

**Synthese neuartiger Muraymycin-Konjugate  
zur Verbesserung der bakteriellen  
Zellaufnahme**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von

**Christian Rohrbacher, M.Sc.**

Saarbrücken

2023

**Tag des Kolloquiums:** 11. September 2023

**Dekan:** Prof. Dr. Ludger Santen

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Christian Ducho  
Prof. Dr. Andreas Speicher

**Akad. Mitglied:** Dr. Josef Zapp

**Vorsitz:** Prof. Dr. Marc Schneider

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2017 bis September 2021 im Fachbereich Pharmazie der Universität des Saarlandes im Arbeitskreis von Prof. Dr. Christian Ducho angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Christian Ducho

Zweitgutachter: Prof. Dr. Andreas Speicher



## Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und biologische Evaluation von antibiotisch wirksamen Muraymycin-Transporter-Konjugaten. Durch Konjugation von Muraymycin-Analoga, einer Klasse von Nucleosid-Antibiotika, die das zur Zellwand-Biosynthese benötigte Enzym *MraY* inhibieren, sollte eine erhöhte Zellaufnahme in Bakterien erreicht werden. Als Transporter-Verbindungen wurden Derivate des Aminoglycosid-Antibiotikums Streptomycin, ein Derivat des Siderophors Enterobactin, das Silsesquioxan GuCOSS und ein zellpenetrierendes Peptid eingesetzt. Generell wurden zwei verschiedene Arten der Konjugation untersucht: zum einen eine stabile Konjugation über eine Triazol-Bindung, welche mittels CuAAC erreicht wurde, als auch eine intrazellulär spaltbare Konjugation über eine Disulfidbrücke.

In einer ebenfalls durchgeführten SAR-Studie wurden die zur Konjugation benötigten Änderungen an der Muraymycin-Grundstruktur als auch eine Reihe an zusätzlich hergestellten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga mit variierenden Seitenketten untersucht.



## **Abstract**

This PhD project had the focus on the synthesis and biological evaluation of conjugates of muraymycin analogues with cell-penetrating moieties. The employed muraymycin analogues belong to the class of nucleoside antibiotics and inhibit the enzyme MraY, which is part of bacterial cell wall biosynthesis. Different kinds of cell-penetrating moieties were utilized with the goal of an improved cellular uptake of the muraymycin analogues. Several streptomycin derivatives, an enterobactin derivative, the silsesquioxane GuCOSS as well as a cell-penetrating peptide were used for these conjugates. Two general types of conjugations were used: a stable triazole conjugation achieved via CuAAC and an intracellularly cleavable disulfide unit. Additionally, an SAR-study with the obtained 5'-deoxy muraymycin analogues, as well as further synthesized 5'-deoxy muraymycin analogues with varying side chains was performed.



## Abkürzungsverzeichnis und Symbole

2-CTC	2-Chlortritylchlorid (Festphasenharz)
$[\alpha]_D^{20}$	Spezifischer Drehwert [°]
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Alloc	Allyloxycarbonyl
AllocCl	Chlorameisensäure-allylester
aq.	aqueous (wässrig)
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestillatus, doppelt destilliert
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bu	Butyl
bzw.	beziehungsweise
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CoA	Coenzym A
COSY	correlation spectroscopy (NMR)
$\delta$	chemical shift (chemische Verschiebung) [ppm]
d	Dublett (NMR) oder Tage
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EDC HCl	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EEDQ	<i>N</i> -Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
ESI	Elektronsprayionisation (MS)
Et	Ethyl
et al.	und andere

## Abkürzungsverzeichnis

EtOAc	Ethylacetat
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
Glc	Glucose
h	Stunden
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence (NMR)
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	High resolution mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence (NMR)
Hz	Hertz
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante [Hz]
kat.	katalytisch
KHMDS	Kaliumhexamethyldisilazid
konz.	konzentriert
$\lambda_{\max}$	Wellenlänge [nm]
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
M	molar
m	Multipllett
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MIC	Minimale Inhibitorische Konzentration
min	Minuten
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
Mur	Muraminsäure
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl [cm <sup>-1</sup> ]

## Abkürzungsverzeichnis

NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
POM	Pivaloyloxymethyl
ppm	parts per million
PrOH	Propanol
Py	Pyridyl
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
quant.	quantitativ
Rt	Raumtemperatur
$R_f$	Retentionsfaktor (DC)
s	Singulett
SAR	structure-activity relationship
SPPS	solid phase peptide synthesis
t	Triplett
$t_R$	Retentionszeit [min] (HPLC)
$T_m$	Schmelzpunkt [°C]
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbare elektromagnetische Strahlung

## Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuchstabencode</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>KENNTNISSTAND.....</b>	<b>5</b>
2.1	Bakterien .....	5
2.1.1	Die bakterielle Zellwand .....	5
2.1.2	Die Peptidoglycan-Biosynthese .....	6
2.1.3	Translocase I (MraY) .....	8
2.2	Muraymycine .....	11
2.2.1	Natürlich vorkommende Muraymycine .....	11
2.2.2	Semi-synthetische Muraymycine .....	14
2.2.3	Synthetische Muraymycine und Muraymycin-Analoga .....	15
2.3	Streptomycine .....	24
2.4	Enterobactine .....	25
2.5	Silsesquioxane .....	27
2.6	Zellpenetrierende Peptide (CPPs) .....	27
<b>3</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG UND PLANUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>29</b>
3.1	Synthese von Muraymycin-Transporter-Konjugaten .....	29
3.1.1	Aufgabenstellung .....	29
3.1.2	Planung und retrosynthetische Betrachtungen .....	34
3.2	SAR-Studie zur Seitenketten-Modifikation der Muraymycin-Analoga .....	41
3.2.1	Aufgabenstellung .....	41
3.2.2	Planung und retrosynthetische Betrachtungen .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTATE UND DISKUSSION.....</b>	<b>45</b>
4.1	Synthese von Reagenzien und Bausteinen .....	45
4.1.1	Synthese von 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) 101 .....	46
4.1.2	Synthese des Phosphonats 30 für die Wittig-Horner-Reaktionen.....	46
4.1.3	Synthese der (5'S)-Nucleosylaminosäure 33a .....	47
4.1.4	Synthese der Aminopropyl-Linker 38 und 45 .....	50
4.1.5	Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren 67, 118 und 95.....	51
4.1.6	Synthese der PySS-Seitenkette 124.....	56
4.1.7	Synthese des intrazellulär spaltbaren 4-Nitrophenyl-2-(pyridin-2-yl-disulfanyl)ethyl-carbonat-Linkers 80.....	57
4.1.8	Synthese der benötigten Bausteine 133 und 135 für die Festphasen-gestützte Synthese .....	58
4.1.9	Synthese der Harnstoffdipeptide .....	60
4.2	Synthese der modifizierten Streptomycine .....	65

4.2.1	Synthese des Azid-Linker-modifizierten Streptomycins 60 .....	65
4.2.2	Synthese des Referenz-Streptomycins 156.....	68
4.2.3	Synthese des Thiol-Linker-modifizierten Streptomycins 59 .....	69
4.2.4	Synthese des PySS-Linker-modifizierten Streptomycins 58.....	72
4.3	Synthese der Muraymycin-Vorstufen und -Referenzen .....	74
4.3.1	Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 68 über den Festphasen- gestützten Syntheseansatz .....	74
4.3.2	Synthese des PySS-Carbamat-Linker-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin- Analogons 79.....	78
4.3.3	Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 65 .....	79
4.3.4	Seitenketten-Modifikationen des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 65 .....	86
4.3.5	Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Referenzverbindung 170 .....	89
4.3.6	Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 82 .....	90
4.3.7	Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 81 .....	91
4.4	Synthese der Konjugate .....	93
4.4.1	Konjugat-Serie 1: Konjugate der R <sup>1</sup> -Seitenketten-modifizierten Muraymycin- Analoga .....	94
4.4.2	Konjugat-Serie 2: Konjugation am L-Lysin des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 68 .....	103
4.4.3	Konjugat-Serie 3: Konjugation an der terminalen Aminosäure des 5'-Desoxy- Muraymycin-Analogons .....	108
4.4.4	Synthese sonstiger Muraymycin-Konjugate.....	111
4.5	Synthese weiterer 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga zur Durchführung von SAR-Untersuchungen .....	114
4.5.1	Synthese der Seitenketten-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga .....	114
4.5.2	Synthese des lipophilen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 93.....	117
4.6	Biologische Evaluation .....	120
4.6.1	Biologische Evaluation der Referenz- und Konjugatverbindungen .....	120
4.6.2	SAR-Studie der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga.....	144
4.6.3	Sonstige biologische Daten .....	148
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>150</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>165</b>
<b>7</b>	<b>EXPERIMENTALTEIL.....</b>	<b>170</b>
7.1	Allgemeines .....	170
7.1.1	Allgemeine Methoden .....	170
7.1.2	Edukte und Reagenzien .....	170
7.1.3	Lösungsmittel.....	170
7.1.4	Absolute Lösungsmittel .....	171
7.1.5	Chromatographie .....	171
7.1.6	Massenspektrometrie.....	177

7.1.7	NMR-Spektroskopie .....	177
7.1.8	IR-Spektroskopie .....	178
7.1.9	UV/VIS-Spektroskopie .....	178
7.1.10	Polarimetrie .....	178
7.2	Synthesen .....	179
7.2.1	Synthese von Reagenzien und Bausteinen .....	179
7.2.2	Synthese der modifizierten Streptomycine .....	214
7.2.3	Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Vorstufen und -Referenzen .....	227
7.2.4	Synthese der Konjugat-Verbindungen .....	256
7.2.5	Synthese sonstiger 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga.....	269
7.3	Biologische Testung .....	283
7.3.1	Fluoreszenz-basierter <i>in vitro</i> -MraY-Assay .....	283
7.3.2	Antibakterielle Aktivitätsmessung .....	283
7.3.3	Zellaufnahme-Assay.....	283
7.3.4	Stabilitätstests .....	283
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>285</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>298</b>



# 1 Einleitung

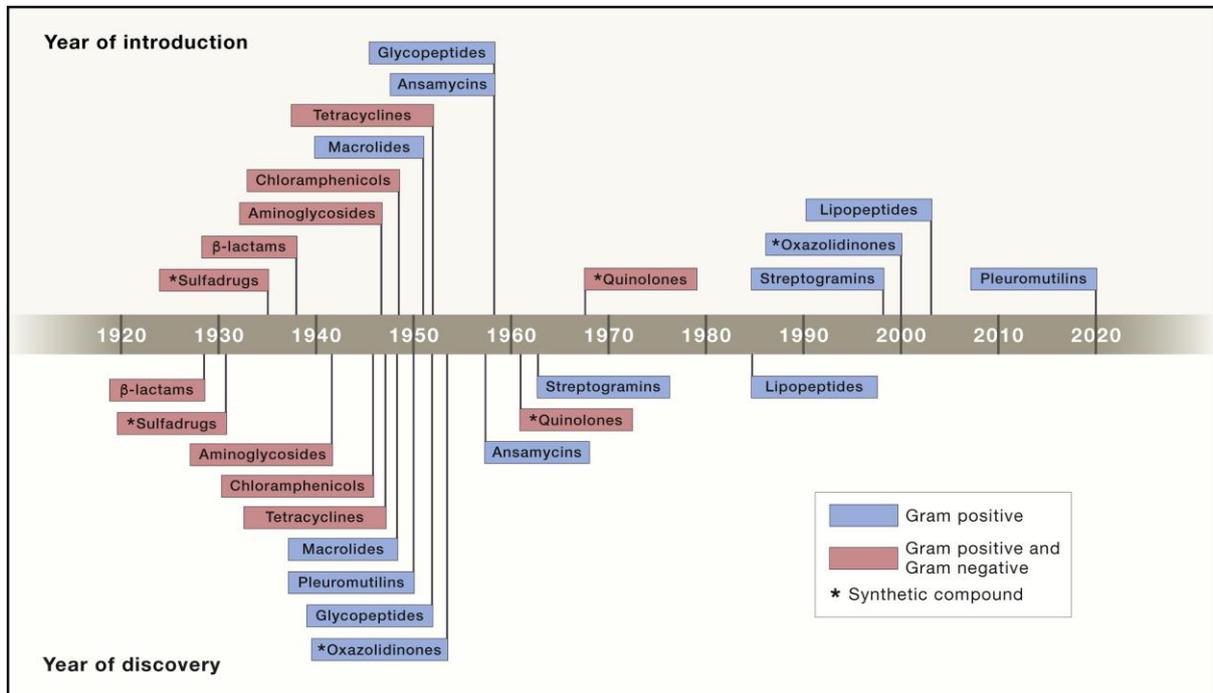
Die Zunahme von Antibiotika-resistenten Bakterienstämmen und das zeitgleiche Fehlen von neuen wirksamen antibiotischen Wirkstoffklassen ist ein zunehmendes globales Problem. Die Substanzklasse der Antibiotika wurde im Jahr 1941 von Selman A. Waksman definiert.<sup>[1,2]</sup> Das Wort Antibiotikum setzt sich aus den beiden altgriechischen Wörtern "anti" (gegen) und "bios" (Leben) zusammen und bezeichnet Substanzen, die in bereits geringen Konzentrationen das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen oder diese sogar abtöten.<sup>[3]</sup> Diese Definition geht auch auf den Mykologen Paul Vuillemin zurück, der bereits im Jahr 1889 Antibiose als die Eigenschaft eines Lebewesens beschreibt, andere Lebewesen zu töten, um das eigene Leben zu sichern.<sup>[4]</sup>

Ein entscheidender Schritt in der Geschichte der Antibiotika wurde mit der Entdeckung des Penicillins durch H. Florey und E. Chain gemacht.<sup>[5]</sup> A. Fleming beobachtete bereits 1928 die antibiotische Wirkung von Penicillium-Pilzen und vermutete eine antibakteriell aktive Verbindung, die er Penicillin nannte.<sup>[6,7]</sup> Florey und Chain gelang die Isolation dieser Verbindung und in anschließenden *in-vivo*-Testungen wurde ihre antibakterielle Wirksamkeit bestätigt.<sup>[5]</sup> Diese Entdeckung führte zu der Produktion von Penicillin im großtechnischen Maßstab und zur therapeutischen Verwendung gegen bakterielle Infektionen. Hauptsächlich kam dieser neue Wirkstoff auch im Zweiten Weltkrieg bei der Wundversorgung zum Einsatz.<sup>[8,9]</sup> Bereits kurz nach der Isolierung dieses ersten potenten Antibiotikums im Jahr 1940 wurden auch schon die ersten Resistenzbildungen gegen diesen neuen Wirkstoff beobachtet.<sup>[5,10,11]</sup>

Die Entdeckung des Penicillins leitete das sogenannte goldene Zeitalter der Antibiotika ein, welches bis zum Ende der 1960er Jahre andauerte. In diesem Zeitraum wurden unter anderem viele neue  $\beta$ -Lactam-Antibiotika entdeckt und eingesetzt. Des Weiteren wurden weitere komplett neue Substanzklassen von antibiotisch aktiven Substanzen entdeckt. Im Prinzip wurden zwei Ansätze verfolgt: zum einen die Isolierung und Testung von Naturstoffen und zum anderen totalsynthetische Ansätze zur Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe.

Mit dem Vorhandensein dieser Vielzahl aktiver antibakterieller Wirkstoffe setzte eine Verlangsamung in der Entwicklung neuer Antibiotika-Wirkstoffklassen ein. Zeitgleich mit dem Ende des "goldenen Zeitalters" wurde in den 1960er Jahren erstmals der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) identifiziert. In Abbildung 1.1 ist diese Entwicklung grafisch dargestellt. Bereits gegen Ende der 1960er Jahre hat die Entdeckung beziehungsweise die Entwicklung und Markteinführung von neuen Antibiotika-Substanzklassen deutlich abgenommen.

Dies gilt insbesondere für Wirkstoffe, die gegen Gram-negative Bakterien wirksam sind. Es ist ebenfalls zu sehen, dass synthetische Verbindungen nur einen kleinen Teil der neuen Antibiotika ausmachen.



**Abb. 1.1** Trends in der Antibiotika-Entwicklung (entnommen aus: K. Lewis, *The Science of Antibiotic Discovery* **2020**, 181, 29-45).<sup>[12]</sup>

Die Ausbildung von Resistenzen ist ein natürlicher evolutionärer Prozess. Es treten verschiedene Arten der Resistenzbildung in Bakterien auf: eine Mutation des Target-Proteins und damit einhergehend ein Verlust der Bindungsaffinität des Antibiotikums, ein enzymatischer Abbau der Wirkstoffe, eine Veränderung der Bakterienmembran und damit eine erschwerte Zellaufnahme des Wirkstoffes, ein verstärkter Transport von Fremdstoffen aus der bakteriellen Zelle (Efflux) und eine Ausbildung von parallelen Stoffwechselreaktionen, die den blockierten Weg umgehen. Verschärft wird dieses Problem der Resistenzbildung dadurch, dass die für die Resistenzen verantwortlichen Gene, welche sich auf Plasmiden befinden, durch Konjugation auf andere Mikroorganismen übertragen werden können, was auch eine Übertragung der ausgebildeten Resistenzen mit sich bringt.<sup>[13-15]</sup>

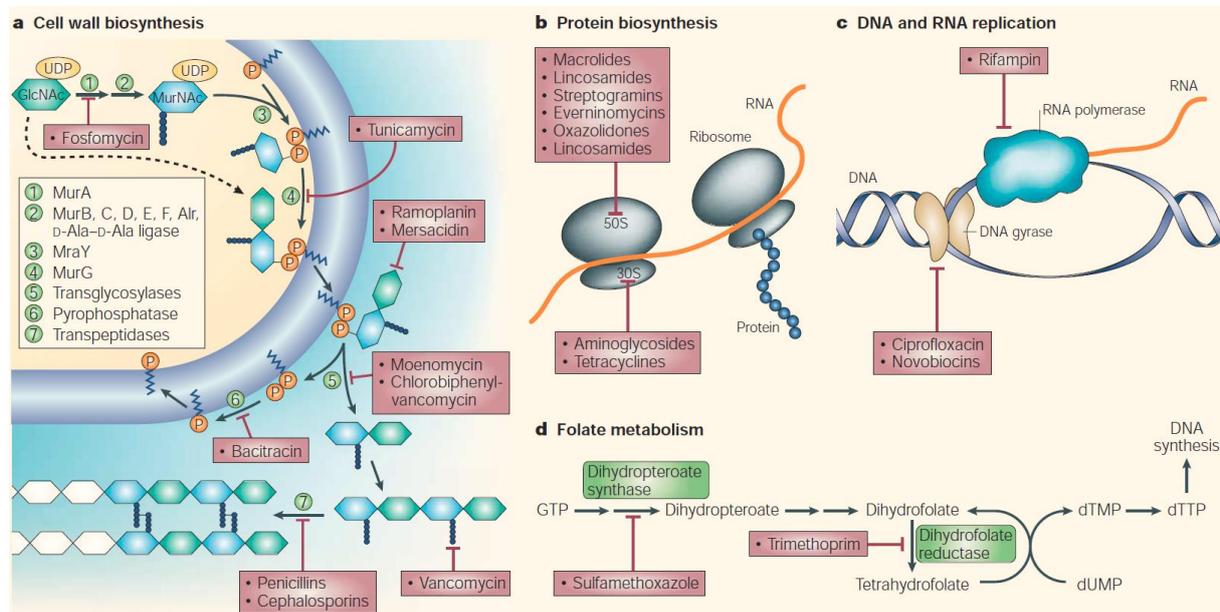
Diese natürlichen Ursachen der Resistenzbildung werden durch den übermäßigen und vor allem unsachgemäßen Umgang mit Antibiotika noch verstärkt. So werden beispielsweise zu viele Antibiotika leichtfertig verschrieben, und in vielen Fällen fällt die Wahl auch auf den falschen antibiotischen Wirkstoff. Zudem werden Antibiotika oft nicht richtig angewendet und zu

frühzeitig wieder abgesetzt. Durch diese Unterdosierung wird der Selektionsdruck auf die Bakterien erhöht, wodurch sich weitere Resistenzen herausbilden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist ebenfalls der hohe Antibiotika-Einsatz in der Landwirtschaft. Hier ist die präventive Gabe von Antibiotika als Futterzusatz in der Massentierhaltung einer der Hauptfaktoren für eine gesteigerte Resistenzbildung. Ein generelles Umdenken ist abseits der Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe längerfristig zur Behebung dieses Problems nötig. Trotz dieser Entwicklungen fand zunehmend ein Rückzug der Pharmaunternehmen aus der Forschung nach neuen antibiotischen Wirkstoffen statt.<sup>[12]</sup> Es sind kaum Gewinne bei einer Markteinführung neuer Antibiotika zu erwarten, da diese nicht in einer großen Menge Anwendung finden, sondern hauptsächlich als Reserve-Antibiotika eingesetzt werden, um eine erneute Ausbildung von Resistenzen gegen den neuen Wirkstoff zu vermeiden. Dieser Umstand, gepaart mit den hohen Entwicklungskosten und den langen Entwicklungszeiten, führt trotz des dringenden Bedarfs an neuen antibiotischen Substanzklassen dazu, dass für pharmazeutische Unternehmen aus wirtschaftlicher Sicht keine Beweggründe vorliegen, auf diesem Gebiet weiter zu forschen. Die einzig logische Schlussfolgerung für gewinnorientierte Unternehmen ist es, die Entwicklung neuer Antibiotika nicht weiterzuführen.<sup>[16]</sup> Bereits 2005 waren nur noch circa acht der großen pharmazeutischen Unternehmen aktiv an der Antibiotika-Forschung beteiligt und eine Trendwende ist bis heute nicht zu erkennen.<sup>[17]</sup> Mit einem Weiterlaufen dieser Entwicklung steht eine stagnierende Zahl von neuen wirksamen Antibiotika einer zunehmend größer werdenden Zahl von resistenten Keimen gegenüber, da über Jahre hinweg das Problem der Resistenzbildung ignoriert wurde und man sich auf die bereits vorhandenen antibiotischen Wirkstoffe verließ. Erst in den letzten Jahren ist dieses Problem mit dem Auftreten immer neuer multiresistenter Bakterienstämme wieder verstärkt in den medialen Fokus gerückt.

Bakterielle Sekundärinfektionen gehen zudem oft mit einer viralen Influenza-Infektion einher und sind häufig die Ursache für einen letalen Krankheitsverlauf durch Krankheitserreger wie beispielsweise *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus*.<sup>[18–20]</sup> Bei der 2020 aufgetretenen SARS-CoV-2-Pandemie spielen bakterielle Sekundärinfektionen der Lunge nur eine untergeordnete Rolle im Krankheitsverlauf, aber sie treten auch hier auf.<sup>[21]</sup> Es besteht die Befürchtung, dass die Coronavirus-Pandemie auch durch die hohe Belastung der Krankenhäuser sowie durch die langen Liege- und Behandlungszeiten von Patienten auf den Krankenhaus-Stationen, zu einer Beschleunigung der bakteriellen Resistenzbildung führt.<sup>[22,23]</sup>

Die Modifikation bereits bekannter Antibiotika umgeht in den meisten Fällen nicht eine ausgebildete Resistenz. Die Entwicklung neuer Antibiotika-Klassen, die neue Targets in den

Bakterien angreifen und damit bereits ausgebildete Resistenzen umgehen, ist dringend notwendig.



**Abb. 1.2** Targets für Antibiotika (entnommen aus: C. Walsh; *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 65-70).<sup>[24]</sup>

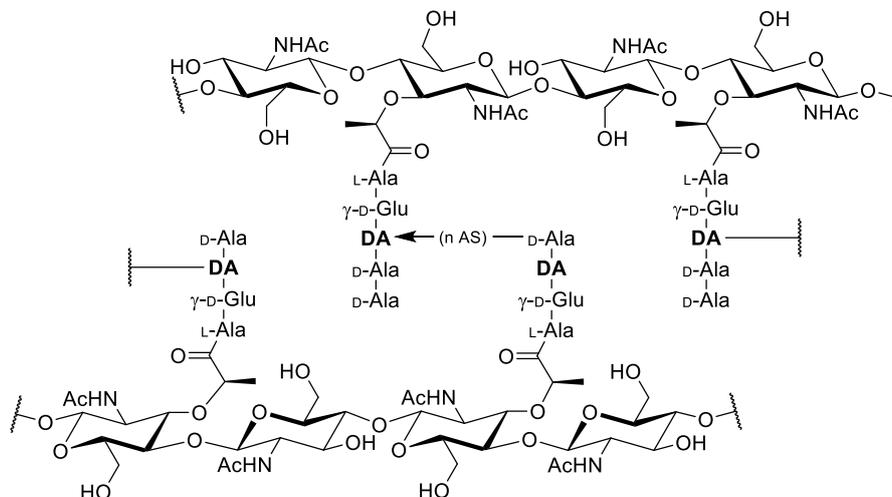
Die vier klassischen Targets in bakteriellen Zellen, die von den antibiotisch aktiven Substanzen adressiert werden, sind in Abbildung 1.2 dargestellt. Diese Targets sind a) die bakterielle Zellwand-Biosynthese, b) die Protein-Biosynthese, c) die DNA- und RNA-Replikation und d) der Folat-Metabolismus.<sup>[24]</sup> Die bakterielle Zellwand-Biosynthese ist ein interessantes Target für antibiotisch aktive Wirkstoffe, da es für dieses Target keine Entsprechung in eukaryontischen Zellen gibt.<sup>[25]</sup> In diesem Schritt stehen mit den essentiellen Enzymen zum Aufbau der Zellwand mehrere potentielle Targets zur Verfügung, die bei den intrazellulären Schritten von den bisher etablierten Wirkstoffen kaum adressiert werden. Zur Umgehung von Resistenzen ist es daher auch wichtig, sich auf solche neuen Targets zu konzentrieren, die bisher nicht im Fokus der Forschung und Entwicklung standen.

## 2 Kenntnisstand

### 2.1 Bakterien

#### 2.1.1 Die bakterielle Zellwand

Im Gegensatz zu eukaryontischen Zellen besitzen bakterielle Zellen eine Zellwand, welche den Bakterien ihre Struktur gibt und sie vor mechanischen Einwirkungen und osmotischer Lyse schützt.<sup>[26]</sup> Die Einteilung von bakteriellen Zellen erfolgt unter anderem anhand ihres Aufbaus der Zellwand. So kann mit der sogenannten Gram-Färbung zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unterschieden werden.<sup>[27]</sup> Gram-positive Bakterien haben eine dicke Zellwand (30-100 nm) bestehend aus Peptidoglycan. Vertreter dieser Klasse sind unter anderem *S. aureus* oder *B. subtilis*. Zur Klasse der Gram-negativen Bakterien gehören beispielsweise *E. coli* und *P. aeruginosa*, welche im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien eine mit 15 nm wesentlich dünnere Peptidoglycan-Zellwand aufweisen. Jedoch besitzen diese Erreger eine zusätzliche Lipid-Doppelschicht, welche eine weitere Diffusionsbarriere darstellt und damit unter anderem auch den Einsatz von Antibiotika erschwert.<sup>[28]</sup>



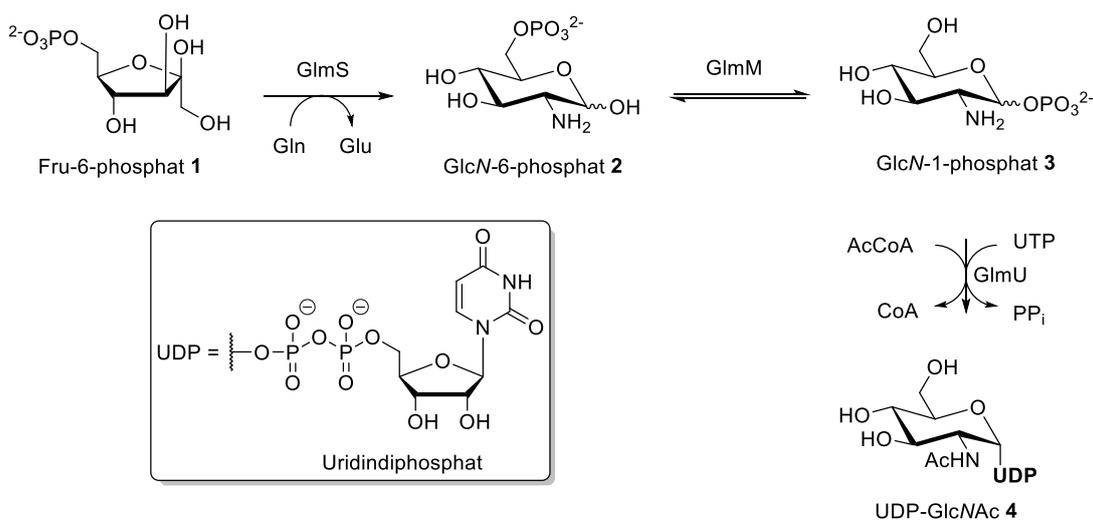
**Abb. 2.1** Aufbau des Peptidoglycans (mit DA: L-Lysin oder *meso*-Diaminopimelinsäure; n AS: variable Anzahl an verbrückenden Aminosäuren).

Das in beiden Bakterienarten vorkommende Peptidoglycan der Zellwand besteht aus quervernetzten Heteropolysaccharidketten, welche über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Das Grundgerüst des Peptidoglycans ist aus alternierend  $\beta$ -(1-4)-glycosidisch verknüpften *N*-Acetylglucosamin-(GlcNAc)- und *N*-Acetylmuraminsäure-(MurNAc)-Zuckereinheiten aufgebaut. Die dadurch gebildeten linearen Polysaccharidketten sind über kurze Oligopeptid-

Seitenketten an den Carboxylgruppen der *N*-Acetylmuraminsäure miteinander verknüpft. Die verknüpfende Peptidseitenkette hat die Aminosäuresequenz L-Ala-γ-D-Glu-DA-D-Ala-D-Ala und variiert zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien in dem Diaminosäure-Baustein (DA). So tritt bei Gram-positiven überwiegend L-Lysin und bei Gram-negativen Bakterien in der Regel *meso*-Diaminopimelat an dieser Position auf.<sup>[29]</sup> Bei bestimmten Bakterienstämmen sind darüber hinaus weitere Variationen an dieser Stelle möglich.<sup>[25,30]</sup> Die Quervernetzung zwischen den Polysaccharidschichten findet zwischen der Aminofunktion der Diaminosäure in der dritten Position und der Carboxylgruppe von D-Alanin in der vierten Position über eine weitere Peptidkette mit einer, von der Bakterienvarianten abhängigen, variablen Anzahl an Aminosäuren statt. Der Aufbau des Peptidoglycans ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

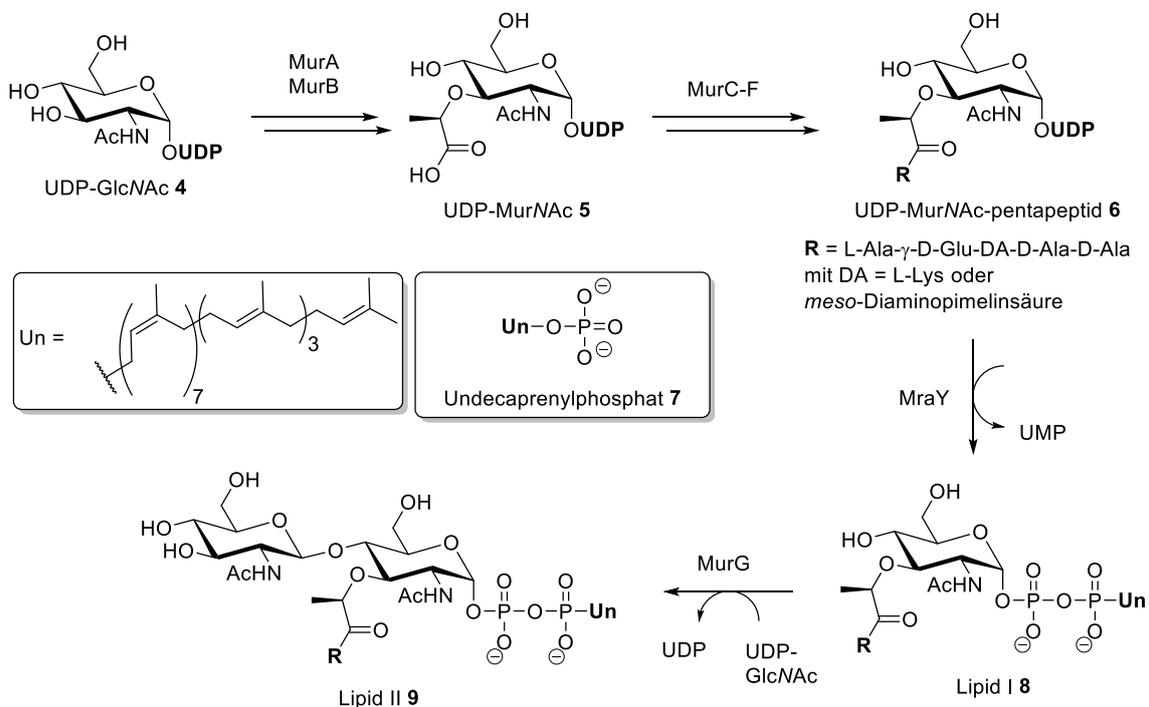
### 2.1.2 Die Peptidoglycan-Biosynthese

Die mehrstufige Biosynthese des Peptidoglycans wurde bereits 1952 von J. T. Park teilweise aufgeklärt. Hierzu wurden zunächst einige Zwischenstufen der Peptidoglycan-Biosynthese isoliert und identifiziert. 1960 wurde der restliche Biosyntheseweg des Peptidoglycans weitgehend aufgeklärt. Der Ablauf der Peptidoglycan-Biosynthese lässt sich im Wesentlichen in drei Schritte einteilen: die intrazelluläre Darstellung der benötigten Zucker- und Aminosäure-Bausteine findet im ersten Schritt statt, gefolgt von dem Aufbau des Pentapeptids **6** am MurNAc und letztendlich die Quervernetzung der Monomere auf der Außenseite der Membran im letzten Schritt der Biosynthese.



**Abb. 2.2** Biosynthese von UDP-GlcNAc 4.

Die Synthese des Uridindiphosphat-*N*-acetylglucosamin-(UDP-GlcNAc)-Grundbausteins **4** erfolgt ausgehend von *D*-Fructose-6-phosphat (Fru-6-phosphat) **1** über vier Schritte (siehe Abbildung 2.2). Fru-6-phosphat **1** wird mit Hilfe der Aminotransferase (GlmS) zu dem Glucosamin-6-Phosphat (GlcN-6-phosphat) **2** umgesetzt und nachfolgend mit Phosphoglucosaminmutase (GlmM) in das Glucoseamin-1-phosphat (GlcN-1-phosphat) **3** umgewandelt.<sup>[31–33]</sup> Im Anschluss daran erfolgt eine Übertragung einer Acetylgruppe von dem Acetyl-Coenzym A (AcCoA) auf die Aminogruppe des GlcN-1-Phosphats **3**. Der Aufbau einer Uridindiphosphat-Gruppe (UDP) an der 1-Position mittels Uridintriphosphat, unter Freisetzung von Pyrophosphat, ist der nächste Schritt der Synthese. Die Uridyltransferase (GlmU) katalysiert die letzte Reaktion zum UDP-GlcNAc **4**.<sup>[34,35]</sup>



**Abb. 2.3** Biosynthese von Lipid II **9**.

Im Anschluss erfolgt die Bildung des intermediären Lipid II **9** an der inneren Seite der Zellmembran. Katalysiert durch die Transferase MurA wird als erstes eine Enolpyruvatgruppe an die 3-Hydroxyfunktion des UDP-GlcNAc **4** übertragen, welche dann im zweiten Schritt mit der Reduktase MurB und mit NADPH zur Lactylseitenkette reduziert wird.<sup>[36,37]</sup> Die so erhaltene Uridindiphosphat-*N*-acetylmuraminsäure (UDP-MurNAc) **5** wird dann im Anschluss mit den ATP-abhängigen Ligasen MurC bis MurF sukzessive mit der Peptidseitenkette erweitert.<sup>[38–41]</sup> Zunächst erfolgt nacheinander die Anbindung von L-Alanin, *D*-Glutaminsäure und der Diaminosäure (DA). Im letzten Schritt des Aufbaus der Peptidseitenkette erfolgt die von MurF

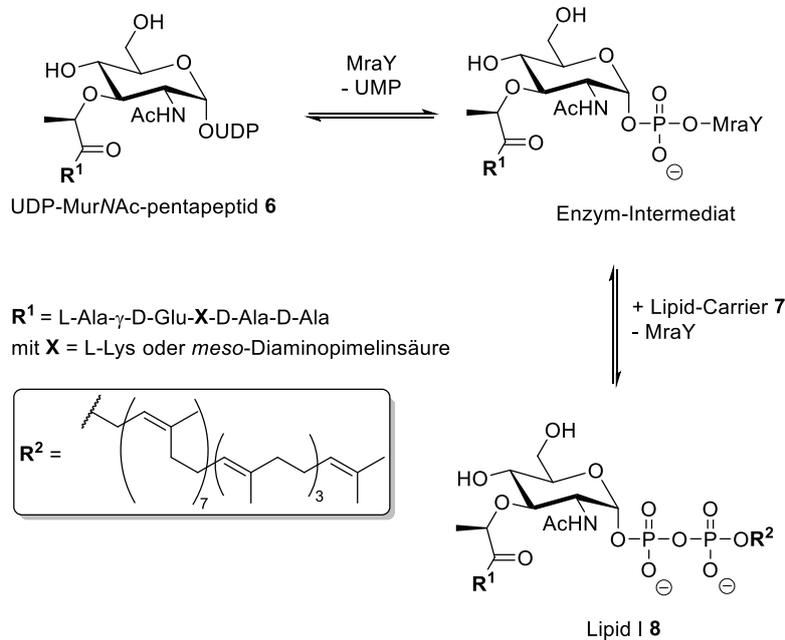
vermittelte Einführung der beiden D-Alanin-Bausteine als Dipeptid an die Peptidkette, wodurch das UDP-MurNAc-pentapeptid **6** gebildet wird. Im nächsten Schritt findet der Übergang vom cytosolischen zum membrangebundenen Teil der Peptidoglycan-Biosynthese statt. Dies geschieht durch die Übertragung des UDP-MurNAc-pentapeptids **6** mittels Translocase I (MraY) auf den membrangebundenen Undecaprenylphosphat-Lipidcarrier **7**.<sup>[25,42]</sup> Das entstandene Undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptid (Lipid I) **8** wird dann  $\beta$ -selektiv, unter UDP-Abspaltung und katalysiert durch die N-Acetylglucosaminyl-Transferase MurG, in das 1,4-Disaccharid Lipid-Intermediat II **9** umgewandelt.<sup>[43]</sup> Der Mechanismus des nachfolgenden Transports des Undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-(Pentapeptid)-GlcNAc (Lipid II) **9** durch die Membran konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden.<sup>[44–47]</sup> Im extrazellulären Teil der Biosynthese findet die Polymerisation des Lipids II **9** statt, welche durch membrangebundene Glycotransferasen katalysiert wird. Die Quervernetzung der  $\beta$ -1,4-verknüpften Polysaccharidketten durch Transpeptidase-Katalyse schließt die Biosynthese des Peptidoglycans ab. Es erfolgt ein nucleophiler Angriff der Aminogruppe der Diaminosäure an die benachbarte Peptidseitenkette unter Abspaltung der terminalen Aminosäure.<sup>[48]</sup>

### 2.1.3 Translocase I (MraY)

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben spielt das Enzym Translocase I (MraY, Uridindiphosphat-N-acetylmuramoyl-Pentapeptid:Undecaprenylphosphat Phospho-N-acetylmuramoyl-Pentapeptid-Transferase) eine Schlüsselrolle beim Aufbau des Peptidoglycan-Gerüsts in der bakteriellen Zellwand und ist damit ein interessantes Target für neue antibakterielle Wirkstoffe. Es wurden bereits einige Nucleosid-Antibiotika entdeckt, die in der Lage sind, das Enzym MraY zu inhibieren. Einige Vertreter dieser Klasse von MraY-Inhibitoren sind beispielsweise die Tunicamycine<sup>[49]</sup>, Capuramycine<sup>[50,51]</sup>, Mureidomycine<sup>[52–54]</sup> und Muraymycine.<sup>[29]</sup> Die Inhibition von MraY führt zu einer Hemmung der Peptidoglycan-Bildung und damit zu einer Lyse der Zelle.<sup>[55]</sup>

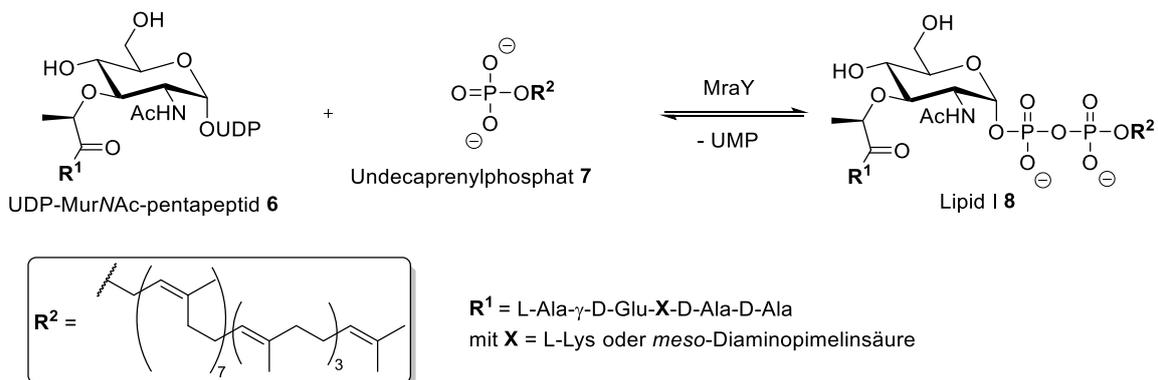
Struve und Neuhaus untersuchten bereits 1965 dieses Enzym genauer und entdeckten dabei die reversible Übertragung des UDP-MurNAc-Pentapeptids **6** auf den membrangebundenen Lipidcarrier Undecaprenylphosphat **7** mit Hilfe von  $Mg^{2+}$  als Cofaktor.<sup>[56]</sup> Durch weitergehende Untersuchungen der Reaktionskinetik konnte die Reversibilität der Reaktion nachgewiesen werden.<sup>[57]</sup> Durch Isotopenmarkierung des UMP mit Tritium wurde in Abwesenheit von Undecaprenylphosphat **7** der Austausch der natürlichen UMP-Gruppe des UDP-MurNAc-Pentapeptids **6** mit Tritium-markiertem UMP beobachtet. Struve et al. postulierten zunächst einen

zweistufigen Mechanismus. Laut diesem Mechanismus findet im ersten Schritt die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes unter UMP-Abspaltung statt. Im zweiten Schritt erfolgt dann die Bildung des Lipids I **8** mit Undecaprenylphosphat **7** unter erneuter Freisetzung des Enzyms *MraY* (siehe Abbildung 2.4).<sup>[58,59]</sup>



**Abb. 2.4** Zweistufiger Mechanismus nach Heydanek et al.<sup>[60]</sup>

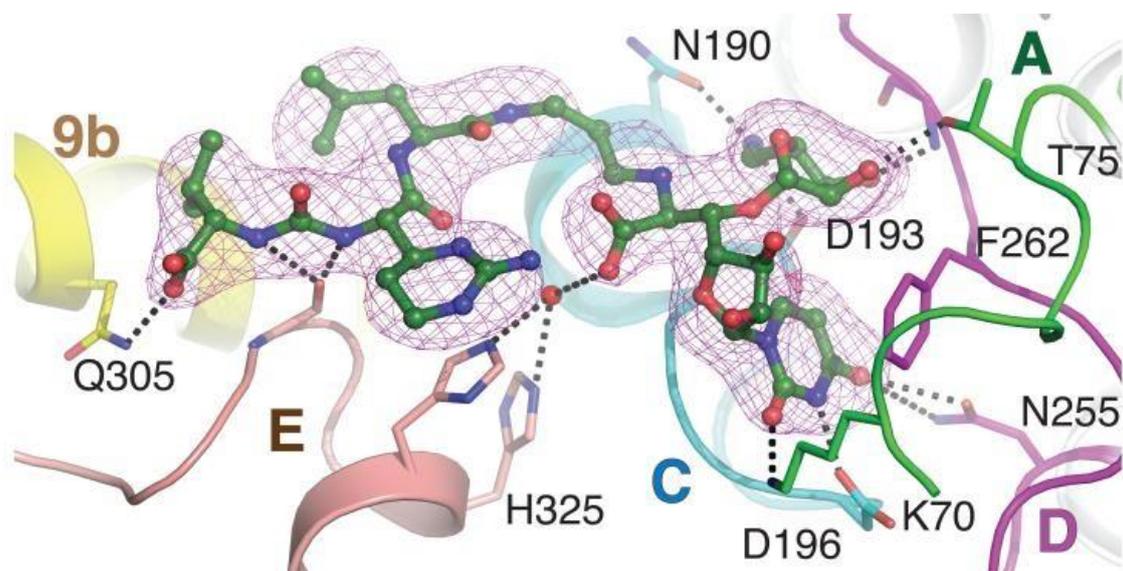
Neuere Mutagenese-Studien von Bouhss und Mitarbeitern mit isoliertem *MraY* deuten allerdings auf einen einstufigen Mechanismus hin.<sup>[61,62]</sup> Das UDP-MurNAc-pentapeptid **6** wird nucleophil von dem Enzym-aktivierten Undecaprenylphosphat **7** angegriffen und bildet dadurch Lipid I **8** mit UMP als Nebenprodukt (siehe Abbildung 2.5).



**Abb. 2.5** Einstufiger Mechanismus nach Bouhss et al.<sup>[61]</sup>

Ikeda und Mitarbeiter identifizierten 1991 das *mraY*-Gen in *E. coli* und führten eine Überexpression dieses Gens durch. Dies führte zu einer erhöhten Translocase I-Aktivität in der

Zellmembran.<sup>[63]</sup> In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten auch die Untersuchungen von Boyle und Donachie im Jahr 1998, dass eine mangelnde Expression von *mraY* in *E. coli* zu einem Anschwellen und der späteren Lyse der bakteriellen Zelle führt.<sup>[64]</sup> Mit dem ersten zweidimensionalen Topologiemodell von MraY, das von Bouhss und Mitarbeitern 1999 aufgestellt wurde, wurde MraY als Transmembranprotein, das aus zehn Transmembran-Segmenten besteht, identifiziert. Die einzelnen Segmente sind über fünf cytoplasmische und sechs periplasmische Loops verknüpft. Der C- und der N-Terminus sind beide auf der periplasmischen Seite der Membran zu finden.<sup>[65]</sup> 2004 gelang Bouhss und Mitarbeitern die Isolierung und Charakterisierung des Enzyms MraY aus *B. subtilis*.<sup>[66]</sup> Die erste zellfreie Expressionsmethode für MraY wurde 2011 von Bernhard und Mitarbeitern etabliert.<sup>[67]</sup> Durch die Bestimmung der Aminosäuresequenz des Enzyms wurden alternierende hydrophobe und hydrophile Abschnitte gefunden, wodurch die Vermutung, dass es sich bei MraY um ein Transmembran-Protein handelt, weiter an Gewicht gewann. Ein erstes Modell für das katalytisch aktive Zentrum wurde von Bugg et al. aufgestellt. Dieses Modell enthält die Aminosäuren Asp-115, Asp-116 als Liganden für den  $Mg^{2+}$ -Cofaktor und Asp-267 als nucleophile Komponente für die Bindung des Substrates.<sup>[65]</sup> Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnten Bouhss et al. allerdings zeigen, dass eine Punktmutation von Asp-267 nicht zu einem Verlust der Aktivität führt.<sup>[61,62]</sup> Die erste Röntgenkristallstruktur von MraY aus *Aquifex aeolicus* von Lee und Mitarbeitern im Jahr 2013 lieferte im Grunde eine Bestätigung des von Bouhss et al. vorgeschlagenen Topologiemodells.<sup>[49]</sup>



**Abb. 2.6** Ausschnitt aus der Kristallstruktur von MraY im Komplex mit Muraymycin D2 (entnommen aus: C. Chung et al., *Nature* **2016**, 533, 557-560).<sup>[68]</sup>

2016 gelang es Lee und Mitarbeitern zudem auch eine Kristallstruktur des Komplexes von MraY aus *Aquifex aeolicus* mit dem natürlich vorkommenden Inhibitor Muraymycin **D2** (siehe Kapitel 2.2.1) zu erhalten, wodurch neue Einblicke in die Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor gewonnen werden konnten (siehe Abbildung 2.6).<sup>[68]</sup>

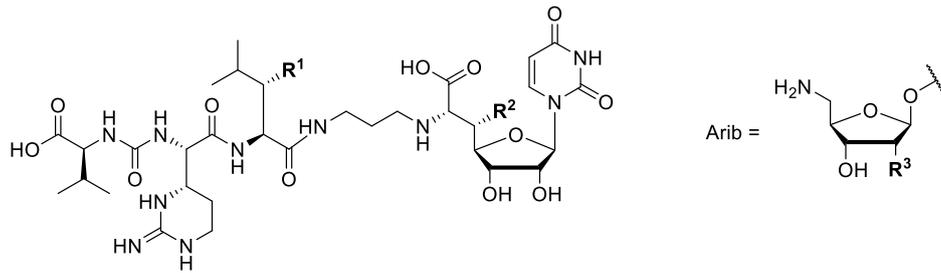
Das Protein durchläuft eine starke Konformationsänderung infolge der Bindung des Muraymycins **D2**.<sup>[54,68]</sup> Diese Fähigkeit zur Konformationsänderung von MraY erklärt unter anderem auch die hohe strukturelle Vielfalt von aktiven Nucleosid-Antibiotika, die in der Lage sind, MraY zu inhibieren.<sup>[53,69]</sup> Des Weiteren wurden eine Bindungstasche für das Nucleosid als auch eine weitere Bindungstasche für die Aminoribose-Einheit identifiziert. Die Peptidkette des Muraymycins lagert sich auf der Protein-Oberfläche an. Im Gegensatz zu der Enzym-Substrat-Bindung findet hier keine Wechselwirkung von Muraymycin **D2** mit den drei Asparat-Resten, die für die katalytische Aktivität verantwortlich sind, statt. Der Mg<sup>2+</sup>-Cofaktor ist ebenfalls nicht an der Inhibitor-Bindung beteiligt. Somit unterscheidet sich die Inhibitor-Bindung erheblich von der Substrat-Bindung, obwohl es sich um einen kompetitiven Inhibitor handelt.

## 2.2 Muraymycine

### 2.2.1 Natürlich vorkommende Muraymycine

Muraymycine gehören zur Klasse der Nucleosid-Lipopeptid-Antibiotika und wurden erstmals 2002 von McDonald und Mitarbeitern aus *Streptomyces* isoliert.<sup>[70]</sup> Die Strukturen dieser 19 isolierten Muraymycine konnten mittels NMR-Spektroskopie und FT-Massenspektrometrie vollständig aufgeklärt werden. Die Muraymycine lassen sich anhand ihrer Strukturmerkmale in vier Gruppen A bis D einteilen. Vertreter dieser vier Gruppen natürlich vorkommender Muraymycine sind in Abbildung 2.7 dargestellt.

2. Kenntnisstand



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>		R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
A1		Arib	-OMe	B7		Arib	-OH
A2		Arib	-OMe	B8		Arib	-OMe
A3		Arib	-OMe	B9		Arib	-OH
A4		Arib	-OH	C1	-OH	Arib	-OMe
A5		-OH		C2	-OH	Arib	-OH
B1		Arib	-OMe	C3	-OH	Arib	-H
B2		Arib	-OMe	C4	-OH	-OH	
B3		Arib	-OMe	D1	-H	Arib	-OMe
B4		Arib	-OMe	D2	-H	Arib	-OH
B5		Arib	-OH	D3	-H	Arib	-H
B6		Arib	-OMe				

Abb. 2.7 Übersicht der natürlich vorkommenden Muraymycine.

Die Grundstruktur der Muraymycine besteht aus einer Glycyl-Uridineinheit, die an ihrer 6'-Amino-Funktion über einen Propylamin-Linker mit einem Harnstofftripeptid verbunden ist. Die 5'-Position dieser Glycyl-Uridineinheit ist *O*-glykosidisch mit einer Aminoribose verbunden. An der Aminoribose-Einheit treten verschiedene Variationen für die einzelnen Vertreter der Muraymycine auf. Im Fall der beiden Muraymycine **A5** und **C4** befindet sich an der 5'-Position eine freie Hydroxyl-Gruppe. Das Harnstofftripeptid besteht aus L-Leucin, oder L-Hydroxyleucin, welches über eine Peptidbindung mit der nicht-proteinogenen Aminosäure Epicapreomycinidin verknüpft ist. Das Epicapreomycinidin ist wiederum über eine Harnstoffgruppe mit L-Valin verknüpft. Die Einteilung in die unterschiedlichen Klassen A-D der Muraymycine erfolgt unter anderem anhand ihrer unterschiedlichen Reste an ihrer (3*S*)-3-Hydroxy-L-Leucin-Einheit beziehungsweise deren Austausch gegen proteinogenes L-Leucin. So umfassen die Klassen A und B Muraymycine mit einer Lipidseitenkette an Position R<sup>1</sup>, die in ihrer Länge und terminalen Funktionalisierung variiert. Hier kommen verzweigte aliphatische und terminal mit Guanidin als auch mit *N*-Hydroxyguanidin funktionalisierte Vertreter vor. Die Muraymycine aus der C-Klasse umfassen solche, die ein nicht funktionalisiertes  $\beta$ -Hydroxyleucin aufweisen. Die Vertreter der Klasse D haben die nicht-hydroxylierte proteinogene Aminosäure L-Leucin als mittleren Baustein gemein.

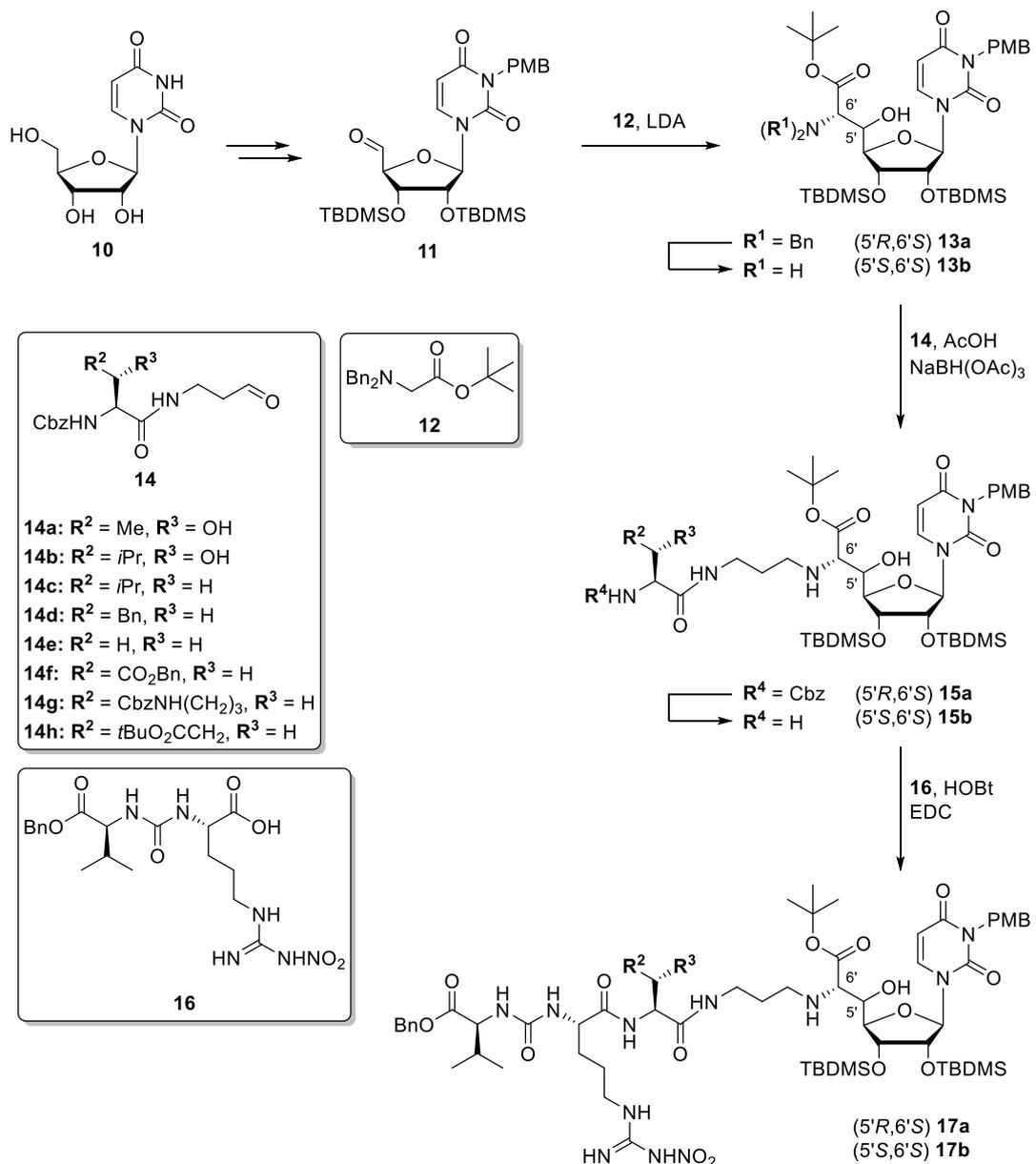
Muraymycin **A1** gehört mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $27 \pm 2$  pM gegen *MraY* *in vitro*<sup>[71]</sup> zu den aktivsten natürlich vorkommenden Muraymycin-Vertretern. Es zeigt eine antibakterielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien wie zum Beispiel *Staphylococci* (MIC = 2 bis 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und *Enterococci* (MIC = 16 bis >64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Gegen Gram-negative Bakterien wurde ebenfalls teilweise eine antibakterielle Aktivität festgestellt. Bei Testung gegen einen *E. coli*-Stamm mit erhöhter Membranpermeabilität wurde ein MIC-Wert von <0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gemessen. Für Effluxdefiziente Stämme von *E. coli* wurde ein MIC-Wert von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gemessen.<sup>[70,71]</sup> In der Zwischenzeit wurden auch weitere Muraymycine von Van Lanen, Ducho und Mitarbeitern isoliert und charakterisiert. Darunter befinden sich auch zwei neue Vertreter der B-Serie, die Muraymycine **B8** und **B9** (siehe Abbildung 2.7).<sup>[72]</sup> Das Muraymycin **B8** besitzt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $4.0 \pm 0.7$  pM gegen *MraY* eine im Vergleich zu Muraymycin **A1** verbesserte Fähigkeit zur Inhibition des Targets und zeigt gegen *S. aureus* (MIC = 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und einen Effluxdefizienten *E. coli*-Stamm (MIC = 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sogar eine bessere biologische Aktivität.<sup>[72]</sup> Dagegen weisen die Muraymycine der Klassen C und D teilweise einen starken Verlust der Aktivität auf. So wurde beispielsweise für die Muraymycine **C4** und **D2** keine nennenswerte Aktivität *in bacterio* festgestellt. Jedoch konnte für das Muraymycin **D1** eine Wirksamkeit gegen *M. tuberculosis* nachgewiesen werden.<sup>[73]</sup>

Im direkten Vergleich mit den Muraymycinen der Klassen C und D wird sehr deutlich, dass durch die Modifikation mit einer lipophilen Seitenkette über eine Ester-Bindung am L-Hydroxyleucin eine Erhöhung der antibakteriellen Aktivität bewirkt wird. Eine Erhöhung der Membrangängigkeit durch das Einführen von  $\omega$ -funktionalisierten Fettsäuren an vereinfachten Modellsystemen der Muraymycin-Struktur konnte von Ducho et al. ebenfalls bereits nachgewiesen werden.<sup>[74,75]</sup> Die bereits in Kapitel 2.1.3 besprochene Kristallstruktur des Komplexes von MraY mit Muraymycin **D2** von Lee und Mitarbeitern macht die Schwierigkeit zur strukturbasierten Vorhersage von Wechselwirkungen auf Grund der hohen konformationellen Flexibilität des Target-Enzyms deutlich.<sup>[53,54,68]</sup>

### 2.2.2 Semi-synthetische Muraymycine

Lin et al. berichteten 2002 von der Darstellung von 16 halb-synthetischen Muraymycinen ausgehend von dem natürlich vorkommenden Muraymycin **C1**.<sup>[76]</sup> Da bereits von den natürlichen Vertretern der Muraymycine bekannt ist, dass eine erhöhte Lipophilie der Gesamtstruktur zu einer verbesserten Zellaufnahme führt, wurde versucht, durch Derivatisierung des primären Amins der Aminoribose an der 6'-Position der Nucleosyl-Aminosäure als auch der sekundären Aminofunktion des Propylamin-Linkers mit lipophilen Seitenketten einen ähnlichen Effekt zu erzielen.<sup>[70-72]</sup> Es konnte jedoch keine nennenswerte Aktivitätssteigerung im Vergleich zu den natürlichen Vertretern der Muraymycine erhalten werden.<sup>[76]</sup> Modifikationen mit lipophilen Gruppen an der primären Aminofunktion der Aminoribose führten sogar zu einem kompletten Verlust der Aktivität am Zielenzym MraY.

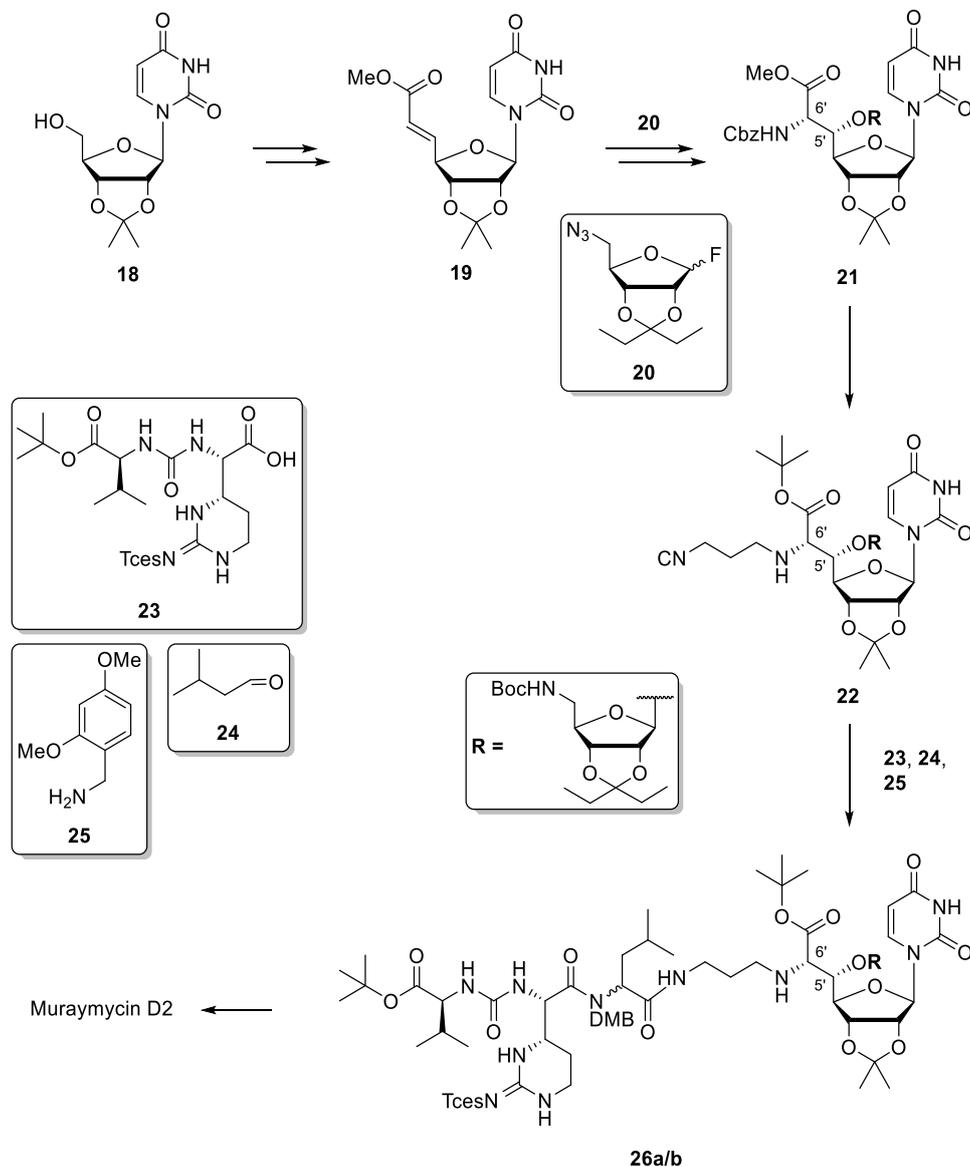
## 2.2.3 Synthetische Muraymycine und Muraymycin-Analoga



**Abb. 2.8** Synthese der vereinfachten Muraymycin-Analoga **17a** und **17b** von Yamashita und Mitarbeitern.<sup>[77]</sup>

Im Jahr 2003 wurden die ersten synthetischen Muraymycin-Analoga von Yamashita et al. hergestellt. Die Synthese der beiden vereinfachten Muraymycin-Analoga **17a** und **17b** wurde ausgehend von Uridin **10** durchgeführt. Über vier Stufen wurde der geschützte Uridin-5'-Aldehyd **11** hergestellt, welcher dann anschließend in einer Aldolreaktion mit *N,N*-Dibenzyl-glycin-*tert*-butylester **12** umgesetzt wurde. Das aus der Reaktion hervorgegangene Produktgemisch aus dem (5'*R*,6'*S*)-Diastereomer **13a** und seinem (5'*S*,6'*S*)-Epimer **13b** konnte säulenchromatographisch getrennt und anschließend jeweils die Benzyl-Gruppe hydrogenolytisch abgespalten

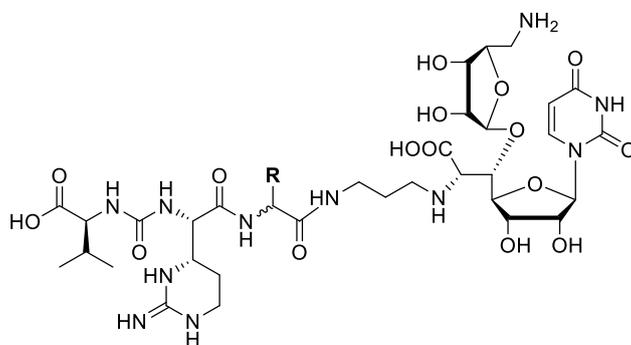
werden. Im nächsten Schritt erfolgten die reduktiven Aminierungen mit den verschiedenen Aldehyden **14a-h**, die sich anhand ihrer variierenden Reste unterscheiden. Nach Cbz-Entschützung erfolgte die Kupplung mit dem Harnstoffdipeptid-Baustein **16**. Das in den Naturstoffen vorkommende Epicapreomycinid wurde hier zur Vereinfachung der Synthese durch L-Arginin ersetzt.<sup>[77]</sup>



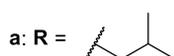
**Abb. 2.9** Synthese von Muraymycin **D2** nach Ichikawa, Matsuda und Mitarbeitern.<sup>[78]</sup>

Die erste Totalsynthese des natürlich vorkommenden Muraymycin **D2**, als auch seines Leucin-Epipimers, wurde 2010 von Ichikawa, Matsuda und Mitarbeitern veröffentlicht.<sup>[78]</sup> Als Schlüsselschritt zur Herstellung des Epimeren-Gemischs von Muraymycin **D2** wurde eine Ugi-Vier-Komponenten-Reaktion verwendet. Zur Herstellung der Glycyl-Uridin-Einheit konnte die Arbeitsgruppe auf Erkenntnisse aus der Synthese von Caprazol, einem Grundbausteins der

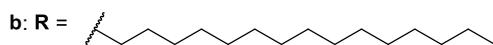
Caprazamycine, zurückgreifen, welche diese Struktureinheit mit den Muraymycinen teilen.<sup>[79-82]</sup> Der geschützte Uridin-5'-Aldehyd wurde nach Oxidation von Alkohol **18** erhalten und in einer Wittig-Reaktion zum (*E*)-Olefin **19** umgewandelt. Dieser Baustein konnte dann mit einer Sharpless-Aminohydroxilierung zur (5'*S*,6'*S*)-Nucleosyl-Aminosäure **21** umgesetzt werden. Die anschließende Glycosylierung der 5'-Position wurde mit Hilfe des Fluoriddonors **20** durchgeführt. Nach Umschützung und reduktiver Aminierung wurde das fertige Isonitril **22** für die Ugi-Vier-Komponenten-Reaktion erhalten. Mit den restlichen Bausteinen, dem Harnstoffdipeptid **23**, dem Dimethoxybenzylamin **25** und dem Isobutyraldehyd **24**, wurde die Ugi-Vier-Komponenten-Reaktion schließlich durchgeführt und das geschützte Muraymycin-Analogon erhalten. Gefolgt wurde dieser Schritt von einer zweistufigen Entschützungs-Sequenz und der Trennung der beiden Epimere mittels HPLC, wodurch das Muraymycin **D2** als auch sein Epimer erhalten wurden.<sup>[78,83]</sup>



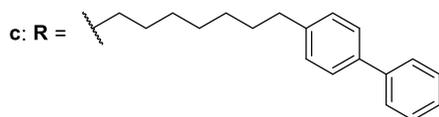
**27 (S) a-e**  
**28 (R) a-e**



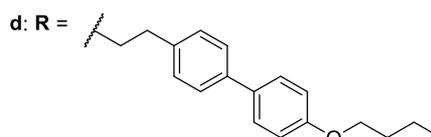
MIC (**27a**) >64 µg/mL  
MIC (**28a**) >64 µg/mL



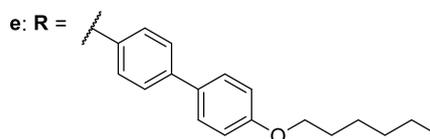
MIC (**27b**) = 2-4 µg/mL  
MIC (**28b**) = 0.25-4 µg/mL



MIC (**27c**) = 4-16 µg/mL  
MIC (**28c**) = 4-16 µg/mL



MIC (**27d**) = 16-64 µg/mL  
MIC (**28d**) = 4-64 µg/mL



MIC (**27e**) = 4-8 µg/mL  
MIC (**28e**) = 4-16 µg/mL

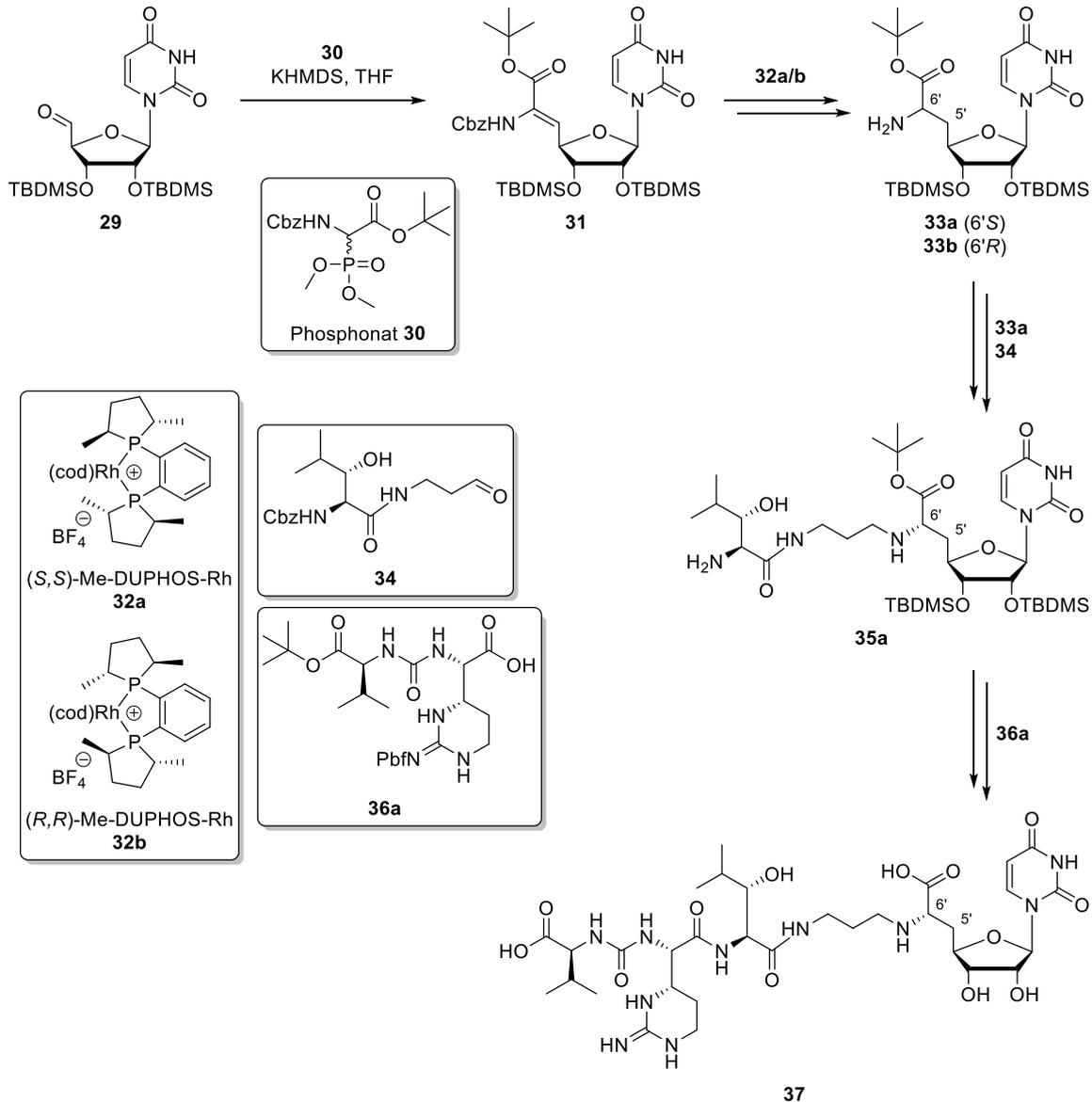
**Abb. 2.10** Synthese lipophil derivatisierter Muraymycin-Analoga nach Matsuda, Ichikawa et al.<sup>[84,85]</sup>

Ebenfalls mit Hilfe der Ugi-Vier-Komponenten-Reaktion gelang es Matsuda, Ichikawa et al. auch, mehrere lipophile Derivate der Muraymycine zu synthetisieren. Hier wurde der L-Leucin-Baustein gegen verschiedene lipophile Substituenten getauscht. Nach den globalen Entschützungen und Trennung der Diastereomere wurde eine Reihe dieser lipophil derivatisierten Muraymycin Analoga erhalten (siehe Abbildung 2.10). Für die synthetisierten lipophilen Derivate **27b** und **28b** wurden schwächere, aber dennoch sehr gute Inhibitionen von MraY ( $IC_{50} = 0.33 \mu\text{M}$  und  $0.74 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu den beiden Stereoisomeren von Muraymycin **D2 27a** und **28a** ( $IC_{50} = 0.01 \mu\text{M}$  und  $0.09 \mu\text{M}$ ) gemessen.<sup>[84,85]</sup> Eine Rigidisierung mit den Biphenyl-Struktureinheiten in der Seitenkette bei den Verbindungen **27e** und **28e** führte zu einer Verschlechterung der antibakteriellen Aktivität. Dieser Befund könnte ein Indiz für die Notwendigkeit einer hinreichenden Flexibilität der lipophilen Seitenkettenstruktur sein.

2016 berichteten Kurosu und Mitarbeiter von einer stereokontrollierten Synthese des natürlich vorkommenden Muraymycin **D1**, als auch zweier Derivate von Muraymycin **D1**, bei denen eine beziehungsweise beide Carbonsäure-Funktionen in Amid-Gruppen überführt wurden (ohne Abbildung).<sup>[73]</sup> Muraymycin **D1** und das an der 7'-Position amidierete Derivat zeigten eine antibakterielle Aktivität gegen *M. tuberculosis*. Für beide Verbindungen wurde ein  $MIC_{50}$  von  $1.56 \mu\text{g/mL}$  erhalten. Das Muraymycin-Analogon mit der zusätzlichen terminalen Amid-Modifikation zeigte dagegen eine leicht schwächere Aktivität ( $MIC_{50} = 6.25 \mu\text{g/mL}$ ).<sup>[73]</sup>

Ducho und Mitarbeiter entwickelten einen stereokontrollierten Ansatz zur Synthese eines vereinfachten Muraymycin-Analogons, basierend auf den Erkenntnissen zum natürlich vorkommenden Muraymycin **A5**, welches das Aminoribose-Strukturelement nicht besitzt und dennoch eine vergleichbare Aktivität zu dem sehr aktiven Muraymycin **A1** aufweist.<sup>[70,86]</sup> Die Synthese dieses 5'-Desoxy-Muraymycin **C4** begann ausgehend von Uridin **10**. Nach TBDMS-Schützungen der drei Alkoholgruppen des Uridins, gefolgt von der selektiven Entschützung an der 5'-Position, wurde der Uridin-5'-Aldehyd **29** durch Oxidation des Uridin-5'-Alkohols **106** generiert. Anschließend wurde der Aldehyd **29** in einer (Z)-selektiven Wittig-Horner-Reaktion mit dem Phosphonat **30** in das (Z)-Olefin **31** umgewandelt. Ein Schlüsselschritt in dieser Synthese ist die asymmetrische Hydrierung mit den kommerziell erhältlichen Rhodium(I)-Katalysatoren (S,S)-Me-DUPHOS-Rh **32a** bzw. dem (R,R)-Me-DUPHOS-Rh **32b** zum hochselektiven Aufbau der entsprechenden Stereozentren. So liefert (S,S)-Me-DUPHOS-Rh **32a** die (S)-konfigurierte Nucleosyl-Aminosäure **33a** und (R,R)-Me-DUPHOS-Rh **32b** die (R)-konfigurierte Nucleosyl-Aminosäure **33b**. Nach hydrogenolytischer Spaltung der Cbz-Schutzgruppe erfolgte die Durchführung einer reduktiven Aminierung mit dem Aldehyd **36**, dessen Synthese nach einer Strategie von Zhu und Mitarbeitern erfolgte (ohne Abbildung).<sup>[87,88]</sup> Nach einer erneuten hydrogenolytischen

Spaltung der Cbz-Schutzgruppe wurde die Peptidkupplung mit dem Epicapreomycin-haltigen Harnstoffdipeptid **36a** durchgeführt. Die Synthese des Epicapreomycin-Bausteins erfolgte nach einer etablierten Synthese nach Ducho et al. (ohne Abbildung).<sup>[89]</sup> Nach saurer globaler Entschützung konnte so das 5'-Desoxy-Muraymycin **C4**-Analogon **37** erhalten werden.<sup>[89]</sup>

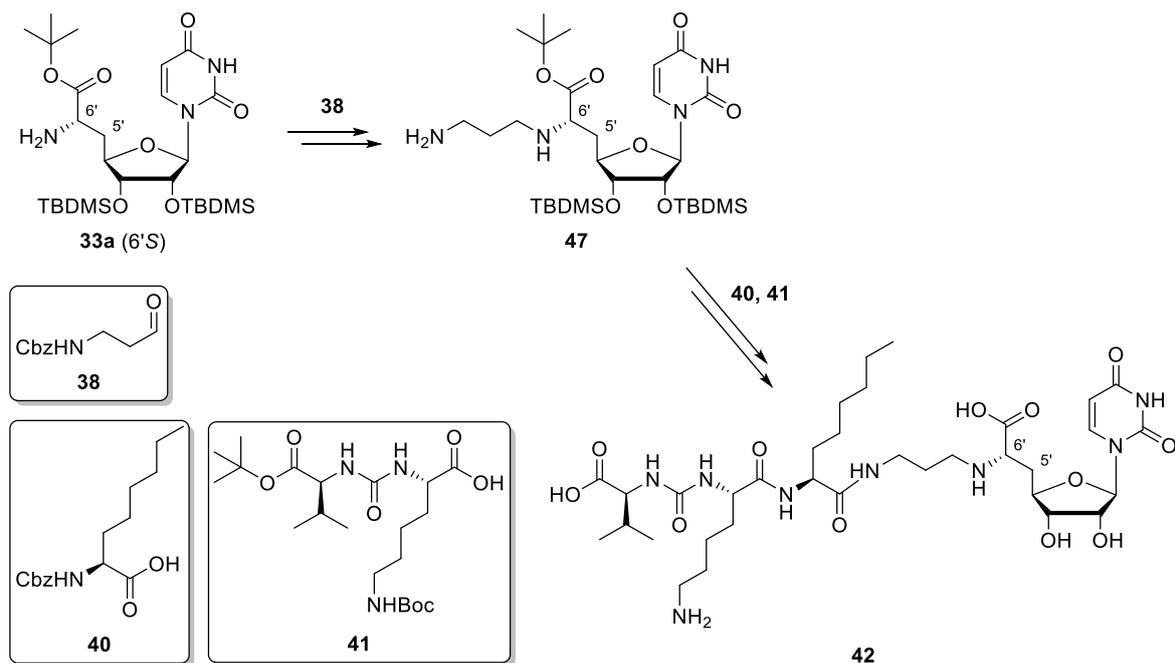


**Abb. 2.11** Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin **C4** Analogons **37** nach Ducho et al.<sup>[88,89]</sup>

Auf ähnlichem Weg wurde auch ein weiter vereinfachtes 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon mit L-Leucin anstelle von L-3-Hydroxyleucin hergestellt, um den Einfluss der Hydroxyl-Gruppe an dieser Position genauer zu untersuchen.<sup>[90]</sup> Eine weitere Vereinfachung erfolgte durch den Austausch des nicht-proteinogenen Epicapreomycidins gegen die proteinogene Aminosäure L-Lysin, was eine erhebliche Minimierung des Synthese-Aufwands zur Folge hatte und zudem

die Aktivität, im Vergleich zu dem Epicapreomycinid-inhaltigen Vertretern, nur in geringen Maße verschlechterte (ohne Abbildung). Für dieses vereinfachte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von  $2.5 \pm 0.6 \mu M$  gegen *MraY* im *in vitro*-Assay gemessen.<sup>[91–94]</sup>

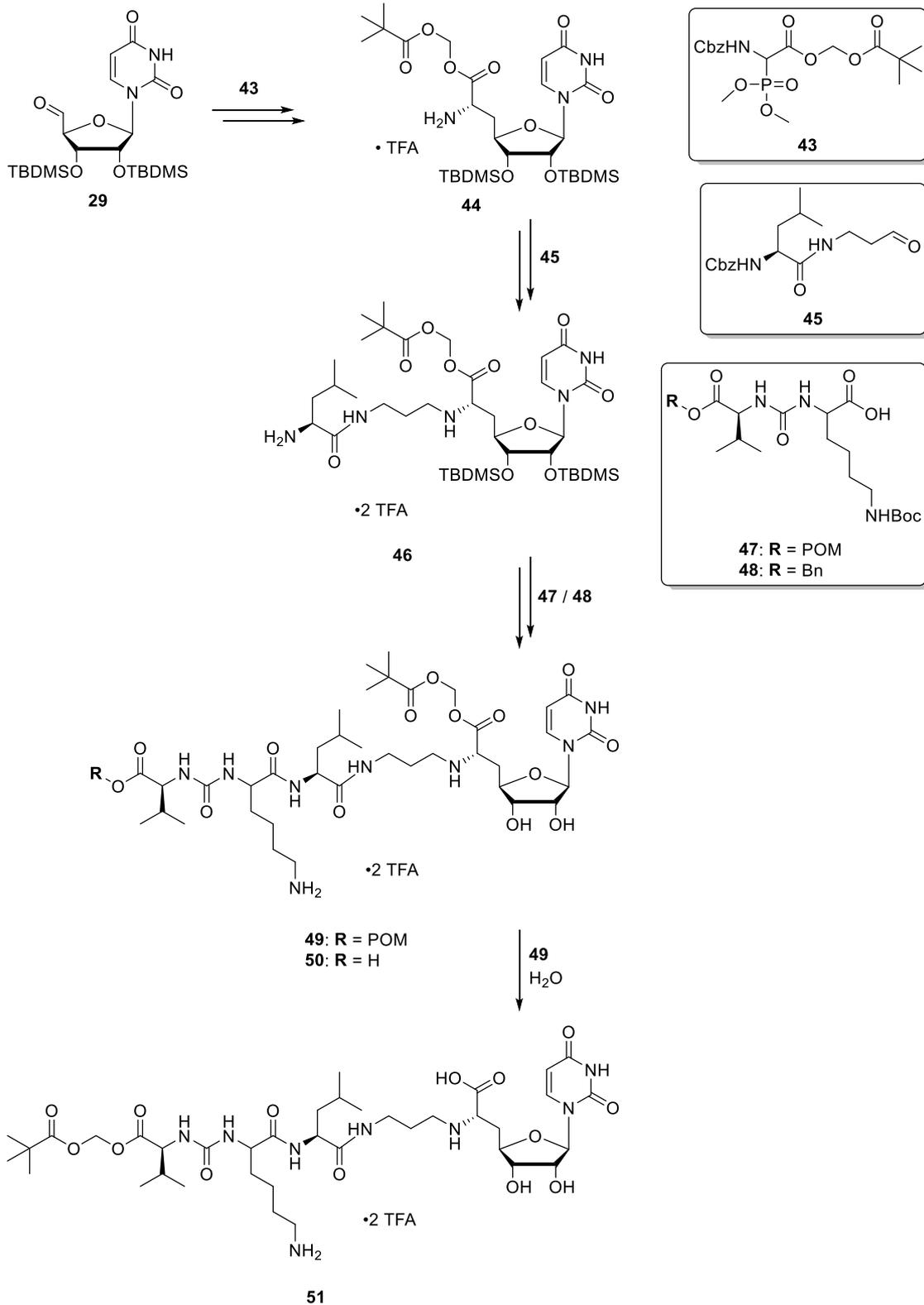
Weitere Untersuchungen zum Einfluss der Lipidseitenkette an dem L-Hydroxyleucin-Baustein wurden durch Ducho et al. durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Derivatisierung an dieser Position durch  $\omega$ -funktionalisierte Fettsäuren zu einer Steigerung der antibakteriellen Aktivität führt, was durch eine erhöhte Akkumulation und auch Penetration der Zellmembran erreicht wurde (ohne Abbildung).<sup>[74,88]</sup>



**Abb. 2.12** Synthese des lipophilen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **42**.<sup>[95]</sup>

Ebenfalls wurde 2017 in Vorarbeiten ausgehend von der (6'S)-Nucleosyl-Aminosäure **33a** ein weiteres vereinfachtes 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **42** mit einer lipophilen Seitenkette hergestellt (siehe Abbildung 2.12). Durch reduktive Aminierung der (6'S)-Nucleosyl-Aminosäure **33a** mit dem Aldehyd **38** wurde zunächst das (6'S)-Diamin **39** hergestellt. Im Unterschied zur Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** wurde an Stelle von L-Leucin hier die (S)-N-Cbz-2-Amino-octansäure **40** durch Peptidkupplung eingeführt. Die Kupplung des Harnstoffdipeptids **41** und globale Entschützung erfolgte analog der publizierten und zuvor besprochenen Methoden.<sup>[91,92]</sup> Für dieses lipophil derivatisierte Muraymycin-Analogon **42** wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von  $0.96 \pm 0.37 \mu M$  gegen *MraY* im *in vitro*-Assay bestimmt. Es zeigte damit eine deutliche Aktivitätssteigerung im Vergleich zu dem L-Leucin-haltigen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** (unveröffentlichte Ergebnisse).<sup>[95]</sup>

## 2. Kenntnisstand



**Abb. 2.13** Synthese von POM-Muraymycin-Prodrugs nach Ducho et al.<sup>[96]</sup>

2016 wurde von D. Wiegmann mit der Synthese von Pivaloyloxymethyl-(POM)-Muraymycin-Prodrugs eine Möglichkeit zur Verbesserung der bakteriellen Zellaufnahme von Muraymycin-

Analoga untersucht. Im Gegensatz zu einer nicht-reversiblen Modifikation der Muraymycin-Grundstruktur wurden hier die Carbonsäurefunktionen durch Veresterung mit Pivaloyloxymethyl-Gruppen in eine lipophilere Spezies überführt, wobei die POM-Gruppen intrazellulär wieder abgespalten werden sollten. Im Rahmen der Dissertation von D. Wiegmann wurden zwei Mono-POM-Prodrugs und das Bis-POM-Prodrug des vereinfachten Muraymycin-Analogons **68** synthetisiert. Ausgehend von dem Aldehyd **29** wurde hier über drei Stufen die POM-geschützte Nucleosyl-Aminosäure **44** als TFA-Salz erhalten. Die Synthese unterscheidet sich in der Verwendung des POM-geschützten Phosphonats **43** bei der Wittig-Horner-Reaktion von der zuvor berichteten und im Arbeitskreis etablierten Synthese-Methode. Die reduktive Aminierung wurde wie bereits zuvor beschrieben mit dem Leu-Aminopropyl-Linker **45** durchgeführt. Im letzten Schritt vor den globalen Entschützungen erfolgten die Peptidkupplungen mit den terminal POM- oder Benzylester-geschützten Harnstoffdipeptiden **47** beziehungsweise **48**. Nach Anwendung von verschiedenen globalen Entschützungsstrategien konnten selektiv die drei POM-Prodrug-Muraymycine erhalten werden. Die Prodrug-Muraymycine **49** und **51** zeigten auf Grund der noch vorhandenen POM-Gruppen wie erwartet keine Inhibition von MraY im *in vitro*-Assay. Für das Prodrug-Muraymycin **50** wurde trotz POM-Modifikation eine gute inhibitorische Aktivität gegen MraY festgestellt ( $IC_{50} = 5.7 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ). Erste antibakterielle Evaluationen zeigten eine Aktivität gegen *E. coli*  $\Delta\text{tolC}$  für die Verbindungen **49** (MIC = 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und **50** (MIC = 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Erste qualitative Stabilitätsmessungen deuteten jedoch bereits auf eine Zersetzung der Verbindung **49** im Assay-Medium hin.<sup>[96]</sup>

Nach der ersten berichteten Methode von Merrifield zum Aufbau von Peptidketten an einer festen Phase, fand diese Methode zunehmend Anwendung in der Peptid-Synthese.<sup>[97-100]</sup> Darüber hinaus wurde diese Festphasen-Synthesemethode auch auf Nucleosid-Antibiotika übertragen. So wurde von Bozzoli et al. der Aufbau einer Substanzbibliothek von Mureidomycinen über eine Festphasen-gestützte Synthese publiziert.<sup>[101]</sup> 2017 wurde von Tran et al. ebenfalls eine Substanzbibliothek von Derivaten des Nucleosid-Antibiotikums Sansanmycin über einen Festphasenansatz erhalten.<sup>[102]</sup> Auf Grundlage dieser ersten Festphasensynthesen von Nucleosid-Antibiotika wurde von K. Leyerer eine Festphasen-gestützte Synthese für Muraymycine entwickelt.<sup>[94]</sup> Hierbei erfolgte der Aufbau der Muraymycin-Peptidkette an der Festphase. Der Dioxolan-Linker **133**, welcher bereits die Struktureinheit des Aminopropyl-Linkers des späteren Muraymycins enthält, wurde mit seiner Carbonsäure-Gruppe am 2-Chlortritylchlorid-Harz **163** gebunden. Anschließend daran erfolgte der sukzessive Aufbau der jeweiligen Peptidketten für die späteren Muraymycin-Analoga durch wiederholte Entschützungsreaktionen der Fmoc-Gruppen und Peptidkupplung mit dem

jeweiligen Aminosäure-Baustein. Das Harnstoffmotiv wurde mit dem *p*-Nitrophenyl-Carbamat der jeweiligen terminalen Aminosäure aufgebaut. Nach Abspaltung von der festen Phase wurden die Peptidketten über zwei Stufen in die Aldehyde transformiert. Der Nucleosid-Baustein **33a** wurde wie zuvor berichtet hergestellt<sup>[89]</sup> und in Lösung durch reduktive Aminierungen mit den Aldehyden der Peptidseitenketten umgesetzt (ohne Abbildung). Die Synthese wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls durchgeführt und wird in Kapitel 4.3.1 im Detail besprochen. Mit Hilfe dieser Festphasensynthese konnte von K. Leyerer ein Alanin-Scan der Muraymycin-Struktur durchgeführt werden und dadurch weitere Einblicke in die Target-Interaktion gewonnen werden. Darüber hinaus wurden auch einige verkürzte Muraymycin-Analoga von K. Leyerer synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die volle Länge des Muraymycin-Grundgerüsts bis zum Harnstoffmotiv wichtig für die antibiotische Aktivität ist. Eine formale Entfernung der Carboxylgruppe des terminalen L-Valins hat allerdings keine deutlich negativen Auswirkungen auf die Aktivität. Des Weiteren wurde bestätigt, dass die Nucleosid-Struktur entscheidend für die Wechselwirkung mit *MraY* ist. Ein Weglassen dieser Einheit führte zu einem kompletten Verlust der Aktivität. Ebenfalls bewirkte der Austausch der L-Leucin-Einheit gegen L-Alanin durch das Fehlen des lipophilen Restes einen deutlichen Verlust an Aktivität. Dies ist auch im Einklang mit der, in der Co-Kristallstruktur beobachteten, Wechselwirkung des L-Leucins mit der hydrophobe Bindetasche an der Proteinoberfläche. Der jeweilige Austausch der letzten beiden Aminosäuren gegen Alanin führte jeweils nicht zu einer drastischen Änderung in der Aktivität. Der Einfluss auf die Wechselwirkung mit dem Target des L-Lysins und des L-Valins in der Peptidkette sind daher eher als moderat einzustufen.<sup>[103]</sup>

2020 wurden zudem von Rudrawar et al. sehr stark vereinfachte Muraymycin-Analoga auf Basis eines Serin-Templats synthetisiert, die nur noch die Schlüsselkomponenten zur Inhibition von *MraY* beinhalteten (ohne Abbildung).<sup>[104]</sup> Durch die Verwendung von Serin wird der erhebliche synthetische Aufwand zum Aufbau der Glycyluridin-Struktur umgangen. Der Aufbau dieser stark vereinfachten Muraymycine erfolgte hier ausgehend von den beiden Enantiomeren, L- und D-Serin und über direkte Peptidkupplung an eine modifizierte 5'-Amino-Uridin-Einheit. An die Hydroxygruppe des Serins ist hierbei eine 5'-Aminoribose-Einheit gebunden. Am *N*-Terminus des Serins erfolgt die Anknüpfung der lipophilen Seitenkette über ein Amid. Nach ersten Erkenntnissen ist hier jedoch ein zusätzlicher, nicht-polarer aromatischer Aminosäure-Spacer wie Phenylalanin oder Tryptophan vor der lipophilen Seitenkette wichtig, um eine antibakterielle Aktivität gegen resistente Stämme zu erhalten. Auch diese Untersuchungen

verdeutlichen nochmal die Wichtigkeit einer lipophilen Seitenkette, neben der essentiellen Uridin-Einheit und der Aminoribose, in der Struktur eines Muraymycin-abgeleiteten MraY-Inhibitors.<sup>[104]</sup>

### 2.3 Streptomycine

Das Aminoglycosid-Antibiotikum Streptomycin wurde erstmals 1943 von Waksman und Mitarbeitern aus *Streptomyces griseus* isoliert.<sup>[105,106]</sup> Als erstes wirksames Antibiotikum gegen Tuberkulose erlangte dieser neue Wirkstoff große Bedeutung und Waksman erhielt für die Entdeckung von Streptomycin 1952 den Nobelpreis in Medizin.

Streptomycin ist aus Streptidin, L-Streptose und N-Methyl-L-glucosamin, welche über zwei glycosydische Bindungen verbunden sind, aufgebaut.<sup>[107]</sup> In wässriger Lösung liegt der Aldehyd der Streptose zu 90% als Hydrat vor. Das Hydrat des Streptomycins liegt durch die Stabilisierung mit der Hydroxy-Gruppe an C-3 bevorzugt vor.<sup>[108]</sup>

Streptomycin ist hauptsächlich wirksam gegen Gram-negative Bakterien und *M. tuberculosis*. Der Mechanismus seiner Zellaufnahme ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Zellaufnahme von Aminoglycosid-Antibiotika lässt sich generell in drei Phasen einteilen.<sup>[109–113]</sup> Zunächst bindet die mehrfach kationisch geladene Struktur der Aminoglycosid-Antibiotika an die negativ geladene Zellmembran der Bakterien. Durch diese Akkumulation an der Zellmembran werden andere Kationen wie zum Beispiel  $Mg^{2+}$  verdrängt und dadurch die Integrität der Membran beeinträchtigt, was zu einer verstärkten Aufnahme des Antibiotikums führt.<sup>[114–116]</sup> In der energieabhängigen Phase I (energy-dependent phase I, EDPI) wird durch die "proton-motive force" das Aminoglycosid-Antibiotikum in geringer Konzentration ins Cytoplasma aufgenommen, wo es an sein Target, das 30S-Ribosom, angreifen kann. Durch diese direkte Interaktion mit der ribosomalen rRNA kommt es zu Fehlcodierungen und daraus folgend zum Einbau von fehlerhaften Proteinen in die innere Zellmembran und damit einhergehend zu einer erhöhten Permeabilität.<sup>[113,117,118]</sup> In der nächsten Phase EDPII (energy-dependent phase II) erfolgt eine rasche Akkumulation des Antibiotikums durch die beschädigte Zellmembran, wodurch erneut die Anzahl an Fehlcodierungen erhöht wird und die Proteinsynthese blockiert wird, was letztendlich zum Zelltod führt.<sup>[116,119–123]</sup>

Allerdings gibt es heute bereits schon viele bekannte Resistenzen gegen Aminoglycosid-Antibiotika und Streptomycin im Speziellen, die zunehmend verbreitet auftreten.<sup>[124,125]</sup> Eine der häufigsten Ursachen zur Ausbildung von Resistenzen gegen Streptomycin besteht in

Konformationsänderungen an der Bindungsstelle, welche durch eine Punktmutation im 16S-rRNA-Gen, dessen codierte RNA mit dem ribosomalen Protein S12 interagiert, induziert werden.<sup>[126–129]</sup>

Es sind nur wenige Optionen zur Modifikation von Streptomycin bekannt, die die antibakterielle Aktivität zu einem gewissen Maße erhalten.<sup>[130]</sup> So bleibt die Aktivität beim Entfernen einer Amidino-Gruppe und beim Anbringen von Mannose an die 4'-OH-Position des *N*-Methyl-L-Glucosamin-Rests erhalten. Beispielsweise wird jedoch ein kompletter Verlust der Aktivität durch Entfernen beider Amidino-Gruppen oder Modifikation an der 3'-OH-Gruppe des *N*-Methyl-L-Glucosamins beobachtet. Auch bei Alkylseitenketten-Modifikationen am Aldehyd wurde über einen Verlust der Aktivität berichtet.<sup>[130]</sup> Ebenso wurde bei der Umwandlung der Aldehydgruppe zu verschiedenen Hydrazon-Derivaten des Streptomycins ein Verlust der antibakteriellen Aktivität festgestellt, der mit zunehmender Größe des eingefügten Restes stark zunimmt.<sup>[131]</sup> Im Gegensatz dazu wurde von J. P. Abad und R. Amils mit einer kovalenten Modifikation der Aldehydgruppe und Einführung von Hydrazon-Bindungen mit verschiedenen Resten nur eine geringe Abnahme der Aktivität des Streptomycins beobachtet.<sup>[132]</sup> Eine Hydrolyse der Hydrazon-derivatisierten Streptomycine in wässriger Pufferlösung führte wieder zur Freisetzung von Streptomycin.<sup>[133]</sup> Inwiefern die Fähigkeit der Zellaufnahme durch diese Modifikationen beeinflusst wird, oder ob nur die Interaktion am ribosomalen Target behindert wird, ist nicht bekannt.

### 2.4 Enterobactine

Enterobactin gehört zu der Naturstoffgruppe der Siderophore. Siderophore sind kleine Moleküle, die in der Lage sind, Eisen zu chelatisieren. Siderophore kommen unter anderem in Gram-negativen Bakterien vor und regulieren dort in einer ihrer Funktionen den Eisentransport durch die Zellwand.<sup>[134–136]</sup> Darüber hinaus erfüllen Siderophore einige weitere biologische Funktionen in Bakterien.<sup>[137–140]</sup> Gram-negative Bakterien sondern Siderophore in die extrazelluläre Umgebung ab, um Eisen zu chelatisieren und in die Zelle zu transportieren.<sup>[141]</sup> Nach der Chelatisierung der Eisen(III)-Ionen werden die Chelatkomplexe von hochselektiven Rezeptorproteinen in der Zellwand erkannt und aktiv in das Cytosol der Bakterien transportiert.<sup>[142]</sup> Nach dem Transport durch die äußere und innere Zellmembran wird Eisen(III) zu Eisen (II) reduziert und aus dem Siderophor-Komplex freigesetzt. Siderophor-Wirkstoff-Konjugate können über denselben Weg über die Siderophor-Rezeptoren in die bakterielle Zelle aufgenommen werden und so als Transportsysteme für Wirkstoffe genutzt werden.<sup>[143–145]</sup> So konnte von

Zscherp et al. ein neuartiges Enterobactin-Derivat synthetisiert werden, welches größtenteils die Eigenschaften des natürlich auftretenden Siderophors beibehält und zudem einen Ankerpunkt zum Anbringen von Cargo-Molekülen bietet. Es konnte auch gezeigt werden, dass durch Konjugation von Cargo-Molekülen an das Enterobactin-Analogon **57** eine Aufnahme in die Zelle unter Eisen-limitierten Bedingungen erreicht werden konnte.

Die Synthese eines dieser Enterobactin-Analoga **57** nach Klahn und Mitarbeitern ist in Abbildung 2.14 teilweise dargestellt.<sup>[146]</sup>

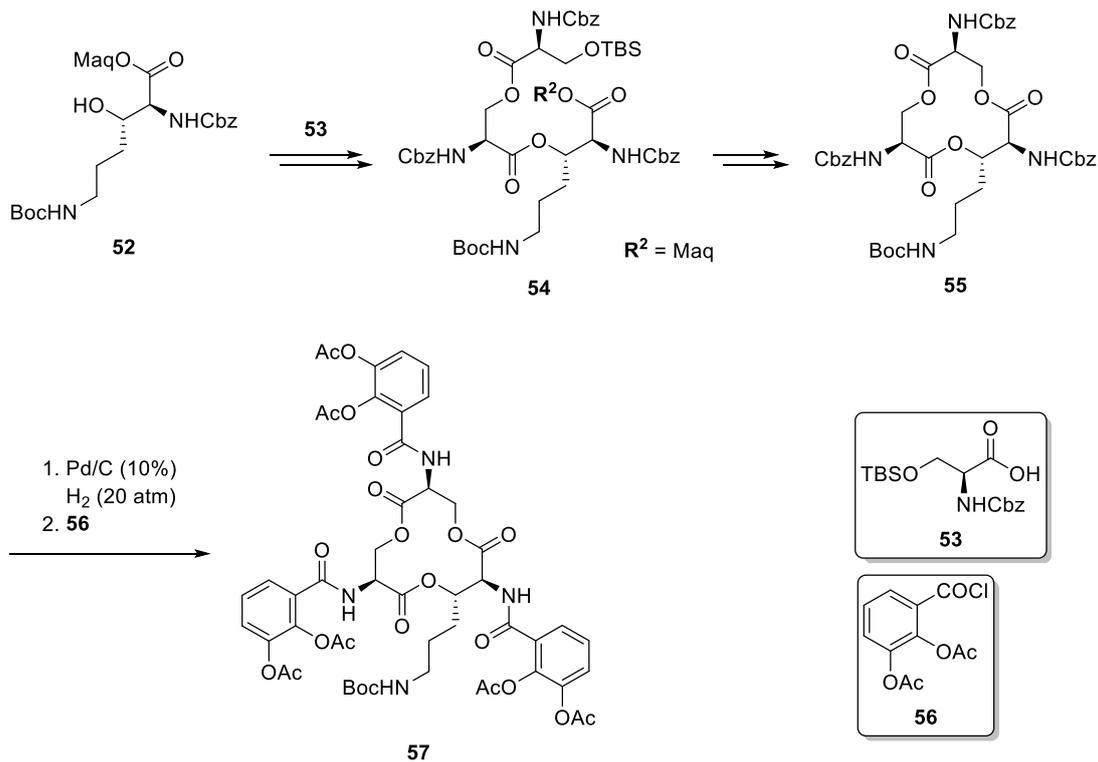


Abb. 2.14 Synthese des Enterobactin-Derivats **57**.<sup>[146]</sup>

Die Synthese des 3-Hydroxylysine-Derivates **52** erfolgte über fünf Stufen ausgehend von 4-Aminobutanol. Nach Schützung der Carbonsäurefunktion als 2-Methylantrachinyl-(Maq)-Ester in Tetrahydrofuran erfolgte die Veresterung mit Cbz-Ser(TBS)-OH **53**. Nach TBS-Entschützung wurde eine Veresterung mit Cbz-Ser(TBS)-OH **53** zur Vervollständigung des Aufbaus des linearen Trimers **54** durchgeführt. Nach Abspaltung der Schutzgruppen TBS und Maq erfolgte der Ringschluss. Durch Zugabe von 2,2'-Dipyridyldisulfid wurde ein intermediärer Thioester gebildet, welcher im nächsten Schritt durch Zugabe von Silberacetat in das gewünschte Tris-Lacton **55** überführt wurde. Im letzten Schritt erfolgte die Einführung der Catechol-Gruppen nach vorhergegangener Cbz-Entschützung. Unter Schotten-Baumann-Bedingungen wurde mit 2,3-Diacetoxybenzoylchlorid acyliert und das Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57** erhalten.<sup>[146]</sup>

## 2.5 Silsesquioxane

Silsesquioxane sind Würfel-oktametrische Verbindungen (cube-octameric silsesquioxane scaffold, COSS) mit alternierenden Silicium- und Sauerstoff-Atomen, die von acht organischen Resten umgeben sind.<sup>[147]</sup> Die ersten Synthesen von Silsesquioxanen wurden im Jahr 1955 beschrieben.<sup>[148]</sup> 1990 wurden von H. C. Marsmann und Mitarbeitern auf ähnliche Weise durch hydrolytische Kondensation von Organosilicium-Monomeren weitere Silsesquioxane mit verschiedenen organischen Resten hergestellt.<sup>[149]</sup> Der Aufbau von funktionalisierten COSS-Derivaten wird heute prinzipiell über zwei Methoden erreicht. Zum einen können die funktionellen Gruppen in nicht vollständig kondensierte COSS-Grundgerüste eingeführt werden. In der zweiten Methode wird zum anderen ein bereits vollständiger COSS-Käfig nachträglich mit reaktiven Gruppen derivatisiert.<sup>[150,151]</sup> Eine Vielzahl von Silsesquioxan-Monomeren ist hierfür mittlerweile kommerziell erhältlich.<sup>[151]</sup> Die eingesetzten organischen Reste können zur Variation der Molekül-Eigenschaften mit verschiedenen Gruppen derivatisiert werden, um so zugeschnittene Bausteine für spezielle Anwendungsbereiche zu erhalten. So wurde von Kolmar und Mitarbeitern bereits gezeigt, dass eine Modifizierung einer COSS-Struktur mit sieben Ammonium-Gruppen in der Lage ist, einen an das COSS konjugierten Wirkstoff in lebende HeLa-Zellen zu transportieren.<sup>[147,151–153]</sup> Ein Guanidin-modifiziertes und mit TAMRA Fluoreszenz-markiertes Silsesquioxan (TAMRA-GuCOSS) zeigte eine noch höhere Aufnahme in HeLa-Zellen, und es konnte zudem in Fluoreszenz-Experimenten eine Aufnahme in Gram-negative *E. coli*-Bakterien nachgewiesen werden, was die Verbindung zu einem idealen Kandidaten für einen Transport von Antibiotika machen könnte.<sup>[147]</sup> Ein weiterer Vorteil dieser Silsesquioxan-Verbindungen besteht darin, dass sie nicht toxisch sind und die anorganische Kernstruktur unter physiologischen Bedingungen hydrolytisch abgebaut wird.<sup>[151]</sup>

## 2.6 Zellpenetrierende Peptide (CPPs)

Zellpenetrierende Peptide sind wasserlösliche, kurzkettige Peptide (<35 Aminosäuren), die bei physiologischem pH-Wert eine positive Ladung aufweisen.<sup>[154,155]</sup>

Im Jahr 1988 wurde mit dem *trans*-Aktivator-Protein (TAT) in natürlichen Proteinen von HIV-1 das erste zellpenetrierende Peptid entdeckt. Untersuchungen zeigten, dass auch bei einer Verkürzung der Aminosäuresequenz von 86 auf 37-57 Aminosäuren die Fähigkeit der Zellpenetration zu einem gewissen Maße erhalten bleibt.<sup>[156,157]</sup> Wenig später wurde im Jahr 1991 von Joliot et al. Penetratin, ein 60-mer Peptid aus *Drosophila antennapedia* entdeckt, welches auch

zellpenetrierende Eigenschaften besitzt.<sup>[158–160]</sup> Basierend auf den natürlichen gefundenen zellpenetrierenden Peptiden gibt es mittlerweile auch eine Vielzahl von synthetisch hergestellten Vertretern dieser Substanzklasse.<sup>[161]</sup>

Ihre Eigenschaft, Zellmembranen und Zellwände zu überwinden, macht sie zu geeigneten Konjugationspartnern für Wirkstoffe, die selbst nicht in der Lage sind in Zellen vorzudringen. Zellpenetrierende Peptide weisen zudem eine relativ geringe Toxizität auf, was sie zusätzlich als geeigneten Kandidaten für den Wirkstofftransport auszeichnet.<sup>[162]</sup> Im Jahr 1994 wurde erstmals das zellpenetrierende Peptid Penetratin als Transporter für ein Cargo-Molekül in eine Zelle verwendet.<sup>[163]</sup> Für Konjugate von zellpenetrierenden Peptiden gibt es mittlerweile eine Vielzahl von biomedizinischen Anwendungen, die sich auch bereits in klinischen Studien befinden, beispielsweise in der Krebstherapie.<sup>[161,164]</sup> So wurde beispielsweise ein zellpenetrierende Peptid bestehend aus 20 Aminosäuren an den Wirkstoff 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (ein Topoisomerase-I-Inhibitor) konjugiert und in einer klinischen Phase-I-Studie erfolgreich getestet.<sup>[165,166]</sup>

Der Mechanismus der Zellaufnahme ist noch nicht vollständig verstanden.<sup>[167]</sup> Der Transport scheint jedoch hauptsächlich über Endocytose<sup>[162,168,169]</sup> und eine direkte Penetration<sup>[170,171]</sup> der Membran stattzufinden. Es ist ebenfalls bereits bekannt, dass die Effektivität der Zellaufnahme unter anderem vom Typ des verwendeten zellpenetrierenden Peptids, sowie seiner Konzentration und dem Verhältnis zum transportierenden Molekül abhängt.<sup>[172–175]</sup> Des Weiteren spielen die Ladung und der adressierte Zelltyp eine Rolle bei der Aufnahmefähigkeit.<sup>[162,173,176]</sup> Untersuchungen zeigten auch, dass zellpenetrierende Peptide sich auch für den Wirkstofftransport in Bakterien eignen, hier jedoch weniger effektiv als in Säugetier-Zellen sind.<sup>[177–179]</sup> So wurde auch durch eine Konjugation eines zellpenetrierenden Peptids an einen antibiotischen Wirkstoff, in diesem Fall ein antimikrobielles Peptid, eine Steigerung der antibakteriellen Aktivität beobachtet.<sup>[179]</sup>

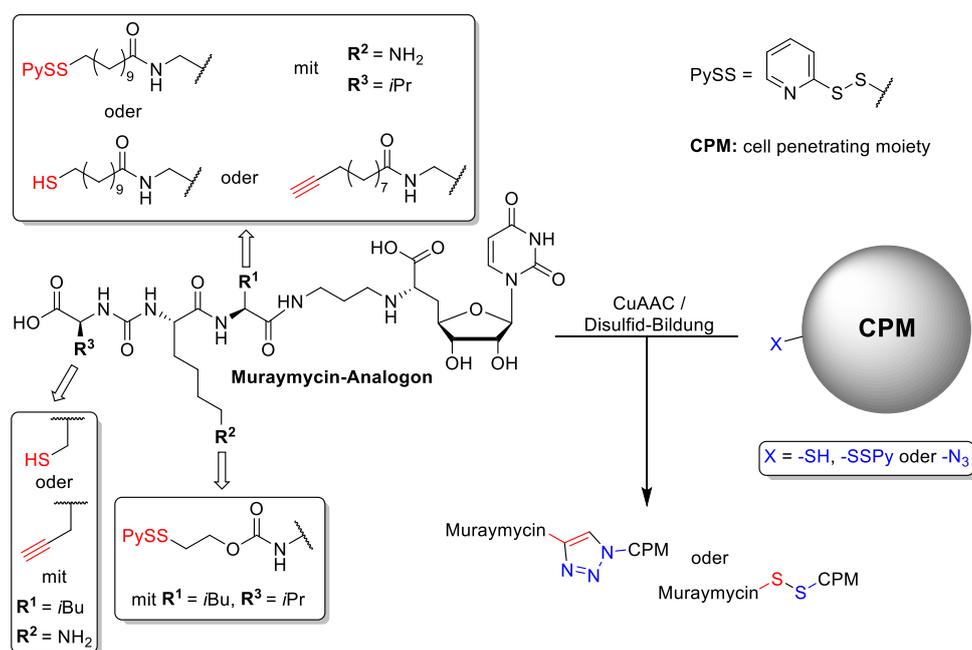
Zellpenetrierende Peptide sind mittlerweile in verschiedensten Formen auch kommerziell erhältlich. So gibt es auf dem Markt bereits eine Vielzahl von Alkin- oder Azid-funktionalisierte CPPs, die mittels Click-Reaktionen an Wirkstoffe zur Herstellung von diversen Konjugaten gekuppelt werden können.<sup>[180,181]</sup>

### 3 Aufgabenstellung und Planung der Arbeit

#### 3.1 Synthese von Muraymycin-Transporter-Konjugaten

##### 3.1.1 Aufgabenstellung

Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf der Synthese verschiedener Konjugate von vereinfachten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga mit Strukturen, die zur Verbesserung der bakteriellen Zellaufnahme dieser Muraymycin-Analoga führen sollten. Zum Aufbau dieser Konjugate sollte auf zwei unterschiedliche Konjugationstypen zurückgegriffen werden. Zum einen sollte eine stabile Konjugation über eine Triazol-Bindung getestet werden, die mittels einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) erreicht werden sollte. In einem anderen Ansatz sollte die Konjugation durch Bildung einer Disulfidbrücke zwischen dem Muraymycin-Analogen und Transporter-Molekül (CPM) stattfinden. Die Disulfidbindung sollte unter intrazellulären Bedingungen wieder gespalten werden und damit das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen als Wirkstoff an seinem Zielort freisetzen.



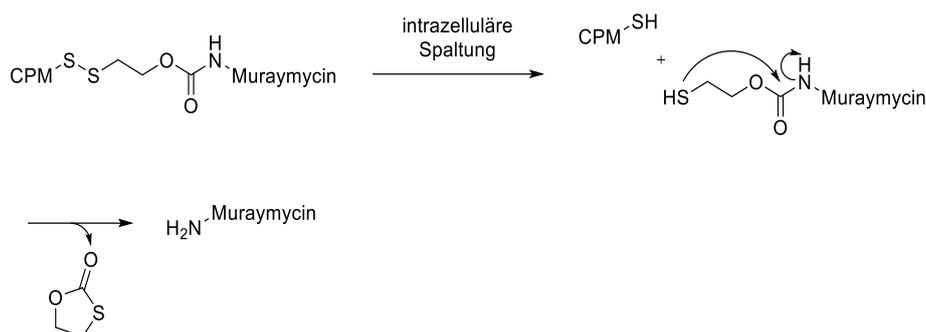
**Abb. 3.1** Übersicht der Modifikationen am Muraymycin-Grundgerüst sowie der generellen Konjugations-Ansätze.

Im Anschluss sollten die synthetisierten Muraymycin-Konjugate als erste Modellsysteme auf ihre antibakteriellen Eigenschaften untersucht werden. Zur Bestimmung einer möglichen erhöhten bakteriellen Zellaufnahme sollten hierzu antibakterielle Wachstums-Assays gegen

diverse Vertreter von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien, als auch Zellaufnahme-Assays in Gram-negativen Bakterien herangezogen werden.<sup>[182]</sup>

Zur Herstellung der jeweiligen Konjugate sollte die Muraymycin-Kernstruktur entsprechend funktionalisiert werden. Für die Auswahl der Modifikationen an der Muraymycin-Struktur wurde auf die bereits gewonnenen Erkenntnisse der durchgeführten SAR-Studien sowie die der Kristallstruktur von MraY mit Muraymycin **D2** zurückgegriffen.<sup>[68]</sup> Für die verschiedenen Modifikationen sollten die Seitenkette der mittleren Aminosäure an Position R<sup>1</sup>, das primäre Amin des L-Lysins (Gruppe R<sup>2</sup>) und die Seitenkette der terminalen Aminosäure an Position R<sup>3</sup> in den Fokus genommen werden. Eine Übersicht der geplanten Modifikationen an der Muraymycin-Grundstruktur für die anschließend vorgesehenen Konjugationen ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Für Modifikationen der Seitenkette der mittleren Aminosäure an Position R<sup>1</sup> ist bekannt, dass hier große Gruppen toleriert werden und lipophile Gruppen sogar vorteilhaft für die inhibitorische Aktivität am Target MraY sind. Damit ist eine Modifikation an dieser Position ein vielversprechender Ansatz zum Aufbau der Konjugat-Verbindungen. Geplant war die Einführung von terminal mit einem (aktivierten) Thiol oder einem Alkin versehenen aliphatischen Seitenketten, die im Folgenden über die spaltbare Disulfidbrücke oder die stabile Verknüpfung über ein Triazol an die zellpenetrierende Struktur gekuppelt werden sollten. Eine biologische Evaluation der verwendeten Konjugat-Vorstufen und jeweiligen Referenzverbindungen sollte ebenfalls erfolgen, um unter anderem die bereits bekannten Erfahrungen aus den SAR-Studien zu validieren.

Der genaue Einfluss von Modifikationen an der N<sup>ε</sup>-Position am L-Lysin (R<sup>2</sup>) ist nicht genau bekannt. Jedoch scheint es hier auch einen größeren Spielraum für Vereinfachungen zu geben, wie man beispielsweise durch die Substitution des Epicapreomycidins mit L-Arginin oder auch L-Lysin sehen kann. Auch der von K. Leyerer durchgeführte Alanin-Scan bestätigt diese Vermutungen.<sup>[103]</sup> Der Einfluss von größeren Gruppen in der Seitenkette des L-Lysins durch Modifikation des primärenamins ist nicht geklärt, weswegen an dieser Position nur auf eine komplett spaltbare Konjugation zurückgegriffen werden sollte, die das parente 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** unter intrazellulären Bedingungen wieder freigegeben sollte. Für diese komplett reversible Modifikation sollte die ε-Aminogruppe des L-Lysins über eine Carbamat-Struktur mit einem Thiol-Linker verbunden werden, der die spätere Disulfidbrücke im Konjugat ausbilden sollte.<sup>[183]</sup> Sowohl die Disulfidbrücke als auch die Carbamat-Struktur sollten intrazellulär wieder komplett gespalten werden.



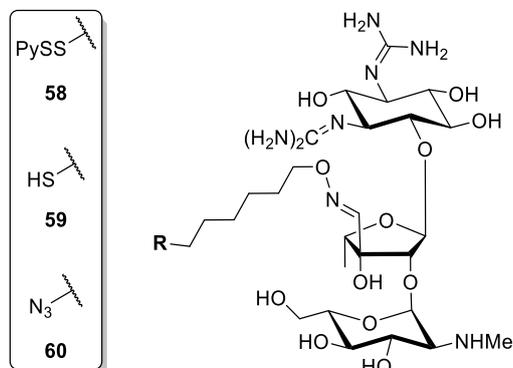
**Abb. 3.2** Vermuteter Mechanismus der intrazellulären Spaltung.

Der vermutete Mechanismus der Spaltung der Konjugate mit der  $N^{\epsilon}$ -Carbamate-Modifikation am Lysin ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Zunächst sollte die reduktive Spaltung der Disulfidbrücke durch die intrazellulären Bedingungen erfolgen, welche von einer intramolekularen Ringschlussbildung-getriebenen Abspaltung des Carbamats gefolgt wird. Damit sollte das eingesetzte Muraymycin-Analogon wieder in seiner unmodifizierten Form freigesetzt werden und so in der Lage sein, *MraY* zu inhibieren.

Auch ist der Einfluss des Austausches der terminalen Aminosäure L-Valin zu L-Cystein oder L-Propargylglycin bisher nicht vollständig geklärt und sollte in dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden. Jedoch ist auch diesbezüglich bereits bekannt, dass eine Verkürzung oder der Austausch von L-Valin zu L-Alanin keine drastischen Änderungen der Target-Interaktion zur Folge hatten.<sup>[103]</sup> Der Einfluss von größeren Resten in der Seitenkette der terminalen Aminosäure-Gruppe ist allerdings bisher noch unklar. Auch an dieser Position sollten wieder beide Konjugationstypen, der spaltbare Typ über eine Disulfidbrücke sowie der stabile Ansatz über ein Triazol, zur Verknüpfung an das Transporter-System getestet werden. Im Falle des spaltbaren Ansatzes über die Disulfidbrücke sollte das modifizierte Muraymycin-Analogon mit dem terminalen L-Cystein **81** intrazellulär wieder freigesetzt werden. Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** sollte als Referenzverbindung ebenfalls biologisch getestet werden. Im Hinblick auf die bisherigen SAR-Daten war mit diesem Konjugations-Ansatz kein deutlicher Verlust an inhibitorischer Aktivität gegen *MraY* zu erwarten. Im Falle der stabilen Konjugation über die Triazol-Bindung und mit einem sehr großen Rest an dieser Position waren die Folgen für die Aktivität gegen *MraY* nicht abzusehen.

Generelle Zielsetzung war, dass im Falle der spaltbaren Konjugations-Ansätze die Target-Interaktion der freigesetzten Muraymycin-Analoga mit dem Zielenzym *MraY* weitestgehend erhalten bleiben sollte, da entweder ein bekanntes und aktives Muraymycin-Analogon wieder freigesetzt werden sollte, oder nur geringe oder sogar vorteilhafte Änderungen in der

Grundstruktur des Muraymycins vorgenommen werden sollten. Im Falle der stabilen Konjugate werden weitaus drastischere Änderungen in den Muraymycin-Analoga verursacht. Durch die hohe konformationelle Flexibilität, die das Target MraY mit sich bringt, waren die Konsequenzen hieraus nicht vollständig abzuschätzen.



**Abb. 3.3** Übersicht der geplanten Modifikationen am Streptomycin.

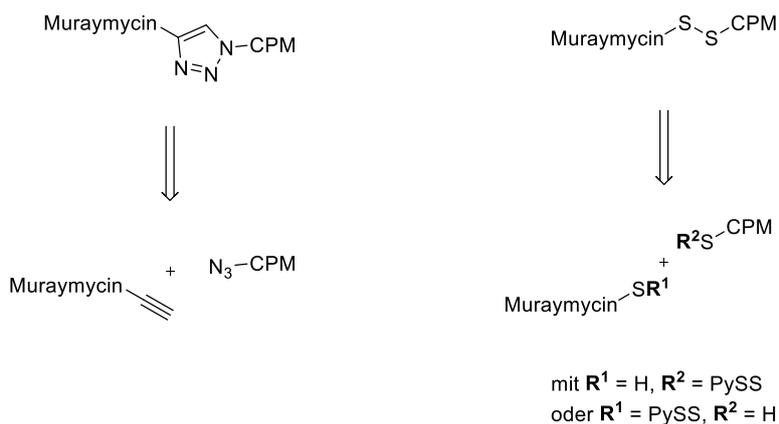
Als zellpenetrierende Transporter-Moleküle sollten Derivate des Aminoglycosid-Antibiotikums Streptomycin, ein Derivat des Eisentransporters Enterobactin, ein zellpenetrierendes Peptid und das zur Zellaufnahme modifizierte Silsesquioxan GuCOSS eingesetzt werden. Das zellpenetrierende KF<sub>2</sub>-Peptid **173** und der GuCOSS-Baustein **172** wurden im Rahmen einer Kooperation von der Arbeitsgruppe von Prof. Kolmar an der TU Darmstadt synthetisiert und zur Verfügung gestellt. In einer weiteren Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Klahn an der TU Braunschweig sollte das Enterobactin-Muraymycin-Konjugat hergestellt werden. Das hier verwendete Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57** wurde von Klahn et al. entwickelt und synthetisiert. Im Fall des Streptomycins als Transporter-Molekül sollte zunächst die entsprechende Modifikation an dem Aminoglycosid-Antibiotikum durchgeführt werden, um die verschiedenen Konjugationen zu ermöglichen (siehe Abbildung 3.3). Zum einen sollte ein Linker mit einem endständigen Azid über eine Oxim-Ligation an die Aldehyd-Funktion des Streptomycins angebracht werden, um die Triazol-Konjugation zu ermöglichen. Zum anderen sollte ein analoger Linker mit einem terminalen Thiol oder einem aktivierten Thiol eingeführt werden, der die späteren Konjugationen über die Ausbildung einer Disulfidbrücke ermöglichen sollte. Diese Muraymycin-Streptomycin-Konjugate sollten idealerweise auch als dualer Wirkstoff fungieren, sofern die Aktivität des Streptomycins durch die hier geplanten Modifikationen zumindest teilweise erhalten bliebe. Im Falle der intrazellulär spaltbaren Konjugate ist der Erhalt der Aktivität durch die Freisetzung des Streptomycin-Derivats wahrscheinlicher als bei den nicht-reversiblen Konjugaten und der damit einhergehenden

größeren strukturellen Änderung. Durch die Verwendung eines Oximethers erhält man zudem eine zusätzliche potenzielle Spaltungsstelle im Konjugat, die zwar hydrolytisch stabiler als die in Kapitel 2.3 bereits diskutierte Hydrazon-Bindung ist, aber dennoch prinzipiell gespalten werden kann. Damit sollte unmodifiziertes Streptomycin unter den entsprechenden Bedingungen ebenfalls wieder freigesetzt werden.<sup>[132,133]</sup> Das Hauptziel war jedoch auch hier eine Erhöhung der Zellaufnahme des Muraymycin-Analogons durch die Transport-Eigenschaften des Streptomycins als auch durch dessen Fähigkeit zur Schwächung der Integrität der Zellwand.

Die Derivatisierungen am 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon an der Position R<sup>1</sup> bilden die erste Serie, an Position R<sup>2</sup> die zweite Serie und an Position R<sup>3</sup> die dritte Serie der Muraymycin-Transporter-Konjugate. In der ersten Konjugat-Serie sollten alle Transporter-Verbindungen im Zuge der reversiblen, intrazellulär spaltbaren Konjugation eingesetzt werden. Im Falle des Ansatzes über die stabile Konjugation sollte lediglich Streptomycin verwendet werden. In der zweiten Konjugat-Serie sollten Streptomycin, das Silsesquioxan GuCOSS **172** und das zellpenetrierende KF<sub>2</sub>-Peptid **173** als intrazellulär spaltbare Transporter-Einheiten eingesetzt werden. Als Transporter-Verbindung sollte in der dritten Serie ausschließlich Streptomycin zum Einsatz kommen, einmal als reversibles Konjugat mit einer Anknüpfung über eine Disulfidbrücke und einmal mit einer stabilen Konjugation, die durch eine Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) erhalten werden sollte.

### 3.1.2 Planung und retrosynthetische Betrachtungen

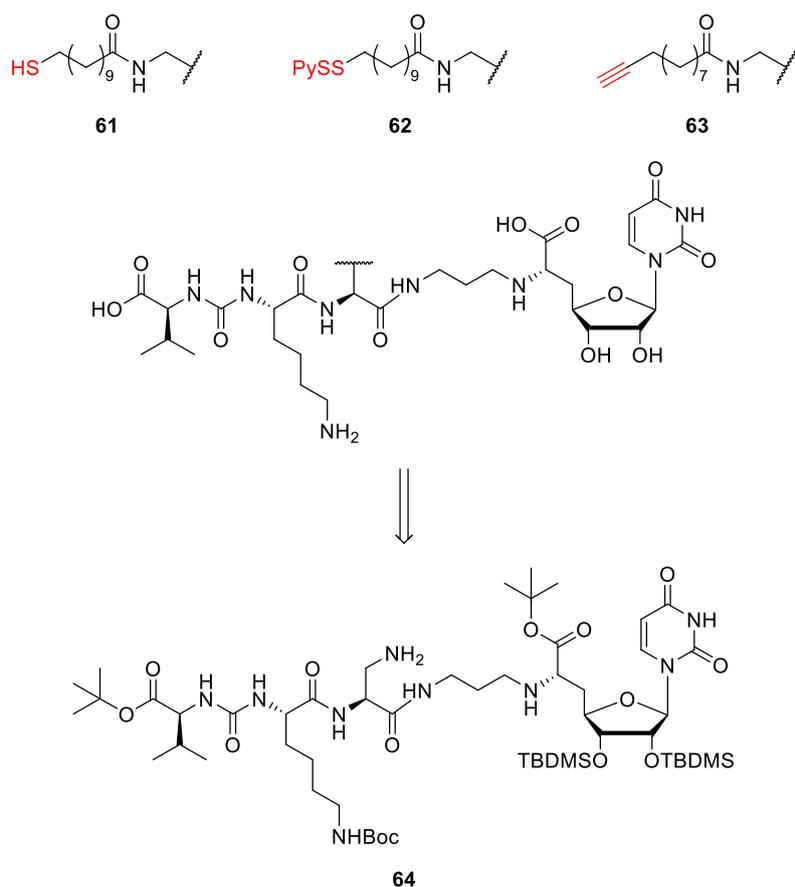
Aus retrosynthetischer Sicht lassen sich die Konjugate zunächst in die Muraymycin-Komponente und die konjugierte Transporter-Komponente trennen. Die Konjugation dieser beiden Komponenten kann entweder durch eine Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) oder durch eine Verknüpfung über eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Thiol-Spezies erfolgen, wobei ein Thiol mit Aldrithiol™-2 aktiviert wird, um eine selektivere und schnellere Disulfid-Bildung zu gewährleisten.



**Abb. 3.4** Retrosynthesen der beiden generellen Konjugations-Ansätze.

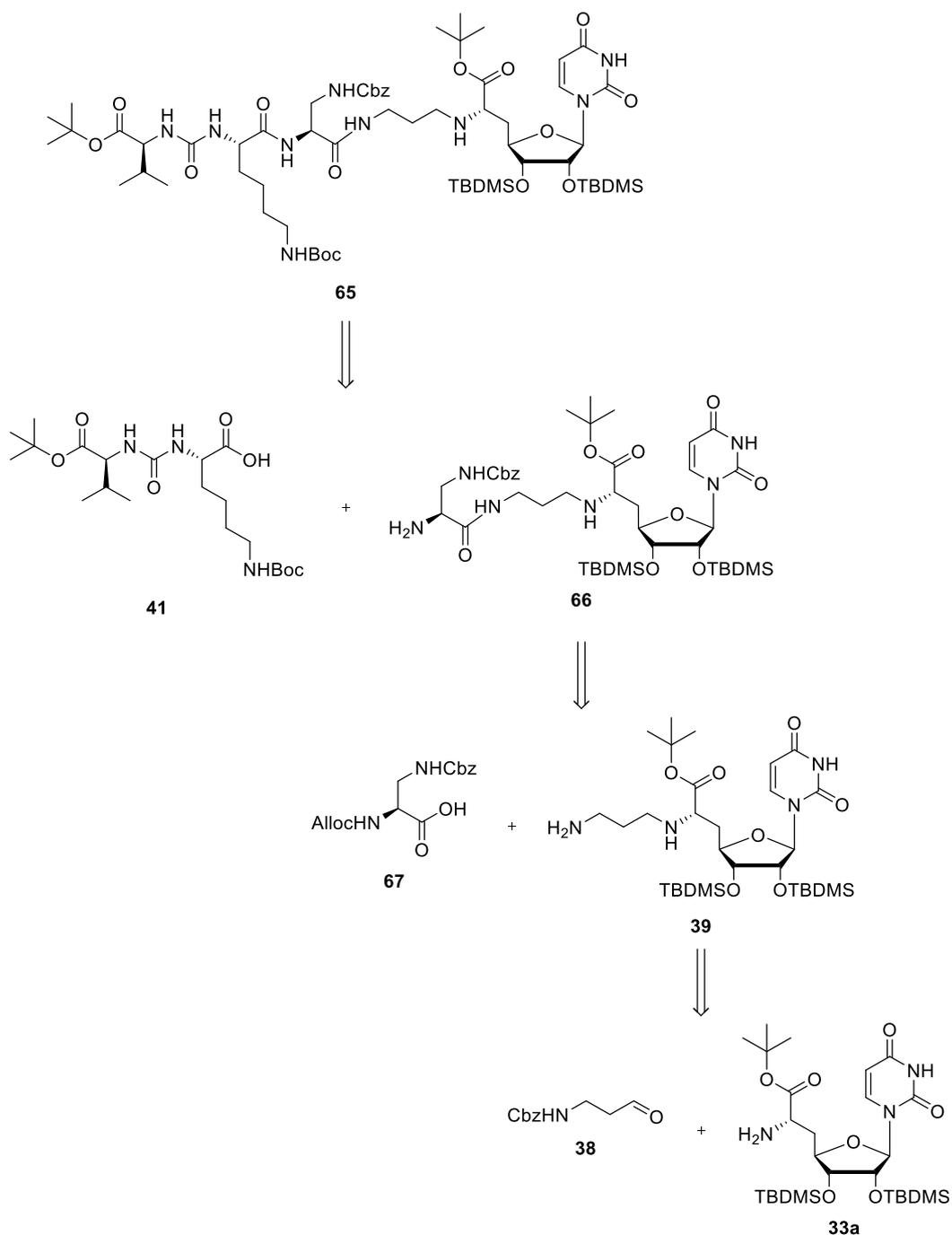
Die Synthese der Muraymycin-Konjugat-Vorstufen unterscheidet sich teilweise innerhalb der drei Serien. Prinzipiell sind die Muraymycin-Grundgerüste über zwei unterschiedliche Ansätze zugänglich. Zum einen können die Muraymycin-Analoga klassisch in Lösung hergestellt werden, zum anderen kann die Synthese der Peptidseitenkette mittels einer Festphasensynthese durchgeführt werden, welche dann in einem späteren Schritt an den Nucleosid-Baustein **33a** gebunden wird. Die verschiedenen retrosynthetischen Herangehensweisen werden im Folgenden für die einzelnen Serien besprochen.

## 3.1.2.1 Retrosynthese in Lösung für die Muraymycin-Konjugat-Vorstufen der ersten Serie



**Abb. 3.5** Retrosynthese der Seitenketten-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga der ersten Konjugat-Serie.

Die Einführung der drei verschiedenen Seitenketten an Position  $R^1$  sollte durch Peptidkupplung an das entschützte Amin der L-Diaminopropionsäure **67** im Muraymycin-Grundgerüst **64** erfolgen. Die 10-Undecinsäure **153** und die 11-Tritylmercaptoundecansäure **169**, die als Seitenketten für die Muraymycin-Analoga **63** beziehungsweise **61** verwendet werden sollten, sind kommerziell erhältlich. Die PySS-aktivierte Seitenkette **124** für das Muraymycin-Analogon **62** sollte in einem Schritt aus der kommerziell erhältlichen 11-Mercaptoundecansäure mit Aldrithiol™-2 **123** hergestellt werden können. Eine globale Entschützung sollte den letzten Schritt dieser Synthese vor der Konjugation an die zellpenetrierende Komponente bilden. Durch Verwendung von ausschließlich säurelabilen Gruppen sollte diese Entschützung in einem Schritt mit einer wässrigen TFA-Lösung durchgeführt werden.



**Abb. 3.6** Retrosynthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **65** in Lösung.

Bei dieser ersten Methode sollte das Muraymycin-Analogon in Lösung aufgebaut werden. Ausgehend von dem Nucleosid-Baustein **33a** sollte hier zunächst durch eine reduktive Aminierung der Aminopropyl-Linker **38** angeknüpft werden (Abb. 3.6).<sup>[89,184,185]</sup> Dieser Schritt sollte von einer Entschützungs-Reaktion der orthogonalen Cbz-Schutzgruppe zu **39** und einer Peptidkuppelung mit dem mittleren Aminosäure-Baustein, in diesem Fall der L-Diaminopropionsäure **67** gefolgt werden. Das Harnstoffdipeptid **41** sollte nach einer im Arbeitskreis bekannten

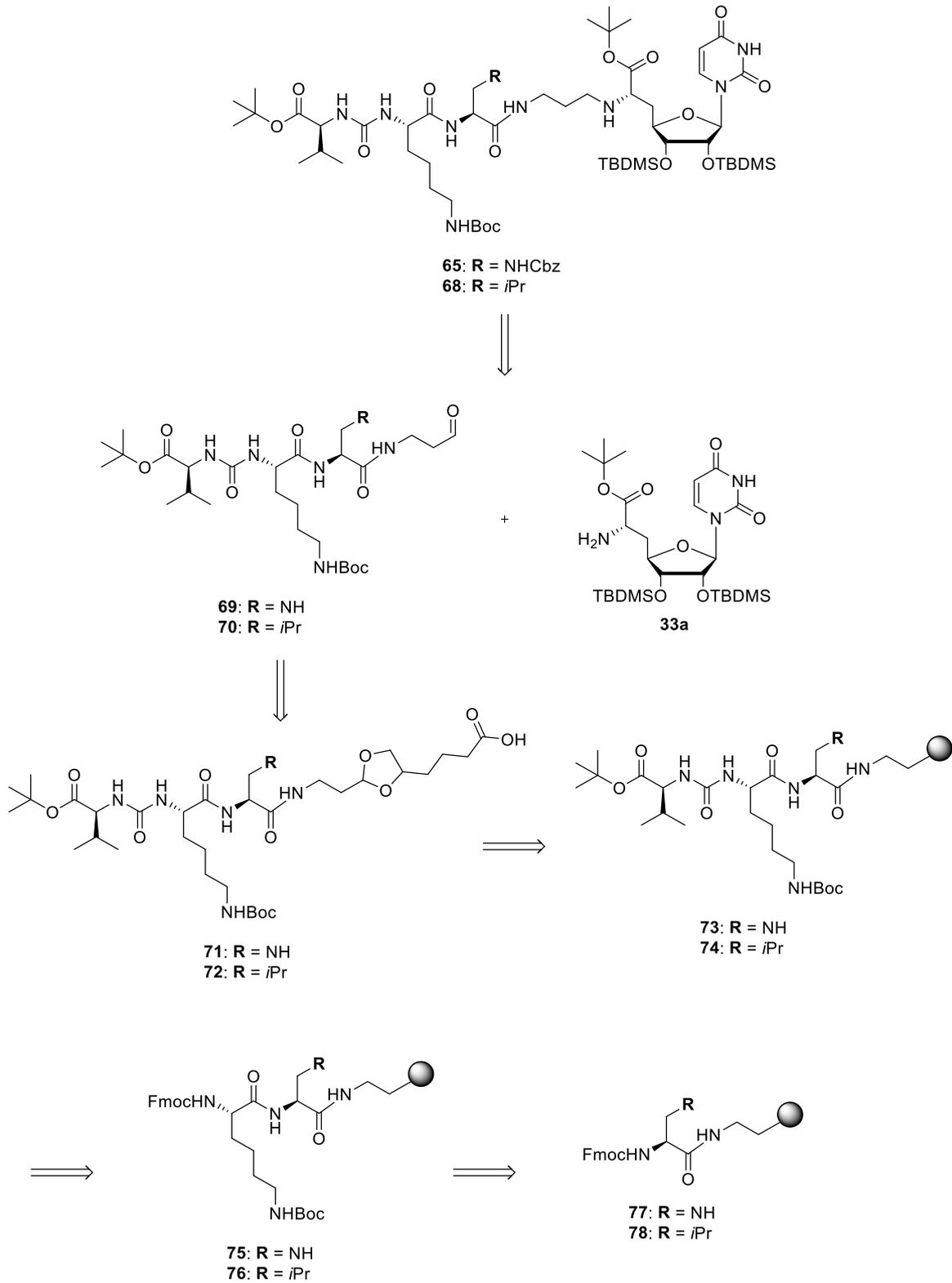
Methode hergestellt werden.<sup>[186,187]</sup> So sollte das *tert*-Butyl-geschützte L-Valin mit Triphosgen in das Isocyanat überführt und mit *N*<sup>ε</sup>-Boc-geschütztem L-Lysin zum Harnstoffdipeptid **41** umgesetzt werden. Nach einer erneuten Entschützungs-Reaktion einer Alloc-Schutzgruppe an der Aminofunktion (Produkt **66**) sollte der letzte Schritt zum Aufbau des geschützten Muraymycins **65** mit der Peptidkupplung des Harnstoffdipeptids **45** stattfinden.

#### 3.1.2.2 Retrosynthese der Festphasen-gestützten Synthese der Muraymycin-Konjugat-Vorstufen der ersten und zweiten Serie

Die zweite Möglichkeit zum Aufbau der Muraymycin-Grundstruktur besteht in einer Festphasen-gestützten Synthesemethode. Die Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** an der Festphase ist eine im Arbeitskreis bereits etablierte Methode.<sup>[94,103]</sup> Zusätzlich sollte im Rahmen dieser Arbeit auch das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **65** mit dieser Methode aufgebaut werden. Dies sollte auch einen direkten Vergleich der beiden Synthesevarianten ermöglichen. Die Retrosynthese über diesen Weg ist für die beiden Muraymycin-Analoga der ersten und zweiten Serie in Abbildung 3.7 dargestellt.

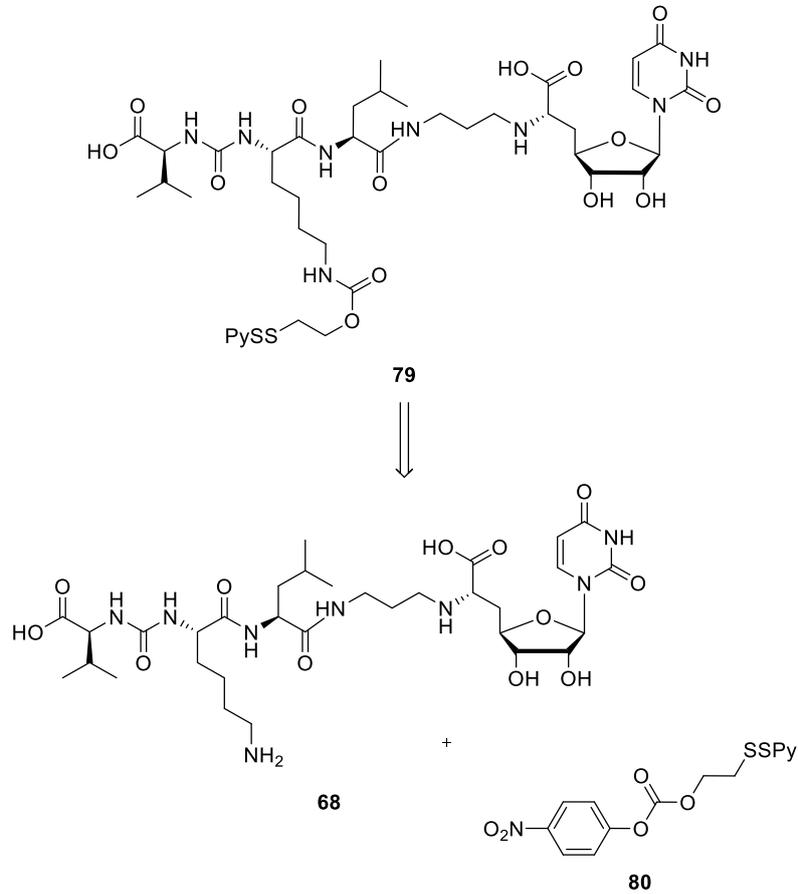
Die Anbindung an das Festphasen-Harz sollte mit der Dioxolancarbonsäure **133** stattfinden, die die Propylamin-Struktureinheit der späteren Muraymycin-Analoga enthält (vergl. Abb. 3.7). Die Synthese der Dioxolancarbonsäure **133** sollte ebenfalls nach einer im Arbeitskreis etablierten Synthesemethode erfolgen.<sup>[94,103]</sup> Der Aufbau der Peptidkette sollte durch sukzessive Fmoc-Entschützung und Peptidkupplung des jeweiligen Aminosäure-Bausteins an der festen Phase erfolgen. Mit dem Aufbau des Harnstoffdipeptid-Motivs durch ein Carbamat-aktiviertes L-Valin sollte im letzten Festphasen-gebundenen Schritt die Peptidkette vervollständigt werden. Nach Abspaltung der Peptidkette vom Festphasen-Harz sollte das Dioxolan gespalten werden und zu dem entsprechenden Aldehyd umgewandelt werden. Eine reduktive Aminierung mit dem Nucleosid-Baustein **33a** sollte den letzten Schritt zur vollständigen Bildung des jeweiligen Muraymycin-Analogons **68** beziehungsweise **65** bilden.

3. Aufgabenstellung und Planung der Arbeit



**Abb. 3.7** Retrosynthese der Muraymycin-Analoga **68** und **65** über den Festphasen-gestützten Syntheseansatz.

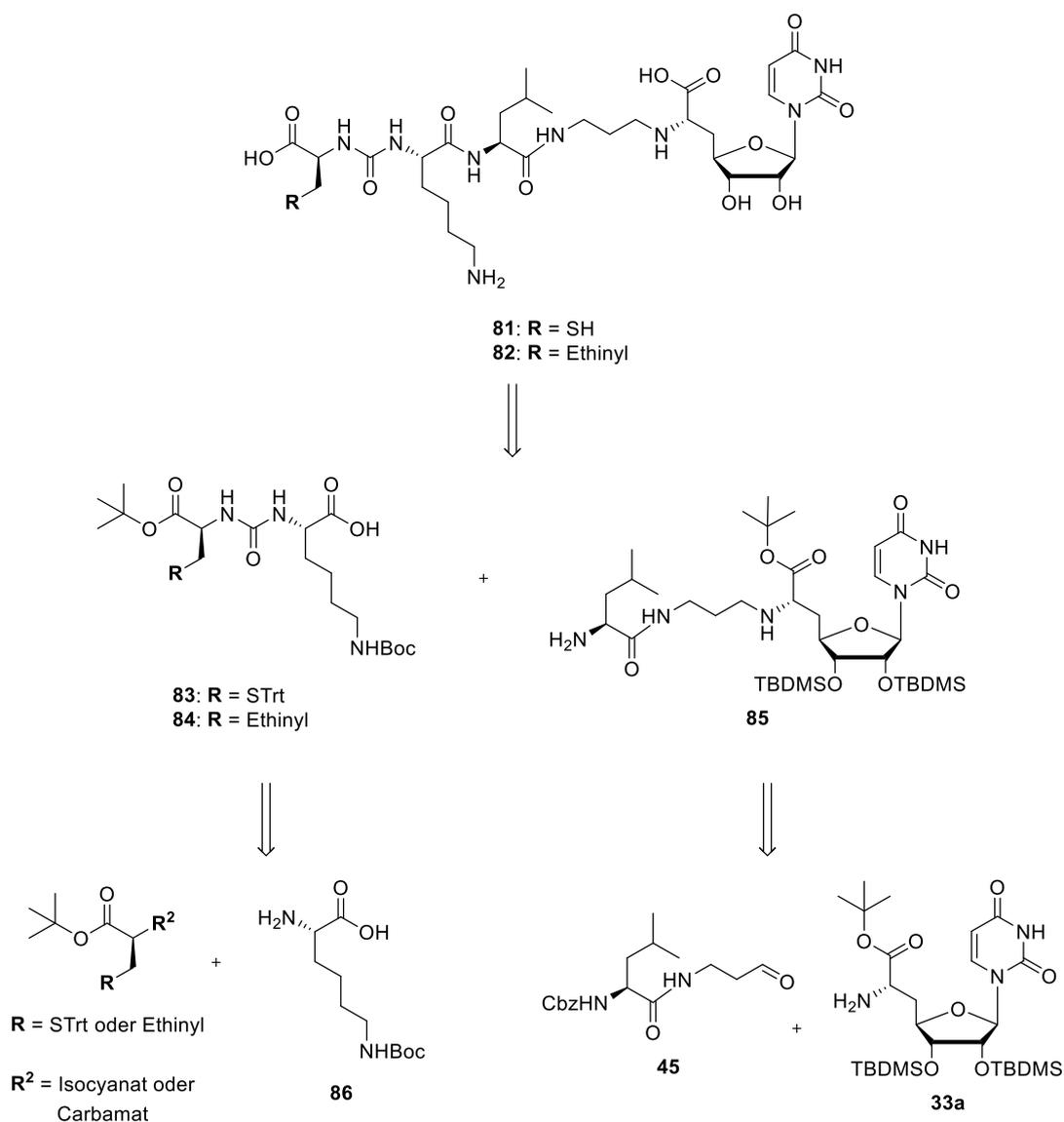
Die Verbindungen der zweiten Serie mussten vor Konjugation mit den jeweiligen Transporter-Einheiten noch mit dem reversiblen Linker **80** an der  $\epsilon$ -Aminofunktion des L-Lysins modifiziert werden. Der retrosynthetische Schritt hierfür ist in Abbildung 3.8 dargestellt.



**Abb. 3.8** Retrosynthese der Muraymycin-Konjugat-Vorstufe **79** der zweiten Serie.

Das Bis-TFA-Salz des Muraymycin-Analogons **68** sollte hierfür mit dem Carbonat **80** umgesetzt werden. Die Verbindung **80** sollte sich in zwei Schritten nach einer literaturbekannten Synthesvorschrift herstellen lassen.<sup>[183]</sup>

## 3.1.2.3 Retrosynthese in Lösung für die Muraymycin-Konjugat-Vorstufen der dritten Serie



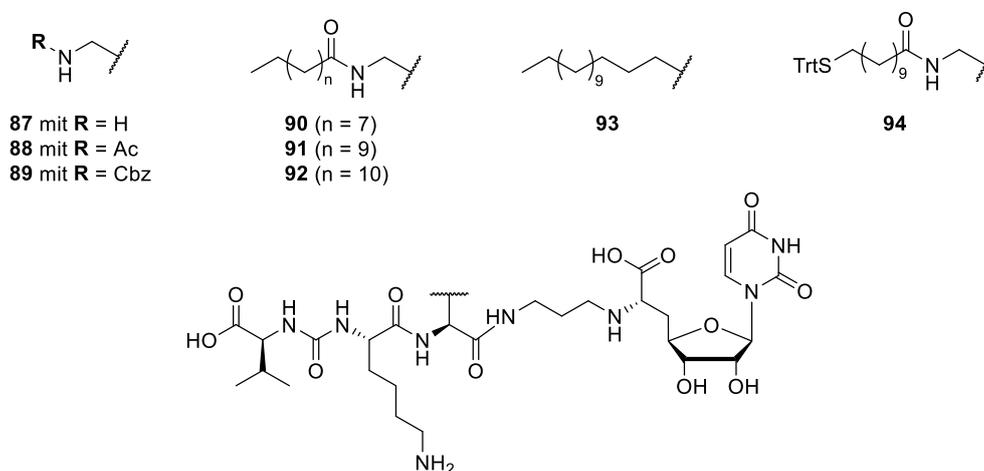
**Abb. 3.9** Retrosynthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **82** und **81**.

Die Synthese der Muraymycin-Konjugat-Vorstufen der dritten Serie sollte erneut in Lösung erfolgen, ähnlich dem klassischen Synthesansatz in Lösung für die erste Serie. Wiederum sollte von dem Nucleosid-Baustein **33a** ausgegangen werden, welcher in einer reduktiven Aminierung mit dem 2-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-1-*N*-(3-aminopropyl)-L-leucinamid **45** umgesetzt werden sollte. Die Synthese des 2-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-1-*N*-(3-aminopropyl)-L-leucinamids **45** sollte nach einer im Arbeitskreis bewährten Synthesemethode über drei Schritte ausgehend von L-Leucin erfolgen.<sup>[184,188,189]</sup> Nach der hydrogenolytischen Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe sollte im letzten Schritt jeweils durch die Anknüpfung des entsprechenden modifizierten Harnstoffdipeptids über eine Peptidkupplung das vollständige geschützte Muraymycin-

Analogon aufgebaut werden. Die Synthese der beiden Harnstoffdipeptide **84** und **83** sollte wieder nach den bekannten Methoden entweder über das Isocyanat der terminalen Aminosäure oder durch Aktivierung des L-Cysteins oder L-Propargylglycins über ein Carbonat und Umsetzung mit dem L-Lysin-Baustein erfolgen.<sup>[186,187]</sup> Nach einer globalen sauren Entschützung sollten die beiden Muraymycin-Analoga in den Konjugationsreaktionen eingesetzt werden.

## 3.2 SAR-Studie zur Seitenketten-Modifikation der Muraymycin-Analoga

### 3.2.1 Aufgabenstellung



**Abb. 3.10** Zielstrukturen der SAR-Studie.

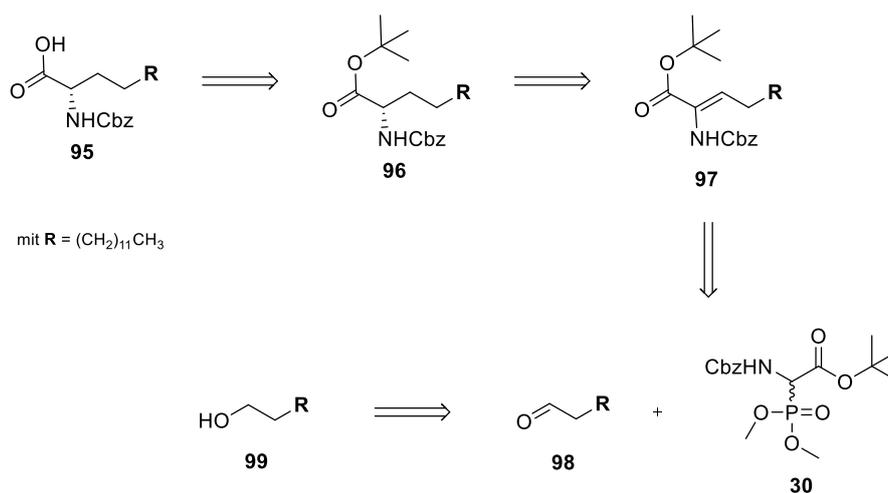
Zusätzlich zu den Synthesen der Konjugat-Verbindungen und deren Muraymycin-Vorstufen, die auch im Rahmen der SAR-Studie untersucht werden sollten, sollte auch der Einfluss des mittleren Aminosäure-Bausteins beziehungsweise dessen Derivatisierung mit lipophilen Seitenketten an der Position  $R^1$  genauer untersucht werden. In dieser Studie sollten verschiedene Seitenketten mit einer variablen Kettenlänge über eine Amid-Bindung eingeführt werden. Des Weiteren sollte auch der Einfluss der terminalen Gruppen in der Seitenkette untersucht werden, die unter anderem auch zum Aufbau der Konjugate eingesetzt werden sollten. Ein zusätzlicher wichtiger Aspekt, der auch evaluiert werden sollte, ist der Einfluss der Verknüpfung der Seitenkette über die Amid-Bindung der L-Diaminopropionsäure. In einer weiteren Testverbindung sollte diese Amid-Bindung durch eine lipophile Struktur mit  $CH_2$ -Einheiten ersetzt werden. Erste Untersuchungen wurden bereits im Rahmen von Vorarbeiten durchgeführt und das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** als Gemisch von Stereoisomeren, ausgehend von dem

Racemat der *N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminohexadecansäure **95**, hergestellt.<sup>[95]</sup> Eine spätere Trennung der Stereoisomere über semipräparative HPLC war zwar erfolgreich, jedoch konnte keines der beiden Stereoisomere vollständig gereinigt werden. Die Ursachen hierfür lagen in dem entstehenden Nebenprodukt des verwendeten Peptidkupplungs-Reagenzes PyBOP. Eine erste Testreaktion zur stereoselektiven Herstellung der (*S*)-konfigurierten *N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminohexadecansäure **95** wurde im Rahmen dieser Vorarbeiten ebenfalls bereits durchgeführt.<sup>[95]</sup> Die Verwendung des selektiven Syntheseweges mit der hergestellten lipophilen Aminosäure **95** in der passenden (*S*)-Konfiguration ist der Synthese mit dem Racemat der Säure vorzuziehen, da nur das daraus resultierende Stereoisomer des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **93** benötigt wird. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die lipophile Aminosäure **95** erneut in einem größeren Ansatz stereoselektiv aufgebaut und in ein Muraymycin-Analogon eingebaut werden. Mit dem so erhaltenen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** sollte ein direkter Vergleich zu dem entsprechenden Muraymycin-Analogon mit Amid-Bindung gewährleistet werden.

#### 3.2.2 Planung und retrosynthetische Betrachtungen

Der Aufbau der Muraymycin-Analoga mit modifizierten Seitenketten innerhalb der SAR-Studie sollte ausgehend von dem L-Diaminopropionsäure-haltigen 5'-Desoxy-Muraymycin-Grundgerüst **64** durch Peptidkupplung mit den entsprechenden Säuren Essigsäure, *n*-Decansäure, *n*-Dodecansäure und *n*-Tridecansäure analog zu der in Abbildung 3.5 in Kapitel 3.1.2.1 dargestellten Retrosynthese erfolgen. Neben den acylierten Aminen sollten zudem die beiden Muraymycin-Analoga **87** mit dem freien Amin als auch mit dem Cbz-geschützten Amin **89** hergestellt werden. Durch globale saure Entschützung des Muraymycin-Grundgerüsts **65** sollte sich die noch Cbz-geschützte Struktur erhalten lassen. Nachfolgend sollte aus **89** durch hydrogenolytische Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **87** erhalten werden.

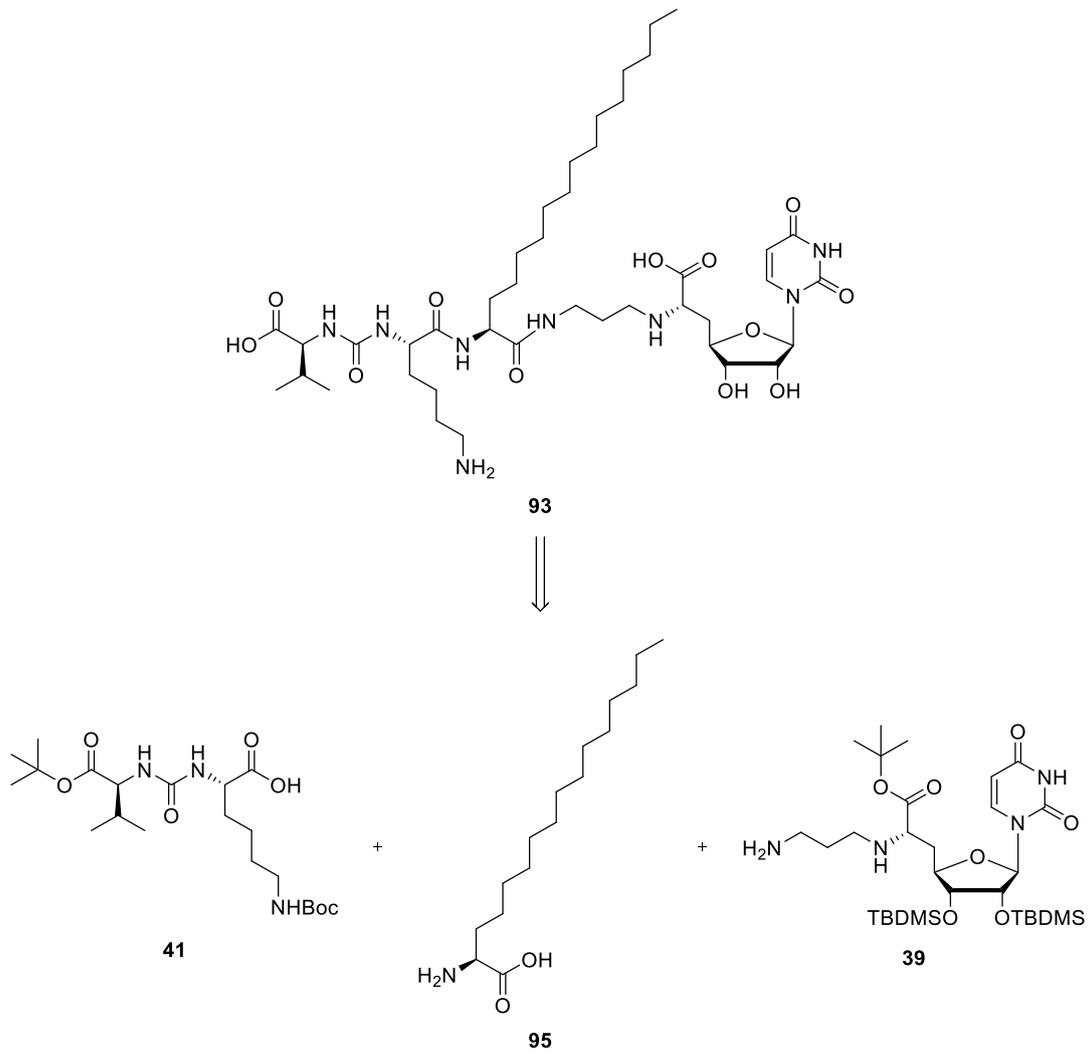
Zusätzlich sollte zur Untersuchung des Einflusses des terminalen Thiols in der Seitenkette bei Verbindung **61** die entsprechende analoge Verbindung mit noch vorhandener *S*-Trityl-Schutzgruppe hergestellt und untersucht werden. Dies sollte durch globale saure Entschützung der komplett geschützten Vorstufe des Muraymycin-Analogons **61** ohne Zugabe eines Scavengers für die *S*-Trityl-Schutzgruppe erreicht werden (siehe Kapitel 3.1.2, Abbildung 3.5).



**Abb. 3.11** Retrosynthese der *N*-Cbz-*(S)*-2-Aminohexadecansäure **95**.

Für den Aufbau des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **93** mit der fehlenden Amid-Struktur in der Seitenkette des mittleren Aminosäure-Bausteins sollte zunächst die gewünschte lipophile Aminosäure in passender Form stereoselektiv hergestellt werden. Die Herstellung dieses Aminosäure-Bausteins **95** sollte dem Schema der Synthese der Nucleosyl-Aminosäure **33a** folgen. Als Startpunkt sollte hierzu der kommerziell erhältliche Alkohol 1-Tetradecanol **99** dienen, welcher mit IBX **101** zum entsprechenden Aldehyd **98** oxidiert werden sollte. Gefolgt von einer Wittig-Horner-Reaktion mit dem Phosphonat **30** sollte selektiv das (*Z*)-Olefin **97** erhalten werden. Durch asymmetrische Hydrierung mit dem Rhodium-Katalysator (*S,S*)-Me-DUPHOS-Rh sollte das Stereozentrum der lipophilen Aminosäure **96** selektiv ausgehend von dem (*Z*)-Olefin **97** aufgebaut werden. Nach saurer Entschützung sollte somit der fertige (*S*)-konfigurierte Aminosäure-Baustein **95** für die Peptidkupplung zum Aufbau des Muraymycin-Analogons **93** zur Verfügung stehen.<sup>[95]</sup>

Der Aufbau des Muraymycin-Analogons **93** sollte wie zuvor beschrieben wieder ausgehend von dem Nucleosid-Baustein **33a** durch reduktive Aminierung mit dem Aminopropyl-Linker **38**, und Cbz-Entschützung zu **39** gefolgt von einer Peptidkupplung mit der zuvor hergestellten lipophilen Aminosäure **95** erfolgen. Im letzten Schritt zum Aufbau des Muraymycin-Grundgerüsts sollte das Harnstoffdipeptid **41** durch Peptidkupplung nach vorangegangener Entschützung-Reaktion der Cbz-Gruppe angefügt werden. Eine globale saure Entschützung sollte den letzten Schritt dieser Synthese bilden und das lipophile 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** liefern (siehe Abbildung 3.11).



**Abb. 3.12** Retrosynthese des lipophilen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **93**.

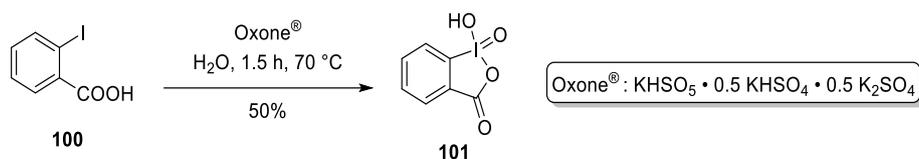
## 4 Resultate und Diskussion

Im ersten Teil dieses Kapitels werden in den Unterkapiteln 4.1 bis 4.5 die synthetischen und analytischen Arbeiten diskutiert. Die Synthesen der verschiedenen Muraymycin-Transporter-Konjugate der drei Serien, der entsprechenden Referenzverbindungen und der Strukturen für SAR-Studien werden hier beschrieben. Im zweiten Teil dieses Kapitels, dem Unterkapitel 4.6, folgt dann die biologische Untersuchung der hergestellten Verbindungen. Hierzu wurden *in-vitro*-Assays zur Hemmung des Targets MraY, Assays zur Wachstumshemmung von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterienstämmen sowie Stabilitätsmessungen in verschiedenen Medien und Zellaufnahme-Assays herangezogen.

### 4.1 Synthese von Reagenzien und Bausteinen

In diesem Kapitel werden die Synthesen der benötigten Reagenzien und Bausteine zum Aufbau der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga besprochen. Der Aufbau der 5'-Nucleosylaminosäure **33a**, welche das Schlüsselstrukturelement der Muraymycine und den Startpunkt zum Aufbau der Peptidseitenkette in Lösung darstellt, wird hier als erstes beschrieben (Kapitel 4.1.1-4.1.3). Die Synthese der beiden verknüpfenden Aminopropyl-Linker **38** und **45** (Kapitel 4.1.4), sowie die Synthesen diverser nicht-kommerziell erhältlicher Aminosäuren der Peptidkette in den passenden orthogonalen Schutzgruppen-Kombinationen werden nachfolgend besprochen (Kapitel 4.1.5). Der für die spätere Konjugation benötigten Linker und die Bausteine für die alternative Festphasensynthese werden an dieser Stelle ebenfalls diskutiert (Kapitel 4.1.7 und 4.1.8). Im letzten Unterkapitel 4.1.9 werden die Synthesen der verschiedenen Harnstoffdipeptide der Muraymycin-Analoga besprochen. Darunter befinden sich auch drei Harnstoffdipeptide, die im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von S. Van Lanen benötigt wurden (Kapitel 4.1.9). Diese Harnstoffdipeptide sollten als Referenzsubstanzen bei der Aufklärung der Muraymycin-Biosynthese dienen.<sup>[190]</sup>

#### 4.1.1 Synthese von 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) **101**



**Abb. 4.1** Synthese von 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) **101**.

Die Synthese des milden Oxidationsmittels 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) **101** wurde nach einer literaturbekannten Vorschrift durchgeführt.<sup>[191]</sup> Die Verwendung von Oxone<sup>®</sup> zur Herstellung der 2-Iodoxybenzoesäure **101** erlaubt eine wesentlich einfachere Reaktionsdurchführung als die Verwendung von Kaliumbromat zur Oxidation.<sup>[192,193]</sup> Die 2-Iodbenzoesäure **100** wurde kommerziell erworben und mit Oxone<sup>®</sup> zur 2-Iodoxybenzoesäure **101** umgesetzt (Abbildung 4.1). Nach 1.5 Stunden Rühren bei 70 °C wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt und der erhaltene Rückstand abfiltriert und gründlich gewaschen. Die Reinheit der Verbindung wurde mittels NMR-Spektroskopie bestätigt. Da von einer Explosivität der Verbindung in der Literatur berichtet worden war, wurde hier und bei den nachfolgenden Reaktionen mit IBX **101** mit erhöhter Vorsicht gearbeitet.<sup>[192]</sup>

Die 2-Iodoxybenzoesäure IBX **101** wurde für die späteren milden und selektiven Oxidationen zur Herstellung diverser Aldehyd-Vorstufen für die Wittig-Horner-Reaktionen benötigt.

#### 4.1.2 Synthese des Phosponats **30** für die Wittig-Horner-Reaktionen

Die Synthese des *N*-Cbz-geschützten *tert*-Butylester-Phosponats **30** erfolgte nach einer literaturbekannten Synthesevorschrift.<sup>[194–197]</sup> Im ersten Schritt der Synthese wurde Glyoxalsäure-Monohydrat **102** mit Benzylcarbamat in Diethylether bei Raumtemperatur umgesetzt. Das erhaltene Zwischenprodukt wurde nach Filtration und Waschen mit Diethylether ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt in Methanol gelöst und unter Säurekatalyse mit Schwefelsäure zum Methyl ester **103** umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von sieben Tagen wurde der Methyl ester **103** durch Lösen in Petrolether und Lagerung bei 0 °C für 30 Stunden als weißer Niederschlag mit einer Ausbeute von 86% erhalten und ebenfalls ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt umgesetzt. Das erhaltene Methyl-2-methoxy-*N*-benzyloxycarbonylglycinat **103** wurde nach tropfenweiser Zugabe von Phosphor(III)-chlorid in Toluol bei 80 °C für vier Stunden gerührt. Nach Zugabe von Trimethylphosphit wurde für weitere zwei Stunden unter Rückfluss gerührt und das Phosponat **104** in einer Michaelis-Arbuzov-artigen Reaktion mit einer Ausbeute von 33% erhalten. Im letzten Schritt der Reaktionssequenz erfolgte die

Umesterung vom Methyl- zum *tert*-Butyl-Ester mittels basischer Esterspaltung mit Natriumhydroxid in 1,4-Dioxan.<sup>[198]</sup> Nach vollständiger Reaktion und Aufarbeitung wurde der farblose Rückstand in einer Mischung aus Dichlormethan und *tert*-Butanol gelöst, mit Molekularsieb als Scavenger für entstehendes Wasser versetzt und für 3.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das *tert*-Butanol diente in diesem Schritt als Lösungsmittel und als nucleophiles Reagenz. Mit *N*-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) als Aktivierungsreagenz wurde die freie Carbonsäure mit dem *tert*-Butanol zum *tert*-Butylester umgesetzt. Nach Rühren des Reaktionsgemisches für weitere 21.5 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion beendet. Es erfolgte eine Filtration über Celite®, und nach Reinigung des Rohproduktes über Säulenchromatographie konnte das Phosphonat **30** mit einer Ausbeute von 46% erhalten werden. Über alle Synthese-Stufen konnte das Phosphonat **30** mit einer Gesamtausbeute von 13% ausgehend von Glyoxal säure-Monohydrat **102** erhalten werden.

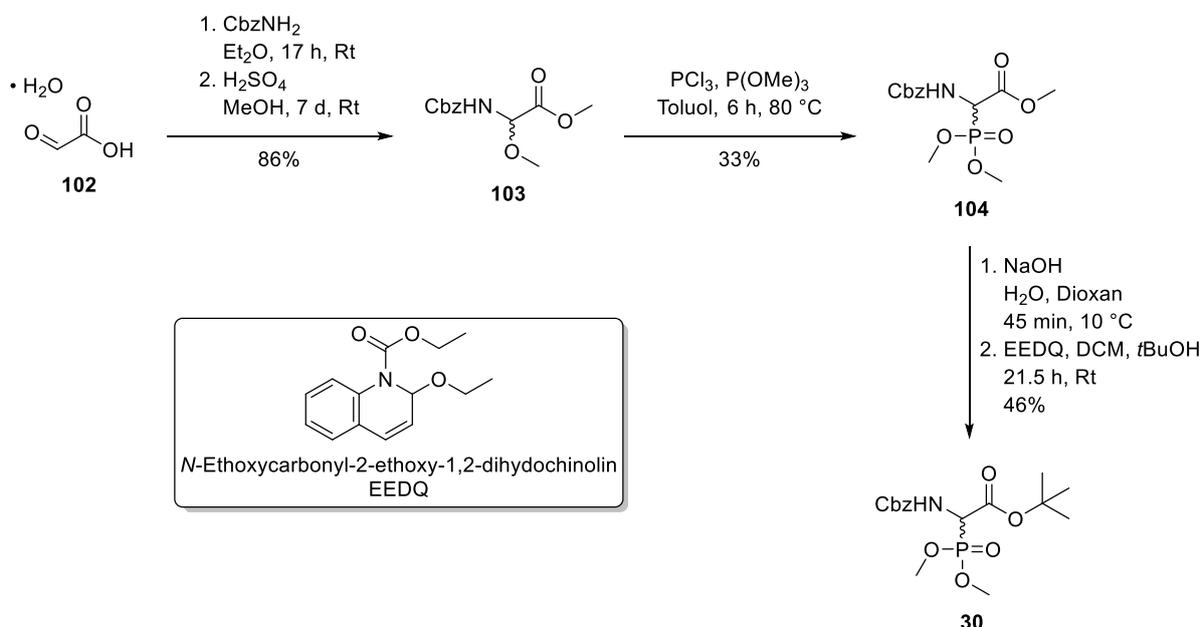
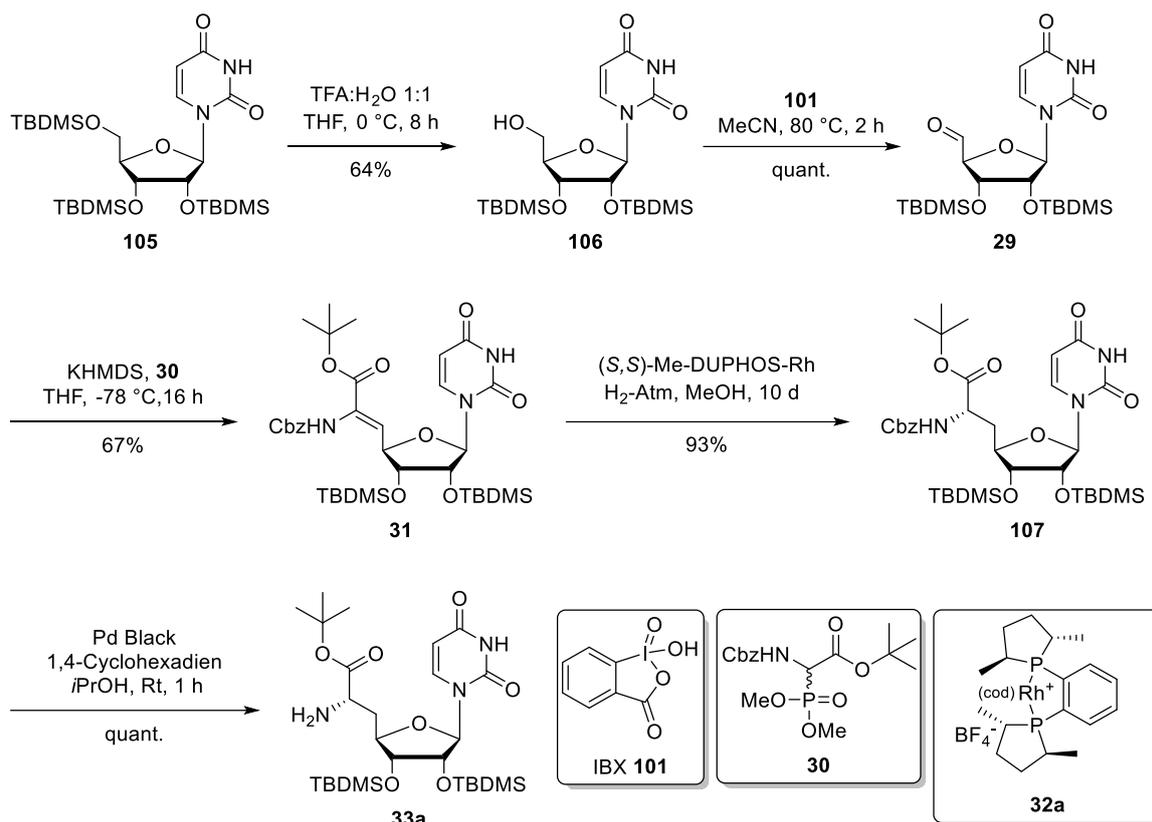


Abb. 4.2 Synthese des Phosphonats **30**.

#### 4.1.3 Synthese der (5'S)-Nucleosylaminosäure **33a**

Die stereokontrollierte Synthese des Nucleosid-Bausteins **33a** erfolgte ausgehend von Uridin **10** nach einer im Arbeitskreis etablierten und literaturbekannten Synthese-Vorschrift.<sup>[89,92,199]</sup>



**Abb. 4.3** Synthese des Nucleosid-Bausteins **33a**.

Das vollständig TBDMS-geschützte Uridin **105** war noch aus Vorarbeiten vorhanden und stellte den Startpunkt der in Abbildung 4.3 dargestellten Synthese dar. Die selektive Entschützung an der 5'-Position erfolgte mittels einer 1:1-Mischung aus TFA und Wasser in Tetrahydrofuran bei 0 °C. Nach einer Reaktionszeit von acht Stunden wurde das selektiv 5'-entschützte Nucleosid **106** mit einer Ausbeute von 64% nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten. Die Oxidation des 5'-Alkohols **106** erfolgte mittels dem zuvor hergestellten Oxidationsmittel IBX **101** (siehe Kapitel 4.1.1).<sup>[200]</sup> Nach zwei Stunden Rühren unter Rückfluss in Acetonitril wurde der 2',3'-O-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridin-5'-aldehyd **29** in quantitativer Ausbeute erhalten. Wegen seiner Instabilität wurde mit **29** direkt nachfolgend und ohne weitere Reinigungsschritte die Wittig-Horner-Reaktion mit dem Phosphonat **30** (siehe Kapitel 4.1.2) durchgeführt. Das Vorliegen des Aldehyds **29** und dessen Reinheit war zuvor mittels <sup>1</sup>H-NMR bestätigt worden. Auf eine weitere Charakterisierung wurde auf Grund der Instabilität der Verbindung **29** verzichtet. Kaliumhexamethyldisilazan wurde in absolutem Tetrahydrofuran gelöst, das Phosphonat **30** bei -78 °C zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Die Zugabe von 2',3'-O-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridin-5'-aldehyd **29** erfolgte tropfenweise ebenfalls bei -78 °C. Unter langsamem Erwärmen auf

Raumtemperatur wurde die Reaktion für 21 Stunden gerührt. Nach Reinigung über Säulenchromatographie wurde das (*Z*)-konfigurierte Produkt **31** mit einer Ausbeute von 67% erhalten. In Vorarbeiten im Arbeitskreis war bereits eindeutig bestätigt worden, dass mit der verwendeten Reaktionsführung selektiv das (*Z*)-Olefin **31** gebildet wird.<sup>[92]</sup> Die hier synthetisierte Verbindung entsprach den spektroskopischen Referenzdaten.

Die (*Z*)-Didehydro-Nucleosyl-Aminosäure **31** wurde stereoselektiv mit dem Rhodium-Katalysator (*S,S*)-Me-DUPHOS-Rh zur (*S*)-konfigurierten Nucleosyl-Aminosäure **107** hydriert. Das (*Z*)-Olefin **31** wurde in absolutem Methanol gelöst und das Lösungsmittel vor Zugabe des Katalysators zusätzlich sorgfältig entgast. Auf Grund der hohen Empfindlichkeit des Katalysators wurde die Reaktion zudem unter einer Argon-Atmosphäre der Reinheit 6.0 angesetzt. Die asymmetrische Hydrierung wurde durch Zugabe des Katalysators und nachfolgenden Austausch der Argon- gegen eine Wasserstoff-Atmosphäre (1 bar) gestartet. Die Wasserstoff-Atmosphäre wurde während des Reaktionsverlaufs täglich erneuert. Die Reaktionskontrolle erfolgte stichprobenweise durch Entnahme von NMR-Proben und Aufnahme von <sup>1</sup>H-NMR-Spektren. Nach einer Reaktionsdauer von 10 Tagen war kein Edukt mehr in den NMR-Spektren nachweisbar und die Reaktion wurde über Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt. Die (6'*S*)-Nucleosyl-Aminosäure **107** wurde mit einer Ausbeute von 93% in reiner Form stereoselektiv erhalten. Der Nachweis, dass es sich bei der Verbindung **107** wirklich um die (6'*S*)-konfigurierte Struktur handelt war bereits in Vorarbeiten durch Ducho und Mitarbeiter eindeutig erbracht worden.<sup>[74,201–203]</sup> Der Nucleosid-Baustein **33a** wurde in seiner Cbz-geschützten und stabilen Form **107** gelagert und nur je nach Bedarf in entsprechender Menge entschützt.

Die Cbz-Entschützung wurde mit Palladium Black (Pd Black) als Katalysator und 1,4-Cyclohexadien in absolutem *iso*-Propanol durchgeführt. Die Verwendung von 1,4-Cyclohexadien als Wasserstoff-Quelle ermöglicht mildere Reaktionsbedingungen und lässt die C5,C6-Doppelbindung der Nucleobase, im Gegensatz zur Verwendung von Wasserstoff, unangetastet. Erste Versuche, die Cbz-Entschützung in absolutem Methanol als Lösungsmittel durchzuführen, hatten zu einer Cyclisierung zwischen dem freien Amin und dem N3-Stickstoff der Nucleobase durch entstehendes Formaldehyd geführt.<sup>[96]</sup> Diese Cyclisierung wurde über Massenspektrometrie mit Detektion einer Molekülmasse  $m/z +12$  entsprechend den Ergebnissen von D. Wiegmann nachgewiesen.<sup>[96]</sup> Durch einen Wechsel des Katalysators zu Palladium auf Kohle (Pd/C) und unter erneuter Verwendung von Methanol als Lösungsmittel trat diese Nebenreaktion ebenfalls auf. Ein Wechsel des Lösungsmittels zu *iso*-Propanol mit Palladium auf Kohle (Pd/C) als Katalysator führte nicht zu einer Produktbildung. Die Entschützung mit Palladium Black und 1,4-Cyclohexadien in *iso*-Propanol hat sich im Folgenden

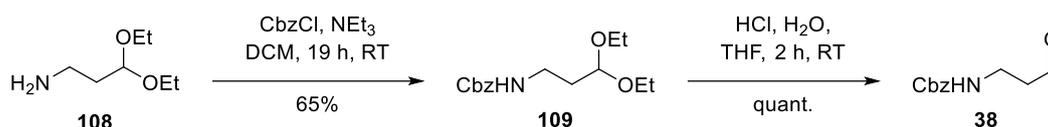
als die zuverlässigste Methode zur Cbz-Entschützung herauskristallisiert. Dennoch kam es auch hier zu stark schwankenden Reaktionszeiten, teilweise sogar zu keinen beobachteten Umsätzen bei Verwendung von identischen Reaktionsparametern. Mit einem schrittweisen Austausch aller verwendeten Reagenzien sollte das Problem eingegrenzt werden. Letztendlich führte hier nur ein Wechsel des Herstellers (von Alfa Aesar zu Merck Sigma-Aldrich) des eingesetzten 1,4-Cyclohexadiens zu reproduzierbaren Ergebnissen. Diese Beobachtung wurde auch bei den weiteren durchgeführten Cbz-Entschütungen an den restlichen Positionen im Molekül gemacht und dementsprechend wurden auch dort konsistent die hier gefundenen Bedingungen verwendet.

Der Nucleosid-Baustein **33a** wurde zum sukzessiven Aufbau der Muraymycine in Lösung und auch in einem späten Schritt für die Festphasen-gestützte Syntheseroute benötigt.

#### 4.1.4 Synthese der Aminopropyl-Linker **38** und **45**

Für die Synthesen der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga in Lösung wurden zwei verschiedene Ansätze zum Einbau der Aminopropyl-Linker, je nach gewünschter Zielstruktur des Muraymycin-Analogons, verfolgt. Für diese beiden Varianten wurden die Aminopropyl-Linker **38** und **45** benötigt.

##### 4.1.4.1 Synthese des Aminopropyl-Linkers **38**

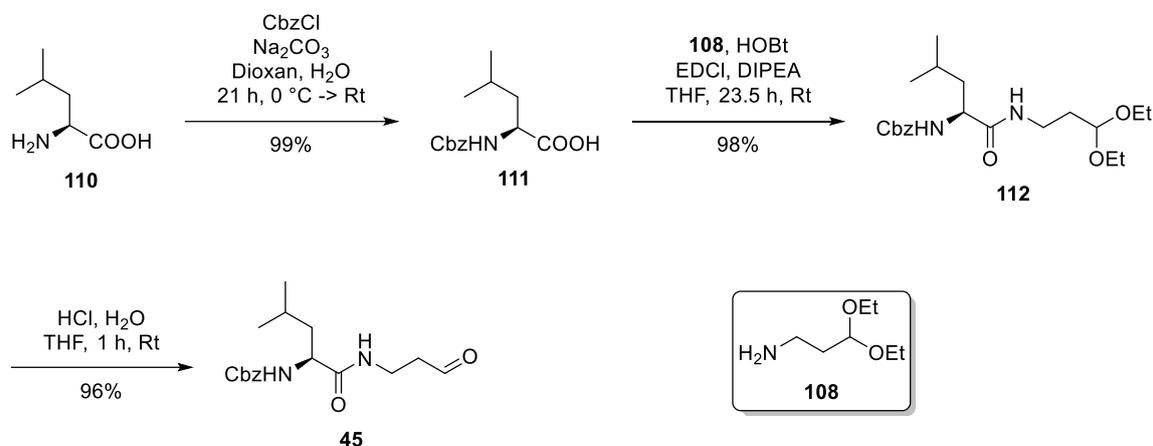


**Abb. 4.4** Synthese des Aminopropyl-Linkers **38**.

Nach einer modifizierten literaturbekannten Synthese wurde 1-Amino-3,3-diethoxypropan **108** mit Benzyloxycarbonylchlorid und Triethylamin als Base in Dichlormethan an der primären Aminogruppe geschützt.<sup>[184,185]</sup> Nach Reinigung über Säulenchromatographie an Kieselgel konnte die Benzyloxycarbonyl-geschützte Vorstufe **109** mit einer Ausbeute von 65% erhalten werden. Im letzten Schritt wurde der Aldehyd **38** durch Hydrolyse des Diethylacetals **109** mit Salzsäure synthetisiert. Nach erneuter säulenchromatographischer Reinigung konnte der fertige Aminopropyl-Linker **38** mit einer quantitativen Ausbeute erhalten werden. Der Aldehyd **38** konnte längerfristig (>2 Jahre) ohne Anzeichen einer Zersetzung bei -18 °C gelagert werden.

#### 4.1.4.2 Synthese des Leucin-Aminopropyl-Linkers 45

Die Synthese des Aldehyds **45** erfolgte ebenfalls nach einer im Arbeitskreis etablierten und literaturbekannten Syntheseroute.<sup>[184,188,189]</sup>



**Abb. 4.5** Synthese des Leucin-Aminopropyl-Linkers **45**.

L-Leucin **110** wurde mit Benzyloxycarbonylchlorid und Natriumcarbonat in einem Dioxan-Wasser-Gemisch bei 0 °C umgesetzt. Das gewünschte Produkt *N*-Benzyloxycarbonyl-L-Leucin **111** konnte mit einer sehr guten Ausbeute von 99% nach wässriger Aufarbeitung erhalten werden. Zur Peptidkupplung im nächsten Schritt mit 1-Amino-3,3-diethoxypropan **108** wurden *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDCI), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in absolutem Tetrahydrofuran eingesetzt. Die Peptidkupplung erzielte eine sehr gute Ausbeute von 98%. Im letzten Schritt dieser Synthesesequenz wurde das Diethylacetal **112** mittels Salzsäure in Tetrahydrofuran mit einer ebenfalls sehr guten Ausbeute von 96% zum gewünschten Aldehyd **45** gespalten. Die Reinigung des Aldehyds **45** erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel. Auch die Lagerung dieses Aldehyds war bei -18 °C über mehrere Jahre möglich.

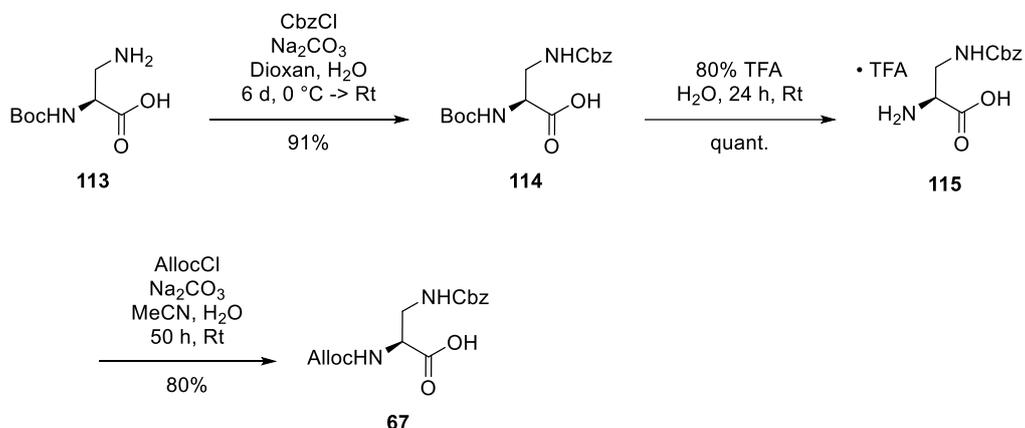
#### 4.1.5 Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren **67**, **118** und **95**

Die benötigten Aminosäure-Bausteine für die mittlere als auch für die terminale Position in der Peptidkette der Muraymycin-Struktur waren teilweise nicht oder nicht mit den benötigten Schutzgruppen-Mustern kommerziell erhältlich und mussten selbst hergestellt werden. Die L-Diaminopropionsäure **113** und das L-Propargylglycin **119** mussten für den späteren Einbau in die Muraymycin-Struktur mit passenden orthogonalen Schutzgruppen versehen werden. Die lipophile Aminosäure **95** ist kommerziell nicht erhältlich und musste in ihrer passenden

Stereokonfiguration vollständig aufgebaut werden. Wie in den Vorarbeiten könnte auch auf das kommerziell erhältliche Racemat der Aminosäure zurückgegriffen werden und anschließend die Trennung der beiden Stereoisomere des finalen Produktes an der HPLC erfolgen.<sup>[95]</sup> Durch diesen Ansatz wird jedoch auch zur Hälfte das ungewünschte Stereoisomer erhalten, wodurch dieser Syntheseweg ineffizient ist und die alternative, stereoselektive Route zu bevorzugen ist.

#### 4.1.5.1 Synthese der Diaminopropionsäure 67

Die L-Diaminopropionsäure **67** war in der benötigten Schutzgruppen-Konfiguration kommerziell nicht verfügbar und musste ausgehend von der (*S*)-3-Amino-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propionsäure **113** selbst hergestellt werden. Hierzu wurde zunächst mit Benzyloxycarbonylchlorid in einer Dioxan-Wasser-Mischung die Aminofunktion in der Seitenkette geschützt. Nach selektiver Abspaltung der Boc-Gruppe mit 80%iger wässriger TFA-Lösung wurde die  $\alpha$ -Aminofunktion mit Chlorameisensäure-allylester (AllocCl) erneut geschützt. Nach 50 Stunden Rühren bei Raumtemperatur in einem Wasser-Acetonitril-Gemisch konnte die Aminosäure **67** in der gewünschten Schutzgruppen-Konfiguration mit einer guten Ausbeute von 80% nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten werden.



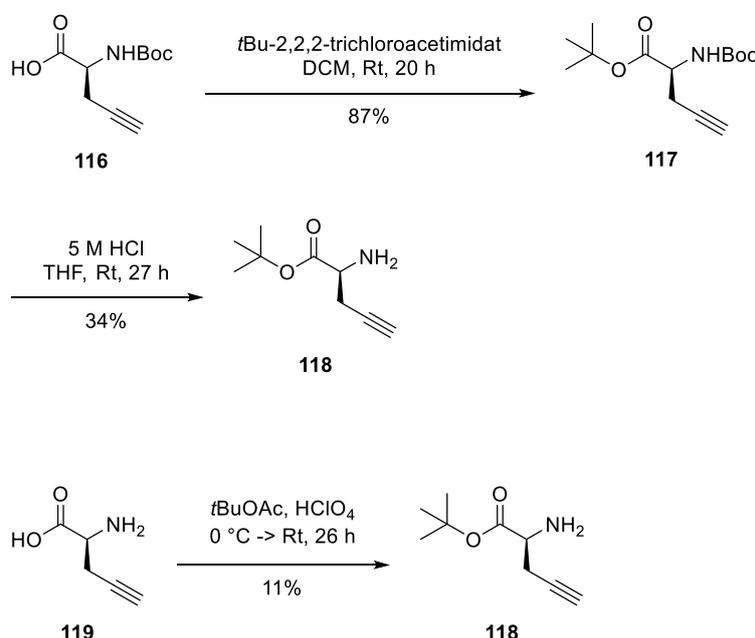
**Abb. 4.6** Synthese der L-Diaminopropionsäure **67**.

Zusammengefasst konnte die L-Diaminopropionsäure **67** in drei Schritten und einer Gesamtausbeute von 73% in passender Schutzgruppen-Konfiguration hergestellt werden. Die Wahl und Position der einzelnen Schutzgruppen ist in der späteren Reaktionsreihenfolge begründet. Säurelabile Schutzgruppen sind in der geplanten Struktur bereits vorhanden und können hier nicht verwendet werden. Die Alloc- und Cbz-Schutzgruppen sind orthogonal, jedoch muss die

Spaltung der Alloc-Schutzgruppe zuerst erfolgen, da im umgekehrten Fall die Doppelbindung der Alloc-Schutzgruppe unter den Bedingungen zur Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe ebenfalls hydriert wird. Im späteren Verlauf der Synthese ist zunächst geplant, die Modifikation an  $\alpha$ -Position durchzuführen und damit zuerst das Muraymycin-Grundgerüst vollständig aufzubauen. Erst in einem darauffolgenden Schritt soll die Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe an der  $\beta$ -Position für die weiteren Seitenkettenmodifikationen erfolgen.

#### 4.1.5.2 Synthese des L-Propargylglycin-*tert*-butylesters **118**

Die nicht-proteinogene Aminosäure L-Propargylglycin **118** musste ebenfalls in passend geschützter Form hergestellt werden. Ausgehend von *N*-Boc-L-Propargylglycin **116** wurde die Carbonsäurefunktion zunächst mit *tert*-Butyl-2,2,2-trichloroacetimidat in Dichlormethan nach einer literaturbekannten Vorschrift verestert.<sup>[204]</sup> Der vollständig geschützte *N*-Boc-L-Propargylglycin-*tert*-butylester **117** konnte so mit einer Ausbeute von 87% nach einer Reaktionsdauer von 20 Stunden bei Raumtemperatur und nachfolgender Reinigung über Säulenchromatographie erhalten werden. Die *tert*-Butyl- und Boc-Schutzgruppen sind nicht orthogonal, dennoch finden sich in der Literatur Methoden zur selektiven Entschützung der Boc-Gruppe.<sup>[205]</sup>



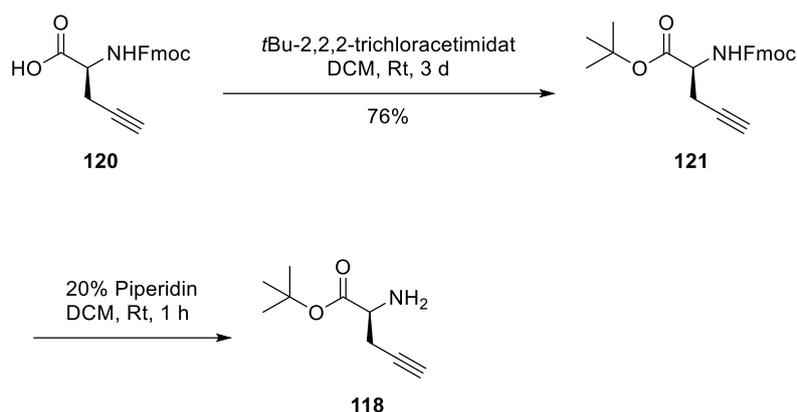
**Abb. 4.7** Varianten zur Synthese des L-Propargylglycin-*tert*-butylesters **118**.

Ein Versuch einer selektiven Abspaltung der Boc-Gruppe von Verbindung **117** erfolgte mit 5 M Salzsäure in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur. Eine erneute Zugabe von 5 M Salzsäure erfolgte nach einer Reaktionszeit von 23 Stunden, nachdem noch kein Umsatz beobachtet

worden war. Es wurde für weitere vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Reaktion durch Zugabe von Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert und abgebrochen wurde. Die in diesem Ansatz einmalig erreichte Ausbeute von 34% des Produkts **118** konnte mit identischer Reaktionsführung in mehreren Testansätzen jedoch leider nicht reproduziert werden, und es trat jeweils eine komplette Entschützung der Aminosäure auf.

In einer anderen Variante wurde ausgehend von L-Propargylglycin **119** von einer selektiven *tert*-Butyl-Veresterung der Carbonsäurefunktion in der Literatur berichtet.<sup>[206,207]</sup> Hierzu wurde in diesem Ansatz L-Propargylglycin **119** mit *tert*-Butylacetat und Perchlorsäure für 26 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Das gewünschte Produkt **118** konnte jedoch nur in einer geringen Ausbeute von 11% und auch hier nicht reproduzierbar erhalten werden.

Da sich die ersten beiden Syntheseversuche als nicht vielversprechend herausstellten, wurde ein Wechsel der Strategie zu einer Synthese mit dem kommerziell erhältlichen Fmoc-geschützten L-Propargylglycin **120** als Startsubstanz unternommen.



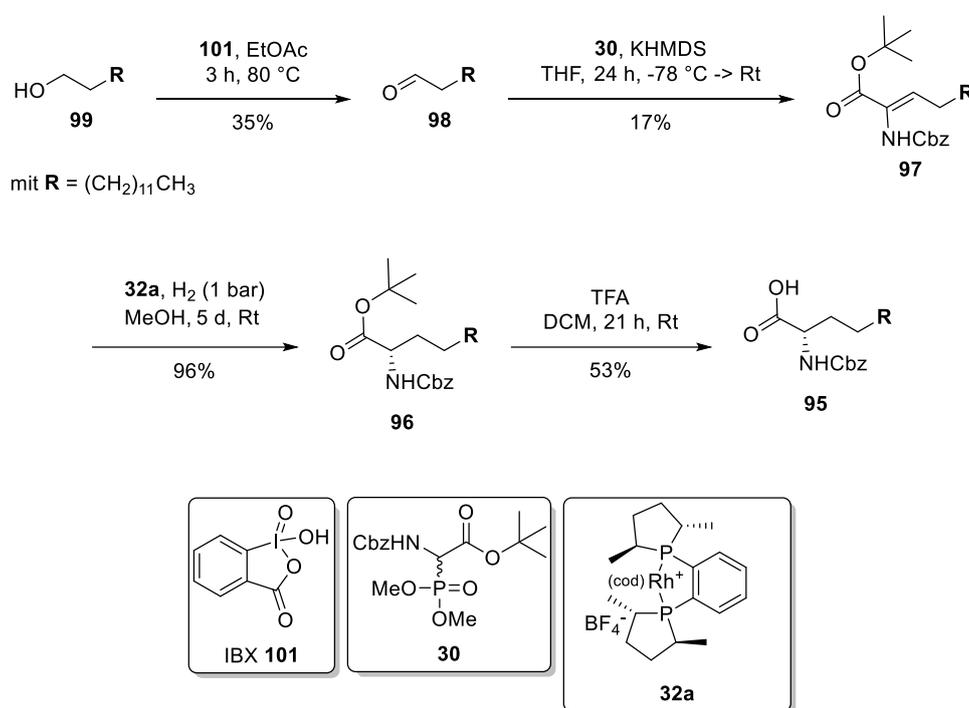
**Abb. 4.8** Synthese des L-Propargylglycin-*tert*-butylesters **118** über die Fmoc-geschützte Zwischenstufe **121**.

Der *N*-Fmoc-L-Propargylglycin-*tert*-butylester **121** konnte mit einer guten Ausbeute von 76% durch Veresterung mit *tert*-Butyl-2,2,2-trichloroacetimidat nach drei Tagen Rühren in Dichlormethan bei Raumtemperatur erhalten werden. Die Reinigung des *N*-Fmoc-L-Propargylglycin-*tert*-butylesters **121** erfolgte über Säulenchromatographie. Die Fmoc-Entschützung des *N*-Fmoc-L-Propargylglycin-*tert*-butylesters **121** wurde mit einer Lösung von 20% Piperidin in Dichlormethan durch eine Stunde Rühren bei Raumtemperatur erreicht. Der Versuch der Reinigung des entschützten Rohproduktes über Säulenchromatographie führte auf Grund der hohen Polarität der Verbindung zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis, und nur ein Teil des Produktes konnte isoliert werden. Da das entstehende Piperidin-Addukt des Dibenzofulvens aus der

Fmoc-Entschützung keine negativen Auswirkungen auf die Folgereaktion hat, wurde in den weiteren Ansätzen die Entschützungreaktion direkt vor der Herstellung des Harnstoffdipeptids durchgeführt und auf eine Reinigung von **118** verzichtet (siehe Kapitel 4.1.9.2).

#### 4.1.5.3 Synthese der *N*<sup>α</sup>-Cbz-(*S*)-2-Aminohexadecansäure **95**

Die Synthese der *N*<sup>α</sup>-Cbz-(*S*)-2-Aminohexadecansäure **95** war bereits in Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe in einer Test-Reaktionssequenz etabliert worden.<sup>[95]</sup> Die stereoselektive Synthese der *N*-Cbz-geschützten (*S*)-2-Aminohexadecansäure **95** erfolgte ausgehend von 14-Tetradecanol **99**.



**Abb. 4.9** Stereoselektive Synthese der (*S*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-Aminohexadecansäure **95**.

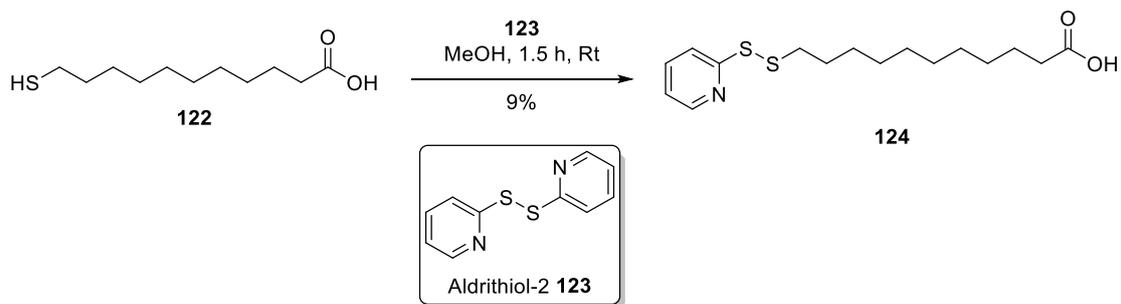
Nach Oxidation des 14-Tetradecanols **99** mit IBX **101** zu Tetradecanal **98** und nachfolgender Reinigung über Säulenchromatographie wurde der Aldehyd **98** mit einer Ausbeute von 35% erhalten.<sup>[200]</sup> Der Aldehyd **98** wurde im Anschluss mit dem Phosphonat **30** in einer Wittig-Horner-Reaktion selektiv zur *Z*-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminohexadec-2-ensäure **97** umgesetzt. In den Vorarbeiten zu dieser Synthese war bereits durch ein <sup>1</sup>H-gekoppeltes <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum bestätigt worden, dass selektiv das *Z*-Alken gebildet wird. Auch in diesem Ansatz wurde im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nur das vinyliche Protonen-Signal des *Z*-Isomers nachgewiesen.<sup>[95,208,209]</sup> Die erhaltenen Spektren entsprachen den vorhandenen Referenzspektren.

Im nächsten Schritt wurde mittels asymmetrischer Hydrierung mit dem Rhodium-Katalysator (*S,S*)-Me-DUPHOS-Rh **32a** und Wasserstoff, wie bereits zuvor in Kapitel 4.1.3 beschrieben, das Stereozentrum der Aminosäure **96** aufgebaut.<sup>[198]</sup> Hierbei musste nach vier Tagen zusätzlicher Katalysator zugegeben werden, nachdem über Reaktionskontrolle per <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie noch kein vollständiger Umsatz des *Z*-Alkens **97** beobachtet worden war. Der (*S,S*)-Me-DUPHOS-Rh Katalysator **32a** bildet selektiv die (*S*)-konfigurierte Verbindung ausgehend von *Z*-Alkenen, wie bereits aus Vorarbeiten bekannt war. Auf eine genaue Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurde an dieser Stelle zunächst verzichtet und es wurde im Folgenden davon ausgegangen, dass ausschließlich die (*S*)-konfigurierte Form der Verbindung vorliegt.<sup>[201–203]</sup>

Im letzten Schritt dieser Synthesesequenz erfolgte die Spaltung des *tert*-Butylesters mit 80% wässriger TFA-Lösung. Die Reinheit des erhaltenen Produkts **95** war zufriedenstellend, und es wurde deswegen ohne weitere Reinigungsschritte in der darauffolgenden Peptidkupplung zum Aufbau des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **93** verwendet.

#### 4.1.6 Synthese der PySS-Seitenkette **124**

Die benötigte Seitenkette **124** mit der aktivierten Thiol-Gruppe zur Seitenketten-Modifikation der Muraymycin-Analoga konnte in einem Schritt aus der kommerziell erhältlichen 11-Mercaptoundecansäure **122** hergestellt werden. Zur Aktivierung der Thiol-Gruppe wurde auf Aldrithiol™-2 (2,2'-Dipyridyldisulfid) **123** zurückgegriffen, welches mit der Carbonsäure **122** in absolutem Methanol umgesetzt wurde.



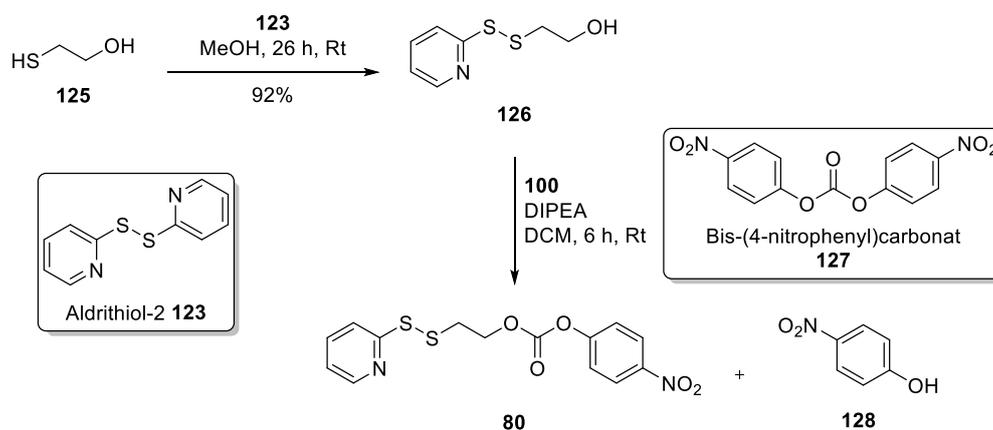
**Abb. 4.10** Synthese der aktivierten Thiol-Seitenkette **124**.

Nach 1.5 Stunden Rühren bei Raumtemperatur erfolgte die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes an Kieselgel, wonach das Produkt 11-(Pyridin-2-ylthio)undecansäure **124** in reiner Form erhalten werden konnte. Auf Grund der ausreichenden Substanzmenge wurde trotz der geringen Ausbeute von nur 9% auf eine weitere Optimierung der Reaktion verzichtet. Ein Grund für die geringe Ausbeute ist die auftretende Nebenreaktion der

Bildung des Säure-Disulfids, die trotz des Vorlegens des Aldrithiols **123** und langsamer Zugabe der Carbonsäure in einem nicht zu vernachlässigenden Maß stattgefunden hat.

#### 4.1.7 Synthese des intrazellulär spaltbaren 4-Nitrophenyl-2-(pyridin-2-yl-disulfanyl)ethylcarbonat-Linkers **80**

Die Synthese des spaltbaren 4-Nitrophenyl-2-(pyridin-2-yl-disulfanyl)ethylcarbonat-Linkers **80**, welcher für die spätere Modifikation an dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **68** benötigt wurde, erfolgte nach einer literaturbekannten Synthese von A. Latorre et al.<sup>[183]</sup>



**Abb. 4.11** Synthese des spaltbaren 4-Nitrophenyl-2-(pyridin-2-yl-disulfanyl)ethylcarbonat-Linkers **80**.

Ausgehend von Aldrithiol™-2 **123** und 2-Mercaptoethanol **125** wurde in einer zweistufigen Synthese der Linker **80** aufgebaut. Nach der Aktivierung der Thiol-Funktion mit Aldrithiol™-2 **123**, welche bei Raumtemperatur über 26 Stunden durchgeführt worden war, wurde nach säulenchromatographischer Reinigung das Carbonat **80** im zweiten Schritt mit Bis(4-nitrophenyl)carbonat **127** und DIPEA in Dichlormethan gebildet. Nach einer Reaktionszeit von sechs Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion abgebrochen und versucht, das Rohprodukt über Säulenchromatographie zu reinigen. Das als Nebenprodukt anfallende 4-Nitrophenol **128** konnte jedoch nicht vollständig aus der Produktfraktion entfernt werden. Da das Nebenprodukt **128** auf die nachfolgenden Reaktionen keinen störenden Einfluss hat und in Folge dessen sowieso erneut als Nebenprodukt dieser Reaktionen entsteht, wurde auf weitere Reinigungsversuche verzichtet und das Produkt in den Folgesynthesen als Gemisch eingesetzt. Die Ausbeute wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Rohproduktes berechnet und das verunreinigte Produkt **80** konnte mit einer berechneten Gesamtausbeute von 77% über beide Schritte erhalten werden.

#### 4.1.8 Synthese der benötigten Bausteine **133** und **135** für die Festphasen-gestützte Synthese

Für die Synthesen, die an der Festphase durchgeführt wurden, wurden zudem noch weitere Bausteine benötigt. Als erste Komponente war der Festphasenlinker **133** erforderlich, der an das Festphasenharz angeknüpft wird und an dem sukzessive der Aufbau der Peptidseitenkette erfolgt. Der Linker **133** beinhaltet das Aminopropyl-Motiv der späteren Muraymycin-Grundstruktur. Die zweite Komponente, die für den Festphasen-gestützten Ansatz benötigt wurde, war das Valin-Carbamat **135** zur Einführung des Harnstoffdipeptid-Motivs als letzten Schritt der Festphasen-gebundenen Synthese zum Aufbau der Muraymycin-Peptideinheit.

##### 4.1.8.1 Synthese des Festphasenlinkers **133**

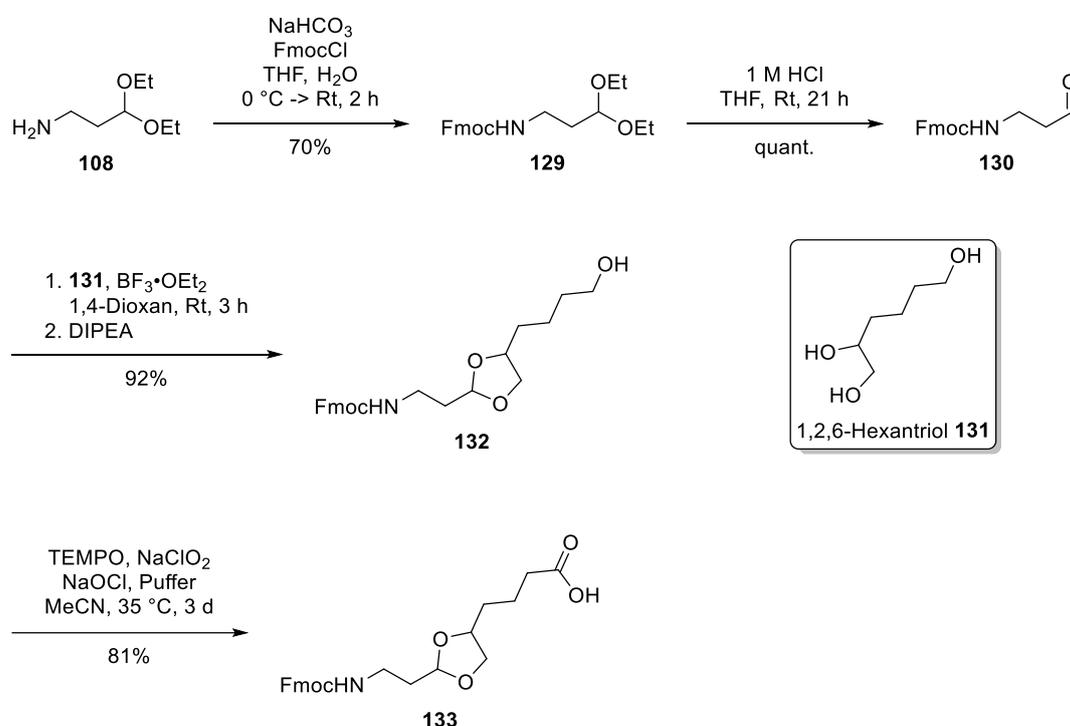


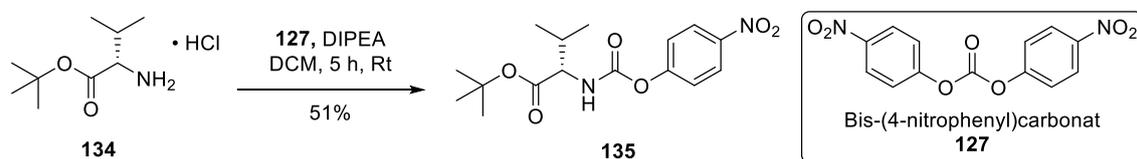
Abb. 4.12 Synthese des Festphasenlinkers **133**.

Die Synthese des Festphasenlinkers **133** wurde nach einer in der Arbeitsgruppe etablierten und publizierten Methode durchgeführt.<sup>[94,210,211]</sup> Als Startsubstanz wurde 1-Amino-3,3-diethoxypropan **108** verwendet und dieses im ersten Schritt an der freien Amino-Gruppe mit 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid geschützt. Die Reaktion wurde bei  $0^\circ\text{C}$  in einer wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Tetrahydrofuran als Cosolvens gestartet und während der Reaktionsdauer von zwei Stunden langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Das Fmoc-

geschütztes Produkt **129** konnte in einer Ausbeute von 70% nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten werden. Nach anschließender Acetalspaltung mit verdünnter Salzsäure in Tetrahydrofuran über 21 Stunden bei Raumtemperatur konnte der Aldehyd **130** quantitativ ohne weitere Reinigung erhalten werden und wurde nachfolgend in der Acetalisierung zum 1,3-Dioxolan **132** mit dem 1,2,6-Hexantriol **131** eingesetzt. Hierzu wurde das 1,2,6-Hexantriol **131** in Tetrahydrofuran vorgelegt und nach Zugabe des Aldehyds **130** und katalytischen Mengen Bortrifluorid-Etherat für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von DIPEA zur Neutralisation und mehreren Waschschrritten wurde das 1,3-Dioxolan **132** nach Säulenchromatographie mit einer guten Ausbeute von 92% erhalten. Im abschließenden Schritt dieser Reaktionssequenz wurde die Oxidation des Aldehyds zur Carbonsäure unter TEMPO-Pinnick-Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde das Dioxolan **132** in Acetonitril und Phosphat-Puffer vorgelegt. Nach Zugabe katalytischer Mengen 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl (TEMPO) und jeweils zwei Äquivalenten Natriumchlorit und wässriger Natriumhypochlorit-Lösung wurde die Reaktionsmischung für drei Tage bei 35 °C gerührt. Nach Aufarbeitung und erneuter Reinigung des Rohproduktes über Säulenchromatographie wurde der benötigte Festphasenlinker **133** mit einer guten Ausbeute von 81% als Stereoisomeren-Gemisch erhalten.

#### 4.1.8.2 Synthese des Valin-Carbamats **135**

Der zum Aufbau des Harnstoffdipeptid-Motivs benötigte Baustein wurde in einem Schritt aus dem L-Valinester **134** und Bis(4-nitrophenyl)carbonat **127** nach einer modifizierten Vorschrift von K. Leyer hergestellt.<sup>[94,212]</sup> Im Gegensatz zu dem verwendeten *para*-Nitrophenylchlorformiat in der publizierten Methode wurde hier auf das Bis(4-nitrophenyl)carbonat **127** zurückgegriffen. Als Base wurde *N,N*-Diisopropylethylamin verwendet.



**Abb. 4.13** Synthese des Valin-*para*-Nitrophenyl-Carbamats **135**.

Das Produkt **135** wurde nach einer Reaktionszeit von fünf Stunden erhalten und mittels Säulenchromatographie gereinigt. Durch den Wechsel des Reagenzes konnte reproduzierbar eine

zu der publizierten Methode (mit *para*-Nitrophenylchlorformiat) vergleichbare Ausbeute erzielt werden (51%). Diese Reproduzierbarkeit war bei der Verwendung von *para*-Nitrophenylchlorformiat nicht gegeben und Ausbeuten in diesem Bereich wurden nur in Ausnahmefällen erzielt.

#### 4.1.9 Synthese der Harnstoffdipeptide

Zum Aufbau der verschiedenen benötigten Harnstoffdipeptide wurde generell auf zwei Methoden zurückgegriffen. Zum einen wurde mittels Triphosgen **136** das Isocyanat der terminalen, *O*-*tert*-Butylester-geschützten Aminosäure hergestellt und im Anschluss das Harnstoffdipeptid-Motiv durch Zugabe des zweiten Aminosäure-Bausteins aufgebaut.<sup>[186,187]</sup> Die zweite Methode verfolgt die gleiche Strategie beim Aufbau der Harnstoffgruppe wie die Festphasengestützte Synthese: in Lösung wird hier die terminale Aminosäure mit Bis(4-nitrophenyl)carbonat **127** an der Aminogruppe aktiviert und dann im Anschluss, ähnlich zu dem Isocyanat-Ansatz, mit der zweiten, ungeschützten Aminosäuren-Komponente umgesetzt. Neben den drei für den Aufbau der Muraymycin-Analoga benötigten Harnstoffdipeptiden, dem Valin-Lysin-Harnstoffdipeptid **41**, dem Propargylglycin-Lysin-Harnstoffdipeptid **84** und dem Cystein-Lysin-Harnstoffdipeptid **83**, wurden noch drei weitere Harnstoffdipeptide als Referenzverbindungen für eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von S. Van Lanen hergestellt.

##### 4.1.9.1 Synthese des Valin-Lysin-Harnstoffdipeptids **41**

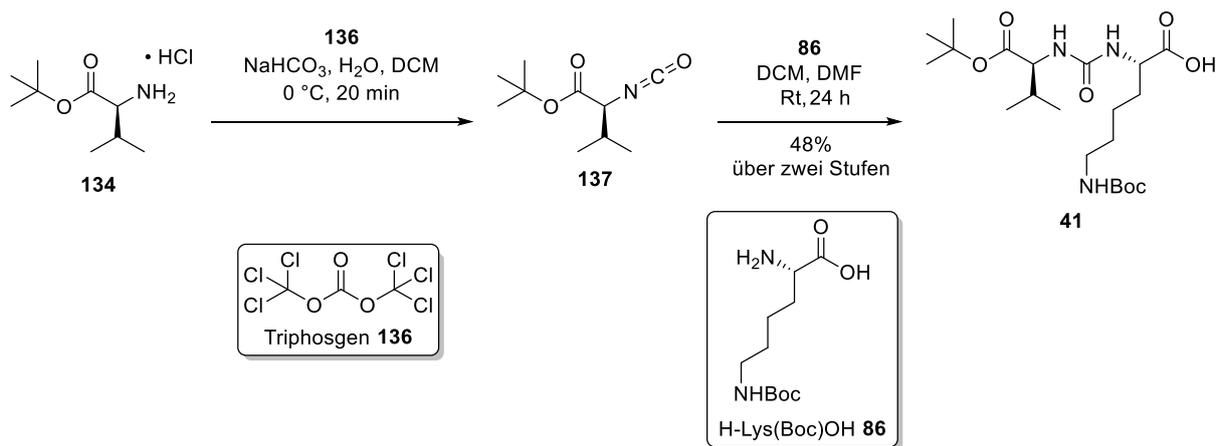


Abb. 4.14 Synthese des Val-Lys-Harnstoffdipeptids **41**.

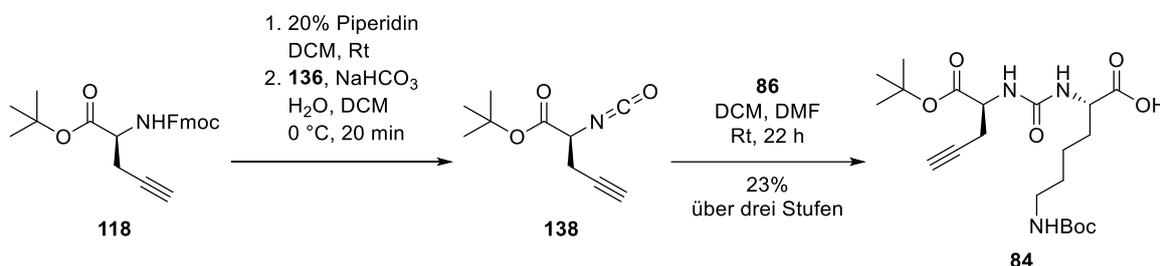
Startpunkt für die Synthese des Valin-Lysin-Harnstoffdipeptids **41** war die Umsetzung des L-Valinesters **134** mit Triphosgen **136** zum Isocyanat **137**. Nach 20 Minuten starkem Rühren bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$

wurde das Isocyanat **137** nach Extraktion und Entfernen des Lösungsmittels erhalten. Im Anschluss wurde das erhaltene Isocyanat **137** mit *N*<sup>ε</sup>-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-Lysin (H-Lys(Boc)OH) **86** umgesetzt.

Auf Grund der Instabilität des gebildeten Isocyanats **137** wurde die Harnstoffbildung direkt im Anschluss durchgeführt und auf eine Reinigung und genaue Charakterisierung des Zwischenproduktes verzichtet. Durch Probleme mit der Löslichkeit von *N*<sup>ε</sup>-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-Lysin **86** in den verwendeten Lösungsmitteln konnten nur mäßige Ausbeuten erzielt werden. Um einen möglichst vollständigen Umsatz zu gewährleisten, wurde die Suspension für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Eine weitere Erhöhung der Reaktionszeit war auf Grund der Instabilität des Isocyanats wenig sinnvoll. Über beide Stufen konnte aber dennoch eine ausreichende Ausbeute von 48% nach säulenchromatographischer Reinigung des Produkts **41** erzielt werden.

#### 4.1.9.2 Synthese des Propargylglycin-Lysin-Harnstoffdipeptids **84**

Das Propargylglycin-haltige Harnstoffdipeptid **84** wurde ebenfalls mit Triphosgen **136** über das Isocyanat-Zwischenprodukt **138** hergestellt.



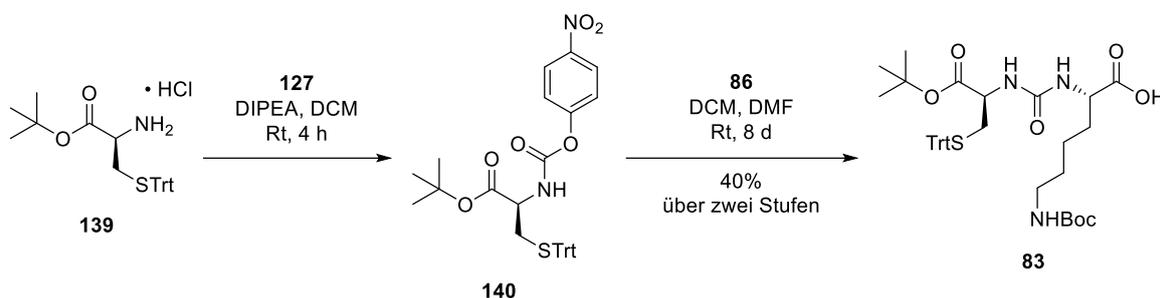
**Abb. 4.15** Synthese des Pra-Lys-Harnstoffdipeptids **84**.

Unter basischer Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20% Piperidin in Dichlormethan wurde die Aminosäure **118** mit Triphosgen **136** zum Isocyanat **138** umgewandelt. Das Isocyanat **138** wurde direkt im Anschluss erneut gelöst und mit *N*<sup>ε</sup>-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-Lysin (H-Lys(Boc)-OH) **86** versetzt und die erhaltene Suspension für einen Tag bei Raumtemperatur gerührt, um das Harnstoffdipeptid **84** zu bilden. Nach Reinigung über Säulenchromatographie wurde das Harnstoffdipeptid **84** mit einer Ausbeute von 23% über diese drei Stufen erhalten. Auch hier begründet sich die niedrige Ausbeute zum Teil in der sehr schlechten Löslichkeit des *N*<sup>ε</sup>-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-Lysins **86** in den benötigten Lösungsmitteln. Es konnten dennoch

ausreichende Mengen des Harnstoffdipeptids **84** für die folgenden Reaktionen erhalten werden.

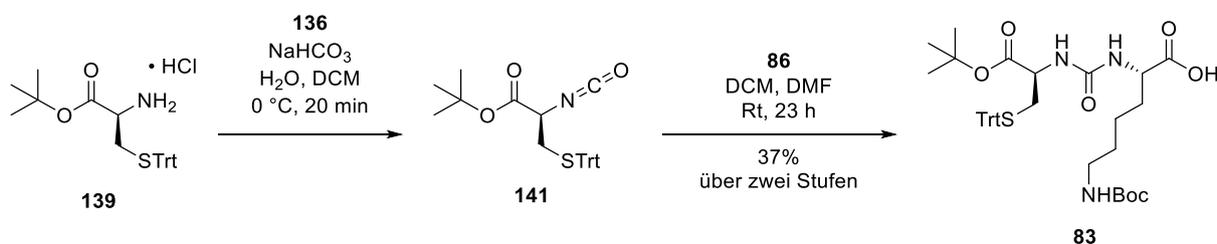
#### 4.1.9.3 Synthese des Cystein-Lysin-Harnstoffdipeptids **83**

Bei der Synthese des Cystein-Lysin-Harnstoffdipeptids **83** wurde auf beide Methoden zur Herstellung des Harnstoffdipeptid-Motivs zurückgegriffen. In der ersten Variante wurde zunächst das Cystein-Carbamat **140** mit Bis(4-nitrophenyl)carbonat **127** ausgehend von dem *S*-Tritylgeschütztem L-Cysteinester **139** hergestellt.



**Abb. 4.16** Synthese des Cys-Lys-Harnstoffdipeptids **83** über das Carbamat **140**.

Überschüssiges Bis(4-nitrophenyl)carbonat **127** wurde durch Säulenchromatographie entfernt und das Produkt ansonsten ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt. Das Zwischenprodukt **140** konnte nicht in reiner Form isoliert werden. Das aktivierte Cystein **140** wurde mit *N* $\epsilon$ -(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-Lysin (H-Lys(Boc)-OH) **86** umgesetzt und in einer Mischung aus Dichlormethan und Dimethylformamid für acht Tage bei Raumtemperatur gerührt. Auch hier lag auf Grund der sehr schlechten Löslichkeit des *N* $\epsilon$ -(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-Lysins **86** eine Suspension vor. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Harnstoffdipeptid-Rohprodukts an Kieselgel konnte die Titelverbindung mit einer Ausbeute von 40% über beide Schritte erhalten werden.

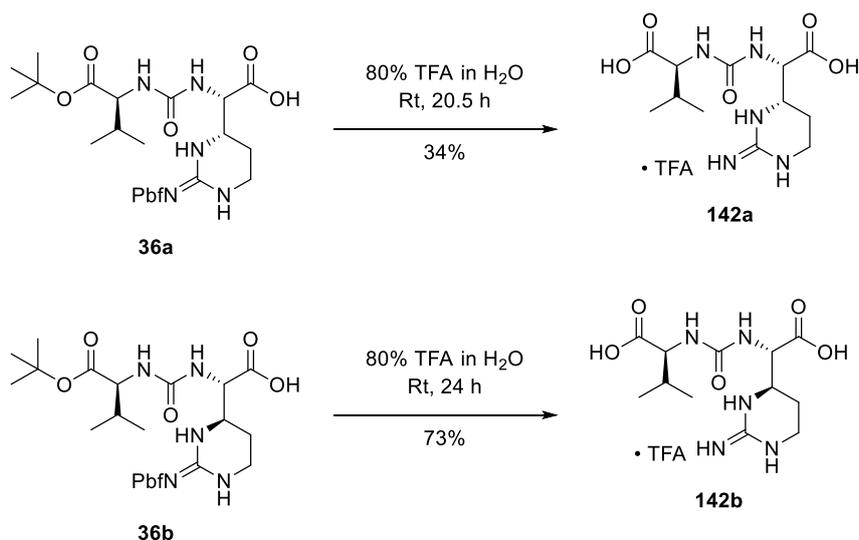


**Abb. 4.17** Synthese des Cys-Lys-Harnstoffdipeptids **83** über das Isocyanat **141**.

In der zweiten Variante wurde das Harnstoffmotiv wie bereits bei den anderen beiden Harnstoffdipeptiden mit Triphosgen **136** über das Isocyanat-Zwischenprodukt aufgebaut. Auf Grund der inhärenten Instabilität des Isocyanats **141** wurde dieses auch hier direkt weiter mit *N*<sup>ε</sup>-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-Lysin (H-Lys(Boc)-OH) **86** umgesetzt. Nach 24 Stunden konnte auch über diese Methode das Harnstoffdipeptid **83** nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 37% erhalten werden. Auch hier wirkte sich wieder die schwere Löslichkeit der H-Lys(Boc)OH **86** aus, welche für die eher mäßige Ausbeute verantwortlich ist. Das Cys-Lys-Harnstoffdipeptids **83** konnte somit über beide Synthesevarianten erfolgreich erhalten werden.

#### 4.1.9.4 Synthese weiterer Harnstoffdipeptide

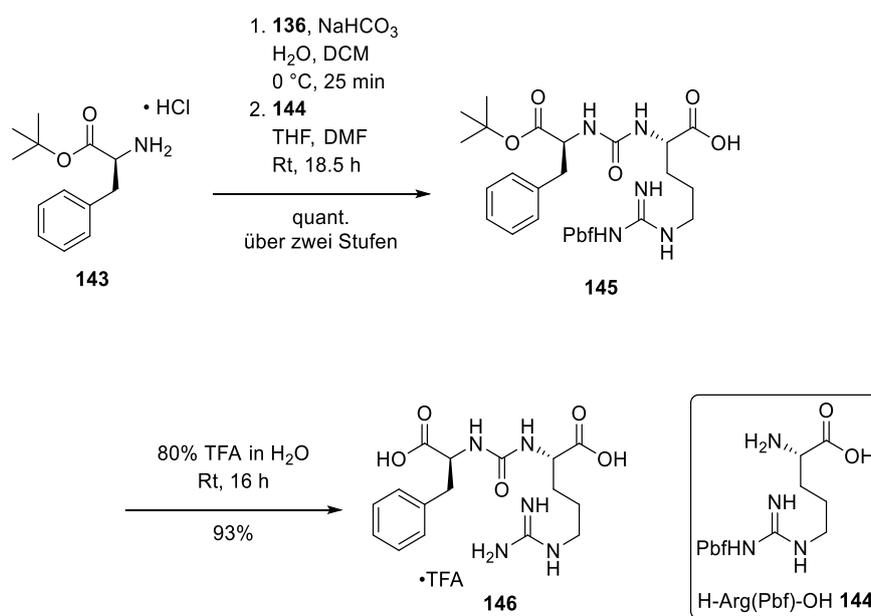
Für eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von S. Van Lanen der Universität Kentucky wurden drei weitere Harnstoffdipeptide hergestellt.



**Abb. 4.18** Entschützung der Valin-Epicapreomycin- und Valin-Capreomycin-Harnstoffdipeptide **142a** und **142b**.

In den Beständen des Arbeitskreises waren noch die von M. Büschleb synthetisierten Epicapreomycin- und Capreomycin-Valin-Harnstoffdipeptide in geschützter Form (**36a** und **36b**) vorhanden. Diese wurden nach Standardprotokoll mit 80%iger wässriger TFA-Lösung global entschützt. Die Reinigung der Substanzen erfolgte mittel semi-präparativer HPLC. Erschwerend war in diesem Fall, dass die beiden Verbindungen nicht UV-aktiv waren und somit nicht mit dem UV-Detektor der HPLC detektiert werden konnten. Daher wurde der gesamte HPLC-

Lauf in Fraktionen ( $\Delta t = 1$  min) gesammelt und mittels Dünnschichtchromatographie und Ninhydrin als Färbereagenz die jeweiligen Produktfraktionen identifiziert. Das Valin-Epicapreomycin-Harnstoffdipeptid **142a** konnte mit einer Ausbeute von 34% nach globaler Entschützung und Reinigung über HPLC erhalten werden. Das Valin-Capreomycin-Harnstoffdipeptid **142b** wurde mit einer Ausbeute von 73% erhalten. Beide Verbindungen wurden S. Van Lanen für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt.



**Abb. 4.19** Synthese des Phe-Arg-Harnstoffdipeptids **146**.

Das dritte benötigte Harnstoffdipeptid **146** musste zunächst aufgebaut werden. L-Phenylalanin-*tert*-butylester-Hydrochlorid **143** wurde kommerziell erworben und mit Triphosgen **136** zum Isocyanat-Zwischenprodukt umgesetzt. Auf Grund der bereits diskutierten Instabilität der Isocyanat-Spezies wurde dieses wieder direkt nachfolgend mit *N*<sup>ω</sup>-(2,2,4,6,7-Pentamethyl-2H-benzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin (H-Arg(Pbf)-OH) **144** umgesetzt. Im Gegensatz zu H-Lys(Boc)-OH **86** weist H-Arg(Pbf)-OH **144** eine wesentlich bessere Löslichkeit auf, was sich im Vergleich zu den Lysin-haltigen Harnstoffdipeptiden **41**, **84** und **83** in einer wesentlich besseren, in diesem Fall sogar einer quantitativen Ausbeute über die beiden Stufen bemerkbar machte. Die Reinheit des vollständig geschützten Harnstoffdipeptids **145** war bereits ohne Säulenchromatographie zufriedenstellend, und das Produkt konnte im Anschluss sofort global mit 80%iger wässriger TFA-Lösung entschützt werden. Nach HPLC-Reinigung konnte so auch das freie Phenylalanin-Arginin-Harnstoffdipeptid **146** mit einer Ausbeute von 93% erhalten werden. Die Verbindung wurde zu unserem Kooperationspartner geschickt und zur Aufklärung des Biosynthesewegs der Muraymycine als Referenzverbindung eingesetzt.<sup>[190]</sup>

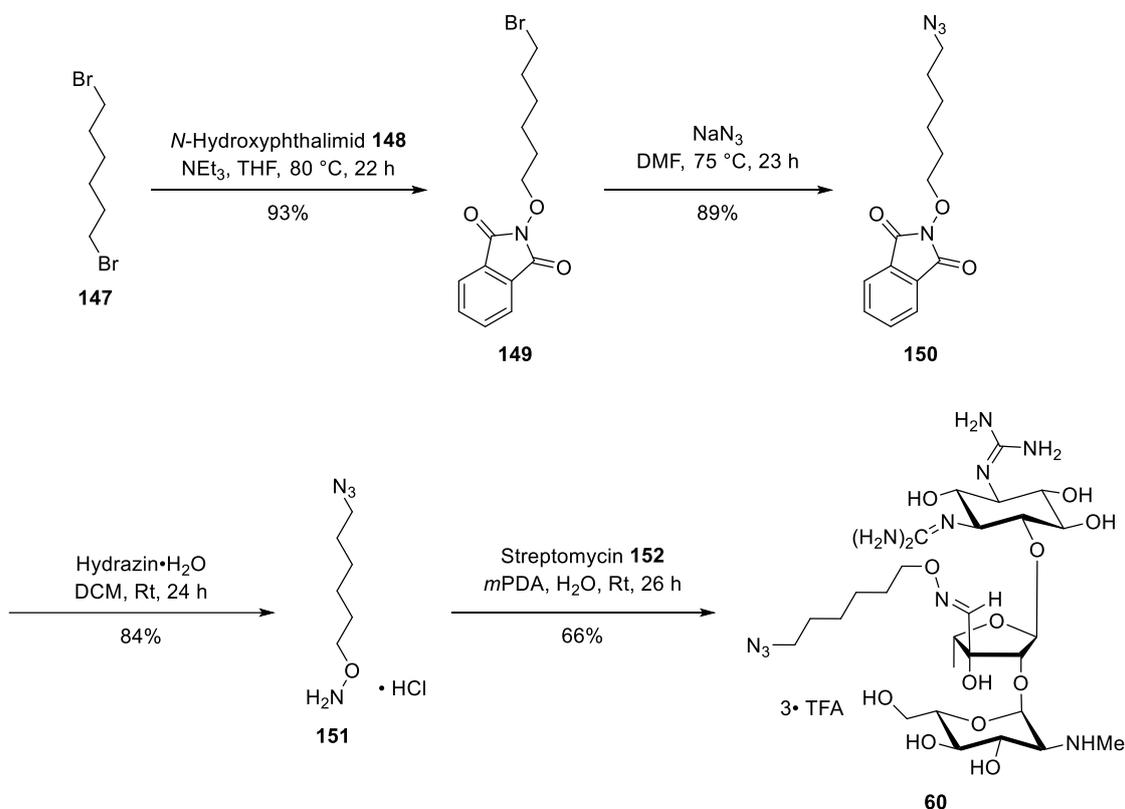
## 4.2 Synthese der modifizierten Streptomycine

Wie bereits in der Literatur berichtet worden war sollte durch die Modifikation an der Aldehyd-Gruppe des Streptomycins dessen antibakterielle Aktivität und die Fähigkeit zur Zellaufnahme in einem gewissen Maße erhalten bleiben.<sup>[132]</sup> In dieser Arbeit sollte Streptomycin mit drei verschiedenen Linker-Typen modifiziert werden, die jeweils über Oxim-Ligation an Streptomycin gebunden werden. Die eingesetzten Linker-Einheiten sind terminal mit einer Azid-Gruppe, einem Thiol oder einem aktivierten Thiol versehen. Zum Aufbau der verschiedenen Linker wurde teilweise auf literaturbekannte Synthesen zurückgegriffen, welche im Folgenden an die jeweiligen Aufgabenstellungen angepasst wurden.

### 4.2.1 Synthese des Azid-Linker-modifizierten Streptomycins 60

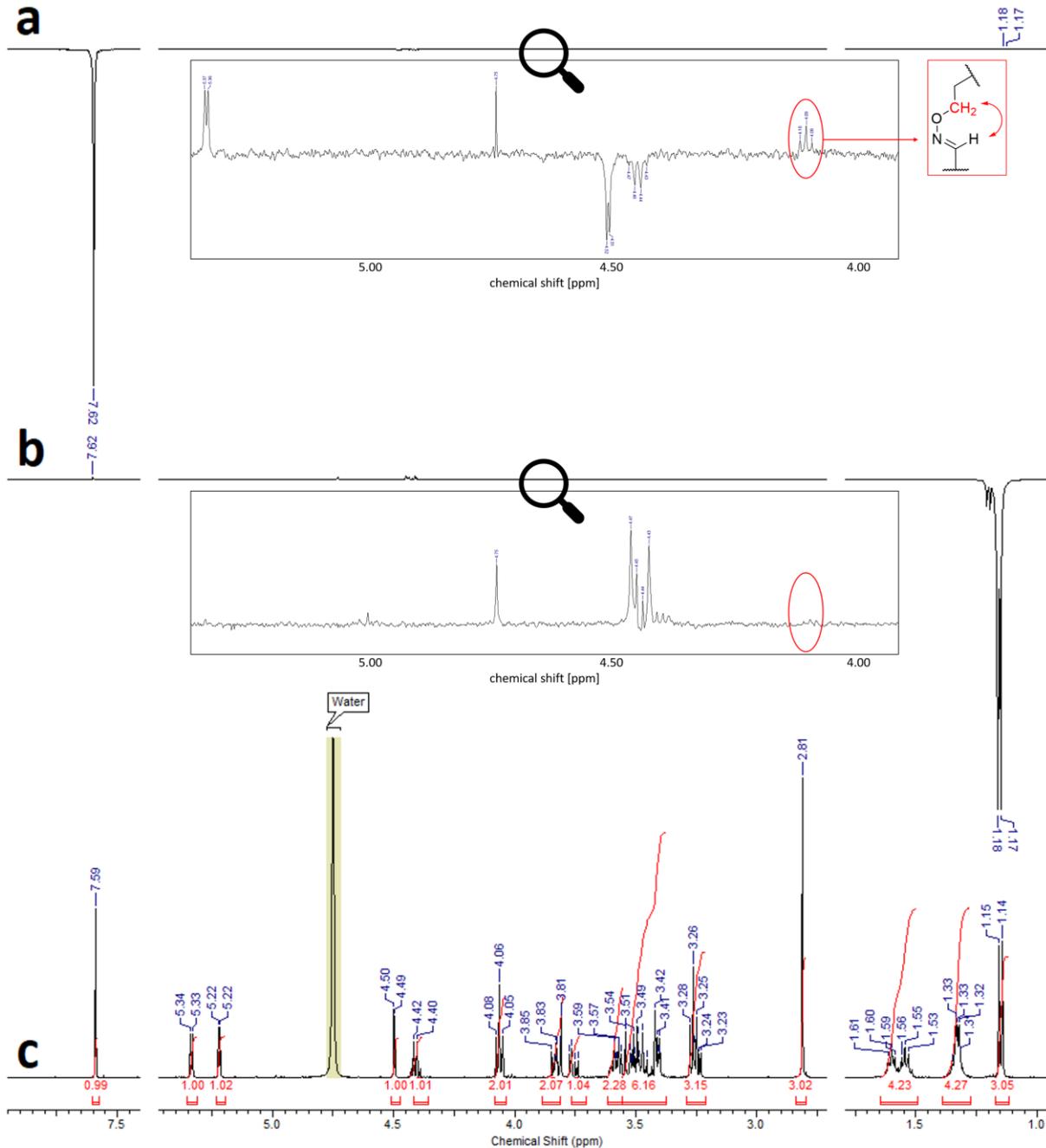
Die Synthese des *O*-(6-Azidohexyl)hydroxylammoniumchlorids **151** erfolgte in modifizierter Form nach einer literaturbekannten Vorschrift.<sup>[213]</sup> Die erste Reaktionsstufe der Synthesesequenz wurde analog zur Literaturvorschrift durchgeführt. Hierzu wurde ausgehend von 1,6-Dibromhexan **147** eine Monosubstitution mit einem Überschuss von *N*-Hydroxyphthalimid **148** und Triethylamin in Tetrahydrofuran bei 80 °C durchgeführt. Nach einer Reaktionsdauer von zwei Tagen und anschließender säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte das Produkt **149** mit einer guten Ausbeute von 93% erhalten. Im Gegensatz zur dem in der Literatur beschriebenen Syntheseweg mussten für das weitere Vorgehen die letzten beide Syntheseschritte getauscht werden. Ein erster Versuch, die Synthese im Einklang mit der veröffentlichten Methode zunächst mit der Bildung des geschützten Hydroxylamins durch Zugabe von Hydrazin-Monohydrat fortzusetzen, führte dazu, dass kein Produkt isoliert werden konnte. Die NMR-Spektren des Rohproduktes deuteten dagegen auf eine Polymerisation des Linkers hin. Deswegen wurde entgegen der publizierten Methode zunächst die Substitutionsreaktion mit Natriumazid durchgeführt. Nach 23 Stunden Rühren in Dimethylformamid und anschließender säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **150** auf diese Weise mit einer guten Ausbeute von 89% erhalten werden. Im letzten Schritt der Linker-Synthese erfolgte die Abspaltung des Phthalimids mit Hydrazin-Monohydrat über eine Reaktionsdauer von 24 Stunden bei Raumtemperatur. Das entstandene Hydroxylamin **151** wurde als das stabilere Hydrochlorid durch Einleiten von Hydrochlorid-Gas in eine Diethylether-Lösung des Produkts ausgefällt. Das *O*-(6-Azidhexyl)hydroxylaminhydrochlorid **151** wurde mit einer sehr guten Ausbeute von 84% erhalten. Alternativ zu dieser Methode wurde eine Lösung des Produkts in DCM

auch mit wässriger 2 M salzsaurer Lösung extrahiert und die so erhaltene wässrige Lösung des Produkt-Hydrochlorids **151** gefriergetrocknet.



**Abb. 4.20** Synthese des Azid-modifizierten Streptomycins **60**.

Die Synthese des mit dem Azid-Linker modifizierten Streptomycins **60** erfolgte durch Oxim-Ligation des Linkers **151** mit Streptomycin **152** und mit *m*-Phenyldiamin (*m*PDA) als Katalysator.<sup>[214]</sup> Nach einem Tag Rühren bei Raumtemperatur in Wasser wurde das Produkt **60** nach Reinigung über semi-präparative HPLC erhalten. Das Produkt war in der UV-Spur hinreichend detektierbar, um es gezielt isolieren zu können. Das Oxim **60** konnte mit einer guten Ausbeute von 66% nach Gefrier Trocknung erhalten werden. Eine nachträglich durchgeführte Testreaktion ohne Zusatz des Katalysators *m*-Phenyldiamin führte zu einem identischen Ergebnis im Hinblick auf die Reaktionszeit und erzielte Ausbeute. Für die folgenden Oxim-Ligationen wurde deswegen auf den Zusatz des Katalysators verzichtet (siehe Kapitel 4.2.3 und 4.2.4).



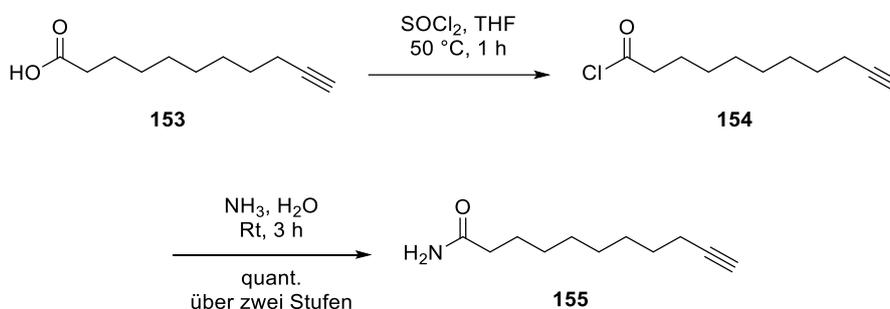
**Abb. 4.21 a:** 1D-NOE-NMR-Spektrum mit Einstrahlung auf das Oxim-Proton; **b:** 1D-NOE-NMR-Spektrum mit Einstrahlung auf die 5'-CH<sub>3</sub>-Gruppe; **c:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Streptomycin-Derivats **60**.

Die Identität und Reinheit des Produktes **60** wurde spektroskopisch bestätigt. Zur genauen Strukturaufklärung der Doppelbindungskonfiguration des entstandenen Oxims **60** wurden zwei 1D-NOE-NMR-Spektren aufgenommen. Dabei erfolgte jeweils eine selektive Einstrahlung auf das Protonen-Signal der Oxim-Gruppe beziehungsweise auf das Signal der Protonen der 5'-CH<sub>3</sub>-

Gruppe der L-Streptose zur Bestimmung der Konfiguration der Doppelbindung.<sup>[215]</sup> Die Auswertung der Spektren zeigt das Vorliegen der *E*-konfigurierten Verbindung (siehe Abbildung 4.21). Für den eigentlichen Zweck der Verbindung als Transportersystem ist das Vorliegen einer bestimmten Konfiguration in diesem Intermediat allerdings erstmal nicht entscheidend.

#### 4.2.2 Synthese des Referenz-Streptomycins 156

Die Synthese einer weiteren Streptomycin-Verbindung mit einer verlängerten Linker-Struktur mit terminalem Amid sollte als weitere Referenzstruktur dienen. Zur Verlängerung der Seitenkette am Streptomycin-Derivat **60** wurde 10-Undecinsäure **153** zunächst über das Säurechlorid **154** in das Amid **155** überführt und dann über eine CuAAC, entsprechend dem geplanten Aufbau der Konjugate, an das Streptomycin-Derivat **60** angebracht. Die 10-Undecinsäure **153** wurde ebenfalls als Seitenkette in den Muraymycin-Analoga zum Aufbau der Konjugate verwendet. Die zusätzliche Streptomycin-Referenz **156** ist nötig, um einen Erhalt der antibakteriellen Wirksamkeit des Streptomycins nach Modifikation an der Aldehyd-Position auch bei größeren Seitenkettenstrukturen am Streptomycin zu untersuchen. Diese Verbindung ist strukturell näher an der Muraymycin-Streptomycin-Konjugat-Verbindung **T1** als die Streptomycin-Referenzverbindung **60** und sollte damit deren Verhalten im stabilen Konjugat gut widerspiegeln.



**Abb. 4.22** Synthese des Carbonsäureamid-Spacers **155**.

Die Synthese des Carbonsäureamids **155** erfolgte nach einer modifizierten literaturbekannten Synthesevorschrift.<sup>[216]</sup> Zunächst wurde mit Thionylchlorid das reaktive Carbonsäurechlorid **154** aus der 10-Undecinsäure **153** erzeugt, welches im zweiten Schritt mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung quantitativ zum Carbonsäureamid **155** umgesetzt wurde.

Im nächsten Schritt wurde das Streptomycin-Derivat **60** mittels Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) hergestellt. Hierzu wurden das Carbonsäureamid **155** und das Streptomycin-Azid **60** in zuvor entgastem destillierten Wasser unter Schutzgas-Atmosphäre

vorgelegt und im Anschluss mit katalytischen Mengen Kupfer(II)-sulfat und Natriumascorbat versetzt und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurden die Kupfersalze mit EDTA komplexiert und das Rohprodukt über semi-präparative HPLC gereinigt. Das Streptomycin-Derivat **156** konnte mit einer Ausbeute von 65% erhalten werden. Die Verbindung **156** soll mit dieser verlängerten Linker-Struktur den Streptomycin-Teil des finalen Konjugats **T1** imitieren und so tiefere Einblicke in die Einflüsse der verschiedenen Modifikationen auf die biologische Aktivität geben.

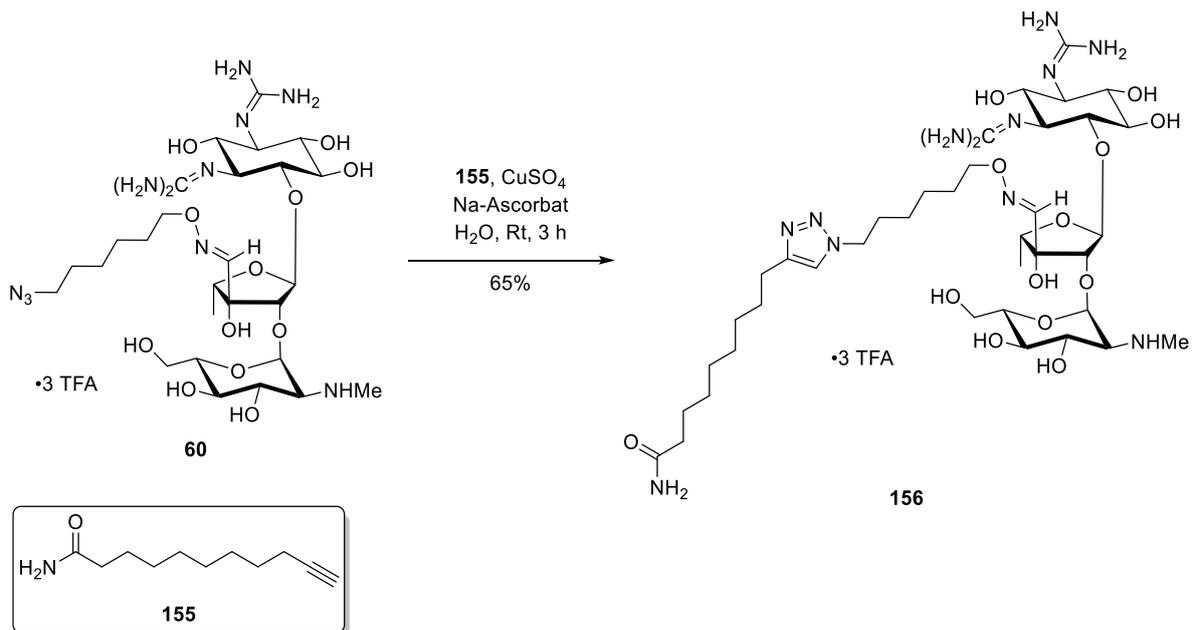
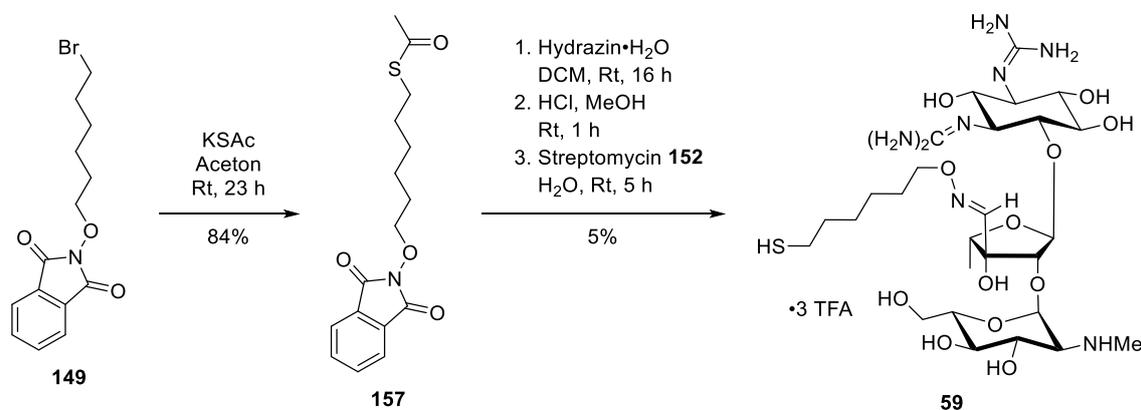


Abb. 4.23 Synthese der Streptomycin-Referenzverbindung **156**.

#### 4.2.3 Synthese des Thiol-Linker-modifizierten Streptomycins **59**

Das mit der Thiol-Seitenkette modifizierte Streptomycin **59** wurde auf zwei Arten hergestellt. In der ersten Variante wurde im ersten Schritt der Reaktionssequenz eine Substitutions-Reaktion der zuvor hergestellten Linker-Vorstufe **149** mit Kaliumthioacetat durchgeführt um das geschützte Thiol in der resultierenden Verbindung **157** einzuführen. Die Reaktion konnte nach einem Tag Rühren mit einer guten Ausbeute von 84% und nach Reinigung über Säulenchromatographie abgeschlossen werden. Da sowohl das freie Thiol als auch das freie Hydroxylamin sehr instabil sind, wurden die Entschützungs-Reaktionen und anschließende Kupplung mit Streptomycin in dieser Reaktionssequenz ohne Isolierung der Zwischenprodukte durchgeführt.<sup>[217]</sup> Zur Entschützung der *N*-Hydroxyphthalimid-Gruppe und der *S*-Acetylgruppe wurde das in Dichlormethan gelöste Produkt mit Hydrazin-Monohydrat versetzt und für 16 Stunden

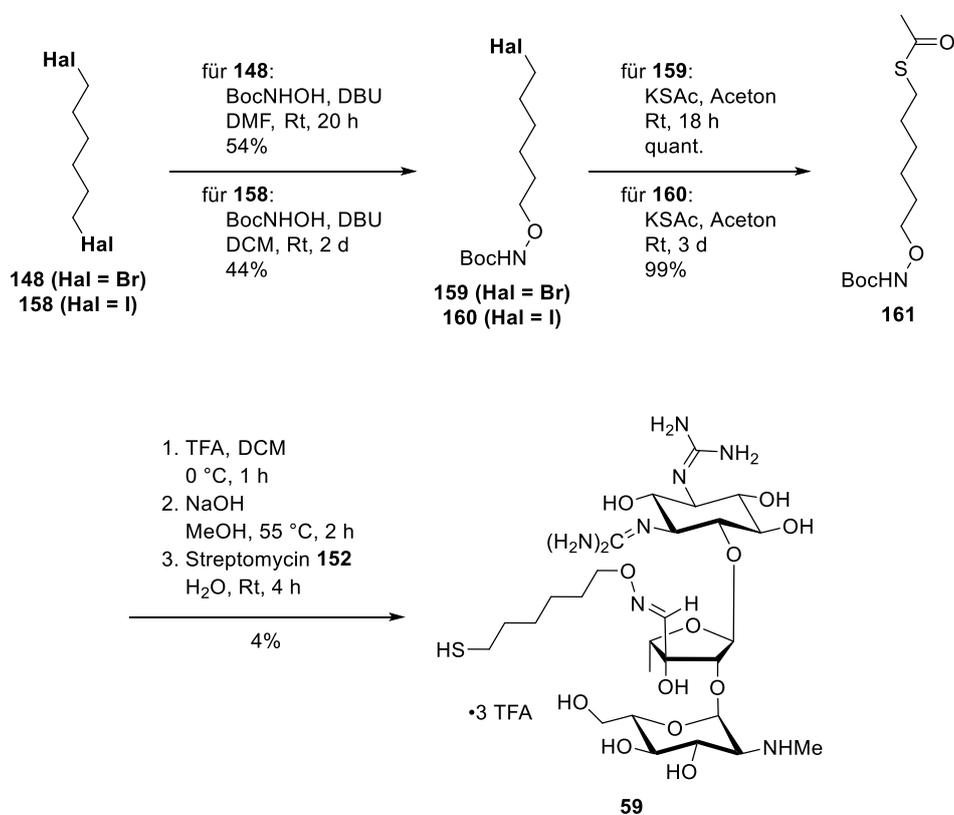
bei Raumtemperatur gerührt.<sup>[218]</sup> Das Lösungsmittel wurde entfernt und die Verbindung direkt im Anschluss in Methanol gelöst und mit Salzsäure bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt.



**Abb. 4.24** Erste Synthesevariante zur Herstellung des Thiol-modifizierten Streptomycins **59**.

Das entstandene Hydrochlorid der entschützten Verbindung wurde nach Gefriertrocknung erhalten und abschließend in Wasser mit Streptomycin-Sulfat **152** und nach einer Reaktionsdauer von fünf Stunden zum Oxim **59** umgesetzt. Über die letzten drei Schritte konnte nur eine Ausbeute von 5% des Thiol-Linker-modifizierten Streptomycins **59** nach semi-präparativer HPLC-Reinigung erhalten werden. Ein Vergleich des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums zu dem zuvor charakterisierten Streptomycin-Derivat **60** zeigt, dass auch hier selektiv das *E*-konfigurierte Oxim gebildet wurde. Die geringe Ausbeute ist wahrscheinlich in der Instabilität des Linkers begründet. Zudem bildet sich während der Reaktion und auch bei der nachfolgenden Reinigung das Disulfid-Dimer des Streptomycins. So wurde während der HPLC-Reinigung nach der Produkt-Elution (Retentionszeit  $t_R = 16.8$  min) ebenfalls ein Peak des lipophileren Disulfids des Streptomycins mit einer Retentionszeit von 20.1 Minuten detektiert. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte die Disulfid-Spezies durch eine Verschiebung des Triplet-Signals der zum Thiol benachbarten  $\text{CH}_2$ -Gruppe von 2.44 ppm zu 2.74 ppm beim Disulfid identifiziert werden. Die Entstehung des Disulfid-Nebenproduktes konnte zudem mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden. In der zweiten Variante wurde ausgehend von 1,6-Dibromhexan **148** oder 1,6-Diodhexan **158** mit *N*-Boc-Hydroxylamin und DBU als Base eine Monosubstitution durchgeführt.<sup>[217]</sup> Die Reaktionen der beiden halogenierten Verbindungen führten mit vergleichbaren Ausbeuten zu den gewünschten Produkten **159** beziehungsweise **160**. So wurde der bromierte Linker **159** nach einer Reaktionsdauer von 20 Stunden und abschließender Reinigung über Säulenchromatographie mit 54% Ausbeute erhalten. Die iodierte Verbindung **160** wurde mit einer Ausbeute von 44% nach zweitägiger Reaktion und säulenchromatographischer Reinigung isoliert. Die

Einführung des Thiols erfolgte analog zur oben beschriebenen Synthese mit Kaliumthioacetat mit den beiden Verbindungen **159** und **160**. Im Fall der Synthese ausgehend von Verbindung **159** wurde nach einer Reaktionszeit von 18 Stunden eine quantitative Ausbeute erhalten, und das Produkt **161** konnte nach Waschen mit Wasser ohne weitere Reinigungsschritte in der nächsten Reaktion umgesetzt werden. Ausgehend von Verbindung **160** wurde für drei Tage gerührt und mit 99% eine ebenfalls sehr gute Ausbeute erhalten. Auch in dieser Synthesesequenz wurden die Entschützungs-Reaktionen und die Oxim-Bildung mit Streptomycin wieder ohne Isolierung der Zwischenprodukte durchgeführt. Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgte mit TFA in Dichlormethan bei 0 °C. Das Thioacetat wurde nachfolgend mit Natriumhydroxid in Methanol bei 55 °C gespalten.<sup>[219]</sup>



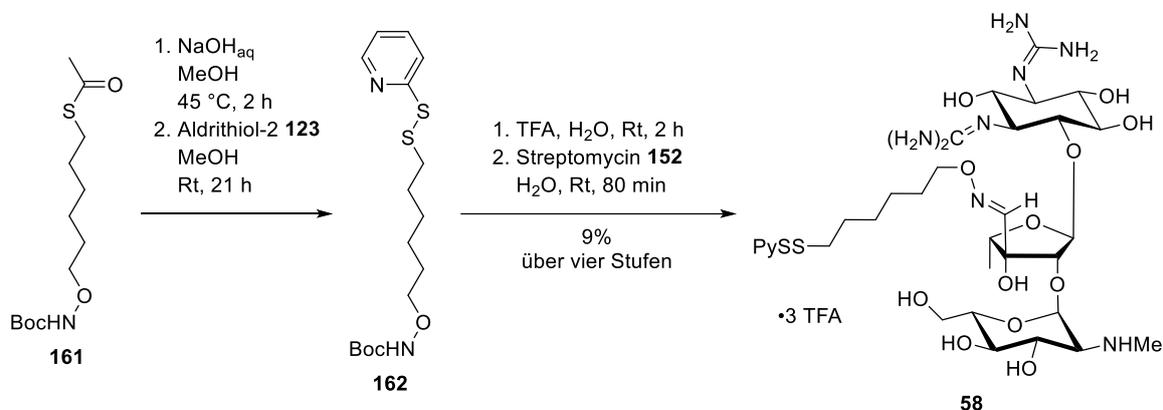
**Abb. 4.25** Zweite Synthesevariante zur Herstellung des Thiol-modifizierten Streptomycins **59**.

Nach Neutralisation mit Salzsäure und Extraktion des Zwischenproduktes mit Dichlormethan wurde das Lösungsmittel entfernt. Nach erneutem Lösen in Wasser wurde die Oxim-Ligation mit Streptomycin-Sulfat **152** durchgeführt. Über diese Route konnte das Streptomycin-Derivat **59** mit einer Ausbeute von 4% über drei Stufen nach HPLC-Reinigung erhalten werden. Eine Optimierung der Reaktionssequenz könnte durch einen Wechsel der Reihenfolge der Entschützungs-Reaktionen erfolgen. Das freie Thiol sollte unter sauren und sauerstofffreien

Bedingungen nur bedingt zur Disulfid-Bildung neigen, weswegen ein Vorziehen der Thioacetat-Spaltung eventuell die bessere Vorgehensweise wäre. Auf Grund der ausreichenden erhaltenen Substanzmengen für die Folgereaktionen wurde diese mögliche Optimierung allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

Das Hydroxylamin neigt im ungeschützten Zustand zur Hydrolyse und zu Nebenreaktionen.<sup>[219,220]</sup> Auch die Oxim-Bindung des erhaltenen Streptomycin-Derivats **59** zeigt eine Tendenz zur Hydrolyse. So entstand auch das Zersetzungsprodukt der Oxim-Bindung nach 24 Stunden während der Aufnahme der NMR-Spektren. Das durch die Spaltung der Oxim-Bindung freigesetzte Streptomycin **152** konnte im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum detektiert werden. Interessant ist hierbei, dass bei der ähnlichen Verbindung mit dem Azid-Linker **60** keine Zersetzung der Oxim-Bindung während den NMR-Messungen in einem ähnlichen Zeitraum beobachtet wurde. Genauere Untersuchungen zu den Stabilitäten dieser Verbindungen wurden in Kapitel 4.6.1.3 im Rahmen von Stabilitätstest durchgeführt. Die folgenden biologischen Testungen des Streptomycin-Derivats **59** wurden mit 10% des Zersetzungsproduktes, dem freigesetzten Streptomycin als Verunreinigung, durchgeführt (siehe Kapitel 4.6).

#### 4.2.4 Synthese des PySS-Linker-modifizierten Streptomycins **58**



**Abb. 4.26** Synthese des PySS-Linker-modifizierten Streptomycins **58**.

Mit einer modifizierten Vorschrift der Synthese des Thiol-Linkers ließ sich auch der S-aktivierte PySS-Linker **162** herstellen. Ausgehend von der Linker-Vorstufe **161** wurde die anschließende Esterspaltung zum freien Thiol und die Aktivierung mit Aldrithiol™-2 **123** in einer Reaktionssequenz ohne Reinigung des Zwischenprodukts durchgeführt, um erneut eine Disulfidbildung des entschützten Linkers **161** zu minimieren. Hierzu wurde das Thioacetat zunächst wieder mit Natriumhydroxid in Methanol gespalten. Im zweiten Schritt wurde dann eine methanolische

Lösung des freien Thiols zu Aldrithiol™-2 **123** in Methanol gegeben und für 21 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das erhaltene Produkt **162** konnte allerdings trotz versuchter säulenchromatographischer Reinigung nicht in Reinform erhalten werden und wurde im nächsten Schritt ohne weitere Reinigungsversuche umgesetzt. Zunächst erfolgte wieder die saure Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe durch Rühren der Verbindung bei Raumtemperatur für zwei Stunden in einer Lösung von TFA in Wasser. Nach dem Entfernen der Säure und des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde das Gemisch erneut in Wasser gelöst und mit Streptomycin-Sulfat **152** innerhalb von 80 Minuten bei Raumtemperatur zum Oxim **58** umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt konnte über semi-präparative HPLC erfolgreich gereinigt und **58** mit einer Ausbeute von 9% über vier Stufen erhalten werden.

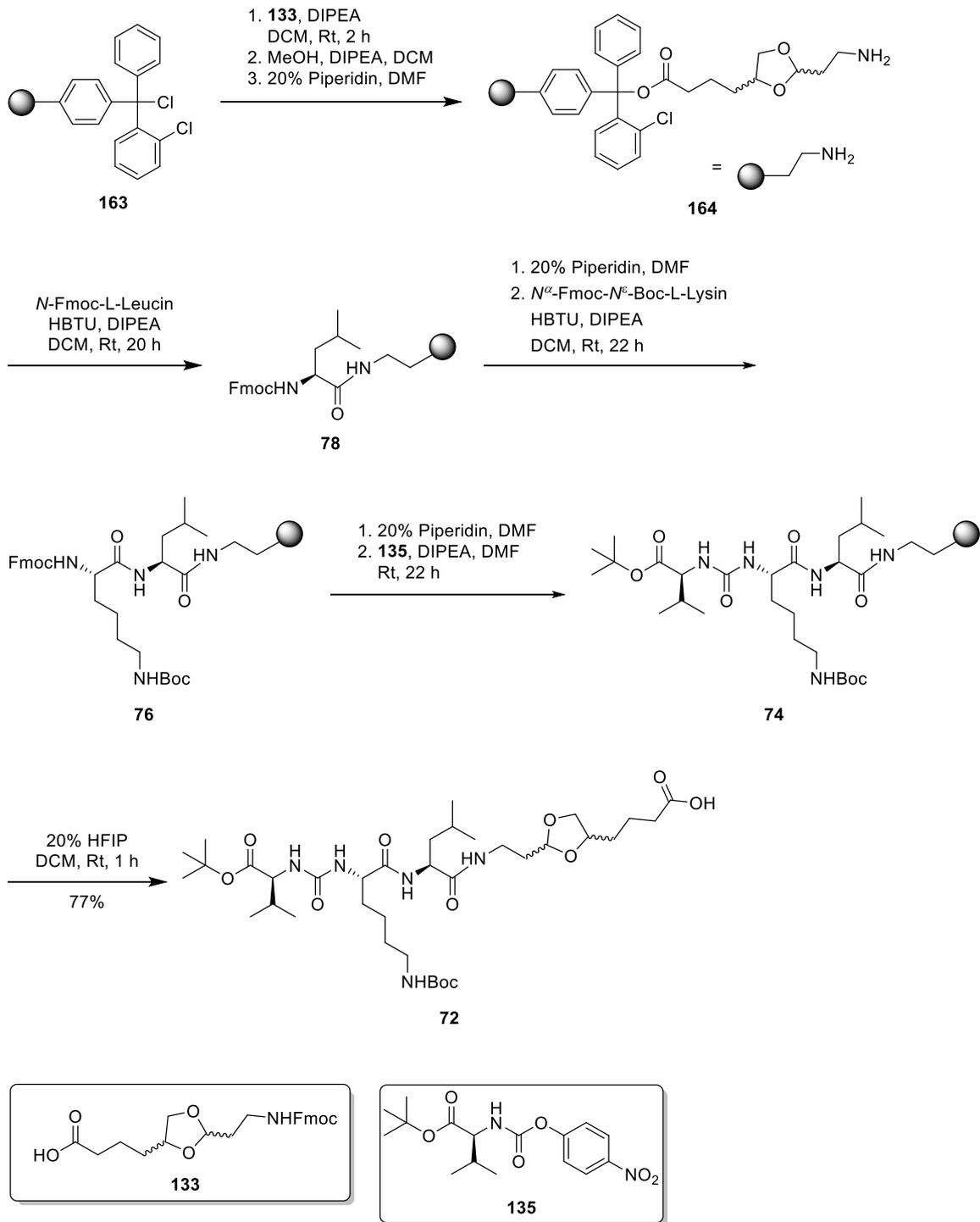
## 4.3 Synthese der Muraymycin-Vorstufen und -Referenzen

### 4.3.1 Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** über den Festphasen-gestützten Syntheseansatz

Das als Referenzverbindung und Vorstufe für die Konjugate der zweiten Serie benötigte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** wurde mittels einer optimierten Festphasen-gestützten und im Arbeitskreis etablierten Synthesemethode hergestellt.<sup>[94]</sup>

Die Festphasensynthesen wurden generell in Spritzen mit eingebauten Fritten durchgeführt und in jedem Reaktionsschritt bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Vorbereitung der Synthese wurde das 2-Chlortritylchlorid-Harz **163** zunächst zwei Stunden in Dichlormethan gequellt. Der Start der Festphasen-gestützten Synthese erfolgte mit der Anbringung des Linkers **133** an das 2-Chlortritylchlorid-Harz **163**. Zwischen jedem Reaktionsschritt erfolgte jeweils ein ausgiebiger Waschschrift, in dem der Festphasen-Ansatz mehrfach gründlich mit Dimethylformamid und Dichlormethan im Wechsel gewaschen wurde. Zum Abreagieren von nicht umgesetzten reaktiven Gruppen an der Harzoberfläche wurde dieses in einem Capping-Schritt mit einer Lösung aus Dichlormethan, Methanol und DIPEA (17:2:1) umgesetzt. Der Start der Kupplungssequenz erfolgte mit der ersten Fmoc-Entschützung mit 20% Piperidin in Dimethylformamid zum Produkt **164**.<sup>[221]</sup> Der Aufbau der Peptidkette an der Festphase wurde sukzessive mit den kommerziell erhältlichen Aminosäuren *N*-Fmoc-L-Leucin und *N*<sup>α</sup>-Fmoc-*N*<sup>ε</sup>-Boc-L-Lysin (Zwischenprodukte **78** und **76**) unter Verwendung von HBTU und DIPEA als Kupplungsreagenzien durchgeführt. Die Anzahl der verwendeten Äquivalente der Aminosäuren-Bausteine als auch der Kupplungsreagenzien konnte von sechs auf drei reduziert werden, wobei die Ausbeuten im Vergleich zu der publizierten Methode erhalten blieben.<sup>[94]</sup> Des Weiteren wurde auch jeder Kupplungsschritt nur noch einmal durchgeführt. Hierdurch konnte die Ökonomie der Reaktion immens gesteigert werden, was auch im Hinblick auf nicht-kommerziell erhältliche Aminosäuren einen erheblichen Vorteil darstellt. Im letzten Schritt wurde mit dem zuvor hergestellten Valin-Carbamat **135** (siehe Kapitel 4.1.8.2) und DIPEA das Harnstoffdipeptid-Motiv der Muraymycin-Peptidkette gebildet (Produkt **74**). Die Abspaltung der Carbonsäure **72** von der Festphase erfolgte mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluoropropanol (HFIP) in Dichlormethan unter Erhalt der verwendeten Schutzgruppen.<sup>[222]</sup> Die Abspaltung wurde zweimal durchgeführt und das Harz nach jedem Durchlauf gründlich mit Dichlormethan gewaschen, um eine vollständige Abspaltung zu gewährleisten. Das Diastereomeren-Gemisch des Produktes **72** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer sehr guten Ausbeute von 77% über alle Peptidbildenden Stufen erhalten werden.

#### 4. Resultate und Diskussion

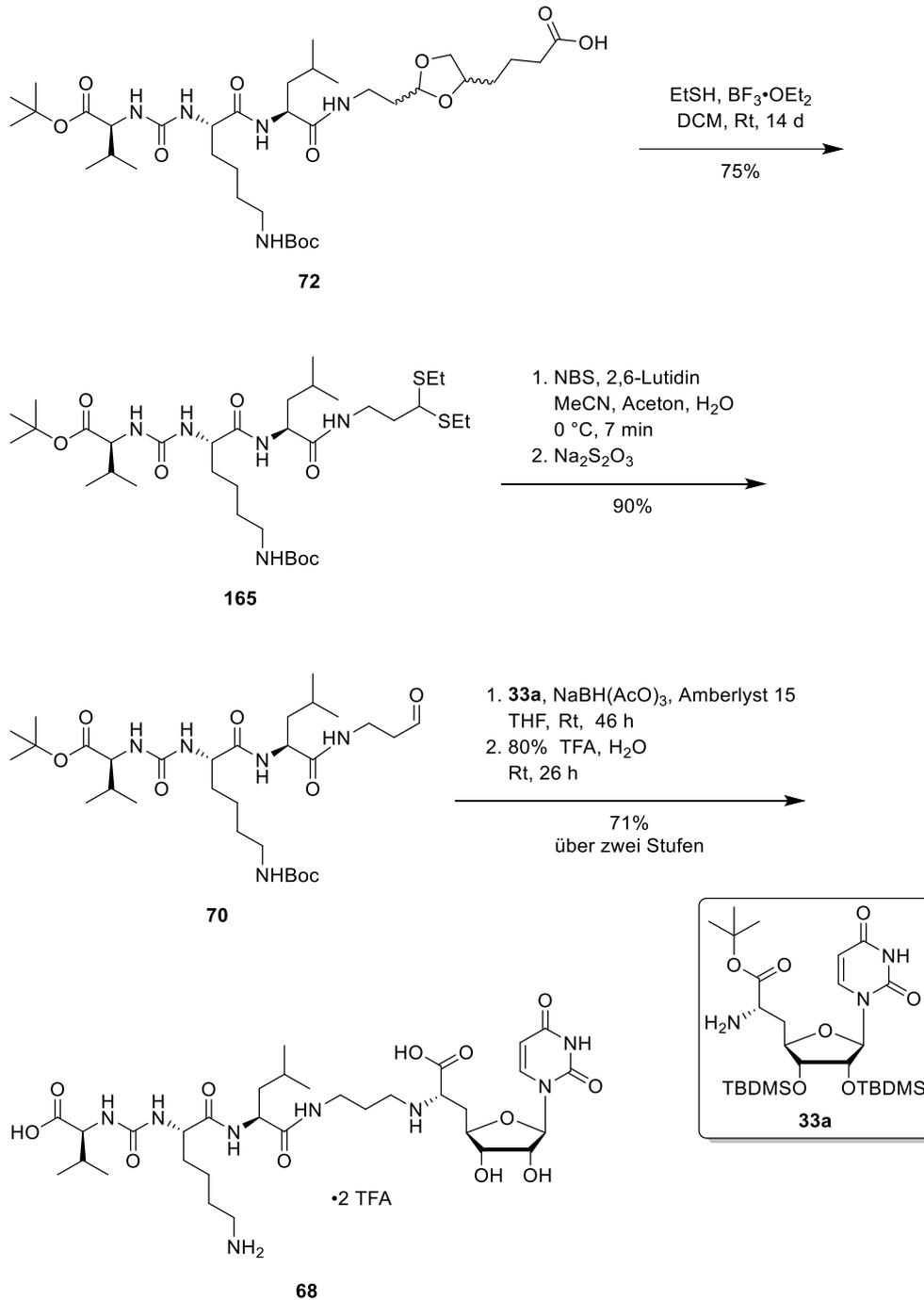


**Abb. 4.27** Festphasen-gestützte Synthese der Peptid-Einheit **72**.

Die Auswertung der NMR-Spektren gestaltete sich auf Grund des erhaltenen Diastereomeren-Gemisches schwierig, weswegen lediglich ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum als auch ein Massenspektrum zur Identifikation des Abspaltungs-Produktes **72** herangezogen wurden. Um eine Aussage zu einer möglichen Epimerisierung in der hergestellten Peptidkette treffen zu können, musste

auf die Analytik des Produktes **165** der nächsten Synthesestufe nach der Abspaltung des Dioxolan-Linkers gewartet werden. Eine eventuell auftretende Epimerisierung würde bei **72** durch die bereits vorhandenen Stereoisomere des Dioxolan-Linkers überdeckt werden. Zur Herstellung des Dithioacetals **165** wurde die Carbonsäure **72** zunächst in Dichlormethan gelöst, Ethanthiol zugegeben und im Anschluss langsam eine mit Dichlormethan verdünnte Bortrifluorid-Diethyletherat-Lösung zugetropft. Nach einer langen Reaktionszeit von 14 Tagen bei Raumtemperatur wurde DIPEA zur Neutralisation des Bortrifluorid-Diethyletherats zugegeben und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Als Nebenreaktion läuft in dieser Synthesestufe parallel immer zu einem gewissen Maße eine Abspaltung der *N*-Boc- und der *tert*-Butylester-Schutzgruppen ab, die sich mittels DC-Kontrolle verfolgen lässt. Die Kombination aus einer höheren Verdünnung von Bortrifluorid-Diethyletherat und einer längeren Reaktionsdauer führten hier zum besten Ergebnis. Weder im  $^1\text{H}$ - noch im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum waren Hinweise auf eine Epimerisierung innerhalb der Peptidkette zu finden. Dies deckt sich auch mit den bisherigen Ergebnissen von K. Leyerer.<sup>[103]</sup>

Im nächsten Schritt wurde der Aldehyd **70** aus dem Dithioacetal **165** generiert. Das Dithioacetal **165** wurde hierzu zunächst in einer Acetonitril-Wasser-Aceton-Mischung vorgelegt, auf 0 °C gekühlt, mit 2,6-Lutidin als Base versetzt und letztendlich nach Zugabe von *N*-Bromsuccinimid für sieben Minuten bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Natriumthiosulfat-Lösung gestoppt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte der Aldehyd **70** mit einer sehr guten Ausbeute von 90% erhalten werden. Der Aldehyd **70** konnte dann nachfolgend mit dem Nucleosid-Baustein **33a** in einer reduktiven Aminierung zum vollständigen Muraymycin-Grundgerüst umgesetzt werden. Beide Edukte wurden hierfür in absolutem Tetrahydrofuran vorgelegt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von frisch aktiviertem Molekularsieb sollte entstehendes Wasser gebunden und das Gleichgewicht in Richtung der Produktseite verschoben werden. Ein Ausschluss von Wasser ist für diese Reaktion ein entscheidendes Kriterium, um das Gleichgewicht auf die Produktseite zu verlagern, weswegen die Glasapparaturen vor Reaktionsbeginn besonders sorgfältig unter Vakuum ausgeheizt und getrocknet wurden.

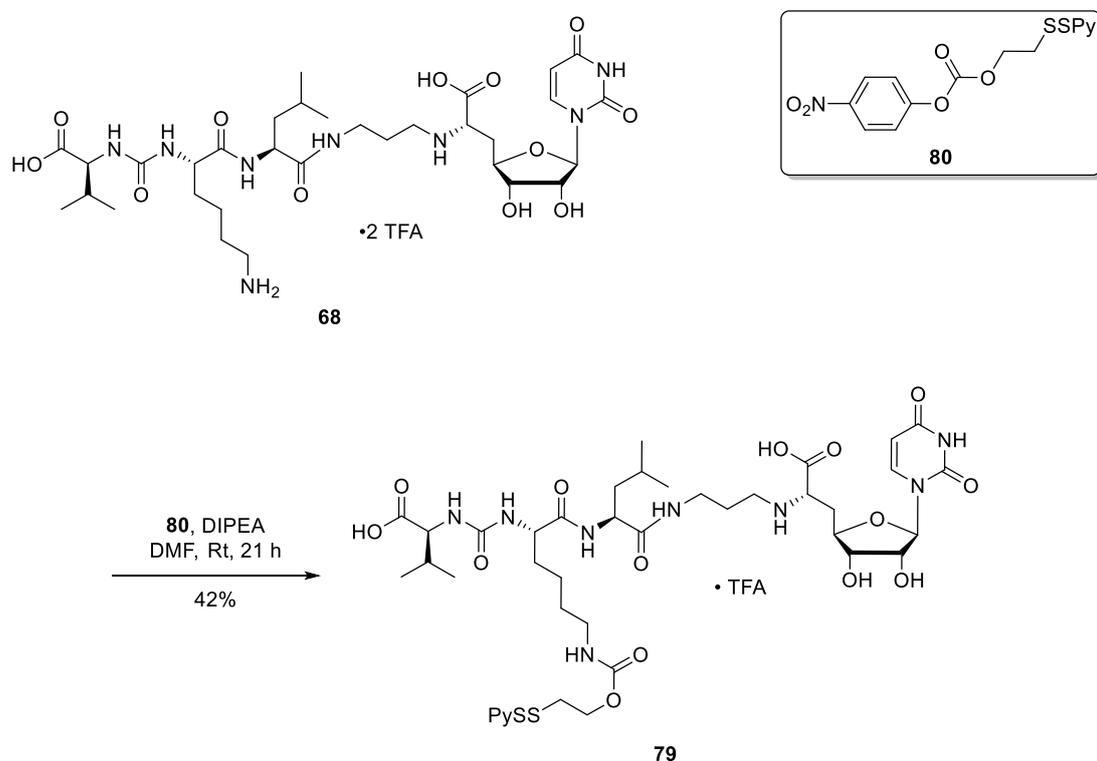


**Abb. 4.28** Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycins-Analogons **68**.

Nach einem Tag wurden das Reduktionsmittel Natriumtriacetoxyborhydrid und Amberlyst 15 als Säure zugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 24 Stunden gerührt. Eine weitere potentielle Fehlerquelle dieser Reaktion stellt das Natriumtriacetoxyborhydrid dar, welches nach längerer Lagerung zerfällt und Essigsäure freisetzt. Natriumtriacetoxyborhydrid wurde deswegen unter Schutzgas gelagert und vor dem Einsatz in der Reaktion mehrere Tage im Vakuum getrocknet. Nach Säulenchromatographie wurde das vollständig geschützte 5'-Desoxy-

Muraymycin-Analogon erhalten und direkt weiter in der globalen Entschützungs-Reaktion umgesetzt. Die globale saure Entschützung zum 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** erfolgte nach Standard-Prozedur mit 80%iger TFA-Lösung in Wasser bei Raumtemperatur. Nach 26 Stunden wurde das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Die Reinigung der Verbindung **68** erfolgte über semi-präparative HPLC, und das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 71% über beide Schritte als zweifaches TFA-Salz erhalten werden.

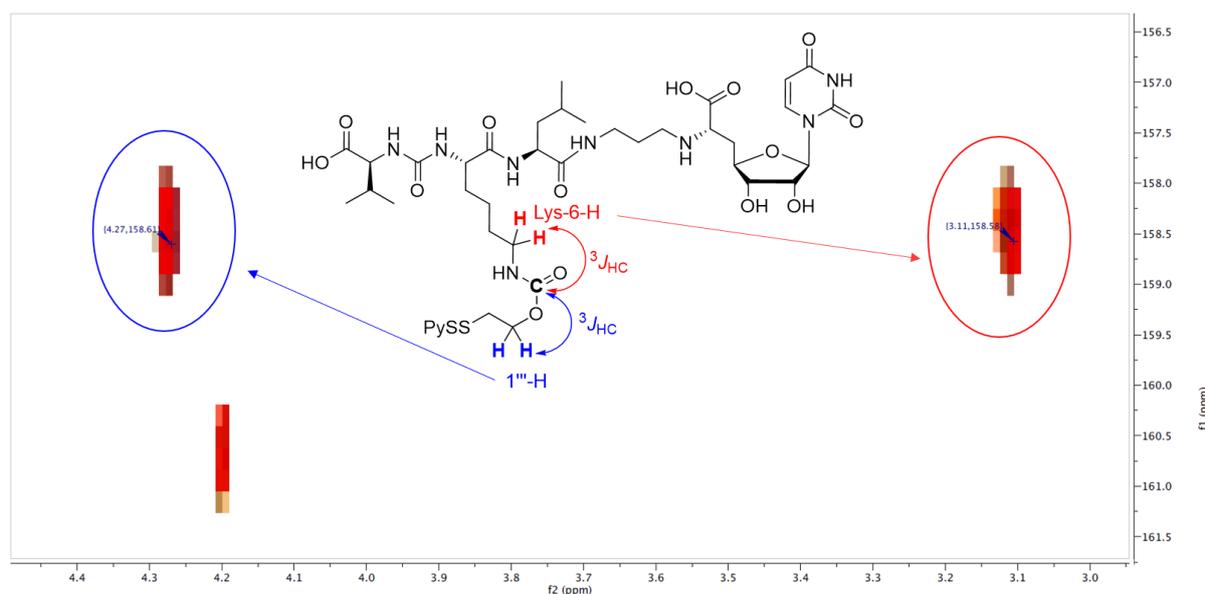
#### 4.3.2 Synthese des PySS-Carbamat-Linker-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **79**



**Abb. 4.29** Synthese des Linker-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **79**.

Die Modifikation des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** erfolgte mit dem 4-Nitrophenyl-2-(pyridin-2-yl)ethylcarbonat-Linker **80** in leichtem Überschuss und mit DIPEA als Base in absolutem Dimethylformamid bei Raumtemperatur.<sup>[183]</sup> Nach einer Reaktionszeit von 21 Stunden wurde das Lösungsmittel entfernt, und nach Reinigung über semi-präparative HPLC konnte die Muraymycin-Konjugat-Vorstufe **79** mit einer Ausbeute von 42% erhalten werden. Mit dieser Reaktionsführung ist auch eine Derivatisierung der sekundären 6'-Aminogruppe der Nucleosid-Einheit anstelle der primären  $\epsilon$ -Aminogruppe des L-Lysins prinzipiell denkbar. Jedoch war bereits bekannt, dass das sekundäre 6'-Amin sterisch schwerer

zugänglich für Modifikationen ist.<sup>[93]</sup> Zur Validierung der Struktur wurde diese mittels NMR-Spektroskopie überprüft. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum und das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum gaben wenig Aufschluss über die Position der Anknüpfung des Linkers. Mit der Durchführung eines HMBC-NMR-Experiments konnte die erwartete Struktur jedoch bestätigt werden. Die  $^3J_{\text{HC}}$ -Kopplung zwischen dem Lysin-6-H und dem Carbonyl-C-Atom des angebrachten Linkers konnte hier detektiert werden (siehe Abb. 4.30).



**Abb. 4.30** Ausschnitt des HMBC-NMR-Spektrums des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **79**.

#### 4.3.3 Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **65**

Das DAP-haltige 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **65** wurde auf zwei Arten hergestellt. Einerseits wurde Verbindung **65** mittels der bereits zuvor beschriebenen Festphasen-gestützten Synthesemethode, andererseits auch mit einer klassischen Synthese in Lösung generiert. Die Synthese des DAP-haltigen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **65** war bisher noch nicht über den Festphasen-gestützten Ansatz durchgeführt worden und dies sollte im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden. Die klassische Synthese in Lösung erfolgte ausgehend vom dem Nucleosid-Baustein **33a** mit dem sukzessiven Aufbau der Muraymycin-Peptidkette. Es sollte ein Vergleich der beiden Syntheseverfahren hinsichtlich der erzielten Ausbeuten und eventueller Epimerisierung durchgeführt werden.

#### 4.3.3.1 Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 65 über den Festphasen-gestützten Syntheseansatz

Die Synthese wurde analog zu der zuvor beschriebenen Festphasen-gestützten Synthese in Kapitel 4.3.1 durchgeführt.

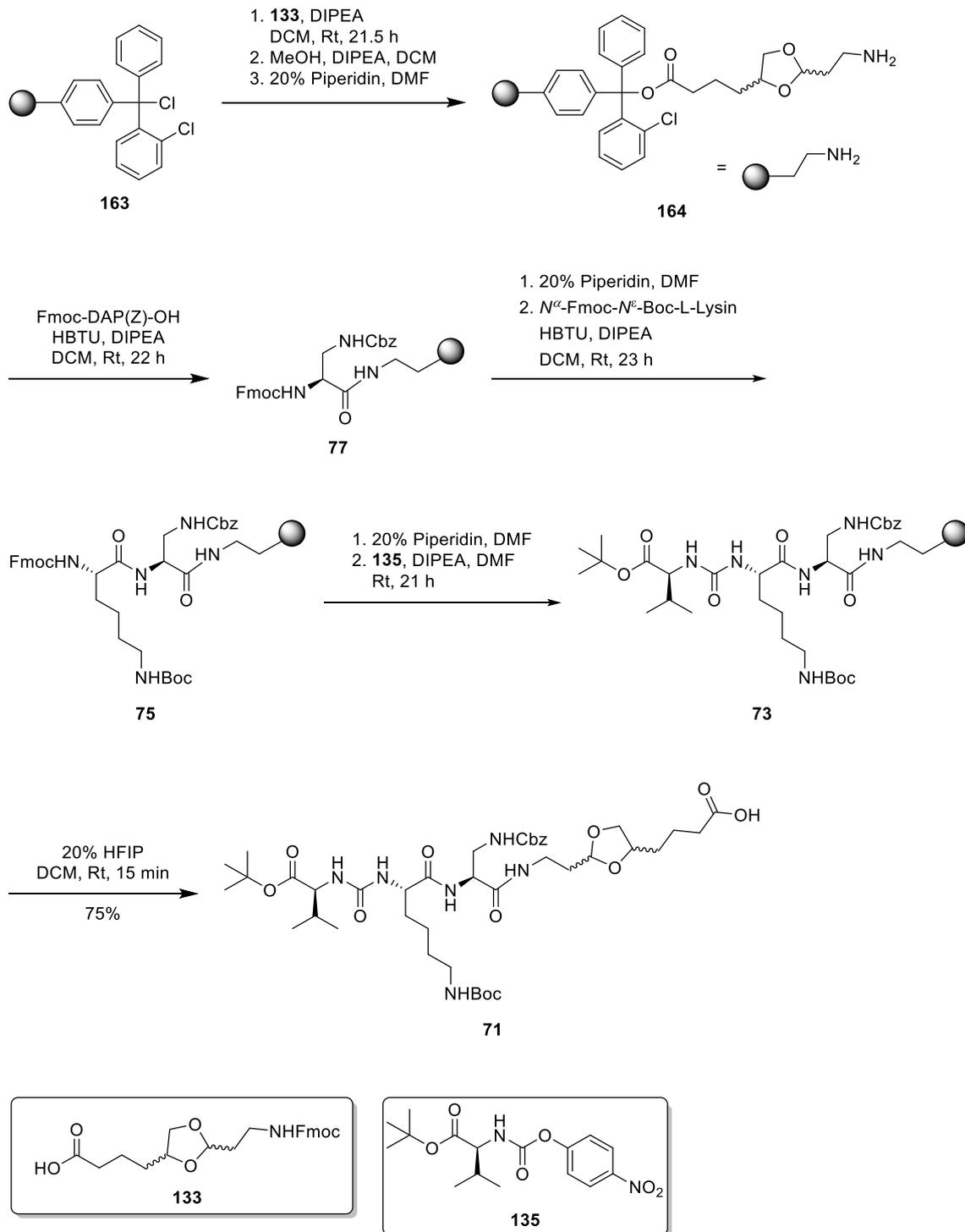


Abb. 4.31 Festphasen-gestützte Synthese der Peptid-Einheit **71**.

Der Aufbau der Peptidkette an der Festphase erfolgte sukzessive mit den kommerziell erhältlichen Aminosäuren  $N^\alpha$ -Fmoc- $N^\beta$ -Cbz-L-2,3-diaminopropionsäure (Fmoc-DAP(Z)OH),  $N^\alpha$ -Fmoc- $N^\epsilon$ -Boc-L-Lysin und dem zuvor hergestellten Valin-Carbamat **135**. Die Kupplungsschritte wurden einmalig mit drei Äquivalenten der Aminosäuren als auch des Kupplungsreagenzes HBTU durchgeführt. Die Base DIPEA wurde jeweils mit sechs Äquivalenten eingesetzt. Die Abspaltungen der Fmoc-Schutzgruppen erfolgten auch hier mit 20% Piperidin in DMF. Nach der ersten Entschützung zu **164** erfolgte zunächst die Peptidkupplung mit Fmoc-DAP(Z)OH zu **77**. Nach erneuter Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde die zweite Peptidkupplung mit  $N^\alpha$ -Fmoc- $N^\epsilon$ -Boc-L-Lysin zu **75** durchgeführt. Das Valin-Carbamat **135** wurde hier nur mit 2.5 Äquivalenten eingesetzt, um mehr von der nicht kommerziell erhältlichen Substanz einzusparen. Nach der Abspaltung vom Festphasen-Harz, die erneut mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluoropropanol in Dichlormethan durchgeführt wurde, und Reinigung über Säulenchromatographie konnte die Val-Lys-DAP-Carbonsäure **71** mit einer zur Synthese der Val-Lys-Leu-Carbonsäure **72** (77%) vergleichbaren Ausbeute von 75% erhalten werden. Auch hier konnte wegen des Diastereomeren-Gemisches zunächst keine Aussage über eine eventuelle Epimerisierung in der Peptidkette getroffen werden, und das Dioxolan **71** wurde wie bereits zuvor beschrieben in das Dithioacetal **166** überführt. Im Unterschied zur vorherigen Synthese des L-Leucin-haltigen Dithioacetals **165** wies die Synthese mit der DAP-haltigen Peptidkette aus bisher nicht geklärten Gründen eine weitaus höhere Empfindlichkeit für eine unerwünschte Abspaltung der *N*-Boc- und *tert*-Butyl-Schutzgruppen durch das Bortrifluorid-Diethyletherat auf. Aus diesem Grund wurde hier mit einer höheren Verdünnung des Bortrifluorid-Diethyletherats gearbeitet, um diese Nebenreaktionen zu begrenzen. In einem Ansatz konnte das Dithioacetal **166** bereits nach sechs Tagen mit 77% Ausbeute erhalten werden. In weiteren, zuvor durchgeführten Ansätzen kam es allerdings teilweise auch zu einer kompletten Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen. Der Wechsel des mittleren Aminosäure-Bausteins von L-Leucin zur L-Diaminopropionsäure hatte keinen Einfluss auf das Epimerisierungs-Verhalten der Reaktion an der Festphase, und in den NMR-Spektren konnte nur das gewünschte Stereoisomer der Verbindung identifiziert werden. Die Vorgehensweise bei der Umwandlung des Dithioacetals **166** zum Aldehyd war auch hier wieder identisch zu der in Kapitel 4.3.1 durchgeführten Synthese des Val-Lys-Leu-Aldehyds **70**. Der Aldehyd der Val-Lys-DAP-Peptidkette **69** wurde hier mit einer guten Ausbeute von 73% erhalten. Die Verbindung **69** wurde dann im letzten Schritt in einer reduktiven Aminierung, erneut analog zur vorherigen Vorgehensweise, mit dem Nucleosid-Baustein **33a** zum geschützten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **65** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer

Reinigung des Rohprodukts wurde das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **65** mit einer sehr guten Ausbeute von 88% erhalten.

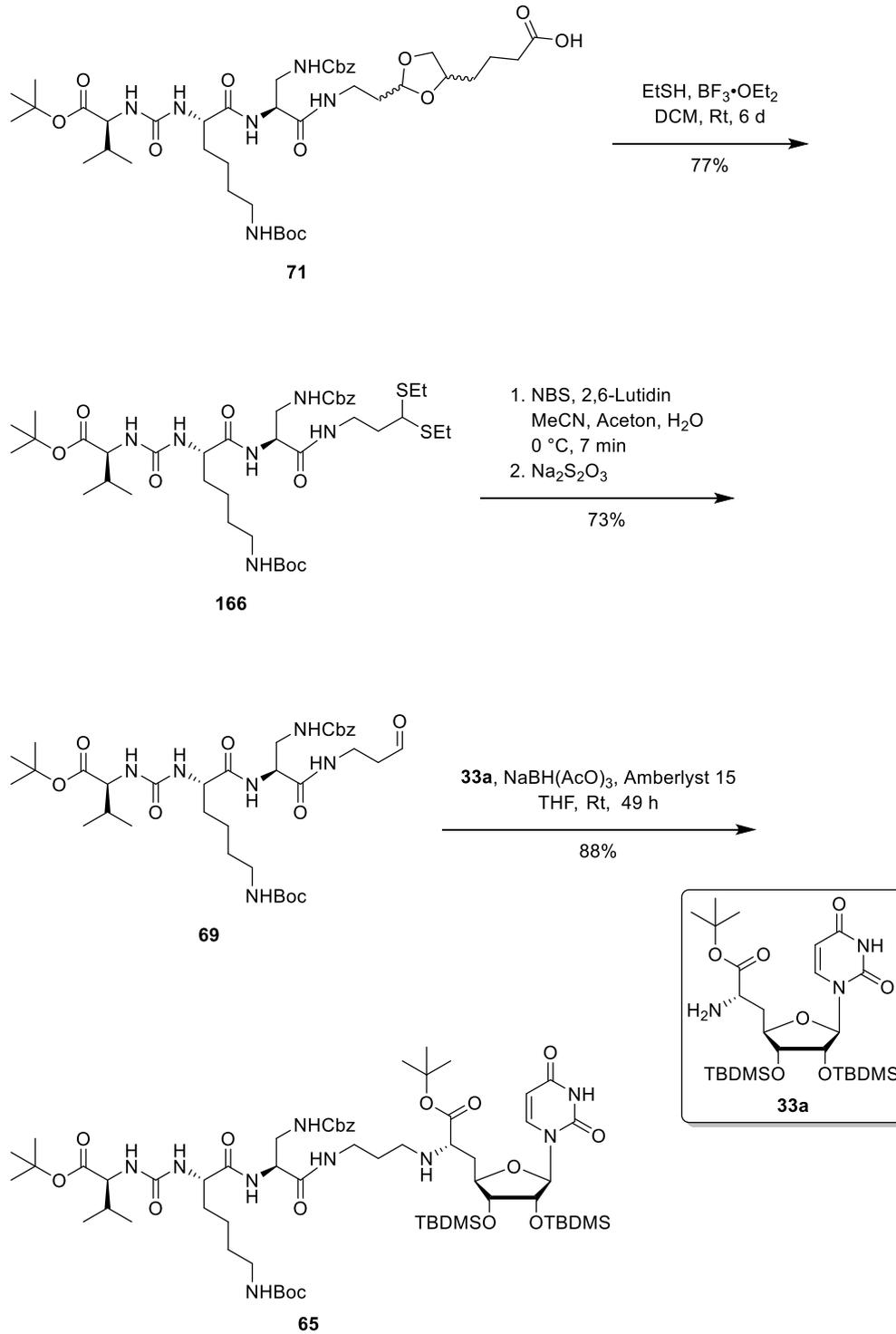
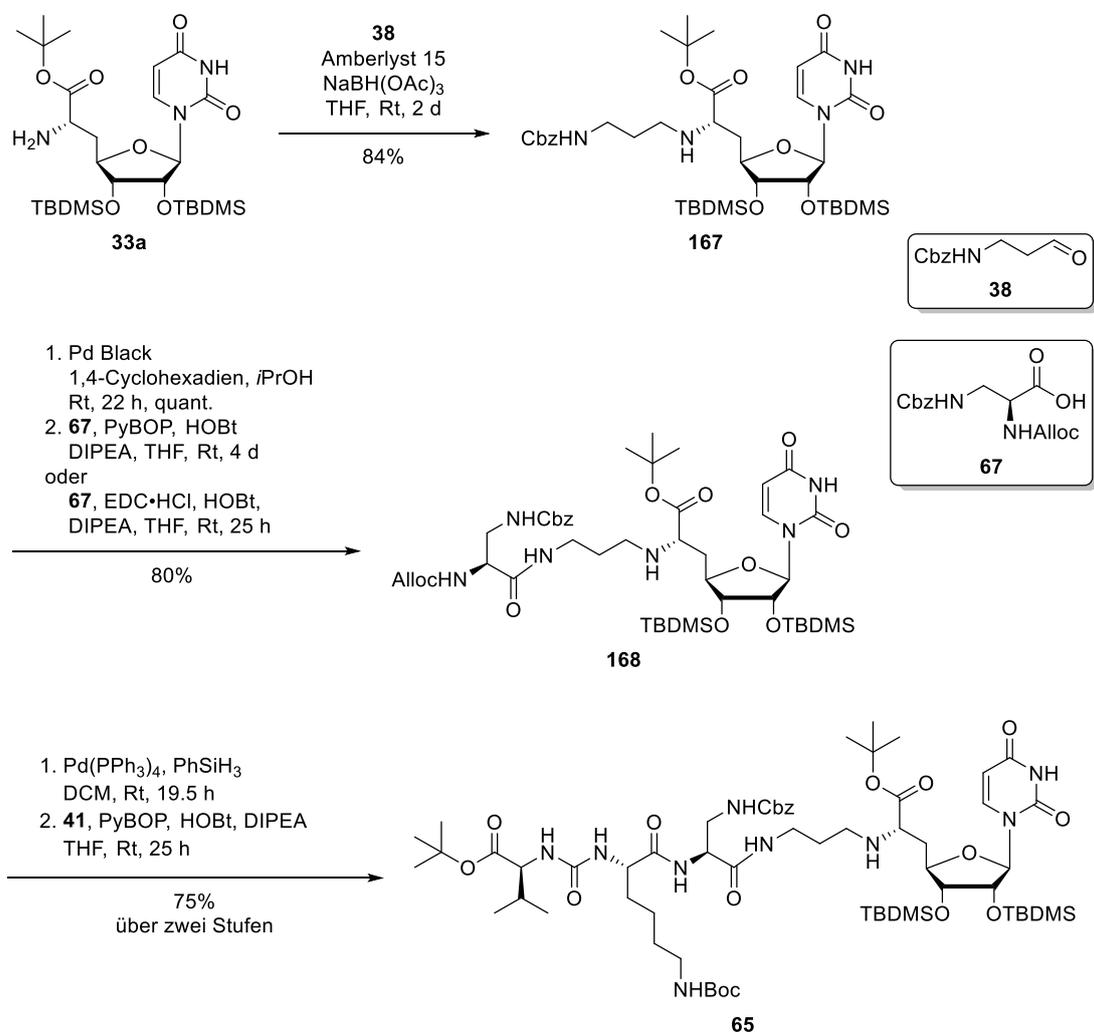


Abb. 4.32 Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **65**.

4.3.3.2 Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **65** in Lösung

Die Herstellung der Verbindung **65** in Lösung erfolgte ausgehend von dem Amin-entschützten Nucleosid-Baustein **33a** mittels einer im Arbeitskreis etablierten Synthesemethode.<sup>[89]</sup>



**Abb. 4.33** Synthese des geschützten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **65** in Lösung.

Die reduktive Aminierung mit dem Aminopropyl-Linker **38** wurde mit leichtem Überschuss des Nucleosid-Bausteins **33a** durchgeführt. Ansonsten erfolgte die Durchführung der Reaktion mit den gleichen Maßnahmen zur Minimierung des Wassergehaltes wie bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben. Nach einer Reaktionsdauer von 24 Stunden wurden das frisch getrocknete Reduktionsmittel Natriumtriacetoxyborhydrid und Amberlyst 15 als Säure zugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Nucleosylamino-säure **167** konnte mit einer Ausbeute von bis zu 84% nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten werden. Aufgrund der hohen Wasserempfindlichkeit dieser Reaktion und der

Tendenz des sterisch weniger anspruchsvollen Aminopropyl-Linkers **38** zur doppelten reduktiven Aminierung an der 6'-Amino-Gruppe wurde eine Ausbeute in dieser Größenordnung allerdings nicht immer erreicht. Das Nebenprodukt durch die zweifache Reaktion des Aminopropyl-Linkers **38** mit dem Nucleosid **33a** wurde in den Massenspektren durch Detektion eines zweiten Signals mit einer Masse von  $m/z = +191$  in manchen Ansätzen beobachtet. Das Nebenprodukt konnte zwar säulenchromatographisch abgetrennt werden, führte jedoch zu einer schlechteren Ausbeute bei den betreffenden Ansätzen. Nach Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe mit Palladium Black und 1,4-Cyclohexadien in absolutem *iso*-Propanol wurde die Verbindung **39** nach Spritzenfiltration quantitativ erhalten und ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Peptidkupplung mit der Diaminopropionsäure **67** umgesetzt. Diese Peptidkupplung wurde auf zwei Arten durchgeführt: als Kupplungsreagenzien wurden PyBOP oder EDC-Hydrochlorid, jeweils in Kombination mit HOBt und DIPEA, in absolutem Tetrahydrofuran getestet. Die Synthesevariante mit dem Kupplungsreagenz PyBOP wurde nach einer Reaktionszeit von vier Tagen beendet, als über die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie und LC-MS keine Edukte mehr nachweisbar waren. Das entstehende Nebenprodukt des PyBOP-Reagenzes, das Tris-(pyrrolidin)phosphinoxid, konnte in dieser ersten Variante säulenchromatographisch an Kieselgel nicht abgetrennt werden. Das Nebenprodukt hat zwar keine negativen Auswirkungen auf die nächsten Reaktionsschritte, jedoch war eine vollständige Charakterisierung der Verbindung so nicht möglich. Deswegen wurde in einem weiteren Ansatz das Kupplungsreagenz gegen EDC-Hydrochlorid getauscht. Nach einer erheblich kürzeren Reaktionszeit von 25 Stunden konnte die Verbindung **168** nach anschließender säulenchromatographischer Reinigung mit 80% (über zwei Stufen von **167**) in einer guten Ausbeute erhalten und vollständig charakterisiert werden.

Die Allyloxycarbonyl-Entschützung der verkürzten Muraymycin-Verbindung **168** erfolgte mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) als Katalysator unter Lichtausschluss in Dichlormethan.<sup>[223]</sup> Phenylsilan wurde als Scavenger zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 19.5 Stunden bei Raumtemperatur wurde kein Alloc-geschütztes Edukt mehr über LC-MS-Reaktionskontrolle nachgewiesen und die Reaktion beendet. Beim Versuch der säulenchromatographischen Reinigung konnte das Produkt **66** jedoch nicht in Reinform erhalten werden, und die versuchte Reinigung des freien Amins ging zudem mit einem erheblichen Materialverlust einher. Deswegen wurde in darauffolgenden Ansätzen auf eine Reinigung dieser Stufe komplett verzichtet und das Produktgemisch der Entschützung direkt in der nachfolgenden Peptidkupplung eingesetzt. Die Peptidkupplung mit dem Harnstoffdipeptid **41** erfolgte mit PyBOP, HOBt und DIPEA als Kupplungsreagenzien in absolutem Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur. Nach einem Tag

Rühren und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Kupplungsprodukt **65** durch diese Vorgehensweise mit einer guten Ausbeute von 75% über beide Stufen erhalten werden.

### 4.3.3.3 Vergleich der Festphasen-gestützten Synthesen der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga zur Synthese in Lösung

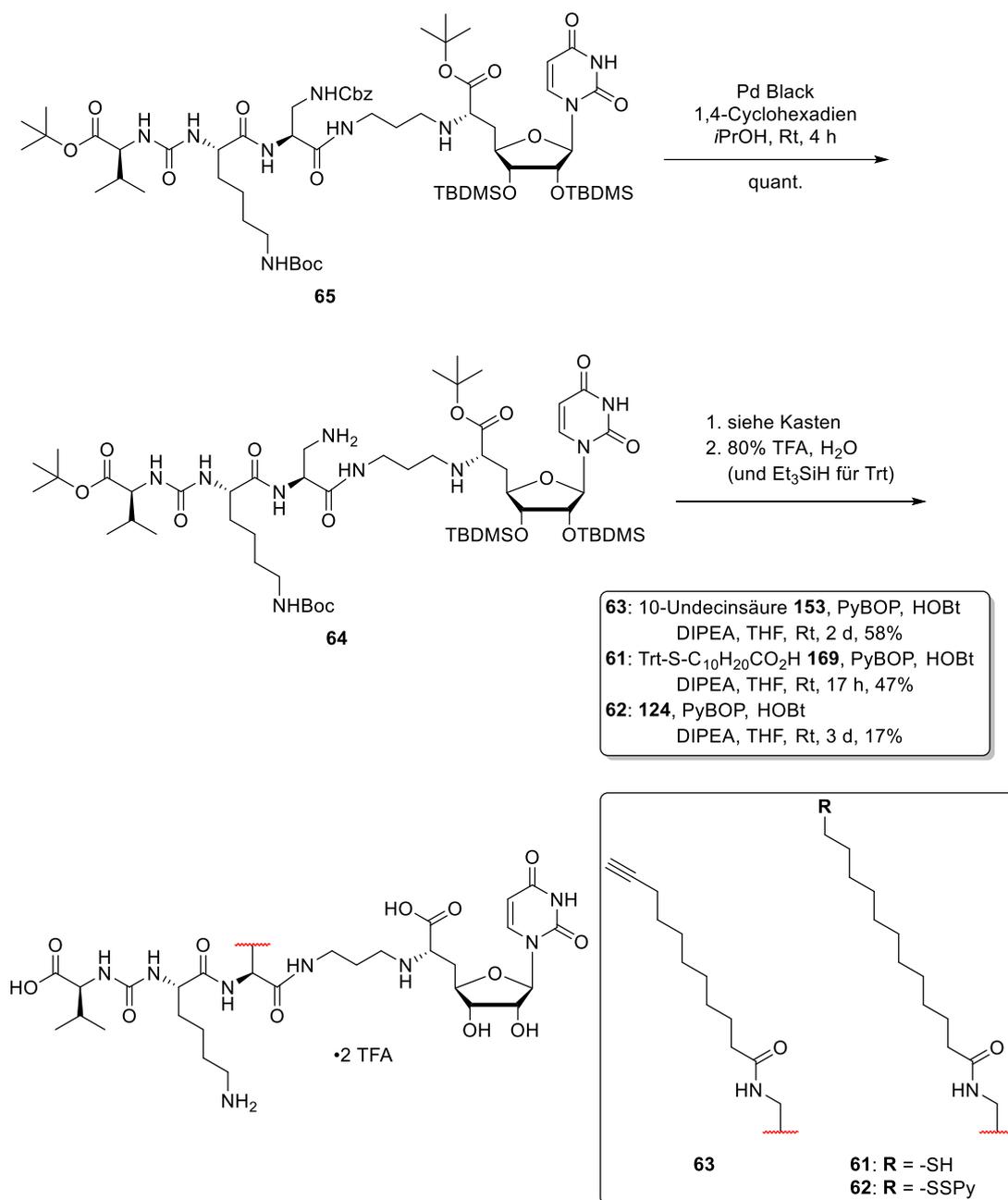
Im Vergleich zur klassischen Synthese der Muraymycin-Grundstruktur in Lösung bietet die Festphasen-gestützte Synthesevariante einige Vorteile. Eine Voraussetzung für die Verwendung der Festphasen-gestützten Synthese ist, dass alle oder wenigstens der Großteil der eingesetzten Aminosäuren der aufzubauenden Peptidkette kommerziell erhältlich sind, da diese an der Festphase im Überschuss eingesetzt werden müssen. Dieser Umstand konnte in dieser Arbeit zwar auch optimiert werden, aber ein Überschuss der Aminosäure-Bausteinen ist nichtsdestotrotz bei den jeweiligen Kupplungsschritten notwendig, um einen vollständigen Umsatz zu gewährleisten. Im Falle von nicht-proteinogenen Aminosäuren, die zum Teil auch unter hohem Arbeitsaufwand hergestellt werden müssen, ist diese Methode daher eher kritisch zu betrachten und nur für spezielle Anwendungen zu empfehlen. Darunter fällt zum einen der Versuch der Vermeidung einer Epimerisierung, wie es beispielsweise auch bei der Peptidkupplung von Epicapreomycin mit einem DAP-haltigen Muraymycin bei der Synthese in Lösung auftrat (nicht veröffentlichte Ergebnisse). Mit der Festphasenmethode ist es generell möglich, größere Substanzmengen in kürzerer Zeit zu generieren. Allerdings ist es bis zu der Abspaltung der Peptidkette von dem Harz nicht möglich, eine praktikable Reaktionskontrolle durchzuführen.<sup>[103]</sup> Die Festphasensynthesen liefen im Rahmen dieser Arbeit jedoch in allen Ansätzen sehr robust und mit durchweg guten Ausbeuten ab. Ein weiterer großer Vorteil der Festphasensynthese ist die erst späte Durchführung der reduktiven Aminierung mit dem Nucleosid-Baustein **33a**. Die Synthese des Nucleosid-Bausteins **33a** ist mit erheblichem Aufwand verbunden und die späte Kupplung an die vollständige Peptidkette führt im Laufe dieser Reaktionssequenz, auf Grund der geringeren Anzahl an folgenden Syntheseschritten, zu insgesamt weniger Substanzverlust. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass durch die längeren Peptidketten die Nebenreaktion der zweifachen reduktiven Aminierung, die oft bei der Verwendung der kürzeren Aminopropyl-Linker **45** und vor Allem **38** (siehe Kapitel 4.3.3.2) auftrat, hier nicht stattfand. Ein weiterer Nachteil der Synthese an der Festphase ist jedoch, dass sowohl der Linker **133** zur Kupplung an das Harz als auch das Valin-Carbamat **135** vor der eigentlichen Synthese zunächst hergestellt werden müssen. Allerdings ist die Synthese dieser beiden Komponenten im Gesamtvergleich zur klassischen Synthese der Muraymycin-Analoga

in Lösung vernachlässigbar und der Arbeitsaufwand mit der Festphase auch in Anbetracht dessen deutlich geringer. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass für die vereinfachten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **68** und in diesem Fall das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **65** die Festphasensynthese eine sehr gute Methode darstellt, um effizient und schnell die Peptidketten der Muraymycin-Analoga aufzubauen.

Eine zusätzliche Verbesserung könnte bei der Festphasensynthese-Route ein Wechsel der Schutzgruppenstrategie mit sich bringen. Durch einen Wechsel der  $N^{\epsilon}$ -Boc-Schutzgruppe des L-Lysins zu einer Cbz-Schutzgruppe könnte die Empfindlichkeit gegenüber der Reaktion mit Bortrifluorid-Diethyletherat umgangen werden. Trotz des zusätzlichen Syntheseschrittes der Cbz-Entschützung könnte durch dieses Vorgehen die Ausbeute in der Gesamtbilanz eventuell verbessert werden, da eine Abspaltung der Boc-Gruppe mit Bortrifluorid-Diethyletherat immer zu einem gewissen Teil als Nebenreaktion abläuft. Ein anderer Schritt zur Optimierung der Synthese wäre längerfristig ein kompletter Wechsel des Aminosäuren-Bausteins von L-Lysin zu L-Arginin, welches mit einer Pbf-Gruppe geschützt ist. Bei dem Muraymycin-Derivat mit L-Arginin handelt es sich auch um eine aktivere Muraymycin-Spezies, die näher an der Struktur des Epicapreomycidin-Bausteins der Naturstoffe ist. Zudem wäre durch die Verwendung der Pbf-Schutzgruppe auch das Risiko der Abspaltung durch Bortrifluorid-Diethyletherat im Vergleich zur Boc-Gruppe erheblich vermindert.

#### 4.3.4 Seitenketten-Modifikationen des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **65**

Zur Seitenketten-Modifikation der Muraymycin-Grundstruktur **65** wurde zunächst die  $N^{\beta}$ -Cbz-Entschützung der Seitenkettenposition der Diaminopropionsäure-Einheit durchgeführt. Die Cbz-Entschützung erfolgte auch an dieser Position wieder mit Palladium Black und 1,4-Cyclohexadien in absolutem *iso*-Propanol, um mögliche Nebenreaktionen zu vermeiden. Die Muraymycin-Grundstruktur wurde nachfolgend mit drei verschiedenen Seitenketten modifiziert: es kam jeweils eine unverzweigte Alkylseitenkette, die entweder terminal mit einem Alkin, einem Thiol oder einem aktivierten Thiol versehen war, zum Einsatz. Die 10-Undecinsäure **153** und die 11-Tritylmercaptoundecansäure **169** waren kommerziell erhältlich. Die 11-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)undecansäure **124** wurde wie in Kapitel 4.1.6 beschrieben hergestellt. Die Synthesen der drei Seitenketten-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **63**, **61** und **62** ist in Abbildung 4.34 zusammengefasst.



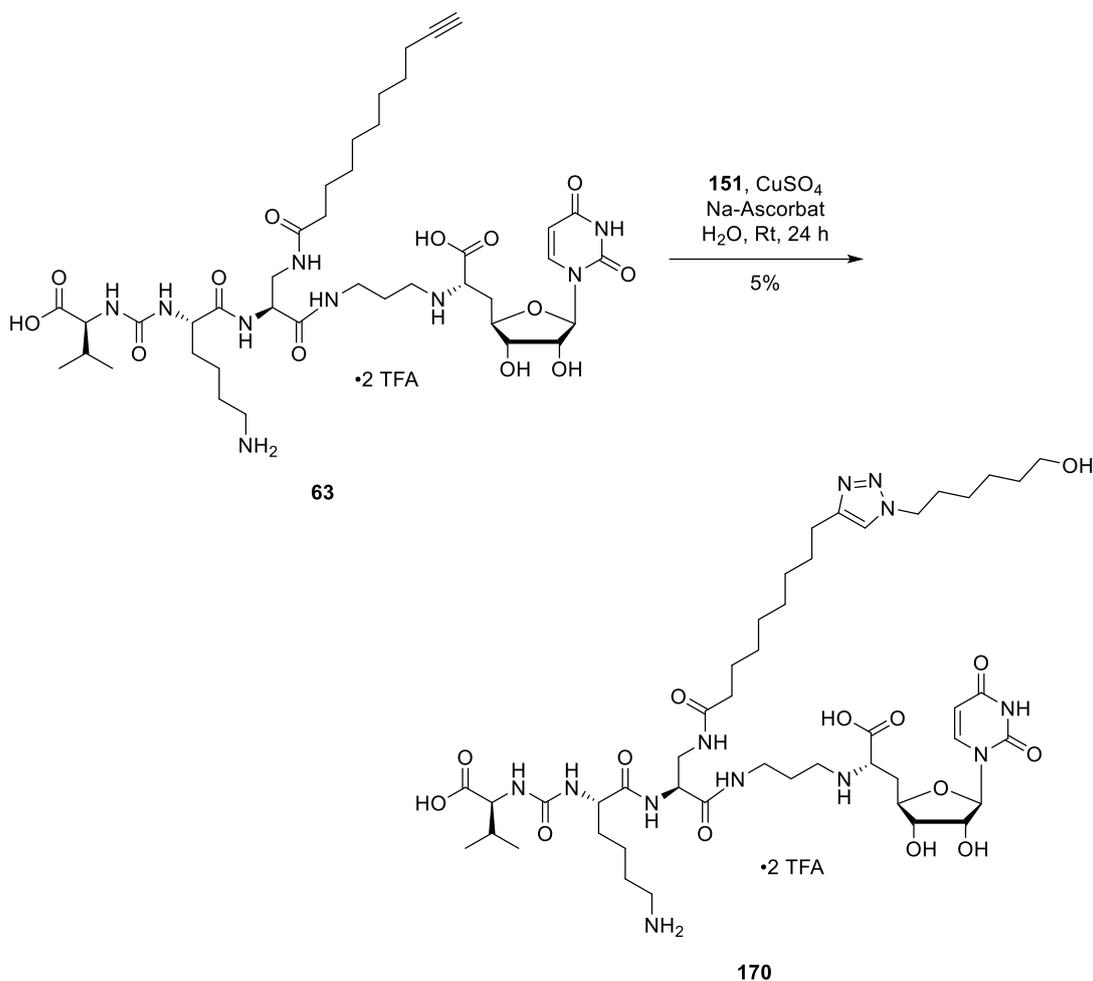
**Abb. 4.34** Seitenketten-Modifikationen des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **65**.

Die Cbz-Entschützung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **65** erfolgte mit Palladium Black und 1,4-Cyclohexadien in *iso*-Propanol bei Raumtemperatur. Nach einer Reaktionszeit von vier Stunden wurde das Produkt **64** durch Spritzenfiltration in quantitativer Ausbeute isoliert. Das Alkin-modifizierte Muraymycin-Analogon **63** wurde in einer Peptidkupplung mit der kommerziell erhältlichen 10-Undecinsäure **153** hergestellt. Als Peptidkupplungs-Reagenzien kamen in dieser, als auch den anderen beiden Synthesen zum Einbau der Seitenketten PyBOP, HOBT und DIPEA in absolutem Tetrahydrofuran zum Einsatz. Nach erfolgreicher Amidkupplung der

10-Undecensäure **153** nach zwei Tagen Reaktionszeit wurde das erhaltene geschützte Zwischenprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Das Alkin-modifizierte Muraymycin-Analogon **63** wurde im Anschluss global mit wässriger TFA-Lösung (80%) entschützt und nach anschließender semi-präparativer HPLC-Reinigung als zweifaches TFA-Salz mit einer Ausbeute von 58% über beide Stufen isoliert.

Das Thiol-modifizierte Muraymycin-Analogon **61** wurde mit der kommerziell erhältlichen 11-Tritylmercaptoundecensäure **169** als Reagenz erhalten. Nach einer Reaktionszeit von 17 Stunden bei Raumtemperatur wurde die erhaltene geschützte Zwischenstufe über Säulenchromatographie gereinigt. Die globale Entschützung erfolgte erneut mit 80%iger wässriger TFA-Lösung und mit dem Zusatz von Triethylsilan als Scavenger für die Trityl-Schutzgruppe. Zusätzlich wurde die Reaktion unter Luftausschluss durchgeführt, um eine Disulfid-Bildung zu vermeiden. Bei der Reinigung des global entschützten Rohproduktes mittels semi-präparativer HPLC wurde jedoch auch in einigen Ansätzen bereits entstandenes dimeres Muraymycin-Disulfid **175** in einer zweiten Fraktion isoliert. Das Muraymycin-Disulfid **175** wurde als Referenzverbindung für die spätere biologische Evaluation ebenfalls gesammelt. Auf Grund dieser ablaufenden Nebenreaktion wurde auf eine längere Lagerung des ungeschützten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61** mit dem freien Thiol, vor Allem in Lösung, verzichtet. Die globale saure Entschützung der Verbindung wurde immer frisch nach Bedarf angesetzt, um die Nebenreaktion der Disulfid-Bildung zu minimieren. Das Produkt konnte bei rascher Aufarbeitung mit einer Ausbeute von bis zu 47% über beide Schritte als zweifaches TFA-Salz isoliert werden.

Das PySS-modifizierte Muraymycin-Analogon **62** wurde mit der zuvor hergestellten Seitenkette **124** und erneut mit den bewährten Kupplungsreagenzien PyBOP, HOBt und DIPEA in absolutem Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur hergestellt. Die Reaktion wurde über eine Dauer von drei Tagen per DC- und LC-MS-Kontrolle verfolgt und nach vollständigem Umsatz der Edukte aufgearbeitet. Die geschützte Zwischenstufe wurde erneut vor der globalen sauren Entschützung über Säulenchromatographie gereinigt. Die globale saure Entschützung erfolgte unter Standardbedingungen mit 80%iger wässriger TFA-Lösung bei Raumtemperatur. Im Vergleich zu den anderen globalen Entschützungen erfolgte hier erst nach zwei Tagen eine vollständige Abspaltung aller säurelabilen Schutzgruppen. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt und gefriergetrocknet. Das PySS-modifizierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** konnte jedoch, nach einer Fehlfunktion an der Gefrieretrocknungs-Anlage, bei der einige Fraktionen der bereits gereinigten Substanz verloren gingen, nur mit einer Ausbeute von 17% über zwei Stufen nach der HPLC-Reinigung erhalten werden. Da dennoch genügend Material für die Folgereaktionen zur Verfügung stand, wurde diese Reaktion nicht erneut durchgeführt.

4.3.5 Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Referenzverbindung **170**

**Abb. 4.35** Synthese der Muraymycin-Referenzverbindung **170**.

Eine wichtige Referenzverbindung, um den Einfluss der Modifikationen an der Muraymycin-Struktur genauer untersuchen zu können, war das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **170**. Diese Verbindung besitzt in der Seitenkette eine Triazol-Struktur mit einer zusätzlichen Alkylkette mit einem terminalen Alkohol. Damit verkörpert diese Substanz den Muraymycin-Teil des späteren Konjugats **T1** mit abgespaltenem Streptomycin. So kann zusätzlich die Affinität dieses Strukturteils zum Zielenzym *MraY* untersucht werden, welches potenziell auch durch Hydrolyse des späteren Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T1** entstehen kann. Zudem liefert diese Struktur generell weitere Hinweise im Rahmen der SAR-Studie, inwieweit Modifikationen in der Seitenkette die Aktivität am Target beeinflussen. Zur Herstellung dieser Verbindung wurde das Alkin-modifizierte Muraymycin-Analogon **63** mit dem Linker **151** in einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) umgesetzt. Kupfer(II)-sulfat und Natriumascorbat, welches zur Reduktion des Kupfers zur katalytisch aktiven Kupfer(I)-Spezies diente,

wurden in dieser Reaktion in Wasser unter einer Schutzgas-Atmosphäre verwendet. Das Wasser wurde vor Reaktionsbeginn entgast, um den Sauerstoffgehalt in der Reaktion auf ein Minimum zu reduzieren. Zusätzlich zur Bildung des Triazols sollte ebenfalls eine Reduktion des Hydroxylamins durch die verwendeten Reaktionsbedingungen stattfinden. Nach abgeschlossener Reaktion wurden die Kupfer-Ionen durch Zugabe von EDTA im Überschuss komplexiert. Nach Reinigung über semi-präparative HPLC konnte die Verbindung **170** nur in geringen Mengen mit einer Ausbeute von 5% isoliert werden. Die Substanzmenge war jedoch zur Identifikation der Verbindung und der anschließenden biologischen Testung ausreichend.

#### 4.3.6 Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **82**

Eine weitere Muraymycin-Vorstufe, die für eine spätere Konjugation benötigt wurde, war das mit einem Alkin modifizierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **82**. Formal erhält man diese Verbindung durch den Austausch von L-Valin zu L-Propargylglycin in der terminalen Position der Peptidkette. Da die Aminosäure L-Propargylglycin, die zum Aufbau dieser Muraymycin-Struktur benötigt wurde, in der passenden Schutzgruppenkonfiguration nicht kommerziell erhältlich war und selbst hergestellt werden musste, wurde hier nicht auf die Festphasen-gestützte Synthesvariante zurückgegriffen. Deswegen erfolgte der Aufbau der Muraymycin-Peptidkette nach der klassischen und im Arbeitskreis etablierten Methode in Lösung ausgehend von dem Nucleosid-Baustein **33a**. Analog zu Kapitel 4.3.3.2 wurde die reduktive Aminierung mit dem entschützten Nucleosid-Baustein **33a** durchgeführt. An Stelle des Propylamin-Linkers **38** wurde hier jedoch der L-Leucin-Propylamin-Linker **45** als Aldehyd eingesetzt. Nach Aufarbeitung und Reinigung des Rohprodukts über Säulenchromatographie konnte das verkürzte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **171** mit einer guten Ausbeute von 76% erhalten werden. Nach Abspaltung der Cbz-Gruppe unter Standardbedingungen mit Palladium Black und 1,4-Cyclohexadien in absolutem *iso*-Propanol wurde das freie Amin in quantitativer Ausbeute erhalten und nachfolgend in einer Peptidkupplung mit dem Harnstoffdipeptid **84** umgesetzt. Als Kupplungsreagenzien wurden erneut PyBOP, HOBt und DIPEA in absolutem Tetrahydrofuran eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Entfernen des Lösungsmittels beendet und das Rohprodukt ohne Reinigung weiter umgesetzt. Nach globaler saurer Entschützung unter Standardbedingungen (80% TFA in Wasser) wurde die Referenzverbindung und Vorstufe für die spätere Konjugation **82** nach Reinigung über semi-präparative HPLC mit einer Ausbeute von 40% über drei Stufen erhalten.

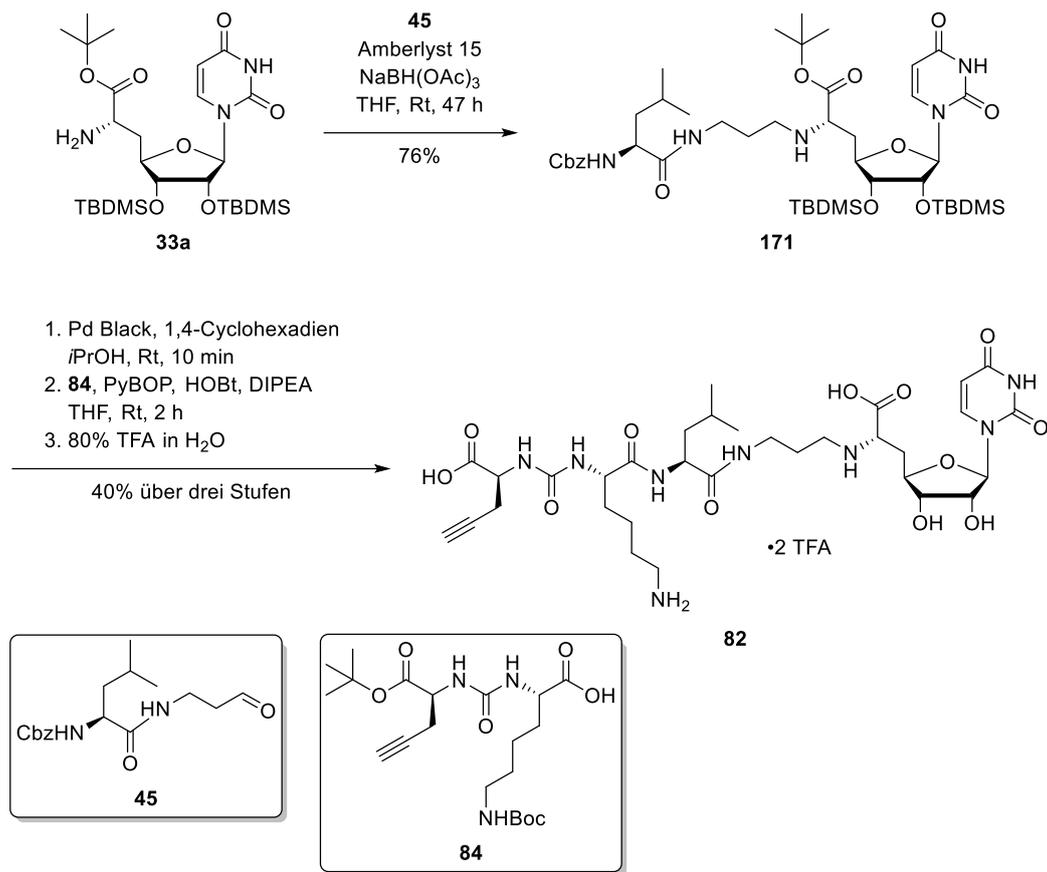
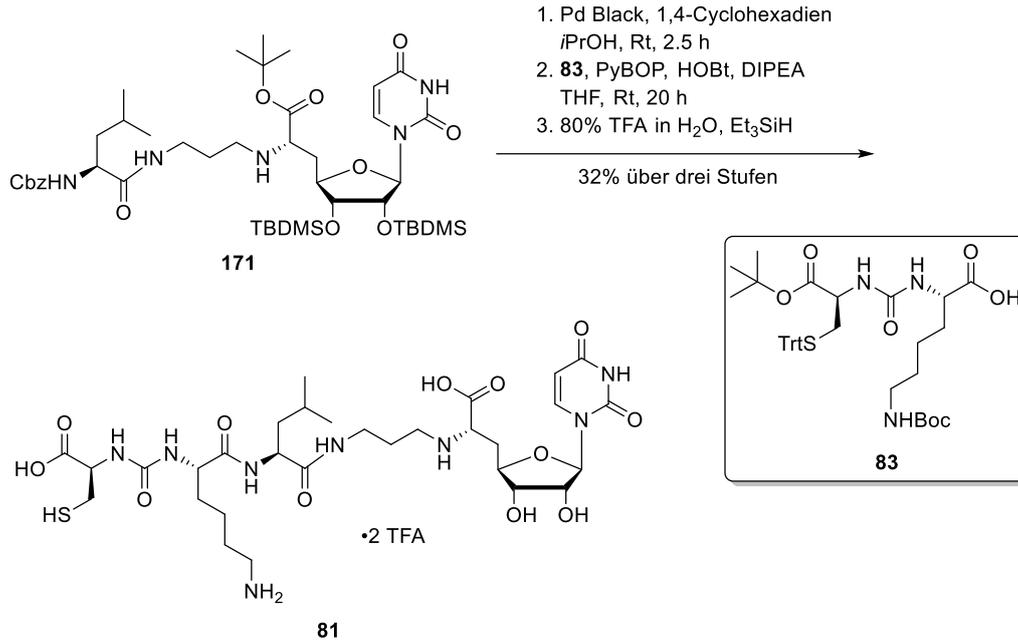


Abb. 4.36 Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **82**.

#### 4.3.7 Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **81**

Analog zu dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **82** wurde eine Verbindung mit einem terminalen Thiol in der Peptidkette als Konjugat-Vorstufe hergestellt. Da die Vorstufe **171** noch in großen Mengen vorhanden war, wurde auch hier nicht auf die Festphasen-Synthese zurückgegriffen. Die *N*-Cbz-Entschützung erfolgte analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise. Die Synthese der Muraymycin-Grundstruktur **81** wurde mit dem Harnstoffdipeptid **83** mit Hilfe von PyBOP, HOBT und DIPEA in absolutem Tetrahydrofuran durchgeführt. Die Peptidkupplung wurde nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur abgebrochen, nachdem die Edukte über Reaktionskontrolle per Dünnschichtchromatographie und LC-MS nicht mehr nachweisbar waren. Vor der globalen Entschützung erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung des noch geschützten Zwischenprodukts an Kieselgel. Auf Grund der Tendenz des freien Thiols zur Disulfid-Bildung wurde nur nach Bedarf ein Teil der komplett geschützten Zwischenstufe global entschützt und der Rest in seiner stabilen, geschützten Form für zukünftige Experimente gelagert.



**Abb. 4.37** Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **81**.

Die globale saure Entschützung der Zwischenstufe erfolgte mit 80%iger wässriger TFA-Lösung und erneut mit Zusatz von Triethylsilan als Scavenger für die Trityl-Schutzgruppe. Zur Prävention der Disulfid-Bildung wurde ebenfalls wieder unter Sauerstoff-Ausschluss gearbeitet. Nach HPLC-Reinigung konnte die Referenzverbindung beziehungsweise die Muraymycin-Konjugat-Vorstufe **81** als zweifaches TFA-Salz mit einer Ausbeute von 32% über drei Stufen erhalten werden.

## 4.4 Synthese der Konjugate

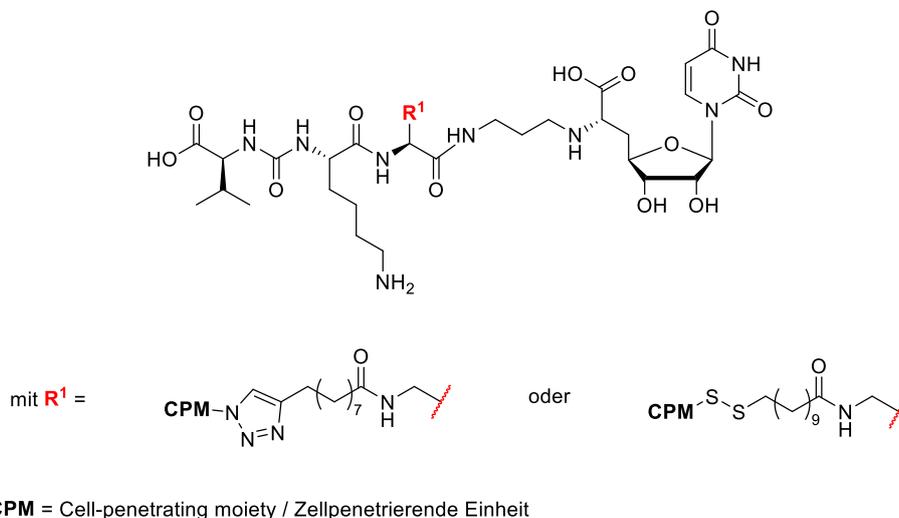
Zur Herstellung der Konjugate wurde generell auf zwei verschiedene Arten der Konjugation zurückgegriffen. Die Verknüpfung der beiden Komponenten erfolgte einerseits mittels eines stabilen Triazols und andererseits über eine intrazellulär spaltbare Disulfidbrücke. Bei den Konjugat-Verbindungen, die mit Streptomycin als Transporter-Komponente über eine zusätzliche Oxim-Struktur verfügen, stellt diese Bindung noch eine weitere Möglichkeit zur Spaltung und Freisetzung der Wirkstoffe dar. Die Herstellung der Triazole erfolgte durch eine Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC). Die Synthese der Disulfidbrücken wurde durch Aktivierung einer der beiden eingesetzten Thiol-Spezies mit Aldrithiol™-2 und Reaktion mit der freien Thiol-Gruppe des zweiten Konjugat-Bausteins erreicht. Die Konjugate werden im Folgenden in drei Serien, je nach Position der durchgeführten Konjugation am Muraymycin-Grundgerüst, unterteilt.

Die erste Serie der Konjugate beinhaltet die an Position R<sup>1</sup> in der Seitenkette modifizierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga, deren Synthese in Kapitel 4.3.4 beschrieben wurde. Als Konjugationspartner wurden in dieser Serie die Streptomycin-Derivate, der GuCOSS-Baustein **172**, das zellpenetrierende KF<sub>2</sub>-Peptid **173** und das Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57** eingesetzt. Alle Konjugationspartner wurden über den reversiblen Disulfidbrücken-Ansatz an das Muraymycin gebunden. Für das Streptomycin erfolgte zudem die Synthese eines Konjugats über die nicht-spaltbare Triazol-Struktur.

Die zweite Konjugat-Serie umfasst die intrazellulär spaltbaren Konjugat-Verbindungen des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** (siehe Kapitel 4.3.2). Hier wurde eine komplett reversible Modifikation an dem bereits bekannten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **68** über eine Carbamat-Einheit an der ε-Aminogruppe des L-Lysins vorgenommen. Dadurch sollte das parente 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **68** unter intrazellulären Bedingungen wieder freigesetzt werden. In dieser Serie wurden die reversiblen Konjugate mit Streptomycin, GuCOSS und dem zellpenetrierende Peptid KF<sub>2</sub> als Transporter-Komponenten dargestellt.

In der dritten Serie werden die Konjugate der Muraymycin-Analoga besprochen, deren terminales L-Valin gegen L-Propargylglycin oder L-Cystein als entsprechende Ankerpunkte für die beiden Konjugationsansätze getauscht wurde (siehe Kapitel 4.3.6 und 4.3.7). In dieser letzten Konjugat-Serie wurde lediglich Streptomycin als zellpenetrierender Transporter eingesetzt. Die Konjugation erfolgte hier wieder über die beiden Varianten, die stabile Triazol-Bindung und die intrazellulär spaltbare Disulfidbrücke.

#### 4.4.1 Konjugat-Serie 1: Konjugate der R<sup>1</sup>-Seitenketten-modifizierten Muraymycin-Analoga

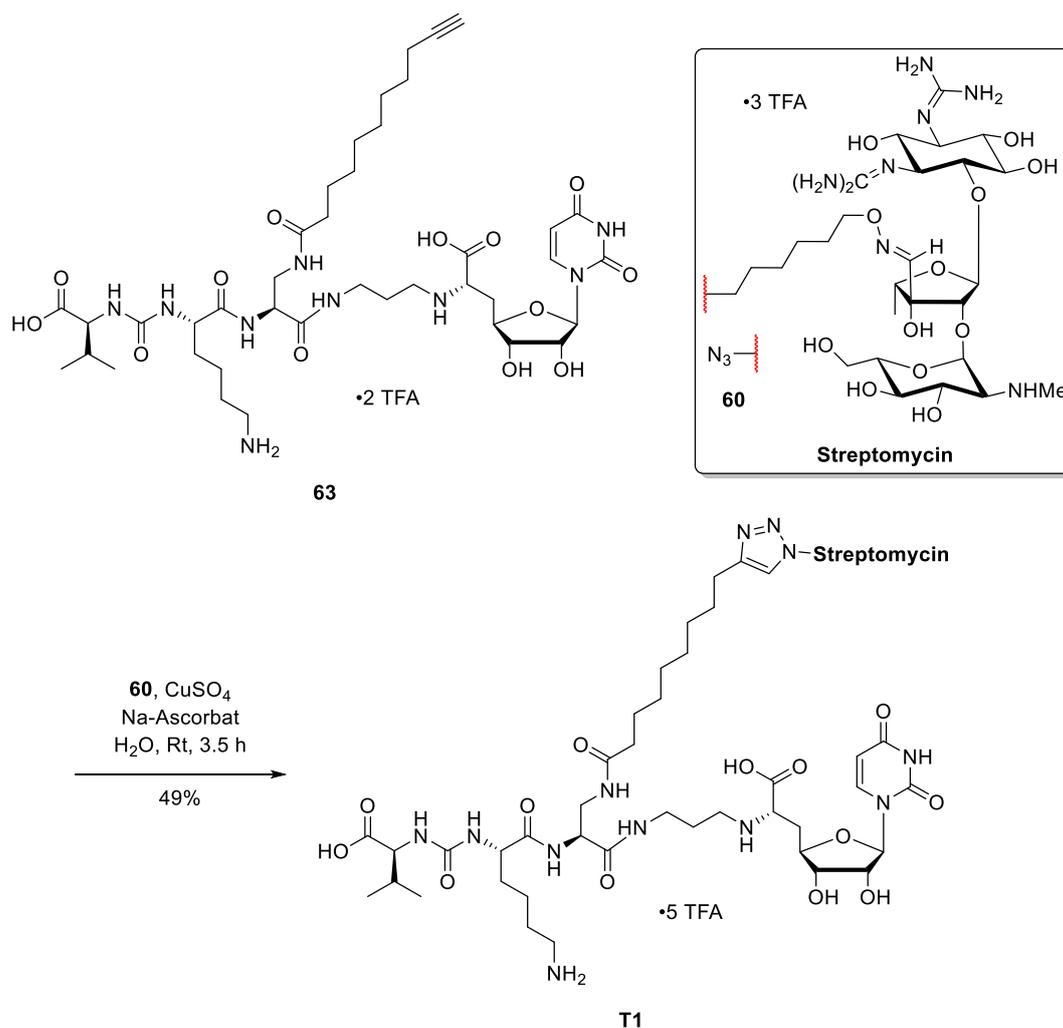


**Abb. 4.38** Erste Serie der Muraymycin-CPM-Konjugate mit Konjugation an der modifizierten mittleren Aminosäure des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogs.

Die erste Serie der Konjugat-Verbindungen wurde mit den an der Position R<sup>1</sup> Seitenketten-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga erhalten (siehe Abbildung 4.38). Mit Streptomycin wurden zwei Konjugate hergestellt: die über ein Triazol konjugierte Verbindung mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **63**, welche über eine Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition hergestellt wurde, und das intrazellulär spaltbare Konjugat über eine Disulfidbrücke mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** beziehungsweise dem S-aktivierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **62**. Die weiteren Muraymycin-Transporter-Konjugate der ersten Serie wurden erneut mit dem Muraymycin-Analogon **61** beziehungsweise **62** und jeweils dem GuCOSS-Baustein **172**, dem zellpenetrierenden KF<sub>2</sub>-Peptid **173** und dem Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57** ausschließlich über die intrazellulär spaltbare Disulfidbrücke konjugiert.

##### 4.4.1.1 Synthese des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats T1

Das Alkin-modifizierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **63** und das Azid-modifizierte Streptomycin **60** wurden in einer CuAAC in destilliertem und entgastem Wasser unter Standardbedingungen mit Kupfer(II)-sulfat und Natriumascorbat umgesetzt.



**Abb. 4.39** Synthese des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T1**.

Das Auffällige an dieser Reaktion war, dass die Kupplung nur mit einem Überschuss der Azid-Spezies **60** ablief. Bei Zugabe im Unterschuss oder mit äquimolaren Mengen des Azid-modifizierten Streptomycins **60** konnten nur Spuren des Produktes detektiert werden. Eine Weiterreaktion der restlichen Edukte fand in diesem Fall auch nach längerem Rühren nicht statt. Eine erneute Zugabe von Katalysator und Natriumascorbat führte ebenfalls zu keiner Änderung. Lediglich der Einsatz des Azids **60** im Überschuss führte zu einem vollständigen Ablaufen der Reaktion. Aus diesem Grund wurde das Azid-modifizierte Streptomycin-Derivat **60** mit 1.3 Äquivalenten eingesetzt. Nach 3.5 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde bei der Reaktionskontrolle über LC-MS ein vollständiger Umsatz des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **63** beobachtet und die Reaktion durch EDTA-Zugabe im Überschuss (zur Komplexbildung der Kupfer-Kationen) abgebrochen und das Lösungsmittel im Anschluss unter reduziertem Druck entfernt. Der Einsatz des Azid-modifizierten Streptomycins **60** im Überschuss führte allerdings

zu erheblichen Problemen bei der Reinigung des Konjugat-Produkts **T1**. Die hohe Polarität des Streptomycin-Derivates **60** bestimmte maßgeblich das Retentionsverhalten der Konjugat-Verbindung **T1**, woraus sich identische Retentionszeiten des Streptomycin-Derivats **60** und des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T1** in der präparativen HPLC ergaben. Eine Wechselwirkung der beiden Verbindungen miteinander kann auch nicht ausgeschlossen werden. Erste Trennversuche über eine C18-Umkehrphasensäule führten auch nach mehrfachen Versuchen nicht zu einer erfolgreichen Reinigung des Konjugats **T1** auf der HPLC. Auch ein Wechsel zu einer Phenylhexyl-Säule, um die aromatischen Wechselwirkungen der Uridin-Struktur des Muraymycins in dem Konjugat **T1** auszunutzen und dadurch eine erhöhte Retentionszeit im Vergleich zu der Streptomycin-Komponente zu erreichen, führte ebenfalls nicht zu einer erfolgreichen Trennung der beiden Komponenten. Ein Verzicht auf die Säurekomponente TFA in dem Lösungsmittelgemisch führte durch die unvollständige Protonierung der Verbindungen lediglich zu einem verstärkten Tailing der Peaks und damit zu einer Verschlechterung der Trennung. Ebenfalls führte ein Wechsel des Lösungsmittels von Acetonitril zu Methanol zu keiner Verbesserung der Trennung.

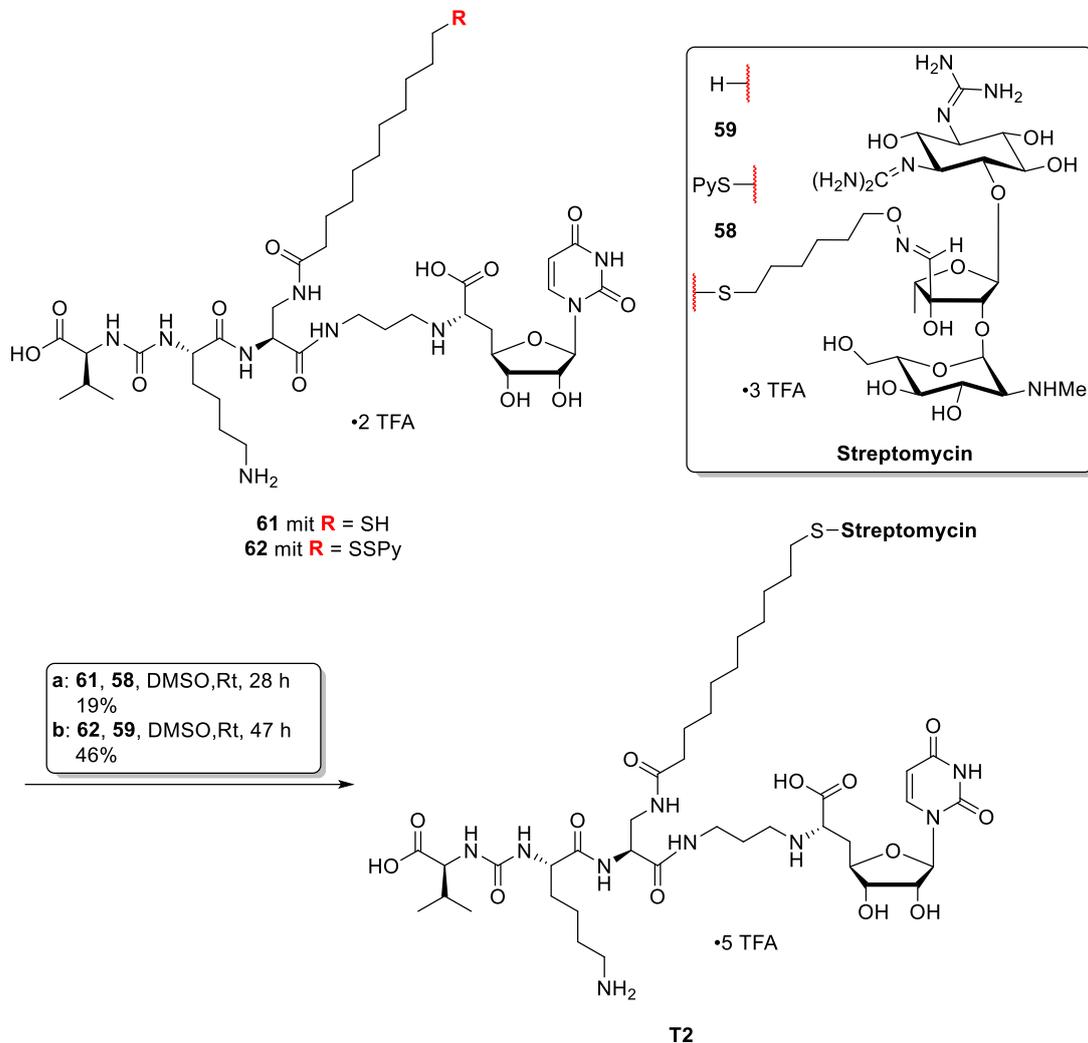
Als weitere Reinigungsmöglichkeiten wurden zunächst sowohl eine Dialyse über eine Membran als auch eine Größenausschlusschromatographie (SEC) in Betracht gezogen. Für eine Dialyse lagen jedoch die Molmassen der beiden Strukturen zu dicht zusammen, sodass eine Trennung hier nicht möglich war. Das gleiche Problem war auch bei der Größenausschlusschromatographie gegeben und das Produkt konnte auch über diese Methode nicht isoliert werden.

Ein erneuter Versuch der Methodenoptimierung an der HPLC führte letztendlich zum Erfolg. So konnte zunächst eine Abreicherung der Streptomycin-Verunreinigung **60** und die Trennung von allen weiteren Verunreinigungen in einer ersten Trennung an der HPLC über eine Gradientenmethode an der C18-Säule erreicht werden. In einer zweiten isokratischen HPLC-Trennung erfolgte dann die vollständige Abtrennung des Azid-modifizierten Streptomycin-Derivats **60** und damit die Isolierung des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T1**. Das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T1** konnte so letztendlich mit einer Ausbeute von 49% nach beiden HPLC-Reinigungen als fünffaches TFA-Salz erhalten werden.

In Lösung wurde beim Messen des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums eine teilweise Zersetzung der Konjugat-Verbindung **T1** beobachtet. Das Oxim wurde auch hier hydrolysiert und setzte Streptomycin frei. Dieser Vorgang stoppt nach circa 8-12% Hydrolyse des Konjugats **T1**. Es wird eine induzierte pH-Änderung durch die entstandenen Hydrolyseprodukte vermutet, die diese pH-

abhängige Reaktion selbst zum Erliegen bringt. Genauere Stabilitätsuntersuchungen dieser Verbindung werden in Kapitel 4.6.1.3 beschrieben.

#### 4.4.1.2 Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugats T2



**Abb. 4.40** Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T2**.

Die intrazellulär spaltbare Variante **T2** des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats wurde auf zwei Arten hergestellt. In der ersten Syntheseroute wurde von dem Muraymycin-Analogen **61** ausgegangen und dieses mit dem PySS-aktivierten Streptomycin-Derivat **58** umgesetzt. Die alternative Synthese erfolgte auf umgekehrtem Weg ausgehend von dem PySS-aktivierten Muraymycin-Analogen **62** mit dem Thiol-modifizierten Streptomycin-Derivat **59**. Bei beiden Syntheseverianten wurden die beiden Edukte äquimolar eingesetzt, in absolutem DMSO gelöst und bei Raumtemperatur umgesetzt. Die erste Syntheseveriante mit dem aktivierten

Streptomycin-Derivat **58** und dem Muraymycin-Analogen mit freier Thiolgruppe **61** war nach 28 Stunden beendet und erzielte nach Reinigung über semi-präparative HPLC eine Ausbeute von 19%. Bei der zweiten Synthesevariante konnte erst nach 47 Stunden ein vollständiger Umsatz der beiden Edukte in der Reaktionskontrolle mittels LC-MS beobachtet werden. Die Ansatzgröße war hier zudem mit 1.4  $\mu\text{mol}$  deutlich geringer als der Ansatz der ersten Variante (5.0  $\mu\text{mol}$ ). Das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T2** konnte auch hier nach semi-präparativer HPLC-Reinigung isoliert werden, und es ergab sich mit 46% eine deutlich bessere Ausbeute mit dieser alternativen Reaktionsführung. Bei diesem Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T2** wurde bereits bei der Reinigung und auch bei den NMR-Messungen eine schnellere Zersetzung beobachtet, als es bei dem vergleichbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T1** der Fall gewesen war. Aus diesem Grund und weil nur eine geringe Substanzmenge zur Verfügung stand, wurde auf ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum und weitergehende Analytik verzichtet und das Produkt nur mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und hochauflösender Massenspektrometrie identifiziert.

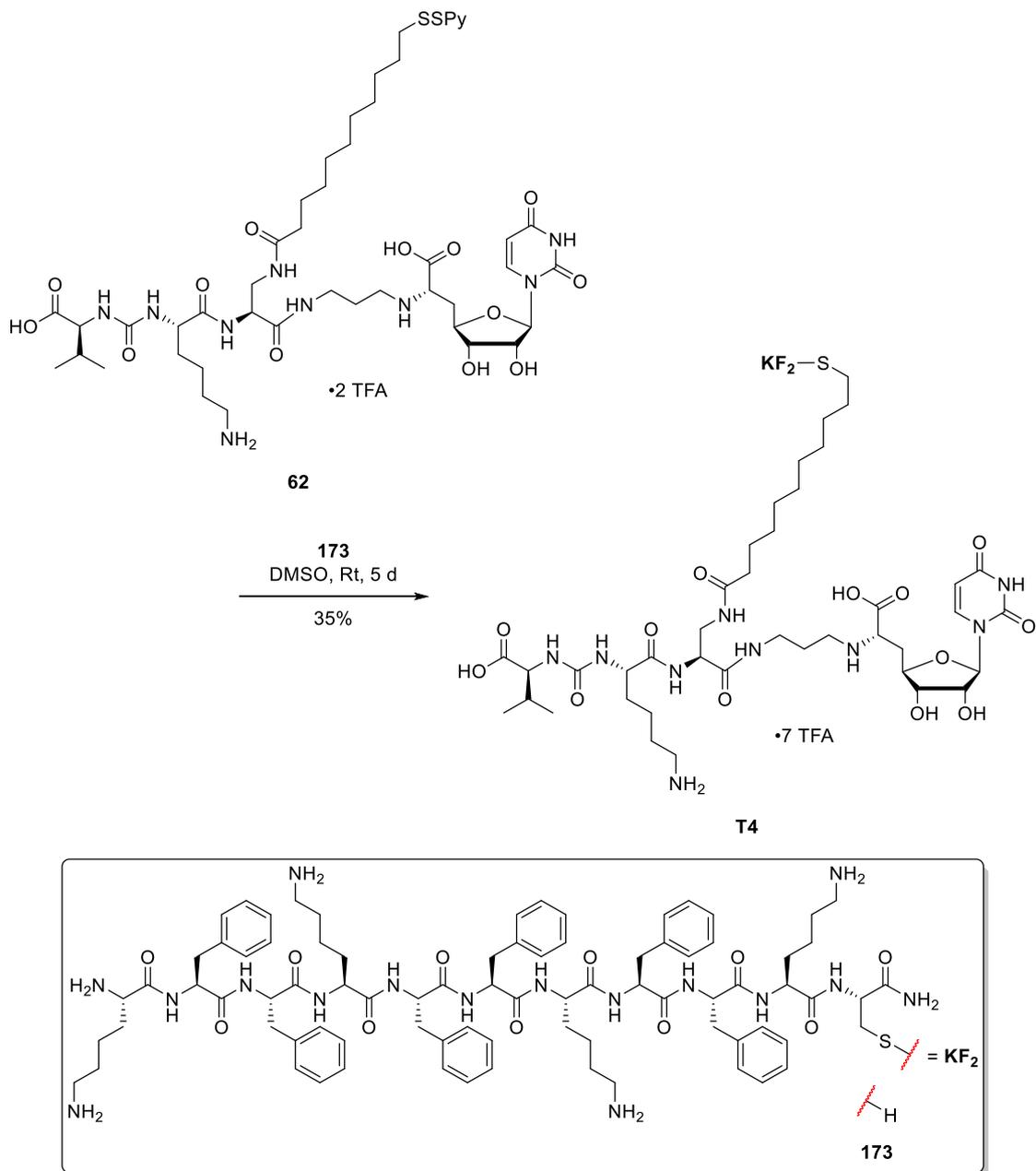
Abgesehen von den besseren Ergebnissen, die die Synthese über das PySS-aktivierte Muraymycin-Analogen **62** erzielte, erlaubt dieser Ansatz zudem eine freiere Auswahl an zu konjugierenden Substanzen. Das einzige Kriterium an die zweite Komponente ist damit das Vorhandensein einer freien Thiol-Gruppe. Darüber hinaus besteht mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **62** keine Gefahr der Disulfidbildung bei einer längeren Lagerung der Substanz. Mit der Muraymycin-Struktur **62** lässt sich so relativ schnell eine große Bandbreite an Konjugaten herstellen. So konnten auch im Folgenden der GuCOSS-Baustein **172** und das zellpenetrierende  $\text{KF}_2$ -Peptid **173** ohne weitere Modifikationen an diesen Bausteinen mit dem Muraymycin-Analogen **62** zu den Konjugaten **T3** (siehe Kapitel 4.4.1.3) und **T4** (siehe Kapitel 4.4.1.4) umgesetzt werden.

#### 4.4.1.3 Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-GuCOSS-Konjugats **T3**

Das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T3** wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kolmar der TU Darmstadt bearbeitet. Der GuCOSS-Baustein **172** wurde von Simon Englert synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Ausgehend von dem PySS-aktivierten Muraymycin-Analogen **62** wurde das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T3** durch Reaktion mit äquimolaren Mengen des Thiol-modifizierten GuCOSS-Bausteins **172** in absolutem DMSO hergestellt. Nach einer Reaktionsdauer von sechs Tagen bei Raumtemperatur wurde über Reaktionskontrolle per LC-MS kein Muraymycin-Edukt **62** mehr nachgewiesen. Die Reaktion wurde durch Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck beendet und das Rohprodukt im Anschluss mittels semi-präparativer HPLC gereinigt. Das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T3** konnte mit einer Ausbeute von 54% als neunfaches TFA-Salz isoliert werden (siehe Abbildung 4.41). Die Zielverbindung **T3** wurde über hochauflösende LC-Massenspektrometrie identifiziert und die Reinheit der Verbindung anhand der erhaltenen Chromatogramme bestätigt. Auf Grund der Instabilität der Verbindung in wässriger Lösung, welche sich hier in der Hydrolyse-Empfindlichkeit des GuCOSS-Bausteins begründet, und der nur geringen verfügbaren Substanzmenge wurde auf eine weitergehende Analytik verzichtet.



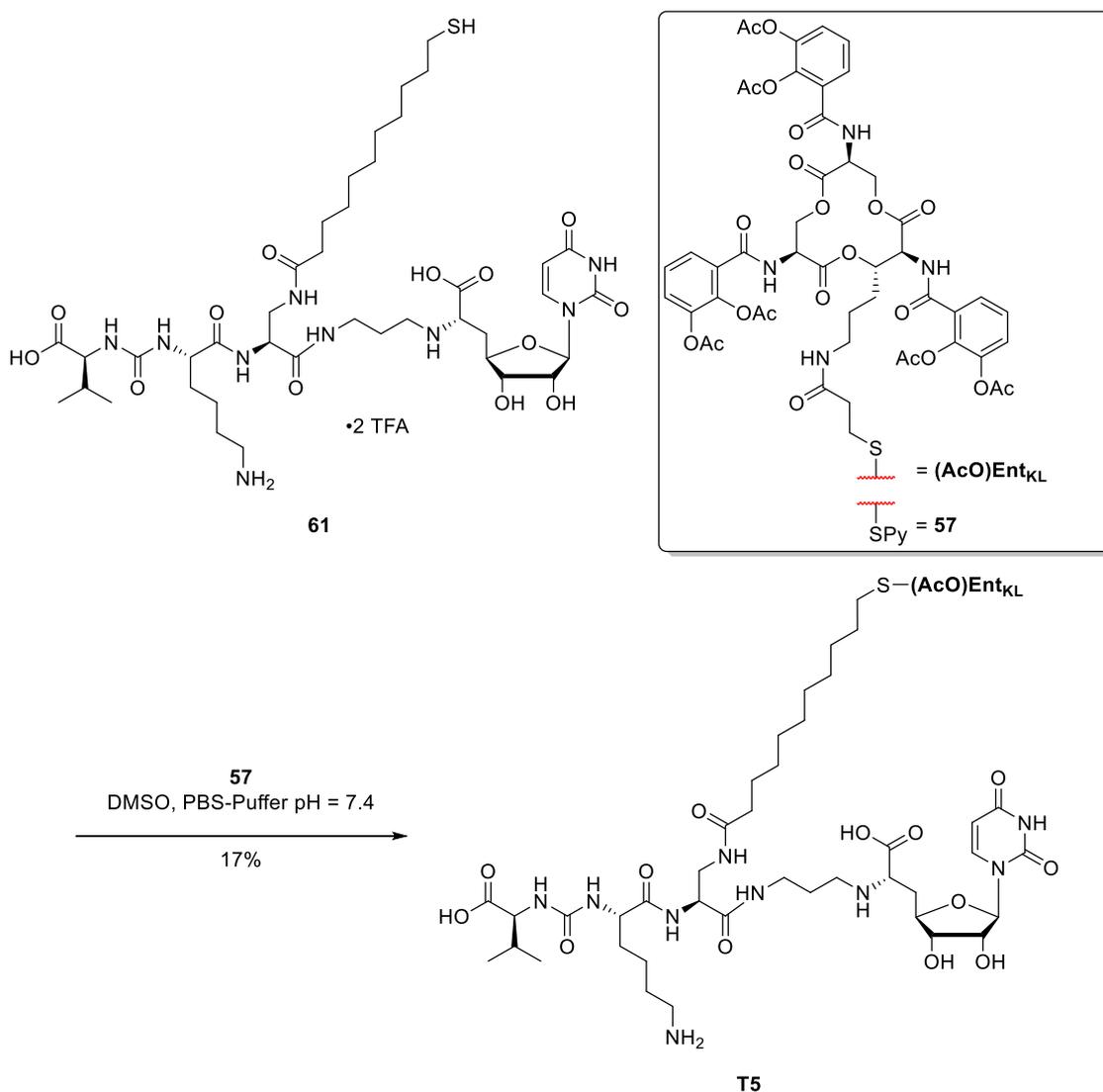
4.4.1.4 Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugats **T4**

**Abb. 4.42** Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugats **T4**.

Identisch zu der Synthese des Muraymycin-GuCOSS-Konjugats **T3** wurde das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T4** ebenfalls ausgehend von dem vereinfachten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **62** mit dem zellpenetrierenden KF<sub>2</sub>-Peptid **173** hergestellt. Auch diese Synthese erfolgte im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kolmar der TU Darmstadt. Das zellpenetrierende KF<sub>2</sub>-Peptid **173** wurde von Simon Englert synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Das aktivierte Muraymycin-Analogon **62** wurde mit äquimolaren Mengen des KF<sub>2</sub>-Peptids **173** in absolutem DMSO gelöst und für fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die

Reaktionskontrolle erfolgte erneut über LC-MS. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt über semi-präparative HPLC gereinigt. Das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T4** wurde mit einer Ausbeute von 35% als siebenfaches TFA-Salz erhalten. Die Struktur wurde auf Grund ihrer Komplexität ausschließlich über hochauflösende Massenspektrometrie identifiziert.

#### 4.4.1.5 Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Enterobactin-Konjugats **T5**



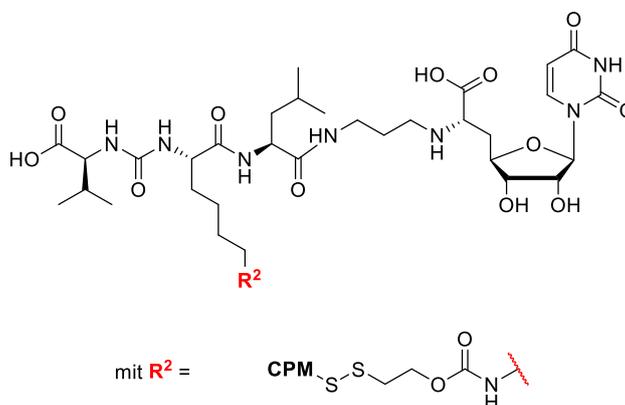
**Abb. 4.43** Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Enterobactin-Konjugats **T5**.

Das Muraymycin-Enterobactin-Konjugat **T5** wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. P. Klahn an der TU Braunschweig hergestellt. Die nachfolgenden Synthesen wurden von Robert Zscherp an der TU Braunschweig durchgeführt. Hierzu wurde das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **174** in geschützter Form zur Verfügung gestellt. Die Entschützung der

Verbindung **174** erfolgte auf Grund der Instabilität des freien Thiols erst kurz vor der Konjugat-Synthese. Nach der globalen sauren Entschützung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **174** wurde das aktivierte Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57** an den Muraymycin-Baustein **61** gekuppelt und das resultierende Muraymycin-Enterobactin-Konjugat **T5** nachfolgend mit einer Ausbeute von 17% nach Reinigung über präparative HPLC isoliert (Abbildung 4.43). Die Verbindung wurde zur biologischen Evaluation in unserem Labor weitergehend untersucht (siehe Kapitel 4.6).

Im Rahmen dieser Kooperation wurde von R. Zscherp ebenfalls versucht, ein Muraymycin-Enterobactin-Konjugat über eine CuAAC zu synthetisieren. Hierfür wurde das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **63** bereitgestellt. Allerdings konnte aus bisher nicht geklärten Gründen keine erfolgreiche Click-Reaktion zur Herstellung des Konjugats durchgeführt werden. Auch ein Überschuss der eingesetzten Azid-Komponente, wie es bei der CuAAC zur Herstellung des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T1** nötig gewesen war, führte in diesem Fall nicht zu einem Umsatz. Die Startmaterialien konnten nach allen Versuchen wieder isoliert werden. Da es sich bei der Variante der Konjugation über die intrazellulär spaltbare Disulfidbrücke bei Verbindung **T5** jedoch um das interessantere Konjugat handelte, wurde die Synthese dieses Konjugats nicht weiterverfolgt.

#### 4.4.2 Konjugat-Serie 2: Konjugation am L-Lysin des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68**



CPM = Cell-penetrating moiety / Zellpenetrierende Einheit

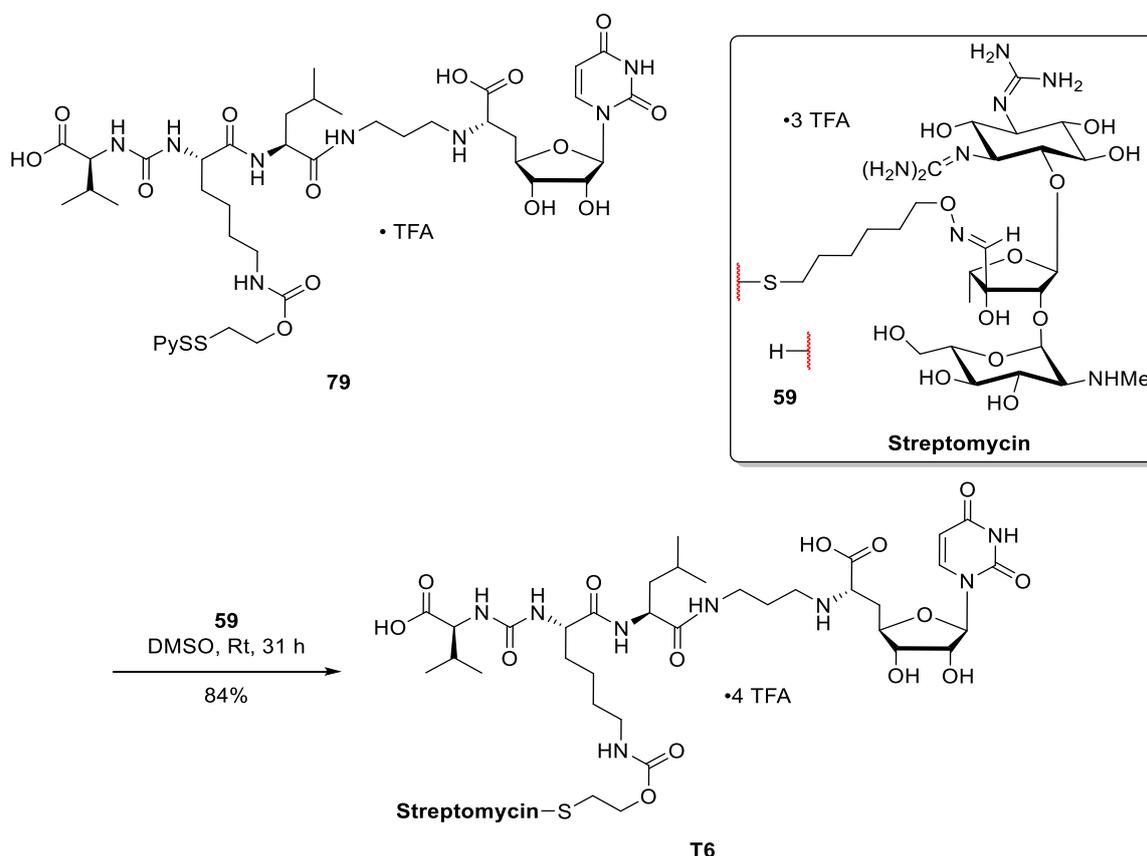
**Abb. 4.44** Zweite Serie der Muraymycin-CPM-Konjugate mit reversibler Konjugation an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des L-Lysins des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68**.

Die zweite Serie der Muraymycin-Transporter-Konjugate umfasst die Verbindungen mit der Modifikation an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des L-Lysins des modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-

Analogons **79**. An dieser Position wurden die intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Konjugate mit dem Streptomycin-Derivat **59**, dem GuCOSS-Baustein **172** und dem zellpenetrierenden KF<sub>2</sub>-Peptid **173** über die Carbamat-Disulfid-Struktur als Linker aufgebaut.<sup>[183]</sup> Für diese Serie erfolgte die Aktivierung des Thiols mit Aldrithiol™-2 ausschließlich am Muraymycin-Analogon **79** durch den verwendeten Linker am L-Lysin. Das PySS-aktivierte Muraymycin-Analogon **79** wurde mit den entsprechenden freien Thiolen der Konjugationspartner umgesetzt.

Durch diese Art der Konjugation sollte die Disulfid-Bindung auch hier im intrazellulären Medium durch reduzierende Spezies gespalten und nach Hydrolyse des resultierenden Carbamats das parente 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** freigesetzt werden (siehe Abbildung 3.2, Kapitel 3.1).

#### 4.4.2.1 Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T6**

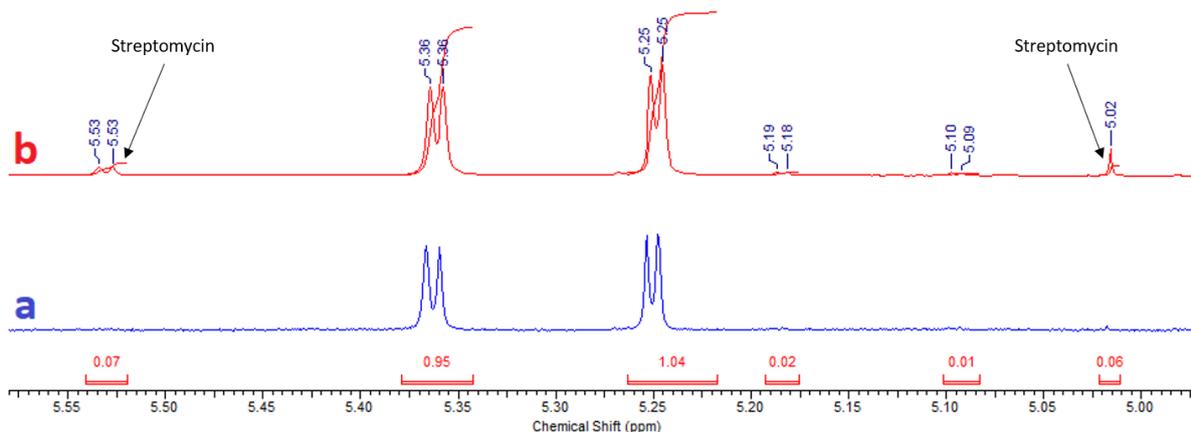


**Abb. 4.45** Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T6**.

Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **79** wurde in absolutem DMSO mit dem Thiol-modifizierten Streptomycin-Derivat **59** in leichtem Überschuss bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach

31 Stunden wurde ein vollständiger Umsatz bei der Reaktionskontrolle über LC-MS festgestellt und die Reaktion durch Verdünnen mit destilliertem Wasser und anschließende Gefrierdrying abgebrochen. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über semi-präparative HPLC und das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T6** konnte mit einer guten Ausbeute von 84% als vierfaches TFA-Salz isoliert werden. Das Produkt wurde über NMR-Spektroskopie und hochauflösende Massenspektrometrie eindeutig identifiziert und die Reinheit des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T6** bestätigt.

Bei der Messung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in  $\text{D}_2\text{O}$  wurde ebenfalls eine Zersetzung der Konjugatstruktur **T6** beobachtet. Es fand erneut eine Hydrolyse der Oxim-Bindung statt, wie es zuvor auch bei analogen Verbindungen mit diesem Strukturmotiv beobachtet worden war. In Abbildung 4.46 sind zwei  $^1\text{H}$ -NMR Spektren des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T6** dargestellt, die in einem Abstand von ungefähr acht Stunden aufgenommen wurden. Die Entstehung des freigesetzten Streptomycins **152** ist am deutlichsten am Signal des Hydrats bei 5.02 ppm zu sehen.

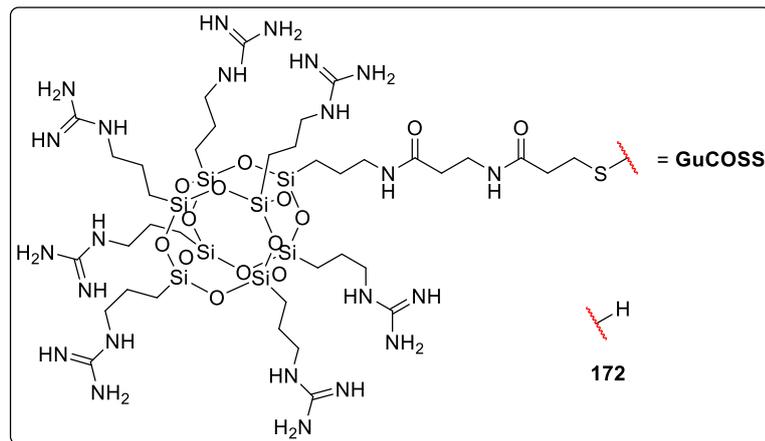
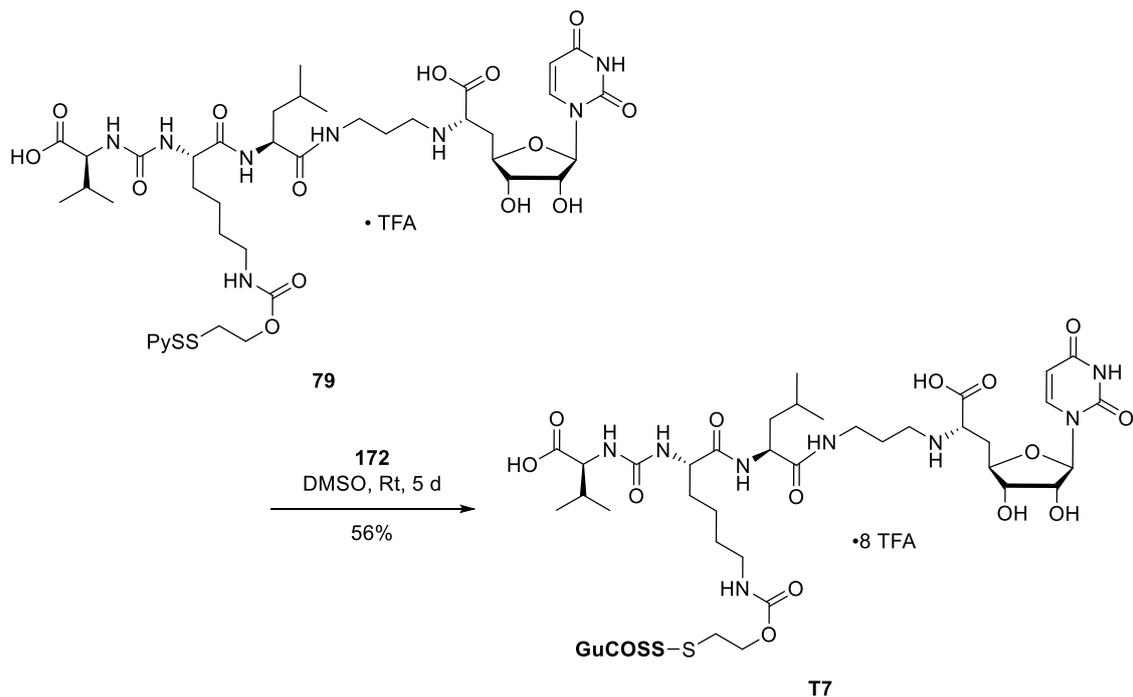


**Abb. 4.46** Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T6**:  
**a** Messung direkt nach Isolierung des Produktes; **b** Detektion der Hydrolyseprodukte nach 8 h.

Die teilweise zersetzte NMR-Probe wurde erneut über semi-präparative HPLC gereinigt und ein Teil des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T6** konnte wieder von den Zersetzungsprodukten abgetrennt werden.

Genauere Untersuchungen zur Stabilität des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T6** in verschiedenen Medien werden in Kapitel 4.6.1.3 im Rahmen der biologischen Evaluation der Konjugat-Verbindungen diskutiert.

## 4.4.2.2 Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-GuCOSS-Konjugats T7



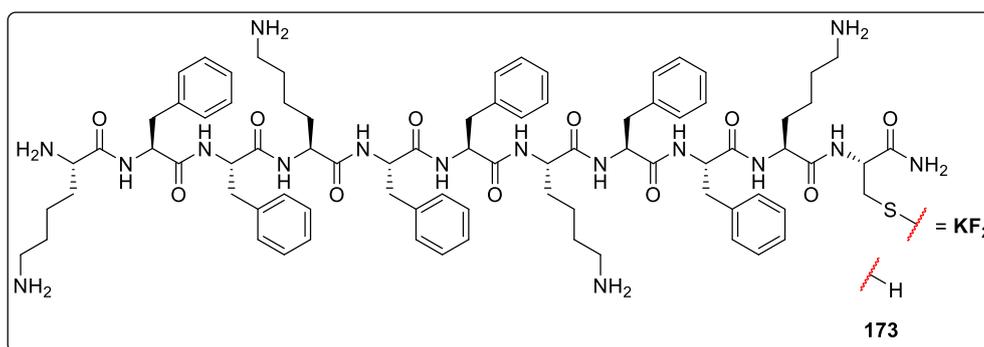
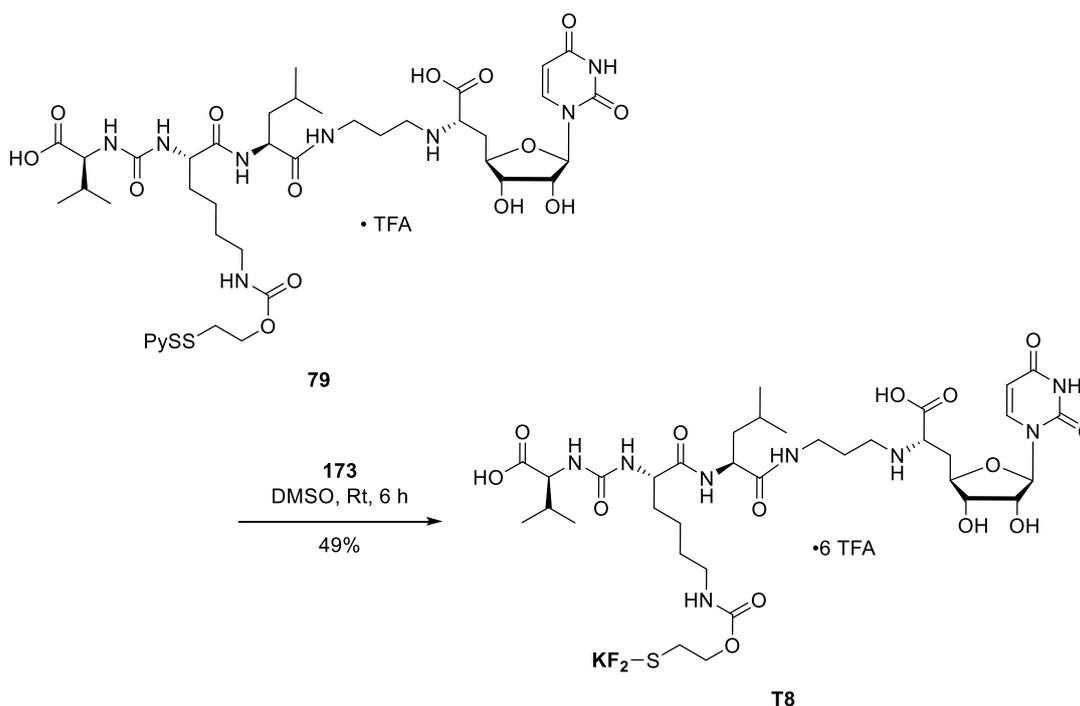
**Abb. 4.47** Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-GuCOSS-Konjugats **T7**.

Dieses Konjugat wurde im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kolmar der TU Darmstadt synthetisiert. Der GuCOSS-Baustein **172** wurde von Simon Englert synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Die Synthese erfolgte ähnlich zu der zuvor beschriebenen Synthesemethode für das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T6**. Das aktivierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **79** wurde in absolutem DMSO vorgelegt und mit äquimolaren Mengen des GuCOSS-Bausteins **172** bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach einer Reaktionsdauer von fünf Tagen wurde das Muraymycin-Edukt **79** nicht mehr bei Reaktionskontrolle über LC-MS detektiert. Die Reaktion

wurde durch Verdünnen mit destilliertem Wasser und anschließender Gefriertrocknung abgebrochen. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über semi-präparative HPLC. Das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** konnte mit einer Ausbeute von 56% als TFA-Salz erhalten werden. Auf Grund der inhärenten Instabilität des GuCOSS-Bausteins und der geringen vorhandenen Substanzmenge wurde die Zielverbindung **T7** ausschließlich über hochauflösende Massenspektrometrie identifiziert.

#### 4.4.2.3 Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugats **T8**



**Abb. 4.48** Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugats **T8**.

Nach gleicher Prozedur wurde das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **79** auch mit dem zellpenetrierenden KF<sub>2</sub>-Peptid **173**, das ebenfalls von Simon Englert im Rahmen der Kooperation mit



## 4.4.3.1 Synthese des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats T9

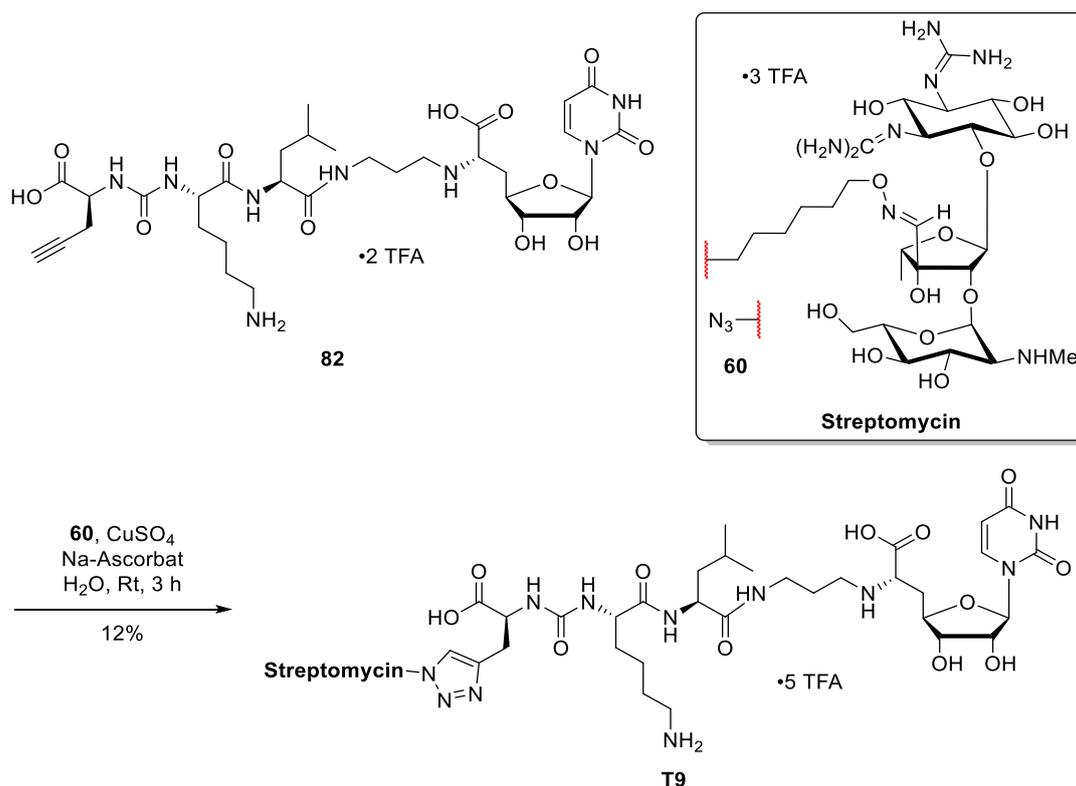
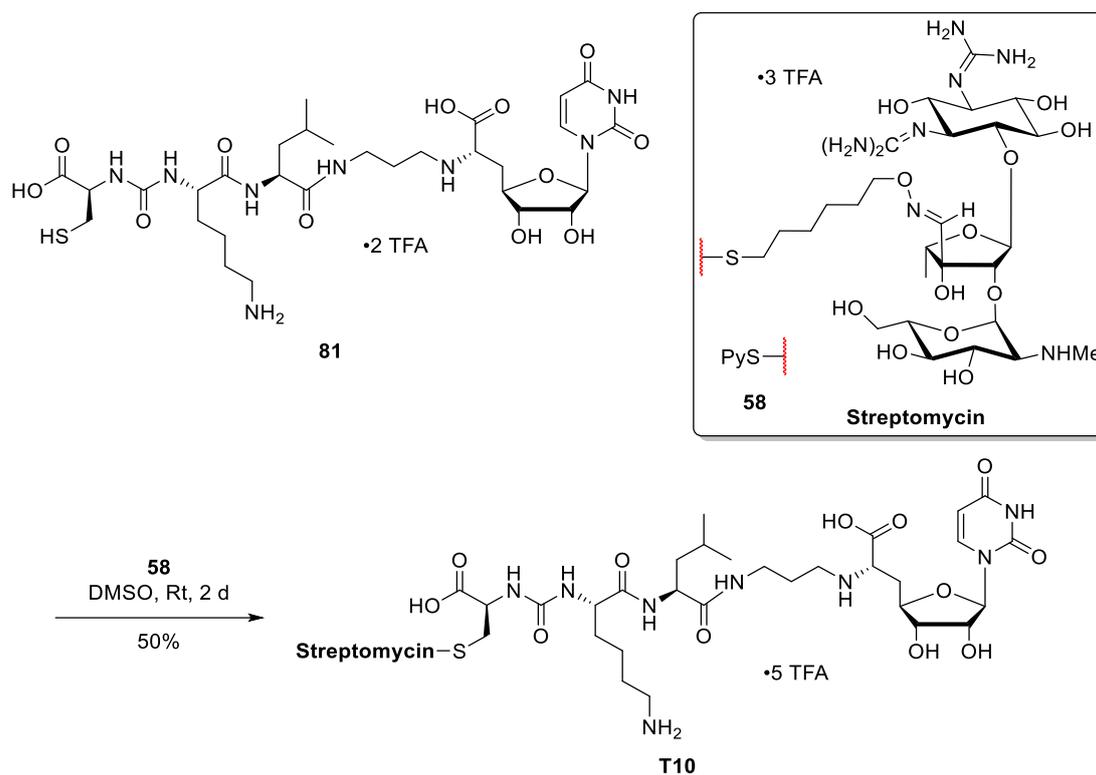


Abb. 4.50 Synthese des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats T9.

Die CuAAC des terminal L-Propargylglycin-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **82** konnte mit äquimolaren Mengen des Streptomycin-Derivats **60** durchgeführt werden. Im Gegensatz zu der Kupfer-katalysierten Click-Reaktion des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **63** mit dem Azid-modifizierten Streptomycin **60** zur Herstellung des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T1** war hier kein Überschuss der Azid-Komponente nötig. Nach drei Stunden Rühren bei Raumtemperatur in entgastem Wasser konnten die beiden Edukte **82** und **60** nicht mehr in der Reaktionskontrolle über LC-MS nachgewiesen werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA abgebrochen und das Lösungsmittel anschließend durch Gefriertrocknung entfernt. Die Zielverbindung **T9** konnte nach Reinigung über semi-präparative HPLC mit einer Ausbeute von 12% als TFA-Salz erhalten werden. Auch bei dieser Verbindung wurde im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum in deuteriertem Wasser eine Hydrolyse der Oxim-Bindung nach 24 Stunden festgestellt. Auch hier kam die Spaltung auf Grund der pH-Abhängigkeit der Reaktion nach circa 10-12% Hydrolyse des Konjugats **T6** selbst zum Erliegen und eine weitere Zunahme der Hydrolyseprodukte wurde NMR-spektroskopisch nicht mehr beobachtet.

4.4.3.2 Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T10**

**Abb. 4.51** Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T10**.

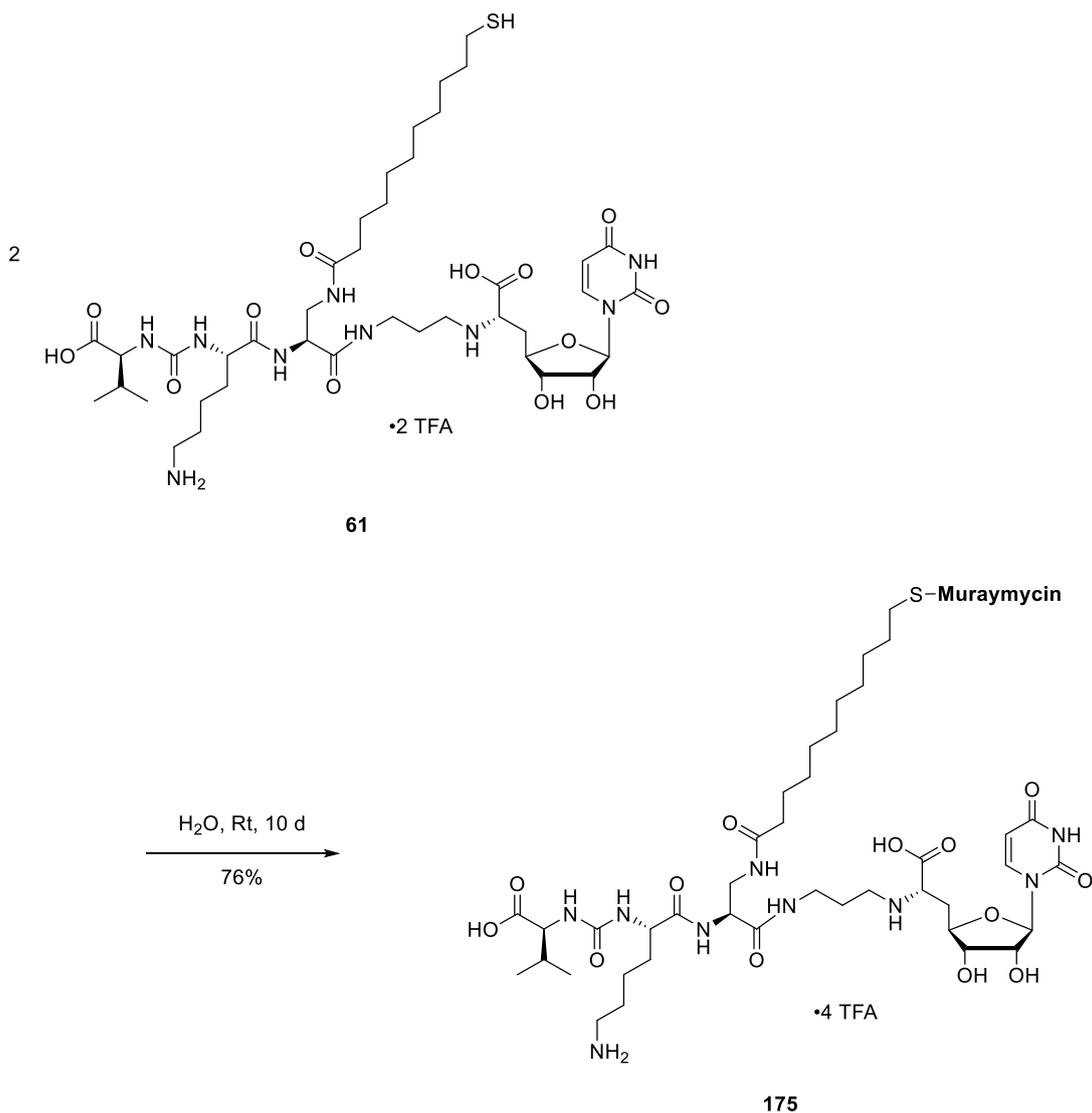
Die Synthese des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T10** erfolgte ausgehend von dem terminal L-Cystein-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** mit einem leichten Überschuss des S-aktivierten Streptomycin-Derivats **58** (1.2 Äquivalente). Nach zwei Tagen Rühren bei Raumtemperatur in absolutem DMSO wurde ein vollständiger Umsatz über LC-MS-Kontrolle beobachtet. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser verdünnt und das Lösungsmittels anschließend durch Gefriertrocknung entfernt. Nach Reinigung über semi-präparative HPLC wurde die Identität der Verbindung und deren Reinheit über LC-gekoppelte hochauflösende Massenspektrometrie verifiziert. Das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T10** wurde mit einer Ausbeute von 50% als TFA-Salz isoliert. Aufgrund der inhärenten Instabilität der Verbindung und der nur geringen Substanzmenge wurde auf eine weitergehende Charakterisierung verzichtet. Prinzipiell wäre zur Herstellung der Verbindung **T10** auch hier der umgekehrte Syntheseweg über das mit Aldrithiol™-2 aktivierte L-Cystein, analog zur Synthese des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T2**, möglich gewesen. Mit dem kommerziell erhältlichen L-Cystein-Baustein und dem noch vorhandenen aktivierten Streptomycin-Derivat **58** stellte sich dieser Weg jedoch in diesem Fall als die effizienteste Syntheseroute zu dem Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T10** heraus.

#### 4.4.4 Synthese sonstiger Muraymycin-Konjugate

Abgesehen von den Muraymycin-Transporter-Konjugaten wurden noch zwei weitere Konjugate im Rahmen dieser Dissertation hergestellt. Die Konjugationen dieser beiden Substanzen wurden analog zur ersten Serie der Muraymycin-Transporter-Konjugate an der R<sup>1</sup>-Position des vereinfachten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons durchgeführt. Bei der ersten Verbindung handelte es sich um eine dimere Muraymycin-Struktur, die zur Untersuchung einer eventuell veränderten bakteriellen Zellaufnahme, beziehungsweise auch einer möglichen Veränderung der Wirkung am Target *MraY* eingesetzt werden sollte. Die Konjugation erfolgte in diesem Fall wieder über eine Disulfidbrücke. Mit dieser zusätzlichen dimeren Referenzverbindung **175** sollten unerwartete Effekte ausgeschlossen werden, die eventuell durch die Entstehung dieser Struktur aus dem Muraymycin-Analogon **61** resultieren könnten. Bei der zweiten hergestellten Konjugat-Verbindung handelte es sich um ein stabiles Muraymycin-Biotin-Konjugat. Mit diesem Konjugat sollen im Rahmen der Dissertation von Pierre Junghanns weitergehende Untersuchungen zur Identifizierung von Off-Targets der Muraymycine durchgeführt werden.

##### 4.4.4.1 Synthese der dimeren 5'-Desoxy-Muraymycin-Struktur **175**

Eine weitere interessante Struktur stellte das Muraymycin-Muraymycin-Konjugat beziehungsweise das dimere Muraymycin **175** dar, welches als Nebenprodukt bereits bei den Synthesen mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** entstanden war. Um ausreichende Mengen des dimeren Muraymycins herzustellen, wurde das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** für zehn Tage an Luftsauerstoff bei Raumtemperatur gerührt, um eine vollständige Disulfid-Bildung zu gewährleisten. Nach semi-präparativer HPLC-Reinigung konnte das Muraymycin-Muraymycin-Konjugat **175** mit einer Ausbeute von 76% als TFA-Salz erhalten werden. Die Struktur der Verbindung wurde mit NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Methoden bestätigt. Der Einfluss der dimeren Natur dieser Muraymycin-Referenzverbindung **175** wird in Kapitel 4.6 im Rahmen der biologischen Evaluation genauer untersucht.



**Abb. 4.52** Synthese des dimeren 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **175**.

#### 4.4.4.2 Synthese des Muraymycin-Biotin-Konjugats **T11**

Ausgehend von dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **63** wurde auch ein Konjugat mit dem kommerziell erhältlichen PEG3-Biotin-Azid **176** über eine CuAAC hergestellt. Hierzu wurde das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **63** in entgastem, destilliertem Wasser vorgelegt und mit PEG3-Biotin-Azid **176** versetzt. Nach Zugabe von Kupfer(II)sulfat und Natriumascorbat wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Komplexbildung der Kupfer-Kationen nach abgeschlossener Reaktion erfolgte erneut mit EDTA. Das Muraymycin-Biotin-Konjugat **T11** konnte nach HPLC-Reinigung mit einer sehr guten Ausbeute von 98% erhalten werden. Das Muraymycin-Biotin-Konjugat **T11** sollte in weiteren Arbeiten von P. Junghanns zur

Identifizierung von Off-Targets von Muraymycinen über Pull-Down-Assays verwendet werden. Biotin dient hier als Ankerpunkt, welches das an Off-Targets gebundene Muraymycin-Biotin-Konjugat **T11** an Streptavidin-Kügelchen binden soll. Alle anderen Komponenten können im Anschluss einfach abgewaschen und eventuell vorhandene Off-Targets isoliert und identifiziert werden.

Für diese Verbindung war im Rahmen der biologischen Evaluation nur eine Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegenüber *MraY* notwendig. Diese dient zur Verifizierung, dass die durchgeführte Modifikation die Affinität zum Target nicht drastisch mindert und die grundlegenden Wechselwirkungen mit *MraY* erhalten bleiben. Die biologische Evaluation dieser Verbindung wird in Kapitel 4.6.3 beschrieben.

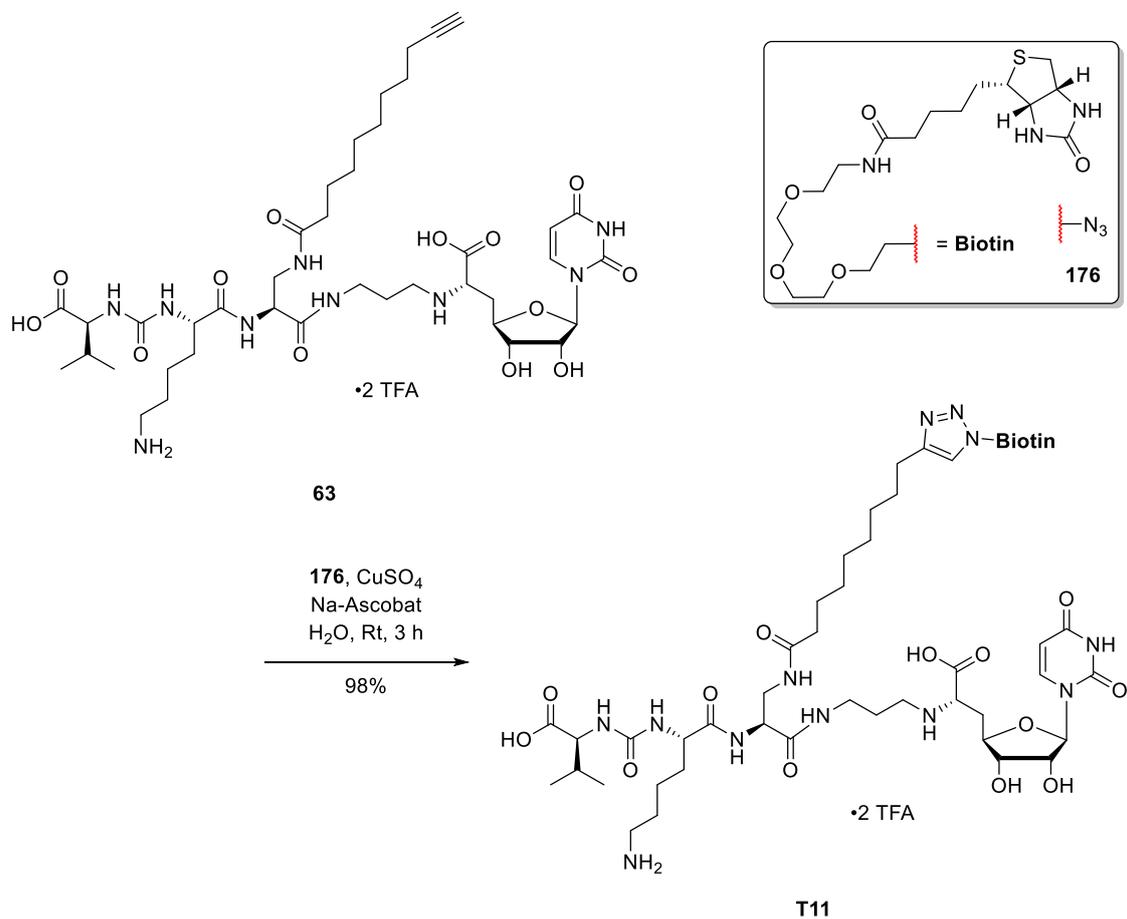


Abb. 4.53 Synthese des Muraymycin-Biotin-Konjugats **T11**.

## 4.5 Synthese weiterer 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga zur Durchführung von SAR-Untersuchungen

Ausgehend von dem L-Diaminopropionsäure-haltigen Muraymycin-Grundgerüst erfolgte die Synthese zusätzlicher Muraymycin-Analoga, die zur weiteren Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehung an *MraY* untersucht werden sollten. Mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **65** als Startpunkt waren eine Reihe weiterer Verbindungen mit Variationen in der Seitenkette für diese SAR-Studie schnell zugänglich. Ein weiteres interessantes Muraymycin-Analoga war eine vergleichbare Verbindung ohne Amid-Struktur am Grundgerüst, die durch einen formalen Austausch der L-Diaminopropionsäure gegen die zuvor hergestellte nicht-proteino-gene Aminosäure **95** synthetisiert wurde.

### 4.5.1 Synthese der Seitenketten-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga

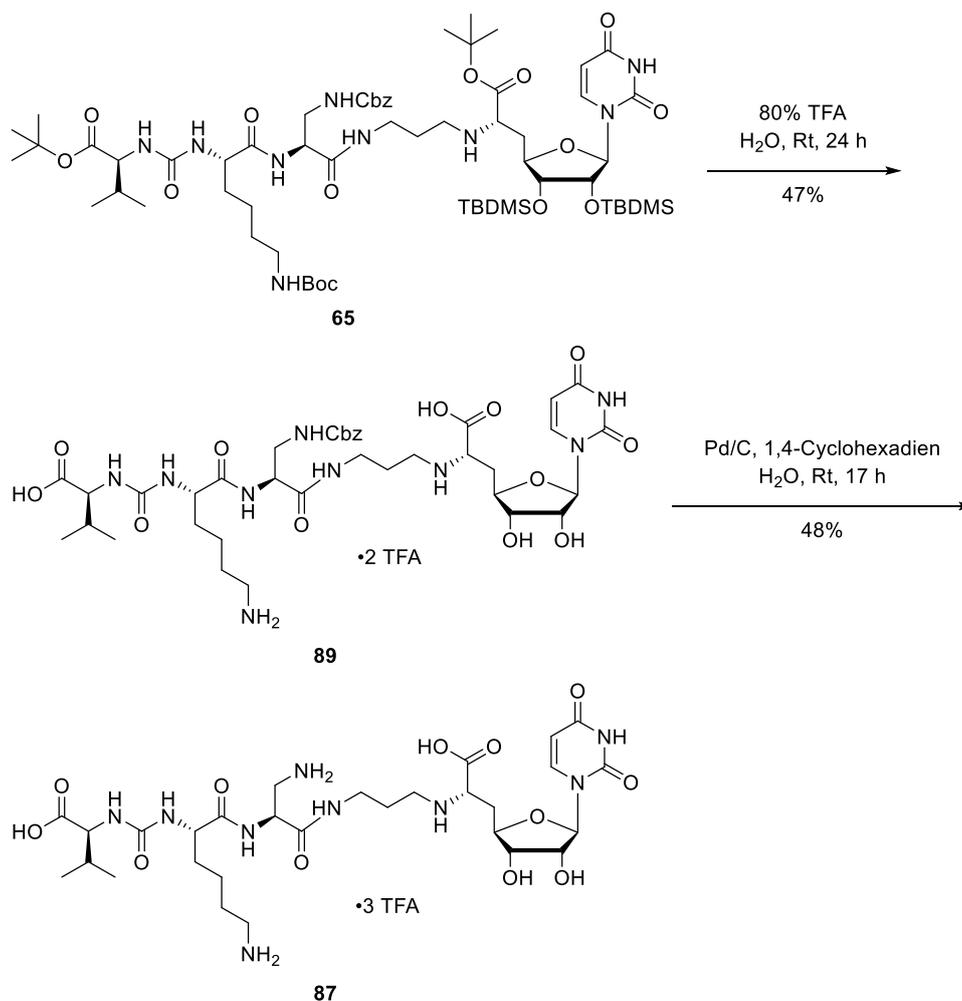
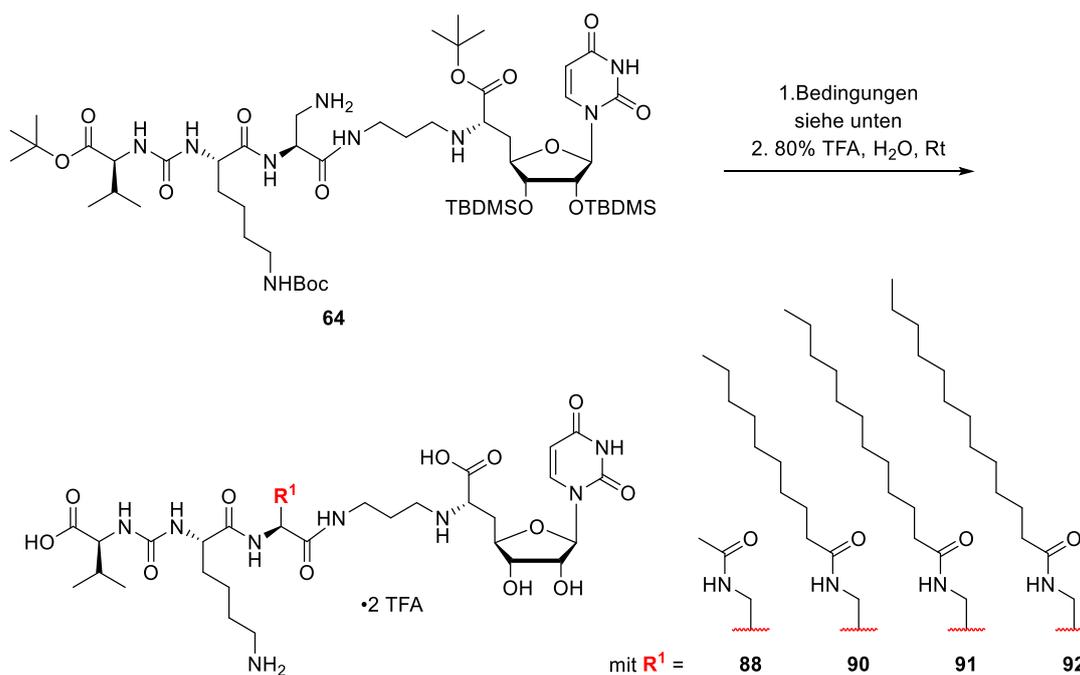


Abb. 4.54 Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **89** und **87**.

Ausgehend von dem DAP-haltigen Muraymycin-Grundgerüst **65** konnten noch weitere interessante Strukturen für SAR-Untersuchungen hergestellt werden (siehe Abbildung 4.54). Zunächst wurde das Muraymycin-Analogon **65** global, jedoch unter Erhalt der Cbz-Schutzgruppe an der L-Diaminopropionsäure mit 80%iger wässriger TFA-Lösung bei Raumtemperatur entschützt. Das Produkt **89** konnte mit einer Ausbeute von 47% nach HPLC-Reinigung als zweifaches TFA-Salz isoliert werden.

Ausgehend von dieser Verbindung konnte in einem weiteren Schritt das neue 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **87** mit dem freien Amin in der Seitenkette durch Cbz-Entschützung nach einer modifizierten, im Arbeitskreis etablierten Vorschrift im wässrigen Medium generiert werden.<sup>[224]</sup> Das Cbz-geschützte Muraymycin-Analogon **89** wurde hierbei mit Palladium auf Kohle (Pd/C) und 1,4-Cyclohexadien in Wasser für 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration und erneuter semi-präparativer HPLC-Reinigung wurde das komplett entschützte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **87** als dreifaches TFA-Salz mit einer Ausbeute von 48% erhalten (siehe Abbildung 4.54).



für <b>88</b>	für <b>90</b>	für <b>91</b>	für <b>92</b>
AcOH <b>177</b>	<i>n</i> -Decansäure <b>178</b>	<i>n</i> -Dodecansäure <b>179</b>	<i>n</i> -Tridecansäure <b>180</b>
EDC-HCl, HOBT, DIPEA	PyBOP, HOBT, DIPEA	EDC-HCl, HOBT, DIPEA	EDC-HCl, HOBT, DIPEA
THF, Rt, 24 h	THF, Rt, 25 h	THF, Rt, 25 h	THF, Rt, 25 h
29% (über zwei Stufen)	41% (über zwei Stufen)	30% (über zwei Stufen)	32% (über zwei Stufen)

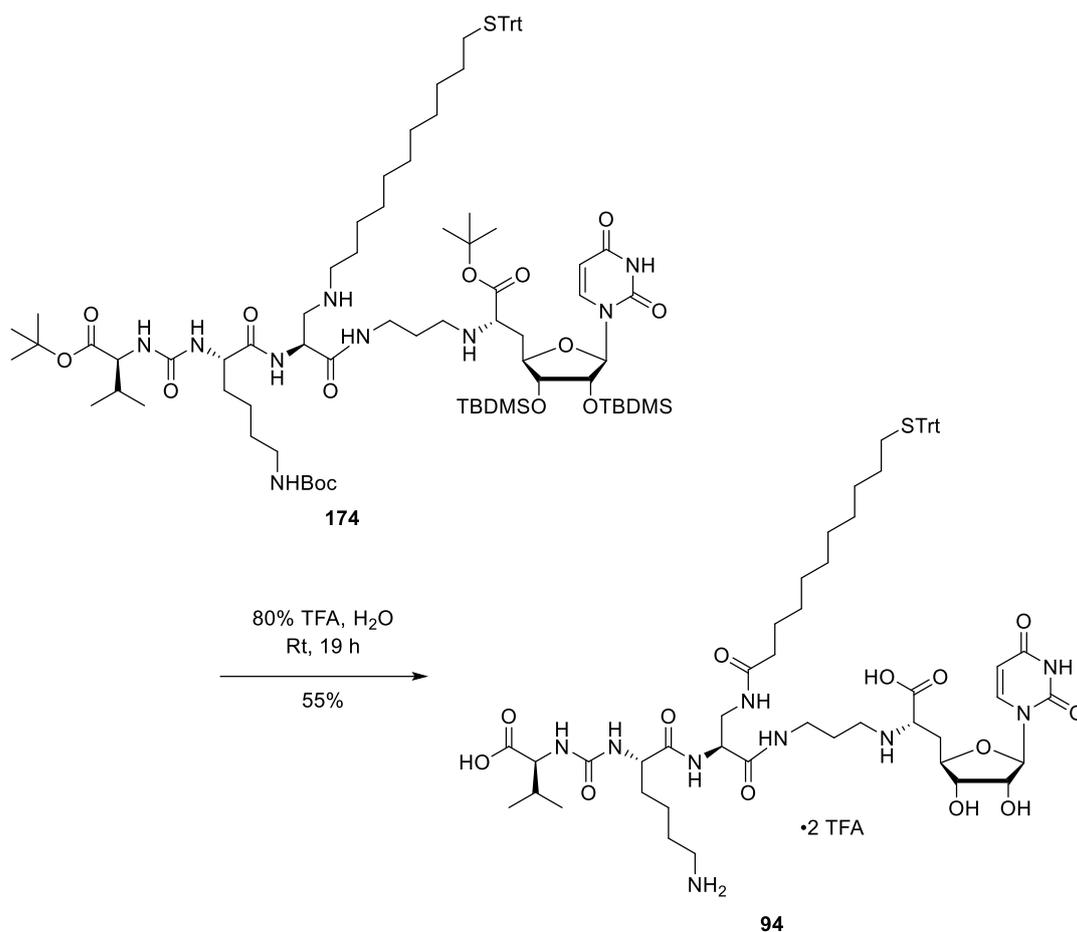
**Abb. 4.55** Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **88**, **90**, **91** und **92** mit Variation der Seitenkettenlänge.

Die Synthese der in der Seitenkette acetylierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Verbindung **88** erfolgte durch Reaktion des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **64** mit Essigsäure und den Kupplungsreagenzien EDC-Hydrochlorid, HOBt und DIPEA in absolutem Tetrahydrofuran. Nach einer Reaktionsdauer von 24 Stunden bei Raumtemperatur konnte das TFA-Salz der Verbindung **88** mit einer Ausbeute von 29% nach HPLC-Reinigung erhalten werden.

Zur Synthese der Verbindungen mit den längeren Seitenketten wurde im Fall des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **90** bei der Peptidkupplung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **64** mit der *n*-Decansäure **178** auf die Verwendung von PyBOP, HOBt und DIPEA in absolutem Tetrahydrofuran zurückgegriffen. Die Verbindung **90** konnte mit einer Ausbeute von 41% nach semi-präparativer HPLC-Reinigung erhalten werden.

Für die 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **91** und **92**, die durch Peptidkupplung von *n*-Dodecansäure **179** beziehungsweise *n*-Tridecansäure **180** mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **64** hergestellt wurden, wurde jeweils erneut auf die Kupplungsreagenzien EDC-Hydrochlorid, HOBt und DIPEA zurückgegriffen. Auf Grund der bekannten Probleme bei der Abtrennung des entstehenden PyBOP-Nebenprodukts **185** bei lipophileren Verbindungen wurde trotz der besseren Ausbeuten, die durch die Verwendung von PyBOP generell erzielt wurden für diese beiden lipophileren Seitenketten wieder zu EDC-Hydrochlorid als Kupplungsreagenz gewechselt. Die Reaktionen wurden ebenfalls wieder in absolutem Tetrahydrofuran durchgeführt und jeweils für 25 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **91** wurde nach semi-präparativer HPLC-Reinigung mit einer Ausbeute von 30% als zweifaches TFA-Salz erhalten. Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon mit der längsten Seitenkette **92** wurde nach semi-präparativer HPLC-Reinigung mit einer Ausbeute von 32% ebenfalls als zweifaches TFA-Salz erhalten.

Zusätzlich wurde ausgehend von dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **174** noch eine weitere Muraymycin-Verbindung hergestellt, um den Einfluss einer derivatisierten Thiol-Funktion in der Seitenkette genauer zu untersuchen. Hierzu wurde eine saure globale Entschützung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **174** ohne Zugabe eines Scavengers durchgeführt. Durch dieses Vorgehen konnte die Trityl-Schutzgruppe am Thiol erhalten werden. Nach 19 Stunden Rühren bei Raumtemperatur in 80%iger wässriger TFA-Lösung konnte so das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **94** nach semi-präparativer HPLC-Reinigung mit einer Ausbeute von 55% als zweifaches TFA-Salz erhalten werden (siehe Abbildung 4.56).



**Abb. 4.56** Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **94**.

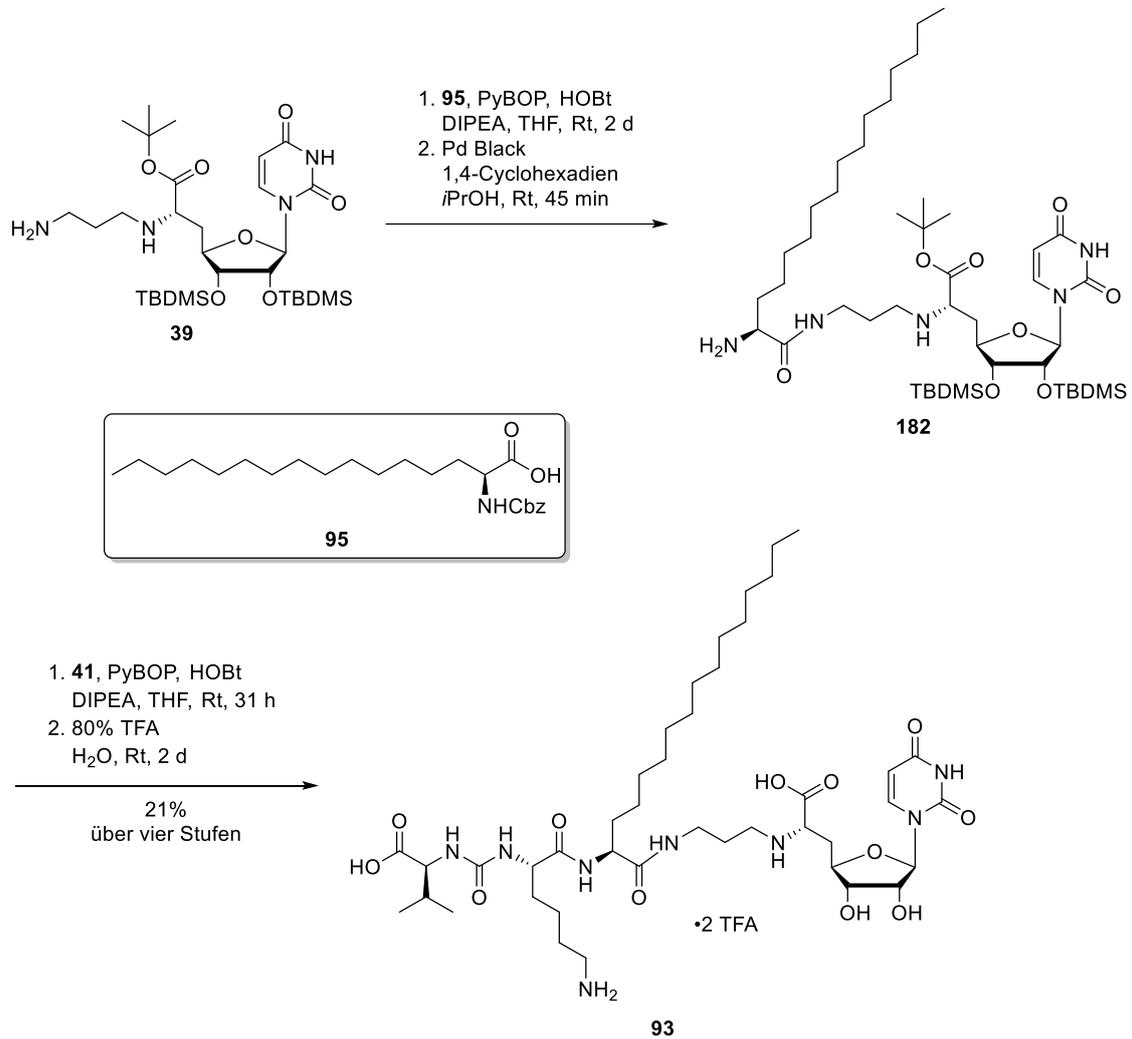
#### 4.5.2 Synthese des lipophilen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **93**

Zur Untersuchung des Einflusses der Amid-Bindung in der Seitenkette des mittleren Aminosäure-Bausteins wurde das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** ausgehend von dem (6'S)-Diamin **39** und der zuvor stereoselektiv synthetisierten lipophilen Aminosäure **95** hergestellt.

Die Synthese des lipophilen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **93** war bereits im Rahmen von Vorarbeiten mit dem kommerziell erhältlichen Racemat der Aminosäure **95** erfolgt.<sup>[95]</sup> Das Diastereomeren-Gemisch des finalen Muraymycin-Analogons konnte zwar mittels HPLC in die beiden Diastereomere getrennt werden, jedoch enthielten beide Fraktionen noch das bei der Verwendung von PyBOP anfallende Nebenprodukt Tri(pyrrolidin-1-yl)phosphinoxid **185**. Zudem konnte keine Zuordnung der Konfigurationen der beiden Stereoisomere durchgeführt werden. Da diese Muraymycin-Struktur ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur SAR-Studie dieser Arbeit darstellt, wurde die Synthese hier erneut aufgegriffen und auf die Erkenntnisse der Vorarbeiten zurückgegriffen.

Die stereoselektiv hergestellte Aminosäure **95** (siehe Kapitel 4.1.5.3) wurde hierzu als mittlerer Aminosäure-Baustein in die Muraymycin-Struktur eingebaut. Als Startpunkt dieser Synthese diente das zuvor hergestellte (6'S)-Diamin **39**, welches in einer Peptidkupplung mit der Aminosäure **95** und PyBOP, HOBt und DIPEA als Kupplungsreagenzien umgesetzt wurde. Trotz der bekannten Probleme der schwierigen Reinigung von lipophilen Verbindungen bei Verwendung von PyBOP als Kupplungsreagenz wurde dieses in dieser Syntheseroute aufgrund der zu erwartenden besseren Ausbeuten eingesetzt und die Probleme bei der Reinigung des Endproduktes in Kauf genommen. Das erhaltene Zwischenprodukt **181** konnte wie erwartet nicht vollständig gereinigt werden und enthielt auch nach versuchter säulenchromatographischer Reinigung noch das PyBOP-Nebenprodukt Tri(pyrrolidin-1-yl)phosphinoxid **185**. Da die nächste Peptidkupplung ebenfalls mit PyBOP durchgeführt wurde und das Nebenprodukt bei der Cbz-Entschützung auch keinen störenden Einfluss hat, wurde auf weitergehende Reinigungsversuche verzichtet und das Rohprodukt in den folgenden Reaktionen weiter umgesetzt. Nach Cbz-Entschützung unter den etablierten Standardbedingungen mit Palladium Black und 1,4-Cyclohexadien in absolutem *iso*-Propanol konnte das Harnstoffdipeptid **41** mit den Kupplungsreagenzien PyBOP, HOBt und DIPEA in Tetrahydrofuran an das verkürzte Muraymycin-Grundgerüst **182** gekuppelt und damit die vollständige Muraymycin-Struktur aufgebaut werden. Auf eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel wurde bei dieser Stufe verzichtet und das Rohprodukt direkt der globalen sauren Entschützung mit wässriger 80%iger TFA zugeführt. Die Reaktionszeit der Entschützung musste hier auf 40 Stunden erhöht werden, da nach 24 Stunden noch unvollständig entschützte Spezies des Muraymycin-Analogons bei der Reaktionskontrolle mittels LC-MS nachgewiesen wurden. Die nachfolgende semi-präparative HPLC-Reinigung wurde mit Hilfe einer Phenylhexyl-Säule durchgeführt. Die Verwendung einer C18-Säule hatte im Rahmen der Vorarbeiten mit dem racemisch durchgeführten Syntheseansatz zwar zu einer guten Trennung der Stereoisomere geführt, jedoch konnte das Tri(pyrrolidin-1-yl)phosphinoxid **185** mit dieser Säule, selbst nach Methodenoptimierung, nicht vollständig entfernt werden.<sup>[95]</sup> Durch die zusätzlichen aromatischen Wechselwirkungen der Phenylhexyl-Säule mit dem Uridin-Baustein des Muraymycin-Analogons erreichte die Zielverbindung **93** eine erhöhte Retentionszeit und es war somit möglich, auch das Tri(pyrrolidin-1-yl)phosphinoxid **185** abzutrennen. Im Rahmen dieser Synthese mit der stereoselektiv hergestellten Aminosäure **95** konnten keine Hinweise auf das Vorliegen eines Diastereomeren-Gemisches in den Chromatogrammen und NMR-Daten gefunden werden. Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass das entsprechende Produkt mit der (*R*)-konfigurierten Aminosäure

zu einem geringen Teil vorlag und durch die Reinigungsschritte über Säulenchromatographie und HPLC im Laufe dieser Reaktionssequenz bereits abgetrennt wurde.



**Abb. 4.57** Synthese des lipophilen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **93**.

Nach der optimierten semi-präparativen HPLC-Reinigung konnte das lipophil derivatisierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** schließlich mit einer Ausbeute von 21% über vier Stufen erhalten werden. Die Struktur und Reinheit der Verbindung **93** wurde mittels NMR-spektroskopischer und massenspektrometrischer Methoden bestätigt.

## 4.6 Biologische Evaluation

Zur biologischen Evaluation der Verbindungen wurden *in vitro*-Assays zur Hemmung des Zielenzym *MraY*, die antibakteriellen Aktivitäten gegen verschiedene Bakterienstämme, Zellaufnahme-Assays sowie Stabilitätstests in verschiedenen Medien (Puffer und bakterielles Zellsatz) herangezogen. Diese Assays wurden von Stefanie Weck, Nathalie Kagerah, Martina Jankowski und Jannine Ludwig durchgeführt.

### 4.6.1 Biologische Evaluation der Referenz- und Konjugatverbindungen

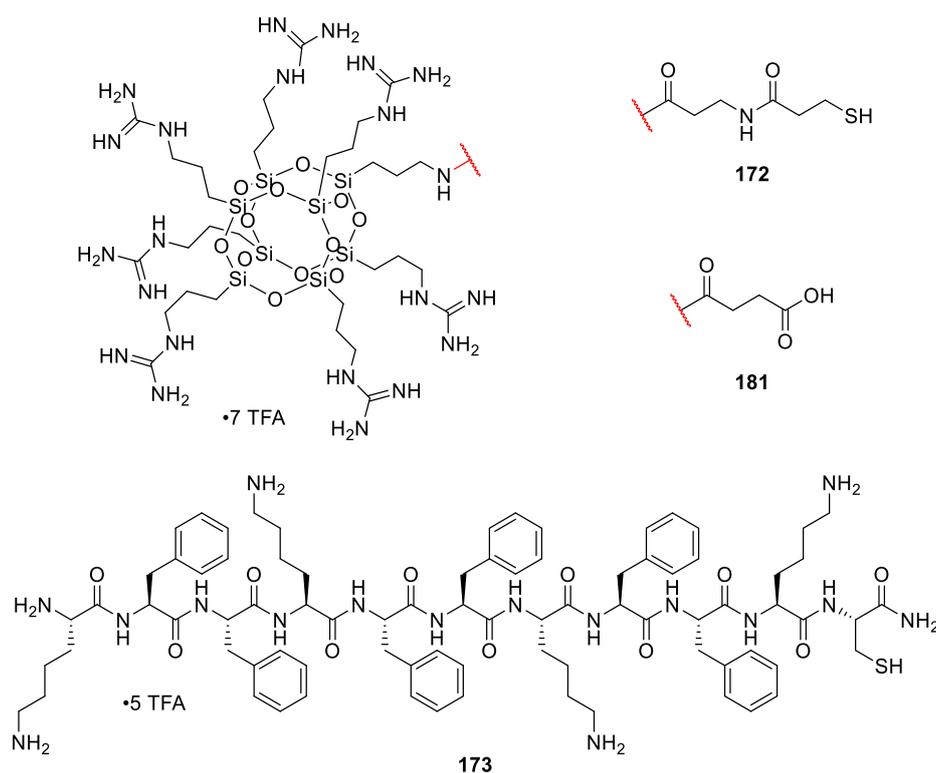
#### 4.6.1.1 Vergleich und Diskussion der inhibitorischen Aktivität gegen *MraY*

Die  $IC_{50}$ -Werte für die Hemmung von *MraY* wurden über einen Fluoreszenz-basierten Assay mit *MraY*-haltigen Membranpräparationen (*MraY* aus *S. aureus*, überexprimiert in *E. coli*) erhalten. Alle Messungen wurden als Triplikate durchgeführt. Zunächst erfolgt in Unterkapitel 4.6.1.1.1 die Diskussion der Transporter- und Muraymycin-Referenzverbindungen. Im folgenden Unterkapitel 4.6.1.1.2 werden die Aktivitäten der Konjugate besprochen.

##### 4.6.1.1.1 Diskussion der Aktivitäten der Vorstufen und Referenzverbindungen

Die im Rahmen der Kooperation mit der TU Darmstadt von der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kolmar bereitgestellten zellpenetrierenden GuCOSS-Einheiten **172** und **181** sowie das zellpenetrierende  $KF_2$ -Peptid **173** wurden als Referenzsubstanzen gegen *MraY* getestet, um mögliche Interaktionen dieser Verbindungen mit dem Zielenzym ausschließen zu können. Da es sich bei diesen Verbindungen um hochpolare Moleküle handelt, könnte es zu einer unspezifischen Interaktion mit dem Enzym kommen. So wurde für die beiden GuCOSS-Vertreter **172** ( $IC_{50}$ :  $98 \pm 57 \mu M$ ) und **181** ( $IC_{50}$ :  $62 \pm 21 \mu M$ ) jeweils eine schwache Hemmung des Zielenzym *MraY* nachgewiesen. Das zellpenetrierende  $KF_2$ -Peptid **173** zeigte hingegen keine Aktivität ( $IC_{50}$ :  $>0.1 \text{ mM}$ ) in den durchgeführten *MraY*-Assays.

Das bereits bekannte und etablierte Antibiotikum Streptomycin **152** sowie dessen im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Derivate wurden nicht speziell gegen *MraY* getestet. Das aus der Kooperation mit der TU Braunschweig verwendete Enterobactin-Derivat **57** wurde ebenfalls nicht gegen *MraY* im Speziellen getestet, da bereits in Voruntersuchungen von P. Klahn et al. keine antibakterielle Aktivität dieses Derivats **57** festgestellt worden war.



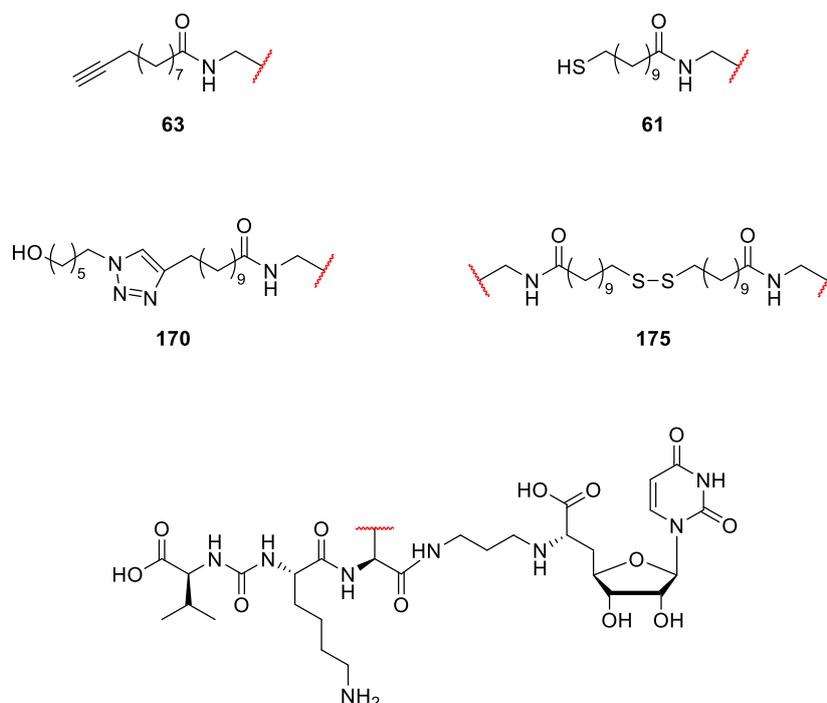
**Abb. 4.58** Übersicht der Transporter-Bausteine aus der Kooperation mit Prof. Kolmar, TU Darmstadt.

**Tabelle 4.1** MraY-Hemmung der aus der Kooperation mit der TU Darmstadt zur Verfügung gestellten Transporter-Moleküle.

Verbindung	172	181	173
IC <sub>50</sub> MraY	98 ± 57 μM	62 ± 21 μM	>0.1 mM

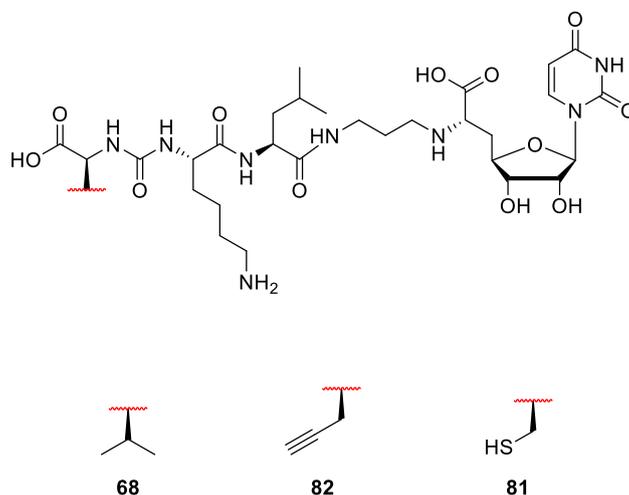
Die zur Konjugation eingesetzten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga aus der ersten Serie wurden ebenfalls auf ihre inhibitorische Aktivität gegen MraY untersucht. Das in der Seitenkette mit einem Alkin-Linker-modifizierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **63** zeigte trotz dieser Modifikation eine gute Aktivität von  $4.0 \pm 0.4 \mu\text{M}$  gegen MraY. Durch die weitere Verlängerung der Seitenkette bei der Muraymycin-Referenzverbindung **170** wurde mit  $4.2 \pm 1.4 \mu\text{M}$  ein identischer IC<sub>50</sub>-Wert erhalten. Somit konnte gezeigt werden, dass diese erweiterte Seitenkettenstruktur keine negativen Auswirkungen auf die Target-Interaktion hat. Eine eventuell eintretende Spaltung der Oxim-Bindung im Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T1** würde eine vergleichbare Struktur freisetzen. Das mit dem in der Seitenkette mit einem Thiol-Linker-

modifizierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **61**, welches aus den späteren Konjugaten intrazellulär freigesetzt werden sollte, zeigte mit  $68 \pm 4$  nM eine sehr gute Inhibition von MraY und war damit wesentlich aktiver als erwartet. Aus den Vorarbeiten ist zwar bekannt, dass größere Reste in dieser Position toleriert und zudem lipophile Strukturen sogar vorteilhaft für die Target-Interaktion sind, dennoch war der starke Gewinn an Aktivität in diesem Ausmaß überraschend. Dieser Befund bestärkt nochmal den Ansatz einer Modifikation an dieser Position in der Muraymycin-Struktur. Mit diesem potenten Muraymycin-Analoga wird ein vorteilhafter Ausgangspunkt für die spaltbaren Konjugate erreicht. Die dimere Muraymycin-Struktur **175**, welche aus zwei über eine Disulfidbrücke verknüpften 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **61** besteht, wurde ebenfalls als Referenzverbindung untersucht. Diese Struktur kann durch längere Lagerung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogs **61** vor Allem in Lösung entstehen und ist damit auch immer zu einem geringen Anteil in Proben des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogs **61** vorhanden. Auch hier war der  $IC_{50}$ -Wert ( $27 \pm 2$  nM) nahezu identisch zu der monomeren Struktur, wenn man von einer Spaltung der Disulfidbrücke und einer Freisetzung von zwei Äquivalenten des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogs **61** ausgeht. Durch die Verwendung des Rohmembran-Assays sind potenziell auch reduzierende Spezies enthalten, was zu einer Spaltung der Disulfidbrücke unter diesen Bedingungen führen kann. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten bei allen entsprechenden Verbindungen des gleichen Konjugations-Typs auf eine Spaltung des Disulfids unter diesen Assay-Bedingungen hin.



**Abb. 4.59** Übersicht der Muraymycin-Konjugat-Vorstufen und Referenzen der ersten Serie.

Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68**, welches die Grundstruktur der Konjugate der zweiten Serie bildet, war bereits in Vorarbeiten im Arbeitskreis auf seine Aktivität gegen MraY getestet worden ( $IC_{50}$ :  $2.5 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ). Auch dieses 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon sollte nach der Zellaufnahme des Konjugats intrazellulär wieder in seiner ursprünglichen Form freigesetzt werden und das Target-Enzym MraY inhibieren.



**Abb. 4.60** Übersicht der Muraymycin-Konjugat-Vorstufen und Referenzen der zweiten und dritten Serie.

Die beiden 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **82** und **81** aus der dritten Serie, welche dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** mit jeweils ausgetauschter terminaler Aminosäure entsprechen, lieferten sehr unterschiedliche Werte im MraY-Assay. So war durch den Austausch des terminalen L-Valins zu L-Propargylglycin bei Verbindung **82** die Aktivität mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $3.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$  im Rahmen des Messfehlers nahezu identisch zu der Referenzverbindung **68**. Dagegen führte der Austausch der terminalen Aminosäure von L-Valin zu L-Cystein bei Verbindung **81** zu einer starken Verbesserung der Aktivität im Vergleich zu dem Referenz-Muraymycin **68**. Mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $280 \pm 77 \text{ nM}$  war das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** am Target deutlich aktiver. Durch diese Aktivitätssteigerung stand auch für die dritte Konjugat-Serie ein potentes 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon zur Verfügung, welches intrazellulär freigesetzt werden und das Target MraY inhibieren kann.

**Tabelle 4.2** MraY-Hemmung der Muraymycin-Konjugat-Vorstufen und Referenzverbindungen der ersten Serie.

Verbindung	63	170	61	175
$IC_{50}$ MraY	$4.0 \pm 0.4 \mu\text{M}$	$4.2 + 1.4 \mu\text{M}$	$68 \pm 4 \text{ nM}$	$27 \pm 2 \text{ nM}$

**Tabelle 4.3** MraY-Hemmung der Muraymycin-Konjugat-Vorstufen und Referenzverbindungen der zweiten und dritten Serie.

Verbindung	68	82	81
IC <sub>50</sub> MraY	2.5 ± 0.6 µM	3.2 ± 0.5 µM	280 ± 77 nM

#### 4.6.1.1.2 Diskussion der MraY-Inhibition der Konjugate

Auch bei der Bestimmung der MraY-Inhibition der Konjugate trat auf Grund der Verwendung des Rohmembran-Assays eine potenzielle Spaltung der Konjugate mit Disulfidbrücke durch die reduktiven Komponenten auf. Die Spaltung der Disulfidbrücke und die resultierende Freisetzung des jeweiligen Muraymycin-Analogons und der Transporter-Einheit führte dazu, dass die bei diesen Verbindungen erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte nur eine Momentaufnahme widerspiegeln und nur eine geringe Aussagekraft über die Inhibitionsfähigkeiten der eigentlichen Konjugate besitzen. Dennoch sind diese Werte nah am realistischen intrazellulären Geschehen, da die eigentliche Wirkung auf den jeweils freigesetzten Muraymycin-Verbindungen, beziehungsweise einer Mischung mit den noch temporär intakten Konjugaten je nach der Geschwindigkeit der Spaltung, beruht.

Dieser Sachverhalt der auftretenden Spaltung wurde auch in der ersten Konjugat-Serie deutlich. Bei einem direkten Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte des stabilen Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T1** mit dem spaltbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T2** fiel ein drastischer Unterschied in der inhibitorischen Aktivität auf. Die Aktivität des Konjugats **T2** entsprach im Rahmen des Messfehlers der der Muraymycin-Referenz **61** (IC<sub>50</sub>: 77 ± 6 µM). Eine vollständige Freisetzung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61** scheint an Hand dieser Daten sehr wahrscheinlich zu sein. Dies würde auch die geringere Aktivität (IC<sub>50</sub>: 18 ± 5 µM) des strukturell sehr ähnlichen Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T1** erklären, welches unter den Assay-Bedingungen an dieser Position nicht gespalten werden kann.

Die erhaltenen Daten des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T1** sind zudem ein Indiz dafür, dass eine Spaltung der Oxim-Bindung unter diesen intrazellulären Bedingungen nicht zu einem signifikanten Teil stattfindet. Eine entsprechende freigesetzte Muraymycin-Verbindung ähnlich der getesteten Muraymycin-Referenzverbindung **170** wäre deutlich aktiver. Eine teilweise Hydrolyse der Oxim-Bindung, wie sie bereits bei der Durchführung der Analytik dieser Streptomycin-Verbindungen beobachtet worden war, lässt sich an Hand dieser Daten jedoch auch nicht vollständig ausschließen.

Auch die weiteren Konjugate der intrazellulär spaltbaren Vertretern aus der ersten Serie zeigten ein ähnliches Verhalten. Für das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T3** wurde mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $933 \pm 126$  nM jedoch ein höherer Wert gemessen als für das freie Muraymycin-Analogon **61**, was jedoch auch durch eine langsamere Spaltung bedingt sein könnte. Durch den sehr großen Rest ist bei dem noch intakten Konjugat **T3** von einer geringeren Inhibition des Targets auszugehen. Bei dem ebenfalls vergleichbaren Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T4** lag der  $IC_{50}$ -Wert mit  $113 \pm 14$  nM wieder näher am gemessenen Wert des freien 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61**.

Auch bei dem Muraymycin-Enterobactin-Konjugat **T5** aus der gleichen Serie befand sich der  $IC_{50}$ -Wert im nanomolaren Bereich, jedoch mit  $123 \pm 8$  nM ebenfalls wieder etwas höher als bei dem entstehenden Referenz-Muraymycin **61**. Eine mögliche Erklärung könnte hier wie bei den analogen Verbindungen der ersten Serie sein, dass die Spaltung der Disulfidbrücke im Falle dieses Konjugats auch wieder etwas langsamer abläuft und der gemessene Wert eine Mischung aus freigesetztem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** und Resten des vollständigen Konjugats **T5** widerspiegelt. Genauere Untersuchungen durch Stabilitätstest konnten mit einigen der Konjugate aus der ersten Serie auf Grund der nur geringen Substanzmenge jedoch nicht durchgeführt werden. Eine genaue Diskussion der gemessenen Stabilitätsdaten erfolgt in Kapitel 4.6.1.3.

**Tabelle 4.4** Zusammenfassung *MraY*-Inhibition der ersten Konjugat-Serie.

Verbindung	T1	T2	T3	T4	T5
Muraymycin-Komponente	63	61	61	61	61
CPM-Komponente	Strept. 60	Strept. 59	GuCOSS 172	KF <sub>2</sub> -CPP 173	(AcO)Ent <sub>KL</sub> 57
$IC_{50}$ <i>MraY</i>	$18 \pm 5$ $\mu$ M	$77 \pm 6$ nM	$933 \pm 126$ nM	$113 \pm 14$ nM	$123 \pm 8$ nM

In der zweiten Serie wurden die intrazellulär spaltbaren Konjugate mit der Verknüpfung an der  $\epsilon$ -Amino-Gruppe des Lysins der Muraymycin-Struktur untersucht. In dieser Serie wurden das Streptomycin-Derivat **59**, GuCOSS **172** und das zellpenetrierende KF<sub>2</sub>-Peptid **173** als Transporter-Einheiten über die reversible Disulfidbrücke und eine Carbamat-Struktur als weitere spaltbare Einheit an das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon konjugiert. Auch hier wurde wieder eine Spaltung der Disulfidbrücken unter den Assay-Bedingungen bei den einzelnen Konjugaten vermutet. So wurden für das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T6** und für das Muraymycin-

KF<sub>2</sub>-Konjugat **T8** IC<sub>50</sub>-Werte erhalten, die jeweils ungefähr dem Wert des Referenz-Muraymycins **68** entsprachen. Für das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T6** wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $1.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$  und für das Konjugat **T8** ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $1.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$  gemessen. Lediglich das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** zeigte mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $477 \pm 33 \text{ nM}$  eine stärkere Inhibition des Targets als das Referenz-Muraymycin **68**. Dies könnte sich durch eine langsamere Abspaltung der GuCOSS-Spezies im Zusammenhang mit einer erhöhten Target-Interaktion des Konjugats **T7** erklären. Für das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T3** der ersten Serie wurde ebenfalls ein IC<sub>50</sub>-Wert festgestellt, der von dem freizusetzenden Muraymycin-Analogon **61** abwich. Im Fall der Verbindung **T3** wurde durch die langsame Spaltung des Konjugats jedoch eine Verschlechterung des IC<sub>50</sub>-Werts erhalten, wogegen mit dem Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** der zweiten Serie eine Verbesserung der Inhibition von *MraY* durch die Konjugation im Vergleich zu dem entsprechenden Muraymycin-Analogon **68** erreicht wurde. Allerdings könnte auch ein Spaltprodukt des hydrolyselabilen GuCOSS-Bausteins für die verbesserte Aktivität verantwortlich sein. Dieser Sachverhalt lässt sich mit den vorhandenen Daten nicht vollständig klären. Die Diskussion der gemessenen Stabilitätsdaten erfolgt auch für die Konjugate der zweiten Serie in Kapitel 4.6.1.3.

**Tabelle 4.5** Zusammenfassung der *MraY*-Inhibition der zweiten Konjugat-Serie.

Verbindung	T6	T7	T8
Muraymycin-Komponente	68	68	68
CPM-Komponente	Strept. 59	GuCOSS 172	KF <sub>2</sub> -CPP 173
IC <sub>50</sub> <i>MraY</i>	$1.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$	$477 \pm 33 \text{ nM}$	$1.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$

Die beiden Muraymycin-Streptomycin-Konjugate aus der dritten Serie liefern wieder einen direkten Vergleich zwischen einem spaltbaren und einem stabilen Konjugations-Ansatz. So wurde für das spaltbare Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T10** ein IC<sub>50</sub> von  $1.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$  bestimmt. Dieser Wert liegt mit einem Faktor von 4.6 über dem der Muraymycin-Referenzverbindung **81**, welche unter den Bedingungen des verwendeten Assays freigesetzt werden sollte. Diese Verschlechterung der Aktivität könnte auch hier ein Indikator für eine langsamere Spaltung des Konjugats durch Reduktion der Disulfidbrücke sein. Der erhaltene Wert spiegelt wahrscheinlich erneut eine Mischung aus dem inaktiveren Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T10** und dem freigesetzten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** wider. Das stabile Muraymycin-

Streptomycin-Konjugat **T9** zeigte mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $13 \pm 2 \mu\text{M}$  eine um einen Faktor vier abgeschwächte Aktivität durch die Konjugation des Streptomycins im Vergleich zu dem Muraymycin-Analogon **82**. Dieser direkte Vergleich der beiden Muraymycin-Streptomycin-Konjugate **T10** und **T9** ist zudem ein weiteres Indiz für das Auftreten der Disulfid-Spaltung und der Freisetzung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **81** aus dem Konjugat **T10** unter den gegebenen Bedingungen des Rohmembran-Assays. Die beiden Konjugat-Verbindungen weisen eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Struktur auf und der Unterschied in ihrer Aktivität gegen *MraY* lässt sich durch diese Spaltung und die damit verbundene Freisetzung des aktiven 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **81** erklären. Der einzige strukturelle Unterschied zwischen beiden Konjugaten besteht lediglich im Vorhandensein der Triazol-Verknüpfung bei Konjugat **T9** im Vergleich zu der Disulfidbrücke bei dem spaltbaren Konjugat **T10** und der daraus resultierenden anderen räumlichen Anordnung des konjugierten Streptomycins. Trotz der sehr großen strukturellen Änderung durch die Konjugation von Streptomycin an dieser terminalen Position des Muraymycin-Grundgerüsts war der störende Einfluss auf die Target-Interaktion im Fall des stabilen Konjugats **T9** nicht sehr ausgeprägt.

**Tabelle 4.6** Zusammenfassung der *MraY*-Inhibition der dritten Konjugat-Serie.

Verbindung	T9	T10
Muraymycin-Komponente	82	81
CPM-Komponente	Strept. 60	Strept. 59
$IC_{50}$ <i>MraY</i>	$13 \pm 2 \mu\text{M}$	$1.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$

#### 4.6.1.2 Vergleich und Diskussion der antibakteriellen Aktivitäten

Die Verbindungen wurden gegen den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  und den Efflux-defizienten *E. coli*-Stamm  $\Delta\text{tolC}$  als Gram-negative Bakterien getestet. Einige ausgewählte Verbindungen wurden zudem gegen *P. aeruginosa* und *S. aureus* getestet. Zunächst erfolgt in Unterkapitel 4.6.1.2.1 die Diskussion der Transporter- und Muraymycin-Referenzverbindungen. Im folgenden Unterkapitel 4.6.1.2.2 werden die antibakteriellen Aktivitäten der Konjugate besprochen.

#### 4.6.1.2.1 Diskussion der antibakteriellen Aktivitäten der Vorstufen und Referenzverbindungen

Das kommerziell erhältliche Streptomycin **152** wurde als Referenzverbindung ebenfalls auf seine antibakterielle Aktivität getestet. Gegen *E. coli*  $\Delta tolC$  wurde für das bakterielle Wachstum ein  $IC_{50}$ -Wert von  $3.8 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$  ( $5.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ) und für *E. coli* DH5 $\alpha$  ein  $IC_{50}$ -Wert von  $7.6 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$  ( $10 \pm 2 \mu\text{M}$ ) gemessen.

Die Modifikation mit dem Azid-haltigen Linker bei dem Streptomycin-Derivat **60** führte zu einem starken Verlust der Aktivität gegen *E. coli* DH5 $\alpha$  ( $IC_{50}$ :  $>100 \mu\text{g/mL}$ ). Gegen den Effluxdefizienten *E. coli*-Stamm  $\Delta tolC$  trat ebenfalls eine Abschwächung der Aktivität auf, aber etwas Aktivität konnte hier erhalten werden ( $IC_{50}$ :  $64 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ ,  $61 \pm 3 \mu\text{M}$ ). Die Streptomycin-Referenzverbindung **156** zeigte ebenfalls einen Verlust der Aktivität gegen *E. coli* DH5 $\alpha$  ( $IC_{50}$ :  $>100 \mu\text{g/mL}$ ). Gegen *E. coli*  $\Delta tolC$  wurde ein ähnliches Ergebnis wie für das Streptomycin-Derivat **60** erhalten und es trat eine Abschwächung der Aktivität auf ( $IC_{50}$ :  $70.6 \mu\text{g/mL}$ ,  $57 \mu\text{M}$ ). Bei den zeitverzögert durchgeführten Wiederholungsmessungen wurde jedoch eine Zersetzung der Probe festgestellt. So wurde bei der ersten Wiederholungsmessung ein  $IC_{50}$ -Wert von  $31 \mu\text{g/mL}$  ( $25 \mu\text{M}$ ) gemessen, bei der zweiten Wiederholung ein  $IC_{50}$  von  $6.7 \mu\text{g/mL}$  ( $5.4 \mu\text{M}$ ), was für einen langsamen Zerfall der Verbindung und eine Freisetzung des Streptomycins **152** spricht. Der Zeitraum der Messungen erstreckte sich insgesamt über ein Jahr.

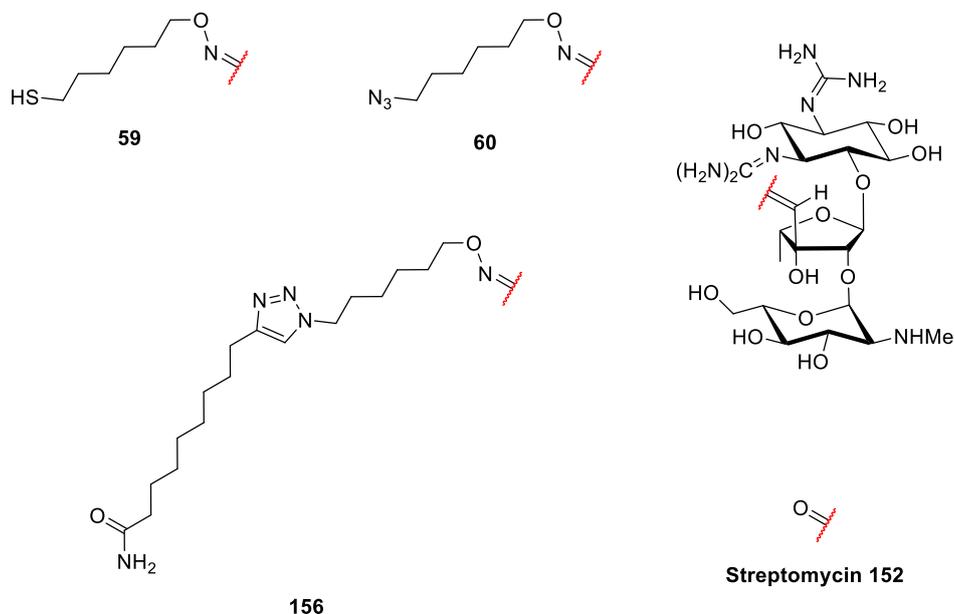


Abb. 4.61 Übersicht über die hergestellten Streptomycin-Derivate.

Bei dem Streptomycin-Derivat mit dem Thiol-haltigen Linker **59** wurde die gemessene Aktivität der Streptomycin-Referenzverbindung **152** gegen die beiden *E. coli*-Stämme  $\Delta toIC$  und DH5 $\alpha$  sogar mit einem Faktor zwei übertroffen. Eine teilweise Hydrolyse der Oxim-Bindung in wässriger Lösung war jedoch bereits bei der Analytik der Verbindung beobachtet worden, wodurch das Streptomycin **152** wieder freigesetzt wurde und zu einem Anteil von circa 10% in der Lösung vorlag. Das Gemisch wurde dennoch unter diesen Bedingungen getestet, da dieses Verhalten intrinsisch für diesen Verbindungstyp ist und bei der angedachten Applikation auch auftreten würde.

**Tabelle 4.7** Zusammenfassung der antibakteriellen Aktivitäten der Streptomycine (in [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] und [ $\mu\text{M}$ ] in Klammern).

Verbindung	152	60	156*	59**
IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> $\Delta toIC$	3.8 $\pm$ 0.4 (5.3 $\pm$ 0.6)	64 $\pm$ 3 (61 $\pm$ 3)	71 (57)	3.2 $\pm$ 0.2 (3.0 $\pm$ 0.2)
IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	7.6 $\pm$ 0.8 (10 $\pm$ 2)	>100	>100	5.0 $\pm$ 1.5 (4.8 $\pm$ 1.4)

\*Zersetzung bei Wiederholungsmessungen; \*\*Mit 10% Streptomycin **152** in der Probe

Die beiden von unserem Kooperationspartner Prof. H. Kolmar zur Verfügung gestellten Silsesquioxane **172** und **181** sowie das zellpenetrierende KF<sub>2</sub>-Peptid **173** wurden ebenfalls als Referenzen gegen beide *E. coli*-Stämme getestet. Das GuCOSS-Derivat **181** wurde als zusätzliche Referenz getestet, um den Einfluss des freien Thiols bei GuCOSS **172** zu untersuchen. Strukturell entspricht diese Verbindung der GuCOSS-Verbindung **172** mit einer verkürzten Linker-Einheit und einer Carbonsäuregruppe statt des terminalen Thiols (siehe Abbildung 4.1, Kapitel 4.6.1.1.1). Durch diese Variation in der Struktur wurde eine Abschwächung der Aktivität gegen beide getestete *E. coli*-Stämme erhalten. Gegen *E. coli*  $\Delta toIC$  wurde eine Halbierung der Aktivität beobachtet, bei DH5 $\alpha$  wurde die Aktivität sogar um einen Faktor von sieben reduziert. Alle aus dieser Kooperation erhaltenen Verbindungen zeigten bereits eine antibakterielle Aktivität gegen beide *E. coli*-Stämme (siehe Tabelle 4.8). Auf Grund der Struktur und hohen Polarität der hier eingesetzten Verbindungen liegt die Vermutung nahe, dass die antibakterielle Aktivität von Membran-disruptiven Effekten herrührt. Bei dem Vergleich der beiden GuCOSS-Verbindungen **172** und **181** wurde zudem der zusätzliche Einfluss der terminalen Thiol-Gruppe auf die antibakterielle Aktivität deutlich

gezeigt. Diese erhöhte antibakterielle Aktivität beim Vorhandensein eines freien Thiols wurde auch bei dem Thiol-modifizierten Streptomycin-Derivat **59** beobachtet.

Gegen Gram-positiven *S. aureus* (Newman-Stamm) wurde für die Transporter-Referenzverbindungen **172**, **181** und **173** ebenfalls eine antibakterielle Wirksamkeit festgestellt (siehe Tabelle 4.8). Für das GuCOSS-Derivat **172** wurde eine gute antibakterielle Aktivität von  $5.9 \pm 2.5 \mu\text{M}$  gemessen. Das GuCOSS-Derivat **181** zeigte wie bei dem Gram-negativen *E. coli* DH5 $\alpha$  eine abgeschwächte Aktivität im Vergleich zu dem GuCOSS-Derivat **172**. Dieser Wert wurde bisher jedoch nur einfach bestimmt und ist als vorläufiges Ergebnis anzusehen. Das zellpenetrierende KF<sub>2</sub>-Peptid **173** zeigte mit  $6.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$  eine gute antibakterielle Aktivität gegen *S. aureus*. Diese antibakteriellen Effekte der Transporter-Verbindungen beruhen auch hier wahrscheinlich auf einer unspezifischen Disruption der Zellmembran.

**Tabelle 4.8** Zusammenfassung der antibakteriellen Aktivitäten der Transporter-Referenzverbindungen (in  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und  $\mu\text{M}$  in Klammern).

Verbindung	<b>172</b>	<b>181</b>	<b>173</b>
<b>IC<sub>50</sub> <i>E. coli</i> <math>\Delta\text{tolC}</math></b>	$1.6 \pm 0.2$ ( $0.8 \pm 0.1$ )	$3.7 \pm 3.2$ ( $1.8 \pm 1.6$ )	$3.4 \pm 1.4$ ( $1.6 \pm 0.7$ )
<b>IC<sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	$9.0 \pm 1.4$ ( $4.5 \pm 0.7$ )	$65 \pm 30$ ( $31 \pm 14$ )	$30 \pm 10$ ( $14 \pm 5$ )
<b>IC<sub>50</sub> <i>S. aureus</i> Newman</b>	$12 \pm 5$ ( $5.9 \pm 2.5$ )	87 (42)	$13.1 \pm 1.7$ ( $6.3 \pm 0.9$ )

Das Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57** war in der Arbeitsgruppe von P. Klahn bereits auf seine antibakteriellen Eigenschaften untersucht worden und es konnte keine antibakterielle Aktivität dieser Verbindung nachgewiesen werden.<sup>[145]</sup>

Die Vorstufen und Referenzverbindungen der nicht-spaltbaren Konjugate, die 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **63**, **170** und **82**, wurden zur Untersuchung des Einflusses der jeweiligen Modifikationen ebenfalls gegen *E. coli* getestet. Wie erwartet wurde für keines dieser vereinfachten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga eine signifikante antibakterielle Aktivität  $<100 \mu\text{g}/\text{mL}$  gegen die beiden *E. coli*-Stämme festgestellt.

Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** war bereits in Vorarbeiten biologisch evaluiert worden und zeigte ebenfalls keine antibakterielle Aktivität  $<100 \mu\text{g}/\text{mL}$  gegen die beiden getesteten Stämme von *E. coli*.

Die Thiol-haltigen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga, welche intrazellulär freigesetzt werden sollten, wurden ebenfalls als Referenzverbindungen evaluiert. Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** zeigte trotz des durch die Modifikation verbesserten  $IC_{50}$ -Wertes von  $280 \pm 77$  nM gegen *MraY* ebenso keine nennenswerte antibakterielle Aktivität gegen *E. coli*. Dieser Umstand verdeutlicht nochmal das Problem der limitierten Zellaufnahme dieser vereinfachten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga.

Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61**, welches einen noch besseren  $IC_{50}$ -Wert gegen *MraY* ( $68 \pm 4$  nM) als das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** erzielte, zeigte mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $27 \pm 7$   $\mu\text{g/mL}$  ( $23 \pm 6$   $\mu\text{M}$ ) dagegen eine gute antibakterielle Aktivität gegen *E. coli*  $\Delta\text{tolC}$ . Ein Faktor für diese verbesserte Aktivität ist wahrscheinlich in der erhöhten Zellaufnahme durch die lipophile Seitenkettenstruktur begründet und nicht alleine in der verbesserten Inhibition von *MraY*. Gegen den Efflux-kompetenten DH5 $\alpha$ -Stamm wurde keine Aktivität ( $IC_{50}$ :  $>100$   $\mu\text{g/mL}$ ) gefunden. Ebenso wurde keine antibakterielle Aktivität  $<100$   $\mu\text{g/mL}$  gegen *S. aureus* festgestellt. Die Ergebnisse des dimeren 5'-Desoxy-Muraymycins **175** ( $IC_{50}$ :  $31 \pm 6$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $14 \pm 3$   $\mu\text{M}$ ) entsprachen im Rahmen des Messfehlers ungefähr denen des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61**. Eine dimere Muraymycin-Struktur bietet demnach keine Vorteile bei der Zellaufnahme in Gram-negative *E. coli*-Bakterien. Das vielversprechende 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** wurde darüber hinaus auch gegen den Gram-negativen *P. aeruginosa*-PAO1-Stamm getestet. Hier wurde jedoch auch keine antibakterielle Aktivität  $<100$   $\mu\text{g/mL}$  gemessen.

**Tabelle 4.9** Zusammenfassung der antibakteriellen Aktivitäten der Muraymycin-Referenzverbindungen (in  $\mu\text{g/mL}$  und  $\mu\text{M}$  in Klammern).

Verbindung	63	170	61	175	82	81
$IC_{50}$ <i>E. coli</i> $\Delta\text{tolC}$	$>100$	$>100$	$27 \pm 7$ ( $23 \pm 6$ )	$31 \pm 6$ ( $14 \pm 3$ )	$>100$	$>100$
$IC_{50}$ <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	$>100$	$>100$	$>100$	$>100$	$>100$	$>100$
$IC_{50}$ <i>S. aureus</i> Newman	-	-	$>100$	-	-	-

#### 4.6.1.2.2 Diskussion der antibakteriellen Aktivitäten der Konjugat-Verbindungen

Der direkte Vergleich zwischen der beiden Muraymycin-Streptomycin-Konjugaten **T1** und **T2**, einem Vertreter eines intrazellulär stabilen und eines intrazellulär spaltbaren Konjugats,

zeigte in der antibakteriellen Testung einen eklatanten Unterschied zwischen beiden Vertretern. Das stabile Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T1** zeigte keine antibakterielle Aktivität gegen beide getesteten *E. coli*-Stämme. Ob eine verbesserte Zellaufnahme mit diesem Konjugat erfolgt und die inhibitorische Potenz gegen MraY nicht ausreicht lässt sich mit diesen Daten alleine nicht klären. Weitergehende Untersuchungen mit einem Zellaufnahme-Assay sind für diese Verbindung notwendig. Im Unterschied zu dem spaltbaren Konjugat **T2** besitzt das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T1** eine gewisse Rigidisierung mit der Triazol-Struktur in der Seitenkette, was im Einklang mit den Ergebnissen der reduzierten antibakteriellen Aktivitäten der Verbindungen von Matsuda, Ichikawa et al. steht.<sup>[84,85]</sup> Das intrazellulär spaltbare Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T2** zeigte jedoch von allen hergestellten Konjugaten die stärkste antibakterielle Aktivität gegen die beiden Stämme von *E. coli*. Im Detail wurde gegen *E. coli*  $\Delta tolC$  ein  $IC_{50}$ -Wert von  $1.6 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$  ( $0.71 \pm 0.14 \mu\text{M}$ ) gemessen. Gegen den DH5 $\alpha$ -Stamm wurde ebenfalls ein sehr guter Wert von  $4.3 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$  ( $2.0 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ) erreicht. Damit übertrafen diese Werte sogar jeweils die gefundenen Aktivitäten der Streptomycin-Referenzen **152** und **59**. Die gefundenen Aktivitäten lassen sich demnach nicht allein durch eine Freisetzung und der Wirkung von Streptomycin erklären. Der Gewinn an antibakterieller Aktivität könnte damit ein Indiz für ein funktionierendes Konjugations-Konzept sein. Jedoch ist auch eine extrazelluläre Spaltung der Oxim-Bindung und eine Aufnahme von dadurch freigesetztem Streptomycin möglich, welches zu einer Verringerung der Membranintegrität in den Bakterien führt, was eine nachfolgend verstärkte Aufnahme des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T2** bedingt. Ebenso könnten auch rein additive Effekte durch die Wirkung von freiem Streptomycin und dem entstehenden Muraymycin-Spaltprodukt die verbesserte Aktivität erklären. Der Vergleich der beiden Konjugate **T1** und **T2** deutet jedoch darauf hin, dass diese Effekte hier zu vernachlässigen sind. Freies Streptomycin sollte bei dem Konjugat **T1** zu einem ähnlichen Maße durch Hydrolyse der Oxim-Bindung entstehen wie bei dem Konjugat **T2** und damit einen vergleichbaren Effekt hervorrufen. Zur genaueren Untersuchung wurden zwei weitere antibakterielle Testungen mit äquivalenten Mengen von jeweils dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** mit Streptomycin **152** und dem Streptomycin-Derivat **59** durchgeführt, um die angesprochenen möglichen additiven Effekte oder eine Membran-disruptive Wirkung von zuvor abgespaltenem Streptomycin ausschließen zu können. Die Ergebnisse der betreffenden Assays sind zur besseren Übersicht in Tabelle 4.10 gegenübergestellt. Die äquimolare Mischung aus dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** und dem Streptomycin-Derivat **59** führte zu einer um den Faktor zwei besseren Aktivität gegen beide Stämme als die äquimolare Mischung aus dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** und Streptomycin **152**. Es ist jedoch auch deutlich zu

erkennen, dass das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T2** signifikant aktiver war als die jeweiligen äquimolaren Mischungen des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61** mit Streptomycin **152** beziehungsweise dem Streptomycin-Derivat **59**. Dies spricht eindeutig für eine verbesserte Zellaufnahme durch die durchgeführte Konjugation.

**Tabelle 4.10** Detaillierte antibakterielle Evaluation des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T2**.

Verbindung	IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> $\Delta$ <i>tolC</i> [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ [ $\mu$ M]
<b>61</b>	23 $\pm$ 6	>100
<b>152</b>	5.3 $\pm$ 0.6	10 $\pm$ 2
<b>61 + 152</b>	6.2 $\pm$ 2.4	8.9 $\pm$ 0.1
<b>59*</b>	3.0 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 1.4
<b>61 + 59*</b>	3.1	3.3
<b>T2</b>	0.71 $\pm$ 0.14	2.0 $\pm$ 0.7

\*Mit 10% Streptomycin **152** in der Probe.

Die beiden Konjugat-Verbindungen der ersten Serie, die im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kolmar der TU Darmstadt hergestellt wurden, also das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T3** und das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T4**, wurden ebenfalls auf ihre antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* getestet. Für beide Konjugate wurden recht ähnliche Aktivitäten gefunden (siehe Tabelle 4.11). Das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T3** zeigte eine Verschlechterung der Aktivität durch die Konjugation an das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** gegen den  $\Delta$ *tolC*-Stamm um einen Faktor von vier im Vergleich zu der GuCOSS-Referenzverbindung **172** (siehe Tabelle 4.8). Eine Abschwächung der vermuteten Membran-disruptiven Effekte des GuCOSS-Bausteins **172** könnte eine mögliche Erklärung hierfür sein. Die hier erhaltenen Daten entsprachen für *E. coli*  $\Delta$ *tolC* eher denen der GuCOSS-Referenzverbindung **181**, welche ebenfalls keine freie Thiol-Gruppe besitzt. Bei dem DH5 $\alpha$ -Stamm wurde dagegen eine um den Faktor 1.7 verbesserte Aktivität im Vergleich zu der GuCOSS-Referenzverbindung **172** gefunden und damit auch eine weitaus bessere Aktivität als bei der GuCOSS-Referenzverbindung **181**. Dies könnte auf eine verstärkte Zellaufnahme und die Wirkung des intrazellulär freigesetzten Muraymycin-Analogons **61** am Zielenzym *MraY* hindeuten. Bei dem Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T4** wurde für den  $\Delta$ *tolC*-Stamm ein identischer IC<sub>50</sub>-Wert im Vergleich zur KF<sub>2</sub>-Referenzverbindung **173** gefunden. Bei dem *E. coli*-DH5 $\alpha$ -Stamm wurde erneut eine verbesserte Aktivität im Vergleich zu der entsprechenden Referenzverbindung gemessen, hier sogar eine um den Faktor 10 bessere Aktivität im Vergleich zu der KF<sub>2</sub>-Referenzverbindung **173**. Dies

könnte auch für das Konjugat **T4** für eine erhöhte Zellaufnahme und Inhibition von MraY durch das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** sprechen. Diese gesteigerte Aktivität gegen den DH5 $\alpha$ -Stamm im Vergleich zu den Referenzverbindungen war in beiden Fällen dahingehend überraschend, da *E. coli* DH5 $\alpha$  mit seinen intakten Efflux-Pumpen einen zusätzlichen Abwehrmechanismus und eine höhere Resilienz gegen Antibiotika im Vergleich zu dem Efflux-defizienten  $\Delta tolC$ -Stamm besitzt. Die Ergebnisse des Muraymycin-GuCOSS-Konjugats **T3** gegen *S. aureus* zeigten auch wieder eine Abschwächung der Aktivität durch die Konjugation im Vergleich zu dem freien GuCOSS-Baustein **172**. Ob diese verminderte Aktivität auf eine Reduktion der vermuteten Membran-disruptiven Effekte zurückzuführen ist, kann auch hier nur mit den vorhandenen Daten spekuliert werden. Zur Untersuchung einer verbesserten Zellaufnahme in Gram-positivem *S. aureus* müsste zunächst ein entsprechender Zellaufnahme-Assay etabliert werden. Ein starkes Indiz für eine verbesserte Zellaufnahme des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61** lieferte allerdings der Vergleich zu den erhaltenen Daten des Muraymycin-GuCOSS-Konjugats **T7** der zweiten Serie (siehe Tabelle 4.12). Durch die Verwendung des am MraY-Target weniger aktiven Muraymycin-Analogons **68** wurde ein kompletter Verlust der Aktivität gegen *S. aureus* beobachtet. Das Konjugat **T3** mit dem intrinsisch aktiveren 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** zeigte dagegen noch eine gute antibakterielle Aktivität. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte allerdings auch eine unterschiedliche Abschwächung der unspezifischen antibakteriellen Aktivität des GuCOSS-Bausteins **172** durch die unterschiedlichen Konjugationsansätze sein. Für das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T4** wurde im Rahmen des Messfehlers eine identische Aktivität gegen *S. aureus* im Vergleich zu dem freien zellpenetrierenden KF<sub>2</sub>-Peptid **173** gemessen. Ein Vergleich zu den Daten des entsprechenden Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugats **T8** aus der zweiten Serie ergibt ein ähnliches Bild wie bei den Muraymycin-GuCOSS-Konjugaten (siehe Tabelle 4.12). Auch in diesem Fall reichen diese Daten alleine nicht für eine detailliertere Aussage über eine verbesserte Zellaufnahme des Muraymycin-Analogons aus.

Die Konjugation des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61** mit dem Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57** führte zu einer fast 12-fachen Steigerung der antibakteriellen Aktivität gegen den Efflux-defizienten *E. coli*-Stamm  $\Delta tolC$  im Vergleich zu dem Referenz-Muraymycin **61**. Das Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57** war der einzige Konjugationspartner im Rahmen dieser Arbeit, bei dem keine intrinsische antibakterielle Aktivität vorlag. Im Hinblick auf die Aktivität des Muraymycin-Enterobactin-Konjugats **T5** gegen MraY, die auch keine Hinweise auf einen stabilen neuen Bindungspartner für das Target lieferte, kann dieser Befund als eine Bestätigung des Transportvorgangs des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61** als einzig antibakterielle wirksame Spezies in diesem System in das Innere der Zelle durch das

Konjugationskonzept gesehen werden. Bei dem *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  mit intaktem Efflux war weder für die Referenzverbindung **61** noch für das Konjugat **T5** eine nennenswerte Aktivität feststellbar (>100 mg/mL). Zusätzlich wurde das Muraymycin-Enterobactin-Konjugat **T5** gegen *P. aeruginosa* PAO1 als weiteres Gram-negatives Bakterium getestet. Wie bei der Muraymycin-Referenz **61** wurde für Konjugat **T5** eine antibakterielle Aktivität >100 mg/mL gegen *P. aeruginosa* gemessen.

Alle spaltbaren Konjugat-Verbindungen der ersten Serie lassen sich gegeneinander bezüglich der Effektivität der zellpenetrierenden Einheiten vergleichen. Problematisch macht die Evaluation der verbesserten Zellaufnahme jedoch, dass alle zellpenetrierenden Einheiten, bis auf das Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57**, selbst bereits eine antibakterielle Aktivität aufweisen. So lässt sich nur an Hand der durchgeführten antibakteriellen Assays für die beiden Konjugate **T3** und **T4** nicht eindeutig eine Aussage über ein verändertes Verhalten bei der Zellaufnahme der beiden Konjugate treffen. Bei dem Muraymycin-Enterobactin-Konjugat **T5** lässt sich dagegen eindeutig eine verbesserte Zellaufnahme an Hand der erhaltenen antibakteriellen Daten für *E. coli*  $\Delta$ *tolC* ablesen. Ebenso ist bei dem Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T2** die deutlich gesteigerte antibakterielle Aktivität gegenüber den Referenzverbindungen für beide *E. coli*-Stämme eine Validierung einer erhöhten Zellaufnahme des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61**.

**Tabelle 4.11** Zusammenfassung der antibakteriellen Aktivitäten der ersten Konjugat-Serie (in [ $\mu$ g/mL] und [ $\mu$ M] in Klammern).

Verbindung	T1	T2	T3	T4	T5
<b>Muraymycin-Komponente</b>	<b>63</b>	<b>61</b>	<b>61</b>	<b>61</b>	<b>61</b>
<b>CPM-Komponente</b>	<b>Strept. 60</b>	<b>Strept. 59</b>	<b>GuCOSS 172</b>	<b>KF<sub>2</sub>-CPP 173</b>	<b>(AcO)Ent<sub>KL</sub> 57</b>
<b>IC<sub>50</sub> <i>E. coli</i> <math>\Delta</math><i>tolC</i></b>	>100	1.6 $\pm$ 0.4 (0.71 $\pm$ 0.14)	9.5 $\pm$ 3.6 (2.9 $\pm$ 1.1)	5.3 $\pm$ 2.6 (1.6 $\pm$ 0.9)	4.0 $\pm$ 3.3 (2.0 $\pm$ 1.7)
<b>IC<sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	>100	4.3 $\pm$ 1.5 (2.0 $\pm$ 0.7)	8.9 $\pm$ 1.7 (2.7 $\pm$ 0.6)	4.7 $\pm$ 1.1 (1.4 $\pm$ 0.4)	>100
<b>IC<sub>50</sub> <i>S. aureus</i> Newman</b>	-	-	51 $\pm$ 8 (16 $\pm$ 3)	18 $\pm$ 3 (5.5 $\pm$ 0.8)	-

In der zweiten Serie zeigte das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T6** einen Verlust der Aktivität gegen *E. coli* DH5 $\alpha$  und eine reduzierte Aktivität gegen *E. coli*  $\Delta toIC$  im Vergleich zu den Streptomycin-Referenzen **152** und **59**. Das könnte einerseits an der langsamen Spaltung des Konjugats und der damit verbundenen langsameren Freisetzung des Streptomycin-Derivats **59** liegen (siehe Stabilitätstests in Kapitel 4.6.1.3), oder andererseits an einer verminderten Zellaufnahme des Streptomycins durch die Konjugation. An Hand dieser Daten lässt sich jedoch ohne Zellaufnahme-Assay keine genauere Aussage über die Zellaufnahme des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** treffen.

Das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T8** zeigte im Vergleich zur getesteten Referenzverbindung des zellpenetrierenden KF<sub>2</sub>-Peptids **173** im Rahmen des Messfehlers eine identische Aktivität gegen beide *E. coli*-Stämme. Das zellpenetrierende KF<sub>2</sub>-Peptid **173** war intrinsisch bereits so aktiv, dass die Muraymycin-Referenzverbindung **68**, welche einen IC<sub>50</sub>-Wert im unteren mikromolaren Bereich gegen MraY zeigte, wahrscheinlich effektiv keinen Unterschied mehr in der Aktivität ausmachte. Für einen wirklichen Nachweis einer gesteigerten Zellaufnahme des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** durch die Konjugation war hier die Durchführung eines Zellaufnahme-Assays notwendig (siehe Kapitel 4.6.1.4). Für das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** sahen die Ergebnisse etwas anders aus. Hier fand ähnlich wie in der ersten Konjugat-Serie eine Verminderung der antibakteriellen Aktivität des Muraymycin-GuCOSS-Konjugats im Vergleich zu der GuCOSS-Referenzverbindung **172** statt. Hier war dies jedoch bei beiden Stämmen von *E. coli* der Fall und es wurde für  $\Delta toIC$  eine 2.5-fach schwächere und für DH5 $\alpha$  eine fünffach schwächere Aktivität im Vergleich zu der GuCOSS-Referenzverbindung **172** bestimmt. Es besteht auch bei diesem Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** aus der zweiten Serie die Vermutung, dass durch die Ausbildung der Disulfidbrücke im Konjugat der vermutete Membran-disruptive Effekt im Vergleich zu dem freien GuCOSS-Baustein **172** eingeschränkt wird. Diese Ergebnisse entsprachen auch hier wieder denen der GuCOSS-Referenzverbindung **181**, welche kein freies Thiol aufweist. Auch in diesem Fall fand eine genauere Untersuchung mittels eines Zellaufnahme-Assays statt (siehe Kapitel 4.6.1.4).

Weder für das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7**, noch das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T8** der zweiten Konjugat-Serie wurde eine antibakterielle Aktivität gegen *S. aureus* festgestellt.

**Tabelle 4.12** Zusammenfassung der antibakteriellen Aktivitäten der zweiten Konjugat-Serie (in  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und  $\mu\text{M}$  in Klammern).

Verbindung	T6	T7	T8
Muraymycin-Komponente	68	68	68
CPM-Komponente	Strept. 59	GuCOSS 172	KF <sub>2</sub> -CPP 173
IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> $\Delta\text{tolC}$	26 ± 12 (13 ± 6)	6.5 ± 2.1 (2.1 ± 0.7)	6.4 ± 3.9 (2.1 ± 1.3)
IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	>100	63 ± 3 (20 ± 1)	44 ± 9 (14 ± 3)
IC <sub>50</sub> <i>S. aureus</i> Newman	-	>100	>50

In der dritten Serie der Konjugate erfolgte wieder ein Vergleich zweier Muraymycin-Streptomycin-Konjugate mit unterschiedlichem Konjugationsprinzip. Identisch zu den Ergebnissen aus der ersten Serie führte auch hier eine stabile Konjugation zwischen Muraymycin und Streptomycin an der terminalen Aminosäure des Muraymycin-Analogons zu einem kompletten Verlust der antibakteriellen Aktivität gegen die *E. coli*-Stämme. Das vergleichbare spaltbare Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T10** zeigte ebenfalls keine antibakterielle Aktivität ( $<100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) gegen DH5 $\alpha$ , aber dennoch mit  $73 \pm 4 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $36 \pm 2 \mu\text{M}$ ) noch etwas Aktivität gegen den Efflux-defizienten *E. coli*-Stamm  $\Delta\text{tolC}$ . Interessant war hier nochmal der direkte Vergleich zu dem Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T6** aus der zweiten Serie, welches einen identischen IC<sub>50</sub>-Wert gegen MraY aufwies, aber dreifach so aktiv im antibakteriellen Assay gegen *E. coli*  $\Delta\text{tolC}$  war. Das freigesetzte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** bei Konjugat **T10** ist ein wesentlich besserer MraY-Inhibitor als das entsprechende Muraymycin-Analogon **68**, das aus dem Konjugat **T6** hervorgeht. Die gefundenen Aktivitätsunterschiede können entweder in einer schlechteren Zellaufnahme des Konjugats oder einer langsameren Spaltung der Disulfid-Bindung nach Zellaufnahme und damit auch einer langsameren Freisetzung des am Target aktiven 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **81** begründet sein. Im Fall des Konjugats **T10** könnte die Sterik der Verbindung eine Rolle spielen, die die Spaltung der Disulfidbrücke hindert. Bei dem Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T6** befindet sich das Streptomycin durch die Anknüpfung am  $\epsilon$ -Amin des Lysins freier im Raum und kann weniger von der Muraymycin-Struktur abgeschirmt werden. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass das Oxim bereits

extrazellulär in unterschiedlichem Maße hydrolysiert wird und die gemessene antibakterielle Wirkung von freigesetztem Streptomycin herrührt. Diese Hydrolyse des Oxims sollte jedoch auch bei dem vergleichbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T9** in einem gewissen Maße ablaufen. Zur Aufklärung der Ursachen muss eine zusätzliche Evaluation mittels Zellaufnahme-Assays auch hier mit beiden Konjugaten erfolgen.

**Tabelle 4.13** Zusammenfassung der antibakteriellen Aktivitäten der dritten Konjugat-Serie (in  $\mu\text{g/mL}$  und  $\mu\text{M}$  in Klammern).

Verbindung	T9	T10
Muraymycin-Komponente	82	81
CPM-Komponente	Strept. 60	Strept. 59
IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> $\Delta\text{tolC}$	>100	73 $\pm$ 4 (36 $\pm$ 2)
IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	>100	>100

#### 4.6.1.3 Stabilitätstests

Wie bereits in Kapitel 4.6.1.1.2 angesprochen konnten nicht für alle Konjugate Stabilitätsdaten ermittelt werden, da entweder nicht genügend Substanz für die Messungen zur Verfügung stand oder die Qualität der Messungen für einige der Verbindungen nicht ausreichend war.

Für die Streptomycin-Derivate war es ebenfalls nicht möglich, einen vollständigen Datensatz zu erhalten. Hier war in einigen Fällen die Qualität der Kalibriergeraden nicht ausreichend, was vielleicht auch auf das pH-abhängige Gleichgewicht der Spaltung der Oxim-Bindung in wässriger Lösung zurückzuführen sein kann. Apparative Fehler an der HPLC- und HRMS-Einheit sind jedoch auch mögliche Fehlerquellen für die schlechte Qualität der Daten.

Das Streptomycin-Derivat **60** war in Puffer über einen Zeitraum von 24 Stunden stabil, zerfiel jedoch mit einer Halbwertszeit von 39 min relativ schnell in bakteriellem Zelllysate. Für das Streptomycin-Derivat **156** konnten in Puffer keine Stabilitätsdaten aufgenommen werden, da zum Zeitpunkt der Messung die Stammlösung bereits komplett zersetzt war. Eine Messung in bakteriellem Zelllysate konnte jedoch mit der noch frischen Stammlösung durchgeführt werden. Durch eine Verlängerung der Seitenkette dieses Streptomycin-Derivates **156** wurde eine erhöhte Stabilität der Verbindung im Vergleich zu dem Streptomycin-Derivat **60** in bakteriellem Zelllysate erreicht. Das Streptomycin-Derivat **59** ist bereits bei der Analytik in den NMR-

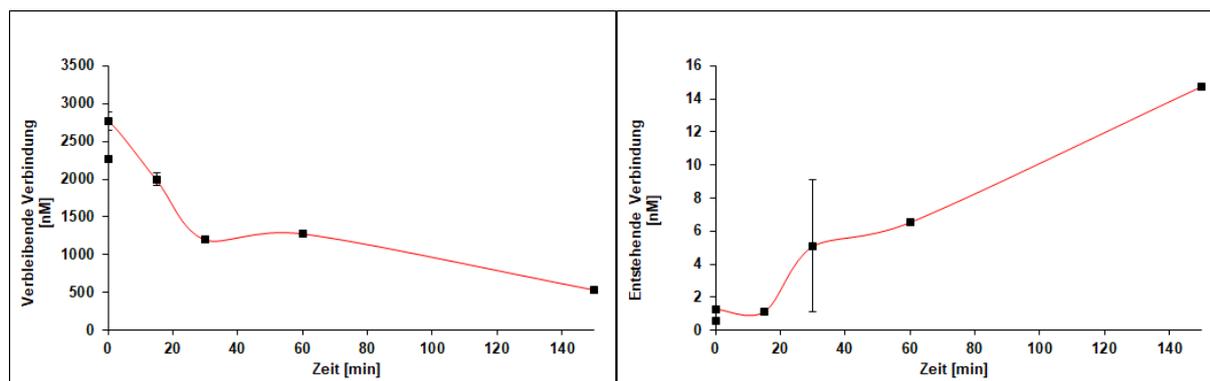
Messungen in deuteriertem Wasser teilweise zerfallen. Bei dieser Verbindung wurde eine pH-abhängige Hydrolyse der Oxim-Bindung vermutet. In Phosphatpuffer zeigte das Streptomycin-Derivat **59** hingegen keine Zersetzung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Für die Messung der Stabilität des Streptomycin-Derivats **59** in bakteriellem Zelllysate konnten bisher keine auswertbaren Daten erhalten werden.

**Tabelle 4.14** Vorläufige Stabilitätsdaten  $t_{1/2}$  der Streptomycin-Derivate in Phosphatpuffer (pH = 7.3) und bakteriellem Zelllysate (aus *E. coli*  $\Delta tolC$ ).

Verbindung	Puffer	Bakt. Zelllysate
<b>60</b>	>24 h	39 min
<b>156</b>	keine Daten	3.3 h
<b>59</b>	>24 h	keine Daten

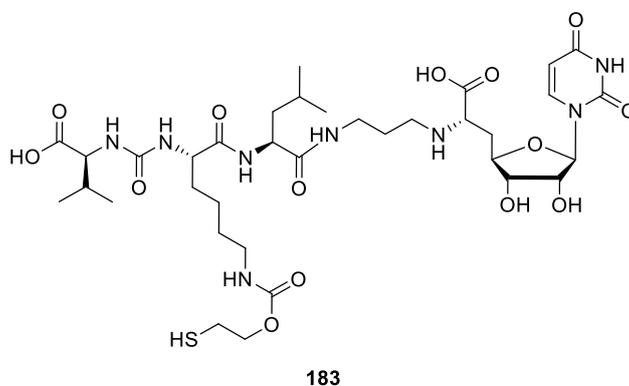
Die beiden Muraymycin-Streptomycin-Konjugate der ersten Serie mit unterschiedlichem Konjugationsprinzip, das stabile Konjugat **T1** und das intrazellulär spaltbare Konjugat **T2** wurden ebenfalls auf ihre Stabilität in bakteriellem Zelllysate untersucht. Für das spaltbare Konjugat **T2** wurde eine Halbwertszeit von 1.3 h gemessen. Das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T1** wies dagegen eine Halbwertszeit von 11 h auf. Hierbei handelt es sich allerdings um vorläufige Daten, die nochmal verifiziert werden müssen. Diese Daten stehen jedoch auch im Einklang mit den gemessenen  $IC_{50}$ -Werten gegen *MraY* der beiden Konjugate und der vermuteten Freisetzung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61** aus dem spaltbaren Konjugat **T2** (siehe Kapitel 4.6.1.1.2).

Diese Ergebnisse sollten im Prinzip auch auf die beiden Muraymycin-Streptomycin-Konjugate der dritten Serie übertragbar sein. Für das intrazellulär spaltbare Konjugat **T10** wurden auch vergleichbare Halbwertszeiten in bakteriellem Zelllysate gemessen. Bei den beiden durchgeführten Messungen wurden zwei stark abweichende Halbwertszeiten von 31 min und 89 min bestimmt. Das über eine Triazol-Bindung verknüpfte Konjugat **T9** zeigte jedoch eine deutlich geringere Stabilität mit einer gemessenen Halbwertszeit von 1.2 h im Vergleich zu dem stabilen Muraymycin-Streptomycin-Konjugat der ersten Serie. Diese gefundene geringe Stabilität ist im Vergleich mit den erhaltenen  $IC_{50}$ -Daten gegen *MraY* der beiden Verbindungen jedoch nicht zu erklären. Auch diese Messungen müssen, vor allem in Anbetracht der unerwarteten Ergebnisse und der großen Abweichungen zwischen den einzelnen Messungen, nochmal wiederholt werden.



**Abb. 4.62** Zersetzung des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T6** (links) und Freisetzung von Muraymycin-Analogons **68** (rechts) im bakteriellen Zelllysat.

Für das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T6** der zweiten Serie wurden Stabilitätstests in Puffer und in bakteriellem Zelllysat gemessen. Qualitativ wurde für das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T6** in Puffer keine Zersetzung beobachtet, im Gegensatz zu dem beobachteten Verhalten der Verbindung gelöst in reinem Wasser. In bakteriellem Zelllysat wurde eine Halbwertszeit von 1.2 h bestimmt. Die Freisetzung des Muraymycin-Analogons **68** wurde ebenfalls bestimmt (Abb. 4.62).



**Abb. 4.63** Im intrazellulären Medium entstehende Muraymycin-Spezies **183** der Konjugate der zweiten Serie.

Die Entstehung des Zwischenprodukts der Spaltung des Konjugats, also des Muraymycin-Carbamats **183**, wurde qualitativ nachgewiesen. Das Muraymycin-Analogon **68** wurde nur in geringer Konzentration gebildet, was die Vermutung nahelegt, dass es sich bei der Carbamat-Zwischenstufe **183** um den stabilsten, und damit den Hauptbestandteil bei diesem Substanzgemisch handelte, dessen Spaltung nur langsam ablief. Das entstehende Muraymycin-Carbamat **183** konnte mangels Referenzverbindung und fehlender Kalibrierung nicht

quantifiziert werden. Die Differenz zwischen der Konjugat-Verbindung und freiem Muraymycin-Analogon **41** sollte annähernd der Konzentration des Intermediats **183** entsprechen.

Für das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** der zweiten Serie wurden ebenfalls Stabilitätstests in Puffer und in bakteriellem Zelllysate durchgeführt. Wie erwartet fand auch hier in bakteriellem Lysat eine Spaltung der Disulfidbrücke statt. Die Spaltung des resultierenden Carbamats **183** lief jedoch auch für diese Konjugat-Verbindung wesentlich langsamer ab als die Reduktion der Disulfidbrücke. Das Carbamat-Zwischenprodukt **183** wurde hier ebenfalls nur qualitativ detektiert.

Für das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T8** der zweiten Serie konnten bisher keine Daten erhalten werden.

**Tabelle 4.15** Vorläufige Halbwertszeiten der getesteten Verbindungen in Phosphatpuffer (pH = 7.3) und bakteriellem Zelllysate (aus *E. coli ΔtolC*).

Verbindung	Puffer	Bakt. Zelllysate
<b>T1</b>	>24 h	11 h
<b>T2</b>	>24 h	1.3 h
<b>T6</b>	>24 h	1.2 h
<b>T7</b>	1.4 h	1.9 h
<b>T9</b>	keine Daten	1.2 h
<b>T10</b>	keine Daten	31/89 min

Für die Muraymycin-Konjugate **T3**, **T4** und **T5** der ersten Serie war zu wenig Substanz vorhanden, um Stabilitätsmessungen durchzuführen. Die Hydrolyselabilität der GuCOSS-Struktur unter physiologischen Bedingungen ist bereits aus den Arbeiten von Kolmar et al. bekannt.<sup>[151]</sup>

#### 4.6.1.4 Ergebnisse der Zellaufnahme-Assays mit *E. coli ΔtolC*

Für das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** und das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T8** wurden Zellaufnahme-Assays mit *E. coli ΔtolC* durchgeführt. Die Zellaufnahme des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** wurde zudem ebenfalls als Referenzwert bestimmt. Die Zellaufnahme-Assays wurden von S. Weck durchgeführt.

Mit dem Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** wurden Voruntersuchungen zur Stabilität der Verbindung durchgeführt. Die Stabilität der Verbindung wurde in Puffer-Lösung und bakteriellem Zellysat untersucht (siehe Kapitel 4.6.1.3). Wie geplant zerfällt das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** unter intrazellulären Bedingungen und die Disulfidbrücke wird sehr rasch gespalten. Die Spaltung der Carbamat-Bindung des resultierenden Muraymycins **183** läuft jedoch deutlich langsamer ab. Der GuCOSS-Baustein zerfällt zudem unter den gegebenen Bedingungen, was ebenfalls zu Produktgemischen führen kann. Für die Zellaufnahme-Assays mussten daher die Bedingungen nach der Zellyse angepasst werden. Nach Zentrifugation der Probe wurde das Lysat in die löslichen (Überstand) und unlöslichen Bestandteile (Pellet) aufgeteilt und im Folgenden getrennt untersucht. Dann erfolgte zuerst eine Behandlung mit DTT (2 mM), um sicherzustellen, dass die Disulfidbrücken des Konjugats komplett gespalten werden. Im Anschluss erfolgte dann eine basische Behandlung des Lysats mit Natriumhydroxid (2 M), um das Carbamat **183** vollständig zu spalten und die 5'-Desoxy-Muraymycin-Referenz **68** freizusetzen, welche letztendlich über die HPLC-gekoppelte hochauflösende Massenspektrometrie detektiert wurde. Diese Aufarbeitungsschritte wurden zur Kontrolle ebenfalls mit der Referenzverbindung **68** durchgeführt.

Die Konzentrationen des freigesetzten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** wurden jeweils für die beiden Fraktionen (Überstand und Pellet) einzeln bestimmt. Das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** und das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T8** zeigten jeweils im Vergleich zur getesteten Muraymycin-Referenzverbindung **68** eine erhöhte Konzentration des freigesetzten Muraymycin-Analogons **68** nach Aufarbeitung des Lysats (siehe Tabelle 4.16). Für das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** wurde im Überstand eine stark erhöhte Konzentration im Vergleich zu dem Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T8** gemessen. Die gefundenen Konzentrationen im Pellet sind für beide Konjugat-Verbindungen identisch.

Das Silsesquioxan GuCOSS und das zellpenetrierende KF<sub>2</sub>-Peptid sind hochgeladene Strukturen und können an der Zellmembran akkumulieren. Mit diesem Assay ist daher keine Aussage darüber möglich, ob die Verbindungen wirklich in die Zelle vorgedrungen sind, oder sich nur an der Membranaußenseite akkumuliert haben. Es lässt sich jedoch mit Sicherheit feststellen, dass durch die Konjugation des Muraymycins an GuCOSS beziehungsweise an das KF<sub>2</sub>-Peptid die Konzentration des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** an der Zelle erheblich gesteigert wurde und damit wahrscheinlich auch eine erhöhte Aufnahme in die bakterielle Zelle stattfand. Vor Allem für das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** sind die Ergebnisse dieses Zellaufnahme-Assays sehr vielversprechend.

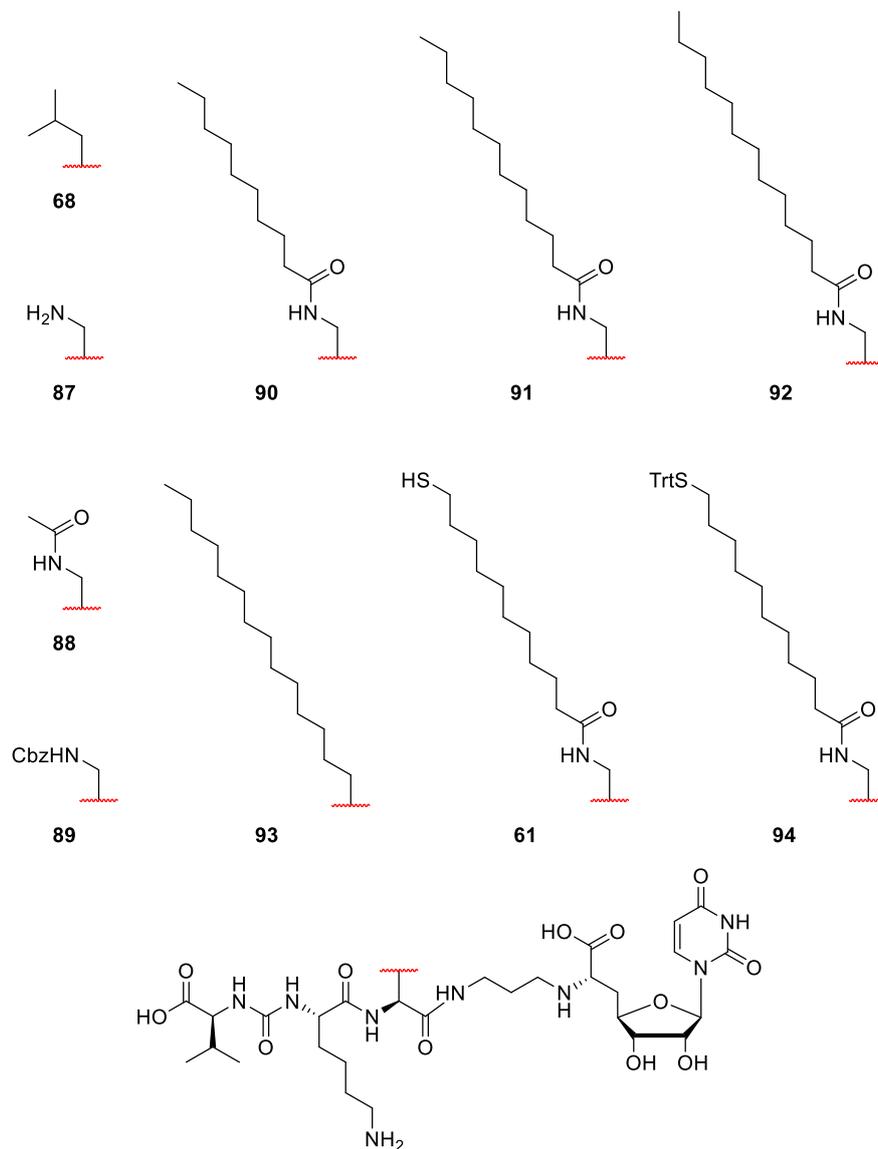
**Tabelle 4.16** Zusammenfassung der Zellaufnahme-Daten der Konjugate **T7**, **T8** und der Muraymycin-Referenzverbindung **68**. Proben-Konzentrationen von **68** nach Aufarbeitung.

Verbindung	T7	T8	68
Pellet Konz.	6.5 ± 0.3 µM	6.3 ± 1.8 µM	-
Überstand Konz.	23 ± 3 µM	9.7 ± 1.4 µM	
Gesamt-Zell-Konz.	29 ± 3 µM	16 ± 4 µM	88 ± 15 nM

#### 4.6.2 SAR-Studie der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga

Der Einfluss der mittleren Aminosäure der Muraymycin-Peptidkette und ihrer Modifikationen in der Seitenkette auf die Target-Interaktion mit MraY sollte ebenfalls genauer untersucht werden. Neben der Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte gegen MraY wurden zudem die antibakteriellen Aktivitäten dieser SAR-Verbindungen gegen die beiden *E. coli*-Stämme getestet, da durch eine Zunahme der Lipophilie auch eine verbesserte Zellaufnahme zu erwarten ist.

Zur vollständigen Diskussion in dieser SAR-Studie erfolgt die Einbeziehung einiger bereits diskutierter Verbindungen aus Kapitel 4.6.1.



**Abb. 4.64** Übersicht der zur Durchführung der SAR-Studie hergestellten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga.

#### 4.6.2.1 Vergleich und Diskussion der inhibitorischen Aktivität gegen *MraY*

Interessant ist, dass das Muraymycin-Analogon mit dem freien Amin **87** und die acetylierte Variante **88** keine nennenswerte Aktivität am Target mehr aufwiesen ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). Dies ist insofern erstaunlich, da nur sehr kleine Änderungen in der Struktur im Vergleich zur Referenzverbindung **68** vorlagen. Diese Befunde sind auch im Einklang mit dem von K. Leyerer durchgeführten Alanin-Scan. Hier wurde auch ein starkes Absinken der Aktivität durch den Einbau von L-Alanin an dieser Position beobachtet ( $IC_{50}$ :  $94 \pm 40 \mu M$ ).<sup>[103]</sup> Die zu dem Muraymycin **87** analoge Verbindung **89** mit noch vorhandener Cbz-Schutzgruppe an dem Amin der Seitenkette zeigte dagegen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $19 \pm 4 \mu M$  wieder eine deutlichere Hemmung von *MraY*.

Zur weiteren Untersuchung wurden unterschiedliche Kettenlängen an dieser Position als Seitenketten eingeführt. Die  $IC_{50}$ -Werte zeigten eine eindeutige Korrelation der inhibitorischen Aktivität mit zunehmender Kettenlänge der lipophilen Seitenkette. So wurden bei dem Muraymycin-Analogon **90** ein  $IC_{50}$ -Wert von  $915 \pm 78$  nM, bei dem Muraymycin-Analogon **91** ein Wert von  $69 \pm 6$  nM und bei dem Muraymycin-Analogon **92** ein Wert von  $30 \pm 3$  nM bestimmt. Eine Erhöhung der Seitenkettenlänge um zwei  $CH_2$ -Einheiten von Verbindung **90** zu **91** führte zu einer Steigerung der Aktivität um einen Faktor von 13 und bestätigt damit die bisherigen Vermutungen über den Einfluss der lipophilen Seitenkette. Eine weitere Verlängerung der Kettenlänge um eine  $CH_2$ -Einheit bei dem Muraymycin-Analogon **92** führte nochmals zu einer Verdopplung der Aktivität verglichen mit dem Muraymycin-Analogon **91**. Ein Vergleich zwischen dem Muraymycin-Analogon **91** und dem Muraymycin-Analogon **61** zeigte, dass ein Austausch der endständigen  $CH_3$ -Gruppe gegen ein Thiol keine Änderung auf die Aktivität der Struktur gegen *MraY* hat.

Die zu **61** analoge Struktur mit noch vorhandener *S*-Trityl-Schutzgruppe, also das Muraymycin-Analogon **94**, wurde ebenfalls in dieser Reihe untersucht. Mit einem gemessenen  $IC_{50}$ -Wert von  $34 \pm 4$  nM war diese Verbindung **94** sogar doppelt so aktiv gegenüber *MraY* wie das Muraymycin-Analogon **61** ohne *S*-Trityl-Modifikation. Im Vergleich zu den anderen Verbindungen führte hier die Seitenkette mit dem großen terminalen aromatischen System zu einer noch unbekanntem Wechselwirkung mit *MraY*.

Ein weiterer Vergleich des lipophil modifizierten Muraymycin-Analogons **90** mit der zuvor hergestellten Konjugat-Vorstufe, dem Muraymycin-Analogon **63**, zeigte zudem auch nochmal einen deutlichen Unterschied in der Aktivität. Die um ein terminales Alkin erweiterte Struktur **63** zeigte mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $4.0 \pm 0.4 \mu M$  eine geringere Aktivität als die Verbindung **90**

mit der gesättigten aliphatischen Seitenkette. Ebenfalls ist von dem bereits untersuchten Muraymycin-Analogon **170** bekannt, dass sich die erhaltene Aktivität durch eine weitere Verlängerung der Seitenkette durch eine CuAAC im Vergleich zur Vorstufe **63** nicht mehr merklich ändert. Erst bei der Einführung von räumlich anspruchsvolleren Resten wie bei dem Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T1** oder dem Muraymycin-Biotin-Konjugat **T11** wirkte sich die Seitenkette negativ auf die Wechselwirkung mit *MraY* aus.

Im Hinblick auf die erhaltenen Ergebnisse der lipophilen Muraymycine sollte auch der Einfluss der Amid-Bindung in der Seitenkette der mittleren Aminosäure genauer untersucht werden. Hierzu wurde das synthetisierte Muraymycin-Analogon **93** ebenfalls in dem Assay gegen *MraY* getestet. Der direkte Vergleich der Verbindung **93** zu ihrer analogen Verbindung **91** mit Amid-Gruppe zeigte, dass eine Substitution der Amid-Bindung durch CH<sub>2</sub>-Einheiten ebenfalls zu einer erheblichen Steigerung der inhibitorischen Aktivität gegen *MraY* mit einem Faktor von 20 führt. Damit handelt es sich bei dieser Verbindung um den aktivsten Muraymycin-Vertreter in dieser SAR-Studie. Diese Daten bestätigen nochmal die Relevanz einer lipophilen Seitenkette für eine gute Wechselwirkung mit *MraY*. Zudem liefern diese Ergebnisse neue Hinweise auf die Wichtigkeit der Verknüpfungsstruktur der mittleren Aminosäure zu ihrer Seitenkette. So sind auch Strukturkomponenten in der Seitenkette nah an der Muraymycin-Kernstruktur entscheidend für eine Wechselwirkung mit *MraY*. Ein Austausch zu einer lipophilen Struktur, wie sie durch den Wechsel der Amid-Bindung zu einer reinen Alkylkette stattfand, führte hier zusätzlich zu einer Verbesserung der Aktivität.

**Tabelle 4.17** Zusammenfassung der inhibitorischen Aktivitäten der SAR-Muraymycine gegen *MraY*.

<b>Verb.</b>	<b>68</b>	<b>87</b>	<b>89</b>	<b>88</b>	<b>90</b>
<b>IC<sub>50</sub> <i>MraY</i></b>	2.5 ± 0.6 µM	>100µM	19 ± 4 µM	>100µM	915 ± 78 nM
<b>Verb.</b>	<b>91</b>	<b>92</b>	<b>93</b>	<b>61</b>	<b>94</b>
<b>IC<sub>50</sub> <i>MraY</i></b>	69 ± 6 nM	30 ± 3 nM	6.8 ± 0.3 nM	68 ± 4 nM	34 ± 4 nM

#### 4.6.2.2 Vergleich und Diskussion der antibakteriellen Aktivitäten

Alle getesteten Muraymycin-Referenzen zeigten keine nennenswerte Aktivität gegen *E. coli* DH5α (IC<sub>50</sub>: >100 µg/mL). Gegen den Efflux-defizienten *E. coli*-Stamm Δ*tolC* war jedoch für die 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **90**, **91**, **92** und **93** eine Aktivität feststellbar (siehe Tabelle 4.18). So nahm die antibakterielle Aktivität mit zunehmender Seitenkettenlänge und einer

damit einhergehenden steigenden Lipophilie zu (**90** < **91** < **92**). Der aktivste Vertreter war die Verbindung **93**, welche sich von dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **91** nur im Vorhandensein der Amid-Verknüpfung zum Anbinden der Seitenkette unterscheidet. So zeigte das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** ohne diese Amid-Struktur einen sehr guten antibakteriellen IC<sub>50</sub>-Wert von  $0.72 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$  ( $0.65 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ) gegen die *E. coli*- $\Delta\text{tolC}$ -Variante. Dieser Befund korreliert mit den gemessenen Aktivitäten dieser 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga gegen *MraY*. Die erhöhte Wirksamkeit kann einerseits durch die bessere Inhibition von *MraY* zustande kommen. Selbst wenn nur geringe Mengen des jeweiligen Muraymycin-Analogons aufgenommen werden, könnten diese schon die gefundene antibakterielle Aktivität erklären. Andererseits bedingt die gesteigerte Lipophilie dieser 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga auch eine gesteigerte zelluläre Aufnahme. Wahrscheinlicher ist jedoch ein synergistischer Effekt aus verbesserter Zellaufnahme und verbesserter Inhibition von *MraY*. Der DH5 $\alpha$ -Stamm von *E. coli* mit intaktem Efflux ist dagegen in der Lage, die Verbindungen wieder aktiv zu entfernen, bevor sie an ihrem Target aktiv werden.

**Tabelle 4.18** Zusammenfassung der antibakteriellen Aktivitäten der SAR-Muraymycine (in  $\mu\text{g/mL}$  und  $\mu\text{M}$  in Klammern).

Verb.	68	87	89	88	90
IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> $\Delta\text{tolC}$	>100	>100	>100	>100	$47 \pm 30$ ( $42 \pm 28$ )
IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	>100	>100	>100	>100	>100
Verb.	91	92	93	61	94
IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> $\Delta\text{tolC}$	$7.2 \pm 0.3$ ( $6.4 \pm 0.3$ )	$3.3 \pm 0.1$ ( $2.9 \pm 0.1$ )	$0.72 \pm 0.08$ ( $0.65 \pm 0.08$ )	$27 \pm 7$ ( $23.3 \pm 5.5$ )	>100
IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	>100	>100	>100	>100	>100

Im direkten Vergleich des lipophilen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **91** mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** zeigte sich, dass die terminale Thiol-Gruppe in der Seitenkette in diesem Fall nachteilig für die Zellaufnahme ist. Für beide Muraymycine wurde ein identischer IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt, was den Unterschied in antibakterieller Aktivität ausschließlich auf eine unterschiedliche Zellaufnahme zurückführen lässt. Durch das Vorhandensein der *S*-Trityl-Schutzgruppe bei dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **94** wurde sogar ein kompletter

Verlust der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli*  $\Delta toIC$  erhalten. So zeigte die Muraymycin-Verbindung **94** weder eine Aktivität  $<100 \mu\text{g/mL}$  gegen *E. coli*  $\Delta toIC$  noch gegen die DH5 $\alpha$ -Variante und dies trotz der sehr guten nanomolaren Inhibition am Ziel-Enzym MraY (siehe vorheriges Kapitel).

### 4.6.3 Sonstige biologische Daten

#### 4.6.3.1 Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten des Muraymycin-Biotin-Konjugats **T11** gegen MraY

Für das Muraymycin-Biotin-Konjugat **T11** musste ebenfalls ein  $IC_{50}$ -Wert gegen MraY bestimmt werden, um dessen Fähigkeit als Sonde zur Auffindung von möglichen Off-Targets von Muraymycinen zu validieren. Für das Muraymycin-Biotin-Konjugat **T11** wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von  $52 \pm 5 \mu\text{M}$  gemessen. Mit diesem Wert zeigte das Muraymycin-Biotin-Konjugat **T11** jedoch eine deutlich verschlechterte Inhibition von MraY als vergleichbare Muraymycin-Strukturen. Die Verschlechterung der Aktivität beruht zum Teil wahrscheinlich auch auf den hydrophilen Eigenschaften des eingesetzten PEG-Linkers am Biotin-Baustein. Diese hydrophile Komponente der Seitenkette scheint, trotz ihrer Peripherie, Auswirkungen auf die lipophile Bindungstasche von MraY zu haben. Weitere sterische Effekte, die die Inhibitionsfähigkeit des Muraymycin-Biotin-Konjugats **T11** mindern, können jedoch auch nicht ausgeschlossen werden. Dennoch ist genug Target-Affinität vorhanden, um dieses Konjugat für erste Versuche zum Auffinden von potentiellen Off-Targets von Muraymycinen in einem Pull-Down-Assay einzusetzen. Streptavidin soll in diesem Assay als Akzeptor für Biotin und damit zur Isolierung der Off-Target-Enzyme dienen. Die weiteren Untersuchungen zum Auffinden der Off-Targets mittels Pull-Down-Assays werden von P. Junghanns im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt.

#### 4.6.3.2 Ergebnisse der Kooperation mit S. Van Lanen

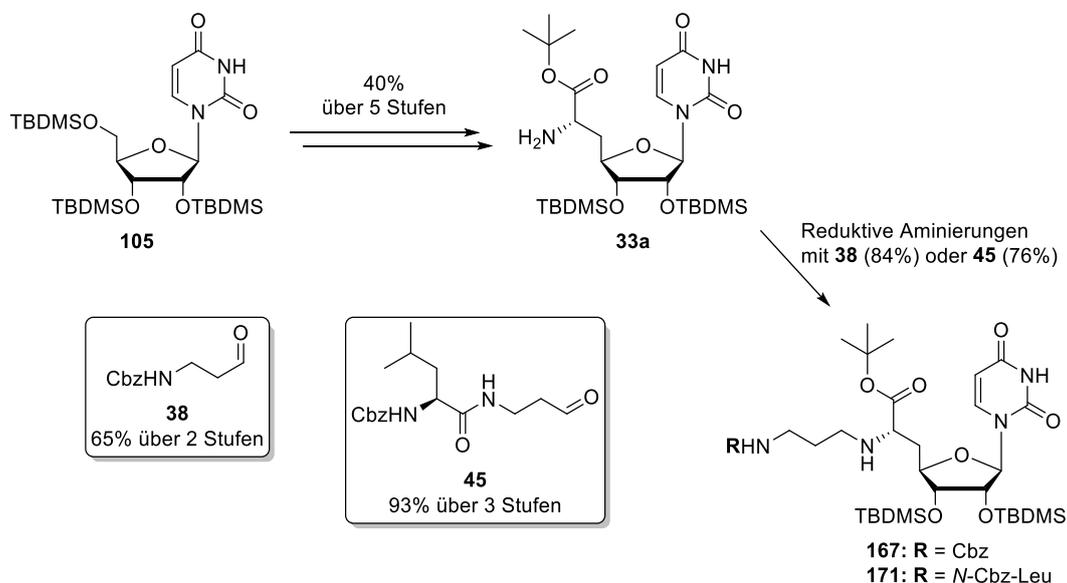
Für die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von S. Van Lanen wurden das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** und die drei Harnstoffdipeptide **146**, **142a** und **142b** synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Mit dem vereinfachten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** wurde untersucht, ob die Hydroxylierung des L-Leucins über den Biosyntheseweg auch mit diesem vereinfachten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon abläuft. Das hydroxylierte Produkt dieser Umsetzung konnte massenspektrometrisch nachgewiesen, aber auf Grund der schlechten Ausbeute nicht isoliert werden. Die biosynthetische Hydroxylierung mit dem entsprechenden

L-Arginin-haltigen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon konnte massenspektrometrisch ebenfalls beobachtet werden, und in diesem Fall konnte das hydroxylierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon auch isoliert werden.<sup>[186,190]</sup> Durch die Verwendung von L-Lysin ist das stark vereinfachte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** strukturell weiter von den natürlich vorkommenden Vertretern entfernt als die Variante mit L-Arginin. Das Harnstoffdipeptid **146** wurde ebenfalls als Referenzverbindung zur Aufklärung der biosynthetischen Bildung des Epicapreomycidins zur Verfügung gestellt.<sup>[190]</sup>

Zudem wurden für zukünftige Experimente die Valin-Epicapreomycin- und Valin-Capreomycin-Harnstoffdipeptide **142a** und **142b** als Referenzverbindungen im Rahmen dieser Arbeit aus Vorstufen von M. Büschleb hergestellt und der Arbeitsgruppe von S. Van Lanen zur Verfügung gestellt (siehe Kapitel 4.1.9.4).

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese und biologische Evaluation von verschiedenen Muraymycin-Transporter-Konjugaten. In dieser Proof-of-Principle-Studie konnten drei verschiedene Serien von Muraymycin-Transporter-Konjugaten hergestellt werden, die sich durch die Position der Konjugation am Muraymycin-Grundgerüst unterscheiden. Zudem wurden innerhalb der Serien zwei generelle Ansätze von Konjugationsarten verfolgt: einerseits eine stabile Konjugation der beiden Moleküle über ein Triazol und andererseits eine intrazellulär spaltbare Disulfid-Bindung. Mit Streptomycin, dem Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub>, dem Silsesquioxan GuCOSS und einem zellpenetrierenden KF<sub>2</sub>-Peptid konnten vier Konjugationspartner für Muraymycine zur Verbesserung der bakteriellen Zellaufnahme evaluiert werden. Als Konjugat-Vorstufen wurden verschiedene neuartige, vereinfachte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga generiert, die ebenfalls auf ihre antibiotische Wirksamkeit untersucht wurden. Durch die Synthese dieser Vorstufen beziehungsweise Referenzverbindungen konnten zudem zusätzliche Einblicke in die Target-Interaktion zwischen den Muraymycinen und dem Enzym MraY gewonnen werden. Im Rahmen dieser Synthesen wurde auch das neue wirksame 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** entdeckt. Zusätzlich hierzu wurden im zweiten Teil dieser Arbeit weitere Seitenketten-modifizierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga im Rahmen einer SAR-Studie hergestellt und biologisch evaluiert.



**Abb. 5.1** Synthese des Nucleosid-Bausteins **33a** und der (6'S)-Diamine **167** und **171**.

Der Schlüsselbaustein aller vereinfachten Muraymycin-Grundstrukturen ist das Nucleosid **33a**. Die Synthese des Nucleosid-Bausteins **33a** erfolgte ausgehend von TBDMS-geschütztem Uridin **105** über fünf Stufen und mit einer Gesamtausbeute von 40% nach einer im Arbeitskreis etablierten und bereits publizierten Synthesemethode. Die anschließenden reduktiven Aminierungen mit dem *N*-Benzyloxycarbonyl-3-aminopropanal **38** und dem 2-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-1-*N*-(3-oxopropyl)-L-leucinamid **45** zum jeweiligen (6'*S*)-Diamin **167** beziehungsweise **171**, welche für die Muraymycin-Synthesen in Lösung benötigt wurden, erfolgten ebenfalls nach diesen publizierten Syntheserouten.<sup>[89,91]</sup>

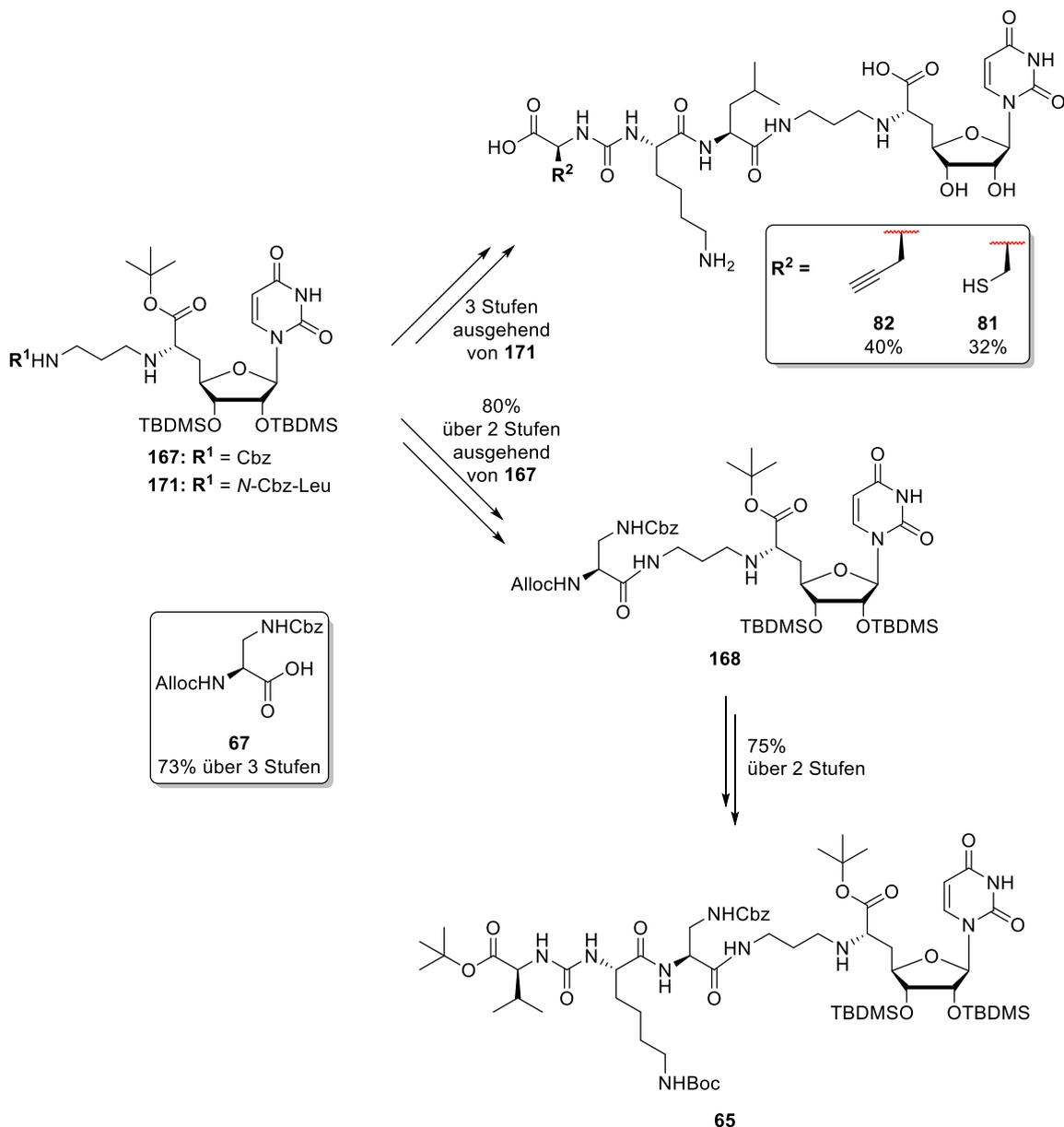
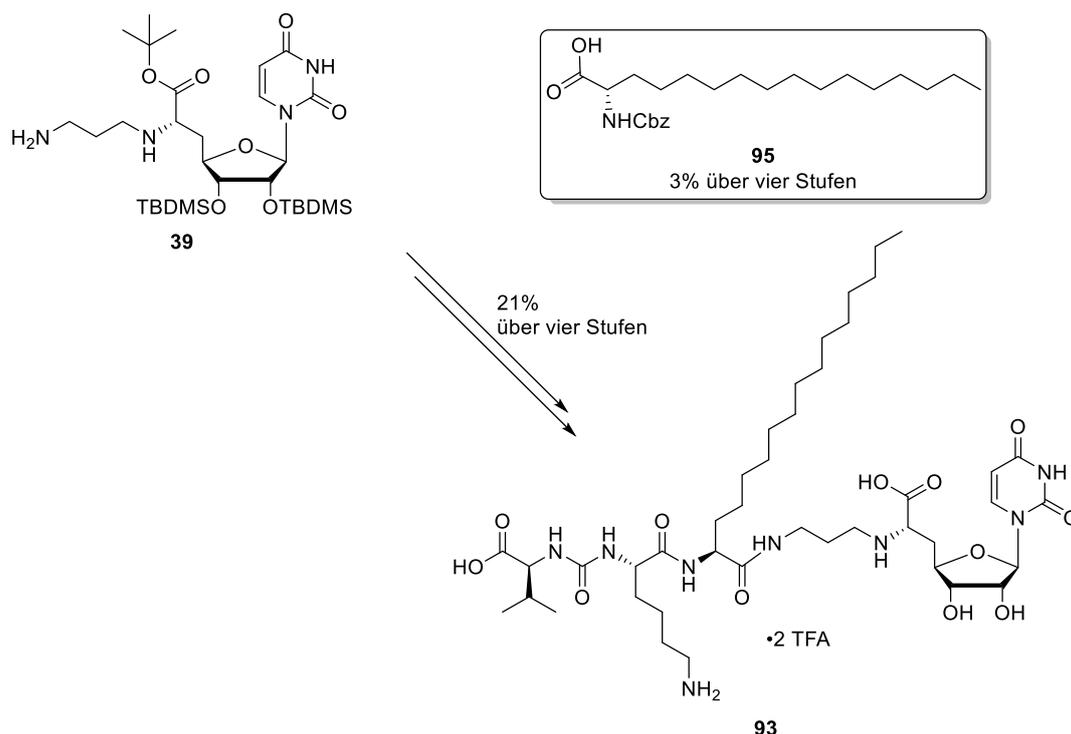


Abb. 5.2 Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **82**, **81** und **65** in Lösung.

Die Synthese des geschützten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **39** in Lösung führte mit einer Ausbeute von 60% über vier Stufen ausgehend von dem (6'S)-Diamin **167** zu dieser wichtigen Vorstufe für die weiteren Modifikationen in der Seitenkette am Muraymycin-Grundgerüst.

Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **82** konnte ausgehend von dem (6'S)-Diamin **171** über drei Stufen mit 40% Ausbeute erhalten werden. Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** wurde mit 32% Ausbeute über drei Stufen ausgehend von **171** erhalten.

Auch die Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **93**, welches für die Durchführung der SAR-Studie benötigt wurde, erfolgte in Lösung ausgehend von dem (6'S)-Diamin **167**.



**Abb. 5.3** Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **93** zur Durchführung der SAR-Studie.

Die lipophile Aminosäure **95** wurde in vier Stufen stereoselektiv und analog der in Vorarbeiten etablierten Methode hergestellt.<sup>[95]</sup> Die Peptidkupplung des Aminosäure-Bausteins **95** erfolgte mit dem Cbz-entschützten (6'S)-Diamin **39**, gefolgt von einer erneuten Cbz-Entschützung und der Peptidkupplung mit dem Harnstoffdipeptid **41**. Nach globaler saurer Entschützung wurde damit auch das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** mit einer Gesamtausbeute von 21% über diese vier Stufen erhalten. Die Verbindung **93** stellte sich zudem mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $6.8 \pm 0.3$  nM gegen *MraY* als der aktivste Vertreter der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga heraus, die in dieser Arbeit hergestellt wurden. Ferner zeigte dieses lipophile 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0.72 \pm 0.08$   $\mu\text{g/mL}$  eine bemerkenswerte antibakterielle

Aktivität gegen *E. coli*  $\Delta toIC$  (siehe Tabelle 5.1). Diese Struktur bildet damit eine gute Grundlage für weitere zukünftige Modifikationen im Rahmen von SAR-Studien.

Die zur klassischen Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga in Lösung benötigten Harnstoffdipeptide wurden zuvor über verschiedene Syntheserouten hergestellt.<sup>[186]</sup>

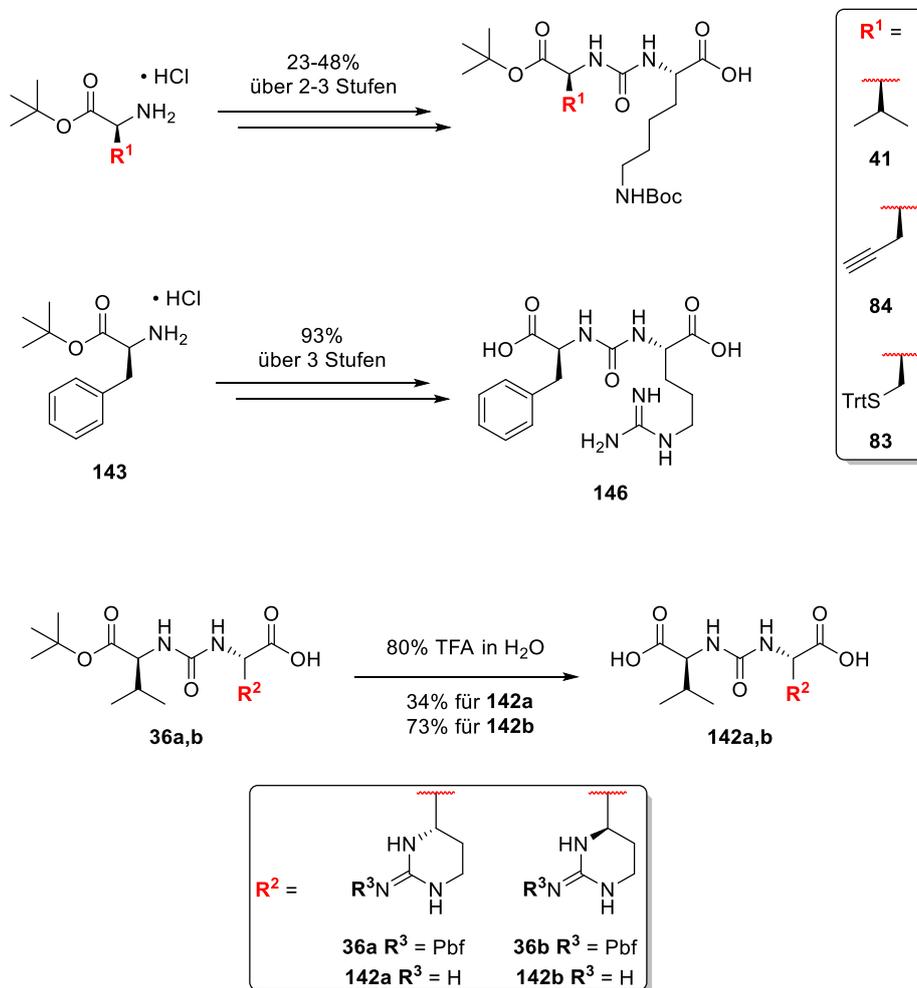


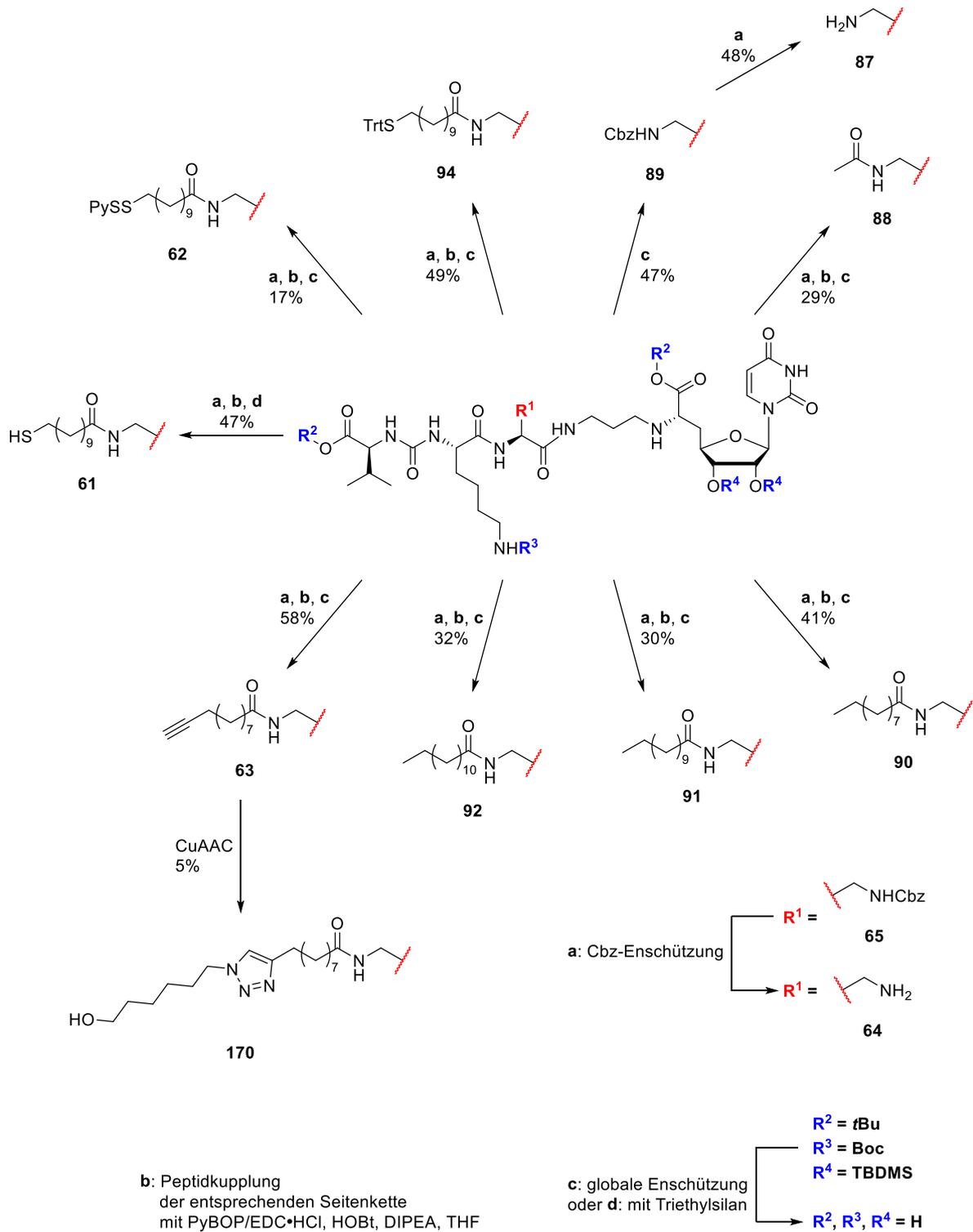
Abb. 5.4 Übersicht der Synthesen der Harnstoffdipeptide.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit sechs Harnstoffdipeptide hergestellt. Neben den drei Harnstoffdipeptiden **41**, **84** und **83**, die zur Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga benötigt wurden, wurden noch drei weitere Harnstoffdipeptide als Referenzverbindungen für die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von S. Van Lanen synthetisiert. Das Harnstoffdipeptid **146** wurde über drei Stufen mit einer sehr guten Ausbeute von 93% aus kommerziell erhältlichen Aminosäuren hergestellt. Die beiden Harnstoffdipeptide **142a** und **142b** wurden aus den von M. Büschleb hergestellten und noch vorhandenen geschützten Epicapreomycin- und Capreomycin-Harnstoffdipeptid-Vorstufen **36a** und **36b** hergestellt und über semi-präparative HPLC gereinigt.<sup>[225]</sup>



an der Festphase hergestellt und das Nucleosid **33a** erst im letzten Schritt in einer reduktiven Aminierung in Lösung zum Aufbau des Muraymycin-Grundgerüsts eingesetzt.<sup>[94,103]</sup> Die publizierte Festphasensynthese konnte in dieser Arbeit optimiert und die Äquivalente der eingesetzten Aminosäuren-Bausteine sowie der Kupplungsreagenzien reduziert werden. Die Festlegung auf die jeweilige Synthesemethode erfolgte aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit der jeweiligen benötigten Aminosäuren sowie unter Berücksichtigung der benötigten Substanzmenge an der Muraymycin-Grundstruktur für die Folgesynthesen. So war es mit der Festphasensynthese möglich, die benötigten größeren Substanzmengen der Muraymycin-Vorstufe **65** für die Synthesen der Konjugate der ersten Serie und der SAR-Studie effektiver herzustellen. Das geschützte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **65** konnte mit dieser Variante mit einer Gesamtausbeute von 37% über den Festphasen-gestützten Ansatz hergestellt werden. Auch das vereinfachte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68**, welches als wichtige Referenzverbindung und Vorstufe für die Konjugate der zweiten Serie diente, wurde mit einer Gesamtausbeute von 37% über die Festphasenroute hergestellt. Die Modifikation der *N*<sup>ε</sup>-Position des Lysins mit dem Linker **80** erfolgte in einer Stufe ausgehend von dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** mit einer Ausbeute von 42%.

Ausgehend von dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **65** erfolgte neben der Synthese der Seitenketten-modifizierten Muraymycin-Vorstufen für die Konjugate der ersten Serie auch die Synthese der zusätzlichen SAR-Verbindungen. Die verschiedenen Seitenketten wurden mittels Peptidkupplung nach zuvor erfolgter Entfernung der Cbz-Schutzgruppe an der L-Diaminopropionsäure eingeführt. Durch nachfolgende globale saure Entschützung wurden die entsprechenden Muraymycin-Verbindungen erhalten. Das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **89** wurde durch globale saure Entschützung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **65** unter Erhalt der Cbz-Schutzgruppe an der L-Diaminopropionsäure erhalten. Das vollständig entschützte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **87** wurde durch einfache Cbz-Entschützung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **89** im Wässrigen erhalten. Die 5'-Desoxy-Muraymycin-Referenzverbindung **170** wurde durch CuAAC nach Einführung der Alkin-haltigen Seitenkette in das Muraymycin-Analogon **63** hergestellt. Eine Übersicht der Synthesen der 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga mit Variation an dem mittleren Aminosäurebaustein ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

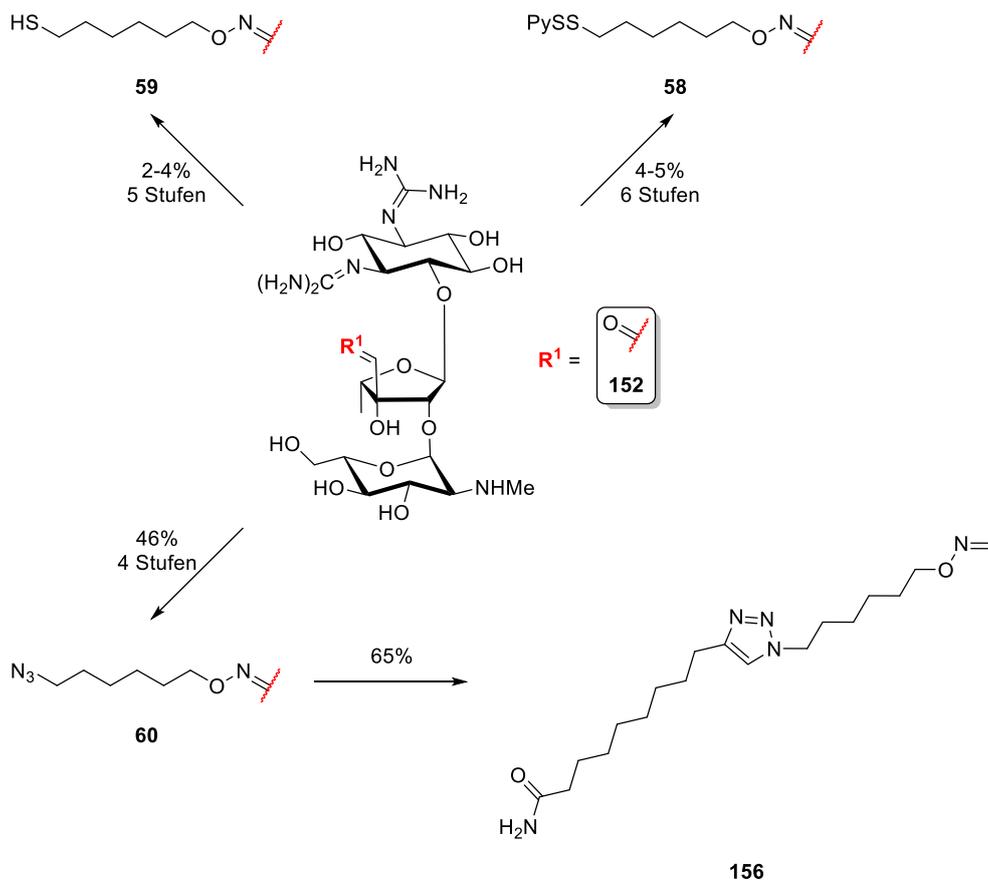


**Abb. 5.6** Übersicht der Synthesen der Seitenketten-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga.

Neben dem bereits bekannten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **68** konnten in dieser Arbeit 13 neue vereinfachte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga hergestellt werden und in einer SAR-Studie auf ihre Wirksamkeit gegen das Zielenzym MraY untersucht werden. Die gesamten

Ergebnisse der biologischen Untersuchungen dieser Verbindungen sind in der Übersichtstabelle 5.1 zusammengefasst.

Durch die erhaltenen Informationen dieser SAR-Studie konnten die bisherigen Erkenntnisse bestätigt und auch neue Einblicke in die Target-Interaktion gewonnen werden. So wurde zum einen der positive Einfluss durch eine lipophile Seitenkette an Position R<sup>1</sup> bestätigt, deren Fähigkeit zur Inhibierung von MraY mit einer zunehmenden Kettenlänge korreliert. Zum anderen konnte die neue Erkenntnis gewonnen werden, dass auch die Art der Anknüpfung der Seitenkette nahe am Muraymycin-Grundgerüst einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität hat. So konnte durch das Ersetzen der Amid-Struktur durch CH<sub>2</sub>-Gruppen die Aktivität nochmals erheblich gesteigert werden und mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** der aktivste Muraymycin-Vertreter im Rahmen dieser Arbeit erhalten werden. Dieser Befund liefert damit einen Ausgangspunkt für weitere Optimierungen der vereinfachten 5'-Desoxy-Muraymycin-Struktur. Auch führte ein Austausch der terminalen Aminosäure zu L-Cystein bei Verbindung **81** zu einer erheblichen Steigerung der Aktivität an MraY (siehe Tabelle 5.1).



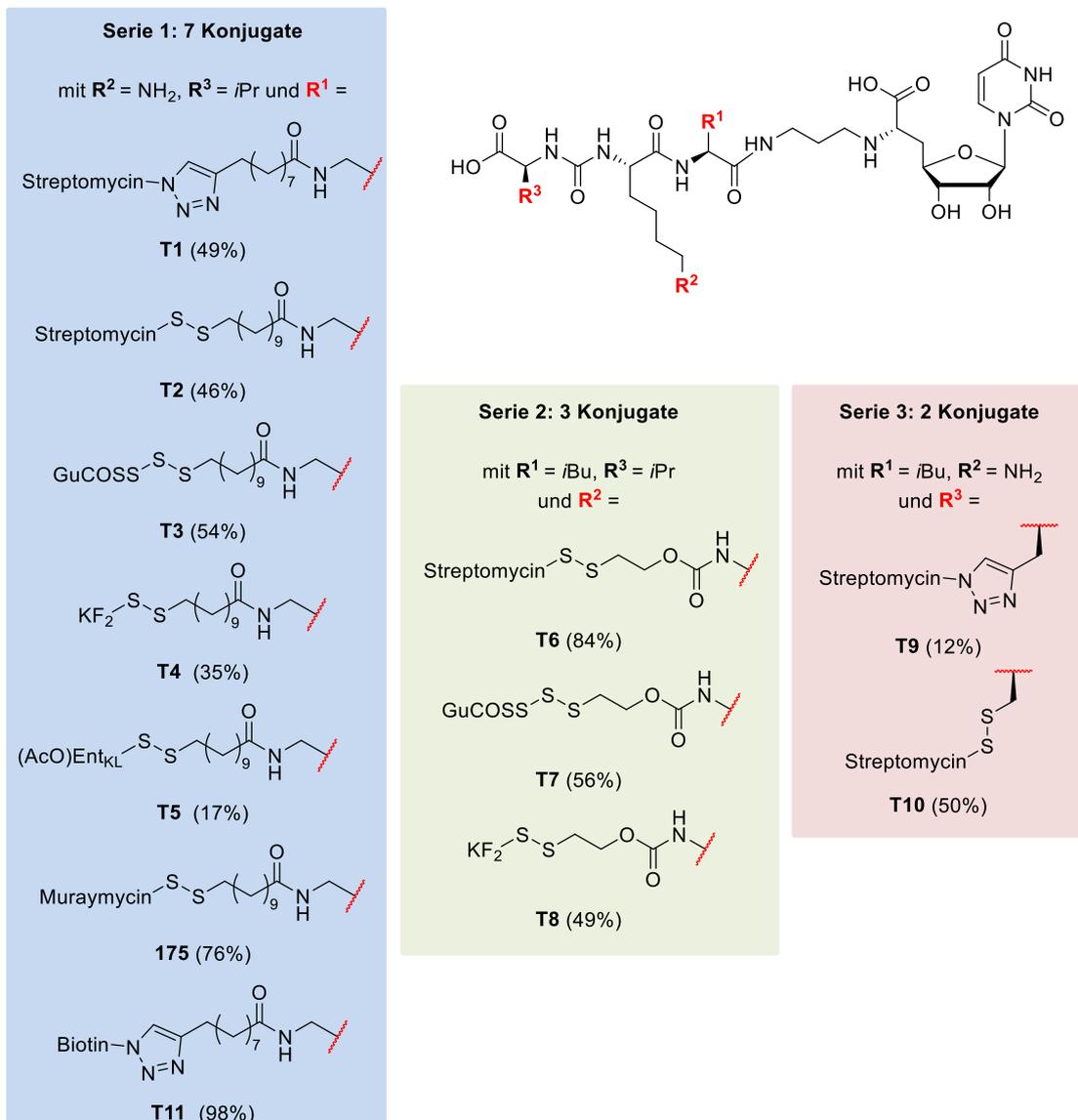
**Abb. 5.7** Übersicht der hergestellten Streptomycin-Derivate.

Drei modifizierte Streptomycin-Derivate wurden in dieser Arbeit als Vorstufen zum Aufbau der Konjugate hergestellt, auch die zusätzliche Streptomycin-Referenzverbindung **156** wurde synthetisiert. Zur Synthese dieser Streptomycin-Derivate wurden zunächst die verschiedenen Linker-Strukturen mit Azid-, Thiol- und einer aktivierten Thiol-Gruppe hergestellt. Die funktionellen Gruppen ermöglichten die Konjugation mit den 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga. Im letzten Schritt wurden die jeweiligen Linker-Strukturen durch Oxim-Ligation mit kommerziell erhältlichem Streptomycin **152** umgesetzt. Die Streptomycin-Referenzverbindung **156** wurde durch nachfolgende CuAAC des hergestellten Streptomycin-Derivats **60** mit dem Carbonsäureamid **155** erhalten (siehe Abbildung 5.7).

Zum Aufbau der Konjugat-Verbindungen mit einer intrazellulär stabilen Triazol-Verknüpfung wurde auf eine Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition zurückgegriffen. Die Muraymycin-Streptomycin Konjugate **T1** (49%) und **T9** (12%) wurden über CuAAC des Azid-modifizierten Streptomycin-Derivats **60** mit den jeweiligen Alkin-modifizierten Muraymycinen **63** und **82** erhalten. Das Muraymycin-Biotin-Konjugat **T11** (98%) wurde ebenfalls über CuAAC aus dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **63** mit dem Azid-PEG3-Biotin **176** hergestellt.

Alle weiteren Konjugat-Verbindungen wurden durch Ausbildung einer Disulfidbrücke durch Verwendung einer aktivierten Thiol-Spezies und einer freien Thiol-Komponente hergestellt. Die einzige Ausnahme bildet hier die dimere Muraymycin-Struktur **175**, welche durch intermolekulare Disulfidbildung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61** mit sich selbst hergestellt wurde (76%). Die Aktivierung der Thiol-Gruppe erfolgte innerhalb der ersten Serie in Abhängigkeit von der verwendeten Transporter-Einheit. Für das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T2** erfolgte die Synthese über beide Varianten, einerseits mit einer Aktivierung durch Aldrithiol™-2 an Streptomycin mit dem Derivat **58** (19%), andererseits mit Aktivierung am 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga mit der Verbindung **62** (46%). Die in Kooperation mit der TU Darmstadt durchgeführten Synthesen der Konjugate **T3** (54%) und **T4** (35%) erfolgten ebenfalls über das aktivierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **62**. Das Muraymycin-Enterobactin-Konjugat **T5** wurde ausgehend von dem PySS-Derivat des Enterobactin-Bausteins (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57** von R. Zscherp an der TU Braunschweig hergestellt (17%). In der zweiten Konjugat-Serie erfolgte die Aktivierung des Thiols ausschließlich am Muraymycin-Analoga in Form der Verbindung **79**. Hergestellt wurden an dieser Position die spaltbaren Konjugate Muraymycin-Streptomycin **T6** (84%), Muraymycin-GuCOSS **T7** (56%) und Muraymycin-KF<sub>2</sub> **T8** (49%). In der dritten Serie erfolgte der Aufbau des Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T10** mit der aktivierten Streptomycin-Spezies **58**, und das intrazellulär spaltbare Konjugat **T10** konnte mit einer Ausbeute von 50% erhalten werden.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit zwölf neuartige Muraymycin-Konjugate hergestellt. Neben den zehn Muraymycin-Transporter-Konjugaten wurden zudem eine dimere Muraymycin-Struktur als Referenzverbindung und ein Muraymycin-Biotin-Konjugat hergestellt, welches für weitergehende Untersuchungen zum Auffinden von Off-Targets von Muraymycinen im Rahmen der Dissertation von P. Junghanns eingesetzt werden soll.



**Abb. 5.8** Übersicht der hergestellten Muraymycin-Konjugate.

Die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen aller hergestellten Referenz- und Zielverbindungen auf ihre *in vitro*-Aktivität gegen MrayY sowie ihre antibakteriellen Daten gegen die beiden *E. coli*-Stämme  $\Delta\text{tolC}$  und DH5 $\alpha$  sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Einige ausgewählte Verbindungen wurden zudem auf ihre antibakterielle Aktivität gegen *S. aureus* als Gram-

positives Pathogen untersucht (siehe Tabelle 5.2). In Tabelle 5.3 sind zudem noch antibakterielle Daten des Muraymycin-Enterobactin-Konjugats **T5** und der Muraymycin-Referenzverbindung **61** gegen *P. aeruginosa* als weiteren Gram-negativen Bakterienstamm zusammengefasst. Für einige der hergestellten Muraymycin-Transporter-Konjugate konnte eine verstärkte Zellaufnahme aus diesen erhaltenen Daten abgeleitet werden. So wurde für das Muraymycin-Enterobactin-Konjugat **T5** eindeutig eine verstärkte Zellaufnahme bei *E. coli*  $\Delta toIC$  durch die erhöhte antibakterielle Aktivität nachgewiesen. Bei dem spaltbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T2** ist eine verstärkte Zellaufnahme sogar in beiden *E. coli*-Stämmen durch die gemessene erhöhte antibakterielle Aktivität sehr wahrscheinlich. Die Evaluation gestaltete sich bei **T2** aufgrund der antibakteriellen Aktivität des eingesetzten Transporter-Moleküls Streptomycins jedoch etwas schwieriger. Allerdings sprechen die vorliegenden Daten auch hier eindeutig für eine verstärkte Zellaufnahme durch das Konjugationsprinzip. Somit konnte durch diese zwei Konjugate bereits ein Beweis für die Wirksamkeit des intrazellulär spaltbaren Konjugationsansatzes erbracht werden. Die Evaluation der Zellaufnahme der weiteren Konjugate ist weniger eindeutig, da auch hier teilweise die konjugierten Transporter-Moleküle bereits antibakteriell gegen die getesteten Bakterienstämme aktiv sind und die durchgeführten antibakteriellen Assays nicht ausreichend zur Untersuchung waren. Für einige ausgewählte Vertreter der erhaltenen Konjugate wurden hierfür noch weitergehende Untersuchungen durchgeführt. Unter Zuhilfenahme von Zellaufnahme-Assays konnte durch S. Weck für das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** und das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T8** aus der zweiten Serie jeweils eine verstärkte zelluläre Anreicherung des Muraymycins im Vergleich zu der Muraymycin-Referenz **68** in *E. coli*  $\Delta toIC$  für beide Konjugate nachgewiesen werden.

Aus der ersten Konjugat-Serie konnten Streptomycin und das Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57** erfolgreich als Transporter eingesetzt und damit die Zellaufnahme beziehungsweise die antibakterielle Wirksamkeit des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61** gesteigert werden. Für zwei Vertreter aus der zweiten Serie konnte eindeutig eine zelluläre Anreicherung des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** durch den Einsatz von GuCOSS **172** und des zellpenetrierenden KF<sub>2</sub>-Peptids **173** als Transporter-Moleküle nachgewiesen werden. Somit konnte für alle getesteten Transporter-Moleküle mindestens ein aktives Muraymycin-Transporter-Konjugat über den intrazellulär spaltbaren Ansatz hergestellt werden, welches die intrazelluläre Konzentration des Muraymycin-Analogons im Vergleich zur jeweiligen Referenzverbindung erhöht und damit die Hypothese dieser Proof-of-Principle-Studie bestätigt.

Für die beiden stabilen Muraymycin-Streptomycin-Konjugate **T1** und **T9** wurde eine Abschwächung der Aktivität gegen *MraY* durch die größeren strukturellen Änderungen festgestellt. Zudem konnte keine antibakterielle Aktivität über diesen Ansatz nachgewiesen werden.

**Tabelle 5.1** Komplettübersicht der inhibitorischen Aktivitäten gegen *MraY* und der antibakteriellen Daten gegen *E. coli*-Stämme (Serie 1 in blau, Serie 2 in grün, Serie 3 in rot, CPMs und sonstige SAR-Strukturen farblos).

CPM-Referenzverbindungen					
Verbindung	IC <sub>50</sub> <i>MraY</i>	IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> $\Delta$ <i>tolC</i>		IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	
		[ $\mu$ g/mL]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ g/mL]	[ $\mu$ M]
<b>152</b>	-	3.8 $\pm$ 0.4	5.3 $\pm$ 0.6	7.6 $\pm$ 0.8	10 $\pm$ 2
<b>60</b>	-	64 $\pm$ 3	61 $\pm$ 3	>100	-
<b>156*</b>	-	71	57	>100	-
<b>59**</b>	-	3.2 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 1.5	4.8 $\pm$ 1.4
<b>172</b>	98 $\pm$ 57 $\mu$ M	1.6 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	9.0 $\pm$ 1.4	4.5 $\pm$ 0.7
<b>181</b>	62 $\pm$ 21 $\mu$ M	3.7 $\pm$ 3.2	1.8 $\pm$ 1.6	65 $\pm$ 30	31 $\pm$ 14
<b>173</b>	> 0.1 mM	3.4 $\pm$ 1.4	1.6 $\pm$ 0.7	30 $\pm$ 10	14 $\pm$ 5
SAR-Muraymycine und Referenzverbindungen					
Verbindung	IC <sub>50</sub> <i>MraY</i>	IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> $\Delta$ <i>tolC</i>		IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	
		[ $\mu$ g/mL]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ g/mL]	[ $\mu$ M]
<b>63</b>	4.0 $\pm$ 0.4 $\mu$ M	>100	-	>100	-
<b>170</b>	4.2 $\pm$ 1.4 $\mu$ M	>100	-	>100	-
<b>61</b>	68 $\pm$ 4 nM	27 $\pm$ 7	23 $\pm$ 6	>100	-
<b>68</b>	2.5 $\pm$ 0.6 $\mu$ M	>100	-	>100	-
<b>82</b>	3.2 $\pm$ 0.5 $\mu$ M	>100	-	>100	-
<b>81</b>	280 $\pm$ 77 nM	>100	-	>100	-

## 5. Zusammenfassung

Verbindung	IC <sub>50</sub> MraY	IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> ΔtolC		IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5α	
		[μg/mL]	[μM]	[μg/mL]	[μM]
87	> 0.1 mM	>100	-	>100	-
89	19 ± 4 μM	>100	-	>100	-
88	> 0.1 mM	>100	-	>100	-
90	915 ± 78 nM	47 ± 30	42 ± 28	>100	-
91	69 ± 6 nM	7.2 ± 0.3	6.4 ± 0.3	>100	-
92	30 ± 3 nM	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1	>100	-
93	6.8 ± 0.3 nM	0.72 ± 0.08	0.65 ± 0.08	>100	-
94	34 ± 4 nM	>100	-	>100	-
<b>Konjugat-Verbindungen</b>					
Verbindung	IC <sub>50</sub> MraY	IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> ΔtolC		IC <sub>50</sub> <i>E. coli</i> DH5α	
		[μg/mL]	[μM]	[μg/mL]	[μM]
T1	18 ± 5 μM	>100	-	>100	-
T2	77 ± 6 nM	1.6 ± 0.4	0.7 ± 0.2	4.3 ± 2	2.0 ± 1
T3	933 ± 126 nM	9.5 ± 4	2.9 ± 1.1	8.9 ± 2	2.7 ± 1
T4	113 ± 14 nM	5.3 ± 3	1.6 ± 0.9	4.7 ± 2	1.4 ± 1
T5	123 ± 8 nM	4.0 ± 4	2.0 ± 1.7	>100	-
175	27 ± 2 nM	31 ± 6	14 ± 3	>100	-
T6	1.7 ± 0.2 μM	26 ± 12	13 ± 6	>100	-
T7	477 ± 33 nM	6.5 ± 2.1	2.1 ± 0.7	63 ± 3	20 ± 1
T8	1.3 ± 0.2 μM	6.4 ± 3.9	2.1 ± 1.3	44 ± 9	14 ± 3
T9	13 ± 2 μM	>100	-	>100	-
T10	1.3 ± 0.6 μM	73 ± 4	36 ± 2	>100	-
T11	52 ± 5 μM	-	-	-	-

\*in Wiederholungsmessungen bereits zerfallen; \*\*mit 10% Streptomycin als Verunreinigung.

**Tabelle 5.2** Vorläufige antibakterielle Daten ausgewählter Verbindungen gegen *S. aureus*.

Verbindung	IC <sub>50</sub> <i>S. aureus</i> Newman	
	[µg/mL]	[µM]
<b>172</b>	12 ± 5	5.9 ± 3
<b>181</b>	87	42
<b>173</b>	13 ± 2	6.3 ± 1.0
<b>61</b>	>100	-
<b>T3</b>	51 ± 8	16 ± 3
<b>T4</b>	18 ± 3	5.5 ± 0.8
<b>T7</b>	>100	-
<b>T8</b>	>50	-

**Tabelle 5.3** Antibakterielle Daten ausgewählter Verbindungen gegen *P. aeruginosa*.

Verbindung	IC <sub>50</sub> <i>P. aeruginosa</i> PAO1
	[µg/mL]
<b>61</b>	>100
<b>T5</b>	>100

Im Rahmen der Kooperation mit S. Van Lanen wurde auch das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** für weitere Untersuchungen des Biosyntheseweges der Muraymycine bereitgestellt. So konnte von Van Lanen et al. auch gezeigt werden, dass eine Hydroxylierung des L-Leucins an synthetischen Analoga der natürlichen auftretenden Muraymycine stattfinden kann. Die Ausbeute dieser biologischen Umsetzung war jedoch mit zunehmender Abweichung von den natürlichen Muraymycinen schlechter. So konnte die Hydroxylierung über den Biosyntheseweg des vereinfachten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **68** am L-Leucin noch massenspektrometrisch nachgewiesen, aber die Verbindung nicht in ausreichenden Mengen isoliert werden. Das entsprechende L-Arginin-haltige 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon, welches strukturell etwas

näher an den bekannten Naturstoffen ist, konnte dagegen in hydroxylierter Form isoliert werden.<sup>[186,190]</sup> Darüber hinaus wurden die Harnstoffdipeptide **146**, **142a** und **142b** ebenfalls als Referenzverbindungen von Van Lanen et al. zur Aufklärung des Biosyntheseweges der Muraymycine eingesetzt (zum Teil noch unveröffentlichte Ergebnisse).<sup>[190]</sup>

## 6 Ausblick

Auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse des intrazellulär spaltbaren Muraymycin-Streptomycin-Konjugats **T2** sollte diese Verbindung noch genauer betrachtet und auf ihre antibakterielle Aktivität gegen weitere Bakterienstämme untersucht werden. Vor Allem ist eine Testung des Konjugats **T2** sowie der anderen Konjugate mit Streptomycin gegen Bakterienstämme mit einer ausgebildeten Resistenz gegen Aminoglycosid-Antibiotika äußerst interessant. Auf eine Untersuchung mittels Zellaufnahme- beziehungsweise Zellanreicherungs-Assays wurde wegen der eindeutigen Ergebnisse der antibakteriellen Assays gegen *E. coli* für das Muraymycin-Streptomycin-Konjugat **T2** hier zunächst verzichtet. Zur Sicherung dieser Ergebnisse könnten die Zellaufnahme-Assays mit *E. coli*  $\Delta tolC$  für einen quantitativen Vergleich zur Aufnahme des freien Muraymycin-Analogons **61** jedoch noch herangezogen werden. Die Zellaufnahme-Assays konnten bisher nur für ausgewählte Verbindungen durchgeführt werden. Dieser Assay ist jedoch auch für die anderen Konjugat-Verbindungen und deren entsprechende Referenzverbindungen von großem Interesse. Hierfür müsste allerdings teilweise eine Resynthese der Konjugate erfolgen. Das betrifft unter anderem auch die Konjugate **T3** und **T4** aus der ersten Serie. Die erhaltenen antibakteriellen Daten beider Verbindungen deuten teilweise auf eine verstärkte Zellaufnahme hin. Für die entsprechenden Konjugate aus der zweiten Serie, das Muraymycin-GuCOSS-Konjugat **T7** und das Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat **T8**, wurde bereits eine Anreicherung in der Zelle durch die Verwendung dieser Transporter-Einheiten nachgewiesen. Des Weiteren muss eine Anpassung der Assay-Bedingungen individuell an die jeweiligen Substanzen erfolgen. Für die beiden stabil verknüpften Muraymycin-Streptomycin-Konjugate **T1** und **T9** konnte zwar keine antibakterielle Aktivität nachgewiesen werden, dieser Umstand könnte sich jedoch auch auf die schlechtere Inhibition von MraY zurückführen lassen. Daher wäre eine Durchführung des Zellaufnahme-Assays auch für diese beiden Verbindungen sinnvoll.

Auch das Muraymycin-Enterobactin-Konjugat **T5** liefert mit der verstärkten Wirkung von intrazellulär freigesetztem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** gegen *E. coli*  $\Delta tolC$  durch eine gesteigerte Zellaufnahme eine Bestätigung des Konjugations-Konzeptes. In Anbetracht dessen wäre eine erneute Untersuchung der bisher erfolglos gebliebenen CuAAC eines Enterobactin-Derivates mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **63** ein interessanter Ansatz. Diese intrazellulär nicht-spaltbare Vergleichsverbindung wäre eine interessante Struktur zur biologischen Evaluation. Eine genauere Betrachtung der Reaktionsbedingungen der CuAAC wäre hierfür jedoch erforderlich. Alternativ hierzu wäre eine Synthese von zwei neuen Muraymycin-

Enterobactin-Konjugaten innerhalb der dritten Serie interessant. Mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** wird zwar nicht die Aktivität des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **61** der ersten Serie erreicht, dennoch besitzt das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** eine sehr gute inhibitorische Potenz gegenüber *MraY* und wäre damit eine gute Ausgangsstruktur für ein weiteres Konjugat mit dem Enterobactin-Derivat (AcO)Ent<sub>KL</sub> **57**. Die Vergleichsstruktur über eine Konjugation mittels CuAAC könnte ausgehend von dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **82** erfolgen.

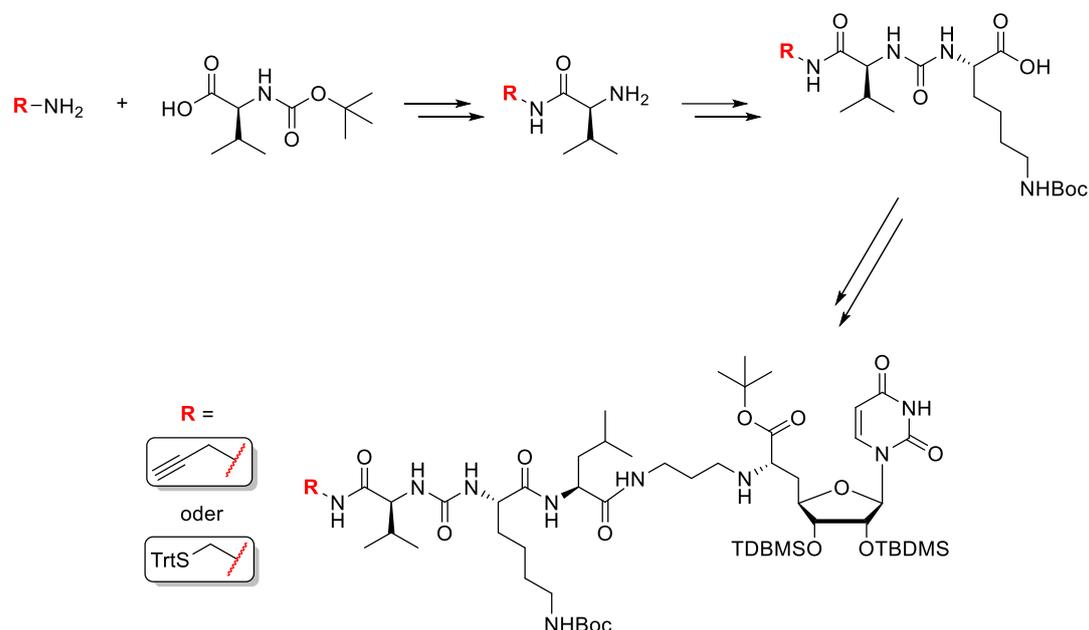
Mit der Einführung weiterer Transporter-Einheiten innerhalb der dritten Konjugat-Serie könnte diese Serie noch erweitert werden. Eine Aktivierung der Thiol-Gruppe am L-Cystein mit Aldrithiol™-2 wäre eine denkbare Option, um weitere Konjugate an dieser Position einfacher zugänglich zu machen. Mit dieser Modifikation könnten beispielsweise bereits vorhandene Bausteine wie GuCOSS **172** oder das zellpenetrierende KF<sub>2</sub>-Peptid **173** auch leicht an dieser Position konjugiert werden.

Allgemein ist eine Konjugation weiterer Transporter-Einheiten durch den modularen Ansatz denkbar und auch leicht zugänglich. Beispielsweise können weitere zellpenetrierende Peptide mit Cystein oder Azid-Modifikationen getestet werden. Ein verstärkter Fokus auf duale Wirkstoffe durch Kupplung an weitere Antibiotika, wie zum Beispiel entsprechend modifizierte Polymyxine, könnte darüber hinaus ein viabler Ansatz für weitere vielversprechende Konjugat-Strukturen sein.

Ausgehend von dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** könnten zudem weitere wichtige Verbindungen durch Variation des Lysin-Amins der Seitenkette hergestellt werden. Hier ist vor Allem auch eine Referenzverbindung für die Konjugate der zweiten Serie interessant. Das intermediär entstehende Carbamat **183** wurde in den bisherigen Stabilitätstests zwar qualitativ nachgewiesen, konnte mangels einer Referenzverbindung jedoch nicht quantitativ bestimmt werden. Mit der hergestellten Referenzverbindung wäre die Bestimmung der Aktivität im *MraY*-Assay möglich und genauere Tests zur Stabilität dieser Verbindung würden mehr Aufschluss über das intrazelluläre Verhalten dieser Konjugate geben.

Ein weiterer Punkt zum Aufbau einer vierten Konjugat-Serie wäre durch eine Modifikation des Muraymycins an der terminalen Carboxylgruppe des L-Valins möglich. Hier kann durch Peptidkupplung ein weiterer Ankerpunkt für eine Konjugation mit einem Alkin oder Thiol realisiert werden (siehe Abbildung 6.1). Erste Vorversuche für eine Alkin-Modifikation an dieser Position wurden bereits von T. Betzholz im Rahmen eines Vertiefungspraktikums durchgeführt. Dieser

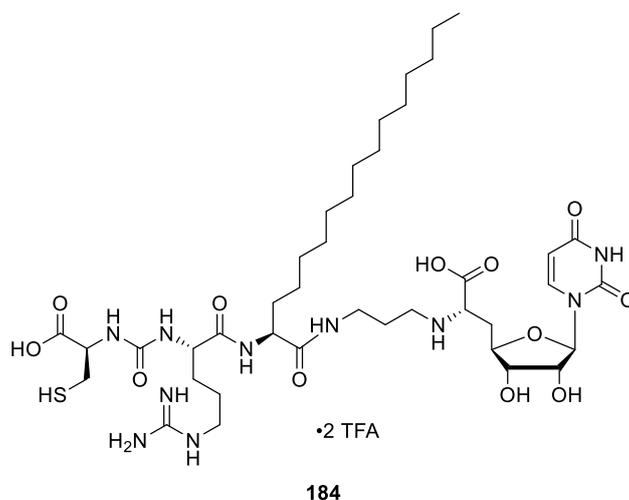
Ansatz wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt, könnte jedoch für zukünftige Untersuchungen neuer Konjugate ebenfalls ein guter Ansatzpunkt sein.



**Abb. 6.1** Synthese möglicher geschützter 5'-Desoxy-Muraymycin-Vorstufen einer vierten Konjugat-Serie.

Die Ergebnisse der durchgeführten SAR-Studie liefern eine Grundlage für weitergehende Untersuchungen. Ausgehend von dem aktivsten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** der durchgeführten SAR-Studie sind noch weitere Modifikationen an der Struktur zur Verbesserung der Aktivität denkbar. So kann das Muraymycin-Analogon **93** abseits der SAR-Studie auch als Ausgangspunkt für weitere Konjugate dienen. Eine Modifikation an der  $N^\epsilon$ -Position des L-Lysins ist hier analog der zweiten Konjugat-Serie möglich. Zur weiteren Optimierung der Muraymycin-Grundstruktur ist bereits bekannt, dass mit einem Wechsel von L-Lysin zu L-Arginin oder zu dem in den Naturstoffen vorkommenden Epicapreomycinidin eine deutliche Steigerung der Inhibition von *MraY* möglich ist. Gemessen am Syntheseaufwand des Epicapreomycinidin-Bausteins und in Relation zu dem erwarteten Aktivitätsgewinn ist L-Arginin hier die bessere Wahl. Zusätzlich wäre ein Austausch der terminalen Aminosäure zu L-Cystein ein interessanter Ansatz. Zum einen wurde bei dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** mit terminaler L-Cystein-Gruppe ebenfalls eine starke Steigerung der Aktivität an *MraY* beobachtet, zudem steht mit dieser Aminosäure erneut ein Ankerpunkt für eine spaltbare Konjugation in einem Arginin-haltigen Muraymycin-Analogon zur Verfügung. Mit der Verwendung von L-Arginin und L-Cystein könnte eine hochpotente Ausgangsverbindung entstehen, die bereits intrinsisch in der

Lage sein könnte, die Zellwand in einem gesteigerten Maße zu überwinden und zudem sehr aktiv das Target MraY inhibiert (siehe Abbildung 6.2).

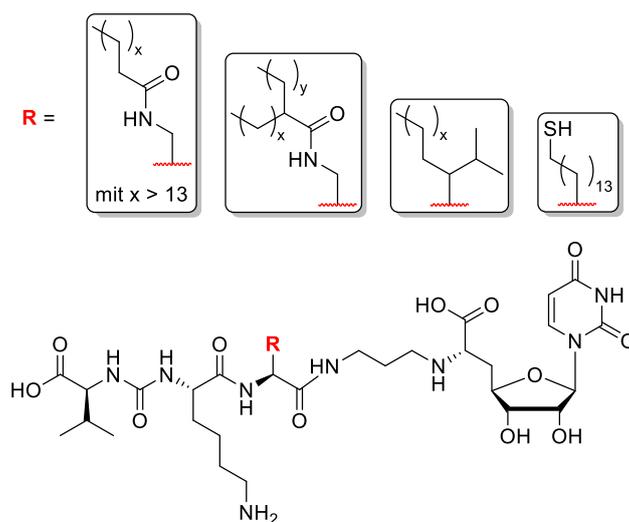


**Abb. 6.2** Auf Basis der SAR-Daten vorgeschlagene 5'-Desoxy-Muraymycin-Struktur **184**.

Durch eine zusätzliche Konjugation an ein Transporter-Molekül könnte die Zellaufnahme dieser vorgeschlagenen Muraymycin-Struktur **184** nochmals gesteigert werden. Hier ist auch interessant, inwieweit die Zellaufnahme eines bereits relativ lipophilen Muraymycin-Analogons durch eine Konjugation an beispielsweise Streptomycin oder Enterobactin überhaupt noch gesteigert werden könnte. Ähnlich zu diesem Ansatz könnte auch eine Modifikation mit POM-Gruppen nach D. Wiegmann an dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** stattfinden, um ein zur Zellaufnahme fähiges Muraymycin-Prodrug zu erhalten.

Im Rahmen der SAR-Studie können ausgehend von der Struktur **64** noch längere lipophile Reste in die Seitenkette eingeführt werden (siehe Abbildung 6.3). Hier ist der Einfluss einer weiteren Verlängerung der Seitenkette noch nicht ganz geklärt. Ein weiterer interessanter Ansatz wäre zudem die Synthese von Muraymycin-Analoga mit verzweigten gesättigten Alkyl-Seitenketten. Diese Strukturen wären ausgehend von dem DAP-haltigen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **64** durch Peptidkupplung mit entsprechenden Carbonsäuren schnell zugänglich. Mit dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **93** als Vorlage lassen sich auch hier Modifikationen vornehmen (siehe Abbildung 6.3). Vor Allem wäre hier eine Verzweigung der Seitenkette mit einer größeren lipophilen Gruppe nahe am Muraymycin-Gerüst auf der Grundlage der bisherigen SAR-Daten genauer zu untersuchen. Hierzu wäre erneut die Synthese und der Einbau von neuen nicht-proteinogenen Aminosäuren mit verzweigten Seitenketten direkt in das Muraymycin-Grundgerüst interessant. Die Synthese dieser Aminosäure-Bausteine könnte auf Grundlage der Herstellung der Aminosäure **95** erfolgen. Dieser Ansatz wäre jedoch mit einem erheblichen

synthetischen Mehraufwand im Vergleich zu den einfachen Modifikationen ausgehend von dem 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **64** verbunden. Auch wäre eine der Muraymycin-Verbindung **61** ähnliche Struktur ohne Amid-Bindung in der Seitenkette, und damit einer wahrscheinlich gesteigerten Aktivität gegen MraY, ein guter Ausgangspunkt für weitere intrazellulär spaltbare Konjugate. Mit der frühen Einführung einer Thiol-haltigen Aminosäure beim Aufbau des Muraymycin-Grundgerüsts müsste ein Wechsel der Schutzgruppen-Strategie erfolgen und beispielsweise eine Fmoc-Schutzgruppe im Falle dieses Bausteins eingesetzt werden, um die Verwendung von Palladium-vermittelten Schutzgruppenspaltungen zu umgehen.



**Abb. 6.3** Mögliche Variationen am 5'-Desoxy-Muraymycin-Gerüst für weitere SAR-Studien.

## 7 Experimentaltteil

### 7.1 Allgemeines

#### 7.1.1 Allgemeine Methoden

Luft- und wasserempfindliche Reaktionen wurden unter Schutzgas-Atmosphäre (Stickstoff oder Argon) mit absoluten Lösungsmitteln durchgeführt, falls nicht anders angegeben. Glasgeräte wurden vor Benutzung unter Erhitzen *in vacuo* getrocknet. Stickstoff wurde über Oran-gegel und Phosphorpentoxid getrocknet. Argon wurde mit einer Reinheit von 6.0 verwendet und wurde nicht zusätzlich getrocknet. Für Reaktionen bei tiefen Temperaturen wurden ent-sprechende Kältemischungen verwendet (Eis in Wasser, Eis mit Natriumchlorid oder flüssiger Stickstoff in Aceton).

#### 7.1.2 Edukte und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden von ABCR, Acros Organics, Alfa Aesar, GL Biochem, Iris Biotech, Car-bolution, Merck, Roth, Sigma Aldrich, VWR und über das Zentrale Chemikalienlager der Uni-versität des Saarlandes in hinreichender Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung einge-setzt. Die benötigten Vorstufen des Epicapreomycin-Valin-Harnstoffdipeptids **36a** sowie des Capreomycin-Valin-Harnstoffdipeptids **36b** wurden von M. Büschleb synthetisiert und waren noch in den Beständen des Arbeitskreises vorhanden.<sup>[225]</sup> Das 2',3',5'-*O*-Tris-(*tert*-butyldime-thylsilyl)-uridin **105** war ebenfalls noch aus Vorarbeiten verfügbar.

#### 7.1.3 Lösungsmittel

Dichlormethan (DCM), Ethylacetat (EtOAc) und Petrolether (PE) wurden in technischer Quali-tät bezogen und vor Benutzung destilliert. Diese Lösungsmittel wurden für Chromatographie, Extraktionen und Reaktionen ohne Schutzgas-Bedingungen verwendet.

Alle anderen Lösungsmittel wurden in p. a.-Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung ein-gesetzt, sofern nicht anders angegeben.

Destilliertes Wasser wurde durchgehend verwendet. Zur Probenvorbereitung an der HPLC so-wie nach HPLC-Reinigungen wurde bidestilliertes Wasser von einem TKA-GenPure-System ver-wendet.

#### 7.1.4 Absolute Lösungsmittel

Aceton: Aceton wurde über Molekularsieb (4 Å) getrocknet und gelagert.

Acetonitril (MeCN): MeCN wurde mittels einer *MBRAUN* MB SPS 800 getrocknet.

Dichlormethan (DCM): DCM wurde mittels einer *MBRAUN* MB SPS 800 getrocknet.

Diethylether (Et<sub>2</sub>O): Et<sub>2</sub>O wurde mittels einer *MBRAUN* MB SPS 800 getrocknet.

*N,N*-Dimethylformamid (DMF): DMF wurde mittels einer *MBRAUN* MB SPS 800 getrocknet.

Dimethylsulfoxid (DMSO): DMSO wurde als absolutes Lösungsmittel über Molekularsieb (3 Å) bezogen.

Ethylacetat (EtOAc): EtOAc wurde über Molekularsieb (4 Å) getrocknet und gelagert.

*iso*-Propanol (*i*PrOH): *i*PrOH wurde als absolutes Lösungsmittel über Molekularsieb (3 Å) bezogen.

Methanol (MeOH): MeOH wurde als absolutes Lösungsmittel über Molekularsieb (3 Å) bezogen.

*tert*-Butanol (*t*BuOH): *t*BuOH wurde als absolutes Lösungsmittel über Molekularsieb (3 Å) bezogen.

Tetrahydrofuran (THF): THF wurde mittels einer *MBRAUN* MB SPS 800 getrocknet und über Molekularsieb (4 Å) gelagert.

Triethylamin (TEA): TEA wurde entgast und über Molekularsieb (4 Å) getrocknet und gelagert.

#### 7.1.5 Chromatographie

##### Säulenchromatographie

Zur Durchführung der Säulenchromatographie wurde das Normalphasen-Kieselgel Si 60 (40-63 µm, *VWR*) verwendet.

##### Dünnschichtchromatographie

Aluminiumplatten beschichtet mit 60 F<sub>254</sub> Silicagel (*VWR*) wurden für die Dünnschichtchromatographie zur Reaktionskontrolle und Kontrolle der Säulenchromatographie verwendet. Die Produkt-Spots wurden mittels UV-Licht (254 nm) und/oder durch Anfärben unter Erhitzen mit VSS-Färbereagenz (4.0 g Vanillin, 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (konz.), 80 mL AcOH, gelöst in MeOH (680 mL)) oder Ninhydrin-Lösung (0.3 g Ninhydrin, 3 mL AcOH, gelöst in 100 mL 1-Butanol), detektiert.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC-Trennungen wurden an einem Agilent Technologies 1200 Series System mit einem MWD-Detektor durchgeführt. Als Säulen wurden eine LiChroCART® 250-10 Purospher® STAR RP-18e (5 µm, 10x250 mm) oder eine Macherey-Nagel VP 250/10 NUCLEODUR Phenyl-Hexyl 5 µm-Säule verwendet.

Verwendete HPLC-Methoden:

## Methode 1

Zeit [min]	0	25	32	42	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	100	60	0	0	100
MeCN +0.1% TFA [%]	0	40	100	100	0

Flow 2.0 mL/min

## Methode 2

Zeit [min]	0	15	25	30	34	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	95	80	60	40	40	95
MeCN +0.1% TFA [%]	5	20	40	60	60	5

Flow 2.0 mL/min

## Methode 3

Zeit [min]	0	15	25	30
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	80	70	60	80
MeCN +0.1% TFA [%]	20	30	40	20

Flow 2.0 mL/min

## 7. Experimentalteil

### Methode 4

Zeit [min]	0	3	5	40	45	55	60
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	100	100	75	75	60	30	100
MeCN +0.1% TFA [%]	0	0	25	25	40	70	0

Flow 2.0 mL/min

### Methode 5

Zeit [min]	0	15	25	32	40	41	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	95	80	60	0	0	70	95
MeCN +0.1% TFA [%]	5	20	40	100	100	30	5

Flow 2.0 mL/min

### Methode 6

Zeit [min]	0	15	25	32	40	41	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	80	70	40	0	0	70	70
MeCN +0.1% TFA [%]	20	30	60	100	100	30	30

Flow 2.0 mL/min

### Methode 7

Zeit [min]	0	15	25	32	40	41	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	80	70	60	0	0	70	70
MeCN +0.1% TFA [%]	20	30	40	100	100	30	30

Flow 2.0 mL/min

## 7. Experimentalteil

### Methode 8

Zeit [min]	0	3	25	32	40	41	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	100	100	20	0	0	60	100
MeCN +0.1% TFA [%]	0	0	80	100	100	40	0

Flow 2.0 mL/min

### Methode 9

Zeit [min]	0	3	25	32	40	41	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	100	100	45	0	0	60	100
MeCN +0.1% TFA [%]	0	0	55	100	100	40	0

Flow 2.0 mL/min

### Methode 10

Zeit [min]	0	3	25	32	40	41	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	100	100	70	50	30	80	100
MeCN +0.1% TFA [%]	0	0	30	50	70	20	0

Flow 2.0 mL/min

### Methode 11

Zeit [min]	0	25	32	40	41	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	90	60	0	0	90	90
MeCN +0.1% TFA [%]	10	40	100	100	10	10

Flow 2.0 mL/min

## 7. Experimentalteil

### Methode 12

Zeit [min]	0	15	25	30	40	42	46	49	50
H <sub>2</sub> O +0.1%TFA [%]	95	80	60	40	40	5	5	95	95
MeCN +0.1% TFA [%]	5	20	40	60	60	95	95	5	5

Flow 2.0 mL/min

### Methode 13

Zeit [min]	0	4	5	22	23	28	30
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	100	100	75	75	0	0	100
MeCN +0.1% TFA [%]	0	0	25	25	100	100	0

Flow 2.0 mL/min

### Methode 14

Zeit [min]	0	3	25	32	40	41	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	100	100	45	40	5	80	90
MeCN +0.1% TFA [%]	0	0	55	60	95	20	10

Flow 2.0 mL/min

### Methode 15

Zeit [min]	0	3	30	31	40	41
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	100	100	50	0	0	100
MeCN +0.1% TFA [%]	0	0	50	100	100	0

Flow 2.0 mL/min

## 7. Experimentalteil

## Methode 16

Zeit [min]	0	3	25	30	32	33	40	44	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	100	100	40	25	20	0	0	100	100
MeCN +0.1% TFA [%]	0	0	60	75	80	100	100	0	0

Flow 2.0 mL/min

## Methode 17

Zeit [min]	0	15	25	38	56	60
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	80	70	60	0	0	80
MeCN +0.1% TFA [%]	20	30	40	100	100	20

Flow 2.0 mL/min

## Methode 18

Zeit [min]	0	15	25	32	40	41	50	55
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	80	70	60	50	20	0	0	70
MeCN +0.1% TFA [%]	20	30	40	50	80	100	100	30

Flow 2.0 mL/min

## Methode 19

Zeit [min]	0	2	32	40	41	45
H <sub>2</sub> O +0.1% TFA [%]	100	100	0	0	0	100
MeCN +0.1% TFA [%]	0	0	100	100	100	0

Flow 2.0 mL/min

### 7.1.6 Massenspektrometrie

Low-Resolution-Massenspektren wurden an einem Surveyor MSQ Plus Massenspektrometer von *Finnigan* mit Elektrospray-Ionisations-Einheit (ESI), AS3000-Autosampler und einem UV2000-Detektor aufgenommen. Die vorgeschaltete LC-Trennung wurde mit einer Nucleodur® 100-5 C<sub>18</sub> (5 µm, 3x125 mm)-Säule durchgeführt.

High-Resolution-Massenspektren wurden mit einem Ultimate 3000 System von *Thermo Scientific* mit einem *Dionex* UltiMate 3000 UHPLC System, bestehend aus Autosampler, Pumpe, Säulen-Einheit, DAD-Detektor und einer *Thermo Scientific* Q Exactive OrbiTrap aufgenommen. Als Säule wurde eine *Thermo* Accucore™ Phenyl-X (2.1 µm, 3x100 mm) verwendet. Die hochauflösenden Massenspektren wurden von Stefanie Weck oder Dr. Stefan Boettcher aufgenommen.

### 7.1.7 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden mit den folgenden NMR-Spektrometern von *Bruker* aufgenommen: *Avance I* und *III 500* oder *Avance DRX 500* (mit TCI-Kryoprobenkopf): <sup>1</sup>H-NMR-Spektren bei 500 MHz und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren bei 126 MHz.

*Avance II 400*: <sup>1</sup>H-NMR-Spektren bei 400 MHz, <sup>19</sup>F-NMR-Spektren bei 376 MHz und <sup>31</sup>P-NMR-Spektren bei 162 MHz.

*Fourier 300*: <sup>1</sup>H-NMR-Spektren bei 300 MHz und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren bei 76 MHz.

Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in [ppm] angegeben und zu dem jeweiligen Lösungsmittel-Signal referenziert. Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in [Hz] angegeben. Zur Kennzeichnung der Multiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), quin (Quintett) und m (Multipllett) sowie deren Kombinationen. Die Kennzeichnung diastereotoper Protonen erfolgte durch ein tiefgestelltes „a“ für das Hochfeld-verschobene und „b“ für das Tieffeld-verschobene Signal. Zur vollständigen Zuordnung der Signale wurden zusätzliche <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY-, <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-, <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMBC- und <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-TOCSY-Spektren herangezogen. Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen, sofern nicht anders deklariert. Bei zu geringen Signal-Rausch-Verhältnissen wurde zur Detektion der Signale auf die 2D-NMR-Spektren zurückgegriffen.

### 7.1.8 IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem Fourier-Transformations-Infrarot-(FTIR)-Spektrometer ALPHA mit einer PlatinumATR®-Einheit der Firma Bruker aufgenommen. Die Wellenzahlen  $\tilde{\nu}$  sind in  $[\text{cm}^{-1}]$  angegeben.

### 7.1.9 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektren wurden mit einem Cary Series 100 UV-Spektrometer von Agilent Technologies aufgenommen. Die Messungen wurden über einen Bereich  $\Delta\lambda$  von 800 nm bis 200 nm durchgeführt. Die Maxima  $\lambda_{\text{max}}$  der Absorptionssignale wurden in  $[\text{nm}]$  angegeben.

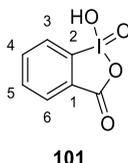
### 7.1.10 Polarimetrie

Die Drehwerte wurden mit einem KRÜSS P3000-Polarimeter und einer Küvette der Länge  $l = 1 \text{ dm}$  bestimmt. Alle Drehwerte wurden mit einer Natriumdampf Lampe ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ) bei Raumtemperatur gemessen. Die spezifischen Drehwerte sind in  $\left[\frac{^\circ \cdot \text{mL}}{\text{g} \cdot \text{dm}}\right]$  angegeben.

## 7.2 Synthesen

### 7.2.1 Synthese von Reagenzien und Bausteinen

#### 7.2.1.1 Synthese von 2-Iodoxybenzoesäure IBX **101**



Oxone<sup>®</sup> (55.8 g, 91.5 mmol, 3.0 Äq) und 2-Iodbenzoesäure **100** (7.50 g, 30.2 mmol, 1.0 Äq) wurden in Wasser (275 mL) vorgelegt und 2 h bei 80 °C gerührt. Es wurde auf 5 °C gekühlt, die entstandene Suspension filtriert und der Rückstand mit Wasser (2x100 mL) und Aceton (2x100 mL) gewaschen. Die Titelverbindung **101** wurde im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 4.22 g (15.1 mmol, 50%) als leicht beiger Feststoff.

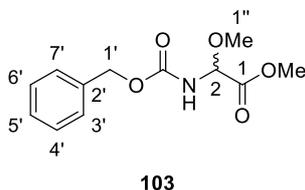
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 7.84 (td, *J* = 7.3 Hz, *J* = 0.6 Hz, 1 H, 5-H), 8.00 (td, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1 H, 4-H), 8.03 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1 H, 6-H), 8.15 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, 3-H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 124.98 (C-3), 130.06 (C-6), 131.43 (C-1), 132.92 (C-5), 133.35 (C-4), 146.54 (C-2), 167.45 ((C=O)O).

**C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>IO<sub>4</sub>** (280.02)

#### 7.2.1.2 Synthese des Cbz-geschützten Phosphonats **30**

##### Synthese von Methyl-2-methoxy-*N*-benzyloxycarbonylglycinat **103**<sup>[194,195]</sup>



Glyoxalsäure-Monohydrat **102** (12.5 g, 136 mmol, 1.1 Äq) und Benzylcarbamat (18.5 g, 122 mmol, 1.0 Äq) wurden in abs. Diethylether (120 mL) vorgelegt und für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Suspension wurde unter reduziertem Druck auf ein Volumen von ungefähr 60 mL eingengt und mit auf 0 °C gekühltem Diethylether (2x15 mL) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde der erhaltene farblose Feststoff in abs. Methanol (120 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und nach Zugabe von konz.

Schwefelsäure (3.8 mL, 68 mmol) für 7 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde langsam in eine gesättigte, wässrige und auf 0 °C gekühlte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (400 mL) gegeben. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (5x200 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Petrolether (150 mL) aufgenommen und für 30 h auf 0 °C gekühlt. Die erhaltene Suspension wurde filtriert und der Rückstand mit auf 0 °C gekühltem Petrolether (2x25 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter reduziertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 26.5 g (105 mmol, 86%) eines farblosen Feststoffes.

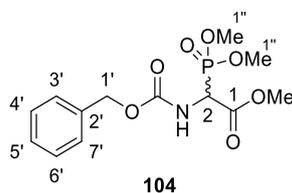
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] = 3.37 (s, 3 H, 1''-H), 3.76 (s, 3 H, COOCH<sub>3</sub>), 5.13 (s, 2 H, 1'-H), 5.23 (s, 1 H, 2-H), 7.28-7.39 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] = 53.19 (COOCH<sub>3</sub>), 55.98 (C-1''), 68.11 (C-1'), 82.20 (C-2), 128.92 (C-3'), 129.09 (C-7'), 129.30 (C-5'), 129.58 (C-4'), 129.65 (C-6'), 138.04 (C-2'), 158.36 (NC(=O)O), 169.92 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 276.00 [M+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>** (253.25)

#### Synthese von Methyl ester-Phosphonat **104**<sup>[195,196]</sup>



Methyl-2-methoxy-*N*-benzyloxycarbonylglycinat **103** (26.5 g, 105 mmol, 1.0 Äq) wurde in abs. Toluol (90 mL) vorgelegt und auf 80 °C erwärmt. Unter Rühren wurde tropfenweise Phosphor(III)-chlorid (10.0 mL, 115 mmol, 1.1 Äq) zugegeben und nach vollständiger Zugabe für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Zugabe von Trimethylphosphit (13.9 mL, 118 mmol, 1.1 Äq) wurde für weitere 2 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (400 mL) gelöst und mit gesättigter, wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3x150 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene farblose Feststoff wurde zerkleinert, in *n*-Hexan suspendiert und für 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde filtriert und der Rückstand mit *n*-Hexan gewaschen. Das Produkt **104** wurde nach Trocknen im Vakuum ohne weitere Reinigung erhalten.

**Ausbeute:** 11.4 g (34.5 mmol, 33%) als farbloser Feststoff.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.70 (d,  $^3J_{\text{HP}} = 11.0$  Hz, 3 H, 1''-H<sub>a</sub>), 3.74 (d,  $^3J_{\text{HP}} = 11.7$  Hz, 3 H, 1''-H<sub>b</sub>), 3.74 (s, 3 H,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.85 (dd,  $J = 22.4$  Hz,  $J = 9.5$  Hz, 1 H, 2-H), 5.03-5.07 (m, 2 H, 1'-H), 5.55 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 2-NH), 7.20-7.30 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H).

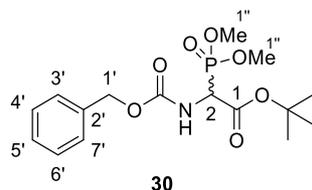
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 51.02 (d,  $^1J_{\text{CP}} = 147.5$  Hz, C-2), 53.35 ( $\text{COOCH}_3$ ), 53.98 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 6.4$  Hz, C<sub>a</sub>-1''), 54.13 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 6.4$  Hz, C<sub>b</sub>-1''), 67.62 (C-1'), 128.12 (C-3', C-7'), 128.32 (C-5'), 128.53 (C-4', C-6'), 135.79 (C-2'), 155.56 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 7.3$  Hz,  $\text{NC(=O)O}$ ), 167.17 (C-1).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 18.33.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 332.10$  [M+H]<sup>+</sup>, 354.00 [M+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>7</sub>P** (331.26)

### Synthese von *tert*-Butylester-Phosphonat **30**<sup>[197]</sup>



Der erste Teil dieser Reaktionssequenz wurde nicht unter Inertgasbedingungen durchgeführt. *N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-(dimethylphosphinyl)-glycinmethylester **104** (11.4 g, 34.5 mmol, 1.0 Äq) wurde in 1,4-Dioxan (15 mL) suspendiert und auf 10 °C gekühlt. Es wurde eine wässrige Natriumhydroxid-Lösung (2 M, 17.9 mL, 35.8 mmol, 1.0 Äq) langsam zugegeben und nach vollständiger Zugabe für 45 min bei 10 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt, der pH-Wert mit wässriger HCl-Lösung (6 M) auf circa 2 eingestellt und Wasser (50 mL) als auch Ethylacetat (100 mL) zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (4x75 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

Das erhaltene Zwischenprodukt wurde in abs. Dichlormethan (75 mL) und abs. *tert*-Butanol (250 mL) gelöst, mit Molekularsieb (3 Å und 4 Å) versetzt und für 3.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von *N*-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (10.0 g, 40.4 mmol, 1.2 Äq) wurde für weitere 21.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde über Celite® filtriert, mit Ethylacetat (4x200 mL) gewaschen und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene orangene Rückstand wurde in Ethylacetat (500 mL) gelöst und nachfolgend mit auf 0 °C gekühlter wässriger HCl-Lösung (0.5 M, 3x80 mL) und gesättigter wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (2x100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat

getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (PE:EtOAc 1:1) wurde die Titelverbindung **30** erhalten.

**Ausbeute:** 5.90 g (15.8 mmol, 46%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.12$  (PE:EtOAc 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.42 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.69 (d,  $^3J_{\text{HP}} = 11.0$  Hz, 3 H,  $1''\text{-H}_a$ ), 3.70 (d,  $^3J_{\text{HP}} = 11.0$  Hz, 3 H,  $1''\text{-H}_b$ ), 4.67 (dd,  $^2J_{\text{HP}} = 23.6$  Hz,  $J = 9.1$  Hz, 2 H, 2-H), 5.08 (s, 2 H,  $1'\text{-H}$ ), 7.28-7.41 (m, 5 H,  $3'\text{-H}$ ,  $4'\text{-H}$ ,  $5'\text{-H}$ ,  $6'\text{-H}$ ,  $7'\text{-H}$ ), 8.19 (dd,  $J = 9.3$  Hz,  $J = 2.0$  Hz, 1 H, NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 27.47 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 52.67 (d,  $^1J_{\text{CP}} = 147.5$  Hz, C-2), 53.46 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 7.3$  Hz,  $\text{C}_a\text{-}1''$ ), 53.56 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 6.4$  Hz,  $\text{C}_b\text{-}1''$ ), 65.98 (C- $1'$ ), 82.28 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 127.68 (C- $3'$ , C- $7'$ ), 127.86 (C- $5'$ ), 128.32 (C- $4'$ , C- $6'$ ), 136.70 (C- $2'$ ), 156.13 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 9.2$  Hz,  $\text{NC}(\text{=O})\text{O}$ ), 165.51 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 2.8$  Hz, C-1).

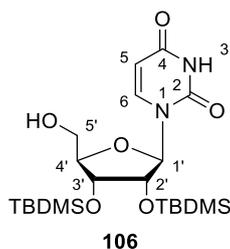
**$^{31}\text{P-NMR}$**  (202 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 19.43.

**MS** (ESI $^+$ ):  $m/z = 374.1$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

**$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_7\text{P}$**  (373.34)

### 7.2.1.3 Synthese des Nucleosid-Bausteins **33a**

#### Synthese von **2',3'-O-Bis-(tert-butyldimethylsilyl)-uridin 106**



**2',3',5'-O-Tris-(tert-butyldimethylsilyl)-uridin 105** (14.2 g, 24.2 mmol) wurde in THF (200 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe einer 1:1-Mischung aus TFA und Wasser (130 mL) wurde für 8 h bei 0 °C gerührt. Der pH-Wert wurde mit gesättigter wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung auf circa 8 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat (800 mL) versetzt, die organische Phase mit gesättigter wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (2x300 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel wurde die Titelverbindung **106** erhalten (DCM:EtOAc 3:1).

**Ausbeute:** 7.29 g (15.4 mmol, 64%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.19$  (DCM:EtOAc 3:1).

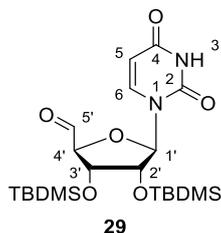
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -0.03 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.02 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.09 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.83 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.54-3.59 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.63-3.68 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 3.88 (q,  $J = 3.0$  Hz, 1 H, 4'-H), 4.14 (dd,  $J = 4.3$  Hz,  $J = 3.0$  Hz, 1 H, 3'-H), 4.25 (dd,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, 2'-H), 5.25 (bs, 1 H, 5'-OH), 5.68 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 5-H), 5.81 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1 H, 1'-H), 7.93 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -5.06 (SiCH<sub>3</sub>), -4.89 (SiCH<sub>3</sub>), -4.78 (SiCH<sub>3</sub>), -4.65 (SiCH<sub>3</sub>), 17.59 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.73 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.57 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.70 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 60.39 (C-5'), 71.90 (C-3'), 74.52 (C-2'), 85.50 (C-4'), 86.84 (C-1'), 102.00 (C-5), 140.32 (C-6), 150.77 (C-2), 163.06 (C-4).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 473.16$  [M+H]<sup>+</sup>, 496.20 [M+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>21</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub>** (472.73)

### Synthese von 2',3'-O-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridin-5'-aldehyd **29**



2',3'-O-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridin **106** (3.38 g, 7.15 mmol, 1.0 Äq) wurde in abs. Acetonitril (75 mL) vorgelegt und nach Zugabe von 2-Iodoxybenzoesäure **101** (4.00 g, 14.3 mmol, 2.0 Äq) für 2 h bei 90 °C gerührt. Nach Kühlen auf 0 °C wurde filtriert und der Rückstand mit Ethylacetat (2x50 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Auf Grund der bekannten Instabilität des Uridin-5'-Aldehyds **29** wurde zur Produktidentifikation lediglich ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen und das Produkt umgehend in der nächsten Reaktion ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** 3.36 g (7.14 mmol, quant.) als farbloser Feststoff.

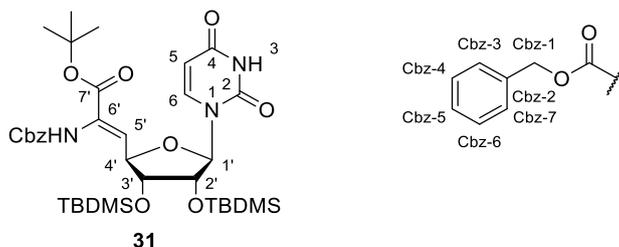
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.02 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.87 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.94 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.29 (dd,  $J = 4.3$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1 H, 3'-H), 4.33 (dd,  $J = 5.4$  Hz,  $J = 4.1$  Hz, 1 H, 2'-H), 4.56 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1 H, 4'-H),

5.75 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.82 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 2.2$  Hz, 1 H, 5-H), 7.71 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H), 8.44 (s, 1 H, NH), 9.82 (s, 1 H, 5'-H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 471.03$  [M+H]<sup>+</sup>.

**C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub>** (470.73)

### Synthese der *Z*-Didehydro-Nucleosyl-Aminosäure **31**



Kaliumhexamethyldisilazan (5 M in Toluol, 9.20 mL, 4.58 mmol, 0.8 Äq) wurde in abs. THF (50 mL) vorgelegt und auf  $-78$  °C gekühlt. Nach Zugabe des Phosphonats **30** (1.71 g, 4.58 mmol, 0.8 Äq) wurde für 20 min gerührt. 2',3'-O-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-uridin-5'-aldehyd **29** (2.70 g, 5.74 mmol, 1.0 Äq) wurde, gelöst in abs. THF (50 mL), tropfenweise bei  $-78$  °C zugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde für 21 h unter langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Methanol (5 mL) und Verdünnen mit Ethylacetat (200 mL) wurde mit halb-gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (2x300 mL) gewaschen, im Anschluss über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt **31** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten (PE:EtOAc 3:2).

**Ausbeute:** 2.21 g (3.08 mmol, 67%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.25$  (PE:EtOAc 3:2).

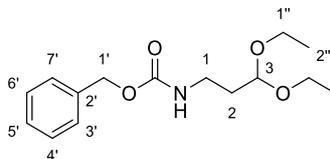
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.08 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.90 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.91 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.49 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.96 (dd,  $J = 6.3$  Hz,  $J = 4.1$  Hz, 1 H, 3'-H), 4.35 (t,  $J = 3.6$  Hz, 1 H, 2'-H), 4.88 (dd,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 6.3$  Hz, 1 H, 4'-H), 5.15 (s, 2 H, Cbz-1-H), 5.59 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.74 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 5-H), 6.27 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5'-H), 6.75 (bs, 1 H, 6'-NH), 7.29 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 6-H), 7.31-7.40 (m, 5 H, Cbz-3-H, Cbz-4-H, Cbz-5-H, Cbz-6-H, Cbz-7-H), 8.44 (bs, 1 H, 3-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = -4.86 (SiCH<sub>3</sub>), -4.81 (SiCH<sub>3</sub>), -4.50 (SiCH<sub>3</sub>), -4.42 (SiCH<sub>3</sub>), 18.02 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.11 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.77 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.84 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.85 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 67.53 (Cbz-C-1), 74.65 (C-2'), 76.06 (C-3'), 79.24 (C-4'), 82.68 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 92.85 (C-1'), 102.32





## 7.2.1.4 Synthesen der Aminopropyl linker

Synthese von *N*-Benzyloxycarbonyl-3,3-diethoxypropylamin **109****109**

1-Amino-3,3-diethoxypropan **108** (2.20 g, 14.9 mmol, 1.0 Äq) und Triethylamin (3.50 mL, 25.1 mmol, 1.7 Äq) wurden in DCM (25 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Benzyloxycarbonylchlorid (2.40 mL, 16.8 mmol, 1.1 Äq) wurde tropfenweise zugegeben und das Reaktionsgemisch im Anschluss für 22.5 h gerührt und dabei langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die organische Phase wurde nachfolgend mit gesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung (2x30 mL), gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1x30 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (1x50 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, die Suspension filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 4:1).

**Ausbeute:** 2.73 g (9.70 mmol, 65%) als farbloses Öl.

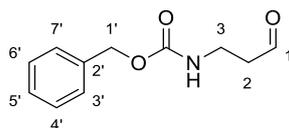
**DC:**  $R_f = 0.25$  (PE:EtOAc 7:3).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.21 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6 H, 2''-H), 1.85 (dt,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, 2 H, 2-H), 3.32 (dt,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, 2 H, 1-H), 3.41-3.52 (m, 2 H, 1''-H<sub>a</sub>), 3.59-3.68 (m, 2 H, 1''-H<sub>b</sub>), 4.56 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1 H, 3-H), 5.05-5.14 (m, 2 H, 1'-H), 5.16-5.25 (m, 1 H, NH), 7.23-7.38 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 15.07 (C-2''), 33.14 (C-2), 36.96 (C-1), 61.47 (C-1''), 66.35 (C-1'), 101.69 (C-3), 127.84, 128.25, 128.28 (C-3', C-4', C-5', C-6', C-7'), 136.54 (C-2'), 156.36 (NC(C=O)O).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 304.05$  [M+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>** (281.35)

**Synthese von *N*-Benzyloxycarbonyl-3-aminopropanal **38******38**

*N*-Benzyloxycarbonyl-3,3-diethoxypropylamin **109** (2.73 g, 9.70 mmol) wurde in THF (15 mL) gelöst, mit Salzsäure (1 M, 14 mL) versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert und mit Ethylacetat (3x200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 4:1 - > 3:2).

**Ausbeute:** 2.01 g (9.70 mmol, quant.) als farbloser Feststoff.

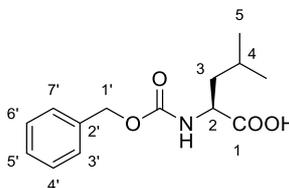
**DC:**  $R_f = 0.10$  (PE:EtOAc 7:3).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.75 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2 H, 2-H), 3.50 (dt,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, 2 H, 3-H), 5.09 (s, 2 H, 1'-H), 5.17 (bs, 1 H, NH), 7.30-7.39 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H), 9.81 (s, 1 H, 1-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 34.45 (C-2), 44.07 (C-3), 66.74 (C-1'), 128.08 (C-3', C-7'), 128.15 (C-5'), 128.52 (C-4', C-6'), 136.35 (C-2'), 156.27 (NHC=O), 201.15 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 230.04$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>.

**$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$**  (207.23)

**Synthese von *N*-(Benzyloxycarbonyl)-L-Leucin **111**<sup>[189]</sup>****111**

Die nachfolgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasbedingungen durchgeführt. L-Leucin **110** (1.00 g, 7.62 mmol, 1.0 Äq) wurde in einer 1:1-Mischung aus Wasser und Dioxan (40 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Natriumcarbonat (2.42 g, 22.9 mmol, 3.0 Äq) wurde Benzyloxycarbonylchlorid (1.19 mL, 8.51 mmol, 1.1 Äq) langsam zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für 21 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur

gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter reduziertem Druck auf ein Volumen von circa 15 mL eingengt und mehrfach mit Diethylether (3x20 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Salzsäure (5 M) auf einen pH-Wert von circa 2 eingestellt und mit Ethylacetat (3x40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt **111** wurde ohne weitere Reinigungsschritte in der nachfolgenden Reaktion weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** 2.00 g (7.54 mmol, 99%) eines farblosen Öls.

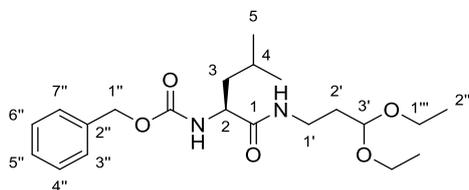
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.97-1.02 (m, 6 H, 5-H), 1.49-1.61 (m, 1 H, 3-H<sub>a</sub>), 1.61-1.81 (m, 2 H, 4-H, 3-H<sub>b</sub>), 4.39-4.46 (m, 1 H, 2-H), 5.13 (s, 2 H, 1'-H), 5.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, NH), 7.29-7.40 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 21.70 (C-5), 22.80 (C-5), 24.75 (C-4), 41.43 (C-3), 52.34 (C-2), 67.16 (C-1'), 128.10, 128.22, 128.53 (C-3', C-4', C-5', C-6', C-7'), 136.08 (C-2'), 156.12 (NC(=O)O), 177.89 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 288.17 [M+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>** (265.31)

### Synthese von **2-N-(Benzyloxycarbonyl)-1-N-(3,3-diethoxypropyl)-L-leucinamid 112**<sup>[184]</sup>



**112**

*N*-(Benzyloxycarbonyl)-L-leucin **111** (1.00 g, 3.77 mmol, 1.0 Äq) wurde in abs. THF (20 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von 1-Hydroxybenzotriazol (530 mg, 3.92 mmol, 1.0 Äq) und *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (750 mg, 3.92 mmol, 1.0 Äq) wurde die entstandene Suspension für 35 min bei Raumtemperatur gerührt. 1-Amino-3,3-diethoxypropan (600 µL, 546 mg, 3.71 mmol, 1.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (670 µL, 3.85 mmol, 1.0 Äq) wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 23.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Ethylacetat (75 mL) verdünnt und Wasser (50 mL) zugegeben. Die organische Phase wurde nachfolgend mit auf 0 °C gekühlter Salzsäure (0.5 M, 120 mL), gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2x100 mL) und Wasser (2x60 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck

entfernt. Das Produkt **112** wurde ohne weitere Reinigungsschritte in der nachfolgenden Reaktion weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** 1.46 g (3.70 mmol, 98%) als farbloser Feststoff.

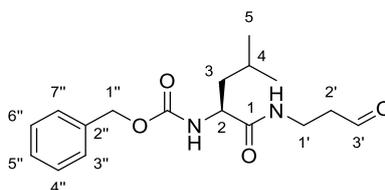
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.91-0.97 (m, 6 H, 5-H), 1.18-1.24 (m, 6 H, 2''-H), 1.44-1.54 (m, 1 H, 3-H<sub>a</sub>), 1.59-1.71 (m, 2 H, 3-H<sub>b</sub>, 4-H), 1.76-1.86 (m, 2 H, 2'-H), 3.27-3.43 (m, 2 H, 1'-H), 3.44-3.54 (m, 2 H, 1'''-H<sub>a</sub>), 3.61-3.71 (m, 2 H, 1'''-H<sub>b</sub>), 4.10-4.17 (m, 1 H, 2-H), 4.52-4.58 (m, 1 H, 3'-H), 5.05-5.15 (m, 2 H, 1''-H), 5.25 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, 2-NH), 6.56-6.64 (m, 1 H, 1-NH), 7.29-7.39 (m, 5 H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H, 7''-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 15.31 (C-2'''), 21.97 (C<sub>a</sub>-5), 22.91 (C<sub>b</sub>-5), 24.65 (C-4), 32.79 (C-2'), 35.45 (C-1'), 41.99 (C-3), 53.61 (C-2), 62.01 (C<sub>a</sub>-1'''), 62.04 (C<sub>b</sub>-1'''), 66.94 (C-1''), 102.40 (C-3'), 128.49 (C-3'', C-7''), 128.14 (C-5''), 128.00 (C-4'', C-6''), 136.19 (C-2''), 156.09 (NC(=O)O), 171.73 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 417.19 [M+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>** (394.51)

#### Synthese von 2-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-1-*N*-(3-oxopropyl)-L-leucinamid **45**<sup>[189]</sup>



**45**

Die nachfolgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasbedingungen durchgeführt. 2-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-1-*N*-(3,3-diethoxypropyl)-L-leucinamid **112** (700 mg, 1.77 mmol, 1.0 Äq) wurde in THF (5 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von Salzsäure (1 M, 1.80 mL, 1.80 mmol, 1.0 Äq) wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50 mL) versetzt und mit Ethylacetat (3x100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, die Suspension filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:EtOAc 3:2).

**Ausbeute:** 546 mg (1.70 μmol, 96%) als farbloser Feststoff.

**DC:** *R<sub>f</sub>* = 0.34 (DCM:EtOAc 3:2).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.93 (d, *J* = 6.3 Hz, 6 H, 5-H), 1.43-1.54 (m, 1 H, 3-H<sub>a</sub>), 1.58-1.69 (m, 2 H, 3-H<sub>b</sub>, 4-H), 2.67-2.75 (m, 2 H, 2'-H), 3.47-3.59 (m, 2 H, 1'-H), 4.07-4.15 (m,

1 H, 2-H), 5.10 (s, 2 H, 1''-H), 5.18 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H, 2-NH), 6.43-6.53 (m, 1 H, 1-NH), 7.30-7.40 (m, 5 H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H, 7''-H), 9.77 (s, 1 H, 3'-H).

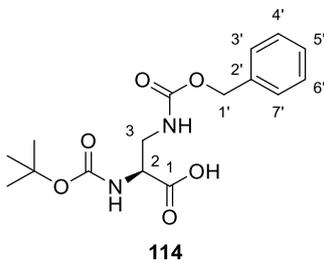
$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 21.91 ( $\text{C}_a$ -5), 22.88 ( $\text{C}_b$ -5), 24.68 (C-4), 32.92 (C-1'), 41.38 (C-3), 43.53 (C-2'), 53.56 (C-2), 67.11 (C-1''), 128.08 (C-3'', C-7''), 128.23 (C-5''), 128.54 (C-4'', C-6''), 136.10 (C-2''), 156.16 (NC(=O)O), 172.27 (C-1), 201.15 (C-3').

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 321.16$  [M+H]<sup>+</sup>, 343.10 [M+Na]<sup>+</sup>, 375.16 [M+MeOH+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>** (320.38)

### 7.2.1.5 Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren-Bausteine

#### Synthese der *N*<sup>α</sup>-Boc-*N*<sup>β</sup>-Cbz-L-2,3-diaminopropionsäure **114**



(S)-3-Amino-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propionsäure **113** (600 mg, 2.94 mmol, 1.0 Äq) wurde in einer Wasser-1,4-Dioxan Mischung (1:3, 80 mL) vorgelegt und mit einer gesättigten wässrigen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (6 mL) versetzt. Nach Kühlen auf 0°C wurde Benzyloxycarbonylchlorid (450  $\mu\text{L}$ , 3.22 mmol, 1.1 Äq) langsam zugetropft, das Reaktionsgemisch im Anschluss langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 6 d gerührt, wobei jeweils nach 2 d erneut Benzyloxycarbonylchlorid (2x200  $\mu\text{L}$ , 1.43 mmol, 0.5 Äq) zugegeben wurde. Das Reaktionsgemisch wurde mit Diethylether (2x150 mL) extrahiert, die wässrige Phase mit Salzsäure (1 M, 100 mL) versetzt und erneut mit Diethylether (2x150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 98:2 zu 96:4).

**Ausbeute:** 907 mg (2.68 mmol, 91%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.20$  (DCM:MeOH 9:1).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.44 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.41 (dd,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 7.4$  Hz, 1 H, 3-H<sub>a</sub>), 3.56 (dd,  $J = 14.2$  Hz,  $J = 4.7$  Hz, 1 H, 3-H<sub>b</sub>), 4.20-4.27 (m, 1 H, 2-H), 5.08 (s, 2 H, 1'-H), 7.26-7.41 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 28.85 ( $\text{OC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 43.53 (C-3), 55.78 (C-2), 67.73 (C-1'), 80.80 ( $\text{OC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 128.92, 129.11, 129.60 (C-3', C-4', C-5', C-6', C-7'), 138.42 (C-2'), 158.07, 159.28 (Boc-N(C=OC)O, Cbz-N(C=OC)O), 174.79 (C-1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -9.1$  ( $c = 3.3$  mg/mL, MeOH).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3339, 2978, 1692, 1517, 1245, 1155, 1076, 1025, 696, 576.

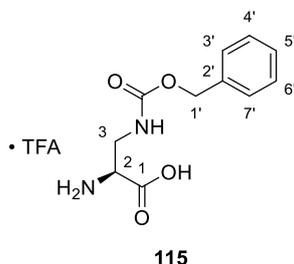
**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 209, 258.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 339.12$  [M+H]<sup>+</sup>, 361.13 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS:** ber. für  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6^+$ : 339.1550, gef.: 339,1549.

**$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$**  (338.36)

### Synthese der $N^{\beta}$ -Cbz-L-2,3-diaminopropionsäure **115**



$N^{\alpha}$ -Boc- $N^{\beta}$ -Cbz-L-2,3-diaminopropionsäure **114** (307 mg, 907  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 80%iger wässriger TFA-Lösung (20 mL) gelöst und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Wasser (10 mL) wurde die TFA unter reduziertem Druck entfernt und das Reaktionsgemisch nach erneuter Zugabe von Wasser (5 mL) gefriergetrocknet. Das Produkt **115** wurde ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Reaktion umgesetzt.

**Ausbeute:** 319 mg (906  $\mu\text{mol}$ , quant.) eines farblosen Feststoffes.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.60 (dd,  $J = 14.8$  Hz,  $J = 6.3$  Hz 1 H, 3- $\text{H}_a$ ), 3.71-3.80 (m, 1 H, 3- $\text{H}_b$ ), 4.11 (dd,  $J = 6.1$  Hz,  $J = 3.9$  Hz, 1 H, 2-H), 5.07-5.16 (m, 2 H, 2'-H), 7.26-7.42 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 40.38 (C-3), 55.12 (C-2), 68.21 (C-1'), 129.13, 129.28, 129.65 (C-3', C-4', C-5', C-6', C-7'), 138.08 (C-2'), 159.76 (Cbz-N(C=OC)O), 170.05 (C-1).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.61.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -19.1$  ( $c = 3.7$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 1688, 1530, 1262, 1180, 1136, 1003, 723, 694, 521.

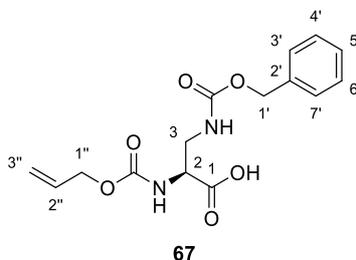
**UV** ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 206, 257.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 239.05$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS**: ber. für C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 239.10263, gef.: 239.10214

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (352.27)

### Synthese der N<sup>α</sup>-Alloc-N<sup>β</sup>-Cbz-L-2,3-diaminopropionsäure **67**



N<sup>β</sup>-Cbz-L-2,3-diaminopropionsäure **115** (320 mg, 908 μmol, 1.0 Äq) und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (194 mg, 1.83 mmol, 2.0 Äq) wurden in einem H<sub>2</sub>O-MeCN-Lösungsmittelgemisch (1:1, 20 ml) vorgelegt. Nach langsamer Zugabe von Chlorameisensäure-allylester (97.0 μL, 110 mg, 908 μmol, 1.0 Äq) wurde für 50 h bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wurde mit wässriger HCl-Lösung (2 M) auf circa 1 eingestellt, die Reaktionsmischung mit Ethylacetat (3x60 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2x80 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Titelverbindung **67** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten (PE:EtOAc 6:4 mit 1% HCOOH).

**Ausbeute**: 233 mg (723 μmol, 80%) eines farblosen Feststoffes.

**DC**: R<sub>f</sub> = 0.05 (PE:EtOAc 7:3 + 1% HCOOH).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] = 3.44 (dd,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 7.7$  Hz, 1 H, 3-H<sub>a</sub>), 3.60 (dd,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 4.6$  Hz, 1 H, 3-H<sub>b</sub>), 4.32 (dd,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 4.7$  Hz, 1 H, 2-H), 4.54 (d,  $J = 5.4$  Hz, 2 H, 1''-H), 5.08 (d,  $J = 2.5$  Hz, 2 H, 1'-H), 5.18 (dd,  $J = 10.6$  Hz,  $J = 1.4$  Hz, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 5.31 (dd,  $J = 17.2$  Hz,  $J = 1.4$  Hz, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 5.86-5.98 (m, 1 H, 2''-H), 7.26-7.41 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] = 43.25 (C-3), 55.85 (C-2), 66.83 (C-1''), 67.74 (C-5), 117.76 (C-3''), 128.92, 129.11, 129.60 (C-3', C-4', C-5', C-6', C-7'), 134.40 (C-2''), 138.42 (C-2'), 158.54, 159.28 (Alloc-N(C=O)O, Cbz-N(C=O)O), 173.75 (C-1).

**Drehwert**:  $[\alpha]_D^{20} = -11.3$  (c = 16 mg/mL, MeOH).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3326, 2964, 1691, 1520, 1234, 1150, 1050, 994, 931, 697.

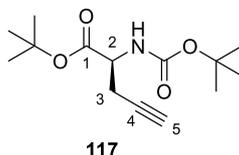
**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 213, 258.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 322.96 [M+H]^+$ ,  $345.08 [M+Na]^+$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $C_{15}H_{19}N_2O_6^+$ : 323.12376, gef.: 323.1227.

$C_{15}H_{18}N_2O_6$  (322.32)

### Synthese von *O*-*t*Bu-geschützten Boc-Pra-OH **117**



*N*-Boc-L-Propargylglycine **116** (400 mg, 1.88 mmol, 1.0 Äq) wurde in abs. DCM (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von *tert*-Butyl-2,2,2-trichloracetimidat (1.23 g, 5.63 mmol, 3.0 Äq) wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen und mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2x100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, die Suspension filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 9:1).

**Ausbeute:** 439 mg (1.63 mmol, 87%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.51$  (PE:EtOAc 4:1).

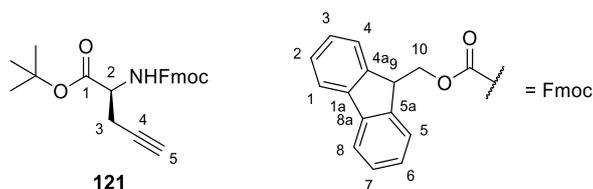
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.46 (s, 9 H,  $OC(CH_3)_3$ ), 1.48 (s, 9 H,  $OC(CH_3)_3$ ), 2.02 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1 H, 5-H), 2.64-2.77 (m, 2 H, 3-H), 4.31-4.38 (m, 1 H, 2-H), 5.35 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 23.04 (C-3), 27.93 ( $OC(\underline{C}H_3)_3$ ), 28.29 ( $OC(\underline{C}H_3)_3$ ), 52.22 (C-2), 71.23 (C-5), 78.84 (C-4), 79.91 ( $OC(\underline{C}H_3)_3$ ), 82.48 ( $OC(\underline{C}H_3)_3$ ), 155.13 (Boc-N(C=OC)O), 169.63 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 292.18 [M+Na]^+$ .

$C_{14}H_{23}NO_4$  (269.34)

### Synthese von *O*-*tert*-Butyl-*N*-Fmoc-L-Propargylglycine **121**



*N*-Fmoc-L-Propargylglycin **120** (1.00 g, 2.98 mmol, 1.0 Äq) wurde in DCM (20 mL) suspendiert und nach Zugabe von *tert*-Butyl-2,2,2-trichloracetimidat (1.95 g, 8.94 mmol, 3.0 Äq) für 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 98:2).

**Ausbeute:** 889 mg (2.27 mmol, 76%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.85$  (DCM:MeOH 9:1).

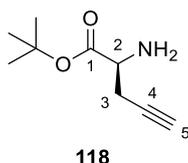
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.47 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.39 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1 H, 5-H), 2.60-2.72 (m, 2 H, 3-H), 4.19-4.26 (m, 2 H, Fmoc-9-H, 2-H), 4.34 (dd,  $J = 7.1$  Hz,  $J = 1.7$  Hz, 2 H, Fmoc-10-H), 7.28-7.34 (m, 2 H, Fmoc-3-H, Fmoc-6-H), 7.39 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, Fmoc-2-H, Fmoc-7-H), 7.58-7.70 (m, 2 H, Fmoc-4-H, Fmoc-5-H), 7.79 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, Fmoc-1-H, Fmoc-8-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 22.83 (C-3), 28.36 ( $\text{OC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 48.49 (Fmoc-C-9), 55.10 (C-2), 68.27 (Fmoc-C-10), 72.44 (C-5), 80.29 (C-4), 83.42 ( $\text{OC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 121.08 (Fmoc-C-1, Fmoc-C-8), 126.43 (Fmoc-C-4, Fmoc-C-5), 128.32 (Fmoc-C-3, Fmoc-C-6), 128.95 (Fmoc-C-2, Fmoc-C-7), 142.72 (Fmoc-C-1a, Fmoc-C-8a), 145.32 (Fmoc-C-4a), 145.50 (Fmoc-C-5a), 158.42 (Fmoc-N(C=O)O), 171.41 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 414.28$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>.

**$\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_4$**  (391.47)

### Synthese von *O-tert*-Butyl-L-Propargylglycin **118**



#### Variante 1:<sup>[204]</sup>

*N*-Boc-L-Propargylglycin-*tert*-butylester **117** (50.0 mg, 186  $\mu\text{mol}$ ) wurde in THF (2 mL) gelöst und nach Zugabe von Salzsäure (5 M, 0.5 mL) bei Raumtemperatur gerührt. Nach 23 h erfolgte eine erneute Zugabe von Salzsäure (5 M, 0.5 mL). Nach weiteren 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit Wasser (3 mL) verdünnt, gesättigte wässrige Natriumcarbonat-Lösung (20 mL) zugegeben und das Reaktionsgemisch mit DCM (3x15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 10.8 mg (63.8  $\mu\text{mol}$ , 34%) eines farblosen Feststoffes.

Variante 2:<sup>[206]</sup>

L-Propargylglycin (500 mg, 4.42 mmol, 1.0 Äq) wurde in *tert*-Butylacetat (10 mL, 8.6 g, 74 mmol, 16.8 Äq) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach langsamer Zugabe von Perchlorsäure (1.50 mL, 2.66 g, 26.4 mmol, 6.0 Äq) bei 0 °C wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und die Reaktionsmischung für 26 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Salzsäure (1 M, 10 mL) abgebrochen und mit Wasser (15 mL) verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (25 mL) gewaschen und im Anschluss mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung ein pH-Wert von ca. 9 eingestellt. Es wurde mit DCM (3x25 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 80.4 mg (475 µmol, 11%) eines farblosen Feststoffes.

Variante 3:

*O-tert*-Butyl-*N*-Fmoc-L-Propargylglycin **121** (458 mg, 1.17 mmol) wurde in 20% Piperidin in DCM (10 mL) vorgelegt und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 95:5).

**Ausbeute:** 11 mg (65 µmol, 6%) eines farblosen Feststoffes.

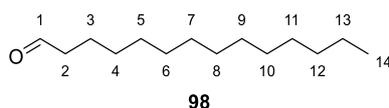
**DC:**  $R_f = 0.60$  (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = 1.49 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.40 (t,  $J = 2.7$  Hz, 1 H, 5-H), 2.58 (dd,  $J = 5.6$  Hz,  $J = 3.8$  Hz,  $J = 2.7$  Hz, 2 H, 3-H), 3.47 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1 H, 2-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = 25.47 (C-3), 28.42 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 54.46 (C-2), 72.81 (C-5), 80.30 (C-4), 82.82 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 174.04 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 170.08$  [M+H]<sup>+</sup>.

**C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>** (169.22)

**Synthese der *N*<sub>α</sub>-Cbz-(*S*)-2-Aminohexadecansäure **95**<sup>[95]</sup>****Synthese von 1-Tetradecanal **98****

1-Tetradecanol **99** (2.0 g, 9.3 mmol, 1.0 Äq) wurde in abs. Ethylacetat (60 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von IBX **101** (8.86 g, 30.9 mmol, 3.3 Äq) wurde für 3 h bei 80 °C gerührt. Es wurde

filtriert, mit Ethylacetat (100 mL) gewaschen und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 3:1).

**Ausbeute:** 686 mg (3.23 mmol, 35%) eines farblosen Öls.

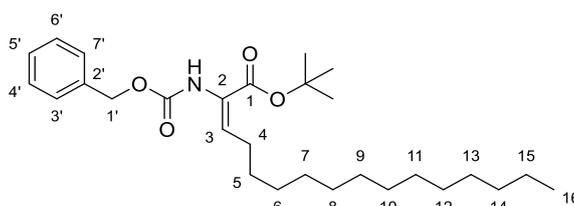
**DC:**  $R_f = 0.43$  (PE:EtOAc 3:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.90 (t,  $J = 6.5$  Hz, 3 H, 14-H), 1.34-1.65 (m, 20 H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H, 13-H), 1.46-1.67 (m, 2 H, 3-H), 2.43 (td,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 1.8$  Hz, 2 H, 2-H), 9.69 (t,  $J = 1.7$  Hz, 1 H, 1-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.63 (C-14), 23.90 (C-13), 30.65 (C-3), 30.76, 30.89, 30.92, 30.95, 30.97 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11), 33.25 (C-12), 44.90 (C-2), 204.71 (C-1).

**$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}$**  (212.37)

#### Synthese der *Z-N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminohexadec-2-ensäure **97**



**97**

Kaliumhexadimethyldisilazan-Lösung (0.5 M in Toluol, 5.2 ml, 2.6 mmol, 0.8 Äq) wurde in abs. THF (88 mL) vorgelegt und auf  $-78$  °C gekühlt. Phosphonat **30** (988 mg, 2.65 mmol, 0.8 Äq) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 min bei  $-78$  °C gerührt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von Tetradecanal **98** (686 mg, 3.23 mmol, 1.0 Äq) ebenfalls bei  $-78$  °C. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h unter langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Es wurde Methanol (7 mL) zugegeben und anschließend mit Ethylacetat verdünnt. Nach Waschen mit halb-gesättigter NaCl-Lösung (2x100 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 9:1).

**Ausbeute:** 251 mg (546  $\mu\text{mol}$ , 17%) eines farblosen Feststoffs.

**DC:**  $R_f = 0.53$  (PE:EtOAc 9:1).

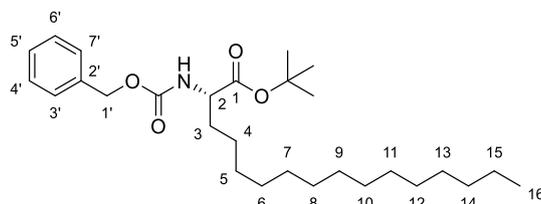
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.89 (t, *J* = 6.7 Hz, 3 H, 16-H), 1.20-1.37 (m, 20 H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H, 13-H, 14-H, 15-H), 1.37-1.51 (m, 2 H, 5-H), 1.48 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.18 (q, *J* = 7.4 Hz, 2 H, 4-H), 5.15 (s, 2 H, 1'-H), 6.13 (brs, 1 H, NH), 6.53 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H, 3-H), 7.28-7.41 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.11 (C-16), 22.69 (C-15), 28.03 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.35, 28.54, 29.36, 29.41, 29.47, 29.55, 29.65, 29.69 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13), 31.93 (C-14), 67.22 (C-1'), 81.69 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 115.90 (C-3), 126.20 (C-2), 128.12 (C-3', C-7'), 128.18 (C-5'), 128.52 (C-4', C-6'), 136.18 (C-2'), 154.09 (N(C=O)O), 163.78 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 482.26 [M+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>4</sub>** (459.33)

### Synthese von (*S*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminohexadecansäure-*tert*-butylester **96**



**96**

*Z*-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminohexadec-2-ensäure **97** (251 mg, 546 μmol) wurde in abs. MeOH (5 mL, entgast) vorgelegt. Nach Zugabe von (*S,S*)-Me-DUPHOS-Rh (ca. 10 mg) wurde für 3 d unter Wasserstoffatmosphäre (1 bar) gerührt. Nach 4 d wurde erneut (*S,S*)-Me-DUPHOS-Rh (ca. 10 mg) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 24 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 4:1).

**Ausbeute:** 242 mg (524 μmol, 96%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:** *R<sub>f</sub>* = 0.30 (PE:EtOAc 4:1).

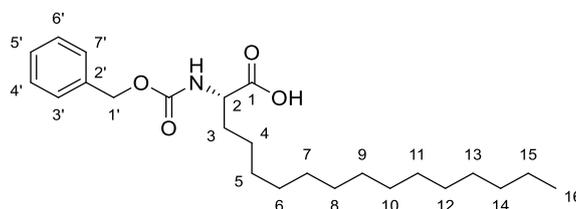
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.89 (t, *J* = 6.4 Hz, 3 H, 16-H), 1.18-1.37 (m, 24 H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H, 13-H, 14-H, 15-H), 1.47 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.53-1.70 (m, 1 H, 3-H<sub>a</sub>), 1.71-1.88 (m, 1 H, 3-H<sub>b</sub>), 4.04 (q, *J* = 6.9 Hz, 1 H, 2-H), 5.12 (s, 2 H, 1'-H), 5.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, 2-NH), 7.28-7.41 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H', 7'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.10 (C-16), 22.68 (C-15), 24.94 (C-4), 28.00 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.24, 29.35, 29.39, 29.51, 29.61, 29.65, 29.68 (C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13),

31.92 (C-3), 32.88 (C-14), 54.38 (C-2), 66.81 (C-1'), 81.87 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.10 (C-3', C-5', C-7'), 128.50 (C-4', C-6'), 136.42 (C-2'), 155.80 (N(C=O)O), 171.74 (C-1).

**C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>4</sub>** (461.69).

### Synthese der (S)-N-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminohexadecansäure **95**



**95**

(S)-N-(Benzyloxycarbonyl)-2-aminohexadecansäure-*tert*-butylester **96** (121 mg, 262 μmol) wurde in DCM (3 mL) vorgelegt, mit TFA (0.5 mL) versetzt und für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in Wasser (7 mL) gelöst und im Anschluss gefriergetrocknet. Das Produkt **95** wurde ohne weitere Reinigung in den nachfolgenden Reaktionen weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** 56.0 mg (138 μmol, 53%) eines farblosen Feststoffes.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] = 0.85-0.95 (m, 3 H, 16-H), 1.20-1.50 (m, 24 H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H, 13-H, 14-H, 15-H), 1.59-1.74 (m, 1 H, 3-H<sub>a</sub>), 1.74-1.90 (m, 1 H, 3-H<sub>b</sub>), 4.14 (dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1 H, 2-H), 5.04-5.15 (m, 2 H, 1'-H), 7.23-7.39 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H).

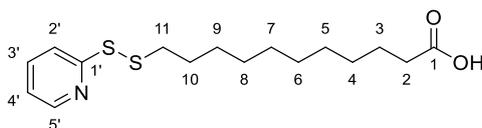
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] = 14.58 (C-16), 23.88 (C-15), 27.00 (C-4), 30.32, 30.62, 30.68, 30.72, 30.78, 30.87, 30.92, 30.95 (C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13), 32.93 (C-3), 33.22 (C-14), 53.74 (C-2), 67.71 (C-1'), 128.90 (C-3', C-7'), 129.10 (C-5'), 129.59 (C-4', C-6'), 138.44 (C-2'), 152.53 (N(C=O)O), 176.28 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 406.52 [M+H]<sup>+</sup>.

**C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>** (405.58).

## 7.2.1.6 Synthese der PySS-Seitenkette 124

## Synthese der Muraymycin-Seitenkette 124



124

Aldrithiol™-2 **123** (1.18 g, 5.35 mmol, 1.2 Äq) wurde in abs. Methanol (20 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von 11-Mercaptoundecansäure **122** (1.00 g, 4.56 mmol, 1.0 Äq) wurde für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 99:1).

**Ausbeute:** 145 mg (443  $\mu$ mol, 9%) eines gelben wachsartigen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.42$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.22-1.35 (m, 10 H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H), 1.35-1.44 (m, 2 H, 9-H), 1.59 (quin,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, 3-H), 1.67 (quin,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, 10-H), 2.27 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, 2-H), 2.81 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, 11-H), 7.22 (ddd,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 4.8$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1 H, 4'-H), 7.73-7.89 (m, 2 H, 2'-H, 3'-H), 8.37-8.41 (m, 1 H, 5'-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 26.22, 29.53, 30.04, 30.35, 30.51, 30.61, 30.62 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10), 35.08 (C-2), 40.08 (C-11), 121.38 (C-4'), 122.42 (C-2'), 139.42 (C-3'), 150.24 (C-5'), 161.93 (C-1'), 177.78 (C-1).

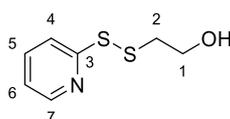
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2915, 2848, 1705, 1469, 1449, 1416, 1256, 1001, 763, 719.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 242, 283.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 327.99$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_2\text{S}_2^+$ : 328.1400, gef.: 328.1389.

**$\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_2\text{S}_2$**  (327.50)

7.2.1.7 Synthese des intrazellulär spaltbaren Linker **80**<sup>[183]</sup>Synthese von 2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol **126**

126

Aldrithiol™-2 **123** (1.00 g, 4.54 mmol, 1.8 Äq) wurde in abs. Methanol (6 mL) vorgelegt. Nach tropfenweiser Zugabe von 2-Mercaptoethanol **125** (178 µL, 199 mg, 2.53 mmol, 1.0 Äq) wurde für 26 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 5:1).

**Ausbeute:** 434 mg (2.32 mmol, 92%) eines farblosen Öls.

**DC:**  $R_f = 0.29$  (PE:EtOAc 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 2.95-2.98 (m, 2 H, 2-H), 3.80-3.83 (m, 2 H, 1-H), 7.17 (ddd,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 5.5$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1 H, 6-H), 7.41 (dt,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, 1 H, 4-H), 7.58-7.62 (m, 1 H, 5-H), 8.52-8.54 (m, 1 H, 7-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 42.75 (C-2), 58.20 (C-1), 121.54 (C-4), 122.00 (C-6), 136.87 (C-5), 149.82 (C-7), 159.08 (C-3).

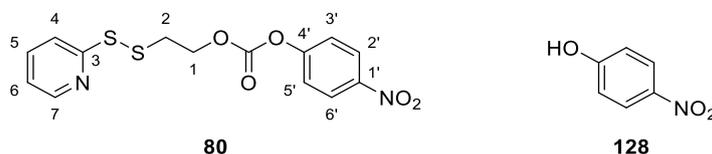
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1574, 1559, 1446, 1416, 1115, 1061, 1043, 994, 758, 717, 618, 479.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 257, 284.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 188.05$  [M+H]<sup>+</sup>.

**C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NOS<sub>2</sub>** (187.28)

#### Synthese von 4-Nitrophenyl-2-(pyridin-2-yl-disulfanyl)ethyl-carbonat **80**



2-(pyridin-2-yl-disulfanyl)ethanol **126** (214 mg, 1.14 mmol, 1.0 Äq) wurde in abs. DCM (7 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von Bis-(4-Nitrophenol)carbonat **127** (515 mg, 1.69 mmol, 1.5 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (340 µL, 252 mg, 1.95 mmol, 1.7 Äq) wurde für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser (2x100 mL) gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 4:1).

**Ausbeute:** 377 mg eines gelblichen Öls, verunreinigt mit 4-Nitrophenol **128** (aus <sup>1</sup>H-NMR berechnete Ausbeute an **80**: 337 mg, 957 µmol, 84%).

**DC:**  $R_f = 0.58$  PE:EtOAc 3:2.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.17 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2 H, 2-H), 4.57 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2 H, 1-H), 7.09-7.19 (m, 1 H, 6-H), 7.35-7.43 (m, 2 H, 4-H, 5-H), 7.63-7.72 (m, 2 H, 3'-H, 5'-H), 8.25-8.33 (m, 2 H, 2'-H, 6'-H), 8.50 (dt,  $J$  = 4.9 Hz,  $J$  = 1.3 Hz, 1 H, 7-H).

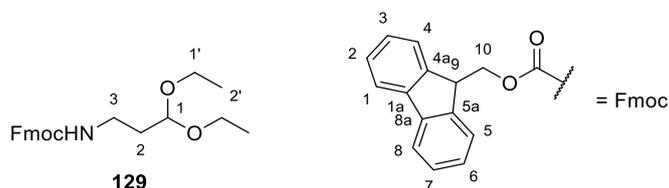
$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 36.72 (C-2), 66.66 (C-1), 115.66 (C-4'), 120.22 (C-6), 121.17 (C-3'), 121.73 (C-5'), 125.34 (C-2'), 126.22 (C-6'), 137.19 (C-5), 149.82 (C-1'), 152.21 (C-7), 155.36 (O(C=O)C), 159.09 (C-4'), 161.72 (C-3).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 353.03 [M+H]<sup>+</sup>.

**C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>** (352.38)

### 7.2.1.8 Synthese der Festphasen-Bausteine<sup>[94,103]</sup>

#### Synthese von *N*-Fmoc-3,3-diethoxypropylamin **129**



1-Amino-3,3-diethoxypropan **108** (1.00 g, 6.79 mmol, 1.0 Äq) wurde in einem 1:1-Gemisch aus Wasser und THF (10 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden Natriumhydrogencarbonat (1.37 g, 16.3 mmol, 2.4 Äq) und 9-Fluorenylmethylchlorformat (2.46 g, 9.51 mmol, 1.4 Äq) zugegeben und für 2 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat (100 mL) wurde nachfolgend mit gesättigter, wässriger Ammoniumchlorid- (100 mL), Natriumhydrogencarbonat- (100 mL) und Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 4:1).

**Ausbeute:** 1.76 g (4.76 mmol, 70%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f$  = 0.10 (PE:EtOAc 4:1).

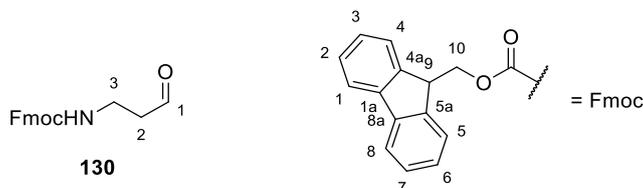
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.24 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 6 H, 2'-H), 1.79-1.91 (m, 2 H, 2-H), 3.27-3.39 (m, 2 H, 3-H), 3.44-3.59 (m, 2 H, 1'-H<sub>a</sub>), 3.62-3.77 (m, 2 H, 1'-H<sub>b</sub>), 4.23 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1 H, Fmoc-9-H), 4.38 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H, Fmoc-10-H), 4.58 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 1 H, 1-H), 5.30 (bs, 1 H, 3-NH), 7.31 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2 H, Fmoc-3-H, Fmoc-6-H), 7.41 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2 H, Fmoc-2-H, Fmoc-7-H), 7.61 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2 H, Fmoc-4-H, Fmoc-5-H), 7.77 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2 H, Fmoc-1-H, Fmoc-8-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 15.29 (C-2'), 33.25 (C-2), 37.10 (C-3), 47.24 (Fmoc-C-9), 61.79 (C-1'), 66.50 (Fmoc-C-10), 102.20 (C-1), 119.91 (Fmoc-C-1, Fmoc-C-8), 125.05 (Fmoc-C-4, Fmoc-C-5), 126.95 (Fmoc-C-3, Fmoc-C-6), 127.60 (Fmoc-C-2, Fmoc-C-7), 141.27 (Fmoc-C-1a, Fmoc-C-8a), 144.01 (Fmoc-C-4a, Fmoc-C-5a), 156.30 (Fmoc-N(C=O)O).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 392.09 [M+Na]<sup>+</sup>.

**$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_4$**  (369.46)

### Synthese von *N*-Fmoc-3-aminopropanal **130**



*N*-Fmoc-3,3-diethoxypropylamin **129** (1.00 g, 2.71 mmol, 1.0 Äq) wurde in THF (20 mL) gelöst, mit wässriger HCl-Lösung (1 M, 2.80 mL, 2.80 mmol, 1.0 Äq) versetzt und für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde gesättigte wässrige Natriumhydrogencarbonat-Lösung (150 mL) zugegeben und mit Ethylacetat (3x100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Reaktion eingesetzt.

**Ausbeute:** 800 mg (2.71 mmol, quant.) als farbloser Feststoff.

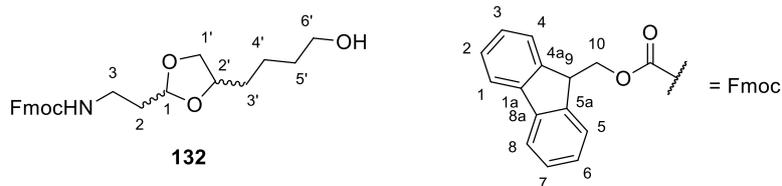
**DC:**  $R_f$  = 0.10 (PE:EtOAc 4:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.74 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 2 H, 2-H), 3.50 (dt,  $J$  = 5.8 Hz, 5.8 Hz, 2 H, 3-H), 4.20 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 1 H, Fmoc-9-H), 4.40 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 2 H, Fmoc-10-H), 5.20 (bs, 1 H, 3-NH), 7.33 (t,  $J$  = 7.4 Hz, Fmoc-3-H, Fmoc-6-H), 7.41 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2 H, Fmoc-2-H, Fmoc-7-H), 7.58 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2 H, Fmoc-4-H, Fmoc-5-H), 7.77 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2 H, Fmoc-1-H, Fmoc-8-H), 9.81 (s, 1 H, 1-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 34.40 (C-3), 44.00 (C-2), 47.18 (Fmoc-C-6), 66.66 (C-5), 119.96, 120.03 (Fmoc-C-1, Fmoc-C-8), 124.68, 124.98 (Fmoc-C-4, Fmoc-C-5), 127.01, 127.04 (Fmoc-C-3, Fmoc-C-6), 127.56, 127.67 (Fmoc-C-2, Fmoc-C-7), 141.28, 141.49 (Fmoc-C-1a, Fmoc-C-8a), 143.83, 144.31 (Fmoc-C-4a, Fmoc-C-5a), 156.29 (Fmoc-N(C=O)O), 201.24 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 318.08 [M+Na]<sup>+</sup>.

**$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3$**  (295.34)

Synthese von Dioxolan **132**

1,2,6-Hexantriol **131** (477 mg, 3.56 mmol, 2.1 Äq) wurde in 1,4-Dioxan (40 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von *N*-Fmoc-3-aminopropanal **130** (500 mg, 1.69 mmol, 1.0 Äq) und Bortrifluorid Etherat (24 mg, 21  $\mu$ L, 0.17 mmol, 0.1 Äq) wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde *N,N*-Diisopropylethylamin (440  $\mu$ L, 328 mg, 2.54 mmol, 1.5 Äq) zugegeben und mit Ethylacetat (100 mL) verdünnt. Im Anschluss wurde mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (2x100 mL) und destilliertem Wasser (2x100 mL) gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 1:1).

**Ausbeute:** 643 mg (1.56  $\mu$ mol, 92%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.53$  (DCM:MeOH 95:5).

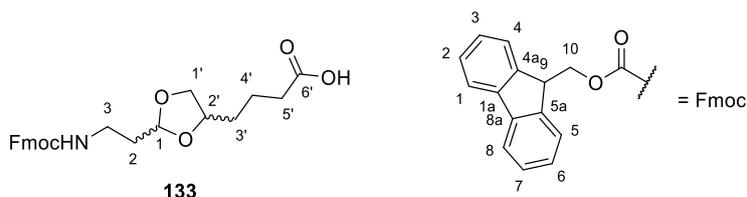
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.40-1.70 (m, 2x6 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 1.85-1.97 (m, 2x2 H, 2-H), 3.34-3.43 (m, 2x2 H, 3-H), 3.46 (dd,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 7.1$  Hz, 1 H, 1'-H<sub>a</sub>), 3.54 (dd,  $J = 7.1$  Hz,  $J = 7.0$  Hz, 1 H, 1'-H<sub>a</sub>), 3.62-3.69 (m, 2x2 H, 6'-H), 3.96 (dd,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 7.0$  Hz, 1 H, 1'-H<sub>b</sub>), 4.04-4.16 (m, 2x1 H, 2'-H, 1'-H<sub>b</sub>), 4.20-4.27 (m, 2x1 H, Fmoc-9-H), 4.39 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2x2 H, Fmoc-10-H), 4.97-5.10 (m, 2x1 H, 1-H), 5.27-5.36 (m, 2x1 H, NH), 7.29-7.35 (m, 2x2 H, Fmoc-3-H, Fmoc-6-H), 7.41 (dd,  $J = 7.2$  Hz,  $J = 7.4$  Hz, 2x2 H, Fmoc-2-H, Fmoc-7-H), 7.61 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2x2 H, Fmoc-4-H, Fmoc-5-H), 7.77 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2x2 H, Fmoc-1-H, Fmoc-8-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 22.01, 22.07 (C-4'), 32.44-33.16 (C-2, C-3', C5'), 36.23 (C-3), 47.27 (Fmoc-C-9), 60.38, 62.59 (C-6'), 67.07 (Fmoc-C-10), 69.67, 70.53 (C-1'), 76.15 (C-2'), 103.47, 102.73 (C-1), 119.94 (Fmoc-C-1, Fmoc-C-8), 125.07 (Fmoc-C-4, Fmoc-C-5), 126.98 (Fmoc-C-3, Fmoc-C-6), 127.63 (Fmoc-C-2, Fmoc-C-7), 141.28 (Fmoc-C-1<sub>a</sub>, Fmoc-C-8<sub>a</sub>), 144.02 (Fmoc-C-4<sub>a</sub>, Fmoc-C-5<sub>a</sub>), 156.31 (Fmoc-N(C=O)O).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 434.09$  [M+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub>** (411.50)

### Synthese der Dioxolancarbonsäure **133**



Dioxolan **132** (1.93 g, 4.69 mmol, 1.0 Äq) wurde in Acetonitril (60 mL) und Phosphat-Puffer (40 mL, pH = 7) vorgelegt. Nach Zugabe von Natriumchlorit (850 mg, 9.38 mmol, 2.0 Äq), TEMPO (220 mg, 1.56 mmol, 0.3 Äq) und wässriger Natriumhypochlorit-Lösung (4%-Lösung, 707  $\mu$ L, 2.0 Äq) wurde auf 35 °C erwärmt und für 3 d gerührt. Es wurde Ethylacetat (100 mL) zugegeben und mit gesättigter wässriger Natriumthiosulfat-Lösung (2x100 mL) und Wasser (2x150 mL) gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE:EtOAc 1:1 -> 9:1).

**Ausbeute:** 1.62 g (3.81 mmol, 81%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.10$  (DCM:MeOH 95:5).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.48-1.74 (m, 2x4 H, 3'-H, 4'-H), 1.74-1.96 (m, 2x2 H, 2-H), 2.37-2.47 (m, 2x2 H, 5'-H), 3.27-3.43 (m, 2x2 H, 3-H), 3.44-3.59 (m, 2x1 H, 1'-H<sub>a</sub>), 3.95 (t,  $J = \text{Hz}$ , 1 H, 1'-H<sub>b</sub>), 4.01-4.10 (m, 2x2 H, 2'-H), 4.10-4.16 (m, 1 H, 1'-H<sub>b</sub>), 4.19-4.30 (m, 2x1 H, Fmoc-9-H), 4.34-4.47 (m, 2x2 H, Fmoc-10-H), 4.93-5.01 (m, 1 H, 1-H), 5.02-5.09 (m, 1 H, 1-H), 5.22-5.32 (m, 2x1 H, 3-NH), 7.32 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2x2 H, Fmoc-3-H, Fmoc-6-H), 7.41 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2x2 H, Fmoc-2-H, Fmoc-7-H), 7.61 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2x2 H, Fmoc-4-H, Fmoc-5-H), 7.77 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2x2 H, Fmoc-1-H, Fmoc-8-H).

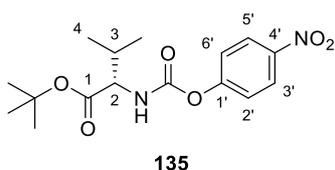
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 20.94, 21.01 (C-4'), 32.29-33.56 (C-2, C-3', C-5'), 36.47 (C-3), 47.06 (Fmoc-C-9), 66.48 (Fmoc-C-10), 69.41 (C-1'), 75.70, 76.21 (C-2'), 102.53, 103.30 (C-1), 119.76 (Fmoc-C-1, Fmoc-C-8), 124.95 (Fmoc-C-4, Fmoc-C-5), 126.85 (Fmoc-C-3, Fmoc-C-6), 127.47 (Fmoc-C-2, Fmoc-C-7), 141.08 (Fmoc-C-1a, Fmoc-C-8a), 143.86 (Fmoc-C-4a, Fmoc-C-5a), 156.27 (Fmoc-N(C=O)O), 176.69 (C-6').

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 448.07$  [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{NO}_6$ : 426.19111, gef.: 426.19106.

**$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_6$**  (425.48)

### Synthese von Valin-*para*-Nitrophenylcarbamat **135**



L-Valin-*tert*-butylester Hydrochlorid **134** (1.0 g, 4.8 mmol, 1.0 Äq) wurde in abs. Dichlormethan (34 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von Bis(4-nitrophenyl)carbonat **127** (2.2 g, 7.2 mmol, 1.5 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (1.6 mL, 9.3 mmol, 2.0 Äq) wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (3x50 mL) gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM:PE 1:1).

**Ausbeute:** 825 mg (2.44 mmol, 51%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.15$  (PE:EtOAc 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.97 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.04 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.51 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.26 (quind,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, Val-3-H), 4.25 (dd,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, Val-2-H), 5.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, Val-2-NH), 7.34 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2 H, 2'-H, 6'-H), 8.25 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H).

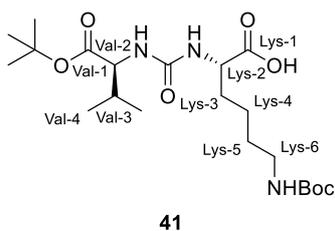
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.27 (C-4), 18.89 (C-4), 27.99 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 31.42 (C-3), 59.47 (C-2), 82.54 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 121.91 (C-2', C-6'), 125.05 (C-3', C-5'), 144.73 (C-4'), 153.02 (N(C=O)O), 155.81 (C-1'), 170.59 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 338.27$  [M+H]<sup>+</sup>, 360.32 [M+Na]<sup>+</sup>.

**$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$**  (338.36)

#### 7.2.1.9 Synthese der Harnstoffdipeptide

##### Synthese von Val-Lys-Harnstoffdipeptid **41**<sup>[186,187]</sup>



L-Valin-*tert*-butylester Hydrochlorid **134** (500 mg, 2.38 mmol, 1.0 Äq) wurde in einer 1:1-Mischung aus DCM und wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Triphosgen **136** (234 mg, 789 µmol, 0.3 Äq) wurde zügig unter starkem Rühren zugegeben und die Emulsion für 20 min bei 0 °C gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert (3x40 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entstandene Isocyanat **137** wurde auf Grund seiner Instabilität direkt weiter umgesetzt und in abs. THF (40 mL) gelöst. *N*<sup>ε</sup>-Boc-L-Lysin **86** (550 mg, 2.33 mmol, 1.0 Äq) wurde in abs. DMF (40 mL) suspendiert und tropfenweise zur Reaktionsmischung gegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde erneut abs. DMF (40 mL) zur Suspension gegeben und die Reaktion für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Ethylacetat (150 mL) zugegeben und mit wässriger HCl-Lösung (1 M, 2x100 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Die Zielverbindung **41** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten (DCM:MeOH:HCOOH 95:5:1).

**Ausbeute:** 504 mg (1.13 mmol, 48%) als farbloser Feststoff.

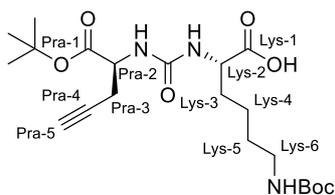
**DC:**  $R_f = 0.74$  (DCM:MeOH:HOAc 7:3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.87 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 0.94 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.45 (s, 9 H, Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.22-1.56 (m, 4 H, Lys-4-H, Lys-5-H), 1.62-1.93 (m, 2 H, Lys-3-H), 2.06-2.19 (m, 1 H, Val-3-H), 3.02-3.20 (m, 2 H, Lys-6-H), 4.25-4.43 (m, 2 H, Lys-2-H), 4.82-4.95 (m, 1 H, Lys-N<sup>ε</sup>H), 5.70-5.86 (m, 1 H, Val-NH), 5.87-5.97 (m, 1 H, Lys-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 17.45 (Val-C-4), 18.95 (Val-C-4), 22.41 (Lys-C-4), 28.02 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.41 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.61 (Lys-C-5), 31.37 (Val-C-3), 31.43 (Lys-C-3), 40.15 (Lys-C-6), 53.28 (Lys-C-2), 58.36 (Val-C-2), 79.35 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 81.91 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.46 (Boc-N(C=O)O), 158.56 (N(C=O)N), 172.57 (Val-C-1), 175.61 (Lys-C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 446.20$  [M+H]<sup>+</sup>, 468.23 [M+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>** (445.55)

**Synthese von Pra-Lys-Harnstoffdipeptid **84****<sup>[186,187]</sup>**84**

*O*-*tert*-Butyl-*N*-Fmoc-L-Propargylglycin **121** (580 mg, 1.48 mmol, 1.0 Äq) wurde in 20% Piperidin in DCM (20 mL) gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel und die Base wurden unter reduziertem Druck entfernt und die entschützte Aminosäure in einer Mischung aus DCM und gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1:1, 20 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Triphosgen **136** (145 mg, 488 µmol, 0.3 Äq) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 min bei 0 °C stark gerührt. Die Phasen wurde getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (4x50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

Das entstandene Isocyanat **138** wurde in abs. THF (40 mL) gelöst und *N*<sup>ε</sup>-Boc-L-Lysin (364 mg, 1.48 mmol, 1.0 Äq), suspendiert in DMF (80 mL), zur Reaktionsmischung gegeben. Nach einer Reaktionsdauer von 22 h wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 9:1+0.1% HCOOH).

**Ausbeute:** 149 mg (338 µmol, 23%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.21$  (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = 1.33-1.49 (m, 4 H, Lys-4-H, Lys-5-H), 1.43 (s, 9 H, Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.49 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.59-1.71 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.77-1.88 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 2.39 (t,  $J = 2.7$  Hz, 1 H, Pra-5-H), 2.56-2.73 (m, 2 H, Pra-3-H), 3.03 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 4.25 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 4.9$  Hz, 1 H, Lys-2-H), 4.35 (dd,  $J = 5.2$  Hz, 1 H, Pra-2-H).

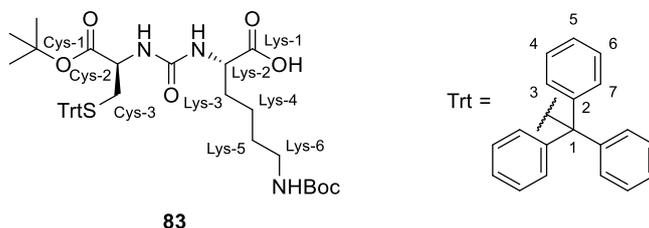
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = 23.75 (Lys-C-4), 24.04 (Pra-C-3), 28.42 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.95 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.70 (Lys-C-5), 33.57 (Lys-C-3), 41.33 (Lys-C-6), 53.59 (Pra-C-2), 54.38 (Lys-C-2), 72.77 (Pra-C-5), 79.96 (Pra-C-4), 80.00 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83.22 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 158.66 (Boc-N(C=O)O), 159.84 (N(C=O)N), 171.89 (Pra-C-1), 176.93 (Lys-C-1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = 11.8$  ( $c = 2.5$  mg/mL, DCM).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2926, 1718, 1686, 1637, 1553, 1366, 1249, 1225, 1158, 637.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 442.23$  [M+H]<sup>+</sup>, 464.22 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS:** ber. für C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>: 442.2548, gef.: 442.2544.

$C_{21}H_{35}N_3O_7$  (441.53)**Synthese von Cys(Trt)Lys(Boc)-Harnstoffdipeptid **83******83**Variante 1:

*S*-Trityl-L-Cysteine-*tert*-butylester Hydrochlorid **139** (300 mg, 658  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und Bis(4-nitrophenyl)carbonat **127** (1.00 g, 987  $\mu$ mol, 1.5 Äq) wurden in abs. DCM (10 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von *N,N*-Diisopropylethylamin (230  $\mu$ L, 171 mg, 1.32 mmol, 2.0 Äq) wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde DCM (10 mL) zugegeben und die Reaktionslösung mit Wasser (2x20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, die Suspension filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 9:1). Das Produkt konnte nicht vollständig gereinigt werden und enthielt noch Reste von 4-Nitrophenol. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigungsversuche weiter umgesetzt.

Das entstandene Carbamat **140** und *N*<sup>ε</sup>-Boc-L-Lysin **86** (607 mg, 2.46 mmol, 3.7 Äq) wurden in einer Mischung aus DCM (20 mL) und DMF (3 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von *N,N*-Diisopropylethylamin (2.00 mL, 1.48 g, 11.5 mmol, 17 Äq) wurde für 8 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Rohprodukt mit wässriger salzsaurer Lösung (1 M, 2x50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Zielverbindung **83** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten (DCM:MeOH 96:4).

**Ausbeute:** 180 mg (261  $\mu$ mol, 40%) eines farblosen Feststoffes.

Variante 2:<sup>[186,187]</sup>

*S*-Trityl-L-Cysteine-*tert*-butylester Hydrochlorid **139** (400 mg, 877  $\mu$ mol, 1.0 Äq) wurde in DCM und gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1:1, 20 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Triphosgen **136** (86.7 mg, 292  $\mu$ mol, 0.3 Äq) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 min bei 0 °C stark gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (4x50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

Das entstandene Isocyanat **141** wurde in abs. THF (40 mL) vorgelegt und *N*<sup>ε</sup>-Boc-L-Lysin **86** (216 mg, 877 μmol, 1.0 Äq), suspendiert in DMF (75 mL), zur Reaktionsmischung gegeben und für 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 96:4 - > 90:10).

**Ausbeute:** 74.0 mg (107 μmol, 37%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.34$  (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = 1.33-1.49 (m, 4 H, Lys-4-H, Lys-5-H), 1.39 (s, 9 H, Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.41 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.58-1.68 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.74-1.85 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 2.41 (dd,  $J = 11.8$  Hz,  $J = 4.9$  Hz, 1 H, Cys-3-H<sub>a</sub>), 2.51 (dd,  $J = 11.8$  Hz,  $J = 7.1$  Hz, 1 H, Cys-3-H<sub>b</sub>), 2.99 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 4.11 (dd,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 5.2$  Hz, 1 H, Lys-2-H), 4.24 (dd,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1 H, Cys-2-H), 7.19-7.23 (m, 3 H, Trt-5-H), 7.25-7.31 (m, 6 H, Trt-4-H, Trt-6-H), 7.35-7.39 (m, 6 H, Trt-3-H, Trt-7-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = 24.16 (Lys-C-4), 28.45 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.01 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.87 (Lys-C-5), 34.00 (Lys-C-3), 35.80 (Cys-C-3), 41.51 (Lys-C-6), 54.37 (Cys-C-2), 56.09 (Lys-C-2), 67.88 (Trt-C-1), 79.96 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83.19 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.07 (Trt-C-5), 129.17 (Trt-C-4, Trt-C-6), 130.83 (Trt-C-3, Trt-C-7), 146.00 (Trt-C-2), 158.62 (Boc-N(C=O)O), 159.88 (N(C=O)N), 172.20 (Cys-C-1), 180.72 (Lys-C-1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -6.7$  ( $c = 4.5$  mg/mL, DCM).

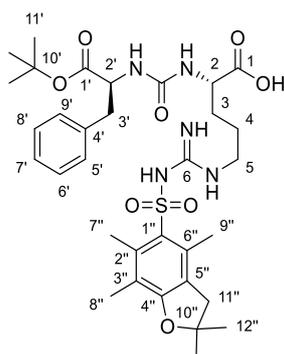
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2975, 2929, 1594, 1416, 1366, 1249, 1151, 742, 699, 619.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 208.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 714.04$  [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS:** ber. für C<sub>38</sub>H<sub>50</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sup>+</sup>: 692.3364, gef.: 692.3348.

**C<sub>38</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S** (691.88)

**Synthese von geschütztem Phe-Arg-Harnstoffdipeptid **145****<sup>[186,187]</sup>
**145**

L-Phenylalanin-*tert*-butylester Hydrochlorid **143** (1.00 g, 3.88 mmol, 1.0 Äq) wurde in einer 1:1-Mischung aus DCM und gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Triphosgen **136** (380 mg, 1.28 mmol, 0.3 Äq) wurde für 25 min bei 0 °C gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit DCM (3x40 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das entstandene Isocyanat wurde in abs. THF (20 mL) gelöst und eine Lösung von *N*<sup>ω</sup>-(2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin **144** (1.65 g, 3.88 mmol, 1.0 Äq) in abs. DMF (40 mL) langsam zugetropft. Nach Rühren für 18.5 h bei Raumtemperatur wurde Ethylacetat (60 mL) zugegeben und mit Salzsäure (1 M, 2x150 mL) gewaschen. Die organische Phase wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Reaktion umgesetzt.

**Ausbeute:** 2.61 g (3.88 mmol, quant.) eines farblosen Schaums.

**DC:**  $R_f = 0.09$  (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.33 (s, 9 H, 11'-H), 1.45 (s, 6 H, 12''-H), 1.52-1.71 (m, 3 H, 3-H<sub>a</sub>, 4-H), 1.78-1.87 (m, 1 H, 3-H<sub>b</sub>), 2.07 (s, 3 H, 8''-H), 2.47 (s, 3 H, 7''-H), 2.54 (s, 3 H, 9''-H), 2.94-3.00 (m, 2 H, 5-H), 2.89 (s, 2 H, 11''-H), 3.15-3.31 (m, 2 H, 3'-H), 4.25-4.40 (m, 1 H, 2-H), 4.49 (q,  $J = 6.6$  Hz, 1 H, 2'-H), 6.15-6.24 (m, 1 H, 2'-NH), 6.27-6.46 (m, 2 H, 2-NH, 6-NH), 7.11-7.22 (m, 5 H, 5'-H, 6'-H, 7'-H, 8'-H, 9'-H).

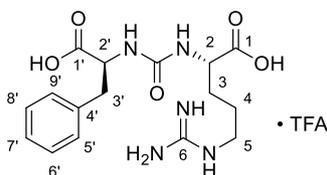
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 12.32 (C-8''), 17.18 (C-9''), 19.18 (C-7''), 25.06 (C-4), 27.74 (C-11'), 27.79 (C-12''), 28.43 (C-3), 28.97 (C-3'), 38.27 (C-11''), 43.01 (C-5), 52.89 (C-2), 54.87 (C-2'), 81.87 (C-10'), 86.40 (C-10''), 117.56 (C-3''), 124.68 (C-1''), 126.58, 128.15, 129.36 (C-5', C-6', C-7', C-8', C-9'), 132.46 (C-5'', C-6''), 136.35 (C-4'), 138.32 (C-2''), 156.02 (C-6), 158.22 (N(C=O)N), 171.88 (C-4''), 174.38 (C-1'), 175.33 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 674.14 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S<sup>+</sup>: 674.3218, gef.: 674.3194.

**C<sub>33</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S** (673.83)

### Synthese von Phe-Arg-Harnstoffdipeptid **146**



**146**

Das geschützte Phe-Arg-Harnstoffdipeptid **145** (513 mg, 761 μmol) wurde für 16 h bei Raumtemperatur in einer 80%igen wässrigen TFA-Lösung (24 mL) gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung unter reduziertem Druck eingengt, Wasser (20 mL) zugegeben und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 338 mg (706 μmol, 93%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):** t<sub>R</sub> = 23.9 min (Methode 1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 1.42-1.59 (m, 3 H, 3-H<sub>a</sub>, 4-H), 1.67-1.76 (m, 1 H, 3-H<sub>b</sub>), 2.90 (dd, J = 13.9 Hz, J = 8.2 Hz, 1 H, 3'-H<sub>a</sub>), 3.01-3.08 (m, 3 H, 3'-H<sub>b</sub>, 5-H), 4.03 (dd, J = 9.0 Hz, J = 4.9 Hz, 1 H, 2-H), 4.38 (dd, J = 8.2 Hz, J = 5.4 Hz, 1 H, 2'-H), 7.13-7.26 (m, 5 H, 5'-H, 6'-H, 7'-H, 8'-H, 9'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 24.36 (C-4), 28.31 (C-3), 37.17 (C-3'), 40.55 (C-5), 52.76 (C-2'), 54.63 (C-2), 127.23 (C-7'), 128.81 (C-5', C-9'), 129.40 (C-6', C-8'), 136.70 (C-4'), 156.83 (N(C=O)N), 159.06 (C-6), 176.10, 176.50 (C-1, C-1').

**<sup>19</sup>F-NMR** (376.5 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = -75.67.

**Drehwert:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -3.9 (c = 18 mg/mL, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3350, 3193, 2936, 1647, 1557, 1440, 1185, 1137, 722, 700.

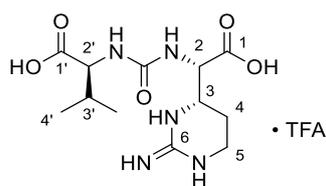
**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 6:4): λ<sub>max</sub> [nm] = 258.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 366.06 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 364.1626, gef.: 364.1620.

**C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>** (479.16)

### Synthese von Val-Epicapreomycin-Harnstoffdipeptid **142a**

**142a**

Das geschützte Val-Epicapreomycin-Harnstoffdipeptid **36a** (22 mg, 32  $\mu$ mol) wurde für 13.5 h bei Raumtemperatur in einer 80%igen wässrigen TFA-Lösung (2 mL) gerührt. Anschließend wurde Wasser (3 mL) zugegeben und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 4.7 mg (11  $\mu$ mol, 34%) als farbloser Feststoff.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R$  = 22-24 min (Methode 1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.90 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3 H, 4'-H<sub>a</sub>), 0.94 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3 H, 4'-H<sub>b</sub>), 1.80-1.89 (m, 1 H, 5-H<sub>a</sub>), 1.89-1.97 (m, 1 H, 5-H<sub>b</sub>), 2.14 (td,  $J$  = 6.9 Hz,  $J$  = 5.5 Hz, 1 H, 3'-H), 3.26-3.39 (m, 2 H, 4-H), 3.94 (td,  $J$  = 6.9 Hz,  $J$  = 4.7 Hz, 1 H, 3-H), 4.08 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 1 H, 2'-H), 4.49 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1 H, 2-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 16.95 (C-4'), 18.51 (C-4'), 20.63 (C-5), 29.97 (C-3'), 36.20 (C-4), 49.96 (C-3), 55.31 (C-2), 58.96 (C-2'), 154.06 (C-6), 159.53 (N(C=O)N), 173.52 (C-1), 176.73 (C-1').

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.59.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20}$  = +7.1 ( $c$  = 2.8 mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

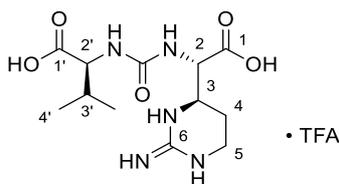
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3339, 2968, 1626, 1559, 1186, 1138, 838, 800, 721, 632.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 315.97 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_5^+$ : 316.1615, gef.: 316.1616.

**$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_7$**  (429.35)

### Synthese von Val-Capreomycin-Harnstoffdipeptid **142b**

**142b**

Das geschützte Val-Capreomycinidin-Harnstoffdipeptid **36b** (36 mg, 53  $\mu\text{mol}$ ) wurde für 24 h bei Raumtemperatur in einer 80%igen wässrigen TFA-Lösung (3 mL) gerührt. Anschließend wurde Wasser (5 mL) zugegeben und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 16.5 mg (38.4  $\mu\text{mol}$ , 73%) als farbloser Feststoff.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 20\text{-}22$  min (Methode 1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.90 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, 4'-H<sub>a</sub>), 0.94 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, 4'-H<sub>b</sub>), 1.84-1.92 (m, 1 H, 5-H<sub>a</sub>), 2.02-2.10 (m, 1 H, 5-H<sub>b</sub>), 2.15 (quind,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, 3'-H), 3.27-3.40 (m, 2 H, 4-H), 3.98 (td,  $J = 7.1$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1 H, 3-H), 4.08 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1 H, 2'-H), 4.47 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1 H, 2-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 16.92 (C-4'), 18.51 (C-4'), 22.51 (C-5), 29.98 (C-3'), 36.25 (C-4), 49.70 (C-3), 56.12 (C-2), 58.92 (C-2'), 154.44 (C-6), 159.59 (N(C=O)N), 173.61 (C-1), 176.78 (C-1').

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.58.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -14.0$  ( $c = 7.1$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3338, 2968, 1622, 1556, 1470, 1187, 1137, 839, 800, 722.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 315.98$  [M+H]<sup>+</sup>.

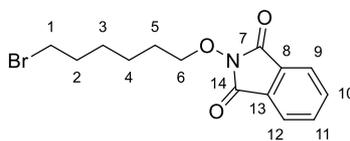
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_5^+$ : 316.1615, gef.: 316.1614.

**$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_7$**  (429.35)

## 7.2.2 Synthese der modifizierten Streptomycine

### 7.2.2.1 Synthese von Azid-modifizierten Streptomycin-Derivat 60

#### Synthese von *N*-(6-bromhexyl)phthalimid **149**<sup>[213]</sup>



**149**

Die folgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. 1,6-Dibromhexan (0.50 g, 0.27 mL, 2.1 mmol, 1.0 Äq), *N*-Hydroxyphthalimid (1.0 g, 6.2 mmol, 3.0 Äq) und Triethylamin (0.80 g, 1.1 mL, 7.9 mmol, 3.8 Äq) wurden in THF (75 mL) gelöst und für 46 h bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, das Rohprodukt

erneut in DCM (100 mL) gelöst und bis zur vollständigen Entfärbung der organischen Phase wiederholt mit gesättigter wässriger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:PE 1:1 -> 100% DCM).

**Ausbeute:** 639 mg (1.96 mmol, 93%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.49 (DCM).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.50-1.61 (m, 4 H, 3-H, 4-H), 1.78-1.85 (m, 2 H, 5-H), 1.91 (quin, *J* = 7.0 Hz, 2 H, 2-H), 3.44 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H, 1-H), 4.22 (t, *J* = 6.6 Hz, 2 H, 6-H), 7.74-7.78 (m, 2 H, 10-H, 11-H), 7.82-7.87 (m, 2 H, 9-H, 12-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 24.80 (C-4), 27.82 (C-3), 27.99 (C-5), 32.58 (C-2), 33.74 (C-1), 78.30 (C-6), 123.49 (C-9, C-12), 128.96 (C-8, C-13), 134.45 (C-10, C-11), 163.65 (C-7, C-14).

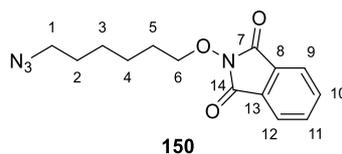
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1786, 1717, 1403, 1125, 972, 873, 785, 696, 644, 518.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 230, 295.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 326.03 [M+H]<sup>+</sup>.

**C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>BrNO<sub>3</sub>** (326.19)

### Synthese von *N*-(6-azidhexyl)phthalimid **150**



Die folgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. *N*-(6-bromhexyl)phthalimid **149** (100 mg, 307  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und Natriumazid (49.8 mg, 766  $\mu$ mol, 2.5 Äq) wurden in DMF (8 mL) gelöst und für 23 h bei 75 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit Wasser (2x50 mL) und mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2x50 mL) gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 4:1).

**Ausbeute:** 79 mg (27  $\mu$ mol, 89%) als farbloses Öl.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.35 (PE:EtOAc 7:3).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.41-1.49 (m, 2 H, 3-H), 1.51-1.59 (m, 2 H, 4-H), 1.63 (quin,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, 2-H), 1.75-1.83 (m, 2 H, 5-H), 3.28 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, 1-H), 4.20 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, 6-H), 7.72-7.78 (m, 2 H, 10-H, 11-H), 7.82-7.87 (m, 2 H, 9-H, 12-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 25.11 (C-4), 26.32 (C-3), 27.95 (C-5), 28.63 (C-2), 51.25 (C-1), 78.22 (C-6), 123.42 (C-9, C-12), 128.86 (C-8, C-13), 134.41 (C-10, C-11), 163.59 (C-7, C-14).

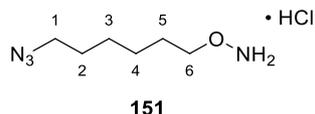
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2091, 1727, 1466, 1371, 1186, 1126, 982, 876, 699, 518.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 233, 297.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 343.13 [ $\text{M} + \text{MeOH} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>.

**$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$**  (288.31)

### Synthese von *O*-(6-azidhexyl)hydroxylamin Hydrochlorid **151**



Die folgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. *N*-(6-azidhexyl)phthalimid **150** (790 mg, 2.74 mmol, 1.0 Äq) wurde in DCM (30 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von Hydrazin-Monohydrat (206 mg, 200  $\mu\text{L}$ , 4.11 mmol, 1.5 Äq) wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Suspension wurde filtriert, der Rückstand mit DCM gewaschen und das Filtrat mit Wasser (2x15 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene farblose Feststoff wurde in Diethylether (40 mL) gelöst und für 30 min mit HCl be-  
gast. Der erhaltene Feststoff wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 449 mg (2.31 mmol, 84%) eines farblosen Feststoffes.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.33-1.43 (m, 4 H, 3-H, 4-H), 1.55-1.62 (m, 2 H, 2-H), 1.66 (quin,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, 5-H), 3.30 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, 1-H), 4.03 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 24.37, 25.60 (C-3, C-4), 26.86 (C-5), 27.85 (C-2), 51.15 (C-1), 75.60 (C-6).

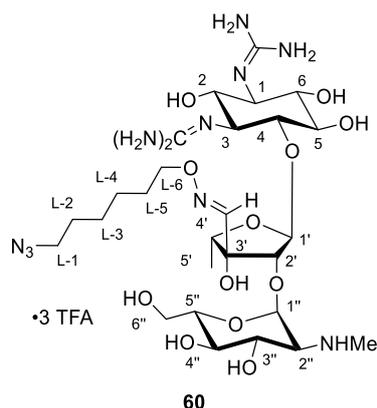
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2932, 2686, 2091, 1509, 1454, 1351, 1260, 1198, 1019, 913.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 181.21 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>.

**HRMS:** ber. für  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}^+$ : 159.12404, gef.: 159.12416.

**$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{OCl}$**  (194.66)

### Synthese von Azid-modifizierten Streptomycin-Derivat **60**



Streptomycin Sulfat **152** (100 mg, 137  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äq) wurde mit *m*-Phenylendiamin (ca. 3 mg, kat.) in  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von *O*-(6-azidhexyl)hydroxylamin Hydrochlorid **151** (23.0 mg, 118  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde für 26 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt und das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 82.2 mg (77.3  $\mu\text{mol}$ , 66%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 26.8$  min (Methode 2).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.15 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H, 5'-H), 1.28-1.38 (m, 4 H, L-3-H, L-4-H), 1.55 (quin,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, L-2-H), 1.60 (quin,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, L-5-H), 2.81 (s, 3 H, Me-NH), 3.22-3.26 (m, 1 H, 2''-H), 3.26 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, L-1-H), 3.38-3.43 (m, 2 H, 4''-H, 4-H), 3.43-3.55 (m, 4 H, 1-H, 2-H, 5-H, 6-H), 3.55-3.61 (m, 2 H, 3-H, 5''-H), 3.73-3.78 (m, 1 H, 6''-H<sub>a</sub>), 3.80-3.85 (m, 2 H, 3''-H, 6''-H<sub>b</sub>), 4.06 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, L-6-H), 4.41 (q,  $J = 6.3$  Hz, 1 H, 4'-H), 4.50 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, 2'-H), 5.22 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.33 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, 1''-H), 7.59 (s, 1 H, Oxim-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.19 (C-5'), 24.66 (L-C-4), 25.81 (L-C-3), 27.98 (L-C-5), 28.09 (L-C-2), 31.23 (NH- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 51.20 (L-C-1), 58.38 (C-3), 58.84 (C-1), 60.20 (C-6''), 60.73 (C-2''), 69.17 (C-4''), 69.27 (C-3''), 70.95 (C-2), 71.49 (C-6), 72.71 (C-5''), 73.06 (C-5), 74.56 (L-C-6), 76.83 (C-4'), 79.30 (C-4), 79.86 (C-3'), 84.02 (C-2'), 92.12 (C-1''), 105.46 (C-1'), 116.42 (q,  $J_{CF} = 291.40$  Hz, TFA- $\text{CF}_3$ ), 149.82 (Oxim-C), 157.61 (C-3-NH $\underline{\text{C}}$ (=NH)NH<sub>2</sub>), 158.25 (C-1-NH $\underline{\text{C}}$ (=NH)NH<sub>2</sub>), 163.08 (q,  $J_{CF} = 35.74$  Hz, TFA-C=O).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.77.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -58.5$  ( $c = 4.5$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3339, 3191, 2939, 2100, 1664, 1184, 1130, 1041, 1006, 721.

**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  54:46):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 199.

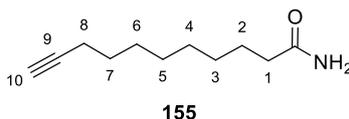
**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 722.46 [M+H]<sup>+</sup>, 362.17 [M+2H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>27</sub>H<sub>53</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub><sup>2+</sup>: 361.6932, gef.: 361.69335.

**C<sub>33</sub>H<sub>54</sub>F<sub>9</sub>N<sub>11</sub>O<sub>18</sub>** (1063.84)

### 7.2.2.2 Synthese der Streptomycin-Referenzverbindung 156

#### Synthese von Amid-Linker 155



10-Undecinsäure **153** (150 mg, 823 μmol, 1.0 Äq) wurde in abs. THF (6 mL) vorgelegt und im Anschluss tropfenweise mit Thionylchlorid (0.33 mL, 4.6 mmol, 5.6 Äq) versetzt. Es wurde für 1 h bei 50 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung (15 mL) versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit DCM (2x200 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2x100 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigungsschritte weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** 149 mg (823 μmol, quant.) eines farblosen Feststoffes.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.51 (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.25-1.36 (m, 6 H, 3-H, 4-H, 5-H), 1.36-1.44 (m, 2 H, 6-H), 1.48-1.56 (m, 2 H, 7-H), 1.64 (quint, J = 7.4 Hz, 2 H, 2-H), 1.94 (t, J = 2.7 Hz, 1 H, 10-H), 2.18 (dt, J = 7.1 Hz, J = 2.5 Hz, 2 H, 8-H), 2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, 1-H), 5.48 (bs, 2 H, (C=O)-NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 18.36 (C-8), 25.46 (C-2), 28.41 (C-7), 28.64, 28.89, 29.15 (C-3, C-4, C-5), 35.85 (C-1), 68.08 (C-10), 84.71 (C-9), 175.56 (C=O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3348, 3279, 3176, 2933, 2921, 2849, 1660, 1629, 1424, 652.

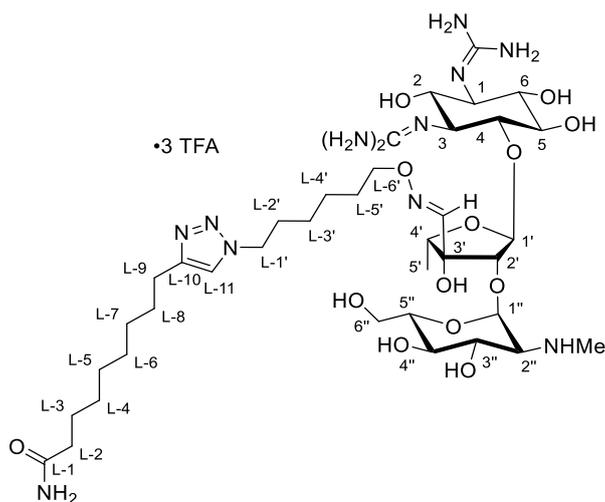
**UV** (MeOH): λ<sub>max</sub> [nm] = 203.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 182.07 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>NO<sup>+</sup>: 182.1540, gef.: 182.1536.

**C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO** (181.28)

## Synthese der Streptomycin-Referenzverbindung 156



156

Der Amid-Linker **155** (10 mg, 58  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und das Streptomycin-Derivat **60** (50 mg, 58  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurden in destilliertem Wasser (12 mL, entgast) und abs. THF (6 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von Kupfer(II)-sulfat (Spatelspitze, kat.) und Natriumascorbat (7.0 mg, 35  $\mu\text{mol}$ , 0.6 Äq) wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (ca. 10 mg) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt und das Rohprodukt über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 47 mg (38  $\mu\text{mol}$ , 65%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 5.9$  min (Methode 3).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.16 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3 H, 5'-H), 1.21-1.28 (m, 10 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-3'-H, L-4'-H), 1.28-1.36 (m, 2 H, L-3-H), 1.52 (quin,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, L-7-H), 1.58 (quin,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, L-5'-H), 1.65 (quin,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, L-8-H), 1.92 (quin,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, L-2'-H), 2.20 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, L-2-H), 2.79 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, L-9-H), 2.82 (s, 3 H,  $\text{NHCH}_3$ ), 3.26 (dd,  $J = 10.7$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1 H, 2''-H), 3.40-3.45 (m, 2 H, 4''-H, 4-H), 3.45-3.64 (m, 6 H, 1-H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H, 5''-H), 3.74-3.79 (m, 1 H, 6''-H<sub>a</sub>), 3.82-3.88 (m, 2 H, 3''-H, 6''-H<sub>b</sub>), 4.04 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, L-6'-H), 4.42 (q,  $J = 6.4$  Hz, 1 H, 4'-H), 4.47-4.52 (m, 3 H, L-1'-H, 2'-H), 5.24 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.34 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1 H, 1''-H), 7.58 (s, 1 H, Oxim-H), 8.15 (s, 1 H, L-11-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.20 (C-5'), 22.97 (L-C-3), 24.39 (L-C-9), 25.18, 25.22 (L-C-3', L-C-4'), 27.56, 27.76, 27.93, 28.02, 28.12, 28.19 (L-C-5', L-C-4, L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-8), 28.76 (L-C-2'), 31.26 ( $\text{NHCH}_3$ ), 35.12 (L-C-2), 52.50 (L-C-1'), 58.38 (C-3), 58.85 (C-1), 60.19 (C-6''), 60.74 (C-2''), 69.18 (C-4''), 69.28 (C-3''), 70.98 (C-2), 71.49 (C-6), 72.72 (C-5''), 73.08 (C-5), 74.41 (L-C-6'), 76.91 (C-4'), 79.25 (C-4), 79.83 (C-3'), 84.14 (C-2'), 92.19 (C-1''), 105.46

(C-1'), 116.41 (q,  $J_{CF} = 291.40$  Hz, TFA- $CF_3$ ), 125.67 (L-C-11), 145.51 (L-C-10), 149.80 (Oxim-C), 157.63 (C-3-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>), 158.26 (C-1-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>), 162.96 (q,  $J_{CF} = 35.70$  Hz, TFA-C=O), 180.44 (L-C-1).

<sup>19</sup>F-NMR (376.5 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = -75.57.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -74.7$  (c = 5.8 mg/mL, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3337, 3194, 2931, 2860, 1663, 1183, 1131, 837, 800, 721.

**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 76:24):  $\lambda_{max}$  [nm] = 244, 299.

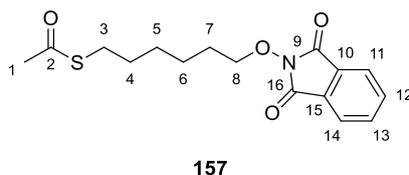
**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 903.67 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>38</sub>H<sub>72</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub><sup>2+</sup>: 452.2665, gef.: 452.2652.

**C<sub>44</sub>H<sub>73</sub>F<sub>9</sub>N<sub>12</sub>O<sub>19</sub>** (1245.12)

### 7.2.2.3 Synthese von Thiol-modifizierten Streptomycin-Derivat 59

#### Synthese von Linker 157



Die folgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. *N*-(6-bromhexyl)phthalimid **149** (639 mg, 1.96 mmol, 1.0 Äq) und Kaliumthioacetat (224 mg, 1.96 mmol, 1.0 Äq) wurden in Aceton (20 mL) vorgelegt und für 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 9:1 -> 4:1).

**Ausbeute:** 527 mg (1.64 mmol, 84%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.63$  (PE:EtOAc 1:1).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.39-1.47 (m, 2 H, 5-H), 1.47-1.55 (m, 2 H, 6-H), 1.60 (quin,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, 4-H), 1.74-1.82 (m, 2 H, 7-H), 2.31 (s, 3 H, 1-H), 2.87 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, 3-H), 4.19 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, 8-H), 7.71-7.77 (m, 2 H, 12-H, 13-H), 7.80-7.85 (m, 2 H, 11-H, 14-H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 25.03 (C-6), 27.93 (C-5), 28.33 (C-7), 28.92 (C-3), 29.27 (C-4), 30.57 (C-1), 78.30 (C-8), 123.41 (C-11, C-14), 128.90 (C-10, C-15), 134.38 (C-12, C-13), 163.58 (C-9, C-16), 195.87 (C-2).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2932, 2856, 1717, 1689, 1127, 1016, 982, 873, 695, 629.

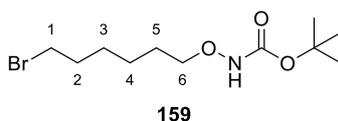
**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 236, 297.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 344.06 [M+Na]<sup>+</sup>, 376.03 [M+MeOH+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>S<sup>+</sup>: 322.1108, gef.: 322.1102.

**C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>S** (321.39)

### Synthese von Linker 159



Die folgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. 1,6-Dibromhexan **148** (1.54 mL, 2.48 g, 10.2 mmol, 2.0 Äq) wurde in DMF (5 mL) vorgelegt. Im Anschluss wurden *N*-Boc-Hydroxylamin (670 mg, 5.00 mmol, 1.0 Äq) und DBU (0.90 mL, 0.91 mg, 6 mmol, 1.2 Äq) in DMF (5 mL) gelöst und langsam zugegeben. Die Reaktion wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Wasser (60 mL) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat (3x80 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (100% PE -> PE:EtOAc 70:30.)

**Ausbeute:** 802 mg (2.71 mmol, 54%) als farbloser Feststoff.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.76 (PE:EtOAc 1:1).

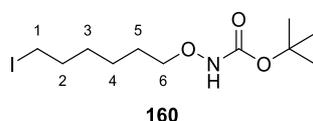
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.33-1.53 (m, 4 H, 3-H, 4-H), 1.47 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.63 (quin, *J* = 6.9 Hz, 2 H, 5-H), 1.85 (quin, *J* = 6.9 Hz, 2 H, 2-H), 3.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H, 1-H), 3.84 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H, 6-H), 7.18 (bs, 1 H, 7-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 25.05 (C-4), 27.78 (C-3), 27.89 (C-5), 28.16 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.56 (C-2), 33.75 (C-1), 76.52 (C-6), 81.53 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.86 (N(C=O)N).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 318.12 [M+Na]<sup>+</sup>.

**C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>BrNO<sub>3</sub>** (296.21)

### Synthese von Linker 160



Die folgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. 1,6-Diiodhexan **158** (2.00 g, 5.92 mmol, 1.0 Äq) und *N*-Boc-Hydroxylamin (800 mg, 6.00 mmol, 1.0 Äq) wurden in DCM (10 mL) vorgelegt. Im Anschluss wurde DBU (1.02 g, 1.00 mL, 6.70 mmol, 1.1 Äq) in DCM (15 mL) gelöst und langsam zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde nachfolgend mit wässriger NaOH-Lösung (2 M, 100 mL), wässriger HCl-Lösung (1 M, 100 mL) und gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (100% PE -> PE:EtOAc 80:20.)

**Ausbeute:** 883 mg (2.57 mmol, 44%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.77$  (PE:EtOAc 1:1).

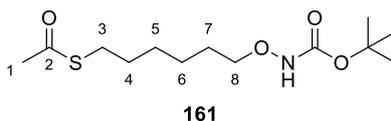
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.32-1.41 (m, 4 H, 3-H, 4-H), 1.43 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.59 (quin,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, 5-H), 1.78 (quin,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, 2-H), 3.14 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H, 1-H), 3.80 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, 6-H), 7.32 (bs, 1 H, 7-NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 6.84 (C-1), 24.71 (C-4), 27.66 (C-5), 28.09 ( $\text{OC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 30.10 (C-3), 33.17 (C-2), 76.36 (C-6), 81.31 ( $\text{OC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 156.76 (N(C=O)N).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 366.37$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>.

**$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{INO}_3$**  (343.21)

### Synthese von Linker 161



#### Variante 1:

Die folgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. Linker **160** (440 mg, 1.28 mmol, 1.0 Äq) und Kaliumthioacetat (224 mg, 1.96 mmol, 1.5 Äq) wurden in Aceton (10 mL) vorgelegt und für 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Suspension wurde DCM (20 mL) zugegeben und das Gemisch nachfolgend mit wässriger NaOH-Lösung (80 mL) und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (80 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:PE 2:1 -> 100% DCM).

**Ausbeute:** 370 mg (1.27 mmol, 99%) als gelbes Öl.

Variante 2:

Die folgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. Linker **159** (390 mg, 1.32 mmol, 1.0 Äq) und Kaliumthioacetat (151 mg, 1.32 mmol, 1.0 Äq) wurden in Aceton (15 mL) vorgelegt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Suspension wurde DCM (100 mL) gegeben und das Reaktionsgemisch mit Wasser (150 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Reaktion umgesetzt.

**Ausbeute:** 386 mg (1.32 mmol, quant.) als gelbes Öl.

**DC:**  $R_f = 0.13$  (DCM).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.33-1.43 (m, 4 H, 5-H, 6-H), 1.48 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.50-1.71 (m, 4 H, 4-H, 7-H), 2.32 (s, 3 H, 1-H), 2.86 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, 3-H), 3.83 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, 8-H), 7.16 (bs, 1 H, 9-NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 25.34 (C-6), 27.78 (C-7), 28.18 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.48 (C-5), 28.94 (C-3), 29.32 (C-1), 30.61 (C-4), 76.56 (C-8), 81.52 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 156.86 ( $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{N}$ ), 196.00 (C-2).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3295, 2976, 2933, 2860, 1689, 1247, 1164, 1107, 772, 625.

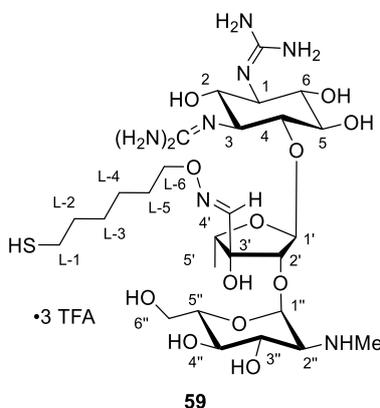
**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 203, 232.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 291.12$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NO}_2\text{S}^+$ : 192.1053, gef.: 192.1051.

**$\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{S}$**  (291.41)

### Synthese von Thiol-modifizierten Streptomycin-Derivat **59**



Variante 1:

Linker **161** (200 mg, 686  $\mu\text{mol}$ ) wurde in DCM (10 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von TFA (1.4 mL) wurde 1 h bei 0 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Zwischenprodukt wurde in Methanol (10 mL) gelöst, mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (2 M, 10 mL) versetzt und für 2 h bei 55 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und mit Dichlormethan (3x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das vollständig entschützte Zwischenprodukt wurde in Wasser (3 mL) gelöst. Nach Zugabe von Streptomycin Sulfat **152** (100 mg, 137  $\mu\text{mol}$ ) wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über semi-präparative HPLC (C18-Säule).

**Ausbeute:** 27.4 mg (26.0  $\mu\text{mol}$ , 4%) eines farblosen Feststoffes.

Variante 2:

Linker **157** (108 mg, 336  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in Dichlormethan (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Hydrazin-Monohydrat (100  $\mu\text{L}$ , 103 mg, 2.06 mmol, 6.0 Äq) wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Wasser (2x15 mL) gewaschen, das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und das Zwischenprodukt in Methanol (3 mL) gelöst. Nach Zugabe von konzentrierter wässriger HCl (12 M, 2 mL) wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Wasser (5 mL) verdünnt und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Das Zwischenprodukt wurde in Wasser (5 mL) gelöst und nach Zugabe von Streptomycin Sulfat **152** (197 mg, 270  $\mu\text{mol}$ , 0.8 Äq) wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über semi-präparative HPLC (C18-Säule).

**Ausbeute:** 17.5 mg (16.6  $\mu\text{mol}$ , 5%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 16.8$  min (Methode 4).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.15 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H, 5'-H), 1.22-1.41 (m, 4 H, L-3-H, L-4-H), 1.46-1.68 (m, 4 H, L-2-H, L-5-H), 2.49 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, L-1-H), 2.81 (s, 3 H,  $\text{NHCH}_3$ ), 3.25 (dd,  $J = 10.7$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 1 H, 2''-H), 3.36-3.64 (m, 8 H, 1-H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 4''-H, 5''-H), 3.71-3.87 (m, 3 H, 3''-H, 6''-H), 4.06 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, L-6-H), 4.41 (q,  $J = 6.1$  Hz, 1 H, 4'-H), 4.50 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1 H, 2'-H), 5.22 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.34 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1 H, 1''-H), 7.59 (s, 1 H, Oxim-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.21 (C-5'), 24.67 (L-C-4), 27.36 (L-C-3), 28.08 (L-C-5), 28.26 (L-C-2), 31.25 (NH-CH<sub>3</sub>), 38.15 (L-C-1), 58.39 (C-3), 58.85 (C-1), 60.24 (C-6''), 60.75 (C-2''), 69.20 (C-4''), 69.27 (C-3''), 70.97 (C-2), 71.48 (C-6), 72.73 (C-5''), 73.07 (C-5), 74.62 (L-C-6), 76.83 (C-4'), 79.30 (C-4), 79.86 (C-3'), 83.98 (C-2'), 92.10 (C-1''), 105.46 (C-1'), 116.42 (q,  $J_{\text{CF}} = 291.40$  Hz, TFA-CF<sub>3</sub>), 149.79 (Oxim-C), 157.61 (C-3-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>), 158.25 (C-1-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>), 163.40 ( $J_{\text{CF}} = 34.80$  Hz, TFA-C=O).

$^{19}\text{F-NMR}$  (376.5 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.56.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -102.6$  (c = 2.8 mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3327, 2933, 1665, 1187, 1131, 1041, 1010, 839, 800, 722.

**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  75:25):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 199.

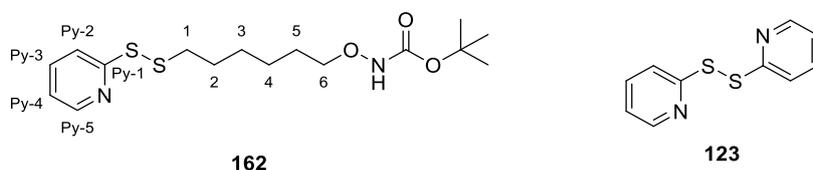
**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 713.30 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_{27}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}^{2+}$ : 357.1785, gef.: 357.1766.

**C<sub>33</sub>H<sub>55</sub>F<sub>9</sub>N<sub>8</sub>O<sub>18</sub>S** (1054.89)

#### 7.2.2.4 Synthese von PySS-Streptomycin-Derivat 58

##### Synthese von PySS-aktivierten Linker 162



Linker **161** (138 mg, 474  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in abs. Methanol (4 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von wässriger NaOH-Lösung (2 M, 500  $\mu\text{L}$ , 951  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äq) wurde für 2 h bei 45 °C gerührt. Es wurde DCM (10 mL) zugegeben, mit wässriger HCl-Lösung (1 M, 10 mL) gewaschen und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde erneut mit DCM (2x10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene gelbliche Öl wurde in abs. Methanol (4 mL) gelöst, langsam zu einer Lösung von Aldrithiol™-2 **123** (210 mg, 951  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äq) in abs. Methanol (8 mL) gegeben und für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 99:1).

**Ausbeute:** 203 mg eines gelben Öls, verunreinigt mit Aldrithiol™-2 **123** (aus  $^1\text{H-NMR}$  berechnete Ausbeute an **162**: 110 mg, 306  $\mu\text{mol}$ , 65%).

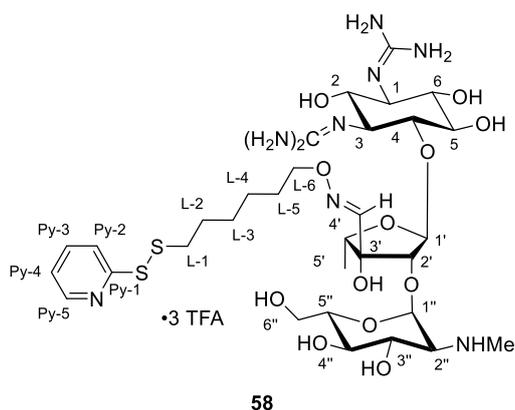
**DC:**  $R_f = 0.82$  (DCM:MeOH 9:1).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.34-1.46 (m, 4 H, 3-H, 4-H), 1.49 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.57-1.66 (m, 2 H, 2-H), 1.71 (quin, 2 H,  $J = 7.3$  Hz, 5-H), 2.77-2.83 (m, 2 H, 1-H), 3.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, 6-H), 7.08-7.11 (m, 1 H, Py-4-H), 7.59-7.76 (m, 2 H, Py-2-H, Py-3-H), 8.46-8.48 (m, 1 H, Py-5-H).

**MS** ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z = 359$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$  (358.52)

### Synthese von PySS-aktivierten Streptomycin-Derivat **58**



Der verunreinigte Linker **162** (70.0 mg, 195  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in einer wässrigen TFA-Lösung (6 mL,  $\text{H}_2\text{O}$ :TFA 6:1) für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Wasser (6 ml) verdünnt und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Im Anschluss wurde das instabile Zwischenprodukt erneut in Wasser (5 mL) gelöst. Nach Zugabe von Streptomycin Sulfat **60** (146 mg, 200  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde für 80 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt und das Rohprodukt über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 19.7 mg (16.9  $\mu\text{mol}$ , 9%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 29.6$  min (Methode 2).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.13 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3 H, 5'-H), 1.21-1.41 (m, 4 H, L-3-H, L-4-H), 1.52 (quin,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, L-5-H), 1.62 (quin,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, L-2-H), 2.63 (t,  $J = 5.2$  Hz, 3 H,  $\text{NHCH}_3$ ), 2.83 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, L-1-H), 3.09-3.34 (m, 6 H, 1-H, 2-H, 4-H, 6-H, 2''-H, 4''-H), 3.42-3.77 (m, 5 H, 3-H, 5-H, 3''-H, 5''-H, 6''-H), 3.96 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, L-6-H), 4.22 (q,  $J = 6.2$  Hz, 1 H, 4'-H), 4.34 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H, 2'-H), 5.19 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, 1''-H), 5.22 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.33 (bs, 1 H, 3'-OH), 5.99 (bs, 1 H, 2-OH), 6.82-7.00 (m, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 7.00-7.16 (m, 4 H,  $\text{NH}_2$ ), 7.15-7.33 (m, 3 H, Py-2-H,  $\text{NH}_2$ ), 7.49 (s, 1 H, Oxim-H), 7.70 (d,  $J = 7.6$  Hz,

1 H, 5-OH), 7.74-7.80 (m, 2 H, Py-4-H, 3''-OH), 7.81-7.87 (m, 1 H, Py-3-H), 8.34-8.43 (m, 1 H, 2''-NH<sub>2,a</sub>), 8.45 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, Py-5-H), 8.80-8.93 (m, 1 H, 2''-NH<sub>2,b</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 12.46 (C-5'), 24.95 (L-C-4), 27.48 (L-C-3), 28.25 (L-C-2, L-C-5), 31.04 (NH-CH<sub>3</sub>), 37.91 (L-C-1), 57.73 (C-5), 58.50 (C-1), 60.22 (C-6''), 60.42 (C-2''), 68.86, 69.63, 71.27, 71.54, 73.31 (C-2, C-4, C-6, C-3'', C-4'', C-5''), 73.39 (L-C-6), 77.18 (C-3), 77.92 (C-3'), 78.53 (C-4'), 86.05 (C-2'), 93.89 (C-1'), 104.33 (C-1''), 115.39 (TFA-CF<sub>3</sub>), 117.75 (TFA-CF<sub>3</sub>), 119.23 (Py-4-C), 121.16 (Py-2-C), 137.79 (Py-3-C), 149.58 (Py-5-C), 157.77 (C-3-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>), 158.19 (C-1-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>), 158.45 (Py-1-C), 158.71 (TFA-C=O), 159.37 (Oxim-C).

<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = -74.11.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -33.3$  (*c* = 0.6 mg/mL, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3343, 3191, 1666, 1420, 1184, 1130, 1041, 1007, 800, 721.

**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 40:60):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 233, 289.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 822.37 [M+H]<sup>+</sup>.

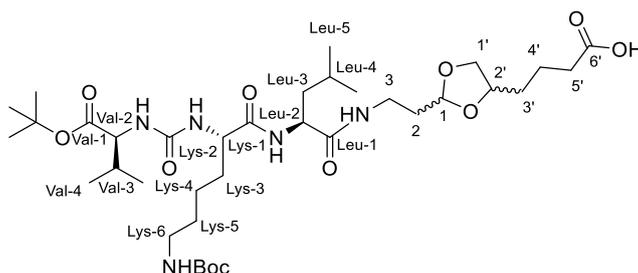
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup>: 822.3485, gef.: 822.3453.

**C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>F<sub>9</sub>N<sub>9</sub>O<sub>18</sub>S<sub>2</sub>** (1164.03)

## 7.2.3 Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Vorstufen und -Referenzen

### 7.2.3.1 Festphasensynthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon 68

#### Festphasensynthese der Val-Lys-Leu-Peptidkette 72



72

2-Chlorotrityl-Harz **163** (123 mg, 141 μmol, 1.0 Äq) wurde in abs. DCM (4 mL) für 2 h gequell. Nach Zugabe des Linkers **133** (60.0 mg, 141 μmol, 1.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (74.0 μL, 54.7 mg, 423 μmol, 3.0 Äq) gelöst in abs. DCM (3 mL) zum Harz wurde für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum Waschen wurde die Spritze mehrfach mit DMF und DCM gespült (jeweils zweimal mit 5x3 mL DMF und 5x3 mL DCM). Zum Capping wurde eine Mischung aus DCM:MeOH:DIPEA (17:2:1, 3 mL) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur

geschüttelt. Zum Waschen wurde die Spritze erneut mehrfach mit DCM und DMF gespült (jeweils zweimal mit 5x3 mL DCM und 5x3 mL DMF). Dieser Waschschrift wurde nachfolgend nach jeder Fmoc-Entschützung und jedem Kupplungsschritt wiederholt.

Die erste Fmoc-Entschützung erfolgte mit einer Lösung von 20% Piperidin in abs. DMF (3 mL). Die Reaktionsmischung wurde für 50 min bei Raumtemperatur geschüttelt und im Anschluss wie oben beschrieben gewaschen. *N*-Fmoc-L-Leucin (150 mg, 423  $\mu$ mol, 3.0 Äq), HBTU (160 mg, 423  $\mu$ mol, 3.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (150  $\mu$ L, 110 mg, 846  $\mu$ mol, 6.0 Äq) wurden in abs. DMF (3 mL) gelöst, zum Harz gegeben und für 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach erneutem Waschen erfolgte die zweite Fmoc-Entschützung mit 20% Piperidin in abs. DMF (3 mL) für 30 min bei Raumtemperatur. *N* <sup>$\alpha$</sup> -Fmoc-*N* <sup>$\epsilon$</sup> -Boc-L-Lysin (198 mg, 407  $\mu$ mol, 2.9 Äq), HBTU (160 mg, 423  $\mu$ mol, 3.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (150  $\mu$ L, 110 mg, 846  $\mu$ mol, 6.0 Äq) wurden in abs. DMF (3 mL) gelöst, zum Harz gegeben und für 22 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die letzte Fmoc-Entschützung wurde nach erneutem Waschen mit 20% Piperidin in abs. DMF (3 mL) für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

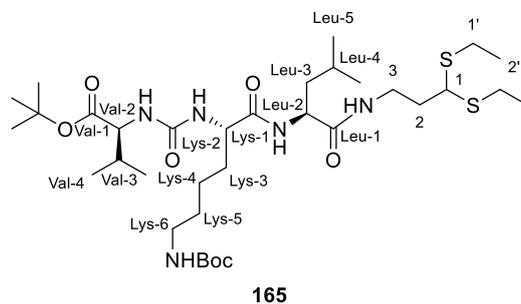
Valin-Carbamat **135** (144 mg, 423  $\mu$ mol, 3.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (150  $\mu$ L, 110 mg, 846  $\mu$ mol, 6.0 Äq) wurden in abs. DMF (3 mL) gelöst, auf das Harz gegeben und für 22 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Abspaltung der Peptidkette wurde eine 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol-Lösung (20%, in abs. DCM, 3 mL) aufgezogen und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und erneut für 45 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Es wurde mit DCM (15x4 mL) jeweils nach den einzelnen Abspaltungen gewaschen und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten (DCM:MeOH 95:5).

**Ausbeute:** 81.0 mg (109  $\mu$ mol, 77%) als eine Mischung von Diastereomeren eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.31$  (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.84-0.94 (m, 12 H, Val-4-H, Leu-5-H), 1.29-1.38 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.44 (s, 9 H, Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.40-1.96 (m, 13 H, Leu-3-H, Leu-4-H, Lys-3-H, Lys-5-H, 2-H, 3'-H, 4'-H), 2.06-2.15 (m, 1 H, Val-3-H), 2.33-2.50 (m, 2 H, 5'-H), 3.00-3.14 (m, 2 H, Lys-6-H), 3.32-3.46 (m, 2 H, 3-H), 3.54 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1 H, 1'-H<sub>a</sub>), 3.87-3.94 (m, 1 H, 2'-H), 4.00-4.16 (m, 1 H, 1'-H<sub>b</sub>), 4.24-4.40 (m, 2 H, Val-2-H, Lys-2-H), 4.40-4.53 (m, 1 H, Leu-2-H), 4.94-5.05 (m, 1 H, 1-H), 5.13 (bs, 1 H, Boc-NH), 6.01 (bs, 1 H, Val-NH), 6.25 (bs, 1 H, Lys-NH), 7.15 (bs, 1 H, Leu-NH), 7.30 (bs 1 H, 3-NH).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 744.61$  [M+H]<sup>+</sup>.

$C_{36}H_{65}N_5O_{11}$  (743.94)Synthese von Val-Lys-Leu-Dithioacetal **165**

Die Val-Lys-Leu-Peptidkette **72** (200 mg, 269  $\mu$ mol, 1.0 Äq) wurde in DCM (15 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von Ethanthiol (300  $\mu$ L, 259 mg, 4.16 mmol, 16.0 Äq) wurde die Reaktionsmischung mit Bortrifluoriddiethyletherat (2.4  $\mu$ L, 2.8 mg, 19  $\mu$ mol, 0.1 Äq) gelöst in DCM (3 mL) versetzt und 14 d bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde *N,N*-Diisopropylethylamin (300  $\mu$ L, 1.62 mmol, 6.0 Äq) zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser (2x100 mL) gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM:MeOH 98:2).

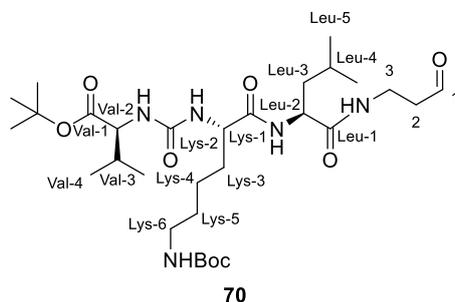
**Ausbeute:** 145 mg (201  $\mu$ mol, 75%) als leicht gelblicher Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.66$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.85-0.94 (m, 12 H, Val-4-H, Leu-4-H), 1.24 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6 H, 2'-H), 1.21-1.41 (m, 4 H, Lys-4-H, Lys-5-H), 1.44 (s, 9 H, Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.46-1.79 (m, 5 H, Leu-3-H, Leu-4-H, Lys-3-H), 2.00 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, 2-H), 2.04-2.14 (m, 1 H, Val-3-H), 2.54-2.63 (m, 2 H, 1'-H<sub>a</sub>), 2.63-2.71 (m, 2 H, 1'-H<sub>b</sub>), 3.02-3.15 (m, 2 H, Lys-6-H), 3.30-3.38 (m, 1 H, 3-H<sub>a</sub>), 3.47-3.57 (m, 1 H, 3-H<sub>b</sub>), 3.83 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1 H, 1-H), 4.26-4.38 (m, 2 H, Lys-2-H, Val-2-H), 4.39-4.46 (m, 1 H, Leu-2-H), 5.09 (bs, 1 H, Boc-NH), 5.98 (bs, 1 H, Val-NH), 6.42 (bs, 1 H, Lys-NH), 6.94 (bs, 1 H, Leu-NH), 7.48 (bs, 1 H, 3-NH).

**$^{13}C$ -NMR** (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.43 (C-2'), 14.44 (C-2'), 17.68 (Val-C-4), 19.02 (Val-C-4), 22.02 (Leu-C-5), 22.32 (Lys-C-4), 22.83 (Leu-C-5), 23.89 (C-1'), 24.24 (C-1'), 24.87 (Leu-C-4), 28.10 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.47 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.61 (Lys-C-5), 31.74 (Val-C-3), 32.12 (Lys-C-3), 35.47 (C-2), 37.75 (C-3), 39.71 (Lys-C-6), 40.73 (Leu-C-3), 48.87 (C-1), 52.05 (Leu-C-2), 54.09 (Lys-C-2), 58.23 (Val-C-2), 79.08 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 81.74 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.50 (Boc-N(C=O)O), 158.23 (N(C=O)N), 172.16 (Leu-C-1), 172.49 (Lys-C-1), 173.30 (Val-C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 743.43$  [M+Na]<sup>+</sup>.

$C_{34}H_{65}N_5O_7S_2$  (720.04)**Synthese von Val-Lys-Leu-Aldehyd 70**

Das Val-Lys-Leu-Dithioacetal **165** (90.0 mg, 125  $\mu$ mol, 1.0 Äq) wurde in einer MeCN:H<sub>2</sub>O:Aceton-Mischung (8:2:1, 80 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 2,6-Lutidin (230  $\mu$ L, 213 mg, 1.99 mmol, 16 Äq) und NBS (179 mg, 1.01 mmol, 8.0 Äq) wurde für 7 min nach Entfernen des Eisbades gerührt. Es wurde gesättigte wässrige Natriumthiosulfat-Lösung (80 mL) zugegeben und 3 min gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit DCM (3x80 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM:MeOH 98:2 -> 95:5).

**Ausbeute:** 69.4 mg (113  $\mu$ mol, 90%) als farbloser Feststoff.

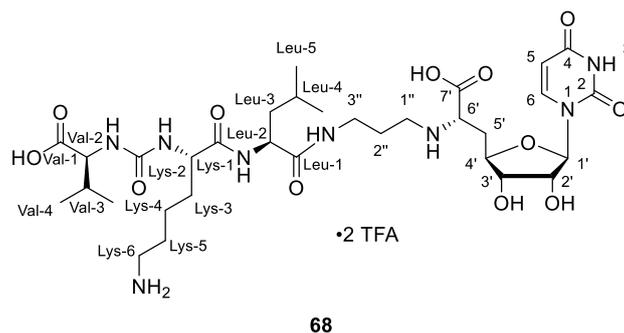
**DC:**  $R_f$  = 0.32 (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.83-0.94 (m, 12 H, Val-4-H, Leu-5-H), 1.29-1.39 (m, 4 H, Lys-4-H, Lys-5-H), 1.44 (s, 9 H, Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.41-1.79 (m, 5 H, Leu-3-H, Leu-4-H, Lys-3-H), 2.03-2.14 (m, 1 H, Val-3-H), 2.63-2.75 (m, 2 H, 2-H), 3.00-3.16 (m, 2 H, Lys-6-H), 3.48-3.62 (m, 2 H, 3-H), 4.27-4.37 (m, 2 H, Val-2-H, Lys-2-H), 4.41-4.48 (m, 1 H, Leu-2-H), 5.09 (bs, 1 H, Boc-NH), 5.98 (bs, 1 H, Val-NH), 6.32 (bs, 1 H, Lys-NH), 7.00 (bs, 1 H, Leu-NH), 7.71 (bs, 1 H, 3-NH), 9.75 (t,  $J$  = 1.3 Hz, 1 H, 1-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 17.68 (Val-C-4), 18.98 (Val-C-4), 22.04 (Leu-C-5), 22.24 (Lys-C-4), 22.75 (Leu-C-5), 24.83 (Leu-C-4), 28.07 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.47 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.62 (Lys-C-5), 31.71 (Val-C-3), 32.29 (Lys-C-3), 33.23 (C-3), 39.68 (Lys-C-6), 40.70 (Leu-C-3), 43.56 (C-2), 52.05 (Leu-C-2), 53.99 (Lys-C-2), 58.25 (Val-C-2), 79.08 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 81.75 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.49 (Boc-N(C=O)O), 158.21 (N(C=O)N), 172.49 (Lys-C-1), 172.42 (Leu-C-1), 173.33 (Val-C-1), 201.10 (C-1).

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 614.49 [M+H]<sup>+</sup>.

 $C_{30}H_{55}N_5O_8$  (613.80)

Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68**

Der Val-Lys-Leu-Aldehyd **70** (69.4 mg, 133  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und der Nucleosid-Baustein **33a** (66.2 mg, 133  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurden in abs. THF (22 mL) mit Molekularsieb (4 Å) vorgelegt und für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Amberlyst 15 (6.0 mg, 28  $\mu\text{mol}$ , 0.2 Äq) und Natriumtriacetoxyborhydrid (52 mg, 0.25 mmol, 1.9 Äq) wurde für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (DCM:MeOH 96:4) wurde die geschützte Zwischenstufe der 5'-Desoxy-Muraymycin-Referenzverbindung **68** erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.37$  (DCM:MeOH 9:1).

Das geschützte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **68** wurde in 80%iger wässriger TFA-Lösung (4.5 mL) für 26 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde unter reduziertem Druck eingengt, mit Wasser (3 mL) verdünnt und gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels semi-präparativer HPLC (C18-Säule).

**Ausbeute:** 91.7 mg (94.5  $\mu\text{mol}$ , 71%) als farbloser Feststoff.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 25.8$  min (Methode 5).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.81 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3 H, Leu-5-H), 0.86 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3 H, Leu-5-H), 0.91 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 0.91 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.32-1.46 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.47-1.69 (m, 6 H, Leu-3-H, Leu-4-H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.69-1.79 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.82-1.93 (m, 2 H, 2''-H), 2.11 (dq,  $J = 12.2$  Hz,  $J = 6.9$  Hz, 1 H, Val-3-H), 2.28-2.38 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.47 (ddd,  $J = 15.1$  Hz,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 2.7$  Hz, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.94 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.03-3.11 (m, 2 H, 1''-H), 3.15-3.32 (m, 2 H, 3''-H), 4.03-4.09 (m, 3 H, Val-2-H, 3'-H, 6'-H), 4.10-4.16 (m, 2 H, Lys-2-H, 4'-H), 4.19-4.24 (m, 1 H, Leu-2-H), 4.40 (dd,  $J = 5.5$  Hz,  $J = 3.9$  Hz, 1 H, 2'-H), 5.70 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.83 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 5-H), 7.59 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.06 (Val-C-4), 18.57 (Val-C-4), 20.72 (Leu-C-5), 22.14 (Lys-C-4), 22.18 (Leu-C-5), 24.48 (Leu-C-4), 25.67 (C-2''), 26.35 (Lys-C-5), 30.03 (Val-C-3), 30.80

(Lys-C-3), 32.25 (C-5'), 36.04 (C-3''), 39.30 (Lys-C-6), 39.58 (Leu-C-3), 44.28 (C-1''), 52.64 (Leu-C-2), 54.27 (Lys-C-2), 57.91 (Val-C-2), 58.92 (C-6'), 72.64 (C-2'), 73.05 (C-3'), 79.43 (C-4'), 91.91 (C-1'), 102.33 (C-5), 142.86 (C-6), 151.47 (C-2), 159.60 (N(C=O)N), 166.23 (C-4), 170.78 (C-7'), 175.01 (Leu-C-1), 175.54 (Lys-C-1), 176.68 (Val-C-1).

$^{19}\text{F-NMR}$  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.60.

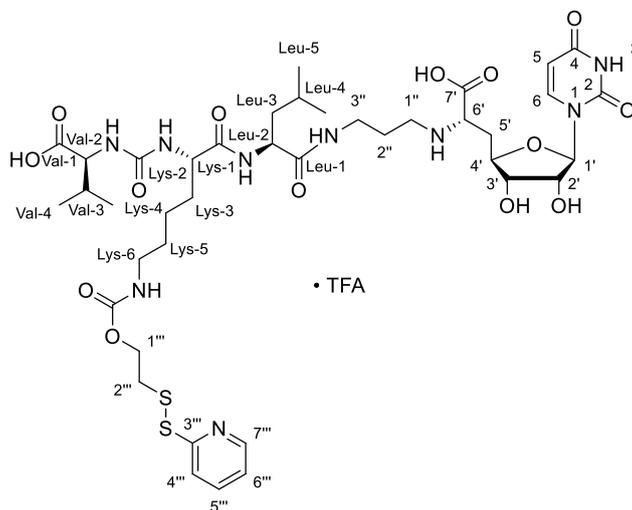
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 743.40 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{N}_8\text{O}_{12}^+$ : 743.3934, gef.: 743.3912.

$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{F}_6\text{N}_8\text{O}_{16}$  (970.87)

### 7.2.3.2 Synthese von PySS-Carbamat-Linker-modifizierten Muraymycin-Analogen 79

#### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen 79



79

5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **68** (21.0 mg, 21.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA q}$ ) und der 4-Nitrophenyl-2-(pyridin-2-ylidysulfanyl)ethylcarbonat-Linker **80** (10.3 mg, 29.2  $\mu\text{mol}$ , 1.4  $\text{\AA q}$ ) wurden in abs. DMF (3 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von *N,N*-Diisopropylethylamin (12  $\mu\text{L}$ , 42 mmol, 2.0  $\text{\AA q}$ ) wurde für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Wasser (20 mL) zugegeben und das Lösungsmittel über Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC (C18-Säule) gereinigt.

**Ausbeute:** 9.7 mg (9.1  $\mu\text{mol}$ , 42%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_r$  = 23.7 min (Methode 7).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.90 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3 H, Leu-5-H), 0.93-0.97 (m, 6 H, Leu-5-H, Val-4-H), 0.99 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 1.27-1.47 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.51 (dt,

$J = 13.9$  Hz,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, Leu-3-H), 1.56-1.71 (m, 4 H, Leu-4-H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.72-1.81 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.86-1.95 (m, 2 H, 2''-H), 2.12-2.22 (m, 1 H, Val-3-H), 2.29-2.38 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.41-2.49 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 3.05 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2 H, 2'''-H), 3.07-3.13 (m, 4 H, 1''-H, Lys-6-H), 3.16-3.24 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.35-3.42 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 4.00-4.03 (m, 1 H, 3'-H), 4.04-4.10 (m, 2 H, 6'-H, Val-2-H), 4.12-4.16 (m, 1 H, 4'-H), 4.16-4.20 (m, 1 H, Lys-2-H), 4.25 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2 H, 1'''-H), 4.29 (dd,  $J = 9.9$  Hz,  $J = 5.2$  Hz, 1 H, Leu-2-H), 4.36 (dd,  $J = 5.7$  Hz,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 2'-H), 5.69 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.71 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5-H), 7.22-7.25 (m, 1 H, 6'''-H), 7.60 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H), 7.79-7.84 (m, 1 H, 4'''-H), 7.86-7.89 (m, 1 H, 5'''-H), 8.40 (d,  $J = 4$  Hz, 1 H, 7'''-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = 18.13 (Val-C-4), 19.86 (Val-C-4), 21.86 (Leu-C-5), 23.64 (Lys-C-4), 24.12 (Leu-C-5), 26.16 (Leu-C-4), 27.55 (C-2''), 30.65 (Lys-C-5), 32.10 (Val-C-3), 32.99 (Lys-C-3), 33.89 (C-5'), 36.93 (C-2'''), 39.17 (C-3''), 41.24 (Lys-C-6), 41.60 (Leu-C-3), 45.25 (C-1''), 53.75 (Leu-C-2), 56.31 (Lys-C-2), 59.07 (Val-C-2), 59.68 (C-6'), 63.57 (C-1'''), 74.18 (C-2'), 75.00 (C-3'), 81.04 (C-4'), 94.61 (C-1'), 103.17 (C-5), 121.38 (C-4'''), 122.62 (C-6'''), 139.43 (C-5'''), 144.09 (C-6), 150.49 (C-7'''), 152.25 (C-2), 158.77 (N(C=O)O), 160.97 (N(C=O)N), 161.35 (C-3'''), 166.20 (C-4), 170.98 (C-7'), 175.89 (Leu-C-1), 176.08 (Lys-C-1), 176.31 (Val-C-1).

**<sup>19</sup>F-NMR** (376 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  [ppm] = -76.97.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -80.0$  (c = 1 mg/mL, MeOH).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3337, 2961, 2873, 1668, 1553, 1419, 1199, 1134, 719, 418.

**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 56:44):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 202, 239, 262.

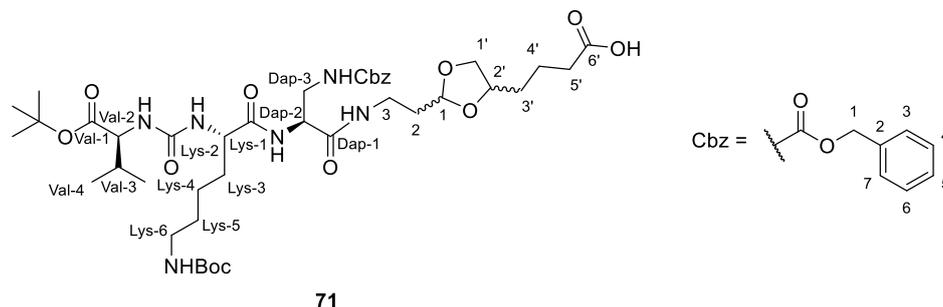
**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 956.68 [M+H]<sup>+</sup>, 478,87 [M+2H]<sup>2+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>40</sub>H<sub>62</sub>N<sub>9</sub>O<sub>14</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup>: 956.3852, gef.: 956.38417.

**C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>F<sub>3</sub>N<sub>9</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>** (1070.12)

## 7.2.3.3 Synthese des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 65

## Festphasensynthese der Val-Lys-DAP-Peptidkette 71



2-Chlortrityl-Harz **163** (130 mg, 141  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in abs. DCM (4 mL) für 2 h gequellt. Nach Zugabe des Linkers **133** (70.0 mg, 165  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (75.0  $\mu\text{L}$ , 54.5 mg, 422  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq) wurde für 21.5 h in abs. DCM (3 mL) bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum Waschen wurde die Spritze mehrfach mit DMF und DCM gespült (jeweils zweimal mit 5x3 mL DMF und 5x3 mL DCM). Zum Capping wurde mit DCM:MeOH:DIPEA (17:2:1, 3 mL) 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum Waschen wurde die Spritze erneut mehrfach mit DCM und DMF gespült (jeweils zweimal mit 5x3 mL DCM und 5x3 mL DMF). Dieser Waschschritt wurde nachfolgend nach jeder Fmoc-Entschützung und jedem Kupplungs-schritt wiederholt.

Nachfolgend wurde die erste Fmoc-Entschützung mit 20% Piperidin in DMF (4 mL) für 20 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die erste Peptidkupplung erfolgte mit Fmoc-DAP(Z)-OH (195 mg, 423  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq), HBTU (160 mg, 422  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (150  $\mu\text{L}$ , 109 mg, 846  $\mu\text{mol}$ , 6.0 Äq) in abs. DMF (4 mL) für 22 h bei Raumtemperatur. Nach erneuter Fmoc-Entschützung und Waschen erfolgte die zweite Peptidkupplung mit *N* <sup>$\alpha$</sup> -Fmoc-*N* <sup>$\epsilon$</sup> -Boc-L-Lysin (198 mg, 423  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq), HBTU (160 mg, 422  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (150  $\mu\text{L}$ , 109 mg, 846  $\mu\text{mol}$ , 6.0 Äq) in abs. DMF (4 mL) für 23 h bei Raumtemperatur. Nach der letzten Fmoc-Entschützung erfolgte die Kupplung mit Valin-Carbamat **135** (120 mg, 355  $\mu\text{mol}$ , 2.5 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (150  $\mu\text{L}$ , 109 mg, 846  $\mu\text{mol}$ , 6.0 Äq) in abs. DMF (4 mL) für 21 h bei Raumtemperatur. Zur Abspaltung der Peptidkette vom Harz wurde eine Lösung von 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol in DCM (20%, 4 mL) zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Es wurde mit DCM (15x4 mL) gewaschen und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten (DCM:MeOH 95:5).

**Ausbeute:** 89.9 mg (106  $\mu\text{mol}$ , 75%) als eine Mischung von Diastereomeren eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.27$  (MeOH:DCM 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.91 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 0.94 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.28-1.53 (m, 4 H, Lys-4-H, 3'-H), 1.43 (s, 9 H, Boc-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.54-1.68 (m, 4 H, Lys-5-H, 4'-H), 1.69-1.79 (m, 2 H, Lys-3-H), 1.79-1.90 (m, 2 H, 2-H), 2.03-2.13 (m, 1 H, Val-3-H), 2.28-2.33 (m, 2 H, 5'-H), 3.03 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.22-3.34 (m, 2 H, 3-H), 3.38-3.59 (m, 3 H, Dap-3-H, 1'-H<sub>a</sub>), 3.90 (dd,  $J = 7.3$  Hz, 1 H, 2'-H), 3.98-4.13 (m, 3 H, Val-2-H, Lys-2-H, 1'-H<sub>b</sub>), 4.37-4.42 (m, 1 H, Dap-2-H), 4.91-5.02 (m, 1 H, 1-H), 5.04-5.14 (m, 2 H, Cbz-1-H), 7.27-7.40 (m, 5 H, Cbz-3-H, Cbz-4-H, Cbz-5-H, Cbz-6-H, Cbz-7-H).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -12.5$  ( $c = 2.4$  mg/mL, MeOH).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3297, 2933, 2873, 1692, 1631, 1541, 1366, 1252, 1141, 696.

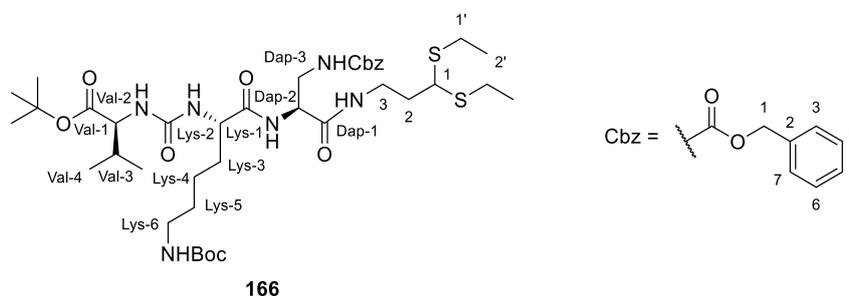
**UV** (*i*PrOH):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 217.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 851.61$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>): ber. für C<sub>41</sub>H<sub>65</sub>N<sub>6</sub>O<sub>13</sub><sup>-</sup>: 849.4615, gef.: 849.4598.

**C<sub>41</sub>H<sub>66</sub>N<sub>6</sub>O<sub>13</sub>** (851.01)

### Synthese von Val-Lys-DAP-Dithioacetal 166



Die Val-Lys-DAP-Peptidkette **71** (200 mg, 236  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und Ethanthiol (260  $\mu\text{L}$ , 218 mg, 3.52 mmol, 15 Äq) wurden in DCM (40 mL) vorgelegt. Nach langsamer Zugabe von Bortrifluorid-diethyletherat (2.0  $\mu\text{L}$ , 16  $\mu\text{mol}$ , 0.1 Äq, gelöst in 2 mL DCM) wurde für 6 d bei Raumtemperatur gerührt. *N,N*-Diisopropylethylamin (140  $\mu\text{L}$ , 106 mg, 823  $\mu\text{mol}$ , 3.5 Äq) wurde zugegeben, die Reaktionslösung für 5 min bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Anschluss unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 98:2).

**Ausbeute:** 151 mg (183  $\mu\text{mol}$ , 77%) eines farblosen, bis leicht gelblichen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.57$  (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, Val-4-H), 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 1.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 6 H, H-2'), 1.31-1.41 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.40-1.49 (m, 2 H, Lys-5-H), 1.46 (s, 18 H, Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.64-1.74 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.74-1.83 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.95-2.05 (m, 2 H, H-2), 2.10 (dd, *J* = 11.8 Hz, *J* = 6.5 Hz, 1 H, Val-3-H), 2.53-2.73 (m, 4 H, 1'-H), 2.99-3.18 (m, 2 H, Lys-6-H), 3.25-3.33 (m, 1 H, 3-H<sub>a</sub>), 3.10-3.61 (m, 3 H, 3-H<sub>b</sub>, Dap-3-H), 3.85 (t, *J* = 7.1 Hz, 1 H, 1-H), 4.00-4.08 (m, 1 H, Lys-2-H), 4.34 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 4.6 Hz, 1 H, Val-2-H), 4.46-4.53 (m, 1 H, Dap-2-H), 4.88-4.96 (m, 1 H, Boc-NH), 4.99-5.16 (m, 2 H, Cbz-1-H), 5.64-5.73 (m, 2 H, Val-NH, Dap-3-NH), 5.95-6.03 (m, 1 H, Lys-NH), 7.28-7.38 (m, 5 H, Cbz-3-H, Cbz-4-H, Cbz-5-H, Cbz-6-H, Cbz-7-H), 7.50-7.56 (m, 1 H, 3-NH), 7.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, Dap-2-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.45 (C-2'), 17.39 (Val-C-4), 19.04 (Val-C-4), 21.95 (Lys-C-4), 24.14 (C-1'), 24.26 (C-1'), 28.04 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.51 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.74 (Lys-C-5), 30.59 (Val-C-3), 31.54 (Lys-C-3), 35.35 (C-2), 37.75 (C-3), 39.29 (Lys-C-6), 42.45 (Dap-C-3), 48.73 (C-1), 54.93 (Dap-C-2), 55.47 (Lys-C-2), 58.09 (Val-C-2), 66.89 (Cbz-C-1), 79.34 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 81.84 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.75 (Cbz-C-3, Cbz-C-7), 128.14 (Cbz-C-5), 128.51 (Cbz-C-4, Cbz-C-6), 136.17 (Cbz-C-2), 156.67 (Cbz-C-1), 157.94 (Boc-N(C=O)O), 158.46 (N(C=O)N), 169.74 (Lys-C-1), 172.10 (Dap-C-1), 173.47 (Val-C-1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -21.4$  (*c* = 1.9 mg/mL, MeOH).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3289, 2931, 1694, 1629, 1539, 1366, 1267, 1158, 695, 641.

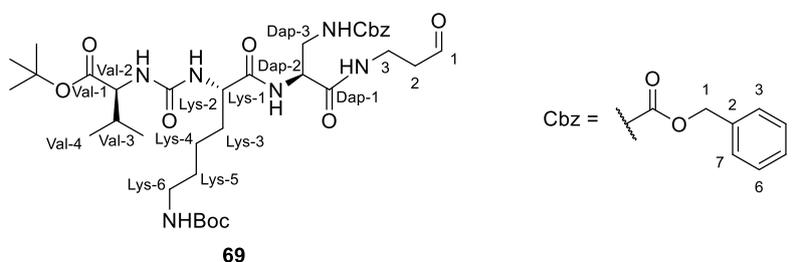
**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 206.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 827.59 [M+H]<sup>+</sup>, 849.56 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>39</sub>H<sub>67</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup>: 827.44055, gef.: 827.43980.

**C<sub>39</sub>H<sub>66</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>** (827.11)

### Synthese von Val-Lys-DAP-Aldehyd **69**



Das Val-Lys-DAP-Dithioacetal **166** (205 mg, 248 μmol, 1.0 Äq) wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril, Wasser und Aceton (MeCN:H<sub>2</sub>O:Aceton 8:2:1, 40 mL) gelöst und auf

0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 2,6-Lutidin (460 µL, 425 mg, 3.97 mmol, 16 Äq) und *N*-Bromsuccinimid (352 mg, 1.98 mmol, 8.0 Äq) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 7 min gerührt. Im Anschluss wurde gesättigte, wässrige Natriumthiosulfat-Lösung (60 mL) zugegeben und für 4 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit DCM (3x120 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 95:5).

**Aubeute:** 131 mg (182 µmol, 73%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.35$  (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.85 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 0.91 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.18-1.48 (m, 4 H, Lys-4-H, Lys-5-H), 1.45 (s, 9 H, Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.46 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.62-1.85 (m, 2 H, Lys-3-H), 1.98-2.15 (m, 1 H, Val-3-H), 2.66 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2 H, 2-H), 2.98-3.19 (m, 2 H, Lys-6-H), 3.27-3.39 (m, 1 H, Dap-3-H<sub>a</sub>), 3.42-3.50 (m, 1 H, 3-H<sub>a</sub>), 3.50-3.62 (m, 2 H, 3-H<sub>b</sub>, Dap-3-H<sub>b</sub>), 4.04-4.14 (m, 1 H, Lys-2-H), 4.29 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 4.1$  Hz, 1 H, Val-2-H), 4.47-4.55 (m, 1 H, Dap-2-H), 4.99 (bs, 1 H, Boc-NH), 5.00-5.14 (m, 2 H, Cbz-1-H), 5.72-5.85 (m, 2 H, Val-NH, Dap-3-NH), 6.05-6.13 (m, 1 H, Lys-NH), 7.28-7.40 (m, 5 H, Cbz-3-H, Cbz-4-H, Cbz-5-H, Cbz-6-H, Cbz-7-H), 7.62-7.69 (m, 1 H, 3-NH), 7.70 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H, Dap-2-NH), 9.73 (s, 1 H, 1-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 17.49 (Val-C-4), 18.99 (Val-C-4), 22.02 (Lys-C-4), 28.04 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.50 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.67 (Lys-C-5), 30.89 (Val-C-3), 31.47 (Lys-C-3), 33.31 (C-3), 39.38 (Lys-C-6), 42.36 (Dap-C-3), 43.31 (C-2), 54.82 (Dap-2-C), 55.35 (Lys-C-2), 58.22 (Val-C-2), 66.85 (Cbz-C-1), 79.27 (Boc-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 81.84 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.77 (Cbz-C-3, Cbz-C-7), 128.11 (Cbz-C-5), 128.50 (Cbz-C-4, Cbz-C-6), 136.26 (Cbz-C-2), 156.64 (Boc-NC(=O)O), 157.85 (Cbz-N(C=O)O), 158.54 (N(C=O)N), 170.06 (Lys-C-1), 172.10 (Dap-C-1), 173.57 (Val-C-1), 201.01 (C-1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -80.0$  ( $c = 1.5$  mg/mL, MeOH).

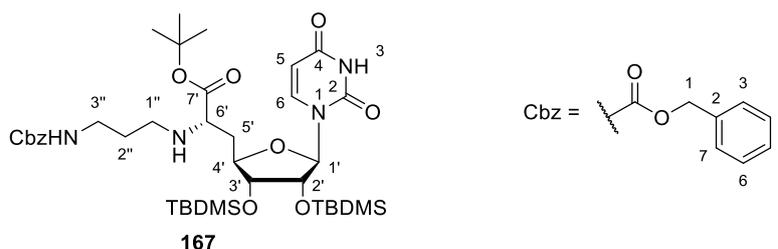
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3295, 2972, 2932, 1693, 1679, 1630, 1540, 1257, 1158, 753.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 209.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 721.51$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>35</sub>H<sub>57</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup>: 721.4131, gef.: 721.4110.

**C<sub>35</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>** (720.87)

Synthese des geschützten (6'*S*)-Diamins **167**

Die (6'*S*)-Nucleosyl-Aminosäure **33a** (266 mg, 454  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in abs. THF (10 mL) mit frisch aktiviertem Molekularsieb (4 Å) vorgelegt. Nach Zugabe von *N*-Benzyloxycarbonyl-3-aminopropanal **38** (92.0 mg, 444  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Amberlyst 15 (20 mg, 94  $\mu\text{mol}$ , 0.2 Äq) und Natriumtriacetoxymborhydrid (190 mg, 897  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äq) wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und der Rückstand mit Ethylacetat (5x50 mL) gründlich gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM:MeOH 98:2).

**Ausbeute:** 297 mg (382  $\mu\text{mol}$ , 84%) als farbloser Feststoff.

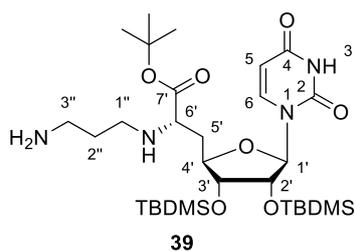
**DC:**  $R_f = 0.32$  (DCM:MeOH 96:4).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -0.01 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.03 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.06 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.83 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.87 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.40 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47-1.58 (m, 2 H, 2''-H), 1.87 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, 5'-H), 1.93-2.02 (m, 1 H, 6'-NH), 2.33-2.41 (m, 1 H, 1''-H<sub>a</sub>), 2.48-2.54 (m, 1 H, 1''-H<sub>b</sub>), 2.98-3.07 (m, 2 H, 3''-H), 3.11 (dd,  $J = 6.1$  Hz, 1 H, 6'-H), 3.84-3.91 (m, 2 H, 3'-H, 4'-H), 4.33 (t,  $J = 4.7$  Hz, 1 H, 2'-H), 4.99 (s, 2 H, Cbz-1-H), 5.68 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, 5-H), 5.70 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, 1'-H), 7.21 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1 H, 3''-NH), 7.27-7.37 (m, 5 H, Cbz-3-H, Cbz-4-H, Cbz-5-H, Cbz-6-H, Cbz-7-H), 7.61 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -4.32 (SiCH<sub>3</sub>), -4.27 (SiCH<sub>3</sub>), -4.27 (SiCH<sub>3</sub>), -3.85 (SiCH<sub>3</sub>), 19.03 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.09 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.54 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.61 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.57 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.04 (C-2''), 38.12 (C-5'), 39.83 (C-3''), 46.21 (C-1''), 60.91 (C-6'), 67.49 (Cbz-C-1), 76.04 (C-2'), 76.70 (C-3'), 82.74 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83.06 (C-4'), 91.99 (C-1'), 103.15 (C-5), 128.92 (Cbz-C-3, Cbz-C-7), 129.08 (Cbz-C-5), 129.61 (Cbz-C-4, Cbz-C-6), 138.60 (Cbz-C-2), 142.85 (C-6), 152.30 (C-2), 159.09 (NC(=O)O), 166.89 (C-4), 174.30 (C-7').

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 777.31$  [M+H]<sup>+</sup>.

**C<sub>38</sub>H<sub>64</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>** (777.12)

Synthese von (6'S)-Diamin **39**

Die geschützte (6'S)-Nucleosyl-Aminosäure **167** (185 mg, 238  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in abs. *iso*-Propanol (5 mL) gelöst, mit Palladium Black (ca. 5 mg) und 1,4-Cyclohexadien (200  $\mu\text{L}$ , 2.11 mmol, 9.0 Äq) versetzt und für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde nach Spritzenfiltration erhalten und ohne weitere Reinigung in den nachfolgenden Reaktionen umgesetzt.

**Ausbeute:** 153 mg (238  $\mu\text{mol}$ , quant.) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.15$  (DCM:MeOH 9:1).

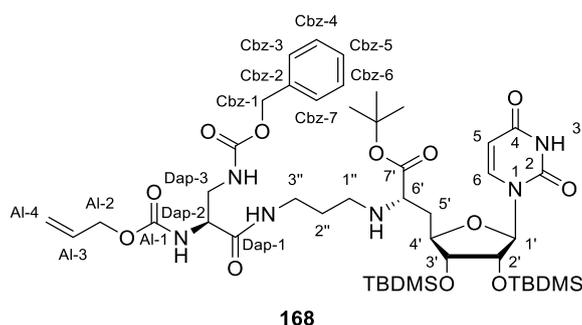
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.08 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.10 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.12 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.13 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.91 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.93 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.49 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.58-1.72 (m, 2 H, 2''-H), 1.87-1.94 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.00-2.07 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.55-2.61 (m, 1 H, 1''-H<sub>a</sub>), 2.61-2.69 (m, 1 H, 1''-H<sub>a</sub>), 2.74 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, 3''-H), 3.31-3.35 (m, 1 H, 6'-H), 3.90 (dd,  $J = 4.7$  Hz, 1 H, 3'-H), 4.04-4.09 (m, 1 H, 4'-H), 4.38 (t,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, 2'-H), 5.73 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5-H), 5.74 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, 1'-H), 7.62 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = -4.34 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.28 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.28 ( $\text{SiCH}_3$ ), -3.85 ( $\text{SiCH}_3$ ), 19.03 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.10 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.55 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.60 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.55 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 32.88 (C-2''), 38.16 (C-5'), 40.82 (C-3''), 46.73 (C-1''), 60.94 (C-6'), 75.84 (C-2'), 76.79 (C-3'), 82.84 (C-4'), 83.01 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 92.57 (C-1'), 103.17 (C-5), 142.98 (C-6), 153.13 (C-2), 167.57 (C-4), 175.11 (C-7').

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 643.31$  [M+H]<sup>+</sup>.

**$\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_7\text{Si}_2$**  (642.99)

### Synthese des verkürzten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 168



#### Variante 1:

$N^\alpha$ -Alloc- $N^\beta$ -Cbz-L-2,3-diaminopropionsäure **67** (155 mg, 481  $\mu$ mol, 1.2 Äq), PyBOP (216 mg, 416  $\mu$ mol, 1.0 Äq), HOBt (56.2 mg, 416  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und  $N,N$ -Diisopropylethylamin (146  $\mu$ L, 108 mg, 838  $\mu$ mol, 2.0 Äq) wurden in abs. THF (5 mL) gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Kühlung auf 0°C erfolgte die Zugabe des (6'S)-Diamins **39** (265 mg, 412  $\mu$ mol, 1.0 Äq) gelöst in abs. THF (3 mL). Nach langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde für 4 d gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH von 98:2 -> 96:4).

**Ausbeute:** 336 mg als farbloser Feststoff mit Tris-(pyrrolidinphosphin)-oxid **185** als Verunreinigung.

#### Variante 2:

$N^\alpha$ -Alloc- $N^\beta$ -Cbz-L-2,3-diaminopropionsäure **67** (77.0 mg, 238  $\mu$ mol, 1.0 Äq), EDC-Hydrochlorid (46.0 mg, 238  $\mu$ mol, 1.0 Äq), HOBt (32.0 mg, 238  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und  $N,N$ -Diisopropylethylamin (62.0  $\mu$ L, 357  $\mu$ mol, 1.5 Äq) wurden in abs. THF (10 mL) vorgelegt. Nach Kühlen auf 0 °C wurde das (6'S)-Diamin **39** (153 mg, 238  $\mu$ mol, 1.0 Äq) zugegeben und nach erneutem Erwärmen auf Raumtemperatur für 25 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH von 100% DCM -> 96:4).

**Ausbeute:** 181 mg (191  $\mu$ mol, 80%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.24$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.08 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.10 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.12 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.13 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.90 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.93 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.48 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.67 (quin,  $J = 6.8$  Hz, 2 H, 2''-H), 1.87-1.96 (m, 1 H, 5'- $\text{H}_a$ ), 2.00-2.07 (m, 1 H, 5'- $\text{H}_b$ ), 2.45-2.58 (m, 1 H, 1''- $\text{H}_a$ ), 2.58-2.67 (m, 1 H, 1''- $\text{H}_b$ ), 3.17-3.30 (m, 2 H, 3''-H), 3.32-3.41 (m, 2 H, 6'-H, Dap-3- $\text{H}_a$ ), 3.44-3.51 (m, 1 H, Dap-3- $\text{H}_b$ ), 3.90 (dd,  $J = 4.7$  Hz, 1 H, 3'-H), 4.03-4.08 (m,

1 H, 4'-H), 4.21 (dd,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, Dap-2-H), 4.33 (dd,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, 2'-H), 4.48-4.59 (m, 2 H, Alloc-2-H), 5.07-5.10 (m, 2 H, Cbz-1-H), 5.18 (dd,  $J = 10.6$  Hz,  $J = 1.4$  Hz, 1 H, Alloc-4-H<sub>a</sub>), 5.30 (dd,  $J = 17.2$  Hz,  $J = 1.4$  Hz, 1 H, Alloc-4-H<sub>b</sub>), 5.74 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 5-H), 5.75 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.87-5.97 (m, 1 H, Alloc-3-H), 7.25-7.40 (m, 5 H, Cbz-3-H, Cbz-4-H, Cbz-5-H, Cbz-6-H, Cbz-7-H), 7.65 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 6-H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = -4.30 (SiCH<sub>3</sub>), -4.26 (SiCH<sub>3</sub>), -4.24 (SiCH<sub>3</sub>), -3.84 (SiCH<sub>3</sub>), 19.02 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.08 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.54 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.61 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.61 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.32 (C-2''), 38.19 (C-5'), 38.54 (C-3''), 43.76 (Dap-C-3), 46.19 (C-1''), 57.13 (Dap-C-2), 60.83 (C-6'), 66.96 (Alloc-C-2), 67.79 (Cbz-C-1), 76.00 (C-2'), 76.73 (C-3'), 82.72 (C-4'), 83.07 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 92.10 (C-1'), 103.17 (C-5), 117.97 (Alloc-C-4), 128.97 (Cbz-C-3, Cbz-C-7), 129.15 (Cbz-C-5), 129.62 (Cbz-C-4, Cbz-C-6), 134.37 (Alloc-C-3), 138.37 (Cbz-C-2), 142.93 (C-6), 152.27 (C-2), 158.27 (Cbz-N(C=O)O), 159.30 (Alloc-C-1), 166.20 (C-4), 172.67 (C-7'), 174.92 (Dap-C-1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -16.0$  ( $c = 7.5$  mg/mL, MeOH).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2953, 2930, 2857, 1683, 1454, 1367, 1251, 1153, 836, 775.

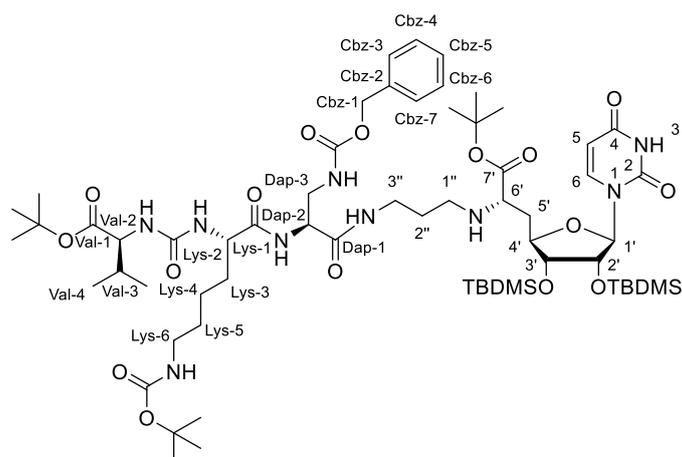
**UV (MeOH):**  $\lambda_{\max}$  [nm] = 260.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 947.77$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS:** ber. für C<sub>45</sub>H<sub>75</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup>: 947.4976, gef.: 947.4944.

**C<sub>45</sub>H<sub>74</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>Si<sub>2</sub>** (947.29)

### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen 65



65

Variante 1:

Das verkürzte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **168** (108 mg, 114  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq), Phenylsilan (300  $\mu\text{L}$ , 263 mg, 2.43 mmol, 21 Äq) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (Spatel­spitze, kat.) wurden unter Lichtausschluss in abs. DCM (10 mL) gelöst und für 19.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das erhaltene Zwischenprodukt ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

Das Harnstoffdipeptid **41** (52.0 mg, 117  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq), PyBOP (59.3 mg, 114  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq), HOBT (15.4 mg, 114  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq), und *N,N*-Diisopropylethylamin (36  $\mu\text{L}$ , 27 mg, 0.21 mmol, 1.8 Äq) wurden in abs. THF (10 mL) vorgelegt und für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das verkürzte Alloc-entschützte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **168** (98.0 mg, 114  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq), gelöst in abs. THF (5 mL), zugegeben und das Reaktionsgemisch für 25 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (100% DCM  $\rightarrow$  DCM:MeOH 98:2).

**Ausbeute:** 110 mg (85.2  $\mu\text{mol}$ , 75%) als farbloser Feststoff.

Variante 2:

Der Val-Lys-DAP-Aldehyd **69** (130 mg, 180  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und der Nucleosid-Baustein **33a** (106 mg, 180  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurden in abs. THF (22 mL) und Molekularsieb (4 Å) vorgelegt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 25 h wurden Amberlyst 15 (8.4 mg, 39  $\mu\text{mol}$ , 0.2 Äq) und Natriumtriacetoxyborhydrid (80 mg, 0.38 mmol, 2.1 Äq) zugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert, der Rückstand mit Ethylacetat gewaschen und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM:MeOH 98:2  $\rightarrow$  95:5).

**Ausbeute:** 204 mg (158  $\mu\text{mol}$ , 88%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.39$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.08 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.10 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.12 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.13 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.91 (s, 9 H  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.93 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.84-0.97 (m, 6 H, Val-4-H), 1.25-1.52 (m, 4 H, Lys-4-H, Lys-5-H), 1.43 (s, 9 H,  $\text{Boc-OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.48 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.49 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.53-1.80 (m, 4 H, Lys-3-H, 2''-H), 1.89-2.14 (m, 3 H, 5'-H, Val-3-H), 2.55-2.72 (m, 2 H, 1''-H), 3.03 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.12-3.19 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.32-3.38 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 3.39-3.53 (m, 3 H, Dap-3-H, 6'-H), 3.92 (dd,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, 3'-H), 4.01 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1 H, Lys-2-H), 4.05-4.12 (m, 2 H, Val-2-H, 4'-H), 4.33-4.42 (m,

2 H, 2'-H, Dap-2-H), 5.04-5.15 (m, 2 H, Cbz-1-H), 5.73-5.75 (m, 1 H, 1'-H), 5.75 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5-H), 7.26-7.39 (m, 5 H, Cbz-3-H, Cbz-4-H, Cbz-5-H, Cbz-6-H, Cbz-7-H), 7.65 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 6-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = -4.29 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.24 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.24 ( $\text{SiCH}_3$ ), -3.85 ( $\text{SiCH}_3$ ), 18.19 (Val-C-4), 19.03 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.10 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.83 (Val-C-4), 24.23 (Lys-C-4), 26.55 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.61 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.52 ( $\text{Boc-OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.60 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.98 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 30.00 (Lys-C-5), 30.76 (C-2''), 32.45 (Val-C-3), 32.98 (Lys-C-3), 37.72 (C-5'), 38.27 (C-3''), 41.27 (Lys-C-6), 43.40 (Dap-C-3), 45.91 (C-1''), 56.32 (Lys-C-2), 56.44 (Dap-C-2), 60.14 (Val-C-2), 60.57 (C-6'), 67.85 (Cbz-C-1), 75.79 (C-2'), 76.73 (C-3'), 80.00 (C-4'), 82.68 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 82.79 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 83.40 ( $\text{Boc-OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 92.49 (C-1'), 103.19 (C-5), 128.88 (Cbz-C-3, Cbz-C-7), 129.21 (Cbz-C-5), 129.67 (Cbz-C-4, Cbz-C-6), 138.28 (Cbz-C-2), 143.23 (C-6), 152.27 (C-2), 158.66 ( $\text{Boc-N}(\text{C}=\text{O})\text{O}$ ), 159.81 (Cbz-N( $\text{C}=\text{O}$ )O), 160.81 ( $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{N}$ ), 166.22 (C-4), 172.10 (C-7'), 173.35 (Lys-C-1, Dap-C-1), 176.05 (Val-C-1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -22.5$  ( $c = 4$  mg/mL, MeOH).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3304, 2930, 2857, 1691, 1536, 1366, 1250, 1152, 837, 776.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 260.

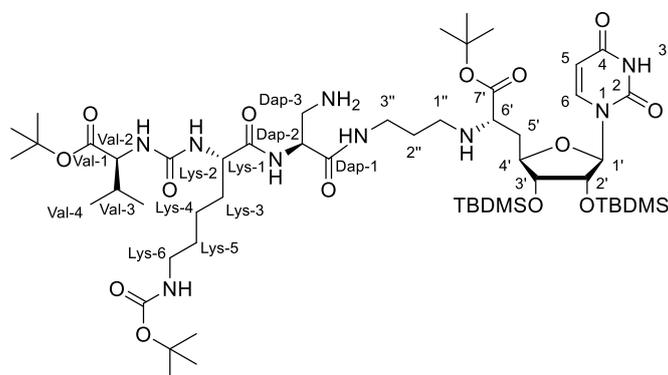
**MS** ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z = 1290.56$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

**HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ): ber. für  $\text{C}_{62}\text{H}_{108}\text{N}_9\text{O}_{16}\text{Si}_2^+$ : 1290.7447, gef.: 1290.7431.

**$\text{C}_{62}\text{H}_{107}\text{N}_9\text{O}_{16}\text{Si}_2$**  (1290.76)

### 7.2.3.4 Synthese der Seitenketten-modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga

#### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen 64



64

5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **65** (52 mg, 40  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq), Palladium Black (ca. 10 mg) und 1,4-Cyclohexadien (0.10 mL, 86 mg, 1.1 mmol, 28 Äq) wurden in abs. *iso*-Propanol (8 mL) 4 h

bei Raumtemperatur gerührt. Nach Spritzenfiltration und Waschen mit Ethylacetat wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt **64** wurde ohne weitere Reinigungsschritte in den nachfolgenden Reaktionen umgesetzt.

**Ausbeute:** 47 mg (40  $\mu$ mol, quant.) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.17$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.08 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.10 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.12 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.13 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.89-0.98 (m, 6 H, Val-4-H), 0.91 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.93 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.34-1.55 (m, 4 H, Lys-4-H, Lys-5-H), 1.43 (s, 9 H,  $\text{Boc-OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.47 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.49 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.58-1.83 (m, 4 H, Lys-3-H, 2''-H), 1.88-1.99 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.00-2.15 (m, 2 H, 5'-H<sub>b</sub>, Val-3-H), 2.47-2.60 (m, 1 H, 1''-H<sub>a</sub>), 2.61-2.71 (m, 1 H, 1''-H<sub>b</sub>), 3.00-3.11 (m, 1 H, Dap-3-H<sub>a</sub>), 3.04 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.19-3.34 (m, 3 H, Dap-3-H<sub>b</sub>, 3''-H), 3.36 (dd,  $J = 9.1$  Hz,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, 6'-H), 3.91 (dd,  $J = 4.6$  Hz, 1 H, 3'-H), 4.01 (dd,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 5.2$  Hz, 1 H, Lys-2-H), 4.04-4.10 (m, 2 H, Val-2-H, 4'-H), 4.37 (dd,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, 2'-H), 4.55 (dd,  $J = 7.9$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1 H, Dap-2-H), 5.76 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5-H), 5.77 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, 1'-H), 7.67 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = -4.29 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.25 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.25 ( $\text{SiCH}_3$ ), -3.85 ( $\text{SiCH}_3$ ), 18.16 (Val-C-4), 19.00 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.07 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.78 (Val-C-4), 24.33 (Lys-C-4), 26.55 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.61 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.51 ( $\text{Boc-OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.60 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.98 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 30.31 (Lys-C-5), 30.75 (C-2''), 32.28 (Val-C-3), 32.74 (Lys-C-3), 38.01 (C-5'), 38.55 (C-3''), 41.24 (Lys-C-6), 42.85 (Dap-C-3), 46.08 (C-1''), 53.50 (Dap-C-2), 56.27 (Lys-C-2), 60.23 (Val-C-2), 60.71 (C-6'), 75.83 (C-2'), 76.73 (C-3'), 80.01 (C-4'), 82.79 (2x  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 83.14 ( $\text{Boc-OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 92.26 (C-1'), 103.21 (C-5), 143.11 (C-6), 152.27 (C-2), 158.64 ( $\text{Boc-N}(\text{C}=\text{O})\text{O}$ ), 160.78 ( $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{N}$ ), 166.19 (C-4), 171.27 (C-7'), 173.36 (Lys-C-1), 174.67 (Dap-C-1), 176.57 (Val-C-1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -4.75$  ( $c = 2.1$  mg/mL, MeOH).

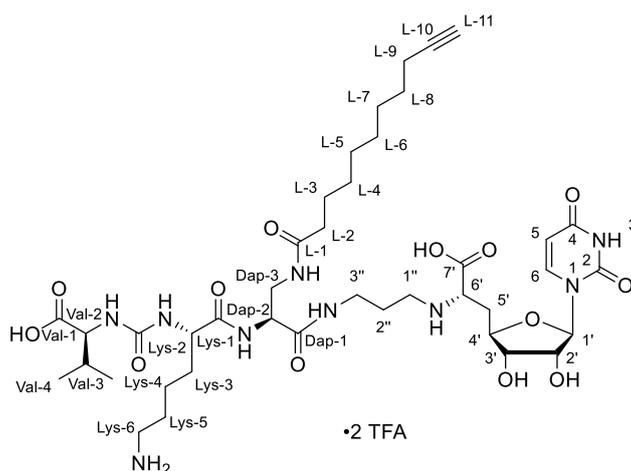
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2929, 1671, 1546, 1460, 1367, 1251, 1156, 836, 777.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 262.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 1156.41$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_{54}\text{H}_{103}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{Si}_2^{2+}$ : 578.8576, gef.: 578.8571.

$\text{C}_{54}\text{H}_{101}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{Si}_2$  (1156.62)

Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **63****63**

10-Undecinsäure **153** (11 mg, 61  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq), PyBOP (32 mg, 61  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq), HOBT (8.3 mg, 61  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (21  $\mu\text{L}$ , 0.12 mmol, 2.0 Äq) wurden in abs. THF (10 mL) vorgelegt und für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und das 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **64** (70 mg, 61  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) zugegeben. Nach langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde für 2 d gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 95:5).

**DC:**  $R_f = 0.35$  (DCM:MeOH 9:1).

Das Produkt wurde im Anschluss in wässriger 80%iger TFA-Lösung (6 mL) gelöst und für 25 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Wasser (6 mL) verdünnt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 39 mg (35  $\mu\text{mol}$ , 58% über zwei Schritte) als farbloser Feststoff.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 19.7$  min (Methode 7).

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  [ppm] = 0.93 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 0.95 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.18-1.28 (m, 6 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H), 1.30-1.38 (m, 2 H, L-3-H), 1.38-1.48 (m, 4 H, Lys-4-H, L-7-H), 1.48-1.55 (m, 2 H, L-8-H), 1.61-1.73 (m, 3 H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.74-1.84 (m, 1H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.89 (quin,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, 2''-H), 2.09-2.23 (m, 5 H, Val-3-H, L-2-H, L-9-H), 2.26-2.34 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.31 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1 H, L-11-H), 2.44 (ddd,  $J = 15.1$  Hz,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.97 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.08 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, 1''-H), 3.15-3.23 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.26-3.36 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 3.46 (dd,  $J = 14.5$  Hz,  $J = 7.3$  Hz, 1 H, Dap-3-H<sub>a</sub>), 3.60 (dd,  $J = 14.3$  Hz,  $J = 3.9$  Hz, 1 H, Dap-3-H<sub>b</sub>), 3.97-4.09 (m, 4 H, Val-2-H, Lys-2-H, 3'-H, 6'-H), 4.12-

4.17 (m, 1 H, 4'-H), 4.37 (dd,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 4.1$  Hz, 1 H, Dap-2-H), 4.40 (dd,  $J = 5.5$  Hz,  $J = 3.9$  Hz, 1 H, 2'-H), 5.73 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.85 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5-H), 7.62 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.28 (Val-C-4), 17.57 (L-C-9), 18.57 (Val-C-4), 22.11 (Lys-C-4), 25.47, 25.58 (C-2'', L-C-3), 26.29, 27.73, 27.95, 28.08, 28.18, 28.28 (L-C-4, L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-8, Lys-C-5), 30.00 (Val-C-3), 30.70 (Lys-C-3), 32.58 (C-5'), 35.71 (L-C-2), 36.20 (C-3''), 39.27 (Lys-C-6), 40.22 (Dap-C-3), 44.23 (C-1''), 54.71 (Dap-C-2), 54.80 (Lys-C-2), 58.95 (Val-C-2), 59.06 (C-6'), 69.09 (L-C-11), 72.69 (C-2'), 72.99 (C-3'), 79.73 (C-4'), 86.73 (L-C-10), 91.84 (C-1'), 102.29 (C-5), 115.25 (TFA- $\text{CF}_3$ ), 117.56 (TFA- $\text{CF}_3$ ), 142.84 (C-6), 151.44 (C-2), 159.84 (N(C=O)N), 162.89 (TFA-C=O), 163.18 (TFA-C=O), 166.22 (C-4), 171.48 (C-7'), 171.64 (L-C-1), 175.76 (Dap-C-1), 176.62 (Lys-C-1), 178.56 (Val-C-1).

$^{19}\text{F-NMR}$  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.59.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -25.0$  ( $c = 1.6$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3293, 3068, 2933, 2860, 1660, 1552, 1199, 1133, 800, 721.

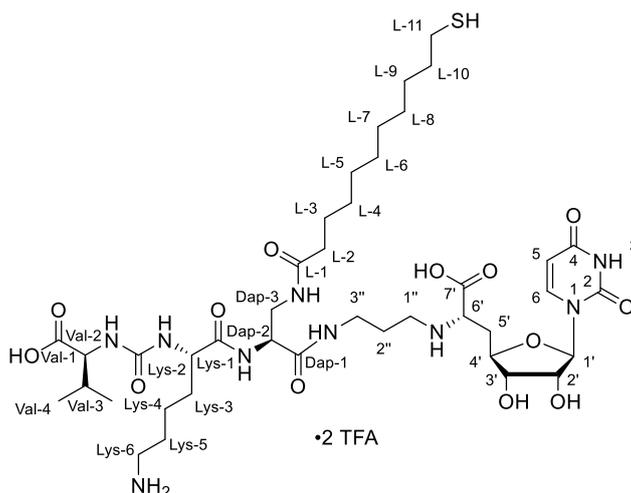
**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  65:35):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI $^+$ ):  $m/z = 880.57$  [M+H] $^+$ .

**HRMS** (ESI $^+$ ): ber. für  $\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{N}_9\text{O}_{13}^+$ : 880.4775, gef.: 880.4772.

$\text{C}_{44}\text{H}_{67}\text{F}_6\text{N}_9\text{O}_{17}$  (1108.06)

### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61**



11-Trytylmercaptoundecansäure **169** (34 mg, 74  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq), PyBOP (39 mg, 74  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq), HOBt (10 mg, 74  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (26  $\mu\text{L}$ , 19 mg,

0.14 mmol, 2.0 Äq) wurden in abs. THF (10 mL) vorgelegt und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **64** (85 mg, 74  $\mu$ mol, 1.0 Äq) gelöst in abs. THF (5 mL) wurde für weitere 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 98:2 -> 95:5).

Das geschützte Zwischenprodukt **174** (15 mg, 9.4  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und Triethylsilan (2.3 mg, 19  $\mu$ mol, 3.0  $\mu$ L, 2.0 Äq) wurden in 80%iger wässriger TFA-Lösung (8 mL, entgast) für 20 h unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Im Anschluss wurde mit destilliertem Wasser (15 mL, entgast) verdünnt und das Rohprodukt gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über semi-präparative HPLC (C18-Säule).

**Ausbeute:** 5.7 mg (5.0  $\mu$ mol, 47%) als farbloser Feststoff.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R$  = 22.9 min (Methode 8).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.91 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3 H, Val-4-H), 0.93 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3 H, Val-4-H), 1.13-1.26 (m, 10 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-7-H, L-8-H), 1.26-1.34 (m, 2 H, L-9-H), 1.34-1.45 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.45-1.58 (m, 4 H, L-3-H, L-10-H), 1.58-1.71 (m, 3 H, Lys-3- $\text{H}_a$ , Lys-5-H), 1.72-1.81 (m, 1 H, Lys-3- $\text{H}_b$ ), 1.82-1.93 (m, 2 H, 2''-H), 2.06-2.14 (m, 1 H, Val-3-H), 2.14-2.20 (m, 2 H, L-2-H), 2.20-2.28 (m, 1 H, 5'- $\text{H}_a$ ), 2.34-2.43 (m, 1 H, 5'- $\text{H}_b$ ), 2.48 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2 H, L-11-H), 2.95 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.04 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2 H, 1''-H), 3.12-3.21 (m, 1 H, 3''- $\text{H}_a$ ), 3.24-3.34 (m, 1 H, 3''- $\text{H}_b$ ), 3.39-3.49 (m, 1 H, Dap-3- $\text{H}_a$ ), 3.53-3.62 (m, 1 H, Dap-3- $\text{H}_b$ ), 3.81-3.90 (m, 1 H, 6'-H), 3.96-4.07 (m, 3 H, 3'-H, Val-2-H, Lys-2-H), 4.08-4.16 (m, 1 H, 4'-H), 4.30-4.36 (m, 1 H, Dap-2-H), 4.36-4.41 (m, 1 H, 2'-H), 5.71 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 1 H, 1'-H), 5.83 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1 H, 5-H), 7.61 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.27 (Val-C-4), 18.68 (Val-C-4), 21.97 (Lys-C-4), 23.92 (L-C-11), 25.45 (C-2''), 26.17 (L-C-3), 27.76, 28.47, 28.51, 28.55, 28.88, 29.15, 29.56 (L-C-4, L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-8, L-C-9, Lys-C-5), 30.00 (Val-C-3), 30.63 (Lys-C-3), 32.80 (C-5'), 33.34 (L-C-10), 35.64 (C-3''), 36.07 (L-C-2), 39.10 (Lys-C-6), 40.17 (Dap-C-3), 44.10 (C-1''), 54.52 (Lys-C-2), 54.70 (Dap-C-2), 58.80 (Val-C-2), 59.62 (C-6'), 72.63 (C-2'), 72.84 (C-3'), 79.85 (C-4'), 91.51 (C-1'), 102.10 (C-5), 116.27 (q,  $J_{\text{CF}}$  = 291.6 Hz, TFA- $\text{CF}_3$ ), 142.60 (C-6), 151.25 (C-2), 159.61 (N(C=O)N), 162.84 (q,  $J_{\text{CF}}$  = 35.4 Hz, TFA-C=O), 165.97 (C-4), 171.40 (C-7'), 171.96 (L-C-1), 175.60 (Dap-C-1), 176.38 (Lys-C-1), 177.79 (Val-C-1).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.56.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20}$  = -40.9 (0.7 mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3287, 3078, 2927, 2855, 1643, 1555, 1199, 1131, 720, 549.

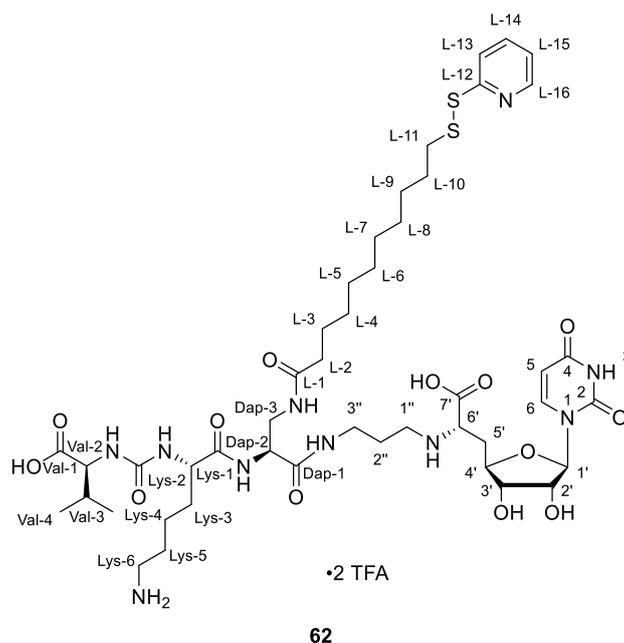
**UV** (MeCN:H<sub>2</sub>O 72:28):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 202, 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 916.19 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>40</sub>H<sub>71</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub>S<sup>2+</sup>: 458.7441, gef.: 458.7418.

**C<sub>44</sub>H<sub>71</sub>F<sub>6</sub>N<sub>9</sub>O<sub>17</sub>S** (1144.15)

### Synthese von S-aktivierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **62**



Die PySS-modifizierte Seitenkette **124** (21.6 mg, 66.0  $\mu$ mol, 1.0 Äq), PyBOP (30.4 mg, 66.0  $\mu$ mol, 1.0 Äq), HOBt (9.0 mg, 66  $\mu$ mol, 1.0 Äq), und *N,N*-Diisopropylethylamin (23  $\mu$ L, 17 mg, 0.13 mmol, 2.0 Äq) wurden in abs. THF (8 mL) vorgelegt und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **64** (76.0 mg, 66.0  $\mu$ mol, 1.0 Äq), gelöst in abs. THF (7 mL), wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch für 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das erhaltene Zwischenprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 95:5).

Die geschützte Verbindung wurde in wässriger 80%iger TFA-Lösung (10 mL) für 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Wasser (15 mL) wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semi-präparativer HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 14.4 mg (11.5  $\mu$ mol, 17%) als farbloser Feststoff.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R$  = 28.9 min (Methode 9).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 0.84 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H, Val-4-H), 0.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H, Val-4-H), 1.03-1.18 (m, 10 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-7-H, L-8-H), 1.18-1.31 (m, 2 H, L-9-H), 1.32-1.48 (m, 4 H, Lys-4-H, L-10-H), 1.50-1.69 (m, 5 H, Lys-3-H<sub>a</sub>, Lys-5-H, L-3-H), 1.70-1.81 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.81-1.94 (m, 2 H, 2''-H), 1.99-2.16 (m, 3 H, Val-3-H, L-2-H), 2.25-2.38 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.38-2.50 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.77 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H, L-11-H), 2.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.07 (t, *J* = 7.1 Hz, 2 H, 1''-H), 3.09-3.18 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.25-3.36 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 3.36-3.46 (m, 1 H, Dap-3-H<sub>a</sub>), 3.51-3.62 (m, 1 H, Dap-3-H<sub>b</sub>), 3.96-4.16 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 6'-H, Val-2-H, Lys-2-H), 4.30-4.39 (m, 2 H, 2'-H, Dap-2-H), 5.69 (d, *J* = 3.7 Hz, 1 H, 1'-H), 5.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, 5-H), 7.47-7.56 (t, *J* = 6.6 Hz, 1 H, L-15-H), 7.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H, 6-H), 7.98 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, L-13-H), 8.06-8.15 (m, 1 H, L-14-H), 8.49 (d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, L-16-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 17.27 (Val-C-4), 18.65 (Val-C-4), 22.01 (Lys-C-4), 25.44 (C-2'', L-C-3), 26.21, 27.71, 28.30, 28.52, 28.64, 28.82 (L-C-4, L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-8, L-C-9, L-C-10, Lys-C-5), 29.96 (Val-C-3), 30.61 (Lys-C-3), 32.23 (C-5'), 35.66 (C-3''), 36.11 (L-C-2), 38.84 (L-C-11), 39.15 (Lys-C-6), 40.18 (Dap-C-3), 44.10 (C-1''), 54.60 (Lys-C-2), 54.71 (Dap-C-2), 57.97 (Val-C-2), 58.72 (C-6'), 72.61 (C-2'), 72.90 (C-3'), 79.31 (C-4'), 91.54 (C-1'), 102.19 (C-5), 116.24 (q, *J*<sub>CF</sub> = 292.0 Hz, TFA-CF<sub>3</sub>), 123.01 (L-C-13), 123.36, 123.38 (L-C-14, L-C-15), 142.54 (C-6), 144.49 (L-C-16), 151.25 (C-2), 157.54 (L-C-12), 159.65 (N(C=O)N), 162.70 (q, *J*<sub>CF</sub> = 35.2 Hz, TFA-C=O), 165.93 (C-4), 170.76 (C-7'), 171.46 (L-C-1), 175.64 (Dap-C-1), 176.14 (Lys-C-1), 177.73 (Val-C-1).

**<sup>19</sup>F-NMR** (376 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = -75.56.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -12.7$  (c = 0.79 mg/mL, H<sub>2</sub>O).

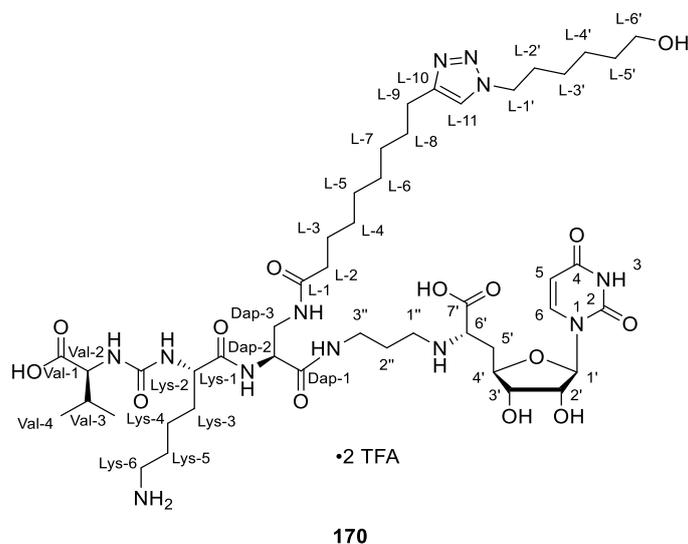
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2929, 2855, 1657, 1558, 1460, 1418, 1199, 1131, 763, 720.

**UV** (MeCN):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 241, 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 1025.25 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>45</sub>H<sub>74</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>S<sub>2</sub><sup>2+</sup>: 513.2434, gef.: 513.2422.

**C<sub>49</sub>H<sub>74</sub>F<sub>6</sub>N<sub>10</sub>O<sub>17</sub>S<sub>2</sub>** (1253.29)

7.2.3.5 Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Referenz **170**Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Referenz **170**

Das Alkin-modifizierte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **63** (12 mg, 11  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und *O*-(6-azidhexyl)hydroxylamin Hydrochlorid **151** (10 mg, 51  $\mu$ mol, 4.7 Äq) wurden in Wasser (6 mL, entgast) vorgelegt. Nach Zugabe von Kupfer(II)-sulfat (Spatelspitze, kat.) und Natriumascorbat (2.5 mg, 13  $\mu$ mol, 1.2 Äq) wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (ca. 10 mg) zugegeben, 15 min bei Raumtemperatur gerührt und das Rohprodukt anschließend gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels semi-präparativer HPLC (C18-Säule).

**Ausbeute:** 0.71 mg (0.57  $\mu$ mol, 5%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R$  = 33.6 min (Methode 10).

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  [ppm] = 0.83 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 0.86 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 1.07-1.28 (m, 12 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-7-H, L-3'-H, L-4'-H), 1.28-1.48 (m, 6 H, Lys-4-H, L-5'-H, L-3-H), 1.48-1.67 (m, 5 H, L-8-H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.68-1.76 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.76-1.86 (m, 4 H, 2''-H, L-2'-H), 2.04 (dd,  $J$  = 12.3 Hz,  $J$  = 6.8 Hz, 1 H, Val-3-H), 2.12 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2 H, L-2-H), 2.13-2.21 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.32 (ddd,  $J$  = 14.9 Hz,  $J$  = 6.7 Hz, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.61 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2 H, L-9-H), 2.91 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2 H, Lys-6-H), 2.98 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2 H, 1''-H), 3.10-3.18 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.20-3.28 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 3.39 (dd,  $J$  = 14.3 Hz,  $J$  = 7.3 Hz, 1 H, Dap-3-H<sub>a</sub>), 3.46 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2 H, L-6'-H), 3.55 (dd,  $J$  = 14.4 Hz,  $J$  = 3.9 Hz, 1 H, Dap-3-H<sub>b</sub>), 3.72 (dd,  $J$  = 6.6 Hz, 1 H, 6'-H), 3.93 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1 H, Val-2-H), 3.95-4.03 (m, 2 H, 3'-H, Lys-2-H), 4.05-4.10 (m, 1 H, 4'-H), 4.28-4.35 (m, 4 H, 2'-H, L-1'-H, Dap-2-H), 5.67 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1 H, 1'-H), 5.78 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1 H, 5-H), 7.58 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1 H, 6-H), 7.72 (s, 1 H, L-11-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.09 (Val-C-4), 18.50 (Val-C-4), 21.91 (Lys-C-4), 24.11, 24.26, 25.14, 25.31, 25.48, 26.11, 27.72, 27.97, 28.03, 28.11, 28.24, 29.12 (C-2''), Lys-C-5, L-C-3, L-C-4, L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-8, L-C-9, L-C-2', L-C-3', L-C-4'), 29.90 (Val-C-3), 30.59 (Lys-C-3), 30.95 (L-C-5'), 32.95 (C-5'), 35.52 (L-C-2), 36.02 (C-3''), 39.09 (Lys-C-6), 40.04 (Dap-C-3), 44.10 (C-1''), 50.28 (L-C-1'), 54.42 (Dap-C-2), 54.66 (Lys-C-2), 59.24 (Val-C-2), 60.26 (C-6'), 61.48 (L-C-6'), 72.59 (C-2'), 72.80 (C-3'), 80.95 (C-4'), 91.65 (C-1'), 102.05 (C-5), 116.24 (q,  $J_{\text{CF}} = 291.6$  Hz, TFA- $\text{CF}_3$ ), 123.27 (L-C-11), 142.70 (C-6), 148.30 (L-C-10), 151.29 (C-2), 159.67 (N(C=O)N), 162.85 (TFA-C=O), 163.13 (TFA-C=O), 166.10 (C-4), 171.48 (C-7'), 172.37 (L-C-1), 175.62 (Dap-C-1), 177.03 (Lys-C-1), 178.40 (Val-C-1).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.58.

**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  46:54):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 261.

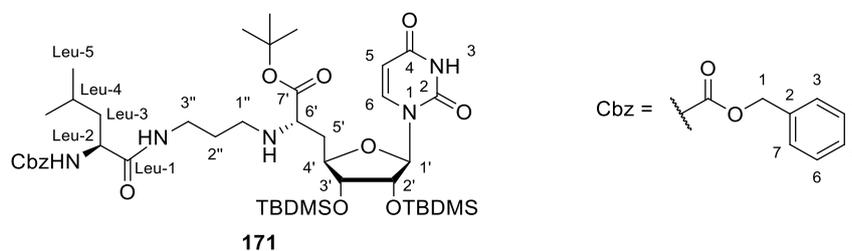
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 1023.57$  [M+H]<sup>+</sup>, 1045.57 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_{46}\text{H}_{80}\text{N}_{12}\text{O}_{14}^{2+}$ : 512.2953, gef.: 512.2940.

**$\text{C}_{50}\text{H}_{80}\text{F}_6\text{N}_{12}\text{O}_{18}$**  (1251.25)

### 7.2.3.6 Synthese der terminal modifizierten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **82** und **81**

#### Synthese des verkürzten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **171**



Nucleosid-Baustein **33a** (122 mg, 208  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und Leu-Propylamin-Linker **45** (66.6 mg, 208  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurden in absolutem THF (10 mL) über frisch aktiviertem Molekularsieb (4 Å) vorgelegt und für 26 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden Amberlyst 15 (11 mg, 35  $\mu\text{mol}$ , 0.2 Äq) und Natriumtriacetoxyborhydrid (88.2 mg, 416  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äq) zugegeben und die Reaktion für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert, der Rückstand mit Ethylacetat (100 mL) gewaschen und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Zielverbindung wurde mittels säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten (DCM:MeOH 98:2).

**Ausbeute:** 141 mg (158  $\mu\text{mol}$ , 76%) als farbloser Feststoff.

**DC:**  $R_f = 0.43$  (DCM:MeOH 9:1).

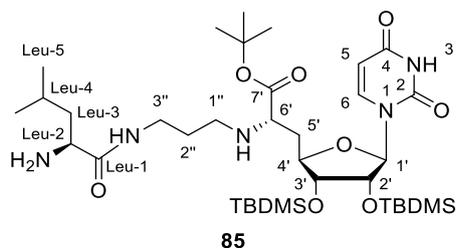
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.08 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.10 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.12 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.13 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.88-0.96 (m, 6 H, Leu-5-H), 0.90 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.93 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.49 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.53 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, Leu-3-H), 1.62-1.72 (m, 3 H,  $2''\text{-H}$ ,  $4''\text{-H}$ ), 1.87-1.95 (m, 1 H,  $5'\text{-H}_a$ ), 2.00-2.08 (m, 1 H,  $5'\text{-H}_b$ ), 2.50-2.58 (m, 1 H,  $1''\text{-H}_a$ ), 2.59-2.69 (m, 1 H,  $1''\text{-H}_b$ ), 3.18-3.29 (m, 2 H,  $3''\text{-H}$ ), 3.32-3.37 (m, 1 H,  $6'\text{-H}$ ), 3.90 (dd,  $J = 4.6$  Hz, 1 H,  $3'\text{-H}$ ), 4.03-4.13 (m, 2 H,  $4'\text{-H}$ , Leu-2-H), 4.34 (t,  $J = 4.4$  Hz, 1 H,  $2'\text{-H}$ ), 5.05-5.12 (m, 2 H, Cbz-1-H), 5.73 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5-H), 5.77 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1 H,  $1'\text{-H}$ ), 7.26-7.37 (m, 5 H, Cbz-3-H, Cbz-4-H, Cbz-5-H, Cbz-6-H, Cbz-7-H), 7.65 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = -4.30 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.27 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.27 ( $\text{SiCH}_3$ ), -3.86 ( $\text{SiCH}_3$ ), 19.03 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.09 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 22.11 (Leu- $\text{C}_a$ -5), 23.60 (Leu- $\text{C}_b$ -5), 26.08 (Leu-C-4), 26.54 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.61 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.60 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 30.48 (C- $2''$ ), 38.14 (C- $5'$ ), 38.36 (C- $3''$ ), 42.37 (Leu-C-3), 46.21 (C- $1''$ ), 55.33 (Leu-C-2), 60.84 (C- $6'$ ), 67.85 (Cbz-C-1), 75.98 (C- $2'$ ), 76.71 (C- $3'$ ), 82.74 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 83.09 (C- $4'$ ), 92.00 (C- $1'$ ), 103.18 (C-5), 129.03 (Cbz-C-3, Cbz-C-7), 129.19 (Cbz-C-5), 129.64 (Cbz-C-4, Cbz-C-6), 138.33 (Cbz-C-2), 142.91 (C-6), 152.28 (C-2), 158.55 (Cbz-C=O), 166.20 (C-4), 174.81, 175.69 (C- $7'$ , Leu-C-1).

**MS** ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z = 890.12$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

**$\text{C}_{44}\text{H}_{75}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{Si}_2$**  (890.28)

### Cbz-Entschützung des verkürzten $5'$ -Desoxy-Muraymycin-Analogons **85**



Das verkürzte  $5'$ -Desoxy-Muraymycin-Analogon **171** (100 mg, 112  $\mu\text{mol}$ ) wurde in abs. *iso*-Propanol (7 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von Palladium Black (ca. 5 mg) und 1,4-Cyclohexadien (0.10 mL, 86 mg, 1.1 mmol) wurde für 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Spritzenfiltration und Nachspülen mit Ethylacetat wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in den folgenden Reaktionen weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** 85.0 mg (112  $\mu\text{mol}$ , quant.) als farbloser Feststoff.

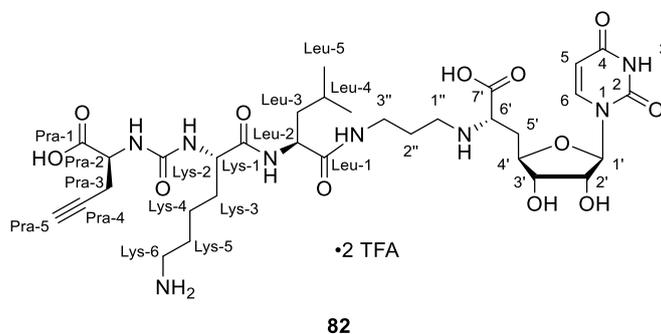
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.09 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.10 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.12 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.13 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.91 (s, 3 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.91 (d,  $J = 5.0$  Hz, 3 H, Leu-5-H), 0.93 (s, 3 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.93 (d,  $J = 5.3$  Hz, 3 H, Leu-5-H), 1.36-1.44 (m, 1 H, Leu-3- $\text{H}_a$ ), 1.49 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.50-1.58 (m, 1 H, Leu-3- $\text{H}_b$ ), 1.59-1.76 (m, 3 H,  $2''$ -H, Leu-4-H), 1.82-2.10 (m, 2 H,  $5'$ -H), 2.45-2.58 (m, 1 H,  $1''$ - $\text{H}_a$ ), 2.58-2.71 (m, 1 H,  $1''$ - $\text{H}_b$ ), 3.18-3.36 (m, 4 H,  $3''$ -H,  $6'$ -H, Leu-2-H), 3.87-3.97 (m, 1 H,  $3'$ -H), 4.02-4.10 (m, 1 H,  $4'$ -H), 4.34 (dd,  $J = 4.5$  Hz, 1 H,  $2'$ -H), 5.75 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H,  $5$ -H), 5.78 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1 H,  $1'$ -H), 7.66 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H,  $6$ -H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = -4.26 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.26 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.23 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.23 ( $\text{SiCH}_3$ ), 18.06 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.02 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 22.01 (Leu-C-5), 22.70 (Leu-C-5), 25.62 (Leu-C-4), 26.55 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.61 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.60 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 30.99 (C- $2''$ ), 38.27 (C- $5'$ ), 38.92 (C- $3''$ ), 45.00 (Leu-C-3), 46.18 (C- $1''$ ), 54.76 (Leu-C-2), 60.92 (C- $6'$ ), 75.99 (C- $2'$ ), 76.80 (C- $3'$ ), 82.78 (C- $4'$ ), 83.02 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 91.71 (C- $1'$ ), 104.92 (C-5), 143.52 (C-6), 152.55 (C-2), 165.03 (C-4), 175.02 (C- $7'$ ), 177.28 (Leu-C-1).

**MS (ESI $^+$ )**:  $m/z = 756.32$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

**$\text{C}_{36}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{O}_8\text{Si}_2$**  (756.15)

### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **82**



Harnstoffdipeptid **84** (39.6 mg, 86.5  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ), PyBOP (45.0 mg, 86.5  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ), HOBT (11.7 mg, 86.5  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) und *N,N*-Diisopropylethylamin (30  $\mu\text{L}$ , 22 mg, 0.17 mmol, 2.0  $\text{\AA}q$ ) wurden in abs. THF (7 mL) vorgelegt und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe des verkürzten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **85** (65.4 mg, 86.5  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) gelöst in abs. THF (5 mL) wurde für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das geschützte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen wurde in 80%iger wässriger TFA-Lösung (10 mL) gelöst und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde erneut unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 33.1 mg (34.3  $\mu\text{mol}$ , 40%) als farbloser Feststoff.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 24.0$  min (Methode 5).

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  [ppm] = 0.80 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H, Leu-5-H), 0.85 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3 H, Leu-5-H), 1.30-1.46 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.46-1.68 (m, 6 H, Leu-3-H, Leu-4-H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.68-1.78 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.80-1.90 (m, 2 H, 2''-H), 2.22-2.31 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.39 (t,  $J = 2.7$  Hz, 1 H, Pra-5-H), 2.39-2.44 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.65-2.76 (m, 2 H, Pra-3-H), 2.92 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.03 (dd,  $J = 7.6$  Hz, 7.6 Hz, 2 H, 1''-H), 3.12-3.22 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.22-3.31 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 3.98 (dd,  $J = 6.3$  Hz, 6.3 Hz, 1 H, 6'-H), 4.00-4.07 (m, 2 H, 3'-H, Lys-2-H), 4.08-4.14 (m, 1 H, 4'-H), 4.16-4.23 (m, 1 H, Leu-2-H), 4.33-4.41 (m, 2 H, 2'-H, Pra-2-H), 5.68 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.81 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5-H), 7.58 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  [ppm] = 20.56 (Leu-C-5), 21.44 (Pra-C-3), 22.04 (Lys-C-4), 22.10 (Leu-C-5), 24.41 (Leu-C-4), 25.58 (C-2''), 26.25 (Lys-C-5), 30.70 (Lys-C-3), 32.50 (C-5'), 35.95 (C-3''), 39.22 (Lys-C-6), 39.34 (Leu-C-3), 44.21 (C-1''), 51.92 (Pra-C-2), 52.54 (Leu-C-2), 54.35 (Lys-C-2), 58.76 (C-6'), 72.14 (Pra-C-5), 72.56 (C-2'), 72.93 (C-3'), 79.73 (C-4', Pra-C-4), 91.81 (C-1'), 102.22 (C-5), 114.40 ( $\text{TFA-CF}_3$ ), 118.27 ( $\text{TFA-CF}_3$ ), 142.82 (C-6), 151.40 (C-2), 159.08 ( $\text{N(C=O)N}$ ), 166.16 (C-4), 171.37 (C-7'), 174.80 (Leu-C-1), 174.91 (Lys-C-1), 175.47 (Pra-C-1).

**$^{19}\text{F-NMR}$  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  [ppm] = -75.63.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -21.4$  (0.9 mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2928, 1665, 1553, 1263, 1199, 1134, 1060, 800, 721, 557.

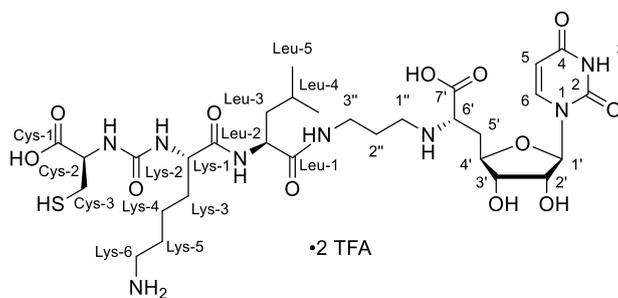
**UV ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  62:38):**  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 262.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 739.26$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** ber. für  $\text{C}_{32}\text{H}_{51}\text{N}_8\text{O}_{12}^+$ : 739.3621, gef.: 739.3622.

**$\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{F}_6\text{N}_8\text{O}_{16}$**  (966.84)

### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon 81



81

Harnstoffdipeptid **83** (77.5 mg, 112  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) wurde zusammen mit PyBOP (58.3 mg, 112  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ), HOBt (51.1 mg, 112  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) und *N,N*-Diisopropylethylamin (39  $\mu\text{L}$ , 0.22 mmol, 2.0  $\text{\AA}q$ ) in abs. THF (10 mL) vorgelegt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 min wurde das verkürzte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **85** (85.0 mg, 112  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 96:4).

Die geschützte Zwischenstufe des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons (63 mg, 44  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) wurde in 80%iger wässriger TFA-Lösung (10 mL, entgast) gelöst und mit Triethylsilan (10 mg, 14  $\mu\text{L}$ , 88  $\mu\text{mol}$ , 2.0  $\text{\AA}q$ ) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde nach 22 h Rühren bei Raumtemperatur mit Wasser (20 mL, entgast) verdünnt und das Lösungsmittel durch Gefrier-trocknung entfernt. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 17.4$  min (Methode 11).

**Ausbeute:** 19.7 mg (20.2  $\mu\text{mol}$ , 32%) als farbloser Feststoff.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.81 (d,  $J = 5.7$  Hz, 3 H, Leu-5-H), 0.87 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3 H, Leu-5-H), 1.32-1.46 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.46-1.59 (m, 3 H, Leu-3-H, Leu-4-H), 1.59-1.70 (m, 3 H, Lys-3- $\text{H}_a$ , Lys-5-H), 1.70-1.80 (m, 1 H, Lys-3- $\text{H}_b$ ), 1.81-1.89 (m, 2 H, 2''-H), 2.18-2.27 (m, 1 H, 5'- $\text{H}_a$ ), 2.38 (ddd,  $J = 15.1$  Hz,  $J = 6.7$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, 5'- $\text{H}_b$ ), 2.89-2.97 (m, 4 H, Lys-6-H, Cys-3-H), 3.02 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, 1''-H), 3.15-3.31 (m, 2 H, 3''-H), 3.86 (dd,  $J = 6.5$  Hz, 1 H, 6'-H), 4.03 (dd,  $J = 6.0$  Hz, 1 H, 3'-H), 4.06 (dd,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, Lys-2-H), 4.11 (ddd,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, 4'-H), 4.17-4.23 (m, 1 H, Leu-2-H), 4.38 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1 H, Cys-2-H), 4.39 (dd,  $J = 5.7$  Hz, 1 H, 2'-H), 5.70 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.82 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 5-H), 7.60 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 20.63 (Leu-C-5), 22.08 (Lys-C-4), 22.13 (Leu-C-5), 24.43 (Leu-C-4), 25.66 (C-2''), 25.97 (Cys-C-3), 26.28 (Lys-C-5), 30.75 (Lys-C-3), 32.85 (C-5'), 35.96 (C-3''), 39.23 (Lys-C-6), 39.43 (Leu-C-3), 44.28 (C-1''), 52.60 (Leu-C-2), 54.31 (Lys-C-2), 55.24 (Cys-C-2), 59.65 (C-6'), 72.63 (C-2'), 72.95 (C-3'), 80.02 (C-4'), 91.83 (C-1'), 102.22 (C-5), 142.90 (C-6), 151.46 (C-2), 159.17 (N(C=O)N), 166.25 (C-4), 172.03 (C-7'), 174.81 (Leu-C-1), 174.95 (Lys-C-1), 175.53 (Cys-C-1).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.58.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = 2.5$  ( $c = 4.0$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2960, 1670, 1533 1464, 1430, 1262, 1200, 1133, 800, 721.

**UV** (MeCN:H<sub>2</sub>O 31:69):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 746.97 [M+H]<sup>+</sup>.

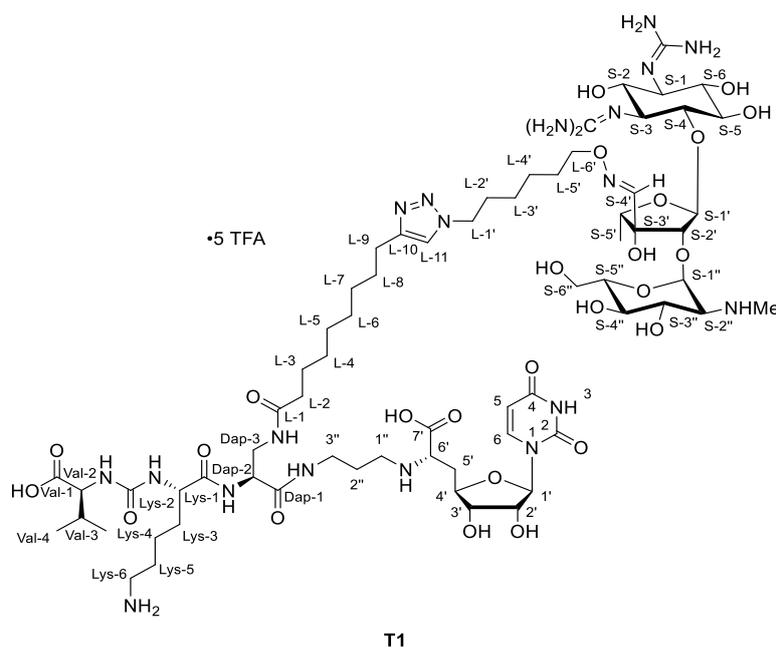
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S<sup>2+</sup>: 374.1707, gef.: 374.1691.

**C<sub>34</sub>H<sub>52</sub>F<sub>6</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>S** (974.88)

## 7.2.4 Synthese der Konjugat-Verbindungen

### 7.2.4.1 Synthese der ersten Konjugat-Serie

#### Synthese von Muraymycin-Streptomycin-Konjugat T1



5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **63** (11.5 mg, 10.4 µmol, 1.0 Äq) und Streptomycin-Derivat **60** (14.8 mg, 13.9 µmol, 1.3 Äq) wurden in destilliertem Wasser (3 mL, entgast) vorgelegt. Nach Zugabe von Kupfer(II)-sulfat (Spatelspitze, kat.) und Natriumascorbat (1.3 mg, 6.6 µmol, 0.6 Äq) wurde für 3.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (ca 10 mg) zugegeben, 15 min bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über zweifache semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 11.1 mg (5.10 µmol, 49%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):** t<sub>R</sub> = 27.4 min (1. Methode 12)

t<sub>R</sub> = 16.9 min (2. Methode 13)

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 0.89 (d, J = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 0.91 (d, J = 6.6 Hz, 3 H, Val-4-H), 1.15 (d, J = 6.3 Hz, 3 H, S-5'-H), 1.17-1.26 (m, 10 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-3'-H, L-4'-H), 1.26-1.34 (m, 2 H, L-7-H), 1.36-1.52 (m, 4 H, Lys-4-H, L-3-H), 1.52-1.70 (m, 7 H, L-8-H, L-5'-H,

Lys-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.73-1.82 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.82-1.91 (m, 4 H, 2''-H, L-2'-H), 2.09 (dd,  $J = 12.3$  Hz,  $J = 6.9$  Hz, 1 H, Val-3-H), 2.16 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, L-2-H), 2.20-2.28 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.40 (ddd,  $J = 14.9$  Hz,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.69 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, L-9-H), 2.82 (s, 3 H, NHCH<sub>3</sub>), 2.95 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.04 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2 H, 1''-H), 3.14-3.22 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.26 (dd,  $J = 10.7$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1 H, S-2''-H), 3.27-3.33 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 3.39-3.64 (m, 10 H, Dap-3-H, S-1-H, S-2-H, S-3-H, S-4-H, S-5-H, S-6-H, S-4''-H, S-5''-H), 3.74-3.79 (m, 1 H, S-6''-H<sub>a</sub>), 3.81-3.90 (m, 3 H, S-3''-H, S-6''-H<sub>b</sub>, 6'-H), 3.98-4.06 (m, 3 H, Lys-2-H, Val-2-H, 3'-H), 4.03 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H, L-6'-H), 4.12 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, 4'-H), 4.33-4.44 (m, 5 H, L-1'-H, Dap-2-H, 2'-H, S-4'-H), 4.50 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, S-2'-H), 5.23 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, S-1'-H), 5.34 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, S-1''-H), 5.71 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.83 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5-H), 7.58 (s, 1 H, Oxim-H), 7.61 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H), 7.87 (s, 1 H, L-11-H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 11.23 (S-C-5'), 17.30 (Val-C-4), 18.59 (Val-C-4), 22.11 (Lys-C-4), 23.98 (L-C-3), 24.46 (L-C-9), 25.35 (L-C-4'), 25.49 (L-C-3'), 25.62 (C-2''), 26.31 (Lys-C-5), 27.98 (L-C-5'), 28.21, 28.22, 28.25, 28.33 (L-C-4, L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-8), 29.14 (L-C-2'), 30.00 (Val-C-3), 30.76 (Lys-C-3), 31.26 (NHCH<sub>3</sub>), 32.90 (C-5'), 35.74 (L-C-2), 36.23 (C-3''), 39.29 (Lys-C-6), 40.24 (Dap-C-3), 44.30 (C-1''), 51.01 (L-C-1'), 54.65 (Lys-C-2), 54.73 (Dap-C-2), 58.40 (S-C-3), 58.87 (S-C-1), 59.13 (Val-C-2), 59.73 (C-6'), 60.22 (S-C-6''), 60.75 (S-C-2''), 69.19 (S-C-4''), 69.30 (S-C-3''), 70.99 (S-C-2), 71.51 (S-C-6), 72.74 (C-2', S-C-5''), 73.01 (C-3'), 73.09 (S-C-5), 74.47 (L-C-6'), 76.84 (S-C-4'), 79.30 (S-C-4), 79.86 (S-C-3'), 80.02 (C-4'), 84.08 (S-C-2'), 91.81 (C-1'), 92.17 (S-C-1''), 102.30 (C-5), 105.46 (S-C-1'), 115.28 (TFA-CF<sub>3</sub>), 117.59 (TFA-CF<sub>3</sub>), 124.03 (L-C-11), 142.85 (C-6), 147.68 (L-C-10), 149.82 (Oxim-C), 151.46 (C-2), 157.63 (S-C-3-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>), 158.28 (S-C-1-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>), 159.83 (N(C=O)N), 163.21 (TFA-C=O), 166.22 (C-4), 171.66 (C-7'), 172.02 (L-C-1), 175.74 (Dap-C-1), 176.69 (Lys-C-1), 178.48 (Val-C-1).

<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = -75.59.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -120.7$  ( $c = 1.7$  mg/mL, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3307, 2931, 1664, 1561, 1431, 1199, 1132, 1052, 800, 721.

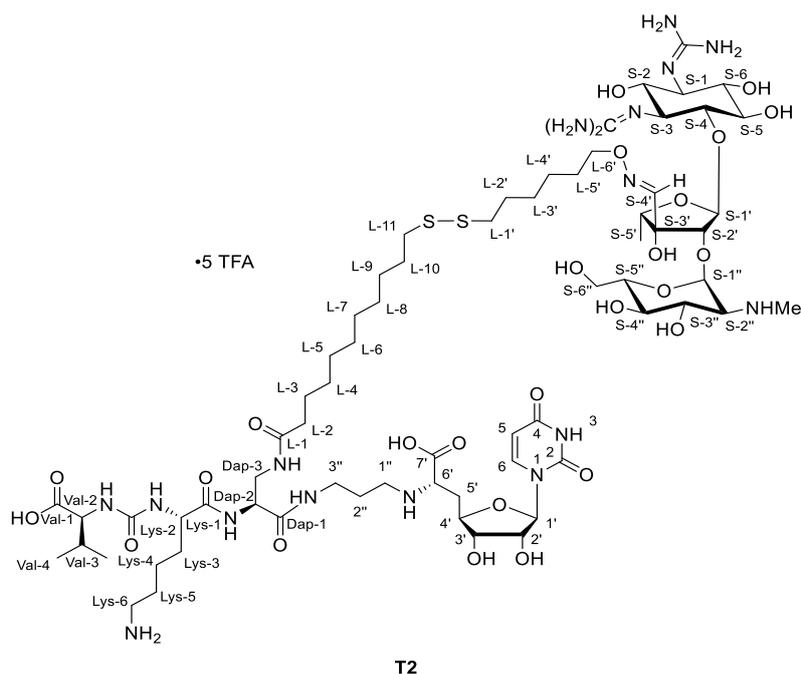
**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 75:25):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 801.78$  [M+2H]<sup>2+</sup>, 534.58 [M+3H]<sup>3+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>67</sub>H<sub>118</sub>N<sub>20</sub>O<sub>25</sub><sup>2+</sup>: 801.4283, gef.: 801.4273.

**C<sub>77</sub>H<sub>121</sub>F<sub>15</sub>N<sub>20</sub>O<sub>35</sub>** (2171.90)

## Synthese von Muraymycin-Streptomycin-Konjugat T2



### Variante 1:

5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** (5.7 mg, 5.0  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und Streptomycin-Derivat **58** (5.8 mg, 5.0  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurden in abs. DMSO (4 mL) vorgelegt und für 28 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Wasser (6 mL) wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über semi-präparative HPLC (C18-Säule).

**Ausbeute:** 2.1 mg (0.96  $\mu\text{mol}$ , 19%) eines farblosen Feststoffes.

### Variante 2:

5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **62** (1.7 mg, 1.4  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und Streptomycin-Derivat **59** (1.5 mg, 1.4  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurden in abs. DMSO (2.5 mL) vorgelegt und für 47 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (5 mL) verdünnt und gefriergetrocknet. Die Reinigung der Substanz erfolgte über semi-präparative HPLC (C18-Säule).

**Ausbeute:** 1.4 mg (0.64  $\mu\text{mol}$ , 46%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 25.9$  min (Methode 14)

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  [ppm] = 0.93 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3 H, Val-4-H), 0.96 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.19 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H, S-5'-H), 1.20-1.48 (m, 18 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-7-H, L-8-H, L-9-H, L-3'-H, L-4'-H, Lys-4-H), 1.48-1.55 (m, 2 H, L-3-H), 1.58-1.73 (m, 9 H, L-10-H, L-2'-H, L-5'-H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.74-1.84 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.85-1.93 (m, 2 H, 2''-H), 2.09-2.17 (m, 1 H, Val-3-H), 2.19 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, L-2-H), 2.21-2.26 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.36-2.42 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.72 (t,  $J = 7.1$  Hz, 4 H, L-11-H, L-1'-H), 2.85 (s, 3 H,  $\text{NHCH}_3$ ), 2.97 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, Lys-6-H),

3.05 (dd,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, 1''-H), 3.15-3.23 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.28 (dd,  $J = 10.6$  Hz,  $J = 3.3$  Hz, 1 H, S-2''-H), 3.30-3.35 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 3.41-3.66 (m, 10 H, Dap-3-H, S-1-H, S-2-H, S-3-H, S-4-H, S-5-H, S-6-H, S-4''-H, S-5''-H), 3.76-3.83 (m, 2 H, S-6''-H<sub>a</sub>, 6'-H), 3.83-3.89 (m, 2 H, S-3''-H, S-6''-H<sub>b</sub>), 4.02-4.07 (m, 3 H, Lys-2-H, Val-2-H, 3'-H), 4.09 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, L-6'-H), 4.12-4.17 (m, 1 H, 4'-H), 4.35-4.41 (m, 2 H, 2'-H, Dap-2-H), 4.44 (q,  $J = 6.3$  Hz, 1 H, S-4'-H), 4.53 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, S-2'-H), 5.25 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, S-1'-H), 5.36 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1 H, S-1''-H), 5.73 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.86 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 5-H), 7.61 (s, 1 H, Oxim-H), 7.64 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H).

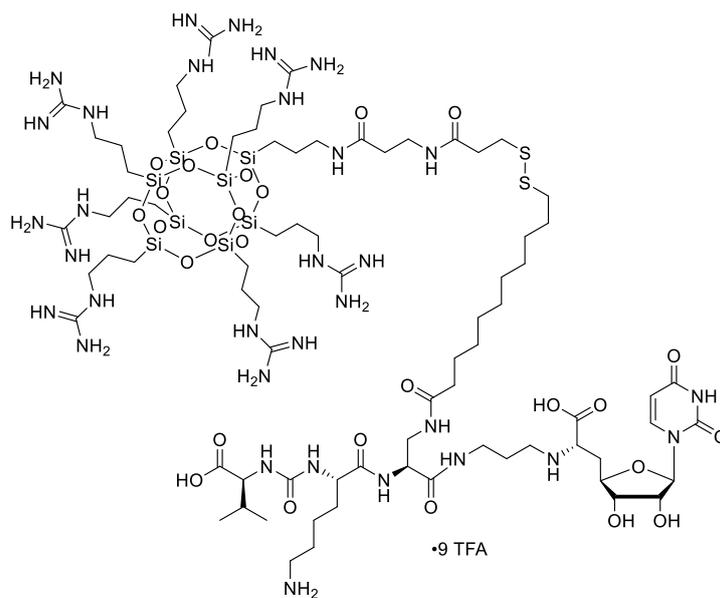
**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 45:55):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 813.94$  [M+2H]<sup>2+</sup>, 543.14 [M+3H]<sup>3+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>67</sub>H<sub>122</sub>N<sub>17</sub>O<sub>25</sub>S<sub>2</sub><sup>3+</sup>: 542.9408, gef.: 542.9388.

**C<sub>77</sub>H<sub>124</sub>F<sub>15</sub>N<sub>17</sub>O<sub>35</sub>S<sub>2</sub>** (2197.02)

### Synthese von Muraymycin-GuCOSS-Konjugat T3



T3

5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **62** (3.6 mg, 2.9  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und GuCOSS-Baustein **172** (6.2 mg, 2.9  $\mu$ mol, 1.0 Äq) wurden in abs. DMSO (1.5 mL) vorgelegt und für 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Wasser (6 mL) wurde gefriergetrocknet und das Rohprodukt im Anschluss über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 5.1 mg (1.6  $\mu$ mol, 54%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 24.1$  min (Methode 9).

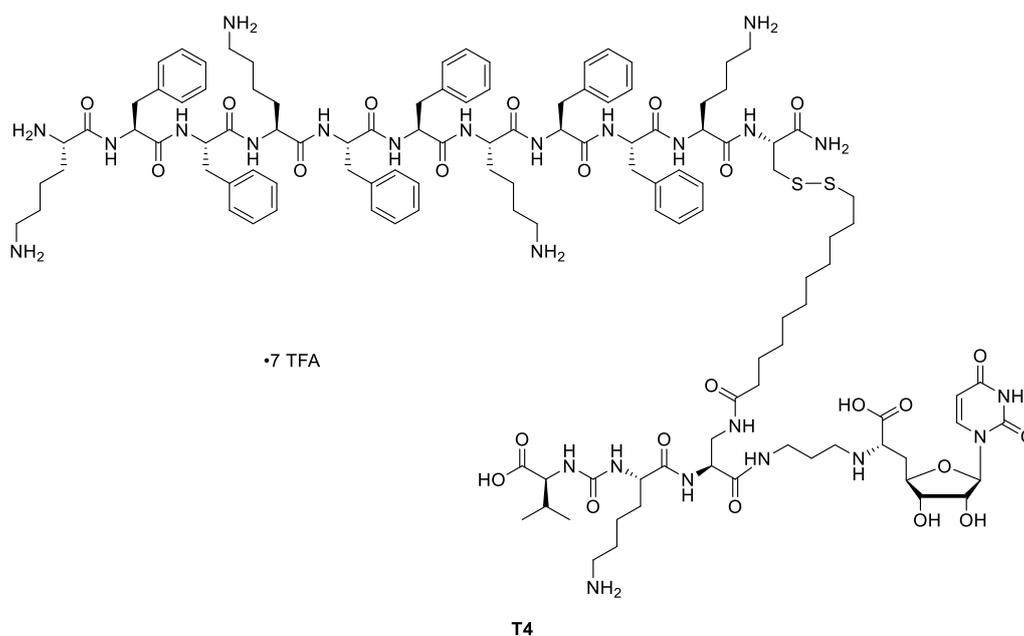
**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 48:52):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 1124.79 [M+2H]<sup>2+</sup>, 749.95 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1146.07 [M+2Na]<sup>2+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>77</sub>H<sub>158</sub>N<sub>32</sub>O<sub>27</sub>S<sub>2</sub>Si<sub>8</sub><sup>4+</sup>: 562.7387, gef.: 562.7379.

**C<sub>95</sub>H<sub>163</sub>F<sub>27</sub>N<sub>32</sub>O<sub>45</sub>S<sub>2</sub>Si<sub>8</sub>** (3275.28)

### Synthese von Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat T4



5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **62** (3.6 mg, 2.9  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und KF<sub>2</sub>-Peptid **173** (6.1 mg, 2.9  $\mu$ mol, 1.0 Äq) wurden in abs. DMSO (1.5 mL) vorgelegt und für 5 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Wasser (5 mL) wurde gefriergetrocknet und das Rohprodukt im Anschluss über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 3.3 mg (1.0  $\mu$ mol, 35%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):** t<sub>R</sub> = 20.9 min (Methode 8).

**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 33:67):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261.

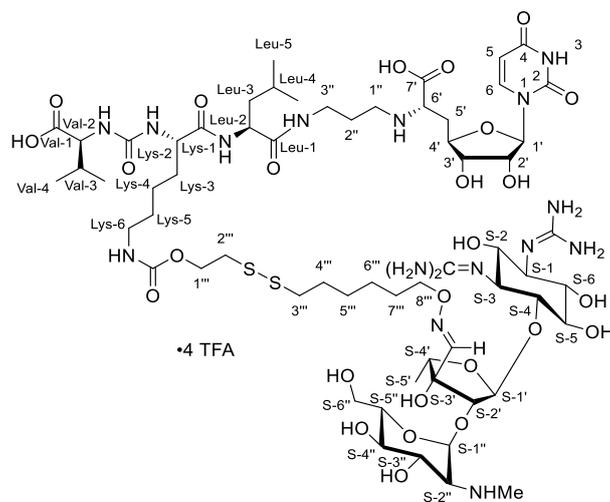
**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 1215.45 [M+2H]<sup>2+</sup>, 810.33 [M+3H]<sup>3+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>121</sub>H<sub>183</sub>N<sub>25</sub>O<sub>24</sub>S<sub>2</sub><sup>6+</sup>: 405.8885, gef.: 405.8867.

**C<sub>135</sub>H<sub>184</sub>F<sub>21</sub>N<sub>25</sub>O<sub>38</sub>S<sub>2</sub>** (3228.18)

## 7.2.4.2 Synthese der zweiten Konjugat-Serie

## Synthese von Muraymycin-Streptomycin-Konjugat T6



T6

5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **79** (5.0 mg 4.7  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) und Streptomycin-Derivat **59** (7.5 mg, 7.1  $\mu\text{mol}$ , 1.5  $\text{\AA}q$ ) wurden in abs. DMSO (2 mL) vorgelegt und für 31 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Wasser (4 mL) zugegeben und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 7.9 mg (3.9  $\mu\text{mol}$ , 84%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 21.3$  min (Methode 6).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.84 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H, Leu-5-H), 0.87-0.91 (m, 6 H, Leu-5-H, Val-4-H), 0.93 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.18 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H, S-5'-H), 1.29-1.41 (m, 6 H, Lys-4-H, 5'''-H, 6'''-H), 1.44-1.77 (m, 11 H, Leu-3-H, Leu-4-H, Lys-3-H, Lys-5-H, 4'''-H, 7'''-H), 1.89 (quin,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, 2''-H), 2.12 (dq,  $J = 12.3$  Hz,  $J = 6.9$  Hz, 1 H, Val-3-H), 2.28 (ddd,  $J = 14.9$  Hz,  $J = 10.3$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.43 (ddd,  $J = 14.9$  Hz,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.72 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, 3'''-H), 2.84 (s, 3 H,  $\text{NHCH}_3$ ), 2.94 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2 H, 2'''-H), 3.07 (dd,  $J = 15.0$  Hz,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, 1''-H), 3.08-3.13 (m, 2 H, Lys-6-H), 3.17-3.25 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.28 (dd,  $J = 10.7$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1 H, S-2''-H), 3.29-3.34 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 3.41-3.65 (m, 8 H, S-1-H, S-2-H, S-3-H, S-4-H, S-5-H, S-6-H, S-4''-H, S-5''-H), 3.76-3.81 (m, 1 H, S-6''-H<sub>a</sub>), 3.83-3.88 (m, 2 H, S-6''-H<sub>b</sub>, S-3''-H), 3.94 (dd,  $J = 6.5$  Hz, 1 H, 6'-H), 4.01-4.11 (m, 5 H, 3'-H, 8'''-H, Val-2-H, Lys-2-H), 4.15 (ddd,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, 4'-H), 4.22-4.26 (m, 1 H, Leu-2-H), 4.28 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2 H, 1'''-H), 4.40 (dd,  $J = 5.5$  Hz,  $J = 3.9$  Hz, 1 H, 2'-H), 4.44 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1 H, S-4'-H), 4.53 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, S-2'-H), 5.25 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, S-1'-H), 5.36 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1 H, S-1''-H), 5.72 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.85 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 5-H), 7.62 (s, 1 H, Oxim-H), 7.62 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.26 (S-C-5'), 17.09 (Val-C-4), 18.59 (Val-C-4), 20.68 (Leu-C-5), 22.18 (Lys-C-4), 22.27 (Leu-C-5), 24.49 (Leu-C-4), 24.71 (C-6'''), 25.73 (C-2''), 27.37 (C-5'''), 28.11 (C-7'''), 28.20 (C-4'''), 29.47 (Lys-C-5), 30.19 (Val-C-3), 30.96 (Lys-C-3), 31.28 (NH- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 32.73 (C-5'), 36.03 (C-3'''), 37.28 (C-2'''), 38.29 (C-3'''), 39.48 (Leu-C-3), 40.12 (Lys-C-6), 44.27 (C-1''), 52.57 (Leu-C-2), 54.71 (Lys-C-2), 58.40 (S-C-3), 58.85 (S-C-1), 58.93 (Val-C-2), 59.21 (C-6'), 60.27 (S-C-6''), 60.77 (S-C-2''), 62.94 (C-1'''), 69.23 (S-C-4''), 69.29 (S-C-3'''), 70.99 (S-C-2), 71.50 (S-C-6), 72.72, 72.76 (C-2', S-C-5''), 73.02 (C-3'), 73.09 (S-C-5), 74.60 (C-8'''), 76.84 (S-C-4'), 79.32 (S-C-4), 79.86 (S-C-3'), 79.89 (C-4'), 84.05 (S-C-2'), 91.86 (C-1'), 92.17 (S-C-1''), 102.29 (C-5), 105.45 (S-C-1'), 115.26 (TFA- $\text{CF}_3$ ), 117.58 (TFA- $\text{CF}_3$ ), 142.86 (C-6), 149.77 (Oxim-C), 151.43 (C-2), 157.62 (S-C-3-NHC(=NH)NH $_2$ ), 158.26 (S-C-1-NHC(=NH)NH $_2$ ), 158.41 (N(C=O)O), 159.56 (N(C=O)N), 162.92 (TFA-C=O), 163.21 (TFA-C=O), 166.20 (C-4), 171.70 (C-7'), 173.31 (Leu-C-1), 174.99 (Lys-C-1), 175.72 (Val-C-1).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.55.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -141.8$  ( $c = 1.3$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3321, 2945, 1665, 1553, 1263, 1185, 1133, 1043, 800, 721.

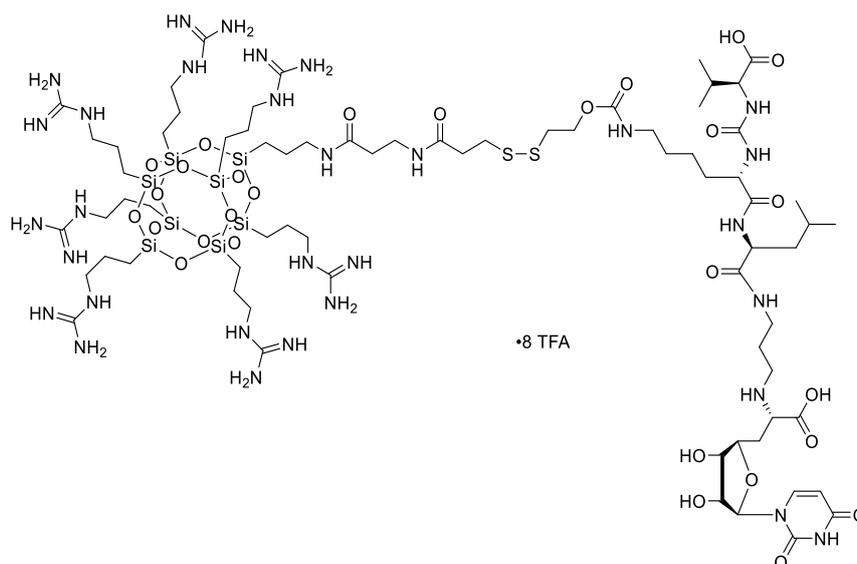
**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  1:1):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI $^+$ ):  $m/z = 1557.61$  [M+H] $^+$ , 779.79 [M+2H] $^{2+}$ .

**HRMS** (ESI $^+$ ): ber. für  $\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{16}\text{O}_{26}\text{S}_2^{3+}$ : 519.9093, gef.: 519.9087.

**$\text{C}_{70}\text{H}_{112}\text{F}_{12}\text{N}_{16}\text{O}_{34}\text{S}_2$**  (2013.85)

### Synthese von Muraymycin-GuCOSS-Konjugat T7



T7

5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **79** (3.85 mg, 3.54  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und GuCOSS-Baustein **172** (7.70 mg, 3.54  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurden in abs. DMSO (2.5 mL) vorgelegt und für 5 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Wasser (5 mL) wurde gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 6.2 mg (2.0  $\mu\text{mol}$ , 56%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 26.9$  min (Methode 15).

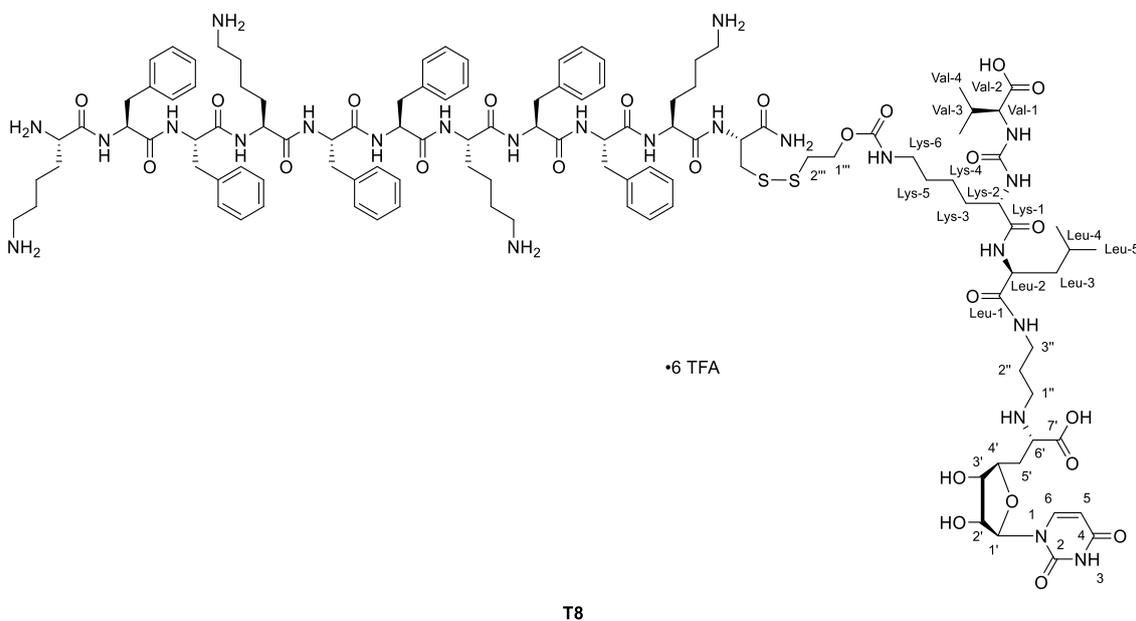
**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  56:44):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 261.

**MS** ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z = 1089.69$  [ $\text{M}+2\text{H}$ ] $^{2+}$ , 726.86 [ $\text{M}+3\text{H}$ ] $^{3+}$ .

**HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ): ber. für  $\text{C}_{72}\text{H}_{145}\text{N}_{31}\text{O}_{28}\text{S}_2\text{Si}_8^{2+}$ : 1089.9230, gef.: 1089.92136.

**$\text{C}_{88}\text{H}_{151}\text{F}_{24}\text{N}_{31}\text{O}_{44}\text{S}_2\text{Si}_8$**  (3092.11)

### Synthese von Muraymycin-KF<sub>2</sub>-Konjugat T8



5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **79** (7.0 mg, 6.5  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) und KF<sub>2</sub>-Peptid **173** (14 mg, 6.7  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurden in abs. DMSO (2 mL) vorgelegt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Wasser (5 mL) wurde das Lösungsmittelgemisch durch Gefrier-trocknung entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über semi-präparative HPLC (C18-Säule).

**Ausbeute:** 9.6 mg (3.2  $\mu\text{mol}$ , 49%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 24.7$  min (Methode 16).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -102.4$  ( $c = 2.1$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3274, 3062, 2930, 1670, 1626, 1525, 1200, 1133, 722, 697.

**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 4:6):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261.

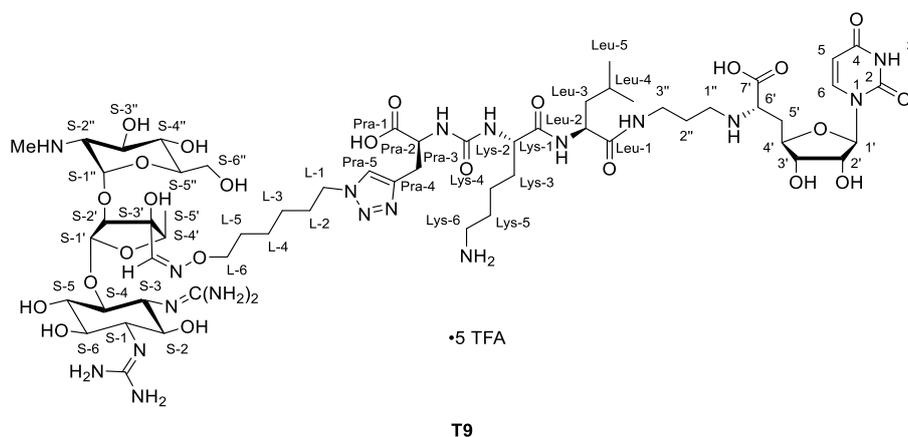
**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 1180.81 [M+2H]<sup>2+</sup>, 787.72 [M+3H]<sup>3+</sup>, 591.07 [M+4H]<sup>4+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>116</sub>H<sub>170</sub>N<sub>24</sub>O<sub>25</sub>S<sub>2</sub><sup>4+</sup>: 591.0555, gef.: 591.0536.

**C<sub>128</sub>H<sub>172</sub>F<sub>18</sub>N<sub>24</sub>O<sub>37</sub>S<sub>2</sub>** (3045.01)

### 7.2.4.3 Synthese der dritten Konjugat-Serie

#### Synthese von Muraymycin-Streptomycin-Konjugat T9



5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **82** (11.4 mg, 11.8  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und Streptomycin-Derivat **60** (12.5 mg, 11.8  $\mu$ mol, 1.0 Äq) wurden in destilliertem Wasser (6 mL, entgast) vorgelegt. Nach Zugabe von Kupfer(II)-sulfat (Spatelspitze, kat.) und Natriumascorbat (1.4 mg, 7.1  $\mu$ mol, 0.6 Äq) wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (ca. 10 mg) zugegeben, das Reaktionsgemisch für weitere 20 min bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Anschluss über Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 2.77 mg (1.36  $\mu$ mol, 12%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R$  = 23.0 min (Methode 5).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.78 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 3 H, Leu-5-H), 0.85 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 3 H, Leu-5-H), 1.13 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3 H, S-5'-H), 1.15-1.23 (m, 2 H, L-3-H), 1.23-1.31 (m, 2 H, L-4-H), 1.31-1.42 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.46-1.66 (m, 8 H, Leu-3-H, Leu-4-H, Lys-5-H, L-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.66-1.76 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.77-1.87 (m, 4 H, 2''-H, L-2-H), 2.17-2.25 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.37 (ddd,  $J$  = 14.9 Hz,  $J$  = 6.9 Hz,  $J$  = 2.8 Hz, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.80 (s, 3 H, NHCH<sub>3</sub>), 2.92 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.01 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2 H, 1''-H), 3.06-3.21 (m, 3 H, 3''-H<sub>a</sub>, S-2''-H, Pra-3-H<sub>a</sub>), 3.21-3.29 (m, 2 H, 3''-H<sub>b</sub>, Pra-3-H<sub>b</sub>), 3.38-3.62 (m, 8 H, S-1-H, S-2-H, S-3-H, S-4-H, S-5-H, S-6-H, S-4''-H,

S-5''-H), 3.71-3.77 (m, 1 H, S-6''-H<sub>a</sub>), 3.78-3.85 (m, 3 H, S-6''-H<sub>b</sub>, S-3''-H, 6'-H), 3.96-4.06 (m, 2 H, Lys-2-H, 3'-H), 4.01 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2 H, L-6-H), 4.10 (ddd,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, 4'-H), 4.14-4.19 (m, 1 H, Leu-2-H), 4.32 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, L-1-H), 4.36 (dd,  $J = 5.7$  Hz,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 2'-H), 4.40 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1 H, S-4'-H), 4.45 (dd,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, Pra-2-H), 4.49 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, S-2'-H), 5.21 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, S-1'-H), 5.32 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1 H, S-1''-H), 5.68 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.80 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 5-H), 7.56 (s, 1 H, Oxim-H), 7.58 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H), 7.80 (s, 1 H, Triazol-H).

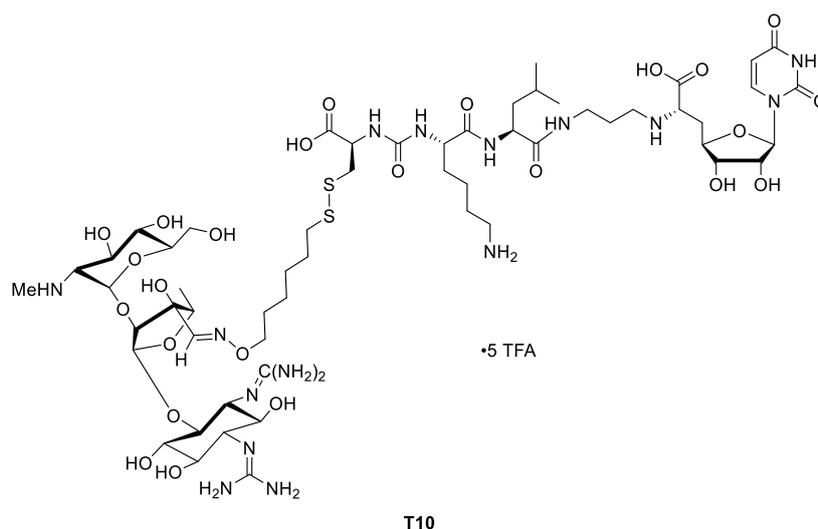
**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 64:36):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 730.88$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>59</sub>H<sub>103</sub>N<sub>19</sub>O<sub>24</sub><sup>2+</sup>: 730.8706, gef.: 730.8705.

**C<sub>69</sub>H<sub>106</sub>F<sub>15</sub>N<sub>19</sub>O<sub>34</sub>** (2030.68)

### Synthese von Muraymycin-Streptomycin-Konjugat T10



5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **81** (5.0 mg 5.1  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) und Streptomycin-Derivat **58** (7.0 mg, 6.0  $\mu\text{mol}$ , 1.2  $\text{\AA}q$ ) wurden in abs. DMSO (2 mL) vorgelegt und für 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Wasser (5 mL) verdünnt und das Lösungsmittel über Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 5.0 mg (2.5  $\mu\text{mol}$ , 50%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 20.5$  min (Methode 11).

**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 65:35):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261.

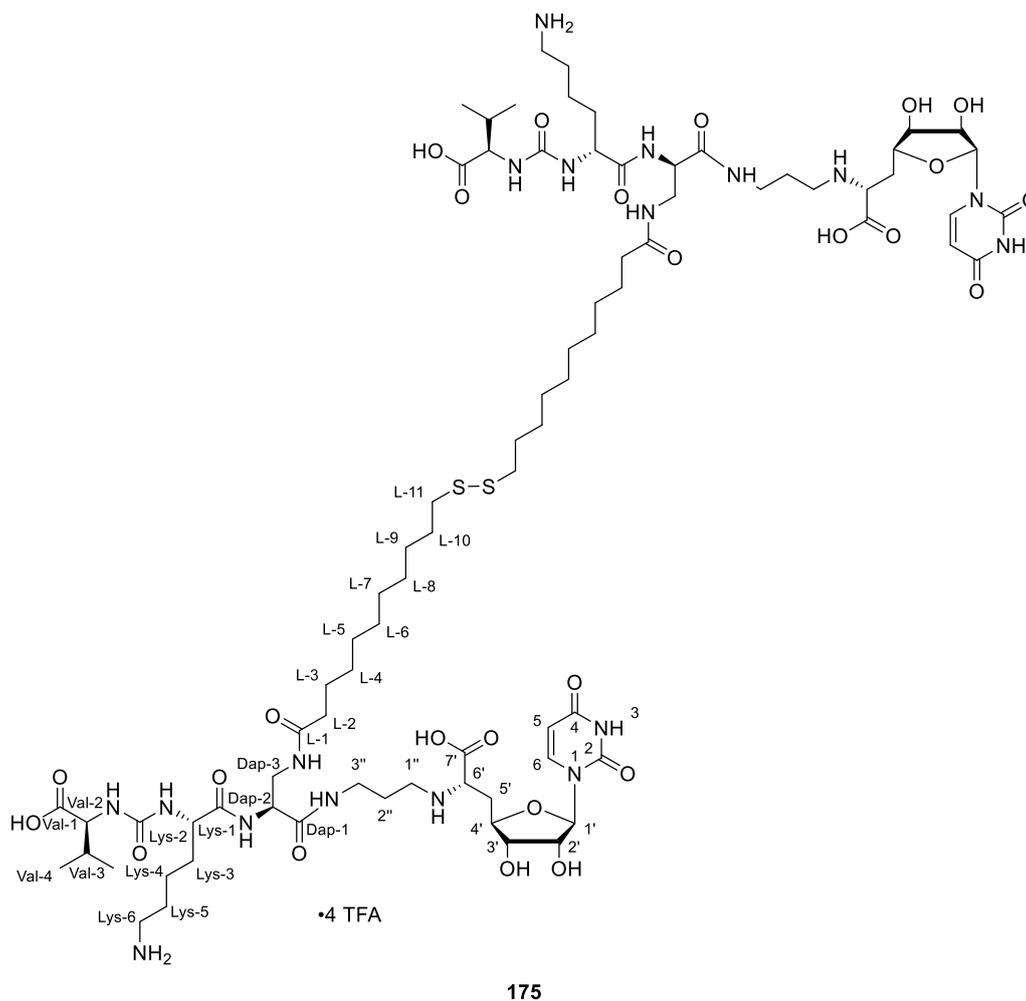
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 1457.98$  [M+H]<sup>+</sup>, 728.94 [M+2H]<sup>2+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>57</sub>H<sub>102</sub>N<sub>16</sub>O<sub>24</sub>S<sub>2</sub><sup>2+</sup>: 729.3342, gef.: 729.3311.

$C_{67}H_{105}F_{15}N_{16}O_{34}S_2$  (2027.75)

## 7.2.4.4 Synthese sonstiger Konjugate

## Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Dimer 175



Die folgende Reaktion wurde nicht unter Inertgas-Bedingungen durchgeführt. 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **61** (1.0 mg, 0.87  $\mu\text{mol}$ ) wurde in Wasser (3 mL) gelöst und für 10 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde gefriergetrocknet und mittels semi-präparativer HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 0.75 mg (0.33  $\mu\text{mol}$ , 76%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 22.5$  min (Methode 8).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.83 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6 H, Val-4-H), 0.87 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6 H, Val-4-H), 1.14-1.28 (m, 20 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-7-H, L-8-H), 1.28-1.38 (m, 8 H, L-10-H, Lys-4-H), 1.41-1.49 (m, 6 H, L-3-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.49-1.65 (m, 10 H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>b</sub>, L-9-H), 1.66-1.79 (m, 4 H, 2''-H), 1.93-2.18 (m, 10 H, Val-3-H, L-2-H, 5'-H), 2.67 (t,  $J = 7.2$  Hz, 4 H, Lys-6-H),

2.71-2.79 (m, 4 H, 1''-H), 2.81-2.93 (m, 4 H, 3''-H), 3.04-3.49 (m, 8 H, Dap-3-H, L-11-H), 3.80 (dd,  $J = 5.4$  Hz, 2 H, 3'-H), 3.88-4.12 (m, 8 H, Lys-2-H, Val-2-H, 4'-H, 6'-H), 4.06-4.12 (m, 2 H, 2'-H), 4.14-4.24 (m, 2 H, Dap-2-H), 5.41-5.53 (m, 2 H, 2'-OH), 5.63 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2 H, 5-H), 5.68 (d,  $J = 4.0$  Hz, 2 H, 1'-H), 6.41 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2 H, Val-2-NH), 6.52 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2 H, Lys-2-NH), 7.63 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2 H, 6-H), 7.65-8.02 (m, 10 H, Lys-6-NH<sub>3</sub>, Dap-3-NH, 3''-NH), 8.10 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, Dap-2-NH), 11.38 (s, 2 H, 3-NH).

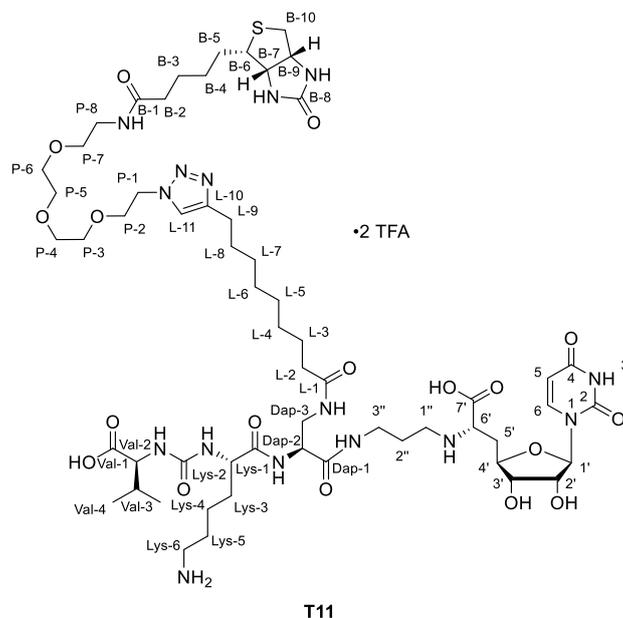
**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 29:71):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 915.27$  [M+2H]<sup>2+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>80</sub>H<sub>138</sub>N<sub>18</sub>O<sub>26</sub>S<sub>2</sub><sup>2+</sup>: 915.4730, gef.: 915.4725.

**C<sub>88</sub>H<sub>140</sub>F<sub>12</sub>N<sub>18</sub>O<sub>34</sub>S<sub>2</sub>** (2286.28)

### Synthese von Muraymycin-Biotin-Konjugat T11



5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **63** (12 mg, 11  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und Azid-PEG3-Biotin **176** (6.0 mg, 13  $\mu$ mol, 1.2 Äq) wurden in Wasser (3 mL, entgast) vorgelegt. Nach Zugabe von Kupfer(II)-sulfat (Spatelspitze, kat.) und Natriumascorbat (1.3 mg, 6.6  $\mu$ mol, 0.6 Äq) wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (ca. 10 mg) zugegeben, 15 min bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 16.4 mg (10.8  $\mu$ mol, 98%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 21.0$  min (Methode 7)

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 0.90 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 0.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 1.17-1.30 (m, 8 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-7-H), 1.30-1.73 (m, 15 H, B-3-H, B-4-H, B-5-H, L-3-H, L-8-H, Lys-4-H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.73-1.83 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.88 (quin, *J* = 7.1 Hz, 2 H, 2''-H), 2.04-2.15 (m, 1 H, Val-3-H), 2.15-2.23 (m, 4 H, L-2-H, B-2-H), 2.23-2.30 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.41 (ddd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 6.9 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.69 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, L-9-H), 2.71-2.77 (m, 1 H, B-10-H<sub>a</sub>), 2.90-2.99 (m, 3 H, Lys-6-H, B-10-H<sub>b</sub>), 3.06 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H, 1''-H), 3.19 (dt, *J* = 13.9 Hz, *J* = 6.6 Hz, 1 H, B-6-H), 3.23-3.32 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.33 (t, *J* = 5.4 Hz, 2 H, P-8-H), 3.33-3.38 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 3.41-3.49 (m, 1 H, Dap-3-H<sub>a</sub>), 3.52-3.63 (m, 11 H, P-3-H, P-4-H, P-5-H, P-6-H, Dap-3-H<sub>b</sub>), 3.64-3.71 (m, 2 H, P-7-H), 3.89 (dd, *J* = 6.5 Hz, 1 H, 6'-H), 3.93 (t, *J* = 4.7 Hz, 2 H, P-2-H), 4.00-4.07 (m, 3 H, Lys-2-H, Val-2-H, 3'-H), 4.13 (ddd, *J* = 10.2 Hz, *J* = 6.9 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1 H, 4'-H), 4.34-4.38 (m, 1 H, B-7-H), 4.36 (dd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1 H, Dap-2-H), 4.39 (dd, *J* = 5.7 Hz, *J* = 3.8 Hz, 1 H, 2'-H), 4.56 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 4.7 Hz, 1 H, B-9-H), 4.58 (t, *J* = 4.7 Hz, 2 H, P-1-H), 5.72 (d, *J* = 3.8 Hz, 1 H, 1'-H), 5.84 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, 5-H), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, 6-H), 7.87 (s, 1 H, L-11-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 17.33 (Val-C-4), 18.64 (Val-C-4), 22.12 (Lys-C-4), 24.27 (L-C-9), 25.27, 25.53, 25.64, 26.32, 27.84, 27.96, 28.03, 28.18, 28.32, 28.37, 28.42, 28.48 (C-2'', Lys-C-5, L-C-3, L-C-4, L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-8, B-C-3, B-C-4, B-C-5), 30.04 (Val-C-3), 30.78 (Lys-C-3), 32.87 (C-5'), 35.56 (L-C-2), 35.77 (B-C-2), 36.24 (C-3''), 39.04 (Lys-C-6), 39.31 (P-C-8), 39.82 (B-C-10), 40.29 (Dap-C-3), 44.31 (C-1'''), 50.52 (P-C-1), 54.65 (Dap-C-2), 54.80 (Lys-C-2), 55.48 (B-C-6), 59.09 (Val-C-2), 59.66 (C-6'), 60.35 (B-C-9), 62.19 (B-C-7), 68.75, 68.99, 69.34, 69.59, 69.61, 69.74, 69.85 (P-C-2, P-C-3, P-C-4, P-C-5, P-C-6, P-C-7), 72.75 (C-2'), 73.02 (C-3'), 80.02 (C-4'), 91.83 (C-1'), 102.31 (C-5), 124.19 (L-C-11), 142.85 (C-6), 148.03 (L-C-10), 151.46 (C-2), 159.82 (N(C=O)N), 165.38 (B-C-8), 166.21 (C-4), 171.64 (C-7'), 171.96 (L-C-1), 175.72 (Dap-C-1), 176.64 (B-C-1), 176.84 (Lys-C-1), 178.44 (Val-C-1).

**<sup>19</sup>F-NMR** (376 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = -75.56.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -107.1$  (*c* = 1.4 mg/mL, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3290, 2931, 2860, 1671, 1552, 1461, 1200, 1131, 799, 720.

**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 64:36):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 1324.38 [M+H]<sup>+</sup>, 662.99 [M+2H]<sup>2+</sup>, 442.33 [M+3H]<sup>3+</sup>.

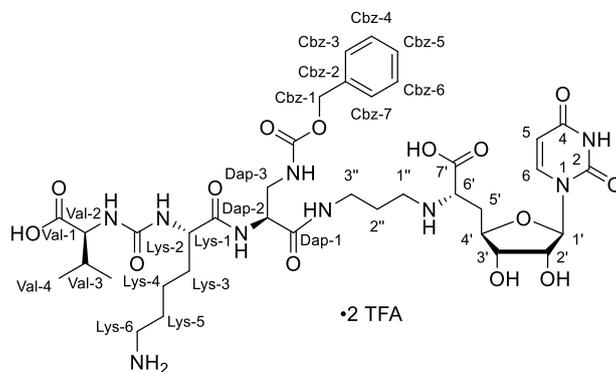
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>58</sub>H<sub>99</sub>N<sub>15</sub>O<sub>18</sub>S<sup>2+</sup>: 662.8501, gef.: 662.8473.

**C<sub>62</sub>H<sub>99</sub>F<sub>6</sub>N<sub>15</sub>O<sub>22</sub>S** (1552.60)

## 7.2.5 Synthese sonstiger 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga

## 7.2.5.1 DAP-haltige Analoga

## Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen 89



89

Das vollständig geschützte 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **65** (23 mg, 18  $\mu$ mol) wurde für 24 h bei Raumtemperatur in einer wässrigen 80%igen TFA-Lösung (4 mL) gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 9.1 mg (8.4  $\mu$ mol, 47%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R$  = 17.2 min (Methode 7).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.87 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 0.90 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 1.31-1.47 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.56-1.69 (m, 3 H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.72-1.81 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.84 (quin,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H, 2''-H), 2.09 (dq,  $J$  = 12.9 Hz,  $J$  = 6.5 Hz, 1 H, Val-3-H), 2.22-2.29 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.41 (ddd,  $J$  = 14.8 Hz,  $J$  = 7.3 Hz,  $J$  = 2.8 Hz, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.94 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2 H, Lys-6-H), 2.98-3.05 (m, 2 H, 1''-H), 3.13-3.28 (m, 2 H, 3''-H), 3.41-3.48 (m, 1 H, Dap-3-H<sub>a</sub>), 3.48-3.55 (m, 1 H, Dap-3-H<sub>b</sub>), 3.90 (dd,  $J$  = 6.3 Hz, 1 H, 6'-H), 4.01-4.08 (m, 3 H, Val-2-H, Lys-2-H, 3'-H), 4.13 (ddd,  $J$  = 10.2 Hz,  $J$  = 6.9 Hz,  $J$  = 2.8 Hz, 1 H, 4'-H), 4.34 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1 H, Dap-2-H), 4.38 (dd,  $J$  = 5.5 Hz,  $J$  = 3.9 Hz, 1 H, 2'-H), 5.04-5.13 (m, 2 H, Cbz-1-H), 5.69 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 1 H, 1'-H), 5.82 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1 H, 5-H), 7.32-7.43 (m, 5 H, Cbz-3-H, Cbz-4-H, Cbz-5-H, Cbz-6-H, Cbz-7-H), 7.58 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.09 (Val-C-4), 18.51 (Val-C-4), 22.05 (Lys-C-4), 25.54 (C-2''), 26.24 (Lys-C-5), 29.97 (Val-C-3), 30.66 (Lys-C-3), 32.69 (C-5'), 36.09 (C-3''), 39.25 (Lys-C-6), 41.37 (Dap-C-3), 44.22 (C-1''), 54.47 (Dap-C-2), 54.55 (Lys-C-2), 58.95 (Val-C-2), 59.22 (C-6'), 67.08 (Cbz-C-1), 72.69 (C-2'), 72.97 (C-3'), 79.75 (C-4'), 91.83 (C-1'), 102.24 (C-5), 115.25 (TFA-CF<sub>3</sub>), 117.57 (TFA-CF<sub>3</sub>), 127.58 (Cbz-C-3, Cbz-C-7), 128.49 (Cbz-C-5), 128.89

(Cbz-C-4, Cbz-C-6), 136.38 (Cbz-C-2), 142.76 (C-6), 151.38 (C-2), 158.81 (N(C=O)O), 159.77 (N(C=O)N), 166.19 (C-4), 171.67 (Dap-C-1), 171.81 (C-7'), 175.73 (Lys-C-1), 176.66 (Val-C-1).

$^{19}\text{F-NMR}$  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.59.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -60.0$  ( $c = 2.7$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3292, 3067, 2963, 1655, 1639, 1545, 1262, 1199, 1132, 721.

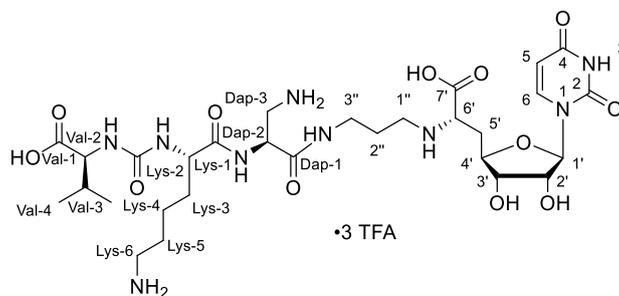
**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  7:3):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 202, 261.

**MS** ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z = 850.53$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

**HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ): ber. für  $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{N}_9\text{O}_{14}^+$ : 850.3941, gef.: 850.39269.

$\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{F}_6\text{N}_9\text{O}_{18}$  (1077.94)

### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **87**



87

5'-Desoxy-Muraymycin-Analogen **89** (13.5 mg, 12.5  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) wurde in Wasser (2 mL) gelöst. Nach Zugabe von Palladium (10% auf Aktivkohle, 2.5 mg, 2.4  $\mu\text{mol}$ , 0.2  $\text{\AA}q$ ) und 1,4-Cyclohexadien (24.0  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{mol}$ , 20  $\text{\AA}q$ ) wurde für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Spritzenfiltration wurde das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über semi-präparative HPLC (C18-Säule).

**Ausbeute:** 6.38 mg (6.03  $\mu\text{mol}$ , 48%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 11.6$  min (Methode 11).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.88 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3 H, Val-4-H), 0.91 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.32-1.50 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.58-1.71 (m, 3 H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.75-1.83 (m, 1 H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.86 (quin,  $J = 7.0$  Hz, 2 H, 2''-H), 2.11 (td,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, Val-3-H), 2.20 (ddd,  $J = 15.1$  Hz,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 6.3$  Hz, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.38 (ddd,  $J = 14.9$  Hz,  $J = 6.5$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.94 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.03 (td,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 3.6$  Hz, 2 H, 1''-H), 3.20-3.27 (m, 3 H, 3''-H, Dap-3-H<sub>a</sub>), 3.44 (dd,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, Dap-3-H<sub>b</sub>), 3.81 (dd,  $J = 6.6$  Hz, 1 H, 6'-H), 3.90 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, Val-2-H), 4.01-4.07 (m, 2 H, Lys-2-H, 3'-H), 4.07-

4.14 (m, 1 H, 4'-H), 4.38 (dd,  $J = 5.7$  Hz,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 2'-H), 4.60 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, Dap-2-H), 5.70 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.83 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 5-H), 7.61 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.03 (Val-C-4), 18.46 (Val-C-4), 22.21 (Lys-C-4), 25.47 (C-2''), 26.19 (Lys-C-5), 29.78 (Val-C-3), 30.31 (Lys-C-3), 32.78 (C-5'), 36.20 (C-3''), 39.22 (Lys-C-6), 39.84 (Dap-C-3), 44.26 (C-1''), 50.72 (Dap-C-2), 54.33 (Lys-C-2), 59.05 (Val-C-2), 59.61 (C-6'), 72.57 (C-2'), 72.91 (C-3'), 79.91 (C-4'), 91.77 (C-1'), 102.23 (C-5), 114.41 (TFA- $\text{CF}_3$ ), 118.28 (TFA- $\text{CF}_3$ ), 142.80 (C-6), 151.44 (C-2), 159.74 (N(C=O)N), 162.74 (TFA-C=O), 163.21 (TFA-C=O), 166.19 (C-4), 170.23 (Dap-C-1), 171.87 (C-7'), 176.08 (Lys-C-1), 176.75 (Val-C-1).

$^{19}\text{F-NMR}$  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.60.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -6.52$  ( $c = 1.5$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3044, 2966, 1664, 1552, 1461, 1265, 1183, 1132, 799, 721.

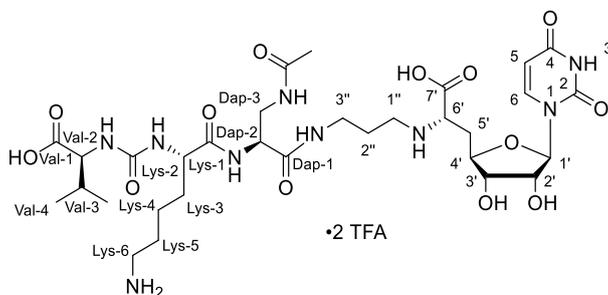
**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  76:24):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI $^+$ ):  $m/z = 716.01$  [M+H] $^+$ , 738.03 [M+Na] $^+$ .

**HRMS** (ESI $^+$ ): ber. für  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_9\text{O}_{12}^+$ : 716.3574, gef.: 716.3583.

$\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{F}_9\text{N}_9\text{O}_{18}$  (1057.83)

### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **88**



**88**

Essigsäure **177** (1.8 mg, 1.7  $\mu\text{L}$  30  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ), EDC Hydrochlorid (5.8 mg, 30  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ), HOBT (4.1 mg, 30  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) und  $N,N$ -Diisopropylethylamin (8.6 mg, 12  $\mu\text{L}$ , 67  $\mu\text{mol}$ , 2.2  $\text{\AA}q$ ) wurden ins abs. THF (3 mL) vorgelegt und für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **64** (35 mg, 30  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) gelöst in abs. THF (5 mL) wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 98:2  $\rightarrow$  95:5). Zur globalen Entschützung wurde das Zwischenprodukt in 80%iger TFA-Lösung in Wasser (10 mL) gelöst und für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Die

Reaktionslösung wurde unter reduziertem Druck eingengt, mit Wasser (12 mL) verdünnt und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 8.48 mg (8.60  $\mu$ mol, 29%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 19.5$  min (Methode 5).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.87 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 0.90 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.30-1.48 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.56-1.69 (m, 3 H, Lys-5-H, Lys-3- $\text{H}_a$ ), 1.70-1.79 (m, 1 H, Lys-3- $\text{H}_b$ ), 1.85 (quin,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, 2''-H), 1.91 (s, 3 H, Ac- $\text{CH}_3$ ), 2.05-2.16 (m, 1 H, Val-3-H), 2.20-2.29 (m, 1 H, 5'- $\text{H}_a$ ), 2.40 (ddd,  $J = 15.0$  Hz,  $J = 6.8$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, 5'- $\text{H}_b$ ), 2.93 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, Lys-6-H), 3.04 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, 1''-H), 3.13-3.22 (m, 1 H, 3''- $\text{H}_a$ ), 3.22-3.30 (m, 1 H, 3''- $\text{H}_b$ ). 3.42 (dd,  $J = 14.3$  Hz,  $J = 7.1$  Hz, 1 H, Dap-3- $\text{H}_a$ ), 3.50-3.57 (m, 1 H, Dap-3- $\text{H}_b$ ). 3.94 (dd,  $J = 6.3$  Hz, 1 H, 6'-H), 3.96-4.07 (m, 3 H, Val-2-H, Lys-2-H, 3'-H), 4.07-4.13 (m, 1 H, 4'-H), 4.31 (dd,  $J = 6.9$  Hz,  $J = 4.7$  Hz, 1 H, 2'-H), 4.36 (dd,  $J = 5.4$  Hz,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, Dap-2-H), 5.69 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.81 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 5-H), 7.58 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 6-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 16.97 (Val-C-4), 18.56 (Val-C-4), 21.81 (Ac- $\text{CH}_3$ ), 22.03 (Lys-C-4), 25.53 (C-2''), 26.24 (Lys-C-5), 30.00 (Val-C-3), 30.53 (Lys-C-3), 32.59 (C-5'), 36.13 (C-3'), 39.19 (Lys-C-6), 40.19 (Dap-C-3), 44.21 (C-1''), 54.46 (Dap-C-2), 54.49 (Lys-C-2), 58.89 (Val-C-2), 59.09 (C-6'), 72.64 (C-2'), 72.94 (C-3'), 79.70 (C-4'), 91.77 (C-1'), 102.19 (C-5), 142.81 (C-6), 151.43 (C-2), 159.77 (N(C=O)N), 166.24 (C-4), 171.64 (C-7', Dap-C-1), 172.27 (Ac-(C=O)), 175.80 (Lys-C-1), 176.64 (Val-C-1).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.67.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -9.7$  ( $c = 1.0$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2966, 1651, 1553, 1462, 1426, 1197, 1131, 1056, 799, 720.

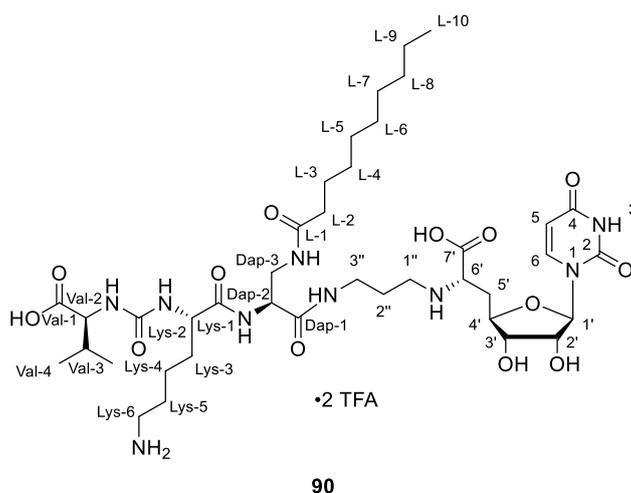
**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  71:29):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 758.20$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{N}_9\text{O}_{13}^+$ : 758.3680, gef.: 758.3658.

**$\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_{173}$**  (985.85)

## Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon 90



*n*-Decansäure **178** (3.3 mg, 19  $\mu$ mol, 1.0 Äq), PyBOP (10 mg, 19  $\mu$ mol, 1.0 Äq), HOBT (2.6 mg, 19  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (5.2 mg, 7.0  $\mu$ L, 40  $\mu$ mol, 2.1 Äq) wurden in abs. THF (4 mL) vorgelegt und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **64** (22 mg, 19  $\mu$ mol, 1.0 Äq) gelöst in abs. THF (6 mL) wurde für 25 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand zur globalen Entschützung mit 80%iger TFA Lösung in Wasser (5 mL) für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde unter reduziertem Druck eingengt, mit Wasser (5 mL) verdünnt und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 8.64 mg (7.87  $\mu$ mol, 41%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R$  = 32.2 min (Methode 7).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.83-0.86 (m, 3 H, L-10-H), 0.84 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 0.87 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3 H, Val-4-H), 1.14-1.28 (m, 12 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-7-H, L-8-H, L-9-H), 1.28-1.39 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.40-1.49 (m, 3 H, L-3-H, Lys-3- $H_a$ ), 1.49-1.56 (m, 2 H, Lys-5-H), 1.56-1.65 (m, 1 H, Lys-3- $H_b$ ), 1.69-1.79 (m, 2 H, 2''-H), 1.96-2.08 (m, 3 H, Val-3-H, L-2-H), 2.12-2.24 (m, 2 H, 5'-H), 2.70-2.80 (m, 2 H, Lys-6-H), 2.84-2.97 (m, 2 H, 1''-H), 2.97-3.06 (m, 1 H, 3''- $H_a$ ), 3.11-3.21 (m, 1 H, 3''- $H_b$ ), 3.21-3.31 (m, 1 H, Dap-3- $H_a$ ), 3.31-3.39 (m, 2 H, Dap-3- $H_b$ , 6'-H), 3.82 (dd,  $J$  = 5.5 Hz, 1 H, 3'-H), 3.84-3.98 (m, 2 H, Lys-2-H, 4'-H), 4.03 (dd,  $J$  = 9.0 Hz,  $J$  = 4.9 Hz, 1 H, Val-2-H), 4.08-4.14 (m, 1 H, 2'-H), 4.16-4.23 (m, 1 H, Dap-2-H), 5.48-5.55 (m, 1 H, 2'-OH), 5.63 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 2.2 Hz, 1 H, 5-H), 5.71 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 1 H, 1'-H), 6.41 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1 H, Val-2-NH), 6.54 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1 H, Lys-2-NH), 7.61 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1 H, 6-H), 7.69-7.82 (m, 3 H, Lys-6-NH $_3$ ), 7.82-7.88 (m, 1 H, Dap-3-NH), 8.00 (dd,  $J$  = 5.5 Hz, 1 H, 3''-NH), 8.04 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1 H, Dap-2-NH), 11.38 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1 H, 3-NH).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 13.92 (L-C-10), 17.49 (Val-C-4), 19.08 (Val-C-4), 22.06 (Lys-C-4, L-C-4), 25.17 (L-C-3), 25.81 (C-2''), 26.65 (Lys-C-5), 28.64, 28.78, 28.86 (L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-9), 30.34 (Val-C-3), 31.25 (L-C-8), 31.64 (Lys-C-3), 32.76 (C-5'), 35.30 (L-C-2), 35.90 (C-3''), 38.92 (Lys-C-6), 40.60 (Dap-C-3), 43.62 (C-1''), 53.64 (Dap-C-2), 53.69 (Lys-C-2), 56.87 (C-6'), 57.44 (Val-C-2), 72.42 (C-2'), 73.06 (C-3'), 78.61 (C-4'), 89.51 (C-1'), 101.97 (C-5), 141.27 (C-6), 150.53 (C-2), 157.95 (N(C=O)N), 163.03 (C-4), 169.87 (Lys-C-1), 169.92 (Dap-C-1), 172.65 (C-7'), 173.23 (L-C-1), 173.80 (Val-C-1).

<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = -75.64.

Drehwert:  $[\alpha]_D^{20} = -15.0$  (c = 1.3 mg/mL, H<sub>2</sub>O).

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2927, 1655, 1552, 1465, 1263, 1200, 1133, 800, 721, 552.

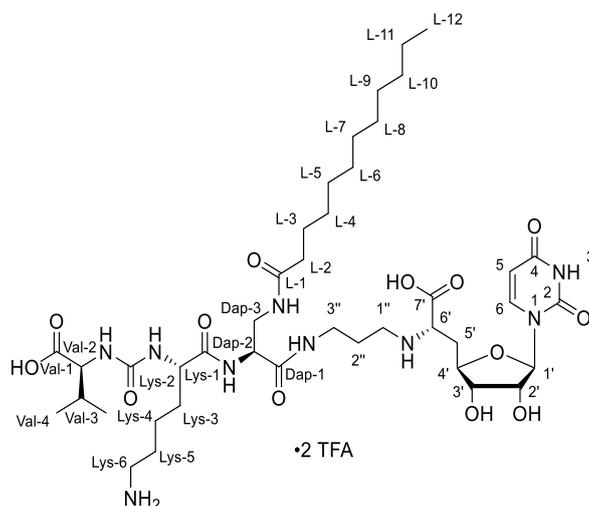
UV (MeCN):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 261.

MS (ESI<sup>+</sup>): m/z = 870.01 [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>39</sub>H<sub>68</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub><sup>+</sup>: 870.4932, gef.: 870.4902.

C<sub>43</sub>H<sub>69</sub>F<sub>6</sub>N<sub>9</sub>O<sub>17</sub> (1098.06)

### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon 91



91

*n*-Dodecansäure **179** (3.8 mg, 19 μmol, 1.0 Äq), EDC Hydrochlorid (3.6 mg, 19 μmol, 1.0 Äq), HOBT (2.6 mg, 19 μmol, 1.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (5.2 mg, 7.0 μL, 40 μmol, 2.1 Äq) wurden ins abs. THF (4 mL) vorgelegt und für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **64** (22 mg, 19 μmol, 1.0 Äq) gelöst in abs. THF (6 mL) wurde für 25 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand zur globalen Entschützung mit 80%iger TFA-Lösung

in Wasser (10 mL) für 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde unter reduziertem Druck eingengt, mit Wasser (5 mL) verdünnt und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 6.31 mg (5.60  $\mu$ mol, 30%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 34.5$  min (Methode 17).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.80-0.87 (m, 3 H, L-12-H), 0.83 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3 H, Val-4-H), 0.87 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.10-1.27 (m, 16 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-7-H, L-8-H, L-9-H, L-10-H, L-11-H), 1.27-1.38 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.39-1.49 (m, 3 H, L-3-H, Lys-3- $H_a$ ), 1.49-1.63 (m, 3 H, Lys-3- $H_b$ , Lys-5-H), 1.65-1.76 (m, 2 H, 2''-H), 1.92-2.17 (m, 5 H, Val-3-H, 5'-H, L-2-H), 2.68-2.80 (m, 2 H, Lys-6-H), 2.81-2.93 (m, 2 H, 1''-H), 3.04-3.14 (m, 2 H, 3''-H), 3.18-3.31 (m, 3 H, Dap-3-H, 6'-H), 3.80 (dd,  $J = 5.7$  Hz, 1 H, 3'-H), 3.92-4.11 (m, 4 H, 2'-H, 4'-H, Lys-2-H, Val-2-H), 4.15-4.24 (m, 1 H, Dap-2-H), 5.41-5.51 (m, 1 H, 2'-OH), 5.62 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5-H), 5.68 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1 H, 1'-H), 6.41 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1 H, Val-2-NH), 6.52 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1 H, Lys-2-NH), 7.63 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 6-H), 7.84-7.90 (m, 1 H, Dap-3-NH), 7.91-8.05 (m, 1 H, 3''-NH), 8.05-8.11 (m, 1 H, Dap-2-NH), 11.32-11.40 (m, 1 H, 3-NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.92 (L-C-12), 17.54 (Val-C-4), 19.11 (Val-C-4), 21.78, 22.06 (Lys-C-4, L-C-4), 25.18 (L-C-3), 25.95 (C-2''), 26.48 (Lys-C-5), 28.68, 28.78, 28.91, 28.98, 29.01 (L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-8, L-C-9, L-C-11), 30.31 (Val-C-3), 31.26 (L-C-10), 31.72 (Lys-C-3), 31.77 (C-5'), 35.29 (L-C-2), 35.90 (C-3''), 38.46 (Lys-C-6), 40.47 (Dap-C-3), 43.56 (C-1''), 53.32 (Dap-C-2), 53.69 (Lys-C-2), 57.40 (C-6'), 57.47 (Val-C-2), 72.65 (C-2'), 73.06 (C-3'), 79.66 (C-4'), 89.47 (C-1'), 101.90 (C-5), 141.34 (C-6), 150.53 (C-2), 157.83 (N(C=O)N), 163.06 (C-4), 169.91 (Lys-C-1), 169.99 (Dap-C-1), 172.62 (C-7'), 173.21 (L-1-C), 173.88 (Val-C-1).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.64.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -16.7$  ( $c = 1.2$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

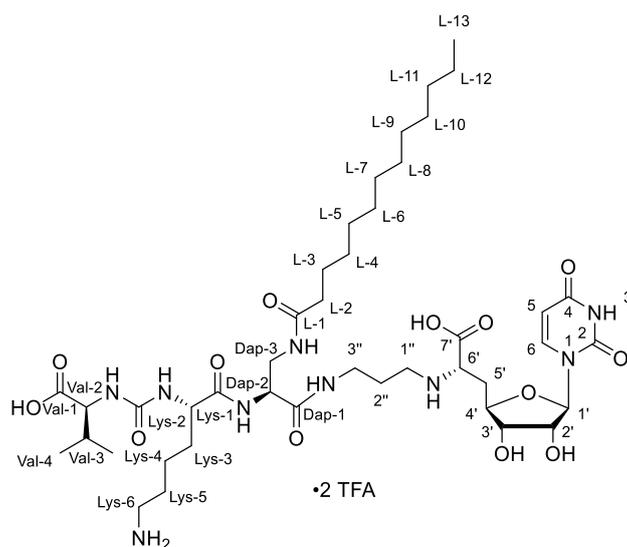
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2925, 1665, 1553, 1465, 1265, 1200, 1134, 800, 721, 560.

**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  16:84):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI $^+$ ):  $m/z = 898.27$  [M+H] $^+$ , 450.04 [M+2H] $^+$ .

**HRMS** (ESI $^+$ ): ber. für  $\text{C}_{41}\text{H}_{72}\text{N}_9\text{O}_{13}^+$ : 898.5244, gef.: 898.5394.

**$\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{F}_6\text{N}_9\text{O}_{17}$**  (1126.12)

Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **92**

*n*-Tridecansäure **180** (4.1 mg, 19  $\mu$ mol, 1.0 Äq), EDC Hydrochlorid (3.6 mg, 19  $\mu$ mol, 1.0 Äq), HOBt (2.6 mg, 19  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (5.2 mg, 7.0  $\mu$ L, 40  $\mu$ mol, 2.1 Äq) wurden ins abs. THF (4 mL) vorgelegt und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe des 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons **64** (22 mg, 19  $\mu$ mol, 1.0 Äq) gelöst in abs. THF (6 mL) wurde für 25 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand zur globalen Entschützung mit 80%iger TFA Lösung in Wasser (10 mL) für 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde unter reduziertem Druck eingengt, mit Wasser (5 mL) verdünnt und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 6.83 mg (5.99  $\mu$ mol, 32%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R$  = 35.1 min (Methode 17).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.81-0.87 (m, 3 H, L-13-H), 0.83 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3 H, Val-4-H), 0.87 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3 H, Val-4-H), 1.14-1.29 (m, 18 H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-7-H, L-8-H, L-9-H, L-10-H, L-11-H, L-12-H), 1.29-1.38 (m, 2 H, Lys-4-H), 1.39-1.49 (m, 3 H, L-3-H, Lys-3-H<sub>a</sub>), 1.50-1.64 (m, 3 H, Lys-5-H, Lys-3-H<sub>b</sub>), 1.67-1.78 (m, 2 H, 2''-H), 1.95-2.19 (m, 5 H, Val-3-H, L-2-H, 5'-H), 2.68-2.81 (m, 2 H, Lys-6-H), 2.89 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H, 1''-H), 3.00-3.17 (m, 2 H, 3''-H), 3.18-3.31 (m, 3 H, Dap-3-H, 6'-H), 3.80 (dd,  $J$  = 5.5 Hz, 1 H, 3'-H), 3.92-4.02 (m, 2 H, 4'-H, Lys-2-H), 4.02-4.06 (m, 1 H, Val-2-H), 4.06-4.13 (m, 1 H, 2'-H), 4.15-4.24 (m, 1 H, Dap-2-H), 5.43-5.55 (m, 1 H, 2'-OH), 5.63 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1 H, 5-H), 5.69 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 1 H, 1'-H), 6.41 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1 H, Val-2-NH), 6.53 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1 H, Lys-2-NH), 7.62 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1 H, 6-H), 7.79-8.01 (m, 2 H, 3''-NH, Dap-3-NH), 8.07 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1 H, Dap-2-NH), 11.35-11.40 (m, 1 H, 3-NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.92 (L-C-13), 17.52 (Val-C-4), 19.10 (Val-C-4), 21.88, 22.06 (Lys-C-4, L-C-4), 25.18 (L-C-3), 25.90 (C-2''), 26.52 (Lys-C-5), 28.67, 28.78, 28.92, 28.99 (L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-8, L-C-9, L-C-10, L-C-12), 30.32 (Val-C-3), 31.26 (L-C-11), 31.72 (Lys-C-3), 33.45 (C-5'), 35.29 (L-C-2), 35.91 (C-3''), 38.90 (Lys-C-6), 40.50 (Dap-C-3), 43.57 (C-1''), 53.45 (Dap-C-2), 53.68 (Lys-C-2), 56.44 (C-6'), 57.46 (Val-C-2), 72.58 (C-2'), 73.06 (C-3'), 79.37 (C-4'), 89.47 (C-1'), 101.92 (C-5), 141.33 (C-6), 150.54 (C-2), 157.88 (N(C=O)N), 163.06 (C-4), 169.91 (Lys-C-1), 169.96 (Dap-C-1), 172.64 (C-7'), 173.22 (L-1-C), 173.85 (Val-C-1).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -75.64.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -13.6$  ( $c = 0.7$  mg/mL,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2925, 1664, 1552, 1465, 1265, 1200, 1134, 800, 721, 551.

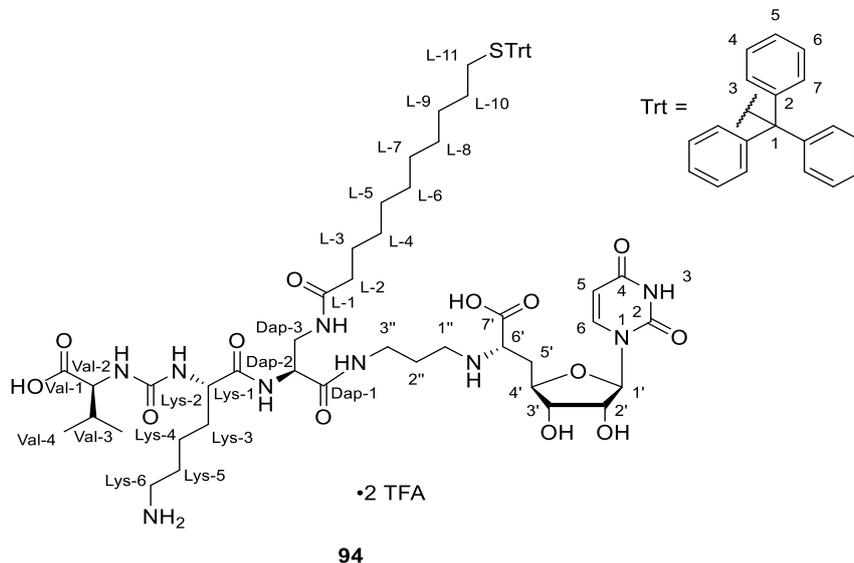
**UV** ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  13:87):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI $^+$ ):  $m/z = 912.43$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , 457.05 [ $\text{M}+2\text{H}$ ] $^+$ .

**HRMS** (ESI $^+$ ): ber. für  $\text{C}_{42}\text{H}_{74}\text{N}_9\text{O}_{13}^+$ : 912.5401, gef.: 912.5394.

**$\text{C}_{46}\text{H}_{75}\text{F}_6\text{N}_9\text{O}_{17}$**  (1140.14)

### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **94**



5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon **174** (10 mg, 6.3  $\mu\text{mol}$ ) wurde in wässriger 80%iger TFA-Lösung (3 mL) gelöst und für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde Wasser (3 mL) zugegeben und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt wurde über semi-präparative HPLC gereinigt (C18-Säule).

**Ausbeute:** 4.79 mg (3.46  $\mu\text{mol}$ , 55%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):**  $t_R = 43.7$  min (Methode 18).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.83 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, Val-4-H), 0.86 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3 H, Val-4-H), 1.01-1.37 (m, 18 H, Lys-4-H, L-4-H, L-5-H, L-6-H, L-7-H, L-8-H, L-9-H, L-10-H, L-11-H), 1.39-1.50 (m, 3 H, L-3-H, Lys-3- $H_a$ ), 1.50-1.64 (m, 3 H, Lys-3- $H_b$ , Lys-5-H), 1.67-1.78 (m, 2 H, 2''-H), 1.91-2.08 (m, 3 H, Val-3-H, L-2-H, 5'- $H_a$ ), 2.08-2.20 (m, 1 H, 5'- $H_b$ ), 2.70-2.79 (m, 2 H, Lys-6-H), 2.84-2.94 (m, 2 H, 1''-H), 3.01-3.16 (m, 2 H, 3''-H), 3.19-3.31 (m, 2 H, Dap-3- $H_a$ , 6'-H), 3.48-3.70 (m, 1 H, Dap-3- $H_b$ ), 3.81 (dd,  $J = 5.5$  Hz, 1 H, 3'-H), 3.91-4.06 (m, 3 H, 4'-H, Val-2-H, Lys-2-H), 4.06-4.13 (m, 1 H, 2'-H), 4.15-4.24 (m, 1 H, Dap-2-H), 5.47 (bs, 1 H, 2'-OH), 5.62 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 5-H), 5.69 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1 H, 1'-H), 6.40 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, Val-2-NH), 6.52 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1 H, Lys-2-NH), 7.13-7.38 (m, 15 H, Trt-3-H, Trt-4-H, Trt-5-H, Trt-6-H, Trt-7-H), 7.62 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H), 7.84 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1 H, Dap-3-NH), 7.85-8.00 (m, 1 H, 3''-NH), 8.05 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1 H, Dap-2-NH), 11.29-11.40 (m, 1 H, 3-NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.52 (Val-C-4), 19.12 (Val-C-4), 21.87 (Lys-C-4, L-C-4), 25.19 (L-C-3), 25.89 (C-2''), 26.55 (Lys-C-5), 27.96, 28.28, 28.41, 28.67, 28.73, 28.75, 28.82 (L-C-5, L-C-6, L-C-7, L-C-8, L-C-9, L-C-10, L-C-11), 30.32 (Val-C-3), 31.23 (C-5'), 32.31 (Lys-C-3), 35.29 (L-C-2), 35.90 (C-3'''), 38.95 (Lys-C-6), 40.10 (Dap-C-3), 43.57 (C-1''), 53.43 (Lys-C-2), 53.67 (Dap-C-2), 57.37 (C-6'), 57.45 (Val-C-2), 65.98 (Trt-C-2), 72.59 (C-2'), 73.06 (C-3'), 78.63 (C-4'), 89.47 (C-1'), 101.93 (C-5), 126.62 (Trt-C-5), 127.95 (Trt-C-3, Trt-C-7), 129.07 (Trt-C-4, Trt-C-6), 141.35 (C-6), 144.56 (Trt-C-2), 150.55 (C-2), 157.87 (N(C=O)N), 163.07 (C-4), 169.92 (Lys-C-1, Dap-C-1), 172.63 (C-7'), 173.21 (L-C-1), 173.88 (Val-C-1).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -73.51.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -11.5$  ( $c = 0.9$  mg/mL, MeOH)

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2927, 2854, 1655, 1560, 1442, 1264, 1201, 1134, 1031, 699.

**UV** (MeCN):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 261.

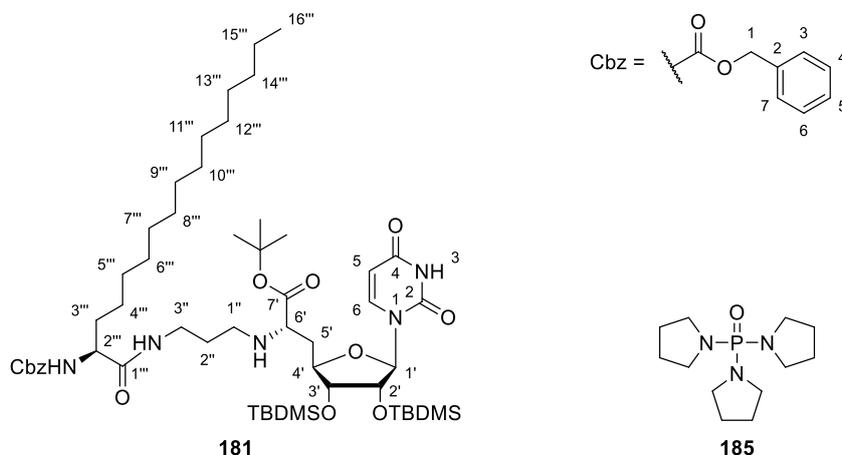
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 1158.51$  [M+H]<sup>+</sup>, 579.87 [M+2H]<sup>2+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für  $\text{C}_{59}\text{H}_{85}\text{N}_9\text{O}_{13}\text{S}^{2+}$ : 579.7988, gef.: 579.7972.

**$\text{C}_{63}\text{H}_{85}\text{F}_6\text{N}_9\text{O}_{17}\text{S}$**  (1386.47)

## 7.2.5.2 Synthese des lipophilen 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogons 93

## Synthese der 5'-Desoxy-Muraymycin-Vorstufe 181



$N^\alpha$ -Cbz-(*S*)-2-Aminohexadecansäure **95** (37 mg, 91  $\mu$ mol, 1.0 Äq), PyBOP (48 mg, 92  $\mu$ mol, 1.0 Äq), HOBt (12 mg, 91  $\mu$ mol, 1.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (32  $\mu$ L, 24 mg, 182  $\mu$ mol, 2.0 Äq) wurden in abs. THF (12 mL) vorgelegt und für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe des (6'*S*)-Diamins **39** (59 mg, 91  $\mu$ mol, 1.0 Äq) wurde für 52.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Die versuchte Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM:MeOH 98:2).

**Ausbeute:** 104 mg eines farblosen Feststoffes verunreinigt mit Tris-(pyrrolidinphosphin)-oxid **185**.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.08 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.10 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.12 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.14 (s, 3 H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.87-0.92 (m, 3 H, 16'''-H), 0.91 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.94 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.23-1.35 (m, 24 H, 4'''-H, 5'''-H, 6'''-H, 7'''-H, 8'''-H, 9'''-H, 10'''-H, 11'''-H, 12'''-H, 13'''-H, 14'''-H, 15'''-H), 1.49 (s, 9 H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.55-1.78 (m, 4 H, 2''-H, 3''-H), 1.94-2.12 (m, 2 H, 5'-H), 2.59-2.81 (m, 2 H, 1''-H), 3.19-3.30 (m, 2 H, 3''-H), 3.45-3.54 (m, 1 H, 6'-H), 3.93 (dd,  $J = 4.7$  Hz, 1 H, 3'-H), 4.00 (dd,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, 2''-H), 4.05-4.16 (m, 1 H, 4'-H), 4.34-4.42 (m, 1 H, 2'-H), 5.08 (q,  $J = 12.6$  Hz, 2 H, Cbz-1-H), 5.70-5.78 (m, 2 H, 5-H, 1'-H), 7.26-7.39 (m, 5 H, Cbz-3-H, Cbz-4-H, Cbz-5-H, Cbz-6-H, Cbz-7-H), 7.64 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, 6-H).

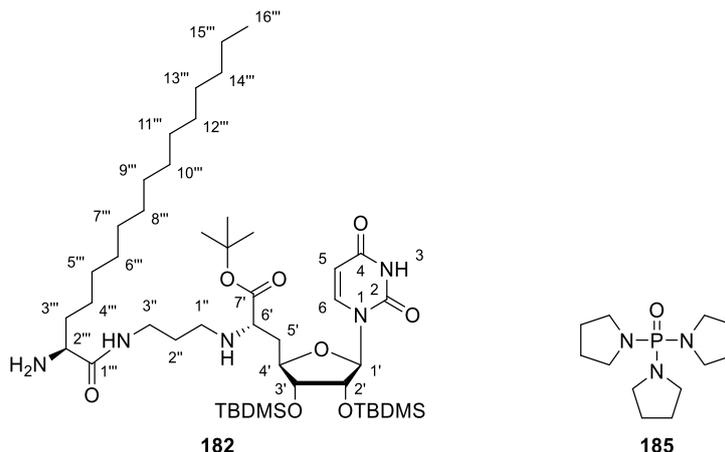
$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] = -4.31 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.26 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.26 ( $\text{SiCH}_3$ ), -3.85 ( $\text{SiCH}_3$ ), 14.62 (C-16'''), 19.02 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.09 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 23.91 (C-15'''), 26.56 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.62 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.56 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 30.48 (C-2''), 30.65, 30.77, 30.86, 30.91, 30.94, 30.97, 33.25 (C-4''', C-5''', C-6''', C-7''', C-8''', C-9''', C-10''', C-11''', C-12''', C-13''', C-14'''), 33.42 (C-3'''), 37.36 (C-5'), 37.92 (C-3''), 45.93 (C-1''), 55.96 (C-2'''), 60.55 (C-6'), 67.84 (Cbz-C-1), 75.73 (C-2'),

76.64 (C-3'), 82.53 (C-4'), 83.73 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 92.59 (C-1'), 103.19 (C-5), 129.01 (Cbz-C-3, Cbz-C-7), 129.19 (Cbz-C-5), 129.64 (Cbz-C-4, Cbz-C-6), 138.32 (Cbz-C-2), 143.23 (C-6), 152.25 (C-2), 158.57 (Cbz-N(C=O)O), 166.17 (C-4), 175.67, 175.68 (C-7', C-1''').

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 1030.56 [M+H]<sup>+</sup>.

**C<sub>54</sub>H<sub>95</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>Si<sub>2</sub>** (1030.55)

### Cbz-Entschützung der 5'-Desoxy-Muraymycin-Vorstufe **182**



Die verunreinigte Muraymycin-Vorstufe **181** (57 mg) wurde in abs. *iso*-Propanol (5 mL) gelöst. Nach Zugabe von Palladium Black (ca. 10 mg) und 1,4-Cyclohexadien (0.10 mL, 86 mg, 1.1 mmol) wurde für 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Spritzenfiltration wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 50 mg eines farblosen Feststoffes verunreinigt mit dem Tris-(pyrrolidinphosphin)-oxid **185**.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] = 0.09 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.14 (s, 3 H, SiCH<sub>3</sub>), 0.83-0.95 (m, 3 H, 16'''-H), 0.91 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.94 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.22-1.38 (m, 24 H, 4'''-H, 5'''-H, 6'''-H, 7'''-H, 8'''-H, 9'''-H, 10'''-H, 11'''-H, 12'''-H, 13'''-H, 14'''-H, 15'''-H), 1.49 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.54-1.78 (m, 4 H, 2''-H, 3'''-H), 1.87-2.12 (m, 2 H, 5'-H), 2.45-2.72 (m, 2 H, 1''-H), 3.08-3.29 (m, 2 H, 3''-H), 3.29-3.40 (m, 1 H, 6'-H), 3.50 (dd, *J* = 6.6 Hz, 1 H, 2'''-H), 3.91 (dd, *J* = 4.6 Hz, 1 H, 3'-H), 4.01-4.12 (m, 1 H, 4'-H), 4.34 (dd, *J* = 4.4 Hz, 1 H, 2'-H), 5.71-5.84 (m, 2 H, 5-H, 1'-H), 7.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, 6-H).

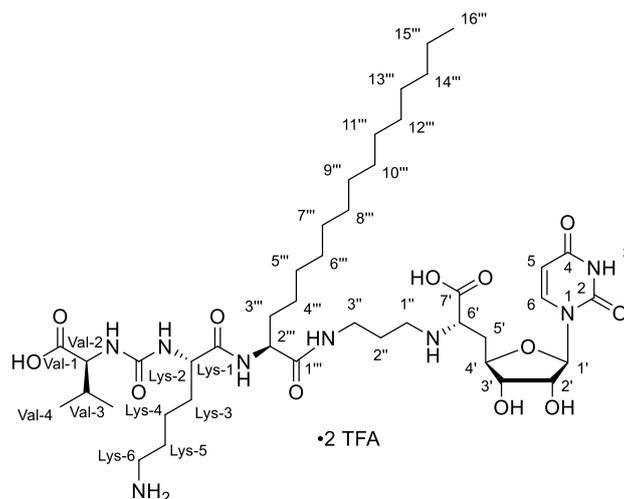
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] = -4.28 (SiCH<sub>3</sub>), -4.24 (SiCH<sub>3</sub>), -4.24 (SiCH<sub>3</sub>), -3.82 (SiCH<sub>3</sub>), 14.62 (C-16'''), 19.02 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.09 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.88 (C-15'''), 26.58 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.63 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.62 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.47 (C-2''), 30.62, 30.69, 30.84, 30.92, 30.95, 31.07, 33.22, (C-4''', C-5''', C-6''', C-7''', C-8''', C-9''', C-10''', C-11''', C-12''', C-13''', C-14'''), 34.80 (C-3''').

38.17 (C-5'), 38.48 (C-3'''), 46.28 (C-1'''), 55.65 (C-2'''), 60.88 (C-6'), 76.00 (C-2'), 76.72 (C-3'), 82.76 (C-4'), 83.04 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 92.03 (C-1'), 103.21 (C-5), 142.91 (C-6), 152.27 (C-2), 166.18 (C-4), 174.13, 174.86 (C-7', C-1''').

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 896.51 [M+H]<sup>+</sup>.

**C<sub>46</sub>H<sub>89</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub>** (896.42)

### Synthese von 5'-Desoxy-Muraymycin-Analogon 93



93

Harnstoffdipeptid **41** (18 mg, 40 μmol, 1.0 Äq), PyBOP (21 mg, 40 μmol, 1.0 Äq), HOBT (5.4 mg, 40 μmol, 1.0 Äq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (10 mg, 14 μL, 80 μmol, 2.0 Äq) wurden in abs. THF (3 mL) vorgelegt und für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe der verunreinigten 5'-Desoxy-Muraymycin-Vorstufe **182** (50 mg), gelöst in abs. THF (5 mL), wurde für 31 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde nach abgeschlossener Reaktion unter reduziertem Druck entfernt.

Zur globalen Entschützung wurde das geschützte Zwischenprodukt für 40 h bei Raumtemperatur in 80% TFA in Wasser (10 mL) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit destilliertem Wasser (18 mL) verdünnt und das Lösungsmittel über Gefriertrocknung entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über semi-präparative HPLC (Phenylhexyl-Säule).

**Ausbeute:** 11.6 mg (10.4 μmol, 21% über vier Stufen) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC (semi-präparativ):** t<sub>R</sub> = 26.7 min (Methode 19).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 0.72 (t, *J* = 6.5 Hz, 3 H, 16'''-H), 0.76-0.90 (m, 6 H, Val-4-H), 1.03-1.46 (m, 26 H, 3'''-H, 4'''-H, 5'''-H, 6'''-H, 7'''-H, 8'''-H, 9'''-H, 10'''-H, 11'''-H, 12'''-H, 13'''-H, 14'''-H, 15'''-H), 1.49-1.80 (m, 6 H, Lys-3-H, Lys-4-H, Lys-5-H), 1.80-1.97 (m, 2 H, 2''-H),

2.00-2.14 (m, 1 H, Val-3-H), 2.14-2.29 (m, 1 H, 5'-H<sub>a</sub>), 2.29-2.45 (m, 1 H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.84-2.96 (m, 2 H, Lys-6-H), 2.97-3.11 (m, 2 H, 1''-H), 3.11-3.20 (m, 1 H, 3''-H<sub>a</sub>), 3.22-3.39 (m, 1 H, 3''-H<sub>b</sub>), 3.77-3.94 (m, 1 H, 6'-H), 3.94-4.26 (m, 5 H, 3'-H, 4'-H, 2'''-H, Lys-2-H, Val-2-H), 4.27-4.35 (m, 1 H, 2'-H), 5.69 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1 H, 1'-H), 5.78 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H, 5-H), 7.57 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, 6-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 13.79 (C-16'''), 17.23 (Val-C-4), 19.11 (Val-C-4), 22.25 (C-15'''), 22.54 (Lys-C-4), 25.42, 26.39, 29.35, 29.66, 29.76 (Lys-C-5, C-2'', C-3''', C-4''', C-5''', C-6''', C-7''', C-8''', C-9''', C-10''', C-11''', C-12''', C-13''', C-14''', Val-C-3), 30.78 (Lys-C-3), 31.86 (C-5'), 36.36 (C-3''), 39.26 (Lys-C-6), 44.51 (C-1''), 54.00 (Lys-C-2, C-2'''), 58.14 (Val-C-2), 59.82 (C-6'), 72.86 (C-2'), 72.90 (C-3'), 80.01 (C-4'), 91.28 (C-1'), 102.24 (C-5), 116.41 (q,  $J_{CF} = 292.1$  Hz, TFA-CF<sub>3</sub>), 142.45 (C-6), 151.26 (C-2), 159.09 (N(C=O)N), 162.90 (q,  $J_{CF} = 35.8$  Hz, TFA-C=O), 165.74 (C-4), 172.08 (C-7'), 173.70 (C-1'''), 174.92 (Lys-C-1), 175.80 (Val-C-1).

**<sup>19</sup>F-NMR** (376 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = -75.58.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -7.5$  (c = 2.7 mg/mL, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2925, 1668, 1555, 1465, 1200, 1134, 833, 800, 721, 551.

**UV** (H<sub>2</sub>O:MeCN 18:82):  $\lambda_{max}$  [nm] = 261.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 883.46 [M+H]<sup>+</sup>, 442.49 [M+2H]<sup>2+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>42</sub>H<sub>75</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub><sup>+</sup>: 883.5499, gef.: 883.5493.

**C<sub>46</sub>H<sub>76</sub>F<sub>6</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>** (1111.14)

## 7.3 Biologische Testung

### 7.3.1 Fluoreszenz-basierter *in vitro*-MraY-Assay

Der Fluoreszenz-basierte MraY-Assay zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte folgte einer zuvor publizierten Methode.<sup>[71,226]</sup> Dieser Assay basiert auf den Ergebnissen des Fluoreszenz-basierten Assays von Bugg et al.<sup>[69,227,228]</sup> Die Messungen wurden von N. Kagerah und S. Weck durchgeführt.

### 7.3.2 Antibakterielle Aktivitätsmessung

Die antibakteriellen Aktivitätsmessungen der Verbindungen wurden ebenfalls nach einer bereits publizierten Methode durchgeführt.<sup>[89]</sup> Die Messungen wurden von M. Jankowski und N. Kagerah durchgeführt.

### 7.3.3 Zellaufnahme-Assay

Die durchgeführten Zellaufnahme-Assays erfolgten auf der Grundlage der Arbeiten von J. Meiers<sup>[182]</sup> und wurden von S. Weck weitergehend optimiert und durchgeführt (unveröffentlichte Ergebnisse).

### 7.3.4 Stabilitätstests

Die Stabilitätstests wurden von M. Jankowski durchgeführt. Es wurden vor jeder Stabilitätsmessung Kalibriergeraden in Milli-Q-Wasser mit einer Verdünnungsreihe (5 µM, 2.5 µM, 1 µM, 0.5 µM, 0.25 µM und 0.1 µM) aus der 20 mM Stammlösung (in DMSO) der entsprechenden Verbindung gemessen. Im Falle der Konjugat-Verbindungen **T6** und **T7** wurde jeweils auch eine Kalibriergerade für das im bakteriellen Lysat entstehende Muraymycin-Analogon **68** aufgenommen.

#### Phosphatpuffer:

Die 50 mM Phosphatpuffer-Lösung wurde mit Dinatriumhydrogenphosphat (547 mg) und Kaliumhydrogenphosphat (155 mg) in Milli-Q-Wasser (100 mL) angesetzt und der pH-Wert mit Phosphorsäure und 0.1 M NaOH-Lösung auf 7.3 eingestellt.

Es wurden sechs Messpunkte (nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h) jeweils in Doppelbestimmung aufgenommen. Die Detektion der Verbindungen erfolgte mittels HPLC-gekoppelter HRMS. Die Messungen erfolgten ohne Zugabe eines internen Standards.

#### Bakterielles Zelllysat:

Das bakterielle Zelllysat wurde aus *E. coli*  $\Delta$ tolC gewonnen. Nach Wachstum der Zellen in LB-Medium bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0.6 wurden die Zellen durch Zentrifugation

(3060 x g bei 4 °C) vom Medium getrennt, das erhaltene Zellpellet bei 0 °C mit Natriumphosphat-Puffer (10 mL) sowie mit Protease-Inhibitor der Firma Roche versetzt und per Ultraschall lysiert (10 Zyklen, 80% Leistung, 15 s Puls mit jeweils 45 s Pause). Nach erneuter Zentrifugation (3060 x g bei 4 °C) wurde das Zelllysat vom Rückstand getrennt und in den Stabilitätsmessungen eingesetzt.

Die Zusammensetzung der Proben bestand aus dem Bakterienlysat (27 µL) und der Stammlösung der jeweiligen Probe (20 mM, 3 µL) gelöst in Natriumphosphatpuffer (199 µL).

Als Stopplösung wurde eine gekühlte Diphenhydramin-Lösung (1.5 µM) eingesetzt und die Probe nach Zugabe mit Eis gekühlt.

Es wurden sechs Messpunkte (nach 0<sub>1</sub> min (erst Zugabe der Stopplösung auf Lysat, dann Zugabe der Verbindung), 0<sub>2</sub> min (erst Zugabe der Verbindung auf Lysat, dann Zugabe der Stopplösung), 15 min, 30 min, 60 min und 150 min) jeweils in Doppelbestimmung nach Zentrifugation (17000 x g, 1 min) aufgenommen. Die Detektion der Verbindungen im Überstand erfolgte mittels HPLC-gekoppelter HRMS.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] S. A. Waksman, History of the word 'Antibiotic.' *J. Hist. Med. Allied Sci.* **1973**, *28*, 284–286.
- [2] S. A. Waksman, What is an antibiotic or antibiotic substance? *Mycologia* **1947**, *39*, 565–569.
- [3] W. Steglich, B. Fugmann, S. Lang-Fugmann, Römpp-Lexikon Naturstoffe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1997**.
- [4] P. Vuillemin, Antibiose et symbiose. *Assoc. Franc Pour l'Avanc. Des sciences* **1889**, *2*, 525–542.
- [5] E. Chain, H. W. Florey, A. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing, A. G. Sanders, Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The Lancet* **1940**, *236*, 226–228.
- [6] A. Fleming, The discovery of penicillin. *Br. Med. Bull.* **1944**, *2*, 4–5.
- [7] A. Fleming, On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull. W. H. O.* **2001**, *79*, 780–790.
- [8] E. Chain, H. W. Florey, The discovery of the chemotherapeutic properties of penicillin. *Br. Med. Bull.* **1944**, *2*, 5–7.
- [9] K. Bush, The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1213*, 1–4.
- [10] E. P. Abraham, E. Chain, An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* **1940**, *146*, 837.
- [11] W. M. Kirby, Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *staphylococci*. *Science* **1944**, *99*, 452–453.
- [12] K. Lewis, The Science of Antibiotic Discovery. *Cell* **2020**, *181*, 29–45.
- [13] J. Davies, Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **1994**, *264*, 1064–1073.
- [14] P. Courvalin, Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother* **1994**, *38*, 1447–1451.
- [15] P. Heisig, Wirkungs- und Resistenzmechanismen: Was ist neu an Ketoliden und Oxazolidinonen? *Pharmazie in unserer Zeit* **2004**, *33*, 10–19.
- [16] B. Plackett, Why big pharma has abandoned antibiotics. *Nature* **2020**, *586*, 50–52.
- [17] E. Power, Impact of antibiotic restrictions: the pharmaceutical perspective. *Clin. Microbiol. Inf.* **2006**, *12*, 25–34.
- [18] C. Joseph, Y. Togawa, N. Shindo, Bacterial and viral infections associated with influenza. *Influenza Other Respir. Viruses* **2013**, *7*, 105–113.
- [19] D. E. Morris, D. W. Cleary, S. C. Clarke, Secondary Bacterial Infections Associated with Influenza Pandemics. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1041.
- [20] K. A. Shirey, D. J. Perkins, W. Lai, W. Zhang, L. R. Fernando, F. Gusovsky, J. C. G. Blanco, S. N. Vogel, Influenza "Trains" the Host for Enhanced Susceptibility to Secondary Bacterial Infection. *mBio* **2019**, *10*, e00810-19.
- [21] N. Shafran, I. Shafran, H. Ben-Zvi, S. Sofer, L. Sheena, I. Krause, A. Shlomai, E. Goldberg, E. H. Sklan, Secondary bacterial infection in COVID-19 patients is a stronger predictor for death compared to influenza patients. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12703.

- [22] J. Hsu, How covid-19 is accelerating the threat of antimicrobial resistance. *BMJ* **2020**, *369*, m1983.
- [23] T. M. Rawson, D. Ming, R. Ahmad, L. S. P. Moore, A. H. Holmes, Antimicrobial use, drug-resistant infections and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 409–410.
- [24] C. Walsh, Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 65–70.
- [25] K. Kimura, T. D. H. Bugg, Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 252–273.
- [26] P. Singleton, *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*. John Wiley & Sons, Chichester, **1995**.
- [27] H. C. Gram, Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschr. Med.* **1884**, *2*, 185–189.
- [28] H. Hahn, P. Klein, P. Giesbrecht, R. E. Streeck, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, **2005**.
- [29] K. H. Schleifer, O. Kandler, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **1972**, *36*, 407–477.
- [30] J. van Heijenoort, Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 503–519.
- [31] B. Badet, P. Vermoote, P. Y. Haumont, F. Lederer, F. Le Goffic, Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry* **1987**, *26*, 1940–1948.
- [32] S. Dutka-Malen, P. Mazodier, B. Badet, Molecular cloning and overexpression of the glucosamine synthetase gene from *Escherichia coli*. *Biochimie* **1988**, *70*, 287–290.
- [33] D. Mengin-Lecreulx, J. van Heijenoort, Characterization of the essential gene glmM encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 32–39.
- [34] D. Mengin-Lecreulx, J. van Heijenoort, Identification of the glmU gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 6150–6157.
- [35] D. Mengin-Lecreulx, J. van Heijenoort, Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the glmU gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 5788–5795.
- [36] T. Skarzynski, D. H. Kim, W. J. Lees, C. T. Walsh, K. Duncan, Stereochemical course of enzymatic enolpyruvyl transfer and catalytic conformation of the active site revealed by the crystal structure of the fluorinated analogue of the reaction tetrahedral intermediate bound to the active site of the C115A mutant of MurA. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2572–2577.
- [37] T. E. Benson, J. L. Marquardt, A. C. Marquardt, F. A. Etzkorn, C. T. Walsh, Overexpression, purification, and mechanistic study of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2024–2030.
- [38] H. Jin, J. J. Emanuele, R. Fairman, J. G. Robertson, M. E. Hail, H.-T. Ho, P. J. Falk, J. J. Villafranca, Structural studies of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramate: L-alanine ligase. *Biochemistry* **1996**, *35*, 1423–1431.
- [39] C. Michaud, D. Blanot, B. Flouret, J. Heijenoort, Partial purification and specificity studies of the D-glutamate-adding and D-alanyl-D-alanine-adding enzymes from *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *166*, 631–637.

- [40] E. Gordon, B. Flouret, L. Chantalat, J. van Heijenoort, D. Mengin-Lecreulx, O. Dideberg, Crystal structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-diaminopimelate ligase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10999–11006.
- [41] Y. Yan, S. Munshi, B. Leiting, M. S. Anderson, J. Chrzas, Z. Chen, Crystal structure of *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide d-alanyl-d-alanine-adding enzyme (MurF) at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 435–445.
- [42] M. Winn, R. J. M. Goss, K. Kimura, T. D. H. Bugg, Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: Recent advances in structure–function studies and nucleoside biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 279–304.
- [43] S. Ha, E. Chang, M.-C. Lo, H. Men, P. Park, M. Ge, S. Walker, The Kinetic Characterization of *Escherichia coli* MurG Using Synthetic Substrate Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8415–8426.
- [44] A. Bouhss, A. E. Trunkfield, T. D. H. Bugg, D. Mengin-Lecreulx, The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 208–233.
- [45] L.-T. Sham, E. K. Butler, M. D. Lebar, D. Kahne, T. G. Bernhardt, N. Ruiz, MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* **2014**, *345*, 220–222.
- [46] A. J. Meeske, L.-T. Sham, H. Kimsey, B.-M. Koo, C. A. Gross, T. G. Bernhardt, D. Z. Rudner, MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 6437–6442.
- [47] N. Ruiz, Lipid Flippases for Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis. *Lipid Insights* **2015**, *8*, 21–31.
- [48] P. Welzel, Syntheses around the Transglycosylation Step in Peptidoglycan Biosynthesis. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4610–4660.
- [49] B. C. Chung, J. Zhao, R. A. Gillespie, D.-Y. Kwon, Z. Guan, J. Hong, P. Zhou, S.-Y. Lee, Crystal Structure of MraY, an Essential Membrane Enzyme for Bacterial Cell Wall Synthesis. *Science* **2013**, *341*, 1012–1016.
- [50] H. Yamaguchi, S. Sato, S. Yoshida, K. Takada, M. Itoh, H. Seto, N. Otake, Capuramycin, a new nucleoside antibiotic. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 1047–1053.
- [51] H. Seto, N. Otake, S. Sato, H. Yamaguchi, K. Takada, M. Itoh, H. S. M. Lu, J. Clardy, The structure of a new nucleoside antibiotic, capuramycin. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2343–2346.
- [52] C. G. Boojamra, R. C. Lemoine, J. Blais, N. G. Vernier, K. A. Stein, A. Magon, S. Chamberland, S. J. Hecker, V. J. Lee, Synthetic dihydropacidamycin antibiotics: A modified spectrum of activity for the pacidamycin class. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3305–3309.
- [53] S. Koppermann, C. Ducho, Naturstoffe bei der Arbeit: strukturelle Einblicke in die Inhibition des bakteriellen Membranproteins MraY. *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 11896–11898.
- [54] S. Koppermann, C. Ducho, Natural Products at Work: Structural Insights into Inhibition of the Bacterial Membrane Protein MraY. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 11722–11724.
- [55] W. Vollmer, D. Blanot, M. A. D. Pedro, Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 149–167.
- [56] W. G. Struve, F. C. Neuhaus, Evidence for an Initial Acceptor of UDP-NAc-Muramyl-Pentapeptide in the Synthesis of Bacterial Mucopeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, *18*, 6–12.

- [57] W. G. Struve, R. K. Sinha, F. C. Neuhaus, M. S. Prime, On the Initial Stage in Peptidoglycan Synthesis. Phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide Translocase. *Biochemistry* **1966**, *5*, 82–93.
- [58] F. C. Neuhaus, Initial Translocation Reaction in the Biosynthesis of Peptidoglycan by Bacterial Membranes. *Acc. Chem. Res.* **1971**, *4*, 297–303.
- [59] D. D. Pless, F. C. Neuhaus, Initial Membrane Reaction in Peptidoglycan Synthesis, Lipid Dependence of Phospho-N-Acetylmuramyl-pentapeptide Translocase. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 1568–1576.
- [60] M. G. Heydanek Jr, W. G. Struve, F. C. Neuhaus, Initial state in peptidoglycan synthesis. III. Kinetics and uncoupling of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase. *Biochemistry* **1969**, *8*, 1214–1221.
- [61] B. Al-Dabbagh, X. Henry, M. E. Ghachi, G. Auger, D. Blanot, C. Parquet, D. Mengin-Lecreulx, A. Bouhss, Active Site Mapping of MraY, a Member of the Polyprenyl-phosphate N-Acetylhexosamine 1-Phosphate Transferase Superfamily, Catalyzing the First Membrane Step of Peptidoglycan Biosynthesis. *Biochemistry* **2008**, *47*, 8919–8928.
- [62] B. Al-Dabbagh, S. Olatunji, M. Crouvoisier, M. El Ghachi, D. Blanot, D. Mengin-Lecreulx, A. Bouhss, Catalytic mechanism of MraY and WecA, two paralogues of the polyprenyl-phosphate N-acetylhexosamine 1-phosphate transferase superfamily. *Biochimie* **2016**, *127*, 249–257.
- [63] M. Ikeda, M. Wachi, H. K. Jung, F. Ishino, M. Matsushashi, The *Escherichia coli* mraY gene encoding UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide: undecaprenyl-phosphate phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 1021–1026.
- [64] D. S. Boyle, W. D. Donachie, mraY Is an Essential Gene for Cell Growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 6429–6432.
- [65] A. J. Lloyd, P. E. Brandish, A. M. Gilbey, T. D. H. Bugg, Phospho-N-Acetyl-Muramyl-Pentapeptide Translocase from *Escherichia coli*: Catalytic Role of Conserved Aspartic Acid Residues. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1747–1757.
- [66] A. Bouhss, M. Crouvoisier, D. Blanot, D. Mengin-Lecreulx, Purification and Characterization of the Bacterial MraY Translocase Catalyzing the First Membrane Step of Peptidoglycan Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29974–29980.
- [67] Y. Ma, D. Munch, T. Schneider, H.-G. Sahl, A. Bouhss, U. Ghoshdastider, J. Wang, V. Dotsch, X. Wang, F. Bernhard, Preparative Scale Cell-free Production and Quality Optimization of MraY Homologues in Different Expression Modes. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38844–38853.
- [68] B. C. Chung, E. H. Mashalidis, T. Tanino, M. Kim, A. Matsuda, J. Hong, S. Ichikawa, S.-Y. Lee, Structural insights into inhibition of lipid I production in bacterial cell wall synthesis. *Nature* **2016**, *533*, 557–560.
- [69] P. E. Brandish, K. Kimura, M. Inukai, R. Southgate, J. T. Lonsdale, T. D. H. Bugg, Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1640–1644.
- [70] L. A. McDonald, L. R. Barbieri, G. T. Carter, E. Lenoy, J. Lotvin, P. J. Petersen, M. M. Siegel, G. Singh, R. T. Williamson, Structures of the Muraymycins, Novel Peptidoglycan Biosynthesis Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10260–10261.
- [71] S. Koppermann, Z. Cui, P. D. Fischer, X. Wang, J. Ludwig, J. S. Thorson, S. G. Van Lanen, C. Ducho, Insights into the Target Interaction of Naturally Occurring Muraymycin Nucleoside Antibiotics. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 779–784.

- [72] Z. Cui, X. Wang, S. Koppermann, J. S. Thorson, C. Ducho, S. G. Van Lanen, Antibacterial Muraymycins from Mutant Strains of *Streptomyces* sp. NRRL 30471. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 942–948.
- [73] K. Mitachi, B. A. Aleiwi, C. M. Schneider, S. Siricilla, M. Kurosu, Stereocontrolled Total Synthesis of Muraymycin D1 Having a Dual Mode of Action against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12975–12980.
- [74] O. Ries, C. Carnarius, C. Steinem, C. Ducho, Membrane-interacting properties of the functionalised fatty acid moiety of muraymycin antibiotics. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6*, 879–886.
- [75] F. Graef, B. Vukosavljevic, J.-P. Michel, M. Wirth, O. Ries, C. De Rossi, M. Windbergs, V. Rosilio, C. Ducho, S. Gordon, C.-M. Lehr, The bacterial cell envelope as delimiter of anti-infective bioavailability – An in vitro permeation model of the Gram-negative bacterial inner membrane. *J. Controlled Release* **2016**, *243*, 214–224.
- [76] Y.-I. Lin, Z. Li, G. D. Francisco, L. A. McDonald, R. A. Davis, G. Singh, Y. Yang, T. S. Mansour, Muraymycins, novel peptidoglycan biosynthesis inhibitors: semisynthesis and SAR of their derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2341–2344.
- [77] A. Yamashita, E. Norton, P. J. Petersen, B. A. Rasmussen, G. Singh, Y. Yang, T. S. Mansour, D. M. Ho, Muraymycins, novel peptidoglycan biosynthesis inhibitors: synthesis and SAR of their analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3345–3350.
- [78] T. Tanino, S. Ichikawa, M. Shiro, A. Matsuda, Total Synthesis of (–)-Muraymycin D2 and Its Epimer. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1366–1377.
- [79] S. Hirano, S. Ichikawa, A. Matsuda, Total Synthesis of Caprazol, a Core Structure of the Caprazamycin Antituberculosis Antibiotics. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1888–1890.
- [80] S. Hirano, S. Ichikawa, A. Matsuda, Total Synthesis of Caprazol, a Core Structure of the Caprazamycin Antituberculosis Antibiotics. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1854–1856.
- [81] S. Hirano, S. Ichikawa, A. Matsuda, Synthesis of Caprazamycin Analogues and Their Structure–Activity Relationship for Antibacterial Activity. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 569–577.
- [82] S. Hirano, S. Ichikawa, A. Matsuda, Development of a Highly  $\beta$ -Selective Ribosylation Reaction without Using Neighboring Group Participation: Total Synthesis of (+)-Caprazol, a Core Structure of Caprazamycins. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9936–9946.
- [83] T. Tanino, S. Hirano, S. Ichikawa, A. Matsuda, Synthetic study of muraymycins using Ugi-four component reaction. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 557–558.
- [84] T. Tanino, S. Ichikawa, B. Al-Dabbagh, A. Bouhss, H. Oyama, A. Matsuda, Synthesis and Biological Evaluation of Muraymycin Analogues Active against Anti-Drug-Resistant Bacteria. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 258–262.
- [85] T. Tanino, B. Al-Dabbagh, D. Mengin-Lecreulx, A. Bouhss, H. Oyama, S. Ichikawa, A. Matsuda, Mechanistic Analysis of Muraymycin Analogues: A Guide to the Design of MraY Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8421–8439.
- [86] G. T. Carter, J. A. Lotvin, L. A. McDonald, Antibiotics aa-896. *Antibiotics Aa-896*, **2003**, WO2002085310 A3.
- [87] T. Laib, J. Chastanet, J. Zhu, Diastereoselective Synthesis of  $\gamma$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino Alcohols and (2S,3S)- $\alpha$ -Hydroxyleucine from Chiral D-(N,N-Dibenzylamino)serine (TBDMS) Aldehyde. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1709–1713.
- [88] O. Ries, M. Büschleb, M. Granitzka, D. Stalke, C. Ducho, Amino acid motifs in natural products: synthesis of O-acylated derivatives of (2S,3S)-3-hydroxyleucine. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1135–1142.

- [89] A. P. Spork, M. Büschleb, O. Ries, D. Wiegmann, S. Boettcher, A. Mihalyi, T. D. Bugg, C. Ducho, Lead Structures for New Antibacterials: Stereocontrolled Synthesis of a Bioactive Muraymycin Analogue. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 15292–15297.
- [90] K. Leyerer, Arbeiten zur Synthese neuer Analoga der Muraymycin-Antibiotika. Masterarbeit, Universität Paderborn, Paderborn, **2013**.
- [91] A. P. Spork, C. Ducho, Novel 5'-deoxy nucleosyl amino acid scaffolds for the synthesis of muraymycin analogues. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2323–2326.
- [92] A. P. Spork, D. Wiegmann, M. Granitzka, D. Stalke, C. Ducho, Stereoselective Synthesis of Uridine-Derived Nucleosyl Amino Acids. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10083–10098.
- [93] D. Wiegmann, S. Koppermann, C. Ducho, Aminoribosylated Analogues of Muraymycin Nucleoside Antibiotics. *Molecules* **2018**, *23*, 3085.
- [94] K. Leyerer, S. Koppermann, C. Ducho, Solid Phase-Supported Synthesis of Muraymycin Analogues. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 7420–7431.
- [95] C. Rohrbacher, Synthese lipophil derivatisierter 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga. Masterarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, **2017**.
- [96] D. Wiegmann, Neue Strategien Zur Entwicklung von Derivaten Der Muraymycin-Antibiotika mit Verbesselter Biologischer Aktivität. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, **2016**.
- [97] R. B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [98] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239–254.
- [99] R. Behrendt, P. White, J. Offer, Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 4–27.
- [100] F. Albericio, Developments in peptide and amide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 211–221.
- [101] A. Bozzoli, W. Kazmierski, G. Kennedy, A. Pasquarello, A. Pecunioso, A solid-phase approach to analogues of the antibiotic mureidomycin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2759–2763.
- [102] A. T. Tran, E. E. Watson, V. Pujari, T. Conroy, L. J. Dowman, A. M. Giltrap, A. Pang, W. R. Wong, R. G. Lington, S. Mahapatra, S. Saunders, S. A. Charman, N. P. West, T. D. H. Bugg, J. Tod, C. G. Dowson, D. I. Roper, D. C. Crick, W. J. Britton, R. J. Payne, Sansanmycin natural product analogues as potent and selective anti-mycobacterials that inhibit lipid I biosynthesis. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14414.
- [103] K. Leyerer, Muraymycin Nucleoside Antibiotics: Novel SAR Insights and Synthetic Approaches. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, **2018**.
- [104] B. Patel, R. V. Kerr, A. K. Malde, M. Zunk, T. D. H. Bugg, G. Grant, S. Rudrawar, Simplified Novel Muraymycin Analogues; using a Serine Template Strategy for Linking Key Pharmacophores. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 1429–1438.
- [105] S. A. Waksman, E. Bugie, A. Schatz, Isolation of Antibiotic Substances from Soil Micro-Organisms, with special reference to Streptothricin and Streptomycin. *Proceedings of Staff Meetings of the Mayo Clinic* **1944**, *19*, 537–48.
- [106] A. Schatz, E. Bugle, S. A. Waksman, Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1944**, *55*, 66–69.
- [107] K. Andry, R. C. Bockrath, Dihydrostreptomycin accumulation in *E. coli*. *Nature* **1974**, *251*, 534–536.

- [108] K. Eger, R. Troschütz, H. J. Roth, *Arzneistoffanalyse*, 5. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **2006**.
- [109] R. E. W. Hancock, Aminoglycoside uptake and mode of action—with special reference to streptomycin and gentamicin: II. Effects of aminoglycosides on cells. *J. Antimicrob. Chemother.* **1981**, *8*, 429–445.
- [110] A. W. Serio, T. Keepers, L. Andrews, K. M. Krause, Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus* **2018**, *8*, e1-20.
- [111] H. W. Taber, J. P. Mueller, P. F. Miller, A. S. Arrow, Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.* **1987**, *51*, 439–457.
- [112] B. D. Davis, Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.* **1987**, *51*, 341–350.
- [113] M. Sabeti Azad, M. Okuda, M. Cyrenne, M. Bourge, M.-P. Heck, S. Yoshizawa, D. Fourmy, Fluorescent Aminoglycoside Antibiotics and Methods for Accurately Monitoring Uptake by Bacteria. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 1008–1017.
- [114] R. A. Moore, N. C. Bates, R. E. Hancock, Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *29*, 496–500.
- [115] R. E. Hancock, V. J. Raffle, T. I. Nicas, Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *19*, 777–785.
- [116] H. W. Taber, J. P. Mueller, P. F. Miller, A. S. Arrow, Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.* **1987**, *51*, 439–457.
- [117] A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **2000**, *407*, 340–348.
- [118] J. Davies, L. Gorini, B. D. Davis, Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol. Pharmacol.* **1965**, *1*, 93–106.
- [119] A. W. Serio, T. Keepers, L. Andrews, K. M. Krause, Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus* **2018**, *8*, 1.
- [120] H. Kaji, Y. Tanaka, Binding of dihydrostreptomycin to ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.* **1968**, *32*, 221–230.
- [121] F. N. Chang, J. G. Flaks, Binding of Dihydrostreptomycin to *Escherichia coli* Ribosomes: Kinetics of the Reaction. *Antimicrob. Agents Chemother* **1972**, *2*, 308–319.
- [122] B. J. Wallace, P.-C. Tai, E. L. Herzog, B. D. Davis, Partial Inhibition of Polysomal Ribosomes of *Escherichia coli* by Streptomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1973**, *70*, 1234–1237.
- [123] L. Luzzatto, D. Apirion, D. Schlessinger, Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*: interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1968**, *60*, 873–880.
- [124] L. S. van Overbeek, E. M. H. Wellington, S. Egan, K. Smalla, H. Heuer, J.-M. Collard, G. Guillaume, A. D. Karagouni, T. L. Nikolakopoulou, J. D. van Elsas, Prevalence of streptomycin-resistance genes in bacterial populations in European habitats. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2002**, *42*, 277–288.
- [125] S. Garneau-Tsodikova, K. J. Labby, Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7*, 11–27.

- [126] M. Finken, P. Kirschner, A. Meier, A. Wrede, E. C. Böttger, Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 1239–1246.
- [127] B. Springer, Y. G. Kidan, T. Prammananan, K. Ellrott, E. C. Böttger, P. Sander, Mechanisms of Streptomycin Resistance: Selection of Mutations in the 16S rRNA Gene Conferring Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2877–2884.
- [128] S. Olkkola, P. Juntunen, H. Heiska, H. Hyytiäinen, M.-L. Hänninen, Mutations in the rpsL gene are involved in streptomycin resistance in *Campylobacter coli*. *Microb. Drug. Resist.* **2010**, *16*, 105–110.
- [129] D. Poggi, P. Oliveira de Giuseppe, M. Picardeau, Antibiotic Resistance Markers for Genetic Manipulations of *Leptospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 4882–4885.
- [130] J. Davies, R. Benveniste, K. Kvitek, B. Ozanne, T. Yamada, Aminoglycosides: Biologic Effects of Molecular Manipulation. *J. Infect. Dis.* **1969**, *119*, 351–354.
- [131] J. Fuentes-Martinez, D. Gutiérrez-Rodríguez, E. Garcia, K. Rivera-Mirqueza, F. Medrano, O. Torres-Ángeles, E. Castillo-Vargas, B. Montaña, C. Godoy-Alcántar, Streptomycin Hydrazone Derivatives: Synthesis and Molecular Recognition in Aqueous Solution. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 1449–1455.
- [132] J. P. Abad, R. Amils, Synthesis of active nitroguaiacol ether derivatives of streptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 1908–1914.
- [133] V. Coessens, E. Schacht, D. Domurado, Synthesis of polyglutamine and dextran conjugates of streptomycin with an acid-sensitive drug-carrier linkage. *J. Controlled Release* **1996**, *38*, 141–150.
- [134] R. C. Hider, X. Kong, Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
- [135] K. N. Raymond, E. A. Dertz, S. S. Kim, Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 3584–3588.
- [136] M. Sánchez, L. Sabio, N. Gálvez, M. Capdevila, J. M. Dominguez-Vera, Iron chemistry at the service of life. *IUBMB Life* **2017**, *69*, 382–388.
- [137] V. I. Holden, M. A. Bachman, Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics* **2015**, *7*, 986–995.
- [138] T. C. Johnstone, E. M. Nolan, Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 6320–6339.
- [139] J. Behnsen, M. Raffatellu, Siderophores: More than Stealing Iron. *mBio* **2016**, *7*, e01906-01916.
- [140] P. Saha, B. S. Yeoh, R. A. Olvera, X. Xiao, V. Singh, D. Awasthi, B. C. Subramanian, Q. Chen, M. Dikshit, Y. Wang, et al., Bacterial Siderophores Hijack Neutrophil Functions. *J. Immunol.* **2017**, *198*, 4293–4303.
- [141] K. H. Negash, J. K. S. Norris, J. T. Hodgkinson, Siderophore-Antibiotic Conjugate Design: New Drugs for Bad Bugs? *Molecules* **2019**, *24*, 3314.
- [142] I. J. Schalk, L. Guillon, Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids* **2013**, *44*, 1267–1277.
- [143] P. Klahn, M. Brönstrup, New Structural Templates for Clinically Validated and Novel Targets in Antimicrobial Drug Research and Development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2016**, *398*, 365–417.

- [144] P. Klahn, M. Brönstrup, Bifunctional antimicrobial conjugates and hybrid antimicrobials. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 832–885.
- [145] R. Zscherp, J. Coetzee, J. Vornweg, J. Grunenberg, J. Herrmann, R. Müller, P. Klahn, Biomimetic enterobactin analogue mediates iron-uptake and cargo transport into *E. coli* and *P. aeruginosa*. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 10179–10190.
- [146] R. Zscherp, J. Coetzee, J. Vornweg, J. Grunenberg, J. Herrmann, R. Müller, P. Klahn, Biomimetic Enterobactin Analogue Mediates Iron-Uptake and Cargo Transport into *E. coli* and *P. aeruginosa*. *ChemRxiv* **2020**.
- [147] S. Hörner, S. Knauer, C. Uth, M. Jöst, V. Schmidts, H. Frauendorf, C. M. Thiele, O. Avrutina, H. Kolmar, Nanoscale Biodegradable Organic–Inorganic Hybrids for Efficient Cell Penetration and Drug Delivery. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 14842–14846.
- [148] M. M. Sprung, F. O. Guenther, The Partial Hydrolysis of Ethyltriethoxysilane. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3996–4002.
- [149] U. Dittmar, B. J. Hendan, U. Flörke, H. C. Marsmann, Funktionalisierte Octa-(propylsil-sesquioxane) (3- $\text{XC}_3\text{H}_6$ ) $_8$ ( $\text{Si}_8\text{O}_{12}$ ) Modellverbindungen für Oberflächenmodifizierte Kieselgele. *J. Organomet. Chem.* **1995**, *489*, 185–194.
- [150] J. F. Brown, L. H. Vogt, The Polycondensation of Cyclohexylsilanetriol. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4313–4317.
- [151] S. Fabritz, S. Hörner, O. Avrutina, H. Kolmar, Bioconjugation on cube-octameric silsesquioxanes. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2224–2236.
- [152] C. McCusker, J. B. Carroll, V. M. Rotello, Cationic polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) units as carriers for drug delivery processes. *Chem. Commun.* **2005**, *8*, 996–998.
- [153] S. Hörner, S. Fabritz, H. D. Herce, O. Avrutina, C. Dietz, R. W. Stark, M. C. Cardoso, H. Kolmar, Cube-octameric silsesquioxane-mediated cargo peptide delivery into living cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2258–2265.
- [154] F. Madani, S. Lindberg, U. Langel, S. Futaki, A. Gräslund, Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* **2011**, *2011*, 414729.
- [155] P. Järver, Ü. Langel, Cell-penetrating peptides-A brief introduction. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, *1758*, 260–263.
- [156] A. D. Frankel, C. O. Pabo, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **1988**, *55*, 1189–1193.
- [157] M. Green, P. M. Loewenstein, Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **1988**, *55*, 1179–1188.
- [158] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz, Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 1864–1868.
- [159] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent\*. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18188–18193.
- [160] P. E. Thorén, D. Persson, M. Karlsson, B. Nordén, The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation. *FEBS Lett.* **2000**, *482*, 265–268.
- [161] S. Reissmann, Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 760–784.
- [162] J. D. Ramsey, N. H. Flynn, Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *154*, 78–86.

- [163] D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450.
- [164] P. P. Tripathi, H. Arami, I. Banga, J. Gupta, S. Gandhi, Cell penetrating peptides in pre-clinical and clinical cancer diagnosis and therapy. *Oncotarget* **2018**, *9*, 37252–37267.
- [165] C. de Coupade, A. Fittipaldi, V. Chagnas, M. Michel, S. Carlier, E. Tasciotti, A. Darmon, D. Ravel, J. Kearsey, M. Giacca, et al., Novel human-derived cell-penetrating peptides for specific subcellular delivery of therapeutic biomolecules. *Biochem. J.* **2005**, *390*, 407–418.
- [166] R. Coriat, S. Faivre, O. Mir, C. Dreyer, S. Ropert, M. Bouattour, R. Desjardins, F. Goldwasser, E. Raymond, Pharmacokinetics and safety of DTS-108, a human oligopeptide bound to SN-38 with an esterase-sensitive cross-linker in patients with advanced malignancies: a Phase I study. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 6207–6216.
- [167] H.-M. Lee, J. Ren, K. M. Tran, B.-M. Jeon, W.-U. Park, H. Kim, K. E. Lee, Y. Oh, M. Choi, D.-S. Kim, et al., Identification of efficient prokaryotic cell-penetrating peptides with applications in bacterial biotechnology. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 1–13.
- [168] S. Pujals, E. Giral, Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 473–484.
- [169] P. Lundin, H. Johansson, P. Guterstam, T. Holm, M. Hansen, U. Langel, S. EL Andaloussi, Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2535–2542.
- [170] B. R. Liu, Y. Huang, J. G. Winiarz, H.-J. Chiang, H.-J. Lee, Intracellular delivery of quantum dots mediated by a histidine- and arginine-rich HR9 cell-penetrating peptide through the direct membrane translocation mechanism. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3520–3537.
- [171] W. B. Kauffman, T. Fuselier, J. He, W. C. Wimley, Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 749–764.
- [172] R. Brock, The Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides: Putting the Puzzle Together. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 863–868.
- [173] D. Jha, R. Mishra, S. Gottschalk, K.-H. Wiesmüller, K. Ugurbil, M. E. Maier, J. Engelmann, CyLoP-1: a novel cysteine-rich cell-penetrating peptide for cytosolic delivery of cargoes. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 319–328.
- [174] A. Elmquist, M. Hansen, Ü. Langel, Structure–activity relationship study of the cell-penetrating peptide pVEC. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, *1758*, 721–729.
- [175] A. H. van Asbeck, A. Beyerle, H. McNeill, P. H. M. Bovee-Geurts, S. Lindberg, W. P. R. Verdurmen, M. Hällbrink, Ü. Langel, O. Heidenreich, R. Brock, Molecular Parameters of siRNA–Cell Penetrating Peptide Nanocomplexes for Efficient Cellular Delivery. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3797–3807.
- [176] P. Agrawal, S. Bhalla, S. S. Usmani, S. Singh, K. Chaudhary, G. P. S. Raghava, A. Gautam, CPPsite 2.0: a repository of experimentally validated cell-penetrating peptides. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1098–1103.
- [177] B. R. Liu, Y.-W. Huang, H.-J. Lee, Mechanistic studies of intracellular delivery of proteins by cell-penetrating peptides in cyanobacteria. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*, 57.
- [178] H. Bai, Y. You, H. Yan, J. Meng, X. Xue, Z. Hou, Y. Zhou, X. Ma, G. Sang, X. Luo, Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to rpoD gene. *Biomaterials* **2012**, *33*, 659–667.

- [179] H. Lee, S. I. Lim, S.-H. Shin, Y. Lim, J. W. Koh, S. Yang, Conjugation of Cell-Penetrating Peptides to Antimicrobial Peptides Enhances Antibacterial Activity. *ACS Omega* **2019**, *4*, 15694–15701.
- [180] S. D. Brown, D. Graham, Conjugation of an oligonucleotide to Tat, a cell-penetrating peptide, via click chemistry. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5032–5034.
- [181] K. Piecyk, M. Jankowska-Anyszka, Chemical conjugation of an mRNA cap analog with a cell-penetrating peptide as a potential membrane permeable translation inhibitor. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 606–609.
- [182] J. Meiers, Entwicklung eines HPLC-MS-basierten Assay zur Evaluierung der bakteriellen Zellaufnahme. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, **2018**.
- [183] A. Latorre, P. Couleaud, A. Aires, A. L. Cortajarena, Á. Somoza, Multifunctionalization of magnetic nanoparticles for controlled drug release: a general approach. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 355–362.
- [184] A. Yamashita, E. Norton, Antibiotic AA 896 Analogs. *Antibiotic AA 896 Analogs*, **202AD**, Patent No. WO/2002/086139.
- [185] N. P. McLaughlin, P. Evans, Dihydroxylation of Vinyl Sulfones: Stereoselective Synthesis of (+)- and (-)-Febrifugine and Halofuginone. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 518–521.
- [186] C. M. Schütz, Inhibitoren Der Bakteriellen Translocase Und Collagenase Als Potentielle Antibiotika. Masterarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, **2016**.
- [187] J. H. Tsai, L. R. Takaoka, N. A. Powell, J. S. Nowick, Synthesis of Amino Acid Ester Isocyanates: Methyl (S)-2-Isocynato-3-Phenylpropanoate. *Org. Synth.* **2003**, *78*, 220-223.
- [188] Y. Ikeda, S. Kawahara, K. Yoshinari, S. Fujita, K. Taira, Specific 3'-Terminal Modification of DNA with a Novel Nucleoside Analogue that Allows a Covalent Linkage of a Nuclear Localization Signal and Enhancement of DNA Stability. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 297–303.
- [189] M. Y. H. Lai, M. A. Brimble, D. J. Callis, P. W. R. Harris, M. S. Levi, F. Sieg, Synthesis and pharmacological evaluation of glycine-modified analogues of the neuroprotective agent glycyl-L-prolyl-L-glutamic acid (GPE). *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 533–548.
- [190] Z. Cui, H. Nguyen, M. Bhardwaj, X. Wang, M. Büschleb, A. Lemke, C. Schütz, C. Rohrbacher, P. Junghanns, S. Koppermann, C. Ducho, J. S. Thorson, S. G. V. Lanen, Enzymatic C $\beta$ -H Functionalization of l-Arg and l-Leu in Nonribosomally Derived Peptidyl Natural Products: A Tale of Two Oxidoreductases. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 19425–19437.
- [191] M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore, A User-Friendly Entry to 2-Iodoxybenzoic Acid (IBX). *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537–4538.
- [192] R. K. Boeckman, Jr. SHao P., J. J. Mullins, The Dess-Martin Periodinane: 1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-one. *Org. Synth.* **2000**, *77*, 141.
- [193] D. B. Dess, J. C. Martin, Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155–4156.
- [194] U. Zoller, D. Ben-Ishai, Amidoalkylation of mercaptans with glyoxylic acid derivatives. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 863–866.
- [195] R. G. Vaswani, A. R. Chamberlin, Stereocontrolled Total Synthesis of (-)-Kaitocephalin. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1661–1681.
- [196] U. Schmidt, A. Lieberknecht, J. Wild, Amino Acids and Peptides; XLIII1. Dehydroamino Acids; XVIII2. Synthesis of Dehydroamino Acids and Amino Acids from N-Acyl-2-(dialkylloxyphosphinyl)-glycin Esters; II. *Synthesis* **1984**, *1984*, 53–60.
- [197] R. Hamzavi, F. Dolle, B. Tavitian, O. Dahl, P. E. Nielsen, Modulation of the Pharmacokinetic Properties of PNA: Preparation of Galactosyl, Mannosyl, Fucosyl, N-

- Acetylgalactosaminyl, and N-Acetylglucosaminyl Derivatives of Aminoethylglycine Peptide Nucleic Acid Monomers and Their Incorporation into PNA Oligomers. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 941–954.
- [198] A. Spork, Synthetische Untersuchungen Zur Nucleosid-Einheit von Muraymycin-Antibiotika. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen, **2012**.
- [199] D. Wiegmann, S. Koppermann, M. Wirth, G. Niro, K. Leyerer, C. Ducho, Muraymycin nucleoside-peptide antibiotics: uridine-derived natural products as lead structures for the development of novel antibacterial agents. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 769–795.
- [200] J. D. More, N. S. Finney, A Simple and Advantageous Protocol for the Oxidation of Alcohols with *o*-Iodoxybenzoic Acid (IBX). *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3001–3003.
- [201] T. Masquelin, E. Broger, K. Müller, R. Schmid, D. Obrecht, Synthesis of Enantiomerically Pure D-and L-(Heteroaryl) alanines by asymmetric hydrogenation of (*Z*)- $\alpha$ -amino- $\alpha\beta$ -didehydro esters. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1395–1411.
- [202] M. J. Burk, C<sub>2</sub>-symmetric bis (phospholanes) and their use in highly enantioselective hydrogenation reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8518–8519.
- [203] J. Halpern, Mechanism and stereoselectivity of asymmetric hydrogenation. *Science* **1982**, *217*, 401–407.
- [204] J. McConathy, D. Zhou, S. E. Shockley, L. A. Jones, E. A. Griffin, H. Lee, S. J. Adams, R. H. Mach, Click synthesis and biologic evaluation of (*R*)- and (*S*)-2-amino-3-[1-(2-[18F]fluoroethyl)-1H-[1,2,3]triazol-4-yl]propanoic acid for brain tumor imaging with positron emission tomography. *Mol. Imaging* **2010**, *9*, 329–342.
- [205] L. S. Lin, T. Lanza, S. E. de Laszlo, Q. Truong, T. Kamenecka, W. K. Hagmann, Deprotection of N-tert-butoxycarbonyl (Boc) groups in the presence of tert-butyl esters. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7013–7016.
- [206] A. Hayata, H. Itoh, S. Matsutaka, M. Inoue, Dual Chemical Modification of a Polytheonamide Mimic: Rational Design and Synthesis of Ion-Channel-Forming 48-mer Peptides with Potent Cytotoxicity. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 3370–3377.
- [207] M. Virlovet, H. Goesmann, C. Feldmann, J. Podlech, Addition of allylzinc to  $\alpha$ -amino acid-derived imines: synthesis of diamino alcohols by hydroboration. *Monatsh. Chem.* **2010**, *141*, 177–198.
- [208] U. Vogeli, W. von Philipsborn, Vicinal C,H spin coupling in substituted alkenes. Stereochemical significance and structural effects. *Org. Magn. Reson.* **1975**, *7*, 617–627.
- [209] C. Ducho, R. B. Hamed, E. T. Batchelar, J. L. Sorensen, B. Odell, C. J. Schofield, Synthesis of regio- and stereoselectively deuterium-labelled derivatives of L-glutamate semialdehyde for studies on carbapenem biosynthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2770–2779.
- [210] H. Konno, Y. Sema, M. Ishii, Y. Hattori, K. Nosaka, K. Akaji, Practical synthesis of peptide C-terminal aldehyde on a solid support. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 4848–4850.
- [211] H. Konno, Y. Sema, Y. Tokairin, Synthetic study of peptide aldehyde via acetal/thioacetal transformation: application for Lys/Ser-containing peptides. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3433–3438.
- [212] B. Raju, J. M. Kassir, T. P. Kogan, Solution-phase combinatorial synthesis of ureas using nitrophenylcarbamates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3043–3048.
- [213] F. Lin, J. Zheng, J. Yu, J. Zhou, M. L. Becker, Cascading “Triclick” functionalization of poly(caprolactone) thin films quantified via a quartz crystal microbalance. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2857–2865.

- [214] M. Rashidian, M. M. Mahmoodi, R. Shah, J. K. Dozier, C. R. Wagner, M. D. Distefano, A Highly Efficient Catalyst for Oxime Ligation and Hydrazone-Oxime Exchange Suitable for Bioconjugation. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 333–342.
- [215] A. Shashkov, S. Amelichev, I. Zavarzin, O. Rakitin, A simple and straightforward method for determination of oxime group configuration in ethanone oximes by differential NOE experiments. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 5684–5687.
- [216] S. Pumtang, W. Siripornnoppakhun, M. Sukwattanasinitt, A. Ajavakom, Solvent colorimetric paper-based polydiacetylene sensors from diacetylene lipids. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *364*, 366–372.
- [217] E. R. Trivedi, C. M. Blumenfeld, T. Wielgos, S. Pokropinski, P. Dande, T. T. Hai, A. G. M. Barrett, B. M. Hoffman, Multi-gram synthesis of a porphyrazine platform for cellular translocation, conjugation to Doxorubicin, and cellular uptake. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5475–5478.
- [218] A. Noel, B. Delpech, D. Crich, Highly Stereoselective Synthesis of Primary, Secondary, and Tertiary  $\alpha$ -S-Sialosides under Lewis Acidic Conditions. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4138–4141.
- [219] A. M. Carvalho, R. Teixeira, R. Novoa-Carballal, R. A. Pires, R. L. Reis, I. Pashkuleva, Redox-Responsive Micellar Nanoparticles from Glycosaminoglycans for CD44 Targeted Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2991–2999.
- [220] J. Kalia, R. T. Raines, Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl* **2008**, *47*, 7523–7526.
- [221] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, 2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 513–520.
- [222] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, A new reagent for the cleavage of fully protected peptides synthesised on 2-chlorotrityl chloride resin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2559–2560.
- [223] A. Merzouk, F. Guibé, A. Loffet, On the use of silylated nucleophiles in the palladium catalysed deprotection of allylic carboxylates and carbamates. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 477–480.
- [224] A. Lemke, Catalytic and Biocatalytic Methods for the Efficient Synthesis of Biologically Relevant Non-Proteinogenic Amino Acids. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen, **2013**.
- [225] M. Büschleb, Synthese von Capreomycin- Und Epicapreomycin- Haltigen Naturstoff-Bausteinen. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen, **2012**.
- [226] S. Wohnig, A. P. Spork, S. Koppermann, G. Mieskes, N. Gisch, R. Jahn, C. Ducho, Total Synthesis of Dansylated Park's Nucleotide for High-Throughput MraY Assays. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 17813–17819.
- [227] P. E. Brandish, M. K. Burnham, J. T. Lonsdale, R. Southgate, M. Inukai, T. D. H. Bugg, Slow binding inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide-translocase (*Escherichia coli*) by mureidomycin A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7609–7614.
- [228] T. Stachyra, C. Dini, P. Ferrari, A. Bouhss, J. van Heijenoort, D. Mengin-Lecreulx, D. Blanot, J. Biton, D. Le Beller, Fluorescence Detection-Based Functional Assay for High-Throughput Screening for MraY. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 897–902.

## 9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Christian Ducho für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in seinem Arbeitskreis mit einem sehr spannenden und fordernden Thema anfertigen zu dürfen.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Speicher für die Übernahme der Rolle als Zweitgutachter dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Josef Zapp möchte ich für die stete Hilfsbereitschaft und die Messung der vielen NMR-Spektren danken.

Zudem möchte ich unserer Bioabteilung bestehend aus Martina Jankowski, Jannine Ludwig, Nathalie Kagerah und Stefanie Weck für die Durchführungen der biologischen Testungen und Evaluierung meiner Substanzen danken.

Dr. Stefan Boettcher möchte ich für die Hilfe bei der Aufnahme und auch der Auswertung von einigen HRMS-Daten danken.

Zudem danke ich meinen Hilfskräften, Vertiefungs- und Wahlpflichtstudierenden Julia Dräger, Daniel Mühlhausen, Simone Rosinus, Tobias Betzholz, Annika Mergel und Elena Geisert, die mir bei vielen Synthesen unter die Arme gegriffen haben.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Arbeitskreises möchte ich für die stets gute Atmosphäre im Labor, als auch außerhalb bei jeglichen Freizeitaktivitäten danken. Insbesondere möchte ich auch dem tollen OC-Team danken, mit dem wir das Praktikum immer reibungslos und mit viel Humor über die Bühne bekommen haben.

Den Boys danke für die stets gute Stimmung im vorderen Labor und die immer sehr unterhaltsamen kulturellen Urlaubsreisen.

Ganz besonders möchte ich meiner Freundin Michelle für die konstante Unterstützung während meiner Promotion danken.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium ermöglicht und mich stets in allen Lagen unterstützt haben.

