{NH},12} = 9.7$ Hz, 1 H, NH_{IIc}), 7.98 (OEt) bzw. 8.00 (OMe) (s, 1 H, 3-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 11.0$ (q, C-15), 14.3 (q, C-25), 16.0 (q, C-16), 19.6 (q, C-9), 20.0 (q, C-9'), 22.8^* (m, C-20), 24.6 (t, C-14), 24.8^* (m, C-21), 29.4 (q, C-10), 29.8 (t, C-6), 30.1 (d, C-8), 30.3 (t, C-19), 30.7 (t, C-5), 37.0 (d, C-13), 44.9 (q, C-23), 52.4 (q, C-24'), 53.0 (d, C-12), 55.3 (t, C-22), 58.9 (d, C-7), 61.4 (t, C-24), 69.7 (d, C-18), 126.9 (OEt) bzw. 127.2 (OMe) (d, C-3), 146.6 (s, C-2), 161.8 (s, C-1), 171.2 (s, C-4), 173.3 (s, C-11), 174.3 (s, C-17).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.4$ (q, C-15), 16.5 (q, C-16), 20.3 (q, C-9), 20.7 (q, C-9'), 147.0 (s, C-2), 161.4 (s, C-1), 171.0 (s, C-4/11/17).

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
-OMe $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{D}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$	497.3131	497.3126
-OEt $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{D}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$	511.3287	511.3247

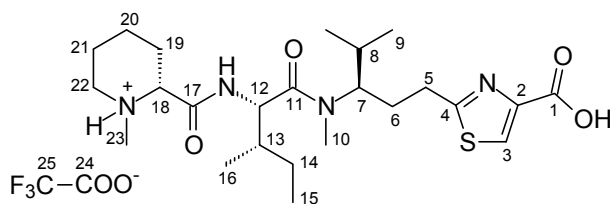
(R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonsäure-Trifluoressigsäure-Salz (55)

(R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-4,5-dideutero-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonsäure-Trifluoressigsäure-Salz (d₂-55)

Gemäß **AAV 3** wurden 71 mg des *N*-methylierten Tripeptids **54** (0.142 mmol) mit 280 μl 1 M NaOH (0.28 mmol, 2.0 Äq.) verseift und mit Trifluoressigsäure angesäuert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH_2Cl_2 :MeOH 9:1, 8:2, 7:3) wurden 63 mg des Produkts **55** (0.106 mmol, 74 % d. Th.) als weißer Feststoff erhalten.

Entsprechend konnte das deuterierte *N*-methylierte Tripeptid d₂-**54** zu d₂-**55** verseift werden (82 % d. Th.).

$R_f(\mathbf{55}) = 0.04$ (CH_2Cl_2 :MeOH 9:1)



¹H-NMR (400 MHz, MeOD):*Hauptrotamer*

δ = 0.80 (d, $^3J_{9,8}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9-H), 0.94 (t, $^3J_{15,14}$ = 7.3 Hz, 3 H, 15-H), 1.00 (d, $^3J_{9',8}$ = 6.8 Hz, 9'-H), 1.03 (d, $^3J_{16,13}$ = 6.8 Hz, 3 H, 16-H), 1.24 (ddq, $^2J_{14a,14b}$ = 13.8 Hz, $^3J_{14a,13}$ = 9.3 Hz, $^3J_{14a,15}$ = 7.3 Hz, 1 H, 14-H_a), 1.53-1.68 (sh, 2 H, 14-H_b, 20-H_{ax}), 1.71-2.07 (sh, 7 H, 6-H_a, 13-H, 18-H, 19-H_{ax}, 20-H_{eq}, 21-H), 2.15 (d, $^2J_{19eq,19ax}$ = 13.8 Hz, 1 H, 19-H_{eq}), 2.22 (m, 1 H, 6-H_b), 2.74 (s, 3 H, 23-H), 2.91 (m, 2 H, 5-H), 3.08 (dd, $^2J_{22ax,22eq} \approx ^3J_{22ax,21ax}$ = 10.5 Hz, 3.11 (s, 3 H, 10-H), 3.49 (d, $^2J_{22eq,22ax}$ = 11.0 Hz, 1 H, 22-H_{eq}), 3.78 (d, $^3J_{18,19ax}$ = 9.8 Hz, 1 H, 18-H), 4.25 (m, 1 H, 7-H), 4.70 (d, $^3J_{12,13}$ = 8.0 Hz, 1 H, 12-H), 8.23 (s, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 0.86 (d, $^3J_{9,8}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9-H), 0.91 (t, $^3J_{15,14}$ = 7.5 Hz, 3 H, 15-H), 1.11 (d, $^3J_{9',8}$ = 6.8 Hz, 9'-H), 2.79 (2 s, 6 H, 10-H, 23-H), 3.89 (m, 1 H, 7-H).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD):*Hauptrotamer*

δ = 11.2 (q, C-15), 16.1 (q, C-16), 20.3 (q, C-9), 20.4 (q, C-9'), 22.3 (t, C-20), 24.0 (t, C-21), 25.5 (t, C-14), 30.2* (q, C-10), 30.2 (t, C-19), 30.7 (t, C-6), 31.2 (d, C-8), 31.4 (t, C-5), 37.4 (d, C-13), 42.9 (q, C-23), 56.0 (d, C-12), 56.2 (t, C-22), 61.4 (d, C-7), 68.1 (d, C-18), 118.2 (q, $^1J_{25,F}$ = 290.9 Hz, C-25), 128.6 (d, C-3), 148.4 (s, C-2), 163.1 (q, $^2J_{24,F}$ = 34.3 Hz, C-24), 164.3 (s, C-1), 169.2 (s, C-17), 172.9 (s, C-4), 174.6 (s, C-11).

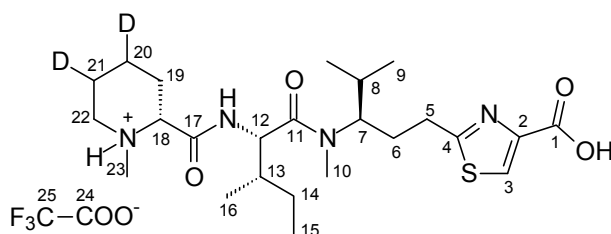
Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.7 (q, C-15), 16.4 (q, C-16), 20.9 (q, C-9'), 24.5 (t, C-21), 30.5 (t, C-6), 31.1 (d, C-8), 64.2 (d, C-7), 147.9 (s, C-2), 169.4 (s, C-17), 172.9 (s, C-4), 173.6 (s, C-11).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -15.4^\circ$ (c = 1.0, MeOH)

Schmelzpunkt: 55 °C

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₄ H ₄₁ N ₄ O ₄ S [M+H] ⁺	481.2849	481.2860



d₂-55

¹H-NMR (400 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

δ = 0.78 (d, $^3J_{9,8}$ = 6.8 Hz, 3 H, 9-H), 0.87-0.98 (sh, 6 H, 9'-H, 15-H), 1.00 (d, $^3J_{16,13}$ = 6.5 Hz, 3 H, 16-H), 1.24 (ddq, $^2J_{14a,14b}$ = 13.6 Hz, $^3J_{14a,13}$ = 9.0 Hz, $^3J_{14a,15}$ = 7.3 Hz, 1 H, 14-H_a), 1.52 (m, 0.5 H, 20-H_{ax}(1/2)), 1.61 (dq, $^2J_{14b,14a}$ = 13.6 Hz, $^3J_{14b,15}$ = 7.5 Hz, $^3J_{14b,13}$ = 2.7 Hz, 1 H, 14-H_b), 1.67-2.17 (sh, 7.5 H, 6-H, 8-H, 13-H, 19-H, 20-H_{eq}(1/2), 21-H(1/2)), 2.60 (s, 3 H, 23-H), 2.79-3.02 (sh, 3 H, 5-H, 22-H_{ax}), 3.11 (s, 3 H, 10-H), 3.35 (dd, $^2J_{22eq,22ax}$ = 12.3 Hz, $^3J_{22eq,21ax/eq}$ = 2.8 Hz, 1 H, 22-H_{eq}), 3.52 (d, $^3J_{18,19ax}$ = 10.6 Hz, 1 H, 18-H), 4.20 (bs, 1 H, 7-H), 4.72 (d, $^3J_{12,13}$ = 8.5 Hz, 1 H, 12-H), 7.98 (s, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.10 (d, $^3J_{9',8}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9'-H), 2.62 (s, 3 H, 23-H), 2.77 (s, 3 H, 10-H), 7.96 (s, 1 H, 3-H).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

δ = 11.2 (q, C-15), 16.1 (q, C-16), 20.3 (q, C-9), 20.5 (q, C-9'), 22.3* (m, C-20), 24.2* (m, C-21), 25.6 (t, C-14), 30.3 (t, C-19), 30.3* (q, C-10), 31.1 (d, C-8), 31.2 (t, C-5), 31.2 (t, C-6), 37.5 (d, C-13), 43.3 (q, C-23), 55.7 (d, C-12), 56.2 (t, C-22), 61.5* (d, C-7), 68.6 (d, C-18), 118.2 (q, $^1J_{25,F}$ = 291.4 Hz, C-25), 124.7 (d, C-3), 154.0 (s, C-2), 163.0 (q, $^2J_{24,F}$ = 34.0 Hz, C-24), 168.1 (s, C-1), 170.7 (s, C-17), 172.3 (s, C-4), 174.7 (s, C-11).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.6 (q, C-15), 16.4 (q, C-16), 20.9 (q, C-9), 30.4 (t, C-19), 38.5 (d, C-13), 43.4 (q, C-23), 124.4 (d, C-3), 173.4 (s, C-11).

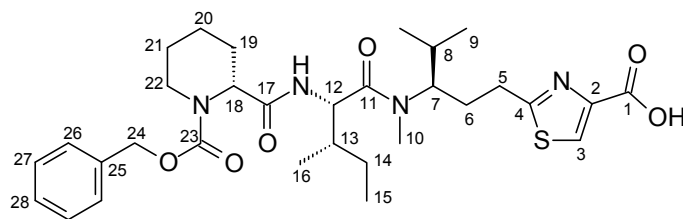
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₃ H ₃₉ D ₂ N ₄ O ₂ S [M-CO ₂] ⁺	438.2998	438.2984

(R)-2-{3-[(N-Benzyloxycarbonyl-(R)-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-4-methylpentyl}-thiazol-4-carbonsäure (56)

(R)-2-{3-[(N-Benzyloxycarbonyl-(R)-4,5-dideutero-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-4-methylpentyl}-thiazol-4-carbonsäure (d₂-56)

Nach **AAV 3** wurden 554 mg des Tripeptids **53** (0.881 mmol) mit 1.32 ml 1 M NaOH (1.32 mmol, 1.5 Äq.) verseift. Es entstanden 518 mg der freien Säure **56** (0.862 mmol, 98 % d. Th.) als farbloser glasartiger Feststoff.

Ebenso wurde das deuterierte Tripeptid d₂-**53** zu d₂-**56** entschützt (96 % d. Th.).



56

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.74 (d, $^3J_{9,8}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9-H), 0.81 (m, 3 H, 15-H), 0.88-0.98 (sh, 6 H, 9'-H, 16-H), 1.06 (m, 1 H, 14-H_a), 1.24-1.74 (sh, 7 H, 8-H, 14-H_b, 19-H_{ax}, 20-H, 21-H), 1.78-1.95 (sh, 2 H, 6-H_a, 13-H), 2.13 (m, 1 H, 6-H_b), 2.29 (d, $^2J_{19eq,19ax}$ = 13.3 Hz, 1 H, 19-H_{eq}), 2.83 (m, 1 H, 22-H_{ax}), 2.87 (t, $^3J_{5,6}$ = 7.8 Hz, 2 H, 5-H), 3.02 (s, 3 H, 10-H), 4.07 (bs, 1 H, 22-H_{eq}), 4.37 (m, 1 H, 7-H), 4.81 (dd, $^3J_{12,NH} \approx ^3J_{12,13}$ = 8.7 Hz, 1 H, 12-H), 4.90 (bs, 1 H, 18-H), 5.12 (d, $^2J_{24a,24b}$ = 12.5 Hz, 1 H, 24-H_a), 5.17 (d, $^2J_{24b,24a}$ = 12.5 Hz, 1 H, 24-H_b), 6.85 (bs, 1 H, NH), 7.23-7.37 (sh, 5 H, arom.-H), 8.10 (s, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.03 (d, $^3J_{9',8}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9'-H), 2.73 (s, 3 H, 10-H), 3.64 (m, 1 H, 7-H), 4.14 (bs, 1 H, 22-H_{eq}), 6.95 (bs, 1 H, NH), 8.06 (s, 1 H, 3-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 10.8 (q, C-15), 15.8 (q, C-16), 19.5 (q, C-9), 19.9 (q, C-9'), 20.4 (t, C-20), 24.3 (t, C-14), 24.8* (t, C-21), 26.0* (t, C-19), 29.6 (t, C-6), 30.2 (d, C-8), 30.4 (t, C-5), 36.7* (d, C-13), 42.1* (t, C-22), 53.8 (d, C-12), 55.1* (d, C-18), 59.1 (d, C-7), 67.6 (t, C-24), 127.6, 127.8, 128.0 (3 d, C-26, C-27, C-28), 128.4 (d, C-3), 136.4 (s, C-25), 146.5 (s, C-2), 163.2 (s, C-1), 170.5 (s, C-5), 170.8 (s, C-17), 174.0 (s, C-11).

Die Signale von C-10 und C-23 sind nicht zu sehen.

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.2 (q, C-15), 16.1 (q, C-16), 20.2 (q, C-9), 20.5 (q, C-9'), 23.6 (t, C-14), 27.6 (q, C-10), 53.1 (d, C-12), 62.8 (d, C-7).

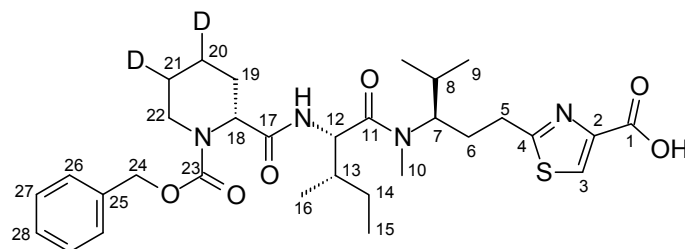
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +6.5^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

Schmelzpunkt: 78-80 °C

Elementaranalyse:

C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₆ S	Ber.	C 61.98	H 7.38	N 9.33
(600.78)	Gef.	C 61.92	H 7.47	N 9.39

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₀ H ₄₅ N ₄ O ₄ S [M-CO ₂ +H] ⁺	557.3162	557.3186

d₂-56

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.73 (m, 3 H, 9-H), 0.80 (m, 3 H, 15-H), 0.90 (m, 3 H, 16-H), 0.92 (d, ³J_{9',8} = 6.5 Hz, 3 H, 9'-H), 1.06 (m, 1 H, 14-H_a), 1.19-1.73 (sh, 5 H, 8-H, 14-H_b, 19-H_{ax}, 20-H(1/2), 21-H(1/2)), 1.76-1.95 (sh, 2 H, 6-H_a, 13-H), 2.12 (m, 1 H, 6-H_b), 2.27 (d, ²J_{19eq,19ax} = 13.6 Hz, 1 H, 19-H_{eq}), 2.83 (m, 1 H, 22-H_{ax}), 2.86 (t, ³J_{5,6} = 7.9 Hz, 2 H, 5-H), 3.01 (s, 3 H, 10-H), 4.05 (bs, 1 H, 22-H_{eq}), 4.35 (m, 1 H, 7-H), 4.80 (dd, ³J_{12,NH} ≈ ³J_{12,13} = 8.8 Hz, 1 H, 12-H), 4.89 (bs, 1 H, 18-H), 5.10 (d, ²J_{24a,24b} = 12.6 Hz, 1H, 24-H_a), 5.16 (d, ²J_{24b,24a} = 12.6 Hz, 1 H, 24-H_b), 7.05 (bs, 1 H, NH_{IIe}), 7.20-7.36 (sh, 5 H, arom.-H), 8.09 (s, 1 H, 3-H), 10.23 (bs, 1 H, COOH).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.02 (d, ³J_{9',8} = 6.5 Hz, 3 H, 9'-H), 2.73 (s, 3 H, 10-H), 3.67 (m, 1 H, 7-H), 4.12 (bs, 1 H, 22-H_{eq}), 8.04 (s, 1 H, 3-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 10.8 (q, C-15), 15.8 (q, C-16), 19.5 (q, C-9), 19.8* (m, C-20), 19.9 (q, C-9'), 24.3 (t, C-14), 24.4* (m, C-21), 26.0* (t, C-19), 29.5* (q, C-10), 29.6 (t, C-6), 30.1 (d, C-8), 30.4 (t, C-5), 36.6 (d, C-13), 41.9 (t, C-22), 53.8 (d, C-12), 55.1* (d, C-18), 59.1 (d, C-7), 67.5 (t, C-24), 127.7, 127.9, 127.9, 128.4 (4 d, C-3, C-26, C-27, C-28), 136.4 (s, C-25), 146.6 (s, C-2), 156.4 (s, C-23), 163.3 (s, C-1), 170.5 (s, C-4), 170.8 (s, C-17), 174.0 (s, C-11).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.1 (q, C-15), 16.1 (q, C-16), 20.2 (q, C-9), 20.5 (q, C-9'), 27.6 (q, C-10), 62.8 (d, C-7).

HRMS (CI)

C₃₁H₄₃D₂N₄O₆S [M+H]⁺

Berechnet

603.3185

Gefunden

603.3160

((R)-2-{3-[(N-Benzoyloxycarbonyl-(R)-pipecolyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-(S)-phenylalanin-methylester (57)

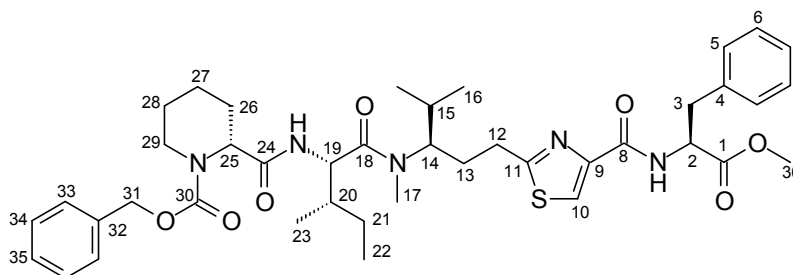
((R)-2-{3-[(N-Benzoyloxycarbonyl-(R)-4,5-dideutero-pipecolyl-(S)-isoleucyl)-methyl-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-(S)-phenylalanin-methylester (d₂-57)

Es wurden 120 mg Tripeptid **56** (0.200 mmol) und 47 mg (*L*)-Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid (0.218 mmol, 1.1 Äq.) mit 28 µl Chlorameisensäure-*iso*-butylester (0.216

mmol, 1.1 Äq.) und 2 x 24 µl NMM (0.437 mmol, 2.2 Äq.) nach **AAV 1** zum Tetrapeptid **57** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 1:1, 4:6, 3:7) wurden 136 mg (0.178 mmol, 89 % d. Th.) eines festen Schaums erhalten.

Entsprechende Umsetzung des deuterierten Tripeptids d₂-**56** lieferte das deuterierte Tetrapeptid d₂-**57** (88 % d. Th.).

R_f(56) = 0.41 (Hexan:EE 3:7); 0.19 (Hexan:EE 1:1)



57

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.76 (d, ³J_{16,15} = 6.5 Hz, 3 H, 16-H), 0.83 (m, 3 H, 22-H), 0.93 (m, 3 H, 23-H), 0.97 (d, ³J_{16',15} = 6.5 Hz, 3 H, 16'-H), 1.03 (m, 1 H, 21-H_a), 1.18-1.89 (sh, 9 H, 13-H_a, 15-H, 20-H, 21-H_b, 26-H_{ax}, 27-H, 28-H), 2.15 (m, 1 H, 13-H_b), 2.30 (d, ²J_{26eq,26ax} = 13.6 Hz, 1 H, 26-H_{eq}), 2.71-2.90 (sh, 3 H, 12-H, 29-H_{ax}), 2.97 (s, 3 H, 17-H), 3.20 (d, ³J_{3,2} = 6.0 Hz, 2 H, 3-H), 3.71 (s, 3 H, 36-H), 4.09 (bs, 1 H, 29-H_{eq}), 4.31 (dd, ³J_{14,15} ≈ ³J_{14,13a/b} = 9.9 Hz, 1 H, 14-H), 4.81 (dd, ³J_{19,NH} ≈ ³J_{19,20} = 8.3 Hz, 1 H, 19-H), 4.89 (bs, 1 H, 25-H), 5.02 (dt, ³J_{2,NH} = 8.3 Hz, ³J_{2,3} = 6.0 Hz, 1 H, 2-H), 5.12 (d, ²J_{31a,31b} = 12.4 Hz, 1H, 31-H_a), 5.17 (d, ²J_{31b,31a} = 12.4 Hz, 1 H, 31-H_b), 6.57 (bs, 1 H, NH_{lle}), 7.15 (m, 2 H, 5-H) 7.18-7.37 (sh, 8 H, arom.-H), 7.72 (d, ³J_{NH,2} = 8.3 Hz, 1 H, NH_{Phe}), 7.92 (s, 1 H, 10-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.06 (d, ³J_{16',15} = 6.5 Hz, 3 H, 16'-H), 3.63 (m, 1 H, 14-H), 3.68 (s, 1 H, 36-H), 4.18 (bs, 1 H, 29-H_{eq}), 4.96 (dd, ³J_{19,NH} = 9.3 Hz, ³J_{19,20} = 6.0 Hz, 1 H, 19-H), 6.60 (d, ³J_{NH,19} = 9.3 Hz, 1 H, NH_{lle}), 7.89 (s, 1 H, 10-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 11.1 (q, C-22), 15.9 (q, C-23), 19.6 (q, C-16), 20.0 (q, C-16'), 20.4 (t, C-27), 24.1 (t, C-21), 24.8* (t, C-28), 25.9* (t, C-26), 29.1 (t, C-13), 29.4* (q, C-17), 30.1 (d, C-15), 30.2 (t, C-12), 37.1 (d, C-20), 38.2 (t, C-3), 42.2* (t, C-29), 52.3 (q, C-36), 53.2 (d, C-2), 53.6 (d, C-19), 55.0* (d, C-25), 58.9* (d, C-14), 67.6 (t, C-31), 123.0 (d, C-10), 127.0 (d, C-7), 127.8 (d, C-33/34), 128.1 (d, C-35), 128.5 (2 d, C-6, C-33/34), 129.3 (d, C-5), 136.0 (s, C-4), 136.3 (s, C-32), 149.1 (s, C-9), 160.6 (s, C-8), 170.0 (s, C-11), 170.4 (s, C-24), 171.8 (s, C-1), 173.2 (s, C-18).

Das Signal von C-30 ist nicht zu sehen.

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.2$ (q, C-22), 16.2 (q, C-23), 53.0 (d, C-2), 171.1 (s, C-1/11/18/24).

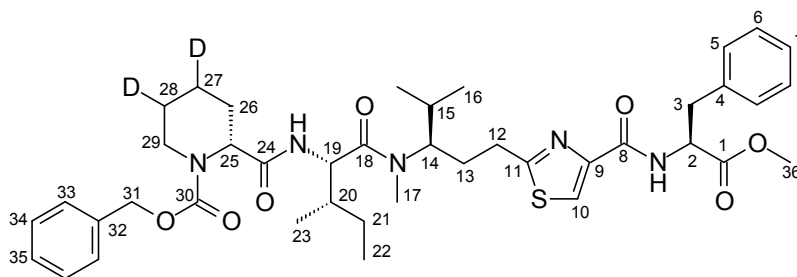
Schmelzpunkt: 47 °C

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +21.2^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

Elementaranalyse:

C ₄₁ H ₅₅ N ₅ O ₇ S	Ber.	C 64.63	H 7.28	N 9.19
(761.98)	Gef.	C 64.68	H 7.14	N 8.77

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₄₁ H ₅₆ N ₅ O ₇ S [M+H] ⁺	762.3900	762.3870



d₂-57

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 0.75$ (d, $^3J_{16,15} = 6.5$ Hz, 3 H, 16-H), 0.82 (m, 3 H, 22-H), 0.93 (m, 3 H, 23-H), 0.96 (d, $^3J_{16',15} = 6.5$ Hz, 3 H, 16'-H), 1.07 (m, 1 H, 21-H_a), 1.19-1.64 (sh, 4 H, 21-H_b, 26-H_{ax}, 27-H(1/2), 28-H(1/2)), 1.65-1.89 (sh, 3 H, 13-H_a, 15-H, 20-H), 2.14 (m, 1 H, 13-H_b), 2.28 (d, $^2J_{26eq,26ax} = 13.5$ Hz, 1 H, 26-H_{eq}), 2.70-2.89 (sh, 3 H, 12-H, 29-H_{ax}), 2.96 (s, 3 H, 17-H), 3.19 (d, $^3J_{3,2} = 6.0$ Hz, 2 H, 3-H), 3.69 (s, 3 H, 36-H), 4.07 (bs, 1 H, 29-H_{eq}), 4.31 (m, 1 H, 14-H), 4.80 (dd, $^3J_{19,NH} \approx ^3J_{19,20} = 8.3$ Hz, 1 H, 19-H), 4.89 (bs, 1 H, 25-H), 5.01 (dt, $^3J_{2,NH} = 8.3$ Hz, $^3J_{2,3} = 6.0$ Hz, 1 H, 2-H), 5.11 (d, $^2J_{31a,31b} = 12.4$ Hz, 1H, 31-H_a), 5.16 (d, $^2J_{31b,31a} = 12.4$ Hz, 1 H, 31-H_b), 6.57 (bs, 1 H, NH_{ile}), 7.14 (dd, $^3J_{5,6} = 7.3$ Hz, $^4J_{5,7} = 1.5$ Hz, 2 H, 5-H) 7.17-7.40 (sh, 8 H, arom.-H), 7.72 (d, $^3J_{NH,2} = 8.3$ Hz, 1 H, NH_{phe}), 7.91 (s, 1 H, 10-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.05$ (d, $^3J_{16',15} = 6.5$ Hz, 3 H, 16'-H), 3.67 (s, 1 H, 36-H), 4.16 (bs, 1 H, 29-H_{eq}), 4.95 (dd, $^3J_{19,NH} = 9.7$ Hz, $^3J_{19,20} = 6.3$ Hz, 1 H, 19-H), 6.61 (d, $^3J_{NH,19} = 9.7$ Hz, 1 H, NH_{ile}), 7.88 (s, 1 H, 10-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 11.0$ (q, C-22), 15.9 (q, C-23), 19.6 (q, C-16), 20.0 (q, C-16'), 20.0* (m, C-27), 24.1 (t, C-21), 24.4* (m, C-28), 25.4* (t, C-26), 29.0 (t, C-13), 29.3 (q, C-17), 30.1 (d, C-15), 30.2 (t, C-12), 37.1 (d, C-20), 38.1 (t, C-3), 42.1* (t, C-29), 52.2 (q, C-36), 53.1 (d, C-2), 53.6 (d, C-19), 55.2* (d, C-25), 58.8 (d, C-14), 67.6 (t, C-31), 123.0 (d, C-10), 127.0 (d, C-7), 127.8 (d, C-33/34), 128.0 (d, C-35), 128.5 (2 d, C-6, C-33/34), 129.2 (d, C-5), 135.9 (s, C-4), 136.3 (s, C-32), 149.0 (s, C-9), 155.5* (s, C-30), 160.5 (s, C-8), 170.0 (s, C-11), 170.4 (s, C-24), 171.7 (s, C-1), 173.2 (s, C-18).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.2$ (q, C-22), 16.2 (q, C-23), 20.3 (q, C-16), 20.5 (q, C-16'), 23.5 (t, C-21), 27.3 (q, C-17), 29.6 (d, C-15), 30.5 (t, C-12), 53.0 (d, C-2), 54.3 (d, C-19), 62.7 (d, C-14), 67.5 (t, C-31), 123.2 (d, C-10).

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{D}_2\text{N}_5\text{O}_7\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$	764.4026	764.4079

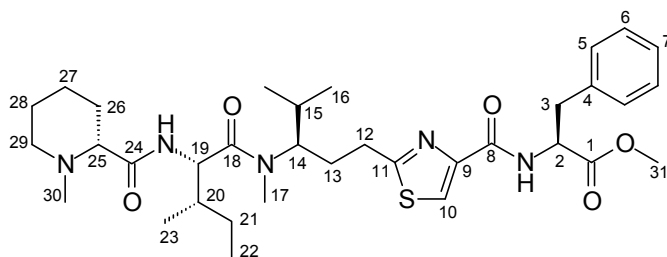
((R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-(S)-phenylalanin-methylester (58)

((R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-4,5-dideutero-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-(S)-phenylalanin-methylester (d_2 -58)

Nach **AAV 5** wurden 99 mg Tetrapeptid **57** (0.130 mmol) mit 180 μl HBr/AcOH (33 Gew.%, 1.04 mmol, 8.0 Äq.) entschützt und anschließend am N-Terminus nach **AAV 7** mit 11.8 mg Paraformaldehyd (0.131 mmol, 1.0 Äq.) und 9.0 mg Natriumcyanoborhydrid (0.143 mmol, 1.1 Äq.) N-methyliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH_2Cl_2 : MeOH 99:1, 98:2, 9:1) wurden 40 mg des Produkts **58** (0.0623 mmol, 48 % d. Th.) als gelbliches Öl erhalten.

Das deuterierte Produkt d_2 -**58** wurde durch entsprechende Umsetzung von d_2 -**57** erhalten (72 % d. Th.).

$R_f(\mathbf{58}) = 0.28$ (CH_2Cl_2 :MeOH 9:1)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):*Hauptrotamer*

δ = 0.74 (d, $^3J_{16,15}$ = 6.5 Hz, 3 H, 16-H), 0.87 (t, $^3J_{22,21}$ = 7.4 Hz, 3 H, 22-H), 0.94 (2 d, $^3J_{16',15}$ = $^3J_{23,20}$ = 6.8 Hz, 3 H, 16'-H, 23-H), 0.98-1.24 (sh, 2 H, 21-H_a, 27-H_{ax}), 1.34 (ddd, $^2J_{26ax,26eq} \approx ^3J_{26ax,25} \approx ^3J_{26ax,27ax}$ = 11.2 Hz, 1 H, 26-H_{ax}), 1.42-1.73 (sh, 5 H, 15-H, 21-H_b, 27-H_{eq}, 28-H), 1.73-1.90 (sh, 3 H, 13-H, 20-H, 26-H_{eq}), 1.98 (dd, $^2J_{29ax,29eq} \approx ^3J_{29ax,28ax}$ = 10.0 Hz, 1 H, 29-H_{ax}), 2.12 (dddd, $^2J_{13b,13a}$ = 14.3 Hz, $^3J_{13b,12a/b}$ = 10.0 Hz, $^3J_{13b,12a/b}$ = 6.8 Hz, $^3J_{13b,14}$ = 3.4 Hz, 1 H, 13-H_b), 2.20 (s, 3 H, 30-H), 2.46 (d, $^3J_{25,26ax}$ = 9.8 Hz, 1 H, 25-H), 2.71-2.92 (sh, 3 H, 12-H, 29-H_{eq}), 2.97 (s, 3 H, 17-H), 3.19 (d, $^3J_{3,2}$ = 6.0 Hz, 2 H, 3-H), 3.69 (s, 3 H, 31-H), 4.31 (m, 1 H, 14-H), 4.75 (dd, $^3J_{19,NH} \approx ^3J_{19,20}$ = 8.8 Hz, 1 H, 19-H), 5.00 (dt, $^3J_{2,NH}$ = 8.3 Hz, $^3J_{2,3}$ = 6.0 Hz, 1 H, 2-H), 7.02 (d, $^3J_{NH,19}$ = 9.0 Hz, 1 H, NH_{1e}), 7.12-7.27 (sh, 5 H, arom.-H), 7.73 (d, $^3J_{NH,2}$ = 8.3 Hz, 1 H, NH_{Ph}), 7.91 (s, 1 H, 10-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.05 (d, $^3J_{16',15}$ = 6.8 Hz, 3 H, 16'-H), 3.63 (m, 1 H, 14-H), 4.93 (dd, $^3J_{19,NH}$ = 9.2 Hz, $^3J_{19,20}$ = 5.9 Hz, 1 H, 19-H), 7.88 (s, 1 H, 10-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):*Hauptrotamer*

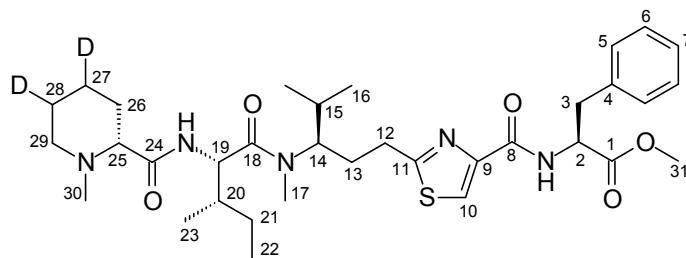
δ = 10.9 (q, C-22), 15.9 (q, C-23), 19.5 (q, C-16), 20.1 (q, C-16'), 23.2 (t, C-27), 24.5 (t, C-21), 25.0 (t, C-28), 29.1 (t, C-13), 29.5* (q, C-17), 30.1 (d, C-15), 30.2 (t, C-12), 30.3 (t, C-26), 37.0 (d, C-20), 38.1 (t, C-3), 44.8 (q, C-30), 52.2 (q, C-31), 53.0 (d, C-19), 53.1 (d, C-2), 55.3 (t, C-29), 58.7* (d, C-14), 69.6 (d, C-25), 123.0 (d, C-10), 127.0 (d, C-7), 128.5 (d, C-6), 129.2 (d, C-5), 136.0 (s, C-4), 149.0 (s, C-9), 160.6 (s, C-8), 170.1 (s, C-11), 171.7 (s, C-1), 173.2 (s, C-18), 174.2 (s, C-24).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.3 (q, C-22), 16.5 (q, C-23), 20.3 (q, C-16), 20.6 (q, C-16'), 24.1 (t, C-21), 27.2 (q, C-17), 38.4 (t, C-3), 52.1 (q, C-31), 53.2, 53.4 (2 d, C-2, C-19), 123.1 (d, C-10), 169.9 (s, C-11), 172.9 (s, C-18).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +23.6^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₄ H ₅₂ N ₅ O ₅ S [M+H] ⁺	642.3689	642.3729

d₂-58

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.75 (d, $^3J_{16,15}$ = 6.8 Hz, 3 H, 16-H), 0.88 (t, $^3J_{22,21}$ = 7.4 Hz, 3 H, 22-H), 0.96 (d, $^3J_{23,20}$ = 6.8 Hz, 3 H, 23-H), 0.96 (d, $^3J_{16',15}$ = 6.8 Hz, 3 H, 16'-H), 1.08-1.20 (sh, 1.5 H, 21-H_a, 27-H_{ax}(1/2)), 1.33 (m, 1 H, 26-H_{ax}), 1.42-1.91 (sh, 6.5 H, 13-H_a, 15-H, 20-H, 21-H_b, 26-H_{eq}, 27-H_{eq}(1/2), 28-H(1/2)), 1.97 (m, 1 H, 29-H_{ax}), 2.14 (m, 1 H, 13-H_b), 2.20 (s, 3 H, 30-H), 2.45 (dd, $^3J_{25,26ax}$ = 11.2 Hz, $^3J_{25,26eq}$ = 3.4 Hz, 1 H, 25-H), 2.72-2.89 (sh, 3 H, 12-H, 29-H_{eq}), 2.98 (s, 3 H, 17-H), 3.20 (d, $^3J_{3,2}$ = 6.1 Hz, 2 H, 3-H), 3.70 (s, 3 H, 31-H), 4.32 (m, 1 H, 14-H), 4.76 (dd, $^3J_{19,NH} \approx ^3J_{19,20}$ = 8.8 Hz, 1 H, 19-H), 5.01 (dt, $^3J_{2,NH}$ = 8.3 Hz, $^3J_{2,3}$ = 6.1 Hz, 1 H, 2-H), 7.01 (d, $^3J_{NH,19}$ = 9.5 Hz, 1 H, NH_{IIe}), 7.15 (d, $^3J_{5,6}$ = 6.8 Hz, 2 H, 5-H) 7.21 (t, $^3J_{7,6}$ = 7.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.26 (dd, $^3J_{6,5} \approx ^3J_{6,7}$ = 6.9 Hz, 2 H, 6-H), 7.73 (d, $^3J_{NH,2}$ = 8.3 Hz, 1 H, NH_{Phe}), 7.92 (s, 1 H, 10-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 0.96 (d, $^3J_{16',15}$ = 6.8 Hz, 3 H, 16'-H), 2.77 (s, 3 H, 17-H), 3.64 (m, 1 H, 14-H), 3.69 (s, 1 H, 31-H), 4.94 (dd, $^3J_{19,NH}$ = 9.7 Hz, $^3J_{19,20}$ = 5.9 Hz, 1 H, 19-H), 7.89 (s, 1 H, 10-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 11.0 (q, C-22), 16.0 (q, C-23), 19.6 (q, C-16), 20.1 (q, C-16'), 23.0* (m, C-27), 24.6 (t, C-21), 24.8* (m, C-28), 29.1 (t, C-13), 29.5* (q, C-17), 30.1 (d, C-15), 30.3 (t, C-12), 30.3 (t, C-26), 37.1 (d, C-20), 38.2 (t, C-3), 44.9 (q, C-30), 52.3 (q, C-31), 53.0 (d, C-19), 53.2 (d, C-2), 55.3 (t, C-29), 58.8* (d, C-14), 69.7 (d, C-25), 123.0 (d, C-10), 127.1 (d, C-7), 128.5 (d, C-6), 129.3 (d, C-5), 136.0 (s, C-4), 149.1 (s, C-9), 160.6 (s, C-8), 170.2 (s, C-11), 171.8 (s, C-1), 173.3 (s, C-18), 174.3 (s, C-24).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.4 (q, C-22), 16.5 (q, C-23), 20.4 (q, C-16), 20.7 (q, C-16'), 27.3 (q, C-17), 38.4 (t, C-3), 52.1 (q, C-31), 62.8 (d, C-14), 123.1 (d, C-10).

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₄ H ₅₀ D ₂ N ₅ O ₅ S [M+H] ⁺	644.3815	644.3808

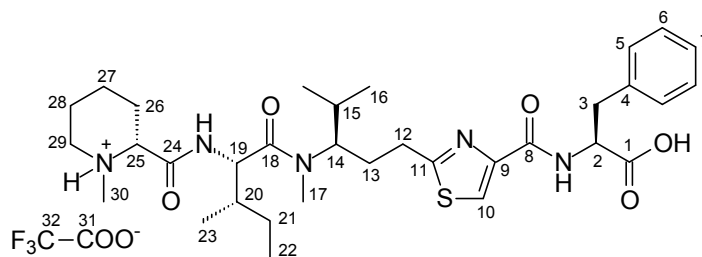
((R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-pipecolyl-(S)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-(S)-phenylalanin-Trifluoressigsäure-Salz (59)

((R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-4,5-dideutero-pipecolyl-(S)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-(S)-phenylalanin-Trifluoressigsäure-Salz (d₂-59)

Gemäß AAV 3 wurden 40 mg des *N*-methylierten Tetrapeptids **58** (62.3 μmol) mit 100 μl 1 M NaOH (100 μmol, 1.6 Äq.) verseift und mit Trifluoressigsäure angesäuert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:MeOH 9:1, 8:2) wurde das TFA-Salz **59** in quantitativer Ausbeute als weißer Feststoff erhalten.

Entsprechend konnte das deuterierte *N*-methylierte Tetrapeptid d₂-**58** zu d₂-**59** verseift werden (quant.).

R_f(59) = 0.10 (CH₂Cl₂:MeOH 9:1)



59

¹H-NMR (400 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

δ = 0.79 (d, ³J_{16,15} = 6.5 Hz, 3 H, 16-H), 0.91 (t, ³J_{22,21} = 7.4 Hz, 3 H, 22-H), 0.97 (d, ³J_{16',15} = 6.5 Hz, 3 H, 16'-H), 1.01 (d, ³J_{23,20} = 6.8 Hz, 3 H, 23-H), 1.21 (ddq, ²J_{21a,21b} = 13.6 Hz, ³J_{21a,20} = 9.4 Hz, ³J_{21a,22} = 7.3 Hz, 1 H, 21-H_a), 1.52-1.69 (sh, 2 H, 21-H_b, 27-H_{ax}), 1.71-2.05 (sh, 7 H, 13-H_a, 15-H, 20-H, 26-H_{ax}, 27-H_{eq}, 28-H), 2.10-2.27 (sh, 2 H, 26-H_{eq}, 13-H_b), 2.73 (s, 3 H, 30-H), 2.80-3.00 (sh, 2 H, 12-H_a, 12-H_b), 3.06 (m, 1 H, 29-H_{ax}), 3.07 (s, 3 H, 17-H), 3.20 (dd, ²J_{3a,3b} = 13.8 Hz, ³J_{3a,2} = 6.8 Hz, 1 H, 3-H_a), 3.33 (m, 1 H, 3-H_b (unter MeOD)), 3.48 (d, ²J_{29eq,29ax} = 12.3 Hz, 1 H, 29-H_{eq}), 3.78 (d, ³J_{25,26ax} = 11.6 Hz, 1 H, 25-H), 4.21 (bs, 1 H, 14-H), 4.69 (d, ³J_{19,20} = 7.5 Hz, 1 H, 19-H), 4.85 (m, 1 H, 2-H (unter H₂O)), 7.15-7.30 (sh, 5 H, arom.-H), 8.04 (s, 1 H, 10-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.09 (d, ³J_{16',15} = 6.3 Hz, 3 H, 16'-H), 2.34 (m, 1 H, 13-H_b), 2.55 (s, 3 H, 30-H), 2.65 (s, 3 H, 17-H), 3.70 (dd, ³J_{14,13a/b} ≈ ³J_{14,15} = 9.0 Hz, 1 H, 14-H), 3.84 (d, ³J_{25,26ax} = 12.0 Hz, 1 H, 25-H), 7.97 (s, 1 H, 10-H).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

δ = 11.4 (q, C-22), 16.1 (q, C-23), 20.3 (q, C-16), 20.5 (q, C-16'), 22.3 (t, C-27), 24.0 (t, C-28), 25.4 (t, C-21), 30.0 (t, C-13), 30.2 (t, C-26), 30.4* (q, C-17), 31.0 (t, C-12), 31.2 (d, C-

15), 37.5 (d, C-20), 38.5 (t, C-3), 42.8 (q, C-30), 55.2 (d, C-2), 56.1 (d, C-19; t, C-29), 60.9* (d, C-14), 68.1 (d, C-25), 118.2 (q, $^1J_{32,F} = 289.5$ Hz, C-32), 124.6 (d, C-10), 127.9 (d, C-7), 129.4 (d, C-6), 130.5 (d, C-5), 138.2 (s, C-4), 150.0 (s, C-9), 162.7 (s, C-8), 163.0 (q, $^2J_{31,F} = 32.8$ Hz, C-31), 169.2 (s, C-24), 172.2 (s, C-11), 174.4 (s, C-18), 174.7 (s, C-1).

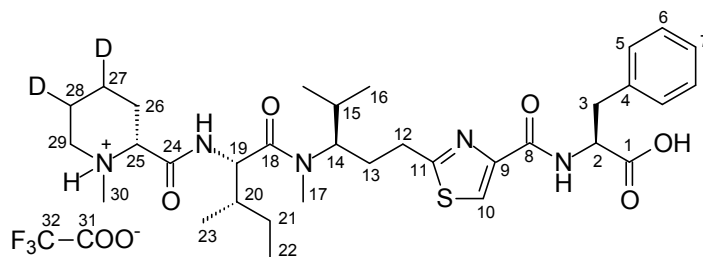
Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.7$ (q, C-22), 16.5 (q, C-23), 20.6 (q, C-16), 20.9 (q, C-16'), 24.5 (t, C-21), 28.3 (q, C-17), 38.7 (t, C-3), 43.0 (q, C-30), 55.3 (d, C-2), 64.8 (d, C-14), 124.8 (d, C-10), 127.8 (d, C-7), 129.3 (d, C-6), 130.6 (d, C-5), 138.5 (s, C-4), 150.2 (s, C-9), 169.4 (s, C-24), 172.6 (s, C-11), 173.7 (s, C-18).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -1.0^\circ$ (c = 1.0, MeOH)

Schmelzpunkt: 88 °C

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₄ H ₄₂ N ₅ O ₃ S [M-C ₉ H ₇ O] ⁺	480.3008	480.2983



d₂-59

¹H-NMR (400 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

$\delta = 0.79$ (d, $^3J_{16,15} = 6.8$ Hz, 3 H, 16-H), 0.91 (t, $^3J_{22,21} = 7.4$ Hz, 3 H, 22-H), 0.97 (d, $^3J_{16',15} = 6.5$ Hz, 3 H, 16'-H), 1.01 (d, $^3J_{23,20} = 6.8$ Hz, 3 H, 23-H), 1.20 (ddq, $^2J_{21a,21b} = 13.6$ Hz, $^3J_{21a,20} = 9.6$ Hz, $^3J_{21a,22} = 7.3$ Hz, 1 H, 21-H_a), 1.56 (m, 0.5 H, 27-H_{ax}(1/2)), 1.63 (dq, $^2J_{21b,21a} = 13.6$ Hz, $^3J_{21b,22} = 7.5$ Hz, $^3J_{21b,20} = 2.8$ Hz, 1 H, 21-H_b), 1.71-2.05 (sh, 5.5 H, 13-H_a, 15-H, 20-H, 26-H_{ax}, 27-H_{eq}(1/2), 28-H(1/2)), 2.13 (ddd, $^2J_{26eq,26ax} = 14.3$ Hz, $^3J_{26eq,25} \approx ^3J_{26eq,27ax}$ bzw. eq = 3.0 Hz, 1 H, 26-H_{eq}), 2.21 (dddd, $^2J_{13b,13a} = 14.3$ Hz, $^3J_{13b,12a/b} \approx ^3J_{13b,14} = 8.5$ Hz, 1 H, 13-H_b), 2.72 (s, 3 H, 30-H), 2.80-3.00 (sh, 2 H, 12-H_a, 12-H_b), 3.06 (m, 1 H, 29-H_{ax}), 3.07 (s, 3 H, 17-H), 3.20 (dd, $^2J_{3a,3b} = 13.8$ Hz, $^3J_{3a,2} = 6.8$ Hz, 1 H, 3-H_a), 3.33 (m, 1 H, 3-H_b (unter MeOD)), 3.47 (dd, $^2J_{29eq,29ax} = 12.3$ Hz, $^3J_{29eq,28ax}$ bzw. eq = 2.8 Hz, 1 H, 29-H_{eq}), 3.77 (dd, $^3J_{25,26ax} = 12.2$ Hz, $^3J_{25,26eq} = 3.2$, 1 H, 25-H), 4.19 (bs, 1 H, 14-H), 4.70 (d, $^3J_{19,20} = 7.5$ Hz, 1 H, 19-H), 4.85 (m, 1 H, 2-H (unter H₂O)), 7.15-7.29 (sh, 5 H, arom.-H), 8.04 (s, 1 H, 10-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.10$ (d, $^3J_{16',15} = 6.5$ Hz, 3 H, 16'-H), 2.34 (m, 1 H, 13-H_b), 2.54 (s, 3 H, 30-H), 2.64 (s, 3 H, 17-H), 3.70 (ddd, $^3J_{14,13b} \approx ^3J_{14,15} = 10.3$ Hz, $^3J_{14,13a} = 2.5$ Hz, 1 H, 14-H), 3.84 (dd, $^3J_{25,26ax} = 12.0$ Hz, $^3J_{25,26eq} = 3.3$ Hz, 1 H, 25-H), 5.07 (d, $^3J_{19,20} = 5.3$ Hz, 1 H, 19-H), 7.96 (s, 1 H, 10-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

$\delta = 11.4$ (q, C-22), 16.2 (q, C-23), 20.3 (q, C-16), 20.5 (q, C-16'), 22.0 (m, C-27), 23.6 (m, C-28), 25.4 (t, C-21), 30.0 (t, C-13), 30.1 (t, C-26), 30.4* (q, C-17), 31.0 (t, C-12), 31.2 (d, C-15), 37.6 (d, C-20), 38.6 (t, C-3), 42.9 (q, C-30), 55.3 (d, C-2), 56.1, 56.2 (d, C-19; t, C-29), 60.7* (d, C-14), 68.1 (d, C-25), 118.3 (q, $^1J_{32,F} = 295.3$ Hz, C-32), 124.6 (d, C-10), 127.8 (d, C-7), 129.4 (d, C-6), 130.5 (d, C-5), 138.2 (s, C-4), 150.1 (s, C-9), 162.7 (s, C-8), 169.3 (s, C-24), 172.1 (s, C-11), 174.4 (s, C-18), 174.7 (s, C-1).

Das Signal von C-31 ist nicht zu sehen.

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.7$ (q, C-22), 16.5 (q, C-23), 20.6 (q, C-16), 20.9 (q, C-16'), 24.5 (t, C-21), 28.3 (q, C-17), 38.8 (t, C-3), 43.0 (q, C-30), 55.2 (d, C-2), 64.9 (d, C-14), 124.7 (d, C-10), 127.7 (d, C-7), 129.3 (d, C-6), 130.5 (d, C-5), 138.7 (s, C-4), 150.3 (s, C-9), 169.4 (s, C-24), 172.6 (s, C-11), 173.7 (s, C-18).

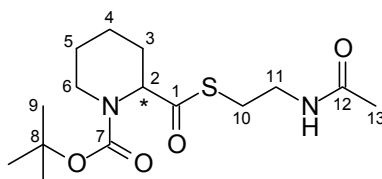
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₄ H ₅₀ D ₂ N ₅ O ₅ S [M+CH ₃] ⁺	644.3815	344.3820

(S)-N-tert.-Butoxycarbonyl-pipecolinsäure-S-(2-acetylamino-ethyl)-thioester ((S)-65)**(R)-N-tert.-Butoxycarbonyl-pipecolinsäure-S-(2-acetylamino-ethyl)-thioester ((R)-65)**

Gemäß **AAV 10** wurden 62 mg Boc-Pipecolinsäure (*S*)-**10** (0.270 mmol, >99 % ee) mit 74 mg CDI (0.456 mmol, 1.7 Äq.) und 81 mg *N*-Acetylcysteamin (0.68 mmol, 2.5 Äq.) in 2.2 ml trockenem THF umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE) wurden 86 mg des SNAC-Esters (*S*)-**65** (0.260 mmol, 96 % d. Th., 94 % ee) als farbloses Öl erhalten.

Durch entsprechende Umsetzung wurde der (*R*)-SNAC-Ester (*R*)-**65** (89 % d. Th., 94 % ee) erhalten.

R_f(65) = 0.29 (EE)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 1.23 (m, 1 H, 4-H_{ax}), 1.40 (m, 1 H, 5-H_{ax}), 1.46 (s, 9 H, 9-H), 1.53-1.67 (sh, 3 H, 3-H_{ax}, 4-H_{eq}, 5-H_{eq}), 1.93 (s, 3 H, 13-H), 2.27 (m, 1 H, 3-H_{eq}), 2.94 (dd, ²J_{6ax,6eq} ≈ ³J_{6ax,5ax} = 13.3 Hz, 1 H, 6-H_{ax}), 3.01 (t, ³J_{10,11} = 6.5 Hz, 2 H, 10-H), 3.40 (td, ³J_{11,10} ≈ ³J_{11,NH} = 6.0 Hz, 2 H, 11-H), 3.96 (d, ²J_{6eq,6ax} = 12.8 Hz, 1 H, 6-H_{eq}), 4.90 (bs, 1 H, 2-H), 5.97 (bs, 1 H, NH).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.43 (s, 9 H, 9-H), 2.84 (dd, ²J_{6ax,6eq} ≈ ³J_{6ax,5ax} = 12.6 Hz, 1 H, 6-H_{ax}), 3.01 (t, ³J_{10,11} = 6.0 Hz, 2 H, 10-H), 3.39 (td, ³J_{11,10} ≈ ³J_{11,NH} = 5.6 Hz, 2 H 11-H), 4.09 (d, ²J_{6eq,6ax} = 11.8 Hz, 1 H, 6-H_{eq}), 4.74 (bs, 1 H, 2-H), 5.86 (bs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 20.3 (t, C-4), 23.2 (q, C-13), 24.6 (t, C-5), 26.2 (t, C-3), 28.3 (q, C-9, t, C-10), 39.4 (t, C-11), 42.4 (t, C-6), 60.8 (d, C-2), 80.6 (s, C-8), 155.6 (s, C-7), 170.3 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 24.4 (t, C-5), 39.6 (t, C-11), 41.0 (t, C-6), 61.9 (d, C-2), 154.7 (s, C-7).

HPLC: Chiralcel OD-H, Hexan:EtOH 93:7, 2 ml/min

(*R*)-**65**: t_R = 3.32 min

(*S*)-**65**: t_R = 4.28 min

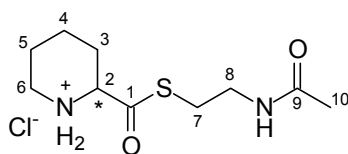
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₅ H ₂₇ N ₂ O ₄ S [M+H] ⁺	331.1692	331.1718

(*R*)-Pipicolinsäure-*S*-(2-acetylamino-ethyl)-thioester-Hydrochlorid ((*R*)-66**)**

(*S*)-Pipicolinsäure-*S*-(2-acetylamino-ethyl)-thioester-Hydrochlorid ((*S*)-66**)**

70 mg des Boc-geschützten (*R*)-Pipicolinsäure-SNAC-esters (*R*)-**65** (0.212 mmol) wurden bei 0 °C mit 1.1 ml einer 4 M HCl-Lösung in Dioxan (4.4 mmol, 21 Äq.) versetzt. Nach 1.5 h wurde das Dioxan abrotiert, wobei 50 mg eines farblosen, glasartigen Feststoffs (*R*)-**66** (0.187 mmol, 88 % d. Th.) erhalten wurden, welcher sich als sehr hygroskopisch erwies.

Ebenso wurde das entsprechende (*S*)-Enantiomer zu (*S*)-**66** entschützt (88 % d. Th.).



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ = 1.52-2.88 (sh, 5 H, 3-H_{ax}, 4-H, 5-H), 1.80 (s, 3 H, 10-H), 2.13 (m, 1 H, 3-H_{eq}), 2.88 (m, 1 H, 6-H_{ax}), 3.02 (dt, ²J_{7a,7b} = 13.3 Hz, ³J_{7a,8} = 7.1 Hz, 1 H, 7-H_a), 3.07 (dt, ²J_{7b,7a} = 13.3 Hz, ³J_{7b,8} = 6.3 Hz, 1 H, 7-H_b), 3.19-3.28 (sh, 3 H, 6-H_{eq}, 8-H), 4.28 (m, 1 H, 2-H), 8.13 (t, ³J_{NH,8} = 5.3 Hz, 1 H, NH_{NAC}), 9.14 (m, 1 H, NH⁺), 9.60 (m, 1 H, NH⁺).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ = 21.1, 21.2 (2 t, C-4, C-5), 22.5 (q, C-10), 27.2 (t, C-3), 28.2 (t, C-7), 37.7 (t, C-8), 43.4 (t, C-6), 62.3 (d, C-2), 169.4 (s, C-9), 196.3 (s, C-1).

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₀ H ₁₉ N ₂ O ₂ S [M+H] ⁺	231.1167	231.1188

(S)-N-tert.-Butoxycarbonyl-pipecolinsäure-thiophenyl-ester ((S)-67)

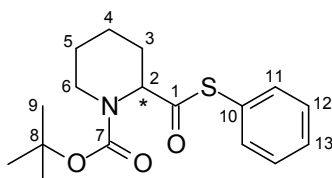
(R)-N-tert.-Butoxycarbonyl-pipecolinsäure-thiophenyl-ester ((R)-67)

Zu einer Lösung von 72 mg Boc-Pipecolinsäure (S)-**10** (0.314 mmol, >99 % ee) in 1.2 ml THF abs. wurden bei Raumtemperatur 47 µl Triethylamin (0.334 mmol, 1.07 Äq.) und anschließend bei -20 °C 43 µl Chlorameisensäure-*iso*-butylester (0.332 mmol, 1.06 Äq.) zugetropft. Nach 5 min wurde das Reaktionsgemisch auf -5 °C erwärmt und 30 min bei dieser Temperatur gerührt, wonach 35 µl Thiophenol (97 %, 0.341 mmol, 1.09 Äq.), gelöst in 0.25 ml THF abs., zugetropft wurden. Es wurde über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt.^[103]

Zur Aufarbeitung wurde das ausgefallene Triethylamin-Hydrochlorid abfiltriert, das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan:EE 95:5, 9:1) gereinigt. Es wurden 92 mg des Thiophenolesters (S)-**67** (0.286 mmol, 91 % d. Th., >99 % ee) als farbloses Öl erhalten.

Thiophenolester (R)-**67** konnte auf gleiche Weise erhalten werden (81 % d. Th., >99 % ee).

R_f(67) = 0.27 (Hexan:EE 9:1)



67

Das Rotamerenverhältnis beträgt bei Raumtemperatur 1:1.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.28-1.48 (sh, 4 H, 4-H_{ax}, 5-H_{ax}), 1.50 (s, 18 H, 9-H), 1.56-1.73 (sh, 6 H, 3-H_{ax}, 4-H_{eq}, 5-H_{eq}), 2.29 (d, ²J_{3eq,3ax} = 16.6 Hz, 1 H, 3-H_{eq}), 2.33 (d, ²J_{3eq,3ax} = 15.6 Hz, 1 H, 3-H_{eq}), 3.00 (dd, ²J_{6ax,6eq} ≈ ³J_{6ax,5ax} = 11.9 Hz, 1 H, 6-H_{ax}), 3.06 (dd, ²J_{6ax,6eq} ≈ ³J_{6ax,5ax} = 12.5 Hz, 1 H, 6-H_{ax}),

4.04 (d, $^2J_{6\text{eq},6\text{ax}} = 13.8$ Hz, 1 H, 6- H_{eq}), 4.17 (d, $^2J_{6\text{eq},6\text{ax}} = 12.6$ Hz, 1 H, 6- H_{eq}), 4.88 (bs, 1 H, 2-H), 5.10 (bs, 1 H, 2-H), 7.35-7.43 (sh, 10 h, arom.-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 20.2, 20.4$ (2 t, C-4), 24.5, 24.8 (2 t, C-5), 26.2, 26.5 (2 t, C-3), 28.4 (q, C-9), 41.1, 42.5 (2 t, C-6), 60.8, 62.0 (2 d, C-2), 80.7 (s, C-8), 127.6 (s, C-10), 129.2 (d, C-13), 129.2, 129.3 (2 d, C-11/12), 134.6, 134.8 (2 d, C-11/12), 154.7 (s, C-7), 199.2, 199.5 (2 s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +149^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3 , (*R*)-**67**)

HPLC: *Reprosil 100 Chiral-NR* 8 μm , Hexan:*i*PrOH 99:1, 1 ml/min

(*R*)-**67**: $t_{\text{R}} = 31.78$ min

(*S*)-**67**: $t_{\text{R}} = 34.29$ min

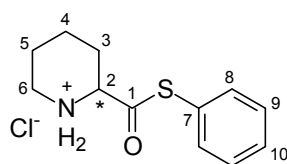
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}_3\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$	322.1477	322.1481

(*R*)-Pipicolinsäure-thiophenyl-ester-Hydrochlorid ((*R*)-**68**)

(*S*)-Pipicolinsäure-thiophenyl-ester-Hydrochlorid ((*S*)-**68**)

Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurden 72 mg des Boc-geschützten (*R*)-Pipicolinsäurethiophenolesters (*R*)-**67** (0.224 mmol) bei 0 °C mit 1.12 ml einer 4 M HCl-Lösung in Dioxan (4.48 mmol, 20 Äq.) versetzt. Nach 5 h wurde das Dioxan abrotiert und der entstandene weiße Feststoff wurde in Diethylether suspendiert, welcher anschließend abdekantiert wurde. Es wurden 56 mg des Hydrochlorids (*R*)-**68** (0.217 mmol, 97 % d. Th.) als weißer Feststoff erhalten.

Ebenso wurde das entsprechende (*S*)-Enantiomer (*S*)-**67** zu (*S*)-**68** entschützt (quant.).



68

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6):

$\delta = 1.57$ - 1.87 (sh, 5 H, 3- H_{ax} , 4-H, 5-H), 2.25 (d, $^2J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 14.2$ Hz, 1 H, 3- H_{eq}), 2.91 (dd, $^2J_{6\text{ax},6\text{eq}} = 12.1$ Hz, $^3J_{6\text{ax},5\text{ax}} = 8.7$ Hz, 1 H, 6- H_{ax}), 3.25 (d, $^2J_{6\text{eq},6\text{ax}} = 12.1$ Hz, 1 H, 6- H_{eq}), 4.45 (dd, $^3J_{2,3\text{ax}} = 11.3$ Hz, $^3J_{2,3\text{eq}} = 2.8$ Hz, 1 H, 2-H), 7.43-7.57 (sh, 5 H, arom.-H), 9.34 (bs, 1 H, NH^+), 9.76 (bs, 1 H, NH^+).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6):

$\delta = 21.0, 21.3$ (2 t, C-4, C-5), 27.0 (t, C-3), 43.5 (t, C-6), 62.1 (d, C-2), 125.0 (s, C-7), 129.7 (d, C-8/9), 130.2 (d, C-10), 134.6 (d, C-8/9), 194.5 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -43.1^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH, (*R*)-**68**)
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +49.1^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH, (*S*)-**68**)

Schmelzpunkt: 190-192 °C (Zers.)

Elementaranalyse:

C ₁₂ H ₁₆ CINOS	Ber.	C 55.91	H 6.26	N 5.43
(257.78)	Gef.	C 55.95	H 6.54	N 5.47

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂ S [M+H] ⁺	222.0953	222.0932

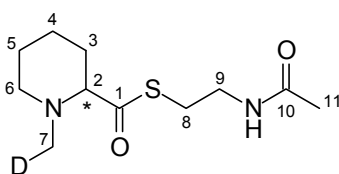
(*S*)-*N*-Deuteromethyl-pipecolinsäure-*S*-(2-acetylamino-ethyl)-thioester ((*S*)-d₁-71)

(*R*)-*N*-Deuteromethyl-pipecolinsäure-*S*-(2-acetylamino-ethyl)-thioester ((*R*)-d₁-71)

Nach **AAV 10** wurden 72 mg (*S*)-*N*-Deuteromethyl-pipecolinsäure (*S*)-d₁-**14** (0.503 mmol), suspendiert in 5 ml THF abs. und zur besseren Löslichkeit mit 39 µl TFA (0.506 mmol, 1.0 Äq.) versetzt, mit 139 mg CDI (0.857 mmol, 1.70 Äq.) und 77 mg *N*-Acetylcysteamin (0.646 mmol, 1.3 Äq.) zur Thioveresterung eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE, Alox N Aktivitätsstufe II) wurden 58 mg des SNAC-Esters (*S*)-d₁-**71** (0.237 mmol, 47 % d. Th.) als gelblicher Feststoff erhalten.

Auf die gleiche Weise konnte der SNAC-Ester (*R*)-d₁-**71** erhalten werden (60 mg, 0.246 mmol, 49 % d. Th.).

R_f(71) = 0.22 (EE, Alox N)



d₁-71

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

$\delta = 1.24$ (m, 1 H, 4-H_{ax}), 1.53-1.66 (sh, 3 H, 3-H_{ax}, 5-H), 1.73 (dddd, $^2J_{4\text{eq},4\text{ax}} = 13.1$ Hz, $^3J_{4\text{eq},3\text{ax}} \approx ^3J_{4\text{eq},3\text{eq}} \approx ^3J_{4\text{eq},5\text{ax}} \approx ^3J_{4\text{eq},5\text{eq}} = 3.8$ Hz, 1 H, 4-H_{eq}), 1.80 (dddd, $^2J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.9$ Hz, $^3J_{3\text{eq},2} \approx ^3J_{3\text{eq},4\text{ax}} \approx ^3J_{3\text{eq},4\text{eq}} = 3.4$ Hz, 1 H, 3-H_{eq}), 1.92 (s, 3 H, 11-H), 2.03 (m 1 H, 6-H_{ax}), 2.21 (s, 2 H, 7-H), 2.80 (dd, $^3J_{2,3\text{ax}} = 10.7$ Hz, $^3J_{2,3\text{eq}} = 3.4$ Hz, 1 H, 2-H), 2.94 (ddd, $^2J_{6\text{eq},6\text{ax}} = 11.5$ Hz, $^3J_{6\text{eq},5\text{ax}} \approx ^3J_{6\text{eq},5\text{eq}} = 3.6$ Hz, 1 H, 6-H_{eq}), 3.00 (t, $^3J_{8,9} = 6.4$ Hz, 2 H, 8-H), 3.40 (td, $^3J_{9,8} \approx ^3J_{9,\text{NH}} = 6.2$ Hz, 2 H, 9-H), 5.84 (bs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

$\delta = 22.9$ (t, C-4), 23.2 (q, C-11), 25.0 (t, C-5), 27.6 (t, C-8), 30.7 (t, C-3), 39.8 (t, C-9), 44.3 (t, $^1J_{7,\text{D}} = 20.4$ Hz, C-7), 55.3 (t, C-6), 75.1 (d, C-2), 170.1 (s, C-10), 203.6 (s, C-1).

Es konnte keine geeignete Trennmethode zur Bestimmung der ee-Werte mittels HPLC oder GC gefunden werden.

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -49.0^{\circ}$ ($c = 1.0$, CHCl_3 , (*S*)-**d**₁-**71**)
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +50.2^{\circ}$ ($c = 1.0$, CHCl_3 , (*R*)-**d**₁-**71**)

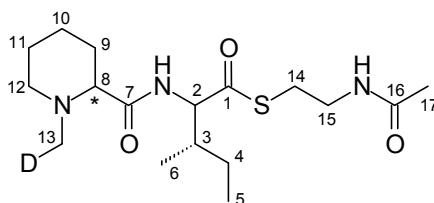
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{DN}_2\text{O}_2\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$	246.1387	246.1344

***N*-Deuteromethyl-(*R*)-pipercolyl-(*S*/*R*)-isoleucin-*S*-(2-acetylamino-ethyl)-thioester
N-Deuteromethyl-(*S*)-pipercolyl-(*S*/*R*)-isoleucin-*S*-(2-acetylamino-ethyl)-thioester
 ((*R*,*S*/*R*)-**d**₁-**73**) und ((*S*,*S*/*R*)-**d**₁-**73**)**

Nach **AAV 10** wurden 64 mg des Dipeptids (*R,S*)-**d**₁-**21** (0.249 mmol) in 2.5 ml THF abs. gelöst und mit 69 mg CDI (0.426 mmol, 1.7 Äq.) und 41 mg *N*-Acetylcysteamin (0.344 mmol, 1.4 Äq.) zur Thioveresterung eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE, Alox N Aktivitätsstufe II) wurden 65 mg des SNAC-Esters (*R,S*)-**d**₁-**73** (0.181 mmol, 73 % d. Th., Epimerisierung: (*R,S*)-**d**₁-**73**:(*R,R*)-**d**₁-**73** 2.3:1) als farbloses zähes Öl erhalten, welches nach einiger Zeit zu einem weißen Feststoff erstarrte.

Auf die gleiche Weise konnte der SNAC-Ester (*S,S*)-**d**₁-**73** erhalten werden (59 mg, 0.165 mmol, 66 % d. Th., Epimerisierung: (*S,S*)-**d**₁-**73**:(*S,R*)-**d**₁-**73** 1.9:1).

R_f(73) = 0.11 (Alox N, EE)



d₁-**73**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3):

(*R,S*)-**d**₁-**73**

$\delta = 0.90$ (t, $^3J_{5,4} = 7.2$ Hz, 3 H, 5-H), 0.96 (d, $^3J_{6,3} = 6.8$ Hz, 3 H, 6-H), 1.14 (ddq, $^2J_{4a,4b} = 13.4$ Hz, $^3J_{4a,3} = 9.6$ Hz, $^3J_{4a,5} = 7.1$ Hz, 1 H, 4- H_a), 1.23 (m, 1 H, 10- H_{ax}), 1.43 (dq, $^2J_{4b,4a} = 13.4$ Hz, $^3J_{4b,5} = 7.6$ Hz, $^3J_{4b,3} = 3.8$ Hz, 1 H, 4- H_b), 1.47 - 1.68 (sh, 3 H, 9- H_{ax} , 11-H), 1.76 (m, 1 H, 10- H_{eq}), 1.91 (m, 1 H, 9- H_{eq}), 1.93 (s, 3 H, 17-H), 1.97 - 2.12 (sh, 2 H, 3-H, 12- H_{ax}), 2.19 (s, 2 H, 13-H), 2.53 (dd, $^3J_{8,9ax} = 11.3$ Hz, $^3J_{8,9eq} = 3.5$ Hz, 1 H, 8-H), 2.92 (d, $^2J_{12eq,12ax} = 11.5$ Hz, 1 H, 12- H_{eq}), 3.01 (t, $^3J_{14,15} = 6.3$ Hz, 2 H, 14-H), 3.36 (ddt, $^2J_{15a,15b} = 14.0$ Hz, $^3J_{15a,NH} \approx ^3J_{15a,14} = 6.1$ Hz, 1 H, 15- H_a), 3.42 (ddt, $^2J_{15b,15a} = 14.0$ Hz, $^3J_{15b,NH} \approx ^3J_{15b,14} = 6.7$ Hz, 1 H, 15- H_b), 4.54 (dd, $^3J_{2,NH} = 8.8$ Hz, $^3J_{2,3} = 4.8$ Hz, 1 H, 2-H), 5.92 (bs, 1 H, NH_{NAC}), 7.10 (d, $^3J_{NH,2} = 8.8$ Hz, 1 H, NH_{Ile}).

Bei einer Verschiebung von 2.21 ppm ist das Signal von 13-H der undeuterten Verbindung (R,S)-73 als Singulett zu erkennen.

(R,R)-d₁-73 (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.85$ (d, $^3J_{6,3} = 6.8$ Hz, 3 H, 6-H), 0.92 (t, $^3J_{5,4} = 7.3$ Hz, 3 H, 5-H), 1.33 (m, 1 H, 9-H_{ax}), 2.27 (s, 2 H, 13-H), 2.52 (dd, $^3J_{8,9ax} = 11.3$ Hz, $^3J_{8,9eq} = 3.3$ Hz, 1 H, 8-H), 4.72 (dd, $^3J_{2,NH} = 9.3$ Hz, $^3J_{2,3} = 4.0$ Hz, 1 H, 2-H), 7.08 (d, $^3J_{NH,2} = 9.3$ Hz, 1 H, NH_{lle}).

Bei einer Verschiebung von 2.30 ppm ist das Signal von 13-H der undeuterten Verbindung (R,R)-73 als Singulett zu erkennen.

(S,S)-d₁-73

$\delta = 0.89$ (t, $^3J_{5,4} = 7.5$ Hz, 3 H, 5-H), 0.93 (d, $^3J_{6,3} = 6.8$ Hz, 3 H, 6-H), 1.09 (ddq, $^2J_{4a,4b} = 13.5$ Hz, $^3J_{4a,3} = 9.5$ Hz, $^3J_{4a,5} = 7.2$ Hz, 1 H, 4-H_a), 1.20 (m, 1 H, 10-H_{ax}), 1.29-1.42 (m, 2 H, 4-H_b, 9-H_{ax}), 1.49 (m, 1 H, 11-H_{ax}), 1.63 (m, 1 H, 11-H_{eq}), 1.71 (m, 1 H, 10-H_{eq}), 1.86-2.07 (sh, 3 H, 3-H, 9-H_{eq}, 12-H_{ax}), 1.92 (s, 3 H, 17-H), 2.23 (s, 2 H, 13-H), 2.50 (dd, $^3J_{8,9ax} = 11.2$ Hz, $^3J_{8,9eq} = 3.4$ Hz, 1 H, 8-H), 2.91 (d, $^2J_{12eq,12ax} = 11.5$ Hz, 1 H, 12-H_{eq}), 3.01 (m, 2 H, 14-H), 3.38 (m, 2 H, 15-H), 4.57 (dd, $^3J_{2,NH} = 8.9$ Hz, $^3J_{2,3} = 5.0$ Hz, 1 H, 2-H), 6.12 (bs, 1 H, NH_{NAC}), 7.06 (d, $^3J_{NH,2} = 8.9$ Hz, 1 H, NH_{lle}).

Bei einer Verschiebung von 2.25 ppm ist das Signal von 13-H der undeuterten Verbindung (S,S)-73 als Singulett zu erkennen.

(S,R)-d₁-73 (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.86$ (d, $^3J_{6,3} = 7.0$ Hz, 3 H, 6-H), 0.92 (t, $^3J_{5,4} = 7.3$ Hz, 3 H, 5-H), 1.75 (m, 1 H, 10-H_{eq}), 1.92 (s, 3 H, 17-H), 2.11 (m, 1 H, 3-H), 2.18 (s, 2 H, 13-H), 2.52 (dd, $^3J_{8,9ax} = 11.3$ Hz, $^3J_{8,9eq} = 3.3$ Hz, 1 H, 8-H), 4.67 (dd, $^3J_{2,NH} = 8.7$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.8$ Hz, 1 H, 2-H), 7.08 (d, $^3J_{NH,2} = 8.7$ Hz, 1 H, NH_{lle}).

Bei einer Verschiebung von 2.20 ppm ist das Signal von 13-H der undeuterten Verbindung (S,R)-73 als Singulett zu erkennen.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

(R,S)-73

$\delta = 11.6$ (q, C-5), 16.1 (q, C-6), 23.1 (q, C-17), 23.2 (t, C-10), 24.6 (t, C-4), 25.1 (t, C-11), 28.3 (t, C-14), 30.2 (t, C-9), 37.2 (d, C-3), 39.4 (t, C-15), 44.8 (m, C-13), 55.3 (t, C-12), 63.4 (d, C-2), 69.5 (d, C-8), 170.3 (s, C-16), 174.7 (s, C-7), 201.1 (s, C-1).

(R,R)-73 (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.6$ (q, C-5), 14.2 (q, C-6), 23.1 (q, C-17), 23.3 (t, C-10), 25.2 (t, C-11), 26.7 (t, C-4), 28.5 (t, C-14), 31.3 (t, C-9), 37.7 (d, C-3), 55.4 (t, C-12), 61.5 (d, C-2), 69.7 (d, C-8).

(S,S)-73

$\delta = 11.5$ (q, C-5), 15.9 (q, C-6), 23.1 (q, C-17), 23.2 (t, C-10), 24.4 (t, C-4), 25.2 (t, C-11), 28.4 (t, C-14), 31.2 (t, C-9), 37.5 (d, C-3), 39.3 (t, C-15), 44.8 (t, $^1J_{13,D} = 20.4$ Hz, C-13), 55.4 (t, C-12), 63.2 (d, C-2), 69.6 (d, C-8), 170.4 (s, C-16), 175.1 (s, C-7), 200.5 (s, C-1).

Bei einer Verschiebung von 45.1 ppm ist das Signal von C-13 der undeuterten Verbindung (*S,S*)-**73** zu erkennen.

(*S,R*)-**73** (ausgewählte Signale)

δ = 11.7 (q, C-5), 14.4 (q, C-6), 23.1 (q, C-17), 23.2 (t, C-10), 25.2 (t, C-11), 26.8 (t, C-4), 28.3 (t, C-9), 37.3 (d, C-3), 39.3 (t, C-15), 55.3 (t, C-12), 61.7 (d, C-2), 69.5 (d, C-8), 170.7 (s, C-16), 174.8 (s, C-7), 201.6 (s, C-1).

Schmelzpunkt: 95-96 °C ((*R,S/R*)-**d₁-73**)
92 °C ((*S,S/R*)-**d₁-73**)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₇ H ₃₁ DN ₃ O ₃ S [M+H] ⁺	359.2227	359.2252

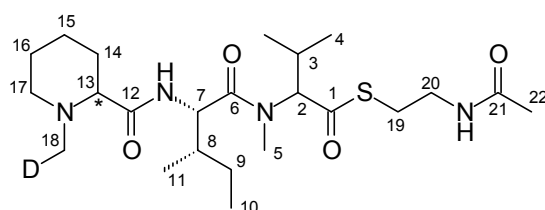
***N*-Deuteromethyl-(*R*)-pipercolyl-(*S*)-isoleucin-*N*-methyl-(*S/R*)-valin-*S*-(2-acetylaminoethyl)-thioester ((*R,S,S/R*)-**d₁-74**)**

***N*-Deuteromethyl-(*S*)-pipercolyl-(*S*)-isoleucin-*N*-methyl-(*S/R*)-valin-*S*-(2-acetylaminoethyl)-thioester ((*S,S,S/R*)-**d₁-74**)**

Nach **AAV 10** wurden 93 mg des Tripeptids (*R,S,S*)-**d₁-30** (0.251 mmol) in 2.5 ml THF abs. gelöst und mit 69 mg CDI (0.426 mmol, 1.7 Äq.) und 35 mg *N*-Acetylcysteamin (0.294 mmol, 1.2 Äq.) zur Thioveresterung eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 1:9, 5:95, 0:100, Alox N Aktivitätsstufe II) wurden 51 mg des SNAC-Esters (*R,S,S/R*)-**d₁-74** (0.108 mmol, 43 % d. Th., Epimerisierung: (*R,S,S*)-**d₁-74**:(*R,S,R*)-**d₁-74** 2.0:1) als farbloses zähes Öl erhalten.

Auf die gleiche Weise konnte der SNAC-Ester (*S,S,S/R*)-**d₁-74** erhalten werden (51 mg, 0.108 mmol, 43 % d. Th., Epimerisierung: (*S,S,S*)-**d₁-74**:(*S,S,R*)-**d₁-74** 2.6:1).

R_f(**d₁-74**) = 0.21 (Alox N, EE)



d₁-74

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

(*R,S,S*)-**d₁-74** Hauptrotamer

δ = 0.75 (d, ³J_{4,3} = 6.8 Hz, 3 H, 4-H), 0.87 (t, ³J_{10,9} = 7.5 Hz, 3 H, 10-H), 0.94 (d, ³J_{11,8} = 6.6 Hz, 3 H, 11-H), 0.96 (d, ³J_{4',3} = 6.3 Hz, 3 H, 4'-H), 1.10-1.26 (sh, 2 H, 9-H_a, 15-H_{ax}), 1.34 (m, 1 H, 14-H_{ax}), 1.43-1.81 (sh, 5 H, 9-H_b, 14-H_{eq}, 15-H_{eq}, 16-H), 1.84-2.05 (sh, 2 H, 8-H, 17-H_{ax}), 1.93 (s, 3 H, 22-H), 2.15-2.30 (sh, 3 H, 3-H, 18-H), 2.45 (bs, 1 H, 13-H), 2.90 (m, 1 H,

17-H_{eq}), 3.01 (t, ${}^3J_{19,20} = 6.3$ Hz, 2 H, 19-H), 3.03 (s, 3 H, 5-H), 3.35 (ddt, ${}^2J_{20a,20b} = 13.9$ Hz, ${}^3J_{20a,NH} \approx {}^3J_{20a,19} = 6.3$ Hz, 1 H, 20-H_a), 3.40 (ddt, ${}^2J_{20b,20a} = 13.9$ Hz, ${}^3J_{20b,NH} \approx {}^3J_{20b,19} = 6.4$ Hz, 1 H, 20-H_b), 4.71 (dd, ${}^3J_{7,NH} \approx {}^3J_{7,8} = 8.8$ Hz, 1 H, 7-H), 4.98 (d, ${}^3J_{2,3} = 10.6$ Hz, 1 H, 2-H), 5.83 (bs, 1 H, NH_{NAC}), 7.07 (bs, 1 H, NH_{IIc}).

(R,S,S)-d₁-74 Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.02$ (d, ${}^3J_{11,8} = 6.8$ Hz, 3 H, 11-H), 1.09 (d, ${}^3J_{4',3} = 6.5$ Hz, 3 H, 4'-H), 2.93 (s, 3 H, 5-H).

(R,S,R)-d₁-74 (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.82$ (d, ${}^3J_{4,3} = 6.8$ Hz, 3 H, 4-H), 1.97 (s, 3 H, 22-H), 2.71 (m, 1 H, 19-H_a), 3.00 (s, 3 H, 5-H), 3.16-3.30 (sh, 2 H, 19-H_b, 20-H_a), 3.45 (m, 1 H, 20-H_b), 4.56 (dd, ${}^3J_{7,NH} \approx {}^3J_{7,8} = 8.5$ Hz, 1 H, 7-H), 7.02 (bs, 1 H, NH_{IIc}).

(S,S,S)-d₁-74 Hauptrotamer

$\delta = 0.75$ (d, ${}^3J_{4,3} = 6.8$ Hz, 3 H, 4-H), 0.87 (t, ${}^3J_{10,9} = 7.4$ Hz, 3 H, 10-H), 0.93 (d, ${}^3J_{11,8} = 6.8$ Hz, 3 H, 11-H), 0.95 (d, ${}^3J_{4',3} = 6.6$ Hz, 3 H, 4'-H), 1.08-1.27 (sh, 2 H, 9-H_a, 15-H_{ax}), 1.33-1.67 (sh, 4 H, 9-H_b, 14-H_{ax}, 16-H), 1.72 (d, ${}^2J_{15eq,15ax} = 12.3$ Hz, 1 15-H_{eq}), 1.82-2.04 (sh, 3 H, 8-H, 14-H_{eq}, 17-H_{ax}), 1.92 (s, 3 H, 22-H), 2.09 (bs, 2 H, 18-H), 2.25 (m, 1 H, 3-H), 2.40 (m, 1 H, 13-H), 2.91 (m, 1 H, 17-H_{eq}), 3.00 (t, ${}^3J_{19,20} = 6.3$ Hz, 2 H, 19-H), 3.03 (s, 3 H, 5-H), 3.35 (ddt, ${}^2J_{20a,20b} = 13.8$ Hz, ${}^3J_{20a,NH} \approx {}^3J_{20a,19} = 6.1$ Hz, 1 H, 20-H_a), 3.39 (ddt, ${}^2J_{20b,20a} = 13.8$ Hz, ${}^3J_{20b,NH} \approx {}^3J_{20b,19} = 6.5$ Hz, 1 H, 20-H_b), 4.71 (dd, ${}^3J_{7,NH} \approx {}^3J_{7,8} = 8.5$ Hz, 1 H, 7-H), 4.99 (d, ${}^3J_{2,3} = 10.5$ Hz, 1 H, 2-H), 5.83 (bs, 1 H, NH_{NAC}), 7.11 (bs, 1 H, NH_{IIc}).

(S,S,S)-d₁-74 Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.98$ (d, ${}^3J_{11,8} = 6.8$ Hz, 3 H, 11-H), 1.09 (d, ${}^3J_{4',3} = 6.6$ Hz, 3 H, 4'-H), 2.93 (s, 3 H, 5-H).

(S,S,R)-d₁-74 (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.81$ (d, ${}^3J_{4,3} = 6.8$ Hz, 3 H, 4-H), 0.90 (d, ${}^3J_{11,8} = 6.3$ Hz, 3 H, 11-H), 1.96 (s, 3 H, 22-H), 2.70 (m, 1 H, 19-H_a), 3.02 (s, 3 H, 5-H), 3.15 (m, 1 H, 19-H_b), 3.28 (m, 2 H, 20-H), 4.56 (dd, ${}^3J_{7,NH} \approx {}^3J_{7,8} = 8.7$ Hz, 1 H, 7-H), 4.99 (d, ${}^3J_{2,3} = 10.8$ Hz, 1 H, 2-H), 7.05 (bs, 1 H, NH_{IIc}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

(R,S,S)-d₁-74 Hauptrotamer

$\delta = 10.8$ (q, C-10), 15.6 (q, C-11), 18.5 (q, C-4), 19.7 (q, C-4'), 23.2 (q, C-22), 23.2* (t, C-15), 24.7 (t, C-9), 25.0* (t, C-16), 26.5 (d, C-3), 28.4 (t, C-19), 30.4* (t, C-14), 31.4 (q, C-5), 37.2 (d, C-8), 39.5 (t, C-20), 44.7 (m, C-18), 52.7 (d, C-7), 55.3 (t, C-17), 68.0 (d, C-2), 69.5* (d, C-13), 170.1 (s, C-21), 170.7, 173.2 (2 s, C-6, C-12), 197.7 (s, C-1).

(R,S,S)-d₁-74 Nebenrotamer (ausgewähltes Signal)

$\delta = 29.7$ (q, C-5).

(R,S,R)-d₁-74 (ausgewählte Signale)

$\delta = 10.7$ (q, C-10), 18.8 (q, C-4), 19.5 (q, C-4'), 23.0 (q, C-22), 24.9 (t, C-9), 25.8 (d, C-3), 29.2 (t, C-19), 30.8 (q, C-5), 36.4 (d, C-8), 67.6 (d, C-2).

(S,S,S)-d₁-74 Hauptrotamer

δ = 10.9 (q, C-10), 15.6 (q, C-11), 18.5 (q, C-4), 19.6 (q, C-4'), 23.2 (q, C-22), 23.4 (t, C-15), 24.4 (t, C-9), 25.3 (t, C-16), 26.4 (d, C-3), 28.4 (t, C-19), 31.2* (t, C-14), 31.3 (q, C-5), 37.4 (d, C-8), 39.5 (t, C-20), 44.4 (m, C-18), 52.5 (d, C-7), 55.5 (t, C-17), 67.9 (d, C-2), 69.9 (d, C-13), 170.1 (s, C-21), 171.1, 173.1 (2 s, C-6, C-12), 197.6 (s, C-1).

(S,S,S)-d₁-74 Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 20.1 (q, C-4), 23.0 (q, C-22), 29.7 (q, C-5).

(S,S,R)-d₁-74 (ausgewählte Signale)

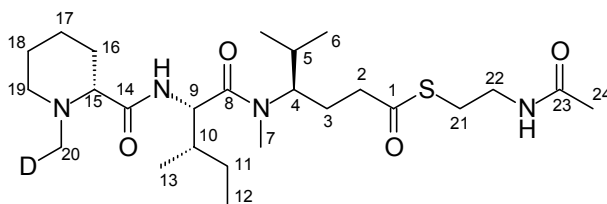
δ = 10.8 (q, C-10), 18.7 (q, C-4), 19.4 (q, C-4'), 23.1 (q, C-22), 24.8 (t, C-9), 25.8 (d, C-3), 29.0 (t, C-19), 30.8 (q, C-5), 36.5 (d, C-8), 39.4 (t, C-20), 67.5 (d, C-2), 170.6, 173.2 (2 s, C-6, C-12), 196.5 (s, C-1).

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₃ H ₄₄ N ₄ O ₄ S [M+H] ⁺	472.3068	472.3104

(4R)-4-[(N-Deuteromethyl-(R)-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-5-methylhexansäure-S-(2-acetylamino-ethyl)-thioester (d₁-75)

Gemäß AAV 11 wurden 20.2 mg d₁-45 (50.7 μ mol) mit 8.5 mg *N*-Acetylcysteamin (71.3 μ mol, 1.4 Äq.), 1.5 mg DMAP (12.3 μ mol, 0.2 Äq.) und 11.8 mg DCC (57.2 μ mol, 1.1 Äq.) zum SNAC-Ester d₁-75 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:MeOH 98:2, 96:4, 95:5, 9:1) wurden 21 mg eines farblosen, zähen Öls (36.6 μ mol, 72 % d. Th., mit ca. 10 μ mol *N*-Acetylcystamin verunreinigt, möglicherweise auch mit geringen Mengen DCU (da die Integration im Alkylbereich des ¹H-Spektrums geringfügig zu hoch war)) erhalten.

R_f(d₁-75) = 0.12 (CH₂Cl₂:MeOH 9:1)

d₁-75

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.69 (d, ³J_{6,5} = 6.8 Hz, 3 H, 6-H), 0.90 (t, ³J_{12,11} = 7.4 Hz, 3 H, 12-H), 0.95 (d, ³J_{6',5} = 6.5 Hz, 3 H, 6'-H), 1.00 (d, ³J_{13,10} = 6.8 Hz, 3 H, 13-H), 1.08-1.35 (m, 3 H, 11-H_a, 16-H_{ax}, 17-H_{ax}), 1.39-1.69 (m, 5 H, 3-H_a, 5-H, 11-H_b, 17-H_{eq}, 18-H), 1.71-1.92 (2 H, 10-H, 16-H_{eq}), 1.97 (s, 3 H, 24-H), 1.97 (m, 1 H, 19-H_{ax}), 2.12-2.23 (m, 3 H, 3-H_b, 20-H), 2.37-2.51 (m, 3 H, 2-H, 15-H), 2.83-2.88 (m, 2 H, 19-H_{eq}, 21-H_a), 2.90 (s, 3 H, 7-H), 3.16 (ddd, ²J_{21b,21a} = 13.9 Hz,

$^3J_{21b,22a/b} = 7.0$ Hz, $^3J_{21b,22a/b} = 4.9$ Hz, 1 H, 21-H_b), 3.35 (m, 1 H, 22-H_a), 3.50 (m, 1 H, 22-H_b), 4.17 (dd, $^3J_{4,3a/b} \approx ^3J_{4,5} = 9.8$ Hz, 1 H, 4-H), 4.74 (dd, $^3J_{9,NH} = 9.4$ Hz, $^3J_{9,10} = 7.9$ Hz, 1 H, 9-H), 6.70 (bs, 1 H, NH_{NAC}), 6.99 (d, $^3J_{NH,9} = 8.8$ Hz, 1 H, NH_{Ile}).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.83$ (t, $^3J_{12,11} = 7.4$ Hz, 3 H, 12-H), 1.05 (d, $^3J_{6',5} = 6.5$ Hz, 3 H, 6'-H), 1.96 (s, 3 H, 24-H), 2.68 (s, 3 H, 7-H), 4.82 (dd, $^3J_{9,NH} = 9.5$ Hz, $^3J_{9,10} = 4.5$ Hz, 1 H, 9-H), 6.89 (bs, 1 H, NH_{NAC}), 7.17 (d, $^3J_{NH,9} = 9.3$ Hz, 1 H, NH_{Ile}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 11.0$ (q, C-12), 16.1 (q, C-13), 19.6 (q, C-6), 20.0 (q, C-6'), 23.0 (q, C-24). 23.2 (t, C-17), 24.5 (2 t, C-3, C-11), 25.1 (t, C-18), 29.0 (t, C-21), 29.1 (q, C-7), 30.0 (d, C-5), 30.3 (t, C-16), 37.1 (d, C-10), 39.0 (t, C-22), 40.4 (t, C-2), 44.6 (t, $^1J_{20,D} = 20.1$ Hz, C-20), 53.0 (d, C-9), 55.3 (t, C-19), 57.9 (d, C-4), 69.5 (d, C-15), 170.5, 173.4, 174.22 (3 s, C-8, C-14, C-23), 198.5 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

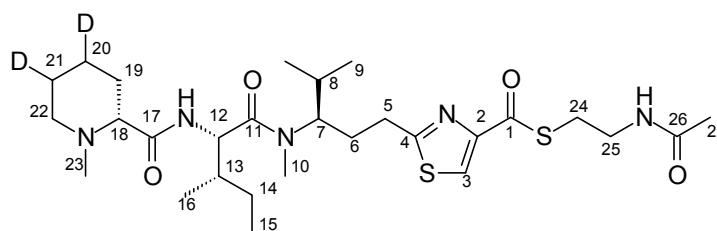
$\delta = 11.5$ (q, C-12), 16.6 (q, C-13), 20.4 (q, C-6), 23.2 (t, C-17), 170.7 (s, C-8/14/23), 199.2 (s, C-1).

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₅ H ₄₆ DN ₄ O ₄ S [M+H] ⁺	500.3381	500.3355

(R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-4,5-dideutero-pipecolyl)-(S)-isoleucyl]-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonsäure-S-(2-acetylamino-ethyl)-thioester (d₂-76)

Gemäß AAV 11 wurden 30.0 mg d₂-55 (50.3 μmol) mit 7.6 mg *N*-Acetylcystamin (63.8 μmol , 1.3 Äq.), 1.5 mg DMAP (12.3 μmol , 0.2 Äq.) und 11.6 mg DCC (56.2 μmol , 1.1 Äq.) zum SNAC-Ester d₂-76 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:MeOH 98:2, 96:4, 95:5, 9:1) wurden 16 mg eines farblosen, zähen Öls (25.4 μmol , 51 % d. Th., mit ca. 5 μmol *N*-Acetylcystamin verunreinigt) erhalten.

R_f(d₂-76) = 0.12 (CH₂Cl₂:MeOH 9:1)



d₂-76

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):*Hauptrotamer*

δ = 0.74 (d, $^3J_{9,10}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9-H), 0.89 (t, $^3J_{15,14}$ = 7.4 Hz, 3 H, 15-H), 0.96 (d, $^3J_{16,13}$ = 6.8 Hz, 16-H), 0.97 (d, $^3J_{9',10}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9'-H), 1.09-1.22 (sh, 1.5 H, 14-H_a, 20-H_{ax}(1/2)), 1.32 (m, 1 H, 19-H_{ax}), 1.48 (m, 0.5 H, 21-H_{ax}(1/2)), 1.53-1.80 (sh, 4 H, 8-H, 14-H_b, 19-H_{eq}, 20-H_{eq}(1/2), 21-H_{eq}(1/2)), 1.80-1.91 (sh, 2 H, 6-H_a, 13-H), 1.94 (s, 3 H, 27-H), 1.97 (m, 1 H, 22-H_{ax}), 2.20 (m, 1 H, 6-H_b), 2.20 (s, 3 H, 23-H), 2.46 (d, $^3J_{18,19ax}$ = 9.3 Hz, 1 H, 18-H), 2.82-2.95 (sh, 3 H, 5-H, 22-H_{eq}), 2.99 (s, 3 H, 10-H), 3.17 (t, $^3J_{24,25}$ = 6.3 Hz, 2 H, 24-H), 3.50 (dt, $^3J_{25,NH} \approx ^3J_{25,24}$ = 6.3 Hz, 25-H), 4.30 (dd, $^3J_{7,6a/b} \approx ^3J_{7,8}$ = 9.7 Hz, 1 H, 7-H), 4.75 (dd, $^3J_{12,NH} = 9.3$ Hz, $^3J_{12,13} = 8.2$ Hz, 1 H, 12-H), 5.96 (bs, 1 H, NH_{NAC}), 7.01 (d, $^3J_{NH,12} = 9.3$ Hz, 1 H, NH_{Ile}), 7.96 (s, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.08 (d, $^3J_{9',10}$ = 6.5 Hz, 3 H, 9'-H), 2.77 (s, 3 H, 10-H), 4.89 (dd, $^3J_{12,NH} = 9.6$ Hz, $^3J_{12,13} = 5.9$ Hz, 1 H, 12-H), 7.13 (d, $^3J_{NH,12} = 9.6$ Hz, 1 H, NH_{Ile}), 7.92 (s, 1 H, 3-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):*Hauptrotamer*

δ = 11.0 (q, C-15), 16.0 (q, C-16), 19.6 (q, C-9), 20.1 (q, C-9'), 22.6* (m, C-20), 23.2 (q, C-27), 24.6 (t, C-14), 24.9* (m, C-21), 28.4 (t, C-24), 29.2 (t, C-6), 29.7* (q, C-10), 30.0 (d, C-8), 30.3* (t, C-19), 30.5 (t, C-5), 37.0 (d, C-13), 39.6 (t, C-25), 44.9 (q, C-23), 53.0 (d, C-12), 55.3 (t, C-22), 58.9* (d, C-7), 69.6 (d, C-18), 123.0 (d, C-3), 152.1 (s, C-2), 170.2, 170.7, 171.0, 173.3 (4 s, C-4, C-11, C-17, C-27), 186.2 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.4 (q, C-15), 16.5 (q, C-16), 20.7 (q, C-9'), 23.2 (q, C-27), 122.9 (d, C-3), 174.2 (s, C-4/11/17/26).

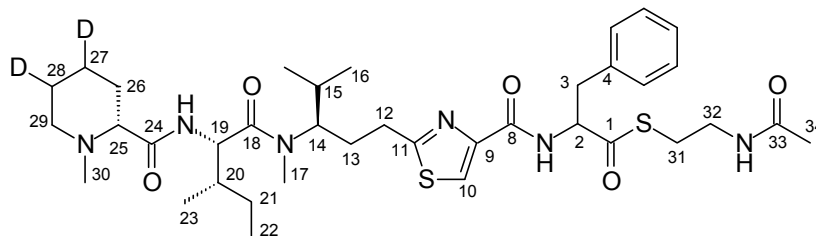
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₈ H ₄₆ D ₂ N ₅ O ₄ S ₂ [M+H] ⁺	584.3273	584.3303

((R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-4,5-dideutero-pipecolyl)-(S)-isoleucyl]-amino]-4-methylpentyl}-thiazol-4-carbonyl)-(S/R)-phenylalanin-S-(2-acetylamino-ethyl)-thioester (d₂-77)

Gemäß **AAV 11** wurden 22.4 mg d₂-**59** (30.1 μ mol) mit 7.1 mg *N*-Acetylcysteamin (59.6 μ mol, 2.0 Äq.), 0.9 mg DMAP (7.4 μ mol, 0.2 Äq.) und 6.9 mg DCC (33.4 μ mol, 1.1 Äq.) zum SNAC-Ester d₂-**77** umgesetzt. Zur besseren Löslichkeit von d₂-**59** wurden zusätzlich 100 μ l DMF abs. zugegeben. Das Rohprodukt wurde in Essigsäureethylester gelöst und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigte organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:MeOH 98:2, 96:4, 95:5, 9:1) wurden 13 mg

eines gelblichen, zähen Öls d₂-77 (14.9 μmol, 50 % d. Th., mit ca. 4 μmol *N*-Acetylcystamin verunreinigt, Epimerisierung Phe 1.3:1) erhalten.

$R_f(d_2-77) = 0.13$ (CH₂Cl₂:MeOH 9:1)



d₂-77

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.76 (d, ³J_{16,15} = 6.3 Hz, 1.5 H, 16-H_{dia1}), 0.77 (d, ³J_{16,15} = 6.0 Hz, 1.5 H, 16-H_{dia2}), 0.86 (t, ³J_{22,21} = 7.4 Hz, 1.5 H, 22-H_{dia2}), 0.87 (t, ³J_{22,21} = 7.4 Hz, 22-H_{dia1}), 0.94 (d, ³J_{16',15} = 6.5 Hz, 1.5 H, 16'-H_{dia2}), 0.94 (d, ³J_{16',15/23,20} = 7.0 Hz, 1.5 H, 16'-H_{dia1}/23-H_{dia1}), 0.96 (d, ³J_{16',15/23,20} = 6.8 Hz, 1.5 H, 16'-H_{dia1}/23-H_{dia1}), 0.97 (d, ³J_{23,20} = 6.8 Hz, 1.5 H, 23-H_{dia2}), 1.09-1.19 (sh, 1.5 H, 21-H_a, 27-H_{ax(1/2)}), 1.32 (m, 1 H, 26-H_{ax}), 1.45 (m, 0.5 H, 28-H_{ax(1/2)}), 1.51-1.89 (sh, 6 H, 13-H_a, 15-H, 20-H, 21-H_b, 26-H_{eq}, 27-H_{eq(1/2)}, 28-H_{eq(1/2)}), 1.91 (2 s, 3 H, 34-H_{dia1,2}), 1.98 (m, 1 H, 29-H_{ax}), 2.10 (m, 13-H_b), 2.20 (s, 3 H, 30-H), 2.46 (d, ³J_{25,26ax} = 10.5 Hz, 1 H, 25-H), 2.75-2.89 (sh, 3 H, 12-H, 29-H_{eq}), 2.91-3.09 (sh, 2 H, 31-H), 2.98 (s, 1.5 H, 17-H_{dia2}), 3.00 (s, 1.5 H, 17-H_{dia1}), 3.20 (dd, ²J_{3a,3b} = 13.8 Hz, ³J_{3a,2} = 7.3 Hz, 0.5 H, 3-H_{a dia1}), 3.24 (dd, ²J_{3b,3a} = 13.5 Hz, ³J_{3b,2} = 6.0 Hz, 0.5 H, 3-H_{b dia1}), 3.25 (d, ³J_{3,2} = 7.0 Hz, 3-H_{dia2}), 3.29-3.46 (sh, 2 H, 32-H), 4.37 (m, 0.5 H, 14-H_{dia1}), 4.43 (m, 0.5 H, 14-H_{dia2}), 4.75 (dd, ³J_{19,NH} = 9.4 Hz, ³J_{19,20} = 8.1 Hz, 0.5 H, 19-H_{dia1}), 4.77 (dd, ³J_{19,NH} = 9.2 Hz, ³J_{19,20} = 8.2 Hz, 0.5 H, 19-H_{dia2}), 4.93-5.06 (sh, 1 H, 2-H), 5.86 (bs, 1 H, NH_{NAC}), 7.01 (d, ³J_{NH,19} = 9.5 Hz, 0.5 H, NH_{Ile dia1}), 7.05 (d, ³J_{NH,19} = 9.3 Hz, 0.5 H, NH_{Ile dia2}), 7.18-7.31 (sh, 5 H, arom.-H), 7.87 (d, ³J_{NH,2} = 8.3 Hz, 0.5 H, NH_{Phe dia1}), 7.89 (s, 0.5 H, 10-H_{dia1}), 7.92 (s, 0.5 H, 10-H_{dia2}), 8.11 (d, ³J_{NH,2} = 8.0 Hz, 0.5 H, NH_{Phe dia2}).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.07 (d, ³J_{16',15} = 6.5 Hz, 3 H, 16'-H), 7.13 (d, ³J_{NH,19} = 9.5 Hz, 0.5 H, NH_{Ile dia2}), 7.15 (d, ³J_{NH,19} = 9.3 Hz, 0.5 H, NH_{Ile dia1}), 7.80 (d, ³J_{NH,2} = 7.5 Hz, 0.5 H, NH_{Phe dia1/2}), 7.81 (d, ³J_{NH,2} = 7.8 Hz, 0.5 H, NH_{Phe dia1/2}), 7.90 (s, 1 H, 10-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 10.9 (2 q, C-22), 15.9 (2 q, C-23), 19.6 (q, C-16_{dia2}), 20.1 (q, C-16'_{dia1}), 22.8* (m, C-27), 23.1 (q, C-34_{dia1}), 23.2 (q, C-34_{dia2}), 24.6 (t, C-21_{dia1}), 24.7 (t, C-21_{dia2}), 24.8* (m, C-28), 28.8 (t, C-31), 29.1 (t, C-13_{dia1}), 29.2 (t, C-13_{dia2}), 29.6 (q, C-17_{dia2}), 29.8 (t, C-12), 30.1 (d, C-

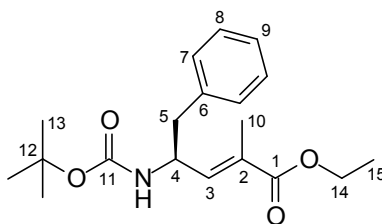
15_{dia2}), 30.2 (d, C-15_{dia1}), 30.3 (t, C-26_{dia1}), 30.4 (t, C-26_{dia2}), 37.1 (d, C-20_{dia1}), 37.2 (d, C-20_{dia2}), 37.9 (t, C-3_{dia2}), 38.1 (t, C-3_{dia1}), 39.0 (t, C-32), 44.9 (q, C-30), 53.0 (d, C-19_{dia1}), 53.1 (d, C-19_{dia2}), 55.3 (t, C-29), 58.5* (d, C-14), 60.0 (d, C-2_{dia1}), 60.5 (d, C-2_{dia2}), 69.6 (d, C-25), 123.2 (d, C-10_{dia2}), 123.4 (d, C-10_{dia1}), 127.1 (d, C-7_{dia2}), 127.2 (d, C-7_{dia1}), 128.6 (d, C-6_{dia2}), 128.7 (d, C-6_{dia1}), 129.3 (d, C-5_{dia1}), 129.4 (d, C-5_{dia2}), 135.8 (s, C-4_{dia1}), 136.1 (s, C-4_{dia2}), 148.7 (s, C-9_{dia1}), 148.8 (s, C-9_{dia2}), 161.0 (s, C-8_{dia1}), 161.3 (s, C-8_{dia2}), 170.3, 170.7, 173.3, 173.4, 174.3 (4 s, C-11, C-18, C-24, C-33), 200.2 (s, C-1_{dia1}), 200.4 (s, C-1_{dia2}).

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₇ H ₅₅ D ₂ N ₆ O ₅ S ₂ [M+H] ⁺	731.3957	731.3966

(4*S*,2*E*)-4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-2-methyl-5-phenyl-2-pentensäure-ethylester^[35,121]
(78)

Nach **AAV 9** wurden 4.90 g (*L*)-Boc-Phenylalaninmethylester (17.5 mmol, 1.0 Äq.) mit 35 ml einer 1 M DIBALH-Lösung in Hexan (35 mmol, 2.0 Äq.) in 50 ml absolutem Dichlormethan zum Aldehyd reduziert, welcher in situ mit einer Ylid-Lösung umgesetzt wurde. Diese wurde zuvor aus 15.5 g (1-Ethoxycarbonyl-ethyl)-triphenylphosphoniumbromid^[122] (35.0 mmol, 2.0 Äq.) und 4.03 g KO^{*t*}Bu (35.9 mmol, 2.1 Äq.) in 40 ml Dichlormethan hergestellt. Durch säulenchromatographische Reinigung (Hexan: EE 95:5, 9:1) wurden 4.78 g des Wittig-Produktes **78** (14.3 mmol, 82 % d. Th., >99 % ee) als farbloses Öl erhalten, welches über Nacht zu einem weißen Feststoff erstarrte.

R_f(78) = 0.31 (Hexan:EE 8:2)



78

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ = 1.26 (t, ³J_{15,14} = 7.3 Hz, 3 H, 15-H), 1.38 (s, 9 H, 13-H), 1.68 (d, ⁴J_{10,3} = 1.5 Hz, 3 H, 10-H), 2.76 (dd, ²J_{5a,5b} = 13.3 Hz, ³J_{5a,4} = 7.0 Hz, 1 H, 5-H_a), 2.90 (m, 1 H, 5-H_b), 4.16 (q, ³J_{14,15} = 7.3 Hz, 2 H, 14-H), 4.55 (bs, 1 H, NH), 4.64 (bs, 1 H, 4-H), 6.49 (dd, ³J_{3,4} = 9.1 Hz, ⁴J_{3,10} = 1.5 Hz, 1 H, 3-H), 7.15 (d, ³J_{7,8} = 7.0 Hz, 2 H, 7-H), 7.20 (t, ³J_{9,8} = 7.3 Hz, 1 H, 9-H), 7.26 (dd, ³J_{8,7} ≈ ³J_{8,9} = 7.2 Hz, 2 H, 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 12.5$ (q, C-10), 14.2 (q, C-15), 28.3 (q, C-13), 41.1 (t, C-5), 50.1 (d, C-4), 60.6 (t, C-14), 79.6 (s, C-12), 126.6 (d, C-9), 128.4 (d, C-8), 129.2 (s, C-2), 129.5 (d, C-7), 136.7 (s, C-6), 140.2 (d, C-3), 154.9 (s, C-11), 167.7 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +33.0^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3)

Schmelzpunkt: 68°C

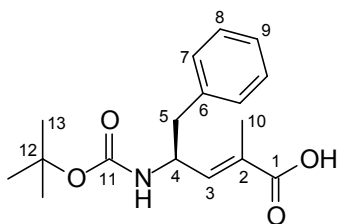
HPLC: *Reprosil 100 Chiral-NR* $8\ \mu\text{m}$, Hexan:*i*PrOH 8:2, 2 ml/min

(*R*)-**78**: $t_{\text{R}} = 5.96$ min

(*S*)-**78**: $t_{\text{R}} = 6.86$ min

(4*S*,2*E*)-4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-2-methyl-5-phenyl-2-pentensäure^[123] (80**)**

Gemäß **AAV 3** wurden 668 mg **78** (2.00 mmol) mit 2.4 ml 1 M NaOH-Lösung (2.4 mmol, 1.2 Äq.) verseift. Da die Reaktion über Nacht noch nicht vollständig abgelaufen war, wurde das Reaktionsgemisch für 2 h auf 80°C erhitzt. Die freie Säure **80** wurde zu 582 mg (1.91 mmol, 95 % d. Th.) als weißer Feststoff isoliert.



80

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

$\delta = 1.39$ (s, 9 H, 13-H), 1.66 (s, 3 H, 10-H), 2.76 (dd, $^2J_{5a,5b} = 13.1$ Hz, $^3J_{5a,4} = 7.3$ Hz, 1 H, 5-H_a), 2.92 (dd, $^2J_{5b,5a} = 13.1$ Hz, $^3J_{5b,4} = 5.2$ Hz, 1 H, 5-H_b), 4.53-4.73 (sh, 2 H, 4-H, NH), 6.63 (d, $^3J_{3,4} = 8.8$ Hz, 1 H, 3-H), 7.15 (m, 2 H, 7-H), 7.21 (tt, $^3J_{9,8} = 7.3$ Hz, $^4J_{9,7} = 1.5$ Hz, 1 H, 9-H), 7.27 (dddd, $^3J_{8,7} \approx ^3J_{8,9} = 7.2$ Hz, $^4J_{8,8'} \approx ^5J_{8,7'} = 1.5$ Hz, 2 H, 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 12.2$ (q, C-10), 28.3 (q, C-13), 41.0 (t, C-5), 50.3 (d, C-4), 79.8 (s, C-11), 126.8 (d, C-9), 128.5 (d, C-8), 129.5 (d, C-7), 136.5 (s, C-6), 142.6 (d, C-3), 172.5 (s, C-1).

Das Signal von C-2 ist nicht zu sehen.

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +44.9^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3)

Schmelzpunkt: 138°C

Elementaranalyse:

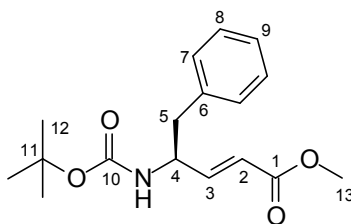
$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_4$	Ber.	C 66.86	H 7.59	N 4.59
(305.37)	Gef.	C 66.55	H 7.57	N 4.45

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₇ H ₂₄ NO ₄ [M+H] ⁺	306.1705	306.1699

(4*S*,2*E*)-4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-5-phenyl-2-pentensäure-methylester^[124] (89**)**

Nach **AAV 9** wurden 4.27 g *L*-BocPheOMe (15.3 mmol) mit 33 ml einer 1 M DIBALH-Lösung in Hexan (33 mmol, 2.2 Äq.) zum Aldehyd reduziert und mit 10.4 g (Triphenyl-λ⁵-phosphanyliden)-essigsäure-methylester^[119] (31.1 mmol, 2.0 Äq.) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (Hexan:EE 8:2) wurden 2.59 g **89** (8.47 mmol, 55 % d. Th.) als weißer Feststoff erhalten.

R_f(89) = 0.29 (Hexan:EE 8:2)



89

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.38 (s, 9 H, 12-H), 2.85 (m, 1 H, 5-H_a), 2.89 (dd, ²J_{5b,5a} = 13.3 Hz, ³J_{5b,4} = 6.5 Hz, 1 H, 5-H_b), 3.70 (s, 3 H, 13-H), 4.49 (bd, 1 H, NH), 4.59 (bs, 1 H, 4-H), 5.84 (dd, ³J_{2,3} = 15.6 Hz, ⁴J_{2,4} = 1.8 Hz, 1 H, 2-H), 6.89 (dd, ³J_{3,2} = 15.6 Hz, ³J_{3,4} = 5.0 Hz, 1 H, 3-H), 7.15 (ddd, ³J_{7,8} = 7.0 Hz, ⁴J_{7,9} ≈ ⁵J_{7,8} = 1.5 Hz, 2 H, 7-H), 7.22 (tt, ³J_{9,8} = 7.4 Hz, ⁴J_{9,7} = 1.5 Hz, 1 H, 9-H), 7.28 (dddd, ³J_{8,7} ≈ ³J_{8,9} = 7.2 Hz, ⁴J_{8,8'} ≈ ⁵J_{8,7'} = 1.5 Hz, 2 H, 8-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 28.3 (q, C-12), 40.8 (t, C-5), 51.6 (q, C-13), 52.2 (d, C-4), 79.9 (s, C-11), 120.7 (d, C-2), 126.9 (d, C-9), 128.6 (d, C-8), 129.4 (d, C-7), 136.3 (s, C-6), 147.9 (d, C-3), 154.9 (s, C-10), 166.6 (s, C-1).

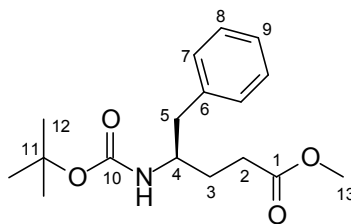
Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3.0^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

Schmelzpunkt: 73 °C

(4*R*)-4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-5-phenyl-pentensäure-methylester^[125] (90**)**

1.37 g **89** (4.49 mmol) wurden nach **AAV 8** mit Hilfe von 68 mg Pd/C (10%) hydriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurden 1.33 g (Hexan:EE 8:2) eines weißen Feststoffs **90** (4.34 mmol, 96 % d. Th.) erhalten.

R_f(90) = 0.25 (Hexan:EE 8:2)

**90****¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.37 (s, 9 H, 12-H), 1.59 (m, 1 H, 3-H_a), 1.84 (m, 1 H, 3-H_b), 2.33 (dt, $^2J_{2a,2b}$ = 16.6 Hz, $^3J_{2a,3}$ = 7.4 Hz, 1 H, 2-H_a), 2.38 (ddd, $^2J_{2b,2a}$ = 16.6 Hz, $^3J_{2b,3a/b}$ = 8.3 Hz, $^3J_{2b,3a/b}$ = 6.8 Hz, 1 H, 2-H_b), 2.72 (dd, $^2J_{5a,5b}$ = 13.3 Hz, $^3J_{5a,4}$ = 7.0 Hz, 1 H, 5-H_a), 2.80 (dd, $^2J_{5b,5a}$ = 13.3 Hz, $^3J_{5b,4}$ = 5.8 Hz, 1 H, 5-H_b), 3.63 (s, 3 H, 13-H), 3.81 (bs, 1 H, 4-H), 4.32 (d, $^3J_{NH,4}$ = 7.5 Hz, 1 H, NH), 7.15 (dd, $^3J_{7,8}$ = 7.0 Hz, $^4J_{7,9}$ = 1.3 Hz, 2 H, 7-H), 7.19 (tt, $^3J_{9,8}$ = 7.3 Hz, $^4J_{9,7}$ = 1.3 Hz, 1 H, 9-H), 7.27 (dddd, $^3J_{8,7} \approx ^3J_{8,9} = 7.2$ Hz, $^5J_{8,7} \approx ^4J_{8,8'} = 1.3$ Hz, 2 H, 8-H).

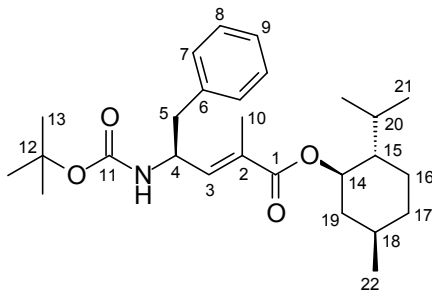
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 28.3 (q, C-12), 29.3 (t, C-3), 30.9 (t, C-2), 41.8 (t, C-5), 51.4 (d, C-4), 51.6 (q, C-13), 79.2 (s, C-11), 126.4 (d, C-9), 128.4 (d, C-8), 129.4 (d, C-7), 137.8 (s, C-6), 155.4 (s, C-10), 174.0 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +5.2^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)**Schmelzpunkt:** 87 °C**(4*S*,2*E*)-4-(tert.-Butoxycarbonylamino)-2-methyl-5-phenyl-2-pentensäure-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-menthyl]-ester (97)**

Zu einer Lösung von 657 mg **80** (2.15 mmol), 840 mg (-)-Menthol (5.38 mmol, 2.5 Äq.) und 26 mg DMAP (0.213 mmol, 0.1 Äq.) in 21.5 ml Diethylether wurden 483 mg DCC (2.34 mmol, 1.1 Äq.), gelöst in 3 ml Diethylether, bei 0 °C zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff über Celite abfiltriert und das Filtrat einrotiert. Durch säulenchromatographische Reinigung (Hexan:EE 95:5) wurden 690 mg eines weißen Feststoffs **97** (1.56 mmol, 72 % d. Th.) erhalten.

R_f(97) = 0.43 (Hexan:EE 8:2)



97

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 0.74 (d, $^3J_{21,20} = 6.8$ Hz, 3 H, 21-H), 0.85 (dddd, $^2J_{17ax,17eq} \approx ^3J_{17ax,16ax} \approx ^3J_{17ax,18(ax)} = 11.8$ Hz, $^3J_{17ax,16eq} = 2.8$ Hz, 1 H, 17-H_{ax}), 0.88 (d, $^3J_{22,18} = 6.3$ Hz, 3 H, 22-H), 0.89 (d, $^3J_{21',20} = 6.8$ Hz, 3 H, 21'-H), 0.93 (ddd, $^2J_{19ax,19eq} \approx ^3J_{19ax,18ax} \approx ^3J_{19ax,14(ax)} = 11.6$ Hz, 1 H, 19-H_{ax}), 1.05 (dddd, $^2J_{16ax,16eq} \approx ^3J_{16ax,15(ax)} \approx ^3J_{16ax,17ax} = 12.9$ Hz, $^3J_{16ax,17eq} = 3.0$ Hz, 1 H, 16-H_{ax}), 1.39 (dddd, $^3J_{15(ax),14(ax)} \approx ^3J_{15(ax),16ax} = 10.0$ Hz, $^3J_{15(ax),16eq} \approx ^3J_{15(ax),20} = 3.0$ Hz, 1 H, 15-H_{ax}), 1.39 (s, 9 H, 13-H), 1.48 (m, 1 H, 18-H_{ax}), 1.63-1.71 (sh, 2 H, 16-H_{eq}, 17-H_{eq}), 1.69 (d, $^4J_{10,3} = 1.5$ Hz, 3 H, 10-H), 1.83 (qqd, $^3J_{20,21} = ^3J_{20,21'} = 6.8$ Hz, $^3J_{20,15(ax)} = 2.8$ Hz, 1 H, 20-H), 1.98 (m, 1 H, 19-H_{eq}), 2.77 (dd, $^2J_{5a,5b} = 13.3$ Hz, $^3J_{5a,4} = 7.0$ Hz, 1 H, 5-H_a), 2.91 (dd, $^2J_{5b,5a} = 13.3$ Hz, $^3J_{5b,4} = 5.5$ Hz, 1 H, 5-H_b), 4.54 (bs, 1 H, NH), 4.64 (bs, 1 H, 4-H), 4.68 (ddd, $^3J_{14(ax),15(ax)} \approx ^3J_{14(ax),19ax} = 10.8$ Hz, $^3J_{14(ax),19eq} = 4.5$ Hz, 1 H, 14-H_{ax}), 6.44 (dd, $^3J_{3,4} = 9.2$ Hz, $^4J_{3,10} = 1.5$ Hz, 1 H, 3-H), 7.12 (m, 2 H, 7-H), 7.19 (tt, $^3J_{9,8} = 7.3$ Hz, $^4J_{9,7} = 1.9$ Hz, 1 H, 9-H), 7.25 (dddd, $^3J_{8,7} \approx ^3J_{8,9} = 7.1$ Hz, $^4J_{8,8'} \approx ^5J_{8,7'} = 1.8$ Hz, 2 H, 8-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 12.7 (q, C-10), 16.4 (q, C-21), 20.8 (q, C-21'), 22.0 (q, C-22), 23.5 (t, C-16), 26.4 (d, C-20), 28.3 (q, C-13), 31.4 (d, C-18), 34.3 (t, C-17), 40.9 (t, C-19), 41.2 (t, C-5), 47.2 (d, C-15), 50.0 (d, C-4), 74.5 (d, C-14), 79.7 (s, C-12), 126.7 (d, C-9), 128.4 (d, C-8), 129.6 (d, C-7), 139.6 (d, C-3), 154.9 (s, C-11), 167.1 (s, C-1).

Das Signal von C-2 ist nicht zu sehen.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -27.8^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

Schmelzpunkt: 89-90 °C

Elementaranalyse:

C ₂₇ H ₄₁ NO ₄	Ber.	C 73.10	H 9.32	N 3.16
(443.63)	Gef.	C 73.15	H 9.08	N 3.21

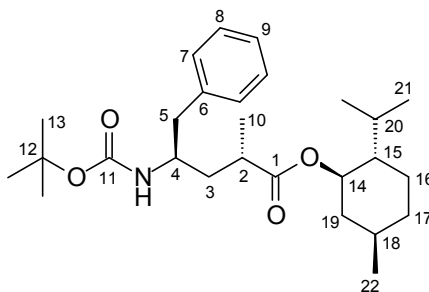
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₇ H ₄₂ NO ₄ [M+H] ⁺	444.3114	444.3077

(2*S*,4*R*)-4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-menthyl]-ester^[41] (**98**)

(2*R*,4*R*)-4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-[(1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-menthyl]-ester^[41] (*epi*-**98**)

Es wurden 599 mg **97** (1.35 mmol) mit 60 mg Pd/C (5%) unter Wasserstoffatmosphäre nach **AAV 8** umgesetzt. Im NMR-Spektrum des Rohproduktes war zu erkennen, dass *epi*-**98** und **98** im Verhältnis 1:3 entstanden sind. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:Et₂O 9:1, Hexan:EE 8:2) konnten 89 mg *epi*-**98** (0.200 mmol, 15 % d. Th., >99 % ds), 361 mg **98** (0.810 mmol, 60 % d. Th., 98 % ds) und 121 mg einer Mischfraktion **98/epi-98** (0.272 mmol, 2.9:1, 20 % d. Th.) isoliert werden.

$R_f(\textit{epi}\text{-98}) = 0.42$ (Hexan:EE 8:2), $R_f(\mathbf{98}) = 0.38$ (Hexan:EE 8:2)



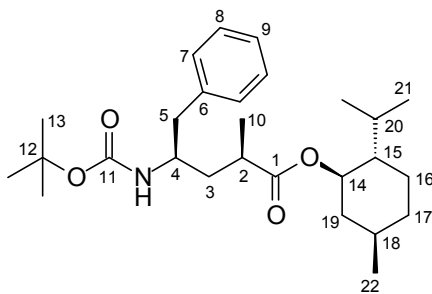
98

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

$\delta = 0.72$ (d, $^3J_{21,20} = 7.0$ Hz, 3 H, 21-H), 0.84 (dddd, $^2J_{17ax,17eq} \approx ^3J_{17ax,16ax} \approx ^3J_{17ax,18(ax)} = 12.9$ Hz, $^3J_{17ax,16eq} = 3.5$ Hz, 1 H, 17-H_{ax}), 0.87 (d, $^3J_{21',20} = 7.0$ Hz, 3 H, 21'-H), 0.88 (d, $^3J_{22,18} = 6.5$ Hz, 3 H, 22-H), 0.91 (ddd, $^2J_{19ax,19eq} \approx ^3J_{19ax,18ax} \approx ^3J_{19ax,14(ax)} = 11.7$ Hz, 1 H, 19-H_{ax}), 1.03 (dddd, $^2J_{16ax,16eq} \approx ^3J_{16ax,15(ax)} \approx ^3J_{16ax,17ax} = 13.0$ Hz, $^3J_{16ax,17eq} = 3.4$ Hz, 1 H, 16-H_{ax}), 1.13 (d, $^3J_{10,2} = 7.3$ Hz, 3 H, 10-H), 1.30-1.54 (sh, 3 H, 3-H_a, 15-H_(ax), 18-H_(ax)), 1.37 (s, 9 H, 13-H), 1.61-1.69 (sh, 2 H, 16-H_{eq}, 17-H_{eq}), 1.78-1.91 (sh, 2 H, 3-H_b, 20-H), 1.97 (d, $^2J_{19eq,19ax} = 11.5$ Hz, 1 H, 19-H_{eq}), 2.54 (m, 1 H, 2-H), 2.75 (dd, $^2J_{5a,5b} = 13.2$ Hz, $^3J_{5a,4} = 6.1$ Hz, 1 H, 5-H_a), 2.79 (m, 1 H, 5-H_b), 3.85 (bs, 1 H, 4-H), 4.32 (bs, 1 H, NH), 4.65 (ddd, $^3J_{14(ax),15(ax)} \approx ^3J_{14(ax),19ax} = 10.9$ Hz, $^3J_{14(ax),19eq} = 4.3$ Hz, 1 H, 14-H_(ax)), 7.15 (d, $^3J_{7,8} = 7.3$ Hz, 2 H, 7-H), 7.19 (tt, $^3J_{9,8} = 7.3$ Hz, $^4J_{9,7} = 1.2$ Hz, 1 H, 9-H), 7.26 (dddd, $^3J_{8,7} \approx ^3J_{8,9} = 7.3$ Hz, $^4J_{8,7'} \approx ^5J_{8,7'} = 1.3$ Hz, 2 H, 8-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

$\delta = 16.1$ (q, C-21), 17.7 (q, C-10), 20.8 (q, C-21'), 22.0 (q, C-22), 23.3 (t, C-16), 26.2 (d, C-20), 28.4 (q, C-13), 31.4 (d, C-18), 34.3 (t, C-17), 36.7 (d, C-2), 37.6 (t, C-3), 40.8 (t, C-19), 41.2 (t, C-5), 47.1 (d, C-15), 49.9 (d, C-4), 74.1 (d, C-14), 79.0 (s, C-12), 126.3 (d, C-9), 128.3 (d, C-8), 129.5 (d, C-7), 137.9 (s, C-6), 155.1 (s, C-11), 175.7 (s, C-1).

**epi-98****¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 0.72 (d, $^3J_{21,20} = 6.8$ Hz, 3 H, 21-H), 0.84 (dddd, $^2J_{17ax,17eq} \approx ^3J_{17ax,16ax} \approx ^3J_{17ax,18(ax)} = 12.9$ Hz, $^3J_{17ax,16eq} = 3.6$ Hz, 1 H, 17-H_{ax}), 0.86 (d, $^3J_{21',20} = 7.0$ Hz, 3 H, 21'-H), 0.87 (d, $^3J_{22,18} = 6.5$ Hz, 3 H, 22-H), 0.90 (ddd, $^2J_{19ax,19eq} \approx ^3J_{19ax,18ax} \approx ^3J_{19ax,14(ax)} = 11.8$ Hz, 1 H, 19-H_{ax}), 1.02 (dddd, $^2J_{16ax,16eq} \approx ^3J_{16ax,15(ax)} \approx ^3J_{16ax,17ax} = 13.0$ Hz, $^3J_{16ax,17eq} = 3.3$ Hz, 1 H, 16-H_{ax}), 1.11 (d, $^3J_{10,2} = 7.3$ Hz, 3 H, 10-H), 1.29-1.47 (sh, 2 H, 15-H_(ax), 18-H_(ax)), 1.38 (s, 9 H, 13-H), 1.49 (ddd, $^2J_{3a,3b} = 14.2$ Hz, $^3J_{3a,2/4} = 8.5$ Hz, $^3J_{3a,2/4} = 4.0$ Hz, 1 H, 3-H_a), 1.61-1.69 (sh, 2 H, 16-H_{eq}, 17-H_{eq}), 1.73 (ddd, $^2J_{3b,3a} = 14.2$ Hz, $^3J_{3b,2/4} = 11.0$ Hz, $^3J_{3b,2/4} = 5.5$ Hz, 1 H, 3-H_b), 1.80 (qqd, $^3J_{20,21} = ^3J_{20,21'} = 6.9$ Hz, $^3J_{20,15(ax)} = 2.8$ Hz, 1 H, 20-H), 1.93 (m, 1 H, 19-H_{eq}), 2.44 (m, 1 H, 2-H), 2.73 (dd, $^2J_{5a,5b} = 13.5$ Hz, $^3J_{5a,4} = 6.5$ Hz, 1 H, 5-H_a), 2.79 (dd, $^2J_{5b,5a} = 13.5$ Hz, $^3J_{5b,4} = 5.0$ Hz, 1 H, 5-H_b), 3.87 (bs, 1 H, 4-H), 4.33 (d, $^3J_{NH,4} = 7.8$ Hz, 1 H, NH), 4.62 (ddd, $^3J_{14(ax),15(ax)} \approx ^3J_{14(ax),19ax} = 10.9$ Hz, $^3J_{14(ax),19eq} = 4.3$ Hz, 1 H, 14-H_(ax)), 7.14 (d, $^3J_{7,8} = 7.0$ Hz, 2 H, 7-H), 7.19 (tt, $^3J_{9,8} = 7.4$ Hz, $^4J_{9,7} = 1.3$ Hz, 1 H, 9-H), 7.26 (dddd, $^3J_{8,7} \approx ^3J_{8,9} = 7.2$ Hz, $^4J_{8,8'} \approx ^5J_{8,7'} = 1.4$ Hz, 2 H, 8-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 16.2 (q, C-21), 16.8 (q, C-10), 20.8 (q, C-21'), 22.0 (q, C-22), 23.3 (t, C-16), 26.2 (d, C-20), 28.4 (q, C-13), 31.4 (d, C-18), 34.3 (t, C-17), 36.9 (d, C-2), 37.2 (t, C-3), 40.8 (t, C-19), 41.2 (t, C-5), 47.0 (d, C-15), 49.8 (d, C-4), 74.1 (d, C-14), 79.2 (s, C-12), 126.3 (d, C-9), 128.3 (d, C-8), 129.5 (d, C-7), 137.9 (s, C-6), 155.4 (s, C-11), 176.1 (s, C-1).

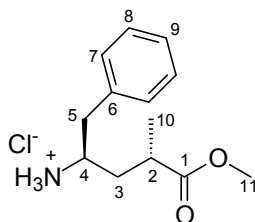
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -36.0^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃, epi-98) $[\alpha]_D^{20} = -17.2^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃, 98)**Schmelzpunkt:** 110-111 °C (epi-98), 91-92 °C (98)**HPLC:** Lichrosorb Si-60 5 μ , Hexan:EE 95:5, 2 ml/minepi-98: $t_R = 7.83$ min98: $t_R = 10.17$ min**Elementaranalyse:**

C ₂₇ H ₄₃ NO ₄	Ber.	C 72.77	H 9.73	N 3.14
(445.64)	Gef.	C 72.42	H 9.49	N 3.16

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₇ H ₄₄ NO ₄ [M+H] ⁺	446.3270	446.3280

(2*S*,4*R*)-4-Amino-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-methylester-Hydrochlorid^[41] (99)

Die Synthese wurde wie bei Zanda *et al.* beschrieben durchgeführt.^[41] Jedoch konnten aus 334 mg des Mentholesters **98** (0.750 mmol) nur 138 mg **99** (0.535 mg, 71 % d. Th.) erhalten werden. (Lit.: 99 %)



99

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.13 (d, ³J_{10,2} = 7.0 Hz, 3 H, 10-H), 1.78 (ddd, ²J_{3a,3b} = 13.8 Hz, ³J_{3a,2/4} = 8.9 Hz, ³J_{3a,2/4} = 3.8 Hz, 1 H, 3-H_a), 1.97 (ddd, ²J_{3b,3a} = 13.8 Hz, ³J_{3b,2/4} = 10.7 Hz, ³J_{3b,2/4} = 3.0 Hz, 1 H, 3-H_b), 2.90 (dd, ²J_{5a,5b} = 13.6 Hz, ³J_{5a,4} = 8.9 Hz, 1 H, 5-H_a), 2.92 (m, 1 H, 2-H), 3.27 (dd, ²J_{5b,5a} = 13.6 Hz, ³J_{5b,4} = 5.3 Hz, 1 H, 5-H_b), 3.58 (s, 3 H, 11-H), 3.60 (bs, 1 H, 4-H), 7.20-7.26 (sh, 3 H, 7-H, 9-H), 7.30 (dd, ³J_{8,7} ≈ ³J_{8,9} = 7.2 Hz, 2 H, 8-H), 8.52 (bs, 3 H, NH₃⁺).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 17.7 (q, C-10), 35.9 (d, C-2), 36.0 (t, C-3), 39.7 (t, C-5), 51.9 (q, C-11), 52.2 (d, C-4), 127.3 (d, C-9), 128.9 (d, C-8), 129.3 (d, C-7), 135.4 (s, C-6), 175.7 (s, C-1).

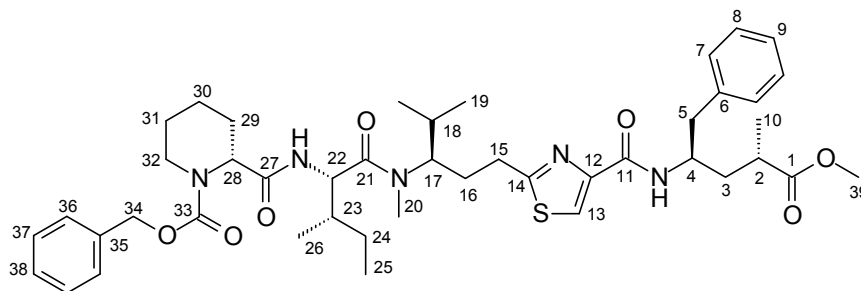
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +11.2^\circ$ (c = 1.0, MeOH)

Schmelzpunkt: 134-137 °C

(2*S*,4*R*)-4-(((*R*)-2-{{3-[(*N*-Benzyloxycarbonyl-(*R*)-pipercolyl-(*S*)-isoleucyl]-methyl-amino}-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino)-2-methyl-5-phenyl-pentan-säure-methylester (100)

Durch Umsetzung von 120 mg des Tripeptids **56** (0.200 mmol) und 57 mg Tubuphenylalaninmethylester-Hydrochlorid **99** (0.221 mmol, 1.1 Äq.) mit 28 µl Chlorameisensäure-*iso*-butylester (0.216 mmol, 1.1 Äq.) und 2 x 24 µl NMM (0.436 mmol, 2.2 Äq.) gemäß **AAV 1** wurden nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 1:1, 3:7) 129 mg (0.160 mmol, 80 % d. Th.) eines farblosen, sehr zähen Öls **100** erhalten.

R_f(100) = 0.19 (Hexan:EE 1:1)



100

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.76 (d, $^3J_{19,18} = 6.5$ Hz, 3 H, 19-H), 0.82 (m, 3 H, 25-H), 0.92 (d, $^3J_{26,23} = 6.0$ Hz, 3 H, 26-H), 0.95 (d, $^3J_{19',18} = 6.5$ Hz, 3 H, 19'-H), 1.03 (m, 1 H, 24-H_a), 1.12 (d, $^3J_{10,2} = 7.0$ Hz, 3 H, 10-H), 1.21-1.65 (sh, 7 H, 3-H_a, 24-H_b, 29-H_{ax}, 30-H, 31-H), 1.66-1.91 (sh, 3 H, 16-H_a, 18-H, 23-H), 1.99 (ddd, $^2J_{3b,3a} = 13.5$ Hz, $^3J_{3b,2/4} = 9.4$ Hz, $^3J_{3b,2/4} = 4.0$ Hz, 1 H, 3-H_b), 2.11 (m, 1 H, 16-H_b), 2.29 (d, $^2J_{29eq,29ax} = 12.8$ Hz, 1 H, 29-H_{eq}), 2.58 (m, 1 H, 2-H), 2.69-3.02 (sh, 5 H, 5-H, 15-H, 32-H_{ax}), 2.98 (s, 3 H, 20-H), 3.59 (s, 3 H, 39-H), 4.08 (bs, 1 H, 32-H_{eq}), 4.29-4.44 (sh, 2 H, 4-H, 17-H), 4.80 (dd, $^3J_{22,NH} \approx ^3J_{22,23} = 8.0$ Hz, 1 H, 22-H), 4.89 (bs, 1 H, 28-H), 5.11 (d, $^2J_{34a,34b} = 12.0$ Hz, 1 H, 34-H_a), 5.16 (d, $^2J_{34b,34a} = 12.0$ Hz, 1 H, 34-H_b), 6.56 (bs, 1 H, NH_{11e}), 7.10-7.38 (sh, 11 H, arom.-H, NH_{Tup}), 7.88 (s, 1 H, 13-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.05 (d, $^3J_{19',18} = 6.5$ Hz, 3 H, 19'-H), 2.77 (s, 3 H, 20-H), 4.18 (bs, 1 H, 32-H_{eq}), 4.97 (dd, $^3J_{22,NH} = 9.0$ Hz, $^3J_{22,23} = 7.0$ Hz, 1 H, 22-H), 5.06 (d, $^2J_{34a,34b} = 12.6$ Hz, 1 H, 34-H_a), 7.86 (s, 1 H, 13-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 11.0 (q, C-25), 15.8 (q, C-26), 17.7 (q, C-10), 19.6 (q, C-19), 20.0 (q, C-19'), 20.4 (t, C-30), 24.1 (t, C-24), 24.8* (t, C-31), 25.5* (t, C-29), 29.3 (t, C-16), 29.3* (q, C-20), 30.1 (t, C-15), 30.2 (d, C-18), 36.4 (d, C-2), 37.2 (d, C-23), 37.8 (t, C-3), 41.2 (t, C-5), 42.2* (t, C-32), 48.4 (d, C-4), 51.6 (q, C-39), 53.6 (d, C-22), 54.9* (d, C-28), 58.8* (d, C-17), 67.6 (t, C-34), 122.3 (d, C-13), 126.4 (d, C-9), 127.8 (d, C-36/37), 128.1 (d, C-38), 128.3 (d, C-8), 128.5 (d, C-36/37), 129.4 (d, C-7), 136.3 (s, C-35), 137.6 (s, C-6), 149.8 (s, C-12), 156.2* (s, C-33), 160.6 (s, C-11), 169.6 (s, C-14), 170.4 (s, C-27), 173.2 (s, C-21), 176.5 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.2 (q, C-25), 16.2 (q, C-26), 20.3 (q, C-19), 20.5 (q, C-19'), 23.5 (t, C-24), 27.3 (q, C-20), 62.7 (d, C-17), 122.6 (d, C-13).

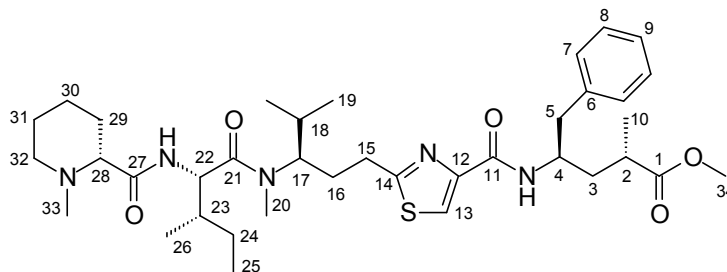
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +19.3^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₄₄ H ₆₂ N ₅ O ₇ [M+H] ⁺	804.4370	804.4331

(2*S*,4*R*)-4-(((*R*)-2-{3-[Methyl-(*N*-methyl-(*R*)-pipercolyl-(*S*)-isoleucyl)-amino]-4-methylpentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino)-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-methylester (101)

Nach **AAV 5** wurden 114 mg Tetrapeptid **100** (0.142 mmol) mit 240 µl HBr/AcOH (33 Gew.%, 1.39 mmol, 9.8 Äq.) entschützt und anschließend am *N*-Terminus nach **AAV 7** mit 12.8 mg Paraformaldehyd (0.142 mmol, 1.0 Äq.) und 9.4 mg Natriumcyanoborhydrid (0.150 mmol, 1.06 Äq.) *N*-methyliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:MeOH 99:1, 98:2, 95:5, 9:1) wurden 64 mg des Produkts **101** (0.0936 mmol, 66 % d. Th.) als gelbliches Öl erhalten.

R_f(101) = 0.39 (CH₂Cl₂:MeOH 9:1)



101

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.75 (d, ³J_{19,18} = 6.5 Hz, 3 H, 19-H), 0.86 (t, ³J_{25,24} = 7.4 Hz, 3 H, 25-H), 0.94 (d, ³J_{19',18} = 6.5 Hz, 3 H, 19'-H), 0.96 (d, ³J_{26,23} = 6.8 Hz, 3 H, 26-H), 1.08-1.25 (sh, 2 H, 24-H_a, 30-H_{ax}), 1.13 (d, ³J_{10,2} = 7.3 Hz, 3 H, 10-H), 1.35 (ddd, ²J_{29ax,29eq} ≈ ³J_{29ax,28} ≈ ³J_{29ax,30ax} = 12.1 Hz, 1 H, 29-H_{ax}), 1.43-1.72 (sh, 6 H, 3-H_a, 18-H, 24-H_b, 30-H_{eq}, 31-H), 1.74-1.91 (sh, 3 H, 16-H_a, 23-H, 29-H_{eq}), 1.94-2.03 (sh, 2 H, 3-H_b, 32-H_{ax}), 2.08 (dtd, ²J_{16b,16a} = 14.5 Hz, ³J_{16b,15} = 8.3 Hz, ³J_{16b,17} = 3.6 Hz, 1 H, 16-H_b), 2.22 (s, 3 H, 33-H), 2.47 (d, ³J_{28,29ax} = 9.0 Hz, 1 H, 28-H), 2.60 (m, 1 H, 2-H), 2.76-2.93 (sh, 4 H, 5-H_a, 15-H, 32-H_{eq}), 2.94 (dd, ²J_{5b,5a} = 13.8 Hz, ³J_{5b,4} = 6.0 Hz, 1 H, 5-H_b), 2.99 (s, 3 H, 20-H), 3.60 (s, 3 H, 34-H), 4.30-4.46 (sh, 2 H, 4-H, 17-H), 4.76 (dd, ³J_{22,NH} = 9.3 Hz, ³J_{22,23} = 8.3 Hz, 1 H, 22-H), 7.04 (bs, 1 H, NH_{Ile}), 7.15-7.27 (sh, 11 H, arom.-H), 7.35 (d, ³J_{NH,4} = 9.3 Hz, NH_{Tup}), 7.87 (s, 1 H, 13-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 0.87 (t, ³J_{25,24} = 7.3 Hz, 3 H, 25-H), 1.06 (d, ³J_{19',18} = 6.5 Hz, 3 H, 19'-H), 2.77 (s, 3 H, 20-H), 3.64 (m, 1 H, 17-H), 4.95 (dd, ³J_{22,NH} = 9.7 Hz, ³J_{22,23} = 6.2 Hz, 1 H, 22-H), 7.86 (s, 1 H, 13-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 11.0$ (q, C-25), 15.9 (q, C-26), 17.8 (q, C-10), 19.6 (q, C-19), 20.1 (q, C-19'), 23.2 (t, C-30), 24.6 (t, C-24), 25.1 (t, C-31), 29.4 (t, C-16), 29.3* (q, C-20), 30.0 (t, C-15), 30.2 (d, C-18), 30.4 (t, C-29), 36.5 (d, C-2), 37.2 (d, C-23), 37.8 (t, C-3), 41.4 (t, C-5), 44.9 (q, C-33), 48.5 (d, C-4), 51.6 (q, C-34), 53.0 (d, C-22), 55.4 (t, C-32), 58.5* (d, C-17), 69.7 (d, C-28), 122.2 (d, C-13), 126.4 (d, C-9), 128.3 (d, C-8), 129.5 (d, C-7), 137.7 (s, C-6), 149.9 (s, C-12), 160.7 (s, C-11), 169.6 (s, C-14), 173.2 (s, C-21), 174.3 (s, C-27), 176.6 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 16.5$ (q, C-26), 17.6 (q, C-10), 22.7 (t, C-30), 41.1 (t, C-5), 49.2 (d, C-4), 122.5 (d, C-13).

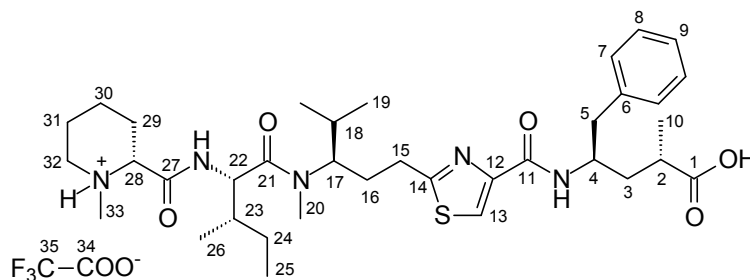
Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +22.9^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_5\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$	684.4159	684.4153

(2*S*,4*R*)-4-(((*R*)-2-{3-[Methyl-(*N*-methyl-(*R*)-pipercolyl-(*S*)-isoleucyl)-amino]-4-methylpentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino)-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-Trifluoressigsäure-Salz (102**)**

Gemäß **AAV 3** wurden 93 mg des *N*-methylierten Tetrapeptids **101** (0.136 mmol) mit 270 μl 1 M NaOH (0.27 mmol, 2.0 Äq.) versetzt, es wurde jedoch 3 h auf 80 °C erwärmt. Nach Aufarbeitung mit Trifluoressigsäure und säulenchromatographischer Reinigung (CH_2Cl_2 :MeOH 9:1, 8:2) wurden 113 mg des TFA-Salzes **102** in quantitativer Ausbeute als weißer Feststoff erhalten.

$R_f(\mathbf{102}) = 0.11$ (CH_2Cl_2 :MeOH 9:1)



102

^1H -NMR (400 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

$\delta = 0.81$ (d, $^3J_{19,18} = 6.3$ Hz, 3 H, 19-H), 0.93 (t, $^3J_{25,24} = 7.1$ Hz, 3 H, 25-H), 0.99 (d, $^3J_{19',18} = 6.3$ Hz, 3 H, 19'-H), 1.02 (d, $^3J_{26,23} = 6.5$ Hz, 3 H, 26-H), 1.23 (m, 1 H, 24- H_a), 1.53-1.86 (sh, 6 H, 3- H_a , 18-H, 24- H_b , 29- H_{ax} , 30- H_{ax} , 31- H_{ax}), 1.86-2.08 (sh, 5 H, 3- H_b , 16- H_a , 23-H, 30- H_{eq} , 31- H_{eq}), 2.11-2.27 (sh, 2 H, 16- H_b , 29- H_{eq}), 2.56 (m, 1 H, 2-H), 2.74 (s, 3 H, 33-H), 2.81-

3.02 (sh, 4 H, 5-H, 15-H), 3.09 (dd, ${}^2J_{32ax,32eq} \approx {}^3J_{32ax,31ax} = 12.3$ Hz, 1 H, 32-H_{ax}), 3.11 (s, 3 H, 20-H), 3.49 (d, ${}^2J_{32eq,32ax} = 11.5$ Hz, 1 H, 32-H_{eq}), 3.76 (d, ${}^3J_{28,29ax} = 10.8$ Hz, 1 H, 28-H), 4.24-4.47 (sh, 2 H, 4-H, 17-H), 4.70 (d, ${}^3J_{22,23} = 7.8$ Hz, 1 H, 22-H), 7.16 (m, 1 H, 9-H), 7.19-7.29 (sh, 4 H, 7-H, 8-H), 7.95 (s, 1 H, 12-H).

Nebenrotamer (ausgewähltes Signal)

$\delta = 2.78$ (s, 1 H, 20-H).

${}^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

$\delta = 11.3$ (q, C-25), 16.0 (q, C-26), 18.5 (q, C-10), 20.3 (q, C-19), 20.5 (q, C-19'), 22.3 (t, C-30), 24.0 (t, C-31), 25.5 (t, C-24), 30.2 (2 t, C-16, C-29), 30.3* (q, C-20), 30.9 (t, C-15), 31.4 (d, C-18), 37.5 (d, C-23), 37.9 (d, C-2), 39.2 (t, C-3), 42.4 (t, C-5), 42.9 (q, C-33), 50.7 (d, C-4), 56.0 (d, C-22), 56.2 (t, C-32), 60.6* (d, C-17), 68.1 (d, C-28), 118.2 (q, ${}^1J_{35,F} = 290.6$ Hz, C-35), 124.0 (d, C-13), 127.4 (d, C-9), 129.3 (d, C-8), 130.4 (d, C-7), 139.5 (s, C-6), 150.5 (s, C-12), 163.1 (q, ${}^2J_{34,F} = 32.8$ Hz, C-34), 163.1 (s, C-11), 169.2 (s, C-27), 171.9 (s, C-14), 174.6 (s, C-21), 180.0 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.8$ (q, C-25), 16.4 (q, C-26), 18.4 (q, C-10), 31.2 (d, C-18), 42.1 (t, C-5), 43.1 (q, C-33), 178.5 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -17.1^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH)

Schmelzpunkt: 60-62 °C

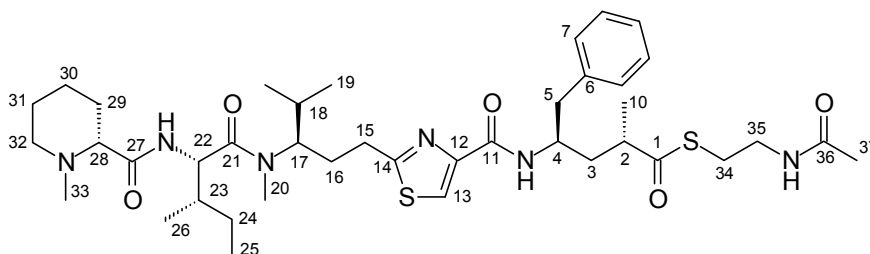
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{O}_5\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$	670.4002	670.3984
$\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_5\text{S} [\text{M}+\text{CH}_3]^+$	684.4159	684.4160
$\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_4\text{S} [\text{M}-\text{OH}]^+$	652.3897	652.3859

(2*S*,4*R*)-4-(((*R*)-2-{3-[Methyl-(*N*-methyl-(*R*)-pipercolyl-(*S*)-isoleucyl)-amino]-4-methylpentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino)-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-*S*-(2-acetylaminoethyl)-thioester (103)

Gemäß **AAV 11** wurden 13 mg **102** (16.6 μmol) mit 5.3 mg *N*-Acetylcysteamin (44.5 μmol , 2.7 Äq.), 1.0 mg DMAP (8.2 μmol , 0.5 Äq.) und 3.8 mg DCC (18.4 μmol , 1.1 Äq.) zum SNAC-Ester **103** umgesetzt. Zur besseren Löslichkeit von **102** wurden zusätzlich 50 μl DMF abs. zugegeben. Das Rohprodukt wurde in Essigsäureethylester gelöst und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigte organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH_2Cl_2 :MeOH 98:2, 96:4, 95:5, 9:1) wurden ca. 4 mg eines farblosen, zähen Öls **103** erhalten (ca. 5 μmol , ca. 30 % d. Th., mit ca. 1.7 μmol *N*-

Acetylcystamin verunreinigt, möglicherweise auch mit geringen Mengen DCU (da die Integration im Alkylbereich des ^1H -Spektrums geringfügig zu hoch war)).

$R_f(103) = 0.19$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 9:1)



103

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 0.76$ (d, $^3J_{19,18} = 6.8$ Hz, 3 H, 19-H), 0.85 (t, $^3J_{25,24} = 7.4$ Hz, 3 H, 25-H), 0.94 (d, $^3J_{19',18} = 6.5$ Hz, 3 H, 19'-H), 0.97 (d, $^3J_{26,23} = 6.8$ Hz, 1.5 H, 26-H), 1.11 (d, $^3J_{10,2} = 7.0$ Hz, 3 H, 10-H), 1.13 - 1.27 (sh, 2 H, 24- H_a , 30- H_{ax}), 1.33 (m, 1 H, 29- H_{ax}), 1.49 (m, 1 H, 31- H_{ax}), 1.55 - 1.74 (sh, 5 H, 3- H_a , 18-H, 24- H_b , 30- H_{eq} , 31- H_{eq}), 1.77 - 1.91 (sh, 3 H, 16- H_a , 23-H, 29- H_{eq}), 1.97 - 2.12 (sh, 3 H, 3- H_b , 16- H_b , 32- H_{ax}), 2.03 (s, 3 H, 37-H), 2.23 (s, 3 H, 33-H), 2.48 (dd, $^3J_{28,29ax} = 10.7$ Hz, $^3J_{28,29eq} = 2.9$ Hz, 1 H, 28-H), 2.64 (ddd, $^2J_{34a,34b} = 13.9$ Hz, $^3J_{34a,35a} = 8.5$ Hz, $^3J_{34a,35b} = 4.0$ Hz, 1 H, 34- H_a), 2.75 - 3.00 (sh, 6 H, 2-H, 5-H, 15-H, 32- H_{eq}), 3.01 (s, 3 H, 20-H), 3.26 (ddd, $^2J_{34b,34a} = 13.9$ Hz, $^3J_{34b,35b} = 6.0$ Hz, $^3J_{34b,35a} = 3.5$ Hz, 1 H, 34- H_b), 3.36 (dddd, $^2J_{35a,35b} = 14.0$ Hz, $^3J_{35a,34a} = 8.4$ Hz, $^3J_{35a,NH} = 5.9$ Hz, $^3J_{35a,34b} = 3.3$ Hz, 1 H, 35- H_a), 3.49 (dddd, $^2J_{35b,35a} = 14.0$ Hz, $^3J_{35b,34b} \approx ^3J_{35b,NH} = 6.0$ Hz, $^3J_{35b,34a} = 4.0$ Hz, 1 H, 35- H_b), 4.30 (m, 1 H, 4-H), 4.53 (bs, 1 H, 17-H), 4.79 (dd, $^3J_{22,NH} = 9.3$ Hz, $^3J_{22,23} = 8.0$ Hz, 1 H, 22-H), 7.07 (d, $^3J_{NH,22} = 9.0$ Hz, 1 H, NH_{IIe}), 7.12 - 7.28 (sh, 5 H, arom.-H), 7.48 (bs, 1 H, NH_{NAC}), 7.79 (d, $^3J_{NH,4} = 10.0$ Hz, 1 H, NH_{Tup}), 7.80 (s, 1 H, 13-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.08$ (d, $^3J_{19',18} = 6.5$ Hz, 3 H, 19'-H), 4.97 (dd, $^3J_{22,NH} = 9.3$ Hz, $^3J_{22,23} = 6.3$ Hz, 1 H, 22-H), 7.83 (s, 1 H, 13-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

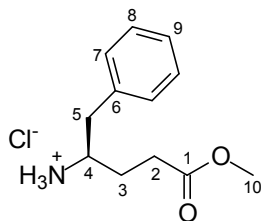
$\delta = 11.0$ (q, C-25), 15.9 (q, C-26), 18.8 (q, C-10), 19.7 (q, C-19), 20.2 (q, C-19'), 23.1 (q, C-37), 23.3 (t, C-30), 24.6 (t, C-24), 25.2 (t, C-31), 29.4 (t, C-16), 29.5 (t, C-34), 29.6 (t, C-15), 29.7^* (q, C-20), 30.3 (d, C-18), 30.6 (t, C-29), 37.5 (d, C-23), 38.4 (t, C-3), 38.6 (t, C-35), 42.5 (t, C-5), 45.0 (q, C-33), 45.3 (d, C-2), 47.9 (d, C-4), 53.1 (d, C-22), 55.4 (t, C-32), 69.7 (d, C-28), 122.1 (d, C-13), 126.6 (d, C-9), 128.4 (d, C-8), 129.4 (d, C-7), 137.4 (s, C-6), 149.8 (s, C-12), 161.2 (s, C-11), 169.5 (s, C-14), 170.7 (s, C-36), 173.4 (s, C-21), 174.3 (s, C-27), 203.1 (s, C-1).

Das Signal von C-17 ist nicht zu sehen.

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₄₀ H ₆₃ N ₆ O ₅ S ₂ [M+H] ⁺	771.4301	771.4298

(4R)-4-Amino-5-phenyl-pentansäure-methylester-Hydrochlorid (104)

Gemäß AAV 4 wurden 768 mg **90** (2.50 mmol) mit 6.25 ml einer 4 M HCl-Lösung in Dioxan (25 mmol, 10.0 Äq.) Boc-entschützt, wobei 599 mg des Hydrochlorids **104** (2.46 mmol, 98 % d. Th.) als weißer Feststoff entstanden.



104

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 2.02 (td, ³J_{3,2} ≈ ³J_{3,4} = 7.0 Hz, 2 H, 3-H), 2.54 (dt, ²J_{2a,2b} = 16.8 Hz, ³J_{2a,3} = 7.5 Hz, 1 H, 2-H_a), 2.62 (dt, ²J_{2b,2a} = 16.8 Hz, ³J_{2b,3} = 7.5 Hz, 1 H, 2-H_b), 2.93 (dd, ²J_{5a,5b} = 13.7 Hz, ³J_{5a,4} = 8.9 Hz, 1 H, 5-H_a), 3.27 (dd, ²J_{5b,5a} = 13.7 Hz, ³J_{5b,4} = 5.2 Hz, 1 H, 5-H_b), 3.55 (s, 3 H, 10-H), 3.60 (bs, 1 H, 4-H), 7.20-7.26 (sh, 3 H, 7-H, 9-H), 7.29 (dd, ³J_{8,7} ≈ ³J_{8,9} = 7.3 Hz, 2 H, 8-H), 8.51 (bs, 3 H, NH₃⁺).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 27.0 (t, C-3), 30.1 (t, C-2), 39.3 (t, C-5), 51.8 (q, C-10), 53.2 (d, C-4), 127.3 (d, C-9), 128.9 (d, C-8), 129.4 (d, C-7), 135.5 (s, C-6), 127.9 (s, C-1).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7.4^{\circ}$ (c = 1.0, MeOH)

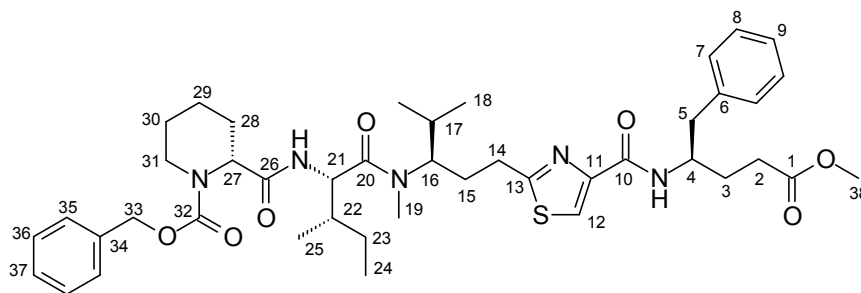
Schmelzpunkt: 117-119 °C

HRMS (EI)	Berechnet	Gefunden
C ₁₁ H ₁₄ NO [M-CH ₃ O] ⁺	176.1075	176.1059

(4R)-4-[(R)-2-{3-[(N-Benzyloxycarbonyl-(R)-pipecolyl-(S)-isoleucyl)-methyl-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino]-5-phenyl-pentansäure-methylester (105)

Gemäß AAV 1 wurden 60 mg der freien Säure **56** (100 μmol) und 27 mg des Amins **104** als Hydrochlorid (111 μmol, 1.1 Äq.) mit Hilfe von 14 μl Chlorameisensäure-*iso*-butylester (108 μmol, 1.1 Äq.) und 2 x 12 μl NMM (218 μmol, 2.2 Äq.) zum Tetrapeptid **105** geknüpft. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hex:EE 1:1, 3:7) wurden 65 mg Produkt **105** (82.2 μmol, 82 % d. Th.) als farbloses Harz erhalten.

$R_f(105) = 0.14$ (Hexan:EE 1:1)



105

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 0.76$ (d, $^3J_{18,17} = 6.3$ Hz, 3 H, 18-H), 0.83 (m, 3 H, 24-H), 0.91 (d, $^3J_{25,22} = 6.3$ Hz, 3 H, 25-H), 0.96 (d, $^3J_{18',17} = 6.5$ Hz, 3 H, 18'-H), 1.04 (m, 1 H, 23-H_a), 1.18-1.89 (sh, 10 H, 3-H_a, 15-H_a, 17-H, 22-H, 23-H_b, 28-H_{ax}, 29-H, 30-H), 1.96 (m, 1 H, 3-H_b), 2.12 (m, 1 H, 15-H_b), 2.29 (d, $^2J_{28\text{eq},28\text{ax}} = 13.3$ Hz, 1 H, 28-H_{ax}), 2.35 (dt, $^2J_{2a,2b} = 16.7$ Hz, $^3J_{2a,3} = 6.8$ Hz, 1 H, 2-H_a), 2.42 (dt, $^2J_{2b,2a} = 16.7$ Hz, $^3J_{2b,3} = 7.1$ Hz, 1 H, 2-H_b), 2.73-2.91 (sh, 3 H, 14-H, 31-H_{ax}), 2.82 (dd, $^2J_{5a,5b} = 13.6$ Hz, $^3J_{5a,4} = 7.3$ Hz, 1 H, 5-H_a), 2.96 (dd, $^2J_{5b,5a} = 13.6$ Hz, $^3J_{5b,4} = 6.0$ Hz, 1 H, 5-H_b), 3.00 (s, 3 H, 19-H), 3.57 (s, 3 H, 38-H), 4.09 (bs, 1 H, 31-H_{eq}), 4.29-4.43 (sh, 2 H, 4-H, 16-H), 4.81 (dd, $^3J_{21,\text{NH}} \approx ^3J_{21,22} = 8.4$ Hz, 1 H, 21-H), 4.90 (bs, 1 H, 27-H), 5.12 (d, $^2J_{33a,33b} = 12.0$ Hz, 1 H, 33-H_a), 5.17 (d, $^2J_{33b,33a} = 12.0$ Hz, 1 H, 33-H_b), 6.59 (bs, 1 H, NH_{11e}), 7.16-7.39 (sh, 11 H, arom.-H, NH_{11e}), 7.89 (s, 1 H, 12-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.06$ (d, $^3J_{18',17} = 6.5$ Hz, 3 H, 18'-H), 2.77 (s, 3 H, 19-H), 4.19 (bs, 1 H, 31-H_{eq}), 4.99 (dd, $^3J_{21,\text{NH}} = 9.3$ Hz, $^3J_{21,22} = 6.5$ Hz, 1 H, 21-H), 5.07 (d, $^2J_{33a,33b} = 12.3$ Hz, 1 H, 33-H_a), 7.87 (s, 1 H, 12-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 11.0$ (q, C-24), 15.8 (q, C-25), 19.6 (q, C-18), 20.0 (q, C-18'), 20.4 (t, C-29), 24.2 (t, C-23), 24.7* (t, C-30), 25.9* (t, C-28), 29.2 (t, C-3), 29.3 (t, C-15), 29.3* (q, C-19), 30.1 (t, C-14), 30.2 (d, C-17), 31.0 (t, C-2), 37.2 (d, C-22), 41.5 (t, C-5), 42.1* (t, C-31), 49.8 (d, C-4), 51.5 (q, C-38), 53.6 (d, C-21), 55.1* (d, C-27), 58.7 (d, C-16), 67.6 (t, C-33), 122.5 (d, C-12), 126.5 (d, C-9), 127.8 (d, C-35/36), 128.1 (d, C-37), 128.4 (d, C-8), 128.5 (d, C-35/36), 129.4 (d, C-7), 136.3 (s, C-34), 137.6 (s, C-6), 149.7 (s, C-11), 156.4 (s, C-26), 160.8 (s, C-10), 169.7 (s, C-13), 170.5 (s, C-26), 173.2 (s, C-20), 173.8 (s, C-1).

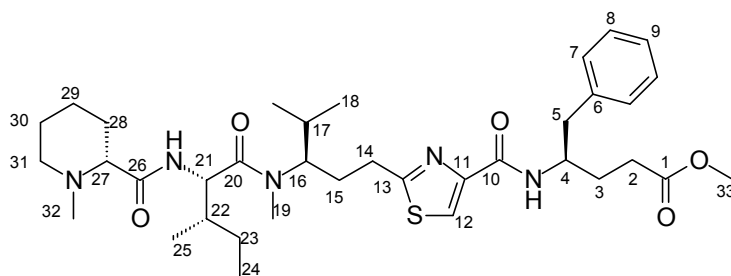
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +4.8^\circ$ (c = 1.0, CHCl_3)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_5\text{O}_7\text{S} [\text{M}-\text{C}_7\text{H}_7]^+$	698.3587	698.3591

(4R)-4-[(R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-piperocolyl-(S)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino]-5-phenyl-pentansäure-methylester (106)

Es wurden 64 mg des Tetrapeptids **105** (75.3 μmol) nach **AAV 5** mit 110 μl HBr/AcOH (33 Gew.%, 637 μmol , 8.5 Äq.) Z-entschützt und anschließend mit Hilfe von 7.0 mg Paraformaldehyd (77.7 μmol , 1.0 Äq.) und 5.2 mg Natriumcyanoborhydrid (82.7 μmol , 1.1 Äq.) nach **AAV 7** N-methyliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE, CH_2Cl_2 :MeOH 95:5, 9:1) wurden 37 mg des Produktes **106** (55.2 μmol , 73 % d. Th.) als gelbliches Öl erhalten.

$R_f(\mathbf{106}) = 0.25$ (CH_2Cl_2 :MeOH 9:1)



106

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 0.74$ (d, $^3J_{18,17} = 6.8$ Hz, 3 H, 18-H), 0.86 (t, $^3J_{24,23} = 7.4$ Hz, 3 H, 24-H), 0.94 (d, $^3J_{18',17} = 6.5$ Hz, 3 H, 18'-H), 0.95 (d, $^3J_{25,22} = 6.8$ Hz, 3 H, 25-H), 1.08-1.25 (sh, 2 H, 23-H_a, 29-H_{ax}), 1.35 (ddd, $^2J_{28\text{ax},28\text{eq}} \approx ^3J_{28\text{ax},27} \approx ^3J_{28\text{ax},29\text{ax}} = 11.5$ Hz, 1 H, 28-H_{ax}), 1.43-1.72 (sh, 5 H, 17-H, 23-H_b, 28-H_{ax}, 29-H_{eq}, 30-H), 1.72-1.89 (sh, 4 H, 3-H_a, 15-H_a, 22-H, 28-H_{eq}), 1.90-2.02 (sh, 2 H, 3-H_b, 31-H_{ax}), 2.09 (dtd, $^2J_{15\text{b},15\text{a}} = 14.3$ Hz, $^3J_{15\text{b},14} = 8.3$ Hz, $^3J_{15\text{b},16} = 3.5$ Hz, 1 H, 15-H_b), 2.20 (s, 3 H, 32-H), 2.35 (dt, $^2J_{2\text{a},2\text{b}} = 16.5$ Hz, $^3J_{2\text{a},3} = 6.4$ Hz, 1 H, 2-H_a), 2.41 (dt, $^2J_{2\text{b},2\text{a}} = 16.5$ Hz, $^3J_{2\text{b},3} = 6.5$ Hz, 1 H, 2-H_b), 2.46 (d, $^3J_{27,28\text{ax}} = 9.0$ Hz, 1 H, 27-H), 2.80 (dd, $^3J_{14,15\text{b}} \approx ^3J_{14,15\text{a}} = 7.6$ Hz, 2 H, 14-H), 2.82 (dd, $^2J_{5\text{a},5\text{b}} = 13.5$ Hz, $^3J_{5\text{a},4} = 7.3$ Hz, 1 H, 5-H_a), 2.86 (m, 1 H, 31-H_{eq}), 2.97 (dd, $^2J_{5\text{b},5\text{a}} = 13.5$ Hz, $^3J_{5\text{b},4} = 5.8$ Hz, 1 H, 5-H_b), 2.99 (s, 3 H, 19-H), 3.56 (s, 3 H, 33-H), 4.28-4.42 (sh, 2 H, 4-H, 16-H), 4.76 (dd, $^3J_{21,\text{NH}} \approx ^3J_{21,22} = 8.8$ Hz, 1 H, 21-H), 7.02 (d, $^3J_{\text{NH},21} = 9.0$ Hz, 1 H, NH_{lle}), 7.14-7.28 (sh, 5 H, arom.-H), 7.37 (d, $^3J_{\text{NH},4} = 9.3$ Hz, 1 H, NH^{„phe“}), 7.87 (s, 1 H, 12-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.06$ (d, $^3J_{18',17} = 6.5$ Hz, 3 H, 18'-H), 2.77 (s, 3 H, 19-H), 3.63 (m, 1 H, 16-H), 4.95 (dd, $^3J_{21,\text{NH}} = 9.8$ Hz, $^3J_{21,22} = 6.0$ Hz, 1 H, 21-H), 7.89 (s, 1 H, 12-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 10.9$ (q, C-24), 15.9 (q, C-25), 19.5 (q, C-18), 20.1 (q, C-18'), 23.2 (t, C-29), 24.6 (t, C-23), 25.0 (t, C-30), 29.2 (t, C-3), 29.3 (t, C-15), 29.3* (q, C-19), 30.0 (t, C-14), 30.2 (d, C-17),

30.4 (t, C-28), 30.9 (t, C-2), 37.1 (d, C-22), 41.5 (t, C-5), 44.8 (q, C-32), 49.8 (d, C-4), 51.5 (q, C-33), 53.0 (d, C-21), 55.4 (t, C-31), 58.5 (d, C-16), 69.6 (d, C-27), 122.0 (d, C-12), 126.5 (d, C-9), 128.4 (d, C-8), 129.4 (d, C-7), 137.7 (s, C-6), 149.7 (s, C-11), 160.8 (s, C-10), 169.7 (s, C-13), 173.2 (s, C-20), 173.8 (s, C-1), 174.3 (s, C-13).

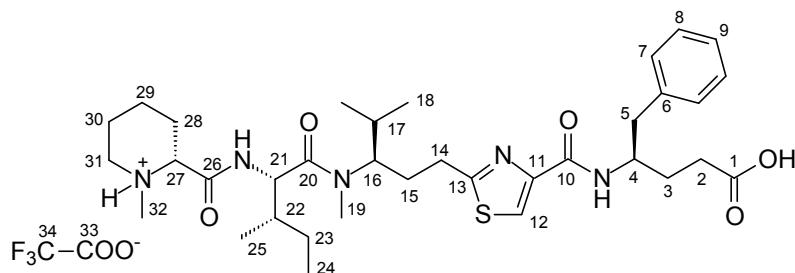
Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +8.4^{\circ}$ ($c = 1.0$, CHCl_3)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{O}_5\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$	670.4002	670.4000

(4R)-4-[(R)-2-{3-[Methyl-(N-methyl-(R)-pipercolyl-(S)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino]-5-phenyl-pentansäure-Trifluoressigsäure-Salz (107)

Gemäß AAV 3 wurden 37 mg des *N*-methylierten Tetrapeptids **106** (55.2 μmol) mit 110 μl 1 M NaOH (110 μmol , 2.0 Äq.) verseift und mit Trifluoressigsäure angesäuert. Nach säulenchromatographischer Reinigung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 9:1, 8:2) wurde das TFA-Salz **107** in quantitativer Ausbeute als weißer Feststoff erhalten.

$R_f(\mathbf{107}) = 0.11$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 9:1)



107

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

$\delta = 0.78$ (d, $^3J_{18,17} = 6.5$ Hz, 3 H, 18-H), 0.91 (t, $^3J_{24,23} = 7.5$ Hz, 3 H, 24-H), 0.97 (d, $^3J_{18',17} = 6.5$ Hz, 3 H, 18'-H), 1.01 (d, $^3J_{25,22} = 6.8$ Hz, 3 H, 25-H), 1.23 (ddq, $^2J_{23a,23b} = 13.7$ Hz, $^3J_{23a,22} = 9.0$ Hz, $^3J_{23a,24} = 7.3$ Hz, 1 H, 23-H_a), 1.48 (dddd, $^2J_{29ax,29eq} \approx ^3J_{29ax,28ax} \approx ^3J_{29ax,30ax} = 12.7$ Hz, $^3J_{29ax,28eq} \approx ^3J_{29ax,30eq} = 3.4$ Hz, 1 H, 29-H_{ax}), 1.56-2.06 (sh, 11 H, 3-H, 15-H_a, 17-H, 22-H, 23-H_b, 28-H, 29-H_{eq}, 30-H), 2.16 (dtd, $^2J_{15b,15a} = 14.4$ Hz, $^3J_{15b,14} = 8.1$ Hz, $^3J_{15b,16} = 3.3$ Hz, 1 H, 15-H_b), 2.27 (dt, $^2J_{2a,2b} = 15.6$ Hz, $^3J_{2a,3} = 7.4$ Hz, 1 H, 2-H_a), 2.37 (dt, $^2J_{2b,2a} = 15.6$ Hz, $^3J_{2b,3} = 7.4$ Hz, 1 H, 2-H_b), 2.51 (s, 3 H, 32-H), 2.68 (dd, $^2J_{31ax,31eq} \approx ^3J_{31ax,30ax} = 12.3$ Hz, 1 H, 31-H_{ax}), 2.80-3.01 (sh, 4 H, 5-H, 14-H), 3.09 (s, 3 H, 19-H), 3.26 (d, $^2J_{31eq,31ax} = 12.3$ Hz, 1 H, 31-H_{eq}), 3.32 (m, 1 H, 27-H (unter MeOD)), 4.26-4.39 (sh, 2 H, 4-H, 16-H), 4.72 (d, $^3J_{21,22} = 8.5$ Hz, 1 H, 21-H), 7.15 (m, 1 H, 9-H), 7.18-7.27 (sh, 4 H, 7-H, 8-H), 7.99 (s, 1 H, 12-H).

2.7 Hz, 1 H, 14-H_b), 1.69 (m, 1 H, 8-H), 1.78 (m, 1 H, 13-H), 1.90 (m, 1 H, 6-H_a), 2.12 (m, 1 H, 6-H_b), 2.87 (dd, $^3J_{5,6a} \approx ^3J_{5,6b} = 7.7$ Hz, 2 H, 5-H), 2.99 (s, 3 H, 10-H), 4.36 (m, 1 H, 7-H), 4.53 (dd, $^3J_{12,NH} \approx ^3J_{12,13} = 8.5$ Hz, 1 H, 12-H), 5.05 (d, $^2J_{18a,18b} = 12.6$ Hz, 1 H, 18-H_a), 5.09 (d, $^2J_{18b,18a} = 12.6$ Hz, 1 H, 18-H_b), 5.78 (d, $^3J_{NH,12} = 9.5$ Hz, 1 H, NH), 7.19-7.39 (sh, 5 H, arom.-H), 8.10 (s, 1 H, 3-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.90$ (d, $^3J_{9,8/16,13} = 6.3$ Hz, 3 H, 9-H/16-H), 1.03 (d, $^3J_{9',8} = 6.3$ Hz, 3 H, 9'-H), 2.73 (s, 3 H, 10-H), 3.60 (dd, $^3J_{7,6a/b} \approx ^3J_{7,8} = 9.4$ Hz, 1 H, 7-H), 4.68 (dd, $^3J_{12,NH} = 9.5$ Hz, $^3J_{12,13} = 6.5$ Hz, 1 H, 12-H), 8.08 (s, 1 H, 3-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 11.1$ (q, C-15), 15.9 (q, C-16), 19.5 (q, C-9), 20.0 (q, C-9'), 24.1 (t, C-14), 29.6 (t, C-6), 29.7* (q, C-10), 30.2 (m, C-5, C-8), 37.2 (d, C-13), 55.8 (d, C-12), 59.0 (d, C-7), 66.8 (t, C-18), 127.6 (d, C-3), 127.7 (d, C-20/21), 128.0 (d, C-22), 128.4 (d, C-20/21), 136.5 (t, C-19), 146.3 (s, C-2), 156.6 (s, C-17), 163.0 (s, C-1), 170.6 (s, C-4), 174.1 (s, C-11).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -14.3^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

Schmelzpunkt: 51-53 °C

Elementaranalyse:

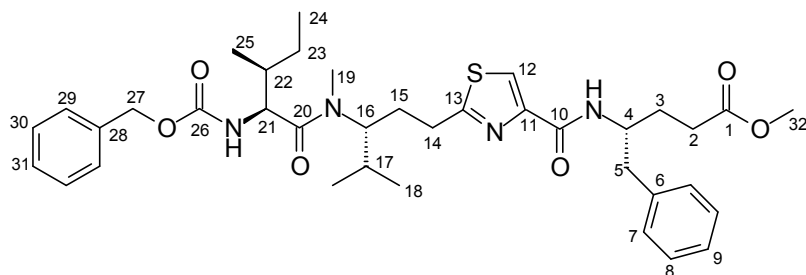
C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₅ S	Ber.	C 61.33	H 7.21	N 8.58
(489.63)	Gef.	C 61.31	H 7.04	N 8.31

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₂₄ H ₃₆ N ₃ O ₃ S [M-CO ₂ +H] ⁺	446.2477	446.2477

(4R)-4-(((R)-2-{3-[(N-Benzoyloxycarbonyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino]-5-phenyl-pentansäure-methylester (109)

Gemäß AAV 1 wurden 49 mg der freien Säure **108** (100 μmol) und 37 mg des Amin **104** als Hydrochlorid (152 μmol , 1.5 Äq.) mit Hilfe von 14 μl Chlorameisensäure-*iso*-butylester (108 μmol , 1.1 Äq.) und 2 x 12 μl NMM (218 μmol , 2.2 Äq.) zum Tripeptid **109** geknüpft. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hex:Et₂O 3:7, 2:8) wurden 57 mg Produkt (84.0 μmol , 84 % d. Th.) als farbloses Harz erhalten.

$R_f(\mathbf{109}) = 0.24$ (Hexan:EE 1:1)



109

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 0.76 (d, $^3J_{18,17}$ = 6.5 Hz, 3 H, 18-H), 0.85 (t, $^3J_{24,23}$ = 7.4 Hz, 3 H, 24-H), 0.95 (d, $^3J_{25,22}$ = 6.5 Hz, 3 H, 25-H), 0.97 (d, $^3J_{18',17}$ = 6.3 Hz, 3 H, 18'-H), 1.10 (ddq, $^2J_{23a,23b}$ = 13.6 Hz, $^3J_{23a,22}$ = 9.8 Hz, $^3J_{23a,24}$ = 7.3 Hz, 1 H, 23-H_a), 1.57 (dq, $^2J_{23b,23a}$ = 13.6 Hz, $^3J_{23b,24}$ = 7.6 Hz, $^3J_{23b,22}$ = 2.9 Hz, 1 H, 23-H_b), 1.65-1.90 (sh, 4 H, 3-H_a, 15-H_a, 17-H, 22-H), 1.95 (m, 1 H, 3-H_b), 2.35 (ddd, $^2J_{2a,2b}$ = 16.3 Hz, $^3J_{2a,3a/b}$ = 9.3 Hz, $^3J_{2a,3a/b}$ = 6.5 Hz, 1 H, 2-H_a), 2.43 (ddd, $^2J_{2b,2a}$ = 16.3 Hz, $^3J_{2b,3a/b}$ = 9.8 Hz, $^3J_{2b,3a/b}$ = 6.0 Hz, 1 H, 2-H_b), 2.79 (t, $^3J_{14,15}$ = 8.2 Hz, 2 H, 14-H), 2.82 (dd, $^2J_{5a,5b}$ = 13.3 Hz, $^3J_{5a,4}$ = 7.2 Hz, 1 H, 5-H_a), 2.96 (s, 3 H, 19-H), 2.97 (dd, $^2J_{5b,5a}$ = 13.3 Hz, $^3J_{5b,4}$ = 5.8 Hz, 1 H, 5-H_b), 3.55 (s, 3 H, 32-H), 4.28-4.43 (sh, 2 H, 4-H, 16-H), 4.54 (dd, $^3J_{21,NH}$ = 9.4 Hz, $^3J_{21,22}$ = 7.0 Hz, 1 H, 21-H), 5.06 (d, $^2J_{27a,27b}$ = 12.5 Hz, 1 H, 27-H_a), 5.10 (d, $^2J_{27b,27a}$ = 12.5 Hz, 1 H, 27-H_b), 5.47 (d, $^3J_{NH,21}$ = 9.4 Hz, 1 H, NH_{IIc}), 7.15-7.34 (sh, 10 H, arom.-H), 7.37 (d, $^3J_{NH,4}$ = 9.0 Hz, 1 H, NH_{IIa}), 7.89 (s, 1 H, 12-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 0.86 (t, $^3J_{24,23}$ = 7.3 Hz, 3 H, 24-H), 0.92, 0.93 (2 d, $^3J_{18,17}$ = $^3J_{25,22}$ = 6.8 Hz, 6 H, 18-H, 25-H), 1.06 (d, $^3J_{18',17}$ = 6.5 Hz, 3 H, 18'-H), 2.73 (s, 3 H, 19-H), 3.56 (s, 3 H, 32-H), 4.64 (dd, $^3J_{21,NH}$ = 9.8 Hz, $^3J_{21,22}$ = 6.8 Hz, 1 H, 21-H), 5.04 (d, $^2J_{27a,27b}$ = 12.3 Hz, 1 H, 27-H_a), 5.54 (d, $^3J_{NH,21}$ = 9.8 Hz, 1 H, NH_{IIc}), 7.88 (s, 1 H, 12-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

δ = 11.2 (q, C-24), 15.9 (q, C-25), 19.5 (q, C-18), 20.1 (q, C-18'), 23.9 (t, C-23), 29.1 (t, C-3), 29.3 (t, C-15), 29.6 (q, C-19), 29.9* (t, C-14), 30.2 (d, C-17), 31.0 (t, C-2), 37.6 (d, C-22), 41.5 (t, C-5), 49.8 (d, C-4), 51.5 (q, C-32), 55.8 (d, C-21), 58.6* (d, C-16), 66.8 (t, C-27), 122.4 (d, C-12), 126.5 (d, C-9), 127.8 (d, C-29/30), 128.0 (d, C-31), 128.4, 128.4 (2 d, C-8, C-29/30), 129.4 (d, C-7), 136.4 (s, C-28), 137.7 (s, C-6), 149.7 (s, C-11), 156.5 (s, C-26), 160.9 (s, C-10), 169.6 (s, C-13), 173.3 (s, C-20), 173.9 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.3 (q, C-24), 16.2 (q, C-25), 20.4 (q, C-18), 23.5 (t, C-23), 27.4 (q, C-19), 29.2 (t, C-3), 31.0 (t, C-2), 37.9 (d, C-22), 50.0 (d, C-4), 55.3 (d, C-21), 62.7 (d, C-16), 66.9 (t, C-27), 122.7 (d, C-12), 137.8 (s, C-6), 169.8 (s, C-13), 172.7 (s, C-1/20).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -10.9^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3)

Elementaranalyse:

$\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$	Ber.	C 65.77	H 7.70	N 8.07
(693.92)	Gef.	C 65.39	H 7.35	N 8.35

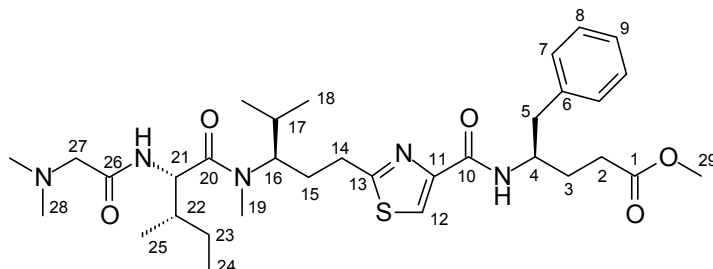
HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_6\text{S} [\text{M}-\text{CH}_2]^+$	679.3529	679.3581

(4R)-4-[(R)-2-{3-[(N,N-Dimethyl-glycyl-(S)-isoleucyl)-methylamino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl]-amino]-5-phenyl-pentansäure-methylester (110)

Zu einer Lösung von 103 mg *N,N*-Dimethylglycin (0.999 mmol) in 2.5 ml Essigsäure-ethylester wurden 202 mg Pentafluorphenol (1.10 mmol) und 227 mg DCC (1.10 mmol) gegeben. Der über Nacht ausgefallene Harnstoff wurde über Celite abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.^[48]

Es wurden 128 mg des Tripeptids **109** (0.189 mmol) nach **AAV 5** mit 330 μl HBr/AcOH (1.91 mmol, 10 Äq.) Z-entschützt und anschließend mit 195 mg des rohen Pentafluorphenol-esters (< 0.724 mmol, < 3.8 Äq.) in 1.9 ml Dichlormethan umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan:EE 1:1, 0:100, CH_2Cl_2 :MeOH 98:2, 95:5) wurden 66 mg des Tetrapeptids **110** (0.105 mmol, 55 % d. Th.) als leicht gelbliches Öl erhalten.

$R_f(\mathbf{110}) = 0.38$ (CH_2Cl_2 :MeOH 9:1)



110

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

Hauptrotamer

$\delta = 0.74$ (d, $^3J_{18,17} = 6.5$ Hz, 3 H, 18-H), 0.84 (t, $^3J_{24,23} = 7.3$ Hz, 3 H, 24-H), 0.94 (2 d, $^3J_{18',17} = ^3J_{25,22} = 6.8$ Hz, 6 H, 18'-H, 25-H), 1.10 (ddq, $^2J_{23a,23b} = 13.8$ Hz, $^3J_{23a,22} = 9.8$ Hz, $^3J_{23a,24} = 7.3$ Hz, 1 H, 23-H_a), 1.56 (dq, $^2J_{23b,23a} = 13.8$ Hz, $^3J_{23b,24} = 7.2$ Hz, $^3J_{23b,22} = 2.8$ Hz, 1 H, 23-H_b), 1.69 (m, 1 H, 17-H), 1.74-1.89 (sh, 3 H, 3-H_a, 15-H_a, 22-H), 1.94 (m, 1 H, 3-H_b), 2.09 (dtd, $^2J_{15b,15a} = 14.8$ Hz, $^3J_{15b,14} = 8.5$ Hz, $^3J_{15,16} = 3.4$ Hz, 1 H, 15-H_b), 2.24 (s, 6 H, 28-H), 2.34 (ddd, $^2J_{2a,2b} = 16.1$ Hz, $^3J_{2a,3a/b} = 8.5$ Hz, $^3J_{2a,3a/b} = 6.7$ Hz, 1 H, 2-H_a), 2.40 (ddd, $^2J_{2b,2a} = 16.1$ Hz, $^3J_{2b,3a/b} = 9.1$ Hz, $^3J_{2b,3a/b} = 6.4$ Hz, 1 H, 2-H_b), 2.75-3.02 (sh, 6 H, 5-H, 14-H, 27-H), 2.97 (s, 3 H, 19-H), 3.55 (s, 3 H, 29-H), 4.28-4.43 (sh, 2 H, 4-H, 16-H), 4.81 (dd,

$^3J_{21,\text{NH}} = 9.7$ Hz, $^3J_{21,22} = 7.5$ Hz, 1 H, 21-H), 7.13-7.27 (sh, 5 H, arom.-H), 7.36 (d, $^3J_{\text{NH},4} = 9.3$ Hz, 1 H, NH^{Phen}), 7.59 (d, $^3J_{\text{NH},21} = 9.7$ Hz, 1 H, NH_{Ile}), 7.87 (s, 1 H, 12-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 0.90$ (d, $^3J_{18,17/25,22} = 6.8$ Hz, 3 H, 18'-H/25-H), 1.06 (d, $^3J_{18',17} = 6.5$ Hz, 3 H, 18'-H), 2.65 (ddd, $^3J_{14a,14b} = 15.8$ Hz, $^3J_{14a,15a/b} = 10.9$ Hz, $^3J_{14,15a/b} = 4.6$ Hz, 1 H, 14-H_a), 2.76 (s, 3 H, 19-H), 3.64 (ddd, $^3J_{16,15a} \approx ^3J_{16,17} = 10.2$ Hz, $^3J_{16,15b} = 3.0$ Hz, 1 H, 16-H), 4.92 (dd, $^3J_{21,\text{NH}} = 9.8$ Hz, $^3J_{21,22} = 6.8$ Hz, 1 H, 21-H), 7.30 (d, $^3J_{\text{NH},4} = 9.5$ Hz, 1 H, NH^{Phen}), 7.66 (d, $^3J_{\text{NH},21} = 9.8$ Hz, 1 H, NH_{Ile}), 7.86 (s, 1 H, 12-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

$\delta = 11.1$ (q, C-24), 15.9 (q, C-25), 19.5 (q, C-18), 20.0 (q, C-18'), 24.2 (t, C-23), 29.1 (t, C-3), 29.2 (t, C-15), 29.6* (q, C-19), 30.0 (t, C-14), 30.2 (d, C-17), 30.9 (t, C-2), 37.3 (d, C-22), 41.4 (t, C-5), 45.9 (q, C-28), 49.8 (d, C-4), 51.5 (q, C-29), 53.1 (d, C-21), 58.5* (d, C-16), 63.0 (t, C-27), 122.3 (d, C-12), 126.4 (d, C-9), 128.4 (d, C-8), 129.4 (d, C-7), 137.6 (s, C-6), 149.7 (s, C-11), 160.8 (s, C-10), 169.6 (s, C-13), 170.4 (s, C-26), 173.0 (s, C-20), 173.7 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 11.2$ (q, C-24), 16.3 (q, C-25), 20.3 (q, C-18), 20.4 (q, C-18'), 23.9 (t, C-23), 27.3 (q, C-19), 31.3 (t, C-2), 37.9 (d, C-22), 46.0 (q, C-28), 49.9 (d, C-4), 52.5 (d, C-21), 62.6 (d, C-16), 63.1 (t, C-27), 122.6 (d, C-12), 149.6 (s, C-11), 169.8 (s, C-13), 170.1 (s, C-26), 172.6 (s, C-20), 173.7 (s, C-1).

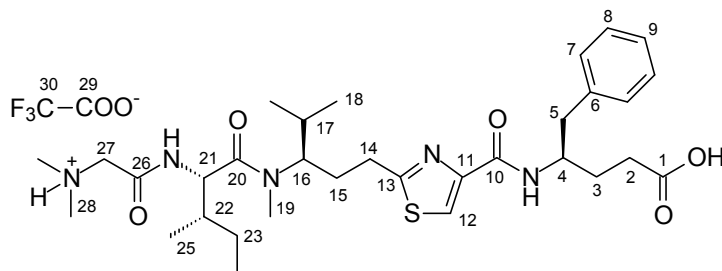
Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -25.7^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl₃)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₃ H ₅₂ N ₅ O ₅ S [M+H] ⁺	630.3689	630.3687

(4R)-4-[(R)-2-{3-[(N,N-Dimethyl-glycyl)-(S)-isoleucyl]-methylamino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino]-5-phenyl-pentansäure-Trifluoressigsäure-Salz (111)

Gemäß **AAV 3** wurden 52 mg des *N*-methylierten Tetrapeptids **110** (82.6 μmol) mit 165 μl 1 M NaOH (165 μmol , 2.0 Äq.) verseift und mit Trifluoressigsäure angesäuert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:MeOH 9:1, 8:2) wurde das TFA-Salz **111** in quantitativer Ausbeute als weißer Feststoff erhalten.

$R_f(\mathbf{111}) = 0.09$ (CH₂Cl₂:MeOH 9:1)



111

¹H-NMR (400 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

δ = 0.78 (d, $^3J_{18,17}$ = 6.5 Hz, 3 H, 18-H), 0.92 (t, $^3J_{24,23}$ = 7.4 Hz, 3 H, 24-H), 0.97 (d, $^3J_{18',17}$ = 6.6 Hz, 3 H, 18'-H), 1.02 (d, $^3J_{25,22}$ = 6.8 Hz, 3 H, 25-H), 1.21 (ddq, $^2J_{23a,23b}$ = 13.8 Hz, $^3J_{23a,22}$ = 9.6 Hz, $^3J_{23a,24}$ = 7.3 Hz, 1 H, 23-H_a), 1.64 (dq, $^2J_{23b,23a}$ = 13.8 Hz, $^3J_{23b,24}$ = 7.5 Hz, $^3J_{23b,22}$ = 2.8 Hz, 1 H, 23-H_b), 1.78 (m, 1 H, 17-H), 1.84-2.06 (sh, 4 H, 3-H, 15-H_a, 17-H, 22-H), 2.16 (dtd, $^2J_{15b,15a}$ = 14.5 Hz, $^3J_{15b,14}$ = 8.1 Hz, $^3J_{15b,16}$ = 3.3 Hz, 1 H, 15-H_b), 2.32 (dt, $^2J_{2a,2b}$ = 15.9 Hz, $^3J_{2a,3}$ = 7.6 Hz, 1 H, 2-H_a), 2.41 (ddd, $^2J_{2b,2a}$ = 15.9 Hz, $^3J_{2b,3a/b}$ = 8.7 Hz, $^3J_{2b,3a/b}$ = 6.2 Hz, 1 H, 2-H_b), 2.72 (s, 6 H, 28-H), 2.80-3.03 (sh, 4 H, 5-H, 14-H), 3.08 (s, 3 H, 19-H), 3.68 (d, $^2J_{27a,27b}$ = 15.6 Hz, 1 H, 27-H_a), 3.73 (d, $^2J_{27b,27a}$ = 15.6 Hz, 1 H, 27-H_b), 4.26-4.39 (sh, 2 H, 4-H, 16-H), 4.79 (d, $^3J_{21,22}$ = 7.8 Hz, 1 H, 21-H), 7.16 (m, 1 H, 9-H), 7.20-7.26 (sh, 4 H, 7-H, 8-H), 7.97 (s, 1 H, 12-H).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 1.11 (d, $^3J_{18',17}$ = 6.5 Hz, 3 H, 18'-H), 2.68 (s, 6 H, 28-H), 2.77 (s, 1 H, 19-H).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD):

Hauptrotamer

δ = 11.4 (q, C-24), 16.1 (q, C-25), 20.2 (q, C-18), 20.5 (q, C-18'), 25.4 (t, C-23), 30.3 (t, C-15), 30.9* (q, C-19), 30.8 (t, C-14), 31.0 (t, C-3), 31.3 (d, C-17), 32.9 (t, C-2), 37.9 (d, C-22), 42.1 (t, C-5), 44.8 (q, C-28), 52.0 (d, C-4), 55.7 (d, C-21), 59.9* (d, C-16), 60.4 (t, C-27), 118.2 (q, $^1J_{34,F}$ = 290.9 Hz, C-30), 124.2 (d, C-12), 127.4 (d, C-9), 129.3 (d, C-8), 130.4 (d, C-7), 139.6 (s, C-6), 150.4 (s, C-11), 163.1 (q, $^2J_{33,F}$ = 35.6 Hz, C-29), 163.2 (s, C-10), 167.6 (s, C-26), 171.8 (s, C-13), 174.5 (s, C-20), 178.9 (s, C-1).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

δ = 11.6 (q, C-24), 16.5 (q, C-25), 21.0 (q, C-18), 24.7 (t, C-23), 32.5 (t, C-2), 38.4 (d, C-22), 41.9 (t, C-5), 45.0 (q, C-28), 54.8 (d, C-21), 124.4 (d, C-12).

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$ = -26.1 ° (c = 1.0, MeOH)

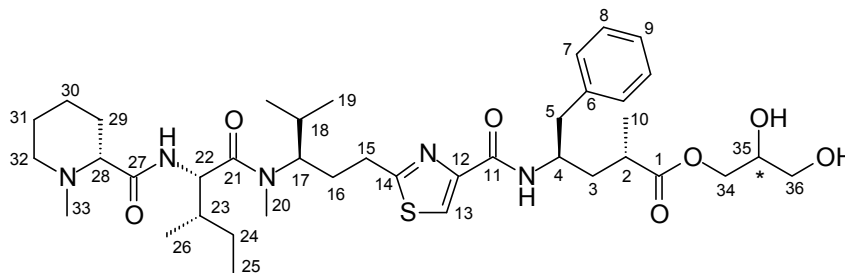
Schmelzpunkt: 55 °C

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₂ H ₄₈ N ₅ O ₄ S [M-OH] ⁺	598.3427	598.3447

(2*S*,4*R*)-4-(((*R*)-2-{3-[Methyl-(*N*-methyl-(*R*)-pipercolyl-(*S*)-isoleucyl)-amino]-4-methylpentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino)-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-2,3-dihydroxypropylester (112)

Zu einer Lösung von 20.2 mg Prätabulysin-Trifluoressigsäuresalz **102** (25.8 μmol) in 100 μl Dichlormethan und 50 μl DMF wurden zunächst 1.3 mg DMAP (10.6 μmol , 0.4 Äq.), sowie eine Lösung von 12.3 mg Glycerol (134 μmol , 5.2 Äq.) in 100 μl DMF gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 5.9 mg DCC (28.6 μmol , 1.1 Äq.) versetzt und über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen. Der entstandene Harnstoff wurde abfiltriert, das Filtrat wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung, sowie gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH_2Cl_2 : MeOH 98:2, 9:1) wurden 13 mg des Glycerolesters **112** (17.5 μmol , 68 % d. Th., dr 1:1) als zähes farbloses Öl erhalten.

$R_f(\mathbf{112}) = 0.13$ (CH_2Cl_2 : MeOH 9:1)



112

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): *Das Diastereomerenverhältnis beträgt 1:1 (am C-35).*

Hauptrotamer

$\delta = 0.75$ (d, $^3J_{19,18} = 6.8$ Hz, 3 H, 19-H), 0.85 (t, $^3J_{25,24} = 7.4$ Hz, 3 H, 25-H), 0.93 (d, $^3J_{19',18} = 6.5$ Hz, 3 H, 19'-H), 0.96 (d, $^3J_{26,23} = 6.8$ Hz, 1.5 H, 26- H_{dia1}), 0.97 (d, $^3J_{26,23} = 6.8$ Hz, 1.5 H, 26- H_{dia2}), 1.12 (d, $^3J_{10,2} = 7.0$ Hz, 3 H, 10-H), 1.09-1.21 (sh, 2 H, 24- H_a , 30- H_{ax}), 1.34 (dddd, $^2J_{29ax,29eq} \approx ^3J_{29ax,28} \approx ^3J_{29ax,30ax} = 13.0$ Hz, $^3J_{29ax,30eq} = 3.4$ Hz, 1 H, 29- H_{ax}), 1.49 (dddd, $^2J_{31ax,31eq} \approx ^3J_{31ax,30ax} \approx ^3J_{31ax,32ax} = 12.5$ Hz, $^3J_{31ax,30eq} \approx ^3J_{31ax,32eq} = 3.4$ Hz, 1 H, 31- H_{ax}), 1.55-1.72 (sh, 5 H, 3- H_a , 18-H, 24- H_b , 30- H_{eq} , 31- H_{eq}), 1.74-1.90 (sh, 3 H, 16- H_a , 23-H, 29- H_{eq}), 1.93-2.10 (sh, 3 H, 3- H_b , 16- H_b , 32- H_{ax}), 2.22 (s, 3 H, 33-H), 2.47 (dd, $^3J_{28,29ax} = 10.9$ Hz, $^3J_{28,29eq} = 2.9$ Hz, 1 H, 28-H), 2.60 (m, 1 H, 2-H), 2.74-2.96 (sh, 5 H, 5-H, 15-H, 32- H_{eq}), 3.00 (s, 3 H, 20-H), 3.57 (dd, $^2J_{36a,36b} = 11.3$ Hz, $^3J_{36a,35} = 6.0$ Hz, 1 H, 36- H_a), 3.64 (dd, $^2J_{36b,36a} = 11.3$ Hz, $^3J_{36b,35} = 7.0$ Hz, 0.5 H, 36- $\text{H}_{b,dia1}$), 3.65 (dd, $^2J_{36b,36a} = 11.3$ Hz, $^3J_{36b,35} = 6.0$ Hz, 0.5 H, 36- $\text{H}_{b,dia2}$), 3.78 (dd, $^2J_{34a,34b} = 11.3$ Hz, $^3J_{34a,35} = 7.2$ Hz, 0.5 H, 34- $\text{H}_{a,dia1}$), 3.85 (dd, $^2J_{34a,34b} = 11.3$ Hz, $^3J_{34a,35} = 2.7$ Hz, 0.5 H, 34- $\text{H}_{a,dia2}$), 3.92 (m, 0.5 H, 35- H_{dia1}), 4.00 (m, 0.5 H, 35- H_{dia2}), 4.35-4.53 (sh, 2 H, 4-H, 17-H), 4.46 (dd, $^2J_{34b,34a} = 11.3$ Hz, $^3J_{34b,35} = 7.2$ Hz, 0.5 H, 34- $\text{H}_{b,dia1}$), 4.48 (dd, $^2J_{34b,34a} = 11.3$ Hz, $^3J_{34b,35} = 4.1$ Hz, 0.5 H, 36- $\text{H}_{b,dia2}$), 4.77 (dd,

$^3J_{22,23} \approx ^3J_{22,\text{NH}} = 8.8$ Hz, 1 H, 22-H), 7.08 (d, $^3J_{\text{NH},22} = 9.5$ Hz, 1 H, NH_{Ile}), 7.16-7.22 (sh, 3 H, 7-H, 9-H), 7.25 (m, 2 H, 8-H), 7.66 (d, $^3J_{\text{NH},4} = 10.0$ Hz, 1 H, NH_{Tup}), 7.88 (s, 0.5 H, 13-H_{dia1}), 7.89 (s, 0.5 H, 13-H_{dia2}).

Nebenrotamer (ausgewählte Signale)

$\delta = 1.06$ (d, $^3J_{19',18} = 6.5$ Hz, 3 H, 19'-H), 7.47 (d, $^3J_{\text{NH},4} = 10.0$ Hz, 1 H, NH_{Tup}), 7.83 (s, 0.5 H, 13-H_{dia1}), 7.90 (s, 0.5 H, 13-H_{dia2}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃):

Hauptrotamer

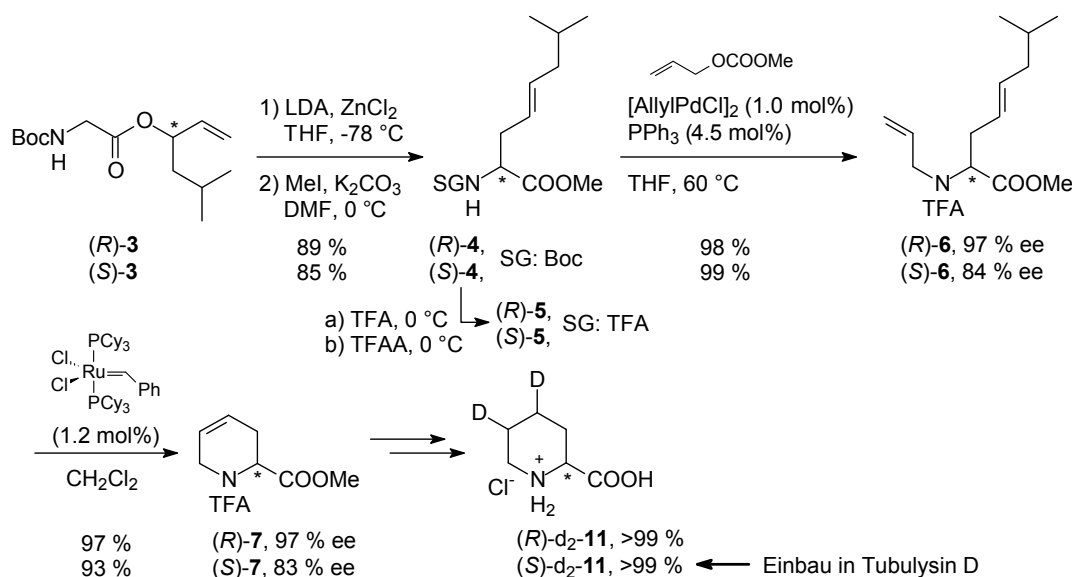
$\delta = 11.0$ (q, C-25), 15.9 (q, C-26), 18.1 (q, C-10_{dia1}), 18.3 (q, C-10_{dia2}), 19.6 (q, C-19), 20.1 (q, C-19'), 23.3 (t, C-30), 24.6 (t, C-24), 25.1 (t, C-31), 29.4 (t, C-16), 29.7* (q, C-20), 29.8 (t, C-15), 30.2 (d, C-18), 30.5 (t, C-29), 36.1 (d, C-2_{dia1}), 36.2 (d, C-2_{dia2}), 37.3 (d, C-23), 39.2 (t, C-3), 42.1 (t, C-5_{dia1}), 42.2 (t, C-5_{dia2}), 44.9 (q, C-33), 48.0 (d, C-4_{dia1}), 48.1 (d, C-4_{dia2}), 53.1 (d, C-22), 55.4 (t, C-32), 58.4* (d, C-17), 63.1 (t, C-36), 65.7 (t, C-34_{dia1}), 66.2 (t, C-34_{dia2}), 69.4 (d, C-35_{dia1}), 69.7 (d, C-28), 69.7 (d, C-35_{dia2}), 123.0 (d, C-13), 126.6 (d, C-9), 128.4 (d, C-8_{dia1}), 128.5 (d, C-8_{dia2}), 129.3 (d, C-7_{dia1}), 129.3 (d, C-7_{dia2}), 137.4 (s, C-6), 149.0 (s, C-12_{dia1}), 149.1 (s, C-12_{dia2}), 161.3 (s, C-11_{dia1}), 161.3 (s, C-11_{dia2}), 169.7 (s, C-14), 173.4 (s, C-21), 174.3 (s, C-27), 176.3 (s, C-1_{dia1}), 176.5 (s, C-1_{dia2}).

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +30^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

HRMS (CI)	Berechnet	Gefunden
C ₃₉ H ₆₁ N ₅ O ₇ S [M+H] ⁺	744.4370	744.4392

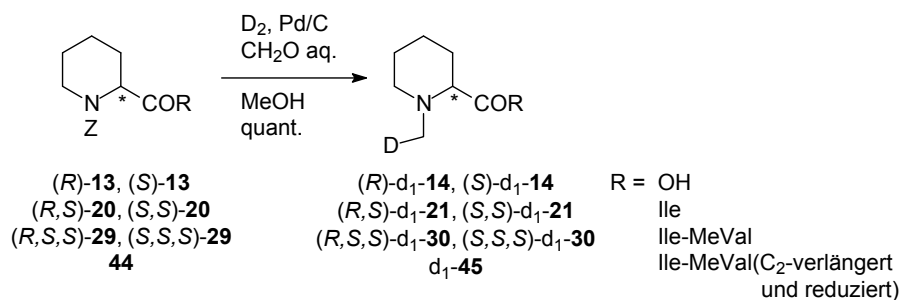
6 Zusammenfassung

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, deuterierte Pipecolinsäure in (*R*)- und (*S*)-Konfiguration zu synthetisieren, um eindeutig zeigen zu können, dass freie Pipecolinsäure einer bestimmten Konfiguration die Starteinheit der Tubulylin-Biosynthese ist. Die Synthese (Schema 6.1) gelang ausgehend von enantiomerenreinen Allylalkoholen über Schlüsselreaktionen wie Esterenolat-Claisen-Umlagerung (**3**→**4**), Pd⁰-katalysierte *N*-Allylierung (**5**→**6**) und Ringschlussmetathese (**6**→**7**). In Fütterungsexperimenten der Arbeitsgruppe Müller konnte mit (*S*)-**d**₂-**11** und (*R*)-**d**₂-**11** eindeutig gezeigt werden, dass (*S*)-Pipecolinsäure am Beginn der Biosynthese steht.



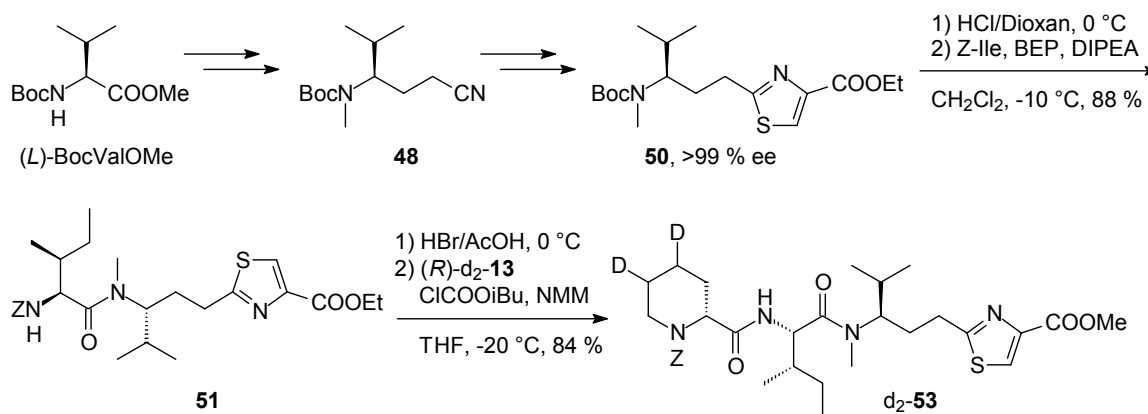
Schema 6.1 Synthese von deuterierter Pipecolinsäure **d**₂-**11**

Die Einführung von Deuterium in *N*-Methylpipecolinsäure (**d**₁-**14**) und kleinen Peptiden (**d**₁-**21**, **d**₁-**30** und **d**₁-**45**) gelang mit Hilfe einer reduktiven Aminierung in Gegenwart eines Pd/C-Katalysators unter Deuteriumatmosphäre direkt im Anschluss an die *Z*-Entschützung (Schema 6.2). Die Verbindungen **d**₁-**14**, **d**₁-**21** und **d**₁-**30** wurden mit Pipecolinsäure beider Konfigurationen synthetisiert, um in Fütterungsstudien die Pipecolinsäure-Epimerase lokalisieren zu können.



Schema 6.2 Entsch\u00fctzung von Z-Pipecolins\u00e4ure **13** und Z-gesch\u00fctzten Peptiden **20**, **29** und **44** und anschließende Deuterierung durch reduktive Aminierung

F\u00fcr die n\u00e4chsten Intermediate musste die Thiazol-Aminos\u00e4ure „Tubuvalin“ **50** synthetisiert werden. Hierzu wurde (*L*)-BocValOMe in einer kombinierten DIBALH-Reduktion/Wittig-Reaktion verl\u00e4ngert. Das ges\u00e4ttigte, *N*-methylierte Nitril **48** wurde mit H₂S in ein Thioamid \u00fcberf\u00fchrt, welches in einer modifizierten Hantzsch Thiazolsynthese umgesetzt wurde. Die durch die *N*-Methylgruppe erschwerte Peptidkn\u00fcpfung mit Isoleucin zu **51** konnte durch Verwendung von 2-Brom-1-ethyl-pyridinium-tetrafluoroborat (BEP), einem hierf\u00fcr pr\u00e4destinierten Reagenz, gel\u00f6st werden (Schema 6.3). Zudem erwies es sich als vorteilhaft, Z-gesch\u00fctztes Isoleucin zu verwenden. Die Anwesenheit von Schwefel im Molek\u00fcl verhinderte die *N*-Deuteromethylierung analog Schema 6.2, so dass auf dideuterierte Z-Pipecolins\u00e4ure (*R*)-d₂-**13** zur Tripeptidkn\u00fcpfung von d₂-**53** zur\u00fcckgegriffen wurde. Das Tripeptid d₂-**53** konnte als Vorstufe f\u00fcr die letzten beiden Intermediate genutzt werden.



Schema 6.3 „Tubuvalin“-Synthese und Peptidkn\u00fcpfungen

Durch Knüpfung der Vorstufen (d₁-14, d₁-21, d₁-30, d₁-45, d₂-55 und d₂-59) mit *N*-Acetylcysteamin konnten die in Abbildung 6.1 gezeigten Deuterium-markierten Biosynthese-Intermediate als SNAC-Ester (d₁-71, d₁-73, d₁-74, d₁-75, d₂-76 und d₂-77) gewonnen werden. Eine teilweise Epimerisierung der α -Stereozentren ließ sich bei der C-terminalen Aktivierung nicht vermeiden. Die Ergebnisse aus Fütterungsexperimenten stehen noch aus.

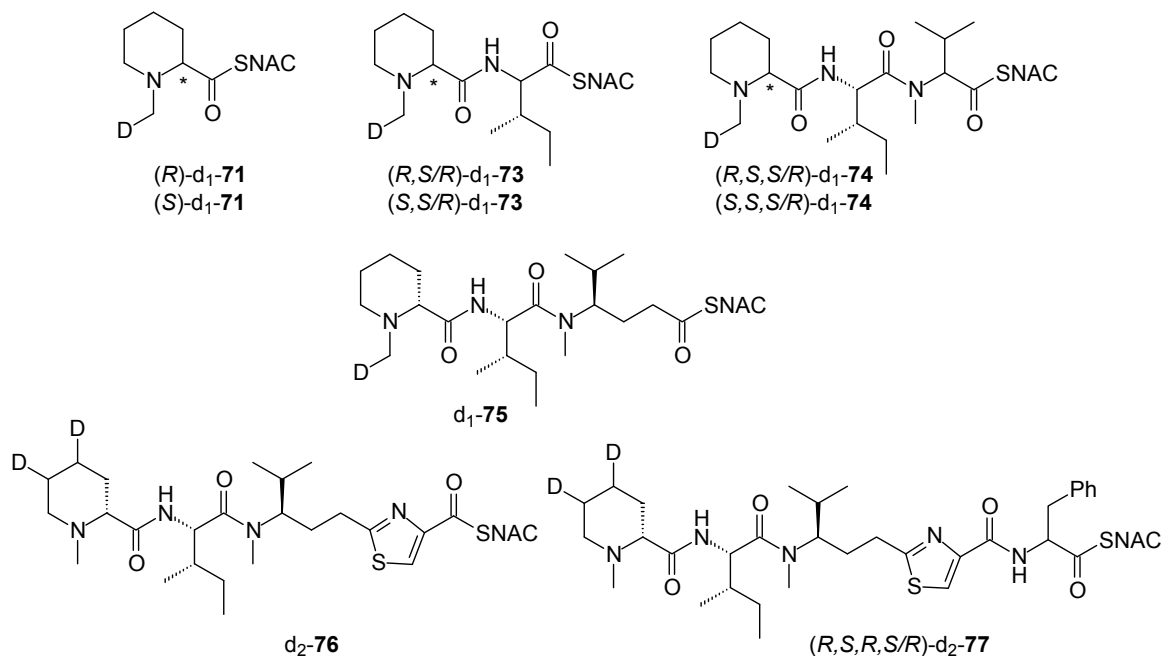
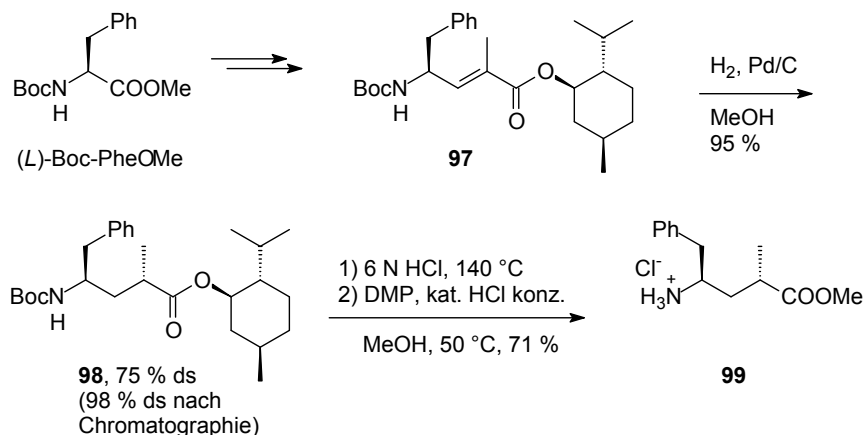


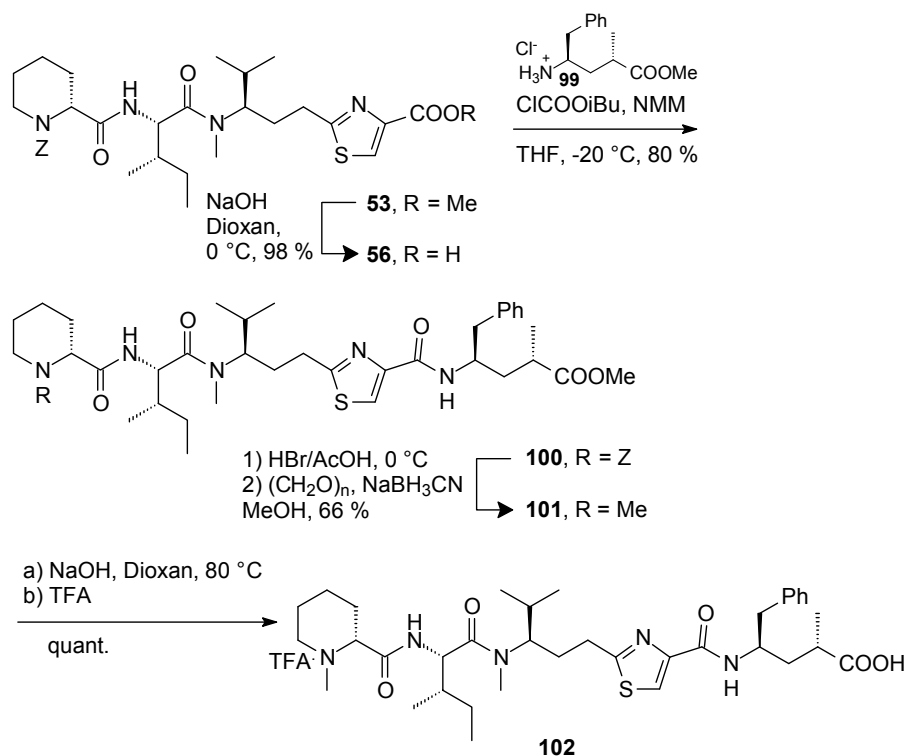
Abbildung 6.1 Deuterium-markierte Biosynthese-Intermediate als SNAC-Ester

Die γ -Aminosäure Tubophenylalanin wurde ausgehend von (*L*)-BocPheOMe in einer kombinierten DIBALH-Reduktion/Wittig-Reaktion verlängert und in den ungesättigten Mentholester **97** überführt (Schema 6.4). Bei dessen Hydrierung entstand **98** mit einer Diastereoselektivität von 75 %. Die Diastereomere konnten durch Säulenchromatographie getrennt werden, so dass **98** mit einem ds von 98 % erhalten werden konnte.



Schema 6.4 Tubophenylalanin-Synthese

Das undeuterierte Tripeptid **53**, das analog zur deuterierten Verbindung d_2 -**53** (Schema 6.3) synthetisiert wurde, konnte mit Tubuphenylalanin **99** zum Tetrapeptid **100** geknüpft werden (Schema 6.5). Zur *N*-Methylierung zu **101** wurde die klassische reduktive Aminierung mit Paraformaldehyd/Natriumcyanoborhydrid verwendet. Nach Entschützen des Methyl-esters konnte Prätubulysin als TFA-Salz **102** erhalten werden. In der Arbeitsgruppe Müller konnte durch Vergleich von Tandem-massenspektrometrisch erhaltenen Fragmentierungsmustern von **102** und biosynthetisch gewonnenem Material gezeigt werden, dass Prätubulysin tatsächlich ein Zwischenprodukt der Tubulysin-Biosynthese ist.



Schema 6.5 Tetrapeptid Prätubulysin **102**

Auf analoge Weise wurden noch weitere Prätubulysin-Derivate (Abb. 6.2; **55**, **59**, **107** und **111**) hergestellt, die neben Prätubulysin im Arbeitskreis Müller bezüglich ihrer cytotoxischen Eigenschaften getestet wurden. Unter diesen Derivaten hat Prätubulysin die höchste cytotoxische Wirkung, sie liegt jedoch unter der von Tubulysin A und D. Unter den Derivaten zeigte auch 2-Desmethyl-Prätubulysin **107** eine interessante cytotoxische Wirkung, die IC₅₀-Werte sind allerdings verglichen mit Prätubulysin **102** in allen getesteten Zelllinien um den Faktor 5-10 höher.

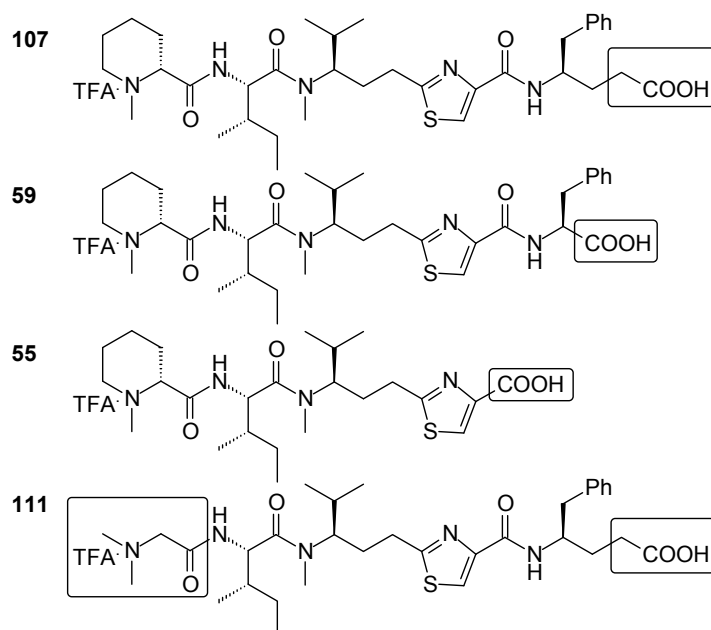
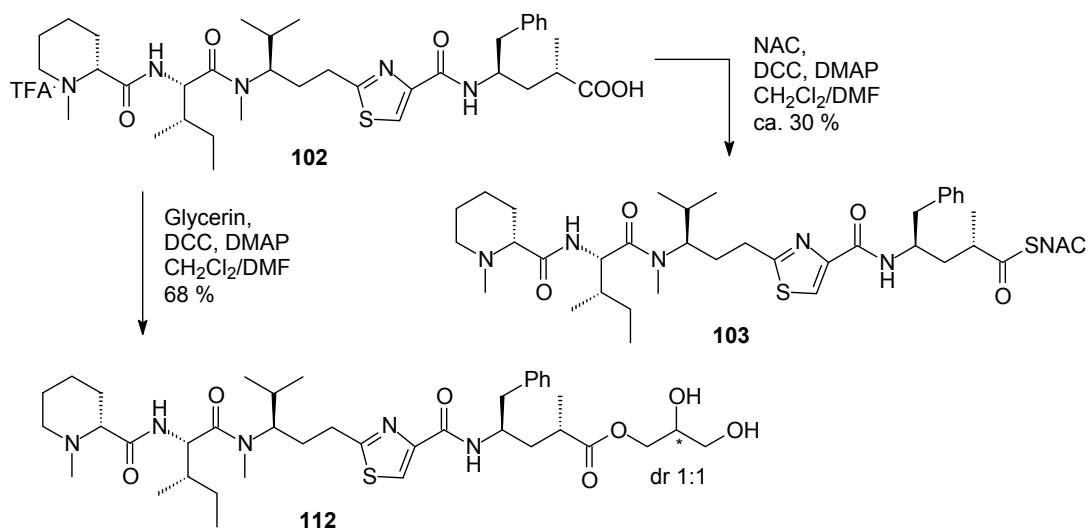


Abbildung 6.2 Vereinfachte Derivate von Prätubulysin

Prätubulysin **102** wurde weiter umgesetzt, zum einen zum SNAC-Ester **103**, zum anderen zum Glycerolester **112** (Schema 6.6). Der SNAC-Ester **103** soll Untersuchungen bezüglich der Abspaltung von Prätubulysin vom Multienzymkomplex durch die Thioesterase TE dienen. Der Glycerolester **112** wurde synthetisiert, da in Zellextrakten Verbindungen gefunden wurden, deren Massen auf Glycerolester von Prätubulysin und Tubulysin D passen. Massenspektrometrische Analysen und NMR-Vergleiche von synthetisiertem **112** und biosynthetischem Prätubulysin-Glycerolester sind in der Arbeitsgruppe Müller noch im Gange.

Schema 6.6 Umsetzungen mit Prätubulysin **102**

7 Literaturverzeichnis

- [1] a) HZI ResearchReport **2006-07**, 54-59; b) Wissenschaftlicher Ergebnisbericht **1999/200** des GBF, 97 (<http://www.helmholtz-hzi.de>).
- [2] H. Reichenbach, *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **2001**, *27*, 149-156.
- [3] T. Iizuka, Y. Jojima, R. Fudou, S. Yamanaka, *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *169*, 317-322.
- [4] S. Schneiker, O. Perlova, O. Kaiser, K. Gerth, A. Alici, M. O. Altmeyer, D. Bartels, T. Bekel, S. Beyer, E. Bode, H. B. Bode, C. J. Bolten, J. V. Choudhuri, S. Doss, Y. A. Elnakady, B. Frank, L. Gaigalat, A. Goesmann, C. Groeger, F. Gross, L. Jelsbak, J. Kalinowski, C. Kegler, T. Knauber, S. Konietzny, M. Kopp, L. Krause, D. Krug, B. Linke, T. Mahmud, R. Martinez-Arias, A. C. Mchardy, M. Merai, F. Meyer, S. Mormann, J. Muños-Dorado, J. Perez, S. Pradella, S. Rachid, G. Raddatz, F. Rosenau, C. Rückert, F. Sasse, M. Scharfe, S. C. Schuster, G. Suen, A. Treuner-Lange, G. J. Velicer, F. J. Vorhölter, K. J. Weissman, R. D. Welch, S. C. Wenzel, D. E. Whitworth, S. Wilhelm, C. Wittmann, H. Blöcker, A. Pühler, R. Müller, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1281-1289.
- [5] R. Jansen, H. Steinmetz, F. Sasse, W.-D. Schubert, G. Hagelüken, S. C. Albrecht, R. Müller, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5796-5799.
- [6] M. Nett, G. M. König, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1245-1261.
- [7] F. Sasse, H. Steinmetz, J. Heil, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 879-885.
- [8] H. Steinmetz, N. Glaser, E. Herdtweck, F. Sasse, H. Reichenbach, G. Höfle, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4996-5000; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4888-4892.
- [9] a) A. Sandmann, F. Sasse, R. Müller, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1071-1079; Dissertation A. Sandmann, Braunschweig **2004** (<http://www.digibib.tu-bs.de/?docid=00001638>).
- [10] M. A. Jordan, L. Wilson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253-265.
- [11] E. Nogales, S. G. Wolf, K. H. Downing, *Nature* **1998**, *391*, 199-203.
- [12] Dissertation Y. A. Elnakady, Braunschweig **2001** (<http://www.digibib.tu-bs.de/?docid=00001245>).
- [13] K. Gerth, N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiotics* **1996**, *49*, 560-563.

- [14] a) M. W. Khalil, F. Sasse, H. Lünsdorf, Y. A. Elnakady, H. Reichenbach, *Chem. Bio. Chem.* **2006**, *7*, 678-683; b) Dissertation M. W. Khalil, Braunschweig **1999** (<http://www.digibib.tu-bs.de/?docid=00001048>).
- [15] E. Hamel, *Pharmac Ther.* **1992**, *55*, 31-51.
- [16] N. A. Thornberry, *Chem. Biol.* **2004**, *5*, R97-R103.
- [17] Phil Dash, Basic Medical Sciences, St. George's, University of London (<http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash>).
- [18] G. Kaur, M. Hollingshead, S. Holbeck, V. Schauer-Vukašinović, R. F. Camalier, A. Dömling, S. Agarwal, *Biochem. J.* **2006**, *396*, 235-242.
- [19] a) A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Chronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766; b) K. D. Paull, R. H. Shoemaker, L. Hodes, A. Monks, D. A. Scudiero, L. Rubinstein, J. Plowman, M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 1088-1092.
- [20] S. V. Ambudkar, A. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, M. M. Gottesman, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*, 361-398.
- [21] D. T. Chao, S. J. Korsmeyer, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 395-419.
- [22] D. C. Altieri, *Oncogene* **2003**, *22*, 8581-8589.
- [23] J. A. Hasler, R. Estabrook, M. Murray, I. Pikuleva, M. Waterman, J. Capdevila, V. Holla, C. Helvig, J. R. Falck, G. Farrell, L. S. Kaminsky, S. D. Spivack, E. Boitier, P. Beaune, *Mol. Aspects Med.* **1999**, *20*, 1-137.
- [24] N. J. Mabweesh, D. Escuin, T. M. LaVallée, V. S. Pribluda, G. M. Swartz, M. S. Johnson, M. T. Willard, H. Zhong, J. W. Simons, P. Giannakakou, *Cancer Cell* **2003**, *3*, 363-375.
- [25] G. Höfle, N. Glaser, T. Leibold, U. Karama, F. Sasse, H. Steinmetz, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 167-178.
- [26] T. Iwagawa, M. Kaneko, H. Okamura, M. Nakatani, R. W. M. van Soest, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1310-1312.
- [27] B. H. Korsch, N. V. Riggs, *Tetrahedron Lett.* **1964**, *5*, 523-525.
- [28] H. M. Peltier, J. P. McMahon, A. W. Patterson, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16018-16019.
- [29] P. Kornwall, C. P. Dell, D. W. Knight, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 2417-2428.
- [30] a) G. R. Pettit, Y. Kamano, C. L. Herald, Y. Fujii, H. Kizu, M. R. Boyd, F. E. Boettner, D. L. Doubek, J. M. Schmidt, J. C. Chapuis, C. Michel, *Tetrahedron* **1993**,

- 49, 9151-9179. b) G. R. Pettit in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, W. Herz, G. W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglich, Ch. Tamm (Eds.) Springer-Verlag, New York **1997**, *70*, 1-79.
- [31] H. Luesch, R. E. Moore, V. J. Paul, S. L. Mooberry, T. H. Corbett, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 907-910.
- [32] G. K. Friestad, J.-C. Marié, A. M. Deveau, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3249-3252.
- [33] G. K. Friestad, J. Qin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9922-9923.
- [34] J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4669-4675.
- [35] P. Wipf, T. Takada, M. J. Rishel, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4057-4060.
- [36] F. A. Davis, B.-C. Chen, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 919-934.
- [37] D. H. Appella, Y. Moritani, R. Shintani, E. M. Ferriera, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9473-9474.
- [38] P. Wipf, Z. Wang, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1605-1607.
- [39] J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2915-2925.
- [40] A. Dömling, B. Beck, U. Eichelberger, S. Sakamuri, S. Menon, Q.-Z. Chen, Y. Lu, L. A. Wessjohann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7393-7397; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7235-7239.
- [41] M. Sani, G. Fossati, F. Huguenot, M. Zanda, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3596-3599; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3526-3529.
- [42] B. Henkel, B. Beck, B. Westner, B. Mejat, A. Dömling, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8947-8950.
- [43] Dissertation B. Beck, München 2003
(http://tumblr.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/ch/2003/beck_b.pdf).
- [44] J. L. Vicario, D. Badía, L. Carrello, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5801-5807.
- [45] A. Dömling, B. Beck, U. Eichelberger, S. Sakamuri, S. Menon, Q.-Z. Chen, Y. Lu, L. A. Wessjohann, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2389-2390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2347-2348.
- [46] E. J. Corey, C. J. Helal, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2092-2118; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1986-2012.
- [47] T. Kochi, T. P. Tang, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11276-11282.
- [48] A. W. Patterson, H. M. Peltier, F. Sasse, J. A. Ellman, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9534-9541.
- [49] A. W. Patterson, H. M. Peltier, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4362-4369.

- [50] Z. Wang, P. A. McPherson, B. S. Raccor, R. Balachandran, G. Zhu, B. W. Day, A. Vogt, P. Wipf, *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *70*, 75-86.
- [51] B. Raghavan, R. Balasubramanian, J. C. Steele, D. L. Sackett, R. A. Fecik, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1530-1533.
- [52] R. Balasubramanian, B. Raghavan, J. C. Steele, D. L. Sackett, R. A. Fecik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2996-2999.
- [53] a) J. A. Nieman, J. E. Coleman, D. J. Wallace, E. Piers, L. Y. Lim, M. Roberge, R. J. Andersen, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 183-199; b) F. Loganzo, C. M. Discafani, T. Annable, C. Beyer, S. Musto, M. Hari, X. Tan, C. Hardy, R. Hernandez, M. Baxter, T. Singanalore, G. Khafizova, M. S. Poruchynsky, T. Fojo, J. A. Nieman, S. Ayrall-Kaloustian, A. Zask, R. J. Andersen, L. M. Greenberger, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1838-1845.
- [54] Y. Lu, P. S. Low, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 675-693.
- [55] I. R. Vlahov, Y. Wang, P. J. Kleindl, C. P. Leamon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4558-4561.
- [56] J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J.-X. Cheng, P. S. Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 13872-13877.
- [57] I. R. Vlahov, H. K. R. Santhapuram, P. J. Kleindl, S. J. Howard, K. M. Stanford, C. P. Leamon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5093-5096.
- [58] C. P. Leamon, J. A. Reddy, M. Vetzal, R. Dorton, E. Westrick, N. Parker, Y. Wang, I. Vlahov, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9839-9844.
- [59] J. Staunton, K. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380-416.
- [60] R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 923-936.
- [61] N. Funa, Y. Ohnishi, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka, S. Horinouchi, *Nature* **1999**, *400*, 897-899.
- [62] a) R. Finking, M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453-488; b) S. A. Siebert, M. A. Marahiel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 715-738.
- [63] a) D. E. Cane, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R319-R325; b) T. A. Keating, C. T. Walsh, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 598-606.
- [64] E. Conti, T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, P. Brick, *EMBO J.* **1997**, *16*, 4174-4183.
- [65] a) T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 493-505; b) G. L. Challis, J. Ravel, C. A. Townsend, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 211-224.
- [66] G. J. Gatto, M. T. Boyne, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3838-3847.

- [67] F. E. King, T. J. King, A. J. Warwick, *J. Chem. Soc.* **1950**, 3590-3597.
- [68] K. Burgess, L. D. Jennings, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6129-6139.
- [69] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.
- [70] Diplomarbeit M. Bauer, Saarbrücken **2003**.
- [71] Y.-F. Wang, C.-S. Chen, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3696-3697.
- [72] a) U. Kazmaier, *Liebigs Ann.* **1997**, 285-295; b) U. Kazmaier, *Amino Acids* **1996**, *11*, 283-299.
- [73] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556-557; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 522-524.
- [74] F. L. Zumpe, U. Kazmaier, *Synlett* **1998**, 1199-1200.
- [75] Dissertation F. L. Zumpe, Heidelberg **1999**.
- [76] J. Tsuji, I. Shimizu, I. Minami, Y. Ohashi, T. Sugiura K. Takahashi, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1523-1529.
- [77] P. Schwab., R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 100-110.
- [78] S. C. Miller, H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9606-9614.
- [79] R. L. Johnson, G. Rajakumar, K.-L. Yu, R. K. Mishra, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2104-2107.
- [80] D. S. Garvey, J. T. Wasicak, J. Y.-L. Chung, Y.-K. Shue, G. M. Carrera, P. D. May, M. M. McKinney, D. Anderson, E. Cadman, L. Vella-Rountree, A. M. Nadzan, M. Williams, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1550-1557.
- [81] Dissertation U. Beutler, Stuttgart **1989**.
- [82] C. Fernández-García, M. A. McKerverey, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2905-2906.
- [83] F. Sanchez-Sancho, B. Herradon, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1951-1965.
- [84] L. Aurelio, J. S. Box, R. T. C. Brownlee, A. B. Hughes, M. M. Sleebs, *J. Org. Chem.* **2002**, *68*, 2652-2667.
- [85] J. Horiuti, M. Polanyi, *Trans. Faraday Soc.* **1934**, *30*, 1164-1172.
- [86] T. Kurita, F. Aoki, T. Mizumoto, T. Maejima, H. Esaki, T. Maegawa, Y. Monguchi, H. Sajiki, *Chem Eur. J.* **2008**, *14*, 3371-3379.
- [87] M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Tonido, *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl): Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Workbench Edition Volume E22a, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York **2004**, S. 17-38.

- [88] J. Jurczak, D. Gryko, A. Kobrzycka, H. Gruza, P. Prokopowicz, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6051-6064.
- [89] K. N. White, J. K. Konopelski, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4111-4112.
- [90] P. Li, J. C. Xu, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2951-2948.
- [91] M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Tonido, *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl): Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Workbench Edition Volume E22a, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York **2004**, S. 538-554.
- [92] J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437-2446.
- [93] H. Balli, F. Kersting, *Liebigs Ann. Chem.* **1961**, *647*, 1-10.
- [94] P. Li, J.-Ch. Xu, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8119-8131.
- [95] U. Schmidt, R. Utz, A. Lieberknecht, H. Griesser, B. Potzolli, J. Bahr, K. Wagner, P. Fischer, *Synthesis* **1987**, 236-241.
- [96] a) U. Schmidt, P. Gleich, H. Griesser, R. Utz, *Synthesis* **1986**, 992-998; b) Dissertation P. Gleich, Stuttgart **1986**.
- [97] J. M. Schwab, J. B. Klassen, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7217-7227.
- [98] F. J. McQuillin, J. Stewart, *J. Chem. Soc.* **1955**, 2966-2967.
- [99] S. A. Sieber, J. Tao, C. T. Walsh, M. A. Marahiel, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 499-504; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 493-498.
- [100] S. Lee, G. W. Qin, K. Nakanishi, M. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6234-6241.
- [101] B. J. Carroll, S. J. Moss, L. Bai, Y. Kato, S. Toelzer, T.-W. Yu, h. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4176-4177.
- [102] Y. S. Tsantrizos, X. Yang, A. McClory, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6609-6614.
- [103] M. Rothe, F.-W. Kunitz, *Liebigs Ann. Chem.* **1957**, *609*, 88-102.
- [104] D. E. Ehmann, J. E. Trauger, T. Stachelhaus, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 765-772.
- [105] a) H. Kizu, M. Koshijima, T. Tomimori, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 3176-3181; K. D. Croft, E. L. Ghisalberty, P. R. Jefferies, C. L. Raston, A. H. White, S. R. Hall, *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1475-1480; K. Takahashi, M. Takani, *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 538-542.
- [106] D. Davidson, S. A. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3426-3428.
- [107] M. Smrcina, P. Majer, E. Majerová, T. A. Guerassina, M. A. Eissenstat, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12867-12874.
- [108] B. Hin, P. Majer, T. Tsukamoto, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7365-7368.

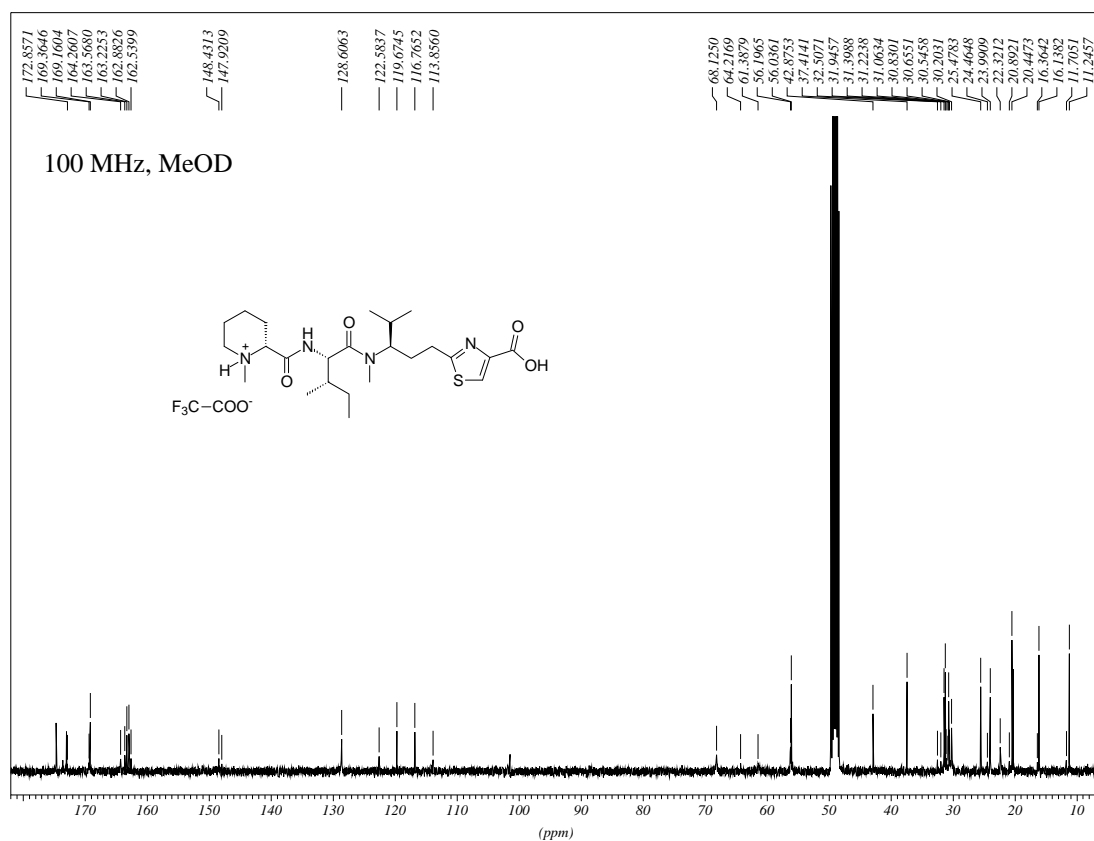
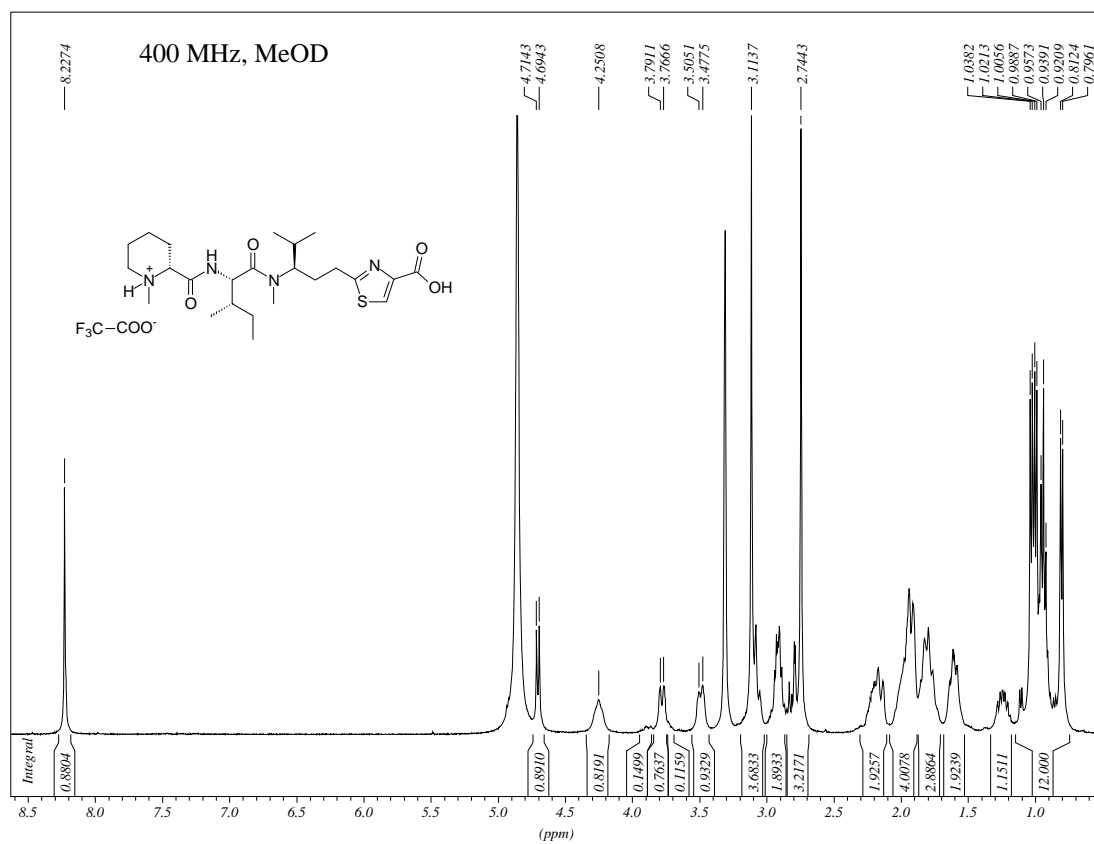
- [109] P. Botti, T. D. Pallin, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10018-10024.
- [110] Y. Chai, D. Pistorius, A. Ullrich, K. Weissman, U. Kazmaier, R. Müller, *in Vorbereitung*.
- [111] a) T. Mosmann, *J. Immunol. Meth.* **1983**, *65*, 55-63; M. V. Berridge, A. S. Tan, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303*, 474-482; c) M. V. Berridge, A. S. Tan, K. D. McCoy, R. Wang, *Biochemica* **1996**, *4*, 14-19.
- [112] Dissertation D. Stolz, Saarbrücken **2007** (<http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2007/1037/>).
- [113] N. G. Gaylord, F. R. Eirich, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 334-337.
- [114] S. Varray, R. Lazaro, J. Martinez, F. Lamaty, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2308-2316.
- [115] M. J. Genin, W. B. Gleason, R. L. Johnson, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 860-866.
- [116] L. Balásperi, B. Penke, J. Petres, K. Kovács, *Monatshefte für Chemie* **1970**, *101*, 1177-1183.
- [117] C. Kashima, K. Harada, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 789-792.
- [118] R. K. Olsen, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1912-1915.
- [119] R. B. Boers, Y. P. Randulfe, H. N. S. van der Haas, M. van Rossum, Baan, J. Lugtenburg, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2094-2108.
- [120] R. A. Abramovitch, B. W. Cue, Jr., *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5316-5319.
- [121] W. V. Murray, S. Sun, I. J. Turchi, F. K. Brown, A. D. Gauthier, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5930-5940.
- [122] O. Isler, H. Gutmann, M. Montavon, R. Rüegg, G. Ryser, P. Zeller, *Helv. Chim. Acta* **1957**, *40*, 1242-1249.
- [123] C. Grison, S. Genève, E. Halbin, P. Coutrot, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4903-4923.
- [124] G. Kokotos, D. A. Six, V. Loukas, T. Smith, V. Constantinou-Kokotou, D. Hadjipavlou-Litina, S. Kotsovolou, A. Chiou, C. C. Beltzner, E. A. Dennis, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3615-3628.
- [125] P. Moutevelis-Minakakis, C. Sinanoglou, V. Loukas, G. Kokotos, *Synthesis* **2005**, 933-938.

8 Anhang

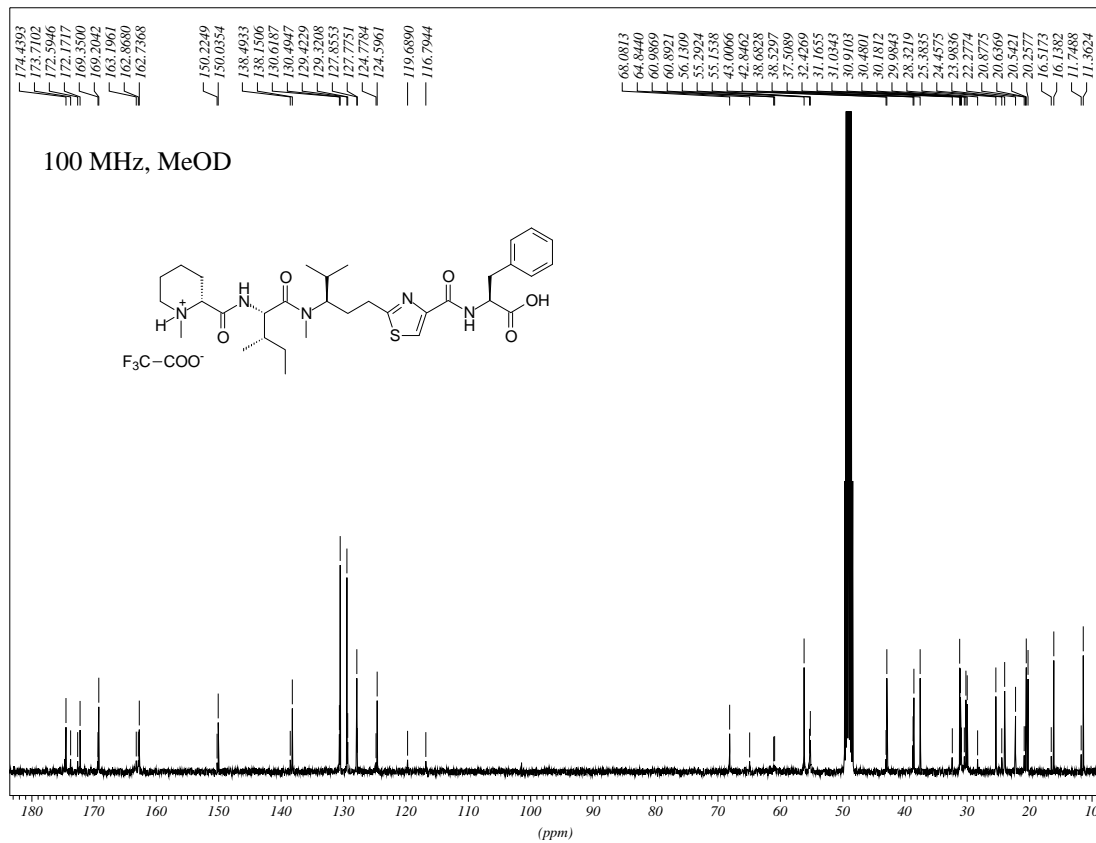
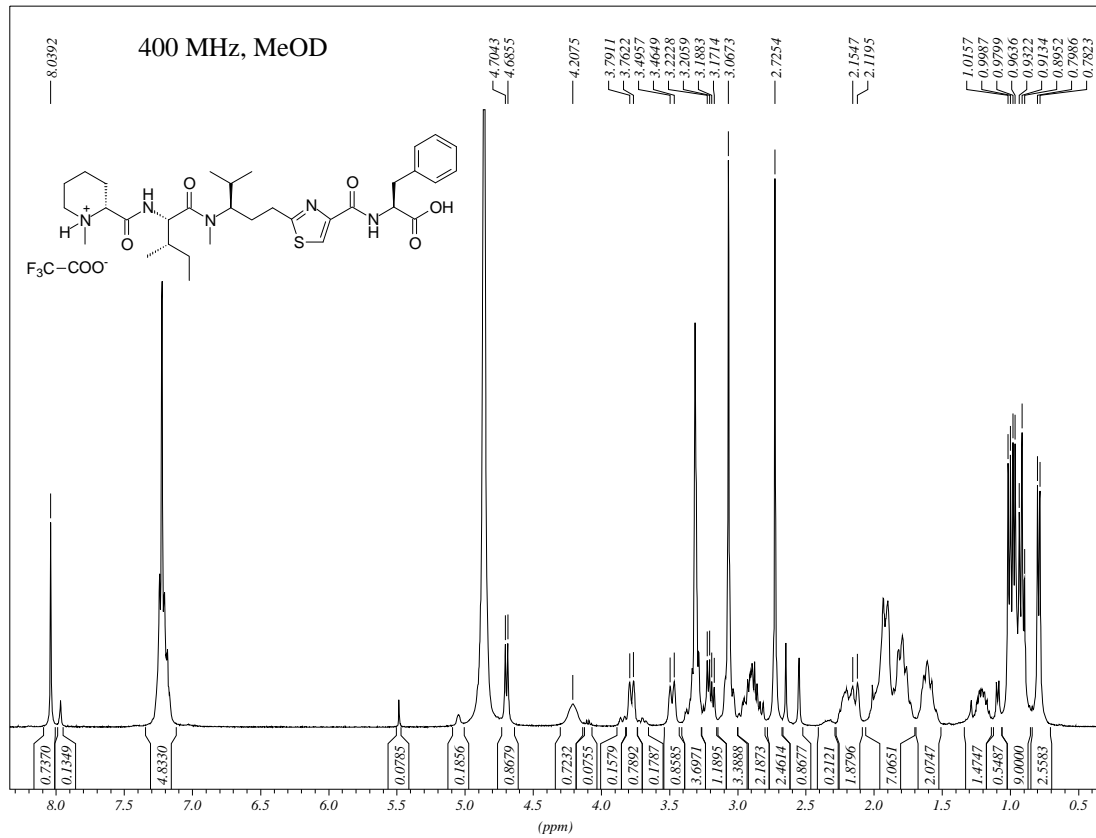
NMR-Spektren ausgewählter Verbindungen

Verbindungen	Seite
(<i>R</i>)-2-{3-[Methyl-(<i>N</i> -methyl-(<i>R</i>)-pipecolyl-(<i>S</i>)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonsäure-Trifluoressigsäure-Salz (55)	218
((<i>R</i>)-2-{3-[Methyl-(<i>N</i> -methyl-(<i>R</i>)-pipecolyl-(<i>S</i>)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-(S)-phenylalanin-Trifluoressigsäure-Salz (59)	219
(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(((<i>R</i>)-2-{3-[Methyl-(<i>N</i> -methyl-(<i>R</i>)-pipecolyl-(<i>S</i>)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino)-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-Trifluoressigsäure-Salz (102, Prätubulysin)	220
(4 <i>R</i>)-4-(((<i>R</i>)-2-{3-[Methyl-(<i>N</i> -methyl-(<i>R</i>)-pipecolyl-(<i>S</i>)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino)-5-phenyl-pentansäure-Trifluoressigsäure-Salz (107)	221
(4 <i>R</i>)-4-(((<i>R</i>)-2-{3-[(<i>N,N</i> -Dimethyl-glycyl-(<i>S</i>)-isoleucyl)-methylamino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino)-5-phenyl-pentansäure-Trifluoressigsäure-Salz (111)	222
(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(((<i>R</i>)-2-{3-[Methyl-(<i>N</i> -methyl-(<i>R</i>)-pipecolyl-(<i>S</i>)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino)-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-2,3-dihydroxy-propylester (112)	223

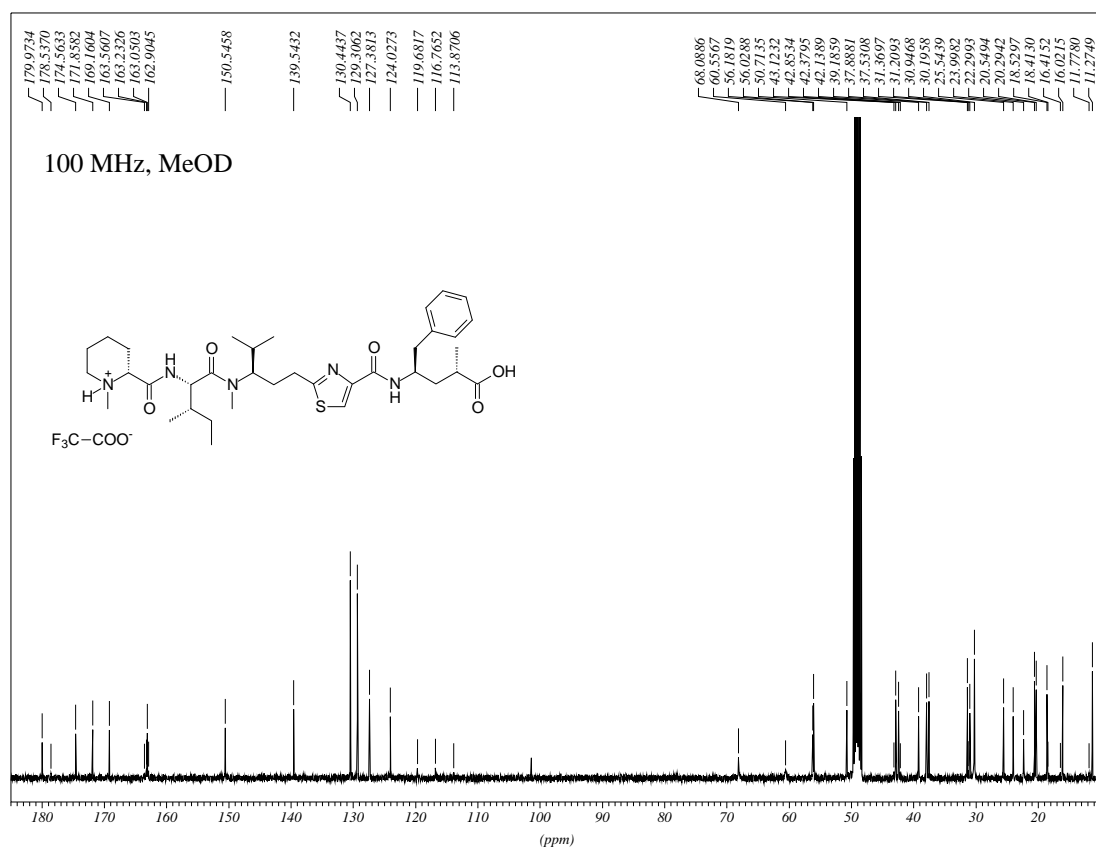
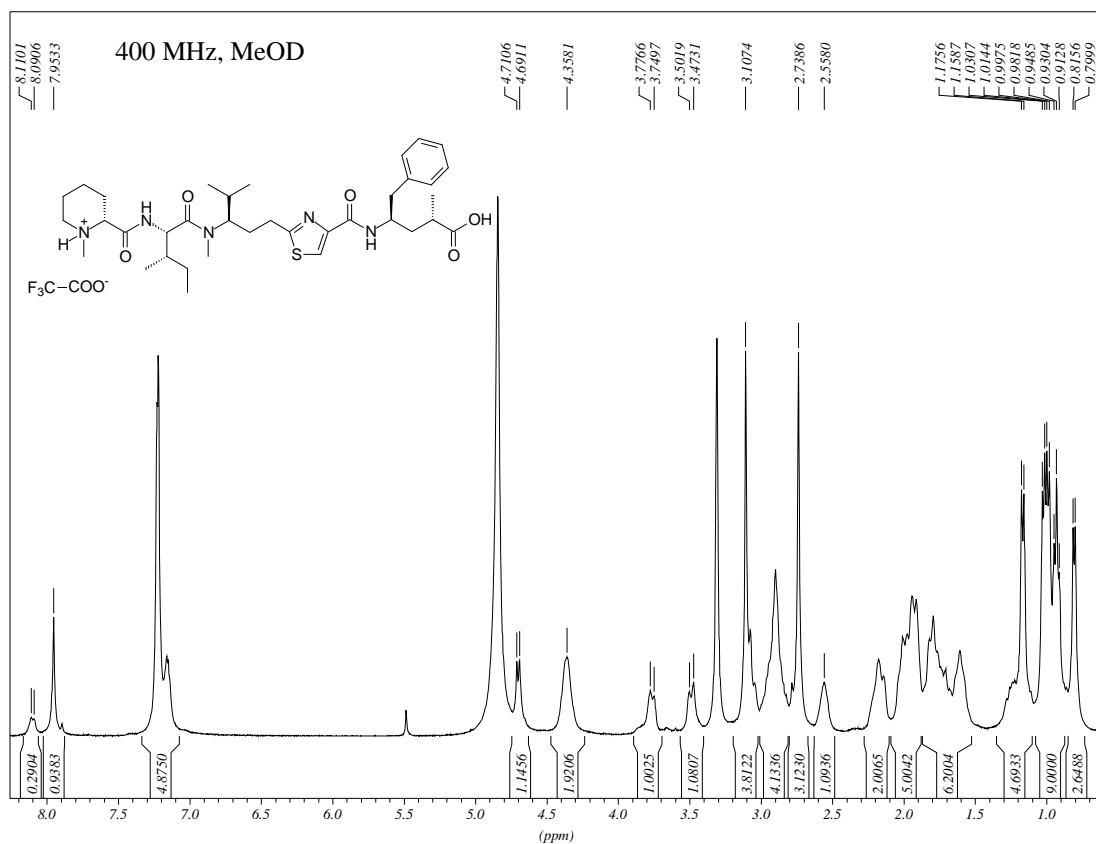
(*R*)-2-{3-[Methyl-(*N*-methyl-(*R*)-piperocolyl-(*S*)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonsäure-Trifluoressigsäure-Salz (**55**)



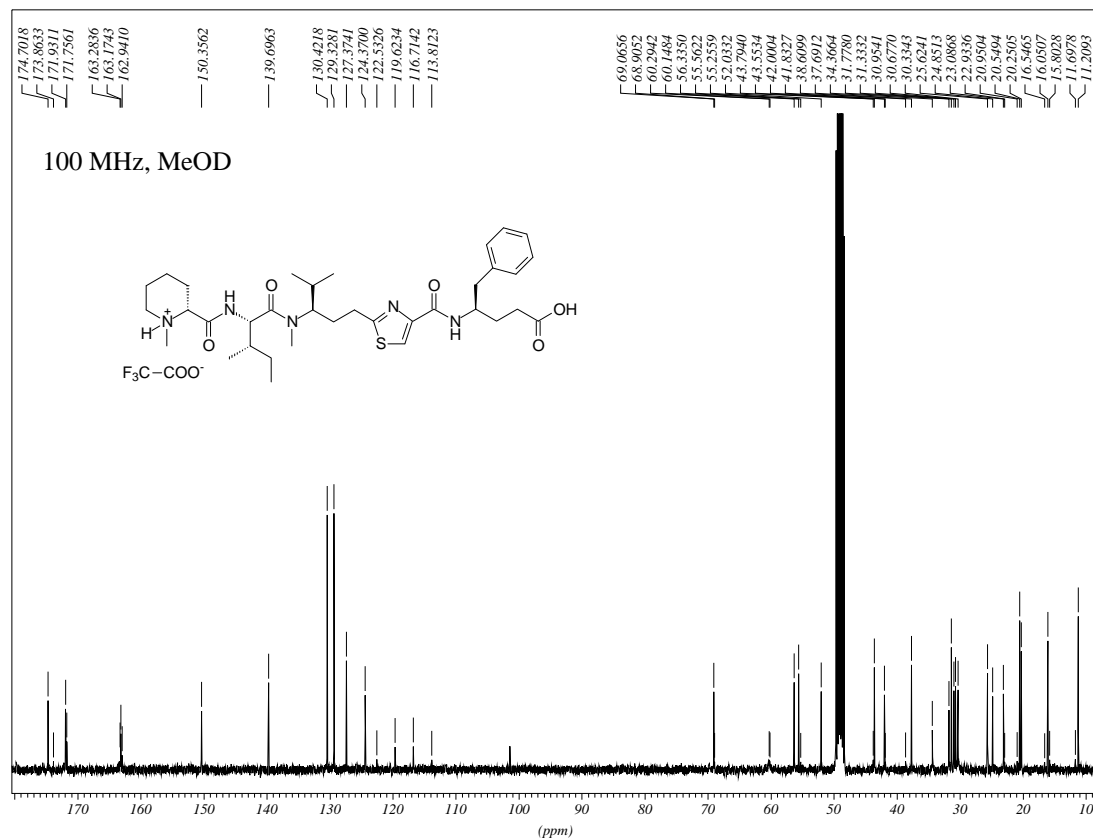
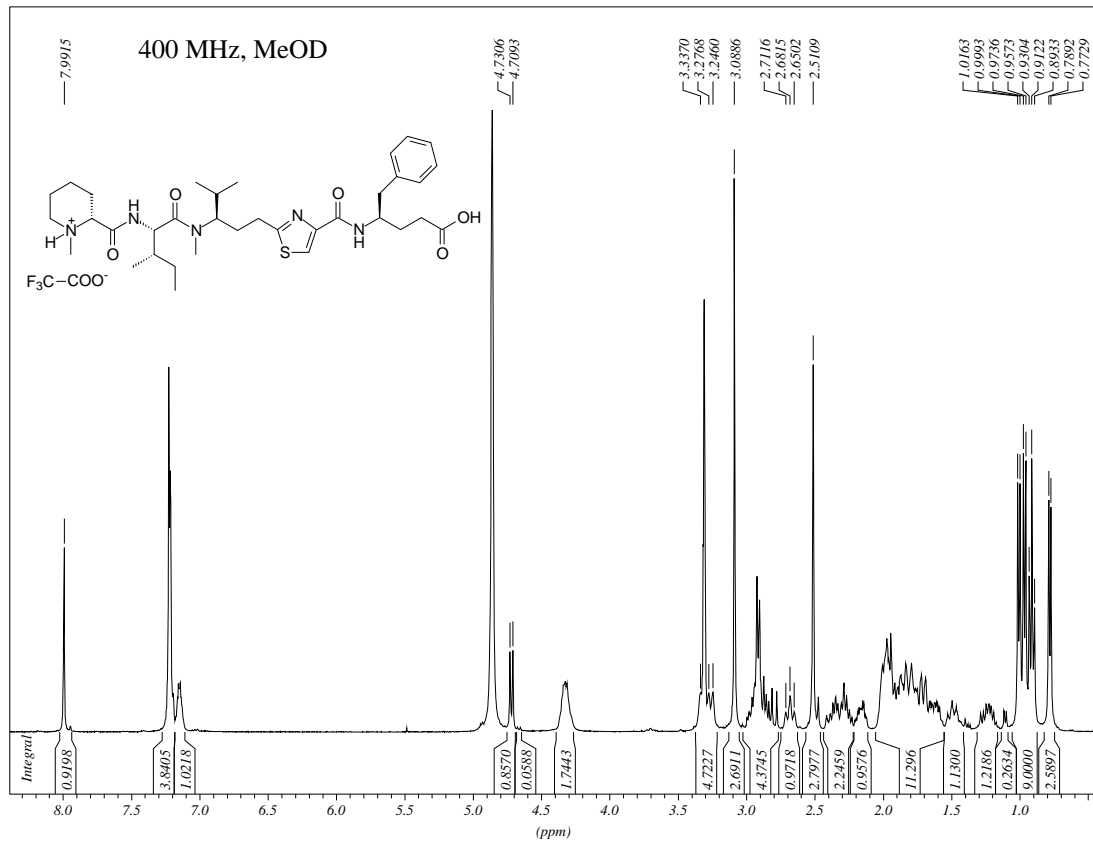
((*R*)-2-{3-[Methyl-(*N*-methyl-(*R*)-piperocolyl-(*S*)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-(*S*)-phenylalanin-Trifluoressigsäure-Salz (**59**)

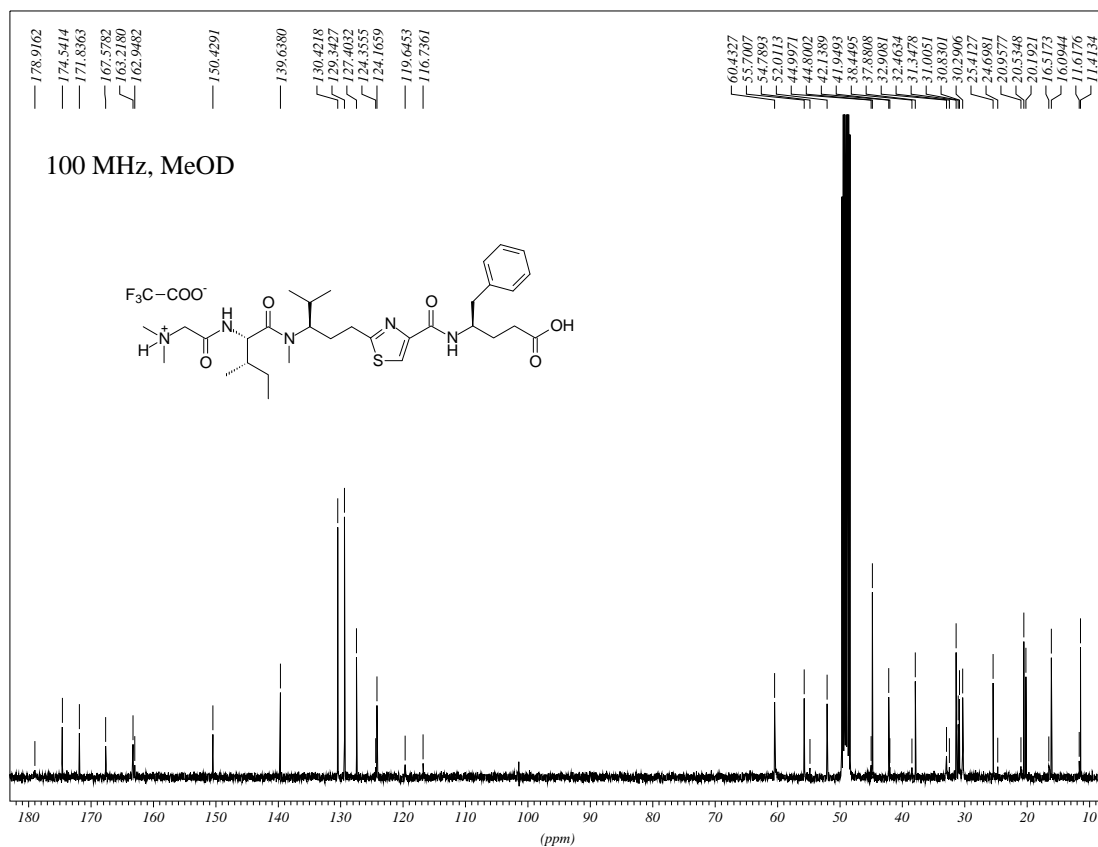
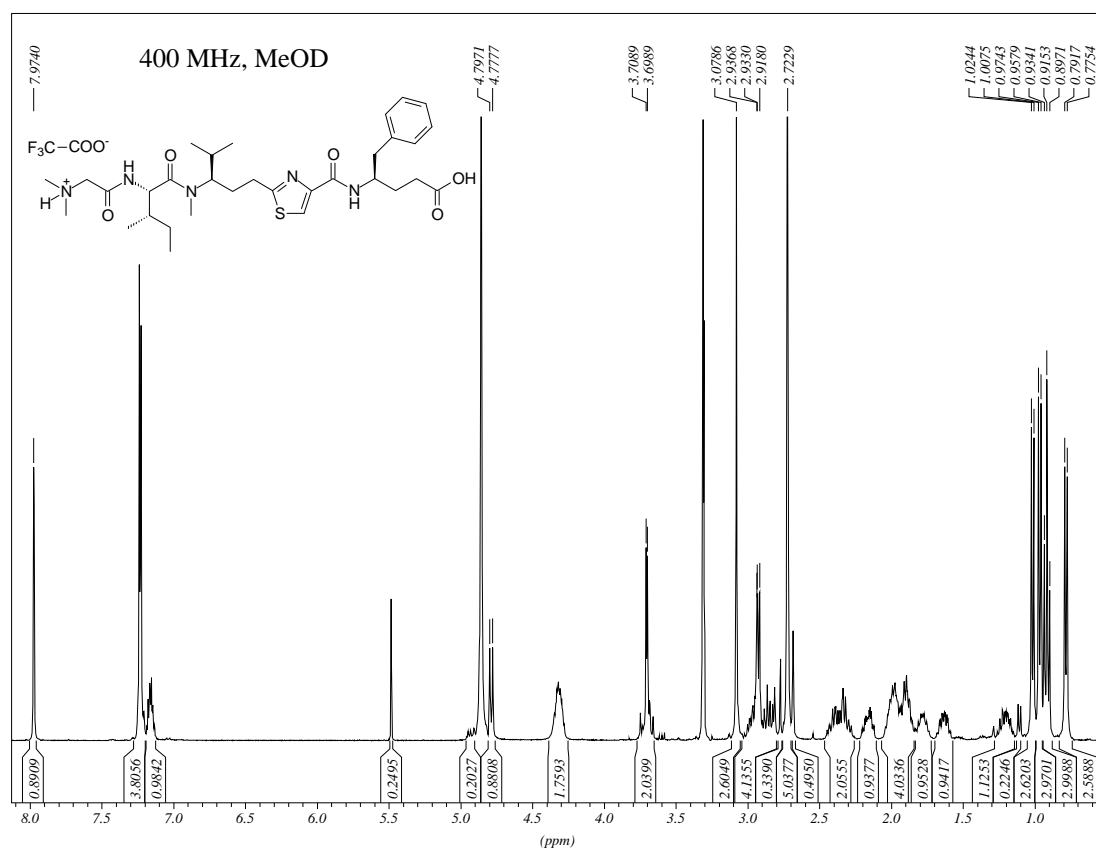


(2*S*,4*R*)-4-[[*(R)*-2-{3-[Methyl-(*N*-methyl-(*R*)-pipercolyl-(*S*)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino]-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-Trifluoressigsäure-Salz
(102, Prätubulysin)

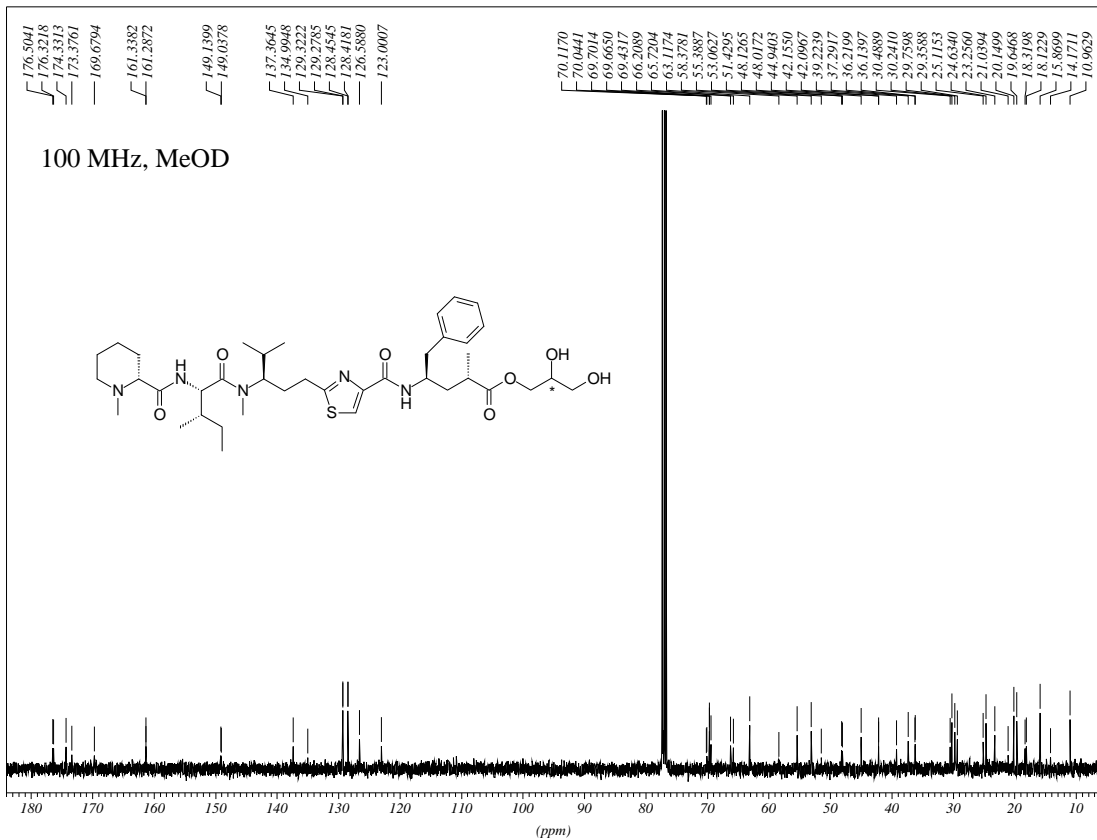
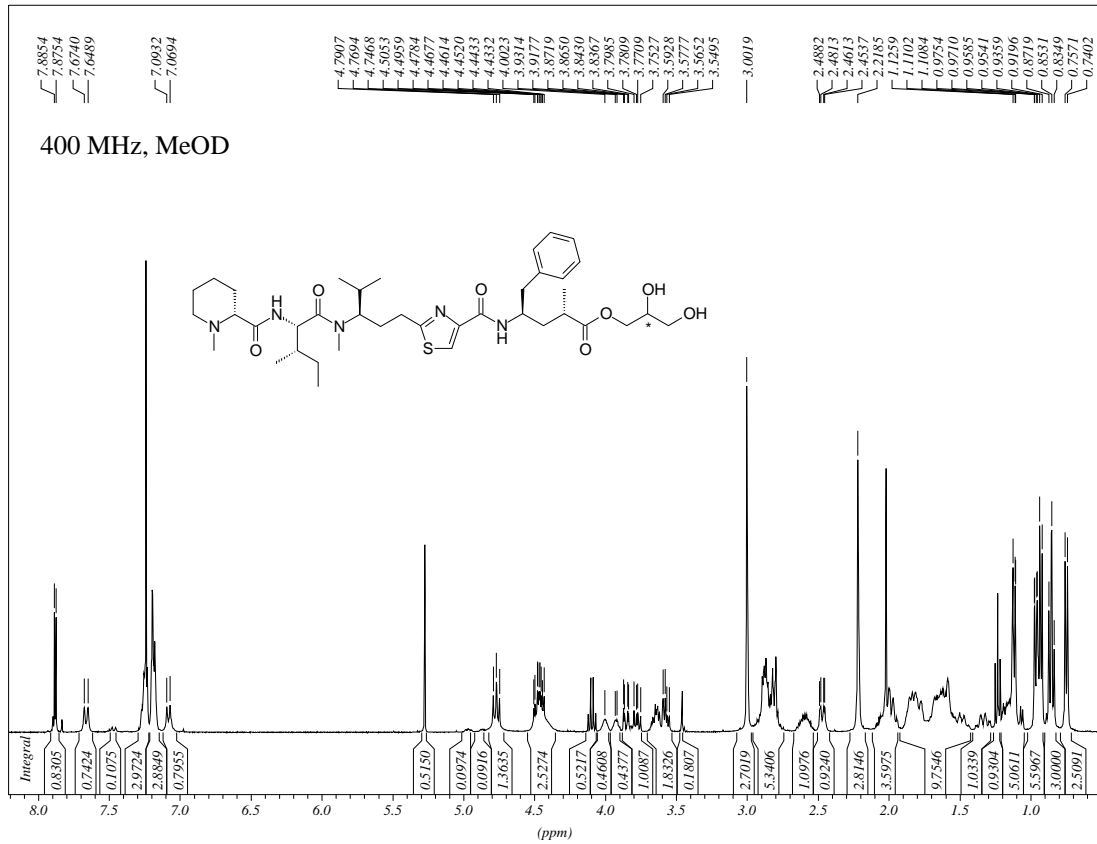


(4*R*)-4-[[*(R)*-2-{3-[Methyl-(*N*-methyl-(*R*)-piperocolyl-(*S*)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino]-5-phenyl-pentansäure-Trifluoressigsäure-Salz (**107**)



(4R)-4-[[*(R)*-2-{3-[(*N,N*-Dimethyl-glycyl-*(S)*-isoleucyl)-methylamino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino]-5-phenyl-pentansäure-Trifluoressigsäure-Salz (**111**)

(2*S*,4*R*)-4-[[*(R)*-2-{3-[Methyl-(*N*-methyl-(*R*)-pipercolyl-(*S*)-isoleucyl)-amino]-4-methyl-pentyl}-thiazol-4-carbonyl)-amino]-2-methyl-5-phenyl-pentansäure-2,3-dihydroxy-propylester (**112**)



Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uli Kazmaier herzlich für die interessante und spannende Themenstellung, die gute fachliche Betreuung und seine Motivation („Geli, du machst das schon!“). Nicht zu vergessen sind die vielen Feiern, auf denen er uns mit seinen Kochkünste kulinarisch sehr verwöhnt hat.

Ein besonderer Dank gilt meinen Laborkolleginnen Katharina, Christina und Frauke, die mir in allen Lebenslagen und auch in stressigen Zeiten mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Meinen weiteren, ehemaligen und derzeitigen Kollegen (Sandra, Christian S., Daniel, Michael, Jan, Steffi, Christian Q., Katja, Alex, Saskia, Christian B., Sarah, Lisa, Jens, Ameer, Brigitte und Anton) danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Ich danke Hechun, Sankar, Nivedita, Dnyaneshwar, Vijay und Ludovic, sowie den neuen Postdocs Vasantha, Narender und Swarup, dafür, dass sie den Arbeitskreis international geprägt haben.

Rigo möchte ich dafür danken, dass er jederzeit bereit war, mir bei präparativen Problemen weiterzuhelfen.

Bei Heike und Rudi möchte ich mich für ihre vielen Mühen bei den Messungen von Massenspektren und CHN-Analysen bedanken, besonders wenn wieder mal eine eilige Probe dabei war... Rudi sei auch für seinen Beistand bei HPLC-Messungen gedankt.

Joachim, unserem „Mädchen für alles“, sei für seine großartige und ideenreiche handwerkliche Unterstützung ein großer Dank ausgesprochen. Zudem möchte ich ihm für die Verköstigungen anlässlich zahlreicher Café-Lolo-Werbeveranstaltungen herzlich danken!

Ich danke Herrn Joseph Zapp, der für NMR-Fragen stets ein offenes Ohr hatte und für besondere Probleme immer eine Lösung gefunden hat. Auch Thomas und Ronny sei für die gute Betreuung und schnelle Hilfe am AV400II gedankt.

Besonderen Dank möchte ich Yi, Jenni und Prof. Dr. Rolf Müller für die reibungslose Kooperation mit meiner Arbeit und ihre stete Diskussionsbereitschaft aussprechen.

Mein größtes Dankeschön geht an Fred, der mich während der gesamten Zeit seelisch, moralisch und technisch unterstützt, meine Aufs und Abs ertragen, mich auf andere Gedanken gebracht, aufgebaut, etc. hat.

Abschließend möchte ich noch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Universität des Saarlandes danken, die hier nicht namentlich erwähnt wurden.