# *Synthese von Derivaten des antiviralen Peptidantibiotikums Feglymycin und Studien zur Untersuchung des Wirkmechanismus*

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin
Anne Hänchen
aus Bad Muskau

Von der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

| | |
|---|---|
| Vorsitzender: | Prof. Dr. rer. nat. Peter Hildebrandt |
| 1. Berichter/Gutachter: | Prof. Dr. rer. nat. Roderich D. Süßmuth |
| 2. Berichter/Gutachter: | Prof. Dr. rer. nat. Martin E. Maier |

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15. April 2011

Berlin 2011
D 83

# Zusammenfassung


## *Synthese von Derivaten des antiviralen Peptidantibiotikums Feglymycin und Studien zur Untersuchung des Wirkmechanismus*

Das aus *Streptomyces* DSM 11171 isolierte lineare 13mer-Peptid Feglymycin reiht sich aufgrund des hohen Anteils an Hydroxyphenylglycinen in der Aminosäuresequenz in die Klasse der Peptidantibiotika mit Vertretern wie Vancomycin oder Ramoplanin A2 ein. Es besitzt außerdem eine nahezu alternierende Anordnung an L- und D-konfigurierten Aminosäuren, sowie eine helikale Sekundärstruktur im Kristall. Feglymycin ist jedoch nicht nur strukturell äußerst interessant, es besitzt auch eine vielseitige biologische Aktivität, denn das Peptid inhibiert sowohl die Replikation von HI-Viren im Zellkulturtest, als auch das Wachstum von *S. aureus*-Stämmen *in vitro*. Neueste Experimente zeigten, dass Feglymycin auch die zytoplasmatischen Enzyme MurA und MurC der bakteriellen Zellwandbiosynthese inhibiert. Die Realisierung der ersten Totalsynthese für Feglymycin ebnete schließlich den Weg zur genaueren Untersuchung dieses Peptidwirkstoffes.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Synthese und Charakterisierung von Feglymycin-Derivaten mit dem Ziel einer genaueren Untersuchung der Wirkmechanismen sowie der Identifizierung einer pharmakophoren Region des Peptids. Die Darstellung des Feglymycin-Enantiomers zeigte, dass die biologischen Aktivitäten unabhängig von der absoluten Konfiguration des Moleküls sind. Dies weißt darauf hin, dass Feglymycin wahrscheinlich weder mit einem spezifischen Rezeptor interagiert, noch im aktiven Zentrum eines Enzyms bindet. Ein Alanin-Scan als eine erste Studie zur Struktur-Aktivitäts-Wirkungsbeziehung ergab, dass lediglich die Deletion der aciden Aminosäureseitenkette der *C*-terminalen Asparaginsäure zu einem leichten Abfall der antiretroviralen Aktivität sowie der Inhibitionswirkung auf die Enzyme MurA und MurC führt. Auch in Bezug auf die antibakterielle Aktivität gegen *S. aureus in vitro* konnten für die Wachstumshemmung essenzielle Aminosäurebausteine in der Sequenz von Feglymycin identifiziert werden. Erstaunlich war dabei, dass der jeweilige Austausch der 3,5-Dihydroxy-D-phenylglycine gegen D-Alanin relativ gut toleriert wurde. Des Weiteren bestätigten Testierungen von Peptidfragmenten frühere Annahmen, nach denen sich eine mögliche pharmakophore Region des Peptids im *N*-terminalen Teil des Naturstoffes befindet. Weiterhin scheint die Möglichkeit zur Ausbildung von mehreren Wasserstoffbrückenbindungen durch die *C*-terminale Aminosäure, sowohl im Naturstoff, als auch bei entsprechenden Peptidfragmenten, wichtig für die biologischen Aktivitäten zu sein. Diese Erkenntnisse stellen wertvolle Bausteine auf dem Weg zur Generierung eines Peptidomimetikums für Feglymycin mit verringerter struktureller Komplexität und verbesserten pharmakologischen Eigenschaften dar. Mit einem fluorge*labelten* Peptidderivat konnten erste $^{19}$F-Festkörper-NMR-Experimente durchgeführt werden, welche Hinweise auf eine mögliche Wechselwirkung von Feglymycin mit Lipidmembranen liefern sollen. Durch die Annelierung eines weiteren Aromaten an die Aminosäureseitenkette von Phenylalanin wurde ein fluoreszierendes Feglymycin-Analogon erhalten, welches zur Lokalisierung des Peptids direkt an seinem Wirkort verwendet werden könnte. Mit der Synthese der beschriebenen Feglymycin-Derivate wurde gezeigt, dass die hochkonvergente Totalsynthesestrategie für den Naturstoff durch Kondensation von Peptidfragmenten in Lösung für den Aufbau von kleinen, zielgerichteten Substanzbibliotheken ausgezeichnet geeignet ist.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Publikationen:**

*„Total Synthesis of the Antiviral Peptide Antibiotic Feglymycin"*

F. Dettner, A. Hänchen, D. Schols, L. Toti, A. Nußer, R. D. Süßmuth, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1888-1893; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1856-1861.

*„Feglymycin is an inhibitor of the enzymes MurA and MurC of the peptidoglycan biosynthesis pathway"*

S. Rausch, A. Hänchen, A. Denisiuk, M. Löhken, T. Schneider, R. D. Süßmuth, *ChemBioChem* **2011**, *8*, 1171-1173.

*„Feglymycin, a unique natural bacterial antibiotic peptide, inhibits HIV entry by targeting the viral envelope protein gp120"*

G. Férir, A. Hänchen, K. O. François, B. Hoorelbeke, D. Huskens, F. Dettner, R. D. Süßmuth, D. Schols, *Virology* **2012**, *433*, 308-319.

*„Alanine Scan of the Peptide Antibiotic Feglymycin – Assessment of Amino Acid Side Chains Contributing to Antimicrobial Activity"*

A. Hänchen, S. Rausch, B. Landmann, L. Toti, A. Nusser, R. D. Süßmuth, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 625-632.

**Poster:**

*„First total synthesis of the 13-amino-acid antiviral antibiotic Feglymycin from Streptomyces sp. DSM 11171."*
F. Dettner, A. Hänchen, B. Landmann, D. Schols, R. D. Süßmuth; VAAM International Workshop, Berlin 29.09.-01.10.**2008**.

*„First total synthesis of the 13-amino-acid antiviral antibiotic Feglymycin from Streptomyces sp."*
F. Dettner, A. Hänchen, B. Landmann, D. Schols, R. D. Süßmuth; 9. Deutsches Peptidsymposium, Göttingen 11.-14.03.**2009**.

*„Feglymycin, a unique 13-amino-acid peptide, with a novel mechanism of anti-HIV-1 activity."*
D. Schols, G. Férir, B. Horelbeeke, A. Hänchen, F. Dettner, R. D. Süßmuth; 22. International Conference on Antiviral Research, Miami Beach, Florida, USA 03.-07.05.**2009**.

*„Structure-activity relationship studies on the 13-amino-acid antiviral antibiotic Feglymycin from Streptomyces sp."*
A. Hänchen, F. Dettner, B. Landmann, D. Schols, R. D. Süßmuth; Bayer PhD Student Course, Köln 05.-09.07.**2009**.

*„Investigations towards the mode of action of the 13-amino-acid antiviral antibiotic Feglymycin from Streptomyces sp."*
A. Hänchen, F. Dettner, B. Landmann, D. Schols, R. D. Süßmuth; 455. WE-Heraeus-Seminar „Biophysics of Membrane-Active Peptides", Bad Honnef 11.-14.04.**2010**.

*„Erfolg haben heißt einmal mehr aufstehen, als man gefallen ist“*

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Roderich Süßmuth**

in der Zeit von Juni 2007 bis Februar 2011 am Institut für Chemie der Fakultät II der Technischen Universität Berlin angefertigt.

## Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roderich D. Süßmuth für die Aufnahme in den Arbeitskreis sowie die exzellente Betreuung, Förderung und Unterstützung während meiner Diplom- und Doktorarbeit. Ich bin sehr dankbar für das stets freundschaftliche Verhältnis und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Bearbeitung meiner abwechslungsreichen Projekte unter hervorragenden Arbeitsbedingungen. Insbesondere danke ich ihm für die Möglichkeit, an zahlreichen Tagungen teilzunehmen und natürlich für die investierte Zeit zur Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Martin E. Maier und Herrn Prof. Dr. Peter Hildebrandt danke ich herzlich für die Übernahme der zweiten Berichterstattung bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Großer Dank gilt der Stiftung Stipendien Fonds des Verbandes der chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.

Herrn Dr. Frank Dettner danke ich sehr für die Einarbeitung in das Arbeitsthema und die großartigen Vorarbeiten im Rahmen der Feglymycin-Totalsynthese.

Herrn Prof. Dr. Dominique Schols und seinen Mitarbeitern (Rega Institute, Leuven, Belgien) danke ich für die Durchführung von antiviralen Testierungen und die konstruktive Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Luigi Toti und Frau Antje Nußer (*Sanofi-Aventis*, Frankfurt a. M., Deutschland) sei gedankt für die Durchführung der antibakteriellen Testierungen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Koert und Herrn Dr. Philipp Reiß (Philipps-Universität Marburg, Deutschland) danke ich für die Durchführung der Ionenkanalexperimente.

Frau Prof. Dr. Anne Ulrich und Herrn Dr. Sergiy Afonin (Karlsruher Institut für Technologie, Deutschland) sei gedankt für die engagierte Zusammenarbeit und die Durchführung erster $^{19}$F-Festkörper-NMR-Messungen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Sahl und Frau Dr. Tanja Schneider (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Deutschland) danke ich für die Durchführung zahlreicher Experimente zur weiteren Charakterisierung der antibakteriellen Aktivität von Feglymycin.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Johannes Imhoff und Frau Dr. Heidi Zinecker (Kieler Wirkstoffzentrum KIWIZ, Deutschland) für die Untersuchung von Feglymycin in Enzyminhibitionstests.

Frau Dipl.-Biochem. Saskia Rausch danke ich ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit, die Durchführung zahlreicher Enzyminhibitionsassays und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herzlichen Dank an Frau Dipl.-Chem. Ginka Völler für die schnelle und kompetente Hilfe bei der Aufnahme von MS/MS-Spektren.

Frau Dr. Maria Schlangen, Frau Christine Klose und Herrn Dipl.-Chem. Florian Oldach danke ich für die zahlreichen durchgeführten (HPLC-)MS-Routinemessungen. Frau Klose danke ich außerdem für die Durchführung der IR-Analytik.

Frau Dr. Jennifer Tuma danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung von NMR-Experimenten.

Vielen Dank dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Karola Rück-Braun für die Möglichkeit der Mitbenutzung des CD-Spektrometers.

Herrn Dr. Lars Merkel vom Arbeitskreis Budisa danke ich ganz herzlich für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren.

Frau Dr. Diane Butz, Frau Dr. Eva Mösker, Herrn Dipl.-Chem. Jonny Nachtigall und Frau Dr. Kathrin Schneider danke ich ganz herzlich für die Einführung an den HPLC-Systemen und in die Größenausschlusschromatographie sowie die Hilfestellungen bei diversen chromatographischen Trennproblemen.

Meinen Praktikanten danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Synthesen. Vielen Dank auch an Benjamin Landmann für die freundliche Bereitstellung von Synthesebausteinen, welche zur schnellen Weiterführung von Teilprojekten beigetragen hat.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern das AK Süßmuth gilt mein Dank für das stets kollegiale, hilfsbereite und freundschaftliche Miteinander. Bitte entschuldigt, dass ich Euch nicht alle namentlich aufführe, Ihr seid einfach mittlerweile zu viele!

Ein Dankeschön auch an meine ehemalige Lehrerin Frau Annerose Frenzel, die mich für die Chemie begeistern konnte.

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die großartige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Wolfgang, ich danke dir für die schöne gemeinsame Zeit in Berlin. Du warst und bist der beste Arbeitskollege und Mitbewohner, den man sich wünschen kann!

# Inhaltsverzeichnis


**1 Allgemeiner Teil ..... 1**

**1.1 Einleitung ..... 1**

**1.2 Antibakterielle Wirkstoffe ..... 5**

1.2.1 Antibiotikaklassen und ihre molekularen Angriffspunkte ..... 6

1.2.2 Die Bakterienhülle als Angriffspunkt für viele Peptidantibiotika ..... 11

1.2.2.1 Der Aufbau der bakteriellen Zellhülle ..... 11

1.2.2.2 Die Biosynthese des Peptidoglycans und deren Inhibitoren ..... 13

1.2.3 Das Problem der Resistenzbildung ..... 20

1.2.4 Ausblick ..... 21

**1.3 Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) ..... 25**

1.3.1 Aktueller Stand zur Verbreitung des HI-Virus ..... 25

1.3.2 Möglichkeiten zur Behandlung der HIV-Infektion ..... 26

1.3.3 Die Anlagerung des HI-Virus an die menschliche Wirtszelle – ein attraktives *Target* ..... 28

1.3.4 Ausblick ..... 31

**1.4 Feglymycin – ein ungewöhnliches Peptid mit vielseitiger biologischer Aktivität 32**

1.4.1 Isolierung und Strukturaufklärung ..... 32

1.4.2 Biosynthese ..... 36

1.4.3 Totalsynthese ..... 38

1.4.4 CD-spektroskopische Untersuchung von Feglymycin ..... 44

1.4.5 Untersuchungen zur Membranwechselwirkung von Feglymycin in Ionenkanalexperimenten ..... 47

1.4.6 Die biologische Aktivität von Feglymycin ..... 49

1.4.6.1 Inhibition der Replikation des HI-Virus *in vitro* ..... 49

1.4.6.2 Antibakterielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus* ..... 52

1.4.6.3 Feglymycin als Enzyminhibitor ..... 53

**2 Zielsetzung ..... 57**

**3 Ergebnisse und Diskussion ..... 59**

**3.1 Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Feglymycin ..... 59**

**3.2 Synthese und Charakterisierung von Feglymycin-Derivaten ..... 64**
3.2.1 Das Feglymycin-Spiegelbild ..... 64
3.2.1.1 Synthese ..... 66
3.2.1.2 Biologische Aktivität ..... 71
3.2.2 Der Alanin-Scan von Feglymycin ..... 74
3.2.2.1 Synthese und analytische Charakterisierung ..... 76
3.2.2.2 Biologische Aktivität ..... 88
3.2.3 Einbau fluorierter Aminosäuren in Feglymycin für Untersuchungen mittels $^{19}$F-Festkörper-NMR-Spektroskopie ..... 96
3.2.4 Einbau eines Fluoreszenz*labels* in Feglymycin ..... 105

**4 Zusammenfassung und Ausblick ..... 113**

**5 Experimenteller Teil ..... 123**

**5.1 Allgemeine Informationen ..... 123**
5.1.1 Chemikalien ..... 123
5.1.2 Chromatographie ..... 123
5.1.3 NMR-Spektroskopie ..... 126
5.1.4 Massenspektrometrie ..... 126
5.1.5 IR-Spektroskopie ..... 128
5.1.6 CD-Spektroskopie ..... 128
5.1.7 UV-Absorbtions- und Fluoreszenzspektroskopie ..... 129
5.1.8 Polarimetrie ..... 130
5.1.9 Nomenklatur ..... 130

**5.2 Synthesevorschriften und spektroskopische Daten ..... 131**

**5.3 Aktivitätstests und biologische Testierungen ..... 235**
5.3.1 DPPH-*Assay* ..... 235
5.3.2 Ionenkanalmessungen zur Untersuchung der Membranaktivität ..... 238
5.3.3 Antivirale Testierung gegen HIV-1 ..... 239
5.3.4 Antimikrobielle Testierung ..... 241
5.3.5 Inhibition des MurA-Enzyms aus *E. coli* ..... 245
5.3.6 Inhibition des MurC-Enzyms aus *E. coli* ..... 247

**6 Anhang.....249**

**6.1 NMR-Spektren ausgewählter Verbindungen .....249**

**6.2 MS/MS-Spektren ausgewählter Verbindungen.....255**

**6.3 Abkürzungsverzeichnis.....272**

**6.4 Literaturverzeichnis.....278**

# 1 Allgemeiner Teil

## 1.1 Einleitung

Peptide spielen im menschlichen Organismus eine extrem wichtige Rolle in zahlreichen biologischen Prozessen.[1] Durch den Aufbau ausgehend von 20 kanonischen Aminosäuren* existiert eine enorme strukturelle Vielfalt dieser Biopolymere. Aufgrund ihrer essenziellen Funktionen bei der Signalweiterleitung als Hormone (z.B. Oxytocin) oder Neurotransmitter (z.B. Endorphine) sind einige Peptide äußerst interessante Verbindungen für den Medizinalchemiker. Eine Reihe von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen nutzen Peptide außerdem als Gifte zur Jagd oder zur Verteidigung. Da diese Toxine verschiedenste pharmakologische Effekte besitzen, wird schon länger daran geforscht, diese Substanzen auch zu Medikamenten weiter zu entwickeln. Bekannte Beispiele hierfür sind u.a. die von Kegelschnecken produzierten Conotoxine mit ihrer schmerzlindernden Wirkung[2] oder das porenbildende Melittin als Hauptbestandteil des Bienengifts.[3] Die wohl wichtigste Rolle in der Pharmakologie und Medizinalchemie spielen jedoch die von Bakterien und Pilzen produzierten Peptidantibiotika.[4] Diese können sowohl ribosomalen (z.B. Lantibiotika[5] oder Thiopeptide[6]) als auch nicht-ribosomalen (z.B. Glycopeptide[7]) Ursprungs sein. Die β-Lactam-Antibiotika können hier zwar nicht direkt eingeordnet werden, sollen aber aufgrund ihrer Bedeutung und der Biosynthese ausgehend von Aminosäuren an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben.[8]

Das enorme Potenzial biologisch wirksamer Peptide kann jedoch aufgrund einer Reihe von Gründen nicht immer voll ausgeschöpft werden. Zum einen werden Peptide durch ihr i.d.R. hohes Molekulargewicht sowie ihre Polarität bei oraler Gabe nur sehr schlecht resorbiert und können nur in geringen Konzentrationen oder gar nicht zu ihrem Wirkort gelangen. Außerdem besitzen sie meist eine extrem geringe Halbwertszeit im menschlichen Organismus, da es unter Beteiligung von Proteasen zu einer schnellen Verstoffwechselung kommt. Einige niedermolekulare, nicht-peptidische Naturstoffe können jedoch erstaunlicherweise den gleichen Effekt auslösen wie biologisch aktive Peptide. Ein bekanntes Beispiel ist Morphin (**1**) als Bestandteil des Opiums. Dieses

* Neben den 20 durch die Triplettcodons im Genom codierten Aminosäuren (kanonische AS) nutzt der menschliche Organismus zusätzlich noch Selenocystein für den Aufbau von Proteinen.

Alkaloid wirkt als Agonist an Opiatrezeptoren, welche sich auf Nervenzellen befinden, und kommt in der Schmerztherapie zum Einsatz. Ein Vergleich mit einem der natürlichen Rezeptorliganden, dem β-Endorphin (**2**) macht deutlich, dass Morphin unmöglich alle funktionellen Gruppen dieses Peptids imitieren kann (Abbildung 1).[9] Dies zeigt, dass oft nur ein kleiner Teil eines Moleküls, die sogenannte pharmakophore Region, ausreichend ist, um an einen Rezeptor zu binden und den vollen pharmakologischen Effekt auszulösen.

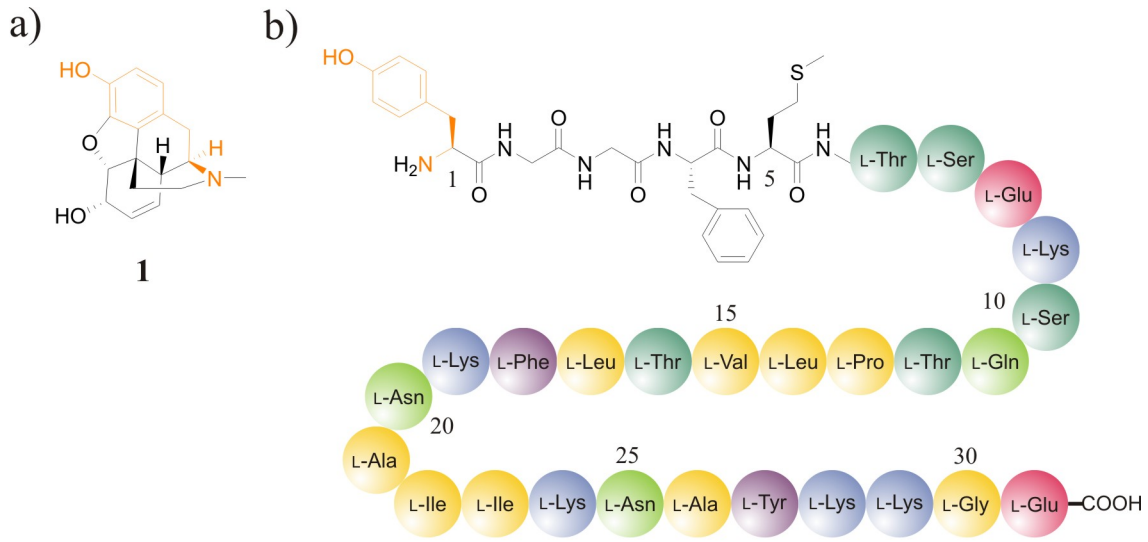



**Abbildung 1:** a) Morphin (**1**) und b) β-Endorphin (**2**) sind Agonisten der Opiatrezeptoren. Das *N*-terminale Pentapeptid von **2** wird als Met-Enkephalin bezeichnet. Die endständige Aminosäure Tyr ist essenziell für die analgetische Wirkung, der *C*-terminale Teil des Peptids ist lediglich für die Rezeptorspezifität entscheidend.

Zur Identifikation der pharmakophoren Region(en) eines Peptids wird i.d.R. ein systematischer Ansatz verfolgt, an dessen Ende ein sogenanntes Peptidomimetikum stehen kann (Abbildung 2).[1,9,10] Dieses zeichnet sich idealerweise durch die gleiche oder sogar durch verbesserte biologische Aktivität und optimierte pharmakologische Eigenschaften im Vergleich zum Originalpeptid aus. Ihm fehlen jedoch oft labile und/oder nichtessenzielle Strukturbestandteile, sodass manchmal der peptidische Ursprung des neuen Wirkstoffes nur noch zu erahnen ist. Ist der genaue Wirkort des zu untersuchenden Peptids nicht genau bekannt, kann dies die Synthese eines Mimetikums erschweren. Andererseits können durch gezielte Strukturvariationen auch erste Hinweise auf mögliche biologische *Target*s erhalten werden.

Der erste Schritt dieser Vorgehensweise kann ein Alanin-Scan sein, bei dem systematisch alle Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht werden. Nach Testierung der Derivate können Rückschlüsse auf die relative Bedeutung jeder Seitenkette für die biologische Aktivität erhalten werden. Positionen, die einen Alanin-Austausch tolerieren, sind prädestiniert für weitere Modifikationen oder Abwandlungen. Wenn durch strukturelle Variationen der Seitenketten eine bessere Ausfüllung der Bindungstasche erreicht wird, kann es zu einer Steigerung der Rezeptoraffinität kommen.

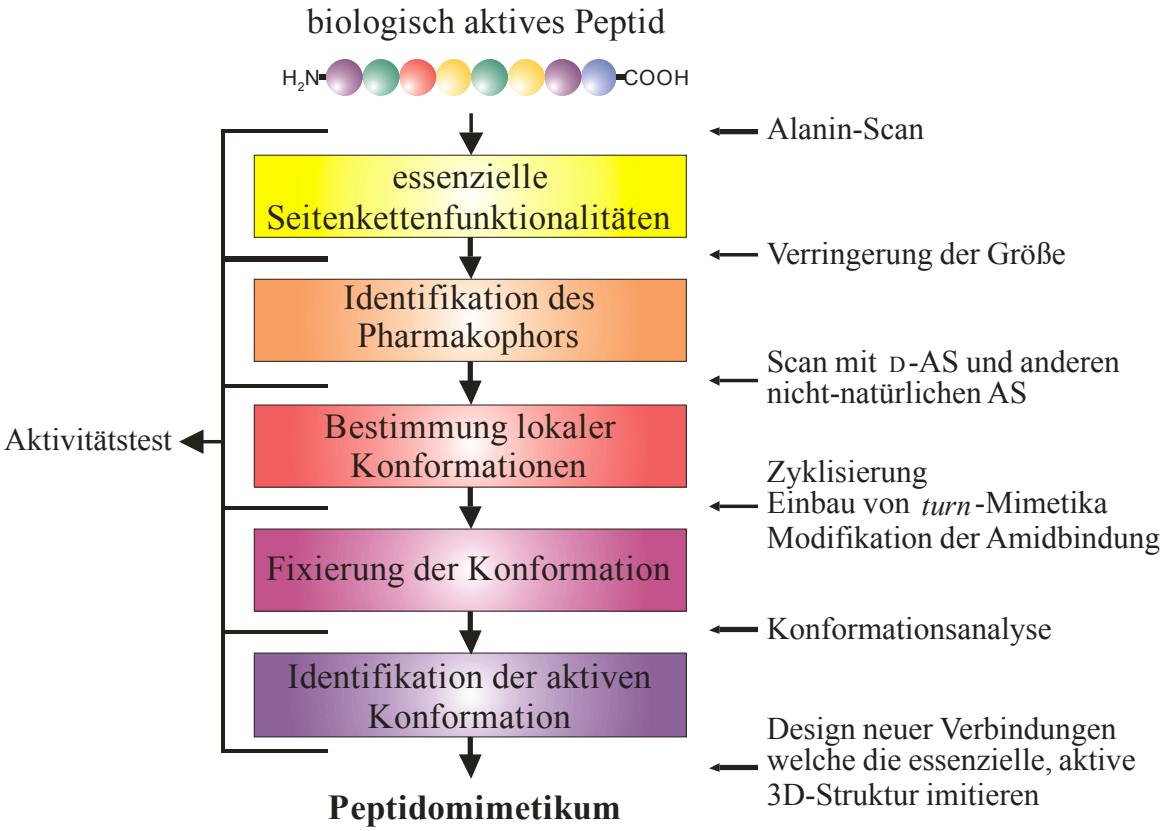



**Abbildung 2:** Systematisches Konzept zum Design von Peptidomimetika.[10] Die Einhaltung der gezeigten Reihenfolge ist nicht zwingend erforderlich; die einzelnen Schritte können natürlich der jeweiligen Problemstellung angepasst werden.

Durch Deletion von einzelnen Aminosäuren oder ganzen Sequenzabschnitten kann die pharmakophore Region eingegrenzt und letztendlich die Größe des Peptids verringert werden. Dies resultiert i.d.R. in einer verbesserten oralen Bioverfügbarkeit. Im nächsten Schritt versucht man, lokale Konformationen wie β-*turns* zu identifizieren, die möglicherweise notwendig sind für eine Bindung an das *Target*. Dies gelingt beispielsweise durch Einbau von D-Aminosäuren, *N*-Methyl-Aminosäuren oder nicht-natürlichen, quartären Bausteinen wie 2-Aminoisobuttersäure (Aib), welche die

Ausbildung von Sekundärstrukturelementen stören können. Wirkt sich die Substitution von L- durch D-Aminosäuren in bestimmten Positionen nicht oder nur geringfügig auf die biologische Aktivität aus, so kann durch Beibehalten dieser Modifikation die Proteolysestabilität entscheidend gesteigert werden. Bei der Konformationsanalyse werden zunehmend auch computergestützte Methoden eingesetzt. Wurde eine oder mehrere *turn*-Regionen im Peptid lokalisiert, so wird im nächsten Schritt versucht, die aktive Konformation durch Einbau von *turn*-Mimetika[11] oder durch Zyklisierung zu fixieren. Am Ende gilt es noch, die „Achillessehne“ des Peptids, die Amidbindungen des Peptidrückgrats als die Schnittstellen von Proteasen, so gut wie möglich zu eliminieren. Zu diesem Zweck wurden bisher schon eine ganze Reihe von isosteren† Gruppen wie die Ketomethylen- oder die *E*-Ethylen-Einheit verwendet. Durch strukturelle Variationen kann man hier außerdem austesten, ob bestimmte Amino- oder Carbonyl-Gruppen an für die Wechselwirkung mit dem biologischen *Target* wichtigen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Am Ende sollte das Rückgrat möglichst vollständig gegen ein nicht-peptidisches Gerüst ersetzt werden, welches die notwendigen Seitenkettenfunktionalitäten in der richtigen räumlichen Orientierung fixiert. Die Fülle an möglichen Strukturvariationen ist natürlich enorm, sodass man immer in Rückkopplung mit den biologischen Testierungsergebnissen den Informationsgewinn durch ein neu zu synthetisierendes Derivat prüfen muss, um den Gesamtaufwand zu reduzieren. Die stetigen Entwicklungen im Bereich der Peptidsynthese, besonders der automatisierten Verfahren an fester Phase, machen diese Studien zur Struktur-Aktivität-Wirkungsbeziehung jedoch immer effizienter.[1,12]

Dieser Ansatz ist alles andere als neuartig, denn Mikroorganismen und einige Tiere bedienen sich bei der Biosynthese biologisch aktiver Peptide schon lange den genannten Strukturmodifikationen. So gelingt ihnen mit Leichtigkeit, wofür der Medizinalchemiker mehrere Monate oder Jahre benötigt: Die Generierung hoch potenter und stabiler Wirkstoffe peptidischer Natur.

† Isoster sind Ionen oder Moleküle, wenn sie dieselbe Anordnung und Anzahl an Atomen mit gleich vielen Valenzelektronen und dieselbe Gesamtladung besitzen.

## 1.2 Antibakterielle Wirkstoffe

Medikamente zur Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten gehören insgesamt betrachtet zu den umsatzstärksten auf dem weltweiten Pharmamarkt und sind zur unverzichtbaren Waffe gegen pathogene Mikroorganismen geworden. Doch warum ziehen sich immer mehr größerer Pharmafirmen aus diesem Therapiegebiet zurück?[13]

Den Startpunkt für die Entwicklung von antibakteriellen Wirkstoffen setzte Alexander Fleming 1929 mit der Entdeckung des β-Lactams Penicillin G (**3**, Abbildung 4), das von dem Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* produziert wird.[14] Die dann folgende zunächst rasante Entdeckung neuer Antibiotikaklassen ist allgemein bekannt und wurde bereits umfangreich in Übersichtsartikeln zusammengefasst.[15] Bis Ende der 60er Jahre waren so nahezu alle bis heute bekannten Wirkstoffgruppen entdeckt, zu denen sehr viele Naturstoffe zählen und die im Wesentlichen fünf Biosynthesewege in Bakterien adressieren: den Aufbau der Zellwand, den Folat-Stoffwechsel, die DNA-Replikation und -Transkription sowie die Proteinbiosynthese (Abbildung 3). Die neue Antibiotikaklasse der Lipopeptide stört außerdem die Struktur und Funktion der Zellmembran (vgl. Abschnitt 1.2.2.2).

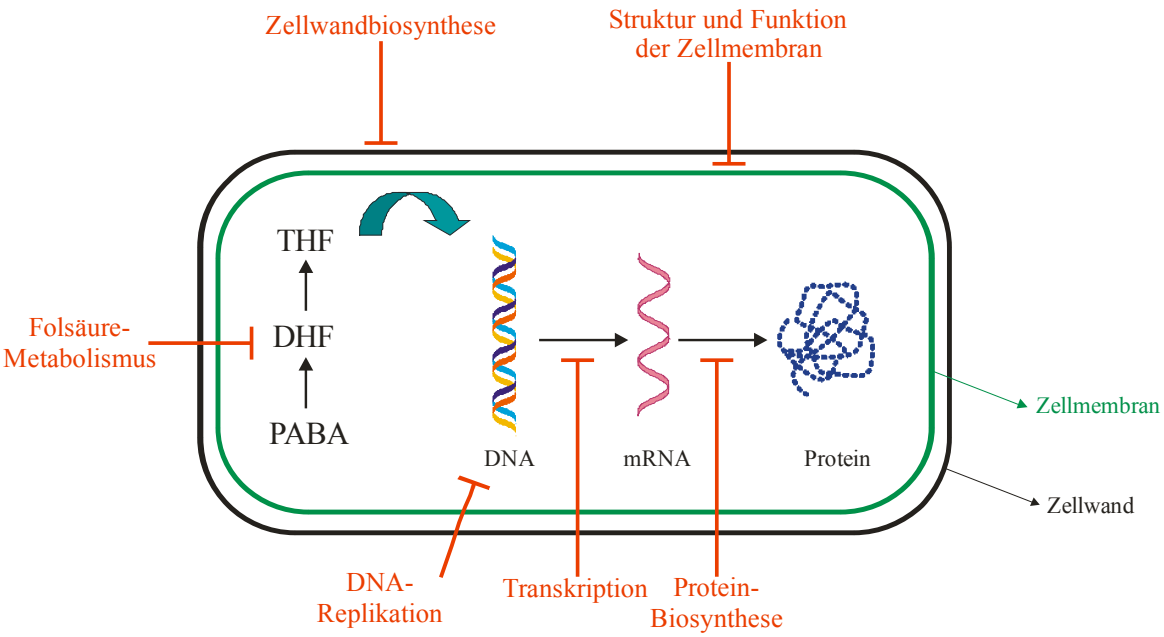



**Abbildung 3:** Angriffspunkte von zugelassenen Antibiotikaklassen auf Biosynthesewege in Bakterien. Auch die schützende Zellmembran kann durch antibakterielle Wirkstoffe zerstört werden.

Mit diesem Repertoire an Wirkstoffen fühlte man sich gut gerüstet, sodass in den folgenden Jahrzehnten nur noch neue Derivate von bekannten antibakteriellen Verbindungen auf den Markt gebracht wurden. Die Fülle von verfügbaren Medikamenten, darunter viele Generika, wiesen im Grunde eine ähnliche Struktur sowie einen vergleichbaren Wirkmechanismus auf. Neue Antibiotika, deren Entwicklung sehr langwierig und kostenintensiv ist, hatten daher ein eher geringes Potenzial zu sogenannten *Blockbustern* aufzusteigen. Dies hatte zur Folge, dass den immer häufiger auftretenden Antibiotika-resistenten Keimen nur sehr wenige oder gar keine neuen Wirkstoffe in den *Pipelines* der Pharmaunternehmen gegenüberstanden.[16] Bis heute hat sich diese Situation nicht wesentlich verbessert. Dies wird auch darin deutlich, dass erst nach ca. 20 Jahren, Anfang 2000, mit Linezolid (**12**, Abbildung 4; Handelsname: Zyvoxid® von *Pfizer*) wieder eine Verbindung zur Behandlung von bakteriellen Infektionen zugelassen wurde, die einer neuen Wirkstoffklasse zugeordnet werden kann.[17] Mittlerweile ist man sich bewusst, dass die Forschung und Entwicklung auf diesem Gebiet unbedingt wieder intensiver verfolgt werden muss, um nicht in die Zeit vor ca. 100 Jahren zurückzufallen, als man der Gefahr durch krankheitserregende Mikroorganismen nahezu schutzlos ausgeliefert war. Die enormen wissenschaftlichen Fortschritte der letzten Jahre in den Naturwissenschaften bieten dabei die Möglichkeit, neue und vielversprechende Wege einzuschlagen.

### 1.2.1 Antibiotikaklassen und ihre molekularen Angriffspunkte

Da sich einige Stoffwechselwege und Strukturmerkmale von Prokaryoten und Eukaryoten unterscheiden, können bei der Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten *Targets* adressiert werden, die im menschlichen Organismus nicht vorkommen. Dadurch erreicht man eine hohe Selektivität und möglichst wenig Nebenwirkungen für den Patienten. In Abbildung 3 sind die wichtigsten Biosynthesewege schematisch dargestellt, in denen die bisher zugelassenen Antibiotikaklassen eingreifen. Einige Beispielverbindungen dazu sind in Tabelle 1 sowie Abbildung 4 aufgeführt. Auf die Details der einzelnen Biosyntheseabläufe wird im Folgenden nicht näher eingegangen. Weiterführende Informationen hierzu können gängigen Lehrbüchern entnommen werden.[18]

**Tabelle 1:** Einige wichtige Antibiotikaklassen mit Beispielen und deren Angriffspunkte in bakteriellen Biosynthesewegen. Nur die Sulfonamide, die Fluorchinolone und die Oxazolidinone gehören zu den vollsynthetischen Wirkstoffen.

| **Antibiotikaklasse** | ***Target*** | **Beispiele** |
|---|---|---|
| **β-Lactame** | Zellwandbiosynthese | Penicillin G (**3**)<br>Chephalosporine |
| **Glycopeptide** | Zellwandbiosynthese | Vancomycin (**4**)<br>Dalbavancin |
| **Lipopeptide** | Zellmembran | Daptomycin (**5**) |
| **Sulfonamide** | Folsäuremetabolismus | Sulfamidochrysoidin (**6**)<br>Sulfamethoxazol |
| **Fluorchinolone** | DNA-Replikation | Ciprofloxacin (**7**)<br>Moxifloxacin |
| **Ansamycine** | Transkription | Rifampicin (**8**) |
| **Polyketide** | Proteinbiosynthese | Tetracyclin (**9**)<br>Minocyclin |
| **Aminoglycoside** | Proteinbiosynthese | Streptomycin (**10**)<br>Kanamycin |
| **Makrolide** | Proteinbiosynthese | Erythromycin A (**11**)<br>Telithromycin |
| **Oxazolidinone** | Proteinbiosynthese | Linezolid (**12**) |

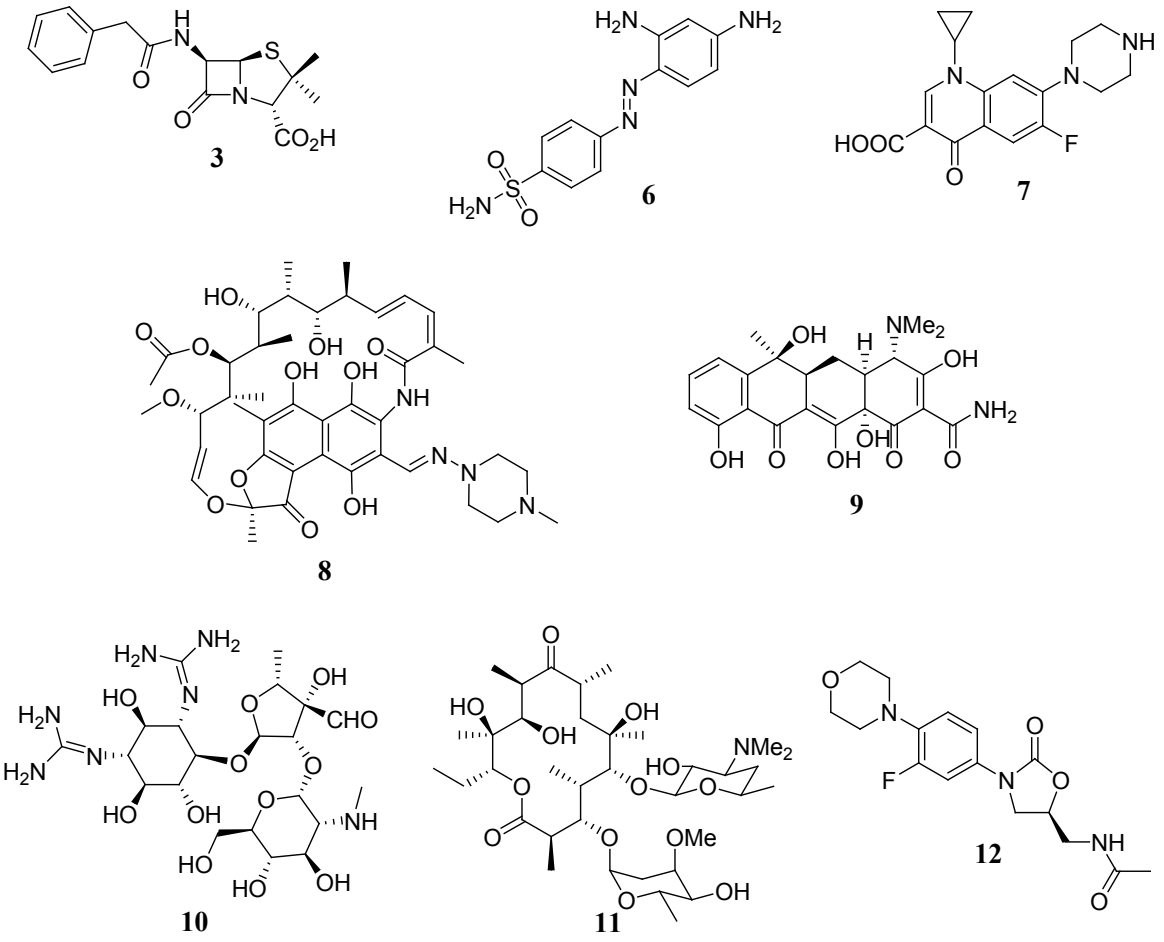



**Abbildung 4:** Einige bedeutende Vertreter der wichtigsten Antibiotikaklassen: Penicillin G (**3**), Sulfamidochrysoidin (**6**), Ciprofloxacin (**7**), Rifampicin (**8**), Tetracyclin (**9**), Streptomycin (**10**), Erythromycin A (**11**) und Linezolid (**12**).

Bakterien grenzen sich von der Umgebung durch eine Zellwand aus Peptidoglycan sowie eine Zellmembran ab. Diese schützende Hülle ist essenziell für das Überleben der Keime und die Störung der Zellwandbiosynthese führt zu einer Wachstumshemmung oder zum Tod der Organismen durch Lyse. Antibiotika, wie z.B. Penicillin G (**3**, Abbildung 4) oder Vancomycin (**4**, Abbildung 10), die hier eingreifen sind bakterizid, das heißt, sie bewirken die Abtötung der Bakterien. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass mit einigen Zellwandbiosyntheseinhibitoren nur sich im Wachstum befindliche Erreger bekämpft werden können. Trotzdem sind diese Wirkstoffe sehr selektiv, denn eukaryotische Zellen besitzen, wenn überhaupt, eine Zellwand, welche aus anderen Biomolekülen aufgebaut ist. Da viele peptidische Naturstoffe die bakterielle Zellwandbiosynthese stören, wird dieses spezielle *Target* in einem eigenen Abschnitt (siehe 1.2.2) behandelt. Polypeptidantibiotika wie Colistin oder Tyrothricin lagern in die bakterielle Zellmembran ein und stören deren Permeabilität.[19] Aufgrund ihrer Toxizität werden sie jedoch nur lokal angewendet.

Die Tetrahydrofolsäure (THF) ist als Coenzym F u.a. notwendig für die Biosynthese von Purin-Bausteinen und damit essenziell für den Aufbau von DNA und RNA. THF wird ausgehend von Folsäure (Vitamin $B_9$) gebildet, welche der menschlichen Körper nicht selbst produzieren kann und damit mit der Nahrung aufnehmen muss. Bakterien hingegen sind in der Lage, die Dihydrofolsäure (DHF) als Vorläufer von THF selbst zu synthetisieren. Ein wichtiger Baustein am Anfang des entsprechenden Biosyntheseweges ist dabei die *para*-Aminobenzoesäure (PABA, vgl. Abbildung 3). Genau an dieser Stelle greift die Antibiotikaklasse der Sulfonamide an, denn diese ähneln strukturell der PABA. Sie fungieren so als falsche Substrate (Mimetika) für die Dihydropteroinsäure-Synthetase und inhibieren diese kompetitiv. Die Störung des Folat-Metabolismus hat einen bakteriostatischen Effekt sowohl auf grampositive als auch auf gramnegative Bakterien, das heißt, lediglich die Vermehrung der Keime wird gestoppt. Das erste Sulfonamid, welches als Breitbandantibiotikum zum Einsatz kam, war der synthetische Azofarbstoff Sulfamidochrysoidin (**6**, Abbildung 4; Handelsname: Prontosil®), dessen biologische Aktivität zuerst 1935 von Gerhard Domagk beschrieben wurde.[20] Die Substanz ist jedoch eine *Prodrug* und wird erst im Körper in den eigentlichen Wirkstoff *para*-Aminophenylsulfonamid (Sulfanilamid) gespalten. Seit der Einführung von Prontosil® wurden eine Vielzahl weiterer Verbindungen dieser Substanzklasse synthetisiert. Als weiterer Wirkstoff ist an dieser Stelle Trimethoprim aus der Gruppe der Diaminopyrimidine zu nennen, welcher die DHF-Reduktase inhibiert. Dieses Enzym kommt zwar auch im Menschen vor, ist aber wesentlich weniger empfindlich gegenüber diesem Antibiotikum.

Die DNA-Replikation in Bakterien kann durch die Gyrasehemmer gestört werden. Das Enzym Gyrase ist in der Lage, Doppelstrangbrüche in die DNA einzuführen und bewirkt so die bei der Vervielfältigung notwendige Entwindung der Doppelhelix. Eine bekannte Antibiotikaklasse, welche an den Gyrase/DNA-Komplex bindet und so die Wiederverknüpfung der Einzelstränge verhindert, sind die Chinolone.[21] Ein Beispiel ist das in den 80er Jahren von der Firma *Bayer* entwickelte Ciprofloxacin (**7**, Abbildung 4; Handelsname von *Bayer*: Ciprobay®/Cipro®), welches zur Untergruppe der Fluorchinolone gezählt wird.[22] Da im menschlichen Organismus ein vergleichbares Enzym vorkommt, ist die Gabe von Chinolon-Antibiotika nicht immer frei von Nebenwirkungen. Die von Streptomyceten produzierten Aminocoumarine (z.B. Novobiocin) zählen als Naturstoffe ebenfalls zu den Gyrasehemmern.[23] Sie verhindern die Bindung von ATP an das Enzym.

Als Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Polymerase in Bakterien wirkt Rifampicin (**8**, Abbildung 4), welches semisynthetisch hergestellt wird.[24] Es hemmt spezifisch den Initiationsschritt beim Umschreiben der doppelsträngigen DNA in einzelsträngige RNA (Translation) und wirkt daher bakterizid. Rifampicin wird hauptsächlich zur Behandlung von Tuberkulose und Lepra, welche durch Mykobakterien verursacht werden, sowie bei MRSA-Infektionen verwendet.

Die Übersetzung der genetischen Information in funktionelle Proteine wird sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten von den Ribosomen durchgeführt. Deren Aufbau und Funktionsweise sind jedoch bei den verschiedenen Lebewesen nicht völlig gleich, sodass auch die bakterielle Translation ein viel adressiertes Angriffsziel von natürlichen und synthetischen Wirkstoffen ist. Antibiotika vom Polyketid-Typ, wie z.B. das Tetracyclin (**9**, Abbildung 4), verhindern die Anlagerung einer neuen Aminoacyl-tRNA an die kleinere 30S-Untereinheit des Ribosoms und wirken dadurch bakteriostatisch auf eine Vielzahl von Keimen.[25] Die Aminoglycoside sind Oligosaccharide, die von Actinomyceten produziert werden und an die 30S-Untereinheit des Ribosoms binden.[26] Dadurch kommt es zur Anlagerung von falschen Aminoacyl-tRNA-Bausteinen und schließlich zur Synthese nicht-funktioneller Proteine. Ein Vertreter ist das 1944 von Waksman *et al.* entdeckte Streptomycin (**10**, Abbildung 4), welches als erster Wirkstoff zur Behandlung von Tuberkulose eingesetzt wurde. Als Nebenwirkung kann es bei Langzeitbehandlungen vor allem zur Schädigung der Nieren und des Gehörs kommen. Die Peptidyltransferaseaktivität der größeren 50S-Unterheit des Ribosoms wird durch Chloramphenicol gehemmt, sodass keine neuen Peptidbindungen geknüpft werden können.[27] Die Gruppe der Makrolid-Antibiotika inhibieren die Aktivität des Elongationsfaktors EF-G.[28] Dieser katalysiert die Hydrolyse von GTP, wobei die dabei frei werdende Energie dazu genutzt wird, die tRNA nach der Knüpfung der Peptidbindung aus dem Ribosom zu entfernen. Durch die Hemmung dieses Schrittes kann das Ribosom nicht zum nächsten Codon der mRNA weiterrücken, sodass die Proteinbiosynthese gestoppt wird. Der bekannteste Vertreter unter den Makroliden, die hauptsächlich gegen grampositive Erreger wirken, ist das Erythromycin A (**11**, Abbildung 4). Eine von den Makroliden abgeleitete, neuere Wirkstoffklasse sind die Ketolide, von denen bisher nur Telithromycin (Handelsname: Telek® von *Sanofi-Aventis*) für die klinische Anwendung zugelassen ist.[29] Es zeichnet sich durch ein breiteres Wirkspektrum sowie zusätzliche Wirkmechanismen aus. Neben den vielen Naturstoffen, die bisher Erwähnung fanden, wurde vor Kurzem nach fast

40 Jahren wieder eine neue Klasse synthetischer Wirkstoffe zur Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten zugelassen, die Oxazolidinone.[17] Linezolid (**12**, Abbildung 4) als ein Vertreter dieser Antibiotikagruppe hemmt die Proteinbiosynthese schon an ihrem Startpunkt, an dem sich die mRNA, die erste Aminoacyl-tRNA und das Ribosom zusammenlagern.

## 1.2.2 Die Bakterienhülle als Angriffspunkt für viele Peptidantibiotika

### 1.2.2.1 Der Aufbau der bakteriellen Zellhülle[30]

Alle Bakterien sind in der ersten Schicht von einer flexiblen, semipermeablen Plasmamembran aus Phospholipiden umgeben. In dieser eingelagert finden sich viele Proteine, die u.a. Teil der Atmungskette oder Bestandteil von Transport- und Signaltransduktionssystemen sind. Auch die Biosynthese der bakteriellen Zellwand findet hier statt. Durch die Hydrophobizität der Lipiddoppelschicht können polare, wasserlösliche Substanzen diese nur sehr schwer überwinden. Zusätzlich zur Zellmembran besitzen Bakterien eine rigide Zellwand, die u.a. zur Stabilisierung gegen den osmotischen Druck und als mechanischer Schutz dient. Diese zweite Schicht wird durch das Peptidoglycan (auch Murein genannt), einem Netzwerk aus Aminosäuren und Zuckern, gebildet. Dabei besteht das Rückgrat aus den abwechselnd miteinander verknüpften Monosacchariden *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc). Diese Zuckerketten sind wiederum durch kurze Peptide quer vernetzt, wobei sich deren Zusammensetzung je nach Bakterienart geringfügig unterscheiden kann. Der Verknüpfungsgrad bestimmt dabei die Starrheit des Peptidoglycangerüsts.

Grampositive Bakterien besitzen eine sehr dicke Zellwand von ca. 20 nm mit eingelagerten Teichonsäuren (Abbildung 5).[31] Diese Bestandteile sind i.d.R. saure Polysaccharide, welche bei Verknüpfung mit den Phospholipiden der Zellmembran als Lipoteichonsäuren[32] und bei Verankerung in der Zellwand als Wandteichonsäuren[33] bezeichnet werden. Durch deren anionischen Charakter tragen die Teichonsäuren zur negativen Ladung an der Zelloberfläche bei und spielen u.a. eine Rolle beim Stofftransport oder bei der Aktivierung des Immunsystems im Wirt. Kleinere Moleküle, z.B. Stoffwechselprodukte, können die vielschichtige Zellwand grampositiver Keime ohne Probleme passieren.

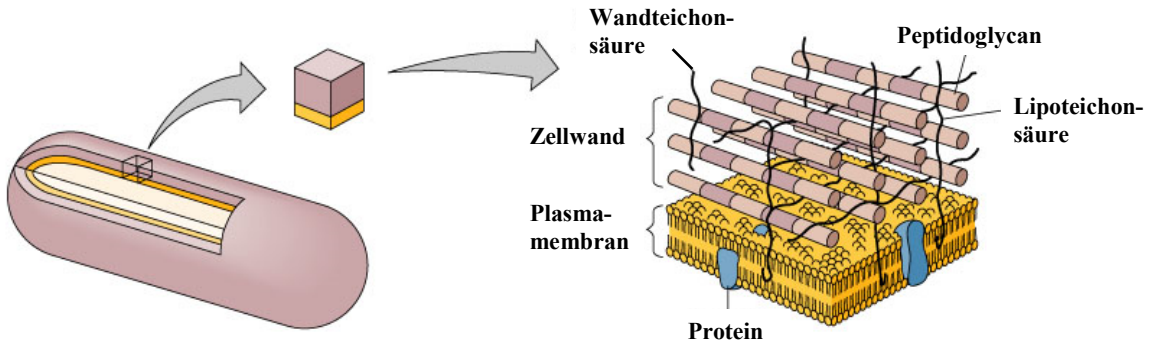



**Abbildung 5:** Aufbau der Zellwand von grampositiven Bakterien.[30b] In die ca. 20 nm dicke Peptidoglycanschicht sind zahlreiche Teichonsäuren eingelagert. Zu dieser Gruppe gehören z.B. die Streptomyceten.

Gramnegative Bakterien besitzen dagegen eine sehr dünne Zellwand von ca. 2 nm, die oft nur aus einer Schicht Peptidoglycan besteht (Abbildung 6). Um die nötige Stabilität zu erreichen, existiert bei diesen Prokaryoten noch eine zusätzliche äußerer Membran. Diese ist asymmetrisch aufgebaut und wird im Inneren von Phospholipiden und außen von Lipopolysacchariden gebildet. Die Lipopolysaccharide an der Oberfläche sind toxisch für viele Organismen und verantwortlich für pathophysiologische Effekte wie Fieber oder einen septischen Schock.[34] Durch die in die Außenmembran eingelagerten Porin-Proteine können kleine hydrophile Moleküle in den Membranzwischenraum, das sogenannte Periplasma, gelangen. Aufgrund des komplexen Aufbaus der Zellhülle gramnegativer Bakterien sind diese oft weniger empfindlich gegenüber Antibiotika und daher unter den pathogenen Krankheitserregern i.d.R. gefährlicher.

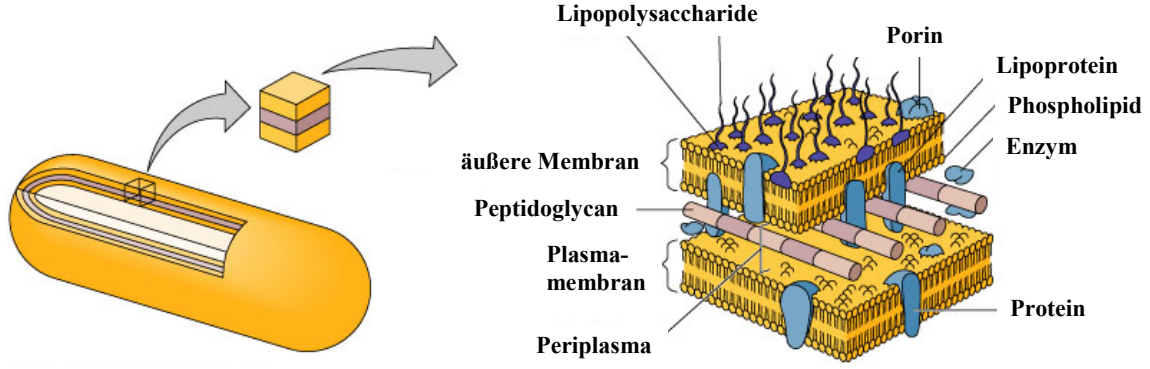



**Abbildung 6:** Die Zellwand von gramnegativen Bakterien ist komplexer aufgebaut als die der grampositiven Bakterien.[30b] Die dünnere Peptidoglycanschicht (ca. 2 nm) wird zusätzlich von einer äußeren Membran umhüllt, welche Lipopolysaccharide enthält. Zu dieser Gruppe gehört z.B. das Enterobakterium *E. coli*.

### 1.2.2.2 Die Biosynthese des Peptidoglycans und deren Inhibitoren

In die Biosynthese des Peptidoglycangerüsts von Bakterien sind zahlreiche Enzyme sowohl im Zytoplasma als auch im Extrazellulärraum bzw. Periplasma involviert. In Abbildung 7 sind die einzelnen Schritte schematisch für *E. coli* (gramnegativ) dargestellt. Der Aufbau des Peptidoglycans bietet zahlreiche Angriffspunkte für antibakterielle Wirkstoffe[35] und kann in drei Abschnitte unterteilt werden.[36]

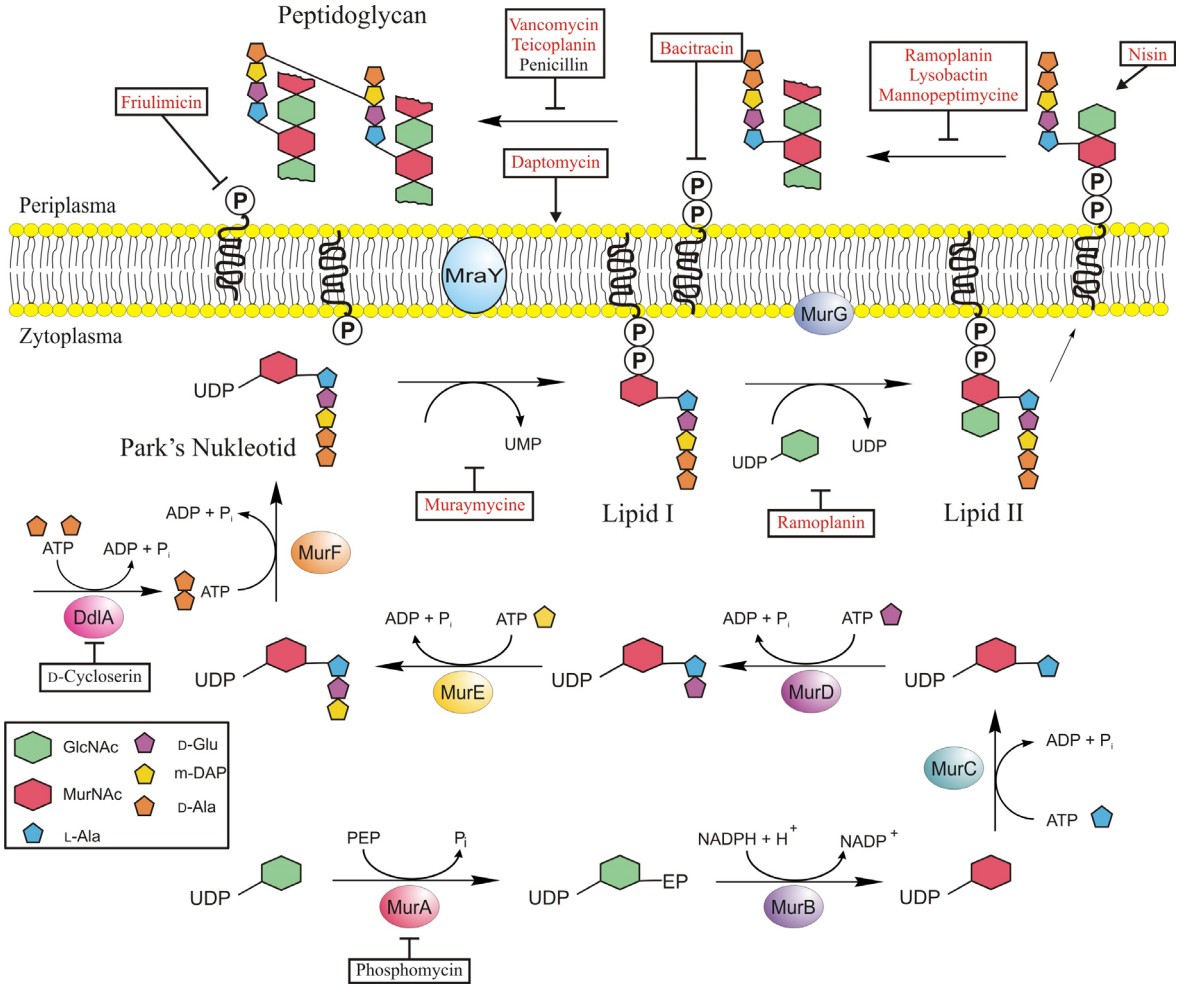
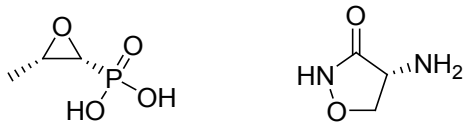



**Abbildung 7:** Die Peptidoglycanbiosynthese in *E. coli*.[35b] Der UDP-*N*-Acetylmuramyl-Pentapeptidbaustein (Park's Nukleotid) wird im Zytoplasma durch eine Reaktionskaskade katalysiert durch die Enzyme MurA-F ausgehend von UDP-*N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) aufgebaut. Die membranständigen Enzyme MraY und MurG sind anschließend für die Synthese des Lipid II-Bausteins verantwortlich. Dieser wird durch einen noch unbekannten Mechanismus in das Periplasma (bei grampositiven Keimen in den Extrazellulärraum) gebracht, wo die Verknüpfung der Glycan- und Peptidketten durch die sogenannten PBPs (*penicillin binding proteins*) erfolgt. Peptidische Inhibitoren der einzelnen Biosyntheseschritte sind rot hervorgehoben.

Zunächst wird im Zytoplasma der Zelle der UDP-*N*-Acetylmuramyl-Pentapeptidbaustein (auch Park's Nukleotid genannt) synthetisiert.[37] Beteiligt sind hierbei die Enzyme MurA-F, wobei zunächst *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) in *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) umgesetzt wird. Anschließend werden an den Zuckerbaustein in ATP-abhängigen Reaktionen nacheinander die Aminosäuren L-Alanin, D-Glutaminsäure, *meso*-Diaminopimelinsäure‡ (*m*-DAP) sowie ein D-Alanyl-D-alanin-Dipeptid gekuppelt.[38] Erstaunlicherweise existiert bisher nur ein Antibiotikum auf dem Markt, das in diese Synthesesequenz eingreift. Der Naturstoff Phosphomycin (**13**, Abbildung 8) wurde bereits 1969 aus einem Streptomyceten isoliert und ist strukturell einzigartig unter allen bekannten Wirkstoffklassen.[39] Es fungiert als Phosphoenolpyruvat-Analogon und inhibiert das MurA-Enzym, die UDP-*N*-Acetylglucosaminenolpyruvyl-Transferase, irreversibel durch kovalente Bindung im aktiven Zentrum.[40] Phosphomycin zeichnet sich durch eine geringe Toxizität sowie niedrige Herstellungskosten aus.




**13** **14**

**Abbildung 8:** Phosphomycin (**13**) und D-Cycloserin (**14**) sind die einzigen als Medikamente eingesetzten Wirkstoffe, die Enzyme der zytoplasmatischen Schritte der Peptidoglycanbiosynthese inhibieren.

Das Oxazolidinon-Derviat D-Cycloserin (**14**, Abbildung 8) besitzt einen dualen Wirkmechanismus.[41] Es hemmt sowohl die Alanin-Racemase als auch die D-Alanin-Ligase, welche den D-Ala-D-Ala-Baustein für die MurF-Reaktion zur Verfügung stellt. Damit greift dieser ebenfalls aus Streptomyceten isolierte Naturstoff indirekt in die Peptidoglycanbiosynthese ein. D-Cycloserin wird als Medikament bei der Behandlung von Tuberkulose eingesetzt. Seit der Entdeckung von Phosphomycin und D-Cycloserin vor nunmehr über 40 Jahre konnte trotz Synthese zahlreicher Substrat- und Übergangszustandsanaloga kein weiterer Inhibitor der Enzyme MurA-F gefunden werden, der das Potenzial zur Weiterentwicklung als antibakterielles Medikament aufwies.[37,38]

‡ In vielen grampositiven Organismen wird statt *meso*-Diaminopimelinsäure L-Lysin eingebaut. Einige Bakterien verwenden z.T. auch andere Diaminosäuren.

Im zweiten Schritt der Peptidoglycanbiosynthese wird das UDP-MurNAc-Pentapeptid katalysiert durch das membranständige Enzym MraY an den in der Lipidschicht verankerten Bactoprenolphosphat-Carrier ($C_{55}$-P) gekuppelt. Der resultierende Baustein wird als Lipid I bezeichnet. Durch die Glycosyltransferase MurG wird dann ein weiteres aktiviertes Zuckermolekül, UDP-GlcNAc, an Lipid I angebracht. Der daraus hervorgegangene Lipid II-Baustein wird im Anschluss durch einen noch unbekannten Mechanismus auf die Außenseite der Zellmembran transportiert (grampositiv: Extrazellulärraum, gramnegativ: Periplasma), wo er schließlich im dritten und letzten Schritt durch eine Vielzahl von Enzymen mit Transpeptidase- und Transglycosylaseaktivität, den sogenannten *penicillin binding proteins* (PBPs), polymerisiert wird.[42] Bei gramnegativen Bakterien wird die Ausbildung der Peptidverbrückung durch die bifunktionelle Aminosäure *m*-DAP ermöglicht, deren freie Aminogruppe mit dem vorletzten D-Ala-Rest eines zweiten Pentapeptids verknüpft wird. Übrig bleibt Undecaprenylpyrophosphat ($C_{55}$-PP), das nach einer Dephosphorylierung zu $C_{55}$-P wieder als Carriermolekül in den Biosynthesezyklus eintreten kann. Bei dem grampositiven Bakterium *S. aureus* wird noch auf der zytoplasmatischen Seite der Membran ein Pentaglycin-Peptid an die freie Aminogruppe von L-Lys des Lipid II-Bausteins gekuppelt. Die Transpeptidierung erfolgt anschließend im Extrazellulärraum über dieses Oligopeptid. Bei anderen Mikroorganismen sind noch viele weitere Modifikationen, insbesondere bei den verwendeten Aminosäurebausteinen, bekannt. Detailliertere Informationen dazu können der Literatur entnommen werden.[43]

Die β-Lactamantibiotika, darunter die Penicilline und die Chephalosporine, waren die ersten antibakteriellen Naturstoffe, deren *Target* die Zellwandbiosynthese darstellte.[8] Diese Substanzklasse inhibiert die Enzyme mit Transpeptidase- und Carboxypeptidasefunktion, die Penicillin-Bindeproteine (PBPs), durch kovalente Bindung im aktiven Zentrum. Sie fungieren dabei als Mimetikum des *C*-terminalen Pentapeptidteils des noch nicht quer vernetzten Peptidoglycanvorläufers. Mittlerweile existiert eine Vielzahl an Derivaten und Untergruppen, die sich insbesondere durch verbesserte Säurefestigkeit, β-Lactamase-Unempfindlichkeit sowie ein erweitertes Wirkspektrum auszeichnen. β-Lactamantibiotika gehören daher immer noch zu den am meisten verwendeten Wirkstoffen bei der Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten.

Viele Peptidantibiotika stören Mechanismen und Enzymfunktionen in den letzten, extrazellulären Schritten der Peptidoglycanbiosynthese.[35] Ein bekannter Vertreter ist das Ramoplanin A2 (**15**, Abbildung 9).[44] Dieses cyclische Lipoglycodepsipeptid wurde zusammen mit weiteren strukturell verwandten Derivaten 1984 im Rahmen eines *Screening*programms aus einem Actinomyceten-Stamm isoliert.[45] Das Peptid enthält neben einer *N*-terminalen, mehrfach ungesättigten Acylkette und einem Disaccharid-Baustein auch zahlreiche D-Aminosäuren. Auffällig ist außerdem der hohe Anteil an 4-Hydroxyphenylglycin-Aminosäuren im Molekül. Die Struktur des Peptids in Lösung wurde mit NMR-spektroskopischen Methoden aufgeklärt.[46] Dabei zeigte sich, dass Ramoplanin A2 eine antiparallele β-Faltblattstruktur ausbildet, wobei sich *turn*-Regionen im Bereich der Aminosäuren 8-9 und 14-16 befinden. Die kompakte Sekundärstruktur wird durch mehrere intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Die erst kürzlich veröffentlichte Röntgenstruktur des Peptids stimmt in weiten Teilen mit der Lösungskonformation überein, wobei im Kristall ein Ramoplanin A2-Dimer beobachtet wird.[47]

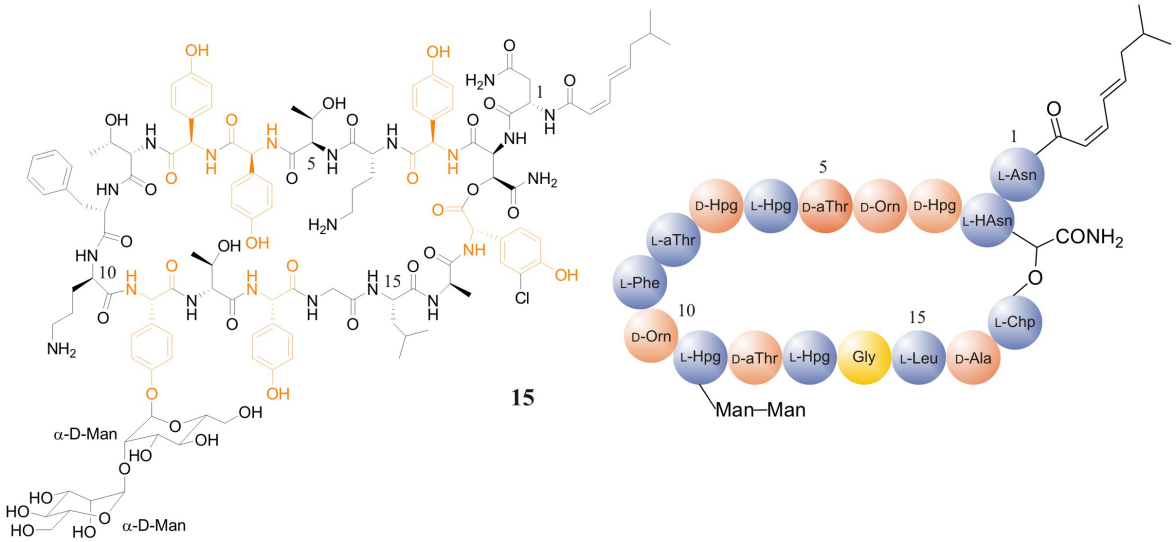


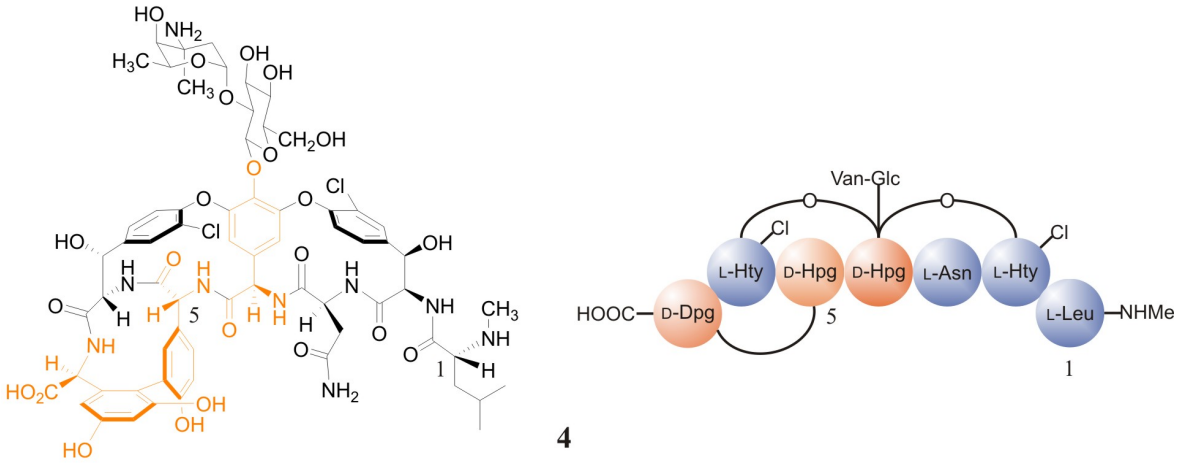

**Abbildung 9:** Das antibakterielle Lipoglycocyclodepsipeptid Ramoplanin A2 (**15**) enthält fünf 4-Hydroxyphenylglycine, davon eines *O*-glycosyliert, und ein 3-Chlor-4-hydroxyphenylglycin (orange in der Strukturformel hervorgehoben). Ramoplanin A2 inhibiert MurG und den Transglycosylierungsschritt von Lipid II. Die genauen Mechanismen dazu sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die antibakterielle Wirkung von Ramoplanin A2 ist auf eine Inhibition des Transglycosylierungsschrittes der Peptidoglycanbiosynthese durch Komplexieren des Lipid II-Bausteins zurückzuführen.[48] Dabei agiert das Peptid wahrscheinlich als amphiphiles Dimer, die Lipid-Seitenkette fungiert als Membrananker und die positiv geladenen Amino-Gruppen der Ornithin-Aminosäuren sind an elektrostatischen Wechselwirkungen beteiligt.[47,49] Weitere Untersuchungen zeigten, dass Ramoplanin A2 *in vitro* die Umsetzung von Lipid I in Lipid II durch das MurG-Enzym hemmt.[50] Damit besitzt dieses Antibiotikum einen dualen Wirkmechanismus, wobei jedoch noch diskutiert wird, ob das Peptid aufgrund seiner hohen Molekülmasse überhaupt die bakterielle Zellmembran passieren kann. Trotz seiner Instabilität und der komplexen Struktur befindet sich Ramoplanin A2 (*Nanotherapeutics*) zurzeit in der Endphase der klinischen Studien zur Behandlung von Infektionen mit grampositiven Bakterien und könnte demnächst das Arsenal an verfügbaren Reserveantibiotika erweitern.[51]

Das schon sehr lange bekannte Cyclopeptid Bacitracin, isoliert aus Bacillus-Stämmen, bildet einen $Zn^{2+}$-abhängigen Komplex mit dem nach der Transglycosylierungsreaktion freiwerdenden Carriermolekül $C_{55}$-PP.[52] Dies verhindert eine Dephosphorylierung dieses Bausteins und damit dessen Wiedereintritt in den Biosyntheseweg auf der zytoplasmatischen Seite. Bacitracin wurde bereits 1948 von der FDA zugelassen, wird aber wegen seiner Nierentoxizität nur topisch (lokal oberflächlich) angewendet.

Unter den Glycopeptidantibiotika, welche seit den 60er Jahren verwendet werden, ist Vancomycin (**4**, Abbildung 10) der wohl bekannteste Vertreter.[7] Dieses Peptid wurde aus *Amycolatopsis orientalis* isoliert und enthält wie Ramoplanin A2 einige Hydroxyphenylglycin-Aminosäuren, welche bei der Ausbildung der cyclischen Strukturmotive beteiligt sind. Die äußerst komplexe Architektur von Vancomycin ist wohl auch der Grund dafür, dass dessen exakte Struktur erst in den 80er Jahren aufgeklärt werden konnte. Glycopeptidantibiotika bilden durch Wasserstoffbrückenbindungen einen Komplex mit dem L-Lys-D-Ala-D-Ala-Peptidteil des Peptidoglycanvorläuermoleküls und verhindern so die für die Stabilität der Zellwand notwendige Quervernetzung. Ihr Einsatz ist auf grampositive Bakterien beschränkt, da sie die äußere Membran von gramnegativen Keimen nicht überwinden können. Die am häufigsten auftretenden Resistenztypen sind mit einer Veränderung der Aminosäurezusammensetzung des Pentapeptids von Lipid II verbunden. Bakterien mit dem *vanA/B*-Resistenzgen bauen dabei beispielsweise als

*C*-terminale Aminosäure nicht D-Alanin, sondern die Hydroxysäure D-Lactat ein. Dies führt zu dem Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung bei der Komplexierung durch Vancomycin. Ein erheblicher Aktivitätsverlust ist die Folge.




**4**

**Abbildung 10:** Das Glycopeptidantibiotikum Vancomycin (**4**) verhindert die Quervernetzung bei der Peptidoglycanbiosynthese durch Komplexieren der D-Ala-D-Ala-Einheit des Pentapeptidbausteins von Lipid II. Die Hydroxyphenylglycin-Aminosäuren sind in der Struktur orange hervorgehoben. Aus historischen Gründen wird bei den Glycopeptidantibiotika der *C*-Terminus links und der *N*-Terminus rechts gezeichnet.

Aus der Gruppe der Glycopeptidantibiotika stehen zurzeit gleich drei neue Verbindungen vor der Zulassung.§ Durch lipophile Reste im Molekül können sich das von Teicoplanin durch Semisynthese abgeleitete Dalbavancin (Handelsname: Zeven® von *Pfizer*) sowie das Vancomycin-Derivat Telavancin (Handelsname: Vibativ® von *Theravance*) wahrscheinlich in der bakteriellen Zellmembran verankern und besitzen durch die Lokalisierung eine erhöhte Aktivität. Eine Störung der Membranintegrität wird außerdem diskutiert. Oritavancin (*The Medicines Company*, entwickelt von *Eli Lilly*), ebenfalls ein Abkömmling von Vancomycin, bindet neben dem D-Ala-Dipeptid zusätzlich an die Pentaglycin-Brücke und verhindert so noch effektiver die Quervernetzung des Peptidoglycans in MRSA-Keimen (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*). Kooperative Effekte, welche aus einer Kombination von Dimerbildung und Membranverankerung resultieren, ermöglichen Oritavancin eine besonders starke Bindung an das Peptidoglycan-Pentapeptid.[53]

§ Telavancin wurde von der FDA bereits für einige Anwendungsgebiete zugelassen. Dalbavancin und Oritavancin befinden sich noch in Phase III der klinischen Studien.

Das Lipopeptid Daptomycin (**16**, Abbildung 11; Handelsname: Cubicin® von *Cubist Pharmaceuticals*) ist der erste Vertreter einer neuen Antibiotikaklasse, der als Medikament zugelassen wurde.[54] Bei dem Peptid handelt es sich um ein semisynthetisches Derivat, dessen Vorläufer aus *Streptomyces roseosporus* isoliert wurde und sich von Daptomycin nur in der Beschaffenheit der Alkykette unterscheidet.[55] Neben drei D-Aminosäuren findet man in der Sequenz auch die nicht-proteinogenen Aminosäuren L-Ornithin, L-β-Methylglutaminsäure sowie L-Kynurenin. Daptomycin bindet mit seinen aciden Resten $Ca^{2+}$-Ionen in einer 1:1-Stöchiometrie. Diese sind notwendig für die biologische Aktivität des Peptids, ein spezifisches *Target* konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden. Es wird vermutet, dass sich Daptomycin in die bakterielle Zellmembran einlagern kann, was zu einer Störung das elektrischen Membranpotenzials führt.[56] Auch der Teichonsäurebiosyntheseweg wird als möglicher Angriffspunkt in Betracht gezogen. Obwohl Daptomycin bei *Eli Lilly* entdeckt wurde, erfolgte die Markteinführung im Jahr 2003 durch eine kleiner Firma unter dem Namen Cubicin® (*Cubist Pharmaceuticals*).[57] Es zeigt sehr gute Aktivität gegenüber resistenten grampositiven Keimen wie Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und MRSA, kann jedoch aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit und unzureichender Resorption nicht oral appliziert werden.[58]

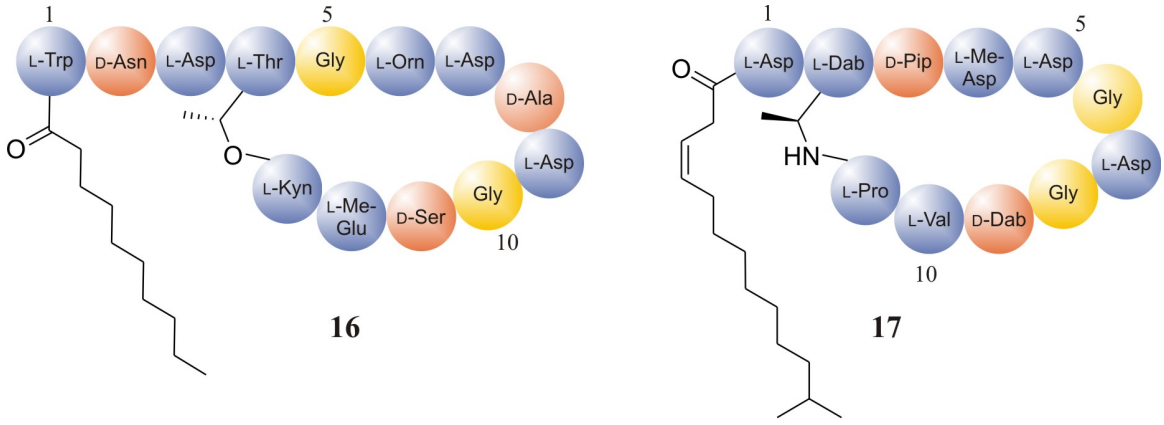



**Abbildung 11:** Die Lipopeptidantibiotika Daptomycin (**16**) und Friulimicin B (**17**) (L-Aminosäuren: blau, D-Aminosäuren: orange, Glycin: gelb; die vollständigen Bezeichnungen der nicht-proteinogenen Aminosäuren können dem Abkürzungsverzeichnis entnommen werden). Aus den gezeigten Kugelmodellen wird die strukturelle Ähnlichkeit dieser Lipopeptide deutlich.

Ein weiteres interessantes Lipopeptidantibiotikum ist das Friulimicin B (**17**, Abbildung 11).[59] Dieses Cyclopeptid ist strukturell verwandt mit Daptomycin und enthält eine verzweigte, ungesättigte $C_{14}$-Fettsäureseitenkette sowie zahlreiche nicht-proteinogene

Aminosäuren. Zunächst vermutete man, dass dessen Wirkmechanismus dem von Daptomycin ähnelt. Neueste Studien zeigten jedoch, dass Friulimicin B einen $Ca^{2+}$-abhängigen, stöchiometrischen Komplex mit dem Bactoprenolphosphat-Carrier ($C_{55}$-P) bildet.[60] Dadurch kommt es nicht nur zur Blockierung der MraY-Reaktion bei der Synthese von Lipid I, sondern auch zur Störung anderer Biosynthesewege, wie dem Aufbau der Teichonsäuren.

### 1.2.3 Das Problem der Resistenzbildung

Mikroorganismen sind ständig darauf angewiesen, den ihnen zur Verfügung stehenden Lebensraum sowie Ressourcen gegen Konkurrenten zu verteidigen. Dazu haben sie über einen langen Zeitraum hinweg extrem effiziente Strategien entwickelt, wie z.B. die Produktion antimikrobieller Substanzen als Sekundärmetabolite. Daneben sind sie jedoch auch in der Lage, sich sehr schnell anzupassen, wenn sie selbst durch derartige Verbindungen bekämpft werden sollen. Unter dem vom Menschen aufgebauten Selektionsdruck durch den unbedachten, übermäßigen oder sogar falschen Einsatz von Antibiotika existieren mittlerweile unter nahezu allen Bakterien Stämme, die gegen einen oder mehrere Wirkstoffe Resistenzmechanismen ausgebildet haben.[61] Zu diesen zählen u.a. der aktive Export des Wirkstoffes aus der Zelle, Mutationen des *Target*proteins, Inaktivierung des Antibiotikums durch enzymatische Modifikationen, das Umgehen des inhibierten Biosyntheseweges oder die Produktion strukturell veränderter Bausteine.[62] Die zugrunde liegenden Resistenzgene können spontan durch horizontalen Transfer in Form von Plasmiden oder Transposons auf andere Arten und Spezies übertragen werden.

Neben den Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) gehören Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) wohl zu den am meisten beachteten Antibiotika-unempfindlichen Krankheitserregern.[63] Diese grampositiven Bakterien werden zu einem immer größeren Problem im Gesundheitswesen. Besonders dramatisch ist die zunehmende Häufigkeit dieser Keime in Krankenhäusern. Die Resistenz gegen Methicillin, welches mittlerweile nicht mehr als Wirkstoff eingesetzt wird, kommt durch die Expression eines zusätzlichen Enzyms der Peptidoglycanbiosynthese, PBP2a, zustande. Dieses besitzt nur eine geringe Affinität für β-Lactamantibiotika und kann daher die Transpeptidaseaktivität des dafür ursprünglich zuständigen Enzyms PBP2, welches jedoch inhibiert wird, übernehmen.[64]

PBP2 katalysiert weiterhin die Verknüpfung der Zucker. In Gegenwart von β-Lactamantibiotika besitzen die Bakterien eine geringer quer vernetzte Zellwand mit längeren Glycansträngen. Auf genetischer Ebene ist die Transpeptidase PBP2a durch das *mecA*-Gen codiert, welches zusammen mit weiteren regulatorischen Genabschnitten wahrscheinlich von außen erworben wurde.

MRSA-Infektionen werden i.d.R. durch Gabe von Glycopeptidantibiotika zusammen mit einem weiteren Wirkstoff wie Rifampicin oder Linezolid als Monotherapie behandelt.[63] Vereinzelt auftretende Resistenzen gegen sogenannte Notfallantibiotika wie Vancomycin in Kombination mit einer Unverträglichkeit gegenüber den eingesetzten Wirkstoffen machen die Behandlung von Infektionen mit MRSA-Stämmen immer komplizierter.[65] In Anbetracht der hohen Kosten für die Entwicklung und Einführung neuer Antibiotika finden ältere Wirkstoffe wie Phosphomycin (**13**, Abbildung 8) und Fusidinsäure wieder mehr Beachtung. Diese könnten möglicherweise in Kombination mit anderen antibakteriellen Wirkstoffen durch eine synergistische Wirkung die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten ergänzen.[66] Auch einige Cephalosporine der 5. Generation, wie z.B. Ceftobiprol (Handelsname: Zevtera® von *Basilea Pharmaceutica*), sind sehr vielversprechend, da sie auch das PBP2a-Enzym hemmen. Ob diese Wirkstoffe in nächster Zeit für die klinische Anwendung zugelassen werden, ist jedoch noch abzuwarten.[67] Eine einfache, aber immer noch nicht ausreichend praktizierte Maßnahme zur Verhinderung von Infektionen mit MRSA in Krankenhäusern ist ein konsequentes Hygienemanagement sowie die frühzeitige Isolierung betroffener Patienten. In den letzten Jahren wurde jedoch immer wieder von MRSA-Infektionen außerhalb von Krankenhäusern berichtet. Die involvierten Stämme werden auch als cMRSA (*community acquired* MRSA) bezeichnet und besitzen i.d.R. noch kein so ausgeprägtes Resistenzspektrum.[68]

### 1.2.4 Ausblick

Die am häufigsten verwendeten Antibiotikaklassen sind nach wie vor die β-Lactame, die Makrolide sowie die Fluorchinolone (Abbildung 12).[13] Dies liegt u.a. daran, dass in den letzten Jahrzehnten eher der Fokus auf der Weiterentwicklung bekannter Leitstrukturen als auf der Entwicklung neuer Wirkstoffklassen lag.

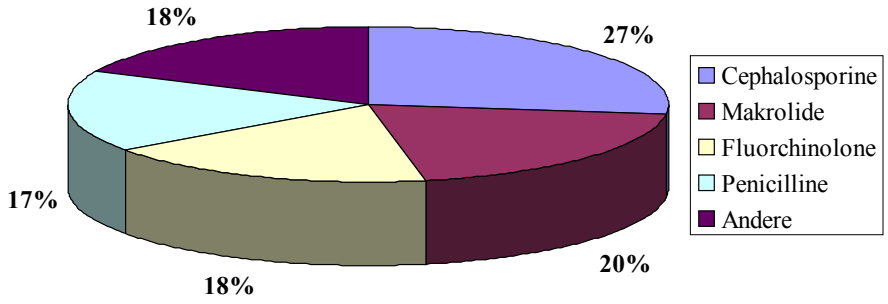



**Abbildung 12:** Marktanteile der führenden Antibiotikaklassen (nach Verkaufszahlen).[13b]

Im Gegensatz zu vielen anderen Therapiegebieten dominieren unter den Medikamenten zur Behandlung von Infektionskrankheiten weiterhin die Naturstoffe aus Bakterien und Pilzen sowie von diesen abgeleitete Verbindungen sehr stark.[4c,d] Insbesondere unter den Zellwandbiosyntheseinhibitoren finden sich Substanzen, die den oft zitierten „Lipiski *rule of five*"-Regeln für mögliche Wirkstoffe ganz und gar nicht entsprechen.[69] Das enorme Potenzial der strukturell faszinierenden und hochpotenten Substanzen, welche die Natur hervorbringt, sollte jedoch auch in Zukunft bei der Leitstruktursuche weiter voll ausgeschöpft werden.[4c,d;70] Naturstoffe besitzen oft eine hohe Dichte an funktionellen Gruppen, was eine hochspezifische Interaktion mit dem *Target* ermöglicht. Auch multiple Wirkmechanismen sind bekannt. Diese strukturellen Voraussetzungen können synthetische Verbindungen oft gar nicht nachahmen. Durch die Fortschritte bei der Sequenzierung ganzer Genome wurde schnell klar, dass bisher nur ein Bruchteil der möglichen Sekundärmetabolite von Mikroorganismen entdeckt wurde. Einige Arten, wie z.B. die marinen Cyano- oder Myxobakterien, wurden noch nicht hinreichend auf die Produktion interessanter Verbindungen untersucht und viele Bakterien konnten bisher im Labor überhaupt noch nicht kultiviert werden.[71] Auch der kombinatorischen Biosynthese wird großes Potenzial zugeschrieben.[72]

Leider ist die Entwicklung neuer Antibiotika, wie schon zuvor erläutert, seit Längerem unattraktiv für größere Pharmaunternehmen geworden.[13] Die Ursachen dafür sind vielfältig. Zum einen ist eine bakterielle Infektion akut, sodass Medikamente nur über einen relativ kurzen Zeitraum angewendet werden müssen. Zum anderen gibt es auf dem Markt eine riesige Menge an antibakteriellen Wirkstoffen, oft in Form von Generika. In den klinischen Studien müssen sich neue Verbindungen daher nicht nur gegenüber den strengen Richtlinien der Zulassungsbehörden, sondern ebenso im Vergleich mit bereits verwendeten Medikamenten behaupten. Durch die oft sehr schnell auftretenden

Resistenzen besteht außerdem die Gefahr, dass ein Antibiotikum wirkungslos wird, bevor überhaupt die Entwicklungskosten kompensiert wurden. Der Trend geht daher immer mehr dazu über, dass kleinere Unternehmen dieses Therapiegebiet bearbeiten und größere Pharmafirmen erst spät in der Entwicklung einsteigen, wenn sich ein hohes Potenzial eines Wirkstoffkandidaten abzeichnet.

Neue Angriffspunkte im bakteriellen Metabolismus, die zurzeit untersucht werden, sind beispielsweise die Biosynthese der Lipopolysaccharide oder der Teichonsäuren.[73] Auch eine aktive Immunisierung mit Oberflächenkomponenten von Mikroorganismen wäre denkbar.[74] Zwei Beispiele für zurzeit untersuchte Naturstoffe mit neuen Wirkmechanismen sollen im Folgenden kurz diskutiert werden.

Die Lipopeptide der Arylomycine sind sowohl strukturell als auch funktionell interessant.[75] Sie enthalten neben einer Lipidkette und *N*-Methyl-Aminosäuren auch die nicht-proteinogene Aminosäure 4-Hydroxyphenylglycin, deren Aromat über eine C-C-Bindung mit einem Tyrosin-Rest verknüpft ist. Ein ähnliches Strukturmotiv findet sich auch bei Vancomycin und verwandten Peptiden. Einige Derivate weisen außerdem verschiedene Hydroxy- und Glycosylierungen auf. Es konnte gezeigt werden, dass Arylomycin $A_2$ (**18**, Abbildung 13) an die bakterielle Signalpeptidase Typ I bindet und diese inhibiert.[76] Das membranständige Enzym gehört zu den Endopeptidasen und ist für die Abspaltung der Signalsequenz von für den Export bestimmten Proteinen zuständig. Eine Hemmung dieser Funktion führt zur Akkumulation dieser Proteine in der Plasmamembran und schließlich zum Tod der Zellen durch Lyse.

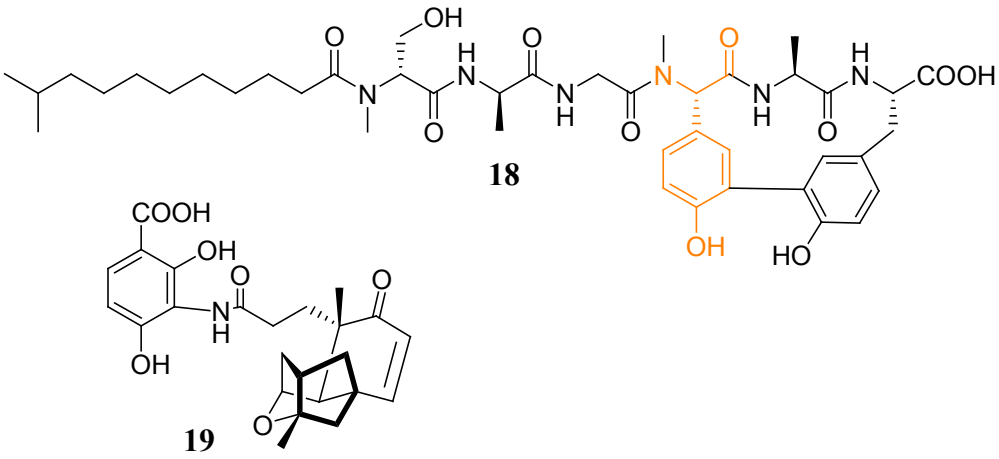



**Abbildung 13:** Arylomycin $A_2$ (**18**) und Platensimycin (**19**). Im Arylomycin $A_2$ ist der 4-Hydroxyphenylglycin-Baustein als nicht-proteinogene Aminosäure farbig hervorgehoben.

Durch die Entdeckung der Naturstoffe Platensimycin (**19**, Abbildung 13) und Platencin bei *Merck & Co*. ist die bakterielle Fettsäurebiosynthese als *Target* wieder stärker in den Fokus der Forschung gerückt.[77] Für die Biosynthese der Fettsäuren sind bei Prokaryoten viele einzelne Enzyme verantwortlich (dissoziative Fettsäuresynthase: FAS-II), wohingegen bei Eukaryoten ein Multienzymkomplex (assoziative Fettsäuresynthase: FAS-I) diese Aufgabe übernimmt.[78] Durch diesen Unterschied wäre eine selektive Adressierung durch Antibiotika möglich. Ob die erwähnten Naturstoffe oder deren Derivate als potenzielle Wirkstoffe weiterentwickelt werden, ist noch abzuwarten. Außerdem müssen die hohen Erwartungen an dieses *Target* womöglich zurückgestellt werden, da neueste Studien zeigen, dass einige grampositive Bakterien Fettsäuren aktiv aus der Umgebung aufnehmen können, um die Hemmung der Fettsäurebiosynthese zu kompensieren.[79]

## 1.3 Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV)

### 1.3.1 Aktueller Stand zur Verbreitung des HI-Virus

Die Gesamtzahl der jährlichen Neuinfektionen mit dem HI-Virus, dem Auslöser der erworbenen Immunschwäche (AIDS) ist seit den späten 1990er Jahren kontinuierlich gesunken (ca. 2.6 Mio. Neuinfizierte 2009 weltweit). Besonders in der sub-Sahara-Region Afrikas ist dieser Trend deutlich zu erkennen (Abbildung 14).[80] Die erwähnte positive Tendenz ist jedoch nicht in allen Teilen der Welt zu verzeichnen. Besonders in Osteuropa und Zentralasien steigt die Zahl der Neuinfektionen immer noch stark an. In Deutschland leben zurzeit schätzungsweise 70.000 HIV-infizierte Menschen, wobei sich die Zahl der jährlich neu diagnostizierten Infektionen seit 2007 auf einem Niveau von ca. 3000 zu stabilisieren scheint.[81]

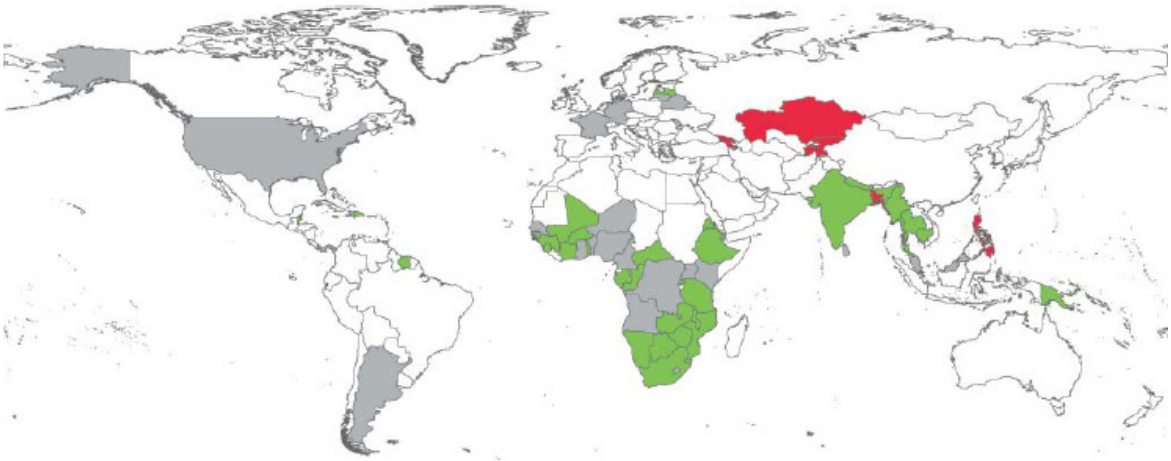


**Abbildung 14:** Veränderungen in der Häufigkeit von Neuinfektionen mit dem HI-Virus im Zeitraum 2001-2009 (rot: zunehmend > 25 %, grau: stabil, grün: abnehmend > 25 %, farblos: keine Daten vorhanden).[80]

Durch die Verbesserung der antiretroviralen Therapiemöglichkeiten und der damit verbundenen verringerten Sterblichkeitsrate (ca. 1.8 Mio. 2009) leben immer mehr HIV-infizierte Menschen auf der Welt (ca. 33 Mio. Ende 2009), davon mit fast 70 % der Großteil in Afrika (Abbildung 15).

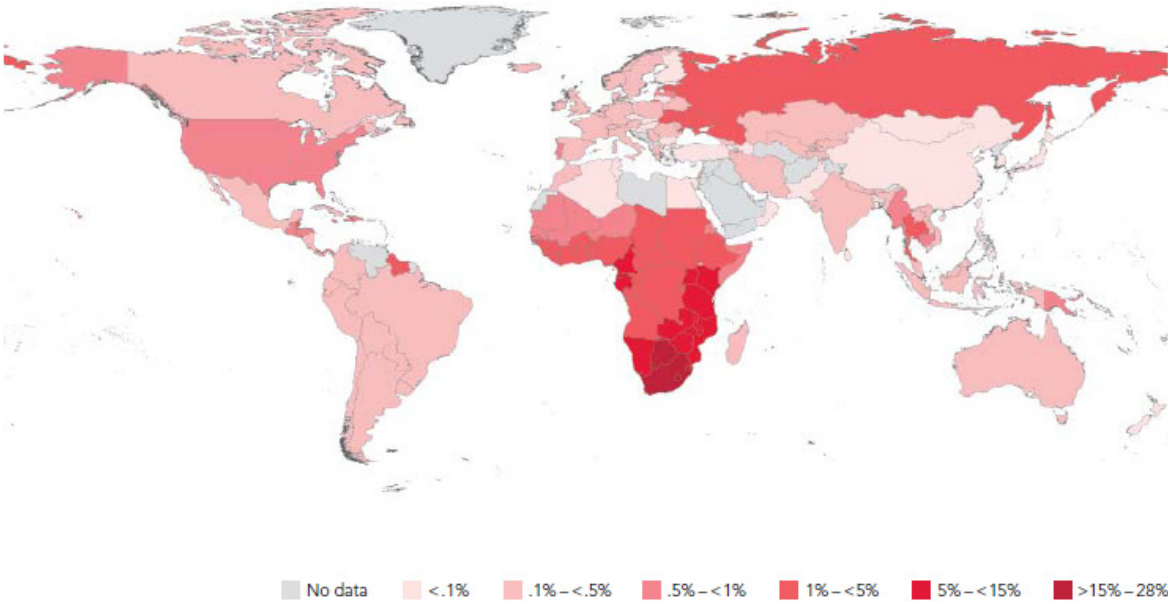



**Abbildung 15:** Weltweite Verbreitung von HIV im Jahr 2009.[80]

### 1.3.2 Möglichkeiten zur Behandlung der HIV-Infektion

Trotz über 20 Jahren an intensiver Forschung gibt es für diese Infektion und der damit verbundenen Krankheit AIDS noch keine heilende Behandlung.[82] Auch ein prophylaktischer Impfstoff steht bisher nicht zur Verfügung.[83] Ein Grund hierfür ist hauptsächlich die starke Wandlungsfähigkeit des Virus durch die sehr hohen Mutationsraten bei dessen Replikation. Die Verleihung des Nobelpreises für Medizin im Jahr 2008 für grundlegende Arbeiten zum HI-Virus unterstreicht zusätzlich die Wichtigkeit und Notwendigkeit der Forschung sowohl zu neuen Medikamenten mit neuen *Targets* als auch zur Entwicklung eines Impfstoffes.[84] Die zurzeit vorhandenen Medikamente können bisher den Verlauf der HIV-Infektion lediglich verlangsamen.

Abbildung 16 zeigt schematisch den Aufbau sowie die wichtigsten Schritte im Replikationszyklus des HI-Virus.

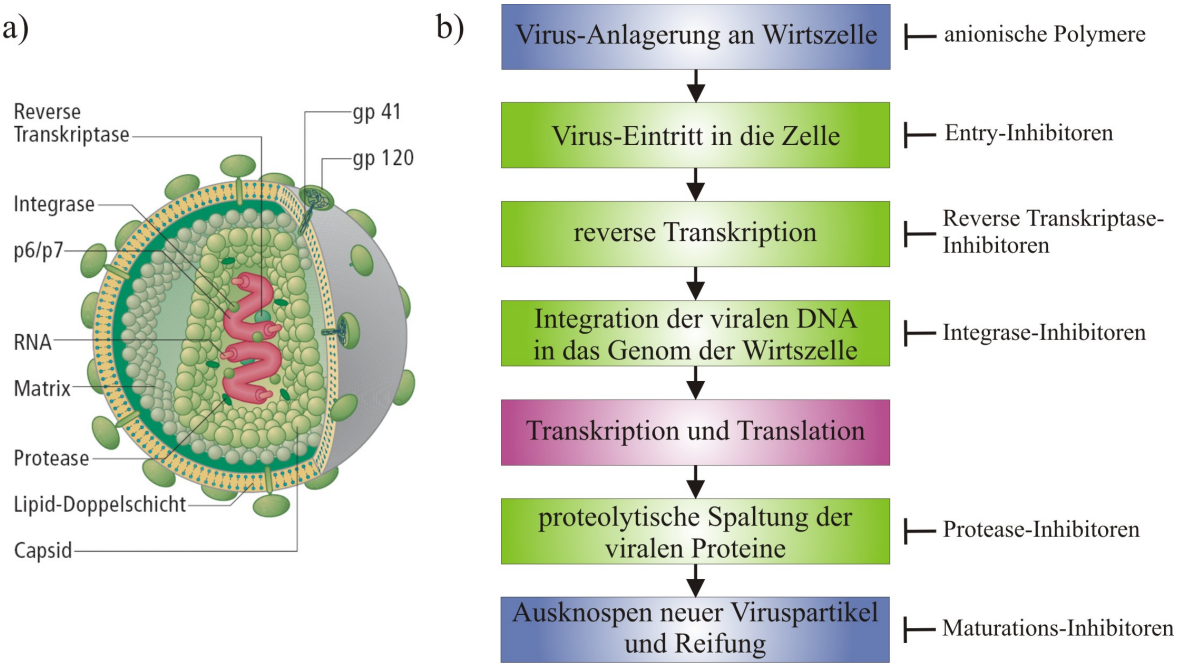



**Abbildung 16:** a) Schematische Darstellung des HI-Virus.[85a] b) Replikationszyklus des HI-Virus und Angriffspunkte von zugelassenen Medikamentenklassen (grün) und solchen in der Entwicklung (blau).[85b]

Die Hauptangriffspunkte von schon länger auf dem Markt befindlichen Medikamenten sind die reverse Transkription und die Schritte, in denen die HIV-Protease involviert ist.[86] Die Reverse-Transkriptase-Inhibitoren werden eingeteilt in Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga (z.B. Zidovudin (**20**, NRTI; Handelsname: Retrovir® von *GlaxoSmithKline* bzw. Tenofovir (**21**, NtRTI; Handelsname: Viread® von *Gilead*) und in Nicht-Nukleosidische Inhibitoren (z.B. Nevirapin (**22**, NNRTI; Handelsname: Viramune® von *Boehringer Ingelheim*). Zu den Protease-Inhibitoren zählt z.B. Darunavir (**23**, Handelsname: Prezista® von *Janssen-Cilag*). Anzumerken ist hier, das nahezu alle Protease-Inhibitoren zusammen mit dem Wirkungsverstärker Ritonavir (**24**, Handelsname: Norvir® von *Abbott*) verabreicht werden. Dieser hemmt ein körpereigenes Cytochrom P450-Enzym, welches für die schnelle Metabolisierung von Protease-Inhibitoren im Körper verantwortlich ist. Durch diese Kombination kann die Dosierung und Einnahmefrequenz der Medikamente verringert werden. Als Inhibitor der HIV-Integrase steht zurzeit nur der Wirkstoff Raltegravir (**25**, Handelsname: Isentress® von *MSD*) zur Verfügung.[87] In Abbildung 17 sind die Strukturen der erwähnten Wirkstoffe dargestellt.

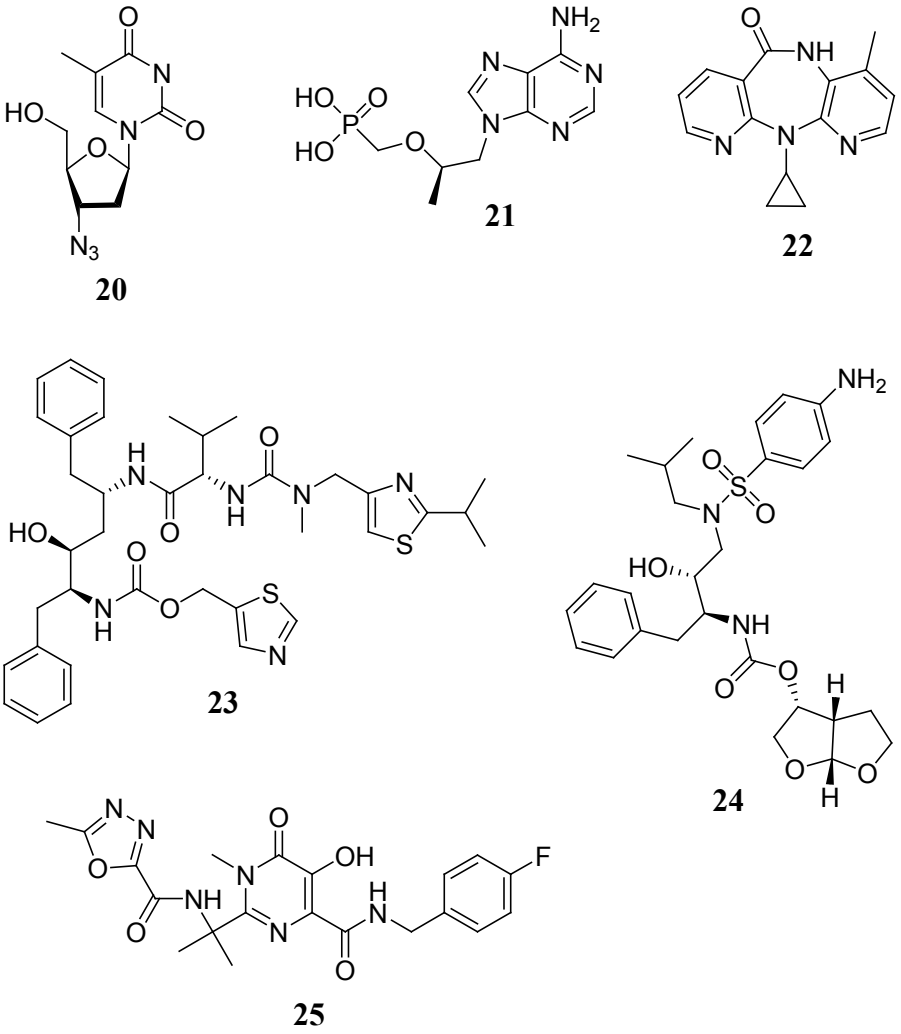



**Abbildung 17:** Vertreter der verschiedenen Inhibitorklassen zur Behandlung von HIV-Infektionen: Zidovudin (**20**), Tenofovir (**21**), Nevirapin (**22**), Darunavir (**23**), Ritonavir (**24**) und Raltegravir (**25**).

### 1.3.3 Die Anlagerung des HI-Virus an die menschliche Wirtszelle – ein attraktives *Target*

Die Anlagerung des HI-Virus an $CD4^+$-Zellen des menschlichen Immunsystems (z.B. T-Lymphozyten oder Makrophagen) und der Eintritt in diese ist ein überaus attraktives *Target* für die Behandlung von Infektionen mit diesem Retrovirus.[88] Mit der Unterbindung dieses Schritts im Replikationszyklus wird die Neubildung von Viruspartikeln verhindert, da es gar nicht erst zu einer Infektion gesunder Zellen kommen kann. Der Mechanismus des Viruseintritts wurde bereits intensiv untersucht und ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt.

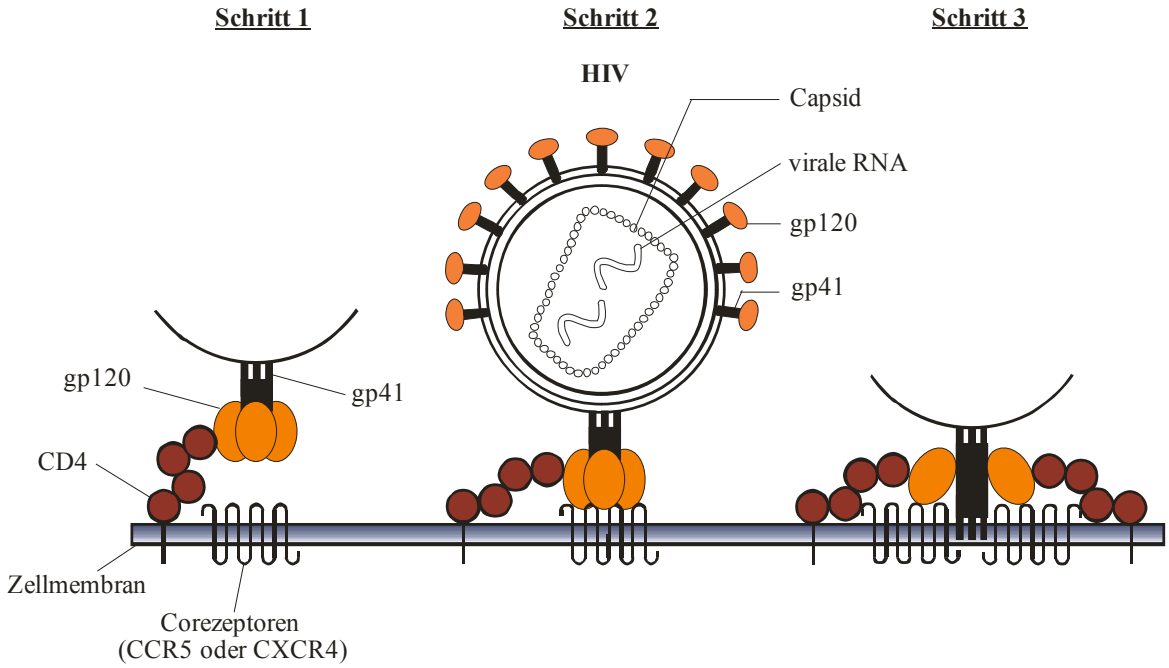
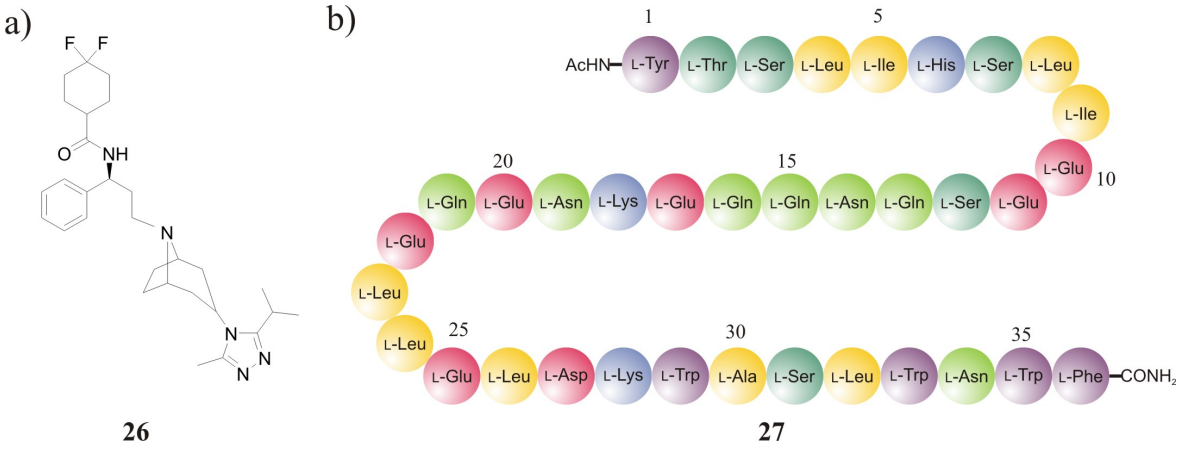



**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der HI-Virus-Anlagerung an $CD4^+$-T-Zellen. Schritt 1: CD4-Bindung; Schritt 2: Corezeptor-Bindung; Schritt 3: Insertion des gp41-Fusionspeptids in die Zellmembran der Wirtszelle.

Nach einer zunächst unspezifischen Wechselwirkung des HI-Virus mit der extrazellulären Matrix oder Lectin-bindenden Proteinen auf der Oberfläche der T-Zellen kommt es zu einer spezifischen Bindung einer hoch konservierten, nicht glycosylierten Region des viralen Oberflächenproteins gp120 an den CD4-Rezeptor (Abbildung 18, Schritt 1). Dies führt zu Konformationsänderungen von gp120, welche eine notwendige Interaktion mit einem der Chemokin-Corezeptoren CCR5 oder CXCR4 ermöglichen (Abbildung 18, Schritt 2).** Infolge weiterer Konformationsänderungen kommt es schließlich zu einer Aktivierung der hydrophoben Fusionsdomäne des viralen Transmembranproteins gp41, welches sich in der Zellmembran verankert (Abbildung 18, Schritt 3). Aus der räumlichen Annäherung zwischen Virus und Wirtszelle resultiert schließlich die Bildung einer Fusionpore und der Viruseintritt in die Zelle.

** Das R5-Virus benutzt nur den CCR5-Corezeptor (hauptsächlich bei Makrophagen vorkommend), das X4-Virus nur den CXCR4-Corezeptor (überwiegend bei T-Lymphozyten vorkommend) für den Eintritt in die Wirtszelle. X4R5-Viren können an beide Rezeptoren binden.

Dieser komplexe Prozess bietet zahlreiche Angriffspunkte für antivirale Substanzen wie z.B. Antikörper, Peptide, sogenannte „*small molecules*“ oder auch Naturstoffe.[89] Von den erwähnten Substanzklassen befinden sich nur zwei in der Anwendung als Reservetherapeutika. Zum einen der CCR5-Antagonist Maraviroc (**26**, Abbildung 19a; Handelsname: Celsentri® von *Pfizer*), welcher durch ein *High-Throughput-Screening* identifiziert wurde.[90] Diese Verbindung kann zwar nur bei Patienten eingesetzt werden, die mit einem R5-Virus infiziert sind, jedoch hat die Blockierung des CCR5-Corezeptors im Gegensatz zur Blockierung des CXCR4-Corezeptors keine schwerwiegenden immunologischen Nebeneffekte.




**26** **27**

**Abbildung 19:** a) Maraviroc (**26**), der erste CCR5-Corezeptor-Antagonist auf dem Markt. b) Primärstruktur von Enfuvirtid (**27**), dem ersten zugelassenen HIV-Fusionsinhibitor.

Das lineare 36mer Peptid Enfuvirtid (**27**, Abbildung 19b; auch T20, Handelsname: Fuzeon® von *Trimeris/Hoffmann-LaRoche*) ist der erste zugelassene Fusionsinhibitor für die anti-HIV-Therapie.[85b] Die Primärsequenz von **27** entspricht den Aminosäuren 643-678 von gp160, dem Genprodukt des viralen *env*-Gens und Vorläuferprotein von gp120 sowie gp41. Durch kompetitive Bindung von Enfuvirtide an entsprechende Regionen von gp41 unterbricht es die für die Membranfusion essenziellen Konformationsänderungen und inhibiert damit im nanomolaren Bereich den Virus-Eintritt in die Zelle.[91] Das Peptid wird totalsynthetisch in über 100 Schritten mittels Fmoc-Festphasenpeptidsynthese hergestellt, sodass dessen Produktion mit immensen Kosten einhergeht.[92] Ein weiterer Nachteil in der Anwendung ist natürlich die sehr geringe Halbwertszeit aufgrund der proteolytischen Instabilität und der damit verbundenen Applikation per subkutaner Injektion. Trotzdem zeigt das Beispiel dieses vielversprechenden Wirkstoffes, dass entgegen dem allgemeinen Trend auch größere Peptide Marktreife erreichen können.

### 1.3.4 Ausblick

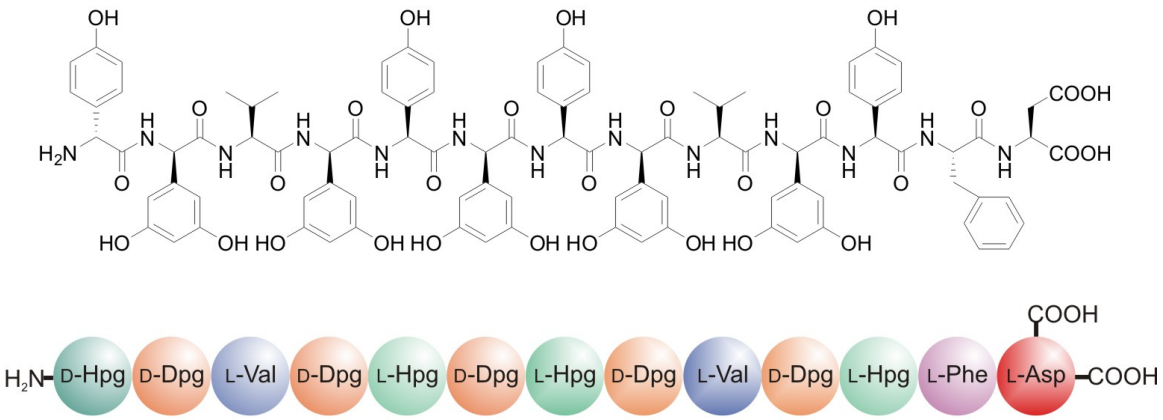
Die beschriebenen Inhibitorklassen werden in der Regel in Kombination im Rahmen der HAART-Therapie (hochaktive antiretrovirale Therapie) zur Reduzierung der Viruslast bei infizierten Patienten eingesetzt. Trotz der Fortschritte in der Entwicklung von antiretroviralen Medikamenten ist der Einsatz der verfügbaren Wirkstoffe in der Therapie oft mit starken Nebenwirkungen verbunden. Die Entwicklungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Adressierung neuer *Target*s weiter voranschreitet. Es ist damit zu rechnen, dass in nächster Zeit neue Wirkstoffkandidaten die klinischen Studien erfolgreich durchlaufen und die Zahl der zur Verfügung stehenden Medikamente für die HIV-Therapie ergänzen werden. Obwohl jährlich zahlreiche vielversprechende Wirkstoffe entdeckt werden, eignen sich nur wenige für eine Weiterentwicklung als Medikament zur Bekämpfung des HI-Virus im Körper des Patienten. Eine attraktive Alternative für diese Verbindungen stellt deren oberflächliche Anwendung als virale Mikrobizide dar. Von Frauen z.B. als Vaginalgel angewendet, können die antiretroviralen Wirkstoffe so neben der Verwendung von Kondomen zur Prävention einer Ansteckung mit dem HI-Virus durch sexuellen Kontakt beitragen.[93] Eine kürzlich veröffentlichte, in Südafrika durchgeführte Studie mit einem Gel, welches den nukleotidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor Tenofovir (**21**, Abbildung 17) enthielt, zeigte dabei Erfolg versprechende Ergebnisse.[94]

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die positiven Entwicklungen der Behandlungsmöglichkeiten in Zukunft dazu führen werden, dass eine HIV-Infektion eher zu den chronischen Erkrankungen zählen wird. Die damit verbundene, lebenslange Einnahme von Medikamenten macht dieses Therapiegebiet dadurch natürlich immer attraktiver für die Pharmaindustrie. Trotzdem sollte nicht vergessen werden, dass das Problem der Resistenzbildung, wie z.B. auch bei der Anwendung von Antibiotika, vermehrt auftritt. In Anbetracht des Ausmaßes der Ausbreitung des HI-Virus, besonders auch in Entwicklungsländern, muss daher die Forschung auf diesem Gebiet sowohl in Bezug auf neue antivirale Wirkstoffe, als auch auf die Entwicklung eines Impfstoffes mit höchster Priorität fortgesetzt werden. Weitere Ziele müssen dabei auch sein, den Zugang zu einer antiretroviralen Therapie für alle Betroffenen zu ermöglichen und zu verbessern, sowie die mit der Behandlung verbundenen Kosten zu senken.

## 1.4 Feglymycin – ein ungewöhnliches Peptid mit vielseitiger biologischer Aktivität

### 1.4.1 Isolierung und Strukturaufklärung

Im Jahr 1999 wurde die Struktur des linearen 13mer Peptids Feglymycin (**28**, Abbildung 20) publiziert.[95] Der Sekundärmetabolit des grampositiven Bakteriums *Streptomyces* DSM 11171 wurde bei der ehemaligen *Hoechst AG* (Frankfurt a. M., jetzt *Sanofi-Aventis*) isoliert und die Aminosäuresequenz unter Verwendung von NMR-Spektroskopie, MS/MS-Experimenten sowie Aminosäureanalyse aufgeklärt. Neben den proteinogenen Aminosäuren L-Valin, L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure enthält Feglymycin einen sehr ungewöhnlich hohen Anteil der nicht-proteinogenen Aminosäuren 4-Hydroxyphenylglycin (Hpg) und 3,5-Dihydroxyphenylglycin (Dpg). Diese aromatischen Bausteine findet man auch in anderen bekannten peptidischen Naturstoffen wie Ramoplanin (**15**, Abbildung 9) oder Vancomycin (**4,** Abbildung 10).




**28**

**Abbildung 20:** Primärstruktur von Feglymycin (**28**).

Durch die Arbeiten von Herrn Dr. Gábor Bunkóczi unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. George M. Sheldrick wurde schließlich im Jahr 2005 die strukturelle Charakterisierung von Feglymycin abgeschlossen, denn erst durch Erhalt der Röntgenstruktur gelang es, die Konfiguration der Stereozentren der aromatischen Hydroxyphenylglycine aufzuklären.[96] In Abbildung 21 ist die Sekundärstruktur von Feglymycin dargestellt. Durch die nahezu

durchgängig alternierende L-D-Konfiguration der Aminosäuren in der Sequenz bildet das Peptid eine doppelsträngige, antiparallele, rechtsgängige β-Helix mit ca. 9 Resten pro Windung aus.[97] Diese wird neben den intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats und der phenolischen Hydroxy-Gruppen auch durch hydrophobe Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäureseitenketten stabilisiert.

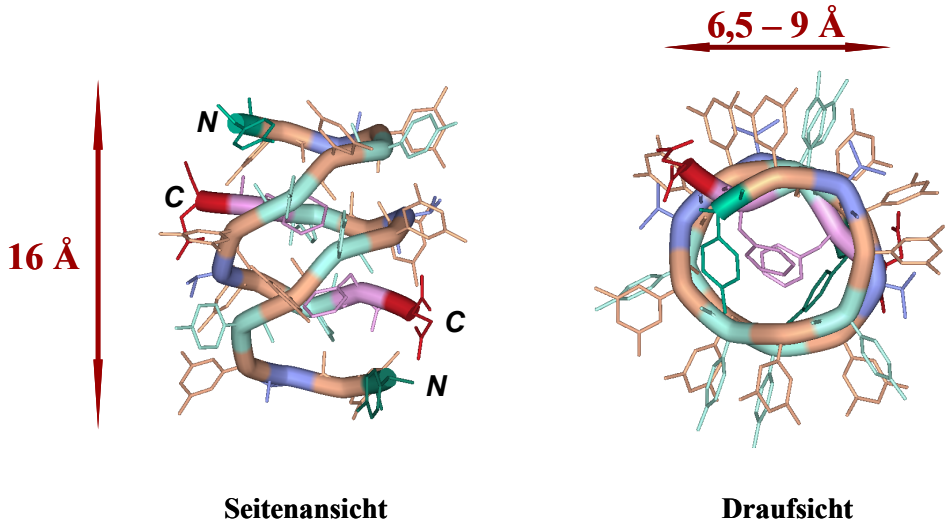



**Abbildung 21:** Die Röntgenstruktur von Feglymycin zeigt eine doppelsträngige, antiparallele, rechtsgängige β-Helix.[96]

Die Ausbildung dieser Sekundärstruktur könnte man sich wie folgt erklären: Durch eine antiparallele Assoziation zweier Peptidmoleküle in Form einer β-Faltblattstruktur kommen die Seitenkettenfunktionalitäten durch die Alternanz der Konfiguration der $C_\alpha$-Atome fast alle auf der gleichen Seite zum Liegen. Die durch die sterische Hinderung entstandene Spannung im Peptidrückgrat wird dann durch ein helikales Aufwinden minimiert. Innerhalb der neu ausgebildeten Sekundärstruktur kommt es durch die veränderte Konformation zur Ausbildung zusätzlicher stabilisierender Wechselwirkungen.[96a,98] Leitet man aus der Röntgenstruktur das Wasserstoffbrückennetzwerk an der Außenseite der β-Helix ab (Abbildung 22), so wird deutlich, dass fast nur Hydroxy-Gruppen der Dpg-Aminosäuren und die Carboxy-Funktion der Asparaginsäureseitenkette daran beteiligt sind. Aufgrund der räumlichen Anordnung der Aminosäuren ist die beschriebene Struktur nach außen hin sehr polar. Die Seitenketten der Phenylalanine ragen ins Innere der Helix und tragen durch hydrophobe Wechselwirkungen zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Sekundärstruktur bei.

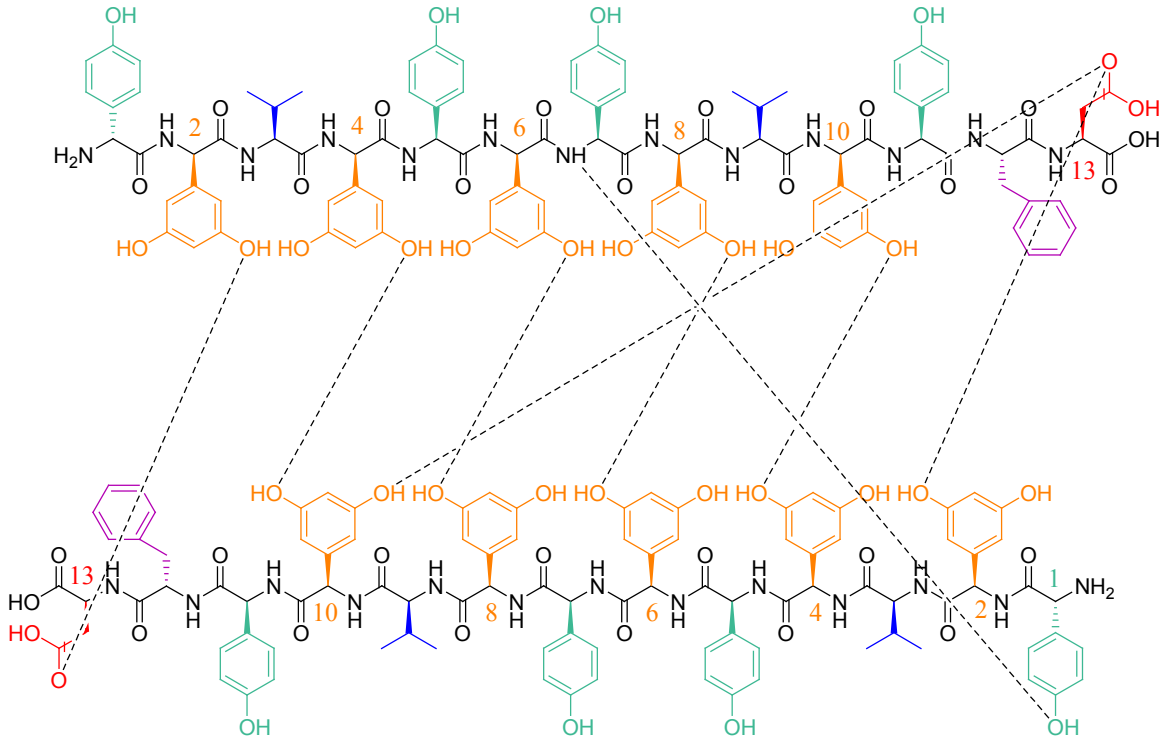
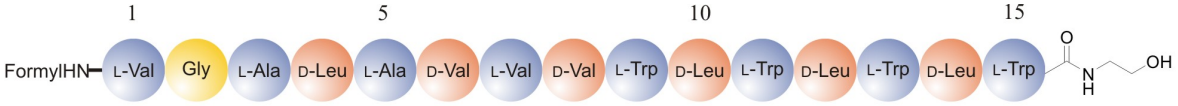


**Abbildung 22:** Wasserstoffbrückennetzwerk der Seitenkettenfunktionalitäten von Feglymycin in Anlehnung an die Röntgenstruktur.[96a]

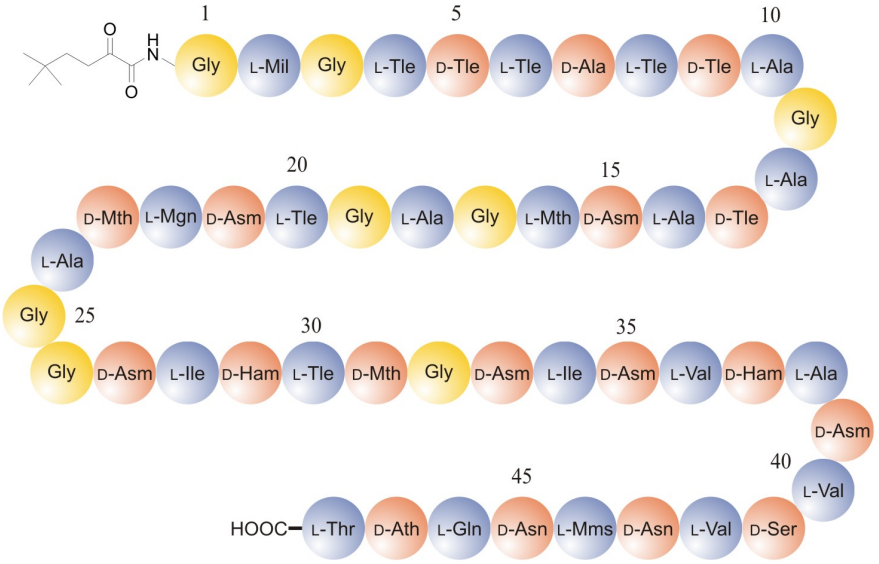
Zwei der wohl bekanntesten Peptide, welche ebenfalls aufgrund ihrer Aminosäuresequenz eine β-Helix ausbilden, sind Gramicidin A (**29**)†† und Polytheonamid B (**30**) (Abbildung 23). Das fast ausschließlich hydrophobe Aminosäuren enthaltende lineare 15mer Peptid Gramicidin A wird produziert von *Bacillus brevis* und besitzt antibakterielle Aktivität.[99] Diese wird hervorgerufen durch die Einlagerung von Gramicidin-Helices in die bakterielle Membran, was zu einem unkontrollierten Fluss von einwertigen Kationen (z.B. $H^+$ oder $K^+$) durch die gebildeten Poren in die Zelle und damit zum Tod des Mikroorganismus führt.[100] Aufgrund seiner Eigenschaft als Ionophor dient Gramicidin A als das wohl am besten untersuchte Modellsystem für Membrankanäle.[101] Interessant ist, dass für dieses Peptid anhand von Festkörper-NMR-Experimenten eine einsträngige Helix vorhergesagt wurde, die ein „Kopf-an-Kopf"-Dimer bildet und damit eine Länge erreicht, die zum Durchspannen einer bakteriellen Membran notwendig ist.[102] Die Kristallstruktur von Gramicidin A zeigt im Gegensatz dazu jedoch eine Doppelhelix aus zwei Peptidmolekülen.[103] Die strukturellen Eigenschaften der gebildeten Helix wie Gängigkeit,

†† Gramicidin A wird als Gemisch zusammen mit Gramicidin B (Phe in Position 11) und Gramicidin C (Tyr in Position 11) von *Bacillus brevis* produziert. Die Mischung bezeichnet man als Gramicidin D.

Höhe und Porendurchmesser sind dabei stark von den äußeren Bedingungen (Konzentration, Lösungsmittel, Anwesenheit von Ionen oder Lipiden) abhängig.




**29**




**30**

**Abbildung 23:** Die Peptide Gramicidin A (**29**) und Polytheonamid B (**30**) bilden wie Feglymycin aufgrund der alternierenden Sequenz an L- und D-Aminosäuren eine β-helikale Struktur aus (L-Aminosäuren: blau, D-Aminosäuren: orange, Glycin: gelb; die vollständigen Bezeichnungen der nicht-proteinogenen Aminosäuren in Polytheonamid B können dem Abkürzungsverzeichnis entnommen werden).

Bei Polytheonamid B (**30**, Abbildung 23) handelt es sich um das wohl größte (48 Aminosäuren) und komplexeste (13 von 19 Aminosäurekomponenten sind nicht-proteinogen), lineare nicht-ribosomal produzierte Peptid, welches bisher bekannt ist. Es wurde isoliert aus dem marinen Schwamm *Theonella swinhoei*, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich um den Sekundärmetaboliten eines symbiotischen Mikroorganismus handelt.[104] Die Sekundärstruktur von Polytheonamid B zeigt eine ca. 45 Å lange, rechtsgängige β-Helix mit einem Porendurchmesser von ca. 4 Å.[105] Die extrem hohe, jedoch wahrscheinlich unspezifische Zytotoxizität das Peptids im pM-Bereich wird ebenfalls einer Einlagerung der helikalen Struktur in die Zellmembran zugeschrieben. Genauere Untersuchungen dazu stehen jedoch noch aus.

### 1.4.2 Biosynthese

Das Biosynthesegencluster für Feglymycin wurde bisher nicht identifiziert. In unserer Arbeitsgruppe soll jedoch demnächst das Genom des Produzentenstammes *Streptomyces* DSM 11171 sequenziert werden, um die Biosynthese des Peptids aufzuklären. Aufgrund der in der Primärsequenz enthaltenen nicht-proteinogenen Aminosäure L-/D-Hpg und D-Dpg handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein nicht-ribosomal synthetisiertes Peptid. Die nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) von Bakterien und Pilzen sind verantwortlich für die Produktion einer erstaunlichen Vielzahl an Sekundärmetaboliten, welche i.d.R. eine vielseitige biologische Aktivität aufweisen. Aufgrund des modularen Aufbaus als Multienzymkomplex und den zahlreichen Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. *N*-Methylierung oder Glycosylierung, sind der strukturellen Vielfalt der produzierten Peptide nahezu keine Grenzen gesetzt. Über den genauen Aufbau und die Funktionsweise von NRPS informieren zahlreiche Übersichtsartikel.[106]

Die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren 4-Hydroxy-L-phenylglycin (**36**) und 3,5-Dihydroxy-L-phenylglycin (**39**) wurde bereits im Rahmen der Biosyntheseaufklärung von Glycopeptidantibiotika intensiv untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Synthese von 4-Hydroxy-L-phenylglycin ausgehend von Prephensäure (**31**, deprotonierte Form: Prephenat) bzw. L-Tyrosin (**35**) erfolgt (Abbildung 24).[107a] Aus dem Primärstoffwechselprodukt Prephenat wird in einer oxidativen Decarboxylierung 4-Hydroxyphenylpyruvat (**32**) gebildet, welches weiter regio- und stereospezifisch zur 4-Hydroxy-L-mandelsäure (**33**) umgesetzt wird.[108] Das dafür zuständige Enzym, die Hydroxymandelat-Synthase (HmaS), ist als nicht-Häm-Eisen-abhängige Dioxygenase homolog zur 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, welche am oxidativen Abbau von Tyrosin beteiligt ist.[109] Nach Umsetzung der α-Hydroxysäure **33** zur α-Ketosäure **34** durch die Hydroxymandelat-Oxidase (Hmo) wird 4-Hydroxy-L-phenylglycin (**36**) durch eine Transaminierungsreaktion erhalten. Als Cosubstrat für die Phenylglycin-Aminotransferase PgaT dient dabei L-Tyrosin, das in der Reaktion zu 4-Hydroxyphenylpyruvat (**32**) umgesetzt wird. Dieser Baustein kann wieder in den beschriebenen Biosyntheseweg einfließen. Im Biosynthesegencluster des zu Feglymycin verwandten Peptids Ramoplanin (**15**, Abbildung 9) findet man zusätzlich zu den erwähnten Enzymen einen weiteren Genabschnitt, welcher Sequenzhomologien zur Chorismat-

Mutase aufweist.[110] Dieses Enzym katalysiert die Claisen-Umlagerung von Chorismat zu Prephenat. Die Umwandlung der L- in die D-Aminosäure, welche in einigen Peptidantibiotika vorkommt, erfolgt im Rahmen der Peptidbiosynthese durch die Epimerisierungsdomänen der entsprechenden NRPS.

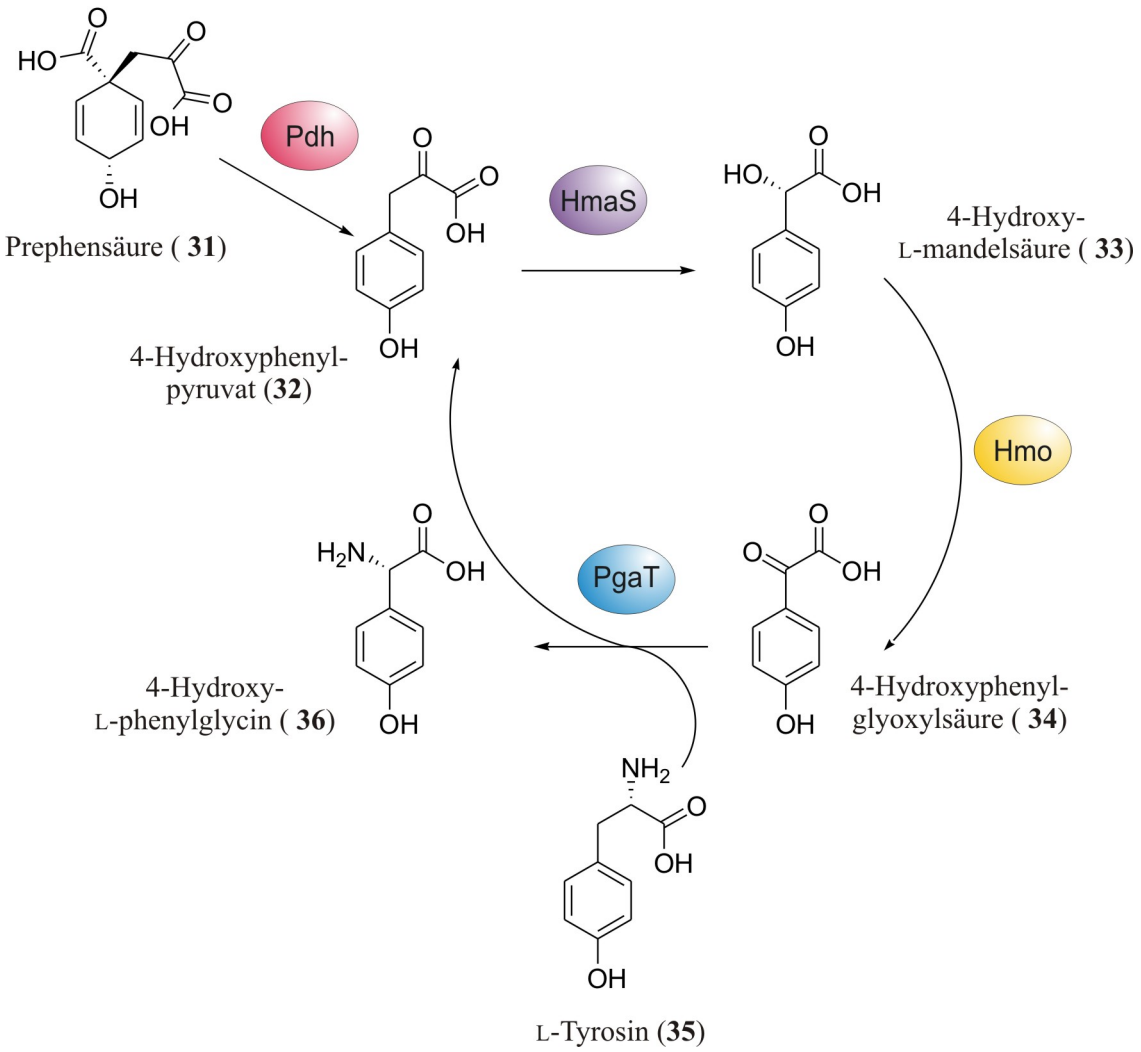



**Abbildung 24:** Biosynthese von 4-Hydroxy-L-phenylglycin (**36**) ausgehend von Prephensäure (**31**) bzw. L-Tyrosin (**35**) (Pdh: Prephenat-Dehydrogenase, HmaS: Hydroxymandelat-Synthase, Hmo: Hydroxymandelat-Oxidase, PgaT: Phenylglycin-Aminotransferase).[107b]

Die sehr ungewöhnliche Aminosäure 3,5-Dihydroxy-L-phenylglycin (**39**) wird biosynthetisch ausgehend von vier Molekülen Malonyl-CoA (**37**) aufgebaut (Abbildung 25).[111] Diese Einheiten werden von der Polyketidsynthase DpgA zu einem linearen Vorläufermolekül zusammengefügt. Anschließend wird der lineare Baustein zu 3,5-Dihydroxyphenylacetyl-CoA zyklisiert. Welche Zwischenstufen dabei genau durchlaufen werden, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Interessant ist, dass DpgA das

Substrat Malonyl-CoA nur in Gegenwart von DpgB umsetzt. Die folgende Vier-Elektronen-Oxidation am $C_\alpha$-Atom und Spaltung des Thioesters durch das Enzym DpgC liefert schließlich 3,5-Dihydroxyglyoxylsäure (**38**). Die Hydroxyacyl-Dehydrogenase DpgC konnte bereits kristallisiert werden und es zeigte sich, dass dieses sauerstoffabhängige Enzym keinen Cofaktor und kein katalytisch aktives Metallzentrum enthält.[112] In Biosynthesestudien mit $^{18}O_2$ konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das Sauerstoffatom der Keto-Gruppe von **38** als auch ein Sauerstoffatom der Carboxy-Funktion aus molekularem $O_2$ stammen.[113] 3,5-Dihydroxy-L-phenylglycin wird am Ende durch eine Transaminierungsreaktion erhalten. Das in diesen Reaktionsschritt involvierte Enzym PgaT kommt auch im Biosyntheseweg von 4-Hydroxy-L-phenylglycin (**36**) vor.

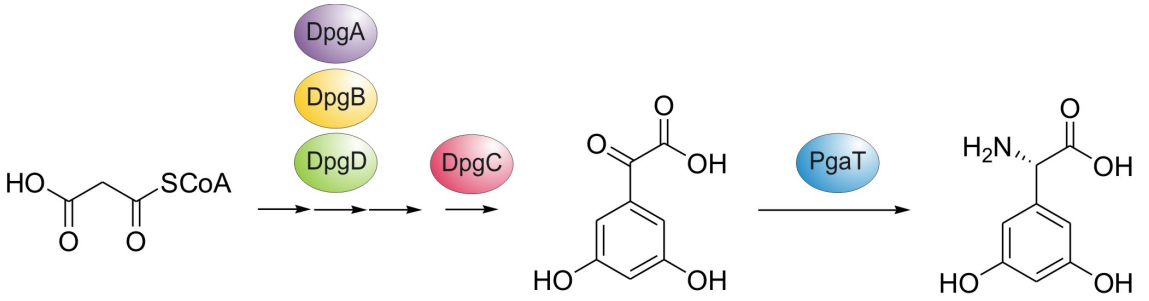



**Abbildung 25:** Biosynthese von 3,5-Dihydroxy-L-phenylglycin (**39**) ausgehend von vier Einheiten Malonyl-CoA (**37**) (DpgA: Dihydroxyphenylessigsäure-Synthase, DpgB: Enoyl-CoA-Hydratase‡‡, DpgC: Hydroxyacyl-Dehydrogenase, DpgD: Enoyl-CoA-Isomerase‡‡, PgaT: Phenylglycin-Aminotransferase).[111]

### 1.4.3 Totalsynthese

Die hohe Anzahl der in Feglymycin vorhandenen aromatischen, nicht-proteinogenen Aminosäuren 4-Hydroxyphenylglycin und 3,5-Dihydroxyphenylglycin schließt den Einsatz von vielen in der Peptidsynthese gängigen Syntheseprotokollen aufgrund der hohen Racemisierungsanfälligkeit aus. Dies machte die Totalsynthese zu einer besonderen Herausforderung. Zehn Jahre nach Veröffentlichung der Struktur gelang es Herrn Dr. Frank Dettner in unserer Arbeitsgruppe, synthetisches Feglymycin zu erhalten.[114] Die von

‡‡ Diese Enzymfunktion wird aufgrund von Sequenzhomologievergleichen vermutet (H. M. Holden, M. M. Benning, T. Haller, J. A. Gerlt, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 145-157).

ihm ausgearbeitete Synthesestrategie ist durch die hohe Flexibilität besonders geeignet für die Generierung von Peptidderivaten durch Aminosäureaustausch und wird daher im Folgenden noch einmal zusammenfassend beschrieben.

Der Schlüsselschritt der Totalsynthese besteht in einer Fragmentkupplung des *N*-terminalen Heptapeptids **42** mit dem *C*-terminalen Hexapeptid **44** unter der Verwendung des Kupplungsreagenzes 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on (DEPBT) (Abbildung 26).[115] Dieses Aktivierungsreagenz ist hier besonders geeignet, da dessen Einsatz in Gegenwart von nicht geschützten Hydroxy-Funktionen problemlos möglich ist.[116] Der völlige Verzicht auf Seitenkettenschutzgruppen gewährleistet außerdem eine bessere Löslichkeit und damit eine problemlose Aufreinigung der synthetisierten Oligopeptide.

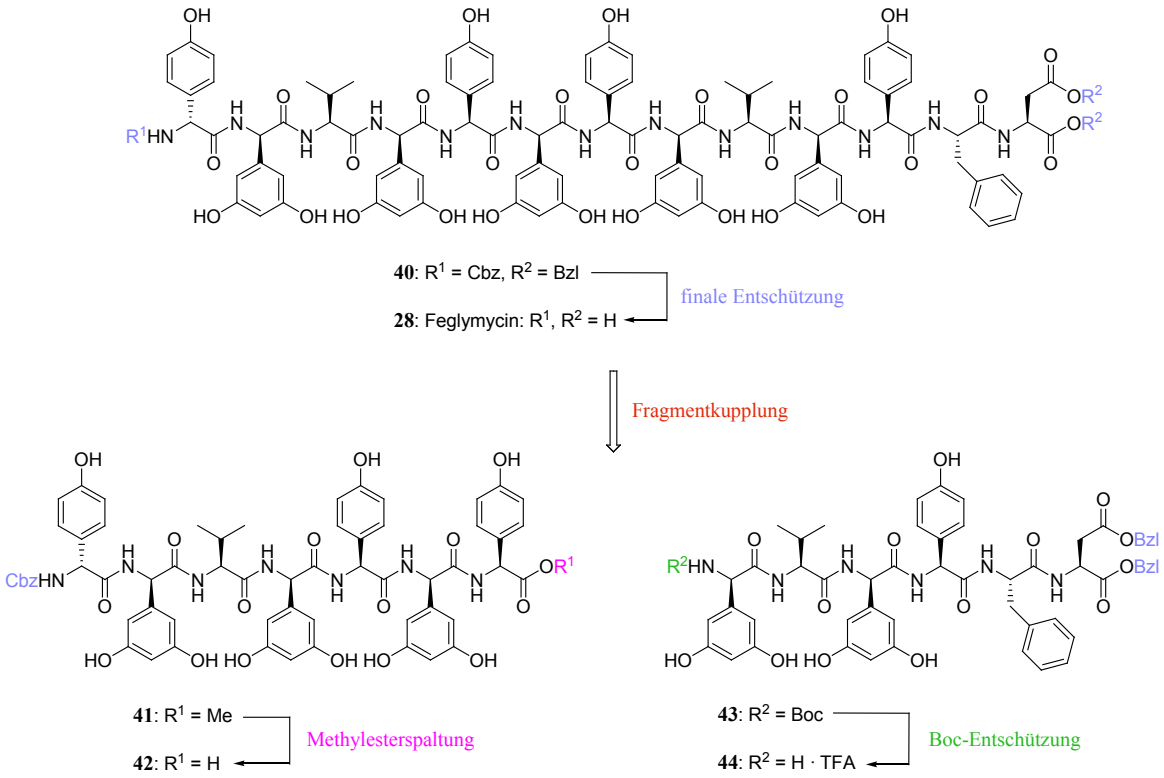



**Abbildung 26:** Retrosynthetische Betrachtung der Feglymycin-Totalsynthese. Das *N*- und *C*-terminal geschützte Vorläuferpeptid **40** wird durch Fragmentkupplung eines Heptapeptids (**42**) und eines Hexapeptids (**44**) erhalten. Die finale Abspaltung der benzylischen Schutzgruppen von **40** liefert das Zielpeptid Feglymycin (**28**) (Bzl-Entschützung: $H_2$, Pd/C (10 %), MeOH, RT, 8 h; Boc-Entschützung: 25 % TFA/DCM, TES, RT, 30 min; Methylesterabspaltung: $Me_3SnOH$, 1,2-DCE, 80 °C, 8 h; Peptidkupplung: DEPBT, $NaHCO_3$, abs. DMF, 0 °C 1 h, dann RT 40 h).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der beschriebene Fragmentkondensationsschritt nochmals mit dem Ziel einer Ausbeutenoptimierung untersucht. Es zeigte sich, dass höhere Ausbeuten erzielt werden, wenn sowohl das Kupplungsreagenz DEPBT als auch das Lösungsmittel DMF vor der Reaktion sorgfältig getrocknet wurden. Weiterhin ist es völlig ausreichend, die Reaktion nach der Zugabe des Aktivierungsreagenzes nur für 1 h (statt für 24 h nach Dettner *et al.*)[114] im Eisbad und anschließend für ca. 40 h bei RT zu belassen, denn die Verfolgung des Reaktionsfortschritts mittels analytischer RP-HPLC zeigte eindeutig, dass bei 0 °C auch nach mehreren Stunden kaum Produkt gebildet wurde. Außerdem konnte beobachtet werden, dass es bei der Boc-Abspaltung von Hexapeptid **43** unter Verwendung von 4 N HCl/Dioxan zur Bildung von Nebenprodukten kam, welche sich durch eine Massendifferenz von +34 amu vom eigentlichen Reaktionsprodukt unterschieden.[117] Es wird vermutet, dass es hier teilweise zu einer Chlorierung des Moleküls, möglicherweise an den aromatischen Aminosäuren, kam. Diese Nebenreaktion wurde im Rahmen der Synthesestudien nicht weiter untersucht, denn durch die Verwendung von 25 % TFA/DCM unter Zusatz von Triethylsilan (TES) als Scavenger verlief die Boc-Abspaltung ohne Nebenreaktionen in nur 30 min quantitativ. Das erhaltene TFA-Salz konnte dann einfach mit Diethylether ausgefällt und nach kurzer Trocknung am Hochvakuum direkt für die Fragmentkupplung eingesetzt werden. Das bei der alten Methode notwendige Entfernen des Dioxans bei leicht erhöhter Temperatur (40 °C) am Rotationsverdampfer entfiel, wodurch die Aufarbeitung noch milder und das Risiko von Nebenreaktionen minimiert wurde.

Der Aufbau der notwendigen Hepta- bzw. Hexapeptidfragmente ist in Abbildung 27 und Abbildung 28 dargestellt und erfolgt modular ausgehend von einzelnen Dipeptideinheiten. Bei der Ausarbeitung der Synthesestrategie wurde darauf geachtet, dass die besonders racemisierungsempfindliche Aminosäure Dpg nur bei der Synthese der Dipeptide aktiviert werden muss, nicht jedoch für die Synthese der höheren Oligomere. Bezüglich der Ausbeuten verlaufen die Boc- und Bzl-Schutzgruppenabspaltungen i.d.R. quantitativ. Die für den Aufbau des Heptapeptids **42** notwendigen Methylesterabspaltungen unter schwach basischen Bedingungen mit Trimethylzinnhydroxid liefern Ausbeuten von ca. 70-90 %.[118] Für alle Peptidkupplungen kommt DEPBT unter Zusatz von $NaHCO_3$ als Base zum Einsatz, da dieses wie schon zuvor erwähnt, aufgrund der Aminosäurezusammensetzung von Feglymycin das Reagenz der Wahl darstellt. Die Ausbeuten liegen dabei im Bereich von ca. 60-90 %. Lediglich für die Synthese des *C*-terminalen Phe-Asp-Dipeptids **58** kann

2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uroniumtetrafluoroborat (TBTU) sowie *N*,*N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin (DIPEA) als Base eingesetzt werden (Abbildung 28).[119]

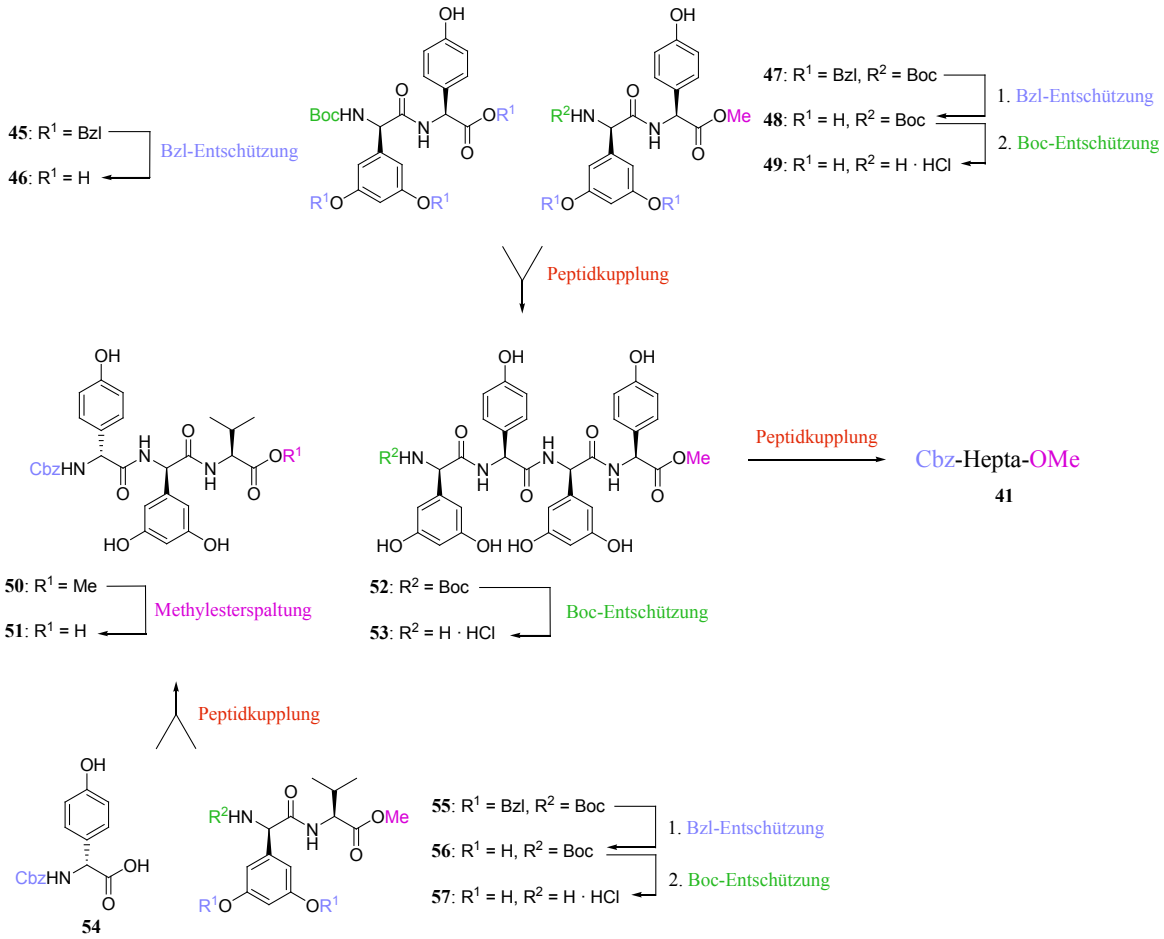



**Abbildung 27:** Reaktionssequenzen zum Aufbau von Tripeptid **51** und Tetrapeptid **53** sowie anschließende Umsetzung dieser Bausteine zum *N*-terminalen Heptapeptid **41** (Bzl-Entschützung: $H_2$, Pd/C (10 %), THF, RT, 12 h; Boc-Entschützung: 4 N HCl/Dioxan, RT, 1 h; Methylesterabspaltung: $Me_3SnOH$, 1,2-DCE, 80 °C, 8 h; Peptidkupplung: DEPBT, $NaHCO_3$, abs. DMF, 0 °C 1 h, dann RT 24 h).

.

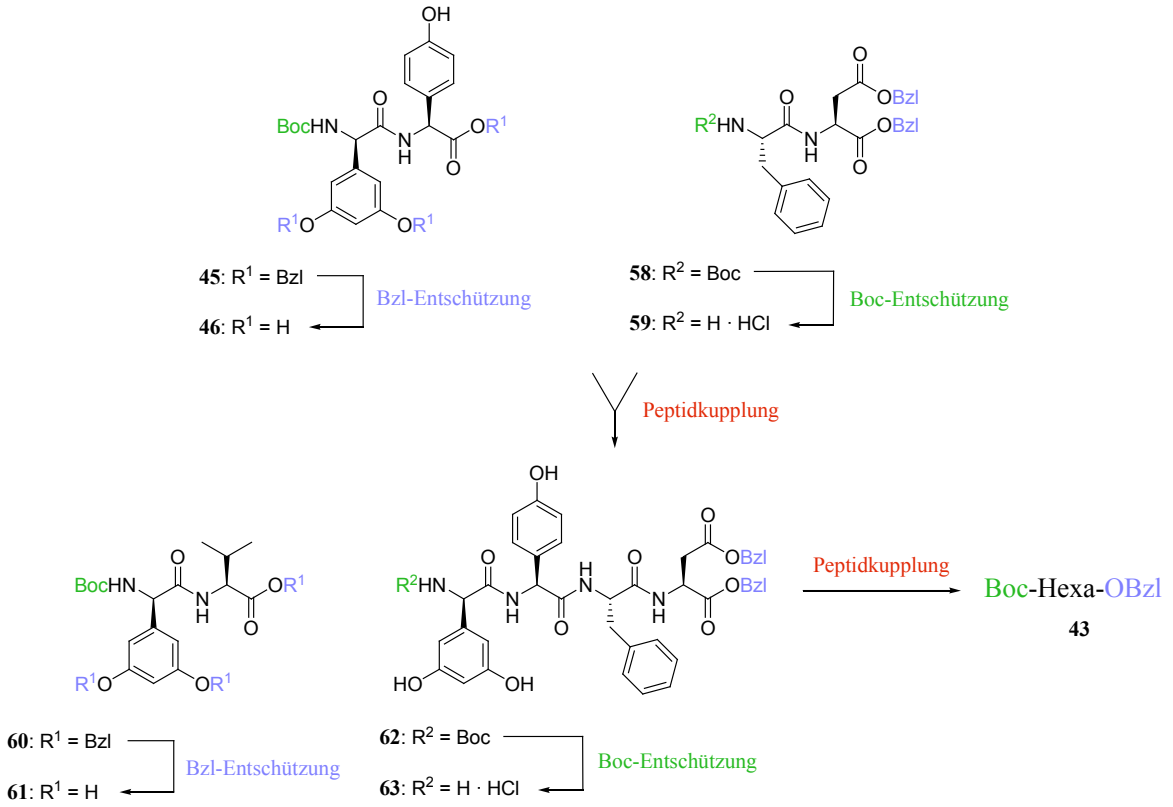



**Abbildung 28:** Reaktionssequenzen zum Aufbau von Tetrapeptid **63** und dessen anschließende Umsetzung mit Dipeptid **61** zum *C*-terminalen Hexapeptid **43** (Bzl-Entschützung: $H_2$, Pd/C (10 %), THF, RT, 12 h; Boc-Entschützung: 4 N HCl/Dioxan, RT, 1 h; Peptidkupplung: DEPBT, $NaHCO_3$, abs. DMF, 0 °C 1 h, dann RT 24 h).

Die für die Synthese von Feglymycin benötigten proteinogenen Aminosäuren L-Valin, L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure sind entsprechend geschützt kommerziell erhältlich. Die 4-Hydroxyphenylglycin-Derivate werden ausgehend von der käuflichen freien Aminosäure durch *N*- oder *C*-terminale Schützung synthetisiert. Für den 3,5-Dihydroxy-D-phenylglycin-Baustein bietet sich aus Kostengründen eine enantioselektive Synthese ausgehend von 3,5-Dihydroxybenzoesäure (**64**) an (Abbildung 29). Dabei wird die Ausgangsverbindung zunächst vollständig benzyliert und der erhaltene Ester **65** anschließend mit $LiAlH_4$ zum Benzylalkohol **66** reduziert.[120] Dieser kann mit aktiviertem $MnO_2$ quantitativ zum Benzaldehyd **67** oxidiert werden. Das durch eine Wittig-Reaktion erhaltene Styrol **68** wird dann in einer asymmetrischen Aminohydroxylierung nach Sharpless zum D-Aminoalkohol **69** umgesetzt.[121] Die Einführung des asymmetrischen Zentrums verläuft bei guten Ausbeuten mit einem *ee*-Wert von etwa 97 % (Abbildung 30).

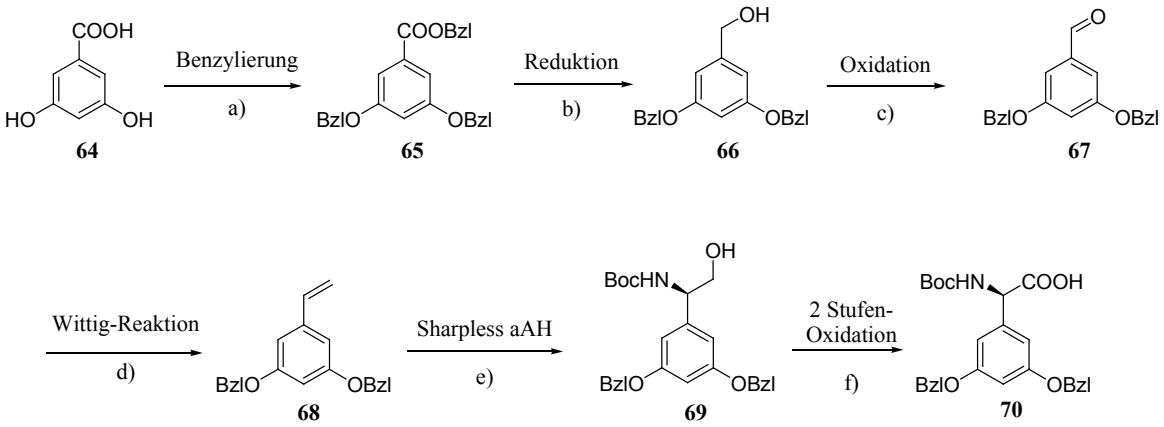



**Abbildung 29:** Synthese von Boc–D-Dpg(Bzl)$_2$–OH (**70**): a) BzlBr, $K_2CO_3$, abs. DMF, RT, 16 h, 99 %; b) $LiAlH_4$, abs. THF, 0 °C → RT, 1 h, 88 %; c) $MnO_2$, abs. DCM, RT, 2 h, 91 %; d) $[Ph_3P\text{-}CH_3]Br$, *n*-BuLi, abs. THF, -40 °C → RT, 4.5 h, 88 %; e) *t*-Butylcarbamat, *t*-BuOCl, $K_2OsO_2(OH)_4$, $(DHQD)_2PHAL$, *n*-PrOH/$H_2O$ (2:1), 0 °C, 1 h, 65 %, 97 % *ee*; f) 1. Dess-Martin-Periodinan, abs. DCM, 0 °C → RT, 2 h; 2. $NaClO_2$, 2-Methyl-2-buten, $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$, $H_2O$, RT, 1 h, 71 % über 2 Stufen).

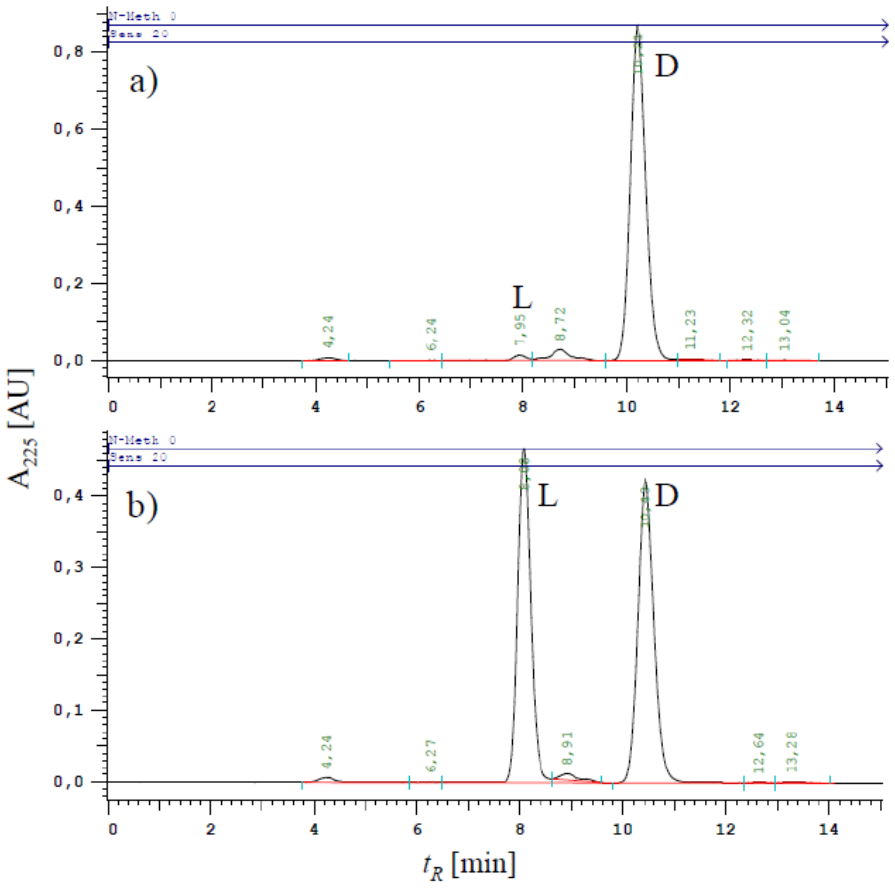



**Abbildung 30:** Chirale NP-HPLC-Analytik (*n*-Hexan/*i*-PrOH 1:1, 0.8 ml/min): a) D-Aminoalkohol **69**, $t_R$ = 11.5 min, *ee* = 97 %; b) Aminoalkohol rac. als Referenz (der L-Aminoalkohol **69'** wurde im Rahmen der Synthese des Feglymycin-Spiegelbilds hergestellt).

Im letzten Reaktionsschritt erhält man durch eine zweistufige Oxidation die Zielaminosäure Boc–D-Dpg(Bzl)$_2$–OH (**70**),[120] welche weiter durch Kombination mit entsprechend *C*-terminal geschützten Val- bzw. Hpg-Bausteinen zu den benötigten Dipeptiden umgesetzt werden kann. Da die Dpg-Aminosäure nicht enantiomerenrein hergestellt und gekuppelt werden kann, entstehen dabei geringe Mengen des unerwünschten diastereomeren Dipeptidbausteins. Dieser kann jedoch ohne Probleme mittels Säulenchromatographie an Kieselgel abgetrennt werden.[114a]

### 1.4.4 CD-spektroskopische Untersuchung von Feglymycin

Eine beliebte Methode zur schnellen Untersuchung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen in Lösung ist die CD-Spektroskopie.[122] Der zugrunde liegende Effekt des Zirkulardichroismus kommt durch die unterschiedlich starke Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht durch optisch aktive Substanzen zustande. Hierbei ist besonders der Wellenlängenbereich von 175-250 nm (fernes UV) interessant, in dem der elektronische $\pi \rightarrow \pi^*$ (um $\lambda$ = 200 nm) und der $n \rightarrow \pi^*$ Übergang (um $\lambda$ = 220 nm) des Amid-Chromophors angeregt werden. Dieses Chromophor zeigt aufgrund der Nachbarschaft zu den $C_\alpha$-Atomen optische Aktivität und somit auch CD-Banden. Der erwähnte Wellenlängenbereich ist also charakteristisch für die Sekundärstruktur, da hier Beiträge des Peptidrückgrates dominieren. Abbildung 31 zeigt CD-Spektren der häufigsten Sekundärstrukturelemente in Proteinen: die $\alpha$-Helix, das $\beta$-Faltblatt sowie das Zufallsknäul (*random coil*). Während bei kleineren Peptiden i.d.R. ein Strukturelement dominiert, kommen in Proteinen oft mehrere Sekundärstrukturen in unterschiedlichen Anteilen vor, sodass entsprechende CD-Spektren als Überlagerungspektren zu betrachten sind.

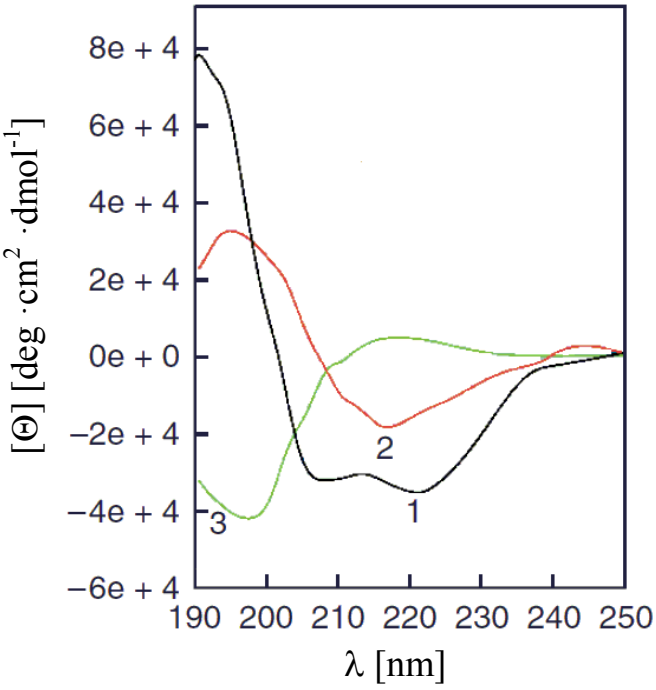



**Abbildung 31:** Repräsentative CD-Spektren von Peptiden bzw. Proteinen mit einer α-helikalen Struktur (**1**, schwarz), einer β-Faltblatt-Struktur (**2**, rot) bzw. als Zufallsknäul (**3**, grün).[123]

Im Rahmen der weiteren Charakterisierung von Feglymycin wurden CD-Spektren des Peptids bei verschiedenen Konzentrationen sowohl in Wasser als auch in 20 % Trifluorethanol (TFE)/Wasser aufgenommen (Abbildung 32). Man beobachtet eine positive Bande um $\lambda_{max} \approx 202$ nm und eine negative Bande um $\lambda_{min} \approx 218$ nm. Diese Spektrenform weist auf eine β-Faltblatt-ähnliche Struktur hin, was im Einklang mit der in der Röntgenstruktur von Feglymycin beobachteten Sekundärstruktur steht.[96] Die Zugabe von TFE hat nahezu keinen Einfluss auf die Spektrenform. Lediglich die Intensität der CD-Banden nimmt etwas zu. TFE ist dafür bekannt, dass es den helikalen Anteil von Peptiden bzw. Proteinen in Lösung erhöhen kann. Für diese Beobachtung gibt es verschiedene Erklärungsversuche. Es wird z.B. postuliert, dass TFE die Carbonyl- und Aminogruppen des Peptidrückgrates von den Wassermolekülen abschirmt, was zu einer verstärkten Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen funktionellen Gruppen führt.[122b] Daraus resultiert schließlich eine kompaktere Sekundärstruktur. Möglicherweise bewirkt die TFE-Zugabe auch bei Feglymycin eine stärkere Ausbildung und/oder Stabilisierung einer β-helikalen Struktur. Der relativ geringe Intensitätsunterschied zu den Spektren in reinem $H_2O$ weist jedoch darauf hin, dass diese geordnete Struktur nicht erst durch TFE-Zugabe induziert wird. Im Gegensatz zu den hydrophoben, porenbildenden Naturstoffen Gramicidin A (**29**) oder Polytheonamid B (**30**)

ist Feglymycin damit eines der wenigen hydrophilien Peptide, welche auch in polaren Lösungsmitteln eine β-Faltblattstruktur bzw. eine β-Helix ausbilden.[124]

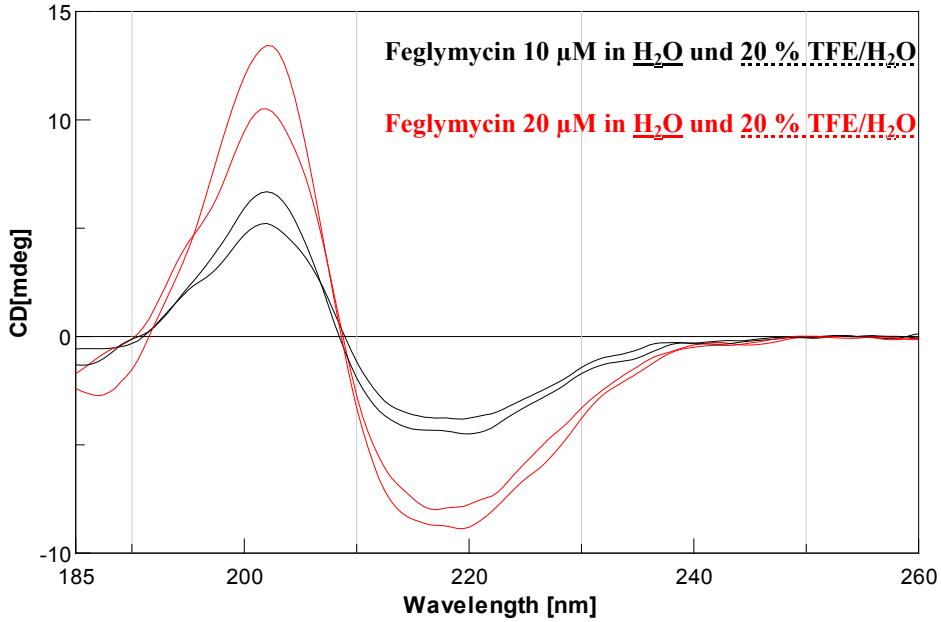



**Abbildung 32:** CD-Spektren von Feglymycin 10 µM (schwarz) und 20 µM (rot) in $H_2O$ und 20 % TFE/$H_2O$.

Bei der Auswertung der CD-Spektren von Feglymycin muss jedoch beachtet werden, dass die Primärstruktur viele aromatische Aminosäuren enthält. Befinden sich Aromaten in einer geordneten asymmetrischen Umgebung, wie es z.B. in Proteinen der Fall sein kann, so weisen sie eine induzierte optische Aktivität und damit CD-Banden auf. Die CD-Spektren im fernen UV enthalten daher nicht nur Anteile der Amid-, sondern auch der aromatischen Chromophore. Eine Veränderung der achiralen Umgebung der Aromaten, d.h. der Tertiärstruktur des Moleküls, kann durch die Aufnahme von CD-Spektren im nahen UV ($\lambda$ = 240-320 nm) verfolgt werden. Die Banden in diesem Spektralbereich sind sehr sensitiv gegenüber Konformationsänderungen und u.a. abhängig davon, wie stark die aromatischen Chromophore dem Lösungsmittel ausgesetzt sind. Auch die Polarität des Lösungsmittels und der pH spielen hier eine Rolle. Die Interpretation der Banden in diesem Spektralbereich wird jedoch durch deren viel geringere Intensität erschwert, sodass mit höheren Konzentrationen und/oder Küvetten mit größeren Weglängen gearbeitet werden muss.

### 1.4.5 Untersuchungen zur Membranwechselwirkung von Feglymycin in Ionenkanalexperimenten

Aufgrund der ähnlichen Sekundärstruktur von Feglymycin und Gramicidin A (**29**, Abbildung 23) wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Ulrich Koert und Herrn Dr. Philipp Reiß (Philipps-Universität Marburg) erste Ionenkanalexperimente zur Untersuchung der Membranaktivität durchgeführt. Dabei kam die sogenannte *black lipid membrane* (BLM)- Technik zum Einsatz (Abbildung 33).[125]

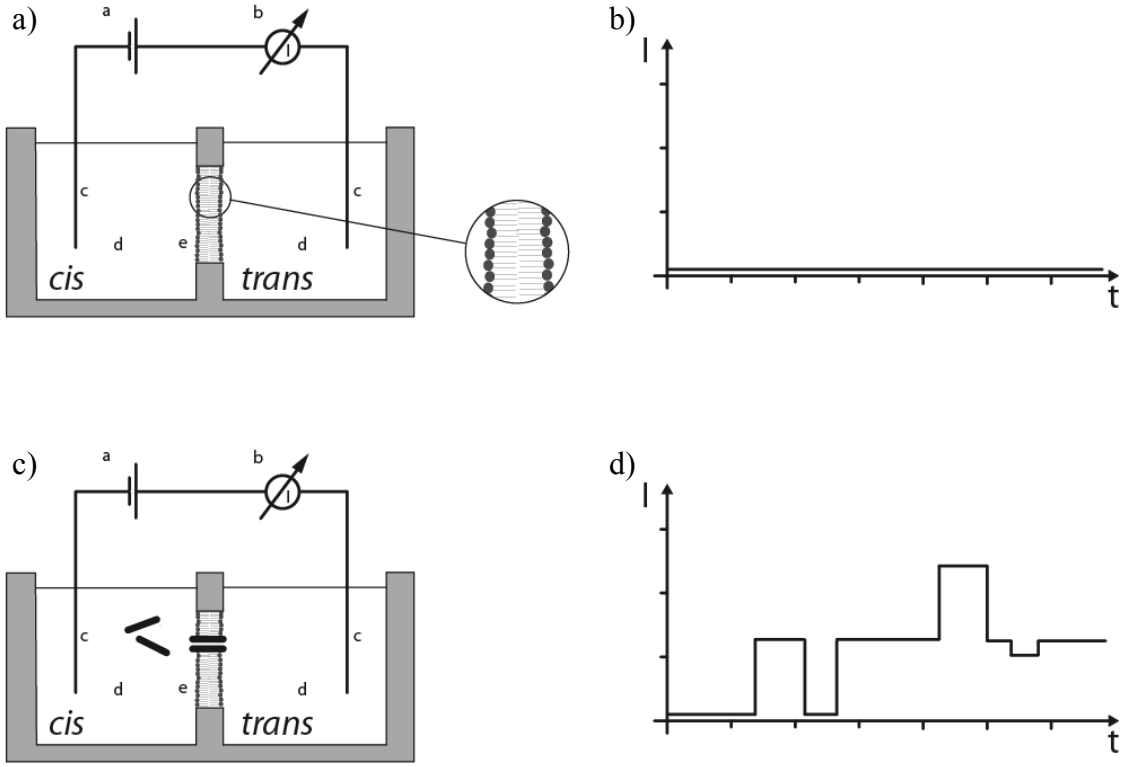



**Abbildung 33:** Die *black lipid membrane*-Technik zur Durchführung von Ionenkanalexperimenten. a) Messapparatur vor Zugabe des Ionophors (a: Spannungsquelle, b: Messverstärker, c: Elektrode, d: Messkammer mit Elektrolytlösung, e: Membran bzw. Lipiddoppelschicht); b) Aufzeichnung des Stromflusses im Strom-Zeit-Diagramm vor Zugabe des Ionophors; c) Messapparatur nach der Zugabe eines membranaktiven Peptids mit geöffneter Pore; d) Aufzeichnung des Stromflusses mit Öffnungs- und Schließvorgängen von Membranporen.[126a]

Der Versuchsaufbau besteht aus zwei mit Elektrolytlösung gefüllten Messkammern, die durch eine kleine Öffnung miteinander verbunden sind. Diese Öffnung wird mit einer planaren Lipiddoppelschicht versehen und in jede Messkammer eine Elektrode getaucht

(Abbildung 33a). Legt man nun eine Spannung an, so tritt nur ein messbarer Stromfluss auf, wenn die durchgängige Lipidmembran teilweise oder vollständig zerstört wird. Dies kann hervorgerufen werden, indem in eine Kammer eine Substanz, z.B. ein membranaktives Peptid, gegeben wird, welche sich in die Lipiddoppelschicht einlagert und diese temporär durch Bildung einer Pore durchlässig für Ionen macht (Abbildung 33c).[126]

Das für Feglymycin erhaltene Strom-Zeit-Diagramm ist in Abbildung 34 gezeigt. Man erkennt, dass durch die Zugabe des Peptids die Leitfähigkeit der verwendeten Membran erhöht wird, d.h. dass die Grundlinie in mehr oder weniger deutlichen Stufen wandert. Die Größe der Stufen ist jedoch sehr unterschiedlich, was ein Hinweis darauf sein kann, dass keine einheitlichen stabilen Poren gebildet werden. Außerdem konnte die beschriebene Erhöhung der Leitfähigkeit erst beim Anlegen einer relativ hohen Spannung von 180 mV bzw. 200 mV beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zunächst keine weiteren Versuche durchgeführt.

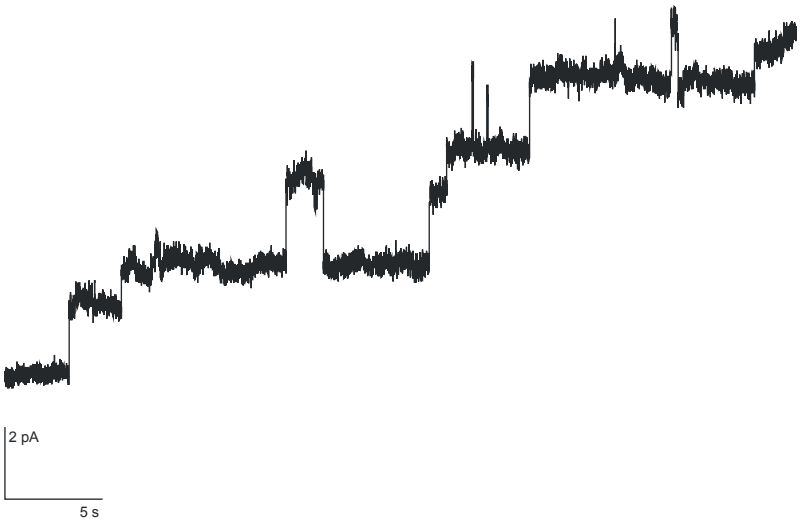



**Abbildung 34:** Strom-Zeit-Diagramm der Ionenkanalmessung von Feglymycin.[127]

### 1.4.6 Die biologische Aktivität von Feglymycin

#### 1.4.6.1 Inhibition der Replikation des HI-Virus *in vitro*

Schon zu Beginn der Untersuchungen des Peptids Feglymycin war bekannt, dass es eine antivirale Aktivität gegen das HI-Virus aufweist.[95] Vértesy *et al.* berichteten, dass die HIV-typische Syncytienbildung mit einem $IC_{50}$-Wert von ~ 5 µM inhibiert wird. Bei Syncytien handelt es sich um nicht-funktionale, mehrkernige Riesenzellen (Abbildung 35a), deren Bildung für Infektionen mit vielen umhüllten Virusarten beschrieben wird.[128]

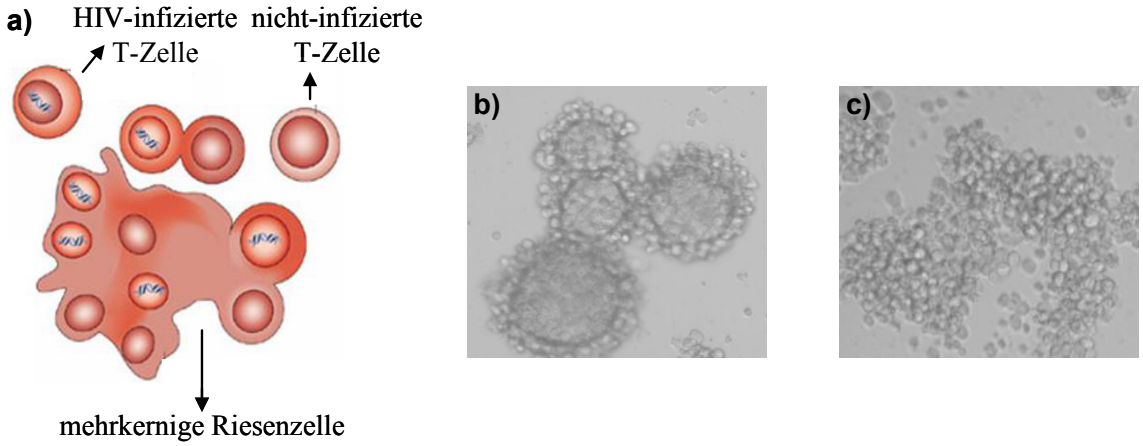



**Abbildung 35:** a) Schematische Darstellung der Syncytienbildung zwischen HIV-infizierten und nicht-infizierten $CD4^+$-T-Zellen. b) Mikroskopaufnahmen einer Syncytienbildung. c) Diese Mikroskopaufnahme zeigt die Inhibition der Riesenzellbildung durch Feglymycin (10 µM).[129]

Im Fall von bestimmten HIV-1-Phänotypen kommt es dabei nach der Expression der Virus-Proteine im Inneren der Wirtszelle zu einer Einlagerung des viralen Env-Komplexes, welcher ein Heterodimer der Oberflächenproteine gp120 und gp41 darstellt, in die Zellmembran. Da sich jetzt die für Anlagerung und Fusion essenziellen viralen Proteine auf der Oberfläche der Wirtszelle befinden, können diese mit den CD4-Rezeptoren gesunder Zellen interagieren, was letztlich zu der Bildung der beschriebenen Riesenzellen führt. Die Bedeutung der Syncytienbildung wird vielseitig eingeschätzt. In der Regel führt diese Aggregation zum Zelltod durch Apoptose, sodass die Anzahl der T-Zellen verringert wird. Andererseits wird auch argumentiert, dass Syncytien möglicherweise als Reservoir für die Viren dienen könnten.[130] Außerdem muss das HI-Virus die Wirtszelle nicht mehr verlassen, um neue Zellen zu infizieren. Damit umgeht es viele biophysikalische und immunologische Barrieren, die mit einer zellfreien Infektion verbunden sind. Somit wird

die Vermehrung sehr viel effizienter. Obwohl die Syncytienbildung mit einer weit fortgeschrittenen HIV-Infektion in Verbindung gebracht wird, ist deren genaue Bedeutung für den Krankheitsverlauf noch nicht vollständig geklärt.[131]

Unter Verwendung von synthetischem Feglymycin wurde die antivirale Wirkung des Peptids in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Dominique Schols (Rega Institut Leuven, Belgien) untersucht, denn der genaue Wirkmechanismus dieses Peptids war bisher nicht bekannt. Die Inhibition der Syncytienbildung konnte dabei bestätigt werden ($IC_{50}$ = 5.4 ± 1.3 µM), wie in Abbildung 35b und c anhand von Mikroskopaufnahmen zu sehen ist.[132] Feglymycin besitzt damit in diesem *Assay* eine vergleichbare Aktivität wie der Fusionsinhibitor Enfuvirtid (**27**, Abbildung 19b; $IC_{50}$ = 3.0 ± 0.7 µM).

Aufgrund der besseren Verfügbarkeit des Naturstoffes Feglymycin nach der Realisierung der Totalsynthese konnte damit begonnen werden, den Wirkmechanismus des Peptids genauer zu untersuchen. Dabei stellte sich zunächst heraus, das Feglymycin eine breite anti-HIV-Aktivität in verschiedenen $CD4^+$-T-Zelllinien ($IC_{50}$ = 0.8 - 3.5 µM) als auch in peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) ($IC_{50}$ = 0.5 - 7.4 µM) aufweist und dabei bei einer Konzentration von bis zu 100 µg/ml nicht zytotoxisch wirkt. Außerdem blieb die Aktivität auch gegenüber Viren erhalten, die gegen gängige Wirkstoffe wie AMD3100[133] oder Enfuvirtid bereits resistent sind. Abbildung 36 zeigt Mikroskopaufnahmen des für die Bestimmung der $IC_{50}$-Werte verwendeten Replikations*assays*. Eine Infektion von $CD4^+$-T-Zellen mit dem HI-Virus hat schon nach wenigen Tagen eine sichtbare morphologische Veränderung der Zellen zur Folge (Abbildung 36b), welche mit dem Zelltod einhergeht.

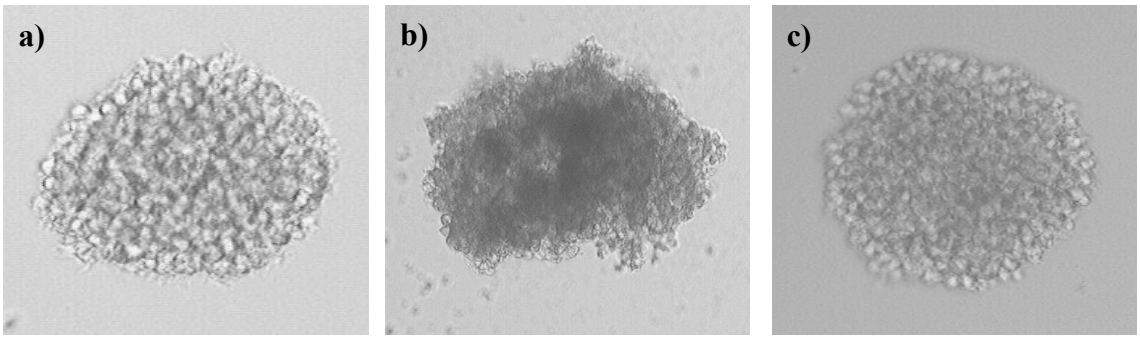



**Abbildung 36:** a) nicht-infizierte MT-4-Zellen ($CD4^+$-T-Zellen); b) sichtbare Zellveränderungen 5 Tage nach Infektion mit HIV-1 IIIB (CPE: zytopathischer Effekt); c) MT-4-Zellen in Gegenwart von HIV-1 IIIB und Feglymycin (10 µM): der virus-induzierte Zelltod wird wirksam inhibiert.[129]

Diesen Effekt macht man sich im sogenannten MTS/PMS-*Assay* (eine Abwandlung des MTT-*Assays*) zunutze, mit dem die Inhibition der Virusreplikation durch antivirale Wirkstoffe quantifiziert werden kann.[134] Dabei wird nach fünftägiger Inkubation der MT-4-Zellen mit dem HI-Virus 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (**71**, MTS)[135] und Phenazinmethosulfat (PMS) zu den Zellen gegeben. Durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase und/oder NAD(P)H von lebenden Zellen wird das Tetrazolium-Salz **71** zu dem wasserlöslichen, blauen Formazan **72** reduziert.[136] PMS dient dabei als Redoxintermediat. Der Farbumschlag kann spektrophotometrisch bei $\lambda$ = 490 nm verfolgt werden. Da in Gegenwart von antiviralen Verbindungen im *in vitro-Assay* mehr lebende Zellen vorhanden sind, erwartet man hier eine mehr oder weniger starke Blaufärbung, welche quantifiziert und zur Bestimmung von $IC_{50}$-Werten herangezogen werden kann.

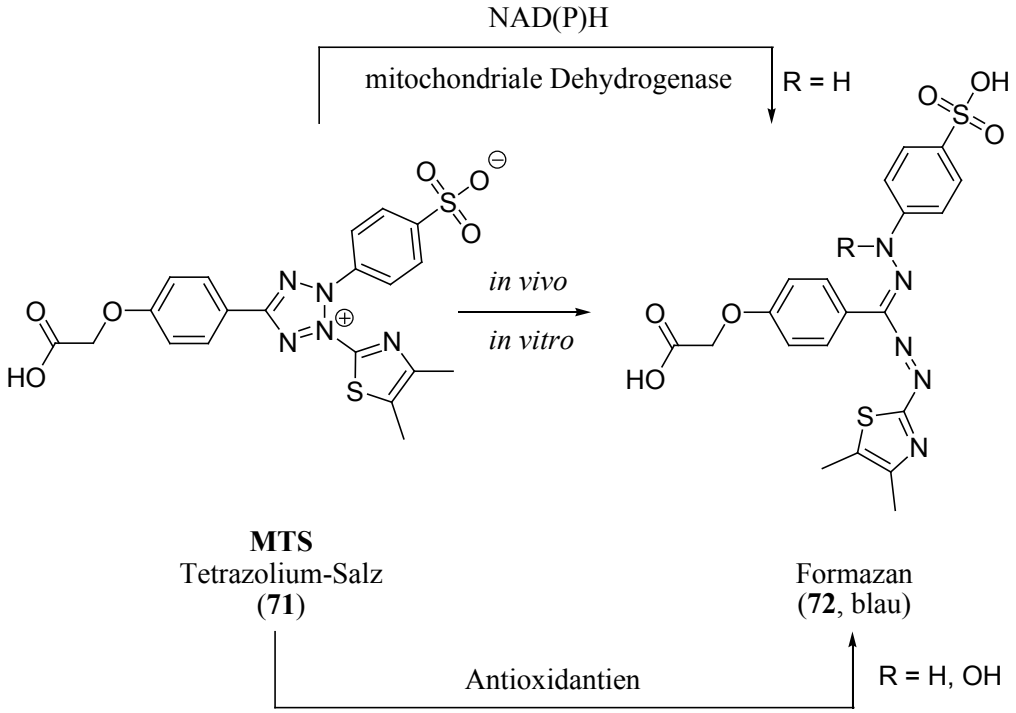



**Abbildung 37:** Durch Reduktionsmittel wie NAD(P)H oder auch Antioxidatien wird das Tetrazolium-Salz MTS (**71**) in das blaue Formazan **72** umgesetzt. Diese Reaktion kann spektrophotometrisch verfolgt und in Zelltoxizitätstests eingesetzt werden.[134, 137]

Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass die anti-HIV-Aktivität von Feglymycin unabhängig davon ist, welchen Corezeptor der jeweilige Virusstamm für den Eintritt in die Wirtszelle verwendet. Verändert man den Zeitpunkt, bei dem der Inhibitor zu Zellen und Virus gegeben wird, so kann der Schritt im Replikationszyklus eingegrenzt werden, in dem

der antivirale Wirkstoff eingreift. Für Feglymycin zeigte sich ein kompletter Aktivitätsverlust, wenn es 1 h nach Infektion zu den T-Zellen gegeben wurde. Das lässt darauf schließen, dass das Peptid schon die Anlagerung des HI-Virus an die Wirtszelle unterbindet. Es konnte in weiteren Experimenten nachgewiesen werden, dass Feglymycin die Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor verhindert. In *surface plasmon resonance* (SPR)-Experimenten mit rekombinantem gp120 (HIV-1 IIIB) konnte man schließlich eine Interaktion mit diesem viralen Oberflächenprotein beobachten. Entgegen allen Erwartungen zeigte die Sequenzierung der Erbinformation eines im Labor generierten Feglymycin-resistenten HIV-1-Stammes[§§] keinerlei Mutationen, sodass noch immer nicht mit absoluter Sicherheit auf den genauen Wirkort geschlossen werden kann.

#### 1.4.6.2 Antibakterielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus*

Die Wirkung von Feglymycin auf ausgewählte Mikroorganismen wurde im Rahmen der ersten Charakterisierung des Peptids bei der damaligen *Hoechst AG* untersucht. Dabei fand man lediglich eine moderate antibakterielle Aktivität gegen die Stämme *S. aureus* 503, *S. pyogenes* 308A und *S. pyogenes* 77A (MIC ~ 32 µg/ml).[95] Da nach der Totalsynthese von Feglymycin Substanz für zusätzliche Testierungen zur Verfügung stand, wurde die Verbindung noch einmal in Zusammenarbeit mit *Sanofi-Aventis* (Dr. Luigi Toti und Antje Nußer) auf ihre Aktivität gegen verschiedene Mikroorganismen getestet.[138] Dabei stellte sich heraus, das Feglymycin das Wachstum von drei grampositiven *S. aureus*-Stämmen mit MIC-Werten im Bereich von 0.3-0.5 µM inhibiert (siehe Abschnitt 5.3.4). Mit einer MIC von ca. 0.3 µM zeigte Feglymycin dabei eine vergleichbar starke Wachstumshemmung wie das Ramoplanin A2 Aglycon (MIC ~ 0.2 µM) gegenüber dem methicillin-sensitiven Stamm *S. aureus* ATCC 29213.[139] Keine Aktivität wurde gegenüber weiteren bei der Untersuchung verwendeten Organismen wie z.B. dem gramnegative *E. coli*, der Hefe *C. albicans* oder dem Mykobakterium *M. smegmatis* festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die biologische Aktivität von Feglymycin nicht auf die anti-HIV-Wirkung beschränkt ist. Besonders die entfernte strukturelle Ähnlichkeit mit den Peptiden Vancomycin (**4**) und Ramoplanin (**15**), dessen *Target* die Zellwandbiosynthese darstellt, gibt Anlass dazu, auch den genauen antibakteriellen Wirkmechanismus von Feglymycin näher zu beleuchten.

§§ Replikation des HI-Virus *in vitro* in Gegenwart von bis zu 30 µg/ml (16 µM) Feglymycin.

### 1.4.6.3 Feglymycin als Enzyminhibitor

Wie schon in Abschnitt 1.2.2 erläutert, ist die bakterielle Zellwandbiosynthese das *Target* von diversen peptidischen Naturstoffen.[35] Es war daher naheliegend, die Wirkung von Feglymycin auf diesen Biosyntheseweg zu untersuchen. Von Frau Dipl.-Biochem. Saskia Rausch wurden dazu in unserer Arbeitsgruppe die zytoplasmatischen Enzyme MurA-F aus *E. coli* rekombinant in *E. coli* BL21 überexprimiert und aufgereinigt.[140] In einer Eintopfreaktion kann mit diesen Enzymen unter Zugabe der entsprechenden Substrate ausgehend von UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) das sogenannte Park's Nukleotid (UDP-*N*-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamyl-*m*-diaminopimelyl-D-alanyl-D-alanin) *in vitro* synthetisiert werden (Abbildung 7).[141] Mithilfe von LC-MS-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass Feglymycin die Enzyme MurA (UDP-*N*-Acetylglucosaminenolpyruvat-Synthase) und MurC (UDP-*N*-Acetylmuramyl-L-alanin-Ligase) dieser Reaktionskaskade inhibiert. Zur genaueren Charakterisierung der beobachteten Hemmwirkung wurden spektrophotometrische *Assays* für die jeweiligen Enzymreaktionen etabliert.

Die Inhibition des MurA Enzyms wurde dabei in einem gekoppelten *Assay* mit dem MurB-Enzym untersucht.[142] Dabei wird die kommerziell erhältliche Ausgangsverbindung UDP-*N*-Acetylglucosamin durch MurA zunächst mit Phosphoenolpyruvat (PEP) umgesetzt und das erhaltene Produkt durch MurB unter Zusatz von NADPH zu UDP-*N*-Acetylmuramat reduziert. Der Verbrauch des Reduktionsmittels NADPH kann spektrophotometrisch bei $\lambda = 340$ nm detektiert werden (Abbildung 38).

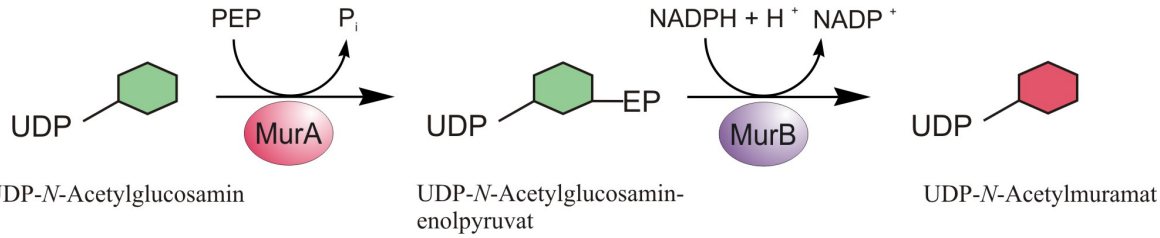



**Abbildung 38:** Gekoppelter *Assay* zur Untersuchung der Inhibition des MurA-Enzyms aus *E. coli*. Der Verbrauch von NADPH durch MurB während der Reaktionskaskade wird spektrophotometrisch bei $\lambda = 340$ nm detektiert.[142]

Die Kupplung der ersten Aminosäure D-Alanin an den UDP-*N*-Acetylmuramat-Baustein erfolgt durch MurC unter Verbrauch von ATP. Durch Zugabe der Enzyme Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydrogenase wird unter Verwendung des entstandenen ADP zunächst PEP zu Pyruvat umgesetzt, welches daraufhin unter Verbrauch von NADH zu Lactat reduziert wird (Abbildung 39).[143] Die Detektion erfolgt analog zu dem MurA-*Assay* spektrophotometrisch bei λ = 340 nm. Das notwendige Edukt UDP-*N*-Acetylmuramat (UDP-MurNAc) wurde durch Totalsynthese von Herrn Dipl.-Chem. Alexander Denisiuk und Herrn Dipl.-Chem. Marius Löhken zur Verfügung gestellt.[144]

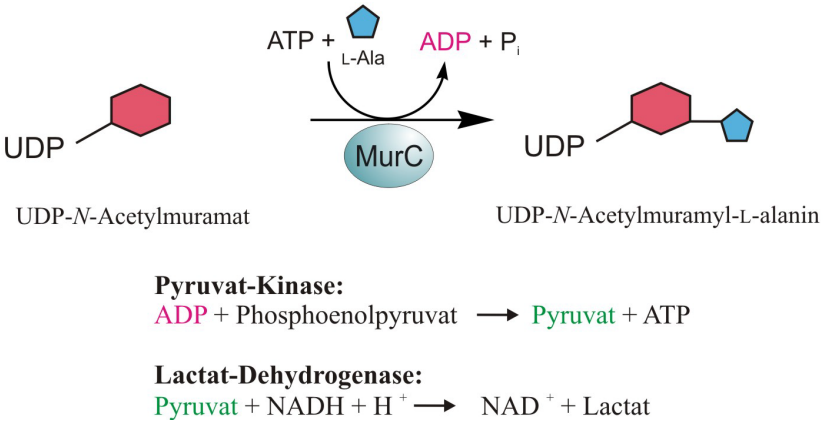



**Abbildung 39:** Gekoppelter *Assay* zur Untersuchung der Inhibition des MurC-Enzyms aus *E. coli*. Der Verbrauch von NADH durch die Lactat-Dehydrogenase während der Reaktionskaskade wird spektrophotometrisch bei λ = 340 nm detektiert.[143]

Feglymycin inhibiert nicht-kompetitiv in Bezug auf alle Substrate das MurA- und das MurC-Enzym im niedrigen einstelligen µM-Bereich, wobei kein Unterschied zwischen den Enzymen aus *E. coli K12* (gramnegativ) und *S. aureus JH1* (grampositiv) festzustellen ist (Tabelle 2).[140]

**Tabelle 2:** $IC_{50}$-Werte für die Inhibition der Enzyme MurA und MurC aus *E. coli* und *S. aureus* durch Feglymycin.

| **Enzym** | **$IC_{50}$ [µM]** |
|---|---|
| MurA (*E. coli*) | 3.4 ± 1.1 |
| MurA (*S. aureus*) | 3.5 ± 1.3 |
| MurC (*E. coli*) | 0.3 ± 0.1 |
| MurC (*S. aureus*) | 1.0 ± 0.6 |

Feglymycin ist damit nach dem MurA-Inhibitor Phosphomycin (**13**, Abbildung 8) der erste Naturstoff, welcher Enzyme des ersten, zytoplasmatischen Abschnitts der Peptidoglycanbiosynthese hemmt.[38] In der durchgeführten Testreihe wurde daher auch Phosphomycin als irreversibler Inhibitor von MurA im Vergleich zu Feglymycin untersucht, wobei ein $IC_{50}$-Wert von ~ 6 µM bestimmt wurde. Damit sind beide Naturstoffe nahezu gleich aktiv. Die Werte können jedoch aufgrund der unterschiedlichen Inhibitionstypen nicht direkt miteinander verglichen werden. Weitere Experimente zeigten außerdem, dass bei einer Inkubation der Mur-Enzyme mit Feglymycin nach max. 5 min die volle inhibitorische Wirkung erreicht wird. Für die Aufklärung des genauen Wirkmechanismus müssen jedoch noch weitere Untersuchungen, wie z.B. Kristallisationsstudien, herangezogen werden.

Zusätzlich zu Feglymycin wurden ebenfalls das im Rahmen der Totalsynthese hergestellte *N*-terminale Heptapeptid **42** sowie das *C*-terminale Hexapeptid **44** (Abbildung 26) auf eine Inhibition der untersuchten Mur-Enzyme getestet. Dazu wurden diese Bausteine jedoch vorher vollständig entschützt, sodass H-Hepta-OH (**73**) den *N*-terminalen Teil und H-Hexa-OH (**74**) den *C*-terminalen Teil des Originalpeptids imitieren. Aus den Ergebnissen in Tabelle 3 geht deutlich hervor, dass das Heptapeptid **73** im Vergleich zu Feglymycin sowohl MurA als auch MurC ähnlich stark hemmt. Das Hexapeptid **74** zeigt im Gegensatz dazu jedoch keine Aktivität mehr. Diese Resultate weisen möglicherweise darauf hin, dass sich die pharmakophore Region des Peptids Feglymycin in Bezug auf die Enzyminhibition eher im *N*-terminalen Teil des Moleküls befindet.

**Tabelle 3:** $IC_{50}$-Werte für die Inhibition der Enzyme MurA und MurC aus *E. coli* für Feglymycin sowie ein *N*- und *C*-terminales Peptidfragment. Die $IC_{50}$-Werte für Feglymycin stimmen im Rahmen der Fehlergrenzen sehr gut mit den Werten früherer Messungen (Tabelle 2) überein.

| **Peptid** | **$IC_{50}$ [µM] MurA E. coli** | **$IC_{50}$ [µM] MurC E. coli** |
|---|---|---|
| Feglymycin (**28**) | 2.4 ± 1.1 | 0.3 ± 0.1 |
| H-Hepta-OH (**73**) | 4.9 ± 0.6 | 0.6 ± 0.1 |
| H-Hexa-OH (**74**) | > 50 | > 50 |

Da Feglymycin gleich wirksam ist gegenüber den Enzymen aus *E. coli* und *S. aureus* wurden für alle weiteren Testreihen zur Untersuchung von Feglymycin-Derivaten zunächst nur die *E. coli*-Enzyme verwendet.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Sahl (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Feglymycin keinen Effekt auf die membranassoziierten Stufen des Peptidoglycanbiosyntheseweges hat. Unter anderem wird die Funktion des extrazellulär arbeitenden und für die Transpeptidierung und -glycosylierung verantwortlichen Enzyms PBP2 nicht durch Feglymycin gestört. Auch auf die Funktion der membrangebundenen Enzyme MraY und MurG (Abbildung 7) wurde kein Einfluss beobachtet.[60]

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Kieler Wirkstoffzentrum KIWIZ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Johannes Imhoff und Frau Dr. Heidi Zinecker wurde Feglymycin außerdem in den im Institut routinemäßig durchgeführten Enzymtests untersucht. Dabei zeigte sich eine sehr gute Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase-3β (GSK-3β) mit einem $IC_{50}$-Wert von 28 nM. Dieser Wert liegt im Bereich von denen bekannter Inhibitoren dieses Enzyms, wie z.B. die Paullone oder gewisse Maleinimide.[145] Als Serin/Threonin-Kinase spielt die GSK-3β eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von zellulären Signalwegen wie beispielsweise bei der Glycogenbiosynthese. Eine fehlerhafte Regulation dieses Enzyms kann einen Einfluss auf so unterschiedliche Krankheiten wie Diabetes oder neurodegenerative Krankheiten haben. In den *in vitro*-Enzym*assays* zeigte Feglymycin jedoch auch eine Hemmung der Phosphodiesterase 4, der Acetylcholinesterase und der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B. Diese Beobachtungen lassen auf eine relativ unspezifische Inhibition schließen. Dies wäre auf jeden Fall negativ für die Weiterentwicklung von Feglymycin als möglicher antibakterieller oder antiretroviraler Wirkstoff zu bewerten. Man muss in dem Zusammenhang aber auch beachten, dass es sich bei den Enzymtests um *in vitro*- und nicht um *in vivo*-Experimente handelt. Ein weiteres Argument gegen eine unspezifische Hemmung ist, dass die Enzyme MurC-F der Peptidoglycanbiosynthese den gleichen Reaktionstyp katalysieren und sich strukturell ähneln. Feglymycin inhibiert jedoch selektiv nur die MurC-Ligase. Weiterhin zeigte Feglymycin gegenüber den im anti-HIV-*Assay* verwendeten T-Zellen keine zytotoxischen Eigenschaften bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml (vgl. Abschnitt 1.4.6.1). Man muss daher vermuten, dass Feglymycin nicht zellgängig für Eukaryoten ist. Genauere Aussagen dazu und zu den enzyminhibitorischen Eigenschaften des Peptids können mit dem jetzigen Wissensstand jedoch noch nicht getroffen werden.

# 2 Zielsetzung

Das lineare 13mer-Peptid Feglymycin, welches vor etwas mehr als 20 Jahren zum ersten Mal aus Streptomyceten isoliert wurde, reiht sich aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung in die Klasse der Hydroxyphenylglycin-enthaltenden Peptidantibiotika mit Vertretern wie Vancomycin oder Ramoplanin A2 ein. Mit der nahezu alternierenden Anordnung an L- und D-konfigurierten Bausteinen sowie der helikalen Sekundärstruktur im Kristall liegt außerdem ein Vergleich mit den membranaktiven Peptiden Gramicidin A und Polytheonamid B nahe. Doch Feglymycin ist nicht nur in Bezug auf seine Struktur äußerst interessant, es besitzt auch eine multiple biologische Aktivität. Dabei ist das Peptid zum einen ein äußerst potenter Inhibitor der Replikation von HI-Viren im Zellkulturtest, zum anderen hemmt es effizient das Wachstum von *S. aureus*-Stämmen *in vitro*. Neueste Studien zeigten außerdem, dass Feglymycin die Enzyme MurA und MurC der bakteriellen Zellwandbiosynthese inhibiert. Die Realisierung der ersten Totalsynthese für Feglymycin durch Herrn Dr. Frank Dettner im Arbeitskreis von Professor Süßmuth ebnete schließlich den Weg zur genaueren Untersuchung dieses Peptidwirkstoffes.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Darstellung von Feglymycin-Derivaten zur weiterführenden Charakterisierung der biologischen Wirkung dieses Naturstoffes. Insbesondere erhofften wir uns dabei, in Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern entscheidende Hinweise auf mögliche molekulare *Targets* von Feglymycin zu erhalten. Durch Synthese und Testierung des Peptid-Enantiomers sollte untersucht werden, ob den biologischen Effekten eine spezifische Interaktion in chiraler Umgebung, z.B. an einem Rezeptor oder im aktiven Zentrum eines Enzyms, zugrunde liegt. Durch den gezielten Austausch jeder einzelnen Aminosäure in der Primärsequenz eines Peptids gegen Alanin unter Erhalt der Stereoinformation erhält man entscheidende Hinweise über den Beitrag jeder Aminosäureseitenkette zur Aktivität. Dieser sogenannte Alanin-Scan sollte für Feglymycin als ein erstes Experiment einer SAR-Studie durchgeführt werden. Insbesondere die genaue Bedeutung der nicht-proteinogenen Aminosäuren 4-Hydroxyphenylglycin und 3,5-Dihydroxyphenylglycin war dabei von großem Interesse. Zur erfolgreichen Realisierung dieses Teilprojektes trug die modulare Totalsynthesestrategie für das Originalpeptid entscheidend bei. Äußerst wichtig

in diesem Zusammenhang war außerdem die sorgfältige Aufreinigung und exakte analytische Charakterisierung der hergestellten Peptidderivate. Durch die zusätzliche Untersuchung von Peptidfragmenten sollte eine mögliche pharmakophore Region des Moleküls eingegrenzt werden. Ein übergeordnetes Ziel bestand schließlich darin zu prüfen, ob insbesondere die racemisierungsempfindlichen Hydroxyphenylglycine durch weniger komplexe Bausteine ersetzt werden können, um so die Generierung eines Peptidomimetikums mit verbesserter Aktivität und optimierten pharmakologischen Eigenschaften voranzutreiben.

Zur weiterführenden Charakterisierung einer möglichen Membraninteraktion von Feglymycin sollten neben Ionenkanalexperimenten zusätzlich auch $^{19}$F-Festkörper-NMR-Studien in Gegenwart von Lipidmembranen hinzugezogen werden. Dies machte die Synthese von fluorierten Peptidanaloga notwendig. Feglymycin ist dabei durch die hohe Anzahl an Hydroxyphenylglycinen im Molekül prädestiniert für den Einbau von bei dieser spektroskopischen Methode häufig verwendeten Fluor-*gelabelten* Phenylglycin-Bausteinen. Um den genauen Wirkort des Peptids sowohl in Bezug auf dessen antiretrovirale, als auch auf dessen antibakterielle Aktivität zu identifizieren, kann der Einbau eines Fluoreszenz*labels* hilfreich sein. Mit dem Austausch von L-Phenylalanin in Position 12 der Sequenz durch 2-Naphthyl-L-alanin sollte evaluiert werden, ob eine Manipulation dieser Aminosäureseitenkette durch Annelierung von Aromaten und damit zur Generierung einer fluoreszierenden Gruppe ohne Aktivitätsverlust möglich ist. Demnach müssten für eine Fluoreszenzmarkierung weder der freie *N*- noch der freie *C*-Terminus des Peptids verwendet werden, deren Integrität insbesondere bei kleineren Oligopeptiden oft essenziell für die Wechselwirkung mit dem molekularen Target ist.

Neben der Synthese der beschriebenen Feglymycin-Derivate sollte der Naturstoff mithilfe eines spektrophotometrischen *Assays* außerdem auf eine mögliche antioxidative Aktivität hin überprüft werden, denn die zahlreiche phenolischen Funktionalitäten im Molekül ließen vermuten, dass das Peptid vergleichbare Eigenschaften wie beispielsweise die bekannten pflanzlichen Polyphenole aufweisen könnte.

# 3 Ergebnisse und Diskussion

## 3.1 Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Feglymycin

Ein besonders charakteristisches Strukturmerkmal des Peptids Feglymycin ist die hohe Anzahl an Hydroxy-Gruppen im Molekül, welche z.B. im 3,5-Dihydroxyphenylglycin die *meta*-Stellung einnehmen. Vergleichbare phenolische Verbindungen wurden zum Großteil auch aus Pflanzen isoliert und sind bekannt für ihre antioxidative Aktivität. Dies bedeutet, sie können Oxidationsreaktionen unterbinden, die z.B. durch freie Radikale oder reaktive Sauerstoffspezies initiiert werden. Diskutiert wird außerdem, dass die erwähnte antioxidative Wirkung durch das Komplexieren von Metallionen wie $Fe^{2+}$ und/oder durch Regeneration anderer Antioxidantien hervorgerufen wird.[146] Ein Ungleichgewicht von natürlichen Antioxidantien und oxidativen Prozessen im Organismus, auch oxidativer Stress genannt, wird mit einer Reihe von Erkrankungen sowie dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht.[147] Interessant ist außerdem, dass viele aus Pflanzen isolierte Polyphenole auch eine antivirale Aktivität gegen das HI-Virus aufweisen.[148] Abbildung 40 zeigt zwei Beispielverbindungen für pflanzliche Polyphenole.

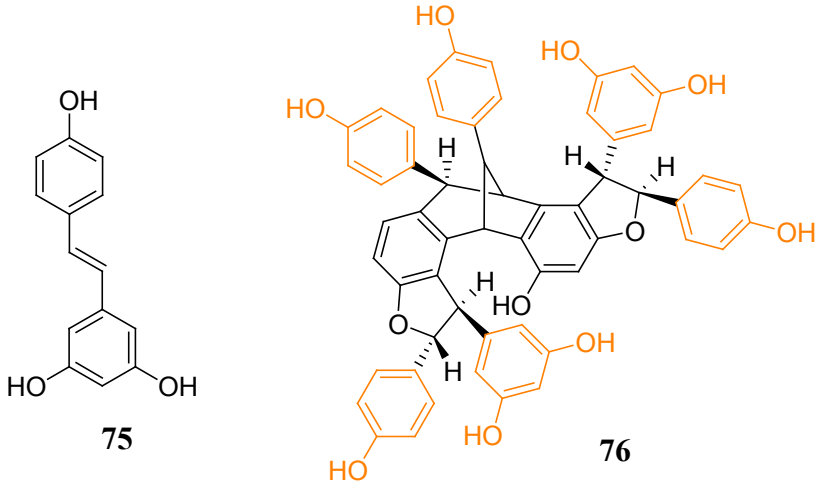



**Abbildung 40:** Die pflanzlichen Polyphenole *trans*-Resveratrol (**75**) und Vaticanol C (**76**).

Das *trans*-Resveratrol (**75**) gehört zur Gruppe der Hydroxystilbene und ist u.a. ein Inhaltsstoff von Rotwein. Sowohl dem *trans*-Resveratrol als auch dem Oligostilben Vaticanol C (**76**) werden neben der antioxidativen Wirkung auch krebsvorbeugende Eigenschaften zugeschrieben.[146] Interessant an der Struktur von Vaticanol C ist die

nahezu cyclische Anordnung der hydroxylierten Aromaten um den Grundkörper des Moleküls. Dieses Strukturmotiv ähnelt in gewisser Weise der Gruppierung der Hydroxyphenylglycin-Aminosäuren in der Röntgenstruktur von Feglymycin (vgl. Abbildung 21).

Aufgrund des zunehmenden Interesses an potenziellen Antioxidantien wurden verschiedenste Testmethoden zu deren Charakterisierung entwickelt.[149] Ein besonders einfach durchzuführender Versuch ist der sogenannte DPPH-*Assay*. Dabei wird das stabile, violette Radikal 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH; **77**) in Gegenwart eines Antioxidanz von diesem abgefangen, wobei ein nur noch schwach gelbliches Reduktionsprodukt entsteht (**78**, Abbildung 41). Die Menge an umgesetztem DPPH kann durch spektrophotometrische Bestimmung der Abnahme der Absorption bei $\lambda$ = 517 nm quantifiziert werden.[150] Die Stabilität des verwendeten Radikals stellt jedoch auch einen Nachteil dieser Methode dar, denn die natürlich vorkommenden Radikalspezies sind i.d.R. sehr viel reaktiver, sodass die erhaltenen Ergebnisse nicht direkt mit der Wirkung eines Radikalfängers *in vivo* korrelieren.

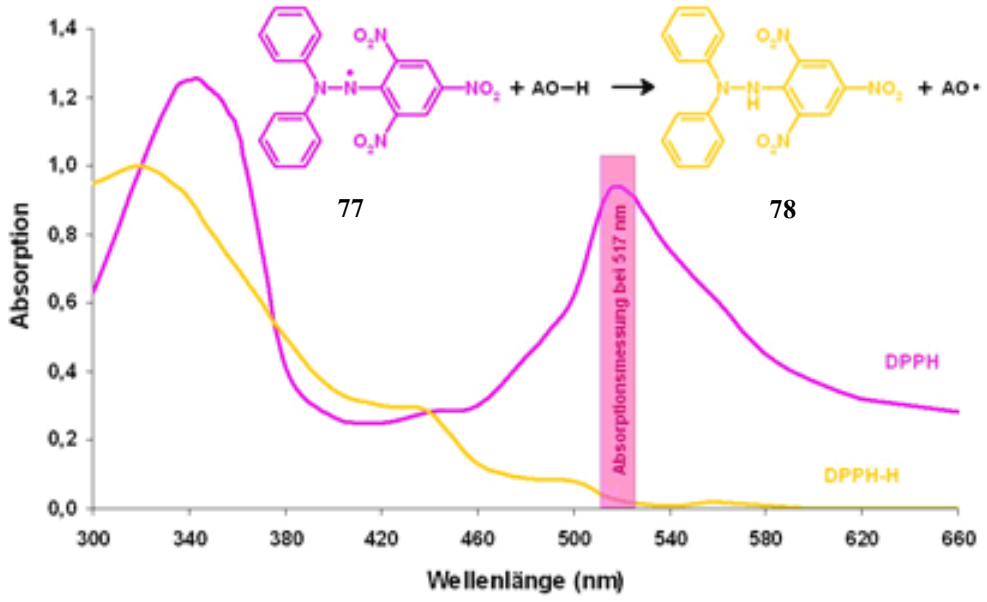



**Abbildung 41:** Mit der Messung der Abnahme der Absorption bei $\lambda$ = 517 nm kann die Reduktion des stabilen Radikals DPPH (**77**) verfolgt werden. Die Reaktion ist verbunden mit einem Farbumschlag von violett nach schwach gelb.

Für die Reaktion von Phenolen mit Radikalen können verschiedene Mechanismen formuliert werden (Abbildung 42).[151] Zum einen ist ein direkter Transfer des phenolischen Wasserstoffatoms auf das Radikal denkbar (HAT-Mechanismus). Eine zweite Möglichkeit wäre eine Deprotonierung der phenolischen Hydroxy-Funktion mit anschließendem Elektronentransfer vom gebildeten Phenolat-Anion auf die Radikalspezies (SPLET-Mechanismus). Kinetische Studien mit DPPH weisen darauf hin, dass bei dessen Reaktion mit Phenolen in Lösungsmitteln wie Methanol, welche eine Ionisierung fördern und an der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, der zweite Reaktionsweg dominiert. Der direkte Protonentransfer ist in diesem Fall ein sehr langsamer Prozess.[152] Die aus der Reaktion resultierenden Radikale können u.a. durch Di- bzw. Oligomerisierung oder Disproportionierung abreagieren. Bei den im Feglymycin enthaltenen phenolischen Aminosäuren ist die Oxidation zu resonanzstabilisierten, chinoiden Strukturen denkbar. Im Fall der 3,5-Dihydroxyphenylglycine, bei denen die Hydroxy-Gruppen der aromatischen Aminosäureseitenketten eine *meta*-Stellung einnehmen, ist die Ausbildung von *ortho*- oder *para*-chinoiden Einheiten nach einer Zwei-Elektronen-Oxidation nicht möglich. Stattdessen entstehen hier i.d.R. höher oxidierte Systeme wie z.B. *para*-Oxychinone. Bei geringer sterischer Hinderung reagieren diese weiter zu oligomeren Strukturen.[153]

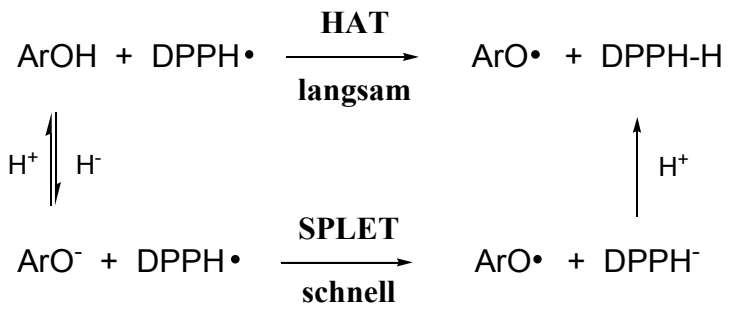
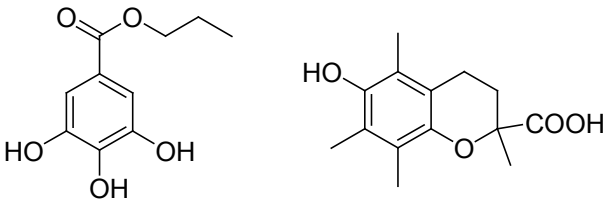



**Abbildung 42:** Mögliche Reaktionsmechanismen von Phenolen (ArOH) mit dem DPPH-Radikal basieren entweder auf einem Wasserstoffatom-Transfer (*hydrogen atom transfer*, HAT) oder einer Deprotonierung gefolgt von einem Elektronen-Transfer (*sequential proton loss electron transfer*, SPLET).

Wichtig bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der DPPH-Methode ist der Vergleich mit Referenzsubstanzen, d.h. bekannten Antioxidantien. Im Rahmen der Untersuchung von Feglymycin wurden dazu das als Lebensmittelzusatzstoff eingesetzte Propylgallat (**79**) sowie das Vitamin E-Derivat Trolox (**80**) verwendet (Abbildung 43).

Zur Bestimmung des jeweiligen $IC_{50}$-Wertes, das heißt der Konzentration an Testsubstanz, bei der die Hälfte der DPPH-Radikale abgefangen werden, erfolgte die Inkubation der Substrate in verschiedenen Konzentrationen mit der DPPH-Lösung. Nach 30 min bei 30 °C schloss sich die Absorptionsmessung bei $\lambda$ = 517 nm an. Genauere Details zur Versuchsdurchführung können Kapitel 5.3.1 dieser Arbeit entnommen werden.




**79** **80**

**Abbildung 43:** Propylgallat (**79**) und Trolox (**80**) werden als Referenzsubstanzen bei der Charakterisierung von potenziellen Antioxidantien eingesetzt.

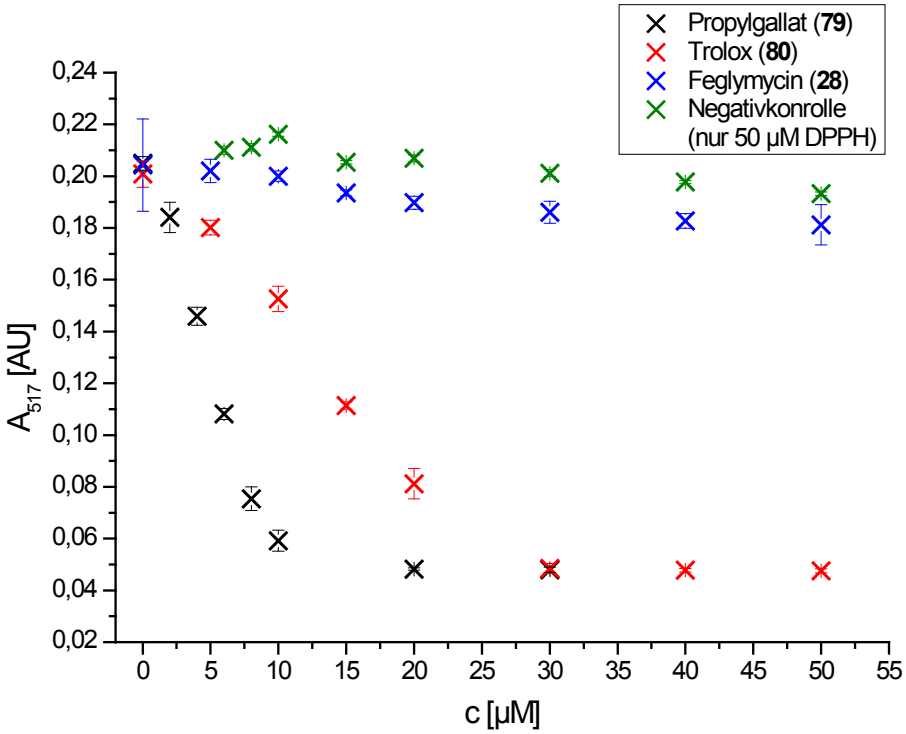



**Abbildung 44:** Auftragung der Absorption A bei $\lambda$ = 517 nm gegen die Substratkonzentration c. Eine Abnahme von $A_{517}$ mit steigender Konzentration korreliert mit einer abnehmenden Konzentration an DPPH-Radikalen in der Lösung. Je stärker diese Abnahme ist, desto höher ist die Aktivität des entsprechenden Antioxidanz. Feglymycin (blau) zeigt im Vergleich zu den Referenzverbindungen Propylgallat (schwarz) und Trolox (rot) nahezu keine antioxidative Aktivität unter den gewählten Reaktionsbedingungen.

Aus Abbildung 44 wird deutlich, dass für die Referenzverbindungen Propylgallat und Trolox im DPPH-*Assay* die Absorption bei $\lambda$ = 517 nm mit steigender Konzentration abnimmt und schließlich einen Sättigungsbereich erreicht. Diese Abnahme ist proportional zur Menge an abgefangenen DPPH-Radikalen. Mit einem $IC_{50}$-Wert von ~ 5 µM besitzt Propylgallat dabei eine etwas höhere antioxidative Kapazität als Trolox ($IC_{50} \approx 13$ µM).

Im Gegensatz dazu zeigt Feglymycin auch bei einer Konzentration von 50 µM kaum eine Reaktion mit dem DPPH-Radikal, was aus der nur sehr schwachen Abnahme der Absorption deutlich wird. Die Messwerte unterscheiden sich dabei nur unwesentlich von der Kontrolle, bei der die DPPH-Lösung ohne weitere Zusätze bei den entsprechenden Reaktionsbedingungen belassen wurde. Dies bedeutet, dass Feglymycin entgegen den Erwartungen und trotz der hohen Anzahl an phenolischen Hydroxy-Gruppen ein sehr viel schwächeres Antioxidanz ist als die Vergleichssubstanzen. Wahrscheinlich erreicht die Absorption bei $\lambda$ = 517 nm erst bei höheren Konzentrationen und/oder einer längeren Reaktionszeit den Sättigungsbereich. Die Ergebnisse des DPPH-Tests widerlegen auch bisherige Annahmen, nach denen Feglymycin ein extrem oxidationsempfindliches Molekül sei. Die Stabilität des reaktiven DPPH-Radikals in Gegenwart des Peptids weist auf eine nicht zu erwartende Reaktionsträgheit hin. Eine Erklärung hierfür ist die mögliche Beteiligung der Hydroxy-Funktionen an einem Wasserstoffbrückennetzwerk, auch unter Beteiligung von Lösungsmittelmolekülen, wie es aus der Röntgenstruktur von Feglymycin abgeleitet wurde (Abbildung 22). Die entsprechenden Wasserstoffatome wären in dem Fall sehr viel weniger zugänglich für eine Reaktion mit freien Radikalen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste man Feglymycin im DPPH-*Assay* noch einmal im Vergleich zu den freien Aminosäuren 4-Hydroxyphenylglycin und 3,5-Dihydroxyphenylglycin untersuchen. Auch kleinere Peptidfragmente, welche kein ausgedehntes, intramolekulares Wasserstoffbrückennetzwerk ausbilden können, sollten für weitere Testierungen hinzugezogen werden.

## 3.2 Synthese und Charakterisierung von Feglymycin-Derivaten

### 3.2.1 Das Feglymycin-Spiegelbild

Befinden sich an einem Kohlenstoffatom vier unterschiedliche Substituenten, so wird dieses als stereogenes oder auch chirales Zentrum bezeichnet.*** Besitzt ein Molekül ein derartiges Asymmetriezentrum, so existieren genau zwei Stereoisomere der Verbindung, welche exakt spiegelbildlich zueinander sind. Erstaunlicherweise kommen einige Bausteine in der Natur, darunter die proteinogenen Aminosäuren und die Zucker der Nukleinsäuren, nur in einer der zwei möglichen Konfigurationen vor.[154] Da die Proteine aller Organismen ausschließlich aus L-Aminosäuren aufgebaut sind, kann man diese Makromoleküle ebenfalls als chiral bezeichnen. Alle enzymkatalysierten Reaktionen finden somit in einer asymmetrischen Umgebung statt, in der sich Bild und Spiegelbild einer Verbindung chemisch nicht identisch verhalten. Dies macht man sich beispielsweise bei der sogenannten enzymatisch kinetischen Racematspaltung zunutze, bei der ein Enantiomer aus einer racemischen Mischung schneller umgesetzt wird als das andere.[155] In der Medizinischen Chemie hat dies zur Folge, dass sich die biologische Wirkung von enantiomeren Verbindungen z.T. erheblich unterscheiden kann.[156] Ein Beispiel hierfür sind einige synthetische Opiate. Während das eine Enantiomer stark schmerzstillende und/oder narkotische Wirkung aufweist, kann das Spiegelbild aufgrund der viel schwächeren Aktivität als hustenstillendes Medikament eingesetzt werden.[9] Im Fall von biologisch aktiven, natürlichen Peptiden hat der Austausch von L- gegen D-Aminosäuren oft erhebliche Auswirkungen auf deren Eigenschaften. D-Peptide sind sehr viel schlechtere Substrate für Proteasen und besitzen damit eine erhöhte Stabilität im Organismus. Dies geht einher mit der Möglichkeit einer oralen Applikation sowie einer geringeren Immunogenität im Falle einer Anwendung als Medikament. Bisher gibt es nur relativ wenige Veröffentlichungen auf diesem Forschungsgebiet, das Potenzial dieser Strukturvariation ist jedoch mit Sicherheit noch nicht voll ausgeschöpft.[157] Die enormen Entwicklungen auf dem Gebiet der Peptidsynthese ermöglichten mittlerweile sogar die Totalsynthese ganzer D-Enzyme, welche eine in Bezug auf die absolute Konfiguration

*** Neben Kohlenstoff können in bestimmten Fällen auch Silicium, Stickstoff, Phosphor und Schwefel Stereozentren bilden. Chiral sind Moleküle im Allgemeinen, wenn sie keine Drehspiegelachse besitzen.

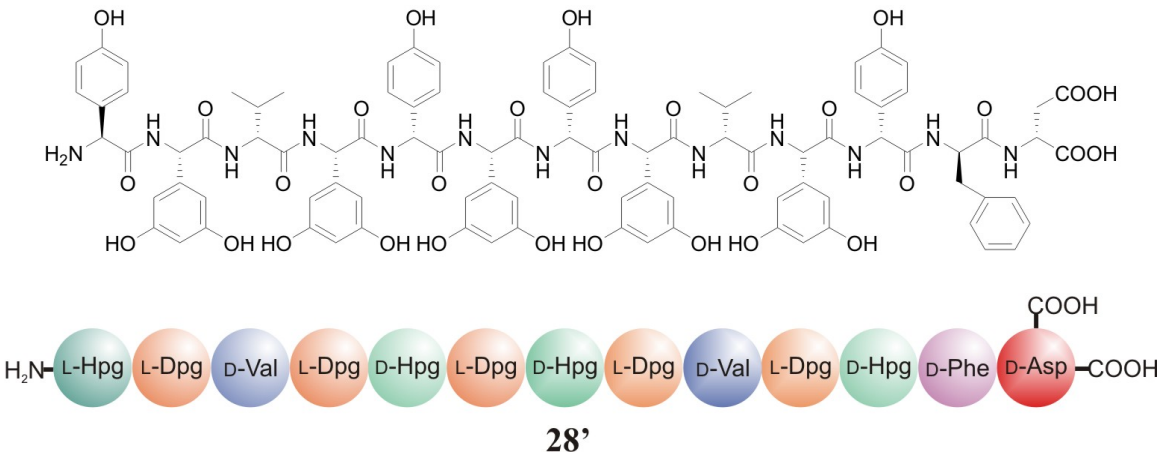
invertierte Substratspezifität aufwiesen.[158] Der Zugang zu racemischen Gemischen von L- und D-Peptiden bzw. Proteinen ist zusätzlich von Bedeutung für die Aufklärung der Sekundärstruktur mittels Kristallstrukturanalyse.[158b] Die experimentellen Daten racemischer Kristalle sind wesentlich besser auszuwerten, was zu einer höheren Genauigkeit der erhaltenen Ergebnisse führt.[159]

Betrachtet man die Auswirkung einer vollständigen Inversion der Konfiguration noch einmal speziell für biologisch aktive all-L-Peptiden, so ist der Erhalt der Wirksamkeit abhängig von dem individuellen *Target*. Bei Peptidhormonen wie z.B. Bradykinin zeigen die enantiomeren Peptide keinerlei Aktivität mehr, da ihre Wirkung auf der spezifischen Interaktion mit (chiralen) Rezeptoren basiert.[157a] Im Fall von antimikrobiellen Peptiden, wie z.B. dem im Bienengift enthaltenen Melittin, wurde im Gegensatz dazu festgestellt, dass beide Enantiomere die gleiche Wirksamkeit aufweisen.[157d] Dies liegt darin begründet, dass diese Verbindungen eine helikale Sekundärstruktur besitzen und in biologischen Membranen Poren ausbilden können. Die Helices der spiegelbildlichen Peptide besitzen dabei eine entgegengesetzte Händigkeit. Die Baustein der Membranen sind zwar auch chirale Moleküle, jedoch scheinen hier keine spezifischen Wechselwirkungen, sondern vielmehr hydrophobe Interaktionen zwischen den Aminosäureseitenketten und den Membranlipiden zu dominieren, die sich unabhängig von der Stereochemie der Moleküle ausbilden können.

Durch das Vorhandensein von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen sowie weiteren Enzymen des Sekundärmetabolismus sind viele Mikroorganismen bei der Produktion von Peptiden nicht auf die natürlichen L-Aminosäuren beschränkt.[106] Daher finden sich unter diesen peptidischen Substanzen eine ganze Reihe von Vertretern, die eine oder mehrere D-Aminosäuren enthalten. Feglymycin stellt dabei einen Sonderfall dar, denn dessen Sequenz enthält eine nahezu alternierende Abfolge von L- und D-Bausteinen. Da die genauen *Target*s und Wirkmechanismen für die biologische Aktivität von Feglymycin noch nicht mit Sicherheit bekannt sind, könnte die Synthese und Charakterisierung des spiegelbildlichen Isomers wichtige Hinweise darauf liefern, ob der Wirkung des Peptids eine spezifische, von der chiralen Umgebung abhängige Interaktion zugrunde liegt oder nicht. In Bezug auf die Stabilität in Gegenwart von Proteasen erwartet man für Feglymycin keinen Unterschied zwischen Bild und Spiegelbild, da beide Peptide L-Aminosäure enthalten, welche von Proteasen erkannt werden können.

### 3.2.1.1 Synthese

Der Aufbau des Feglymycin-Spiegelbilds (**28'**, Abbildung 45) erfolgte zum überwiegenden Teil unter Verwendung der Synthesestrategie, die von Herrn Dr. Frank Dettner für den Naturstoff ausgearbeitet und in Abschnitt 1.4.3 bereits erläutert wurde.[114]




**28'**

**Abbildung 45:** Das Feglymycin-Spiegelbild – alle Stereozentren sind invertiert.

Alle notwendigen proteinogenen Aminosäuren konnten dabei entsprechend geschützt käuflich erworben werden. Im Gegensatz zu dessen Enantiomer ist auch der 4-Hydroxy-D-phenylglycinmethylester kommerziell erhältlich. Für die Darstellung des 4-Hydroxy-D-phenylglycinbenzylester-Hydrochlorids (**82'**) kam eine andere Methode als bei der Feglymycin-Totalsynthese zum Einsatz, da bei einer direkten Benzylschützung der freien Aminosäure **36'** unter Verwendung von Benzylalkohol und Thionylchlorid eine teilweise Racemisierung beobachtet wurde (Abbildung 46).[160] Bei einer Benzylierung mit $Cs_2CO_3$ und Benzylbromid trat diese unerwünschte Nebenreaktion nicht auf.[161] Nachteil war jedoch, dass nicht die freie Aminosäure umgesetzt werden konnte. Eine Boc-Schützung dieser vor der eigentlichen Carboxy-Schützung verlief jedoch nahezu quantitativ.[162] Der mit dieser Reaktionssequenz erhaltene Baustein Boc–D-Hpg–OBzl (**81'**) konnte sehr gut durch Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt werden, wohingegen sich die Abtrennung des in der ersten Methode im Überschuss verwendeten Benzylalkohols besonders bei größeren Ansätzen als problematisch erwies. Sollte die voll geschützte Aminosäure **81'** in einer Peptidkupplung eingesetzt werden, so erfolgte kurz vor der Reaktion die schnelle und saubere Abspaltung der Aminoschutzgruppe unter Verwendung von 4 N HCl in Dioxan.[117]

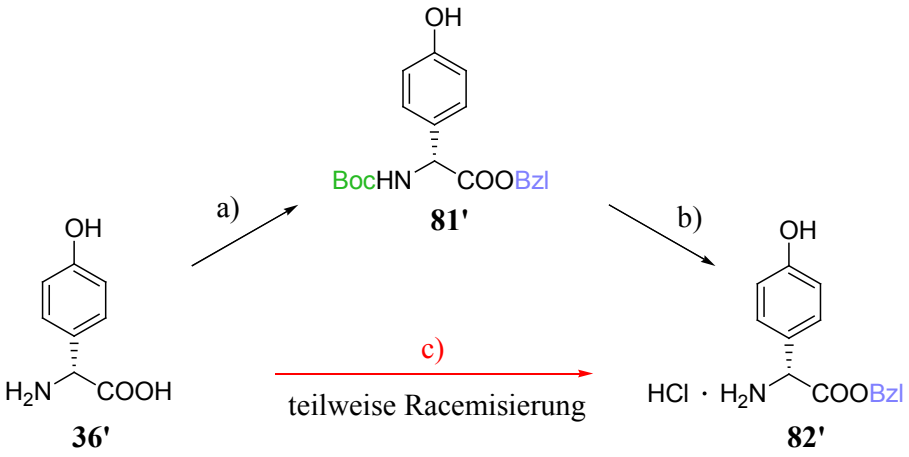



**Abbildung 46:** Syntheserouten zur Darstellung von HCl·H–D-Hpg–OBzl (**82'**). Bei der direkten Benzylierung kann es zu einer teilweisen Racemisierung der Aminosäure kommen.[160] Eine dreistufige Synthese über die einfach aufzureinigende Zwischenstufe Boc–D-Hpg–OBzl (**81'**) lieferte das Produkt **82** in guter Ausbeute ohne Racemisierung. a) 1. $Boc_2O$, NaOH, $H_2O$/Dioxan (1:1), RT, 24 h, quant.; 2. $Cs_2CO_3$, MeOH/$H_2O$ (10:1), RT, 30 min, quant.; 3. BzlBr, abs. DMF, RT, 24 h, 60 %; b) 4 N HCl/Dioxan, RT, 30 min, quant.; c) $SOCl_2$, BzlOH, 0 °C → RT → 80 °C, 24 h, 89 %.

Die Aminosäure Boc–L-Dpg$(OBzl)_2$–OH (**70'**) wurde analog zu deren Spiegelbild synthetisiert (Abbildung 29). Bei der asymmetrischen Aminohydroxylierung musste jedoch $(DHQ)_2$PHAL statt $(DHQD)_2$PHAL als chiraler Ligand eingesetzt werden.[121] Wie aus Abbildung 47 ersichtlich, verlief auch die Synthese von Aminoalkohol **69'** mit sehr guter Enantioselektivität (*ee* = 97 %).

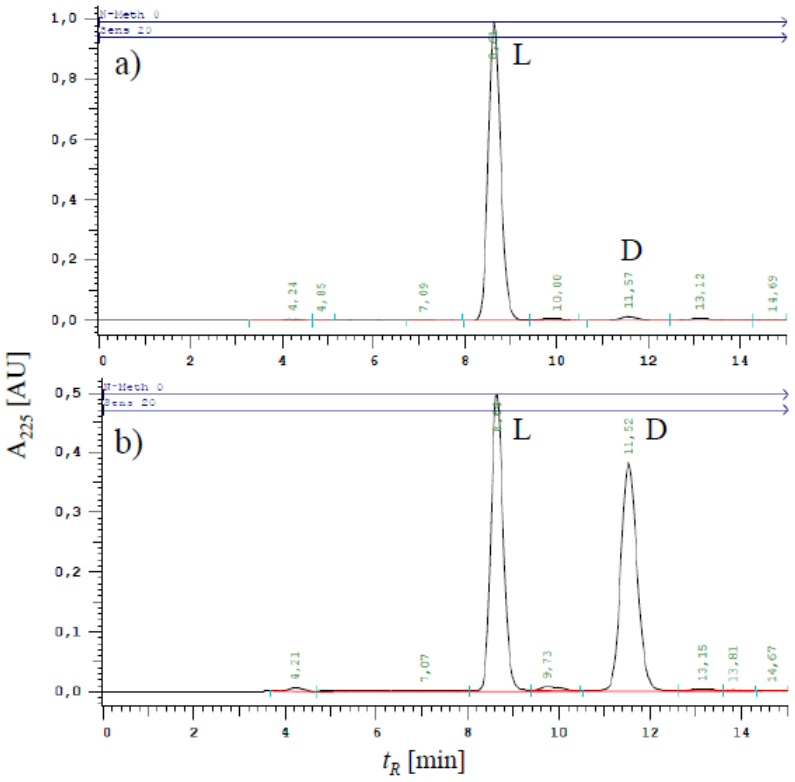



**Abbildung 47:** Chirale NP-HPLC-Analytik (*n*-Hexan/*i*-PrOH 1:1, 0.8 ml/min): a) L-Aminoalkohol **69'**, $t_R$ = 8.6 min, *ee* = 97 %; b) Aminoalkohol rac. als Referenz (der D-Aminoalkohol **69** wurde im Rahmen der Feglymycin-Totalsynthese hergestellt).

Da das Feglymycin-Spiegelbild nach erfolgter Synthese auf seine biologische Aktivität hin untersucht werden sollte, musste gewährleistet sein, dass die Verbindung in sehr guter Reinheit vorliegt. Das nach der finalen Fragmentkupplung erhaltene geschützte Tridecapeptid **40'** (vgl. Abschnitt 1.4.3) wurde daher in drei Stufen aufgereinigt (Abbildung 48). Durch einfaches Ausfällen mit $H_2O$ aus der Reaktionsmischung konnte das Kondensationsprodukt zunächst von dem Großteil der vom Aktivierungsreagenz DEPBT stammenden Nebenprodukte abgetrennt werden. Eine Aufreinigung des Rohpeptids mit Sephadex LH20 Größenausschlusschromatographie[163] und präparativer RP-HPLC lieferte schließlich das Produkt in sehr guter Reinheit.

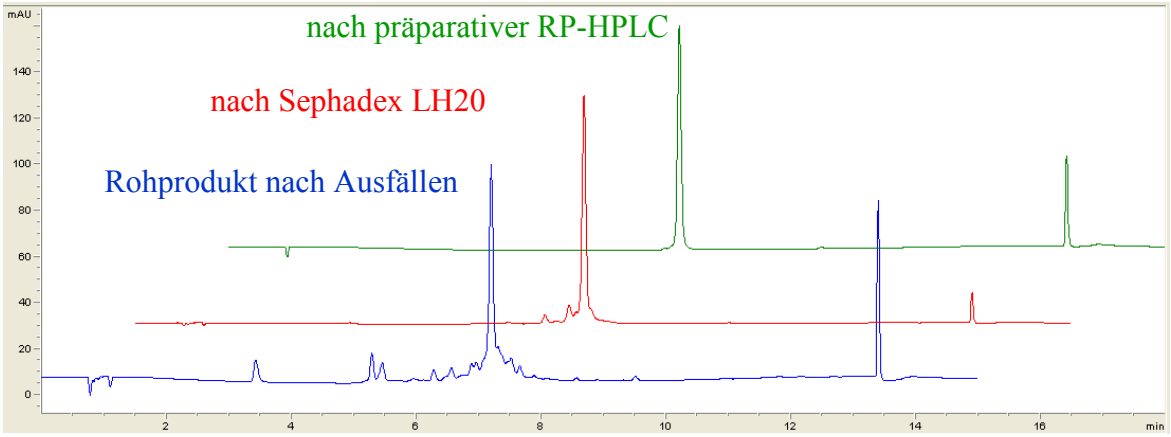



**Abbildung 48:** Anhand der gezeigten analytischen RP-HPLC-Chromatogramme wird die Verbesserung der Produktreinheit von Tridecapeptid **40'** durch die verschiedenen aufeinanderfolgenden Aufreinigungsschritte deutlich (Detektionswellenlängen: $\lambda$ = 280 nm, der verwendete Gradient kann Abschnitt 5.1.2 dieser Arbeit entnommen werden).

Das nach hydrogenolytischer Schutzgruppenabspaltung erhaltene Feglymycin-Enantiomer (**28'**) musste daher nicht mehr weiter aufgereinigt werden. Generell kann man sagen, das alle im Rahmen der Synthese des Feglymycin-Spiegelbilds durchgeführten Reaktionen, wie zu erwarten, mit vergleichbaren Ausbeuten abliefen wie die analogen Reaktionen zur Darstellung das natürlichen Peptids. Alle Bausteine wurden hinsichtlich ihres Drehwertes charakterisiert, wobei die Absolutwerte der jeweils enantiomeren Verbindungen im Rahmen der Fehlergrenzen sehr gute Übereinstimmung zeigten.[114]

Die CD-Spektren von Feglymycin und dessen Enantiomer sind nahezu exakt spiegelsymmetrisch, wobei sich auch für das Spiegelbild **28'** die Spektren in $H_2O$ und 20 % TFE/$H_2O$ nur geringfügig in Bezug auf die Intensität unterscheiden (Abbildung 49). Wie in Abschnitt 1.4.4 erläutert, weist das CD-Spektrum von Feglymycin auf eine β-helikale Struktur hin, wie es auch in der Röntgenstruktur der Fall ist.[96] Aufgrund der spiegelsymmetrischen CD-Spektren und der Annahme, dass die Händigkeit einer solchen helikalen Sekundärstruktur neben der räumlichen Lage der Endgruppen und der chemischen Umgebung hauptsächlich abhängig von der Aminosäuresequenz ist, sollte das Feglymycin-Spiegelbild in Lösung in Form einer Helix mit entgegengesetztem Drehsinn vorliegen. Der Naturstoff zeigt im Kristall eine rechtsgängige helikale Struktur, die Sekundärstruktur des Enantiomers wäre dementsprechend linksgängig. Eine derartige absolute Interpretation der Ergebnisse der CD-spektroskopischen Messungen ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da die CD-Banden von Feglymycin im verwendeten

Wellenlängenbereich wahrscheinlich erhebliche Anteile der aromatischen Chromophore enthalten. Die allgemeine Beobachtung, dass linksgängige Helices eine positive Bande im Bereich von λ = 205-215 nm zeigen,[164] muss in diesem Fall nicht mehr zutreffen. CD-Experimente mit dem Peptidantibiotikum Gramicidin A (**29**, Abbildung 23) haben dies bestätigt.[157e]

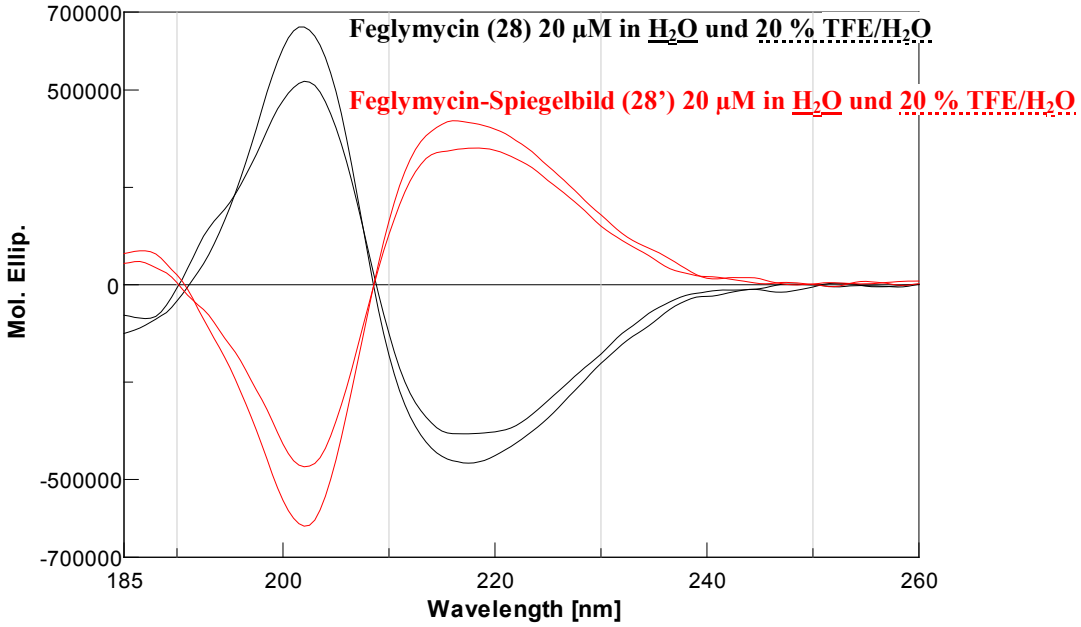



**Abbildung 49:** CD-Spektren von Feglymycin (**28**, 20 µM, schwarz) und Feglymycin-Spiegelbild (**28'**, 20 µM, rot) in $H_2O$ und 20 % TFE/$H_2O$. Wie zu erwarten sind die Spektren der enantiomeren Peptide nahezu exakt spiegelsymmetrisch.

Koeppe *et al.* synthetisierten dazu sowohl Gramicidin A (**29**), dessen Spiegelbild Gramicidin $A^-$ sowie das Derivat Gramicidin $M^-$, bei dem alle vier Tryptophane der Sequenz gegen Phenylalanin ausgetauscht und alle Stereozentren invertiert wurden.[157e] Der Aromat der Phenylalanin-Seitenkette ist ein wesentlich schwächeres Chromophor als der Indolring von Tryptophan, sodass die CD-Banden von Gramicidin $M^-$ im Wellenlängenbereich um 210 nm fast nur Anteile der Amid-Chromophore des Peptid-Rückgrates enthalten. Aus der beobachteten positiven Elliptizität (Abbildung 50c) kann daher geschlossen werden, dass dieses Peptid in Lösung eine linksgängige Helix ausbildet.[165] Es konnte nachgewiesen werden, dass auch die Sekundärstruktur von Gramicidin $A^-$ diese Händigkeit besitzt und dass Gramicidin A wie in der Röntgenstruktur eine rechtsgängige β-Helix ausbildet, obwohl in dessen CD-Spektrum um λ = 210 nm auch eine positive Elliptizität gemessen wird (Abbildung 50a).

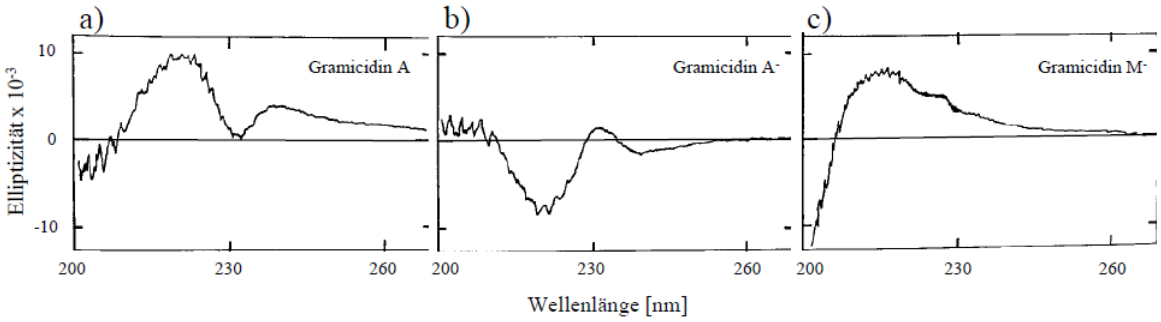
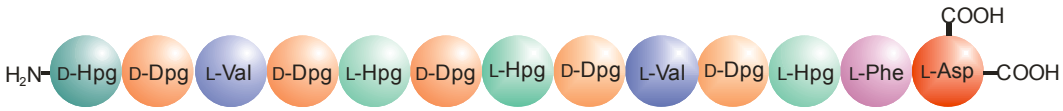



**Abbildung 50:** CD-Spektren von a) Gramicidin A, b) Gramicidin $A^-$ und c) Gramicidin $M^-$ dispergiert in unilamellaren DMPC-Vesikeln.[157e] Die positive Elliptizität um $\lambda$ = 210 nm weist im Fall von Gramicidin $M^-$ auf eine linksgängige helikale Struktur hin.[165] Gramicidin $A^-$ besitzt die gleiche Konfiguration der Aminosäuresequenz und bildet daher ebenfalls eine linksgängige Sekundärstruktur aus. Aufgrund des hohen Anteils der CD-Banden der Trp-Seitenketten in diesem Peptid zeigt das CD-Spektrum um $\lambda$ = 210 nm jedoch eine negative Elliptizität.

Aus der hohen Ähnlichkeit der Kristallstrukturen von Feglymycin und Gramicidin A sowie den Ergebnissen der CD-spektroskopischen Messungen kann geschlossen werden, dass Feglymycin wahrscheinlich auch in wässriger Lösung eine rechtsgängige β-helikale Struktur ausbildet. Sollte diese Annahme zutreffen, lässt sich jedoch anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht sagen, ob diese Helix ein- oder doppelsträngig ist.

### 3.2.1.2 Biologische Aktivität

Bereits im Rahmen der Untersuchungen zur antiviralen Aktivität von Feglymycin gegen das HI-Virus (vgl. Abschnitt 1.4.6.1) wurde nicht nur der Naturstoff selbst, sondern alle bei der Totalsynthese angefallenen Peptidfragmente sowie die entsprechenden Enantiomere getestet.[114] Die wichtigsten Ergebnisse sind in Abbildung 51 zusammengefasst. Erstaunlicherweise zeigte das Feglymycin-Spiegelbild eine identische Wirkung im HIV-Replikations*assay* wie der Naturstoff selbst. Auch das *N*-terminale Heptapeptidfragment **42** war noch sehr gut wirksam, für das *C*-terminale Hexapeptid **43** wurde jedoch ein kompletter Aktivitätsverlust beobachtet.

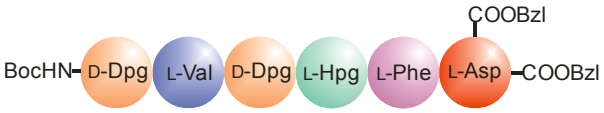



**28**

$IC_{50}$ = 1.1 µM; $CC_{50}$ > 50 µM
Enantiomer **28'**: $IC_{50}$ = 1.1 µM; $CC_{50}$ > 50 µM

**42**

$IC_{50}$ = 7.5 µM; $CC_{50}$ > 80 µM
Enantiomer **42'**: $IC_{50}$ = 7.5 µM; $CC_{50}$ > 80 µM




**43**

$IC_{50}$ > 90 µM; $CC_{50}$ > 90 µM
Enantiomer **43'**: $IC_{50}$ > 90 µM; $CC_{50}$ > 90 µM

**Abbildung 51:** Ausgewählte Ergebnisse der antiretroviralen Testierung ($IC_{50}$: 50 % Inhibitorkonzentration oder Substanzkonzentration, die notwendig ist, um den virus-induzierten zytopathischen Effekt (CPE) durch HIV-1 NL4.3 in humanen MT-4-Zellen zu inhibieren. $CC_{50}$: 50 % zytotoxische Konzentration oder Substanzkonzentration, die notwendig ist, um das Zellwachstum von MT-4-Zellen um 50 % zu inhibieren. Die Unterschiede in den $CC_{50}$-Werten kommen durch die Umrechnung von [µg/ml] in [µM] zustande, welche zur besseren Vergleichbarkeit durchgeführt wurde).[114]

Obwohl im Fall der anti-HIV-Testierung nur die geschützten Peptidfragmente **42** und **43** untersucht wurden, weisen die Ergebnisse doch erhebliche Parallelen zu denen der Inhibitions*assays* für die Mur-Enzyme auf (vgl. Abschnitt 1.4.6.3). Damit bestätigt sich auch für die antivirale Aktivität von Feglymycin die Hypothese, dass eine mögliche pharmakophore Region des Moleküls eher im *N*-terminalen Teil der Aminosäuresequenz liegt.

Erstaunlicherweise zeigte das Feglymycin-Spiegelbild in Bezug auf die antibakterielle Wirkung gegen ausgewählte *S. aureus*-Stämme ebenfalls nahezu keine Aktivitätsunterschiede im Vergleich mit dem Naturstoff. Auch die Inhibitionswirkung gegen das MurC-Enzym aus *E. coli* scheint unabhängig von der absoluten Konfiguration des Peptids an sich zu sein (Tabelle 4). Liegt das *Target* von Feglymycin tatsächlich in der Bakterienzelle, so muss es demnach auch einen von der Stereochemie des Peptids unabhängigen Transportmechanismus geben.

**Tabelle 4:** Antibakterielle Aktivität und Enzyminhibitionswirkung des Feglymycin-Spiegelbilds im Vergleich mit dem natürlichen Peptid. Detaillierte Informationen zu den durchgeführten Testierungen finden sich in Kapitel 5.3 dieser Arbeit.

| | **Feglymycin (28)** | **Feglymycin-Spiegelbild (28')** |
|---|---|---|
| **Antibakterielle Aktivität** | | |
| *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) | $IC_{80}$ = 0.16 µM | $IC_{80}$ = 0.37 µM |
| | MIC = 0.26 µM | MIC = 0.53 µM |
| *S. aureus* ATCC 33592 (MRSA) | $IC_{80}$ = 0.34 µM | $IC_{80}$ = 0.66 µM |
| | MIC = 0.53 µM | MIC = 1.05 µM |
| *S. aureus* ATCC 13709 (MSSA) | $IC_{80}$ = 0.29 µM | $IC_{80}$ = 0.31 µM |
| | MIC = 0.53 µM | MIC = 0.53 µM |
| **Enzyminhibition** | | |
| MurC (*E. coli*)[a] | $IC_{50}$ = 0.28 ± 0.14 µM | $IC_{50}$ = 0.59 ± 0.41 µM |

[a] Aufgrund der limitierten Substanzmenge wurde das Feglymycin-Spiegelbild zunächst nur auf eine Inhibition von MurC aus *E. coli* hin untersucht.

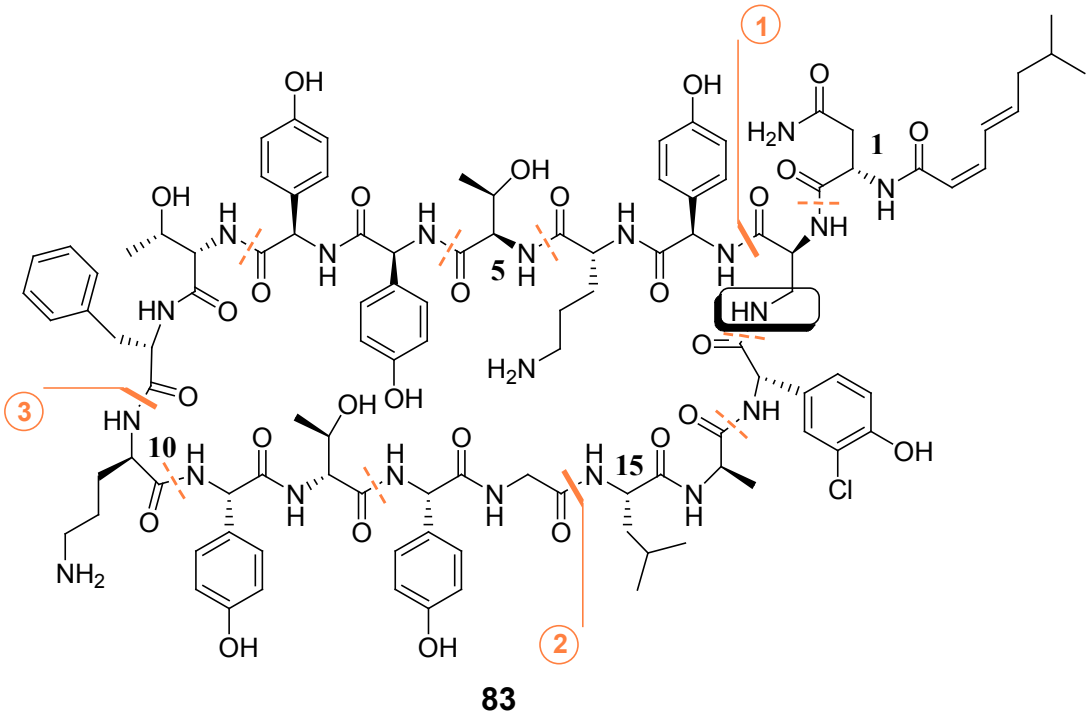
Zusammenfassend kann man für Feglymycin also sagen, dass bei allen durchgeführten Aktivitätstests offensichtlich kein Unterschied besteht zwischen Bild und Spiegelbild des Peptids. Dies weist darauf hin, dass sowohl der anti-HIV als auch der antibakteriellen Wirkung keine spezifische Bindung im aktiven Zentrum eines Enzyms bzw. Rezeptors zugrunde liegt. Ist die beschriebene helikale Sekundärstruktur von Feglymycin auch die aktive Konformation, so nehmen die phenolischen Seitenketten sowohl beim Feglymycin als auch bei dessen Spiegelbild nahezu die gesamte Oberfläche des Peptids ein, unabhängig von der Händigkeit der Helix. Möglicherweise ist daher lediglich das Vorhandensein der aromatischen Reste sowie der zahlreichen Hydroxy-Funktionen der entscheidende Faktor.

### 3.2.2 Der Alanin-Scan von Feglymycin

Der Alanin-Scan ist eine klassische Methode im Bereich der Medizinalchemie von biologisch aktiven Peptiden.[10] Dabei wird jede Aminosäure der Sequenz unter Erhalt der Konfiguration systematisch mithilfe organisch-synthetischer oder molekularbiologischer Methoden gegen Alanin, eine der strukturell einfachsten Aminosäuren, ausgetauscht. Anhand von Aktivitätstests wird dann die Auswirkung dieser Substitution untersucht.[166] Glycin wird in diesem Zusammenhang i.d.R. bewusst nicht verwendet, da es aufgrund des nicht vorhandenen Stereozentrums am $C_\alpha$-Atom die Sekundärstruktur von Peptiden stören kann. Ein Alanin-Scan kann Auskunft darüber geben, ob bestimmte Aminosäuren oder ganze Peptidabschnitte mehr oder weniger wichtig für die biologische Wirkung sind. Weiterhin können Informationen über die Art der Wechselwirkung mit einem bestimmten *Target* erhalten werden. Führt beispielsweise der Austausch von in der Seitenkette geladenen Aminosäuren wie Lysin oder Asparaginsäure zu einem Aktivitätsabfall, so sind möglicherweise ionische Wechselwirkungen am Wirkort von größerer Bedeutung. Diese Erkenntnisse sind insbesondere dann wichtig, wenn eine strukturell sehr komplexe peptidische Verbindung untersucht wird, welche z.B. nur durch eine aufwendige Totalsynthese zugänglich ist. Findet man durch einen Alanin-Scan heraus, dass sich der Austausch bestimmter Bausteine nicht oder nur in geringem Maße auf die Aktivität auswirkt, so kann das Peptid strukturell wesentlich vereinfacht werden. Ist der Austausch von empfindlichen Aminosäuren wie Cystein in der Aminosäuresequenz möglich, so kann dies zusätzlich zu einer erhöhten metabolischen Stabilität und damit zu verbesserten pharmakologischen Eigenschaften führen.

Das antibakteriell wirksame Lipoglycodepsipeptid Ramoplanin A2 (**15**, Abbildung 9) ist, wie schon zuvor beschrieben, strukturell ähnlich zu Feglymycin. Die Totalsynthese dieses Naturstoffes basiert auch auf einer vergleichbaren Strategie: 1. Aufbau des Peptidrückgrates durch Kupplung von Di- und Tripeptidbausteinen, 2. Aktivierung der racemisierungsempfindlichen Hydroxyphenylglycine mit DEPBT, 3. minimale Verwendung von Seitenkettenschutzgruppen, 4. finale Fragmentkondensation der Oligopeptide.[116] Durch den modularen Charakter der Synthesestrategie konnte ein Alanin-Scan für Ramoplanin A2 mit verringertem Aufwand von der Arbeitsgruppe um D. L. Boger realisiert werden.[166f] Dabei wurde jedoch nicht der Naturstoff als

Ausgangspeptid verwendet, sondern das [L-Dap$^2$]-Ramoplanin A2 Aglycon (**83**, Abbildung 52). Dieses Derivat enthält nicht die Disaccharideinheit in der Seitenkette von L-Hpg$^{11}$ sowie L-2,3-Diaminopropionsäure (L-Dap) statt L-Hydroxyasparagin in Position 2 der Sequenz. Damit wurde die hydrolyseempfindliche Esterbindung durch eine stabilere Amidbindung ersetzt. Zuvor konnte gezeigt werden, dass diese Modifikationen, welche die Totalsynthese in Lösung wesentlich vereinfachen, keinen Einfluss auf die biologische Wirkung des Originalpeptids haben.[167] Im Zuge des Alanin-Scans von [L-Dap$^2$]-Ramoplanin A2 Aglycon erfolgte der Austausch von 14 der insgesamt 17 Aminosäuren, wobei L-Asn$^1$, L-Dap$^2$, Gly$^{14}$ sowie D-Ala$^{16}$ nicht substituiert wurden.




**83**

**Abbildung 52:** Struktur von [L-Dap$^2$]-Ramoplanin A2 Aglycon (**83**). Für den Alanin-Scan erfolgte die Aufteilung des Peptids in drei Fragmente, welche durch Kondensation von Di- und Tripeptideinheiten aufgebaut wurden.

Die antibakterielle Testierung gegen *S. aureus* ATCC 25923 zeigte, dass der Austausch von D-Orn$^{10}$ gegen D-Ala mit dem größten Aktivitätsabfall verbunden ist (> 500-fache Erhöhung des MIC-Wertes). Dies bestätigte die Vermutung, dass die unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Seitenkette dieser Aminosäure möglicherweise essenziell für eine stabilisierende Bindung von Ramoplanin an die Diphosphateinheit von Lipid II ist. Weiterhin hatte eine Substitution von D-Hpg$^3$, D-Orn$^4$, D-Hpg$^7$ und L-Leu$^{15}$ eine starke Erhöhung der MIC-Werte zur Folge (40- bis 74-fach). Es scheint also auch zuzutreffen,

dass die ungewöhnliche Aminosäure 4-Hydroxyphenylglycin eine nicht unerhebliche Rolle bei der biologischen Wirkung des Moleküls spielt. Denkbar ist, dass z.B. die phenolischen Hydroxy-Gruppen durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen eine Interaktion mit dem *Target* stabilisieren. Interessant ist außerdem, dass der Austausch von L-Chp[17] gegen L-Ala den geringsten Effekt auf die antibakterielle Wirkung hatte, sodass diese Position im Rahmen weiterer Studien für synthetische Modifikationen prädestiniert ist. Zusammenfassend muss jedoch gesagt werden, dass die Bedeutung nahezu jeder Aminosäure für die biologische Aktivität von [L-Dap[2]]-Ramoplanin A2 Aglycon signifikant ist. Dies macht die Modifikation des Moleküls durch den Einbau strukturell einfacherer Bausteine schwierig, da sehr wahrscheinlich nicht nur ein kleiner Teil der Sequenz, sondern vielmehr das gesamte Peptid aufgrund seiner Kompaktheit und der ausgeprägten Sekundärstruktur als Pharmakophor fungiert.

Durch die ähnliche Strategie für die Totalsynthese ist ein Alanin-Scan für Feglymycin mit vergleichbarem Aufwand realisierbar wie für das [L-Dap[2]]-Ramoplanin A2 Aglycon. Diese erste Studie in Bezug auf eine Struktur-Aktivität-Wirkungsbeziehung soll Hinweise darauf geben, welche Bedeutung die im Feglymycin vorkommenden Aminosäuren für die biologische Aktivität des Peptids haben. In diesem Zusammenhang sind besonders die in der Sequenz dominierenden, nicht-proteinogenen Aminosäuren Hpg und Dpg von großem Interesse. Ziel ist außerdem, Aminosäuren zu identifizieren, die sowohl für die Ausbildung der Sekundärstruktur als auch für die biologischen Effekte des Peptids nicht essenziell sind. So könnte die Primärstruktur vereinfacht und damit die Totalsynthese von aktiven Derivaten wesentlich erleichtert werden. Zusammen mit den ersten Testierungsergebnissen für Peptidfragmente des Feglymycin-Moleküls sollen Rückschlüsse auf das Vorhandensein einer pharmakophoren Region gezogen werden.

#### 3.2.2.1 Synthese und analytische Charakterisierung

Für einen vollständigen Alanin-Scan von Feglymycin ist die Darstellung von 13 neuen Tridecapeptiden notwendig (Abbildung 53). Dabei ist es wichtig, dass man die Konfiguration der jeweils ausgetauschten Aminosäure beibehält, damit die Ausbildung der Sekundärstruktur möglichst wenig beeinflusst wird.

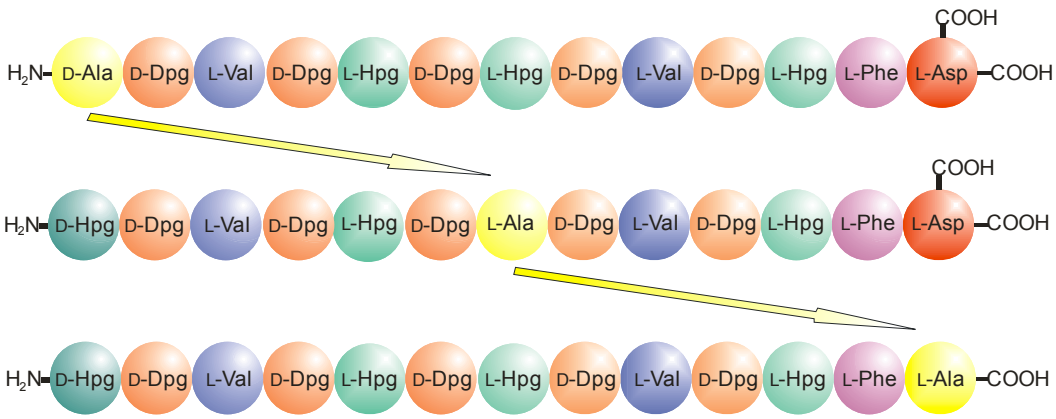



**Abbildung 53:** Für einen Alanin-Scan von Feglymycin wird jede Aminosäure unter Beibehaltung der absoluten Konfiguration gegen Alanin ausgetauscht. Dies erfordert die Synthese von 13 neuen Peptiden.

Wie aus Abbildung 54 deutlich wird, muss für die Synthese eines Feglymycin-Derivates mit einer Aminosäuresubstitution nicht das komplette Molekül neu aufgebaut werden. Es ist lediglich erforderlich, einen der Dipeptidbausteine zu verändern. Da Feglymycin für dessen weitere Charakterisierung in Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern nach der ersten Totalsynthese noch einmal in größerem Maßstab hergestellt wurde, standen zu Beginn der Arbeiten für den Alanin-Scan alle notwendigen Peptidfragmente in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Durch die Kombinationsmöglichkeiten dieser mit den neu zu synthetisierenden Ala-Scan-Dipeptidbausteinen durch Fragmentkupplungen in Lösung konnte der Arbeitsaufwand auf ein überschaubares Maß reduziert werden.

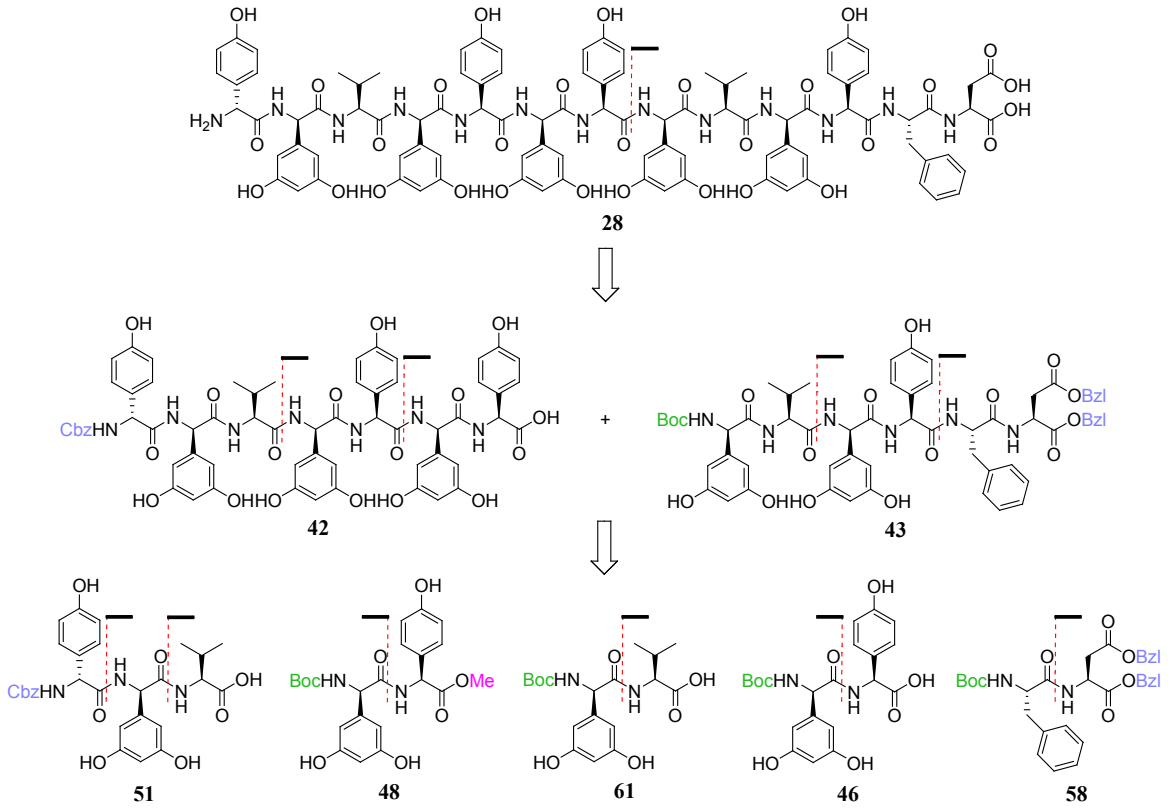
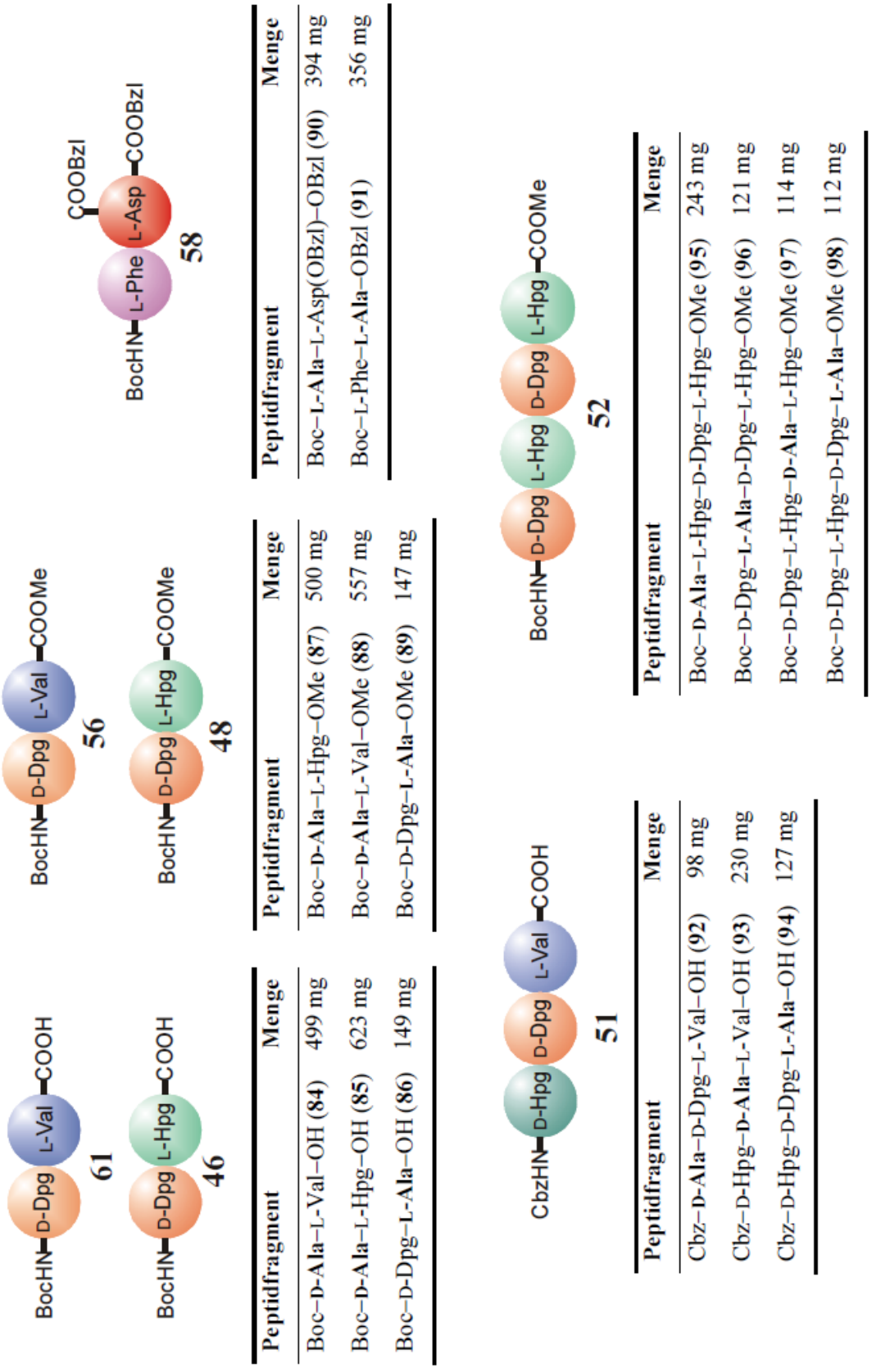



**Abbildung 54:** Die flexible Totalsynthesestrategie für Feglymycin ausgehend von nur fünf verschiedenen Dipeptiden sowie von Cbz–D-Hpg–OH ermöglicht den schnellen Aufbau von Derivaten.[114] Durch dieses Baukastenprinzip muss dabei nie das gesamte Molekül von Grund auf neu synthetisiert werden, sondern bestehende Fragmente werden nur mit neuen Dipeptidbausteinen kombiniert.

Alle für dieses Projekt synthetisierten Peptidbausteine mit den entsprechenden Mengen sind in Abbildung 55 und Abbildung 56 zusammengefasst. Die Originalpeptide sind zur besseren Übersichtlichkeit im Kugelmodel über den jeweiligen Peptidgruppen abgebildet.




| Peptidfragment | Menge |
|---|---|
| Boc–D-Ala–L-Val–OH (84) | 499 mg |
| Boc–D-Ala–L-Hpg–OH (85) | 623 mg |
| Boc–D-Dpg–L-Ala–OH (86) | 149 mg |

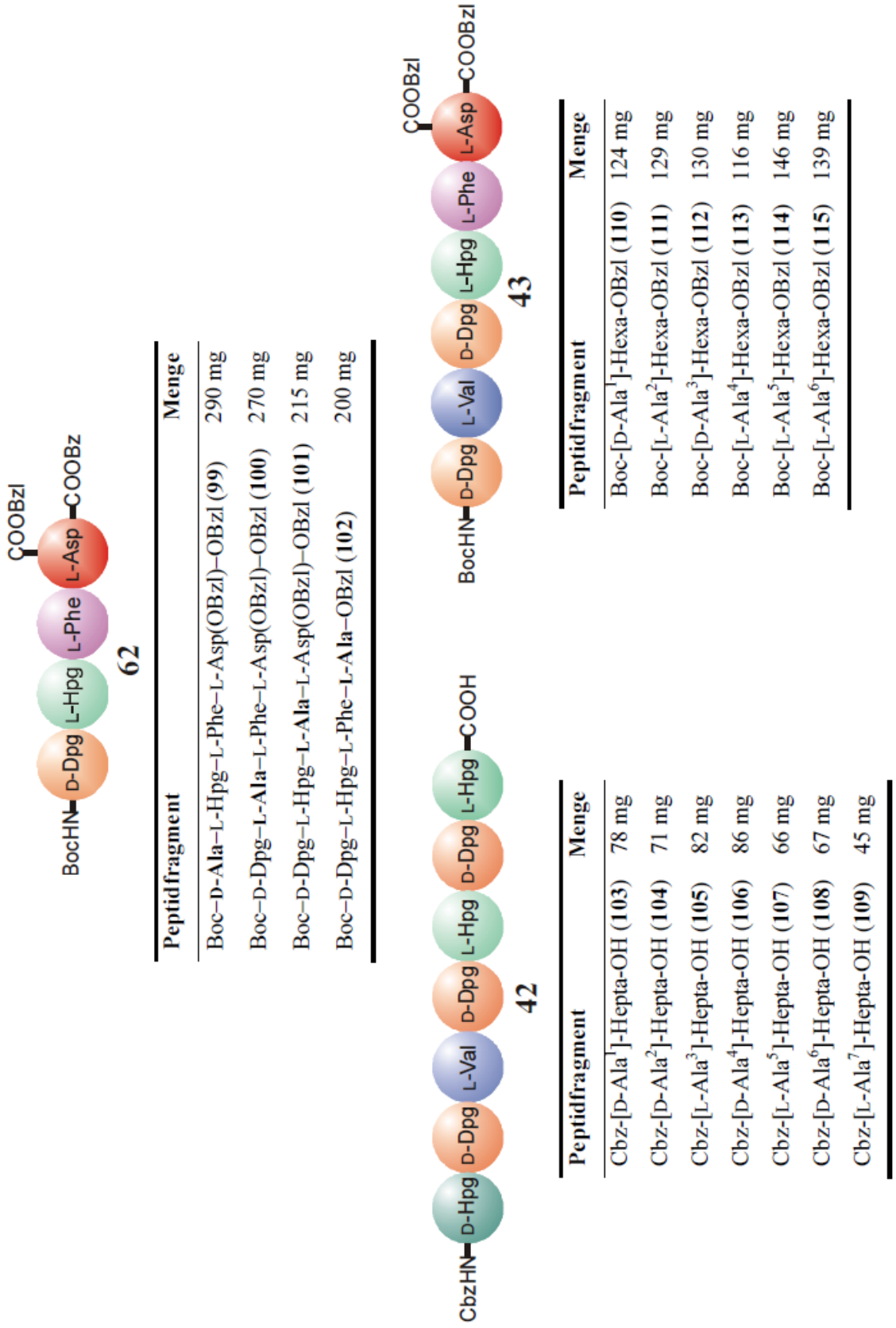
| Peptidfragment | Menge |
|---|---|
| Boc–D-Ala–L-Hpg–OMe (87) | 500 mg |
| Boc–D-Ala–L-Val–OMe (88) | 557 mg |
| Boc–D-Dpg–L-Ala–OMe (89) | 147 mg |

| Peptidfragment | Menge |
|---|---|
| Boc–L-Ala–L-Asp(OBzl)–OBzl (90) | 394 mg |
| Boc–L-Phe–L-Ala–OBzl (91) | 356 mg |

| Peptidfragment | Menge |
|---|---|
| Cbz–D-Ala–D-Dpg–L-Val–OH (92) | 98 mg |
| Cbz–D-Hpg–D-Ala–L-Val–OH (93) | 230 mg |
| Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Ala–OH (94) | 127 mg |

| Peptidfragment | Menge |
|---|---|
| Boc–D-Ala–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–OMe (95) | 243 mg |
| Boc–D-Dpg–L-Ala–D-Dpg–L-Hpg–OMe (96) | 121 mg |
| Boc–D-Dpg–L-Hpg–D-Ala–L-Hpg–OMe (97) | 114 mg |
| Boc–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Ala–OMe (98) | 112 mg |

**Abbildung 55:** Synthetisierte Peptidfragmente für den Feglymycin-Alanin-Scan.




| Peptidfragment | Menge |
|---|---|
| Boc–D-Ala–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl (**99**) | 290 mg |
| Boc–D-Dpg–L-Ala–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl (**100**) | 270 mg |
| Boc–D-Dpg–L-Hpg–L-Ala–L-Asp(OBzl)–OBzl (**101**) | 215 mg |
| Boc–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Ala–OBzl (**102**) | 200 mg |

| Peptidfragment | Menge |
|---|---|
| Cbz-[D-Ala$^1$]-Hepta-OH (**103**) | 78 mg |
| Cbz-[D-Ala$^2$]-Hepta-OH (**104**) | 71 mg |
| Cbz-[L-Ala$^3$]-Hepta-OH (**105**) | 82 mg |
| Cbz-[D-Ala$^4$]-Hepta-OH (**106**) | 86 mg |
| Cbz-[L-Ala$^5$]-Hepta-OH (**107**) | 66 mg |
| Cbz-[D-Ala$^6$]-Hepta-OH (**108**) | 67 mg |
| Cbz-[L-Ala$^7$]-Hepta-OH (**109**) | 45 mg |

| Peptidfragment | Menge |
|---|---|
| Boc-[D-Ala$^1$]-Hexa-OBzl (**110**) | 124 mg |
| Boc-[L-Ala$^2$]-Hexa-OBzl (**111**) | 129 mg |
| Boc-[D-Ala$^3$]-Hexa-OBzl (**112**) | 130 mg |
| Boc-[L-Ala$^4$]-Hexa-OBzl (**113**) | 116 mg |
| Boc-[L-Ala$^5$]-Hexa-OBzl (**114**) | 146 mg |
| Boc-[L-Ala$^6$]-Hexa-OBzl (**115**) | 139 mg |

**Abbildung 56:** Synthetisierte Peptidfragmente für den Feglymycin-Alanin-Scan.

Generell kann man sagen, das nahezu alle Alanin-Scan-Peptide einfacher aufzureinigen waren als die ursprünglichen Bausteine. Dies war insbesondere bemerkbar, wenn ein Austausch von Hpg oder Dpg gegen Ala vorgenommen wurde. Durch die damit einhergehende Deletion einer phenolischen Seitenkette zeigten die Peptide ein sehr viel besseres Elutionsverhalten bei der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel. Die Produktbanden waren i.d.R. schmaler, sodass eine verbesserte Trennung und damit auch Reinheit erhalten werden konnte. Bei der Aufreinigung der Hexa- bzw. Heptapeptide war aufgrund der schlechten Löslichkeit in EtOAc oder auch DCM keine Extraktion dieser Peptide aus der mit $H_2O$ verdünnten Reaktionsmischung mehr möglich. Durch einfaches Ausfällen dieser Oligopeptide durch Zugabe von $H_2O$ im Überschuss konnte dieses Problem jedoch leicht behoben werden. Die Abtrennung mitausgefällter Nebenprodukte erfolgte im Anschluss unter Verwendung einer Kieselgelsäule, wobei aufgrund der hohen Polarität der Bausteine die Lösungsmittelsysteme $CHCl_3$/MeOH oder DCM/MeOH verwendet werden mussten. Die nach der finalen Fragmentkupplung erhaltenen geschützten Tridecapeptide wurden, wie schon zuvor beschrieben (vgl. Abschnitt 3.2.1.1), nach dem Ausfällen über eine Sephadex LH20-Säule aufgereinigt, da diese Peptide nur noch gut in MeOH, teilweise auch in AcN, löslich waren. Durch Verwendung des FPLC-Systems ÄKTApurifier 10 (*GE Healthcare*) konnten die Trennungen für jede Verbindung unter den gleichen konstanten Bedingungen (4 °C, 0.2 ml/min Flussrate) durchgeführt werden. Dabei fiel auf, dass die Peptide nicht nach einer Zeit eluierten, die man aufgrund der Molekülgröße erwartet hätte. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass phenolische Verbindungen besonders starke Adsorptionseffekte an Dextranen[†††] zeigen, sodass die Elutionszeit nicht mehr nur vom Diffusionsvermögen in die Materialporen abhängig ist.[163] Trotzdem erhielt man nach der Größenausschlusschromatographie schon sehr reine Produktfraktionen. Um die Arbeiten für den Alanin-Scan von Feglymycin schnell voranzutreiben, wurden nur die saubersten Fraktionen vereinigt und weiter verwendet. Nach der folgenden finalen Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC wurde genauso verfahren. Damit konnte gewährleistet werden, dass das jeweils für die letzte Schutzgruppenabspaltung verwendete Tridecapeptid absolut frei von Verunreinigungen ist (vgl. Abbildung 48). Die nach der rückstandsfreien *N*- und *C*-terminalen Entschützung mit Pd/C (10 %) und $H_2$ in MeOH erhaltenen

††† Sephadex-Material besteht aus verzweigten, neutralen Polysacchariden, den sogenannten Dextranen. Sephadex wurde zuerst von der Firma *Pharmacia* vertrieben und leitet sich ab von *separation Pharmacia dextran*.

Ala-Scan-Feglymycin-Derivate konnten daher direkt für die analytische Charakterisierung und die biologischen Testierungen verwendet werden. Nachteil an dieser Vorgehensweise ist, dass die Bestimmung der Gesamtausbeuten für die Fragmentkondensationsschritte nicht möglich war. Man kann jedoch sagen, dass trotz des i.d.R. nahezu vollständigen Reaktionsumsatzes, welcher mittels analytischer RP-HPLC verfolgt wurde, die Aufreinigungsschritte mit nicht unerheblichen Produktverlusten verbunden waren. Dies wurde vorerst in Kauf genommen, denn das Ziel bestand zunächst darin, möglichst reine Peptide zu erhalten. In Tabelle 5 sind die synthetisierten Mengen der einzelnen Alanin-Derivate von Feglymycin aufgeführt. Die Retentionszeiten der analytischen RP-HPLC zeigen deutlich, dass sich der Austausch der Aminosäuren gegen Alanin fast bei keinem Derivat stark auf die Polarität des Moleküls auswirkte. Lediglich [L-Ala$^{12}$]-Feglymycin (**127**) ist durch den Wegfall der hydrophoben Phenylalanin-Seitenkette etwas polarer als Feglymycin selbst.

**Tabelle 5:** Alanin-Scan-Feglymycin-Derivate: synthetisierte Mengen und Retentionszeiten der analytischen RP-HPLC (der verwendete Gradient kann Kapitel 5.1.2 dieser Arbeit entnommen werden).

| **Verbindung** | **substituierte Aminosäure** | **Menge** | **Retentionszeit** |
|---|---|---|---|
| Feglymycin (**28**) | - | - | 3.8 min |
| [D-Ala$^{1}$]-Feglymycin (**116**) | D-Hpg | 5.4 mg | ~ 5 min[a] |
| [D-Ala$^{2}$]-Feglymycin (**117**) | D-Dpg | 6.0 mg | 3.7 min |
| [L-Ala$^{3}$]-Feglymycin (**118**) | L-Val | 2.6 mg | 3.6 min |
| [D-Ala$^{4}$]-Feglymycin (**119**) | D-Dpg | 6.9 mg | 4.0 min |
| [L-Ala$^{5}$]-Feglymycin (**120**) | L-Hpg | 4.7 mg | 3.9 min |
| [D-Ala$^{6}$]-Feglymycin (**121**) | D-Dpg | 5.4 mg | 3.7 min |
| [L-Ala$^{7}$]-Feglymycin (**122**) | L-Hpg | 3.7 mg | 3.9 min |
| [D-Ala$^{8}$]-Feglymycin (**123**) | D-Dpg | 8.5 mg | 3.6 min |
| [L-Ala$^{9}$]-Feglymycin (**124**) | L-Val | 7.3 mg | 3.6 min |
| [D-Ala$^{10}$]-Feglymycin (**125**) | D-Dpg | 9.3 mg | 4.1 min |
| [L-Ala$^{11}$]-Feglymycin (**126**) | L-Hpg | 6.4 mg | 3.9 min |
| [L-Ala$^{12}$]-Feglymycin (**127**) | L-Phe | 3.4 mg | 3.4 min |
| [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (**128**) | L-Asp | 9.0 mg | 3.7 min |

[a] Dieses Peptid eluierte als sehr breiten Peak von der Säule.

Etwas deutlichere Auswirkungen hatte die Substitution von D-Hpg[1] gegen D-Ala, denn schon das entsprechende geschützte Tridecapeptid war im Gegensatz zu allen anderen Peptiden nur sehr schlecht in MeOH, dafür besser in AcN löslich. Die notwendige hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung zur Synthese von [D-Ala[1]]-Feglymycin (**116**) war daher nur in einem Lösungsmittelgemisch von MeOH und DMF möglich, wobei sich durch die schlechte Löslichkeit die Reaktionszeit erhöhte. Das entschützte Peptid zeigte außerdem im RP-HPLC-Chromatogramm keinen deutlichen Peak, sondern eluierte nur sehr schlecht von der Säule. Dies ließ vermuten, dass der Austausch der *N*-terminalen Hydroxyphenylglycin-Aminosäure möglicherweise die Struktur des Peptids in Lösung nachhaltig beeinflusst. Für die weitere Charakterisierung der Peptide des Alanin-Scans wurden Stammlösungen in $H_2O$ hergestellt. Dabei zeigte sich deutlich, dass einige Derivate wesentlich schlechter löslich waren als Feglymycin, welches eine sehr gute Wasserlöslichkeit aufweist (Abbildung 57). Diese qualitative Beobachtung in Bezug auf die Polarität korreliert jedoch nicht mit den Retentionszeiten der RP-HPLC-Analytik.

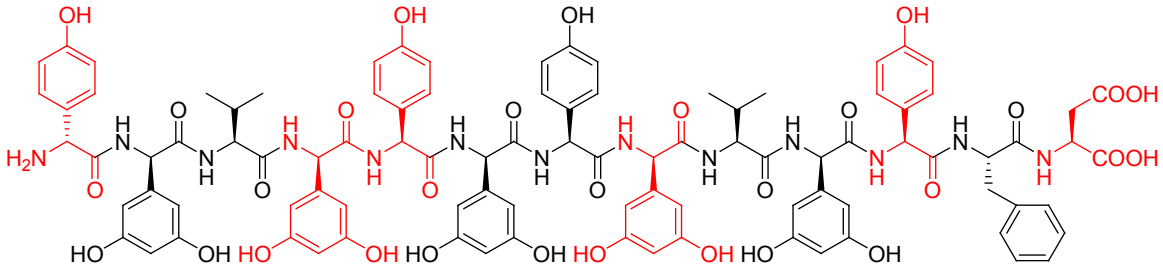


**Abbildung 57:** Ein Austausch der rot gekennzeichneten Aminosäuren gegen Alanin führte zu einer schlechteren Löslichkeit des entsprechenden Feglymycin-Derivates in Wasser.

Die CD-Spektroskopie ist eine besonders einfache und schnelle Methode zur Untersuchung von Konformationsänderungen von Peptiden in Lösung. Um zu überprüfen, ob sich ein Aminosäureaustausch gegen Alanin im Feglymycin-Molekül auf dessen Sekundärstruktur auswirkt, wurden CD-Spektren aller Peptide sowohl in $H_2O$ als auch in 20 % TFE/$H_2O$ aufgenommen. Da die Spektren fast aller Derivate, wie auch schon für Feglymycin beschrieben (vgl. Abschnitt 1.4.4), nahezu keinen Unterschied in den beiden Lösungsmitteln zeigten, wird im Folgenden nur auf die Messungen in $H_2O$ eingegangen.

Abbildung 58 zeigt, dass sich eine Substitution der beiden Valine in Position 3 und 9 der Aminosäuresequenz kaum auf die Form und Intensität der CD-Signale auswirkt. Dies war auch zu erwarten, da aus dem Ersatz von Valin durch Alanin aufgrund der doch sehr ähnlichen Polarität und Größe der Seitenketten Peptidderivate resultieren, welche sich strukturell nur unwesentlich vom Originalpeptid unterscheiden.

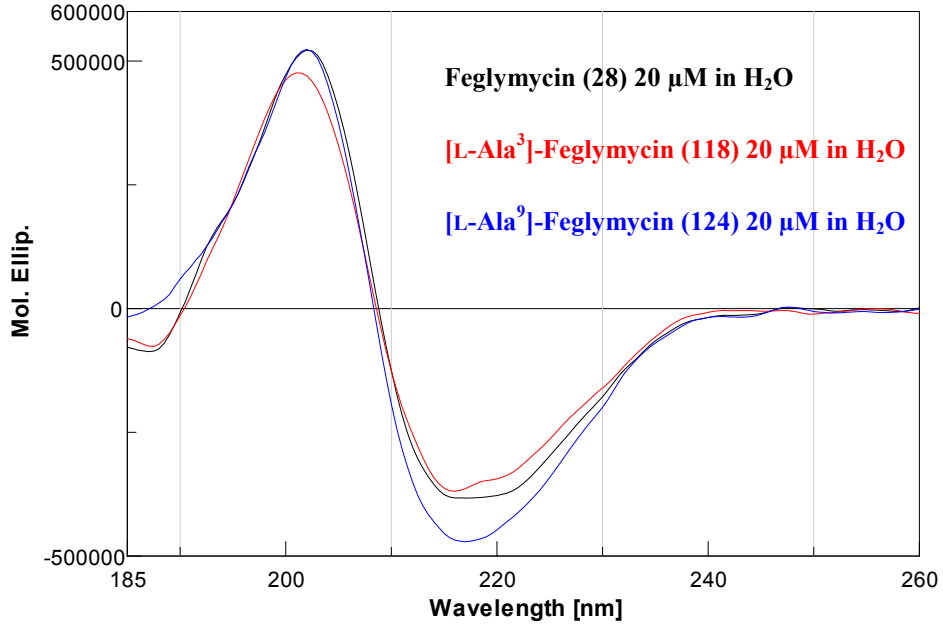



**Abbildung 58:** CD-Spektren von Feglymycin (20 µM in $H_2O$, schwarz) und von Feglymycin-Derivaten, in denen Valin gegen Alanin ausgetauscht wurde.

Die CD-Spektren der vier Derivate, bei denen 4-Hydroxyphenylglycin gegen Alanin ausgetauscht wurde, zeigen etwas deutlichere Abweichungen zum Spektrum von Feglymycin (Abbildung 59). Dabei ist eine Verschiebung der Extrema bei [D-Ala$^1$]-Feglymycin (**116**) besonders deutlich zu erkennen. Dies korreliert möglicherweise mit der für dieses Derivat beobachteten Löslichkeitsverschlechterung, welche auch auf eine Veränderung der Sekundärstruktur in Lösung zurückzuführen sein könnte. Das CD-Spektrum von [L-Ala$^7$]-Feglymycin (**122**) weist ein zusätzliches Minimum bei $\lambda$ = 195 nm auf. Generell fällt auf, dass es stärkere Unterschiede im Bereich der positiven Elliptizität zwischen $\lambda$ = 185 nm und $\lambda$ = 210 nm gibt.

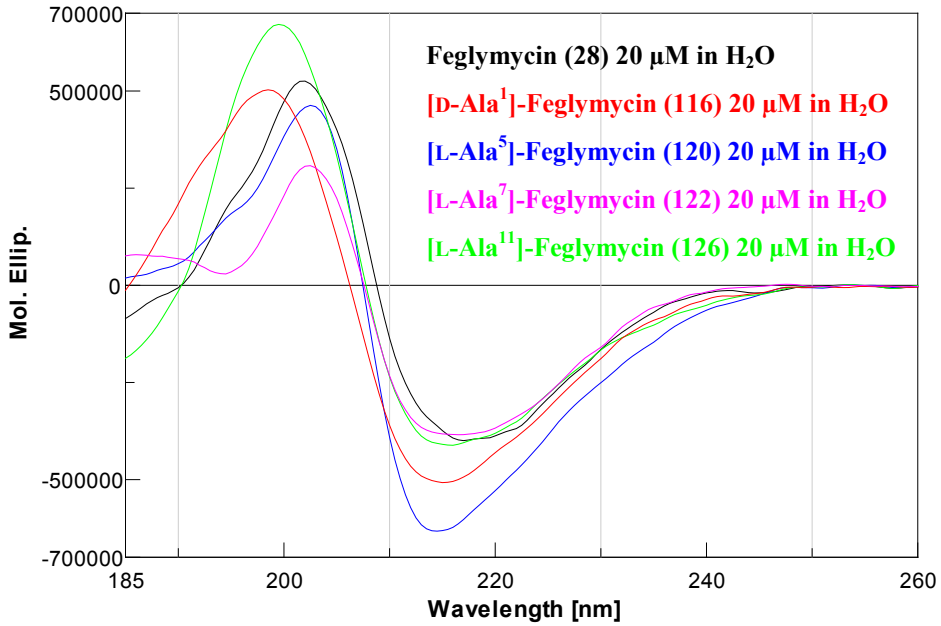



**Abbildung 59:** CD-Spektren von Feglymycin (20 µM in $H_2O$, schwarz) und von Feglymycin-Derivaten, in denen 4-Hydroxyphenylglycin gegen Alanin ausgetauscht wurde.

Die Spektren für alle [Dpg → Ala]-Feglymycin-Derivate zeigen wieder eine sehr hohe Ähnlichkeit zum Spektrum von Feglymycin (Abbildung 60). Lediglich für [D-Ala$^4$]-Feglymycin (**119**) und [D-Ala$^{10}$]-Feglymycin (**125**) wurde im Wellenlängenbereich von 210-230 nm eine weniger intensive Elliptizität gemessen, was auf eine etwas weniger geordnete Struktur hinweisen kann.[124] Außerdem fällt noch auf, dass die Spektren aller Peptide wie auch das von Feglymycin selbst im Vergleich zu den [Hpg → Ala]-Derivaten unter $\lambda$ = 190 nm eine negative Elliptizität zeigen. Eine Interpretation von Messwerten in diesem Wellenlängenbereich ist jedoch sehr vage, da hier sowohl das Lösungsmittel als auch der in diesem gelöste Sauerstoff eine nicht unerhebliche Eigenabsorption besitzen.

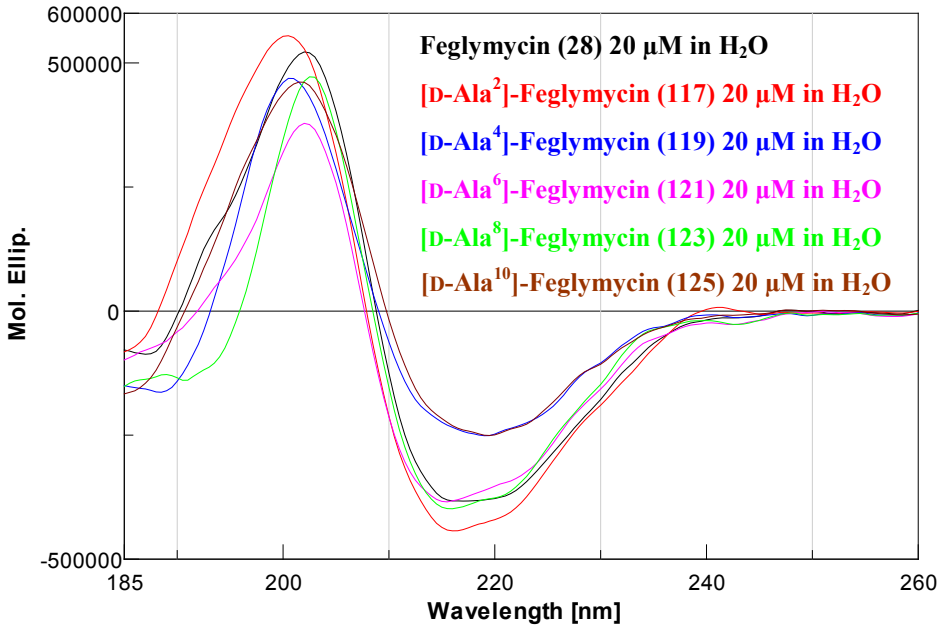



**Abbildung 60:** CD-Spektren von Feglymycin (20 µM in $H_2O$, schwarz) und von Feglymycin-Derivaten, in denen 3,5-Dihydroxyphenylglycin gegen Alanin ausgetauscht wurde.

Der größte Effekt zeigte sich für [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (**128**), welches durch Substitution der *C*-terminalen Asparaginsäure durch Alanin erhalten wurde. Das CD-Spektrum dieses Peptids besitzt in $H_2O$ im Vergleich zum Originalpeptid eine deutlich geringere Intensität, was auf eine weniger stark ausgeprägte Sekundärstruktur hinweist (Abbildung 61). Erstaunlicherweise wir dieser Effekt nicht mehr in 20 % TFE/$H_2O$ als Lösungsmittel beobachtet (Abbildung 62). Dies bestätigt die für Trifluorethanol berichtete Eigenschaft, die Ausbildung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen, darunter insbesondere Helices, zu induzieren bzw. zu verstärken.[122b] Möglicherweise kann eine Zugabe dieses schwach sauren Alkohols die Auswirkungen der Deletion einer Carbonsäurefunktionalität im Molekül auf die Sekundärstrukturbildung kompensieren. Die CD-Messungen wurden für [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin wiederholt, wobei der beschriebene Spektrenverlauf bestätigt werden konnte. Aus der Röntgenstruktur von Feglymycin kann man deutlich ableiten, dass die Carboxy-Funktion der Seitenkette von Asparaginsäure an mehreren potenziellen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt ist (Abbildung 22).[96] Ein Wegfall dieser stabilisierenden Wechselwirkung in [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin kann die räumliche Struktur des Peptids in Lösung erheblich beeinflussen. Außerdem ist dieses Peptidderivat unter physiologischen Bedingungen nach außen hin nicht mehr negativ geladen, sondern durch das Vorhandensein jeweils einer freien Amino- und Carboxy-Funktion neutral. Dies geht einher mit einem veränderten elektrischen Dipolmoment.

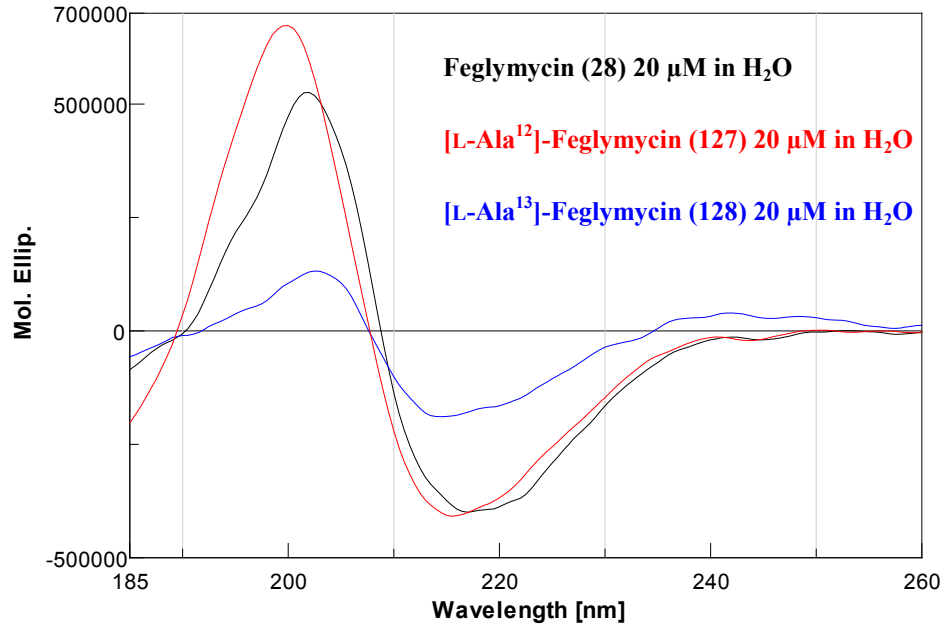



**Abbildung 61:** CD-Spektren von Feglymycin (20 µM in $H_2O$, schwarz) und von Feglymycin-Derivaten, in denen Phenylalanin bzw. Asparaginsäure gegen Alanin ausgetauscht wurden. Für [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (**128**) zeigte das CD-Spektrum im Vergleich zum natürlichen Peptid eine deutlich geringere Intensität.

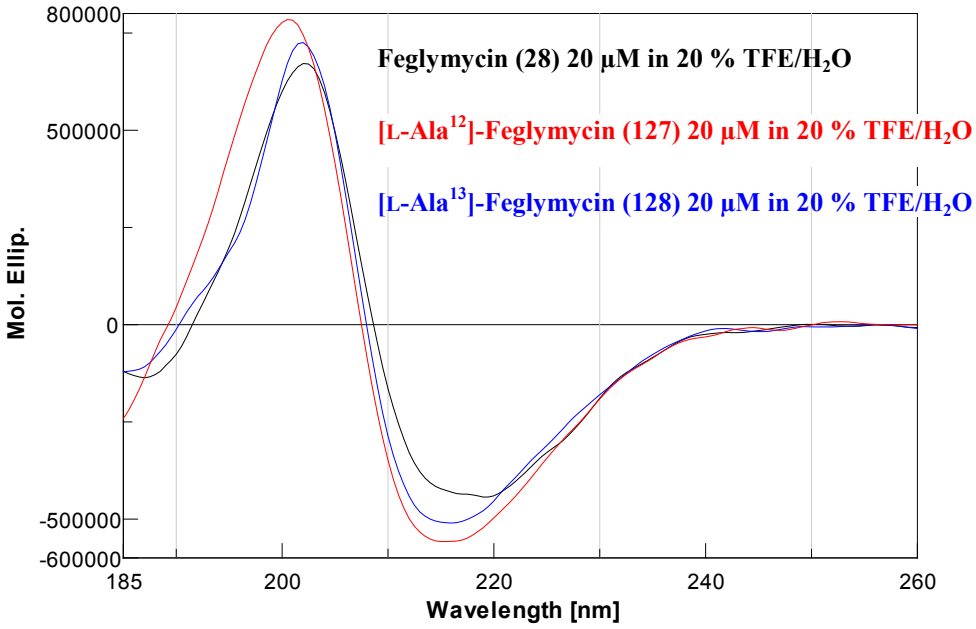



**Abbildung 62:** CD-Spektren von Feglymycin (20 µM in 20 % TFE/$H_2O$, schwarz) und von Feglymycin-Derivaten, in denen Phenylalanin bzw. Asparaginsäure gegen Alanin ausgetauscht wurden. Das Spektrum von [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (**128**) unterscheidet sich in 20 % TFE/$H_2O$ kaum von dem CD-Spektrum des nicht-modifizierten Peptids.

### 3.2.2.2 Biologische Aktivität

Alle Derivate des Alanin-Scans wurden zusammen mit Feglymycin auf ihre biologische Aktivität in verschiedenen *Assays* überprüft. Dabei lagen zuerst die Ergebnisse der antiviralen Testierungen in Bezug auf eine Inhibition des HI-Virus *in vitro* vor (Abbildung 63).

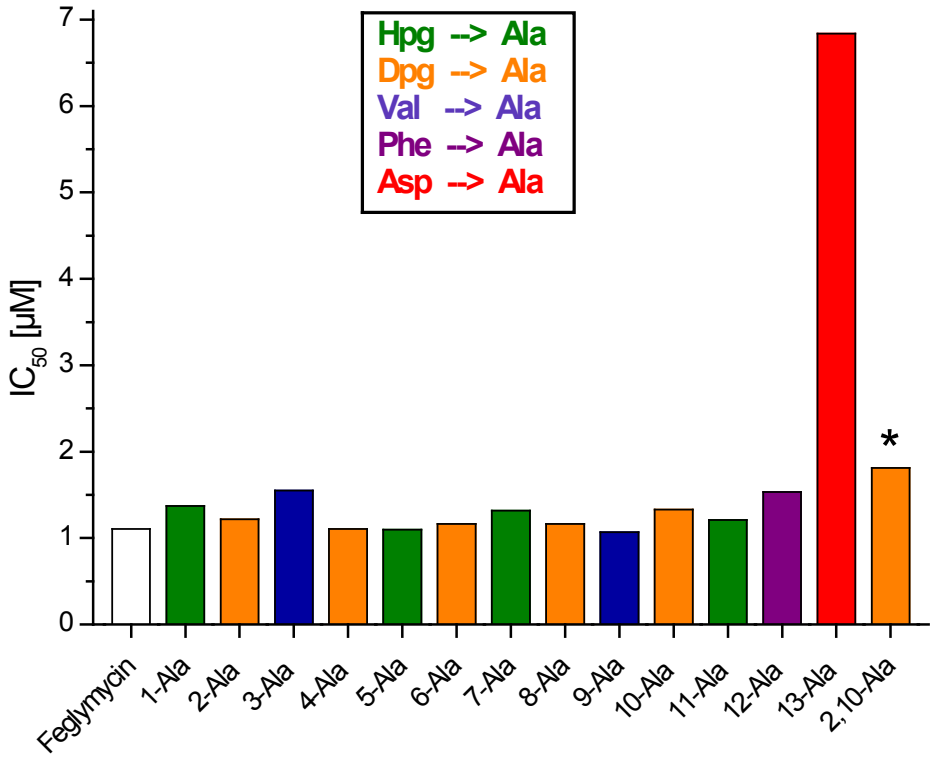
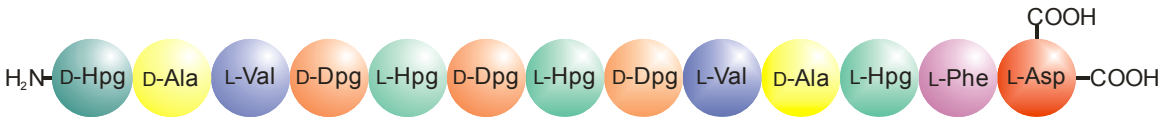



**Abbildung 63:** Antivirale Aktivität der Alanin-Scan-Derivate im Vergleich zu Feglymycin (* Das Doppel-Ala-Derivat [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin (**129**, Abbildung 64) wurde erst nachträglich synthetisiert und getestet (vgl. Seite 89)). Die $IC_{50}$-Werte wurden mit der MTS/PMS-Methode im Zellkulturtest (mit HIV-1 NL4.3 infizierte humane MT-4-Zellen) bestimmt und durch Wiederholung der Testreihe verifiziert. Alle Verbindungen wirkten nicht zytotoxisch ($CC_{50}$ > 50 µM). Detaillierte Informationen können Abschnitt 5.3.3 entnommen werden.

Erstaunlicherweise hat nur die Substitution der *C*-terminalen Asparaginsäure gegen Alanin einen Einfluss auf die antiretrovirale Wirkung. [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (**128**) zeigt dabei einen um Faktor 6 erhöhten $IC_{50}$-Wert, welcher aber immer noch im einstelligen µM-Bereich liegt. Es ist möglich, das die für dieses Derivat postulierte verringerte Sekundärstrukturausbildung in Wasser mit dem beobachteten Effekt im HIV-Replikations*assay* in Zusammenhang steht.

Eine Erklärung für das erhaltene Ergebnis insgesamt könnte die Aminosäurezusammensetzung von Feglymycin selbst sein. In der Sequenz des Peptids kommen nahezu alle Aminosäuren mehrfach vor. Insbesondere die Hydroxyphenylglycine sind vier- bzw. fünfmal enthalten. Sollten diese Bausteine also wichtig für eine Interaktion mit dem biologischen *Target* sein, kann der Wegfall einer Seitenkettenfunktionalität sehr wahrscheinlich durch die verbleibenden Reste kompensiert werden. Schon die CD-Spektren ließen vermuten, dass die aktive Konformation bei fast allen Ala-Scan-Peptiden erhalten bleibt. Um diese Hypothese näher zu beleuchten, wurde ein Doppel-Ala-Derivat (**129**, Abbildung 64) von Feglymycin synthetisiert. Dazu erfolgte die Kombination eines Hepta- mit einem Hexapeptid (**104** und **112**, vgl. Abbildung 56), in denen jeweils eine Aminosäure (D-Dpg) gegen Alanin ausgetauscht war.




**129**

**Abbildung 64:** Mit dem Doppel-Ala-Derivat **129** sollte insbesondere die Bedeutung der Dpg-Aminosäuren auf die biologische Aktivität von Feglymycin untersucht werden.

Die Positionen 2 und 10 wurden für die Substitution ausgewählt, da die Hydroxy-Gruppen von D-Dpg$^{2}$ und D-Dpg$^{10}$ laut Analyse des Wasserstoffbrückennetzwerkes der Röntgenstruktur keine stabilisierenden Wechselwirkungen untereinander, sondern nur mit anderen Aminosäuren eingehen (vgl. Abbildung 22). Außerdem ist die Seitenkette von D-Dpg$^{10}$ an der Ausbildung von drei H-Brücken im Feglymycin-Dimer beteiligt. Unter der Annahme, dass die Sekundärstruktur von Feglymycin wichtig für die biologische Wirkung ist, sollten die in Peptid **129** vorgenommenen strukturellen Veränderungen die Ausbildung und Stabilisierung der helikalen Struktur stören oder sogar verhindern. Außerdem ging eine Manipulation dieser Aminosäuren im Rahmen das Alanin-Scans nicht mit einer Verschlechterung der Löslichkeit der Peptide in Wasser einher (vgl. Abbildung 57).

Abbildung 65 zeigt das CD-Spektrum von [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin im Vergleich zu den Spektren von Feglymycin und den Peptiden, in denen jeweils nur D-Dpg in Position 2 oder 10 durch D-Ala ersetzt wurde. Man erkennt deutlich, dass die Spektrenform für alle Peptide vergleichbar ist. Nur im Wellenlängenbereich um $\lambda$ = 220 nm zeigt die CD-Bande von [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin eine geringere Intensität. Da der gleiche Effekt auch für

[D-Ala$^{10}$]-Feglymycin beobachtet wird, kann man davon ausgehen, dass ein Austausch der Aminosäure in Position 10 die Ursache für die Veränderung im CD-Spektrum ist.

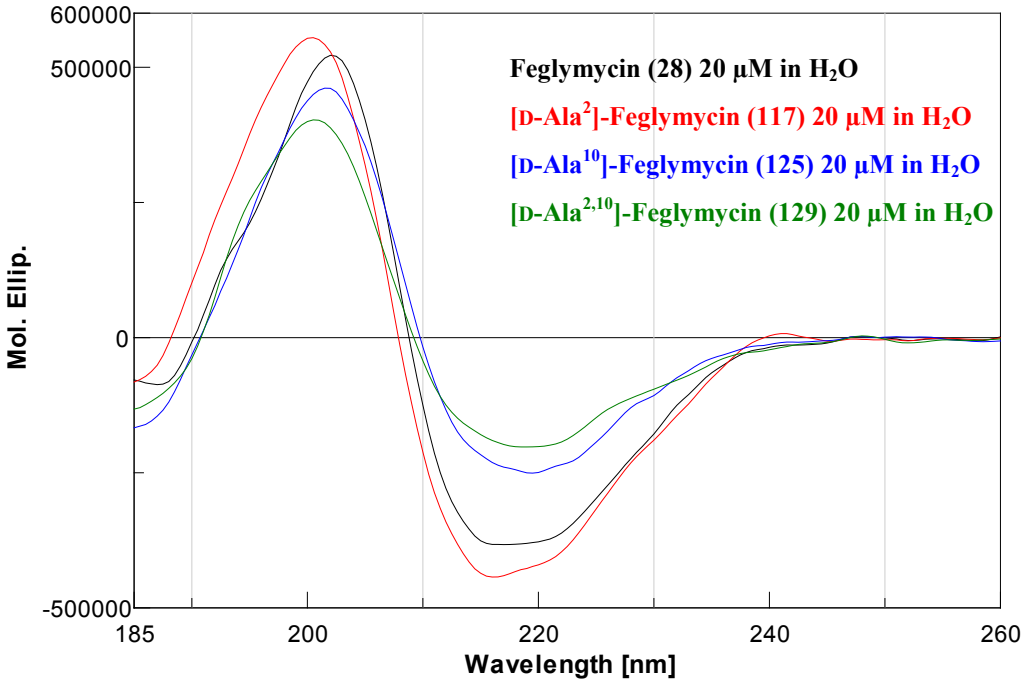



**Abbildung 65:** CD-Spektren von Feglymycin (20 µM in $H_2O$, schwarz), [D-Ala$^2$]-Feglymycin (**117**, rot), [D-Ala$^{10}$]-Feglymycin (**125**, blau) sowie dem Doppel-Ala-Derivat [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin (**129**, grün).

Zur Aufnahme der CD-Spektren und deren Interpretation soll an dieser Stelle noch eine Anmerkung gemacht werden. Obwohl bei der Vorbereitung der Stammlösungen mit äußerster Sorgfalt vorgegangen wurde, sind Fehler durch geringe Abweichungen bei den verwendeten Konzentrationen nicht auszuschließen. Idealerweise müsste die aus der Einwaage berechnete Konzentration der Peptide in Lösung zusätzlich durch UV-spektroskopische Methoden oder Aminosäureanalytik verifiziert werden. Für weiterführende Studien zur Sekundärstruktur von Feglymycin-Derivaten sollte dies in Zukunft berücksichtigt werden.

Betrachtet man den im HIV-Replikations*assay* bestimmten $IC_{50}$-Wert für [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin, so ist dieses Peptid überraschenderweise vergleichbar aktiv wie Feglymycin selbst (Abbildung 63). Dieser Effekt ist natürlich äußerst positiv in Anbetracht der Tatsache, dass die enantioselektive Darstellung der Dpg-Aminosäure eine arbeits- und kostenintensive Synthesesequenz darstellt (vgl. Abbildung 29). Es zeigt sich, dass gar nicht alle dieser Aminosäuren in der Sequenz vorhanden sein müssen, um einen biologischen

Effekt auszulösen. Bevor jedoch endgültige Schlüsse aus diesen ersten Testierungsergebnissen gezogen werden können, müssen auch die Resultate der Enzyminhibitions*assays* sowie der antibakteriellen Testierung gegen *S. aureus* betrachtet werden.

In Abbildung 66 und Abbildung 67 sind die $IC_{50}$-Werte für alle Ala-Scan-Feglymycin-Derivate aus den Inhibitions*assays* für die Enzyme MurA und MurC aus *E. coli* zusammengefasst. Für das MurA-Enzym zeigen nur die Peptide [L-Ala$^{5}$]- und [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin eine etwas verminderte Hemmwirkung. Das Ergebnis für Position 13, d.h. dem Austausch von Asparaginsäure gegen Alanin, korreliert mit den Resultaten der antiviralen Testierung. Die Erhöhung des $IC_{50}$-Wertes (~ Faktor 7) ist dabei vergleichbar stark. Im Bereich der Fehlergrenzen zeigen alle weiteren Feglymycin-Derviate eine ähnliche Wirksamkeit wie das Originalpeptid. Auch [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin mit zwei Alanin-Bausteinen in der Sequenz inhibiert MurA nach wie vor.

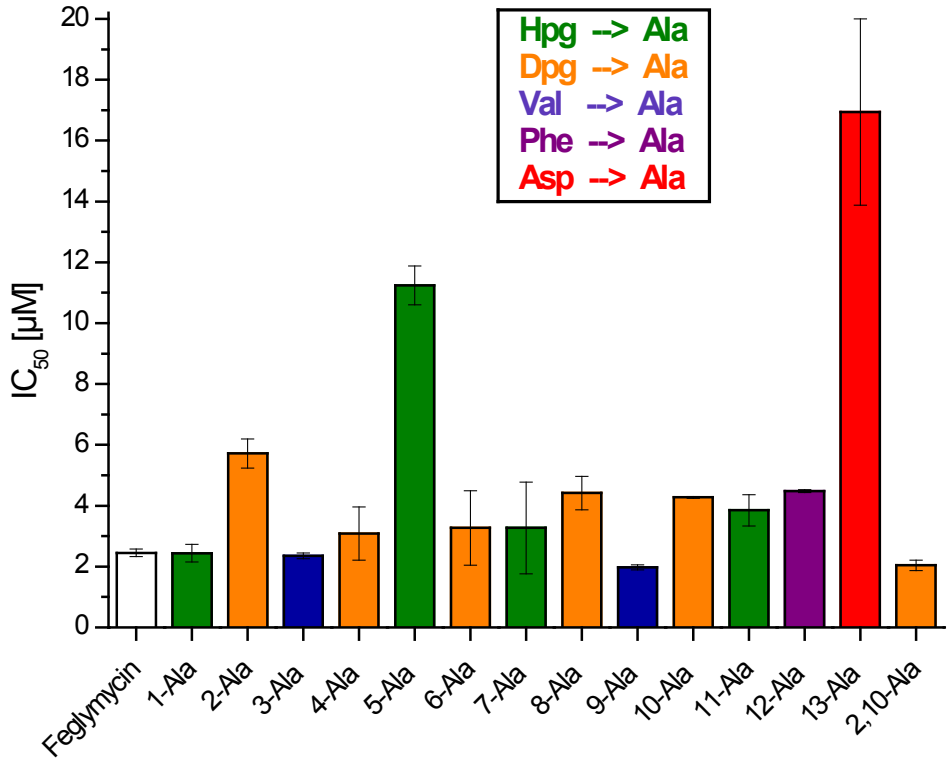



**Abbildung 66:** Inhibition des MurA-Enzyms aus *E. coli* durch die Alanin-Scan-Derivate im Vergleich zu Feglymycin. Detaillierte Informationen können Abschnitt 5.3.5 dieser Arbeit entnommen werden.

Für das MurC-Enzym zeigt sich ein etwas deutlicherer Trend. Sowohl die Deletion der sauren Aminosäureseitenkette in Position 13, als auch der doppelte Ersatz von D-Dpg wirken sich im Vergleich zu den anderen Peptiden stärker auf die Inhibitionseigenschaften von Feglymycin aus. Der $IC_{50}$-Wert ist für [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin um den Faktor 12, für [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin um den Faktor 8 erhöht. Die $IC_{50}$-Werte der beiden Verbindungen liegen trotz der beschriebenen Erhöhung aber immer noch im niedrigen, einstelligen µM-Bereich. Ein kompletter Aktivitätsverlust wird für keines der Feglymycin-Derivate beobachtet.

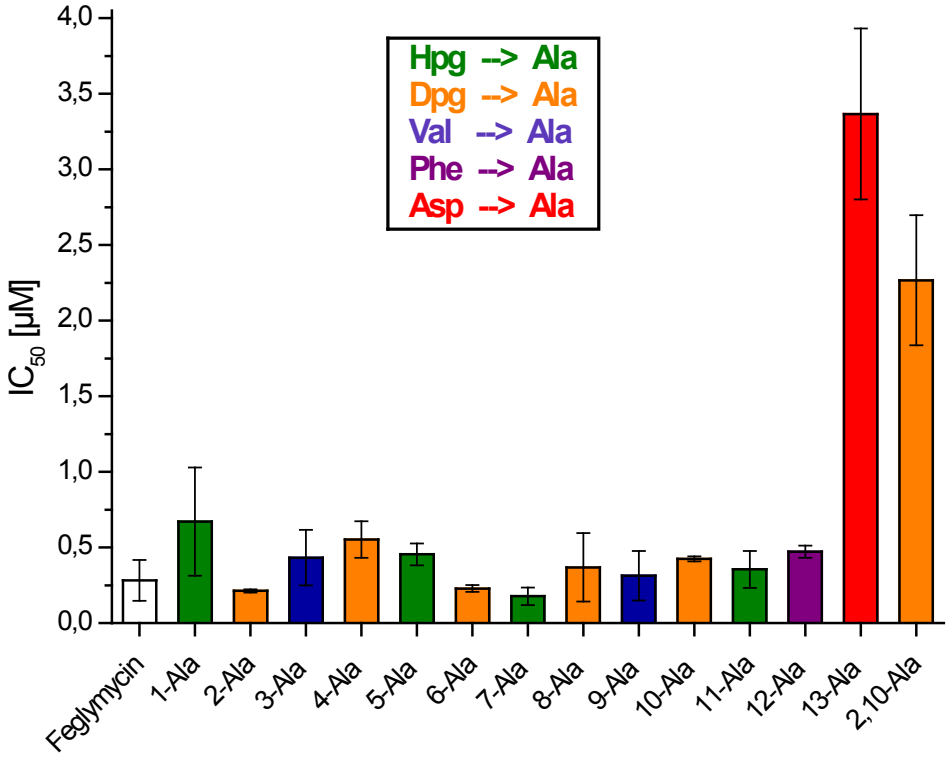



**Abbildung 67:** Inhibition des MurC-Enzyms aus *E. coli* durch die Alanin-Scan-Derivate im Vergleich zu Feglymycin. Detaillierte Informationen können Kapitel 5.3.6 dieser Arbeit entnommen werden.

Die Parallelen der Testierungsergebnisse für den HIV-Replikations*assay* und die Inhibitionsstudien mit den Mur-Enzymen sind auf den ersten Blick erstaunlich und zunächst überraschend. Bei genauerer Betrachtung der unterschiedlichen Testsysteme zeigen sich aber auch gewisse Gemeinsamkeiten. Nach dem jetzigen Stand der Untersuchungen wird davon ausgegangen, dass der antiretroviralen Aktivität eine Wechselwirkung mit dem viralen Oberflächenprotein gp120 zugrunde liegt (vgl. Kapitel 1.4.6.1). Ist dies wirklich der Fall, so kann das Peptid bei Inkubation mit $CD4^+$-T-Zellen

und dem HI-Virus an das Zielprotein binden, ohne zuvor eine Barriere, z.B. die Zellmembran, überwinden zu müssen. Auch bei den Mur-Inhibitions*assays* wird Feglymycin direkt mit dem Enzym und den Substraten inkubiert. In beiden Fällen ist der Interaktionspartner also sehr wahrscheinlich eine bestimmte Aminosäuresequenz, die ohne Hindernisse zugänglich ist. Für die Bindung ist bei genauerer Betrachtung der Testierungsergebnisse eine doppelte Ladung am *C*-Terminus das Peptids von Vorteil. Das Fehlen dieses Strukturmotivs resultiert jedoch nicht in einem vollständigen Aktivitätsverlust. In diesem Zusammenhang soll noch einmal an die Testierungsergebnisse für Peptidfragmente von Feglymycin erinnert werden. Während *N*-terminale Heptapeptide in beiden *Assay*systemen kaum einen Aktivitätsverlust zeigten,‡‡‡ waren *C*-terminale Hexapeptide, sowohl geschützt als auch mit freien Endgruppen, völlig wirkungslos. Dies bedeutet zum einen, dass vielleicht weniger eine doppelte negative Ladung am *C*-terminalen Ende des Peptids vorhanden sein muss, sondern vielmehr zwei funktionelle Gruppen, welche als H-Brückenakzeptor und/oder -donor fungieren können. Im Fall von Feglymycin wären das zwei Carboxy-Gruppen, bei den *N*-terminalen Heptapeptiden die freie Carbonsäure-Funktion des Peptidrückgrads sowie die phenolische Hydroxy-Funktionalität der Seitenkette von L-Hpg. In [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin ist ein derartiges Strukturmotiv nicht vorhanden, was die verminderte Wirksamkeit erklären könnte. Der komplette Aktivitätsverlust bei den *C*-terminalen Hexapeptiden zeigt andererseits, dass die in diesen Peptidfragmenten vorhandenen funktionellen Gruppen allein nicht für eine Wechselwirkung mit den jeweiligen Targets ausreichend sind.

In gewisser Weise bestätigt sich somit die Vermutung, dass insgesamt betrachtet die zahlreichen phenolischen Seitenketten in einer möglichen helikalen Anordnung essenzieller für die biologische Aktivität sind. Die Phenol-Einheit ist durch den hydrophoben Charakter des Aromaten und der polaren Hydroxy-Gruppe amphiphil. Der aromatische Ring kann an hydrophoben Van-der-Waals-Wechselwirkungen beteiligt sein. Durch die Hydroxy-Funktion ist die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen möglich. Dabei fungiert diese aufgrund des Dipolcharakters sowohl als H-Brücken-Donor (H-Atom) als auch als H-Brücken-Akzeptor (O-Atom). Diese gegensätzlichen Eigenschaften können sich bei der Wechselwirkung mit Biomolekülen, wie z.B. Proteinen,

‡‡‡ In den Mur-Inhibitions*assays* zeigte nur H-Hepta-OH (**73**) eine Aktivität, geschützte Varianten waren wirkunslos (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wiesen sowohl geschützte, als auch ungeschützte *N*-terminale Heptapeptide antiretrovirale Aktivität gegen HIV auf.

ergänzen. Für pflanzliche Polyphenole, die Feglymycin in gewisser Weise strukturell ähnlich sind (vgl. Abschnitt 3.1), wird häufig eine unspezifische Bindung an Proteine beobachtet. Oft erfolgt die Assoziation dabei zunächst durch hydrophobe Wechselwirkungen, sowie einer anschließenden Stabilisierung des Komplexes durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Dies ist i.d.R. mit einer Ausfällung des Proteins und mit dessen Inaktivierung verbunden.[146] Für Feglymycin ist ein ähnlicher Mechanismus denkbar. Möglicherweise bewirkt es durch die Interaktion mit bestimmten Sequenzen eine Konformationsänderung des Proteins bzw. Enzyms, was eine inaktive Sekundärstruktur zur Folge haben könnte. Eine unspezifische Bindung scheint für Feglymycin jedoch eher unwahrscheinlich, denn es inhibiert beispielsweise nicht alle Mur-Enzyme. Auch direkte Wechselwirkungen mit anderen HI-Virusbestandteilen und Zellrezeptoren konnten bisher ausgeschlossen werden. Man muss daher davon ausgehen, dass es doch bestimmte Erkennungssequenzen für Feglymycin an den einzelnen *Targets* gibt, wobei jedoch nicht jede Aminosäure des Peptids für eine Wechselwirkung mit dieser unbedingt notwendig erscheint.

Das Testsystem zur Untersuchung der Wachstumshemmung auf bestimmte Bakterien ist mit den bisher beschriebenen *in vitro-Assays* nicht direkt vergleichbar. Die zu untersuchenden Substanzen werden dabei direkt zu einer Bakterienkultur gegeben, das heißt, es handelt sich um lebende Organismen. Liegt das *Target* dabei innerhalb der Zellen, so muss das Peptid zunächst dorthin gelangen. Dies bedeutet die Überwindung der Zellwand und der Zellmembran. Mit diesem Versuch kann überprüft werden, ob eine Verbindung überhaupt zellgängig ist und ob diese noch im Organismus in Gegenwart von zahlreichen metabolisierenden Enzymen wirken kann. Für Feglymycin und dessen Derivate ist die Interpretation der Ergebnisse hierbei nicht so einfach. Es konnte zwar eine Inhibition der Enzyme MurA und MurC *in vitro* nachgewiesen werden, das bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass dies auch die wirklichen Angriffspunkte des Peptids im bakteriellen Metabolismus sind. Aufgrund der Größe und Polarität von Feglymycin muss man eher davon ausgehen, dass es wie auch andere, strukturell verwandte Peptidantibiotika die bakterielle Zellhülle durch reine Diffusion wahrscheinlich nicht überwinden kann. Abbildung 68 fasst die Resultate der antibakteriellen Testierungen zusammen. Dabei zeigten die Alanin-Derivate von Feglymycin ebenfalls nur eine Hemmwirkung gegenüber den im Diagramm genannten *S. aureus*-Stämmen, wobei kaum ein Unterschied zwischen MSSA und MRSA festgestellt werden konnte.

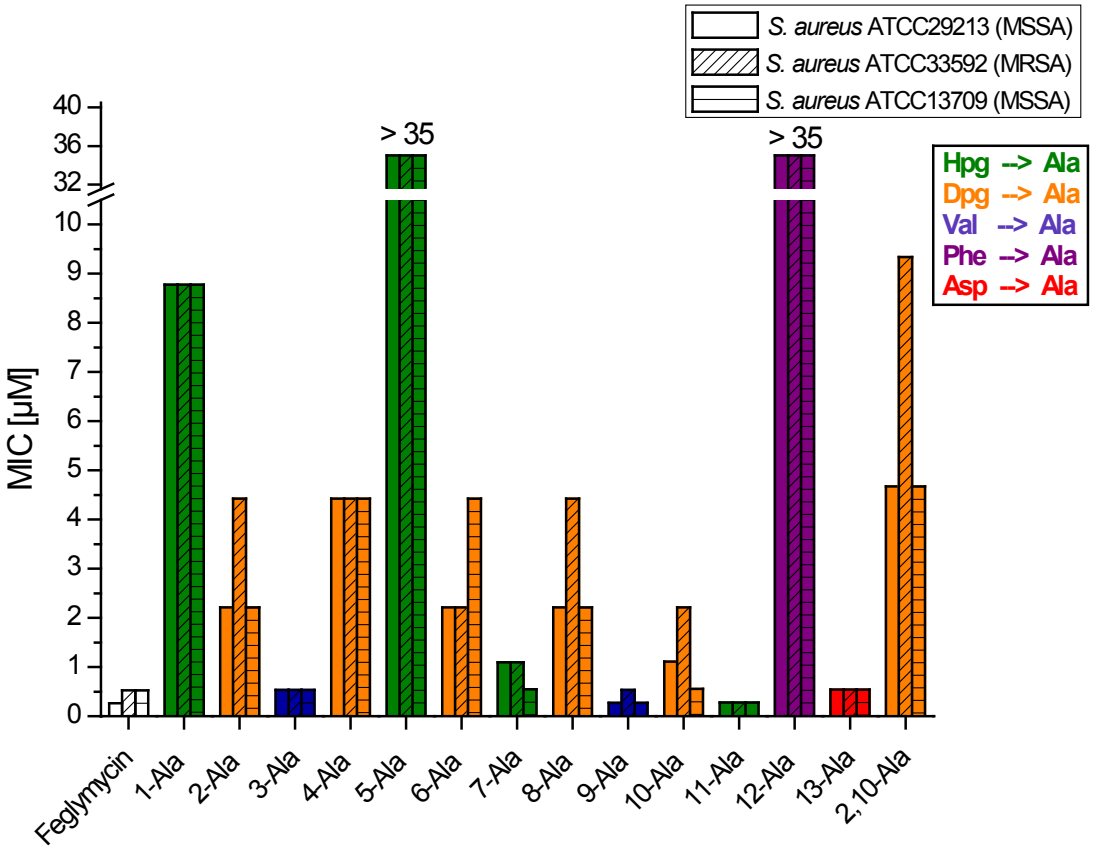



**Abbildung 68:** Antibakterielle Aktivität der Alanin-Scan-Derivate gegen ausgewählte *S. aureus*-Stämme im Vergleich zu Feglymycin. Die MIC-Werte wurden gemäß den Richtlinien des *CLSI* bestimmt und durch Wiederholung der Testreihe verifiziert. Detaillierte Informationen sowie die bestimmten $IC_{80}$-Werte können Kapitel 5.3.4 dieser Arbeit entnommen werden.

Wie aufgrund der geringen strukturellen Veränderung zu erwarten war, sind die Peptide, in denen Valin gegen Alanin ausgetauscht wurde, vergleichbar aktiv wie das Originalpeptid. Auch eine Substitution von L-Hpg[7] und L-Hpg[11] gegen L-Ala wird toleriert. Im Gegensatz dazu führt der Ersatz von D-Hpg[1] zu einem starken, der Ersatz von L-Hpg[5] zu einem vollständigen Verlust der antibakteriellen Wirkung. Interessant ist außerdem, dass sowohl der einfache, als auch der doppelte Austausch von D-Dpg in der Aminosäuresequenz einen ähnlich starken Effekt auf die gemessenen MIC-Werte hat. Dies spricht dafür, dass alle Dpg-Aminosäuren vergleichbar wichtig für die Aktivität in diesem *Assay* sind. Erstaunlich ist das Ergebnis für [L-Ala[12]]-Feglymycin. Die Deletion der aromatischen Seitenkette macht dieses Peptid völlig wirkungslos in Bezug auf die Wachstumshemmung der Bakterien. [L-Ala[13]]-Feglymycin hingegen zeigt im Gegensatz zu den anderen Testsystemen einen mit Feglymycin vergleichbaren Effekt. Sind die zytoplasmatischen Enzyme MurA und MurC wirklich das molekulare *Target* von Feglymycin, so muss man davon ausgehen, dass [D-Ala[1]]-, [L-Ala[5]]- und [L-Ala[12]]-Feglymycin die Zellhülle der

Bakterien nicht mehr passieren können. Dabei gibt es jedoch anscheinend keinen Zusammenhang mit den Beobachtungen aus den CD-Messungen und den Polaritäten dieser Verbindungen. Zu diesem Zeitpunkt kann noch nicht gesagt werden, ob Feglymycin bzw. die synthetisierten Derivate zellgängig sind. Weitere Untersuchungen hierzu müssen folgen, um den genauen Wirkmechanismus zu verstehen. Da in den Inhibitions*assays* für die Mur-Enzyme keine extremen Aktivitätsverluste beobachtet wurden, ist es durchaus möglich, dass die geringen Unterschiede der $IC_{50}$-Werte im Testsystem mit lebenden Organismen überhaupt nicht detektiert werden können. Weiterhin muss aufgrund der erhaltenen Ergebnisse weiter davon ausgegangen werden, dass Feglymycin neben den Enzymen MurA und MurC noch weitere *Targets* adressiert, welche möglicherweise nicht im Inneren der Zelle liegen. Denkbar wäre ein mit Ramoplanin A2 vergleichbarer Mechanismus, wobei der Hauptangriffspunkt außerhalb der Bakterienzelle liegt, obwohl auch zytoplasmatische Enzyme *in vitro* gehemmt werden. Die extrem komplexen Biosynthesevorgänge in lebenden Zellen lassen gesicherte Aussage über die genaue Wirkung von Feglymycin auf Bakterien zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht zu.

### 3.2.3 Einbau fluorierter Aminosäuren in Feglymycin für Untersuchungen mittels $^{19}$F-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Aufgrund der vergleichbaren Röntgenstrukturen von Feglymycin und Gramicidin A bestand die Vermutung, dass es sich bei Feglymycin ebenfalls um ein Peptid handelt, welches mit Lipidmembranen interagiert. Dies könnte mit der beobachteten biologischen Aktivität in Zusammenhang stehen, denn sollte eine Inhibition der Enzyme MurA und MurC die molekulare Ursache für die antibakterielle Wirkung von Feglymycin sein, so muss geklärt werden, wie das Peptide die Zellmembran überwinden kann. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Koert (Philipps-Universität Marburg) konnte zwar keine wie für Gramicidin A charakteristische Porenbildung in Lipiddoppelschichten nachgewiesen werden, dies schließt aber nicht aus, dass Feglymycin nicht in einer anderen Art und Weise mit membranähnlichen Strukturen wechselwirkt. Neben Ionenkanalexperimenten (vgl. Abschnitt 1.4.5) stellt die $^{19}$F-Festkörper-NMR-Spektroskopie eine weitere, sehr nützliche Methode dar, das Verhalten von Peptiden in Gegenwart von Modellmembranen zu untersuchen. Man erhält so aus verhältnismäßig wenigen NMR-Parametern Informationen über die chemische Umgebung, die räumliche

Orientierung, eine mögliche Oligomerisierung sowie die Dynamik des Moleküls in einem Milieu, welches dem natürlichen sehr ähnlich ist.[168] Der weite Bereich der chemischen Verschiebung für den $^{19}$F-Kern ermöglicht es, selbst geringste Veränderungen in der Umgebung des *Labels* zu detektieren. Besonders intensiv studiert wurden mit dieser Methode antimikrobielle Peptide (AMPs),[169] zellpenetrierende Peptide oder auch Fusionspeptide. Eine ausführliche Beschreibung des theoretischen Hintergrunds und der Anwendung dieser NMR-Methode kann entsprechender Literatur entnommen werden.[168] Eine Grundvoraussetzung für die Durchführung dieser NMR-Experimente ist zunächst das Vorhandensein eines Fluor*labels* im zu untersuchenden Peptid. Dieses muss synthetisch in die Aminosäuresequenz eingebaut werden, da es keine natürlichen Peptide gibt, welche Fluoratome enthalten. Dies hat jedoch auch den Vorteil, dass es bei den NMR-Messungen später keine störenden Hintergrundsignale gibt.

Im Fall von Peptiden bietet sich die Substitution eines Aminosäurebausteins gegen ein fluoriertes Analogon an. In Abbildung 69 sind einige häufig verwendete Verbindungen gezeigt. Für einen Austausch sollte dabei eine in Bezug auf die Polarität und den sterischen Anspruch möglichst ähnliche Aminosäure gewählt werden. Der Vorteil an Fluor ist, dass es einen ähnlichen Van-der-Waals-Radius besitzt wie Wasserstoff, sodass eine Substitution i.d.R. nur einen geringen Einfluss auf die Struktur des Peptids hat.[170] Stärker sind jedoch die elektronischen Auswirkungen durch die hohe Elektronegativität des Fluoratoms. So ist beispielsweise 4-Trifluormethyl-L-phenylglycin (**132**) aufgrund des starken Elektronenzugs wesentlich leichter am $C_\alpha$-Zentrum deprotonierbar und dadurch racemisierungsempfindlicher als Phenylglycin. Außerdem beobachtet man häufig, dass durch den Einbau von fluorierten Bausteinen die Lipophilie des Peptids und damit seine Membranpermeabilität erhöht wird. Dies kann eine verbesserte Bioverfügbarkeit zur Folge haben.

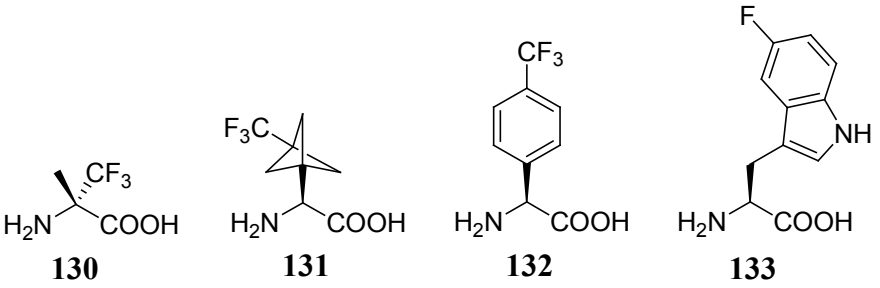



**Abbildung 69:** Die fluorierten Aminosäuren 2-Trifluormethyl-L-alanin (**130**),[171] L-3-Trifluormethylbicyclopent-[1.1.1]-1-ylglycin (**131**),[172] 4-Trifluormethyl-L-phenylglycin (**132**)[173] und 5-Fluor-L-tryptophan (**133**)[174] sind geeignet für den Einbau in Peptide, welche mittels $^{19}$F-Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht werden sollen.

Für die $^{19}$F-Festkörper-NMR-Spektroskopie ist es von besonderer Wichtigkeit, dass sich das Fluor*label* möglichst starr am Peptidrückgrat befindet. Dies wird z.B. durch eine eingeschränkte Rotationsfreiheit, wie bei Aminosäure **131** oder **132** (Abbildung 69), gewährleistet. Der Vorteil dieser Analysemethode ist die sehr hohe Empfindlichkeit des Fluorkerns, sodass i.d.R. nur wenige Milligramm des fluorierten Peptids für die Messungen ausreichend sind. Allerdings muss darauf geachtet werden, dass die jeweilige Probe vor der Untersuchung von allen Fluor-enthaltenden Verunreinigungen abgetrennt wird. Das bedeutet u.a., dass für eine Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC Trifluoressigsäure als Additiv nicht eingesetzt werden darf. Für fundierte Aussagen über die Orientierung eines Peptids in einer Membran müssen mindestens vier Positionen in der Aminosäuresequenz nacheinander markiert werden. Bevor mit den NMR-Messungen begonnen werden kann, ist es zwingend notwendig, das Fluor-*gelabelte* Peptidderivat auf seine biologische Wirksamkeit hin zu überprüfen. Kommt es durch die Aminosäuresubstitution zu einem starken Aktivitätsverlust, so ist sehr wahrscheinlich die ursprüngliche Konformation des Peptids gestört oder wichtige Wechselwirkungen mit dem Target können nicht mehr ausgebildet werden. In diesem Fall ist eine Untersuchung mittels $^{19}$F-Festkörper-NMR-Spektroskopie nicht mehr sinnvoll. Nützlich ist hierbei auch die Charakterisierung mithilfe der CD-Spektroskopie, die es ermöglicht, schnell und einfach Veränderungen der Sekundärstruktur in Lösung oder auch in Gegenwart von Lipiden sichtbar zu machen.

Betrachtet man die Aminosäurezusammensetzung von Feglymycin, so ist das Molekül geradezu prädestiniert für einen Austausch der 4-Hydroxyphenylglycin-Bausteine gegen 4-Trifluormethyl-L-phenylglycin (**132**). Die Substitution ist dabei durch das Vorhandensein von vier dieser Aminosäuren nicht nur an verschiedenen Positionen der Sequenz möglich,[§§§] sie geht auch einher mit einer minimalen strukturellen Veränderung, da insgesamt betrachtet nur eine OH- gegen eine $CF_3$-Gruppe ausgetauscht wird. Die Trifluormethyl-Gruppe ist vom sterischen Anspruch her vergleichbar mit der Isopropyl-Funktionalität und weist außerdem eine Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen auf.[170] 4-Trifluormethylphenylglycin wurde bereits zur Charakterisierung von membranaktiven Modellpeptiden eingesetzt, wobei es sich besonders für den Ersatz sterisch anspruchsvoller, hydrophober Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin eignet.[173] Die relativ hohe Racemisierungsanfälligkeit dieser Aminosäure sollte für die Synthese eines entsprechenden Feglymycin-Derivates weniger problematisch sein, da die Reaktionsbedingungen durch das Vorhandensein der 3,5-Dihydroxyphenylglycine im Peptid von vornherein sehr mild gewählt wurden.

Da unklar war, ob sich ein fluoriertes Feglymycin-Derivat überhaupt für die $^{19}$F-Festkörper-NMR-Spektroskopie in Gegenwart von Lipidmembranen eignet, sollte zunächst nur das in Abbildung 70 gezeigte Peptid **134** synthetisiert werden. Position 11 wurde für den ersten Aminosäureaustausch gewählt, da das *C*-terminale Hexapeptid **43** generell schneller und einfacher aufgebaut werden kann als das *N*-terminale Heptapeptid **42**, welches die drei weiteren Hpg-Aminosäuren enthält. Häufig wird 4-Trifluormethylphenylglycin als racemisches Gemisch für die Synthese verwendet. Die epimeren Peptide trennt man anschließend mit präparativer RP-HPLC, wobei beide Isomere für die NMR-Analytik verwendet werden können.[173b] Da Feglymycin jedoch sehr polar ist, konnte nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass eine Auftrennung von Peptidepimeren am Ende noch möglich sein würde. Außerdem ist 4-Trifluormethyl-L-phenylglycin (**132**) enantiomerenrein kommerziell erhältlich, sodass das Feglymycin-Derivat **134** mit der in Abbildung 70 dargestellten Syntheseroute hergestellt werden konnte.

§§§ In Position 1 der Aminosäuresequenz besitzt 4-Hydroxyphenylglycin die D-Konfiguration und sollte gegen 4-Trifluormethyl-D-phenylglycin ausgetauscht werden.

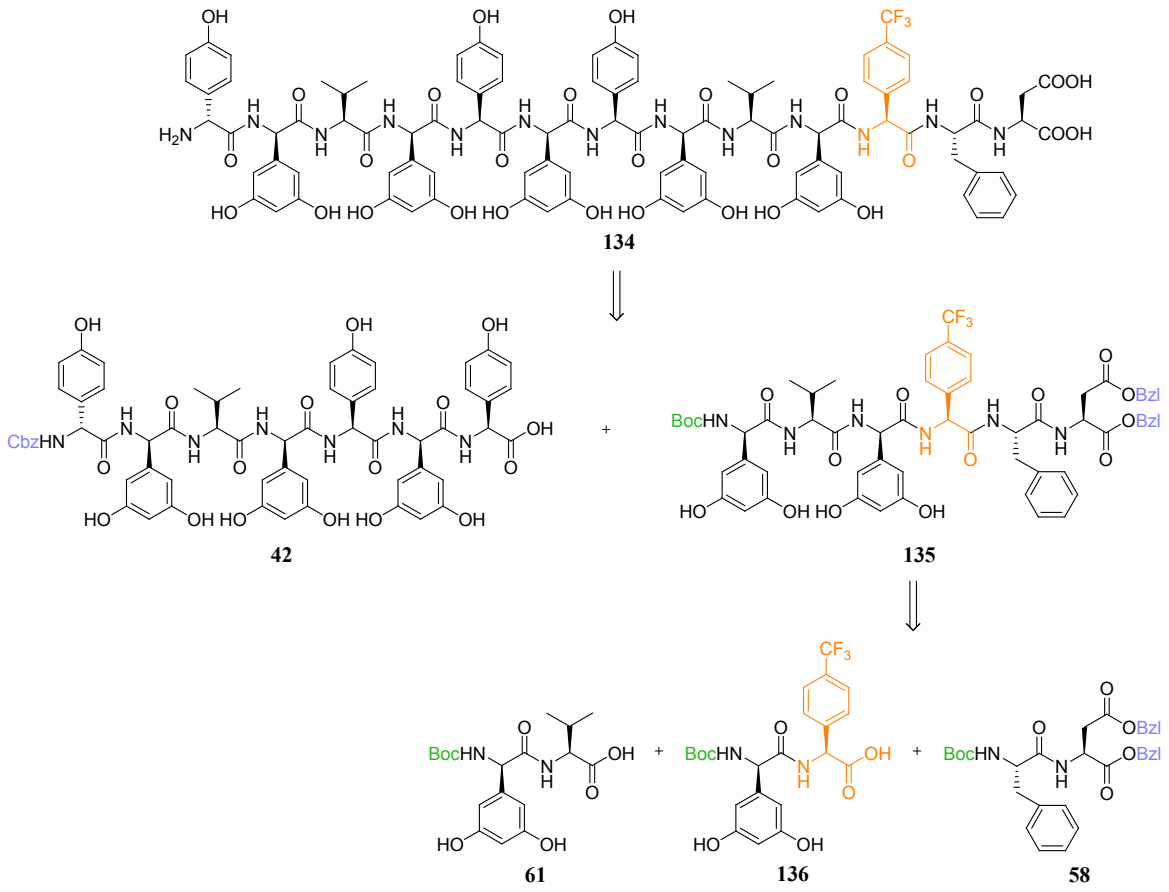



**Abbildung 70:** Retrosynthese zum Aufbau von [4-$CF_3$-L-$Phg^{11}$]-Feglymycin (**134**).

Für den Aufbau von Hexapeptid **135** war lediglich ein neuer Dipeptidbaustein (**136**) notwendig. Alle anderen Oligopeptide entstammen der Feglymycin-Totalsynthese und waren aus früheren Synthesen noch vorhanden. Die Schützung von 4-Trifluormethyl-L-phenylglycin (**132**) wurde zunächst unter den gleichen Bedingungen wie für 4-Hydroxy-D-phenylglycin (**36'**, vgl. Abbildung 46) durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch, dass es bei Verwendung von NaOH als Base für die Boc-Schützung im ersten Syntheseschritt doch zu einer erheblichen Racemisierung der Aminosäure kommt. Bei einer Wiederholung der Reaktion mit $NaHCO_3$ konnte diese unerwünschte Nebenreaktion deutlich minimiert werden (Abbildung 72).

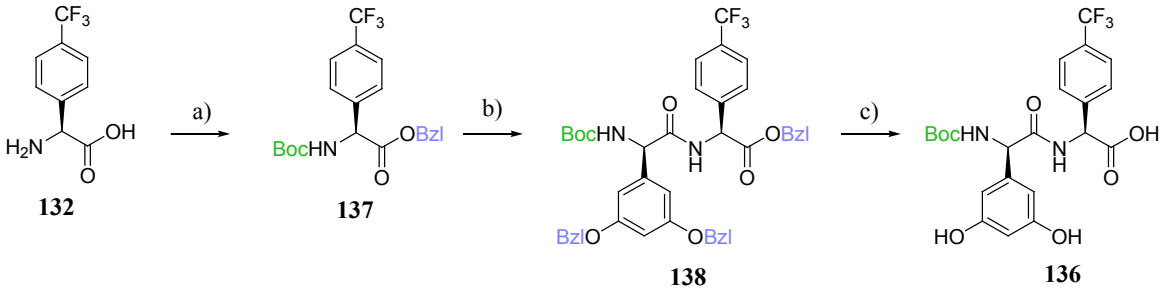



**Abbildung 71:** Synthese von Dipeptid **136**: a) 1. $Boc_2O$, $NaHCO_3$, Dioxan/$H_2O$ (2:1), RT, 24 h, 85 %; 2. $Cs_2CO_3$, MeOH/$H_2O$ (10:1), RT, 30 min, quant.; 3. BzlBr, abs. DMF, RT, 24 h, 90 %; b) 1. 4 N HCl/Dioxan, RT, 1 h, quant.; 2. Boc–D-Dpg(Bzl)$_2$–OH (**70**), DEPBT, $NaHCO_3$, abs. DMF, 0 °C, 1 h → RT, 24 h, 45 %; c) Pd/C (10 %), $H_2$, THF, RT, 7 h, quant.

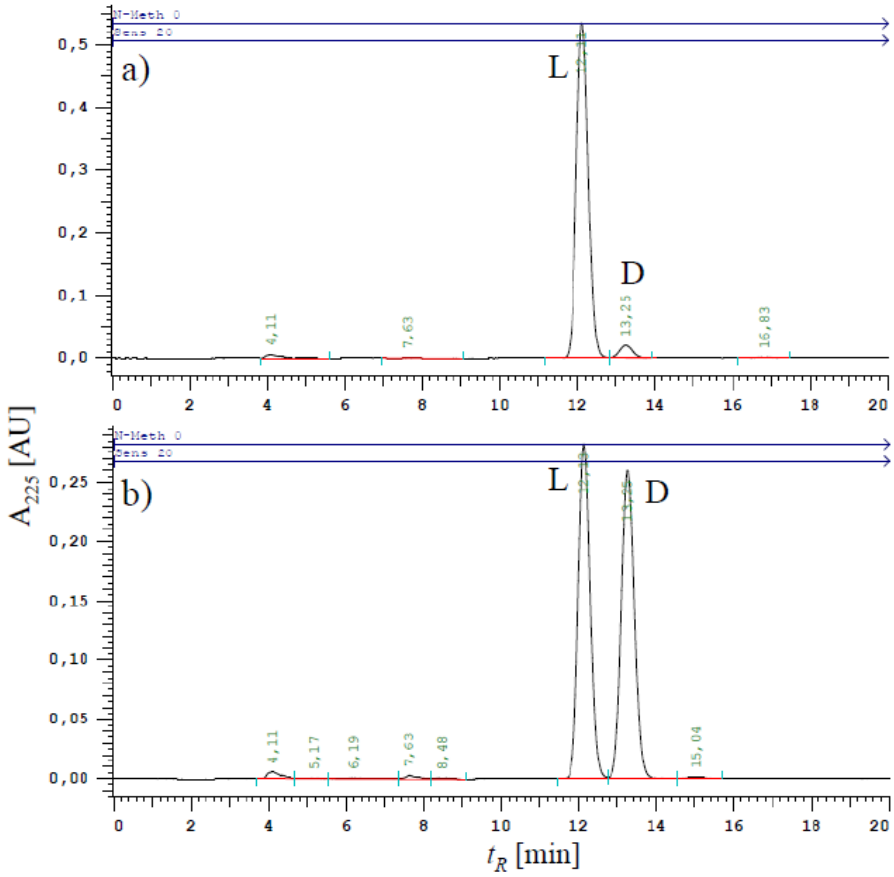



**Abbildung 72:** Chirale NP-HPLC-Analytik (*n*-Hexan/*i*-PrOH 17:3, 0.8 ml/min): a) Boc–4-$CF_3$-L-Phg–OBzl (**137**) nach der Boc-Schützung mit 3 eq $NaHCO_3$ als Base; b) Boc–4-$CF_3$-Phg–OBzl nach der Boc-Schützung mit 1 eq NaOH als Base: die Aminosäure ist hier nahezu vollständig racemisiert.

Die voll geschützte Aminosäure Boc–4-$CF_3$-L-Phg–OBzl (**137**) wurde nach erfolgter Boc-Abspaltung mit Boc–D-Dpg$(Bzl)_2$–OH (**70**) unter Verwendung des Kupplungsreagenzes DEPBT kondensiert (Abbildung 71). Das erhaltene Dipeptid **138** lag aufgrund der leichten Racemisierung der fluorierten Aminosäure **137** nicht diastereomerenrein vor, das unerwünschte Isomer konnte jedoch sauber mittels Säulenchromatographie an Kieselgel abgetrennt werden. Die Abspaltung der benzylischen Schutzgruppen lieferte schließlich Dipeptid **136**, welches direkt für den weiteren Aufbau von [4-$CF_3$-L-$Phg^{11}$]-Feglymycin (**134**) Verwendung fand. Die weitere Synthese wurde analog zu den schon beschriebenen Feglymycin-Derivaten durchgeführt. Das Zielpeptid [4-$CF_3$-L-$Phg^{11}$]-Feglymycin wies trotz der leicht erhöhten Hydrophobizität im Vergleich zu Feglymycin keine verschlechterte Löslichkeit in $H_2O$, MeOH und DMSO auf. Die Ergebnisse der CD-spektroskopischen Messungen sowohl in $H_2O$ als auch in 20 % TFE/$H_2O$ zeigten außerdem nahezu keine Unterschiede zum Originalpeptid (Abbildung 73). Man kann also davon ausgehen, dass der Einbau von 4-Trifluormethyl-L-phenylglycin in Position 11 der Aminosäuresequenz keine dramatischen Auswirkungen auf die Sekundärstruktur in Lösung hat.

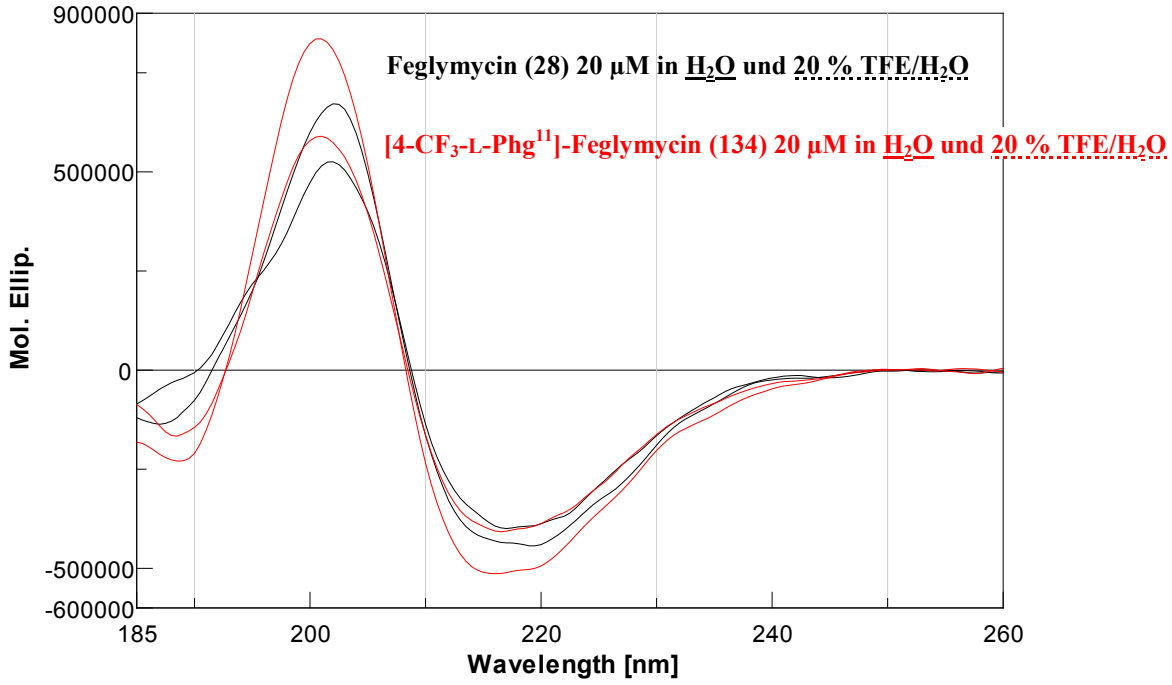



**Abbildung 73:** CD-Spektren von Feglymycin (**28**, 20 µM, schwarz) und [4-$CF_3$-L-$Phg^{11}$]-Feglymycin (**134**, 20 µM, rot) in $H_2O$ und 20 % TFE/$H_2O$.

[4-$CF_3$-L-Phg$^{11}$]-Feglymycin (**134**) zeigte bei den biologischen Testierungen (HIV-Replikations*assay*, antibakterielle Aktivität gegen *S. aureus* und Inhibition des MurC-Enzyms von *E. coli*) nur geringfügige Aktivitätsunterschiede zu Feglymycin selbst (vgl. auch Kapitel 5.3). Für die Wachstumshemmung von *S. aureus*-Stämmen (Abbildung 74) sowie die Inhibition von MurC (Abbildung 75) sind die Ergebnisse im Folgenden auch noch einmal im Vergleich zu den Ergebnissen für [L-Ala$^{11}$]-Feglymycin (**126**) grafisch dargestellt. Es zeigte sich, dass sowohl eine Verkleinerung der Seitenkette, als auch eine Erhöhung der Hydrophobizität in dieser Position der Sequenz in Bezug auf die Aktivität des Peptids nahezu toleriert wird.

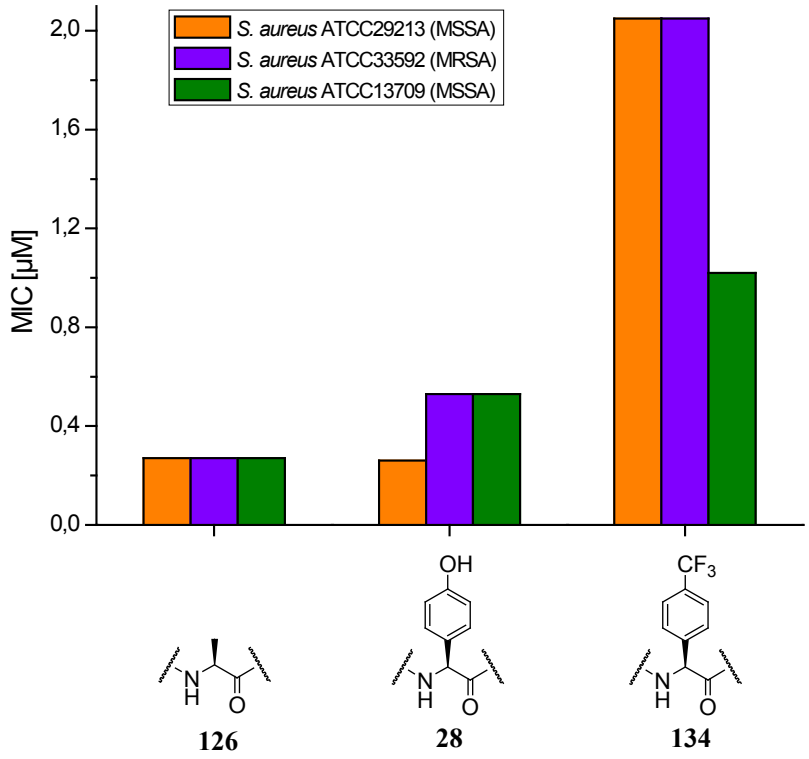



**Abbildung 74:** Auswirkung eines Austausches von L-Hpg gegen L-Ala (Peptid **126**) bzw. 4-$CF_3$-L-Phg (Peptid **134**) in Position 11 der Aminosäuresequenz von Feglymycin (**28**) auf die antibakterielle Aktivität gegen ausgewählte *S. aureus*-Stämme.

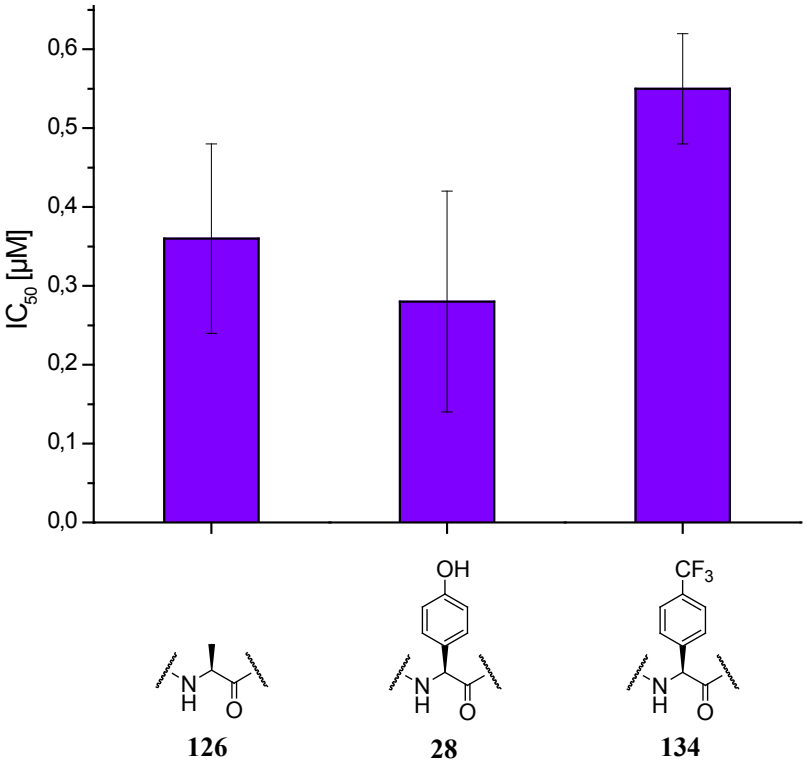



**Abbildung 75:** Auswirkung eines Austausches von L-Hpg gegen L-Ala (Peptid **126**) bzw. 4-$CF_3$-L-Phg (Peptid **134**) in Position 11 der Aminosäuresequenz von Feglymycin (**28**) auf die Inhibition des MurC-Enzyms aus *E. coli*.

Erste NMR-Experimente mit dem synthetisierten Feglymycin-Derivat **134** wurden bereits von Herrn Dr. Sergiy Afonin im Arbeitskreis von Frau Prof. Anne S. Ulrich (Karlsruher Institut für Technologie) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Peptid in der für die Messungen verwendeten Lipiddoppelschicht (DMPC-Membran) orientiert vorliegt. Es gab außerdem Hinweise darauf, dass es zu keiner Ausbildung größerer Aggregate kommt, sodass eine Porenbildung in der Membran durch Feglymycin-Moleküle eher unwahrscheinlich ist. Wie schon zuvor erläutert, ist für eine vollständige und sichere Interpretation die Synthese und Untersuchung von mindestens drei weiteren Derivaten mit fluorierten Aminosäuren an anderen Positionen notwendig. Die Ergebnisse des Feglymycin-Alanin-Scans können bei der Wahl der auszutauschenden Aminosäuren einen wichtigen Beitrag leisten. Zwar kann man Alanin und 4-Trifluormethylphenylglycin strukturell nicht direkt vergleichen, dennoch erscheint die Wahrscheinlichkeit eines Aktivitätsabfalls bei einer Substitution von D-Hpg[1] oder L-Hpg[5] gegen 4-Trifluormethylphenylglycin erhöht. Eine sichere Voraussage dazu kann jedoch auf der Basis der vorliegenden Testierungsergebnisse und theoretischer Überlegungen nicht getroffen werden. Alternativ könnte aber auch L-3-Trifluormethylbicyclo-

pent-[1.1.1]-1-ylglycin (**131**, Abbildung 69) statt Valin in Position 3 und 9 in das Peptid eingebaut werden. Diese Aminosäure besitzt ebenfalls die notwendige starre Fixierung des Fluor*labels* zum Peptidrückgrat und ist von der Raumausfüllung und Polarität durchaus mit Valin vergleichbar. Zusätzliche Informationen über die Beschaffenheit von Feglymycin in Gegenwart von Membransystemen können $^{2}$H- oder $^{15}$N-Markierungen innerhalb des Moleküls liefern. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass besonders bei $^{15}$N-*gelabelten* Peptiden größere Substanzmengen zur Verfügung stehen müssen, da die $^{15}$N-NMR-Spektroskopie wesentlich weniger sensitiv ist als die $^{19}$F-NMR-Spektroskopie.

### 3.2.4 Einbau eines Fluoreszenz*labels* in Feglymycin

Die Markierung von Biomolekülen und Naturstoffen mit Fluoreszenzfarbstoffen ist eine oft verwendete Methode zu deren genauerer Charakterisierung in biologischen Systemen.[175] So kann z.B. mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie eine Verbindung direkt an ihrem Wirkort in der Zelle sichtbar gemacht werden. Aufgrund der hohen Intensität von Fluoreszenz ist diese analytische Methode sehr sensitiv. Proteine werden i.d.R. mit gängigen Fluoreszenzfarbstoffen an bestimmten Seitenketten von Aminosäuren markiert.[176] Aufgrund der Größe des Proteins im Vergleich zum angebrachten Farbstoff ist diese Modifikation fast nie mit einer Störung der biologischen Funktion verbunden. Will man jedoch kleinere Peptide untersuchen, so kann schon eine geringfügige Manipulation der Struktur zu einem erheblichen Aktivitätsverlust führen. Eine Markierung am *N*- oder *C*-Terminus ist ebenfalls zu vermeiden, da die unter physiologischen Bedingungen geladenen Molekülenden oft sehr wichtig für molekulare Interaktionen sind. Ziel ist es daher, fluoreszierende Analoga von Aminosäure zu verwenden, welche sich sterisch und elektronisch nur unwesentlich von den zu ersetzenden Bausteinen unterscheiden.[177] Die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind durch ihre aromatischen Seitenketten quasi natürliche Fluoreszenz*label*. Besonders Phenylalanin besitzt jedoch eine geringe Quantenausbeute und einen niedrigen molaren Extinktionskoeffizienten, sodass dessen Vorhandensein in der Sequenz eines Peptids oft für fluoreszenzspektroskopische Methoden nicht ausreichend ist.

Da die Frage nach dem molekularen *Target* für die antiretrovirale und die antibakterielle Aktivität von Feglymycin noch immer nicht abschließend geklärt werden konnte, wäre eine Fluoreszenzmarkierung des Peptids sehr hilfreich. So könnte auch untersucht werden, ob das Peptid in Zellen eindringen kann.

Da fluoreszierende Gruppen i.d.R. aus kondensierten aromatischen Systemen aufgebaut sind, bietet sich bei Feglymycin eine Manipulation der Phenylalanin-Seitenkette an, denn schon die Annelierung eines weiteren Aromaten resultiert in einer beträchtlichen Steigerung der Fluoreszenzaktivität. Daher wurde analog zu den anderen bisher beschriebenen Derivaten Peptid **139** (Abbildung 76) synthetisiert, wobei L-Phenylalanin gegen 2-Naphthyl-L-alanin ausgetauscht wurde. Dabei war lediglich die Darstellung von Dipeptid **141** notwendig, wobei Boc–L-2-Nal–OH kommerziell erhältlich war und racemisierungsfrei unter Verwendung des Kupplungsreagenzes TBTU mit der entsprechend geschützten Asparaginsäure kondensiert werden konnte. Tridecapeptid **139** zeigte nahezu keinen Polaritäts- und Löslichkeitsunterschied zu Feglymycin.

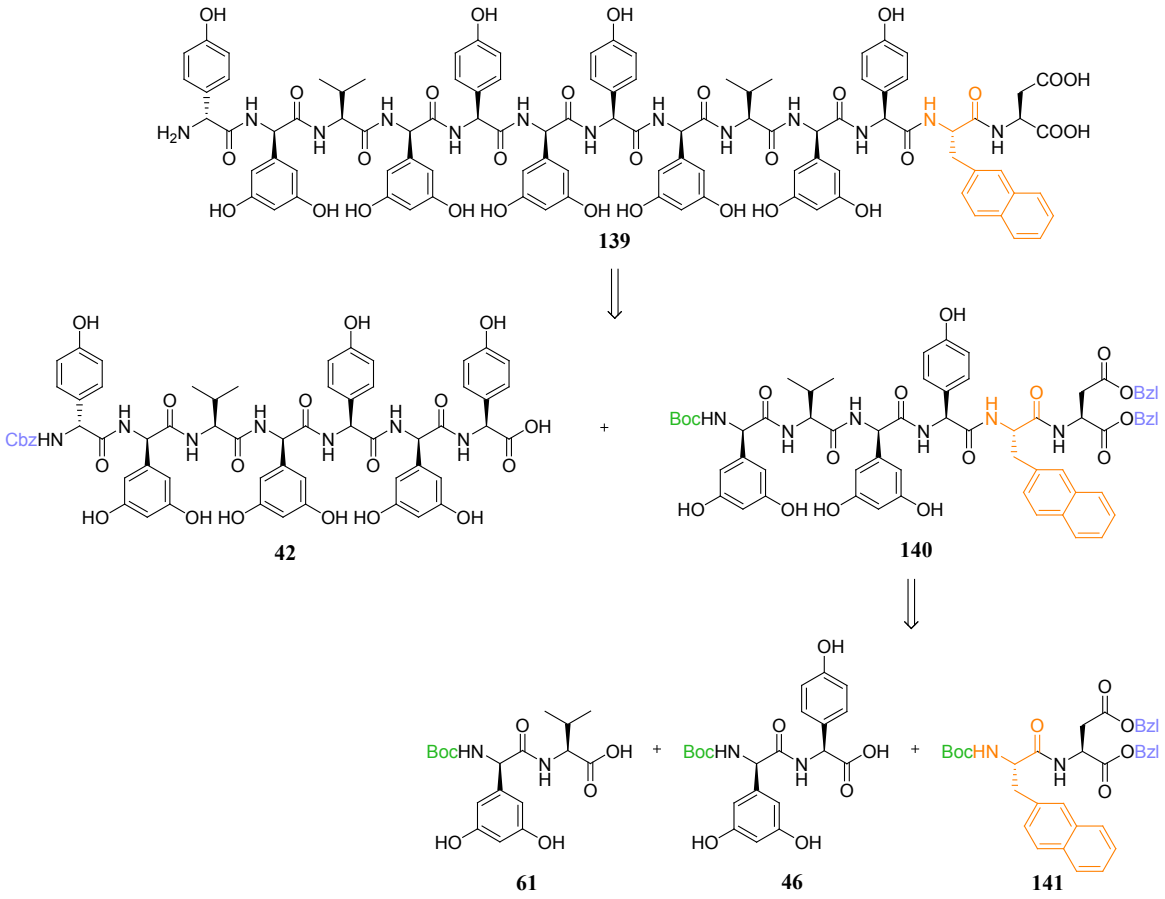



**Abbildung 76:** Retrosynthetische Betrachtung zum Aufbau von [L-2-Nal[12]]-Feglymycin (**139**).

In Abbildung 77 sind die CD-Spektren von [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**) in $H_2O$ und 20 % TFE/$H_2O$ den Spektren von Feglymycin gegenübergestellt.

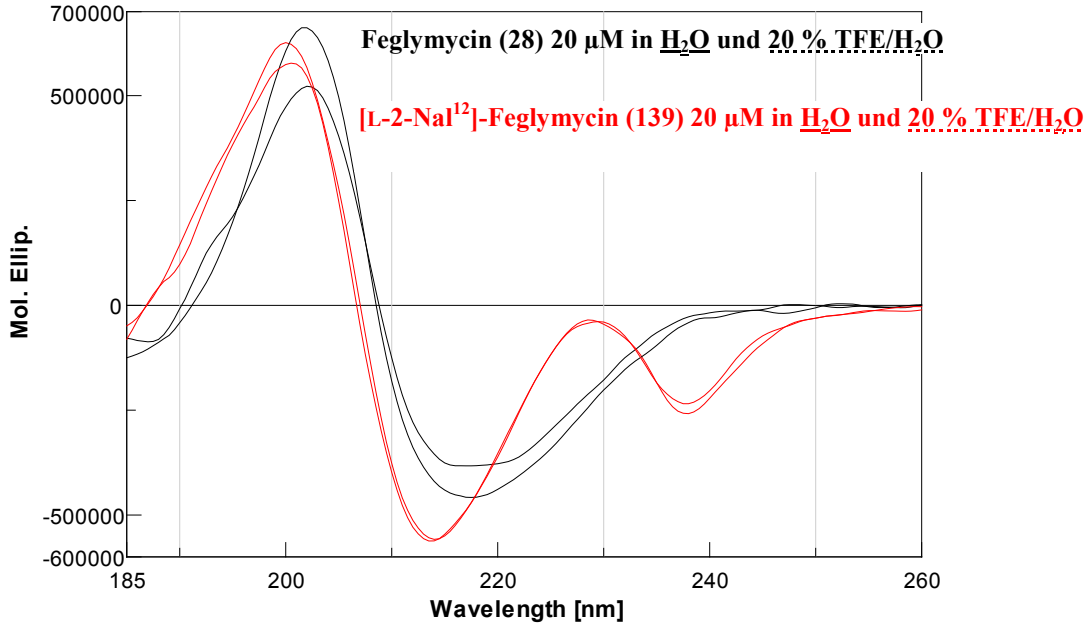



**Abbildung 77:** CD-Spektren von Feglymycin (**28**, 20 µM, schwarz) und [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**, 20 µM, rot) in $H_2O$ und 20 % TFE/$H_2O$.

Der Naphthylring ist ein sehr viel stärkeres Chromophor als der Phenylring. Diese spiegelt sich deutlich in den gezeigten CD-Spektren wider. Für [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin ergeben sich dadurch im Wellenlängenbereich von 220-250 nm zusätzliche Extrema. Daher ist es hier schwieriger, den Einfluss der vorgenommenen Aminosäuresubstitution auf die Sekundärstruktur des Peptids zu bewerten. Die UV-Spektren der beiden Peptide unterscheiden sich in Bezug auf die Intensität. Auch das Absorptionsmaximum im Bereich der aromatischen Chromophore ist für [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin etwas zu höheren Wellenlängen verschoben (Abbildung 78). In den Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren zeigt sich ein noch deutlicherer Unterschied (Abbildung 79). Die Intensität der Fluoreszenzemission ist für [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin um ein Vielfaches größer als für Feglymycin. Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda$ = 278 nm liegt $\lambda_{max}$ der Emission bei $\lambda \approx$ 338 nm. Damit sind die spektroskopischen Eigenschaften von 2-Naphthyl-L-alanin im Peptid in etwa mit denen von Tryptophan vergleichbar. Die sehr niedrige Peptidkonzentration, welche bei der Aufnahme der Fluoreszenzspektren verwendet wurde zeigt, wie sensitiv diese Methode ist.

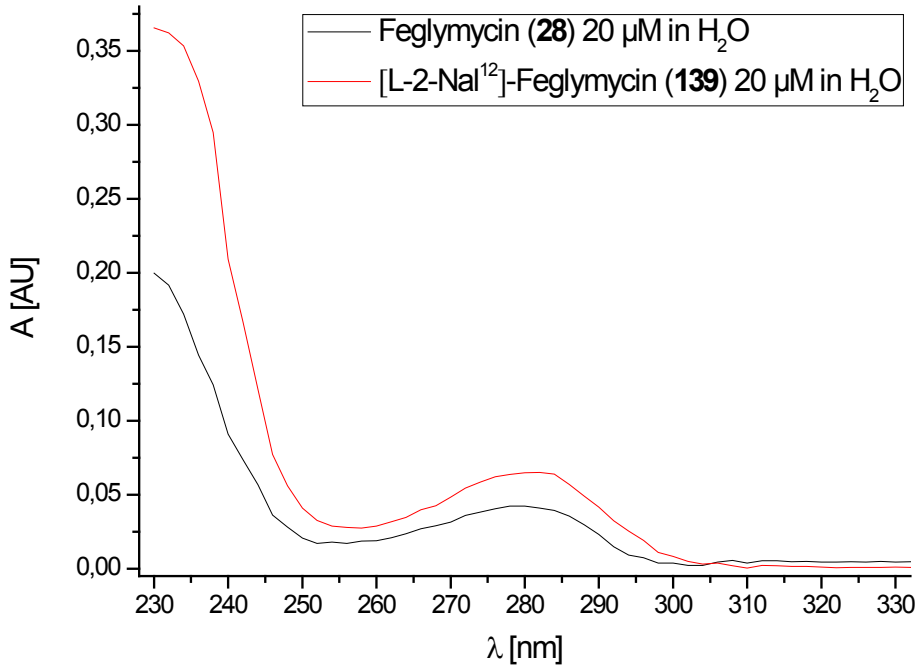



**Abbildung 78:** UV-Absorbtionsspektren von Feglymycin (**28**, schwarz) und [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**, rot) jeweils 20 µM in $H_2O$.

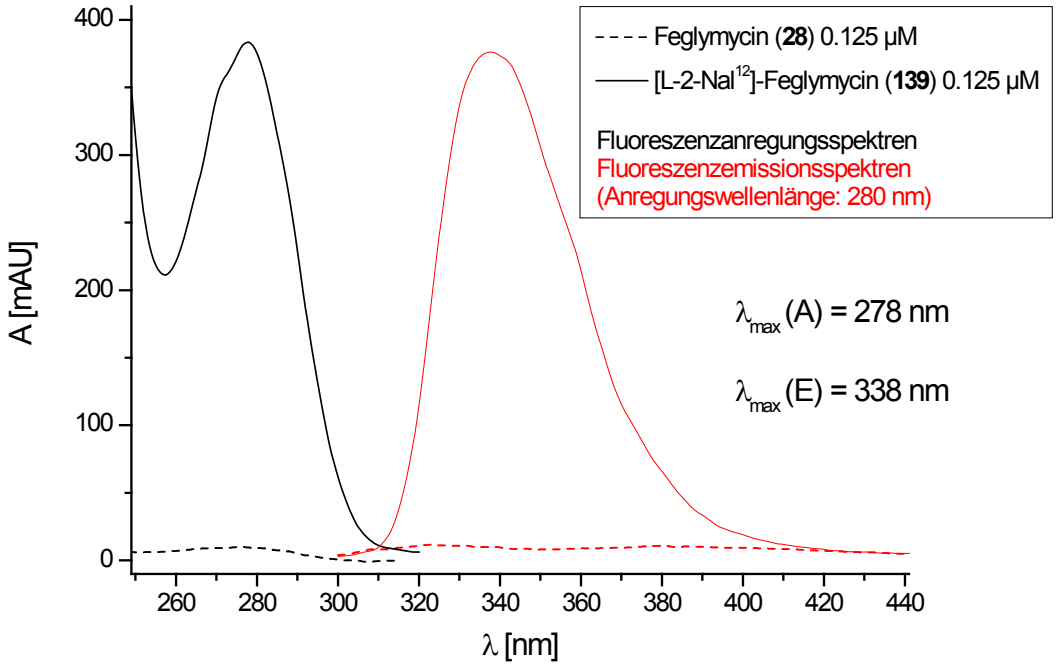



**Abbildung 79:** Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von Feglymycin (**28**) und [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**) jeweils 0.125 µM in $H_2O$.

Das fluoreszenzmarkierte Feglymycin-Derivat wurde zusammen mit den Alanin-Scan-Peptiden auf seine biologische Aktivität hin überprüft. Im Folgenden sind die Resultate der jeweiligen Testierungen gegenübergestellt.

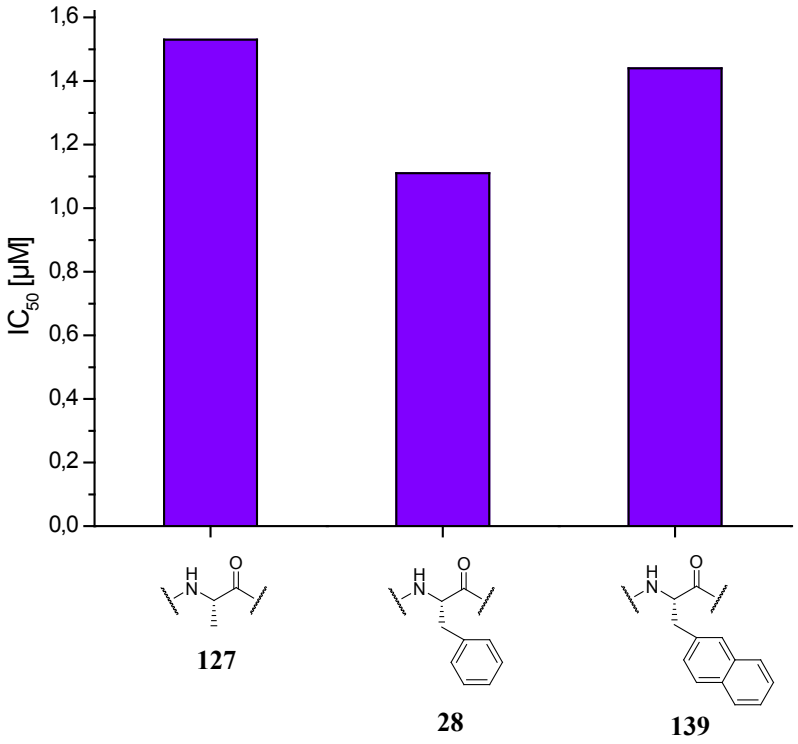



**Abbildung 80:** Auswirkung eines Austausches von L-Phe gegen L-Ala (Peptid **127**) bzw. L-2-Nal (Peptid **139**) in Position 12 der Aminosäuresequenz von Feglymycin (**28**) auf die antivirale Aktivität gegen HIV-1.

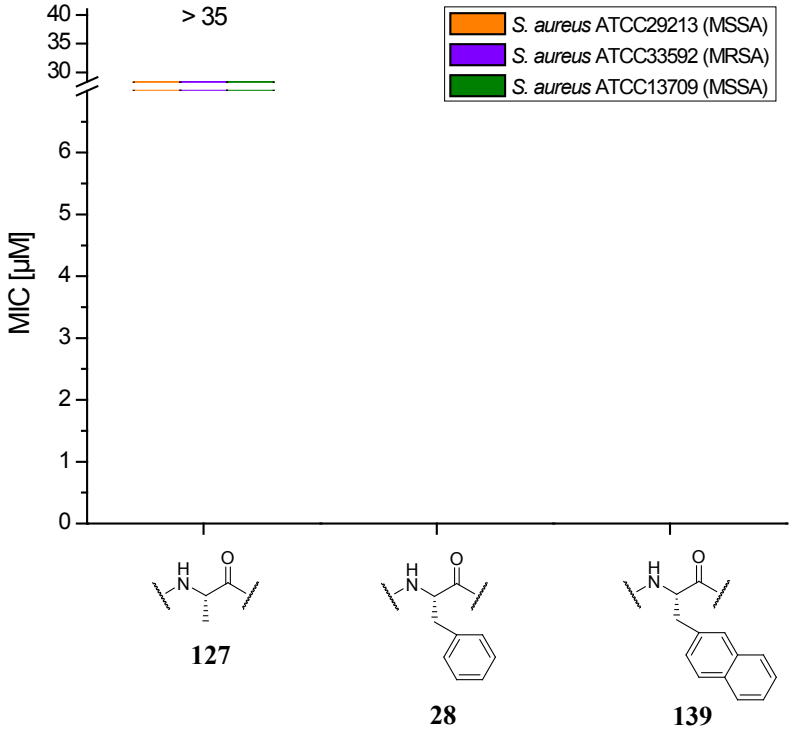



**Abbildung 81:** Auswirkung eines Austausches von L-Phe gegen L-Ala (Peptid **127**) bzw. L-2-Nal (Peptid **139**) in Position 12 der Aminosäuresequenz von Feglymycin (**28**) auf die antibakterielle Aktivität gegen ausgewählte *S. aureus*-Stämme.

Für die Hemmung der Replikation von HIV *in vitro* durch Feglymycin wird sowohl die Verkleinerung als auch die Vergrößerung des sterischen Anspruchs der Aminosäureseitenkette in Position 12 toleriert (Abbildung 80). Wie schon zuvor beschrieben, ist eine Substitution von L-Phe$^{12}$ gegen L-Ala mit dem Verlust der antibakteriellen Aktivität verbunden. Die Annelierung eines weiteren Aromaten an die Seitenkette von Phenylalanin bewirkt jedoch nur eine relativ geringe Erhöhung der MIC-Werte (Faktor 2-8; Abbildung 81). Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, zeigen die Peptide [L-Ala$^{12}$]-Feglymycin (**127**) und [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**) keinen Aktivitätsverlust in den Inhibitionstests für die Enzyme MurA und MurC aus *E. coli*.

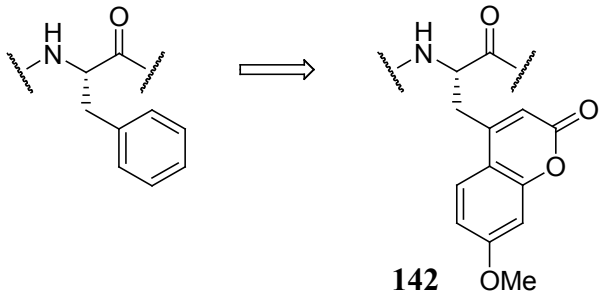
**Tabelle 6:** Auswirkung eines Austausches von Phe gegen Ala bzw. 2-Nal in Position 12 der Aminosäuresequenz von Feglymycin auf die Inhibition der Enzyme MurA und MurC aus *E. coli*.

| **Peptid** | **$IC_{50}$ [µM] MurA E. coli** | **$IC_{50}$ [µM] MurC E. coli** |
|---|---|---|
| Feglymycin (**28**) | 2.4 ± 1.1 | 0.3 ± 0.1 |
| [L-Ala$^{12}$]-Feglymycin (**127**) | 4.5 ± 0.1 | 0.5 ± 0.1 |
| [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**) | 3.6 ± 0.7 | 0.3 ± 0.1 |

Aus der Röntgenstruktur des Feglymycin-Dimers geht hervor, dass die aromatischen Reste der beiden Phenylalanine durch die Unterbrechung der Alternanz der Konfiguration am $C_\alpha$-Atom in den Helixinnenraum ragen (vgl. Abbildung 21). Durch hydrophobe Wechselwirkungen der Aromaten wird so die Sekundärstruktur stabilisiert. Man könnte daher annehmen, dass ein Wegfall dieser Seitenketten in [L-Ala$^{12}$]-Feglymycin zu einer weniger stark ausgeprägten Sekundärstruktur in Lösung führt, was mit dem beobachteten Verlust der antibakteriellen Wirkung in Zusammenhang stehen könnte. Im CD-Spektrum lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit dem Originalpeptid feststellen und auch in den anderen Testsystemen hat der Ersatz von L-Phe$^{12}$ gegen L-Ala im Peptid keine Auswirkungen. Lediglich für die Hemmung des Wachstums von *S. aureus* scheint also das Vorhandensein einer stark hydrophoben Aminosäureseitenkette am *C*-terminalen Ende des Peptids notwendig zu sein. Weitere Variationen dieses Strukturmotivs sowie die Testierung von Peptidfragmenten müssen jedoch für eine genauere Interpretation folgen.

Die Eignung von [L-2-Nal[12]]-Feglymycin für Untersuchungen mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden muss jetzt noch überprüft werden, denn die Anregung des Fluoreszenz*labels* erfolgt bei $\lambda \approx 280$ nm, also mit UV-Licht. Dies könnte bei der Verwendung des Peptids in komplexen biologischen Systemen zu störenden Hintergrundsignalen führen, die von Proteinen mit Tyrosin- oder Tryptophan-Bausteinen stammen. Auch bei der Arbeit mit lebenden Zellen kann eine Bestrahlung mit Licht dieser Wellenlänge diese schädigen.

Aufgrund der positiven Testierungsergebnisse ist es jetzt aber auch möglich, weitere Fluoreszenz*label* in die Primärsequenz von Feglymycin einzubauen. Da sich gezeigt hat, dass eine gewisse Vergrößerung der Aminosäureseitenkette von Phenylalanin in Position 12 in Bezug auf die biologische Wirkung des Peptids toleriert wird, könnten hier weitere Modifikationen eingeführt werden. Durch seine sehr guten spektroskopischen Eigenschaften und die Anregung bei Wellenlängen über 400 nm sind hierfür Coumarinderivate sehr geeignet. Die in Abbildung 82 gezeigte Aminosäure H-β-(7-methoxy-coumarin-4-yl)-L-alanin (**142**) bietet sich beispielsweise an.




**142**

**Abbildung 82:** Der Austausch von Phenylalanin gegen die Aminosäure H-β-(7-methoxy-coumarin-4-yl)-L-alanin (**142**) ist eine weitere Möglichkeit zur Fluoreszenzmarkierung von Feglymycin.

Coumarine besitzen eine hohe Quantenausbeute, sind hinreichend stabil und relativ einfach zu synthetisieren.[178] Eine Anregung erfolgt im Fall von Aminosäure **142** bei $\lambda = 488$ nm, wobei eine grüne Fluoreszenz beobachtet wird. Die Seitenkette dieses Bausteins enthält jedoch durch die Sauerstoffatome zusätzliche Wasserstoffbrückenakzeptoren. Nach dem Einbau dieser Aminosäure ist daher wie bei allen Peptidderivaten eine Überprüfung in den einzelnen Aktivitätstests unerlässlich.

# 4 Zusammenfassung und Ausblick

Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Derivate des Tridecapeptids Feglymycin konnten wertvolle Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen erhalten werden. Die Modifikation einzelner Aminosäurebausteine zeigte, welche Positionen in der Sequenz variiert werden können, ohne dass die biologische Aktivität des Peptids verloren geht. Die wohl wichtigste Erkenntnis ist dabei, dass insbesondere nicht alle der 3,5-Dihydroxyphenylglycine im Molekül vorhanden sein müssen. Die Synthese des Feglymycin-Spiegelbilds zeigte eindeutig, dass die absolute Konfiguration der Aminosäuren im Molekül insgesamt invertiert werden kann. Dies weist darauf hin, das Feglymycin nicht mit einem spezifischen Rezeptor wechselwirkt oder im aktiven Zentrum eines Enzyms bindet und dabei in Bezug auf die antibakterielle Wirkung möglicherweise über einen unspezifischen Transportmechanismus in die Zelle aufgenommen wird. Ein Antioxidantien*assay* widerlegte die bisherige Annahme, dass Feglymycin aufgrund der vielen phenolischen Aminosäuren ein extrem oxidationsempfindliches Molekül ist.

Betrachtet man noch einmal die Röntgenstruktur des Feglymyin-Dimers, so erkennt man in der Draufsicht, dass die helikale Struktur zwei unterschiedliche Seiten aufweist (Abbildung 83). Auf der einen Seite befinden sich mit den Aminosäuren 5-8 nur die Seitenketten von Hydroxyphenylglycin-Bausteinen. Auch die Hydroxy-Gruppen des *N*-terminalen D-Hpg zeigen jeweils an den Enden der Helix in diese Richtung. Die gegenüberliegende Seite wird flankiert von hydrophoben Valin-Bausteinen als auch von den negativ geladenen Seitenketten der Asparaginsäuren. In der Mittelregion befinden sich sowohl Val-, Hpg- als auch Dpg-Aminosäuren.

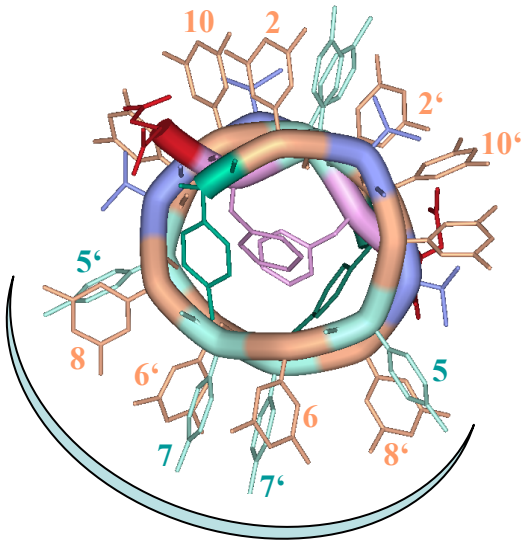



**Abbildung 83:** Die Röntgenstruktur von Feglymycin (Draufsicht). Die Aminosäuren 5-8 könnten eine mögliche pharmakophore Region des Peptids bilden.

Aus Abbildung 83 wird deutlich, dass das Peptidrückgrat von Feglymycin durch die nach außen ragenden Aminosäureseitenketten stark von der Umgebung abgeschirmt wird. Es ist daher weniger wahrscheinlich, dass eine Wechselwirkung mit den molekularen *Targets* über die Amid-Gruppen der Peptidkette erfolgt. Wie schon zuvor eingehend diskutiert, sind die zahlreichen phenolischen Seitenketten möglicherweise in diesem Zusammenhang von größerer Bedeutung. Dabei könnte eine pharmakophore Region von den Resten 5-8 des Feglymycin-Moleküls gebildet werden. Dafür sprechen einige Beobachtungen, die im Rahmen der Synthese und Testierung von Feglymycin-Derivaten gemacht wurden. Zum einen wurde der gleichzeitige Austausch der Dpg-Aminosäuren in Position 2 und 10 in Bezug auf die biologische Wirkung relativ gut toleriert. Beide Aminosäuren befinden sich auf der gegenüberliegenden Seite des hypothetischen Pharmakophors, sodass die Deletion dieser phenolischen Seitenketten für die *Target*bindung möglicherweise keine Rolle spielt. Die antibakterielle Aktivität geht hingegen bei einem Austausch von D-Hpg[1] und L-Hpg[5] gegen L-Ala verloren. Beide Aminosäureseitenketten befinden sich auf der gleichen Seite und könnten eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit einer Erkennungssequenz eines Proteins bzw. Enzyms spielen. Weiterhin zeigten *N*-terminale Heptapeptidfragmente mit den Aminosäuren 1-7 in den Mur-Enzyminhibitionstests und im HIV-Replikations*assay* eine vergleichbare Hemmwirkung wie Feglymycin selbst. Dies bekräftigt das Vorhandensein einer pharmakophoren Region in diesem Molekülabschnitt. Für gesicherte Aussagen müssen jedoch idealerweise weitere SAR-Studien folgen.

Ruft man sich noch einmal das in Kapitel 1.1 vorgestellte systematische Konzept zur Generierung eines Peptidomimetikums ins Gedächtnis, so konnten die Schritte 1 und 2 schon nahezu vollständig bearbeitet werden. Durch den Alanin-Scan und die Synthese weiterer Derivate wurden für die biologischen Aktivitäten von Feglymycin essenzielle Aminosäureseitenketten identifiziert. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die Aminosäuren 1-7 ausreichend sind, um einen inhibitorischen Effekt auszulösen. Ein naheliegender Versuch, der jetzt folgen könnte, ist die genauere Untersuchung der Alanin-Scan-Heptapeptide (**103**-**109**, Abbildung 56), insbesondere auch in Bezug auf deren Wirkung gegen *S. aureus in vitro*. Dazu sollten diese jedoch zuvor *N*-terminal entschützt werden, um den Amino-Terminus von Feglymycin so gut wie möglich zu imitieren. Durch eine Amidierung der *C*-terminalen Enden könnte überprüft werden, ob an dieser Stelle eine negative Ladung notwendig ist. Mit der Aufnahme von CD-Spektren dieser Fragmente wäre eine Sekundärstrukturvorhersage möglich.

Die Sekundärstruktur von Feglymycin in Lösung ist sehr wahrscheinlich von großer Bedeutung für dessen antiretrovirale und antibakterielle Aktivität. Die bisherigen Interpretationen von CD-Spektren und Testierungsergebnissen basierten auf der Annahme, dass Feglymycin in Lösung eine vergleichbare Form annimmt wie in der Röntgenstruktur. Detailliertere Informationen zur Sekundärstruktur eines Peptids in Lösung können zusätzlich aus NMR-Parametern erhalten werden.[179] Die NMR-Analytik von Feglymycin erfolgte bisher aufgrund der guten Löslichkeit in DMSO-$d_6$. Alle Multipletts waren dabei scharf und hervorragend aufgelöst. Dies spricht dafür, dass in Lösung keine Konformere oder Oligomere vorliegen. Lediglich die phenolischen Protonen zeigten bei einem hohen Wassergehalt des NMR-Lösungsmittels DMSO-$d_6$ eine starke Peakverbreiterung, was eine genaue Zuordnung der Signale erschwerte.

Die chemische Verschiebung der Amid-Protonen des Peptidrückgrates kann Auskunft darüber geben, ob diese eher in Kontakt mit dem Lösungsmittel stehen ($\delta_{NH}$ ~ 6-7 ppm) oder bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind ($\delta_{NH}$ ~ 7-9 ppm).[180] Im Fall von Feglymycin liegen die Signale dieser Protonen ausschließlich im Bereich von ca. 8-9 ppm. Dies spricht dafür, dass diese Wasserstoffatome an H-Brücken beteiligt sind. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass das verwendete Lösungsmittel DMSO-$d_6$ ein starker

Wasserstoffbrückenakzeptor ist. Sind die Amid-Protonen von Feglymycin tatsächlich nur an inter- bzw. intramolekularen**** H-Brücken beteiligt, so sollte sich der Wechsel zu einem weniger polaren Lösungsmittel wie z.B. $CDCl_3$ kaum auf deren chemische Verschiebung auswirken. Deuterium-Austauschexperimente könnten dazu weitere Informationen liefern. Dabei macht man sich den Effekt zunutze, dass Protonen, welche Wasserstoffbrückenbindungen bilden, abgeschirmter vorliegen und damit eine geringere Austauschrate mit Deuteronen des NMR-Lösungsmittels (in dem Fall $D_2O$) aufweisen. Dies spiegelt sich auch in den Amid-NH-Temperaturkoeffizienten ($\Delta\delta/\Delta T$) wider, welche ein Maß für die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung dieser Protonen sind.[181] Dieser Koeffizient ist ebenfalls abhängig davon, ob und wie stark die Amid-Protonen an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Der starke Lösungsmitteleinfluss ist jedoch bei der Auswertung zu berücksichtigen. Ein weiterer Parameter, der für die Sekundärstrukturvorhersage herangezogen werden kann, ergibt sich aus der skalaren Kopplung zwischen Amid-Proton und dem Proton des $C_\alpha$-Atoms einer Aminosäure. Die $^3J_{NH,H\alpha}$-Kopplungskonstante ist abhängig vom Diederwinkel zwischen diesen vicinalen Protonen und damit auch von der Konformation der Peptidkette.[182] Sie liegt für α-Helices bei ~ 4 Hz, beim Zufallsknäul bei ~ 6-7 Hz und bei β-Faltblattstrukturen i.d.R. über 7.5 Hz.[183] Im Fall von Feglymycin ist die Bestimmung dieser Kopplungskonstanten aus dem $^1$H-NMR-Spektrum eher schwierig, da die chemischen Verschiebungen sowohl der NH- als auch der $CH_\alpha$-Protonen der einzelnen Aminosäuren sehr ähnlich sind und sich daher viele Signale überlagern. Die $^3J_{NH,H\alpha}$-Kopplungskonstanten von gut separierten Signalen liegen jedoch im Bereich von 7-10 Hz. Genauere Werte könnten hier noch aus 2D-Experimenten (COSY, DQF-COSY) gewonnen werden.

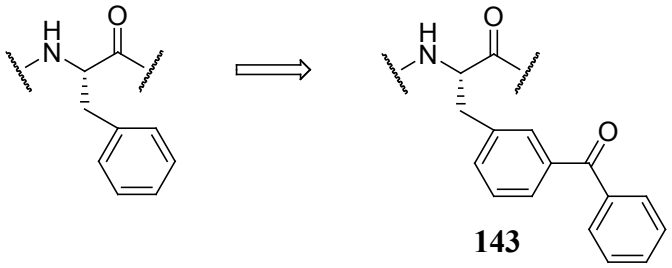
Diese ersten NMR-Parameter sind natürlich nicht ausreichend für eine sichere Vorhersage der Peptidstruktur in Lösung, sie bestätigen jedoch die Ergebnisse der CD-Messungen und weisen darauf hin, dass Feglymycin möglicherweise auch in Lösung eine β-Faltblatt-ähnliche oder β-helikale Konformation ausbildet. Genauere Informationen hierzu sollen jetzt außerdem NOESY-Experimente liefern.[179,183] Die anhand von NOE-Kontakten bestimmten Abstände der Protonen im Molekül sollen dann in molekulardynamische Strukturrechnungen einfließen.[184]

**** Gemeint sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei Feglymycin-Molekülen ohne Beteiligung von Lösungsmittelmolekülen.

Es stellt sich weiterhin die Frage, inwiefern Feglymycin in der Lage ist, biologische Membranen zu überwinden. Bisher scheint lediglich klar zu sein, dass das Peptid nicht wie z.B. Gramicidin A (**29**, Abbildung 23) Poren bilden kann. Die Synthese weiterer Peptidderivate mit einem Fluor*label* und deren Untersuchung mittels $^{19}$F-Festkörper-NMR-Spektroskopie kann dazu beitragen, eine mögliche anderweitige Membraninteraktion zu beleuchten. Auch der Einbau eines Fluoreszenz*labels* kann hilfreich dabei sein, das Peptid in Gegenwart von lebenden Zellen zu lokalisieren. Dabei liegt der Fokus insbesondere auf der Untersuchung von Bakterien, denn auch für viele andere Antibiotika ist bisher nicht eindeutig klar, wie sie die bakterielle Zellhülle überwinden und zu ihren jeweiligen *Targets* gelangen können. Lediglich stark hydrophobe Verbindungen passieren die Lipidmembran teilweise durch den unspezifischen Mechanismus der Diffusion. Bakterien verfügen jedoch auch über spezielle Oligopeptid-Permeasen (Opp). Diese membranständigen Proteine aus der Klasse der ATP-abhängigen ABC-Transporter schleusen Peptide unterschiedlicher Länge und Aminosäure-zusammensetzung in die Zelle und sind u.a. zuständig für die Versorgung der Bakterien mit Nährstoffen.[185] Sie besitzen dabei jedoch i.d.R. ein relativ breites Substratspektrum. In *S. aureus* sind bisher fünf dieser Transportproteine bekannt, darunter vier der schon erwähnten Oligopeptid-Permeasen (Opp1-4) sowie eine Protein (DtpT), welches ausschließlich Di- und Tripeptide in die Zelle importiert.[186] Es ist möglich, dass Feglymycin über eines dieser Transportsysteme in die Bakterienzelle gelangen kann. Diese Hypothese sollte durch die Testierung der synthetisierten Feglymycin-Derivate auf deren antibakterielle Aktivität gegenüber entsprechenden *Knockout*-Mutanten näher untersucht werden.

Es ist abzuwarten, ob in nächster Zeit auch das molekulare *Target* für die antiretrovirale Aktivität von Feglymycin eindeutig identifiziert werden kann. Das Fehlen von Mutationen im Genom von Feglymycin-resistenten Virusstämmen ist sehr ungewöhnlich und bedarf weiterer Untersuchungen. Vielversprechend ist dabei jedoch, dass sich gegen dieses Peptid resistente Stämme nur sehr langsam bilden. Ob Feglymycin für die Weiterentwicklung als Wirkstoff für die antiretrovirale Therapie geeignet ist, möglicherweise in der Formulierung eines Mikrobizids, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht absehbar.

In Bezug auf die Hemmung der Enzyme Mur A und MurC des Peptidoglycanbiosyntheseweges ist bisher nur bekannt, dass Feglymycin wahrscheinlich nicht im aktiven Zentrum der Proteine bindet. Um weitere Informationen über die Bindungsstelle und den Mechanismus der Inhibition zu erhalten, bietet sich neben der Röntgenstrukturanalyse auch die Verwendung eines Photoaffinitäts*labels* an.[187] Dabei wird eine chemisch inerte, aber photoreaktive Gruppe in die Struktur des Inhibitors integriert. Nach Inkubation mit dem Zielenzym kann durch eine Bestrahlung der Probe, i.d.R. mit UV-Licht, der Ligand kovalent an das Protein gebunden werden. Zur Identifikation der Bindungsstelle können dann beispielsweise massenspektrometrische Analysemethoden gekoppelt mit einem enzymatischen Verdau verwendet werden. Da sich für Feglymycin gezeigt hat, dass eine Vergrößerung der aromatischen Seitenkette in Position 12 der Sequenz (Austausch von L-Phe$^{12}$ gegen L-2-Nal) kaum auf dessen biologische Aktivität auswirkt, ist diese Position möglicherweise geeignet für den Einbau eines Photoaffinitäts*labels*. Dabei bietet sich beispielsweise die Aminosäure 3-(4-Benzoylphenyl)-L-alanin (L-Bpa, **143**, Abbildung 84) an. Die Benzophenoneinheit dieses Bausteins wird häufig als photosensitive Gruppe verwendet und ist in Bezug auf die Größe der Seitenkette vergleichbar mit 2-Naphthyl-L-alanin.[188]




**143**

**Abbildung 84:** Durch einen Austausch von L-Phenylalanin in Position 12 der Aminosäuresequenz von Feglymycin durch 3-(4-Benzoylphenyl)-L-alanin (**143**) erhält man ein Peptidderivat mit Photoaffinitäts*label*.

Wird die Benzophenon-Gruppe UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von ca. 350 nm ausgesetzt, entsteht ein Radikal, welches bevorzugt mit hydrophoben Regionen eines Proteins abreagiert. Dabei kommt es zu einer Insertion insbesondere in unreaktive CH-Bindungen. Ein Vorteil von Benzophenon ist dessen höhere Stabilität im Vergleich zu anderen photosensitiven Gruppen wie z.B. den Arylaziden oder Diazirinen. Außerdem ist diese funktionelle Gruppe kompatibel mit der Schutzgruppenstrategie der Feglymycin-Totalsynthese.

Ein Photoaffinitäts*label* an einem Wirkstoff kann auch dazu verwendet werden, dessen *Target* aus einer Mischung von vielen Proteinen zu identifizieren. Dabei ist jedoch das Anbringen eines zweiten *Labels* an dem Molekül notwendig, um die Ligand/Protein-Komplexe später eindeutig identifizieren zu können. Neben der Verwendung von fluoreszierenden Gruppen kommen häufig auch radioaktive Marker zum Einsatz. Eine Möglichkeit hierbei wäre beispielsweise der Austausch eines Wasserstoffatoms am Aromaten von Benzophenon gegen Tritium.[188a] Diese Substitution verändert die ursprüngliche Struktur in Bezug auf die Sterik am wenigsten. Ein Nachteil ist jedoch, dass die Arbeit mit radioaktiven Isotopen besondere Sicherheitsmaßnahmen erfordert. Die beschriebene Methode wurde z.B. verwendet, um den Wirkmechanismus der Mannopeptimycine zu untersuchen. Durch den Einsatz des radioaktiven Photoaffinitäts*labels* konnte gezeigt werden, das diese antibakteriellen Glycopeptide an Lipid II binden und so die Peptidoglycanbiosynthese stören.[189]

Eine weitere Methode mögliche Proteine bzw. Enzyme zu finden, mit denen Feglymycin interagiert, ist ein sogenannter *Pull-Down-Assay*.[190] Dazu muss das Peptid kovalent an einen festen Träger, z.B. einem Polysaccharid, gebunden werden. Anschließend wird der immobilisierte Ligand mit einem Proteinlysat, z.B. von *S. aureus*, inkubiert. Proteine, die nicht am Ligand, und damit auch nicht am polymeren Träger binden, können anschließend durch gründliches Waschen entfernt werden. Auch unspezifisch gebundene Proteine werden so eliminiert. Die Elution des Zielproteins erfolgt im Anschluss beispielsweise mit einem Überschuss an Ligand oder unter denaturierenden Bedingungen. Bei der weiterführenden Analyse kommen u.a. Gelelektrophorese oder Massenspektrometrie zum Einsatz. Das Prinzip der Affinitätschromatographie wurde in den letzten Jahren stetig weiterentwickelt und hat dazu beigetragen, die molekularen Angriffspunkte vieler Wirkstoff zu finden.[191] Ein Problem bei dieser Methode kann sein, dass der verwendete Ligand durch das Anbringen an die Trägermatrix seine Aktivität verliert, da möglicherweise für die Interaktion wichtige Strukturelemente blockiert werden. Es ist daher i.d.R. unerlässlich, zuvor eine SAR-Studie durchzuführen, um die für die biologische Wirkung essenziellen Strukturbestandteile zu identifizieren.

Da bisher noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob eine Inhibition der Enzyme MurA und MurC der Zellwandbiosynthese wirklich die molekulare Ursache für die antibakterielle Aktivität von Feglymycin ist, müssen hier noch weitere Untersuchungen folgen. Möglich wäre z.B. die Durchführung von Fütterungsversuchen mit radioaktiv markierten Biosynthesevorläufern wie 5-[$^3$H]-Thymidin oder [$^3$H]-Glucosamin in Gegenwart von Feglymycin.[60] So könnten die Auswirkungen auf die Biosynthese von Makromolekülen wie der DNA und RNA oder die Protein-, Fettsäure- bzw. Zellwandbiosynthese *in vivo* verfolgt werden. Zur Identifizierung des molekularen *Target*s ist auch eine Proteomanalyse von *S. aureus*-Stämmen denkbar, welche zusammen mit Feglymycin angezogen wurden.[192] Diese relative neue Methode kann Hinweise darauf liefern, ob sich die Expression bestimmter Genprodukte in Gegenwart des Peptids verändert. Sollte Feglymycin tatsächlich mehrere bakterielle Biosynthesewege inhibieren, so kann dies die Entwicklung von Resistenzen erheblich erschweren.

Durch das Baukastenprinzip der Feglymycin-Totalsynthese wird die Generierung von analogen Peptiden sehr erleichtert. Im Rahmen einer SAR-Studie sind noch zahlreiche Derivate denkbar, die wertvolle Informationen über die Wichtigkeit der in Feglymycin enthaltenen Aminosäuren für die biologische Wirkung liefern könnten. Um zu überprüfen, ob die Starrheit der Seitenketten der Hydroxyphenylglycine relativ zum Peptidrückgrat von Bedeutung ist, könnte statt 4-Hydroxyphenylglycin Tyrosin in die Sequenz eingebaut werden. Durch die zusätzliche Methylengruppe besitzt die phenolische Seitenkette eine erweiterte Rotationsfreiheit und Flexibilität. Dies könnte die Interaktion mit einem *Target* erheblich beeinflussen. Weiterhin wäre ein systematischer Ersatz der Hydroxyphenylglycine gegen Phenylglycine denkbar. Die strukturellen Veränderungen wären dabei nicht so extrem wie beim Alanin-Scan und die Wichtigkeit der einzelnen Hydroxy-Gruppen könnte überprüft werden. In Anbetracht des Potenzials antibakterieller Lipopeptide wie Daptomycin (**16**, Abbildung 11) sollte getestet werden, inwiefern das Anbringen einer lipophilen Seitenkette an das Feglymycin-Molekül dessen biologische Wirkung beeinflusst. Möglich wäre hierbei eine Acylierung des *N*-Terminus. Die Fülle an denkbaren strukturellen Veränderungen ist nahezu unbegrenzt. So könnte außerdem die Ladungsverteilung im Peptid durch Einbau von zusätzlichen aciden oder auch basischen Aminosäuren variiert werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Synthese des Retro-Inverso-Peptids dar, wobei die Konfiguration der Aminosäuren sowie die Richtung der Sequenz umgekehrt werden.[193] Interessant ist dabei insbesondere die Auswirkung der

veränderten Ladungsverteilung der Endgruppen auf die biologische Wirkung des Peptids bei gleichbleibender räumlicher Anordnung der Aminosäureseitenketten. Um den Aufwand zur Generierung totalsynthetischer Peptidderivate bei der Durchführung weiterer SAR-Studien zu minimieren wäre die Identifizierung des Feglymycin-Genclusters hilfreich. Die molekularbiologische Manipulation auf genetischer Ebene würde die Produktion von Feglymycin-Derivaten *in vivo* erlauben. Obwohl dabei i.d.R. nur geringe Produktmengen isoliert werden, reichen diese oft für eine erste Abschätzung der biologischen Aktivität aus. Aufgrund der Vielzahl an Möglichkeiten sollte bei allen weiteren strukturellen Modifikationen der Feglymycin-Struktur unbedingt rational und zielgerichtet vorgegangen werden.

# 5 Experimenteller Teil

## 5.1 Allgemeine Informationen

### 5.1.1 Chemikalien

Für Synthese und Analytik verwendete Chemikalien wurden von den Firmen *AAPPTech* (Louisville, KY, USA), *ABCR* (Karlsruhe), *Alfa Aesar* (Karlsruhe), *Bachem* (Bubendorf, Schweiz), *Fisher Scientific* (Schwerte), *Iris Biotech* (Marktredwitz), *Merck* (Darmstadt), *Orpegen Pharma* (Heidelberg) und *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen) bezogen. Wenn nicht anders angegeben, wurden diese wie erhalten eingesetzt.

Wasserfreie Lösungsmittel von *Fisher Scientific-ACROS* (Schwerte) wurden, wenn nicht anders vermerkt, wie gekauft verwendet.

Deuterierte Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie (Chloroform-$d_1$ 99.8 % und Dimethylsulfoxid-$d_6$ 99.8 %) wurden von der Firma *Euriso-Top* (Saarbrücken) bezogen.

### 5.1.2 Chromatographie

**Flash-Chromatographie (FC)** wurde durchgeführt unter Verwendung von Davisil®-Kieselgel (*GRACE Davison*, Hollerhecke; Korngröße 40-63 µm) oder des CombiFlash Rf-Systems mit vorgepackten Kieselgelsäulen (*Teledyne ISCO*, Lincoln, NE, USA). Als Eluenten kamen *n*-Hexan, Essigsäureethylester, Diethylether, Dichlormethan, Chloroform sowie Methanol zum Einsatz.

**Analytische Dünnschichtchromatogramme (DC)** wurden mit beschichteten DC-Aluminium-Folien mit Fluoreszenzindikator der Firma *Merck* (Kieselgel 60 $F_{254}$) aufgenommen. Die Detektion von Verbindungen erfolgte zum einen mittels UV-Licht ($\lambda$ = 254 nm) und zum anderen durch Entwickeln mit folgenden Färbelösungen:[194]

- Permanganat-Reagenz: 3 g $KMnO_4$, 20 g $K_2CO_3$, 300 ml $H_2O$, 5 ml 5 %ige NaOH-Lösung
- Molybdat-Reagenz: 20 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$, 400 mg $Ce(SO_4)_2$, 400 ml 10 %ige $H_2SO_4$-Lösung
- Ninhydrin-Reagenz: 300 mg Ninhydrin, 100 ml *n*-BuOH
- 2,6-Dichlorphenolindophenol-Reagenz: 380 mg 2,6-Dichlorphenolindophenol (Na-Salz), 480 ml EtOH

**Analytische RP-HPLC** kam bei der Reaktions- und Reinheitskontrolle zum Einsatz. Verwendung fand dabei eine analytische HPLC-Anlage der 1100-Serie von *Agilent Technologies* (Santa Clara, CA, USA) mit DAD-Detektor und einer Luna 5u C18(2) 100A-Säule (5 µm, 4.6 x 100 mm; *Phenomenex,* Aschaffenburg) sowie die Steuerungs- und Auswertungssoftware *Agilent* Chem Station. Es wurde, soweit nicht anders angegeben, folgender Standardgradient bei einer Flussrate von 1.5 ml/min verwendet (LM A: AcN + 0.1 % HCOOH; LM B: Millipore-$H_2O$ + 0.1 % HCOOH):

**Tabelle 7:** Gradient für die analytische RP-HPLC-Analytik.

| Zeit | LM A : LM B |
|---|---|
| 0 min | 5 : 95 |
| 10 min | 100 : 0 |
| 13 min | 100 : 0 |
| 13.1 min | 5 : 95 |
| 15 min | 5 : 95 |

**Analytische chirale NP-HPLC** wurde zu Bestimmung von *ee*-Werten herangezogen. Zur Durchführung der Analysen diente eine HPLC-Anlage LaChrom der Firma *Merck-Hitachi* (*VWR International*, Darmstadt) mit einer CHIRALPAK® AD-H Säule (5 µm, 4.6 x 250 mm) von *Chiral Technologies* (Illkirch-Cedex, Frankreich). Die Steuerung der Module und die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software D 7000 HSM von *Merck-Hitachi*. Als isokratisches Lösungsmittelsystem diente *n*-Hexan und *iso*-Propanol. Die Lösungsmittelverhältnisse sowie die verwendeten Flussraten sind an entsprechender Stelle angegeben. *ee*-Werte wurden mit der folgenden Formel berechnet, wobei $E^+$ die Integralfläche des Enantiomers im Überschuss und $E^-$ die Integralfläche des Enantiomers im Unterschuss ist (Detektionswellenlänge $\lambda$ = 225 nm):

$$ee[\%] = \frac{E^+ - E^-}{E^+ + E^-} \cdot 100\%$$

**Präparative RP-HPLC-Trennungen** erfolgten mit einer HPLC-Anlage der 1100-Serie von *Agilent Technologies* mit DAD-Detektor unter Verwendung einer RP-$C_{18}$-Säule (Grom-Sil 120, ODS-5 ST, 10 µm, 20 x 250 mm; *Grom*, Rottenburg-Hailfingen) sowie der Steuerungs- und Auswertungssoftware *Agilent* Chem Station. Als Lösungsmittelsysteme wurden AcN + 0.1 % HCOOH (LM A) und Millipore-$H_2O$ + 0.1 % HCOOH (LM B) mit einer Flussrate von 15 ml/min eingesetzt. Die jeweiligen Gradienten sind an entsprechender Stelle aufgeführt. Die Detektion und Fraktionierung erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, bei einer Wellenlänge von $\lambda$ = 280 nm.

**Größenausschlusschromatographie** wurde durchgeführt mit Sephadex LH20-Material von *GE Healthcare* (Uppsala, Schweden). Vor dem Packen der Säule wurde das in Methanol (*gradient grade*) suspendierte Material für 30 min im Ultraschallbad entgast, anschließend 24 h bei 4 °C gequollen und dann in einem Schritt in eine Glassäule (ECO25 999 VOE, 25 x 1000 mm) der Firma *KRON-LAB* (Dinslaken) gegossen. Anschließend wurde die verschlossene Säule mit dem FPLC-System ÄKTApurifier 10 (*GE Healthcare*; Steuerungssoftware: UNICORN 5.2) verbunden und bei einer Flussrate von 4 ml/min gepackt, bis das Säulenbett eine konstante Höhe erreicht hatte. Vor einer Trennung wurde die Säule 24 h bei einer Flussrate von 0.2 ml/min äquilibriert. Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Aufreinigungen erfolgten unter Verwendung folgender Parameter:

- Lösungsmittel: Methanol (*gradient grade*)
- Flussrate: 0.2 ml/min
- Probenschleife: 1 ml; aufgetragenes Probenvolumen 0.5 ml - 0.8 ml bei einer Konzentration von ca. 100 mg/ml
- Detektionswellenlängen: $\lambda$ = 214 nm, 280 nm und 310 nm
- Fraktionierungsbeginn nach ca. 200 ml Vorlauf (0.4 CV)
- Fraktionsvolumen: 2 ml

### 5.1.3 NMR-Spektroskopie

**$^{1}$H-NMR-Spektren** wurden an einem Avance 400 MHz oder einem DRX 500 MHz NMR-Spektrometer der Firma *Bruker* (Rheinstetten) bei 298 K aufgenommen und mit der Software Topspin 1.3 (*Bruker*) ausgewertet. Das verwendete Lösungsmittel und die Sendefrequenz sind zusammen mit den spektroskopischen Daten aufgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in δ-Werten in [ppm] relativ zum Restsignal der undeuterierten Lösungsmittelanteile angegeben.[195] In Klammern sind die Signalmultiplizität, die Kopplungskonstante *J* in [Hz] und die durch elektronische Integration ermittelte Protonenzahl angegeben. Die Signalmultiplizität ist wie folgt gekennzeichnet: (s) Singulett, (br s) breites Singulett, (d) Dublett, (t) Triplett und (m) Multiplett.

**$^{13}$C-APT-NMR-Spektren** wurden an einem Avance 400 MHz NMR-Spektrometer von *Bruker* bei 298 K $^{1}$H-breitbandentkoppelt aufgenommen und mit der Software Topspin 1.3 ausgewertet. Das verwendete Lösungsmittel und die Sendefrequenz sind zusammen mit den spektroskopischen Daten aufgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in δ-Werten in [ppm] relativ zum Restsignal der undeuterierten Lösungsmittelanteile angegeben.[195]

**2D-NMR-Experimente** (COSY, HSQC, HMBC) wurden mit einem DRX 500 MHz NMR-Spektrometer der Firma *Bruker* bei 298 K durchgeführt.

### 5.1.4 Massenspektrometrie

**EI-MS- und EI-HRMS-Spektren** wurden mit einem Finnigan MAT 95 S (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) mit einem Ionisierungspotenzial von 70 eV aufgenommen.

**HPLC-ESI-MS- und ESI-HRMS-Messungen** wurden an einer Orbitrap LTQ XL (*Thermo Fisher Scientific*) in Kombination mit einem 1200-HPLC-System (*Agilent Technologies*; Säule: Hypersil-100 C18 5 µm, 3 x 50 mm, *Thermo Fisher Scientific*) unter Verwendung des folgenden Gradienten bei einer Flussrate von 1.3 ml/min aufgenommen (LM A: MeOH + 0.025 % HCOOH; LM B: Millipore-$H_2O$ + 0.025 % HCOOH):

**Tabelle 8:** Gradient für HPLC-ESI-MS-Messungen.

| Zeit | LM A : LM B |
|---|---|
| 0 min | 5 : 95 |
| 12 min | 100 : 0 |
| 14 min | 100 : 0 |
| 14.1 min | 5 : 95 |
| 16.5 min | 5 : 95 |

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software Xcalibur (*Thermo Fisher Scientific*).

**HPLC-ESI-MS/MS-Spektren** wurden an einem Qtrap 2000 Massenspektrometer der Firma *Applied Biosystems* (Darmstadt) in Kombination mit einem 1100-HPLC-System (*Agilent Technologies*; Säule: Luna 3u C18(2) 100A 3 µm, 1 x 50 mm, *Phenomenex*) unter Verwendung des folgenden Gradienten bei einer Flussrate von 1.5 ml/min aufgenommen (LM A: AcN + 0.1 % HCOOH; LM B: Millipore-$H_2O$ + 0.1 % HCOOH):

**Tabelle 9:** Gradient für HPLC-ESI-MS/MS-Messungen.

| Zeit | LM A : LM B |
|---|---|
| 0 min | 5 : 95 |
| 10 min | 100 : 0 |
| 13 min | 100 : 0 |
| 13.1 min | 5 : 95 |
| 15 min | 5 : 95 |

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software Analyst 1.4.2, ebenfalls von der Firma *Applied Biosystems*.

HPLC-ESI-MS/MS-Spektren für alle vollständig entschützten Feglymycin-Derivate wurden mit einem ESI-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer 6460 von *Agilent Technologies* in Kombination mit einem 1290 Infinity LC-System (Säule: Eclipse Plus C18 1.8 µm, 2.1 x 50 mm, ebenfalls von *Agilent Technologies*; Injektionsvolumen: 15 µl) unter Verwendung des folgenden Gradienten bei einer Flussrate von 0.3 ml/min aufgenommen (LM A: AcN + 0.1 % TFA; LM B: Millipore-$H_2O$ + 0.1 % TFA):

**Tabelle 10:** Gradient für HPLC-ESI-MS/MS-Messungen für Feglymycin-Derivate.

| Zeit | LM A : LM B |
|---|---|
| 0 min | 5 : 95 |
| 6.5 min | 100 : 0 |
| 8 min | 100 : 0 |
| 8.5 min | 5 : 95 |
| 10 min | 5 : 95 |

Die Fragmentierungsexperimente erfolgten im Positivmodus unter Verwendung der folgenden Parameter sowie der Steuerungs- und Auswertungssoftware MassHunter (*Agilent Technologies*):

- *gas temperature*: 250 °C, *gas flow*: 10 l/min
- *nebulizer*: 30 psi
- *sheat gas temperature*: 400 °C, *sheat gas flow*: 11 l/min
- *capillary*: 5000 V, *noozle voltage*: 1500 V
- *collision energy*: 10 V
- *fragmentator*: 160

### 5.1.5 IR-Spektroskopie

IR-Spektren wurden mit einem Nicolet Magna-IR 750 FTIR-Spektrometer oder einem Nicolet Avatar 360 E.S.P. FTIR-Spektrometer (*Thermo Fisher Scientific*) als ATR aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software OMNIC (*Thermo Fisher Scientific*). Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen [$cm^{-1}$] angegeben.

### 5.1.6 CD-Spektroskopie[123]

Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte mit einem J715 CD-Spektrometer von *JASCO* (Gross-Umstadt) und einer Präzisions-Küvette aus Quarzglas SUPRASIL® (Schichtdicke: 1 mm) der Firma *Hellma* (Müllheim) bei Raumtemperatur. Dabei wurden folgende Parameter verwendet:

- Wellenlängenbereich: λ = 185 nm - 260 nm
- Wellenlängenintervall: 0.5 nm
- Scangeschwindigkeit: 50 nm/min
- Bandweite: 1 nm
- Anzahl der Wiederholungsmessungen: 5

Jedes Spektrum wurde geglättet (Savitsky-Golay *smoothing*, *smoothing window* 15 *points*) und anschließend Leerwert-korrigiert (*blank*: Millipore-$H_2O$ bzw. 20 % TFE/Millipore-$H_2O$). Die Umrechnung der gemessenen Elliptizität $\theta$ [mdeg] in die molare Elliptizität $[\Theta]$ erfolgte mit folgender Formel:

$$[\Theta] = \frac{\theta}{10 \cdot c \cdot l}$$ mit $l$ = Schichtdicke der Küvette in [cm] und $c$ = Konzentration in [mol/l]

Damit ergibt sich als Einheit für $[\Theta]$: $\left[\frac{\deg \cdot cm^2}{dmol}\right]$

### 5.1.7 UV-Absorbtions- und Fluoreszenzspektroskopie

UV-Absorptionsspektren wurden mit dem *Tecan* Microplate Reader Infiniti 200 (Männedorf, Schweiz; Steuerungssoftware i-control v1.6) unter Verwendung einer 96-Well-Quarzplatte der Firma *Hellma* aufgenommen und anschließend Leerwert-korrigiert (*blank*: Millipore-$H_2O$). Für die Messungen wurden folgende Parameter verwendet:

- Wellenlängenbereich: λ = 230 nm - 500 nm
- Wellenlängenintervall: 2 nm
- Bandweite: 5 nm (für λ = 230 nm - 315 nm), 9 nm (für λ = 316 nm - 500 nm)
- Anzahl der Wiederholungsmessungen: 3

Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren wurden mit einem LS 55 Fluoreszenzspektrometer der Firma *PerkinElmer* (Waltham, MA, USA; Steuerungssoftware FL WinLab 4.00.03) unter Verwendung einer Küvette für Fluoreszenzspektroskopie aus Quarzglas SUPRASIL® (Schichtdicke: 10 mm, spektral vermessen) der Firma *Hellma* aufgenommen und anschließend Leerwert-korrigiert (*blank*: Millipore-$H_2O$). Es wurden folgende Parameter verwendet:

- Wellenlängenbereich: $\lambda$ = 240 nm - 500 nm
- Wellenlängenintervall: 0.5 nm
- Anregungswellenlänge: $\lambda$ = 280 nm

### 5.1.8 Polarimetrie

Die optische Rotation jeder chiralen Verbindung in [°] wurde mit dem Digital-Polarimeter P-2000 der Firma *JASCO* bei einer Wellenlänge von $\lambda$ = 589 nm (Natrium-D-Linie) unter Verwendung einer zylindrischen Glasküvette (Weglänge: 0.5 dm) gemessen. Jeder Messwert wurde dabei fünfmal im Abstand von 20 s bestimmt und anschließend gemittelt. Bei der jeweiligen Substanz ist neben dem spezifischen Drehwerte in $\left[\frac{° \cdot ml}{dm \cdot g}\right]$ und der Temperatur in Klammern auch die Konzentration in [g/100 ml] sowie das verwendete Lösungsmittel angegeben. Wurde von einer Verbindung auch das entsprechende Enantiomer synthetisiert, so ist dessen spezifischer Drehwert ebenfalls angegeben und die Substanznummer als **x'** gekennzeichnet.

### 5.1.9 Nomenklatur

Bei der Benennung der Aminosäuren und Peptide wurden die Vorschläge der IUPAC-IUB-Kommision für biologische Nomenklatur berücksichtigt.[196]

## 5.2 Synthesevorschriften und spektroskopische Daten

Synthesevorschriften für Bausteine, welche für die Totalsynthese von Feglymycin und dessen Spiegelbild benötigt wurden, sowie deren analytische Daten können der Literatur entnommen werden.[114] Verbindungen, die in diesem Zusammenhang aufgrund geringer Änderungen der Synthesestrategie noch nicht durch Herrn Dr. Frank Dettner beschrieben wurden, sind im Folgenden ergänzend aufgeführt.

### Ia Allgemeine Vorschrift für Peptidsynthesen mit EDC/HOAt

Zu einer Lösung der Kupplungspartner (*N*- bzw. *C*-terminal geschützte Aminosäure im Verhältnis 1:1) in abs. DMF (5 ml/mmol AS) wurden bei 0 °C nacheinander $NaHCO_3$ (3 eq), HOAt (1.1 eq) und EDC·HCl (1.1 eq) gegeben und 2 h gerührt. Nach weiteren 24 h bei RT wurde die Reaktionsmischung mit $H_2O$ (20 ml/mmol AS) verdünnt und mit EtOAc (3 x 20 ml/mmol AS) extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen mit jeweils der halben Menge an ges. $NaHCO_3$-Lsg. (3x), 5 %iger $KHSO_4$-Lsg. (3x) und ges. NaCl-Lsg. (1x) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet und filtriert. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel. Das verwendete Lösungsmittelsystem, die Menge der eingesetzten Kupplungspartner sowie die Ausbeute sind bei der jeweiligen Substanz angegeben.

### Ib Allgemeine Vorschrift für Peptidsynthesen mit TBTU

Zu einer Lösung der Kupplungspartner (*N*- bzw. *C*-terminal geschützte Aminosäure im Verhältnis 1:1) in abs. DCM (10 ml/mmol AS) wurde DIPEA (3 eq) gegeben und 10 min gerührt. Nach Zugabe von TBTU (2 eq) wurde die Reaktionsmischung für 24 h bei RT gerührt und anschließend unter vermindertem Druck auf ein Viertel des Volumens eingeengt. Nach Verdünnen des Rückstandes mit der vierfachen Menge an $H_2O$ wurde mit EtOAc (3 x 20 ml/mmol As) extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen mit jeweils der halben Menge an ges. $NaHCO_3$-Lsg. (3x), 1 N HCl (3x) und ges. NaCl-Lsg. (1x) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck erfolgte eine säulenchromatographische

Reinigung an Kieselgel. Das verwendete Lösungsmittelsystem, die Menge der eingesetzten Kupplungspartner sowie die Ausbeute sind bei der jeweiligen Substanz angegeben.

## Ic Allgemeine Vorschrift für Peptidsynthesen mit DEPBT

Lag der *C*-terminal geschützte Kupplungspartner (Aminosäure oder Peptid) noch *N*-Boc-geschützt vor, so erfolgte kurz vor der Peptidsynthese die Boc-Entschützung. Dazu wurde unter Ar-Atmosphäre mit 4 N HCl/Dioxan (10 ml/mmol Edukt) versetzt und bei RT gerührt, bis mittels analytischer DC ein vollständiger Umsatz festgestellt werden konnte. Die jeweilige Reaktionszeit ist bei der entsprechenden Substanz vermerkt. Die flüchtigen Komponenten wurden anschließend unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in $Et_2O$ aufgenommen und das Lösungsmittel wieder entfernt (3x). Nach Trocknung am Hochvakuum für 30 min wurde das in quantitativer Ausbeute erhaltene Aminosäure- bzw. Peptid-Hydrochlorid mit dem *N*-terminal geschützten Kupplungspartner (1 eq Aminosäure oder Peptid) in abs. DMF (10 ml/mmol AS bzw. Peptid) gelöst und bei 0 °C nacheinander mit $NaHCO_3$ (2 eq) und DEPBT (2 eq) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 1 h bei 0 °C und weiteren 24 h bei RT wurde die Reaktionsmischung mit $H_2O$ (50 ml/mmol AS bzw. Peptid) verdünnt und mit EtOAc (4 x 30 ml/mmol AS bzw. Peptid) extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen mit jeweils der halben Menge an $H_2O$ (2x), ges. $NaHCO_3$-Lsg. (3x) und ges. NaCl-Lsg. (1x) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel. Das verwendete Lösungsmittelsystem, die Menge der eingesetzten Kupplungspartner sowie die Ausbeute sind bei der jeweiligen Substanz angegeben.

Bei der Synthese von Hexa- bzw. Heptapeptiden wurde die Reaktionsmischung aufgrund der schlechten Löslichkeit der Zielpeptide in EtOAc zunächst mit der fünffachen Menge an $H_2O$ versetzt und der Niederschlag, welcher einen Großteil des Produktes enthielt, abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde wie zuvor beschrieben mit EtOAc extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase wurde diese mit $Na_2SO_4$ getrocknet und nach der Filtration mit dem in MeOH gelösten Pellet der Zentrifugation vereinigt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

## Id Allgemeine Vorschrift für Fragmentkupplungen mit DEPBT zur Synthese von Tridecapeptiden

Zunächst ist anzumerken, dass im Folgenden eine optimierte Reaktionsvorschrift beschrieben wird. Einige Fragmentkupplungen erfolgten unter geringfügig veränderten Bedingungen, wie z.B. eingesetzte Menge an DEPBT und $NaHCO_3$ und/oder Reaktionszeit bzw. -temperatur, wodurch teilweise schlechtere Ausbeuten erzielt wurden.

Kurz vor der eigentlichen Fragmentkupplung erfolgte die *N*-Boc-Entschützung des *C*-terminalen Kupplungspartners (Hexapeptid). Dazu wurde das zu entschützende Peptid in DCM (16 ml/mmol Edukt) suspendiert und unter Ar-Atmosphäre nacheinander mit Triethylsilan (15 eq) und Trifluoressigsäure (4 ml/mmol Edukt) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei RT gerührt und anschließend mit $Et_2O$ (200 ml/mmol Edukt) versetzt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, für 1 h am Hochvakuum getrocknet und anschließend zusammen mit dem *N*-terminal geschützten Kupplungspartner (Heptapeptid; 0.9 eq), $NaHCO_3$ (5.0 eq) und DEPBT (2.5 eq) unter Ar-Atmosphäre bei 0 °C in abs. DMF (10 ml/mmol Hexapeptid) aufgenommen. Nach einer Reaktionszeit von 1 h bei 0 °C und weiteren 40 h bei RT wurde die Reaktionsmischung mit dem zehnfachen Volumen an $H_2O$ versetzt und der erhaltene Niederschlag abzentrifugiert. Das Pellet wurde noch einmal mit der gleichen Menge $H_2O$ gewaschen und nach erneuter Zentrifugation lyophilisiert. Anschließend wurde der Rückstand in MeOH (1 ml/100 mg Rohprodukt) gelöst und mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Nach Reanalytik mit analytischer RP-HPLC wurden nur die saubersten Fraktionen der Trennung vereinigt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Produkt zusätzlich mit präparativer RP-HPLC gereinigt. Die verwendeten Lösungsmittelgradienten und die Menge der eingesetzten Kupplungspartner sind bei der jeweiligen Substanz angegeben.

Da im Zuge der Aufreinigungsschritte immer nur mit den saubersten Fraktionen weitergearbeitet wurde, konnten für die Fragmentkupplungen keine Gesamtausbeuten bestimmt werden. Angegeben sind lediglich die am Ende für Analytik und die finale Entschützung verfügbaren Peptidmengen.

## IIa Allgemeine Vorschrift für die hydrogenolytische Abspaltung benzylischer Schutzgruppen von Dipeptiden

Zu einer Lösung des zu entschützenden Dipeptids in THF (10 ml/mmol Peptid) wurde Pd/C (10 %) (200 mg/mmol Peptid) gegeben und der Kolben nacheinander mit Ar und $H_2$ gespült. Der Reaktionsfortschritt wurde mit analytischer DC verfolgt. Nach der vollständigen Umsetzung der Ausgangsverbindung wurde zur Aufarbeitung abfiltriert (Rotilabo®-Spritzenfilter, PTFE, 0.45 µm) und gründlich mit MeOH nachgespült. Die flüchtigen Komponenten wurden anschließend unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Produkt in wenig MeOH gelöst, mit $H_2O$ versetzt und lyophilisiert. Soweit nicht anders angegeben, konnte mit der beschriebenen Reaktionsvorschrift eine quantitative Ausbeute erzielt werden. Die eingesetzte Menge an Peptid und die Reaktionszeit sind bei der jeweiligen Substanz vermerkt.

## IIb Allgemeine Vorschrift für die hydrogenolytische Abspaltung benzylischer Schutzgruppen von Tridecapeptiden

Zu einer Lösung des zu entschützenden Tridecapeptids in MeOH (0.1 ml/mg Peptid) wurde Pd/C (10 %) (0.5 mg/mg Peptid) sowie 1-2 Tropfen $H_2O$ gegeben und der Kolben nacheinander mit Ar und $H_2$ gespült. Nach einer Reaktionszeit von 8 h wurde abfiltriert (Rotilabo®-Spritzenfilter, PTFE, 0.45 µm) und gründlich mit MeOH nachgespült. Die flüchtigen Komponenten wurden anschließend unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Produkt in wenig MeOH gelöst, mit $H_2O$ versetzt und lyophilisiert. Soweit nicht anders angegeben, konnte mit der beschriebenen Reaktionsvorschrift eine quantitative Ausbeute erzielt werden. Die eingesetzte Menge an Peptid ist bei der jeweiligen Substanz vermerkt.

## III Allgemeine Vorschrift für die Methylesterabspaltung mit TMTH

Das zu entschützende Peptidfragment wurde zusammen mit TMTH (20 eq) in 1,2-Dichlorethan (90 ml/mmol Peptid) suspendiert und unter einer Ar-Atmosphäre bei 85 °C unter Rückfluss gerührt. Nach 8 h wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in ges. $NaHCO_3$-Lsg. (ca. 100 ml/mmol Peptid) aufgenommen. Anschließend wurde die leicht trübe wässrige Lösung portionsweise mit fester Zitronensäure versetzt, bis sich ein pH von 4-5 einstellte. Nach Extraktion mit EtOAc (4 x 50 ml/mmol Peptid) wurde die organische Phase mit jeweils der halben Menge an 10 %iger Zitronensäurelösung (1x), $H_2O$ (3x) und ges. NaCl-Lsg. (1x) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet und filtriert. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck wurde das erhaltene Produkt in wenig MeOH gelöst, mit $H_2O$ versetzt und lyophilisiert. Die eingesetzte Menge an Peptid und die Ausbeute sind bei der jeweiligen Substanz vermerkt.

**Feglymycin-Spiegelbild 28':** H–L-Hpg–L-Dpg–D-Val–L-Dpg–D-Hpg–L-Dpg–D-Hpg–L-Dpg–D-Val–L-Dpg–D-Hpg–D-Phe–D-Asp–OH

Unter Verwendung der allgemeinen Vorschrift **IIb** wurde durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung ausgehend von Tridecapeptid **40'** (4.5 mg, 2.0 µmol) das als farbloser Feststoff vorliegende Feglymycin-Spiegelbild (**28'**, 3.8 mg, quant.) erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.8 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +73.0 (c = 0.06, MeOH), **28**: $[\alpha]_D^{23}$ = -78.3 (c = 0.06, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3285, 2969, 1636, 1513, 1369, 1221, 1152, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.54-0.56 (m, 6H), 0.58-0.61 (m, 6H), 1.84-1.89 (m, 2H), 2.80-2.84 (m, 1H), 3.04-3.07 (m, 1H), 4.14 (br s, 1H), 4.35-4.39 (m, 2H), 4.48-4.53 (m, 1H), 4.90 (br s, 1H), 5.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.42 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.49-5.51 (m, 2H), 5.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.59-5.63 (m, 2H), 6.04-6.07 (m, 4H), 6.11 (br s, 1H), 6.18 (br s, 2H), 6.20 (br s, 2H), 6.26 (br s, 2H), 6.29 (br s, 2H), 6.36 (br s, 2H), 6.54-6.58 (m, 6H), 6.78 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.04-7.08 (m, 4H), 7.14-7.16 (m, 1H), 7.20-7.25 (m, 4H), 7.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.80 (br s, 1H), 8.04 (br s, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.51-8.54 (m, 2H), 8.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.65-8.68 (m, 3H), 8.79 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.90 (br s, 1H), 9.09 (s, 2H), 9.15 (s, 6H), 9.22 (s, 2H), 9.29 (s, 1H), 9.32 (s, 2H), 9.67 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.4, 18.7, 31.2, 36.7, 48.3, 53.7, 54.7, 55.1, 55.6, 55.8, 56.6, 101.4, 105.0, 105.1, 105.2, 114.5, 115.1, 126.0, 127.7, 127.8, 128.0, 129.0.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{95}H_{98}N_{13}O_{30}^+$ $[M+H]^+$ 1900.6543, gef. 1900.6619; |Δm| (ppm) = 4.0.

**Tridecapeptid 40':** Cbz–L-Hpg–L-Dpg–D-Val–L-Dpg–D-Hpg–L-Dpg–D-Hpg–L-Dpg–D-Val–L-Dpg–D-Hpg–D-Phe–D-Asp(OBzl)–OBzl

Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **43'** (20 mg, 18 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **42'** (19 mg, 16 µmol) umgesetzt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 30 % → 60 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) wurde Tridecapeptid **40'** (6 mg, 3 µmol) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.1 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +49.1 (c = 0.07, MeOH), **40**: $[\alpha]_D^{23}$ = -53.8 (c = 0.07, MeOH).

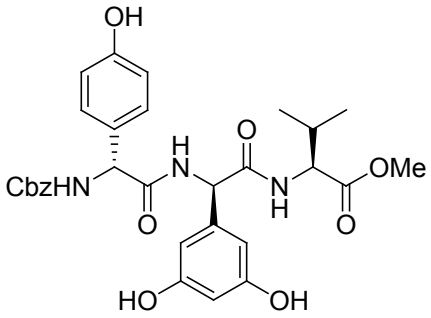
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3292, 1694, 1639, 1513, 1340, 1217, 1154, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.56-0.61 (m, 9H), 1.85-1.91 (m, 2H), 2.69-2.74 (m, 1H), 2.75-2.80 (m, 1H), 2.81-2.86 (m, 1H), 2.95-2.99 (m, 1H), 4.34-4.40 (m, 2H), 4.52-4.56 (m, 1H), 4.67-4.72 (m, 1H), 4.98-5.08 (m, 6H), 5.29-5.33 (m, 2H), 5.39-5.40 (m, 2H), 5.46 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.56-5.60 (m, 2H), 5.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.04-6.06 (m, 2H), 6.07 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.09 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.11 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.18 (br s, 2H), 6.21 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.29 (br s, 2H), 6.33 (br s, 2H), 6.53-6.56 (m, 6H), 6.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.20-7.22 (m, 6H), 7.28-7.33 (m, 15H), 7.81 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.45 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.49-8.56 (m, 4H), 8.62 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.67-8.71 (m, 2H), 8.80 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 9.07 (s, 2H), 9.08 (s, 2H), 9.13 (s, 2H), 9.15 (s, 2H), 9.18 (s, 2H), 9.24 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 9.35 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 17.3, 18.8, 31.2, 35.4, 37.3, 48.2, 53.4, 54.6, 54.8, 55.2, 55.4, 55.5, 55.9, 56.5, 56.7, 57.1, 65.3, 65.7, 101.3, 101.4, 105.0, 105.2, 114.6, 126.1, 127.7, 128.0, 128.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{117}H_{115}N_{13}NaO_{32}^+$ $[M+Na]^+$ 2236.7669, gef. 2236.7725; |Δm| (ppm) = 2.5.

**Tripeptid 50:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–OMe




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Dipeptid **56** (448 mg, 1.13 mmol; Reaktionszeit: 30 min) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit *N*-(Benzyloxycarbonyl)-4-hydroxy-D-phenylglycin (**54**, 341 mg, 1.13 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) wurde Tripeptid **50** (495 mg, 0.85 mmol, 75 %) als schwach rosa Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.43 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{25}$ = -90.8 (c = 0.77, MeOH), **50'**: $[\alpha]_D^{25}$ = +83.6 (c = 0.77, MeOH).

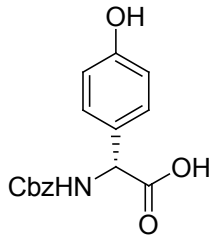
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3309, 2967, 1652, 1604, 1514, 1455, 1268, 1221, 1149, 1007.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.70 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.73 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.89-1.98 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 4.07-4.13 (m, 1H), 5.02 (s, 2H), 5.31 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.45 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H) 6.11 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.32 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.29-7.35 (m, 5H), 7.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.54 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 9.18 (s, 2H), 9.36 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.9, 18.8, 30.2, 51.7, 55.8, 57.2, 57.4, 65.5, 101.7, 105.4, 114.0, 127.7, 127.8, 128.3, 128.5, 128.9, 137.0, 140.6, 155.5, 156.8, 158.1, 169.7, 169.9, 171.8.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{30}H_{34}N_3O_9^+$ $[M+H]^+$ 580.2295, gef. 580.2284; |Δm| (ppm) = 1.9.

**_N_-(Benzyloxycarbonyl)-4-hydroxy-D-phenylglycin (Cbz–D-Hpg–OH; 54)**




Zu einer Suspension von 4-Hydroxy-D-phenylglycin (**36'**, 0.84 g, 5.0 mmol) und $NaHCO_3$ (1.05 g, 12.5 mmol, 2.5 eq) in $H_2O$ (10 ml) wurde bei 0 °C Chlorameisensäurebenzylester (1.07 ml, 7.5 mmol, 1.5 eq) über einen Zeitraum von 1 h zugetropft. Nach 24 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit 6 N HCl auf pH 2-3 angesäuert und mit EtOAc (3 x 10 ml) extrahiert. Nach Waschen der vereinigten organischen Phasen mit 1 N HCl (3 x 10 ml) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 10 ml) wurde über $Na_2SO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Aminosäure **54** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5 + 0.1 % AcOH) als farbloser Feststoff erhalten (0.77 g, 2.6 mmol, 52 %).

**DC** $R_f$ = 0.28 ($CHCl_3$/MeOH 9:1 (+ 0.1 % AcOH)).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{25}$ = -121.4 (c = 0.66, MeOH), **54'**: $[\alpha]_D^{25}$ = +114.64 (c = 0.66, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3327, 2974, 1697, 1614, 1515, 1219, 1176, 1053.

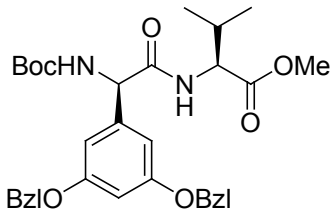
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 5.00 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 6.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.27-7.36 (m, 5H), 7.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 9.46 (br s, 1H), 12.64 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 57.6, 65.5, 115.1, 127.2, 127.7, 127.8, 128.4, 129.0, 137.0, 155.8, 157.2, 172.5.

**MS (EI)** *m/z* 301 ($M^{+\cdot}$), 256, 212, 166, 120, 91, 65.

**HRMS (EI)** *m/z* ber. für $C_{16}H_{15}NO_5^{+\cdot}$ ($M^{+\cdot}$) 301.0950, gef. 301.0943; |Δm| (ppm) = 2.3.

**Dipeptid 55:** Boc–D-Dpg(Bzl)$_2$–L-Val–OMe




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** wurde ausgehend von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-3,5-dibenzoxy-D-phenylglycin (**70**, 1.27 g, 2.74 mmol) und L-Valinmethylester (0.46 g, 2.74 mmol; als Hydrochlorid) nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, *n*-Hexan/$Et_2O$ 1.5:1) Dipeptid **55** (1.18 g, 2.05 mmol, 75 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.42 (*n*-Hexan/$Et_2O$ 1:2).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{25}$ = -57.4 (c = 0.74, MeOH), **55'**: $[\alpha]_D^{25}$ = +65.8 (c = 0.74, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3314, 2966, 1741, 1655, 1596, 1521, 1367, 1162, 1052, 1028.

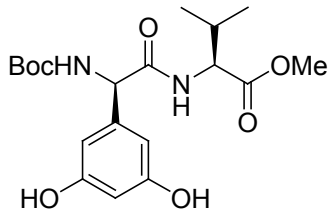
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.70 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.76 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.95-2.03 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 4.13-4.16 (m, 1H), 5.05 (s, 4H), 5.31 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.56 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.33-7.43 (m, 10H), 8.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.8, 18.8, 28.1, 30.3, 51.8, 57.2, 69.3, 78.4, 100.8, 106.3, 127.7, 127.9, 128.5, 137.0, 146.5, 159.3, 170.3, 171.9.

**MS (EI)** *m/z* 576 ($M^{+\cdot}$), 503, 418, 362, 318, 263, 191, 91.

**HRMS (EI)** *m/z* ber. für $C_{33}H_{40}N_2O_7^{+\cdot}$ ($M^{+\cdot}$) 576.2836, gef. 576.2850; |Δm| (ppm) = 2.4.

**Dipeptid 56:** Boc–D-Dpg–L-Val–OMe




Durch katalytische Hydrogenolyse von Peptid **55** (1.18 g, 2.05 mmol) entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIa** erhielt man nach 18 h Reaktionszeit Dipeptid **56** (0.81 g) als farblosen Feststoff in quantitativer Ausbeute.

**DC** $R_f$ = 0.55 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{25}$ = -77.7 (c = 0.60, MeOH), **56'**: $[\alpha]_D^{25}$ = +78.8 (c = 0.60, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3291, 2969, 1665, 1603, 1494, 1367, 1160, 1024, 1005.

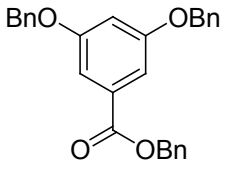
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.75 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.38 (s, 9H), 1.95-2.03 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 4.11-4.15 (m, 1H), 5.17 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.09 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 9.16 (s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.0, 18.9, 28.2, 30.2, 51.7, 57.3, 78.3, 101.6, 105.1, 140.9, 154.6, 158.1, 170.4, 171.9.

**MS (EI)** *m/z* 396 ($M^{+\cdot}$), 239, 182, 138, 121, 105, 84, 66.

**HRMS (EI)** *m/z* ber. für $C_{19}H_{28}N_2O_7^{+\cdot}$ ($M^{+\cdot}$) 396.1897, gef. 396.1890; |Δm| (ppm) = 1.8.

**3,5-Dibenzoxybenzoesäurebenzylester (65)**



3,5-Dihydroxybenzoesäure (**64**, 20 g, 0.13 mol) und $K_2CO_3$ (90 g, 0.65 mol, 5.0 eq) wurden in abs. DMF (300 ml) suspendiert und unter Ar-Atmosphäre tropfenweise mit Benzylbromid (50 ml, 0.42 mol, 3.2 eq) versetzt. Nach 16 h Reaktionszeit wurde die trübe Reaktionsmischung mit EtOAc (500 ml) verdünnt und mit $H_2O$ (2 x 500 ml) sowie ges. NaCl-Lsg. (4 x 250 ml) gewaschen. Nach Trocknung über $MgSO_4$ und Filtration wurde die organische Phase unter reduziertem Druck eingeengt. Durch säulenchromatographische Reinigung des erhaltenen Rohproduktes in mehreren Portionen ($SiO_2$, *n*-Hexan/EtOAc 8:1) erhielt man **65** als farblosen Feststoff (55 g, 0.13 mol, 99 %).

**DC** $R_f$ = 0.56 (*n*-Hexan/EtOAc 5:1).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3032, 1715, 1593, 1442, 1295, 1221, 1153, 1052, 1027.

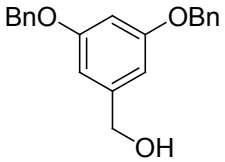
**$^1$H-NMR** (400 MHz; $CDCl_3$): δ (ppm) = 5.07 (s, 4H), 5.35 (s, 2H), 6.81 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 7.33-7.45 (m, 17H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; $CDCl_3$): δ (ppm) = 67.0, 70.5, 107.4, 108.7, 127.7, 128.3, 128.4, 128.7, 128.8, 132.2, 136.1, 136.6, 159.9, 166.2.

**MS (EI)** *m/z* 424 ($M^{+\cdot}$), 333, 227, 181, 91.

**HRMS (EI)** *m/z* ber. für $C_{28}H_{24}O_4^{+\cdot}$ ($M^{+\cdot}$) 424.1675, gef. 424.1670; |Δm| (ppm) = 1.2.

**3,5-Dibenzoxybenzylalkohol (66)**




$LiAlH_4$ (4.6 g, 120 mmol, 2 eq) wurde unter Ar-Atmosphäre in abs. THF (120 ml) suspendiert und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte über einen Zeitraum von 1.5 h die Zugabe von 3,5-Dibenzoxybenzoesäurebenzylester (**65**, 25.0 g, 60 mmol) gelöst in abs. THF (90 ml). Nach 1 h bei RT wurde die Reaktionsmischung erneut auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit ges. $NH_4Cl$-Lsg. (50 ml) versetzt. Nach Filtration der erhaltenen Suspension wurde der Rückstand gründlich mit EtOAc gewaschen und das Filtrat unter reduziertem Druck eingeengt. Durch Umkristallisation (*n*-Hexan/EtOAc 2:1) konnte ein Großteil des Produktes von dem als Nebenprodukt angefallenen Benzylalkohol abgetrennt werden. Die verbleibende Mutterlauge wurde anschließend unter vermindertem

Druck vom Lösungsmittel befreit und säulenchromatographisch aufgereinigt ($SiO_2$, CombiFlash Rf-System, *n*-Hexan/EtOAc). Alkohol **66** konnte mit einer Gesamtausbeute von 88 % (17.0 g, 53 mmol) als farbloser Feststoff isoliert werden.

**DC** $R_f$ = 0.15 (*n*-Hexan/EtOAc 5:1).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3359, 3032, 2871, 1594, 1451, 1375, 1293, 1154, 1051, 1028.

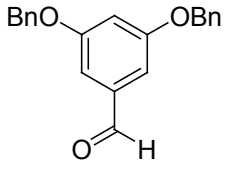
**$^1$H-NMR** (400 MHz; $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.69 (s, 1H), 4.63 (s, 2H), 5.04 (s, 4H), 6.56 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 7.31-7.41 (m, 10H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; $CDCl_3$): δ (ppm) = 65.4, 70.2, 101.5, 105.9, 127.7, 128.1, 128.7, 137.0, 143.6, 160.3.

**MS (EI)** *m/z* 320 ($M^{+\cdot}$), 289, 211, 181, 91, 65.

**HRMS (EI)** *m/z* ber. für $C_{21}H_{20}O_3^{+\cdot}$ ($M^{+\cdot}$) 320.1412, gef. 320.1403; |Δm| (ppm) = 2.8.

**3,5-Dibenzoxybenzaldehyd (67)**




Zu einer Lösung von Alkohol **66** (10 g, 31.2 mmol) in abs. DCM (100 ml) wurde bei RT portionsweise aktiviertes $MnO_2$ (52 g) gegeben. Nach 2 h wurde die Reaktionsmischung über Celite abfiltriert und mit DCM gründlich nachgewaschen. Anschließend erfolgte das Entfernen der flüchtigen Komponenten unter reduziertem Druck. Benzaldehyd **67** wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 91 % (9 g, 28.3 mmol) erhalten. Die weitere Umsetzung von **67** zu *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-3,5-dibenzoxy-D-phenylglycin (**70**) erfolgte, wie in der Dissertation von Herrn Dr. Frank Dettner beschrieben, in einer dreistufigen Synthesesequenz (vgl. Abbildung 29).[114a]

**DC** $R_f$ = 0.49 (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3032, 1694, 1591, 1447, 1376, 1292, 1154, 1053, 1028.

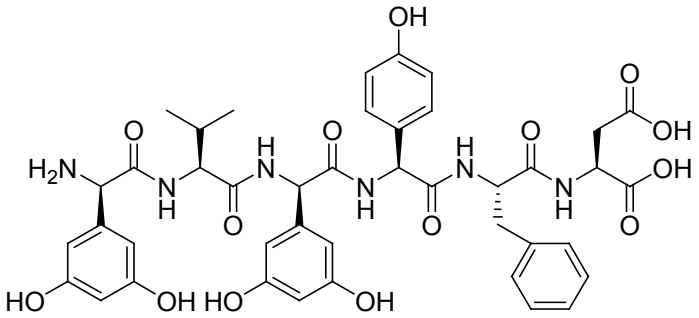
**$^1$H-NMR** (400 MHz; $CDCl_3$): δ (ppm) = 5.10 (s, 4H), 6.88 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.35-7.45 (m, 10H), 9.90 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; $CDCl_3$): δ (ppm) = 70.5, 108.5, 108.8, 127.7, 128.4, 128.8, 136.4, 138.6, 160.5, 191.9.

**MS (EI)** *m/z* 318 ($M^{+\cdot}$), 256, 181, 91, 65.

**HRMS (EI)** *m/z* ber. für $C_{21}H_{18}O_3^{+\cdot}$ ($M^{+\cdot}$) 318.1256, gef. 318.1251; |Δm| (ppm) = 1.6.

**Hexapeptid 74:** H–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH



Hexapeptid **144** (34 mg, 35 µmol) wurde in 4 N HCl/Dioxan (2 ml) gelöst und 15 min bei RT gerührt. Nach Zugabe von $H_2O$ (4 ml) und Lyophilisation wurden 31 mg (35 µmol, quant.) von Peptid **74** als HCl-Salz erhalten. Für biologische Testierungen wurde dieses zusätzlich mit präparativer HPLC (linearer Gradient: 15 % → 50 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) aufgereinigt.

**DC** $R_f$ = 0.76 (EtOAc/*n*-BuOH/$H_2O$/AcOH 2:1:1:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.7 min.

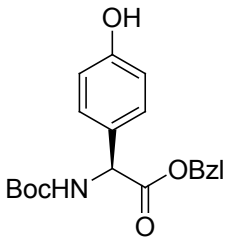
**Drehwert** $[\alpha]_D^{21}$ = -20.6 (c = 0.83, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3288, 1639, 1515, 1456, 1272, 1164, 1024.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.57 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.61 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.77-1.85 (m, 1H), 2.28-2.44 (m, 2H), 2.84-2.90 (m, 1H), 3.05-3.10 (m, 1H), 4.09-4.14 (m, 1H), 4.45-4.55 (m, 2H), 4.83 (s, 1H), 5.21 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.08 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.20 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.42 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.17-7.26 (m, 5H), 7.75 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.37-8.39 (m, 2H), 8.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.80 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.17 (br s, 1H), 9.36 (br s, 2H), 9.40 (br s, 2H) .

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{42}H_{47}N_6O_{14}^+$ $[M+H]^+$ 859.3150, gef. 859.3136; $|\Delta m|$ (ppm) = 1.6.

***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-4-hydroxy-L-phenylglycinbenzylester (Boc–L-Hpg–OBzl; 81)**




Zu einer Lösung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-4-hydroxy-L-phenylglycin (1.34 g, 5.0 mmol) in MeOH (50 ml) wurde $Cs_2CO_3$ (0.82 g, 2.5 mmol, 0.5 eq) gelöst in $H_2O$ (5 ml) zugetropft und die klare Lösung 30 min bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das erhaltene Cs-Salz für 30 min am Hochvakuum getrocknet und anschließend in abs. DMF (40 ml) suspendiert. Nach Zugabe von Benzylbromid (0.65 ml, 5.5 mmol, 1.1 eq) wurde die Reaktionsmischung 24 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die erhaltene Suspension mit $H_2O$ (100 ml) versetzt und mit EtOAc (3 x 50 ml) extrahiert. Im Anschluss wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. $NaHCO_3$-Lsg. (3 x 50 ml) sowie mit ges. NaCl-Lsg. (3 x 50 ml) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet, filtriert und die flüchtigen Bestandteile unter reduziertem Druck entfernt. Aus dem öligen Rohprodukt erhielt man nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, *n*-Hexan/EtOAc 3:1) das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von 60 % (1.07 g, 3.0 mmol).

**DC** $R_f$ = 0.19 (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{25}$ = +64.8 (c = 0.64, MeOH), **81'**: $[\alpha]_D^{25}$ = -61.8 (c = 0.64, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3344, 2977, 1707, 1614, 1597, 1515, 1455, 1367, 1248, 1164, 1053, 1025, 1002.

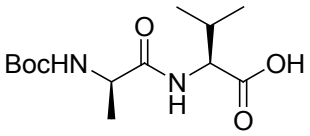
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.38 (s, 9H), 5.10-5.13 (m, 3H), 6.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.22-7.32 (m, 5H), 7.65 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 9.49 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 28.2, 57.4, 65.9, 78.4, 115.1, 126.5, 127.5, 127.9, 128.3, 129.2, 135.9, 155.3, 157.3, 171.3.

**MS (EI)** *m/z* 357 ($M^{+\cdot}$), 301, 222, 122, 91, 84, 66, 57.

**HRMS (EI)** *m/z* ber. für $C_{20}H_{23}NO_5^{+\cdot}$ ($M^{+\cdot}$) 357.1576, gef. 357.1572; |Δm| (ppm) = 1.1.

**Dipeptid 84:** Boc–**D-Ala**–L-Val–OH




Durch katalytische Hydrogenolyse von Peptid **146** (655 mg, 1.73 mmol) entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIa** erhielt man nach 3 h Reaktionszeit Dipeptid **84** (499 mg) als farblosen Feststoff in quantitativer Ausbeute.

**DC** $R_f$ = 0.19 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +31.6 (c = 1.10, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3317, 2972, 2935, 1719, 1659, 1527, 1393, 1368, 1249, 1167.

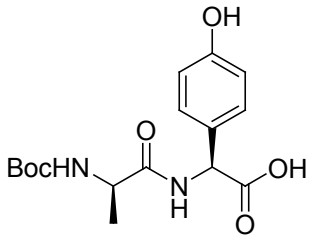
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.84 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.18 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 2.01-2.09 (m, 1H), 4.02-4.09 (m, 1H), 4.15-4.19 (m, 1H), 6.93 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 12.74 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.6, 18.5, 19.0, 28.2, 30.2, 49.7, 56.7, 78.1, 172.9.

**MS (ESI)** *m/z* 289 $[M+H]^+$, 233, 189, 171, 143, 118.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{13}H_{25}N_2O_5^+$ $[M+H]^+$ 289.1764, gef. 289.1759; |Δm| (ppm) = 1.7.

**Dipeptid 85:** Boc–**D-Ala**–L-Hpg–OH




Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIa** wurde durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung ausgehend von Peptid **147** (790 mg, 1.84 mmol) nach 16 h Reaktionszeit das als farbloser Feststoff vorliegende Dipeptid **85** (623 mg, quant.) erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.14 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +127.4 (c = 1.59, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3318, 2979, 2935, 1659, 1516, 1368, 1251, 1172.

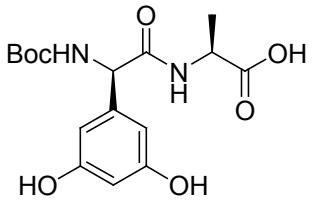
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.14 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.38 (s, 9H), 4.05-4.09 (m, 1H), 5.17 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.49 (br s, 1H), 12.79 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.2, 28.2, 49.5, 55.4, 78.1, 115.2, 127.6, 128.4, 155.0, 157.1, 172.1, 172.3.

**MS (ESI)** *m/z* 339 $[M+H]^+$, 283, 239, 221, 193, 168, 151, 122.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{16}H_{23}N_2O_6^+$ $[M+H]^+$ 339.1556, gef. 339.1557; |Δm| (ppm) = 0.3.

**Dipeptid 86:** Boc–D-Dpg–**L-Ala**–OH



Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIa** wurde durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung ausgehend von Peptid **148** (265 mg, 0.42 mmol) nach einer Reaktionszeit von 24 h das als farbloser Feststoff vorliegende Dipeptid **86** (149 mg, quant.) erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.09 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -78.0 (c = 1.13, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3317, 2979, 2935, 1691, 1665, 1606, 1511, 1456, 1369, 1252, 1161, 1009.

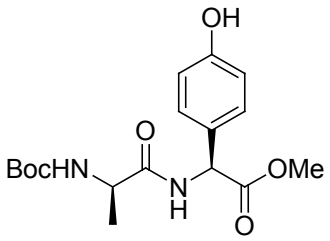
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.22 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 4.10-4.17 (m, 1H), 5.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.09 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 9.19 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.3, 28.2, 47.7, 57.1, 78.4, 101.7, 105.2, 141.0, 154.6, 158.2, 169.7, 173.9.

**MS (ESI)** *m/z* 355 $[M+H]^+$, 299, 255, 210, 192, 164, 138.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{16}H_{23}N_2O_7^+$ $[M+H]^+$ 355.1505, gef. 355.1505; |Δm| (ppm) = 0.

**Dipeptid 87:** Boc–**D-Ala**–L-Hpg–OMe




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** wurde ausgehend von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-D-alanin (378 mg, 2.00 mmol) und 4-Hydroxy-L-phenylglycin-methylester (435 mg, 2.00 mmol; als Hydrochlorid) nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) Dipeptid **87** (500 mg, 1.42 mmol, 71 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.56 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +129.6 (c = 1.17, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3317, 2977, 1743, 1662, 1516, 1452, 1367, 1250, 1220, 1169, 1070, 1022.

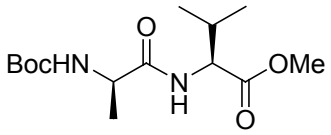
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.14 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 3.61 (s, 3H), 4.05-4.12 (m, 1H), 5.26 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.37 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 9.54 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.3, 28.2, 49.4, 52.1, 55.5, 78.1, 115.4, 126.5, 128.7, 155.0, 157.4, 171.3, 172.6.

**MS (ESI)** *m/z* 353 $[M+H]^+$, 321, 297, 253, 193, 182, 165, 137, 122.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{17}H_{25}N_2O_6^+$ $[M+H]^+$ 353.1713, gef. 353.1706; |Δm| (ppm) = 2.0.

**Dipeptid 88:** Boc–**D-Ala**–L-Val–OMe




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ib** erhielt man ausgehend von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-D-alanin (378 mg, 2.00 mmol) und L-Valinmethylester (335 mg, 2.00 mmol; als Hydrochlorid) nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, *n*-Hexan/EtOAc 3:1) das als farbloser Feststoff vorliegende Dipeptid **88** (557 mg, 1.84 mmol, 92 %).

**DC** $R_f$ = 0.58 (*n*-Hexan/EtOAc 1:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +14.3 (c = 1.73, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3314, 2970, 2935, 1742, 1716, 1662, 1517, 1366, 1249, 1209, 1168, 1052, 1023.

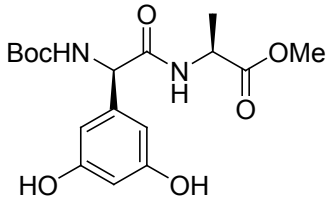
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.84 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.17 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.99-2.08 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 4.03-4.10 (m, 1H), 4.19-4.22 (m, 1H), 6.90 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.9, 18.5, 18.9, 28.2, 30.2, 49.6, 51.8, 56.9, 78.0, 155.0, 172.0, 173.1.

**MS (ESI)** *m/z* 303 $[M+H]^+$, 247, 203, 187, 171, 158, 143, 132.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{14}H_{27}N_2O_5^+$ $[M+H]^+$ 303.1920, gef. 303.1920; |Δm| (ppm) = 0.

**Dipeptid 89:** Boc–D-Dpg–**L-Ala**–OMe




Durch katalytische Hydrogenolyse von Peptid **149** (220 mg, 0.40 mmol) entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIa** erhielt man nach 24 h Reaktionszeit Dipeptid **89** (147 mg) als farblosen Feststoff in quantitativer Ausbeute.

**DC** $R_f$ = 0.19 (*n*-Hexan/EtOAc 1:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -89.2 (c = 1.40, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3315, 2978, 1663, 1604, 1502, 1455, 1367, 1159, 1058, 1008.

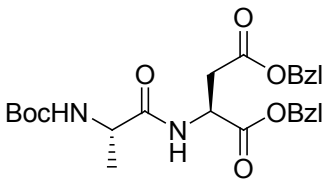
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.24 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.38 (s, 9H), 3.62 (s, 3H), 4.18-4.25 (m, 1H), 5.05 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.10 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.55 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 9.20 (s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.7, 27.9, 47.5, 51.6, 56.9, 78.1, 101.4, 105.9, 140.5, 157.9, 169.6, 172.6.

**MS (ESI)** *m/z* 369 $[M+H]^+$, 313, 269, 252, 224, 192, 164, 153, 138.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{17}H_{25}N_2O_7^+$ $[M+H]^+$ 369.1662, gef. 369.1661; |Δm| (ppm) = 0.3.

**Dipeptid 90:** Boc–**L-Ala**–L-Asp(OBzl)–OBzl




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ia** wurde ausgehend von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-alanin (189 mg, 1.00 mmol) und L-Asparaginsäuredibenzylester (486 mg, 1.00 mmol; als *para*-Toluolsulfonat) nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, *n*-Hexan/EtOAc 7:1) Dipeptid **90** (394 mg, 0.81 mmol, 81 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.38 ($CHCl_3$/MeOH 9:0.5).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -23.0 (c = 0.65, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3322, 2977, 1736, 1672, 1499, 1366, 1248, 1167, 1051.

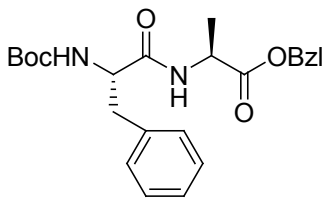
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.36 (s, 9H), 2.77-2.93 (m, 2H), 3.96-4.00 (m, 1H), 4.72-4.78 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 6.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.31-7.38 (m, 10H), 8.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.1, 28.2, 35.8, 48.5, 49.4, 65.9, 66.3, 78.0, 127.8, 128.0, 128.4, 135.7, 135.8, 155.0, 169.8, 170.4, 172.9.

**MS (EI)** *m/z* 484 ($M^{+\cdot}$), 123, 178, 144, 91, 57.

**HRMS (EI)** *m/z* ber. für $C_{26}H_{32}N_2O_7^{+\cdot}$ ($M^{+\cdot}$) 484.2210, gef. 484.2208; |Δm| (ppm) = 0.4.

**Dipeptid 91:** Boc–L-Phe–**L-Ala**–OBzl



Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **Ia** wurde ausgehend von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-phenylalanin (265 mg, 1.00 mmol) und L-Alaninbenzylester (351 mg, 1.00 mmol; als *para*-Toluolsulfonat) nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, *n*-Hexan/EtOAc 2:1) Dipeptid **91** (356 mg, 0.84 mmol, 84 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.46 (*n*-Hexan/EtOAc 2:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -19.5 (c = 1.66, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3293, 2978, 2933, 1745, 1658, 1533, 1455, 1391, 1366, 1250, 1161, 1048.

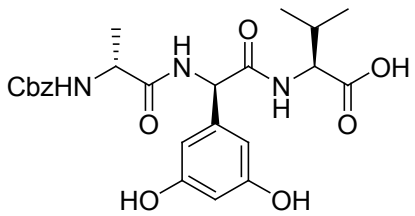
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.28 (s, 9H), 1.34 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 2.64-2.70 (m, 1H), 2.90-2.95 (m, 1H), 4.16-4.22 (m, 1H), 4.33-4.40 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.15-7.26 (m, 5H), 7.31-7.37 (m, 5H), 8.43 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 28.1, 37.4, 47.7, 55.3, 65.9, 77.9, 126.1, 127.7, 127.9, 128.0, 128.4, 129.2, 136.0, 138.2, 155.2, 171.9, 172.4.

**MS (EI)** *m/z* 426 ($M^{+\cdot}$), 370, 309, 279, 235, 220, 174, 164, 120, 91, 57.

**HRMS (EI)** *m/z* ber. für $C_{24}H_{30}N_2O_5^{+\cdot}$ ($M^{+\cdot}$) 426.2155, gef. 426.2148; |Δm| (ppm) = 1.6.

**Tripeptid 92:** Cbz–**D-Ala**–D-Dpg–L-Val–OH




Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **III** erhielt man ausgehend von Tripeptid **150** (140 mg, 0.28 mmol) durch Methylesterspaltung das *C*-terminal entschützte Tripeptid **92** (98 mg, 0.20 mmol, 71 %) als schwach rosa Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.09 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -42.8 (c = 0.61, MeOH).

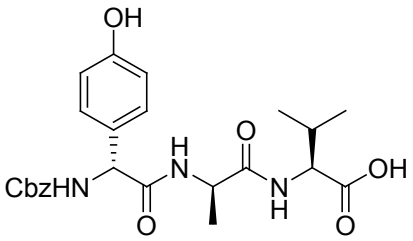
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3305, 2970, 1700, 1654, 1605, 1523, 1455, 1259, 1161.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.74 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.21 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.97-2.05 (m, 1H), 4.12-4.21 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 5.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.11 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.32 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 7.31-7.35 (m, 5H), 7.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 9.14 (s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.8, 18.2, 18.9, 30.2, 50.0, 55.7, 57.0, 65.4, 101.7, 105.3, 127.7, 128.0, 128.3, 137.0, 140.7, 155.6, 158.0, 170.0, 171.7, 172.7.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{24}H_{30}N_3O_8^+$ $[M+H]^+$ 488.2033, gef. 488.2019; |Δm| (ppm) = 2.9.

**Tripeptid 93:** Cbz–D-Hpg–**D-Ala**–L-Val–OH




Durch Methylesterabspaltung von Tripeptid **151** (260 mg, 0.54 mmol) entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **III** wurde das *C*-terminal entschützte Tripeptid **93** (230 mg, 0.49 mmol, 91 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.19 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -34.4 (c = 0.43, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3298, 2966, 1703, 1647, 1514, 1454, 1228, 1048.

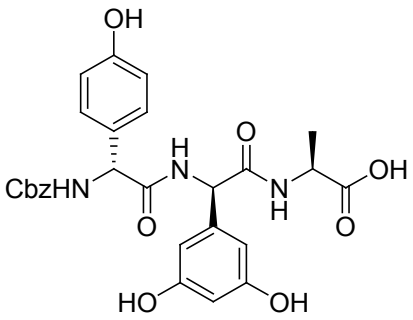
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H), 0.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H), 1.23 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.95-2.03 (m, 1H), 4.10-4.14 (m, 1H), 4.38-4.45 (m, 1H), 5.04 (s, 2H), 5.16 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.30-7.36 (m, 5H), 7.70 (d,

*J* = 9.0 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.36 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.6, 19.0, 30.1, 48.2, 56.8, 57.7, 65.5, 115.0, 127.6, 127.7, 128.3, 128.5, 136.9, 155.5, 156.8, 169.8, 171.9, 172.7.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{24}H_{30}N_3O_7^+$ $[M+H]^+$ 472.2084, gef. 472.2077; |Δm| (ppm) = 1.5.

**Tripeptid 94:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–OH




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **III** wurde ausgehend von Tripeptid **152** (146 mg, 0.27 mmol) durch Methylesterspaltung das *C*-terminal entschützte Tripeptid **94** (127 mg, 0.24 mmol, 89 %) als schwach rosa Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.22 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -76.1 (c = 1.01, MeOH).

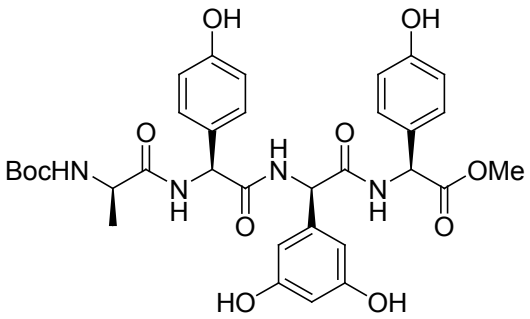
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3294, 1655, 1604, 1514, 1455, 1342, 1231, 1163, 1047, 1023.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.15 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 4.06-4.13 (m, 1H), 5.02 (s, 2H), 5.29-5.33 (m, 2H), 6.12 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.29-7.35 (m, 5H), 7.74 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 9.19 (br s, 2H), 9.35 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 47.7, 55.9, 57.3, 65.5, 101.7, 105.4, 114.9, 127.7, 128.3, 128.4, 128.9, 136.9, 140.5, 155.4, 156.7, 158.1, 169.0, 169.6, 173.7.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{27}H_{28}N_3O_9^+$ $[M+H]^+$ 538.1826, gef. 538.1824; |Δm| (ppm) = 0.4.

**Tetrapeptid 95:** Boc–**D-Ala**–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–OMe




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** wurde Dipeptid **48** (223 mg, 0.50 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 2 h) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **85** (169 mg, 0.50 mmol) gekuppelt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:1) wurde Tetrapeptid **95** (243 mg, 0.36 mmol, 72 %) als schwach rosa Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.49 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = +55.8 (c = 0.37, MeOH).

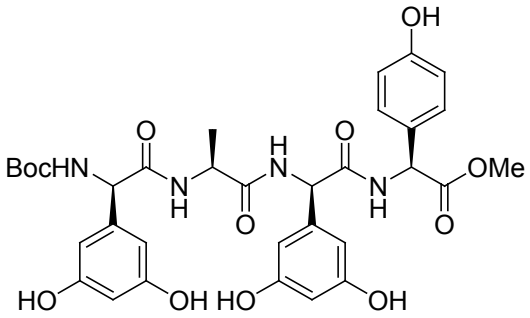
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3307, 2977, 1649, 1514, 1454, 1367, 1223, 1165.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.15 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.39 (s, 9H), 3.62 (s, 3H), 3.99-4.06 (m, 1H), 5.23 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.48 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.59 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.06 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 6.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.94 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 9.09 (br s, 2H), 9.29 (br s, 1H), 9.51 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.9, 28.1, 49.9, 52.1, 54.6, 55.4, 55.8, 78.2, 101.7, 105.4, 114.8, 115.3, 125.8, 127.8, 128.8, 140.0, 152.7, 156.6, 157.4, 158.0, 169.5, 169.6, 171.2.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{33}H_{39}N_4O_{11}^+$ $[M+H]^+$ 667.2615, gef. 667.2601; |Δm| (ppm) = 2.1.

**Tetrapeptid 96:** Boc–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–OMe




Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Dipeptid **48** (223 mg, 0.50 mmol; Reaktionszeit: 45 min) sowie die anschließende Umsetzung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **86** (177 mg, 0.50 mmol). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:1) wurde Tetrapeptid **96** (121 mg, 0.18 mmol, 36 %) als schwach rosa Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.49 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -27.7 (c = 0.70, MeOH).

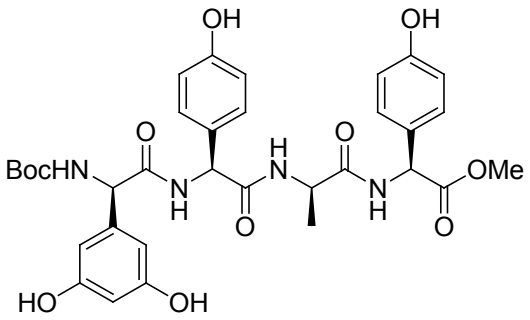
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3312, 2978, 1657, 1605, 1515, 1368, 1162, 1009.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 3.62 (s, 3H), 4.41-4.48 (m, 1H), 5.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.22 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.07 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.09 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.24 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.27 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.57 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 9.00 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 9.16 (s, 2H), 9.19 (s, 2H), 9.54 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.6, 28.2, 48.0, 52.2, 55.3, 55.8, 57.1, 78.3, 101.6, 105.1, 115.3, 125.8, 128.9, 140.8, 141.2, 157.5, 158.1, 169.4, 169.6, 171.3, 171.5.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{33}H_{39}N_4O_{12}^+$ $[M+H]^+$ 683.2564, gef. 683.2548; |Δm| (ppm) = 2.3.

**Tetrapeptid 97:** Boc–D-Dpg–L-Hpg–**D-Ala**–L-Hpg–OMe




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Dipeptid **87** (92 mg, 0.26 mmol; Reaktionszeit: 30 min) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **46** (112 mg, 0.26 mmol). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:1) erhielt man das als farbloser Feststoff vorliegende Tetrapeptid **97** (114 mg, 0.17 mmol, 65 %).

**DC** $R_f$ = 0.58 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +77.3 (c = 0.79, MeOH).

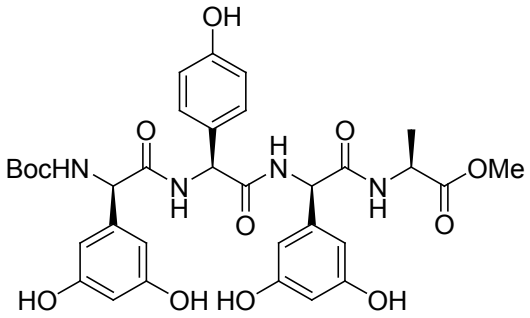
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3308, 2976, 1658, 1614, 1515, 1454, 1367, 1224, 1163, 1008.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.09 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.38 (s, 9H), 3.62 (s, 3H), 4.36-4.43 (m, 1H), 5.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.29-5.33 (m, 2H), 6.09 (s, 1H), 6.25 (s, 2H), 6.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 8.37 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.64 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 9.15 (s, 2H), 9.34 (s, 1H), 9.51 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.4, 28.1, 47.8, 52.1, 55.6, 55.7, 57.2, 78.4, 101.7, 105.3, 114.9, 115.4, 126.4, 128.1, 128.3, 128.7, 140.7, 154.6, 156.8, 157.4, 158.1, 169.5, 169.7, 171.2, 171.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{33}H_{39}N_4O_{11}^+$ $[M+H]^+$ 667.2615, gef. 667.2621; |Δm| (ppm) = 0.9.

**Tetrapeptid 98:** Boc–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–OMe




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** wurde Dipeptid **89** (111 mg, 0.30 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 1.5 h) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **46** (130 mg, 0.30 mmol) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:1) wurde Tetrapeptid **98** (112 mg, 0.16 mmol, 53 %) als schwach gelblicher Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.51 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -66.3 (c = 0.67, MeOH).

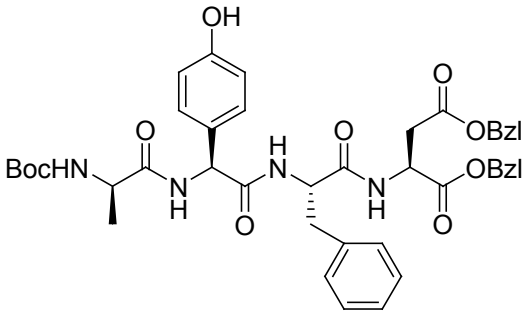
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3323, 2978, 1656, 1605, 1514, 1456, 1368, 1161.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.25 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.38 (s, 9H), 3.64 (s, 3H), 4.21-4.28 (m, 1H), 5.19 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.08 (m, 2H), 6.16 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 8.53-8.58 (m, 2H), 8.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.16 (s, 4H), 9.32 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 28.2, 47.8, 51.9, 55.3, 56.0, 56.6, 78.4, 101.7, 101.8, 105.3, 105.5, 114.8, 128.1, 140.0, 140.9, 154.6, 156.7, 158.1, 169.5, 169.6, 169.7, 172.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{33}H_{39}N_4O_{12}^+$ $[M+H]^+$ 683.2564, gef. 683.2546; |Δm| (ppm) = 2.6.

**Tetrapeptid 99:** Boc–**D-Ala**–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl




Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Dipeptid **58** (280 mg, 0.50 mmol; Reaktionszeit: 30 min) sowie die anschließende Umsetzung des erhaltenen Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **85** (169 mg, 0.50 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) erhielt man Tetrapeptid **99** (290 mg, 0.37 mmol, 74 %) als farblosen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.42 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +9.3 (c = 0.59, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3290, 2978, 1739, 1639, 1515, 1455, 1366, 1218, 1172, 1049.

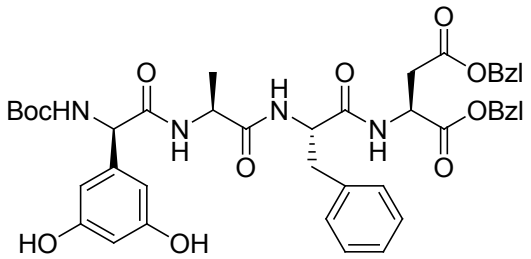
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 2.72-2.90 (m, 3H), 3.05-3.09 (m, 1H), 4.54-4.60 (m, 1H), 4.68-4.73 (m, 1H), 5.06 (m, 5H), 5.23 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.11 (m, 1H), 7.19-7.24 (m, 5H), 7.32-7.35 (m, 10H), 8.13 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 9.36 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.8, 28.2, 35.7, 37.4, 48.6, 49.9, 53.5, 55.7, 66.0, 66.4, 78.3, 114.8, 126.3, 127.8, 128.0, 128.1, 128.4, 129.1, 135.7, 135.8, 137.7, 155.3, 156.8, 169.6, 169.7, 170.2, 170.7, 172.7.

**MS (ESI)** *m/z* 781 $[M+H]^+$, 725, 681, 461, 314, 120.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{43}H_{48}N_4NaO_{10}^+$ $[M+Na]^+$ 803.3268, gef. 803.3264; |Δm| (ppm) = 0.5.

**Tetrapeptid 100:** Boc–D-Dpg–**L-Ala**–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Dipeptid **58** (280 mg, 0.50 mmol; Reaktionszeit: 30 min) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **86** (177 mg, 0.50 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) wurde das als farbloser Feststoff vorliegende Tetrapeptid **100** (270 mg, 0.34 mmol, 68 %) erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.42 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -60.9 (c = 1.23, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3290, 2976, 1736, 1642, 1498, 1455, 1367, 1163.

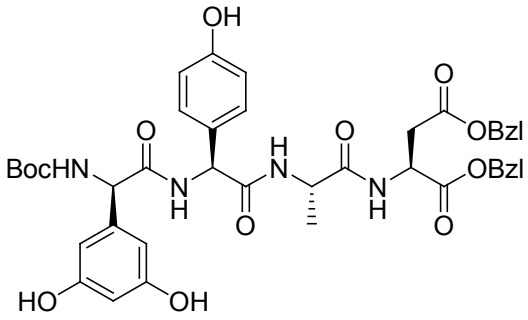
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.06 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.36 (s, 9H), 2.72-2.81 (m, 2H), 2.88-3.01 (m, 2H), 4.16-4.19 (m, 1H), 4.49-4.54 (m, 1H), 4.71-4.76 (m, 1H), 5.01-5.03 (m, 1H), 5.08 (s, 4H), 6.09 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.15-7.25 (m, 5H), 7.30-7.36 (m, 10H), 8.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 9.20 (s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.8, 28.1, 35.7, 37.3, 48.3, 48.6, 53.5, 57.3, 65.9, 66.3, 78.4, 101.7, 105.2, 126.2, 127.7, 127.9, 128.0, 128.3, 129.0, 130.1, 135.6, 135.7, 137.5, 158.1, 169.7, 170.2, 170.9, 171.6.

**MS (ESI)** *m/z* 797 $[M+H]^+$, 697, 461, 371, 314, 228, 210, 181, 120.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{43}H_{48}N_4NaO_{11}^+$ $[M+Na]^+$ 819.3217, gef. 819.3216; |Δm| (ppm) = 0.1.

**Tetrapeptid 101:** Boc–D-Dpg–L-Hpg–**L-Ala**–L-Asp(OBzl)–OBzl




Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **Ic** wurde Dipeptid **90** (194 mg, 0.40 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 30 min) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **46** (173 mg, 0.40 mmol) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) wurde Tetrapeptid **101** (215 mg, 0.27 mmol, 68 %) als schwach gelblicher Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.38 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -10.2 (c = 1.79, MeOH).

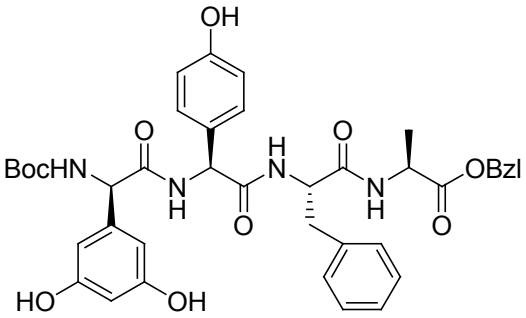
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3289, 2978, 1736, 1636, 1514, 1455, 1367, 1215, 1164, 1006.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.19 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 2.73-2.87 (m, 2H), 4.30-4.37 (m, 1H), 4.68-4.74 (m, 1H), 5.02-5.09 (m, 4H), 5.14 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.10 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.04-7.08 (m, 3H), 7.28-7.37 (m, 10H), 8.35-8.37 (m, 2H), 8.44 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.15 (s, 2H), 9.31 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.4, 28.1, 35.6, 47.8, 48.4, 55.4, 57.4, 65.9, 66.3, 78.4, 101.7, 105.4, 114.8, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.4, 135.6, 135.8, 140.6, 154.7, 156.7, 158.1, 169.4, 169.6, 170.3, 171.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{42}H_{47}N_4O_{12}^+$ $[M+H]^+$ 799.3190, gef. 799.3177; |Δm| (ppm) = 1.6.

**Tetrapeptid 102:** Boc–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–**L-Ala**–OBzl




Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Dipeptid **91** (213 mg, 0.50 mmol; Reaktionszeit: 30 min) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **46** (216 mg, 0.50 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) wurde Tetrapeptid **102** (200 mg, 0.27 mmol, 54 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.19 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -6.0 (c = 1.13, MeOH).

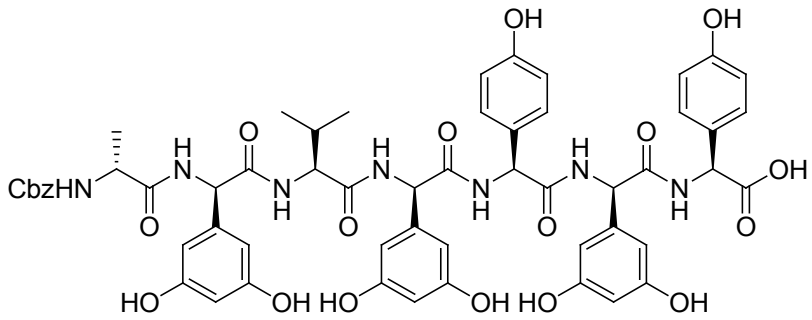
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3274, 3087, 2979, 1747, 1628, 1515, 1455, 1367, 1161, 1006.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.34 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.39 (s, 9H), 2.77-2.83 (m, 1H), 3.10-3.15 (m, 1H), 4.24-4.31 (m, 1H), 4.57-4.51 (m, 1H), 5.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 5.12 (br s, 3H), 6.10 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.19-7.25 (m, 5H), 7.32-7.37 (m, 5H), 8.16-8.21 (m, 2H), 8.55 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 9.17 (s, 2H), 9.34 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.6, 28.2, 37.1, 47.7, 53.5, 56.5, 57.5, 65.8, 78.5, 101.9, 105.6, 114.8, 126.2, 127.7, 127.9, 128.1, 128.4, 128.6, 129.1, 136.0, 137.7, 156.8, 158.1, 169.6, 170.5, 170.6, 172.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{40}H_{45}N_4O_{10}^+$ $[M+H]^+$ 741.3136, gef. 741.3125; |Δm| (ppm) = 1.5.

**Heptapeptid 103:** Cbz–**D-Ala**–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–OH



Durch Methylesterabspaltung von Heptapeptid **153** (100 mg, 89 µmol) entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **III** wurde das *C*-terminal entschützte Heptapeptid **103** (78 mg, 70 µmol, 78 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.08 (DCM/MeOH 4:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.2 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -9.5 (c = 0.80, MeOH).

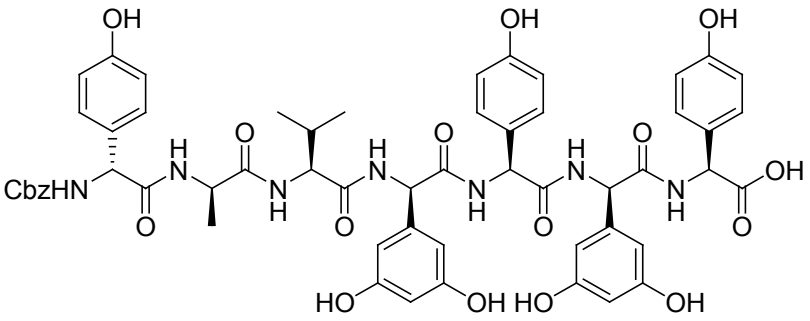
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3291, 2974, 1695, 1634, 1513, 1150, 1004.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.62-0.65 (m, 6H), 1.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.89-1.97 (m, 1H), 4.18-4.25 (m, 1H), 4.39-4.42 (m, 1H), 4.98-5.06 (m, 2H), 5.16 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.04 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.08 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.12 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.30 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.34 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.22-7.35 (m, 5H), 7.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.78 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.86 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.05 (s, 2H), 9.11 (br s, 2H), 9.16 (br s, 2H), 9.22 (s, 1H), 9.42 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 18.3, 19.1, 31.4, 49.8, 54.9, 55.5, 55.7, 55.8, 56.2, 56.9, 65.4, 101.6, 101.7, 105.4, 105.5, 114.7, 115.1, 126.4, 126.6, 127.7, 127.9, 128.0, 128.3, 128.6, 128.7, 137.0, 140.4, 140.7, 155.6, 156.4, 157.1, 157.9, 158.0, 169.0, 169.4, 169.6, 170.2, 172.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{56}H_{56}N_7O_{18}^-$ $[M-H]^-$ 1114.3682, gef. 1114.3673; $|\Delta m|$ (ppm) = 0.8.

**Heptapeptid 104:** Cbz–D-Hpg–**D-Ala**–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–OH



Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **III** erhielt man ausgehend von Heptapeptid **154** (90 mg, 81 µmol) durch Methylesterspaltung das *C*-terminal entschützte Heptapeptid **104** (71 mg, 65 µmol, 80 %) als schwach rosa Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.08 (DCM/MeOH 4:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.5 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -8.6 (c = 0.39, MeOH).

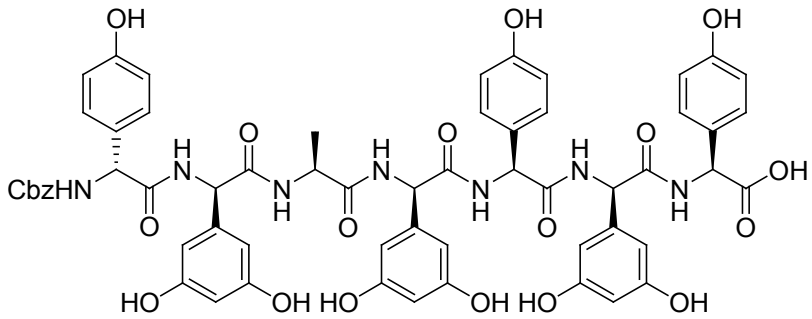
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3294, 2973, 1694, 1633, 1514, 1219, 1154.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.61 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.69 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.25 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H), 1.82-1.90 (m, 1H), 4.35-4.40 (m, 2H), 5.00-5.07 (m, 2H), 5.15-5.17 (m, 2H), 5.50-5.54 (m, 2H), 5.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.04 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.08 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.28 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.66-6.69 (m, 4H), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.28-7.36 (m, 5H), 7.49 (br s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.30 (br s, 1H), 8.42 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.77 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.83 (br s, 1H), 9.09 (s, 2H), 9.10 (br s, 2H), 9.23 (s, 1H), 9.34 (br s, 1H), 9.41 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 18.9, 19.1, 31.0, 48.7, 54.9, 55.7, 55.8, 56.7, 57.7, 65.5, 101.6, 105.4, 105.5, 114.7, 115.0, 115.1, 127.6, 127.7, 127.9, 128.3, 128.5, 128.7, 140.4, 140.7, 156.5, 156.9, 157.1, 157.9, 158.0, 169.0, 169.3, 169.5, 169.9, 170.2, 171.8, 172.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{56}H_{56}N_7O_{17}^-$ $[M-H]^-$ 1098.3733, gef. 1098.3724; $|\Delta m|$ (ppm) = 0.8.

**Heptapeptid 105:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–OH



Durch Methylesterabspaltung von Heptapeptid **155** (90 mg, 76 µmol) nach der allgemeinen Vorschrift **III** wurde das *C*-terminal entschützte Heptapeptid **105** (82 mg, 70 µmol, 92 %) als schwach rosa Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.08 (DCM/MeOH 4:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.2 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -33.9 (c = 0.44, MeOH).

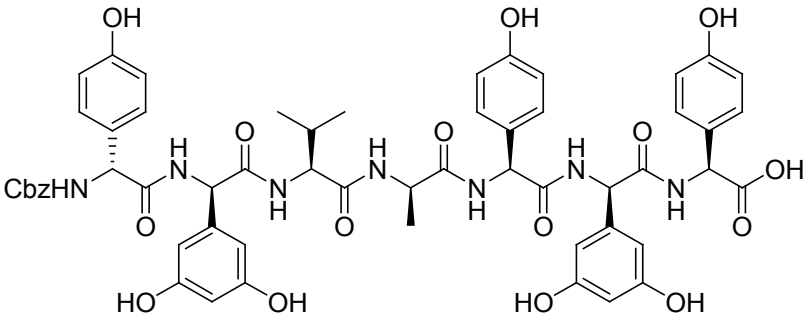
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3302, 2969, 2925, 1643, 1605, 1513, 1262, 1159.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.05 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 4.44-4.48 (m, 1H), 4.99-5.05 (m, 2H), 5.17 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.30-5.34 (m, 2H), 5.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.04 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.07 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.12 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.27 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.29 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.67-6.69 (m, 4H), 7.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.27-7.35 (m, 5H), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 9.00 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.05 (s, 2H), 9.10 (s, 2H), 9.19 (s, 2H), 9.23 (s, 1H), 9.34 (br s, 1H), 9.42 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.6, 47.8, 54.8, 55.4, 55.5, 55.7, 56.1, 57.3, 65.5, 101.5, 101.7, 105.1, 105.4, 105.5, 114.7, 114.9, 115.1, 127.7, 128.0, 128.3, 128.5, 128.6, 129.0, 136.9, 140.5, 141.0, 155.4, 156.4, 156.8, 157.1, 157.9, 158.0, 158.1, 168.8, 169.0, 169.4, 169.5, 169.6, 171.3, 172.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{59}H_{54}N_7O_{19}^-$ $[M-H]^-$ 1164.3474, gef. 1164.3469; |Δm| (ppm) = 0.4.

**Heptapeptid 106:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–**D-Ala**–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–OH




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **III** erhielt man ausgehend von Heptapeptid **156** (100 mg, 90 µmol) durch Methylesterspaltung das *C*-terminal entschützte Heptapeptid **106** (86 mg, 78 µmol, 86 %) als schwach rosa Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.08 (DCM/MeOH 4:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.4 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -3.1 (c = 0.59, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3291, 2970, 1696, 1631, 1514, 1452, 1227, 1157.

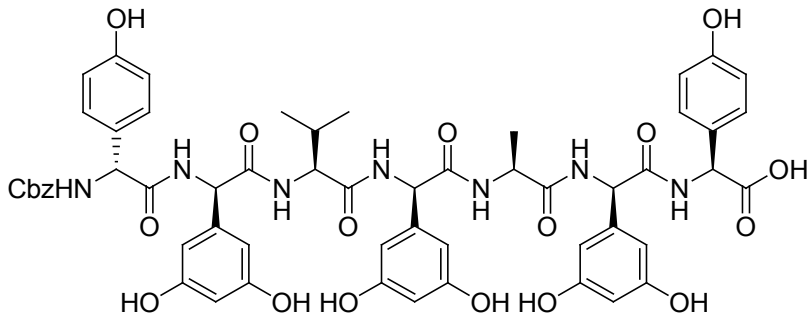
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.60-0.64 (m, 6H), 1.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.82-1.90 (m, 1H), 4.12-4.16 (m, 1H), 4.42-4.48 (m, 1H), 5.02 (m, 2H), 5.15 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.30 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.39 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.04 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.12 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.34 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.66-6.68 (m, 4H), 7.10 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.28-7.35 (m, 5H), 7.82 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.97-7.99 (m, 2H), 8.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.54 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.88

(d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 9.12 (s, 2H), 9.21 (br s, 2H), 9.30 (s, 1H), 9.37 (br s, 1H), 9.45 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.6, 18.5, 19.0, 31.0, 48.1, 54.6, 55.5, 55.8, 56.4, 57.3, 57.5, 65.6, 101.3, 101.5, 105.4, 105.6, 114.8, 115.0, 115.1, 127.8, 127.9, 128.4, 128.5, 128.6, 128.9, 129.4, 137.0, 140.3, 140.5, 155.5, 156.6, 156.8, 157.1, 158.0, 158.1, 169.5, 169.6, 169.8, 170.2, 171.4, 172.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{56}H_{56}N_7O_{17}^-$ $[M-H]^-$ 1098.3733, gef. 1098.3705; |Δm| (ppm) = 2.5.

**Heptapeptid 107:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–OH




Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **III** erhielt man ausgehend von Heptapeptid **157** (90 mg, 80 µmol) durch Methylesterspaltung das *C*-terminal entschützte Heptapeptid **107** (66 mg, 59 µmol, 74 %) als schwach rosa Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.08 (DCM/MeOH 4:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.4 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -56.5 (c = 0.34, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3304, 2927, 1642, 1605, 1514, 1455, 1222, 1158.

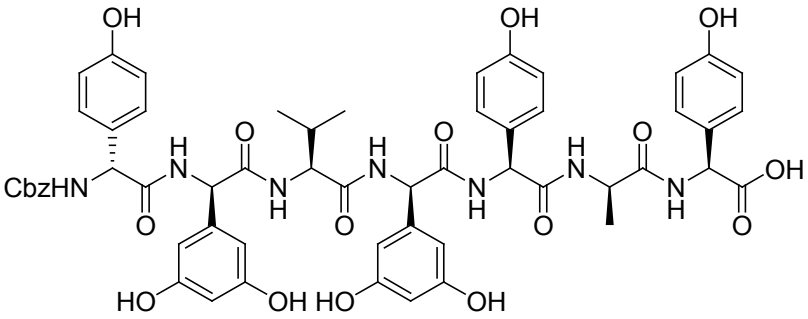
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.54 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.57 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.10 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.82-1.90 (m, 1H), 4.33-4.37 (m, 1H), 4.44-4.51 (m, 1H), 5.02 (s, 2H), 5.15 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.29 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.38 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.07 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.08 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.11 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.26 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.33 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.66-6.70 (m, 4H), 7.13 (d, *J* = 8.7 Hz,

2H), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.28-7.34 (m, 5H), 7.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 9.11 (s, 2H), 9.14 (s, 2H), 9.16 (s, 2H), 9.34 (br s, 1H), 9.43 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.2, 18.6, 19.0, 31.2, 47.8, 55.1, 55.7, 56.0, 56.8, 56.8, 57.5, 65.5, 101.5, 101.6, 101.7, 105.0, 105.3, 105.5, 114.9, 115.1, 126.4, 126.6, 127.7, 128.0, 128.3, 128.5, 128.6, 128.9, 136.9, 140.9, 141.0, 156.8, 157.1, 158.0, 169.1, 169.3, 169.7, 170.2, 171.6, 172.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{56}H_{56}N_7O_{18}^-$ $[M-H]^-$ 1114.3682, gef. 1114.3673; |Δm| (ppm) = 0.8.

**Heptapeptid 108:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–**D-Ala**–L-Hpg–OH



Durch Methylesterabspaltung von Heptapeptid **158** (90 mg, 80 µmol) entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **III** wurde das *C*-terminal entschützte Heptapeptid **108** (67 mg, 61 µmol, 56 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.08 (DCM/MeOH 4:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.5 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = +7.9 (c = 0.70, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$): 3293, 1695, 1623, 1513, 1238, 1157.

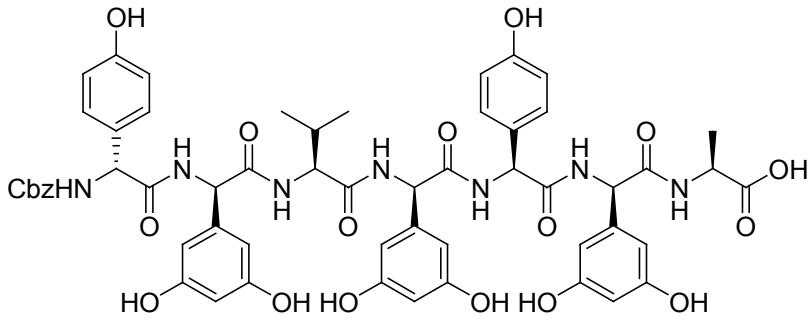
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.55 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.57 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.06 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.80-1.88 (m, 1H), 4.34-4.39 (m, 1H), 4.42-4.46 (m, 1H), 5.02 (s, 2H), 5.23 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.36-5.40 (m, 2H), 5.48 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.08 (t,

*J* = 2.1 Hz, 1H), 6.11 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.33 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.27-7.34 (m, 5H), 7.77 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 9.12 (s, 2H), 9.15 (s, 2H), 9.29 (s, 1H), 9.33 (br s, 1H), 9.44 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.3, 18.6, 19.0, 31.4, 47.8, 55.5, 55.6, 56.0, 56.3, 56.8, 57.5, 65.5, 101.7, 105.5, 105.6, 114.8, 114.9, 115.2, 127.7, 128.0, 128.3, 128.5, 128.7, 128.9, 136.9, 140.4, 140.8, 156.6, 156.7, 157.0, 158.0, 169.2, 169.3, 169.6, 170.3, 171.6, 172.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{56}H_{56}N_7O_{17}^-$ $[M-H]^-$ 1098.3733, gef. 1098.3724; |Δm| (ppm) = 0.8.

**Heptapeptid 109:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–OH




Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **III** erhielt man ausgehend von Heptapeptid **159** (90 mg, 80 µmol) durch Methylesterspaltung das *C*-terminal entschützte Heptapeptid **109** (45 mg, 40 µmol, 50 %) als farblosen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.08 (DCM/MeOH 4:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.3 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -71.9 (c = 0.31, MeOH).

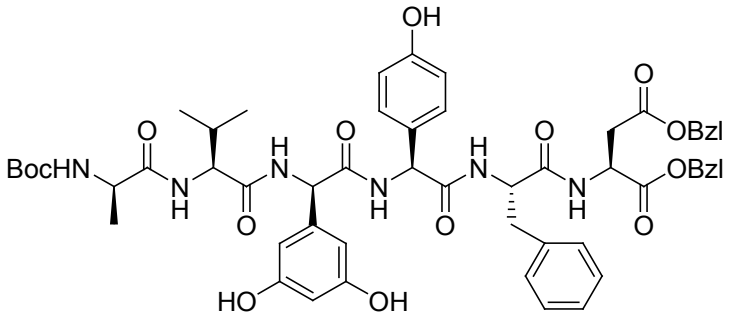
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3300, 2972, 1638, 1605, 1514, 1456, 1341, 1228, 1156, 1005.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.55 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.57 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.81-1.88 (m, 1H), 4.10-4.17 (m, 1H), 4.38-4.40 (m, 1H), 5.02 (s, 2H), 5.30 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.06-6.07 (m, 2H), 6.11 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.17 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.27 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.34 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.27-7.34 (m, 5H), 7.75 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.39-8.42 (m, 2H), 8.50 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 9.10 (s, 4H), 9.17 (br s, 3H), 9.23 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.2, 17.3, 19.0, 31.4, 47.6, 55.0, 55.7, 56.3, 56.8, 57.4, 65.5, 101.6, 101.7, 105.4, 105.5, 114.7, 114.9, 127.7, 127.8, 128.0, 128.3, 128.5, 128.9, 136.9, 140.4, 140.8, 156.2, 156.5, 156.7, 158.0, 169.1, 169.3, 169.6, 170.1, 173.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{56}H_{56}N_7O_{18}^-$ $[M-H]^-$ 1114.3682, gef. 1114.3673; |Δm| (ppm) = 0.8.

**Hexapeptid 110:** Boc–**D-Ala**–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** wurde Tetrapeptid **62** (150 mg, 0.17 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 3 h) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **84** (49 mg, 0.17 mmol) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) wurde Hexapeptid **110** (124 mg, 0.12 mmol, 71 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.37 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 8.1 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -6.3 (c = 1.36, MeOH).

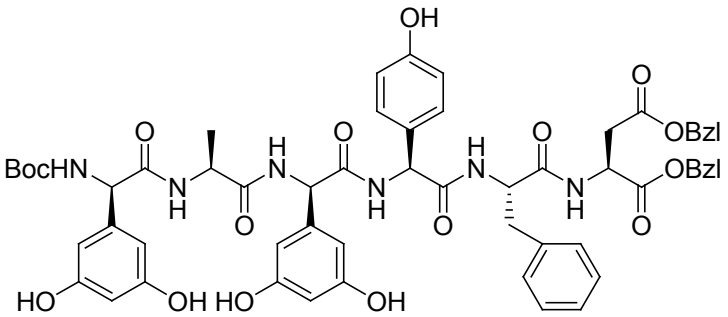
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3289, 2972, 1635, 1514, 1217, 1167.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.74 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.95-2.02 (m, 1H), 2.71-2.89 (m, 3H), 3.01-3.06 (m, 1H), 3.98-4.05 (m, 1H), 4.47-4.50 (m, 1H), 4.53-4.59 (m, 1H), 4.70-4.76 (m, 1H), 5.02-5.09 (m, 4H), 5.28 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.45 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 6.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.89-6.91 (m, 3H), 7.14-7.21 (m, 5H), 7.28-7.35 (m, 10H), 7.47 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.61-8.63 (m, 2H), 9.16 (s, 2H), 9.31 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 18.2, 19.2, 28.1, 31.6, 35.7, 37.5, 48.5, 50.2, 53.7, 55.7, 55.9, 56.3, 66.0, 66.4, 78.2, 101.8, 105.6, 114.8, 126.3, 127.8, 128.0, 128.4, 129.2, 135.7, 135.8, 137.5, 140.2, 155.0, 156.7, 158.1, 169.4, 169.7, 169.8, 170.3, 170.6, 170.9, 172.4.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{56}H_{64}N_6NaO_{14}^+$ $[M+Na]^+$ 1067.4378, gef. 1067.4348; |Δm| (ppm) = 2.8.

**Hexapeptid 111:** Boc–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Tetrapeptid **62** (140 mg, 0.16 mmol; Reaktionszeit: 2 h) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **86** (57 mg, 0.16 mmol). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:1.5) erhielt man das als farbloser Feststoff vorliegende Hexapeptid **111** (129 mg, 0.12 mmol, 75 %).

**DC** $R_f$ = 0.21 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.4 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -29.6 (c = 0.51, MeOH).

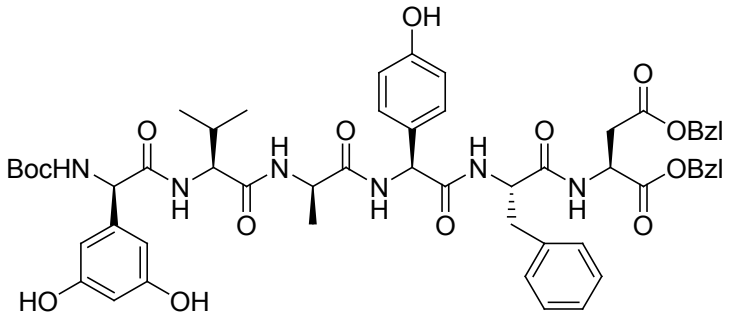
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3285, 2974, 1623, 1515, 1367, 1163.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.13 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.34 (s, 9H), 2.75-2.89 (m, 3H), 3.00-3.05 (m, 1H), 4.46-4.51 (m, 1H), 4.53-4.58 (m, 1H), 4.72-4.77 (m, 1H), 5.01-5.09 (m, 5H), 5.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.44 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.10 (s, 2H), 6.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.27 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.15-7.22 (m, 5H), 7.28-7.35 (m, 10H), 8.18 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.13 (s, 2H), 9.15 (s, 2H), 9.27 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.7, 28.1, 35.7, 37.2, 48.0, 48.5, 53.6, 55.2, 57.2, 65.9, 66.3, 78.3, 101.6, 101.7, 105.1, 105.3, 114.7, 126.3, 127.7, 127.9, 128.0, 128.3, 129.1, 135.6, 135.8, 137.5, 140.3, 156.6, 158.1, 158.1, 169.2, 169.3, 169.6, 169.7, 170.2, 170.7, 171.6.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{59}H_{62}N_6NaO_{16}^+$ $[M+Na]^+$ 1133.4120, gef. 1133.4112; |Δm| (ppm) = 0.7.

**Hexapeptid 112:** Boc–D-Dpg–L-Val–**D-Ala**–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** wurde Tetrapeptid **99** (265 mg, 0.34 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 1 h) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **61** (130 mg, 0.34 mmol) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) erhielt man Hexapeptid **112** (130 mg, 0.12 mmol, 35 %) als farblosen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.47 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.9 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -22.9 (c = 0.80, MeOH/AcN 7:3).

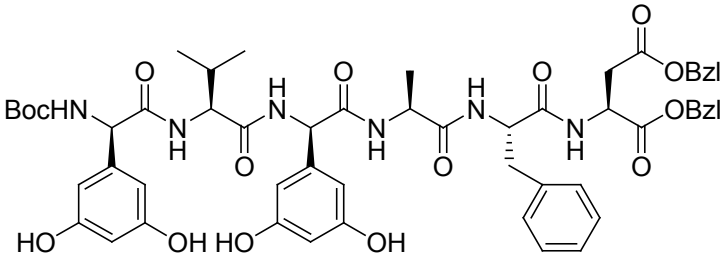
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3276, 2972, 1630, 1515, 1455, 1219, 1165.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.68-0.69 (m, 6H), 1.17 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.34 (s, 9H), 1.89-1.98 (m, 1H), 2.73-2.89 (m, 3H), 3.00-3.04 (m, 1H), 4.13-4.17 (m, 1H), 4.36-4.39 (m, 1H), 4.52-4.57 (m, 1H), 4.71-4.76 (m, 1H), 5.01-5.12 (m, 5H), 5.29 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.16 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 6.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.14-7.21 (m, 5H), 7.28-7.35 (m, 10H), 8.06 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 9.20 (s, 2H), 9.42 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.7, 18.2, 18.9, 28.1, 30.7, 35.6, 37.2, 48.2, 48.5, 53.7, 55.8, 57.5, 57.8, 65.9, 66.2, 78.3, 101.8, 105.2, 114.9, 126.1, 127.7, 127.9, 128.3, 129.2, 135.6, 135.8, 137.6, 155.1, 156.8, 158.1, 169.6, 169.7, 169.9, 170.2, 170.5, 170.7, 171.6.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{56}H_{64}N_6NaO_{14}^+$ $[M+Na]^+$ 1067.4378, gef. 1067.4345; |Δm| (ppm) = 3.1.

**Hexapeptid 113:** Boc–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–**L-Ala**–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl




Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **Ic** wurde Tetrapeptid **100** (115 mg, 0.14 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 1 h) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **61** (54 mg, 0.14 mmol) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) wurde Hexapeptid **113** (116 mg, 0.11 mmol, 79 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.24 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.7 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -65.0 (c = 0.73, MeOH).

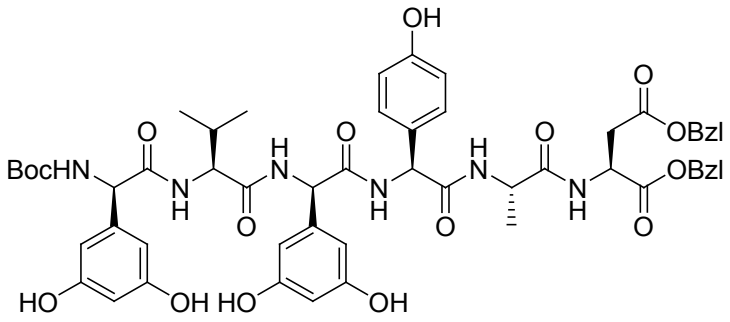
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3284, 2974, 1633, 1523, 1455, 1162, 1005.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.63-0.65 (m, 6H), 1.07 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.34 (s, 9H), 1.86-1.95 (m, 1H), 2.75-2.81 (m, 2H), 2.86-2.92 (m, 1H), 2.97-3.01 (m, 1H), 4.19-4.26 (m, 1H), 4.34-4.38 (m, 1H), 4.52-4.56 (m, 1H), 4.74-4.79 (m, 1H), 5.08 (s, 4H), 5.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.32 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.09 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.11 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.30 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H) 6.78 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.14-7.22 (m, 5H), 7.29-7.34 (m, 10H), 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.47-8.49 (m, 2H), 9.10 (s, 2H), 9.13 (s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.5, 18.0, 19.0, 28.1, 31.2, 35.7, 37.3, 48.1, 48.5, 53.6, 56.0, 56.8, 57.0, 65.9, 66.3, 78.2, 101.6, 101.7, 105.2, 105.5, 126.2, 127.7, 127.9, 128.0, 128.3, 129.1, 135.6, 135.7, 137.5, 140.3, 141.2, 154.5, 158.0, 169.3, 169.7, 169.8, 170.2, 170.4, 171.0, 171.7.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{56}H_{64}N_6NaO_{15}^+$ $[M+Na]^+$ 1083.4327, gef. 1083.4299; |Δm| (ppm) = 2.6.

**Hexapeptid 114:** Boc–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–**L-Ala**–L-Asp(OBzl)–OBzl




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Tetrapeptid **101** (150 mg, 0.19 mmol; Reaktionszeit: 1 h) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **61** (73 mg, 0.19 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung

($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:1) erhielt man Hexapeptid **114** (146 mg, 0.14 mmol, 74 %) als schwach gelblichen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.46 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.0 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -28.6 (c = 0.86, MeOH/AcN 7:3).

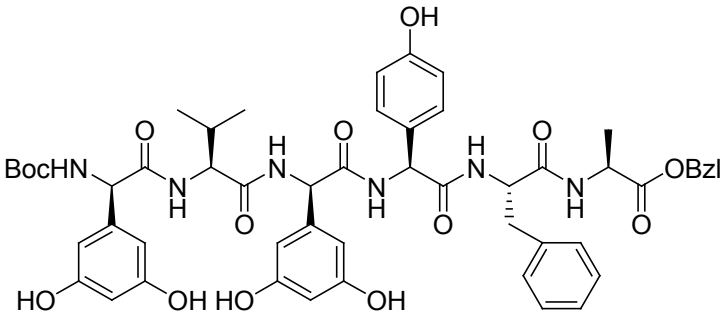
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3281, 2974, 1631, 1514, 1455, 1367, 1162, 1005.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.64-0.65 (m, 6H), 1.20 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.87-1.93 (m, 1H), 2.73-2.86 (m, 2H), 4.32-4.40 (m, 2H), 4.69-4.75 (m, 1H), 5.06 (s, 4H), 5.16 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.39 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.51 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.08-6.10 (m, 2H), 6.30 (s, 4H), 6.59 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.29-7.36 (m, 10H), 7.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 9.10 (s, 4H), 9.26 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 18.3, 19.0, 28.1, 31.3, 35.6, 47.9, 48.4, 55.3, 55.8, 56.9, 57.3, 65.9, 66.3, 78.3, 101.6, 101.7, 105.2, 105.5, 114.8, 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 128.3, 135.6, 135.8, 140.5, 141.2, 154.5, 156.6, 158.0, 169.2, 169.5, 169.6, 169.8, 170.3, 171.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{55}H_{62}N_6NaO_{16}^+$ $[M+Na]^+$ 1085.4120, gef. 1085.4069; |Δm| (ppm) = 4.7.

**Hexapeptid 115:** Boc–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–**L-Ala**–OBzl




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Tetrapeptid **102** (150 mg, 0.20 mmol; Reaktionszeit: 2 h) sowie die anschließende Umsetzung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal

geschützten Dipeptid **61** (77 mg, 0.20 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:1) wurde Hexapeptid **115** (139 mg, 0.14 mmol, 70 %) als schwach gelblicher Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.42 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 6.9 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -36.9 (c = 1.26, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3278, 2975, 1632, 1514, 1455, 1367, 1159, 1005.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.63-0.65 (m, 6H), 1.29 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.34 (s, 9H), 1.88-1.94 (m, 1H), 2.78-2.84 (m, 1H), 3.07-3.12 (m, 1H), 4.31-4.38 (m, 1H), 4.40-4.44 (m, 1H), 4.50-4.56 (m, 1H), 5.07-5.15 (m, 2H), 5.18 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.21 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.42 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.09 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.10 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.31 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.15-7.24 (m, 5H), 7.29-7.37 (m, 5H), 7.92 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 9.13 (s, 2H), 9.16 (s, 2H), 9.31 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.8, 17.3, 19.0, 28.1, 31.5, 37.2, 47.7, 53.7, 56.1, 56.7, 57.2, 65.8, 78.2, 101.6, 101.8, 105.2, 105.7, 126.3, 127.7, 128.0, 128.1, 128.4, 129.2, 136.0, 137.8, 139.9, 154.5, 156.7, 158.0, 169.6, 169.7, 170.7, 172.2.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{53}H_{60}N_6NaO_{14}^+$ $[M+Na]^+$ 1027.4065, gef. 1027.4009; |Δm| (ppm) = 5.5.

**[D-Ala$^1$]-Feglymycin (116):** H–**D-Ala**–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Unter Verwendung der allgemeinen Vorschrift **IIb** wurde durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung ausgehend von Tridecapeptid **160** (6.4 mg, 3.0 µmol) das als farbloser Feststoff vorliegende [D-Ala$^1$]-Feglymycin (**116**, 5.4 mg, quant.) erhalten. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Eduktes in MeOH wurden der trüben Reaktionsmischung geringe Mengen an DMF zugesetzt. Die Reaktionszeit verlängerte sich auf 24 h.

**analyt. HPLC** $t_R$ = ~ 5 min (sehr breiter Peak)

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -162.3 (c = 0.08, MeOH/AcN 7:1).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3283, 1695, 1632, 1513, 1456, 1154, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.58-0.61 (m, 12H), 1.35 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 1.86-1.94 (m, 2H), 2.80-2.85 (m, 1H), 2.99-3.06 (m, 1H), 3.94-3.98 (m, 1H), 4.37-4.43 (m, 2H), 4.50-4.54 (m, 1H), 5.30 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.41 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.47 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.49-5.56 (m, 3H), 5.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.06 (br s, 2H), 6.09 (br s, 2H), 6.13 (br s, 1H), 6.18 (br s, 2H), 6.21 (br s, 2H), 6.29 (br s, 4H), 6.36 (br s, 2H), 6.55-6.57 (m, 6H), 6.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.03-7.06 (m, 4H), 7.14-7.16 (m, 1H), 7.21-7.25 (m, 4H), 8.14 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.50-8.51 (m, 2H), 8.55 (br s, 1H), 8.63-8.66 (m, 3H), 8.75 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.92 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.09 (br s, 2H), 9.16 (br s, 6H), 9.22 (br s, 2H), 9.29 (br s, 2H), 9.32 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.2, 17.4, 18.8, 31.2, 37.0, 47.9, 53.7, 54.8, 55.1, 55.6, 55.8, 56.6, 101.3, 101.4, 105.0, 105.3, 114.5, 126.2, 127.8, 128.0, 129.0.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{90}H_{96}N_{13}O_{29}^+$ $[M+H]^+$ 1822.6431, gef. 1822.6448; |Δm| (ppm) = 0.9.

**[D-Ala$^2$]-Feglymycin (117):** H–D-Hpg–**D-Ala**–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Durch katalytische Hydrogenolyse von Peptid **161** (7.0 mg, 3.3 µmol) entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIb** erhielt man [D-Ala$^2$]-Feglymycin (**117**, 6.0 mg) als farblosen Feststoff in quantitativer Ausbeute.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.7 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -86.4 (c = 0.09, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3284, 2966, 2925, 1633, 1512, 1378, 1148, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.58-0.62 (m, 9H), 0.70 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.27 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.86-1.92 (m, 2H), 2.80-2.85 (m, 1H), 3.04-3.08 (m, 1H), 4.37-4.40 (m, 1H), 4.40-4.43 (m, 1H), 4.46-4.53 (m, 2H), 4.84 (br s, 1H), 5.30 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.49-5.53 (m, 2H), 5.59 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.05 (br s, 2H), 6.08 (br s, 2H), 6.19 (br s, 2H), 6.20 (br s, 2H), 6.27 (br s, 2H), 6.29 (br s, 2H), 6.54-6.58 (m, 6H), 6.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.02-7.04 (m, 4H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.21-7.25 (m, 4H), 7.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.50-8.52 (m, 2H), 8.56 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.59-8.63 (m, 4H), 8.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.09 (br s, 2H), 9.16 (br s, 6H), 9.28 (br s, 2H), 9.32 (br s, 1H), 9.69 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.2, 18.7, 18.9, 31.1, 36.9, 48.4, 53.7, 54.7, 55.0, 55.1, 55.4, 55.8, 56.3, 56.8, 101.4, 105.0, 105.1, 105.2, 114.5, 115.2, 126.1, 127.7, 127.8, 128.0, 129.0, 129.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{90}H_{96}N_{13}O_{28}^+$ $[M+H]^+$ 1806.6488, gef. 1806.6579; |Δm| (ppm) = 5.0.

**[L-Ala$^3$]-Feglymycin (118):** H–D-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **IIb** wurde durch katalytische Hydrogenolyse ausgehend von Tridecapeptid **162** (3.0 mg, 1.4 µmol) das als farbloser Feststoff vorliegende [L-Ala$^3$]-Feglymycin (**118**, 2.6 mg) in quantitativer Ausbeute erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.6 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -65.7 (c = 0.06, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$): 3284, 1693, 1636, 1513, 1456, 1340, 1155, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.59 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 0.61 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.06 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H) 1.86-1.91 (m, 1H), 2.80-2.84 (m, 1H), 3.03-3.07 (m, 1H), 4.35-4.38 (m, 1H), 4.40-4.43 (m, 1H), 4.49-4.53 (m, 1H), 4.94 (br s, 1H), 5.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.39 (d,

*J* = 8.0 Hz, 1H), 5.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.46 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.51 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.56 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.04-6.06 (m, 3H), 6.08 (br s, 1H), 6.14 (br s, 1H), 6.17 (br s, 2H), 6.19 (br s, 2H), 6.24 (br s, 2H), 6.29 (br s, 2H), 6.32 (br s, 2H), 6.56-6.58 (m, 6H), 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.21-7.25 (m, 4H), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.14 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.54-8.58 (m, 2H), 8.66-8.69 (m, 2H), 8.76-8.80 (m, 2H), 8.92 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 9.09 (br s, 2H), 9.15 (br s, 6H), 9.27 (br s, 2H), 9.30 (br s, 1H), 9.32 (br s, 2H), 9.74 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 18.3, 18.7, 36.9, 47.5, 53.7, 54.6, 55.0, 55.2, 55.4, 55.5, 55.6, 56.7, 101.2, 101.5, 104.7, 105.0, 105.2, 114.5, 115.2, 126.1, 127.8, 128.0, 129.0.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{93}H_{94}N_{13}O_{30}^+$ $[M+H]^+$ 1872.6224, gef. 1872.6302; |Δm| (ppm) = 4.2.

**[D-Ala$^4$]-Feglymycin (119):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–**D-Ala**–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung ausgehend von Peptid **163** (8.0 mg, 3.8 µmol) entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIb** erhielt man [D-Ala$^4$]-Feglymycin (**119**, 6.9 mg, quant.) als farblosen Feststoff.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 4.0 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -86.3 (c = 0.12, MeOH/AcN 7:1).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3283, 2971, 1694, 1633, 1513, 1370, 1158, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.58-0.62 (m, 12H), 1.10 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.83-1.89 (m, 2H), 2.80-2.85 (m, 1H), 3.04-3.08 (m, 1H), 4.10-4.13 (m, 1H), 4.38-4.41 (m, 1H), 4.45-4.48 (m, 1H), 4.50-4.55 (m, 1H) 4.95 (br s, 1H), 5.31 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.42 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.45-5.50 (m, 3H), 5.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.05 (br s, 1H), 6.07 (br s, 1H), 6.09 (br s, 1H), 6.13 (br s, 1H), 6.20

(br s, 2H), 6.22 (br s, 2H), 6.29 (br s, 2H), 6.36 (br s, 2H), 6.54-6.57 (m, 4H), 6.64 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.14-7.19 (m, 3H), 7.21-7.25 (m, 4H), 7.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.97 (br s, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.48-8.53 (m, 3H), 8.64-8.68 (m, 2H), 8.73 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.91 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 9.10 (br s, 2H), 9.16 (br s, 4H), 9.25 (br s, 2H), 9.27 (br s, 1H), 9.32 (br s, 2H), 9.71 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.3, 18.5, 18.6, 30.8, 31.0, 37.0, 47.7, 53.6, 54.6, 54.8, 55.1, 55.5, 55.7, 56.0, 56.7, 57.3, 101.4, 101.6, 105.1, 105.3, 105.4, 114.5, 114.6, 115.2, 126.2, 127.7, 127.9, 128.0, 129.0.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{90}H_{96}N_{13}O_{28}^+$ $[M+H]^+$ 1806.6488, gef. 1806.6581; |Δm| (ppm) = 5.2.

**[L-Ala$^5$]-Feglymycin (120):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **IIb** erhielt man durch katalytische Hydrogenolyse ausgehend von Peptid **164** (5.6 mg, 2.6 µmol) das als farbloser Feststoff vorliegende [L-Ala$^5$]-Feglymycin (**120**, 4.7 mg, quant.).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.9 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -101.5 (c = 0.11, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3284, 2971, 1694, 1635, 1514, 1339, 1153, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.55-0.57 (m, 6H), 0.59 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.61 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.85-1.89 (m, 2H), 2.80-2.85 (m, 1H), 3.03-3.07 (m, 1H), 4.31-4.34 (m, 1H), 4.36-4.39 (m, 1H), 4.44-4.52 (m, 2H), 4.91 (br s, 1H), 5.29 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.36 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.44 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.48-5.51 (m, 2H), 5.55 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.03 (br s, 1H), 6.07 (br s, 1H), 6.09 (br s, 2H), 6.11 (br s, 1H), 6.18 (br s, 2H), 6.23 (br s, 2H), 6.27 (br s, 2H), 6.29 (br s, 2H), 6.35 (br s, 2H), 6.56-6.60 (m, 4H), 6.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.5 Hz,

2H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.21-7.25 (m, 4H), 7.28 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 8.01 (br s, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.56-8.60 (m, 2H), 8.64 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.71 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.90 (br s, 1H), 9.06 (br s, 2H), 9.14 (br s, 2H), 9.21 (br s, 6H), 9.32 (br s, 2H), 9.68 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.4, 18.4, 18.8, 31.2, 36.8, 47.6, 53.7, 54.8, 55.1, 55.3, 55.5, 55.7, 56.5, 56.7, 101.2, 101.3, 104.8, 104.9, 105.1, 105.2, 114.6, 115.2, 126.2, 127.9, 128.1, 129.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{90}H_{96}N_{13}O_{29}^+$ $[M+H]^+$ 1822.6431, gef. 1822.6520; |Δm| (ppm) = 4.9.

**[D-Ala$^6$]-Feglymycin (121):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–**D-Ala**–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Durch katalytische Hydrogenolyse von Peptid **165** (6.4 mg, 3.0 µmol) nach der allgemeinen Vorschrift **IIb** erhielt man [D-Ala$^6$]-Feglymycin (**121**, 5.4 mg) als farblosen Feststoff in quantitativer Ausbeute.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.7 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -84.5 (c = 0.08, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$): 3285, 2973, 1635, 1514, 1382, 1220, 1155, 1006.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53-0.55 (m, 6H), 0.58-0.60 (m, 6H), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.82-1.91 (m, 2H), 2.81-2.85 (m, 1H), 3.04-3.07 (m, 1H), 4.34-4.44 (m, 3H), 4.50-4.54 (m, 1H), 4.96 (br s, 1H), 5.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.48-5.49 (m, 3H), 5.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.06 (br s, 1H), 6.08 (br s, 2H), 6.12 (br s, 1H), 6.22 (br s, 2H), 6.26 (br s, 2H), 6.29 (br s, 2H), 6.37 (br s, 2H), 6.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.13-7.17 (m, 3H), 7.20-7.25 (m, 4H), 7.31 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.41 (br s, 1H), 8.47-8.53 (m, 4H), 8.57 (br s, 1H),

8.63 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 9.12 (br s, 2H), 9.16 (br s, 4H), 9.22 (br s, 2H), 9.32 (br s, 1H), 9.35 (s, 1H), 9.73 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.3, 18.3, 18.7, 31.2, 37.2, 47.9, 53.5, 54.4, 54.6, 55.1, 55.6, 55.9, 56.5, 101.4, 101.5, 105.1, 105.2, 105.3, 114.5, 114.6, 115.2, 126.1, 127.8, 127.9, 129.0, 129.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{90}H_{96}N_{13}O_{28}^+$ $[M+H]^+$ 1806.6488, gef. 1806.6464; |Δm| (ppm) = 1.3.

**[L-Ala$^7$]-Feglymycin (122):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIb** wurde durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung ausgehend von Tridecapeptid **166** (4.3 mg, 2.0 µmol) das als farbloser Feststoff vorliegende [L-Ala$^7$]-Feglymycin (**122**, 3.7 mg, quant.) erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.9 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -103.4 (c = 0.10, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3286, 2926, 1636, 1514, 1456, 1381, 1154, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53-0.55 (m, 6H), 0.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.65 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.14 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.85-1.92 (m, 2H), 2.79-2.83 (m, 1H), 3.02-3.05 (m, 1H), 4.34-4.37 (m, 2H), 4.49-4.53 (m, 2H), 4.97 (br s, 1H), 5.29 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.32-5.33 (m, 1H), 5.47-5.51 (m, 3H), 5.53 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.06-6.08 (m, 4H), 6.12 (br s, 1H), 6.13 (br s, 2H), 6.24 (br s, 2H), 6.29 (br s, 2H), 6.30 (br s, 2H), 6.36 (br s, 2H), 6.56-6.58 (m, 4H), 6.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.13-7.16 (m, 1H), 7.20-7.24 (m, 4H), 7.31 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.00 (br s, 1H), 8.24 (d, *J* = 7.8 Hz 1H), 8.33 (br s, 1H), 8.39 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.52-8.59 (m, 5H), 8.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.79 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.96 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.15 (br s, 5H), 9.16 (br s, 3H), 9.23 (br s, 2H), 9.32 (br s, 2H), 9.74 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.4, 18.3, 18.7, 18.8, 31.1, 37.0, 47.6, 53.5, 54.5, 54.7, 55.1, 55.4, 56.6, 101.3, 101.5, 104.7, 104.8, 105.1, 105.2, 114.5, 115.2, 126.1, 127.8, 128.0, 129.0, 129.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{90}H_{96}N_{13}O_{29}^+$ $[M+H]^+$ 1822.6431, gef. 1822.6526; |Δm| (ppm) = 5.2.

**[D-Ala$^8$]-Feglymycin (123):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–**D-Ala**–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung ausgehend von Peptid **167** (10.0 mg, 4.7 µmol) entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIb** wurde [D-Ala$^8$]-Feglymycin (**123**, 8.5 mg, quant.) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.6 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -85.1 (c = 0.11, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3282, 2926, 1634, 1513, 1381, 1220, 1154, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.52-0.56 (m, 6H), 0.72 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.75 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.15 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.81-1.88 (m, 1H), 1.93-2.00 (m, 1H), 2.81-2.85 (m, 1H), 3.04-3.08 (m, 1H), 4.35-4.41 (m, 2H), 4.44-4.48 (m, 1H), 4.48-4.51 (m, 1H), 4.93 (br s, 1H), 5.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.35 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.44 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.46-5.49 (m, 2H), 5.51 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.07-6.09 (m, 3H), 6.12 (br s, 1H), 6.20 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.26 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.29 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.36 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.53-6.57 (m, 4H), 6.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.01-7.05 (m, 4H), 7.13-7.15 (m, 1H), 7.19-7.23 (m, 4H), 7.30 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.95-7.99 (m, 2H), 8.25 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.47-8.50 (m, 2H), 8.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.61-8.62 (m, 2H), 8.70 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.89 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 9.14 (br s, 5H), 9.20 (br s, 2H), 9.30 (br s, 2H), 9.67 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.3, 18.7, 18.8, 31.0, 31.5, 48.0, 53.7, 54.8, 55.2, 55.5, 55.7, 56.4, 56.5, 101.4, 101.5, 105.2, 105.3, 114.5, 115.1, 125.8, 127.7, 127.9, 129.0.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{90}H_{96}N_{13}O_{28}^+$ $[M+H]^+$ 1806.6488, gef. 1806.6552; |Δm| (ppm) = 3.5.

**[L-Ala$^9$]-Feglymycin (124):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Durch katalytische Hydrogenolyse von Tridecapeptid **168** (8.5 mg, 3.9 µmol) nach der allgemeinen Synthesevorschrift **IIb** erhielt man [L-Ala$^9$]-Feglymycin (**124**, 7.3 mg) als farblosen Feststoff in quantitativer Ausbeute.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.6 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -86.2 (c = 0.09, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$): 3286, 1636, 1512, 1378, 1220, 1153, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53-0.56 (m, 6H), 1.12 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.84-1.90 (m, 1H), 2.80-2.84 (m, 1H), 3.03-3.07 (m, 1H), 4.35-4.39 (m, 1H), 4.47-4.54 (m, 2H), 4.95 (br s, 1H), 5.31-5.34 (m, 2H), 5.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.49-5.51 (m, 2H), 5.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.59 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.61 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.05-6.07 (m, 3H), 6.08 (br s, 1H), 6.13 (br s, 1H), 6.15 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.17 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.25 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.27 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 6.36 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.55-6.59 (m, 6H), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.06-7.08 (m, 4H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.21-7.25 (m, 4H), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.97 (br s, 1H), 8.31 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.53-8.54 (m, 2H), 8.65-8.69 (m, 4H), 8.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 9.12 (br s, 5H), 9.15 (br s, 3H), 9.21 (br s, 2H), 9.28 (br s, 2H), 9.31 (br s, 1H), 9.67 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 18.4, 18.7, 31.1, 37.0, 47.7, 53.5, 54.6, 55.2, 55.4, 55.7, 56.4, 101.2, 101.5, 104.9, 105.0, 105.3, 114.6, 115.2, 126.2, 127.8, 128.0, 129.0, 129.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{93}H_{94}N_{13}O_{30}^{+}$ $[M+H]^+$ 1872.6224, gef. 1872.6285; |Δm| (ppm) = 3.3.

**[D-Ala$^{10}$]-Feglymycin (125):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–**D-Ala**–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Unter Verwendung der allgemeinen Vorschrift **IIb** erhielt man durch katalytische Hydrogenolyse ausgehend von Peptid **169** (11.0 mg, 5.2 µmol) das als farbloser Feststoff vorliegende [D-Ala$^{10}$]-Feglymycin (**125**, 9.3 mg, quant.).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 4.1 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -53.6 (c = 0.10, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3283, 2971, 1635, 1512, 1369, 1220, 1156, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.52 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.55 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.65-0.67 (m, 6H), 1.15 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.83-1.95 (m, 2H), 2.54 (br s, 1H), 2.61 (br s, 1H), 2.79-2.83 (m, 1H), 3.02-3.06 (m, 1H), 4.16-4.19 (m, 1H), 4.35-4.38 (m, 1H), 4.42-4.44 (m, 1H), 4.48 (br s, 1H), 4.52-4.56 (m, 1H), 4.99 (br s, 1H), 5.34-5.35 (m, 2H), 5.48-5.50 (m, 2H), 5.52 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.57-5.60 (m, 2H), 6.06-6.08 (m, 3H), 6.13 (br s, 1H), 6.18 (br s, 2H), 6.22 (br s, 2H), 6.26 (br s, 2H), 6.37 (br s, 2H), 6.53-6.57 (m, 4H), 6.66 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.01-7.04 (m, 4H), 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.20-7.25 (m, 4H), 7.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.94-7.98 (m, 2H), 8.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.27 (br s, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.42 (br s, 2H), 8.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.60-8.62 (m, 2H), 8.67 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.72 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.92 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 9.09 (s, 2H), 9.12 (s, 4H), 9.21 (s, 2H), 9.25 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 9.34 (br s, 1H), 9.72 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 17.5, 18.6, 18.7, 30.8, 31.1, 35.6, 37.2, 47.8, 48.3, 53.5, 54.4, 54.7, 54.9, 55.5, 55.8, 56.0, 56.4, 57.4, 101.4, 101.6, 105.1, 105.4, 114.6, 114.7, 115.2, 126.2, 127.8, 128.0, 129.1, 129.2.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{90}H_{96}N_{13}O_{28}^{+}$ $[M+H]^+$ 1806.6488, gef. 1806.6550; |Δm| (ppm) = 3.4.

**[L-Ala$^{11}$]-Feglymycin (126):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–**L-Ala**–L-Phe–L-Asp–OH

Nach der allgemeinen Vorschrift **IIb** wurde durch katalytische Hydrogenolyse von Peptid **170** (7.5 mg, 3.5 µmol) [L-Ala$^{11}$]-Feglymycin (**126**, 6.4 mg) als farbloser Feststoff in quantitativer Ausbeute erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.9 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -101.6 (c = 0.11, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$): 3281, 2971, 1692, 1636, 1512, 1369, 1149, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-d$_6$): δ (ppm) = 0.52-0.56 (m, 6H), 0.59 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.12 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.84-1.91 (m, 2H), 2.77-2.82 (m, 1H), 3.01-3.05 (m, 1H), 4.20-4.23 (m, 1H), 4.32-4.38 (m, 2H), 4.47-4.51 (m, 1H), 4.99 (br s, 1H), 5.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.49-5.51 (m, 2H), 5.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.60-5.61 (m, 2H), 6.05-6.06 (m, 2H), 6.08 (br s, 1H), 6.09 (br s, 1H), 6.13 (br s, 1H), 6.17 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.19 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.25 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.27 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.36 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.55-6.58 (m, 4H), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.05-7.07 (m, 4H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.22-7.27 (m, 4H), 7.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.96 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.14-8.15 (m, 2H), 8.25 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.48-8.52 (m, 2H), 8.62-8.67 (m, 3H), 8.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.92 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 9.07 (s, 2H), 9.09 (s, 2H), 9.13 (s, 2H), 9.17 (s, 2H), 9.21 (s, 2H), 9.29 (br s, 2H), 9.72 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-d$_6$): δ (ppm) = 16.9, 17.4, 18.7, 31.1, 35.6, 47.6, 48.1, 54.4, 54.6, 55.0, 55.3, 55.7, 56.6, 101.3, 101.5, 105.0, 105.3, 114.5, 115.2, 127.8, 129.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{90}H_{96}N_{13}O_{29}^+$ $[M+H]^+$ 1822.6431, gef. 1822.6511; |Δm| (ppm) = 4.3.

**[L-Ala$^{12}$]-Feglymycin (127):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–**L-Ala**–L-Asp–OH

Durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung ausgehend von Tridecapeptid **171** (4.1 mg, 1.9 µmol) unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **IIb** wurde [L-Ala$^{12}$]-Feglymycin (**127**, 3.4 mg, quant.) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.4 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -86.0 (c = 0.08, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$): 3284, 2971, 1694, 1632, 1513, 1370, 1153, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-d$_6$): δ (ppm) = 0.52-0.56 (m, 6H), 0.59-0.63 (m, 6H), 1.24 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.84-1.91 (m, 2H), 2.56 (br s, 2H), 4.31-4.37 (m, 3H), 4.46 (br s, 1H), 4.99 (br s, 1H), 5.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.49-5.54 (m, 4H), 5.61-5.63 (m, 2H), 6.05 (m, 2H), 6.07 (br s, 1H), 6.09 (br s, 1H), 6.13 (br s, 1H), 6.16 (br s, 2H), 6.20 (br s, 2H), 6.25 (br s, 2H), 6.31 (br s, 2H), 6.36 (br s, 2H), 6.55-6.61 (m, 6H), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.06-7.09 (m, 4H), 7.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.08 (br s, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.43-8.44 (m, 2H), 8.50-8.53 (m, 2H), 8.64-8.66 (m, 2H), 8.68-8.71 (m, 2H), 8.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 9.07 (s, 2H), 9.09 (s, 2H), 9.13 (s, 2H), 9.14 (s, 2H), 9.22 (s, 2H), 9.28 (s, 2H), 9.31 (s, 1H), 9.73 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-d$_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.4, 18.7, 31.2, 36.7, 48.3, 53.7, 54.7, 55.1, 55.6, 55.8, 56.6, 101.4, 105.0, 105.1, 105.2, 114.5, 115.1, 126.0, 127.7, 127.8, 128.0, 129.0.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{89}H_{94}N_{13}O_{30}^+$ $[M+H]^+$ 1824.6224, gef. 1824.6216; |Δm| (ppm) = 0.4.

**[L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (128):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–**L-Ala**–OH

Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIb** wurde durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung von Tridecapeptid **172** (10.2 mg, 4.9 µmol) das als farbloser Feststoff vorliegende [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (**128**, 9.0 mg) in quantitativer Ausbeute erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.7 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -74.7 (c = 0.09, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3286, 2969, 2927, 1637, 1513, 1457, 1154, 1005.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.56-0.62 (m, 12H), 1.22 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.84-1.90 (m, 2H), 2.81-2.87 (m, 1H), 3.08-3.13 (m, 1H), 4.09-4.16 (m, 1H), 4.35-4.40 (m, 2H), 4.48-4.54 (m, 1H), 4.71 (br s, 1H), 5.23 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.41-5.43 (m, 2H), 5.46-5.50 (m, 2H), 5.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.60-5.62 (m, 2H), 6.06-6.07 (m, 2H), 6.09 (br s, 1H), 6.11 (br s, 2H), 6.19 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.21 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.28 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.29 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.36 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.55-6.58 (m, 6H), 6.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.02-7.06 (m, 4H), 7.16-7.20 (m, 1H), 7.23-7.27 (m, 6H), 7.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.53-8.55 (m, 2H), 8.60-8.63 (m, 2H), 8.72 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 9.10 (br s, 4H), 9.16 (br s, 3H), 9.21 (br s, 2H), 9.31 (br s, 3H), 9.55 (br s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.1, 18.8, 31.2, 36.8, 53.6, 54.8, 55.4, 55.5, 55.7, 56.7, 101.5, 105.0, 105.2, 114.4, 114.8, 125.9, 127.6, 128.1, 128.8.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{94}H_{98}N_{13}O_{28}^+$ $[M+H]^+$ 1856.6639, gef. 1856.6694; |Δm| (ppm) = 3.0.

**[D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin (129):** H–D-Hpg–**D-Ala**–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–**D-Ala**–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH

Durch katalytische Hydrogenolyse ausgehend von Tridecapeptid **173** (3.0 mg, 1.5 µmol) entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIb** erhielt man [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin (**129**, 2.6 mg, quant.) als farblosen Feststoff.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 4.0 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{21}$ = -35.5 (c = 0.19, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$): 3284, 2969, 2929, 1634, 1513, 1370, 1220, 1155.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-d$_6$): δ (ppm) = 0.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.65-0.66 (m, 6H), 0.70 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.15 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.27 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.87-1.93 (m, 2H), 2.79-2.84 (m, 1H), 3.04-3.07 (m, 1H), 4.17-4.20 (m, 1H), 4.41-4.49 (m, 3H), 4.50-4.55 (m, 1H), 4.86 (br s, 1H), 5.34-5.36 (m, 2H), 5.49-5.53 (m, 2H), 5.58-5.62 (m, 2H), 6.06 (br s, 1H), 6.08 (br s, 2H), 6.19 (br s, 2H), 6.23 (br s, 2H), 6.27 (br s, 2H), 6.53-6.56 (m, 4H), 6.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.01-7.02 (m, 4H), 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.13-7.16 (m, 1H), 7.20-7.23 (m, 4H), 7.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.38-8.39 (m, 2H), 8.51 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.61-8.65 (m, 3H), 8.69 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.76 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 9.14 (br s, 6H), 9.28 (br s, 2H), 9.36 (br s, 1H), 9.70 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-d$_6$): δ (ppm) = 17.3, 17.9, 18.5, 18.7, 18.9, 19.0, 30.8, 36.9, 47.7, 48.4, 53.6, 54.7, 54.8, 54.9, 55.4, 56.1, 56.3, 57.3, 101.3, 105.1, 114.4, 114.6, 115.2, 126.1, 127.6, 127.8, 128.1, 129.0.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{85}H_{94}N_{13}O_{26}^+$ $[M+H]^+$ 1712.6433, gef. 1712.6428; |Δm| (ppm) = 0.3.

**[4-$CF_3$-L-$Phg^{11}$]-Feglymycin (134):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–**4-$CF_3$-L-Phg**–L-Phe–L-Asp–OH

Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIb** wurde durch hydrogenolytische Schutzgruppenabspaltung ausgehend von Peptid **176** (7.2 mg, 3.2 µmol) das als farbloser Feststoff vorliegende [4-$CF_3$-L-$Phg^{11}$]-Feglymycin (**134**, 6.3 mg, quant.) erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 4.8 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -67.4 (c = 0.10, MeOH).

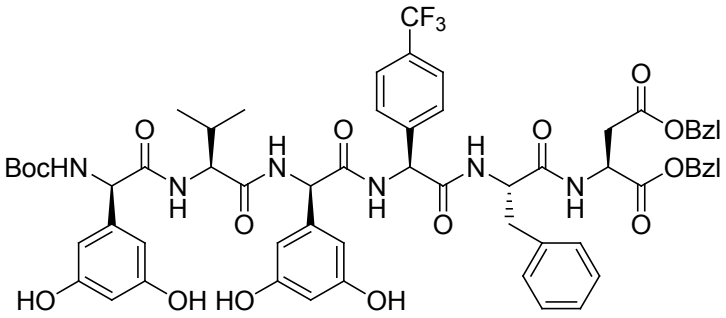
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3285, 2928, 1694, 1638, 1514, 1330, 1155, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53-0.56 (m, 6H), 0.59-0.61 (m, 6H), 1.83-1.91 (m, 2H), 2.81-2.85 (m, 1H), 3.05-3.09 (m, 1H), 4.35-4.38 (m, 2H), 4.51-4.59 (m, 1H), 4.95 (br s, 1H), 5.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.48-5.50 (m, 2H), 5.51-5.54 (m, 2H), 5.56-5.59 (m, 2H), 5.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.06-6.08 (m, 3H), 6.11 (br s, 1H), 6.12 (br s, 1H), 6.18 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 6.20 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.26 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 6.29 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.36 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.54-6.57 (m, 4H), 6.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.14-7.16 (m, 1H), 7.21-7.25 (m, 4H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.98 (br s, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.50-8.53 (m, 2H), 8.61-8.65 (m, 3H), 8.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.74 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.79 (br s, 1H), 8.90 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 9.09 (br s, 2H), 9.13 (br s, 4H), 9.18 (br s, 2H), 9.22 (br s, 2H), 9.28 (br s, 2H), 9.70 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.3, 18.7, 31.3, 37.2, 53.7, 54.6, 55.0, 55.5, 55.8, 56.6, 101.3, 101.5, 105.1, 105.2, 114.5, 115.2, 124.6, 126.3, 127.3, 127.7, 127.9, 129.0, 129.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{96}H_{97}F_3N_{13}O_{29}^+$ $[M+H]^+$ 1952.6467, gef. 1952.6459; |Δm| (ppm) = 0.4.

**Hexapeptid 135:** Boc–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–**4-$CF_3$-L-Phg**–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl




Unter Verwendung der allgemeinen Vorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Tetrapeptid **175** (60 mg, 65 µmol; Reaktionszeit: 1.5 h) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **61** (25 mg, 65 µmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.8) erhielt man Hexapeptid **135** (42 mg, 35 µmol, 54 %) als farblosen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.6 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 8.4 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -31.8 (c = 0.44, MeOH).

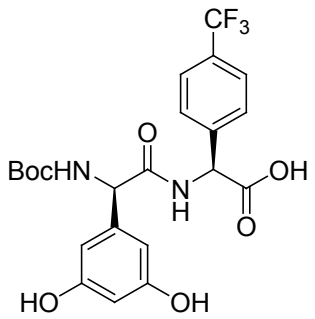
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3283, 2973, 1633, 1523, 1327, 1163, 1005.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.64-0.66 (m, 6H), 1.33 (s, 9H), 1.87-1.95 (m, 1H), 2.69-2.88 (m, 3H), 2.99-3.04 (m, 1H), 4.39-4.42 (m, 1H), 4.55-4.61 (m, 1H), 4.70-4.75 (m, 1H), 5.00-5.09 (m, 4H), 5.18 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.09 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.11 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.31 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.14-7.19 (m, 5H), 7.28-7.34 (m, 10H), 7.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.53-8.58 (m, 2H), 8.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 9.10 (s, 2H), 9.12 (s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 19.0, 28.0, 31.3, 35.6, 37.6, 48.5, 53.6, 55.4, 55.8, 57.0, 65.8, 66.3, 78.2, 101.6, 101.7, 105.2, 105.5, 124.7, 126.3, 127.5, 127.7, 127.8, 127.9, 128.0, 128.3, 129.1, 135.6, 135.7, 137.2, 140.2, 141.3, 143.0, 155.4, 158.1, 168.3, 169.4, 169.6, 169.8, 170.2, 170.4, 170.5.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{62}H_{65}F_3N_6NaO_{15}^+$ $[M+Na]^+$ 1213.4358, gef. 1213.4301; $|\Delta m|$ (ppm) = 4.7.

**Dipeptid 136:** Boc–D-Dpg–**4-$CF_3$-L-Phg**–OH




Durch katalytische Hydrogenolyse von Peptid **138** (250 mg, 0.33 mmol) entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **IIa** erhielt man nach einer Reaktionszeit von 7 h Dipeptid **136** (160 mg) als farblosen Feststoff in quantitativer Ausbeute.

**DC** $R_f$ = 0.19 ($CHCl_3$/MeOH 9:2 (+ 0.1 % AcOH)).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +4.0 (c = 2.26, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3327, 2977, 2929, 1669, 1605, 1508, 1368, 1325, 1245, 1162, 1126, 1068, 1018.

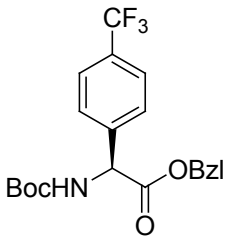
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.38 (s, 9H), 5.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.10 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.84 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 9.14 (s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 28.1, 55.9, 57.3, 78.4, 101.7, 105.3, 125.2, 128.1, 140.4, 141.8, 154.7, 158.1, 169.8, 170.7.

**MS (ESI)** *m/z* 485 $[M+H]^+$, 429, 385, 368, 340, 322, 294, 279, 220, 138.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{22}H_{23}F_3N_2NaO_7^+$ $[M+Na]^+$ 507.1355, gef. 507.1351; $|\Delta m|$ (ppm) = 0.8.

**_N_-(_tert_-Butyloxycarbonyl)-4-trifluormethyl-L-phenylglycinbenzylester (Boc–4-$CF_3$-L-Phg–OBzl; 137)**




Zu einer Lösung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-4-trifluormethyl-L-phenylglycin (**174**, 800 mg, 2.51 mmol) in MeOH (25 ml) wurde $Cs_2CO_3$ (448 mg, 1.38 mmol, 0.55 eq) gelöst in $H_2O$ (2.5 ml) zugetropft und die klare Lösung 30 min bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das erhaltene Cs-Salz für 30 min am Hochvakuum getrocknet und anschließend in abs. DMF (25 ml) suspendiert. Nach Zugabe von Benzylbromid (327 µl, 2.75 mmol, 1.10 eq) wurde die Reaktionsmischung 24 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die erhaltene Suspension mit $H_2O$ (70 ml) versetzt und mit EtOAc (3 x 50 ml) extrahiert. Im Anschluss wurde die organische Phase mit ges. NaCl-Lsg. (3 x 50 ml) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet, filtriert und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, *n*-Hexan/EtOAc 7:1) erhielt man das Produkt mit einer Ausbeute von 90 % (930 mg, 2.27 mmol).

**DC** $R_f$ = 0.46 (*n*-Hexan/EtOAc 5:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +38.4 (c = 1.81, MeOH).

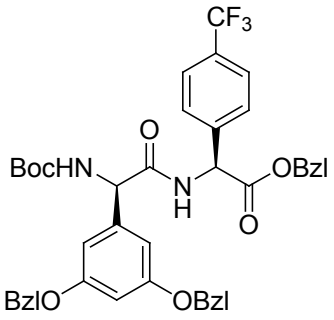
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3362, 2982, 1752, 1691, 1331, 1167, 1119, 1108, 1068, 1018.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.39 (s, 9H), 5.10-5.17 (m, 2H), 5.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.22-7.24 (m, 2H), 7.29-7.32 (m, 3H), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 28.1, 57.3, 66.4, 78.8, 125.2, 127.5, 128.0, 128.3, 128.8, 135.6, 141.2, 155.2, 170.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{21}H_{22}F_3NNaO_4^+$ $[M+Na]^+$ 432.1399, gef. 432.1380; |Δm| (ppm) = 4.4.

**Dipeptid 138:** Boc–D-Dpg(Bzl)$_2$–**4-CF$_3$-L-Phg**–OBzl




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-4-trifluormethyl-L-phenylglycin-benzylester (**137**, 300 mg, 0.73 mmol; Reaktionszeit: 1 h) sowie die anschließende Umsetzung des erhaltenen Aminosäure-Hydrochlorids mit *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-3,5-dibenzoxy-D-phenylglycin (**70**, 338 mg, 0.73 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, *n*-Hexan/$Et_2O$ 2:1) wurde Dipeptid **138** (252 mg, 0.33 mmol, 45 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.19 (*n*-Hexan/$Et_2O$ 1.5:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -33.4 (c = 0.50, MeOH/AcN 7:3).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3327, 2978, 1733, 1655, 1328, 1159, 1123, 1069.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.39 (s, 9H), 5.00 (s, 4H), 5.16 (s, 2H), 5.34 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.66 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.56 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 7.20-7.22 (m, 2H), 7.29-7.41 (m, 14H), 7.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 9.16 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 28.1, 55.8, 57.4, 66.5, 69.3, 78.5, 100.8, 106.4, 125.3, 127.5, 127.6, 127.8, 128.0, 128.3, 128.5, 135.5, 136.8, 140.7, 159.3, 169.5, 169.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{43}H_{42}F_3N_2O_7^+$ $[M+H]^+$ 755.2944, gef. 755.2965; |Δm| (ppm) = 2.8.

**[L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (139):** H–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–**L-2-Nal**–L-Asp–OH

Durch katalytische Hydrogenolyse von Peptid **178** (7.0 mg, 3.1 µmol) entsprechend der allgemeinen Vorschrift **IIb** erhielt man [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**, 6.1 mg) als farblosen Feststoff in quantitativer Ausbeute.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 3.7 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -10.4 (c = 0.10, MeOH).

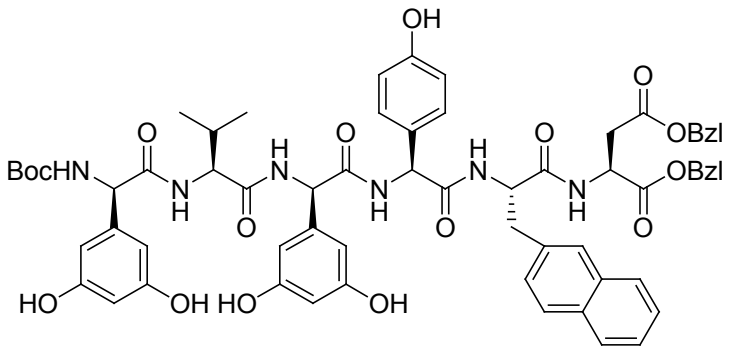
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$): 3283, 1694, 1636, 1512, 1340, 1217, 1152, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-d$_6$): δ (ppm) = 0.52-0.55 (m, 6H), 0.57-0.60 (m, 6H), 1.84-1.91 (m, 2H), 2.99-3.03 (m, 1H), 3.21-3.24 (m, 1H), 4.35-4.37 (m, 2H), 4.49 (br s, 1H), 4.62-4.66 (m, 1H), 4.99 (br s, 1H), 5.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.43 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.49-5.52 (m, 2H), 5.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.59-5.63 (m, 2H), 6.06 (br s, 2H), 6.07 (br s, 1H), 6.09 (br s, 1H), 6.13 (br s, 1H), 6.17 (br s, 2H), 6.19 (br s, 2H), 6.25 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.36 (br s, 2H), 6.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.54-6.58 (m, 4H), 6.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.05-7.08 (m, 4H), 7.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.42-7.47 (m, 3H), 7.75-7.85 (m, 4H), 7.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.53-8.63 (m, 2H), 8.42-8.47 (m, 3H), 8.52-8.54 (m, 2H), 8.65-8.68 (m, 3H), 8.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.94 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.09 (br s, 2H), 9.11 (br s, 2H), 9.14 (br s, 2H), 9.16 (br s, 2H), 9.22 (br s, 2H), 9.28 (br s, 1H), 9.30 (br s, 1H), 9.31 (br s, 1H), 9.74 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-d$_6$): δ (ppm) = 16.9, 17.3, 18.7, 31.2, 35.4, 37.7, 48.2, 53.4, 54.6, 55.3, 55.4, 55.6, 55.9, 56.4, 56.7, 57.1, 65.7, 101.3, 101.4, 105.1, 105.2, 105.3, 114.5, 114.6, 125.4, 127.2, 127.3, 127.6, 127.7, 127.9, 128.0, 128.3.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{99}H_{100}N_{13}O_{30}^+$ $[M+H]^+$ 1950.6699, gef. 1950.6778; |Δm| (ppm) = 4.1.

**Hexapeptid 140:** Boc–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–**L-2-Nal**–L-Asp(OBzl)–OBzl




Unter Verwendung der allgemeinen Vorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Tetrapeptid **177** (140 mg, 0.15 mmol; Reaktionszeit: 1.5 h) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **61** (57 mg, 0.15 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:1) erhielt man Hexapeptid **140** (134 mg, 0.11 mmol, 73 %) als farblosen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.45 ($CHCl_3$/MeOH 9:1.5).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 8.1 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = +8.3 (c = 0.71, MeOH/AcN 7:3).

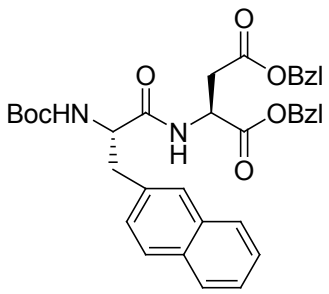
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3286, 1689, 1632, 1513, 1162.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.63-0.64 (m, 6H), 1.33 (s, 9H), 1.88-1.96 (m, 1H), 2.78-2.87 (m, 2H), 2.98-3.04 (m, 1H), 3.17-3.23 (m, 1H), 4.40-4.44 (m, 1H), 4.64-4.70 (m, 1H), 4.74-4.79 (m, 1H), 5.00-5.09 (m, 4H), 5.19 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.43 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.09-6.11 (m, 2H), 6.28 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.45 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.28-7.33 (m, 10H), 7.39-7.48 (m, 3H), 7.72-7.86 (m, 4H), 7.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.49-8.53 (m, 3H), 9.14 (br s, 5H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.3, 19.0, 28.1, 35.7, 37.5, 48.5, 53.7, 55.8, 56.0, 56.8, 57.2, 65.9, 66.3, 78.2, 101.6, 101.8, 105.2, 105.6, 114.7, 125.4, 125.8, 127.4, 127.5, 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 128.3, 128.4, 131.9, 132.9, 135.3, 135.6, 135.8, 140.2, 141.4, 154.5, 156.6, 158.0, 169.3, 169.7, 169.8, 170.2, 170.4, 170.6.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{65}H_{68}N_6NaO_{16}^+$ $[M+Na]^+$ 1211.4590, gef. 1211.4575; |Δm| (ppm) = 1.2.

**Dipeptid 141:** Boc–**L-2-Nal**–L-Asp(OBzl)–OBzl




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ib** erhielt man ausgehend von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-2-naphthyl-L-alanin (473 mg, 1.50 mmol) und L-Asparaginsäuredibenzylester (729 mg, 1.50 mmol; als *para*-Toluolsulfonat) nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, CombiFlash Rf-System, *n*-Hexan/EtOAc) Dipeptid **141** (756 mg, 1.24 mmol, 83 %) als farblosen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.2 (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = +4.0 (c = 0.69, MeOH/AcN 7:3).

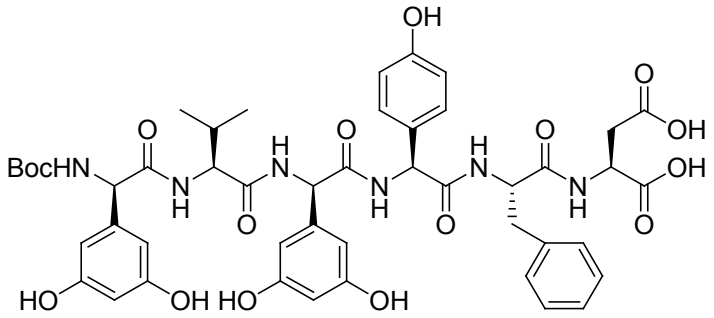
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3312, 2977, 1738, 1662, 1509, 1455, 1391, 1248, 1169, 1052, 1018.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.23 (s, 9H), 2.80-2.97 (m, 3H), 3.08-3.12 (m, 1H), 4.29-4.35 (m, 1H), 4.78-4.84 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.30-7.36 (m, 10H), 7.42-7.49 (m, 3H), 7.71-7.86 (m, 4H), 8.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 28.0, 35.8, 37.6, 48.6, 55.4, 65.9, 66.3, 78.0, 125.3, 125.9, 127.3, 127.4, 127.7, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 131.8, 132.9, 135.6, 135.8, 155.2, 169.8, 170.4, 171.8.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{30}H_{33}N_3O_9^+$ $[M+H]^+$ 580.2217, gef. 580.2284; |Δm| (ppm) = 1.2.

**Hexapeptid 144:** Boc–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp–OH



Eine Lösung von Boc-Hexa-OBzl (**43**, 25 mg, 75 µmol) in MeOH (3 ml) wurde mit Pd/C (10 %) (50 mg) versetzt. Nach Spülen des Kolbens mit Ar wurde die Reaktionsmischung für 8 h in einer $H_2$-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator durch Filtration entfernt (Rotilabo®-Spritzenfilter, PTFE, 0.45 µm), das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Die Aufreinigung von 20 mg des erhaltenen farblosen Feststoffes (gesamt: 63 mg) mit präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 15 % → 50 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) lieferte 13 mg (14 µmol) von Hexapeptid **144** als farblosen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.1 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.4 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{25}$ = -24.7 (c = 0.37, MeOH).

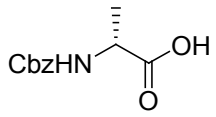
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3288, 2972, 1636, 1514, 1368, 1250, 1159, 1005.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.62-0.65 (m, 6H), 1.35 (s, 9H), 1.88-1.96 (m, 1H), 2.80-2.85 (m, 1H), 3.04-3.09 (m, 1H), 4.36-4.38 (m, 1H), 4.40-4.42 (m, 1H), 4.50-4.56 (m, 1H), 5.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.49 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.08-6.09 (m, 2H), 6.29 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.31 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.56 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.14-7.22 (m, 5H), 8.00-8.03 (m, 2H), 8.39 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.53-8.58 (m, 2H), 9.12 (s, 4H), 9.28 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 19.1, 28.1, 31.4, 48.5, 53.8, 55.4, 55.7, 56.9, 57.2, 78.3, 101.6, 101.7, 105.2, 105.5, 114.8, 126.3, 128.0, 128.1, 129.2, 137.5, 140.6, 156.6, 158.0, 169.1, 169.6, 169.8, 170.3, 1719, 172.4.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{47}H_{55}N_6O_{16}^+$ $[M+H]^+$ 959.3675, gef. 959.3659; $|\Delta m|$ (ppm) = 1.7.

### *N*-(Benzyloxycarbonyl)-D-alanin (Cbz–D-Ala–OH; 145)




Zu einer Lösung von D-Alanin (200 mg, 2.25 mmol) in 1 N NaOH (4 ml) wurde bei 0 °C langsam Chlorameisensäurebenzylester (396 µl, 2.70 mmol, 1.2 eq) zugetropft. Nach 24 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit $H_2O$ (5 ml) verdünnt und mit 1 N NaOH auf pH 8-9 gebracht. Die wässrige Lösung wurde mit $Et_2O$ (3 x 10 ml) gewaschen und anschließend mit 6 N HCl auf pH 2-3 angesäuert. Nach Extraktion mit EtOAc (3 x 10 ml) wurden die vereinigten organischen Extrakte mit 1 N HCl (3 x 10 ml) sowie ges. NaCl-Lsg (1 x 10 ml) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck eingeengt. Es wurden 318 mg (1.43 mmol, 64 %) Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.49 ($CHCl_3$/MeOH 9:1 (+ 0.1 % AcOH)).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +21.5 (c = 1.34, MeOH).††††

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3306, 2967, 1652, 1604, 1523, 1259, 1215, 1150.

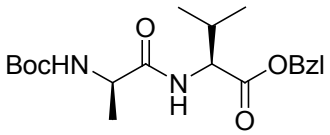
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.27 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 3.97-4.05 (m, 1H), 5.00 (s, 2H), 7.29-7.39 (m, 5H), 7.56 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 49.2, 65.3, 127.7, 128.3, 137.0, 155.8, 174.3.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{11}H_{12}NO_4^-$ $[M-H]^-$ 222.0766, gef. 222.0768; $|\Delta m|$ (ppm) = 0.9.

†††† Literaturwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +13.9 (c = 2.00, MeOH) (J.-L. Moriniere, B. Danree, A. Guy, *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, *22*, 347-357.)

**Dipeptid 146:** Boc–**D-Ala**–L-Val–OBzl




Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **Ib** wurde ausgehend von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-D-alanin (378 mg, 2.00 mmol) und L-Valinbenzylester (488 mg, 2.00 mmol; als Hydrochlorid) nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, *n*-Hexan/EtOAc 3:1) Dipeptid **146** (742 mg, 1.96 mmol, 98 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.23 (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +4.4 (c = 1.44, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3317, 2970, 2933, 1716, 1664, 1513, 1455, 1366, 1248, 1168, 1053, 1024.

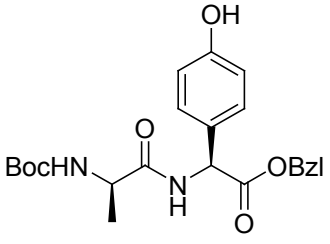
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.83 (m, 6H), 1.17 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 2.02-2.10 (m, 1H), 4.05-4.12 (m, 1H), 4.22-4.29 (m, 1H), 5.10-5.18 (m, 2H), 6.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.33-7.38 (m, 5H), 7.97 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.9, 18.5, 18.9, 28.2, 30.2, 49.6, 57.1, 78.1, 128.0, 128.1, 128.4, 135.8, 155.0, 171.3, 173.1.

**MS (ESI)** *m/z* 379 $[M+H]^+$, 323, 279, 208, 171, 143, 134.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{20}H_{31}N_2O_5^+$ $[M+H]^+$ 379.2233, gef. 379.2225; |Δm| (ppm) = 2.1.

**Dipeptid 147:** Boc–**D-Ala**–L-Hpg–OBzl



Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-4-hydroxy-L-phenylglycinbenzylester (**81**, 715 mg, 2.00 mmol; Reaktionszeit: 30 min) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Aminosäure-Hydrochlorids mit *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-D-alanin (378 mg, 2.00 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.4) wurde Dipeptid **147** (855 mg, 1.99 mmol, 99 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.47 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +76.1 (c = 1.99, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3317, 1978, 1740, 1661, 1516, 1455, 1367, 1250, 1168, 1027.

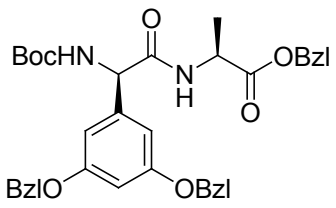
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.13 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.36 (s, 9H), 4.07-4.11 (m, 1H), 5.07-5.15 (m, 2H), 5.31 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.22-7.31 (m, 5H), 8.39 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 9.53 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.3, 28.2, 49.5, 55.7, 66.6, 78.1, 115.3, 126.4, 127.6, 128.0, 128.3, 128.8, 135.8, 155.0, 157.4, 170.6, 172.7.

**MS (ESI)** *m/z* 429 $[M+H]^+$, 373, 329, 241, 237, 183, 179, 134, 122, 107.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{23}H_{29}N_2O_6^+$ $[M+H]^+$ 429.2026, gef. 429.2023; |Δm| (ppm) = 0.7.

**Dipeptid 148:** Boc–D-Dpg(Bzl)$_2$–**L-Ala**–OBzl




Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** wurde durch Kupplung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-3,5-dibenzoxy-D-phenylglycin (**70**, 232 mg, 0.50 mmol) und L-Alaninbenzylester (178 mg, 0.50 mmol; als *para*-Toluolsulfonat) nach

säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, CombiFlash Rf-System, *n*-Hexan/EtOAc) Dipeptid **148** (267 mg, 0.43 mmol, 86 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.5 (*n*-Hexan/EtOAc 2:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -65.2 (c = 0.83, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3329, 2978, 2933, 1741, 1655, 1597, 1521, 1453, 1366, 1251, 1163, 1053, 1029.

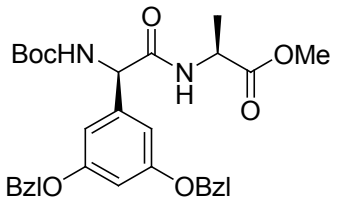
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.25 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.38 (s, 9H), 4.21-4.29 (m, 1H), 5.05 (s, 4H), 5.12 (m, 2H), 5.20 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.58 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.31-7.44 (m, 15H), 8.64 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 28.1, 47.9, 57.3, 65.9, 69.3, 78.4, 100.7, 106.3, 127.6, 127.8, 127.9, 128.4, 136.0, 136.0, 159.3, 169.8, 172.2.

**MS (ESI)** *m/z* 625 $[M+H]^+$, 569, 525, 508, 391, 318, 181.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{37}H_{41}N_2O_7^+$ $[M+H]^+$ 625.2914, gef. 625.2901; |Δm| (ppm) = 2.1.

**Dipeptid 149:** Boc–D-Dpg(Bzl)$_2$–**L-Ala**–OMe




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erhielt man durch Kupplung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-3,5-dibenzoxy-D-phenylglycin (**70**, 232 mg, 0.50 mmol) und L-Alaninmethylester (70 mg, 0.50 mmol; als Hydrochlorid) nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, CombiFlash Rf-System, *n*-Hexan/EtOAc) Dipeptid **149** (226 mg, 0.41 mmol, 82 %) als farblosen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.2 (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -62.0 (c = 1.70, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3320, 2979, 1744, 1655, 1596, 1522, 1452, 1366, 1251, 1212, 1162, 1052, 1028.

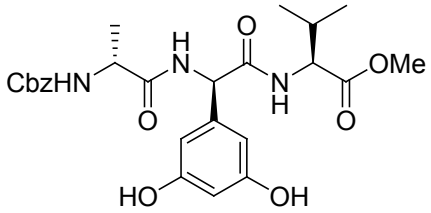
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.21 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.38 (s, 9H), 3.62 (s, 3H), 4.16-4.24 (m, 1H), 5.06 (s, 4H), 5.18 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.58 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.33-7.45 (m, 10H), 8.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 28.1, 47.7, 51.9, 69.3, 78.5, 100.7, 106.4, 127.8, 127.9, 128.5, 136.9, 157.0, 159.3, 169.7, 172.9.

**MS (ESI)** *m/z* 549 $[M+H]^+$, 493, 449, 433, 405, 319.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{31}H_{37}N_2O_7^+$ $[M+H]^+$ 549.2601, gef. 549.2601; |Δm| (ppm) = 0.

**Tripeptid 150:** Cbz–**D-Ala**–D-Dpg–L-Val–OMe




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Dipeptid **56** (198 mg, 0.50 mmol; Reaktionszeit: 30 min) sowie die anschließende Umsetzung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit *N*-(Benzyloxycarbonyl)-D-alanin (**145**, 112 mg, 0.50 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) wurde Tripeptid **150** (155 mg, 0.31 mmol, 62 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.27 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -56.1 (c = 1.19, MeOH).

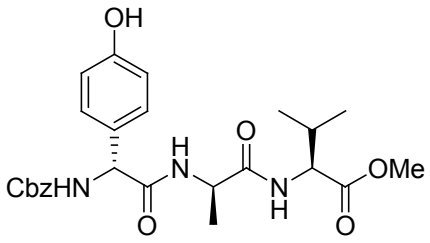
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3322, 3034, 1704, 1530, 1455, 1218, 1072, 1028.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.75 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.21 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.96-2.04 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 4.14-4.19 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 5.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.12 (m, 1H), 6.31 (s, 2H), 7.29-7.35 (m, 5H), 7.50 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 9.14 (s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.9, 18.1, 18.8, 30.2, 50.0, 51.6, 55.7, 57.3, 65.4, 101.7, 105.3, 127.6, 128.3, 136.9, 140.5, 158.1, 170.1, 171.7.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{25}H_{31}N_3NaO_8^+$ $[M+Na]^+$ 524.2009, gef. 524.1995; |Δm| (ppm) = 2.7.

**Tripeptid 151:** Cbz–D-Hpg–**D-Ala**–L-Val–OMe




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Dipeptid **88** (300 mg, 1.00 mmol; Reaktionszeit: 30 min) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit *N*-(Benzyloxycarbonyl)-4-hydroxy-D-phenylglycin (**54**, 301 mg, 1.00 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) wurde Tripeptid **151** (372 mg, 0.77 mmol, 77 %) als schwach gelblicher Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.54 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -52.1 (c = 1.60, MeOH).

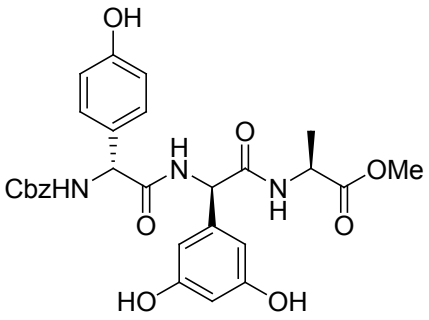
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3302, 2967, 1645, 1514, 1454, 1217, 1149, 1048.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.79 (m, 6H), 1.23 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.93-2.01 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 4.16-4.19 (m, 1H), 4.39-4.46 (m, 1H), 5.04 (s, 2H), 5.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.29-7.35 (m, 5H), 7.72 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 9.33 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.8, 18.8, 18.9, 30.1, 48.0, 51.7, 56.9, 57.6, 65.5, 114.9, 127.6, 127.7, 128.3, 128.4, 136.9, 155.5, 156.8, 169.8, 171.7, 172.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{25}H_{32}N_3O_7^+$ $[M+H]^+$ 486.2240, gef. 486.2213; |Δm| (ppm) = 5.6.

**Tripeptid 152:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–OMe




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Dipeptid **89** (184 mg, 0.50 mmol; Reaktionszeit: 30 min) sowie die anschließende Umsetzung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit *N*-(Benzyloxycarbonyl)-4-hydroxy-D-phenylglycin (**54**, 151 mg, 0.50 mmol). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) erhielt man Tripeptid **152** (178 mg, 0.32 mmol, 64 %) als schwach gelblichen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.31 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -95.7 (c = 1.33, MeOH).

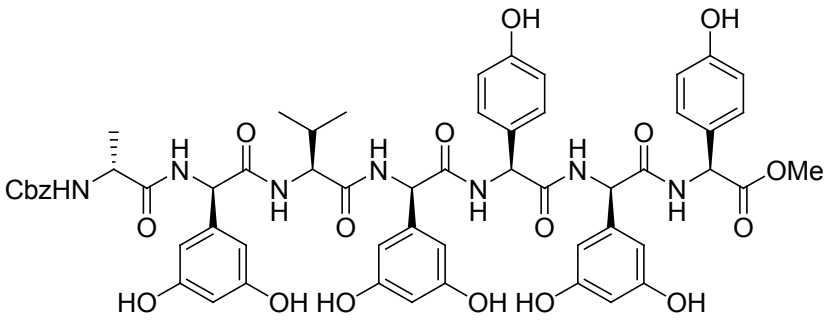
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3305, 2975, 1696, 1655, 1604, 1514, 1454, 1223, 1160, 1053, 1011.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.19 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 3.58 (s, 3H), 4.16-4.24 (m, 1H), 5.02 (s, 2H), 5.30-5.34 (m, 2H), 6.13 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.29-7.34 (m, 5H), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.45 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 9.18 (s, 2H), 9.32 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 47.6, 51.8, 55.7, 57.3, 65.5, 101.8, 105.4, 114.9, 127.6, 128.3, 128.4, 128.9, 136.9, 140.2, 156.7, 158.1, 169.3, 169.6, 172.6.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{28}H_{30}N_3O_9^+$ $[M+H]^+$ 552.1982, gef. 552.1955; $|\Delta m|$ (ppm) = 4.9.

**Heptapeptid 153:** Cbz–**D-Ala**–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–OMe




Unter Verwendung der allgemeinen Vorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Tetrapeptid **52** (137 mg, 0.18 mmol; Reaktionszeit: 1.5 h) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Tripeptid **92** (88 mg, 0.18 mmol). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:2) erhielt man Heptapeptid **153** (135 mg, 0.12 mmol, 67 %) als schwach rosa Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.29 (DCM/MeOH 4:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.4 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -14.1 (c = 0.36, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3297, 2963, 2930, 1637, 1514, 1454, 1262, 1146.

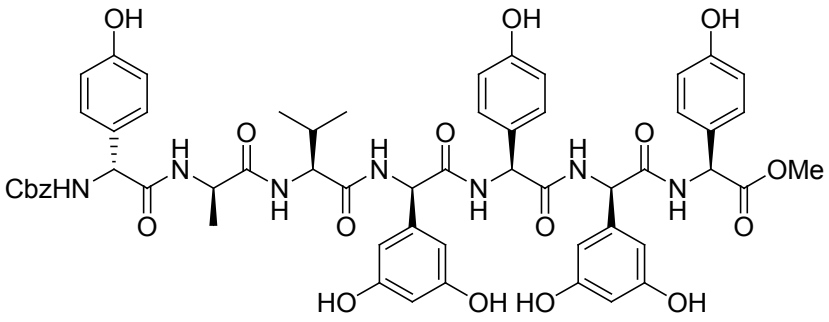
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.62-0.65 (m, 6H), 1.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.88-1.96 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 4.18-4.23 (m, 1H), 4.38-4.42 (m, 1H), 4.98-5.06 (m, 2H), 5.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.58 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.04 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.08 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.12 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.17 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.30 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.33 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.28-7.35 (m, 5H), 7.43 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.79 (d,

$J$ = 8.3 Hz, 1H), 8.99 (d, $J$ = 7.2 Hz, 1H), 9.07 (s, 2H), 9.12 (s, 2H), 9.16 (s, 2H), 9.23 (s, 1H), 9.50 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 18.3, 19.1, 31.4, 49.8, 52.1, 54.9, 55.4, 55.7, 55.8, 56.2, 57.0, 65.4, 101.6, 101.7, 105.3, 105.5, 114.7, 115.3, 125.8, 127.7, 127.9, 128.3, 128.7, 128.8, 137.0, 140.3, 140.7, 155.6, 156.4, 157.4, 158.0, 169.0, 169.5, 169.6, 169.7, 170.2, 171.3, 171.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{57}H_{59}N_7NaO_{18}^+$ $[M+Na]^+$ 1152.3814, gef. 1152.3795; |Δm| (ppm) = 1.6.

**Heptapeptid 154:** Cbz–D-Hpg–**D-Ala**–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–OMe




Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** wurde Tetrapeptid **52** (152 mg, 0.20 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 3 h) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Tripeptid **93** (94 mg, 0.20 mmol) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:2) wurde Heptapeptid **154** (108 mg, 0.10 mmol, 50 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.36 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.7 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -9.0 (c = 1.40, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3298, 2926, 1635, 1514, 1454, 1220, 1159, 1005.

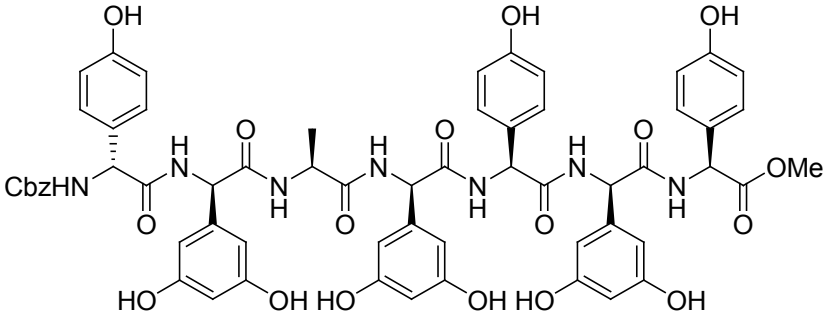
**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.62 (d, $J$ = 6.8 Hz, 3H), 0.69 (d, $J$ = 6.6 Hz, 3H), 1.25 (d, $J$ = 6.9 Hz, 3H), 1.83-1.91 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 4.35-4.41 (m, 2H), 5.00-5.07 (m, 2H), 5.16 (d, $J$ = 8.4 Hz, 1H), 5.23 (d, $J$ = 7.1 Hz, 1H), 5.50-5.55 (m, 2H), 5.63 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1H), 6.04 (t, $J$ = 2.1 Hz, 1H), 6.08 (t, $J$ = 2.1 Hz, 1H), 6.17 (d, $J$ = 2.2 Hz, 2H), 6.28

(d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.27-7.36 (m, 5H), 7.46 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.99 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 9.07 (br s, 2H), 9.10 (br s, 2H), 9.23 (br s, 1H), 9.33 (br s, 1H), 9.50 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 18.9, 19.1, 31.1, 48.7, 52.1, 54.8, 55.4, 55.7, 55.8, 56.6, 57.7, 65.5, 101.7, 105.3, 105.5, 114.7, 115.0, 115.3, 125.8, 127.6, 127.7, 127.9, 128.3, 128.5, 128.7, 128.8, 136.9, 140.3, 140.7, 156.4, 156.8, 157.4, 158.0, 169.0, 169.4, 169.7, 169.9, 170.2, 171.3, 171.7.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{57}H_{59}N_7NaO_{18}^+$ $[M+Na]^+$ 1136.3865, gef. 1136.3836; |Δm| (ppm) = 2.6.

**Heptapeptid 155:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–OMe




Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Tetrapeptid **52** (152 mg, 0.20 mmol; Reaktionszeit: 2 h) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Tripeptid **94** (108 mg, 0.20 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:2) erhielt man das als farbloser Feststoff vorliegende Heptapeptid **155** (108 mg, 0.09 mmol, 45 %).

**DC** $R_f$ = 0.49 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.4 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -39.4 (c = 0.56, MeOH).

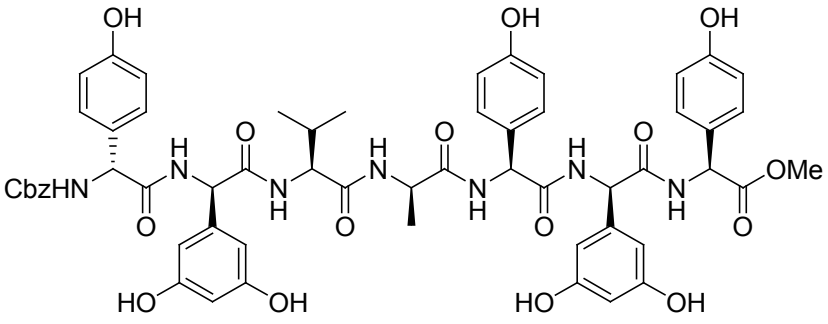
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3300, 2925, 1643, 1605, 1514, 1455, 1265, 1149.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.06 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 3.62 (s, 3H), 4.41-4.48 (m, 1H), 4.99-5.05 (m, 2H), 5.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.29-5.33 (m, 2H), 5.52 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.04 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.07 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.12 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.16 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.27 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.29 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.55 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.28-7.34 (m, 5H), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 9.00 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 9.18 (br s, 9H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 18.6, 47.9, 52.1, 55.4, 55.7, 56.2, 57.4, 65.5, 101.6, 101.7, 101.8, 105.1, 105.3, 105.5, 114.7, 114.9, 115.3, 125.8, 127.7, 128.0, 128.3, 128.5, 128.6, 128.8, 129.0, 136.9, 140.3, 140.5, 141.0, 156.5, 156.8, 157.4, 158.0, 158.1, 168.8, 168.9, 169.5, 169.6, 171.3.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{60}H_{57}N_7NaO_{19}^+$ $[M+Na]^+$ 1202.3607, gef. 1202.3585; |Δm| (ppm) = 1.8.

**Heptapeptid 156:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–**D-Ala**–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–OMe




Unter Verwendung der allgemeinen Vorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Tetrapeptid **95** (140 mg, 0.21 mmol; Reaktionszeit: 1 h) sowie die anschließende Umsetzung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Tripeptid **51** (119 mg, 0.21 mmol). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ($SiO_2$,

$CHCl_3$/MeOH 9:2) erhielt man Heptapeptid **156** (124 mg, 0.11 mmol, 52 %) als farblosen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.30 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.7 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -7.9 (c = 0.71, MeOH).

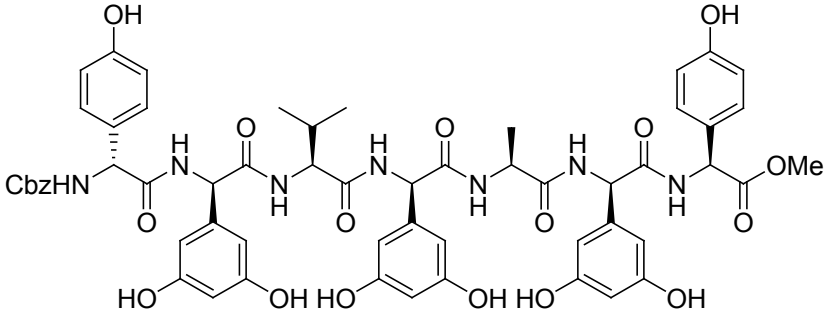
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3291, 2972, 1694, 1633, 1514, 1454, 1221, 1157.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.62-0.65 (m, 6H), 1.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.84-1.92 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 4.12-4.16 (m, 1H), 4.42-4.49 (m, 1H), 5.02 (m, 2H), 5.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.05 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.12 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.34 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.27-7.34 (m, 5H), 7.77 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.91-7.93 (m, 2H), 8.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.97 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 9.08 (s, 2H), 9.17 (s, 2H), 9.27 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 9.49 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.5, 18.4, 18.9, 30.8, 48.0, 52.1, 54.7, 55.4, 55.7, 56.4, 57.5, 65.5, 101.7, 101.8, 105.4, 105.6, 114.8, 114.9, 115.3, 125.8, 127.6, 127.7, 127.9, 128.3, 128.5, 128.8, 128.9, 129.3, 136.9, 140.2, 140.4, 155.5, 156.5, 156.7, 157.4, 158.0, 158.1, 169.4, 169.6, 169.7, 170.2, 171.2, 171.3.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{57}H_{59}N_7NaO_{18}^+$ $[M+Na]^+$ 1136.3865, gef. 1136.3837; |Δm| (ppm) = 2.5.

**Heptapeptid 157:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–OMe



Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **Ic** wurde Tetrapeptid **96** (110 mg, 0.16 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 2 h) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Tripeptid **51** (91 mg, 0.16 mmol) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:1.5) wurde Heptapeptid **157** (116 mg, 0.10 mmol, 63 %) als schwach rosa Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.31 ($CHCl_3$/MeOH 9:2).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.6 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -62.8 (c = 0.77, MeOH).

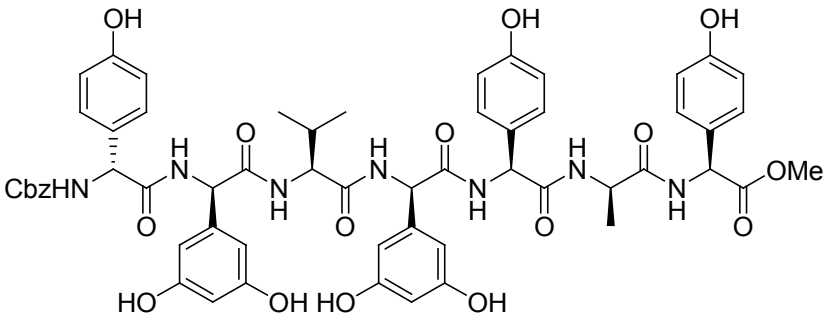
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3301, 2974, 1642, 1606, 1515, 1266, 1160, 1007.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.55 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.57 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.82-1.90 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 4.34-4.38 (m, 1H), 4.45-4.52 (m, 1H), 4.98-5.04 (m, 2H), 5.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.38-5.42 (m, 2H), 5.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.06 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.08 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.10 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.25 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.33 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.26-7.36 (m, 5H), 7.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.41 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 9.09 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 9.18 (s, 4H), 9.19 (s, 2H), 9.37 (s, 1H), 9.56 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.3, 18.7, 19.1, 31.4, 47.8, 52.2, 55.1, 55.7, 55.8, 56.4, 56.8, 57.4, 65.6, 101.6, 101.7, 105.2, 105.5, 115.0, 115.4, 125.7, 127.7, 127.8, 128.3, 128.6, 129.0, 136.9, 140.9, 141.0, 155.5, 156.8, 157.5, 158.0, 158.1, 169.1, 169.4, 169.6, 169.7, 170.3, 171.4, 171.7.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{57}H_{60}N_7O_{18}^+$ $[M+H]^+$ 1130.3995, gef. 1130.3987; |Δm| (ppm) = 0.7.

**Heptapeptid 158:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–**D-Ala**–L-Hpg–OMe




Unter Verwendung der allgemeinen Vorschrift **Ic** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Tetrapeptid **97** (100 mg, 0.15 mmol; Reaktionszeit: 3.5 h) sowie die anschließende Kupplung des erhaltenen Peptid-Hydrochlorids mit dem *N*-terminal geschützten Tripeptid **51** (85 mg, 0.15 mmol). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:2) erhielt man Heptapeptid **158** (108 mg, 0.10 mmol, 67 %) als farblosen Feststoff.

**DC** $R_f$ = 0.28 (DCM/MeOH 6:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.7 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = +4.6 (c = 0.79, MeOH).

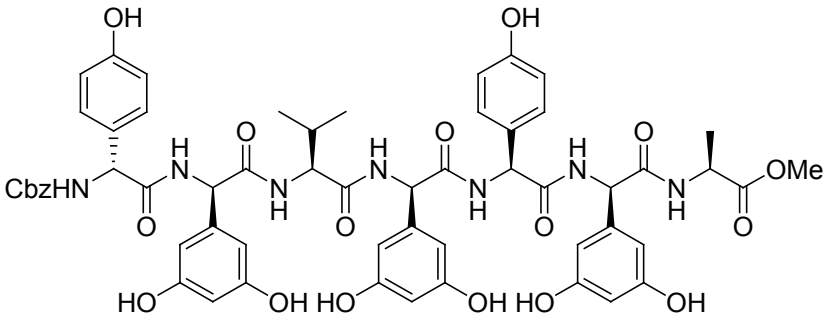
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3293, 2973, 1695, 1632, 1514, 1219, 1174.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.54 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.57 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.05 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.79-1.88 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 4.35-4.39 (m, 1H), 4.41-4.48 (m, 1H), 4.98-5.05 (m, 2H), 5.29-5.32 (m, 2H), 5.38-5.41 (m, 2H), 5.52 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.07 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.10 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.33 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.26-7.36 (m, 5H), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.78 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 9.15 (s, 2H), 9.18 (s, 2H), 9.33 (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 9.56 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 18.8, 19.0, 31.5, 47.7, 52.2, 55.4, 55.5, 55.8, 56.3, 56.8, 57.4, 65.6, 101.7, 105.5, 105.6, 114.9, 115.0, 115.4, 126.4, 127.7, 127.8, 128.1, 128.4, 128.6, 128.8, 129.0, 140.5, 140.9, 155.5, 156.6, 156.8, 157.4, 158.0, 158.1, 169.2, 169.4, 169.6, 170.4, 171.4, 172.0.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{57}H_{60}N_7O_{17}^+$ $[M+H]^+$ 1114.4046, gef. 1114.4028; |Δm| (ppm) = 1.6.

**Heptapeptid 159:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–OMe




Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Ic** wurde Tetrapeptid **98** (137 mg, 0.20 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 3 h) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Tripeptid **51** (113 mg, 0.20 mmol) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:2) wurde Heptapeptid **159** (138 mg, 0.12 mmol, 60 %) als schwach rosa Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.34 ($CHCl_3$/MeOH 9:3).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 5.5 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -75.4 (c = 0.20, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3300, 2971, 1694, 1641, 1605, 1513, 1455, 1222, 1150, 1005.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.54 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.57 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.24 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.80-1.88 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 4.21-4.28 (m, 1H), 4.35-4.39 (m, 1H), 5.02 (s, 2H), 5.28-5.32 (m, 2H), 5.39 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.07-6.08 (m, 2H), 6.11 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.16 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.28 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.33 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.55

(d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.29-7.35 (m, 5H), 7.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 9.10 (s, 2H), 9.12 (s, 2H), 9.15 (s, 2H), 9.25 (s, 1H), 9.32 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.3, 19.0, 31.4, 47.7, 51.9, 55.1, 55.7, 55.8, 56.3, 56.8, 57.4, 65.5, 101.6, 101.7, 105.4, 105.5, 114.7, 114.9, 127.7, 128.0, 128.3, 128.5, 128.9, 136.9, 139.1, 140.1, 140.8, 156.5, 156.8, 158.0, 169.1, 169.3, 169.5, 169.6, 170.1, 172.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{57}H_{59}N_7NaO_{18}^+$ $[M+Na]^+$ 1152.3814, gef. 1152.3801; |Δm| (ppm) = 1.1.

**Tridecapeptid 160:** Cbz–**D-Ala**–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

In Anlehnung an die allgemeine Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **43** (46 mg, 40 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **103** (40 mg, 36 µmol) umgesetzt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie wurde Tridecapeptid **160** (13 mg, 6 µmol) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.0 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{21}$ = -120.8 (c = 0.24, MeOH/AcN 7:1).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3286, 2927, 1632, 1513, 1387, 1156, 1004.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.58-0.64 (m, 12H), 1.21 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.84-2.01 (m, 2H), 2.69-2.87 (m, 3H), 2.95-3.00 (m, 1H), 4.17-4.25 (m, 1H), 4.32-4.40 (m, 2H), 4.51-4.57 (m, 1H), 4.67-4.72 (m, 1H), 4.96-5.08 (m, 6H), 5.29 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.36-5.41 (m, 2H), 5.44 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.56-5.60 (m, 2H), 5.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.05 (br s, 2H), 6.07 (br s, 1H), 6.09 (br s, 1H), 6.11 (br s, 1H), 6.19 (br s, 2H), 6.20 (br s, 2H), 6.29 (br s, 4H), 6.31 (br s, 2H), 6.54-6.56 (m, 6H), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.03-7.07 (m, 4H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.20-7.21 (m, 4H), 7.28-7.35 (m, 15H), 7.47 (d,

*J* = 7.8 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.40-8.45 (m, 2H), 8.47-8.50 (m, 2H), 8.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.67 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.69-8.71 (m, 2H), 8.77 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.4, 17.6, 18.3, 19.1, 31.5, 35.7, 37.6, 48.5, 49.8, 53.7, 55.0, 55.8, 56.1, 55.4, 56.3, 57.1, 65.5, 66.0, 101.7, 105.3, 105.5, 114.8, 126.4, 128.1, 128.2, 129.2, 135.6, 135.8, 137.0, 140.5, 155.7, 156.6, 158.0, 158.2, 169.1, 169.2, 169.5, 169.8, 170.3, 170.4, 170.8, 172.0.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{112}H_{113}N_{13}NaO_{31}^+$ $[M+Na]^+$ 2158.7563, gef. 2158.7656; |Δm| (ppm) = 4.3.

**Tridecapeptid 161:** Cbz–D-Hpg–**D-Ala**–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

In Anlehnung an die allgemeine Synthesevorschrift **Id** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Hexapeptid **43** (40 mg, 35 µmol) sowie die anschließende Umsetzung des erhaltenen TFA-Salzes mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **104** (35 mg, 32 µmol). Tridecapeptid **161** (10 mg, 5 µmol) wurde nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 40 % → 60 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.3 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -55.3 (c = 0.11, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3286, 2973, 1694, 1635, 1513, 1216, 1153, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.57-0.60 (m, 9H), 0.68 (d, *J* = 6.4 Hz, 9H), 1.24 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.84-1.90 (m, 2H), 2.70-2.86 (m, 3H), 2.96-3.00 (m, 1H), 4.33-4.40 (m, 3H), 4.52-4.57 (m, 1H), 4.68-4.72 (m, 1H), 5.00-5.08 (m, 6H), 5.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.31 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.38 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.46 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.05-6.06 (m, 2H), 6.08 (br s, 1H), 6.10 (br s, 1H), 6.19 (br s, 2H), 6.21 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.30 (br s, 2H), 6.53-6.55

(m, 6H), 6.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.01-7.04 (m, 4H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.20-7.22 (m, 6H), 7.28-7.34 (m, 15H), 7.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.44 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.46-8.49 (m, 2H), 8.53 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.60-8.63 (m, 2H), 8.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 9.09 (br s, 4H), 9.15 (br s, 2H), 9.17 (br s, 2H), 9.26 (br s, 2H), 9.30 (br s, 1H), 9.37 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.2, 18.7, 18.9, 31.0, 35.3, 37.4, 48.2, 48.4, 53.4, 54.6, 55.2, 55.5, 55.9, 56.5, 57.5, 65.7, 101.4, 105.1, 105.3, 114.5, 114.7, 126.2, 127.7, 127.8, 127.9, 128.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{112}H_{113}N_{13}NaO_{30}^{+}$ $[M+Na]^+$ 2142.7614, gef. 2142.7682; |Δm| (ppm) = 3.2.

**Tridecapeptid 162:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

In Anlehnung an die allgemeine Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **43** (40 mg, 34 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **105** (36 mg, 31 µmol) gekuppelt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 40 % → 60 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) wurde das als farbloser Feststoff vorliegende Tridecapeptid **162** (7 mg, 3 µmol) erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.0 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -38.7 (c = 0.11, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3291, 2922, 1693, 1638, 1513, 1217, 1155, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.58 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.61 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.05 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.86-1.90 (m, 1H), 2.69-2.86 (m, 3H), 2.95-2.99 (m, 1H), 4.33-4.36 (m, 1H), 4.42-4.45 (m, 1H), 4.52-4.56 (m, 1H), 4.67-4.71 (m, 1H), 4.97-5.08 (m, 6H), 5.29-5.32 (m, 3H), 5.43 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.45 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.58-5.61 (m, 2H), 5.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.03-6.05 (m, 2H), 6.06 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.09 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.12 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.17

(d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.20 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.27 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.28-6.29 (m, 4H), 6.54-6.57 (m, 6H), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.14-7.17 (m, 1H), 7.20-7.22 (m, 6H), 7.28-7.34 (m, 15H), 7.79 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 8.08-8.11 (m, 2H), 8.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.45 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.51-8.57 (m, 4H), 8.65 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.78-8.82 (m, 2H), 9.07 (s, 4H), 9.15 (br s, 4H), 9.23 (s, 2H), 9.27 (br s, 2H), 9.30 (br s, 1H), 9.38 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.3, 18.5, 18.8, 31.2, 35.4, 37.5, 47.7, 48.3, 53.5, 54.6, 55.0, 55.5, 55.6, 56.9, 57.1, 65.4, 65.8, 101.4, 101.6, 104.9, 105.1, 105.3, 114.6, 114.7, 126.2, 127.9, 128.0, 128.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{115}H_{111}N_{13}NaO_{32}^+$ $[M+Na]^+$ 2208.7356, gef. 2208.7431; |Δm| (ppm) = 3.4.

**Tridecapeptid 163:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–**D-Ala**–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

In Anlehnung an die allgemeine Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **43** (45 mg, 40 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **106** (40 mg, 36 µmol) umgesetzt. Tridecapeptid **163** (11 mg, 5 µmol) wurde nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschluss-chromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 40 % → 60 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.2 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -40.6 (c = 0.11, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3292, 2972, 1694, 1634, 1513, 1369, 1218, 1157.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.57-0.63 (m, 12H), 1.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.86-1.90 (m, 2H), 2.70-2.86 (m, 3H), 2.96-2.99 (m, 1H), 4.10-4.13 (m, 1H), 4.36-4.39 (m, 1H), 4.43-4.46 (m, 1H), 4.53-4.57 (m, 1H), 4.68-4.72 (m, 1H), 5.00-5.08 (m, 6H), 5.28-5.33 (m, 2H), 5.36 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.67 (d, *J* = 8.2 Hz,

1H), 6.06 (br s, 2H), 6.10 (br s, 1H), 6.12 (br s, 1H), 6.21 (br s, 2H), 6.22 (br s, 2H), 6.29 (br s, 2H), 6.34 (br s, 2H), 6.53-6.55 (m, 4H), 6.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.14-7.21 (m, 9H), 7.28-7.32 (m, 15H), 7.81 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.90-7.93 (m, 2H), 8.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.41 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.44-8.47 (m, 3H), 8.51-8.55 (m, 2H), 8.64-8.67 (m, 2H), 8.75 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.09 (s, 2H), 9.11 (s, 2H), 9.16 (s, 2H), 9.21 (s, 2H), 9.26 (s, 1H), 9.30 (s, 2H), 9.36 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.2, 18.3, 18.7, 35.3, 37.3, 47.9, 48.2, 53.4, 54.6, 54.8, 55.3, 55.6, 55.9, 56.2, 56.7, 57.2, 57.4, 65.3, 65.8, 101.4, 101.5, 105.2, 105.4, 114.5, 114.6, 126.1, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.8.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{112}H_{113}N_{13}NaO_{30}^{+}$ $[M+Na]^+$ 2142.7614, gef. 2142.7710; |Δm| (ppm) = 4.5.

**Tridecapeptid 164:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

In Anlehnung an die allgemeine Synthesevorschrift **Id** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Hexapeptid **43** (45 mg, 40 µmol). Anschließend wurde das erhaltene TFA-Salz mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **107** (40 mg, 36 µmol) gekuppelt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 40 % → 55 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) erhielt man Tridecapeptid **164** (7 mg, 3 µmol) als farblosen Feststoff.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.2 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -72.7 (c = 0.12, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3290, 2972, 1694, 1636, 1513, 1217, 1154, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.55-0.57 (m, 6H), 0.60 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.10 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.86 (br s, 2H), 2.68-2.84 (m, 3H), 2.94-2.98 (m, 1H), 4.32-4.35 (m, 1H), 4.45-4.48 (m, 1H), 4.50-4.54 (m, 1H), 4.66-4.70 (m, 1H), 5.00-5.07 (m, 6H), 5.27-5.31 (m, 2H), 5.36-5.38 (m, 2H), 5.41 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.47 (d, *J* = 8.0 Hz,

1H), 5.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.59 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.03 (br s, 1H), 6.06-6.07 (m, 3H), 6.09 (br s, 1H), 6.17 (br s, 2H), 6.24 (br s, 2H), 6.25 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.31 (br s, 2H), 6.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.13-7.16 (m, 1H), 7.18-7.20 (m, 6H), 7.28-7.31 (m, 15H), 7.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.45-8.46 (m, 2H), 8.49-8.58 (m, 6H), 8.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.05 (s, 2H), 9.14 (s, 4H), 9.17 (s, 2H), 9.19 (s, 2H), 9.28 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 9.35 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 17.3, 18.8, 31.1, 35.4, 37.3, 47.7, 48.3, 53.5, 54.9, 55.2, 55.5, 55.9, 56.7, 57.2, 65.3, 65.7, 101.4, 104.9, 105.2, 114.5, 114.7, 126.2, 127.8, 128.0, 128.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{112}H_{113}N_{13}NaO_{31}^+$ $[M+Na]^+$ 2158.7563, gef. 2158.7623; |Δm| (ppm) = 2.8.

**Tridecapeptid 165:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–**D-Ala**–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

In Anlehnung an die allgemeine Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **43** (46 mg, 40 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **108** (40 mg, 36 µmol) umgesetzt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 40 % → 60 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) wurde das als farbloser Feststoff vorliegende Tridecapeptid **165** (8 mg, 4 µmol) erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.1 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -47.2 (c = 0.12, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3291, 1693, 1636, 1514, 1455, 1218, 1156, 1003.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53-0.60 (m, 12H), 1.04 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.83-1.89 (m, 2H), 2.71-2.86 (m, 3H), 2.96-2.99 (m, 1H), 4.35-4.39 (m, 2H), 4.43-4.46 (m, 1H), 4.53-4.57 (m, 1H), 4.68-4.73 (m, 1H), 5.00-5.08 (m, 6H), 5.29-5.32 (m, 2H), 5.36-5.40 (m, 2H), 5.47

(d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.50 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.07 (br s, 1H), 6.08 (br s, 2H), 6.11 (br s, 1H), 6.23 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.29 (br s, 2H), 6.34 (br s, 2H), 6.54 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.59 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.13-7.16 (m, 3H), 7.20-7.21 (m, 6H), 7.28-7.33 (m, 15H), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.41 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.45-8.55 (m, 6H), 8.61 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.11 (s, 2H), 9.16 (s, 4H), 9.18 (s, 2H), 9.30 (s, 1H), 9.32 (s, 2H), 9.36 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.3, 18.7, 31.2, 35.5, 37.3, 47.7, 48.2, 53.4, 54.7, 55.2, 55.6, 55.9, 56.7, 57.2, 65.4, 65.8, 101.5, 105.1, 105.3, 114.5, 114.6, 126.1, 127.7, 127.9, 128.0, 128.8.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{112}H_{113}N_{13}NaO_{30}^{+}$ $[M+Na]^+$ 2142.7614, gef. 2142.7686; |Δm| (ppm) = 3.4.

**Tridecapeptid 166:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

In Anlehnung an die allgemeine Synthesevorschrift **Id** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Hexapeptid **43** (46 mg, 40 µmol). Anschließend wurde das erhaltene TFA-Salz mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **109** (40 mg, 36 µmol) gekuppelt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie erhielt man Tridecapeptid **166** (6 mg, 3 µmol) als farblosen Feststoff.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.1 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = -76.0 (c = 0.07, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3292, 2924, 1693, 1637, 1514, 1455, 1218, 1155.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.56 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.61 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.64 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.12 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.85-1.92 (m, 2H), 2.69-2.85 (m, 3H), 2.94-2.98 (m, 1H), 4.36 (br s, 2H), 4.46-4.50 (m, 1H), 4.51-4.55 (m, 1H), 4.67-4.71 (m,

1H), 4.99-5.07 (m, 6H), 5.28-5.30 (m, 2H), 5.34 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.38 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.45-5.47 (m, 2H), 5.53 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 5.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.06 (br s, 2H), 6.08 (br s, 2H), 6.10 (br s, 1H), 6.14 (br s, 2H), 6.26 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.30 (br s, 2H), 6.32 (br s, 2H), 6.53-6.57 (m, 4H), 6.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.13-7.16 (m, 1H), 7.19-7.20 (m, 6H), 7.27-7.33 (m, 15H), 7.80 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.44-8.56 (m, 6H), 8.66 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.75 (br s, 1H), 9.19 (br s, 13H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 17.4, 18.4, 18.8, 31.1, 35.4, 37.4, 48.3, 53.4, 54.9, 55.4, 55.5, 56.1, 56.7, 57.2, 65.4, 65.8, 101.4, 104.9, 105.2, 114.6, 114.7, 126.2, 127.8, 128.0, 128.1, 128.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{112}H_{113}N_{13}NaO_{31}^+$ $[M+Na]^+$ 2158.7563, gef. 2158.7643; |Δm| (ppm) = 3.7.

**Tridecapeptid 167:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–**D-Ala**–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **110** (50 mg, 48 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **42** (51 mg, 43 µmol) umgesetzt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 45 % → 60 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) wurde Tridecapeptid **167** (19 mg, 9 µmol) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.3 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -50.9 (c = 0.14, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3288, 1694, 1637, 1513, 1455, 1218, 1156, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.52 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.56 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.72 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.74 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.13 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.82-1.88 (m, 1H), 1.92-1.99 (m, 1H), 2.70-2.80 (m, 2H), 2.81-2.86 (m, 1H), 2.95-2.99 (m, 1H), 4.37-4.40 (m, 2H), 4.44-4.47 (m, 1H), 4.53-4.57 (m, 1H), 4.68-4.72 (m, 1H), 5.00-5.08 (m, 6H), 5.30

(d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.39 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.46-5.48 (m, 2H), 5.55 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.07 (br s, 2H), 6.10 (br s, 1H), 6.11 (br s, 1H), 6.21 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.30 (br s, 2H), 6.34 (br s, 2H), 6.53-6.54 (m, 4H), 6.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.02-7.05 (m, 4H), 7.14-7.15 (m, 1H), 7.19-7.22 (m, 6H), 7.28-7.34 (m, 15H), 7.81 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.88-7.92 (m, 2H), 8.23 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.46-8.51 (m, 4H), 8.56 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.66-8.67 (m, 2H), 8.74 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 9.11 (s, 2H), 9.13 (s, 2H, 9.15 (s, 2H), 9.18 (s, 2H), 9.25 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 9.35 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 17.4, 18.7, 18.8, 31.1, 31.2, 35.4, 37.4, 48.1, 48.2, 53.4, 54.6, 55.2, 55.3, 55.4, 56.0, 56.4, 56.6, 57.2, 65.3, 65.8, 101.4, 105.2, 105.3, 114.4, 114.6, 114.7, 126.0, 127.7, 127.9, 128.0, 128.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{112}H_{113}N_{13}NaO_{30}^{+}$ $[M+Na]^+$ 2142.7614, gef. 2142.7690; |Δm| (ppm) = 3.5.

**Tridecapeptid 168:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–**L-Ala**–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **111** (50 mg, 45 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **42** (34 mg, 41 µmol) gekuppelt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 40 % → 55 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) erhielt man Tridecapeptid **168** (16 mg, 7 µmol) als farblosen Feststoff.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 6.9 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -46.4 (c = 0.16, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3290, 1694, 1638, 1513, 1339, 1217, 1154, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.56 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.86-1.90 (m, 1H), 2.70-2.79 (m, 2H), 2.81-2.86 (m, 1H), 2.95-2.99 (m, 1H), 4.37-4.40 (m, 1H), 4.45-

4.48 (m, 1H), 4.52-4.56 (m, 1H), 4.68-4.72 (m, 1H), 5.00-5.08 (m, 6H), 5.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.31-5.34 (m, 2H), 5.39 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.46 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.57-5.60 (m, 2H), 5.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.03 (br s, 1H), 6.06 (br s, 2H), 6.09 (br s, 1H), 6.11 (br s, 1H), 6.15 (br s, 2H), 6.17 (br s, 2H), 6.28 (br s, 4H), 6.33 (br s, 2H), 6.54-6.57 (m, 6H), 6.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.06-7.09 (m, 4H), 7.14-7.16 (m, 1H), 7.20-7.22 (m, 6H), 7.28-7.33 (m, 15H), 7.81 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.41 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.51-8.57 (m, 4H), 8.62 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.68-8.71 (m, 2H), 8.73 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.80 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.06 (s, 2H), 9.11 (s, 2H), 9.12 (s, 2H), 9.16 (s, 2H), 9.19 (s, 2H), 9.25 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 9.35 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 18.5, 18.8, 31.1, 35.5, 37.4, 48.3, 53.5, 54.5, 54.7, 55.3, 55.5, 56.1, 56.5, 57.1, 65.4, 65.7, 101.3, 105.0, 105.2, 114.5, 114.7, 126.1, 127.8, 128.0, 128.8.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{115}H_{111}N_{13}NaO_{32}^{+}$ $[M+Na]^+$ 2208.7356, gef. 2208.7385; |Δm| (ppm) = 2.9.

**Tridecapeptid 169:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–**D-Ala**–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **Id** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Hexapeptid **112** (50 mg, 48 µmol). Anschließend wurde das erhaltene TFA-Salz mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **42** (51 mg, 43 µmol) umgesetzt. Tridecapeptid **169** (19 mg, 9 µmol) wurde nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 45 % → 60 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.2 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -34.0 (c = 0.16, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3289, 2971, 1693, 1635, 1513, 1218, 1157, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.56 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.64-0.65 (m, 6H), 1.15 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.84-1.92 (m, 2H), 2.70-2.79 (m, 2H), 2.82-2.86 (m, 1H), 2.95-2.99 (m, 1H), 4.15-4.18 (m, 1H), 4.37-4.40 (m, 1H), 4.42-4.44 (m, 1H), 4.53-4.57 (m, 1H), 4.68-4.72 (m, 1H), 5.00-5.08 (m, 6H), 5.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.35-5.36 (m, 2H), 5.40 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.05 (br s, 1H), 6.07 (br s, 2H), 6.11 (br s, 1H), 6.19 (br s, 2H), 6.25 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.34 (br s, 2H), 6.52-6.55 (m, 4H), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.01-7.05 (m, 4H), 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.14-7.16 (m, 1H), 7.20-7.22 (m, 6H), 7.29-7.33 (m, 15H), 7.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.37-8.40 (m, 2H), 8.49 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.66-8.69 (m, 3H), 8.78 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 9.08 (s, 2H), 9.13 (br s, 4H), 9.19 (s, 2H), 9.25 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 9.36 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.4, 18.7, 30.8, 31.2, 35.4, 37.2, 48.2, 53.4, 54.6, 54.9, 55.4, 56.0, 56.4, 57.1, 57.2, 65.3, 65.7, 101.4, 105.1, 105.3, 114.4, 114.6, 114.7, 126.1, 127.7, 127.8, 127.9, 128.8, 128.9.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{112}H_{113}N_{13}NaO_{30}^+$ $[M+Na]^+$ 2142.7614, gef. 2142.7677; |Δm| (ppm) = 2.9.

**Tridecapeptid 170:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–**L-Ala**–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

Nach der allgemeinen Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **113** (50 mg, 47 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **42** (50 mg, 42 µmol) gekuppelt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 40 % → 60 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) erhielt man das als farbloser Feststoff vorliegende Tridecapeptid **170** (15 mg, 7 µmol).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.2 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -74.9 (c = 0.13, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3289, 2971, 1637, 1513, 1339, 1217, 1153, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.56-0.59 (m, 9H), 0.61 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.08 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.85-1.90 (m, 2H), 2.72-2.80 (m, 2H), 2.87-2.92 (m, 1H), 2.93-2.97 (m, 1H), 4.19-4.25 (m, 1H), 4.31-4.33 (m, 1H), 4.37-4.40 (m, 1H), 4.59-4.53 (m, 1H), 4.71-4.75 (m, 1H), 4.98-5.04 (m, 2H), 5.07 (s, 4H), 5.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.34 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.39-5.40 (m, 2H), 5.53 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.60 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.04-6.06 (m, 2H), 6.07 (br s, 1H), 6.09 (br s, 1H), 6.11 (br s, 1H), 6.18 (br s, 2H), 6.20 (br s, 2H), 6.27 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.34 (br s, 2H), 6.54-6.56 (m, 4H), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.04-7.08 (m, 4H), 7.13-7.16 (m, 1H), 7.21-7.22 (m, 6H), 7.29-7.33 (m, 15H), 7.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.12-8.15 (m, 2H), 8.23 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.65-8.68 (m, 2H), 8.71 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 9.07 (br s, 4H), 9.13 (s, 2H), 9.17 (s, 2H), 9.18 (s, 2H), 9.25 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 9.35 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 17.4, 18.8, 31.0, 35.5, 37.2, 47.8, 48.3, 53.5, 54.6, 55.5, 55.9, 56.5, 56.8, 57.1, 65.3, 65.9, 101.3, 101.5, 105.0, 105.1, 105.3, 114.5, 114.7, 126.1, 127.7, 127.9, 128.8.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{112}H_{113}N_{13}NaO_{31}^+$ $[M+Na]^+$ 2158.7563, gef. 2158.7672; |Δm| (ppm) = 5.0.

**Tridecapeptid 171:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–**L-Ala**–L-Asp(OBzl)–OBzl

In Anlehnung an die allgemeine Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **114** (80 mg, 75 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **42** (81 mg, 68 µmol) umgesetzt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer

Gradient: 30 % → 65 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) wurde Tridecapeptid **171** (11 mg, 5 µmol) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.2 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{22}$ = -63.9 (c = 0.15, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3294, 2971, 1635, 1513, 1455, 1217, 1155, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.56 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.86 (br s, 2H), 2.72-2.84 (m, 2H), 4.32-4.35 (m, 2H), 4.37-4.39 (m, 1H), 4.67-4.71 (m, 1H), 5.00-5.05 (m, 6H), 5.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.39-5.42 (m, 3H), 5.51 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.62-5.66 (m, 2H), 6.03 (br s, 1H), 6.05 (br s, 1H), 6.07 (br s, 1H), 6.09 (br s, 1H), 6.11 (br s, 1H), 6.17 (br s, 2H), 6.20 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.32 (br s, 2H), 6.33 (br s, 2H), 6.54-6.58 (m, 6H), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.07-7.09 (m, 4H), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.28-7.33 (m, 15H), 7.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.49-8.54 (m, 3H), 8.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.69-8.75 (m, 3H), 8.82 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 9.08 (br s, 4H), 9.15 (br s, 4H), 9.20 (br s, 2H), 9.27 (br s, 2H), 9.31 (br s, 1H), 9.37 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 17.5, 18.8, 31.2, 35.3, 47.6, 48.2, 54.7, 55.0, 55.4, 55.9, 56.1, 56.6, 56.8, 57.1, 65.4, 65.9, 101.3, 101.4, 105.0, 105.1, 105.2, 114.5, 114.7, 127.8, 127.9, 128.3.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{111}H_{111}N_{13}NaO_{32}^+$ $[M+Na]^+$ 2160.7356, gef. 2160.7415; |Δm| (ppm) = 2.7.

**Tridecapeptid 172:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–L-Phe–**L-Ala**–OBzl

In Anlehnung an die allgemeine Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **115** (70 mg, 69 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **42** (74 mg, 62 µmol) gekuppelt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels

Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie erhielt man das als farbloser Feststoff vorliegende Tridecapeptid **172** (25 mg, 12 µmol).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 6.6 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{21}$ = -60.7 (c = 0.58, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3287, 2968, 2929, 1692, 1638, 1513, 1455, 1216, 1154, 1023, 1004.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.56-0.59 (m, 9H), 0.61 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.28 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.83-1.92 (m, 2H), 2.75-2.81 (m, 1H), 3.00-3.05 (m, 1H), 4.29-4.32 (m, 1H), 4.34-4.40 (m, 2H), 4.49-4.55 (m, 1H), 4.97-5.04 (m, 2H), 5.06-5.14 (m, 2H), 5.24 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.39-5.43 (m, 3H), 5.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 5.61 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.04-6.06 (m, 2H), 6.07 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.10 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.11 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.20 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.28 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.29 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.34 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.54-6.57 (m, 6H), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.14-7.25 (m, 7H), 7.29-7.35 (m, 10H), 7.82 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.31-8.36 (m, 2H), 8.49-8.58 (m 5H), 8.68-8.72 (m, 2H), 8.81 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 9.11 (br s, 4H), 9.17 (br s, 2H), 9.21 (br s, 4H), 9.30 (br s, 2H), 9.37 (br s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.8, 17.2, 17.6, 19.0, 19.1, 31.6, 47.8, 53.8, 55.0, 55.2, 55.6, 55.8, 56.5, 56.8, 65.6, 66.0, 101.7, 101.8, 105.5, 105.6, 105.8, 114.8, 115.0, 127.8, 128.1, 128.2, 128.4, 128.5, 128.6, 128.6, 128.8, 129.3, 136.0, 137.0, 140.4, 156.6, 156.8, 156.9, 158.0 158.1, 169.1, 169.5, 169.7, 170.3, 170.7, 170.8, 172.3.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{109}H_{109}N_{13}NaO_{30}^+$ $[M+Na]^+$ 2102.7301, gef. 2102.7401; |Δm| (ppm) = 4.8.

**Tridecapeptid 173:** Cbz–D-Hpg–**D-Ala**–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–**D-Ala**–L-Hpg–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Id** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Hexapeptid **112** (25 mg, 24 µmol). Anschließend wurde das erhaltene TFA-Salz mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **104** (24 mg, 22 µmol) umgesetzt. Tridecapeptid **173** (5 mg, 3 µmol) wurde nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 45 % → 70 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.7 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{21}$ = -26.0 (c = 0.13, MeOH).

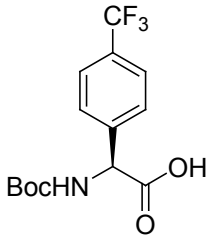
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3286, 2967, 2929, 1693, 1633, 1513, 1217, 1174.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.60 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.64-0.65 (m, 6H), 0.69 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.15 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.24 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.85-1.92 (m, 2H), 2.71-2.79 (m, 2H), 2.82-2.86 (m, 1H), 2.95-2.99 (m, 1H), 4.16-4.19 (m, 1H), 4.33-4.37 (m, 1H), 4.39-4.45 (m, 2H), 4.53-4.58 (m, 1H), 4.68-4.72 (m, 1H), 5.00-5.08 (m, 6H), 5.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.34-5.36 (m, 2H), 5.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.05 (br s, 1H), 6.08 (br s, 2H), 6.20 (br s, 2H), 6.23 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 6.52-6.55 (m, 4H), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.00-7.03 (m, 4H), 7.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.13-7.16 (m, 1H), 7.20-7.22 (m, 6H), 7.29-7.35 (m, 15H), 7.49 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.37-8.41 (m, 2H), 8.49 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.65-8.70 (m, 3H), 8.80 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.09 (br s, 2H), 9.14 (br s, 4H), 9.24 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 9.36 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 17.0, 17.3, 18.7, 18.5, 18.8, 30.8, 35.4, 37.3, 47.8, 48.1, 48.4, 53.4, 54.6, 54.9, 55.4, 56.0, 56.3, 57.2, 57.4, 58.8, 65.2, 65.7, 101.3, 105.1, 105.2, 114.4, 114.6, 114.7, 126.1, 127.6, 127.8, 127.9, 128.0, 128.8.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{107}H_{111}N_{13}NaO_{28}^{+}$ $[M+Na]^{+}$ 2048.7559, gef. 2048.7564; $|\Delta m|$ (ppm) = 0.2.

***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-4-trifluormethyl-L-phenylglycin (Boc–4-$CF_3$-L-Phg–OH; 174)**




Zu einer Lösung von 4-Trifluormethyl-L-phenylglycin (**132**, 657 mg, 3.0 mmol) und $NaHCO_3$ (756 mg, 9.0 mmol, 3.0 eq) in $H_2O$/Dioxan (1:1, 6 ml) wurde Di-*tert*-butylcarbonat (827 µl, 3.6 mmol, 1.2 eq) gelöst in Dioxan (3 ml) zugetropft. Nach 24 h bei RT wurde die Reaktionsmischung unter reduziertem Druck etwas eingeengt, der Rückstand in $H_2O$ (40 ml) und ges. $NaHCO_3$-Lsg. (10 ml) aufgenommen und mit $Et_2O$ (2 x 30 ml) gewaschen. Nach Ansäuern der wässrigen Phase mit 1 N HCl auf pH 3-4 wurde diese mit EtOAc (3 x 50 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 1 N HCl (2 x 50 ml) sowie ges. NaCl-Lsg (1 x 50 ml) gewaschen und über $Na_2SO_4$ getrocknet. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck erhielt man ohne weitere Aufreinigung Aminosäure **174** als schwach gelblichen Feststoff (818 mg, 2.6 mmol, 85 %).

**DC** $R_f$ = 0.67 ($CHCl_3$/MeOH 9:2 (+ 0.1 % AcOH)).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = +106.1 (c = 1.39, MeOH).

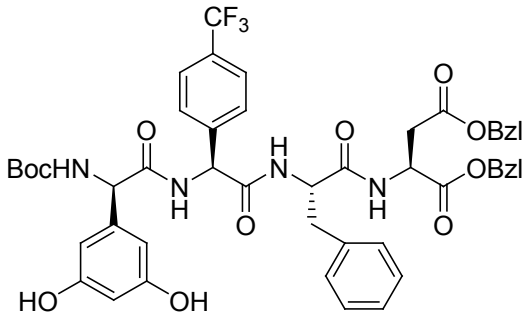
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3303, 2981, 2936, 1723, 1662, 1502, 1395, 1325, 1256, 1164, 1127, 1068, 1019.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.39 (s, 9H), 5.26 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 13.01 (br s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 28.1, 57.2, 66.3, 78.6, 125.2, 128.6, 142.3, 155.2, 171.6.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{14}H_{15}F_3NO_4^-$ $[M-H]^-$ 318.0953, gef. 318.0949; $|\Delta m|$ (ppm) = 1.6.

**Tetrapeptid 175:** Boc–D-Dpg–**4-$CF_3$-L-Phg**–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl




Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **Ic** wurde Dipeptid **58** (112 mg, 0.20 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 1 h) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **136** (97 mg, 0.20 mmol) gekuppelt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.3) wurde Tetrapeptid **175** (80 mg, 0.09 mmol, 45 %) als schwach gelblicher Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.34 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**analyt. HPLC** $t_R$ = 8.8 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -21.5 (c = 0.73, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3275, 1623, 1330, 1164, 1122, 1070.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.38 (s, 9H), 2.70-2.89 (m, 3H), 3.00-3.05 (m, 1H), 4.55-4.60 (m, 1H), 4.69-4.74 (m, 1H), 5.00-5.11 (m, 4H), 5.17 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.60 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.11 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.16-7.24 (m, 5H), 7.27-7.35 (m, 10H), 7.39 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.63-8.66 (m, 2H), 9.14 (s, 2H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 28.1, 35.6, 37.6, 48.5, 53.6, 55.5, 65.9, 66.3, 78.4, 101.7, 105.4, 124.8, 126.2, 127.5, 127.7, 127.8, 128.0, 128.3, 129.1, 135.6, 135.7, 137.2, 140.3, 142.9, 154.9, 158.1, 168.3, 169.6, 169.8, 170.1, 170.5.

**MS (ESI)** *m/z* 927 $[M+H]^+$, 871, 827, 461, 371, 314, 228, 210, 181, 120.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{49}H_{49}F_3N_4NaO_{11}^+$ $[M+Na]^+$ 949.3248, gef. 949.3215; $|\Delta m|$ (ppm) = 3.5.

**Tridecapeptid 176:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–**4-$CF_3$-L-Phg**–L-Phe–L-Asp(OBzl)–OBzl

Unter Verwendung der allgemeinen Synthesevorschrift **Id** erfolgte zunächst die Boc-Entschützung von Hexapeptid **135** (40 mg, 34 µmol). Anschließend wurde das erhaltene TFA-Salz mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **42** (37 mg, 31 µmol) gekuppelt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 30 % → 70 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) erhielt man Tridecapeptid **176** (13 mg, 6 µmol) als farblosen Feststoff.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.6 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{25}$ = -59.6 (c = 0.10, MeOH).

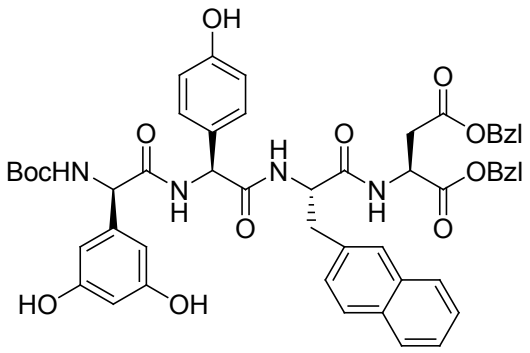
**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3287, 1695, 1638, 1513, 1330, 1217, 1156, 1004.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.56-0.60 (m, 9H), 1.83-1.91 (m, 2H), 2.71-2.85 (m, 3H), 2.97-3.01 (m, 1H), 4.34-4.40 (m, 2H), 4.55-4.60 (m, 1H), 4.66-4.71 (m, 1H), 4.98-5.07 (m, 6H), 5.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.37-5.40 (m, 2H), 5.50-5.53 (m, 2H), 5.54-5.58 (m, 2H), 5.59-5.63 (m, 2H), 6.05-6.09 (m, 3H), 6.11-6.13 (m, 2H), 6.19 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.22 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.28-6.30 (m, 4H), 6.34 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.53-6.56 (m, 4H), 6.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.13-7.18 (m, 1H), 7.20-7.22 (m, 6H), 7.26-7.36 (m, 17H), 7.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.43-8.45 (m, 2H), 8.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.56-8.64 (m, 4H), 8.69-8.72 (m, 3H), 9.06 (s, 2H), 9.07 (s, 2H), 9.11 (s, 2H), 9.15 (s, 2H), 9.16 (s, 2H), 9.22 (s, 1H), 9.24 (s, 1H), 9.33 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.8, 17.2, 18.7, 31.2, 35.4, 37.4, 48.3, 53.5, 54.8, 55.0, 55.4, 56.0, 56.6, 57.1, 65.6, 65.9, 101.3, 101.4, 105.1, 105.3, 114.5, 114.7, 124.5, 126.2, 127.4, 127.7, 127.8, 127.9, 128.7.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{118}H_{114}F_3N_{13}NaO_{31}^+$ $[M+Na]^+$ 2288.7594, gef. 2288.7600; $|\Delta m|$ (ppm) = 2.6

**Tetrapeptid 177:** Boc–D-Dpg–L-Hpg–**L-2-Nal**–L-Asp(OBzl)–OBzl




Entsprechend der allgemeinen Vorschrift **Ic** wurde Dipeptid **141** (183 mg, 0.30 mmol) zunächst Boc-entschützt (Reaktionszeit: 2 h) und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Dipeptid **46** (130 mg, 0.30 mmol) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Rohproduktes ($SiO_2$, $CHCl_3$/MeOH 9:0.5) wurde Tetrapeptid **177** (170 mg, 0.18 mmol, 60 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC** $R_f$ = 0.29 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

**Drehwert** $[\alpha]_D^{24}$ = +23.3 (c = 1.23, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3307, 2974, 2929, 1645, 1602, 1514, 1455, 1367, 1216, 1164, 1007.

**$^1$H-NMR** (400 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 1.38 (s, 9H), 2.73-2.92 (m, 2H), 2.95-3.00 (m, 1H), 3.20-3.24 (m, 1H), 4.63-4.69 (m, 1H), 4.71-4.76 (m, 1H), 5.03-5.11 (m, 5H), 5.25 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.01 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.45 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.28-7.38 (m, 11H), 7.44-7.49 (m, 2H), 7.68 (br s, 1H), 7.75-7.86 (m, 3H), 8.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 9.14 (br s, 2H), 9.27 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** (100 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 28.1, 35.7, 37.6, 48.6, 53.6, 56.0, 57.3, 65.9, 66.3, 78.4, 101.7, 105.4, 114.7, 125.3, 125.8, 127.4, 127.5, 127.8, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 131.8, 132.9, 135.2, 135.6, 135.7, 154.7, 156.7, 158.1, 169.6, 170.2, 170.5.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{52}H_{52}N_4NaO_{12}^+$ $[M+Na]^+$ 947.3480, gef. 947.3449; |Δm| (ppm) = 3.3.

**Tridecapeptid 178:** Cbz–D-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Hpg–D-Dpg–L-Val–D-Dpg–L-Hpg–**L-2-Nal**–L-Asp(OBzl)–OBzl

In Anlehnung an die allgemeine Synthesevorschrift **Id** wurde Hexapeptid **140** (40 mg, 34 µmol) zunächst Boc-entschützt und anschließend mit dem *N*-terminal geschützten Heptapeptid **42** (37 mg, 31 µmol) umgesetzt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Sephadex LH20-Größenausschlusschromatographie und präparativer RP-HPLC (linearer Gradient: 45 % → 60 % AcN (+ 0.1 % HCOOH) in 30 min) wurde Tridecapeptid **178** (11 mg, 5 µmol) als farbloser Feststoff erhalten.

**analyt. HPLC** $t_R$ = 7.5 min.

**Drehwert** $[\alpha]_D^{23}$ = -28.5 (c = 0.12, MeOH).

**IR** (ATR) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$): 3294, 1694, 1641, 1513, 1379, 1219, 1155, 1005.

**$^1$H-NMR** (500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 0.53 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.55-0.60 (m, 9H), 1.84-1.91 (m, 2H), 2.69-2.71 (m, 1H), 2.81-2.86 (m, 1H), 2.95-3.00 (m, 1H), 3.13-3.15 (m, 1H), 4.33-4.40 (m, 2H), 4.63-4.68 (m, 1H), 4.68-4.73 (m, 1H), 4.96-5.06 (m, 6H), 5.29-5.32 (m, 2H), 5.39-5.40 (m, 2H), 5.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.04-6.06 (m, 2H), 6.07 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.09 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.11 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.20 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 6.28 (br s, 4H), 6.34 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 6.49 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.53-6.56 (m, 4H), 6.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.26-7.33 (m, 15H), 7.39-7.46 (m, 3H), 7.71-7.83 (m, 5H), 7.86 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.40-8.42 (m, 2H), 8.48-8.49 (m, 2H), 8.52 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.59-8.62 (m, 2H), 8.66-8.69 (m, 2H), 8.78 (d,

*J* = 8.1 Hz, 1H), 9.07 (s, 4H), 9.12 (s, 2H), 9.15 (s, 2H), 9.18 (s, 2H), 9.24 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 9.35 (s, 1H).

**$^{13}$C-NMR** ($^{13}$C-Signale aus dem HSQC-Spektrum, 500 MHz; DMSO-$d_6$): δ (ppm) = 16.9, 17.3, 18.7, 31.2, 37.4, 48.3, 53.5, 54.4, 54.7, 55.3, 55.4, 55.6, 55.8, 56.7, 65.7, 66.1, 101.3, 101.6, 105.0, 105.1, 105.2, 105.3, 114.5, 115.2, 125.4, 127.3, 127.7, 127.8, 128.0, 129.1.

**HRMS (ESI)** *m/z* ber. für $C_{121}H_{117}N_{13}NaO_{32}^{+}$ $[M+Na]^+$ 2286.7825, gef. 2286.8007; |Δm| (ppm) = 8.0.

## 5.3 Aktivitätstests und biologische Testierungen

### 5.3.1 DPPH-*Assay*

Die antioxidative Aktivität wurde durch spektrophotometrische Bestimmung der Verringerung der Absorption einer 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)-Lösung bei $\lambda$ = 517 nm mit dem *Tecan* Microplate Reader Infiniti 200 bestimmt.[150c] Dazu wurden zunächst Stammlösungen von DPPH (**77**, 200 µM in MeOH), Propylgallat (**79**, 100 µM in MeOH), (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (**80**, Trolox, 100 µM in MeOH) und Feglymycin (**28**, 100 µM in MeOH) hergestellt. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung abgedunkelt auf Eis gelagert. In 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden anschließend Verdünnungsreihen der Substrate hergestellt (Endvolumen 150 µl) und die Reaktion durch Zugabe von jeweils 50 µl DPPH-Stammlösung gestartet (Endkonzentration DPPH: 50 µM). Nach Inkubation der Reaktionslösung für 30 min bei 30 °C erfolgte die Absorptionsbestimmung jeder Verdünnungsreihe bei $\lambda$ = 517 nm in einer 96-Well-Polystyrolplatte (Bandweite: 9 nm, drei Wiederholungsmessungen im Abstand von 20 s). Jede Messreihe wurde dreimal und unter striktem Lichtausschluss durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine 50 µM DPPH-Lösung, welche den gleichen Inkubationsbedingungen ausgesetzt wurde. Im Anschluss erfolgte für jede Verbindung die Mittelung der Einzelmessungen, die Auftragung der Absorption bei $\lambda$ = 517 nm ($A_{517}$) gegen die Substratkonzentration sowie die Bestimmung des $IC_{50}$-Wertes (Abbildung 85 und Abbildung 86; Auswertungssoftware: Origin Pro 8, *OriginLab Corporation*, Northampton, MA, USA).

Propylgallat (**79**)

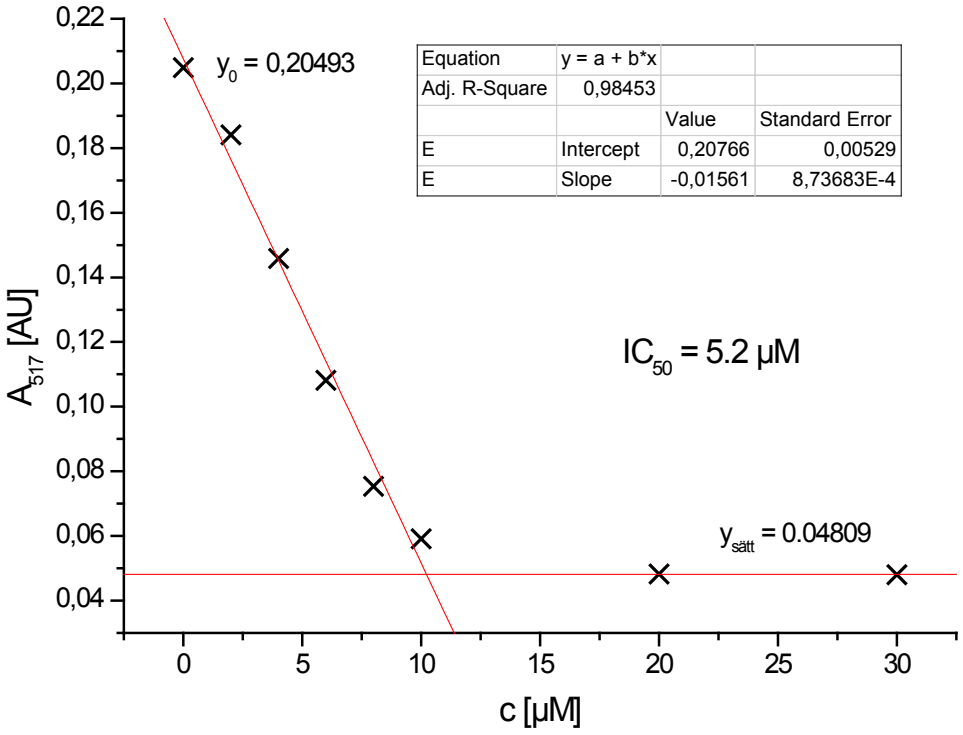



**Abbildung 85:** Auftragung zur Bestimmung des $IC_{50}$-Wertes für Propylgallat (**79**).

Berechnung des $IC_{50}$-Wertes:

$$A_{517}(IC_{50}) = \frac{(y_0 - y_{sätt})}{2} + y_{sätt}$$

$$IC_{50} = \frac{A_{517}(IC_{50}) - a}{b}$$

Die Parameter a und b wurden der linearen Regression aus Origin entnommen.

Trolox (**80**, (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)

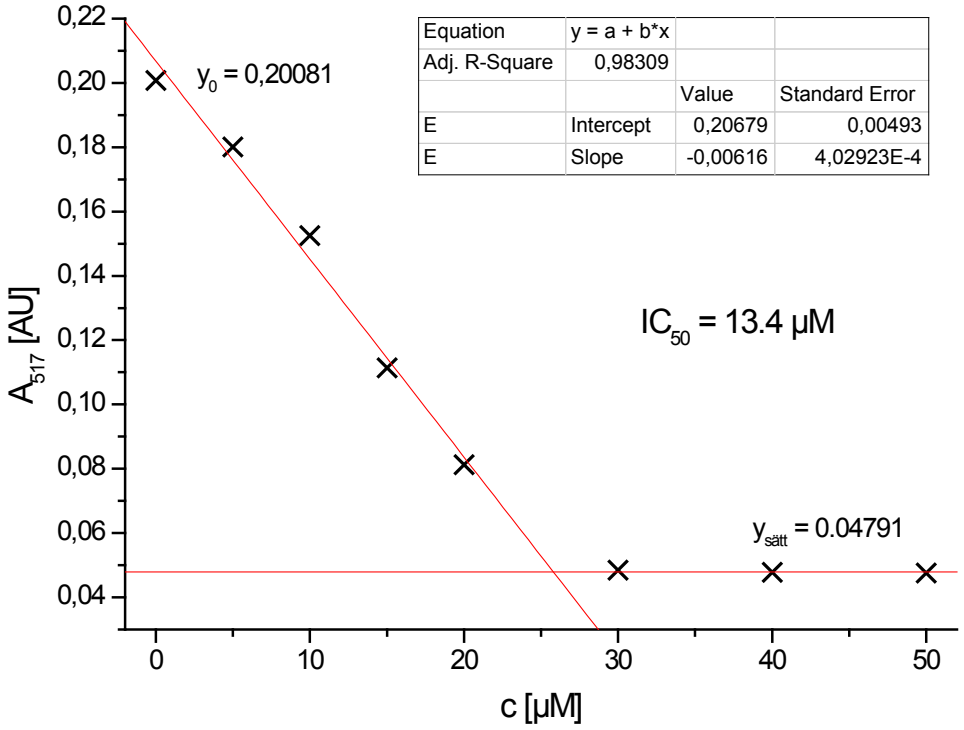



**Abbildung 86:** Auftragung zur Bestimmung des $IC_{50}$-Wertes für Trolox (**80**).

Feglymycin (**28**)

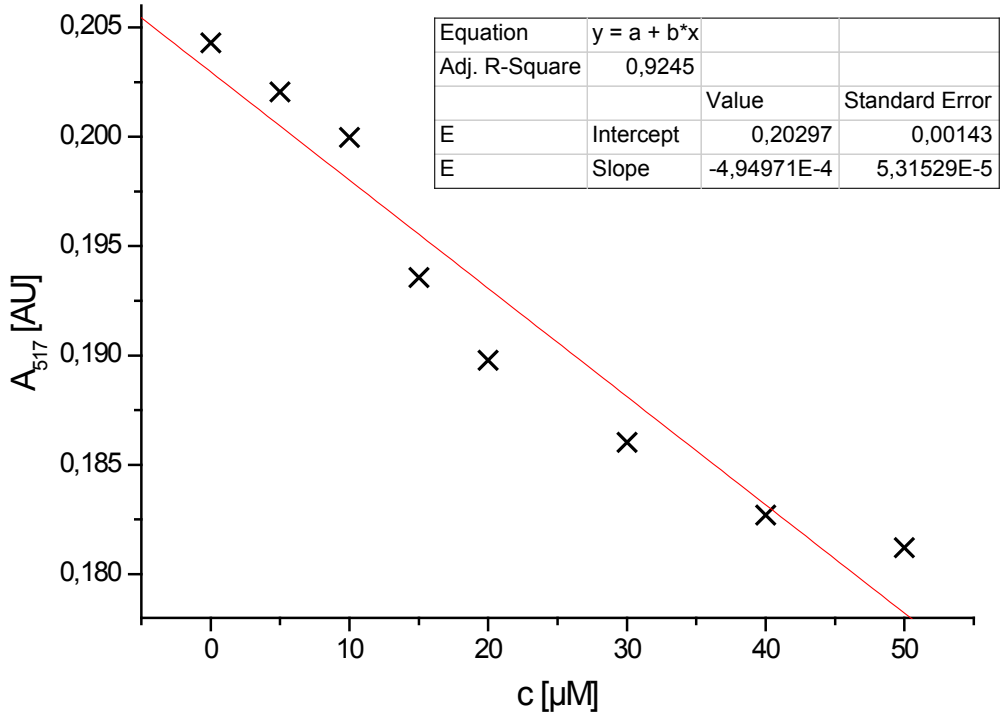



**Abbildung 87:** Auftragung $A_{517}$ gegen die Substratkonzentration c für Feglymycin (**28**). Aufgrund des fehlenden Sättigungsbereiches kann kein $IC_{50}$-Wert bestimmt werden.

Der Sättigungswert für die Absorption bei $\lambda$ = 517 nm, welcher einer vollständigen Umsetzung der DPPH-Radikale entspricht, beträgt bei den Messungen für Propylgallat und Trolox etwa 0.048 AU. Dieser Wert wird für Feglymycin auch bei einer Substratkonzentration von 50 µM nicht erreicht. Unter der Annahme, dass die für Feglymycin beobachtete Absorption mit steigender Konzentration weiter linear bis zu einem Sättigungswert von 0.048 AU abnimmt, lässt sich ein $IC_{50}$-Wert von ca. 150 µM abschätzen.

### 5.3.2 Ionenkanalmessungen zur Untersuchung der Membranaktivität

Die Untersuchung von Feglymycin im Ionenkanalexperiment erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Koert durch Herrn Dr. Philipp Reiß (Philipps-Universität Marburg). Die Experimente wurden wie folgt durchgeführt:[197]

Zur Herstellung einer Stammlösung wurde Feglymycin in Methanol gelöst. Eine planare Lipidmembran wurde durch Bestreichen der Öffnung einer Polystyrolküvette (Durchmesser 0.2 mm) mit einer Lösung von DPhPC oder Asolectin‡‡‡‡ in *n*-Decan (25 mg/ml) hergestellt. Als Elektrolyte dienten CsCl und KCl. Nachdem die Feglymycin-Stammlösung in die trans-Seite der Küvette gegeben wurde (Endkonzentration 0.25 nM), wurde die Membran bei 0 V erneut gezogen und eine definierte Spannung angelegt. Die Stromdetektion und -aufzeichnung erfolgte mit dem Patch-Clamp-Verstärker Axopatch 200B, einem Digidata Analog-Digital-Wandler und der pClamp 10 Software (*Axon Instruments*, Foster City, CA, USA). Die Aufnahmefrequenz betrug 5 kHz. Die Daten wurden anschließend mit einem digitalen Filter von 50 Hz der pClamp 10 Software gefiltert.

‡‡‡‡ Asolectin ist eine Mischung von verschiedenen Phospholipiden mit den Hauptbestandteilen Lecithin, Cephalin und Phosphatidylinositol. Es bildet eine weniger rigide Membran als DPhPC.

### 5.3.3 Antivirale Testierung gegen HIV-1

Alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Feglymycin-Derviate wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dominique Schols (Rega Institut, Leuven, Belgien) auf ihre antivirale Aktivität gegen HIV-1 unter Verwendung eines standardisierten MTS/PMS-*Assay* untersucht.[134] Die experimentellen Details zur Versuchsdurchführung können der Publikation zur Totalsynthese von Feglymycin in der *Angewandten Chemie* entnommen werden.[114b] In Tabelle 11 sind die $IC_{50}$- und $CC_{50}$-Werte zusammenfassend dargestellt. Alle Werte wurden durch eine Wiederholungsmessung bestätigt. Als Referenzverbindung diente AMD3100, ein CXCR4-Antagonist aus der Substanzklasse der Bizyklame.[133]

**Tabelle 11:** $IC_{50}$- und $CC_{50}$-Werte für Feglymycin und dessen Derivate im MTS/PMS-*Assay* zur Untersuchung der antiviralen Aktivität gegen HIV-1. Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte eine Umrechnung der Werte von [µg/ml] in [µM] unter Berücksichtigung der Molekülmasse jeder Verbindung.

| **Verbindung** | **$IC_{50}$ [µM] [a]** | **$CC_{50}$ [µM] [b]** |
|---|---|---|
| Feglymycin (**28**) | 1.11 | > 50 |
| Feglymycin-Spiegelbild (**28'**) | 1.11 | > 50 |
| [D-Ala$^{1}$]-Feglymycin (**116**) | 1.37 | > 50 |
| [D-Ala$^{2}$]-Feglymycin (**117**) | 1.22 | > 50 |
| [L-Ala$^{3}$]-Feglymycin (**118**) | 1.55 | > 50 |
| [D-Ala$^{4}$]-Feglymycin (**119**) | 1.11 | > 50 |
| [L-Ala$^{5}$]-Feglymycin (**120**) | 1.10 | > 50 |
| [D-Ala$^{6}$]-Feglymycin (**121**) | 1.16 | > 50 |
| [L-Ala$^{7}$]-Feglymycin (**122**) | 1.32 | > 50 |
| [D-Ala$^{8}$]-Feglymycin (**123**) | 1.16 | > 50 |
| [L-Ala$^{9}$]-Feglymycin (**124**) | 1.07 | > 50 |
| [D-Ala$^{10}$]-Feglymycin (**125**) | 1.33 | > 50 |
| [L-Ala$^{11}$]-Feglymycin (**126**) | 1.21 | > 50 |
| [L-Ala$^{12}$]-Feglymycin (**127**) | 1.53 | > 50 |
| [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (**128**) | 6.84 | > 50 |
| [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin (**129**) | 1.81 | > 50 |
| [4-$CF_3$-L-Phg$^{11}$]Feglymycin (**134**) | 2.97[c] | > 50 |
| [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**) | 1.44 | > 50 |
| AMD3100 (Kontrolle) | 0.01 | > 200 |

[a] $IC_{50}$: 50 % Inhibitorkonzentration oder Substanzkonzentration, die notwendig ist, um den virus-induzierten zytopathischen Effekt (CPE) durch HIV-1 NL4.3 in humanen MT-4 Zellen um 50 % zu inhibieren. [b] $CC_{50}$: 50 % zytotoxische Konzentration oder Substanzkonzentration, die notwendig ist, um das Zellwachstum von MT-4-Zellen um 50 % zu inhibieren. [c] Peptid **134** wurde nicht zusammen mit den anderen Verbindungen untersucht. Der $IC_{50}$-Wert für Feglymycin als Referenz betrug bei dieser Testreihe 2.68 µM.

### 5.3.4 Antimikrobielle Testierung

Die Testierung der hergestellten Feglymycin-Derviate gegen verschiedene Mikroorganismen *in vitro* erfolgte in Zusammenarbeit mit *Sanofi-Aventis* (Frankfurt a. M.) unter der Leitung von Herrn Dr. Luigi Toti. Die Versuche wurden von Frau Antje Nußer gemäß den Richtlinien des *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* durchgeführt.[138] Die experimentellen Details können außerdem der Dissertation von Herrn Dr. Frank Dettner entnommen werden.[114a] Alle Werte wurden durch eine Wiederholungsmessung bestätigt.

**Tabelle 12:** Verwendete Keime für die antimikrobielle Testierung.

| **Stamm** | **Einteilung** |
|---|---|
| *S. aureus* ATCC 29213 | grampositives Bakterium (MSSA) |
| *S. aureus* ATCC 33592 | grampositives Bakterium (MRSA) |
| *S. aureus* ATCC 13709 | grampositives Bakterium (MSSA) |
| *E. coli* ATCC 25922 | gramnegatives Bakterium |
| *E. faecalis* ATCC 29212 | grampositives Bakterium |
| *S. pyogenes* ATCC 12344 | grampositives Bakterium |
| *C. albicans* FH 2173 | Hefepilz |
| *M. smegmatis* ATCC 607 | Mykobakterium |

Die Ergebnisse der Testierung sind in Tabelle 13 bis Tabelle 15 zusammengefasst ($IC_{80}$: 80 % Inhibitorkonzentration oder Substanzkonzentration, die notwendig ist, um das Wachstum von Mikroorganismen um 80 % zu inhibieren; MIC: minimale Hemmkonzentration einer Substanz, bei der das Wachstum von Mikroorganismen visuell nicht mehr beobachtet werden kann). Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte eine Umrechnung der Werte von [µg/ml] in [µM] unter Berücksichtigung der Molekülmasse jeder Verbindung.

**Tabelle 13:** Ergebnisse der antimikrobiellen Testierung ($IC_{80}$ und MIC) für die Peptide **28'**, **134** und **139** im Vergleich zu Feglymycin (**28**).

| **Verbindung** | | | | | | | $IC_{80}$ [µM] | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Keim** | Feglymycin (**28**) | Feglymycin-Spiegelbild (**28'**) | [4-$CF_3$-L-$Phg^{11}$]-Feglymycin (**134**) | [L-2-$Nal^{12}$]-Feglymycin (**139**) | | Feglymycin (**28**) | Feglymycin-Spiegelbild (**28'**) | [4-$CF_3$-L-$Phg^{11}$]-Feglymycin (**134**) | [L-2-$Nal^{12}$]-Feglymycin (**139**) |
| *S. aureus* ATCC 29213 | 0.26 | 0.53 | 2.05 | 2.05 | | 0.16 | 0.37 | 1.69 | 1.34 |
| *S. aureus* ATCC 33592 | 0.53 | 1.05 | 2.05 | 4.10 | | 0.34 | 0.66 | 0.56 | 2.62 |
| *S. aureus* ATCC 13709 | 0.53 | 0.53 | 1.02 | 1.03 | | 0.29 | 0.31 | 0.94 | 0.86 |
| *E. coli* ATCC 25922 | > 33 | > 33 | > 32 | > 33 | | > 33 | > 33 | > 32 | > 32 |
| *E. faecalis* ATCC 29212 | > 33 | > 33 | > 32 | > 33 | | > 33 | > 33 | > 32 | > 32 |
| *S. pyogenes* ATCC 12344 | > 33 | > 33 | > 32 | > 33 | | > 33 | 12.32 | > 32 | > 32 |
| *C. albicans* FH 2173 | > 33 | > 33 | > 32 | > 33 | | > 33 | > 33 | > 32 | > 32 |
| *M. smegmatis* ATCC 607 | > 33 | > 33 | > 32 | > 33 | | > 33 | > 33 | > 32 | > 32 |

**Tabelle 14:** MIC-Werte der antimikrobiellen Testierung für die Peptide des Feglymycin-Alanin-Scans.

| **Verbindung** | Feglymycin (28) | 1-Ala (116) | 2-Ala (117) | 3-Ala (118) | 4-Ala (119) | 5-Ala (120) | 6-Ala (121) | 7-Ala (122) | 8-Ala (123) | 9-Ala (124) | 10-Ala (125) | 11-Ala (126) | 12-Ala (127) | 13-Ala (128) | 2,10-Ala (129) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Keim** | **MIC (µM)** | | | | | | | | | | | | | | |
| *S. aureus* ATCC 29213 | 0.26 | 8.78 | 2.21 | 0.53 | 4.43 | > 35 | 2.21 | 1.10 | 2.21 | 0.27 | 1.11 | 0.27 | > 35 | 0.54 | 4.67 |
| *S. aureus* ATCC 33592 | 0.53 | 8.78 | 4.43 | 0.53 | 4.43 | > 35 | 2.21 | 1.10 | 4.43 | 0.53 | 2.21 | 0.27 | > 35 | 0.54 | 9.34 |
| *S. aureus* ATCC 13709 | 0.53 | 8.78 | 2.21 | 0.53 | 4.43 | > 35 | 4.43 | 0.55 | 2.21 | 0.27 | 0.55 | 0.27 | > 35 | 0.54 | 4.67 |
| *E. coli* ATCC 25922 | > 33 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 37 |
| *E. faecalis* ATCC 29212 | > 33 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 37 |
| *S. pyogenes* ATCC 12344 | > 33 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 37 |
| *C. albicans* FH 2173 | > 33 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 37 |
| *M. smegmatis* ATCC 607 | > 33 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 37 |

**Tabelle 15:** $IC_{80}$-Werte der antimikrobiellen Testierung für die Peptide des Feglymycin-Alanin-Scans.

| **Verbindung** | Feglymycin (28) | 1-Ala (116) | 2-Ala (117) | 3-Ala (118) | 4-Ala (119) | 5-Ala (120) | 6-Ala (121) | 7-Ala (122) | 8-Ala (123) | 9-Ala (124) | 10-Ala (125) | 11-Ala (126) | 12-Ala (127) | 13-Ala (128) | 2,10-Ala (129) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Keim** | **$IC_{80}$ (µM)** | | | | | | | | | | | | | | |
| *S. aureus* ATCC 29213 | 0.16 | 5.01 | 1.95 | 0.49 | 2.95 | > 35 | 1.67 | 0.70 | 2.11 | 0.21 | 0.73 | 0.07 | 17.79 | 0.35 | 3.75 |
| *S. aureus* ATCC 33592 | 0.34 | 6.76 | 2.68 | 0.45 | 2.77 | > 35 | 1.62 | 0.67 | 2.42 | 0.37 | 1.16 | 0.25 | > 35 | 0.66 | 5.17 |
| *S. aureus* ATCC 13709 | 0.29 | 5.81 | 2.04 | 0.31 | 2.62 | > 35 | 2.73 | 0.32 | 1.87 | 0.19 | 0.36 | 0.08 | > 35 | 0.31 | 3.86 |
| *E. coli* ATCC 25922 | > 33 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 37 |
| *E. faecalis* ATCC 29212 | > 33 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 37 |
| *S. pyogenes* ATCC 12344 | > 33 | > 35 | > 35 | 30.19 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | 19.71 | > 34 | > 35 | 18.30 | > 35 | > 34 | > 37 |
| *C. albicans* FH 2173 | > 33 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 37 |
| *M. smegmatis* ATCC 607 | > 33 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 35 | > 35 | > 35 | > 34 | > 37 |

### 5.3.5 Inhibition des MurA-Enzyms aus *E. coli*[140]

Die Inhibition des MurA-Enzyms aus *E. coli* wurde in einem Kopplungs*assay* mit dem MurB-Enzym aus *E. coli* durch Frau Dipl.-Biochem. Saskia Rausch untersucht.[142] Dabei wurde der Verbrauch von NADPH bei einer Wellenlänge von $\lambda$ = 340 nm in 20 s Intervallen in einer 96-Well-Polystyrolplatte mit dem *Tecan* Microplate Reader Infiniti 200 über einen Zeitraum von 20 min bei 37 °C detektiert. Der Reaktionspuffer enthielt 50 mM Tris/HCl pH 7.0, 10 mM KCl, 3.5 mM DTT, 500 µM NADPH, 500 nM MurB, 200 µM PEP und 20 nM MurA. Für die Bestimmung der $IC_{50}$-Werte wurde die Reaktionslösung zunächst mit neun verschiedenen Peptidkonzentrationen (0 µM bis 100 µM) für 5 min bei 37 °C vorinkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 400 µM UDP-GlcNAc gestartet. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne das Substrat UDP-GlcNAc. Als bekannter Inhibitor von MurA wurde außerdem Phosphomycin (**13**, Abbildung 8) getestet. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt.

**Tabelle 16:** $IC_{50}$-Werte und Fehler $|\Delta IC_{50}|$ für den MurA-Inhibitions*assay*.

| **Verbindung** | **$IC_{50}$ [µM]**[a] | **$|\Delta IC_{50}|$ [µM]** |
|---|---|---|
| Feglymycin (**28**) | 2.45 | 0.12 |
| Feglymycin-Spiegelbild (**28'**) | -[b] | -[b] |
| [D-Ala[1]]-Feglymycin (**116**) | 2.44 | 0.29 |
| [D-Ala[2]]-Feglymycin (**117**) | 5.72 | 0.48 |
| [L-Ala[3]]-Feglymycin (**118**) | 2.35 | 0.10 |
| [D-Ala[4]]-Feglymycin (**119**) | 3.08 | 0.88 |
| [L-Ala[5]]-Feglymycin (**120**) | 11.24 | 0.64 |
| [D-Ala[6]]-Feglymycin (**121**) | 3.27 | 1.22 |
| [L-Ala[7]]-Feglymycin (**122**) | 3.27 | 1.51 |
| [D-Ala[8]]-Feglymycin (**123**) | 4.42 | 0.55 |
| [L-Ala[9]]-Feglymycin (**124**) | 1.97 | 0.08 |
| [D-Ala[10]]-Feglymycin (**125**) | 4.27 | 0.03 |
| [L-Ala[11]]-Feglymycin (**126**) | 3.85 | 0.52 |
| [L-Ala[12]]-Feglymycin (**127**) | 4.48 | 0.05 |
| [L-Ala[13]]-Feglymycin (**128**) | 16.94 | 3.06 |
| [D-Ala[2,10]]-Feglymycin (**129**) | 2.04 | 0.17 |
| [4-$CF_3$-L-Phg[11]]Feglymycin (**134**) | -[b] | -[b] |
| [L-2-Nal[12]]-Feglymycin (**139**) | 3.63 | 0.66 |
| H-Hepta-OH (**73**) | 4.91 | 0.59 |
| H-Hexa-OH (**74**) | 61.47 | 4.91 |
| Phosphomycin (**13**) | 6.20 | 2.80 |

[a] $IC_{50}$: 50 % Inhibitorkonzentration oder Substanzkonzentration, die notwendig ist, um die Enzymaktivität um 50 % herabzusetzen. [b] Substanz wurde nicht getestet.

### 5.3.6 Inhibition des MurC-Enzyms aus *E. coli*[140]

Die Inhibition des MurC-Enzyms aus *E.coli* wurde in einem Kopplungs*assay* mit den Enzymen Pyruvat-Kinase Typ II aus Kaninchen (PK; *Sigma-Aldrich*) und Lactat-Dehydrogenase Typ II aus Kaninchen (LDH, *Sigma-Aldrich*) durch Frau Dipl.-Biochem. Saskia Rausch untersucht.[143] Dabei wurde der Verbrauch von NADH bei einer Wellenlänge von $\lambda$ = 340 nm in 20 s Intervallen in einer 96-Well-Polystyrolplatte mit dem *Tecan* Microplate Reader Infiniti 200 über einen Zeitraum von 20 min bei 37 °C detektiert. Der Reaktionspuffer enthielt 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 400 µM L-Alanin, 400 µM ATP, 2.5 mM DTT, 1 mM PEP, 1 mM NADH, 10 U/ml LDH, 10 U/ml PK und 20 nM MurC. Für die Bestimmung der $IC_{50}$-Werte wurde die Reaktionslösung zunächst mit acht verschiedenen Peptidkonzentrationen (0 µM bis 50 µM) für 5 min bei 37 °C vorinkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 400 µM UDP-MurNAc gestartet. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne das Substrat UDP-MurNAc. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt. UDP-MurNAc wurde durch Totalsynthese von Dipl.-Chem. Alexander Denisiuk und Dipl.-Chem. Marius Löhken zur Verfügung gestellt.[144]

**Tabelle 17:** $IC_{50}$-Werte und Fehler $|\Delta IC_{50}|$ für den MurC-Inhibitions*assay*.

| **Verbindung** | **$IC_{50}$ [µM]**[a] | **$|\Delta IC_{50}|$ [µM]** |
|---|---|---|
| Feglymycin (**28**) | 0.28 | 0.14 |
| Feglymycin-Spiegelbild (**28'**) | 0.59 | 0.41 |
| [D-Ala$^{1}$]-Feglymycin (**116**) | 0.67 | 0.36 |
| [D-Ala$^{2}$]-Feglymycin (**117**) | 0.21 | 0.01 |
| [L-Ala$^{3}$]-Feglymycin (**118**) | 0.43 | 0.18 |
| [D-Ala$^{4}$]-Feglymycin (**119**) | 0.55 | 0.12 |
| [L-Ala$^{5}$]-Feglymycin (**120**) | 0.45 | 0.07 |
| [D-Ala$^{6}$]-Feglymycin (**121**) | 0.23 | 0.02 |
| [L-Ala$^{7}$]-Feglymycin (**122**) | 0.18 | 0.06 |
| [D-Ala$^{8}$]-Feglymycin (**123**) | 0.37 | 0.23 |
| [L-Ala$^{9}$]-Feglymycin (**124**) | 0.31 | 0.16 |
| [D-Ala$^{10}$]-Feglymycin (**125**) | 0.42 | 0.02 |
| [L-Ala$^{11}$]-Feglymycin (**126**) | 0.36 | 0.12 |
| [L-Ala$^{12}$]-Feglymycin (**127**) | 0.47 | 0.04 |
| [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (**128**) | 3.37 | 0.57 |
| [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin (**129**) | 2.27 | 0.43 |
| [4-$CF_3$-L-Phg$^{11}$]Feglymycin (**134**) | 0.55 | 0.07 |
| [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**) | 0.29 | 0.11 |
| H-Hexa-OH (**73**) | > 50 | - |
| H-Hepta-OH (**74**) | 0.57 | 0.03 |

[a] $IC_{50}$: 50 % Inhibitorkonzentration oder Substanzkonzentration, die notwendig ist, um die Enzymaktivität um 50 % herabzusetzen.

# 6 Anhang

## 6.1 NMR-Spektren ausgewählter Verbindungen

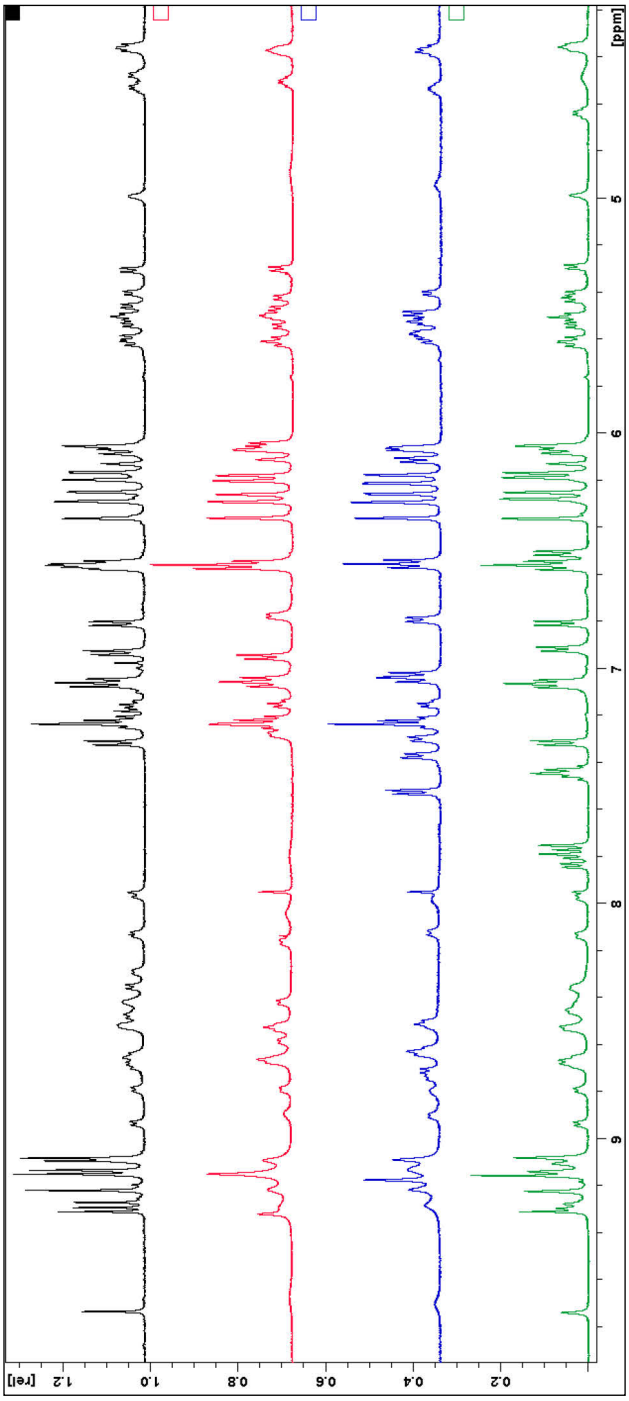



**Abbildung 88:** Gegenüberstellung der $^{1}$H-NMR-Spektren von Feglymycin (**28**, schwarz), Feglymycin-Spiegelbild (**28'**, rot), [4-$CF_3$-L-Phg$^{11}$]-Feglymycin (**134**, blau) und [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**, grün). Zur besseren Übersichtlichkeit ist nur der Bereich von δ = 4-10 ppm abgebildet.

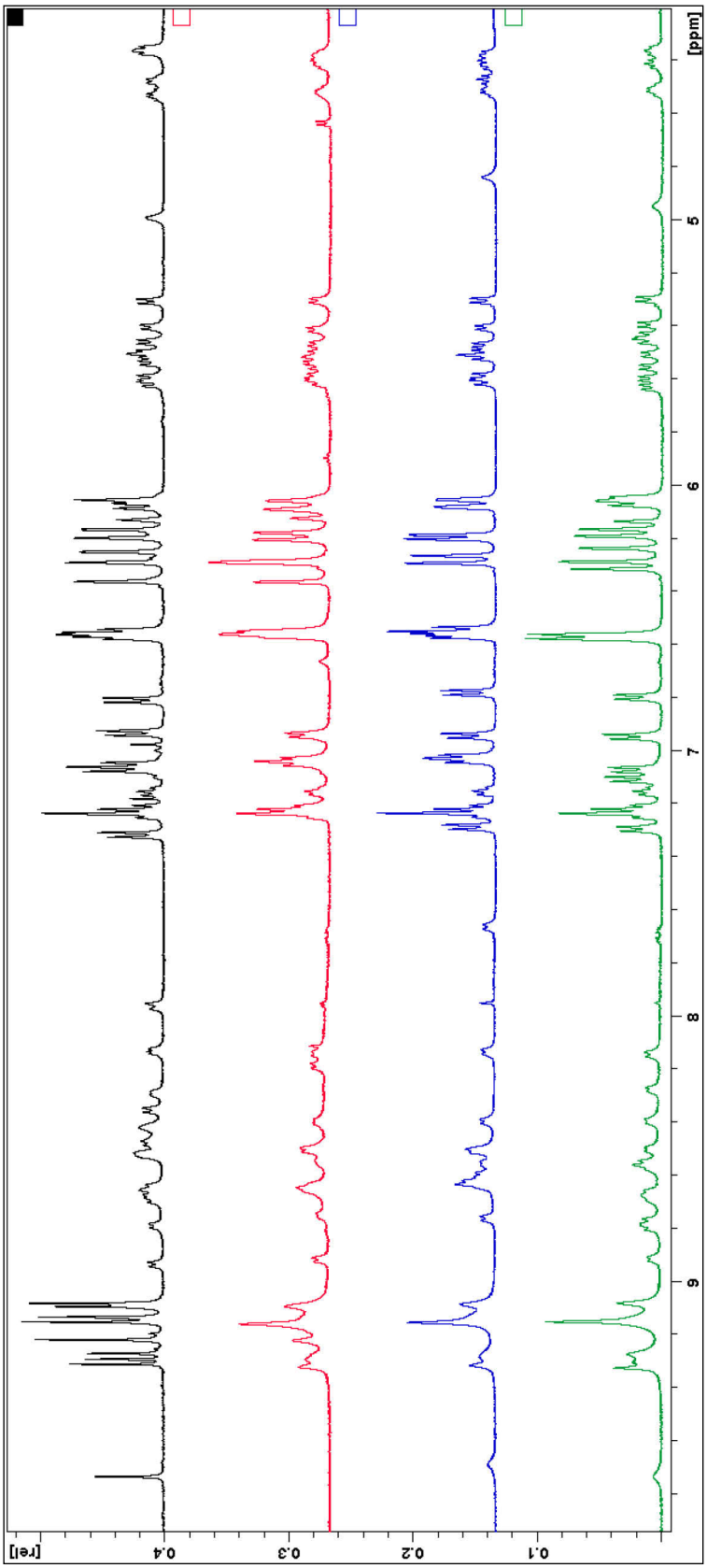



**Abbildung 89:** Gegenüberstellung der $^{1}$H-NMR-Spektren von Feglymycin (**28**, schwarz), [D-Ala$^{1}$]-Feglymycin (**116**, rot), [D-Ala$^{2}$]-Feglymycin (**117**, blau) und [L-Ala$^{3}$]-Feglymycin (**118**, grün). Zur besseren Übersichtlichkeit ist nur der Bereich von δ = 4-10 ppm abgebildet.

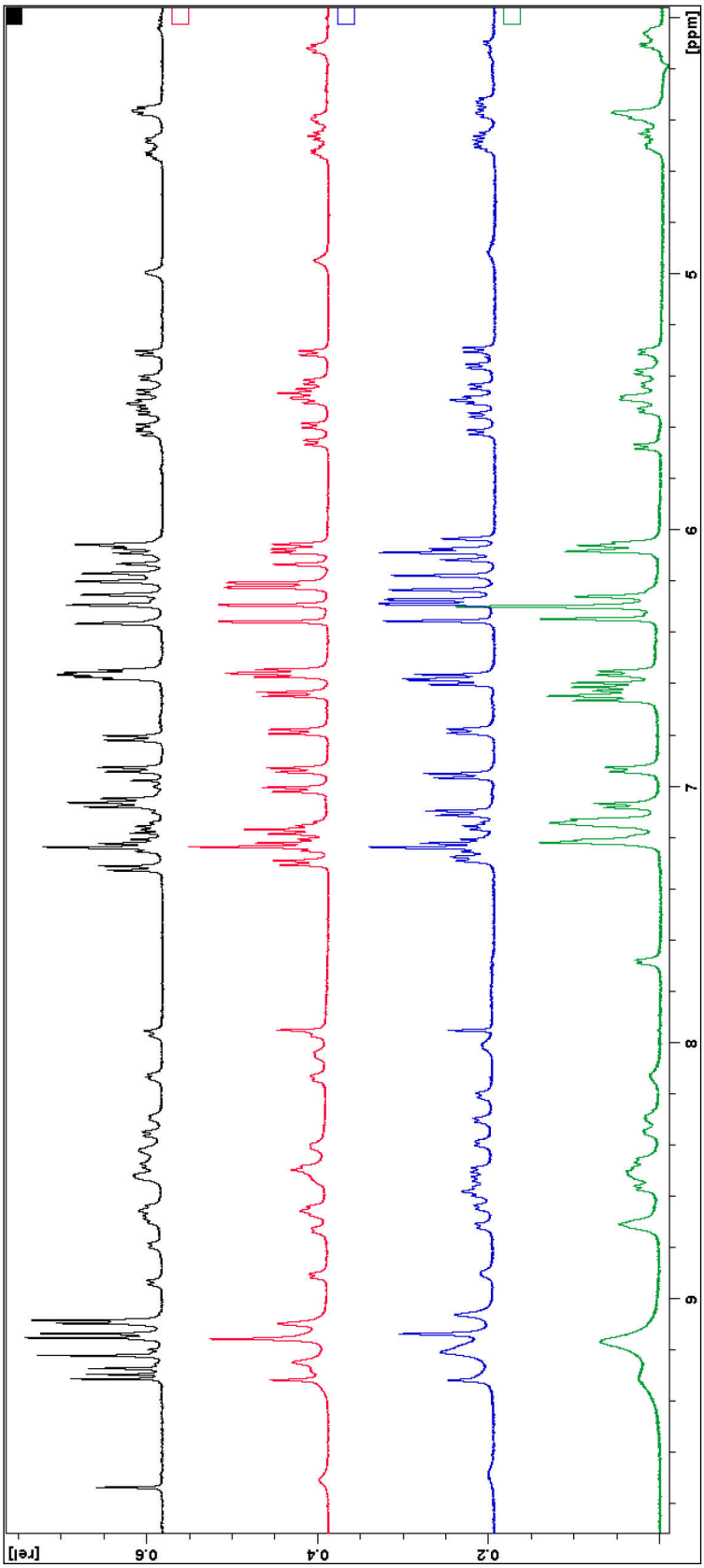



**Abbildung 90:** Gegenüberstellung der $^{1}$H-NMR-Spektren von Feglymycin (**28**, schwarz), [D-Ala$^{4}$]-Feglymycin (**119**, rot), [L-Ala$^{5}$]-Feglymycin (**120**, blau) und [D-Ala$^{6}$]-Feglymycin (**121**, grün). Zur besseren Übersichtlichkeit ist nur der Bereich von δ = 4-10 ppm abgebildet.

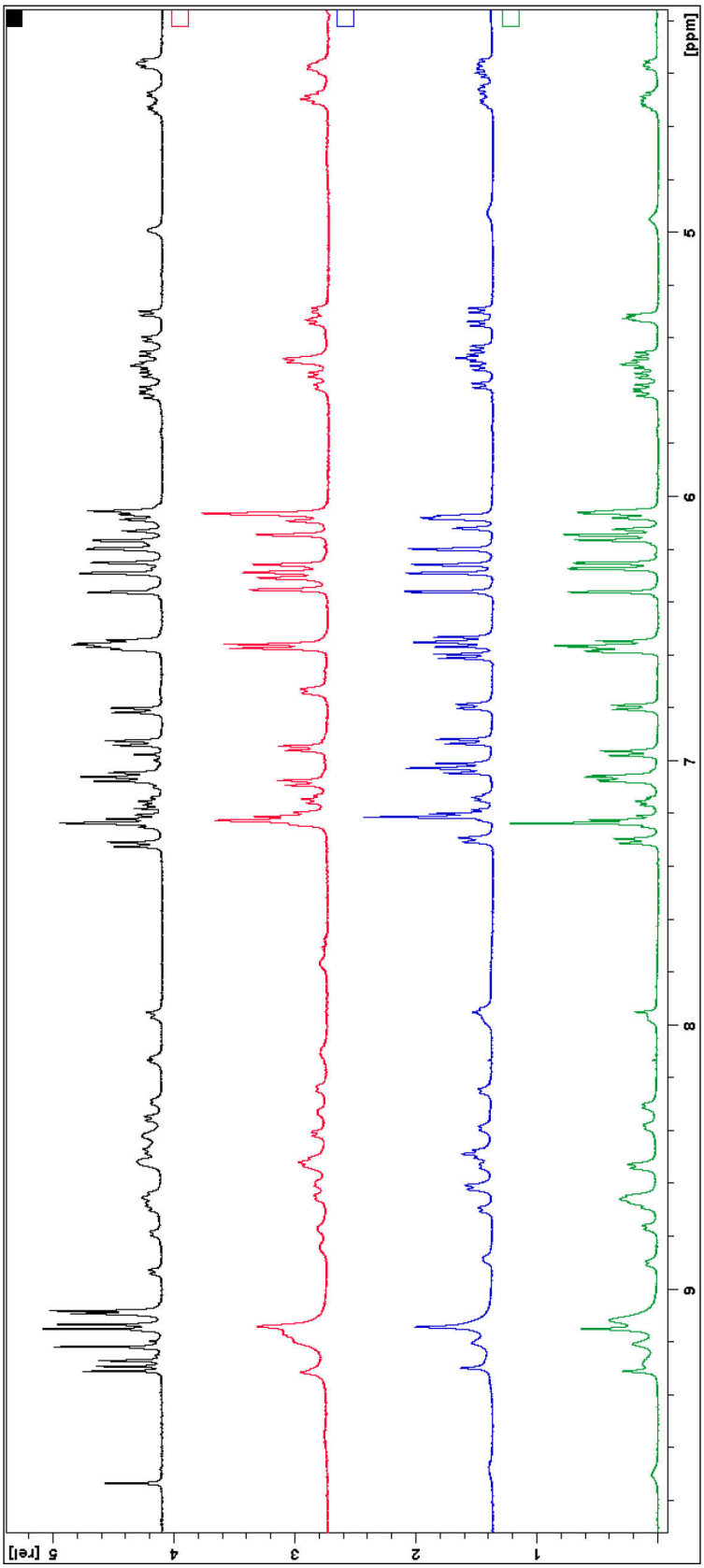



**Abbildung 91:** Gegenüberstellung der $^{1}$H-NMR-Spektren von Feglymycin (**28**, schwarz), [L-Ala$^{7}$]-Feglymycin (**122**, rot), [D-Ala$^{8}$]-Feglymycin (**123**, blau) und [L-Ala$^{9}$]-Feglymycin (**124**, grün). Zur besseren Übersichtlichkeit ist nur der Bereich von δ = 4-10 ppm abgebildet.

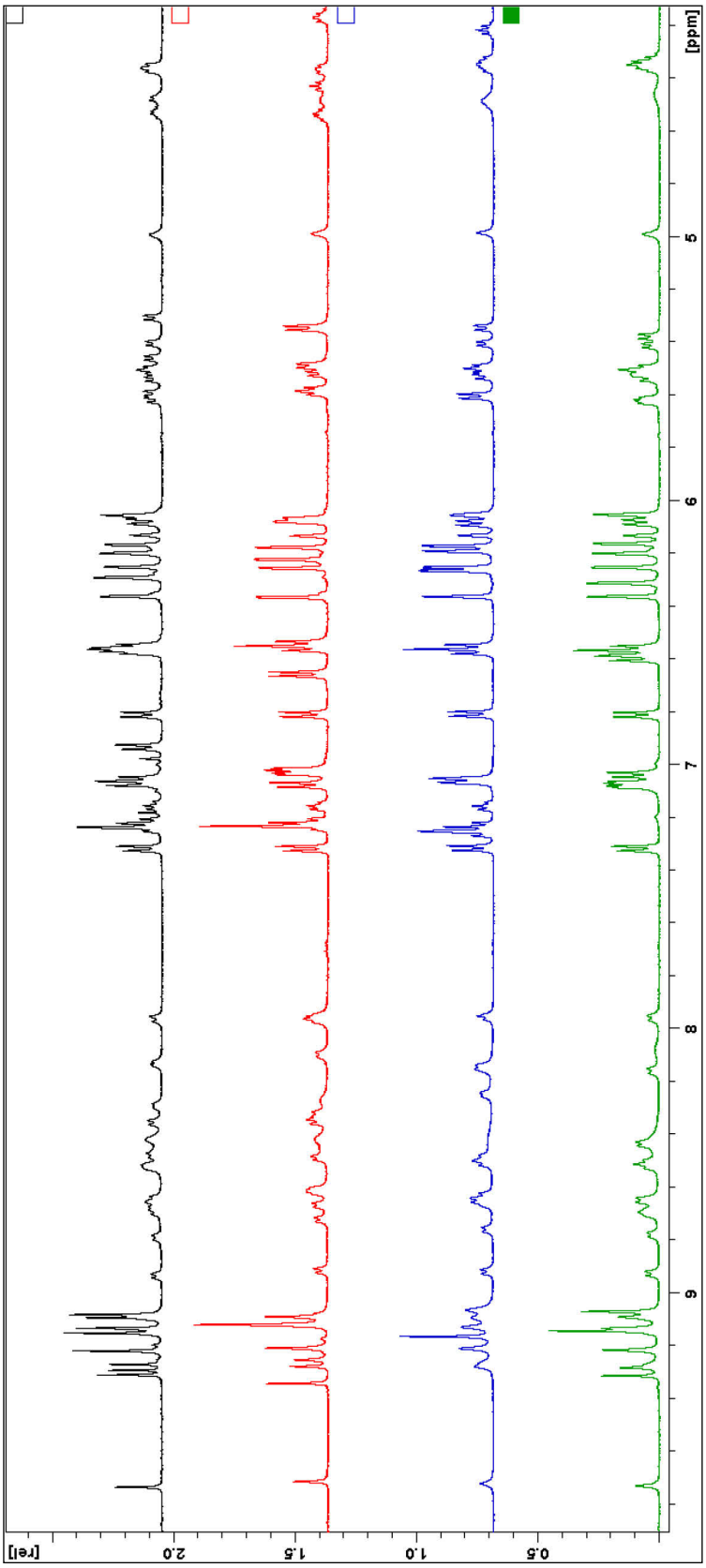



**Abbildung 92:** Gegenüberstellung der $^{1}$H-NMR-Spektren von Feglymycin (**28**, schwarz), [D-Ala$^{10}$]-Feglymycin (**125**, rot), [L-Ala$^{11}$]-Feglymycin (**126**, blau), [L-Ala$^{12}$]-Feglymycin (**127**, grün). Zur besseren Übersichtlichkeit ist nur der Bereich von δ = 4-10 ppm abgebildet.

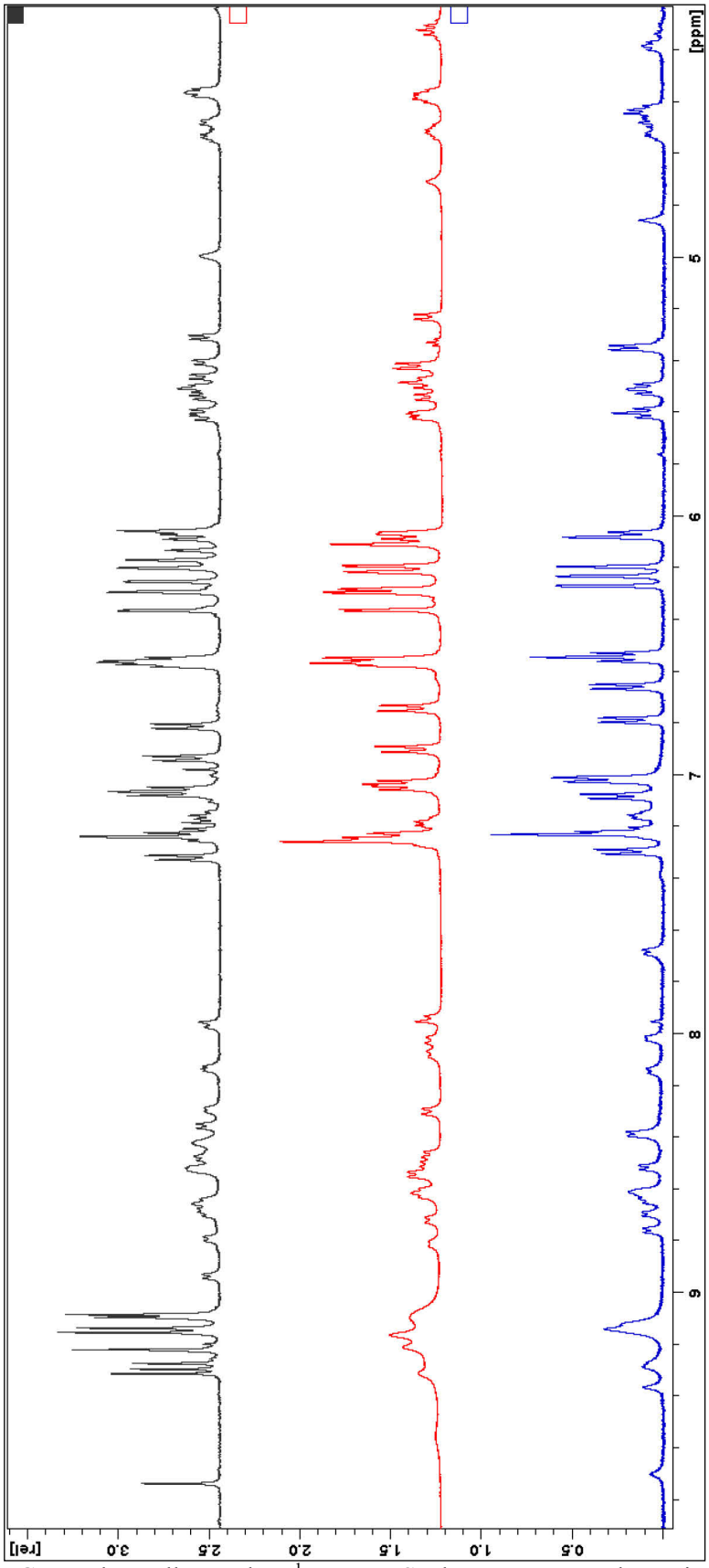



**Abbildung 93:** Gegenüberstellung der $^{1}$H-NMR-Spektren von Feglymycin (**28**, schwarz), [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (**128**, rot) und [D-Ala$^{2,10}$]-Feglymycin (**129**, blau). Zur besseren Übersichtlichkeit ist nur der Bereich von δ = 4-10 ppm abgebildet.

## 6.2 MS/MS-Spektren ausgewählter Verbindungen

Zur Überprüfung der korrekten Aminosäuresequenz synthetisierter Feglymycin-Dervivate wurden MS/MS-Experimente durchgeführt. Dabei erfolgte jeweils die Fragmentierung des zweifach protonierten, doppelt positiv geladenen Molekülions. In allen Spektren ist das Molekülion neben den beobachteten Fragmentionen gekennzeichnet.

Bei Peptiden treten Fragmentierungen i.d.R. an bestimmten Sollbruchstellen des Peptidrückgrates auf. Für Feglymycin und dessen Derivate beobachtete man unter den verwendeten Messbedingungen ausschließlich Peptidfragmente, die aus der Spaltung der Amidbindung resultierten. Nach der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlman werden die bei dieser Bindungsspaltung entstandenen geladenen Molekülionen als b- bzw. y-Fragmente bezeichnet (Abbildung 94).[198] Die nach den Buchstaben angeführten Zahlen stehen für die im jeweiligen Fragment enthaltenen Aminosäurereste.

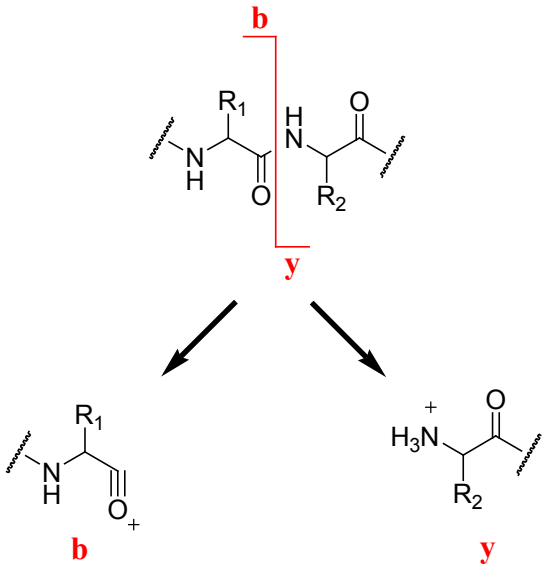
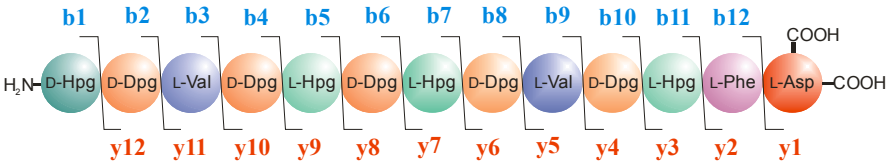



**Abbildung 94:** Bei den MS/MS-Experimenten der Feglymycin-Derivate entstanden hauptsächlich Fragmentionen, die aus der Spaltung der Amidbindung resultierten.



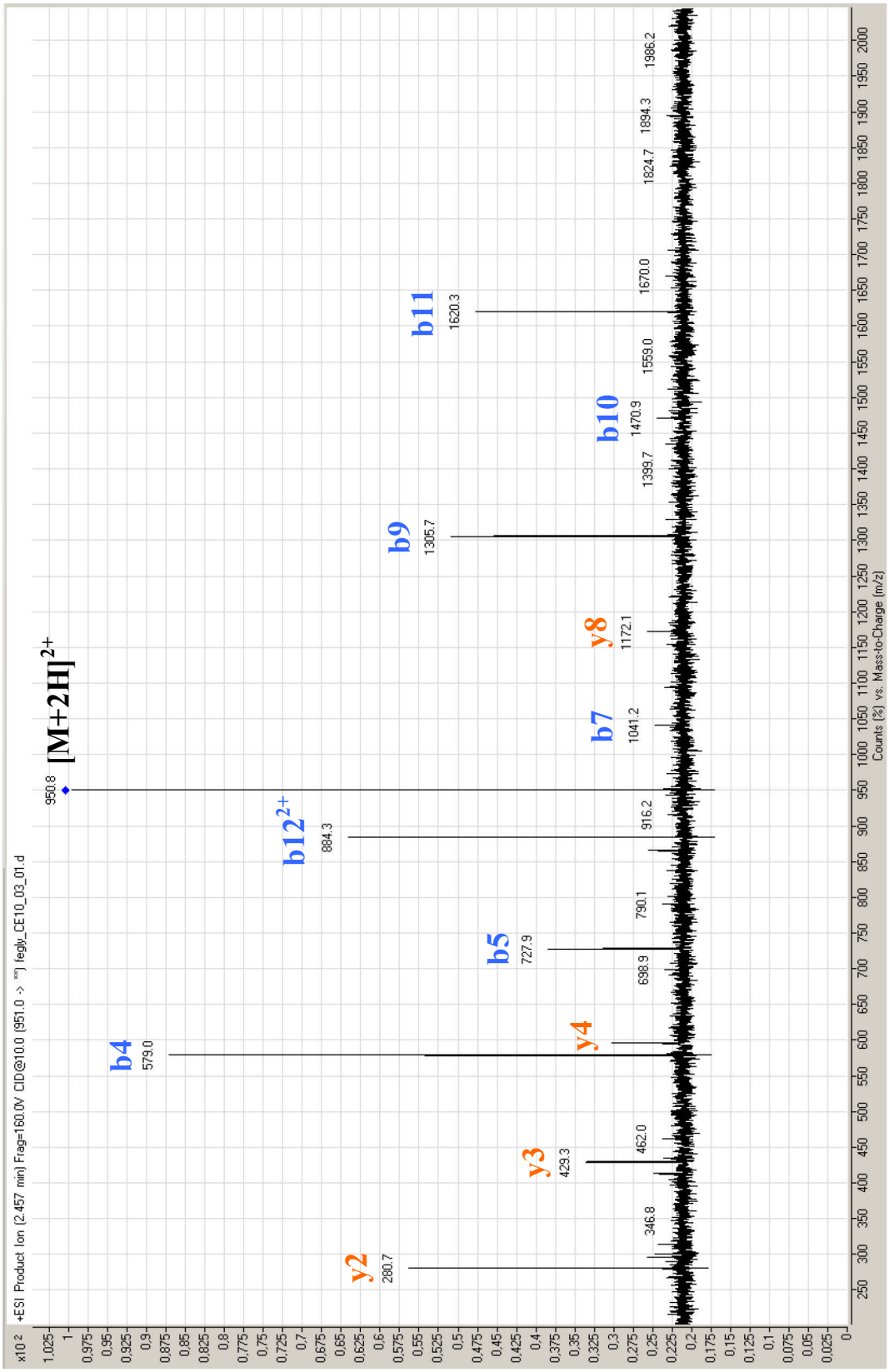
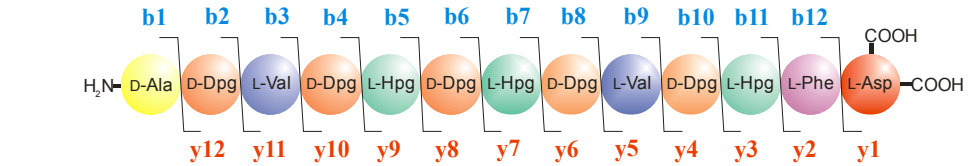




**Abbildung 95:** MS/MS-Spektrum von Feglymycin (**28**).



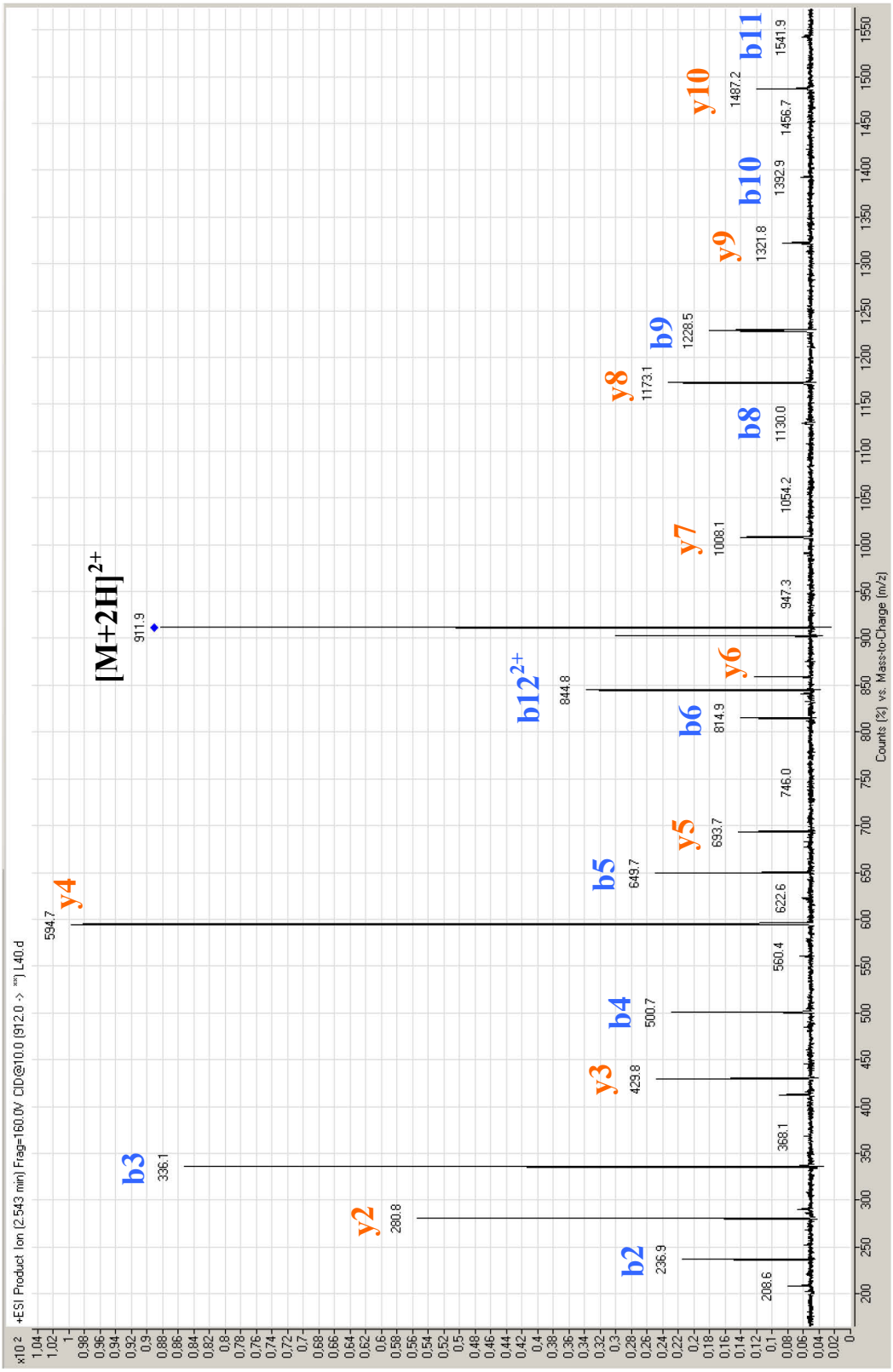
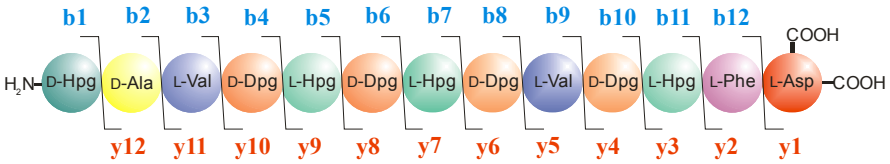




**Abbildung 96:** MS/MS-Spektrum von [D-Ala[1]]-Feglymycin (**116**).



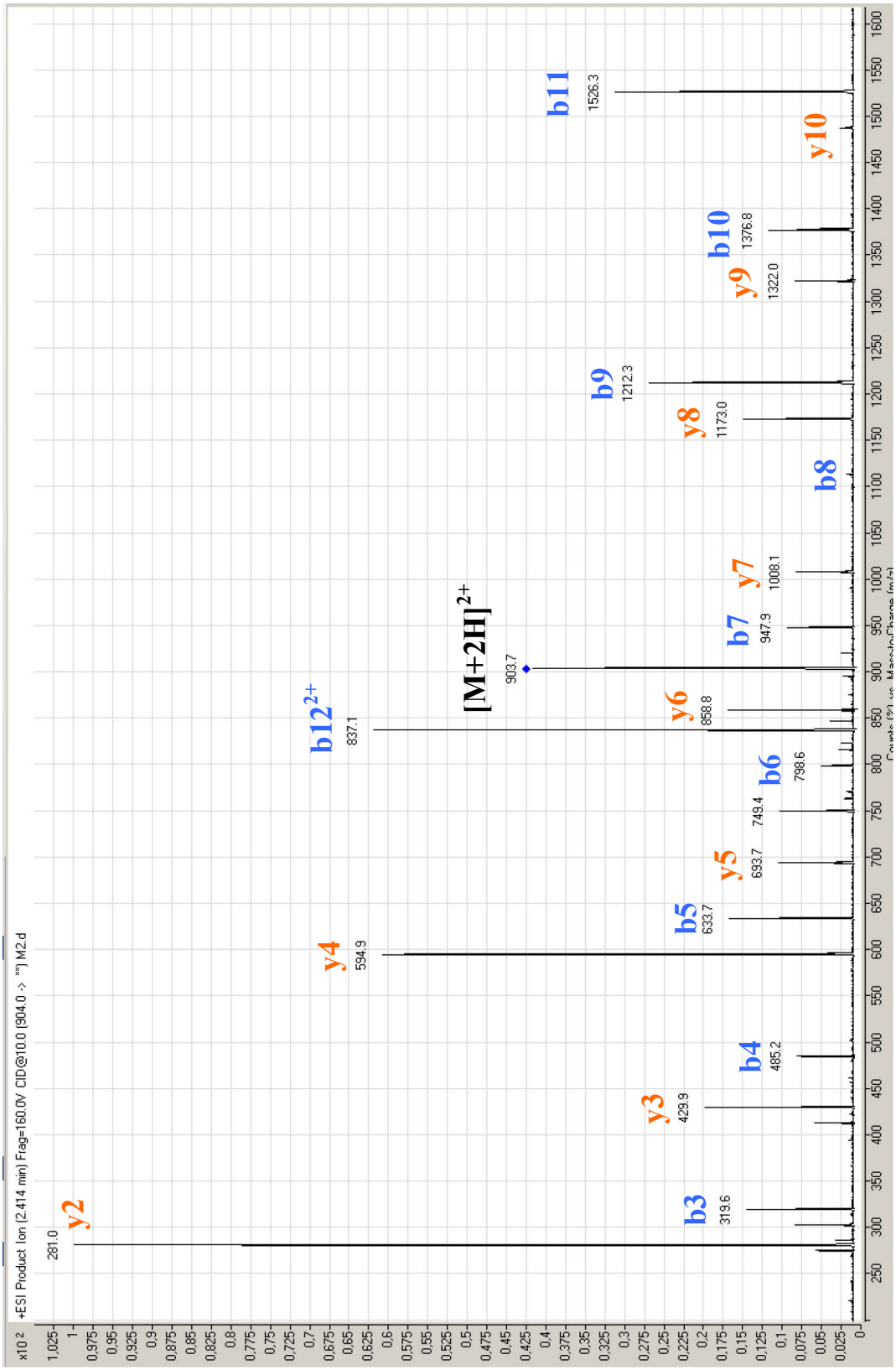




**Abbildung 97:** MS/MS-Spektrum von [D-Ala[2]]-Feglymycin (**117**).

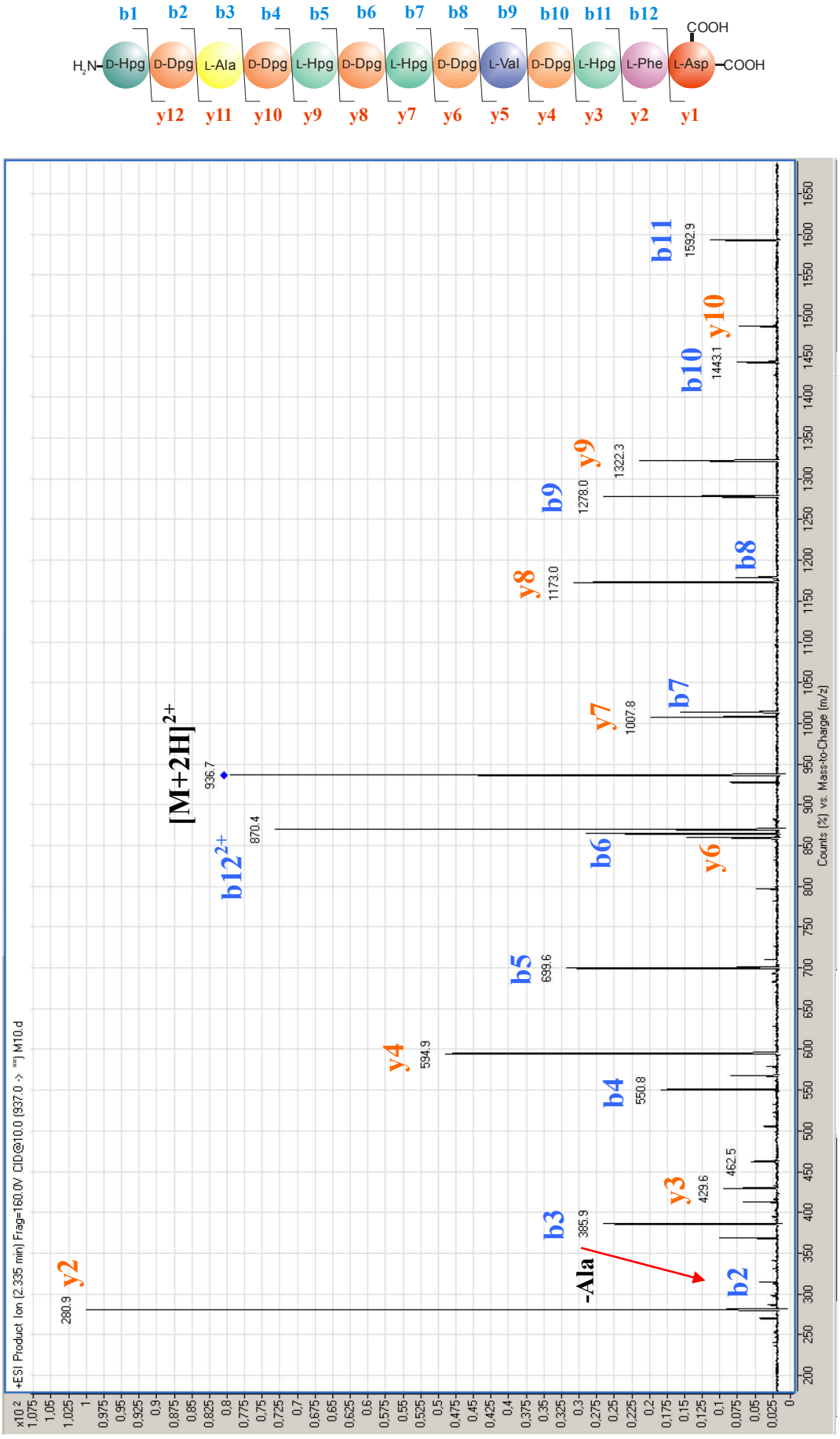
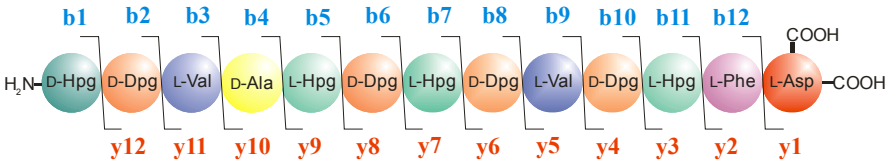



**Abbildung 98:** MS/MS-Spektrum von [L-Ala[3]]-Feglymycin (**118**).



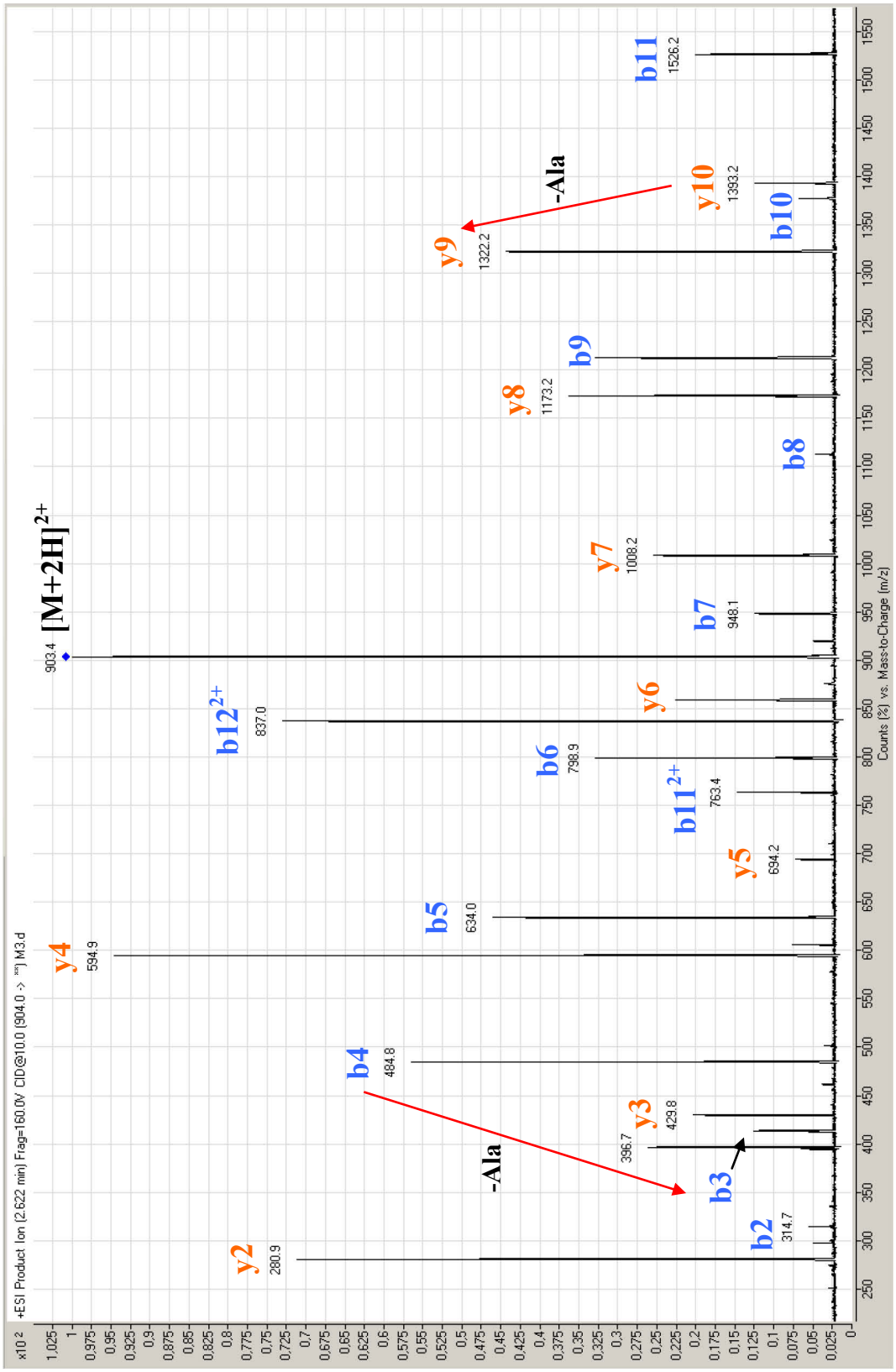
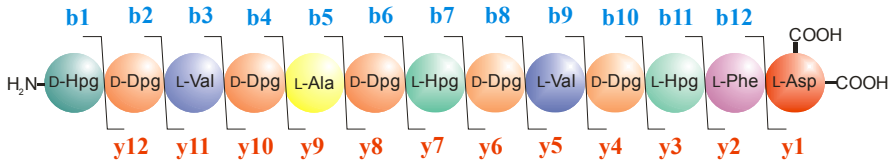




**Abbildung 99:** MS/MS-Spektrum von [D-Ala[4]]-Feglymycin (**119**).



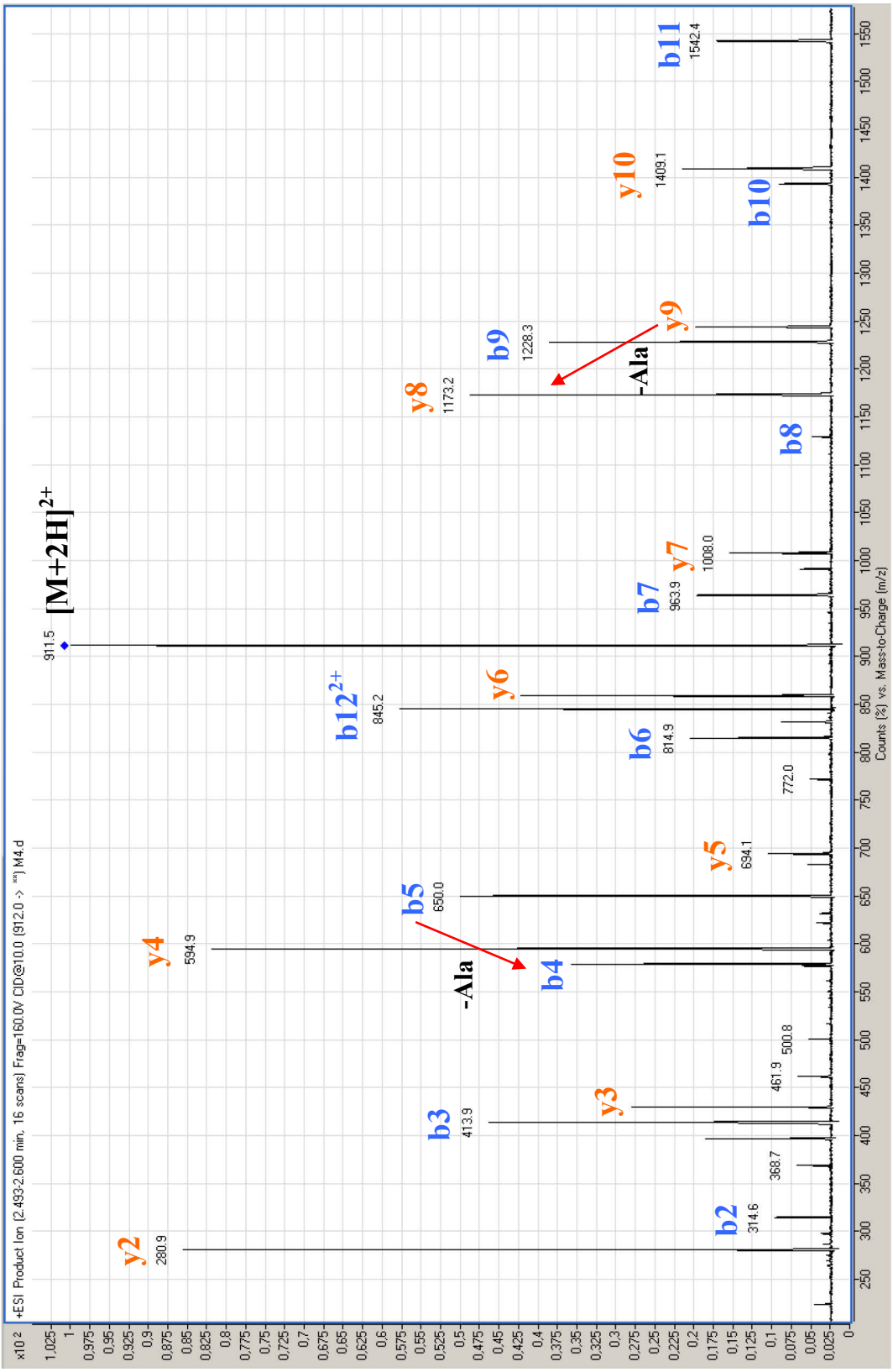
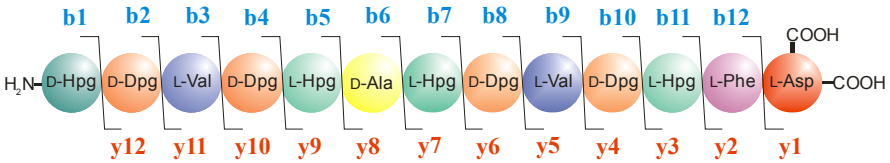




**Abbildung 100:** MS/MS-Spektrum von [L-Ala[5]]-Feglymycin (**120**).



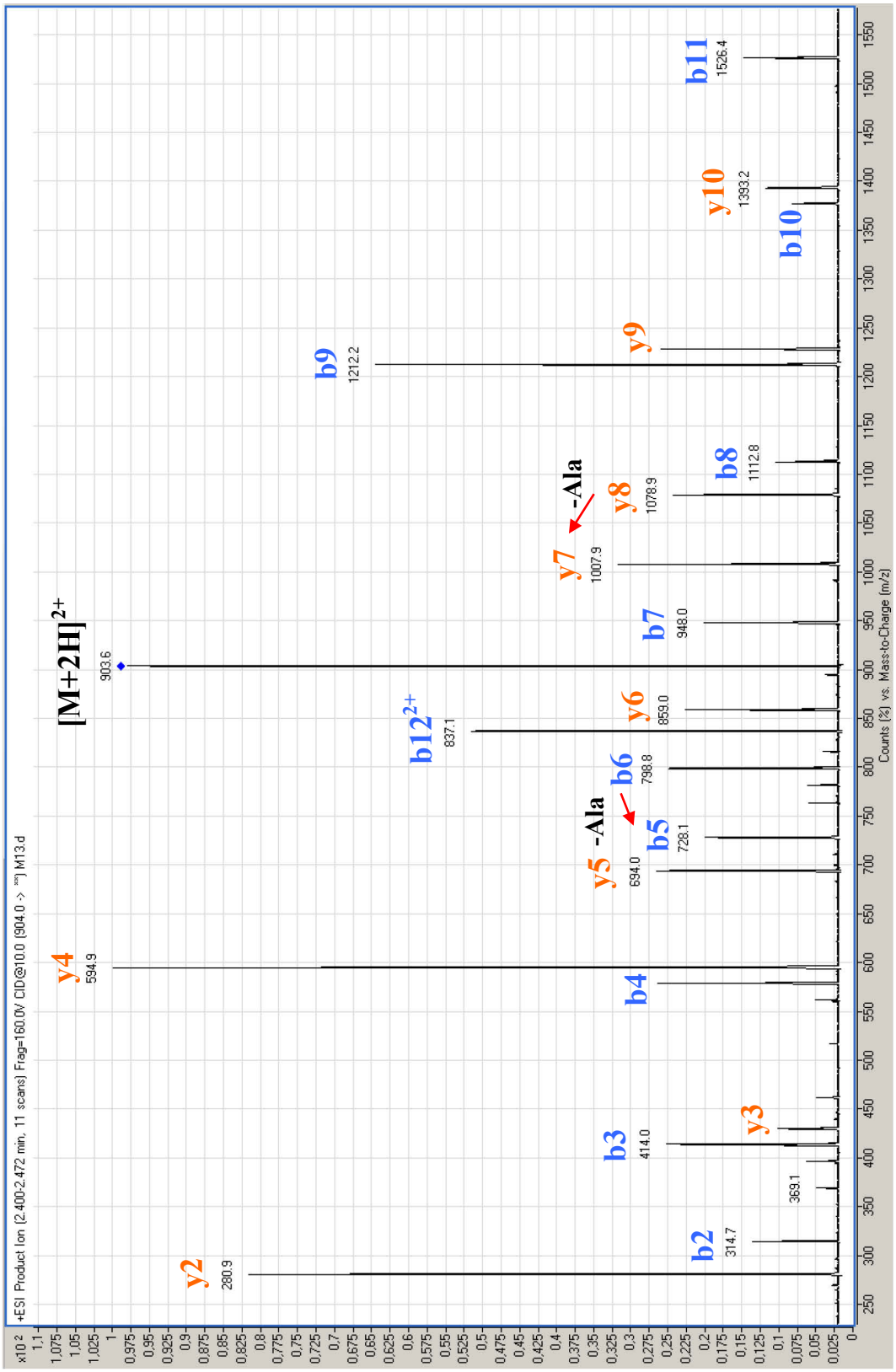




**Abbildung 101:** MS/MS-Spektrum von [D-Ala[6]]-Feglymycin (**121**).

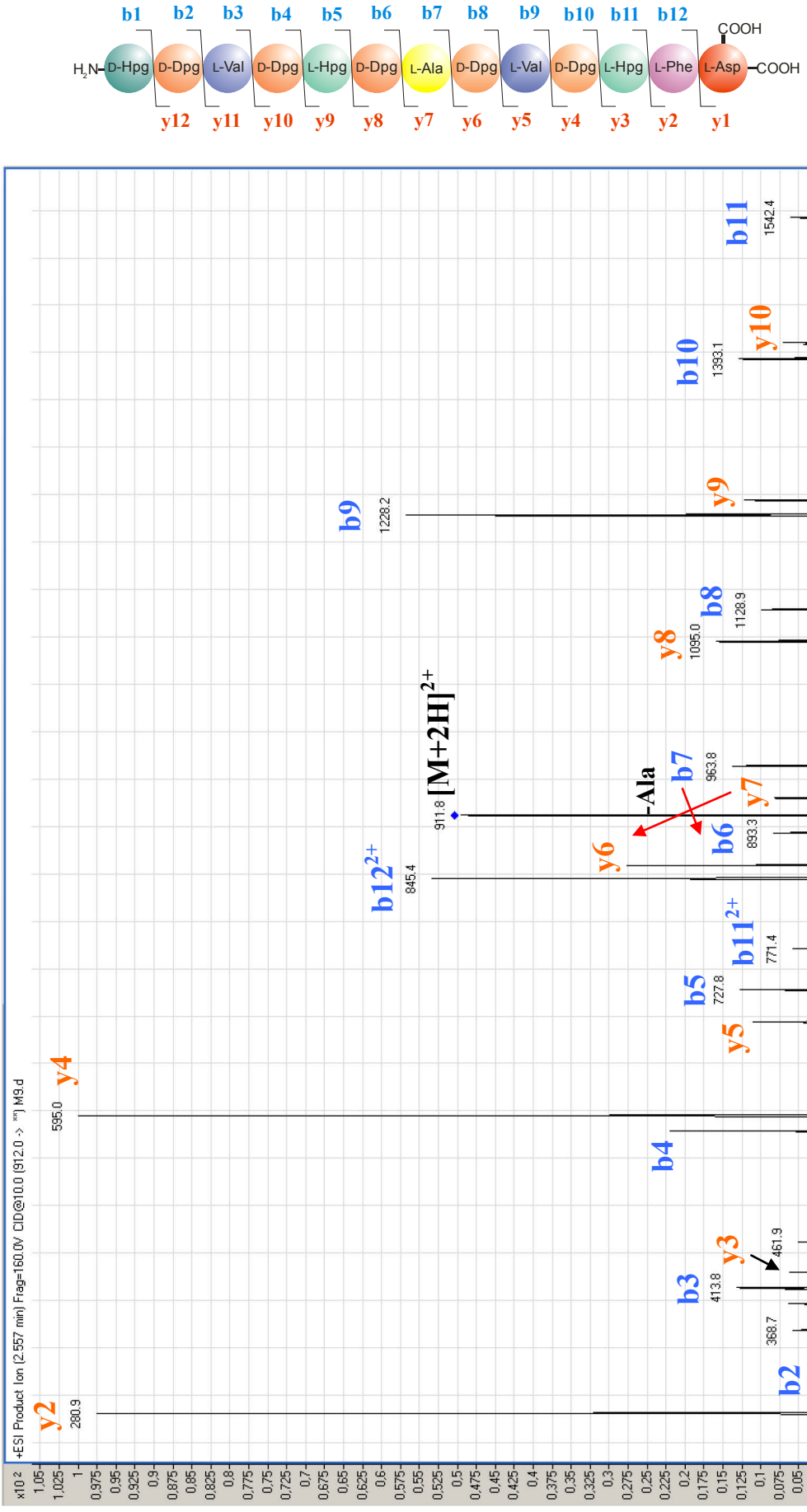
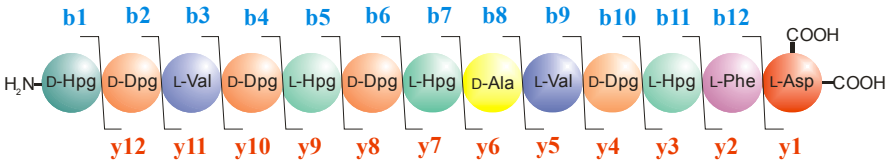



**Abbildung 102:** MS/MS-Spektrum von [L-Ala[7]]-Feglymycin (**122**).



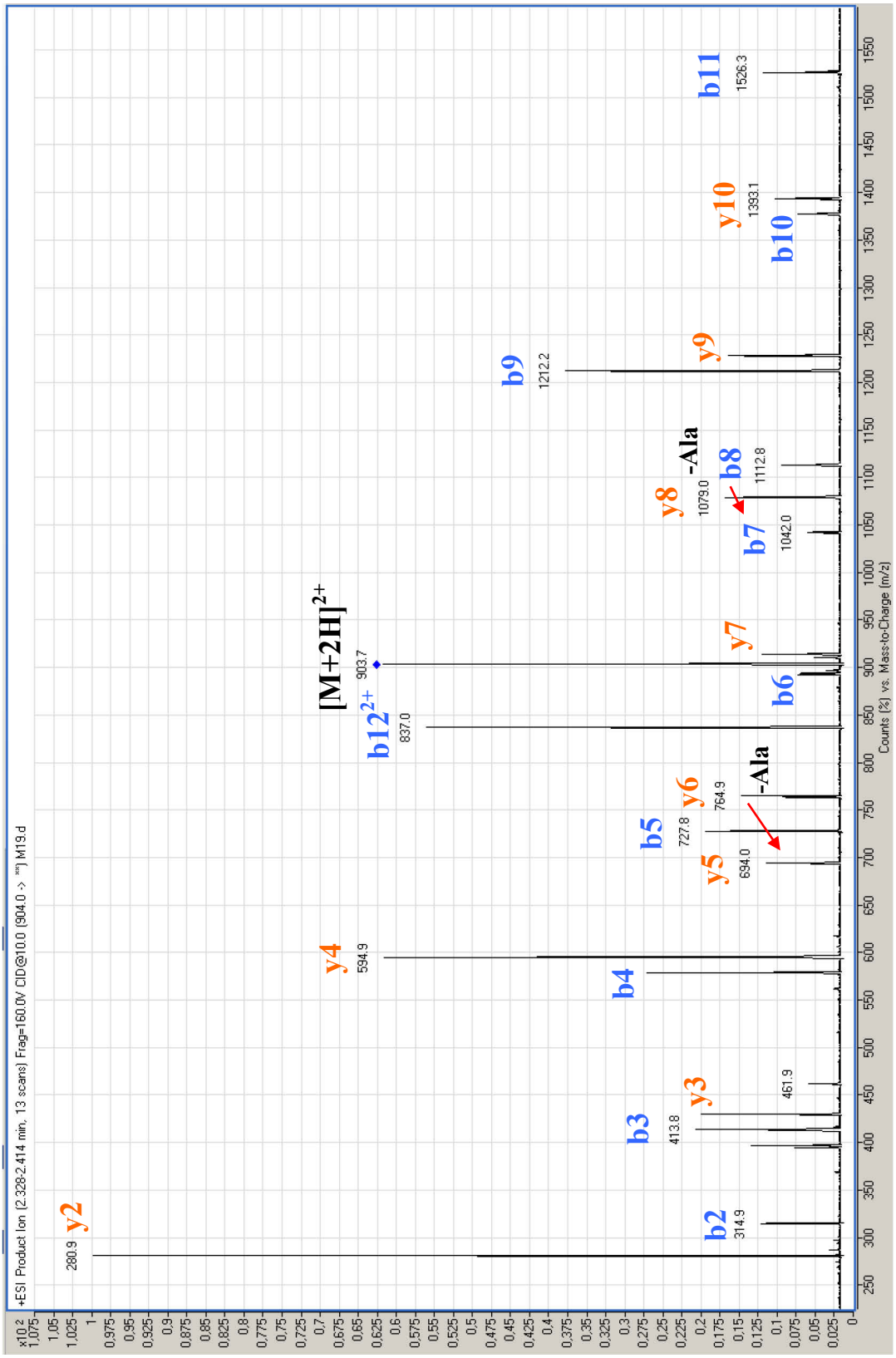
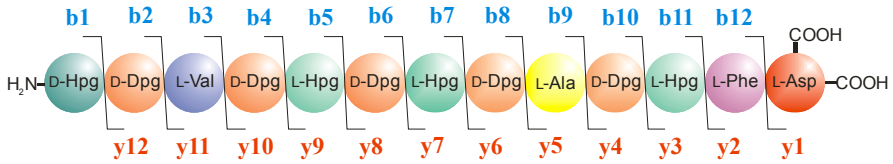




**Abbildung 103:** MS/MS-Spektrum von [D-Ala[8]]-Feglymycin (**123**).



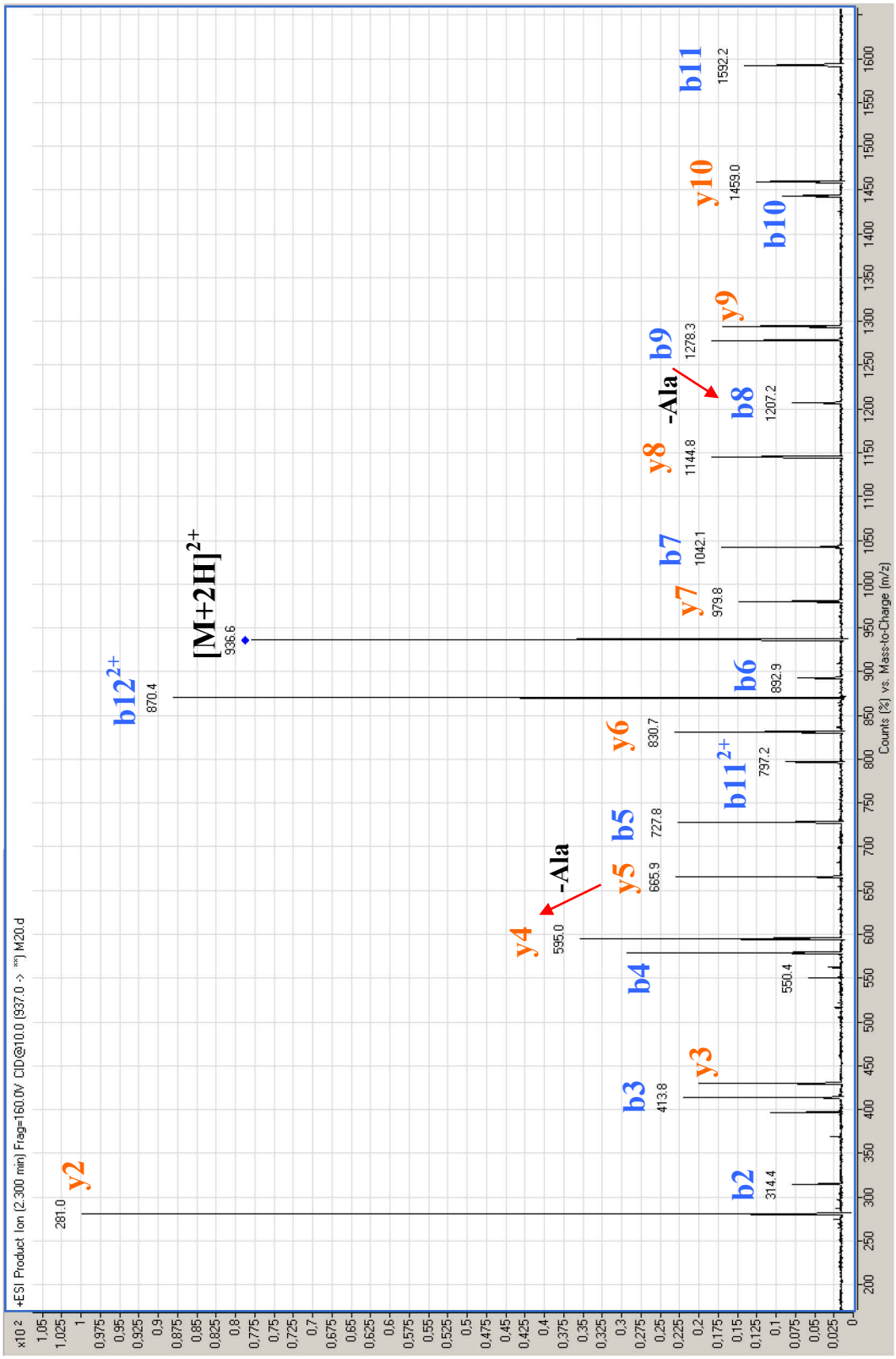
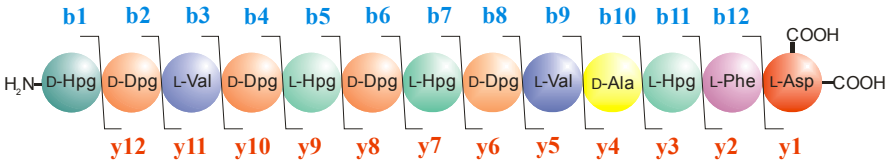




**Abbildung 104:** MS/MS-Spektrum von [L-Ala[9]]-Feglymycin (**124**).



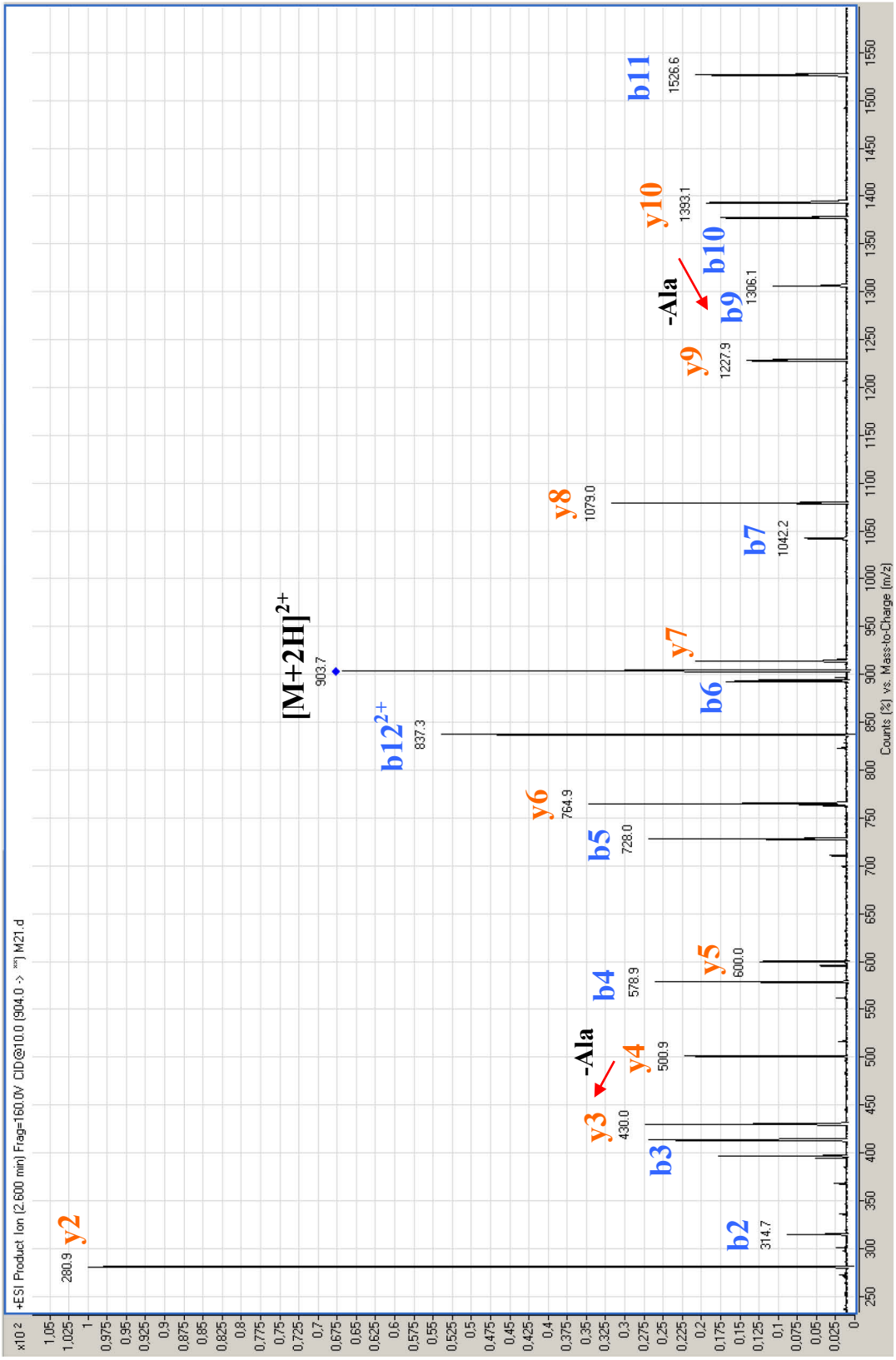
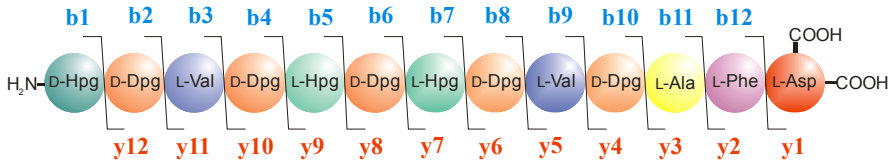




**Abbildung 105:** MS/MS-Spektrum von [D-Ala[10]]-Feglymycin (**125**).



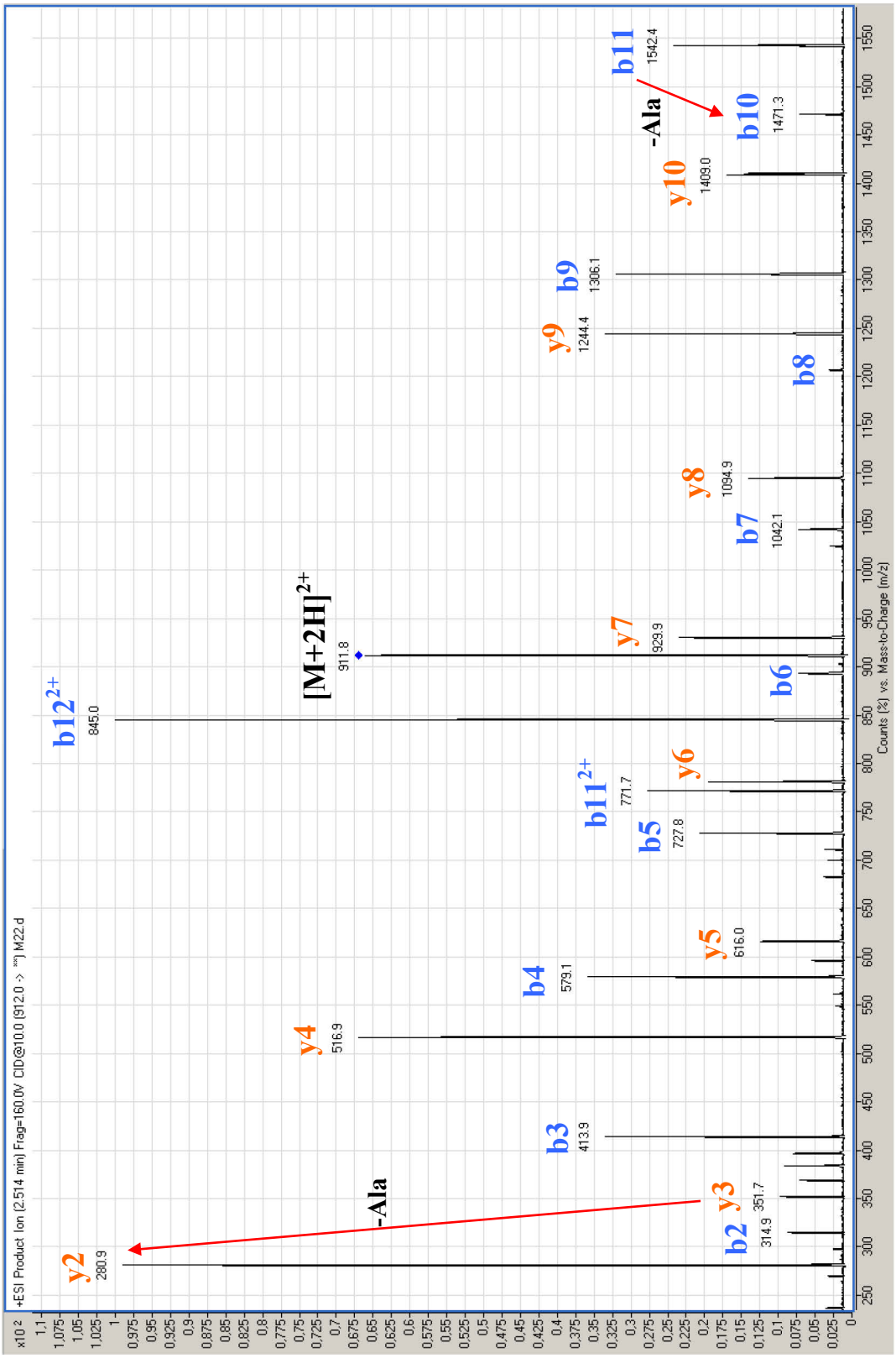
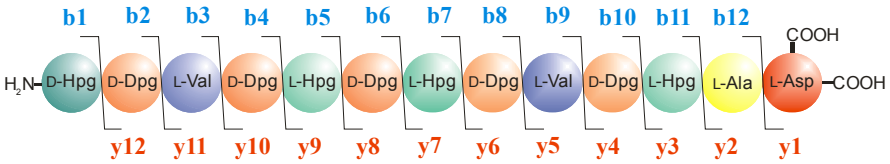




**Abbildung 106:** MS/MS-Spektrum von [L-Ala[11]]-Feglymycin (**126**).



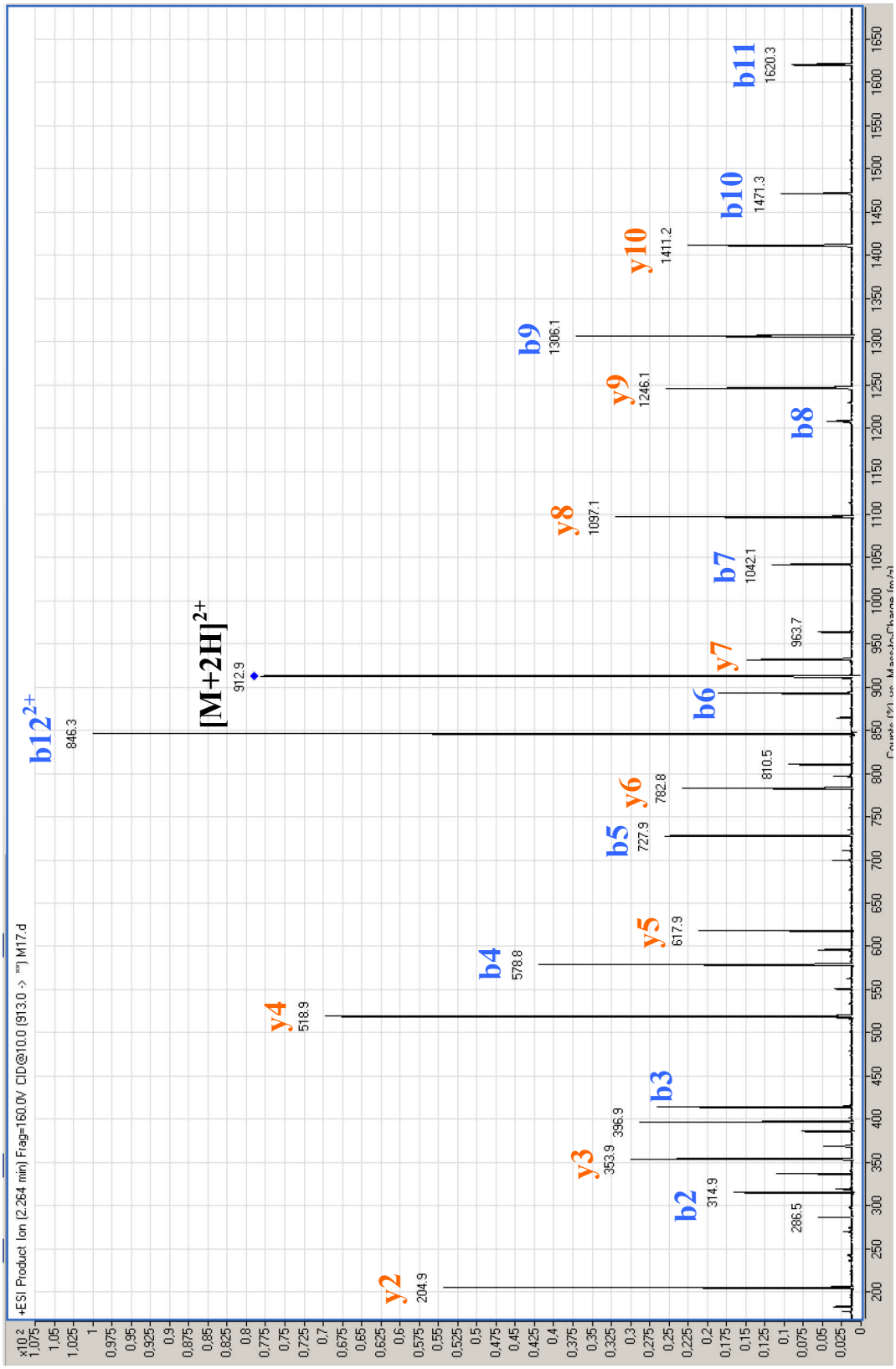
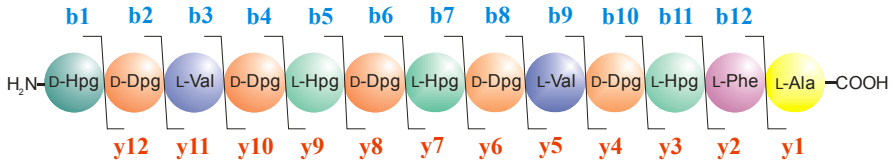




**Abbildung 107:** MS/MS-Spektrum von [L-Ala[12]]-Feglymycin (**127**).



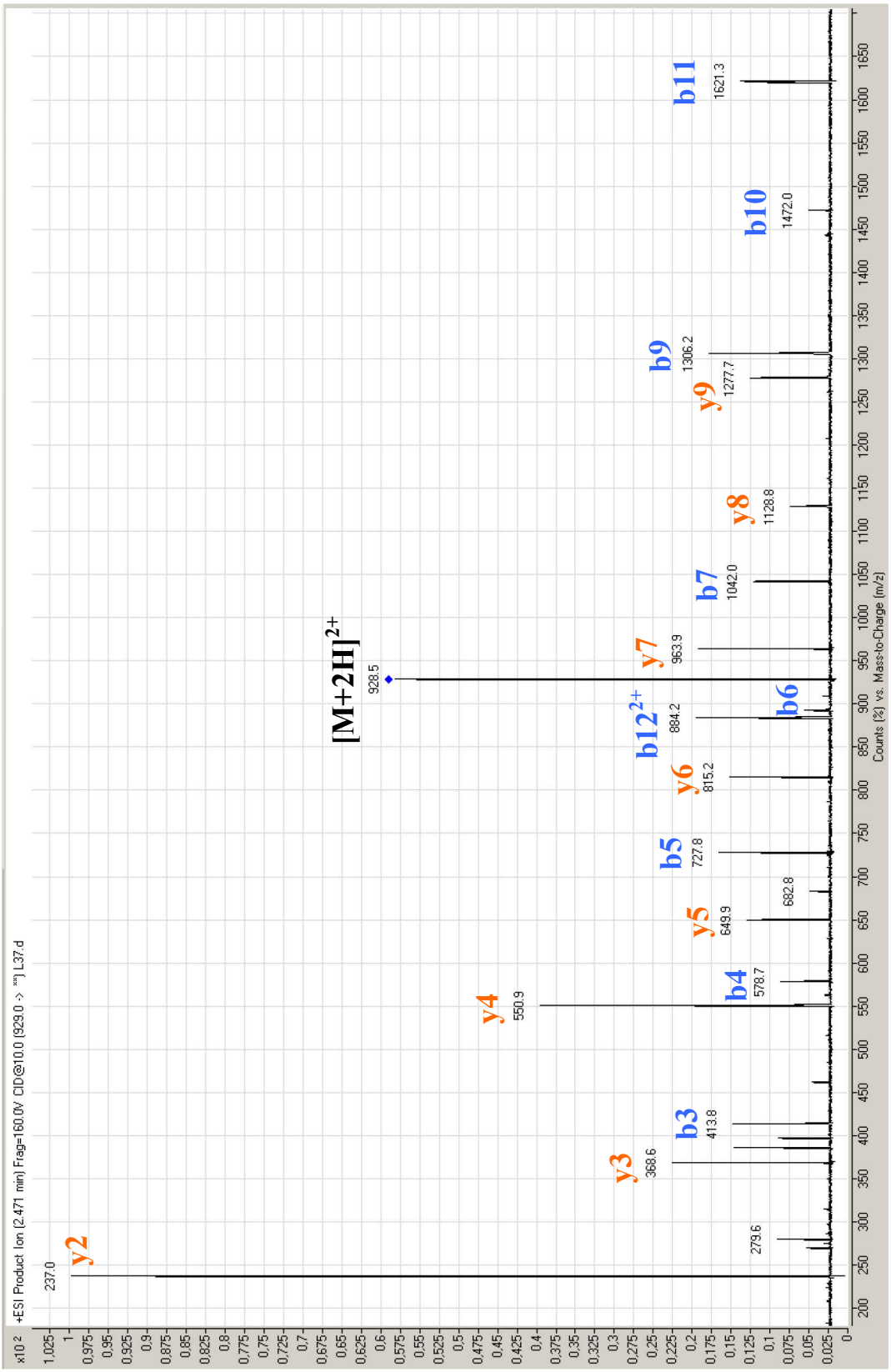
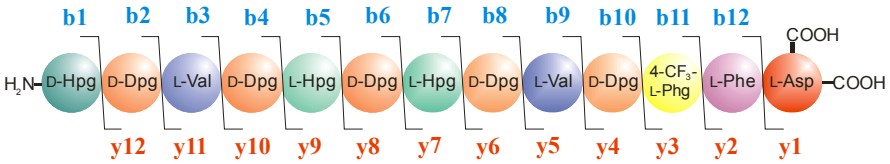




**Abbildung 108:** MS/MS-Spektrum von [L-Ala$^{13}$]-Feglymycin (**128**).



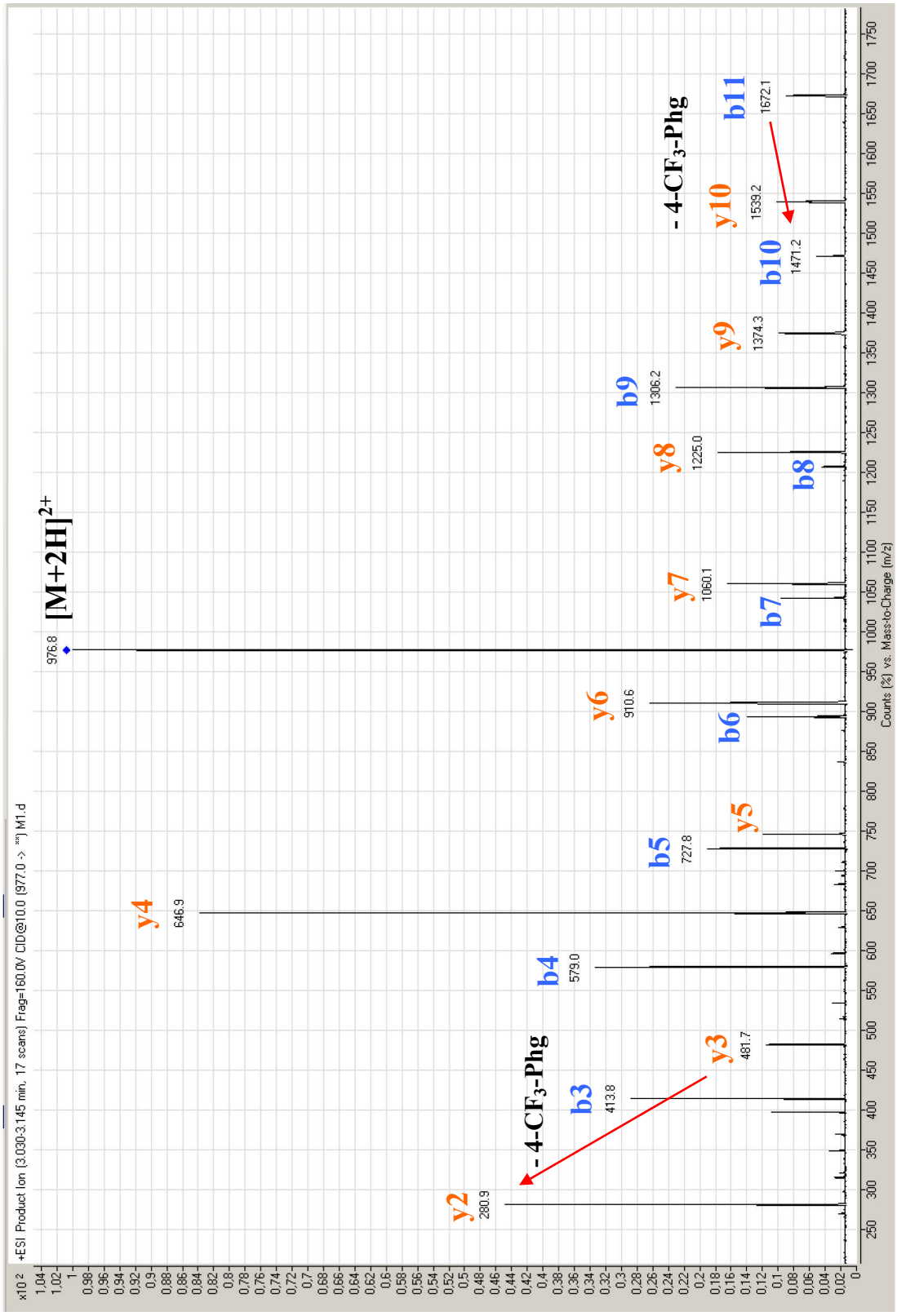
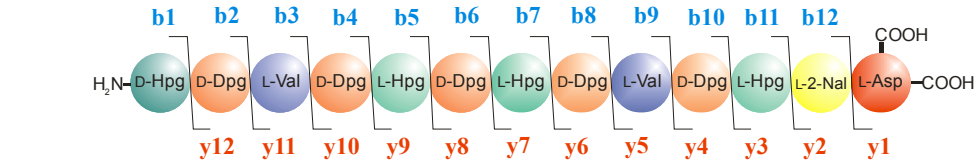




**Abbildung 109:** MS/MS-Spektrum von [4-$CF_3$-L-Phg[11]]-Feglymycin (**134**).



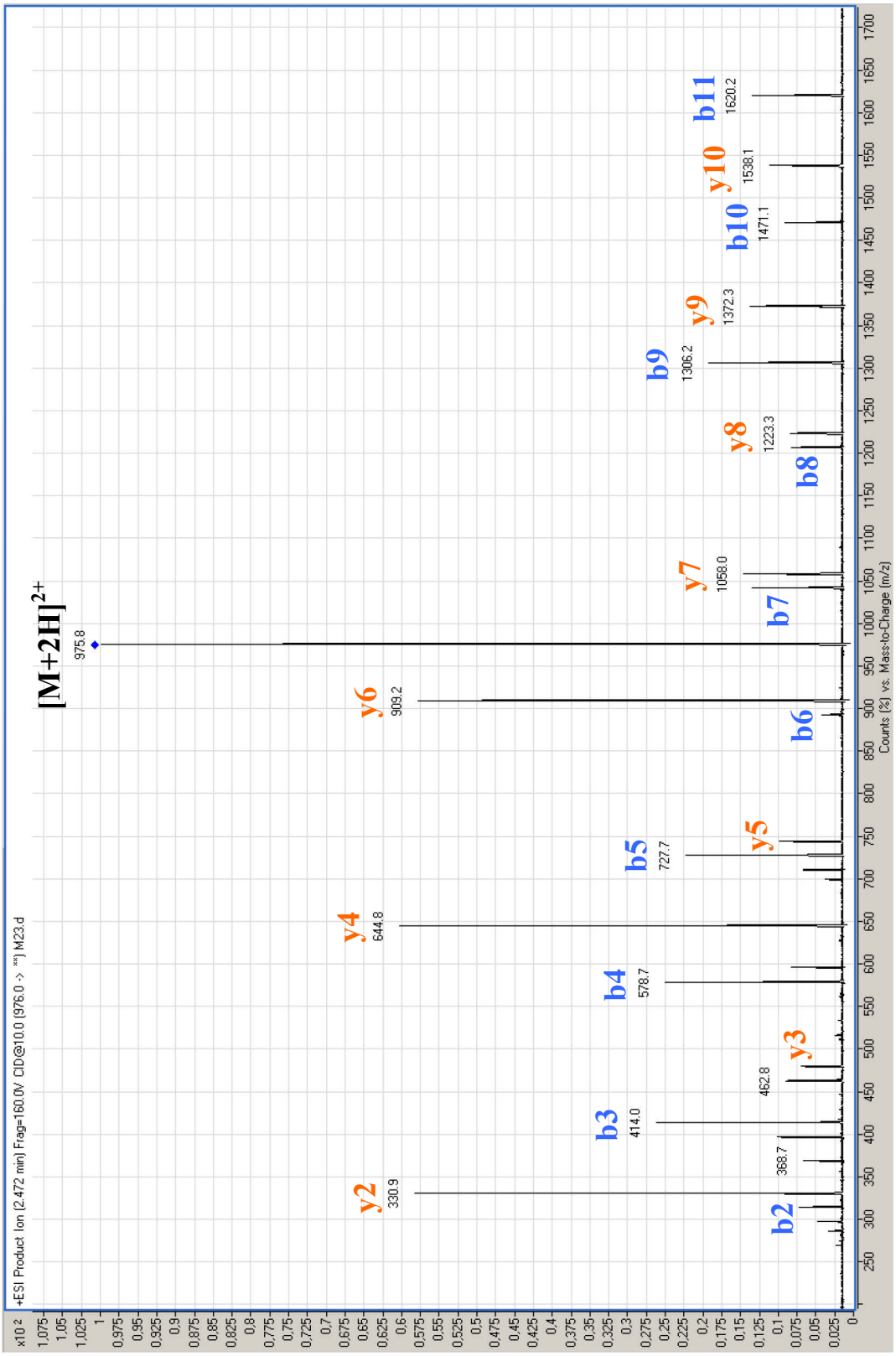




**Abbildung 110:** MS/MS-Spektrum von [L-2-Nal$^{12}$]-Feglymycin (**139**).

## 6.3 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| $[\alpha]_D^T$ | spezifischer Drehwert bei λ = 589 nm und Temperatur T [°C] |
| δ | chemische Verschiebung |
| Δ | Änderung |
| λ | Wellenlänge |
| Å | Ångström (1 Å = $10^{-10}$ m) |
| A | Absorption |
| abs. | absolut |
| Ac | Acetyl |
| AcN | Acetonitril |
| AcOH | Essigsäure |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Aib | 2-Aminoisobuttersäure |
| AMP | antimikrobielles Peptid |
| APT | *attached proton test* |
| AS | Aminosäure |
| Asm | γ-*N*-Methylasparagin |
| Ath | *allo*-Threonin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATR | abgeschwächte Totalreflektion (*attenuated total reflectance*) |
| AU | Absorptionseinheit (*absorption unit*) |
| ber. | berechnet |
| BLM | planare Lipiddoppelschicht (*black lipid membrane*) |
| Boc | *tert*-Butoxycarbonyl |
| Bpa | 3-(4-Benzoylphenyl)-alanin |
| *n*-Bu | *n*-Butyl |
| *t*-Bu | *tert*-Butyl |
| Bzl | Benzyl |
| °C | Grad Celsius |
| c | Konzentration |
| Cbz | Benzyloxycarbonyl |
| CC | zytotoxische Konzentration (*cytotoxic concentration*) |
| CCR5 | CC-Chemokin-Rezeptor Typ 5 |
| CD | Zirkulardichroismus (*circular dichroism*) |
| CD4 | *cluster of differentiation* 4 |

| | |
|---|---|
| Chp | 3-Chlor-4-hydroxyphenylglycin |
| cm | Zentimeter |
| COSY | Korrelationsspektroskopie (*correlation spectroscopy*) |
| CPE | zytopathischer Effekt (*cytopathic effect*) |
| CV | Säulenvolumen (*column volume*) |
| CXCR4 | CXC-Chemokin-Rezeptor Typ 4 |
| d | Tag (*day*) bzw. Duplett |
| Da | Dalton (1 Da = $1.66 \cdot 10^{-27}$ kg) |
| Dab | 2,3-Diaminobuttersäure |
| DAD | Diodenarraydetektor |
| Dap | 2,3-Diaminopropionsäure |
| DAP | 2,6-Diaminopimelinsäure |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCE | Dichlorethan |
| DCM | Dichlormethan |
| DEPBT | 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on |
| DHF | Dihydrofolsäure |
| $(DHQ)_2PHAL$ | 1,4-Bis-(dihydrochininyl)-phtalazin |
| $(DHQD)_2PHAL$ | 1,4-Bis-(dihydrochinidinyl)-phtalazin |
| DIPEA | *N*,*N*-Diisopropyl-*N*-ethylamin |
| DMF | *N,N*-Dimethylformamid |
| dm | Dezimeter |
| DMPC | Dimyristoylphosphatidylcholin |
| DMSO-$d_6$ | deuteriertes Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*) |
| Dpg | 3,5-Dihydroxyphenylglycin |
| DPhPC | Diphytanoylphosphatidylcholin |
| DQF-COSY | *double-quantum-filtered correlation spectroscopy* |
| DtpT | Di- und Tripeptid-Transporter |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDC·HCl | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid |
| *ee* | enantiomerer Überschuss (*enantiomeric excess*) |
| EI | Elektronenstoß-Ionisation |
| eq | molare Äquivalente |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| *et al.* | und andere (*et alii*) |
| EtOAc | Essigsäureethylester |

| | |
|---|---|
| EtOH | Ethanol |
| eV | Elektronenvolt |
| FC | Flash-Chromatographie |
| FAS | Fettsäuresynthase (*fatty acid synthase*) |
| FDA | *U.S. Food and Drug Administration* |
| FPLC | *fast protein liquid chromatography* |
| FTIR | Fourier-Transform-Infrarot (*fourier transform infrared*) |
| g | Gramm |
| gef. | gefunden |
| GlcNAc | *N*-Acetylglucosamin |
| h | Stunde (*hour*) |
| Ham | γ-*N*-Methyl-*threo*-β-hydroxyasparagin |
| HMBC | *heteronuclear multiple bond correlation* |
| HOAt | 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol |
| Hpg | 4-Hydroxyphenylglycin |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*) |
| HRMS | hochauflösende Massenspektrometrie (*high resolution mass spectrometry*) |
| HSQC | *heteronuclear single quantum coherence* |
| Hty | β-Hydroxytyrosin |
| Hz | Hertz |
| IC | Inhibitorkonzentration (*inhibitory concentration*) |
| IR | infrarot |
| *J* | Kopplungskonstante |
| K | Kelvin |
| Kyn | Kynurenin |
| l | Liter |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| LM | Lösungsmittel |
| m | Multiplett |
| M | molar |
| mdeg | Milligrad (*millidegree*) |
| Me | Methyl |
| MeOH | Methanol |
| mg | Milligramm |
| Mgn | β-Methylglutamin |
| MHz | Megahertz |

| | |
|---|---|
| MIC | minimale Hemmkonzentration (*minimum inhibitory concentration*) |
| Mil | β-Methylisoleucin |
| min | Minute |
| Mio | Millionen |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | millimolar |
| mmol | Millimol |
| Mms | β,β-Dimethylmethioninsulfoxid |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*) |
| MRSA | Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* |
| MS | Massenspektrometrie |
| MS/MS | Tandem-Massenspektrometrie |
| MSSA | Methicillin-sensitiver *Staphylococcus aureus* |
| Mth | β-Methylthreonin |
| MTS | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| MurNAc | *N*-Acetylmuraminsäure |
| *m/z* | Masse/Ladungs-Verhältnis |
| µM | mikromolar |
| µmol | Mikromol |
| µl | Mikroliter |
| N | normal |
| NADH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form |
| NADPH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form |
| Nal | Naphthylalanin |
| nm | Nanometer |
| nM | nanomolar |
| NMR | Kernmagnetische Resonanz (*nuclear magnetic resonance*) |
| NNRTI | Nicht-Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor |
| NOESY | *nuclear overhauser and exchange spectroscopy* |
| NP | Normalphase |
| NRPS | nicht-ribosomale Peptidsynthetase |
| NRTI | Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor |
| NtRTI | Nukleotidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor |
| Opp | Oligopeptid-Permease |

| | |
|---|---|
| Orn | Ornithin |
| PABA | *para*-Aminobenzoesäure (*para-aminobenzoic acid*) |
| PBMCs | mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*) |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| $P_i$ | Orthophosphat |
| Pip | Pipecolinsäure |
| PK | Pyruvat-Kinase |
| pM | pikomolar |
| PMS | Phenazinmethosulfat |
| ppm | Teile pro Million (*parts per million*) |
| *i*-PrOH | *iso*-Propanol |
| *n*-PrOH | *n*-Propanol |
| PTFE | Polytetrafluorethylen (Teflon®) |
| quant. | quantitativ |
| rac. | racemisch |
| $R_f$ | Retentionsfaktor |
| RP | Umkehrphase (*reversed phase*) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde bzw. Singulett |
| SAR | Struktur-Aktivitäts-Beziehung (*structure-activity-relationship*) |
| $SiO_2$ | Siliciumdioxid (Kieselgel) |
| SPR | Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*) |
| t | Triplett |
| TBTU | 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uroniumtetrafluoroborat |
| *tert* | tertiär |
| TES | Triethylsilan |
| TFA | Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid*) |
| THF | Tetrahydrofolsäure bzw. Tetrahydrofuran |
| Tle | *tert*-Leucin |
| TMTH | Trimethylzinnhydroxid (*trimethyltin hydroxide*) |
| $t_R$ | Retentionszeit (*retention time*) |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure (*transfer ribonucleic acid*) |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | Enzymeinheit (*enzyme unit*) |
| UDP | Uridin-5'-diphosphat |

| | |
|---|---|
| UMP | Uridin-5’-monophosphat |
| UV | ultraviolett |
| Van | Vancosamin (als Abkürzung das Zuckers in Strukturformeln) |
| VIS | sichtbar (*visible*) |
| VRE | Vancomycin-resistente Enterokokken |

## 6.4 Literaturverzeichnis


[1] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, WILEY-VCH: Weinheim, Deutschland, **2009**.

[2] R. Halai, D. J. Craik, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 526-536.

[3] H. Raghuraman, A. Chattopadhyay, *Biosci. Rep.* **2007**, *27*, 189-223.

[4] a) R. E. W. Hancock, D. S. Chapple, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1317-1323. b) F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194-5254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072-5129. c) K. C. Nicolaou, J. S. Chen, D. J. Edmonds, A. A. Estrada, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 670-732; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 660-719.

[5] a) J. M. Willey, W. A. van der Donk, *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477-501. b) G. Biermaum, H.-G. Sahl, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10*, 2-18.

[6] R. A. Hughes, C. J. Moody, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8076-8101; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7930-7954.

[7] a) D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1264-1286; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1172-1193. b) K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2230-2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2096-2152. c) F. Wolter, S. Schoof, R. D. Süssmuth, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *267*, 143-185.

[8] G. N. Rolinson, *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *41*, 589-603.

[9] G. Klebe, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Deutschland, **2009**.

[10] a) G. R. Marshall, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *49*, 3547-3558. b) J. Gante, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780-1802; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1699-1720. c) A. Grauer, B. König, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5099-5111.

[11] a) J. B. Ball, P. F. Alewood, *J. Mol. Recognit.* **2004**, *3*, 55-64. b) J. Cluzeau, W. D. Lubell, *Biopolymers* **2005**, *80*, 98-150.

[12] *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 201-207.

[13] a) R. E. Christoffersen, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1512-1514. b) H. Kresse, M. J. Belsey, H. Rovini, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 19-20.

[14] A. Fleming, *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226-236.

[15] a) U. Gräfe, *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Deutschland, **1992**. b) P. Fernandes, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1497-1503.

[16] H. W. Boucher, G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards Jr., D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett, *Clinical Infectious Diseases* **2009**, *48*, 1-12.

[17] M. R. Barbachyn, C. W. Ford, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2056-2144; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2010-2023.

[18] a) G. Michal (Hrsg.), *Biochemical Pathways*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Deutschland, **1999**. b) J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Deutschland, **2003**.

[19] R. O. Studer, *Prog. Med. Chem.* **1967**, *5*, 1-58.

[20] G. Domagk, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **1935**, *61*, 250-253.

[21] L. A. Mitscher, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 559-592.

[22] P. G. Higgins, A. C. Fluit, F. J. Schmitz, *Curr. Drug Targets* **2003**, *4*, 181-190.

[23] L. Heide, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1241-1250.

[24] *Drugs* **1971**, *1*, 354-398.

[25] I. Chopra, M. Roberts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, 232-260.

[26] J. G. Silva, I. Carvalho, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1101-1119.

[27] T. D. Brock, *Bacteriol. Rev.* **1961**, *25*, 32-48.

[28] L. Katz, G. W. Ashley, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 499-527.

[29] K. Wellington, S. Noble, *Drugs* **2004**, *64*, 1683-1684.

[30] a) K. Munk (Hrsg.), *Grundstudium Biologie: Mikrobiologie*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Deutschland, **2001**. b) G. J. Tortora, B. R. Funke, C. L. Case, *Microbiology: An Introduction*, Pearson Education Inc.: San Francisco, CA, USA, **2004**.

[31] C. Weidenmaier, A. Peschel, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 276-287.

[32] O. Rahman, L. G. Dover, I. C. Sutcliffe, *Trends Microbiol.* **2009**, *17*, 219-225.

[33] J. G. Swoboda, J. Campbell, T. C. Meredith, S. Walker, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 35-45.

[34] C. R. H. Raetz, C. Whitfield, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 635-700.

[35] a) A. L. Koch, *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 673-687. b) T. Schneider, H.-G. Sahl, *Int. J. Med. Microbiol.* **2010**, *300*, 161-169.

[36] J. van Heijenoort, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 300-304.

[37] H. Barreteau, A. Kovaĉ, A. Boniface, M. Sova, S. Gobec, D. Blanot, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 168-207.

[38] A. El Zoeiby, F. Sanschagrin, R. C. Levesque, *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 1-12.

[39] D. Hendlin, E. O. Stapley, M. Jackson, H. Wallick, A. K. Miller, F. J. Wolf, T. W. Miller, L. Chaiet, F. W. Kahan, E. L. Foltz, H. B. Woodruff, J. M. Mata, S. Hernandez, S. Mochales, *Science* **1969**, *166*, 122-123.

[40] J. L. Marquardt, E. D. Brown, W. S. Lane, T. M. Haley, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10646-10651.

[41] J. L. Lynch, F. C. Neuhaus, *J. Bacteriol.* **1965**, *91*, 449-460.

[42] A. Bouhss, A. E. Trunkfield, T. D. H. Bugg, D. Mengin-Lecreulx, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 208-233.

[43] W. Vollmer, D. Blanot, M. A. de Pedro, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 149-167.

[44] a) D. G. McCafferty, P. Cudic, B. A. Frankel, S. Barkallah, R. G. Kruger, W. Li, *Biopolymers* **2002**, *66*, 261-284. b) S. Walker, L. Chen, Y. Hu, Y. Rew, D. Shin, D. L. Boger, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 449-475.

[45] a) B. Cavalleri, H. Pagani, G. Volpe, E. Selva, F. Parenti, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 309-317. b) R. Pallanza, M. Berti, R. Scotti, E. Randisi, V. Arioli, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 318-324.

[46] M. Kurz, W. Guba, *Biochemistry* **1996**, *35*, 12570-12575.

[47] J. B. Hamburger, A. J. Hoertz, A. Lee, R. J. Senturia, D. G. McCafferty, P. J. Loll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 13759-13764.

[48] a) M.-C. Lo, H. Men, A. Branstrom, J. Helm, N. Yao, R. Goldman, S. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3540-3541. b) Y. Hu, J. S. Helm, L. Chen, X.-Y. Ye, S. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8736-8737.

[49] P. Cudic, J. K. Kranz, D. C. Behenna, R. G. Kruger, H. Tadesse, A. J. Wand, Y. I. Veklich, J. W. Weisel, D. G. McCafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 7384-7389.

[50] E. A. Soner, P. E. Reynolds, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 413-419.

[51] http://www.nanotherapeutics.com/products_pipeline_ramoplanin.php (21.02.2011)

[52] a) B. A. Johnson, H. Anker, F. L. Meleney, *Science* **1945**, *102*, 376-377. b) K. J. Stone, J. L. Strominger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1971**, *68*, 3223-3227.

[53] a) N. E. Allen, T. I. Nicas, *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**, *26*, 511-532. b) G. G. Zhanel, D. Calic, F. Schweizer, S. Zelenitsky, H. Adam, P. R. S. Lagacé-Wiens, E. Rubinstein, A. S. Gin, D. J. Hoban, J. A. Karlowsky, *Drugs* **2010**, *70*, 859-886.

[54] R. H. Baltz, V. Miao, S. K. Wrigley, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 717-741.

[55] M. Debono, B. J. Abbott, R. M. Molloy, D. S. Fukuda, A. H. Hunt, V. M. Daupert, F. T. Counter, J. L. Ott, C. B. Carrell, L. C. Howard, L. D. Boeck, R. L. Hamill, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1093-1105.

[56] J. A. Silverman, N. G. Perlmutter, H. M. Shapiro, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2538-2544.

[57] A. Raja, J. LaBonte, J. Lebbos, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 943-944.

[58] R. Sauermann, M. Rothenburger, W. Graninger, C. Joukhadar, *Pharmacology* **2008**, *81*, 79-91.

[59] a) W. Aretz, J. Meiwes, G. Seibert, G. Vonis, J. Wink, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 807-815. b) L. Vértesy, E. Ehlers, H. Kogler, M. Kurz, J. Meiwes, G. Seibert, M. Vogel, P. Hammann, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 816-827.

[60] T. Schneider, K. Gries, M. Josten, I. Wiedemann, S. Pelzer, H. Labischinski, H.-G. Sahl, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1610-1618.

[61] H. C. Neu, *Science* **1992**, *257*, 1064-1073.

[62] a) J.-L. Mainardi, R. Villet, T. D. Bugg, C. Mayer, M. Arthur, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 386-408. b) G. D. Wright, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4055-4061.

[63] a) H. F. Chambers, *Clin. Microbiol. Rev.* **1988**, *1*, 173-186. b) Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 8, 25.02.**2000** und aktualisierte Fassung 09/**2009**. c) H. Grundmann, M. Aires-de-Sousa, J. Boyce, E. Tiemersma, *Lancet* **2006**, *368*, 874-885.

[64] a) M. G. Pinho, S. R. Filipe, H. De Lencastre, A. Tomasz, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 6525-6531. b) M. G. Pinho, H. De Lencastre, A. Tomasz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 10886-10891.

[65] K. Hiramatsu, *Drug Res. Updates* **1998**, *1*, 135-150.

[66] a) R. Maviglia, R. Nestorini, M. A. Pennisi, *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 895-905. b) X.-H. Yu, X.-J. Song, Y. Cai, B.-B. Liang, D.-F. Lin, R. Wang, *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 657-659.

[67] http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=31957 (21.02.2011)

[68] H. C. Maltezou, H. Giamarellou, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *27*, 87-96.

[69] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.

[70] a) F. E. Koehn, G. T. Carter, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 206-220. b) J. Clardy, M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1541-1550. c) M. Salemm, M. Nazir, M. S. Ali, H. Hussain, Y. S. Lee, N. Riaz, A. Jabbar, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 238-254. d) S. Donadio, S. Maffioli, P. Monciardini, M. Sosio, D. Jabes, *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 423-430.

[71] P. G. Williams, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 45-52.

[72] a) C. T. Walsh, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 124-134. b) H. G. Floss, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 242-257. c) C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2469-2493.

[73] J. G. Swoboda, T. C. Meredith, J. Campbell, S. Brown, T. Suzuki, T. Bollenbach, A. J. Malhowski, R. Kishony, M. S. Gilmore, S. Walker, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 875-883.

[74] a) H. Breithaupt, *Nat. Biotechol.* **1999**, *17*, 1165-1169. b) C. T. Walsh, *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 65-70.

[75] a) J. Schimana, K. Gebhardt, A. Höltzel, D. G. Schmid, R. Süssmuth, J. Müller, R. Pukall, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 565-570. b) A. Höltzel, D. G. Schmid, G. J. Nicholson, S. Stevanovic, J. Schimana, K. Gebhardt, H.-P. Fiedler, G. Jung, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 571-577. c) P. Kulanthaivel, A. J. Kreuzman, M. A. Strege, M. D. Belvo, T. A. Smitka, M. Clemens, J. R. Swartling, K. L. Minton, F. Zheng, E. L. Angleton, D. Mullen, L. N. Jungheim, V. J. Klimkowski, T. I. Nicas, R. C. Thompson, S.-B. Peng, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36250-36258.

[76] C. Luo, P. Roussel, J. Dreier, M. G. P. Page, M. Paetzel, *Biochemistry* **2009**, *48*, 8976-8984.

[77] D. Häbich, F. von Nussbaum, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 951-954.

[78] K. J. Weissman, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2929-2931.

[79] S. Brinster, G. Lamberet, B. Staels, P. Trieu-Cuot, A. Gruss, C. Poyart, *Nature* **2009**, *458*, 83-87.

[80] UNAIDS Global report on AIDS epidemic, **2010**.

[81] Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 46, 22.11.**2010**.

[82] D. D. Richman, D. M. Margolis, M. Delaney, W. C. Greene, D. Hazuda, R. J. Pomerantz, *Science* **2009**, *323*, 4277-4283.

[83] a) D. H. Barouch, *Nature* **2008**, *455*, 613-619. b) B. D. Walker, D. R. Burton, *Science* **2008**, *320*, 760-764.

[84] a) F. Barré-Sinoussi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5921-5927; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5809-5814. b) L. Montagnier, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5928-5940; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5815-5826.

[85] a) http://www.schulbuchzentrum-online.de/pdf/978-3-507-10560-7-5-l.pdf (21.02.2011). b) J. LaBonte, J. Lebbos, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 345-346.

[86] a) http://www.hiv-wechselwirkungen.de/media/de/Liste der antiretroviralen Medikamente.pdf (21.02.2011). b) A. Tavassoli, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1337-1346.

[87] D. Hazuda, M. Iwamoto, L. Wenning, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *49*, 377-394.

[88] a) G. B. Melikyan, *Retrovirology* **2008**, *5*, 111-123. b) J. C. Tilton, R. W. Doms, *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 91-100. c) M. Hertje, M. Zhou, U. Dietrich, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1825-1835.

[89] a) E. De Clercq, *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 323-349. b) I. Pal Singh, H. S. Bodiwala, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1781-1800.

[90] P. Dorr, M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, R. Webster, D. Armour, D. Price, B. Stammen, A. Wood, M. Perros, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4721-4732.

[91] a) C. T. Wild, D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, T. J. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 9770-9774. b) J. M. Kilby, S. Hopkins, T. M. Venetta, B. Dimassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, M. S. Saag, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1302-1307.

[92] B. L. Bray, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 586-593.

[93] a) S. S. A. Karim, C. Baxter, *HIV Ther.* **2009**, *3*, 3-6. b) R. W. Buckheit Jr., K. M. Watson, K. M. Morrow, A. S. Ham, *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 142-158.

[94] Q. A. Karim, S. S. A. Karim, J. A. Frohlich, A. C. Grobler, C. Baxter, L. E. Mansoor, A. B. M. Kharsany, S. Sibeko, K. P. Mlisana, Z. Omar, T. N. Gengiah, S. Maarschalk, N. Arulappan, M. Mlotshwa, L. Morris, D. Taylor, *Science* **2010**, *329*, 1168-1174.

[95] a) Hoechst AG (Frankfurt a. M., Deutschland), *Patent* EP 0 848 064 A1, **1999**. b) L. Vértesy, W. Aretz, M. Knauf, A. Markus, M. Vogel, J. Wink, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 374-382.

[96] a) Dissertation Dr. G. Bunkóczi, Georg-August-Universität zu Göttingen **2004**. b) G. Bunkóczi, L. Vértesy, G. M. Sheldrick, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1364-1366; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1340-1342.

[97] F. Colonna-Cesari, S. Premilat, F. Heitz, G. Spach, B. Lotz, *Macromolecules* **1977**, *10*, 1284-1288.

[98] D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1016-1041; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 988-1011.

[99] a) R. D. Hotchkiss, R. D. Dubos, *J. Biol. Chem.* **1940**, *132*, 791-792. b) D. J. Chadwick, G. Cardew, *Gramicidin and Related Ion Channel-Forming Peptides,* Wiley: Chichester, Großbritannien, **1999**.

[100] a) S. B. Hladky, D. A. Haydon, *Nature* **1970**, *225*, 451-453. b) S. B. Hiadky, D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *274*, 294-312. c) V. B. Meyers, D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *274*, 313-322. d) B. M. Burkhardt, N. Li, D. A. Langs, W. A. Pangborn, W. L. Duax, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 12950-12955.

[101] D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2007**, *1768*, 2011-2025.

[102] R. R. Ketchem, B. Roux, T. A. Cross, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 1-14.

[103] B. A. Wallace, *Biophys. J.* **1986**, *49*, 295-304.

[104] a) T. Hamada, T. Sugawara, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 609-612. b) T. Hamada, T. Sugawara, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 719-720. c) T. Hamada, S. Matsunaga, G. Yano, N. Fusetani, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 110-118.

[105] T. Hamada, S. Matsunaga, M. Fujiwara, K. Fujita, H. Hirota, R. Schmucki, P. Güntert, N. Fusetani, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12941-12945.

[106] a) A. Koglin, C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 987-1000. b) M. A. Marahiel, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 799-807. c) R. Finking, M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453-488. d) D. Schwarzer, R. Finking, M. A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 275–287.

[107] a) B. K. Hubbart, M. G. Thomas, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 931-942. b) Dissertation Dr. Suada Turkanović, Technische Universität Berlin **2007**.

[108] O. W. Choroba, D. H. Williams, J. B. Spencer, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5389-5390.

[109] B. Lindblad, G. Lindstedt, S. Lindstedt, M. Rundgren, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 5073-5084.

[110] a) C. M. Farnet, E. Zazopoulos, A. Staffa, *Patent* WO 0231155, **2002**. b) D. G. McCafferty, P. Cudic, B. A. Frankel, S. Barkallah, R. G. Kruger, W. Li, *Biopolymers* **2002**, *66*, 261-284.

[111] a) T.-L. Li, O. W. Choroba, H. Hong, D. H. Williams, J. B. Spencer, *Chem. Commun.* **2001**, 2156-2157. b) A. M. Sandercock, E. H. Charles, W. Scaife, P. N. Kirkpatrick, S. W. O'Brien, E. A. Papageorgiou, J. B. Spencer, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **2001**, 1252-1253. c) V. Pfeifer, G. J. Nicholson, J. Ries, J. Recktenwald, A. B. Schefer, R. M. Shawky, J. Schröder, W. Wohlleben, S. Pelzer, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38370-38377. d) H. Chen, C. C. Tseng, B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 14901-14906. e) B. Wilkinson, J. Micklefield, *Methods in Enzymology* **2009**, *458*, 353-378.

[112] P. F. Widboom, E. N. Fielding, Y. Liu, S. D. Bruner, *Nature* **2007**, *447*, 342-345.

[113] C. C. Tseng, F. H. Vaillancourt, S. D. Bruner, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1195-1203.

[114] a) Dissertation Dr. Frank Dettner, Technische Universität Berlin **2008**. b) F. Dettner, A. Hänchen, D. Schols, L. Toti, A. Nußer, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1888-1893; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1856-1861.

[115] a) C.-X. Fan, X.-L. Hao, Y.-H. Ye, *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 1455-1460. b) H. Li, X. Jiang, Y.-H. Ye, C. Fan, T. Romoff, M. Goodman, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 91-93. c) Y.-H. Ye, H. Li, X. Jiang, *Biopolymers* **2005**, *80*, 172-178.

[116] a) W. Jiang, J. Wanner, R. J. Lee, P.-Y. Bounaud, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5288-5290. b) W. Jiang, J. Wanner, R. J. Lee, P.-Y. Bounaud, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1877-1887. c) D. Shin, D. L. Boger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 11977-11979.

[117] G. Han, M. Tamaki, V. J. Hruy, *J. Peptide Res.* **2001**, *58*, 338-341.

[118] K. C. Nicolaou, A. A. Estrada, M. Zak, S. H. Lee, B. S. Safina, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1402-1406; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1378-1382.

[119] R. Kaul, S. Surprenant, W. D. Lubell, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3838-3844.

[120] D. L. Boger, R. M. Borzilleri, S. Nukui, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3561-3565.

[121] K. L. Reddy, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1207-1217.

[122] a) N. Purdie, H. G. Brittain (Hrsg.), *Techniques and Instrumentations in Analytical Chemistry - Volume 14: Analytical Applications of Circular Dichroism*, Elsevier: Amsterdam, Niederlande, **1994**. b) J. Buchner, T. Kiefhaber (Hrsg.), *Protein Folding Handbook*, WILEY-VCH: Weinheim, Deutschland, **2005**.

[123] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2876-2890.

[124] J. L. Kulp III, T. D. Clark, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11867-11877.

[125] M. Winterhalter, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5*, 250-255.

[126] a) Dissertation Dr. Heiko Maischak, Friedrich-Schiller-Universitat Jena **2010**. b) L.-O. Essen, U. Koert, *Ann. Rep. Prog. Chem., Sect. C* **2008**, *104*, 165-188. c) U. Koert, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 1501-1506. c) U. Koert, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1129-1146.

[127] Quelle: Dr. Philipp Reiß, Philipps-Universität Marburg.

[128] Q. Sattentau, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 815-826.

[129] Quelle: Prof. D. Schols, Rega Institut Leuven, Belgien.

[130] L. Huerta, N. López-Balderas, E. Rivera-Toledo, G. Sandoval, G. Gómez-Icazbalceta, C. Villarreal, E. Lamoyi, C. Larralde, *TheScientificWorldJOURNAL* **2009**, *9*, 746-763.

[131] D. D. Richman, S. A. Bozzette, *Journal of Infectious Diseases* **1994**, *169*, 968-974.

[132] G. Férir, D. Huskens, B. Hoorelbeke, F. Dettner, A. Hänchen, R. D. Süssmuth, D. Schols, *J. Virol.*, in Vorbereitung.

[133] a) E. De Clercq, N. Yamamoto, R. Pauwels, J. Balzarini, M. Witvrouw, K. De Vreese, Z. Debyser, B. Rosenwirth, P. Peichl, R. Datema, D. Thornton, R. Skerlj, F. Gaul, S. Padmanabhan, G. Bridger, G. Henson, M. Abrams, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 668-674. b) M. M. Rosenkilde, L.-O. Gerlach, J. S. Jakobsen, R. T. Skerlj, G. J. Bridger, T. W. Schwartz, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 3033-3041.

[134] a) R. Pauwels, J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter, E. De Clercq, *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309-321. b) C. Pannecouque, D. Daelemans, E. De Clercq, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 427-434.

[135] J. A. Barltrop, T. C. Owen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 611-614.

[136] A. H. Cory, T. C. Owen, J. A. Barltrop, J. G. Cory, *Cancer Commun.* **1991**, *3*, 207-212.

[137] Y. Liu, M. G. Nair, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1193-1195.

[138] a) www.clsi.org. b) "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically"; approved standard-seventh edition, M7-A7 Vol. 26 No. 2, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). c) I. Wiegand, K. Hilpert, R. E. W. Hancock, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 163-175.

[139] X. Fang, J. Nam, D. Shin, Y. Rew, D. L. Boger, S. Walker, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6189-6191.

[140] S. Rausch, A. Hänchen, A. Denisiuk, M. Löhken, T. Schneider, R. D. Süssmuth, *ChemBioChem* **2011**, *8*, 1171-1173.

[141] A. El Zoeiby, F. Sanschagrin, P. C. Havugimana, A. Garnier, R. C. Levesque, *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *201*, 229-235.

[142] E. D. Brown, J. L. Marquardt, J. P. Lee, C. T. Walsh, K. S. Anderson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10638-10645.

[143] H. Jin, J. J. Emanuele Jr., R. Fairman, J. G. Robertson, M. E. Hail, H. T. Ho, P. J. Falk, J. J. Villafranca, *Biochemistry* **1996***, 35*, 1423-1431.

[144] a) P. J. Montoya-Peleaz, J. G. Riley, W. A. Szarek, M. A. Valvano, J. S. Schutzbach, I. Brockhausen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005***, 15*, 1205-1211. b) H. Takaku, J. Sato, H. Ishida, T. Inazu, H. Ishida, M. Kiso, *Glycoconjugate J.* **2006***, 23*, 565-573. c) A. Babič, S. Pečar, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008***, 19*, 2265-2271.

[145] P. Cohen, M. Goedert, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 479-487.

[146] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouységu, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 610-646; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 586-621.

[147] T. Finkel, N. J. Holbrook, *Nature* **2000**, *408*, 239-247.

[148] P. Cos, L. Maes, A. Vlietinck, L. Pieters, *Planta Med.* **2008**, *74*, 1323-1337.

[149] a) M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, *Analyst* **2002**, *127*, 183-198. b) Z.-Q. Lui, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5675-5691.

[150] a) M. S. Blois, *Nature* **1958**, *181*, 1199-1200. b) P. Molyneux, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2004**, *26*, 211-219. c) O. P. Sharma, T. K. Bhat, *Food Chemistry* **2009**, *113*, 1202-1205.

[151] D. Huang, B. Ou, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841-1856.

[152] a) G. Litwinienko, K. U. Ingold, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3433-3438. b) G. Litwinienko, K. U. Ingold, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5888-5896. c) M. C. Foti, C. Daquino, C. Geraci, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2309-2314.

[153] a) H. Musso, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 965-977; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 723-735. b) H. Musso, H. Döpp, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 3627-3643.

[154] S. Mason, *Trends Pharmacol. Sci.* **1986**, *7*, 20-23.

[155] a) B. Martin-Matute, J.-E. Backvall, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226-232. b) A. H. Kamaruddin, M. H. Uzir, H. Y. Aboul-Enein, H. N. A. Halim, *Chirality* **2008**, *21*, 449-467.

[156] a) P. A. Lehmann, *Trends Pharmacol. Sci.* **1986**, *7*, 281-285. b) H. Murakami, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *269*, 273-299.

[157] a) J. M. Stewart, D. W. Woolley, *Nature* **1965**, *206*, 619-620. b) G. Flouret, V. du Vigneaud, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3775-3776. c) K. Vogler, R. O. Studer, W. Lergier, P. Lanz, *Helv. Chim. Acta* **1965**, *48*, 1407-1414. d) D. Wade, A. Boman, B. Wahlin, C. M. Drain, D. Andreu, H. G. Boman, R. B. Merrifield, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 4761-4765. e) R. E. Koeppe II, L. L. Providence, D. V. Greathouse, F. Heitz, Y. Trudelle, N. Purdie, O. S. Andersen, *Proteins* **1992**, *12*, 49-62. f) B. D. Welch, A. P. VanDenmark, A. Heroux, C. P. Hill, M. S. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 16828-16833. g) R. Konno, H. Brückner, A. D'Aniello, G. Fisher, N. Fujii, H. Homma (Hrsg.), *D-Amino Acids: A New Frontier in Amino Acid and Protein Research – Practical Methods and Protocols*, Nova Science Publishers Inc.: Hauppauge, NY, USA, **2007**.

[158] a) R. C. deL. Milton, S. C. F. Milton, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, *256*, 1445-1448. b) L. E. Zawadzke, J. M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4002-4003. c) G. Jung, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1484-1486; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 1457-1459. d) G. A. Petsko, *Science* **1992**, *256*, 1403-1404. e) M. C. Fitzgerald, I. Chernushevich, K. G. Standing, S. B. H. Kent, C. P. Whitman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11075-11080.

[159] A. S. Moffat, *Science* **1992**, *256*, 309-310.

[160] A. Rosowsky, R. A. Forsch, R. G. Moran, W. Kohler, J. H. Freisheim, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1326-1331.

[161] S. Wang, B. F. Gisin, D. P. Winter, R. Makofske, I. D. Kulesha, C. Tzougraki, J. Meienhofer, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1286-1290.

[162] G. M. Salituro, C. A. Townsend, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 760-770.

[163] H. Henke, *J. Chromatogr.* **1983**, *254*, 296-308.

[164] a) G. P. Lorenzi, L. Tomasic, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8322-8323. b) M. Sastry, C. Brown, G. Wagner, T. D. Clark, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10650-10651.

[165] F. Heitz, A. Heitz, Y. Trudelle, *Biophys. Chem.* **1986**, *24*, 149-160.

[166] a) A. G. Beck-Sickinger, H. A. Wieland, H. Wittneben, K.-D. Willim, K. Rudolf, G. Jung, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 947-958. b) J. P. Tam, W. Liu, J.-W. Zhang, M. Galantino, F. Bertolero, C. Cristiani, F. Vaghi, R. de Castiglione, *Peptides* **1994**, *15*, 703-708. c) L. Quatara, R. Ricci, S. Meini, R. Patacchini, A. Giolitti, S. Amadesi, C. Rizzi, A. Rizzi, K. Varani, P. A. Borea, C. A. Maggi, D. Regoli, *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 1001-1010. d) P. Nicole, L. Lins, C. Rouyer-Fessard, C. Drouot, P. Fulcrand, A. Thomas, A. Couvineau, J. Martinez, R. Brasseur, M. Laburthe, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 24003-24012. e) G. Corzo, J. K. Sabo, F. Bosmans, B. Billen, E. Villegas, J. Tytgat, R. S. Norton, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4643-4652. f) J. Nam, D. Shin, Y. Rew, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8747-8755.

[167] L. Chen, Y. Yuan, J. S. Helm, Y. Hu, Y. Rew, D. Shin, D. L. Boger, S. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7462-7463.

[168] A. S. Ulrich, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *46*, 1-21.

[169] a) K. V. R. Reddy, R. D. Yedery, C. Aranha, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *24*, 536-547. b) O. Toke, *Biopolymers* **2005**, *80*, 717-735.

[170] a) D. O'Hagan, H. S. Rzepa, *Chem. Commun.* **1997**, 645-652. b) B. E. Smart, *J. Flourine Chem.* **2001**, *109*, 3-11.

[171] D. Maisch, P. Wadhwani, S. Afonin, C. Böttcher, B. Koksch, A. S. Ulrich, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15596-15597.

[172] a) P. K. Mikhailiuk, S. Afonin, A. N. Chernega, E. B. Rusanov, M. O. Platonov, G. G. Dubinina, M. Berditsch, A. S. Ulrich, I. V. Komarov, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5787-5789; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5659-5661. b) S. Afonin, P. K. Mikhailiuk, I. V. Komarov, A. S. Ulrich, *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 614-623.

[173] a) R. W. Glaser, C. Sachse, U. H. N. Dürr, P. Wadhwani, A. S. Ulrich, *J. Magn. Reson.* **2004**, *168*, 153-163. b) P. Wadhwandi, J. Bürck, E. Strandberg, C. Mink, S. Afonin, A. S. Ulrich, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16515-16517.

[174] S. L. Grage, J. Wang, T. A. Cross, A. S. Ulrich, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 3336-3350.

[175] M. S. T. Gonçalves, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190-212.

[176] a) K. L. Holmes, L. M. Lantz, *Methods Cell Biol.* **2001**, *63*, 185-204. b) B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, *312*, 217-224. c) H. M. O'Hare, K. Johnsson, A. Gautier, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 488-494.

[177] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579-2619.

[178] a) P. Kele, G. Sui, Q. Huo, R. M. Leblanc, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4959-4963. b) M.-P. Brun, L. Bischoff, C. Garbay, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3514-3518; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3432-3436.

[179] W. R. Croasmun, R. M. K. Carlson (Hrsg.), *Two-Dimensional NMR Spectroscopy, Second Edition*, VCH Publishers Inc.: New York, NY, USA, **1994**.

[180] Dissertation Dr. Máté Erdélyi, Universität Uppsala **2004**.

[181] a) N. J. Baxter, M. P. Williamson, *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 359-369. b) T. Cierpicki, J. Otlewski, *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 249-261.

[182] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.

[183] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 519-538.

[184] a) D. Neuhaus, M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH Publishers Inc.: New York, NY, USA, **1989**. b) D. F. Mierke, H. Kessler, *Biopolymers* **1993**, *33*, 1003-1017. c) F. Castiglione, A. Marazzi, M. Meli, G. Colombo, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 603-610. d) H.-D. Höltje, W. Sippl, D. Rogan, G. Folkers, *Molecular Modeling, Basic Principles and Applications*, WILEY-VCH: Weinheim, Deutschland, **2008**. e) A. Kukol, *Molecular Modeling of Proteins*, Humana Press: Totowa, NJ, USA, **2008**.

[185] V. Monnet, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2100-2114.

[186] A. Hiron, E. Borezée-Durant, J.-C. Piard, V. Juillard, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 5119-5129.

[187] a) J. S. Fedan, G. K. Hogaboom, J. P. O'Donnell, *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 1167-1180. b) S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479-12529.

[188] a) G. D. Prestwich, G. Dormán, J. T. Elliott, D. M. Marecak, A. Chaudhary, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 222-234. b) K. Wright, A. Moretto, M. Crisma, M. Wakselman, J.-P. Mazaleyrat, F. Formaggio, C. Toniolo, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3281-3286.

[189] A. Ruzin, G. Singh, A. Severin, Y. Yang, R. G. Dushin, A. G. Sutherland, A. Minnick, M. Greenstein, M. K. May, D. M. Shlaes, P. A. Bradford, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 728-739.

[190] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 616-624.

[191] B. Lomenick, R. W. Olsen, J. Huang, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 34-46.

[192] J. E. Bandow, H. Brötz, L. I. O. Leichert, H. Labischinski, M. Hecker, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 948-955.

[193] a) M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 523-529; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1969**, *8*, 492-499. b) M. Chorev, M. Goodman, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 266-273. c) M. D. Fletcher, M. M. Campbell, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 763-795.

[194] J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Advanced Practical Organic Chemistry*, CRC Press Taylor Francis Group: Boca Raton, FL, USA, **1998**.

[195] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

[196] *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 9-37.

[197] J. R. Pfeifer, P. Reiß, U. Koert, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 515-518; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 501-504.

[198] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biol. Mass. Spectrom.* **1984**, *11*, 601.