Synthese und Untersuchung von Methanobactinderivaten als neue Wirkstoffe gegen Morbus Wilson

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Lukas Daniel Schaaf, M.Sc.

2023

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Plettenburg
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kirschning
Tag der Promotion: 15. März 2022

Für Christin

VERTRAULICHKEITSHINWEIS

Dieses Dokument ist streng vertraulich zu behandeln und darf ohne Zustimmung des Helmholtz Zentrum München-Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt GmbH (HMGU) nicht der Öffentlichkeit zugänglich gemacht oder an Dritte weitergegeben werden. Auch die Veröffentlichung des Inhalts, ganz oder teilweise z. B. in Form von Vorträgen, Postern oder wissenschaftlichen Artikeln, bedarf der Zustimmung des HMGU.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Lukas Daniel Schaaf

Synthese und Untersuchung von Methanobactinderivaten als neue Wirkstoffe gegen Morbus Wilson

Schlagworte: Morbus WILSON, Kupferspeicherkrankheit, Methanobactin, Thioamid, Oxazolon, bioaktive Sonde, Totalsynthese, Naturstoffmodifikation, Thiopeptid, *Disulfide-Rebridging*, *in vivo* Bildgebung

Morbus WILSON (MW) ist eine autosomal rezessive Stoffwechselerkrankung, bei der eine Mutation des sogenannten „WILSON-Gens“ einen Defekt der Kupfer-transportierenden ATPase ATP7B hervorruft. Infolgedessen kommt es zu einer Akkumulation von Kupfer vorwiegend in der Leber, die sowohl eine schwerwiegende Schädigung dieses Organs als auch neurologische Defekte verursacht. Die zur Behandlung von MW bereits zugelassenen Therapieansätze auf Grundlage von niedermolekularen Chelatoren und der Gabe von Zink-reicher Nahrung zeigen nur eine eingeschränkte Wirksamkeit bei schweren Verläufen. Mit dem Ziel, einen neuartigen Therapieansatz zu entwickeln, wurde in vorangegangen Studien gezeigt, dass Methanobactin OB3b ein potentieller Wirkstoff gegen MW sein kann. Bei diesem Naturstoff handelt es sich um einen Vertreter von ribosomal produzierten, posttranslational modifizierten, peptidischen Kupfer-Chelatoren aus methanotrophen Bakterien. Diese Moleküle zeichnen sich durch eine außerordentlich hohe Affinität gegenüber diesem Metallion aus, die zu den höchsten, jemals in biologischen Systemen gemessenen gehört.

Das Ziel dieser Arbeit war es, synthetische Studien zu Methanobactin OB3b durchzuführen. Dabei sollten zunächst strukturvereinfachte Naturstoffderivate als neue Wirkstoffe gegen MW ergänzend zu Methanobactin OB3b hergestellt werden. Darauf aufbauend sollte ein totalsynthetischer Ansatz von Methanobactin OB3b entwickelt werden. Eine besondere Herausforderung stellte die Synthese der Kupfer-Koordinationsmotive in Form von Enthiol-substituierten Oxazolonen dar. Ein weiteres Ziel war die Modifikation des Naturstoffes, um daraus bioaktive Sonden zu gewinnen, die für die Aufklärung des Wirkmechanismus in biologischen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden können.

Im ersten Teil der Arbeit wird die erfolgreiche Synthese von strukturvereinfachten Naturstoffderivaten dargelegt. Es wurde eine Strategie erarbeitet, ein geschütztes Oxazolon über ein Thioamid mit einem Disulfid-enthaltenen Oligopeptid zu verknüpfen.

Darüber hinaus werden in dem anschließenden Kapitel Fragmente einer möglichen Totalsynthese von Methanobactin OB3b beschrieben. In ersten Versuchen konnte die Verbindung zweier Fragmente und eine weitere Funktionalisierung erzielt werden.

Abschließend wird die Naturstoffmodifikation von Methanobactin OB3b mittels *Disulfide-Rebridging* diskutiert. Im Weiteren wurden aus dem modifizierten Naturstoff bioaktive Sonden erhalten, mit denen auf zellulärer Ebene eine zeitabhängige Lokalisation in den Lysosomen nachgewiesen werden konnte. Mithilfe von *in vivo* Bildgebungsverfahren wurde eine zeitlich aufgelöste Bioverteilung in athymischen Mäusen ermittelt und eine bevorzugte Anreicherung in der Leber der Tiere sowie eine renale Exkretion der eingesetzten Sonde nachgewiesen.

ABSTRACT

Lukas Daniel Schaaf

Synthesis and investigation of methanobactin derivatives as novel agents against Wilson´s disease

Key words: WILSON's disease, copper storage disease, methanobactin, thioamide, oxazolone, bioactive probes, total synthesis, natural product modification, thiopeptide, disulfide-rebridging, *in vivo* imaging

WILSON's disease (MW) is an autosomal recessive metabolic disorder in which a mutation of the so-called "WILSON gene" causes a defect of the copper-transporting ATPase ATP7B. As a result, copper accumulates mainly in the liver, causing both severe organ damages and neurological defects. The therapeutic approaches already approved based on small molecule chelators and the administration of zinc-rich food show only limited efficacy in severe courses. With the aim of developing a novel therapeutic option, previous studies have shown that methanobactin OB3b may be a potential agent against MW. This natural product is a representative of ribosomally produced, posttranslationally modified, peptide copper chelators from methanotrophic bacteria. These molecules are characterized by exceptionally high affinity to this metal ion, which is among the highest ever measured in biological systems.

The aim of this work was to perform synthetic studies on methanobactin OB3b. First, structurally simplified natural product derivatives were to be prepared as new active substances against MW complementary to methanobactin OB3b. Based on this, a total synthetic approach of methanobactin OB3b was to be developed. The synthesis of the copper coordination motifs in the form of enthiol-substituted oxazolones posed a particular challenge.Another goal was to modify the natural product to obtain bioactive probes that can be used to elucidate the mechanism of action in biological studies *in vitro* and *in vivo*.

In the first part of the presented thesis, the successful synthesis of structurally simplified natural product derivatives is described. A strategy was worked out to link a protected oxazolone to a disulfide-containing oligopeptide via a thioamide.

In addition, the fragments of a possible total synthesis of methanobactin OB3b are outlined in the subsequent chapter. In initial experiments, a linkage of two fragments followed by further transformations could be achieved.

In the final chapter, the natural product modification of methanobactin OB3b by disulfide-rebridging is discussed. Furthermore, bioactive probes were obtained from the modified natural product, which could be used to detect time-dependent localization in lysosomes at the cellular level. Using *in vivo* imaging techniques, a time-resolved bio-distribution in athymic mice was determined and a preferential accumulation in the liver of the animals as well as a renal excretion of the applied probe was demonstrated.

DANKSAGUNG

Zunächst einmal möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Plettenburg für sein Vertrauen in mich trotz des durchaus holprigen Bewerbungsgespräches im Vorfeld bedanken. Es hat mich äußerst motiviert, eine Dissertation auf diesem bisher synthetisch unerforschten und extrem spannenden Gebiet anzufertigen. Ich bedanke mich herzlich für die hervorragende Betreuung, die es mir ermöglicht hat, dieses herausfordernde Thema zu bearbeiten. Außerdem bin ich sehr dankbar dafür, in einem interdisziplinären Feld gearbeitet und viel Neues gelernt zu haben. Neben den fachlichen Belangen danke ich ihm für die Unterstützung hinsichtlich meines weiteren Berufsweges und für die wertvollen Tipps zum Beispiel für die Gestaltung meines Lebenslaufs.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Andreas Kirschning für die Übernahme des Korreferats bedanken, wie auch bei Prof. Dr. Thomas Scheper, dass er den Prüfungsvorsitz trotz seines nahenden Ruhestands noch übernommen hat.

Des Weiteren geht mein Dank an Dr. Gerrit Jürjens, ohne den bei uns im Arbeitskreis gar nichts laufen würde. Sei es bei der Betreuung von Geräten, der Organisation von Seminaren oder einfach bei den täglichen Fragen rund um die praktische Arbeit im Labor. Ich habe speziell durch seine fachliche Expertise Einiges an Wissen in organischer Synthese hinzugewonnen, sodass ich sicherlich in Zukunft besser auf kommende Vorstellungsgespräche vorbereitet bin. Ich bedanke mich außerdem dafür, dass er am Ende meine Doktorarbeit Korrektur gelesen hat, was ihm sicherlich nicht immer ganz leicht gefallen ist.

Mein Dank gilt weiterhin meinen Kooperationspartnern für die aufwendige Durchführung der biologischen Untersuchungen und der radiochemischen Synthesen sowie für die Bereitstellung der Daten: Yaschar Kabiri, Prof. Dr. Hans Zischka, Dr. Michael Willmann, Prof. Dr. Tobias Ross, Hannes Rolbieski und Dr. Oliver Bruns.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Maik Siebke bedanken, der mich bei der Entwicklung der Totalsynthese tatkräftig unterstützt hat.

Unserem technischen Angestellten Felix Neure verdanke ich die zügige Bestellung von Chemikalien und unserer Sekretärin Valerie Gießelmann danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und für die Übernahme zahlreicher Organisationsangelegenheit, ohne die wir im Arbeitskreis ziemlich aufgeschmissen wären.

Ebenso bedanke ich mich bei der NMR- und Massenspektrometrie-Abteilung des Instituts für Organische Chemie für ihre ausgezeichnete Arbeit, ihre Hilfsbereitschaft bei allen technischen und analytischen Fragestellungen und für die zügige Messung aller Service-Aufträge. Dabei geht ein besonderer Dank an Dr. Gerald Dräger, der immer mit Rat und Tat zur Seite stand und an Dr. Jörg Fohrer, der mich außerdem in Sachen Eintracht-Anhängerschaft unterstützt hat.

Ich möchte dem gesamten AK Plettenburg und AK Jürjens für die tolle Zeit danken, die ich in den letzten Jahren hier verbracht habe. Unser Miteinander war immer von einer kollegialen Atmosphäre und einer guten Zusammenarbeit geprägt, was leider durch die Corona-Pandemie ein wenig in Mitleidenschaft gezogen wurde.
Speziell geht hierbei mein Dank an alle aktuellen und ehemaligen Kollegen in 340: Anna Luisa Warnke, Fabian Brunswig, Huilong Ma, Haydn Ball. Ich werde unseren legendären (und grauenhaften) Musikmix vermissen! Bei allen meinen Praktikanten und meinen Masteranden Fabian Brunswig und Lennart Spickschen bedanke ich mich für ihre tolle Mitarbeit. Die Betreuung hat mir viel Spaß bereitet und mir selber Vieles gelehrt.

Für das Korrekturlesen danke ich außerdem Fabian Brunswig, Yaschar Kabiri, Dr. Michael Willmann und Dr. Marvin Jeldrik Böhm.

Am Ende geht ein Riesendankeschön an meine Familie und meine Freunde. Ihr habt mir unendlich viel Rückhalt gegeben und mich auf dem ganzen Weg bis hierhin begleitet. Ohne Euch hätte ich das so nicht geschafft!

Es gibt noch einen Menschen, dem ich gar nicht genug danken kann. Du bereicherst jeden Tag mein Leben und stehst mir in allen Lagen zur Seite. Gerade in der letzten, sehr anstrengenden Phase meiner Doktorarbeit hast Du mich eigentlich in Allem unheimlich unterstützt.
Ich bin so froh, dass ich Dich habe! Danke Chrissi!

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$[\propto]_D^T$	Drehwert bei *T* mit Natrium D Linie
Å	Angström (10^{-10} m)
AAC	Alkin-Azid-Cycloaddition
Abs.	Absorption
Ac	Acetyl
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
Ala	Alanin
All	Allyl
Alox	Aluminiumoxid
APCI	Atmospheric pressure chemical ionisation
APT	Attached Proton Test
aq.	wässrig
Äq.	Äquivalente
Ar	Aryl
Arg	Arginin
ASM	Sauren Sphingomyelinase
AST	Aspartat-Aminotransferase
Asp	Asparaginsäure
Atox1	*Antioxidant1 copper chaperone*
ATP	Adenosintriphosphat
B	Allgemeine Base
BCA	2,2-Bicinchoninat
BCS	Bathocuproindisulfonat
BINOL	1,1′-Bi-2-naphthol
Bn	Benzyl
Boc	*Tert*-Butyloxycarbonyl
brsm	Basierend auf rückgewon-nenem Startmaterial
BTFFH	Fluor-*N,N,N′,N′*-bis(tetramethylen)formamidinium Hexafluorophosphat
*n*Bu	*n*-Butyl
Bz	Benzoyl
C(x)	Kette mit x C-Atomen
cat.	katalytisch
C_q	Quartäres C-Atom
CCO	Cytochrom-*c*-Oxidase
CCS	*Copper chaperone for superoxide dismutase*
CDI	1,1‘-Carbonyldiimidazol
Co	Kontrolle
COMMD1	*Copper Metabolism MURR1 Domain-containing 1*
Ctr1	Kupfertransporter 1
Cy	Cyclohexyl
Cy-5	Cyanin-5
Cys	Cystein
d	Dublett
δ	Chemische Verschiebung
DBCO	Dibenzocyclooctin
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAD	Azodicarbonsäurediethylester
d.h.	das heißt
$\Delta H_{Diss,298}$	Dissoziationsenthalpie bei 298 K
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIPEA	*N,N*-Diisopropylethylamin
4-DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMDO	Dimethyldioxiran
DMF	*N,N*-Dimethylformaid
DMP	Dess-Martin Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DR	*Disulfide-Rebridging*
DTT	Dithiothreitol
E°	Standardpotential
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylamin-propyl)carbodimid
ee	Enantiomeren Überschuss
EE	Ethylacetat
EEDQ	*N*-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
EI	Elektronenstoßionisation
Em	Emission
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
et al.	*et alii* (und andere)
Ex	Anregung
F_{254}	Fluoreszenz bei 254 nm

Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
ges.	Gesättigt
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HATU	*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- TU
HBTU	*O*-(Benzotriazol-1-yl)-TU
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2	Humane Leberkrebszelllinie G2
His	Histidin
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruck LC
HR	Hochauflösend
HSAB	Hard and soft acids and bases
*i*Bu	*Iso*-Butyl
Ile	Isoleucin
Im	Imidazolyl
Imi	Imidazolon
i.p.	Intraperitoneal
*i*Pr	*Iso*-propyl
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
J	Kopplungskonstante
K_b	Bindekonstante
konz.	konzentriert
LC	Flüssigchromatographie
LLS	Längste lineare Sequenz
LM	Lösungsmittel
Leu	Leucin
LR	LAWESSON-Reagenz
Lys	Lysin
M	Molar
m	Multiplett
m	meta
M.Sc.	Master of Science
m/z	Masse zu Ladung Verhältnis
MB	Methanobactin
mBBr	Monobrombiman
Me	Methyl
Met	Methionin
MMO	Methanmonoxygenase
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl-*tert*butylether
MTPA	MOSHER-Säure
MW	Morbus WILSON
n.b.	Nicht bestimmt
NBS	*N*-Bromsuccinimid
NIR	Nahinfrarot
NMM	*N*-Methylmorpholin
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NPys	2-Nitropyridinsulfenyl
Nu	Allgemeines Nukleophil
o	ortho
opt.	Optische
OSu	*N*-Oxysuccinimid
Oxa	Oxazolon
Oxyma	Hydroxyiminocyanessigsäuree-thylester
p	para
PAB	*p*-Azidobenzyl
PB	Phosphat Puffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol-Kette
Pen	*D*-Penicillamin
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PG	Allgemeine Schutzgruppe
Ph	Phenyl
Phe	Phenylalanin
PI	Nach der Injektion
PK	Pharmakokinetik
PMB	*p*-Methoxybenzyl
pMMO	Partikuläre MMO
Pro	Prolin
Py	Pyridin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
PyDiFOP	4,6-Bistrifluormethyl-PyBOP
PyFOP	6-Trifluormethyl-PyBOP
PyFNOP	6-Nitro-4-Trifluormethyl-PyBOP
PyNOP	6-Nitro-PyBOP
Pyr	Pyrrolidin
Pyra	Pyrazindiol
q	Quartett
quant.	quantitativ
R	Allgemeiner Rest
R_f	Retentionsfaktor
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
RiPP	Ribosomal produziertes, posttranslational modifiziertes Peptid

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
Rot.	Rotation
s	Singulett
*s*Bu	*sec*-Butyl
SDS	Natriumlaurylsulfat
Ser	Serin
sMMO	Lösliche MMO
SOD	Superoxid-Dismutase
SPAAC	„Strain-promoted“ AAC
Su	Succinimid
SWIR	Kurzwelliges Infrarotlicht
t	Triplett
TASF	Tris(dimethylamino)sulfonium difluortrimethylsilikat
*t*Bu	*tert*-Butyl
TBAF	Tributylammoniumfluorid
TBS	*Tert*-Butyldimethylsilyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
Teoc	2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl
TETA	Tetraethylentetramin
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TFE	1,1,1-Trifluorethanol
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TIC	*Total ion count*
TIPS	Triisopropylsilyl
TMS	Trimethylsilyl
TMSE	(2-Trimethylsilyl)ethyl
TMU	Tetramethylurea
t_r	Retenstionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Trt	Triphenylmethyl
Ts	Toluolsulfonyl
TSA	Toluolsulfonsäure
TTM	Tetrathiomolybdat
TU	*N*,*N*,*N*′,*N*′-Tetramethyluronium Hexafluorophosphat
Tyr	Tyrosin
U	Unbehandelte Co
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VIS	Sichtbar
VKER	Verseifung-Kupplung-Eintopfreaktion
Vol	Volumen
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

INHALTSVERZEICHNIS

Widmung III
Vertraulichkeitshinweis V
Kurzzusammenfassung VII
Abstract VIII
Danksagung IX
Abkürzungsverzeichnis XI
Inhaltsverzeichnis XIV
1 Einleitung 18
1.1 Humaner Kupfermetabolismus 18
1.1.1 Aufnahme von Kupfer in den Körper 18
1.1.2 Verteilung und Regulation von Kupfer im Körper 20
1.1.3 Toxikologische Relevanz von Kupfer 22
1.2 Morbus WILSON 23
1.2.1 Pathogenese 23
1.2.2 Klinische Befunde und Diagnose 24
1.3 Etablierte Behandlungsmethoden gegen Morbus Wilson 27
1.4 Methanobactine 29
1.4.1 Methanotrophe Bakterien 29
1.4.2 Struktur und Eigenschaften bekannter Methanobactine 30
1.4.3 Biosynthese der Methanobactine 34
1.5 Methanobactin als Wirkstoff gegen Morbus WILSON 35
1.5.1 *Ex vivo* Untersuchungen mit Atp7b-*knock-out* Ratten[23] 35
1.5.2 *In vivo* Untersuchungen mit Atp7b-*knock-out* Ratten[23] 37
2 Zielsetzung der Dissertation 40
2.1 Synthese strukturvereinfachter Naturstoffderivate 41
2.2 Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu **MB OB3b** 43
2.3 Synthese und Anwendung **MB OB3b**-basierter Sonden 45
3 Ergebnisse und Diskussion 46
3.1 Synthese strukturvereinfachter Naturstoffderivate 46
3.1.1 Retrosynthetische Analysen 46
3.1.2 Synthese des modifizierten Penicillamins **11** mit einem CH_2-Linker 50
3.1.3 Synthese des modifizierten Penicillamins **21** mit einem C_2H_4-Linker 52
3.1.4 Synthese des Tetrapeptids **12** 54
3.1.5 Verknüpfung der modifizierten Penicillamine mit dem Tetrapeptid **12** 55

3.1.6 Synthese und Verseifung des Oxazolesters **9** 61
3.1.7 Synthese des Thioamids durch Thioacylierungsmethoden 62
3.1.8 Modifizierte Retrosynthese 71
3.1.9 Synthese des Thioamids Ph-Oxa(OEt)-CSNH-Gly-OMe **85** und Alkylierung zu verschiedenen Thioimidaten 75
3.1.10 Synthese des Tripeptids **106** 79
3.1.11 Verknüpfung der modifizierten Penicillamine mit dem Tripeptid **106** 80
3.1.12 Reaktionen der Thioimidate mit verschiedenen Peptiden 84
3.1.13 Sukzessive Entfernung der Schutzgruppen der Me-Thioimidate 90
3.1.14 Bestimmung der Cu-Affinität mittels UV-VIS Titration 102
3.2 Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu **MB OB3b** 112
3.2.1 Retrosynthetische Analysen 112
3.2.2 Synthese des Pyr-substituierten Oxazols durch Funktionalisierung eines 2-Me-Oxazols 117
3.2.3 Synthese von **158** durch die Funktionalisierung eines Chloroacetamids 120
3.2.4 Asymmetrische Allylierung von **158** zu Homoallylalkohol **166** 121
3.2.5 Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OEt **156** aus **166** 130
3.2.6 Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OMe)-OMe **194** durch eine Rh-katalysierte [3+2]-Cycloaddition 133
3.2.7 Synthese von *i*Bu-CH(OTBS)-Oxa(OMe)-OMe **202** 136
3.2.8 Synthese der Oxazol-Me-Thioimidate 138
3.2.9 Synthese der peptidischen Fragmente von **MB OB3b** 146
3.2.10 Verknüpfung der Me-Thioimidate mit den peptidischen Fragmenten 147
3.2.11 Weiterführende retrosynthetische Analysen anderer bekannter Methanobactine 149
3.3 Synthese und Anwendung **MB OB3b**-basierter Sonden 152
3.3.1 Verwendung von **MB OB3b(Zn)** als Ausgangsverbindung für weitere chemische Modifikationen 152
3.3.2 Modifikation der Cys im Peptidrückgrat 155
3.3.3 *Disulfide-Rebridging* zur Modifikation von **MB OB3b(Zn)** 158
3.3.4 Verknüpfung des modifizierten Naturstoffes mit DBCO-tragenden Markern 172
3.3.5 Anwendung der verschiedenen Sonden in biologischen Untersuchungen 187
4 Zusammenfassung und Ausblick 207
4.1 Synthese strukturvereinfachter Naturstoffderivate 207
4.2 Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu **MB OB3b** 211
4.3 Synthese und Anwendung **MB OB3b**-basierter Sonden 215
4.4 Überblick über die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse 219
5 Experimenteller Teil 220

5.1 Allgemeines ... 220
5.1.1 Arbeitstechniken, Materialien und Reagenzien ... 220
5.1.2 Analyse- und Aufreinigungsmethoden ... 222
5.1.3 Allgemeine Vorschriften für chemische und biologische Arbeiten ... 225
5.2 Synthese strukturvereinfachter Naturstoffderivate ... 235
5.2.1 Synthese des modifizierten Penicillamins **11** mit einem CH_2-Linker ... 235
5.2.2 Synthese des modifizierten Penicillamins **21** mit einem C_2H_4-Linker ... 242
5.2.3 Synthese des Tetrapeptids **12** ... 244
5.2.4 Verknüpfung der modifizierten Penicillamine mit dem Tetrapeptid **12** ... 246
5.2.5 Synthese und Verseifung des Oxazolesters **9** ... 261
5.2.6 Synthese des Thioamids durch Thioacylierungsmethoden ... 263
5.2.7 Synthese des Thioamids Ph-Oxa(OEt)-CSNH-Gly-OMe **85** und Alkylierung zu verschiedenen Thioimidaten ... 278
5.2.8 Synthese des Tripeptids **106** ... 283
5.2.9 Verknüpfung der modifizierten Penicillamine mit dem Tripeptid **106** ... 285
5.2.10 Reaktionen der Thioimidate mit verschiedenen Peptiden ... 298
5.2.11 Sukzessive Entfernung der Schutzgruppen der Me-Thioimidate ... 312
5.2.12 Bestimmung der Cu-Affinität mittels UV-VIS Titration ... 328
5.3 Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu **MB OB3b** ... 331
5.3.1 Synthese des Pyr-substituierten Oxazols durch Funktionalisierung eines 2-Me-Oxazols ... 331
5.3.2 Synthese von **158** durch Funktionalisierung eines Chloroacetamids ... 333
5.3.3 Asymmetrische Allylierung von **158** zum Homoallylalkohol **166** ... 337
5.3.4 Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OEt **156** aus **166** ... 349
5.3.5 Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OMe)-OMe **194** durch eine Rh-katalysierte [3+2]-Cycloaddition ... 353
5.3.6 Synthese von *i*Bu-CH(OTBS)-Oxa(OMe)-OMe **202** ... 354
5.3.7 Synthese der Oxazol-Me-Thioimidate ... 356
5.3.8 Synthese der peptidischen Fragmente von **MB OB3b** ... 371
5.3.9 Verknüpfung der Me-Thioimidate mit den peptidischen Fragmenten ... 374
5.4 Synthese und Anwendung **MB OB3b**-basierter Sonden ... 377
5.4.1 Verwendung von **MB OB3b(Zn)** als Ausgangsverbindung für weitere chemische Modifikationen ... 377
5.4.2 Modifikation der Cys im Peptidrückgrat ... 378
5.4.3 *Disulfide Rebridging* zur Modifikation von **MB OB3b(Zn)** ... 380
5.4.4 Verknüpfung des modifizierten Naturstoffes mit DBCO-tragenden Markern ... 387
5.4.5 Anwendung der verschiedenen Sonden in biologischen Untersuchungen ... 397

6 Anhang 400
6.1 NMR-Spektren 400
6.2 HPLC Chromatogramme 481
6.3 UV-VIS Titrationen 534
7 Literaturverzeichnis 536
8 Inhaltsverzeichnis zu 6 Anhang 548
Lebenslauf 549
Publikationen 550
Betreute Abschlussarbeiten 551

1 EINLEITUNG

1.1 HUMANER KUPFERMETABOLISMUS

Kupfer (Cu) ist aufgrund seiner ausgeprägten Redox-Aktivität für die meisten aeroben Organismen ein essentielles Element. In ionischer Form kann es leicht zwischen den Oxidationsstufen +I (Cu^{+}) und +II (Cu^{2+}) wechseln (E° = 0.16 V).[1] Im Hinblick auf seine entscheidende Rolle als katalytischer und struktureller Cofaktor in vielen Enzymen (z.B. Cytochrom-*c*-Oxidase (CCO) und Cu/Zn Superoxid-Dismutase (SOD)), wird in diesem einleitenden Kapitel dessen Aufnahme, Verteilung und Regulation im menschlichen Körper beschrieben.[2]

1.1.1 Aufnahme von Kupfer in den Körper

Der Körper eines durchschnittlichen männlichen Erwachsenen enthält ca. 100 mg Cu, die im Gewebe (1 µg/g < *c*(Cu) < 10 µg/g) und im Blut (ca. 1.0 µg/mL) unterschiedlich verteilt sind. Innerhalb des Blutes liegt Cu hauptsächlich in der Oxidationsstufe +II vor, während nach einer Aufnahme in die Zellen die Oxidationsstufe +I durch eine Bindung an Proteine stabilisiert wird.[3] Zur Aufrechterhaltung der mit dem Spurenelement verbundenen biochemischen Prozesse muss der Mensch über die Nahrung ungefähr 1.0-1.5 mg Cu pro Tag aufnehmen (**Abbildung 1**).[4] Einen besonders hohen Anteil an Cu weisen dabei dunkle Schokolade, Cashewkerne oder Rinderleber auf.

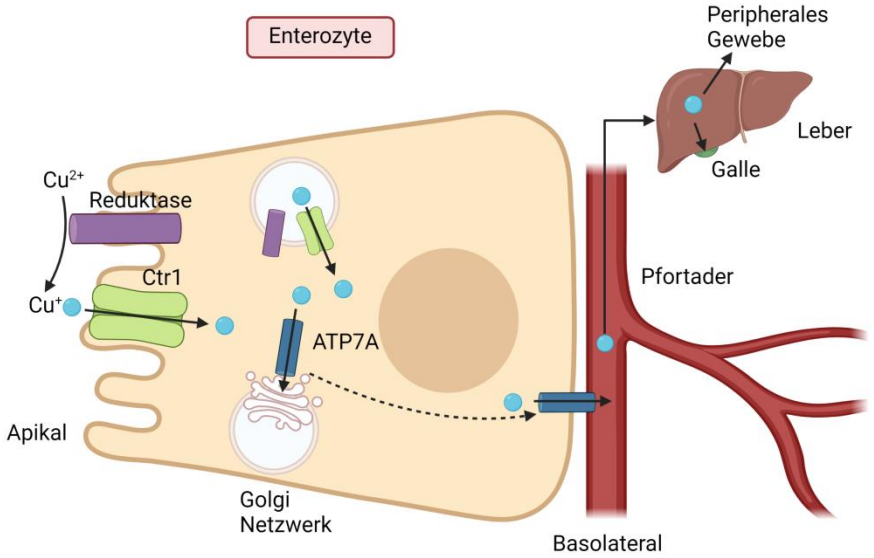


***Abbildung 1**: Intestinale Cu-Aufnahme über den Kupfertransporter 1 (Ctr1, grün) und periphere Verteilung mithilfe der ATPase ATP7A (blau) über die Pfortader gebunden an verschiedene Transportproteine L in die Leber nach KIM et. al. und erstellt mit biorender.com.*[1]

Die Aufnahme findet über die apikale Zellmembran der im Dünndarmepithel vorhandenen Enterozyten statt und ist in **Abbildung 1** schematisch dargestellt.

Der für diesen Prozess verantwortliche Transporter ist der Kupfertransporter 1 (Ctr1, grün in **Abbildung 1**) der als integrales Membranprotein in allen eukaryotischen Zellen konserviert ist.[5] Dieser besitzt eine Selektivität für Cu^{+}. Über die Nahrung wird jedoch größtenteils Cu^{2+} aufgenommen. Obwohl dies noch nicht abschließend geklärt ist, wird angenommen, dass Cu^{2+} über membranständige Metalloreduktasen vor der Aufnahme reduziert wird. Die Interaktion dieser Enzyme mit Ctr1 konnte sowohl in Hefezellen[6] als auch in menschlichen Zellen[7] nachgewiesen werden. Zur Regulation der Cu-Aufnahme kann der Ctr1 Transporter zu endosomalen Kompartimenten (z.B. Vesikeln) hin wandern.[8] Nach Aufnahme in die Enterozyten wird Cu durch sogenannte Metallochaperone entweder zum Beladen der kupferabhängigen Enzyme gebracht oder durch die basolaterale Membran mithilfe der ATPase ATP7A (dunkelblau in **Abbildung 1**) in die Pfortader überführt. Eine Mutation dieses Enzyms führt zu der sogenannten MENKES-Erkrankung.

Über die Pfortader wird Cu, nachdem es an Proteine wie Albumin, alpha2-Makroglobulin oder Transcuprein gebunden wurde, zur weiteren Verteilung in die Leber transportiert. Dieses Organ weist die höchste Konzentration an Cu im Körper auf (ca. 15-50 µg/g) und stellt den zentralen Ort der Cu-Homöostase dar.[9]

1.1.2 Verteilung und Regulation von Kupfer im Körper

Die Aufnahme von Cu in die Hepatozyten erfolgt wie zuvor über Ctr1 (**Abbildung 2**). Durch verschiedene Liganden, wie das *Copper chaperone for superoxide dismutase* (CCS) und das *Antioxidant 1 copper chaperone* (Atox1), wird es dann unter anderem zur Cu/Zn SOD, zum Mitochondrium oder zur ATPase ATP7B transportiert.

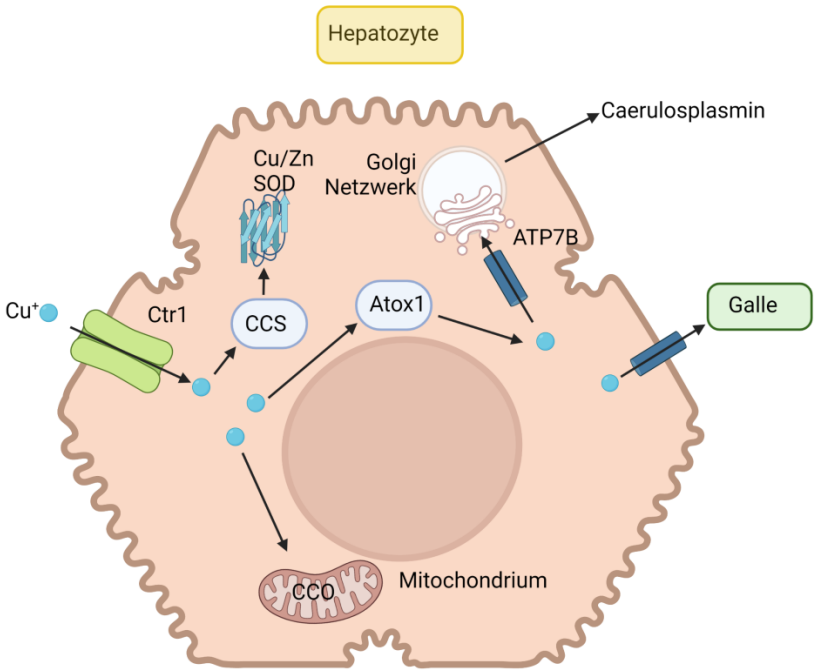


***Abbildung 2**: Cu-Aufnahme in die Hepazozyte, Verteilung in die Organellen und Sekretion über die ATPase ATP7B (blau) zur biliären Exkretion und zur Bindung an Caeruloplasmin nach Kim et. al . und erstellt mit biorender.com.*[1]

Abgesehen von diesen Transportprozessen ist wenig über die Lagerung und die Mobilisierung von Cu innerhalb der Zelle bekannt. Neben intrazellulären Vesikeln als potentielle Depots (vgl. **Abbildung 1**) gibt es Hinweise darauf, dass Lysosome[6] und Mitochondrien[10] ebenfalls als Cu-Speicher verwendet werden können.

Die ATPase ATP7B (dunkelblau in **Abbildung 2**) stellt das in der Leber vorkommende und im Golgi-Netzwerk lokalisierte Pendant zu dem oben beschriebenen ATP7A dar und vermittelt die Bindung von Cu an die zur Ausscheidung vorgesehenen Proteine (**Abbildung 2**). In diesem Zusammenhang ist die Bindung an die Multi-Cu Ferroxidase Caeruloplasmin hervorzuheben, die eine wichtige Rolle im Eisen-Metabolismus spielt, da sie die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} katalysiert.[11] Dieses Protein kann bis zu acht Cu^{2+}-Ionen binden. Nach erfolgreicher Sekretion wird das beladene Caeruloplasmin in den Blutkreislauf abgegeben, sodass ungefähr 90 % des im Serum vorhanden Cu daran gebunden sind.[12]

Ein weiteres wichtiges Transportprotein, mit dem ATP7B interagiert, ist das *Copper Metabolism MURR1 Domain-containing 1* (COMMD1).[13] Über dieses kann überschüssiges Kupfer in die Galle ausgeschieden werden, wo es gebunden an Gallensalze nicht erneut durch den enterohepatischen Kreislauf resorbiert werden kann. Mechanistisch übernimmt COMMD1 dabei zwei Aufgaben (**Abbildung 3**).[14] Einerseits sorgt es dafür, dass ATP7B vom Trans-Golgi-Netzwerk, einem Teil des Golgi-Netzwerks, in zytosolische Vesikel überführt wird. Dort sorgt ATP7B für die Aufnahme des in den Hepatozyten angereicherten Kupfers. Über Exozytose werden die Ionen final in die Galle überführt. Andererseits reguliert es die Stabilität von ATP7B durch Ubiquitinierung und proteosomalen Abbau im Fall einer Mutation oder einer falschen Faltung des Transporters. Letzteres ist für das Verständnis der Pathogenese von Morbus WILSON (MW) wichtig (vgl. 1.2.1).

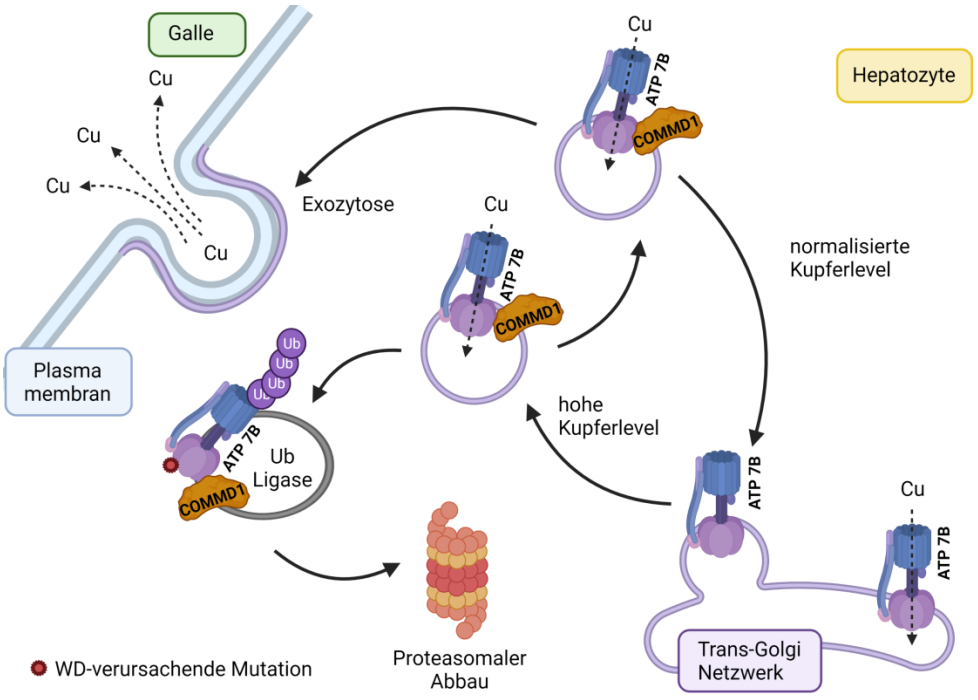
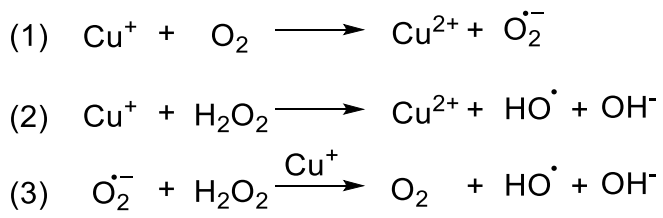


***Abbildung 3**: Detaillierte Darstellung der Exkretion von Cu durch Interaktion von COMMD1 (gelb) mit ATP7B (lila) und proteosomaler Abbau des Transporters durch Ubiquitinierung nach RIERA-ROMO und erstellt mit biorender.com.*[14]

1.1.3 Toxikologische Relevanz von Kupfer

In den vorangegangenen Abschnitten ist deutlich geworden, dass Cu nach der Aufnahme in die Zelle fast ausschließlich proteingebunden vorliegt. Übersteigt die Konzentration der Cu-Ionen einen Schwellenwert können diese nicht mehr durch die dafür vorgesehenen Proteine gebunden werden und verursachen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch die in **Schema 1** dargestellten Reaktionen.[15]



***Schema 1**: Cu^+-induzierte Bildung von ROS.[15]*

Einerseits werden durch die Reaktion mit O_2 Superoxidradikale gebildet (Reaktion 1 in **Schema 1**), die in einem weiteren Schritt mit H_2O_2 unter Cu^+-Katalyse äußerst reaktive Hydroxylradikale in der sogenannten Haber-Weiss-Reaktion bilden können (Reaktion 3 in **Schema 1**). Andererseits kann Cu^+ in einer Fenton-Reaktion direkt mit H_2O_2 zu Hydroxylradikalen und Hydroxidanionen reagieren (Reaktion 2 in **Schema 1**). Speziell die Hydroxylradikale gehen unvermittelt eine Folgereaktion mit den vorhandenen Biomolekülen (Proteine, Lipide, etc.) ein. Trotz der zellulären Mechanismen gegen oxidativen Stress (z. B. Cu/Zn SOD) und einer Reduktion der ROS durch die zellulären Antioxidantien, wie Glutathion oder Ascorbinsäure, führt die erhöhte Cu-Konzentration zu irreversiblen Zellschäden. Neben dieser Schädigung durch die ROS sind weitere bekannte toxische Wirkungen von Cu die Veränderung des Lipid-Stoffwechsels[16], die Veränderung der hepatischen Genexpression[17] und die Induktion der hepatischen Apoptose[18]. Auf die organspezifischen Schäden wird im nachfolgenden Kapitel weiter eingegangen.

1.2 MORBUS WILSON

1.2.1 Pathogenese

Morbus WILSON (MW) als autosomal rezessive Störung des Kupfermetabolismus wurde zum ersten Mal 1912 von dem britischen Physiologen SAMUEL A. K. WILSON beschrieben.[19] Diese Kupferspeicherkrankheit wird durch eine Mutation des sogenannten „WILSON-Gens“ auf dem 13. Chromosom hervorgerufen, das die unter 1.1.2 beschriebene, in der Leber vorkommenden ATPase ATP7B codiert. Mit einer weltweiten Prävalenz von 1 : 30000 gehört MW zu den seltenen genetisch vererbbaren Krankheiten.

Obwohl die Variabilität der Mutationen sehr groß ist und mehrere Hundert verschiedene beschrieben worden sind, kommt im mitteleuropäischen Raum die H1069Q-Mutation am häufigsten vor (ca. 40 %).[19] In Folge dieser Mutation wird in der Aminosäuresequenz von ATP7B His durch Glu ausgetauscht, wodurch eine korrekte Phosphorylierung der ATPase nicht mehr erfolgen kann.[20] Eine in Asien häufig auftretende Mutation betrifft die Aminosäure Arg an Position 778.[21] Es ist bekannt, dass diese einen Austausch von Arg durch die Aminosäuren Leu oder Trp verursacht. Auf dem amerikanischen Kontinent tritt neben der H1069Q-Mutation eine Deletion der Aminosäure Ala an Position 1135 mit gesteigerter Häufigkeit auf.

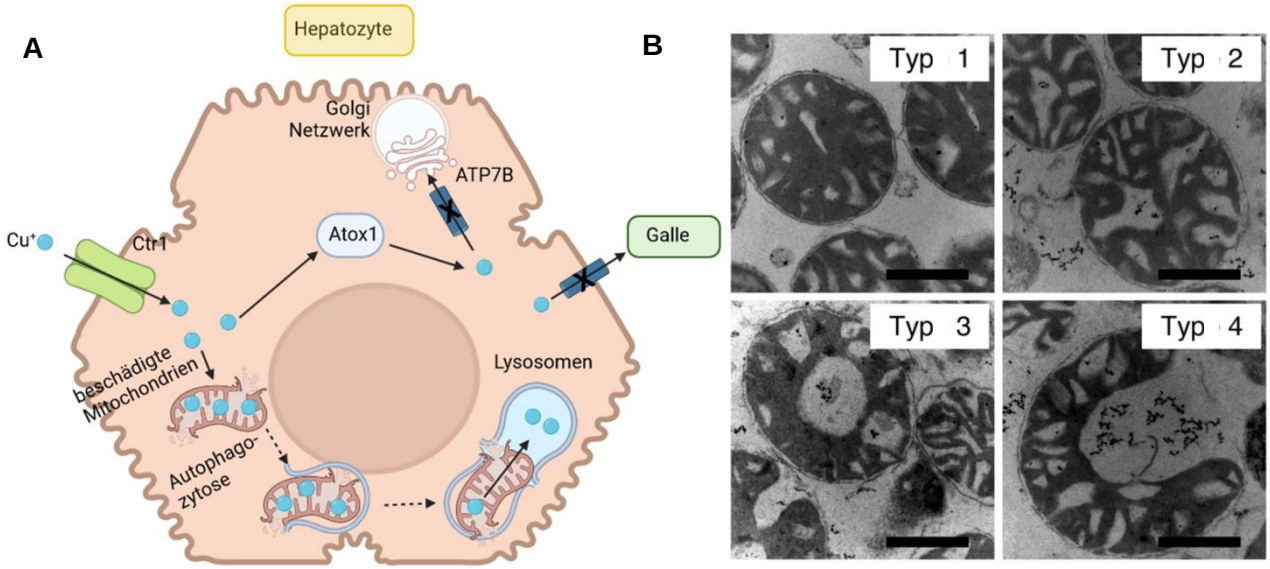


Abbildung 4: A: *Schematische Darstellung einer Hepatozyte im Fall von MW inklusive einhergehender Autophagie beschädigter Mitochondrien nach POLISHCHUK et al. und erstellt mit biorender.com;* ***B:*** *Vergleich normal strukturierter (Typ 1 & 2) mit beschädigten (Typ 3 & 4) Mitochondrien aus Atp7b-defiziären Ratten (Maßstabsbalken: 500 nm) nach LICHTMANNEGGER et al..*[22,23]

Infolge dieser vielfältigen Mutationen wird der dysfunktionale Kupfertransporter nach Ubiquitinierung dem proteosomalen Abbau unterzogen (siehe **Abbildung 3** in 1.1.2). Dies führt wiederum dazu, dass Cu in den Hepatozyten akkumuliert wird, da dieses nicht mehr über die in 1.1.2 beschriebenen Exkretionswege aus der Zelle befördert werden kann (**Abbildung 4** A).

Die überschüssigen Metallionen sammeln sich im Zytosol an und verursachen durch die unter 1.1.3 erwähnten toxischen Effekte Schäden an Zellorganellen durch Reaktion mit den verschiedenen Biomolekülen. Insbesondere am Mitochondrium lassen sich diese eindrucksvoll beobachten (**Abbildung 4** B). Mittels Autophagozytose der beschädigten Organellen in die Lysosomen versuchen die Hepatozyten, die nicht mehr mögliche Exkretion von Cu durch Speicherung in anderen Kompartimenten auszugleichen (vgl. 1.1.2).[22] Ab dem Zeitpunkt der Erschöpfung dieser Speicherungsmöglichkeiten ergeben sich demzufolge Leberzellschäden, die in einer Funktionsstörung des Organs und in den weiteren Manifestationen von MW münden.

1.2.2 Klinische Befunde und Diagnose

Aufgrund der unter 1.2.1 beschriebenen Pathogenese ist eine hepatische Dysfunktion der häufigste klinische Befund von MW.[20] Davon abgesehen gibt es ein großes Spektrum an betroffenen Teilen des Körpers (z. B. ZNS, Niere, Auge, Herz, Magen-Darm-Trakt), mit einer Vielzahl an verschiedenen Symptomen, die unterschiedlich schwer ausfallen können.[19] Dies lässt aufgrund des essentiellen Charakters von Cu für viele Stoffwechselprozesse nachvollziehen (vgl. 1.1). In den meisten Fällen manifestiert sich die Krankheit zwischen dem zehnten und dem dreißigsten Lebensjahr. Generell lassen sich eine akute und eine chronische Verlaufsform unterscheiden.

Erstere wird bei 5-10 % der Fälle und eher bei jungen Frauen beobachtet.[20] Dabei tritt bei einem augenscheinlich gesunden Patienten ein akutes Leberversagen begleitet von einer COOMBS-negativen (ohne Bildung von Antikörpern gegen Erythrozyten) hämolytischen Anämie auf.[24] Diese Anämie wird durch eine spontane Freisetzung großer Mengen von in der Leber gespeichertem Cu aus den nekrotischen Hepatozyten verursacht (vgl. 1.2.1). Das in die Blutbahn übertretende Cu führt im Anschluss zu einer Zerstörung der Membran der Erythrozyten und zu einer Zersetzung der darin enthaltenen Enzyme und des Hämoglobins. Bei diesem Fall verläuft die Krankheit unbehandelt oft innerhalb kurzer Zeit tödlich.

Einem chronischen Verlauf geht zumeist eine asymptomatische Lebervergrößerung voraus, die sich in eine chronische Hepaptits und schließlich in eine Leberzirrhose weiter entwickelt.[20]

Neben den hepatischen zählen die neurologischen Symptome zu den wichtigsten klinischen Befunden. Letztere treten bei 40-60 % der Fälle meist unabhängig von den hepatischen Symptomen und etwas später, zwischen dem fünfzehnten und dem dreißigsten Lebensjahr, auf.[20] Diese sind zunächst mild und beinhalten einen leichten Tremor, Sprachschwierigkeiten oder eine Mikrographie (kleine Handschrift).[25] Verursacht werden die Symptome durch einen Transport des Cu nach einer Freisetzung aus der initial betroffenen Leber über das Blut in das ZNS gefolgt von einer Akkumulation im Gehirn. In einem fortgeschrittenen Stadium werden progressive Bewegungsstörungen und ein irreversibler Verlust neuronaler Funktionen beobachtet, die bis zu einer Bewegungs- und Sprachunfähigkeit führen können.

Wegen der Heterogenität der klinischen und laborchemischen Befunde ist eine eindeutige Diagnose der MW oftmals schwierig. In diesem Zusammenhang stellen jedoch die sogenannten KAYSER-FLEISCHER-Ringe einen deutlichen Hinweis auf die Kupferspeicherkrankheit dar (**Abbildung 5**).

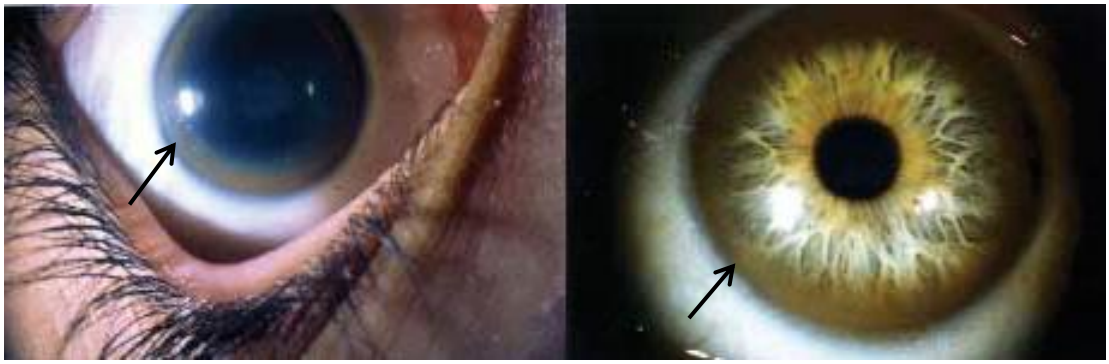


***Abbildung 5**: KAYSER-FLEISCHER-Ringe in der Peripherie der Kornea bei einer Spaltlampenuntersuchung nach SCHMIDT.*[19]

Diese ein bis drei Millimeter breiten grünbraunen, rötlichen oder goldbraunen Ringe kommen aufgrund von Cu-S Verbindungen am Rand der Kornea (Hornhaut) bei ca 80 % aller Erkrankten vor und begleiten zu 95 % die neurologischen und nur im fortgeschrittenen Stadium die hepatischen Symptome.[19]

Zur weiteren Vereinfachung des Nachweises der Krankheit wurde im Rahmen einer Konsensuskonferenz im Jahr 2001 ein diagnostischer Bewertungsrahmen aufgestellt (**Tabelle 1**).[26] Bei einer Addition der entsprechenden „Leipzig-*scores*" der beobachteten Symptome spricht ein Wert > 3 für eine wahrscheinliche Diagnose, ein Wert von 3 für eine mögliche Diagnose bei weiterer indizierter Testung und ein Wert < 3 für eine unwahrscheinliche Diagnose.

Unter den aufgelisteten Parametern sind die oben bereits erwähnten KAYSER-FLEISCHER-Ringe, die Serum- und Urindiagnostik und die Leberbiopsie hervorzuheben, da die Konzentrationen von Cu und Caeruloplasmin im Serum erniedrigt sind, während die Konzentration von Cu im Urin in der Leber erhöht ist.[20] Mithilfe einer Kombination der Ergebnisse unter Berücksichtigung der entsprechenden *scores* kann eine Diagnose gestellt weden. Eine Mutationsanalyse würde zwar die MW mit Sicherheit nachweisen, ist aber aufgrund der unter 1.2.1 erwähnten Vielzahl an Mutationen nicht praktikabel.

Tabelle 1: *Diagnostischer Leipzig-score zur Beurteilung einer Erkrankung an MW nach FERENCI et al..*[26]

Parameter	*Score*	Parameter	*Score*
KAYSER-FLEISCHER Ringe		**Cu in Lebertrockenmasse**	
Vorhanden	2	> 250 µg/g	2
Fehlend	0	50-250 µg/g	1
		Normal (15-50 µg/g)	-1
Neurologische Symptome		**Cu im Sammelurin**	
Schwer	2	> 200 µg/d	2
Mild	1	100-200 µg/d	1
Fehlend	0	Normal (< 30 µg/d)	0
Caeruloplasmin im Serum		**ATP7B Mutationsanalyse**	
< 0.1 g/L	2	Mutation auf beiden Allelen	4
0.1-0.2 g/L	1	Mutation auf einem Allel	1
Normal (> 0.2 g/L)	0	Keine Mutation	0
COOMBS-neg. hämolyt. Anämie			
Vorhanden	2		
Fehlend	0		

Nachdem bei einem Patienten MW festgestellt wurde, sind derzeit verschiedenen Therapieformen indiziert. Einen Überblick über den Stand der Behandlungsmöglichkeiten wird im nächsten Abschnitt gegeben.

1.3 Etablierte Behandlungsmethoden gegen Morbus Wilson

Sobald die Diagnose der MW erfolgte, muss die Therapie unmittelbar und unabhängig von den Symptomen begonnen werden. Um eine effiziente Entkupferung des Körpers zu ermöglichen und die Cu-Homöostase wieder herzustellen, ist eine lebenslange und vor allem ununterbrochene Behandlung notwendig, da ansonsten eine Verschlechterung des Krankheitsbildes droht.[27]

Im Wesentlichen ist in einem sequentiellen Schema zunächst eine effektive Entfernung des im Körper akkumulierten Cu gefolgt von einer dauerhaften Erhaltungstherapie inklusive Cu-armer Ernährung vorgesehen.

Für die erste Phase mit einer negativen Cu-Bilanz werden daher zugelassene Cu-Chelatoren (**Abbildung 6**) eingesetzt, die einen stabilen und renal exkretierbaren Komplex bilden, bis die Cu-Konzentrationen wieder den normalen Werten entsprechen (vgl. **Tabelle 1**).

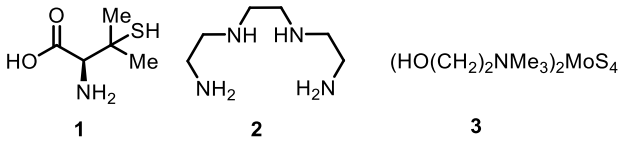


***Abbildung 6**: Kupferchelatoren Pen **1**, Triethylentetramin **2**, Cholin-Tetrathiomolybdat **3**.*

Für die zweite Phase werden Zinksalze (150 mg/d in drei Einzeldosen) eingesetzt, die die Synthese des endogenen Cu-Chelators Metallothionein in den Enterozyten induzieren und somit die Absorption von Cu aus der Nahrung hemmen, da es nicht mehr an die ATPase ATP7A abgegeben wird. (vgl. 1.1.1).[20] Im Fall einer akuten Erkrankung, beziehungsweise bei einer zu starken Leberschädigung ist eine Lebertransplantation indiziert.[28] Mithilfe der damit verbundenen Beseitigung des Gendefekts (vgl. 1.2.1) ist es möglich, die Krankheit zu heilen.[29] Da es aber schwierig ist, eine geeignete Spenderleber zu finden, wird dieser Ansatz oft nur als letzte Option in Betracht gezogen.

D-Penicillamin **1** (D-PA, Pen) war lange Zeit die erste orale Therapieoption.[30] Im Fall von hepatischen Verläufen kann durch eine initiale Zieldosis von 20 mg/kg Körpergewicht verteilt auf zwei bis vier Einzeldosen ein Therapieerfolg bei bis zu 90 % der Patienten erzielt werden. Im Fall von neurologischen Verläufen gelingt dies aber nur bei etwa 50 %. In einigen Fällen konnte sogar eine Verschlechterung der Symptome beobachtet werden.[31] Darüber hinaus besitzt **1** ein nicht unerhebliches Nebenwirkungsspektrum, das unter anderem Knochenmarksdepressionen beinhaltet.

Außer **1** wird Triethylentetramin **2** (TETA) eingesetzt, das deutlich verträglicher ist und bei einer initialen oralen Zieldosis von 1200-1800 mg/d verteilt auf zwei bis drei Einzeldosen ähnlich effektiv wie **1** ist.[32] Wie auch schon bei **1** beobachtet kann es bei einer Behandlung mit **2** ebenfalls zu einer Verschlechterung der neurologischen Symptome kommen. Um diese generellen Nebenwirkungen zu vermindern, besteht die Möglichkeit, nach Jahren der Entkupferung die Dosis der beiden Chelatoren zu verringern.

Der Komplexbildner Cholin-Tetrathiomolybdat **3** (TTM) konnte zu einer Therapie von Patienten mit neurologischem Verlauf erfolgreich eingesetzt werden, ohne dass eine Verschlechterung der Symptome eintrat.[33] Wegen toxikologischer Bedenken gegenüber der schwermetallhaltigen Verbindung ist diese für den oralen Einsatz zur Behandlung der MW bisher nicht zugelassen.

Aufgrund der zuvor aufgeführten Punkte wird ersichtlich, dass die zur Initialtherapie verwendeten Chelatoren **1**-**3** schwerwiegende Nebenwirkungen besitzen und das Krankheitsbild teilweise sogar noch verschlechtern können. Außerdem können diese bei dem akuten Verlauf der Krankheit und bei einer zu starken Leberschädigung nicht mehr verwendet werden. Daher besteht ein ausgesprochener Bedarf für eine neuartige Initialtherapie der MW.

In diesem Zusammenhang können natürlich vorkommende Cu-Chelatoren einen wichtigen Beitrag leisten. Insbesondere Methanobactine, die von methanotrophen Bakterien produziert werden, sind sehr starke und spezifische Cu-Binder. Da sie sich unter diesem Aspekt hervorragend als Wirkstoffe für eine Initialtherapie eignen würden, wird im nächsten Abschnitt auf diese Substanzklasse näher eingegangen.

1.4 METHANOBACTINE

1.4.1 Methanotrophe Bakterien

Die Oxidation von Methan zu Methanol stellt aufgrund der außerordentlich starken CH-Bindung ($\Delta H_{Diss,298}$ = 105 kcal/mol) eine thermodynamisch stark gehemmte Umsetzung dar.[34] In der Natur wird diese Reaktion als erster Schritt im Metabolismus von sogenannten methanotrophen Bakterien unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Diese Organismen verwenden Methan als ihre einzige Energie- und Kohlenstoffquelle.[35]

Um die hohe Aktivierungsenergie dieser Reaktion herabzusetzen und diese bei Umgebungstemperaturen durchführen zu können, verwenden methanotrophe Bakterien Methanmonooxygenasen (MMOs) als Metalloenzyme. Von dieser Enzymklasse gibt es zwei strukturell stark unterschiedliche Formen.[36] Die erste, sogenannte partikuläre Form (pMMO) wird von allen Methanotrophen außer *Methylocella silvestris* BL2 produziert und kommt in den Mikroorganismen als integrales Membranprotein vor. Darüber hinaus produzieren einige Stämme eine im Cytoplasma gelöste Form (sMMO). Im aktiven Zentrum der sMMOs befindet sich nicht Häm-gebundenes Eisen als redox-aktives Metallion, während pMMOs Kupfer an dieser Stelle besitzen.[37] Bei Organismen, wie zum Beispiel *Methylococcus capsulatus* und *Methylosinus trichosporium* OB3b, die beide Formen exprimieren können, wird durch einen „copper switch“ bei niedrigen Cu-Konzentrationen unter 1 µM im Medium bevorzugt sMMO hergestellt, während bei Werten über 5 µM die Synthese von pMMO erfolgt.[38] Im Allgemeinen besitzen Methanotrophe durch die Anwesenheit von drei Cu-Ionen im aktiven Zentrum der pMMOs einen erhöhten Bedarf, dieses Metallion aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Diese Enzyme sind teilweise so stark exprimiert, dass sie bis zu einem Viertel der zellulären Proteinmassen ausmachen können.

Um den gesteigerten Bedarf zu stillen, produzieren die Bakterien Siderophor-ähnliche Naturstoffe, die als Chalkophore (griechisch: Kupferträger) bezeichnet werden.[39] Ein wichtiger Vertreter dieser Verbindungen stellt die Klasse der Methanobactine (MBs) dar.

1.4.2 Struktur und Eigenschaften bekannter Methanobactine

Bei MBs handelt es sich um ribosomal produzierte, posttranslational modifizierte Peptide (RiPPs). Seit der Aufklärung der Kristallstruktur des von *Methylosinus trichosporium* OB3b hergestellten **MB OB3b**s durch Kim *et. al.* im Jahr 2004[40] wurden insgesamt sechs weitere MBs isoliert und strukturell charakterisiert (**Abbildung 7**).[41]

Alle MBs enthalten stickstoffhaltige Heterozyklen mit einem benachbarten Thioamid als Cu-koordinierende Einheiten. Es lassen sich jedoch zwei Gruppen unterscheiden, die jeweils Naturstoffe mit verschiedenen Strukturelementen enthalten.

Gruppe I enthält drei Vertreter (**MB OB3b, MB LW4, MB NR3K**), die allesamt aus *Methylosinus* Stämmen gewonnen wurden.[41] **MB OB3b** ist das am besten untersuchte Methanobactin, dessen Struktur mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie bestimmt wurde.[40,42] Die Struktur von **MB LW4**[43] wurde mithilfe von NMR-Spektroskopie und die Struktur von **MB NR3K**[44] durch Röntgenkristallographie aufgeklärt. Am N-Terminus der Oligopeptidsequenz ist entweder ein Oxazolon (Oxa)- oder ein Pyrazindiol (Pyra)-Ring zu finden. Die andere Koordinationseinheit in Richtung des C-Terminus enthält immer einen Oxa-Ring. Ein weiteres Merkmal dieser Gruppe ist, dass alle Verbindungen über eine intramolekulare Disulfidbindung verfügen, die nach Koordination eines Cu-Ions eine bizyklische und räumlich eng um das Zentralion gewundene Struktur ermöglicht (**Abbildung 8** A).

Gruppe II enthält vier Vertreter (**MB SB2, MB SV97, MB CSC1, MB M**), die allesamt aus *Methylocystis* Stämmen gewonnen wurden.[41] Die Struktur des am längsten bekannten Methanobactins der Gruppe II **MB SB2**[45] wurde auf Grundlage NMR-spektroskopischer Untersuchungen bestimmt, während die restlichen Naturstoffe[46] dieser Klasse durch Röntgenkristallographie charakterisiert wurden. Am N-Terminus der Oligopeptidsequenz ist entweder ein Imidazolon (Imi)- oder ein Pyra-Ring zu finden. Wie auch in Gruppe I ist die andere Koordinationseinheit immer ein Oxa.

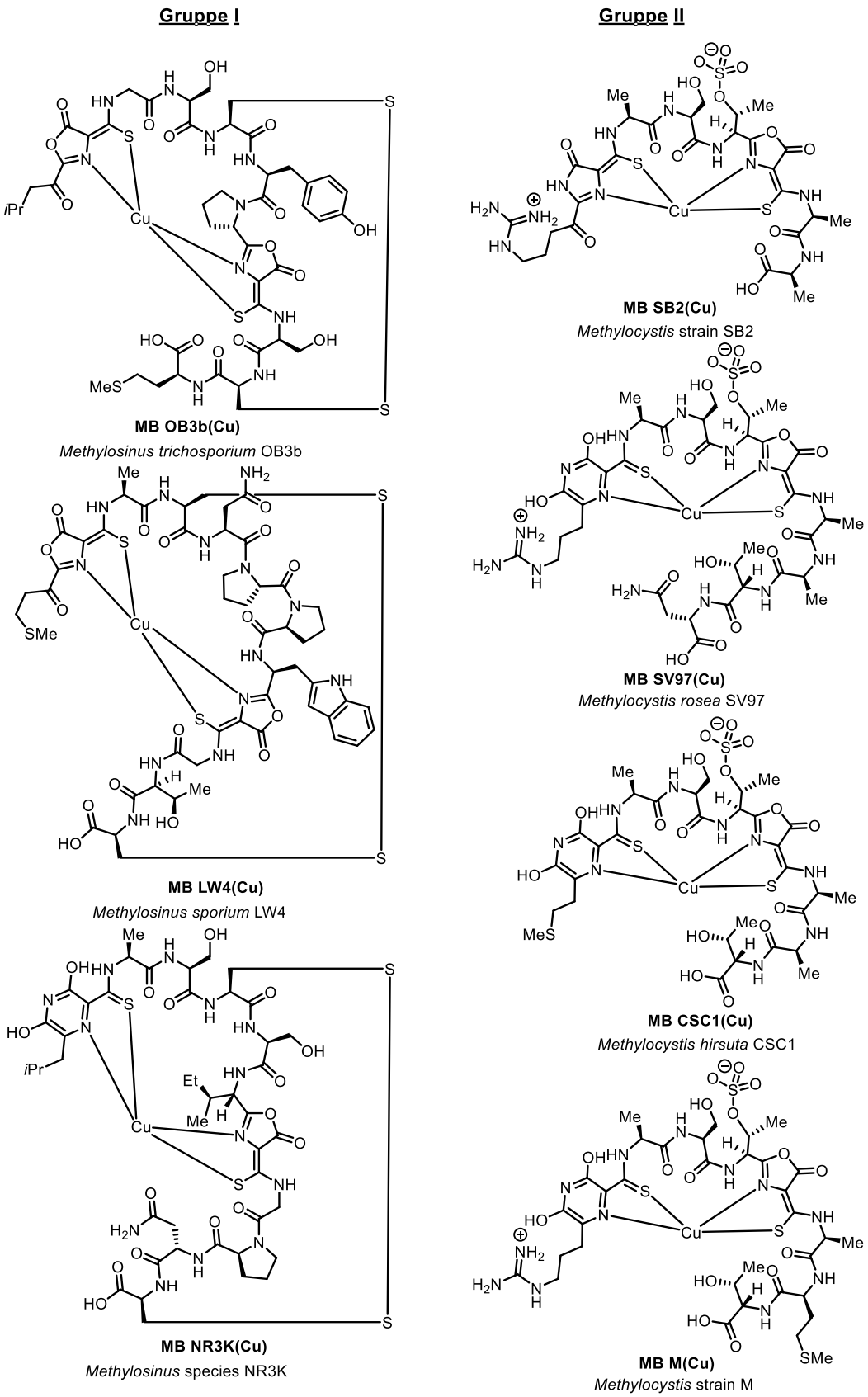


Abbildung 7: *Strukturen aller bekannten MBs und Zuordnung zu den produzierenden Methanotrophen unterteilt in Gruppe I mit intramolekularer Disulfidbindung und Gruppe II mit sulfatiertem Thr.*[41]

Ein weiteres, hochkonserviertes Merkmal ist die Verknüpfung der Heterozyklen durch die Aminosäuresequenz Alanin (Ala), Serin (Ser), Sulfato-Threonin (Thr(OSO_3)), was die strukturgebende Rolle analog zu dem intramolekularen Disulfid der Substanzen aus Gruppe I übernimmt. Durch eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Ser und dem Thr(OSO_3) wird auch bei den Verbindungen der Gruppe II nach Koordination von Cu eine enge räumliche Anordnung um das Zentralion sichergestellt (**Abbildung 8** B). Im Gegensatz zu Gruppe I lässt sich in der C-terminalen Peptidsequenz eine Häufung von zwei Aminosäuren (d.h. Ala und Thr) feststellen, wodurch die Chelatoren der Gruppe II insgesamt eine konserviertere Struktur besitzen. Als nächstes werden die Eigenschaften als Chelatoren näher beleuchtet.

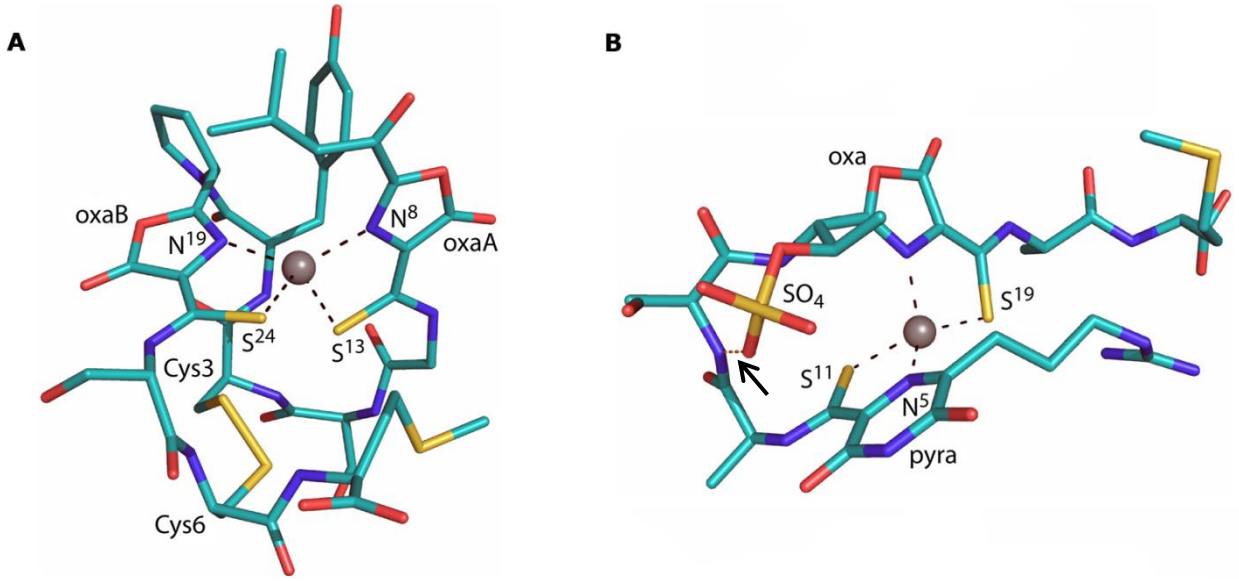


***Abbildung 8**: Kristallstrukturen von **A: MB OB3b(Cu)** und **B: MB M-Thr(Cu)** ohne C-terminales Thr nach DiSpirito et al.. Das Zentralion ist in grau, die Cu-koordinierenden Einheiten namentlich und die Wasserstoffbrückenbindung mit einer orangenen gestrichelten Linie (schwarzer Pfeil) dargestellt.*[47]

Alle MBs weisen eine außerordentliche hohe und selektive Affinität gegenüber Cu auf. Obwohl sowohl Cu^+ als auch Cu^{2+} koordiniert werden können, ist die Oxidationsstufe von dem in den MBs gebundenen Cu immer +I.[47] Vermutlich wird Cu^{2+} über einen bisher unbekannten Mechanismus nach der Chelatisierung schnell zu Cu^+ reduziert. Die durch Konkurrenzexperimente mit bekannten Chelatoren bestimmten Cu^+-Affinitäten liegen für alle MBs im Bereich von $K_b \approx 10^{21}$ M^{-1} und gehören damit zu den höchsten jemals in biologischen Systemen gemessenen (**Tabelle 2**).[47]

***Tabelle 2**: Komplexbildungskonstanten K_b(Cu) ausgewählter Methanobactine: a) Cu^+-Affinität ermittelt durch Konkurrenzexperimente mit bekannten Chelatoren, b) Cu^{2+}-Affinität berechnet auf Basis der Reduktionspotentiale, c) Cu^{2+}-Affinität ermittelt mithilfe isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC).*

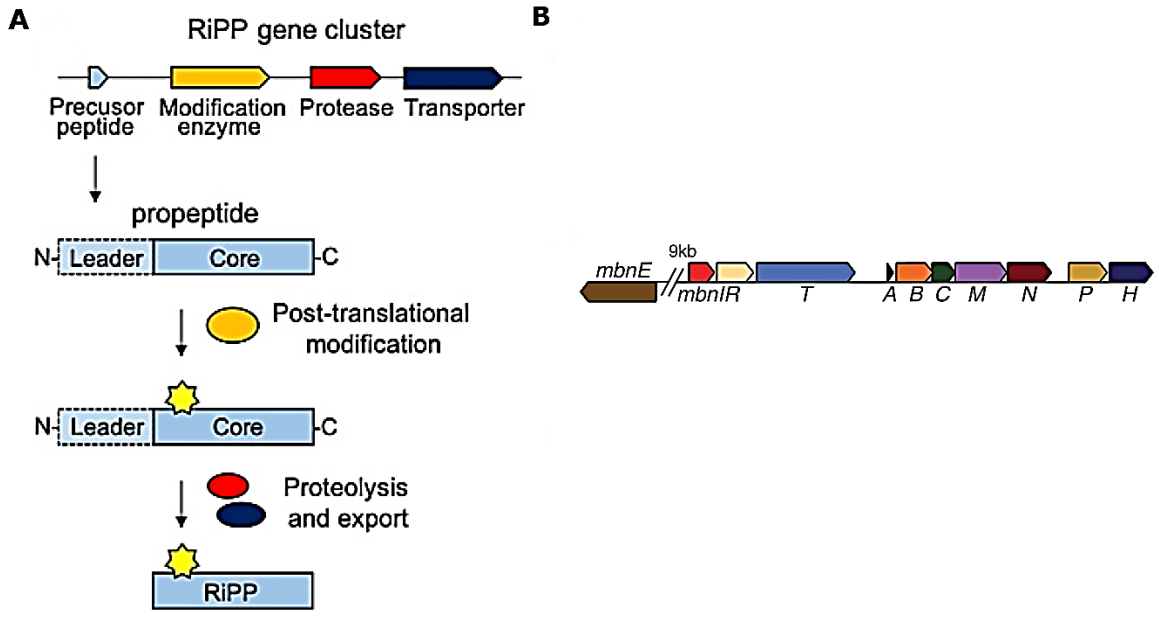
Eintrag	Methanobactin	K_b(Cu) [M^{-1}]
1	**MB OB3b[a)]**	$6.8 \cdot 10^{20}$ [48]
2	**MB OB3b[b)]**	$3.4 \cdot 10^{12}$ [48]
3	**MB OB3b[c)]**	$2.6 \cdot 10^{8}$ [49]
4	**MB OB3b-reduziert[a)]**	$8.8 \cdot 10^{18}$ [48]
5	**MB CSC1[a)]**	$7.4 \cdot 10^{20}$ [46]
6	**MB CSC1-(SO_3)[a)]**	$2.2 \cdot 10^{19}$ [46]

Im Vergleich dazu sind die auf Basis der Reduktionspotentiale berechneten Affinitäten für die Bindung von Cu^{2+} um mehrere Größenordnungen geringer (Eintrag 1 *vs.* Eintrag 2 in **Tabelle 2**). Neben dem N_2S_2-Bindemotiv stellt die oben bereits erwähnte enge räumliche Anordnung des peptidischen Naturstoffes um das Zentralion einen entscheidenden Faktor für die starke Bindung dar. Wie in den Kristallstrukturen in **Abbildung 8** gut zu erkennen ist, bildet sich im Fall von **MB OB3b** eine pyramidale Anordnung und im Fall von **MB M** eine haarnadelförmige Anordnung der Chelatoren um das Cu^+ aus, die charakteristisch für die jeweiligen Gruppen sind (vgl. **Abbildung 7**). Für MBs, in denen diese Anordnung durch das Fehlen der Disulfidbindung bzw. des Sulfats und damit der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung nicht mehr gegeben ist, ist die Cu^+-Bindekonstante um mehr als eine Größenordnung verringert (Eintrag 1 *vs.* Eintrag 4 und Eintrag 5 *vs.* Eintrag 6 in **Tabelle 2**).

Neben der prädominanten Bindung von Cu, können MBs in dessen Abwesenheit auch weitere Metallionen, wenn auch deutlich schwächer, chelatisieren.[49] Mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) konnten die Komplexe von **MB OB3b** mit Ag^+, Au^{3+}, Hg^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} und Zn^{2+} untersucht werden. Im Vergleich zur Affinität gegenüber Cu^{2+} (Eintrag 3 in **Tabelle 2**), wurden für die anderen Ionen niedrigere Komplexbildungskonstanten im Bereich von 10^4 bis 10^7 ermittelt.

1.4.3 Biosynthese der Methanobactine

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei MBs um RiPPs.[41] Daher erfolgt die Biosynthese nach dem für diese Klasse bekannten Mechanismus (**Schema 2** A).[50] Aus dem im RiPP-Gen-Cluster codierten *precursor-peptide* wird ribosomal ein Propeptid hergestellt, das aus einer N-terminalen *leader*- und einer C-terminalen *core*-Sequenz besteht. Letztere enthält die Aminosäuresequenz des späteren RiPPs, wohingegen Erstere zur posttranslationalen Modifikation mithilfe der im Cluster codierten Enzyme (gelb in **Schema 2** A) benötigt wird. Nach diesem Schritt wird die *leader*-Sequenz durch Proteasen (rot in **Schema 2** A) wieder abgespalten und das finale RiPP durch einen exprimierten Transporter (dunkelblau in **Schema 2** A) freigesetzt.



***Schema 2**: **A:** Generelle Biosynthese von RiPPs nach LUU et al.: Ribosomale Expression des Propeptids aus dem Gen-Cluster gefolgt von Modifikation des core-Peptids und Entfernung des N-terminalen leader-Peptids zum fertigen RiPP, das mittels eines Transporters freigesetzt wird; **B:** Gen-Cluster für die Synthese von **MB OB3b** nach KENNEY et al..*[51,52]

Bisher wurde das Genom von *Methylosinus trichosporium* OB3b und die Biosynthese des zugehörigen **MB OB3b** am besten analysiert (**Schema 2** B).[52] In diesem Zusammenhang konnte das Gen *mbnA* identifiziert werden, das das Propeptid codiert. Die darin enthaltene *leader*- und *core*-Sequenz lauten: Met-Thr-Val-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Ile-Gly-Arg-Ala-Ala-Ala bzw. Leu-Cys-Gly-Ser-Cys-Tyr-Pro-Cys-Ser-Cys-Met. Die hervorgehobenen Cys der *core*-Sequenz werden im Zuge der posttranslationalen Modifikation durch die zu *mbnA* benachbarten Gene *mbnB* und

mbnC zu den in **MB OB3b** enthaltenen Oxazolon-Enthiol-Fragmenten modifiziert (vgl. **Abbildung 7**).

Obwohl der genaue molekulare Mechanismus dieser Umsetzung nicht geklärt ist, wird vermutet, dass *mbnB* und *mbnC* Fe-abhängige Oxidasen sind, die unter Verwendung von O_2 eine Vierelektronen-Oxidation des Cys zu den Koordinationsmotiven katalysieren. Die weitere Modifikation des hervorgehobenen Leu zu der Isovaleryl-Seitenkette wird durch eine in *mbnN* codierte Aminotransferase durchgeführt. Darüber hinaus enthält das in **Schema 2** B dargestellte Operon noch Gene, die vermutlich für den Zell-Import (*mbnE* und *mbnT*) und den Export (*mbnM*) von **MB OB3b** und für die Regulation der Gen-Expression (*mbnIR*) zuständig sind. Die Funktion dieser Gene, genauso wie die der beiden letzten Gene *mbnP* und *mbnH*, konnte aber nicht abschließend geklärt werden.[41]

1.5 Methanobactin als Wirkstoff gegen Morbus Wilson

Wie bereits unter 1.3 erläutert wurde, besteht aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen und der schlechten Wirksamkeit etablierter Medikamente ein erheblicher Bedarf, neue Wirkstoffe zur Initialtherapie zu finden. Aufgrund der außerordentlichen starken Bindung von Cu durch die Methanobactine (vgl. 1.4) wurde in einer ersten Studie durch die Arbeitsgruppe um Hans Zischka am Helmholtz Zentrum München getestet, ob **MB OB3b** als ein potentieller neuer Wirkstoff für die Initialtherapie der MW eingesetzt werden kann.[23]

1.5.1 *Ex vivo* Untersuchungen mit Atp7b-*knock-out* Ratten[23]

Zur Durchführung der dafür notwendigen Untersuchungen wurde von den Autor:innen zunächst eine Cu-verursachte, akute Hepatitis in Ratten beschrieben, die eine homozygote Löschung von $13 \cdot 10^3$ Basenpaaren auf dem Atp7b-Gen besaßen (Atp7b-*knock-out* Ratten).[53] Bei diesen Tieren kam es zu einer Akkumulation von Cu in der Leber mit der unter 1.2 beschriebenen, für MW charakteristischen Pathogenese. Durch den Vergleich der Gewebeproben der *knock-out* Ratten mit denen eines erkrankten Menschen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Leberschäden als auch die Schäden an den Mitochondrien durch den Modellorganismus gut abgebildet wurden (**Abbildung 9**).

Für die nachfolgenden Tests wurden die Konzentrationen von Cu in den Hepatozyten und die Serum-Konzentrationen von Bilirubin (Abbauprodukt der Hämgruppe in Hämoglobin) sowie der Aspartat-Aminotransferase (AST) als relevante Parameter zur Beurteilung der Behandlung ausgewählt. Die erwähnten Serum-Konzentrationen ließen den Autor:innen zufolge bei steigender Konzentration einen guten Schluss auf eine fortschreitende Leberschädigung zu.[53]

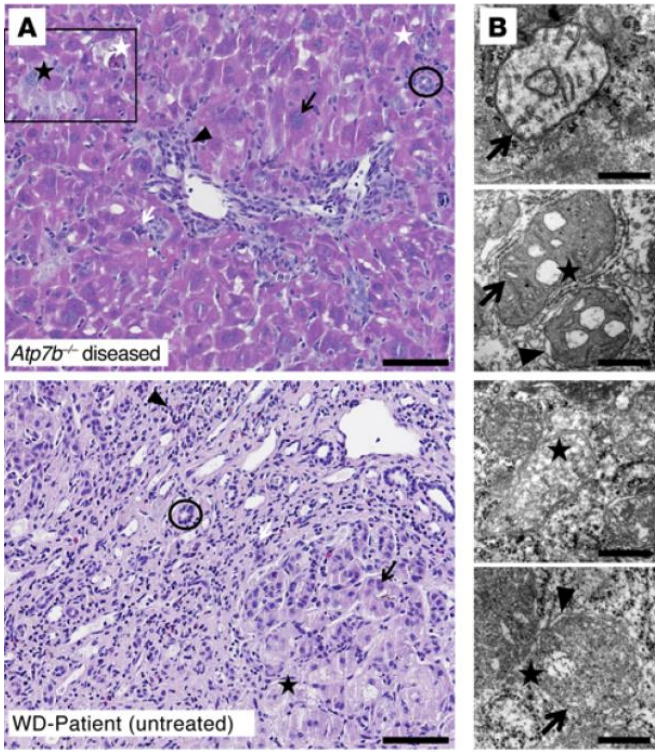


Abbildung 9 *nach* LICHTMANNEGGER *et al.:*
A: *Vergleich von Hämatoxylin-Eosin-eingefärbten Gewebeproben einer Atp7bk-knock-Out Ratte (oben) mit der eines unbehandelten MW-Patienten mit akutem Leberversagen: Maßstab: 100 µm, schwarzer Keil: Gewebenekrosen, schwarzer Kreis: Gallengänge, schwarzer Pfeil: Anisokaryosen, weißer Pfeil: entzündliches Gewebe, weißer Stern: Apoptose, schwarzer Stern: aufgeblähte Hepatozyten;*
B: *Genauere Aufnahme der dazugehörigen Mitochondrien: Maßstab: 500 nm, schwarzer Stern: Vakuolisierung, schwarzer Keil und Pfeil: Schäden an der inneren und äußeren mitochondrialen Membran.*[23]

In einem ersten *ex vivo* Experiment mit isolierten Mitochondrien aus Lebern der Atp7b-*knock-out* Ratten konnte gezeigt werden, dass unter Berücksichtigung der etablierten Wirkstoffe (vgl. **Abbildung 6**) lediglich **MB OB3b** deutlich und TTM **3** nur zu einem geringen Ausmaß die Cu-Menge in den isolierten Mitochondrien verringern konnte (**Abbildung 10** A).

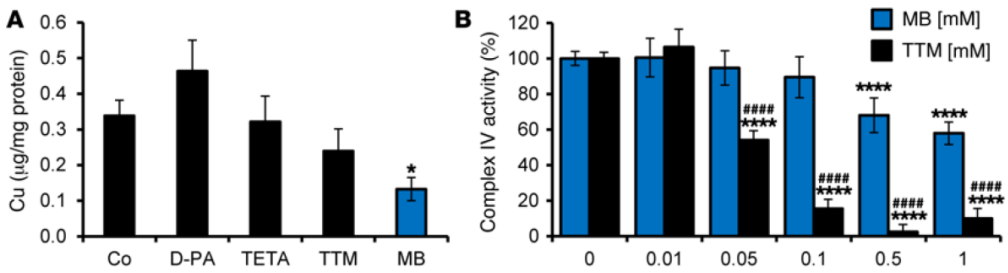


Abbildung 10 *nach* LICHTMANNEGGER *et al.:* ***A:*** *Verringerung der mitochondrialen Cu-Menge gegenüber der Kontrolle (Co) durch Gabe von verschiedenen Chelatoren (30 min Inkubation in 2 mM);* ***B:*** *Aktivität des Komplex IV der Atmungskette nach Gabe von TTM (schwarz) und* ***MB OB3b*** *(blau).*[23]

Darüber hinaus führte der natürliche Cu-Chelator im Gegensatz zu TTM zu keiner deutlichen Verringerung der Aktivität des Cu-abhängigen Komplex IV der Atmungskette (**Abbildung 10** B). Somit konnten die Autor:innen die Toxizität der schwermetallhaltigen Verbindung auf Ebene des Mitochondriums nachweisen (vgl. 1.3).

In derselben Veröffentlichung wurde weiterhin mithilfe der Perfusion von isolierten Lebern aus Atp7b-*knock-out* Ratten über zwei Stunden gezeigt, dass **MB OB3b** zu einer zehnfach höheren Ausscheidung von Cu in die Galle verglichen mit TTM **3** führte, während D-PA **1** und TETA **2** keine Mobilisierung des Metalls ermöglichten (**Abbildung 11** A). Die Effizienz von **MB OB3b** konnte außerdem anhand des Cu-Gehalts von Leberhomogenaten verdeutlich werden (**Abbildung 11** B). Nach zwei Stunden war nur dieser Chelator in der Lage, die Menge an Cu in der Leber signifikant zu senken.

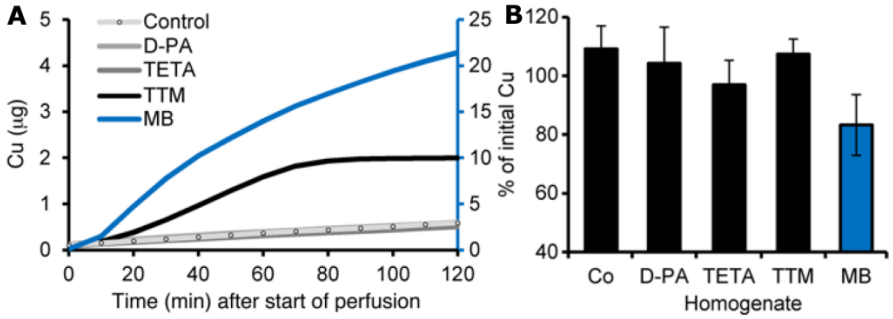


Abbildung 11 *nach* LICHTMANNEGGER *et al.:* ***A:*** *Kumulierte Ausscheidung von Cu in die Galle bei Leber-Perfusion von Atp7b-knock-out Ratten über zwei Stunden mit Lösungen der vier verschiedenen Chelatoren (blaue Achse: 0.7 µM* ***MB OB3b****, schwarze Achse: 0.8 µM TTM* ***3****, 1.8 µM TETA* ***2****, 2.2 µM D-PA* ***1****);* ***B:*** *Cu-Level im Leberzellhomogenat nach zwei Stunden Perfusion im Vergleich zu vor der Perfusion.*[23]

1.5.2 *In vivo* Untersuchungen mit Atp7b-*knock-out* Ratten[23]

Im Anschluss an die *ex vivo* Experimente führten die Autor:innen eine darauf aufbauende *in vivo* Studie durch. Bei dieser konnte zunächst gezeigt werden, dass **MB OB3b** in gesunden Atp7b-heterozygoten Ratten während der 45-minütigen Anwesenheit im Blutserum keine Veränderung der oben beschriebenen, relevanten Parameter verursachte (hepatische Cu-Konzentration und Serum-Konzentrationen von Bilirubin und AST). Bei einer Behandlung für zwei aufeinanderfolgende Tage mit **MB OB3b** konnte zudem keine negative Beeinträchtigung der Gesundheit der Tiere beobachtet werden.

Als nächstes wurden die Atp7b-*knock-out* Ratten bei Krankheitsbeginn einerseits durch eine tägliche intraperitoneale (*i.p.)* Injektion von **MB OB3b** (150 mg/kg Körpergewicht)

für drei bzw. fünf Tage und andererseits durch eine tägliche orale Gabe von D-PA **1** (100 mg/kg Körpergewicht) und TETA **2** (480 mg/kg Körpergewicht) für vier Tage behandelt (**Abbildung 12** A).

Gegenüber D-PA **1** und TETA **2** war **MB OB3b** nicht nur in der Lage, die Zellschäden in den isolierten Gewebeproben deutlich zu senken. Der Naturstoff konnte in zwei Dritteln der Fälle auch die AST-Level sogar bei besonders hohen Werten (beginnendes Leberversagen) im Blutserum verringern. Bei einer Gabe von D-PA **1** und TETA **2** wurde dieser Effekt von den Autor:innen nicht beobachtet. Stattdessen stiegen in drei Vierteln der Fälle die AST-Level an. Dieses positive Ergebnis wurde in der Veröffentlichung mithilfe der zugehörigen Cu-Konzentrationen der Leberzellhomogenate und der isolierten Mitochondrien aus den Atp7b-*knock-out* Ratten verdeutlicht. Bei einer Behandlung mit **MB OB3b** waren diese in allen Fällen geringer als bei einer Behandlung mit D-PA **1** oder TETA **2** (**Abbildung 12** B).

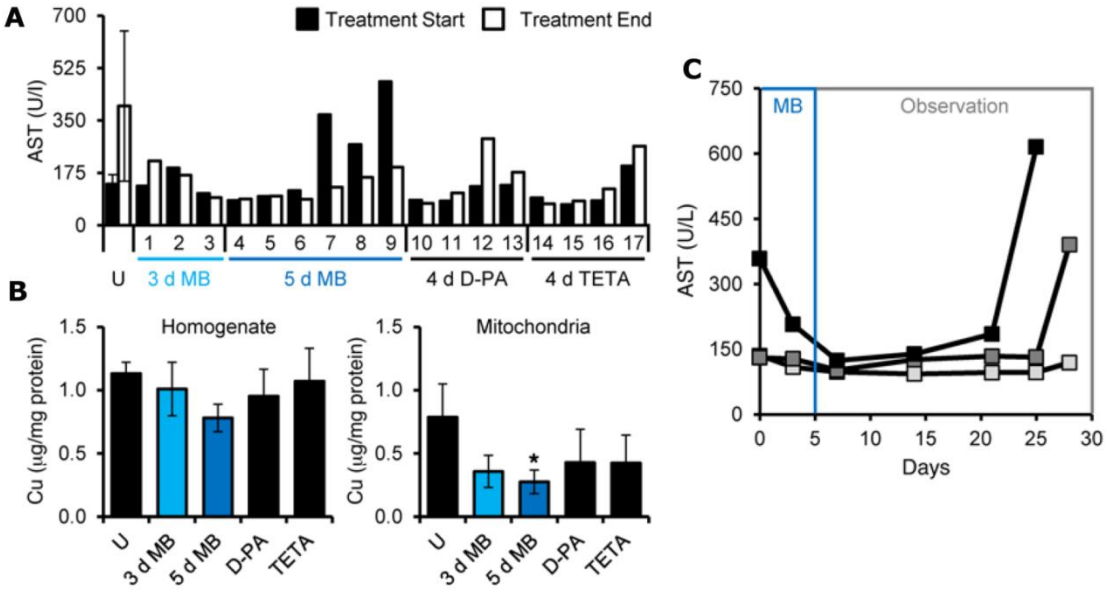


Abbildung 12 *nach* LICHTMANNEGGER *et al.:* ***A:*** *Entwicklung der AST-Level bei 82-90 Tage alten Atp7b-knock-out Ratten durch Behandlung mit* ***MB OB3b*** *für drei bzw. für fünf Tage und durch Behandlung mit* D-PA ***1*** *und TETA* ***2*** *für vier Tage im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (U);* ***B:*** *Cu-Gehalt in Leberzellhomogenaten und in isolierten Mitochondrien nach der in* ***A*** *beschriebenen Behandlungsdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe (U);* ***C:*** *Entwicklung der AST-Level bei drei Ratten durch eine einmal tägliche Behandlung mit* ***MB OB3b*** *für fünf Tage und nachfolgender Erhaltungstherapie mit Zn-angereicherter Nahrung für 25 Tage.*[23]

Um die Grundlagen für ein Behandlungsschema und damit für eine neue Initialtherapie der MW zu legen, wurde außerdem untersucht, wie lange die AST-Level in Atp7b-*knock-out* Ratten niedrig gehalten werden konnten (**Abbildung 12** C). Dafür erfolgte eine einmal tägliche Behandlung mit **MB OB3b** für fünf Tage (insgesamt fünf *i.p.* Injektionen)

und eine anschließende Erhaltungstherapie durch Gabe von Zn-angereicherter Nahrung (vgl. 1.3). Durch dieses Schema konnte bei allen drei untersuchten Ratten für mindestens zwei Wochen niedrige AST-Spiegel festgestellt werden. Eine größere Behandlungspause von drei Wochen konnte durch fünfzehn *i.p.* Injektionen verteilt über fünf Tage erreicht werden. Durch eine Wiederholung dieser Intensivbehandlung konnten die Autor:innen sogar eine Pause von sieben Wochen ermöglichen.

Der bedeutendste Therapieerfolg, der in der Veröffentlichung beschrieben wurde, konnte bei der Behandlung von akut erkrankten Ratten erzielt werden. Mithilfe von sechszehn *i.p.* Injektionen verteilt über sieben Tage wurden alle Versuchstiere vor einem akuten Leberversagen gerettet, gewannen an Körpergewicht und wiesen wieder normalisierte Level an AST, Bilirubin und Cu auf.

Dieses Ergebnis unterstreicht die ausgezeichnete Bioaktivität von **MB OB3b**, da bei einem akuten Verlauf der MW mit einhergehendem Leberversagen die gängige Initialtherapie unter Verwendung der Chelatoren **1**-**3** wirkungslos ist. In diesem Fall ist eine Lebertransplantation der einzige Ausweg, die Patent:innen zu retten. Besonders der letzte Punkt verdeutlicht das große Potential des natürlichen Cu-Chelators als ein Wirkstoff zur Behandlung der MW eingesetzt zu werden.

2 ZIELSETZUNG DER DISSERTATION

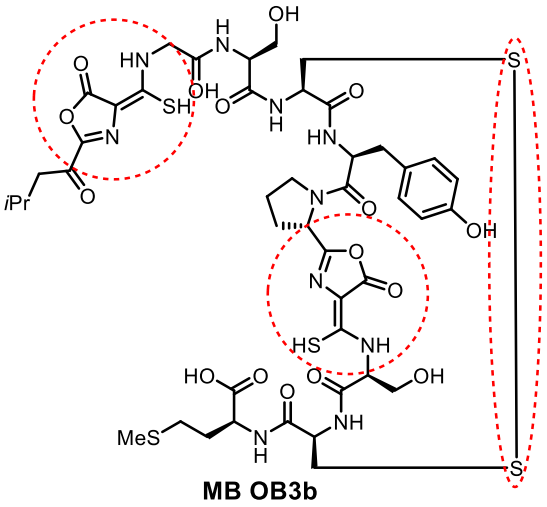


***Abbildung 13**: Struktur von **MB OB3b** mit Oxazolon-Enthiol-Cu-Bindemotiv und intramolekularem Disulfid (rote gestrichelte Kreise).*

MB OB3b ist neben seiner ausgezeichneten *in vitro* und *in vivo* Bioaktivität gegenüber MW ein aus chemisch-synthetischer Sicht hochinteressanter Naturstoff (**Abbildung 13**). **MB OB3b** besitzt einerseits vollständig substituierte Oxazolon-Enthiol-Koordinationsmotive für die Bindung eines Cu^{+}, die mit jeweils einem Tetra- und einem Tripeptid verknüpft sind und deren Synthese in der Literatur unbekannt ist. Andererseits sind die beiden, in den Peptidfragmenten enthaltenen Cysteine durch eine intramolekulare Disulfidbindung verknüpft. Diese beiden Strukturelemente und die insgesamt fünf Schwefelatome in unterschiedlichen Oxidationsstufen (d.h. -I und -II) machen **MB OB3b** zu einem sehr komplexen Molekül.

In der vorliegenden Dissertation sollen daher unterschiedliche synthetische Studien durchgeführt werden, die zu der Entwicklung eines Wirkstoffes gegen MW beitragen können.

2.1 Synthese strukturvereinfachter Naturstoffderivate

In einem ersten Teil der Arbeit sollen Derivate von **MB OB3b** synthetisiert werden, die eine ähnliche Cu-Affinität wie der Naturstoff besitzen, aber eine verbesserte Atomökonomie als **MB OB3b** hinsichtlich der Koordination nur eines Cu^+ aufweisen (*M*(**MB OB3b**) = 1155.31 g/mol vs. *M*(Cu) = 63.55 g/mol). Diese Methanobactin-ähnlichen Chelatoren sollen außerdem modifizierte Strukturmotive beinhalten, die durch eine geringere Polarität und eine erhöhte Stabilität zu einem verbesserten Wirkstoffcharakter führen. Dadurch können diese Naturstoffderivate als neue Wirkstoffe gegen MW eine optimale Ergänzung zu **MB OB3b** sein.

Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen ist die Synthese der potentiellen Chelatoren **4** und **5** ein Ziel dieser Dissertation (**Abbildung 14**). Verglichen mit **MB OB3b** (**Abbildung 13**) besitzen diese Moleküle ebenfalls ein N_2S_2-Cu-Bindemotiv (rote Elemente in **Abbildung 14**), jedoch keine Oxazolon-Enthiol-Einheiten. Stattdessen soll der nördliche Teil der Chelatoren aus einem alkylierten Ph-Oxa(OEt)-Thioamid bestehen, das ein geschütztes Analogon des in **MB OB3b** vorkommenden Strukturelements ist (schwarzer Kreis in **Abbildung 14**).

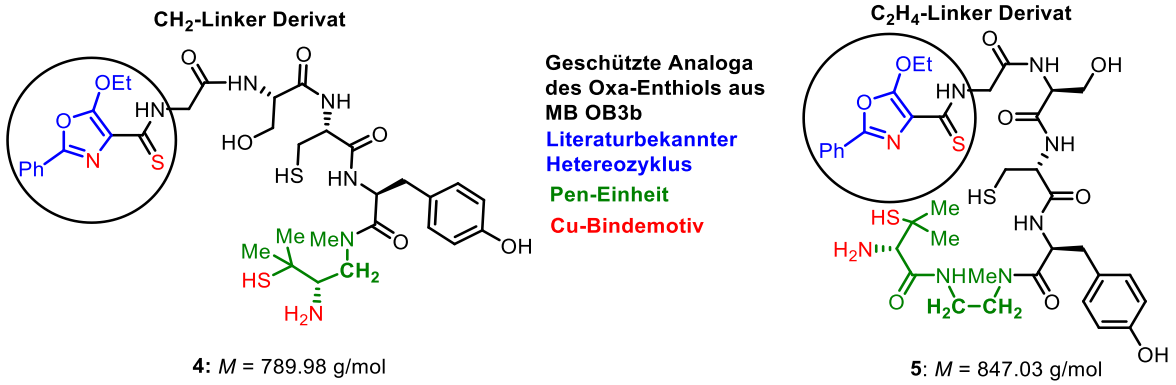


***Abbildung 14**: Vereinfachte Derivate von **MB OB3b** mit dem in rot dargestellten potentiellen N_2S_2-Cu-Bindemotiv, dem blau markierten literaturbekannten Ph-substituierten Oxa(OEt) und mit den modifizierten Pen-Einheiten in grün.*

Dadurch liegt der Heterozyklus in **4** und **5** in einer elektronenreicheren aromatischen Form vor (+I- und +M-Effekt der Ethoxygruppe), die einerseits unempfindlicher als die elektrophilen Oxazolone gegenüber einer Hydrolyse sein sollte, sowie wahrscheinlich eine veränderte Donoreigenschaft (Thioamid *vs.* Enthiol) gegenüber Cu^+ besitzt. Über einen Vergleich mit den Oxazolon-Enthiol-Einheiten ist es daher möglich, geeignete Ligandeneigenschaften für die Koordination des Cu^+ zu studieren. Der Ph-Substituent kann durch die Konjugation zu einer weiteren Stabilisierung des Oxazols beitragen. Die

Et-Schutzgruppe wurde gewählt, da diese zu einer ausreichenden Stabilisierung des Heterozyklus führen sollte, jedoch prinzipiell später entfernt werden kann, um das Cu-Bindemotiv ähnlicher zum Naturstoff zu machen. Darüber hinaus ist aus Vorarbeiten in der Literatur ein Zugang zu dem Ph-Oxa(OEt)-Element (blaue Struktur in **Abbildung 14**) bekannt.[54]

Der südliche Teil des gesamten Methanobactins (d.h. Oxazolon-Enthiol und Tripeptid) wird in **4** und **5** durch modifizierte Pen-Einheiten ersetzt (grüne Strukturen in **Abbildung 14**), die die den unteren Teil des N_2S_2-Cu Bindemotivs enthalten und somit zu einer deutlich vereinfachten Struktur bei einem verringerten Molekulargewicht führen (*M*(**4**) = 789.98 g/mol vs. *M*(**5**) = 847.03 g/mol). Pen als bidentater Ligand wurde ausgewählt, da es sich bei dieser nicht proteinogenen Aminosäure um einen etablierten Wirkstoff gegen MW mit nachgewiesener Cu-Affinität und um eine robustere Struktur als die Oxazolone handelt (vgl. **1** in **Abbildung 6**). Die Substitution des südlichen Tripeptids von **MB OB3b** macht **4** und **5** ferner zu unpolareren Molekülen, die dadurch ebenfalls nicht mehr über ein komplexes intramolekulares Disulfid besitzen.

Um eine Ähnlichkeit zum Naturstoff und einen vergleichbaren Abstand der N_2S_2-Cu-Bindemotive zu bewahren, sollen die Naturstoffderivate das Peptidfragment Gly-Ser-Cys-Tyr mit einem tertiären Amid enthalten (**Abbildung 13**). Diesbezüglich soll durch einen kürzeren CH_2-Linker in **4** und durch einen längeren C_2H_4-Linker in **5** der Einfluss des Bindestellenabstands auf die Cu-Affinität untersucht werden.

Die Bestimmung der Cu-Affinitäten von **4** und **5** ist ein weiteres Ziel dieses Kapitels. Die Bestimmung lässt im Nachgang durch einen Vergleich mit **MB OB3b** Schlussfolgerungen auf wichtige Strukturelemente zu.

Die Entwicklung einer Synthese der strukturvereinfachten Naturstoffderivate soll außerdem Methoden für eine Totalsynthese von **MB OB3b** in einem nachfolgenden Kapitel bereitstellen.

2.2 Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu MB OB3b

Eine Totalsynthese von **MB OB3b** ist aufgrund der in dem Naturstoff vorkommenden ungewöhnlichen Strukturelemente von besonderem Interesse (**Abbildung 13**).

Dafür sollen in dem zweiten Teil der Arbeit Strategien entwickelt werden, die Oxazolon-Enthiol-Cu-Bindemotive herzustellen und diese mit den peptidischen Fragmenten zu verbinden. Außerdem besteht ein weiteres Ziel darin, eine praktikable Methode zum Aufbau des intramolekularen Disulfids zu erarbeiten. In der Literatur werden diese funktionellen Gruppen häufig durch Oxidation der entsprechenden Thiole oder durch die Anwendung eines geeigneten Reagenzes gebildet.[55,56] Im Fall des Disulfids von **MB OB3b** muss evaluiert werden, ob diese Methoden in Anwesenheit der restlichen Schwefelatome anwendbar sind.

Zur Synthese der in der Literatur unbekannten Oxazolon-Enthiole soll in dieser Arbeit ein neuartiger Zugang entwickelt werden. Im Vergleich zu dem Ph-Oxa(OEt)-Element, das Teil der strukturvereinfachten Naturstoffderivate ist (vgl. **Abbildung 14**), handelt es sich bei den Oxazolonen aus **MB OB3b** um deutlich komplexere Heterozyklen (**Abbildung 15**).

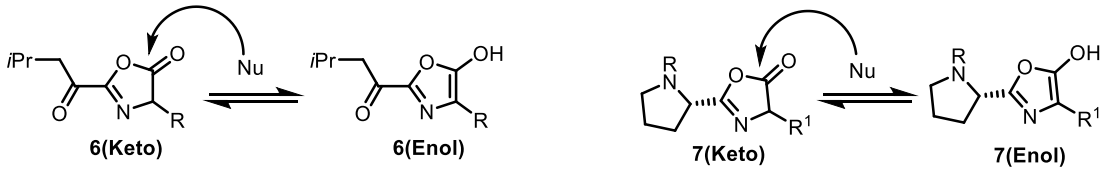


***Abbildung 15**: Tautomerie der Oxa-Heterozyklen von **MB OB3b** und potentielle Reaktion mit einem Nukleophil (Nu).*

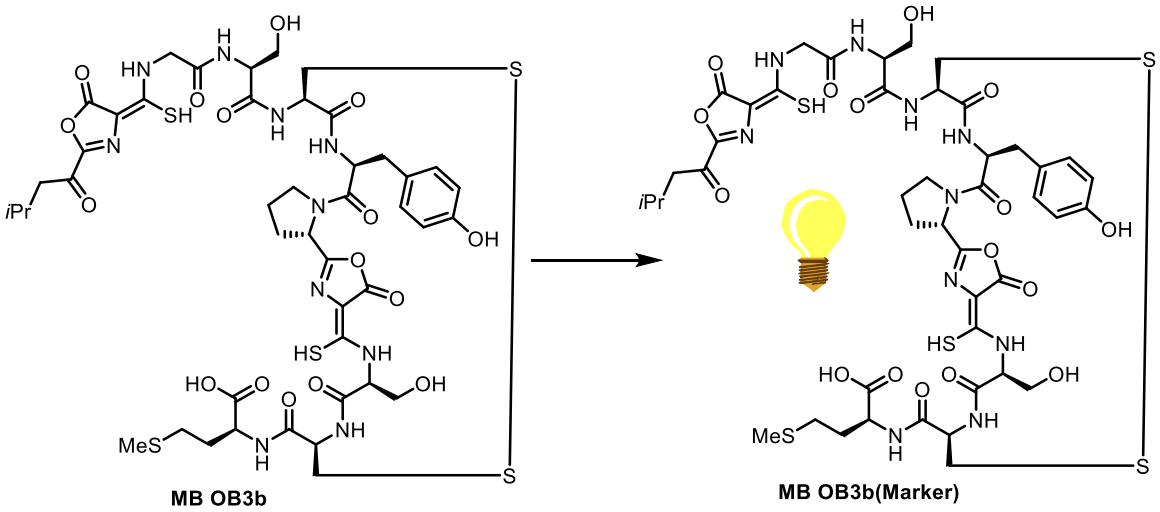
Diese sind mit einer Alkyl- anstelle einer Ph-Gruppe in der 2-Position substituiert und beinhalten im Fall von **7** ein Stereozentrum. Da keine Konjugation mit einem benachbarten π-System in **6** und **7** wie im Ph-Oxa(OEt)-Strukturelement möglich kann, sind diese deutlich instabiler. Lediglich im Fall von **6** könnte die Acylgruppe zu einer geringfügigen Stabilisierung durch eine Konjugation mit dem Heterozyklus führen. Des Weiteren kann bei **6** und **7** eine Tautomerie zwischen der Keto- und der Enol-Form erfolgen, da diese nicht *O*-alkyliert sind. Die aufgrund der Tautomerie erhaltenen Lactone **6(Keto)** und **7(Keto)** können durch Nukleophile wie zum Beispiel angegriffen und gespalten werden werden. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung von der Gruppe um Herzon konnte diesbezüglich die Empfindlichkeit von Oxazolonen ähnlich zu **6(Keto)** und **7(Keto)** gegenüber einer hydrolytischen Ringöffnung veranschaulicht

werden.[57] Darüber hinaus zeigten die Autor:innen, dass bei den Heterozyklen ähnlich zu **6(Enol)** und **7(Enol)** mit R = R^1 = CO_2H leicht eine Decarboxylierung erfolgen kann.
Aus diesen Gründen ist es entscheidend, die labilen Heterozyklen für eine Verwendung in der Totalsynthese analog zum Ph-Oxa(OEt)-Strukturelement zu schützen. Die so erhaltenen aromatischen Ketenacetale sollten zu einer ausreichenden Stabilisierung der Heterozyklen führen.
Da die Heterozyklen **6(Enol)** und **7(Enol)** in ihrer alkylierten Form stark dem Ph-Oxa(OEt)-Element der strukturvereinfachten Derivate ähneln, soll ein totalsynthetischer Zugang zu **MB OB3b** aufbauend auf einer Synthese von **4** und **5** (**Abbildung 14**) entwickelt werden, um auf die Synthesemethoden aus dem ersten Kapitel der Doktorarbeit zurückgreifen zu können. Für eine Totalsynthese von **MB OB3b** ist es gleichermaßen wie für die Synthese der Naturstoffderivate erforderlich, einen seitenselektiven Einbau eines Thioamids in ein Oligopeptid in Nachbarschaft zu elektronenreichen alkylierten Oxazolen zu etablieren.

2.3 Synthese und Anwendung MB OB3b-basierter Sonden

Im dritten und abschließenden Teil der Dissertation sollen Grundlagen für die Aufklärung des Wirkmechanismus von **MB OB3b** entwickelt werden. In den unter 1.5 beschriebenen *ex vivo* und *in vivo* Untersuchungen konnten keine Informationen über die Bioverteilung von **MB OB3b** *in vitro* und in *vivo* gewonnen werden. Ebenso sind Mechanismen zur Aufnahme, zur Exkretion und zum Metabolismus des Cu-Chelators unbekannt. Für eine Weiterentwicklung von **MB OB3b** zu einem Wirkstoff gegen MW müssen diese wichtigen physiologischen Parameter identifiziert werden.

Aus diesem Grund besteht ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, eine geeignete chemische Modifikation des Cu-Chelators zu entwickeln, die die Bioaktivität nicht beeinträchtigt. Weiterhin soll es diese Modifikation ermöglichen, Marker wie Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Elementen zur Positronen-Emission-Tomographie (PET) in den Naturstoff einzuführen (**Schema 3**).



***Schema 3**: Synthese der Sonde **MB OB3b(Marker)** durch Modifikation von **MB OB3b** mit einem Marker (Glühbirne).*

Die durch chemische Synthese erhaltenen Sonden sollen in biologischen *in vitro* und *in vivo* Studien angewandt werden, um die oben beschriebenen physiologischen Parameter beurteilen zu können.

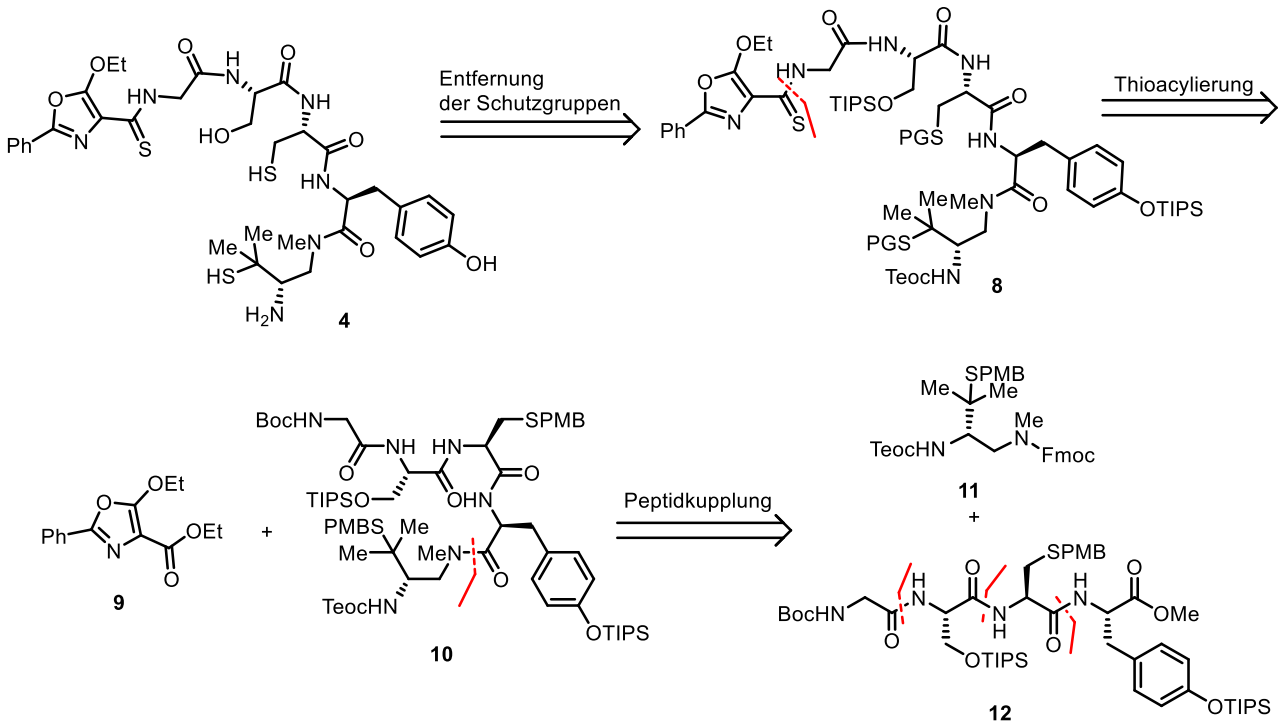
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 SYNTHESE STRUKTURVEREINFACHTER NATURSTOFFDERIVATE

3.1.1 Retrosynthetische Analysen

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Chelatoren **4** und **5** zu synthetisieren, um einfacher zugängliche Derivate des Naturstoffs mit einer verbesserten Atomökonomie für die Koordination eines Cu^{+}-Ions zu erhalten. Die Herstellung solcher Moleküle beinhaltete die besondere Herausforderung, ein Thioamid selektiv an einer Stelle des Oligopeptids einzubauen. Dafür musste in Nachbarschaft zu einem hochsubstituierten Oxazol ein Thioamid aufgebaut werden.

Der finale Schritt einer möglichen Retrosynthese des Naturstoffderivats **4** mit einem CH_2-Linker stellt die globale Entfernung aller Schutzgruppen aus **8** dar (**Schema 4**).



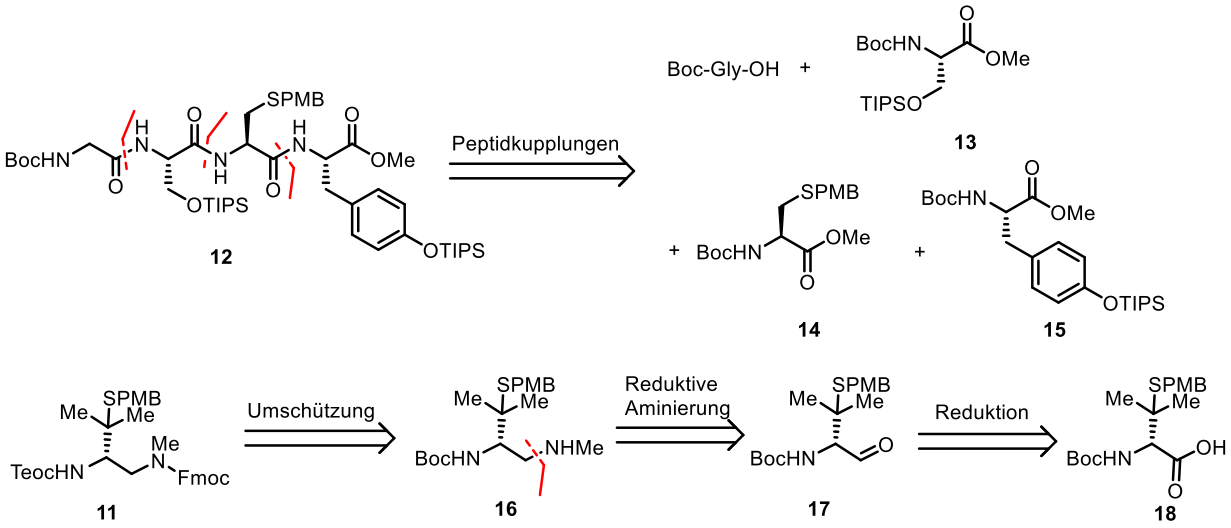
Schema 4: *Retrosynthese des Naturstoffderivats mit einem CH_2-Linker **4** über eine Thioacylierung des Ph-Oxa(OEt)-OEt **9** mit dem Pentapeptidfragment **10**, das aus **11** und **12** zugänglich ist. PG bezeichnet eine allgemeine Schutzgruppe.*

In diesem Kontext mussten insbesondere zur Schützung der Thiole in der modifizierten Pen-Einheit und im Cys Ansätze erarbeitet werden, die Nukleophilie der Schwefelatome herabzusetzen, damit diese nicht die nötigen Reaktionen zu **8** behinderten. Aus diesem Grund sind diese in **Schema 4** noch nicht näher spezifiziert. Außerdem war vorerst

unklar, welche Derivate sich in Anwesenheit des Thioamids selektiv entschützen ließen. Bei PMB-Thioethern handelt es sich um nützliche Schutzgruppen von Thiolen, die einerseits die erste Anforderung erfüllen und sich durch Reaktion mit 2-Nitropyridinsulfenylchlorid (NPysCl)[55] selektiv gegenüber anderen Schutzgruppen abspalten lassen.[56,58] Durch die Masterarbeit von FABIAN BRUNSIWG konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Reaktion in Anwesenheit eines Thioamids nicht mehr durchgeführt werden kann.[59]

Das für die Synthese von **8** notwendige Tetrapeptidfragment **10** mit PMB-geschützten Thiolen musste daher in ein dementsprechendes Amin ohne PMB-Gruppen umgewandelt werden, welches gemeinsam mit **9** zum Aufbau des Thioamids verwendet werden konnte (**Schema 4**). Diese Verknüpfung sollte über eine sogenannte Thioacylierung erfolgen. Mithilfe dieser Strategie kann eine seitenselektive Einführung des Thioamids nach einer Umwandlung des Esters von **9** in ein Thioacylierungsreagenz erfolgen.[60–65]

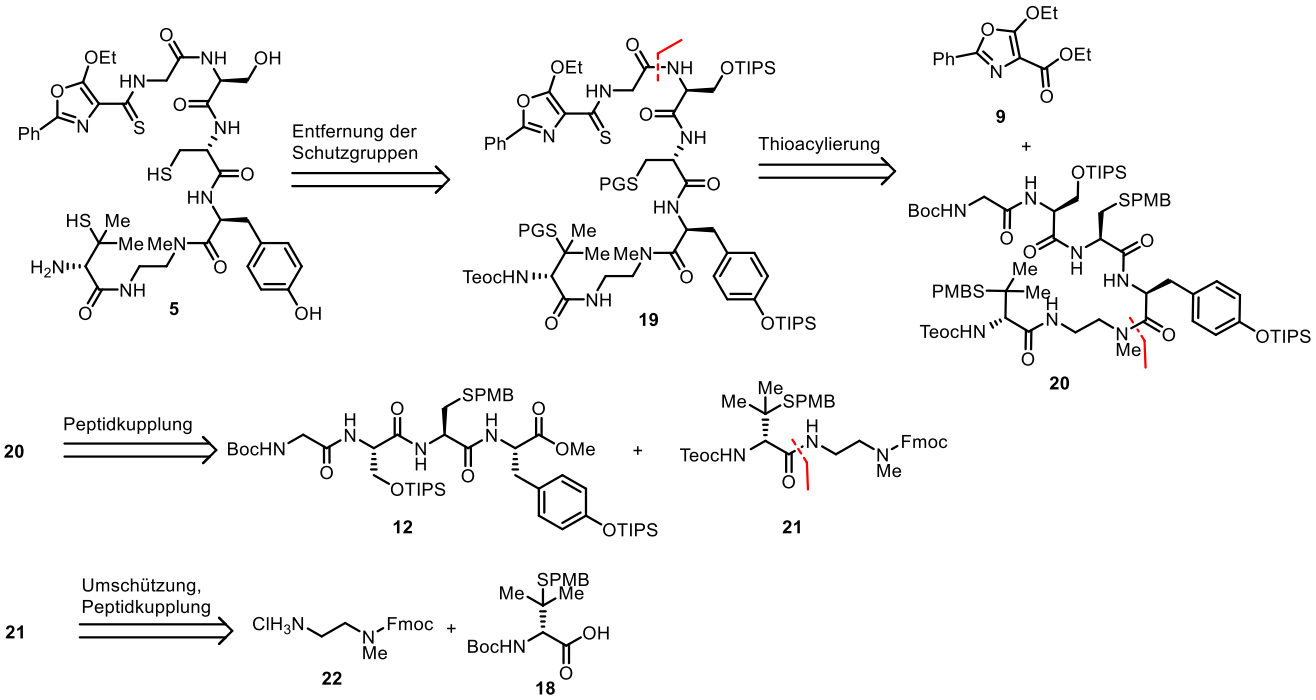
Die Synthese von Ph-Oxa(OEt)-OEt **9** wurde bereits in Arbeiten von NOLT *et al.* veröffentlicht.[54] **10** kann wiederum durch eine Peptidkupplung zwischen Tetrapeptid **12** und dem modifizierten Pen **11** mit einem CH_2-Linker erhalten werden, deren beide Amine orthogonal mit einer Fmoc- und einer Teoc-Gruppe geschützt sind (**Schema 5**). Letztere sollte sicherstellen, dass die Boc-Gruppe in **10** selektiv entfernt werden kann, während das Teoc-geschützte Amin in **8** simultan mit den beiden TIPS-geschützten Alkoholen entschützt werden kann. **11** kann nach Umschützung und reduktiver Aminierung aus Aldehyd **17** hergestellt werden. Die Synthese von **17** sollte ausgehend von der literaturbekannten Carbonsäure **18** erfolgen.[66] Das Tetrapeptid **12** ist aus den vollständig geschützten Aminosäurederivaten **13**, **14**[67] und **15**[68] sowie aus dem kommerziell erhältlichen Boc-Gly-OH zugänglich.



***Schema 5**: Retrosynthesen von **12** und **11** aus den Aminosäurebausteinen Boc-Gly-OH, **13**, **14**, **15** und **18**.*

Wie durch die in **Schema 4** und **Schema 5** dargestellten Retrosynthesen ersichtlich ist, handelt es sich dabei um eine konvergente Syntheseroute ausgehend von ähnlich großen Einzelbausteinen **9**, **11** und **13**-**15**. Dieser modulare Aufbau bietet in nachfolgenden Optimierungsstudien einen schnellen Zugang zu weiteren unterschiedlich funktionalisierten Zielstrukturen.

Das Naturstoffderivat **5** kann in analoger Weise zu **4** synthetisiert werden (**Schema 6**). Das den Entschützungen und der Thioacylierung mit **9** vorangehende Tetrapeptidfragment **20** ist, wie auch das kleinere Analogon **10**, durch Kupplung von **12** mit dem modifizierten Pen **21** mit einem C_2H_4-Linker zugänglich. **21** kann ebenfalls nach Schutzgruppenaustausch aus der Carbonsäure **18**[66] hergestellt werden. Die Verknüpfung von **18** mit dem literaturbekannten Linker **22**[69,70] sollte über eine Amidbindung und nicht wie im Fall von **16** über eine reduktive Aminierung stattfinden, um eine orthogonale Schützung von drei unterschiedlichen Stickstoffen zu vermeiden.



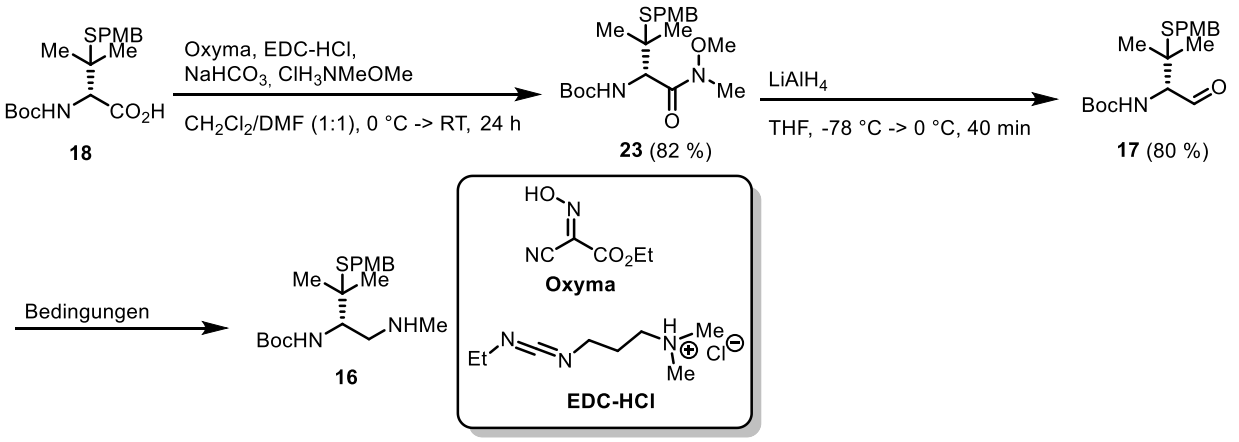
***Schema 6**: Retrosynthese des Naturstoffderivats mit einem C_2H_4-Linker **5** über eine Thioacylierung des Ph-Oxa(OEt)-OEt **9** mit dem Pentapeptidfragment **20**, welches aus **18** nach Kupplung mit dem literaturbekannten Hydrochlorid **22** zugänglich ist.*

Bei den nachfolgend beschriebenen Reaktionen zur Umsetzung der geplanten Retrosynthesen aus **Schema 4**, **Schema 5** und **Schema 6** handelt es sich teilweise um noch nicht optimierte Ausbeuten, da möglichst zeitnah ein Zugang zu **4** und **5** etabliert werden sollte.

3.1.2 Synthese des modifizierten Penicillamins 11 mit einem CH_2-Linker

Als erstes Fragment für die die Synthese des Naturstoffderivats **4** (vgl. **Schema 4**) wurde das modifizierte Pen **11** ausgehend von dem literaturbekannten, PMB- und Boc-geschützte Pen **18** dargestellt (**Schema 7**).[66]

Um **18** zu dem benötigten Aldehyd **17** reduzieren zu können, wurde die Carbonsäure zunächst in ein Weinreb-Amid überführt.[71] Durch die Anwendung des in der Arbeitsgruppe etablierten EDC/Oxyma Standardprotokolls konnte das Amid **23** in einer guten Ausbeute von 82 % erhalten werden.[72] Bei der Reduktion von **23** zu **17** mit $LiAlH_4$ stellte sich als wichtig heraus, nur 1.6 Äq. des Reduktionsmittels zu verwenden, um eine weitere Reduktion zum Alkohol zu verhindern.[71] Im Folgenden wurde der Aldehyd in einer reduktiven Aminierung mit $MeNH_2$ zu **16** weiter umgesetzt. Dafür wurden verschiedene Bedingungen untersucht (**Tabelle 3**).



***Schema 7**: Synthese des Mono-Boc Diamins **16** mit den in **Tabelle 3** zusammengefassten Bedingungen.*

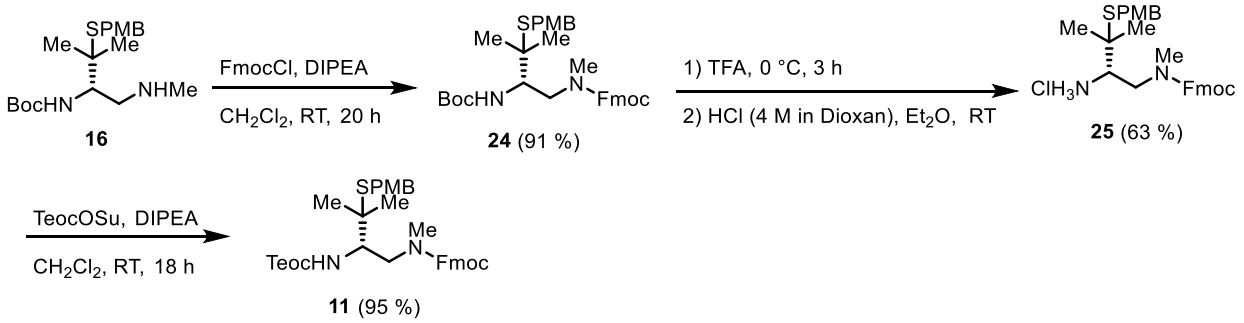
Zunächst wurde eine Reaktion mit $NaBH(OAc)_3$ in CH_2Cl_2 angestrebt (Eintrag 1 in **Tabelle 3**).[73] Bei dieser Reaktion konnte das gewünschte Produkt massenspektrometrisch nachgewiesen, aber nicht isoliert werden. Ein Problem bei dieser Reaktion könnte der zu reaktionsträge Aldehyd **17** und die damit nicht vollständige Bildung des Imins darstelllen. Daher wurde in einem zweistufigen Prozess die Bildung des Imins durch eine verlängerte Reaktionszeit forciert, dieses durch Aufarbeitung isoliert und mit $NaBH_3CN$ in MeOH umgesetzt.[74] Diese Bedingungen ergaben **16** in geringer Ausbeute von 19 % (Eintrag 2 in **Tabelle 3**). Daher wurden anschließend Brønstedt-[75] und Lewis-saure[76] Bedingungen getestet (Eintrag 3 & 4 in **Tabelle 3**). Die zuerst angewandten Brønstedt-sauren Bedingungen führten zwar zu einer Bildung des gewünschten Produkts. Dieses war jedeoch durch unbekannte

Nebenprodukte stark verunreinigt. Die Verwendung von Ti(O*i*Pr)$_4$ ergab **16** ohne Verunreinigungen in einer sehr guten Ausbeute von 93 % direkt nach der Aufarbeitung.

***Tabelle 3**: Untersuchte Bedingungen zur reduktiven Aminierung von **17** zu **16** aus **Schema 7**.*

Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
1	$MeNH_2$ (2 M in THF), $NaBH(OAc)_3$, CH_2Cl_2, -20 °C -> RT, 20 h	**16** nur mittels LC-MS nachweisbar
2	1) $MeNH_2$ (2 M in THF), Na_2SO_4, PhH, RT, 48 h 2) $NaBH_3CN$, MeOH, RT, 4 h	**16** in 19 % isoliert
3	1) $MeNH_2$ (2 M in THF), 2% AcOH in CH_2Cl_2, RT, 3.5 h 2) $NaBH(OAc)_3$, 2% AcOH in CH_2Cl_2, RT, 18 h	**16** mit unbekannten Verunreinigungen isoliert (Reinheit < 50 %)
4	1) $MeNH_2$ (2 M in THF), Ti(O*i*Pr)$_4$ MeOH, RT, 4 h 2) $NaBH_4$, MeOH, RT, 16 h	**16** in 93 % isoliert

Ausgehend von **16** wurde das sekundäre Amin des Moleküls mit einer Fmoc-Gruppe geschützt, um nachfolgend die Schutzgruppe des primären Amins von Boc auf Teoc wechseln zu können (**Schema 8**). Dieser Austausch war notwendig, um zu einem späteren Zeitpunkt der Synthese eine selektive Boc-Entfernung durchführen zu können (**Schema 4** in 3.1.1). Die Reaktion zu **24** verlief in guter Ausbeute von 91 % nach chromatographischer Reinigung. Durch die sterisch anspruchsvollen Schutzgruppen in **24** bildeten sich in Lösung zwei Vorzugskonformationen aus, die zu einer Vielzahl an Signalen in den NMR-Spektren führten und die Zurodnung erschwerten.



***Schema 8:** Schutzgruppenaustausch zur Synthese des orthogonal geschützten Diamins **11**.*

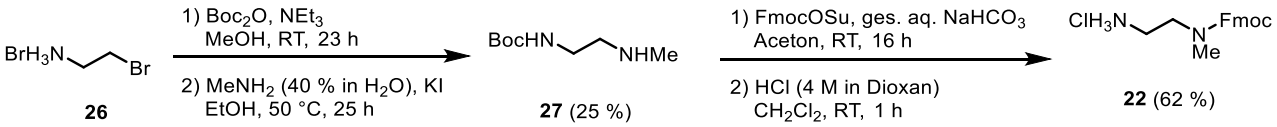
Die nachfolgende Entfernung der Boc-Gruppe mit TFA bei 0 °C und Bildung des Hydrochlorids mit 4 M HCl in 1,4-Dioxan lieferten **25** in 63 % Ausbeute.[77] Die moderate Ausbeute kann dadurch erklärt werden, dass das Produkt sehr hygroskopisch war und sich bei der Aufarbeitung nach Verflüssigung zum Teil in dem zum Waschen verwendeten Et_2O löste. Bei der abschließenden Schützung mit Teoc-OSu und DIPEA

wurde annähernd quantitative Ausbeute für **11** erreicht (**Schema 8**). Wie bereits bei **24** führten die sterisch anspruchsvollen Schutzgruppen zu zwei separaten Sätzen an Signalen in den NMR-Sepktren

Mithilfe dieser Sequenz konnte das modifizierte Pen **11** in einer guten Gesamtausbeute von 33 % über acht Stufen ausgehend von D-PA in einem Maßstab von 600 mg hergestellt werden.

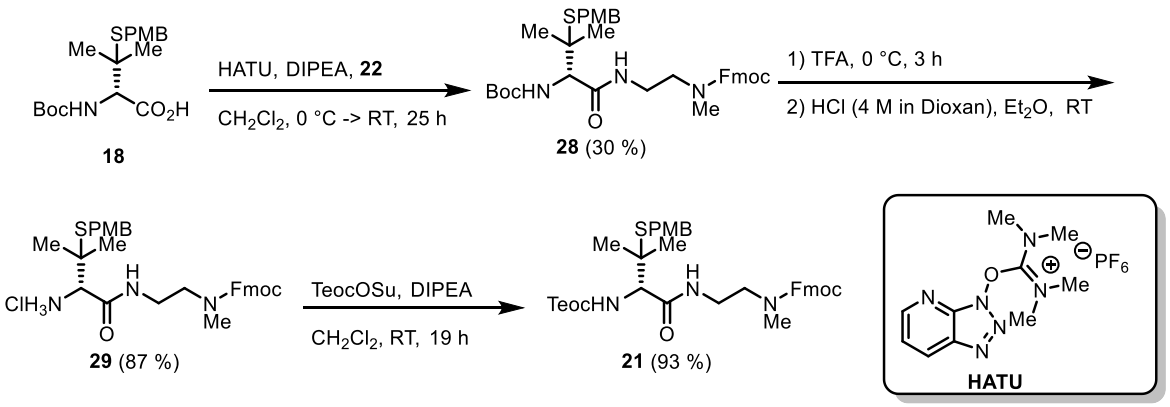
3.1.3 Synthese des modifizierten Penicillamins 21 mit einem C_2H_4-Linker

Als erstes Fragment für die Synthese des Naturstoffderivats **5** (vgl. **Schema 6** in 3.1.1) wurde das modifizierte Pen **21** ausgehend von dem literaturbekannten, unsymmetrische C_2-Linker **22**[69,70] hergestellt (**Schema 9**). Zur Darstellung von **22** erfolgten ausgehend von **26** eine Boc-Schützung, nukleophile Substitution mit $MeNH_2$, Fmoc-Schützung und Boc-Entschützung, was **22** in 16 % Ausbeute über vier Stufen lieferte (Literaturausbeute: 38 %). Eine bessere Ausbeute wurde vermutlich durch die intramolekulare Zyklisierung zum Aziridin als Konkurrenzreaktion verhindert. Aufgrund der einfachen kommerziellen Erhältlichkeit der Startmaterialien ist die Ausbeute aber tolerierbar und dieser Schritt wurde nicht weiter optimiert.



***Schema 9**: Literaturbekannte Synthese des Ethylen-Linkers als Hydrochlorid **22**.*

Im Weiteren wurde **22** in einer HATU-vermittelten Peptidkupplung mit Carbonsäure **18** zu Peptid **28** umgesetzt (**Schema 10**). Dabei wurde eine Ausbeute von 30 % erzielt. Im Gegensatz zu **24** (vgl. **Schema 8**) wurde bei **28** mittels NMR-Spektroskopie nur eine Konformation in Lösung beobachtet. Ein Grund dafür könnte sein, dass der C_2-Linker die sterische Überladung des Pen-Bindemotivs verhindert, da er einen größeren räumlichen Abstand der beiden Carbamte voneinander ermöglicht, sodass sich nicht zwei unterschiedliche Vorzugskonformationen aufgrund der *cis*/*trans*-Isomerie der Carbonyle ausbilden.



***Schema 10**: Peptidkupplung und Schutzgruppenwechsel zur Synthese des orthogonal geschützten Diamins **21**.*

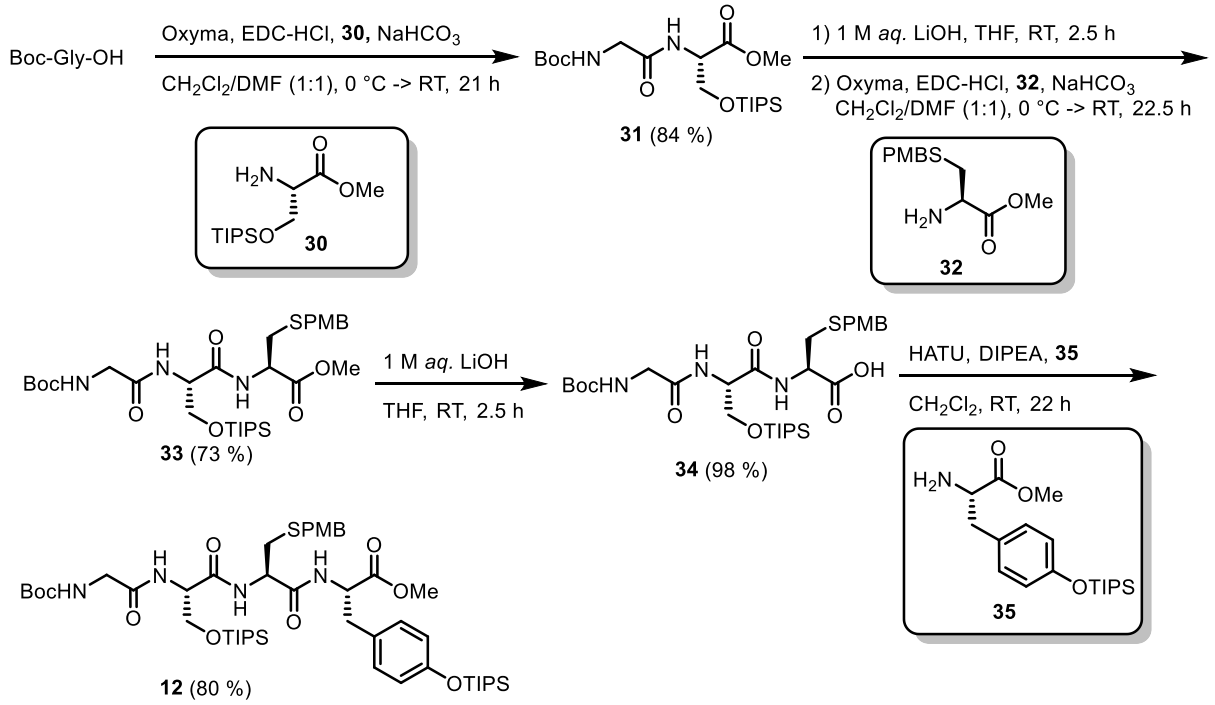
Diese denkbaren unterschiedlichen Eigenschaften der modifizierten Pen-Einheit könnten bei der späteren Cu-Koordination von Bedeutung sein, da der CH_2-Linker des Naturstoffderivats **4** ein rigideres und der C_2H_4-Linker Naturstoffderivats **5** ein flexibleren Chelator ergeben könnte (vgl. **Schema 4** und **Schema 6** in 3.1.1). Die beiden letzten Reaktionen zur Herstellung von **21** wurden analog zu dem Pen mit einem CH_2-Linker durchgeführt (vgl. **Schema 8**). Es ist festzuhalten, dass die Boc-Entschützung und Bildung des Hydrochlorids **29** in besserer Ausbeute ablief als die Reaktion zu **25**. Aufgrund der in **29** vorhandenen Amidfunktion ist das Molekül polarer und dadurch schlechter in Et_2O löslich.

Zusammengefasst konnte auch das modifizierte Pen **21** in einem Maßstab von 300 mg mit einer moderaten Gesamtausbeute von 4 % über sieben Stufen längste lineare Sequenz (LLS) erhalten werden. Die Schwachpunkte der Syntheseroute waren die Herstellung des C_2-Linkers **22** und dessen Verknüpfung mit der Carbonsäure **18**.

3.1.4 Synthese des Tetrapeptids 12

Ein Fragment, das für die Synthese der Naturstoffderivate **4** und **5** gleichermaßen verwendet werden kann, ist Tetrapeptidfragment **12** (vgl. **Schema 4** und **Schema 6** in 3.1.1). Die Synthese von **12** erfolgte unter standardmäßigen Peptidkupplungsbedingungen und in den ersten Stufen analog zu den, in der Masterarbeit von FABIAN BRUNSIWG beschriebenen Vorschriften (**Schema 11**).[59] Dafür wurde in einem ersten Schritt Boc-Gly-OH mithilfe von EDC/Oxyma Bedingungen mit H_2N-Ser(OTIPS)-OMe **30**[59] zu Dipeptid **31** in einer Ausbeute von 84 % gekuppelt. Der darin enthaltene Me-Ester wurde wiederum mithilfe von 1 M *aq.* LiOH in THF zur Carbonsäure gespalten und diese mit H_2N-Cys(SPMB)-OMe **32**[66] in einer weiteren EDC/Oxyma Peptidkupplung eingesetzt. Um eine gute Ausbeute von 73 % über zwei Stufen zu erzielen, war es notwendig, Amin **32** frisch herzustellen.

Generell zeigten die in dieser Arbeit hergestellten Aminosäuren und Peptide mit einem ungeschützten *N*-Terminus die Tendenz, sich bei Lagerung zu zersetzen. Daher wurden die Boc-Entschützungen zu den entsprechenden Aminen direkt vor der nachfolgenden Peptidkupplung durchgeführt und diese ohne weitere Reinigung eingesetzt.



***Schema 11**: Synthese des Tetrapeptids **12** über Boc-Gly-Ser(OTIPS)-Cys(SPMB)-OMe **33**.*

Für die anschließende Kupplung mit der letzten benötigten Aminosäure **35** wurde **33** analog zu **31** umgesetzt und Carbonsäure **34** konnte in nahezu quantitativer Ausbeute

erhalten werden. Aufgrund der anspruchsvollen Peptidkupplung zwischen Cys und Tyr wurden für diese Reaktion verschiedene Reagenzien getestet (EDC/Oxyma, BTFFH[78], PyBOP, CDI, EEDQ,[79] HATU). Erst durch die Anwendung von HATU konnte eine gute Ausbeute ohne eine Epimerisierung der Stereozentren erzielt werden.

Der einzige Nachteil dieser Methode war, dass **12** auch nach chromatographischer Reinigung nur zusammen mit Tetramethylharnstoff (TMU) als Verunreinigung isoliert werden konnte (geschätzte Reinheit nach ^{1}H-NMR Spektrum: 94 %; bei der Ausbeutenberechnung berücksichtigt). Dieser entsteht als stöchiometrisches Nebenprodukt bei der Kupplungsreaktion, ist aber so unreaktiv, dass er die nachfolgenden Reaktionen nicht beeinflusst. Das vollständig geschützte Tetrapeptidfragment **12** von **MB OB3b** wurde im Multigramm-Maßstab mit einer guten Ausbeute von 48 % über sieben Stufen LLS ausgehend von Boc-Ser-OMe erhalten.

3.1.5 Verknüpfung der modifizierten Penicillamine mit dem Tetrapeptid 12

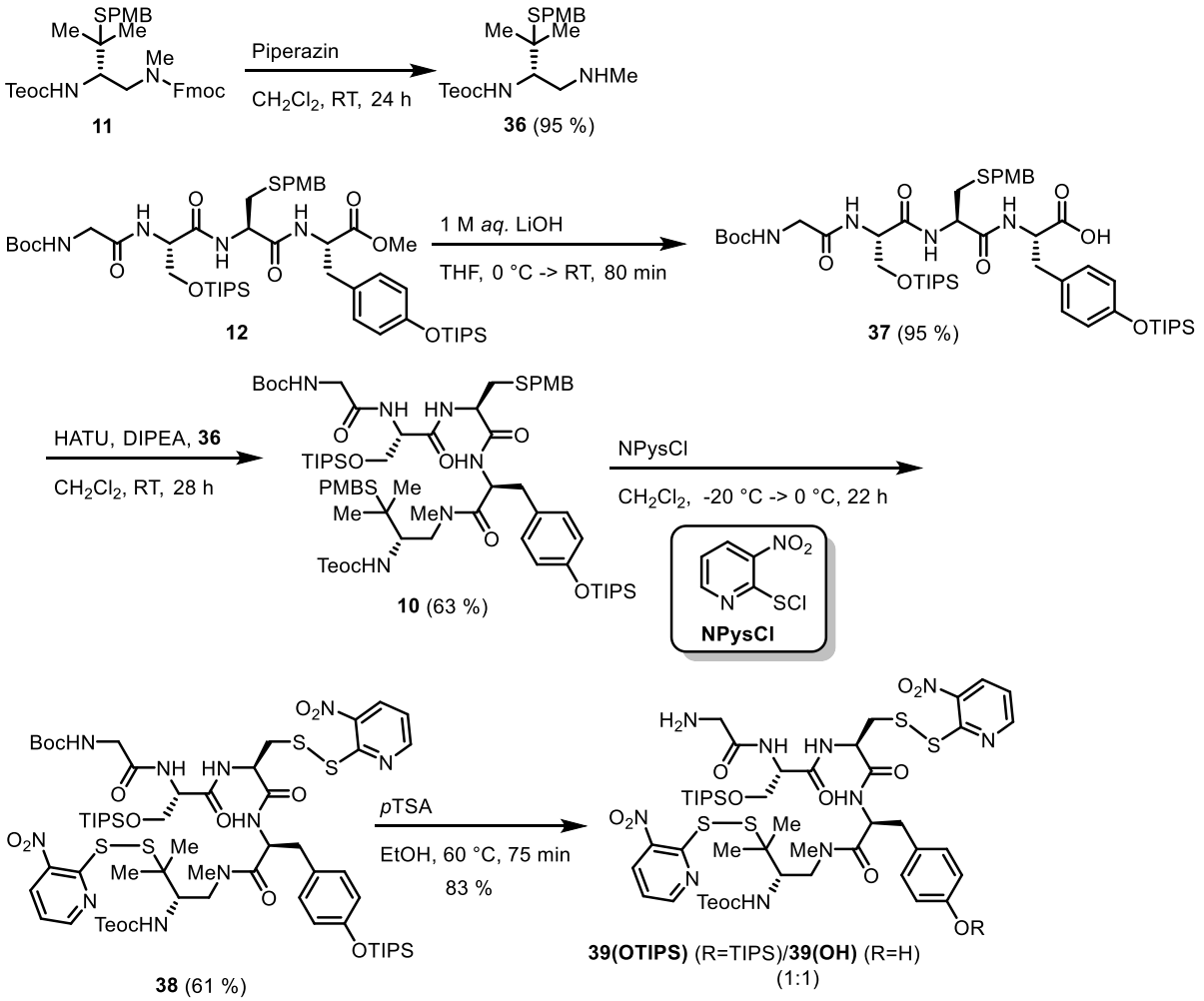
*3.1.5.1 Kupplung mit **11** und weitere Funktionalisierungen*

Die nächste Herausforderung zur Realisierung der unter 3.1.1 aufgestellten Retrosynthesen bestand darin, die sekundären Amine der Penicillamine aus 3.1.2 und 3.1.3 mit der Carbonsäure von **12** zu verknüpfen.

Dafür wurde zunächst die Fmoc-Gruppe des Pen **11** mit einem CH_2-Linker mithilfe des dafür standardmäßig verwendeten Piperazin in CH_2Cl_2 in nahezu quantitativer Ausbeute entfernt (**Schema 12**).[80]

Der *C*-Terminus des Tetrapeptids **12** wurde durch die Verseifung des darin enthaltenen Methylesters freigesetzt. Dazu wurden die zuvor verwendeten Bedingungen (1 M *aq.* LiOH bei RT für 2-3 h) leicht verändert. Bei 0 °C wurde die Base zu einer Lösung aus **12** in THF hinzugefügt und die Reaktion wurde im Anschluss lediglich für 80 min bei RT bis zur Aufarbeitung fortgeführt (**Schema 12**). Diese Reaktionsführung ermöglichte eine Isolation von **37** in 95 % Ausbeute und sie war erforderlich, um die Hydrolyse der basenlabilen TIPS-Schutzgruppe des Tyrosins zu unterbinden. Für die anschließende Kupplung mit dem sekundären Amin **36** wurden die HATU-vermittelten Bedingungen angewandt, da dieses Protokoll bei der Verknüpfung von Cys und Tyr bereits gute Ausbeuten geliefert hatte (vgl. 3.1.4). Nach chromatographischer Reinigung konnte **10** in einer Ausbeute von 63 % und mit Verunreinigungen durch TMU isoliert werden

(geschätzte Reinheit nach ^{1}H-NMR Spektrum: 63 %; bei der Ausbeutenberechnung berücksichtigt).



***Schema 12**: Synthese des Pentamers **10**, Umschützung in das NPys-Peptid **38** und selektive Entfernung der Boc-Gruppe zu **39**.*

Durch die Masterarbeit von FABIAN BRUNSIWG wurde erfolgreich gezeigt, dass NPys-geschützte Cys-enthaltene Peptide zum Aufbau eines Thioamids am *N*-Terminus verwendet werden können.[59] Aus diesem Grund wurden NPys-Gruppen zum Schutz der beiden vorhandenen Thiole auch in der Synthese der strukturvereinfachten Naturstoffderivate benutzt. Durch die Umsetzung des Pentamers **10** mit einem Überschuss an NPysCl wurde das gewünschte NPys-Peptid **38** gemeinsam mit einem Spuren an monosubstituiertem Produkt in 61 % erhalten. Für die Reaktionsführung war es entscheidend, die Mischung nicht zu lange bei RT zu rühren, da sonst eine vermehrte Zersetzung eintrat. Diese Umsetzung verdeutlichte jedoch, dass NPysCl auch bei komplexen Verbindungen zu einer selektiven Entschützung von Thiolen eingesetzt

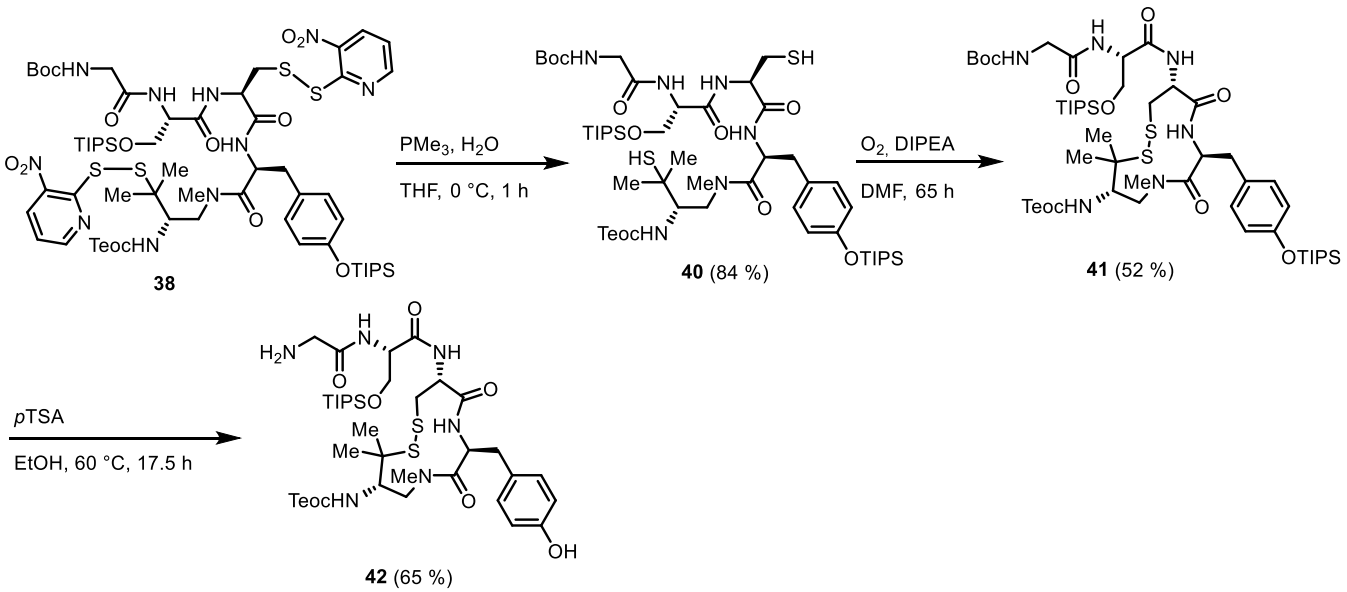
werden konnte. Insgesamt konnte NPys-Peptid **38** in einer Ausbeute von 31 % über drei Stufen ausgehend von Tetrapeptid **12** erhalten werden.

Im Folgenden bestand die Herausforderung darin, selektiv Amin **39** herzustellen, dessen *N*-Terminus über eine Thioacylierung in ein Thioamid überführt werden konnte. Die Entfernung der Boc-Gruppe wurde dabei sowohl durch potentiell basische Stellen (d.h. NPys-Gruppen) als auch durch die anderen vorhandenen säurelabilen Schutzgruppen (d.h. Teoc-, TIPS-Gruppe) erschwert. Nach einer Untersuchung der verschiedenen Brønstedtsäuren TFA, 1 M HCl in EtOAc und *p*TSA in EtOH stellte sich Letztere als geeignet heraus, die Boc- selektiv gegenüber der Teoc-Gruppe zu entfernen.[81] Jedoch bestand **39** nach genauerer Analyse aus einer Mischung aus **39(OTIPS)** und dem TIPS-entschützten Analogon **39(OH)**. Durch Integration der zugehörigen Singale der UV-Spur bei 254 nm wurde ein Verhältnis von 1:1 der beiden Produkte **39(OTIPS)** und **39(OH)** bestimmt (**Schema 12**). Bei dem freigesetzten Alkohol handelte es sich höchstwahrscheinlich um das Phenol des Tyr, da der dortige Silylether im Vergleich zu dem von Ser instabiler gegenüber sauren Reaktionsbedingungen ist. Da das Phenol jedoch aufgrund der geringeren Nukleophilie im Vergleich zu dem Amin keinen negativen Einfluss auf die nachfolgende Thioacylierung hat, wurden keine Versuche unternommen, **39(OTIPS)** und **39(OH)** zu trennen.

Neben der Verwendung von Thioethern und NPys-Gruppen zum Schutz freier Thiole in Seitenketten von Aminosäuren, können zwei Thiole in einem Peptid prinzipiell auch durch eine intramolekulare Disulfidbindung elegant geschützt werden. Da sich der Schwefel nicht mehr in der Oxidationsstufe -II sondern in -I befindet, ist dessen Nukleophilie dadurch deutlich herab gesenkt. Die Herstellung und Lagerung der strukturvereinfachten Naturstoffderivate als intramolekulare Disulfide hätte darüber hinaus noch den Vorteil, dass diese vor einer Oxidation der Thiole und einer möglichen Polymersierung geschützt wären. Außerdem wäre die Bildung eines intramolekularen Disulfids interessant, da dadurch ein Zwölfring geschlossen wird, der eine Ähnlichkeit zu dem Disulfid in **MB OB3b** aufweist.

Zur Synthese eines solchen Disulfides wurden zunächst die NPys-Gruppen aus **38** entfernt (**Schema 13**). Die Staudinger-Reduktion dieser asymmetrischen und besonders elektronenarmen Disulfide mit PMe_3 war bereits aus früheren Arbeiten in der Arbeitsgruppe PLETTENBURG an einem Mono-NPys-Peptid bekannt.[59] Unter leichter

Anpassung der Reaktionsbedingungen konnte Dithiol **40** nach extraktiver Reinigung in einer guten Ausbeute von 84 % isoliert werden.



Schema 13: *Synthese des intramolekularen Disulfids **41** und Entschützung zu Amin **42(OH)**.*

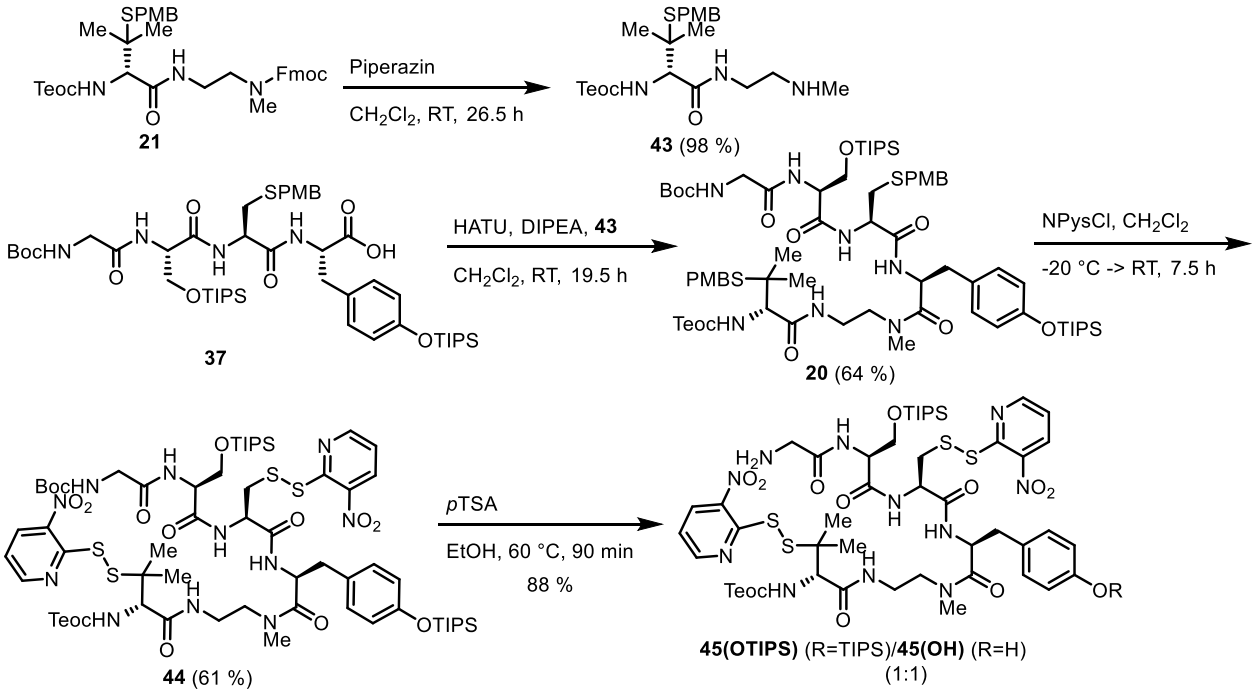
40 wurde ohne weitere Reinigung für die Knüpfung des intramolekularen Disulfides in DMF unter O_2-Atmosphäre eingesetzt.[59] Eine 0.8 mM Reaktionsmischung sollte dabei die intramolekulare gegenüber der intermolekularen Reaktion von zwei Molekülen **40** bevorzugen. Inital wurde zunächst O_2 für 45 min durch die Mischung geleitet, bevor diese nach 24 h und 48 h erneut mit frischem O_2 behandelt wurden. Mittels Säulenchromatographie konnte Disulfids **41** in einer Ausbeute von 52 % erhalten werden. Eine bessere Ausbeute des Disulfids wurde vermutlich durch andere auftretende Oxidationsreaktionen und durch Oligo- und Polymerisierungen verhindert. Es wurden aber keine weiteren Produkte chromatographisch isoliert, aus denen **40** mittels Reduktion zurückgewonnnen werden könnte.

In einem weiteren Schritt wurde die Boc-Gruppe des Gly aus **41** entfernt, um das Amin zur Thioacylierung verwenden zu können. Dafür wurde eine modifizierte Version der Methode zur Synthese der Mischung aus **39(OTIPS)** und **39(OH)** verwendet (vgl. **Schema 12**). Hier wurde gezielt durch längeres Erhitzen mit einem Überschuss an *p*TSA die Entfernung der TIPS-Gruppe forciert, um nur ein einziges Amin für die anschließende Peptidkupplung zum Aufbau des Thioamids einzusetzen. Nach Waschen mit PE zur Entfernung der Silyl-Reste, konnte **42(OH)** in einer aufgrund von eintretender

Zersetzung geringeren Ausbeute von 65 % erhalten werden (**Schema 13**). Insgesamt betrug die Ausbeute für die Umsetzung von **38** in Amin **42(OH)** 28 % über drei Stufen.

*3.1.5.2 Kupplung mit **21** und weitere Funktionalisierungen*

Analog zu den, im vorherigen Abschnitt beschriebenen Schritten zur Synthese der Moleküle mit einem CH_2-Linker wurde **21** mit einem C_2H_4-Linker zunächst einer Fmoc-Entschützung unterzogen (**Schema 14**). Das sekundäre Amin **43** konnte nach Reaktion mit Piperazin in einer sehr guten Ausbeute von 98 % isoliert werden, bevor es mit Carbonsäure **37** in der HATU-vermittelten Reaktion zu **20** gekuppelt wurde. Die Ausbeute bei dieser Reaktion lag mit 64 % im gleichen Bereich wie bei der Herstellung des PMB-Pentamers **10** mit einem CH_2-Linker (vgl. **Schema 12**).

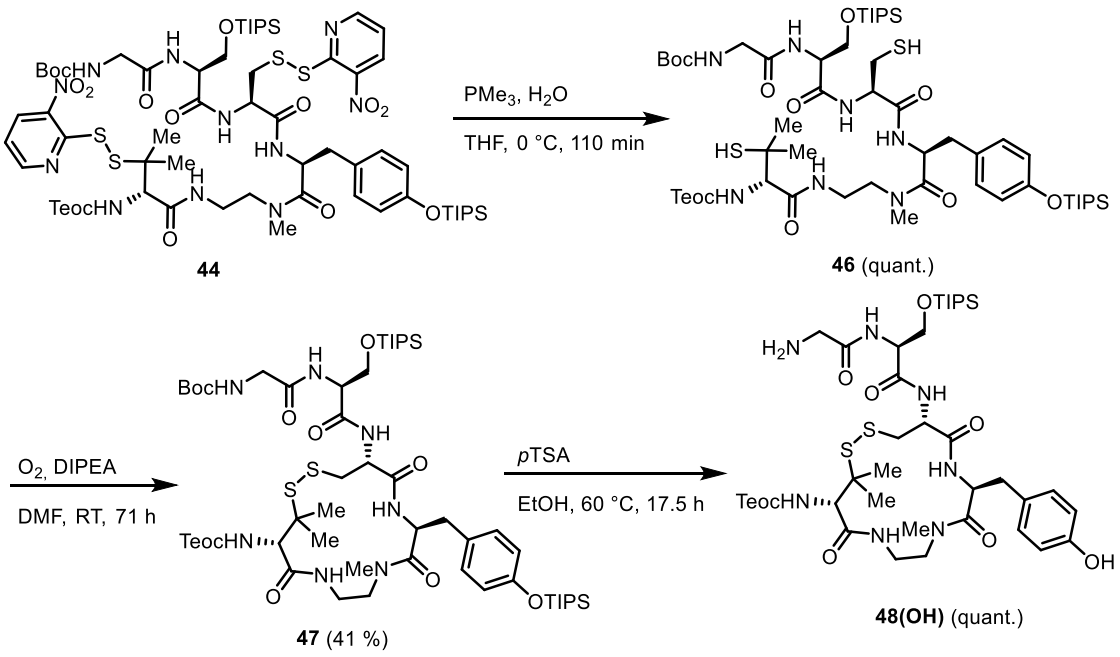


***Schema 14**: Synthese des Pentamers **20**, des NPys-Pentamers **44** und Entschützung der Boc-Gruppe des N-terminalen Glycins.*

Der nachfolgende NPys-Austausch lieferte **44** in vergleichbarer Ausbeute von 61 %. Die Reaktionsdauer betrug lediglich 7.5 h, da nach dieser Zeit nur noch wenig monosubstituiertes Produkt mittels LC-MS beobachtet wurde. Letzteres ließ sich jedoch nicht gänzlich abtrennen, sodass **44** nur gemeinsam mit Spuren dieser Verunreinigung isoliert werden konnte. Mithilfe dieser Reaktionen konnte das NPys-Peptid **44** in einer Gesamtbeute von 37 % über drei Stufen ausgehend von Tetrapeptid **12** erhalten werden. Bei der Umsetzung zu Amin **45** zeigte sich, dass nach ähnlicher Reaktionszeit wie im Fall der analogen Verbindung mit einem CH_2-Linker Linker (vgl. **Schema 12**) die

Entfernung der Boc-Gruppe mit einer geringeren Selektivität ablief. Es wurde zwar wieder eine 1:1 Mischung aus **45(OTIPS)** und **45(OH)** erhalten, jedoch zeigte die Reaktionskontrolle mittels LC-MS deutliche, nicht näher identifizierte Verunreinigungen, die **39** nicht aufwies. Wie bei den anderen primären Aminen zuvor wurden aber keine weiteren Versuche unternommen, **45(OTIPS)** und **45(OH)** chromatographisch zu reinigen.

Aus den unter 3.1.5.1 beschriebenen Gründen wurde das intramolekulare Disulfid mit einem C_2H_4-Linker als geeignete Vorstufe zur Synthese des Naturstoffderivats **5** ausgewählt (vgl. **Schema 6** in 3.1.1). Die Umsetzung des NPys-Pentamers **44** bis zu Disulfid **47** erfolgte analog zu den für Disulfid **41** mit einem CH_2-Linker beschriebenen Schritten (**Schema 15**). Zunächst wurden die beiden NPys-Gruppen durch Reduktion mit PMe_3 in quantitativer Ausbeute entfernt, bevor Dithiol **46** in der Disulfid-Bildung unter O_2-Atmosphäre in DMF umgesetzt wurde.



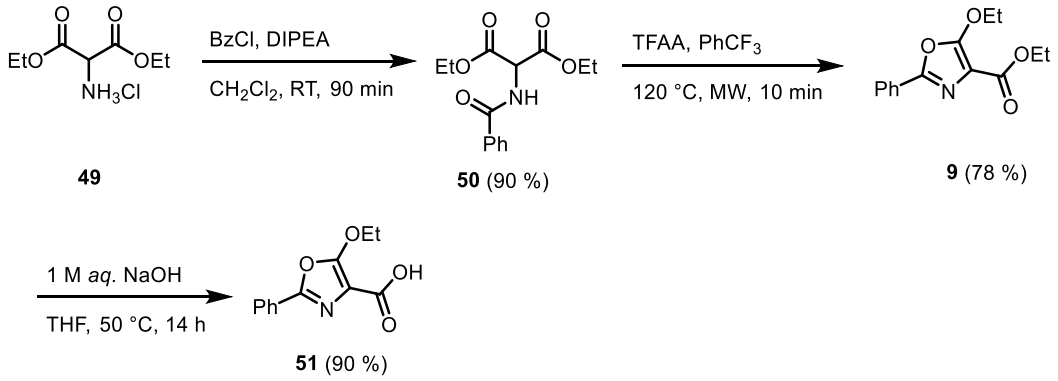
***Schema 15**: Synthese des intramolekularen Disulfids **47** und Entfernung der Boc-Gruppe des N-terminalen Glycins.*

Die Atmosphäre wurde wieder nach 24 h und 48 h mit frischem O_2 ausgetauscht und die Reaktion für eine Gesamtzeit von 71 h fortgesetzt. Dies ergab **47** in einer Ausbeute von 41 %. Generell lässt sich festhalten, dass die Bildung des Fünfzehnringes in **47** erwartungsgemäß weniger begünstigt ist als die Bildung des Zwölfringes in **41** (52 % vgl. **Schema 13**). Ähnlich wie bei der Synthese des Disulfidamins mit einem CH_2-Linker führte das Erhitzen mit einem Überschuss an *p*TSA in EtOH zu einer simultanen

Entfernung der Boc- und der TIPS-Schutzgruppe unter Bildung von **48(OH)**, welches in einer Gesamtausbeute von 41 % über drei Stufen ausgehend von **44** synthetisiert wurde.

3.1.6 Synthese und Verseifung des Oxazolesters 9

Nachdem die, für die Umsetzung der unter 3.1.1 beschriebenen Retrosynthesen notwendigen Peptidfragmente erfolgreich erhalten werden konnten, wurde Oxazolester **9** hergestellt. Dieser sollte im Nachgang einen Zugang zu den gewünschten Thioamiden mithilfe einer Thioacylierung ermöglichen (vgl. **Schema 4** und **Schema 6** in 3.1.1). Unter Verwendung von BzCl und DIPEA wurde zunächst das Hydrochlorid von Diethylaminomalonat **49** zu Benzamid **50** umgesetzt (**Schema 16**). In einem nächsten Schritt erfolgte die literaturbekannte Zyklisierung zu Oxazol-Et-Ester **9**.[54]



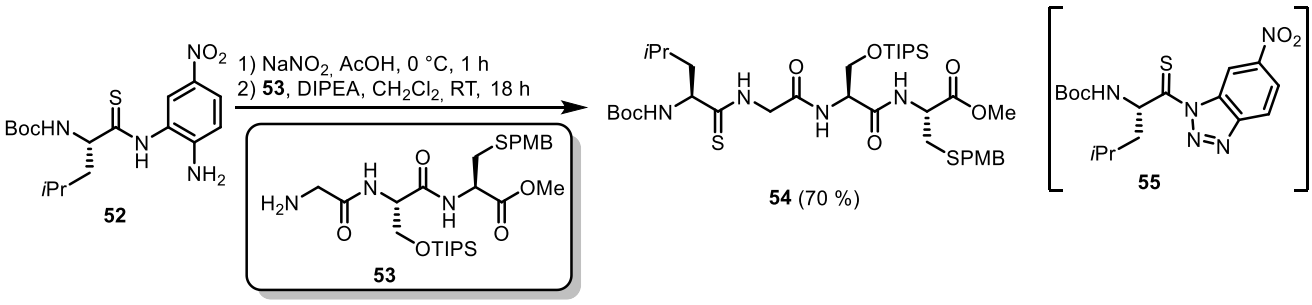
***Schema 16**: Literaturbekannte Synthese des Oxazols **9**[54] und Verseifung zur Carbonsäure **51**.*

Im Gegensatz zu den in der Literatur verwendeten Bedingungen wurde nicht bei 160 °C sondern bei einer Temperatur von 120 °C ein optimaler Umsatz zum gewünschten Produkt erreicht. Bei höheren Temperaturen fand bevorzugt eine Zersetzung von **9** statt. Nach chromatographischer Reinigung konnte **9** im Multigramm-Maßstab mit einer Ausbeute von 78 % isoliert werden (Literaturausbeute: 79 %). Als nächstes wurde der Et-Ester von **9** mithilfe von 1 M *aq.* NaOH zur Carbonsäure **51** gespalten, die nachfolgend für eine Thioacylierung verwendet werden konnte.

3.1.7 Synthese des Thioamids durch Thioacylierungsmethoden

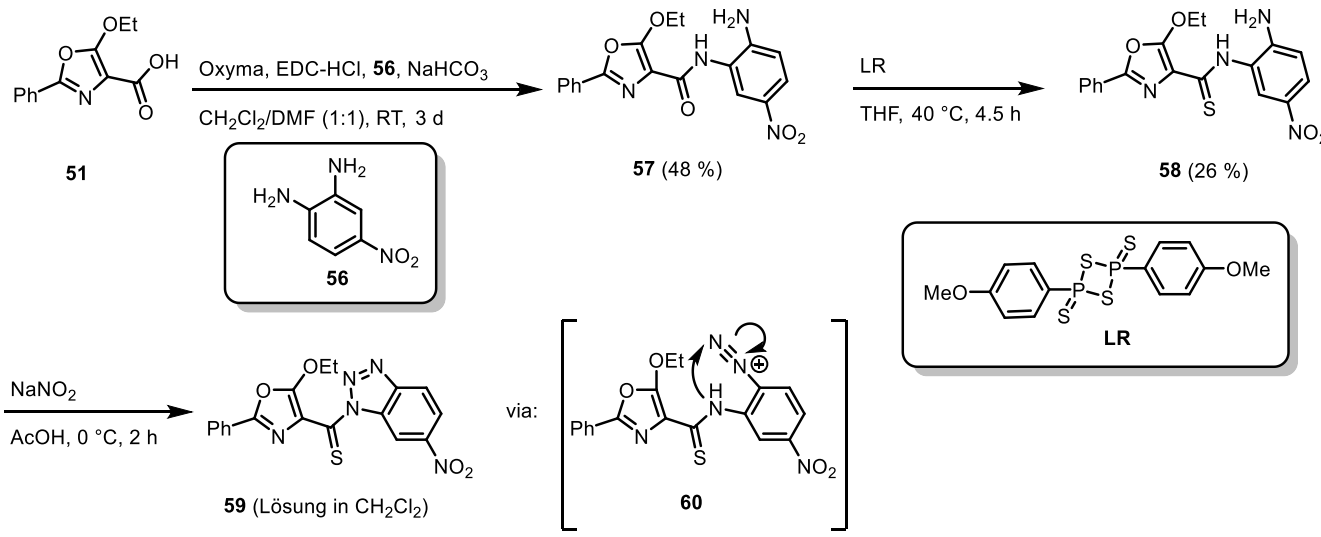
*3.1.7.1 Synthese und Anwendung der aktivierten Thiocarbonylverbindung **59***

In seiner Masterarbeit beschrieb FABIAN BRUNSIWG, dass eine Thioamidbindung zwischen zwei aliphatischen Aminosäuren selektiv durch die Reaktion eines aktivierten Thionocarbonyls mit einem Amin aufgebaut werden konnte (**Schema 17**).[59] Bei dieser Methode handelte es sich um die Verwendung des aus Thioanilid **52** *in situ* gebildeten Thionotriazols **55** zur Thioacylierung des Amins **53**. Diese seitenselektive Einführung eines Thioamids in ein Oligopeptid wurde ursprünglich von der Gruppe um CHATTERJEE für die Festphasen-unterstützte Synthese von Thiopeptiden entwickelt.[60] Aufgrund des guten Ergebnisses, welches bei der Synthese des Thioamids **54** erzielt wurde, wurde diese Methode ebenfalls in der vorliegenden Dissertation als erstes untersucht. Die Peptidfragmente aus den vorherigen Kapiteln sollten auf diese Weise mit der Oxazolcarbonsäure **51** zur Umsetzung unter 3.1.1 beschriebenen Retrosynthesen verbunden werden.



***Schema 17**: Synthese des Thioamids **54** durch Verwendung des aus **52** gebildeten Thionotriazols zur Thioacylierung von **53** nach BRUNSWIG.*[59]

Die Herstellung der dafür notwendigen aktivierten Thiocarbonylverbindung **59** erfolgte in Anlehnung an die, in der Literatur beschriebenen Bedingungen für die Synthese des aliphatischen Thionotriazols **55** (**Schema 18**).[60] Als erstes wurde **51** in Anilid **57** durch Peptidkupplung mit Anilin **56** umgewandelt. Mithilfe der, bei der Synthese der Peptidbausteine eingesetzten EDC/Oxyma-Kupplungsbedingungen konnte **57** in einer Ausbeute von 48 % erhalten werden. Die geringe Ausbeute lag hauptsächlich an der niedrigen Reaktivität des Anilins **56.** Von den beiden vorhandenen Aminogruppen reagierte selektiv die in meta-Stellung zur NO_2-Gruppe befindliche, da diese die nukleophilere ist.

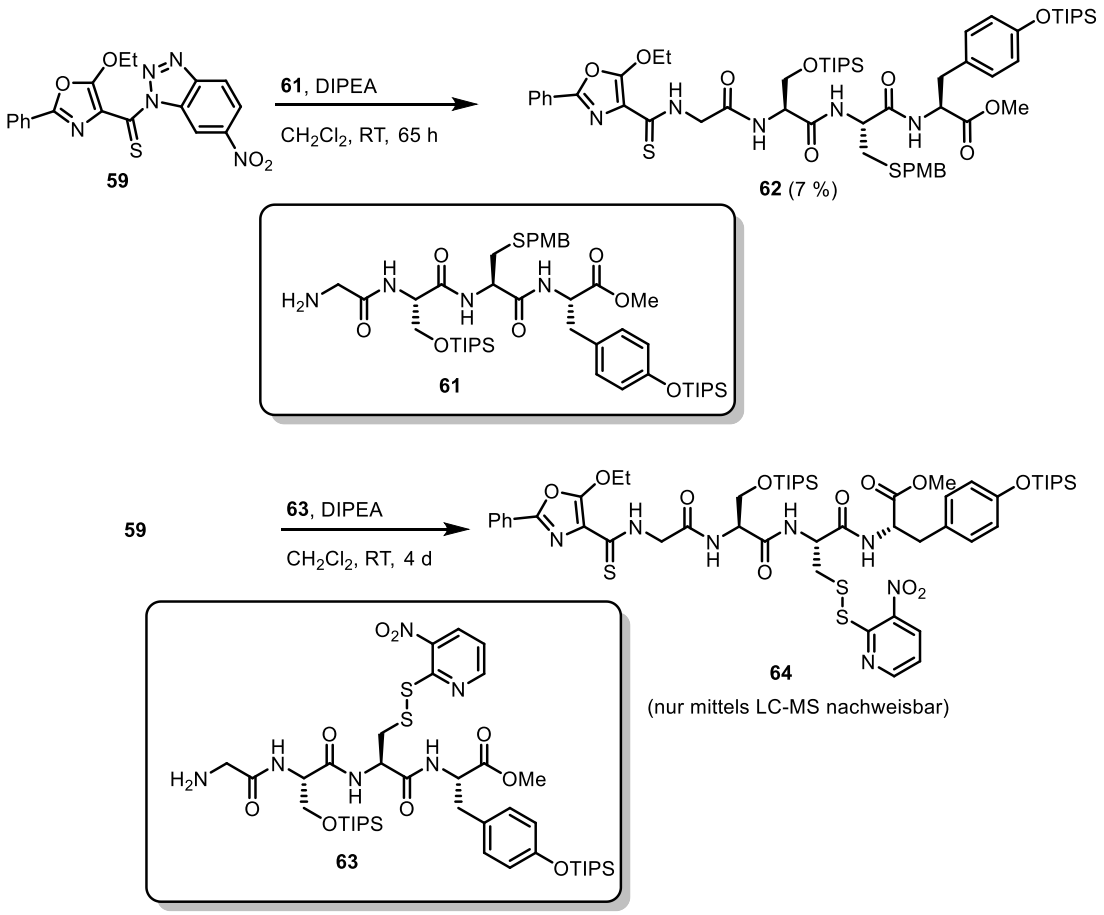


***Schema 18**: Synthese des Thionobenzotriazols **58** über die Diazonium-Zwischenstufe **60** .*

Im nächsten Schritt wurde **57** durch Thionierung mithilfe des LAWESSON-Reagenzes (LR) in THF bei 40 °C in Thioamid **58** überführt. Dabei wurde eine maximale Ausbeute von 26 % erzielt (**Schema 18**). Vermutlich trat eine Zersetzung des Oxazolrings als Nebenreaktion auf. Es ist denkbar, dass LR an die Doppelbindung des Ketenacetals in **57** addierte, was wiederum zu einer Spaltung des Rings führen könnte. Auch durch eine Verwendung von anderen Lösungsmitteln (CH_2Cl_2, Toluol) konnte die Ausbeute nicht verbessert werden.

Abschließend wurde die aktivierte Thiocarbonyl-Verbindung **59** durch Diazotierung von **58** mit $NaNO_2$ in AcOH unter Lichtausschluss erhalten. Das Produkt wurde in einer CH_2Cl_2-Lösung isoliert und konnte mittels DC-MS Analyse nachgewiesen werden. Mechanistisch verläuft die Reaktion über eine 5-*endo-dig* Zyklisierung der Diazonium-Zwischenstufe **60** (**Schema 18**). Aufgrund der Labilität von **59** wurde die CH_2Cl_2-Lösung nicht unter vermindertem Druck konzentriert, sondern direkt in der nachfolgenden Thioamidknüpfung umgesetzt.

Als Testsubstrate für die Thioacylierung mit **59** wurde das unter 3.1.4 beschriebene Tetrapeptidfragment **12** als Ausgangverbindung verwendet und mittels Boc-Entschützung zu den Aminen **61** und **63** umgesetzt (**Schema 19**). Diese wurden direkt im Anschluss mit **59** unter Lichtausschluss zur Reaktion gebracht. Anhand von **63** sollte untersucht werden, ob ein NPys-geschütztes Amin mithilfe von **59** thioacyliert werden kann.



***Schema 19**: Thioamidkupplungen unter Verwendung des aktivierten Thiocarbonyls **59**.*

Nach einer Reaktionszeit von 65 h bei RT konnte das gewünschte Produkt **62** mittels DC-MS und LC-MS bei der Umsetzung von **61** mit **59** erfolgreich nachgewiesen werden. Jedoch enthielt die Reaktionsmischung auch noch nicht reagiertes **61**. Da sich nach dieser Zeit der Umsatz vermutlich aufgrund der Zersetzung von **59** nicht mehr veränderte, wurde die Reaktion aufgearbeitet und säulenchromatographisch gereinigt. Dadurch wurde eine Fraktion in 7 % Ausbeute isoliert, die nach LC-MS-Analyse das Thioamid **62** gemeinsam mit unbekannten Verunreinigungen enthielt.

Die Reaktion mit dem NPys-Amin **63** lieferte ebenfalls kein zufriedenstellendes Ergebnis. Nach einer Reaktionsdauer von vier Tagen bei RT konnte zwar die Anwesenheit des gewünschten Thioamids **64** mittels LC-MS nachgewiesen werden. Jedoch war der Umsatz so gering, dass der Ansatz direkt verworfen und nicht weiter verfolgt wurde. Daher stellten NPys-geschützte Amine wie **63** keine nützlichen Verbindungen dar, die in einer Thioacylierungsreaktion verwendet werden konnten.

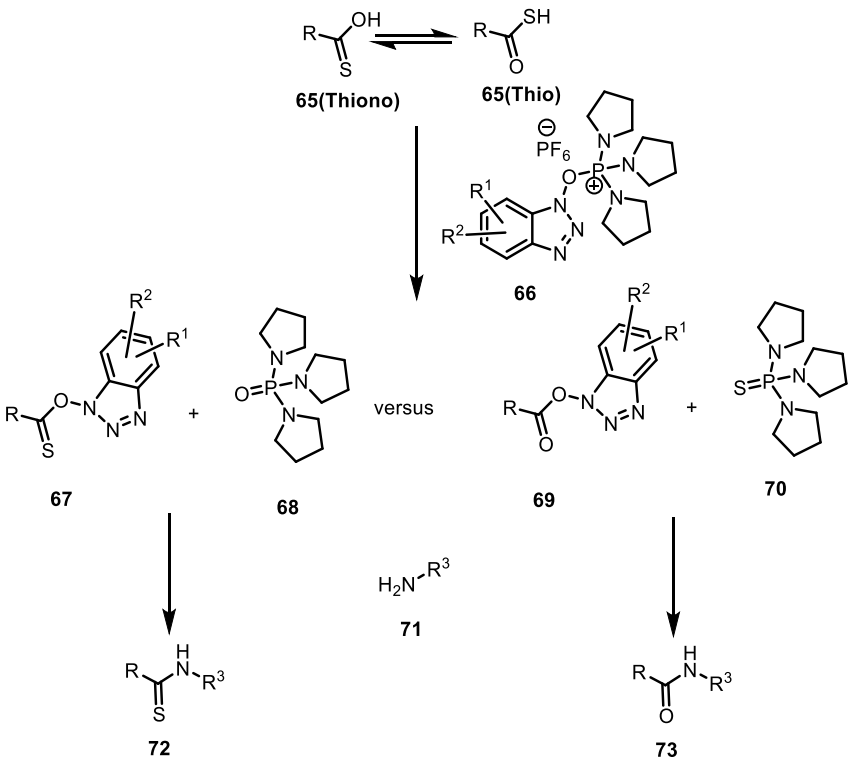
Es kann zusammengefasst werden, dass die Strategie, ein Peptid an **59** zu kuppeln zwar zu einer Bildung des gewünschten Produkts führte, jedoch war die Ausbeute sehr gering und das Thioamid konnte nur gemeinsam mit unbekannten Verunreinigungen isoliert werden. Außerdem stellte die Synthese von **59** einen weiteren Schwachpunkt der Sequenz dar. Dieses konnte ausgehend von Ph-Oxa(OEt)-OH **51** nur in einer maximalen Ausbeute von 12 % über drei Stufen in einer CH_2Cl_2-Lösung erhalten werden.

Wie unter 3.1.1 beschrieben bestand das Ziel darin, mit den strukturvereinfachten Naturstoffderivaten **4** und **5** eine Route zu etablieren, die für eine Totalsynthese von **MB OB3b** angewandt werden kann. Dabei ist eine so geringe Ausbeute eines Kupplungspartners nicht akzeptabel. Aus diesem Grund wurde die Kupplung mit Thionotriazolen wie **59** verworfen.

3.1.7.2 *Synthese und Anwendung elektronenarmer PyBOP-Derivate*

Neben dem geringeren Umsatz der aktivierten Thionocarbonyl-Verbindung zu einem Thioamid war eines der Hauptprobleme in der Synthese von **59** die geringe Ausbeute der Thionierung von **57**. Um die genannten Punkte zu verbessern, war das Ziel, Thiocarbonsäuren[82] mithilfe von elektronenarmen PyBOP-Derivaten **66**[61] mit den entsprechenden Aminen zu kuppeln.

Dieser Ansatz basiert auf dem Prinzip, dass die sich ausbildende P=O Bindung in **68** stärker als die P=S Bindung in **70** ist (**Schema 20**).[61] Zur gewünschten Bildung des Thiono-OBt-Esters **67** muss daher Thiocarbonsäure **65(Thiono)** an dem Phosphor der Kupplungsreagenzien angreifen. Durch eine Verringerung der Elektronendichte der HOBt-Derivate wird der Phosphor ebenfalls elektronenärmer und nach dem HSAB-Konzept härter. Dies begünstigt wiederum einen Angriff des Sauerstoffs aus **65**. Ein elektronenärmeres Intermediat **67** bietet zudem den Vorteil, dass es schneller mit Amin **71** unter Bildung des Thioamids **72** reagiert. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass immer ein Teil von **65** zu Amid **73** umgesetzt wird, da der OBt-Ester **69** aus **65(Thio)** gebildet werden kann und Letzteres selbst bei einer unvollständigen Aktivierung durch **66** als Elektrophil für einen Angriff von **71** dienen kann.[61]

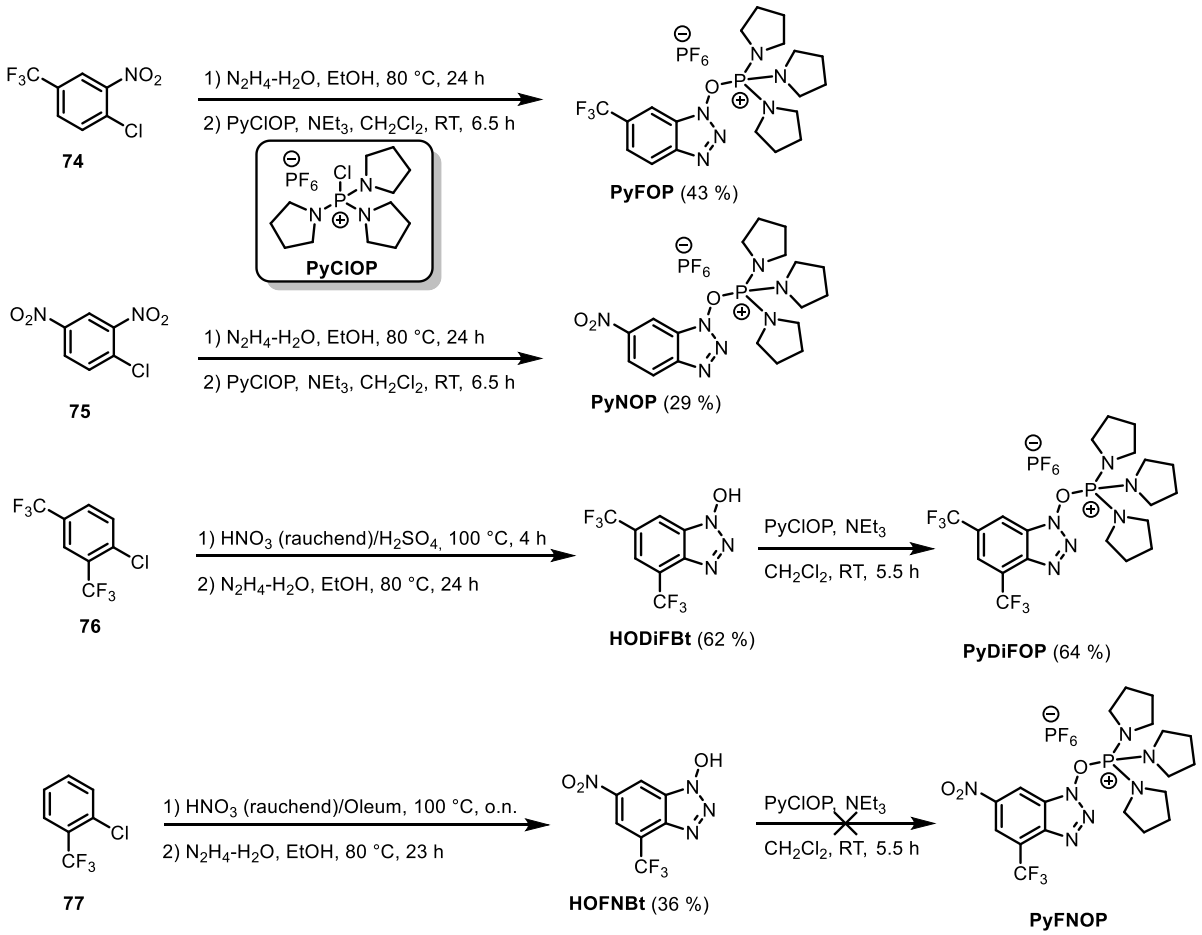


***Schema 20**: Zwischenprodukte zur Bildung von Thioamiden **72** und Amiden **73** mithilfe von PyBOP Reagenzien **66**.*

Zur Umsetzung dieser Strategie wurden die elektronenarmen Kupplingsreagenzien nach teilweise literaturbekannten Synthesen aus den entsprechend modifizierten HOBt-Derivaten und PyClOP[61] als Startmaterial hergestellt (**Schema 21**).

Zunächst erfolgte die in der Literatur beschriebene Reaktion zu PyFOP und PyNOP.[61,83] Dafür wurde das Chlorid der elektronenarmen Nitrobenzole **74** und **75** mit Hydrazin substituiert. Unter den Reaktionsbedingungen ging das erhaltene Arylhydrazin unmittelbar eine intramolekulare Zyklisierung mit der Nitrogruppe zu den modifizierten HOBt-Derivaten ein. Diese wurden wiederum mit PyClOP[61] umgesetzt, was die PyBOP-Derivate in 43 % über zwei Stufen bzw. 29 % über zwei Stufen ergab (Literaturausbeuten: 80 % bzw. 52 %).[61,83]

Darüber hinaus wurden die noch elektronenärmeren PyBOP-Derivate PyDiFOP und PyFNOP hergestellt (**Schema 21**). Dafür wurde **76** zunächst nitriert[84] und das erhaltene Nitrobenzol wie zuvor mit Hydrazin zu HODiFBt in einer Ausbeute von 62 % über zwei Stufen zyklisiert. Die Reaktion mit PyClOP ergab PyDiFOP in 64 % Ausbeute zusammen mit 15 % freiem HODiFBt. Dieses entstand vermutlich bei der Aufarbeitung aufgrund von Hydrolyse des im Vergleich zu PyFOP und PyNOP elektrophileren Kupplungsreagenzes.

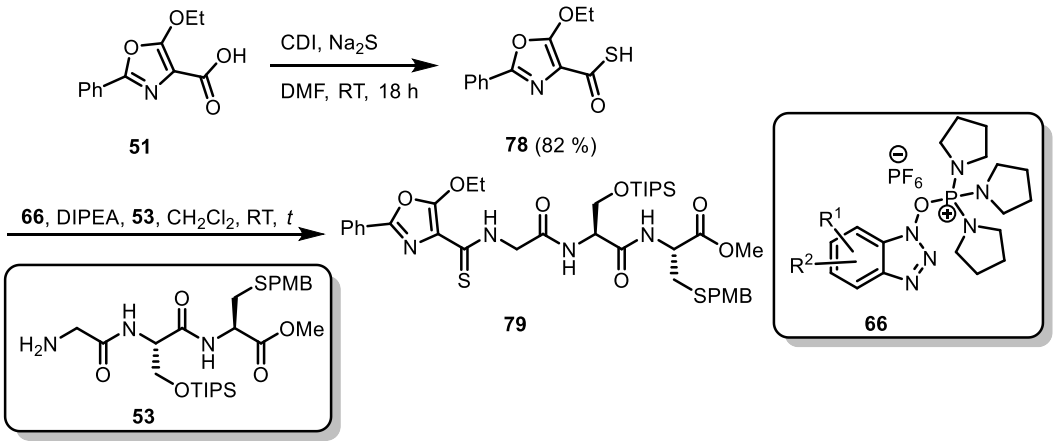


***Schema 21**: Synthese verschiedener elektronenarmer PyBOP Derivate.*

Um PyFNOP zu gewinnen, wurde zunächst **77** doppelt nitriert.[85] Das *o,p*-Dinitrochlorbenzol konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung nur in Kombination mit den einfach nitrierten Chlorbenzolen isoliert werden (6 % *p*-NO_2 und 2% *o*-NO_2). Da aber lediglich Letzteres und die Dinitroverbindung mit Hydrazin im nächsten Schritt reagieren würden, wurde keine weitere Aufreinigung durchgeführt. Das entsprechende HOFNBt konnte dann nach der bekannten Vorgehensweise in einer Ausbeute von 36 % über zwei Stufen synthetisiert werden (**Schema 21**). Abschließend ließ sich daraus PyFNOP jedoch nicht herstellen. Entweder ist HOFNBt nicht nukleophil genug, um das Chlorid in PyClOP zu substituieren, oder PyFNOP ist so elektronenarm und reaktiv gegenüber einem Elektrophil, dass es beim Waschen mit H_2O noch schneller als PyDiFOP zerfällt.

Nach erfolgreicher Herstellung der benötigten elektronenarmen PyBOP-Derivate **66** wurde Carbonsäure **51** durch Aktivierung mittels CDI und Reaktion mit Na_2S zur

Thiocarbonsäure **78** umgesetzt und in guter Ausbeute erhalten (**Schema 22**).[82] **78** konnte unter Ar-Atmosphäre im Gefrierschrank ohne merkliche Zersetzung gelagert werden. Lediglich in Lösung trat eine Zersetzung auf, sodass bereits nach Lagerung über Nacht in Aceton mittels LC-MS Nebenprodukte detektiert wurden. Im Anschluss wurden die in **Schema 21** beschriebenen Kupplungsreagenzien **66** für die selektive Thioamidkupplung zu **79** verwendet (**Schema 22**). Zur Validierung der Methode wurde mit Amin **53** wieder ein kürzeres und einfacher zugängliches Peptidfragment (vgl. 3.1.4) verwendet.



***Schema 22**: Synthese der Thiocarbonsäure **78** und selektive Kupplung zu dem Thioamid **79** mithilfe der in **Tabelle 4** erwähnten PyBOP-Derivate **66**.*

In **Tabelle 4** sind die Resultate der getesteten Kupplungsreagenzien zusammengefasst. Wie erwartet, nahm die isolierte Ausbeute von **79** unter Verwendung von elektronenärmeren Reagenzien zu und erreichte einen maximalen Wert von 48 % (Eintrag 4 in **Tabelle 4**). Jedoch konnte laut LC-MS-Analyse auch nach chromatographischer Reinigung nur eine Mischung aus **79** und dem korrespondierenden Amid in allen gezeigten Reaktionen erhalten werden.

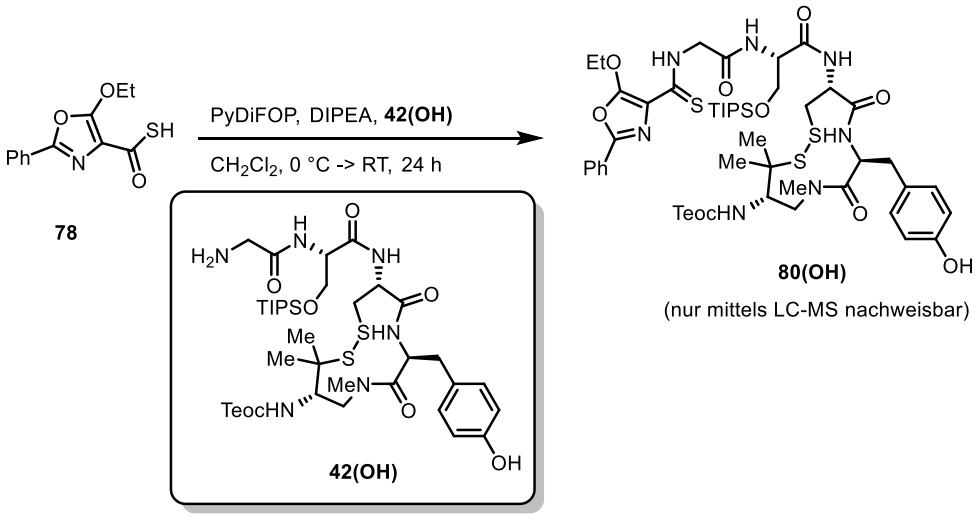
***Tabelle 4**: Ergebnisse der Thioamidkupplungen aus **Schema 22** mit den verschiedenen PyBOP-Derivaten **66** aus **Schema 21**; Die Verhältnisse wurden per LC-MS aufgrundlage der extrahierten Massespuren bestimmt.*

Eintrag	Reagenz 66	*t* [d]	Ausbeute 79 [%]
1	PyBOP	5	hauptsächlich Bildung des Amids
2	PyNOP	6	17 (3:2 Mischung mit Amid)
3	PyFOP	6	20 (1:1 Mischung mit Amid)
4	PyDiFOP	2	48 (2:1 Mischung mit Amid)

Durch diese Resultate lässt sich festhalten, dass die Synthese von **78** eine äußerst effektive Methode bot, um das Schwefelatom in das Ph-Oxa(OEt)-Motiv einzubringen. Bei der nachfolgenden Kupplung mithilfe elektronenarmer PyBOP-Derivate konnte die

Bildung des gewünschten Thioamids erfolgreich nachgewiesen werden. Bezüglich der Selektivität gegenüber einer Bildung des Amids wurde erwartungsgemäß mit PyDiFOP als elektronenärmsten Kupplungsreagenz das beste Ergebnis erzielt. Daher wurde dieses Reagenz im Folgenden auf die Reaktion von **78** mit den komplexeren Pentameraminen aus 3.1.5.1 und 3.1.5.2 angewandt.

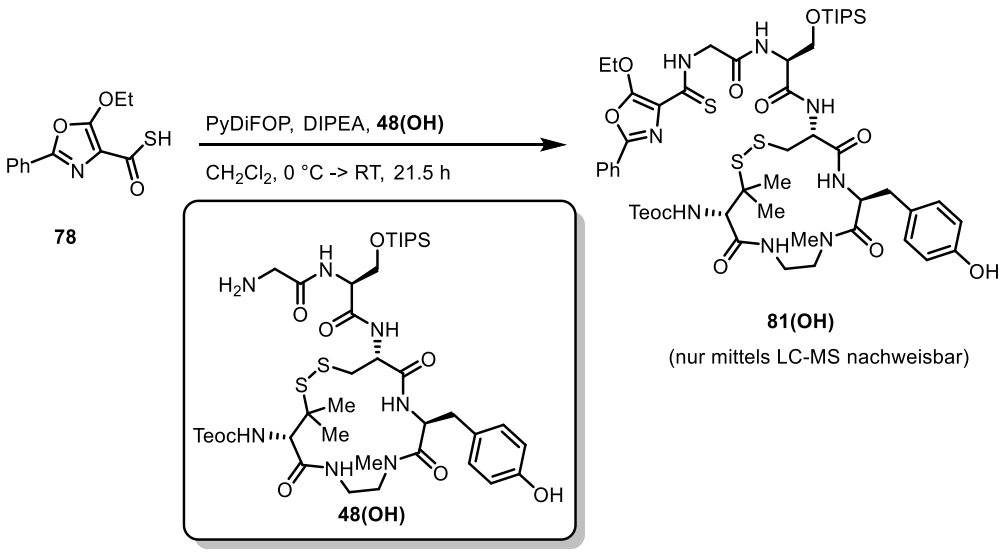
Zuerst wurde die Kupplung von **78** mit Disulfidamin **42(OH)** durchgeführt (**Schema 23**). Nach einer Reaktionszeit von 24 h wurde die Mischung verdünnt und direkt mittels Säulenchromatographie gereinigt, da bei der Kontrolle mittels LC-MS nur **80(OH)** und keines der Startmaterialien nachgewiesen werden konnte. Nach der Reinigung konnte **80** zwar in dem isolierten Feststoff mittels LC-MS und HRMS nachgewiesen werden, jedoch bestand dieser hauptsächlich aus unbekannten Nebenprodukten. Bei der Reaktion, der nachfolgenden Aufarbeitung oder der Reinigung trat vermutlich bevorzugt eine Zersetzung der Startmaterialien anstelle einer Produktbildung auf.



***Schema 23**: PyDiFOP vermittelte Thioamidkupplung zwischen **78** und Pentameramin mit einem CH_2-Linker **42(OH)**.*

Ebenfalls wurde eine Kupplung von **78** mit Disulfidamin **48(OH)** durchgeführt (**Schema 24**).

Nach 21.5 h Rühren konnte mittels LC-MS ein vollständiger Umsatz zu dem gewünschten Thioamid **81(OH)** nachgewiesen werden. Nach einer Aufarbeitung der Reaktionsmischung ließen sich in dem gewonnen Rohmaterial jedoch nur noch Spuren von **81(OH)** massenspektrometrisch nachweisen. Demzufolge bestand das Rohprodukt hauptsächlich aus **78** und Tris(pyrrolidin)phosphinoxid. Dies könnte auf eine Zersetzung bei der wässrigen Aufarbeitung hindeuten.



***Schema 24**: PyDiFOP vermittelte Thioamidkupplung zwischen **78** und Pentameramin mit einem C_2H_4-Linker **48(OH)**.*

Unter Berücksichtigung der beiden Kupplungsversuche mit den komplexeren Aminen **42(OH)** und **48(OH)** lässt sich festhalten, dass diese Strategie trotz einer nachgewiesenen Bildung der Thiopeptide nicht dafür geeignet war, die Chelatoren **4** und **5** aus komplexeren Vorläufern herzustellen. Aus nicht näher untersuchten Gründen führte die Reaktion mit den elektroenarmen PyBOP-Derivaten nicht zu einer isolierbaren Menge der erhofften Kupplungsprodukte.

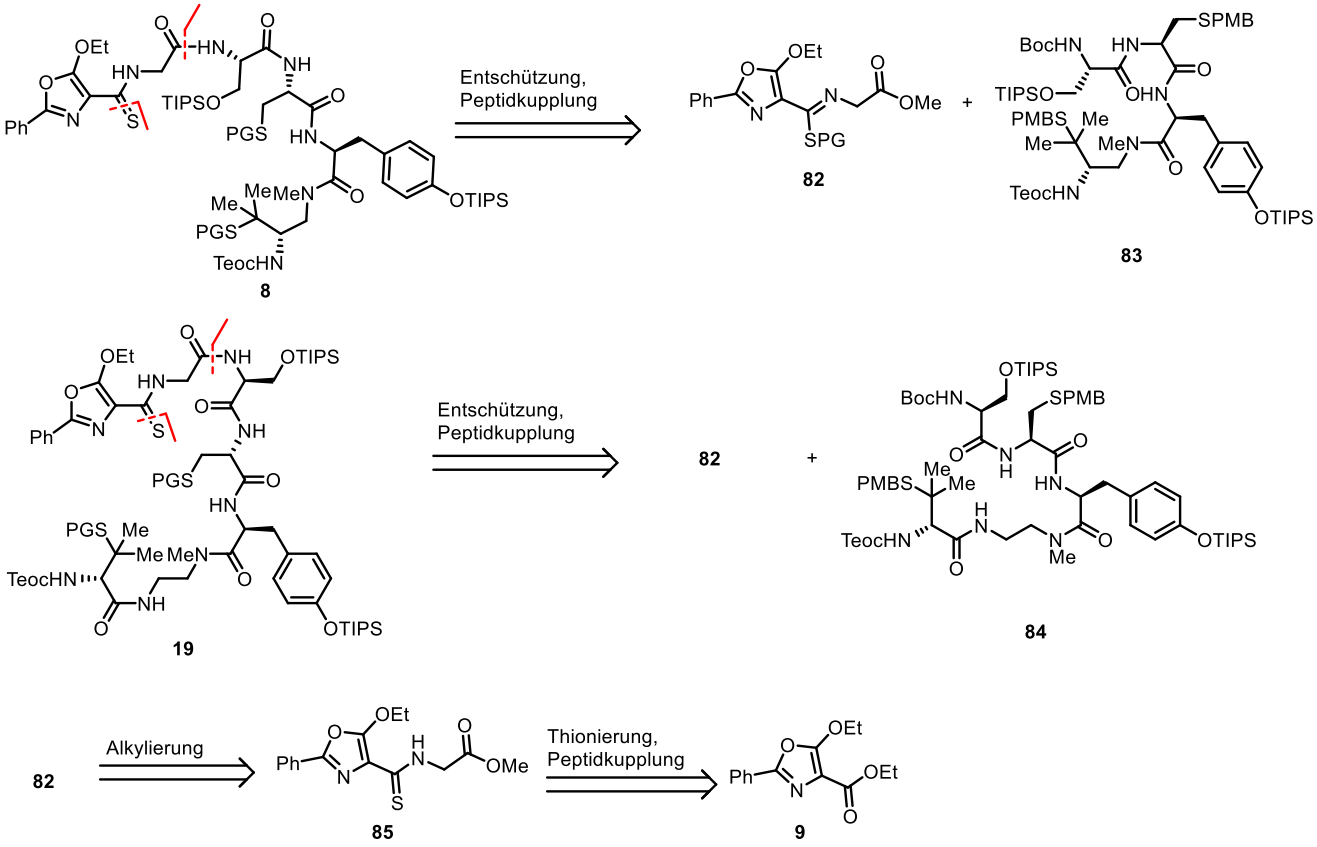
Im Allgemeinen wiesen die beiden beschriebenen Ansätze zur Thioacylierung darauf hin, dass diese Methode nicht zur Synthese von Thioamiden mit einem Ph-Oxa(OEt)-Motiv angewandt werden konnte. Der nukleophiler Angriff der untersuchten Gly-terminalen Amine an die aktivierten Thiocarbonylverbindungen führte in den meisten Fällen ausschließlich zu einer Zersetzung.

Weitere Versuche zur Thioacylierung basierend auf einer Aktivierung der Thiocarbonsäure durch ein Ynamid[62], durch durch *O,O*'-Diethyl-dithiophosphate[63] sowie die Verwendung eines Thionophtalimids[64] oder eines Dithioesters[65] zur Thioacylierung führten ebensowenig zu einem Erfolg.

3.1.8 Modifizierte Retrosynthese

Da der retrosynthetische Ansatz (vgl. **Schema 4** und **Schema 6** unter 3.1.1), die komplexen Thiopeptide **8** und **19** mithilfe einer Thioacylierung zu erhalten, nicht erfolgreich war, wurden die Retrosynthesen geringfügig angepasst. Infolge dieser Anpassung sollte die Einführung des Thioamids nicht in direkter Nachbarschaft zum Heterozyklus erfolgen, um die beobachtete Zersetzung zu umgehen. Stattdessen bestand das neue Ziel darin, die um eine Aminosäure verkürzten Tetrapeptidfragmente **83** und **84** in einer Kupplung mit dem als Thioimidat geschützten Thioamid **82** umzusetzen (**Schema 25**). Die so erhaltenen Thioimidatpeptide könnten in einem abschließenden Schritt zu den Thioamiden **8** und **19** entschützt werden.

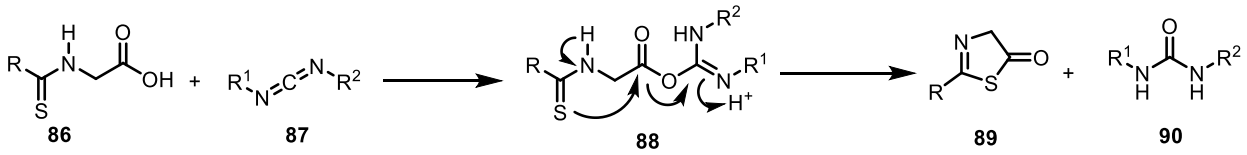
Eine Synthese der Oligopeptide **83** und **84** ist analog zu den unter 3.1.5 beschriebenen Sequenzen möglich. Das Thioimidat **82** kann mithilfe einer Alkylierung aus dem Thioamid **85** hergestellt werden, welches durch eine Peptidkupplung gefolgt von einer Thionierung aus dem bekannten Oxa-Ester **9** zugänglich ist.



***Schema 25**: Angepasste Retrosynthese der Thioamide **8** und **19** durch eine Peptidkupplung zwischen dem als Thioimidat geschützten Methylester **82** und den Tetrapeptidfragmenten **83** und **84**.*

Die Schutzgruppe des Thioamids **85** wurde zunächst nicht näher spezifiziert, da zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt war, welche Derivate für eine Kupplung mit den Peptiden **83** und **84** in Frage kamen. In diesem Zusammenhang musste ebenfalls identifiziert werden, welche Schutzgruppen der Thiole des Cys und des Pen durch das Thioimidat toleriert wurden und in welcher Reihenfolge sich diese entfernen ließen.

Die Verwendung eines Thioimidats war notwendig, da die Aktivierung des *C*-Terminus von Peptidn in direkter Nachbarschaft zu einem Thioamid nicht zu einer erfolgreichen Peptidkupplung führen würde (**Schema 26**). Nach der erfolgten Aktivierung der endständigen Carbonsäure in **86** durch Carbodiimid **52** als beispielhaftes Kuplungsreagenz kann das Thioamid in **54** eine *5-exo-trig* Zyklisierung eingehen. Dies ergibt Thiazolon **89**, das gegenüber dem nukleophilen Angriff eines Amins unreaktiv ist.



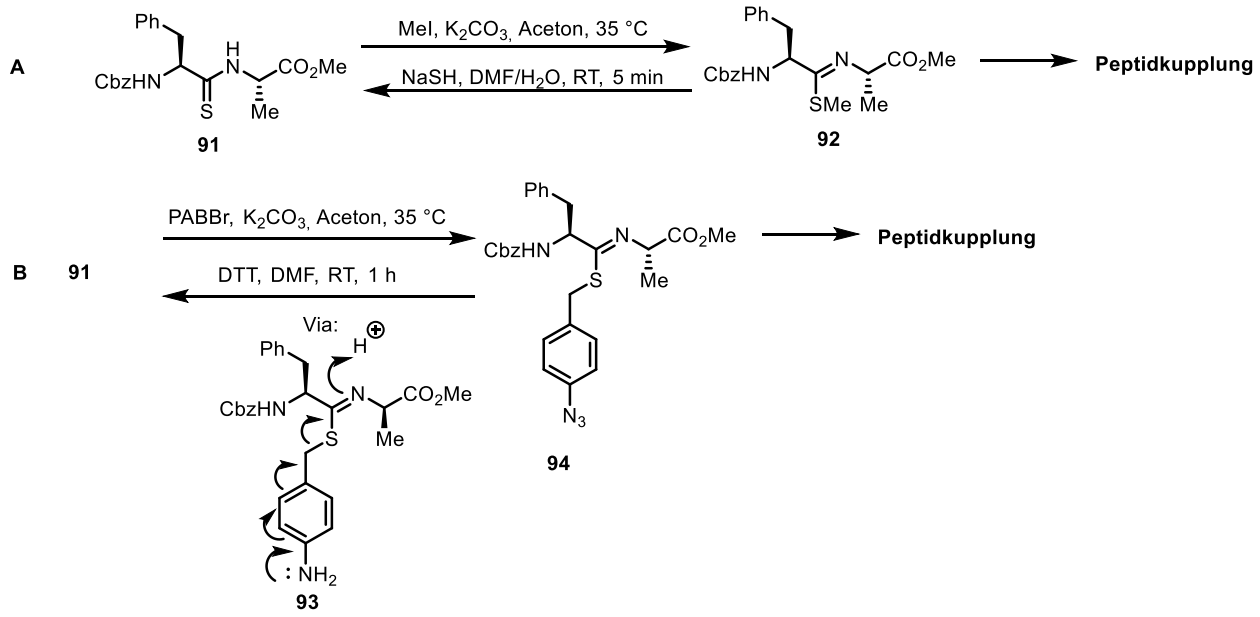
Schema 26: *Bildung des Thiazolons **89** durch eine intramolekulare Zyklisierung von **88** nach der beispielhaften Aktivierung einer Carbonsäure **86** durch Carbodiimid **87**.*

Diese Zyklisierung mit einem benachbarten, *C*-terminalen Gly wurde sowohl in der Masterarbeit von FABIAN BRUNSIWG als auch von der Gruppe um KAZMAIER beobachtet.[59,86] Die Umwandlung von **85** in ein Thioimidat **82** sollte die Bildung von **89** weitestgehend unterdrücken, da die intramolekulare Zyklisierung zu der Bildung einer thermodynamisch ungünstigen, geladenen Spezies führen würde.

In der Literatur ist die Verwendung eines Thioimidats als Schutzgruppe bisher nur aus wenigen Publikationen bekannt.

Von der Gruppe um VANVELLER konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Methylierung von Thioamiden wie **91** zu dem Me-Thioimidat **92** die Racemisierung des α-Stereozentrums bei einer nachfolgenden Peptidkupplung unterdrückte (**Schema 27** A).[87] Thioamide weisen im Vergleich zu den korrespondierenden Amiden eine um drei Größenordnungen höhere Azidität des α-CHs auf, sodass dieses durch die Basen zur Verlängerung der Peptidkette abstrahiert werden kann. Aufgrund der höheren Energie des π^*-Orbitals der C=N-Bindung können Thioimidate die negative Ladung nach Deprotonierung nicht so gut stabilisieren und besitzen somit eine geringere Azidität als Thioamide.[87]

Neben einer Anwendung von **92** in weiteren Peptidkupplungen konnten die Autor:innen demonstrieren, dass durch Reaktion mit NaSH bei RT in einer Mischung aus DMF und H_2O die Methylgruppe aus **92** innerhalb von 5 min wieder entfernt werden konnte (**Schema 27** A). Darüber hinaus konnte auch eine Mischung aus H_2S und 2,4,6-Collidin für denselben Zweck verwendet werden.[87] Zusammengenommen machen diese Ergebnisse das Me-Thioimidat zu einer sehr interessanten Schutzgruppe für die in **Schema 25** beschriebene Retrosynthese.

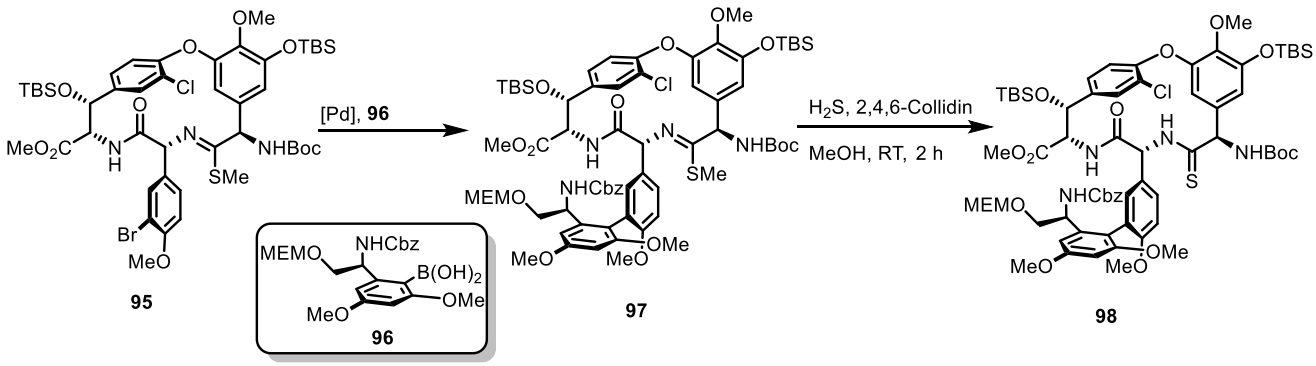


***Schema 27**: Installation und Entfernung verschiedener Thioimidatschutzgruppen an einem Phe-Ala-Dipeptid: **A**: Synthese des Me-Thioimidats **92** zur weiteren Peptidkupplung durch Alkylierung mit Methyliodid und Spaltung durch NaSH in DMF/H_2O.[87] **B**: Synthese des alternativen PAB-Thioimidats **94** und Spaltung durch DTT in DMF.[88]*

Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde in einer weiteren Publikation von einem alternativen Thioimidat berichtet, um auf die Verwendung der toxischen und korrosiven Reagenzien H_2S und NaSH verzichten zu können.[88] Dazu stellten sie unter anderem aus **91** mittels Alkylierung mit *p*-Azidobenzyl (PAB)-Bromid geschützte Thioamide wie **94** her (**Schema 27** B). Diese PAB-Thioimidate konnten wie auch die Me-Thioimidate erfolgreich in der Festphasen-Peptidsynthese eingesetzt werden. Am Beispiel von **94** wurde gezeigt, dass die PAB-Gruppe sehr mild mithilfe von DTT entfernt werden kann. Dabei reduzierte DTT das Azid zunächst zu Anilin **93**, das durch die geringfügig sauren Bedingungen das Thioamid **91** frei setzte. Diese Schutzgruppe ist besonders interessant, da sich die PMB-Schutzgruppen der Thiole in den Peptidfragmenten **83** und **84** durch Reaktion mit NPysCl gefolgt von einer Reduktion entfernen lassen.[56,58] Bei

Anwesenheit eines PAB-Thioimidats könnten diese Schutzgruppen folglich simultan entfernt werden, weil DTT auch standardmäßig zur Reduktion von Disulfiden eingesetzt wird.

Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel in der Anwendung eines Me-Thioimdates wurde von XIE *et al.* berichtet.[89] Bei der dort beschriebenen Synthese verschiedener Vancomycin-Analoga verwendeten die Autor:innen ein Me-Thioimidat in **95**, um eine Pd-katalysierte SUZUKI-Kreuzkupplung mit der Boronsäure **96** zu ermöglichen, die mit einem ungeschützten Thioamid nicht möglich war (**Schema 28**). Im Anschluss wurde das erhaltene Produkt **97** mithilfe von H_2S-Gas und 2,4,6-Collidin in MeOH bei RT in das Thioamid **98** überführt. Dies zeigte, dass eine Entschützung des Thioamids auch in hochfunktionalisierten Molekülen durchgeführt werden kann. Aufgrund der Basizität von NaSH wurde hier auf die mildere, wenn auch giftigere, Kombination aus H_2S mit einer organischen Base zurück gegriffen.



***Schema 28**: Anwendung eines Me-Thioimidats in der Pd-cat. SUZUKI-Kreuzkupplung und Entschützung durch H_2S und 2,4,6-Collidin in MeOH.*[89]

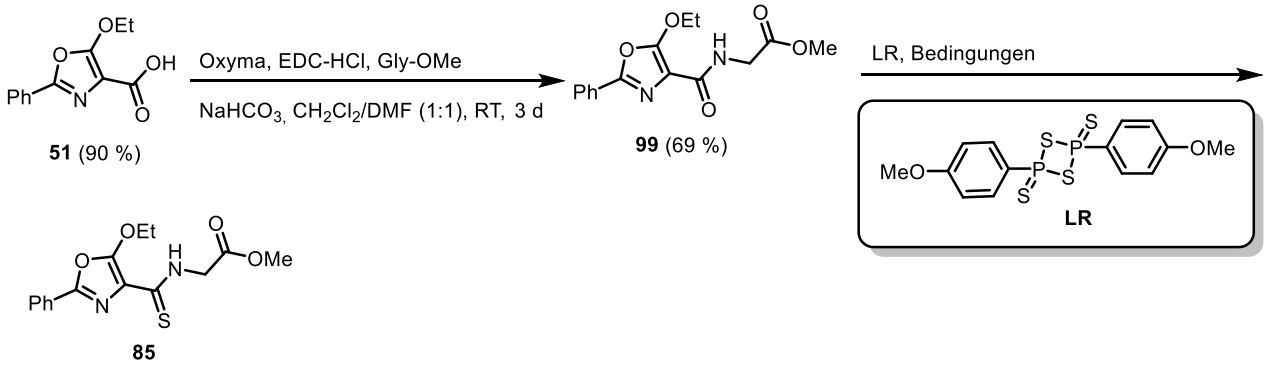
Weitere Thioimidate **82**, die prinzipiell eine gleichzeitige Entfernung mehrerer Schutzgruppen ermöglichen würde, wären Silyl- und PMB-geschützte Thioamide (vgl. **Schema 25**).

Eine Silylgruppe könnte gemeinsam mit den anderen siliziumbasierten Schutzgruppen (d.h. die TIPS-Gruppen des Ser und Tyr und Teoc-Gruppe des Pen) in **83** und **84** nach einer erfolgten Verknüpfung gespalten werden. Die Schützung von schwefelhaltigen funktionellen Gruppen mit Silyl-Gruppen ist bisher nur in wenigen Fällen wie z. B. bei aromatischen Thiolen in Oligothiophenen bekannt.[90] Diese wurden mit einer (Trimethylsilyl)ethyl-Schutzruppe (TMSE) versehen, die durch eine Reaktion mit TBAF wieder freigesetzt werden konnte.

Daneben wäre eine Verwendung von PMB-Thioimdaten vorteilhaft, da diese Schutzgruppe bereits in **83** und **84** vorhanden ist (vgl. **Schema 25**). Die PMB-Gruppen könnten dann durch Reaktion mit NPysCl gefolgt von einer Reduktion gemeinsam abgespalten werden.

3.1.9 Synthese des Thioamids Ph-Oxa(OEt)-CSNH-Gly-OMe 85 und Alkylierung zu verschiedenen Thioimidaten

Als erstes benötigtes Fragment zur Umsetzung der angepassten Retrosynthese (vgl. **Schema 25** in 3.1.8) wurde Thioamid **85** hergestellt. Dafür wurde als erstes die unter 3.1.6 beschriebene Carbonsäure **51** durch eine EDC/Oxyma vermittelte Peptidkupplung mit Gly-OMe zu Amid **99** in einer Ausbeute von 69 % umgesetzt (**Schema 29**). Ausgehend von **99** erfolgte nun die Synthese des Thioamids in Nachbarschaft zu dem Oxazol. Klassischerweise wird die Thionierung eines Amids mithilfe von LR durchgeführt.[91] Für diese Reaktion, die über einen der WITTIG-Reaktion analogen Mechanismus verläuft, sind viele verschiedene Bedingungen in Abhängigkeit vom Substrat bekannt.[92] Daher wurden zunächst verschiedene Lösungsmittel, Temperaturen und Äquivalente LR für die Umsetzung von **99** zu **85** getestet. Die dabei erzielten Ergebnisse sind **Tabelle 5** zusammengefasst und die beschriebenen Umsätze wurden als relative Werte mittels LC-MS auf Grundlage der Integrale der UV-Spur bei 220 nm bestimmt.



***Schema 29**: Funktionalisierung der Carbonsäure **51** inklusive Thionierung des Peptids **99** unter den in **Tabelle 5** zusammengefassten Bedingungen.*

In einer ersten Reaktion wurde **99** mit 0.5 Äq. LR in Toluol als Lösungsmittel für 2 h unter Rückfluss erhitzt (Eintrag 1 in **Tabelle 5**). Nach dieser Zeit konnte ein Umsatz von 17 % zu Thioamid **85** festgestellt werden. Nach einer Reaktionszeit von 4 h steigerte sich dieser Wert lediglich auf 22 %. Aufgrund dessen wurden die Äquivalente von LR auf 1.1 erhöht (Eintrag 2 in **Tabelle 5**). Entgegen der Erwartungen führte dies zu einem

geringeren Umsatz von **99**. Folglich ist davon auszugehen, dass es durch höhere Temperatur vermehrt zu einer Zersetzung anstelle einer erfolgreichen Bildung von **85** kommt. Da aber eine hohe Temperatur notwendig ist, um LR in ausreichender Menge in Toluol zu lösen, wurde dieses als Lösungsmittel verworfen. Als nächstes wurde unter Berücksichtigung dessen überprüft, ob THF als polareres Lösungsmittel eine bessere Umsetzung bei tieferen Temperaturen ermöglichte. Eine Reaktion bei 66 °C und mit 0.5 Äq. LR lieferte bereits nach 2 h einen deutlich besseren Umsatz als die Reaktionen in Toluol (Eintrag 3 in **Tabelle 5**). Nach weiterem Erhitzen für 2 h verringerte sich dieser Wert jedoch wieder. Höchstwahrscheinlich trat auch hier eine Zersetzung als Konkurrenzreaktion auf. Folglich wurde in einer nachfolgenden Reaktion die Temperatur verringert und der Umsatz in kürzeren Zeitintervallen kontrolliert (Eintrag 4 in **Tabelle 5**). Leider konnte der Umsatz unter Anwendung dieser Taktik zu keinem Zeitpunkt gesteigert werden.

***Tabelle 5**: Untersuchte Bedingungen für die Thionierung von **99** zu **85** in **Schema 29**. Der Umsatz wurde zum relativen Vergleich untereinander mithilfe der UV-Spur bei 220 nm mittels LC-MS kontrolliert.*

Eintrag	Äq. LR	LM	*T* [°C]	*t* [h]	Umsatz [%]	Isolierte Ausbeute [%]
1	0.5	Toluol	111	2 4	17 22	n.b.
2	1.1	Toluol	111	2 4	18 19	n.b.
3	0.5	THF	66	2 4	58 53	n.b.
4	0.5	THF	50	1 2 3	13 20 25	n.b.
5	0.5 1.0 2.2 2.2	CH_2Cl_2	42	7 16.5 23.5 43	28 57 87 72	52 %

Abschließend wurde **99** mit 0.5 Äq. LR in CH_2Cl_2 für 7 h auf 42 °C erhitzt (Eintrag 5 in **Tabelle 5**). Mittels LC-MS wurde zu diesem Zeitpunkt ein Umsatz von 28 % festgestellt. Durch Zugabe von weiteren 0.5 Äq. LR und einer um 16.5 h verlängerten Reaktionszeit (gesamt: 23.5 h) konnte der Umsatz im Gegensatz zu den Reaktionen in Toluol und THF auf 57 % gesteigert werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden weitere 1.2 Äq. LR zur Reaktionsmischung gegeben und der Umsatz nach weiteren 23.5 h kontrolliert (gesamt: 47 h). Dabei wurde ein nahezu vollständiger Umsatz von 87 % beobachtet. Eine Verlängerung der Reaktionszeit um weitere 19.5 h (gesamt: 66.5 h) führte nicht zu

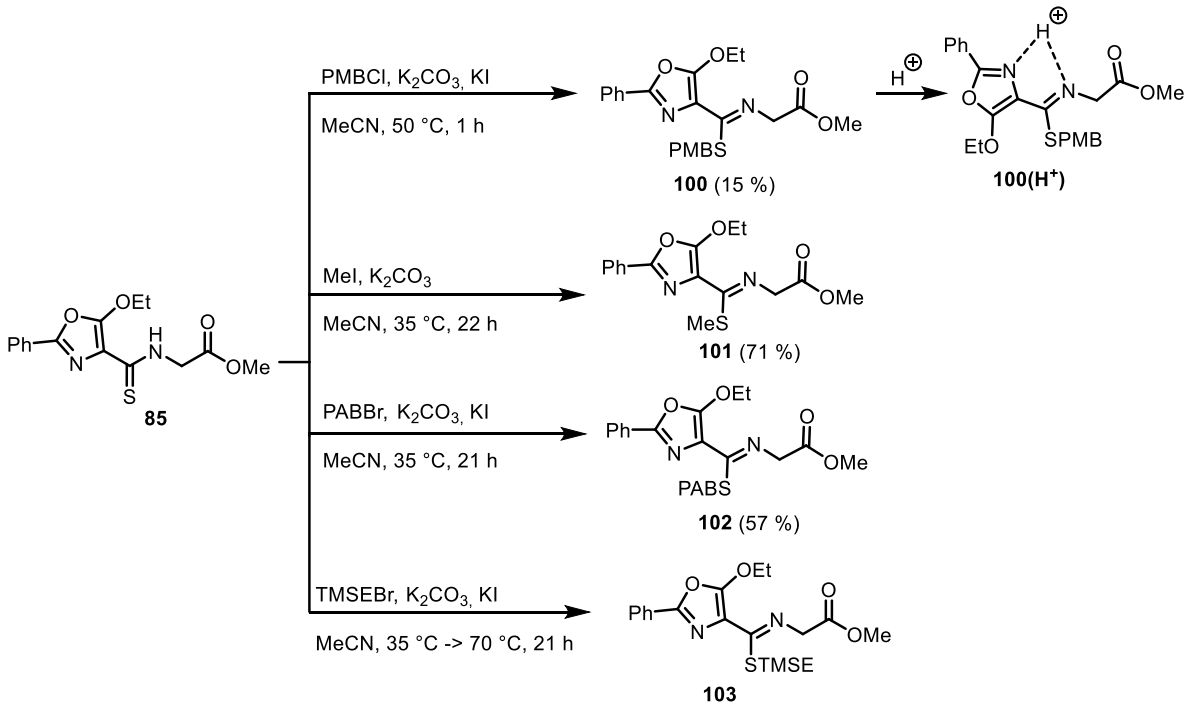
einer weiteren Verbesserung sondern zu einer Verringerung des Umsatzes auf 72 %. Thioamid **85** konnte nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 52 % erhalten werden.

Zusammenfassend lässt sich anhand der durchgeführten Versuche festhalten, dass CH_2Cl_2 für die Thionierung von **99** zu **85** das am besten geeignete Lösungsmittel ist. Bei zu hohen Temperaturen und zu großen Mengen an LR tritt bevorzugt eine Zersetzung anstelle der gewollten Thionierung auf. Bei einer Reaktionsdauer von insgesamt 47 h und einer schrittweisen Zugabe von 2.2 Äq. LR wurden die besten Ergebnisse erzielt.

Mit diesen Reaktionen wurde der Vorläufer der geplanten Thioimidate in einer guten Gesamtausbeute von 23 % über fünf Stufen aus Diethylaminomalonat **49** (vgl. **Schema 16** in 3.1.6) hergestellt. Somit konnte im Vergleich zur unter 3.1.7 beschriebenen Thioacylierung eine effiziente Einführung des Schwefels erfolgen.

Wie unter 3.1.8 beschrieben, waren Thioimidate, die eine simultane Entfernung mehrerer Schutzgruppen ermöglichten, von besonderem Interesse. Aus diesem Grund wurde **85** zuerst mit PMBCl alkyliert (**Schema 30**).[93] Nachdem sich eine wässrige Aufarbeitung als kontraproduktiv heraus gestellt hatte, wurde die Reaktionsmischung direkt durch Säulenchromatographie gereinigt. Mithilfe dessen konnte **100** als verunreinigtes Produkt in einer Ausbeute von 15 % isoliert werden. Vermutlich ist die geringe Ausbeute darauf zurück zu führen, dass es sich bei der PMB-Gruppe um einen elektronenreichen Aromaten handelt, der die Basizität des Stickstoffs im Thioimidat als Schiff´sche Base erhöht. Dadurch ist eine Protonierung zu **100(H^+)** wahrscheinlich, die wiederum eine Zersetzung durch den Angriff von Nukleophilen wie H_2O erleichtern kann (**Schema 30**).

Als Alternative dazu wurde Me-Thioimidat **101** synthetisiert (vgl. **Schema 28** in 3.1.8). Um eine Zersetzung des Produkts während der chromatographischen Reinigung auf dem sauren Kieselgel zu verhindern, wurde das Laufmittel mit 1 % NEt_3 versetzt. Dadurch wurde eine isolierte Ausbeute von 71 % erzielt. Diese Methode wurde im Folgenden auf die Renigung aller Me-Thioimidat angewandt.



***Schema 30**: Synthese der verschiedenen Thioimidate **100, 101, 102** und **103**.*

Anhand von NMR-Analysen konnte festgestellt werden, dass **101** aus einer 3:2 Mischung von Isomeren bezüglich der C=N-Bindung besteht (**Abbildung 16**).

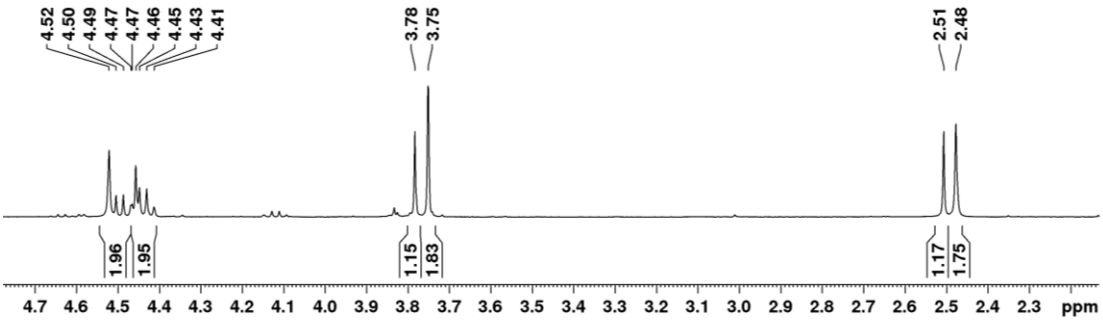


***Abbildung 16**: Ausschnitt aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **101** zur Beurteilung des Verhältnisses der cis/trans Isomere: δ (OMe) = 3.78, 3.75 ppm und δ (SMe) = 2.51, 2.48 ppm.*

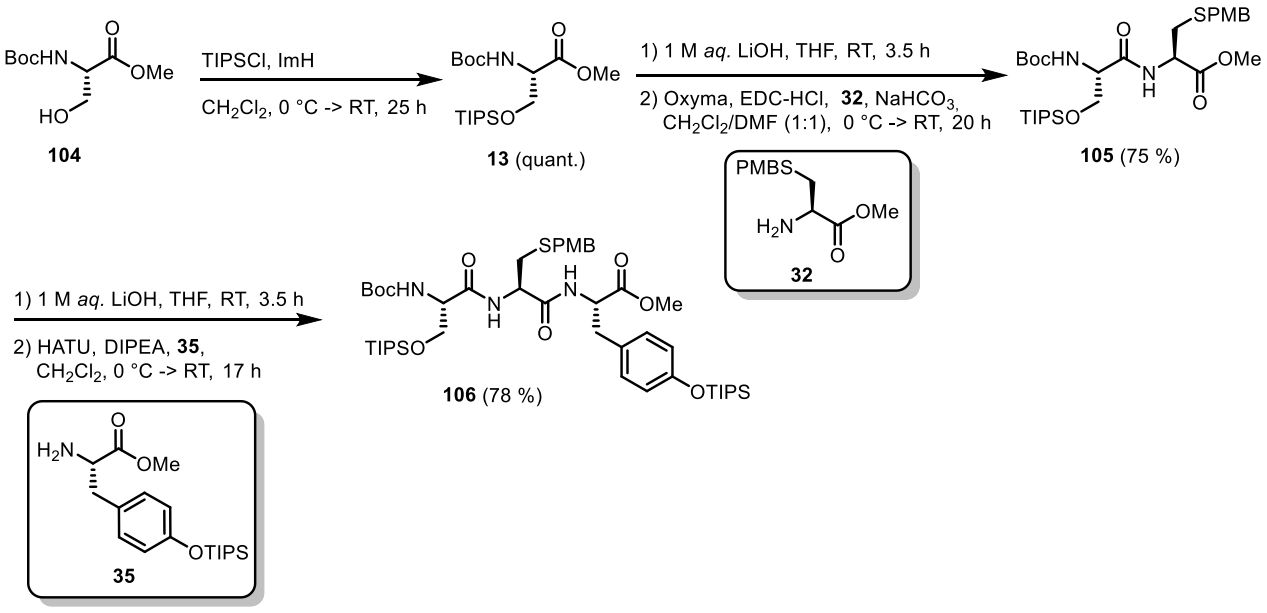
Eine weiteres Thioimidat, das eine gleichzeitige Entschützung nach der Kupplung mit den Peptiden **83** und **84** ermöglichen würde, ist PAB-Thioimidat **102** (vgl. 3.1.8). Zur Synthese dieser Verbindung wurde **85** mit PABBr[94,95] und einer katalytischen Menge an KI alkyliert (**Schema 30**). Die Reaktion lieferte **102** in 57 % als eine Mischung aus *cis/trans* Isomeren im Verhältnis von 6:5, das sich wieder NMR-spektroskopisch bestimmen ließ.

Die Synthese des beabsichtigten silyl-geschützten Thioimidats **103** durch eine Alkylierung mit TMSEBr[90] stellte sich als problematisch heraus. Auch nach Erwärmen

auf 70 °C wurde nur ein geringer Umsatz des Startmaterials beobachtet (**Schema 30**). Vermutlich war das Alkylierungsmittel nicht elektrophil genug, um mit dem Thioamid eine Reaktion einzugehen. Aufgrund der guten Ergebnisse in der Synthese der anderen Thioimidate, wurden keine weiteren Versuche mehr zur Herstellung von **103** durchgeführt und die Verwendung der TMSE-Schutzgruppe als Möglichkeit zur globalen Entfernung der Silylschutzgruppen verworfen.

3.1.10 Synthese des Tripeptids 106

Aufgrund der Modifikation der Retrosynthese (vgl. **Schema 25** in 3.1.8) konnte das unter 3.1.4 beschriebene Tetrapeptid **12** nicht weiter für die Synthese der Naturstoffderivate verwendet werden. Stattdessen wurde das, um eine Aminosäure verkürzte Tripeptid **106** in einer analogen Sequenz hergestellt (**Schema 31**). Dafür wurde als erstes die Carbonsäure aus **13** mit **32**[66] unter Oxyma/EDC-Bedingungen zur Reaktion gebracht. Dadurch konnte Dipeptid **105** in einer guten Ausbeute von 75 % über zwei Stufen erhalten werden. Die nachfolgende Kupplung mit **35** wurde mithilfe von HATU als Kupplungsreagenz durchgeführt. Somit wurde **106** in einem Multigramm-Maßstab mit einer guten Ausbeute von 59 % über fünf Stufen isoliert.



***Schema 31**: Synthese des Tripeptids **106**.*

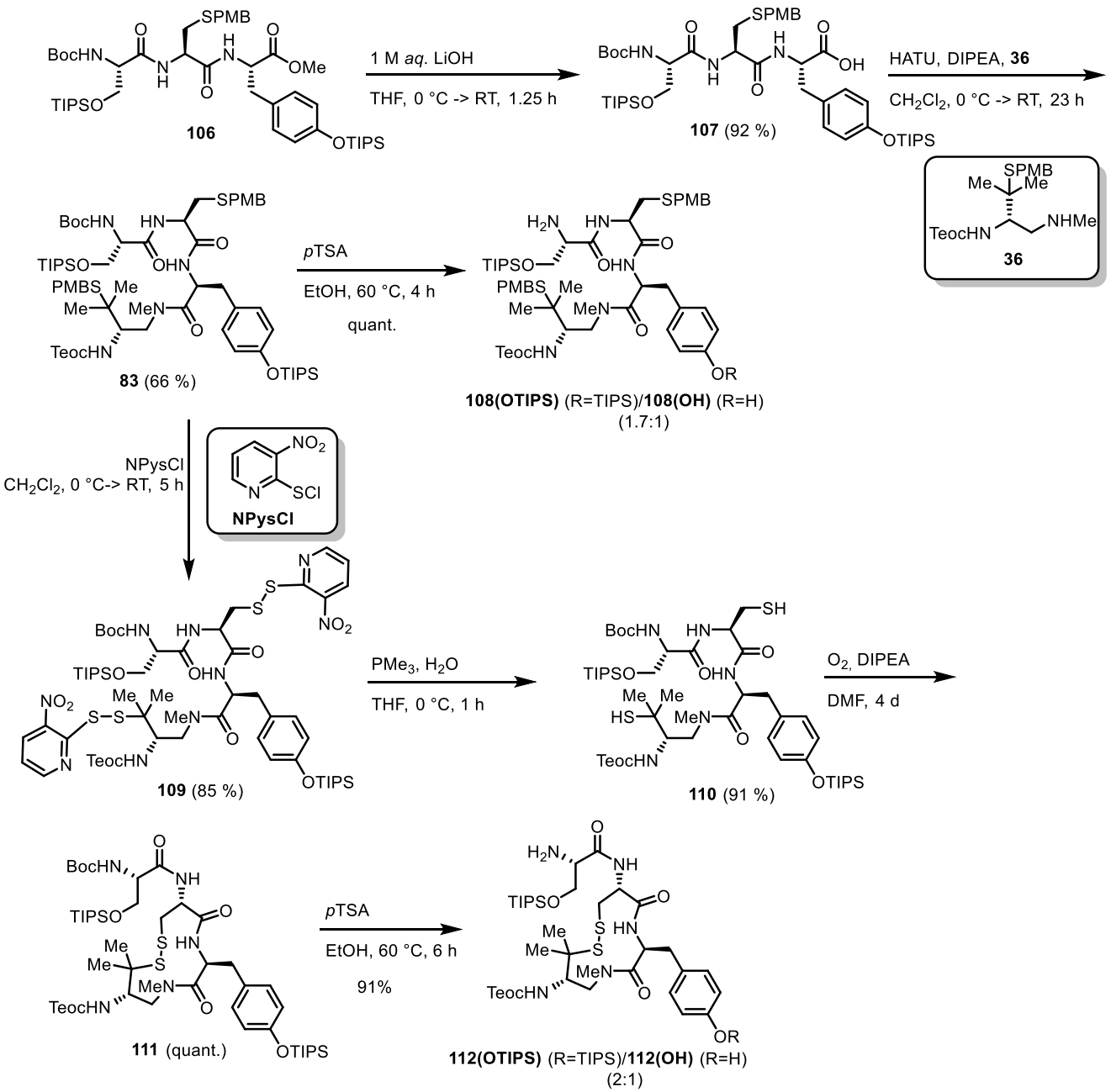
3.1.11 Verknüpfung der modifizierten Penicillamine mit dem Tripeptid 106

*3.1.11.1 Kupplung mit **36** und weitere Funktionalisierungen*

Ausgehend von Tripeptid **106** wurde die unter 3.1.5 beschriebene Strategie angewandt, um die Verknüpfung mit den sekundären Aminen der Penicillamine aus 3.1.2 und 3.1.3 zu den benötigten Tetrapeptiden (vgl. **Schema 25** in 3.1.8) durchzuführen. Die in 92 % erhaltene Carbonsäure **107** wurde unter Verwendung von HATU als Kupplungsreagenz mit sekundären Amin **36** zu Tetramer **83** mit einer Ausbeute von 66 % umgesetzt (**Schema 32**).

Um zu überprüfen, ob im Anschluss an eine Kupplung mit den Thioimidaten die PMB-Schutzgruppen entfernt werden können und ob eine gleichzeitige Schutzgruppenentfernung möglich ist, wurde **83** zu korrespondierenden Amin **108** als Modellsystem umgesetzt (**Schema 32**). Wie in der Masterarbeit von FABIAN BRUNSIWG veranschaulicht wurde, ist diese Entfernung der PMB-Schutzgruppen mithilfe von NPysCl in Anwesenheit eines Thioamids ist nicht mehr realisierbar, da das Thiocarbonyl durch eine Reaktion mit diesem zersetzt wird.[59]

Die Bedingungen zur selektiven Boc-Entfernung (*p*TSA in EtOH) führten nach 4 h zu einem vollständigen Umsatz von **83**. Wie bei den entsprechenden Reaktionen in 3.1.5.1 und 3.1.5.2 wurde zum Teil die Schutzgruppe des Tyr entfernt, sodass eine 1.7:1 Mischung aus **108(OTIPS)** und dem TIPS-entschützten Analogon **108(OH)** erhalten wurde. Auch hier erfolgte keine chromatographische Trennung der beiden Produkte, da sich das Phenol nicht negativ auf die nachfolgende Verknüpfung mit den Thioimidaten auswirkt.



Schema 32: *Synthese des Tetramers **83**, Umschützung in NPys-Peptid **109**, Bildung des intramolekularen Disulfids **111** und selektive Entfernung der Boc-Gruppen.*

Neben den PMB-geschützten Aminen wurde Tetramer **83** ebenfalls in ein Peptid umgewandelt, das ein intramolekulares Disulfid enthält. Wie bereits unter 3.1.5.1 beschrieben wurde, stellt die Verwendung des Disulfids als interne Schutzgruppe der Thiole eine elegante Methode dar. Zu Beginn der Sequenz wurde **83** mit einem doppelten Überschuss an NPysCl umgesetzt (**Schema 32**). Es stellte sich heraus, dass eine direkte chromatographische Reinigung der Reaktionsmischung eine geeignete Möglichkeit ist, um **109** in einer sehr guten Ausbeute von 85 % zu isolieren. Die

nachfolgende doppelte Reduktion mit PMe_3 lieferte Dithiol **110** in 91 % Ausbeute. In der anschließenden Bildung des Disulfids **111** konnte ein vollständiger Umsatz erst nach 4 d Reaktionszeit mittels LC-MS festgestellt werden, da die O_2-Atmosphäre über der Reaktionslösung vermutlich nicht ausreichend gesättigt war. **111** wurde nur durch wässrige Aufarbeitung isoliert und ohne weitere Reinigung den oben beschriebenen Bedingungen zur Entfernung der Boc-Gruppe unterzogen. Dies ergab eine Mischung aus den Aminen **112(OTIPS)** und **112(OH)** im Verhältnis von 2:1, die aus den oben beschriebenen Gründen nicht getrennt wurden und direkt für die Reaktion mit den Thioimidaten eingesetzt wurden.

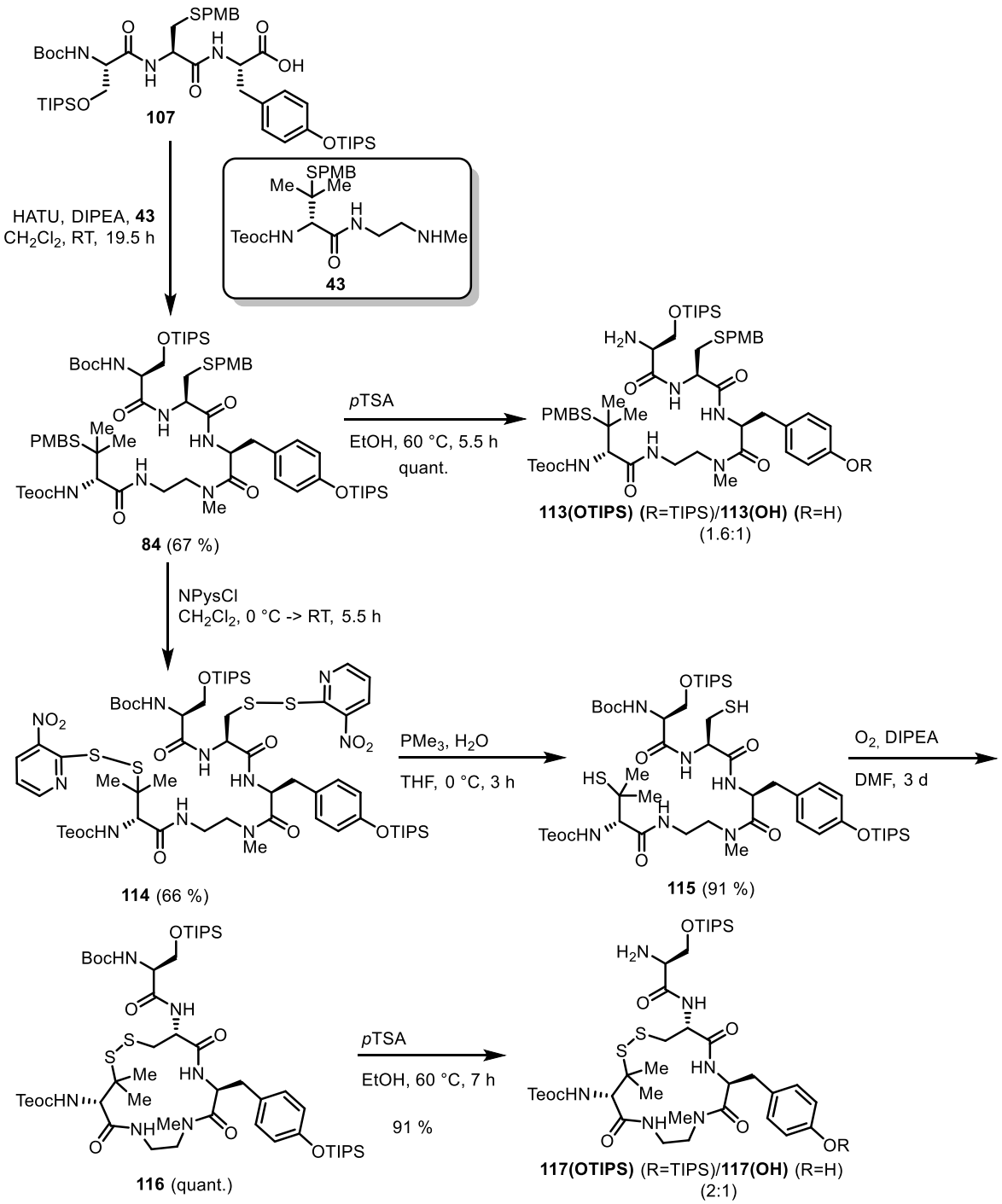
Somit konnten ausgehend von **106** Amine **112(OTIPS)** und **112(OH)** in einer guten Gesamtausbeute von 47 % über sechs Stufen erhalten werden.

3.1.11.2 *Kupplung mit **43** und weitere Funktionalisierung*

Analog zu den, im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Schritten zur Synthese der Moleküle mit einem CH_2-Linker erfolgte die Synthese des Tetrapeptidfragments **84** durch Kupplung von **107** mit dem sekundären Amin **43**. Dies ergab **84** im Maßstab von mehreren hundert Milligramm mit einer Ausbeute von 67 % (**Schema 33**).

Auch hier wurde das Tetramer aufgrund der oben beschriebenen Gründe zunächst einer Boc-Entschützung mit *p*TSA unterzogen. Nach einer etwas verlängerten Reaktionszeit wurde wieder eine Mischung der Amine **113(OTIPS)** und **113(OH)** im ähnlichen Verhältnis von 1.6:1 in quantitativer Ausbeute erhalten. Es erfolgte keine chromatographische Trennung der Produkte, da das ungeschützte Phenol die beabsichtigte Kupplung mit den Thioimidaten nicht behindern sollte.

Außerdem wurde **84** zu der Mischung aus den Disulfidaminen **117(OTIPS)** und **117(OH)** umgesetzt (**Schema 33**). Dabei wurden in den Reaktionen mit NPysCl und PMe_3 vergleichbare Ausbeuten wie für das Derivat mit einem CH_2-Linker von 66 % und 91 % erzielt. Die intramolekulare Disulfidknüpfung von **115** zu **116** konnte durch einen konstanten Anschluss des für die O_2-Atmosphäre verwendeten Ballons auf 3 d verkürzt werden. Aus nicht chromatographisch gereinigtem **116** wurde im Anschluss die Mischung der Amine **117(OTIPS)** und **117(OH)** im Verhältnis von 2:1 erhalten, die ohne weitere Reinigung für die Reaktion mit den Thioimidaten eingesetzt wurde.



***Schema 33**: Synthese der Tetramers **84**, Umschützung in NPys-Peptid **114**, Bildung des intramolekularen Disulfids **116** und selektive Entfernung der Boc-Gruppen.*

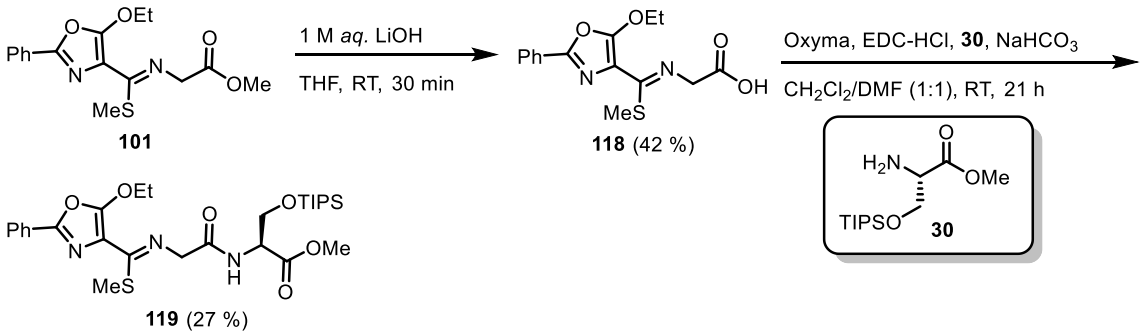
Ausgehend von **106** konnten die Peptidbausteine mit einem C_2H_4-Linker **117(OTIPS)** und **117(OH)** zusammengefasst in einer guten Gesamtausbeute von 37 % über sechs Stufen erhalten werden.

Durch die erfolgreiche Synthese der unterschiedlichen Tetrapeptide standen alle Fragmente für die Umsetzung der angepassten Retrosynthese aus 3.1.8 zur Verfügung.

3.1.12 Reaktionen der Thioimidate mit verschiedenen Peptiden

Basierend auf den hergestellten Fragmenten zur Synthese der strukturvereinfachten Naturstoffderivtate, war es von zentraler Bedeutung, dass sich die, unter 3.1.9 beschriebenen Thioimidate in einer Peptidkupplung umsetzen ließen (vgl. **Schema 25** in 3.1.8). Aus diesem Grund wurde diese Reaktion zunächst an einem einfachen Modellsystem durch die Kupplung mit einer Aminosäure getestet.

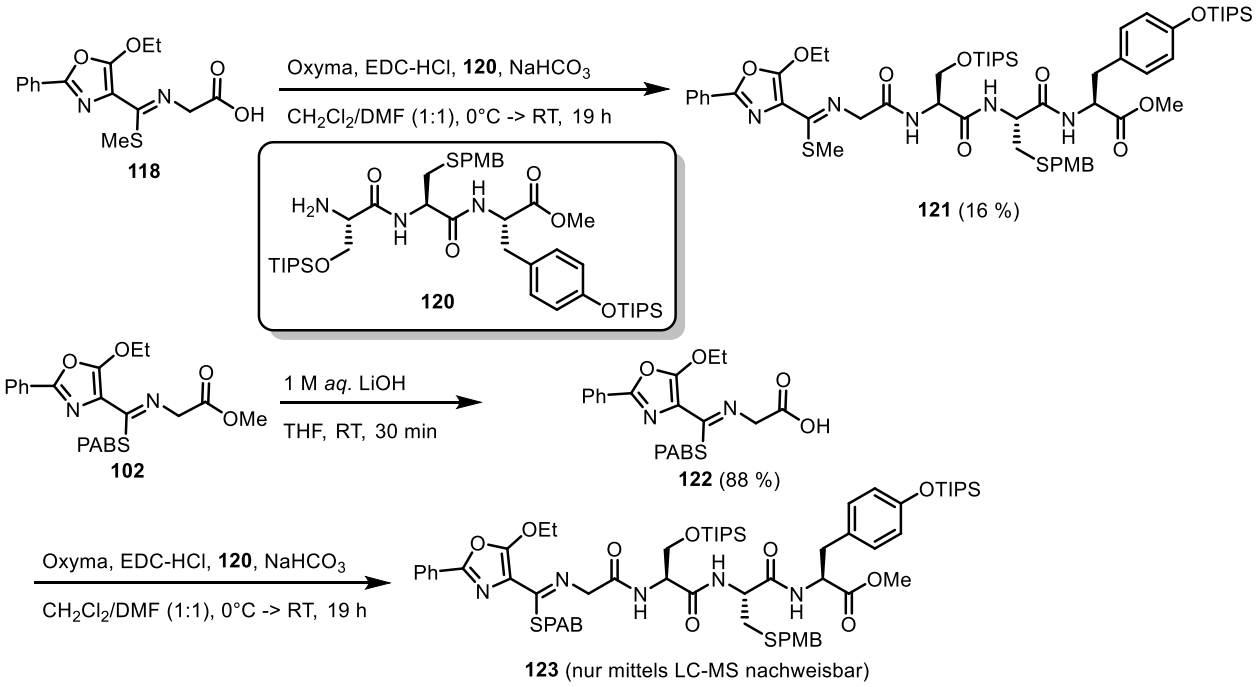
Dafür wurde **101** als erstes zu **118** unter den Standardbedingungen mit 1 M *aq.* LiOH umgesetzt (**Schema 34**). Bei einem Ansäuern der Reaktionsmischung mit 1 M *aq.* $KHSO_4$ auf pH 2 trat eine Zersetzung von **118** auf. Um dies zu verhindern, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 % *aq.* KH_2PO_4 beendet und mit 2 M *aq.* Zitronensäure auf pH 4 gebracht. Des Weiteren wurde die erhaltene Lösung aus **118** bei RT konzentriert, da sich das Thioimidat bei 40 °C am Rotationsverdampfer durch Autoprotolyse zersetzte. Dies verdeutlichte die bereits unter 3.1.9 beschriebene Säureempfindlichkeit. Trotz dieser Vorkehrungen wurde **118** nur in einer Ausbeute von 42 % erhalten und aufgrund seiner Empfindlichkeit direkt für den nächsten Schritt eingesetzt. In diesem wurde es mit H_2N-Ser(OTIPS)-OMe **30** in Anwesenheit von EDC/Oxyma zur Reaktion gebracht. Dabei konnte eine erfolgreiche Bildung des Thioimidattripeptids **119** festgestellt werden. Das gewünschte Kupplungsprodukt wurde nach der Reinigung in 27 % Ausbeute isoliert, sodass eine Gesamtausbeute von 8 % über drei Stufen ausgehend von **85** erzielt werden konnte.



Schema 34: *Schrittweise Verseifung und Kupplung des Me-Thioimidats **101** um eine Aminosäure in Richtung des C-Terminus.*

Mithilfe dieser Reaktion konnte die generelle Machbarkeit des retrosynthetischen Ansatzes aus 3.1.8 verdeutlicht werden. Die Schützung des Thioamids ermöglichte somit die Verlängerung des Peptids ausgehend von dem Ph-Oxa(OEt)-Motiv in Richtung des *C*-Terminus.

Nach der Etablierung der Kupplung einer Aminosäure wurde daraufhin ein größeres Peptid mit der Carbonsäure zur Reaktion gebracht. Unter denselben Bedingungen wie zuvor konnte durch Kupplung mit Tripeptidamin **120** das größere Thioimidat **121** in einer Ausbeute von 16 % erhalten werden (**Schema 35**). Die geringe Ausbeute der Synthese von **121** lässt sich vermutlich auf eine Zersetzung der Carbonsäure unter den Reaktionsbedingungen zurückführen. Generell wurde beobachtet, dass die Synthese und weitere Umsetzung von **118** das größte Problem bei der Verwendung der Me-Thioimidate war.

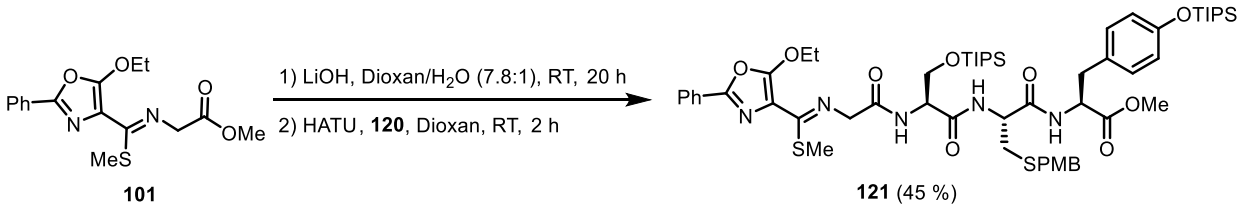


***Schema 35**: Kupplung der Me-Thioimidatcarbonsäure **118** und der PAB-Thioimidatcarbonsäure **122** mit dem Tripeptidamin **120**.*

Um PAB-Thioimidat **102** für den Aufbau thioamidhaltiger Peptide zu testen, wurde dieses der gleichen Reaktionssequenz unterzogen (**Schema 35**). Nach Bildung der Carbonsäure **122** wurde das isolierte Produkt ebenfalls unter EDC/Oxyma Bedingungen mit Amin **120** gekuppelt. Die Anwesenheit des größeren PAB-Thioimidats **123** konnte zwar mittels LC-MS bestätigt werden, jedoch wurden in der nach Säulenchromatographie isolierten Fraktion hauptsächlich Zersetzungsprodukte mittels ^{1}H-NMR Spektroskopie nachgewiesen. Dies könnte entweder auf eine Zersetzung während der Reaktion oder bei der nachfolgenden Reinigung zurück zuführen sein. Aufgrund dieses Ergebnisses waren PAB-Thioimidate offensichtlich weniger geeignet als die Me-Thioimidate, um diese als geschützte Thioamidfragmente zu verwenden.

Daher wurden keine weiteren Versuche zur Anwendung der PAB-Thioimidate durchgeführt und fortan **101** zum weiteren Aufbau der strukturvereinfachten Derivate **4** und **5** verwendet.

In einer nächsten Optimierung bestand das Ziel darin, die Isolierung der Carbonsäure **118** zu umgehen, indem die Verseifung von **101** und die Bildung von **121** in derselben Reaktionsmischung durchgeführt wurde (**Schema 36**). Bei dieser Umsetzung handelt es sich um eine sogenannte Verseifungs-Kupplungs-Eintopfreaktion (VKER), die für die Kupplung proteinogener Aminosäuren mit HATU in wässrigem 1,4-Dioxan von AZZOUZ *et al.* verwendet wurde.[96] Da die Hydrolyse des HOAt-Aktivesters der Carbonsäuren unter diesen Bedingungen unproblematisch war, wurden diese auch auf die Reaktion von **101** mit **120** angewandt. Die Verseifung erfolgte mit LiOH in einer Mischung aus H_2O und 1,4-Dioxan bei RT über 20 h. Im Anschluss wurde die Aktivierung und Kupplung bei RT durchgeführt und innerhalb von 2 h ein vollständiger Umsatz zum gewünschten Produkt festgestellt. Die Aufreinigung lieferte **121** in einer deutlich verbesserten Ausbeute von 45 % über zwei Stufen im Vergleich zu der schrittweisen Kupplung (7 % vgl. **Schema 34** und **Schema 35**).



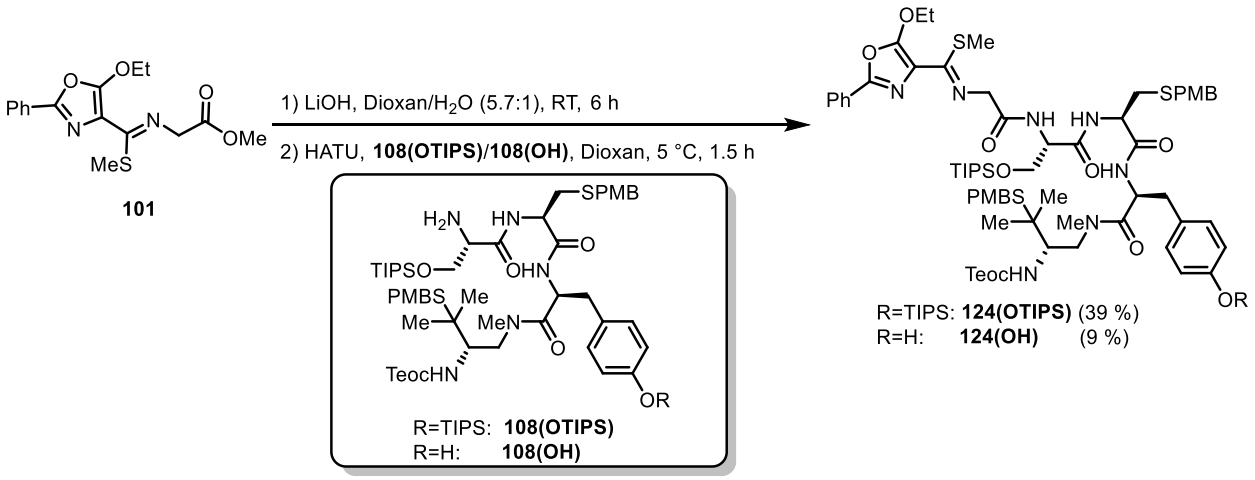
101 **121** (45 %)

Schema 36: *Synthese von **121** aus **101** in einer VKER.*

Nachdem die VKER mit Tripeptid **120** erfolgreich verlief, wurde diese Strategie auf die Kupplung von **101** mit den komplexen Aminen aus 3.1.11 übertragen. Dieser Transfer von einem Testsubstrat auf komplexere Ausgangsmaterialien hatte sich bei Verwendung der elektronenarmen PyBOP-Derivaten zur Thioacylierung unter 3.1.7.2 als besonders problematisch herausgestellt.

In dem hier beschriebenen Fall konnte eine erfolgreiche Verknüpfung des Thioimdates **101** mit der Mischung aus Aminen **108(OTIPS)** und **108(OH)** erzielt werden (**Schema 37**). Durch einen höheren Anteil an H_2O (15 % anstelle von 11%) wurde eine schnellere Verseifung von **101** erzielt. Das Me-Thioimidat wurde zudem im Überschuss eingesetzt, um ein mögliche Zersetzung unter den Reaktionsbedingungen zu kompensieren. Die Produkte **124(OTIPS)** und **124(OH)** konnten durch eine

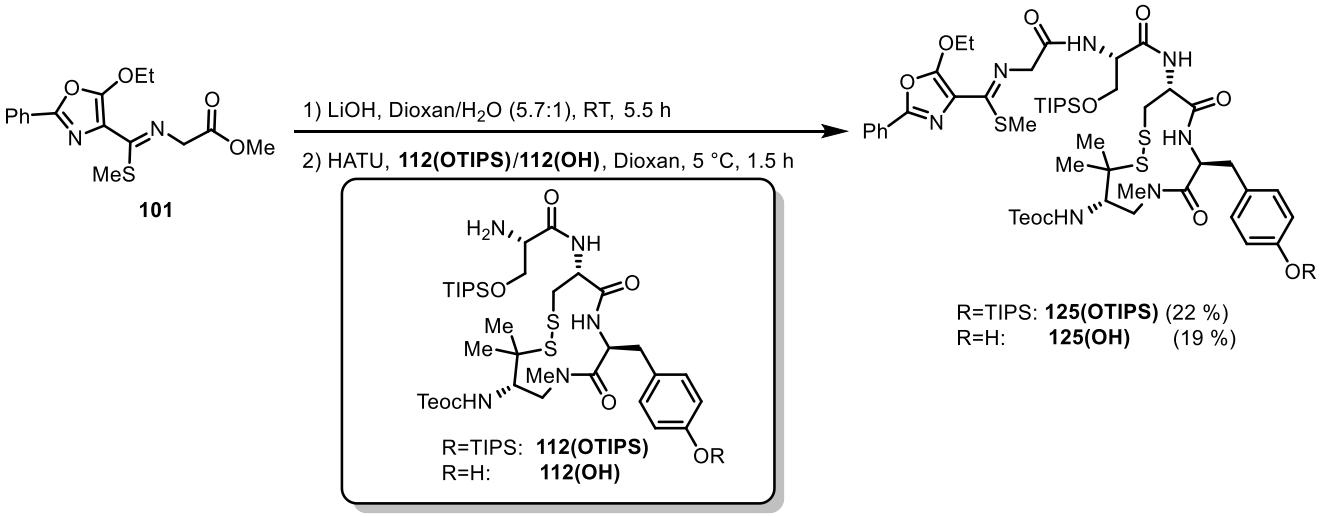
chromatographische Reinigung voneinander und von dem verbliebenen **101** getrennt in einer kombinierten Ausbeute von 48 % über zwei Stufen isoliert werden.



***Schema 37**: Synthese von **124** aus **101** in einer VKER.*

Die erfolgreiche Etablierung dieser Konjugationsmethode bot einen Zugang zu den Thioamid-enthaltenden Peptiden **8** und **19** (vgl. **Schema 25** in 3.1.8) nach der noch ausstehenden Entfernung der Schutzgruppen der Schwefelatome. Im Vergleich zu der vorher beschriebenen Reaktion zu **121** (**Schema 36**) lässt sich festhalten dass die HATU-vermittelte Kuppung sogar bei tieferen, milden Temperaturen (d.h. 5 °C) innerhalb einer kurzen Reaktionszeit zum vollständigen Umsatz führte.

Darüber hinaus wurden auch die Amine mit einem intramolekularen Disulfid **112(OTIPS)** und **112(OH)** mit **101** zur Reaktion gebracht (**Schema 38**). Die erhaltenen Produkte besitzen gegenüber **124** den Vorteil, dass eine Entschützung der PMB-Gruppen der Thiole nicht mehr notwendig ist.

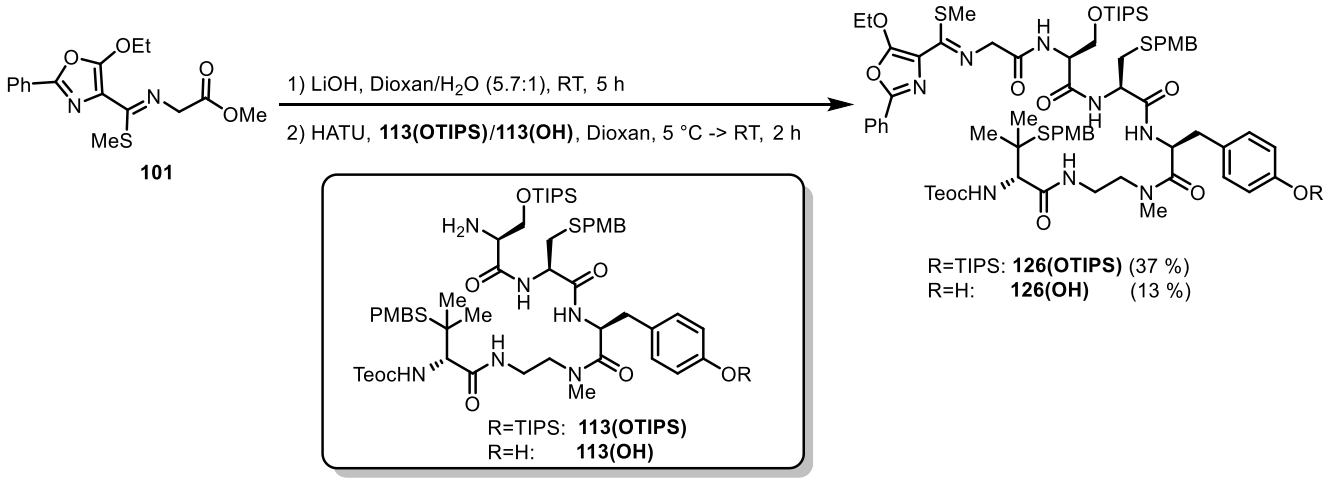


***Schema 38**: Synthese der Disulfid-Me-Thioimidate **125** aus **101** in einer VKER.*

Für die Synthese wurden dieselben Reaktionsbedingungen wie zur Kupplung der PMB-geschützten verwendet und das TIPS-geschützte Produkt **125(OTIPS)** konnte wieder von dem Produkt ohne TIPS-Schutzgruppe **125(OH)** getrennt werden. Ersteres ließ sich laut LC-MS Analyse jedoch nur in Verbindung mit nicht reagiertem **101** isolieren. **125(OH)** hingegen wurde nach chromatographischer Reinigung als Addukt mit zwei Äquivalenten NEt_3 isoliert. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung von **125(OTIPS)** und **125(OH)** wurde dadurch erschwert, dass diese in mehreren unterschiedlichen Konformationen vorliegen und daher eine Zuordnung der beobachteten Signale zu den funktionellen Gruppen nicht eindeutig möglich war. **125(OTIPS)** und **125(OH)** wurden anschließend vereinigt und gemeinsam in den folgenden Entfernungen der Schutzgruppen umgesetzt.

Insgesmt standen die zwei verschieden geschützten Hexamere mit einem CH_2-Linker **124** und **125** zur Verfügung, die unterschiedlichen Entschützungsmethoden unterzogen wurden. Die dazu durchgeführten Versuche sind unter 3.1.13 beschrieben.

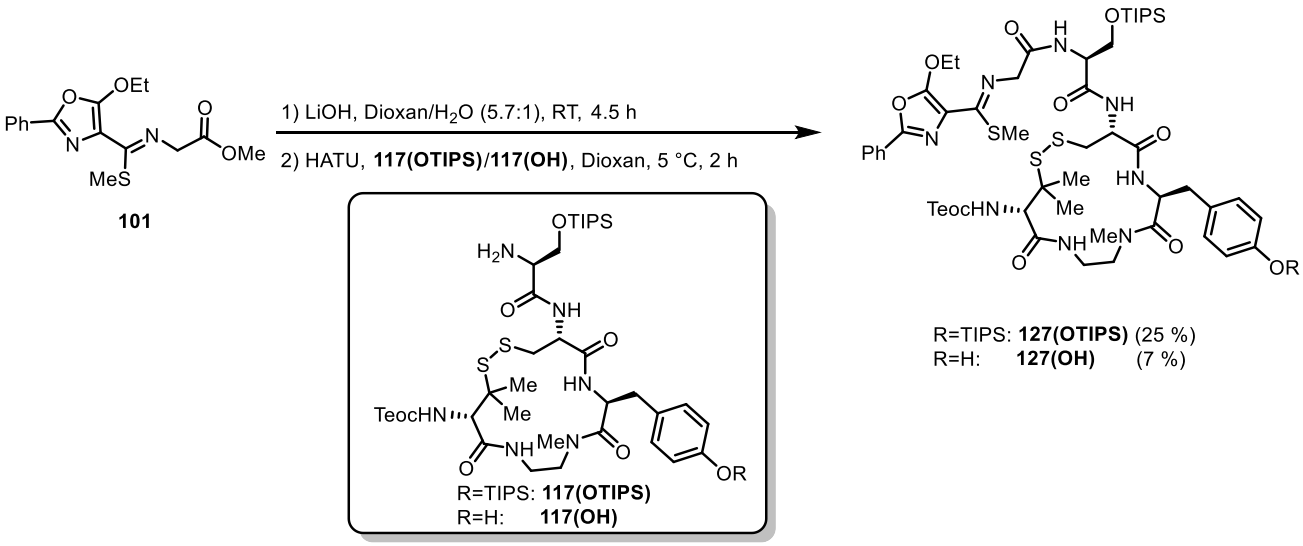
Analog zu den Peptiden mit einem CH_2-Linker wurde **101** in einer VKER mit der Mischung aus PMB-geschützten Aminen **113(OTIPS)** und **113(OH)** mit einem C_2H_4-Linker zu den entschprechenden Me-Thioimidaten umgesetzt (**Schema 39**). Es wurden äquimolare Mengen an Me-Thioimidat und Aminen verwendet, wodurch **126(OTIPS)** und **126(OH)** in einer kombinierten Ausbeute von 50 % ohne Verunreinigungen isoliert werden konnten.



***Schema 39**: Synthese von **126** aus **101** in einer VKER.*

Die Me-Thioimidatdisulfide mit einem C_2H_4-Linker **127(OTIPS)** und **127(OH)** konnten gleichermaßen erfolgreich hergestellt, mittels Säulenchromatographie getrennt und in

einer etwas geringfügigeren Ausbeute erhalten werden (**Schema 40**). Eine Zuordnung der Signale bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung war aufgrund der zuvor beschriebenen Problematik erneut nicht eindeutig möglich. **127(OTIPS)** und **127(OH)** wurden im Anschluss gemeinsam für die Entfernung der Silyl-Schutzgruppen eingesetzt, die unter 3.1.13 erläutert ist.



Schema 40: *Synthese der Disulfid-Me-Thioimidate* ***127*** *aus* ***101*** *in einer VKER.*

Bei den beschriebenen Synthesen ist auffällig, dass die Reaktionen mit den Disulfidaminen **112(OTIPS)/112(OH)** (41 % über zwei Stufen) und **117(OTIPS)/117(OH)** (32 % über zwei Stufen) geringere Ausbeuten lieferten als mit den entsprechenden PMB-geschützten Aminen **108(OTIPS)/108(OH)** (48 % über zwei Stufen) und **113(OTIPS)/113(OH)** (50 % über zwei Stufen). Dies lässt sich damit erklären, dass im letzteren Fall die Amine aus einem chromatographisch gereinigtem Startmaterial hergestellt wurden. Die Disulfidamine wurden aus den Boc-geschützten Vorläufern erhalten, die nach der Disulfid-Bildung nur extraktiv gereinigt wurden (vgl. 3.1.11).

Am Ende des Kapitels über den Aufbau von Thiopeptiden mit einem Ph-Oxa(OEt)-Motiv sollen die Ergebnisse kurz zusammengefasst werden. In einem ersten retrosynthetischen Ansatz (vgl. 3.1.1) unter Verwendung von Reagenzien zur Thioacylierung endständiger Amine ließ sich kein Zugang zu den gewünschten Thiopeptiden ermöglichen. Aufgrund der direkten Nachbarschaft des Reaktionszentrums zum Oxazol wurde vermutlich eine Zersetzung dieser Reagenzien induziert (vgl. 3.1.7). Im Anschluss wurde die Retrosynthese durch die Anwendung des als Me-Thioimidat geschützten Thioamids **101** (vgl. 3.1.8) verändert. Unter Verseifung-Kupplung-

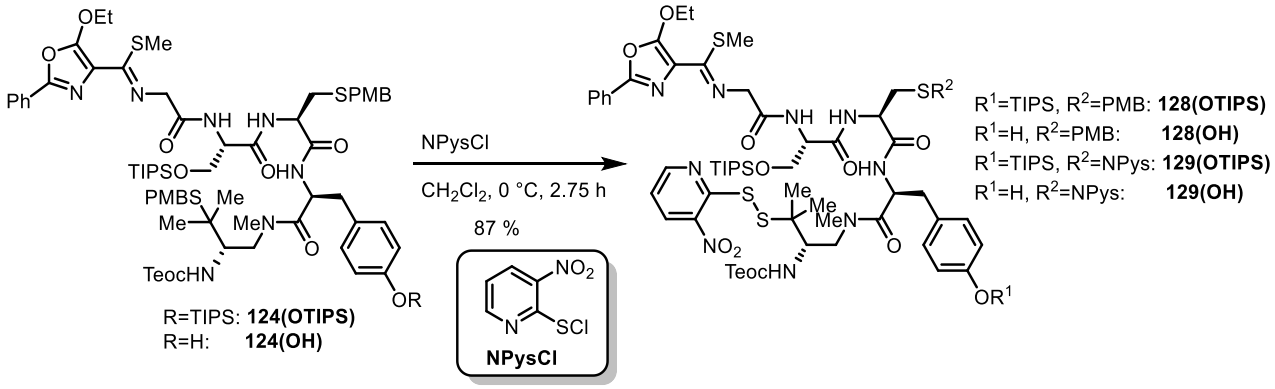
Eintopfbedingungen konnte final ein erfolgreicher Zugang zu den geschützten Thiopeptiden etabliert werden.

Ausgehend von diesen Verbindungen werden im nächsten Abschnitt Strategien präsentiert, diese zu den strukturvereinfachten Derivaten **4** und **5** zu entschützen.

3.1.13 Sukzessive Entfernung der Schutzgruppen der Me-Thioimidate

3.1.13.1 Entfernung der PMB-Schutzgruppen in Anwesenheit des Me-Thioimidats

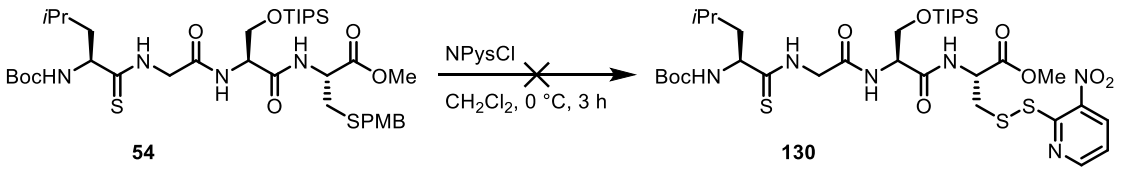
Nach der erfolgten Synthese der unterschiedlich geschützten Thiopeptide, bestand die Herausforderung darin, eine geeignete Reihenfolge für die Entfernung der Schutzgruppen zu entwickeln. Als erstes wurde, wie unter 3.1.11.1 angedeutet, untersucht, ob die PMB-Schutzgruppen der Thiole aus Me-Thioimidaten **124(OTIPS)** und **124(OH)** mit einem CH_2-Linker entfernt werden können. Dafür wurden die beiden Me-Thioimidate zunächst vereinigt für 2.75 h bei 0 °C mit 2.5 Äq. NPysCl behandelt (**Schema 41**). Nach dieser Zeit konnte ein vollständiger Umsatz zu den Di-NPys-Produkten **129(OTIPS)** und **129(OH)** festgestellt werden.



***Schema 41**: Umschützung der PMB-geschützten Thiole in einer Mischung aus **124(OTIPS)** und **124(OH)** durch Reaktion mit NPysCl.*

Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass die PMB-Thioether in Anwesenheit des Me-Thioimidats in **124** spaltbar waren. Folglich verhinderte die Umwandlung des Thioamids in ein Thioimidat die, in der Masterarbeit von FABIAN BRUNSIWG beobachtete Zersetzung des Thiocarbonyls bei einer Reaktion mit NPysCl (**Schema 42**).[59]

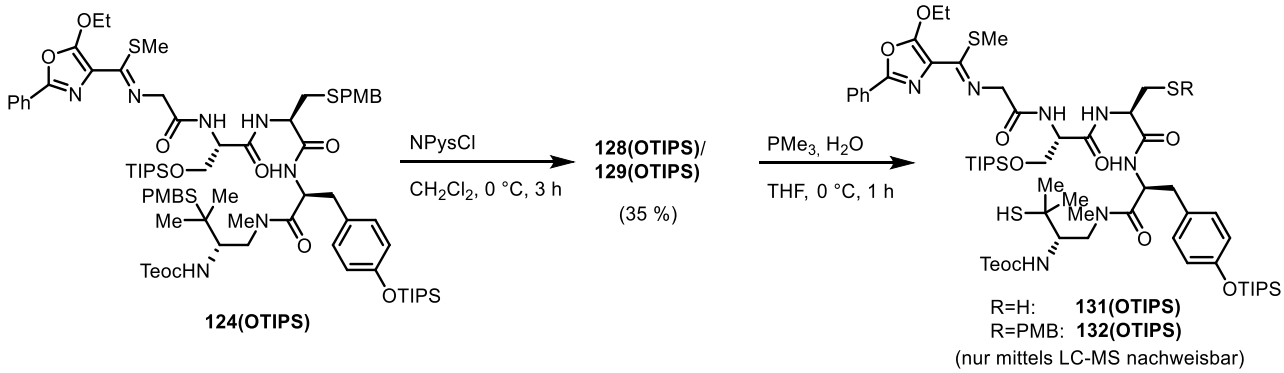
Nach der wässrigen Aufarbeitung wurden jedoch in dem Rohprodukt wieder die monosubstituierten Produkte **128(OTIPS)** und **128(OH)** mittels LC-MS nachgewiesen. Da NPysCl generell mit dem elektronenreichsten Thioether reagieren sollte, sind ein Austausch der PMB-Gruppe des Penicillamins und das Produkt **128** am wahrscheinlichsten.



Schema 42: *Nicht erfolgreiche Umschützung des PMB-geschützten Thiols in **54** durch Reaktion mit NPysCl nach* BRUNSWIG.[59]

Es ist denkbar, dass das bei der Reaktion entstandene PMBCl während der Aufarbeitung mit den gewünschten Produkten **129** zurück zu **128** reagierte. Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass auch Alkohole neben Thiolen und Thioethern eine Reaktion mit NPysCl eingehen können.[97] Das ungeschützte Phenol in **129(OH)** könnte daher womöglich eine Rückreaktion von **129** zu **128** begünstigt haben.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden **124(OTIPS)** als isolierte Fraktion für die weitere Synthese verwendet. Des Weiteren wurde nach vollständigem Umsatz von **124(OTIPS)** mit 3 Äq. NPysCl die Reaktionsmischung vor der säulenchromatographischen Reinigung im Hochvakuum getrocknet, um gebildetes PMBCl zu entfernen. Dadurch wurde aber wiederum das Produkt **129(OTIPS)** nur in Kombination mit **128(OTIPS)** in einer Ausbeute von 35 % isoliert (**Schema 43**).



Schema 43*: Umschützung der PMB-geschützten Thiole in **124(OTIPS)** durch Reaktion mit NPysCl und Isolierung der Disulfide gefolgt von Reduktion mit PMe_3 zu **131(OTIPS**).*

Folglich wurde die Bildung des einfach umgeschützten **128(OTIPS)** nicht durch die Abwesenheit des freien Phenols verhindert. Die Mischung wurde im Anschluss trotzdem für die nachfolgende Reduktion mit PMe_3 eingesetzt (**Schema 43**). Dabei konnte die Bildung des Dithiols **131(OTIPS**) aus **129(OTIPS)** und des entsprechenden Monothiols **132(OTIPS)** aus **128(OTIPS)** mittels LC-MS nachgewiesen werden. Es wurde jedoch auch die vermehrte Bildung eines nicht näher bestimmbaren Nebenprodukts festgestellt, das durch Säulenchromatographie nicht abgetrennt werden konnnte. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Reaktion mit PMe_3 zu einer Zersetzung führen könnte. Es

ist denkbar, dass die Doppelbindung des Me-Thioimidats gegenüber dem Nukleophil PMe_3 reaktiv ist. Bei einem direkten Umsatz des vollständig gebildeten NPys-Peptids **129(OTIPS)** mit PMe_3 ohne vorherige Aufarbeitung und Reinigung konnte die Bildung des Mono-PMB-Thiols **132(OTIPS)** zwar erfolgreich unterdrückt werden, jedoch wurde das gewünschte Produkt **131(OTIPS)** nur in geringer Intensität in einer LC-MS-Kontrolle gefunden. Diese Beobachtung unterstützte wiederum die vermutete Zersetzung der Me-Thioimidate bei einer Reaktion mit PMe_3.

Bei einer Anwendung derselben Sequenz auf die analoge Verbindung mit einem C_2H_4-Linker **126(OTIPS)** (vgl. **Schema 39** in 3.1.12) wurde ebenfalls eine hauptsächliche Zersetzung beobachtet.

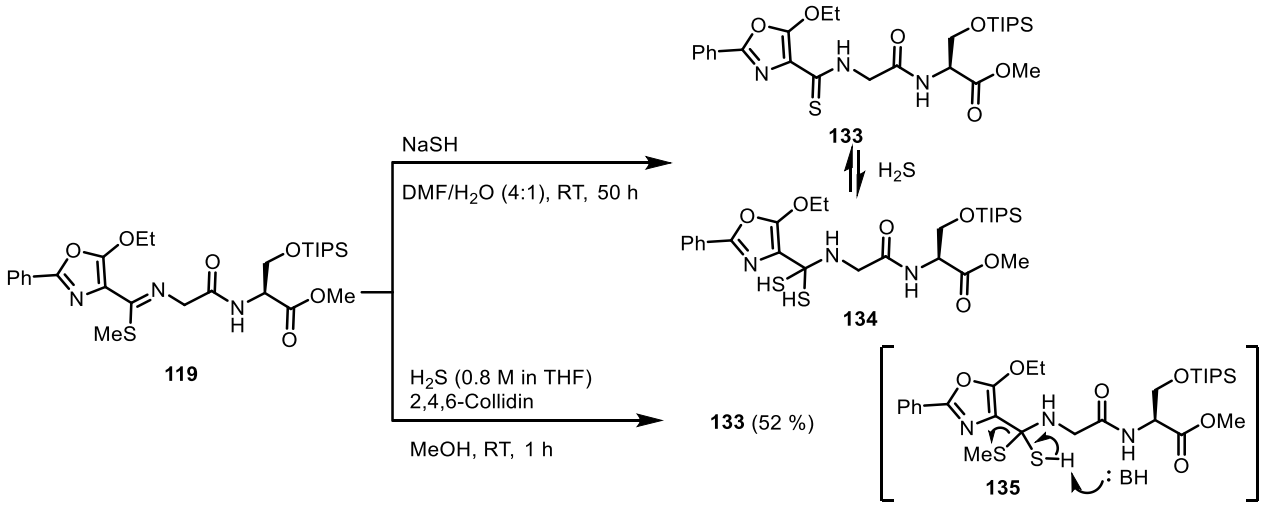
Aus diesem Grund lässt sich festhalten, dass sich bei dem NPys-Austausch zwar die Rückreaktion mit dem gebildeten PMBCl unterdrücken ließ, das Me-Thioimidat jedoch eine selektive Entfernung der NPys-Reste mit PMe_3 verhinderte. Es lässt sich festhalten, dass PMB-Gruppen zum Schutz der Thiole nur für die Synthesen der unter 3.1.11 beschriebenen Tetrapeptide aber nicht für eine Verknüpfung dieser zu Thiopeptiden geeignet waren. Die PMB-Gruppen ließen sich weder in Anwesenheit eines Thioamids noch eines Thioimidats entfernen.

Stattdessen wurden im Folgenden die Me-Thioimidatdisulfide **125** und **127** weiteren Schutzgruppenentfernungen unterzogen.

3.1.13.2 Untersuchungen zur Spaltung des Me-Thioimidats

Zur Umsetzung der modifizierten Retrosynthese (vgl. **Schema 25** in 3.1.8) war es wichtig, die Me-Thioimidate auch wieder zu den Thioamiden entschützen zu können. Folglich wurde als nächstes ein Ansatz zur Entfernung der Me-Schutzgruppe entwickelt.

Wie unter 3.1.8 erwähnt wurde, ist die Reaktion mit NaSH in einer Mischung aus DMF und H_2O bei RT eine Möglichkeit, um Me-Thioimidate zu spalten.[87] Um diese Methode beurteilen zu können, wurde sie auf das strukturell einfachste Me-Thioimidat **119** aus 3.1.12 als Modellsystem angewandt (**Schema 44**). Nach einer Reaktionszeit von 50 h konnte ein vollständiger Umsatz von **119** erreicht werden. Im Vergleich zu den aliphatischen Thioimidaten aus der Literatur wurde durch die Nachbarschaft zum elektronenreichen Oxa(OEt)-Heterozyklus der nukleophile Angriff des Hydrogensulfids vermutlich deutlich erschwert. Dieser ist notwendig, um Zwischenprodukt **135** zu bilden, aus dem mittels Deprotonierung MeSH eliminiert und das Thioamid gebildet werden kann.



***Schema 44**: Demethylierung des Thioimidats **119** unter verschiedenen Bedingungen.*

Darüber hinaus ist die Bildung des Thioamids **133** aus **119** reversibel, was ebenfalls für eine langsame Reaktion verantwortlich sein kann.

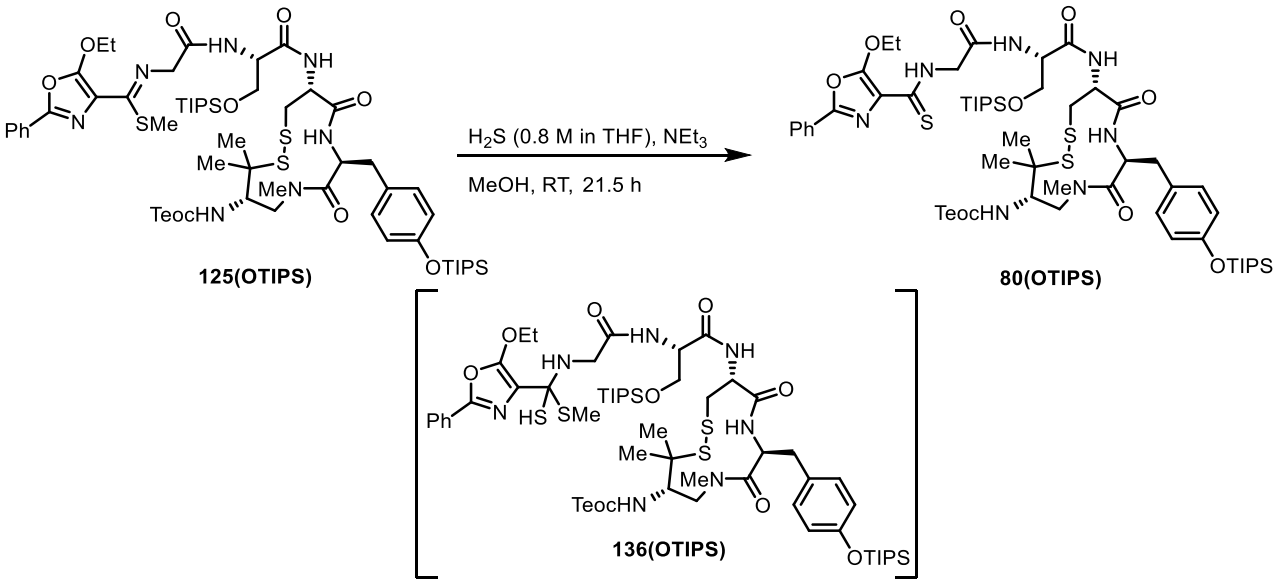
Im Laufe der Reaktion konnte **133** zwar mittels LC-MS nachgewiesen werden, jedoch wurde ein Signal mit höherer Intensität beobachtet, das dem Additionsprodukt von H_2S an **133** zugeordnet werden konnte. Dieses Produkt könnte die Struktur von **134** aufweisen und würde darauf hindeuten, dass die Thioamide in Nachbarschaft zum Oxa hauptsächlich in einer Art zwitterionischen Form mit einem geringen Doppelbindungscharakter der C-S-Bindung vorliegen. Die Anwesenheit eines

Nukleophils (hier NaSH) könnte folglich zu der tetraedrischen Struktur geführt haben (**Schema 44**).

Eine weitere Möglichkeit, Thioamide aus Me-Thioimidaten zu erhalten, ist die ebenfalls aus der Literatur bekannte Kombination aus H_2S und 2,4,6-Collidin.[89] Präparativ wurde die Reaktion aus Sicherheitsgründen hier nicht mit H_2S Gas sondern mit einer 0.8 M Lösung aus H_2S in THF durchgeführt (**Schema 44**). Thioimidat **119** konnte unter diesen Bedingungen innerhalb 1 h vollständig umgesetzt werden. Neben dem gewünschten Thioamid **133** wurde zwischenzeitlich das H_2S-Addukt von **119** mittels LC-MS detektiert. Durch den großen Überschuss an H_2S konnte das Gleichgewicht letztlich auf die Seite des Thioamids verschoben und nach der Aufarbeitung **133** als Rohprodukt in einer Ausbeute von 52 % erhalten werden. Offensichtlich ist **135** unter den weniger basischen Bedingungen aber so stabil, dass es in der Reaktionskontrolle beobachtet werden konnte, während das H_2S-Additionsprodukt **134** unter den stärker basischen Bedingungen mit NaSH bevorzugt gebildete wurde.

Zusammenfassend konnte mit der Synthese von **133** ein erstes Beispiel für die Umsetzung der Me-Thioimidatstrategie zum Aufbau von Thiopeptiden mit einer Oxa(OEt)-Gly-Thioamid Bindung demonstriert werden. Es ist erwähnenswert, dass die hier diskutierte Elektrophilie der Me-Thioimidate bedeutet, dass diese Strukturmotive mit anderen Nukleophilen ungewollten Nebenreaktionen eingehen können (vgl. Reaktion mit PMe_3 unter 3.1.13.1).

Da eine Synthese der Me-Thioimidatdithiole aufgrund von einer Zersetzung bei der Entfernung der PMB-Schutzgruppen nicht möglich war (vgl. 3.1.13.1), wurde die Methode zur Demethylierung des Thioimdates auf das komplexe Disulfid **125(OTIPS)** transferiert. Dabei wurden die Bedingungen der Bildung von **133** leicht modifiziert, um eine effektive Spaltung des Me-Thioimidats zu erzielen (**Schema 45**).



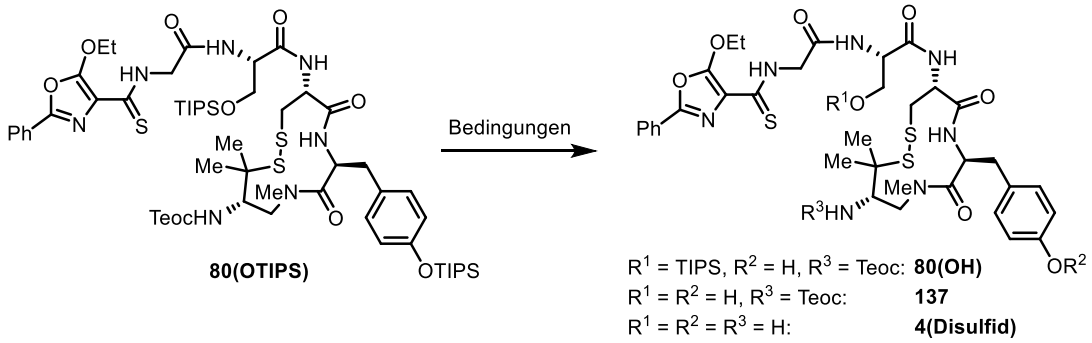
***Schema 45**: Demethylierung des Thioimidats **125(OTIPS)** unter intermediärer Bildung des H_2S-Aditions-Produkts **136(OTIPS)**.*

Im Gegensatz zur Synthese von **133** konnte bei der Reaktion von **125(OTIPS)** mit H_2S und 2,4,6-Collidin lediglich die Bildung des H_2S-Addukts **136(OTIPS)** und nicht des gewünschten Thioamids **80(OTIPS)** festgestellt werden. Vermutlich war die Basizität des Collidins (pK_B = 6.57[98]) nicht hoch genung, um das gebildete Addukt zu deprotonieren. Die Eliminierung von MeSH zu **80(OTIPS)** konnte erst durch den Einsatz von NEt_3 (pK_B = 3.74[99]) ermöglicht werden. Innerhalb von 21.5 h bei RT konnte ein vollständiger Umsatz des Me-Thioimidats zu **80(OTIPS)** erzielt werden. Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde das nach der Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt nicht gereinigt und direkt für Tests zur Entfernung der Silyl-Schutzgruppen eingesetzt.

Mit Abschluss dieser Untersuchungen stand somit eine effektive Methode zur Verfügung, auch komplexe Me-Thioimidate in Thioamide zu überführen und damit einen Zugang zu den strukturvereinfachten Derivaten zu ermöglichen.

3.1.13.3 Entfernung der Silyl-Schutzgruppen

Nachdem in den beiden vorangegangenen Abschnitten Ansätze zur Entschützung der unterschiedlichen Schwefelatome diskutiert wurden, bestand das nächste Ziel darin, eine geeignete Strategie zur Spaltung der unterschiedlichen siliziumbasierten Schutzgruppen zu entwickeln. Als erstes wurde die Kompatibilität des Disulfid-Thioamids **80(OTIPS)** mit unterschiedlichen, in **Tabelle 6** aufgeführten Bedingungen zur Entfernung der Silyl-Gruppen untersucht (**Schema 46**).



Schema 46: *Globale Entfernung der Silyl-Schutzgruppen aus* ***80(OTIPS)*** *unter den in* ***Tabelle 6*** *zusammengefassten Bedingungen.*

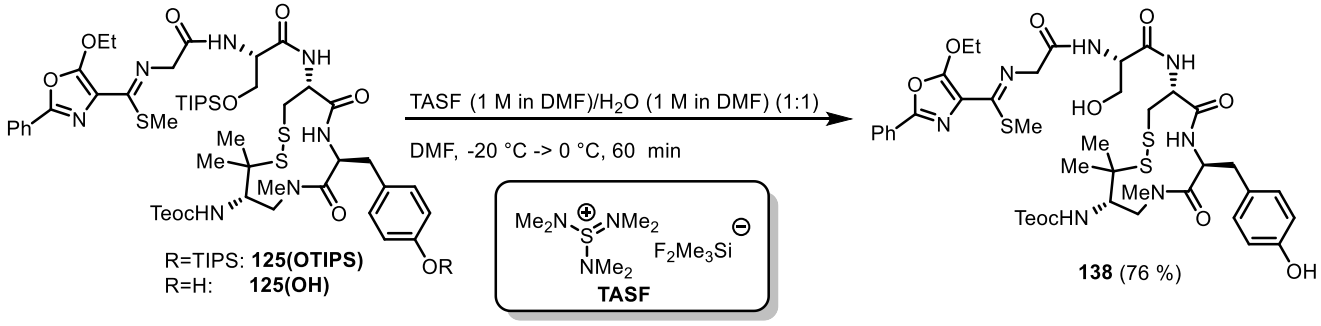
Bei einer Reaktion mit TBAF als Standardreagenz zur Entfernung von Silyl-Gruppen wurde bereits nach 30 min bei 0 °C eine vollständige Zersetzung des Thioamids beobachtet (Eintrag 1 in **Tabelle 6**). Die Zugabe von AcOH zu der Reaktionsmischung zur Abschwächung der Reaktivität konnte eine Zersetzung ebenfalls nicht verhindern (Eintrag 2 in **Tabelle 6**). Vermutlich ist das Thioamid gegenüber dem stark nukleophilen und basischen Fluorid-Anion nicht stabil genug. Als nächst mildere Variante wurde **80(OTIPS)** mit Tris(dimethylamino)sulfonium difluortrimethylsilikat (TASF) und H_2O im Verhältnis von 1:1 zur Reaktion gebracht (Eintrag 3 in **Tabelle 6**). Bei 0 °C wurde die Entfernung einer TIPS-Gruppe erfolgreich nachgewiesen, bei der es sich aufgrund der besseren Abgangsgruppenqualität sehr wahrscheinlich um die Schutzgruppe des Tyr handelte. Im Anschluss wurde die Reaktion bei RT fortgeführt, was zu einer Spaltung des weiteren Silylethers führte. Die Teoc-Schutzgruppe des Amins wurde jedoch laut LC-MS unter diesen Bedingungen nicht entfernt und **4(Disulfid)** wurde nicht erhalten. Letzteres wurde durch eine Reaktion mit HF (70 % in Py) neben einer Bildung von **80(OH)** und **137** in Spuren ermöglicht (Eintrag 4 in **Tabelle 6**).

***Tabelle 6**: Untersuchte Bedingungen zur Entfernung der Silyl-Schutzgruppen des Disulfid-Thioamids **80(OTIPS)** aus **Schema 46**.*

Eintrag	Bedingungen	Ergebnis nach LC-MS
1	TBAF, THF, 0 °C, 30 min	Zersetzung
2	TBAF/AcOH (1:1.3), THF, 0 °C, 30 min	Zersetzung
3	TASF/H_2O (1:1), DMF, 0 °C -> RT, 24 h	Bildung von **80(OH)** und **137**
4	HF (70 % in Py), THF, 0 °C -> RT, 23 h	Bildung von **80(OH)** und **137**, **4(Disulfid)** in Spuren nachgewiesen

Es ist möglich, dass das Thioamid wegen seines schwach aziden Charakters die Spaltung der Silyl-Schutzgruppen verlangsamen kann. Um dies zu umgehen, kann das Thioimidat erst nach Freisetzung der Silyl-geschützten Funktionalitäten gespalten werden. Dieser Anatz ermöglicht es darüber hinaus, die aus der vorherigen Eintopfkupplung erhaltenen Produkte mit und ohne TIPS-Schutzgruppe gemeinsam einzusetzen (vgl. 3.1.12).

Unter Anbetracht der Ergebnisse, die bei der Entschützung von **80(OTIPS)** erzielt werden konnten (**Schema 46**), wäre prinzipiell eine vollständige Entfernung der Silyl-Schutzgruppen aus der Mischung der Me-Thioimidate **125(OTIPS)** und **125(OH)** denkbar (**Schema 47**). Dies konnte jedoch bei einer Reaktion mit TASF und H_2O bei RT analog zu Eintrag 3 in **Tabelle 6** nicht erreicht werden. Stattdessen wurde nur eine Zersetzung festgestellt.

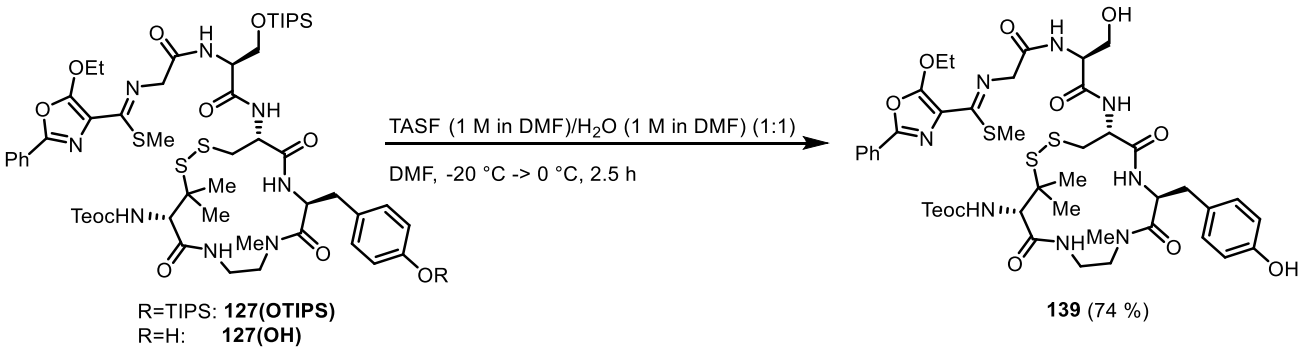


***Schema 47**: Entfernung der Silyl-Schutzgruppen der Alkohole aus den Me-Thioimidaten **125(OTIPS)** und **125(OH)** mit TASF/H_2O in DMF.*

Aus diesem Grund wurden in einem ersten Schritt nur die TIPS-Schutzgruppen aus **125(OTIPS)** und **125(OH)** vollständig entfernt. Bei einer Reaktion bei -20 °C mit 5 Äq. TASF/H_2O konnte nach 60 min ein vollständiger Umsatz zu **138** beobachtet werden und nach Aufarbeitung wurde das Rohprodukt in 76 % Ausbeute erhalten (**Schema 47**). Wegen der Hydrolyseempfindlichkeit wurde das Me-Thioimidat nicht weiter gereinigt und

direkt in der nachfolgenden Demethylierung zu dem entsprechenden Thioamid weiter umgesetzt. Die verbleibende Teoc-Gruppe sollte erst im Anschluss daran entfernt werden.

Durch Anwendung derselben Bedingungen zur TIPS-Entschützung konnte nach einer leicht verlängerten Reaktionszeit auch der Umsatz der Disulfid-Me-Thioimidate **127(OTIPS)** und **127(OH)** realisiert werden (**Schema 48**). Das in 74 % isolierte Teoc-geschützte Me-Thioimidat **139** wurde im Weiteren analog zu **138** ohne weitere Reinigung für die nachfolgende Demethylierung zu dem entsprechenden Thioamid eingesetzt.



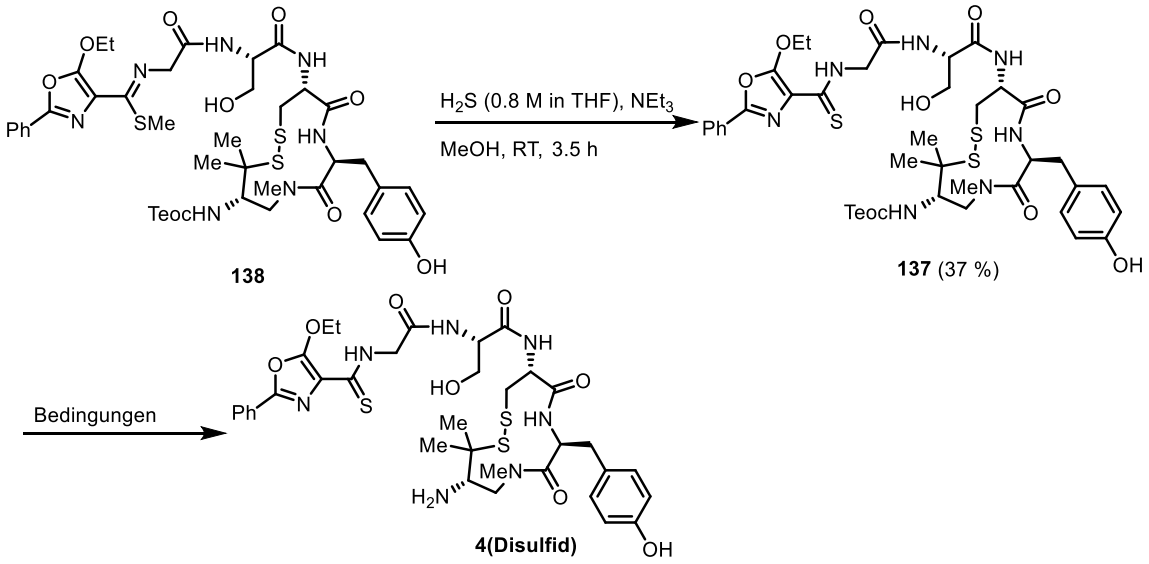
***Schema 48**: Entfernung der Silyl-Schutzgruppen der Alkohole aus den Me-Thioimidaten **127(OTIPS)** und **127(OH)** mit TASF/H_2O in DMF.*

Zusammenfassend ergab sich durch die hier beschriebenen Reaktionen folgende geeignetete Reihenfolge für die Entfernung der Schutzgruppen aus den Disulfid-Me-Thioimidaten **125** und **127** zu den Naturstoffderivaten **4** und **5**:

1) Spaltung der TIPS-Schutzgruppen mit TASF und H_2O,
2) Demethylierung zum Thioamid mit H_2S und NEt_3,
3) Spaltung der Teoc-Schutzgruppe unter den im nächsten Abschnitt diskutierten Bedingungen.

*3.1.13.4 Finale Freisetzung des Thioamids aus **138** und **139** und Entfernung der Teoc-Gruppe*

Als erstes Teoc-Me-Thioimidat **138** mit einem CH_2-Linker den unter 3.1.13.2 optimierten Bedingungen zur Entschützung des Thioamids unterzogen (**Schema 49**). Eine Reaktionszeit von 3.5 h bei RT ergab nach säulenchromatographischer Reinigung **137** in 37 % isolierter Ausbeute. Die geringe Ausbeute kann auf eine Reaktion des intramolekularen Disulfids mit H_2S zurückgeführt werden, die womöglich zu einer Bildung von Polymeren führte. Darüber hinaus enthielt das zuvor nicht gereinigte **138** noch Reste von **101** aus der VKER (vgl. 3.1.12), die erst auf dieser Stufe abgetrennt wurden. **137** wurde ebenfalls NMR-spektroskopisch untersucht. Die Zuordnung der beobachteten Signale zu den funktionellen Gruppen in dem Molekül war jedoch nicht eindeutig möglich, da dieses in mehreren unterschiedlichen Konformationen vorlag.



Schema 49: *Demethylierung von **138** zu Thioamid **137** und Entfernung der Teoc-Gruppe unter den in **Tabelle 7** beschriebenen Bedingungen.*

Im Weiteren wurde **137** hinsichtlich einer Entfernung der Teoc-Gruppe als letzte verbliebene Schutzgruppe untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in **Tabelle 7** dargestellt. Es wurde explizit auf fluoridhaltige Reagenzien verzichtet, da diese unter 3.1.13.3 nicht zu einer Teoc-Entschützung sondern zu einer Zersetzung geführt hatten. Als erste Methode wurden Brønstedt-saure Bedingungen getestet (Eintrag 1 und 2 in **Tabelle 7**).

***Tabelle 7**: Untersuchte Bedingungen zur finalen Entschützung des Amins in **137** aus **Schema 49**.*

Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
1	*p*TSA (1.1 Äq.), TFE, 60 °C, 40 min	Zersetzung
2	TFA (20 Äq.), CH_2Cl_2, 0 °C -> RT, 19 h	Geringer Umsatz von **137**
3	$ZnCl_2$ (0.1 M in THF, 10 Äq.), TFE, 40 °C, 22.5 h	Kein Umsatz
4	$ZnCl_2$ (10 Äq.), TFE, 45 °C, 3.5 h	Vollständiger Umsatz zu Amin **4(Disulfid);** Rohausbeute: 40 %

Dabei wurde neben einer Zersetzung nur ein geringer Umsatz des Startmaterials beobachtet. Eine Bildung des gewünschten Produkts **4(Disulfid)** wurde aber zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen. Daher wurde als nächstes untersucht, ob Lewis-saure Bedingungen zu einer effektiven Entschützung von **137** führen konnten. Diesbezüglich brachte die Verwendung einer 0.1 M Lösung aus $ZnCl_2$ in THF nicht den erhofften Erfolg (Eintrag 3 in **Tabelle 7**). Vermutlich war wegen der Koordination der Zn^{2+}-Ionen durch THF die Lewis-Azidität zu weit herabgesetzt. Eine Reaktion mit $ZnCl_2$ in dem schlechter koordinierenden Lösungsmittel TFE lieferte bei 45 °C innerhalb von 3.5 h einen vollständigen Umsatz zu dem potentiellen Chelator **4(Disulfid)** (Eintrag 4 in **Tabelle 7**). Nach wässriger Aufarbeitung konnte dieser mit einer Rohausbeute von 40 % erhalten werden. Ausgehend von den geschützten Me-Thioimidatdisulfiden **125(OTIPS)** und **125(OH)** (vgl. **Schema 47** in 3.1.13.3) wurden die Schutzgruppen in einer dreistufigen Sequenz mit einer Gesamtausbeute von 11 % entfernt.

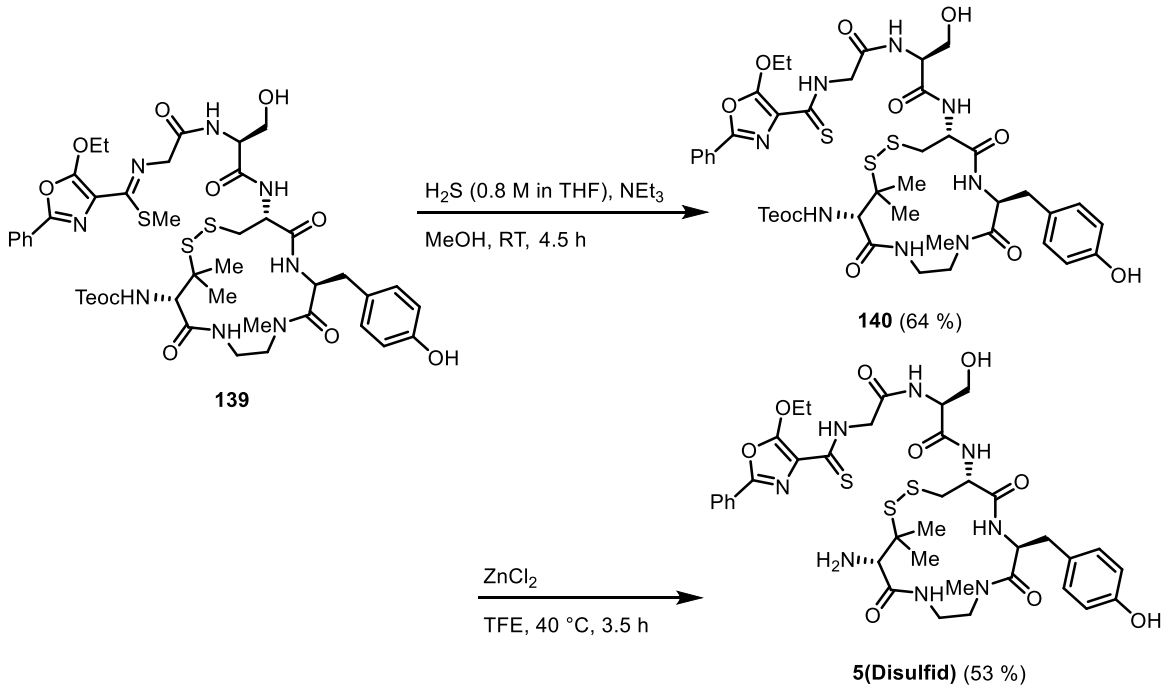
Mit der finalen Entfernung der Teoc-Gruppe konnte das in **Schema 4** unter 3.1.1 formulierte Ziel nach einer Vielzahl an untersuchten Bedingungen erfolgreich erreicht und ein Derivat mit einem CH_2-Linker hergestellt werden. Es konnte anhand der beschriebenen Ergebnisse zum ersten Mal in der Literatur ein Zugang zu Naturstoffderivaten von **MB OB3b** ermöglicht werden. Analog zum natürlichen Chelator wurde ein Oxa(OEt)-Motiv über ein Thioamid mit einer schwefelhaltigen Aminosäurekette verbunden, die über ein intramolekulares Disulfid verfügt.

Darüber hinaus könnte **4(Disulfid)** in einem weiteren Schritt mithilfe eines geeigneten Reduktionsmittels (z.B. PMe_3) in das Naturstoffderivat in der Dithiolform **4** (vgl **Schema 4**) überführt und hinsichtlich seiner Cu^+-Affinität untersucht werden.[48]

Um die Synthese des Naturstoffderivats **5** mit einem C_2H_4-Linker auf die gleiche Weise abzuschließen, wurde das als Rohprodukt gewonnene **139** unter den erarbeiteten

Bedingungen mit H_2S und NEt_3 in MeOH umgesetzt (**Schema 50**). Infolge dessen wurde Thioamid **140** in einer Ausbeute von 64 % erhalten.

Obwohl im Vergleich zu **137** (37 % vgl. **Schema 49**) eine verbesserte Ausbeute erzielt werden konnte, führte vermutlich auch hier die Nebenreaktion mit dem, im Überschuss eingesetzen H_2S zu einer verringerten Bildung des gewünschten Produkts. Die Analyse des Produkts mittels NMR-Spektroskopie gestaltete sich aufgrund der unterschiedlichen Konformationen, in denen **140** vorlag, als äußerst schwierig und eine Zuordnung der beobachteten Signale zu den funktionellen Gruppen in dem Molekül war nicht eindeutig möglich.



Schema 50: *Demethylierung von **139** zu Thioamid **140** und Entfernung der Teoc-Gruppe.*

Ferner wurde das geschützte Thioamid **140** in der finalen Teoc-Entschützung eingesetzt. Die bei der Synthese von **4(Disulfid)** etablierten Bedingungen wurden insofern modifiziert, dass die Temperatur leicht auf 40 °C verringert wurde, um einer Zersetzung vorzubeugen. Dadurch konnte **5(Disulfid)** in einer geringfügig verbesserten Ausbeute von 53 % im Vergleich zum Derivat mit einem CH_2-Linker (40 % vgl. Eintrag 4 in **Tabelle 7**) hergestellt werden.

Ausgehend von den geschützten Me-Thioimidatdisulfiden **127(OTIPS)** und **127(OH)** (vgl. **Schema 48** in 3.1.13.3) wurden die Schutzgruppen in einer dreistufigen Sequenz mit einer Gesamtausbeute von 25 % entfernt. Das in **Schema 6** unter 3.1.1 formulierte Ziel

wurde mit der Synthese von **5(Disulfid)** ebenfalls erfolgreich erreicht. Basierend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen lässt sich nachfolgend eine Totalsynthese von **MB OB3b** entwickeln.

Insgesamt standen zwei unterschiedliche potentielle Chelatoren zur Verfügung, die als Derivate von **MB OB3b** hinsichtlich ihrer Cu^{+}-Affinität getestet werden können.[48] Dafür könnte **5(Disulfid)** ebenfalls mit einem Reduktionsmittel (z.B. PMe_3) in das Naturstoffderivat in der Dithiolform **5** überführt werden (vgl. **Schema 6**).

Im Hinblick auf einen Einsatz von **4(Disulfid)** und **5(Disulfid)** als potentielle Wirkstoffe gegen MW bieten diese die Möglichkeit, sie als *prodrugs* zu verwenden. Nach einer Aufnahme in die Hepatozyten, die den primären Ort der Cu-Ablagerungen darstellen (vgl. 1.2.1), können **4(Disulfid)** und **5(Disulfid)** im reduktiven Milieu der Zelle zu **4** und **5** reduziert werden. Die dadurch erhaltenen Dithiole weisen im Vergleich zu den Disulfiden eine deutlich höhere Cu-Affinität auf (stärkere σ-Donoreigenschaft von Thiolen im Vergleich zu Disulfiden). Als affine Chelatoren stehen sie dann für eine Koordination des angelagerten Cu zur Verfügung. In einer oxidativen Umgebung, wie zum Beispiel im Plasma, würden bevorzugt **4(Disulfid)** und **5(Disulfid)** vorliegen, sodass die Naturstoffderivate bis zu ihrem Wirkort als weniger potente Chelatoren vorliegen. Dieses Konzept der Adressierung von Hepatozyten durch *prodrugs* in Form von Disulfiden konnte bereits anhand anderer Moleküle in der Literatur gezeigt werden.[100,101]

3.1.14 Bestimmung der Cu-Affinität mittels UV-VIS Titration

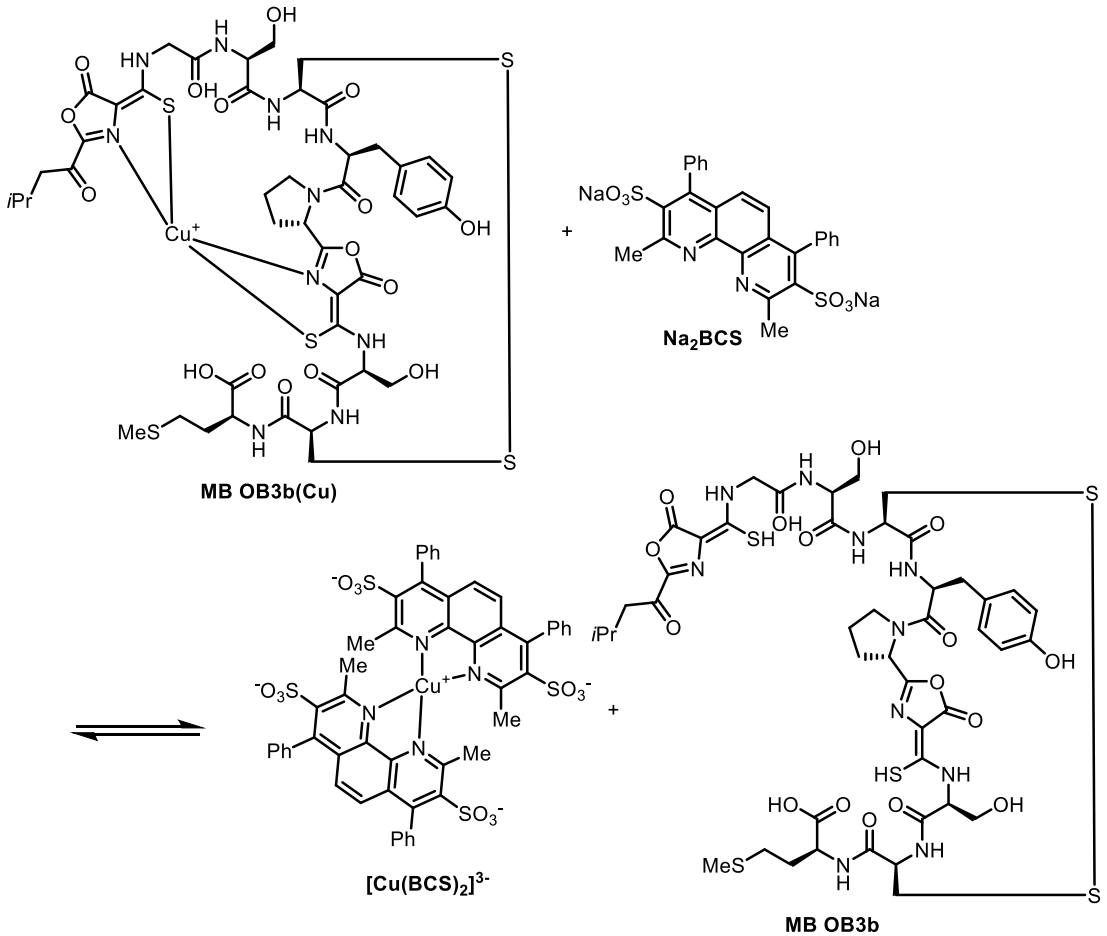
3.1.14.1 *Bestimmung der Cu-Affinität von **MB OB3b***

Die Bestimmung der Metallionenaffinität eines Chelators ist durch die direkte Titration unter Messung der bei der Koordination freiwerdenden Enthalpie mittels kalorimetischer Methoden möglich.[102] Diese Methode ist jedoch oft fehlerbehaftet, da die gemessene Enthalpie neben der Affinität ebenfalls eine Kombination aus verschiedenen anderen Beiträgen (Löslichkeitsenthalpie, Protonierungsgleichgewichte, Redoxgleichgewicht, *etc.*) enthält.[103]

Daher bietet ein Konkurrenzexperiment mit chromophoren Liganden bekannter Affinität, deren Komplexe mit den Metallionen einen hohen Extinktionskoeffizienten bei einer bestimmten Wellenlänge aufweisen, entscheidende Vorteile.[104] Bei diesem Experiment werden durch verschiedene Kombinationen aus dem Metallionen-Chelator-Komplex und

dem chromophoren Liganden unterschiedliche Gleichgewichtskonzentrationen erreicht, die Rückschlüsse auf die Affinität des zu untersuchenden Chelators zulassen. Dafür werden UV-VIS spektroskopisch die Konzentrationen des Ligand-Metallionen-Komplexes bestimmt. Auf Grundlage dieser Technik wurden die unter 1.4.2 beschriebenen Cu^+-Affinitäten der unterschiedlichen Methanobactine bestimmt.[46,48]

Für **MB OB3b** wurde von EL GHAZOUANI *et al*. die Cu^+-Affinität mithilfe von Natriumbathocuproindisulfonat (Na_2BCS), das einen selektiven Liganden für einwertiges Kupfer darstellt, bestimmt (**Schema 51**). Nach Koordination das Phenantrolins an das Metallion weist der Komplex $[Cu(BCS)_2]^{3-}$ ein Absorptionsmaximum bei λ = 483 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{[Cu(BCS)2]}$ = 12800 $M^{-1}cm^{-1}$ auf.[48] Die Stabilitätskonstante von $[Cu(BCS)_2]^{3-}$ beträgt β_2^{max} = $6.3 \cdot 10^{19}$ M^{-2} und ist damit ungefähr eine Größenordnung kleiner als die Cu-Affinität von **MB OB3b** (K_b(Cu) = $6.8 \cdot 10^{20}$ M^{-1} vgl. **Tabelle 2** in 1.4.2).[48]



***Schema 51**: Konkurrierende Koordination von Cu^+ zwischen **MB OB3b** und **Na_2BCS**.[48]*

Experimentell ermittelten die Autor:innen die Absorption bei 483 nm ($Abs_{483\ nm}$) bei jeweils verschiedenen Konzentrationen von **MB OB3b**, Cu^+ und Na_2BCS in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C.[48]

Daraus konnten sie nach Korrektur mit der Absorption von **MB OB3b(Cu)** bei 483 nm durch Gleichung (1) die Konzentration von $[Cu(BCS)_2]^{3-}$ bestimmen:

$$c([\mathrm{Cu(BCS)_2}]^{3-}) = \frac{Abs_{483\ \mathrm{nm}} - \varepsilon_{\mathrm{MB\ OB3b(Cu)}}\, c(\mathrm{Cu^+})}{\varepsilon_{[\mathrm{Cu(BCS)2}]} - \varepsilon_{\mathrm{MB\ OB3b(Cu)}}} \quad (1)$$

Dabei ist $c(Cu^+)$ die Konzentration an Cu^+-Ionen in der Analytlösung und $\varepsilon_{\mathrm{MB\ OB3b(Cu)}}$ = 2500 $M^{-1}cm^{-1}$ der Extinktionskoeffizient von **MB OB3b(Cu)** bei 483 nm.[48]

In einer ersten sogenannten UV-VIS Titration wurde $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ bei schrittweiser Zugabe von **MB OB3b** zu einer Mischung aus einem großen Überschuss Na_2BCS (5 mM) und Cu^+ (10.2 µM) bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Konzentration von **MB OB3b** (c(MB OB3b)) aufgetragen (**Abbildung 17**).

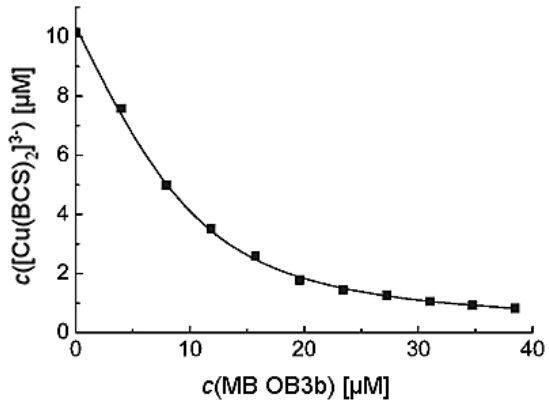


***Abbildung 17**: Titration von **MB OB3b** in eine Lösung aus Na_2BCS (5 mM) und Cu^+ (10.2 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C. Die Berechnung von $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ erfolgte nach Gleichung (1) und Anpassung der Werte erfolgte nach Gleichung (2), was eine K_b von 6.8 ± 0.2·10^{20} ergibt. Modifiziert übernommen von* El Ghazouani *et al.*[48]*

Nach einer Anpassung an folgende Gleichung (2) konnte K_b von **MB OB3b** berechnet werden[48]:

$$K_{\mathrm{b}} = \frac{[c(\mathrm{Cu^+}) - c([\mathrm{Cu(BCS)_2}]^{3-})][c(\mathrm{Na_2BCS}) - 2c([\mathrm{Cu(BCS)_2}]^{3-})]^2 \beta_2}{c([\mathrm{Cu(BCS)_2}]^{3-})[c(\mathrm{MB\ OB3b}) + c([\mathrm{Cu(BCS)_2}]^{3-}) - c(\mathrm{Cu^+})]} \quad (2)$$

Dabei ist ergänzend zu Gleichung (1) $c(Na_2BCS)$ die Konzentration an Na_2BCS und c(MB OB3b) die Konzentration an **MB OB3b** in der Titrationslösung. Die pH-Wert abhängige Stabilitätskonstante β_2 von $[Cu(BCS)_2]^{3-}$ lässt sich aus β_2^{max} mit einem pK_a-Wert von 5.7 für Na_2BCS folgendermaßen berechnen[48]:

$$\beta_2 = \frac{\beta_2^{\max}}{\left(1 + \frac{c(\mathrm{H_3O^+})}{K_{\mathrm{a}}(\mathrm{Na_2BCS})}\right)^2} \quad (3)$$

Auf Grundlage von Gleichung (2) und (3) konnten die Autor:innen $K_b(Cu) = 6.8 \pm 0.2 \cdot 10^{20}$ für **MB OB3b** bei pH 7.5 bestimmen.[48]

Um sicherzustellen, dass bei der Titration Gleichgewichtsbedingungen erreicht wurden (vgl. **Schema 51**), führten die Autor:innen eine zweite UV-VIS Titration durch, bei der schrittweise Na_2BCS zu einer äquimolaren Mischung aus **MB OB3b** (5.8 µM) und Cu^+ (5.8 µM) gegeben wurde. Die Analyse der Daten erfolgte analog zu oben nach Gleichung (1) und $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ wurde gegen $c(Na_2BCS)$ aufgetragen (**Abbildung 18**).

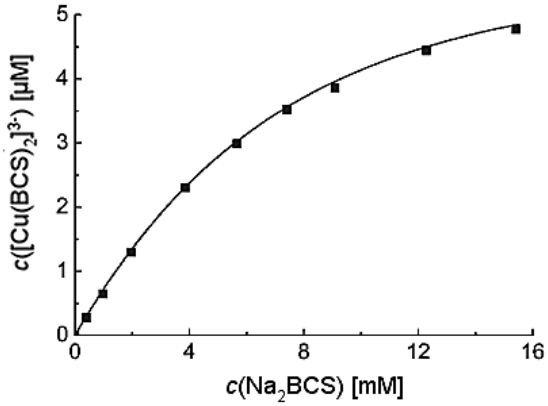
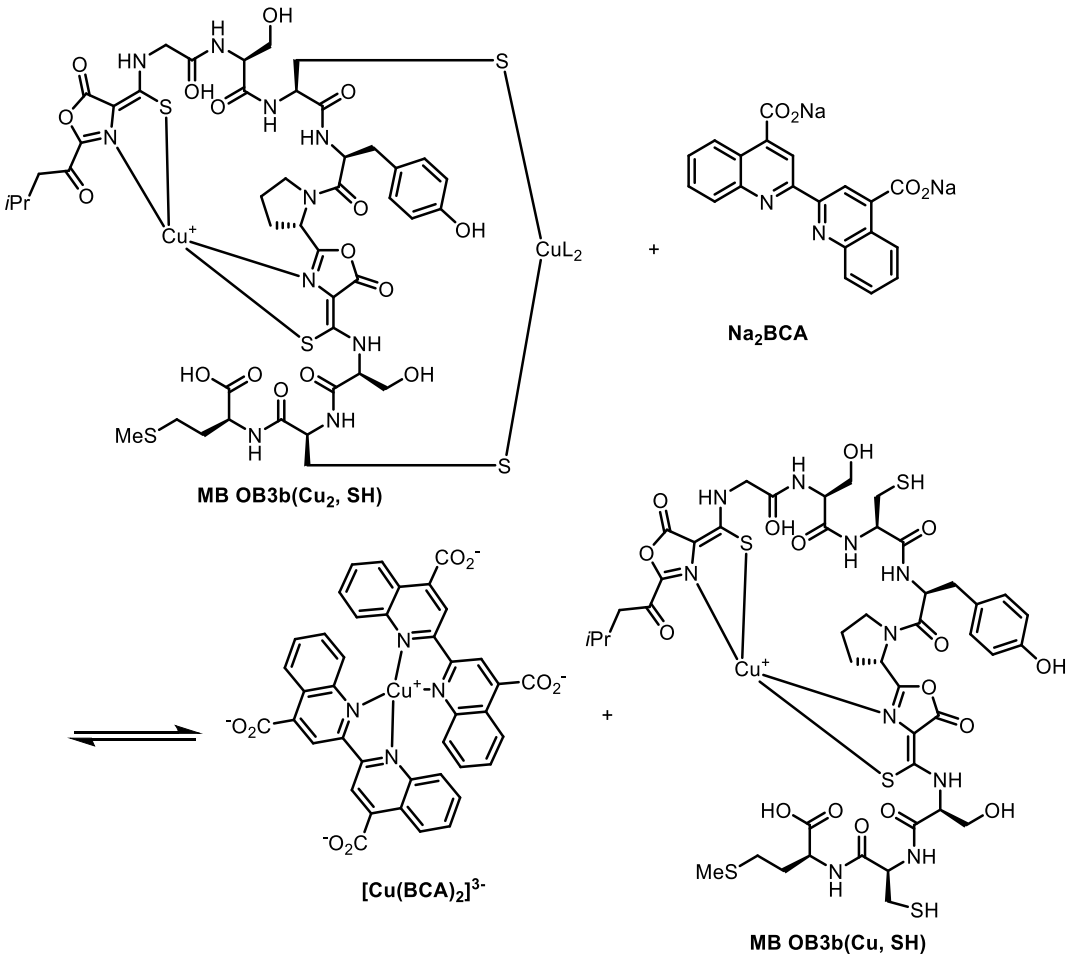


***Abbildung 18**: Titration von Na_2BCS in eine Lösung aus **MB OB3b** (5.8 µM) und Cu^+ (5.8 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °. Die Berechnung von $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ erfolgte nach Gleichung (1) und Anpassung der Werte erfolgte nach Gleichung (2), was eine K_b von $6.2 \pm 0.3 \cdot 10^{20}$ ergibt. Modifiziert übernommen von* El Ghazouani *et al.*[48]*

Auf Grundlage von Gleichung (2) und (3) konnten die Autor:innen $K_b(Cu) = 6.2 \pm 0.3 \cdot 10^{20}$ für **MB OB3b** bei pH 7.5 bestimmen.[48]

In einem weiteren Experiment untersuchten El Ghazouani *et al*. ebenfalls die Affinität von **MB OB3b**, in dem das Disulfid reduziert wurde (**MB OB3b(SH)**). Einerseits konnten sie eine schwächere Bindung von Cu^+ im Zentrum des Moleküls ($K_b(Cu) = 8.8 \cdot 10^{18}$ M^{-1}) durch eine UV-VIS Titration mit Na_2BCS nachweisen. Andererseits verwendeten sie den alternativen, ebenfalls selektiven und schwächeren Cu^+-Liganden Natrium-2,2-Bicinchoninat (Na_2BCA), um eine zweite Kupferbindestelle, vermutlich durch die Thiole des Cys, mit $K_b(Cu) = 3 \cdot 10^{15}$ M^{-1} identifizieren (**Schema 52**).[48] Der Komplex $[Cu(BCA)_2]^{3-}$ besitzt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 562$ nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{[Cu(BCA)2]} = 7800$ $M^{-1}cm^{-1}$ bei einer Stabilitätskonstante von $\beta_2 = 1.6 \cdot 10^{17}$ M^{-2} bei pH 7.[48]

Experimentell ermittelten die Autor:innen die Absorption bei 562 nm ($Abs_{562\ nm}$) unter Korrektur durch $\varepsilon_{MB\ OB3b(Cu)} = 400\ M^{-1}cm^{-1}$ durch die Titration einer Mischung aus **MB OB3b(SH)** (10.3 µM) und einem Überschuss Cu^{+} (16.4 µM, Absättigung der zentralen Cu-Bindestelle) mit Na_2BCA in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C und analysierten die Daten auf die zuvor beschriebene Weise.[48]



***Schema 52**: Konkurrierende Koordination von Cu^{+} zwischen **MB OB3b(Cu,SH)** und **Na_2BCA**.[48]*

3.1.14.2 Validierung der Cu-Affinitätsbestimmung mittels UV-VIS Titration

Für eine Bestimmung der Cu-Affinität der strukturvereinfachten Naturstoffderivate **4** und **5** (**Abbildung 19**) können die beiden chromophoren Liganden Na_2BCS und Na_2BCA ebenfalls verwendet werden.

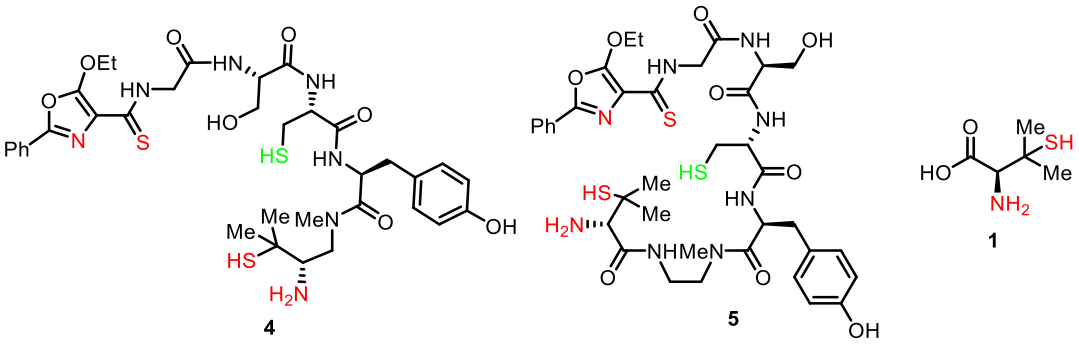


***Abbildung 19**: Strukturen der Naturstoffderivate **4** und **5** und von Penicillamin **1**; Rot: Kupferbindestellen; Grün: weitere Stelle mit potentieller Wechselwirkung mit einem gebundenen Cu^+.*

Im Vergleich zu **MB OB3b** (**Schema 51**) enthalten diese ein Ph-Oxa(OEt)-Thioamid und modifizierte Pen-Einheiten anstelle der Oxazolon-Enthiole als N_2S_2-Koordinationsmotiv. Aufgrund der Unterschiede zu **MB OB3b** sollte die Cu-Affinität unterhalb der des natürlichen Cu-Chelators liegen. Einerseits weisen **4** und **5** kein intramolekulares Disulfid auf (vgl. verringerte Affinität von **MB OB3b(SH)** *vs.* **MB OB3b**) und andererseits handelt es sich bei den Koordinationseinheiten in **4** und **5** um deutlich elektronenreichere Liganden als bei den Oxazolon-Enthiole in **MB OB3b**. Letztere besitzen gegenüber dem elektronenreichen Cu^+ vermutlich nicht nur eine σ-Donor- sondern auch eine π-Akzeptoreigenschaft, die durch das elektronenarme Oxazolon vermittelt wird. Das Ph-Oxa(OEt)-Thioamid-Motiv in **4** und **5** besitzt durch den aromatischen Hetereozyklus ebenfalls eine ähnlich Koordinationseigenschaft, die jedoch aus dem oben genannten Grund wahrscheinlich geringer ausgeprägt ist (**Abbildung 19**). Zusammengenommen mit dem durch Modifikation von Penicillamin **1** eingeführten Thiolaminmotiv sollte aber eine hinreichend hohe Cu-Affinität erreicht werden. Außerdem ist neben dem N_2S_2-Koordinationsmotiv (Rot in **Abbildung 19**) auch eine Wechselwirkung des weiteren Thiols **4** und **5** (Grün in **Abbildung 19**) mit dem Cu^+-Ion denkbar, die zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Komplexes führen kann.

Um die Affinitäten der Naturstoffderivate **4** und **5** bestimmen zu können, sollte in einem ersten Experiment untersucht werden, ob sich die unter 3.1.14.1 beschriebenen

Resultate von EL GHAZOUANI *et al*. bei einer UV-VIS Titration von **MB OB3b** mit Na_2BCS reproduzieren ließen.

Dafür wurde in einer ersten Titration unter Ar-Atmosphäre in entgasten Lösungsmitteln schrittweise **MB OB3b** zu einer Mischung aus Na_2BCS (5 mM) und $[Cu(MeCN)_4]PF_6$ (10.2 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C gegeben und die Absorption bei 483 nm ($Abs_{483\,nm}$) gemessen. Durch Anwendung von Gleichung (1) wurde $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ bestimmt und gegen c(MB OB3b) aufgetragen (**Abbildung 20**).

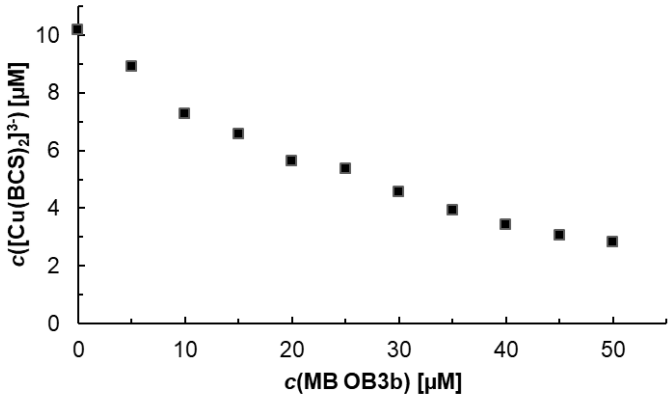


***Abbildung 20**: In dieser Arbeit durchgeführte Titration von **MB OB3b** in eine Lösung aus Na_2BCS (5 mM) und Cu^+ (10.2 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C. Die Berechnung von $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ erfolgte nach Gleichung (1).*

Dabei konnte ein ähnlicher Kurvenverlauf wie in **Abbildung 17** erhalten werden. Jedoch waren die hier ermittelten Werte für $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ bei einer vergleichbaren Menge an hinzugefügtem **MB OB3b** zu hoch. Im Vergleich zur Literatur nahm $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ speziell für kleine c(MB OB3b) nicht so stark wie in **Abbildung 17** ab. Diese Abweichung könnte darauf hinweisen, dass der eingesetzte Naturstoff nicht nachweisbare Verunreinigungen enthielt, die letztlich zu einer geringeren Konzentration des hinzugefügten **MB OB3b** führten.

Da es sich hierbei um einen ersten Versuch zur Validierung der UV-VIS Titration zur Bestimmung der Cu-Affinität handelte, sollten in Zukunft weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Ergebnisse der Literatur zu reproduzieren.

Die in **Abbildung 20** dargestellten Werte von $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ in Abhängigkeit von c(MB OB3b) können jedoch als Grundlage dafür verwendet werden, um in einer analogen UV-VIS Titration der Naturstoffderivate **4** und **5** eine relative Cu-Affinität durch einen Vergleich der Kurvenverläufe abzuschätzen (d. h. stärkere, ähnlich starke oder deutlich schwächere Komplexierung).

Daher wurde analog zu EL GHAZOUANI *et al*. in einer zweiten Titration schrittweise Na_2BCS zu einer Mischung aus **MB OB3b** (5.8 µM) und Cu^+ (5.8 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C gegeben und $Abs_{483\,nm}$ gemessen. Durch die Anwendung von Gleichung (1) wurde wieder $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ bestimmt und gegen $c(Na_2BCS)$ aufgetragen (**Abbildung 21**).

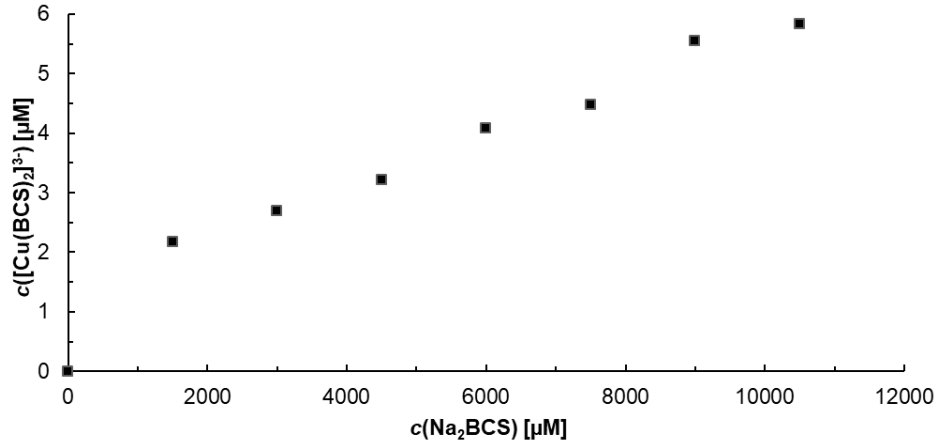


***Abbildung 21**: In dieser Arbeit durchgeführte Titration von Na_2BCS in eine Lösung aus **MB OB3b** (5.8 µM) und Cu^+ (5.8 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C, Berechnung von $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ nach Gleichung (1).*

Analog zu den in **Abbildung 20** dargestellten Ergebnissen wurde bei dieser Titration ein ähnlicher Kurvenverlauf zu dem der Literatur beobachtet (vgl. **Abbildung 18**). Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ waren ebenfalls bei einer vergleichbaren Menge an hinzugefügtem Na_2BCS höher als bei der in **Abbildung 18** dargestellten Titration. Diese wiederholt beobachtete Abweichung kann ein Hinweis auf einen systemischen Fehler des verwendeten Spektrometers (ungenaue Bestimmung der Absorption in kleinen Konzentrationsbereichen) oder auf eine Verunreinigung der verwendeten Materialien sein.

Wie auch **Abbildung 20** kann der in **Abbildung 21** dargestellte Kurvenverlauf als Referenz dafür verwendet werden, eine relative Cu-Affinität der Naturstoffderivate **4** und **5** in einer analogen UV-VIS Titration abzuschätzen.

Falls die Cu-Affinität der Naturstoffderivate um mehrere Größenordnungen unterhalb der Stabilitätskonstante von $[Cu(BCS)_2]^{3-}$ liegen sollte, kann kein effektives Konkurrenzexperiment mit Na_2BCS durchgeführt werden. In diesem Fall sollte auf eine UV-VIS Titration mit schwächeren Ligand Na_2BCA wie bei der Bestimmung der Affinität der zweiten Kupferbindestelle in **MB OB3b(SH)** zurückgegriffen werden (vgl. **Schema 52**). Daher wurden analog zu den Titrationen mit Na_2BCS auch

Referenzkurvenverläufe mit Na_2BCA und **MB OB3b** für eine Evaluation der Cu-Affinität von **4** und **5** erstellt.

In einer ersten Titration wurde unter Ar-Atmosphäre in entgasten Lösungsmitteln schrittweise **MB OB3b** zu einer Mischung aus Na_2BCA (10 mM) und $[Cu(MeCN)_4]PF_6$ (10.2 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C gegeben und $Abs_{562\ nm}$ gemessen. Durch Anwendung von Gleichung (1) nach einer Anpassung der entsprechenden Konstanten wurde $c([Cu(BCA)_2]^{3-})$ bestimmt und gegen c(MB OB3b) aufgetragen (**Abbildung 22**).

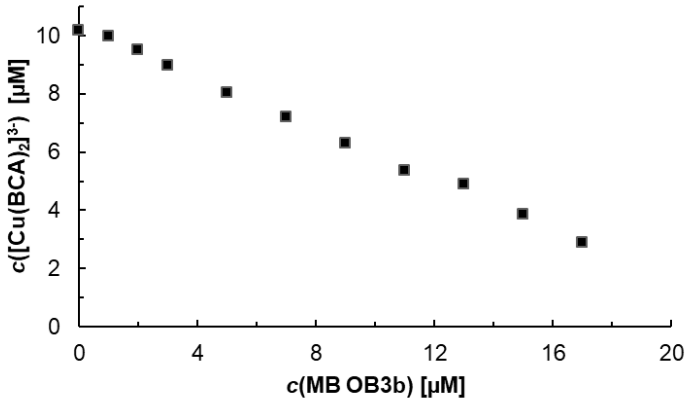


***Abbildung 22**: Titration von **MB OB3b** in eine Lösung aus Na_2BCAS (10 mM) und Cu^+ (10.2 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C, Berechnung von $c([Cu(BCA)_2]^{3-})$ nach Gleichung (1).*

In einer zweiten Titration wurde in analoger Weise Na_2BCS zu einer Mischung aus **MB OB3b** (0.58 µM) und Cu^+ (5.8 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C gegeben und $Abs_{562\ nm}$ gemessen. Durch Anwendung von Gleichung (1) nach einer Anpassung der entsprechenden Konstanten wurde wieder $c([Cu(BCA)_2]^{3-})$ bestimmt und gegen $c(Na_2BCA)$ aufgetragen (**Abbildung 23**).

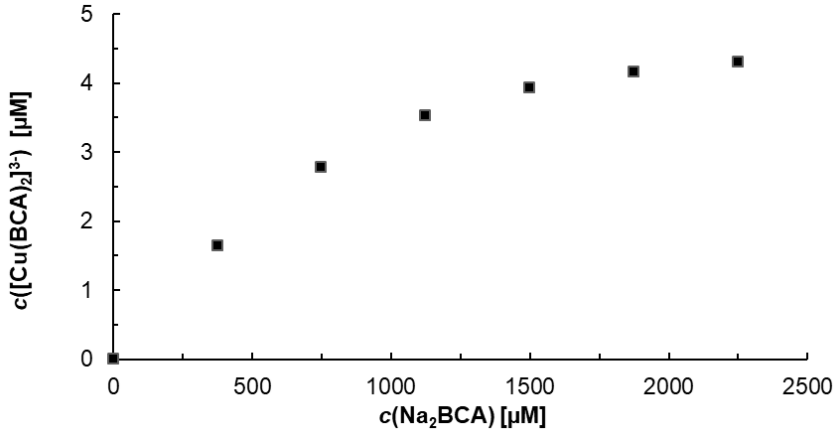


***Abbildung 23**: Titration von Na_2BCA in eine Lösung aus **MB OB3b** (0.58 µM) und Cu^+ (5.8 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C, Berechnung von $c([Cu(BCA)_2]^{3-})$ nach Gleichung (1).*

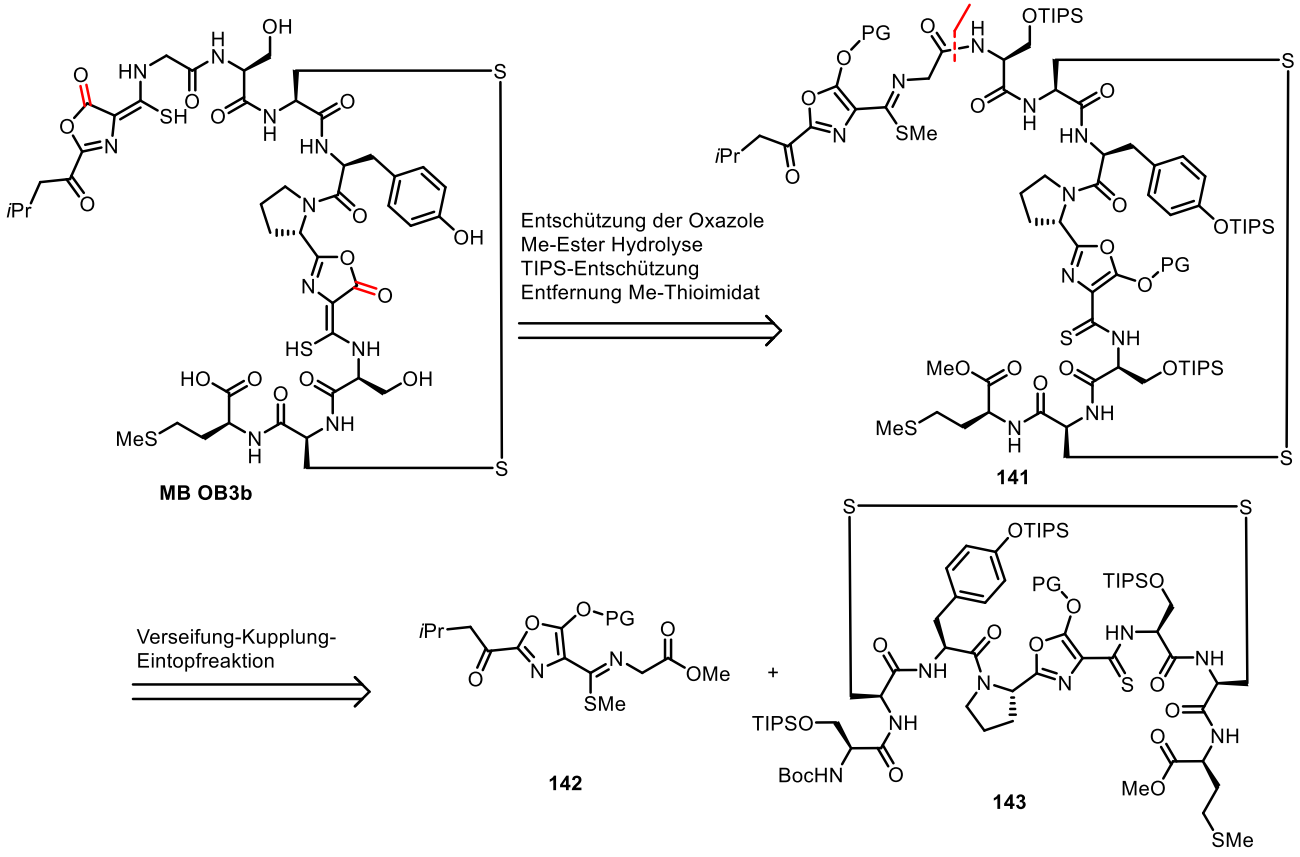
Im Rahmen dieser Dissertation konnten vier unterschiedliche Referenzkurvenverläufe des Komplexes $[Cu(BCS)_2]^{3-}$ bzw. des Komplexes $[Cu(BCA)_2]^{3-}$ bei einem Konkurrenzexperiment mit **MB OB3b** erhalten werden. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Reproduktion der Ergebnisse[48] von EL GHAZOUANI *et al*. war es nicht möglich, aus den Kurvenverläufen von $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ und $c([Cu(BCA)_2]^{3-})$ exakte Werte für K_b des Naturstoffes zu berechnen. Im Vergleich zur Literatur wiesen die Kurven von $c([Cu(BCS)_2]^{3-})$ (**Abbildung 20** und **Abbildung 21**) speziell bei kleinen Analytkonzentrationen einen anderen Verlauf auf. Eine Begründung könnten systemische Fehler beim Experiment oder eine Verunreinigung der Materialien sein.

Eine Ermittlung und Behebung dieser Fehlerquellen sollte in Zukunft Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um die UV-VIS Titration durch eine Reproduktion der Literaturergebnisse als Methode zu validieren. Im Anschluss kann diese für die Bestimmung der Cu-Affinitäten der strukturvereinfachten Naturstoffderivate angewandt werden.

3.2 Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu MB OB3b

3.2.1 Retrosynthetische Analysen

Die im vorherigen Kapitel diskutierte Synthese der strukturvereinfachten Naturstoffderivate **4(Disulfid)** und **5(Disulfid)** veranschaulichte eine Möglichkeit, ein Thioamid selektiv in Nachbarschaft zu einem Oxa(OEt)-Heterozyklus in ein schwefelhaltiges Oligopeptid zu installieren. Die Erkenntnisse, die im ersten Teil dieser Dissertation gewonnen wurden, werden im zweiten Teil auf die Entwicklung eines totalsynthetischen Zugangs zu **MB OB3b** angewandt. Des Weiteren mussten für diesen Zugang Methoden erarbeitet werden, ein intramolekulares Disufid über einen noch größeren Abstand aufzubauen und die bisher unbekannten Oxazolon-Enthiole Strukturelemente zu erhalten. Unter Berücksichtigung dessen würden die letzten vier Stufen einer möglichen Retrosynthese von **MB OB3b** die Spaltung des Me-Thioimidats, die Entfernung der Silyl-Schutzgruppen, die Verseifung des *C*-terminalen Methylesters und die Freisetzung der labilen Oxazolone aus **141** sein (**Schema 53**).



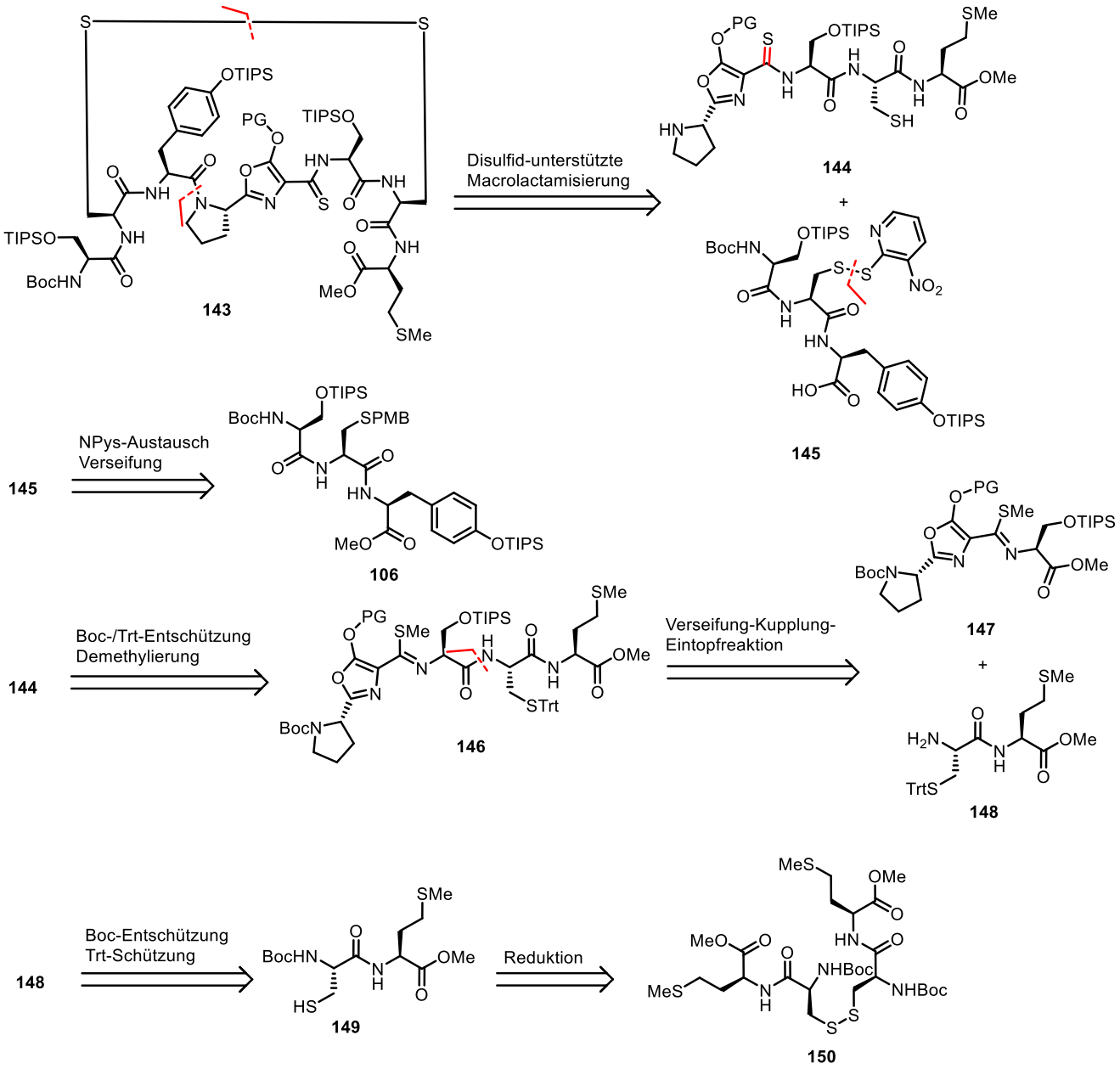
Schema 53: *Retrosynthetischer Zugang zu* ***MB OB3b*** *über die Fragmente* ***142*** *und* ***143;*** *PG bezeichnet eine allgemeine Schutzgruppe.*

Die Oxa-Schutzgruppe wurde zunächst nicht näher spezifiziert. Diese muss über die gesamte Synthesesequenz bis zum letzten Schritt der Totalsynthese stabil sein und sich zu diesem Zeitpunkt selektiv entfernen lassen. Im vorangegangenen Kapitel konnte für diese, in Nachbarschaft zu den Thiocarbonylen in **141** befindlichen, Ketenacetale eine Et-Gruppe erfolgreich als Schutzgruppe verwendet werden. Eine Me-Gruppe stellt auch eine valide Schutzgruppe für die Oxa-Elemente dar. Aufgrund der geringeren sterischen Hinderung sollte diese deutlich einfacher zu entfernen sein, was für das Endspiel der Totalsynthese bedeutsam sein kann (siehe oben). Eine Trimethylsilylethyl (TMSE)-Gruppe, welche eine gemeinsame Entfernung mit den TIPS-Gruppen ermöglichen würde, wurde verworfen, da in der Masterarbeit von LENNART SPICKSCHEN gezeigt wurde, dass solche TMSE-geschützten Oxazole äußerst labil sind.[105] Daher wurden im Folgenden nur Experimente zur Synthese von Et- und Me-geschützten Oxazolen durchgeführt.

Eine Möglichkeit, die Stabilität des Naturstoffes zu erhöhen, ist die Koordination von Metallionen.[23] Nach einer Spaltung des Me-Thioimidats in **141** könnte durch Chelatisierung von Cu^{+} oder Zn^{2+} das Molekül für die Entfernungen der übrigen Schutzgruppen ausreichend stabilisiert werden. Ein Nachteil dieses Ansatzes wäre, dass der Naturstoff nicht in seiner *apo*-Form erhalten werden würde.

Thiopeptid **141** lässt sich durch die in Kapitel 3.1.12 beschriebene VKER aus Me-Thioimidat **142** und Disulfid **143** herstellen (**Schema 53**). **143** beinhaltet ein ungeschütztes Thioamid, das aufgrund seiner konformativen Fixierung nicht den Angriff des Amins am *N*-Terminus an die aktivierte Carbonsäure aus **142** verhindern kann (vgl. 3.1.8). Bei der notwendigen Boc-Entschützung von **143** muss jedoch sichergestellt werden, dass das Thioamid nicht durch das, aus der Schutzgruppe entstehende *t*Bu-Kation alkyliert wird.

Das Fragment **143** kann wiederum mithife einer Disulfid-unterstützten Macrolactamisierung erhalten werden (**Schema 54**). Durch eine Reaktion der NPys-Carbonsäure **145** mit Thiol von **144** soll in einem ersten Reaktionsschritt das asymmetrische Disulfid aufgebaut werden, bevor in derselben Reaktionsmischung eine Peptidkupplung zwischen dem *C*-terminalen Tyr und dem dem *N*-terminalen Pyr erfolgt.



Schema 54: *Retrosynthese des Disulfid-Thioamids **143** durch eine simultane Disulfidbildung und Amidkupplung aus **145** und **144**, das nach Entfernung der Schutzgruppen und einer VKER aus dem Me-Thioimidat **147** und dem Dipeptidamin **148** zugänglich ist.*

Neben der im Kapitel 3.1 beschriebenen Möglichkeit, die NPys-Gruppe als Intermediat bei der Spaltung von Thioethern zu verwenden, wurden NPys-Thiole in der Literatur

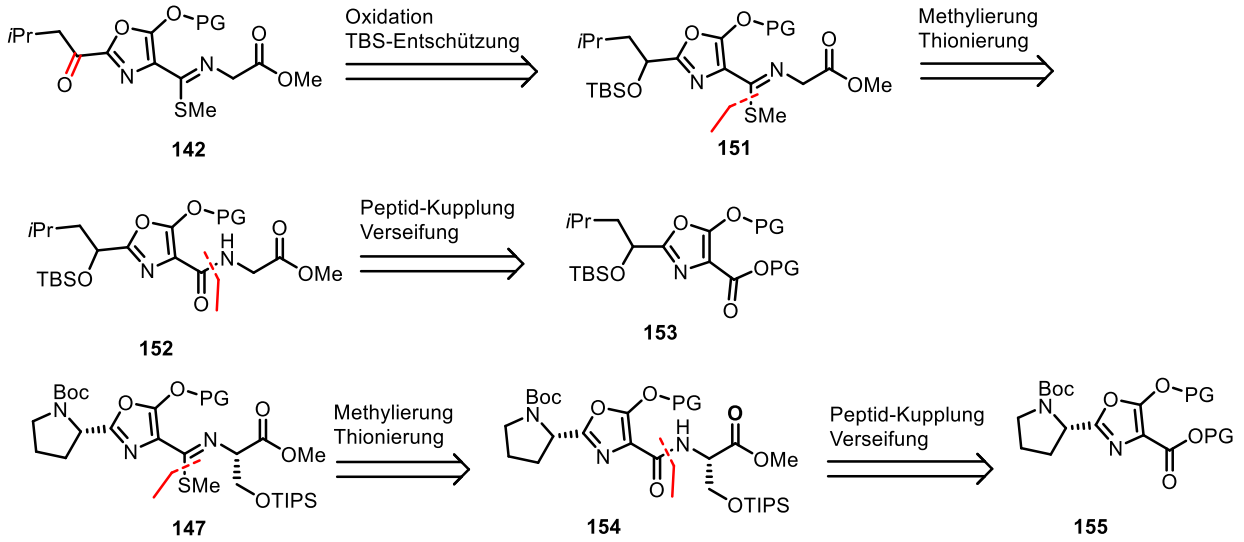
bereits erfolgreich verwendet, um asymmetrische Disulfide aufzubauen.[106] Aufgrund der Elimination des NPys-Disulfids zu einem Alken unter basischen Bedingungen muss die NPys-geschützte Carbonsäure **145** aus dem, im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Tripeptid **106** zuerst durch Verseifung und dann durch NPys-Austausch der PMB-Gruppe synthetisiert werden.[97]

Das für die simultane Disulfidbildung und Amidkupplung notwendige Thioamid **144** kann nach gleichzeitiger Boc-/Trt-Entschützung[107] und Demethylierung aus **146** hergestellt werden. Die Spaltung des Me-Thioimidats zum Thioamid ist vor einer Entfernung der beiden säurelabilen Schutzgruppen notwendig, da sich bei der Synthese der strukturvereinfachten Derivate zeigte, dass Oxa-Me-Thioimidate sich bei Behandlung mit Säure zersetzen (vgl. 3.1.9). **146** ist durch eine VKER aus Me-Thioimidat **147** und Dipeptidamin **148** zugänglich.

Letzteres kann nach einer Boc-Entschützung und einer Trt-Schützung aus Thiol **149** hergestellt werden, das durch literaturbekannte Reduktion von **150** erhältlich ist.[108]

Ein anderer retrosynthetischer Ansatz unter Verwendung des Disulfids als Schutzgruppe des Cys ausgehend von **150** analog zur Synthese der Derivate Derivate **4(Disulfid)** und **5(Disulfid)** war nicht erfolgreich. Nach der Verknüpfung mit Me-Thioimidat **147** führte die Demethylierung zu einer Zersetzung des Disulfidhomodimers.

Die geplante Retrosynthese der in **Schema 53** und **Schema 54** abgebildeten Oxazol-Thioimidate **142** und **147** ist in **Schema 55** dargestellt. Neben dem zuvor diskutierten selektiven Einbau des Thioamids in die Oligopeptidsequenz stellte die Synthese von **142** und **147** die größte Herausforderung bei der Totalsynthese von **MB OB3b** dar.



***Schema 55**: Retrosynthese der Oxazol-Fragmente **142** und **147** bis zu den entsprechenden Oxazol-Estern **153** und **155**.*

Im Gegensatz zu dem Ph-Oxa(OEt)-Motiv aus dem Kapitel 3.1 sind die Synthesen der alkylsubstituierten Oxazole in **142** und **147** nicht in der Literatur bekannt.

Das Keton in **142** soll durch TBS-Entschützung von **151** gefolgt von Oxidation des sekundären Alkohols synthetisiert werden. Das Me-Thioimidat **151** ist durch eine Thionierung und eine Methylierung eines Gly-Amids **152** zugänglich. Das Amid wiederum kann aus dem Ester **153** hergestellt werden. In analoger Weise kann das Pyr-substituierte Me-Thioimidat **147** durch dieselbe Sequenz aus dem Ester **155** synthetisiert werden.

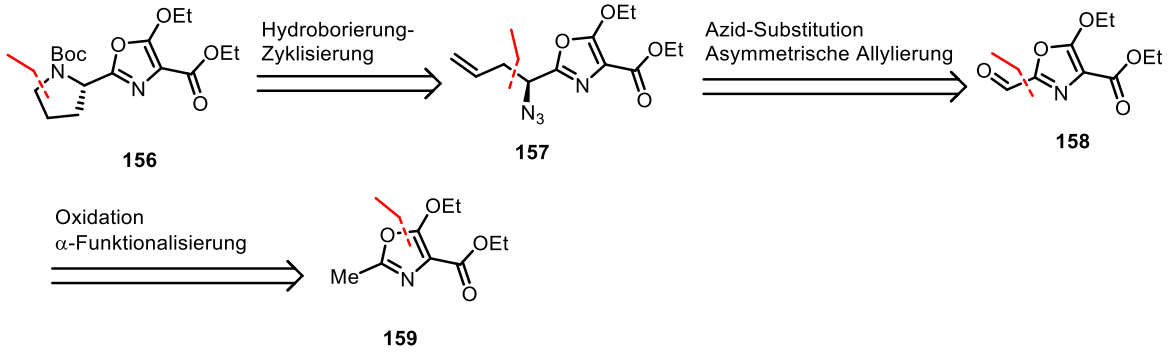
Der modulare Aufbau der Totalsynthese aus den beiden Peptiden **145** und **150** (**Schema 54**) und den beiden Me-Thioimidaten **142** und **147** (**Schema 55**) ermöglicht somit eine konvergente Synthese.

Bei den nachfolgend beschriebenen Reaktionen bestand das vorangige Ziel darin, die generelle Machbarkeit der Retrosynthesen zu demonstrieren. Aus diesem Grund erfolgte teilweise keine Optimierung der Ausbeuten der einzelnen Syntheseschritte.

3.2.2 Synthese des Pyr-substituierten Oxazols durch Funktionalisierung eines 2-Me-Oxazols

Zu Beginn wurde eine Synthese des Esters **155** mit einer Et-Schutzgruppe entwickelt, da diese in der Synthese der strukturvereinfachten Naturstoffderivate unter 3.1 erfolgreich eingesetzt wurde. Die Herstellung des entsprechenden Et-substituierten **153** (vgl. **Schema 55**) wurde bereits in der Masterarbeit von LENNART SPICKSCHEN beschrieben.[105]

Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OEt **156** lässt sich nach Boc-Schützung und einer Hydroborierung-Zyklisierungskaskade aus dem Homoallylazid **157** herstellen (**Schema 56**). Dabei handelt es sich um eine gängige Methode, Pyrrolidine zu synthetisieren.[109] Die dafür notwendige Verbindung **157** kann durch eine S_N2-Substitution aus dem entsprechenden Homoallylakohol erhalten werden. Die korrekte Stereochemie des sekundären Alkohols soll durch eine asymmetrische Allylierung des Aldehyds **158** erreicht werden.



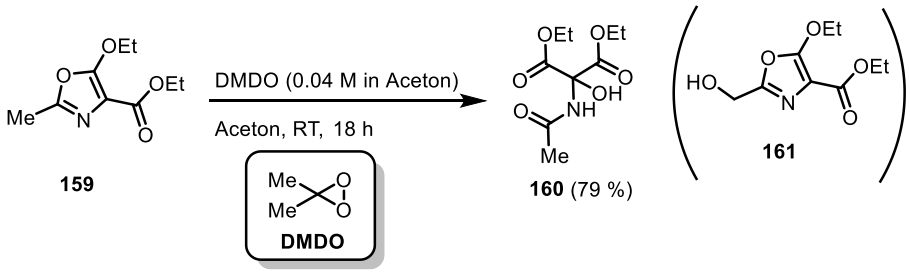
156 **157** **158** **159**

Schema 56: *Retrosynthese des Et-geschützten Oxazols **156** über den Aldehyd **158** bis zum literaturbekannten Me-Oxazol **159**.*

Die Darstellung von **158** ist durch Oxidation und CH-Funktionalisierung des literaturbekannten 2-Me substituierten Oxazols **159** möglich.[110] Ein anderer retrosynthetischer Ansatz unter Deprotonierung eines analogen 2-H-Oxazols[111] gefolgt von einer Formylierung führte nicht zum Erfolg, da eine Lithiierung an dieser Position vermutlich eine elektrozyklische Ringöffnung begünstigte.[112]

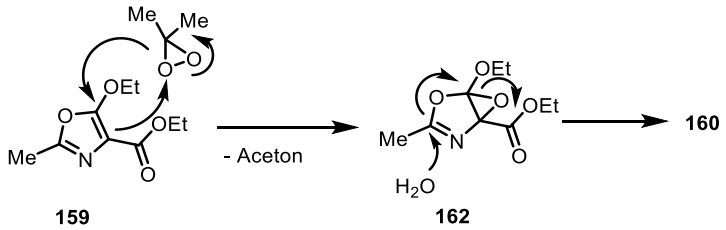
Ausgehend von **159** waren unterschiedliche Funktionalisierungen möglich. Als erstes war das Ziel, das Hydroxymethyloxazol **161** direkt durch eine Hydroxylierung der Methylgruppe von **159** zu erhalten (**Schema 57**). Eine Hydroxylierung mithilfe des DAVIS-Reagenzes[113] führte genauso wenig zu einer erfolgreichen Bildung von **161** wie die CH-Oxygenierung durch DMDO[114].

Bei dem Einsatz von Letzterem konnte stattdessen eine oxidative Ringöffnung des Oxazols zu **160** beobachtet werden (**Schema 57**).



Schema 57**: Oxidative Ringöffnung des 2-Me-Oxazols **159** zu **160** anstelle einer Hydroxylierung zu **161.

Ein möglicher Mechanismus, der die Bildung von **160** erklären könnte, ist in **Schema 58** abgebildet. Zunächst wird durch DMDO die elektronenreichste Doppelbindung des Oxazols zu **162** epoxidiert. Durch die wässrigen Reaktionsbedingungen wird das Epoxid im Anschluss zu dem Acetamidomalonat **160** hydrolysiert.

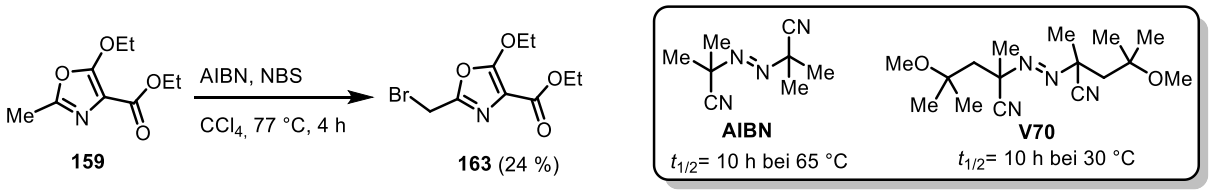


***Schema 58**: Mechanismus der DMDO-induzierten Bildung von **160**.*

Bei dieser ungewöhnlichen Verbindung handelt es sich um ein acetyliertes Halbaminal, dessen Struktur durch NMR-Spektroskopie belegt werden konnte. Die Reaktion verlief sehr selektiv und **160** wurde in einer Ausbeute von 79 % isoliert. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die Doppelbindung des Ketenacetals in den geschützten Oxazolen äußerst reaktiv gegenüber Elektrophilen ist und steht im Einklang mit den moderaten Ausbeuten, die im vorangegangenen Kapitel zum Beispiel bei der Thionierung (vgl. 3.1.9) oder bei der Synthese der Thioacylierungsreagenzien (vgl. 3.1.7) erhalten wurden. Da die Ketenacetalbindung auf ähnliche Weise mit anderen Oxygenierungsreagenzien reagieren kann, wurde diese Strategie verworfen und eine α-Funktionalisierung durch eine radikalische Bromierung getestet. Das eingeführte Bromid könnte in einer nachfolgenden Reaktion als Fluchtgruppe für die Substitution mit einem Sauerstoffnukleophil dienen.

Nach einer Untersuchung verschiedener Äquivalente des Radikalstarters AIBN und des Bromierungsmittels NBS konnte eine maximale Ausbeute von 24 % für das Bromomethyloxazol **163** mit 0.2 Äq. AIBN und 2 Äq. NBS erzielt werden (**Schema 59**).

Bei mehr Äquivalenten der Reagenzien wurde eine vermehrte Zersetzung des Produkts beobachtet. Eine Bromierung bei RT mithilfe des dafür entwickelten Radikalstarters **V70**[115] lieferte ebenso kein besseres Ergebnis.



***Schema 59**: Bromierung des 2-Me-Oxazols **159** zu **163** und unterschiedliche Radikalstarter[115] mit zugehörigen Zehn-Stunden-Halbwertszeiten.*

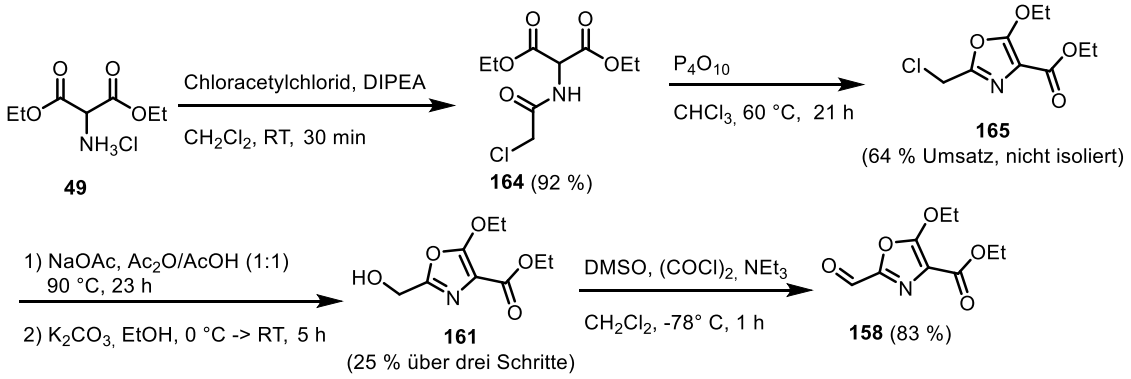
Aufgrund dessen wurde eine Funktionalisierung des 2-Me-Oxazols **159** final veworfen, da die moderate Ausbeute der Bromierung nicht eine präparative Synthese des Aldehyds **158** ermöglichte. Vermutlich beeinträchtigte die Reaktivität der Ketenacetal-Doppelbindung auch die Reaktion mit NBS insofern, dass es hauptsächlich zu einer Zersetzung anstelle einer Bildung von **163** kam.

Um eine Funktionalisierung von **159** zu umgehen, sollte in einem alternativen Ansatz ein bereits funktionalisiertes Oxazol direkt aus dem entsprechend funktionalisierten Amid gewonnen werden.

3.2.3 Synthese von 158 durch die Funktionalisierung eines Chloracetamids

Als Ausgangsmaterial für eine Synthese des Aldehyds **158** wurde als erstes Chloracetamid **164** durch Acylierung von **49** mit Chloracetylchlorid in einer sehr guten Ausbeute von 92 % hergestellt (**Schema 60**).

Bei der nachfolgenden Zyklisierung von **164** zu **165** unter Verwendung von P_4O_{10} konnte nach 21 h bei 60 °C mittels ^{1}H-NMR Spektroskopie ein Umsatz von 64 % zu dem gewünschten Produkt festgestellt werden. Aufgrund zu ähnlicher Retentionszeiten war eine Trennung von Amid und Oxazol weder durch Kieselgel- noch durch Umkehrphasen-Säulenchromatographie möglich. Deshalb wurde das erhaltene Gemisch für die nächste Reaktion ohne Reinigung eingesetzt.



***Schema 60**: Synthese und Funktionalisierung des Chloracetamids **164** bis Aldehyd **158**.*

Diese Reaktion beinhaltete die Substitution des Chlorids in **165** durch ein Acetat in Anlehnung an bereits in der Literatur beschriebene Bedingungen für die Reaktion eines ähnlich substituierten Oxazols.[116] Eine Reaktionstemperatur von 90 °C lieferte selektiv das gewünschte Substitutionsprodukt aus **165**, während das weniger reaktive Amid **164** unter diesen Bedingungen nicht umgesetzt wurde. Das nach der Aufarbeitung erhaltene Gemisch aus dem Substitutionsprodukt und **164** wurde daraufhin mit K_2CO_3 in EtOH für 5 h zur Reaktion gebracht. Dadurch konnte Hydroxymethyloxazol **161** nach chromatographischer Abtrennung des Amids **164** in einer Ausbeute von 25 % über drei Stufen isoliert werden (**Schema 60**). Abschließend wurde der Alkohol zu Aldehyd **158** unter SWERN-Bedingungen oxidiert.[116] Unter den optimierten Bedingungen wurde **158** als zentraler Baustein für die nachfolgende Synthese in einer guten Ausbeute von 83 % isoliert. Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit wurde der Aldehyd für die nächsten Reaktionen als Rohprodukt verwendet.

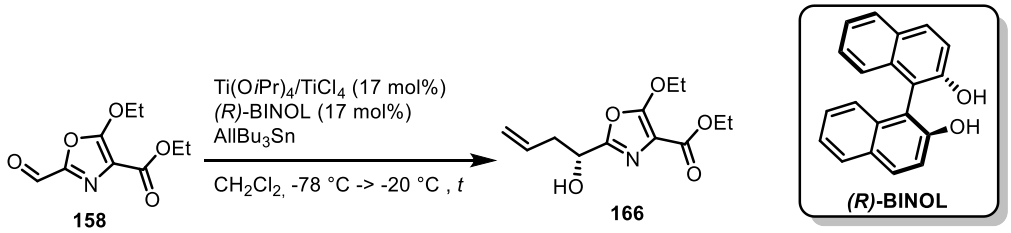
Zusammenfassend konnte die bisher unbekannte Synthese des hochfunktionalisierten Oxazolaldehyds **158** mit einer Gesamtausbeute von 19 % über fünf Stufen etabliert werden.

3.2.4 Asymmetrische Allylierung von 158 zu Homoallylalkohol 166

3.2.4.1 Ti-katalysierte KECK-Allylierung mit BINOL als chiralem Liganden

Da durch die asymmetrische Allylierung von **158** das Stereozentrum des Pyrrolidinringes aufgebaut wird (vgl. **Schema 56** in 3.2.2), ist es entscheidend, bei dieser Reaktion einen guten Enantiomerenüberschuss (*ee*) zu erzielen.

In diesem Zusammenhang wurde als erste Methode eine asymmetrische KECK-Allylierung nach GUI *et al.* getestet und *in situ* der Lewis-azide *(R)*-BINOL Katalysator zur Aktivierung von **158** aus Ti(O*i*Pr)$_4$ und $TiCl_4$ in verschiedenen Verhältnissen hergestellt (**Schema 61**).[116] Zu diesem Katalysator wurden nacheinander der Aldehyd und $AllBu_3Sn$ als Allylierungsmittel hinzugegeben (**Schema 61**). Die unterschiedlichen Mischungen an Ti(O*i*Pr)$_4$ und $TiCl_4$ wurden verwendet, um unterschiedlich starke Lewis-Säuren zu generieren. Die dabei erhaltenen Ergebnisse, inklusive gebildeter Lewis-Säuren und Reaktionszeiten sind in **Tabelle 8** zusammengefasst.



***Schema 61**: KECK-Allylierung von Aldehyd **158** unter Verwendung der in Tabelle 8 beschriebenen Kombinationen aus $Ti(OiPr)_4/TiCl_4$ bei verschiedenen Reaktionszeiten.*

Durch die Allylierung mit [(BINOL)(O*i*Pr)$_2$Ti] als Lewis-Säure konnte der gewünschte Homoallylalkohol nur in racemischer Form mit einer isolierten Ausbeute von 38 % synthetisiert werden (Eintrag 1 in **Tabelle 8**). Vermutlich ist der aus Ti(O*i*Pr)$_4$ geformte Katalysator zu unreaktiv, um über die 165 h Reaktionszeit zur Bildung eines bevorzugten Enantiomers zu führen. Daher wurde als nächstes eine 3:1 Mischung aus Ti(O*i*Pr)$_4$ und $TiCl_4$ verwendet. Ausgehend von der Spezies TiCl(O*i*Pr)$_3$ führte die Koordination von *(R)*-BINOL durch die Bildung von einem Äquivalent HCl zu einem reaktiveren Katalysator. Dieses wird aufgrund der Oxophilie des Titans gebildet, die dazu führt, dass das Chlorid als Ligand des Metallions als erstes ausgetauscht wird.

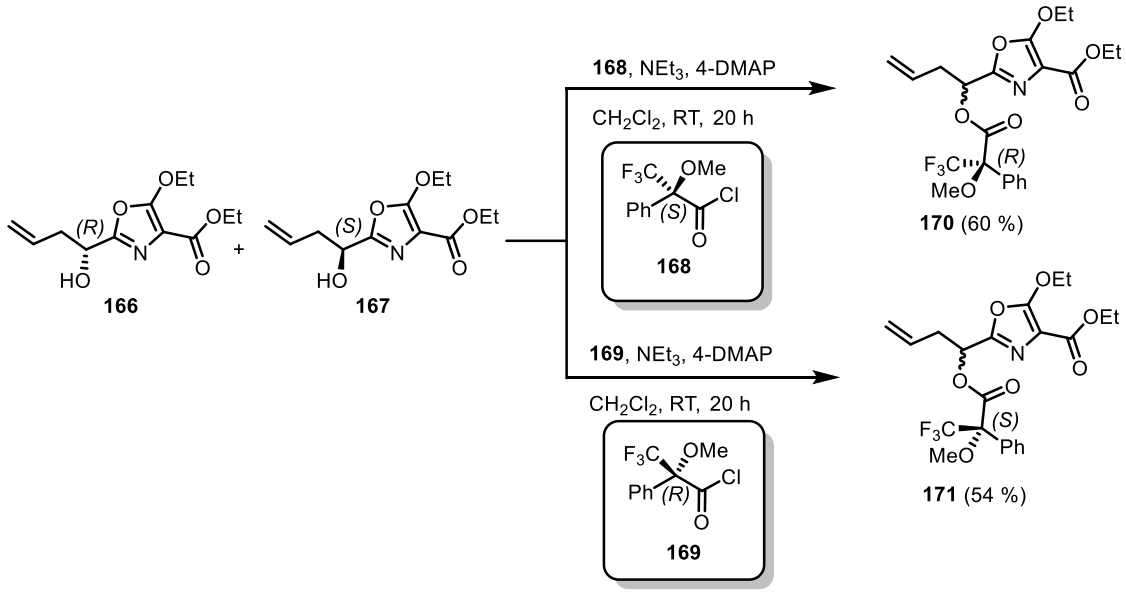
Dadurch wurde **166** in einer verbesserten Ausbeute von 56 % und einem *ee* von 55 % erhalten (Eintrag 2 in **Tabelle 8**). Dieses Ergebnis kann entweder durch die stärkere Aktivierung des Carbonyls durch das entstandene Äquivalent HCl oder durch eine Protonierung des Stickstoffes in **158** erklärt werden, was eine konkurrierende Koordination des Titans durch den Heterozyklus anstelle des Aldehyds verhindern würde.

Tabelle 8: *Untersuchte Bedingungen zur Synthese des Homoallylalkohols* ***166*** *aus* ***Schema 61****. Der ee wurde mittels* MOSHER*-Ester aus* ***Schema 62*** *bestimmt.*

Eintrag	$Ti(OiPr)_4/TiCl_4$	Katalysator	*t* [h]	Ausbeute [%]	*ee* [%]
1	1:0	[(*(R)*-BINOL)(O*i*Pr)$_2$Ti]	165	38	0
2	3:1	[(*(R)*-BINOL)(O*i*Pr)$_2$Ti] + 1 Äq. HCl	136	56	55
3	1:1	[(*(R)*-BINOL)(O*i*Pr)$_2$Ti] + 2 Äq. HCl	90	47	20
4	1:3	[(*(R)*-BINOL)Cl(O*i*Pr)Ti] + 2 Äq. HCl	89	51	8
5	0:1	[(*(R)*-BINOL)Cl_2Ti] + 2 Äq. HCl	89	67	11

Eine Erhöhung des Anteils an $TiCl_4$ hatte keinen weiteren positiven Einfluss auf den Ausgang der Reaktion. Bei der Generierung von zwei Äquivalenten HCl wurde bei einer kürzeren Reaktionszeit eine leicht schlechtere Ausbeute bei deutlich geringerem *ee* erzielt (Eintrag 3 in **Tabelle 8**). Obwohl die Ausbeute durch die Katalysatoren [(BINOL)Cl(O*i*Pr)Ti] und [(BINOL)Cl_2Ti] wieder leicht gesteigert werden konnte, verschlechterten sich die erhaltenen Enantiomerenüberschüsse weiter (Eintrag 4 und Eintrag 5 in **Tabelle 8**). Vermutlich waren die Lewis-Säuren mit einem höheren Anteil an Chloridionen zu reaktiv, um zu einer selektiven Bildung eines Enantiomers zu führen.

Die einzelnen Enantiomerenüberschüsse des gebildeten chiralen Alkohols **166** wurden durch Reaktion des Gemisches mit dem Enantiomer **167** in Anwesenheit von 4-DMAP und NEt_3 mit den Acylchloriden **168** und **169** zu den entsprechenden *(R)*- und *(S)*-MOSHER-Ester bestimmt (**Schema 62**).[117] Dabei wurde der *ee* durch einen Vergleich der Integrale nach Zurodnung der Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum zu den Diastereomeren der Ester **170** und **171** berechnet (Beispiel in **Abbildung 24**).



***Schema 62**: Synthese der beiden MOSHER-Ester **170** und **171** ausgehend von dem Gemisch der sekundären Alkohole **166** und **167**.*

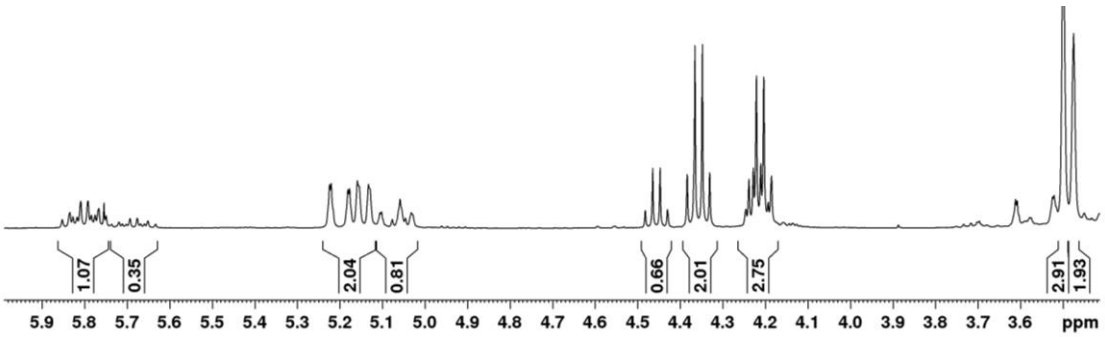


***Abbildung 24**: Ausschnitt aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum (400 MHz, DMSO) des (S)-MOSHER-Esters **171** nach Reaktion mit dem Enantiomerengemisch von **166** und **167** aus Eintrag 2 in Tabelle 8: (R,S)-Diastereomer: δ = 5.17, 4.36, 3.50 ppm und (S,S)-Diastereomer: δ = 5.06, 4.46, 3.48 ppm.*

Neben der Bestimmung des *ee* können **170** und **171** zusätzlich dafür verwendet werden, die absolute Konfiguration des bevorzugt gebildeten Enantiomers des sekundären Homoallylalkohols **166** zu ermitteln.[117] Diese Methode beruhte auf der konformativen Fixierung der Substituenten am quartären Kohlenstoff α-ständig zum Ester. Durch den anomeren Effekt des Esters ordnet sich die CF_3-Gruppe in **170** und **171** antiperiplanar zum einfach gebunden Sauerstoff an. Durch den Phenylring erfährt der Teil des

sekundären Alkohols einen diamagnetischen Shift im ^{1}H-NMR-Spektrum, der auf derselben Seite wie der Phenylring steht. In der allgemeinen Darstellung in **Abbildung 25** ist zu erkennen, dass im Fall von Diastereomer **A** (*(S)*-MOSHER-Ester) R^2 *syn*-ständig zur Ph-Gruppe ist und durch den Ringstromeffekt des Aromaten abgeschirmt wird. Im Fall von Diastereomer **B** (*(R)*-MOSHER-Ester) erfährt R^1 diese Abschirmung. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit hergestellten MOSHER-Ester ergeben diese allgemeinen Überlegungen, dass in **171** mit *(S)*-MOSHER-Ester die Oxa(OEt)-Gruppe *syn*-ständig (nach hinten zeigend und R^2 in **Abbildung 25**) und in **170** mit *(R)*-MOSHER-Ester das Alken *syn*-ständig (nach vorne zeigend und R^1 in **Abbildung 25**) zur Ph-Gruppe sein muss, da diese jeweils eine diamagnetischen Verschiebung erfahren. Daher muss der bevorzugt gebildete sekundäre Alkohol die gewünschte *(R)*-Konfiguration aufweisen, was sich anhand der Subtraktion der chemischen Verschiebungen der einzelnen funktionellen Gruppen in **171** und **170** nachvollziehen lässt (**Abbildung 25**).

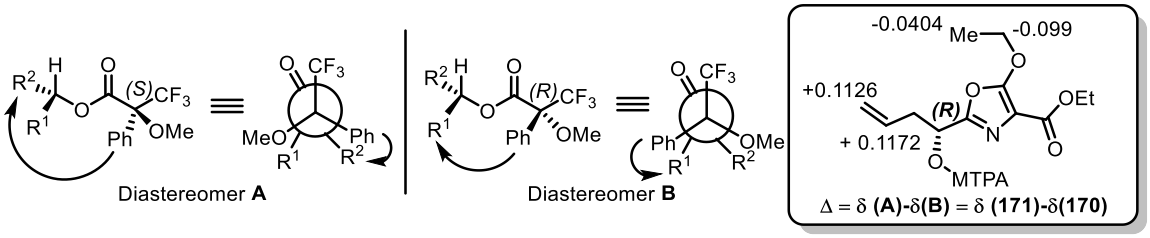


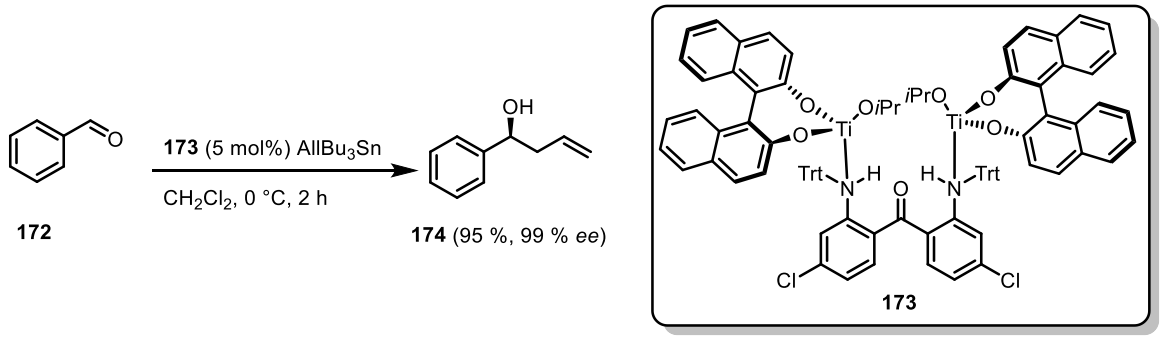
***Abbildung 25**: Abschirmung der zur Ph-Gruppe syn-ständigen Reste in den (S)- und (R)-MOSHER-Estern aus einem sekundären Alkohol nach SHAO et al.[117] und Bestimmung der absoluten Konfiguration des sekundären Alkohols **166** durch einen Vergleich der chemischen Verschiebungen der Ester **170** und **171** in DMSO-d6.*

Bei der Wahl des für die MOSHER-Analyse verwendeten NMR-Lösungsmittels war es wichtig, dass sich keine unterschiedlichen Vorzugskonformationen der Ester **170** und **171** bildeten. In diesem Fall war deuteriertes DMSO das geeignetste Lösungsmittel zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von **166**.

Obwohl das korrekte Isomer von **166** bevorzugt gebildet wurde, ist der erhaltene *ee* von 55 % noch verbesserungswürdig. Um für die Totalsynthese von **MB OB3b** den benötigten Baustein (vgl. **Schema 56** in 3.2.2) mit einer möglichst hohen optischen Reinheit herstellen zu können, musste die KECK-Allylierung mit *(R)*-BINOL weiter optimiert werden.

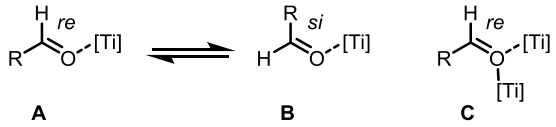
3.2.4.2 Ti-katalysierte KECK-Allylierung mithilfe eines verbrückenden Liganden

Eine Optimierung der [((*R*)-BINOL)(OiPr)$_2$Ti]-katalysierten Allylierung, die auch für die Synthese des Homoallylalkohols **166** angewandt werden kann, wurde von MARUOKA *et al*. im Jahr 2001 entwickelt.[118] Für die asymmetrische Umsetzung von Benzaldehyd **172** zu Homoallylalkohol **174** verwendeten sie anstelle des mononuklearen Katalysators den *in situ* generierten binuklearen Ti-Komplex **173** (**Schema 63**). Die beiden, mit *(R)*-BINOL chelatisierten Ti-Zentren werden dabei durch ein Diaminobenzophenon verbrückt. Die beiden Trityl-Gruppen sorgen aufgrund ihres sterischen Anspruchs zusätzlich für eine Fixierung des Komplexes. Durch Anwendung dieses rigiden Systems wurde laut den Autor:innen **174** in 95 % Ausbeute und 99 % *ee* isoliert, wohingegen eine Kombination aus Ti(O*i*Pr)$_4$ und *(R)*-BINOL unter ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen nur eine Ausbeute von 5 % und eine optische Reinheit von 72 % *ee* lieferte.



***Schema 63**: Verwendung des binuklearen Ti-Komplexes **173** zur Synthese des Homoallylalkohols **174** nach MARUOKA et al.*[118]

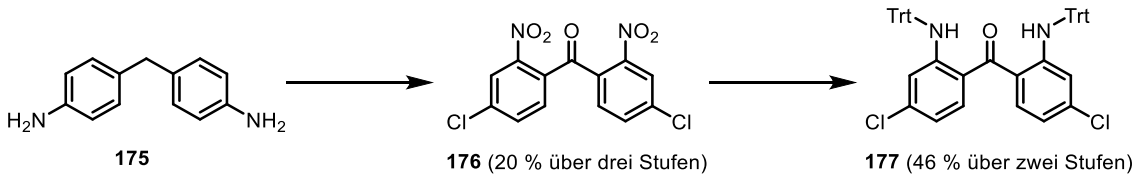
Die Autor:innen begründeten die höhere Aktivität und Enantioselektivität mit dem binuklearen Charakter von **173**. Aufgrund der Verbrückung der beiden Titanzentren durch den Aldehyd werde dieser stärker aktiviert (**C** in **Schema 64**) als durch Koordination an ein Titan.[118]



***Schema 64**: Konformative Fixierung des Aldehyds in **C** durch den binuclearen Katalysator **173** aus **Schema 63** nach MARUOKA et al.*[118]

Die selektivere Bildung eines Enantiomers wurde durch die konformative Fixierung in **C** begründet. Das Gleichgewicht zwischen den Rotameren **A** und **B** bei einem mononuklearen Komplex führe laut den Autor:innen nicht zu einer gleichwertigen Fixierung (**Schema 64**). Daher könne der Angriff eines Nukleophils bei einem mononuklearen Komplex leichter von beiden prochiralen Seiten erfolgen.

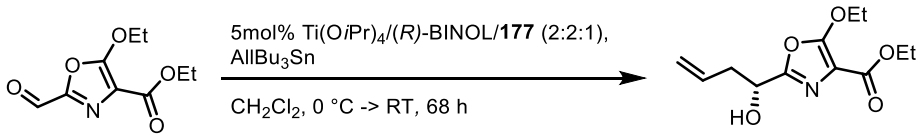
Um **173** in der Allylierung von Aldehyd **158** als Katalysator anwenden zu können, wurde zunächst der verbrückende Diaminobenzophenon Ligand **177** ausgehend von Dianilin **175** über Dinitroverbindung **286** analog zu den in der Literatur beschriebenen Bedingungen mit einer Gesamtausbeute von 9 % über fünf Stufen hergestellt (**Schema 65**, Literaturausbeute: 6 %).[119–121]



175 **176** (20 % über drei Stufen) **177** (46 % über zwei Stufen)

***Schema 65**: Überblick über die literaturbekannte Synthese des verbrückenden Liganden **177**.*[119–121]

Bei der Verwendung von **177** in der asymmetrischen Allylierung von **158** konnte nach 2 h bei 0 °C kein Umsatz des Aldehyds festgestellt werden, weshalb die Mischung auf RT erwärmt wurde, um eine Bildung von **166** zu beobachten (**Schema 66**). Der Homoallylalkohol **166** konnte nach 68 h Reaktionszeit in einer leicht verbesserten Ausbeute von 42 % im Vergleich zu der Reaktion ohne **B50** isoliert werden (38 % vgl. Eintrag 1 in **Tabelle 8**). Die Synthese des MOSHER-Esters ergab einen geringfügig höheren *ee* von 11 % (0 % vgl. Eintrag 1 in **Tabelle 8**).



158 **166** (42 %, 11 % *ee*)

***Schema 66**: KECK-Allylierung von Aldehyd **158** unter Verwendung des verbrückenden Liganden **177**.*

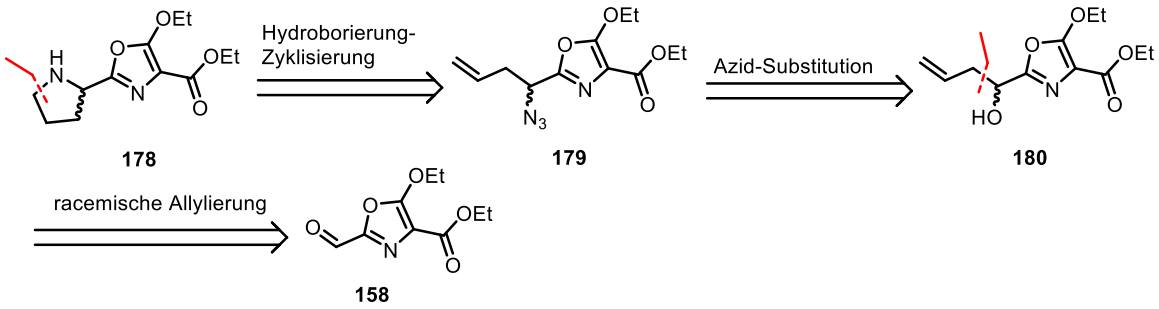
Durch eine schrittweise Erhöhung der Äquivalente des Katalysators und eine längere Reaktionszeit bei 0 °C wurden weder die Ausbeute noch die optische Reinheit weiter verbessert.

Zusammengefasst konnte die Synthese von **166** durch Verwendung des dinuklearen Komplexes **173** anstelle des mononuklearen Komplexes [(*(R)*-BINOL)(OiPr)$_2$Ti] hinsichtlich der Ausbeute und des *ee* optimiert werden. Trotz des zunächst vielversprechenden Ergebnisses wurden keine weiteren Versuche zur Verbesserung dieses Systems durchgeführt, da zeitgleich durch eine andere Methode (vgl. 3.2.4.3) höhere Ausbeuten und optische Reinheiten erzielt wurden.

3.2.4.3 Indium-vermittelte asymmetrische Allylierung

Zu Beginn des Abschnittes über die asymmetrische Allylierung von **158** wurde der *ee* immer NMR-spektroskopisch durch die Synthese der MOSHER-Ester bestimmt. Diese Methode birgt aber die Nachteile, dass sie mindestens eine weitere Reaktion erfordert und nur auf Alkohole angewandt werden kann.

Generell kann der *ee* verschiedener Substanzen mittels chiraler HPLC bestimmt werden. Daher wurde zu diesem Zeitpunkt eine racemische Allylierung angestrebt, um Referenzproben wie **180**, **179** und **178** für die enantiomeren angereicherten Verbindungen (vgl. **Schema 56** in 3.2.2) herzustellen (**Schema 67**).



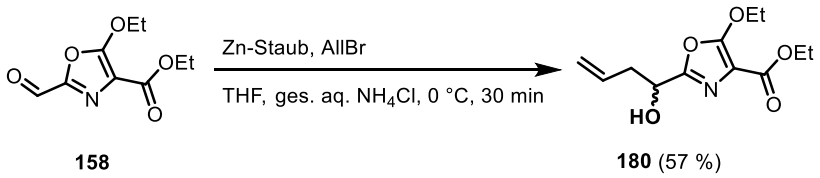
Schema 67**: Retrosynthese der racemischen funktionalisierten Oxazole aus dem Aldehyd **158.

Anhand dieser lassen sich geeignete Bedingungen zur analytischen Trennung der Enantiomere identifizieren, die zur nachfolgenden Analyse der enantiomeren-angereicherten Verbindungen dienen können (vgl. **Schema 56** in 3.2.2). Bei der Synthese des Homoallylazids aus dem Homoallylalkohol ist wichtig, dass die Reaktion vollständig über einen S_N2-Mechanismus verläuft und keine Epimerisierung des gewünschten Enantiomers stattfindet. Neben der zuvor diskutierten Enantioselektivität der Allylierung lässt sich die selektive Inversion des Stereozentrums in der S_N2-Reaktion nur durch die Bestimmung des *ee* mittels chiraler HPLC nachweisen (**Schema 67**).

Eine Möglichkeit, den racemischen Homoallylalkohol zu erhalten, ist die Zn-vermittelte BARBIER-Addition von AllBr an einen Aldehyd.[122] Vorteilhaft an dieser Reaktion ist, dass sie sehr einfach in wässrigen Lösungsmitteln durchgeführt werden kann. Mechanistisch ist die Reaktion mit der GRIGNARD-Reaktion verwandt. Bei Letzterer wird durch Elektronentransfer vom Metall auf die Kohlenstoff-Halogen-Bindung eine rein organometallische Spezies erzeugt, wohingegen bei der BARBIER-Reaktion radikalische und metallorganische Spezies miteinander konkurrieren.[123] Die Natur dieser verschiedenen Spezies hängt von der Stabilisierung der Radikale am nukleophilen

Kohlenstoff aber auch am Carbonyl ab und ist nicht einfach vorauszusagen. Die BARBIER- unterscheidet sich jedoch deutlich von der GRIGNARD-Reaktion darin, dass das Nukleophil mit dem Substrat in einer Reaktionsmischung generiert wird und nicht wie in der GRIGNARD-Reaktion vor Zugabe des Substrats hergestellt wird.[123]

Die Anwendung dieser Methode auf die Umsetzung von **158** zu Alkohol **180** lieferte bereits nach 30 min bei 0 °C einen vollständigen Umsatz des Startmaterials und nach chromatographischer Reinigung das Produkt in 57 % isolierter Ausbeute (**Schema 68**). Darüber hinaus konnten die beiden Enantiomere von **180** erfolgreich durch eine analytische chirale HPLC getrennt werden.



158 **180** (57 %)

Schema 68**: Racemische BARBIER-Allylierung von **158.

Basierend auf dem guten Ergebnis der racemischen Zn-vermittelten Babier-Allylierung bestand das Ziel darin, diese Reaktion asymmetrisch bei möglichst tiefen Temperaturen (d.h. -78 °C) durchzuführen. Eine Möglichkeit stellt die Verwendung von Indium-Organylen und chiralen 1,2-Aminoalkoholen dar.[124]

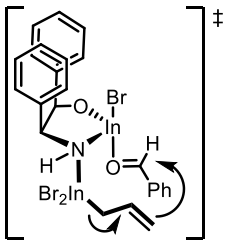


***Abbildung 26**: Vorgeschlagener Übergangszustand für die Indium-vermittelte asymmetrische Allylierung von Benzaldehyd mit (1S,2R)-2-amino-1,2-diphenylethan-1-ol als Liganden nach HADDAD et al..*[126]

Obwohl seit über 30 Jahren der Mechanismus der Indium-vermittelten Allylierung immer wieder untersucht wurde, ist die genaue Zusammensetzung des reaktiven Intermediates weiterhin unbekannt. Dies liegt unter anderem daran, dass die Reaktion von Indium und Allylhalogeniden zu einer Mischung aus verschiedenen In(I) und In(III) Verbindungen führt, die ineinander übergehen können.[125]

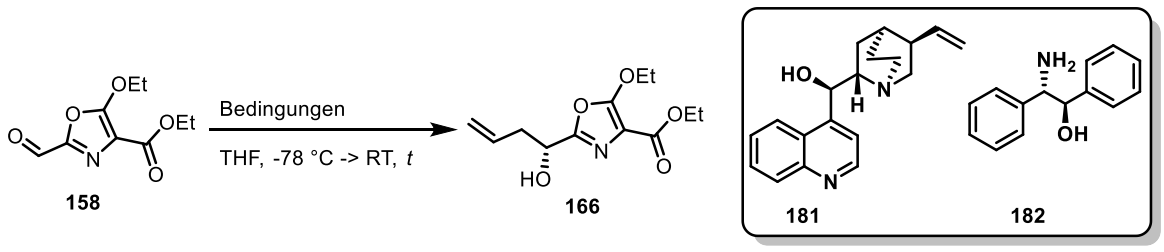
In einem, von der Gruppe um SINGARAM im Jahr 2010 veröffentlichten Artikel wurde von einer asymmetrischen Indium-vermittelten Allylierung unter Verwendung von (1*S*,2*R*)-2-amino-1,2-diphenylethan-1-ol als chiralen Liganden berichtet (**Abbildung 26**).[126]

Für die von ihnen verwendeten Reaktionsbedingungen (trockenes THF und trockenes Hexan bei -78 °C) postulierten sie die alleinige Anwesenheit eines Allylindium(III)-Komplexes, der in der Allylierung von Benzaldehyd zu einer Ausbeute von 90 % und einem *ee* von 93 % führte (**Abbildung 26**).

In diesem Komplex liegt das Indium tetraedrisch koordiniert durch den Aminoalkohol, das Substrat und ein Bromid vor. Mithilfe des deprotonierten Amins wird ein weiterer Indium-Allylkomplex rekrutiert, der eine nukleophile Allylgruppe trägt. Die Abschirmung der oberen Seite durch die Phenylringe führt dazu, dass die Koordination des Benzaldehyds nur von unten erfolgen kann. Dadurch wird die *si*-Seite dem Angriff des Nukleophils ausgesetzt. Daher lieferte die Verwendung des Ligands auch den (*S*)-Homoallylalkohol als Produkt.[126]

Im Fall des hier gewünschten chiralen Homoallylalkohols **166** liegt eine (*R*)-Konfiguration vor (vgl. **Schema 69**). Aufgrund dessen muss der Angriff des Allylanions von der *re*-Seite erfolgen. Daher ist eine (1*R*,2*S*)-Konfiguration des 1,2-Aminoalkohols für die Synthese von **166** notwendig.

Auf Grundlage dieser Vorüberlegungen wurden bei einer initialen Reaktionstemperatur von -78 °C die chiralen Additive **181** und **182** untersucht, die Indium als Liganden, wie in **Abbildung 26** dargestellt, koordinieren können (**Schema 69**). Die erfolgreiche Bildung des Indiumorganyls aus dem verwendeten Indiumstaub wurde bei der Reaktionsführung durch eine klare Lösung bestätigt.



***Schema 69**: Indium-vermittelte Babier-artige Allylierung von **158** mit chiralen Additiven und den in Tabelle 9 zusammengefassten Bedingungen und Ergebnissen.*

Die bei den Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse sind in **Tabelle 9** zusammengefasst.

***Tabelle 9**: Untersuchte Bedingungen für die Indium-vermittelte asymmetrische Allylierung von **158** aus **Schema 69**. Der ee wurde mittels chiraler HPLC durch Vergleich mit **180** bestimmt.*

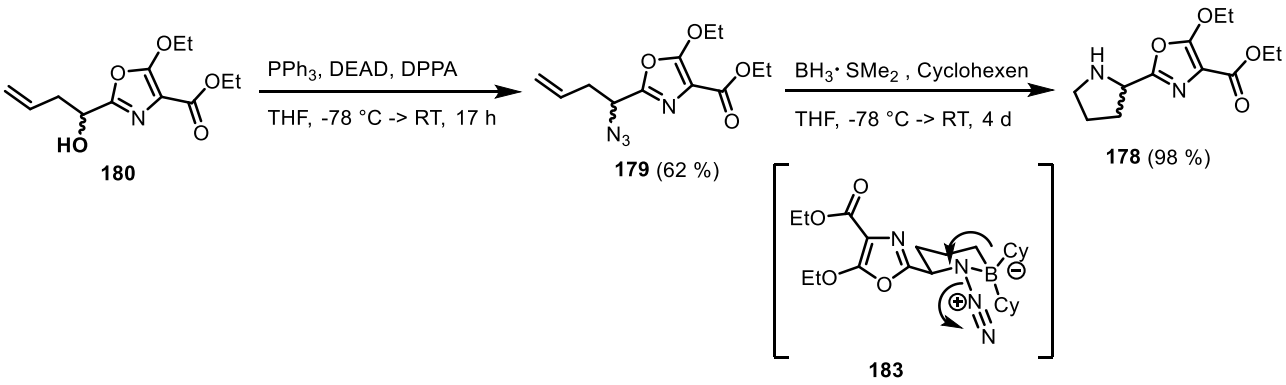
Eintrag	Bedingungen	*t* [h]	Ausbeute [%]	*ee* [%]
1	In-Staub (1.0 Äq.), AllBr (3.0 Äq.), **181** (1.0 Äq.)	15.5	44	46
2	In-Staub (2.0 Äq.), AllBr (2.0 Äq.), **181** (2.0 Äq.), Py (2.0 Äq.)	1.5	47	31
3	In-Staub (1.1 Äq.), AllBr (3.0 Äq.), *(R)*-BINOL (1.1 Äq.)	16	27	13
4	In-Staub (1.1 Äq.), AllBr (3.0 Äq.), **B53** (1.1 Äq.)	1	68	70

In einem ersten Versuch wurde das Alkaloid Cinchonidin **181** als Ligand verwendet (Eintrag 1 in **Tabelle 9**).[124] Im Vergleich zu den KECK-Allylierungen aus 3.2.4.1 und 3.2.4.2 konnte bei einer deutlich verkürzten Reaktionszeit eine ähnliche Ausbeute und optische Reinheit wie bei dem besten zuvor erhaltenen Ergebnis (55 % vgl. Eintrag 2 in **Tabelle 8**) erzielt werden. Die Verwendung von Pyridin als zusätzliche Base in Kombination mit **181** (Eintrag 2 in **Tabelle 9**) verbesserte einerseits die Ausbeute leicht und verschlechterte andererseits den *ee* um 15 %. Mithilfe von (*R*)-BINOL wurde ebenfalls nicht ein vergleichbares Ergebnis zu Eintrag 1 erzielt (Eintrag 3 in **Tabelle 9**). Bei einer Reaktion mit **182** als chiralem Liganden konnte eine gute Ausbeute von 68 % bei einem guten *ee* von 70 % innerhalb einer sehr kurzen Reaktionszeit erzielt werden (Eintrag 4 in **Tabelle 9**). Unter diesen Bedingungen konnte das beste Resultat für die enantioselektive Allylierung von **158** zu **166** in dieser Dissertation erhalten werden. Es ist aber denkbar, dass aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit die Temperatur weiter verringert und dadurch der *ee* weiter erhöht werden könnte. Durch die Synthese der beiden MOSHER-Ester wurde, wie bereits unter 3.2.4.1 beschrieben, die korrekte absolute Konfiguration des chiralen Kohlenstoffes bestätigt.[117]

3.2.5 Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OEt 156 aus 166

Zur Synthese weiterer racemischer Referenzen für die Bestimmung des *ee* nach der in **Schema 67** unter 3.2.4.3 aufgeführten Retrosynthese wurde **180** zu **179** umgesetzt (**Schema 70**). Dabei eignete sich Diphenylphosphorylazid (DPPA) für eine direkte Umwandlung des sekundären Alkohols nach einem S_N2-Mechanismus unter Inversion der Konfiguration. Dieses Reagenz wurde in der Literatur bereits für die Synthese von Nicotinalkaloiden angewandt.[109] Im Gegensatz zu dem dort beschriebenen Protokoll wurden nicht unter Verwendung von DBU sondern unter mitsunobuähnlichen

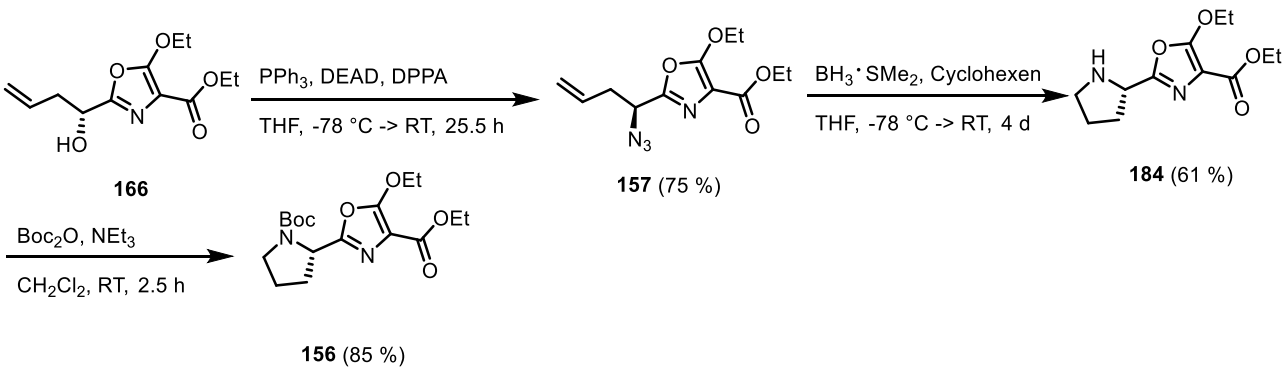
Bedingungen mit Azodicarbonsäurediethylester (DEAD) die besten Ergebnisse erzielt. Diese ermöglichten es, **179** in 62 % Ausbeute zu isolieren, deren Enantiomere im Anschluss mithilfe einer chiralen HPLC die im analytischen Maßstab getrennt werden konnten.



Schema 70**: Synthese des racemischen Pyrrolidinoxazols **178.

In der nachfolgend durchgeführten Hydroborierung-Zyklisierungs-Kaskadenreaktion zu Pyr-Oxazol **178** wurde das Hydroborierungsreagenz Cy_2BH zunächst *in situ* hergestellt. Die nachfolgende Reaktion mit Azid **179** erfolgte über Intermediat **183** nach Hydroborierung der terminlen Doppelbindung (**Schema 70**).[109] Bei der anschließenden sigmatropen Umlagerung wurde die C-B-Bindung gebrochen und eine C-N-Bindung unter Freisetzung von N_2 als thermodynamische Triebkraft gebildet. Dabei ist besonders hervorzuheben, dass keine weiteren Nebenprodukte beobachtet wurden und **178** in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten wurde.

Die notwendigen Schritte für die Synthese von **156** wurden analog zu den racemischen Pendants durchgeführt (**Schema 71**). Nach Isolation des Azids **157** in 75 % Ausbeute wurde mittels HPLC der identische *ee* wie für **166** bestimmt, sodass eine Epimerisierung während der Reaktion ausgeschlossen werden konnte.



***Schema 71**: Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OEt **156** aus **166**.*

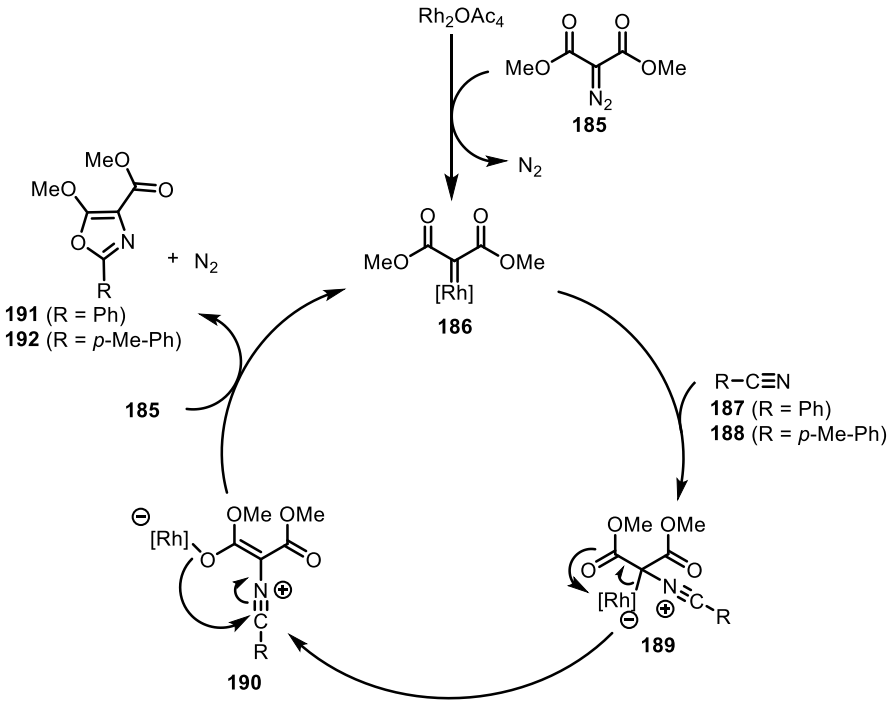
Im Vergleich zum racemischen **178** wurde **184** nur in einer moderaten Ausbeute von 61 % isoliert. Dies könnte damit zusammen hängen, dass die Kaskadenreaktion in einem vergrößerten Maßstab lokal zu einer stärkeren Wärmeentwicklung führte, die eine Zersetzung von **184** begünstigte. In einem letzten Schritt ergab die Boc-Schützung den gewünschten Baustein Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OEt **156** in 85 % Ausbeute. Ausgehend von **158** konnte dieser innerhalb von vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 26 % und 70 % *ee* erhalten werden.

Die dargelegte Sequenz stellt die erste bekannte asymmetrische Synthese eines derartigen Boc-Pyr-substituierten Oxazols dar. Nach vielseitiger Optimierung wurde auf Grundlage der In-vermittelten Allylierung eine hervorragende Methode etabliert, um das Stereozentrum in α-Position zum Oxazol aufzubauen. Das in **Schema 55** formulierte Ziel wurde hiermit erreicht und Ester **155** mit Et-Schutzgruppen wurde in einem Gramm-Maßstab ausgehend von Diethylaminomalonat Hydrochlorid mit einer Gesamtausbeute von 5 % über neun Stufen gewonnen.

Im Hinblick auf die insgesamt moderate Ausbeute und die stufenintensive Herstellung von **156** sollte für eine Synthese des Me-geschützten Oxazols eine effektivere Methode gefunden werden. Wie unter 3.2.1 erwähnt wurde, kann diese Schutzgruppe in dem finalen Schritt einer möglichen Totalsynthese von **MB OB3b** leichter entfernt werden (**Schema 53**).

3.2.6 Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OMe)-OMe 194 durch eine Rh-katalysierte [3+2]-Cycloaddition

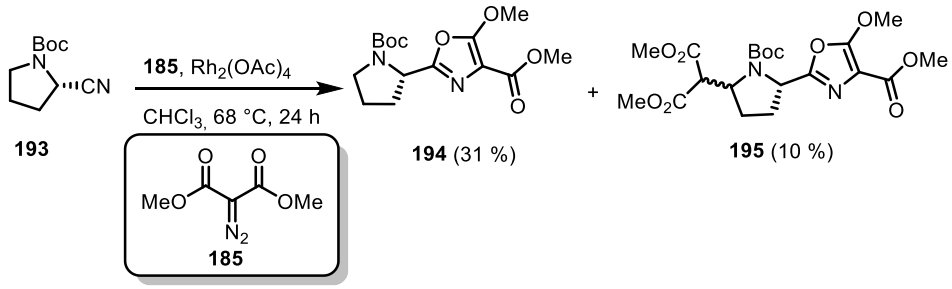
Zur Synthese hochfunktionalisierter Oxazole wurde durch die Arbeit von HELQUIST *et al.* ein bedeutender Beitrag geleistet.[127] In einer Rh-katalysierten [3+2]-Cycloaddition konnten die Autor:innen aus aromatischen Nitrilen und Dimethyldiazomalonat **185** in Anwesenheit von Rh_2OAc_4 Oxazole wie **191** und **192** aufbauen (**Schema 72**). Der zugehörige Katalysezyklus beinhaltet als ersten Schritt die Bildung eines elektrophilen Carbenoids **186** unter Freisetzung von N_2. Dieser Komplex wird darauffolgend von einem Nitril nukleophil angegriffen und es wird das formell zwitterionische Intermediat **189** erhalten. Durch Wanderung des [Rh] bildet sich Methylendiolat **190**, das zu dem Oxazol zyklisiert. Durch Reaktion mit **185** wird das ursprüngliche Carbenoid **186** danach regeneriert.



***Schema 72**: Katalysezyklus der 3,2-Cycloaddition von **185** und Nitrilen **187** und **188** nach HELQUIST et al.*[127]

Neben der Synthese von Oxazolen ausgehend von aromatischen Nitrilen wie **187** und **188** konnte diese Methode auch verwendet werden, um komplexere Verbindungen mit einem Chlormethyl- oder einem Alken-Substituenten herzustellen.[128] Die Synthese eines Oxazols wie **155** (vgl. **Schema 55** in 3.2.1) mit einem α-Stereozentrum und einem Pyr-Substituenten ist hingegen gänzlich unbekannt.

Das dafür notwendige Nitril Boc-2-Cyanopyrrolidin **193** ließ sich in einer literaturbekannten Synthese ausgehend von *(S)*-Prolin in drei Stufen herstellen (86 %, Literaturausbeute: 98 %).[129] Ausgehend von **193** wurde die [3+2]-Cycloaddition mit Dimethyldiazomalonat **185**[130] durchgeführt (**Schema 73**). Bei dem Aufbau der Reaktion war es den Autor:innen zufolge wichtig, dass **185** tropfenweise über 21 h zu der refluxierenden Mischung aus **193** und $Rh_2(OAc)_4$ gegeben wurde.[127]



***Schema 73**: [3+2]-Cycloaddition von Nitril **193** und **185** zu Oxazol **194** unter Bildung des Nebenprodukts **195**.*

Durch die Präkoordination des Nitrils an [Rh] wurde zunächst ein Komplex gebildet, der vor Beginn der Zugabe von **185** durch seine violette Färbung erkennbar war. Vermutlich musste das elektrophile Carben **186** direkt nach seiner Bildung von einem Nitril abgefangen werden (vgl. **Schema 72**), um selektiv das Produkt zu bilden. Nach einer Reaktionszeit von 24 h und einer Reinigung mittels Säulenchromatographie wurde das gewünschte Oxazol **194** in 31 % Ausbeute erhalten. Es zeigte sich, dass die Reaktion nicht vollständig ablief, da das Startmaterial **193** in 46 % zurückgewonnen werden konnte (77 % *brsm*). Außerdem führte die Reaktion nicht zu einer selektiven Bildung von **194**. Nach der chromatographischen Reinigung wurde eine 3:1 Mischung aus **194** und dem alkylierten Produkt **195** erhalten.

Dieses Verhältnis kann anhand des aufgenommenen ^{1}H-NMR-Spektrums nachvollzogen werden (**Abbildung 27**). Aufgrund der chemischen Verschiebungen lassen sich das Dublett bei δ = 4.21 ppm der CH-Gruppe des Diesters in **195** und das Multiplett bei δ = 3.56-3.39 ppm der CH_2-Gruppe in α-Position zur NBoc-Gruppe in **194** zuordnen.

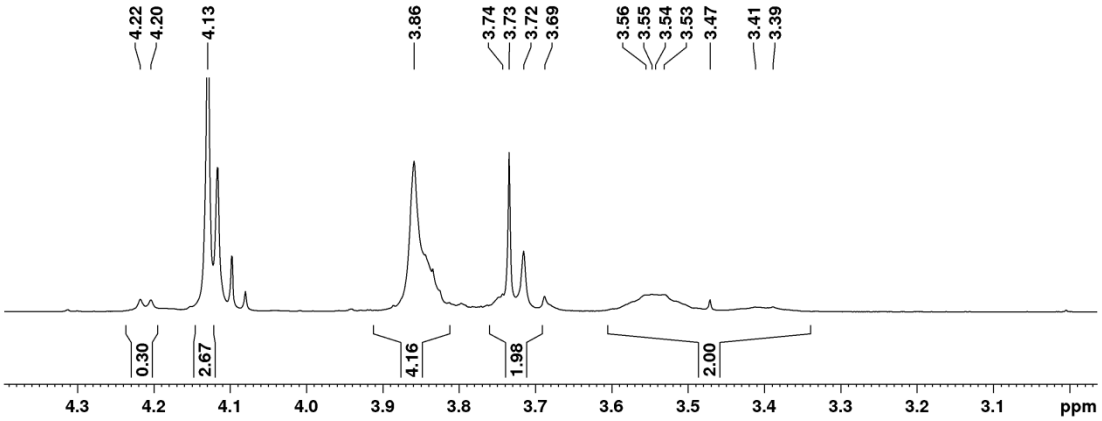
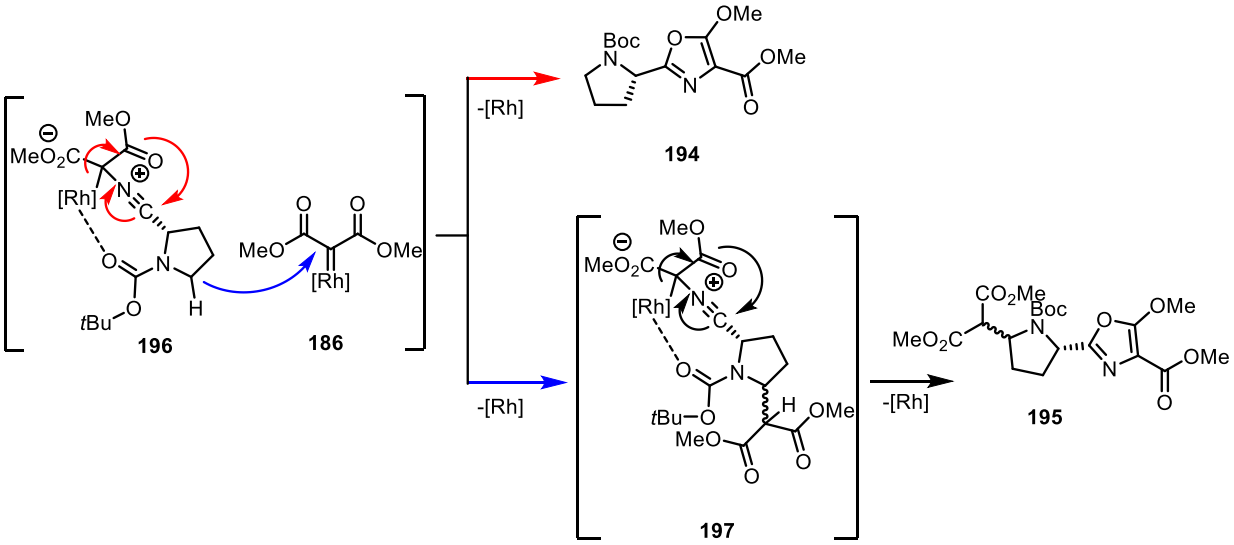


Abbildung 27: *Ausschnitt aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) der Mischung aus **194** (δ = 4.13, 3.86, 3.56-3.39 ppm) und **195** (δ = 4.21, 3.74-3.69 ppm).*

Die Bildung dieses Nebenprodukts lässt sich auf Grundlage des, in **Schema 72** dargestellten Katalysezyklus erklären (**Schema 74**). Nach Bildung des zwitterionischen Intermediats **196** aus Reaktion von **193** mit **186** kann dieses durch eine schwache Wechselwirkung mit der Boc-Gruppe stabilisiert werden.



Schema 74*: Bildung der Produkte **194** und **195** aus dem zwitterionischen Intermediat **196** durch direkte Cycloaddition (rot) und vorherige CH-Insertion mit **186** zu **197** (blau).*

Da zur Bildung des gewünschten Oxazols **194** eine Eliminierung des [Rh] notwendig ist (roter Reaktionsweg in **Schema 74**), ist diese Cycloaddition durch die weitere Wechselwirkung wahrscheinlich verlangsamt, sodass ein weiteres Carbenoid **186** eine

CH-Insertion an der am besten zugänglichen und azidesten Stelle in **196** eingeht (blauer Reaktionsweg in **Schema 74**). Da dies die CH_2-Gruppe in α-Position zur NBoc-Gruppe ist, wird dadurch das Nebenprodukt **195** über das Intermediat **197** gebildet.

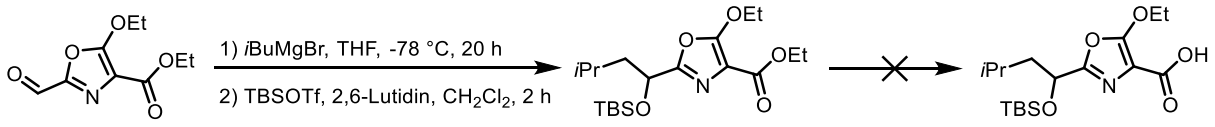
Im Folgenden wurden keine weiteren Versuche unternommen, **194** und **195** zu trennen und die Mischung wurde ohne Reinigung für die nachfolgende Reaktion eingesetzt. Da es sich bei dieser um eine Verseifung handelte, sollte es einfach möglich sein, die aus **195** entstehende Tricarbonsäure aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit abzutrennen.

Zusammenfassend wurde Boc-Pyr-Oxa(OMe)-OMe **194** in nur vier Stufen mit einer guten Gesamtausbeute von 27 % (66 % *brsm*) erhalten. Dies stellte im Vergleich zu der Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OEt **156** (vgl. **Schema 71** unter 3.2.5) eine enorme Verbesserung dar, weil einerseits die Anzahl der Syntheseschritte verringert und andererdeits die Ausbeute deutlich erhöht wurde (vgl. 5 % über neun Stufen). Außerdem wurde mit **194** eine enantiomerenreine Verbindung ausgehend von *(S)*-Prolin synthetisiert.

Durch Anwendung der äußerst wirkungsvollen Rh-Katalyse wurde insgesamt ein sehr schneller und effizienter Zugang ermöglicht.

3.2.7 Synthese von *i*Bu-CH(OTBS)-Oxa(OMe)-OMe 202

Nach der Herstellung des Boc-Pyr-substituierten Oxazols **194** wurde die erarbeitete Methode als nächstes zur Synthese des entsprechenden Esters mit TBS-geschütztem Isobutylalkohol angewandt. LENNART SPICKSCHEN beschrieb in seiner Masterarbeit, dass die Synthese und die Funktionalisierung des Isovaleryl-substituierten Oxazols **198** mit Et-Schutzgruppen problematisch war (**Schema 75**).[105]

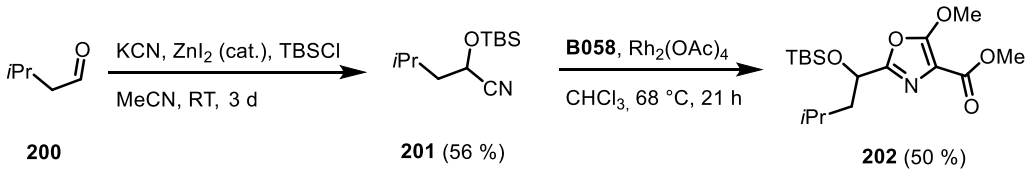


158 **198** (23 %) **199**

***Schema 75**: Synthese des Et-geschützten, Isovaleryl-substituierten Oxazols **198** und nicht erfolgreiche Spaltung des Esters zu der Carbonsäure **199** nach SPICKSCHEN.*[105]

Für die Umwandlung des Aldehyds **158** zu **198** wurde lediglich eine Ausbeute von 23 % über zwei Stufen erzielt und im Rahmen der Masterarbeit konnte keine Spaltung des Esters zu **199** erzielt werden. Daher bot die oben beschriebene [3+2]-Cycloaddition eine ausgezeichnete Möglichkeit, diese Probleme durch eine direkte Synthese des zu **198** analogen Me-geschützten Oxazols zu umgehen (vgl. **Schema 55** in 3.2.1).

In einem ersten Schritt wurde das für die Cycloaddition benötigte Nitril **201** hergestellt (**Schema 76**). Da sich in α-Stellung des Oxazols ein sekundärer Alkohol befindet, der im weiteren Verlauf der Synthese zu einem Keton oxidiert werden soll, musste dieses in Form eines TBS-geschützten Cyanhydrins synthetisiert werden. Um auf eine Verwendung von TBSCN[131,132] zur Synthese des Nitrils verzichten zu können, wurde **201** durch die *in situ* TBS-Schützung des aus **200** und KCN gebildeten Cyanhydrins gewonnen.[133] Aufgrund der in Konkurrenz auftretenden Cyanid-katalysierten Homo-Kupplung des Aldehyds wurde **201** nur in einer moderaten Ausbeute von 56 % erhalten.



200 **201** (56 %) **202** (50 %)

Schema 76: *Synthese des Cyanhydrins **201** und [3+2]-Cycloaddition mit **185** zu Oxazol **202.***

Die nachfolgende Rh-katalysierte [3+2]-Cycloaddition ergab **202** in einer Ausbeute von 50 % ohne ein nachweisbares Nebenprodukt, das durch eine weitere CH-Insertion entstanden war. Im Gegensatz zu **193** beinhaltete **201** weder eine koordinierende Funktionalität noch eine Stelle mit erhöhter CH-Azidität (vgl **Schema 73**). Dadurch war das entsprechende zwitterionische Intermediat im Gegensatz zu **196** nicht langlebig genug, um eine Nebenreaktion zu begünstigen (vgl. **Schema 74**).

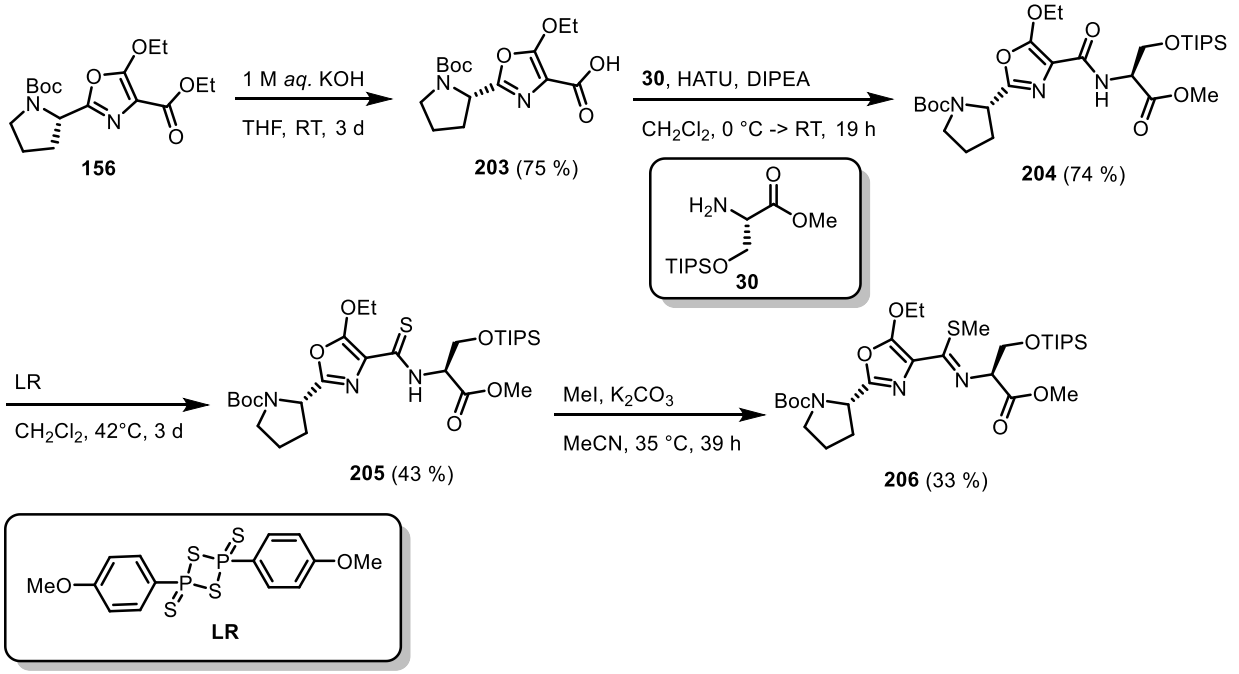
Die Synthese von **202** in nur zwei Stufen mit einer Ausbeute von 28 % unterstreicht die hervorragende Anwendbarkeit der Rh-katalysierten [3+2]-Cycloaddition zum Aufbau dieser Me-geschützten Oxazole.

3.2.8 Synthese der Oxazol-Me-Thioimidate

*3.2.8.1 Synthese des Me-Thioimidats aus Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OEt **156***

Die erfolgreiche Herstellung der unterschiedlichen Oxazolester **156**, **194** und **202** ermöglichte einen Zugang zu den entsprechenden Me-Thioimidaten (vgl. **Schema 55**).

Um das Me-Thioimidat mit einer Et-Schutzgruppe zu erhalten, wurde als erstes Ester **156** mit 1 M *aq.* KOH über 3 d bei RT zu Carbonsäure **203** gespalten (**Schema 77**). Im Anschluss erfolgte eine HATU-vermittelte Peptidkupplung mit **30**, die das diastereomerenreine Amid **204** in einer guten Ausbeute von 74 % lieferte.



***Schema 77**: Synthese des Me-Thioimidats **206** mit Et-geschütztem Oxazol.*

Die darauffolgende Thionierung wurde unter den, im Kapitel 3.1.9 optimierten Bedingungen durchgeführt und ergab das Thioamid **205** in 43 % Ausbeute. Im Laufe der Reaktion musste nach 48 h weiteres Reagenz hinzugefügt werden, um einen vollständigen Umsatz des Amids **204** zu erzielen. Es ist denkbar, dass die verlängerte Reaktionszeit zu einer Zersetzung führte, da Nebenreaktionen wie eine Addition an den elektronenreichen Heterozyklus möglich sind.

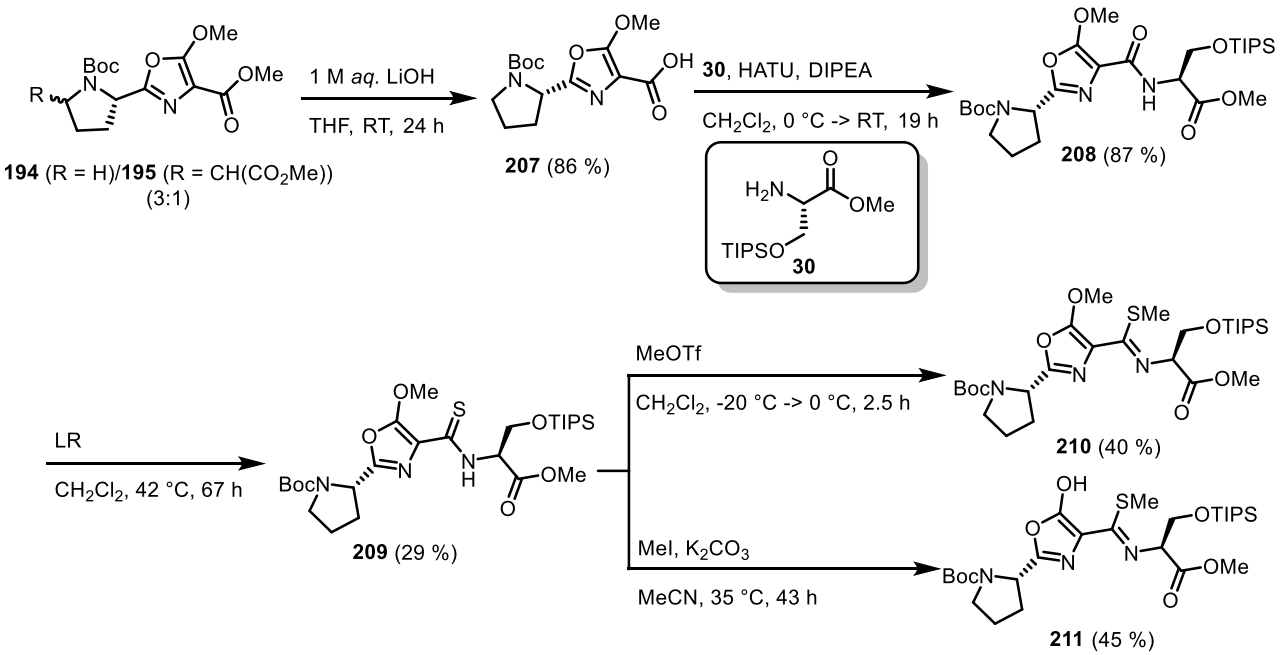
Die abschließende Methylierung stellte sich ebenfalls als problematisch heraus (**Schema 77**). Im Vergleich zu der unter 3.1.9 beschriebenen Synthese des verwandten Me-Thioimidats (**Schema 30**) mussten die Bedingungen angepasst werden. Zum vollständigen Umsatz des Thioamids **205** wurden insgesamt 4 Äq. Methyliodid bei einer

Reaktionsdauer von 39 h zugegeben. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das benachbarte TIPS-geschützte Ser die Thioamidbindung sterisch abschirmt. Darüber hinaus deutete eine LC-MS Kontrolle darauf hin, dass im Laufe der Reaktion die Et-Schutzgruppe des Oxazols entfernt wurde. Diese unerwartete Entschützung des Heterozyklus wird unter 3.2.8.2 genauer diskutiert. Mit dem in **Schema 79** dargestellten Mechanismus lässt sich die Bildung des im Fall von **206** beobachteten Nebenprodukts erklären.

Durch diese Sequenz gelang ein erfolgreicher Transfer der unter 3.1 in der Synthese der strukturvereinfachten Naturstoffderivate **4** und **5** etablierten Strategie. Dies unterstreicht den Wert der Erkenntnisse, die mit diesen Molekülen gewonnen werden konnten. Das Me-Thioimidat **206** wurde als erstes Fragment der Totalsynthese von **MB OB3b** in einer Gesamtausbeute von 8 % über vier Stufen ausgehend von **156** erhalten.

*3.2.8.2 Synthese des Me-Thioimidats aus Boc-Pyr-Oxa(OMe)-OMe **194***

Aufbauend auf der Synthese von **206** wurden die dabei entwickelten Bedingungen auf die Herstellung des analogen Me-Thioimidats mit einem Me-geschützten Oxazol angewandt (**Schema 78**). Dafür wurde die 3:1 Mischung aus **194** und **195** zunächst mit 1 M *aq.* LiOH über 24 h zur Reaktion gebracht. Im Vergleich zur Verseifung aliphatischer Me-Ester musste für einen vollständigen Umsatz von **194** eine größere Menge Base bei einer längeren Reaktionszeit eingesetzt werden, da der Heterozyklus die Elektronendichte des Me-Esters deutlich erhöhte. Nach der wässrigen Aufarbeitung wurde Carbonsäure **207** nach erfolgreicher Abtrennung der aus **195** gebildeten Tricarbonsäure in 86 % Ausbeute (basierend auf eingesetztem **194**) isoliert. Die nachfolgende HATU-vermittelte Kupplung mit **30** verlief wie im Fall des Et-geschützten Oxazols ohne Probleme und ergab das Amid **208** in sehr guter Ausbeute von 87 %.



***Schema 78**: Synthese des Me-Thioimidats **210** mit Me-geschütztem Oxazol aus der Mischung der Oxazole **194/195**.*

Die Thionierung von **208** mit 2.0 Äq. LR über 67 h führte zu einer Bildung von **209** in einer isolierten Ausbeute von 29 %. Gleichzeitig konnten 17 % **208** wiedergewonnen werden (46 % *brsm*). Es zeigte sich, dass das Me-geschützte Oxazol im Vergleich zum Et-geschützten instabiler war, da **209** unter gleichen Reaktionsbedingungen in einer geringeren Ausbeute isoliert werden konnte. Die Ausbeute wurde auch nicht durch eine Verlängerung der Reaktionszeit verbessert, da in diesem Fall eine verstärkte Zersetzung eintrat.

Für die abschließende Methylierung von **209** zu **210** als zweites Fragment der Totalsynthese wurden verschiedene Bedingungen evaluiert (**Schema 78**). Als erstes wurde die in vorherigen Versuchen verwendete Methylierung mittels Methyliodid und K_2CO_3 als Base angewandt. Wie bei der Herstellung des Et-geschützten Thioimidats **206** (vgl. **Schema 77**) wurde nach einer Reaktionszeit von 24 h mit 4 Äq. Methylierungsreagenz mittels LC-MS kein vollständiger Umsatz des Startmaterials nachgewiesen.

Da sich der Umsatz nach weiteren 19 h und einer erneuten Zugabe von 4 Äq. Methyliodid nicht änderte, wurde die Reaktion aufgearbeitet und säulenchromatographisch gereinigt. Das dabei isolierte Produkt konnte allerdings nicht dem ursprünglich angestrebten Me-Thioimidat **210** sondern dem Analogon **211** mit entschütztem Oxazol zugeordnet werden.

Nach ^{1}H-NMR-Analytik konnte eindeutig die Me-Gruppe des Thioimidats im Bereich von δ = 3.0-2.5 ppm nachgewiesen werden (**Abbildung 28**). Im Bereich von δ = 4.5-3.5 ppm wurde jedoch nur noch ein Signal gefunden, welches nur einer weiteren Methoxygruppe zugeordnet werden konnte.

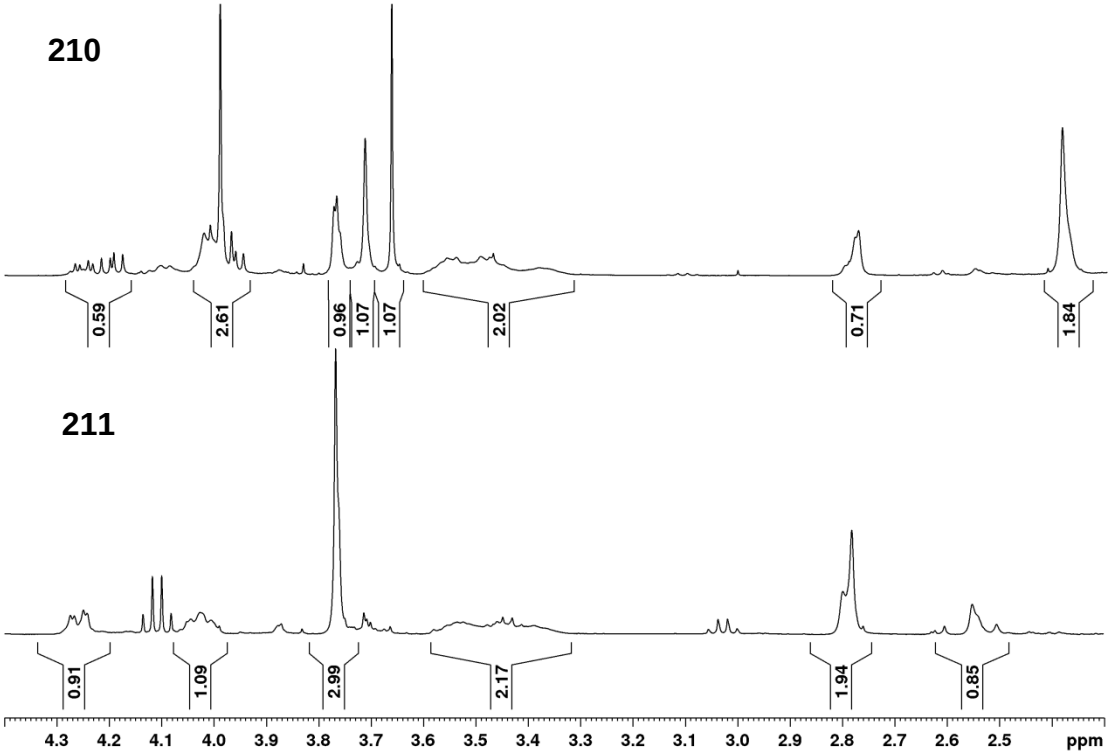
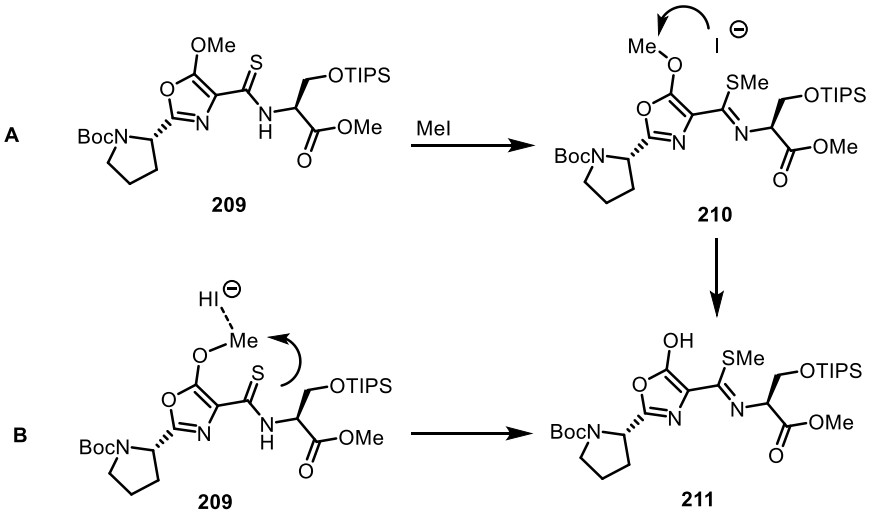


***Abbildung 28**: Vergleich der Auschnitte aus den ^{1}H-NMR Spektren (400 MHz, $CDCl_3$) von **210** und **211**.*

Neben dem gezeigten Ausschnitt wurde bei $\delta = 8.92$ ppm ein breites Singulett beobachtet. Dieses Signal weist darauf hin, dass **211** in der, in **Schema 78** dargestellten Enol- und nicht in der tautomeren Keto-Form vorlag, die wahrscheinlich durch die Konjugation mit der Doppelbindung des Thioimidats stabilisiert wird. Unter Berücksichtigung dieser Entschützung kann erklärt werden, weshalb mittels LC-MS-Kontrolle kein vollständiger Umsatz des Startmaterials beobachtet wurde, da sich das Molekulargewicht bei der Umwandlung von **209** zu **211** nicht veränderte.

Diese Reaktion kann aufgrund der formellen Wanderung als eine Methyliodid-induzierte Me-Gruppen-Umlagerung bezeichnet werden. Es ist wahrscheinlich, dass diese durch einen Überschuss an Iodid-Anionen ausgelöst wurde. Zwei mögliche Mechanismen für diese Reaktion sind in **Schema 79** dargestellt. Eine erste Variante wäre die intermediäre Bildung des Me-Thioimidats **210**, das im nächsten Schritt durch das gebildete Iodid nukleophil zu **211** demethyliert wird (**A** in **Schema 79**). Die andere Variante wäre ein konzertierter Mechanismus, in dem das Iodid eine Wechselwirkung zur Me-Gruppe ausbildet, sodass die Sauerstoff-Kohlenstoff-Bindung geschwächt und die Me-Gruppe in einer Umlagerung auf den Schwefel transferiert wird (**B** in **Schema 79**).



Schema 79: *Mögliche Mechanismen für die Bildung von **211** aus **209** durch eine Me-Gruppen-Umlagerung: **A**: Schrittweiser Mechanismus unter Bildung von **210**; **B**: direkte Iodid-katalysierte Umlagerung zu **211**.*

Eine Möglichkeit dies zu überprüfen, wäre eine Reaktion von **209** mit einer katalytischen Menge an Iodid-Ionen. Falls sich dabei **211** bildet, würde dies für den Mechanismus **B** sprechen. Ein Hinweis darauf, dass Mechanismus **A** ablaufen könnte, ist die unter 3.2.8.1 beobachtete Entfernung der Et-Schutzgruppe. Dort fand kein Transfer auf den Schwefel sondern nur eine Entfernung dieser Schutzgruppe statt.

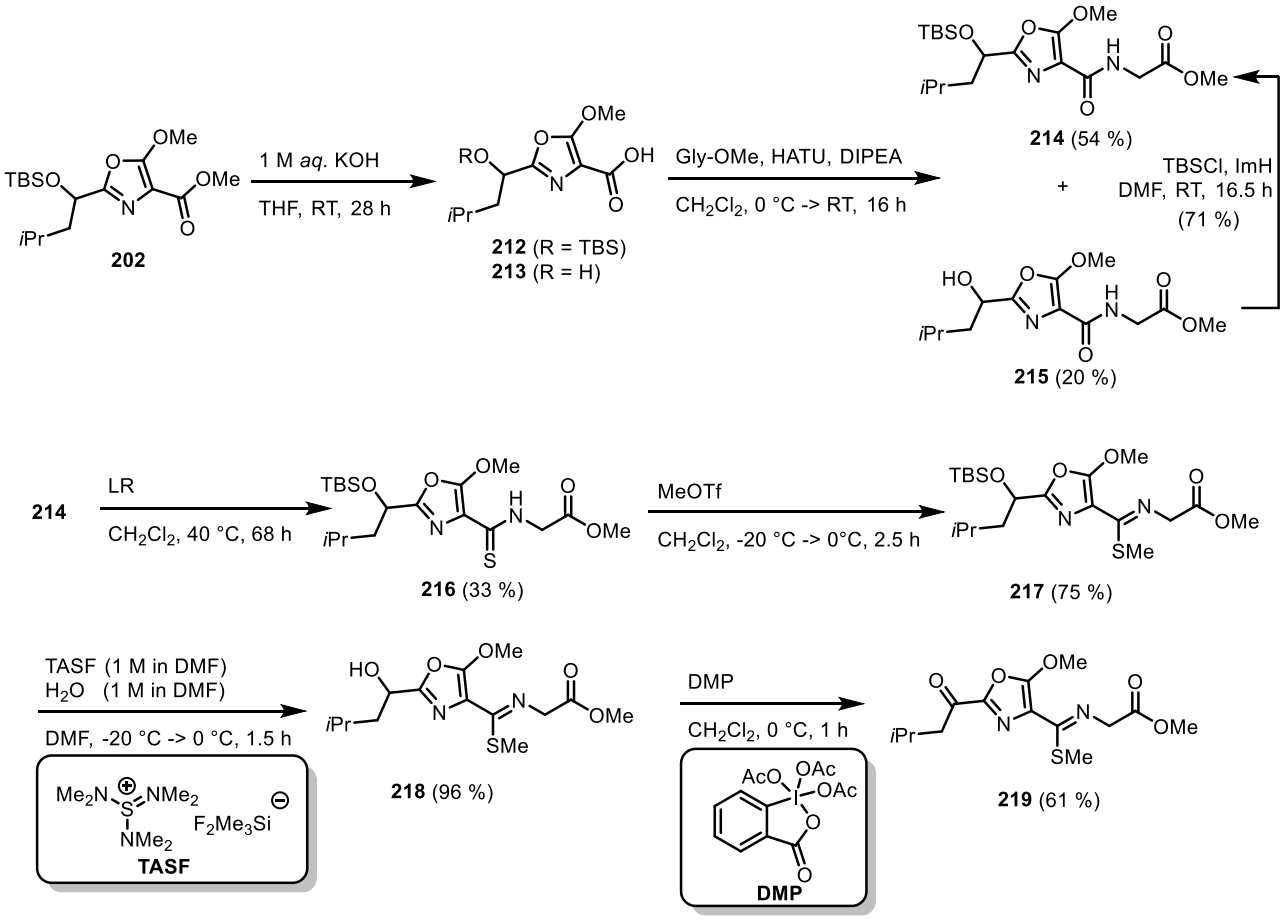
Diese unerwartete Beobachtung ist äußerst wertvoll, da die Iodid-vermittelte Entfernung der Me-Schutzgruppe im Endspiel der Totalsynthese eine Möglichkeit bietet, unter Zuhilfenahme eines geeigneten Me-Abfangreagenzes die Oxazolone freizusetzen (vgl. **Schema 53**).

Um die ursprünglich beabsichtigten Synthese des Me-Thioimidats **210** mit Me-geschützten Oxazol zu ermöglichen, wurde als nächstes MeOTf zur Methylierung von **209** eingesetzt (**Schema 78**), da es sich bei dem Triflat-Ion um ein nicht nukleophiles Anion handelte. Bereits mit einem doppelten Überschuss an MeOTf bei einer Temperatur von -20 °C konnte innerhalb von 2.5 h unter Erwärmen auf 0 °C ein vollständiger Umsatz zu **210** beobachtet werden. Nach chromatographischer Reinigung wurde dieses in 40 % Ausbeute isoliert und NMR-spektroskopisch analysiert (**Abbildung 28**). Die moderate Ausbeute lässt sich durch mögliche, nicht abtrennbare Verunreinigungen in **209** aus der Thionierungsreaktion erklären.

Mithilfe dieser Sequenz wurde **210** als zweites Me-Thioimidat für eine mögliche Totalsynthese von **MB OB3b** erfolgreich erhalten. In einer vierstufigen Synthese ausgehend von der Mischung aus **194** und **195** wurde das Fragment mit einer Gesamtausbeute von 9 % (14 % *brsm*) hergestellt. Problematisch war hierbei die Thionierung zu **209**, die entweder wegen einer Zersetzung des Heterozyklus oder einer Nebenreaktion mit der Boc-Schutzgruppe nur ein verunreinigtes Produkt in einer geringen Ausbeute lieferte.

*3.2.8.3 Synthese des Me-Thioimidats aus iBu-CH(OTBS)-Oxa(OMe)-OMe **202***

Nachdem die Fragmente mit dem Pyr-substituierten Oxazol erfolgreich hergestellt wurden, wurde die analoge Sequenz zur Synthese des TBS-geschützten Me-Thioimidats **217** angewandt (**Schema 80**). Die Verseifung von **202** wurde mit 1 M *aq.* KOH durchgeführt, um einen effizienten Umsatz des im Vergleich zu **194** (vgl. **Schema 78**) noch elektronenreicheren Esters sicherzustellen. Nach 28 h wurde die Reaktion beendet, da neben der Spaltung des Me-Esters auch die Spaltung des TBS-Ethers beobachtet wurde. Die so erhaltene Mischung aus **212** und **213** wurde nicht weiter gereinigt, weil der ungeschützte Alkohol aufgrund der geringeren Nukleophilie und der sterischen Hinderung bei der nachfolgenden Peptidkupplung mit Gly-OMe zu keinen signifikanten Nebenreaktionen führen kann. Diese Reaktion ergab anschließend nach chromatographischer Reinigung sowohl das TBS-geschützte Peptid **214** in 54 % als auch das Peptid mit freiem Alkohol **215** in 20 % über zwei Stufen ausgehend von **202** (**Schema 80**).



***Schema 80**: Synthese des Me-Thioimidatketons **219** aus dem Oxazol **202**.*

215 konnte durch Behandlung mit TBSCl wieder zu **214** in einer isolierten Ausbeute von 71 % überführt werden (**Schema 80**). Die Anwesenheit der Schutzgruppe war aufgrund der Reaktionsbedingungen der nachfolgenden Stufen essentiell. Als erstes ergab die Thionierung von **214** das Thioamid **216** in 33 % Ausbeute. Ähnlich zur Synthese des Pyr-substituierten Thioamids (vgl. **Schema 78**) wurden 24 % des Amids **214** zurückgewonnen (57 % *brsm*).

Eine abschließende Methylierung mit MeOTf bei tiefen Temperaturen lieferte **217** in einer deutlich besseren Ausbeute von 75 % verglichen mit **210** (40 % vgl. **Schema 78**). Die höhere Ausbeute kann damit erklärt werden, dass die bei der Methylierung frei werdenden Protonen nicht zu einer Zersetzung der Seitengruppen führen können. Gegenüber sauren Reaktionsbedingungen ist der TBS-Ether in **217** deutlich stabiler als die Boc-Gruppe in **210**.

Anschließend wurde **217** bis zu Me-Thioimidatfragment **219** umgesetzt (**Schema 80**). Dafür wurde der TBS-Ether als erstes mit TASF/H_2O (1/1) in DMF gespalten. Bei der Herstellung der strukturvereinfachten Derivate hatte sich diese Methode bereits als sehr mild und effektiv erwiesen (vgl. 3.1.13.3). Um eine mögliche Zersetzung während der Säulenchromatographie zu verhindern, wurde Alkohol **218** direkt mittels DMP oxidiert. Bei 0 °C konnte ein vollständiger Umsatz zu Keton **219** beobachtet werden, ohne dass eine Zersetzung des Hydrolyse empfindlichen Me-Thioimidats eintrat. **219** wurde dadurch als Rohprodukt in 61 % Ausbeute erhalten. Zusammengenommen betrug die Gesamtausbeute für die Synthese von **219** als Rohprodukt ausgehend von **202** 10 % über sechs Stufen (17 % *brsm*).

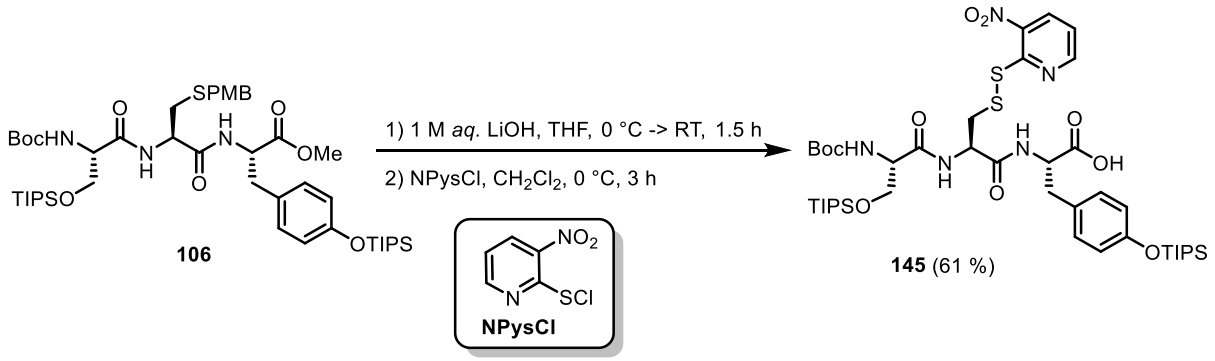
Im Vergleich zu dem Boc-geschützten **210** (14 % über vier Stufen *brsm* vgl. **Schema 78** unter 3.2.8.2) ergab sich daher eine leicht bessere Ausbeute, da die TBS-geschützte Seitenkette weniger empfindlich gegenüber den Reaktionsbedingungen ist als das Boc-geschützte Pyrrolidin.

Mit dem Erhalt des letzten benötigten Me-Thioimidats war der wichtigste Beitrag zur Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu **MB OB3b** geleistet. Die bisher noch nie in der Literatur beschriebenen Me-Thioimidatoxazole konnten durch einen speziell dafür entwickelten Ansatz hergestellt werden. Im nächsten Abschnitt werden die Synthesen der peptidischen Fragmente von **MB OB3b** behandelt.

3.2.9 Synthese der peptidischen Fragmente von MB OB3b

*3.2.9.1 Synthese der NPys-geschützten Carbonsäure **145***

Die Synthese von **145** als nördliches Peptidfragment erfolgte ausgehend von dem Tripeptid **106** (vgl. 3.1.10) mit dem Ziel, die in **Schema 54** unter 3.2.1 beschriebene Disulfid-unterstützte Macrolactamisierung mit dem Thiolamin **144** durchführen zu können. Daher wurde der Ester in **106** als erstes mit 1 M *aq.* LiOH zur Carbonsäure hydrolysiert (**Schema 81**).

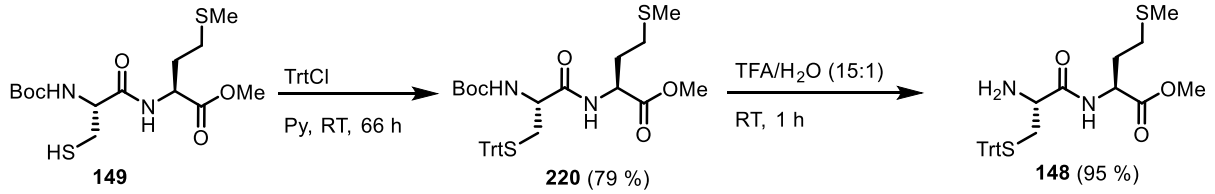


***Schema 81**: Synthese der NPys-geschützten Carbonsäure **145** in zwei Stufen.*

In einem zweiten Schritt wurde diese dann mit NPysCl bei 0 °C in CH_2Cl_2 umgeschützt, sodass **145** in 61 % über zwei Stufen erhalten wurde.

3.2.9.2 Synthese des südlichen Peptids

Um das südliche Peptidfragment von **MB OB3b** herzustellen, wurde die literaturbekannte Verbindung **149** (48 % über zwei Stufen, Literaturausbeute: 50 %[108]) in einem ersten Schritt zu **220** in Anlehnung an die Trt-Schützung eines Thioacetals[134] umgesetzt (**Schema 82**).



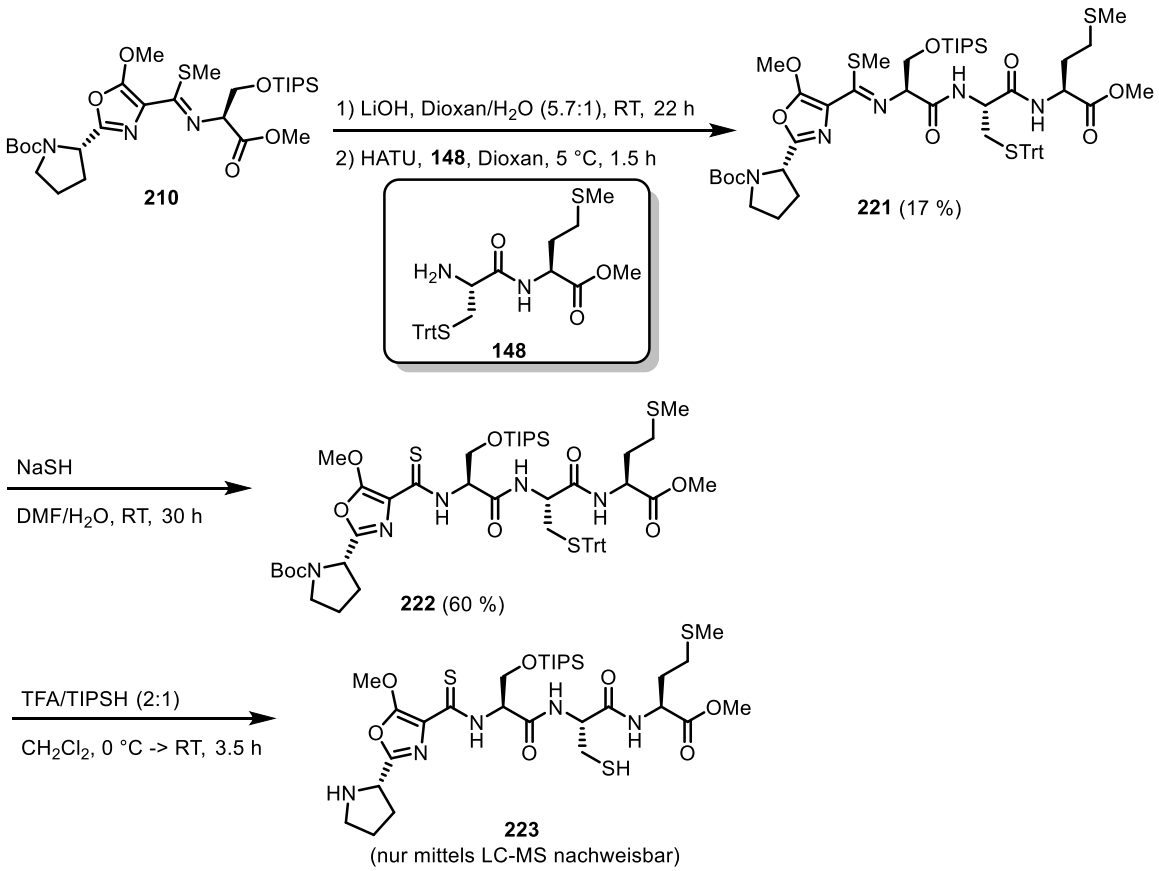
***Schema 82:** Synthese des Amins **148** für eine mögliche Verknüpfung mit den Boc-Pyr-Me-Thioimidaten.*

Da die Boc-Gruppe in **220** als nächstes selektiv gegenüber der Trt-Gruppe gespalten werden musste, wurde eine, aus der Literatur[135] bekannte 15:1 Mischung aus TFA/H_2O Bedingungen eingesetzt. Dies lieferte Amin **148** in nahezu quantitativer Ausbeute von 95 %, das ohne weitere Reinigung in der folgenden VKER eingesetzt werden konnte. Insgesamt betrug die Ausbeute für **148** ausgehend von **149** 75 % über zwei Stufen.

3.2.10 Verknüpfung der Me-Thioimidate mit den peptidischen Fragmenten

*3.2.10.1 Reaktion des Me-Thioimidats **210** mit dem Amin **148** und Entfernung der Schutzgruppen*

Wie anhand der Abschnitte 3.2.6 und 3.2.8 deutlich geworden ist, konnte Thioimidat **210** mit Me-geschütztem Oxazol im Gegensatz zu Thioimidat **206** mit Et-geschütztem Oxazol (vgl. **Schema 77**) effizienter in einer Gesamtausbeute von 9 % *brsm* über acht Stufen erhalten werden. **206** wurde hingegen nur mit einer Gesamtausbeute von 0.4 % *brsm* über 13 Stufen hergestellt. Aus diesem Grund war **210** für eine Totalsynthese von **MB OB3b** vielversprechender und wurde in der nachfolgenden VKER mit dem Trt-geschützten Amin **148** eingesetzt (**Schema 83**).



***Schema 83**: Synthese des Thioimidattetramers **221** aus Me-Thioimidat **210** in einer VKER gefolgt von Demethylierung und doppelter Entschützung zu Thiolamin **223**.*

Nachdem ein vollständiger Umsatz zu Thioimidattetramer **221** beobachtet wurde, ergab die chromatographische Reinigung **221** in einer moderaten Ausbeute von 17 % über zwei Stufen. Verglichen mit den Ausbeuten, die bei der Synthese der Naturstoffderivate erzielt wurden, ist diese nur etwa halb so groß (vgl. 3.1.12). In zukünftigen Stufen sollte

daher eine weitere Optimierung dieses Schritts durchgeführt werden. Eine Möglichkeit könnte sein, die Kupplung unter wasserfreien Bedingungen durchzuführen, um eine denkbare Zersetzung des Oxazol-Thioimidats zu vermeiden.

Für die Demethylierung zu **222** wurde nicht H_2S in MeOH[89] verwendet, da diese Bedingungen nur zu einem langsamen Umsatz von **221** geführt hatten. Vermutlich war H_2S in Kombination mit NEt_3 nicht nukleophil genug, um das im Vergleich zum Ph-Oxa(OEt)-Thioimidat elektronenreichere Thioimidat zu spalten (vgl. 3.1.13.2). Daher wurde NaSH als stärkeres Nukleophil für die Entschützung des Thioamids benutzt.[88] Nach 30 h Reaktionszeit wurde ein vollständiger Umsatz von **221** festgestellt. Das in 60 % Ausbeute erhaltene Rohprodukt wurde im Anschluss direkt in der nachfolgenden Entschützung eingesetzt, die eine simultane Entfernung der Boc- und der Trt-Schutztgruppe beinhaltete.

Für diese zweifache Schutzgruppenentfernung wurde TFA in einer 2:1 Mischung mit TIPSH (10 Äq) in CH_2Cl_2 eingesetzt.[107] Mittels LC-MS konnte nach 3.5 h unter Erwärmen von 0 °C auf RT ein vollständiger Umsatz von **222** beobachtet werden. Nach basischer Aufarbeitung war das gewünschte Produkt jedoch nicht mehr nachweisbar. Es ist möglich, dass der große Überschuss der Reagenzien oder die Bedingungen der Aufarbeitung zu einer Zersetzung von **223** führten.

Zusammengefasst konnten mit den in **Schema 83** beschriebenen Reaktionen erste Versuche zu einer weiteren Funktionalisierung des Me-Thioimidats **221** durchgeführt werden. Weiterhin konnte die prinzipielle Machbarkeit des Ansatzes belegt werden, die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Fragmente einer möglichen Totalsynthese von **MB OB3b** verknüpfen zu können. Es stellte sich heraus, dass die unter 3.1.12 erarbeitete VKER auch auf die hier diskutierten komplexeren Me-Thioimidate anwendbar ist.

Um in Zukunft eine Verbindung mit NPys-Carbonsäure **145** (vgl. **Schema 81**) zu ermöglichen, sollten zunächst die Reaktionen bis zur Stufe des Thioamids **222** optimiert werden, um Thiolamin **223** in quantitativer Menge isolieren zu können. Ausgehend davon sollte die Disulfid-unterstützte Macrolactamisierung mit **145** als Schlüsselreaktion zum Aufbau des Grundgerüsts von **MB OB3b** erfolgen (vgl. **Schema 54** in 3.2.1).

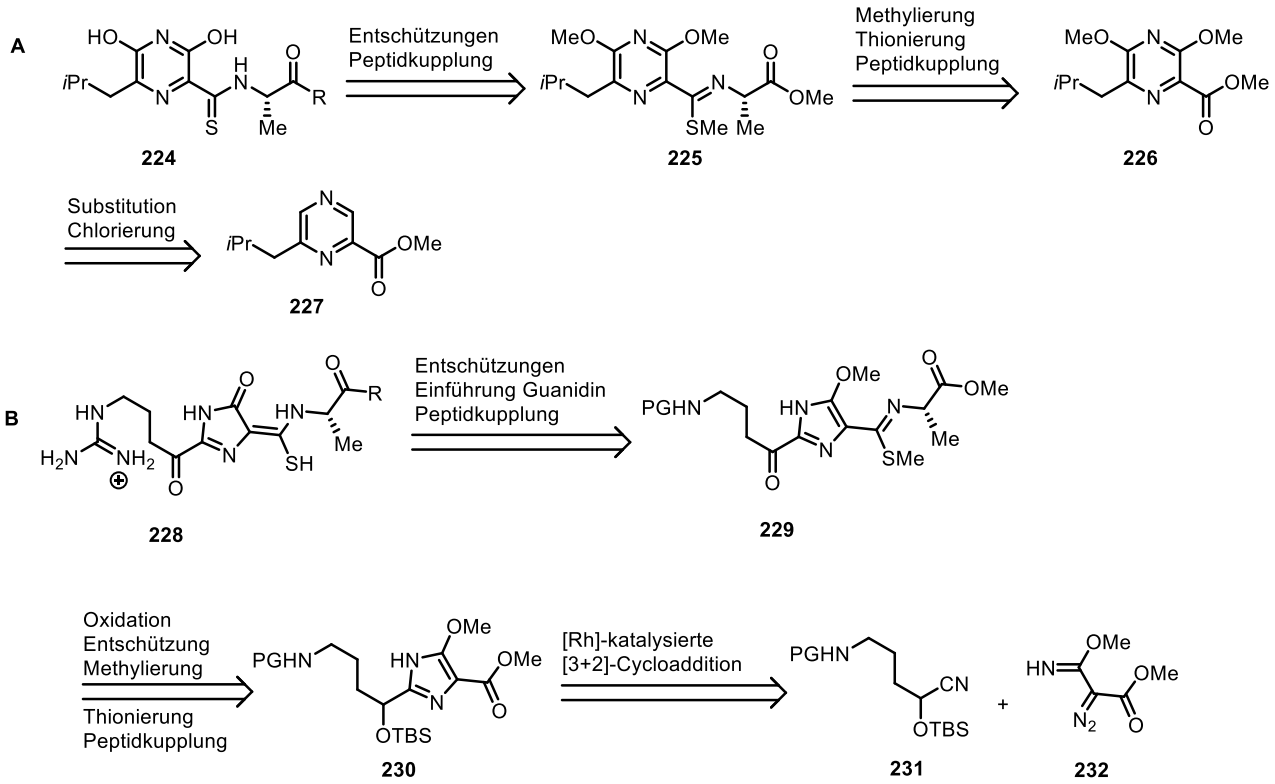
3.2.11 Weiterführende retrosynthetische Analysen anderer bekannter Methanobactine

Neben einer Fertigstellung der Totalsynthese von **MB OB3b** sind die Totalsynthesen der anderen bekannten Methanobactine ebenfalls von Interesse (vgl. **Abbildung 7** in 1.4.2). Daher werden in diesem Abschnitt mögliche Restrosynthesen der charakteristischen Strukturelemente aus den verwandten Cu-Chelatoren diskutiert.

Alle bisher bekannten Methanobactine besitzen mindestens eine Oxa-Koordinationseinheit. Darüber hinaus weisen alle Vertreter der Gruppe I dieser Naturstoffklasse ein intramolekulares Disulfid als charakteristisches Strukturelement auf. Auf Grundlage der in dieser Dissertation entwickelten Synthese der Me-geschützten Oxa-Me-Thioimidate und der in **Schema 53** und **Schema 54** unter 3.2.1 entwickelten Retrosynthese sind diese Strukturelemente bei den, in **Abbildung 7** dargestellten Naturstoffen zugänglich.

Die Vertreter der Gruppe II dieser Naturstoffklasse beinhalten anstelle des Disulfids ein sulfatiertes Thr als strukturgebendes Merkmal zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung (vgl. **Abbildung 7** in 1.4.2). Die Sulfatgruppe könnte durch eine geeignete Schutzgruppenstrategie der Alkohole in einer der letzten Schritte einer möglichen Totalsynthese installiert werden.

Neben den Oxazolonen enthalten Methanobactine auch andere Koordinationsmotive, deren mögliche Retrosynthese in **Schema 84** dargestellt ist.



Schema 84: *Mögliche Retrosynthesen für ausgewählte Heterozyklen aus den in* ***Abbildung 7*** *in 1.4.2 dargestellten Methanobactinen;* ***A****: Pyra-Koordinationseinheit aus* ***MB NR3K****;* ***B****: Imi-Koordinationseinheit aus* ***MB SB2****.*

Bei dem ersten, in **MB NR3K**, **MB SV97**, **MB CSC1**, und **MB M** (vgl. **Abbildung 7** in 1.4.2) auftretenden Koordinationsmotiv handelt es sich um ein Pyrazindiol (Pyra) (**Schema 84** A). Analog zu den letzten Stufen einer möglichen Totalsynthese von **MB OB3b** (vgl. **Schema 53** in 3.2.1) könnte das Pyra-enthaltenden Fragment **224** aus Me-Thioimidat **225** durch eine Entfernung der Schutzgruppen und eine Kupplung mit dem restlichen Peptidfragment des Naturstoffes hergestellt werden. Durch die Anwendung der in dieser Dissertation entwickelten Strategie ist **225** aus Me-Ester **226** zugänglich. Dieser hochsubstituierte Heterozyklus könnte durch eine Chlorierung gefolgt von einer S_NAr aus dem Pyrazin **227** hergestellt werden.[136]

Für einen synthetischen Zugang zu diesen Strukturelementen ist daher eine gesonderte Strategie notwendig und es kann nicht auf die unter 3.2.6 beschriebene Rh-katalysierte [3+2]-Cycloaddition zurückgegriffen werden.

Bei dem zweiten unterschiedlichen, lediglich in **MB SB2** auftretenden Koordinationsmotiv handelt es sich um ein Imidazolon (Imi) (**Schema 84** B). Dieses enthält zudem ein äußerst basisches Guanidin, das aufgrund dieser Eigenschaft zu einem möglichst späten Zeitpunkt der Syntese eingebracht werden sollte.

Unter Berücksichtigung dessen kann das Imi-enthaltende Fragment **228** aus **229** synthetisiert werden.[137] Das Imi-Me-Thioimidat **229** lässt sich analog zu dem nördlichen Oxa-Me-Thioimidat Fragment von **MB OB3b** aus **230** herstellen (vgl. 3.2.8.3). Das hochsubstituierte Imidazol könnte durch die, in dieser Arbeit etablierte [Rh]-katalysierten Cycloaddition zwischen dem TBS-geschützten Cyanhydrin **231** und dem Diazocarbonyl **232** erhalten werden (**Schema 84** B). Aufgrund der höheren Nukleophilie des Stickstoffes sollte das Me-Imidat in **232** hinsichtlich einer Zyklisierung reaktiver als der Me-Ester sein. **232** kann durch Behandlung des entsprechenden Diazonitrils[138] mit HCl in MeOH erhalten werden, da es sich bei Diazocarbonylen um stabile Verbindungen handelt, die unter sauren Bedingungen modifiziert werden können.[139] Anhand der beschriebenen Sequenz wird ersichtlich, dass die, in diesem Kapitel etablierte Strategie ebenso einen Zugang zu dem Imidazolon aus **MB SB2** ermöglichen kann.

3.3 Synthese und Anwendung MB OB3b-basierter Sonden

3.3.1 Verwendung von MB OB3b(Zn) als Ausgangsverbindung für weitere chemische Modifikationen

Nachdem sich die vorangegangenen Kapitel einerseits mit der Synthese strukturvereinfachter Derivate und andererseits mit der Entwicklung eines totalsynthetischen Zugangs zu **MB OB3b** beschäftigten, wird in dem dritten und abschließenden Teil der vorliegenden Arbeit eine Methode zur chemischen Modifikation des Naturstoffes beschrieben.

Aus den unter 1.5 vorgestellten Arbeiten der Arbeitsgruppe um Hans Zischka geht hervor, dass **MB OB3b** ein potentieller Wirkstoff zur Behandlung von MW sein kann.[23] Sowohl bei *in vitro* Versuchen mit Cu-beladenen HepG2-Zellen als auch bei *ex vivo* Versuchen mit isolierten Mitochondrien aus Atp7b-*knock-out* Ratten als Tiermodell für MW konnte **MB OB3b** die Cu-Konzentrationen in den untersuchten Proben deutlicher senken als die bisher zugelassenen Wirkstoffe D-PA und TETA. Darüber hinaus wurde bei *in vivo* Experimenten mit Atp7b-*knock-out* Ratten gezeigt, dass durch eine Gabe von **MB OB3b** *i.p.* der Gehalt an angereicherten Cu signifikant gesenkt werden konnte und dass die erkrankten Versuchstiere unter Verbesserung der allgemeinen Konstitution keine Anzeichen einer starken Leberschädigung mehr aufwiesen. Für die Weiterentwicklung des Naturstoffes zu einem Wirkstoff gegen MW müssen physiologische Parameter, wie die Bioverteilung, Aufnahme- und Exkretions-mechanismen sowie der Metabolismus aufgeklärt werden.

Die Grundlage dafür soll durch die Synthesen **MB OB3b**-basierter Sonden gelegt werden. Es ist dabei von zentraler Bedeutung, dass die Bioaktivität (d. h. eine weiterhin mögliche Koordination von Cu^{+}) des Chelators durch das Anbringen des Markers nicht beeinträchtigt wird. Nach einer erfolgreichen Synthese sollen mit diesen Sonden sowohl Zellversuche als auch erste *in vivo* Studien durchgeführt werden.

In den oben erwähnten Arbeiten wurde der Naturstoff für die Injektionen zur Behandlung der Atp7b-*knock-out* Ratten nicht in seiner *apo*-Form sondern bevorzugt als *prodrug* in Form des Zinkkomplexes **MB OB3b(Zn)** eingesetzt, um den Naturstoff zu stabilisieren. Da die Bindekonstante von **MB OB3b** für ein Zn^{2+}-Ion deutlich unterhalb der für ein Cu^{+}-Ion liegt (vgl. 1.4.2), kann das Zn^{2+} durch Cu^{+} ausgetauscht werden und sich die

thermodynamisch stabilere Verbindung **MB OB3b(Cu)** bilden. Ohne ein chelatisiertes Metallion wurde von den Autor:innen in wässriger Lösung eine hydrolytische Zersetzung von **MB OB3b** beobachtet.[23] Für die beiden Oxazolone (Oxa) beschrieben sie eine Halbwertszeit von ungefähr 100 h (**Abbildung 29**). Diese ließ sich aus der relativen Absorption der Enthiol-substituierten Heterozyklen (vgl. **Abbildung 13** in Kapitel 2) mittels UV-VIS Spektroskopie bestimmen.

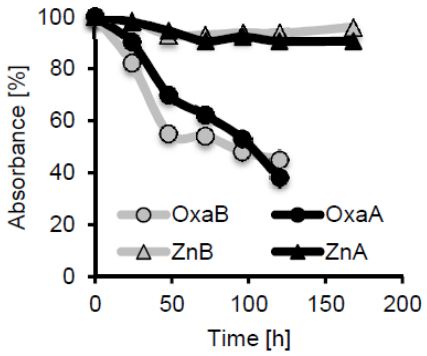
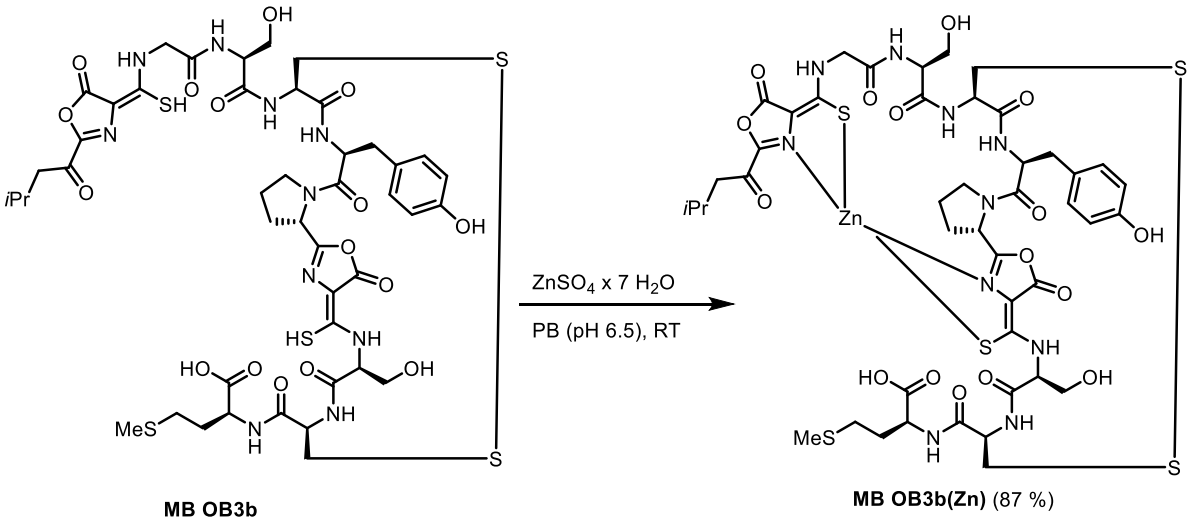


***Abbildung 29**: Relative Absorption der Oxazolone in einer wässrigen Lösung aus **MB OB3b** (OxaA bei 394 nm, OxaB bei 340 nm) und **MB OB3b(Zn)** (ZnA bei 394 nm, ZnB bei 340 nm) über einen Zeitraum von 200 h nach LICHTMANNEGGER et al..*[23]

Eine wesentliche Stabilisierung konnte durch eine Koordination von Zn^{2+} erzielt werden. Dies lässt sich anhand der relativen Absorption der Oxazolone von **MB OB3b(Zn)** nachvollziehen, die im Gegensatz zu der von **MB OB3b** über den beobachteten Zeitraum nur sehr wenig abnahm (**Abbildung 29**). Vermutlich führt die π-Rückbindung des Metallions zu den Oxa-Liganden zu einer Erhöhung der Elektronendichte, was den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls erschwert.

Aus diesem Grund wurde der Naturstoff als erstes in den Zn-Komplex **MB OB3b(Zn)** umgewandelt, um ihn für die nachfolgenden chemischen Modifikationen zu stabilisieren (**Schema 85**). Dafür erfolgte eine schrittweise (10 x 0.1 Äq.) Zugabe einer wässrigen $ZnSO_4$-Lösung zu einer Lösung aus **MB OB3b** in Phosphatpuffer (PB) bei pH 6.5. Im Anschluss wurden die Reaktionsmischung gefriergetrocknet und die anorganischen Salze durch Suspension in MeOH mit anschließender Filtration abgetrennt. Nach dieser Aufarbeitung konnte **MB OB3b(Zn)** im 100 mg-Maßstab mit einer Ausbeute von 87 % isoliert und massenspektrometrisch analysiert werden.

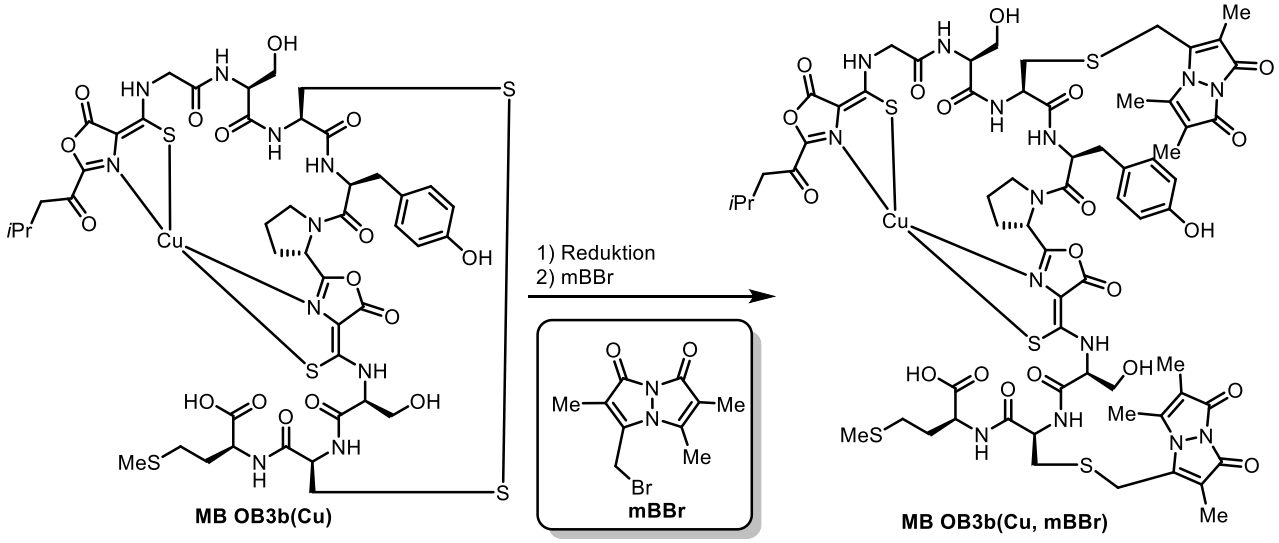


***Schema 85**: Zink-Beladung von **MB OB3b** zu **MB OB3b(Zn)**.*

Aufgrund der moderat starken Bindung konnte bei der Ionisation vorrangig eine Freisetzung des Zn^{2+} beobachtet werden (vgl. 1.4.2). Bei einer ^{1}H-NMR-spektroskopischen Untersuchung von **MB OB3b(Zn)** konnte aufgrund der starken Verbreiterung der Signale keine Zuordnung zu den funktionellen Gruppen erfolgen.

3.3.2 Modifikation der Cys im Peptidrückgrat

Im Gegensatz zur Modifikation von **MB OB3b(Zn)** ist die Modifikation von **MB OB3b(Cu)** bereits bekannt.[140] In der Literatur wird eine Fluoreszenzmarkierung des Cu-Komplexes durch Monobrombinman (mBBr) beschrieben (**Schema 86**).



***Schema 86**: Fluoreszenzmarkierung von **MB OB3b(Cu)** mithilfe von mBBr zu **MB OB3b(Cu, mBBr)** nach BALASUBRAMANIAN et al..*[140]

Dieser Farbstoff weist eine Fluoreszenz bei 405 nm auf, sobald er an ein Thiol gebunden vorliegt. Die Autor:innen konnten damit die Aufnahme von markiertem **MB OB3b(Cu, mBBr)** in methanotrophen Bakterien verfolgen (**mBBr** in **Abbildung 30**). Für einen stärkeren Kontrast färbten sie die Bakterienmembran mit dem roten und lipophilen Farbstoff FM 4-64 an (**FM 4-64** in **Abbildung 30**). Dadurch wurde nachgewiesen, dass die cyan-fluoreszierende Verbindung **MB OB3b(Cu, mBBr)** nach der Aufnahme hauptsächlich im Zytoplasma vorlag (***merge*** in **Abbildung 30**).[140]

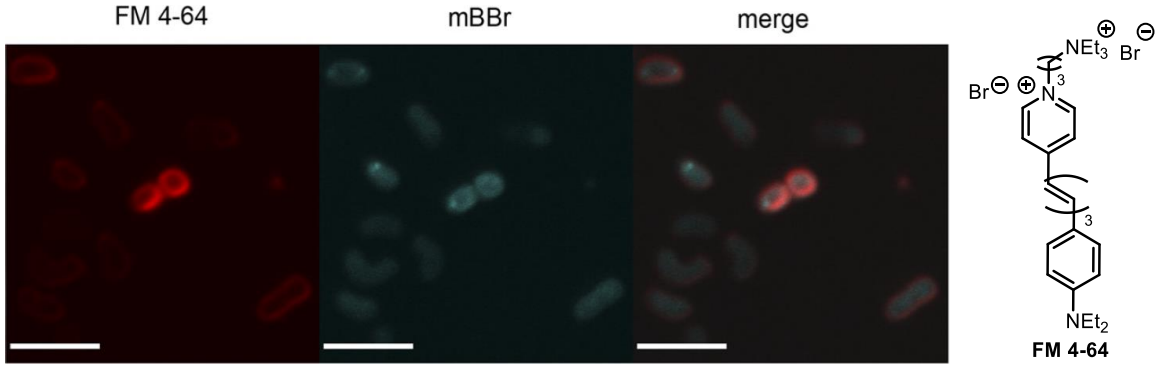
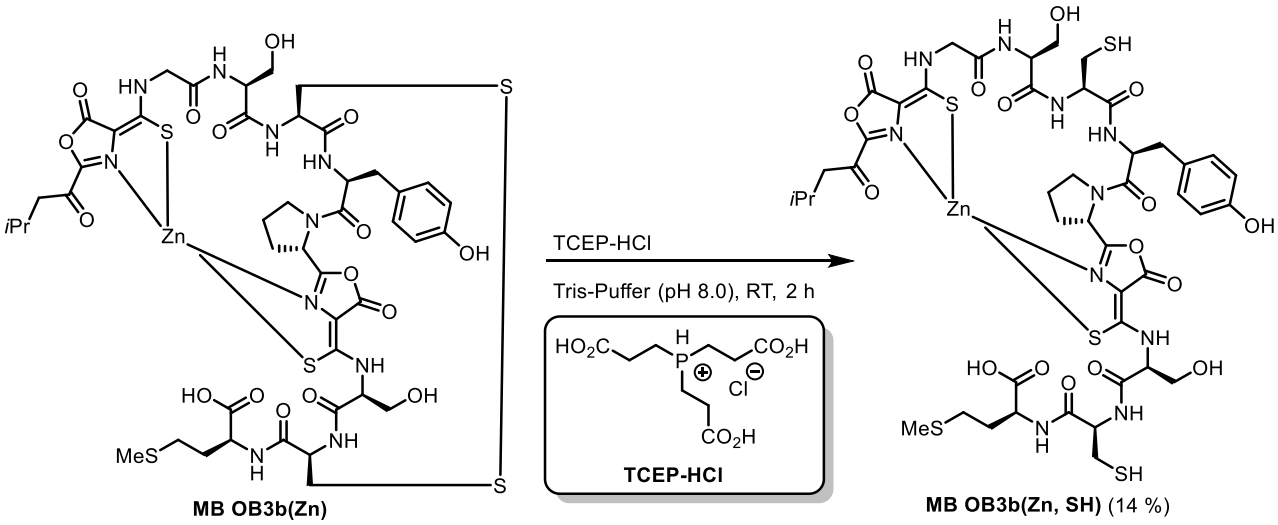


***Abbildung 30**: Fokussierte Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von internalisiertem **MB OB3b(Cu, mBBr)**; modifiziert nach BALASUBRAMANIAN et al.: Cyan (λ = 405 nm): Monobrombiman (**mBBr**); Rot (λ = 543 nm): Membran Farbstoff **FM4-64**. Die weiße Linie entspricht einer Länge von 4 µm.*[140]

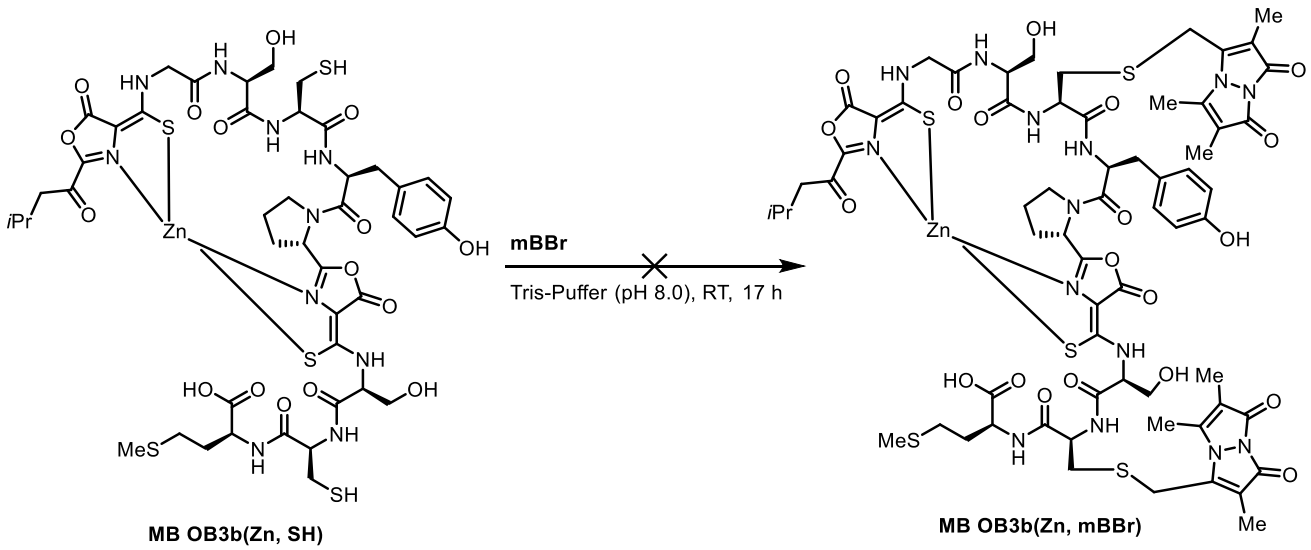
In einem ersten Ansatz war das Ziel, diese Methode für eine analoge chemische Modifikation von **MB OB3b(Zn)** anzuwenden, um eine Zn-beladene und bioaktive mBBr-Sonde zu erhalten. Zur Herstellung dieser Sonde wurde zuerst das interne Disulfid von **MB OB3b(Zn)** zu dem entsprechenden Dithiol reduziert. Dies erfolgte analog zur Reduktion von **MB OB3b(Cu)** unter Verwendung von TCEP-HCl (**Schema 87**).[140]



***Schema 87**: Reduktion des Disulfids von **MB OB3b(Zn)** mit **TCEP-HCl**.*

Dieses wasserlösliche Phosphin wird häufig zur milden Reduktion von Disulfiden in Peptiden oder anderen Naturstoff angewandt.[141] In der veröffentlichten Vorschrift wurde jedoch nicht näher beschrieben, in welchem Lösungsmittel die Reduktion von **MB OB3b(Cu)** durchgeführt wurde.[140] Bei einer Reaktion in PB (pH 6.5) konnte das Dithiol **MB OB3b(Zn, SH)** zwar erfolgreich nachgewiesen werden, das Produkt wurde aber nach einer HPLC-Reinigung in keiner der isolierten Fraktionen wiedergefunden. Eine weiterhin durchgeführte Reduktion in leicht basischem Tris-Puffer (pH 8.0) führte ebenfalls zu einer Bildung von **MB OB3b(Zn, SH)**. Nach einer Reinigung der Reaktionsmischung durch eine HPLC wurde eine Fraktion isoliert, die LC-MS-Analysen zufolge **MB OB3b(Zn, SH)** in geringer Menge enthielt. Hauptsächlich wurden jedoch unbekannte Nebenprodukte in größerer Intensität nachgewiesen.

Anschließend wurde die isolierte Fraktion, wie in der Literatur für die Synthese von **MB OB3b(Cu, mBBr)** beschrieben, mit mBBr[142–144] in Tris Puffer (pH 8.0) zur Reaktion gebracht (**Schema 88**).[140] Da nach 17 h Reaktionszeit mittels LC-MS zwar der Umsatz von **MB OB3b(Zn, SH)**, jedoch keine Bildung des gewünschten Modifikationsprodukts **MB OB3b(Zn, mBBr)** festgestellt wurde, wurde der Ansatz verworfen.



***Schema 88**: Fehlgeschlagene Funktionalisierung des isolierten Dithiols **MB OB3b(Zn, SH)** mit mBBr.*

Eine Synthese von **MB OB3b(Zn, mBBr)** in einer Eintopfreaktion ausgehend von **MB OB3b(Zn)** ohne eine Isolierung von **MB OB3b(Zn, SH)** führte ebenso nicht zum Erfolg. Da durch die Modifikation die Bioaktivität des Methanobactins erhalten werden sollte, wurde kein Versuch unternommen, die literaturbeschriebene Synthese von **MB OB3b(Cu, mBBr)** zu reproduzieren (**Schema 86**).[140]

Zusammenfassend stabilisierte die Koordination von Zn^{2+} **MB OB3b** nicht ausreichend, um **MB OB3b(Zn, SH)** mit mBBr modifizieren zu können. Im Gegensatz zu **MB OB3b(Cu)** führte die Reduktion des internen Disulfids vermutlich zu einer deutlich empfindlicheren Verbindung, die weder die gewünschte Folgereaktion einging, noch chromatographisch isoliert werden konnte.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse lässt sich darauf schließen, dass das stabilitätsgebende, intramolekulare Disulfid von **MB OB3b(Zn)** bei einer chemischen Modifikation erhalten werden muss. Aus diesem Grund muss eine neue Strategie zur Beibehaltung der räumlichen Anordnung des Chelators um das Zentralion entwickelt werden (vgl. **Abbildung 8** in 1.4.2).

3.3.3 *Disulfide-Rebridging* zur Modifikation von MB OB3b(Zn)

3.3.3.1 Literaturbekannte Anwendungen des Disulfide-Rebridging

Eine interessante Methode zur orthogonalen Konjugation von Disulfid-enthaltenden Peptiden ist das *Disulfide-Rebridging* (*DR*).[145] Dabei wird das reduktiv geöffnete Disulfid durch Insertion eines Reagenzes mit thiolspezifischen reaktiven Gruppen wieder geschlossen (**Abbildung 31**). Die erste Gruppe an literaturbekannten Reagenzien basiert darauf, dass die Thiole eine S_N2'-Reaktion mit diesen eingehen (**234**, **235** (gefolgt von einer Michael-Addition), **236**). Die zweite Gruppe fungiert als Akzeptoren für eine Michael-Addition der Thiole (**233** und **239** nach *in situ* Bildung des Akzeptors). Außerdem sind noch Reagenzien bekannt, die eine doppelte Thiol-En (wie im Fall von **238**) oder eine doppelte nukleophile Substitution (im Fall von **237**) eingehen können.

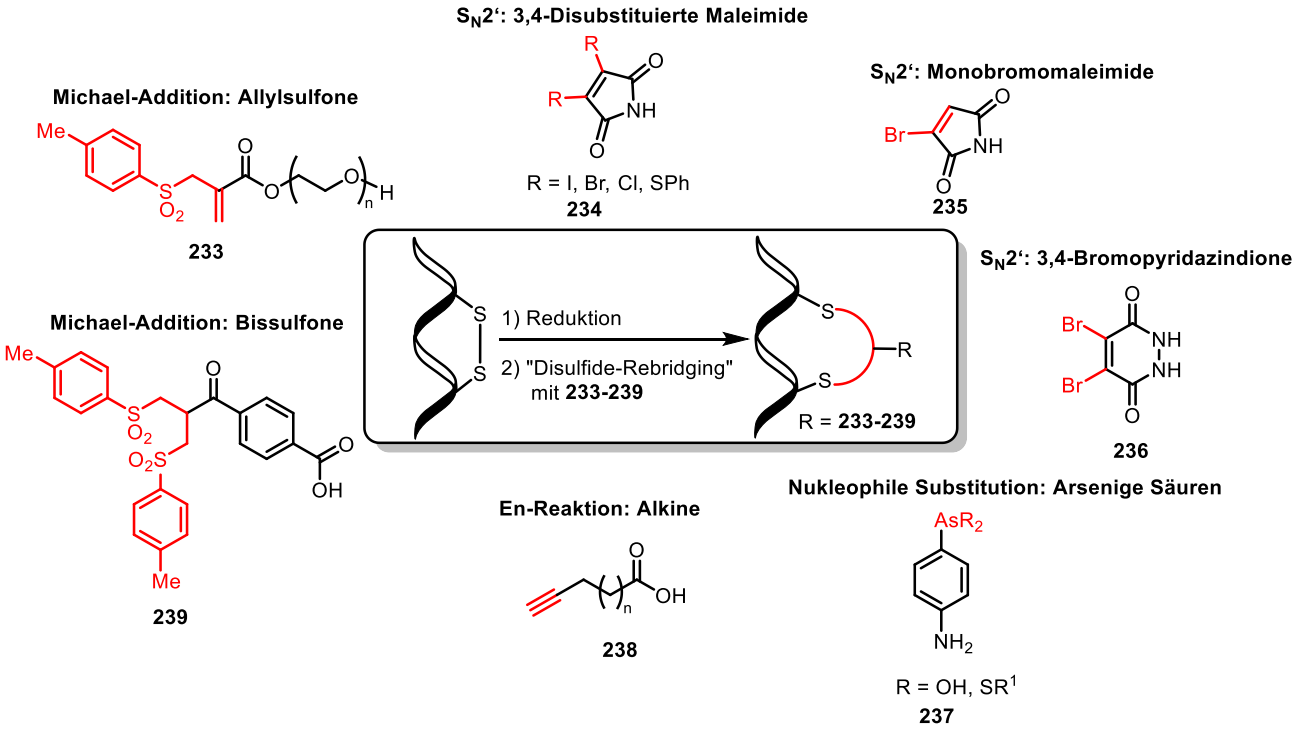
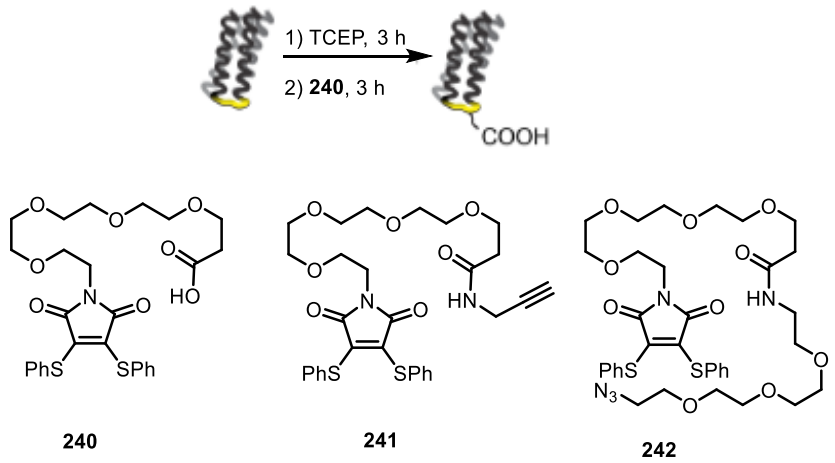


***Abbildung 31**: Prinzip des DR und Übersicht über die dafür in der Literatur verwendeten Reagenzien nach KUAN et al.; Reaktive Gruppen sind in rot gekennzeichnet.*[145]

Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass er eine selektive Modifikation von Disulfiden ermöglicht und dass die modifizierten Naturstoffe ihre strukturelle Integrität beibehalten. Unter Berücksichtigung der genannten Aspekte ist *DR* eine äußerst interessante Methode für die Modifikation von **MB OB3b(Zn)**. Mithilfe dieser könnte das Dithiol **MB OB3b(Zn, SH)** für eine Markierung ausreichend stabilisiert und die Bioaktivität aufgrund der ähnlichen räumlichen Anordnung des Naturstoffes konserviert werden.

In einer kürzlich erschienen Publikation wurden die Dithiophenolmaleimide **240**, **241** und **242** als beispielhafte Vertreter der ersten Gruppe (vgl. **234** in **Abbildung 31**) zum *Rebridging* der Disufid-Brücke (gelb in **Schema 89**) in Leptin verwendet.[146]



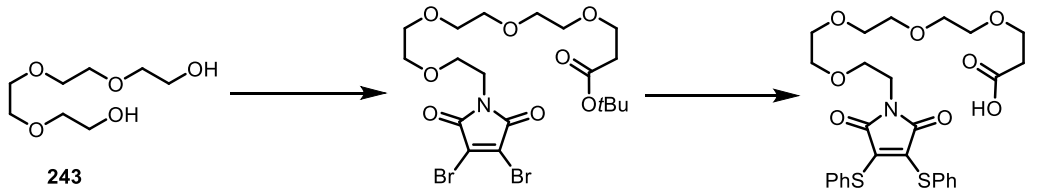
Schema 89: *Exemplarische Modifikation der Disulfidbrücke in Leptin durch DR mit* ***240*** *und weitere in der Publikation beschriebene DR-Linker; Modifiziert nach* MANGINI *et al..*[146]

Durch eine seitenselektive Mono-Funktionalisierung konnten die Autor:innen die gute Anwendbarkeit der Dithiophenolmaleimide für die Modifikation eines Peptids verdeutlichen.

Aufgrund der schnellen Insertion der Dithiophenolmaleimideinheiten von **240**-**242** in ein Disulfid über 3 h (**Schema 89**), sollte es mit dieser Technik möglich sein, die stabilitätsgebende Rolle des Disulfids in **MB OB3b(Zn)** zu bewahren und eine Zersetzung des Modifikationsprodukts (vgl. **Schema 88**) zu verhindern. Daher bestand im Folgenden das Ziel darin, diese Reagenzien für das *DR* von **MB OB3b(Zn)** anzuwenden. Durch die PEG-Ketten der in **Schema 89** dargestellten *DR*-Linker wird darüber hinaus ein geeigneter Abstand zwischen den im Weiteren anzubringenden Markern und der Cu-Bindestelle von **MB OB3b(Zn)** ermöglicht. Ein weiterer Vorteil der PEG-Ketten besteht darin, die Polarität der Modifikationsprodukte zu erhöhen und damit ihre Wasserlöslichkeit zu verbessern.

3.3.3.2 Synthese verschiedener DR-Linker

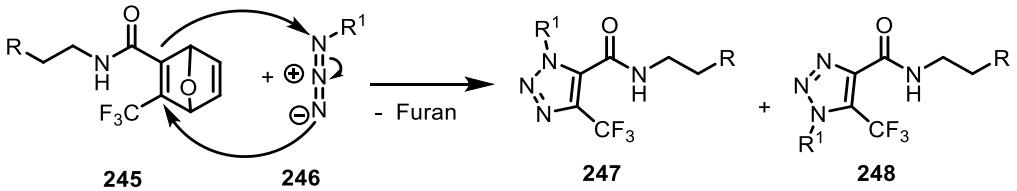
Als erster Schritt zur Synthese der oben beschriebenen *DR*-Linker wurde **240** nach literaturbekannten Bedingungen ausgehend von Tetraethylenglykol **243** in einer Ausbeute von 20 % über vier Stufen hergestellt (**Schema 90**, Literaturausbeute: 32 %).[146,147] Dabei erfolgte zuerst eine Verlängerung der PEG-Kette, eine Mitsunobu-Reaktion mit 3,4-Dibromomaleimid und anschließend eine Spaltung des *t*Bu-Esters sowie eine S_N2‘ Reaktion mit Thiophenol.



***Schema 90**: Übersicht über die literaturbekannte Synthese der Carbonsäure **240** als Ausgangpunkt für DR-Linker zur Modifikation von **MB OB3b**(Zn).*[146,147]

Ausgehend von dem vielseitig einsetzbaren **240** wurden im Folgenden nur *DR*-Linker hergestellt, die in einer kupferfreien Alkin-Azid-Cycloaddition (AAC) mit Aziden oder Alkinen umgesetzt werden können. Die klassische Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition von Alkinen und Aziden unter Verwendung von Cu^+ als Katalysator kann für eine Modifikation von **MB OB3b** nicht angewandt werden.[148] Dabei würde es zu einer irreversiblen Cu-Bindung kommen, wodurch der Naturstoff seine Bioaktivität verlieren würde.

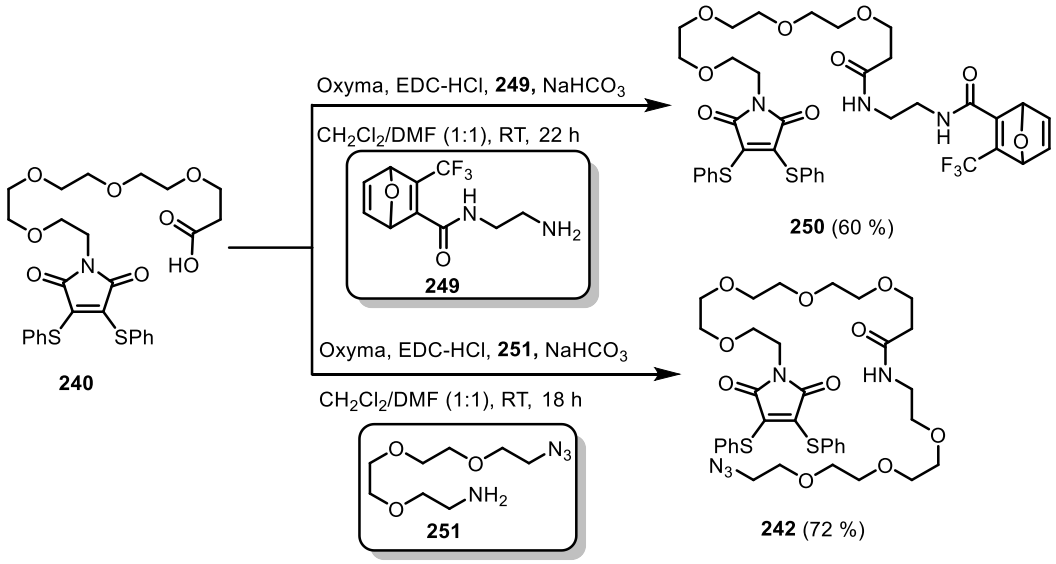
Ein bekannter Vorläufer für eine kupferfreie AAC ist der Rutjes-Linker **245**.[149] Bei Erwärmung auf 40 °C geht **245** eine 1,3-dipolare Cycloaddition mit einem Azid **246** zu **247** oder **248** unter Freisetzung von Furan ein (**Schema 91**). Da bei dieser Reaktion keine Regioselektivität erzielt wird, kommt es zu der Bildung der isomeren Triazole.



***Schema 91**: Mechanismus der 1,3-dipolaren Cycloaddition von **245** und **246** zu den unterschiedlichen isomeren Triazolen **247** und **248**.*[149]

Um die kupferfreie Konjugation mit einem Azid-modifizierten Marker zu ermöglichen, wurde **240** mit dem Rutjes-Linker-Amin **249** zur Reaktion gebracht (**Schema 92**). Diese erfolgte nach den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Bedingungen zur

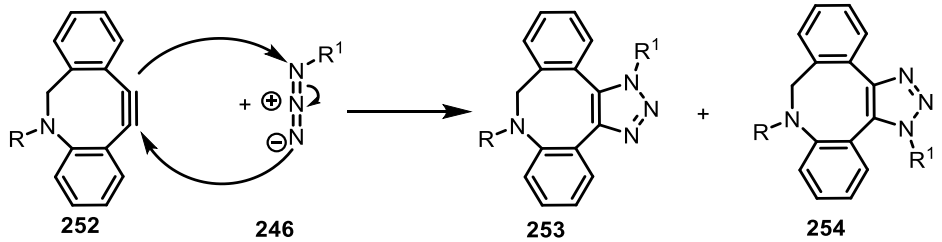
EDC/Oxyma vermittelten Peptidkupplung und lieferte das neuartige *DR*-Reagenz **250** in einer Ausbeute von 60 %. Insgesamt ließ sich **250** in einer Gesamtausbeute von 12 % über fünf Stufen ausgehend von Tetraethylenglykol erhalten.



***Schema 92**: Synthese des neuartigen Rutjes-DR-Linkers **250** und des Azid-DR-Linkers **242**.*

Ein zweites Reagenz als komplementäre Alternative zu dem Rutjes-*DR*-Linker **250**, mit dem eine kupferfreie AAC z. B. mit dem Rutjes-Linker **245** (**Schema 91**) möglich ist, ist der Azid-*DR*-Linker **242**.[146] Dafür wurde **240** mit H_2N-PEG(3)-N_3 **251** umgesetzt und **242** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 72 % gewonnen werden. Die Gesamtausbeute der Sequenz betrug folglich 14 % über fünf Stufen ausgehend von Tetraethylenglykol.

Anschließend an eine *DR*-Modifikation von **MB OB3b(Zn)** mit **242** kann das erhaltene Derivat nicht nur durch Reaktion mit dem Rutjes-Linker **245** sondern auch mit dem Dibenzocyclooctin(DBCO)-modifizierten Molekül **252** in einer s*train-promoted* AAC (SPAAC) konjugiert werden (**Schema 93**).



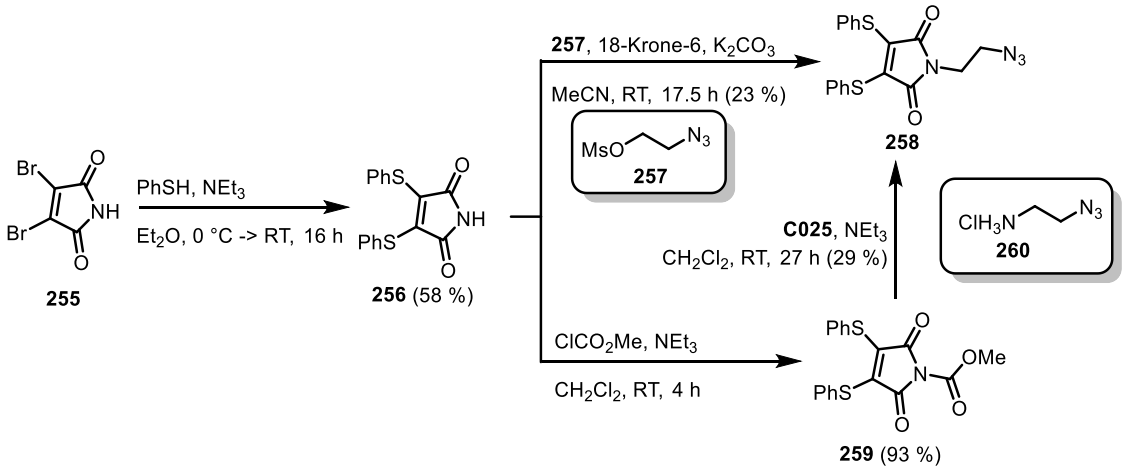
***Schema 93:** Mechanismus der SPAAC zwischen **252** und **246** zu den unterschiedlichen isomeren Triazolen **253** und **254**.*[150]

Diese gespannten, zyklischen Alkine gehen ohne die Anwesenheit eines Katalysators bei RT eine 1,3-dipolare Cycloaddition mit einem Azid **246** zu den entsprechenden

Triazolen **253** oder **254** ein, um als thermodynamische Triebkraft die Ringspannung zu verringern. Wie bei der Reaktion des Rutjes-Linker wird dabei keine regioselektive Bildung eines Triazols erzielt. Diese Methode wurde bereits vielfach in der Literatur angewandt.[150] Der Vorteil der SPAAC besteht darin, dass sie im Gegensatz zur Reaktion mit dem Rutjes-Linker kein Furan frei gesetzt wird und daher spurlos erfolgt. Nachteilig ist, dass durch die Bildung von **253**/**254** das Molekulargewicht im Vergleich zur Bildung von **247**/**248** stärker erhöht wird. Dadurch könnten z.B. die Löslichkeitseigenschaften des Modifikationsprodukts stärker beeinflusst werden.

Obwohl durch die PEG-Ketten in den *DR*-Reagenzien **242** und **250** ein hinreichender Abstand zwischen dem Marker und dem Chelator sichergestellt werden soll, haben diese den Nachteil, das Molekulargewicht des Konjugates deutlich zu erhöhen. Um durch die später erhaltenen Sonden die Bioaktivität von **MB OB3b** aussagekräftig beurteilen zu können, ist es entscheidend, dass die Sonden sich wie der parentale Naturstoff verhalten. Dieses Verhalten kann bei einer zu starken Erhöhung des Molekulargewichts beeinflusst werden.

Zur Synthese eines modifizierten Naturstoffes mit einem geringeren Molekulargewicht, wurde zusätzlich der neuartige *DR*-Linker **258** mit einem C_2-Linker zwischen dem Maleimid und dem Azid synthetisiert (**Schema 94**).



***Schema 94**: Synthese des kürzeren DR-Linkers **258** durch unterschiedliche Sequenzen.*

Dafür wurde als erstes das Dithiophenolmaleimid **256** aus **255** in einer S_N2'-Reaktion mit PhSH gewonnen (Literaturausbeute: 84 %).[151] **256** wurde dann unter Anwendung einer Vorschrift zur Alkylierung von Sulfonamiden mit dem Azidoethylmesylat **257**[152] in MeCN bei RT funktionalisiert.[153] Dabei konnte **258** in einer Ausbeute von 23 % isoliert werden.

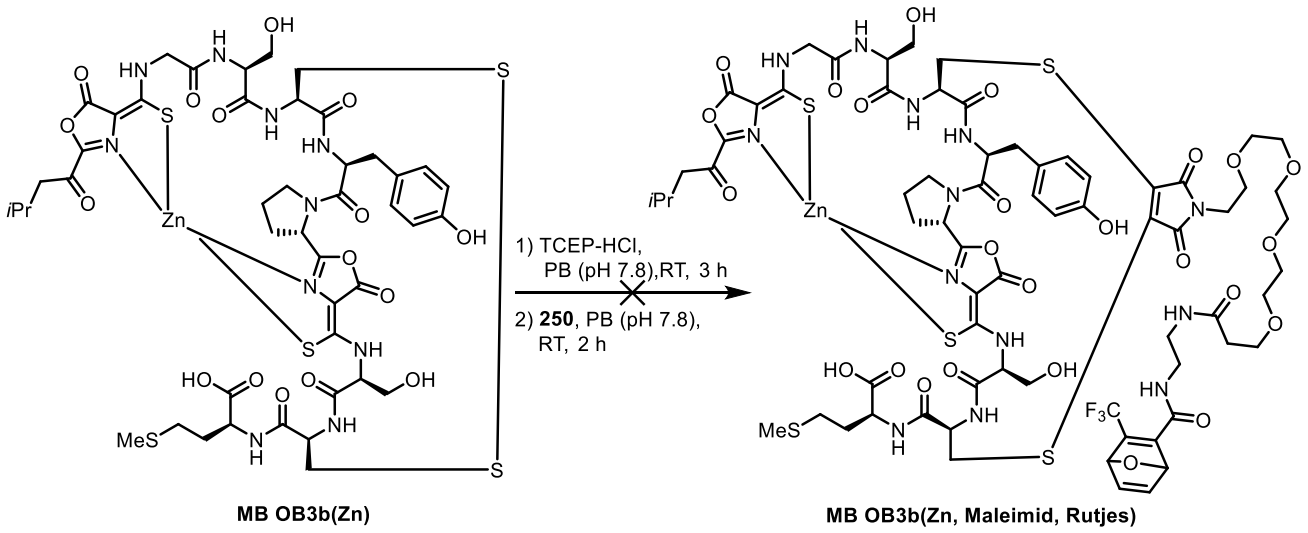
Eine mögliche, die Ausbeute verringernde Nebenreaktion könnte eine Alkylierung der Sulifde sein. Um die geringe Gesamtausbeute von 13 % über zwei Stufen zu erhöhen, wurde zudem eine weitere Synthesestrategie evaluiert. Diese Strategie bestand darin, **256** in einer literaturbekannten Reaktion in das elektrophile Me-Carbamat **259** umzuwandeln (**Schema 94**, Literaturausbeute: 97 %).[154] Dieses wurde in einem weiteren Schritt analog zur Synthese ähnlicher Maleimide mit dem Hydrochlorid **260**[155] umgesetzt.[156] Bei dieser Reaktion wurde nur eine geringfügig höhere Ausbeute für **258** von 29 % erzielt. Eine mögliche Nebenreaktion könnte hier die Substitution der SPh-Gruppen durch **260** sein. Die Gesamtausbeute der Synthese von **258** konnte somit im Vergleich zu der zuvor beschriebenen Sequenz leicht auf 16 % über drei Stufen verbessert werden.

Durch die in diesem Abschnitt diskutierten Arbeiten standen die verschiedenen *DR*-Reagenzien **250**, **242** sowie **258** zur Modifikation von **MB OB3b(Zn)** zur Verfügung.

*3.3.3.3 Reaktionen von **MB OB3b(Zn)** mit den DR-Linkern*

Eine Modifikation des Naturstoffes mit dem Rutjes-Linker **250** (vgl. **Schema 92** in 3.3.3.2) wurde als besonders nützlich angesehen, da das, durch *DR* erhaltene Derivat nachfolgend eine Kondensation mit einem Azid ermöglichen würde. Sehr viele gängige Fluoreszenzfarbstoffe sind als Azidderivate erhältlich. **MB OB3b(Zn, Maleimid, Rutjes)** als *DR*-Produkt würde daher die Synthese einer Vielzahl unterschiedlicher Zielmoleküle ermöglichen.

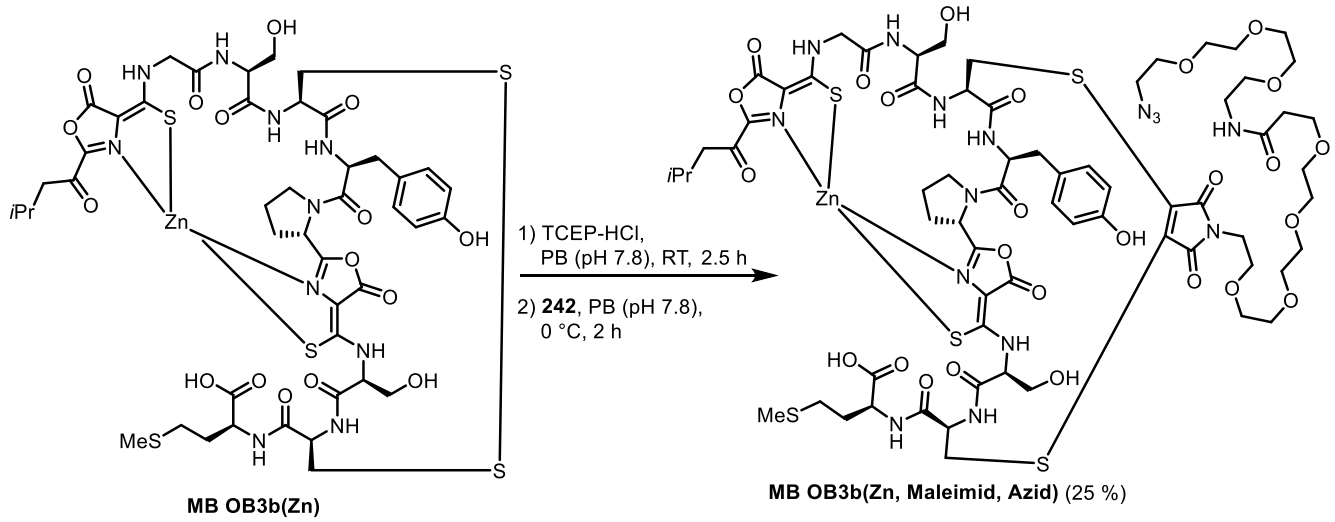
Zur Umsetzung dieses Ziels wurden die, aus der oben beschriebenen Modifikation von Leptin bekannten Bedingungen verwendet (**Schema 95**).[146] Nach Reaktion von **MB OB3b(Zn)** mit TCEP in PB für 3 h bei RT konnte eine vollständige Reduktion des Disulfids zu dem entsprechenden Dithiol mittels LC-MS nachgewiesen werden. Im Anschluss an die Zugabe einer Lösung aus **250** in MeCN wurde jedoch nicht das gewünschte Modifikationsprodukt **MB OB3b(Zn, Maleimid, Rutjes)** sondern nicht näher bestimmbare Zersetzungsprodukte detektiert. Der Wechsel von Phosphat- auf Tris-Puffer (pH 8.0) erbrachte gleichermaßen nicht den erhofften Erfolg.



***Schema 95**: Fehlgeschlagene Modifikation der Disulfidbrücke von **MB OB3b(Zn)** durch den DR-Linker **250**.*

Der Rutjes-Linker schien unter den gewählten Bedingungen eine zu große Tendenz zu besitzen, Nebenreaktionen einzugehen. Es ist denkbar, dass die, nach der Reduktion erhaltenen Thiole von **MB OB3b(Zn, SH)** neben dem *DR* eine Reaktion mit dem MICHAEL-System des Rutjes-Linkers eingehen könnten. Nach der Addition eines Thiols an die Doppelbindung könnte eine *retro*-DIELS-ALDER Fragmentierung des Oxanorbornadiens zu den Zersetzungsprodukten geführt haben.[157]

Aufgrund dessen wurde eine Funktionalisierung von **MB OB3b(Zn)** durch **250** verworfen und als nächstes der Azid-Linker **242** verwendet. Dafür wurde **MB OB3b(Zn)** in PB (pH 7.8) mit 1.5 Äq. TCEP zu Dithiol **MB OB3b(Zn, SH)** reduziert, welches anschließend *in situ* mit 2.0 Äq. des Reagenzes **242** zur Reaktion gebracht wurde (**Schema 96**). Nach dieser Zeit konnte das Modifikationsprodukt **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** erfolgreich detektiert werden.



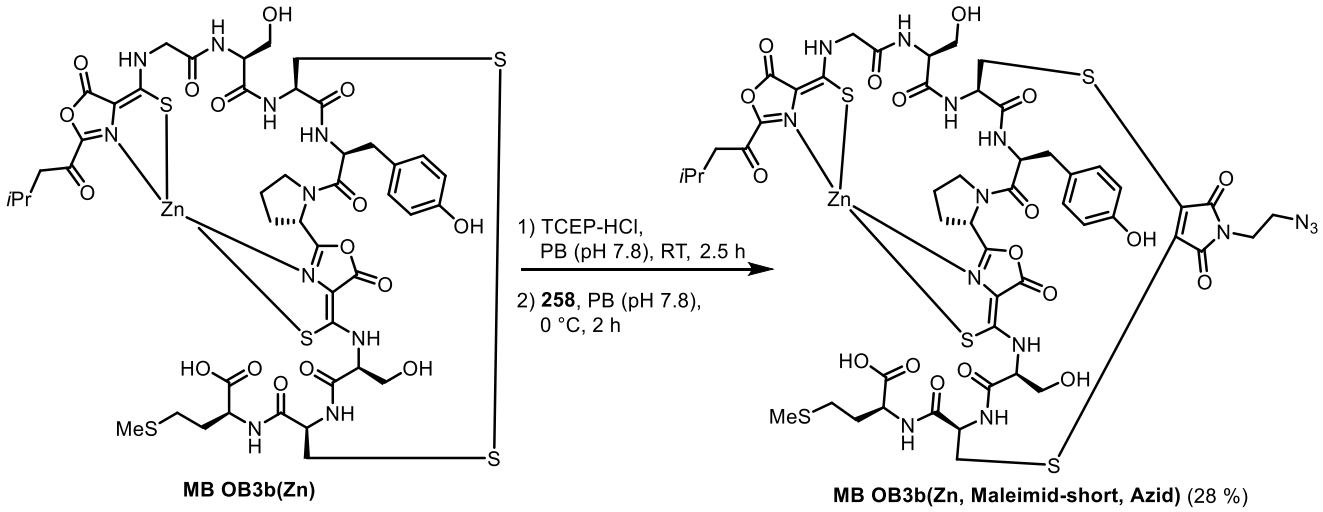
***Schema 96**: Modifikation der Disulfidbrücke von **MB OB3b(Zn)** durch den Linker **242**.*

Dies zeigte, dass **242** unter den gewählten Bedingungen im Gegensatz zu **250** stabil war. Bei der anschließenden Reinigung mittels HPLC war es essentiell, Eluenten als Gemisch mit 10 mM NH_4OAc-Puffer (pH 6.5) zu verwenden, da die standardmäßig zugesetzte TFA (0.05 %) zu einer Zersetzung des Produkts führte. Diese Methode war bereits in der Literatur erfolgreich zur Aufreinigung von **MB OB3b** angewandt worden.[48] Unter diesen Bedingungen konnte **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** in 25 % Ausbeute isoliert werden, was einen sehr guten Wert unter Berücksichtigung der hohen Dichte an komplexen funktionellen Gruppen darstellt.

Zusammengefasst konnte durch das *DR* zum ersten Mal in der Literatur ein modifiziertes **MB OB3b** erhalten werden, das nicht ein Cu chelatisiert. Aufgrund der Stabilität des erhaltenen Naturstoffderivats im Vergleich zu dem Konjugat ohne intramolekulare Disulfidbrücke (vgl. 3.3.2), sollte es weiterhin möglich sein, das Modifikationsprodukt als potentiellen Cu-Chelator einzusetzen.

Dieses vielversprechende Ergebnis legte die Grundlage für die Synthese bioaktiver Sonden, die zu einer Charakterisierung von **MB OB3b** *in vitro* und *in vivo* beitragen können.

Die Modifikation mit dem kürzeren *DR*-Linker **258** (**Schema 97**) konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden und ergab das Produkt **MB OB3b(Zn, Maleimid-short, Azid)** in einer vergleichbaren Ausbeute von 28 %.



***Schema 97**: Modifikation der Disulfidbrücke von **MB OB3b(Zn)** durch den kürzeren DR-Linker **258**.*

Somit standen insgesamt zwei unterschiedliche Modifikationsprodukte mit einer PEG-Kette und einem C_2-Linker zur Verfügung, um diese mit DBCO-modifizierten Markern zu verknüpfen. Prinzipiell wäre auch eine Konjugation mit Markern möglich, die mit einem Rutjes-Linker modifiziert wurden (vgl. **Schema 91** in 3.3.3.2). Aufgrund der kommerziellen Erhältlichkeit von DBCO-modifizierten Farbstoffen und der spurlosen Kondensation mit einem Azid wurden im Folgenden ausschließlich DBCOs als Reaktionspartner verwendet.

*3.3.3.4 Bioaktivität des modifizierten Naturstoffes **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)***

Um beurteilen zu können, ob die Modifikation des Naturstoffes mittels *DR* die Bioaktivität nicht beeinflusst, kann ein Vergleich der Abreicherung von Kupferspiegeln (im Folgenden als „Entkupferung“ bezeichnet) von HepG2-Zellen mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und **MB OB3b(Zn)** herangezogen werden. Die Leberzelllinie HepG2 bietet sich für diesen Vergleich an, da die initialen Tests des Naturstoffes mit diesen Zellen durchgeführt wurden (vgl. 3.3.1) und die Leber der Ort mit der höchsten Cu-Konzentration im Körper ist (vgl. 1.1.1).

Die Untersuchungen wurden durch YASCHAR KABIRI (AK ZISCHKA) am Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zuerst durch Zugabe einer, über den zu beobachtenden Zeitraum nicht toxischen [Cu(His)$_2$]-Lösung mit Kupfer beladen (im Folgenden als „verkupfert“ bezeichnet).[158] Nach einem Aufschluss wurde der Cu und Zn-Gehalt der Zellen mithilfe eines Spectro ARCOS ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*) bestimmt (**[Cu(His)$_2$]** in **Abbildung 32**). Neben einer Analyse der verkupferten Zellen wurden diese vor dem Aufschluss zusätzlich mit einem durch die Chelatoren angereicherten Medium behandelt. Nach der Inkubation mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und **MB OB3b(Zn)** erfolgte eine analoge Bestimmung des Cu- und Zn-Gehalts der Zellen (**Abbildung 32**). Der Zn-Gehalt kann zur Beurteilung der Internalisierung der (zunächst Zink-beladenen) MB-Derivate in die HepG2-Zellen verwendet werden.

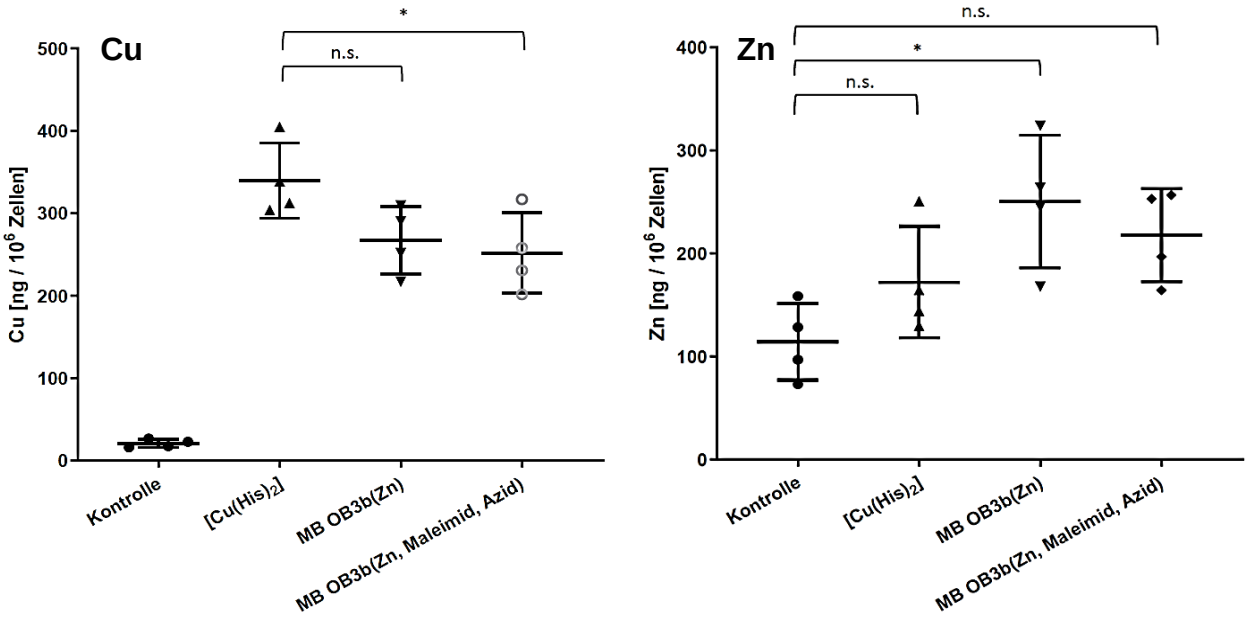


***Abbildung 32**: Cu- und Zn-Gehalt von HepG2-Zellen pro 10^6 Zellen nach unterschiedlicher Behandlung: **Kontrolle**: 48 h Inkubation in Medium; **[Cu(His)$_2$]:** Inkubation in einer 150 µM Lösung aus [Cu(His)$_2$] für 24 h gefolgt von 24 h Inkubation in Medium; **MB OB3b(Zn)**: Inkubation in einer 150 µM Lösung aus [Cu(His)$_2$] für 24 h gefolgt von Inkubation in einer 40 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn)** für 24 h; **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)**: Inkubation in einer 150 µM Lösung aus [Cu(His)$_2$] für 24 h gefolgt von Inkubation in einer 40 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** für 24 h (One-way ANOVA multiple comparisons test. Durchgeführt mit GraphPad Prism 8: n.s.: nicht signifikant, * $p < 0.05$; n = 4).*

Gegenüber den Zellen, die nicht mit den Chelatoren behandelt wurden (**[Cu(His)$_2$]** in **Abbildung 32**) konnte die in den Zellen im Mittel nachgewiesene Menge an Cu sowohl bei einer Behandlung mit **MB OB3b(Zn)** als auch mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** gleichermaßen gesenkt werden. Insgesamt wiesen die Werte aber eine große Streuung

auf. Auf Grundlage der aus den Zellen entfernten Stoffmenge an Cu lässt sich im Weiteren eine Entkupferungseffizienz durch die Inkubation mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und **MB OB3b(Zn)** berechnen (**Tabelle 10**).

***Tabelle 10**: Entkupferungseffizienzen durch die einmalige Inkubation mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und **MB OB3b(Zn)** auf Grundlage der Werte aus **Abbildung 32**: Berechnung der mittleren entfernten Cu-Menge im Vergleich zu dem Wert von **[Cu(His)$_2$]**.*

Eintrag	Methanobactinderivat (120 nmol)	Mittlere entfernte Cu-Menge [ng/10^6 Zellen]	Entkupferungseffizienz pro 10^6 Zellen [nmol(Cu)/nmol(Chelator))]
1	**MB OB3b(Zn)**	72.3±61.4	0.0095
2	**MB OB3b (Zn, Maleimid, Azid)**	87.8±67.1	0.0115

Es zeigte sich, dass im Schnitt 0.95 % des hinzugefügten **MB OB3b(Zn)** und 1.15 % des hinzugefügten **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** zu einer Entkupferung der HepG2-Zellen führte. Im Umkehrschluss waren für die Entfernung eines Cu-Ions durchschnittlich 105 Moleküle **MB OB3b(Zn)** bzw. 87 Moleküle **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** notwendig.

Die gering erscheinenden Effizienzen lassen sich unter dem Aspekt einordnen, dass sie sich auf den Teil der Cu-koordinierenden Methanobactine beziehen, der aus den Zellen in das umgebende Medium transportiert wurde. In diesem Zusammenhang ist es wegen der Größe der Chelatoren wahrscheinlich, dass diese sowohl mit als auch ohne chelatisiertes Cu durch einen aktiven Transport durch die Zellmembran befördert werden.[159] Da in diesem Versuch kein Durchflusssystem verwendet wurde, konnte sich über 24 h ein Gleichgewicht zwischen den Methanobactinen (mit koordiniertem Zn und Cu) im intrazellulären und extrazellulären Raum einstellen. Außerdem ist es aufgrund der vermuteten Aufnahmemechanismen unwahrscheinlich, dass die gesamte Menge der zugegebenen Chelatoren in die Zellen aufgenommen wurde. Des Weiteren wurden bei den unter 3.3.1 beschriebenen *in vivo* Experimenten mit Atp7b-*knock-out* Ratten vergleichbare Entkupferungseffizienzen von 10 % für die Behandlung mit **MB OB3b(Zn)** und von 1 % für die Behandlung mit D-PA bestimmt.[158]

Bei einer Analyse der Zn-Konzentrationen der HepG2-Zellen gegenüber der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde eine Erhöhung des Gehalts festgestellt, die auf eine Aufnahme der Zn-koordinierenden Chelatoren in die Zelle hindeutet. Anhand der **Abbildung 32** lässt sich erkennen, dass die Zn-Konzentration in den HepG2-Zellen, die nur mit [Cu(His)$_2$] behandelt wurden, ebenfalls anstieg. Ein möglicher Grund hierfür ist,

dass die Behandlung von Zellen mit Cu (bzw. Schwermetallen im Allgemeinen) die Expression von Metallothioneinen erhöht, um deren Toxizität abzuschwächen. Dies führt dazu, dass die Zellen durch ihre Zn-Homöostase vermehrt Zink aus dem Medium akkumulieren.[160] Im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit $[Cu(His)_2]$ wurde im Mittel eine erhöhte Zn-Konzentration nach Behandlung mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** (Aufgenommene Zn-Menge: 45.6±70.4 ng/10^6 Zellen) und **MB OB3b(Zn)** (Aufgenommene Zn-Menge: 78.1±84.1 ng/10^6 Zellen) beobachtet (**Abbildung 32**). Aufgrund der großen Streuung der Messwerte waren diese Erhöhungen jedoch nicht signifikant. Daher lässt sich die angestiegene Zn-Konzentration in den verkupferten Zellen nach der Behandlung mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und **MB OB3b(Zn)** nicht vollständig auf die Internalisierung der Chelatoren zurückführen.

In einem weiteren Experiment sollte durch eine Mehrfachbehandlung der verkupferten HepG2-Zellen mit den Methanobactinen der Fluss im lebenden Organismus simuliert werden. Daher wurden die Zellen wiederholt für 12 h mit einer gleichen Konzentration der Chelatoren versetzt und die Metallgehälter wie zuvor bestimmt (**Abbildung 33**).

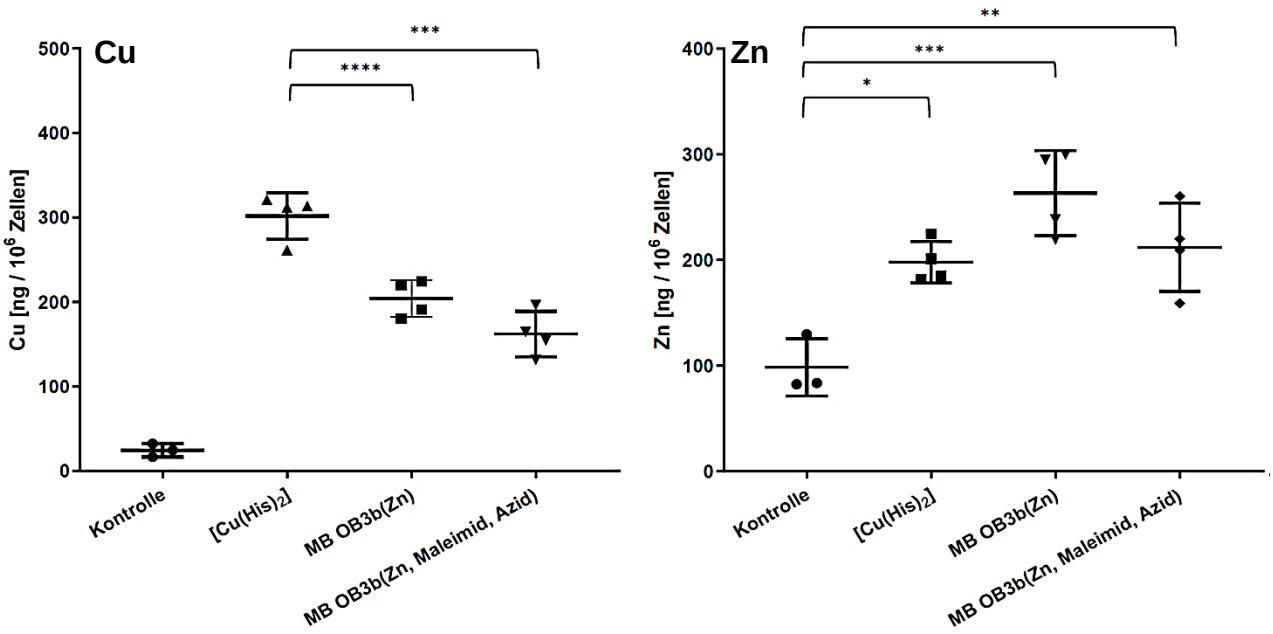


***Abbildung 33**: Cu- und Zn-Gehalt von HepG2-Zellen pro 10^6 Zellen nach unterschiedlicher Behandlung: **Kontrolle**: 48 h Inkubation in Medium; **[Cu(His)$_2$]:** Inkubation in einer 150 µM Lösung aus $[Cu(His)_2]$ für 24 h gefolgt von 24 h Inkubation in Medium; **MB OB3b(Zn)**: Inkubation in einer 150 µM Lösung aus $[Cu(His)_2]$ für 24 h gefolgt von einer zweimaligen Inkubation in einer 40 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn)** für 12 h; **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)**: Inkubation in einer 150 µM Lösung aus $[Cu(His)_2]$ für 24 h gefolgt von einer zweimaligen Inkubation in einer 40 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** für 12 h (One-way ANOVA multiple comparisons test. Durchgeführt mit GraphPad Prism 8: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001; n = 4).*

Im Vergleich zu den in **Abbildung 32** dargestellten Metallwerten der HepG2-Zellen konnte durch die zweifache Behandlung mit beiden Naturstoffderivaten für 12 h eine

deutlich signifikantere Verringerung der Kupferionen-Konzentration gegenüber **[Cu(His)$_2$]** erreicht werden (**Abbildung 33**). Dabei konnte gezeigt werden, dass die hervorgerufenen Entkupferungen durch **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und **MB OB3b(Zn)** sich additiv verhielten (größere Mittlere entfernte Cu-Menge als bei einer Einfachbehandlung mit 120 nmol). Mithilfe dieses vielversprechenden Ergebnisses konnte der Erhalt der Bioaktivität in dem modifizierten **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** (vgl. 3.3.3.3) bestätigt werden. Im Mittel zeigt die Behandlung mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** sogar eine Tendenz zu einer stärkeren Entkupferung der HepG2 Zellen als die Behandlung mit **MB OB3b(Zn)**.

Analog zu der Einfachbehandlung für 24 h lassen sich die Entkupferungseffizienzen pro 10^6 Zellen bei der doppelten Behandlung mit den Chelatoren berechnen (**Tabelle 11**). Die Werte für die mittlere entfernte Cu-Menge wiesen bei diesem Experiment eine deutlich kleinere Standardabweichung auf. Die Entkupferungseffizienzen liegen jedoch unterhalb denen, die bei der Einfachbehandlung erzielt wurden.

***Tabelle 11**: Entkupferungseffizienzen durch die zweimalige Inkubation mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und **MB OB3b(Zn)** auf Grundlage der Werte aus **Abbildung 33**: Berechnung der mittleren entfernten Cu-Menge im Vergleich zu dem Wert von **[Cu(His)$_2$]**.*

Eintrag	Methanobactinderivat (2x120 nmol)	Mittlere entfernte Cu-Menge [ng/10^6 Zellen]	Entkupferungseffizienz pro 10^6 Zellen [nmol(Cu)/nmol(Chelator))]
1	**MB OB3b(Zn)**	97.7±34.9	0.0064
2	**MB OB3b (Zn, Maleimid, Azid)**	138.6±38.3	0.0091

Vermutlich fand über 24 h im Gegensatz zu der doppelten Behandlung über 12 h eine effektivere Einstellung des Gleichgewichts zwischen den internalisierten und den Methanobactinen im Medium statt.

Um die Wirksamkeit einer solchen Mehrfachbehandlung zu steigern, könnte in Zukunft das Intervall der Zugabe von den Methanobactinen verlängert werden. Dabei wären zwei verschiedene Experimente von Interesse. Einerseits könnte eine Doppelbehandlung mit jeweils 120 nmol über 24 h erfolgen. Andererseits wäre eine zweimalige Gabe von jeweils 60 nmol über 12 h möglich. Der erste Versuch würde Informationen darüber liefern, ob die wiederholte Ausführung der zuerst beschriebenen Einfachbehandlung zu einer zweifach höheren Entkupferung bei gleicherbleibender Entkupferungseffizienz führen würde. Der zweite Versuch könnte verdeutlichen, ob eine

schrittweise Zugabe der bei der Einfachbehandlung verwendeten Menge Chelator eine höhere Entkupferungseffizienz ermöglichen kann.

Im Vergleich zu der nicht behandelten Kontrollgruppe konnte in allen Fällen eine signifikante Erhöhung des Zn-Gehalts nachgewiesen werden. Verglichen mit der alleinigen Inkubation mit [$Cu(His)_2$] wurde wie der Einfachbehandlung eine erhöhte Zn-Konzentration nach Behandlung mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** (Aufgenommene Zn-Menge: 14.1±46.0 ng/10^6 Zellen) und **MB OB3b(Zn)** (Aufgenommene Zn-Menge: 65.3±44.8 ng/10^6 Zellen) nachgewiesen (**Abbildung 33**). Die große Streuung der Messwerte führte dazu, dass die Erhöhungen wieder nicht signifikant waren. Es ist auffällig, dass die mittleren aufgenommenen Zn-Mengen bei einer doppelten Inkubation mit den Zn-haltigen Verbindungen niedriger als die bei der oben beschriebenen Einfachbehandlung waren. Vermutlich verhindert die hochregulierte Homöostase eine weitere Aufnahme des Metallions. Aus diesem Grund stellt der Zn-Gehalt kein geeignetes Kriterium zur Beurteilung der Internalisierung der (zunächst Zink-beladenen) MB-Derivate in die HepG2-Zellen dar. Für einen abschließenden Beweis der Aufnahme in die Zellen sollten stattdessen Studien mit **MB Ob3b**-basierten Sonden herangezogen werden, da sich die durch **MB OB3b(Zn)** und **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** hervorgerufene signifikante Entkupferung der Zellen (**Abbildung 33**) nur mit einer Internalisierung der Methanobactinderivate in die Zellen erklären lässt.

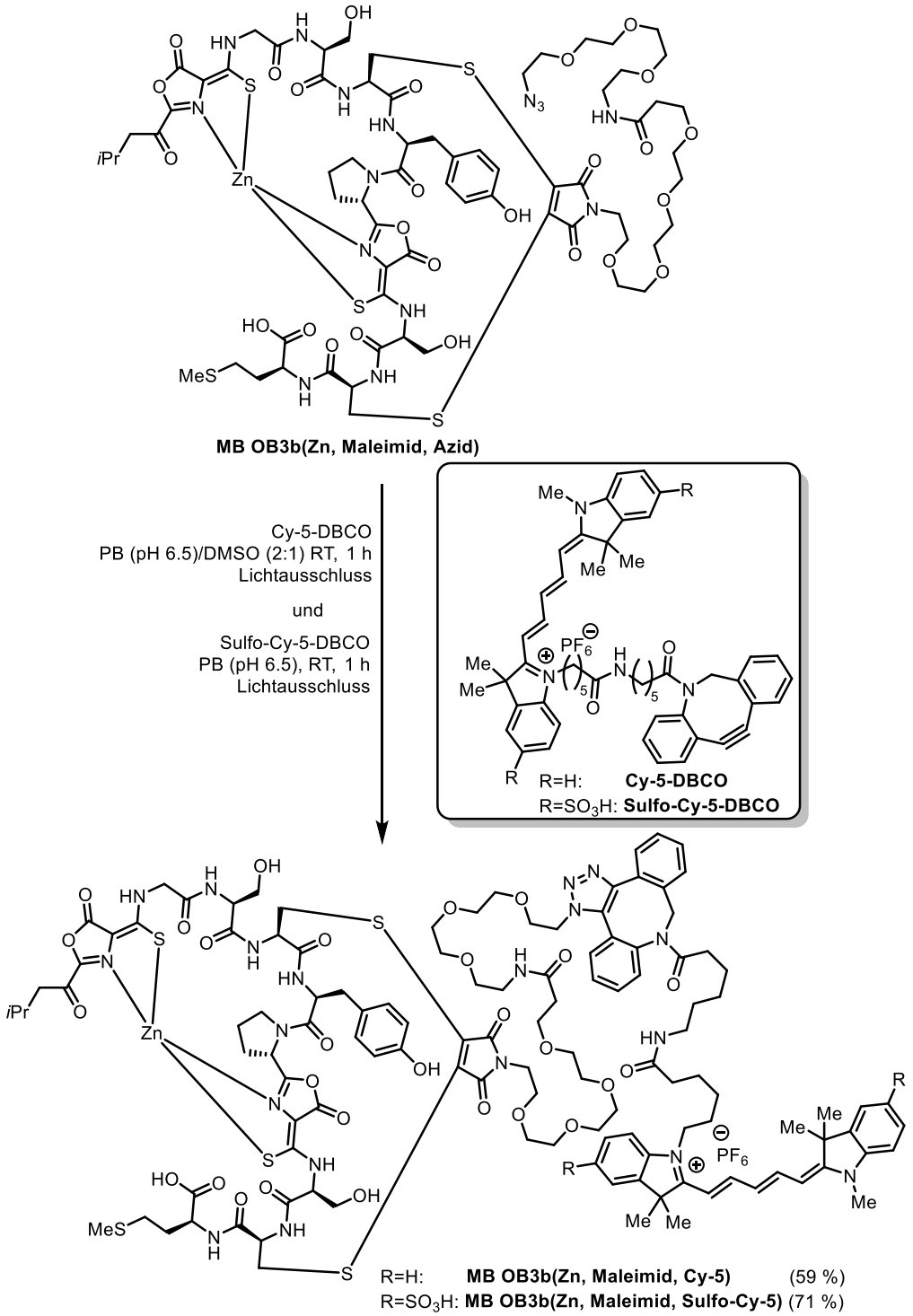
Mit den in diesem Abschnitt durchgeführten Experimenten konnte die Nützlichkeit des *DR* zur Modifikation von **MB OB3b** unter Beibehaltung der Bioaktivität unterstrichen werden. Da sich **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** in den *in vitro* Experimenten genauso wie das Ausgangmaterial **MB OB3b(Zn)** verhielt, können die im nächsten Abschnitt beschriebenen Sonden zur Aufklärung der unter 3.3.1 aufgeführten physiologischen Parameter sowie zu einem Nachweise für die Internalisierung in die Zellen verwendet werden.

3.3.4 Verknüpfung des modifizierten Naturstoffes mit DBCO-tragenden Markern

3.3.4.1 Reaktionen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

Zur Synthese der fluoreszenzbasierten **MB OB3b**-Sonden wurde die Verknüpfung mit einem DBCO-modifizierten Farbstoff mittels SPAAC durchgeführt (vgl. **Schema 93** in 3.3.3.2). Dieser Farbstoff sollte ein möglichst weit rotverschobenes Anregungs- und Emissionsmaximum aufweisen, um durch das verwendete Laserlicht einerseits nicht die chromophoren Oxa-Einheiten (λ_{max} = 394 nm und λ_{max} = 340 nm)[23] und andererseits nicht die Autofluoreszenz der Zellen (λ = 350-500 nm)[161] anzuregen. Daher bot sich der von Lumiprobe kommerziell erhältliche Farbstoff Cy-5-DBCO (λ_{max} (Ex) = 646 nm und λ_{max} (Em) = 662 nm) an.[162]

Für eine Synthese der Cy-5-basierten Sonde wurde eine Lösung aus Cy-5-DBCO in DMSO zu einer Lösung des modifizierten Naturstoffes mit einer PEG-Kette **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** in PB (pH 6.5) gegeben (**Schema 98**). Dieser Puffer wurde gewählt, da er bereits zur Synthese von **MB OB3b(Zn)** verwendet wurde und daher ein pH-Wert von 6.5 für MB-Derivate ideal ist (vgl. pH-Wert für die HPLC-Reinigung von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)**). Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde ein vollständiger Umsatz zu dem entsprechenden markierten Produkt **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** mittels LC-MS festgestellt. Nach Reinigung mittels HPLC mit 10 mM NH_4OAc-Puffer (pH 6.5) enthaltenden Laufmitteln wurde dieses in 59 % Ausbeute erhalten. Es ist möglich, dass eine bessere Ausbeute des gewünschten Produkts durch eine Nebenreaktion der Oxazolon-Enthiole mit dem gespannten Cyclooctin nach einer Freisetzung des Zn^{2+} in der Reaktionsmischung verhindert wurde.



***Schema 98**: SPAAC mit **Cy-5-DBCO** und **Sulfo- Cy-5-DBCO** zu Fluoreszenz-markierten Sonden **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** und **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)**. Die anderen Isomere aus den SPAAC sind aufgrund der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.*

Es stellte sich heraus, dass **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** aufgrund des hydrophoben Farbstoffes nur moderat wasserlöslich war. Um eine Sonde mit verbesserter Wasserlöslichkeit zu erhalten, wurde zusätzlich der polarere Farbstoff Sulfo-Cy-5-DBCO mit den gleichen spektralen Eigenschaften wie Cy-5-DBCO zur Markierung von

MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid) mittels SPAAC eingesetzt (**Schema 98**).[163] Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit des Farbstoffes konnte in der Reaktion auf die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel verzichtet werden. Die Umsetzung des Azid-modifizierten Naturstoffes unter den gleichen Bedingungen wie zuvor ergab das wasserlösliche Produkt **MB OB3b(Zn, Maleimid, Sulfo-Cy-5)** in 71 % isolierter Ausbeute (**Schema 98**). Es wurde ergänzend untersucht, ob die Konjugation von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** mit den Cy-5 Farbstoffen einen Einfluss auf die Anregungs- und Emissionswellenlänge der Farbstoffe hatte (**Abbildung 34**). Anhand der aufgenommenen Spektren von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** ist zu erkennen, dass sich das Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von λ = 646 nm und das Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von λ = 662 nm befindet. Diese Werte sind deckungsgleich mit den, von dem Hersteller angegebenen Maxima.[162] Die Naturstoffmodifikation führte dementsprechend nicht zu einer Veränderung der spektralen Eigenschaften des Farbstoffes.

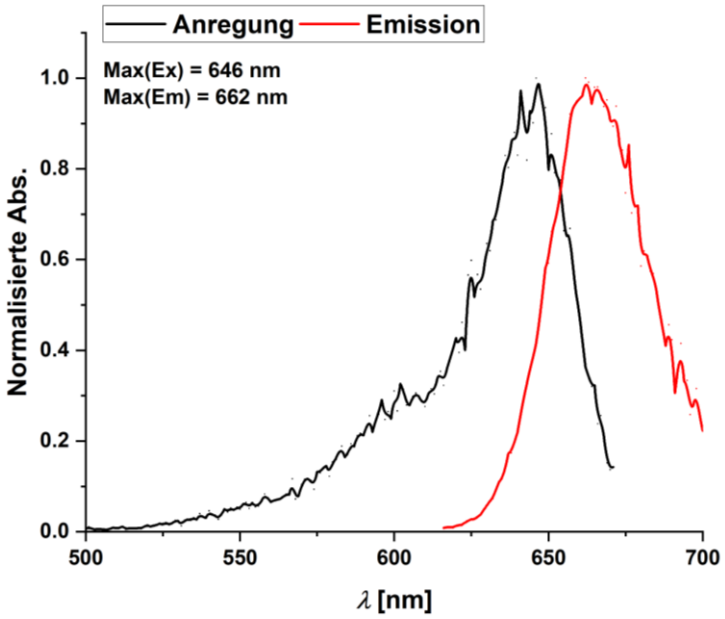


Abbildung 34**: Anregungs- und Emissionsspektrum von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5).

Neben den *in vitro* Fluoreszenzmessungen besteht außerdem die Möglichkeit, mit einem geeigneten Farbstoff *in vivo* Messungen mittels fluoreszenzoptischer Bildgebung durchzuführen.[164,165]

Diese Messungen werden in einem Wellenlängenbereich von λ = 700-900 nm und damit im Nahinfrarot (NIR) durchgeführt, da in diesem diagnostischem Fenster endogene Moleküle wie Hämoglobin (Hb), Oxyhämoglobin (HbO_2), Melanin und vor allem H_2O im Gegensatz zu, sichtbaren Bereich (VIS) eine geringe Absorption aufweisen (**Abbildung 35** A).[166] Dadurch kann das Nahinfrarotlicht bis zu einige Zentimeter tief in das Gewebe eindringen.

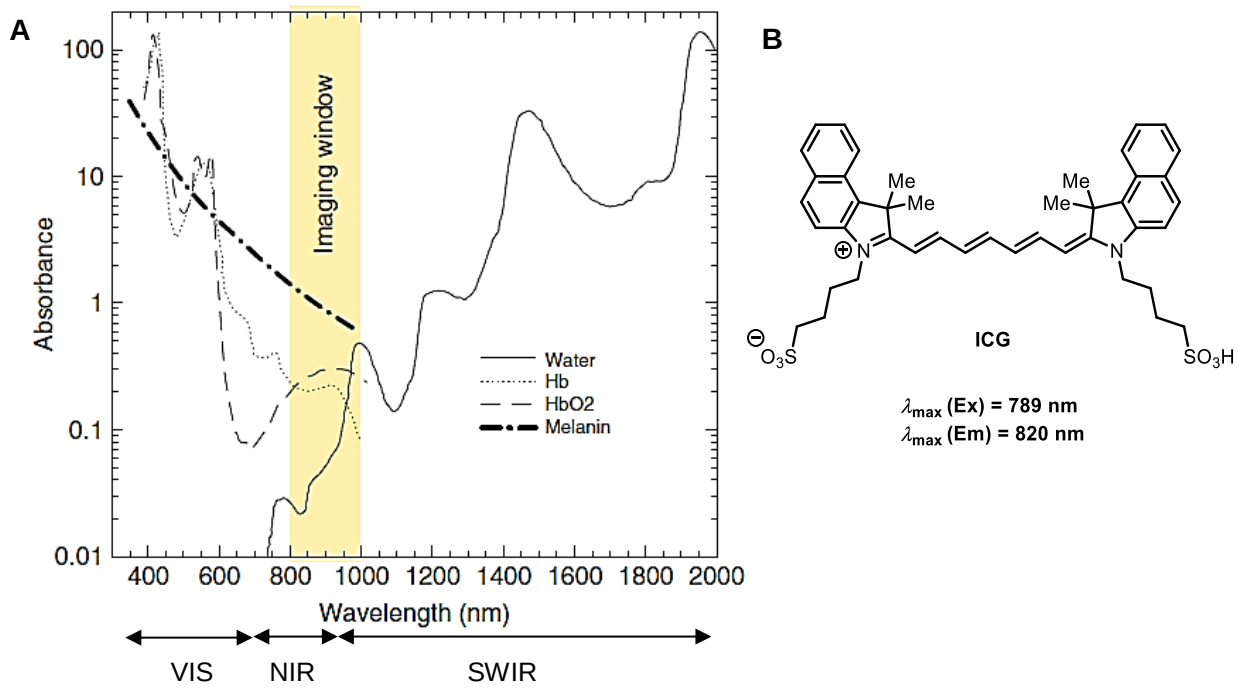


***Abbildung 35: A**: Absorption endogener Moleküle wie Wasser, Hämoglobin (Hb), Oxyhämoglobin (HbO_2) und Melanin im Bereich von λ = 400-2000 nm modifiziert nach ALTINOĞLU et al.; der Bereich mit der größten optischen Transmission ist das diagnostische Fenster (Imaging window)*[166]*; **B**: Struktur und Eigenschaften des klinisch genutzten NIR-Fluoreszenzfarbstoffs Indocyaningrün (ICG).*[167]

Insgesamt lässt sich aufgrund des guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses im NIR-Bereich eine kontrastreiche Bildgebung mit hoher Auflösung durchführen.

Die fluoreszenzoptische Bildgebung konnte durch technische Fortschritte im Laufe der letzten Jahre auf den Bereich des kurzwelligen Infrarotlichtes (SWIR, λ = 900-2500 nm) ausgeweitet werden.[168] Aufgrund der noch geringeren Absorption der physiologischen Moleküle, kann ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis und eine bessere Auflösung *in vivo* erzielt werden. Kontraintuitiv zu der stärkeren Absorption von H_2O im

SWIR-Bereich (**Abbildung 35** A) konnten CARR *et al.* zeigen, dass bei einer hohen Konzentration der entsprechenden Sonde und bei einer Unterdrückung von Hintergrundsignalen ein hoher Kontrast ermöglicht werden konnte.[169] Diesbezüglich ist anhand von **Abbildung 36** zu erkennen, dass bei der fluoreszenzoptischen Untersuchung eines Rattenkopfes bei λ = 1000-1700 nm (NIR-II) die Gefäße mit einer größeren Schärfe sichtbar sind als bei λ = 850-900 nm (NIR-I).[170]

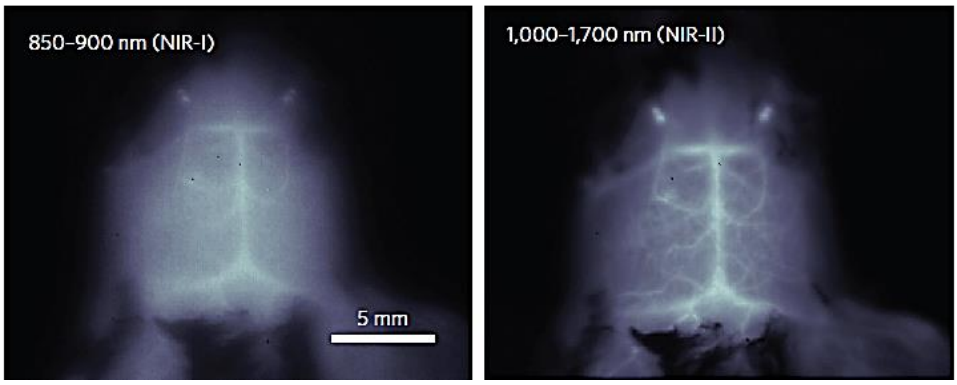
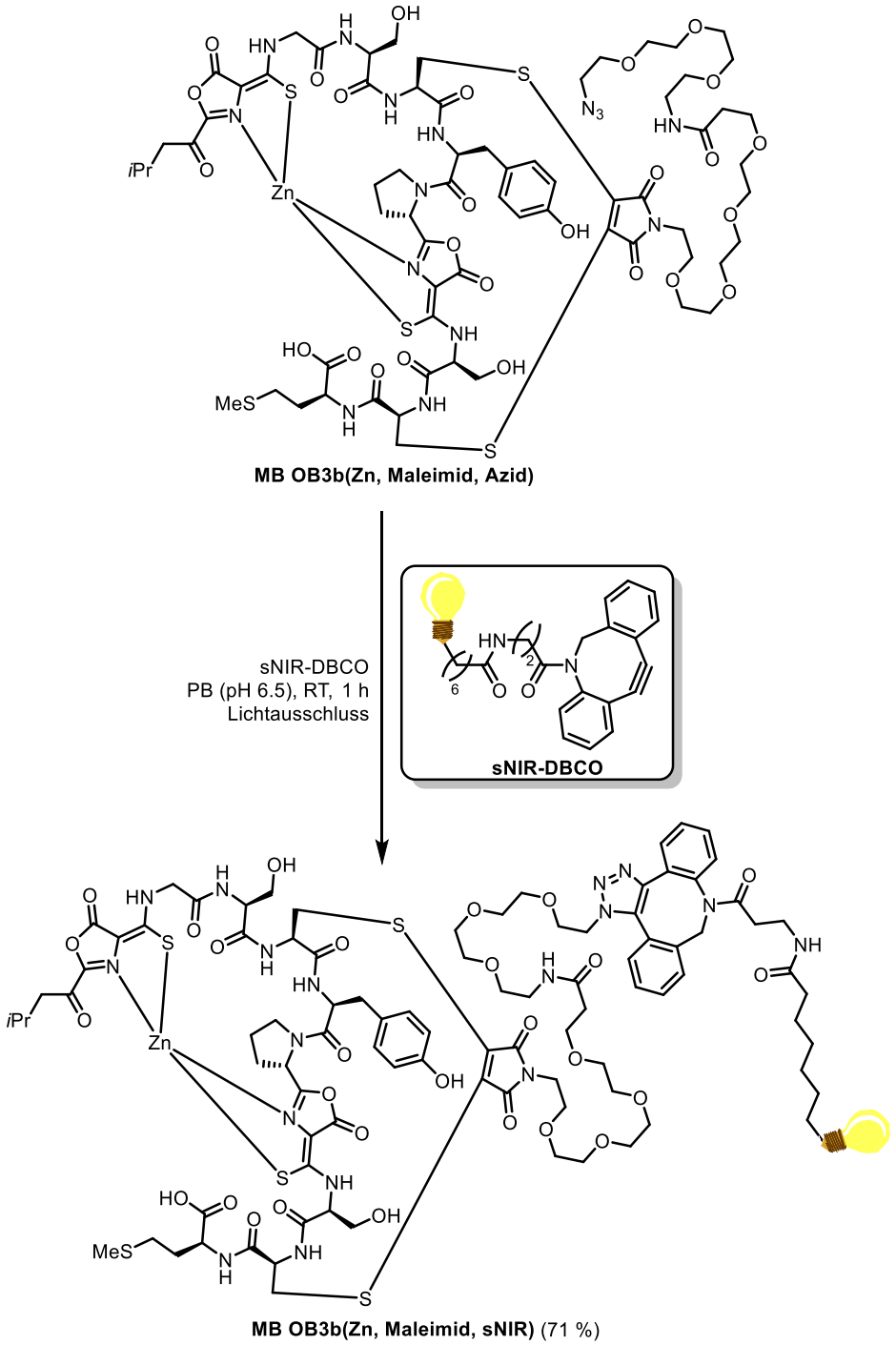


***Abbildung 36**: Infrarotfluoreszenzaufnahmen eines Rattenkopfes nach HONG et al. im Bereich des NIRs (λ = 850-900 nm) und im Bereich des SWIRs (λ = 1000-1700 nm).*[170]

In einer weiteren Veröffentlichung verdeutlichten CARR *et al.*, dass der klinisch zugelassene Farbstoff Indocyaningrün (ICG) aufgrund einer schwachen Absorption in diesem Bereich für die SWIR-Bildgebung verwendet werden kann (vgl. **Abbildung 35** B).[167]

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde durch MERLE M. WEITZENBERG das Reagenz sNIR-DBCO (Struktur wegen patentrechtlicher Gründe nicht gezeigt, symbolisiert durch eine Glühbirne in **Schema 99**) zur Cu-freien Modifikation von Aziden hergestellt, das ein Anregungsmaximum (λ_{max}(Ex) = 785 nm) und ein Emissionsmaximum (λ_{max}(Em) = 800 nm) im NIR-Bereich aufweist.[165] Mithilfe dieses Reagenzes wurde **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** unter den zuvor etablierten Bedingungen konjugiert und das Produkt **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** nach Reinigung mittels präparativer HPLC in 71 % Ausbeute isoliert (**Schema 99**).



***Schema 99**: SPAAC mit **sNIR-DBCO** zum Fluoreszenz-markierten **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)**. Das andere Isomer aus der SPAAC ist aufgrund der Übersichtlichkeit und die Struktur von sNIR ist wegen patentrechtlicher Gründe nicht gezeigt und durch eine Glühbirne symbolisiert.*

Anhand des aufgenommenen Anregungs- und Emissionsspektrums von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** ist zu erkennen, dass im Vergleich zu dem ungebundenen Farbstoff (λ_{max}(Ex) = 785 nm und λ_{max}(Em) = 800 nm)[165] das Anregungs- und Emissionsmaximum (λ_{max}(Ex) = 788 nm und (λ_{max}(Em) = 812 nm) leicht

rotverschoben waren (**Abbildung 37**). Die spektralen Eigenschaften von sNIR wurden daher wie im Fall der Cy-5-Farbstoffe durch die Konjugation an **MB OB3b** nicht maßgeblich beeinflusst.

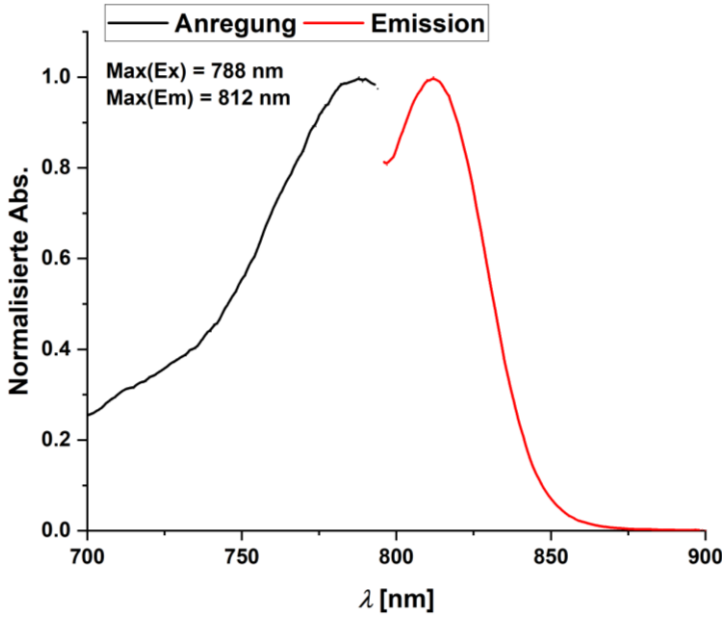


***Abbildung 37**: Anregungs- und Emissionsspektrum von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)**; aufgrund der festgelegten Emissionswellenlänge von λ = 810 nm (Anregungsspektrum) und der festgelegten Anregnungswellenlänge von λ = 780 nm (Emissionsspektrum) wurden nur die relevanten Ausschnitte der Spektren abgebildet.*

Auf Grundlage der in diesem Abschnitt beschriebenen Synthesen konnten die drei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sonden **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)**, **MB OB3b(Zn, Maleimid, Sulfo-Cy-5)** und **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** erfolgreich hergestellt werden.

Dadurch ist es erstmals möglich, neuartige, bioaktive **MB OB3b**-basierte Sonden für biologische Untersuchungen zur Aufklärung der unter 3.3.1 aufgeführten physiologischen Parameter einzusetzen. Die in diesem Zusammenhang erhaltenen Ergebnisse werden in dem Abschnitt 3.3.5 diskutiert.

*3.3.4.2 Synthese eines ^{18}F-markierten **MB OB3b(Zn)** zur Bildgebung mittels PET*

Neben den Bildgebungsverfahren basierend auf *in vitro* und *in vivo* Fluoreszenzspektroskopie besteht die Möglichkeit, Stoffwechselvorgänge auf molekularer Ebene mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sichtbar zu machen.

Dabei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem durch den Zerfall eines Radionuklids ein Positron freigesetzt wird.[171] Trifft dieses auf ein Elektron findet eine sogenannte Annihilation statt und es werden zwei γ-Photonen im Winkel von 180 ° freigesetzt (**Abbildung 38**).

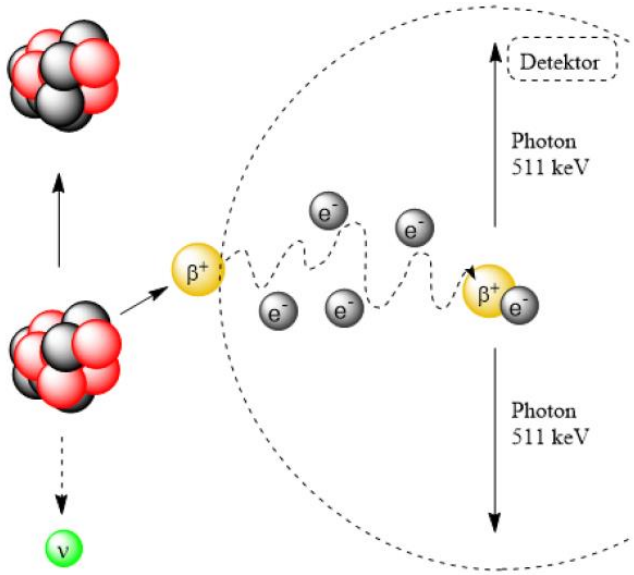


***Abbildung 38**: Positronenemmision (β^+) eines Radionuklids und Annihilation mit einem Elektron (e^-) unter Freisetzung zweier γ-Photonen im Winkel von 180 ° nach WILLMANN.*[172]

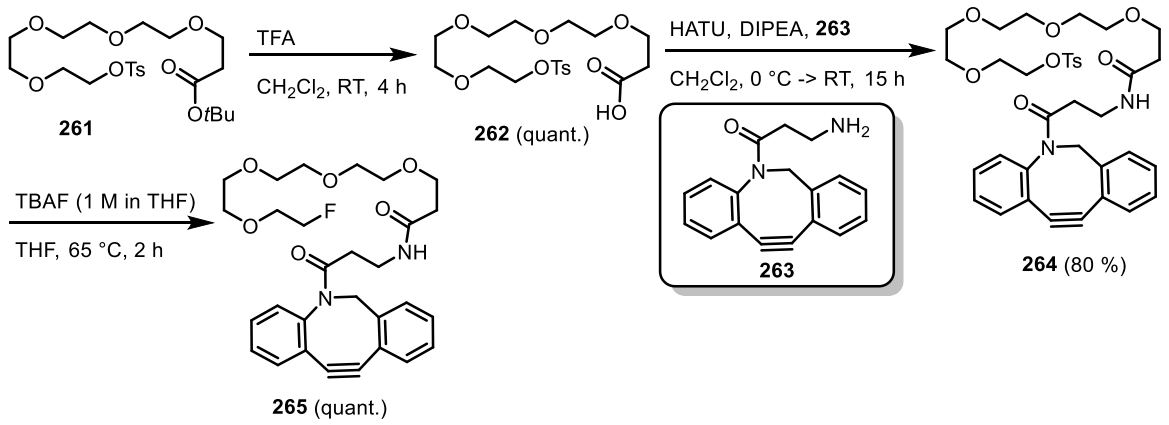
Diese werden daraufhin durch einen kreisförmig angeordneten Detektor als Koinzidenzereignis nachgewiesen. Aufgrund der hochenergetischen Strahlung (511 keV) können die Radiopharmaka, die das Radionuklid tragen, in einer sehr geringen Menge eingesetzt werden. Die Grundlage dafür stellt das von GEORGES CHARLES DE HEVESY (Nobelpreisträger für Chemie 1943) entwickelte *tracer*-Prinzip der nuklearmedizinischen Funktionsdiagnostik dar.[173] Da die applizierte Menge der radioaktiv markierten, pharmakologisch aktiven Substanz im subphysiologischen Bereich liegt, weist diese keine toxischen Effekte durch Wirkung auf das *target* auf.

Eine Möglichkeit für eine Markierung bietet das kurzlebige Isotop ^{18}F, das mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2}$ = 110 min Positronen emittiert. Um das zu untersuchende Molekül

selektiv und schnell in ein ^{18}F-Radiopharmakon umzuwandeln, bietet sich wiederum die SPAAC mit einem ^{18}F-tragenden Reagenz an.

Daher bestand das Ziel darin, die unter 3.3.3.3 beschriebenen Azide mit einem DBCO-^{18}F-Linker zu modifizieren. Um eine Vergleichbarkeit mit den zuvor beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffsonden (vgl. **Schema 98** und **Schema 99**) hinsichtlich der Molekülgröße zu gewährleisten, wurde eine PEG(4)-Kette zur Verbindung des DBCOs mit dem ^{18}F gewählt (**Schema 100**).

In Anlehnung an die literaturbekannte Synthese eines ähnlichen ^{18}F-PEG(3)-DBCO-Linkers[174] erfolgte die Umwandlung des TsO-*t*Bu-Esters **261**[175] in den TsO-PEG(4)-DBCO-Linker **264** als Vorläufer für die Synthese des ^{18}F-PEG(4)-DBCO-Linkers.

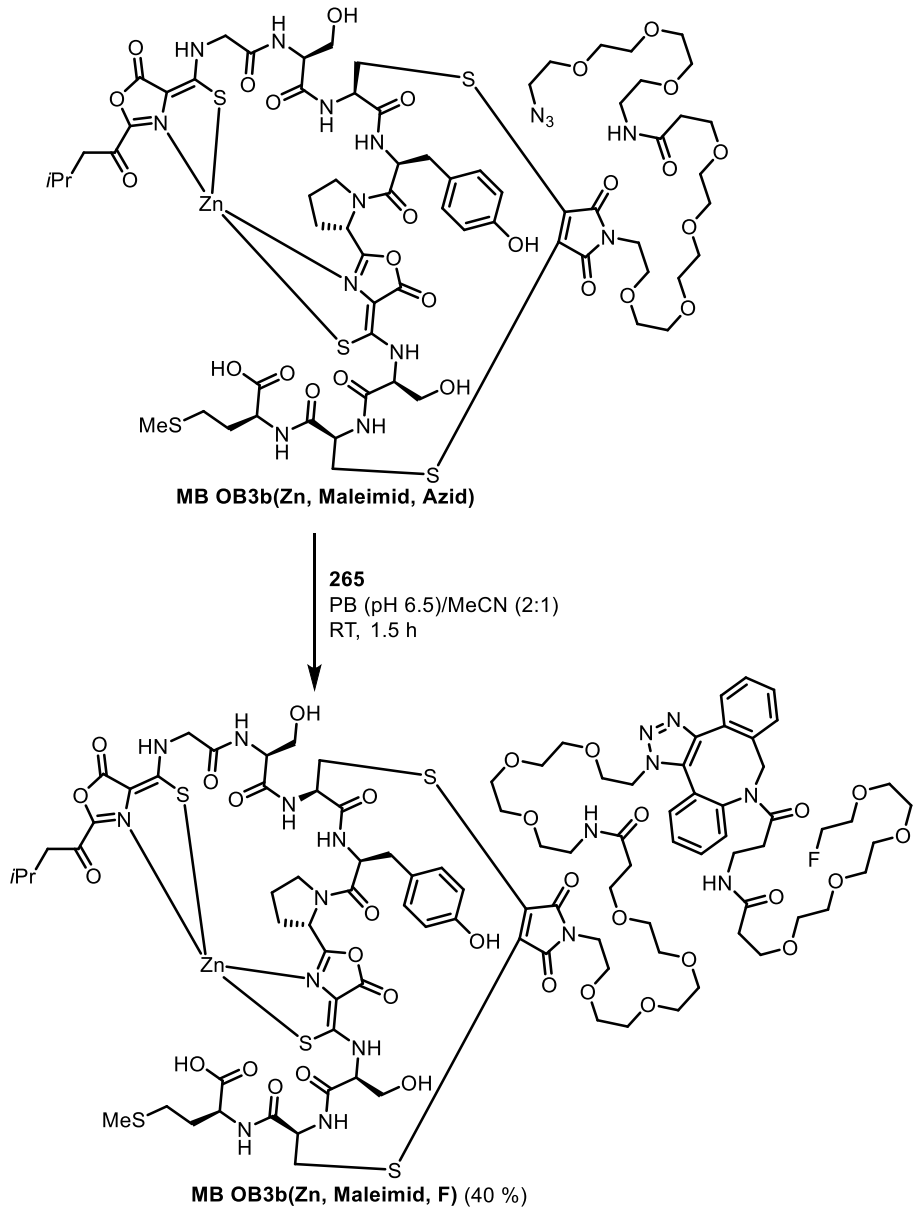


***Schema 100**: Synthese des TsO-PEG(4)-DBCO-Linkers **264** und Umwandlung in das nicht-radioaktive Fluorid **265**.*

Dies beinhaltete die TFA-vermittelte Verseifung zur Carbonsäure **262** und die Peptidkupplung mit dem DBCO-Amin **263**[176] zu **264**. Letzteres ergab das gewünschte Produkt nach Reinigung mittels Säulenchromatographie in einer Ausbeute von 80 %. **264** kann in einer nachfolgenden radiochemischen Synthese durch eine nukleophile Substitution des OTs in das entsprechende ^{18}F-Reagenz umgewandelt werden. Außerdem wurde das Fluorid **265** aus **264** als nicht-radioaktive Referenz für den entsprechenden ^{18}F-PEG(4)-DBCO-Linker in der nachfolgenden radiochemischen Synthese hergestellt (**Schema 100**). Die Synthese erfolgte unter Verwendung von TBAF als Nukleophil und lieferte das Produkt in quantitativer Ausbeute.

Die Synthese des nicht-radioaktiven Konjugats **MB OB3b(Zn, Maleimid, F)** als Referenz für das ^{18}F-enthaltende Derivat erfolgte durch eine SPAAC von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** mit **265** (**Schema 101**). Für eine Vergleichbarkeit mit den in Abschnitt 3.3.4.1 beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffsonden wurde der

modifizierte Naturstoff mit einer PEG-Kette und nicht derenige mit einem C_2-Linker gewählt.



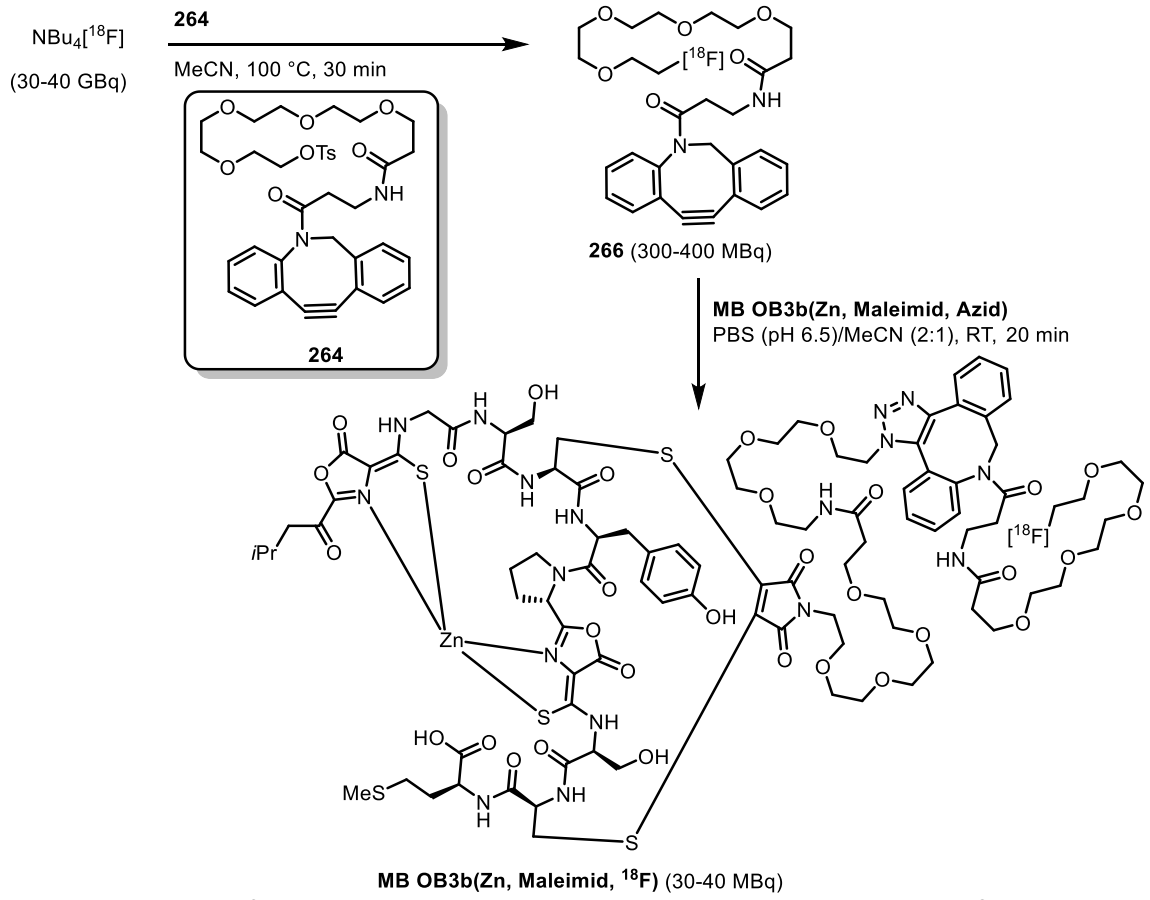
***Schema 101**: SPAAC mit **265** zur Fluorid-Referenzprobe **MB OB3b(Zn, Maleimid, F)**. Das andere Isomer aus der SPAAC ist aufgrund der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.*

Dafür wurde eine Lösung aus **265** in MeCN zu einer Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** in PB (pH 6.5) gegeben. Nach präparativer HPLC wurde das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 40 % isoliert.

Als nächstes konnte die radiochemische Synthese der ^{18}F-Analoga erfolgen, die in den spezialisierten Laboren der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. TOBIAS ROSS am Institut für

Radiopharmazeutische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover gemeinsam mit Dr. MICHAEL WILLMANN durchgeführt wurde.

Die Synthese erfolgte ausgehend von [^{18}F]FNBu$_4$ mit einer Aktivität von 30-40 GBq, das durch Fixierung von [^{18}F]Fluorid auf einer Anionenaustauscherkartusche und Elution mit methanolischer NBu$_4$HCO$_3$-Lösung (1.5 Äq. bzgl. **264**) gewonnen wurde (**Schema 102**). Die Substitution des Tosylats in **264** durch [^{18}F]Fluorid erfolgte nach Entfernung des MeOH in MeCN (*c* = 9.3 mM bzgl. **264**) bei 100 °C über 30 min. Nach Isolation mittels semi-präparativer HPLC konnte der ^{18}F-PEG(4)-DBCO-Linker **266** mit einer Aktivität von 300-400 MBq erhalten werden. Da dies einer geringen Aktivitätsausbeute von 1 % entspricht und vermutlich nur eine geringfügige Substitution des Tosylats stattfand, sollte diese Reaktion in Zukunft optimiert werden. Die Nukleophilie des [^{18}F]Fluorids könnte durch eine zusätzliche Verwendung von [2.2.2]Kryptand zur effektiven Komplexierung der Alkali- und Erdalkalimetallkationen erhöht und die Reaktion durch eine höhere Konzentration beschleunigt werden.[177]



***Schema 102**: SPAAC mit dem ^{18}F-PEG(4)-DBCO-Linker **266** zu Radiopharmakon **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)**. Die Ausbeuten sind als gemessene Aktivitäten angegeben und das andere Isomer aus der SPAAC ist aufgrund der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.*

GOMZINA *et al.* verwendeten diesbezüglich für die effiziente radiochemische Synthese von 2-Deoxy-2-[^{18}F]fluor-*D*-Glukose aus dem entsprechenden Mannosetriflat-Vorläufer eine 2:1 Mischung aus [2.2.2]Kryptand und K_2CO_3 in MeCN zur Elution des fixierten [^{18}F]Fluorids und zur nachfolgenden Umsetzung des Substrats (äquimolar zu K_2CO_3).[178]

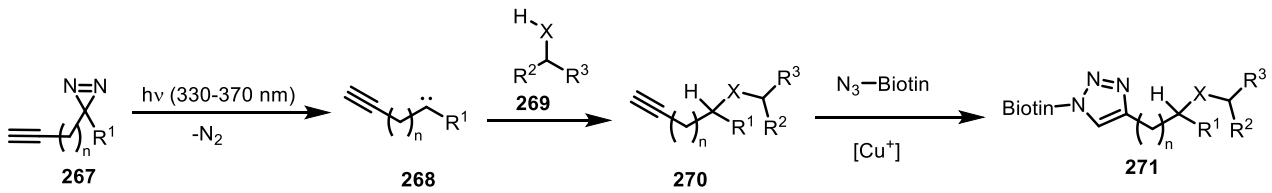
Die nachfolgende SPAAC zwischen dem ^{18}F-PEG(4)-DBCO-Linker **266** und **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** unter den zuvor optimierten Bedingungen ergab nach einer Reaktionszeit von 20 min und einer Reinigung mithilfe von semi-präparativer HPLC das gewünschte Radiopharmakon **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** mit einer Aktivität von 30-40 MBq (**Schema 102**). Die chemische Identität wurde mithilfe der Radio-HPLC über einen Vergleich der Retentionszeiten von **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** und **MB OB3b(Zn, Maleimid, F)** bestätigt.

Durch die erfolgreiche Synthese des radioaktiv-markierten Naturstoffes stand eine zusätzliche Methode zur Verfügung, die bioaktiven MB**-**Derivate *in vitro* und *in vivo* nachverfolgen zu können. Die weitere Verwendung von **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** und die dabei erhaltenen Ergebnisse werden in dem Abschnitt 3.3.5.1 diskutiert.

3.3.4.3 *Synthese eines Diazirin-modifizierten Naturstoffes zur Identifikation der* ***MB OB3b(Zn)****-bindenden Proteine*

Ein weiterer wichtiger Aspekt neben der Identifikation der Bioverteilung und der Aufnahme- und Exkretionswege von **MB OB3b(Zn)** ist die Identifikation von endogenen Proteinen, die den natürlichen Cu-Chelator nach Aufnahme in den Körper binden. Dies könnte u. A. Aufschlüsse über den Aufnahmeweg in die Zelle liefern (aktive *vs*. passive Aufnahme).

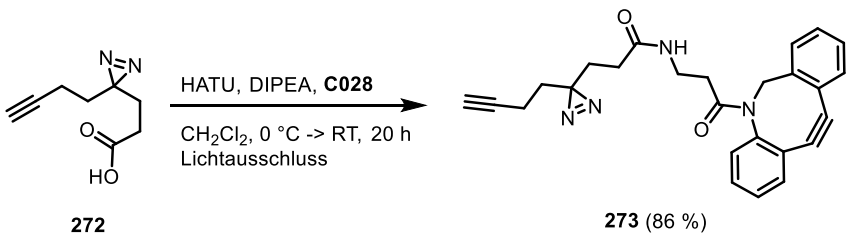
Ein Weg, diese Proteine zu identifizieren, ist die sogenannte Photoaffinitätsmarkierung.[179] Dabei können Diazirinderivate **267** eingesetzt werden, aus denen durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 330-370 nm ein reaktives Carben **268** gebildet werden kann (**Schema 103**). Dieses reagiert spontan mit benachbarten Aminosäurengruppen des bindenden Proteins (symbolisiert durch **269** in **Schema 103**), wodurch ein kovalent vernetztes Produkt **270** erhalten wird.[180]



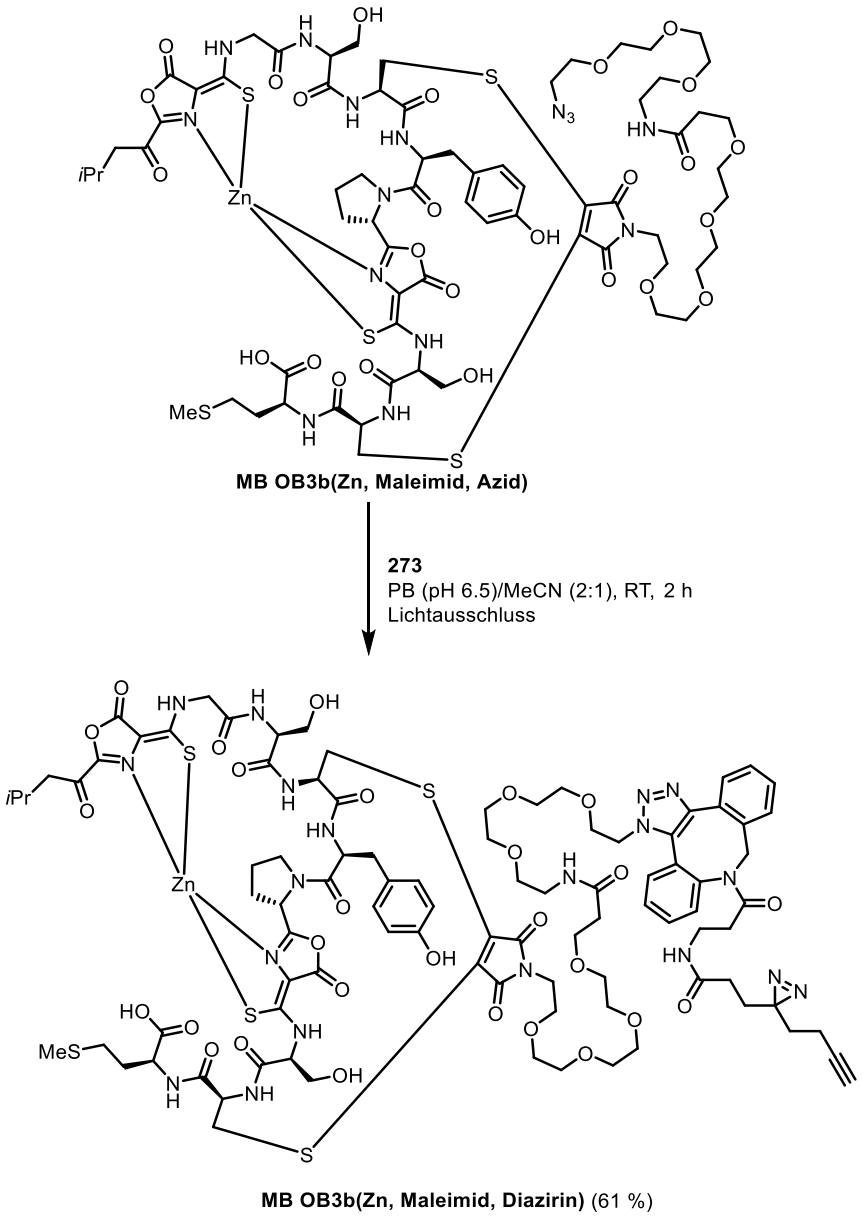
***Schema 103**: Freisetzung des reaktiven Carbens **268** durch Bestrahlung des Diazirins **267** mit UV-Licht und nachfolgende Insertion in eine X-H-Bindung von **269** zu dem vernetzten Produkt **270**. Die Isolierung von **270** kann über eine Konjugation mit Biotin erfolgen, die eine Konjugation z. B. mit magnetischen Streptavidinkugel ermöglichen.*

Im Anschluss wird **270** mittels proteomischer Analysen identifiziert. Die Proteomik beschreibt in diesem Zusammenhang die Untersuchung der in der Zelle bzw. im Organismus vorliegenden Gesamtheit der Proteine.[181] Nach einer Lyse der Zellen wird das Konjugat **270** isoliert und massenspektrometrisch untersucht.[182] Die Isolierung von **270** kann über das sogenannte *target-fishing* erfolgen, indem eine Cu^+-katalysierte 1,3-dipolaren Cycloaddition als bioorthogonale ‘click‘-Reaktion mit dem in **270** eingeführten Alkin durchgeführt wird (**Schema 103**).[183] Als Reaktionspartner bietet sich ein Azid-modifiziertes Biotin an, da das erhaltene Triazol **271** leicht über die starke biotinvermittelte Bindung an Streptavidin (z. B. über magnetische Kugeln) isoliert werden kann. Da die Bindung von **268** an verschiedene Proteine erfolgen kann, muss zur Identifikation von spezifischen Bindungspartnern ein Kompetitionsexperiment mit der unmodifizierten Ausgangsverbindung (hier: **MB OB3b**) im Überschuss erfolgen. Ein Vergleich dieser Experimente liefert nachfolgend die spezifischen Protein-bindungspartner.

Zur Identifikation möglicher Proteinwechselwirkungen von **MB OB3b(Zn)** mithilfe der oben beschriebenen Proteomikanalyse wurde als erster Schritt ein trifunktionaler Linker hergestellt. Neben den oben beschriebenen Anforderungen sollte dieser Linker (vgl. **267** in **Schema 103**) mit den Aziden aus 3.3.3.3 in einer SPAAC verknüpfbar sein. Eine nachfolgende Cu-katalysierte Cycloaddition zur Isolierung der Konjugate mit den bindenden Proteinen (vgl. **270** in **Schema 103**) ist zu diesem Zeitpunkt möglich, weil die Bioaktivität von **MB OB3b** nicht mehr notwendig ist. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurde **273** aus Carbonsäure **272** und DBCO-Amin **263** synthetisieert und in einer guten Ausbeute von 86 % isoliert (**Schema 104**).



***Schema 104**: Synthese des trifunktionalen Linkers **273**.*



***Schema 105**: SPAAC mit **273** zu **MB OB3b(Zn, Maleimid, Diazirin)**. Das andere Isomer aus der SPAAC ist aufgrund der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.*

Abschließend wurde **273** in der zuvor erarbeiteten SPAAC mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** umgesetzt (**Schema 105**). Um einen größeren Abstand

zwischen der Cu-Koordinationsstelle und des Diazirins zu gewährleisten wurde bei der Synthese ebenfalls der modifizierte Naturstoff mit einer PEG-Kette antelle des modifizierten Naturstoffes mit einem C_2-Linker verwendet (vgl. 3.3.3.3). Nach Reinigung mittels präparativer HPLC konnte **MB OB3b(Zn, Maleimid, Diazirin)** in einer Ausbeute von 61% isoliert werden.

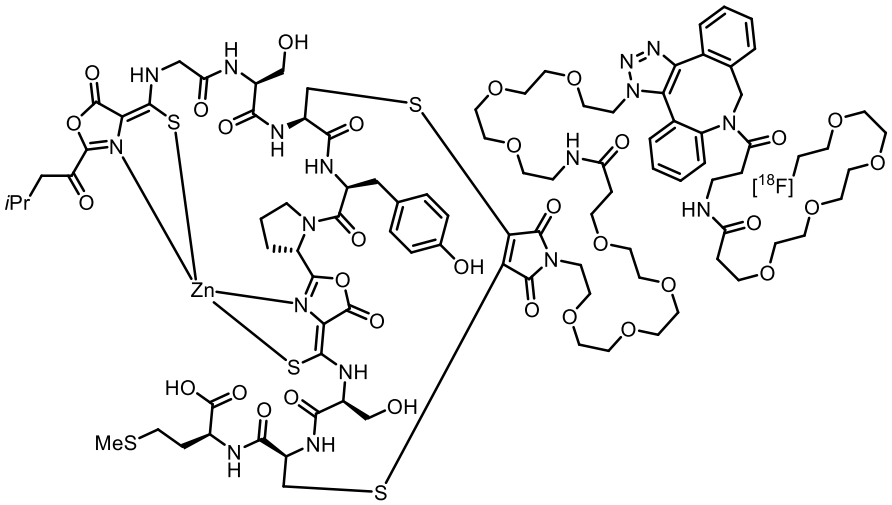
Mit den in diesem Abschnitt präsentierten Arbeiten stehen fünf verschieden modifizierte und bioaktive **MB OB3b**-basierte Sonden zur Verfügung, um den Naturstoff *in vitro* und *in vivo* untersuchen zu können. Durch die beschriebenen Synthesen konnte im Anschluss an das *DR* als Naturstoffmodifikation ein gänzlich neuartiger Zugang zu einer Plattform von Methanobactinen erfolgreich entwickelt werden. Dabei ist besonders die Vielseitigkeit hervorzuheben, die das eingeführte Azid in **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und **MB OB3b(Zn, Maleimid-short, Azid)** hinsichtlich einer Konjugation durch beliebige DBCO-modifizierte Marker mittels SPAAC bietet.

Diese vielversprechenden Ergebnisse stellen die Grundlage für aufbauende Untersuchungen dar, die in Zukunft die Weiterentwicklung von **MB OB3b** zu einem Wirkstoff gegen die Kupferspeicherkrankheit MW unterstützen können.

3.3.5 Anwendung der verschiedenen Sonden in biologischen Untersuchungen

3.3.5.1 In vitro PET-Untersuchungen

Nachdem die Synthese der unterschiedlichen **MB OB3b**-basierten Sonden erfolgreich abgeschlossen werden konnte, wurden diese Sonden für biologische Studien verwendet. Als erstes sollte das Radiopharmakon **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** (**Abbildung 39**) mit dem Positronen emittierenden Element ^{18}F dafür angewandt werden, *in vitro* die Kinetik der Aufnahme und des Effluxes zu untersuchen. Wie bei den unter 3.3.3.4 beschriebenen Studien zur Bioaktivität wurden die Experimente mit der Leberzelllinie HepG2 durchgeführt.



MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)

***Abbildung 39**: Struktur von **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)**.*

Die dafür notwendigen PET-Untersuchungen wurden ebenfalls in den Laboren der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. TOBIAS ROSS von Dr. MICHAEL WILLMANN durchgeführt.

Für die Ermittlung einer Aufnahme-Kinetik wurden die Zellen bis zu 90 min (limitiert durch die Halbwertszeit von ^{18}F: $t_{1/2}$ = 110 min) mit einer Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** (Aktivität: 120 kBq in PBS) inkubiert und das Zelllysat unter einem γ-Strahlenzähler vermessen. Die erhaltenen zerfallskorrigierten *counts* sind gegen die Inkubationszeit aufgetragen (**Abbildung 40**).

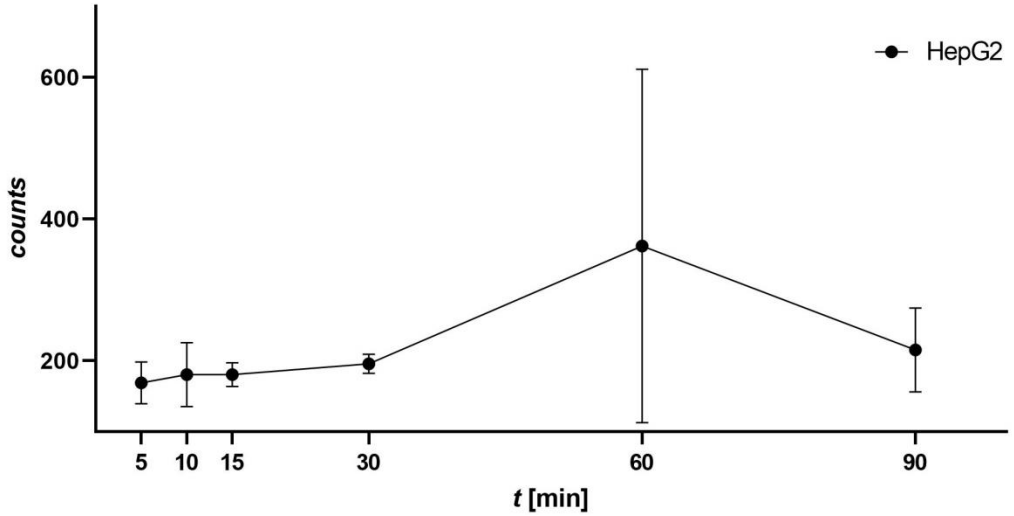


***Abbildung 40**: Aufnahme-Kinetik bei 37 °C über einen Zeitraum von 90 min von **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** in HepG2-Zellen auf Grundlage der zerfallskorrigierten counts bei einer Untersuchung des Zelllysates; die Werte wurden in Triplikaten aufgenommen und nicht durch den Hintergrund korrigiert.*

Anhand dieser Auftragung lässt sich feststellen, dass innerhalb der ersten 30 min nach Inkubation nur eine geringfügige Zunahme der *counts* und damit lediglich eine geringfügige Internalisierung von **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** in die Zellen nachgewiesen wurden. Im Laufe der nächsten 60 min stiegen die *counts* leicht an, sodass in diesem Zeitraum eine beginnende Aufnahme der radioakiv markierten Sonde vermutet werden kann. Die große Streuung des 60 min-Messwerts könnte auf eine mögliche Kontamination der Proben durch Radioaktivität zurückzuführen sein, die nicht durch die Aufnahme des modifizierten Naturstoffes in die Zellen verursacht wurde.

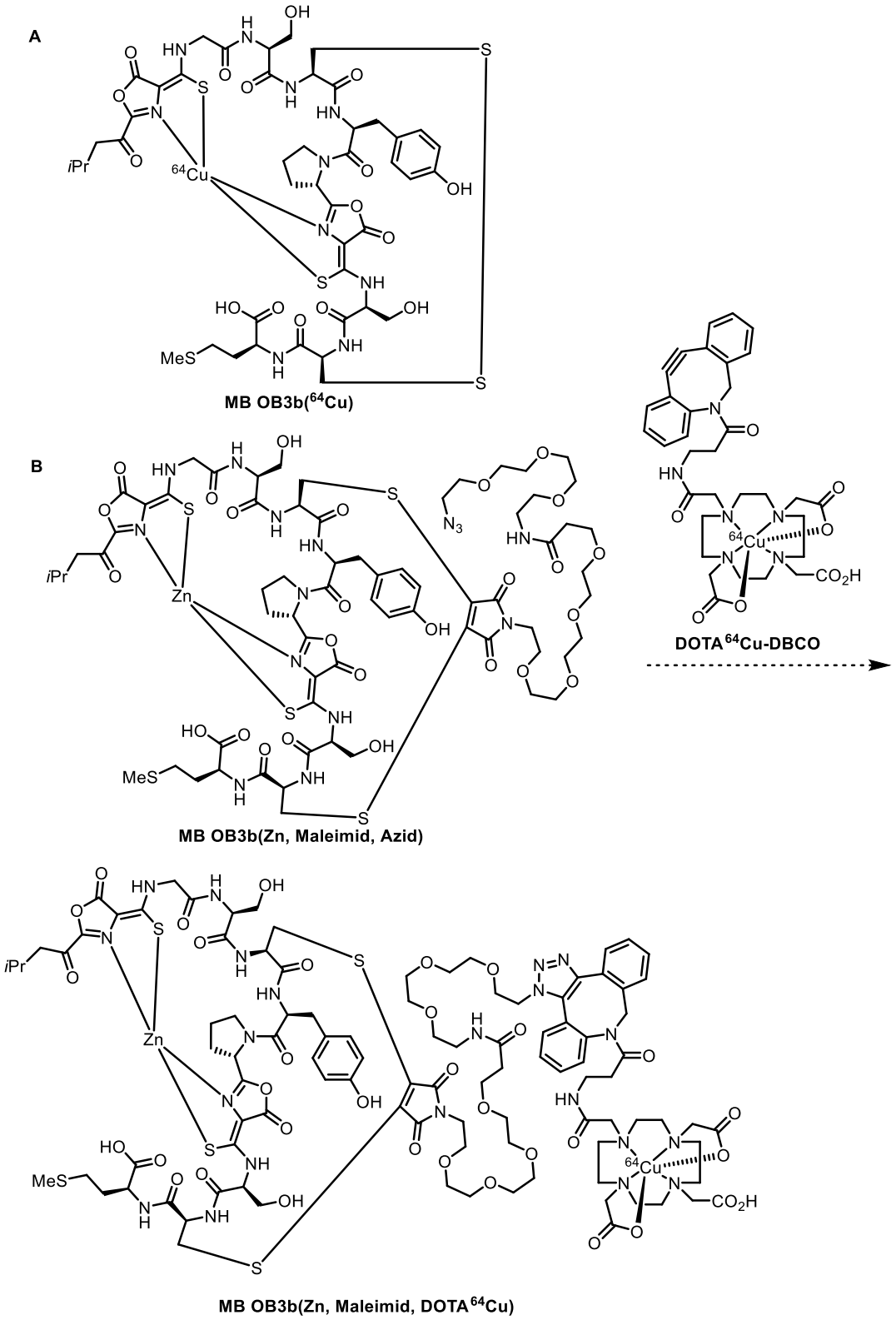
Auf Grundlage dieses Ergebnisses ist es wahrscheinlich, dass **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** nur langsam in einer Zeitskala von Stunden und nicht Minuten in die HepG2-Zellen aufgenommen wird. Wegen der geringen Halbwertszeit von $t_{1/2}$ = 110 min ist ^{18}F daher als Radionuklid ungeeignet, um die Aufnahme des Cu-Chelators mittels ^{18}F-PET nachzuverfolgen. Bei einer längeren Beobachtung über einen Zeitraum größer als 90 min würde die spezifische Aktivität zu stark sinken und sich das Verhältnis vermehrt in Richtung des nicht-radioaktiven Derivats verschieben.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, wäre die Verwendung des ebenfalls Positronen emittierenden Radionuklids ^{64}Cu.[184] Die Halbwertszeit von $t_{1/2}$ = 12.7 h würde es ermöglichen, die Zellen über den benötigten Zeitraum zu beobachten.[185]

Diesbezüglich könnte einerseits direkt das ^{64}Cu koordinierende **MB OB3b(^{64}Cu)** eingesetzt werden (**Schema 106** A). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass dadurch die Aufnahme des nicht mehr bioaktiven Komplexes untersucht werden würde.

Andererseits könnte der $^{64}Cu^{2+}$ Komplex von DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) an **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** konjugiert werden (**Schema 106** B). DOTA wurde in der Literatur bereits für die Herstellung ^{64}Cu-basierter Radiopharmaka verwendet und stellt einen Liganden mit hoher Affinität zu Cu^{2+} ($K_b \approx 10^{22}$) dar.[186,187] Da **MB OB3b** eine deutlich geringere Cu^{2+}-Bindekonstante aufweist ($K_b \approx 10^{12}$ vgl. 1.4.2), wird das komplexierte ^{64}Cu nicht von **MB OB3b** aus dem DOTA-Komplex extrahiert. Die dafür notwendige **MB OB3b(Zn, Maleimid, DOTA^{64}Cu)** könnte mit der unter 3.3.4 erarbeiteten Methodik aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und DOTA^{64}Cu-DBCO hergestellt werden und als bioaktive PET-Sonde für *in vitro* Studien angewandt werden (**Schema 106** B).

Eine weitere Möglichkeit wäre es, die Zellen in Analogie zu den unter 3.3.3.4 beschriebenen Experimenten zuerst mit ^{64}Cu und dann mit *apo*-**MB OB3b** zu behandeln. Damit könnte eine Kinetik der Entkupferung *in vitro* und der gesamte Prozess der Internalisierung, Cu-Koordination und Exkretion durch die Messung der Abnahme der zerfallskorrigierten *counts* simultan analysiert werden. Diese Methodik würde die Anwendung der ^{64}Cu-basierten PET-Sonden (**Schema 106**) optimal ergänzen.



***Schema 106**: Mögliche ^{64}Cu-basierte PET-Sonden; **A**: **MB OB3b(^{64}Cu)**; **B**: Synthese von **MB OB3b(Zn, Maleimid, DOTA^{64}Cu)** durch SPAAC von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und DOTA^{64}Cu-DBCO.*

Neben einer Untersuchung der Aufnahme-Kinetik von **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** wurde ebenfalls dessen Efflux-Kinetik untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst für 60 min mit einer Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** (Aktivität: 120 kBq in PBS) inkubiert. Nach einem Wechsel des Überstandes wurden die Zellen bis zu 90 min in neutralem PBS inkubiert und das Zelllysat unter einem γ-Strahlenzähler vermessen (**Abbildung 41**).

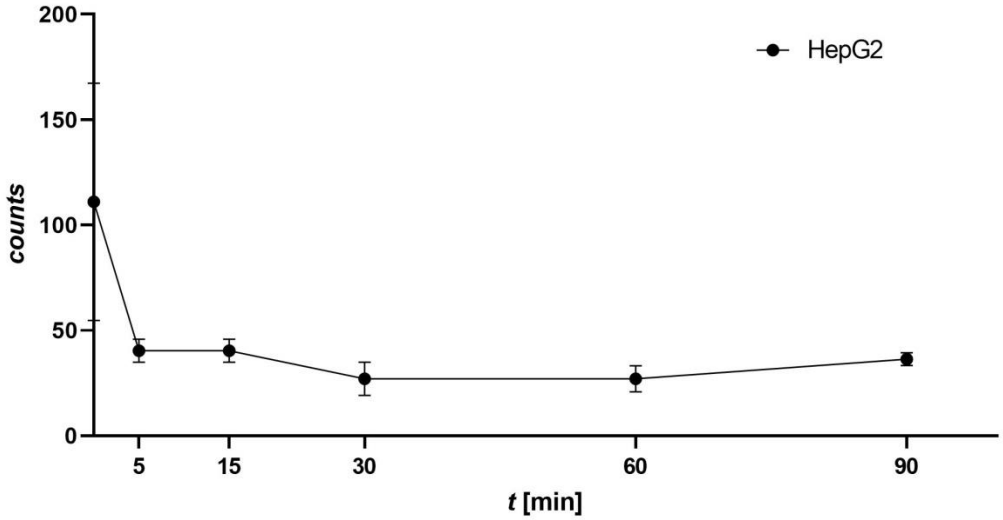


Abbildung 41: *Efflux-Kinetik bei 37 °C über einen Zeitraum von 90 min von* ***MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)*** *in HepG2-Zellen auf Grundlage der zerfallskorrigierten counts bei einer Untersuchung des Zelllysates nach einer Inkubation der Zellen mit* ***MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)*** *für 60 min gefolgt von Waschen und einer Inkubation in PBS; die Werte wurden wurden in Triplikaten aufgenommen nicht durch den Hintergrund korrigiert.*

Anhand der dargestellten Ergebnisse lässt sich erkennen, dass der Efflux der internalisierten Sonde aus den HepG2-Zellen in den PBS-Puffer rasch innerhalb der ersten 5 min erfolgte. Nach dieser Zeit blieben die ermittelten zerfallskorrigierten *counts* konstant, sodass davon auszugehen ist, dass kein weiterer Efflux erfolgte.

Wie oben beschrieben, sollten in Zukunft Experimente mit ^{64}Cu durchgeführt werden, um *in vitro* PET Untersuchungen über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen.

3.3.5.2 In vitro Fluoreszenzmessungen

Wie unter 3.3.4.1 beschrieben, wurden ebenfalls Sonden hergestellt, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthalten. Von diesen wurde im Folgenden der modifizierte Chelator **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** (**Abbildung 42**) in biologischen Untersuchungen mit der Leberzelllinie HepG2 angewandt. In diesem Zusammenhang wurden Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von YASCHAR KABIRI (AK ZISCHKA) am Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München durchgeführt.

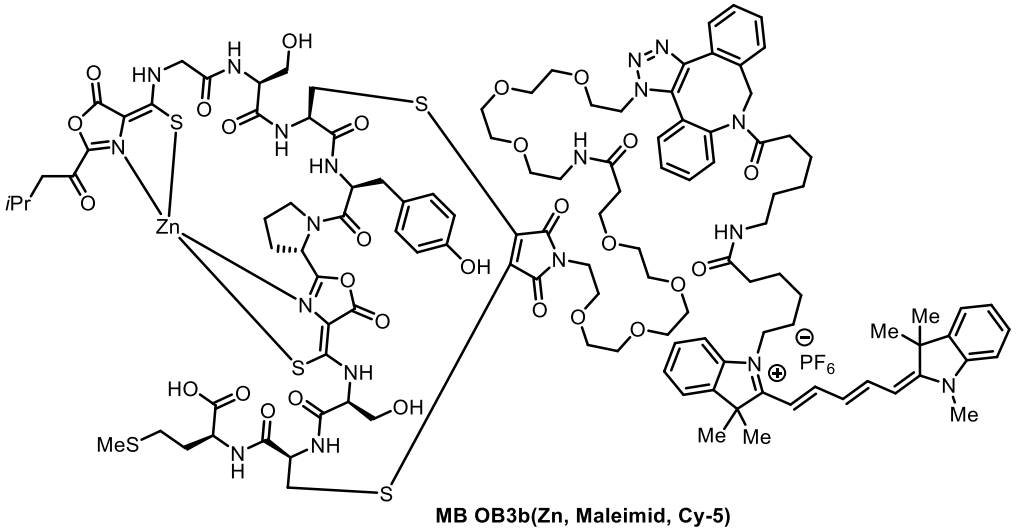


***Abbildung 42**: Struktur von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)**.*

Abbildung 43 zeigt Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von HepG2-Zelllen, die mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** angereichertem Medium (*c* = 10 µM) für 24 h inkubiert und direkt vor der Aufnahme mit spezifischen Farbstoffen zur Visualisierung des Zellkerns und der Mitochondrien behandelt wurden. In **B** wurden diese Zellen vor Inkubation mit dem Naturstoffderivat mit [Cu(His)$_2$] angereichertem Medium (*c* = 150 µM) für 24 h versetzt. Diese Behandlung hatte das Ziel, eine gesteigerte Aufnahme von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** auf Grundlage der hohen Cu-Affinität des Chelators hervorzurufen.

Anhand der Rotfärbung (λ_{max} (Em) = 662 nm) in den Abbildungen lässt sich deutlich erkennen, dass **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** in die Zellen aufgenommen wurde. Trotz des im Vergleich zu **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** weiter erhöhten Molekulargewichts konnte folglich eine Internalisierung des modifizierten Naturstoffes erreicht werden. Die unter 3.3.3.4 getätigte Annahme wurde damit belegt.

Dass keine homogene Verteilung der Sonde zu beobachten war, deutet darauf hin, dass diese vesikulär vorliegt und somit durch einen aktiven Transport internalisiert wird. Um einen möglichen Transportmechanismus und die dabei beteiligten Proteine zu identifizieren, könnte in zukünftigen Proteomikanalysen die unter 3.3.4.3 beschriebene Sonde **MB OB3b(Zn, Maleimid, Diazirin)** eingesetzt werden.

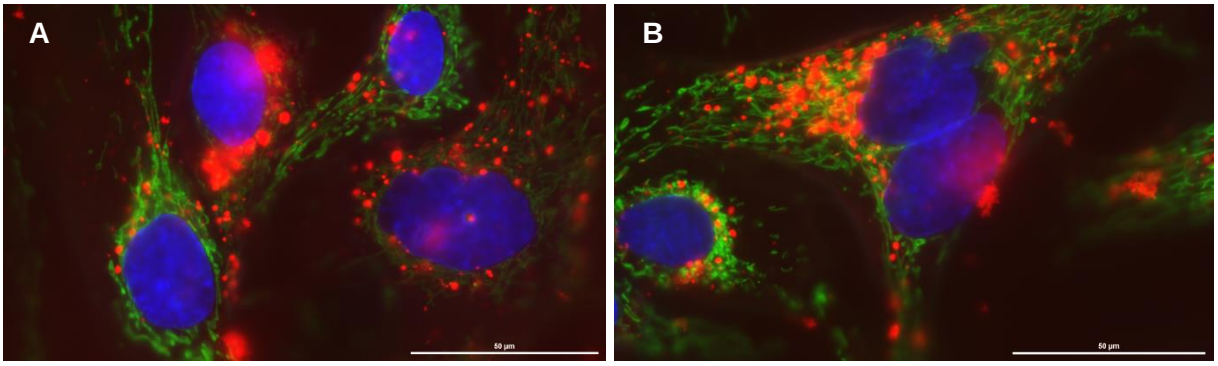


***Abbildung 43**: Öl-Immersionsmikroskopieaufnahmen von HepG2-Zellen; **A**: nach Inkubation in einer 10 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** für 24 h; **B**: nach Inkubation in einer 150 µM Lösung aus [Cu(His)$_2$] für 24 h und mit einer 10 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** für 24 h (blau: Zellkerne angefärbt mit Hoechst 33342, grün: Mitochondrien angefärbt mit MitoTracker™ Green FM, rot: **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)**, Maßstabsbalken: 50 µm).*

Neben einer erfolgreichen Aufnahme des modifizierten Chelators in die Zellen konnte gezeigt werden, dass dieser nicht in den Mitochondrien lokalisiert ist (**Abbildung 43**). Dies ist insofern unerwartet, da diese Organellen einen hohen Gehalt an Cu haben (vgl. 1.1.2). Eine Kolokalisation der Sonde und der Mitochondrien wurde auch nach einer vorherigen Behandlung der HepG2-Zellen mit [Cu(His)$_2$] nicht beobachtet (**Abbildung 43** B).

Bei einem Vergleich der Aufnahmen **A** und **B** lässt sich kein Unterschied in der Intensität des internalisierten **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** mit und ohne vorherige Inkubation mit [Cu(His)$_2$] erkennen. Somit führte die erhöhte Cu-Konzentration in den HepG2-Zellen (vgl. 3.3.3.4) nicht zu einer verstärkten Aufnahme der Sonde in die Zellen, sodass die Triebkraft für die Endozytose vermutlich nicht die zelluläre Cu-Konzentration ist. Die Bildung intrazellulärer Vesikel nach der Aufnahme von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** könnte darauf hindeuten, dass die Sonde in den Lysosomen lokalisiert ist (**Abbildung 43**).[159] Nach einer Endozytose befinden sich Moleküle, die aufgrund ihrer Größe nicht passiv durch die Zellmembran diffundieren können, bekannterweise in Endosomen, die einen Transport in die Lysosomen vermitteln.

Um dies zu überprüfen, wurden in weiteren Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen die Zellen nach einer Inkubation mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** mit *LysoTracker™ Green* zur Visualisierung der Lysosomen direkt vor der Aufnahme behandelt (**Abbildung 44**). In der Abbildung ist eine Überlagerung der Rot- und Grünfärbung erkennbar. Dieses Ergebnis lässt eine Kolokalisation des markierten Naturstoffs und der Lysosomen möglich erscheinen. In einigen Fällen ist jedoch weiterhin die Grünfärbung des lysosomenspezifischen Farbstoffes ersichtlich (deutlicher in **B** als in **A**). Dies könnte entweder auf den Messaufbau zurück zu führen sein oder darauf hindeuten, dass nicht alle Zellorganellen die Sonde aufgenommen haben.

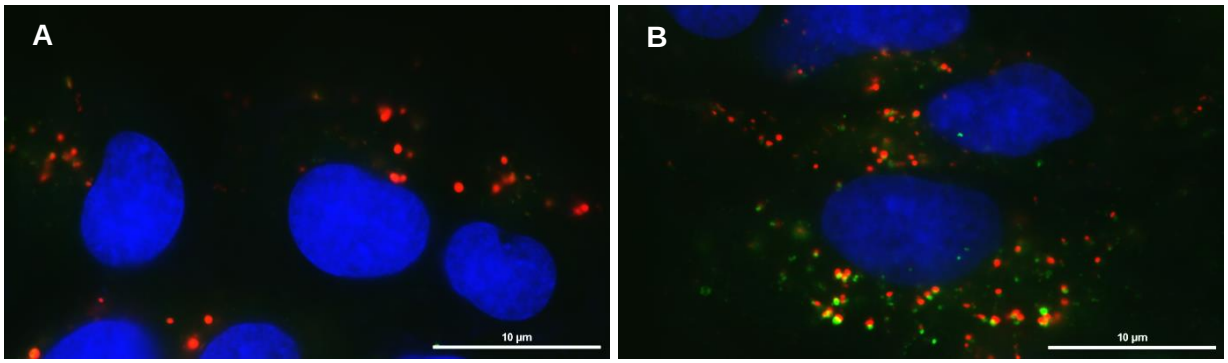


***Abbildung 44**: Öl-Immersionsmikroskopieaufnahmen von HepG2-Zellen; **A**: nach Inkubation in einer 10 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** für 24 h; **B**: nach Inkubation in einer 150 µM Lösung aus [Cu(His)$_2$] für 24 h und mit einer 10 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** für 24 h (blau: Zellkerne angefärbt mit Hoechst 33342, grün: Lysosomen angefärbt mit LysoTracker™ Green DND-26, rot: **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)**, Maßstabsbalken: 10 µm).*

Bis zu diesem Punkt wurden Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen nach einer einheitlichen Inkubationszeit von 24 h mit Lösungen aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** beschrieben. Zur Beurteilung der Aufnahmegeschwindigkeit der Sonde wurden aus diesem Grund zeitaufgelöste Bilder nach 2 h, 3 h, 5 h und 8 h aufgenommen (**Abbildung 45**).

In dem vorangegangenen Abschnitt 3.3.5.1 wurde diesbezüglich diskutiert, dass bei einer Inkubation von HepG2-Zellen mit einer ^{18}F-markierten MB-Sonde über 90 min nur eine geringfügige Aufnahme beobachtet werden konnte. Auf Grundlage von zeitaufgelösten Konfokalmikroskopieaufnahmen konnte frühestens nach 2 h eine geringe vesikuläre Aufnahme des modifizierten Naturstoffes in die Zelle detektiert werden (**Abbildung 45** A). Anhand der hauptsächlich diffusen roten Färbung lässt sich vermuten, dass **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** zu diesem Zeitpunkt noch vorrangig im Medium verteilt ist. Innerhalb der nächsten drei Stunden wurde das internalisierte Derivat und die diskrete Verteilung in die Lysosome deutlich sichtbar, bevor bei einer

Inkubation von 8 h eine ähnliche Verteilung in den HepG2-Zellen wie nach 24 h nachgewiesen wurde (**A** in **Abbildung 44**). Bei Aufnahmen über diese Zeit hinaus konnte keine weitere Veränderung beobachtet werden, was darauf hinweist, dass nach 8 h eine maximale Sättigungskonzentration an **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** in den Zellen erreicht wurde.

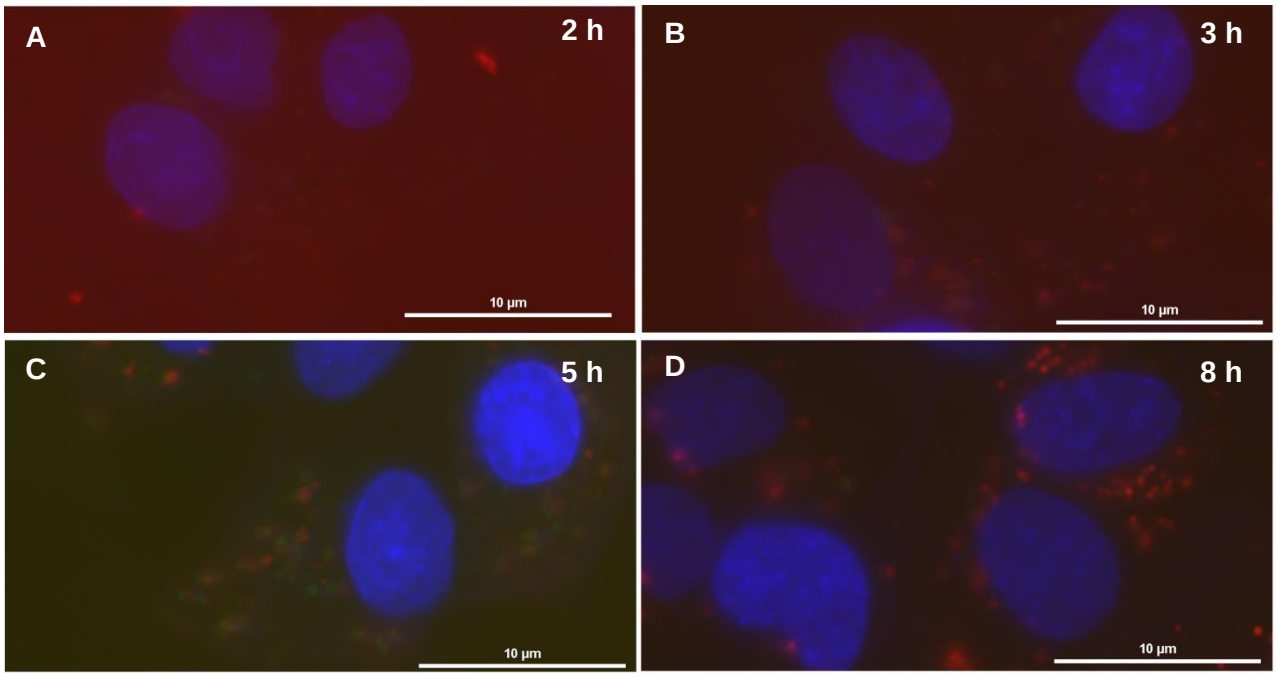


Abbildung 45: *Zeitaufgelöste Konfokalmikroskopieaufnahmen mit einem Nikon ECLIPSE Ti-S Fluoreszenzmikroskop von HepG2-Zellen nach Inkubation in einer 10 µM Lösung aus* ***MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)*** *(blau: Zellkerne angefärbt mit Hoechst 33342, grün: Lysosomen angefärbt mit LysoTracker™ Green DND-26, rot:* ***MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)****, Maßstabsbalken: 10 µm).*

Unter Berücksichtigung dieses Zeitverlaufs und der Ergebnisse, die bei der Bestimmung der Metallwerte unter 3.3.3.4 beschrieben wurden, findet die Einstellung des Gleichgewichts zwischen den Methanobactinen im Medium und in den Zellen nur langsam über einen längeren Zeitraum statt. Unter 3.3.3.4 wurde zudem beschrieben, dass eine effektivere Entkupferung der HepG2-Zellen durch eine längere Behandlung der Zellen erreicht wurde.

Um in zukünftigen Experimenten eine möglichst effiziente Entkupferung der Zellen in dem unter 3.3.3.4 beschriebenen Experiment zu erzielen, könnten diese für 8 h mit einer Lösung aus dem zu untersuchenden Naturstoffderivat behandelt werden. Dadurch würde sich ein Sättigungsgleichgewicht zwischen Chelator innerhalb und außerhalb der Zellen einstellen. Im Anschluss könnte dann eine Exkretionsphase folgen, in der durch

einen mehrfachen Wechsel des Mediums eine rasche Abgabe des mit Cu-beladenen Naturstoffes entlang des Konzentrationsgradienten aus den Zellen ermöglicht wird.

Zur Identifikation möglicher rezeptorvermittelter Aufnahmewege des modifizierten Naturstoffes wurden in einem nächsten Experiment HepG2-Zellen vor der Inkubation mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** mit einer nicht zelltoxischen Konzentrationen unterschiedlicher Zellaufnahmeinhibitoren behandelt (**Abbildung 46**). In diesem Zusammenhang wurden folgende Verbindungen ausgewählt, um verschiedene Internalisierungswege zu untersuchen: 1) Genistein **274**[188] als Inhibitor von Tyrosinkinasen, die in der Caveolin-vermittelten Endozytose beteiligt sind; 2) Pitstop® 2 **275**[189] als Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose; 3) Nocodazol **276**[190] als Disruptor von Mikrotubuli, die vermutlich an endozytotischen Prozessen beteiligt sind.

Im Vergleich zu der in **Abbildung 45** B dargestellten Aufnahme, lässt sich bei allen verwendeten Inhibitoren in **Abbildung 46** feststellen, dass nach derselben Inkubationszeit von 3 h keine Endozytose der Sonde **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** unter Bildung intrazellulärer Vesikel erfolgte.

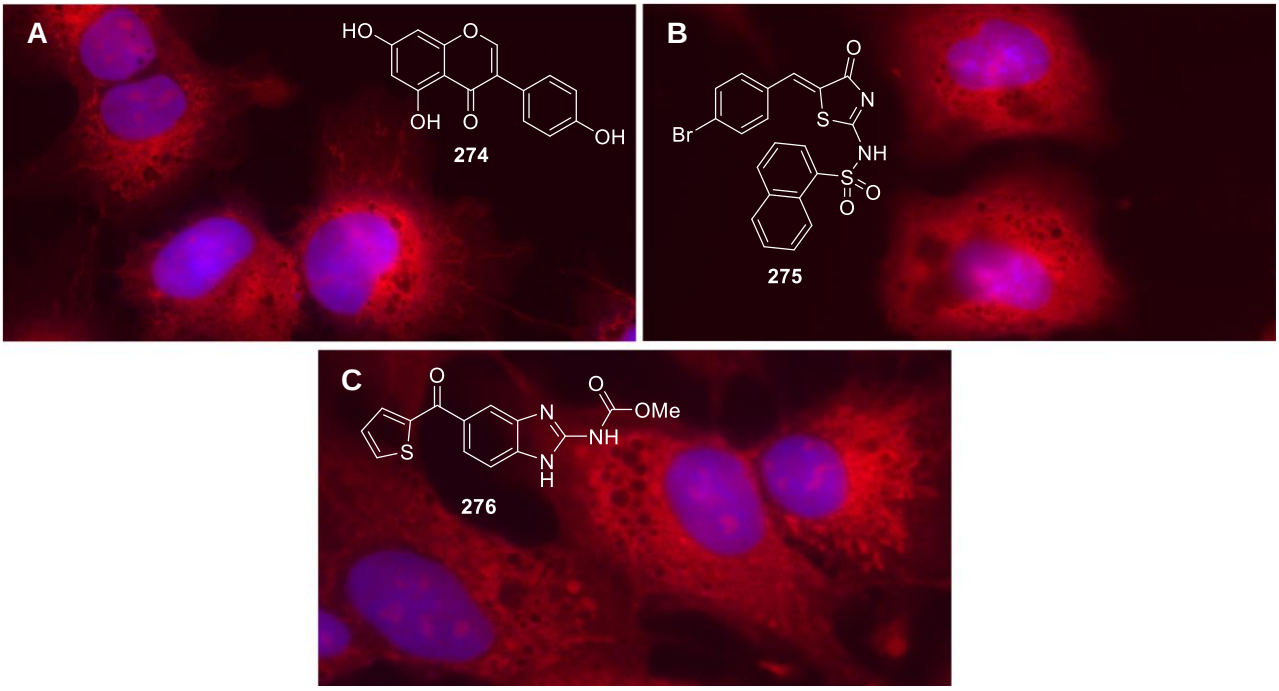


Abbildung 46: *Öl-Immersionsmikroskopieaufnahmen von HepG2-Zellen mit einem Nikon ECLIPSE Ti-S Fluoreszenzmikroskop nach Inkubation mit verschiedenen Zellaufnahmeinhibitoren gefolgt von einer Inkubation in einer 10 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** für 3 h ; **A**: Inkubation in einer 200 µM Lösung aus Genistein **274** für 30 min; **B**: Inkubation in einer 20 µM Lösung aus Pitstop® 2 **275** für 30 min; **C**: Inkubation in einer 20 µM Lösung aus Nocodazol **276** für 30 min (blau: Zellkerne angefärbt mit Hoechst 33342, rot: **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)**).*

Stattdessen wurde beobachtet, dass **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** an der Zelloberfläche zu adhärieren schien. Die Adhäsion kann ein Hinweis auf eine Bindung an einen Rezeptor sein, der die Endozytose über die oben beschriebenen Wege vermittelt. In der in **Abbildung 45** B dargestellten Aufnahme wurde eine solche Adhäsion ohne die Anwesenheit der Aufnahmeinhibitoren nicht beobachtet.

Zu einer Kontrolle dieser Schlussfolgerung könnten die HepG2-Zellen in einem darauf aufbauenden Experiment bei 4 °C mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** inkubiert werden, da bekannt ist, dass dass bei dieser Temperatur keine Endocytose stattfindet.[191] Folglich sollte ein ähnliches Ergebnis wie in **Abbildung 46** erhalten werden. Darüber hinaus könnte in weiteren Experimenten bei unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren mithilfe von zeitlich aufgelösten Mikroskopieaufnahmen untersucht werden, welcher Aufnahmeweg wie lange blockiert wird. Anhand der Ergebnisse könnte ein bevorzugter Internalisierungsweg identifiziert werden.

Um zu überprüfen, ob die Sonde **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** tatsächlich über einen Rezeptor gebunden wird, könnten die Zellen aus **Abbildung 46** in einem Verdrängungsassay mit **MB OB3b(Zn)** behandelt werden. Nach einem Wechsel des Mediums sollte keine anhaltende Fluoreszenz der Zelloberfläche zu beobachten sein. Des Weiteren könnte der mögliche Einfluss der Modifikation von **MB OB3b(Zn)** zu **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** auf eine Internalisierung analysiert werden, indem verkupferte HepG2-Zellen zunächst mit den Zellaufnahmeinhibitoren und danach mit **MB OB3b(Zn)** analog zu dem unter 3.3.3.4 beschriebenen Experimenten behandelt werden. Bei einer verringerten mittleren entfernten Cu-Menge im Vergleich zu den in diesem Abschnitt beschriebenen Werten, kann auf inhibierte Internalisierung geschlossen werden.

Zusammengefasst verdeutlichten die durchgeführten *in vitro* Fluoreszenzmessungen sowohl eine Aufnahme und Lokalisierung der bioaktiven Sonde **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** in den Lysosomen als auch eine Inhibierung der Internalisierung, die auf eine Rezeptor-vermittelte Endozytose hinweist.

3.3.5.3 In vivo Fluoreszenzmessungen

Abgesehen von *in vitro* Studien war es im Rahmen dieser Dissertation ebenfalls möglich, eine der hergestellten Sonden im lebenden Tiermodell nachverfolgen zu können. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten *in vivo* Fluoreszenzaufnahmen mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** (**Abbildung 47**) wurden von HANNES ROLBIESKI in den Laboren der Arbeitsgruppe von Dr. OLIVER BRUNS am Helmholtz Pioneer Campus angefertigt. Bei den Aufahmen ist zu beachten, dass durch die Fluoreszenz der Farbstoff sichtbar gemacht wird. Daher werden die Ergebnisse in diesem Abschnitt unter dem Vorbehalt diskutiert, dass die Sonde nicht metabolisiert wurde.

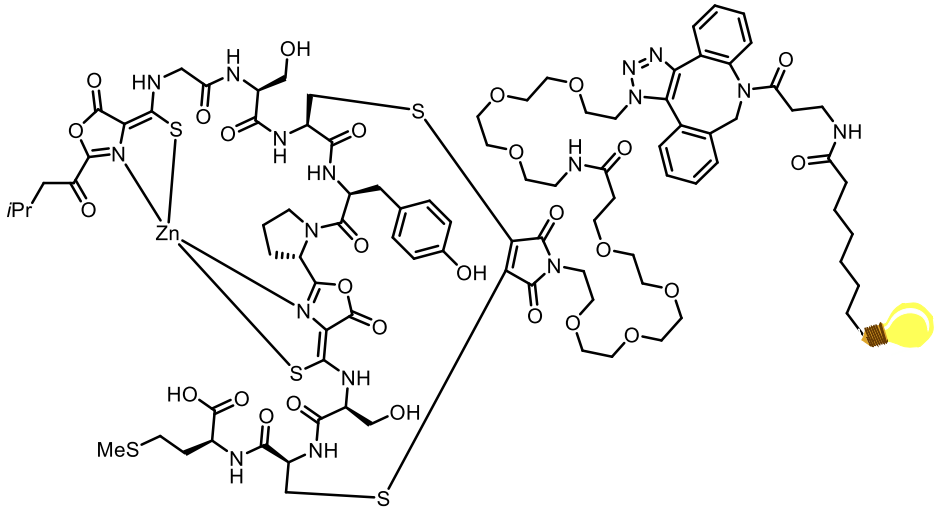


***Abbildung 47**: Struktur von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)**. Die Struktur von sNIR ist wegen patentrechtlicher Gründe nicht gezeigt und durch eine Glühbirne symbolisiert.*

In einem ersten Experiment wurden über einen kontinuierlichen Zeitraum nach der Injektion (*Post*-Injektion: PI) Bilder aufgenommen, in denen die Sonde durch eine helle Färbung im Körper der Maus sichtbar war (**Abbildung 48**). In **A** ist 2 min PI eine Verteilung der Sonde im Blutkreislauf (Färbung der Blutgefäße) neben einer Anreicherung in der Leber als stark durchblutetes Organ sichtbar. Etwa 10 min PI wurde eine maximale Leberkonzentration von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** erreicht (**Abbildung 48** B). Nach einer Anreicherung in der Leber wurde die Sonde in die Blase transportiert, deren Färbung innerhalb der nächsten 5 min (insgesamt 15 min PI) intensiver wurde als die der Leber (**Abbildung 48** C). 45 min PI konnte die Leber nur noch geringfügig vom umliegenden Gewebe unterschieden werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der Großteil des modifizierten Naturstoffes zu diesem

Zeitpunkt bei ansonsten gleichbleibender Gewebeverteilung aus der Leber in die Blase exkretiert war (**Abbildung 48** D). Bis zum Ende des Beobachtungszeitraum nach insgesamt 210 min PI (**Abbildung 48** F) konnte eine deutliche Abnahme der Gewebeverteilung festgestellt werden, sodass die renale Ausscheidung von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** zu diesem Zeitpunkt fast vollständig war.

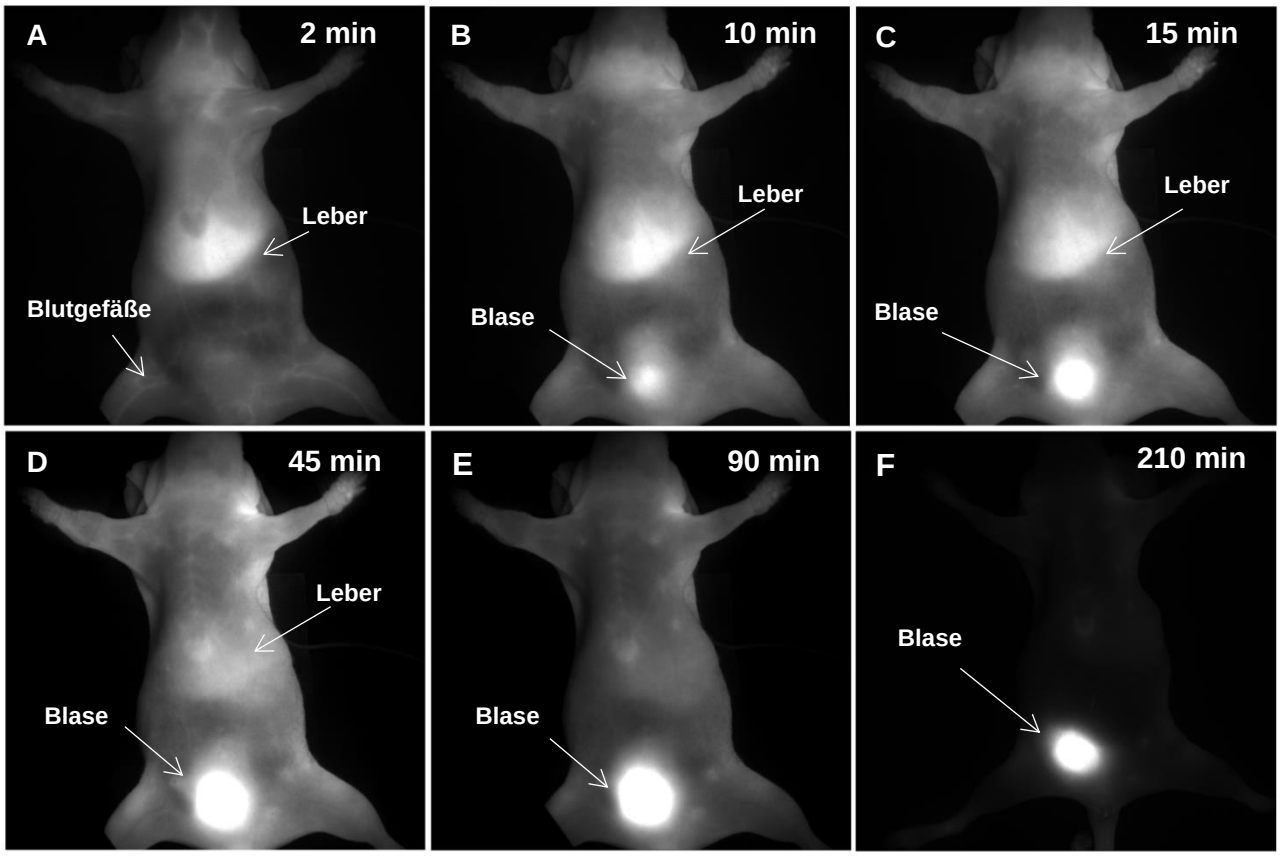


***Abbildung 48**: Zeitaufgelöste Infrarotfluoreszenzaufnahmen (Belichtungszeit: 50 ms, Vergrößerung: 0.43, gleicher Kontrast) nach der Injektion von 100 µL einer 50 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)**; **A**-**E**: Maus 1; **F**: Maus 2.*

Die vorrangige renale *clearance* von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** ist erwartungsgemäß, da die verwendete Sonde eine hohe Polarität aufweist. Des Weiteren zeigte der zur Modifikation verwendete sNIR-Farbstoff in früheren Experimenten im Vergleich zu ähnlichen Farbstoffen bevorzugt eine renale Exkretion.[165]

In den Studien von LICHTMANNEGGER *et al.* wurde ebenfalls eine Ausscheidung des für die Behandlung der Atp7b-*knock-out* Ratten eingesetzten **MB OB3b(Zn)** über die Blase beobachtet.[23] Die Autor:innen berichteten weiterhin davon, dass ein Großteil des entfernten Cu nach einer biliären Exkretion in dem Faeces wiedergefunden wurde. Dieses Ergebnis bedeutet, dass das Cu-koordinierende **MB OB3b(Cu)** hauptsächlich über die Leber ausgeschieden wird. Es lässt aber keinen Schluss zu, ob das im großen

Überschuss eingesetzte **MB OB3b(Zn)** ebenfalls biliär oder renal exkretiert wurde. Wie im Abschnitt 3.3.3.4 erläutert wurde, führen lediglich 10 % des zur Behandlung der Atp7b-*knock-out* Ratten verwendeten **MB OB3b(Zn)** zu einer biliären Ausscheidung des Cu in Form von **MB OB3b(Cu)**. Die in **Abbildung 48** beobachtete bevorzugte renale Exkretion in der gesunden Maus ist folglich unter diesem Aspekt einzuordnen, dass eine bliäre *clearance* von 10 % und weniger durch die helle Färbung der Blase nicht sichtbar wäre.

Prinzipiell ist eine hepatische Ausscheidung von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** aber auch in der gesunden Maus denkbar, da eine Aufnahme in HepG2-Zellen auf Grundlage der *in vitro* Untersuchungen in Abschnitt 3.3.5.2 nachgewiesen werden konnte. Aufgrund von zeitaufgelösten Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen konnte aber gezeigt werden, dass frühestens nach 2 h eine Aufnahme in die Zellen detektierbar war. Eine entsprechend langsame Aufnahmekinetik der Sonde **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** in die Leberzellen der lebenden Maus könnte durch den Fluss im Tiermodell weiter herabgesetzt werden. Dies könnte die bevorzugte Exkretion in den Urin nach einer Anreicherung in der Leber bis 10 min PI erklären (**Abbildung 48**).

Da die Leber der vermutete primäre Wirkort von **MB OB3b** in den Atp7b-*knock-out* Ratten ist, ist die initiale Ansammlung von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** innerhalb von 10 min PI (**Abbildung 48** B) von besonderem Interesse. Aus diesem Grund wurden im Folgenden die, auf die jeweiligen Maxima normalisierten relativen Fluoreszenzintensitäten (RFUs) der Leber und der Gefäße des Vorderlaufs über einen Zeitraum von 90 min PI miteinander verglichen (**Abbildung 49** A).

Dies lässt direkt einen Schluss auf die Verteilung der Sonde in den unterschiedlichen Körperteilen zu. Wie zuvor beschrieben, erreichte die Leberkonzentration des modifizierten Naturstoffes innerhalb kurzer Zeit ein Maximum (nach ca. 9 min PI). Eine maximale Anreicherung in den Gefäßen des Vorderlaufs konnte nach ungefähr 23 min PI beobachtet werden. Die absoluten RFUs der Leber waren mit Ausnahme der Phase kurz nach der Injektion zu jedem Zeitpunkt höher als die der Gefäße des Vorderlaufs (**Abbildung 49** B). Dies verdeutlicht, dass eine Ansammlung von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** in der Leber bevorzugt war und diese über einen, im Vergleich zum Gewebe im Vorderlauf unterschiedlichen Transportmechanimus ablief.

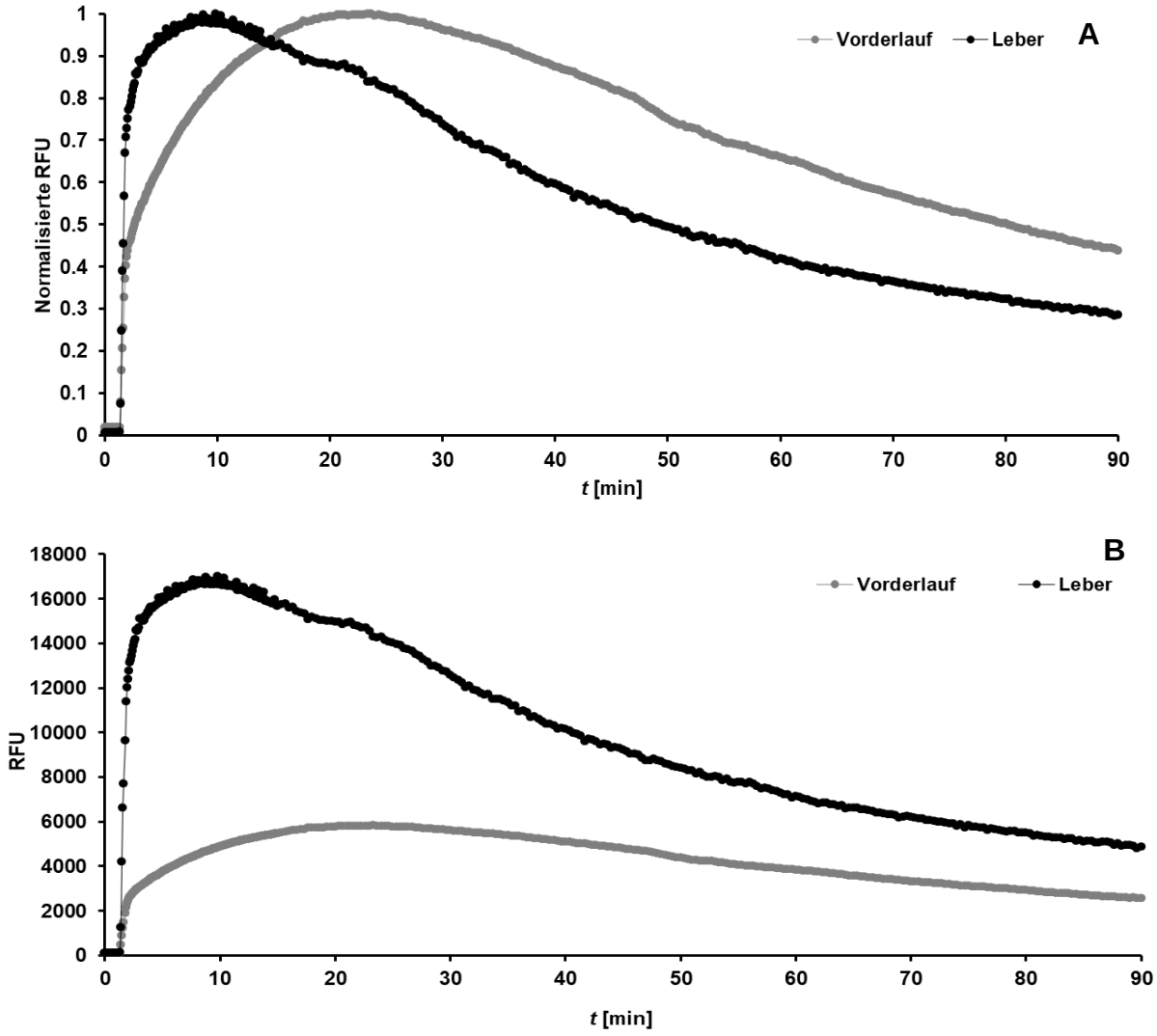


***Abbildung 49**: Zeitliche Verläuf der, auf das jeweilige Maximum normalisierten RFUs (**A**) und der absoluten RFUs (**B**) des Vorderlaufs (grau) und der Leber (schwarz) auf Grundlage der Infrarotfluoreszenzaufnahmen aus **Abbildung 48**; erstellt mit ImageJ.*

Nach dem Erreichen der maximalen Konzentration von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** in der Leber und in den Gefäßen des Vorderlaufs konnte anschließend eine kontinuierliche und gleichmäßige Abnahme der RFUs beobachtet werden (**Abbildung 49**). Eine deutliche Konzentrationsabnahme der Sonde in der Leber wurde bereits vor dem Erreichen der Maximalkonzentration im Muskelgewebe nachgewiesen (23 min in **Abbildung 49** A).

Zur Ermittlung einer detaillierten Aufnahme- und Exkretionskinetik des Cu-Chelators *in vivo* müssen in Zukunft weitere Experimente durchgeführt werden. Diesbezüglich können PET-Messungen mit den entsprechenden radioaktiv markierten Derivaten einen wertvollen Beitrag leisten. Unter 3.3.5.1 wurde beschrieben, dass sich die bioaktive Sonde **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** wegen der langsamen Aufnahme-Kinetik nicht für *in vitro* PET-Untersuchungen eignete. Da in den hier beschriebenen *in vivo* Untersuchungen eine rasche Verteilung gefolgt von einer schnellen Exkretion hauptsächlich in die Blase festgestellt wurde, ist eine Verwendung von ^{18}F als Radionuklid für eine Bestimmung der *in vivo* Bioverteilungskinetik ideal.

Um zu klären, ob **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** durch die beobachtete Anreicherung in der Leber ebenfalls metabolisiert über die Galle in den Darm ausgeschieden wurde, wurden drei unterschiedliche Mäuse nach 45 min PI, 90 min PI und 210 min PI euthanasiert und mithilfe des gleichen Messaufabaus Einzelbilder *ex vivo* aufgenommen. Des Weiteren wurde der Urin aus der Blase und die Flüssigkeit aus der Gallenblase gesammelt und tiefgefroren, um diese in Zukunft auf mögliche Metabolite von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** massenspektrometrisch untersuchen zu können.

Als erstes wurden die euthanasierten Mäuse nach einem Aufschnitt der Bauchdecke untersucht (**Abbildung 50**).

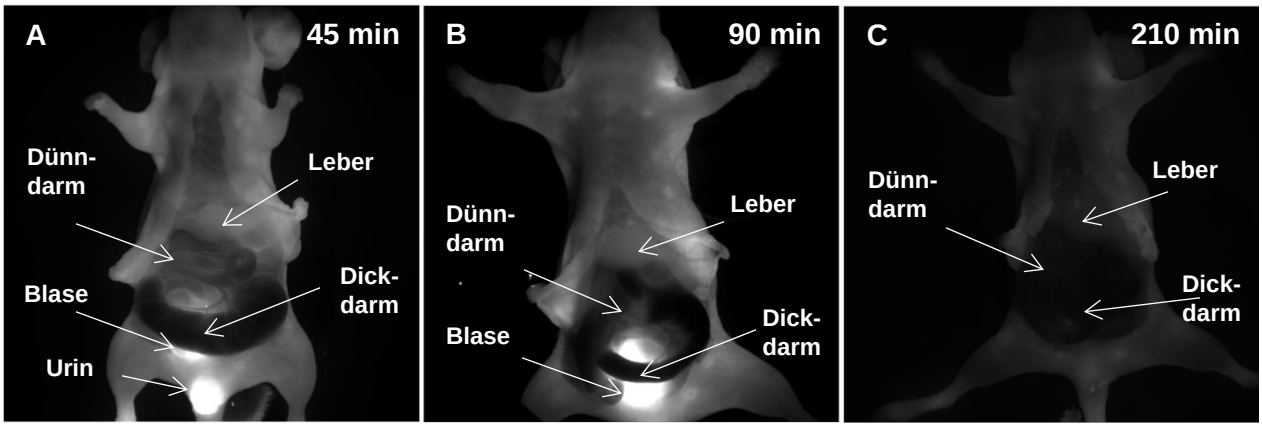


***Abbildung 50**: Infrarotfluoreszenzaufnahmen der euthanasierten und geöffneten Mäuse mit unterschiedlichen Kontrasten; **A**: Maus 1 mit verdeckte Blase und Austritt von Urin (Belichtungszeit: 500 ms, Vergrößerung: 0.43); **B**: Maus 2 mit verdeckte Blase (Belichtungszeit: 50 ms, Vergrößerung: 0.43); **C**: Maus 3 geleerte Blase (Belichtungszeit: 50 ms, Vergrößerung: 0.43).*

In allen Fällen ist eine Färbung der Leber zu erkennen, die in keinem Fall intensiver war als die der restlichen Körperteile. Außerdem wurde keine Färbung des Dünndarms oder des Dickdarms beobachtet. Daher war über den beobachteten Zeitraum keine Ausscheidung aus der Leber in diese Organe detektierbar. Folglich kann die Abnahme der Konzentration von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** in der Leber (vgl. **Abbildung 49**) vorrangig mit der oben beschriebenen Exkretion in die Blase begründet werden.

Diese Schlussfolgerung konnte mit einer *ex vivo* Untersuchung der Lebern aus den drei euthanasierten Mäusen nach den zuvor erwähnten Zeiträumen bestätigt werden (**Abbildung 51**). In allen Fällen konnte zwar die Sonde in dem Organ nachgewiesen werden, jedoch war die Gallenblase im Vergleich zu den restlichen Teilen der Leber nicht intensiver gefärbt. Bei einer verstärkten biliären Exkretion wäre zu erwarten gewesen, dass ein größerer Anteil der Sonde in der Gallenblase enthalten wäre.

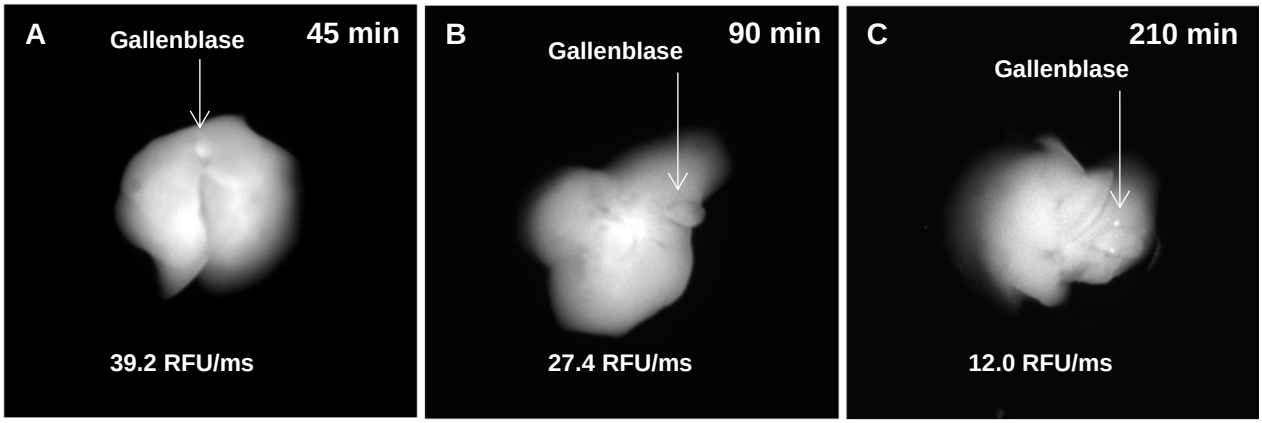


***Abbildung 51**: Infrarotfluoreszenzaufnahmen der entnommenen Lebern mit unterschiedlichen Kontrasten und RFUs; **A**: Maus 1, Belichtungszeit: 500 ms, Vergrößerung: 0.75; **B**: Maus 2, Belichtungszeit: 50 ms, Vergrößerung: 0.75; **C**: Maus 3, Belichtungszeit: 50 ms, Vergrößerung: 0.75; Auswertung erfolgte mit ImageJ.*

Folglich fand, wie auch im Fall der Atp7b-*knock-out* Ratten (vgl.: 10 % Exkretion nach Cu-Koordination über die Leber in den Faeces) keine vermehrte hepatische *clearance* statt, die mithilfe der Fluoreszenzaufnahmen detektiert werden konnte. Die abnehmende Leberkonzentration aufgrund der renalen Ausscheidung lässt sich ferner anhand der RFU des Organs pro ms Belichtungszeit nachvollziehen (**Abbildung 51**). Zwischen Minute 45 PI und Minute 90 PI nahm demnach die Konzentration um ungefähr ein Drittel und zwischen Minute 90 PI und Minute 210 PI um etwa die Hälfte ab.

Die berechneten RFUs pro ms Belichtungszeit für alle entnommenen Organe sind in der nachfolgenden **Tabelle 12** zusammengefasst. Dabei ist zu beachten, dass nur Werte bei einer gleichen Vergrößerung direkt miteinander verglichen werden können. Bei allen Organen (Eintrag 1 und 3-7) abgesehen von den Nieren (Eintrag 2) lässt sich eine Abnahme der Konzentration von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** feststellen.

***Tabelle 12**: RFU pro ms Belichtungszeit für unterschiedliche entnommene Organe aus den euthanasierten Mäusen nach verschiedenen Zeitpunkte; Auswertung erfolgte mit ImageJ; a: Vergrößerung: 0.75; b: Vergrößerung: 1.50.*

Eintrag	Organ	RFU/ms nach 45 min (Maus 1)	RFU/ms nach 90 min (Maus 2)	RFU/ms nach 210 min (Maus 3)
1	**Leber[a]**	39.2	27.4	12.0
2	**Niere[b]**	138.9	146.9	183.0
3	**Milz und Pankreas[a]**	13.6	11.9	3.7
4	**Magen[a]**	38.5	17.9	10.5
5	**Herz[a]**	9.22	10.4	6.1
6	**Lunge[a]**	56.0	27.6	15.4
7	**Gehirn[b]**	3.4	3.8	2.8

Die steigenden Werte für die Niere korrelieren mit der zuvor beobachteten Anreicherung der Sonde in der Blase. Neben einer Verteilung in der Leber und der Niere konnte eine Anwesenheit des Chelators im vergleichbaren Maße in der Lunge festgestellt werden (Eintrag 6, Vergößerung: 0.75). Diese Beobachtung kann mit der starken Durchblutung dieses Organs erklärt werden. Die erhöhten Werte im Magen (Eintrag 4 Vergößerung: 0.75) können auf die Eigenfluoreszenz des Futters bei der eingestrahlten Wellenlänge von λ = 785 nm zurückgeführt werden (**Abbildung 52**).

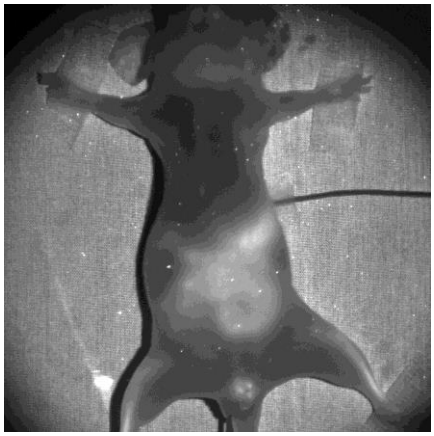


***Abbildung 52**: Infrarotfluoreszenzaufnahme (Belichtungszeit: 500 ms, Vergrößerung: 0.43) einer Maus vor Injektion der 50 µM Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)**.*

In Milz und Pankreas (Eintrag 3, Vergößerung: 0.75), Herz (Eintrag 5, Vergößerung: 0.75) und Gehirn (Eintrag 7, Vergößerung: 1.50) wurde die Sonde in niedrigen Mengen nachgewiesen. Die messbaren Spiegel der Sonde im Gehirn sind unter dem Aspekt interessant, dass bei einer neurologischen Ausprägung der Kupferspeicherkrankheit zu einer Ansammlung von Cu in ZNS und in Gehirn kommt (vgl. 1.2.2). Vermutlich befindet sich **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** in diesem Organ nur in den Gefäßen, da es aufgrund seiner Polarität und Größe nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann.

Zusammenfassend konnte mithilfe der in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse verdeutlicht werden, dass sich die zur *in vivo* Fluoreszenzmessung eingesetzte Sonde **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** nach der Injektion hauptsächlich in Leber und in der Niere verteilt. Daraufhin erfolgt vorrangig eine Exkretion in die Blase.

In folgenden Experimenten sollte in Zukunft ein unpolarer Farbstoff an **MB OB3b** konjugiert werden, der hauptsächlich eine biliäre Ausscheidung aufsweist (z.B. ICG oder Cy-7).[192] Falls die eingesetzte Sonde wie **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** ebenfalls

verstärkt renal exkretiert wird, ist dies auf das Verhalten des Naturstoffes zurückzuführen. Für den Fall, dass eine verstärkte biliäre Exkretion beobachtet wird, lässt sich schlussfolgern, dass die Modifikation durch den Farbstoff die Ausscheidung der Sonde maßgeblich bestimmt und **MB OB3b** vermutlich über beide Wege gleichermaßen exkretiert wird.

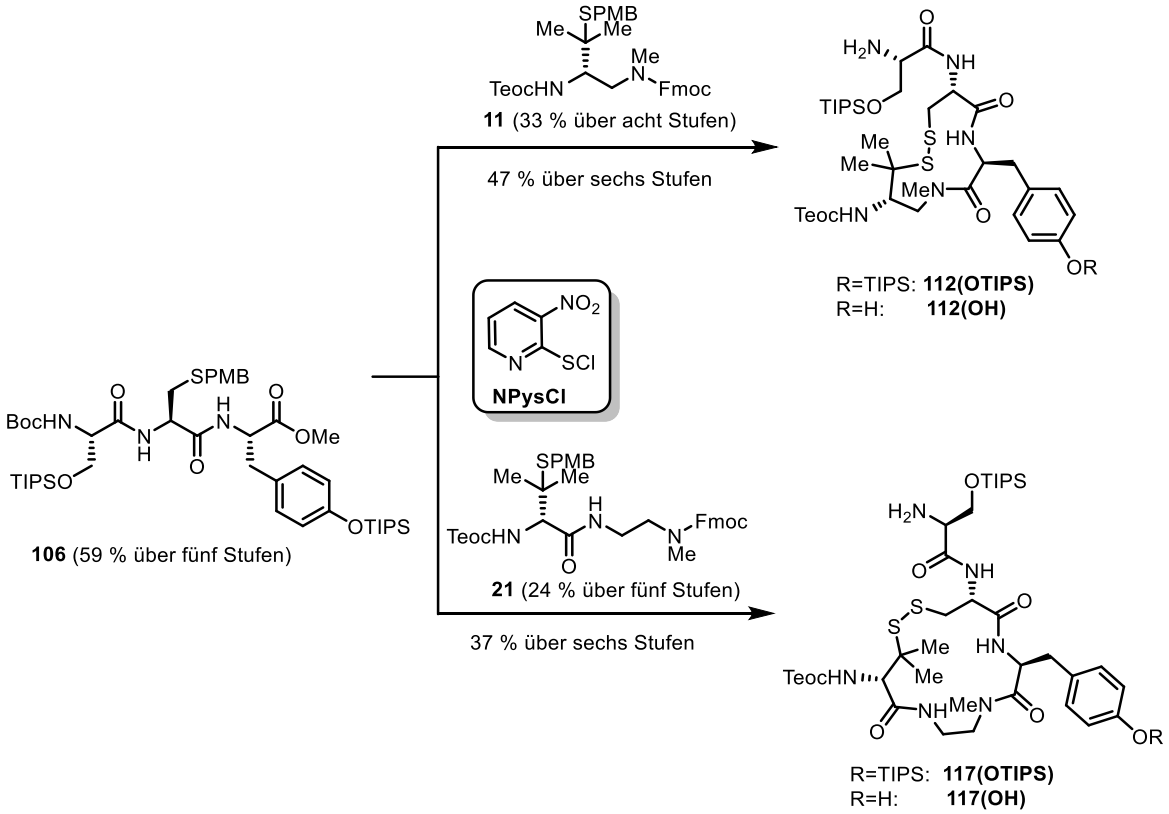
Letztendlich sollte die in diesem Abschnitt anhand der Untersuchung von gesunden Mäusen entwickelte Methodik auf Atp7b-*knock-out* Ratten transferiert werden. Dadurch könnte der Wirkmechanismus von **MB OB3b** in diesem, bislang am häufigsten eingesetzten Tiermodell für MW aufgeklärt werden. Darüber hinaus können die im Abschnitt 3.3.5.1 beschriebenen PET-Sonden auf Basis der Radionuklide ^{18}F und ^{64}Cu eingesetzt werden, um Kinetiken in den Atp7b-*knock-out* Ratten zu bestimmen. Diesbezüglich können die Aufnahme, die Verteilung und die Exkretion entweder mit dem Radionuklid ^{18}F über einen kürzeren oder mit dem Radionuklid ^{64}Cu über einen längeren Zeitraum analysiert werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

4.1 SYNTHESE STRUKTURVEREINFACHTER NATURSTOFFDERIVATE

In diesem Kapitel wird der erste bekannte synthetische Zugang zu **MB OB3b** ähnlichen Molekülen beschrieben. Dafür wurde eine synthetische Methode entwickelt, die eine Verknüpfung zwischen einem hochsubstituierten Oxazol und einem peptidischen Fragment von **MB OB3b** über ein Thioamid herzustellen. Dies ermöglichte die erfolgreiche Synthese strukturvereinfachter Naturstoffderivate, die in zukünftigen Untersuchungen als einfacher zugängliche Surrogate von **MB OB3b** mit einer verbesserten Atomökonomie bezüglich der Cu-Koordination werden können.

In einem ersten Schritt wurden dafür die modifizierten Penicillamine **11** und **21** in einer Ausbeute von 33 % über acht Stufen bzw. 24 % über fünf Stufen als südliche Teile der unterschiedlichen strukturvereinfachten Naturstoffderivate hergestellt (**Schema 107**).



***Schema 107**: Synthese der Disulfidamine **112(OTIPS)/112(OH)** mit einem CH_2-Linker und **117(OTIPS)/117(OH)** mit einem C_2H_4-Linker ausgehend von Tripeptid **106**.*

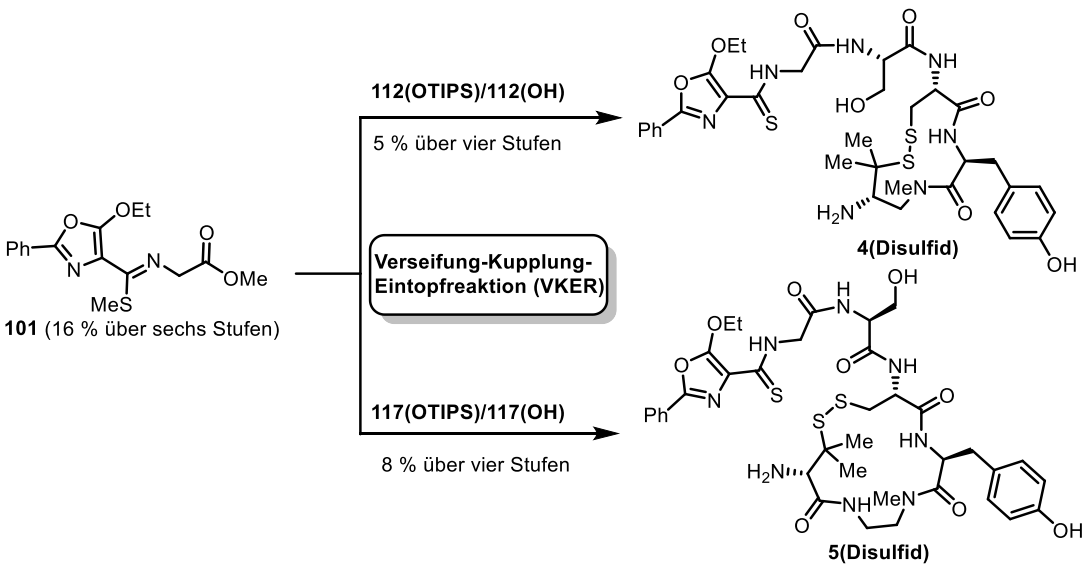
Im Weiteren wurden **11** und **21** mit dem Tripeptid **106**, das als Peptidfragment von **MB OB3b** in 59 % über fünf Stufen erhalten werden konnte, in einer HATU vermittelten

Peptidkupplung verknüpft. Die erhaltenen Oligopeptide mit einem CH_2-Linker und einem C_2H_4-Linker wurden im Anschluss zu den Aminen **112(OTIPS)/112(OH)** und **117(OTIPS)/117(OH)** umgesetzt (**Schema 107**). In dieser Sequenz ist die Transformation der PMB-geschützten Thiole in das intramolekulare Disulfid besonders hervorzuheben. Mithilfe des in der Literatur beschriebenen Reagenzes NPysCl konnte in den hochfunktionalisierten Molekülen unter milden Bedingungen selektiv ein doppelter Austausch der Thioether zu den korrespondierenden NPys-Disulfiden erzielt werden.[55,56,58] Unter oxidativen Bedingungen war es im Anschluss möglich, sowohl einen Zwölfring als auch einen Fünfzehnring über die Bildung des intramolekularen Disulfids zu erhalten. Diese elegante Taktik bot den Vorteil einer Rigidisierung des Oligopeptids, in dem das Disulfid als interne Schutzgruppe der Thiole dient.

Ausgehend von **106** wurden die Mischungen aus den Aminen mit TIPS-geschütztem und TIPS-entschütztem Phenol in einer Ausbeute von 47 % über sechs Stufen bzw. 37 % über sechs Stufen erhalten (**Schema 107**). Die selektive Entfernung der Boc-Gruppe gegenüber der Teoc-Gruppe konnte mithilfe einer Reaktion mit *p*TSA in EtOH erreicht werden, die jedoch zu einer partiellen TIPS-Entschützung führte.

112(OTIPS)/112(OH) wurde ausgehend von D-PA in einer Ausbeute von 16 % über 14 Stufen LLS und **117(OTIPS)/117(OH)** wurde ausgehend von Bromoethylamin Hydrobromid in 2 % über 13 Stufen LLS synthetisiert. Die Ausbeute des Amins mit einem C_2H_4-Linker ist im Vergleich zu der des Amins mit einem CH_2-Linker geringer, da die Funktionalisierung des Bromethylamin Hydrobromids nur eine geringe Ausbeute lieferte (vgl. 3.1.3).

Als nördlicher Teil der strukturvereinfachten Naturstoffderivate wurde das Oxazol-Me-Thioimidat **101** ausgehend von Diethylaminomalonat Hydrochlorid in sechs Stufen mit einer Gesamtausbeute von 16 % synthetisiert (**Schema 108**). Diese ungewöhnliche Verbindung mit einem hochsubstituierten Oxazol konnte basierend auf einer optimierten Einführung des Schwefels mithilfe des LAWESSON-Reagenzes und einer abschließenden Methylierung erhalten werden. **101** war die Schlüsselverbindung zur Synthese der strukturvereinfachten Naturstoffderivate. Der zentrale Erkenntnisgewinn dieses Kapitels wurde durch die Anwendung der VKER in der Verknüpfung von **101** mit den oben erwähnten Disulfidaminen erzielt.



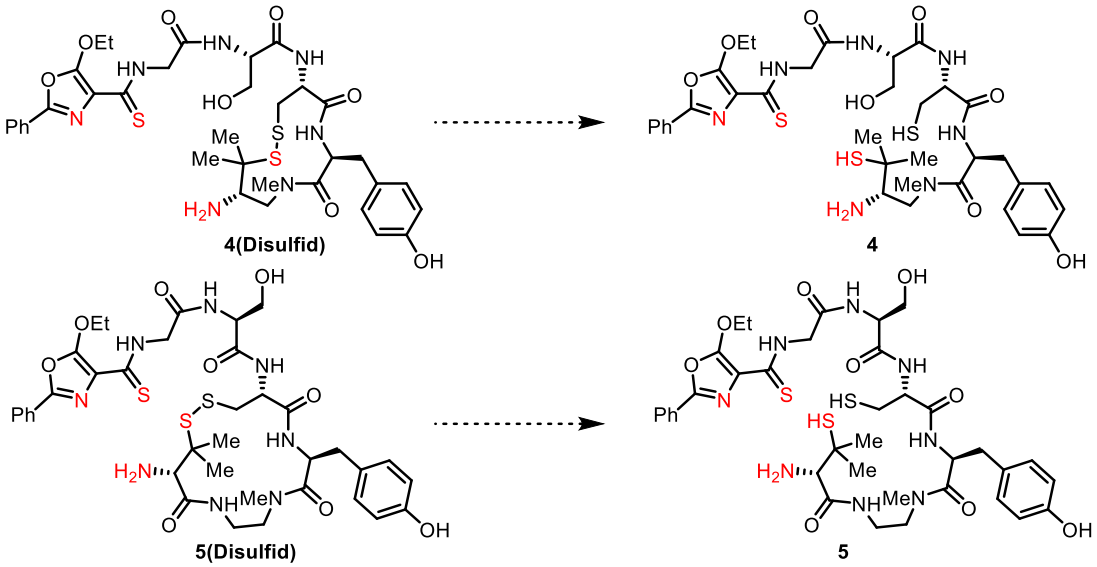
***Schema 108**: Weiterer Umsatz der Disulfidamine **112(OTIPS)/112(OH)** mit einem CH_2-Linker und **117(OTIPS)/117(OH)** mit einem C_2H_4-Linker durch eine VKER mit dem Me-Thioimidat **101** bis zu den strukturvereinfachten Naturstoffderivaten **4(Disulfid)** und **5(Disulfid)**.*

Die speziell für diese Kupplung etablierte Reaktion löste nach einer Vielzahl von untersuchten Methoden das Problem, die Verbindung zwischen dem Oxazol und dem peptidischen Fragment von **MB OB3b** über ein Thioamid herzustellen. Ausgehend von dem Me-Thioimidat konnte das Thioamid nach einer Entfernung der TIPS-Schutzgruppen mithilfe einer Reaktion mit H_2S erfolgreich freigesetzt werden (**Schema 108**). Die finale Teoc-Entschützung des *N*-Terminus erfolgte unter Lewis-sauren Bedingungen und ergab die Derivate **4** und **5** in einer als Disulfid geschützten Form (**4(Disulfid)** und **5(Disulfid)** in **Schema 108**) in 5 % bzw. 8 % über vier Stufen. Die Lagerung als intramolekulare Disulfide bietet den Vorteil, dass eine ungewollte Oligomerisierung durch eine intermolekulare Disulfidbildung unterdrückt wird. Daher zeigte sich, dass diese Strategie im Vergleich zur ursprünglich beabsichtigten offenkettigen Dithiolform vorteilhaft war.

Es wird ersichtlich, dass mit diesem Kapitel wertvolle Erkenntnisse zur Synthese **MB OB3b** ähnlicher Moleküle gewonnen werden konnten. Somit wurde das Ziel, praktikable Methoden für die Totalsynthese von **MB OB3b** zu etablieren erfüllt. Die potentiellen Chelatoren **4(Disulfid)** und **5(Disulfid)** wurden in einer Gesamtausbeute von 0.8 % über 18 Stufen LLS bzw. 0.2 % über 17 Stufen LLS synthetisiert.

Für eine Charakterisierung dieser Cu-Chelatoren hinsichtlich ihrer Affinität können die Disulfide entweder direkt auf Grundlage von Konkurrenzexperimenten mittels UV-VIS Titration[48] analysiert oder zuerst durch Reduktion zu den entsprechenden Thiol-

Verbindungen **4** und **5** umgesetzt werden (**Schema 109**). Es ist zu erwarten, dass **4(Disulfid)** und **5(Disulfid)** durch das Thioamid-Oxazol, das Disulfid und das Amin der modifizierten Pen-Einheiten bereits eine Cu-Affinität aufweisen. Aufgrund der stärkeren σ-Donoreigenschaft des Koordinationsmotivs (rot in **Schema 109**) sollten die Naturstoffderivate **4** und **5** potentere Chelatoren sein.



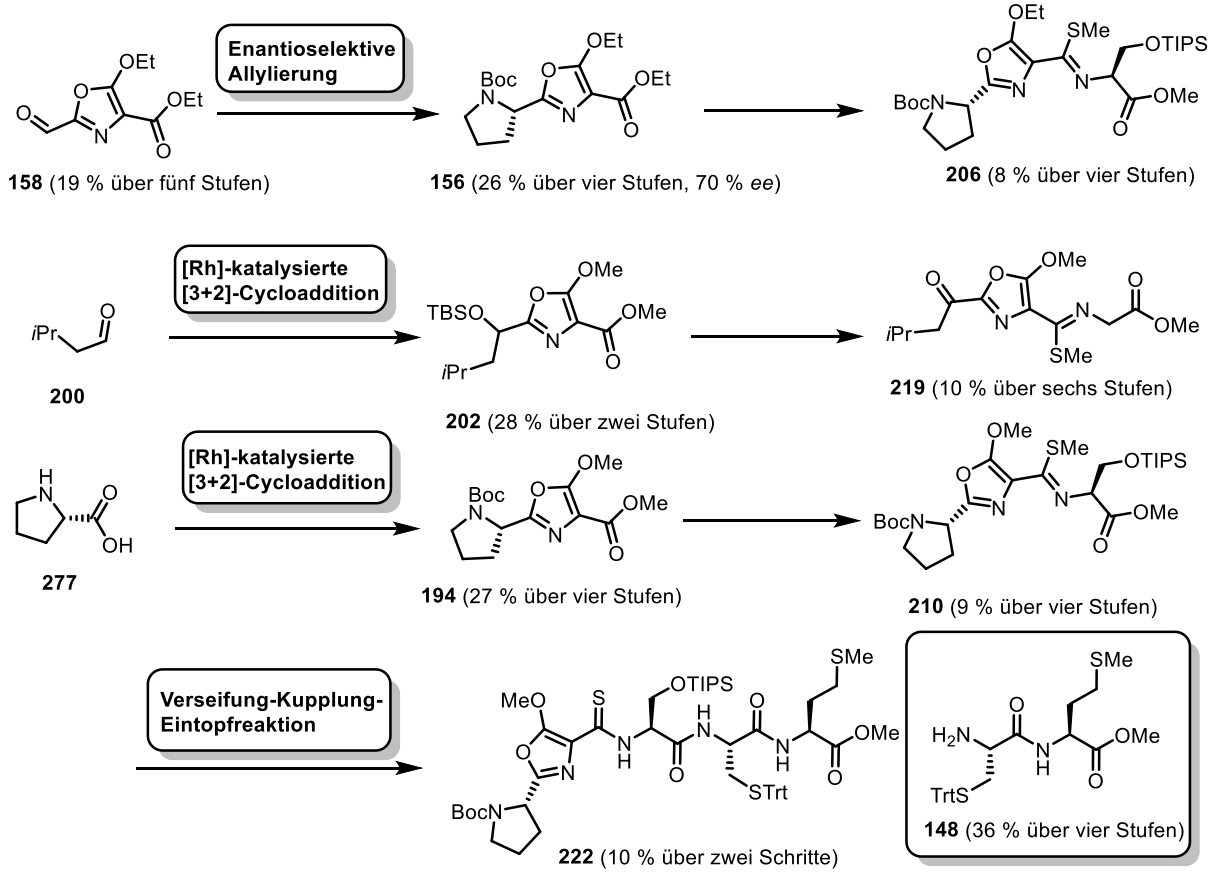
***Schema 109**: Reduktion der Disulfide in **4(Disulfid)** und **5(Disulfid)** zur Freisetzung der Thiole; Rot: N_2S_2-Koordinationsmotiv.*

Zur Validierung der UV-VIS Titrationen als Methode für die Bestimmung der Cu-Affinität wurden bereits erste Vorversuche mit **MB OB3b** durchgeführt. Dabei konnten die K_b-Werte aus der Literatur nicht reproduziert werden. Daher muss in Zukunft diese Methode zunächst etabliert werden, um die Cu-Affinitäten der unterschiedlichen Chelatoren **4(Disulfid)**, **5(Disulfid)**, **4** und **5** zu bestimmen.

Nach einer Ermittlung der unterschiedlichen Cu-Affinitäten können aus einem Vergleich mit **MB OB3b** Schlussfolgerungen im Hinblick auf notwendige Struktureinheiten (Oxazolon-Enthiole *vs.* Ph-Oxa(OEt)-Thioamid und Pen-Einheiten) sowie auf einen Abstand der N_2S_4-Koordinationsmotive (CH_2- vs. C_2H_4-Linker) getroffen werden. Darüber hinaus kann durch eine gezielte Modifikation (z.B. Dealkylierung des Heterozyklus) des Koordinationsmotivs (rot in **Schema 109**) bzw. der Peptidkette eine SAR-Studie durchgeführt werden, um die minimale pharmakophore Einheit eines **MB OB3b** ähnlichen Chelators zu ermitteln. Dies kann in Zukunft zu einer Entwicklung weiterer strukturvereinfachter Naturstoffderivate beitragen, die als Wirkstoffe gegen MW ergänzend zu **MB OB3b** in biologischen Studien eingesetzt werden können.

4.2 Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu MB OB3b

Durch die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten konnten die Grundlagen einer möglichen Totalsynthese von **MB OB3b** gelegt werden. Es wird ein synthetischer Zugang zu Fragmenten diskutiert, die zur Umsetzung der in **Schema 53** bis **Schema 55** unter 3.2.1 dargestellten Retrosynthese eingesetzt werden können. Diesbezüglich wurde die im ersten Teil erarbeite Strategie, Me-geschützte Thioamide zur Synthese von Thiopeptiden zu verwenden, auf die Strukturelemente des Naturstoffes transferiert. Von diesen Strukturelementen wurden zunächst zwei verschieden geschützte Boc-Pyr-Oxa-Me-Thioimidate synthetisiert (**Schema 110**).



***Schema 110**: Synthese des Me-Thioimidats **206** aus dem Aldehyd **158**, sowie der Me-Thioimidate **210** und **219** basierend [Rh]-katalysierter [3+2]-Cycloaddition und weitere Verknüpfung mit dem Dipeptidamin **148** zu dem Thioamid **157**.*

Die Et-geschützte Verbindung **206** konnte über 13 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 0.4 % hergestellt werden. Als problematisch bei der Synthese stellten sich die finalen Schritte ausgehend von dem Et-Ester **156** heraus, da besonders bei der Thionierung eine verstärkte Zersetzung des Startmaterials eintrat. Durch die Sequenz konnte eine Synthese des vielseitig einsetzbaren Aldehyds **158** gefolgt von einer enantioselektiven Transformation zu **156** entwickelt werden.

Mithilfe einer durchgeführten Optimierungsstudie konnte ein maximaler Enantiomerenüberschuss von 70 % in der asymmetrischen Allylierung zum Aufbau des Stereozentrums in **156** erzielt werden.

Eine Verbesserung der Synthese des zentralen Fragments von **MB OB3b** hinsichtlich der Ausbeute und der optischen Reinheit gelang durch die Anwendung der [Rh]-katalysierten [3+2]-Cycloaddition. Diesbezüglich erfolgte eine Darstellung der Me-geschützten Verbindung **210** über acht Stufen mit einer Gesamtausbeute von 2 %. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sowohl bei der Cycloaddition als auch bei der Thionierung zudem noch Startmaterial zurückgewonnen wurde. Außerdem gelang durch die Verwendung von Prolin als Ausgangsmaterial eine Isolierung des enantiomerenreinen Me-Esters **194**.

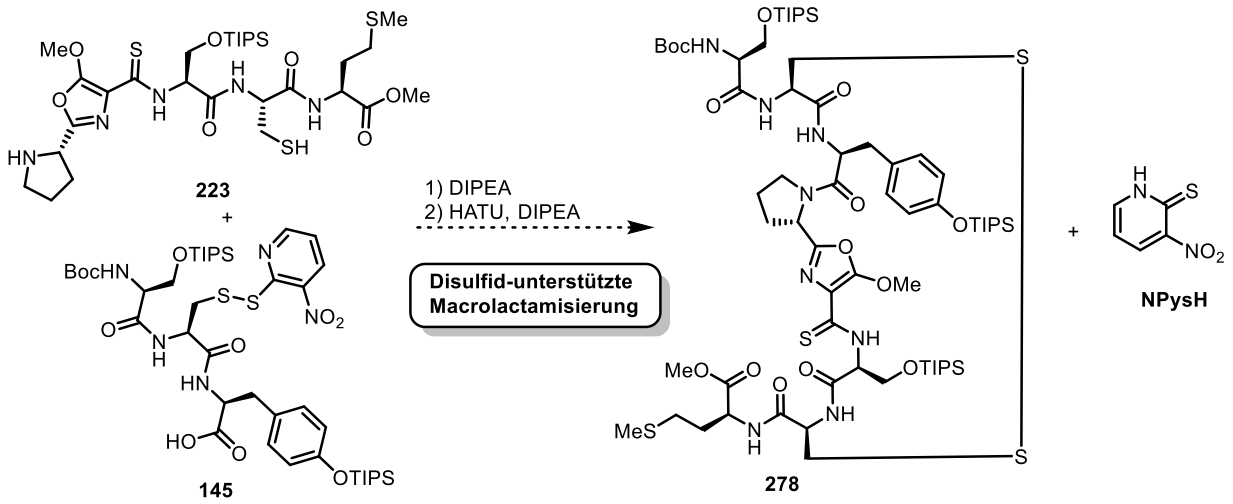
Basierend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen wurde **210** im Folgenden dafür verwendet, eine Verknüpfung mit dem Dipeptid **148** durchzuführen (**Schema 110**). Die Anwendung der im vorherigen Kapitel entwickelten VKER gefolgt von einer Entfernung der Me-Schutzgruppe des Thioamids ermöglichte zum ersten Mal in der Literatur die Synthese des thioamidhaltigen Tetrapeptids **222** aus **MB OB3b** als Rohprodukt in 10 % über zwei Stufen.

Als verbleibendes Me-Thioimidat-Fragment wurde das Keton **219** ebenfalls erfolgreich mit einer Ausbeute von 3 % über acht Stufen als Rohprodukt synthetisiert (**Schema 110**). Es zeigte sich, dass die [Rh]-Katalyse eine äußerst effiziente Methode zum Aufbau dieser hochfunktionalisierten und elektronenreichen Heterozyklen darstellt.

Ferner konnte die zuvor antizipierte Labilität der Oxazolon-Einheiten aus **MB OB3b** durch die Verwendung einer Me-Schutzgruppe erfolgreich herabgesetzt werden, um die synthetischen Transformationen zu ermöglichen.

In einem nächsten Schritt sollte die Synthese des Thioamids **222** optimiert werden, um dieses in ausreichender Menge zu Thiolamin **223** entschützen zu können (**Schema 111**). Ausgehend von **223** sollte in zukünftigen Untersuchungen die Verknüpfung mit der NPys-Carbonsäure **145** in einer Disulfid-unterstützten Macrolactamisierung erfolgen (**Schema 111**). Diese komplexe Umsetzung als Schlüsselschritt zum Aufbau des Grundgerüstes von **MB OB3b** sollte schrittweise in einer Reaktionsmischung erfolgen. Zunächst können **223** und **145** in einer stark verdünnten Lösung in Anwesenheit von

DIPEA als Base zu dem asymmetrischen Disulfid unter irreversibler Freisetzung von NPysH verbunden werden.[106]

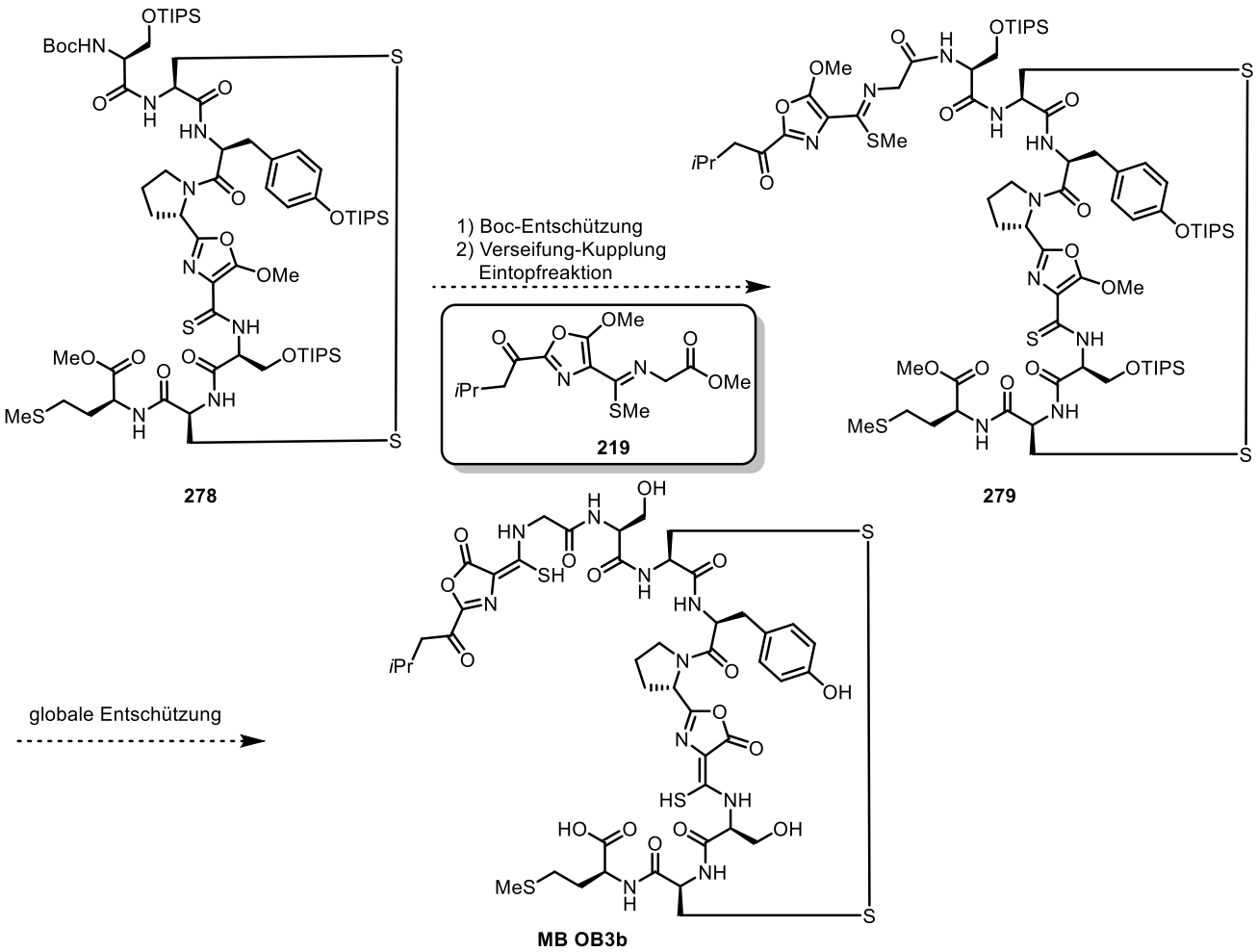


***Schema 111**: Mögliche Verknüpfung der Fragmente **223** und **145** zu dem intramolekularen Disulfid **278** in einer Disulfid-unterstützten Macrolactamisierung.*

Durch Zugabe eines Kupplungsreagenzes wie z. B. HATU lässt sich anschließend die Peptidbindung zwischen dem *C*-terminalen Tyr und dem *N*-terminalen Pyr herstellen, um den Makrozyklus zu **278** zu schließen. Zur weiteren Umsetzung von **278** kann auf die erarbeitete Methodik aus der Synthese der strukturvereinfachten Naturstoffderivate zurückgegriffen werden.

Eine nachfolgende Entfernung der Boc-Gruppe aus **278** würde ein Amin liefern, dass mit dem, in dieser Arbeit hergestellten Me-Thioimidat **219** in einer VKER eingesetzt werden könnte (**Schema 112**). Dadurch kann ein Zugang zu **279** ermöglicht werden, der das vollständige Oligopeptid des Naturstoffes **MB OB3b** enthält.

In den abschließenden Reaktionen der Totalsynthese müssen sämtliche Schutzgruppen aus **279** entfernt werden. Initial sollte das Me-Thioimidat im nördlichen Teil des Moleküls zum Thioamid gespalten werden. Das so freigesetzte N_2S_2-Bindemotiv könnte genutzt werden, um die Me-geschützten Oxazole für die darauffolgenden Entschützungsreaktionen zu stabilisieren, indem die Koordinationsstelle mit einem Metallion wie Cu^+ oder Zn^{2+} besetzt wird. Die simultane Entfernung aller TIPS-Schutzgruppen könnte mithilfe von TASF/H_2O (1/1) in DMF erfolgen, was im Endspiel der Synthese der strukturvereinfachten Naturstoffderivate bereits zu einem guten Ergebnis führte.



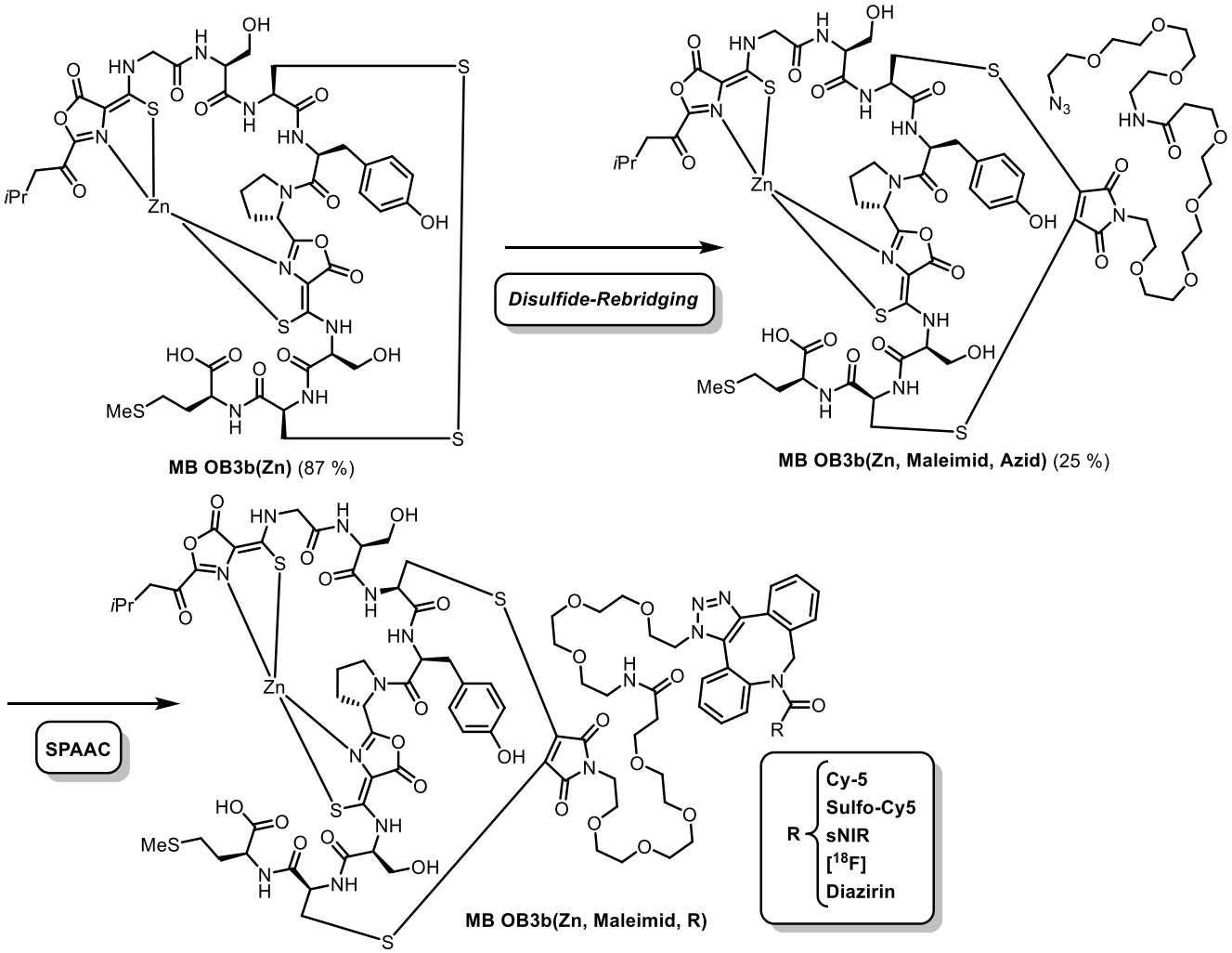
***Schema 112**: Mögliche Synthese von **279** durch Reaktion von **278** mit dem Me-Thioimidat **219** zum Aufbau des vollständigen Oligopeptids von **MB OB3b**, das durch eine Entfernung aller Schutzgruppen einen Zugang zu dem Naturstoff bietet.*

Danach sollte aus strategischen Gründen die Spaltung des Me-Esters erfolgen, um eine hydrolytische Öffnung der Oxazole zu vermeiden.[57] Für den Fall, dass bei einer Anwendung der Standardmethode (1 M *aq.* LiOH bei RT für 2-3 h) trotzdem eine Zersetzung stattfindet, könnte diese Reaktion auch wasserfrei mit TMSONa[193] oder Me_3SnOH[194] erfolgen. Die abschließende Entschützung der beiden Oxazole zu **MB OB3b** könnte mit einem geeigneten Nukleophil und einem Me-Abfangreagenz realisiert werden (**Schema 112**).

In einem weiterführenden Projekt könnten darüber hinaus Totalsynthesen der anderen bekannten Methanobactine[41] entwickelt werden. Diesbezüglich wurde ein erster Ansatz für einen möglichen synthetischen Zugang zu den heterozyklischen Enthiol- bzw. Thioamid-Koordinationseinheiten diskutiert.

4.3 SYNTHESE UND ANWENDUNG MB OB3B-BASIERTER SONDEN

In diesem Kapitel wird eine bisher unbekannte chemische Modifikation von **MB OB3b** zu Naturstoffderivaten beschrieben, die die Bioaktivität des Cu-Chelators nicht beeinträchtigt (**Schema 113**). Ferner wurde die dabei eingeführte Azid-Funktionalität erfolgreich genutzt, verschiedene Marker an das Derivat zu konjugieren, um vielseitig einsetzbare und gänzlich neuartige Sonden zu erhalten. Basierend auf diesen synthetischen Pionierarbeiten konnten die Sonden in vielversprechenden biologischen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden, um wichtige physiologische Parameter zu bestimmen, die eine Grundlage für die Weiterentwicklung von **MB OB3b** zu einem Wirkstoff gegen MW darstellen.



***Schema 113**: Modifikation von **MB OB3b(Zn)** mittels Disulfide-Rebridging zu **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** und Konjugation zu den verschiedenen Sonden mittels DBCO-vermittelter SPAAC.*

Diese Ergebnisse wurden durch die Modifikation des in 87 % hergestellten **MB OB3b(Zn)** mittels *Disulfide-Rebridging* ermöglicht (**Schema 113**). Nachdem sich

das interne Disulfid des Zn-Komplexes als essentiell für die Stabilität herausgestellt hatte, ergab die formelle Insertion eines Maleimids in diese Bindung das Modifikationsprodukt **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** in einer Ausbeute von 25 %.

Mithilfe von *in vitro* Entkupferungstests mit der Leberzelllinie HepG2 konnte nachgewiesen werden, dass sich der modifizierte Naturstoff in seiner Effizienz, Cu aus den Zellen zu transportieren, nicht von **MB OB3b(Zn)** unterscheidet und somit die Bioaktivität erhalten blieb. Bei diesen Experimenten wurden maximale *in vitro* Entkupferungseffizienzen von 0.95 % und 1.15 % für **MB OB3b(Zn)** bzw. **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** erzielt.

Basierend auf diesem fundamental wichtigen Ergebnis erfolgte die Konjugation von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** durch SPAAC mit verschiedenen DBCO-tragenden Markern (**Schema 113**). In diesem Zusammenhang wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Cy-5, Sulfo-Cy-5 und sNIR, das Radionuklid ^{18}F zur PET und ein Diazirin als Photoaffinitätsmarker angebracht.

In ersten *in vitro* Versuchen mit der PET-Sonde **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** konnte bestätigt werden, dass die auf dem Naturstoff basierende Sonde in die HepG2-Zellen aufgenommen wird. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 90 min konnte nur eine geringfügige Aufnahme in die Zellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Endozytose von Methanobactinen *in vitro* nicht in einer Größenordnung von Minuten sondern von Stunden stattfindet.

Unter Anwendung des fluoreszenzmarkierten **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** konnte eine mögliche Lokalisation der Sonde in den Lysosomen nach einer Aufnahme in HepG2-Zellen nachgewiesen werden. In einer, im Vergleich zu den PET-Studien verlängerten kinetischen *in vitro* Untersuchung wurde nach einer Inkubationszeit von 2 h eine messbare und nach 8 h eine maximale Zellkonzentration detektiert. Somit konnten erstmals die dynamischen Prozesse bei einer Behandlung mit dem natürlichen Cu-Chelator auf zellulärer Ebene sichtbar gemacht werden. Die Adhäsion von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** auf der Zelloberflache bei einer Verwendung von Aufnahmeinhibitoren deutete auf einen rezeptorvermitelten Internalisierung hin.

Bei *in vivo* Untersuchungen mit **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** als Nahinfrarot-Farbstoff markiertes Derivat an athymischen Mäusen zeigte sich, dass nach einer kurzen Zeit von 9 min nach der Injektion *i.v.* eine maximale Leberkonzentration erreicht wurde. Von

diesem Zeitpunkt an wurde die bevorzugt in der Leber angereicherte Sonde kontinuierlich über einen Zeitraum von 210 min hauptsächlich renal exkretiert. Bei einer nachfolgenden *ex vivo* Analyse der entnommenen Organe konnte eine vorrangige Anwesenheit des fluoreszenzmarkierten Naturstoffes in der Leber, der Niere und der Lunge festgestellt werden. Durch die zeitlich aufgelösten Fluoreszenzaufnahmen ließ sich zum ersten Mal eine *in vivo* Bioverteilung durch eine MB-basierte Sonde ermitteln. Insgesamt wurden auf Grundlage der biologischen Studien wertvolle Erkenntnisse für die Weiterentwicklung von **MB OB3b** zu einem neuen Wirkstoff gegen MW erhalten.

In zukünftigen Untersuchungen sollten die Aufnahmemechanismen in HepG2-Zellen mit den, in dieser Dissertation präsentierten Methoden weiter analysiert werden. Mithilfe einer Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Aufnahmeinhibitoren könnten spezifische Aufnahmewege in die Zellen ausgeschlossen werden. Eine Identifikation der bei der Internalisierung und bei dem weiteren Transport in der Zelle involvierten Proteine kann durch eine Anwendung der der Photoaffinitätssonde **MB OB3b(Zn, Maleimid, Diazirin)** erfolgen. Hinsichtlich der Experimente mit Radionukliden sollte in Zukunft ^{64}Cu mit einer größeren Halbwertszeit als ^{18}F verwendet werden. Nach einer Verkupferung der HepG2-Zellen könnte bei einer Behandlung mit **MB OB3b** eine Kinetik des gesamten Prozesses der Internalisierung, Cu-Koordination und der Exkretion von **MB OB3b(^{64}Cu)** über einen längeren Zeitraum beobachtet werden.

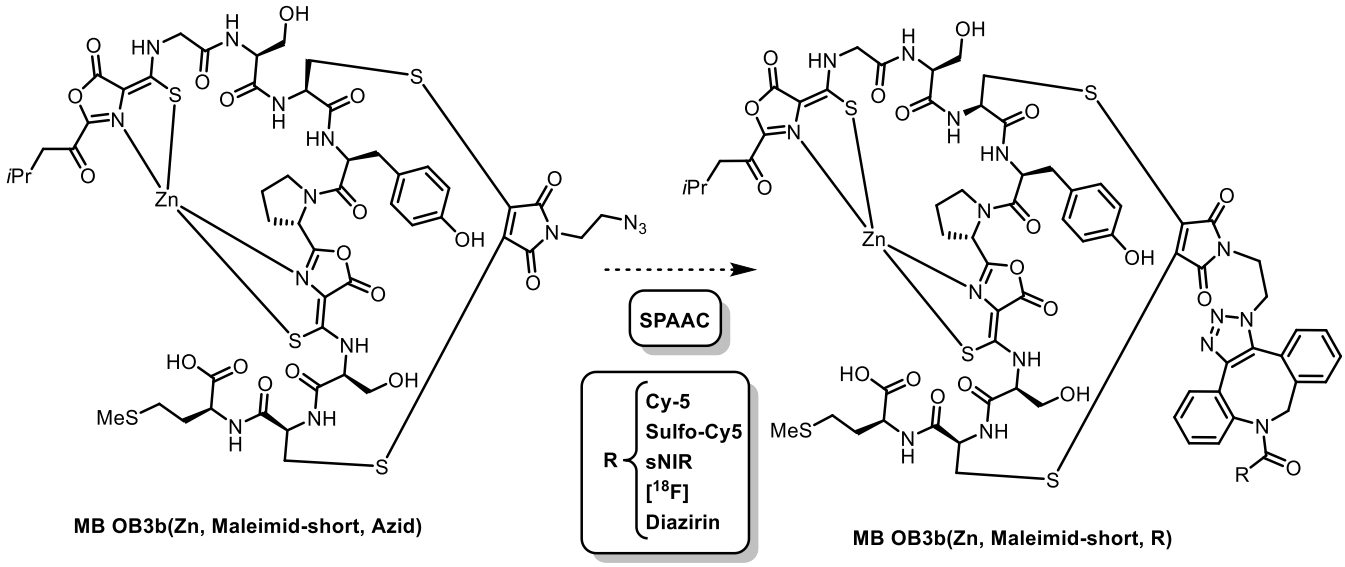
Zukünftig sollen diese *in vitro* Experimente mit Atp7b-*knock-out* Zellen wiederholt werden, um die Pathogenese der Kupferspeicherkrankheit besser abbilden zu können. In diesem Zusammenhang könnten auch die Auswirkungen einer Verkupferung der Zellen gefolgt von einer Entkupferung durch die MB-Derivate besser beurteilt werden.

Zusätzlich zu den *in vitro* Studien sollten weitere *in vivo* Untersuchungen durchgeführt werden. Einerseits könnte **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** mit einem unpolareren Farbstoff wie ICG oder Cy-7, für die eine biliäre *clearance* bekannt ist, konjugiert werden.[192] Auf Grundlage der erhaltenen Sonde könnte beurteilt werden, ob die, bei **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** beobachtete renale *clearance* durch den Farbstoff hervorgerufen wurde. Andererseits könnte mithilfe der PET-Sonde **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** die Kinetik über einen kurzen Zeittraum PI untersucht

werden, der in der Größenordnung der Halbwertszeit von ^{18}F liegt. Für die Beobachtung eines längeren Zeitraumes würde sich die Verwendung von ^{64}Cu anbieten.

Darüber hinaus wird von zentraler Bedeutung sein, die bei den *in vivo* Experimenten in gesunden Mäusen gewonnenen Erkenntnisse auf Atp7b-*knock-out* Ratten zu transferieren, da diese das bisher verwendete Tiermodell für MW darstellen.[23] Bei den Ratten ist eine Untersuchung mittels PET von besonderem Interesse. Mithilfe von ^{64}Cu können die Anreicherung in der Leber und die Entkupferung bei Gabe von **MB OB3b** hervorragend nachverfolgt werden.

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass die, in dieser Arbeit hergestellten Sonden ein, im Vergleich zum Naturstoff deutlich erhöhtes Molekulargewicht besitzen. Um Sonden mit einem geringeren Molekulargewicht zu erhalten, die **MB OB3b** ähnlicher sind als die Sonden mit einer PEG-Kette (vgl. **Schema 113**), könnte **MB OB3b(Zn, Maleimid-short, Azid)** als Ausgangssubstanz verwendet werden (**Schema 114**).



Schema 114: *Mögliche Synthese weiterer Sonden ausgehend von* ***MB OB3b(Zn, Maleimid-short, Azid)*** *mittels DBCO-vermittelter SPAAC.*

Diese Sonden mit einem C_2-Linker können ergänzend zur Aufklärung des Wirkmechanismus von **MB OB3b** und zur Ermittlung wichtiger physiologischer Parameter eingesetzt werden.

4.4 Überblick über die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse

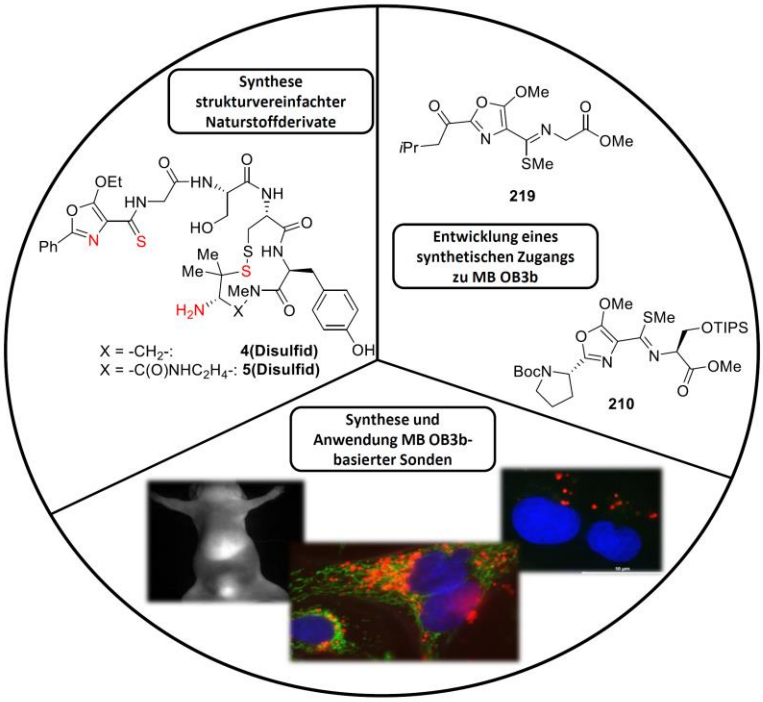


***Abbildung 53**: Übersicht über die drei Teilbereiche der vorliegenden Disseration mit wichtigen Aspekten der jeweiligen Kapitel.*

Mit der Synthese der strukturvereinfachten Naturstoffderivate **4(Disulifd)** und **5(Disulfid)** wurden praktikable Methoden für die Herstellung Methanobactin-ähnlicher Moleküle entwickelt. Es wurde eine Sequenz erarbeitet, ein geschütztes Oxazolon über ein Thioamid mit einem Disulfid-enthaltenen Oligopeptid zu verknüpfen. Die Schlüsselreaktion dieser Sequenz war die Verseifung-Kupplung-Eintopfreaktion eines Me-Thioimidats. In zukünftigen Untersuchungen sollen diese Derivate auf ihre Cu-Affinität untersucht und als neue Wirkstoffe gegen MW eingesetzt werden.

Die im ersten Teil der Arbeit entwickelte Synthesestrategie wurde dafür verwendet, Grundlagen für eine Totalsynthese von **MB OB3b** zu legen. Durch Anwendung der [Rh]-katalysierten [3+2]-Cycloaddition konnte ein Zugang zu den Me-Thioimidaten **210** und **219** ermöglicht werden, die in Zukunft eine Herstellung des Naturstoffes ermöglichen können.

Im abschließenden Kapitel wurde eine Modifikation von **MB OB3b** mittels *Disulfide-Rebridging* dafür genutzt, bioaktive Sonden zu erhalten. Mit diesen konnte *in vitro* eine zeitabhängige Lokalisation in den Lysosomen nachgewiesen sowie *in vivo* eine Bioverteilung in Mäusen ermittelt werden. Zukünftig sollen diese Experimente auf eine Untersuchung von Atp7b-*knock-out* Ratten als Tiermodell für MW transferiert werden.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 ALLGEMEINES

5.1.1 Arbeitstechniken, Materialien und Reagenzien

Alle nicht-wässrigen Reaktionen wurden standardmäßig unter trockener Ar Atmosphäre durch Verwendung von Schlenk-Linien Techniken durchgeführt. Kommerziell erhältliche Chemikalien und Lösungsmittel wurden, insofern nicht anders beschrieben, ohne weitere Reinigung verwendet und von SIGMA-ALDRICH, ACROS ORGANICS, ALFA AESAR, TCI CHEMICALS und FLUOROCHEM gekauft. Deuterierte Lösungsmittel wurden von DEUTERO GmbH erworben. Kommerziell erhältliche Farbstoffe wurden von LUMIPROBE GmbH gekauft. Für feuchtigkeitsempfindliche NMR-Proben wurden die Lösungsmittel über AlOx getrocknet.

Zur Filtration von Lösungen vor automatisierter chromatographischer Reinigung wurden CHROMAFIL® Xtra PTFE-45/25 Spritzenfilter der Firma MACHEREY-NAGEL mit einer Porengröße von 0.45 µm verwendet.

THF wurde über Na/Benzophenon getrocknet und unter Ar Atmosphäre destilliert. NEt_3 wurde über KOH und DIPEA über CaH_2 unter N_2 Atmosphäre destilliert.

Molekularsieb wurde vor Verwendung durch Erhitzen auf 160 °C im Hochvakuum über Nacht aktiviert.

0.1 M *aq.* Phosphatpuffer wurde nach der Methode von SØRENSEN hergestellt.[195] Dafür wurden 0.1 M *aq.* Stammlösungen von KH_2PO_4 (**A**, 13.61 g in 1000 mL H_2O) und Na_2HPO_4 x 2 H_2O (**B**, 17.80 g in 1000 mL H_2O) hergestellt. Für pH 6.5 wurden **A** (70 mL) und **B** (30 mL) miteinander vermischt und auf die angegebene Konzentration verdünnt. Für pH 7.8 wurden **A** (9 mL) und **B** (91 mL) miteinander vermischt und auf die angegebene Konzentration verdünnt.

0.05 M *aq.* Tris-Puffer wurde aus einer 0.2 M *aq.* Stammlösung aus Tris (**A**, 21.03 g in 1000 mL H_2O) und einer 0.1 M *aq.* Stammlösung aus HCl (**B**, 10 mL 1 M *aq.* HCl verdünnt auf 100 mL) hergestellt. Für pH 8.0 wurden **A** (50 mL) und **B** (55.8 mL) miteinander vermischt.

Zur Herstellung von 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5) wurde eine Lösung aus Hepes (2.38 g, 10 mmol) in H_2O (400 mL) mit 1 M *aq.* NaOH auf einen pH von 7.5 gebracht und mit H_2O auf 500 mL aufgefüllt.

Mikrowellen-unterstütze Reaktionen wurden der Monowave 450 Mikrowelle Firma ANTON-PAAR durchgeführt.

Zur Kühlung von Reaktionen wurden Eis-Salz Gemische für -20 °C und Trockeneis-Aceton Gemische für -78 °C eingesetzt.

Organische Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders angegeben, am Rotationsverdampfer der Firma BÜCHI unter vermindertem bei 45 °C entfernt. Wässrige Lösungen wurden mithilfe einer Gefriertrocknungsanalge Alpha 2-4 von CHRIST tiefgefroren konzentriert.

Radiochemische Reaktionen wurden in den dafür vorgesehenen Laboren der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. TOBIAS ROSS am Institut für Radiopharmazeutische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) durchgeführt. QMA Kartuschen (Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate Plus Light, 46 mg sorbent) wurden von WATERS erworben und mit 1 mL H_2O direkt vor Benutzung konditioniert. Sep-Pak tC18 Kartuschen (Sep-Pak tC18 Plus Light, 145 mg sorbent) wurden ebenfalls von WATERS erworben und mit 5 mL EtOH und 10 mL H_2O direkt vor Benutzung konditioniert. [^{18}F]Fluorid wurde durch eine ^{18}O(p,n)^{18}F Reaktion mittels Bombardierung von [^{18}O]-angereichertem H_2O (97-98 %) mit 11 MeV Protonen in einem Eclipse HP Cyclotron (SIEMENS, Knoxville, USA) an der MHH hergestellt. Vor der Radiosynthese wurde wässriges [^{18}F]Fluorid auf ein Anionenaustauschharz (QMA Kartuschen) immobilisiert, mit MeOH (1 mL) gewaschen und mit einem Argon-Strom für 1 min getrocknet. Bei diesem Prozess erfolgte die Immobilisierung des wässrigen [^{18}F]Fluorids und das Waschen/Eluieren des ^{18}F von unterschiedlichen Seiten der Kartusche.

Folgende Verbindungen wurden nach literaturbekannten Vorschriften hergestellt:

Boc-Cys(SPMB)-OMe **14**[67], Boc-Tyr(OTIPS)-OMe **15**[68], Boc-Pen(SPMB)-OH **18**[66], *N*-Boc-*N*'-Me-Ethylendiamin **27**[69], *N*-Fmoc,Me-Ethylendiamin Hydrochlorid **22**[70], H_2N-Ser(OTIPS)-OMe **30**[59], Dipeptid **31**[59], H_2N-Cys(SPMB)-OMe **32**[66], Tripeptid **33**[59], NPysCl[55], Benzamid **50**[54], PyCLOP[61], 6-CF_3-HOBt[83], PyFOP[61], 6-NO_2-HOBt[83], PyNOP[61], Dipeptid **105**[59], Amin **53**[59], PABBr[94,95], TMSEBr[90], Me-Oxa(OEt)-OEt **159**[110], DMDO[114], Dimethyldiazomalonat **185**[130], Nitril **193**[129], Boc-Cys-Met-OMe **149**[108], mBBr[142–144], Dibromomaleimid-*tert*-butylester **244**[146], Dithiophenylmaleimid-Carbonsäure **240**[146], Dithiophenolmaleimid **256**[151], Mesylat **257**[152], Carbamat **259**[154],

Hydrochlorid **260**[155], TsO-*t*Bu-Ester **261**[175], DBCO-Amin **263**[176]. Die Analytik stimmte mit der jeweiligen Literatur überein.

Rutjes-Linker **249**[149] und H_2N-PEG(3)-N_3 **251** wurden von CHRISTIN AHLBRECHT, M.Sc. und sNIR-DBCO wurde von MERLE M. WEITZENBERG, M.Sc. synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

5.1.2 Analyse- und Aufreinigungsmethoden

Für die **Dünnschichtchromatographie** wurden DC Kieselgel 60 F_{254} Glasplatten der Firma MERCK (Schichtdicke: 0.21-0.27 mm Porengröße: 60 Å mit Fluoreszenzindikator UV254) mit angegebenen Laufmittelgemischen verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm oder durch Anfärben mit wässriger $KMnO_4$-Lösung, wässriger Cer-Molybdat-Lösung, Ninhydrin-Lösung (für Amine) und Bromkresolgrün-Lösung (für Carbonsäuren) mit nachfolgender Wärmebehandlung zur Sichtbarmachung. Zur Identifikation der aufgetrennten Substanzen mittels Massenspektrometrie wurde ein Plate Express der Firma ADVION mit gekoppelter ESI- und APCI-Quelle verwendet.

LC-MS-Daten für Reaktionskontrollen und Reinheitsbestimmungen wurden, wie für die jeweiligen Verbindungen angegeben, einerseits an einem AGILENT 1100 series HPLC System gekoppelt mit einem Esquire 3000plus MS Detektor unter Verwendung von C8-HPLC Säulen bei den angegebenen Wellenlängen gemessen (standardisierter Report, Methoden:

DEFAULT.M (ESI-MS^+): 0 min, 97 % H_2O/3 % MeCN (0.05 % TFA); 1.5 min, 97 % MeCN/3 % H_2O (0.05 % TFA); 2 min, Laufende; 1 ml/min; 30 °C.

DEFAULTUNPOL.M (ESI-MS^+): 0 min, 97 % H_2O/3 % MeCN (0.05 % TFA); 1 min, 97 % MeCN/3 % H_2O (0.05 % TFA); 2 min, Laufende; 1 ml/min; 30 °C. *DEFAULT_NEG.M* (ESI-MS^-): 0 min, 97 % H_2O/3 % MeCN (0.05 % TFA); 1.5 min, 97 % MeCN/3 % H_2O (0.05 % TFA); 2 min, Laufende; 1 ml/min; 30 °C).

Darüber hinaus wurde ein Acquity UPLC H Class der Firma WATERS mit integriertem Diodenarray-Detektor und einer C18-HPLC Säule verwendet (Auswertung mithilfe von MassLynx 4.1, Methoden:

UPLC-MS-kurz (ESI-MS^+): 0 min, 95 % H_2O/5 % MeCN (0.05 % TFA); 1.0 min, 95 % MeCN/5 % H_2O (0.05 % TFA); 2.25 min, 95 % MeCN/5 % H_2O (0.05 % TFA); 2.27 min, 5 % MeCN/95 % H_2O (0.05 % TFA); 3 min, Laufende; 0.8 ml/min; 30 °C).

UPLC-MS-lang (ESI-MS^+): 0 min, 96 % H_2O/4 % MeCN (0.05 % TFA); 10.0 min, 90 % MeCN/10 % H_2O (0.05 % TFA); 15 min, Laufende; 0.8 ml/min; 30 °C).

Außerdem wurden die Messungen für größere Moleküle (M > 1000 Da) an einem WATERS Alliance HT 2795 System gekoppelt mit einem WATERS Micromass LCT-Premier MS Detektor unter Verwendung einer C18-Widepore Säule bei einer Wellenlänge von λ = 220 nm durchgeführt (Auswertung mithilfe von MassLynx 4.1, Methoden:

25-100(2) ACN 5min (ESI-MS^+): 0 min, 75 % H_2O/25 % MeCN (0.05 % TFA); 2 min, 100 % MeCN/0 % H_2O (0.05 % TFA); 5 min, Laufende; 0.6 ml/min; 30 °C.

1-90 ACN 5min (ESI-MS^+): 0 min, 99 % H_2O/1 % MeCN (0.05 % TFA); 5 min, 90 % MeCN/10 % H_2O (0.05 % TFA), Laufende; 0.6 ml/min; 30 °C).

Säulenchromatographie erfolgte unter Überdruck mit den angegebenen Laufmittelgemischen manuell oder automatisiert mit einer Reveleris Prep. Anlage der Firma BÜCHI und wurde entweder mit Kieselgel der Firma MACHEREY-NAGEL (Partikelgröße: 40-63 µm, Normalphase) oder mit C18-modifiziertem Kieselgel der Firma MACHEREY-NAGEL (Partikelgröße: 40-63 µm, Umkehrphase) als stationäre Phasen durchgeführt. Für die Normalphasen- Säulenchromatographie wurde das Rohprodukt entweder als Lösung im Start-Eluentengemisch oder auf Kieselgur immobilisiert aufgetragen. Für die Umkehrphasen-Säulenchromatographie wurde das Rohprodukt als Lösung im Start-Eluentengemisch aufgetragen und es wurden Laufmittel mit 0.05 % TFA verwendet.

Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) wurde mit den angegebenen Laufmittelgemischen für Substanzmengen unter 10 mg an einer Reveleris Prep. Anlage der Firma BÜCHI unter Verwendung einer Jupiter 10 µm Proteo 90 Å LC Säule (250 mm x 4.6 mm) von PHENOMENEX durchgeführt. Für Substanzmengen ab 10 mg wurde eine AZURA Assistant ASM 2.1L mit angeschlossenem LABOCOL Vario 4000 Fraktionensammler der Firma KNAUER mit einer Jupiter 10 µm Proteo 90 Å LC Säule (250 mm x 21.2 mm) von PHENOMENEX verwendet.

Zur **Zentrifugen-Filtration** von Molekülen > 2500 Da wurden AMICON-15 Zentrifugenfilter von MERCK mit dem beschriebenen Cut-Off verwendet. Die Filtration wurde an einer HERAEUS Megafuge 16R der Firma Thermo SCIENTIFIC bei 2500 Umdrehungen/Minute durchgeführt.

Alle **NMR-Experimente** wurden mit einem Spektrometer der Firma BRUKER vom Typ DPX-400 (^{1}H: 400.13 MHz, ^{13}C{^{1}H}: 100.61 MHz)), Typ DPX-500 (^{1}H: 500.13 MHz, ^{13}C{^{1}H}: 125.76 MHz)) und Typ DPX-600 (^{1}H: 600.33 MHz, ^{13}C{^{1}H}: 150.95 MHz)) bei Raumtemperatur in den angegebenen deuterierten Lösungsmitteln durchgeführt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zu $Si(CH_3)_4$ angegeben. Alle Proben für die ^{1}H-Spektroskopie enthalten das Restprotonensignal des jeweiligen Lösungsmittels als Referenz (Chloroform: δ(^{1}H-NMR) = 7.26 ppm, Methanol: δ(^{1}H-NMR) = 3.31 ppm, Dimethylsulfoxid: δ(^{1}H-NMR) = 2.50 ppm, Aceton: δ(^{1}H-NMR) = 2.05 ppm, Wasser: δ(^{1}H-NMR) = 4.79 ppm). Alle Proben für die ^{13}C-Spektroskopie wurden auf das Signal des Lösungsmittels referenziert und wurden breitbandentkoppelt aufgenommen (Chloroform: δ(^{13}C-NMR) = 77.2ppm, Methanol: δ(^{13}C-NMR) = 49.0 ppm, Dimethylsulfoxid: δ(^{1}H-NMR) = 39.5 ppm). Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hz angegeben und die entsprechenden Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q) und Multiplett (m). Zum Prozessieren und Auswerten der Spektren wurde TOPSPIN verwendet.

Die Zuordnung der ^{13}C-NMR Signale hinsichtlich CH_3, CH_2, CH and C_q wurde mittels ^{13}C-APT-Experimenten durchgeführt. Die Zuordnung zu funktionellen Gruppen erfolgte im Abgleich mit Inkrementrechnungen.

Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) wurde an einem WATERS Micromass LCT-Premier Spektrometer durchgeführt. Dabei wurde eine Lockspray Dual Ion Source und eine *Loop*-Injektion durch das WATERS Alliance 2695-System verwendet. Die Ionisation erfolgte durch Elektrosprayionisation (ESI). Elektronenstoßionisations(EI)-Spektren wurden mit einem Micromass GCT Spektrometer mit Direkteinlass bei 70 eV aufgenommen. Die errechneten und gefundenen Masse/Ladung (m/z) Werte sind in atomaren Einheiten angegeben.

Optische Drehwerte α wurden für chirale Substanzen an einem PERKIN ELMER Polarimeter 341 mit einer Glasküvette von d = 1 dm Länge und mit der Konzentration *c* [0.01 g/ml] gemessen. Daraus ergibt sich der spezifische Drehwert $[\propto]_D^T = \frac{\alpha}{cd}\left[\frac{^\circ\cdot \mathrm{mL}}{dm\cdot g}\right]$.

Zur **Bestimmung der Enantiomeren-Überschüsse (*ee*)** wurden an einer THERMO SCIENTIFIC Dionex UltiMate 3000 Chromatogramme von 1 µL aus einer CH_2Cl_2-Lösung (1 mg/mL Substanz) bei einer Wellenlänge von λ = 254 nm mit den angegebenen

Laufmittelgemischen und chiralen Säulen aufgenommen. Der Vergleich mit den entsprechenden racemischen Proben ergab den *ee*.

Zur **Bestimmung der Anregungs- und Emissionsmaxima** wurde für Wellenlängen $\lambda \leq 700$ nm ein *Cytation* 5-*Plate Reader* der Firma BIOTECH und eine Lösung des fluoreszenzmarkierten Naturstoffes in H_2O (c = 0.1 mg/mL) in einer 96-Well-Platte mit den folgenden Parametern verwendet:

Excitation Start: 300/9 nm, Stop: 671 nm, Step: 1 nm, Fixed Emission: 690/9 nm.

Emission Start: 616/9 nm, Stop: 700 nm, Step: 1 nm, Fixed Excitation: 596/9 nm.

Für Wellenlängen $\lambda \leq 900$ nm wurde ein AGILENT-*Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* und eine Lösung des fluoreszenzmarkierten Naturstoffes in H_2O (c = 0.05 mg/mL) mit den folgenden Parametern verwendet:

Excitation Start: 700/10 nm, Stop: 795 nm, Step: 1 nm, Fixed Emission: 810/10 nm

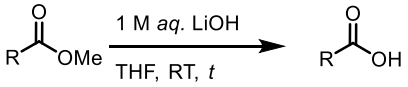
Emission Start: 790/10 nm, Stop: 900 nm, Step: 1 nm, Fixed Excitation: 780/20 nm

UV-VIS Spektren wurden an einem AGILENT-*Cary Series UV-Vis Spectrophotometer* bei 25 °C in einer Quarztcuvette mit einer Weglänge von d = 1 cm gemessen.

Die **UV-VIS Titrationen** erfolgten mithilfe einer HAMILTON-Mikroliterspritze unter einer Ar-Atmosphäre bei Rühren der Analytlösungen durch einen dafür konzipierten, miniaturisierten Magnetrührer.

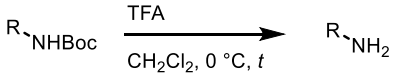
5.1.3 Allgemeine Vorschriften für chemische und biologische Arbeiten

5.1.3.1 *Verseifung von Methylestern*



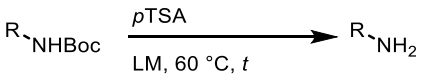
Der Methylester wurde in THF (0.1 M) bei RT gelöst und 1 M *aq.* LiOH (2.2 Äq.) hinzu gegeben. Die Reaktion wurde für die angegebene Zeit gerührt, bis kein Startmaterial mehr zu beobachten war. Im Anschluss wurde die Mischung mit H_2O verdünnt und der pH-Wert mit 1 M *aq.* $KHSO_4$ auf 2 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert (3 x) und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt nach LC-MS Analyse direkt weiter verwendet.

5.1.3.2 Entfernung der Boc-Schutzgruppe von Aminen



Zu einer Lösung aus dem geschützten Amin in trockenem CH_2Cl_2 (0.96 M) wurde TFA (20 Äq.) unter Ar-Atmosphäre bei 0 °C hinzugefügt und die Mischung für die spezifizierte Zeit bei der gleichen Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit ges. *aq.* Na_2CO_3 basifiziert, auf RT erwärmt und die wässrige Phase mit EtOAc (3 x) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Dies ergab das freie Amin, das direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde.

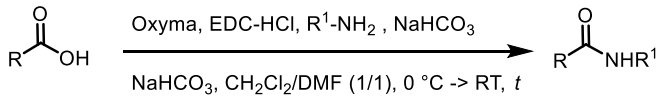
5.1.3.3 Entfernung der Boc-Schutzgruppe in Anwesenheit einer Teoc-Schutzgruppe



Es wurde eine leicht veränderten Version der Literaturvorschrift[81] zur selektiven Boc-Entschützung von N^{α}-Boc-N^{ε}-Teoc-Lysin verwendet.

Zu dem Boc-geschützten Peptid wurde eine Mischung aus der angegebenen Menge *p*TSA und dem trockenen Lösungsmittel (0.05 M bzgl. Peptid) unter Ar-Atmosphäre gegeben. Die Reaktion wurde, falls nicht anders beschrieben, für die angegebene Zeit auf 60 °C erhitzt und im Anschluss durch Zugabe von ges. *aq.* Na_2CO_3 beendet und mit EtOAc verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 x) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Dies lieferte eine Mischung aus Aminen, die nach LC-MS Analyse direkt für den nächsten Schritt ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

5.1.3.4 EDC/Oxyma-vermittelte Peptidkupplung

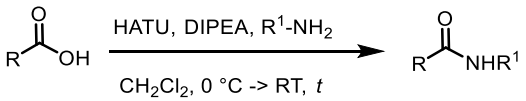


Die Reaktion wurde analog zu einer Vorschrift[72] nach JÜRJENS *et al.* durchgeführt.

Die Carbonsäure wurde in einer 1:1 Mischung aus trockenem CH_2Cl_2 und trockenem DMF (0.1 M) unter Ar-Atmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zur Lösung wurden nacheinander Oxyma, EDC-HCl und $NaHCO_3$ gegeben. Die sich gelb färbende

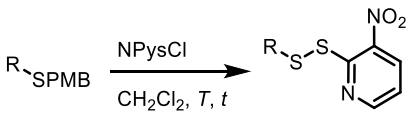
Mischung wurde für 15 min bei 0 °C gerührt. Im Anschluss wurde das Amin hinzugefügt und die Reaktion langsam über Nacht auf RT erwärmt und für die angegebene Zeit weiter gerührt. Nach Verdünnung mit H_2O und EtOAc wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3 x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* NH_4Cl (3 x), ges. *aq.* $NaHCO_3$ (3 x), H_2O und ges. *aq.* NaCl (2 x) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand mithilfe von Säulenchromatographie auf Kieselgel und dem angegebenen Eluenten gereinigt.

5.1.3.5 *HATU-vermittelte Peptidkupplung*



Die Carbonsäure wurde in trockenem CH_2Cl_2 (0.1 M) unter Ar-Atmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden nacheinander DIPEA (2 Äq., 3 Äq. bei Verwendung des Hydrochlorids) und HATU (1.3 Äq.) hinzugegeben und die resultierende Lösung für 10 min gerührt. Danach wurde das Amin (1 Äq.) hinzugefügt und die Reaktionsmischung für die angegebene Zeit unter Erwärmung auf RT gerührt, bis ein vollständiger Umsatz beobachtet wurde. Nach Verdünnung mit H_2O wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3 x) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* NH_4Cl (3 x), ges. *aq.* $NaHCO_3$ (3 x) und ges. *aq.* NaCl (2 x) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand mithilfe von Säulenchromatographie auf Kieselgel und dem angegebenen Eluenten gereinigt.

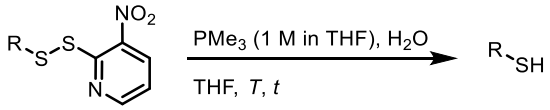
5.1.3.6 *Austausch der PMB-Schutzgruppe durch eine NPys-Schutzgruppe*



Das SPMB-geschützte Peptid wurde in trockenem CH_2Cl_2 unter Ar-Atmosphäre gelöst, auf die angegebene Temperatur gebracht und die beschriebene Menge NPysCl wurde zu der Lösung gegeben. Die Reaktionsmischung wurde zunächst bei derselben Temperatur gerührt und dann, wenn so beschrieben, erwärmt und für die entsprechende Zeit gerührt. Nach vollständigem Umsatz kann die Reaktion auf drei verschiedene Arten aufgearbeitet und gereinigt werden:

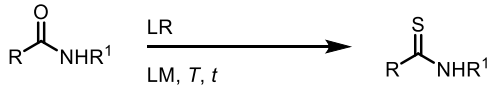
A) Sie wurde durch Zugabe von ges. *aq.* Na_2CO_3 beendet und mit EtOAc verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 x) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. aq NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie auf Silica unter Verwendung des angegebenen Laufmittelgemisches gereinigt, um das NPys-Disulfid zu erhalten.
B) Sie wurde bei 0 °C konzentriert und danach bei RT im Hochvakuum getrocknet. Der so erhaltene Rückstand wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet.
C) Sie wurde direkt ohne Aufarbeitung chromatographisch auf Kieselgel unter Verwendung von MeOH in CH_2Cl_2 (0 %-> 1 %-> 2 %-> 3 %) gereinigt, um das NPys-Disulfid zu erhalten.

5.1.3.7 *Reduktion des NPys-Disulfids zum Thiol*



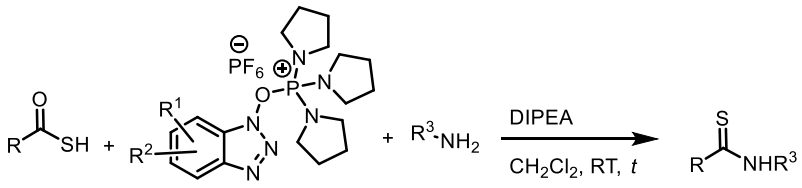
Das NPys-Disulfid wurde in entgastem THF (0.01 M -0.07 M) unter Ar-Atmosphäre gelöst und auf die spezifizierte Temperatur gekühlt. Zu der Lösung wurden nacheinander die beschriebenen Mengen entgastes H_2O und PMe_3 (1 M in THF) gegeben und die Reaktionsmischung wurde bei derselben Temperatur für die bestimmte Zeit gerührt, bis kein Startmaterial mehr mittels LC-MS nachgewiesen werden konnte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. *aq.* $NaHCO_3$ beendet und mit EtOAc verdünnt. Die organische Phase wurde mit ges. *aq.* $NaHCO_3$ gewaschen bis die wässrige Phase farblos war. Daraufhin wurde die organische Phase weiter mit ges. *aq.* NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer bei maximal 35 °C entfernt. Der Rückstand enthielt entweder das gewünschte Thiol in ausreichend reiner Form oder wurde, wenn so ausgeführt, weiter gereinigt.

5.1.3.8 *Thionierung von Amiden*



Das Peptid wurde dem angegebenen trockenen Lösungsmittel unter Ar-Atmosphäre gelöst. Zu der Lösung wurde bei der angebenden Temperatur LR gegeben und die Reaktionsmischung wurde für die spezifizierte Zeit und Temperatur gerührt. Wenn so beschrieben, wurden weitere Portionen des Reagenzes hinzugefügt. Während des gesamten Prozesses wurde der Reaktionsfortschritt regelmäßig durch LC-MS-Kontrollen überwacht. Im Anschluss wurde die Mischung auf 0 °C abgekühlt, durch Zugabe von ges. *aq.* Na_2CO_3 (10 mL pro mmol (Amid)) verdünnt und für 30 min bei derselben Temperatur stark gerührt. Danach wurde diese mit EtOAc (3 x) extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. *aq.* NaCl (1 x) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mithilfe von Säulenchromatographie auf Kieselgel und dem angegebenen Eluenten gereinigt.

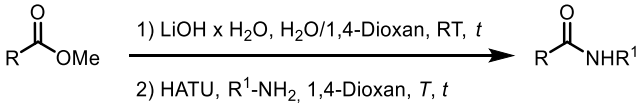
5.1.3.9 *Kupplung von Thiocarbonsäuren mit PyBOP-Derivaten*



Die Synthese wurde in einer leicht angewandelten Version der Literaturvorschrift[61] zur Kupplung von Cyclohexylamin und Thioessigsäure durchgeführt.

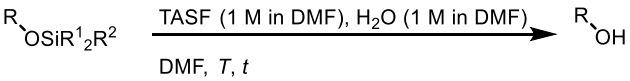
Das Amin wurde in trockenem CH_2Cl_2 (0.47 M) unter Ar-Atmosphäre bei RT gelöst. DIPEA (2 Äq.) und das entsprechende PyBOP-Derivat (1 Äq.) wurden hinzugefügt und die Mischung für 5 min gerührt, bevor eine Lösung aus der Thiocarbonsäure (1 Äq.) und DIPEA (2 Äq.) in trockenem CH_2Cl_2 (0.47 M) zu getropft wurde. Die Reaktion wurde bei RT gerührt, bis diese durch Zugabe von H_2O beendet wurde. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x) extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* NH_4Cl (3 x), ges. *aq.* $NaHCO_3$ (3 x), H_2O und ges. *aq.* NaCl (3 x) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatografie auf Kieselgel (Laufmittel MeOH in CH_2Cl_2: 0 %->1 %->3 %) gereinigt.

5.1.3.10 *Verseifung-Kupplung-Eintopfreaktion*



Die Durchführung orientierte sich an einer literaturbekannten VKER mit HATU.[96]
Der Ester wurde bei RT in der angegebenen Menge 1,4-Dioxan gelöst und die definierten Mengen an LiOH x H_2O und H_2O wurden nacheinander hinzugegeben. Die Mischung wurde für die angegebene Zeit bei RT gerührt, bis kein Ester mehr mittels LC-MS Kontrolle nachgewiesen werden konnte, bevor die spezifizierte Menge HATU bei der aufgeführten Temperatur hinzugefügt wurde. Nach 10 min Rühren wurde eine Lösung aus dem Amin in der angegebenen Menge 1,4-Dioxan und einem weiteren Lösungsmittel, wenn so beschrieben, hinzu getropft. Die Reaktion wurde gerührt, bis ein vollständiger Umsatz zu dem gewünschten Amid festgestellt werden konnte. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung mit ges. *aq.* NaCl und EtOAc verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 x) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand chromatographisch auf Kieselgel unter Verwendung des angegebenen Laufmittelgemisches gereinigt.

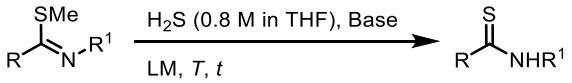
5.1.3.11 *Entfernung der Silyl-Schutzgruppen mittels TASF/H_2O in DMF*



In einem geeigneten, mit Kunststoff beschichteten Kolben wurde das Silyl-geschützte Substrat unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF gelöst. Die Mischung wurde auf die angegebene Temperatur gekühlt und nacheinander eine Lösung aus H_2O in trockenem DMF (1 M) und eine Lösung aus TASF in trockenem DMF (1 M) hinzugetropft. Die Reaktion wurde unter langsamem Erwärmen auf die spezifizierte Temperatur stark gerührt und nach der beschriebenen Zeit bei 0 °C nacheinander mit H_2O und EtOAc verdünnt. In Anschluss wurde die zweiphasige Mischung mit 3 Tropfen ges. *aq.* $CaCl_2$ versetzt und die wässrige Phase mit EtOAc (2x) extrahiert Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei max.39 °C entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde entweder

direkt für den nächsten Schritt verwendet oder säulenchromatographisch auf Silica mithilfe des angegebenen Eluenten gereinigt.

5.1.3.12 Demethylierung eines Me-Thioimidats mithilfe von H_2S



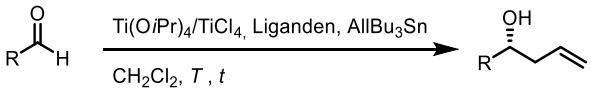
Die Vorschrift orientierte sich an der Demethylierung eines Thioamids bei der Synthese von Vancomycinderivaten.[89]

Zu einer Lösung aus dem Me-Thioimidat unter Ar-Atmosphäre in dem angegebenen trockenen Lösungsmittel und bei der angegebenen Temperatur wurden nacheinander die Base und H_2S (0.8 M in THF) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde stark bei der beschriebenen Temperatur gerührt und mittels LC-MS kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz des Startmaterials wurde die Reaktionsmischung je nach verwendeten Reagenzien unterschiedlich aufgearbeitet:

A) Sie wurde unter vermindertem Druck bei max. 35 °C am Rotationsverdampfer konzentriert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Der so erhaltene Rückstand wurde bei Bedarf mittels Säulenchromatographie gereinigt, um das Thioamid zu erhalten.

B) Sie wurde durch Zugabe von ges. *aq.* $NaHCO_3$ und EtOAc verdünnt. Die organische Phase wurde mit ges. *aq.* $NaHCO_3$ und ges. *aq.* NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und bei Bedarf chromatographisch gereinigt, um das Thioamid zu isolieren.

5.1.3.13 Ti-katalysierte KECK-Allylierung



Es wurden Vorschriften zur asymmetrischen Allylierung von aromatischen Aldehyden nach KECK *et al.* und KII *et al*. verwendet und leicht abgeändert.[118,196]

Verwendung von *(R)*-BINOL als einzigen Liganden:

In einem ausgeheitzten Schlenk-Kolben wurde aktivierter gepulverter 4 Å-Molekularsieb in trockenem CH_2Cl_2 (0.5 M bezüglich des Aldehyds) unter Ar-Atmosphäre bei RT suspendiert. Nacheinander wurden *(R)*-BINOL, Ti(O*i*Pr) und, wenn so beschrieben,

$TiCl_4$ hinzugefügt und die Mischung wurde für 1 h auf 45 °C erhitzt. Danach wurde diese auf RT abgekühlt und eine Lösung des Aldehyds in trockenem CH_2Cl_2 (0.7 M) langsam hinzu getropft. Nach 45 min Rühren bei RT wurde die orangene Suspension auf -78 °C abgekühlt und $AllBu_3Sn$ (1.03 Äq.) tropfenweise über 25 min dazu gegeben. Die Reaktion wurde für 30 min bei derselben Temperatur gerührt, bevor sie für die angegeben Zeit im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert wurde.

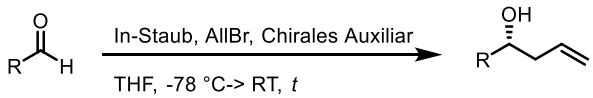
Verwendung von *(R)*-BINOL und 177 als gemeinsame Liganden:

In einem ausgeheitzten Schlenk-Kolben wurde gepulverter 4 Å-Molekularsieb in trockenem CH_2Cl_2 (0.5 M bezüglich des Aldehyds) unter Ar-Atmosphäre bei RT suspendiert. Nacheinander wurden $Ti(OiPr)_4$ und **177** hinzugefügt und die Mischung für 1 h bei RT gerührt. Danach wurde *(R)*-BINOL dazu gegeben und das Rühren über Nacht fortgesetzt. Im Anschluss wurde eine Lösung des Aldehyds in trockenem CH_2Cl_2 (0.7 M) langsam hinzu getropft und nach 45 min Rühren bei RT wurde $AllBu_3Sn$ (1.03 Äq.) bei 0 °C tropfenweise über 25 min dazu gegeben. Die Reaktion wurde danach auf RT erwärmt und für die angegebene Zeit gerührt.

Reinigung in beiden Fällen:

Im Anschluss wurde sie durch Zugabe von ges. *aq.* $NaHCO_3$ beendet. Die Mischung wurde für 1.5 h stark gerührt, über Kieselgur filtriert und die wässrige Phase des Filtrats mit CH_2Cl_2 (3 x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde durch Kieselgel-Säulenchromatographie mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (5/1-> 3/1-> 1/1) gereinigt, um den *(R)*-Homoallylalkohol in angegebener optischer Reinheit zu isolieren.

5.1.3.14 *In-vermittelte asymmetrische Allylierung*

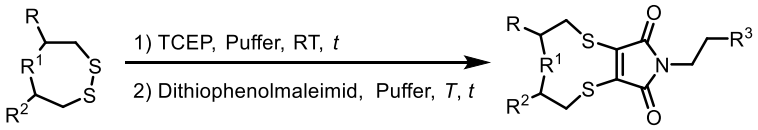


Die Synthese wurde nach einer leicht veränderten Version der Literaturvorschrift[124] zur asymmetrischen Allylierung von Benzaldehyd durchgeführt.

In-Staub und das chirale Auxiliar wurden in einem ausgeheizten Rundkolben unter Ar-Atmosphäre vorgelegt und mit trockenem THF versetzt. Anschließend wurde Allylbromid hinzugefügt und die Reaktionsmischung stark für 30 min gerührt, bis diese zu einer

homogenen Lösung wurde. Danach wurde diese auf -78 °C gekühlt und eine -78 °C kalte Lösung des Aldehyds in trockenem THF wurde tropfenweise hinzugefügt und die Reaktion langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Wenn kein Startmaterial mehr zu beobachten war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M *aq.* HCl beendet und mit EtOAc verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x) extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. *aq.* NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie auf Kieselgel mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (2/1->1/2) gereinigt, um den *(R)*-Homoallylalkohol in angegebener optischer Reinheit zu isolieren.

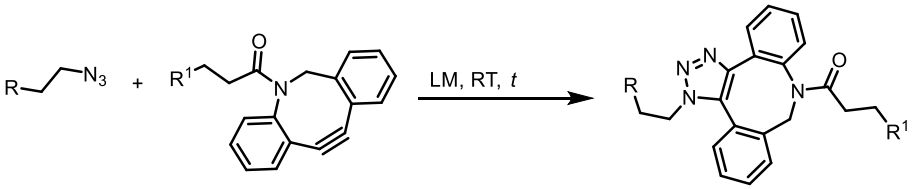
5.1.3.15 *DR mit Dithiophenolmaleimiden*



Die Reaktion wurde nach einer veränderten Version der Vorschrift zum *DR* von Leptin durchgeführt.[146]

Das Disulfid wurde in entgastem Puffer unter Ar-Atmosphäre bei RT gelöst. Zu der Lösung wurde TCEP gegeben und die Reaktionsmischung für die angegebene Zeit bei RT gerührt. Im Anschluss wurde bei der beschriebenen Temperatur eine Lösung aus dem entsprechenden Dithiophenolmaleimid-*DR*-Linker in entgastem MeCN hinzugefügt und die Mischung für die spezifizierte Zeit bei derselben Temperatur gerührt, bis mittels LC-MS kein Startmaterial mehr nachgewiesen werden konnte. Danach wurde die Reaktionsmischung je nach Anteil von MeCN zunächst bei RT konzentriert und dann chromatographisch gereinigt. Dafür wurde eine präparative HPLC mit dem angegebenen Gradienten durchgeführt

5.1.3.16 SPAAC zwischen einem Azid und einem DBCO-modifizierten Marker



Die gesamte Synthese erfolgte unter Lichtausschluss. Das Azid wurde in entgastem Puffer unter Ar-Atmosphäre bei RT gelöst. Zu der Mischung wurde eine Lösung aus dem DBCO-modifizierten Marker in dem angegebenen Lösungsmittel hinzugefügt und die Reaktion wurde bei derselben Temperatur solange gerührt, bis ein vollständiger Umsatz des Startmaterials festgestellt werden konnte. Im Anschluss wurde die Mischung im Fall einer Suspension mit MeCN und im Fall einer Lösung mit H_2O verdünnt, filtriert und mittels präparativer HPLC mit dem angegebenen Gradienten gereinigt, um das gewünschte Konjugat zu erhalten

5.1.3.17 Kultivierung von HepG2-Zellen

Alle für die biologischen Tests verwendeten HepG2-Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, low glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate*)[197] bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt mit 10 % fetalem Kälberserum und 1x Penstrep kultiviert. Die weitere Behandlung ist in den einzelnen Vorschriften spezifiziert.

5.1.3.18 [Cu(His)$_2$]-Behandlungslösung

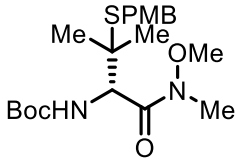
$CuCl_2$ x 2 H_2O (0.108 g, 0.634 mmol) und *(S)*-Histidin (0.244 g, 1.57 mmol) wurden in 0.9 % *aq.* NaCl (80 mL) gelöst und durch Zugabe von 0.2 M *aq.* NaOH auf einen pH-Wert von 7.4 gebracht. Die erhaltene Lösung wurde mit H_2O auf 100 mL aufgefüllt, durch 200 nm Sterilfilter gefiltert und bei 4 °C gelagert. Für die weitere Verwendung wurde die 6.34 mM Lösung auf die spezifizierte Konzentration mit dem unter 5.1.3.17 beschriebenen Medium verdünnt.

.

5.2 SYNTHESE STRUKTURVEREINFACHTER NATURSTOFFDERIVATE

5.2.1 Synthese des modifizierten Penicillamins 11 mit einem CH_2-Linker

Tert-butyl(*S*)-(1-(methoxy(methyl)amino)-3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamat (**23**)



23

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.4 unter Verwendung von **18** (2.26 g, 6.11 mmol), Oxyma (1.39 g, 9.78 mmol), EDC-HCl (1.76 g, 9.17 mmol), $NaHCO_3$ (5.75 g, 68.4 mmol), *N,O*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid (715 mg, 7.33 mmol), trockenem CH_2Cl_2 (31 mL) und trockenem DMF (31 mL) bei einer Reaktionsdauer von 23.5 h. Die Aufreinigung erfolgte mithilfe von PE/EE (5/1 -> 2/1 -> 1/1) und ergab **23** in Form eines farblosen viskosen Öls (2.07 g, 5.01 mmol, 82 %).

R_f (PE/EE: 3/1) = 0.36.

LC-MS(*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.027 min (*m/z* (ESI-MS^+): 435 ($M+Na^+$)).

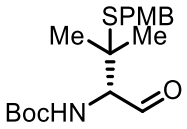
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.27-7.25 (m, 2H, CH(PMB)), 6.82-6.78 (m, 2H, CH(PMB)), 5.45 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, BocNH), 5.05 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, CH), 3.86-3.75 (m, 8H, 2x OMe, CH_2(PMB)), 3.24 (s, 3H, NMe), 1.45 (s, 9H, CH_3(Boc)), 1.38 (s, 3H, CH_3), 1.37 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.4 (Cq), 158.7 (Cq), 155.6 (Cq), 130.5 (CH), 129.6 (Cq), 114.0 (CH), 79.9 (Cq), 61.9 (CH), 55.4 (CH_3), 54.1 (CH_3), 49.1 (CH_2), 32.9 (Cq), 31.9 (CH_3), 28.5 (CH_3), 25.9 (CH_3), 25.2 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{20}H_{32}N_2O_5SNa^+$: 435.1930; gefunden (ESI-MS^+): 435.1928.

Opt. Rot. α = 0.079° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = 7.9°.

Tert-butyl(*S*)-(3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamat (**17**)



17

Die Synthese wurde nach einer leicht veränderten Literaturvorschrift[71] der Reduktion von einem geschützten α-Aminosäure-Weinreb-Amid durchgeführt.

Eine Lösung aus **23** (1.00 g, 2.42 mmol) in trockenem THF (10 mL) wurde tropfenweise zu einer stark gerührten Suspension von $LiAlH_4$ (147 mg, 3.88 mmol) in THF (14 mL) bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre in einem ausgeheizten 250 mL Rundkolben gegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde die Mischung auf 0 °C erwärmt und für 40 min gerührt. Danach wurde die Reaktion durch vorsichtige Zugabe von 1 M *aq.* $KHSO_4$ Lösung (10 mL) beendet und auf RT erwärmt. Nach Verdünnung mit H_2O (20 mL) und EtOAc (50 mL) wurde die Mischung für 1 h stark gerührt und über Kieselgur filtriert. Die wässrige Phase des Filtrats wurde mit EtOAC (3 x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M *aq.* HCl Lösung (2 x 20 mL), ges. *aq.* $NaHCO_3$ Lösung (2 x 20 mL), H_2O (20 mL) und ges. *aq.* NaCl Lösung (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert (Belüftung des Rotationsverdampfers mit N_2 zur Vermeidung der Oxidation des Produkts). Dadurch wurde **17** als hellgelbes Öl erhalten (685 mg, 1.95 mmol, 80 %).

R_f (PE/EE: 3/1) = 0.54.

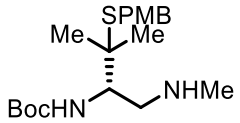
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.89 (s, 1H, CHO), 7.25-7.22 (m, 2H, CH(PMB)), 6.86-6.82 (m, 2H, CH(PMB)), 5.36 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, BocNH), 4.31 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH), 3.79 (s, 5H, OMe, CH_2(PMB)), 1.48 (s, 3H, CH_3), 1.45 (s, 9H, CH_3(Boc)), 1.31 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 200.1 (CH), 158.9 (Cq), 156.1 (Cq), 130.2 (CH), 129.1 (Cq), 114.3 (CH), 80.4 (Cq), 65.4 (CH), 55.4 (CH_3), 48.1 (CH_2), 32.9 (Cq), 28.4 (CH_3), 26.4 (CH_3), 25.8 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{18}H_{27}NO_4SNa^+$: 376.1559; gefunden (ESI-MS$^+$): 376.1562.

Opt. Rot. α = -0.132° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = -13.2°.

Tert-butyl(*S*)-(3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methyl-1-(methylamino)butan-2-yl)carbamat (**16**) unter Verwendung von $NaBH_3CN$



16

Die Synthese wurde nach einer leicht veränderten Literaturvorschrift[74] der reduktiven Aminierung von einem geschützten Alanin-Aldehyd durchgeführt.

Zu einer Lösung aus **17** (183 mg, 0.518 mmol) in trockenem Benzol (1.1 mL) wurde $MeNH_2$ (0.39 mL, 0.78 mmol, 2 M in THF) und trockenes Na_2SO_4 (275 mg) unter Ar-Atmosphäre bei RT hinzugefügt. Die Suspension wurde für 48 h bei RT gerührt und unter Ar filtriert. Der Rückstand wurde mit Benzol (2 x 1 mL) gewaschen und die vereinten Filtrate wurden unter vermindertem Druck konzentriert. Das so erhaltene gelbliche Öl wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem MeOH (1.1 mL) aufgenommen und $NaBH_3CN$ (25 mg, 0.39 mmol) hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 4 h bei RT gerührt und durch die Zugabe von 2 M *aq.* Zitronensäure Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde mit MTBE (3 x 5 mL) gewaschen, mit 15 % *aq.* NaOH Lösung basifiziert und anschließend mit 30 % MeOH in CH_2Cl_2 extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, um **16** als farbloses Öl zu erhalten (35 mg, 0.084 mmol, 19 %).

LC-MS(*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 0.391 min (*m/z* (ESI-MS^+): 369 ($M+H^+$)).

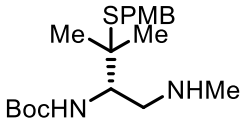
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.25-7.23 (m, 2H, CH(PMB)), 6.84-6.81 (m, 2H, CH(PMB)), 4.79 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, BocNH), 3.84-3.81 (m, 1H, CH), 3.77 (s, 3H, OMe) 3.76-3.74 (m, 2H, CH_2(PMB)), 2.94-2.90 (m, 1H, NCH), 2.65-2.57 (m, 1H, NCH), 2.41 (s, 3H, NMe), 1.44 (s, 9H, CH_3(Boc)), 1.39 (s, 3H, CH_3), 1.31 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 158.8 (Cq), 156.5 (Cq), 130.2 (CH), 129.8 (Cq), 114.0 (CH), 79.5 (Cq), 57.9 (CH), 55.4 (CH_3), 52.5 (CH_2), 49.7 (CH_2), 36.4 (CH_3), 32.6 (Cq), 28.5 (CH_3), 27.0 (CH_3), 26.5 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{19}H_{33}N_2O_3S^+$: 369.2212; gefunden (ESI-MS^+): 369.2212.

Opt. Rot. α = 0.037° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 3.7°$.

Tert-butyl(*S*)-(3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methyl-1-(methylamino)butan-2-yl)carbamat (**16**) unter Verwendung von $NaBH(OAc)_3$/AcOH

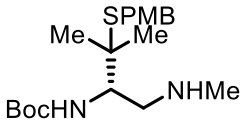


16

Die Synthese wurde nach einer leicht veränderten Literaturvorschrift[75] der reduktiven Aminierung von einem sterisch gehinderten Aldehyd durchgeführt.

Zu einer Lösung aus **17** (30 mg, 0.085 mmol) in trockenem CH_2Cl_2/AcOH (55/1, 1.6 mL) wurde $MeNH_2$ (0.08 mL, 0.16 mmol, 2 M in THF) unter Ar-Atmosphäre bei RT hinzugefügt. Nach 3.5 h wurde $NaBH(OAc)_3$ (50 mg, 0.24 mmol) zur Reaktionsmischung gegeben und das Rühren für 17.5 h fortgesetzt. Anschließend wurde die Lösung mit CH_2Cl_2 und ges. *aq.* $NaHCO_3$ Lösung (5 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Dies ergab ein farbloses Öl (25 mg), das nach ^{1}H-NMR Analyse das Produkt **16** und unbekannte Verunreinigungen enthielt und daher verworfen wurde.

Tert-butyl(*S*)-(3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methyl-1-(methylamino)butan-2-yl)carbamat (**16**) unter Verwendung von $NaBH_4$/Ti(O*i*Pr)$_4$



16

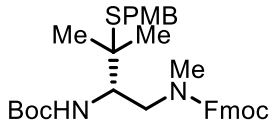
Die Synthese wurde nach einer leicht veränderten Literaturvorschrift[76] der reduktiven Aminierung von einem Pyrrolidinaldehyd durchgeführt.

Zu einer Lösung aus **17** (685 mg, 1.94 mmol) in trockenem MeOH (2.0 mL) in einem 50 mL Rundkolben wurden nacheinander $MeNH_2$ (2.9 mL, 5.8 mmol, 2 M in THF) und Ti(O*i*Pr)$_4$ (0.34 mL, 1.2 mmol) tropfenweise unter Ar-Atmosphäre bei RT hinzugefügt. Nach 4 h Rühren wurde zu der sich bildenden Suspension $NaBH_4$ (95 mg, 2.5 mmol) gegeben und die Reaktion für 15.5 h weiter gerührt. Im Anschluss wurde die Mischung vorsichtig mit CH_2Cl_2 (10 mL) und H_2O (20 mL) verdünnt und über Kieselgur filtriert. Die wässrige Phase des Filtrats wurde mit CH_2Cl_2 (3 x 50 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels

unter vermindertem Druck konnte **16** als farbloses Öl (663 mg, 1.80 mmol, 93 %) erhalten werden.

Die Analytik stimmte mit der vorherigen überein.

(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl(*S*)-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methylbutyl)(methyl)carbamat (**24**)



24

FmocCl (506 mg, 1.96 mmol), und DIPEA (0.36 mL, 2.1 mmol) wurden zu einer Lösung aus **16** (655 mg, 1.78 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (17.8 mL) unter Ar-Atmosphäre gegeben und die Lösung für 20 h bei RT gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung unter vermindertem Druck konzentriert und der Rückstand mit Et_2O (3 x 50 mL) behandelt und filtriert, um das Ammoniumsalz zu entfernen. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie auf Kieselgel (Eluent: PE/EE 5/1 -> 3/1) gereinigt. **24** wurde als farbloses viskoses Öl erhalten (954 mg, 1.62 mmol, 91 %), das nach NMR-Analyse aus Isomeren im Verhältnis von 1.4:1 bestand.

R_f (PE/EE: 3/1) = 0.35.

LC-MS(*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.070 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 591 (M+H$^+$), 613 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.76 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.71 (d, *J* = 7.4 Hz, 1.4H, Ar-H), 7.63-7.55 (m, 3.6H, Ar-H). 7.41-7.36 (m, 3.6H, Ar-H), 7.34-7.28 (m, 4.4H, Ar-H), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1.4H Ar-H), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1.4H, Ar-H), 4.91 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 4.71 (dd, *J* = 10.7, 4.6 Hz, 1H), 4.52 (dd, *J* = 10.7, 4.9 Hz, 1H), 4.40-4.36 (m, 1H), 4.32-4.28 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 2H), 4.04-3.97 (m, 2H), 3.88-3.73 (m, 9.4H), 3.70-3.62 (m, 2H), 3.40 (dd, *J* = 14.0, 3.0 Hz, 1H), 3.18-3.12 (m, 1H), 2.94-2.90 (m, 3H, NMe), 2.83-2.76 (m, 2.4H, NMe), 1.45-43 (m, 10H, CH_3), 1.41-1.37 (m, 4H, CH_3), 1.32-1.30 (m, 9.4H, CH_3), 1.22 (s, 2.4H, CH_3) ppm.

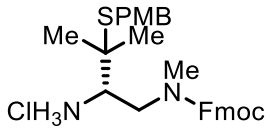
^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 158.8 (Cq), 157.5 (Cq), 156.5 (Cq), 156.2 (Cq), 156.2 (Cq), 144.2 (Cq), 144.1 (Cq), 141.5 (Cq), 141.3 (Cq), 130.2 (CH), 130.1 (CH), 129.9 (Cq), 129.7 (Cq), 127.8 (CH), 127.3 (CH), 127.2 (CH), 125.2 (CH), 125.1 (CH),

124.5 (CH), 120.3 (CH), 120.1 (CH), 114.3 (CH), 114.1 (CH), 79.6 (Cq), 79.3 (Cq), 67.9 (CH_2), 66.4 (CH_2), 56.4 (CH), 55.5 (CH_3), 55.4 (CH_3), 49.3 (CH_2), 48.6 (CH_2), 48.5 (CH_2), 48.0 (CH_2), 47.4 (CH), 34.6 (CH_3), 34.5 (CH_3), 32.6 (Cq), 32.4 (Cq), 28.5 (CH_3), 28.4 (CH_3), 27.0 (CH_3), 26.8 (CH_3), 25.1 (CH_3), 24.7 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{34}H_{42}N_2O_5SNa^+$: 613.2712; gefunden (ESI-MS^+): 613.2710.

Opt. Rot. α = 0.314° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 31.4°$.

(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl(*S*)-(2-(chlor-λ^5-azaneyl)-3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methylbutyl)(methyl)carbamat (**25**)



25

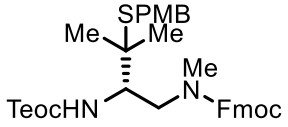
Die Synthese erfolgte nach einer leicht veränderten Literaturvorschrift[77] der Boc-Entschützung eines Penicillamin haltigen Dipeptids.

24 (880 mg, 1.49 mmol) wurde bei 0 °C in TFA (2.2 mL, 30 mmol) unter Ar-Atmosphäre gelöst und für 3 h bei derselben Temperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit CH_2Cl_2 (20 mL) verdünnt und unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde in Et_2O (25 mL) aufgenommen und mit HCl (0.73 mL, 2.9 mmol, 4 M in 1,4-Dioxan) versetzt. Der Niederschlag wurde bei 0 °C abfiltriert und mit eiskaltem Et_2O (3 x 10 mL) gewaschen. Trocknen im Hochvakuum ergab **25** als ein hygroskopisches farbloses Pulver (494 mg, 0.937 mmol, 63 %), das nach LC-MS Analyse direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde.

LC-MS(*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 0.335 min (*m/z* (ESI-MS^+): 491 ($M+H^+$), 513 ($M+Na^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{29}H_{35}N_2O_3S^+$: 491.2368; gefunden (ESI-MS^+): 491.2366.

(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl(*S*)-(3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methyl-2-(((2-(trimethylsilyl)ethoxy)carbonyl)amino)butyl)(methyl)carbamat (**11**)



11

Teoc-OSu (267 mg, 1.03 mmol) und DIPEA (0.34 ml, 2.0 mmol) wurde nacheinander zu einer Lösung aus **25** (494 mg, 0.937 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (9.4 mL) unter Ar-Atmosphäre bei RT gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 18 h gerührt und anschließend mit H_2O (20 mL) verdünnt. Die wässrige Phase wurde unter Rühren mit 1 M *aq.* $KHSO_4$ Lösung angesäuert und danach mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* $NaHCO_3$ Lösung (3 x 20 mL) und ges. *aq.* NaCl Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um **11** als farbloses viskoses Öl (564 mg, 0.888 mmol, 95 %) zu erhalten, das nach NMR-Analyse aus Isomeren im Verhältnis von 1.4:1 bestand.

R_f (PE/EE: 3/1) = 0.36.

LC-MS(*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.114 min (*m/z* (ESI-MS^+): 657 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.71 (dd, *J* = 7.0, 2.9 Hz, 1.1H, Ar-H), 7.62-7.55 (m, 3.1H, Ar-H). 7.42-7.36 (m, 3.3H, Ar-H), 7.36-7.26 (m, 4.7H, Ar-H), 7.19 (d, *J* = 8.3 Hz, 1.2H Ar-H), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1.4H, Ar-H), 5.05 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.71 (dd, *J* = 10.7, 4.3 Hz, 1H), 4.57-4.47 (m, 2H), 4.28-3.99 (m, 7.4H), 3.93-3.84 (m, 2.2H), 3.81-3.76 (m, 8.2H), 3.70-3.63 (m, 1.3H), 3.38 (dd, *J* = 14.0, 2.9 Hz, 1H), 3.14-3.12 (m, 1H), 2.93 (s, 3H, NMe), 2.72 (m, 2.1H, NMe), 1.46 (s, 3.6H, CH_3), 1.31 (s, 3.8H, CH_3), 1.23 (s, 2.0H, CH_3), 1.00-0.96 (m, 4.4H), 0.80-0.63 (m, 1.6H, CH_2-TMS), -0.12 (s, 7.4H, CH_3(TMS)) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 158.8 (Cq), 157.6 (Cq), 157.5 (Cq), 157.1 (Cq), 156.3 (Cq), 144.5 (Cq), 144.2 (Cq), 144.1 (Cq), 143.8 (Cq), 141.5 (Cq), 141.4 (Cq), 141.4 (Cq), 141.3 (Cq), 130.2 (CH), 130.2 (CH), 130.1 (Cq), 129.9 (Cq), 127.8 (CH), 127.5 (CH), 127.3 (CH), 127.2 (CH), 125.3 (CH), 125.2 (CH), 124.6 (CH), 124.6 (CH), 120.2 (CH), 120.1 (CH), 114.2 (CH), 114.2 (CH), 68.0 (CH_2), 66.3 (CH_2), 63.3 (CH_2), 57.0 (CH), 56.0 (CH_3), 55.4 (CH_3), 49.2 (CH_2), 48.7 (CH_2), 48.4 (CH_2), 48.3 (CH_2), 47.4

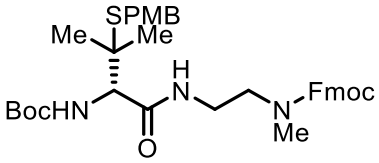
(CH), 47.3 (CH), 34.6 (CH_3), 34.4 (CH_3), 32.7 (Cq), 32.5 (Cq), 27.1 (CH_3), 26.9 (CH_3), 24.9 (CH_3), 24.7 (CH_3), 17.9 (CH_2), 17.6 (CH_2), -1.3 (CH_3), -1.5 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{35}H_{46}N_2O_5SSiNa^+$: 657.2794; gefunden (ESI-MS$^+$): 657.2796.

Opt. Rot. α = 0.243° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 24.3°$.

5.2.2 Synthese des modifizierten Penicillamins 21 mit einem C_2H_4-Linker

(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl(*S*)-(2-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methylbutanamido)ethyl)(methyl)carbamat (**28**)



28

Die Synthese erfolgte der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung von **18** (578 mg, 1.56 mmol), DIPEA (0.80 mL, 4.7 mmol), HATU (773 mg, 2.03 mmol), **22** (521 mg, 1.56 mmol) und trockenem CH_2Cl_2 (15.6 mL) bei einer Dauer von 24 h. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Gemisch PE/EE (3/1 -> 1/1) und ergab **28** in Form eines farblosen Schaumes (300 mg, 0.463 mmol, 30 %).

R_f (PE/EE: 1/1) = 0.29.

LC-MS(*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.063 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 648 (M+H$^+$), 670 (M+Na$^+$)).

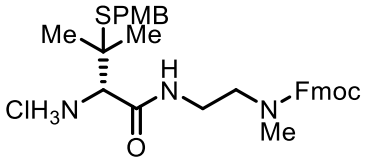
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.76 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH(Fmoc)), 7.57 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH(Fmoc)), 7.41-7.38 (m, 2H, CH(Fmoc)). 7.33-7.29 (m, 2H, CH(Fmoc)), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H CH(PMB)), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH(PMB)), 6.73 (brs, 1H, CONH), 5.55 (brs, 1H, BocNH), 4.54 (brs, 1H, CH(Pen)), 4.44-4.34 (m, 1H, CH(Fmoc)), 4.22 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, CH(Fmoc)), 4.15 (brs, 1H, CH(Fmoc)), 3.75 (brs, 5H, OMe, CH_2(PMB)), 3.43 (brs, 2H NHC$\underline{H}_2$), 3.05-2.86 (m, 5H, NMe, C$\underline{H}_2$NMe), 1.45-1.41 (m, 12H, CH_3(Boc), CH_3), 1.31 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.3 (Cq), 158.8 (Cq), 157.2 (Cq), 155.9 (Cq), 144.1 (Cq), 141.5 (Cq) 130.3 (CH), 129.6 (Cq), 127.9 (CH), 127.2 (CH), 125.2 (CH), 120.1 (CH), 114.2 (CH), 77.4 (CH), 67.8 (CH_2), 55.4 (CH_3), 48.6 (CH_2), 48.2 (CH_2), 47.4 (CH), 37.9 (CH_2), 34.9 (CH_3), 32.8 (Cq), 28.5 (CH_3), 25.9 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{36}H_{45}N_3O_6SNa^+$: 670.2927; gefunden (ESI-MS$^+$): 670.2927.

Opt. Rot. α = 0.151° (*c* = 1.0, $CHCl_3$), $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 15.1°$.

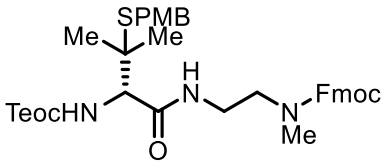
(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl(*S*)-(2-(2-(chlor-λ^5-azaneyl)-3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methylbutanamido)ethyl)(methyl)carbamat (**29**)



29

Die Synthese wurde analog zur Herstellung von **25** unter Verwendung von **28** (286 mg, 0.441 mmol), TFA (0.65 mL, 8.9 mmol) und HCl (0.22 mL, 0.88 mmol, 4 M in 1,4-Dioxan) durchgeführt. **29** wurde als farbloses Pulver (223 mg, 0.382 mmol, 87 %) erhalten, das nach LC-MS Analyse direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde.
LC-MS(*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 0.116 min (*m/z* (ESI-MS^+): 548 ($M+H^+$), 570 ($M+Na^+$)).
HRMS: berechnet m/z für $C_{31}H_{38}N_3O_4S^+$: 548.2583; gefunden (ESI-MS^+): 548.2581.

(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl (*S*)-(2-(3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methyl-2-(((2-(trimethylsilyl)ethoxy)carbonyl)amino)butanamido)ethyl)(methyl)carbamat (**21**)



21

Die Synthese wurde analog zur Herstellung von **11** unter Verwendung von **29** (223 mg, 0.382 mmol), Teoc-OSu (109 mg, 0.420 mmol), DIPEA (0.14 ml, 0.80 mmol) und trockenem CH_2Cl_2 (3.8 mL) durchgeführt. Dadurch konnte **21** als farbloser Schaum erhalten werden (246 mg, 0.355 mmol, 93 %).
R_f (PE/EE: 1/1) = 0.4.
LC-MS(*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.082 min (*m/z* (ESI-MS^+): 714 ($M+Na^+$)).
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.76 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH(Fmoc)), 7.57 (brs, 2H, CH(Fmoc)), 7.41-7.38 (m, 2H, CH(Fmoc)). 7.33-7.29 (m, 2H, CH(Fmoc)), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H CH(PMB)), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH(PMB)), 6.71 (brs, 1H, CONH),

5.63 (brs, 1H, TeocNH), 4.53 (brs, 1H, CH(Pen)), 4.44-4.35 (m, 1H, CH(Fmoc)), 4.23-4.07 (m, 4H, CH(Fmoc), CH_2O(Teoc)), 3.75 (brs, 5H, OMe, CH_2(PMB)), 3.42 (brs, 2H NHC$\underline{H}_2$), 2.99-2.82 (m, 5H, NMe, C$\underline{H}_2$NMe), 1.41 (s, 3H, CH_3), 1.3 (s, 3H, CH_3), 0.98-0.94 (TMS-CH_2), 0.04-0.01 (m, 9H, TMS) ppm.

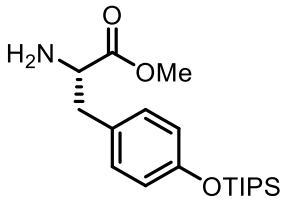
^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.0 (Cq), 158.8 (Cq), 157.2 (Cq), 156.8 (Cq), 144.0 (Cq), 141.4 (Cq) 130.2 (CH), 129.6 (Cq), 127.8 (CH), 127.1 (CH), 125.1 (CH), 120.1 (CH), 114.1 (CH), 67.7 (CH_2), 63.6 (CH_2), 61.1 (CH), 55.3 (CH_3), 48.5 (CH_2), 48.1 (CH_2), 47.3 (CH), 38.4 (CH_2), 34.7 (CH_3), 32.8 (Cq), 26.1 (CH_3), 25.8 (CH_3), 17.8 (CH_2), -1.4 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{37}H_{49}N_3O_6SSiNa^+$: 714.3009; gefunden (ESI-MS$^+$): 714.3005.

Opt. Rot. α = 0.165° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 16.5°$.

5.2.3 Synthese des Tetrapeptids 12

(*S*)-2-Amino-3-(4-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)-methylpropanoat (**35**)



35

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.2 unter Verwendung von Boc-Tyr(OTIPS)-OMe (418 mg, 0.925 mmol), TFA (1.4 mL, 19 mmol) und trockenem CH_2Cl_2 (0.97 mL) bei einer Reaktionszeit von 3 h. Dadurch wurde **35** als hellgelbes Öl (323 mg, 0.919 mmol, quant.) erhalten, das nach LC-MS Kontrolle direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde.

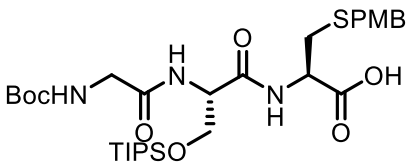
R_f (PE/EE: 1/2) = 0.23.

LC-MS *(DEFAULT.M)***:** *tr* = 1.032 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 352 (M+H$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 6.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 3.73-3.67 (m, 4H, H_2N-C$\underline{H}$-, OMe), 3.01 (dd, *J* = 13.6, 5.4 Hz, 1H, Ar-CH-), 2.84 (dd, *J* = 13.6, 7.6 Hz, 1H, Ar-CH-), 1.98 (bs, 2H, NH_2), 1.28-1.21 (m, 3H, CH(TIPS)), 1.10-1.08 (m, 18H, CH_3(TIPS)) ppm.

Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.[198]

N-(*N*-((*Tert*-butoxycarbonyl)glycyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-seryl)-*S*-(4-methoxybenzyl)-*L*-Cystein (**34**)

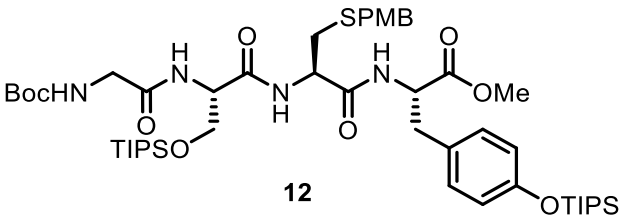


34

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.1 unter Verwendung von Tripeptid **33** (644 mg, 0.982 mmol), 1 M *aq.* LiOH (2.2 mL, 2.2 mmol) und THF (9.8 mL) bei einer Reaktionszeit von 2.5 h. **34** wurde als hellgelber Schaum (616 mg, 0.960 mmol, 98 %) erhalten.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.135 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 642 (M+H$^+$), 664 (M+Na$^+$)).

(9S,12R,15S)-12-(((4-Methoxybenzyl)thio)methyl)-2,2-dimethyl-4,7,10,13-tetraoxo-15-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-9-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecansäuremethylester (**12**)



12

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung von Tripeptidcarbonsäure **34** (588 mg, 0.916 mmol), DIPEA (0.32 mL, 1.8 mmol), HATU (453 mg, 1.19 mmol), **35** (323 mg, 0.916 mmol) und CH_2Cl_2 (9.2 mL) bei einer Dauer von 19 h. Die Aufreinigung erfolgte mit MeOH in CH_2Cl_2 (1 % -> 2 % -> 3 %) und ergab **12** in Form eines leicht gelben Feststoffes (712 mg, 0.730 mmol, 80 %).

R_f (PE/EE: 1/1) = 0.38.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.375 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 975 (M+H$^+$), 997 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.32 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.24-7.20 (m, 2H, Ar-H), 6.99-6.93 (m, 3H, Ar-H, NH), 6.85-6.76 (m, 4H, Ar-H), 5.14 (brs, 1H, BocNH), 4.77-4.69 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.49-4.40 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 4.19 (dd, *J* = 9.6, 3.2 Hz, 1H, CH(Peptid)), 3.87-3.82 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 3.78-3.74 (m, 4H, OMe, CH(Peptid)), 3.65-3.63 (m, 5H, OMe, CH_2(PMB)), 3.02 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH_2(Tyr)), 2.74 (d, *J* = 6.3 Hz,

2H, CH_2(Cys)), 1.44 (s, 9H, CH_3(Boc)), 1.28-1.17 (m, 3H, CH(TIPS)), 1.12-1.03 (m, 36H, CH_3(TIPS)) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.7 (Cq), 170.0 (Cq), 169.9 (Cq), 169.7 (Cq), 158.9 (Cq), 158.9 (Cq), 155.3 (Cq), 130.3 (CH), 130.2 (CH), 130.0 (Cq), 128.6 (Cq), 120.2 (CH), 114.1 (CH), 80.8 (Cq), 62.9 (CH_2), 55.4 (CH_3), 55.0 (CH), 54.1 (CH), 52.7 (CH), 52.3 (CH_3), 37.3 (CH_2), 35.7 (CH_2), 33.1 (CH_2), 28.4 (CH_3), 18.0 (CH_3), 12.8 (CH), 11.9 (CH) ppm.

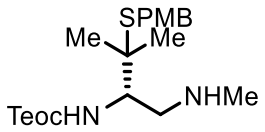
HRMS: berechnet m/z für $C_{49}H_{82}N_4O_{10}SSi_2Na^+$: 997.5188; gefunden (ESI-MS$^+$): 997.5189.

Opt. Rot. α = 0.101° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 10.1°$.

5.2.4 Verknüpfung der modifizierten Penicillamine mit dem Tetrapeptid 12

*5.2.4.1 Kupplung mit **11** und weitere Funktionalisierungen*

2-(Trimethylsilyl)ethoxy*(S)*-(3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methyl-1-(methylamino)butan-2-yl)carbamat (**36**)



36

Die Synthese wurde in einer leicht abgewandelten Version der Literaturvorschrift[80] zur Herstellung eines Boc-geschützten Piperazins durchgeführt.

Teoc-Pen(PMBS)-CH_2NMeFmoc **11** (420 mg, 0.662 mmol) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (4.8 mL) unter Ar-Atmosphäre bei RT geöst und Piperazin (171 mg, 1.99 mmol) wurde hinzugefügt. Die Lösung wurde für 24h gerührt und unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer konzentriert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie auf C18-modifiziertem Silica gereinigt (Eluent: MeCN in H_2O: 0 %-> 30 % -> 80 %). Dies ergab **36** als ein farbloses Öl (258 mg, 0.625 mmol, 95 %).

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 0.362 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 413 (M+H$^+$), 435 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.66 (brs, 1H, NH), 8.72 (brs, 1H, NH), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 5.99 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H, NH), 4.23-4.16 (m, 1H, CH), 4.09-3.93 (m, 2H, OCH_2), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (s, 2H, CH_2(PMB)),

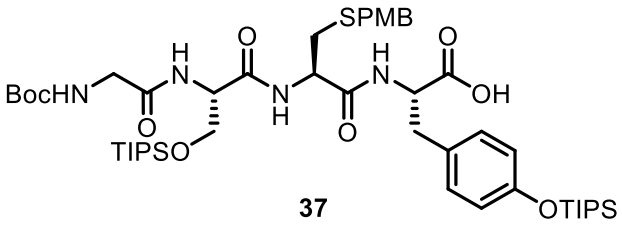
3.44-3.41 (m, 1H, -C<u>H</u>$_2$NHCH$_3$), 3.12-3.07 (m, 1H, -C<u>H</u>$_2$NHCH$_3$), 2.58 (s, 3H, NH<u>CH</u>$_3$), 1.39 (s, 3H, CH$_3$(Pen)), 1.26 (s, 3H, CH$_3$(Pen)), 0.96-0.92 (m, 2H, -C<u>H</u>$_2$TMS), 0.01 (s, 9H, TMS) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 158.9 (Cq), 157.8 (Cq), 130.2 (Ar-CH), 129.6 (Ar-Cq), 114.2 (Ar-CH), 63.9 (CH), 55.4 (OMe), 55.1 (OCH_2), 49.4 (CH_2), 48.7 (CH_2), 32.8 (Cq), 32.6 (NHMe), 26.6 (CH_3), 24.8 (CH_3), 17.5 (<u>C</u>H_2-TMS), -1.5 (TMS-CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{20}H_{37}N_2O_3SSi^+$: 413.2294; gefunden (ESI-MS$^+$): 413.2294.

Opt. Rot. α = 0.292° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 29.2$ °.

(9S,12R,15S)-12-(((4-Methoxybenzyl)thio)methyl)-2,2-dimethyl-4,7,10,13-tetraoxo-15-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-9-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecansäure (**37**)



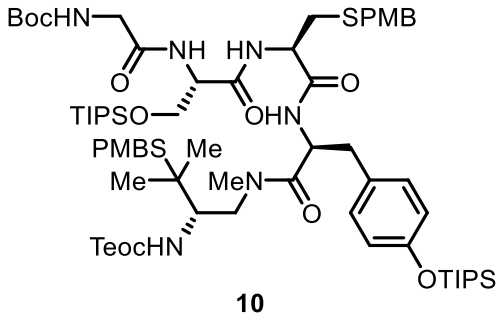
37

Zur Vermeidung der Hydrolyse der TIPS-Schutzgruppe des Tyrosins wurde die Verseifung des Tetrapeptids **12** in einer leicht abgewandelten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.1 durchgeführt.

12 (710 mg, 0.728 mmol) wurde in THF (7.3 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. 1 M *aq.* LiOH (0.91 mL, 0.91 mmol) wurde hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde auf RT gebracht. Nach 1h Rühren wurde die Mischung mit H_2O (15 mL) verdünnt und der pH-Wert mit 1 M *aq.* $KHSO_4$ auf 2 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert (3 x25 mL) und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* NaCl gewaschen (15 mL) und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, um **37** als einen farblosen Feststoff (670 mg, 0.697 mmol, 95 %) zu erhalten, der nach LC-MS Analyse direkt für die nächste Reaktion verwendet wurde.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.234 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 961 (M+H$^+$), 983 (M+Na$^+$)).

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*4S,8S,11R,14S*)-11-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3,3,6-trimethyl-7,10,13,16-tetraoxo-8-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-14-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-2-thia-6,9,12,15-tetraazaheptadecan-4,17-diyl)dicarbamat (**10**)



10

Die Synthese erfolgte nach einer leicht veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung von Tetrapeptidcarbonsäure **37** (133 mg, 0.138 mmol), DIPEA (0.05 mL, 0.3 mmol), HATU (69 mg, 0.18 mmol), **36** (57 mg, 0.14 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2 (1 mL)) und trockenem CH_2Cl_2 (1 mL) bei einer Dauer von 28 h. Die Aufreinigung erfolgte mit MeOH in CH_2Cl_2 (0 %-> 1 % -> 2 % -> 5 %) und ergab **10** in Form eines leicht gelben Feststoffes (124 mg, 0.087 mmol, 63 %).

R_f (6 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.56.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.398 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1356 (M+H$^+$), 1378 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.37-7.33 (m, 1H, NH), 7.24-7.18 (m, 5H, 2x Ar-H, NH), 7.04-6.96 (3H, Ar-H, NH), 6.83-6.75 (m, 7H, 3x Ar-H, NH), 5.27 (brs, 1H, CH(Peptid)), 5.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH(Peptid)), 4.95-4.90 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.53-4.42 (m, 2H, Peptide), 4.18-4.11 (m, 2H, Peptide), 3.99-3.82 (m, 5H, OCH_2, Peptide), 3.77-3.75 (m, 10H, 2x OCH_3, 2x CH_2(PMB)), 3.66-3.63 (m, 3H, Peptide), 2.88-2.81 (m, 2H, Peptide), 2.74-2.71 (m, 2H, Peptide), 2.46 (s, 3H, NCH_3), 1.43 (s, 9H, CH_3(Boc)), 1.27-1.18 (m, 6H, CH_3(Pen)), 1.07-1.04 (m, 42H, TIPS), 0.93-0.89 (m, 2H, -C$\underline{H_2}$TMS), -0.01 (s, 9H, TMS) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 172.2 (Cq), 171.7 (Cq), 170.1 (Cq), 169.7 (Cq), 169.1 (Cq), 158.9 (Cq), 157.6 (Cq), 156.3 (Cq), 155.2 (Cq), 130.5 (Ar-CH), 130.3 (Ar-CH), 130.2 (Ar-CH), 130.1 (Ar-CH), 130.0 (Ar-Cq), 128.7 (Ar-Cq), 120.1 (Ar-CH), 120.0 (Ar-CH), 114.1 (Ar-CH), 114.1 (Ar-CH), 114.1 (Ar-CH), 114.0 (Ar-CH), 80.5 (Cq(Boc)), 64.0 (CH_2), 63.3 (CH_2), 62.9 (CH_2), 56.0 (CH), 55.4 (OCH_3), 55.3 (OCH_3), 54.7 (CH),

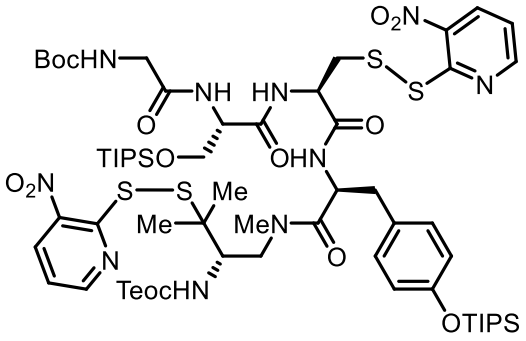
54.0 (CH), 52.7 (CH), 52.3 (CH), 51.2 (CH), 49.0 (CH_2), 47.1 (CH_2), 44.7 (Cq), 39.0 (CH_2), 37.3 (CH_2), 35.8 (CH_2), 35.1 (NCH_3), 33.4 (CH_2(PMB)), 32.8 (CH_2(PMB)), 28.4 (CH_3(Boc)),), 27.0 (CH_3(Pen)), 24.7 (CH_3(Pen)), 18.0 (TIPS), 17.9 ($\underline{C}H_2$-TMS), 12.7 (TIPS), 11.9 (TIPS), -1.4 (TMS) ppm.

Zwei Ar-CH und ein Ar-Cq wurden nicht gefunden. Die NMR-Spektren enthalten eine Verunreinigung durch Tetramethylharnstoff[199] (δ(^{1}H-NMR) = 2.80 ppm, δ(^{13}C-NMR) = 165.7, 38.6 ppm). Dadurch ergibt sich eine geschätzte Reinheit von 63 %.

HRMS: berechnet m/z für $C_{68}H_{115}N_6O_{12}S_2Si_3^+$: 1355.7322; gefunden (ESI-MS$^+$): 1355.7328.

Opt. Rot. α = 0.206° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 20.6$ °.

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*4S,7R,10S,14S*)-12,15-dimethyl-15-((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)-7-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-2,5,8,11-tetraoxo-10-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-3,6,9,12-tetraazahexadecan-1,14-diyl)dicarbamat (**38**)



38

Es wurde die allgemeine Vorschrift 5.1.3.6 angewandt. Dafür wurden Pentamer **10** (240 mg, 0.177 mmol) und NPysCl (93 mg, 0.49 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (1.8 mL) für 22 h unter Erwärmen von -20 °C auf 0 °C verwendet. Nach Aufarbeitung A wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie auf Silica unter Verwendung des Laufmittelgemisches MeOH in CH_2Cl_2 (0 %-> 1 % -> 2 % -> 5 %) gereinigt, um **38** als einen gelben Feststoff (152 mg, 0.107 mmol, 61 %) zu erhalten, der laut LC-MS Analyse noch Spuren des Mono-Substitutionsprodukts als Verunreinigung enthielt.

R_f (6 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.36.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.333 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1424 (M+H$^+$), 1446 (M+Na$^+$)).

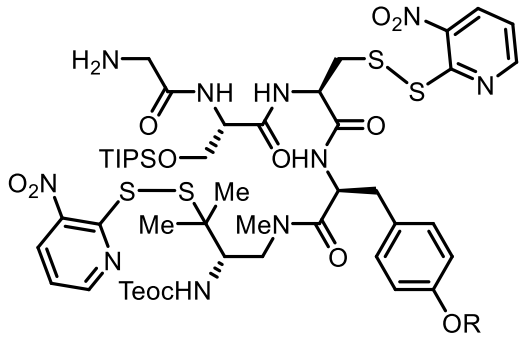
^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.89-8.77 (m, 2H), 8.52-8.43 (m, 2H), 7.58-7.52 (m, 2H), 7.39-7.30 (m, 2H), 7.25-7.22 (m, 1H), 7.08-6.99 (m, 3H, CH(Try), NH), 6.85-6.74 (m, 3H, CH(Try), NH), 6.36 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, NH), 5.83-5.51 (m, 1H), 5.16 (brs, 1H), 5.06-5.05 (m, 1H), 4.77-4.41 (m, 2H), 4.13-3.99 (m, 4H), 3.91-3.80 (m, 3H), 3.71-3.62 (m, 2H), 3.25-3.11 (m, 2H), 2.99-2.63 (m, 6H), 1.44-1.36 (m, 9H, CH_3(Boc)), 1.27-1.18 (m, 6H, CH_3(Pen)), 1.09-1.03 (m, 42H, 2xTIPS), 0.86-0.82 (m, 2H, C$\underline{H_2}$TMS), -0.06- -0.13 (m, 9H, TMS) ppm.

Das aufgenommene $^{13}C\{^1H\}$-NMR konnte aufgrund der Vielzahl an Signalen, die weit über die Anzahl an C-Atomen von **38** hinausging, nicht ausgewertet werden. Das Molekül lag vermutlich in Lösung in vielen verschiedenen Konformationen vor.

HRMS: berechnet m/z für $C_{62}H_{102}N_{10}O_{14}S_4Si_3Na^+$: 1445.5665; gefunden (ESI-MS$^+$): 1445.5667.

Opt. Rot. α = -0.453° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = -45.3 °.

2-Trimethylsilylethyl((*6S,9R,12S,16S*)-6-(2-aminoacetamido)-12-(4-hydroxybenzyl)-3,3-diisopropyl-2,14,17-trimethyl-17-((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)-9-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-7,10,13-trioxo-4-oxa-8,11,14-triaza-3-silaoctadecan-16-yl)carbamat (**39**)



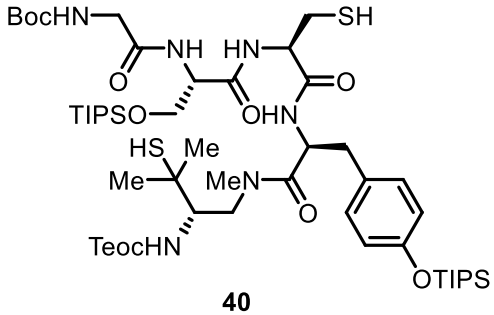
R = TIPS: **39(OTIPS)**
R = H: **39(OH)**

Die Reaktion erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.3 unter Verwendung von NPys-Pentamer **38** (30 mg, 0.021 mmol) und *p*TSA (4 mg, 0.02 mmol) in trockenem EtOH (0.21 mL). Nach 75 min bei 60 °C ergab die Aufarbeitung eine 1:1 Mischung der Produkte **39(OTIPS)** und **39(OH)** als gelben Schaum (23 mg, 0.017 mmol, 83 %).

Diese wurde nach LC-MS Analyse direkt für den nächsten Schritt verwendet.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.045 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1167 (**39(OH)**+H$^+$), 1189 (**39(OH)** +Na$^+$)), 1.153 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1324 (**39(OTIPS)** +H$^+$), 1346 (**39(OTIPS)** +Na$^+$).

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*4S,7R,10S,14S*)-15-mercapto-7-(mercaptomethyl)-12,15-dimethyl-2,5,8,11-tetraoxo-10-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-3,6,9,12-tetraazahexadecan-1,14-diyl)dicarbamat (**40**)



40

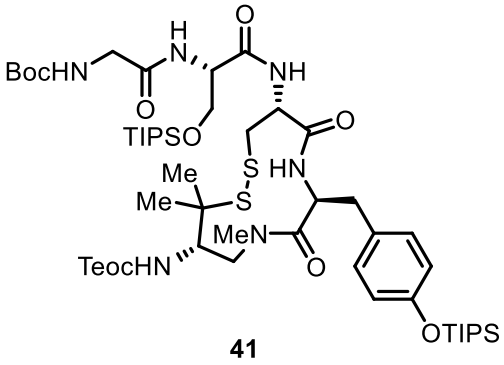
Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.7. Es wurden NPys-Pentamer **38** (152 mg, 0.107 mmol), entgastes THF (1.6 mL), entgastes H_2O (0.04 mL, 2 mmol) und eine 1 M Lösung aus PMe_3 in THF (0.23 mL, 0.23 mmol) bei 0 °C für 1 h verwendet. Die Aufarbeitung lieferte das gewünschte Produkt **40** als hellgelben kristallinen Feststoff (100 mg, 0.090 mmol, 84 %), der direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde.

R_f (6 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.45.

LC-MS (*25-100(2) ACN 5min*)**:** t_r = 3.54 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1115 (M+H$^+$), 1137 (M+Na$^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{52}H_{98}N_6O_{10}S_2Si_3Na^+$: 1137.5991; gefunden (ESI-MS$^+$): 1137.5989.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,8S,11R*)-11-((*S*)-2-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)acetamido)-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-3,3,6-trimethyl-7,10-dioxo-8-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)carbamat (**41**)



41

Die Reaktion erfolgte in einer abgewandelten Version[59] der in der Gruppe bekannten Bildung eines intermolekularem Disulfids.

Pentamerdithiol **40** (100 mg, 0.090 mmol) wurde in trockenem DMF (115 mL) bei RT gelöst und destilliertes DIPEA (0.03 mL, 0.2 mmol) hinzu gegeben. Durch die Lösung wurde für 20 min ein O_2-Strom geleitet und die Reaktion unter O_2-Atmosphäre weiter gerührt. Nach 20 h wurde wiederholt für 30 min ein O_2-Strom durch die Reaktionsmischung geleitet und das Rühren für 24 h fortgesetzt. Dies wurde noch einmal wiederholt, sodass die Gesamtreaktionszeit 72 h betrug. Nach vollständigem Umsatz von **40** wurde die Lösung mit H_2O (50 mL) und EtOAc (100 mL) verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* NH_4Cl (3x50 mL), H_2O (50 mL) und ges. *aq.* NaCl (50 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und **41** konnte nach chromatographischer Reinigung auf Silica (Eluent: MeOH in CH_2Cl_2 (0 %-> 1 % -> 2 % -> 5 %)) als hellgelber Feststoff (52 mg, 0.047 mmol, 52 %) erhalten werden, der laut LC-MS Analyse einen kleinen Anteil an **40** mit einer PMB-Gruppe enthielt.

R_f (6 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.24.

LC-MS (*25-100(2) ACN 5min)***:** t_r = 3.37 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1113 (**41**+H$^+$), 1135 (**41**+Na$^+$)), 3.53 (1235 (**40+PMB**+H$^+$), 1257 (**40+PMB** +Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH), 7.07-7.03 (m, 2H, Ar-CH), 6.83-6.73 (m, 3H, Ar-CH, NH), 5.53 (brs, 1H), 5.35 (brs, 1H), 5.22-5.01 (m, 2H), 4.85-4.81 (m, 1H), 4.72 (brs, 1H), 4.63-4.50 (m, 1H), 4.12-3.92

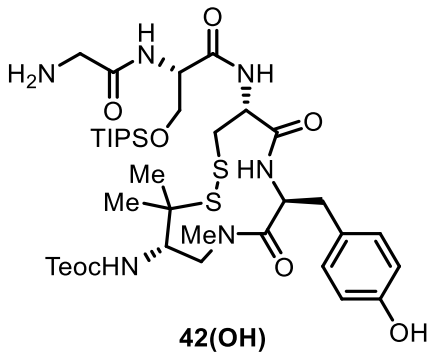
(m, 5H),3.80-3.77 (m, 2H), 3.25-2.93 (m, 2H), 2.85-2.82 (m, 3H, NCH_3), 2.60-2.56 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 1.43-1.41 (m, 9H, CH_3(Boc)), 1.33-1.20 (m, 9H, CH_3(Pen), TIPS), 1.07-1.03 (m, 40H, 2xTIPS), 0.95-0.87 (m, 2H, C$\underline{H}_2$TMS), 0.01 (s, 9H, TMS) ppm.

$^{13}C\{^1H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 173.5 (Cq), 168.7 (Cq), 156.0 (Cq), 155.2 (Cq), 155.0 (Cq), 130.5 (Ar-CH)m 130.2 (Ar-CH), 128.5 (Ar-Cq), 120.4 (Ar-CH), 120.1 (Ar-CH), 64.1 (CH_2), 63.7 (CH_2), 61.5 (CH), 55.4 (CH), 54.8 (CH), 51.1 (CH), 41.9 (CH), 38.3 (CH_2), 37.6 (CH_3), 29.9 (CH_2), 28.5 (CH_3(Boc)), 18.1 (TIPS), 18.0 (TIPS), 12.7 (TIPS), 12.0 ($\underline{C}H_2$-TMS), -1.3 (TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{52}H_{96}N_6O_{10}S_2Si_3Na^+$: 1135.5835; gefunden (ESI-MS^+): 1135.5837.

Opt. Rot. α = 0.850° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 85.0$ °.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,8S,11R*)-11-((*S*)-2-(2-aminoacetamido)-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-8-(4-hydroxybenzyl)-3,3,6-trimethyl-7,10-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)carbamat (**42(OH)**)



42(OH)

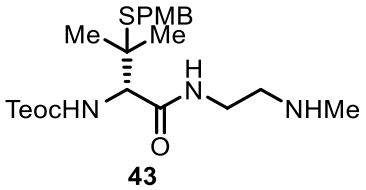
Die Reaktion erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.3 unter Verwendung von Pentamerdisulfid **41** (14 mg, 0.013 mmol) und einer Mischung aus *p*TSA (7 mg, 0.04 mmol) in trockenem EtOH (0.51 mL). Nach 17.5 h bei 60 °C ergab die Aufarbeitung das gewünschte Produkt **42(OH)** als hellgelbes Pulver (7 mg, 0.008 mmol, 65 %), das wurde mit PE (3x0.2 mL) gewaschen wurde und laut LC-MS Analyse noch Spuren des TIPS-geschützten Amins **42(OTIPS)** enthielt.

LC-MS (*25-100(2) ACN 5min)***:*** t_r = 2.26 min (*m/z* (ESI-MS^+): 857 (**42(OH)**+H^+)), 2.83 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1013 (**42(OTIPS)**+H)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{38}H_{69}N_6O_8S_2Si_2$: 857.4157; gefunden (ESI-MS^+): 857.4151.

*5.2.4.2 Kupplung mit **21** und weitere Funktionalisierung*

2-Trimethylsilylethyl*(S)*-(3-((4-methoxybenzyl)thio)-3-methyl-1-((2-(methylamino)ethyl)amino)-1-oxobutan-2-yl)carbamat (**43**)



43

Die Synthese wurde analog zur Herstellung von Teoc-Pen(PMBS)-CH_2NHMe **36** unter Verwendung von Teoc-Pen(PMBS)-$NH(CH_2)_2NMeFmoc$ **21** (476 mg, 0.688 mmol) und Piperazin (178 mg, 2.06 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (5.0 mL) bei einer Dauer von 26 h durchgeführt. Chromatographische Reinigung ergab das gewünschte Produkt **43** als farblosen öligen Feststoff (318 mg, 0.677 mmol, 98 %).

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 0.309 min (*m/z* (ESI-MS^+): 470 (M+H)).

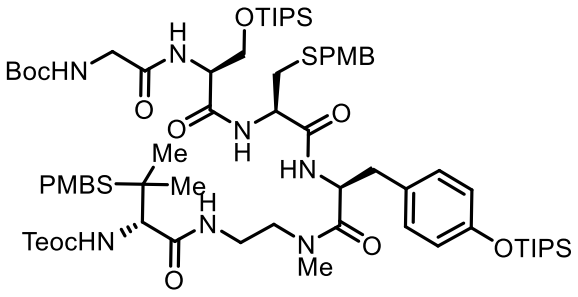
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.14 (brs, 2H, $N\underline{H}CH_3$), 8.38 (s, 1H, CONH), 7.22 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH(Ar)), 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH(Ar)), 5.85 (s, 1H, OCONH), 4.11-3.97 (m, 3H, OCH_2, CH), 3.78-3.65 (m, 7H, OCH_3, CH_2(PMB), $NHC\underline{H}_2$), 3.20 (brs, 2H, $NHC\underline{H}_2$), 2.66 (s, 3H, NCH_3), 1.46 (s, 3H, CH_3 (Pen)), 1.34 (s, 3H, CH_3(Pen)), 0.98-0.94 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-TMS), 0.02 (2, 9H, TMS) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.1 (Cq), 158.9 (Cq), 157.8 (Cq), 130.2 (CH(Ar)), 129.2 (Cq(Ar)), 114.2 (CH(Ar)), 64.2 (OCH_2), 61.8 (CH), 55.4 (OCH_3), 47.9 (CH_2), 47.6 (CH_2), 36.4 (Cq), 33.4 (NCH_3), 32.6 (NCH_2), 27.1 (CH_3(Pen)), 24.6 (CH_3(Pen)), 17.8 ($\underline{C}H_2$-TMS), -1.4 (TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{22}H_{39}N_3O_4SSiNa^+$: 492.2328; gefunden (ESI-MS^+): 492.2328.

Opt. Rot. α = -0.157° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = -15.7 °.

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*4S,11S,14R,17S*)-14-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3,3,9-trimethyl-5,10,13,16,19-pentaoxo-11-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-17-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-2-thia-6,9,12,15,18-pentaazaicosan-4,20-diyl)dicarbamat (**20**)



20

Die Synthese erfolgte analog zur allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung von Tetrapeptidcarbonsäure **37** (670 mg, 0.697 mmol), DIPEA (0.24 mL, 1.4 mmol), HATU (345 mg, 0.906 mmol), **43** (311 mg, 0.662 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2 (6 mL)) und trockenem CH_2Cl_2 (5 mL) bei einer Dauer von 23 h. Chromatographische Reinigung ergab das gewünschte Produkt **20** als farblosen Feststoff (627 mg, 0.444 mmol, 64 %).

R_f (6 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.41.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.293 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1413 ($M+H^+$), 1435 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.59 (brs, 1H, NH), 7.46 (brs, 1H, NH), 7.20 (d, *J* = 8.1 Hz, 3H, CH(Ar), NH), 7.11 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH(Ar)), 7.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H, CH(Ar), NH), 6.81-6.75 (m, 6H, CH(Ar)), 5.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH), 5.64 (brs, 1H, NH), 5.08 (brs, 1H, CH(Peptid)), 4.80 (brs, 1H, CH(Peptid)), 4.53 (brs, 1H, CH(Peptid)), 4.30 (brs, 1H, CH(Peptid)), 4.18-4.06 (m, 3H, OCH_2, CH(Peptid)), 3.92 (brs, 2H, CH_2(Peptid)), 3.79-3.72 (m, 10H, 2x OCH_3, 2x CH_2(PMB)), 3.64-3.63 (m, 2H), 3.55 (s, 1H), 3.32-3.22 (m, 2H, CH_2NR_2), 3.01-2.89 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 2.79-2.72 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 2.69-2.64 (m, 3H, NCH_3), 1.43 (s, 9H, CH_3(Boc)), 1.35-1.33 (m, 6H, CH_3(Pen)), 1.25-1.17 (m, 5H, TIPS), 1.07-1.05 (m, 42H, TIPS), 0.86-0.82 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-TMS), 0.02 (s, 9H, TMS) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.9 (Cq), 170.5 (Cq), 170.2 (Cq), 169.9 (Cq), 169.2 (Cq), 158.8 (Cq), 158.7 (Cq), 156.7 (Cq), 156.3 (Cq), 155.3 (Cq), 130.5 (Ar-CH), 130.4 (Ar-CH), 130.3 (Ar-CH), 130.2 (Ar-CH), 130.1 (Ar-CH), 129.8 (Ar-Cq), 129.6 (Ar-

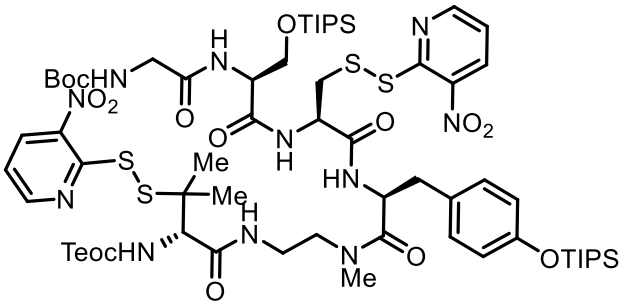
Cq), 128.7 (Ar-Cq), 120.1 (Ar-CH), 114.1 (Ar-CH), 114.2 (Ar-CH), 114.1 (Ar-CH), 114.0 (Ar-CH), 80.2 (Cq(Boc)), 63.7 (CH_2), 63.3 (CH_2), 61.2 (CH), 55.3 (OCH_3), 55.3 (OCH_3), 53.0 (CH), 50.7 (CH), 48.7 (CH_2), 48.0 (CH_2), 44.3 (Cq), 38.7 (CH), 36.3 (CH), 36.1 (CH_2), 32.7 (CH_2(PMB)), 28.5 (CH_3(Boc)), 26.7 (CH_3(Pen)), 25.8 (CH_3(Pen)), 25.6 (NCH_3), 18.1 (TIPS), 18.1 (TIPS), 18.0 (TIPS), 17.8 ($\underline{C}H_2$-TMS), 12.7 (TIPS), 11.9 (TIPS), -1.4 (TMS) ppm.

Drei Ar-CH und ein CH_2(PMB) wurden nicht gefunden. Die NMR-Spektren enthalten eine Verunreinigung durch Tetramethylharnstoff[199] (δ(^{1}H-NMR) = 2.80 ppm, δ(^{13}C-NMR) = 165.7, 38.7 ppm). Dadurch ergibt sich eine geschätzte Reinheit von 92 %.

HRMS: berechnet m/z für $C_{70}H_{117}N_7O_{13}S_2Si_3Na^+$: 1434.7356; gefunden (ESI-MS^+): 1434.7355.

Opt. Rot. α = 0.126° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 12.6$ °.

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*4S,7R,10S,17S*)-12,18-dimethyl-18-((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)-7-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-2,5,8,11,16-pentaoxo-10-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-3,6,9,12,15-pentaazanonadecan-1,17-diyl)dicarbamat (**44**)



44

Die Synthese erfolgte analog zur allgemeinen Vorschrift 5.1.3.6 unter Verwendung von Pentamer **20** (250 mg, 0.177 mmol), NPysCl (85 mg, 0.44 mmol) und trockenem CH_2Cl_2 (1.8 mL) bei einer verkürzten Reaktionsdauer von 7.5 h unter Erwärmen von -20 °C auf 0 °C. Nach Aufarbeitung A wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie auf Silica unter Verwendung des Laufmittelgemisches MeOH in CH_2Cl_2 (0 %-> 1 % -> 2 % -> 5 %) gereinigt, um da gewünschte disubstituierte Produkt **44** als gelber Feststoff (159 mg, 0.107 mmol, 61 %) mit Spuren des Mono-Substitutionsprodukts als Verunreinigung zu isolieren.

R_f (6 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.22.

LC-MS (*25-100(2) ACN 5min*)**:** t_r = 3.49 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1480 ($M+H^+$), 1502 ($M+Na^+$)).

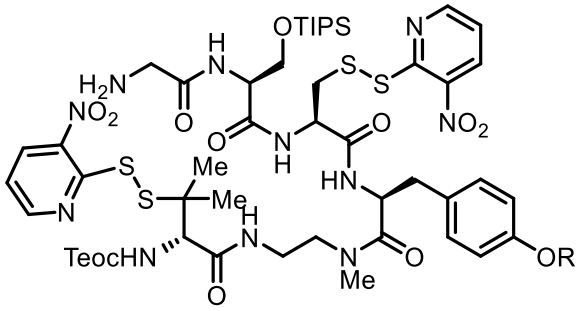
^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.95-8.84 (m, 1H, CH(NPys)), 8.77-8.73 (m, 1H, CH(NPys)), 8.54-8.47 (m, 2H, CH(NPys)), 8.24-8.14 (m, 1H, CH(NPys)), 7.56-7.53 (m, 1H, NH), 7.44-7.32 (m, 2H, CH(NPys), NH), 7.06-6.99 (m, 2H, CH(Ph)), 6.80-6.74 (m, 3H, CH(Ph), NH), 5.73-5.54 (m, 2H, 2 x NH), 5.30-5.26 (m, 1H, CH(Peptide)), 5.13-5.03 (1H, CH(Peptide)), 4.94-4.91 (1H, CH(Peptide)), 4.68 (brs, 1H, CH(Peptide)), 4.54-4.41 (1H, CH(Peptide)), 4.21-3.97 (m, 5H), 3.86-3.70 (m, 3H), 3.48-3.15 (m, 4H), 2.99-2.69 (m, 6H), 2.60-2.50 (m, 1H), 1.45-1.42 (m, 9H, CH_3(Boc)), 1.30-1.21 (m, 6H, CH_3(Pen)), 1.09-1.04 (m, 42H, TIPS), 0.85-0.83 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-TMS), 0.04-0.00 (m, 9H, TMS) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ = 172.0 (Cq), 170.9 (Cq), 170.0 (Cq), 168.8 (Cq), 158.4 (Cq), 156.5 (Cq), 156.2 (Cq), 155.5 (Cq), 155.4 (Cq), 154.0 (CH(NPys)), 153.6 (CH(NPys)), 143.1 (Cq(NPys)), 142.9 (Cq(NPys)), 134.3 (CH(NPys)), 134.1 (CH(NPys)), 130.5 (CH(Ph)), 128.5 (Cq(Ph)), 121.3 (CH(NPys)), 121.1 (CH(NPys)), 120.2 (CH(Ph)), 80.0 (Cq(Boc)), 63.9 (CH_2), 63.8 (CH_2), 63.4 (CH_2), 62.2 (CH), 55.8 (CH), 55.5 (CH), 53.7 (CH_2), 50.5 (CH), 47.8 (CH_2), 47.4 (CH_2), 43.8 (Cq), 35.9 (CH), 29.8 (CH_2), 28.8 (NCH_3), 28.6 (CH_3(Boc)), 27.4 (CH_3(Pen)), 26.9 (CH_3(Pen)), 18.1 (TIPS), 17.9 ($\underline{C}H_2$-TMS), 12.8 (TIPS), 11.9 (TIPS), -1.4 (TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{64}H_{105}N_{11}O_{15}S_4Si_3Na^+$: 1502.5880; gefunden (ESI-MS$^+$): 1502.5837.

Opt. Rot. α = 0.066° (*c* = 1.0, MeOH); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 6.6$ °.

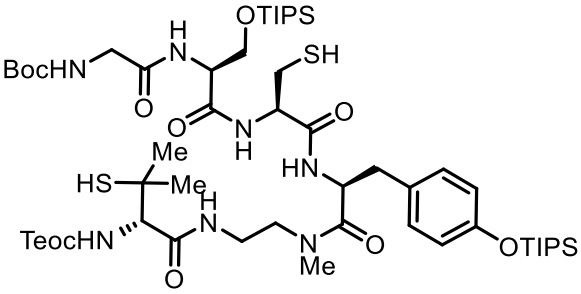
2-Trimethylsilylethyl((*6S,9R,12S,19S*)-6-(2-aminoacetamido)-12-(4-hydroxybenzyl)-3,3-diisopropyl-2,14,20-trimethyl-20-((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)-9-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-7,10,13,18-tetraoxo-4-oxa-8,11,14,17-tetraaza-3-silahenicosan-19-yl)carbamat (**45**)



R = TIPS: **45(OTIPS)**
R = H: **45(OH)**

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.3 unter Verwendung von NPys-Pentamer **44** (40mg, 0.027 mmol), *p*TSA (5 mg, 0.03 mmol) und trockenem EtOH (0.23 mL) bei einer Dauer von 90 min durchgeführt. Nach Aufarbeitung konnte eine 1:1 Mischung der Produkte **45(OTIPS)** und **45(OH)** gemeinsam mit anderen Verunreinigungen als gelber Feststoff (29 mg, 0.024 mmol, 88 %) isoliert werden.
Es wurde nach LC-MS Analyse direkt für den nächsten Schritt verwendet.
LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.032 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1224 (**45(OH)**+H$^+$)), 1.135 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1381 (**45(OTIPS)** +H$^+$), 1503 (**45(OTIPS)** +Na$^+$).

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*4S,7R,10S,17S*)-18-mercapto-7-(mercaptomethyl)-12,18-dimethyl-2,5,8,11,16-pentaoxo-10-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-3,6,9,12,15-pentaazanonadecan-1,17-diyl)dicarbamat (**46**)



46

Die Herstellung wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.7 unter Verwendung von NPys-Pentamer **44** (159 mg, 0.107 mmol), entgastem THF (1.6 mL), entgastem H_2O

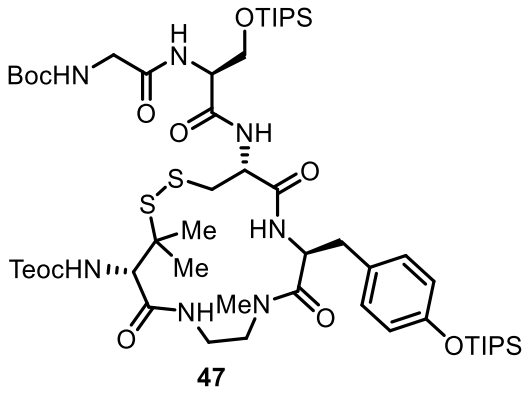
(0.05 mL, 3 mmol) und einer 1 M Lösung aus PMe_3 in THF (0.22 mL, 0.22 mmol) bei einer Reaktionszeit von 110 min bei 0 °C durchgeführt. Nach der Aufarbeitung wurde **46** als ein hellgelber Feststoff (131 mg, 0.112 mmol, quant.) isoliert und direkt für den nächsten Schritt verwendet.

R_f (6 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.37.

LC-MS (*25-100(2) ACN 5min*)**:** t_r = 3.42 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1172 (M+H$^+$), 1194 (M+Na$^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{54}H_{101}N_7O_{11}S_2Si_3Na^+$: 1194.6206; gefunden (ESI-MS$^+$): 1194.6208.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,11S,14R*)-14-((*S*)-2-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)acetamido)-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-3,3,9-trimethyl-5,10,13-trioxo-11-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-1,2-dithia-6,9,12-triazacyclopentadecan-4-yl)carbamat (**47**)



47

Die Herstellung erfolgte analog zur Reaktion zum Pentamerdisulfid **41**. Es wurde Pentamerdithiol **46** (131 mg, 0.112 mmol), DIPEA (0.04 mL, 0.2 mL) und trockenes DMF (115 mL) bei einer Reaktionszeit von 71 h verwendet. Säulenchromatografie auf Silica ergab Disulfid **47** in Form eines hellgelben Feststoffes (53 mg, 0.045 mmol, 41 %).

R_f (6 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.24.

LC-MS (*25-100(2) ACN 5min)***:** t_r = 3.30 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1170 (M+H$^+$), 1192 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.06-7.00 (m, 2H, CH(Ar)), 6.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH(Ar)), 5.42-5.40 (m, 2H, NH), 5.21 (brs, 2H, CH(Peptid)), 5.02(brs, 1H, CH(Peptid)), 4.77 (brs, 1H, CH(Peptid)), 4.57-4.50 (m, 2H, OCH_2), 4.21-4.01 (m, 6H), 3.81-3.76 (m, 2H), 3.28-3.25 (m, 1H), 2.98-2.95 (m, 3H), 2.87-2.72 (m, 3H), 2.42 (s, 3H, NCH_3), 2.34-

2.31 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 1.43 (s, 9H, CH_3(Boc)), 1.36-1.32 (m, 3H, CH_3(Pen)), 1.25-1.19 (m, 6H, CH_3(Pen), TIPS), 1.08-1.05 (m, 39H, TIPS), 0.88-0.82 (m, 2H, $\underline{C}H_2$-TMS), 0.03-0.00 (m, 9H, TMS) ppm.

Die Amid-NH wurden aufgrund der ausgeprägten Verbreiterung der Signale nicht gefunden.

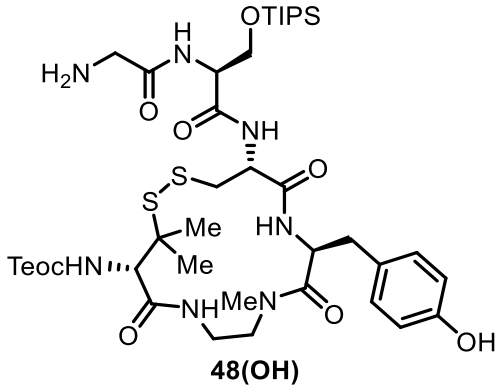
$^{13}C\{^1H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.0 (Cq), 169.5 (Cq), 169.4 (Cq), 156.4 (Cq), 155.5 (Cq), 130.6 (Ar-CH), 128.4 (Ar-Cq), 120.0 (Ar-CH), 79.9 (Cq(Boc)), 63.8 (CH_2), 63.4 (CH_2), 54.6 (CH), 53.0 (CH_2), 45.6 (CH_2), 44.1 (Cq), 34.3 (CH), 29.8 (CH_2), 28.6 (CH_3(Boc)), 28.5 (NCH_3), 18.2 (TIPS), 18.1 (TIPS), 18.0 (TIPS), 17.7 ($\underline{C}H_2$-TMS), 12.7 (TIPS), 12.0 (TIPS), 11.9 (TIPS), -1.4 (TMS) ppm.

Aufgrund der Verdünnung und der Verbreiterung der Signale wurden mehrere Kohlenstoffe nicht gefunden.

HRMS: berechnet m/z für $C_{54}H_{99}N_7O_{11}S_2Si_3Na^+$: 1192.6050; gefunden (ESI-MS^+): 1192.6050.

Opt. Rot. α = 0.290 (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 29.0$ °.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,11S,14R*)-14-((*S*)-2-(2-aminoacetamido)-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-11-(4-hydroxybenzyl)-3,3,9-trimethyl-5,10,13-trioxo-1,2-dithia-6,9,12-triazacyclopentadecan-4-yl)carbamat (**48(OH)**)



48(OH)

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.3 unter Verwendung von Pentamerdisulfid **47** (14 mg, 0.012 mmol) und *p*TSA (7 mg, 0.04 mmol) in trockenem EtOH (0.48 mL) bei einer Dauer von 6.25 h. Nach Aufarbeitung (kein Waschen mit PE) konnte das Amin **48(OH)** als farbloser Feststoff (11 mg, 0.012 mmol, quant.) isoliert

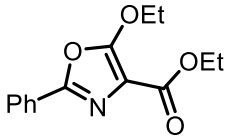
werden, das noch Spuren von **48(OTIPS)** enthielt. Es wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet.

LC-MS (*25-100(2) ACN 5min)***:** t_r = 2.14 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 914 (**48(OH)**+H$^+$), 936 (**48(OH)**+Na$^+$)), 2.72 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1070 (**48(OTIPS)**+H$^+$), 1092 (**48(OTIPS)**+Na$^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{40}H_{72}N_7O_9S_2Si_2^+$: 914.4372; gefunden (ESI-MS$^+$): 914.4374.

5.2.5 Synthese und Verseifung des Oxazolesters 9

5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbonsäureethylester (**9**)



9

Die Synthese erfolgte nach einer leicht abgewandelten Version der Literaturvorschrift.[54] **50** (9.17 g, 32.8 mmol) und TFAA (17.6 mL, 125 mmol) wurden in $PhCF_3$ (11.8 mL) unter Ar-Atmosphäre gelöst und auf drei 20 mL-Mikrowellengefäße aufgeteilt. Die Gefäße wurden verschlossen und die Reaktionsmischungen bei 120 °C für 10 min unter Mikrowellen-Einstrahlung bei maximaler Leistung gerührt. Im Anschluss wurde die gelbbraune Lösung unter vermindertem Druck konzentriert und der Rückstand durch Säulenchromatographie auf Silica unter Verwendung des Laufmittelgemisches PE/EE (7/1-> 5/1-> 3/1) gereinigt. Dadurch konnte **9** als hellgelbes viskoses Öl erhalten werden (6.64 g, 25.4 mmol, 78 %).

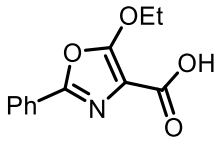
R_f (PE/EE (3/1)) = 0.21.

LC-MS (*UPLC-MS-kurz*): *tr* = 1.22 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 284 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.98-7.95 (m, 2H, CH(Ar)), 7.45-7.43 (m, 3H, CH(Ar)), 4.59 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 1.54 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.[54]

5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbonsäure (**51**)



51

Ph-Oxa-OEt **9** (522 mg, 2.00 mmol) wurde in THF (20 mL) bei RT gelöst und 1 M *aq.* NaOH-Lösung (3.4 mL, 3.4 mmol) wurde hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 50 °C erhitzt und für 20 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Startmaterials wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt und der pH-Wert auf 2 durch Zugabe von 1 M *aq.* HCl-Lösung eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (3x) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Dadurch konnte die Carbonsäure **51** als farbloser Feststoff (416 mg, 1.78 mmol, 90 %) erhalten werden, der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet wurde.

LC-MS (*UPLC-MS-kurz*): *tr* = 1.02 min (*m/z* (ESI-MS^+): 256 ($M+Na^+$)).

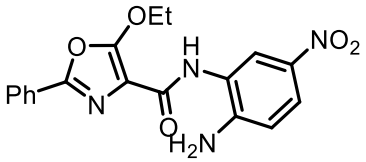
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.56 (bs, 1H, CO_2H), 7.99-7.96 (m, 2H, CH(Ar)), 7.46-7.44 (m, 3H, CH(Ar)), 4.65 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 1.55 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.[54]

5.2.6 Synthese des Thioamids durch Thioacylierungsmethoden

*5.2.6.1 Synthese und Anwendung der aktivierten Thiocarbonylverbindung **59***

N-(2-Amino-5-nitrophenyl)-5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carboxamid (**57**)



57

57 wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.4 synthetisiert. Dafür wurden **51** (100 mg, 0.429 mmol), Oxyma (74 mg, 0.52 mmol), EDC-HCl (91 mg, 0.48 mmol), $NaHCO_3$ (180 mg, 2.14 mmol), Anilin **56** (66 mg, 0.43 mmol), trockenes CH_2Cl_2 (2.2 mL) und trockenes DMF (2.2 mL) bei einer Reaktionsdauer von 72 h benutzt. Die Aufreinigung durch Säulenchromatographie auf Silica erfolgte mit PE/EE (3/1-> 2/1-> 1/1) als Laufmittelgemisch. Das lieferte **57** als gelben Feststoff (76 mg, 0.21 mmol, 48 %).

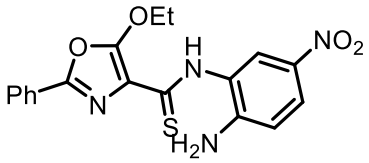
R_f (PE/EE: 1/1) = 0.37.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 9.29 (s, 1H, -CONH-), 8.17 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, CH(Anilin)), 8.00-7.98 (m, 2H, CH(Ph)), 7.90 (dd, *J* = 9.1, 2.5 Hz, 1H, CH(Anilin)), 7.58-7.50 (m, 3H, CH(Ph)), 6.81 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, CH(Anilin)), 6.52 (s, 2H, NH_2), 4.64 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2$-CH_3), 1.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, OCH_2-$C\underline{H}_3$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, DMSO) δ = 159.4 (Cq(Carbonyl)), 159.3 (Cq(Oxa)), 150.3 (Cq(Anilin)), 149.4 (Cq(Aninlin)), 135.5 (Cq(Oxa)), 130.6 (Cq(Ph)), 129.1 (CH(Ph)), 126.2 (CH(Ph)), 125.5 (CH(Ph)), 122.8 (Cq(Oxa)), 121.2 (CH(Anilin)), 114.0 (CH(Anilin)), 110.6 (CH(Anilin)), 70.5 (CH_2), 14.8 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{18}H_{16}N_4O_5Na^+$: 391.1018; gefunden (ESI-MS^+): 391.1020.

N-(2-Amino-5-nitrophenyl)-5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamid (**58**)



58

Die Synthese erfolgte analog zur allgemeinen Vorschrift 5.1.3.8 und zu der in der Literatur beschriebenen Thionierung von Anilinamiden.[60] Es wurden Anilinamid **57** (392 mg, 1.06 mmol) in trockenem THF (7.1 mL) und LR (431 mg, 1.06 mmol) für 4.5 h bei 40 °C verwendet. Durch Aufarbeitung und Säulenchromatographie auf Silica (Eluent: PE/EE (5/1-> 3/1-> 2/1-> 1/1-> 1/2)) konnte das Thioamid **58** als rot-braunen Feststoff (104 mg, 0.271 mmol, 26 %) erhalten werden.

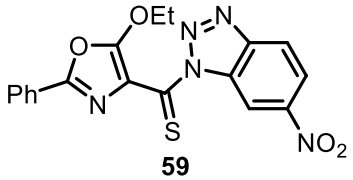
R_f (PE/EE: 2/1) = 0.29.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 10.73 (s, 1H, -CSNH-), 8.02-7.95 (m, 4H, CH(Ph), CH(Anilin)), 7.60-7.55 (m, 3H, CH(Ph)), 6.81 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, CH(Anilin)), 6.53 (s, 2H, NH_2), 4.65 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2$-CH_3), 1.45 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, OCH_2-$C\underline{H}_3$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, DMSO) δ = 185.0 (Cq(Carbonyl)), 160.3 (Cq(Oxa)), 151.5 (Cq(Anilin)), 148.1 (Cq(Aninlin)), 135.1 (Cq(Oxa)), 130.6 (Cq(Ph)), 129.1 (CH(Ph)), 126.0 (CH(Ph)), 125.6 (CH(Ph)), 124.6 (Cq(Oxa)), 122.4 (CH(Anilin)), 116.3 (CH(Anilin)), 114.0 (CH(Anilin)), 70.1 (CH_2), 14.9 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{18}H_{16}N_4O_4SNa^+$: 407.0790; gefunden (ESI-MS$^+$): 407.0809.

(5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)(6-nitro-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)methanthion (**59**)



59

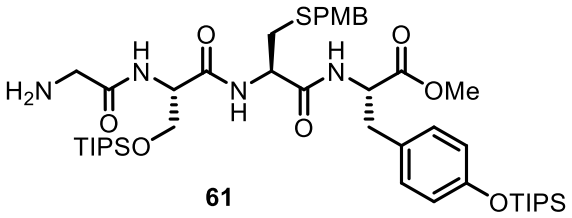
Die Herstellung von **59** wurde analog zu der Synthese von literaturbekannten Thionobenzotriazolen durchgeführt. [60]

Eine Lösung aus **58** (35 mg, 0.091 mmol) in 95 Vol% AcOH (1.8 mL) wurde unter Lichtausschluss auf 0 °C gekühlt. $NaNO_2$ (10 mg, 0.14 mmol) wurde zu der gelb-orangenen Suspension gegeben und die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei derselben Temperatur weiter gerührt, bis **59** mittels DC-MS nachgewiesen werden

konnte. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von kaltem H_2O (5 mL) beendet und der dabei enstandene Niederschlag in CH_2Cl_2 (9.0 mL, 0.010M) gelöst. Die Lösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet und entgast, indem ein Ar-Strom durch diese geleitet wurde, bevor diese direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde.

R_f (PE/EE: 2/1) = 0.55.

(*6S,9R,12S*)-6-(2-Aminoacetamido)-3,3-diisopropyl-9-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-2-methyl-7,10-dioxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-oxa-8,11-diaza-3-silatridecansäuremethylester (**61**)



61

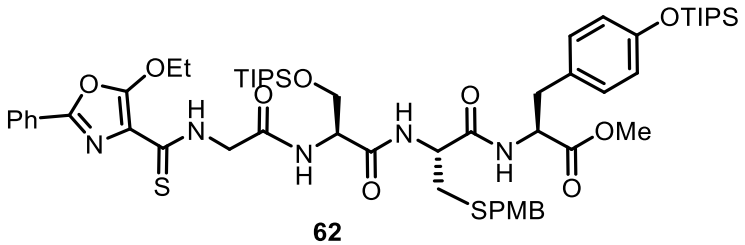
Die Herstellung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.2 unter Verwendung von **12** (60 mg, 0.062 mmol), TFA (0.10 mL, 1.2 mmol) und trockenem CH_2Cl_2 (0.62 mL). Nach einer Reaktionszeit von 3 h konnte **61** nach der beschriebenen Aufarbeitung als hellgelber Feststoff gewonnen werden (50 mg, 0.057 mmol, 93 %).

R_f (PE/EE: 1/3) = 0.15.

LC-MS *(25-100(2) ACN 5min)***:** t_r = 2.59 min (*m/z* (ESI-MS^+): 875 ($M+H^+$), 897 ($M+Na^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{44}H_{74}N_4O_8SSi_2Na^+$: 897.4664; gefunden (ESI-MS^+): 897.4664.

(*6S,9R,12S*)-1-(5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)-9-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-4,7,10-trioxo-1-thioxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-6-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-2,5,8,11-tetraazatridecansäuremethylester (**62**) durch Kupplung mit **59**



62

Die Reaktion wurde auf Grundlage der Kupplung von Primären Aminen an Thionobenzotriazole durchgeführt. [60]

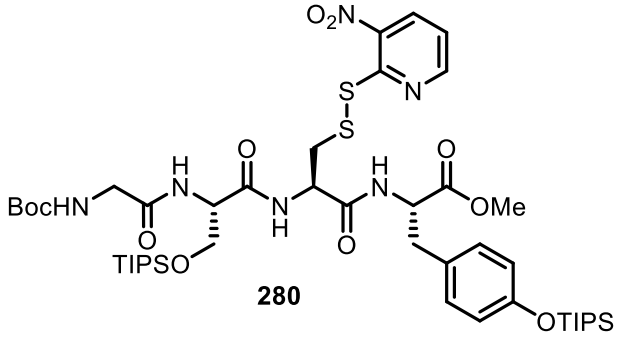
Unter Lichtausschluss wurde frisch hergestelltes Tetrapeptidamin **61** (44 mg, 0.050 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.6 mL) unter Ar-Atmosphäre bei RT gelöst und nacheinander trockenes DIPEA (0.02 mL; 0.09 mmol) und die frisch hergestellte Lösung aus **59** in CH_2Cl_2 (0.010M, 9 mL; 0.09 mmol) hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei RT für 65 h unter Lichtausschluss gerührt und im Anschluss durch Zugabe von H_2O beendet. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phae wurden mit ges. *aq.* NH_4Cl (3 x 5 mL) und ges. *aq.* NaCl (5 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch auf Silica mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (3/1-> 1/1) aufgereinigt. Dadurch konnte ein gelber öliger Feststoff (5 mg, 0.006 mmol, 7 %) gewonnen werden, der aufgrund von LC-MS das gewünschte Produkt enthielt.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.400 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1106 (M+H$^+$), 1128 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.92 (bs, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.92-7.85 (m, 2H), 7.59-7.37 (m, 4H), 7.21-7.18 (m, 2H), 6.97-6.93 (m, 3H), 6.81-6.74 (m, 5H), 4.75-4.41 (m, 3H), 4.28-4.08 (m, 2H), 3.77-3.57 (m, 9H), 3.04-3.00 (m, 2H), 2.84-2.65 (m, 2H), 1.76-1.54 (m, 6H), 1.25-1.17 (m, 6H), 1.07-0.99 (m, 40H) ppm.

Aufgrund der nicht eindeutigen Analyseergebnisse und des Fehlens von HR-MS-Daten ist davon auszugehen, dass **62** nicht erfolgreich oder bestenfalls in Spuren isoliert werden konnte.

(*9S,12R,15S*)-2,2-Dimethyl-12-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-4,7,10,13-tetraoxo-15-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-9-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecansäuremethylester (**280**)



280

Die Synthese wurde anhand der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.6 durchgeführt. Es wurden **12** (55 mg, 0.056 mmol) NPysCl (13 mg, 0.068 mmol) und trockenes CH_2Cl_2 (0.57 mL) verwendet. Die Reaktionsmischung wurde für 2.5 h bei 0 °C gerührt und danach das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie auf Silica unter Verwendung von PE/EE (3/1-> 1/1) als Laufmittelgemisch gereinigt. Dies lieferte **280** in Form eines gelben Feststoffes (47 mg, 0.047 mmol,83 %).

R_f (PE/EE: 1/1) = 0.25.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.343 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1009 (M+H$^+$), 1031 (M+Na$^+$)).

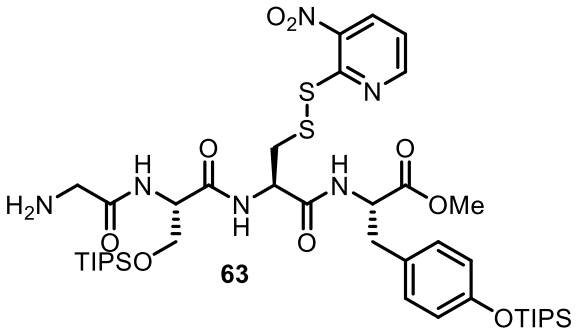
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.46 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H, CH(NPys)), 8.26 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH(NPys)), 7.90 (bs, 1H, NH), 7.51 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH), 7.20 (dd, *J* = 8.1, 4.6 Hz, 1H, CH(NPys)), 7.00-6.91 (m, 3H, Ar-H, NH), 6.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H),), 5.16 (brs, 1H, BocNH), 4.87-4.82 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.64-4.58 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.45-4.41 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.16-4.14 (m, 1H, CH(Peptid)), 3.88-3.80 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 3.73-3.70 (m, 4H, OMe, CH(Peptid)), 3.18-3.08 (m, 4H, CH_2(Cys) CH_2(Tyr)), 1.43-1.41 (m, 9H, CH_3(Boc)), 1.28-1.19 (m, 6H, CH(TIPS)), 1.09-1.01 (m, 36H, CH_3(TIPS)) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.7 (Cq), 169.7 (Cq), 169.7 (Cq), 169.1 (Cq), 169.0 (Cq), 157.4 (Cq(Carbonyl)), 155.4 (Cq(Ar)), 154.0 (CH(NPys), 142.7 (Cq(NPys)), 134.0 (CH(NPys)), 130.6 (CH(Ar)), 130.5 (Cq(Ar)), 121.2 (CH(NPys)), 120.3 (CH(Ar)), 80.7 (Cq(Boc)), 63.0 (CH_2(Peptid)), 54.8 (CH(Peptid)), 54.4 (CH(Peptid)), 53.0

(CH(Peptid)), 52.4 (CH_3(Peptid)), 44.7 (CH_2(Peptid)), 41.4 (CH_2(Peptid)), 36.9 (CH_2(Peptid)), 28.4 (CH_3(Boc)), 18.1 (CH_3(TIPS)), 18.0 (CH_3(TIPS)), 12.7 (CH(TIPS)), 11.9 (CH(TIPS)) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{46}H_{76}N_6O_{11}S_2Si_2Na^+$: 1031.4450; gefunden (ESI-MS^+): 1031.4415.

(*6S,9R,12S*)-6-(2-Aminoacetamido)-3,3-diisopropyl-2-methyl-9-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-7,10-dioxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-oxa-8,11-diaza-3-silatridecansäuremethylester (**63**)



63

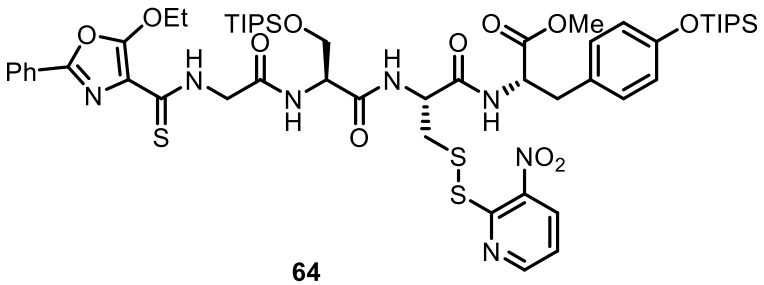
Die Reaktion wurde nach einer leicht abgewandelten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.2 durchgeführt. Es wurden **280** (47 mg, 0.047 mmol), TFA (0.08 mL, 0.9 mmol) und trockenes CH_2Cl_2 (0.47 mL) verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 6 h unter Erwärmung auf RT nach 1 h wurde **63** nach der beschriebenen Aufarbeitung als gelbes Öl erhalten (37 mg, 0.041 mmol, 88 %) und ohne weitere Reinigung und Analyse für den nächsten Schritt verwendet.

R_f (PE/EE: 1/3) = 0.1.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.047 min (*m/z* (ESI-MS^+): 909 ($M+H^+$), 931 ($M+Na^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{41}H_{69}N_6O_9S_2Si_2^+$: 909.4106; gefunden (ESI-MS^+): 909.4100.

(*6S,9R,12S*)-1-(5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)-9-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-4,7,10-trioxo-1-thioxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-6-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-2,5,8,11-tetraazatridecansäuremethylester (**64**)

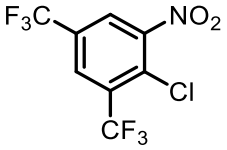


64

Die Reaktion wurde analog zur Synthese von **62** unter Verwendung von frisch hergestelltem NPys-Tetrapeptidamin **63** (37 mg, 0.041 mmol), trockenem CH_2Cl_2 (0.4 mL), trockenem DIPEA (0.01 mL, 0.07 mmmol) und der frisch hergestellten Lösung aus **59** in CH_2Cl_2 (0.014 M, 5 mL; 0.07 mmol). Nach einer Reaktionszeit von 96 h bei RT unter Lichtausschluss wurde der Ansatz verworfen, da durch die Reaktionskontrolle mittels LC-MS nur ein minimaler Umsatz zum gewünschten Produkt **64** festgestellt werden konnte.

5.2.6.2 *Synthese und Anwendung elektronenarmer PyBOP-Derivate*

2-Chlor-1-nitro-3,5-bis(trifluormethyl)benzol (**281**)



281

Die Synthese wurde in einer leicht angewandelten Version der Literaturvorschrift[84] durchgeführt.

1-Chlor-2,4-bis(trifluormethyl)benzol **76** (0.658 mL, 4.02 mmol) wurde auf 100 °C erhitzt und eine Mischung aus rauchender HNO_3 und konzentrierter H_2SO_4 (1:1, 5.2 mL) über 30 min langsam hinzugefügt. Im Anschluss wurde die Reaktion für 5 h bei derselben Temperatur gerührt, abgekühlt und auf Eis gegossen. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert (3 x 50 mL) und die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (2 x 10 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und bei vermindertem Druck

konzentriert. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel mit PE/EE (100/1) als Eluent gefiltert. Dies ergab **281** als hellgelbes Öl (968 mg, 3.30 mmol, 82 %).

R_f (PE/EE : 100/1) = 0.58.

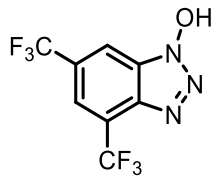
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.20 (s, 1H, Ar-H), 8.16 (s, 1H, Ar-H) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 132.6 (q, J = 33 Hz, $\underline{C}CF_3$), 130.8 (q, J = 35 Hz, $\underline{C}CF_3$), 129.8 (s, CCl), 127.5-127.3 (m, CH), 125.3 (q, J = 4.0 Hz, CH), 121.9 (q, J = 273 Hz, CF_3), 121.4 (q, J = 275 Hz, CF_3) ppm.

CNO_2 wurde aufgrund der Verdünnung der Probe nicht beobachtet.

Ein **HRMS** konnte nicht aufgenommen werden, da eine zu starke Fragmentierung auftrat.

4,6-Bis(trifluormethyl)-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-ol (**HODiFBt**)



HODiFBt

Die Synthese wurde in einer leicht angewandelten Version der Literaturvorschrift[83] zur Herstellung von HOBt-Derivaten durchgeführt.

Hydrazin-Monohydrat (0.25 mL, 5.1 mmol), wurde zu einer Lösung aus **281** (500 mg, 1.70 mmol) in absolutem EtOH (10.2 mL) bei RT gegeben und die Reaktion wurde für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Reaktionsmischung unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde in 10 % *aq.* Na_2CO_3 (50 mL) gelöst, mit Et_2O (3 x 10 mL) gewaschen und mit konz. *aq.* HCl angesäuert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser (3 x 5 mL) gewaschen. **HODiFBT** (351 mg, 1.30 mmol, 76 %) konnte nach Trocknen im Vakuum als farbloser Feststoff erhalten werden.

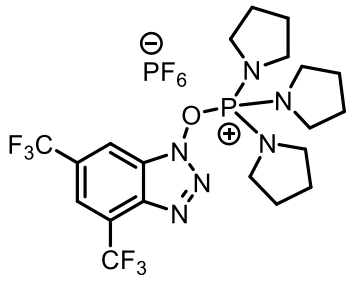
R_f (PE/EE : 100/1) = 0.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.60 (s, 1H, Ar-H), 8.06 (s, 1H, Ar-H) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, DMSO) δ = 139.6 (s, CN), 128.3 (s, CN), 127.1 (q, J = 33 Hz, $\underline{C}CF_3$), 123.2 (q, J = 273 Hz, CF_3), 122.5 (q, J = 273 Hz, CF_3), 120.6 (q, J = 35 Hz, $\underline{C}CF_3$), 119.0-118.8 (m, CH), 114.1 (q, J = 4.0 Hz, CH) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_8H_2N_3OF_6^-$: 270.0102; gefunden (ESI-MS$^-$): 270.0102.

((4,6-Bis(trifluormethyl)-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)tri(pyrrolidin-1-yl)phosphoniumhexafluorophosphat (**PyDiFOP**)



PyDiFOP

Die Synthese wurde nach der Literaturvorschrift[61] zur Herstellung von elektronenarmen PyBOP-Derivaten durchgeführt.

HODiFBT (65 mg, 0.24 mmol) und PyClOP (100 mg, 0.237 mmol) wurden in trockenem CH_2Cl_2 (0.31 ml) unter Ar-Atmosphäre bei RT suspendiert und NEt_3 (0.04 mL, 0.4 mmol) wurde hinzugefügt. Die Mischung wurde für 5.5 h weiter gerührt und das Rohprodukt wurde mit Et_2O (3 mL) ausgefällt. Nach Filtration wurde der Rückstand mit kaltem H_2O (3 x 1.5 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. PyDiFOP wurde als farbloser Feststoff (100 mg, 0.152 mmol, 64 %) in Mischung mit 15 % **HODiFBT** (Verhältnis der Integrale im ^{1}H-NMR) erhalten.

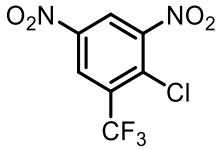
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$ (getrocknet)): δ = 8.15 (s, 1H, Ar-H), 8.04 (s, 1H, Ar-H), 3.47-3.43 (m, 12H, CH_2N), 2.03-2.00 (m, 12H, CH_2) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$ (getrocknet)) δ = 48.9 (d, J = 4.8 Hz, CH_2N), 26.3 (d, J = 9.3 Hz, CH_2) ppm.

Die aromatischen Kohlenstoffe wurden aufgrund der Verdünnung nicht beobachtet.

Aufgrund des Zerfalls bei Ionisierung, konnte kein **HRMS** aufgenommen werden.

2-Chlor-1,5-dinitro-3-(trifluormethyl)benzol **282**



282

Die Synthese wurde analog zur Herstellung von **281** unter Verwendung von 1-Chlor-2-(trifluormethyl)benzol **77** (0.725 mL, 5.54 mmol) und einer Mischung (1:1, 5.2 mL) aus rauchender HNO_3 und rauchender H_2SO_4 (20 %SO_3) bei einer Reaktionsdauer von 6 h

durchgeführt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatografie auf Kieselgel unter Verwendung von PE/EE (100/1->100/3->20/1) als Eluent gereinigt. Dies ergab **282** als hellgelben Feststoff (748 mg, 2.77 mmol, 50 %) in Mischung mit 8 % Mono-NO_2-Produkten (Verhältnis der Integrale im ^{1}H-NMR).

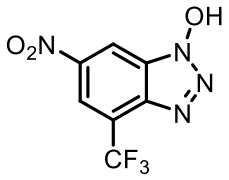
R_f (PE/EE : 100/1) = 0.13.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.79 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, Ar-H), 8.78 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, Ar-H) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 150.4 (s, CNO_2), 145.9 (s, CNO_2), 132.9 (q, *J* = 34 Hz, $\underline{C}CF_3$), 132.4 (s, CCl), 125.2 (q, *J* = 5.4 Hz, CH), 123.2 (s, CH), 121.0 (q, *J* = 275 Hz, CF_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_7H_2N_2O_4F_3Cl^+$: 269.9655; gefunden (EI-MS$^+$): 269.9652.

6-Nitro-4-(trifluormethyl)-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-ol (**HOFNBt**)



HOFNBt

Die Synthese wurde analog zur Herstellung von HODiFBt unter Verwendung von **282** (500 mg, 1.85 mmol), Hydrazin-Monohydrat (0.27 mL, 5.5 mmol) und absolutem EtOH (11.1 mL) bei einer Dauer von 23 h durchgeführt. Das Rohprodukt wurde nach Ansäuern aus der wässrigen Phase mit CH_2Cl_2 (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Dies lieferte HOFNBt als hellbraunen Feststoff (330 mg, 1.33 mmol, 72 %).

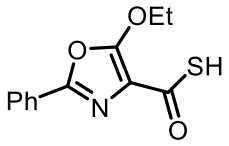
R_f (PE/EE: 100/1) = 0

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.99 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 8.46-8.45 (m, 1H, Ar-H) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, DMSO) δ = 145.4 (s, CNO_2), 140.2 (q, *J* = 1.3 Hz, CN), 128.2 (s, CN), 122.2 (q, *J* = 273 Hz, CF_3), 119.7 (q, *J* = 35 Hz, $\underline{C}CF_3$), 117.5 (q, *J* = 5.2 Hz, CH), 112.6 (s, CH) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_7H_2N_4O_3F_3^-$: 247.0079; gefunden (ESI-MS$^-$): 247.0079.

5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-thiocarbonsäure (**78**)



78

Die Synthese wurde in einer leicht angewandelten Version der Literaturvorschrift[82] zur Herstellung einer Imidazo-pyrimidinon-thiocarbonsäure durchgeführt.

Phenyl-Oxazol-Carbonsäure **51** (200 mg, 0.858 mmol) wurde in trockenem DMF (3.4 mL) unter Ar-Atmosphäre bei RT gelöst und CDI (209 mg, 1.29 mmol) hinzugefügt. Nach 4 h Rühren bei derselben Temperatur wurde die Mischung mit Na_2S (201 mg, 2.57 mmol) versetzt und die rotbraune Suspension für weitere 18 h gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion auf 0 °C gekühlt und mit 1 M *aq.* HCl (20 mL) versetzt. Der entstandene gelbe Niederschlag wurde abfiltriert, mit eiskaltem H_2O gewaschen und unter Vakuum getrocknet, um **78** als hellgelbes Pulver (175 mg, 0.702 mmol, 82 %) zu erhalten, das unter Ar im Gefrierfach gelagert wurde.

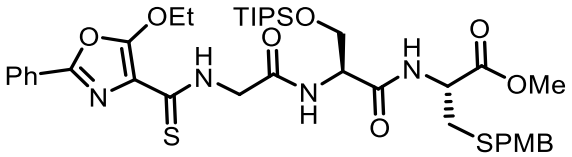
LC-MS(*DEFAULT_NEG.M*)**:** t_r = 1.010 min (*m/z* (ESI-MS$^-$): 248 (M-H$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, Aceton (getrocknet)): δ = 8.10 (bs, 2H, Ph-H), 7.70 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, Ph-H), 7.63 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, Ph-H), 4.57 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH_2), 1.34 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH_3) ppm.

Ein ^{13}C-NMR wurde aufgrund der geringen Löslichkeit und intensiver Zersetzung in Lösung nicht aufgenommen.

HRMS: berechnet m/z für $C_{12}H_{10}NO_3S^-$: 248.0381; gefunden (ESI-MS$^-$): 248.0382.

N-(*N*-((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbonothioyl)glycyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-seryl)-*S*-(4-methoxybenzyl)-*L*-methylcysteinat (**79**) unter Verwendung von PyBOP



79

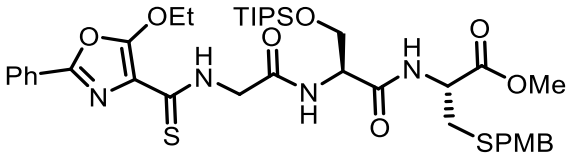
Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.9 unter Verwendung von **53** (47 mg, 0.085 mmol), DIPEA (0.07 mL, 0.3 mmol), PyBOP (44 mg, 0.085 mmol) und **78** (21 mg, 0.085 mmol) bei einer Dauer von 5 d. Nach chromatographischer Reinigung

konnte ein gelbes Öl (4 mg, 6 %) erhalten werden, das LC-MS- und ^{1}H-NMR-Analyse zufolge aus dem Produkt **79**, dem Amid und anderen Verunreinigungen bestehen könnte.

R_f (2 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.17.

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurden keine weiteren analytischen-Daten aufgenommen.

N-(*N*-((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbonothioyl)glycyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-seryl)-*S*-(4-methoxybenzyl)-*L*-methylcysteinat (**79**) unter Verwendung von PyNOP



79

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.9 unter Verwendung von **53** (34 mg, 0.061 mmol), DIPEA (0.04 mL, 0.2 mmol), PyNOP (35 mg, 0.061 mmol) und **78** (16 mg, 0.061 mmol) bei einer Dauer von 6 d. Chromatographische Reinigung ergab einen gelb-braunen öligen Feststoff (8 mg, 0.01 mmol, 17 %), der LC-MS-Analyse zufolge das Produkt **79** neben dem Oxo-Amid enthielt.

R_f (2 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.17.

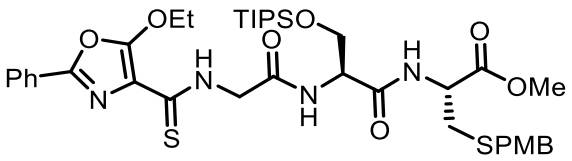
LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.158 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 809 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.94 (s, 1H, NH), 8.37 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H, NH), 7.89-7.82 (m, 1H, ArH), 7.58-7.39 (m, 2H, ArH), 7.29 (brs, 1H, NH), 7.21-7.17 (m, 2H, PMB-H), 6.85-6.82 (m, 2H, PMB-H), 6.76 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, NH), 4.80-4.75 (m, 1H, CH (Peptid)), 4.49-4.44 (m, 1H, CH (Peptid)), 4.13-4.08 (m, 3H, CH (Peptid), $OC\underline{H}_2CH_3$), 3.79-3.70 (m, 7H, OCH_3, CH (Peptid)), 3.64 (s, 2H, CH_2 (PMB)), 3.27-3.25 (m, 1H, CH (Peptid)), 2.91-2.77 (m, 2H, CH_2(Cys)), 1.31-1.24 (m, 3H), 1.20-1.12 (m, 3H, CH(TIPS)), 1.09-1.02 (m, 19H, CH_3(TIPS)) ppm.

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

Das Produkt konnte nicht mittels **HRMS** nachgewiesen werden.

N-(*N*-((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbonothioyl)glycyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-seryl)-*S*-(4-methoxybenzyl)-*L*-methylcysteinat (**79**) unter Verwendung von PyFOP



79

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.9 unter Verwendung von **53** (67 mg, 0.12 mmol), DIPEA (0.08 mL, 0.5 mmol), PyFOP (71 mg, 0.12 mmol) und **78** (30 mg, 0.12 mmol) bei einer Dauer von 6 d. Chromatographische Reinigung ergab einen braunen öligen Feststoff (19 mg, 0.024 mmol, 20 %), der LC-MS-Analyse zufolge das Produkt **79** neben dem Oxo-Amid enthielt.

R_f (2 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.17.

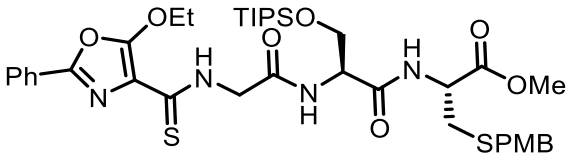
LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.179 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 809 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.28 (s, 1H, NH), 7.95 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 7.67 (dd, *J* = 8.8, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.56-7.39 (m, 3H, ArH), 7.20-7.16 (m, 2H, PMB-H), 6.94 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, NH), 6.83-6.80 (m, 2H, PMB-H), 4.81-4.76 (m, 1H, CH (Peptid)), 4.54-4.49 (m, 1H, CH (Peptid)), 4.13-4.09 (m, 3H, CH (Peptid), $OC\underline{H}_2CH_3$), 3.78-3.71 (m, 7H, OCH_3, CH (Peptid)), 3.64 (s, 2H, CH_2 (PMB)), 2.93-2.77 (m, 2H, CH_2(Cys)), 1.31-1.25 (m, 3H), 1.17-1.12 (m, 3H, CH(TIPS)), 1.07-1.01 (m, 21H, CH_3(TIPS)) ppm.

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

Das Produkt konnte nicht mittels **HRMS** nachgewiesen werden.

N-(*N*-((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbonothioyl)glycyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-seryl)-*S*-(4-methoxybenzyl)-*L*-methylcysteinat (**79**) unter Verwendung von PyDiFOP



79

Die Synthese erfolgte nach einer leicht veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.9 unter Verwendung von **53** (34 mg, 0.061 mmol), PyDiFOP (61 mg, 0.09 mmol) und DIPEA (0.03 mL, 0.2 mmol), das als Lösung mit **78** (16 mg, 0.061 mmol) hinzugefügt wurde. Die Reaktionsdauer betrug 2 d. Chromatographische Reinigung

ergab einen gelb-braunen Feststoff (23 mg, 0.029 mmol, 48 %), der LC-MS-Analyse zufolge das Produkt **79** neben dem Oxo-Amid enthielt.

R_f (2 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.17.

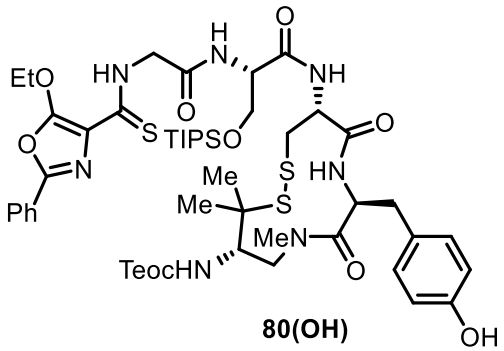
LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M*)**:** t_r = 1.179 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 809 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.56 (s, 1H, NH), 7.99 (s, 1H, NH), 7.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.41-7.37 (m, 1H, ArH), 7.21-7.18 (m, 2H, PMB-H), 6.85-6.81 (m, 3H, NH, PMB-H), 4.80-4.74 (m, 1H, CH (Peptid)), 4.51-4.46 (m, 1H, CH (Peptid)), 4.11-4.07 (m, 3H, CH (Peptid), OCH_2CH_3), 3.80-3.70 (m, 7H, OCH_3, CH (Peptid)), 3.64 (s, 2H, CH_2 (PMB)), 2.90-2.76 (m, 2H, CH_2(Cys)), 1.31-1.25 (m, 2H), 1.20-1.11 (m, 3H, CH(TIPS)), 1.09-1.02 (m, 19H, CH_3(TIPS)) ppm.

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

Das Produkt konnte nicht mittels **HRMS** nachgewiesen werden.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,8S,11R*)-11-((*S*)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-8-(4-hydroxybenzyl)-3,3,6-trimethyl-7,10-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)carbamat (**80(OH)**) unter Verwendung von PyDiFOP



80(OH)

Die Synthese erfolgte nach einer abgewandelten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.9. Pentamerdisulfid-amin **42(OH)** (7 mg, 0.008 mmol) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (0.16 mL) unter Ar-Atmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. PyDiFOP (11 mg, 0.016 mmol) wurde hinzugefügt und nach 5 min Rühren wurde eine Lösung aus **78** (2 mg, 0.008 mmol) und DIPEA (0.01 mL, 0.04 mmol) in trockenem $CHCl_3$ (0.16 mL) zugetropft. Die Reaktion wurde über Nacht langsam auf RT gebracht. Nach 24 h wurde die Mischung mit CH_2Cl_2 (1 mL) verdünnt, filtriert und mittels Säulenchromatographie auf Silica (Laufmittelgemisch: MeOH in CH_2Cl_2 (0 %-> 1 % -> 2 % -> 5 %)) gereinigt.

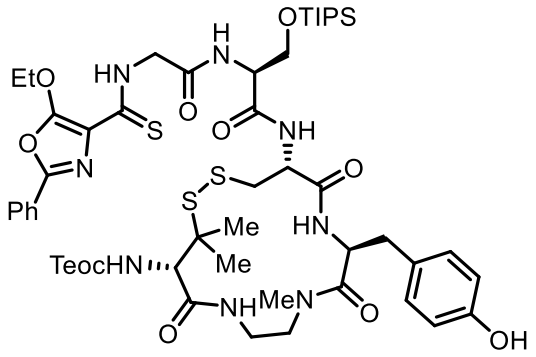
Dadurch konnten 7 mg eines gelben Feststoffes gewonnen werden, der das Thioamid **80(OH)** laut LC-MS Analyse neben anderen unbekannten Verunreinigungen enthielt.

LC-MS (*25-100(2) ACN 5min*)**:** t_r = 2.84 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1088 (M+H$^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{50}H_{77}N_7O_{10}S_3Si_2Na^+$: 1110.4330; gefunden (ESI-MS$^+$): 1110.4327.

Aufgrund der Verunreinigungen wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,11S,14R*)-14-((*S*)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-11-(4-hydroxybenzyl)-3,3,9-trimethyl-5,10,13-trioxo-1,2-dithia-6,9,12-triazacyclopentadecan-4-yl)carbamat (**81(OH)**) unter Verwendung von PyDiFOP



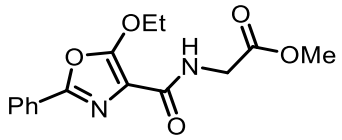
81(OH)

Die Synthese erfolgte nach einer abgewandelten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.9**.** Es wurde **48(OH)** (11 mg, 0.012 mmol), PyDiFOP (16 mg, 0.024 mmol), DIPEA (0.01 mL, 0.06 mmol), das als Lösung mit **78** (16 mg, 0.061 mmol) hinzugefügt wurde, und trockenes CH_2Cl_2 (0.24 mL) verwendet. Die Reaktionsdauer betrug 21.5 h. Es wurde keine chromatographische Reinigung durchgeführt, da das Thioamid **81(OH)** nach der Aufarbeitung nicht mehr mittels LC-MS Analyse nachgewiesen werden konnte.

LC-MS (*25-100(2) ACN 5min)***:** t_r = 2.72 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1145 (M+H$^+$), 1167 (M+Na$^+$)).

5.2.7 Synthese des Thioamids Ph-Oxa(OEt)-CSNH-Gly-OMe 85 und Alkylierung zu verschiedenen Thioimidaten

(5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbonyl)-methylglycinat (**99**)



99

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.4 unter Verwendung von Ph-Oxa-OH **51** (190 mg, 0.815 mmol), Oxyma (139 mg, 0.978 mmol), EDC-HCl (172 mg, 0.896 mmol), $NaHCO_3$ (343 mg, 4.07 mmol), Glycinmethylester Hydrochlorid (103 mg, 0.815 mmol), trockenem CH_2Cl_2 (4.0 mL) und trockenem DMF (4.0 mL) bei einer Reaktionsdauer von 72 h. Die Aufreinigung erfolgte mithilfe von CH_2Cl_2/MeOH (100/0-> 50/1) und ergab **99** als gelbes viskoses Öl (170 mg, 0.559 mmol, 69 %).

R_f (CH_2Cl_2/MeOH (50/1)) = 0.36.

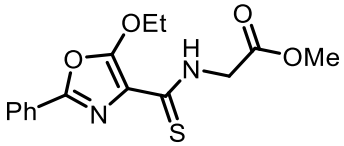
LC-MS (*UPLC-MS-kurz*): *tr* = 1.11 min (*m/z* (ESI-MS^+): 327 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.94-7.92 (m, 2H, CH(Ar)), 7.46-7.43 (m, 3H, CH(Ar)), 7.29 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, NH), 4.64 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.22 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, $NHC\underline{H}_2$), 3.79 (s, 3H, OMe), 1.51 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.6 (Cq), 161.4 (Cq), 159.3 (Cq), 150.6 (Cq), 130.5 (CH), 128.9 (CH), 126.7 (Cq), 125.9 (CH), 110.6 (Cq), 70.8 (CH_2), 52.5 (CH_3), 40.9 (CH_2), 15.2 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{15}H_{16}N_2O_5Na^+$: 327.0957; gefunden (ESI-MS^+): 327.0949.

(5-Ethoxy-2-phenyloxazole-4-carbonothioyl)-methylglycinat (**85**)



85

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.8 durchgeführt. Es wurden **99** (662 mg, 2.18 mmol), trockenes CH_2Cl_2 (14.5 mL) und LR (880 mg, 2.18 mmol) bei einer Temperatur von 42 °C und einer Reaktionszeit von 16.5 h verwendet. Nach Abkühlen wurde eine zweite Portion LR (1.06 g, 2.61 mmol) zur Reaktionsmischung

hinzugefügt und diese für weitere 43 h auf 40 °C erhitzt. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 60 h wurde die allgemeine Aufarbeitung angewandt und das Rohprodukt säulenchromatographisch auf Silica (Eluent: PE/EE (10/1-> 7/1-> 5/1)) gereinigt, um das Thioamid **85** als hellgelben Feststoff (359 mg, 1.12 mmol, 52 %) zu erhalten.

R_f (PE/EE: 3/1) = 0.26.

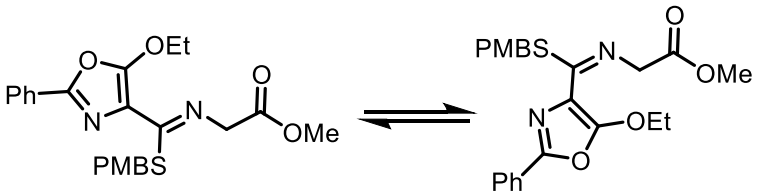
LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 0.986 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 343 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.01 (bs, 1H, NH), 7.97-7.94 (m, 2H, Ar-H), 7.47-7.44 (m, 3H, Ar-H), 4.63 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OC<u>H</u>$_2$-CH$_3$), 4.58 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, NHC<u>H</u>$_2$-), 3.83 (s, 3H, OMe), 1.57 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, OCH$_2$-C<u>H</u>$_3$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 185.1 (Cq(Thioamid)), 169.7 (Cq(Ester)), 160.0 (Cq(Oxa)), 149.6 (Cq(Oxa)), 130.7 (Cq(Ph)), 129.0 (CH(Ph)), 126.5 (CH(Ph)), 126.1 (CH(Ph)), 116.3 (Cq(Oxa)), 70.5 (CH_2), 52.7 (CH_3), 45.8 (CH_2), 15.3 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{15}H_{16}N_2O_4SNa^+$: 343.0728; gefunden (ESI-MS$^+$): 343.0727.

(*Z*)-2-(((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)((4-methoxybenzyl)thio)methylen)amino)-methylacetat (*cis*-**100**) und (*E*)-2-(((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)((4-methoxybenzyl)thio)methylen)amino)-methylacetat (*trans*-**100**)



***cis*-100** ***trans*-100**

Die Reaktion wurde in Anlehnung an die Benzylierung eines zyklischen Thioamids durchgeführt. [93]

Das Thioamid **85** (25 mg, 0.078 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre bei RT in trockenem MeCN (0.78 mL) gelöst. Zu der Lösung wurden nacheinander PMBCl (22 µL, 0.16 mmol), wasserfreies KI (1 mg, 0.008 mmol) und wasserfreies K_2CO_3 (22 mg, 0.16 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 1 h auf 50 °C erhitzt. Danach wurde sie mit CH_2Cl_2 (5 mL) verdünnt, auf Kieselgur immobilisiert und anschließend chromatographisch auf Silica mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (10/1-> 8/1-> 3/1) gereinigt. Dadurch konnte ein gelbes Öl (5 mg, 0.01 mmol, 15 %) erhalten werden, das

nach NMR-Analyse aus einer 1:1 Mischung von *cis/trans* Isomeren von **100** und nicht näher bestimmbaren Verunreinigungen bestand.

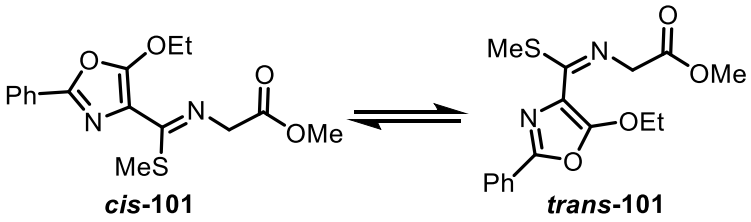
R_f (PE/EE (3/1)) = 0.42.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.296 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 441 (M+H$^+$)), 463 (M+Na$^+$).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.00-7.88 (m, 4H, CH(Ph)), 7.45-7.35 (m, 6H, CH(Ph)), 7.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH(PMB)), 7.16 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH(PMB)), 7.10 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH(PMB)), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH(PMB)), 6.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, CH(PMB)), 4.67-4.56 (m, 2H, CH_2(Gly)), 4.44-4.40 (m, 4H, CH_2(PMB), $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.34-4.21 (m, 5H, CH_2(PMB), $OC\underline{H}_2CH_3$, CH(Gly)), 4.14-4.08 (m, 1H, CH(Gly)), 3.79-3.75 (m, 12H, OMe), 1.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.39 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

Aufgrund der Verunreinigungen wurde keine weitere Analytik durchgeführt und das Produkt verworfen.

(*Z*)-2-(((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)(methylthio)methylen)amino)methylacetat (*cis*-**101**) und (*E*)-2-(((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)(methylthio)methylen)amino)-methylacetat (*trans*-**101**)



***cis*-101** ***trans*-101**

Methyliodid (0.084 mL, 1.3 mmol) und wasserfreies K_2CO_3 (277 mg, 2.00 mmol) wurden nacheinander unter Ar-Atmosphäre bei RT zu einer Lösung aus dem Thioamid **85** (214 mg, 0.668 mmol) in trockenem MeCN (6.7 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für 22 h bei 35 °C gerührt, über Kieselgur filtriert (mit MeCN eluiert), auf Kieselgur immobilisiert und chromatographisch auf Silica mit dem Laufmittelgemisch 1 % NEt_3 in PE/EE (8/1-> 6/1) gereinigt. Somit konnte das Me-Thioimidat **101** als gelbes Öl gewonnen werden (158 mg, 0.473 mmol, 71 %). NMR-Analysen zufolge bestand das isolierte Produkt aus einer 3:2 Mischung von *cis/trans* Isomeren von **101**.

R_f (1 % NEt_3 in PE/EE (1/1)) = 0.56.

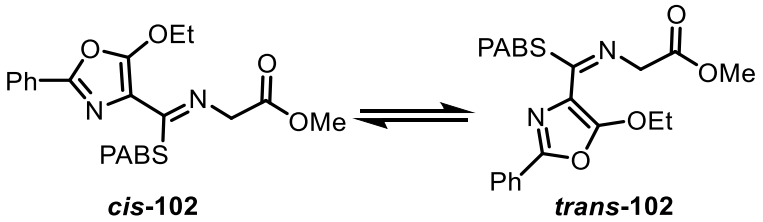
LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.059 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 335 (M+H$^+$), 357 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.96-7.89 (m, 2.0H, CH(Ph)), 7.45-7.41 (m, 3.0H, CH(Ph)), 4.52-4.47 (m, 2.0H, $OC\underline{H}_2CH_3$, CH_2(Gly)), 4.47-4.41 (m, 2.0H, $OC\underline{H}_2CH_3$, CH_2(Gly)), 3.78 (s, 1.2H, OMe), 3.75 (s, 1.8H, OMe), 2.51 (s, 1.2H, SMe), 2.48 (s, 1.8H,SMe), 1.48 (t, *J* = 7.1 Hz, 3.0H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.7 (Cq(Carbonyl)), 170.6 (Cq(Carbonyl)), 160.9 (Cq(Oxa)), 159.8 (Cq(Oxa)), 156.9 (Cq(Carbonyl)), 155.7 (Cq(Carbonyl)), 151.9 (Cq(Oxa)), 151.3 (Cq(Oxa)), 130.4 (CH(Ar)), 130.2 (CH(Ar)), 128.8 (CH(Ar)), 128.8 (CH(Ar)), 127.1 (Cq(Ar)), 126.8 (Cq(Ar)), 125.8 (CH(Ar)), 114.6 (Cq(Oxa)), 111.7 (Cq(Oxa)), 70.6 ($OC\underline{H}_2CH_3$), 70.4 ($OC\underline{H}_2CH_3$), 55.5 (CH_2(Gly)), 55.1 (CH_2(Gly)), 52.2 (OCH_3), 51.9 (OCH_3), 16.1 (SCH_3), 15.1 (SCH_3), 15.1 ($OCH_2C\underline{H}_3$), 13.4 ($OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{16}H_{18}N_2O_4SNa^+$: 357.0885; gefunden (ESI-MS$^+$): 357.0886.

(*Z*)-2-((((4-Azidobenzyl)thio)(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)methylen)amino)methylacetat (*cis*-**102**) und (*E*)-2-((((4-Azidobenzyl)thio)(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)methylen)amino)methylacetat (*trans*-**102**)



***cis*-102** ***trans*-102**

Die Synthese wurde analog zur Herstellung des Me-Thioimidats **101** durchgeführt.

Dabei wurden **85** (50 mg, 0.16 mmol), PABBr (50 mg, 0.23 mmol), K_2CO_3 (65 mg, 0.47 mmol) und zusätzlich KI (2.6 mg, 0.016 mmol) in trockenem MeCN (1.6 mL) verwendet. Die Reaktion wurde bei 35 °C für 21 h gerührt. Die Reinigung erfolgte durch Chromatographie auf Kieselgel mit dem Laufmittelgemisch 1 % NEt_3 in PE/EE (10/1-> 6/1 und ergab **102** als gelbes Öl (40 mg, 0.089 mmol, 57 %). NMR-Analysen zufolge bestand das isolierte Produkt aus einer 1.2:1 Mischung von *cis/trans* Isomeren von **102**.

R_f (1 % NEt_3 PE/EE (1/1)) = 0.72.

LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.427 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 452 (M+H$^+$), 474 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.99-7.96 (m, 0.9H, CH(Ph)), 7.91-7.89 (m, 1.1H, CH(Ph)), 7.46-7.42 (m, 4.2H, CH(Ph), CH(PAB)), 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 0.8H, CH(PAB)), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1.2H, CH(PAB)), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 0.8H, CH(PAB)), 4.55 (s, 1.1H,

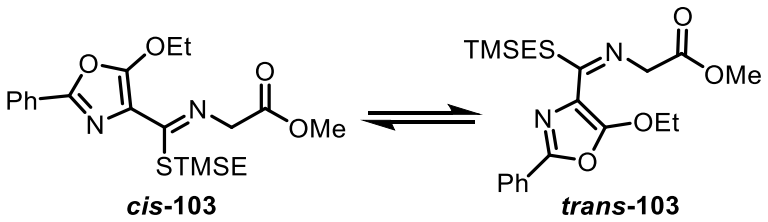
CH_2(PAB)), 4.45 (s, 0.7H, CH_2(PAB)), 4.41 (q, J = 7.1 Hz, 1.1H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.34-4.28 (m, 2.4H, $OC\underline{H}_2CH_3$, CH_2(Gly)), 3.77 (s, 1.6H, OMe), 3.76 (s, 1.1H, OMe), 1.46 (t, J = 7.1 Hz, 1.8H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.40 (t, J = 7.1 Hz, 1.2H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

$^{13}C\{^1H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 138.7 (Cq), 135.2 (Cq), 134.3 (Cq), 131.0 (CH), 130.5 (CH), 130.3 (CH), 130.3 (CH), 129.0 (CH), 128.9 (CH), 127.0 (Cq), 126.8 (Cq), 126.1(CH), 125.9 (CH), 119.3 (CH), 119.1 (CH), 70.6 (CH_2), 70.5 (CH_2), 55.5 (CH_2), 55.3 (CH_2), 52.3 (CH_3), 52.0 (CH_3), 36.8 (CH_2), 33.8 (CH_2), 15.1 (CH_3) ppm.

Aufgrund der großen Verdünnung wurden mehrere Cq nicht beobachtet.

HRMS: berechnet m/z für $C_{22}H_{21}N_5O_4SNa^+$: 474.1212; gefunden (ESI-MS^+): 474.1205.

(*Z*)-2-(((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)((2-(trimethylsilyl)ethyl)thio)methylen)amino)-methylacetat (*cis*-**103**) und (*E*)-2-(((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)((2-(trimethylsilyl)ethyl)thio)methylen)amino)methylacetat (*trans*-**103**)



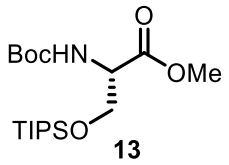
***cis*-103** ***trans*-103**

Die Reaktion wurde analog zur Herstellung des PAB-Thioimidats **102** unter Verwendung von **85** (50 mg, 0.16 mmol), TMSEBr (57 mg, 0.31 mmol), K_2CO_3 (65 mg, 0.47 mmol) und KI (2.6 mg, 0.016 mmol) in trockenem MeCN (1.6 mL) bei 70 °C für 21 h durchgeführt. Da nach dieser Zeit das Thioimidat **103** nur in sehr geringen Mengen mittels LC-MS nachgewiesen werden konnte, wurde die Reaktionsmischung mit EtOAc und ges. *aq.* Na_2CO_3 verdünnt und die organische Phase mit ges. *aq.* NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Dadurch konnte nicht reagiertes **85** (43 mg) wiedergewonnen werden.

LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.490 min (*m/z* (ESI-MS^+): 421 ($M+H^+$), 443 ($M+Na^+$)).

5.2.8 Synthese des Tripeptids 106

N-(*Tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-methylserinat (**13**)



13

Boc-Ser-OMe (1.01 g, 4.58 mmol) und TIPSCl (1.3 mL, 6.0 mmol) wurden in trockenem CH_2Cl_2 (5.4 mL) unter Ar Atmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde portionsweise ImH (661 mg, 9.71 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 25 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M *aq.* HCl auf 5 gestellt und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3x10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration und Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde **13** zusammen mit nicht identifizierten Silyl-Verbindungen als farbloses Öl (1.82 g, 4.84 mmol, quant.) erhalten, das für den nächsten Schritt ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

R_f (PE/EE: 2/1) = 0.70.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** *tr* = 1.267 min (*m/z* (ESI-MS^+): 398 ($M+Na^+$)).

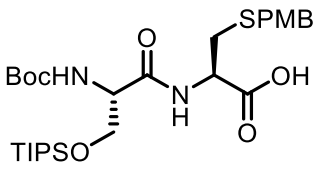
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.39 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, BocNH), 4.37 (dt, *J* = 8.5, 2.6 Hz, 1H, NCH), 4.14 (dd, *J* = 9.8, 2.5 Hz, 1H, OCH), 3.93 (dd, *J* = 9.8, 2.9 Hz, 1H, OCH), 3.74 (s, 3H, OMe), 1.45 (s, 9H, CH_3(Boc)), 1.10-1.01 (m, 21H, CH/CH_3(TIPS)) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.1 (Cq), 154.6 (Cq), 77.4 (Cq), 64.4 (CH_2),56.4 (CH), 52.4 (CH_3), 17.9 (CH_3), 12.4 (CH), 12.2 (CH_3), 12.0 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{18}H_{37}NO_5SiNa^+$: 398.2339; gefunden (ESI-MS^+): 398.2335.

Opt. Rot. α = 0.244° (*c* = 1, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 24.4$ °.

N-(*N*-(*Tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-seryl)-*S*-(4-methoxybenzyl)-*L*-cystein (**283**)

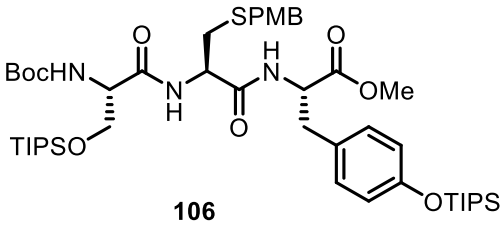


283

Die Herstellung wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.1 durchgeführt. Dazu wurden Dipeptid **105** (2.45 g, 4.09 mmol), 1 M *aq.* LiOH (9.0 mL, 9.10 mmol) und THF (41 mL) bei einer Reaktionszeit von 3.5 h verwendet. Nach der Aufarbeitung wurde **283** als farbloses viskoses Öl (2.58 g, 4.09 mmol, quant.) isoliert und direkt für den nächsten Schritt eingesetzt.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** *tr* = 1.133 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 585 (M+H$^+$), 607 (M+Na$^+$)).

(*6S,9R,12S*)-6-((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)-3,3-diisopropyl-9-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-2-methyl-7,10-dioxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-oxa-8,11-diaza-3-silatridecansäuremethylester (**106**)



106

Die Synthese erfolgte nach einer leicht veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung von Dipeptidcarbonsäure **283** (2.40 g, 4.10 mmol), DIPEA (2.1 mL, 12 mmol), HATU (2.03 g, 5.34 mmol), Amin **35** (1.88 g, 5.34 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2/DMF (22.0 mL/2.0 mL)) und trockenem CH_2Cl_2 (22.0 mL) bei einer Dauer von 17 h. Die Aufreinigung erfolgte mit PE/EE (5/1 -> 3/1) und ergab **106** in Form eines leicht gelben Schaums (2.93g, 3.19 mmol, 78 %).

R_f (PE/EE: 2/1) = 0.37.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.885 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 940 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.33 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, NH), 7.24-7.22 (m, 2H, Ar-H), 6.96-6.94 (m, 3H, Ar-H, NH), 6.83-6.77 (m, 4H, Ar-H), 5.34 (bs, 1H, BocNH), 4.73-4.69

(m, 1H, CH(Peptid)), 4.47-4.41 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.18 (bs, 1H, CH(Peptid)), 4.15-4.10 (m, 1H, CH(Peptid)), 3.79-3.76 (m, 4H, OMe, CH(Peptid)), 3.67-3.63 (m, 5H, CH_2(PMB), OMe), 3.01 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH_2(Tyr)), 2.85 (dd, *J* = 13.3, 4.0 Hz, 1H, CH(Cys)), 2.62 (dd, *J* = 14.0, 7.8 Hz, 1H, CH(Cys)), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.27-1.19 (m, 6H, CH(TIPS)), 1.08-1.02 (m, 36H, CH_3(TIPS)) ppm.

$^{13}C\{^1H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.6 (Cq(Carbonyl)), 170.6 (Cq(Carbonyl)), 169.8 (Cq(Carbonyl)), 158.9 (Cq(Ar)), 157.0 (Cq(Carbonyl)), 155.3 (Cq(Ar)), 130.3 (CH(Ar)), 130.2 (CH(Ar)), 130.0 (Cq(Ar)), 128.3 (Cq(Ar)), 120.2 (CH(Ar)), 114.1 (CH(Ar)), 80.5 (Cq(Boc)), 63.5 (CH_2(Peptid)), 56.3 (CH(Peptid)), 55.4 (CH_3(Peptid)), 54.1 (CH(Peptid)), 52.6 (CH(Peptid)), 52.3 (CH_3(Peptid)), 37.2 (CH_2(Peptid)), 35.9 (CH_2(Peptid)), 33.3 (CH_2(Peptid)), 28.4 (CH_3(Boc)), 18.1 (CH_3(TIPS)), 18.0 (CH_3(TIPS)), 12.8 (CH(TIPS)), 11.9 (CH(TIPS)) ppm.

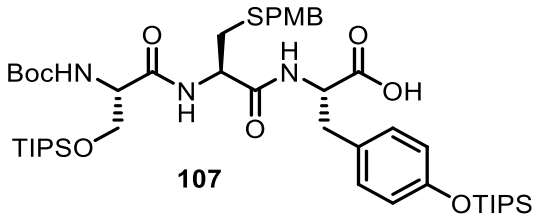
HRMS: berechnet m/z für $C_{45}H_{79}N_3O_9SSi_2Na^+$: 940.4973; gefunden (ESI-MS^+):940.4956.

Opt. Rot. α = 2.970° (*c* = 0.7, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 424.3$ °.

5.2.9 Verknüpfung der modifizierten Penicillamine mit dem Tripeptid 106

*5.2.9.1 Kupplung mit **36** und weitere Funktionalisierungen*

(*6S,9R,12S*)-6-((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)-3,3-diisopropyl-9-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-2-methyl-7,10-dioxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-oxa-8,11-diaza-3-silatridecansäure (**107**)

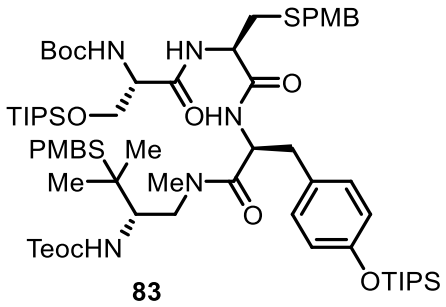


107

Die Herstellung wurde leicht verändert nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.1 durchgeführt. Dazu wurden Tripeptid **106** (730 mg, 0.795 mmol), 1 M *aq.* LiOH (1.0 mL, 1.0 mmol) und THF (8.0 mL) bei einer Temperatur von 0 °C unter Erwärmen auf RT und einer Reaktionszeit von 100 min verwendet. Nach der Aufarbeitung wurde **107** als farbloser Schaum (660 mg, 0.730 mmol, 92 %) isoliert und direkt für den nächsten Schritt eingesetzt.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)*: t_r = 1.350 min (*m/z* (ESI-MS^+): 904 ($M+H^+$), 926 ($M+Na^+$)).

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((4S,8S,11R,14S)-17,17-diisopropyl-11-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3,3,6,18-tetramethyl-7,10,13-trioxo-8-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-16-oxa-2-thia-6,9,12-triaza-17-silanonadecan-4,14-diyl)dicarbamat (**83**)



83

Die Synthese erfolgte nach einer leicht veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung von Tripeptidcarbonsäure **107** (340 mg, 0.376 mmol), DIPEA (0.20 mL, 1.1 mmol), HATU (186 mg, 0.489 mmol), CH_2-Pen**-**Amin **36** (174 mg, 0.421 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2 (3.0 mL)) und trockenem CH_2Cl_2 (2.7 mL) bei einer Dauer von 23 h. Die Aufreinigung erfolgte mit PE/EE (5/1 -> 3/1 -> 2/1) und ergab **83** in Form eines farblosen Feststoffes (321 mg, 0.247 mmol, 66 %).

R_f (PE/EE (2/1)) = 0.60.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.712 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1298 ($M+H^+$), 1320 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.33 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, NH(Amid)), 7.27-7.21 (m, 4H, CH(Ar)), 7.15 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, NH(Amid)), 6.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH(Ar)), 6.85-6.81 (m, 4H, CH(Ar)), 6.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH(Ar)), 5.37 (bs, 1H, NH(Carbamat)), 5.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NH(Carbamat)), 4.96-4.91 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.48-4.38 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.21-4.11 (m, 3H, CH_2(Peptid), CH(Peptid)), 4.00-3.91 (m, 3H, CH_2(Peptid), CH(Peptid)), 3.81-3.66 (m, 11H, OMe, CH_2(PMB), CH(Pen)), 3.11 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, CH(Pen)), 2.92-2.72 (m, 3H, CH_2(Tyr), CH(Cys)), 2.63-2.58 (m, 1H, CH(Cys)), 2.45 (s, 3H, NMe), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.41 (s, 3H, Me(Pen)), 1.27-1.19 (m, 7H, Me(Pen), CH(TIPS)), 1.08-1.03 (m, 36H, CH(TIPS), CH_3(TIPS)), 0.91 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, C$\underline{H_2}$TMS), -0.01 (s, 9H, TMS) ppm.

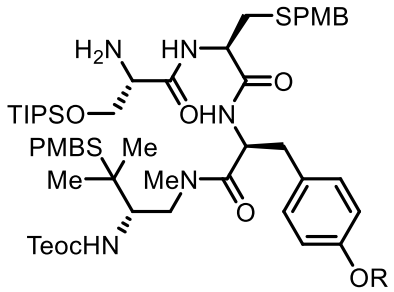
^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 172.1 (Cq), 170.6 (Cq), 169.2 (Cq), 158.8 (Cq), 158.8 (Cq), 157.5 (Cq), 157.4(Cq), 155.3 (Cq), 130.5 (CH), 130.2 (CH), 130.2 (CH), 130.1 (Cq), 128.7 (Cq), 120.1 (CH), 114.2 (CH), 114.1 (CH), 63.5 (CH_2), 63.3 (CH_2),

56.2 (CH), 55.4 (CH_3), 55.3 (CH_3), 53.2 (CH), 52.6 (CH), 51.2 (CH), 49.0 (CH_2), 47.8 (CH_2), 39.1 (Cq), 35.9 (CH_2), 35.2 (CH_3), 33.4 (CH_2), 32.7 (CH_2), 28.5 (CH_3), 27.1 (CH_3), 24.8 (CH_3), 18.1 (CH), 18.1 (CH), 18.0 (CH), 12.8 (CH_3), 11.9 (CH_3), -1.4 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{66}H_{111}N_5O_{11}S_2Si_3Na^+$: 1320.6927; gefunden (ESI-MS^+): 1320.6919.

Opt. Rot. α = 0.179° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 17.9$ °

2-Trimethylsilylethyl((*4S,8S,11R,14S*)-14-amino-8-(4-hydroxybenzyl)-17,17-diisopropyl-11-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3,3,6,18-tetramethyl-7,10,13-trioxo-16-oxa-2-thia-6,9,12-triaza-17-silanonadecan-4-yl)carbamat (**108**)

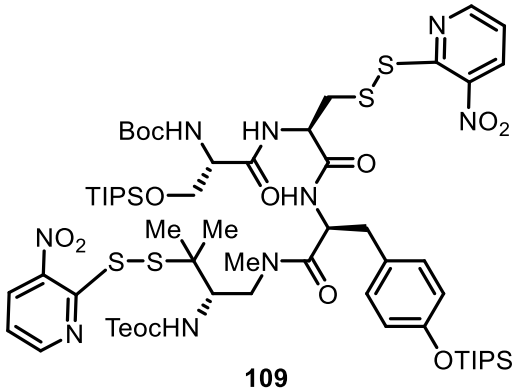


R=TIPS: **108(OTIPS)**
R=H: **108(OH)**

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.3. Dafür wurden **83** (140 mg, 0.108 mmol), *p*TSA (38 mg, 0.22 mmol) und trockenes EtOH (2.2 mL) bei einer Reaktionszeit von 4 h verwendet. Nach der beschriebenen Aufarbeitung konnte nach LC-MS Analyse eine 4.5:2.7:1 Mischung aus **108(OTIPS)**/**108(OH)/**nicht Boc-entschütztem **83(OH)** in Form eines leicht verunreinigten gelben öligen Feststoffes (130 mg, 0.108 mmol, quant.) isoliert werden.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.105 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1064 (**108(OH)**+Na^+)), 1.219 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1220 (**108(OTIPS)**+Na^+)).

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*6S,9R,12S,16S*)-3,3-diisopropyl-2,14,17-trimethyl-17-((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)-9-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-7,10,13-trioxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-oxa-8,11,14-triaza-3-silaoctadecan-6,16-diyl)dicarbamat (**109**)



109

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.6 durchgeführt. Es wurde **83** (194 mg, 0.149 mmol), NPysCl (114 mg, 0.597 mmol) und trockenes CH_2Cl_2 (15 mL) verwendet. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 0 °C und danach für 3 h bei RT gerührt. Durch die Reinigung C) konnte **109** als gelber Feststoff (173 mg, 0.127 mmol, 85 %) erhalten werden.

R_f (3 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.34.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.539 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1366 ($M+H^+$), 1388 ($M+Na^+$)).

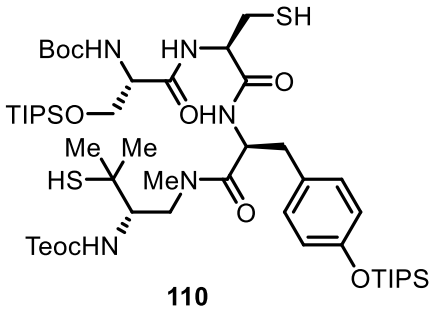
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.96-8.73 (m, 1H, CH(NPys)), 8.57-8.33 (m, 3H, CH(NPys)), 7.53 (bs, 1H, NH(Amid)), 7.35-7.28 (m, 1H, CH(NPys)), 7.21-7.17 (m, 1H, CH(NPys)), 7.09-6.99 (m, 2H, CH(Ph)), 6.88 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NH(Amid)), 6.81-6.75 (m, 2H, CH(Ph)), 6.38 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NH(Carbamat)), 5.33 (bs, 1H, NH(Carbamat)), 5.11-5.08 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.54 (bs, 1H, CH(Peptid)), 4.37-4.30 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.16 (bs, 1H, CH(Peptid)), 4.11-4.00 (m, 3H, CH(Peptid), CH_2(Peptid)), 3.95-3.72 (m, 3H, CH(Peptid), CH_2(Peptid)), 3.28-3.10 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 3.02-2.95 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 2.87 (bs, 1H, CH(Peptid)), 2.73 (bs, 2H, CH_2(Peptid)), 1.47-1.32 (m, 15H, Boc, Me(Pen)), 1.29-1.21 (m, 5H, CH(TIPS)), 1.10-1.02 (m, 36H, CH_3(TIPS)), 0.83 (bs, 2H, C<u>H</u>$_2$TMS), -0.04- -0.08 (m, 9H, TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{60}H_{99}N_9O_{13}S_4Si_3Na^+$: 1388.5451; gefunden (ESI-MS^+): 1388.5460.

Opt. Rot. α = -0.645° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\boldsymbol{24}} =$ **-**64.5 °.

Das aufgenommene $^{13}C\{^1H\}$-NMR konnte aufgrund der Vielzahl an Signalen, die weit über die Anzahl an C-Atomen von **109** hinausging, nicht ausgewertet werden. Das Molekül lag vermutlich in Lösung in verschiedenen stabilen Konformationen vor.

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*6S,9R,12S,16S*)-3,3-diisopropyl-17-mercapto-9-(mercaptomethyl)-2,14,17-trimethyl-7,10,13-trioxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-oxa-8,11,14-triaza-3-silaoctadecan-6,16-diyl)dicarbamat (**110**)



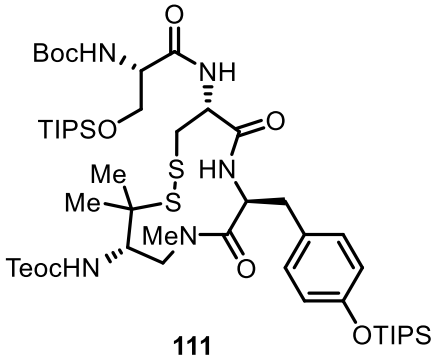
110

Die Reaktion erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.7 unter Verwendung von Di-NPys-Disulfid **109** (173 mg, 0.127 mmol), entgastem H_2O (105 µL, 5.82 mmol), PMe_3 (1 M in THF, 0.51 mL, 0.51 mmol) und entgastem THF (1.8 mL) bei einer Temperatur von 0 °C und einer Reaktionsdauer von 60 min. Nach der beschriebenen Aufarbeitung wurde das Dithiol **110** als hellgelber Feststoff (122 mg, 0.115 mmol, 91 %) erhalten, der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet wurde.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.509 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1058 ($M+H^+$), 1080 ($M+Na^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{50}H_{95}N_5O_9S_2Si_3Na^+$: 1080.5777; gefunden (ESI-MS^+): 1080.5760.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,8S,11R*)-11-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-3,3,6-trimethyl-7,10-dioxo-8-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)carbamat (**111**)



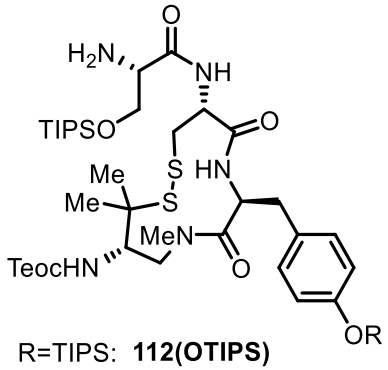
111

Die Herstellung erfolgte analog zur Reaktion zum Pentamerdisulfid **41**. Es wurden Dithiol **110** (122 mg, 0.115 mmol) in trockenem DMF (115 mL) und DIPEA (0.04 mL, 0.2 mmol) bei einer Reaktionszeit von 22 h verwendet. Danach wurde wiederholt für 30 min ein O_2-Strom durch die Reaktionsmischung geleitet und das Rühren für 24 h fortgesetzt. Dies wurde noch zweimal wiederholt, sodass die Reaktionsmischung insgesamt für vier Tage gerührt wurde. Die Aufarbeitung ergab **111** als leicht verunreinigten hellgelben Feststoff (122 mg, 0.115 mmol, quant.), der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet wurde.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.518 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1056 (M+H$^+$), 1078 (M+Na$^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{50}H_{93}N_5O_9S_2Si_3Na^+$: 1078.5620; gefunden (ESI-MS$^+$): 1078.5582.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,8S,11R*)-11-((S)-2-amino-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-8-(4-hydroxybenzyl)-3,3,6-trimethyl-7,10-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)carbamat (**112**)



R=TIPS: **112(OTIPS)**
R=H: **112(OH)**

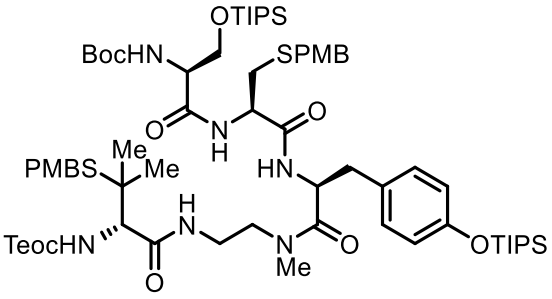
Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.3. Dafür wurden **111** (56 mg, 0.053 mmol), *p*TSA (19 mg, 0.11 mmol) und trockenes EtOH (1.1 mL) bei einer Reaktionszeit von 6 h verwendet. Nach der beschriebenen Aufarbeitung konnte nach LC-MS Analyse eine 2:1 Mischung aus **112(OTIPS)**/**112(OH)** in Form eines leicht verunreinigten gelben öligen Feststoffes (46 mg, 0.048 mmol, 91 %) isoliert werden, der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet wurde.

LC-MS *(25-100(2) ACN 5min)***:** t_r = 2.16 min (*m/z* (ESI-MS^+): 800 (**112(OH)**+H^+)), 2.64 (*m/z* (ESI-MS^+): 956 (**112(OTIPS)**+H^+)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{45}H_{85}N_5O_7S_2Si_3Na^+$: 978.5096; gefunden (ESI-MS^+): 978.5095.

*5.2.9.2 Kupplung mit **43** und weitere Funktionalisierung*

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*4S,11S,14R,17S*)-20,20-diisopropyl-14-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3,3,9,21-tetramethyl-5,10,13,16-tetraoxo-11-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-19-oxa-2-thia-6,9,12,15-tetraaza-20-siladocosan-4,17-diyl)dicarbamat (**84**)



84

Die Synthese erfolgte nach einer leicht veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung von Tripeptidcarbonsäure **107** (320 mg, 0.354 mmol), DIPEA (0.18 mL, 1.0 mmol), HATU (175 mg, 0.460 mmol), C_2H_4-Pen**-**Amin **43** (175 mg, 0.372 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2 (3.0 mL)) und trockenem CH_2Cl_2 (2.1 mL) bei einer Dauer von 24 h. Die Aufreinigung erfolgte mit PE/EE (3/1 -> 2/1 -> 1/1) und ergab **84** in Form eines farblosen Feststoffes (318 mg, 0.235 mmol, 67 %).

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.41.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.617 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1377 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, NH(Amid)), 7.24-7.19 (m, 5H, CH(Ar), NH(Amid)), 7.06-6.97 (m, 3H, CH(Ar), NH(Amid)), 6.83-6.75 (m, 6H, CH(Ar)), 5.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH(Carbamat)), 5.42 (bs, 1H, NH(Carbamat)), 4.87 (bs, 1H, CH(Peptid)), 4.51 (bs, 1H, CH(Peptid)), 4.21-4.09 (m, 4H, CH(Peptid), CH_2(Peptid)), 3.83 (bs, 2H, CH_2(Peptid)), 3.78-3.61 (m, 10H, OMe, CH_2(PMB)), 3.29 (bs, 1H, CH(Peptid)), 3.05-2.87 (m, 3H, CH(Peptid), CH_2(Tyr)), 2.74-2.64 (m, 5H, CH_2(Cys), NMe), 1.48-1.34 (m, 15H, Boc, Me(Pen)), 1.27-1.18 (m, 4H, CH(TIPS)), 1.07-0.99 (m, 38H, CH_3(TIPS), C$\underline{H}_2$TMS), 0.03 (s, 9H, TMS) ppm.

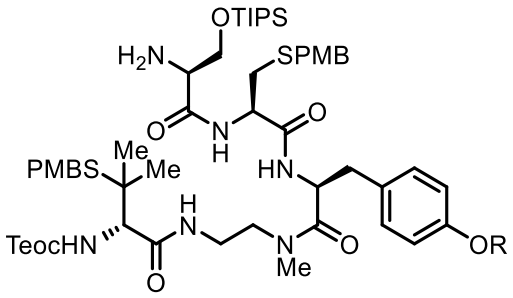
^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.4 (Cq), 170.2 (Cq), 169.4 (Cq), 169.3 (Cq), 162.3 (Cq), 158.9 (Cq), 158.7 (Cq), 156.7 (Cq), 155.2 (Cq), 130.5 (CH), 130.3 (CH), 130.2 (CH), 129.9 (Cq), 129.6 (Cq), 120.1 (CH), 114.1 (CH), 114.1 (CH), 80.7 (Cq), 63.7

(CH_2), 63.4 (CH_2), 57.6 (CH), 56.8 (CH), 55.4 (CH_3), 55.3 (CH_3), 52.7 (CH), 51.0 (CH), 48.8 (CH_2), 42.5 (CH_2), 40.7 (CH_2), 37.6 (Cq), 36.1 (CH_2), 33.4 (CH_2), 32.8 (CH_2), 28.5 (CH_3), 26.8 (CH_3), 25.7 (CH_3), 18.1 (CH), 18.0 (CH), 12.7 (CH_3), 11.9 (CH_3), -1.4 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{68}H_{114}N_6O_{12}S_2Si_3Na^+$: 1377.7142; gefunden (ESI-MS^+): 1377.7102.

Opt. Rot. α = 0.184° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 18.4$ °.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,11S,14R,17S*)-17-amino-11-(4-hydroxybenzyl)-20,20-diisopropyl-14-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3,3,9,21-tetramethyl-5,10,13,16-tetraoxo-19-oxa-2-thia-6,9,12,15-tetraaza-20-siladocosan-4-yl)carbamat (**113**)

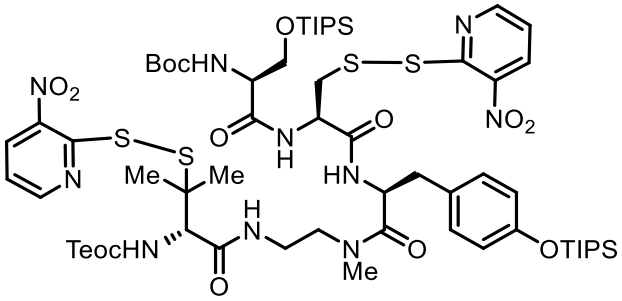


R=TIPS: **113(OTIPS)**
R=H: **113(OH)**

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.3. Dafür wurden **84** (145 mg, 0.107 mmol), *p*TSA (37 mg, 0.21 mmol) und trockenes EtOH (2.2 mL) bei einer Reaktionszeit von 5.5 h verwendet. Nach der beschriebenen Aufarbeitung konnte nach LC-MS Analyse eine 7.3:4.7:1 Mischung aus **113(OTIPS)**/**113(OH)/**nicht Boc-entschütztem **84(OH)** in Form eines leicht verunreinigten gelben öligen Feststoffes (142 mg, 0.107 mmol, quant.) isoliert werden.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.083 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1121 (**113(OH)**+Na^+)), 1.193 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1277 (**113(OTIPS)**+Na^+)).

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*6S,9R,12S,19S*)-3,3-diisopropyl-2,14,20-trimethyl-20-((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)-9-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-7,10,13,18-tetraoxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-oxa-8,11,14,17-tetraaza-3-silahenicosan-6,19-diyl)dicarbamat (**114**)



114

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.6 durchgeführt. Es wurde **84** (182 mg, 0.134 mmol), NPysCl (103 mg, 0.537 mmol) und trockenes CH_2Cl_2 (13.5 mL) verwendet. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 0 °C und danach für 3.5 h bei RT gerührt. Durch die Reinigung C) konnte **114** als dunkler gelber Feststoff (126 mg, 0.088 mmol, 65 %) erhalten werden.

R_f (3 % MeOH in CH_2Cl_2) = 0.32.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.435 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1445 ($M+Na^+$)).

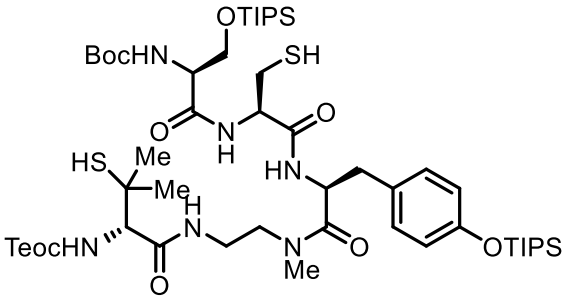
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.27 (bs, 1H, CH(NPys)), 8.89 (bs, 1H, CH(NPys)), 8.61-8.48 (m, 2H, CH(NPys)), 8.22-8.17 (m, 1H, NH(Amid)), 7.48-7.32 (m, 2H, CH(NPys)), 7.04-6.97 (m, 2H, CH(Ph)), 6.79-6.70 (m, 3H, NH(Amid), CH(Ph)), 5.37 (bs, 1H, NH(Carbamat)), 5.20 (bs, 1H, NH(Carbamat)), 5.04-4.94 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.65-4.50 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.29-4.04 (m, 5H, CH_2(Peptid), CH(Peptid)), 3.81-3.74 (m, 1H, CH(Peptid)), 3.48-3.20 (m, 4H, CH_2(Peptid)), 3.02-2.68 (m, 6H, CH_2(Tyr), CH_2(Cys), NMe), 1.55-1.50 (m, 3H, Me(Pen)), 1.46-1.40 (m, 9H, Boc), 1.28-1.19 (m, 8H, Me(Pen), CH(TIPS)), 1.09-0.98 (m, 37H, CH_3(TIPS)), 0.87-0.82 (m, 2H, C$\underline{H_2}$TMS), 0.04- -0.01 (m, 9H, TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{62}H_{102}N_{10}O_{14}S_4Si_3Na^+$: 1445.5665; gefunden (ESI-MS^+): 1445.5621.

Opt. Rot. α = 0.070° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 7.0°$.

Das aufgenommene $^{13}C\{^{1}H\}$-NMR konnte aufgrund der Vielzahl an Signalen, die weit über die Anzahl an C-Atomen von **114** hinausging, nicht ausgewertet werden. Das Molekül lag vermutlich in Lösung in verschiedenen stabilen Konformationen vor.

Tert-butyl(2-trimethylsilylethyl)((*6S,9R,12S,19S*)-3,3-diisopropyl-20-mercapto-9-(mercaptomethyl)-2,14,20-trimethyl-7,10,13,18-tetraoxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-oxa-8,11,14,17-tetraaza-3-silahenicosan-6,19-diyl)dicarbamat (**115**)



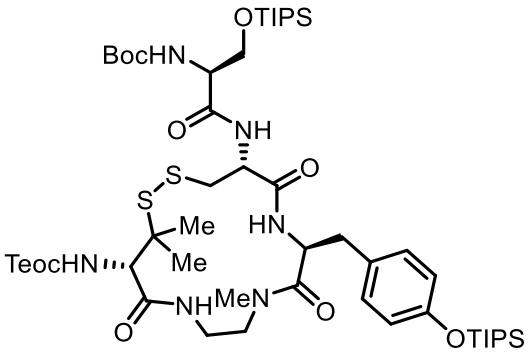
115

Die Reaktion erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.7 unter Verwendung von Di-NPys-Disulfid **114** (126 mg, 0.088 mmol), entgastem H_2O (73 µL, 4.1 mmol), PMe_3 (1 M in THF, 0.54 mL, 0.54 mmol) und entgastem THF (1.3 mL) bei einer Temperatur von 0 °C und einer Reaktionsdauer von 3 h. Nach der beschriebenen Aufarbeitung wurde das Dithiol **115** als hellgelber Feststoff (90 mg, 0.081 mmol, 91 %) erhalten, der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet wurde.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.432 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1115 ($M+H^+$), 1137 ($M+Na^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{52}H_{98}N_6O_{10}S_2Si_3Na^+$: 1137.5991; gefunden (ESI-MS^+): 1137.5989.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,11S,14R*)-14-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-3,3,9-trimethyl-5,10,13-trioxo-11-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-1,2-dithia-6,9,12-triazacyclopentadecan-4-yl)carbamat (**116**)



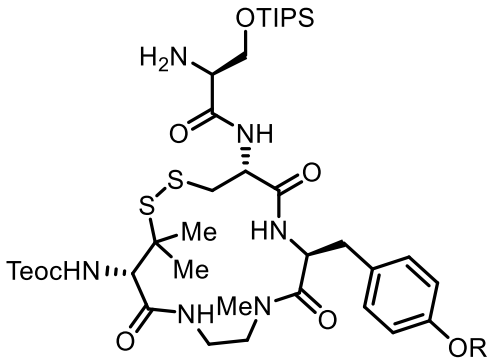
116

Die Reaktion erfolgte analog zur Herstellung des Tetrapeptiddisulfids mit einem CH_2-Linker **111**. Es wurde Dithiol **115** (90 mg, 0.081 mmol), DIPEA (0.03 mL, 0.2 mmol) und trockenes DMF (81 mL) bei einer Reaktionszeit von 3 d unter konstantem Anschluss und dreimaligem Erneuern des O_2-Ballons verwendet. Dieselbe Aufarbeitung ergab **116** als leicht verunreinigten hellgelben Feststoff (106 mg, 0.081 mmol, quant.), der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet wurde.

LC-MS *(25-100(2) ACN 5min)***:** t_r = 3.42. min (*m/z* (ESI-MS^+): 1113 ($M+H^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{52}H_{97}N_6O_{10}S_2Si_3^+$: 1113.6015; gefunden (ESI-MS^+): 1113.6013.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,11S,14R*)-14-((*S*)-2-amino-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-11-(4-hydroxybenzyl)-3,3,9-trimethyl-5,10,13-trioxo-1,2-dithia-6,9,12-triazacyclopentadecan-4-yl)carbamat (**117**)



R=TIPS: **117(OTIPS)**
R=H: **117(OH)**

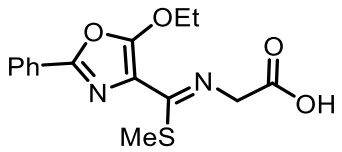
Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.3. Dafür wurden **116** (104 mg, 0.093 mmol), *p*TSA (32 mg, 0.19 mmol) und trockenes EtOH (1.9 mL) bei einer Reaktionszeit von 7 h verwendet. Nach der beschriebenen Aufarbeitung konnte nach LC-MS Analyse eine 2:1 Mischung aus **117(OTIPS)**/**117(OH)** in Form eines leicht verunreinigten gelben öligen Feststoffes (86 mg, 0.085 mmol, 91 %) isoliert werden, der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet wurde.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 0.398 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 879 (**117(OH)**+Na$^+$)), 1.123 (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1035 (**117(OTIPS)**+Na$^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{47}H_{89}N_6O_8S_2Si_3^+$: 1013.5491; gefunden (ESI-MS$^+$): 1013.5506.

5.2.10 Reaktionen der Thioimidate mit verschiedenen Peptiden

2-(((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)(methylthio)methylen)amino)essigsäure (**118**)

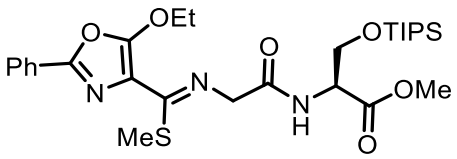


118

Die Herstellung wurde nach einer in der Aufarbeitung veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.1 durchgeführt. Dafür wurde Me-Thioimidat **101** (45 mg, 0.14 mmol), 1 M *aq.* LiOH (0.27 mL, 0.27 mmol) und THF (1.4 mL) bei einer Reaktionszeit von 30 min verwendet. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionsmischung bei 0 °C mit 5 % *aq.* KH_2PO_4 (1.4 mL) verdünnt und vorsichtig mit 2 M *aq.* Zitronensäure auf einen pH-Wert von 4 gebracht. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 7 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und bei RT unter vermindertem Druck konzentriert. Dadurch konnte **118** als gelber öliger Feststoff (18 mg, 0.056 mmol, 42 %) gewonnen werden, der direkt für den nächsten Schritt verendet wurde.

LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 0.970 min (*m/z* (ESI-MS^+): 321 ($M+H^+$)).

N-(2-(((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)(methylthio)methylen)amino)acetyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-methylserinat (**119**)



119

119 wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.4 synthetisiert. Es wurden Carbonsäure **118** (23 mg, 0.072 mmol), Oxyma (23 mg, 0.16 mmol), EDC-HCl (31 mg, 0.16 mmol), $NaHCO_3$ (31 mg, 0.36 mmol), H_2N-Ser(OTIPS)-OMe **30** (24 mg, 0.87 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2 (0.2 mL)), trockenes CH_2Cl_2 (0.2 mL) und trockenes DMF (0.4 mL) bei einer Reaktionsdauer von 19.5 h verwendet. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (8/1-> 4/1-> 2/1-> 1/1) gereinigt,

um **119** als gelbes viskoses Öl (11 mg, 0.019 mmol, 27 %) zu erhalten. NMR-Analysen zufolge bestand es aus einer 5:1 Mischung von *cis/trans* Isomeren von **119**.

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.64.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 0.486 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 578 (M+H$^+$), 600 (M+Na$^+$)), 1.022 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 578 (M+H$^+$), 600 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, CONH), 7.95-7.92 (m, 4H, CH(Ph)), 7.45-7.41 (m, 6H, CH(Ph)), 4.80 (dt, *J* =8.4, 2.6 Hz, 1H, CH(Ser)), 4.50-4.44 (m, 3H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.34-4.32 (m, 2H, CH_2(Gly)), 4.30-4.27 (m, 1H, CH_2(Gly)), 4.24-4.17 (m, 2H, CH(Ser)), 4.00 (dd, *J* = 9.8, 2.8 Hz, 1H, CH(Ser)), 3.96 (dd, *J* = 9.9, 3.6 Hz, 0.4H, CH(Ser)), 3.77-3.74 (s, 5H, OMe), 2.55 (s, 0.6H, SMe), 2.49 (s, 3H,SMe), 1.52-1.47 (m, 4H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.08-1.00 (m, 28H, TIPS) ppm.

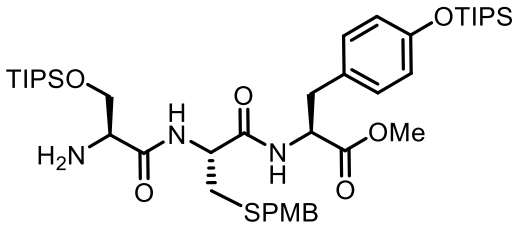
^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.3 (Cq(Carbonyl)), 170.8 (Cq(Carbonyl)), 158.5 (Cq(Oxa)), 151.9 (Cq(Oxa)), 130.3 (CH(Ar)), 128.8 (CH(Ar)), 128.6 (CH(Ar)), 126.7 (Cq(Ar)), 126.2 (CH(Ar)), 125.8 (CH(Ar)), 70.1 ($O\underline{C}H_2CH_3$), 64.4 (CH_2(Ser)), 56.4 (CH_2(Gly)), 54.3 (CH(Ser)), 52.3 (OCH_3), 17.8 (CH_3(TIPS)), 17.7 (CH_3(TIPS)), 15.0 (SCH_3), 13.6 ($OCH_2\underline{C}H_3$), 11.8 (CH(TIPS)), 11.8 (CH(TIPS)) ppm.

Aufgrund der großen Verdünnung wurden nicht alle Signale im ^{13}C-NMR gefunden.

HRMS: berechnet m/z für $C_{28}H_{43}N_3O_6SSiNa^+$: 600.2540; gefunden (ESI-MS$^+$): 600.2540.

Opt. Rot. α = 0.279° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = 27.9 °.

(*6S,9R,12S*)-6-Amino-3,3-diisopropyl-9-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-2-methyl-7,10-dioxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-oxa-8,11-diaza-3-silatridecansäuremethylester (**120**)



120

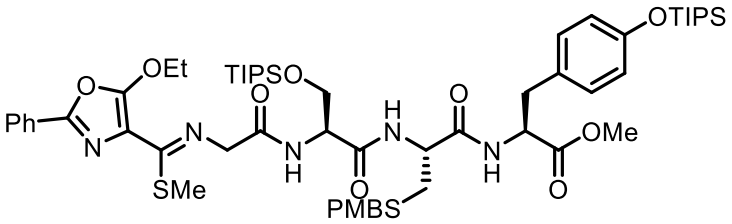
Die Synthese von **120** wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.2 durchgeführt. Es wurde **106** (130 mg, 0.142 mmol), TFA (0.21 mL, 2.8 mmol) und trockenes DCM (0.15 mL) verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 3 h konnte **120** nach der

beschriebenen Aufarbeitung als farbloses Öl gewonnen werden (136 mg, 0.142 mmol, quant.).

R_f (PE/EE: 1/3) = 0.38.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.156 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 818 (M+H$^+$), 840 (M+Na$^+$)).

(*8S,11R,14S*)-3-(5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)-11-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-6,9,12-trioxo-14-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-8-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-2-thia-4,7,10,13-tetraazapentadec-3-ensäuremethylester (**121**) durch Kupplung unter EDC/Oxyma-Bedingungen



121

121 wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.4 synthetisiert. Es wurden Thioimidatcarbonsäure **118** (18 mg, 0.056 mmol), Oxyma (18 mg, 0.12 mmol), EDC-HCl (24 mg, 0.12 mmol), $NaHCO_3$ (24 mg, 0.28 mmol), Amin **120** (115 mg, 0.140 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2 (0.2 mL)), trockenes CH_2Cl_2 (0.2 mL) und trockenes DMF (0.3 mL) bei einer Reaktionsdauer von 19 h verwendet. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (8/1-> 3/1-> 1/1) gereinigt, um **121** als orangenen Feststoff (10 mg, 0.009 mmol, 16 %) zu erhalten. NMR-Analysen zufolge bestand das isolierte Produkt aus einer 6:5 Mischung von *cis/trans* Isomeren.

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.68.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.191 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1120 (M+H$^+$), 1142 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.93-7.80 (m, 2H, CH(Ph)), 7.43-7.30 (m, 3H, CH(Ph)), 7.22-7.17 (m, 2H, CH(Ar)), 6.99-6.94 (m, 3H, CH(Ar), NH), 6.82-6.76 (m, 6H, CH(Ar), NH), 4.72-4.71 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.52-4.34 (m, 4H, $OC\underline{H}_2CH_3$, CH_2(Peptid)), 4.26-4.17 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 3.76 (bs, 5H, PMB), 3.68-3.60 (m, 5H, OMe, CH(Peptid)), 3.03-2.99 (m, 2H, CH_2(Tyr)), 2.86-2.78 (m, 2H, CH(Cys)), 2.66-2.59 (m,1H, CH(Cys)), 2.54 (s, 1H, SMe), 2.49 (s, 2H, SMe), 1.50 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.44 (t,

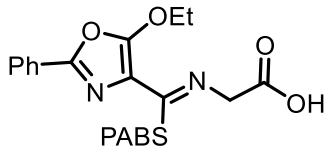
J = 7.0 Hz, 1H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.33-1.19 (m, 9H, CH(TIPS)), 1.08-1.05 (m, 41H, CH_3(TIPS)) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{57}H_{85}N_5O_{10}S_2Si_2Na^+$: 1142.5174; gefunden (ESI-MS^+): 1142.5154.

Opt. Rot. α = 0.112° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 11.2$ °

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

2-((((4-Azidobenzyl)thio)(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)methylen)amino)essigsäure (**122**)



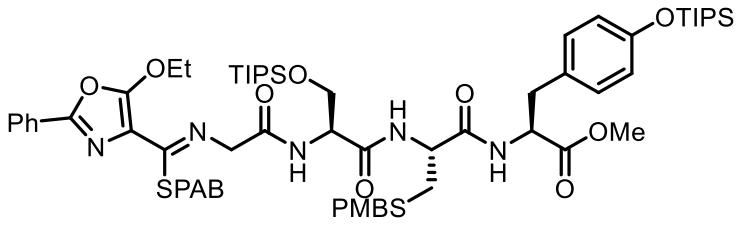
122

Die Herstellung wurde nach einer in der Aufarbeitung veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.1 durchgeführt. Dafür wurden PAB-Thioimidat **102** (20 mg, 0.044 mmol) als Mischung mit 1 M *aq.* LiOH (0.09 mL, 0.09 mmol) und THF (0.45 mL) bei einer Reaktionszeit von 30 min verwendet. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionsmischung bei 0 °C mit 5 % *aq.* KH_2PO_4 (0.5 mL) verdünnt und vorsichtig mit 2 M *aq.* Zitronensäure auf einen pH-Wert von 4 gebracht. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 3 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (3 x 1 mL) und ges. *aq.* NaCl (2 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und bei RT unter vermindertem Druck konzentriert. Dadurch konnte **122** als gelber Feststoff (17 mg, 0.039 mmol, 88 %) gewonnen werden, der direkt für den nächsten Schritt verendet wurde.

LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.278 min (Zersetzung bei Ionisation (ESI-MS^+):).

Das sich **122** schon bei Ionisation in der LC-MS zersetzte, wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

(*8S,11R,14S*)-1-(4-Azidophenyl)-3-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)-11-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-6,9,12-trioxo-14-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-8-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-2-thia-4,7,10,13-tetraazapentadec-3-ensäuremethylester (**123**) durch Kupplung unter EDC/Oxyma-Bedingungen



123

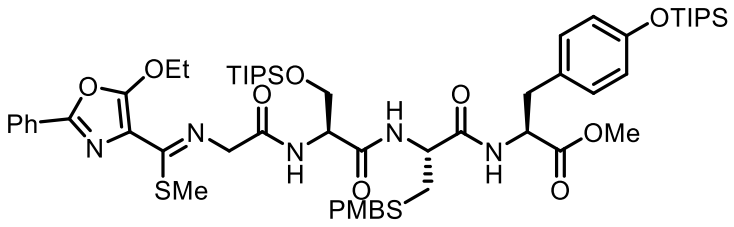
123 wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.4 synthetisiert. Es wurden Thioimidatcarbonsäure **122** (17 mg, 0.039 mmol), Oxyma (12 mg, 0.085 mmol), EDC-HCl (17 mg, 0.085 mmol), $NaHCO_3$ (17 mg, 0.19 mmol), Amin **120** (45 mg, 0.054 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2 (0.2 mL)), trockenes CH_2Cl_2 (0.2 mL) und trockenes DMF (0.3 mL) bei einer Reaktionsdauer von 19 h verwendet. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (8/1-> 6/1-> 3/1) gereinigt, um einen gelben Feststoff (4 mg) zu erhalten, der laut LC-MS-Analyse zwar das Thioimidat **123** enthielt, laut ^{1}H-NMR-Analyse jedoch hauptsächlich aus nicht näher bestimmbaren Nebenprodukten bestand. Daher wurde die isolierte Fraktion nicht näher untersucht und verworfen.

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.72.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.337 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1237 (M+H$^+$), 1259 (M+Na$^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{63}H_{88}N_8O_{10}S_2Si_2Na^+$: 1259.5501; gefunden (ESI-MS$^+$): 1259.5479.

(*8S,11R,14S*)-3-(5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)-11-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-6,9,12-trioxo-14-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-8-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-2-thia-4,7,10,13-tetraazapentadec-3-ensäuremethylester (**121**) durch Verseifung-Kupplung-Eintopfreaktion

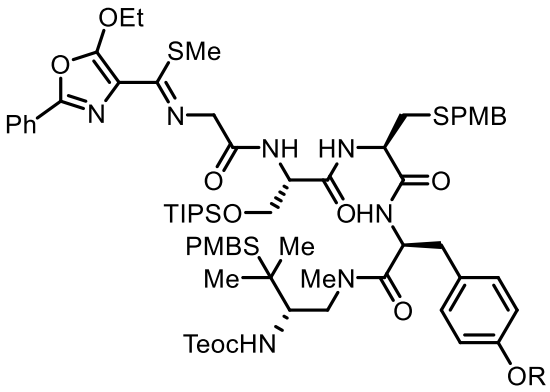


121

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.10 durchgeführt. Es wurden dafür zunächst Me-Thioimidat **101** (10 mg, 0.030 mmol) mit LiOH x H_2O (3.2 mg, 0.076 mmol) und H_2O (38.7 µL, 2.15 mmol) in 1,4-Dioxan (300 µL) für 20 h zur Reaktion gebracht. Danach wurden HATU (19 mg, 0.048 mmol) und Amin **120** (37 mg, 0.045 mmol) gelöst in 1,4-Dioxan (300 µL) und einem Tropfen DMF, wie in der Allgemeinen Vorschrift beschrieben, bei RT hinzugefügt und für 2 h bei derselben Temperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung erfolgte die Reinigung mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (4/1-> 2/1-> 1/1) und lieferte das Thioimidat **121** als gelbes Öl (15 mg, 0.013 mmol, 45 % über zwei Stufen).

Die Analytik stimmte mit der vorherigen überein.

5-Ethoxy-*N*-((*8S,12S,15R,18S*)-12-(4-hydroxybenzyl)-15-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-8-(2-((4-methoxybenzyl)thio)propan-2-yl)-2,2,10-trimethyl-6,11,14,17,20-pentaoxo-18-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-5-oxa-7,10,13,16,19-pentaaza-2-silahenicosan-21-yl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**124**)



R=TIPS: **124(OTIPS)**
R=H: **124(OH)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.10 durchgeführt. Es wurden dafür zunächst Me-Thioimidat **101** (52 mg, 0.16 mmol) mit LiOH x H_2O (8.0 mg, 0.19 mmol) und H_2O (67.2 µL, 3.73 mmol) in 1,4-Dioxan (383 µL) für 6 h zur Reaktion gebracht. Danach wurden HATU (95 mg, 0.25 mmol) und Mischung aus den Aminen **108(OTIPS)/108(OH)** (125 mg, 0.105 mmol) gelöst in 1,4-Dioxan (400 µL), wie in der Allgemeinen Vorschrift beschrieben, bei 5 °C hinzugefügt und für 2 h bei derselben Temperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung erfolgte die Reinigung mit dem Laufmittelgemisch 1 % NEt_3 in PE/EE (6/1-> 4/1-> 1/1-> 0/100) und lieferte das Thioimidat **124(OTIPS)** als gelbes Öl (61 mg, 0.041 mmol, 39 % über zwei Stufen) und das Thioimidat **124(OH)** als hellgelbes Öl (14 mg, 0.009 mmol, 9 % über zwei Stufen). NMR-Analysen zufolge bestand das isolierte Produkt aus einer Mischung von *cis/trans* Isomeren.

124(OTIPS):

R_f (3 % MeOH und 1 % NEt_3 in CH_2Cl_2) = 0.29.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.162 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1522 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.35 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, NH(Amid)), 7.92-7.91 (m, 2H, CH(Ph)), 7.42 (bs, 3H, CH(Ph)), 7.35 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, NH(Amid)), 7.23 (bs, 2H, CH(Ar)), 7.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH(Amid)), 7.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH(Ar)), 6.83-6.75 (m, 6H, CH(Ar)), 5.06 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH(Carbamat)), 4.96-4.91,(m, 1H, CH(Peptid)),

4.56-4.54 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.50-4.43 (m, 3H, CH(Peptid), $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.38-4.33 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 4.24-4.20 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.15-4.11 (m, 1H, CH(Peptid)), 3.98-3.91 (m, 2H, CH_2(Peptid)), 3.76-3.66 (m, 11H, OMe, CH_2(PMB), CH(Peptid)), 3.13 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, CH(Peptid)), 2.95-2.84 (m, 2H, CH_2(Tyr)), 2.77-2.73 (m, 1H, CH(Cys)), 2.65-2.61 (m, 1H, CH(Cys)), 2.55-2.47 (m, 6H, NMe, SMe), 1.49 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.41-1.36 (m, 3H, Me(Pen)), 1.27-1.19 (m, 8H, Me(Pen), CH(TIPS)), 1.07-1.00 (m, 36H, CH_3(TIPS)), 0.91 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H, $C\underline{H}_2$TMS), -0.02 (s, 9H, TMS) ppm.

$^{13}C\{^1H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 172.1 (Cq), 172.0 (Cq), 171.0 (Cq), 170.2 (Cq), 169.2 (Cq), 169.0 (Cq), 158.8 (Cq), 157.4 (Cq), 155.7 (Cq), 155.2 (Cq), 151.9 (Cq), 130.5 (CH), 130.4 (CH), 130.2 (CH), 130.2 (CH), 130.1 (Cq), 128.9 (CH), 128.8 (Cq), 126.8 (Cq), 125.9 (CH), 125.6 (CH), 120.0 (CH), 114.1 (CH), 114.1 (CH), 111.7 (Cq), 70.3 (CH_2), 63.4 (CH_2), 56.6 (CH_2), 56.2 (CH), 55.4 (CH_3), 54.7 (CH), 52.5 (CH), 51.3 (CH), 49.1 (CH_2), 47.9 (CH_2), 45.9 (CH_2), 39.0 (Cq), 35.7 (CH_2), 35.2 (CH_3), 33.3 (CH_2), 32.7 (CH_2), 29.8 (CH_2), 27.0 (CH_3), 24.7 (CH_3), 18.1 (CH), 18.1 (CH), 18.0 (CH), 15.2 (CH_3), 13.9 (CH_3), 12.7 (CH_3), 12.0 (CH_3), -1.4 (CH_3) ppm.

Die NMR-Spektren enthalten eine Verunreinigung durch Tetramethylharnstoff[199] (δ(^{1}H-NMR) = 2.80 ppm, δ(^{13}C-NMR) = 165.7, 38.6 ppm). Dadurch ergibt sich eine geschätzte Reinheit von 81 %.

HRMS: berechnet m/z für $C_{76}H_{117}N_7O_{12}S_3Si_3Na^+$: 1522.7128; gefunden (ESI-MS^+): 1522.7103.

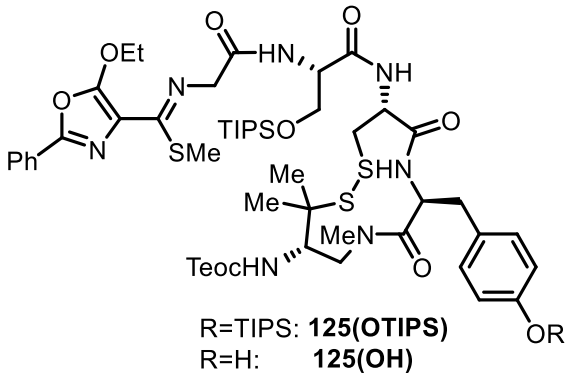
Opt. Rot. α = 0.172° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 17.2$ °.

124(OH):

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.001 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1366 ($M+Na^+$)).

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

5-Ethoxy-*N*-(2-(((*S*)-1-(((*4R,7S,11S*)-7-(4-hydroxybenzyl)-9,12,12-trimethyl-5,8-dioxo-11-(((2-trimethylsilyloxy)carbonyl)amino)-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)amino)-1-oxo-3-((triisopropylsilyl)oxy)propan-2-yl)amino)-2-oxoethyl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**125**)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.10 durchgeführt. Es wurde dafür zunächst Me-Thioimidat **101** (15 mg, 0.045 mmol) mit LiOH x H_2O (3.3 mg, 0.079 mmol) und H_2O (19.4 µL, 1.08 mmol) in 1,4-Dioxan (110 µL) für 5.5 h zur Reaktion gebracht. Danach wurden HATU (39 mg, 0.10 mmol) und eine Mischung aus den Aminen **112(OTIPS)/112(OH)** (43 mg, 0.045 mmol) gelöst in einer Mischung aus 1,4-Dioxan und DMF (10/1, 110 µL) wie in der allgemeinen Vorschrift beschrieben, bei 5 °C hinzugefügt und für 1.5 h bei derselben Temperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung erfolgte die Reinigung mit dem Laufmittelgemisch 1 % NEt_3 und MeOH in CH_2Cl_2 (0 %-> 1 %-> 2 %) und lieferte das, durch nicht reagiertes Me-Thioimidat **101** verunreinigte, Thioimidat **125(OTIPS)** als gelben Feststoff (12 mg, 0.010 mmol, 22 % über zwei Stufen) und das Thioimidat **125(OH)** als braunen Feststoff, der in EtOAc (5 mL) aufgenommen und mit H_2O gewaschen wurde, um das der ^{1}H-NMR-Analyse zufolge verbliebene $HNEt_3^+$ zu entfernen (9 mg, 0.008 mmol, 19 % über zwei Stufen).

125(OTIPS):

R_f (3 % MeOH und 1 % NEt_3 in CH_2Cl_2) = 0.47.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.262 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1258 ($M+H^+$), 1280 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.38-8.30 (m, 1H, NH), 7.96-7.89 (m, 2H, CH(Ph)), 7.56 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, NH), 7.43-7.41 (m, 3H, CH(Ph)), 7.11 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 7.04-7.02 (m, 2H, CH(Ar)), 6.78-6.74 (m, 2H, CH(Ar)), 6.27 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NH), 5.13-5.08 (m, 1H), 5.00-4.97 (m, 1H), 4.79-4.62 (m, 2H), 4.52-4.41 (m, 4H), 4.38-4.36 (m, 1H),

4.26-4.09 (m, 3H), 3.82-3.74 (m, 4H), 3.63-3.58 (m, 1H), 3.25-3.19 (m, 1H), 3.07-2.82 (m, 4H, CH(Cys), CH(Tyr)), 2.52-2.47 (m, 6H, NMe, SMe), 1.58-1.44 (m, 10H, Me(Pen), $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.28-1.19 (m, 9H, CH(TIPS)), 1.08-1.04 (m, 35H, CH_3(TIPS)), 0.86-0.82 (m, 4H, $C\underline{H}_2$TMS), 0.06-0.01 (m, 9H, TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{60}H_{99}N_7O_{10}S_3Si_3Na^+$: 1280.5821; gefunden (ESI-MS^+): 1280.5822.

Opt. Rot. α = 0.378° (*c* = 0.5, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 75.6°$.

Aufgrund der Verunreinigung durch das Me-Thioimidat **101** und durch Tetramethylharnstoff[199] (δ (^{1}H-NMR) = 2.80 ppm) wurde keine weitere Analytik durchgeführt. Dadurch ergibt sich eine geschätzte Reinheit von 72 %.

125(OH):

R_f (3 % MeOH und 1 % NEt_3 in CH_2Cl_2) = 0.40.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.100 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1102 ($M+H^+$), 1124 ($M+Na^+$)).

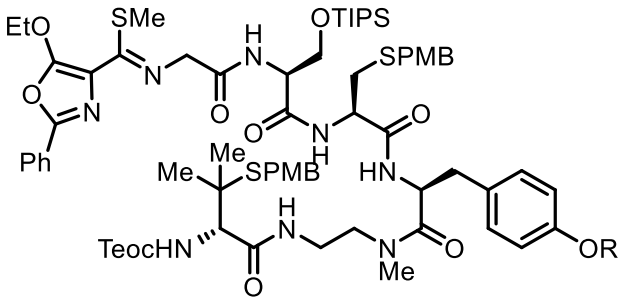
^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.49-8.43 (m, 1H, NH), 7.94-7.83 (m, 2H, CH(Ph)), 7.43-7.42 (m, 3H, CH(Ph)), 7.10-7.02 (m, 2H, CH(Ar)), 6.78-6.73 (m, 2H, CH(Ar)), 5.16-5.11 (m, 1H), 5.01-4.99 (m, 1H), 4.77-4.75 (m, 1H), 4.67-4.63 (m, 1H), 4.52-4.44 (m, 2H), 4.37-4.34 (m, 1H), 4.14-4.08 (m, 3H), 3.80-3.68 (m, 1H), 3.30-3.25 (m, 1H), 2.99-2.79 (m, 5H, CH(Cys), CH(Tyr)), 2.59-2.57 (m, 3H, NMe), 2.50-2.47 (m, 3H, SMe), 1.37-1.18 (m, 18H, Me(Pen), $OCH_2C\underline{H}_3$, CH(TIPS)), 1.07-1.05 (m, 24H, CH_3(TIPS), $C\underline{H}_2$TMS), 0.06-0.00 (m, 9H, TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{51}H_{79}N_7O_{10}S_3Si_2Na^+$: 1124.4487; gefunden (ESI-MS^+): 1124.4481.

Opt. Rot. α = 0.150° (*c* = 0.3, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 50.0°$.

Aufgrund der Verunreinigung und der Verbreiterung der Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum wurde keine weitere Analytik durchgeführt. Es ergibt sich eine geschätzte Reinheit von 35 %.

5-Ethoxy-*N*-((*8S,15S,18R,21S*)-15-(4-hydroxybenzyl)-18-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-8-(2-((4-methoxybenzyl)thio)propan-2-yl)-2,2,13-trimethyl-6,9,14,17,20,23-hexaoxo-21-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-5-oxa-7,10,13,16,19,22-hexaaza-2-silatetracosan-24-yl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**126**)



R=TIPS: **126(OTIPS)**
R=H: **126(OH)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.10 durchgeführt. Es wurden dafür zunächst Me-Thioimidat **101** (57 mg, 0.17 mmol) mit LiOH x H_2O (8.8 mg, 0.21 mmol) und H_2O (73.6 µL, 4.09 mmol) in 1,4-Dioxan (418 µL) für 5 h zur Reaktion gebracht. Danach wurden HATU (104 mg, 0.272 mmol) und Mischung aus den Aminen **113(OTIPS)/113(OH)** (132 mg, 0.105 mmol) gelöst in 1,4-Dioxan (440 µL), wie in der Allgemeinen Vorschrift beschrieben, bei 5 °C hinzugefügt und für 2 h unter Erwärmen auf RT gerührt. Nach der Aufarbeitung erfolgte die Reinigung mit dem Laufmittelgemisch 1 % NEt_3 in PE/EE (8/1-> 5/1-> 3/1-> 0/100) und lieferte das Thioimidat **126(OTIPS)** als gelbes Öl (60 mg, 0.039 mmol, 37 % über zwei Stufen) und das Thioimidat **126(OH)** als braunes Öl (18 mg, 0.014 mmol, 13 % über zwei Stufen). NMR-Analysen zufolge bestand das isolierte Produkt aus einer Mischung von *cis/trans* Isomeren.

126(OTIPS):

R_f (3 % MeOH und 1 % NEt_3 in CH_2Cl_2) = 0.30.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)*: t_r = 1.282 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1579 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.91 (bs, 2H, CH(Ph)), 7.43-7.41 (m, 3H, CH(Ph)), 7.31 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, NH(Amid)), 7.24-7.18 (m, 5H, CH(Ar), NH(Amid)), 7.05-6.96 (m, 3H, CH(Ar), NH(Amid)), 6.81-6.72 (m, 7H, CH(Ar), NH(Amid)), 5.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH(Carbamat)), 5.00-4.89 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.66-4.55 (m, 1H, CH(Peptid)), 4.50-4.39 (m, 3H, OC$\underline{H_2}$CH$_3$, CH(Peptid)), 4.24-4.09 (m, 5H, CH_2(Peptid), CH(Peptid)), 3.82-3.74 (m, 10H, OMe, CH_2(PMB)), 3.68-3.56 (m, 3H, CH_2(Peptid), CH(Peptid)), 3.42-3.35 (m, 1H, CH(Peptid)), 3.29-3.22 (m, 1H, CH(Peptid)), 3.13-3.07 (m, 1H, CH(Peptid)),

3.03-2.85 (m, 2H, CH_2(Tyr)), 2.78-2.75 (m, 1H, CH(Cys)), 2.72-2.66 (m, 3H, CH(Cys), NMe), 2.53-2.48 (m, 3H, SMe), 1.50-1.46 (m, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.44-1.41 (m, 3H, Me(Pen)), 1.37-1.35(m, 3H, Me(Pen)), 1.29-1.18 (m, 8H, CH(TIPS)), 1.06-0.95 (m, 38H, CH_3(TIPS), CH_2TMS), 0.01 (s, 9H, TMS) ppm.

$^{13}C\{^1H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 172.6 (Cq), 171.6 (Cq), 171.5 (Cq), 170.6 (Cq), 170.1 (Cq), 169.3 (Cq), 159.0 (Cq), 158.8 (Cq), 156.7 (Cq), 155.8 (Cq), 155.1 (Cq), 152.0 (Cq), 130.5 (CH), 130.3 (CH), 130.2 (CH), 129.9 (Cq), 129.6 (Cq), 128.9 (CH), 126.7 (Cq), 125.9 (CH), 125.7 (CH), 120.0 (CH), 114.1 (CH), 114.1 (CH), 111.6 (Cq), 70.3 (CH_2), 63.7 (CH_2), 63.1 (CH_2), 56.7 (CH_2), 55.5 (CH), 55.3 (CH_3), 52.6 (CH), 51.2 (CH), 48.6 (CH_2), 48.2 (CH_2), 45.9 (CH_2), 38.4 (Cq), 37.9 (CH_2), 36.6 (CH_3), 35.9 (CH_2), 32.8 (CH_2), 29.8 (CH_2), 29.3 (CH_2), 28.4 (CH_3), 27.3 (CH_2), 26.8 (CH_3), 25.7 (CH_3), 18.1 (CH), 18.0 (CH), 16.1 (CH_3), 15.2 (CH_3), 13.9 (CH_3), 12.7 (CH_3), 11.9 (CH_3), -1.4 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{78}H_{120}N_8O_{13}S_3Si_3Na^+$: 1579.7343; gefunden (ESI-MS^+): 1579.7316.

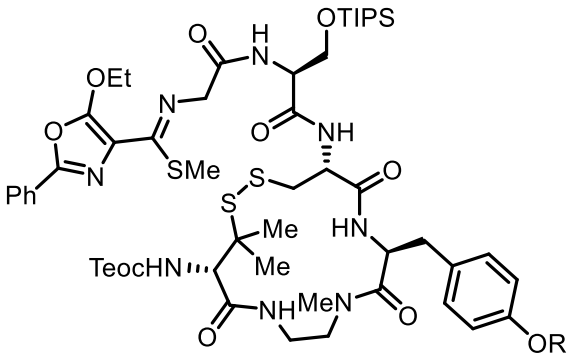
Opt. Rot. α = 0.108° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = 10.8 °.

126(OH):

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.133 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1423 ($M+Na^+$)).

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

5-Ethoxy-*N*-(2-(((*S*)-1-(((*4R,7S,14S*)-7-(4-hydroxybenzyl)-9,15,15-trimethyl-5,8,13-trioxo-14-(((2-trimethylsilyloxy)carbonyl)amino)-1,2-dithia-6,9,12-triazacyclopentadecan-4-yl)amino)-1-oxo-3-((triisopropylsilyl)oxy)propan-2-yl)amino)-2-oxoethyl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**127**)



R=TIPS: **127(OTIPS)**
R=H: **127(OH)**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.10 durchgeführt. Es wurde dafür zunächst Me-Thioimidat **101** (27 mg, 0.081 mmol) mit LiOH x H_2O (4.2 mg, 0.099 mmol) und H_2O (34.9 µL, 1.94 mmol) in 1,4-Dioxan (200 µL) für 4.5 h zur Reaktion gebracht. Danach wurden HATU (50 mg, 0.13 mmol) und Mischung aus den Aminen **117(OTIPS)/117(OH)** (82 mg, 0.081 mmol) gelöst in einer Mischung aus 1,4-Dioxan und DMF (10/1, 200 µL), wie in der allgemeinen Vorschrift beschrieben, bei 5 °C hinzugefügt und für 2 h bei derselben Temperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung erfolgte die Reinigung mit dem Laufmittelgemisch 1 % NEt_3 und MeOH in CH_2Cl_2 (0 %-> 1 %-> 2 %) und lieferte das Thioimidat **127(OTIPS)** als gelb-braunen Feststoff (27 mg, 0.021 mmol, 25 % über zwei Stufen) und das Thioimidat **127(OH)** als hellbraunen Feststoff (6 mg, 0.005 mmol, 7 % über zwei Stufen) nach abermaligem Waschen einer Lösung in EtOAc (5 mL) mit H_2O (1 mL).

127(OTIPS):

R_f (3 % MeOH und 1 % NEt_3 in CH_2Cl_2) = 0.42.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.194 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1315 ($M+H^+$), 1337 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.30 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.95-7.87 (m, 2H, CH(Ph)), 7.43-7.38 (m, 3H, CH(Ph)), 7.04-6.96 (m, 3H, CH(Ar), NH), 6.89-6.86 (m, 1H, NH), 6.80-6.71 (m, 3H, CH(Ar), NH), 5.43-5.33 (m, 1H), 5.14-5.06 (m, 1H), 4.65-4.57 (m, 1H), 4.52-4.36 (m, 3H), 4.27-4.22 (m, 1H), 4.17-4.11 (m, 3H), 3.80-3.75 (m, 1H), 3.64-3.53

(m, 3H), 3.26-2.86 (m, 4H, CH(Cys), CH(Tyr)), 2.56-2.46 (m, 6H, NMe, SMe), 1.52-1.44 (m, 5H, Me(Pen), $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.42-1.36 (m, 5H, Me(Pen), $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.27-1.12 (m, 12H, CH(TIPS)), 1.08-0.96 (m, 35H, CH_3(TIPS)), 0.87-0.82 (m, 4H, $C\underline{H}_2$TMS), 0.06-0.02 (m, 9H, TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{62}H_{102}N_8O_{11}S_3Si_3Na^+$: 1337.6036; gefunden (ESI-MS^+): 1337.6047.

Opt. Rot. α = 0.160° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 16.0°$.

Das NMR-Spektrum enthält eine Verunreinigung durch Tetramethylharnstoff[199] (δ (^{1}H-NMR) = 2.80 ppm und es wurden nicht alle erwarteten Signale aufgrund der verschiedenen Konformere von **127(OTIPS)** gefunden. Daher wurde auch keine weitere Analytik aufgenommen und es ergibt sich eine geschätzte Reinheit von 88 %.

127(OH):

R_f (3 % MeOH und 1 % NEt_3 in CH_2Cl_2) = 0.36.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.042 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1159 ($M+H^+$), 1181 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.53-8.49 (m, 1H, NH), 7.95-7.87 (m, 2H, CH(Ph)), 7.47-7.43 (m, 3H, CH(Ph)), 7.06-6.95 (m, 2H, CH(Ar)), 6.80-6.77 (m, 2H, CH(Ar)), 5.41-5.33 (m, 1H), 5.16-5.11 (m, 1H), 4.91-4.83 (m, 1H), 4.62-4.53 (m, 1H), 4.50-4.45 (m, 1H), 4.38-4.36 (m, 1H), 4.25-4.07 (m, 3H), 3.79-3.73 (m, 1H), 3.69-3.62 (m, 1H), 3.56-3.53 (m, 1H), 3.40-3.37 (m, 1H), 3.21-3.14 (m, 1H), 3.03-3.00 (m, 1H), 2.94-2.88 (m, 1H), 2.79-2.77 (m, 1H), 2.61-2.47 (m, 2H), 2.36-2.27 (m, 1H), 2.24-2.20 (m, 1H), 1.53-1.41 (m, 4H, Me(Pen), $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.37-1.17 (m, 17H, Me(Pen), $OCH_2C\underline{H}_3$, CH(TIPS)), 1.09-1.07 (m, 18H, CH_3(TIPS)), 0.89-0.82 (m, 4H, $C\underline{H}_2$TMS), 0.07-0.02 (m, 9H, TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{53}H_{82}N_8O_{11}S_3Si_2Na^+$: 1181.4701; gefunden (ESI-MS^+): 1181.4695.

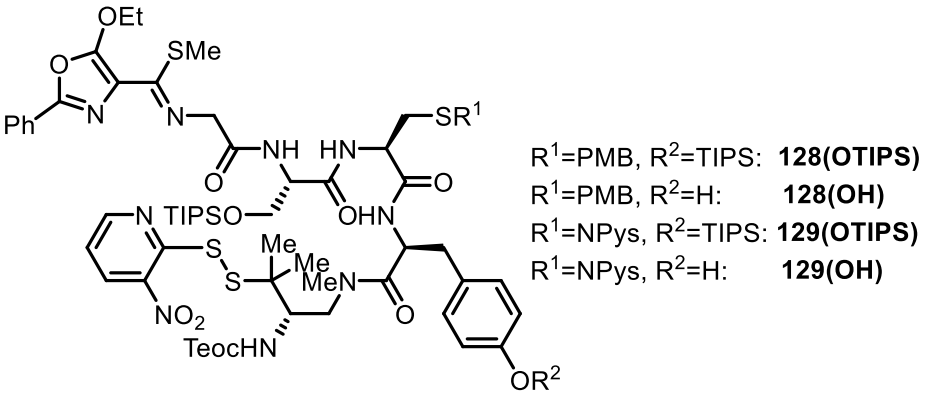
Opt. Rot. α = 0.184° (*c* = 0.6, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 30.7°$.

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

5.2.11 Sukzessive Entfernung der Schutzgruppen der Me-Thioimidate

5.2.11.1 *Entfernung der PMB-Schutzgruppen in Anwesenheit des Me-Thioimidats*

5-Ethoxy-*N*-((*8S,12S,15R,18S*)-12-(4-hydroxybenzyl)-15-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-2,2,10-trimethyl-8-(2-((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)propan-2-yl)-6,11,14,17,20-pentaoxo-18-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-5-oxa-7,10,13,16,19-pentaaza-2-silahenicosan-21-yl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**128**) und 5-Ethoxy-*N*-((*8S,12S,15R,18S*)-12-(4-hydroxybenzyl)-2,2,10-trimethyl-15-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-8-(2-((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)propan-2-yl)-6,11,14,17,20-pentaoxo-18-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-5-oxa-7,10,13,16,19-pentaaza-2-silahenicosan-21-yl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**129**) durch Reaktion gemischter Startmaterialien

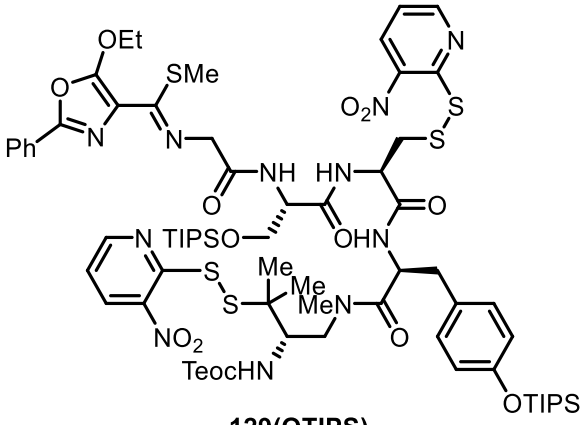


Die Synthese wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.6 durchgeführt. Es wurde eine nicht getrennte Mischung aus **124(OTIPS)** und **124(OH)** (11 mg, 0.008 mmol), NPysCl (4 mg, 0.020 mmol) und trockenes CH_2Cl_2 (0.82 mL) verwendet. Die Reaktionsmischung wurde für 2.75 h bei 0 °C gerührt. Nach dieser Zeit konnte ein vollständiger Umsatz zu **129(OTIPS)** und **129(OH)** festgestellt werden und es wurde Aufarbeitung A) angewandt. Dadurch wurde ein gelber Feststoff (10 mg, 0.007 mmol, 87 %) isoliert, der der LC-MS Analyse zufolge die gewünschten Produkte **129(OTIPS)** und **129(OH)**, aber auch die Zwischenprodukte **128(OTIPS)** und **128(OH)** enthielt. Wegen der geringen Substanzmenge wurde das Rohprodukt aber nicht säulenchromatographisch gereinigt.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.122 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1434 (**129(OH)**+Na$^+$)), 1.259 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1590 (**129(OTIPS)**+Na$^+$)).

Aufgrund der geringen Substanzmenge und der Verunreinigung wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

5-Ethoxy-*N*-((*8S,12S,15R,18S*)-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-2,2,10-trimethyl-15-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-8-(2-((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)propan-2-yl)-6,11,14,17,20-pentaoxo-18-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-5-oxa-7,10,13,16,19-pentaaza-2-silahenicosan-21-yl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**129(OTIPS)**)



129(OTIPS)

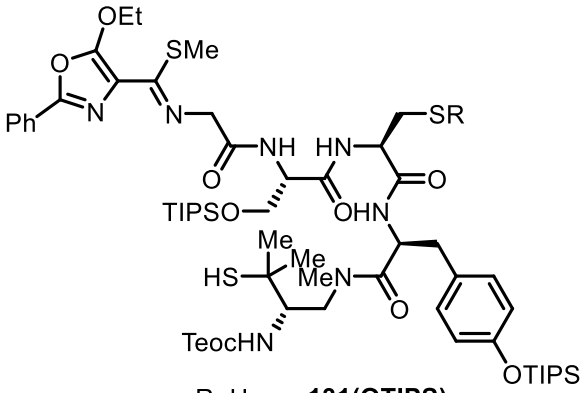
Die Synthese wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.6 durchgeführt. Es wurde **124(OTIPS)** (33 mg, 0.022 mmol), NPysCl (13 mg, 0.066 mmol) und trockenes CH_2Cl_2 (2.2 mL) verwendet. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei 0 °C gerührt. Nach dieser Zeit konnte ein vollständiger Umsatz zu **129(OTIPS)** festgestellt werden und es wurde Aufarbeitung A) angewandt. Das gewonnene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie auf Kieselgel (Eluent: PE/EE (5/1-> 3/1-> 1/1-> 1/2)) gereinigt, um das gewünschte Produkt **129(OTIPS)** in Kombination mit dem Zwischenprodukt **128(OTIPS)** als braunen Feststoff (12 mg, 0.008 mmol, 35 %) zu isolieren.

R_f (3 % MeOH und 1 % NEt_3 in CH_2Cl_2) = 0.42.

LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.283 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1556 (**128(OTIPS)**+Na^+), 1590 (**129(OTIPS)**+Na^+)).

Aufgrund der Verunreinigung wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

5-Ethoxy-*N*-((*8S,12S,15R,18S*)-15-(mercaptomethyl)-8-(2-mercaptopropan-2-yl)-2,2,10-trimethyl-6,11,14,17,20-pentaoxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-18-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-5-oxa-7,10,13,16,19-pentaaza-2-silahenicosan-21-yl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**131**) und
5-Ethoxy-*N*-((*8S,12S,15R,18S*)-8-(2-mercaptopropan-2-yl)-15-(((4-methoxybenzyl)thio)methyl)-2,2,10-trimethyl-6,11,14,17,20-pentaoxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-18-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-5-oxa-7,10,13,16,19-pentaaza-2-silahenicosan-21-yl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**132**)



R=H: **131(OTIPS)**
R=PMB: **132(OTIPS)**

Die Reaktion erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.7 unter Verwendung der Mischung aus **129(OTIPS)** und **128(OTIPS)** (12 mg, 0.008 mmol), entgastem H_2O (22 µL, 1.2 mmol), PMe_3 (1 M in THF, 0.03 mL, 0.03 mmol) und entgastem THF (0.77 mL) bei einer Temperatur von 0 °C und einer Reaktionsdauer von 65 min. Nach der beschriebenen Aufarbeitung wurde ein braunes Rohprodukt erhalten, das mittels Kieselgel-Säulenchromatographie mit dem Laufmittelgemisch 1 % NEt_3 und MeOH in CH_2Cl_2 (0 %-> 2 %) gereinigt wurde. Dadurch konnte ein brauner Feststoff (12 mg, 0.008 mmol, quant.) gewonnen werden, der laut LC-MS Analyse eine Mischung aus dem Dithiol **131(OTIPS)** und dem Mono-PMB-Thiol **132(OTIPS)** neben anderen Verunreinigungen enthielt.

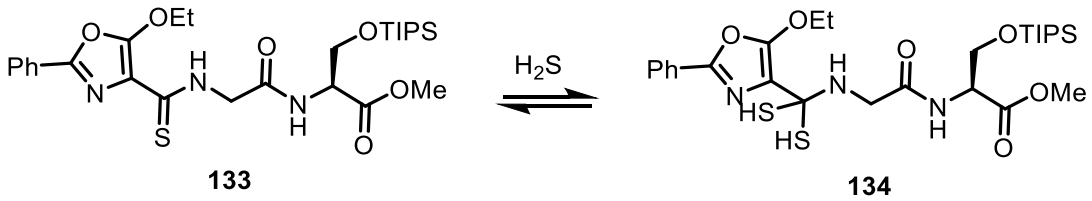
R_f (3 % MeOH und 1 % NEt_3 in CH_2Cl_2) = 0.32.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.328 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1282 (**131(OTIPS)**+Na^+)), 1.363 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1402 (**132(OTIPS)**+Na^+)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{60}H_{101}N_7O_{10}S_3Si_3Na^+$: 1282.5978; gefunden (ESI-MS^+): 1282.5986.

5.2.11.2 *Untersuchungen zur Spaltung des Me-Thioimidats*

N-(((5-Ethoxy-2-phenyloxazol-4-yl)dimercaptomethyl)glycyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-methylserinat (**134**) durch Reaktion mit NaSH



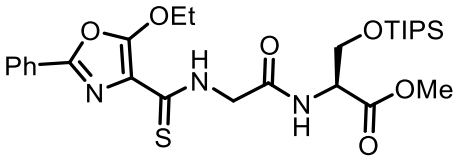
133 **134**

Die Reaktion wurde nach einer Vorschrift zur Spaltung eines Me-Thioimidats in einem voll-geschützten Dipeptid durchgeführt.[87]

Me-Thioimidat **119** (5 mg, 0.009 mmol) wurde bei RT unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (0.87 mL) gelöst. Eine Lösung aus $NaSHxH_2O$ (6.4 mg, 0.087 mmol) in entgastem H_2O (0.09 mL) wurde hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde für 50 h bei derselben Temperatur stark gerührt. Da nach dieser Zeit die Bildung des Thioamids **133** nicht mittels LC-MS nachgewiesen werden konnte und lediglich ein schwach intensives Signal gefunden wurde, das durch das Molekül mit der Struktur von **134** ausgelöst werden könnte, wurde der Ansatz nicht aufgearbeitet und verworfen.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.097 min (*m/z* (ESI-MS^+): 620 (**134**+Na^+)).

N-((5-Ethoxy-2-phenyloxazoe-4-carbonothioyl)glycyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-methylserinat **133** durch Reaktion mit H_2S



133

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.12 unter Verwendung von Me-Thioimidat **119** (6 mg, 0.01 mmol), 2,4,6-Collidin (28 µL, 0.21 mmol), H_2S (0.8 M in THF, 0.13 mL, 0.10 mmol) und trockenem MeOH (1.1 mL) bei RT und einer Reaktionsdauer von 1 h. Es wurde Aufarbeitung B) angewandt. Der erhaltene gelbe ölige Feststoff (3 mg, 0.005 mmol, 52 %) wurde aufgrund der geringen Substanzmenge nicht weiter gereinigt und konnte durch die analytischen Daten als das Thioamid **133** identifiziert werden.

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.64.

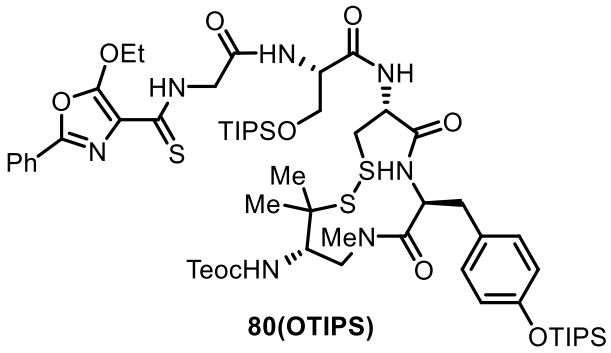
LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.153 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 564 (M+H$^+$), 586 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, CSNH), 7.95 (bs, 2H, CH(Ph)), 7.45-7.43 (m, 3H, CH(Ph)), 6.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 4.72 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH(Gly)), 4.63 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.56 (dd, *J* = 13.0, 5.0 Hz, 1H, CH(Gly)), 4.30-4.27 (m, 1H, CH(Ser)), 4.23-4.21 (m, 1H, CH(Ser)), 3.97-3.92 (m, 1H, CH(Ser)), 3.76 (s, 3H, OMe), 1.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.34-1.28 (m, 3H, CH(TIPS)), 1.08-0.94 (m, 18H, CH_3(TIPS)) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{27}H_{41}N_3O_6SSiNa^+$: 586.2383; gefunden (ESI-MS$^+$): 586.2386.

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

2-Trimethylsilyl((*4S,8S,11R*)-11-((*S*)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-3,3,6-trimethyl-7,10-dioxo-8-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)carbamat (**80(OTIPS)**) durch Reaktion mit H_2S und NEt_3 in MeOH



80(OTIPS)

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.12 unter Verwendung des verunreinigten Pen-Me-Thioimidatdisulfids **125(OTIPS)** (6 mg, 0.005 mmol), trockenem NEt_3 (6.6 µL, 0.048 mmol), H_2S (0.8 M in THF, 0.06 mL, 0.05 mmol) und trockenem MeOH (4.8 mL) bei RT für 21.5 h. Im Anschluss konnte kein Startmaterial mehr mittels LC-MS beobachtet werden und es wurde Aufarbeitung A) angewandt, um **80(OTIPS)** als verunreinigtes Rohprodukt in Form eines gelben öligen Feststoffes (8 mg, 0.005 mmol, quant.) zu erhalten.

R_f (3 % MeOH und 1 % NEt_3 in CH_2Cl_2) = 0.37.

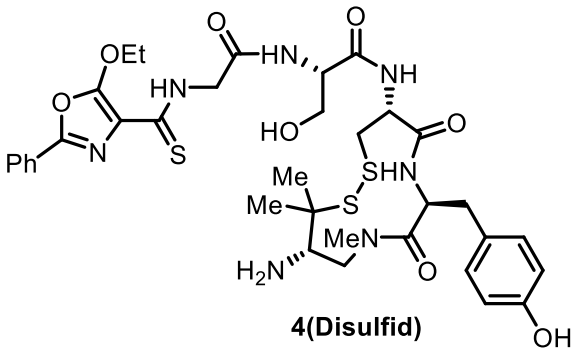
LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.433 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1244 (**80(OTIPS)**+H$^+$), 1266 (**80(OTIPS)**+Na$^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{59}H_{98}N_7O_{10}S_3Si_3^+$: 1244.5845; gefunden (ESI-MS^+): 1244.5851.

Aufgrund der Verunreinigung wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

5.2.11.3 Entfernung der Silyl-Schutzgruppen

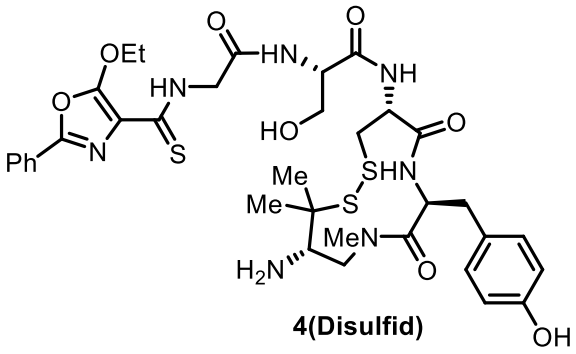
(*S*)-*N*-((*4R,7S,11S*)-11-Amino-7-(4-hydroxybenzyl)-9,12,12-trimethyl-5,8-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-hydroxypropanamid (**4(Disulfid)**) durch Reaktion mit TBAF



4(Disulfid)

In einem geeigneten, mit Kunststoff beschichteten Kolben wurde **80(OTIPS)** als Rohprodukt (2 mg, 0.002 mmol) in trockenem THF (1.6 mL) unter Ar-Atmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. TBAF (0.5 M in THF, 10 µL, 0.005 mmol) wurde zu der Lösung gegeben und die Reaktionsmischung wurde bei derselben Temperatur gerührt. Bei einer Reaktionskontrolle nach 30 min wurde weder das Startmaterial noch das gänzlich entschützte Produkt **4(Disulfid)**, noch die teilweise entschützten Produkte nachgewiesen. Daher wurde der Ansatz nicht aufgearbeitet und verworfen.

(*S*)-*N*-((*4R,7S,11S*)-11-Amino-7-(4-hydroxybenzyl)-9,12,12-trimethyl-5,8-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-hydroxypropanamid **4(Disulfid)** durch Reaktion mit TBAF und AcOH

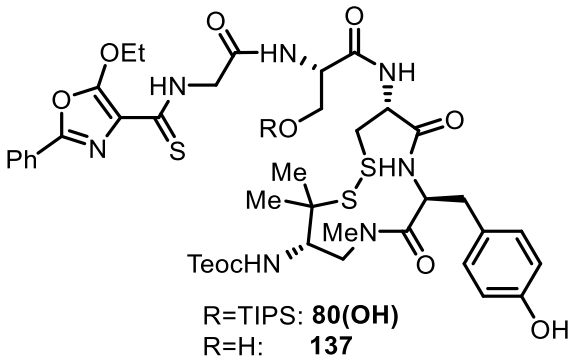


4(Disulfid)

In einem geeigneten, mit Kunststoff beschichteten Kolben wurde **80(OTIPS)** als Rohprodukt (2 mg, 0.002 mmol) in trockenem THF (1.6 mL) unter Ar-Atmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. AcOH (0.6 µL, 0.01 mmol) und TBAF (0.5 M in THF, 16 µL, 0.008 mmol) wurden nacheinander zu der Lösung gegeben und die Reaktionsmischung wurde bei derselben Temperatur gerührt. Bei einer Reaktionskontrolle nach 30 min wurde weder das Startmaterial noch das vollständig entschützte Produkt **4(Disulfid)**, noch die teilweise entschützten Produkte nachgewiesen. Daher wurde der Ansatz nicht aufgearbeitet und verworfen.

2-Trimethylsilylethyl((*4S,8S,11R*)-11-((*S*)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-((triisopropylsilyl)oxy)propanamido)-8-(4-hydroxybenzyl)-3,3,6-trimethyl-7,10-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)carbamat (**80(OH)**)

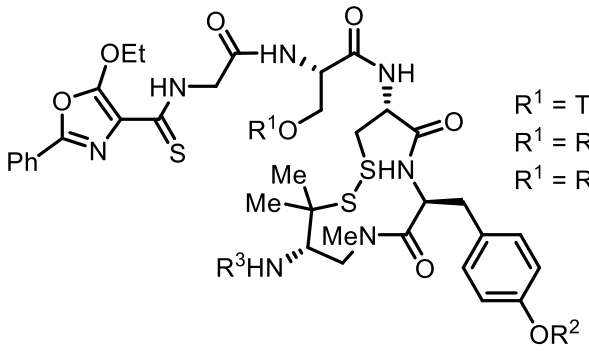
und 2-Trimethylsilylethyl((*4S,8S,11R*)-11-((*S*)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazole-4-carbothioamido)acetamido)-3-hydroxypropanamido)-8-(4-hydroxybenzyl)-3,3,6-trimethyl-7,10-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)carbamat (**137**) durch Reaktion mit TASF und H_2O



Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.11 unter Verwendung von **80(OTIPS)** als Rohprodukt (2 mg, 0.002 mmol), H_2O (0.1 M in trockenem DMF, 0.08 mL, 0.008 mmol) und TASF (1 M in trockenem DMF, 8 µL, 0.008 mmol) in trockenem DMF (1.6 mL) bei 0 °C. Unter Erwärmen auf RT über 1.5 h wurde die Reaktionsmischung im Anschuss für 22 h weiter gerührt. Nach dieser Zeit konnte ein Umsatz zu den teilweise entschützten Produkten **137** und **80** mittels LC-MS nachgewiesen werden. Da das gewünschte Disulfid **4(Disulfid)** jedoch nicht beobachtet wurde, wurde der Ansatz nicht aufgearbeitet und verworfen.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 0.271 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 932 (**137**+H$^+$), 954 (**137**+Na$^+$)), 1.203 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1088 (**80**+H$^+$), 1110 (**80**+Na$^+$)).

80(OH), **137** und **4(Disulfid)** durch Reaktion mit Py-HF Komplex

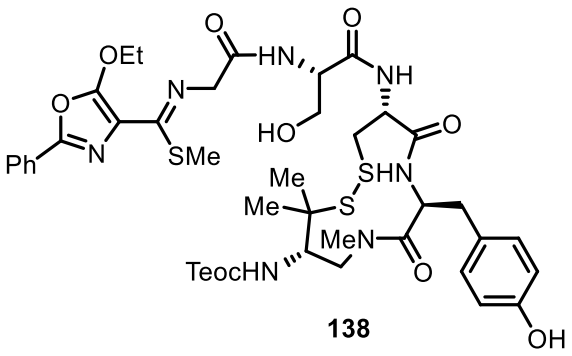


R^1 = TIPS, R^2 = H, R^3 = Teoc: **80(OH)**
R^1 = R^2 = H, R^3 = Teoc: **137**
R^1 = R^2 = R^3 = H: **4(Disulfid)**

In einem geeigneten, mit Kunststoff beschichteten Kolben wurde **80(OTIPS)** als Rohprodukt (2 mg, 0.002 mmol) in trockenem THF (1.6 mL) unter Ar-Atmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. HF (70 % in Py 34 µL, 1.3 mmol) wurden zu der Lösung gegeben und die Reaktionsmischung wurde bei derselben Temperatur für 1 h gerührt. Danach wurde die Reaktion auf RT erwärmt und für 22 h weiter gerührt. Nach dieser Zeit konnte ein Umsatz zu den teilweise entschützten Produkten **137** und **80** und zu dem gewünschten Disulfid **4(Disulfid)** in Spuren mittels LC-MS nachgewiesen werden. Aufgrund des kleinen Maßstabs wurde der Ansatz nicht aufgearbeitet und verworfen.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 0.21 (*m/z* (ESI-MS$^+$): 809 (**4(Disulfid)**+Na$^+$)), 0.271 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 932 (**137**+H$^+$), 954 (**137**+Na$^+$)), 1.203 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1088 (**80**+H$^+$), 1110 (**80**+Na$^+$)).

5-Ethoxy-*N*-(2-(((*S*)-3-hydroxy-1-(((*4R,7S,11S*)-7-(4-hydroxybenzyl)-9,12,12-trimethyl-5,8-dioxo-11-(((2-trimethylsilyloxy)carbonyl)amino)-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)amino)-2-oxoethyl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**138**)



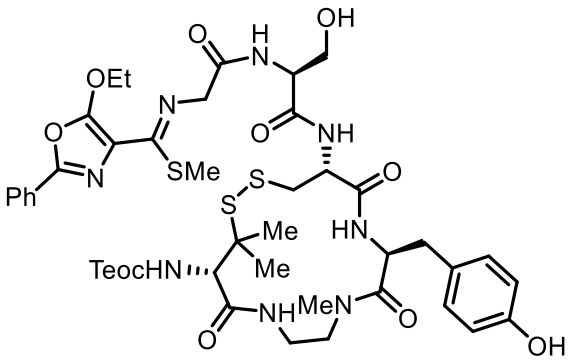
138

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.11 unter Verwendung der Mischung aus verunreinigtem **125(OTIPS)** und **125(OH)** (23 mg, 0.018 mmol), H_2O (1 M in trockenem DMF, 91 µL, 0.091 mmol) und TASF (1 M in trockenem DMF, 91 µL, 0.091 mmol) und trockenem DMF (0.37 mL) bei -20 °C. Nach 60 min unter Erwärmen auf 0 °C wurde die Reaktionsmischung wie beschrieben aufgearbeitet und das gewünschte Produkt **138** als gelbbrauner Feststoff (13 mg, 0.014 mmol, 76 %) erhalten, der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet wurde.

LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.362 min (*m/z* (ESI-MS^+): 946 ($M+H^+$), 968 ($M+Na^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{42}H_{59}N_7O_{10}S_3SiNa^+$: 968.3153; gefunden (ESI-MS^+): 968.3119.

5-Ethoxy-*N*-(2-(((*S*)-3-hydroxy-1-(((*4R,7S,14S*)-7-(4-hydroxybenzyl)-9,15,15-trimethyl-5,8,13-trioxo-14-(((2-trimethylsilyloxy)carbonyl)amino)-1,2-dithia-6,9,12-triazacyclopentadecan-4-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)amino)-2-oxoethyl)-2-phenyloxazol-4-carbimidomethylthioat (**139**)



139

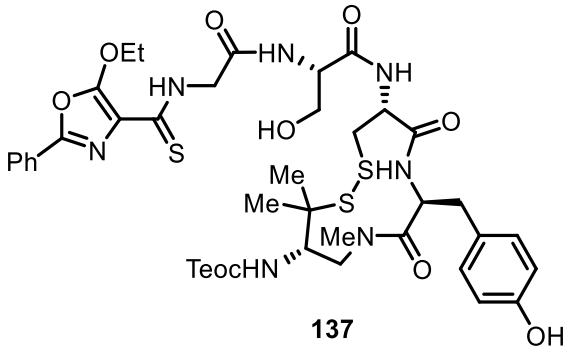
Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.11 unter Verwendung der Mischung aus **127(OTIPS)** und **127(OH)** (34 mg, 0.026 mmol), H_2O (1 M in trockenem DMF, 0.13 mL, 0.13 mmol) und TASF (1 M in trockenem DMF, 0.13 mL, 0.13 mmol) in trockenem DMF (0.52 mL) bei -20 °C. Nach 2.5 h unter Erwärmen auf 0 °C wurde die Reaktionsmischung wie beschrieben aufgearbeitet und das gewünschte Produkt **139** als gelber Feststoff (19 mg, 0.019 mmol, 74 %) erhalten, der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet wurde.

LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.322 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1003 ($M+H^+$), 1025 ($M+Na^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{44}H_{62}N_8O_{11}S_3SiNa^+$: 1025.3367; gefunden (ESI-MS^+): 1025.3373.

*5.2.11.4 Finale Freisetzung des Thioamids aus **138** und **139** und Entfernung der Teoc-Gruppe*

2-Trimethylsilylethyl((*4S,8S,11R*)-11-((*S*)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazole-4-carbothioamido)acetamido)-3-hydroxypropanamido)-8-(4-hydroxybenzyl)-3,3,6-trimethyl-7,10-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)carbamat (**137**)



137

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.12 unter Verwendung des Pen-Me-Thioimidatdisulfids **138** (14 mg, 0.015 mmol), trockenem NEt_3 (0.02 mL, 0.1 mmol), H_2S (0.8 M in THF, 0.19 mL, 0.15 mmol) und trockenem MeOH (15 mL) bei RT für 4 h. Im Anschluss konnte kein Startmaterial mehr mittels LC-MS beobachtet werden und es wurde Aufarbeitung A) angewandt. Anschließend wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie auf Silica (Laufmittelgemisch: MeOH in EtOAc (0 %-> 1 %-> 3 %)) gereinigt, um das Thioamid **137** in Form eines hellgelben Feststoffes (5 mg, 0.005 mmol, 37 %) zu erhalten.

R_f (5 % MeOH in EtOAc) = 0.48.

LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 1.511 min (*m/z* (ESI-MS^+): 932 ($M+H^+$)).

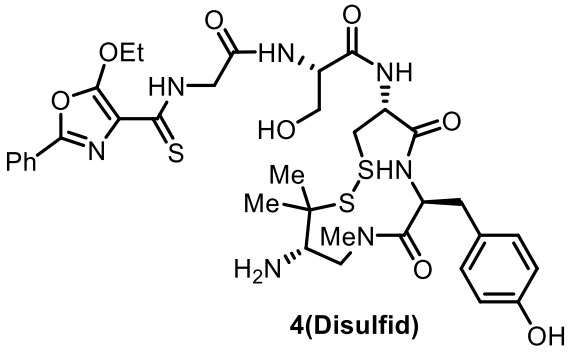
^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.25-9.23 (m, 1H, CSNH), 8.73-8.72 (m, 1H, NH), , 8.38-8.36 (m, 1H, NH), 7.97-7.85 (m, 2H, CH(Ph)), 7.82-7.80 (m, 1H, NH), 7.55-7.40 (m, 4H, CH(Ph), NH), 7.03 (bs, 2H, CH(Ar)), 6.73 (bs, 2H, CH(Ar)), 5.37-5.31 (m, 2H), 5.18-5.01 (m, 1H), 4.87-4.78 (m, 1H), 4.74-4.58 (m, 2H), 4.17-3.98 (m, 3H), 3.87-3.71 (m, 2H), 3.69-3.54 (m, 1H), 3.11-2.66 (m, 4H), 2.23-2.20 (m, 1H), 2.02-1.98 (m, 1H), 1.64-1.41 (m, 15H, Me(Pen), $OCH_2C\underline{H}_3$), 0.89-0.82 (m, 9H, $C\underline{H}_2TMS$), 0.06-0.01 (m, 9H, TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{41}H_{57}N_7O_{10}S_3SiNa^+$: 954.2996; gefunden (ESI-MS^+): 954.3030.

Opt. Rot. α = 0.410° (*c* = 0.6, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 82.0°$.

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

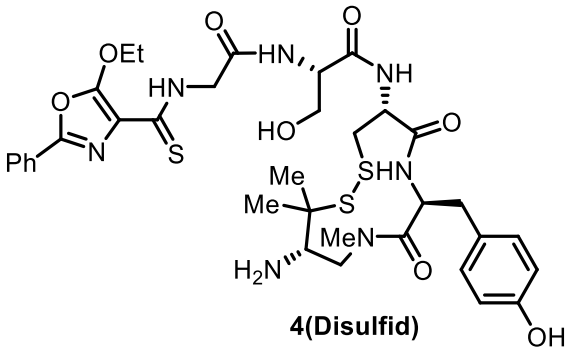
(*S*)-*N*-((*4R,7S,11S*)-11-Amino-7-(4-hydroxybenzyl)-9,12,12-trimethyl-5,8-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-hydroxypropanamid **4(Disulfid)** unter Verwendung von *p*TSA in TFE



4(Disulfid)

Eine Lösung aus *p*TSA (0.2 mg, 1 µmol) in trockenem TFE (1.0 mL) wurde bei RT unter Ar-Atmosphäre zu **137** (1.0 mg, 1.1 µmol) gegeben und die Mischung auf 60 °C erhitzt. Nach 40 min wurde die Reaktion auf RT abgekühlt und mittels LC-MS-Kontrolle untersucht. Dabei wurde lediglich eine Zersetzung des Startmaterials beobachtet. Daher wurde dieser Ansatz verworfen und nicht weiter aufgearbeitet.

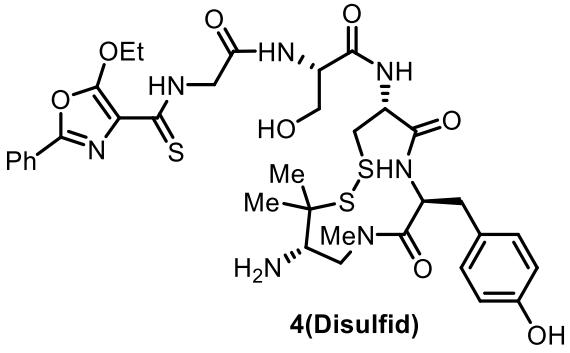
(*S*)-*N*-((*4R,7S,11S*)-11-Amino-7-(4-hydroxybenzyl)-9,12,12-trimethyl-5,8-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-hydroxypropanamid **4(Disulfid)** unter Verwendung von TFA in CH_2Cl_2



4(Disulfid)

Eine Lösung aus TFA in trockenem CH_2Cl_2 (0.04 M, 0.75 mL, 0.030 mmol) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus **137** (1.4 mg, 1.5 µmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.50 mL) gegeben und die Mischung auf RT erwärmt. Nach 19 h Rühren bei derselben Temperatur konnte mittels LC-MS-Kontrolle nur ein geringer Umsatz des Startmaterial und hauptsächlich eine Zersetzung festgestellt werden. Daher wurde dieser Ansatz verworfen und nicht weiter aufgearbeitet.

(*S*)-*N*-((*4R,7S,11S*)-11-Amino-7-(4-hydroxybenzyl)-9,12,12-trimethyl-5,8-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-hydroxypropanamid **4(Disulfid)** unter Verwendung von 0.1 M $ZnCl_2$ in THF

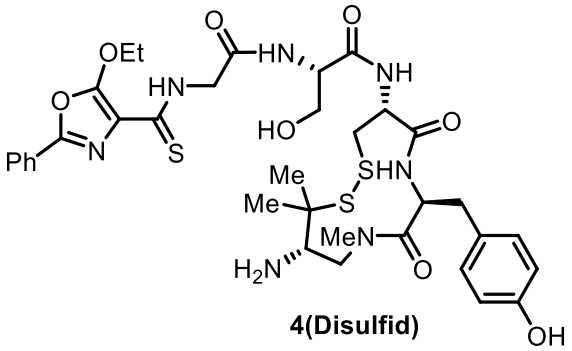


4(Disulfid)

Eine Lösung aus $ZnCl_2$ in trockenem THF (0.1 M, 0.32 mL, 0.032 mmol) wurde bei RT unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus **137** (3.0 mg, 3.2 µmol) in trockenem TFE (0.32 mL) gegeben und die Mischung für 22.5 h auf 40 °C erwärmt. Nach dieser Zeit

wurde kein Umsatz des Startmaterials festgestellt und die Reaktionsmischung wurde mit H_2O (1 mL) und EtOAc (5 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit H_2O (1 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, konnte **137** (3.0 mg, 3.2 µmol) wiedergewonnen werden.

(*S*)-*N*-((*4R,7S,11S*)-11-Amino-7-(4-hydroxybenzyl)-9,12,12-trimethyl-5,8-dioxo-1,2-dithia-6,9-diazacyclododecan-4-yl)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-hydroxypropanamid **4(Disulfid)** unter Verwendung von $ZnCl_2$ in TFE



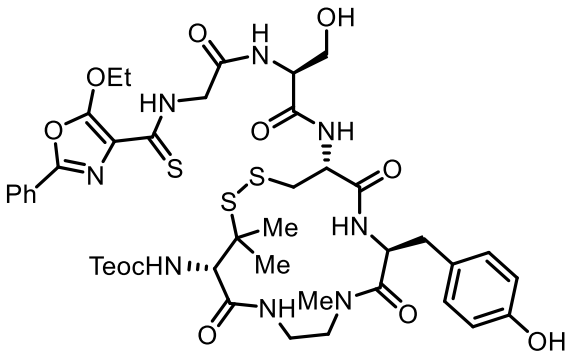
4(Disulfid)

Eine Lösung aus **137** (3.0 mg, 3.2 µmol) in trockenem TFE (0.32 mL) wurde zu *in vacuo* getrocknetem $ZnCl_2$ (4.4 mg, 0.032 mmol) bei RT unter Ar-Atmosphäre gegeben und die Mischung für 3.5 h auf 45 °C erwärmt. Nach dieser Zeit konnte ein vollständiger Umsatz des Startmaterials mittels LC-MS-Kontrolle festgestellt werden und die Reaktionsmischung wurde mit H_2O (1 mL) und EtOAc (5 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit H_2O (1 mL) und ges. *aq.* NaCl (1 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in EtOAc (1 mL) aufgenommen und mit 1 M *aq.* HCl (4 x 0.5 mL) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet und das gewünschte Amin **4(Disulfid)** konnte als hellgelber Feststoff (1.0 mg, 1.3 µmol, 40 %) erhalten werden.

LC-MS *(1-90 ACN 5min)***:** t_r = 2.69 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 394.5 (**4(Disulfid)**+2H$^+$), 788 (**4(Disulfid)**+H$^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{35}H_{45}N_7O_8S_3Na^+$: 810.2389; gefunden (ESI-MS$^+$): 810.2394.

2-Trimethylsilyl((*4S,11S,14R*)-14-((*S*)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-hydroxypropanamido)-11-(4-hydroxybenzyl)-3,3,9-trimethyl-5,10,13-trioxo-1,2-dithia-6,9,12-triazacyclopentadecan-4-yl)carbamat (**140**)



140

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.12 unter Verwendung des Pen-Me-Thioimidatdisulfids **139** (19 mg, 0.019 mmol), trockenem NEt_3 (0.03 mL, 0.2 mmol), H_2S (0.8 M in THF, 0.36 mL, 0.29 mmol) und trockenem MeOH (19 mL) bei RT für 4.5 h. Im Anschluss konnte kein Startmaterial mehr mittels LC-MS beobachtet werden und es wurde Aufarbeitung A) angewandt. Anschließend wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie auf Silica (Laufmittelgemisch: MeOH in EtOAc (0 %-> 1 %-> 3 %)) gereinigt, um das Thioamid **140** in Form eines hellgelben Feststoffes (12 mg, 0.012 mmol, 64 %) zu erhalten.

R_f (5 % MeOH in EtOAc) = 0.26.

LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.456 min (*m/z* (ESI-MS^+): 989 (**140**+H^+), 1011 (**140**+Na^+)).

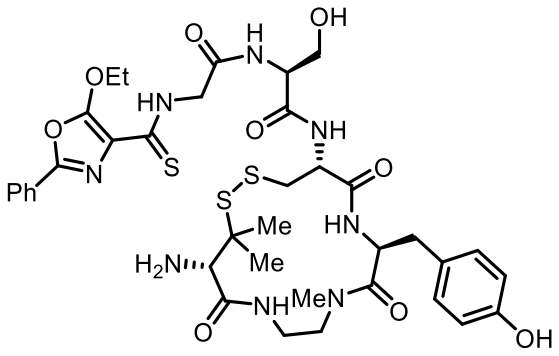
^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.35 (bs, 1H, CSNH), 7.91 (bs, 2H, CH(Ph)), 7.43 (bs, 3H, CH(Ph)), 6.99 (bs, 2H, CH(Ar)), 6.75 (bs, 1H, CH(Ar)), 4.59 (bs, 1H), 4.10 (bs, 3H), 3.75-3.70 (m, 1H), 3.59-3.55 (m, 1H), 3.44-3.40 (m, 1H), 3.13-3.08 (m, 1H), 2.99-2.84 (m, 3H), 2.38-2.32 (m, 1H), 2.24-2.19 (m, 1H), 2.04-1.96 (m, 1H), 1.72 (bs, 3H), 1.65-1.63 (m, 1H), 1.57-1.54 (m, 1H), 1.51-1.39 (m, 5H), 0.89-0.82 (m, 6H, C$\underline{H}_2$TMS), 0.07--0.04 (m, 9H, TMS) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{43}H_{60}N_8O_{11}S_3SiNa^+$: 1011.3211; gefunden (ESI-MS^+): 1011.3214.

Opt. Rot. α = 0.125° (*c* = 0.5, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 25.0°$.

Aufgrund der geringen Substanzmenge und der Verbreiterung der Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

(*S*)-*N*-((*4R,7S,14S*)-14-Amino-7-(4-hydroxybenzyl)-9,15,15-trimethyl-5,8,13-trioxo-1,2-dithia-6,9,12-triazacyclopentadecan-4-yl)-2-(2-(5-ethoxy-2-phenyloxazol-4-carbothioamido)acetamido)-3-hydroxypropanamid (**5(Disulfid)**)



5(Disulfid)

5(Disulfid) wurde analog zu **4(Disulfid)** mit $ZnCl_2$ in TFE hergestellt. Dazu wurden eine Lösung aus **140** (2.0 mg, 2.0 µmol) in trockenem TFE (0.21 mL) und getrocknetes $ZnCl_2$ (2.8 mg, 0.020 mmol) bei einer Reaktionszeit von 3.5 h und einer Temperatur von 40 °C verwendet. Nach der Aufarbeitung wurde das Amin **5(Disulfid)** hellgelber Feststoff (0.9 mg, 1.1 µmol, 53 %) gewonnen.

LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.090 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 845 (**5(Disulfid)**+H^+), 867 (**5(Disulfid)**+Na^+)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{37}H_{49}N_8O_9S_3^+$: 845.2785; gefunden (ESI-MS$^+$): 845.2784.

5.2.12 Bestimmung der Cu-Affinität mittels UV-VIS Titration

Titration einer Lösung aus Na_2BCS und $[Cu(MeCN)_4]PF_6$ mit MB OB3b

$[Cu(MeCN)_4]PF_6$ (0.38 mg, 1.0 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem MeCN (1000 µL) gelöst und die erhaltene 1.02 mM Lösung mit entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5) auf eine Konzentration von 102 µM verdünnt. Na_2BCS x H_2O (6.48 mg, 11.1 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5, 2000 µL) gelöst, um eine 5.56 mM Lösung zu erhalten. **MB OB3b** (0.35 mg, 0.30 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5, 100 µL) gelöst, um eine 3.0 mM Lösung zu erhalten.

Vor Beginn der Titration wurden 200 µL der 102 µM $[Cu(MeCN)_4]PF_6$-Lösung mit 1800 µL der 5.56 mM Na_2BCS-Lösung unter Ar-Atmosphäre gemischt. Im Anschluss wurden 1.5 mL der erhaltenen Lösung unter Ar-Atmosphäre in eine Quartzküvette

überführt, diese mit einem Septum verschlossen, schrittweise die 3.0 mM **MB OB3b**-Lösung hinzugegeben und bei den gewünschten Konzentrationen nach 5 min Rühren ein UV-VIS Spektrum aufgenommen. Die auftretende Volumenvergößerung durch die hinzugefügte **MB OB3b**-Lösung wurde aufgrund des geringen Volumens vernächlassigt.

Titration einer Lösung aus MB OB3b und $[Cu(MeCN)_4]PF_6$ mit Na_2BCS

$[Cu(MeCN)_4]PF_6$ (0.38 mg, 1.0 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem MeCN (1000 µL) gelöst und die erhaltene 1.02 mM Lösung mit entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5) auf eine Konzentration von 102 µM verdünnt. $Na_2BCS \times H_2O$ (52.4 mg, 89.9 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5, 200 µL) gelöst, um eine 450 mM Lösung zu erhalten. **MB OB3b** (0.14 mg, 0.12 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5, 1000 µL) gelöst und die erhaltene 0.12 mM Lösung mit entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5) auf eine Konzentration von 6.15 µM verdünnt.

Vor Beginn der Titration wurden 114 µL der 102 µM $[Cu(MeCN)_4]PF_6$-Lösung mit 1886 µL der 6.15 µM **MB OB3b**-Lösung unter Ar-Atmosphäre gemischt. Im Anschluss wurden 1.5 mL der erhaltenen Lösung unter Ar-Atmosphäre in eine Quartzküvette überführt, diese mit einem Septum verschlossen, schrittweise die 450 mM Na_2BCS-Lösung hinzugegeben und bei den gewünschten Konzentrationen nach 5 min Rühren ein UV-VIS Spektrum aufgenommen. Die auftretende Volumenvergößerung durch die hinzugefügte Na_2BCS-Lösung wurde aufgrund des geringen Volumens vernächlassigt.

Titration einer Lösung aus Na_2BCA und $[Cu(MeCN)_4]PF_6$ mit MB OB3b

$[Cu(MeCN)_4]PF_6$ (0.38 mg, 1.0 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem MeCN (1000 µL) gelöst und die erhaltene 1.02 mM Lösung mit entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5) auf eine Konzentration von 102 µM verdünnt. Na_2BCA (8.62 mg, 22.2 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5, 2000 µL) gelöst, um eine 11.1 mM Lösung zu erhalten. **MB OB3b** (0.35 mg, 0.30 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5, 100 µL) gelöst, um eine 3.0 mM Lösung zu erhalten.

Vor Beginn der Titration wurden 200 µL der 102 µM $[Cu(MeCN)_4]PF_6$-Lösung mit 1800 µL der 1.11 mM Na_2BCA-Lösung unter Ar-Atmosphäre gemischt. Im Anschluss

wurden 1.5 mL der erhaltenen Lösung unter Ar-Atmosphäre in eine Quartzküvette überführt, diese mit einem Septum verschlossen, schrittweise die 3.0 mM **MB OB3b**-Lösung hinzugegeben und bei den gewünschten Konzentrationen nach 5 min Rühren ein UV-VIS Spektrum aufgenommen. Die auftretende Volumenvergößerung durch die hinzugefügte **MB OB3b**-Lösung wurde aufgrund des geringen Volumens vernächlassigt.

Titration einer Lösung aus MB OB3b und $[Cu(MeCN)_4]PF_6$ mit Na_2BCA

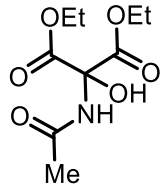
$[Cu(MeCN)_4]PF_6$ (0.38 mg, 1.0 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem MeCN (1000 µL) gelöst und die erhaltene 1.02 mM Lösung mit entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5) auf eine Konzentration von 102 µM verdünnt. Na_2BCA (35.0 mg, 90.1 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5, 400 µL) gelöst, um eine 230 mM Lösung zu erhalten. **MB OB3b** (0.14 mg, 0.12 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5, 1000 µL) gelöst und die erhaltene 0.12 mM Lösung mit entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5) auf eine Konzentration von 6.15 µM verdünnt.

Vor Beginn der Titration wurden 114 µL der 102 µM $[Cu(MeCN)_4]PF_6$-Lösung mit 189 µL der 6.15 µM **MB OB3b**-Lösung unter Ar-Atmosphäre gemischt und auf 2000 µL mit entgastem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7.5) aufgefüllt. Im Anschluss wurden 1.5 mL der erhaltenen Lösung unter Ar-Atmosphäre in eine Quartzküvette überführt, diese mit einem Septum verschlossen, schrittweise die 230 mM Na_2BCA-Lösung hinzugegeben und bei den gewünschten Konzentrationen nach 5 min Rühren ein UV-VIS Spektrum aufgenommen. Die auftretende Volumenvergößerung durch die hinzugefügte Na_2BCA-Lösung wurde aufgrund des geringen Volumens vernächlassigt.

5.3 Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu MB OB3b

5.3.1 Synthese des Pyr-substituierten Oxazols durch Funktionalisierung eines 2-Me-Oxazols

2-Acetamido-2-hydroxydiethylmalonat (**160**)



160

Es wurde eine Vorschrift zur Oxygenierung von Adamantan verwendet.[114]

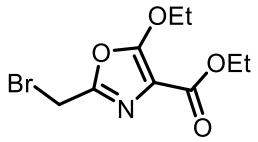
Eine frisch hergestellte DMDO-Lösung (0.04 M in Aceton, 5.3 mL, 0.21 mmol) wurde zu einer Lösung aus dem Me-Oxa(OEt)-OEt **159** (77 mg, 0.39 mmol) in trockenem Aceton bei RT gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 18 h unter Lichtausschluss bei derselben Temperatur gerührt und das Lösungsmittel im Anschluss bei RT unter vermindertem Druck entfernt. Dies lieferte ein Farbloses Öl (71 mg, 0.31 mmol, 79 %), das den NMR-Spektren zufolge nicht aus dem gewünschten Produkt **161** bestand, sondern das oxidative Zersetzungsprodukt **160** nach Ringöffnung von **159** enthielt.

LC-MS (*UPLC-MS-lang*): *tr* = 6.02 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 234 (M+H$^+$), 256 (M+Na$^+$)), 489 (2M+Na$^+$).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.31 (bs, 1H, NH), 4.31 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 2.06 (s, 3H, Me), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.2 (Cq), 167.0 (Cq), 79.8 (Cq), 63.7 (CH_2), 22.9 (CH_3), 13.9 (CH_3) ppm.

2-(Bromomethyl)-5-ethoxyoxazol-4-carbonsäureethylester (**163**)



163

Die Synthese erfolgte nach einer leicht abgewandelten Version der Literaturvorschrift zur Bromierung eines Diphenyl-substitutierten Methyl-oxazols.[200]

Me-Oxa(OEt)-OEt **159** (106 mg, 0.532 mmol), wurde bei RT unter Ar-Atmoshphäre in trockenem CCl_4 (2.3 mL) gelöst. Zu der Lösung wurden nacheinander AIBN (15 mg, 0.090 mmol) und NBS (190 mg, 1.06 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel bei RT entfernt und der Rückstand in CH_2Cl_2 (5 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit H_2O (2 mL) und ges. *aq.* NaCl (2 mL) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer wurde das erhaltene gelbbraune Öl mittel Säulenchromatographie auf Silica unter Verwendung des Laufmittelgemisches PE/EE (4/1->3/1->2/1) gereinigt. Dies lieferte **163** als hellgelbes Öl (35 mg, 0.13 mmol, 24 %).

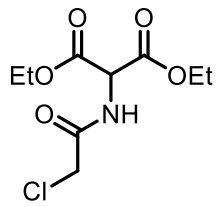
R_f (CH_2Cl_2/MeOH (30/1)) = 0.63.

LC-MS (*UPLC-MS-lang*): *tr* = 6.94 min (*m/z* (ESI-MS^+): 278/280 ($M+H^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.53 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.38-4.32 (m, 4H, $OC\underline{H}_2CH_3$, CH_2Br), 1.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

5.3.2 Synthese von 158 durch Funktionalisierung eines Chloracetamids

2-(2-Chloracetamido)diethylmalonat (**164**)



164

Die Synthese von **164** erfolgte nach der Vorschrift zur Herstellung des verwandten Benzamids **21**.[54]

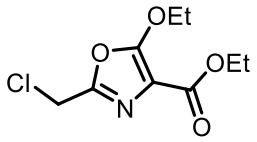
Hydrochlorid **49** (5.02 g, 23.7 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre bei RT in trockenem CH_2Cl_2 (86 mL) suspendiert und trockenes DIPEA (8.1 mL, 47 mmol) wurde hinzugefügt. Die resultierende Lösung wurde für 10 min gerührt, bevor Chloracetylchlorid (1.9 mL, 24 mmol) tropfenweise zugegeben wurde. Die Reaktionsmischung wurde für 40 min bei derselben Temperatur gerührt, dann mit CH_2Cl_2 (100 mL) verdünnt und mit 1 M *aq.* HCl (2 x 100 mL), ges. *aq.* $NaHCO_3$ (100 mL) und ges. *aq.* NaCl (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Dadurch konnte das Amid **164** als farbloser Feststoff (5.46 g, 21.7 mmol, 92 %) erhalten werden.

R_f (CH_2Cl_2/MeOH (30/1)) = 0.80.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.50 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, NH), 5.13 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, C<u>H</u>NH), 4.35-4.22 (m, 4H, OC<u>H$_2$</u>CH$_3$), 4.10 (s, 2H, CH_2Cl), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, OCH$_2$C<u>H$_3$</u>) ppm.

Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.[201]

2-(Chlormethyl)-5-ethoxyoxazol-4- carbonsäureethylester (**165**)



165

Die Herstellung von **165** wurde nach der Vorschrift zur Synthese von 2-Me-Oxa(OEt)-OEt **159** durchgeführt. [110]

Zu einer Lösung aus **164** (915 mg, 3.62 mmol) in trockenem $CHCl_3$ (4.2 mL) unter Ar-Atmosphäre wurde P_4O_{10} (3.15 g, 22.2 mmol) portionsweise hinzugefügt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung verschlossen und für 21 h auf 60 °C erhitzt. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion auf 0 °C gekühlt und durch langsame Zugabe von H_2O (100 mL) und CH_2Cl_2 (100 mL) beendet. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (2 x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (20 mL) und ges. aw. NaCl (20 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene braune ölige Feststoff (700 mg) mittels ^{1}H-NMR Spektroskopie untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass dieser zu 64 % aus **165** und zu 36 % aus **164** bestand. Diese Mischung wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet.

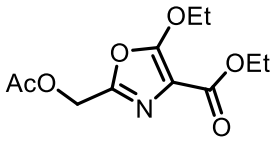
R_f (CH_2Cl_2/MeOH (30/1)) = 0.86.

LC-MS (*DEFAULT.M*): *tr* = 1.116 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 256 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.57-4.51 (m, 4H, OC<u>H</u>$_2$CH$_3$, CH$_2$Cl), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OC<u>H</u>$_2$CH$_3$), 1.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH$_2$C<u>H</u>$_3$), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH$_2$C<u>H</u>$_3$) ppm.

Da nur eine Mischung aus **165** und **164** erhalten wurde, wurde keine weitere Analytik durchgeführt. Sie stimmt mit der Literatur überein.[105]

2-(Acetoxymethyl)-5-ethoxyoxazol-4- carbonsäureethylester (**284**)



284

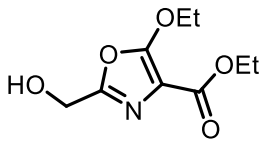
Es wurde eine Vorschrift zur Substitution des Chlorid eines ähnlichen Chlormethyloxazols verwendet.[116]

Die Mischung aus **165** und **164** (532 mg) und NaOAc (564 mg, 6.88 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in Ac_2O (7.2 mL) und AcOH (7.2 mL) gelöst und für 23 h auf 90 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Reaktionsmischung mit H_2O (20 mL) verdünnt und mit CH_2Cl_2 (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* $NaHCO_3$ (3 x 21 mL) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Dies lieferte eine Mischung aus **284** (64 %) und **164** (36 %) als braunen Feststoff (582 mg).

R_f (CH_2Cl_2/MeOH (30/1)) = 0.69.

Da nur eine Mischung aus **284** und **164** erhalten wurde, wurde auch hier keine weitere Analytik durchgeführt. Sie stimmt mit der Literatur überein.[105]

2-(Hydroxymethyl)-5-ethoxyoxazol-4- carbonsäureethylester (**161**)



161

Es wurde eine Vorschrift zur Spaltung eines ähnlichen Acetoxymethyloxazols verwendet.[116]

Eine Lösung der Mischung aus **284** und **164** (582 mg) in trockenem EtOH (8.7 mL) unter Ar-Atmosphäre wurde auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde trockenes K_2CO_3 (313 mg, 2.26 mmol) hinzugefügt und die Reaktionsmischung auf RT erwärmt. Nach 5 h wurde kein Startmaterial mehr per LC-MS detektiert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in ges. *aq.* NaCl (25 mL) aufgenommen und mit CH_2Cl_2 (3 x 125 mL) extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel PE/EE (1/1-> 1/2-> 1/3)). Damit konnte der gewünschte Alkohol **161** als hellgelbes Öl (150 mg, 0.697 mmol, 25 % über drei Stufen) erhalten werden.

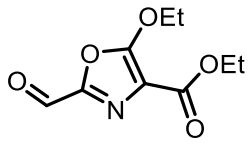
R_f (PE/EE (1/4)) = 0.34.

LC-MS (*DEFAULT.M*): *tr* = 0.684 min (*m/z* (ESI-MS^+): 238 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.63 (s, 2H, $C\underline{H}_2OH$), 4.51 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 2.07 (bs, 1H, $CH_2O\underline{H}$), 1.48 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.[105]

5-Ethoxy-2-formyloxazol-4-carbonsäureethylester (**158**)



158

Es wurde eine Vorschrift zur Oxidation eines ähnlichen Hydroxymethyloxazols verwendet.[116]

Zu einer Lösung aus trockenem DMSO (0.33 mL, 4.6 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.85 mL) wurde bei-78 °C unter Ar-Atmosphäre eine Lösung aus Oxalylchlorid (0.21 mL, 2.3 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (15 mL) tropfenweise hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 45 min bei derselben Temperatur gerührt, bevor eine Lösung aus **161** (416 mg, 1.93 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (3.1 mL) hinzugetropft wurde. Die erhaltene leicht gelbe Suspension wurde für 1 h weiter gerührt und dann trockenes NEt_3 (1.6 mL, 12 mmol) langsam zur Mischung gegeben. Nach einer weiteren Stunde Reaktionszeit wurde kein Startmaterial mehr detektiert und die Reaktion wurde bei 0 °C durch Zugabe von H_2O (5 mL) und ges. *aq.* $NaHCO_3$ (7 mL) beendet. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel bei höchstens 35 °C unter vermindertem Druck entfernt und der Rotationsverdampfer mit N_2 belüftet. Der Rückstand wurde in Et_2O (100 mL) aufgenommen und die organische Phase wurde

erneut mit H_2O (3 x 10 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer wie zuvor beschrieben konzentriert. Dies ergab den Aldehyd **158** als hellgelben Feststoff (339 mg, 1.59 mmol, 83 %), der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet und unter Argon bei -20 °C gelagert wurde.

R_f (PE/EE (1/3)) = 0.73.

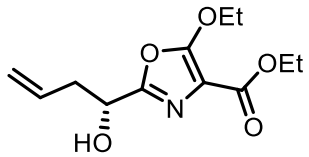
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.53 (s, 1H, CHO), 4.67 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 1.55 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.[105]

5.3.3 Asymmetrische Allylierung von 158 zum Homoallylalkohol 166

5.3.3.1 Ti-katalysierte KECK-Allylierung mit BINOL als chiralem Liganden

(*R*)-5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**166**) unter Verwendung von Ti(O*i*Pr)$_4$



166

Die Synthese erfolgte der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.13 unter Verwendung von 4 Å-Molekularsieb (57 mg) in trockenem CH_2Cl_2 (0.45 mL), Ti(O*i*Pr)$_4$ (0.01 mL, 0.04 mmol), *(R)*-BINOL (11 mg, 0.037 mmol), Aldehyd **158** (46 mg, 0.22 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.30 mL) und $AllBu_3Sn$ (0.07 mL, 0.2 mmol) bei einer Reaktionszeit von 165 h. **166** wurde als hellgelbes Öl erhalten (21 mg, 0.082 mmol, 38 %, 0 % *ee*).

R_f (PE/EE: 1/1) = 0.33.

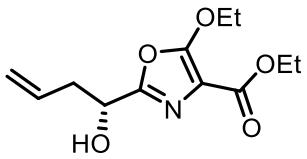
LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 0.849 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 278 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.86-5.76 (m, 1H, CH (Alken)), 5.20-5.14 (m, 2H, CH_2 (Alken)), 4.77 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, OCH), 4.50 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 2.72-2.60 (m, 2H, CH_2), 1.48 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 161.6 (Cq), 161.5 (Cq), 153.9 (Cq), 132.4 (CH), 119.6 (CH_2), 107.2 (Cq), 70.2 (CH), 67.1 (CH_2), 60.9 (CH_2), 39.6 (CH_2), 15.1 (CH_3), 14.6 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{12}H_{17}NO_5Na^+$: 278.1004; gefunden (ESI-MS$^+$): 278.1006.

R)-5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**166**) unter Verwendung von Ti(O*i*Pr)$_4$/TiCl$_4$ (3/1)

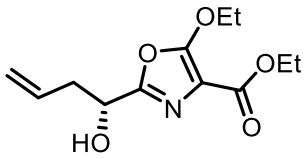


166

Die Synthese erfolgte nach einer leichten Abwandlung der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.13 unter Verwendung von 4 Å-Molekularsieb (78 mg) in trockenem CH_2Cl_2 (0.23 mL), einer Lösung aus Ti(O*i*Pr)$_4$ (11 µL, 0.038 mmol) und $TiCl_4$ (1.4 µL, 0.013 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.40 mL), *(R)*-BINOL (15 mg, 0.050 mmol), Aldehyd **158** (63 mg, 0.30 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.40 mL) und $AllBu_3Sn$ (0.10 mL, 0.30 mmol) bei einer Reaktionszeit von 136 h. **166** wurde als hellgelbes Öl erhalten (45 mg, 0.18 mmol, 56 %, 55 % *ee*).

Die Analytik stimmte mit der vorherigen überein.

R)-5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**166**) unter Verwendung von Ti(O*i*Pr)$_4$/TiCl$_4$ (1/1)

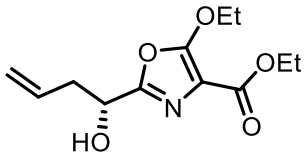


166

Die Synthese erfolgte nach einer leichten Abwandlung der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.13 unter Verwendung von 4 Å-Molekularsieb (62 mg) in trockenem CH_2Cl_2 (0.19 mL), einer Lösung aus Ti(O*i*Pr)$_4$ (5.9 µL, 0.020 mmol) und $TiCl_4$ (2.2 µL, 0.020 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.32 mL), *(R)*-BINOL (12 mg, 0.040 mmol), Aldehyd **158** (50 mg, 0.24 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.32 mL) und $AllBu_3Sn$ (0.08 mL, 0.2 mmol) bei einer Reaktionszeit von 90 h. **166** wurde als hellgelbes Öl erhalten (28 mg, 0.11 mmol, 47 %, 20 % *ee*).

Die Analytik stimmte mit der vorherigen überein.

R)-5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**166**) unter Verwendung von $Ti(O\textit{i}Pr)_4/TiCl_4$ (1/3)

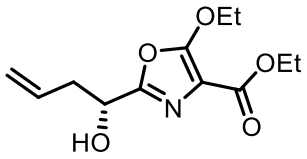


166

Die Synthese erfolgte nach einer leichten Abwandlung der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.13 unter Verwendung von 4 Å-Molekularsieb (62 mg) in trockenem CH_2Cl_2 (0.19 mL), einer Lösung aus $Ti(O\textit{i}Pr)_4$ (3.0 µL, 0.010 mmol) und $TiCl_4$ (3.3 µL, 0.030 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.32 mL), *(R)*-BINOL (12 mg, 0.040 mmol), Aldehyd **158** (50 mg, 0.24 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.32 mL) und $AllBu_3Sn$ (0.08 mL, 0.2 mmol) bei einer Reaktionszeit von 89 h. **166** wurde als hellgelbes Öl erhalten (30 mg, 0.12 mmol, 51 %, 8 % *ee*).

Die Analytik stimmte mit der vorherigen überein.

R)-5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**166**) unter Verwendung von $TiCl_4$

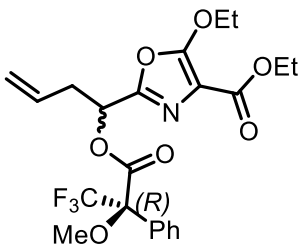


166

Die Synthese erfolgte nach einer leichten Abwandlung der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.13 unter Verwendung von 4 Å-Molekularsieb (62 mg) in trockenem CH_2Cl_2 (0.19 mL), einer Lösung aus $TiCl_4$ (4.4 µL, 0.040 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.32 mL), *(R)*-BINOL (12 mg, 0.040 mmol), Aldehyd **158** (50 mg, 0.24 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.32 mL) und $AllBu_3Sn$ (0.08 mL, 0.2 mmol) bei einer Reaktionszeit von 89 h. **166** wurde als hellgelbes Öl erhalten (40 mg, 0.16 mmol, 67 %, 11 % *ee*).

Die Analytik stimmte mit der vorherigen überein.

5-Ethoxy-2-(1-(((*R*)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropanoyl)oxy)but-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**170**)



170

Die Synthese erfolgte nach einer abgewandelten Version der Literaturvorschrift[117] zur Synthese von MOSHER-Estern.

166 (10 mg, 0.039 mmol) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (0.39 mL) unter Ar-Atmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Im Anschluss wurden nacheinander NEt_3 (0.02 mL, 0.2 mmol), 4-DMAP (0.5 mg, 0.004 mmol) und *(S)*-α-Methoxy-α-(trifluormethyl)phenylacetylchlorid (8.8 µL, 0.047 mmol) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und für 20 h gerührt, bevor die Reaktion mit H_2O (0.5 mL) beendet wurde. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (2 x 1 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M *aq.* HCl (2 x 0.5 mL) und ges. *aq.* $NaHCO_3$ (3 x 0.5 mL) gewaschen und über Na_2SO4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mithilfe von Säulenchromatographie auf Kieselgel (Eluent: PE/EE 5/1) gereinigt, um **170** als farbloses Öl (11 mg, 0.023 mmol, 60 %) zu erhalten.

Analytik des prädominanten *(R)*-Homoallylesters:

R_f (PE/EE: 3/1) = 0.43.

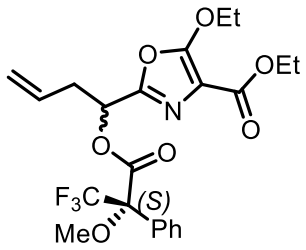
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 7.51-7.43 (m, 6H, Ar-H), 6.11 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, OCH), 5.74-5.63 (m, 1H, CH (Alken)), 5.10-5.03 (m, 2H, CH_2 (Alken)), 4.46 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 3.47 (s, 3H, OMe), 2.83-2.66 (m, 2H, CH_2), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

Das ^{1}H-NMR enthält zusätzlich Signale des entsprechenden *(S)*-Homoallylester.

HRMS: berechnet m/z für $C_{22}H_{24}NO_7F_3Na^+$: 494.1403; gefunden (ESI-MS$^+$): 494.1405.

Da der MOSHER-Ester zur Bestimmung der Konfiguration von **166** hergestellt wurde, wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

5-Ethoxy-2-(1-(((*S*)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropanoyl)oxy)but-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**171**)



171

Die Synthese erfolgte analog zur Herstellung des *(R)*-MOSHER-Ester **170**.

Es wurden **166** (10 mg, 0.039 mmol), trockenes CH_2Cl_2 (0.39 mL), NEt_3 (0.02 mL, 0.2 mmol), 4-DMAP (0.5 mg, 0.004 mmol) und *(R)*-α-Methoxy-α-(trifluormethyl)phenylacetylchlorid (8.8 µL, 0.047 mmol) verwendet. Nach chromatographischer Reinigung wurde **171** als farbloses Öl (10 mg, 0.021 mmol, 54 %) erhalten.

Analytik des prädominanten *(R)*-Homoallylesters:

R_f (PE/EE: 1/1) = 0.79.

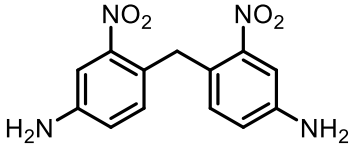
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 7.50-7.43 (m, 6H, Ar-H), 6.11 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, OCH), 5.85-5.76 (m, 1H, CH (Alken)), 5.22-5.16 (m, 2H, CH_2 (Alken)), 4.36 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.21 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 3.50 (s, 3H, OMe), 2.87-2.74 (m, 2H, CH_2), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

Das ^{1}H-NMR enthält zusätzlich Signale des entsprechenden *(S)*-Homoallylesters.

Da der MOSHER-Ester zur Bestimmung der Konfiguration von **166** hergestellt wurde, wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

5.3.3.2 Ti-katalysierte KECK-Allylierung mithilfe eines verbrückenden Liganden

4,4'-Methylenbis(3-nitroanilin) (**285**)



285

Die Synthese erfolgte unter einer leichten Abwandlung der Literatur bekannten Vorschrift.[119]

4,4'-Methylendianilin **175** (5.00 g, 25.2 mmol) wurde in konz. H_2SO_4 (55 mL) gelöst und auf -20 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde tropfenweise über 40 min eine Mischung aus konz. HNO_3 und konz. H_2SO_4 (3.6 mL/9.0 mL) so zugegeben, dass die Temperatur des Reaktionsgemisches unter 5 °C blieb. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion für weitere 30 min gerührt und dann auf Eis (200 g) gegeben. Nach 12 h wurde ein farbloser Niederschlag abfiltriert und das Filtrat wurde vorsichtig mit Na_2CO_3 neutralisiert. Der dabei enstandene gelbe Niederschlag wurde abfiltriert, mit H_2O (3 x 20 mL) gewaschen und aus EtOH umkristallisiert. Dies lieferte **285** als orange-gelben Feststoff (4.06 g, 14.1 mmol, 56 %).

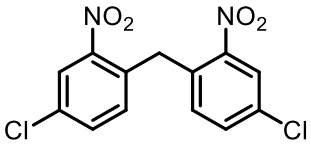
R_f (PE/EE: 1/1) = 0.15.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 7.13 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH(*o*-NO_2)), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH(*m*-NO_2)), 6.78 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 2H, CH(*p*-NO_2)), 5.64 (s, 4H, NH_2), 4.13 (s, 2H, CH_2) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, DMSO) δ = 149.3 (Cq), 148.3 (Cq), 132.1 (CH), 120.4 (Cq), 118.6 (CH), 108.4 (CH), 33.2 (CH_2) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{13}H_{12}N_4O_4Na^+$: 311.0756; gefunden (ESI-MS^+): 311.0753.

Bis(4-chlor-2-nitrophenyl)methan (**286**)



286

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die in der Literatur bekannten Vorschrift.[120]

Zu einer Suspension aus trockenem $CuCl_2$ (2.24 g, 16.7 mmol) in trockenem MeCN (120 mL) unter Ar-Atmosphäre wurden bei 0 °C nacheinander *tert*-Butylnitrit (2.6 mL, 20 mmol) auf einmal und eine Lösung aus 4,4'-Methylenbis(3-nitroanilin) **285** (2.00 g, 6.94 mmol) in trockenem MeCN (120 mL) tropfenweisen über 1 h hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde über 17 h langsam auf RT gebracht und im Anschluss unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde in CH_2Cl_2 (50 mL) aufgenommen, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie auf Silica unter Verwendung des Laufmittelgemisches PE/EE (20/1-> 10/1) gereinigt, um das gewünschte Produkt **286** (1.34 g, 4.08 mmol, 59 %) als hellgelben Feststoff zu isolieren.

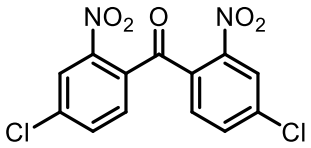
R_f (PE/EE: 3/1) = 0.45.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.05 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, CH(*o*-NO_2)), 7.52 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 2H, CH(*p*-NO_2)), 7.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH(*m*-NO_2)), 4.57 (s, 2H, CH_2) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 149.4 (Cq), 134.1 (Cq), 133.7 (CH), 133.1 (CH), 132.0 (Cq), 125.6 (CH), 35.4 (CH_2) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4^+$: 325.9861; gefunden (EI-MS$^+$): 325.9866.

Bis(4-chlor-2-nitrophenyl)methanon (**176**)



176

Die Synthese erfolgte unter einer leichten Abwandlung der aus der Literatur bekannten Vorschrift. [120]

Diarylmethan **286** (1.28 g, 3.90 mmol) wurde in AcOH (25.5 mL) gelöst und unter Rückfluss erhitzt. Über 45 min wurde portionsweise CrO_3 (2.04 g, 20.4 mmol) hinzugefügt und die Reaktionsmischung nach vollendeter Zugabe für weitere 2.5 h unter

Rückfluss erhitzt. Danach wurde diese auf RT gekühlt,über Kieselgur gefiltert und mit CH_2Cl_2 eluiert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck auf ein Volumen von 5 mL konzentriert und durch Zugabe von H_2O verdünnt, bis ein Niederschlag auftrat. Dieser wurde abgetrennt, mit H_2O (2 x 10 mL) gewaschen und aus einer Mischung aus Aceton und EtOH umkristallisiert. **176** wurde dadurch als farbloser Feststoff (807 mg, 2.37 mmol, 61 %) gewonnen.

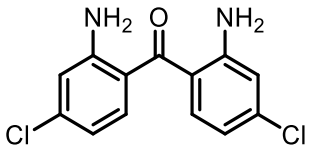
R_f (PE/EE: 3/1) = 0.31.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.95 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, CH(*o*-NO_2)), 7.67 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 2H, CH(*p*-NO_2)), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH(*m*-NO_2)) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 188.0 (Cq), 148.7 (Cq), 139.1 (Cq), 133.3 (CH), 131.7 (CH), 130.6 (Cq), 125.0 (CH) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{13}H_6Cl_2N_2O_5Na^+$: 362.9551; gefunden (ESI-MS$^+$): 362.9554.

Bis(2-amino-4-chlorphenyl)methanon (**287**)



287

Die Synthese erfolgte nach einer literaturbekannten Vorschrift. [121]

Eine Lösung aus Benzophenon **176** (744 mg, 2.18 mmol) in AcOH (14.8 mL) und H_2O (1.8 mL) wurde auf 100 °C erhitzt und Fe-Pulver (1.31 g, 23.4 mmol) wurde über 1 h portionsweise hinzugefügt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung für 30 min weiter erhitzt, dann auf RT gekühlt und über Kieselgur filtriert. Nach Elution mit AcOH (70 mL) wurde das Filtrat mit H_2O (140 mL) verdünnt, der Niederschlag abfiltriert, dieser mit H_2O (2 x 50 mL) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Somit wurde **287** als gelber Feststoff (420 mg, 1.49 mmol, 69 %) erhalten.

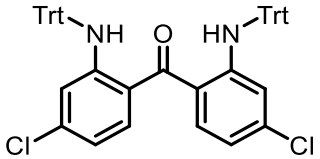
R_f (PE/EE: 3/1) = 0.29.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH(*m*-NH_2)), 6.72 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, CH(*o*-NH_2)), 6.60 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 2H, CH(*p*-NH_2)), 5.52 (bs, 4H, NH_2) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 198.5 (Cq), 150.5 (Cq), 139.4 (Cq), 134.5 (CH), 119.0 (Cq), 116.5 (CH), 116.4 (CH) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{13}H_{10}Cl_2N_2O^+$: 280.0170; gefunden (EI-MS$^+$): 280.0182.

Bis(4-chlor-2-(tritylamino)phenyl)methanon (**177**)



177

Benzophenon **287** (50 mg, 0.18 mmol) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (1.9 mL) unter Ar-Atmosphäre bei RT gelöst. Zu der Lösung wurden nacheinander NEt_3 (0.18 mL, 1.3 mmol) und portionsweise TrtCl (209 mg, 0.747 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung wurde für 2.5 h bei RT gerührt. Nachdem kein Startmaterial mehr per DC nachgewiesen werden konnte, wurde die Reaktion mit CH_2Cl_2 (30 mL) verdünnt und mit H_2O (4 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtritert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der erhaltene grüne Feststoff wurde säulenchromatographisch auf Silica (Eluent: PE/EE (20/1-> 15/1-> 10/1)) gereinigt, damit das doppelt Trityl-geschützte Produkt **177** als gelber Feststoff erhalten werden konnte (90 mg, 0.12 mmol, 67 %).

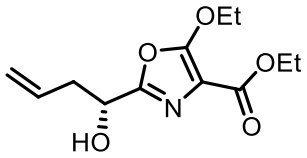
R_f (PE/EE: 3/1) = 0.55.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.08 (s, 2H, NH), 7.35-7.19 (m, 32H, CH(Trt), CH(*m*-NHTrt)), 6.44 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 2H, CH(*p*- NHTrt)), 6.22 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H, CH(*o*-NHTrt)) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 199.5 (Cq), 149.6 (Cq), 144.8 (Cq), 138.5 (Cq), 134.5 (CH), 129.0 (CH), 128.3 (CH), 127.2 (CH), 120.2 (Cq), 116.8 (CH), 115.2 (CH), 71.7 (Cq) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{51}H_{38}Cl_2N_2ONa^+$: 787.2259; gefunden (ESI-MS$^+$): 787.2255.

(R)-5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**166**) unter Verwendung von 5 mol% **177**



166

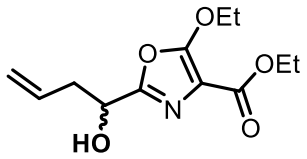
Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.13 unter Verwendung von 4 Å-Molekularsieb (124 mg), trockenem CH_2Cl_2 (0.97 mL), $Ti(OiPr)_4$ (0.02 mL, 0.05 mmol), **177** (18 mg, 0.023 mmol), *(R)*-BINOL (14 mg, 0.047 mmol), Aldehyd **158** (100 mg, 0.469 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (0.65 mL) und $AllBu_3Sn$ (0.15 mL, 0.48 mmol) bei einer Reaktionszeit von 68 h. **166** wurde als hellgelbes Öl erhalten (50 mg, 0.20 mmol, 42 %, 11 % *ee*).

Opt. Rot. α = 0.145° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 14.5$ °.

Die restliche Analytik stimmte mit der vorherigen.

5.3.3.3 *In-vermittelte asymmetrische Allylierung*

5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**180**)



180

Die Synthese erfolgte nach der Literaturvorschrift[122] zur Allylierung von Cephalosporinen.

Zn-Staub (154 mg, 2.35 mmol) und Allylbromid (0.08 mL, 0.9 mmol) wurden zu einer Lösung aus Aldehyd **158** (100 mg, 0.469 mmol) in THF (4.7 mL) gegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und ges. *aq.* NH_4Cl (2.4 mL) langsam hinzugefügt. Im Anschluss wurde für 30 min gerührt und die Mischung über Kieselgur filtriert. Das Filtrat wurde mit EtOAc (20 mL) und 2 M *aq.* HCl (10 mL) verdünnt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. *aq.* NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie auf

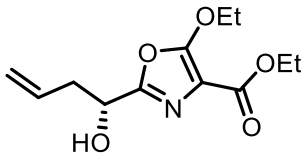
Kieselgel gereinigt (Laufmittelgemisch: PE/EE 1/1), um **180** als gelbes Öl (68 mg, 0.27 mmol, 57 %) zu erhalten.

R_f (PE/EE: 1/1) = 0.33.

Chirale HPLC: CHIRALCEL® OD-H mit 97.5/2.5 Hex/*i*PrOH (1 mL/min): $t_R(1)$ = 25.4 min, $t_R(2)$ = 29.0 min.

Die restliche Analytik stimmte mit der des enantiomerenangereicherten Produkts überein.

(R)-5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**166**) unter Verwendung von (-)Cinchonidin **181**



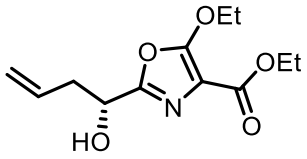
166

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.14 unter Verwendung von In-Staub (27 mg, 0.24 mmol), **181** (69 mg, 0.24 mmol), THF (1.5 mL), Allylbromid (0.06 mL, 0.7 mmol), einer Lösung aus **158** (50 mg, 0.24 mmol) in THF (2.5 mL) und 1 M *aq.* HCl (10 mL). Die Reaktion wurde 15.5 h gerührt und **166** wurde als hellgelbes Öl (26 mg, 0.10 mmol, 44 %, 46 % *ee*) erhalten.

Chirale HPLC: CHIRALCEL® OD-H mit 97.5/2.5 Hex/*i*PrOH (1 mL/min): $t_R(1)$ = 25.6 min (Hauptenantiomer: 72.9 %), $t_R(2)$ = 29.0 min (Nebenenantiomer: 27.1 %).

Die restliche Analytik stimmte mit der vorherigen.

(R)-5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**166**) unter Verwendung von (-)Cinchonidin **181** und Pyridin

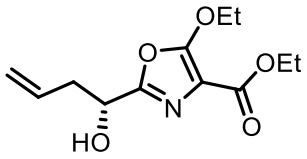


166

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.14 unter Verwendung von In-Staub (54 mg, 0.47 mmol), **181** (138 mg, 0.469 mmol) zusammen mit Pyridin (0.04 mL, 0.5 mmol), THF (2.5 mL), Allylbromid (0.04 mL, 0.5 mmol), einer Lösung aus

158 (50 mg, 0.24 mmol) in THF (0.9 mL) und 1 M *aq.* HCl (10 mL). Die Reaktion wurde 1.5 h gerührt und **166** wurde als gelbes Öl (28 mg, 0.11 mmol, 47 %, 31 % *ee*) erhalten.
Chirale HPLC: CHIRALCEL® OD-H mit 97.5/2.5 Hex/*i*PrOH (1 mL/min): $t_R(1)$ = 25.3 min (Hauptenantiomer: 65.3 %), $t_R(2)$ = 29.5 min (Nebenenantiomer: 34.7 %).
Die restliche Analytik stimmte mit der vorherigen.

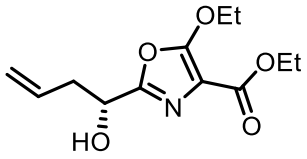
(R)-5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**166**) unter Verwendung von *(R)*-BINOL



166

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.14 unter Verwendung von In-Staub (15 mg, 0.13 mmol), ***(R)*-BINOL** (37 mg, 0.13 mmol), THF (0.75 mL), Allylbromid (0.03 mL, 0.4 mmol), einer Lösung aus **158** (25 mg, 0.12 mmol) in THF (1.25 mL) und 1 M *aq.* HCl (5 mL). Die Reaktion wurde 16 h gerührt und **166** wurde als hellgelbes Öl (8 mg, 0.03 mmol, 27 %, 13 % *ee*) erhalten.
Chirale HPLC: CHIRALCEL® OD-H mit 97.5/2.5 Hex/*i*PrOH (1 mL/min): $t_R(1)$ = 26.3 min (Hauptenantiomer: 56.2 %), $t_R(2)$ = 31.0 min (Nebenenantiomer: 43.8 %).
Die restliche Analytik stimmte mit der vorherigen.

(R)-5-Ethoxy-2-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**166**) unter Verwendung von *(1R,2S)*-2-amino-1,2-diphenylethan-1-ol **182**



166

Die Synthese erfolgte nach 5.1.3.14 unter Verwendung von In-Staub (177 mg, 1.55 mmol), **182** (330 mg, 1.55 mmol), THF (9 mL), Allylbromid (0.37 mL, 4.2 mmol), einer Lösung aus **158** (300 mg, 1.41 mmol) in THF (15 mL) und 1 M *aq.* HCl (25 mL). Die Reaktion wurde 1 h gerührt und **166** wurde als gelbes Öl (244 mg, 0.956 mmol, 68 %, 70 % *ee*) erhalten.

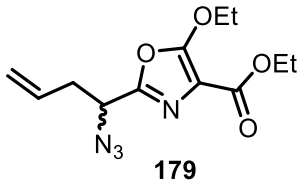
Chirale HPLC: CHIRALCEL® OD-H mit 97.5/2.5 Hex/*i*PrOH (1 mL/min): $t_R(1)$ = 24.7 min (Hauptenantiomer: 85.1 %), $t_R(2)$ = 29.6 min (Nebenenantiomer: 14.9 %).

Opt. Rot. α = 0.239 (*c* = 1, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 23.9°$.

Die restliche Analytik stimmte mit der vorherigen.

5.3.4 Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OEt 156 aus 166

2-(1-Azidobut-3-en-1-yl)-5-ethoxyoxazol-4- carbonsäureethylester (**179**)



179

Die Synthese erfolgte nach der Literaturvorschrift[72] zur Substitution eines sekundären Alkohols in α-Stellung zu einem Ester.

180 (65 mg, 0.26 mmol) und PPh_3 (134 mg, 0.509 mmol) wurden in trockenem THF (1.5 mL) unter Ar-Atmosphäre gelöst und auf -78 °C gekühlt. DPPA (0.11 mL, 0.51 mmol) und DEAD (0.08 mL, 0.5 mmol) wurden nacheinander zur Lösung hinzugefügt und die Reaktion wurde über Nacht langsam auf RT erwärmt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Mischung über Kieselgel filtriert und mit PE/EE 1.8/1 eluiert. Das Filtrat wurde *in vacuo* konzentriert und mittels Säulenchromatographie auf Kieselgel (Eluent: PE/EE 7/1) gereinigt. Dadurch wurde **179** als hellgrünes Öl erhalten (44 mg, 0.16 mmol, 62 %) erhalten.

R_f (PE/EE: 1/1) = 0.76.

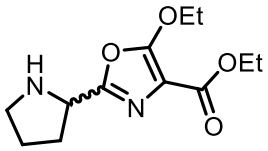
Chirale HPLC: CHIRALCEL® AD-H mit 97.5/2.5 Hex/*i*PrOH (1.5 mL/min): $t_R(1)$ = 9.2 min, $t_R(2)$ = 11.3 min.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.83-5.72 (m, 1H, CH (Alken)), 5.22-5.14 (m, 2H, CH_2 (Alken)), 4.55-4.46 (m, 3H, N_3CH, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.36 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 2.77-2.65 (m, 2H, CH_2), 1.49 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 161.7 (Cq), 161.4 (Cq), 150.3 (Cq), 132.0 (CH), 119.6 (CH_2), 107.5 (Cq), 70.3 (CH_2), 60.9 (CH_2), 58.1 (CH), 36.5 (CH_2), 15.1 (CH_3), 14.6 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{12}H_{16}N_4O_4Na^+$: 303.1069; gefunden (ESI-MS^+): 303.1070.

5-Ethoxy-2-(pyrrolidin-2-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**178**)



178

Die Synthese wurde nach einer leicht veränderten Version der Literaturvorschrift[109] zur Synthese eines Pyrrolidins in Nicotinalkaloiden durchgeführt.

Frisch destilliertes Cyclohexen (0.13 mL, 1.3 mmol) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Rohr unter Ar-Atmosphäre in trockenem THF (0.67 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Mischung wurde eine frisch hergestellte Lösung aus $BH_3 \cdot SMe_2$ (0.31 mL, 0.62 mmol, 2 M in trockenem THF) gegeben und die entstehende Suspension wurde bei derselben Temperatur für 1 h gerührt. Nachdem die Reaktion auf -78 °C gekühlt wurde, wurde eine Lösung aus **179** (44 mg, 0.16 mmol) in trockenem THF (0.4 mL) langsam hinzu getropft. Im Anschluss wurde die Mischung langsam auf RT erwärmt und für 4 d weiter gerührt, bevor die Reaktion durch Zugabe von MeOH beendet wurde. Nach Verdünnung mit Et_2O wurde die organische Phase mit 1 M *aq.* HCl (6 x 3 mL) extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde mittels Umkehrphasen-Chromatographie auf C18-Kieselgel (Laufmittel: MeCN in H_2O: 0 %-> 30 %-> 80 %) gereinigt. Dies ergab **178** als gelbes Öl (39 mg, 0.15 mmol, 98 %).

R_f (CH_2Cl_2/MeOH: 30/1) = 0.11.

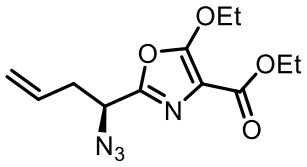
LC-MS: t_r = 0.292 min (*m/z* (ESI-MS^+): 255 ($M+H^+$), 277 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 4.86 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH), 4.56 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.31 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 3.53-3.42 (m, 2H, NCH_2), 2.54-2.37 (m, 2H, CH_2), 2.30-2.15 (m, 2H, CH_2), 1.47 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, MeOD) δ = 163.4 (Cq), 162.9 (Cq), 149.2 (Cq), 108.6 (Cq), 71.9 (CH), 61.8 (CH_2), 56.5 (CH_2), 47.0 (CH_2), 29.5 (CH_2), 24.6 (CH_2), 15.2 (CH_3), 14.6 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{12}H_{19}N_2O_4^+$: 255.1345; gefunden (ESI-MS^+): 255.1343.

(S)-2-(1-Azidobut-3-en-1-yl)-5-ethoxyoxazol-4- carbonsäureethylester (**157**)



157

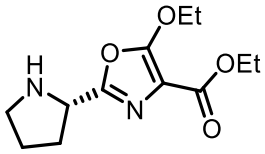
Die Synthese wurde analog zur Herstellung von **179** unter Verwendung von **166** (244 mg, 0.956 mmol, 70 % *ee*), PPh_3 (502 mg, 1.91 mmol), trockenem THF (5.4 mL), DPPA (0.41 mL, 1.9 mmol) und DEAD (0.30 mL, 1.9 mmol) bei einer Reaktionsdauer von 25.5h durchgeführt. **157** wurde als hellgelbes Öl (201 mg, 0.717 mmol, 75 %, 70 % *ee*) erhalten.

Chirale HPLC: CHIRALCEL® AD-H mit 97.5/2.5 Hex/*i*PrOH (1.5 mL/min): $t_R(1)$ = 10.7 min (Nebenenantiomer: 14.8 %), $t_R(2)$ = 13.0 min (Hauptenantiomer: 85.2 %).

Opt. Rot. α = -0.475 (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = -47.5°.

Die anderen analytischen Daten stimmten mit denen von **179** überein.

(S)- 5-Ethoxy-2-(pyrrolidin-2-yl)oxazol-4-carbonsäureethylester (**184**)



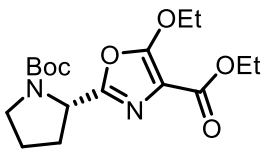
184

Die Synthese wurde analog zur Herstellung von **178** unter Verwendung von Cyclohexen (0.56 mL, 5.5 mmol), trockenem THF (2.9 mL), einer Lösung aus $BH_3{\cdot}SMe_2$ (1.4 mL, 2.8 mmol, 2 M in trockenem THF) und einer Lösung aus **157** (191 mg, 0.681 mmol, 70 % *ee*) in trockenem THF (1.4 mL) bei einer Dauer von 4d durchgeführt. Dies ergab **184** als gelb-grünes Öl (105 mg, 0.413 mmol, 61 %).

Opt. Rot. α = -0.198 (*c* = 2.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = -9.9°.

Die anderen analytischen Daten stimmten mit denen von **178** überein.

(*S*)-2-(1-(*Tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl)-5-ethoxyoxazol-4-carbonsäureethylester (**156**)



156

Diese Synthese erfolgte nach einer Literaturvorschrift[202] zur Boc-Schützung von pyrrolidinhaltigen Aminosäuren.

Zu einer Lösung aus **184** (65 mg, 0.26 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (2.6 mL) unter Ar-Atmosphäre wurden bei RT Boc_2O (84 mg, 0.38 mmol) und NEt_3 (0.11 mL, 0.74 mmol) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 2.5 h bei derselben Temperatur gerührt und nach vollständigem Umsatz von **184** wurde die Mischung unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie auf Kieselgel mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (2/1) gereinigt. **156** konnte als hellgelbes Öl (77 mg, 0.22 mmol, 85 %) erhalten werden, das den NMR-Analysen zufolge aus zwei Rotameren (1.75/1) besteht.

R_f (PE/EE: 1/2) = 0.52.

LC-MS (*UPLC-MS-kurz*): *tr* = 1.18 min (*m/z* (ESI-MS^+): 377 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.87 (bs, 0.4H, CH), 4.77 (bs, 0.6H, CH), 4.44 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.37-4.32 (m, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 3.60-3.48 (m, 1.6H, NCH_2), 3.41 (bs, 0.4H, NCH_2), 2.34-2.23 (m, 1H, CH_2), 2.16-2.10 (m, 1.6H, CH_2), 2.00 (bs, 1.8H, CH_2), 1.95-1.86 (m, 1.5H, CH_2), 1.47-1.44 (m, 6H, CH_3(Boc), $OCH_2C\underline{H}_3$), 1.36-1.32 (m, 9H, CH_3(Boc), $OCH_2C\underline{H}_3$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 161.7 (Cq), 161.1 (Cq), 159.8 (Cq), 154.3 (Cq), 80.0 (Cq), 80.2 (Cq), 70.1 (CH), 70.0 (CH), 60.7 (CH_2), 60.5 (CH_2), 55.1 (CH_2), 54.6 (CH_2), 46.8 (CH_2), 46.5 (CH_2), 32.4 (CH_2), 29.8 (CH_2), 28.4 (CH_3), 24.4 (CH_2), 23.8 (CH_2), 15.1 (CH_3), 14.5 (CH_3) ppm.

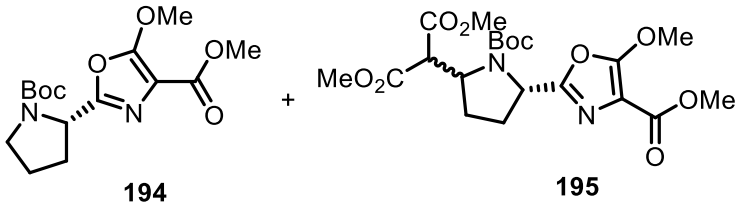
Ein Cq wurde aufgrund der Verdünnung nicht beobachtet.

HRMS: berechnet m/z für $C_{17}H_{26}N_2O_6Na^+$: 377.1689; gefunden (ESI-MS^+): 377.1692.

Opt. Rot. α = -0.509 (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = -50.9°.

5.3.5 Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OMe)-OMe 194 durch eine Rh-katalysierte [3+2]-Cycloaddition

(*S*)-2-(1-(*Tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl)-5-methoxyoxazol-4-carbonsäuremethylester (**194**)



194 **195**

Es wurde eine Vorschrift zur Synthese ähnlicher Oxazole mittels [3+2]-Cycloaddition verwendet.[127]

In einen ausgeheizten Zweihalskolben wurden unter Ar-Atmosphäre bei RT nacheinander $Rh_2(OAc)_4$ (27 mg, 0.061 mmol), Boc-2-Cyanopyrrolidin **193** (600 mg, 3.06 mmol) und trockenes $CHCl_3$ (2.0 mL) gegeben. Die resultierende Suspension wurde unter Rückfluss erhitzt, bis diese eine tiefe lila Farbe aufwies. Im Anschluss wurde mithilfe einer Spritzenpumpe eine Lösung aus dem Diazocarbonyl **185** (532 mg, 3.36 mmol) in trockenem $CHCl_3$ (11.5 mL) über das obere Ende des Rückflusskühlers zu der siedenden Reaktionsmischung mit einer Geschwindigkeit von 0.5 ml/h zu getropft. Nach 19 h musste dieser Vorgang abgebrochen werden, da die verwendete Spritze undicht wurde. Daher wurde die Reaktion auf RT gekühlt, unter vermindertem Druck konzentriert und der Rückstand durch Säulenchromatographie auf Kieselgel mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (4/1-> 2/1-> 1/1-> 1/2) gereinigt. Dies lieferte das Oxazol **194** als eine 3:1 Mischung mit dem alkylierten Oxazol **195** in Form eines farblosen viskosen Öls (408 mg, 1.25 mmol, 41 %). Außerdem konnte das Startmaterial **193** als farbloses Öl (280 mg, 1.43 mmol, 46 %) wiedergewonnen werden.

R_f (PE/EE (1/2)) = 0.35.

LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.105 min (*m/z* (ESI-MS^+): 349 (**194**+Na^+)), 1.211 (*m/z* (ESI-MS^+): 479 (**195**+Na^+)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.86-4.74 (m, 1H, CH(Pyr)), 4.13 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.56-3.39 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 2.39-2.11 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 2.07-1.88 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 1.44 (s, 3H, CH_3(Boc)), 1.32 (s, 4H, CH_3(Boc)) ppm.

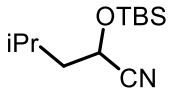
$^{13}C\{^1H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 168.7 (Cq(**195**)), 168.3 (Cq), 162.0 (Cq), 154.2 (Cq), 80.9 (Cq), 80.2(Cq), 59.9 (CH_3), 57.4 (CH(**195**)), 55.9 (CH(**195**)), 55.0 (CH), 52.7 (CH_3(**195**)), 51.9 (CH_3), 46.6 (CH_2), 32.4 (CH_2), 28.4 (CH_3), 23.8 (CH_2) ppm. Aufgrund der geringen Konzentration wurden nicht alle Cq gefunden.

HRMS: berechnet m/z für $C_{15}H_{22}N_2O_6Na^+$: 349.1376; gefunden (ESI-MS^+): 349.1377.

Da das Produkt aus einer Mischung aus **194** und **195** bestand, wurde kein Drehwert gemessen.

5.3.6 Synthese von *i*Bu-CH(OTBS)-Oxa(OMe)-OMe 202

2-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-methylvaleronitril (**201**)



201

Die Synthese erfolgte analog zur Herstellung eines ähnlichen TBS-geschützten Cyanhydrins.[133]

Unter Ar-Atmosphäre wurde Isovaleraldehyd (0.83 mL, 7.7 mmol) in trockenem MeCN (50 mL) bei RT gelöst. Zu der Lösung wurden nacheinander KCN (2.02 g, 30.9 mmol), ZnI_2 (50 mg, 0.16 mmol) und TBSCl (2.33 g, 15.5 mmol) gegeben und die Mischung wurde für 72 h stark gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Aldehyds wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Et_2O (100 mL) behandelt. Der entstandene Niederschlag wurde abgefiltert und mit Et_2O gewaschen (3 x 20 mL). Die vereinigten Filtrate wurden mit H_2O (50 mL) und ges. *aq.* NaCl (50 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels Säulenchromatographie auf Silica mit dem Eluenten PE/EE (50/1-> 20/1) gereinigt. Dies ergab das Cyanhydrin **E50** als hellgelbes Öl (974 mg, 4.28 mmol, 56 %).

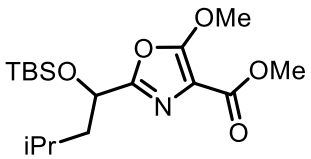
R_f (PE/EE (20/1)) = 0.54.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.45 (dd, *J* = 7.8, 6.2 Hz, 1H, CH-O), 1.91-1.81 (m, 1H, C<u>H</u>(CH_3)$_2$), 1.78-1.71 (m, 1H, CH_2), 1.68-1.61 (m, 1H, CH_2), 0.96 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH(C<u>H</u>$_3$)$_2$), 0.94 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH(C<u>H</u>$_3$)$_2$), 0.91 (s, 9H, tBu(TBS)), 0.19 (s, 3H, Me(TBS)), 0.14 (s, 3H, Me(TBS)) ppm.

$^{13}C\{^{1}H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 80.4 (Cq), 80.1 (Cq), 79.8 (Cq), 60.6 (CH), 45.2 (CH_2), 31.5 (Cq), 25.7 (CH_3), 24.2 (CH_3), 22.8 (CH_3), 22.1 (CH), -5.0 (CH_3), -5.3 (CH_3) ppm.

Aufgrund von Zersetzung bei Ionisation mittels EI-MS wurde kein HRMS aufgenommen.

2-(1-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-carbonsäuremethylester (**202**)



202

Die Durchführung erfolgte analog zur Reaktion zu Boc-Pyr-Oxa(OMe)-OMe **194** unter Verwendung von $Rh_2(OAc)_4$ (8 mg, 0.02 mmol), Cyanhydrin **201** (200 mg, 0.879 mmol), trockenem $CHCl_3$ (2.0 mL) und einer Lösung aus dem Diazocarbonyl **185** (153 mg, 0.967 mmol) in trockenem $CHCl_3$ (10.0 mL) bei Zugabe- und Reaktionszeit von 20 h. Die Reinigung erfolgte mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (6/1-> 4/1) und lieferte das Oxazol **202** als farbloses Öl (157 mg, 0.439 mmol, 50 %).

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.66.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.035 min (*m/z* (ESI-MS^+): 358 ($M+H^+$), 380 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.75 (dd, *J* = 8.9, 5.1 Hz, 1H, CH-O), 4.17 (s, 3H, OMe), 3.87 (s, 3H, OMe), 1.85-1.79 (m, 1H, CH_2), 1.77-1.67 (m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$), 1.58-1.51 (m, 1H, CH_2), 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.86 (s, 9H, tBu(TBS)), 0.08 (s, 3H, Me(TBS)), -0.06 (s, 3H, Me(TBS)) ppm.

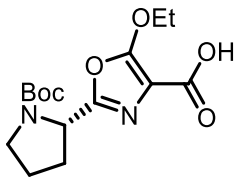
$^{13}C\{^{1}H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 162.1 (Cq), 161.9 (Cq), 154.6 (Cq), 105.6 (Cq), 67.2 (CH), 59.8 (CH_3), 51.9 (CH_3), 45.1 (CH_2), 25.8 (CH_3), 24.2 (CH_3), 23.3 (CH_3), 21.8 (CH), 18.2 (Cq), -4.9 (CH_3), -5.1 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{17}H_{31}NO_5SiNa^+$: 380.1869; gefunden (ESI-MS^+): 380.1866.

5.3.7 Synthese der Oxazol-Me-Thioimidate

*5.3.7.1 Synthese des Me-Thioimidats aus Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OEt **156***

(*S*)-2-(1-(*Tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl)-5-ethoxyoxazol-4-carbonsäure (**203**)



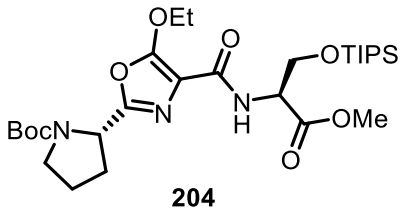
203

156 (35 mg, 0.099 mmol) wurde in THF (1.0 mL) bei RT gelöst und mit 1 M *aq.* KOH (0.34 mL, 0.34 mmol) versetzt. Die Reaktion wurde für 3 d gerührt, bevor sie auf 0 °C gekühlt, mit CH_2Cl_2 verdünnt und der pH-Wert der wässrigen Phase mit 1 M *aq.* $KHSO_4$ auf 2 gestellt wurde. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert (3 x) und die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das farblose und viskose Rohprodukt (24 mg, 0.074 mmol, 75 %) wurde nach LC-MS Kontrolle direkt für den nächsten Schritt verwendet.

LC-MS: t_r = 1.092 min (*m/z* (ESI-M^+): 349 (M+Na^+)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{15}H_{22}N_2O_6Na^+$: 349.1376; gefunden (ESI-MS^+): 349.1378.

Tert-butyl-(*S*)-2-(5-ethoxy-4-(((*S*)-1-methoxy-1-oxo-3-((triisopropylsilyl)oxy)propan-2-yl)carbamoyl)oxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (**204**)



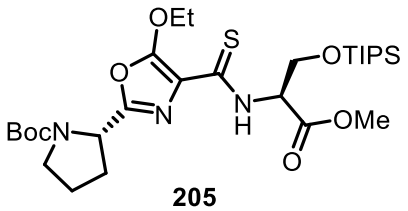
204

Die Synthese erfolgte nach einer leicht veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung von Carbonsäure **203** (77 mg, 0.24 mmol), DIPEA (0.12 mL, 0.71 mmol), HATU (144 mg, 0.378 mmol), Amin **30** (114 mg, 0.413 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2 (1.2 mL)) und trockenem CH_2Cl_2 (1.2 mL) bei einer Reaktionsdauer von 19 h. Die Aufreinigung erfolgte mit PE/EE (4/1-> 1/1) und ergab **204** in Form eines leicht gelben Öls (102 mg, 0.175 mmol, 74 %).

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.33.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)*: t_r = 1.094 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 584 (M+H$^+$), 606 (M+Na$^+$)).
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.51-7.45 (m, 1H, NH), 4.83 (bs, 0.4H, CH(Pyr)), 4.76 (dt, *J* = 8.6, 2.9 Hz, 1H, CH-N(Ser)), 4.69-4.66 (m, 0.6H, CH(Pyr)), 4.47 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.22 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, CH-O(Ser)), 3.93 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH-O(Ser)), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.53-3.35 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 2.21-2.19 (m, 1H, CH(Pyr)), 2.10-1.98 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 1.91-1.85 (m, 1H, CH(Pyr)), 1.42-1.38 (m, 6H, $OCH_2C\underline{H}_3$, CH_3(Boc)), 1.30 (s, 6H, CH_3(Boc)), 1.07-0.99 (m, 21H, TIPS) ppm.
^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.0 (Cq), 160.9 (Cq), 158.8 (Cq), 153.8 (Cq), 153.5 (Cq), 109.5 (Cq), 80.0 (Cq), 70.5 (CH_2), 64.4 (CH_2), 54.8 (CH), 53.8 (CH), 52.3 (CH_3), 46.3 (CH_2), 32.1 (CH_2), 28.3 (CH_3), 23.6 (CH_2), 17.9 (CH_3), 17.9 (CH_3), 15.1 (CH), 11.9 (CH_3) ppm.
HRMS: berechnet m/z für $C_{28}H_{49}N_3O_8SiNa^+$: 606.3187; gefunden (ESI-MS$^+$): 606.3170.
Opt. Rot. α = -0.015° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = -1.5°.

Tert-butyl (*S*)-2-(5-ethoxy-4-(((*S*)-1-methoxy-1-oxo-3-((triisopropylsilyl)oxy)propan-2-yl)carbamothioyl)oxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (**205**)



205

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.8. Dazu wurden Amid **204** (102 mg, 0.175 mmol), LR (141 mg, 0.349 mmol) und trockenes CH_2Cl_2 (3.5 mL) bei einer Temperatur von 42 °C für 48 h verwendet. Nach dieser Zeit wurde weiteres LR (35 mg, 0.087 mmol) hinzugefügt und die Reaktionsmischung für weitere 24 h auf 42 °C erhitzt. Nach der allgemeinen Aufarbeitung und Reinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie auf Silica (Eluent: PE/EE (8/1-> 6/1-> 2/1)) konnte das Thioamid **205** mit leichten Verunreinigungen durch Reste von LR als gelbes Öl isoliert werden (45 mg, 0.075 mmol, 43 %).
R_f (PE/EE (1/1)) = 0.59.
LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)*: t_r = 1.153 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 600 (M+H$^+$), 622 (M+Na$^+$)).
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.16-9.10 (m, 1H, CSNH), 5.45 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH-N(Ser)), 4.85 (bs, 0.4H, CH(Pyr)), 4.74-4.71 (m, 0.6H, CH(Pyr)), 4.47 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H,

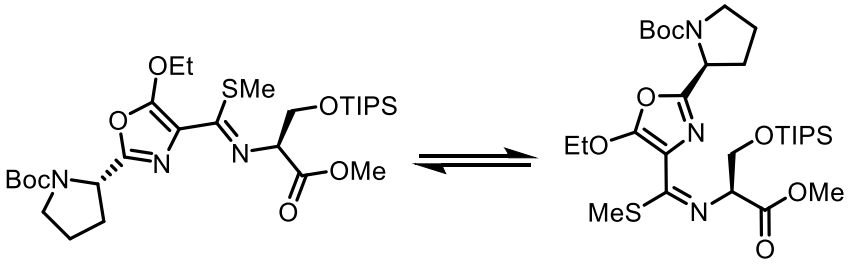
$OC\underline{H}_2CH_3$), 4.28 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH-O(Ser)), 4.09 (d, *J* =7.2 Hz, 1H, CH-O(Ser)), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.56-3.37 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 2.27-2.20 (m, 1H, CH(Pyr)), 2.15-2.00 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 1.94-1.88 (m, 1H, CH(Pyr)), 1.48-1.44 (m, 6H, $OCH_2C\underline{H}_3$, CH_3(Boc)), 1.32 (s, 6H,CH_3(Boc)), 1.06-1.00 (m, 21H, TIPS) ppm.

$^{13}C\{^1H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 184.7 (Cq), 170.3 (Cq), 164.3 (Cq), 153.9 (Cq), 153.0 (Cq), 115.2 (Cq), 80.1 (Cq), 70.2 (CH_2), 63.7 (CH_2), 58.1 (CH), 54.8 (CH), 52.5 (CH_3), 46.4 (CH_2), 32.2 (CH_2), 28.4 (CH_3), 23.6 (CH_2), 17.9 (CH_3), 17.9 (CH_3), 15.2 (CH), 11.9 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{28}H_{49}N_3O_7SSiNa^+$: 622.2958; gefunden (ESI-MS^+): 622.2960.

Opt. Rot. α = 0.125° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 12.5°$.

Tert-butyl (*S*)-2-(4-((*S,Z*)-8,8-diisopropyl-5-(methoxycarbonyl)-9-methyl-7-oxa-2-thia-4-aza-8-siladec-3-en-3-yl)-5-ethoxyoxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (*cis*-**206**) und *Tert*-butyl (*S*)-2-(4-((*S,E*)-8,8-diisopropyl-5-(methoxycarbonyl)-9-methyl-7-oxa-2-thia-4-aza-8-siladec-3-en-3-yl)-5-ethoxyoxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (*trans*-**206**)



***cis*-206** ***trans*-206**

Methyliodid (0.010 mL, 0.15 mmol) und wasserfreies K_2CO_3 (32 mg, 0.23 mmol) wurden nacheinander unter Ar-Atmosphäre bei RT zu einer Lösung aus dem Thioamid **205** (45 mg, 0.075 mmol) in trockenem MeCN (0.75 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für 20 h bei 35 °C gerührt. Nach dieser Zeit konnte per LC-MS kein vollständiger Umsatz zum Produkt **206** festgestellt werden. Daher wurde eine weitere Portion Methyliodid (0.010 mL, 0.15 mmol) hinzugefügt und die Reaktion für weitere 19 h auf 35 °C erhitzt. Im Anschluss wurde die Mischung über Kieselgur filtriert (mit MeCN eluiert), auf Kieselgur immobilisiert und chromatographisch auf Silica mit dem Laufmittelgemisch 1 % NEt_3 in PE/EE (8/1-> 6/1-> 4/1) gereinigt. Somit konnte das Me-Thioimidat **206** als hellgelbes Öl gewonnen werden (15 mg, 0.024 mmol, 33 %), das laut

NMR Analyse als ein 2:1 Gemisch aus cis/trans Isomeren bezüglich des Thioimidats vorlag.

R_f (1 % NEt_3 in PE/EE (2/1)) = 0.43.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)*: t_r = 1.140 min (*m/z* (ESI-MS^+): 614 ($M+H^+$), 636 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.84-4.71 (m, 1H, CH(Pyr)), 4.35-4.25 (m, 2H, $OC\underline{H}_2CH_3$), 4.22-4.18 (m, 1H, CH(Ser)), 4.12-4.06 (m, 1H, CH(Ser)), 3.99-3.94 (m, 1H, CH(Ser)), 3.72 (s, 1H, OMe), 3.66 (s, 2H, OMe), 3.56-3.38 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 2.39 (bs, 3H, SMe), 2.24-1.87 (m, 4H, 2xCH_2(Pyr)), 1.43-1.34 (m, 12H, $OCH_2C\underline{H}_3$, CH_3(Boc)), 1.04-1.02 (m, 21H, TIPS) ppm.

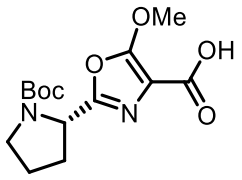
^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.1 (Cq), 80.0 (Cq), 70.6 (CH_2), 70.2 (CH_2), 68.6 (CH), 68.0 (CH), 66.0 (CH_2), 64.9 (CH_2), 52.1 (CH), 51.7 (CH_3), 46.4 (CH_2), 32.1 (CH_2), 29.9 (CH_2), 28.5 (CH_3), 18.0 (CH_3), 16.1 (CH_3), 15.0 (CH), 13.4 (CH_3), 12.0 (CH_3), 12.0 (CH_3) ppm.

Einige Cq wurden aufgrund der geringen Substanzmenge nicht beobachtet.

Opt. Rot. α = -0.364° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = -36.4°.

*5.3.7.2 Synthese des Me-Thioimidats aus Boc-Pyr-Oxa(OMe)-OMe **194***

(*S*)-2-(1-(*Tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl)-5-methoxyoxazol-4-carbonsäure (**207**)



207

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.1 durchgeführt. Dafür wurde die Mischung aus **194** und **195** (408 mg, 1.25 mmol), 1 M *aq.* LiOH (3.8 mL, 3.8 mmoll) und THF (12.5 mL) verwendet. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h bei RT gerührt und wie beschrieben aufgearbeitet. Dadurch konnte die Oxazol-Carbonsäure **207** als farbloser Feststoff (335 mg, 1.07 mmol, 86 %) isoliert werden.

LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 1.004 min (*m/z* (ESI-MS^+): 335 ($M+Na^+$)).

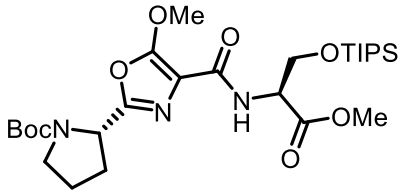
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.88 (bs, 0.5H, CH(Pyr)), 4.77 (bs, 0.5H, CH(Pyr)), 4.19 (s, 3H, OMe), 3.58-3.40 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 2.30-1.91 (m, 4H, 2xCH_2(Pyr)), 1.45 (bs, 4H, CH_3(Boc)), 1.34 (5H, CH_3(Boc)). ppm.

$^{13}C\{^{1}H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 165.3 (Cq), 162.2 (Cq), 154.3 (Cq), 154.1 (Cq), 105.6 (Cq), 80.5 (Cq), 60.1 (CH_3), 54.9 (CH), 46.5 (CH_2), 32.2 (CH_2), 28.4 (CH_3), 23.8 (CH_2) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{14}H_{20}N_2O_6Na^+$: 335.1219; gefunden (ESI-MS^+): 335.1219.

Opt. Rot. α = -0.879° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\boldsymbol{24}}$ = -87.9°.

Tert-butyl-(*S*)-2-(5-methoxy-4-(((*S*)-1-methoxy-1-oxo-3-((triisopropylsilyl)oxy)propan-2-yl)carbamoyl)oxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (**208**)



208

Die Synthese erfolgte nach einer leicht veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung von Carbonsäure **207** (370 mg, 1.19 mmol), DIPEA (0.61 mL, 3.6 mmol), HATU (721 mg, 1.90 mmol), Amin **30** (571 mg, 2.07 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2 (6.0 mL)) und trockenem CH_2Cl_2 (6.0 mL) bei einer Reaktionsdauer von 16 h. Die Aufreinigung erfolgte mit PE/EE (4/1-> 1/1) und ergab **208** in Form eines leicht gelben Öls (585 mg, 1.03 mmol, 87 %).

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.19.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.060 min (*m/z* (ESI-MS^+): 570 ($M+H^+$), 592 ($M+Na^+$)).

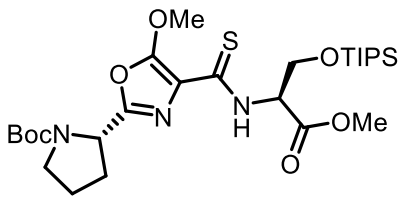
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.50-7.45 (m,1H, NH), 4.86 (bs, 0.2H, CH(Pyr)), 4.79 (dt, *J* = 8.4, 2.7 Hz, 1H, CH-N(Ser)), 4.71-4.57 (m, 0.8H, CH(Pyr)), 4.25 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, CH-O(Ser)), 4.14 (s, 3H, OMe), 3.94 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, CH-O(Ser)), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.58-3.37 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 2.40-1.86 (m, 4H, 2xCH_2(Pyr)), 1.45 (s, 3H, CH_3(Boc)), 1.33 (s, 4H, CH_3(Boc)), 1.28 (s, 2H, CH_3(Boc)), 1.08-1.02 (m, 21H, TIPS) ppm.

$^{13}C\{^{1}H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.1 (Cq), 168.3 (Cq), 160.9 (Cq), 153.9 (Cq), 153.6 (Cq), 108.8 (Cq), 80.0 (Cq), 64.4 (CH_2), 60.4 (CH_3), 54.8 (CH), 53.8 (CH), 52.4 (CH_3), 46.4 (CH_2), 32.1 (CH_2), 28.4 (CH_3), 23.6 (CH2), 17.9 (CH_3), 17.9 (CH_3), 11.9 (CH) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{27}H_{47}N_3O_8SiNa^+$: 592.3030; gefunden (ESI-MS^+): 592.3028.

Opt. Rot. α = -0.146° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\boldsymbol{24}}$ = -14.6°.

Tert-butyl (*S*)-2-(5-methoxy-4-(((*S*)-1-methoxy-1-oxo-3-((triisopropylsilyl)oxy)propan-2-yl)carbamothioyl)oxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (**209**)



209

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.8. Dazu wurden Amid **208** (518 mg, 0.909 mmol), LR (735 mg, 1.82 mmol) und trockenes CH_2Cl_2 (18 mL) bei einer Temperatur von 40 °C für 67 h verwendet. Durch Aufarbeitung und Reinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie auf Silica (Eluent: PE/EE (8/1-> 6/1-> 4/1-> 2/1)) konnte das Thioamid **209** als gelbes Öl erhalten werden (151 mg, 0.258 mmol, 29 %), das leichte, nicht abtrennbare Verunreinigungen durch Reste des Thionierungsreagenzes enthielt. Darüber hinaus wurde ebenfalls das Startmaterial **208** als hellgelbes Öl zurückgewonnen (88 mg, 0.15 mmol, 17 %).

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.49.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.122 min (*m/z* (ESI-MS^+): 586 ($M+H^+$), 608 ($M+Na^+$)).

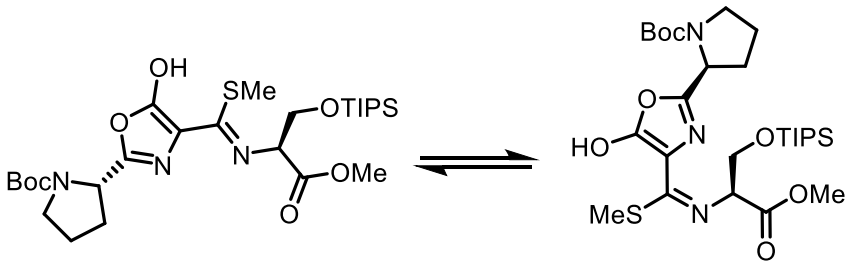
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.14-9.09 (m, 1H, CSNH), 5.44 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH-N(Ser)), 4.87 (bs, 0.3H, CH(Pyr)), 4.75-4.66 (m, 0.7H, CH(Pyr)), 4.31-4.28 (m, 1H, CH-O(Ser)), 4.14 (s, 3H, OMe), 4.12-4.07 (m, 1H, CH-O(Ser)), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.58-3.34 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 2.28-1.89 (m, 4H, 2xCH_2(Pyr)), 1.45 (s, 4H, CH_3(Boc)), 1.33 (s, 5H, CH_3(Boc)), 1.07-1.01 (m, 21H, TIPS) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 184.5 (Cq), 170.3 (Cq), 164.3 (Cq), 152.6 (Cq), 152.1 (Cq), 114.3 (Cq), 80.1 (Cq), 63.7 (CH_2), 59.7 (CH_3), 58.1 (CH), 54.7 (CH), 52.4 (CH_3), 46.4 (CH_2), 32.1 (CH_2), 28.4 (CH_3), 23.6 (CH2), 17.9 (CH_3), 17.9 (CH_3), 11.9 (CH) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{27}H_{47}N_3O_7SSiNa^+$: 608.2802; gefunden (ESI-MS^+): 608.2809.

Aufgrund der Verunreinigung durch Reste von LR wurde kein Drehwert gemessen.

Tert-butyl (*S*)-2-(4-((*S,Z*)-8,8-diisopropyl-5-(methoxycarbonyl)-9-methyl-7-oxa-2-thia-4-aza-8-siladec-3-en-3-yl)-5-hydroxyoxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (*cis*-**211**) und *Tert*-butyl (*S*)-2-(4-((*S,E*)-8,8-diisopropyl-5-(methoxycarbonyl)-9-methyl-7-oxa-2-thia-4-aza-8-siladec-3-en-3-yl)-5-hydroxyoxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (*trans*-**211**)



***cis*-211** ***trans*-211**

Methyliodid (0.025 mL, 0.40 mmol) und wasserfreies K_2CO_3 (28 mg, 0.20 mmol) wurden nacheinander unter Ar-Atmosphäre bei RT zu einer Lösung aus dem verunreinigtem Thioamid **209** (59 mg, 0.10 mmol) in trockenem MeCN (1.0 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für 24 h bei 35 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurde per LC-MS kein vollständiger Umsatz des Startmaterials festgestellt. Daher wurde weiteres Methyliodid (0.025 mL, 0.40 mmol) und wasserfreies K_2CO_3 (28 mg, 0.20 mmol) hinzugefügt und die Reaktion für weitere 19 h auf 35 °C erhitzt. Im Anschluss wurde die Mischung über Kieselgur filtriert (mit MeCN eluiert), auf Kieselgur immobilisiert und chromatographisch auf Silica mit dem Laufmittelgemisch 1 % NEt_3 in PE/EE (8/1-> 6/1-> 4/1) gereinigt. Dies lieferte laut NMR-Analysen nicht das erwartete Me-Thioimidat **210** sondern das demethylierte Me-Thioimidat **211** als gelbes Öl (27 mg, 0.045 mmol, 45 %), das laut NMR Analyse als ein 2:1 Gemisch aus cis/trans Isomeren bezüglich des Thioimidats vorlag.

R_f (1 % NEt_3 in PE/EE (2/1)) = 0.27.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.108 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 586 (M+H$^+$), 608 (M+Na$^+$)).

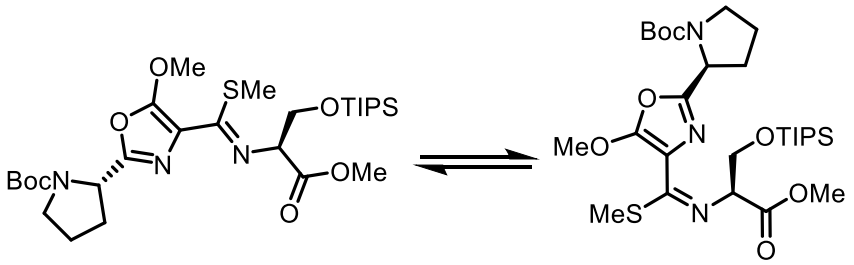
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.92 (bs, 1H, OH), 4.71-4.65 (m, 1H, CH(Pyr)), 4.59-4.51 (m, 1H, CH-N(Ser)), 4.26 (dd, *J* = 9.9, 3.0 Hz, 1H, CH-O(Ser)), 4.04-3.99 (m, 1H, CH-O(Ser)), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.57-3.39 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 2.78 (s, 2H, SMe), 2.55 (s, 1H, SMe), 2.20-2.14 (m, 1H, CH_2(Pyr)), 2.07-1.96 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 1.90-1.83 (m, 1H, CH_2(Pyr)), 1.43 (s, 3H, CH_3(Boc)), 1.36 (s, 6H, CH_3(Boc)), 1.04-1.03 (m, 21H, TIPS) ppm.

$^{13}C\{^{1}H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 161.1 (Cq), 155.5 (Cq), 154.3 (Cq), 147.4 (Cq), 145.9 (Cq), 128.5 (Cq), 79.8 (Cq), 64.4 (CH_2), 59.4 (CH), 55.4 (CH), 52.8 (CH_3), 46.3 (CH_2), 45.5 (CH_2), 31.5 (CH_2), 28.5 (CH_3), 23.4 (CH_2), 18.0 (CH_3), 17.9 (CH_3), 17.9 (CH_3), 11.9 (CH), 11.9 (CH) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{27}H_{47}N_3O_7SSiNa^+$: 608.2802; gefunden (ESI-MS$^+$): 608.2809.

Opt. Rot. α = -0.176° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = -17.6°.

Tert-butyl (*S*)-2-(4-((*S,Z*)-8,8-diisopropyl-5-(methoxycarbonyl)-9-methyl-7-oxa-2-thia-4-aza-8-siladec-3-en-3-yl)-5-methoxyoxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (*cis*-**210**) und *Tert*-butyl (*S*)-2-(4-((*S,E*)-8,8-diisopropyl-5-(methoxycarbonyl)-9-methyl-7-oxa-2-thia-4-aza-8-siladec-3-en-3-yl)-5-methoxyoxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (*trans*-**210**)



***cis*-210** ***trans*-210**

MeOTf (0.033 mL, 0.29 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre bei -20 °C zu einer Lösung aus dem verunreinigtem Thioamid **209** (84 mg, 0.14 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (1.5 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter langsamem Erwärmen auf 0 °C für 2.5 h gerührt und danach direkt mittels Säulenchromatographie auf Silica (Eluent: 1 % NEt_3 in PE/EE (8/1-> 6/1-> 4/1)) gesäubert. Dadurch wurde das gewünschte Produkt **210** als hellgelbes Öl isoliert (34 mg, 0.057 mmol, 40 %), das laut NMR Analyse als ein 2:1 Gemisch aus cis/trans Isomeren bezüglich des Thioimidats vorlag.

R_f (1 % NEt_3 in PE/EE (1/1)) = 0.63.

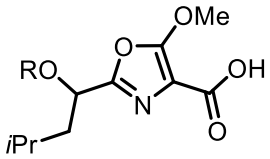
LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)*: t_r = 1.023 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 600 (M+H$^+$), 622 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.84-4.66 (m, 2H, CH(Pyr, CH-N(Ser))), 4.26-4.18 (m, 1H, CH-O(Ser)), 4.02-3.95 (m, 4H, OMe, CH-O(Ser)), 3.77 (s, 1H, OMe), 3.71 (s, 1H, OMe), 3.66 (s, 1H, OMe), 3.57-3.38 (m, 2H, CH_2(Pyr)), 2.78 (s, 1H, SMe), 2.39 (s, 2H, SMe), 2.23-1.87 (m, 4H, 2xCH_2(Pyr)), 1.43 (s, 3H, CH_3(Boc)), 1.36 (s, 6H, CH_3(Boc)), 1.04-1.01 (m, 21H, TIPS) ppm.

$^{13}C\{^{1}H\}$-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.2 (Cq), 163.6 (Cq), 155.2 (Cq), 151.8 (Cq), 80.1 (Cq), 80.0 (Cq), 68.6 (CH_3), 68.1 (CH_3), 66.0 (CH_2), 65.0 (CH_2), 64.3 (CH_2), 60.4 (CH), 59.9 (CH), 55.9 (CH), 52.9 (CH_3), 52.1 (CH_3), 51.8 (CH_3), 46.4 (CH_2), 45.5 (CH_2), 32.2 (CH_2), 29.8 (CH_2), 28.5 (CH_3), 23.7 (CH_2), 17.9 (CH_3), 17.9 (CH_3), 16.1 (CH_3), 13.4 (CH_3), 12.1 (CH), 12.0 (CH), 12.0 (CH) ppm.
Aufgrund der geringen Substanzmenge wurden einige Cq nicht gefunden.
HRMS: berechnet m/z für $C_{28}H_{50}N_3O_7SSi^+$: 600.3139; gefunden (ESI-MS^+): 600.3129.
Opt. Rot. α = -0.436° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}}$ = -43.6°.

*5.3.7.3 Synthese des Me-Thioimidats aus iBu-CH(OTBS)-Oxa(OMe)-OMe **202***

2-(1-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-carbonsäure (**212**) und 2-(1-Hydroxy-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-carbonsäure (**213**)

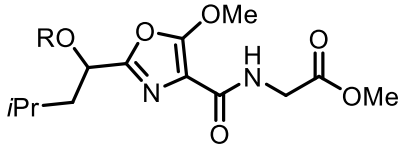


212 (R = TBS)
213 (R = H)

Die Reaktion wurde analog zur Synthese von Boc-Pyr-Oxa(OEt)-OH **203** durchgeführt. Dafür wurde **202** (400 mg, 1.12 mmol), 1 M *aq.* KOH (5.6 mL, 5.6 mmoll) und THF (11.2 mL) verwendet. Die Reaktionsmischung wurde für 28 h bei RT gerührt und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Dadurch konnte die Oxazol-Carbonsäure **212** als Mischung mit dem Alkohol **213** in Form eines farblosen Öls (362 mg) gewonnen werden, das direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde.
LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 0.802 min (*m/z* (ESI-MS^+): 252 (**213**+Na^+)), 1.577 min (*m/z* (ESI-MS^+): 366 (**212**+Na^+)).
HRMS (212): berechnet m/z für $C_{16}H_{28}NO_5Si^-$: 342.1737; gefunden (ESI-MS^-): 342.1739.
HRMS (211): berechnet m/z für $C_{10}H_{14}NO_5^-$: 228.0872; gefunden (ESI-MS^-): 228.0866.

(2-(1-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-carbonyl)-methylglycinat (**214**) und

(2-(1-Hydroxy-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-carbonyl)-methylglycinat (**215**)



214 (R = TBS)
215 (R = H)

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung der Mischung aus Carbonsäuren **212** und **213** (362 mg), DIPEA (0.72 mL, 4.2 mmol), HATU (721 mg, 1.90 mmol), Gly-OMe Hydrochlorid (199 mg, 1.58 mmol) und trockenem CH_2Cl_2 (10.5 mL) bei einer Reaktionsdauer von 16 h. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung auf Kieselgel (Eluent: PE/EE 3/1-> 1/1) wurde das TBS-geschütztes Amid **214** als farbloses Öl (247 mg, 0.596 mmol, 54 % über zwei Stufen) und das Alkohol –Amid **215** als farbloses, durch TMU verunreinigtes Öl (148 mg, 0.218 mmol, 20 % über zwei Stufen) erhalten.

214:

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.39.

LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 1.640 min (*m/z* (ESI-MS^+): 415 ($M+H^+$), 437 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.09 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 4.68 (dd, *J* = 8.4, 5.5 Hz, 1H, CH-O), 4.18-4.16 (m, 5H, OMe, CH_2(Gly)), 3.77 (s, 3H, OMe), 1.84-1.77 (m, 1H, CH_2(iBu)), 1.75-1.67 (m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$), 1.62-1.56 (m, 1H, CH_2(iBu)), 0.94 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.91 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.87 (s, 9H, tBu(TBS)), 0.08 (s, 3H, Me(TBS)), -0.03 (s, 3H, Me(TBS)) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.5 (Cq), 161.3 (Cq), 159.6 (Cq), 154.0 (Cq), 108.1 (Cq), 67.0 (CH), 60.3 (CH_3), 52.5 (CH_3), 45.0 (CH_2), 40.9 (CH_2), 25.8 (CH_3), 24.2 (CH_3), 23.2 (CH_3), 22.0 (CH), 18.3 (Cq), -4.8 (CH_3), -5.0 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{19}H_{34}N_2O_6SiNa^+$: 437.2084; gefunden (ESI-MS^+): 437.2075.

215:

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.09.

LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 0.946 min (*m/z* (ESI-MS^+): 323 ($M+Na^+$)).

1H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ = 7.13 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 4.70 (dd, *J* = 8.5, 5.3 Hz, 1H, CH-O), 4.19 (s, 3H, OMe), 4.17 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH_2(Gly)), 3.77 (s, 3H, OMe),

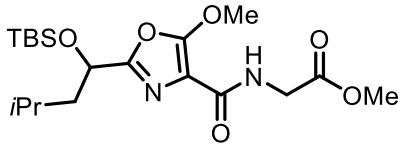
1.85-1.65 (m, 3H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$, CH_2(iBu)), 0.97 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.95 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.5 (Cq), 161.2 (Cq), 159.8 (Cq), 154.5 (Cq), 108.3 (Cq), 66.0 (CH), 60.5 (CH_3), 52.5 (CH_3), 44.0 (CH_2), 40.8 (CH_2), 24.4 (CH_3), 23.2 (CH_3), 22.0 (CH) ppm.

Die NMR-Spektren enthalten eine Verunreinigung durch Tetramethylharnstoff[199] (δ(^{1}H-NMR) = 2.80 ppm, δ(^{13}C-NMR) = 165.7, 38.6 ppm).

HRMS: berechnet m/z für $C_{13}H_{20}N_2O_6Na^+$: 323.1219; gefunden (ESI-MS$^+$): 323.1217.

(2-(1-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-carbonyl)-methylglycinat (**214**) ausgehend von **215**

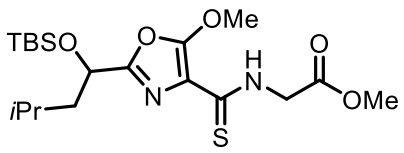


214

215 (148 mg, 0.218 mmol) wurde bei RT in trockenem DMF (0.24 mL) unter Ar-Atmosphäre gelöst und ImH (32 mg, 0.47 mmol) und TBSCl (50 mg, 0.33 mmol) wurden nacheinander hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 16.5 h bei derselben Temperatur gerührt und nach vollständigem Umsatz mit H_2O (10 mL) verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O (3 x 5 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie auf Silica mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (4/1-> 2/1) gereinigt, um **214** als farbloses Öl zu isolieren (64 mg, 0.155 mmol, 71 %).

Die Analytik stimmte mit der vorherigen überein.

(2-(1-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-carbonothioyl)-methylglycinate (**216**)



216

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.8 Dazu wurden Amid **214** (238 mg, 0.574 mmol), LR (465 mg, 1.15 mmol) und trockenes CH_2Cl_2 (11.5 mL) bei einer Temperatur von 40 °C für 69 h verwendet. Durch Aufarbeitung und Reinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie auf Silica (Eluent: PE/EE (8/1-> 6/1-> 4/1) konnte das Thioamid **216** als gelbes Öl gewonnen werden (81 mg, 0.19 mmol, 33%). Darüber hinaus wurde ebenfalls das Startmaterial **214** als gelbes Öl zurückgewonnen (56 mg, 0.28 mmol, 24 %).

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.69.

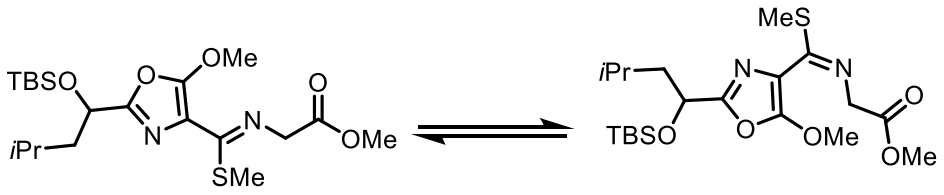
LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.044 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 431 (M+H$^+$), 453 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.81 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, NH), 4.69 (dd, *J* = 8.3, 5.6 Hz, 1H, CH-O), 4.53 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H, CH_2(Gly)), 4.18 (s, 3H, OMe), 3.81 (s, 3H, OMe), 1.83-1.76 (m, 1H, CH_2(iBu)), 1.75-1.67 (m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$), 1.63-1.57 (m, 1H, CH_2(iBu)), 0.94 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.91 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.87 (s, 9H, tBu(TBS)), 0.09 (s, 3H, Me(TBS)), -0.02 (s, 3H, Me(TBS)) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 185.1 (Cq), 169.6 (Cq), 160.4 (Cq), 152.8 (Cq), 113.6 (Cq), 67.0 (CH), 59.7 (CH_3), 52.7 (CH_3), 45.7 (CH_2), 45.0 (CH_2), 25.8 (CH_3), 24.2 (CH_3), 23.2 (CH_3), 22.0 (CH), 18.2 (Cq), -4.8 (CH_3), -5.0 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{19}H_{34}N_2O_5SSiNa^+$: 453.1855; gefunden (ESI-MS$^+$): 453.1849.

(*Z*)-2-(((2-(1-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-yl)(methylthio)methylen)amino)-methylacetat (*cis*-**217**) und
(*E*)-2-(((2-(1-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-yl)(methylthio)methylen)amino)-methylacetat (trans-**217**)



***cis*-217** ***trans*-217**

Es wurde die Vorschrift zur Herstellung des Me-Thioimidats **210** verwendet. Dafür wurde Thioamid **216** (80 mg, 0.19 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (1.9 mL) mit MeOTf (25.2 µL, 0.223 mmol) für 2.5 h zur Reaktion gebracht. Nach dieser Zeit wurde das gewünschte Produkt **217** mithilfe von chromatographischer Reinigung unter Verwendung von 1 % NEt_3 in PE/EE (10/1-> 8/1) als Laufmittelgemisch in Form eines hellgelben Öls isoliert (162mg, 0.139 mmol, 75 %), das laut NMR Analyse als ein 1.3:1 Gemisch aus cis/trans Isomeren bezüglich des Thioimidats vorlag.

R_f (1 % NEt_3 in PE/EE (1/1)) = 0.71.

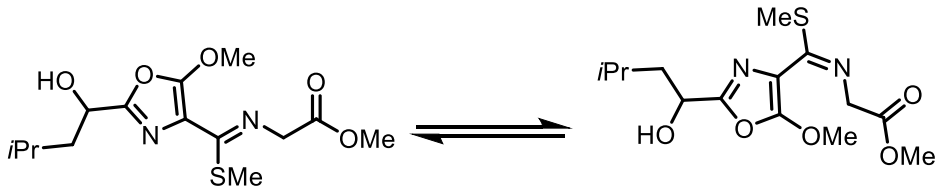
LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.517 min (*m/z* (ESI-MS^+): 445 ($M+H^+$), 467 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.74-4.68 (m, 1H, CH-O), 4.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 0.8H, CH_2(Gly)), 4.41 (s, 1.1H, CH_2(Gly)), 4.09 (s, 1.3H, OMe), 4.04 (s, 1.7H, OMe), 3.77 (s, 1.3H, OMe), 3.74 (s, 1.7H, OMe), 2.44 (s, 1.6H, SMe), 2.43 (1.4H, SMe), 1.84-1.75 (m, 1H, CH_2(*i*Bu)), 1.74-1.64 (m, 1H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$), 1.61-1.53 (m, 1H, CH_2(*i*Bu)), 0.94 (d, *J* = 3.6 Hz, 1.5H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.92 (d, *J* = 3.5 Hz, 1.5H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.90 (d, *J* = 3.0 Hz, 1.5H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.88 (d, *J* = 2.9 Hz, 1.5H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$), 0.86-0.86 (m, 9H, *t*Bu(TBS)), 0.08-0.08 (m, 3H, Me(TBS)), -0.04 (s, 1.3H, Me(TBS)), -0.05 (s, 1.7H, Me(TBS)) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.8 (Cq), 170.7 (Cq), 161.2 (Cq), 159.8 (Cq), 156.1 (Cq), 155.5 (Cq), 154.6 (Cq), 108.9 (Cq), 67.2 (CH), 67.2 (CH), 60.4 (CH_3), 60.2 (CH_3), 55.4 (CH_2), 55.2 (CH_2), 52.2 (CH_3), 52.0 (CH_3), 45.2 (CH_2), 44.9 (CH_2), 25.8 (CH_3), 24.2 (CH), 23.3 (CH_3), 23.2 (CH_3), 22.0 (CH_3), 21.9 (CH_3), 18.3 (Cq), 16.1 (CH_3), 13.4 (CH_3), -4.8 (CH_3), -4.9 (CH_3), -5.0 (CH_3), -5.1 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{20}H_{37}N_2O_5SSi^+$: 445.2192; gefunden (ESI-MS^+): 445.2192.

(*Z*)-2-(((2-(1-Hydroxy-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-yl)(methylthio)methylen)amino)-methylacetat (*cis*-**218**) und
(*E*)-2-(((2-(1-Hydroxy-3-methylbutyl)-5-methoxyoxazol-4-yl)(methylthio)methylen)amino)-methylacetat (trans-**218**)



***cis*-218** ***trans*-218**

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.11 unter Verwendung von Me-Thioimidat **217** (7.0 mg, 0.016 mmol), H_2O (1 M in trockenem DMF, 24 µL, 0.024 mmol) und TASF (1 M in trockenem DMF, 24 µL, 0.024 mmol) und trockenem DMF (0.32 mL) bei -20 °C. Nach 90 min unter Erwärmen auf 0 °C wurde die Reaktionsmischung wie beschrieben aufgearbeitet und das gewünschte Produkt **218** mit Verunreinigungen durch restliche Silylverbindungen als gelber öliger Feststoff (5.0 mg, 0.015 mmol, 96 % Rohausbeute) erhalten, der ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet wurde.

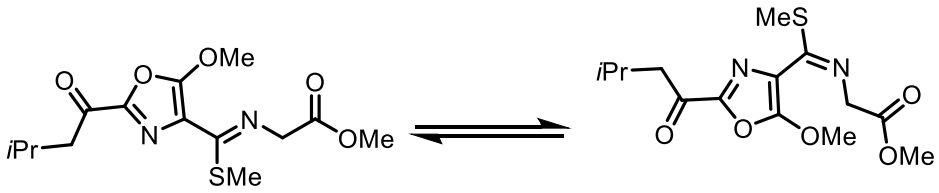
R_f (1 % NEt_3 in PE/EE (1/1)) = 0.65.

LC-MS *(1-90 ACN 5min)***:** t_r = 0.42 min (*m/z* (ESI-MS^+): 331 ($M+H^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.75-4.70 (m, 1H, CH-O), 4.43 (s, 0.8H, CH_2(Gly)), 4.41 (s, 1.0H, CH_2(Gly)), 4.11 (s, 1.7H, OMe), 4.06 (s, 1.7H, OMe), 3.77 (s, 1.3H, OMe), 3.74 (s, 1.7H, OMe), 2.45 (s, 1.4H, SMe), 2.43 (1.5H, SMe), 1.82-1.77 (m, 2H, CH_2(*i*Bu), OH), 1.70-1.60 (m, 2H, C<u>H</u>$(CH_3)_2$, CH_2(*i*Bu)), 0.97-0.95 (m, 6H, CH(C<u>H</u>$_3)_2$) ppm.

Aufgrund der Isolierung eines Rohprodukts und der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

(*Z*)-2-(((5-Methoxy-2-(3-methylbutanoyl)oxazol-4-yl)(methylthio)methylen)amino)-methylacetat (*cis*-**219**) und
(*Z*)-2-(((5-Methoxy-2-(3-methylbutanoyl)oxazol-4-yl)(methylthio)methylen)amino)-methylacetat (*trans*-**219**)



***cis*-219** ***trans*-219**

218 (5.0 mg, 0.15 mmol) wurde bei 0 °C in trockenem CH_2Cl_2 (0.31 mL) unter Ar-Atmosphäre gelöst und DMP (7.1 mg, 0.017 mmol) wurde hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei derselben Temperatur gerührt und nach vollständigem Umsatz mit ges. *aq.* Na_2CO_3 (0.2 mL) verdünnt und für weitere 20 min bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (3 x 1 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck bei maximal 39 °C konnte **219** als Rohprodukt in Form eines gelben Feststoffes (3.0 mg, 61 % Rohausbeute) erhalten werden.

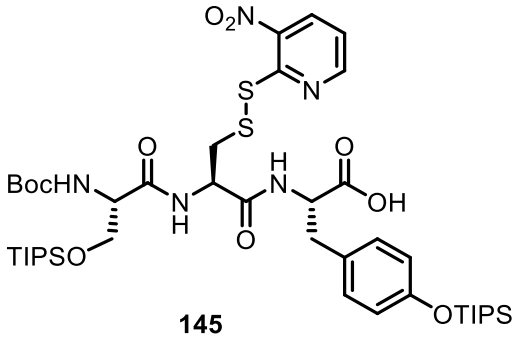
LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.253 (*m/z* (ESI-MS$^+$): 351 (M+Na$^+$)), 1.324 (*m/z* (ESI-MS$^+$): 369 (M+H_2O+Na$^+$)).

Aufgrund der Isolierung eines Rohprodukts und der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

5.3.8 Synthese der peptidischen Fragmente von MB OB3b

*5.3.8.1 Synthese der NPys-geschützten Carbonsäure **145***

(6S,9R,12S)-6-((*Tert*-butoxycarbonyl)amino)-3,3-diisopropyl-2-methyl-9-(((3-nitropyridin-2-yl)disulfaneyl)methyl)-7,10-dioxo-12-(4-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)-4-oxa-8,11-diaza-3-silatridecansäure (**145**)



145

Die Herstellung erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.6**.** Es wurde Carbonsäure **107** (49 mg, 0.054 mmol), NPysCl (21 mg, 0.11 mmol) und trockenes CH_2Cl_2 (5.4 mL) verwendet. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h gerührt. Durch die Reinigung C) mit dem Eluenten MeOH (0 %-> 1 %-> 2 %) und 1 % AcOH in CH_2Cl_2 konnte **145** als gelber Feststoff (32 mg, 0.034 mmol, 63 %) erhalten werden.

R_f (3 % MeOH in CH_2Cl_2 + 1 % AcOH) = 0.42.

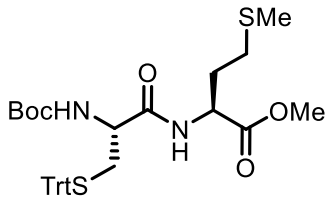
LC-MS (*DEFAULTUNPOL.M)***:*** t_r = 1.280 min (*m/z* (ESI-MS^+): 938 ($M+H^+$), 960 ($M+Na^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{43}H_{71}N_5O_{10}S_2Si_2Na^+$: 960.4079; gefunden (ESI-MS^+): 960.4073.

Aufgrund der Empfindlichkeit des Produkts wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

5.3.8.2 Synthese des südlichen Peptids

N-(*Tert*-butoxycarbonyl)-*S*-trityl-*L*-cysteinyl-*L*-methylmethioninat (**220**)



220

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Trt-Schützung eines Thiohalbacetals in einem Glykosid.[134]

Boc-Cys-Met-OMe **149** (378 mg, 1.03 mmol) wurde in trockenem Py (3.6 mL) bei RT unter Ar-Atmosphäre gelöst und TrtCl (302 mg, 1.05 mmol) wurde zur Lösung hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 66 h bei derselben Temperatur gerührt und danach mit EtOAc (150 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit 1 M *aq.* HCl (3 x 20 mL), H_2O (20 mL) und ges. *aq.* NaCl (20 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* konzentriert. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie auf Silica mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (4/1) gereinigt. Dadurch konnte **220** als farbloser Schaum (493 mg, 0.810 mmol, 79 %) gewonnen werden.

R_f (PE/EE (1/1)) = 0.46.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.024 min (*m/z* (ESI-MS^+): 631 ($M+Na^+$)).

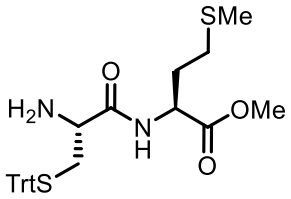
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.45 (d, *J* = 7.5 Hz, 6H, CH(Ph)), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H, CH(Ph)), 7.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH(Ph)), 6.74 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, NH(Amid)), 4.83 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH(Boc)), 4.68-4.63 (m, 1H, CH(Peptid)), 3.87 (bs, 1H, CH(Peptid)), 3.73 (s, 3H, OMe), 2.84 (bs, 1H, -CH-S(Cys)), 2.54-2.48 (m, 3H, CH-S(Cys), CH_2-S(Met)), 2.23-2.14 (m, 1H, CH(Met)), 2.06 (s, 3H, SMe), 2.01-1.92 (m, 1H, CH(Met)), 1.45 (s, 9H, CH_3(Boc)) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 171.9 (Cq), 170.3 (Cq), 155.4 (Cq), 144.4 (Cq), 129.6 (CH), 128.2 (CH), 127.0 (CH), 80.4 (Cq), 67.3 (Cq), 53.6 (CH), 52.6 (CH), 51.6 (CH_3), 33.5 (CH_2), 31.8 (CH_2), 29.8 (CH_2), 28.3 (CH_3), 15.5 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{33}H_{40}N_2O_5S_2Na^+$: 631.2276; gefunden (ESI-MS^+): 631.2276.

Opt. Rot. α = 0.272° (*c* = 1.0, $CHCl_3$); $[\boldsymbol{\alpha}]_{\boldsymbol{D}}^{\mathbf{24}} = 27.2°$.

S-Trityl-*L*-cysteinyl-*L*-methylmethioninat (**148**)



148

Die Reaktion wurde analog zu einer Boc-Entschützung in einem ähnlichen Trt-geschützten Cys-haltigen Peptid durchgeführt.[135]

220 (150 mg, 0.246 mmol) wurde bei RT mit einer Mischung aus TFA und H_2O (15/1, 3.6 mL) für 1 h behandelt behandelt. Nach vollständigem Umsatz des Startmaterials wurde die gelbe Lösung mit EtOAc (15 mL) verdünnt und die Reaktion durch Zugabe von ges *aq.* Na_2CO_3 (35 mL) beendet. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 x 15 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges *aq.* $NaHCO_3$ (15 mL) und ges. aq NaCl (15 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, um das gewünschte Produkt **148** als farblosen öligen Feststoff (116 mg, 0.234 mmol, 95 %) zu erhalten, der ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion verwendet wurde.

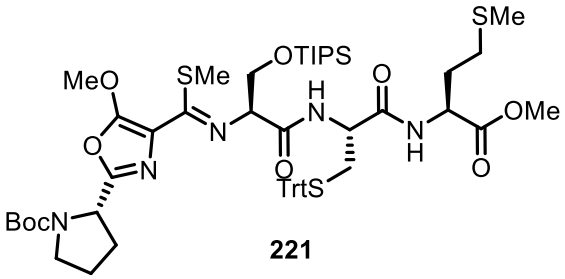
LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.325 min (*m/z* (ESI-MS^+): 531 ($M+Na^+$), 1039 ($2M+Na^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{28}H_{32}N_2O_3S_2Na^+$: 531.1752; gefunden (ESI-MS^+): 531.1749.

5.3.9 Verknüpfung der Me-Thioimidate mit den peptidischen Fragmenten

*5.3.9.1 Reaktion des Me-Thioimidats **210** mit dem Amin **148** und Entfernung der Schutzgruppen*

Tert-butyl (*S*)-2-(5-methoxy-4-((*5S,8R,11S*)-11-(methoxycarbonyl)-6,9-dioxo-5-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)-8-((tritylthio)methyl)-2,14-dithia-4,7,10-triazapentadec-3-en-3-yl)oxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (**221**)



221

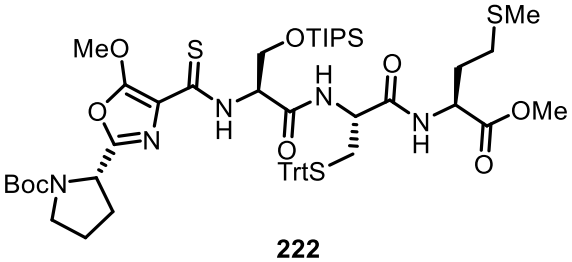
Die Reaktion wurde nach einer leicht veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.10 durchgeführt. Es wurde dafür zunächst Me-Thioimidat **210** (61 mg, 0.10 mmol) mit LiOH x H_2O (11 mg, 0.25 mmol) und H_2O (88 µL, 4.9 mmol) in 1,4-Dioxan (500 µL) für 22 h zur Reaktion gebracht. Danach wurden HATU (101 mg, 0.26 mmol) und nach 5 min Rühren das Amin **148** (52 mg, 0.10 mmol) gelöst in einer Mischung aus 1,4-Dioxan und DMF (11/3, 500 µL) wie in der allgemeinen Vorschrift beschrieben, bei 5 °C hinzugefügt und für 1.5 h bei derselben Temperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung erfolgte die Reinigung mit dem Laufmittelgemisch 1 % NEt_3 in PE/EE (4/1-> 2/1-> 1/1), die das Me-Thioimidattetramer **221** als gelbliches Öl ergab (18 mg, 0.017 mmol, 17 % über zwei Stufen).

R_f (1 % NEt_3 in PE/EE (1/1)) = 0.39.

LC-MS *(DEFAULTUNPOL.M)***:** t_r = 1.137 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1076 ($M+H^+$), 1098 ($M+Na^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{55}H_{77}N_5O_9S_3SiNa^+$: 1098.4550; gefunden (ESI-MS^+): 1098.4545.

Tert-butyl (*S*)-2-(4-(((*5S,8R,11S*)-14,14-diisopropyl-5-(methoxycarbonyl)-15-methyl-7,10-dioxo-8-((tritylthio)methyl)-13-oxa-2-thia-6,9-diaza-14-silahexadecan-11-yl)carbamothioyl)-5-methoxyoxazol-2-yl)pyrrolidin-1-carboxylat (**222**)



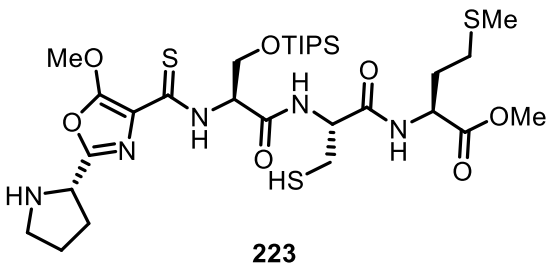
222

Das Me-Thioimidattetramer **221** (5 mg, 0.005 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre bei RT in trockenem DMF (0.46 mL) gelöst und eine Lösung aus NaSH x H_2O (8 mg, 0.1 mmol) in entgastem H_2O (0.12 mL) wurde hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 30 h bei derselben Temperatur stark gerührt und durch Zugabe von ges. *aq.* $NaHCO_3$ (1 mL), ges. *aq.* NaCl (1 mL) und EtOAc (5 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit ges. *aq.* $NaHCO_3$ (2 x 1 mL), H_2O (1 mL) und ges. *aq.* NaCl (1 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Dies ergab **222** als Rohprodukt in Form eines farblosen öligen Feststoffes (3 mg, 0.003 mmol, 60 %), der nicht weiter gereinigt und direkt für die nächste Reaktion eingesetzt wurde.

LC-MS *(25-100(2) ACN 5min)***:** t_r = 3.14 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1062 ($M+H^+$)).

Aufgrund der Isolierung eines Rohprodukts und der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

N-(5-Methoxy-2-((*S*)-pyrrolidin-2-yl)oxazol-4-carbonothioyl)-*O*-(triisopropylsilyl)-*L*-seryl-*L*-cysteinyl-*L*-methylmethioninat (**223**)



223

Es wurde die Vorschrift zur Entfernung einer Trt-Schutzgruppe aus einem Cys-Dopamin verwendet.[107]

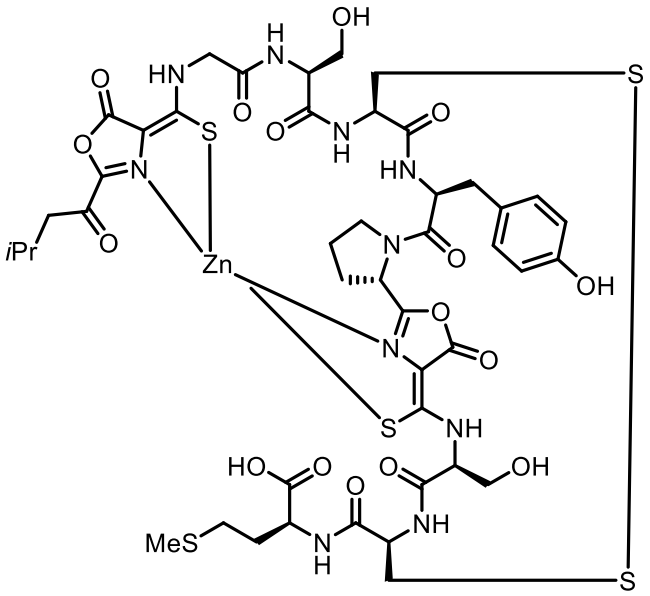
Das als Rohprodukt erhaltene Thioamidtetramer **222** (5 mg, 0.005 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem CH_2Cl_2 (0.47 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Im Anschluss wurden nacheinander TIPSH (9.6 µL, 0.047 mmol) und TFA (10.7 µL, 0.094 mmol) hinzugetropft und die Mischung wurde für 1.5 h bei derselben Temperatur gerührt. Nach dieser Zeit wurde sie auf RT erwärmt und für weitere 2 h gerührt. Dann konnte ein vollständiger Umsatz zu **223** per LC-MS festgestellt werden und die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. *aq.* Na_2CO_3 (0.1 mL) basifiziert. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 1 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Thiolamin **223** weder in der organischen noch in der wässrigen Phase per LC-MS nachgewiesen. Daher wurde dieser Ansatz schlussendlich verworfen.

LC-MS *(25-100(2) ACN 5min)***:** t_r = 1.92 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 720 (M+H)).

5.4 SYNTHESE UND ANWENDUNG MB OB3B-BASIERTER SONDEN

5.4.1 Verwendung von MB OB3b(Zn) als Ausgangsverbindung für weitere chemische Modifikationen

MB OB3b(Zn)



MB OB3b(Zn)

Die Chelatisierung von Zn^{2+}-Ionen erfolgt auf Grundlage eines Protokolls, das von ZISCHKA *et al.* entwickelt wurde.[23]

MB OB3b (100 mg, 0.0870 mmol) wurde in 10 mM *aq.* PB (pH 6.5, 8.7 mL) bei RT gelöst und eine 20 mM $ZnSO_4$ x 7 H_2O Lösung (4.33 mL; 0.0870 mmol) wurde in Schritten von 433 µL hinzugefügt. Nach jeder dritten Zugabe wurde der pH-Wert kontrolliert und nach vollständiger Zugabe wurde dieser durch Zugabe von 0.1 mM *aq.* Na_2HPO_4 wieder auf einen Wert von 6.5 gebracht. Im Anschluss wurde die Lösung durch Gefriertrocknung konzentriert und der Rückstand in MeOH gelöst und über Kieselgur filtriert. Das Filtrat wurde vorsichtig am Rotationsverdampfer bei 35 °C unter vermindertem Druck eingeengt, der Rückstand erneut in H_2O gelöst, über einen Spritzenfilter filtriert und gefriergetrocknet. Dadurch wurde **MB OB3b(Zn)** als gelber Feststoff erhalten (92 mg, 0.075 mmol, 87 %).

LC-MS (*1-90 ACN 5min*)**:** t_r = 2.82 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1217 ($M+H^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ = 8.46 (s, 1H), 8.04-7.94 (m, 2H), 7.19 (bs, 2H), 6.89 (bs, 2H), 6.81-6.79 (m, 2H), 6.71-6.69 (m, 2H), 6.45 (bs,1H), 5.19 (bs, 1H), 5.14 (bs, 1H),

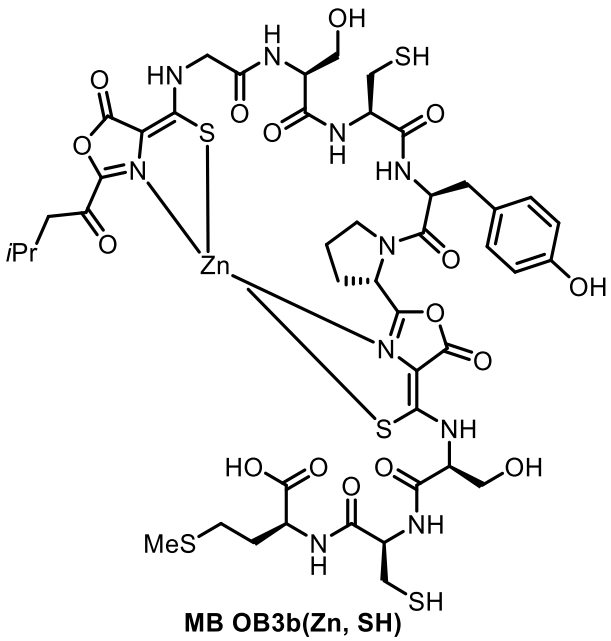
5.06 (bs, 1H), 4.57 (bs, 1H), 4.53 (bs, 1H), 4.41-4.36 (m, 2H), 4.28-4.25 (m, 1H), 4.11-3.97 (m, 7H), 3.82-3.79 (m, 2H), 3.66-3.58 (m, 4H), 3.50-3.41 (m, 2H), 3.36 (bs, 4H), 2.83 (bs, 4H), 2.72-2.68 (m, 3H), 2.24-2.12 (m, 5H), 1.95-1.93 (m, 3H), 1.35-1.21 (m, 6H), 0.98-0.92 (m, 8H) ppm.

Des schlechten Signal zu Rauschen Verhältnis im ^{1}H-NMR-Spektrum wurde kein ^{13}C-NMR Spektrum aufgenommen.

HRMS: berechnet m/z für $C_{45}H_{57}N_{10}O_{16}S_5Zn^+$: 1217.1849; gefunden (ESI-MS$^+$): 1217.1848.

5.4.2 Modifikation der Cys im Peptidrückgrat

MB OB3b(Zn, SH)



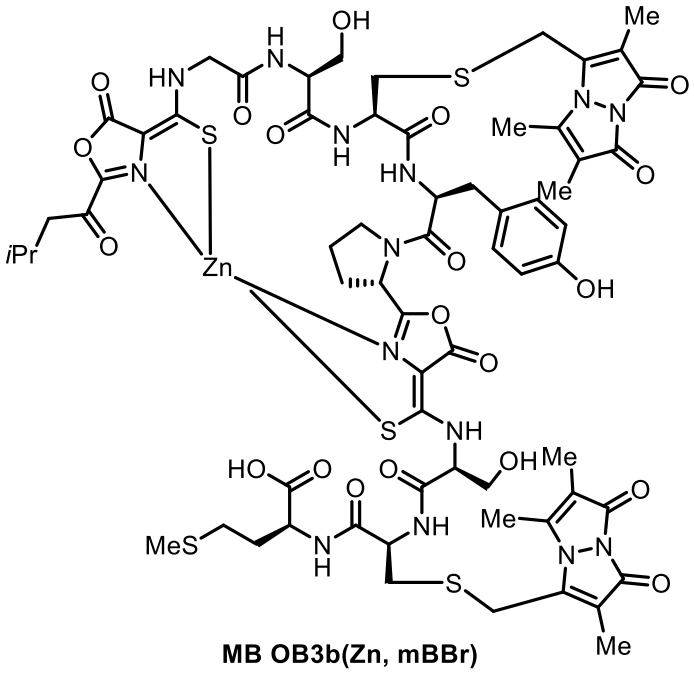
MB OB3b(Zn, SH)

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die bekannte Reduktion der Disulfidbindung in **MB OB3b(Cu)**.[140]

MB OB3b(Zn) (5.0 mg, 4.1 µmol) wurde in 50 mM *aq.* Tris Puffer (pH 8.0, 0.82 mL) bei RT gelöst und die Lösung wurde für 5 min entgast, indem ein Ar-Strom durch sie geleitet wurden. TCEP-HCl (11.8 mg, 41.0 µmol) wurde unter Ar-Atmosphäre hinzugefügt und die Reaktionsmischung bei RT für 2 h gerührt. Anschließend wurde sie mit einer Mischung aus MeCN/H_2O (4/1, 5 mL) verdünnt, über Kieselgur filtriert und mit H_2O (10 mL) eluiert. Das Filtrat wurde durch Gefriertrocknung konzentriert, der Rückstand in MeCN aufgenommen und durch eine HPLC (Eluent: MeCN in H_2O + 0.05 % TFA: 1 %->

99 %) gereinigt. Dadurch konnte ein hellgelber Feststoff (0.7 mg, 0.6 µmol, 15 %) isoliert werden, der laut LC-MS das gewünschte Produkt **MB OB3b(Zn, SH)** in Spuren enthielt. **LC-MS** (*1-90 ACN 5min*)**:** t_r = 2.84 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1219 (M+H$^+$).

MB OB3b(Zn, mBBr)



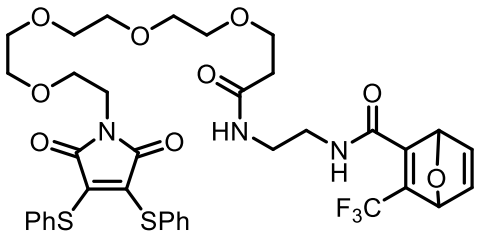
MB OB3b(Zn, mBBr)

Die Synthese erfolgte analog zur Modifikation der beiden Thiole in **MB OB3b(Cu, SH)**.[140]

MB OB3b(Zn, SH) (0.30 mg, 0.25 µmol) wurde in 50 mM *aq.* Tris Puffer (pH 8.0, 49 µL) bei RT gelöst und die Lösung wurde für 5 min entgast, indem ein Ar-Strom durch sie geleitet wurden. Anschließend wurde mBBr (0.33 mg, 1.2 µmol) unter Ar-Atmosphäre hinzugefügt, die Reaktionsmischung unter Lichtausschluss über Nacht gerührt und dann mit MeCN (0.5 mL) verdünnt und mittels LC-MS untersucht. Dabei wurde die Bildung des gewünschten Produkts **MB OB3b(Zn, mBBr)** nicht festgestellt. Daher wurde dieser Ansatz verworfen.

5.4.3 *Disulfide Rebridging* zur Modifikation von MB OB3b(Zn)

N-(1-(2,5-Dioxo-3,4-bis(phenylthio)-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaoctadecan-18-yl)-3-(trifluormethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carboxamid (**250**)



250

250 wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.4 synthetisiert. Es wurden Carbonsäure **240** (103 mg, 0.185 mmol), Oxyma (42 mg, 0.29 mmol), EDC-HCl (53 mg, 0.28 mmol), $NaHCO_3$ (93 mg, 1.1 mmol), das TFA-Salz des Rutjes-Linkers **249** (73 mg, 0.20 mmol), trockenes CH_2Cl_2 (0.9 mL) und trockenes DMF (0.9 mL) bei einer Reaktionsdauer von 22 h verwendet. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mit dem Laufmittelgemisch EE in PE (30 %-> 50 %-> 100 %) gereinigt, um **250** als gelbes Öl (87 mg, 0.11 mmol, 60 %) zu erhalten.

R_f (EE/MeOH, 3/1) = 0.70.

LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 1.498 min (*m/z* (ESI-MS^+): 814 ($M+Na^+$)).

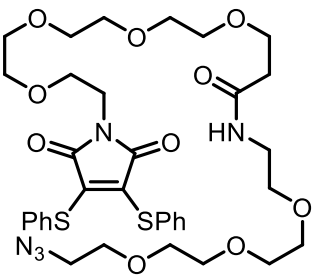
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.34-7.32 (m, 1H, CH(Olefin)), 7.28-7.17 (m, 10H, CH(Ph)), 7.14-7.13 (m, 1H, CH(Olefin)), 7.09-7.04 (m, 2H, 2 x NH), 5.60 (bs, 2H, OCH), 3.71-3.68 (m, 4H, N-CH_2, CH_2-O), 3.63-3.56 (m, 14H, CH_2-O), 3.51-3.33 (m, 4H, NH-($C\underline{H}_2$)$_2$NH), 2.46 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, $C\underline{H}_2$-CONH) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 178.2 (Cq), 173.5 (Cq), 166.9 (Cq), 143.8 (CH), 142.2 (CH), 135.8 (Cq), 132.0 (CH), 129.1 (CH), 129.0 (Cq), 128.5 (CH), 86.1 (CH), 83.6 (CH), 70.7 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.3 (CH_2), 70.2 (CH_2), 70.0 (CH_2), 67.8 (CH_2), 67.2 (CH_2), 41.0 (CH_2), 38.8 (CH_2), 38.1 (CH_2), 36.9 (CH_2) ppm.

Aufgrund der geringen Konzentration wurden die Kohlenstoffe in Nachbarschaft zum Fluoratom nicht beobachtet.

HRMS: berechnet m/z für $C_{37}H_{40}F_3N_3O_9S_2Na^+$: 814.2056; gefunden (ESI-MS^+): 814.2048.

N-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1-(2,5-dioxo-3,4-bis(phenylthio)-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecansäureamid (**242**)



242

242 wurde nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.4 synthetisiert. Es wurden Carbonsäure **240** (200 mg, 0.356 mmol), Oxyma (81 mg, 0.57 mmol), EDC-HCl (103 mg, 0.534 mmol), $NaHCO_3$ (150 mg, 1.78 mmol), H_2N-PEG(3)-N_3 **251** (87 µL, 0.39 mmol), trockenes CH_2Cl_2 (1.8 mL) und trockenes DMF (1.8 mL) bei einer Reaktionsdauer von 18 h verwendet. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mit dem Laufmittelgemisch MeOH in EE (0 %-> 10 %-> 20 %) gereinigt, um **242** als gelbes Öl (196 mg, 0.257 mmol, 72 %) zu erhalten.

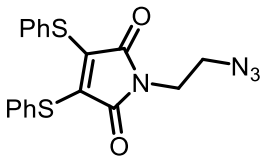
R_f (EE/MeOH, 3/1) = 0.68.

LC-MS *(DEFAULT.M)***:** t_r = 1.497 min (*m/z* (ESI-MS^+): 784 ($M+Na^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.26-7.16 (m, 10H, CH(Ph)), 6.59 (bs, 1H, NH), 3.71-3.50 (m, 30H, N-CH_2, CH_2-O), 3.41 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, CONH-C$\underline{H_2}$-), 3.36 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH_2-N_3), 2.43 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, C$\underline{H_2}$-CONH) ppm.

Die Analytik stimmte mit der Literatur überein.[146]

1-(2-Azidoethyl)-3,4-bis(phenylthio)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**258**) durch Alkylierung mit dem Mesylat **257**



258

Die Reaktion wurde analog zu einer Alkylierung von Sulfonamiden mit **257** durchgeführt.[153]

Zu einer Lösung aus Maleimid **256** (47 mg, 0.15 mmol) in trockenem MeCN unter Ar-Atmosphäre wurden bei RT nacheinander 18-Krone-6 (40 mg, 0.15 mmol), gemörsertes

trockenes K_2CO_3 (25 mg, 0.18 mmol) und nach 5 min Rühren Azidoethylmesylat **257** (30 mg, 0.18 mmol) gegeben. Die Mischung wurde unter Lichtausschluss für 17.5 h bei derselben Temperatur gerührt bevor sie über Kieselgur filtriert, mit MeCN eluiert und unter vermindertem Druck konzentriert wurde. Der Rückstand wurde auf Kieselgur immobilisiert und chromatographisch auf Silica mit dem Laufmittelgemisch PE/EE (10/1-> 6/1-> 4/1) gereinigt wurde. Dadurch konnte **258** als orangenes Öl erhalten werden (13 mg, 0.034 mmol, 23 %).

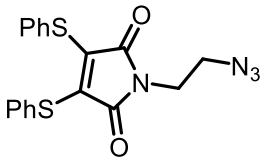
R_f (PE/EE (3/1)) = 0.38.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.33-7.21 (m, 10H, CH(Ph)), 3.71 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, $(OC)_2N$-CH_2), 3.47 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH_2-N_3) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 166.6 (Cq), 136.0 (Cq), 132.1 (CH), 129.2 (CH), 129.0 (Cq), 128.6 (CH),48.8 (CH_2), 37.9 (CH_2) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{18}H_{14}N_4O_2S_2Na^+$: 405.0456; gefunden (ESI-MS$^+$): 405.0446.

1-(2-Azidoethyl)-3,4-bis(phenylthio)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**258**) durch Reaktion mit dem Hydrochlorid **260**



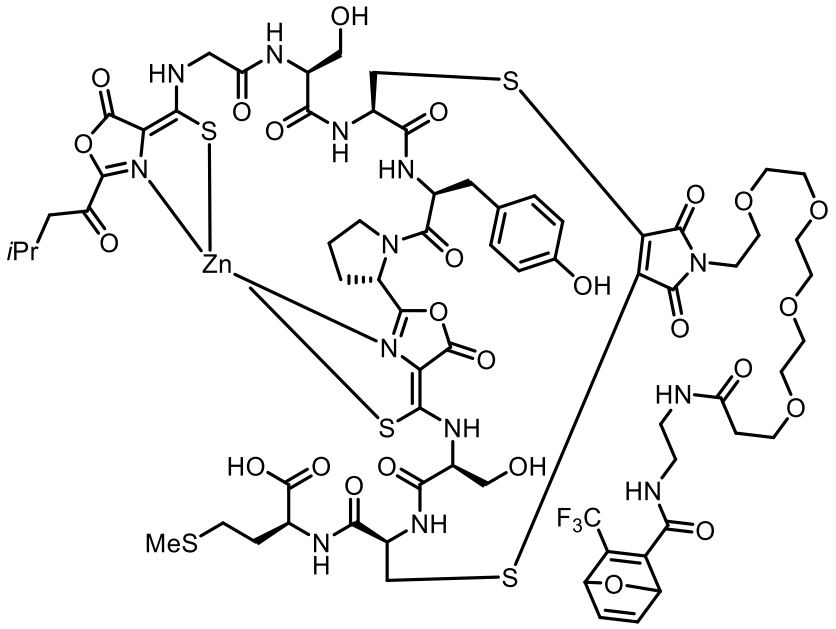
258

Die Reaktion wurde analog zu einer Synthese ähnlicher Dithiomaleimide durchgeführt.[156]

Das Carbamat **259** (104 mg, 0.280 mmol) und trockenes NEt_3 (0.06 mL, 0.4 mmol), wurden unter Ar-Atmosphäre bei RT in trockenem CH_2Cl_2 (3.1 mL) gelöst und das Hydrochlorid **260** (52 mg, 0.42 mmol) wurde hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 27 h bei derselben Temperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Der Rückstand wurde mittels Kieselgel-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE (10/1-> 8/1-> 6/1-> 3/1)) gereinigt. Dies lieferte das gewünschte Produkt **258** in Form eines orangenen viskosen Öls (31 mg, 0.081 mmol, 29 %).

Die Analytik stimmte mit der vorherigen überein.

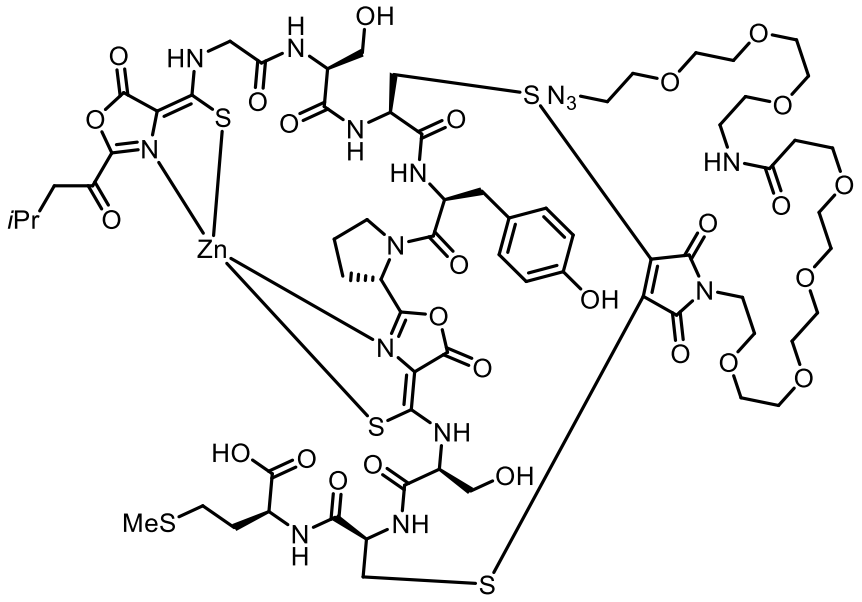
MB OB3b(Zn, Maleimid, Rutjes)



MB OB3b(Zn, Maleimid, Rutjes)

Zur Durchführung wurde die allgemeine Vorschrift 5.1.3.15 angewandt. In diesem Zusammenhang wurden zunächst **MB OB3b(Zn)** (1.0 mg, 0.82 µmol) und TCEP (3.3 mg, 11 µmol) in entgastem 66 mM *aq.* PB (pH 7.8, 3.3 mL) für 3 h bei RT zur Reaktion gebracht. Danach wurde eine Lösung aus **250** (3.3 mg, 4.1 µmol) in entgastem MeCN (84 µL) bei RT hinzugefügt und die Mischung für 2 h weiter gerührt. Nach dieser Zeit konnte zwar ein vollständiger Umsatz der Startmaterialien beobachtet werden, jedoch wurde keine Bildung des gewünschten Addukts **MB OB3b(Zn, Maleimid, Rutjes)** nachgewiesen. Deshalb wurde der Ansatz nicht gereinigt und direkt verworfen.

MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)



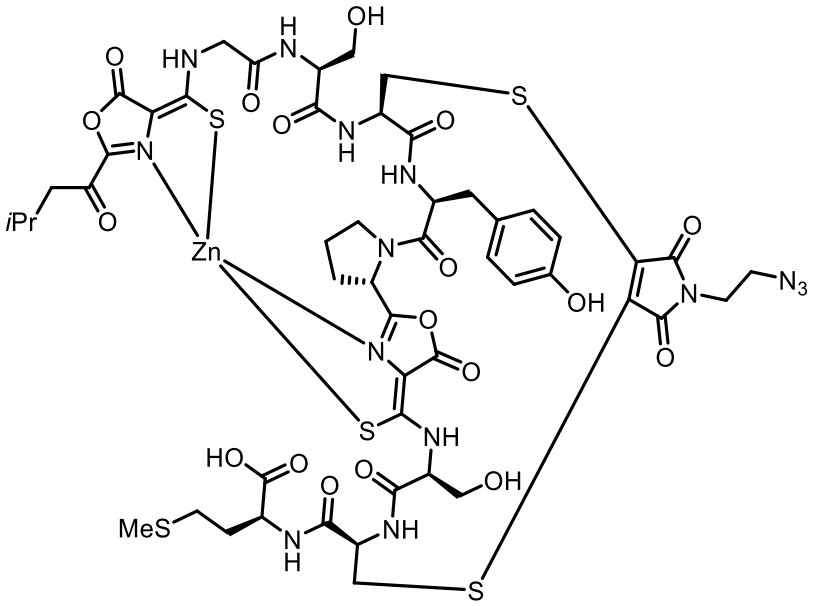
MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)

Zur Durchführung wurde die allgemeine Vorschrift 5.1.3.15 angewandt. In diesem Zusammenhang wurden zunächst **MB OB3b(Zn)** (50 mg, 41 µmol) und TCEP (18 mg, 62 µmol) in entgastem 66 mM *aq.* PB (pH 7.8, 8.2 mL) für 2.5 h bei RT zur Reaktion gebracht. Danach wurde eine Lösung aus **242** (63 mg, 82 µmol) in entgastem MeCN (407 µL) bei 0 °C hinzugefügt und die Mischung für 2 h weiter gerührt. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionsmischung filtriert und mittels HPLC (Eluent: MeCN (80 % in H_2O, 10 mM NH_4OAc, pH 6.5) in H_2O (10 mM NH_4OAc, pH 6.5): 5 %-> 60 %-> 70 %-> 100 %) gereinigt, um den modifizierten Naturstoff **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** als gelben Feststoff (18 mg, 510 µmol, 25 %) zu isolieren.

LC-MS (*1-90 ACN 5min*)**:** t_r = 2.81 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1760 ($M+H^+$)), 2.89 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1698 ($M-Zn+H^+$)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{68}H_{95}N_{15}O_{26}S_5Zn^{2+}$: 880.7234; gefunden (ESI-MS^+): 880.7237.

MB OB3b(Zn, Maleimid-short, Azid)



MB OB3b(Zn, Maleimid-short, Azid)

Zur Durchführung wurde die allgemeine Vorschrift 5.1.3.15 angewandt. In diesem Zusammenhang wurden zunächst **MB OB3b(Zn)** (16 mg, 13 µmol) und TCEP (5.6 mg, 20 µmol) in entgastem 66 mM *aq.* PB (pH 7.8, 2.6 mL) für 2.5 h bei RT zur Reaktion gebracht. Danach wurde eine Lösung aus Azid-Rebridging-Linker **258** (10 mg, 26 µmol) in entgastem MeCN (656 µL) bei 0 °C hinzugefügt und die Mischung für 2 h weiter gerührt. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionsmischung filtriert und mittels HPLC (Eluent: MeCN (80 % in H_2O, 10 mM NH_4OAc, pH 6.5) in H_2O (10 mM NH_4OAc, pH 6.5): 5 %-> 60 %-> 70 %-> 100 %) gereinigt, um den modifizierten Naturstoff **MB OB3b(Zn, Maleimid-short, Azid)** als gelben Feststoff (5.0 mg, 3.6 µmol, 28 %) zu gewinnen.

LC-MS (*DEFAULT.M*)**:** t_r = 1.165 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1319 (M-Zn+H^+)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{51}H_{61}N_{14}O_{18}S_5Zn^+$: 1381.2183; gefunden (ESI-MS^+): 1381.2185.

Metallgehaltanalysen

Die Untersuchungen wurden von YASCHAR KABIRI, M.Sc am Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München durchgeführt.

Die nach 5.1.3.17 kultivierten HepG2-Zellen wurden auf 6 cm Zellkulturplatten ($1 \cdot 10^6$ Zellen pro Platte) ausgesät, für 24 h wachsen gelassen und mit PBS gewaschen (1 x). Für die verschiedenen Experimente wurden die Zellen im Folgenden unterschiedlich behandelt:

1) Kontrolle: Die Zellen wurden mit dem unter 5.1.3.17 beschriebenen Medium für 48 h inkubiert, mit PBS gewaschen (2 x 5 mL), mit Trypsin abgelöst (0.5 mL, 1 g Trypsin/100 ml *ROTI®Cell Hanks' BSS*[203], 5 min, 37 °C), erneut mit PBS gewaschen und in einer Neubauerkammer gezählt. Im Anschluss wurden diese mit Suprapur® 65 % *aq.* HNO_3 aufgeschlossen und der angegebene Metallgehalt mittels Spectro ARCOS ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*) bestimmt.

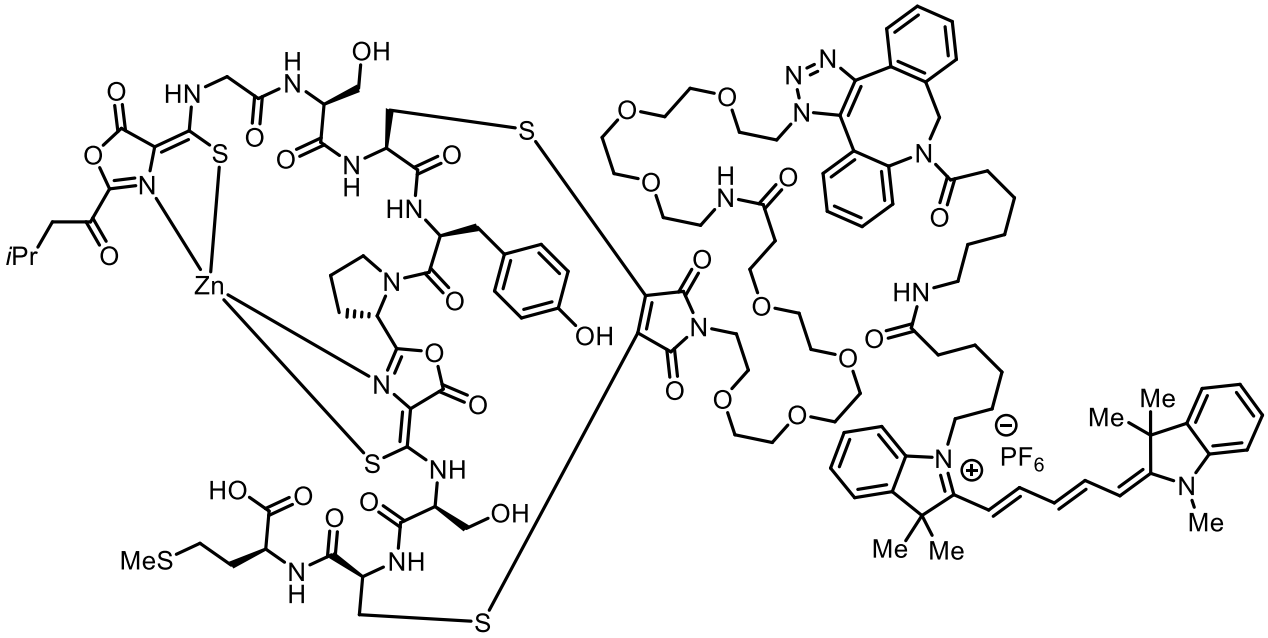
2) $[Cu(His)_2]$: Die Zellen wurden mit der $[Cu(His)_2]$-Behandlungslösung (3 mL, finale Konzentration: 150 µM) für 24 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt inkubiert, mit PBS gewaschen (2x 5 mL) und für weitere 24 h mit dem unter 5.1.3.17 beschriebenen Medium inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen (2 x 5 mL), mit Trypsin abgelöst (0.5 mL, 1 g Trypsin/100 ml *ROTI®Cell Hanks' BSS*[203], 5 min, 37 °C), erneut mit PBS gewaschen und in einer Neubauerkammer gezählt. Der Aufschluss und die Vermessung erfolgten analog zu 1).

3) **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)/MB OB3b(Zn)**: Die Behandlung der Zellen erfolgte analog zu 2) mit dem Unterschied, dass der zweite Inkubationsschritt mit einer Behandlungslösung aus dem zu untersuchenden Chelator in dem unter 5.1.3.17 beschriebenen Medium (3 mL, 40 µM) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt für 24 h beziehungsweise für zweimal 12 h mit zwischenzeitlichem Waschen erfolgte.

Die Anfertigung der Proben sowie Messungen erfolgten jeweils in einer Vierfachbestimmmung.

5.4.4 Verknüpfung des modifizierten Naturstoffes mit DBCO-tragenden Markern

MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)

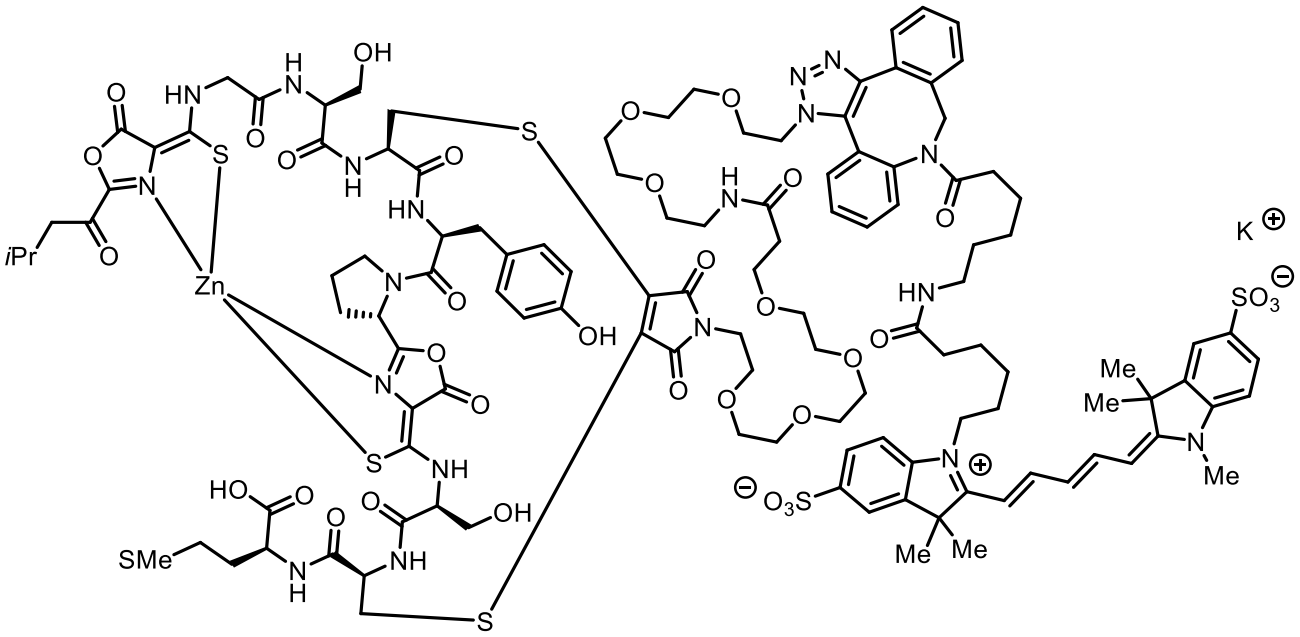


MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)

Die Synthese des Konjugats erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.16. Es wurden **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** (3.0 mg, 1.7 µmol), 10 mM *aq.* PB (pH 6.5, 380 µL) und eine Lösung aus Cy-5-DBCO (2.4 mg, 2.6 µmol) in DMSO (190 µL) bei einer Reaktionszeit von 1 h verwendet. Die Suspension wurde wie in der allgemeinen Vorschrift beschrieben mit dem Eluenten MeCN (80 % in H_2O, 10 mM NH_4OAc, pH 6.5) in H_2O (10 mM NH_4OAc, pH 6.5): 25 %-> 60 %-> 70 %-> 100 %) gereinigt, um **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** als dunkelblauen Feststoff (2.7 mg, 1.0 µmol, 59 %) zu erhalten.

LC-MS (*1-90 ACN 5min*)**:** t_r = 3.51 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1241 (M^+-Zn+H^+), 1272 (M^++H^+)).
HRMS: berechnet m/z für $C_{121}H_{153}N_{19}O_{28}S_5Zn^{2+}$: 1271.9514; gefunden (ESI-MS$^+$): 1271.9520.

MB OB3b(Zn, Maleimid, Sulfo-Cy-5)



MB OB3b(Zn, Maleimid, Sulfo-Cy-5)

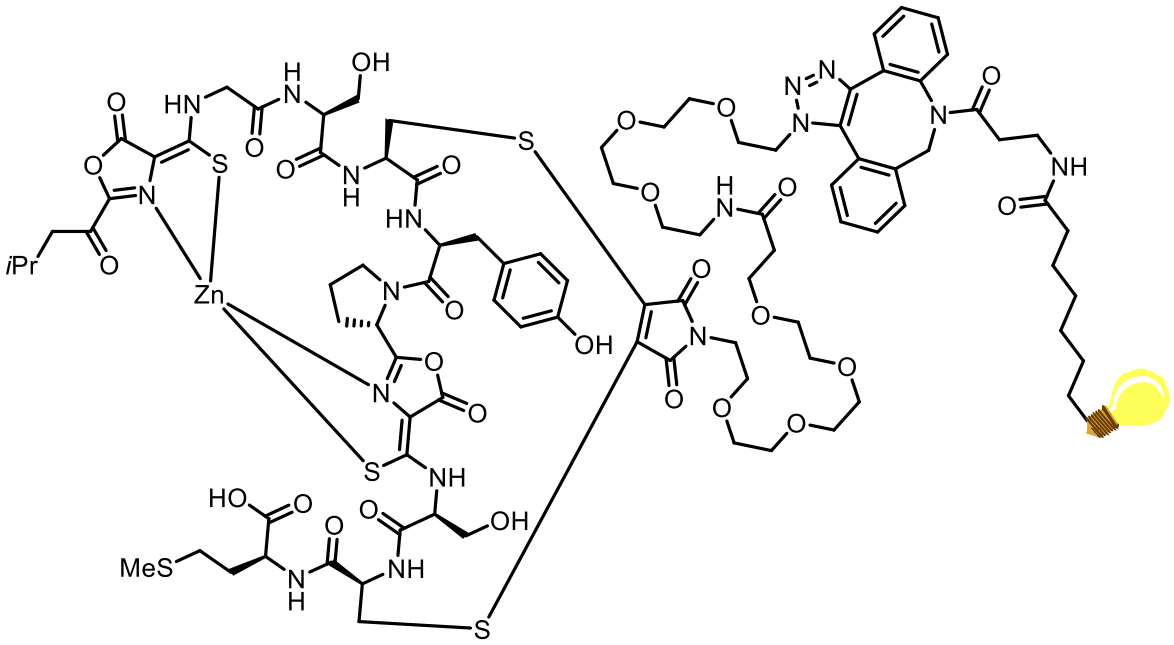
Die Synthese des Konjugats erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.16. Es wurden **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** (3.0 mg, 1.7 µmol), 10 mM *aq.* PB (pH 6.5, 340 µL) und eine Lösung aus Sulfo-Cy-5-DBCO (2.1 mg, 2.1 µmol) in 10 mM *aq.* PB (pH 6.5, 340 µL) bei einer Reaktionszeit von 1 h verwendet. Die Lösung wurde wie in der allgemeinen Vorschrift beschrieben mit dem Eluenten MeCN (80 % in H_2O, 10 mM NH_4OAc, pH 6.5) in H_2O (10 mM NH_4OAc, pH 6.5): 25 %-> 60 %-> 70 %-> 100 %) gereinigt, um **MB OB3b(Zn, Maleimid, Sulfo-Cy-5)** als blauen Feststoff (3.3 mg, 1.2 µmol, 71 %) zu erhalten.

Zur weiteren Reinigung wurde ein Aliquot **MB OB3b(Zn, Maleimid, Sulfo-Cy-5)** (1.2 mg, 0.44 µmol) in 10 mM NH_4OAc-Puffer gelöst und unter Lichtausschluss über einen Zentrifugenfilter mit einem 3000 Da *Cut-off* filtriert (3x). Der Rückstand wurde wieder in 10 mM NH_4OAc-Puffer aufgenommen und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Dies lieferte **MB OB3b(Zn, Maleimid, Sulfo-Cy-5)** als dunkelblauen Feststoff (1.0 mg, 0.36 µmol, 82 %)

LC-MS (*1-90 ACN 5min*)**:** t_r = 3.05 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1352 (M^-+3H^+)), 3.14 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1321 (M^--Zn+3H^+)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{121}H_{153}N_{19}O_{34}S_7Zn^{2+}$: 1351.9082; gefunden (ESI-MS^+): 1351.9086.

MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)



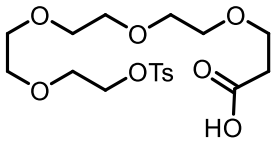
MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)

Die Synthese des Konjugats erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.16. Es wurden **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** (0.5 mg, 0.3 µmol), 10 mM *aq.* PB (pH 6.5, 546 µL) und eine Lösung aus sNIR-DBCO (1.2 mg, 0.97 µmol) in 10 mM *aq.* PB (pH 6.5, 90 µL) bei einer Reaktionszeit von 1 h verwendet. bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Die Lösung wurde wie in der allgemeinen Vorschrift beschrieben mit dem Eluenten MeCN (80 % in H_2O, 10 mM NH_4OAc, pH 6.5) in H_2O (10 mM NH_4OAc, pH 6.5): 25 %-> 60 %-> 70 %-> 100 %) gereinigt, um **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** als grünen Feststoff (0.6 mg, 0.2 µmol, 71 %) zu erhalten.

LC-MS (*DEFAULT*)**:** t_r = 1.155 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1471 (M-Zn+2H^+), 1502 (M+2H^+)).

HRMS: berechnet m/z für $C_{129}H_{161}N_{20}O_{41}S_9Zn^{3-}$: 999.2635; gefunden (ESI-MS^+): 999.2649.

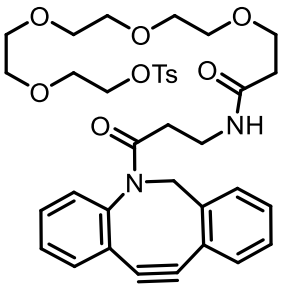
1-(Tosyloxy)-3,6,9,12-tetraoxapentadecansäure (**262**)



262

Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an die Synthese des PEG3 Analogons.[174]
TsO-PEG4-*t*Bu-Ester **261** (80 mg, 0.17 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem CH_2Cl_2 (0.69 mL) bei RT gelöst und TFA (0.69 mL, 9.0 mmol) wurde hinzu getropft. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 4 h gerührt, bevor sie unter vermindertem Druck konzentriert und der Rückstand mit PhMe (4 x 1.5 mL) coevaporiert wurde. Dies lieferte die Carbonsäure **262** als farbloses viskoses Öl (70 mg, 0.17 mmol, quant.).
R_f (EE) = 0.29.
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH(Ts)), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH(Ts)), 4.17 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H, C$\underline{H}_2$-OTs), 3.78 (t, *J* = 5.9Hz, 2H, C$\underline{H}_2$-CH_2CO_2H), 3.71 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H, C$\underline{H}_2$-CH_2OTs), 3.68-3.60 (m, 12H, 6xCH_2-O), 2.62 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, C$\underline{H}_2$-CO_2H), 2.45 (s, 3H, CH_3(Ts)) ppm.
^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 136.5 (Cq), 130.0 (CH), 128.2 (CH), 70.9 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.3 (CH_2), 70.2 (CH_2), 69.4 (CH_2), 68.8 (CH_2), 66.6 (CH_2), 44.7 (CH_2), 39.0 (CH_3) ppm.
Zwei Cq wurden aufgrund der großen Verdünnung nicht beobachtet.
HRMS: berechnet m/z für $C_{18}H_{28}O_9SNa^+$: 443.1352; gefunden (ESI-MS$^+$): 443.1353.

1-(Tosyloxy)-3,6,9,12-tetraoxapentadecanoyl-DBCO-Amid (**264**)



264

Die Synthese erfolgte nach einer leicht veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung der Carbonsäure **262** (70 mg, 0.17 mmol), DIPEA (0.09 mL, 0.5 mmol), HATU (102 mg, 0.266 mmol), DBCO-Amin **263** (65 mg, 0.23 mmol, Lösung

in trockenem CH_2Cl_2 (0.85 mL)) und trockenem CH_2Cl_2 (0.85 mL) bei einer Reaktionsdauer von 15 h. Die Aufreinigung erfolgte mit EE/THF (1/1) als Laufmittel und ergab **264** in Form eines leicht gelben viskosen Öls, das durch Lyophilisation weiter getrocknet wurde (90 mg, 0.15 mmol, 80 %).

R_f (EE/THF (1/1)) = 0.19.

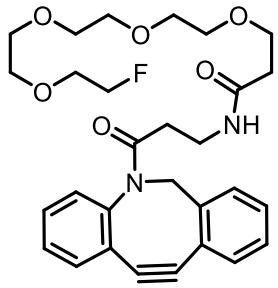
LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 1.441 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 679 (M+H$^+$), 701 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH(Ts)), 7.67 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, CH(DBCO)), 7.39-7.26 (m, 9H, CH(Ts), 7xCH(DBCO)), 6.58 (bs, 1H, NH), 5.30-5.01 (m, 1H, CH_2(DBCO)), 4.13 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H, C$\underline{H_2}$-OTs), 3.71-3.51 (m, 17H, CH_2(DBCO), 8xCH_2-O), 3.36-3.29 (m, 1H, C$\underline{H_2}$-NH), 3.24-3.18 (m, 1H, C$\underline{H_2}$-NH), 2.53 (ddd, *J* = 16.6, 7.5, 4.6 Hz, 1H, C$\underline{H_2}$-CH_2NH), 2.44 (s, 3H, CH_3(Ts)), 2.34 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, C$\underline{H_2}$-CONH), 1.93 (ddd, *J* = 16.6, 6.5, 4.5 Hz, 1H, C$\underline{H_2}$-CH_2NH) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 173.8 (Cq), 172.1 (Cq), 151.0 (Cq), 148.1 (Cq), 145.0 (Cq), 133.0 (Cq), 132.2 (CH), 130.0 (CH), 129.3 (CH), 128.9 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.3 (CH), 125.7 (CH), 123.1 (Cq), 122.5 (Cq), 114.8 (Cq), 107.9 (Cq), 70.7 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.4 (CH_2), 70.3 (CH_2), 70.2 (CH_2), 69.4 (CH_2), 68.8 (CH_2), 66.9 (CH_2), 55.7 (CH_2), 36.2 (CH_2), 35.8 (CH_2), 34.6 (CH_2), 21.8 (CH_3) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{36}H_{42}N_2O_9SNa^+$: 701.2509; gefunden (ESI-MS$^+$): 701.2496.

1-Fluor-3,6,9,12-tetraoxapentadecanoyl-DBCO-amid (**265**)



265

Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an die Synthese des PEG3 Analogons.[174]

Eine Mischung aus **264** (5 mg, 0.007 mmol) und TBAF (1 M in THF, 15 µL 0.015 mmol) in trockenem THF (2.5 mL) wurde unter Ar-Atmosphäre für 2 h auf 65 °C erhitzt. Nach vollständigem Umsatz des Tosylats wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck

entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch auf Kieselgel gereinigt (Eluent: EE/THF (1/1->1/2)), um das Fluorid **265** als hellgelbes Öl zu isolieren (4 mg, 0.007 mmol, quant.), das nicht abtrennbare Lösungsmittelreste enthielt.

R_f (EE/THF (1/2)) = 0.29.

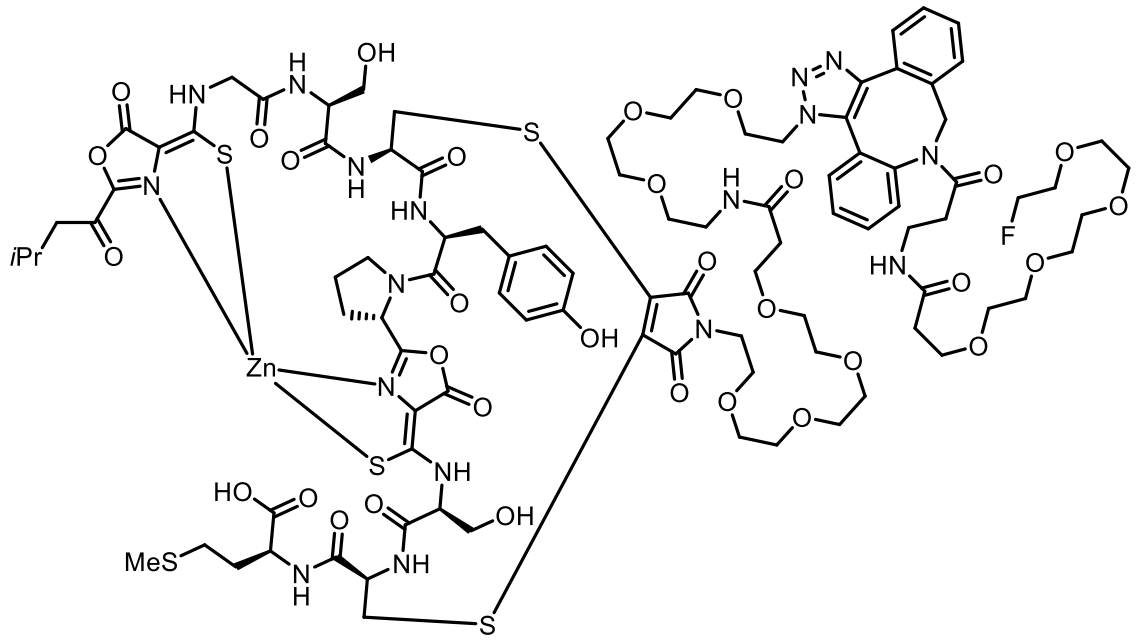
LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 1.250 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 527 (M+H$^+$), 549 (M+Na$^+$)).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.71-7.66 (m, 2H, CH(DBCO)), 7.54-7.52 (m, 2H, CH(DBCO)), 7.40-7.27 (m, 4H, CH(DBCO)), 6.56 (bs, 1H, NH), 5.13 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, CH_2(DBCO)), 4.55 (dt, *J* = 47.7, 4.1 Hz, 2H, CH_2-F), 4.37- 4.21 (m, 4H, C$\underline{H}_2$-CH_2F, CH_2-O), 3.76 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H, CH_2(DBCO)), 3.70-3.46 (m, 12H, 6xCH_2-O), 3.37-3.22 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-NH), 2.49 (ddd, *J* = 16.8, 7.0, 4.7 Hz, 1H, C$\underline{H}_2$-CH_2NH), 2.33-2.29 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-CONH), 1.96 (ddd, *J* = 16.6, 7.0, 4.6 Hz, 1H, C$\underline{H}_2$-CH_2NH) ppm.

HRMS: berechnet m/z für $C_{29}H_{35}FN_2O_6Na^+$: 549.2377; gefunden (ESI-MS$^+$): 549.2378s.

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

MB OB3b(Zn, Maleimid, F)

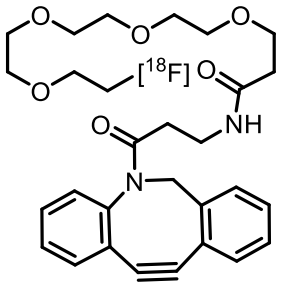


MB OB3b(Zn, Maleimid, F)

Die Synthese des Konjugats erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.16. Es wurden **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** (1.0 mg, 0.6 µmol), 10 mM *aq.* PB (pH 6.5, 392 µL) und eine Lösung aus **265** (0.5 mg, 0.9 µmol) in MeCN (196 µL) bei einer Reaktionszeit von 1.5 h verwendet. Die Suspension wurde wie in der allgemeinen

Vorschrift beschrieben mit dem Eluenten MeCN (80 % in H_2O, 10 mM NH_4OAc, pH 6.5) in H_2O (10 mM NH_4OAc, pH 6.5): 25 %-> 60 %-> 70 %-> 100 %) gereinigt, um **MB OB3b(Zn, Maleimid, F)** als gelben Feststoff (0.5 mg, 0.2 µmol, 40 %) zu erhalten.
LC-MS (*DEFAULT*)**:** t_r = 1.291 min (*m/z* (ESI-MS^+): 1113 (M-Zn+$2H^+$), 1144 (M+$2H^+$))
HRMS: berechnet m/z für $C_{97}H_{128}FN_{17}O_{32}S_5Zn^{2+}$: 1143.8474; gefunden (ESI-MS^+): 1143.8494.

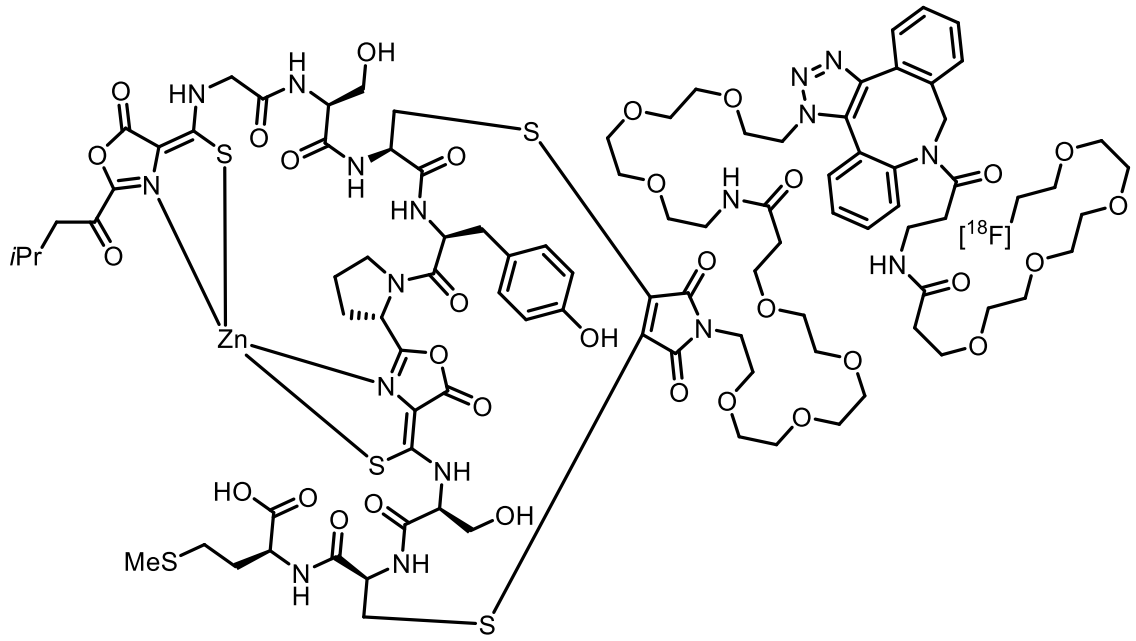
1-[^{18}F]Fluor-3,6,9,12-tetraoxapentadecanoyl-DBCO-amid (**266**)



266

[^{18}F]Fluorid (30-40 GBq) wurde mit einer Lösung aus Et_4NHCO_3 (2.6 mg, 14 µmol) in MeOH (1.3 mL) von einer QMA Kartusche eluiert. Das Lösemittel wurde entfernt und eine Lösung aus **264** (6.3 mg, 9.3 µmol) in MeCN (1.0 mL) wurde hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde verschlossen und für 30 min auf 100 °C erhitzt. Im Anschluss wurde **266** durch direkte Reinigung der Reaktionsmischung mittels semi-präparativer HPLC (Phenomenex Kinetex 2.6 µm C18 100 Å 150x10 mm; 3 mL/min; 40 % MeCN in H_2O; t_r = 8.76 min) isoliert und auf einer konditionierten Sep-Pak tC18 Kartusche immobilisiert. Die Kartusche wurde mit H_2O (5 mL) gewaschen und für 1 min mit einem Ar-Strom getrocknet, bevor **266** mit EtOH (0.5 mL) eluiert wurde. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Produkt (300-400 MBq) direkt für den nächsten Schritt verwendet.

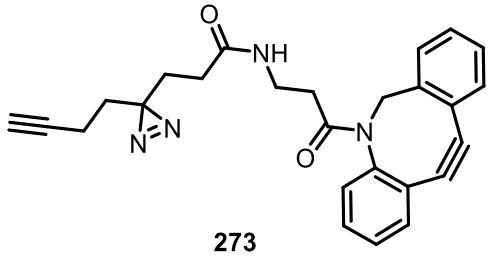
MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)



MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)

266 (300-400 MBq) wurde in MeCN (100 µL) gelöst und eine Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** (0.95 mg, 0.54 µmol) in *aq.* PBS-Puffer (pH 6.5, 200 µL) wurde hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 20 min bei RT inkubiert, bevor diese mithilfe einer semi-präparativer HPLC (Phenomenex Gemini 5 µm C18 110 Å 250x10 mm; 1.5 mL/min; 0 min, 95 % H_2O/5 % MeCN (0.1 % TFA); 0 min, 5 % H_2O/95 % MeCN (0.1 % TFA); t_r = 13.52 min) isoliert wurde. Anschließend wurde die **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** enthaltende Fraktion auf einer konditionierten Sep-Pak tC18 Kartusche immobilisiert, mit H_2O (5 mL) gewaschen und für 1 min mit einem Ar-Strom getrocknet. **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** (30-40 MBq) wurde von der Kartusche mit EtOH (0.5 mL) eluiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

3-(3-(But-3-in-1-yl)-3*H*-diazirin-3-yl)propanoyl-DBCO-amid (**273**)



273

Die Synthese erfolgte unter Lichtausschluss nach einer leicht veränderten Version der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.5 unter Verwendung der Carbonsäure **272** (20 mg, 0.12 mmol), DIPEA (0.07 mL, 0.4 mmol), HATU (60 mg, 0.16 mmol), DBCO-Amin **263** (37 mg, 0.13 mmol, Lösung in trockenem CH_2Cl_2 (0.60 mL)) und trockenem CH_2Cl_2 (0.60 mL) bei einer Reaktionsdauer von 20 h. Die Aufreinigung erfolgte durch eine Filtration über Silica mit PE/EE (1/1-> 1/3) als Laufmittel und ergab **273** in Form eines leicht gelben Öls (44 mg, 0.10 mmol, 86 %).

R_f (PE/EE (1/3)) = 0.25.

LC-MS *(DEFAULT.M)*: t_r = 1.395 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 425 (M+H$^+$), 447 (M+Na$^+$)).

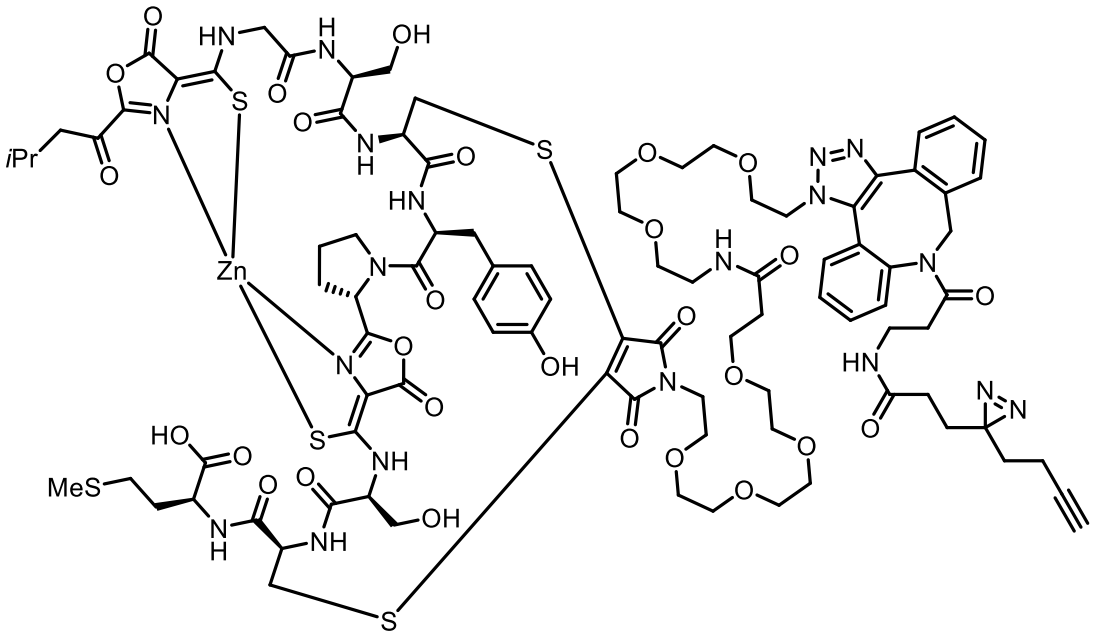
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.67 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH(DBCO)), 7.42-7.26 (m, 7H, 7 x CH(DBCO)), 6.14 (bs, 1H, NH), 5.14 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, CH_2(DBCO)), 3.71 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, CH_2(DBCO)), 3.38-3.19 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-NH), 2.47 (ddd, *J* = 16.7, 7.5, 3.7 Hz, 1H, C$\underline{H}_2$-CH_2NH), 2.02-1.93 (m, 4H, C$\underline{H}_2$-CH_2NH, CH(Alkin), C$\underline{H}_2$-CO-NH), 1.85-1.58 (m, 6H, 3 x CH_2) ppm.

^{13}C{^{1}H}-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 172.4 (Cq), 171.3 (Cq), 151.0 (Cq), 148.0 (Cq), 132.2 (CH), 129.2 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.5 (CH), 125.8 (CH), 123.0 (Cq), 122.6 (Cq), 114.9 (Cq), 107.9 (Cq), 81.8 (CH), 69.4 (Cq), 55.7 (CH_2), 35.5 (CH_2), 34.7 (CH_2), 32.4 (CH_2), 30.4 (CH_2), 28.6 (CH_2), 13.4 (CH_2) ppm.

Die NMR-Spektren enthalten eine Verunreinigung durch Tetramethylharnstoff[199] (δ(^{1}H-NMR) = 2.80 ppm, δ(^{13}C-NMR) = 38.6, 165.7 ppm).

HRMS: berechnet m/z für $C_{26}H_{24}N_4O_2Na^+$: 447.1797; gefunden (ESI-MS$^+$): 447.1790.

MB OB3b(Zn, Maleimid, Diazirin)



MB OB3b(Zn, Maleimid, Diazirin)

Die Synthese des Konjugats erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.1.3.16. Es wurden **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** (2.0 mg, 1.2 µmol), 10 mM *aq.* PB (pH 6.5, 303 µL) und eine Lösung aus **273** (0.60 mg, 1.4 µmol) in MeCN (151 µL) bei einer Reaktionszeit von 2 h verwendet. Die Suspension wurde wie in der allgemeinen Vorschrift beschrieben mit dem Eluenten MeCN (80 % in H_2O, 10 mM NH_4OAc, pH 6.5) in H_2O (10 mM NH_4OAc, pH 6.5): 25 %-> 60 %-> 70 %-> 100 %) gereinigt, um **MB OB3b(Zn, Maleimid, Diazirin)** als gelben Feststoff (1.5 mg, 0.69 µmol, 61 %) zu erhalten.

LC-MS (*DEFAULT*)**:** t_r = 1.359 min (*m/z* (ESI-MS$^+$): 1062 (M-Zn+2H$^+$), 1093 (M+2H$^+$))

HRMS: berechnet m/z für $C_{94}H_{119}N_{19}O_{28}S_5Zn^{2+}$: 1092.8183; gefunden (ESI-MS$^+$): 1092.8187.

5.4.5 Anwendung der verschiedenen Sonden in biologischen Untersuchungen

Aufnahme-Kinetik bei 37 °C über einen Zeitraum von 90 min

Die Untersuchungen wurden von Dr. MICHAEL WILLMANN am Institut für Radiopharmazeutische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.
Die nach 5.1.3.17 kultivierten HepG2-Zellen wurden in einer 24er-*Well-Plate* ($0.2 \cdot 10^6$ Zellen pro *Well*) ausgesät und für 48 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt inkubiert. Das Zellmedium wurde abgenommen und eine Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** (1000 µL, Aktivität: 120 kBq in PBS) zur Inkubation bei 37 °C für *t* = 5, 10, 15, 30, 60 und 90 min zugegeben. Nach der Inkubationszeit *t* wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen (2 x 500 µL). Die Zellen wurden in 0.5% SDS (500 µL) lysiert und resuspendiert, in Messröhrchen überführt und im *Gamma-Counter* gemessen. Anfertigung der Proben sowie Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten.

Efflux-Kinetik bei 37 °C über einen Zeitraum von 90 min

Die Untersuchungen wurden von Dr. MICHAEL WILLMANN am Institut für Radiopharmazeutische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.
Die nach 5.1.3.17 kultivierten HepG2-Zellen wurden in einer 24er-*Well-Plate* ($0.2 \cdot 10^6$ Zellen pro *Well*) ausgesät und für 48 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt inkubiert. Das Zellmedium wurde abgenommen und eine Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** (1000 µL, Aktivität: 120 kBq in PBS) zur Inkubation bei 37 °C für 60 min zugegeben. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen (2 x 500 µL). PBS (1000 µL) wurde zugefügt und bei 37 °C für *t* = 5, 15, 30, 60 und 90 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit *t* wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen (1 x 1000 µL). Die Zellen wurden in 0.5% SDS (500 µL) lysiert und resuspendiert, in Messröhrchen überführt und im *Gamma-Counter* gemessen. Anfertigung der Proben sowie Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten.

In vitro Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen als Endpunktbestimmung

Die Untersuchungen wurden von YASCHAR KABIRI, M.Sc am Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München durchgeführt.

Die nach 5.1.3.17 kultivierten HepG2-Zellen wurden auf mit Poly-D-Lys beschichteten 8-*well*-Objekträgern (IBIDI, Deutschland) ausgesät, für 24 h inkubiert und mit PBS gewaschen (1 x). Im Anschluss wurden diese einerseits direkt mit einer Behandlungslösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** in dem unter 5.1.3.17 beschriebenen Medium (5 mL, 10 µM) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt für 24 h inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden diese zunächst mit [$Cu(His)_2$]-Behandlungslösung (200 µL, finale Konzentration: 150 µM) für 24 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt inkubiert, mit dem unter 5.1.3.17 beschriebenen Medium gewaschen (2 x 200 µL) und für weitere 24 h wie zuvor mit der Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** inkubiert. Die beiden Ansätze wurden getrennt voneinander mit weiteren Farbstoffen zum Anfärben der jeweiligen Zellkompartimente behandelt (Zellkern: Hoechst 33342 (1 µg/mL für 5 min), Mitochondrien: MitoTracker™ Green FM (100 nM für 30 min), Lysosomen: LysoTracker™ Green DND-26 (100 nM für 30 min)) und anschließend direkt mithilfe eines Nikon ECLIPSE Ti-S Fluoreszenzmikroskop mit einer Öl-Immersionslinse vermessen.

Zeitabhängige *in vitro* Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen

Die Untersuchungen wurden von YASCHAR KABIRI, M.Sc am Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München durchgeführt.

Die nach 5.1.3.17 kultivierten HepG2-Zellen wurden auf mit Poly-D-Lys beschichteten 8-*well*-Objekträgern (ibidi, Deutschland) ausgesät, für 24 h wachsen gelassen und mit PBS gewaschen (1 x). Im Anschluss wurden diese direkt mit einer Behandlungslösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** in dem unter 5.1.3.17 beschriebenen Medium (5 mL, 10 µM) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt für 2, 3, 5 und 8 h inkubiert. Die Ansätze wurden getrennt voneinander mit weiteren Farbstoffen zum Anfärben der jeweiligen Zellkompartimente behandelt (Zellkern: Hoechst 33342 (1 µg/mL für 5 min), Lysosomen: LysoTracker™ Green DND-26 (100 nM für 30 min)) und anschließend direkt mithilfe eines Nikon ECLIPSE Ti-S Fluoreszenzmikroskop mit einer Konfokallinse vermessen.

In vitro Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen mit Aufnahmeinhibitoren

Die Untersuchungen wurden von YASCHAR KABIRI, M.Sc am Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München durchgeführt.

Die nach 5.1.3.17 kultivierten HepG2-Zellen wurden auf mit Poly-D-Lys beschichteten 8-*well*-Objekträgern (IBIDI, Deutschland) ausgesät, für 24 h wachsen gelassen und mit PBS gewaschen (1 x). Im Anschluss wurden diese direkt mit einer Behandlungslösung aus verschiedenen Aufnahmeinhibitoren in dem unter 5.1.3.17 beschriebenen Medium (200 µL, Genistein **274**: 200 µM, Pitstop® 2 **275**: 20 µM, Nocodazol **276**: 20 µM) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt für 30 min inkubiert. Danach wurde das überständige Medium entfernt und die Zellen mit einer Behandlungslösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** in dem unter 5.1.3.17 beschriebenen Medium (5 mL, 10 µM) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt für 3 h inkubiert. Nachdem die Zellen mit Hoechst 33342 (1 µg/mL für 5 min) versetzt wurden, wurden diese direkt mithilfe eines Nikon ECLIPSE Ti-S Fluoreszenzmikroskop mit einer Öl-Immersionslinse vermessen.

In vivo Fluoreszenzmessungen

Die Untersuchungen wurden von HANNES ROLBIESKI am Helmholtz Pioneer Campus München durchgeführt.

Dafür wurde eine sCMOS pco.edge 4.2 Infrarotkamera mit einem Optem Fusion SWIR Objektiv in Kombination mit drei Emissionsfiltern (2xLP800, BP825-50) verwendet. Angeregt wurde mit einem Lumics Laser unit LU0785DLU250-S70AN03 (25 W) der Wellenlänge λ = 785 nm. Es wurden ein SP800 Filter und ein *engineered* Diffuser (ED1-S20-MD) genutzt. Als Versuchstiere wurden athymische Mäuse verwendet, die mit einer Mischung aus Isofluran und Sauerstoff narkotisiert und denen eine Lösung aus **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** in 0.9 % *aq.* NaCl (100 µL, 50 µM) in die Schwanzvene injiziert wurden. Im Anschluss erfolgte eine kontinuierliche Aufnahme *in vivo* über 45 min, 90 min und 210 min. Nach diesen Zeitpunkten wurden die Mäue euthanasiert und mit dem oben beschriebenen Aufbau Einzelbilder der geöffneten Mäuse und der verschiedenen entnommenen Organe (Leber, Niere, Milz, Pankreas, Magen, Herz, Lunge, Gehirn) *ex vivo* aufgenommen.

6 ANHANG

6.1 NMR-SPEKTREN

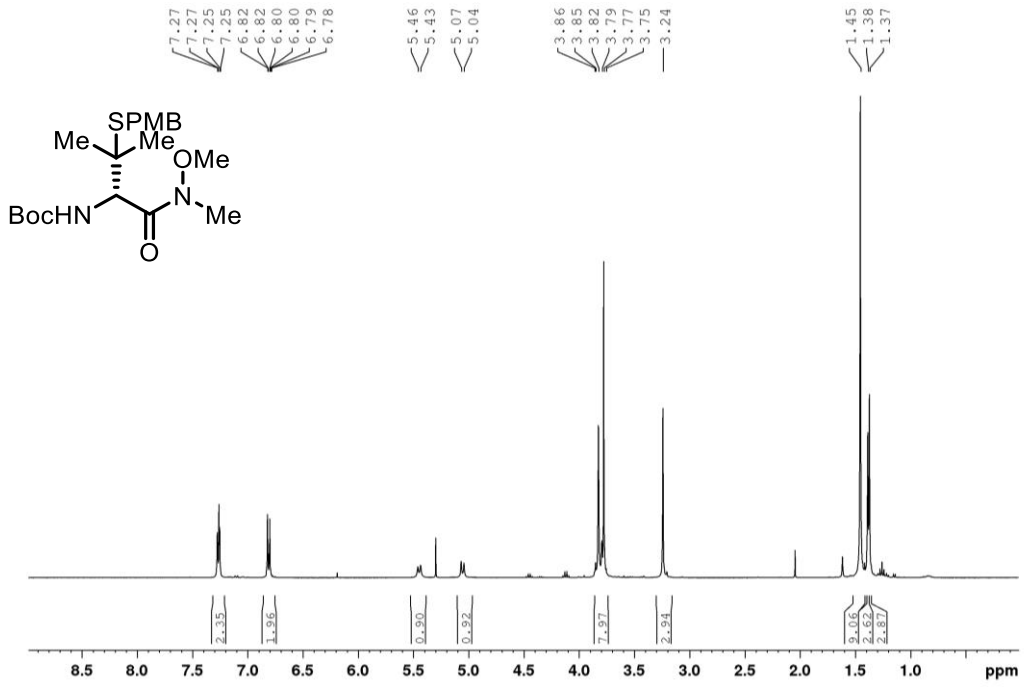


*Abbildung 54: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **23.***

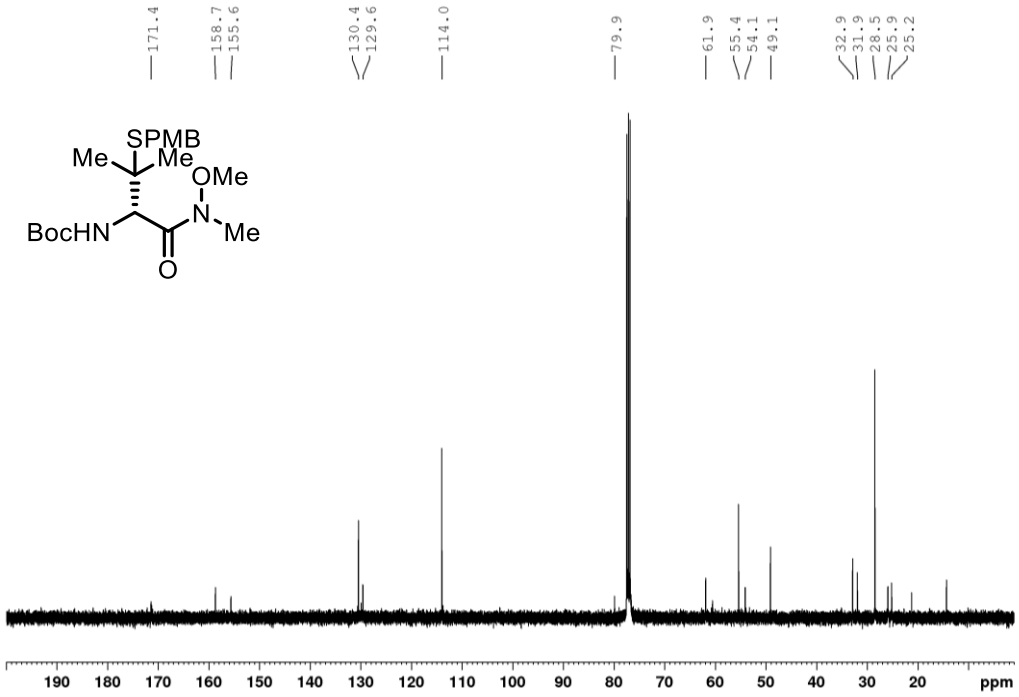


*Abbildung 55: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **23**.*

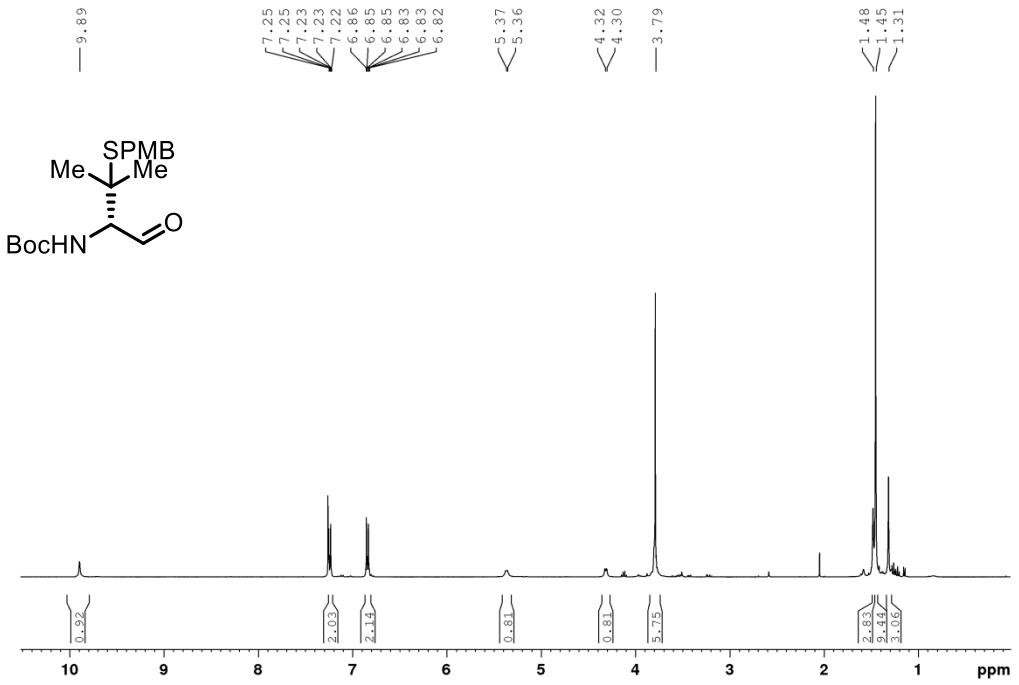


*Abbildung 56: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **17.***

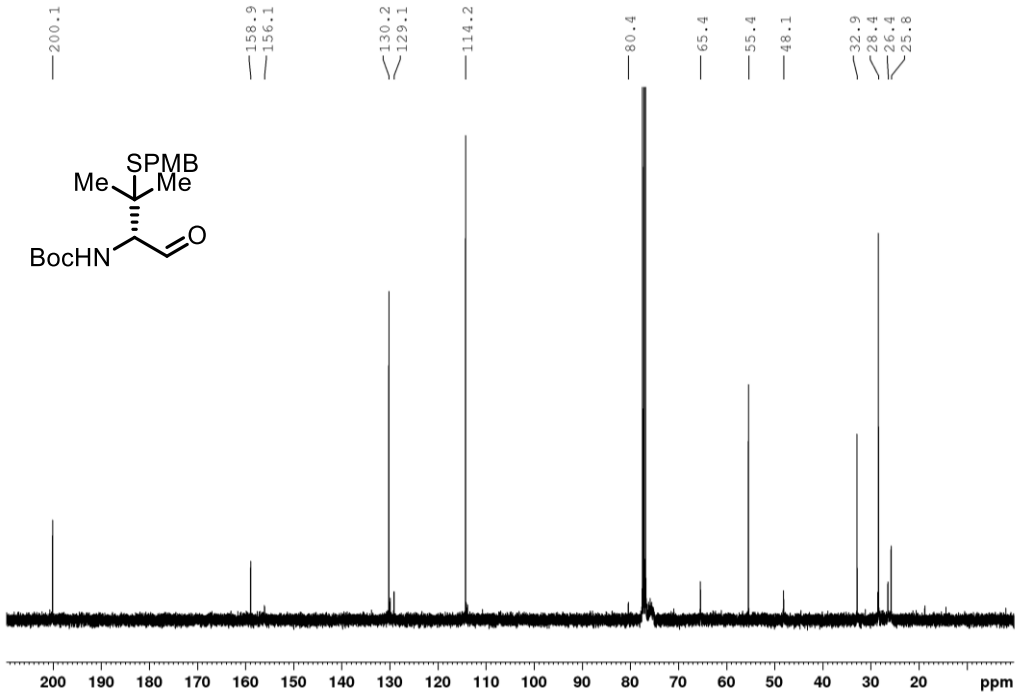


*Abbildung 57: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **17**.*

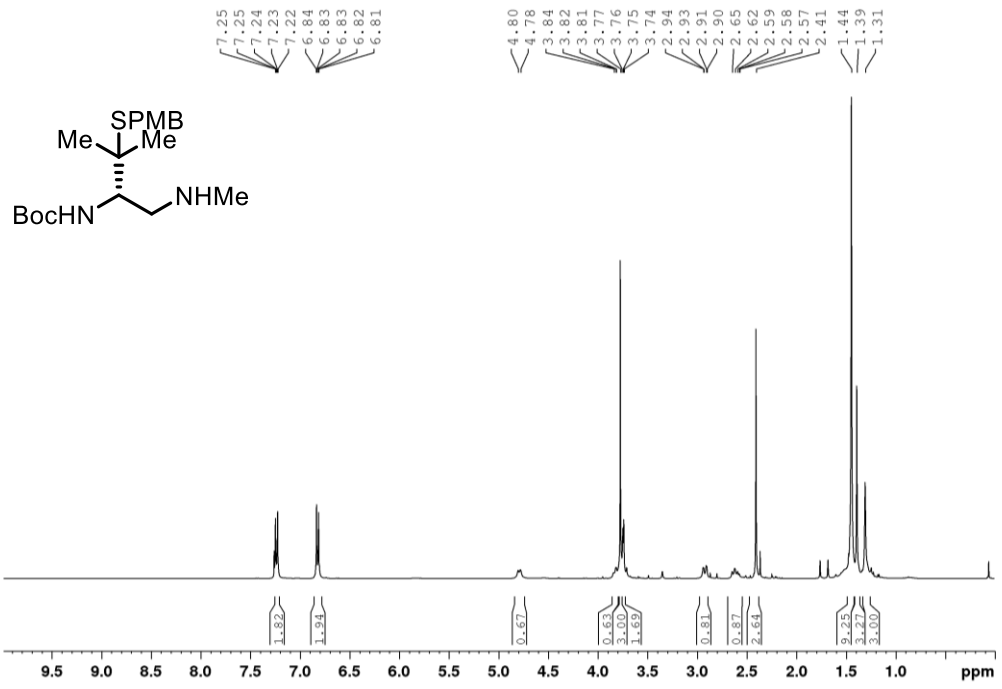


*Abbildung 58: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **16.***

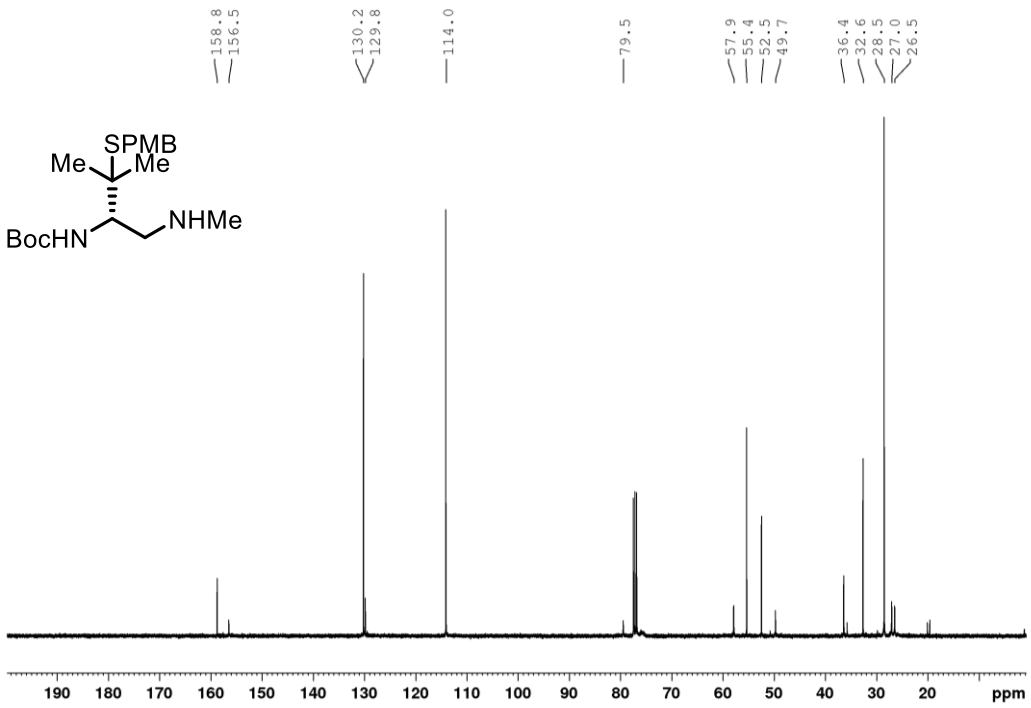


*Abbildung 59: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **16**.*

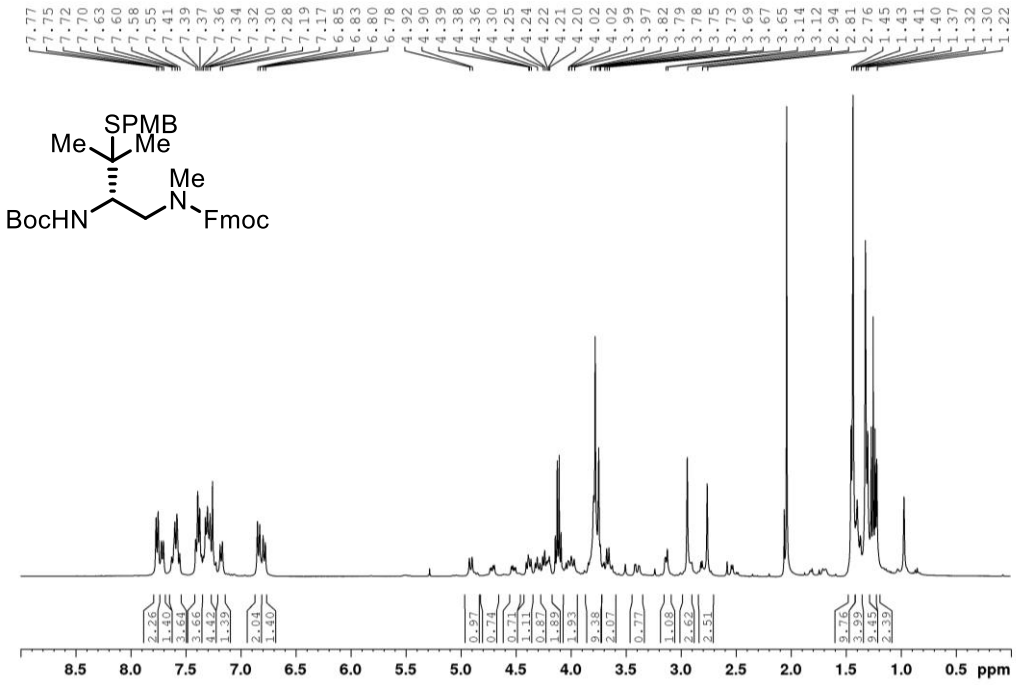


*Abbildung 60: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **24.***

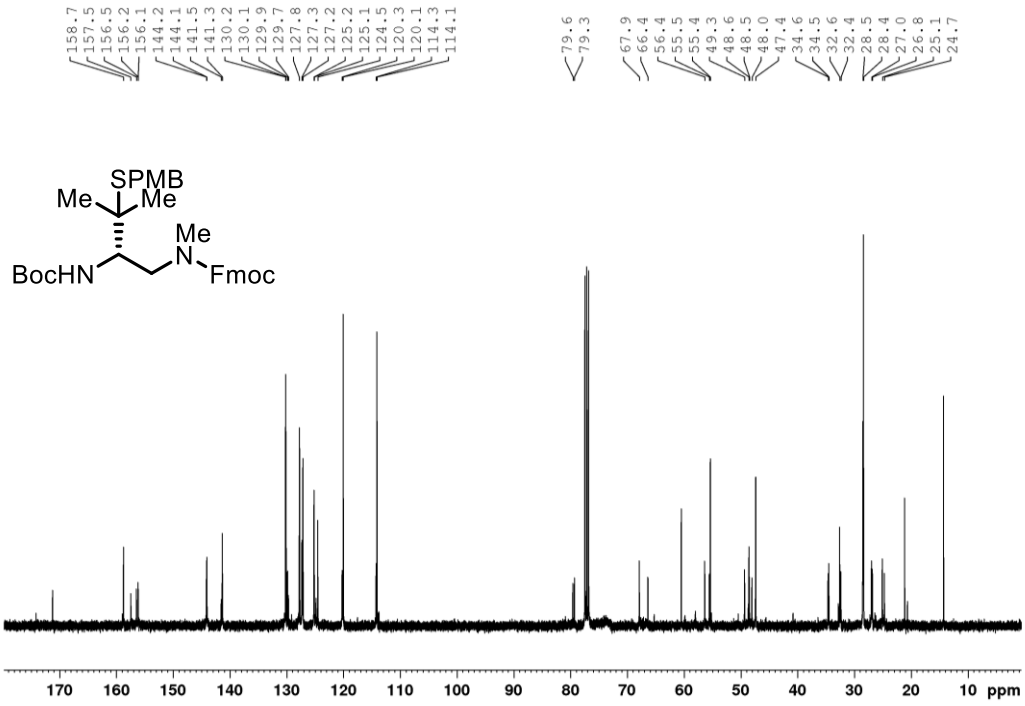


*Abbildung 61: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **24**.*

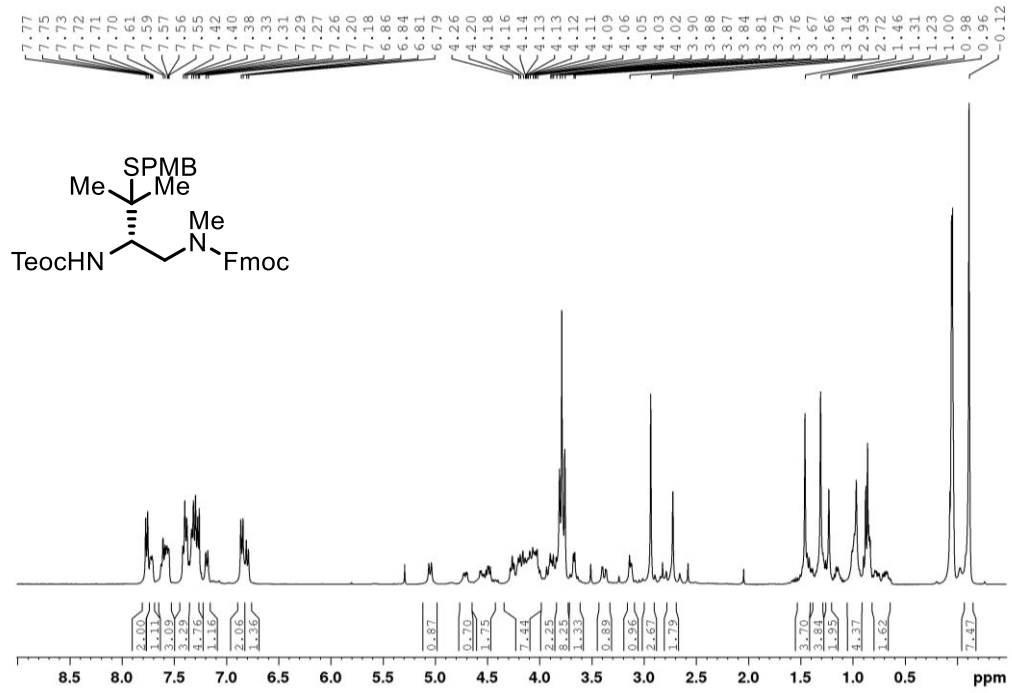


*Abbildung 62: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **11.***

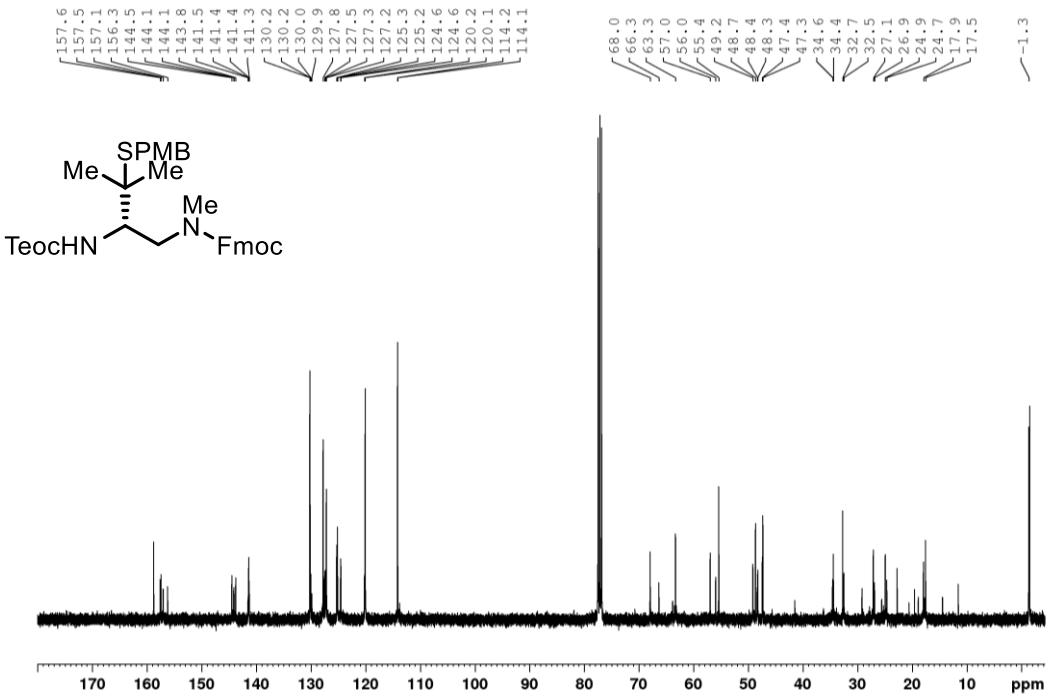


*Abbildung 63: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **11**.*

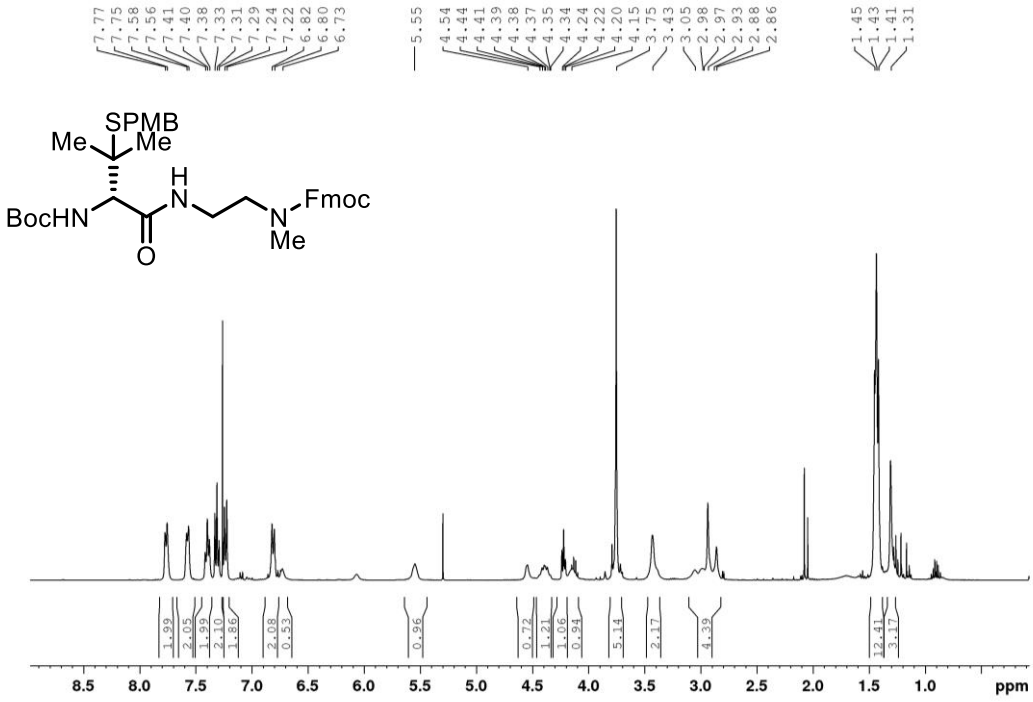


*Abbildung 64: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **28.***

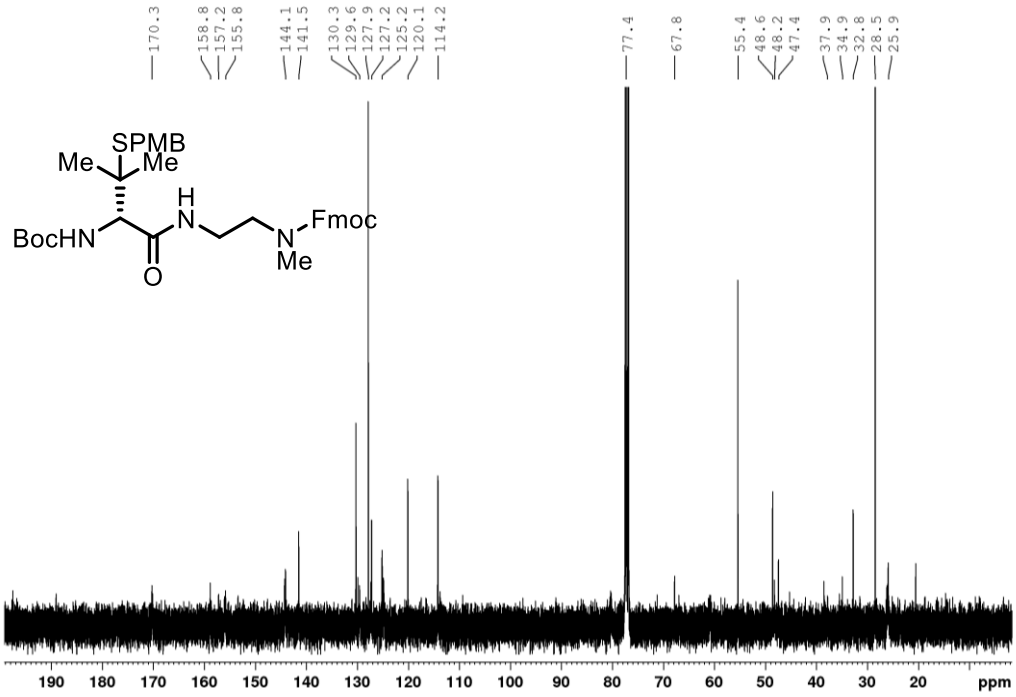


*Abbildung 65: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **28**.*

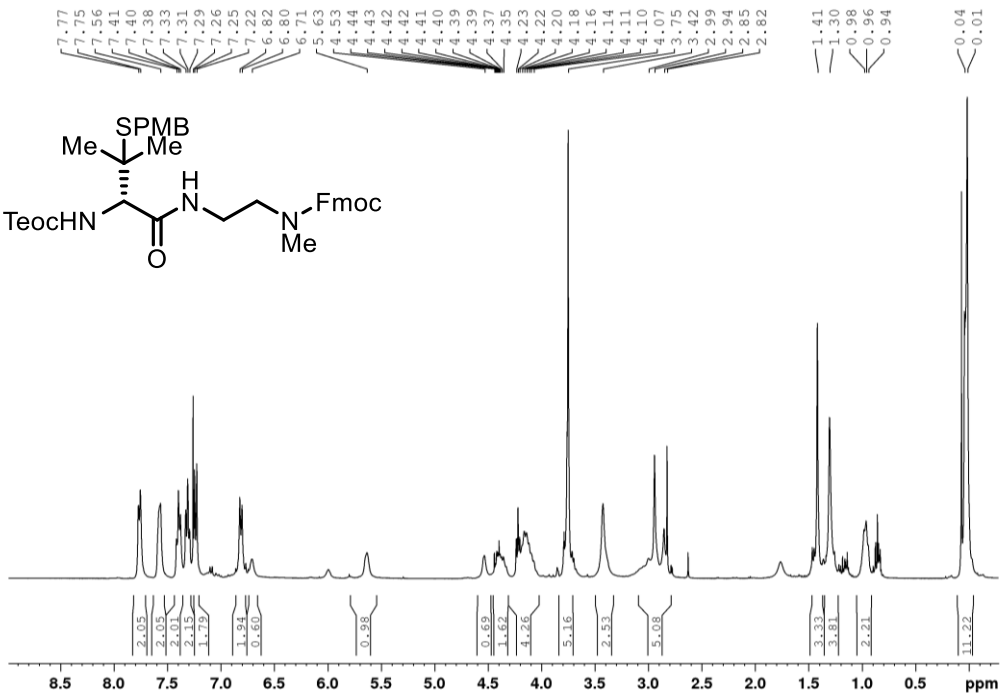


*Abbildung 66: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **21.***

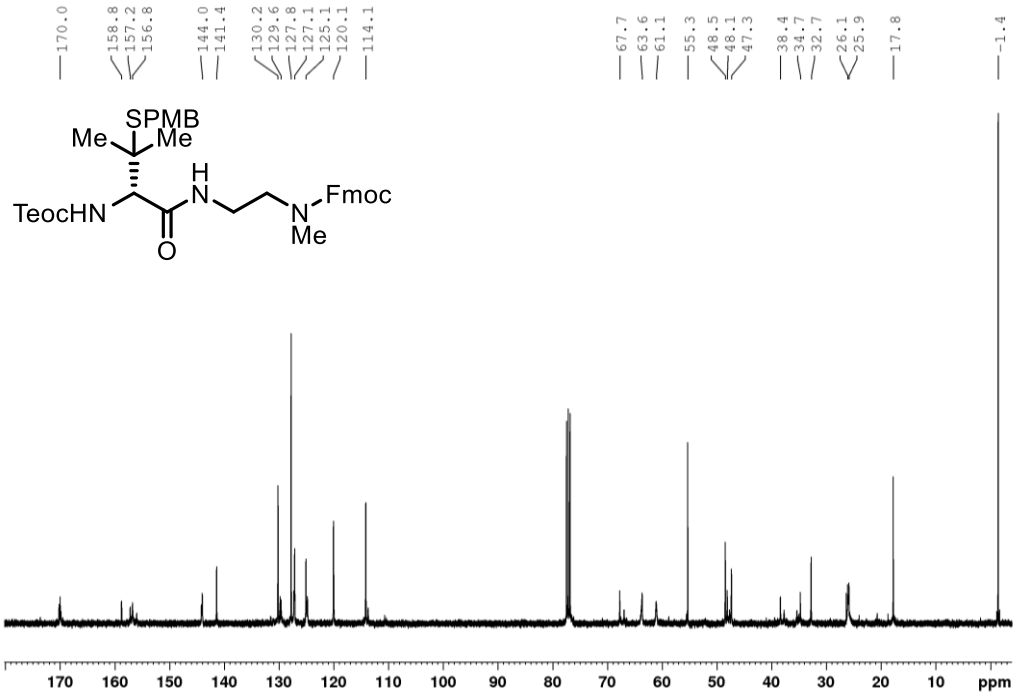


*Abbildung 67: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **21**.*

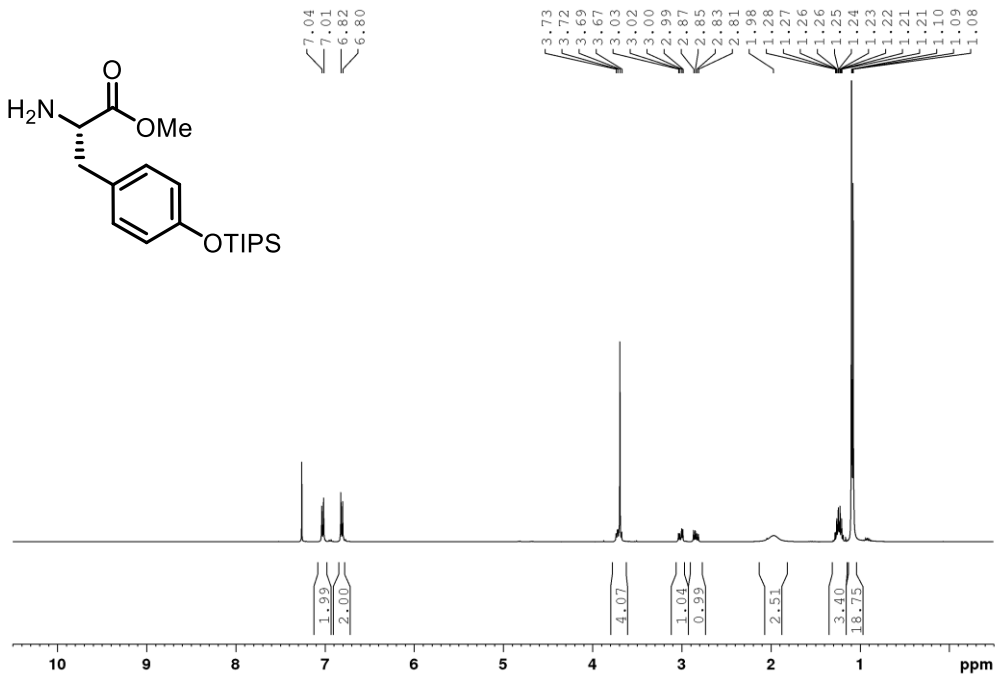


*Abbildung 68: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **35**.*

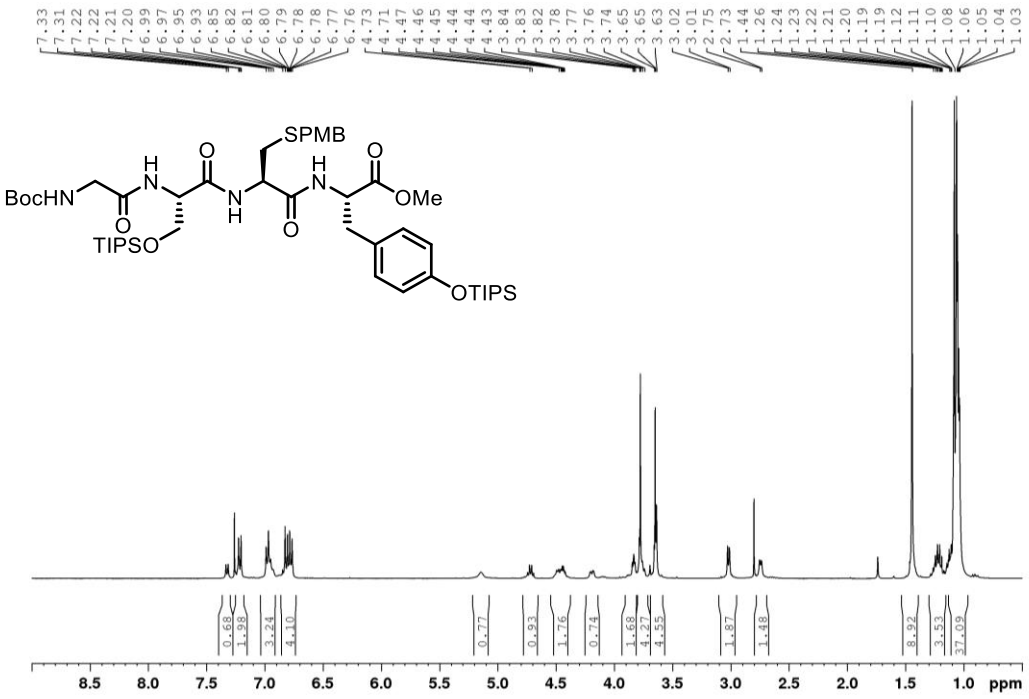


*Abbildung 69: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **12.***

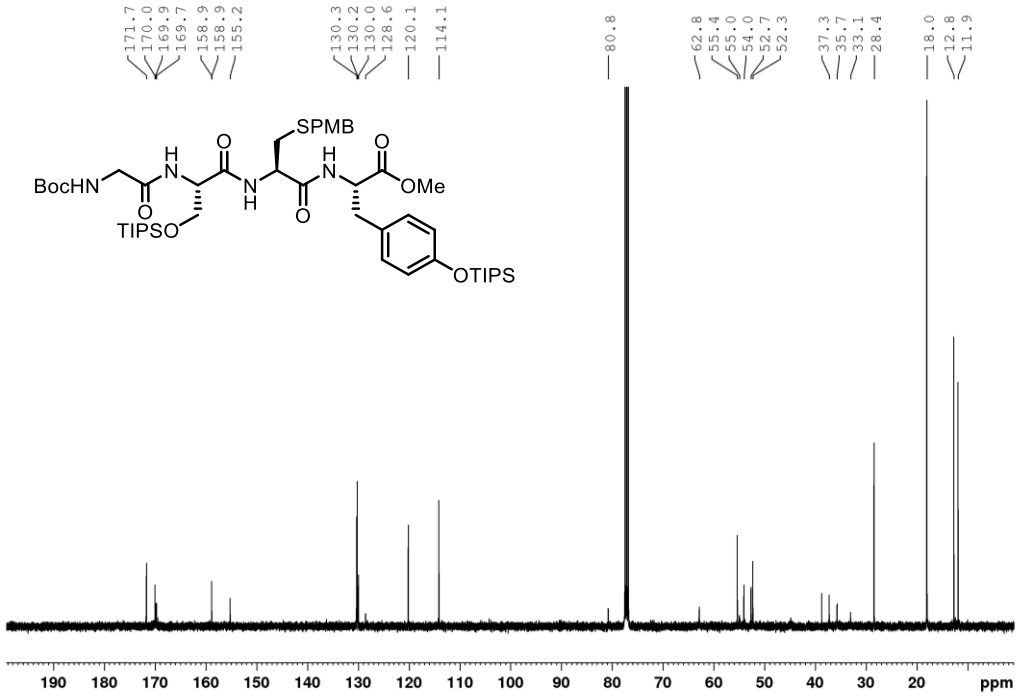


*Abbildung 70: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **12**.*

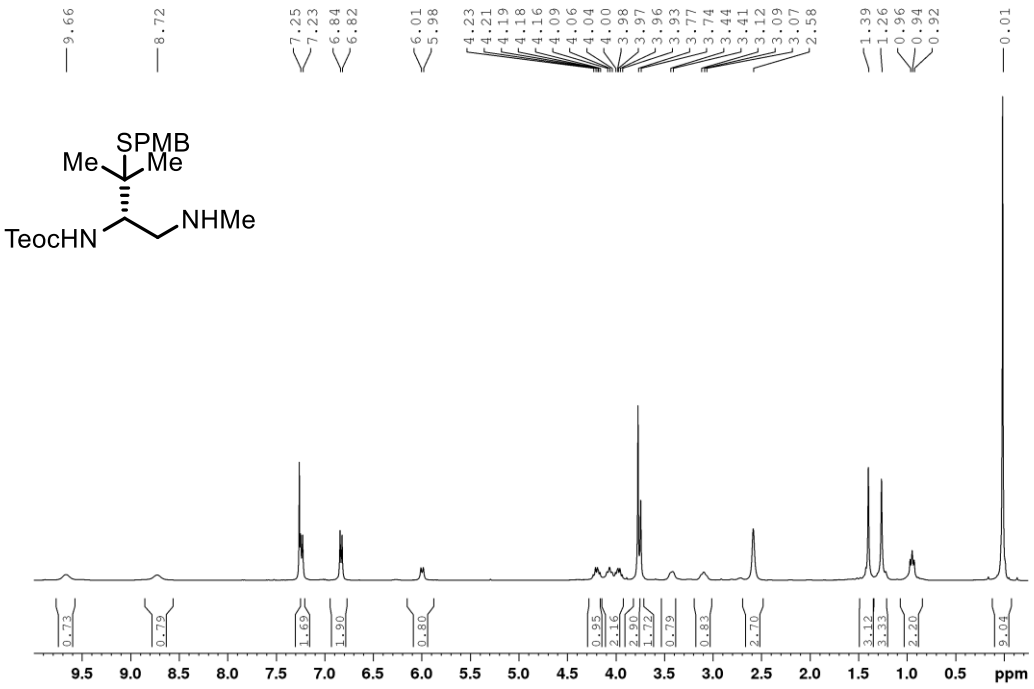


*Abbildung 71: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **36.***

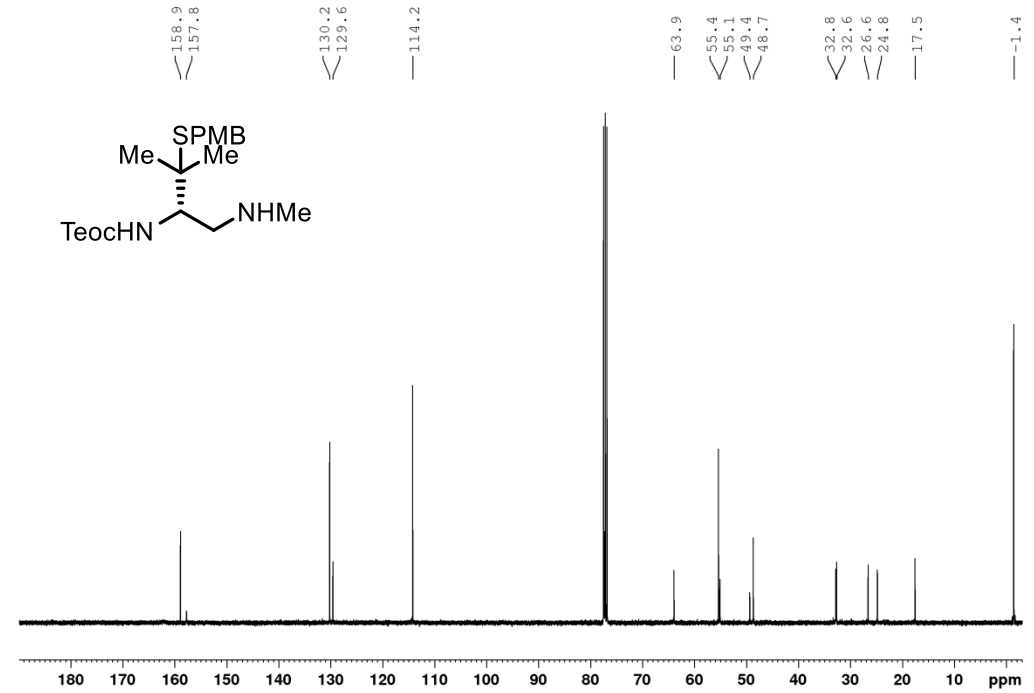


*Abbildung 72: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **36**.*

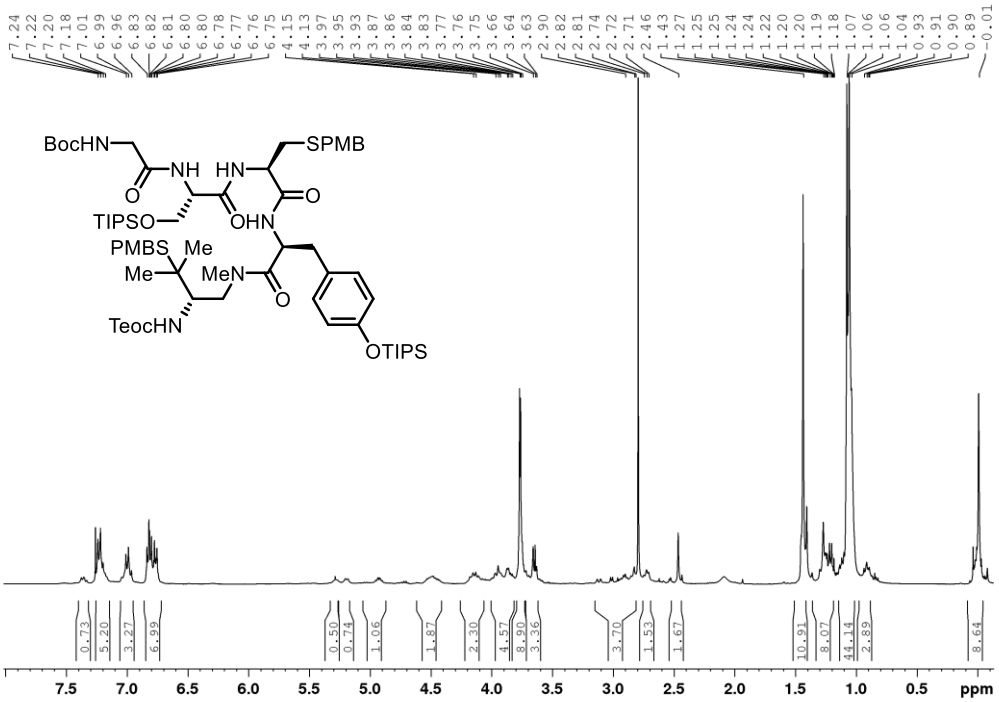


*Abbildung 73: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **10.***

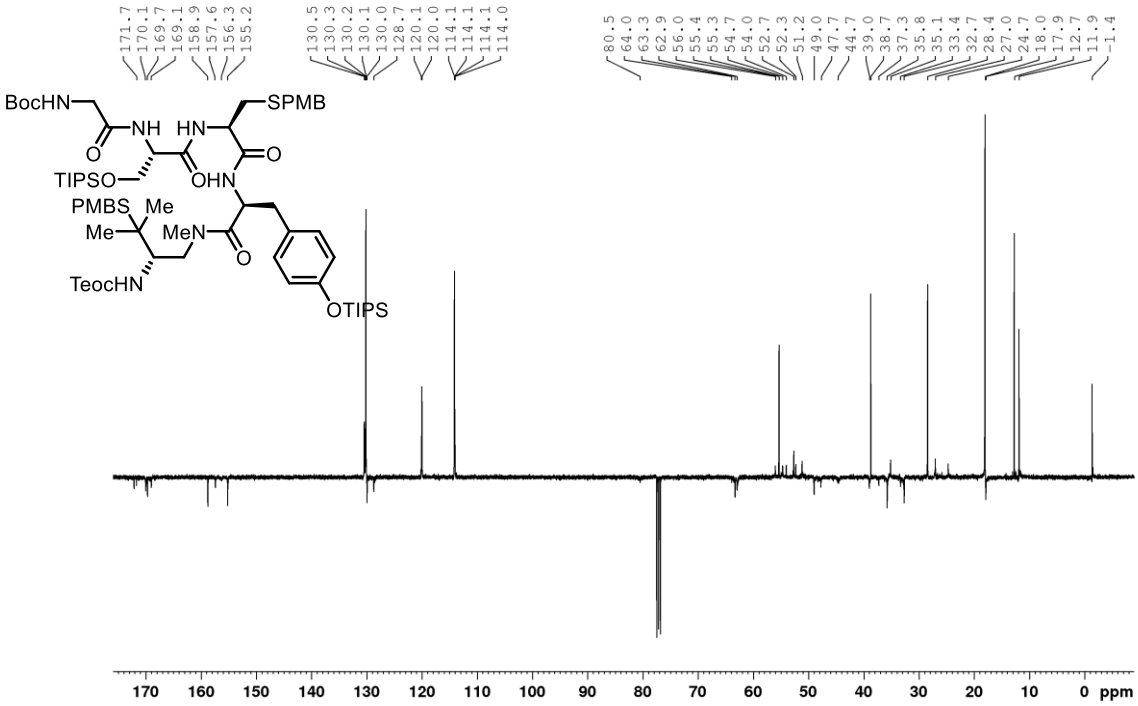


*Abbildung 74: ^{13}C-APT-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **10**.*

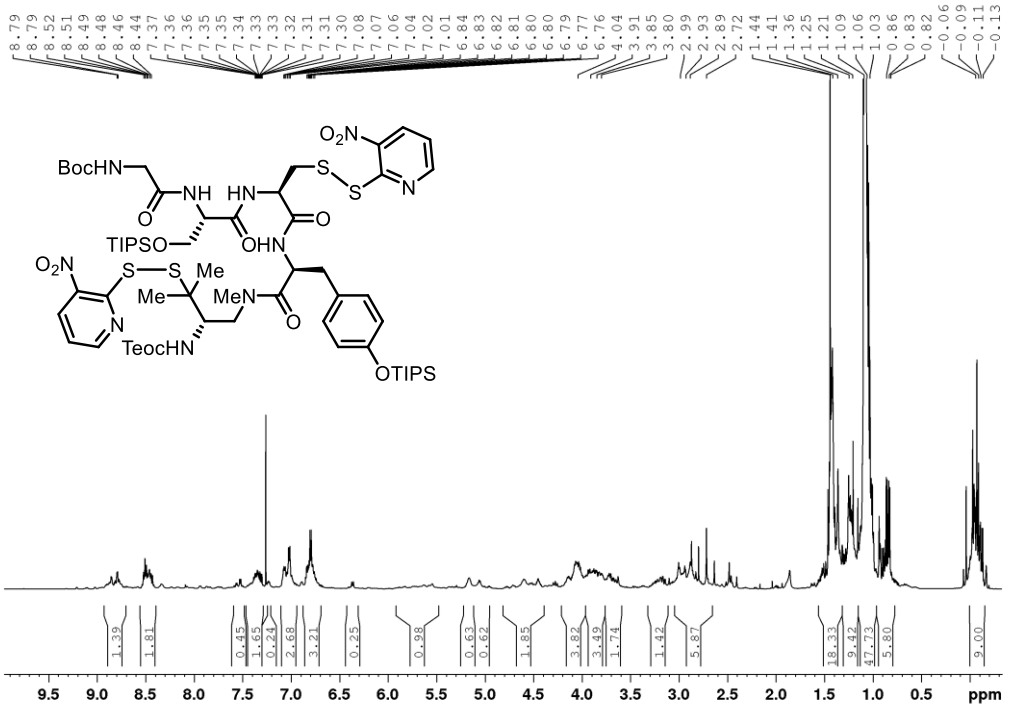


*Abbildung 75: ^{1}H-NMR Spektrum (600 MHz, $CDCl_3$) von **38.***

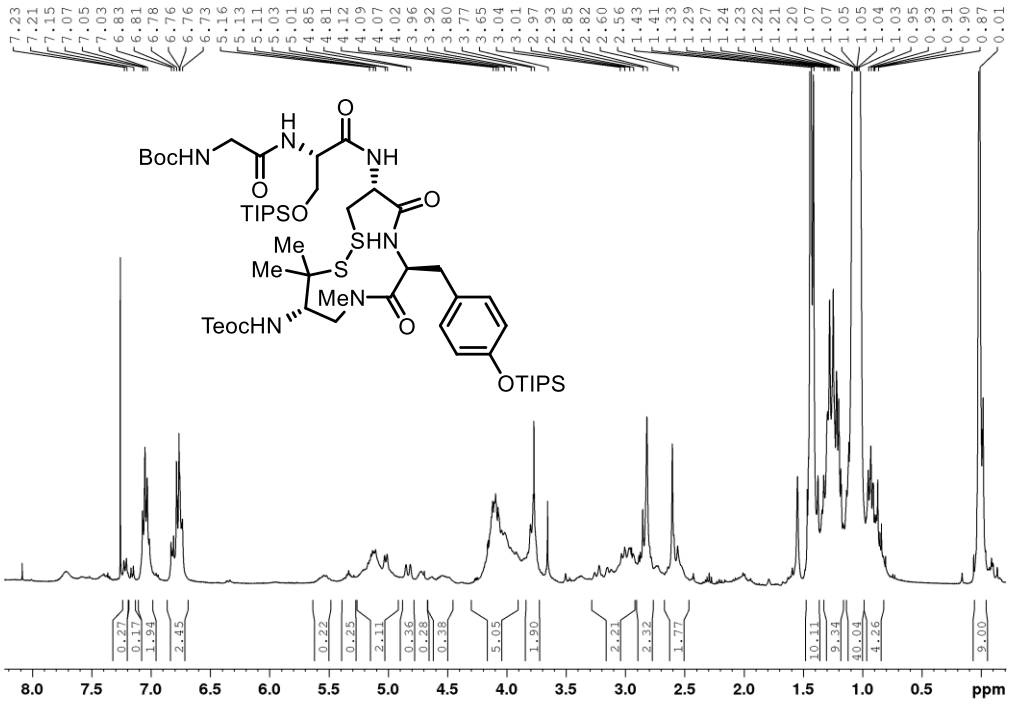


*Abbildung 76: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **41.***

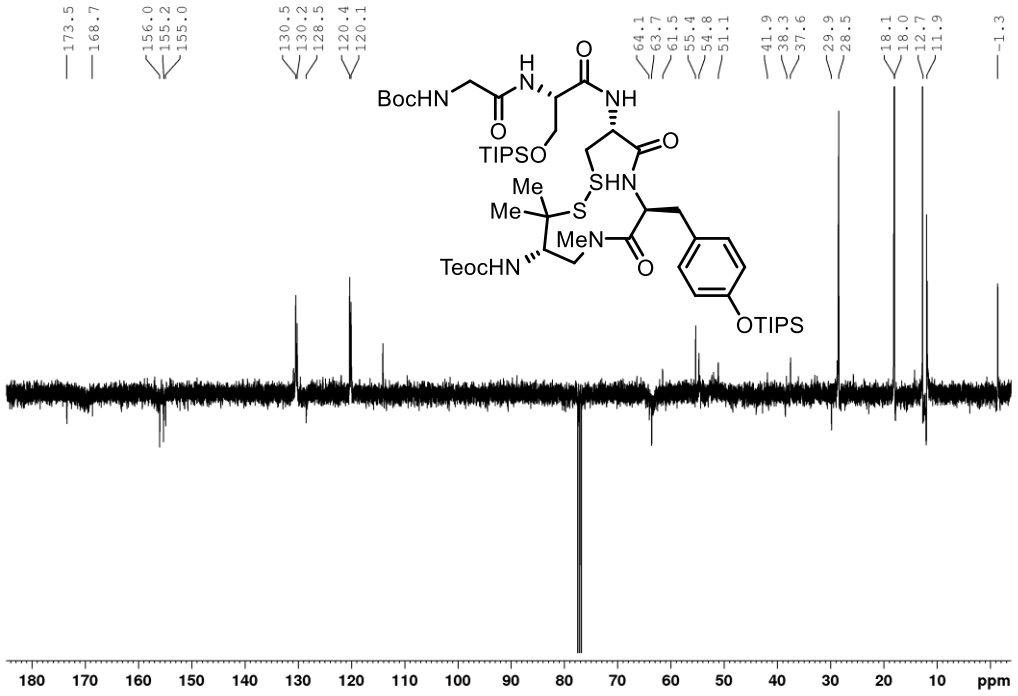


*Abbildung 77: ^{13}C-APT-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **41**.*

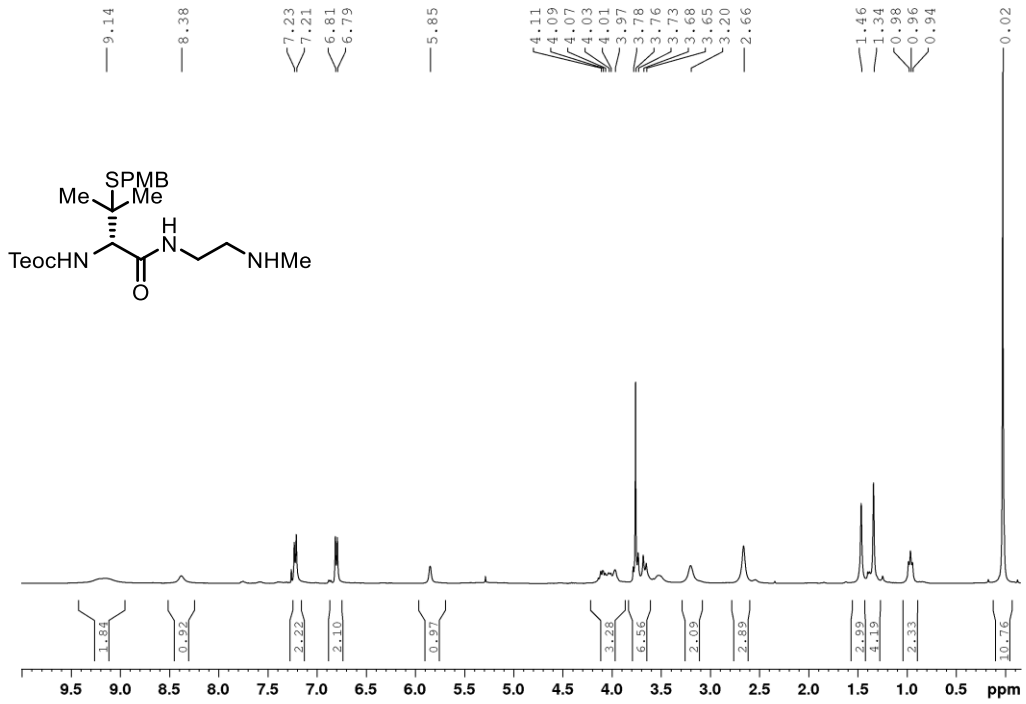


*Abbildung 78: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **43.***

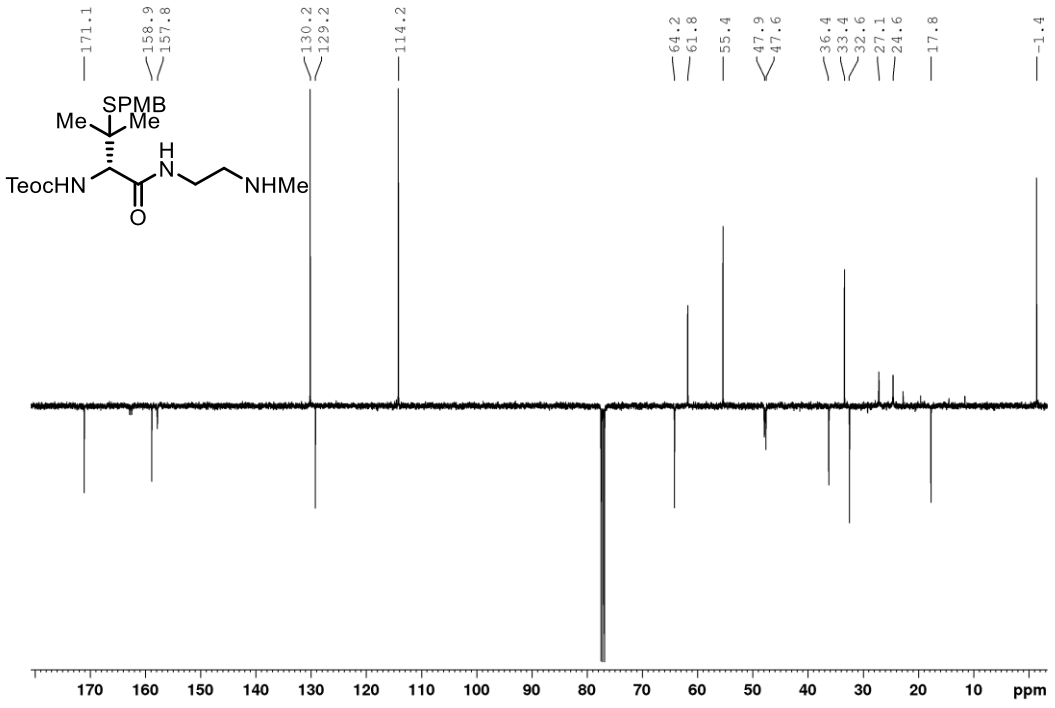


*Abbildung 79: ^{13}C-APT-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **43**.*

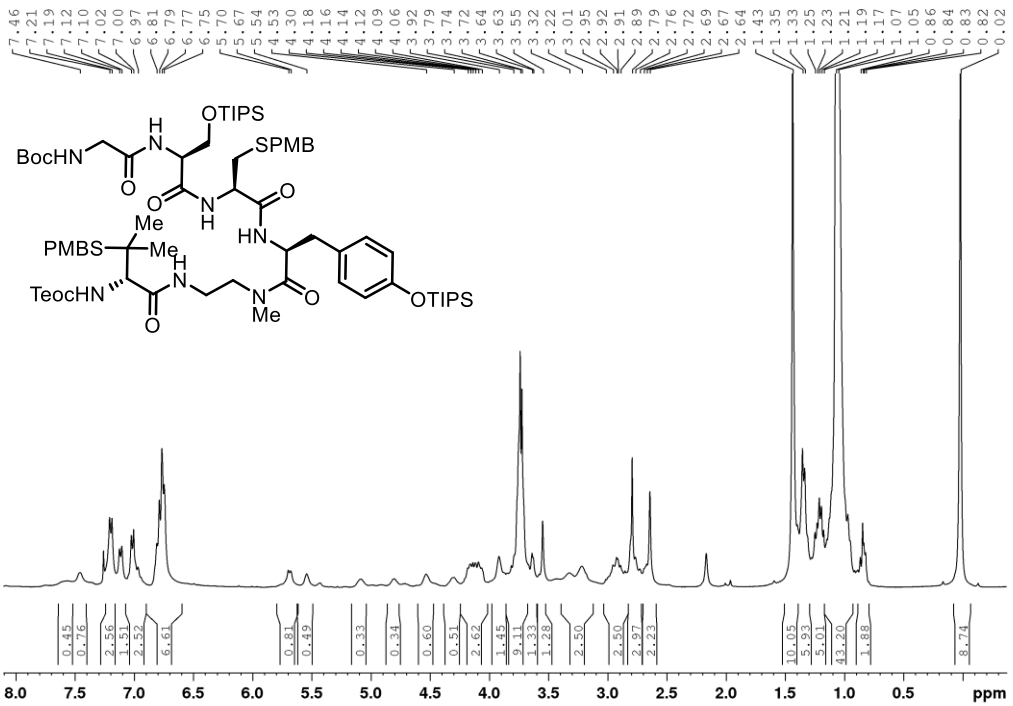


*Abbildung 80: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **20**.*

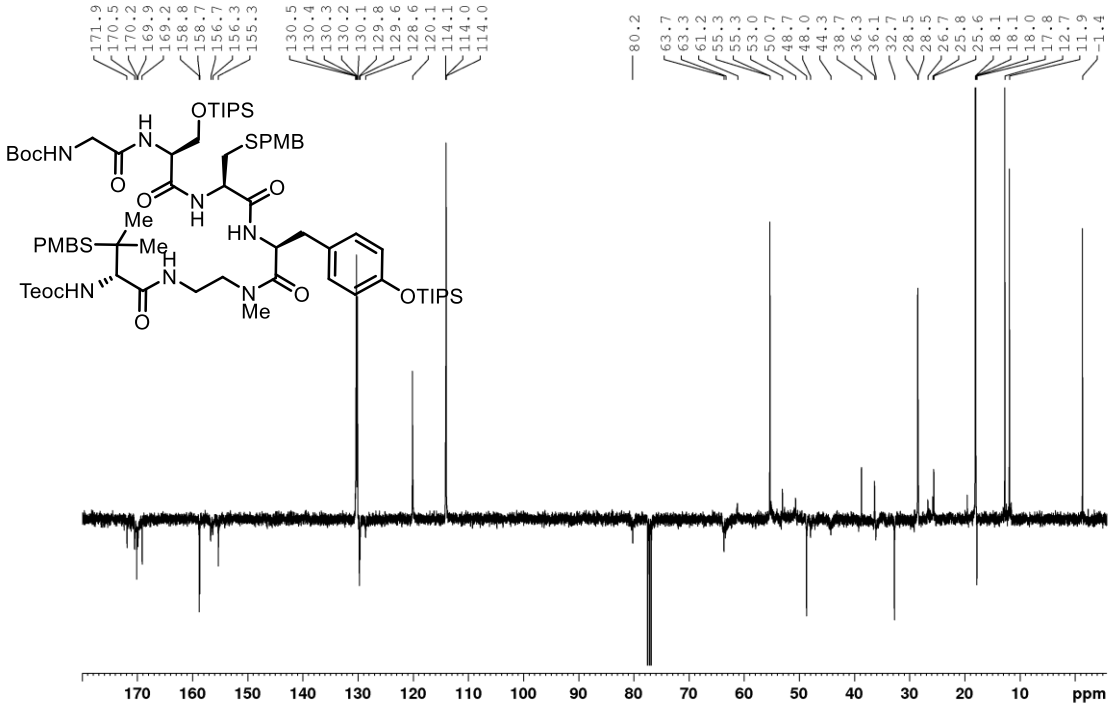


*Abbildung 81: ^{13}C-APT-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **20**.*

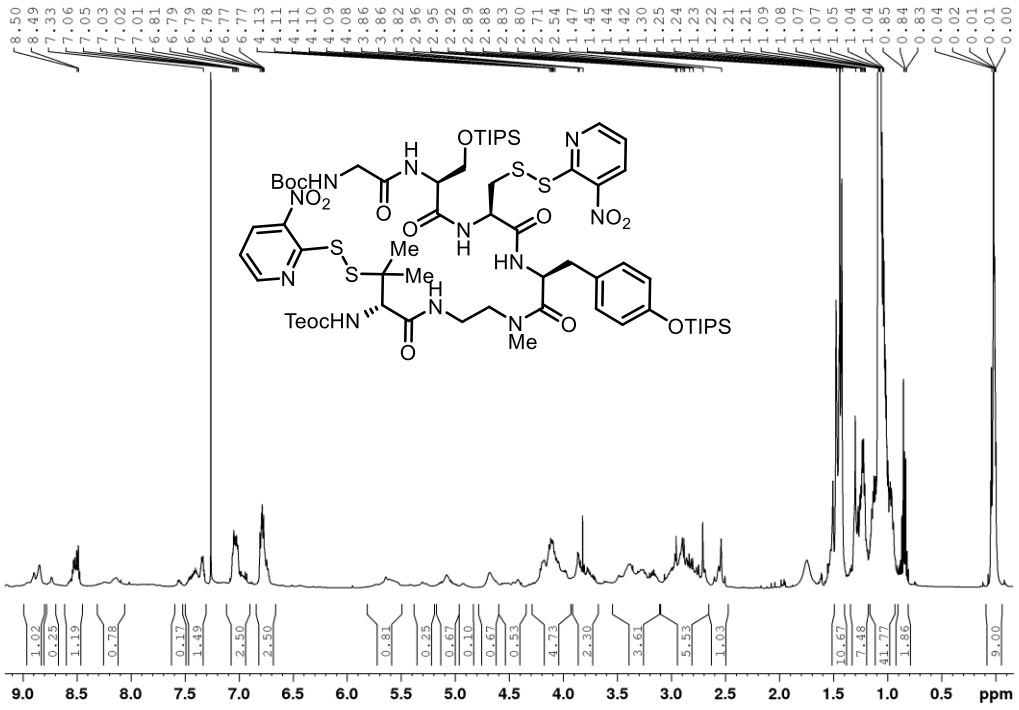


*Abbildung 82: ^{1}H-NMR Spektrum (600 MHz, $CDCl_3$) von **44.***

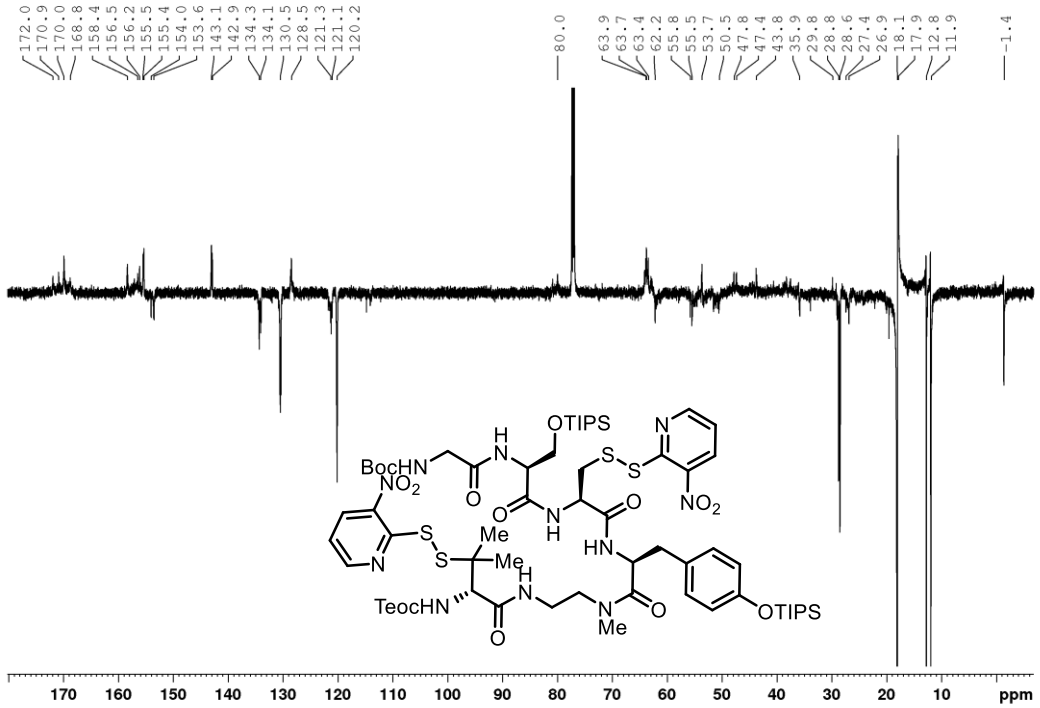


*Abbildung 83: ^{13}C-APT-NMR Spektrum (151 MHz, $CDCl_3$) von **44**.*

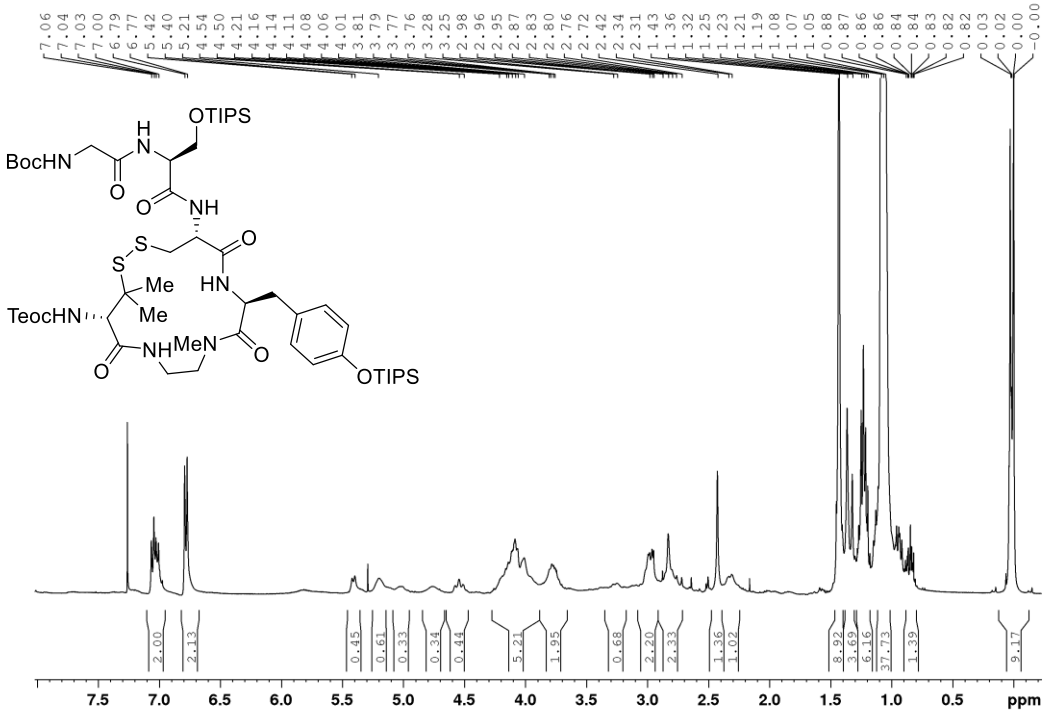


*Abbildung 84: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **47**.*

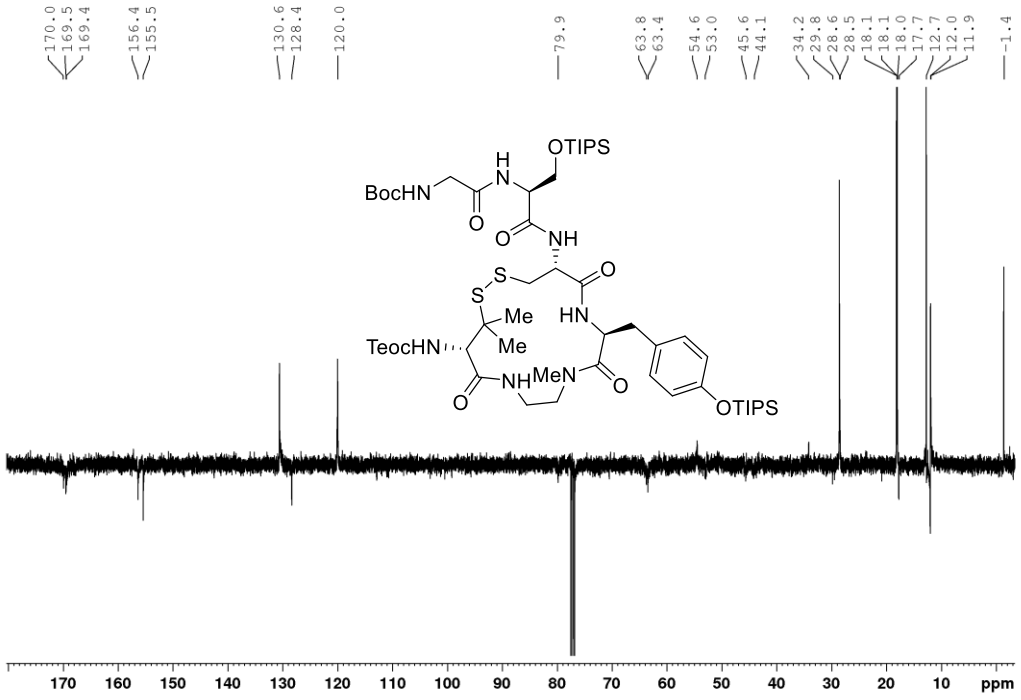


*Abbildung 85: ^{13}C-APT-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **47**.*

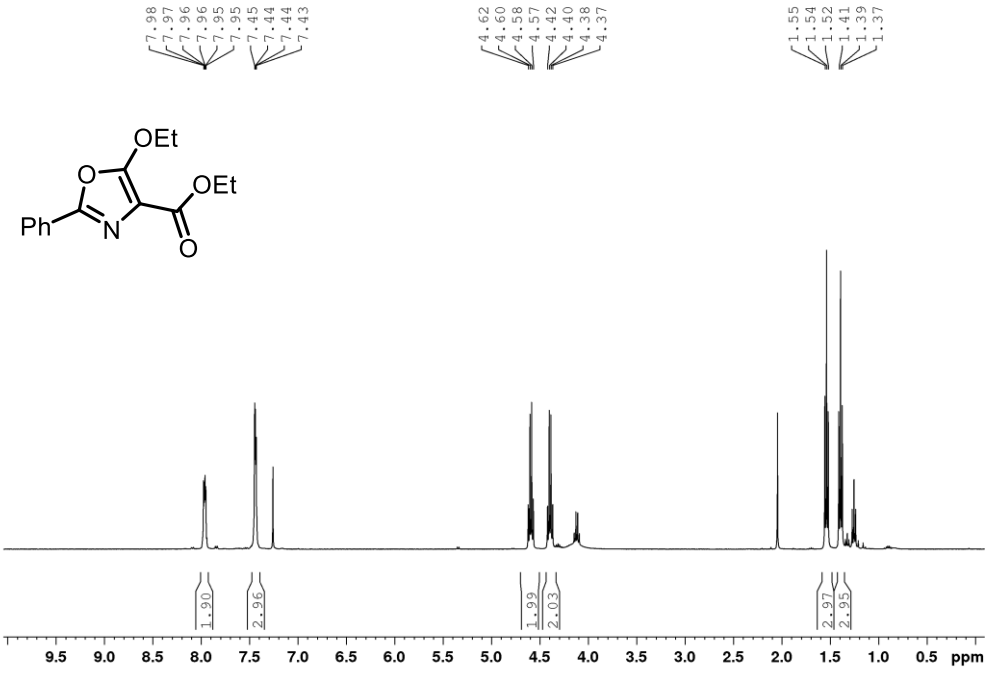


*Abbildung 86: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **9**.*

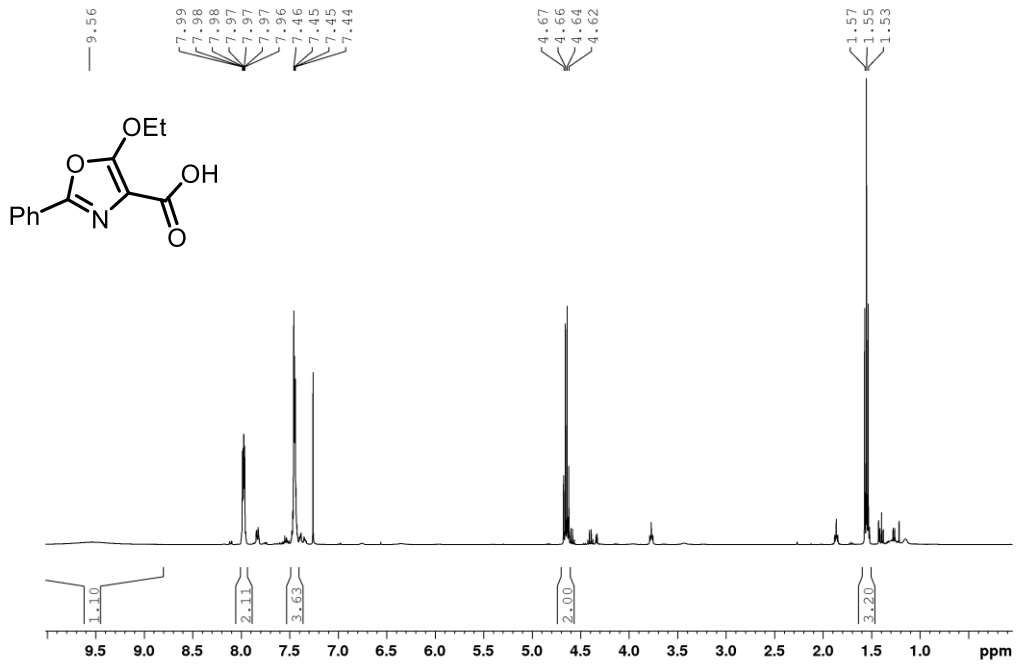


*Abbildung 87: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **51**.*

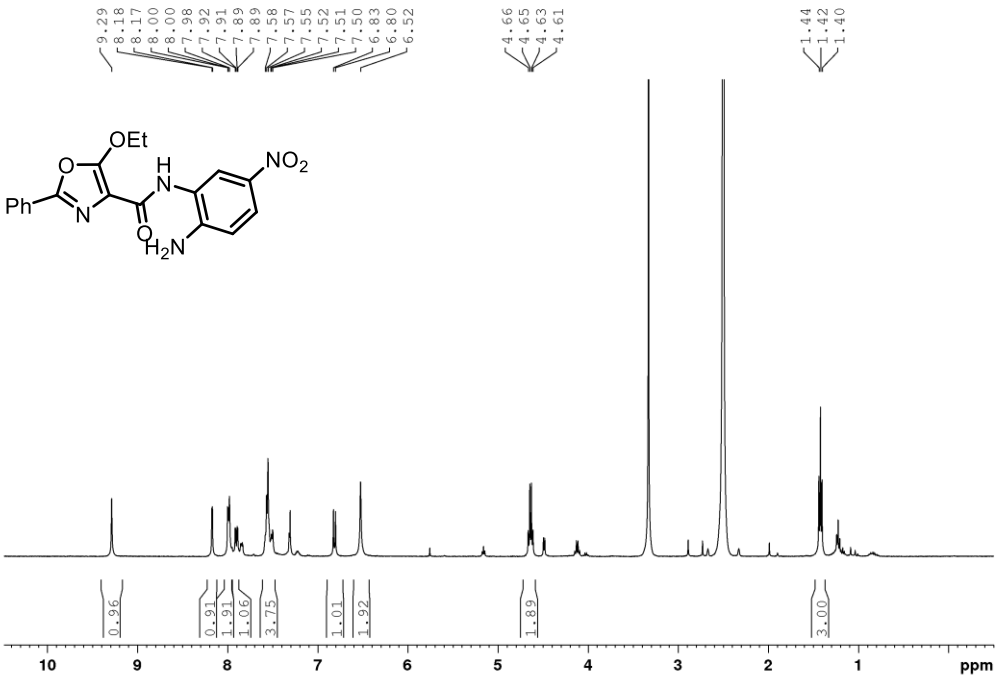


*Abbildung 88: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, DMSO) von **57**.*

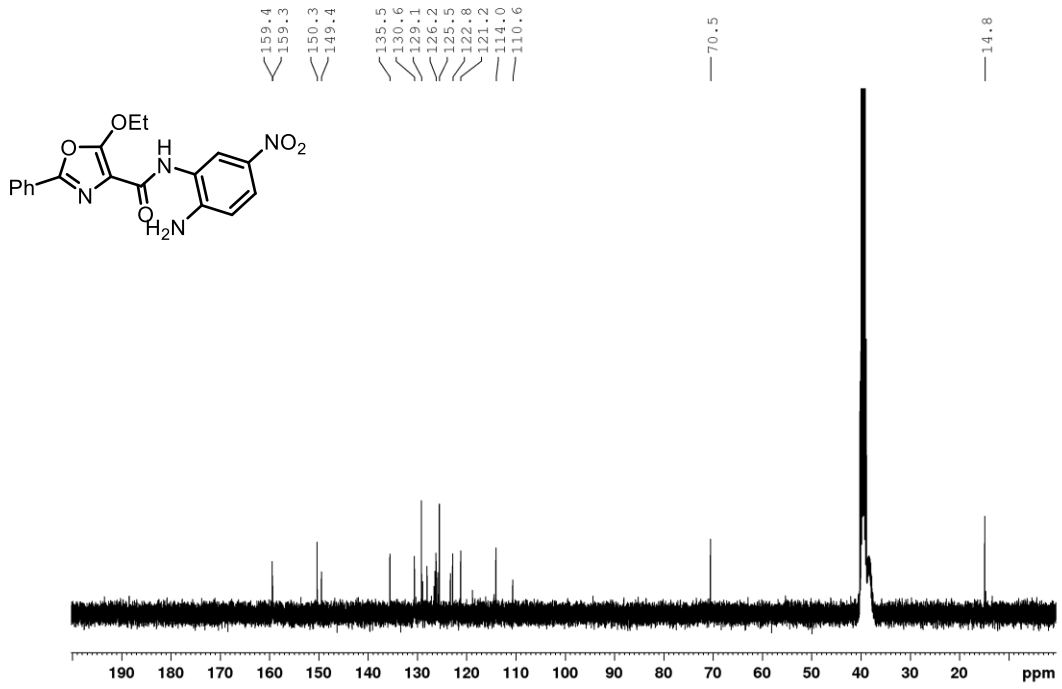


*Abbildung 89: [13]C-NMR Spektrum (101 MHz, DMSO) von **57**.*

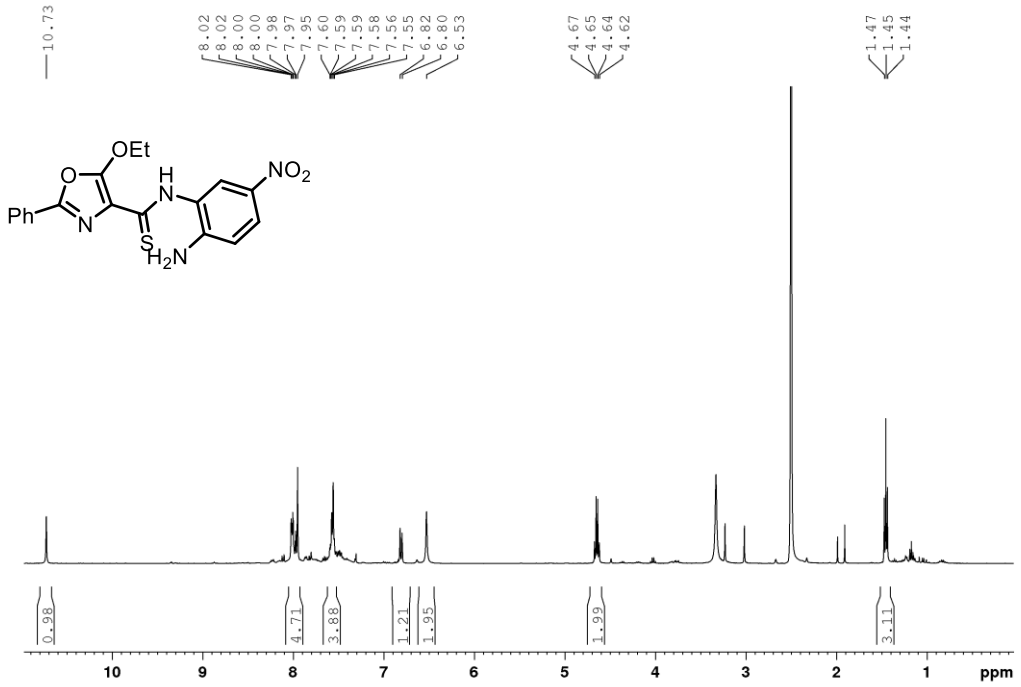


*Abbildung 90: [1]H-NMR Spektrum (400 MHz, DMSO) von **58**.*

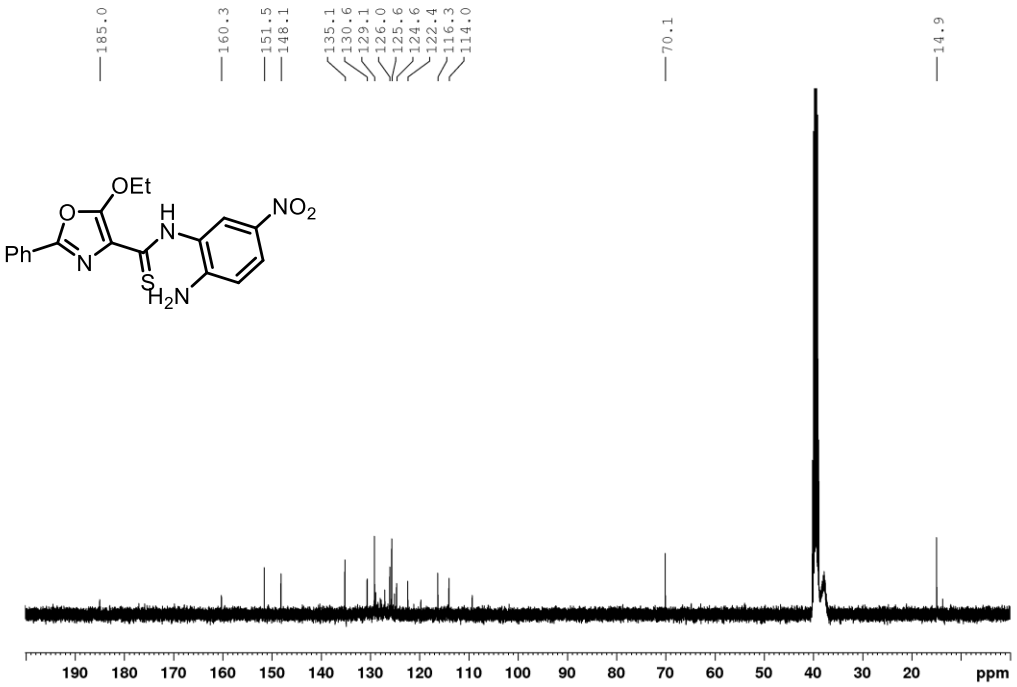


*Abbildung 91: [13]C-NMR Spektrum (101 MHz, DMSO) von **58**.*

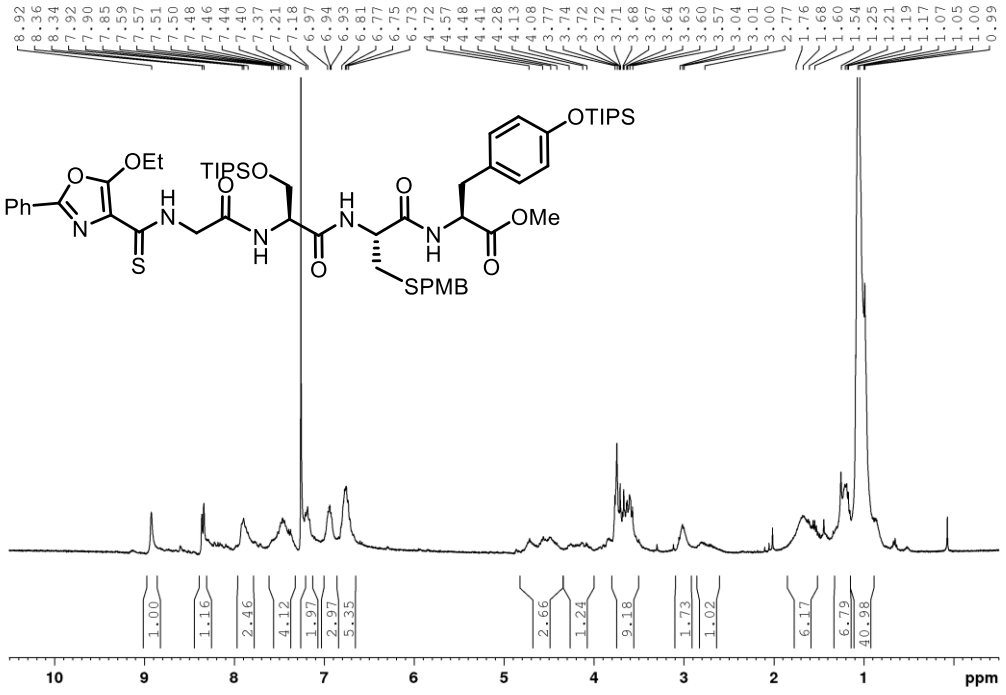


*Abbildung 92: [1]H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **62** nach Kupplung von **59** und **61**.*

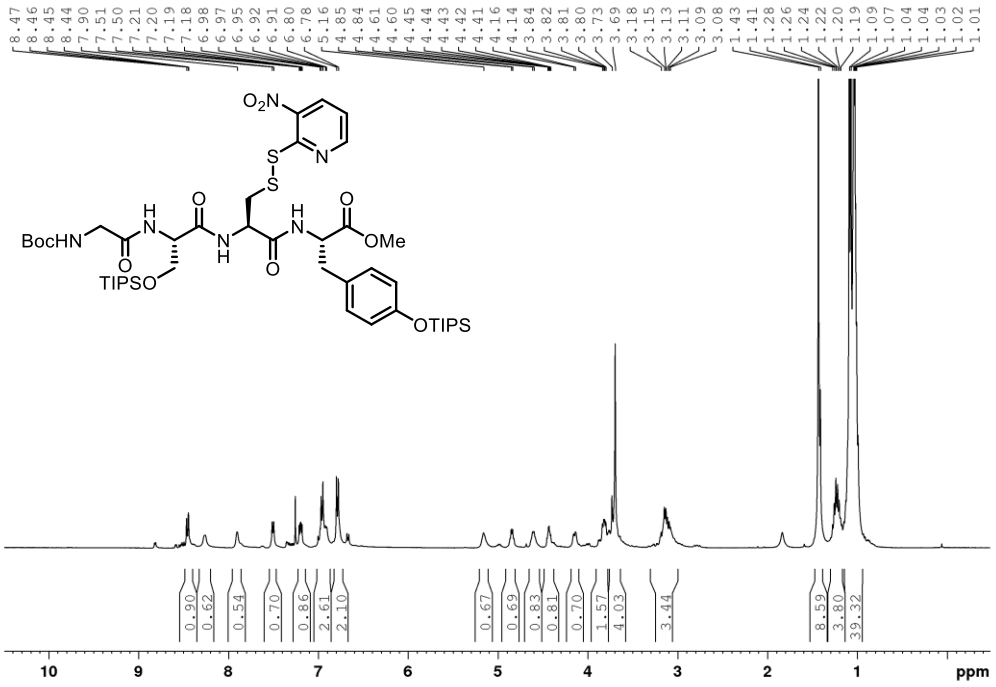


*Abbildung 93: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **280**.*

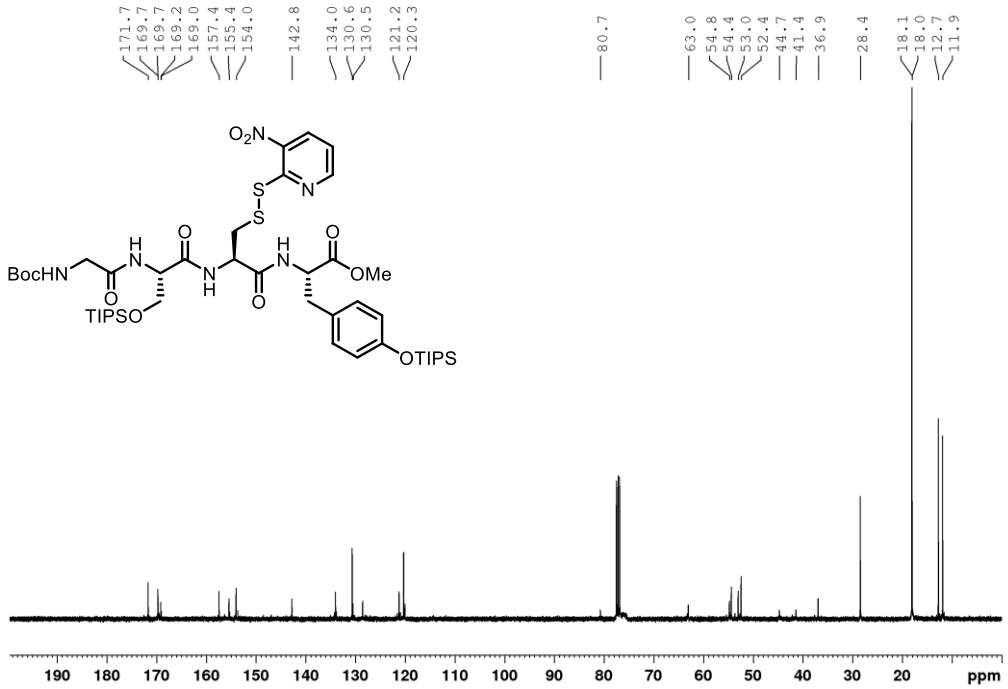


*Abbildung 94: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **280**.*

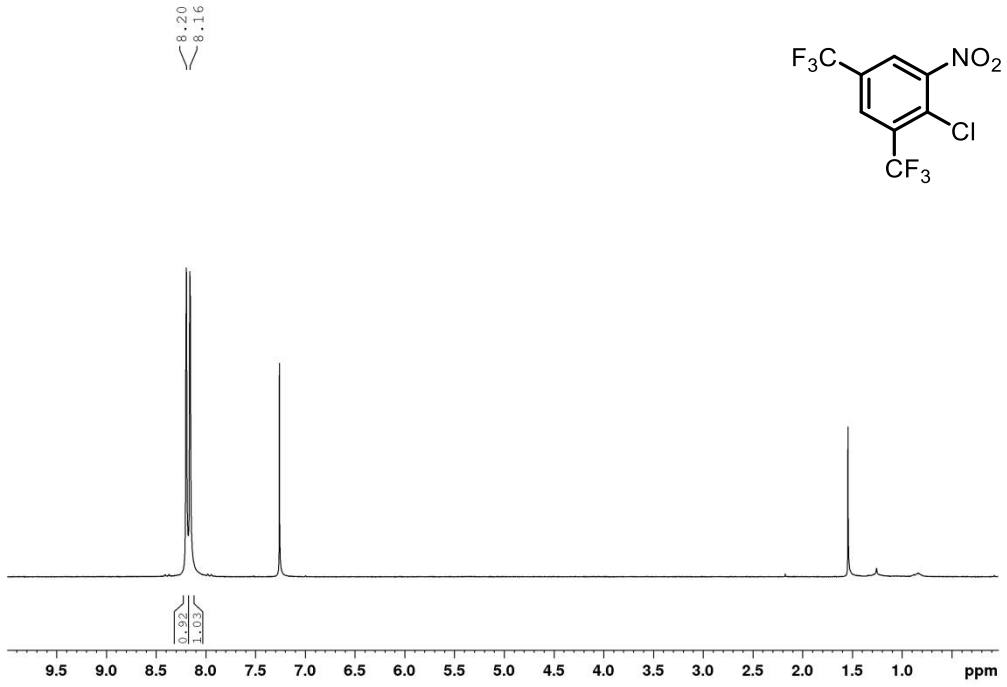


*Abbildung 95: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **281**.*

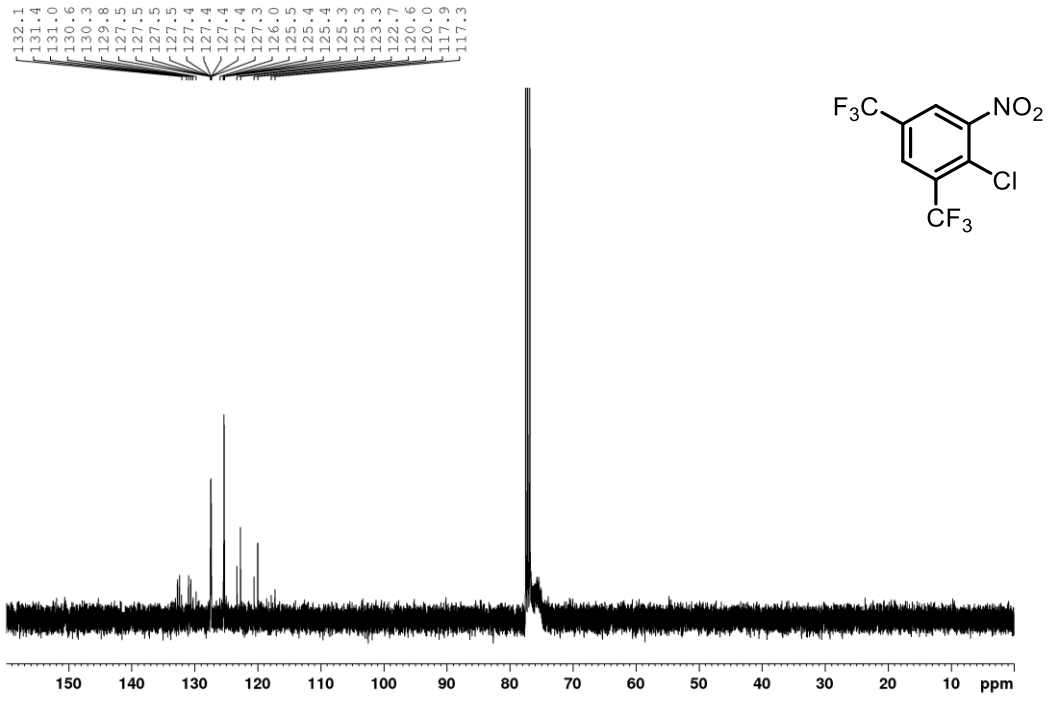


*Abbildung 96: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **281**.*

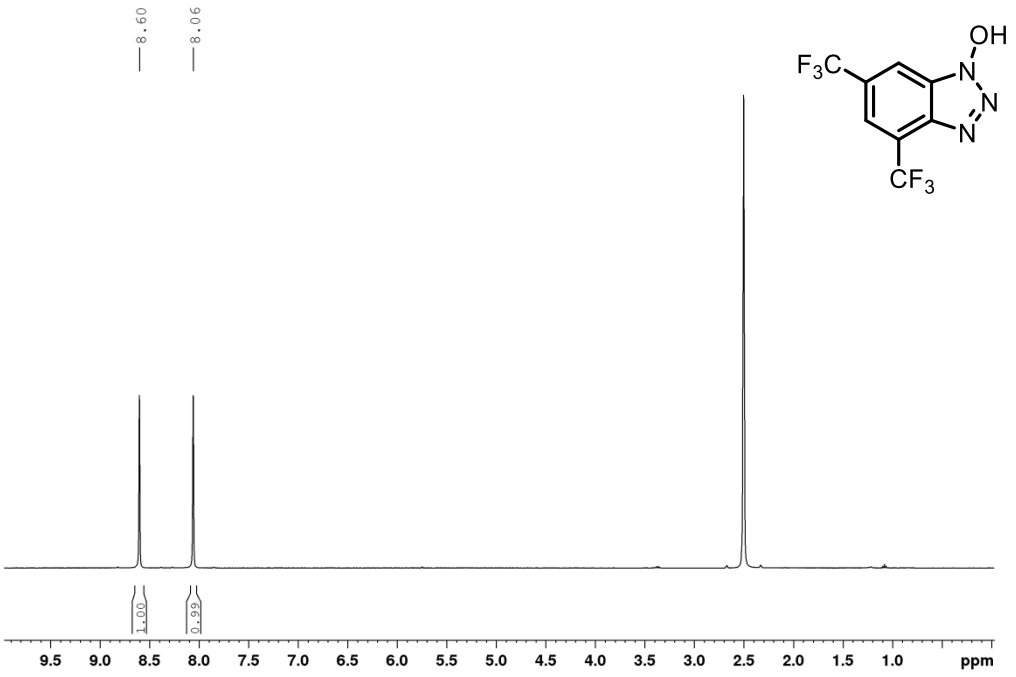


Abbildung 97: [1]H-NMR Spektrum (400 MHz, DMSO) von HODiFBt.

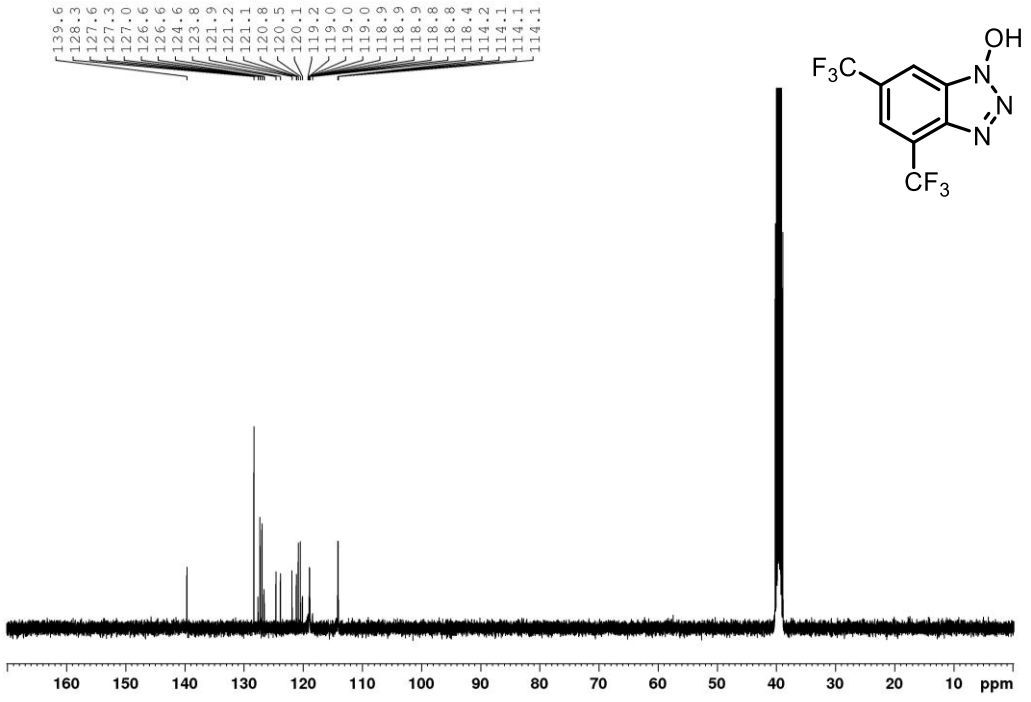


Abbildung 98: [13]C-NMR Spektrum (101 MHz, DMSO) von HODiFBt.



Abbildung 99: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von PyDiFOP.

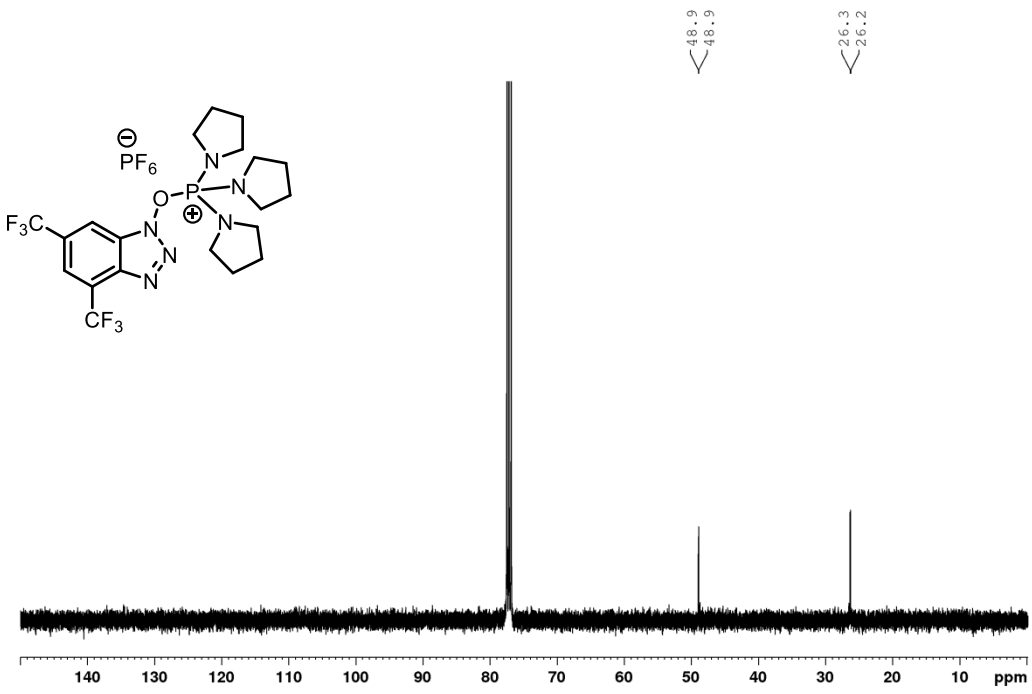


Abbildung 100: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von PyDiFOP.

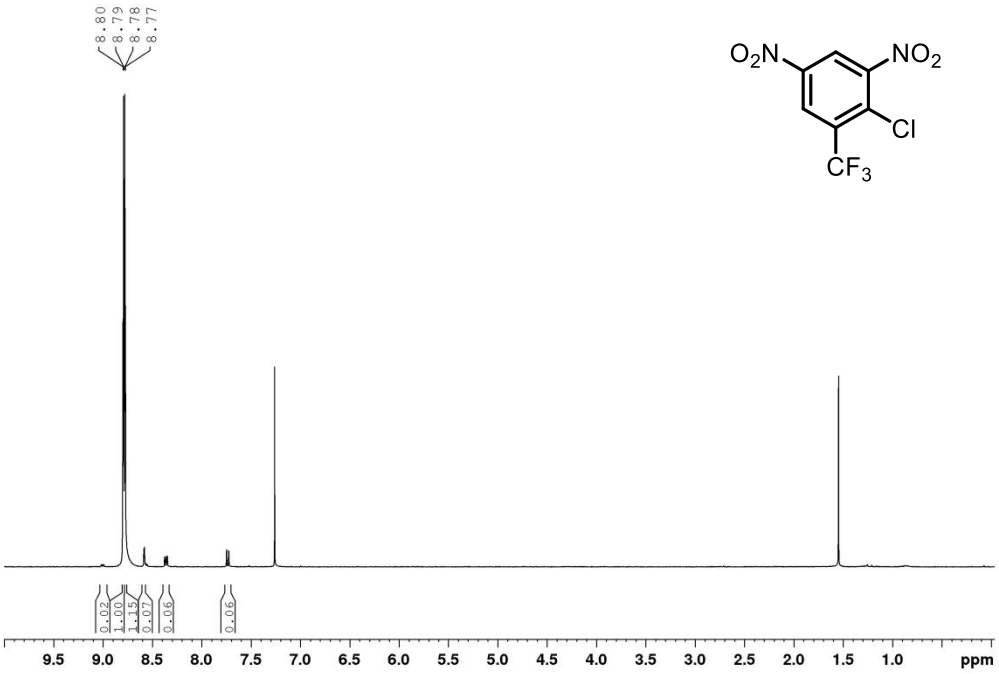


*Abbildung 101: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **282**.*

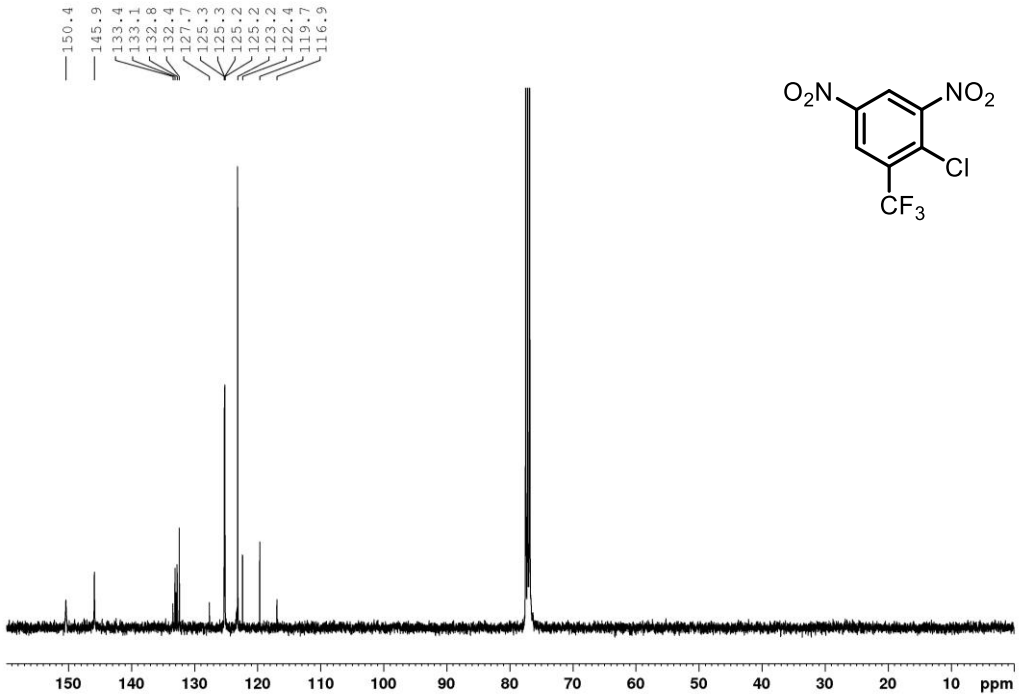


*Abbildung 102: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **282**.*

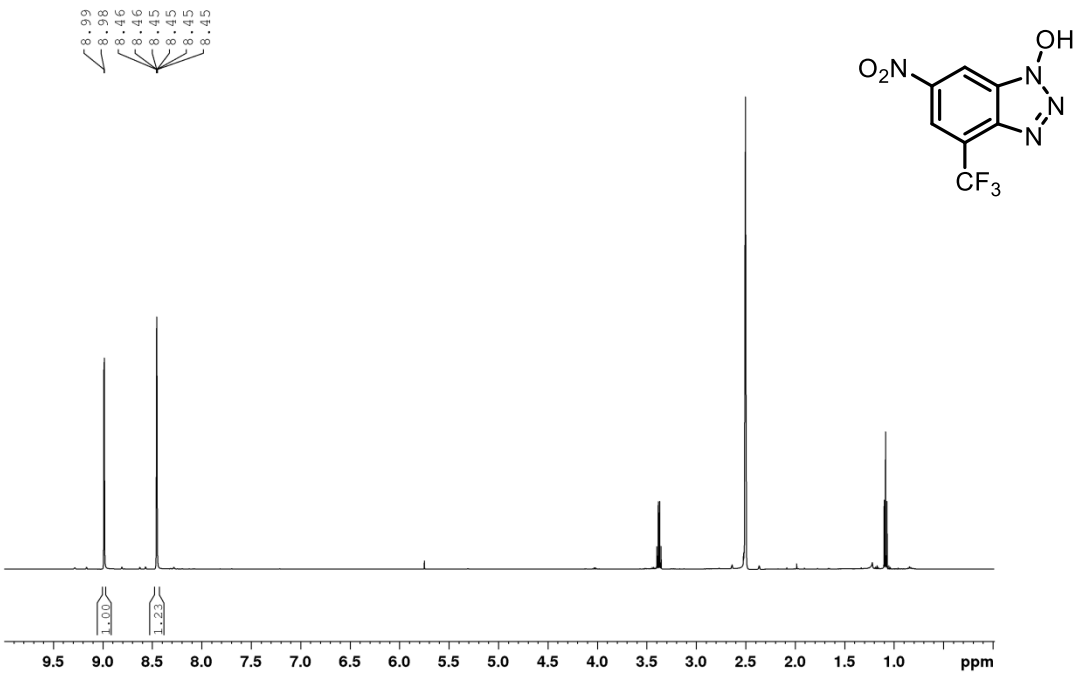


Abbildung 103: [1]H-NMR Spektrum (400 MHz, DMSO) von HOFNBt.

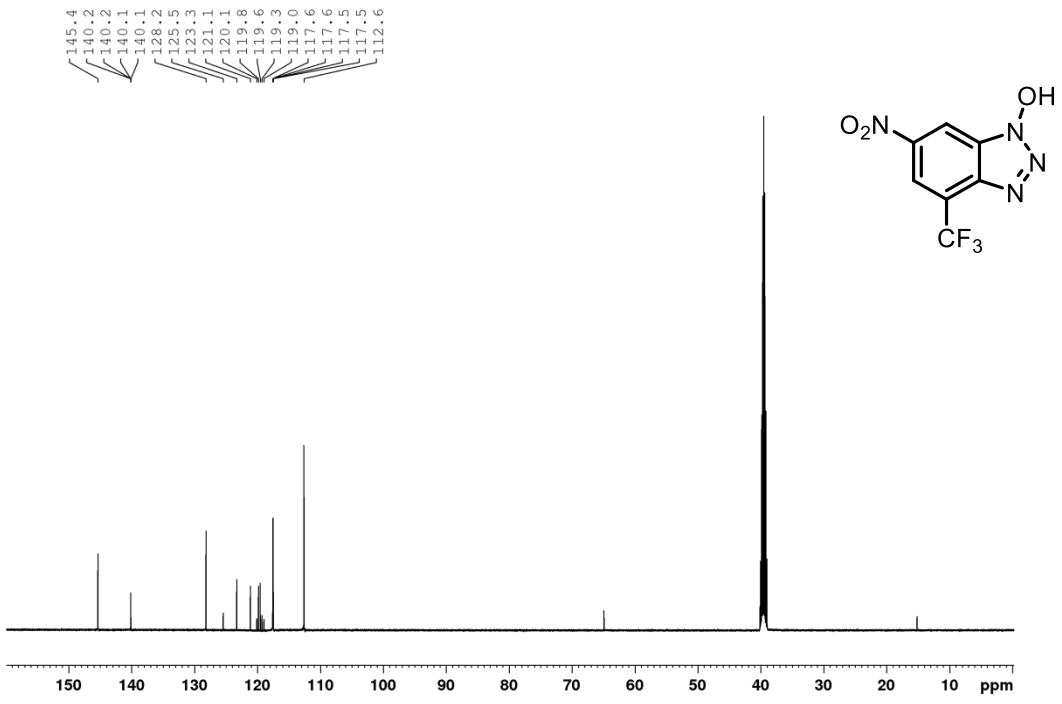


Abbildung 104: [13]C-NMR Spektrum (101 MHz, DMSO) von HOFNBt.

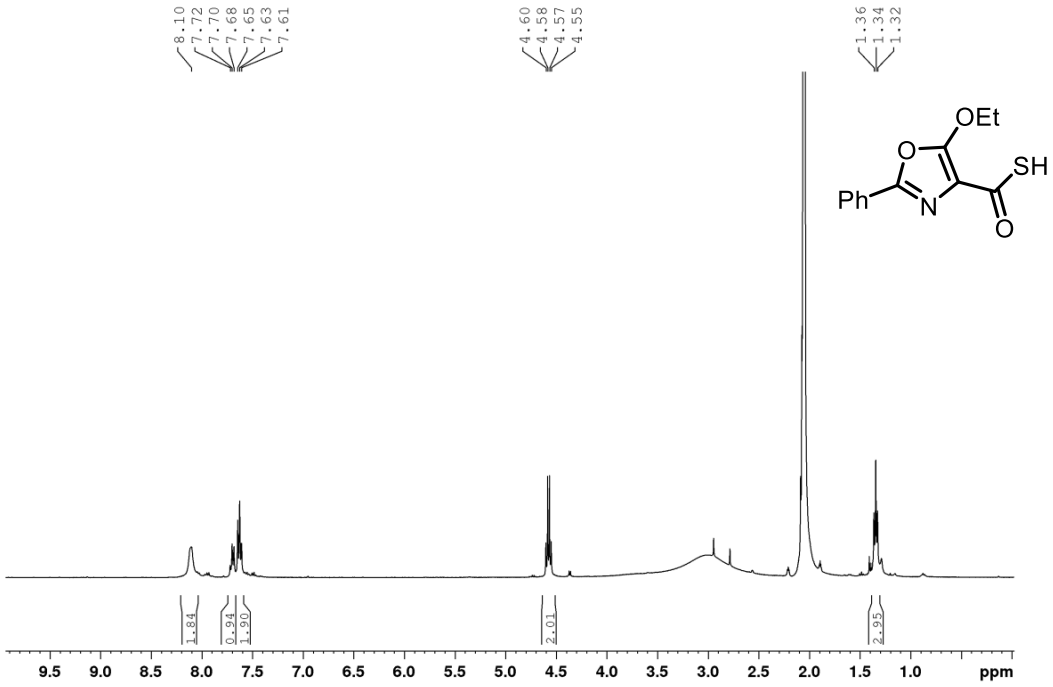


*Abbildung 105: [1]H-NMR Spektrum (400 MHz, Aceton) von **78**.*

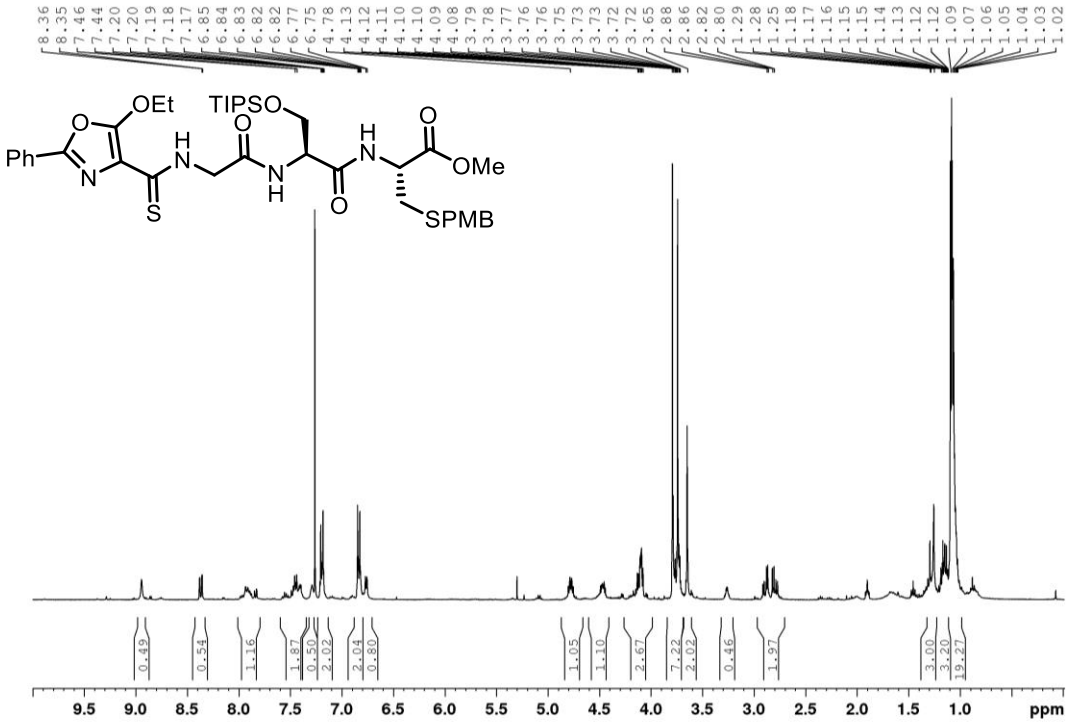


*Abbildung 106: [1]H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **79** unter Verwendung von PyNOP.*

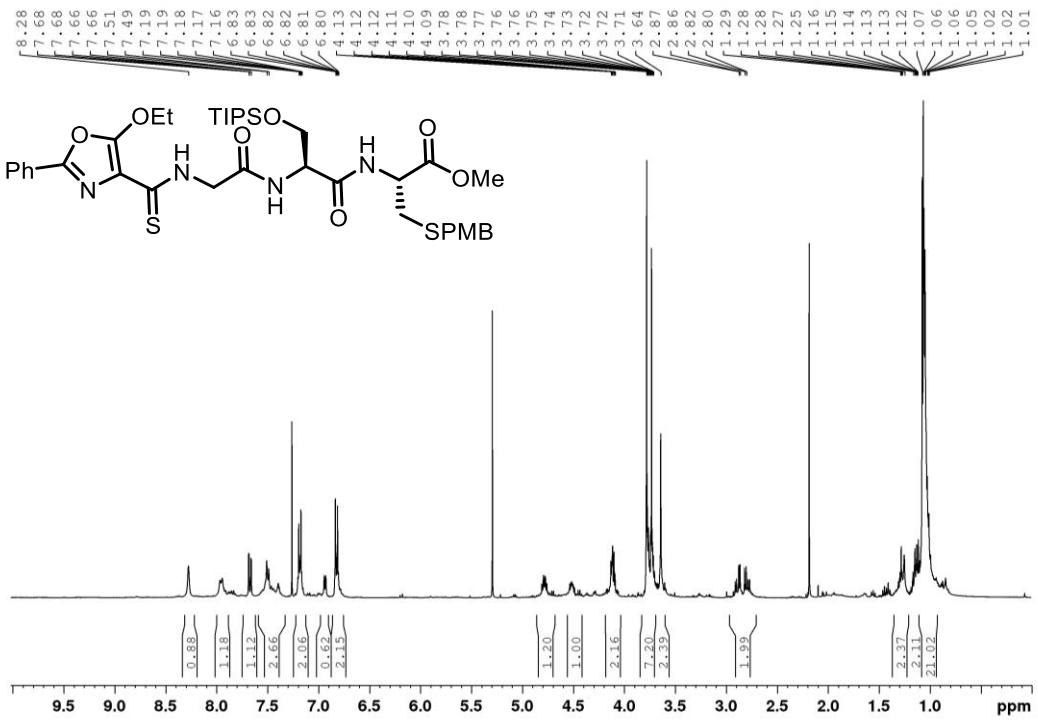


*Abbildung 107: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **79** unter Verwendung von PyFOP.*

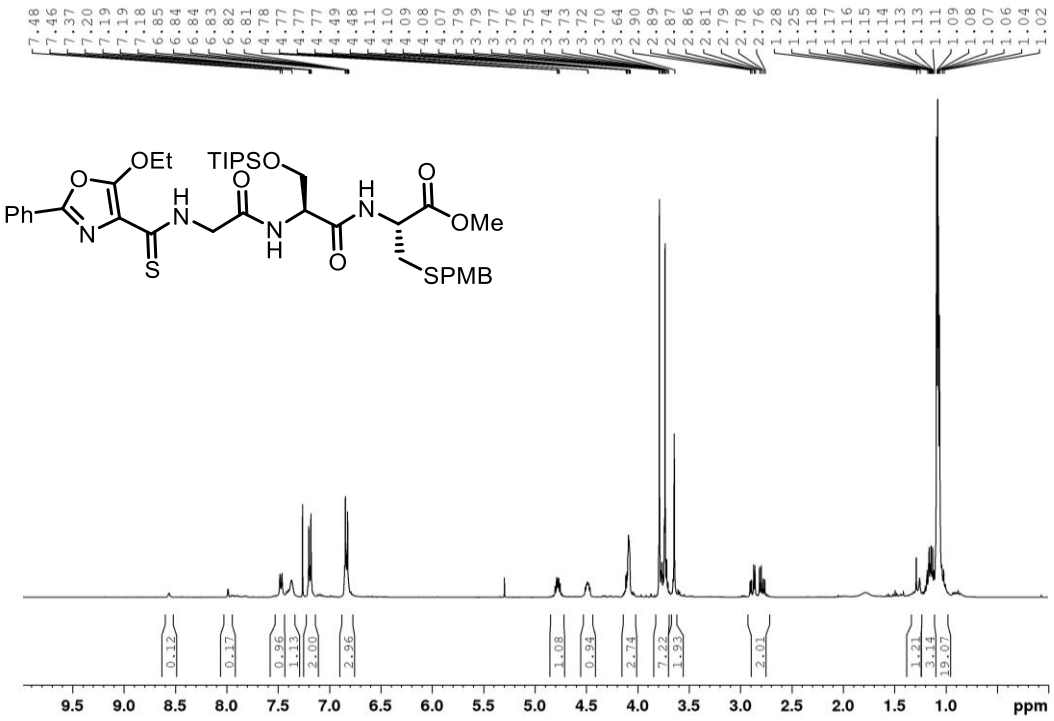


*Abbildung 108: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **79** unter Verwendung von PyDiFOP.*

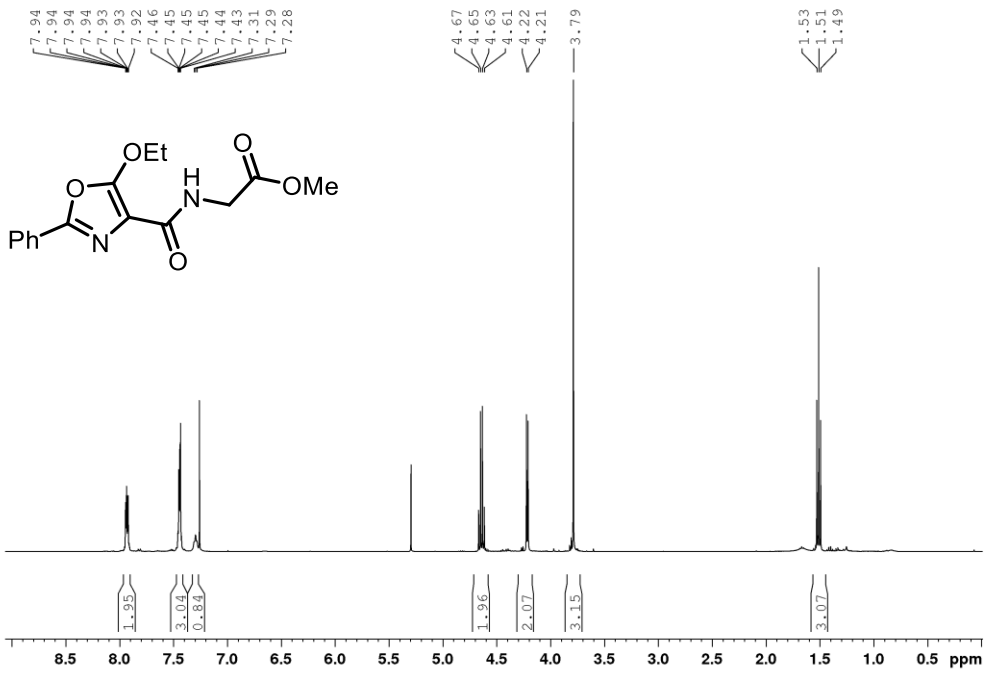


*Abbildung 109: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **99**.*

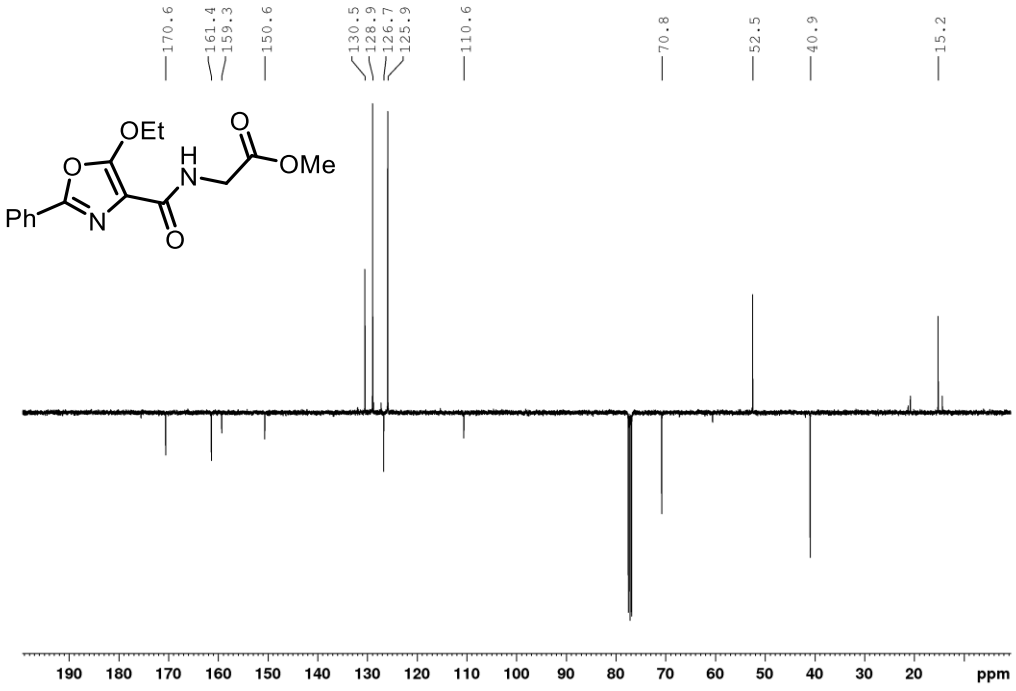


*Abbildung 110: ^{13}C-APT-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **99**.*

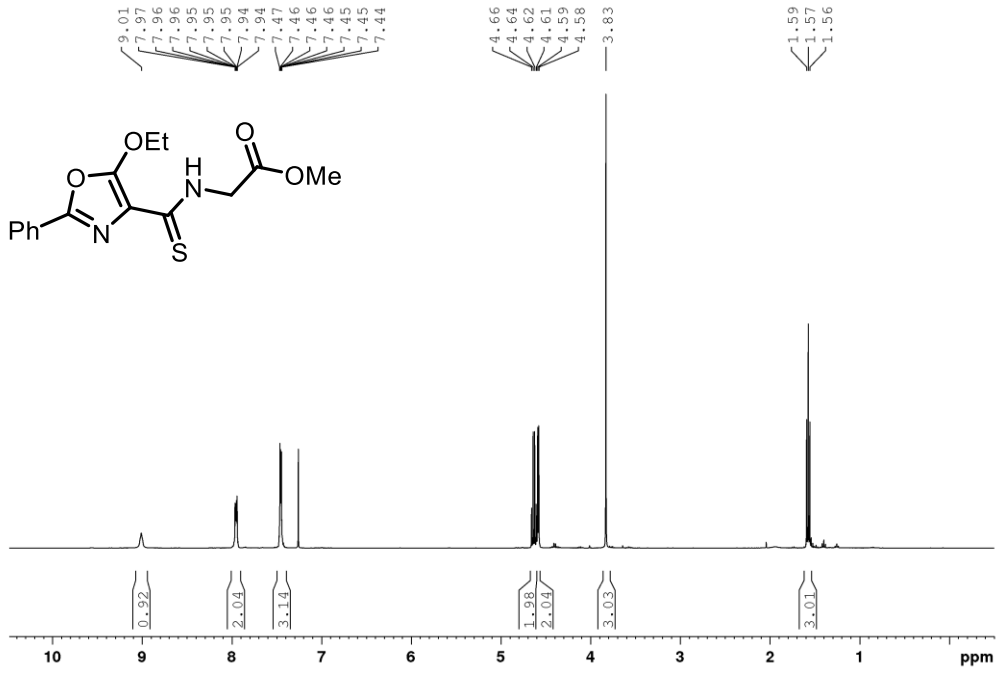


*Abbildung 111: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **85**.*

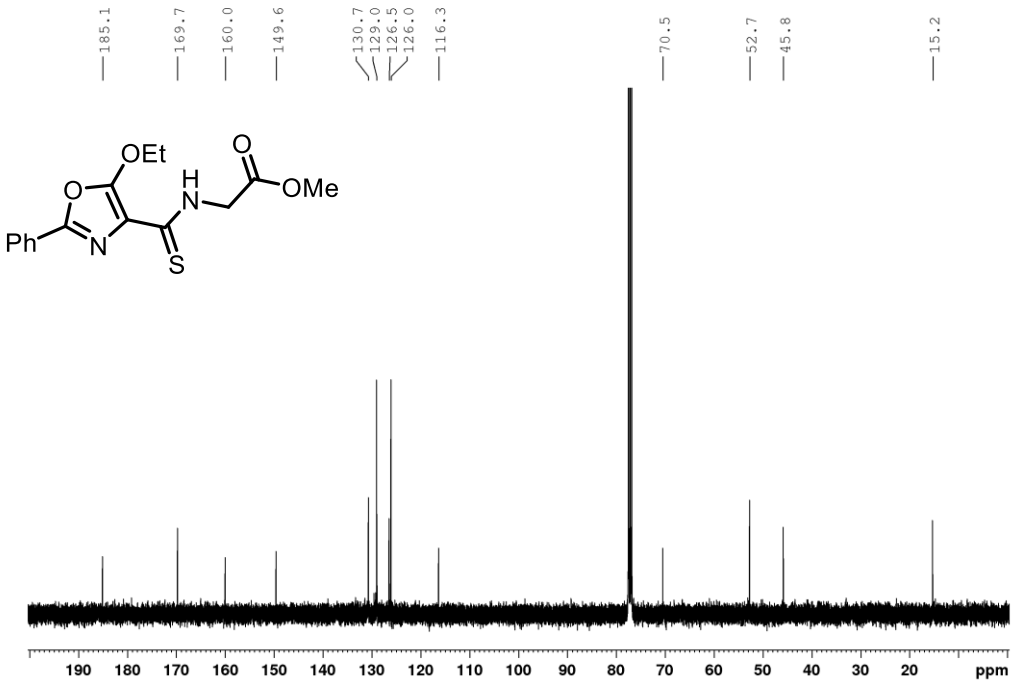


*Abbildung 112: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **85**.*

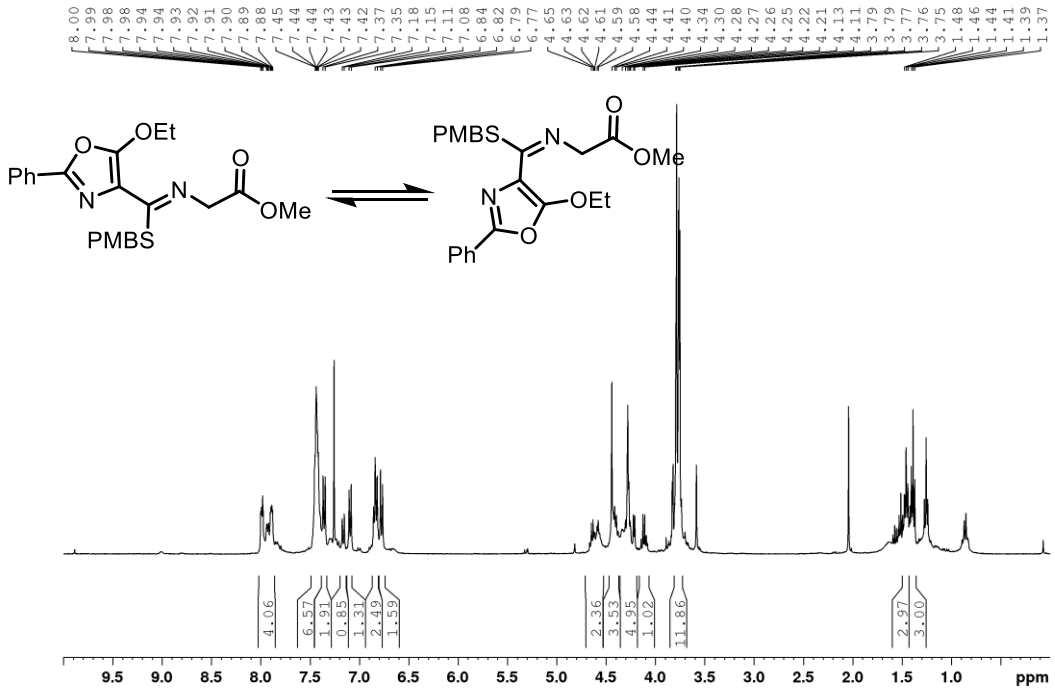


*Abbildung 113: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **100.***

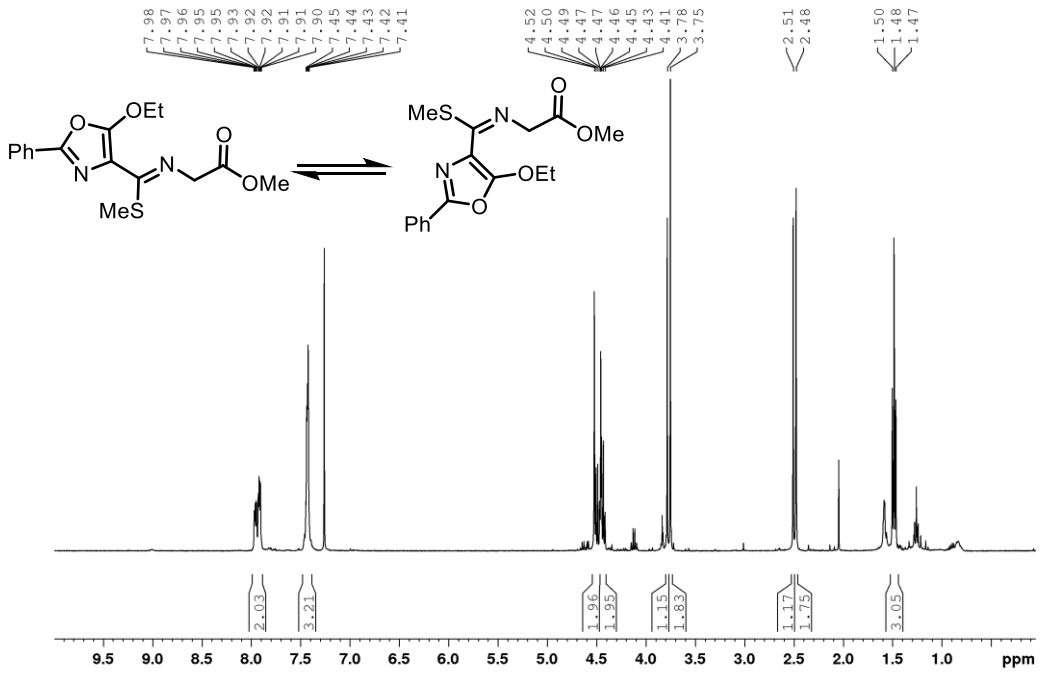


*Abbildung 114: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **101**.*

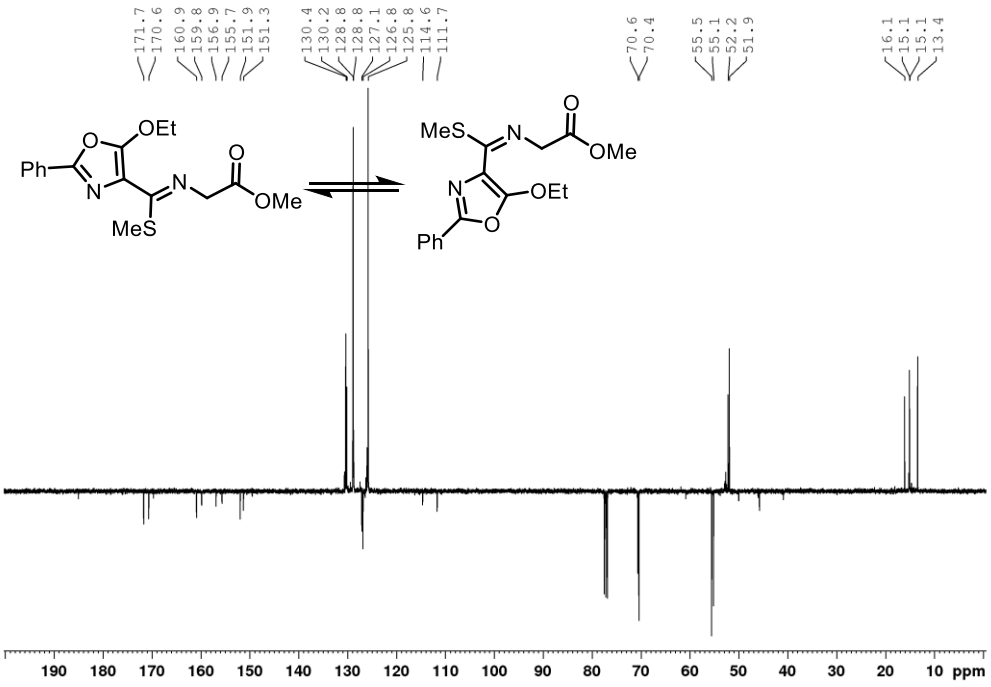


*Abbildung 115: ^{13}C-APT-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **101**.*

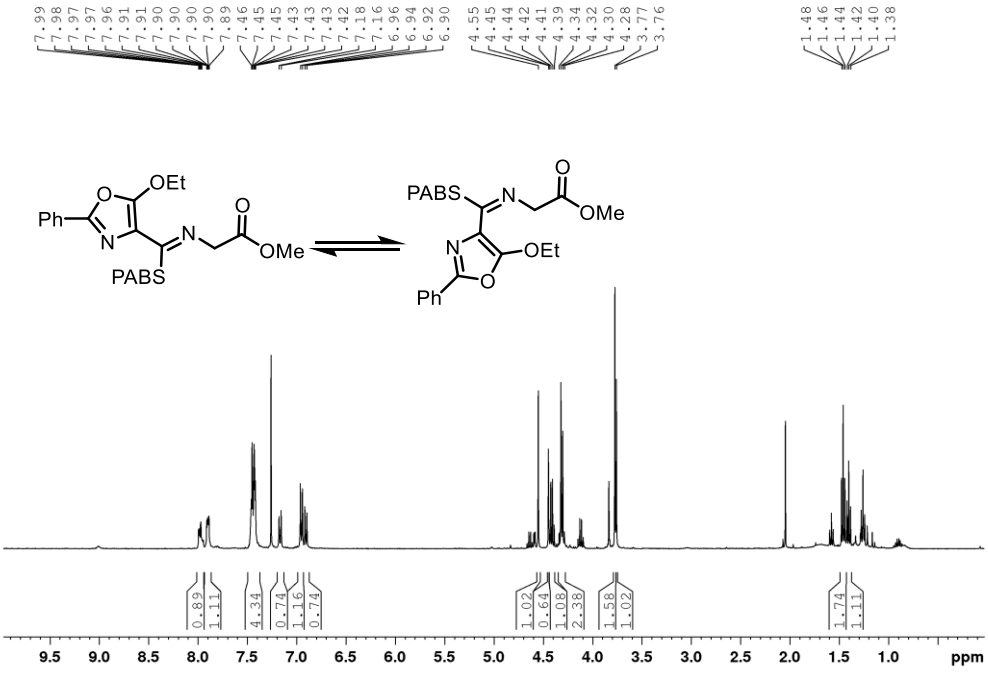


Abbildung 116: ^{1}H-NMR Spektrum *(400 MHz, $CDCl_3$) von **102**.*

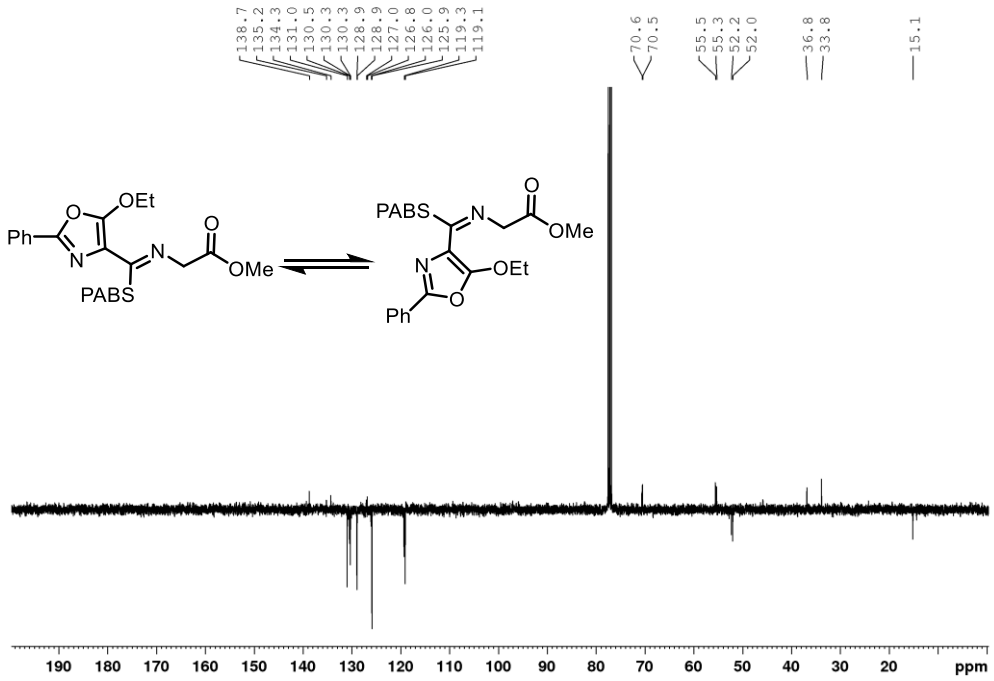


*Abbildung 117: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **102**.*

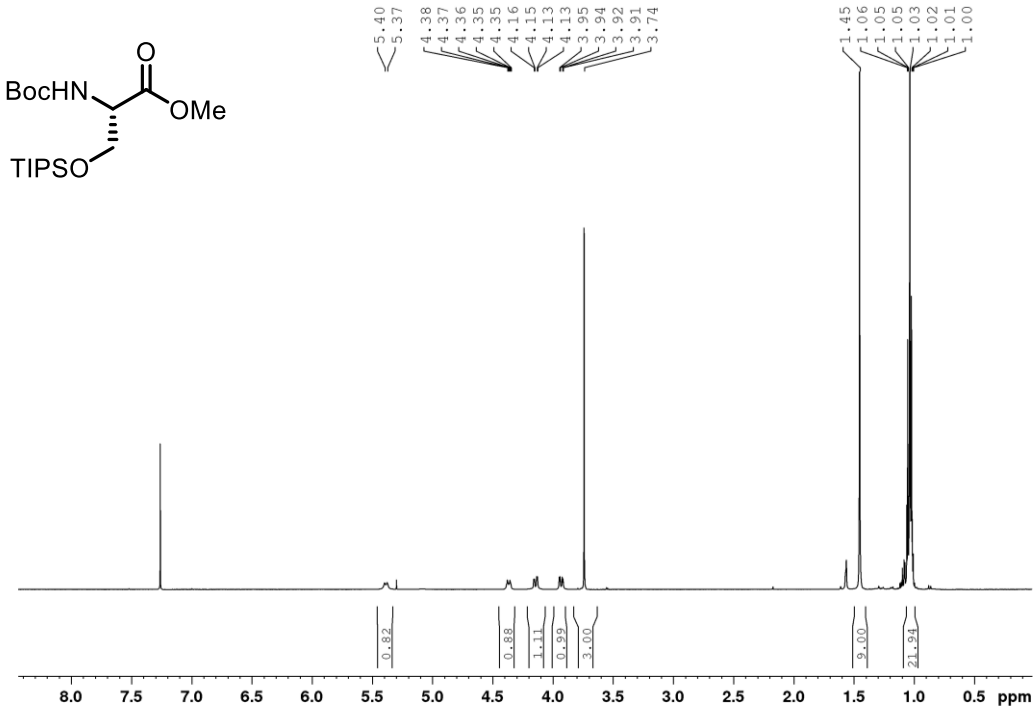


*Abbildung 118: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **13.***

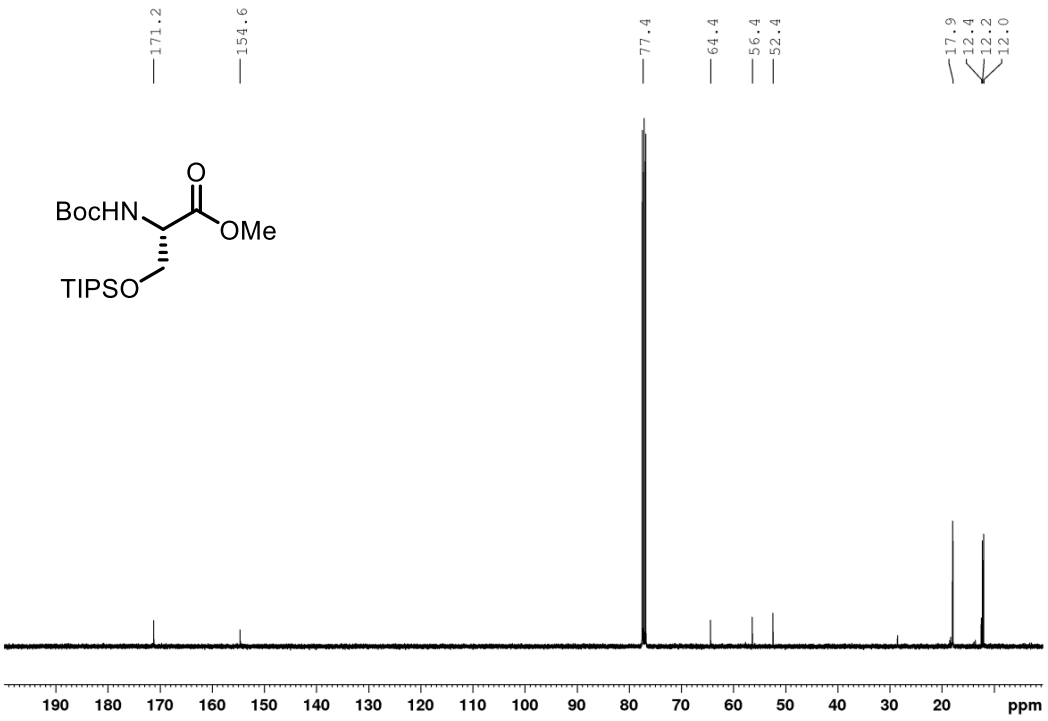


*Abbildung 119: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **13**.*

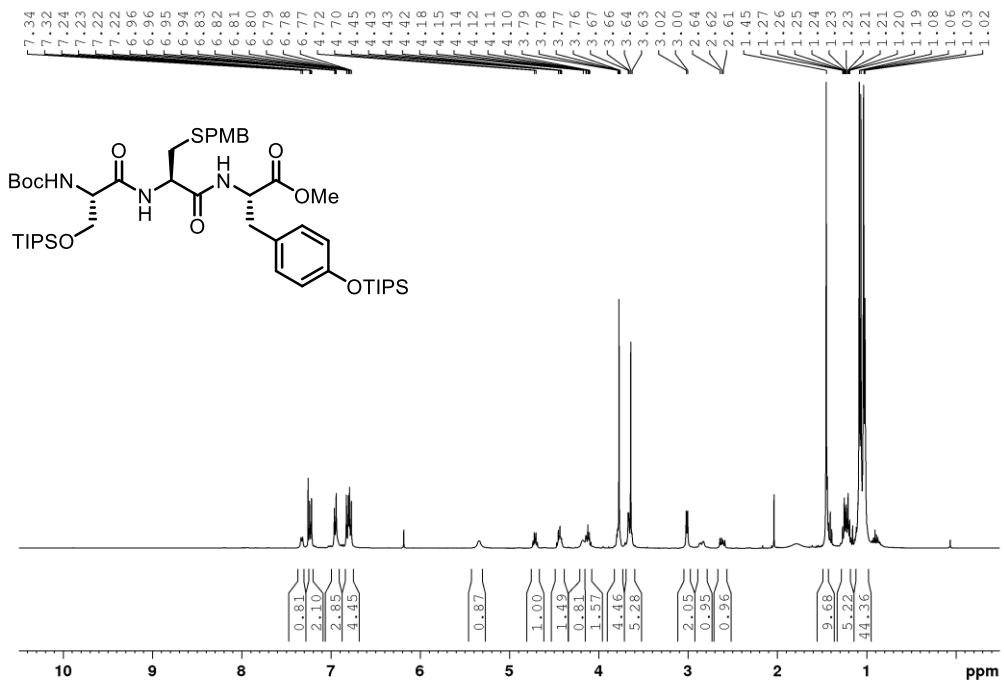


*Abbildung 120: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **106**.*

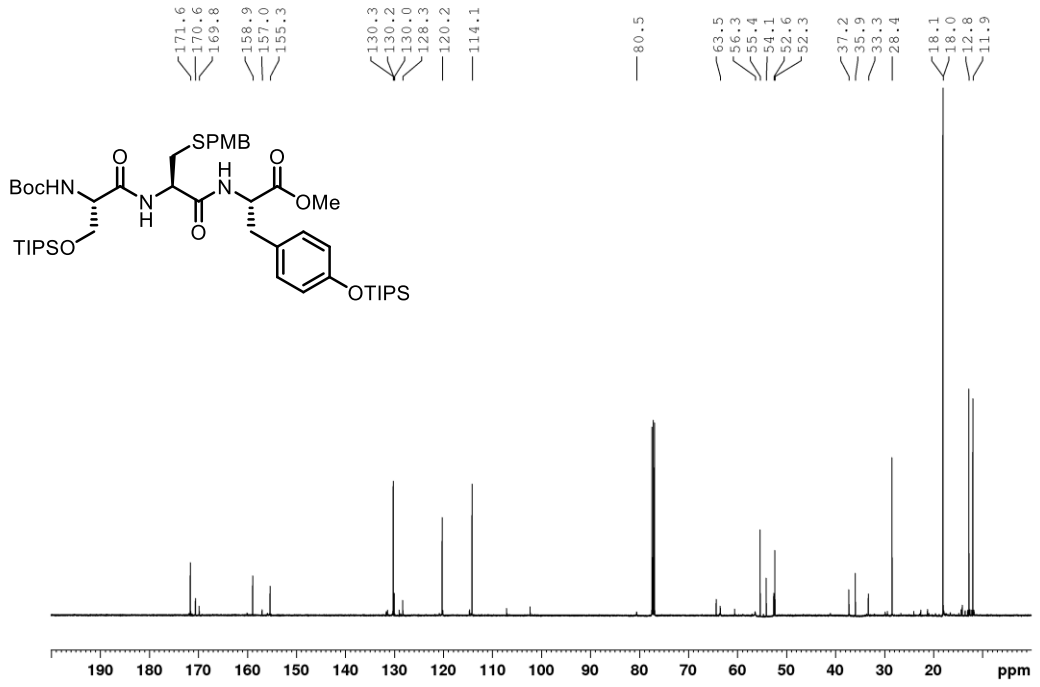


*Abbildung 121: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **106**.*

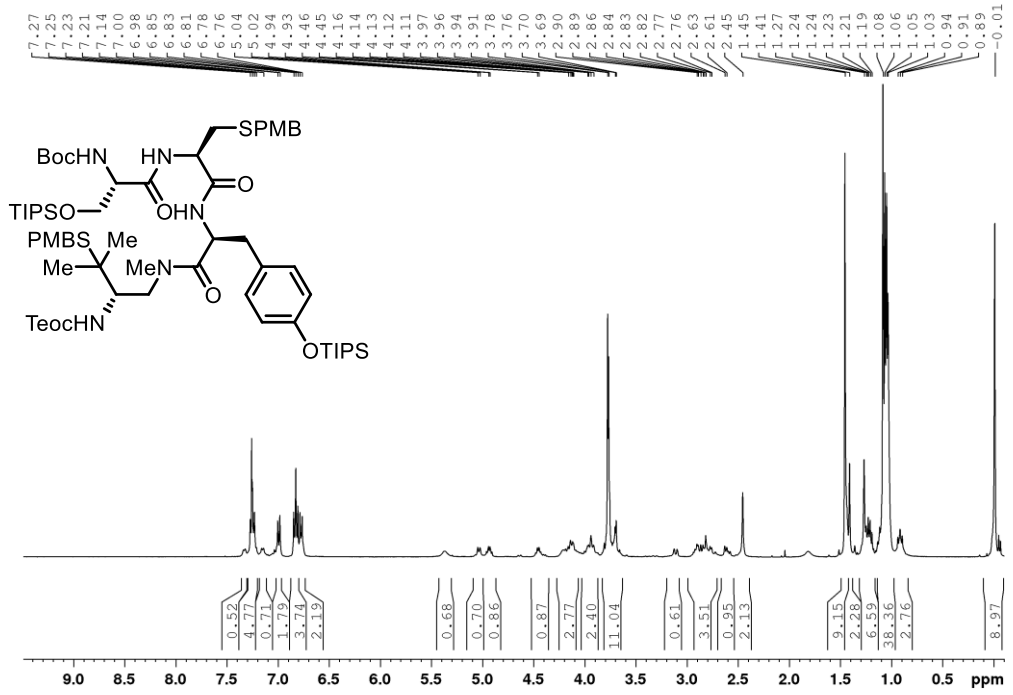


*Abbildung 122: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **83**.*

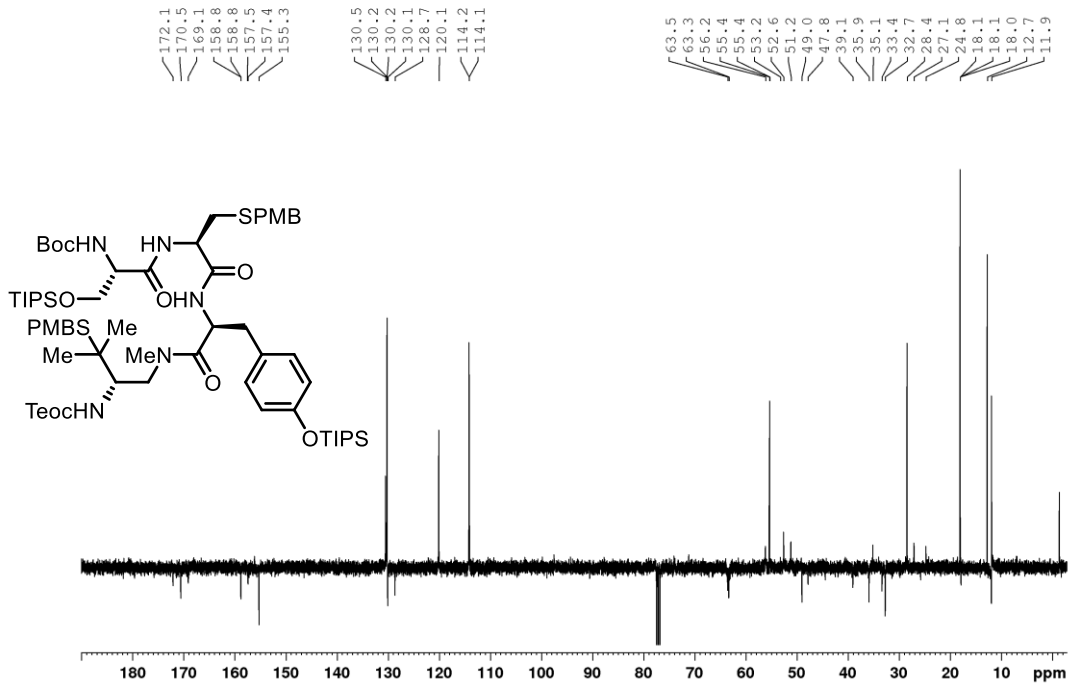


*Abbildung 123: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **83**.*

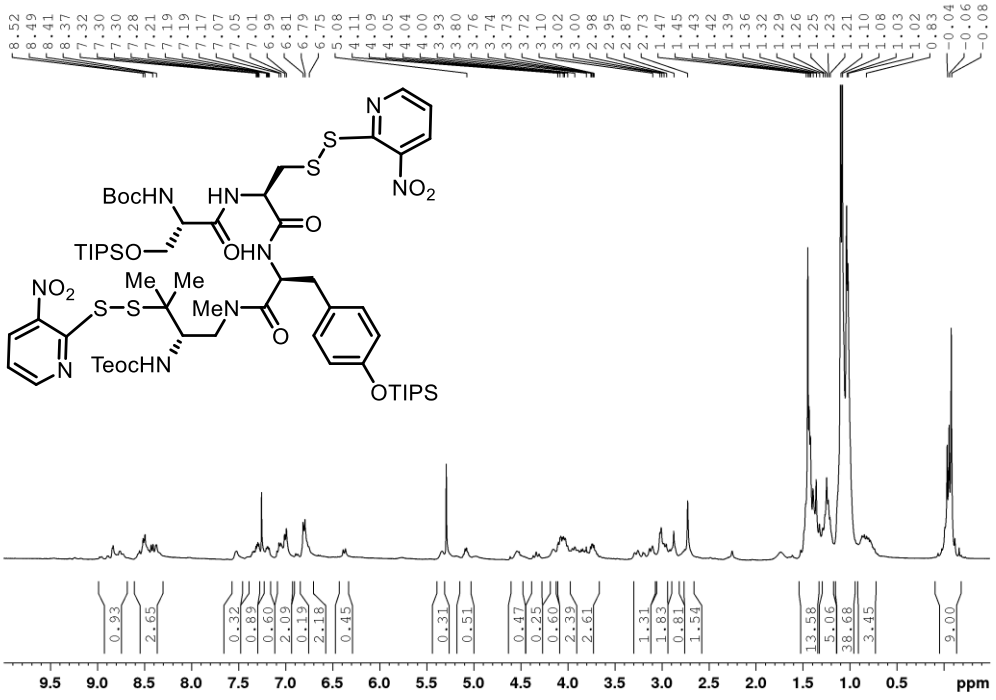


*Abbildung 124: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **109**.*

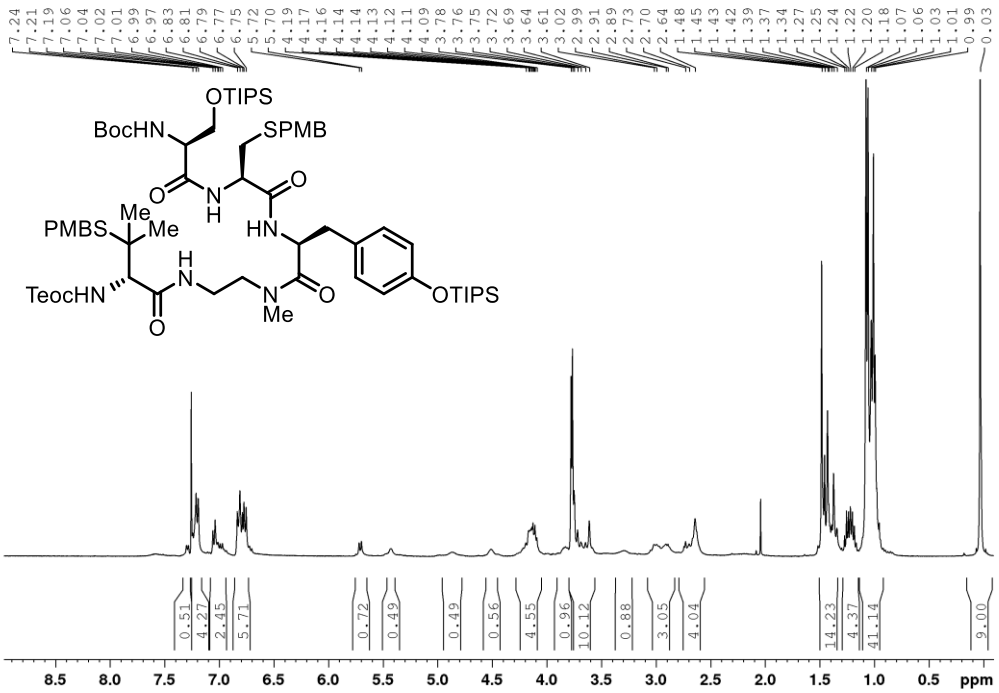


*Abbildung 125: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **84**.*

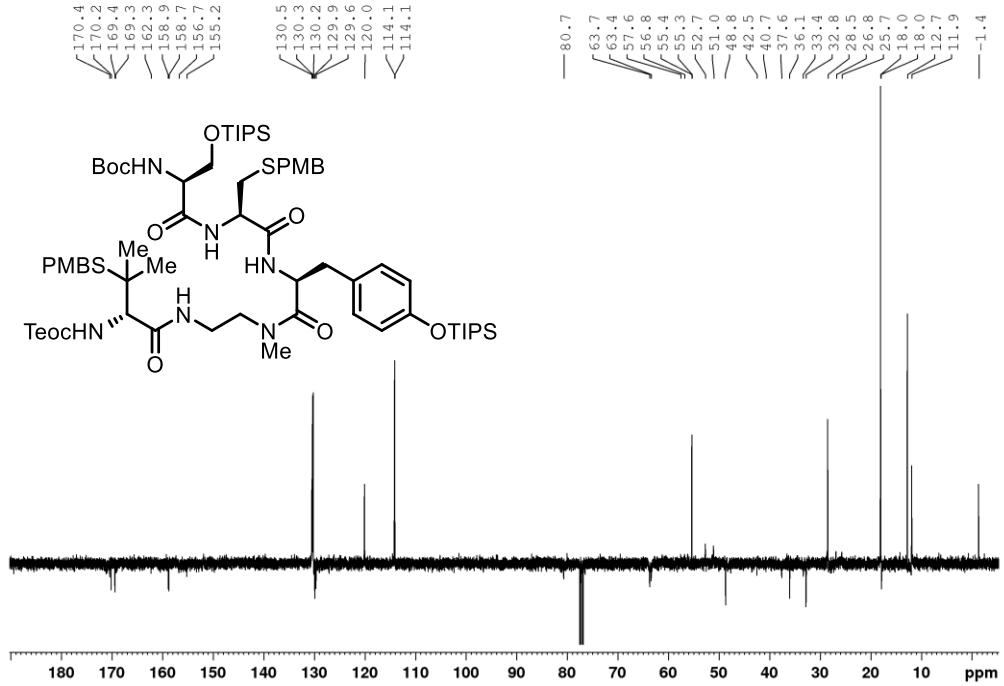


*Abbildung 126: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **84**.*

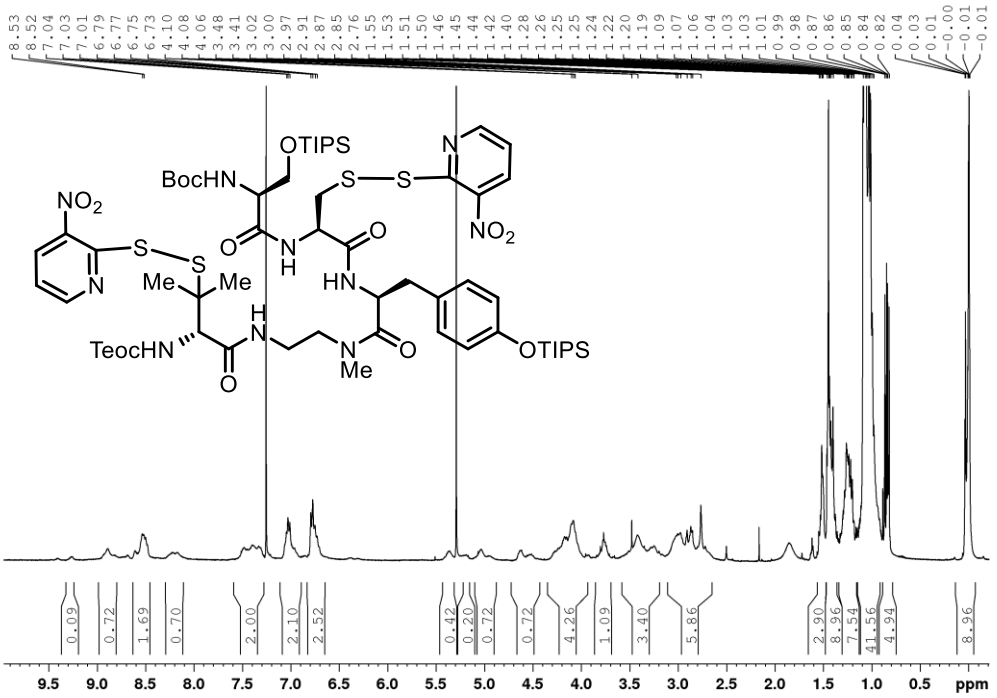


*Abbildung 127: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **114**.*

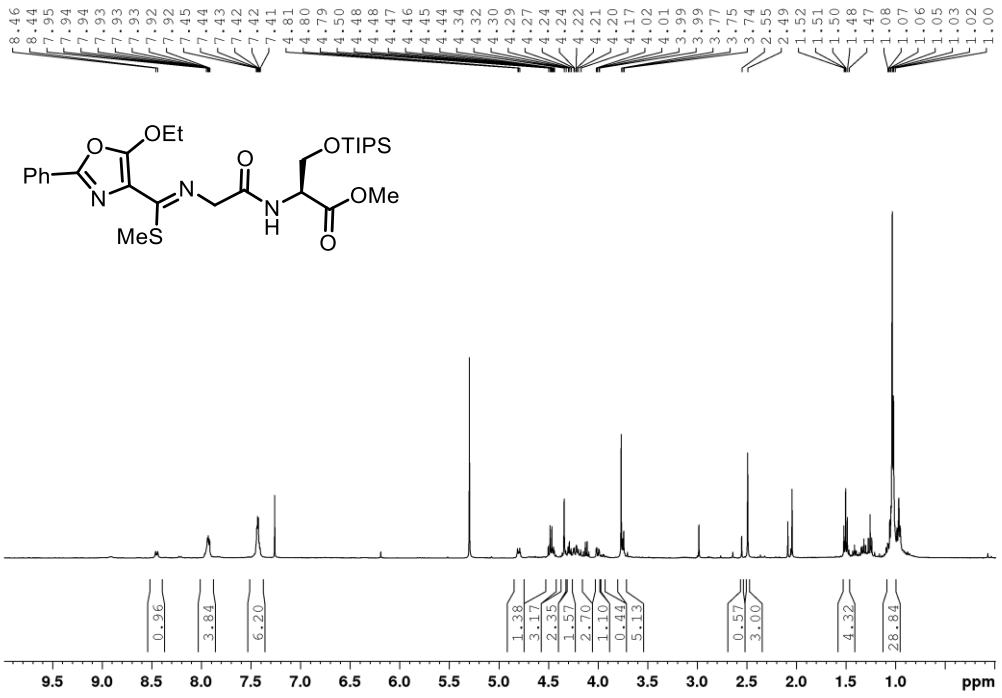


*Abbildung 128: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **119.***

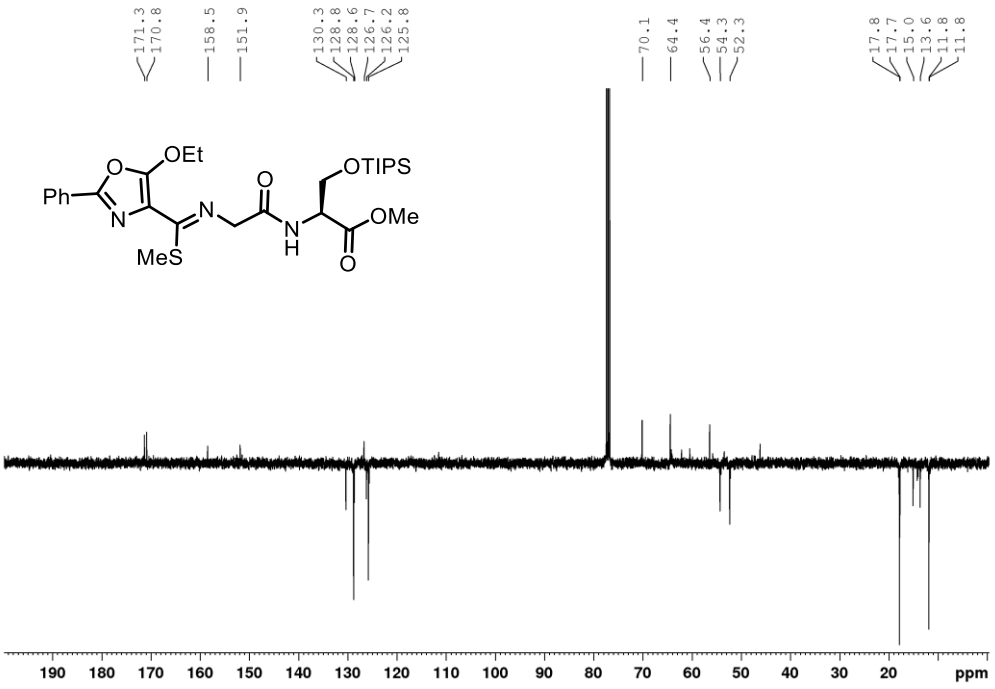


*Abbildung 129: ^{13}C-APT-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **119**.*

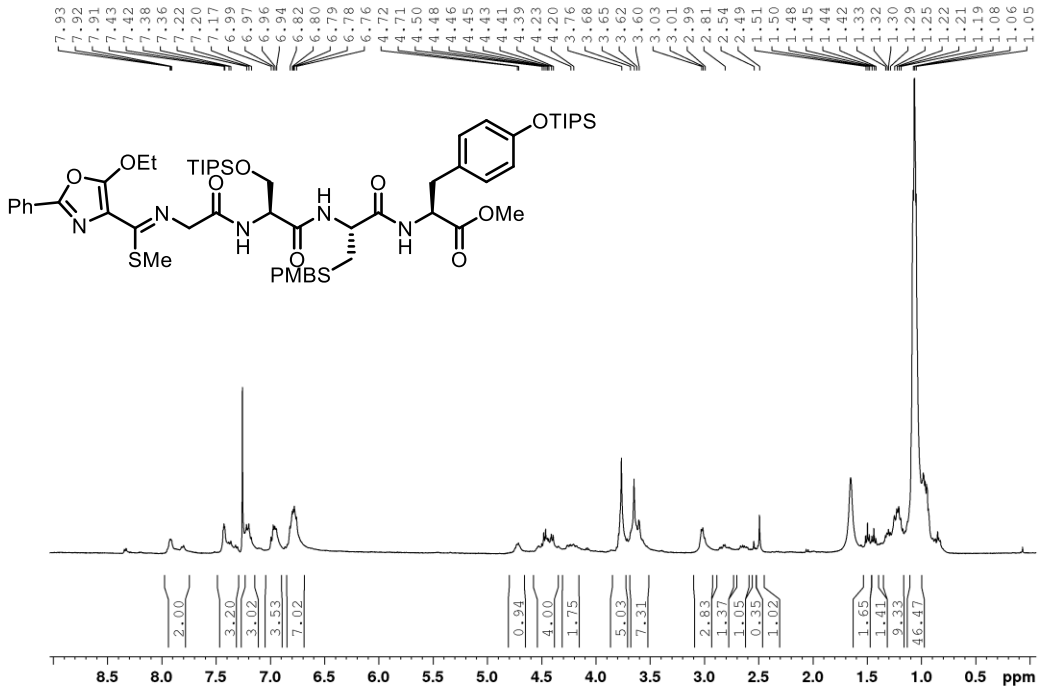


*Abbildung 130: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **121**.*

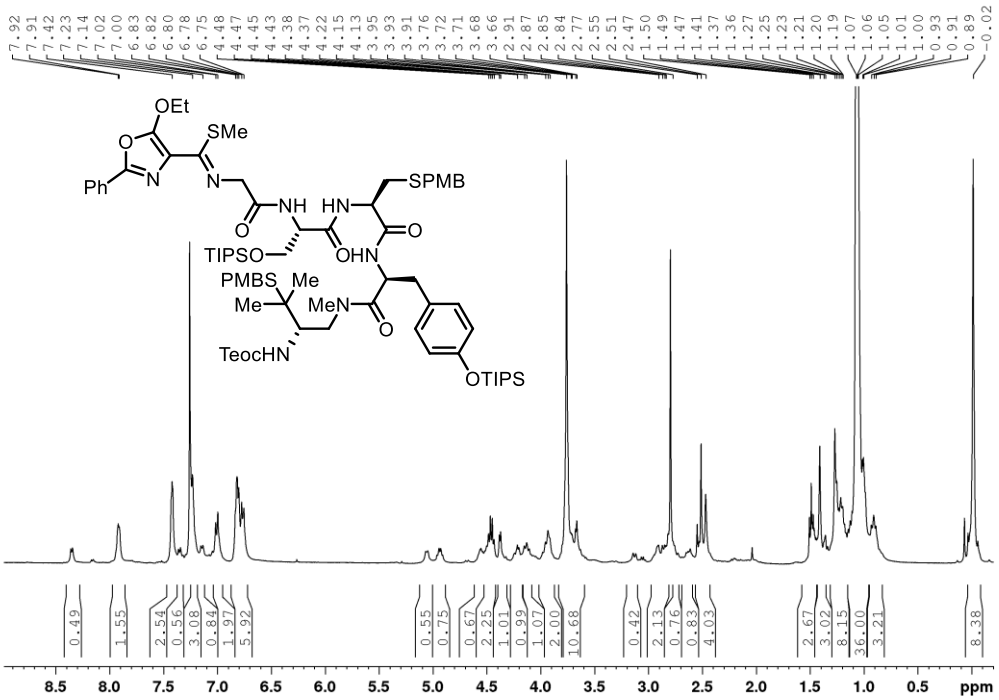


*Abbildung 131: [1]H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **124(OTIPS)**.*

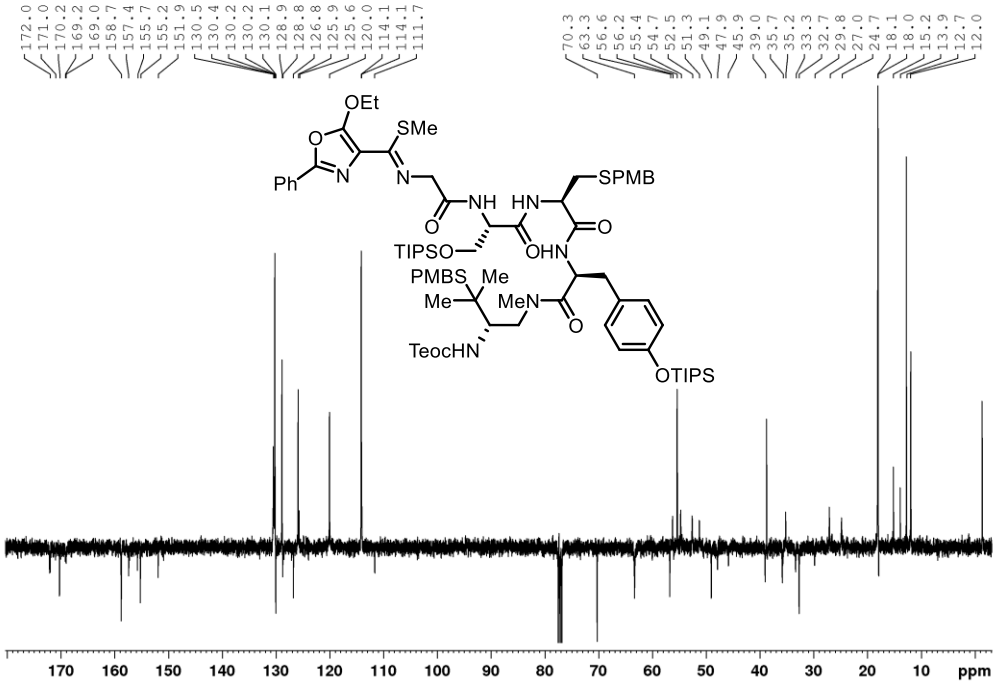


*Abbildung 132: [13]C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **124(OTIPS)**.*

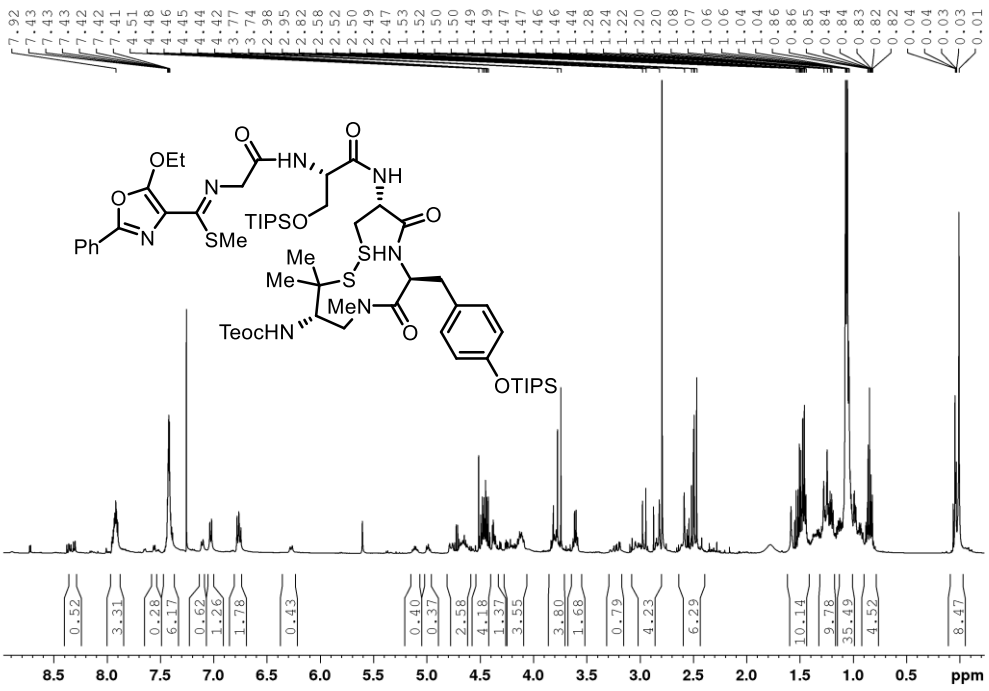


*Abbildung 133: ^{1}H-NMR Spektrum (500 MHz, $CDCl_3$) von **125(OTIPS)**.*

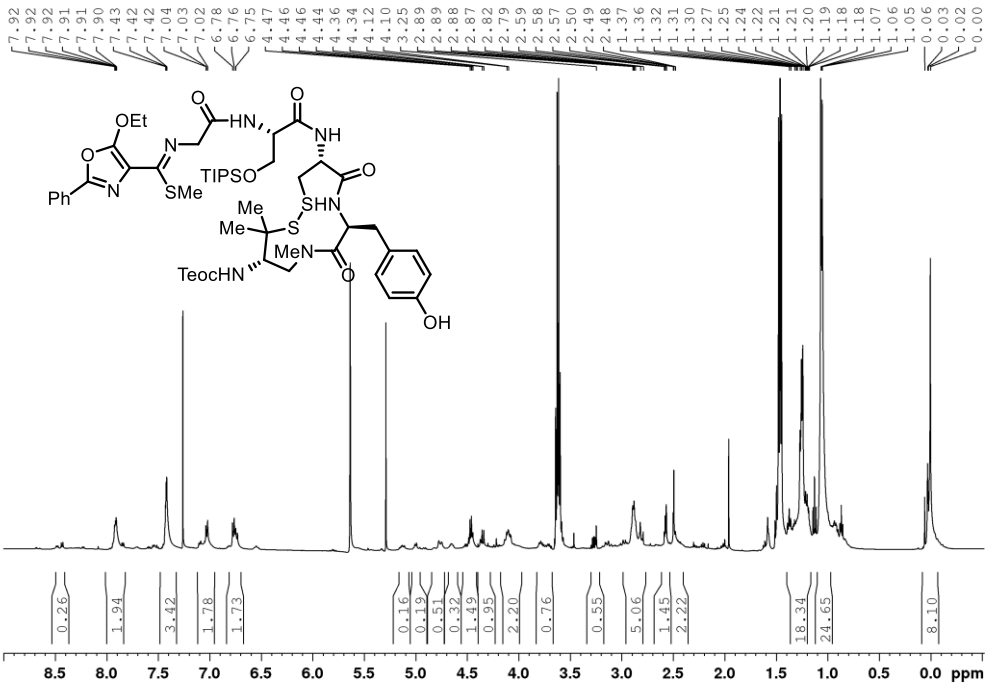


*Abbildung 134: ^{1}H-NMR Spektrum (500 MHz, $CDCl_3$) von **125(OH)**.*

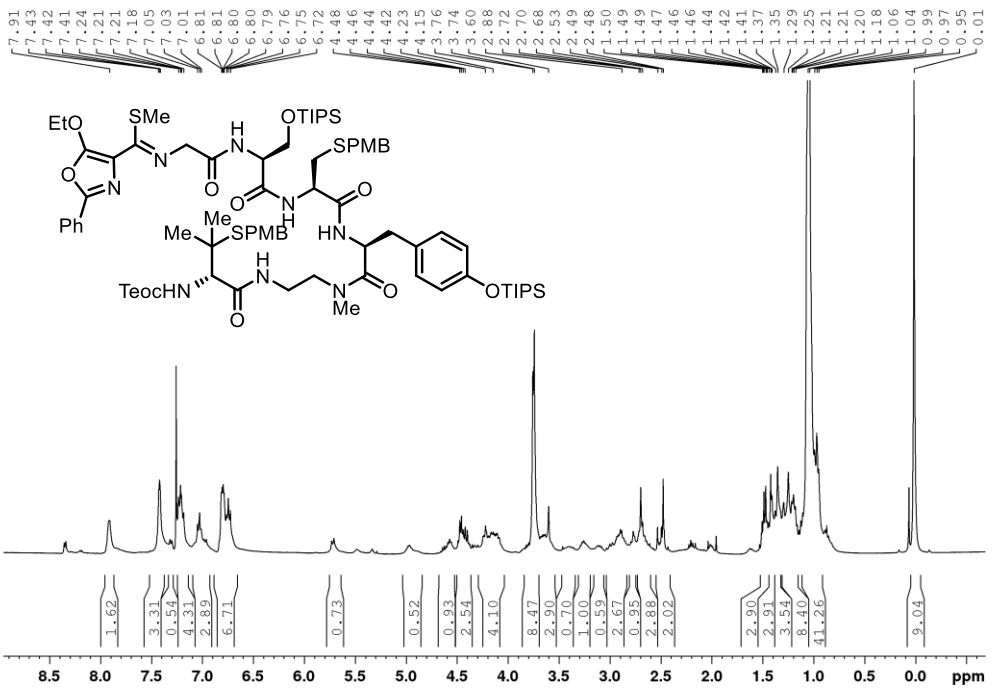


*Abbildung 135: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **126(OTIPS)**.*

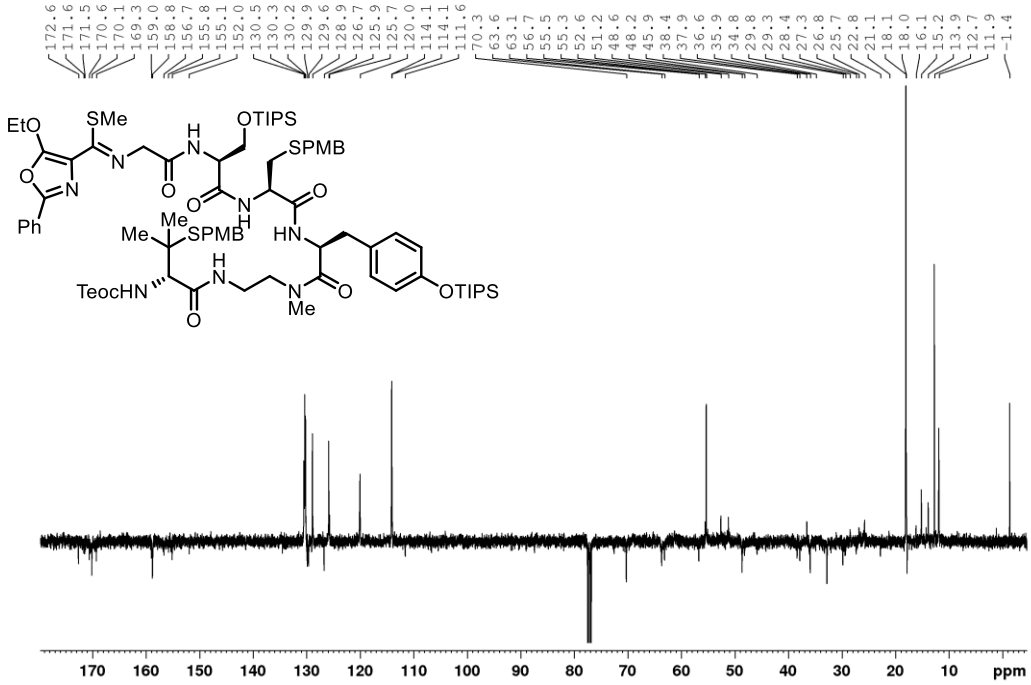


*Abbildung 136: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **126(OTIPS)**.*

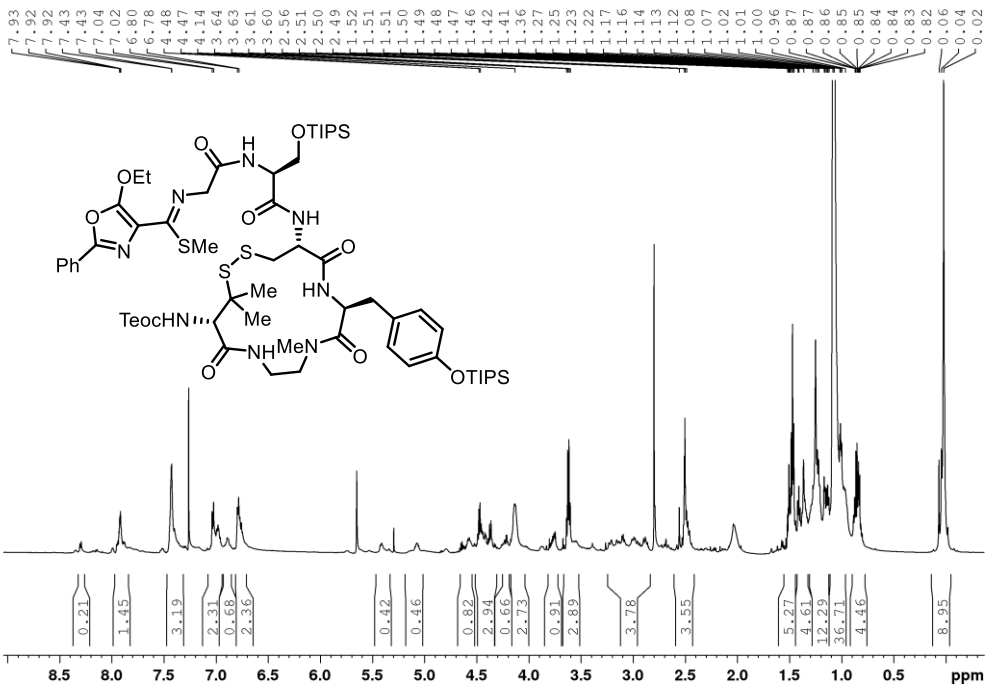


*Abbildung 137: ^{1}H-NMR Spektrum (600 MHz, $CDCl_3$) von **127(OTIPS)**.*

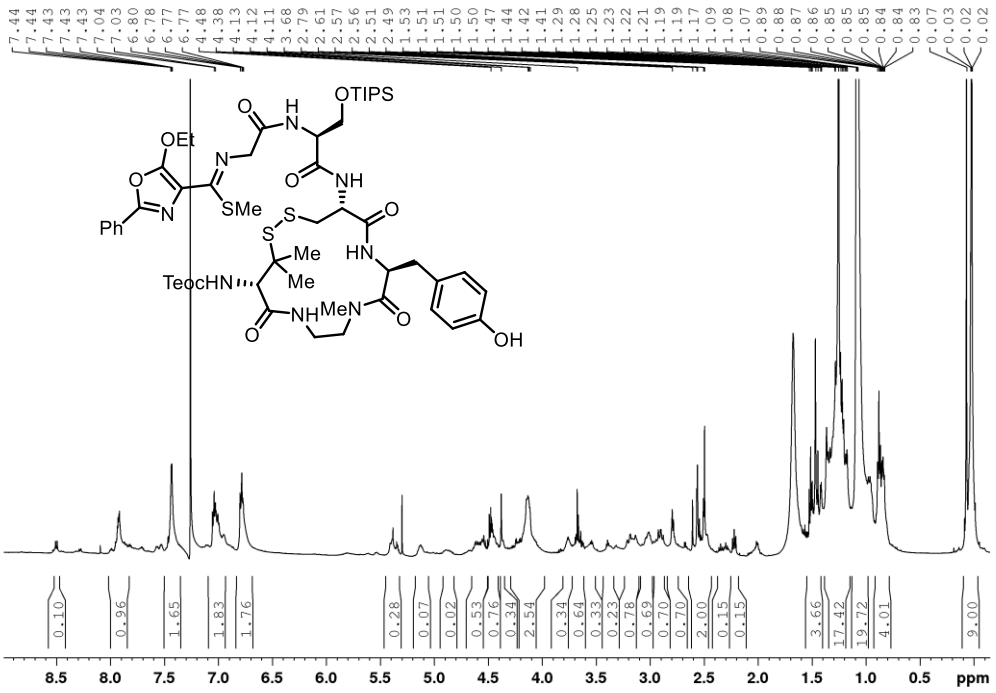


*Abbildung 138: ^{1}H-NMR Spektrum (500 MHz, $CDCl_3$) von **127(OH)**.*

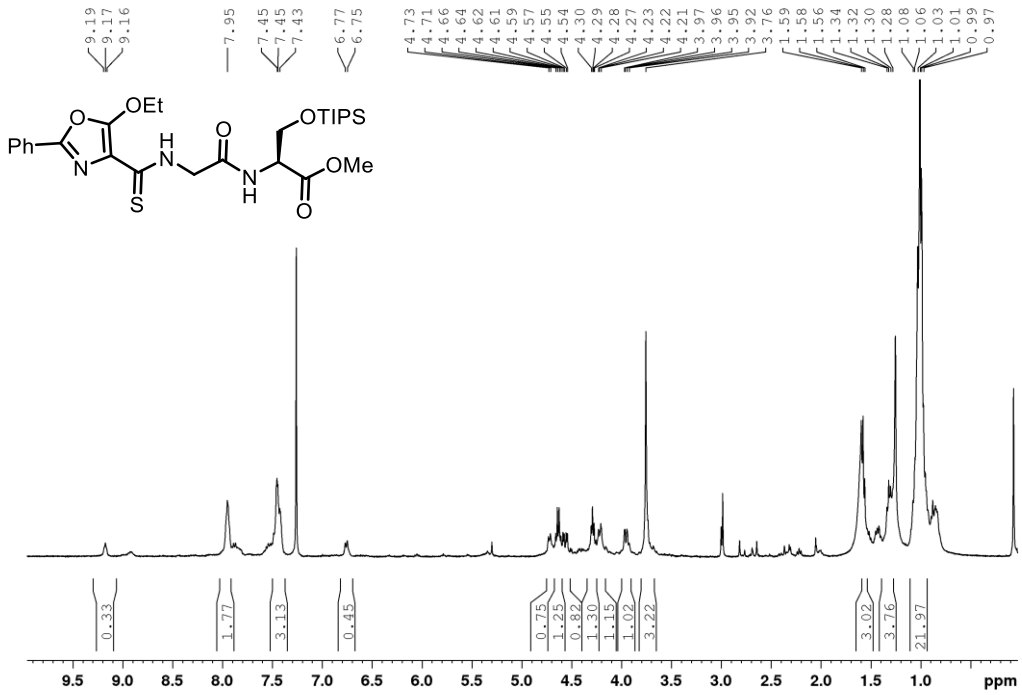


*Abbildung 139: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **133**.*

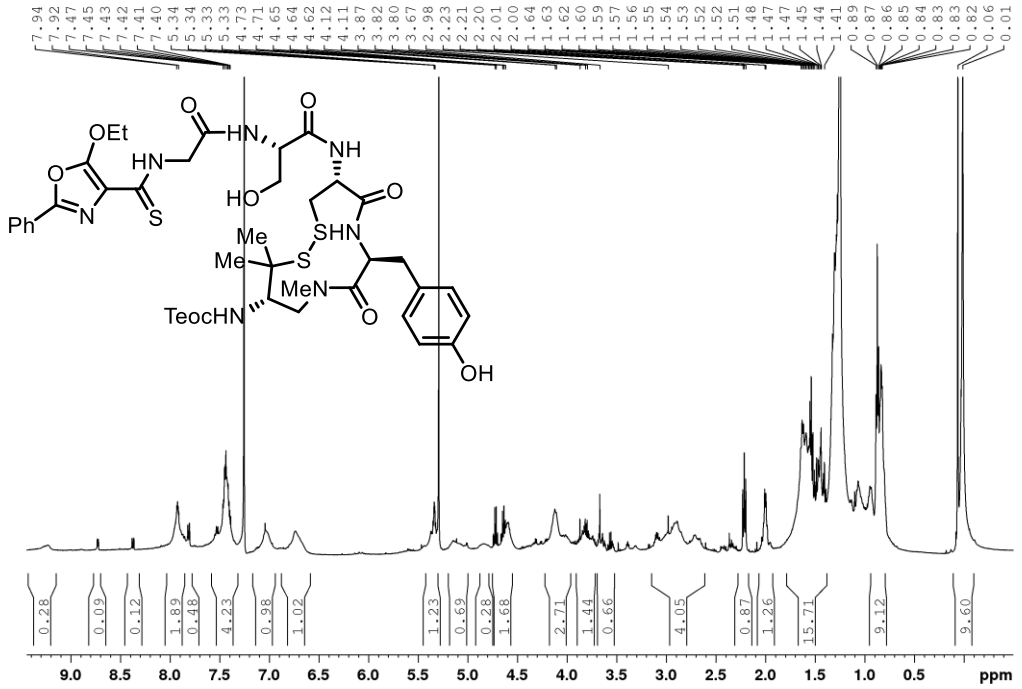


*Abbildung 140: ^{1}H-NMR Spektrum (500 MHz, $CDCl_3$) von **137**.*

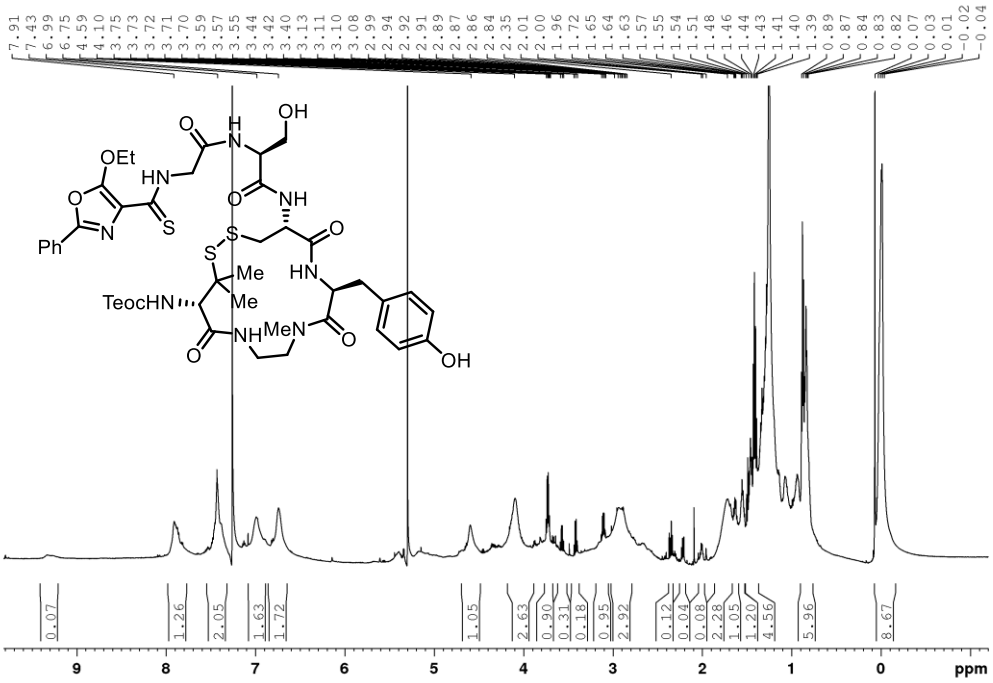


*Abbildung 141: ^{1}H-NMR Spektrum (600 MHz, $CDCl_3$) von **140**.*

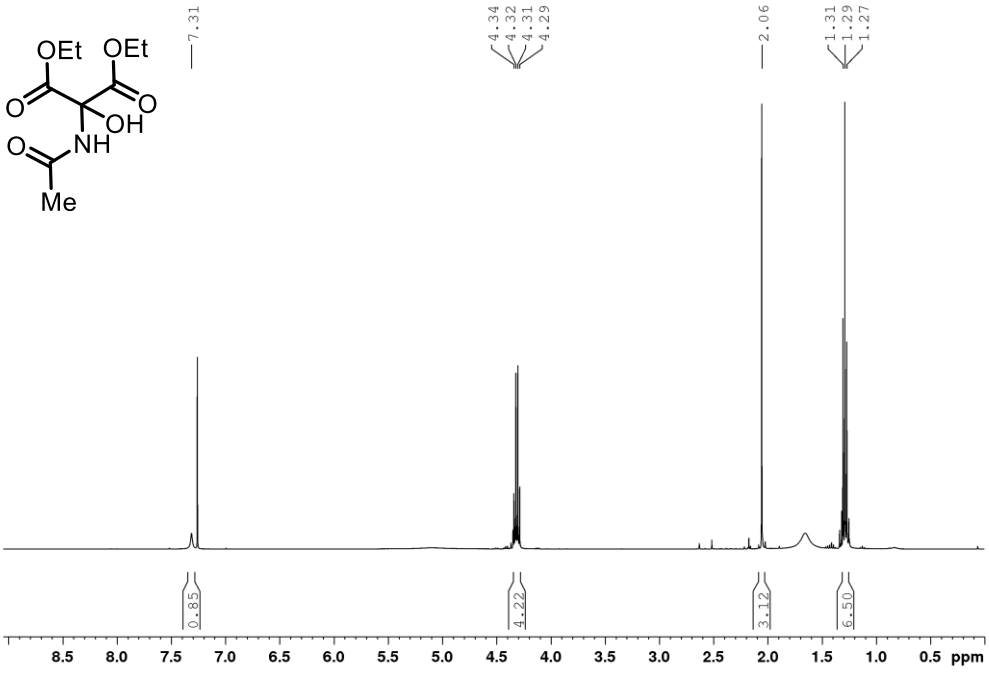


*Abbildung 142: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **160**.*

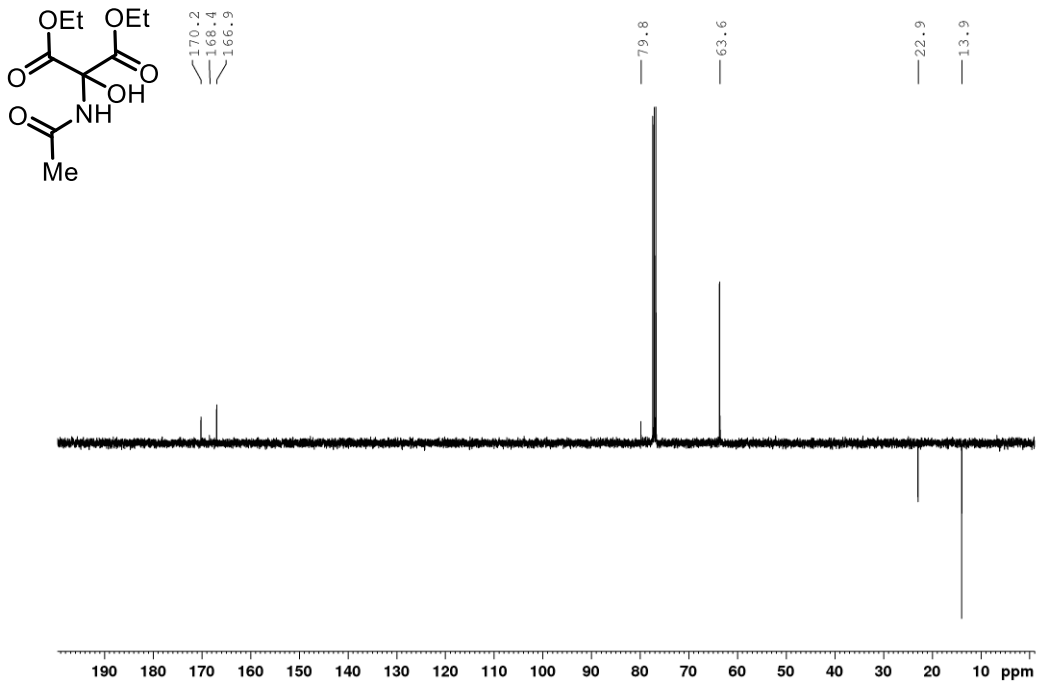


*Abbildung 143: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **160**.*

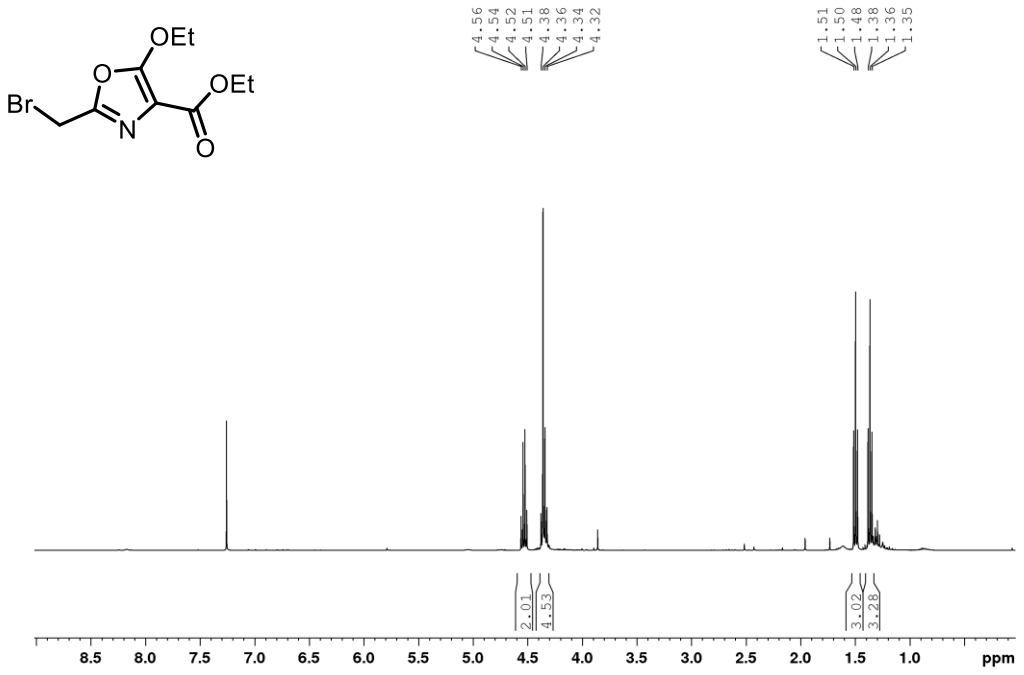


*Abbildung 144: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **163**.*

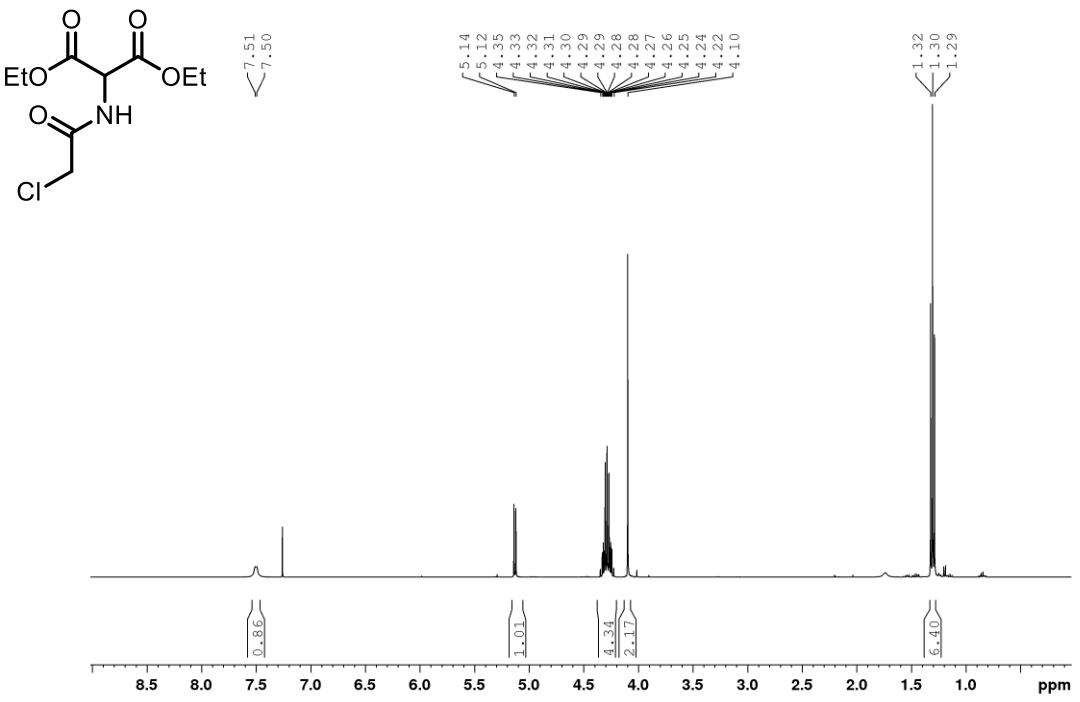


*Abbildung 145: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **164**.*

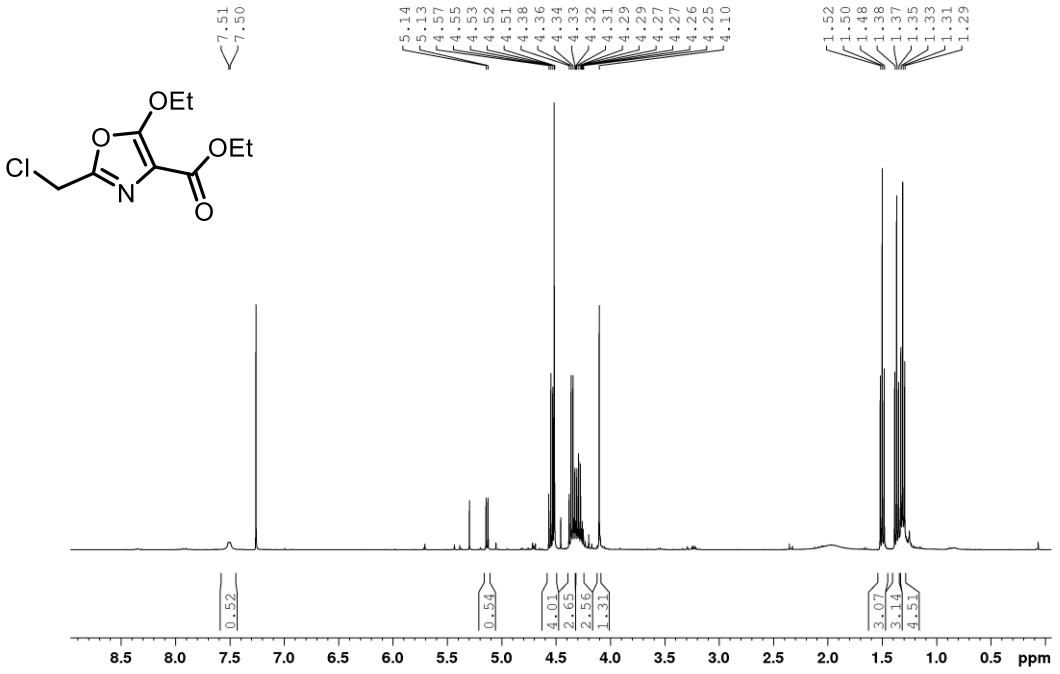


*Abbildung 146: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **165** und nicht reagiertem **164**.*

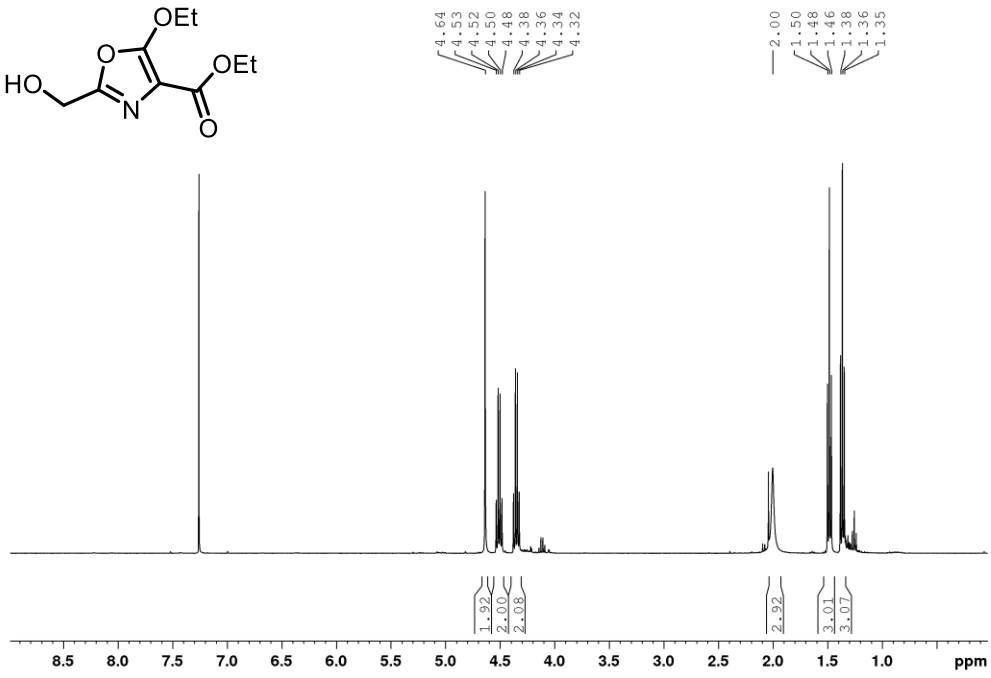


*Abbildung 147: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **161** nach Ethanolyse von **284.***

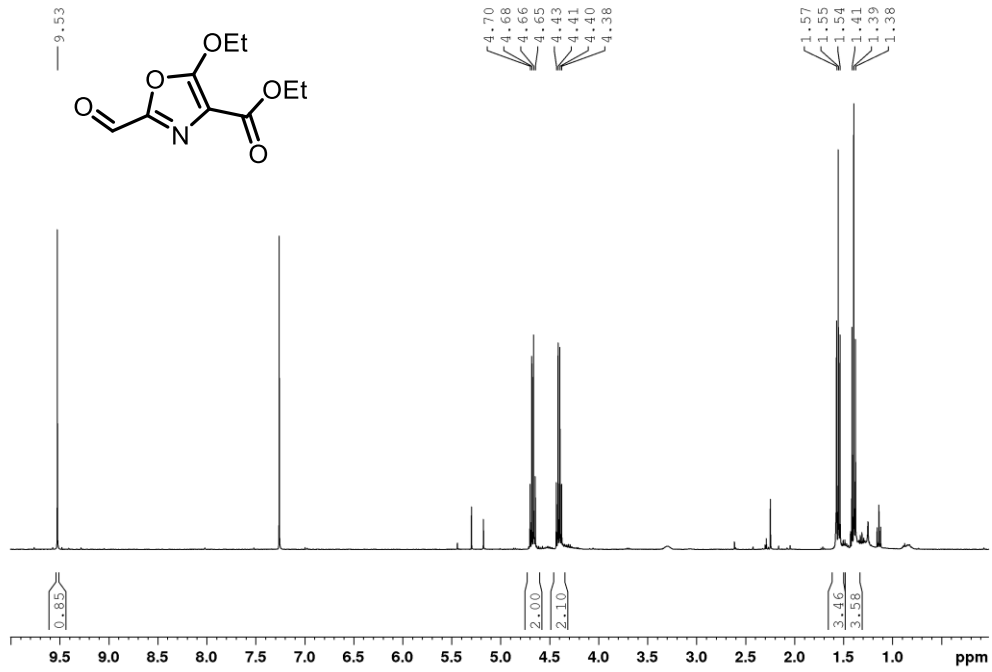


*Abbildung 148: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **158**.*

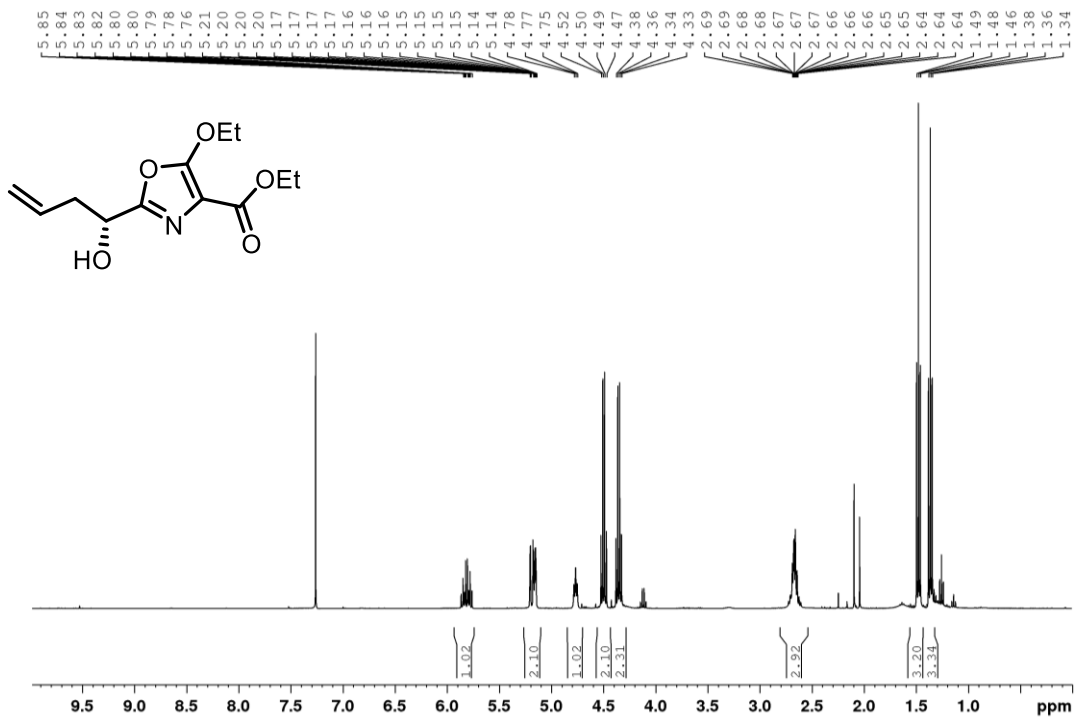


*Abbildung 149: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **166.***

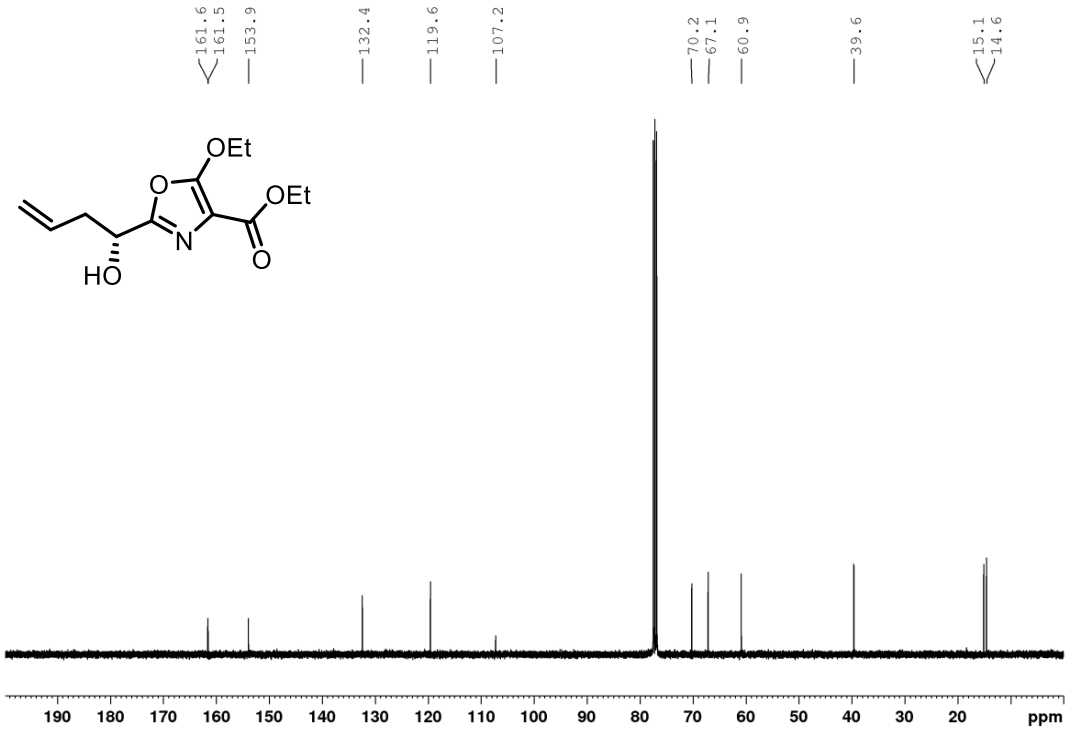


*Abbildung 150: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **166**.*

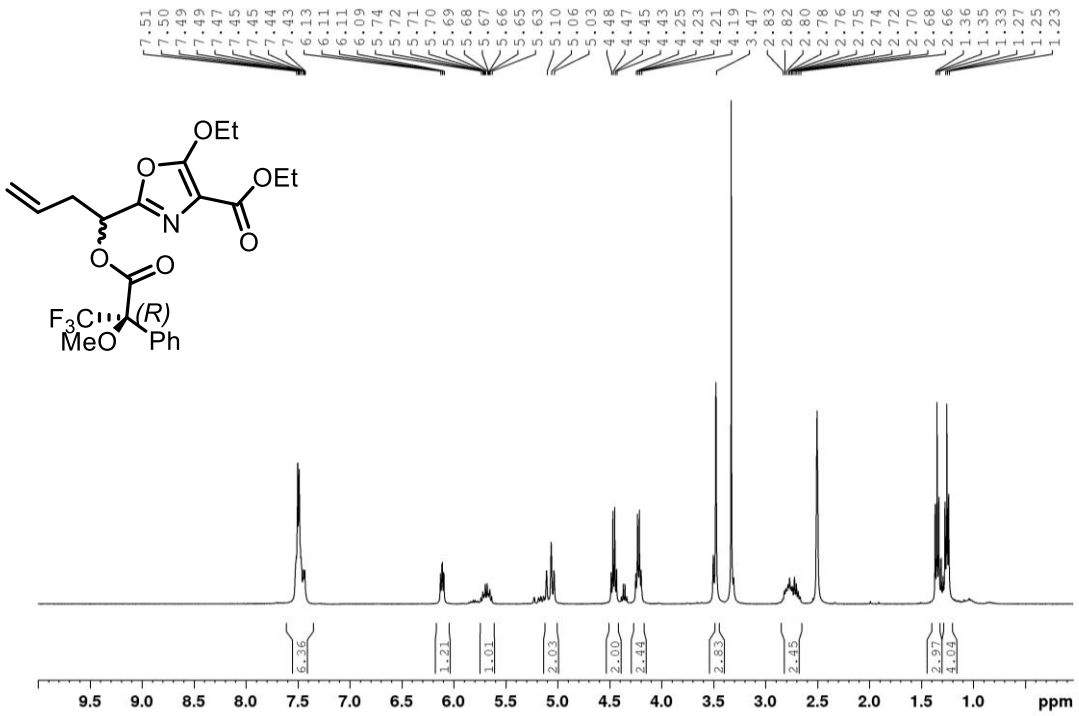


*Abbildung 151: [1]H-NMR Spektrum (400 MHz, DMSO) von **170.***

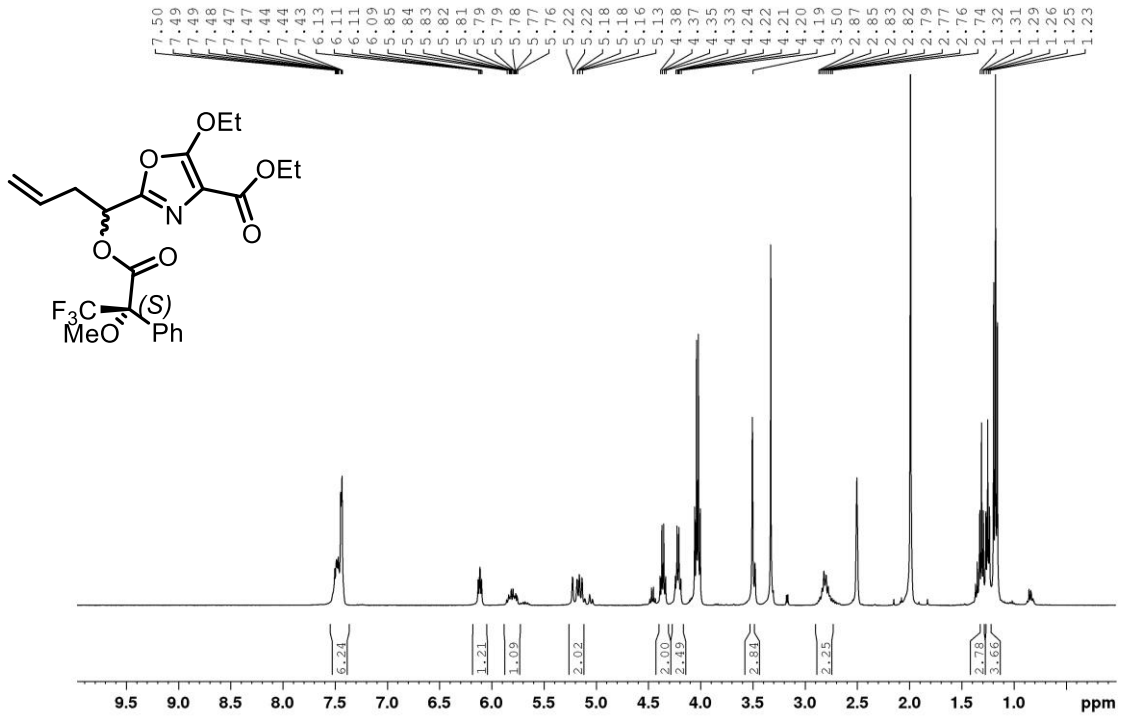


*Abbildung 152: [1]H-NMR Spektrum (400 MHz, DMSO) von **171***

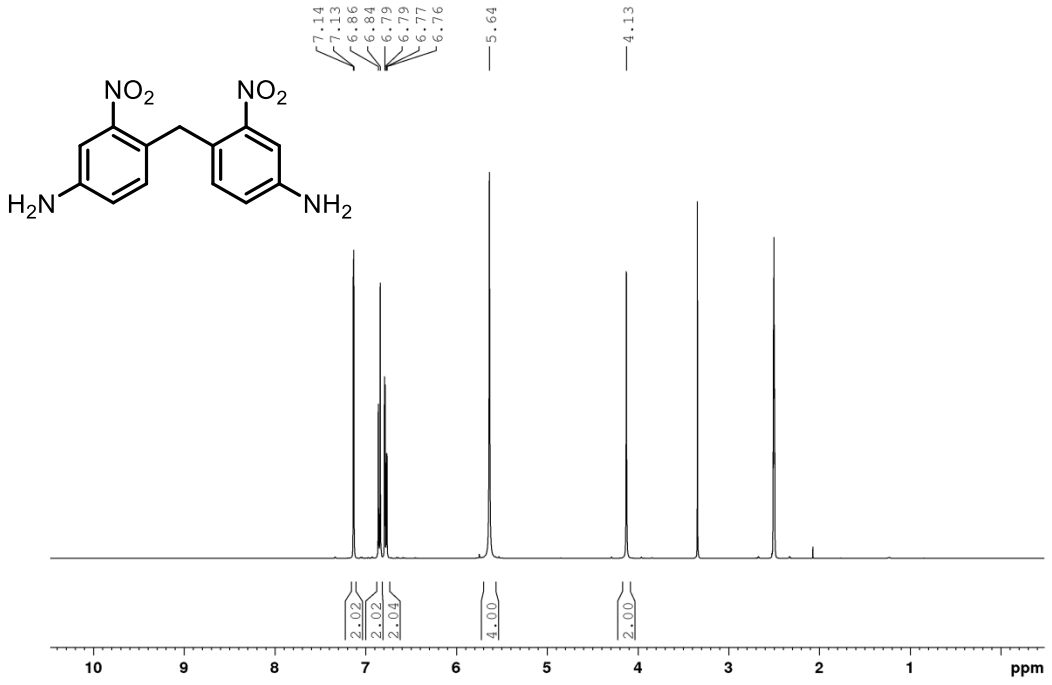


*Abbildung 153: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, DMSO) von **285**.*

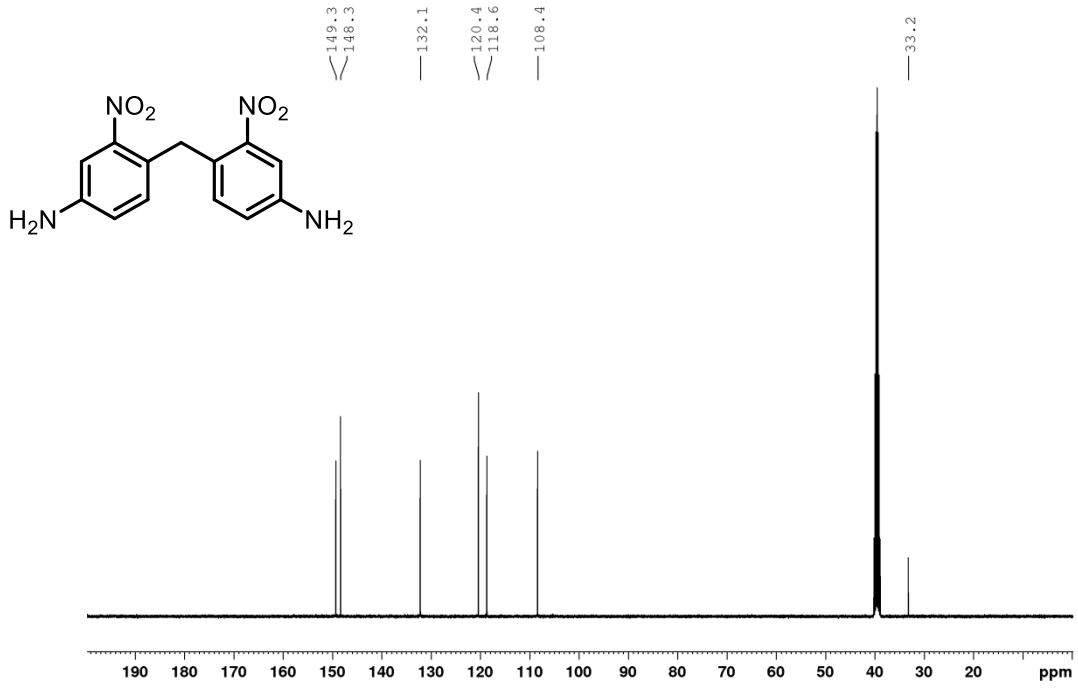


*Abbildung 154: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, DMSO) von **285**.*

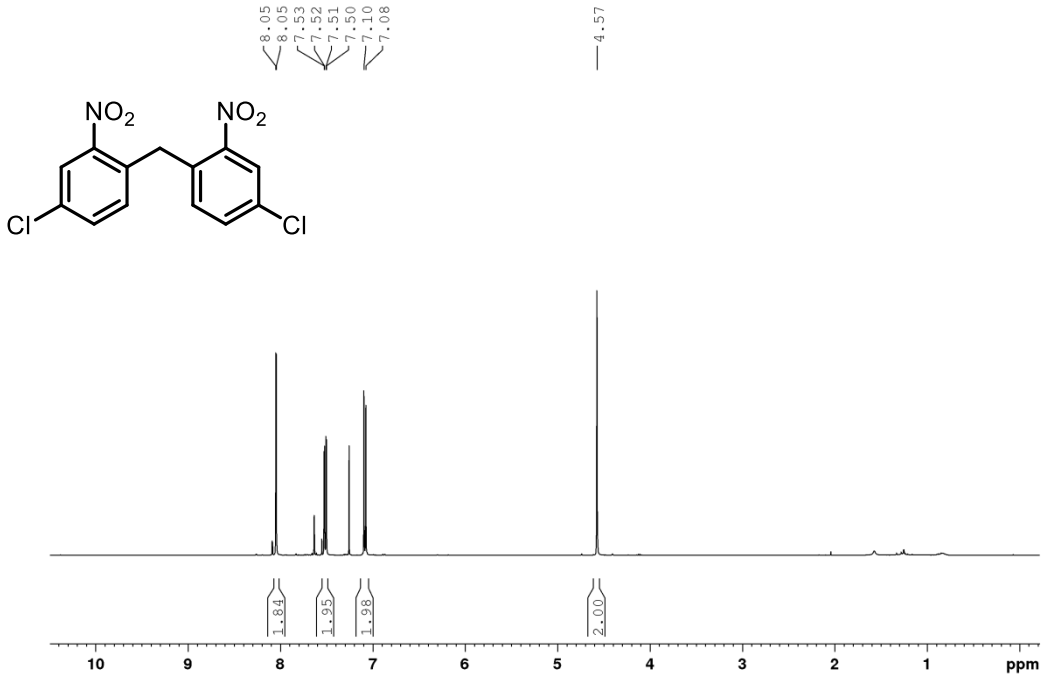


*Abbildung 155: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **286**.*

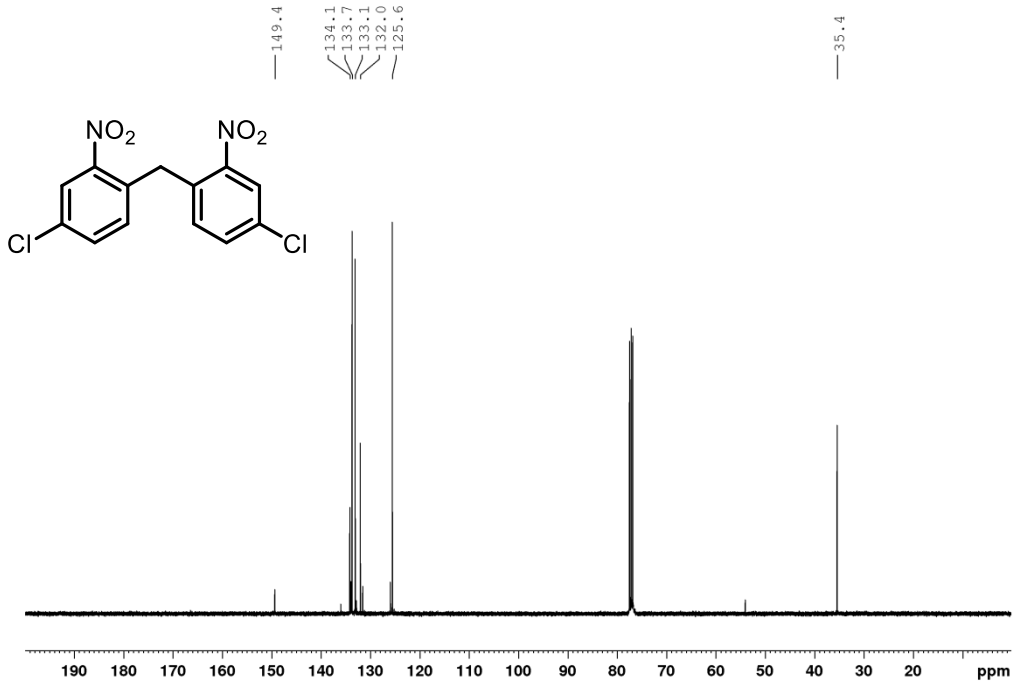


*Abbildung 156: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **286**.*

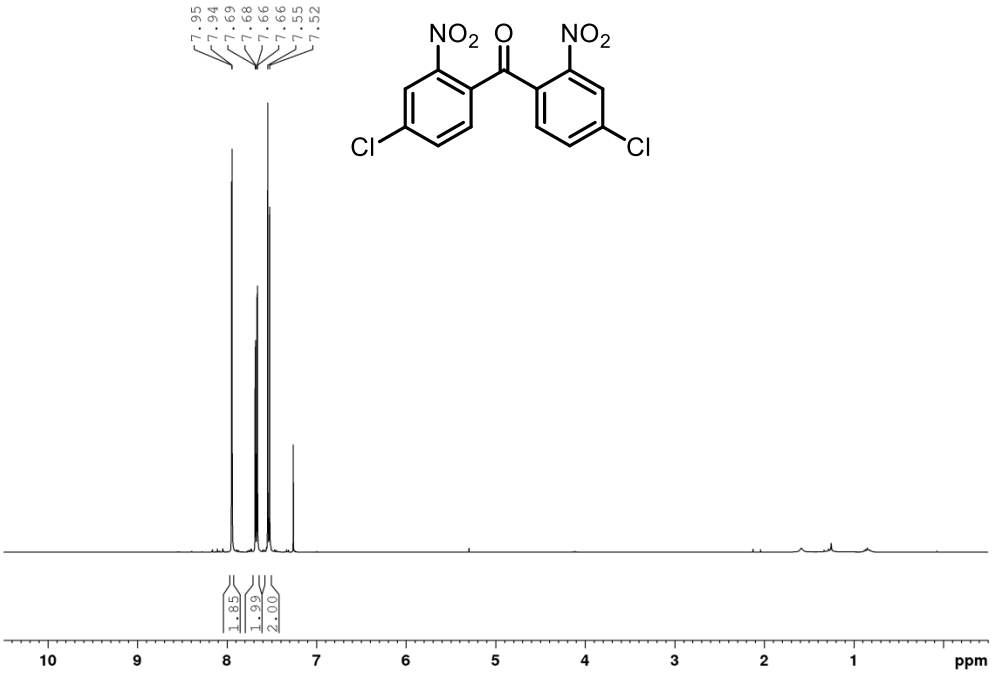


*Abbildung 157: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **176**.*



*Abbildung 158: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **176**.*

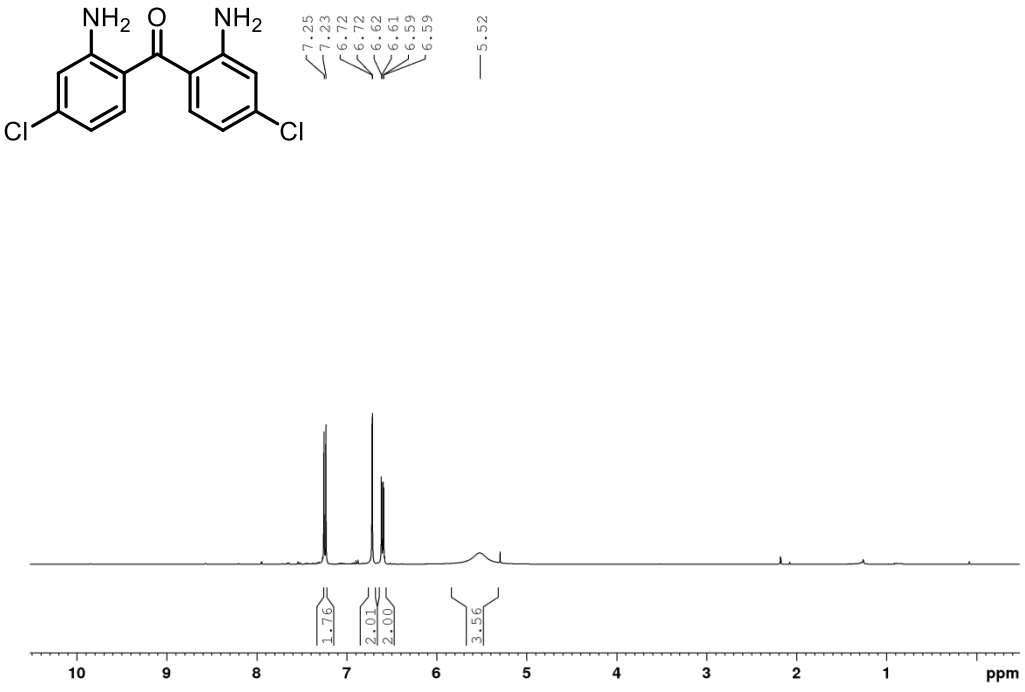


*Abbildung 159: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **287**.*

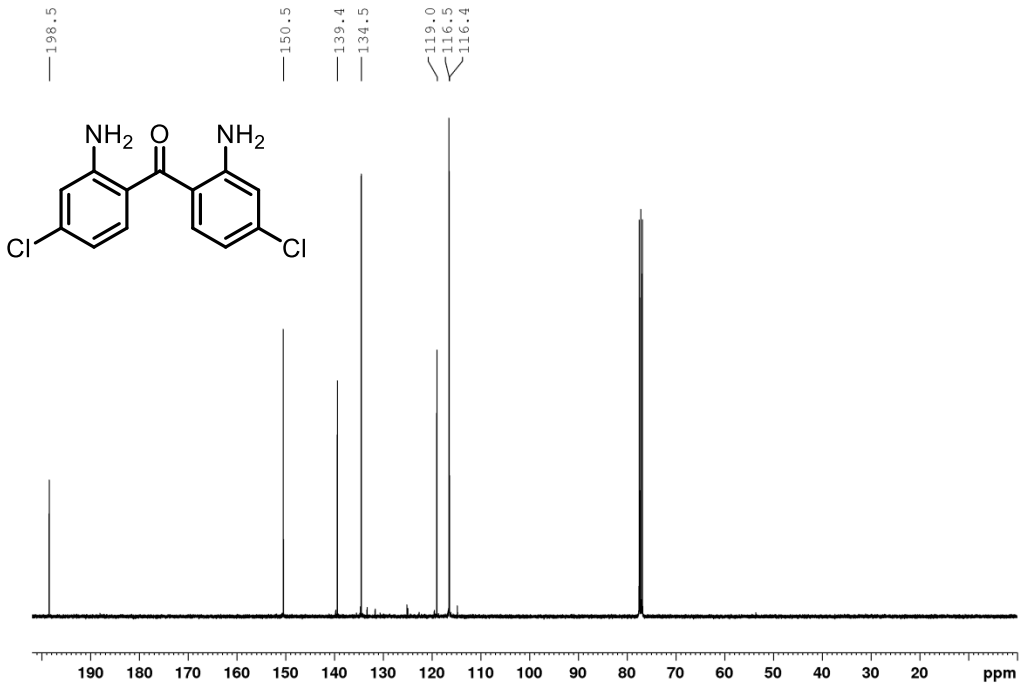


*Abbildung 160: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **287**.*

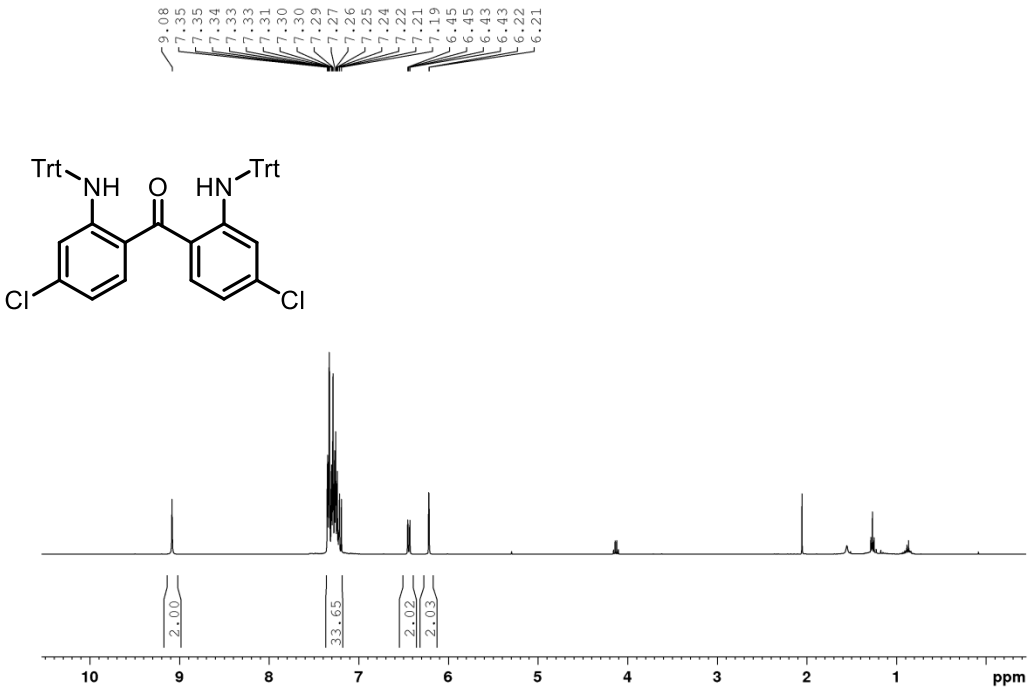


*Abbildung 161: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **177**.*

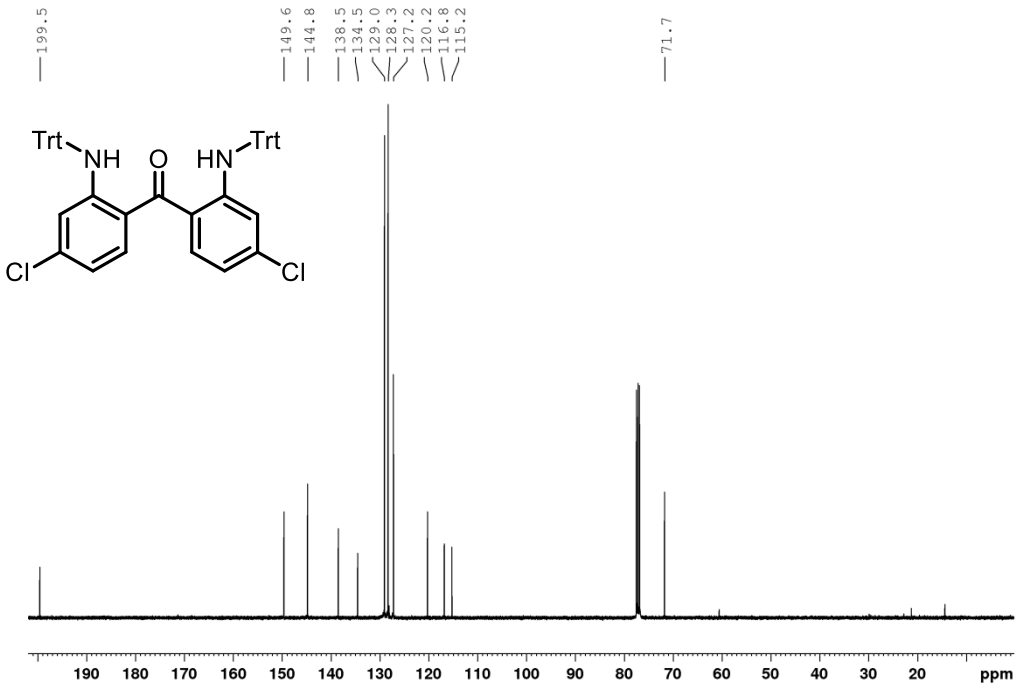


*Abbildung 162: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **177**.*

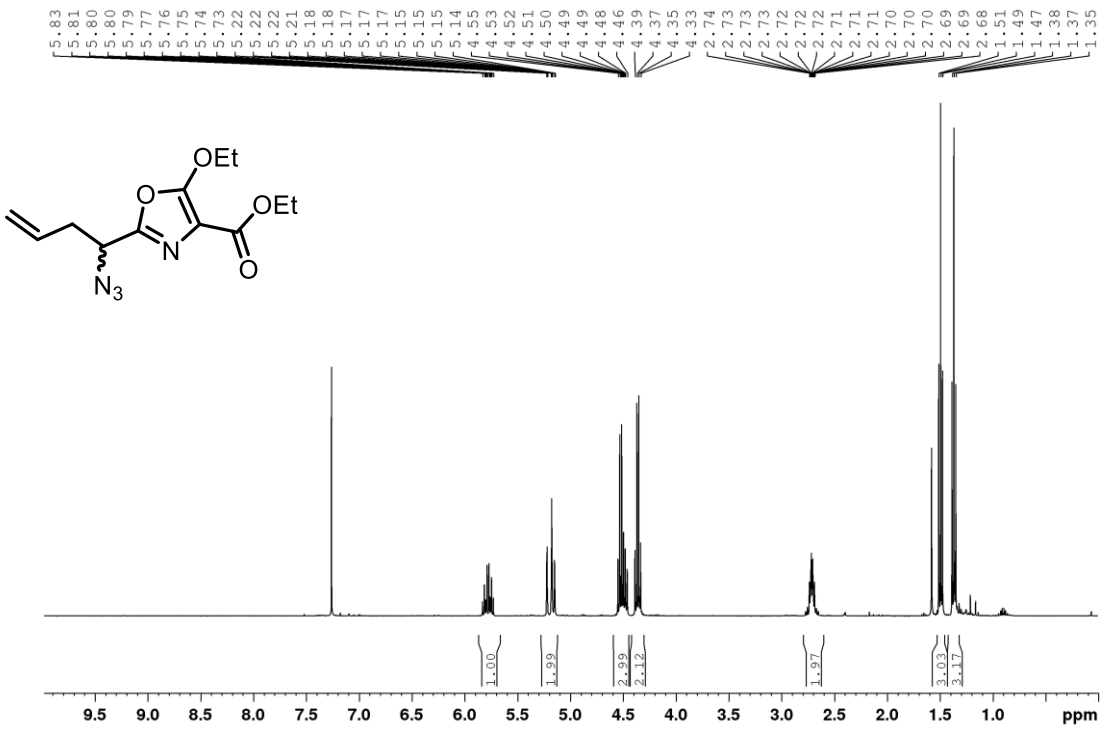


*Abbildung 163: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **179.***

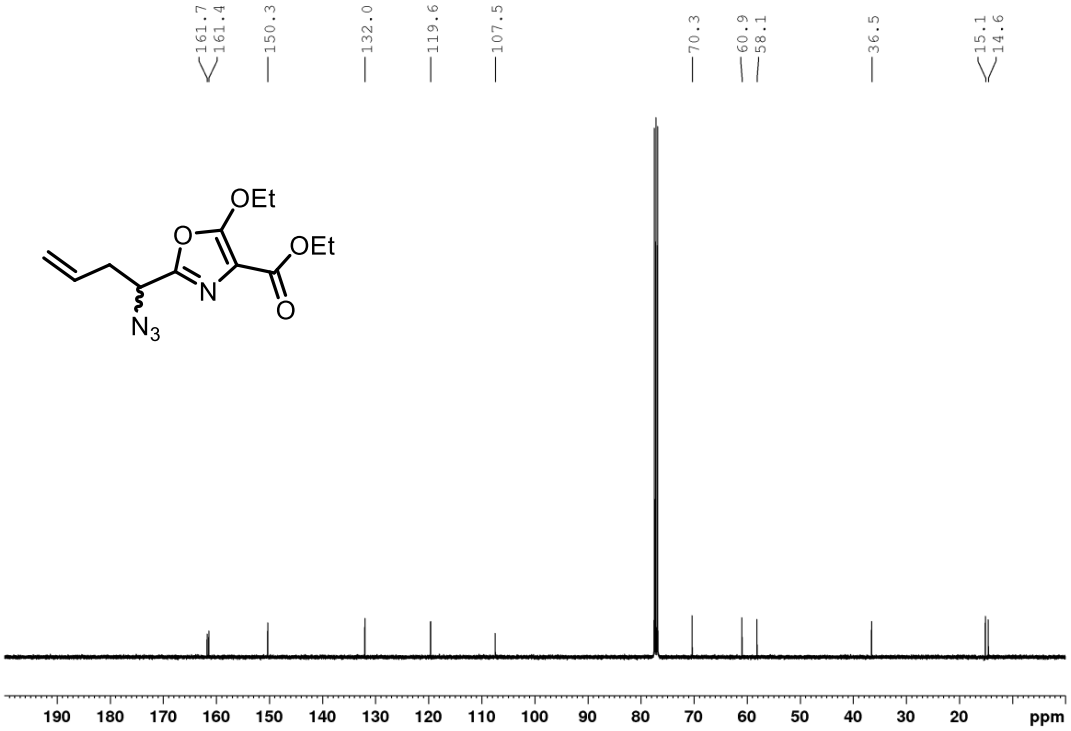


*Abbildung 164: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **179**.*

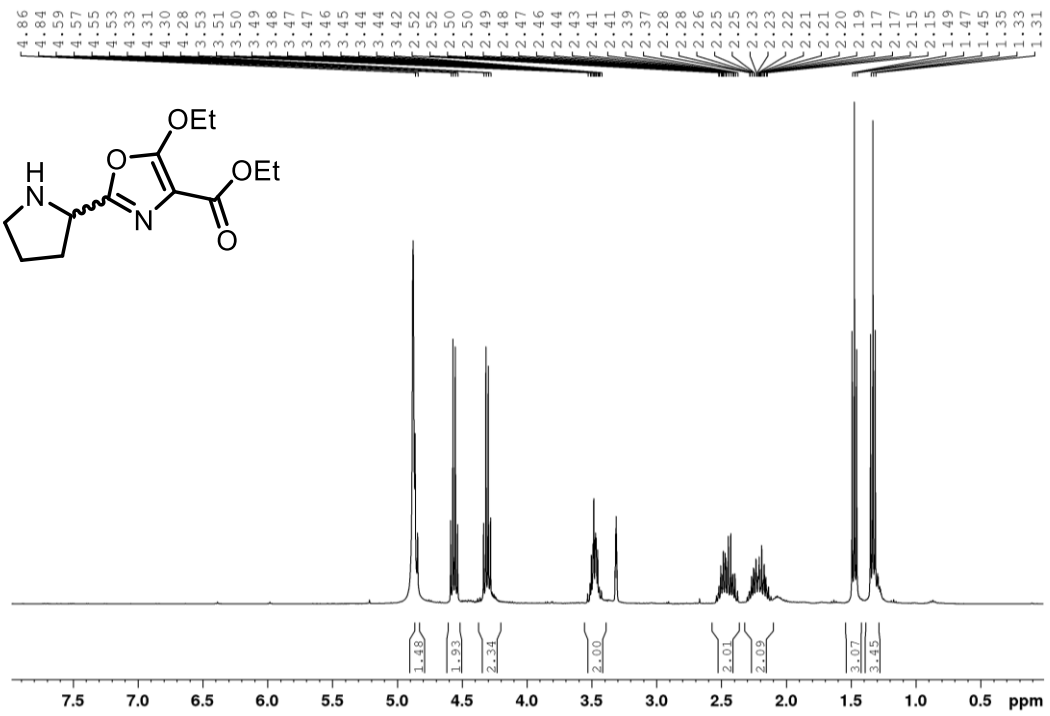


*Abbildung 165: [1]H-NMR Spektrum (400 MHz, MeOD) von **178.***

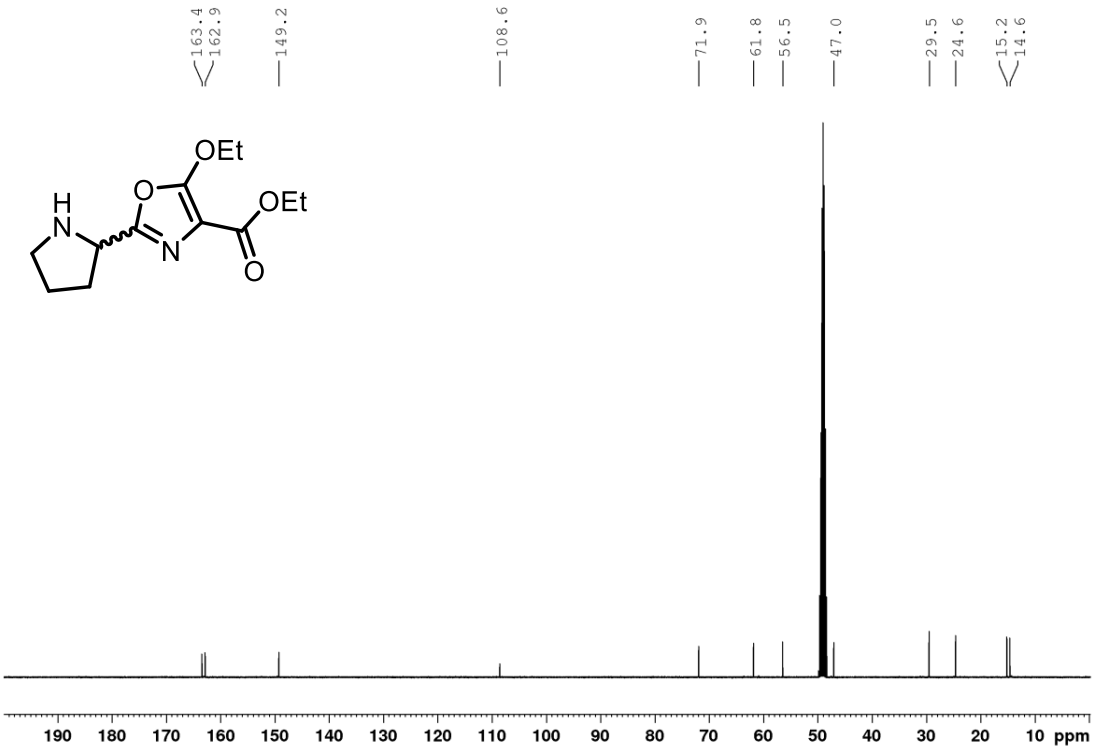


*Abbildung 166: [13]C-NMR Spektrum (101 MHz, MeOD) von **178**.*

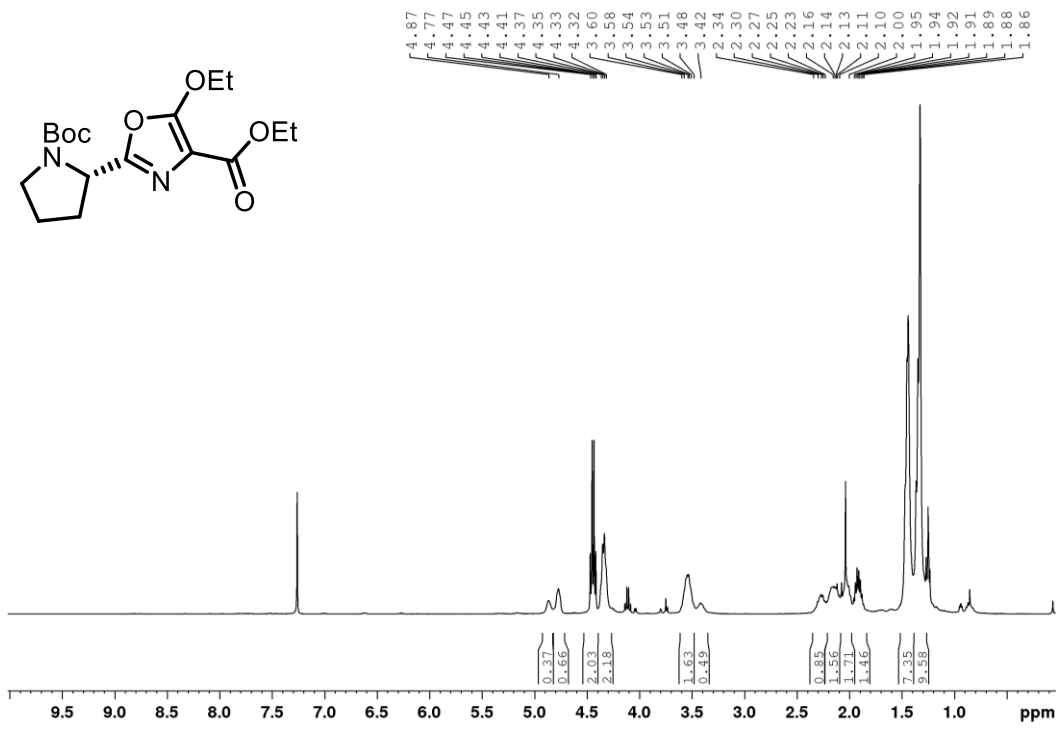


*Abbildung 167: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **156.***

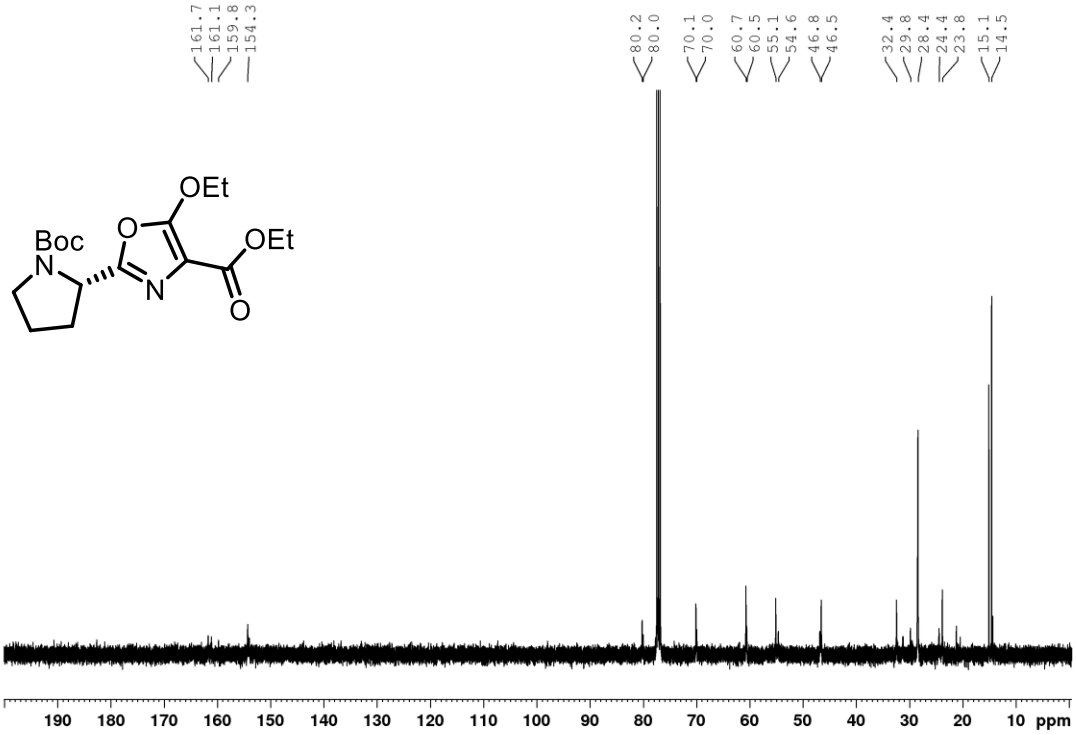


*Abbildung 168: ^{13}C-NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **156**.*

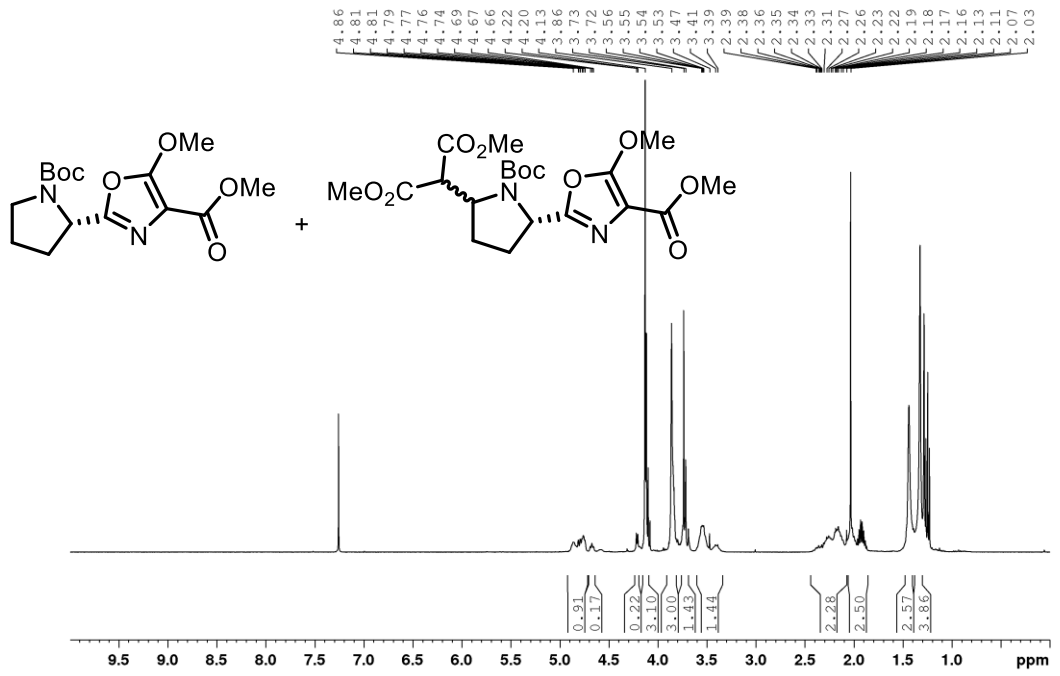


*Abbildung 169: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **194/195**.*

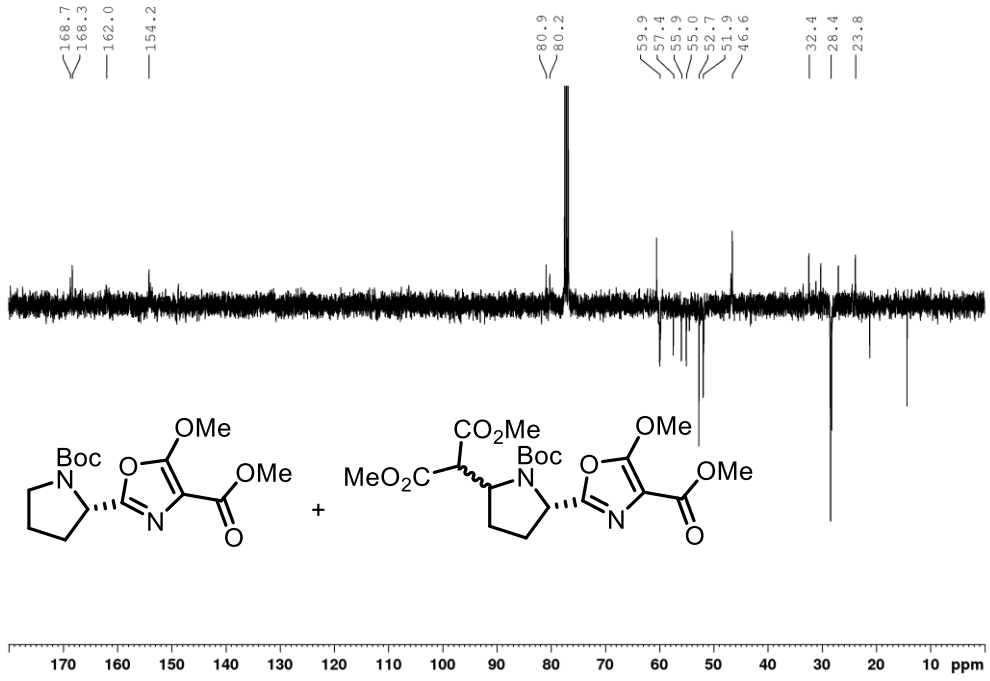


*Abbildung 170: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **194/195**.*

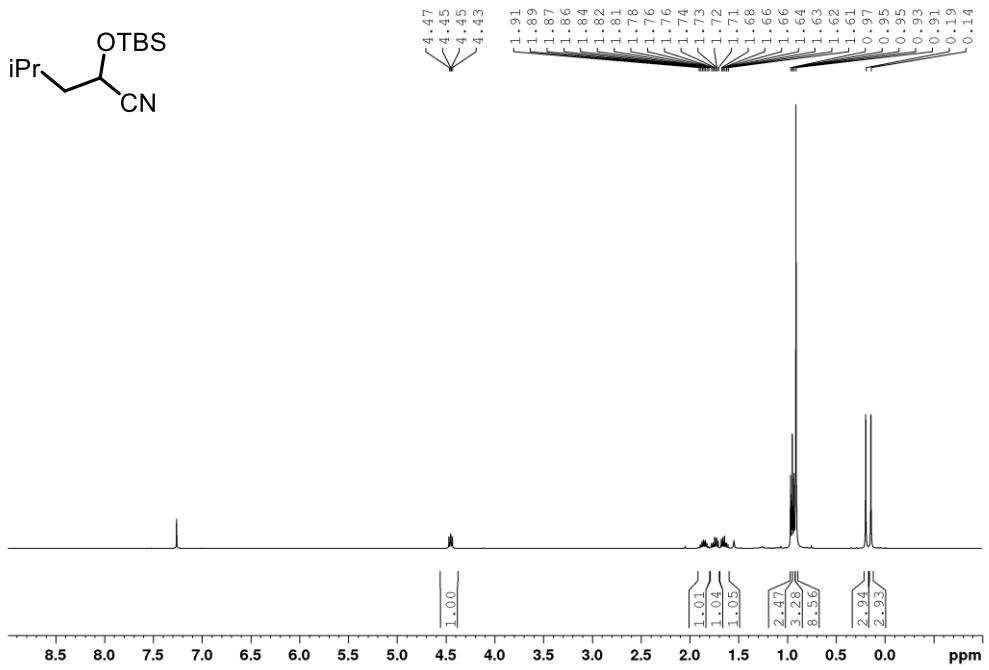


*Abbildung 171: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **201**.*

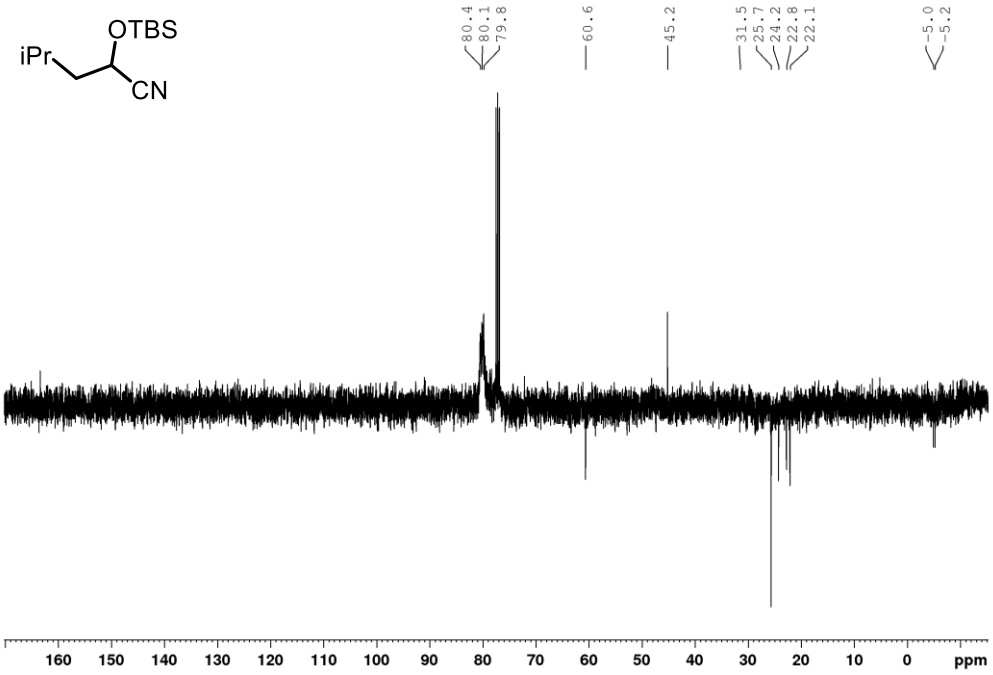


*Abbildung 172: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **201**.*

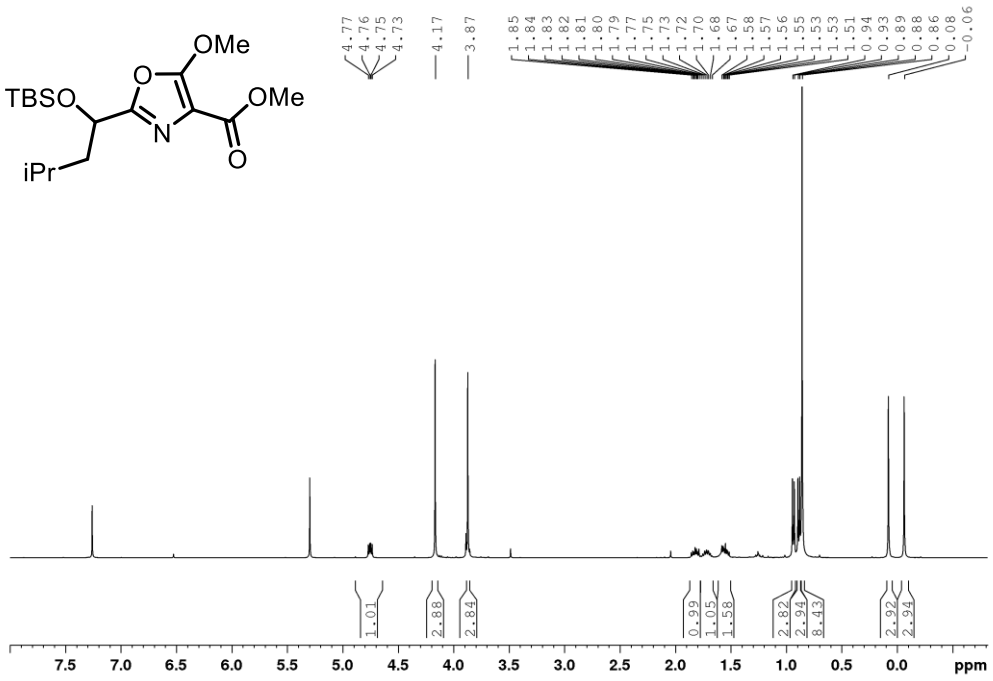


*Abbildung 173: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **202**.*

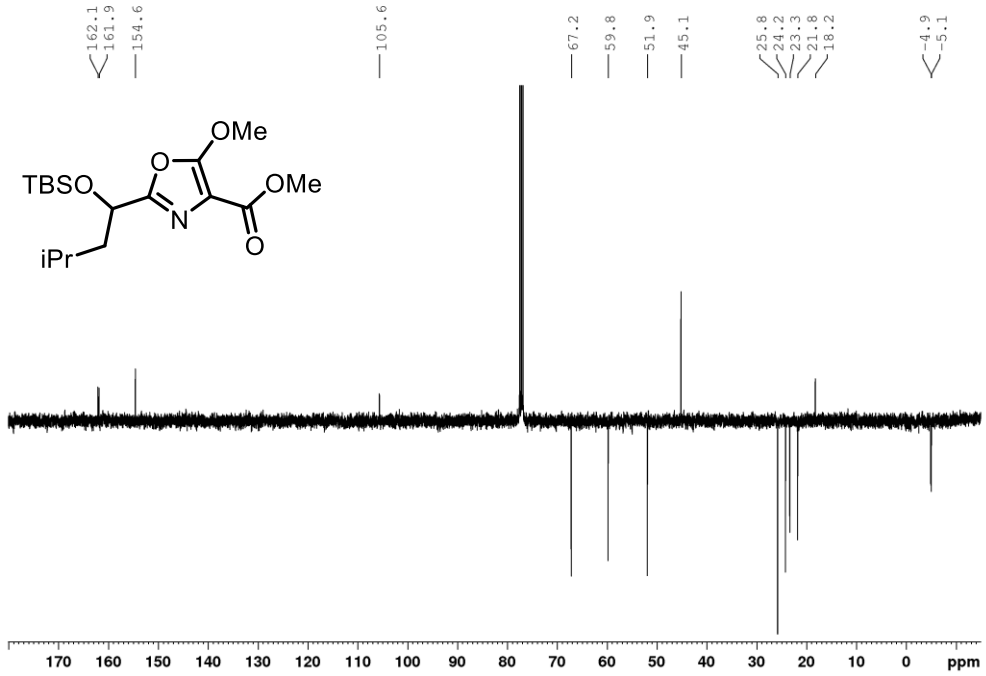


*Abbildung 174: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **202**.*

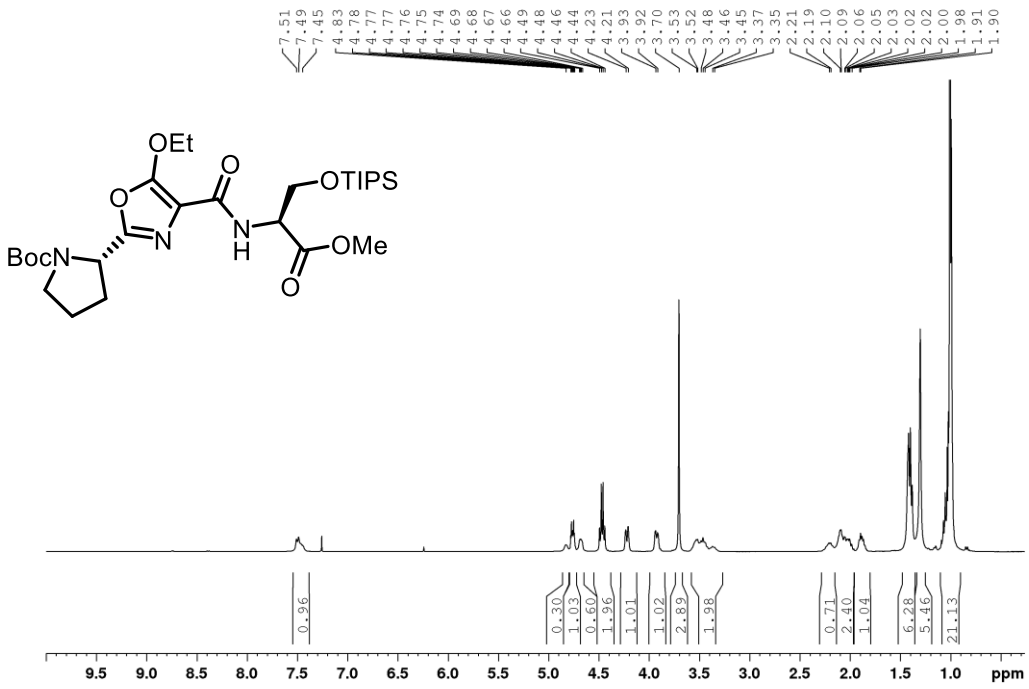


*Abbildung 175: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **204**.*

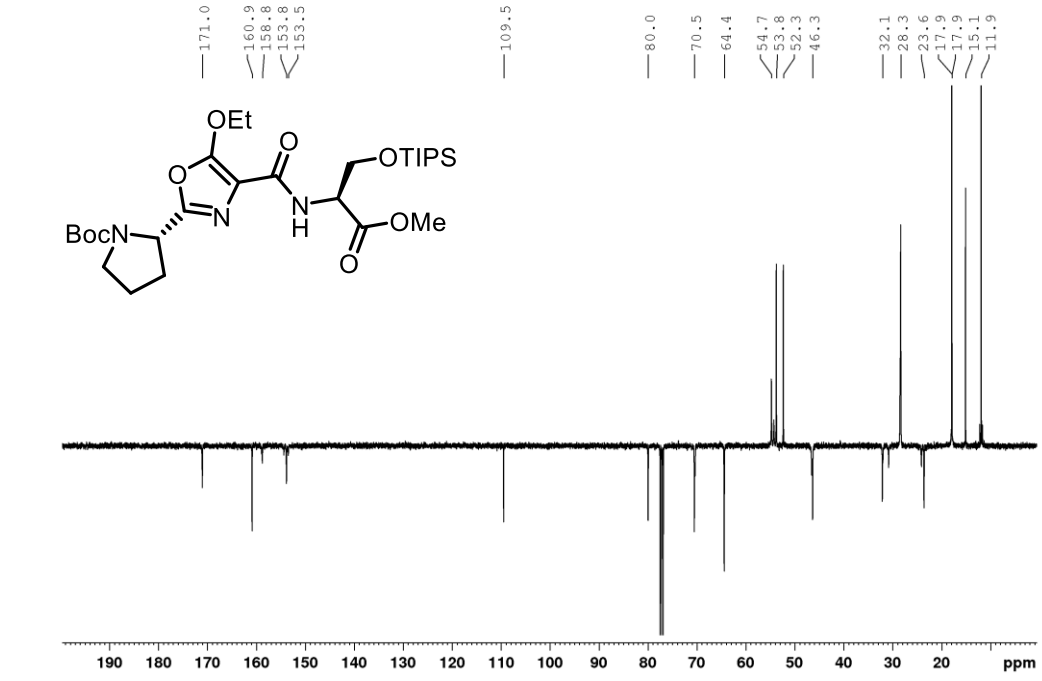


*Abbildung 176: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **204**.*

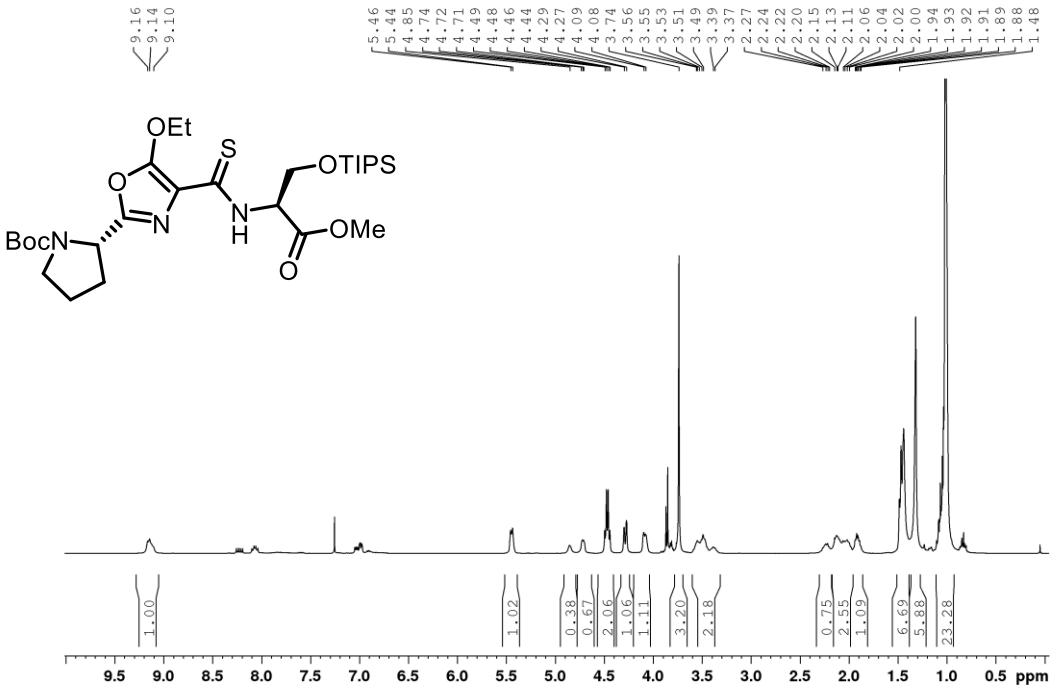


*Abbildung 177: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **205**.*

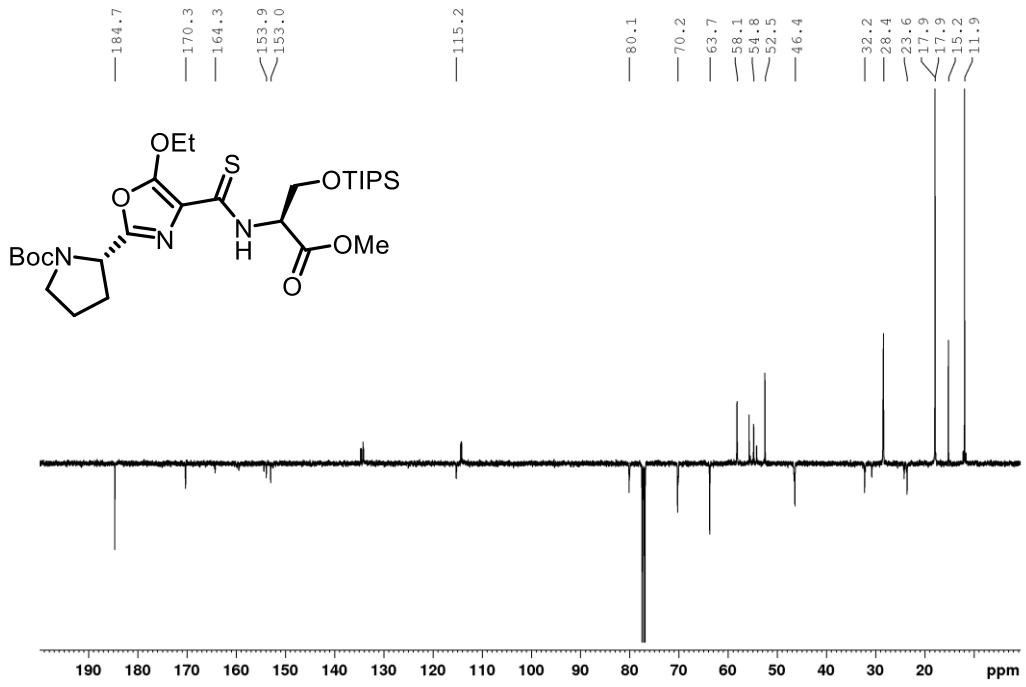


*Abbildung 178: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **205**.*

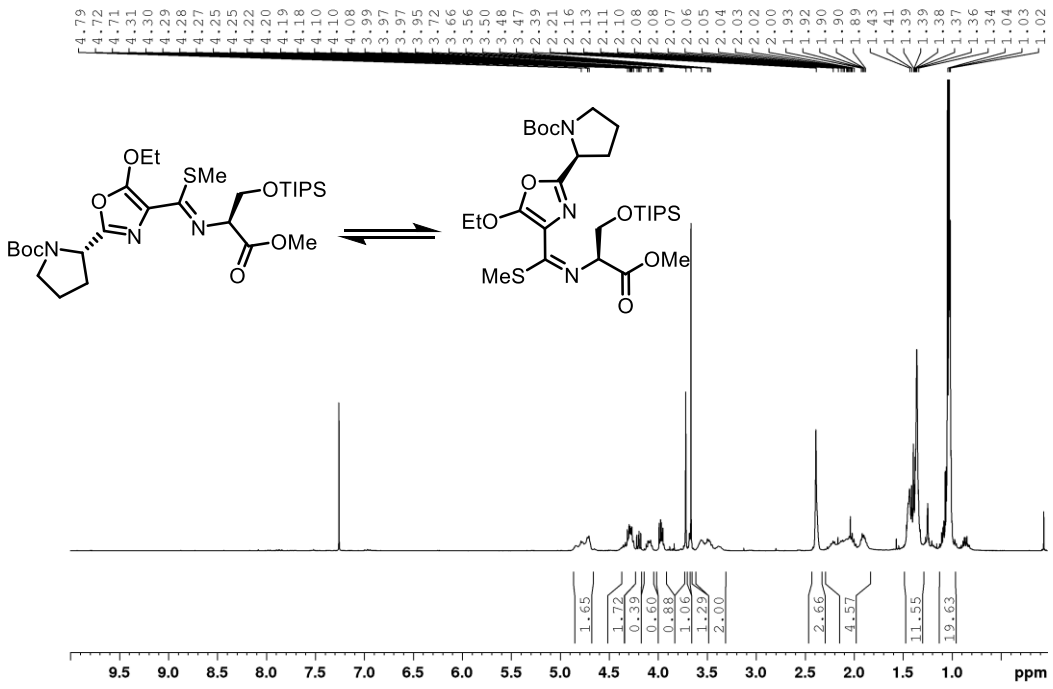


*Abbildung 179: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **206**.*

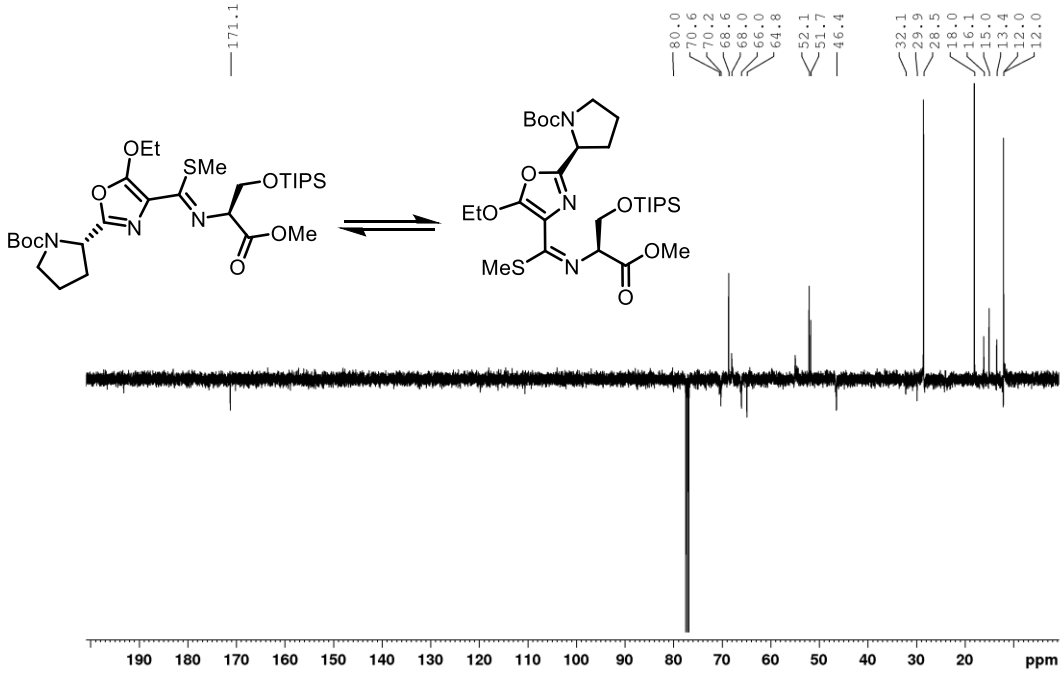


*Abbildung 180: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **206**.*

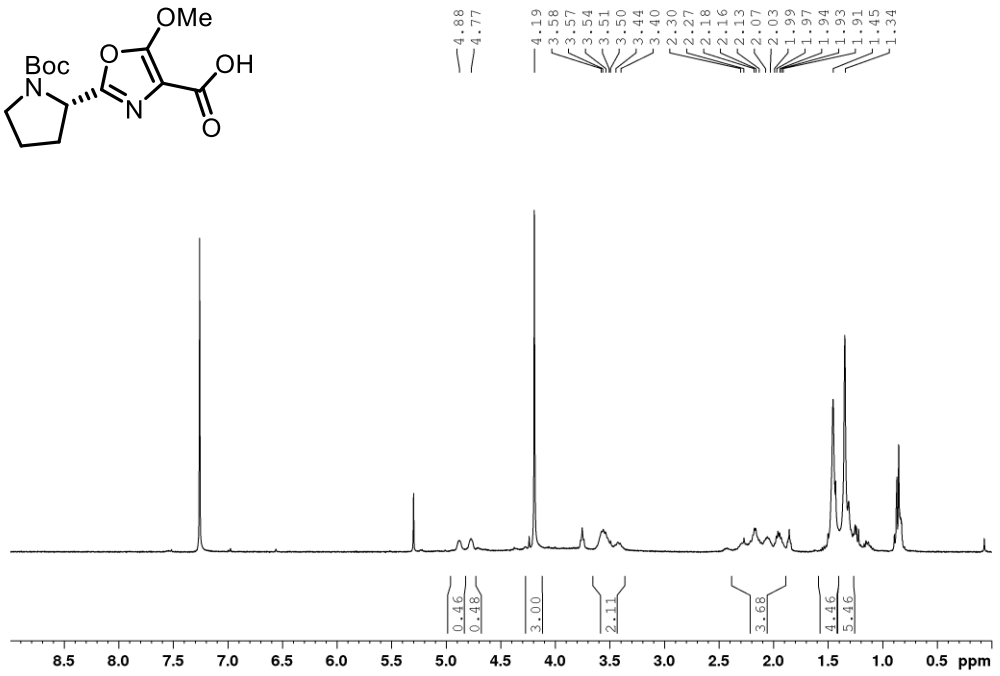


*Abbildung 181: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **207**.*

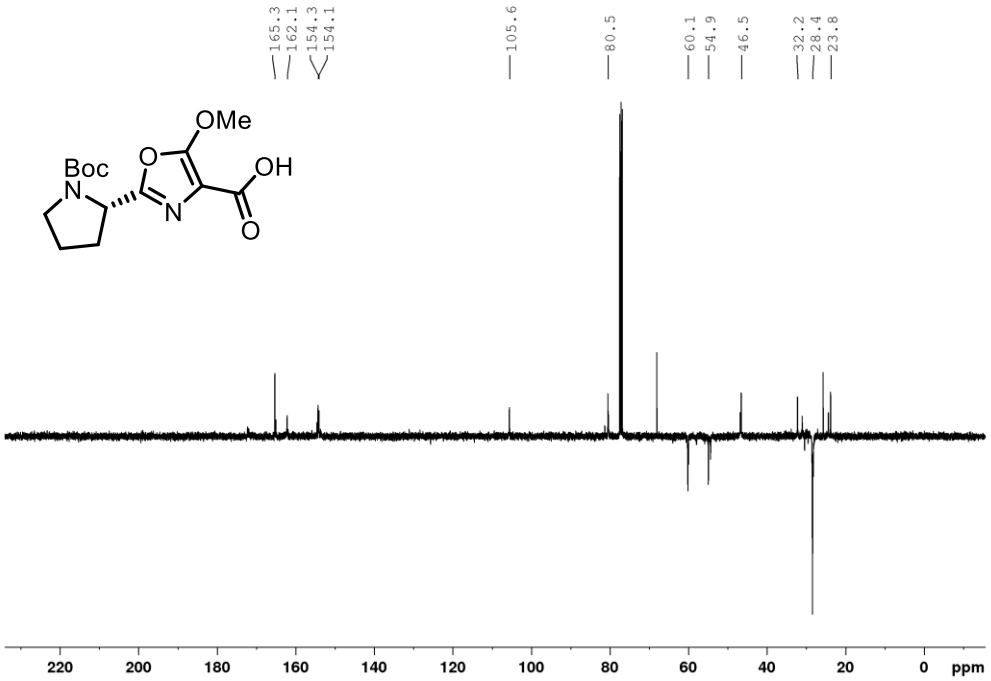


*Abbildung 182: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **207**.*

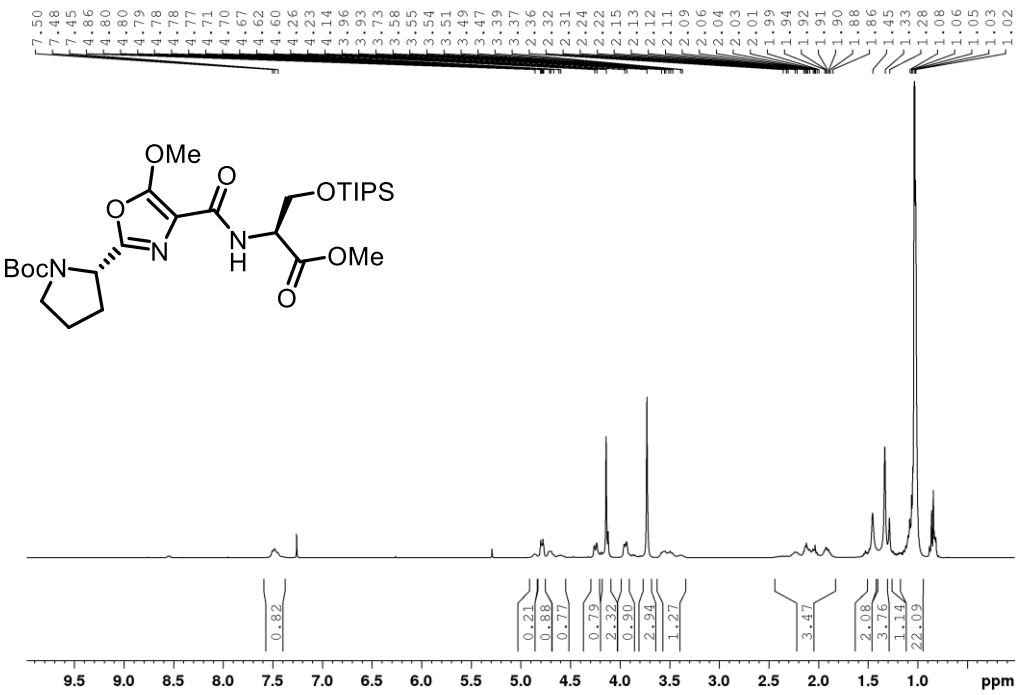


*Abbildung 183: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **208**.*

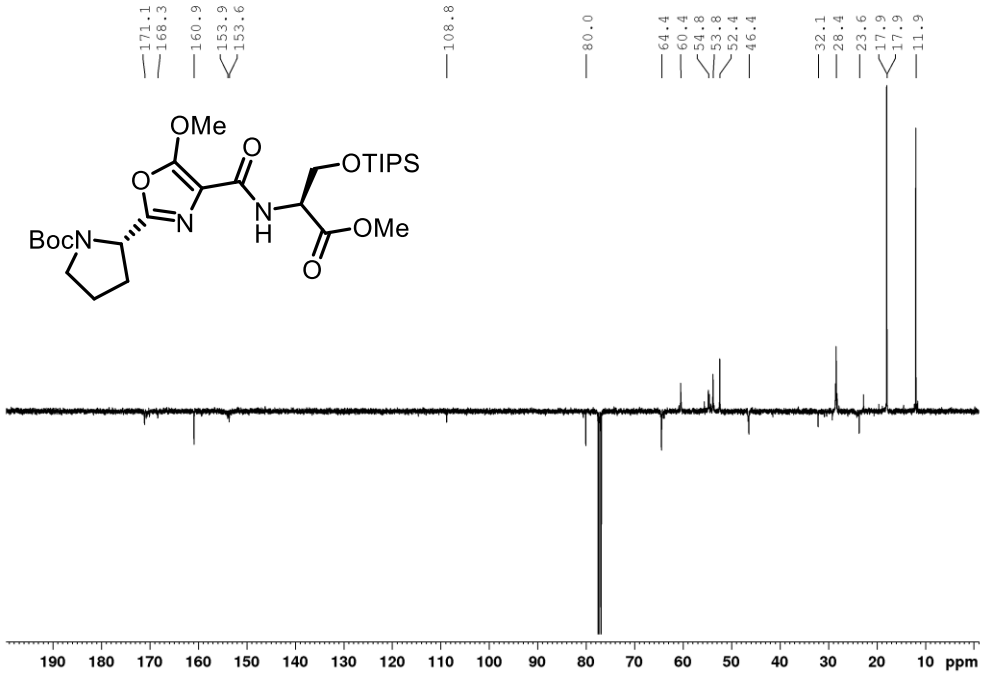


*Abbildung 184: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **208**.*

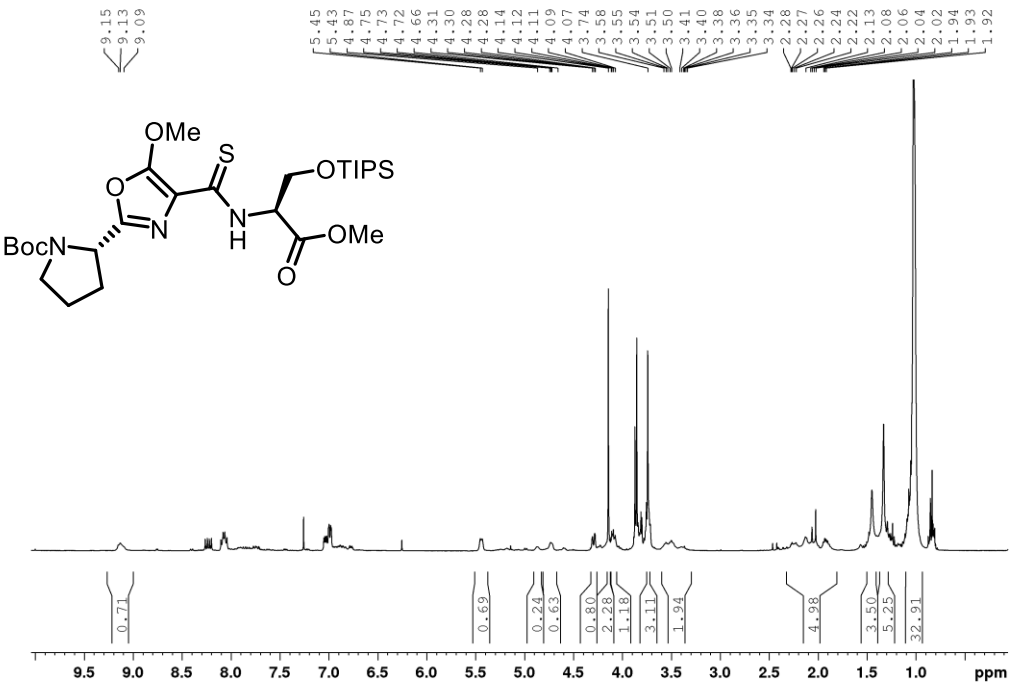


*Abbildung 185: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **209**.*

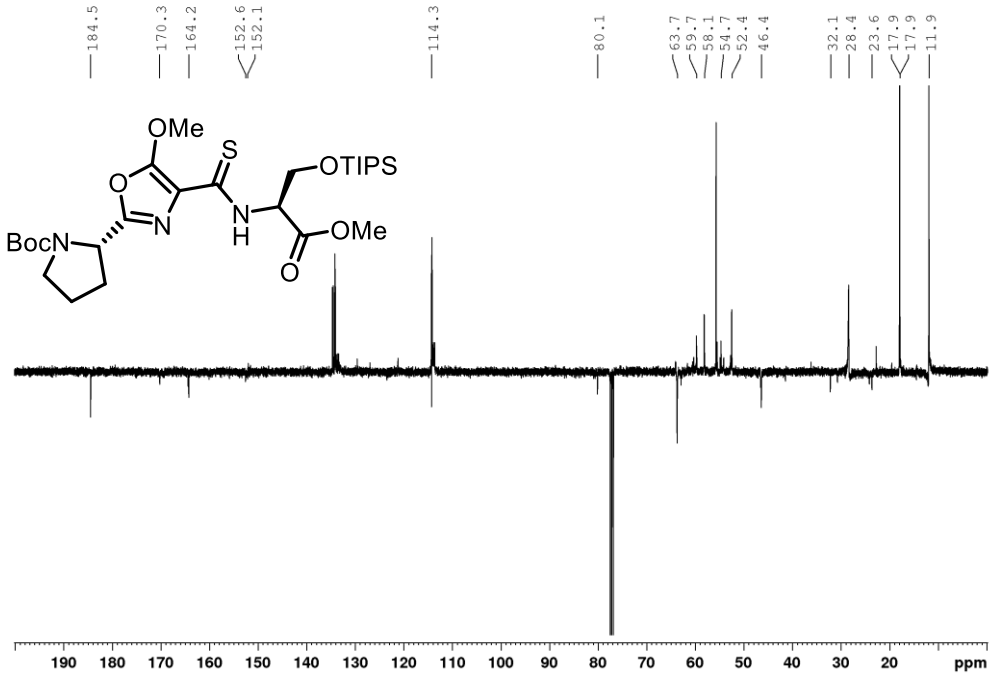


*Abbildung 186: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **209**.*

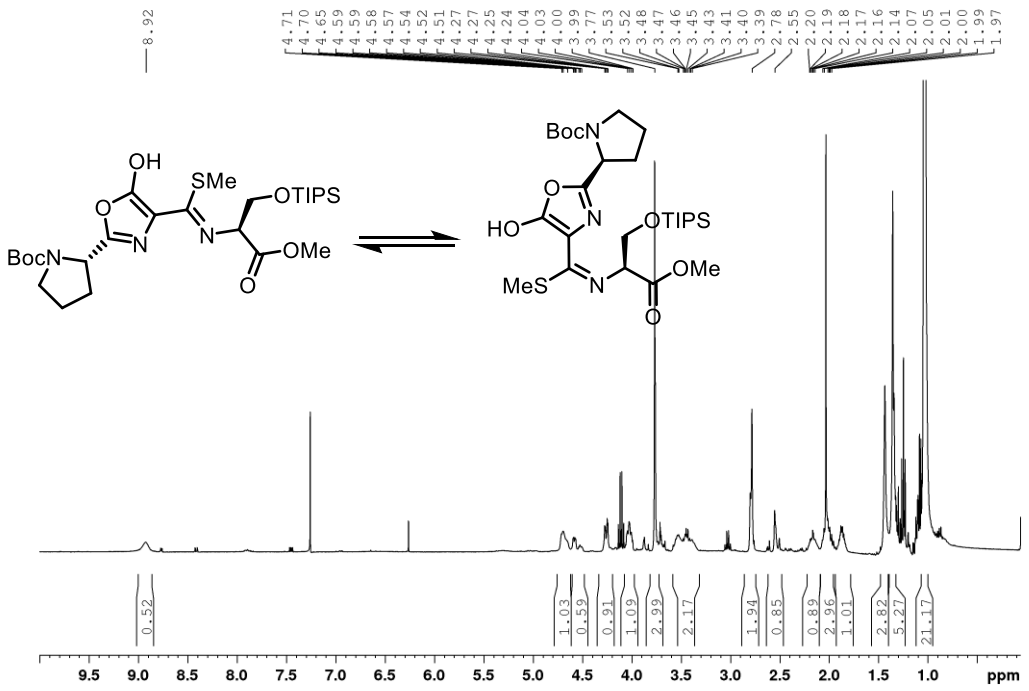


*Abbildung 187: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **211**.*

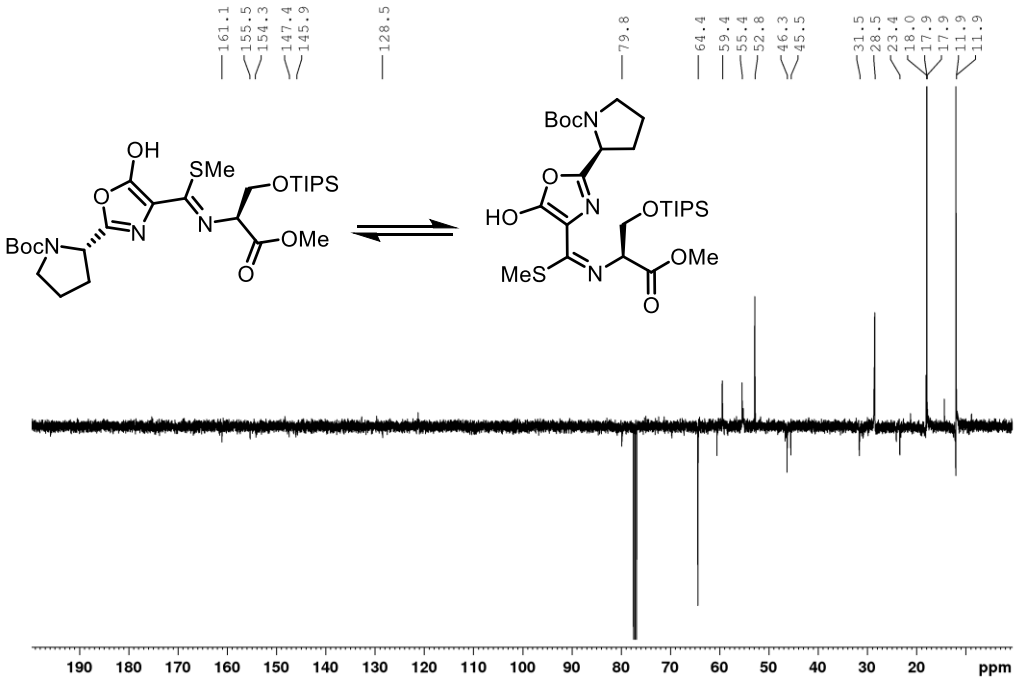


*Abbildung 188: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **211**.*

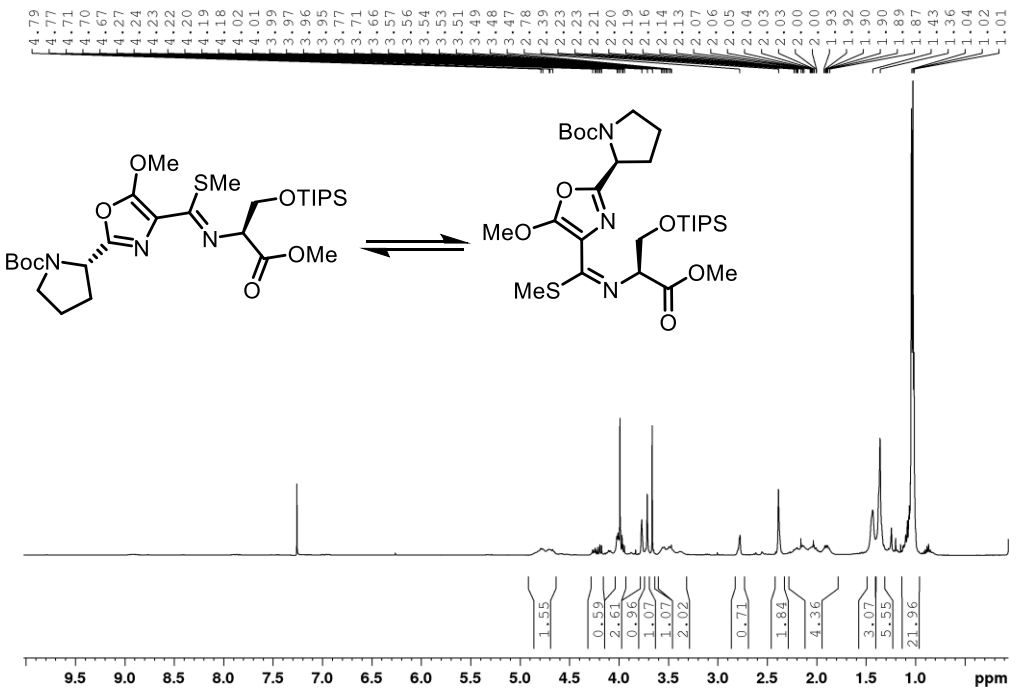


*Abbildung 189: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **210**.*

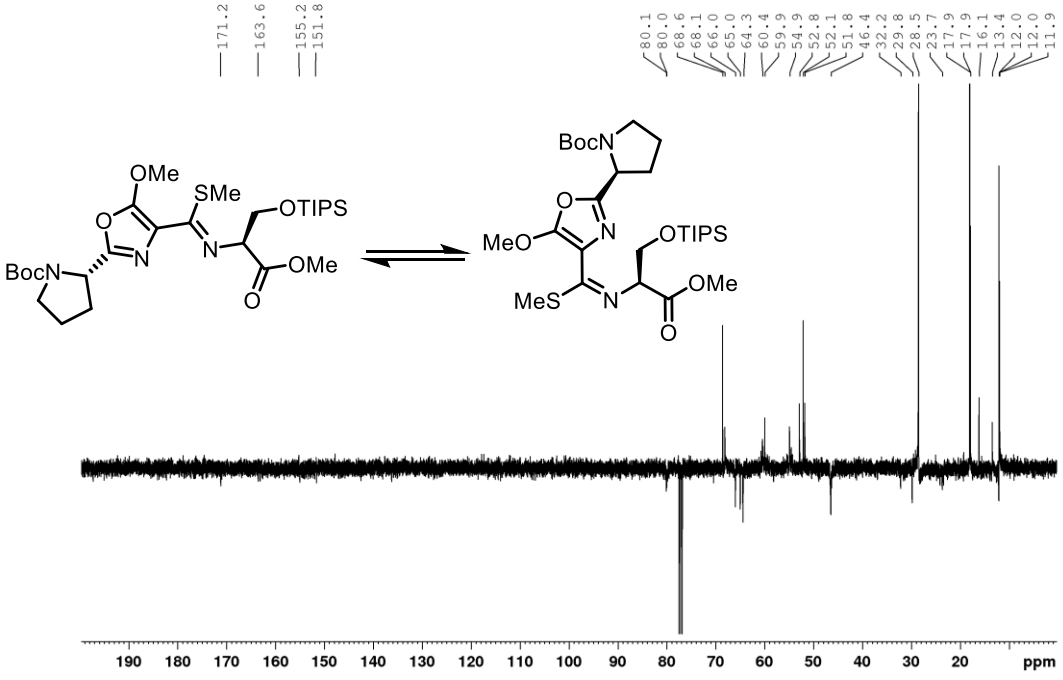


*Abbildung 190: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **210**.*

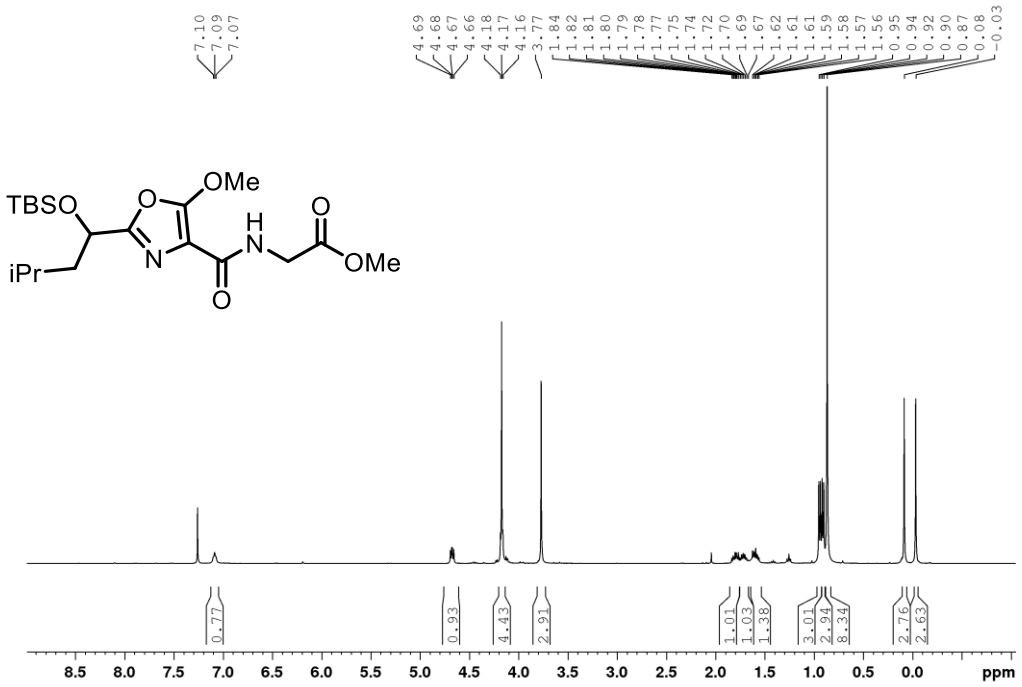


*Abbildung 191: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **214**.*

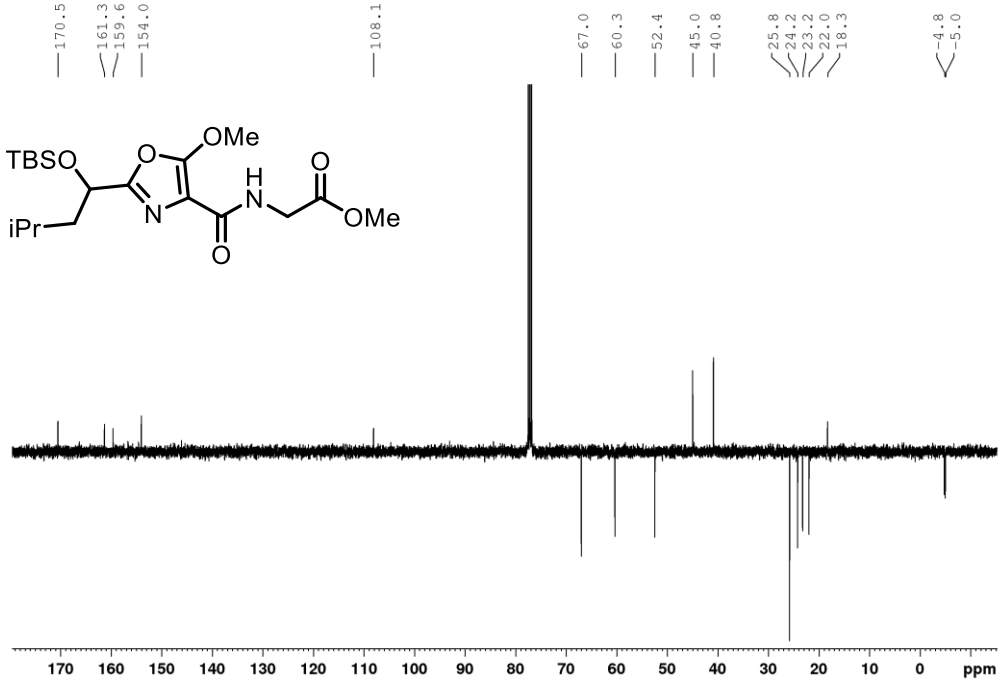


*Abbildung 192: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **214**.*

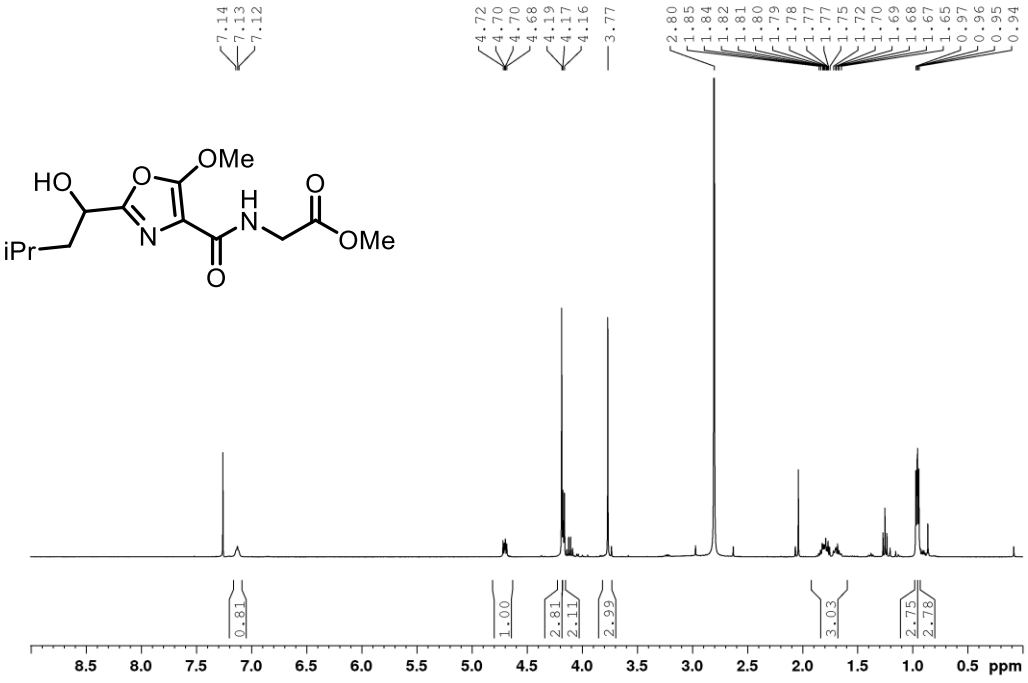


*Abbildung 193: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **215**.*

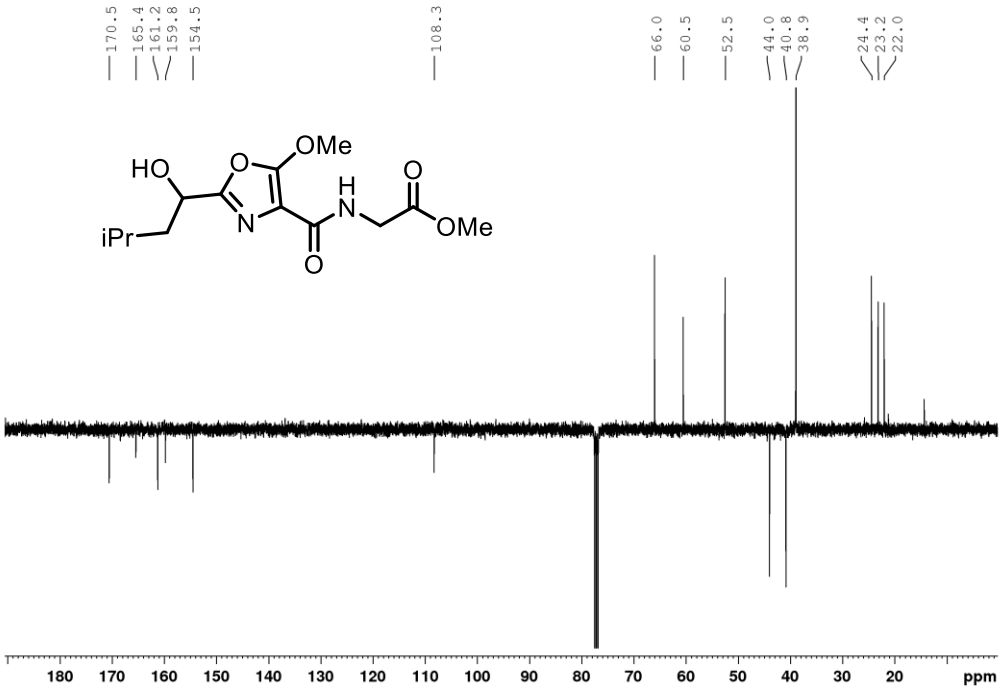


*Abbildung 194: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **215**.*

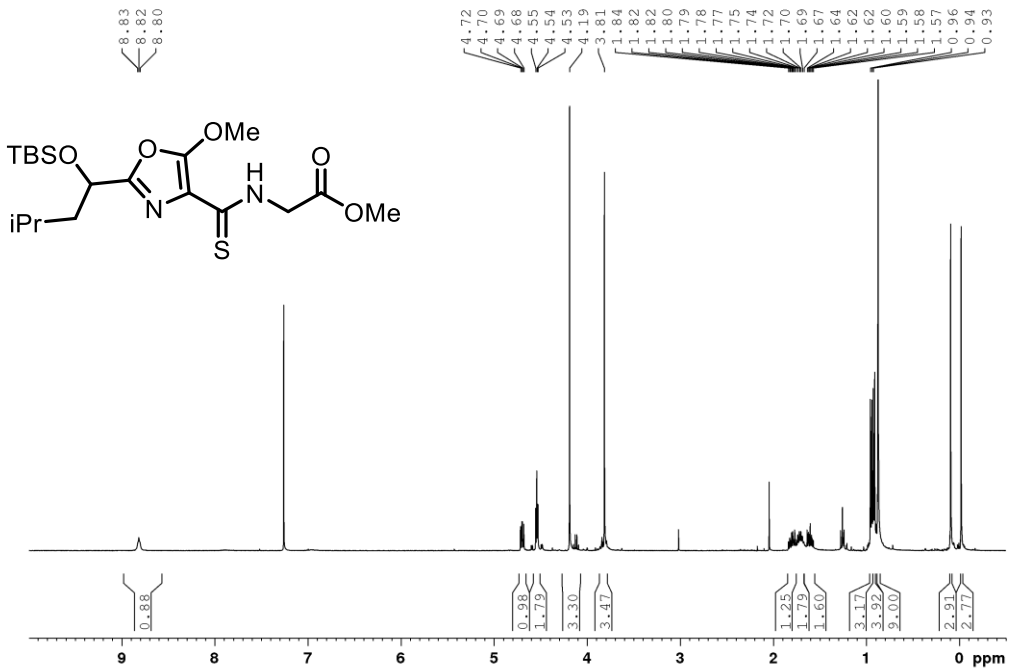


*Abbildung 195: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **216**.*

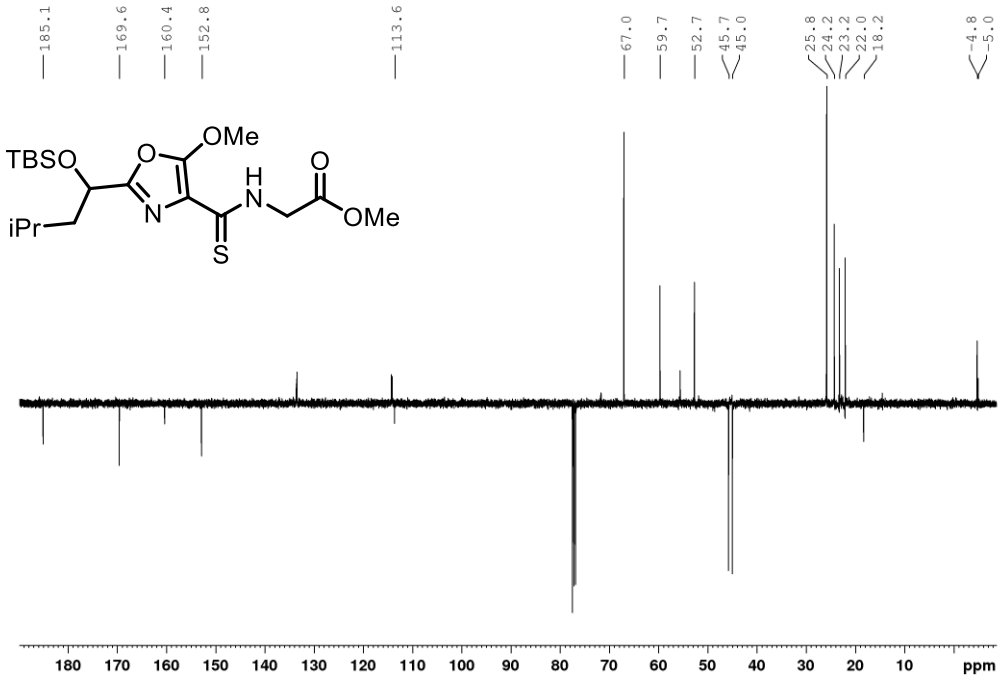


*Abbildung 196: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **216**.*

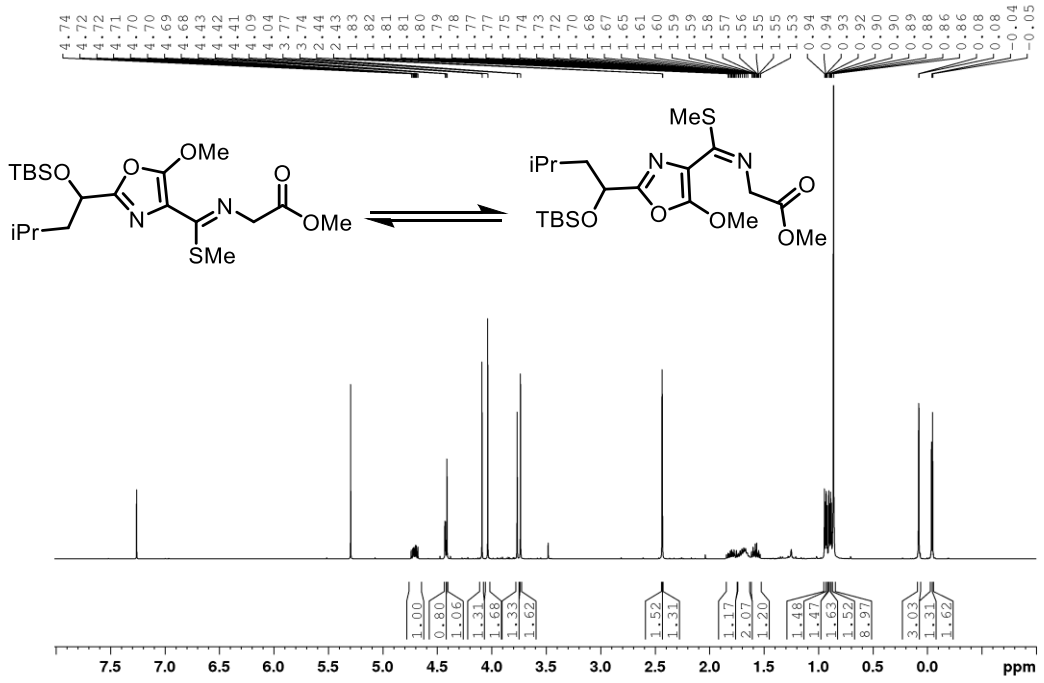


*Abbildung 197: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **217**.*

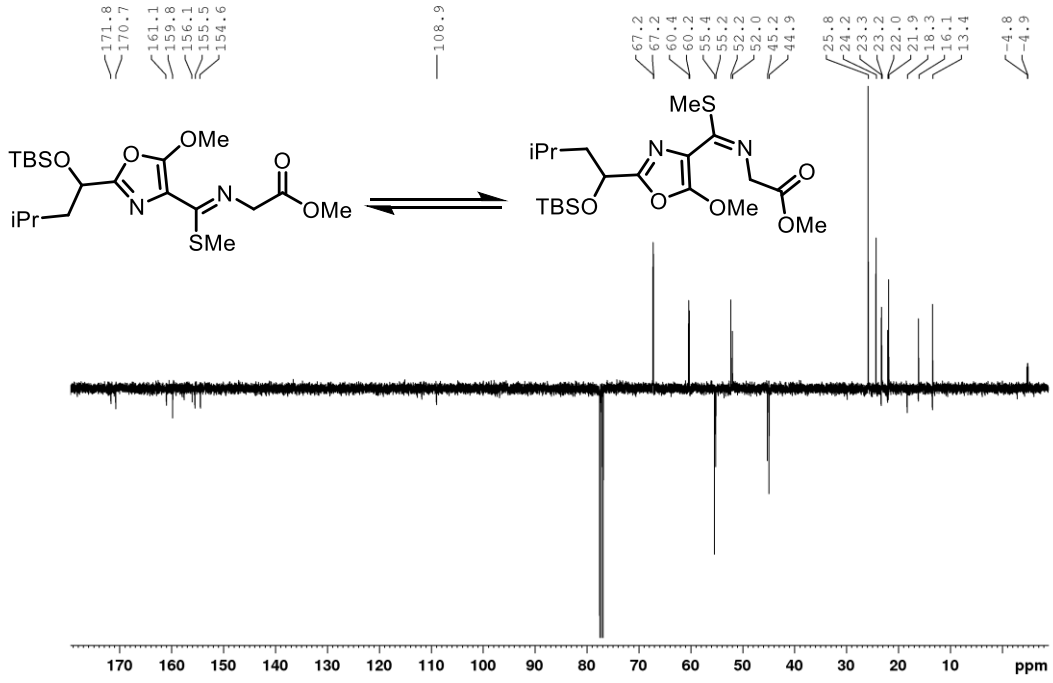


*Abbildung 198: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **217**.*

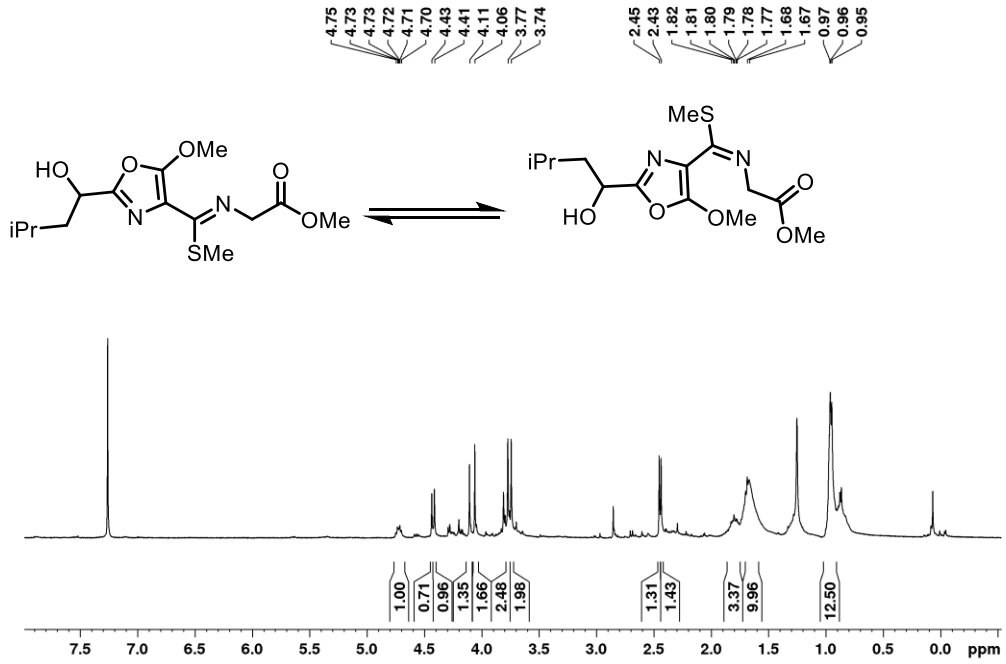


*Abbildung 199: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **218**.*

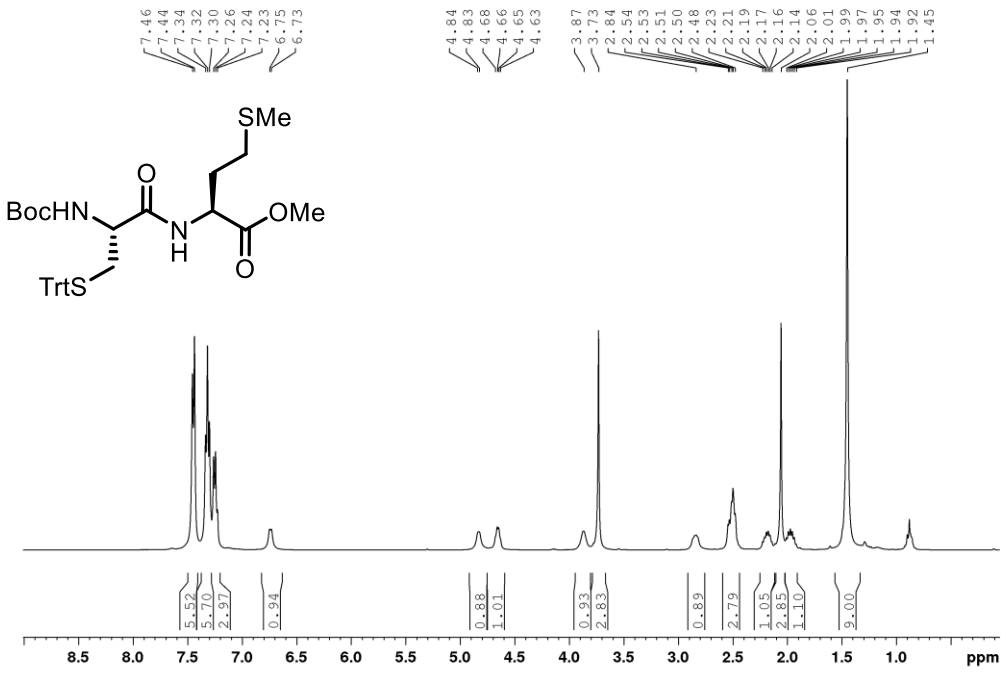


*Abbildung 200: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **220**.*

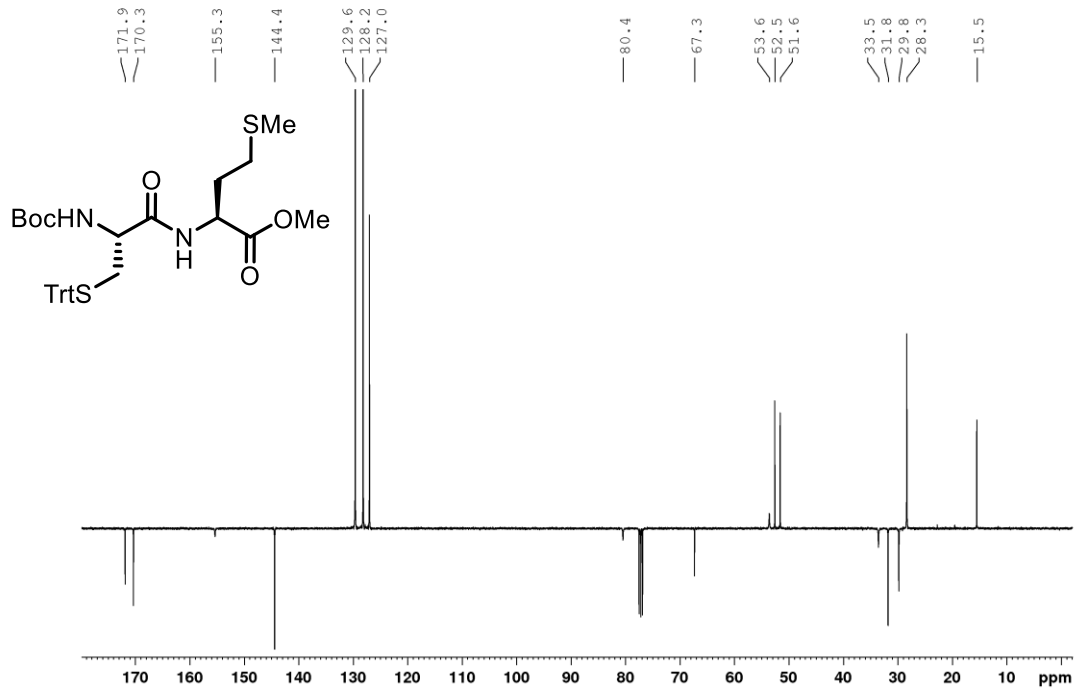


*Abbildung 201: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **220**.*

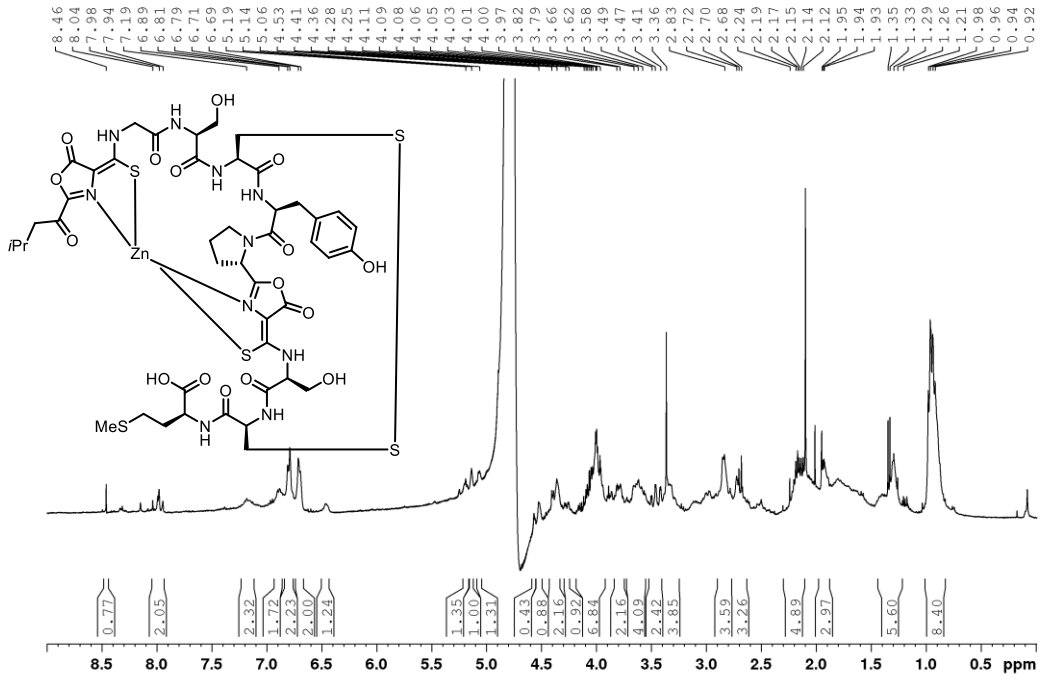


*Abbildung 202: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, D_2O) von **MB OB3b(Zn)**.*

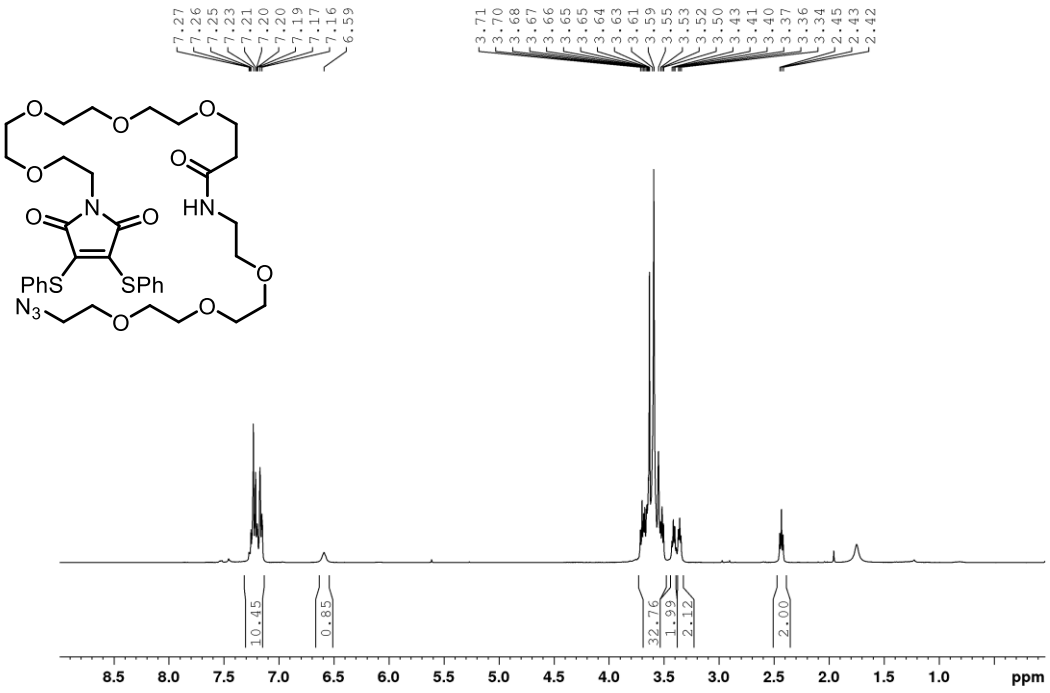


*Abbildung 203: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **242.***

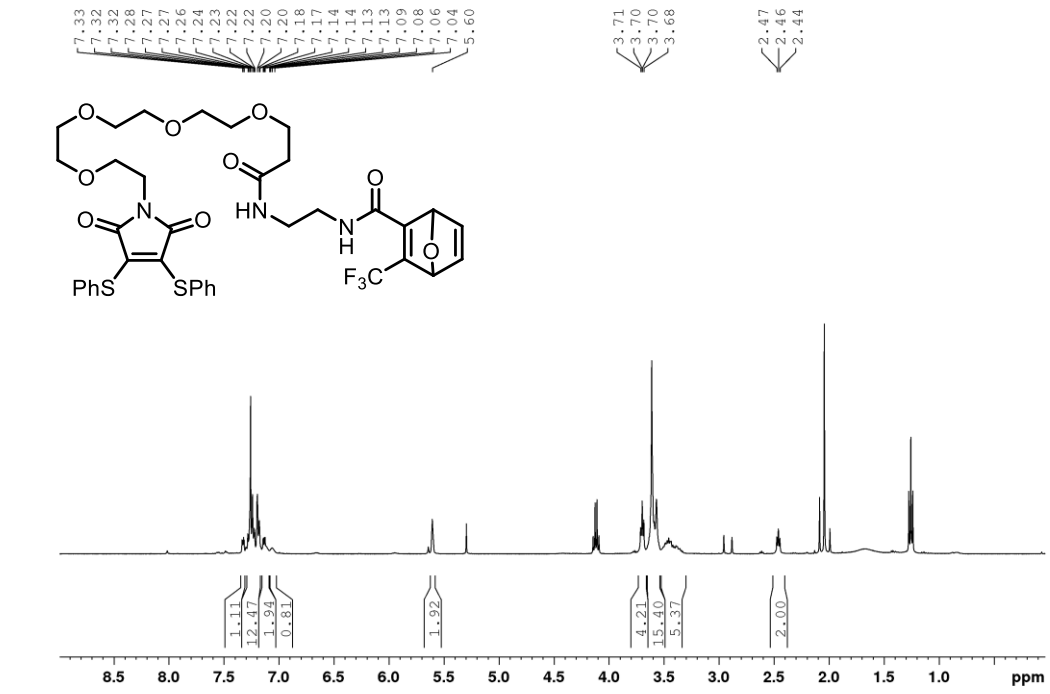


*Abbildung 204: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **250.***

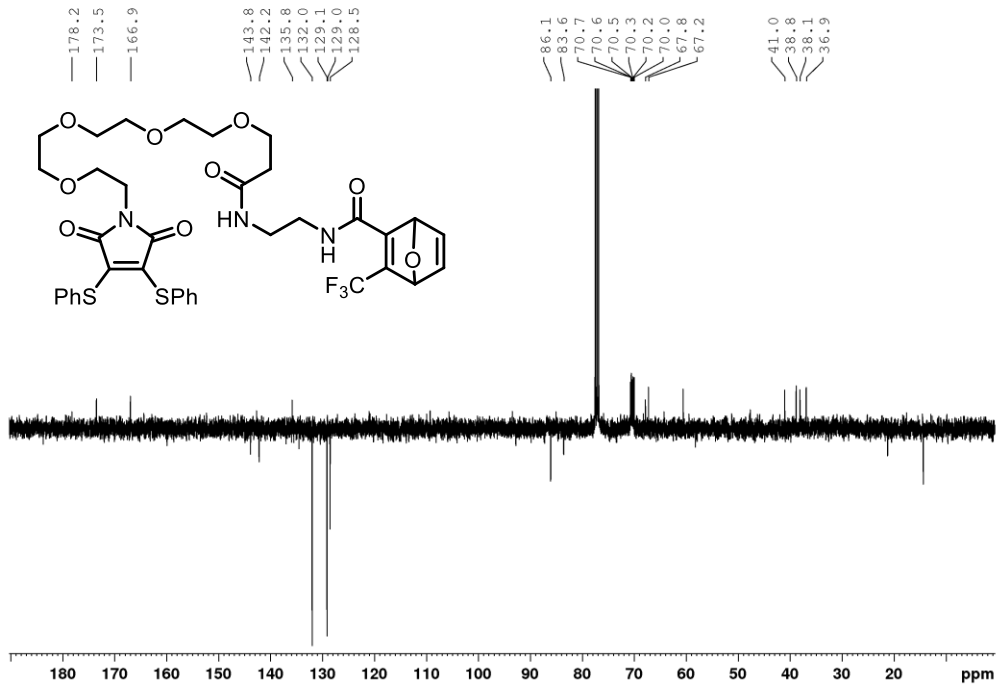


*Abbildung 205: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **250.***

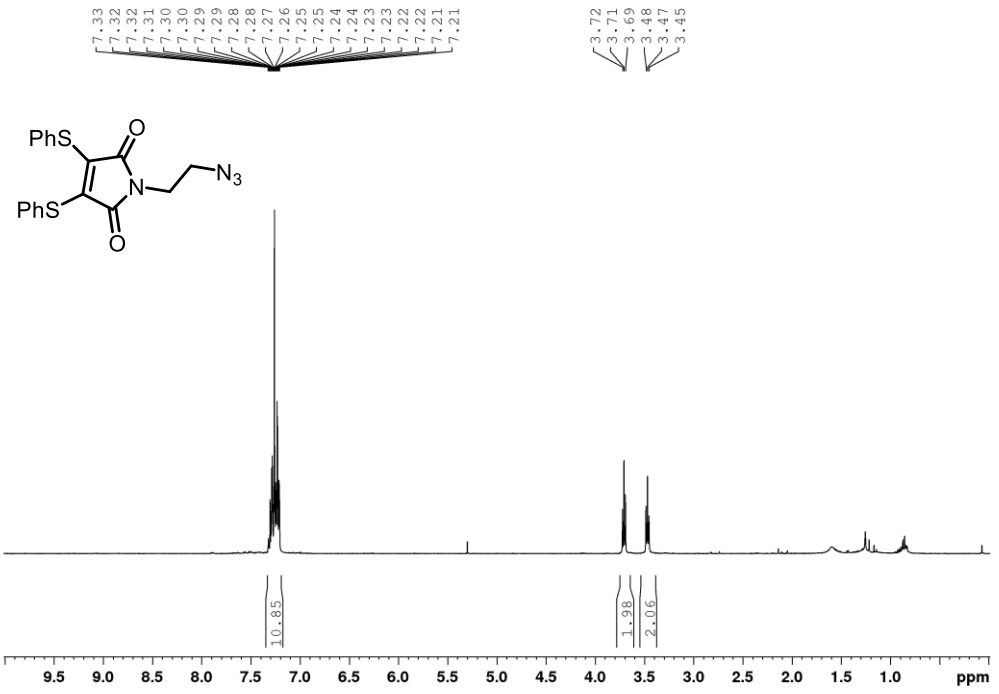


*Abbildung 206: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **258**.*

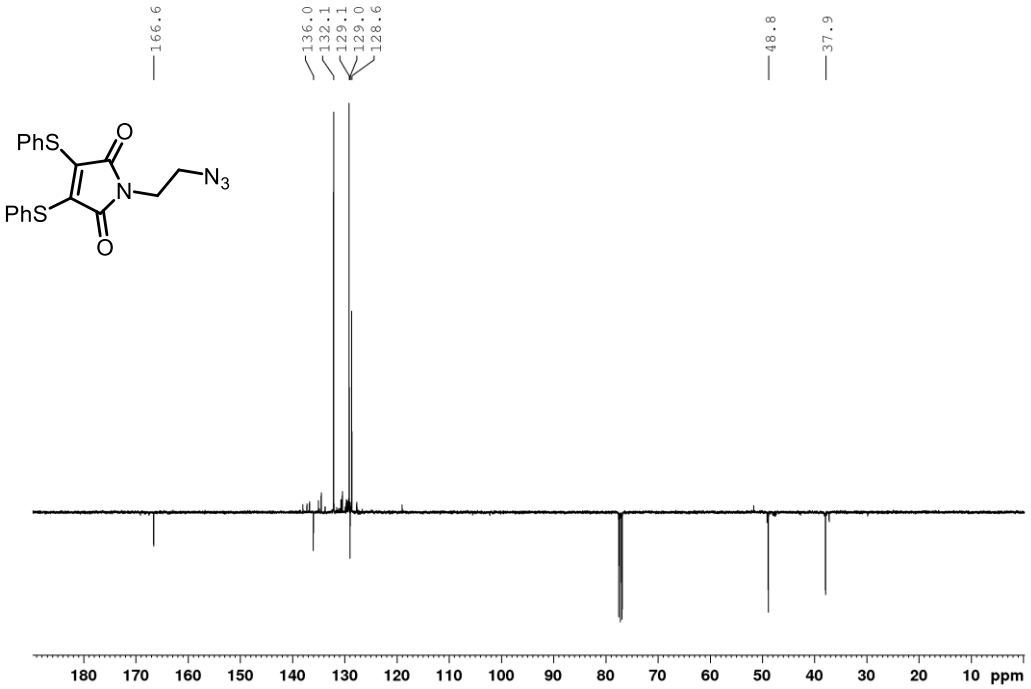


*Abbildung 207: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **258.***

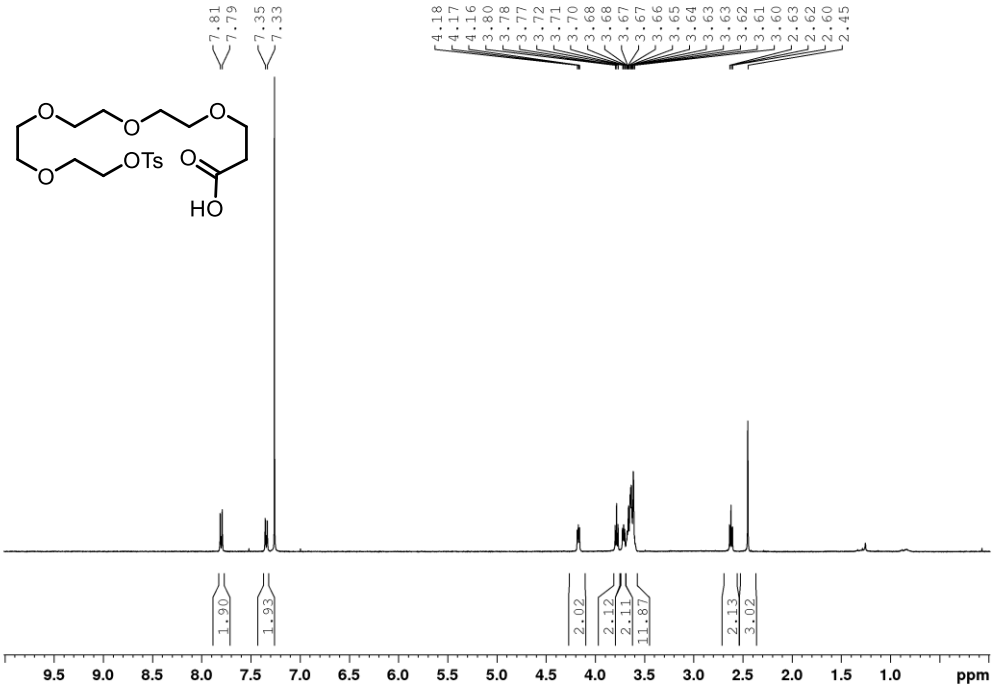


*Abbildung 208: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **262**.*

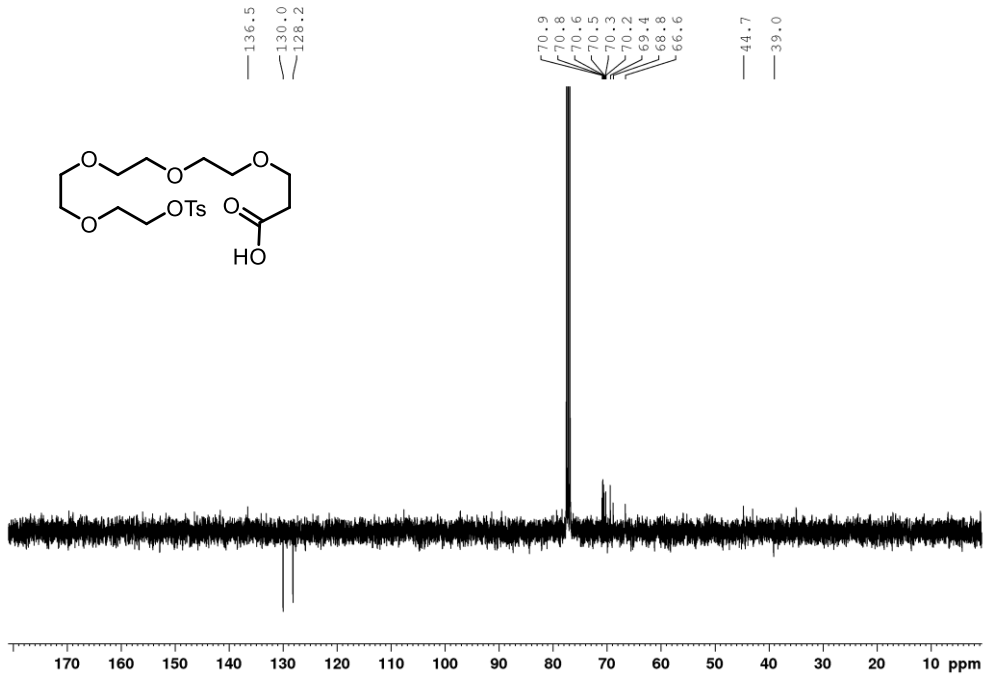


*Abbildung 209: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **262**.*

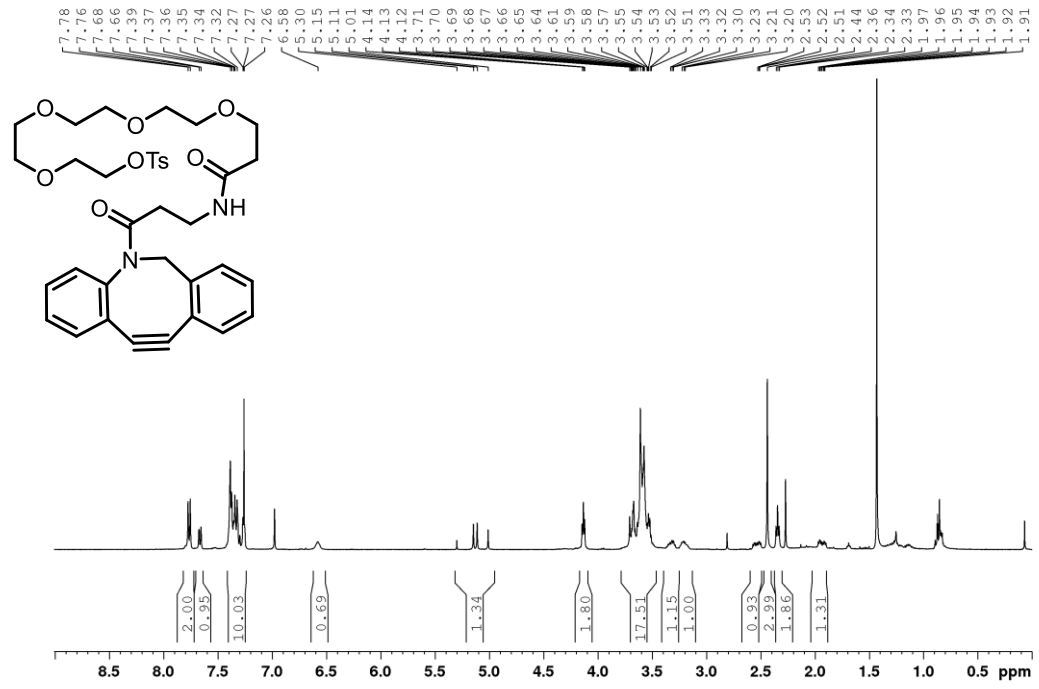


*Abbildung 210: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **264**.*

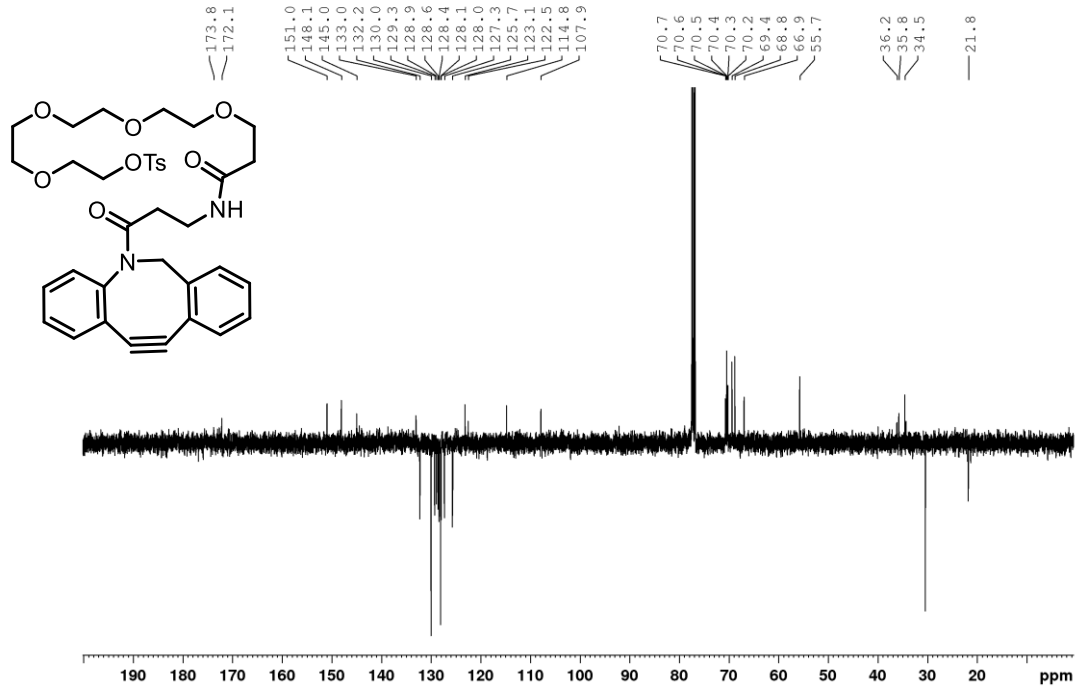


*Abbildung 211: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **264**.*

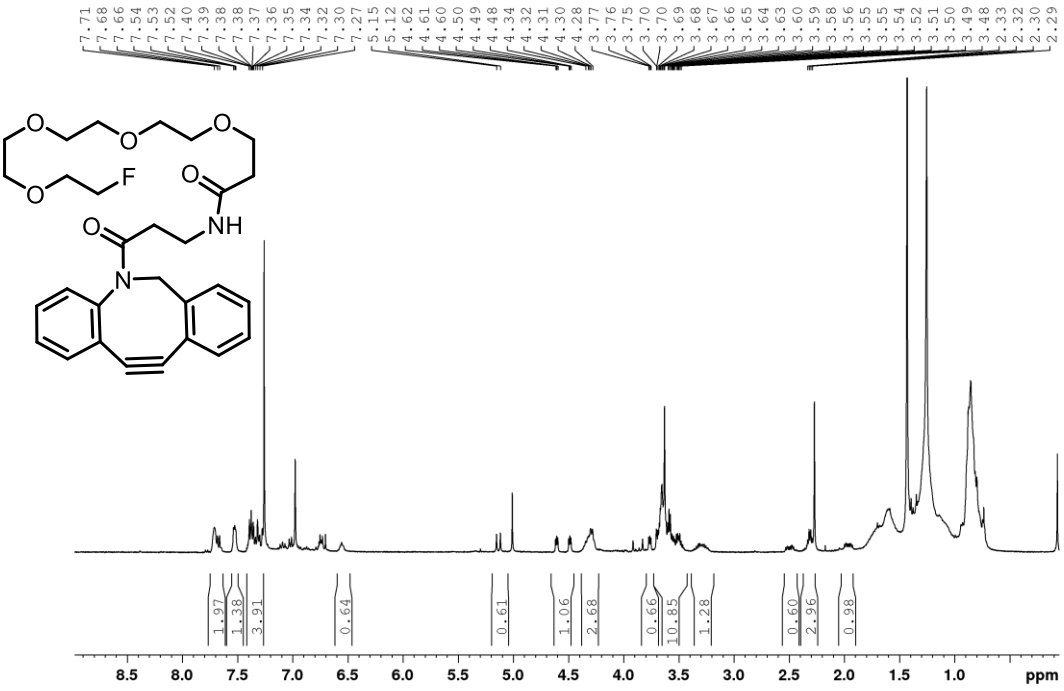


*Abbildung 212: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **265**.*

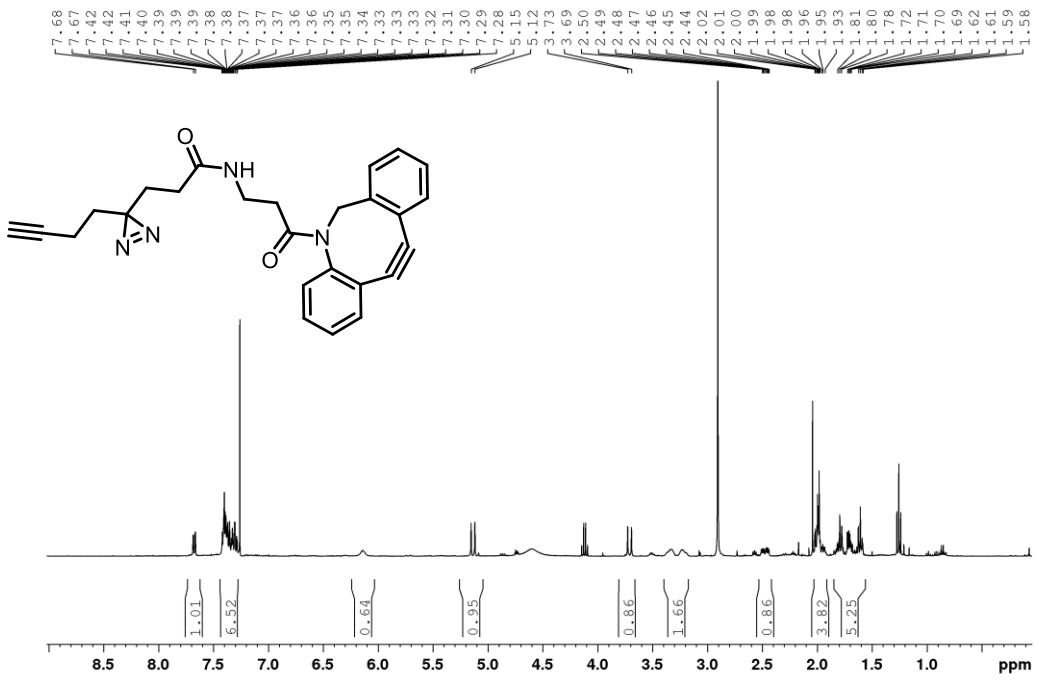


*Abbildung 213: ^{1}H-NMR Spektrum (400 MHz, $CDCl_3$) von **273**.*

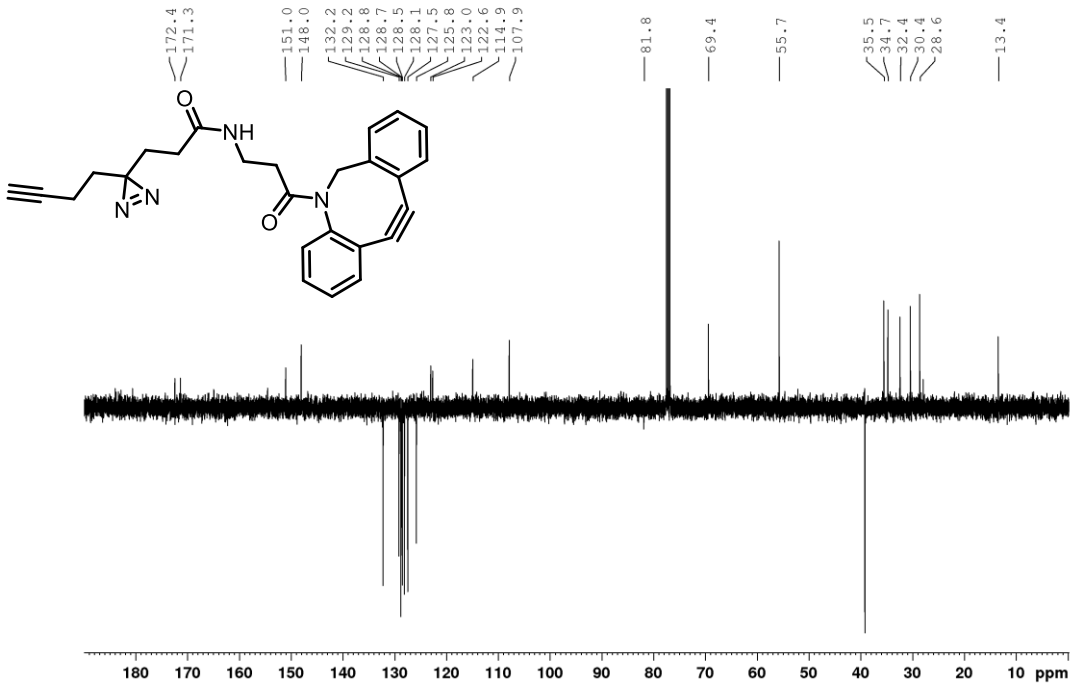


*Abbildung 214: ^{13}C-APT -NMR Spektrum (101 MHz, $CDCl_3$) von **273**.*

6.2 HPLC CHROMATOGRAMME

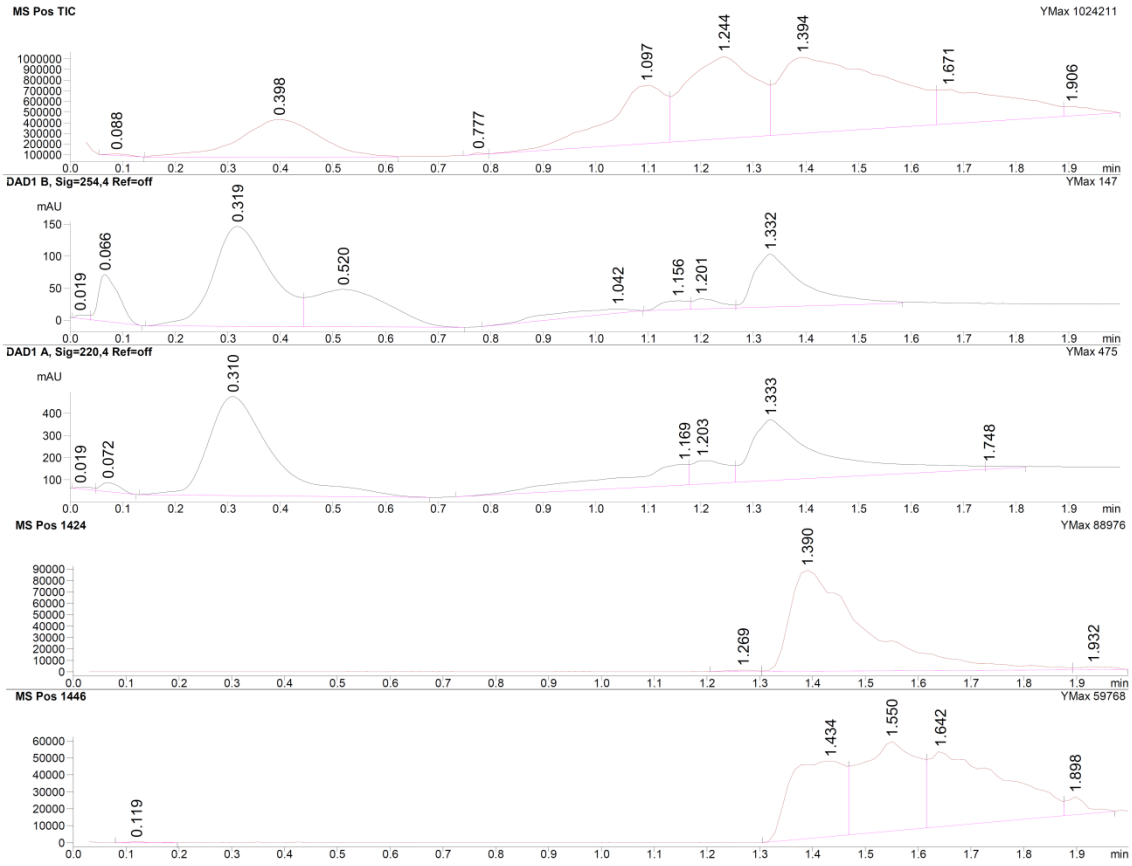


*Abbildung 215: LC-MS Chromatogramm von **38** (m/z (ESI-MS$^+$): 1424 (M+H$^+$), 1446(M+Na$^+$)).*

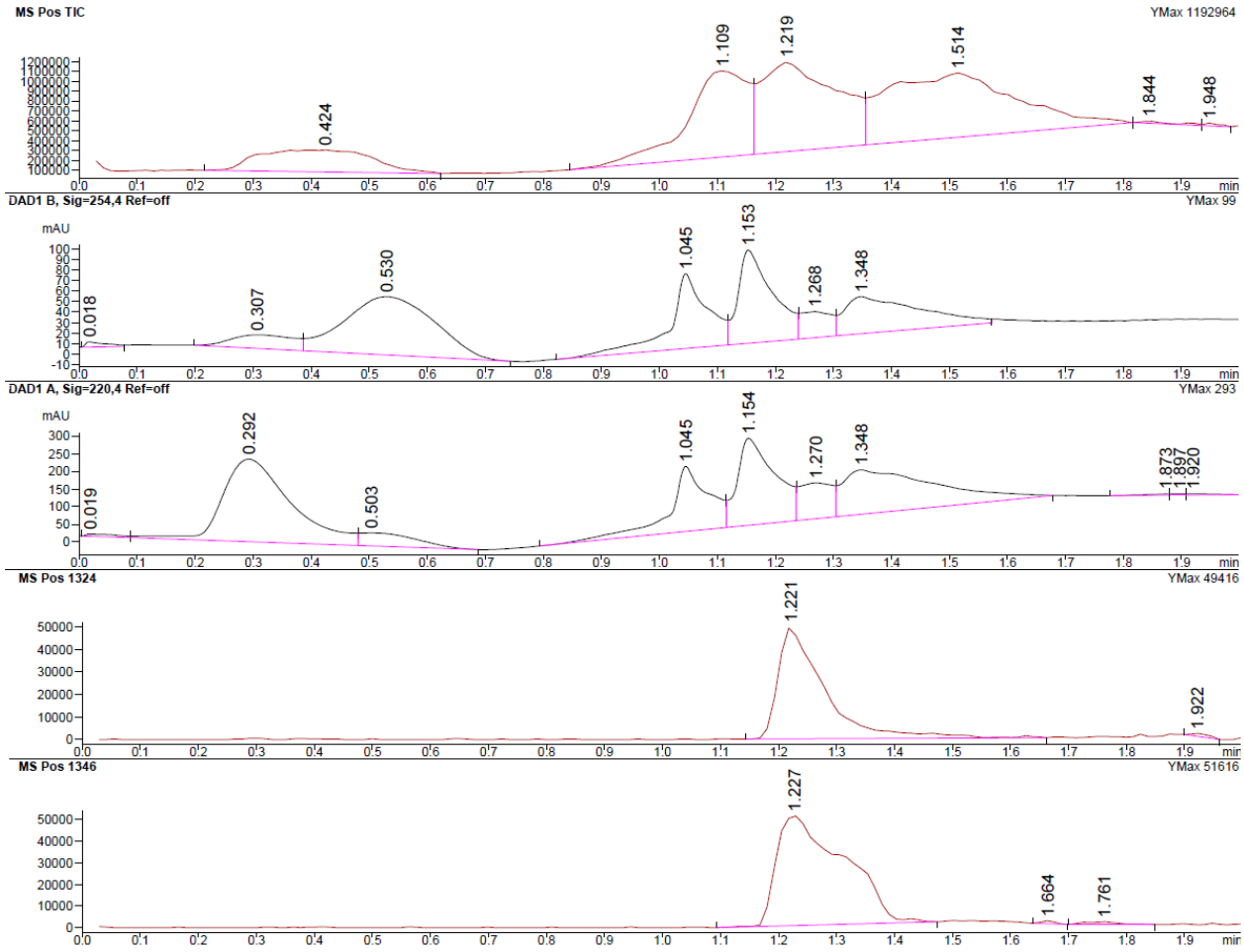


*Abbildung 216: LC-MS Chromatogramm von **39** (m/z (ESI-MS$^+$): 1167 (**39(OH)**+H$^+$), 1189 (**39(OH)**+Na$^+$), 1324 (**39(OTIPS)**+H$^+$), 1346 (**39(OTIPS)**+Na$^+$)).*

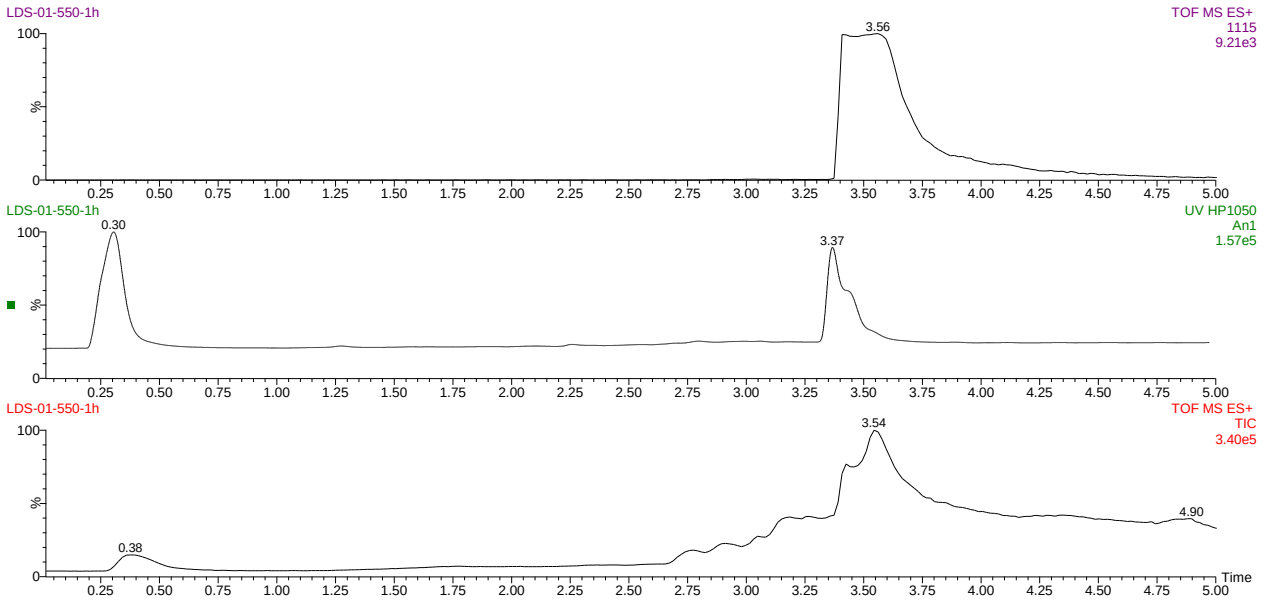


*Abbildung 217: LC-MS Chromatogramm von **40** (m/z (ESI-MS$^+$): 1115 (M+H$^+$)).*

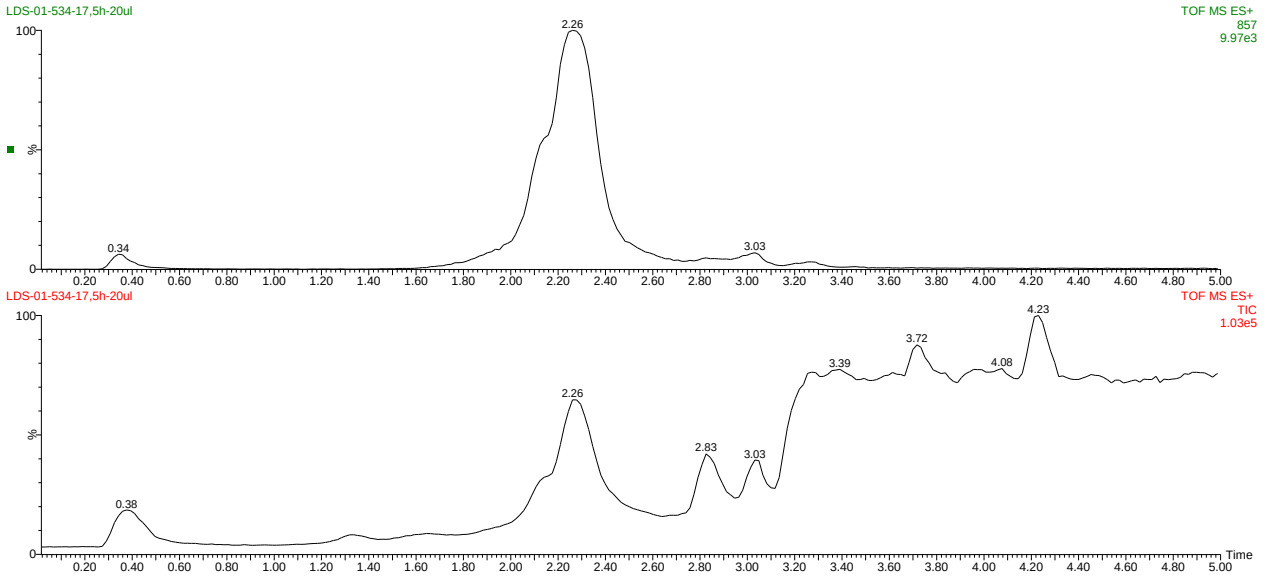


*Abbildung 218: LC-MS Chromatogramm von **42(OH)** (m/z (ESI-MS$^+$): 857 (M+H$^+$)).*

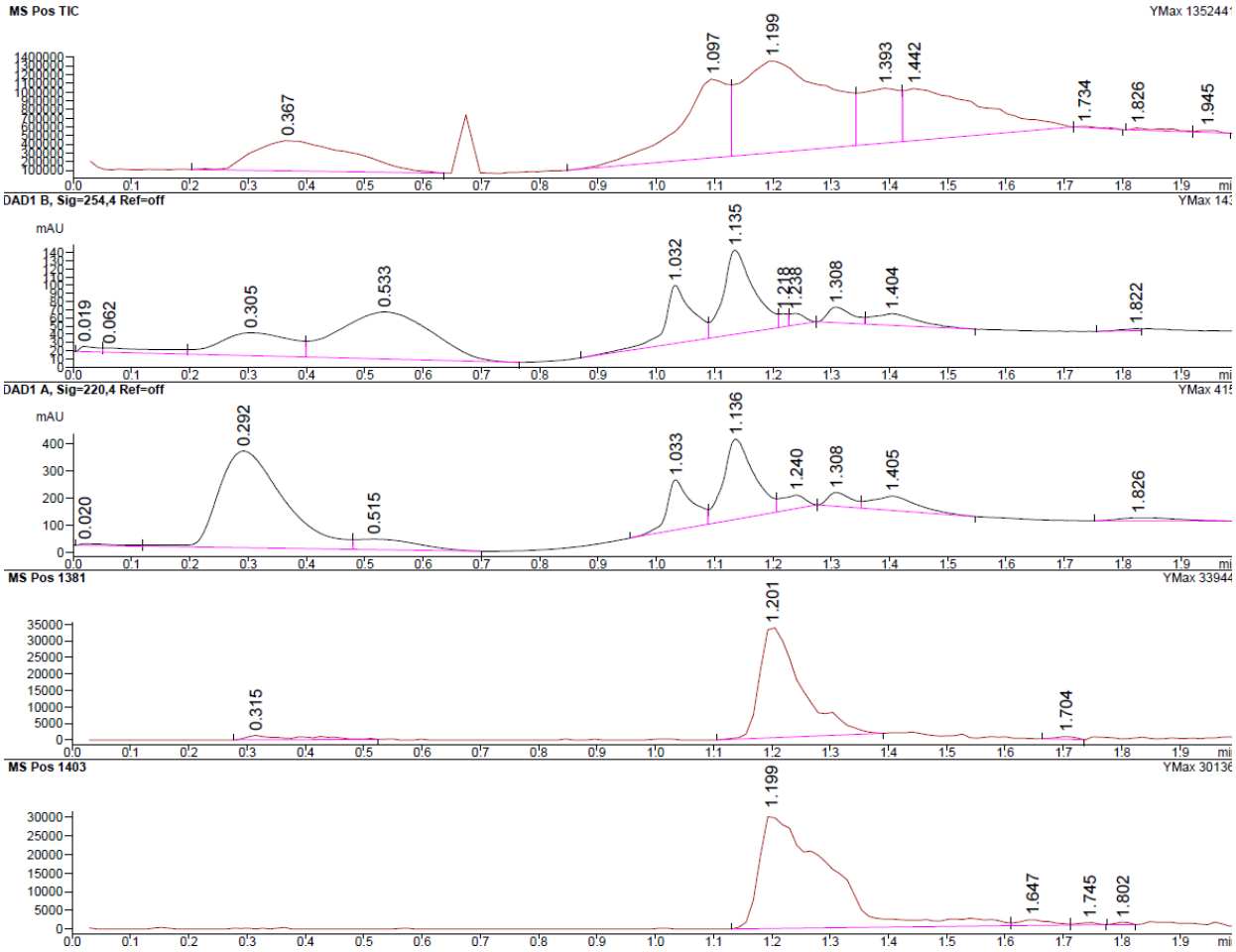


*Abbildung 219: LC-MS Chromatogramm von **45** (m/z (ESI-MS$^+$): 1224 (**45(OH)**+H$^+$), 1381 (**45(OTIPS)**+H$^+$), 1403 (**39(OTIPS)**+Na$^+$)).*

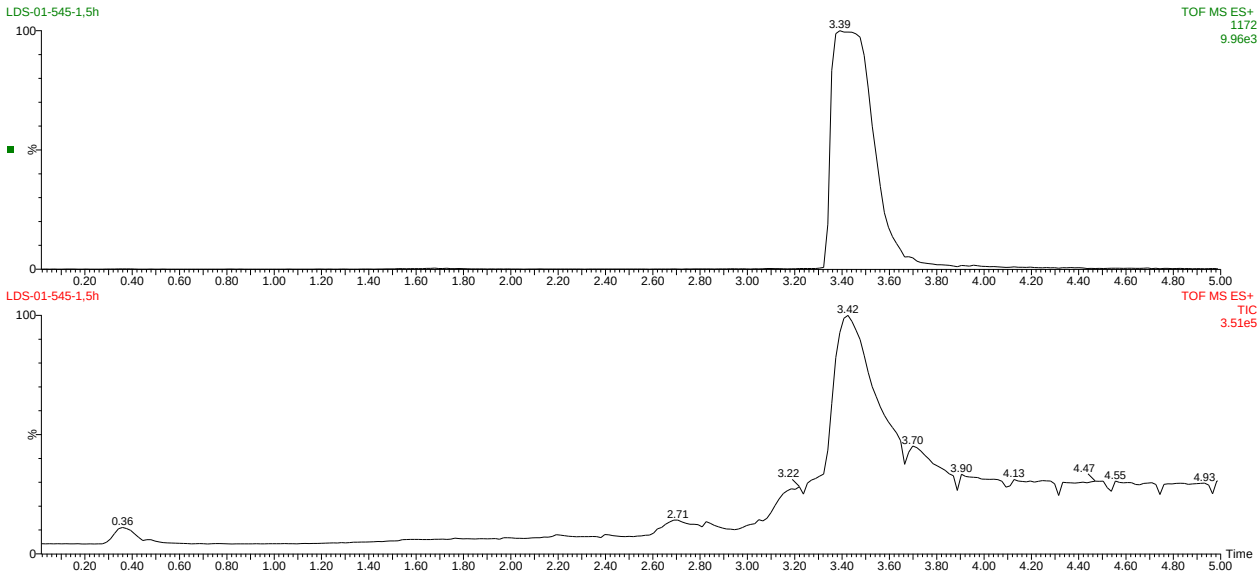


*Abbildung 220: LC-MS Chromatogramm von **46** (m/z (ESI-MS$^+$): 1115 (M+H$^+$)).*

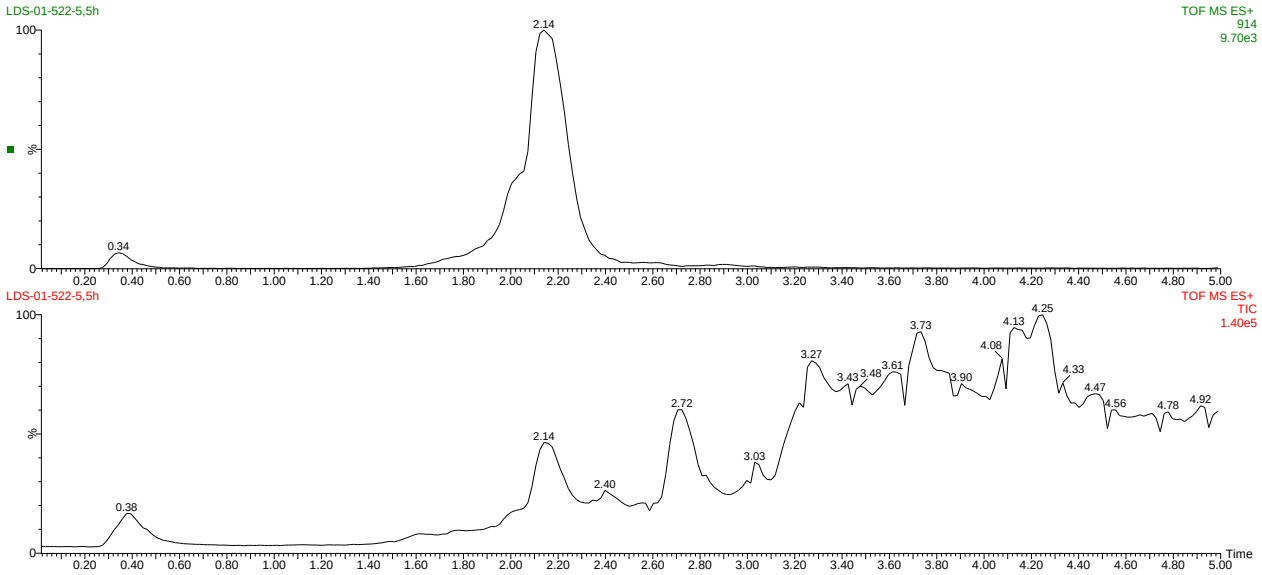


*Abbildung 221: LC-MS Chromatogramm von **48(OH)** (m/z (ESI-MS$^+$): 857 (M+H$^+$)).*

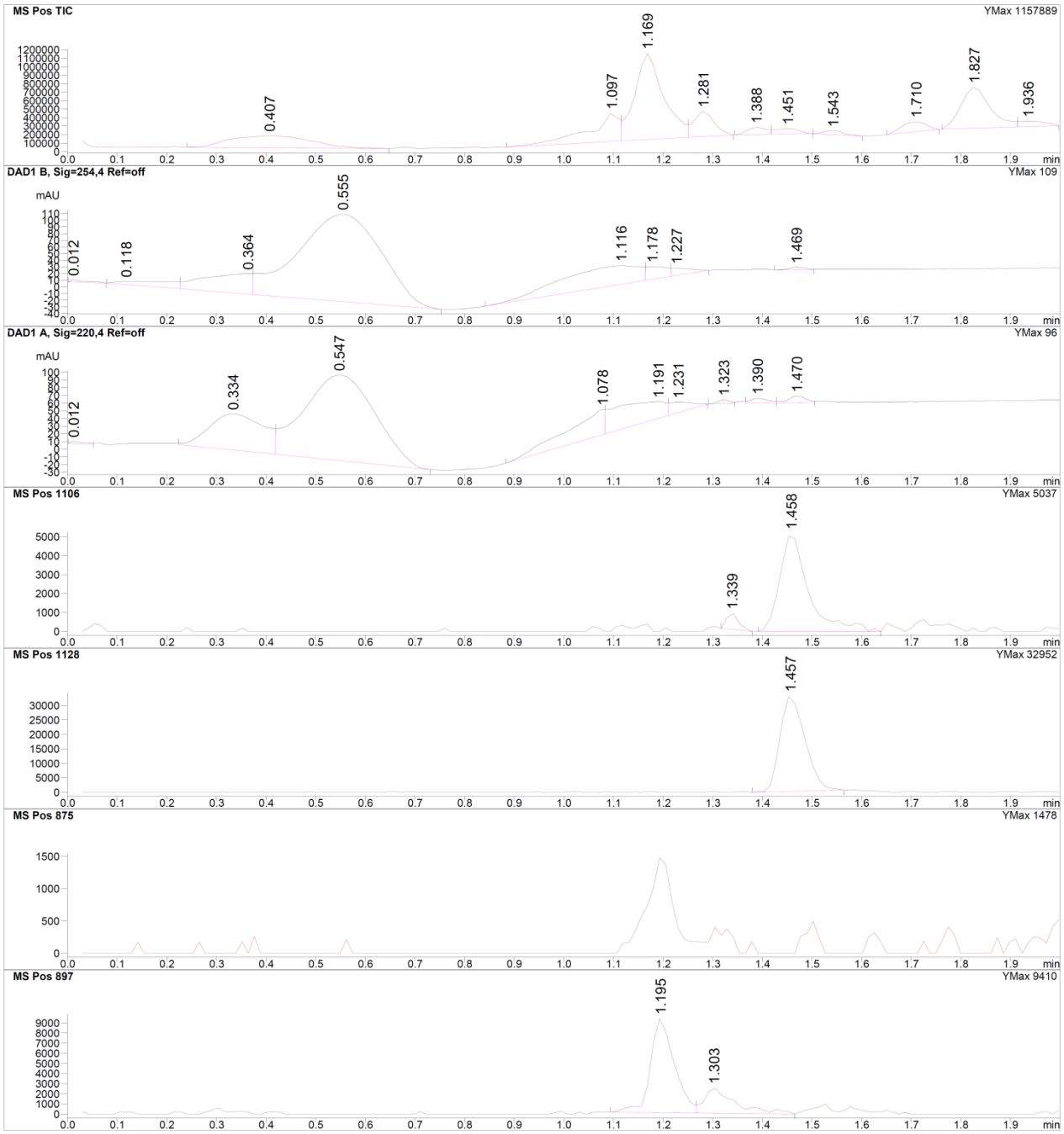


*Abbildung 222: LC-MS Chromatogramm von **62** (m/z (ESI-MS$^+$): 1106 (M+H$^+$), 1128 (M+Na$^+$)) nach Reaktion zwischen **61** (m/z (ESI-MS$^+$): 875 (M+H$^+$), 897 (M+Na$^+$)) und **59** (m/z (ESI-MS$^+$): 396 (M+H$^+$)).*

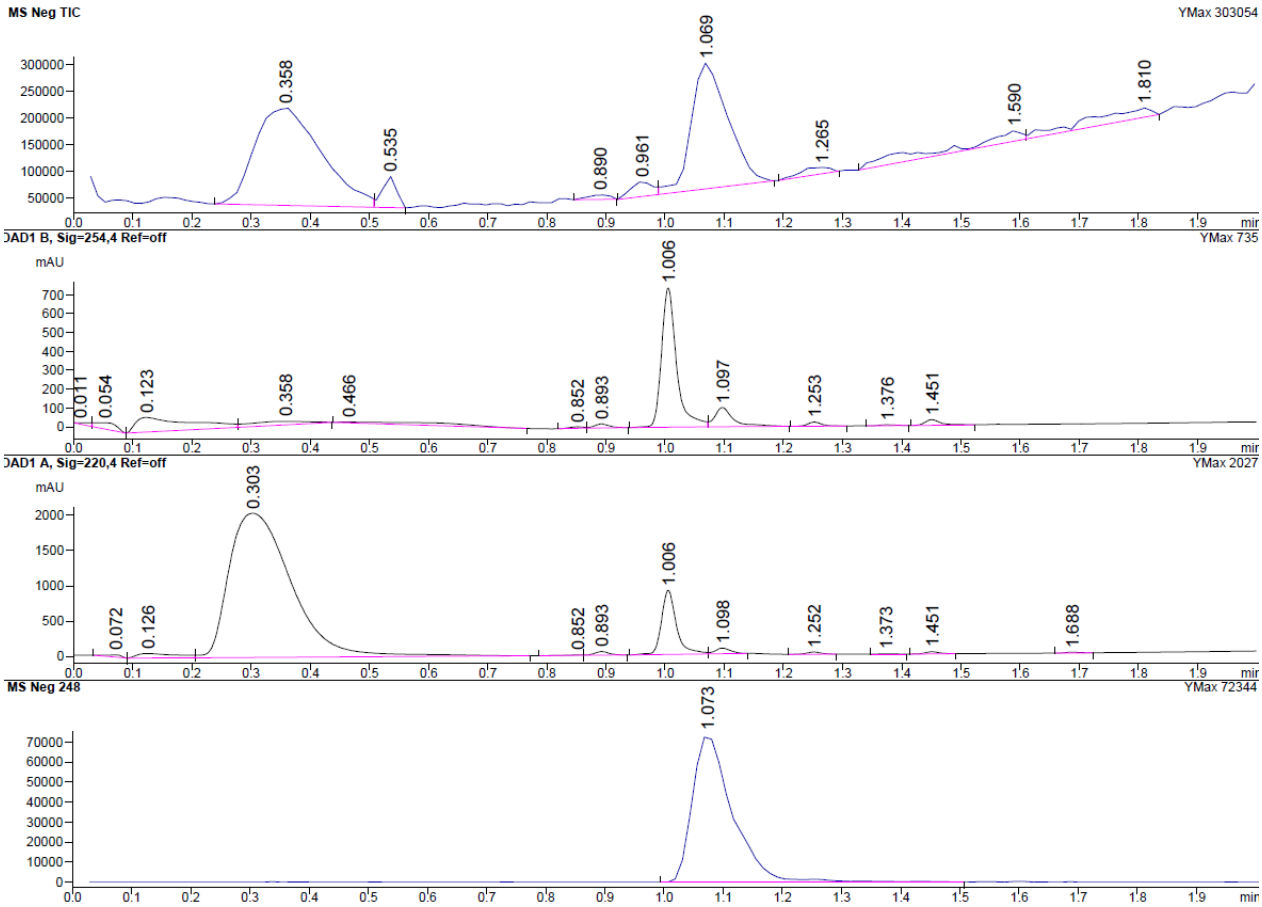


*Abbildung 223: LC-MS Chromatogramm von **78** (m/z (ESI-MS$^-$): 248 (M-H$^+$)).*

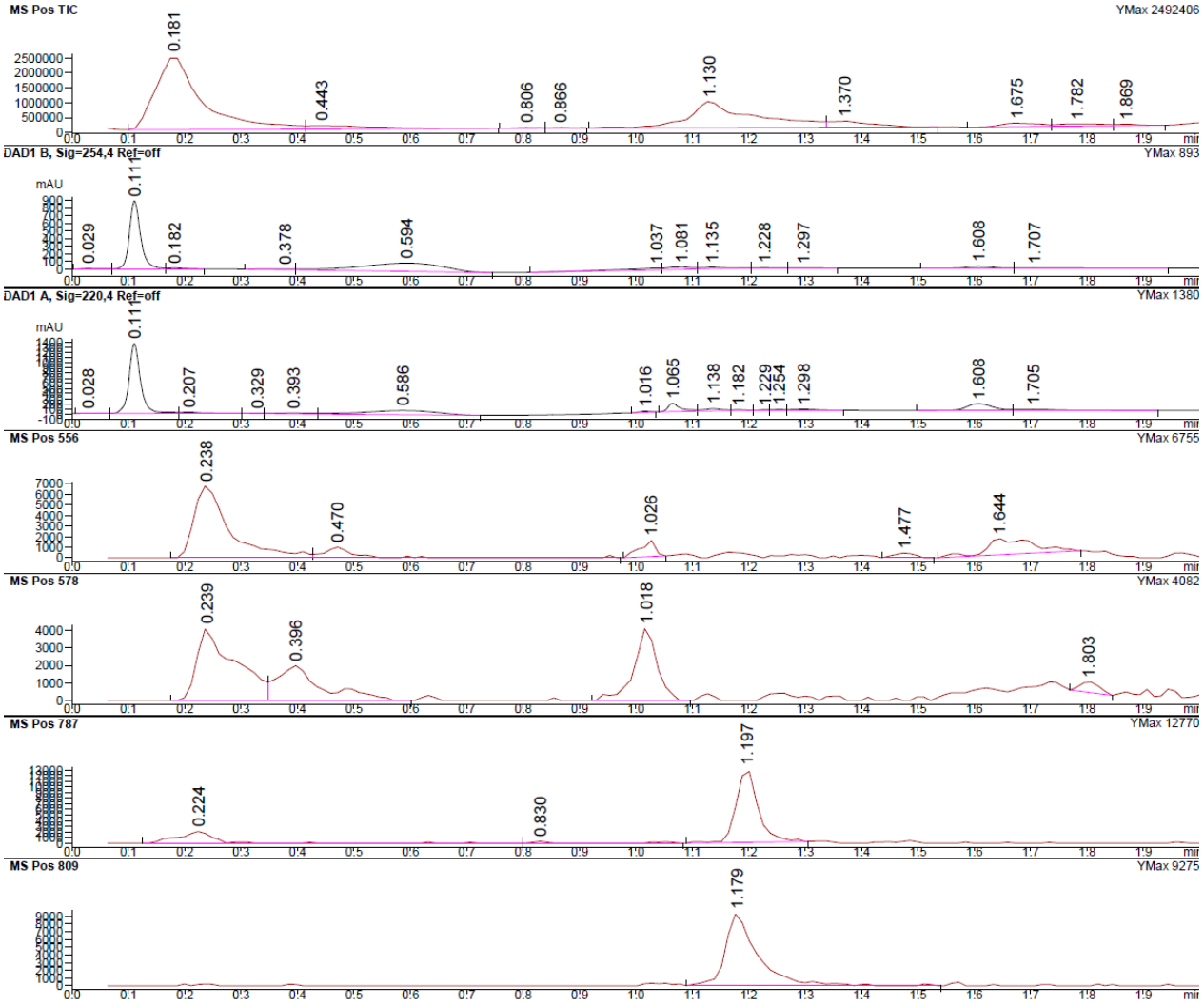


*Abbildung 224: LC-MS Chromatogramm von **79** (m/z (ESI-MS$^+$): 787 (M+H$^+$), 809 (M+Na$^+$)) nach Reaktion zwischen **53** (m/z (ESI-MS$^+$): 556 (M+H$^+$), 578 (M+Na$^+$)), **78** und PyDiFOP.*

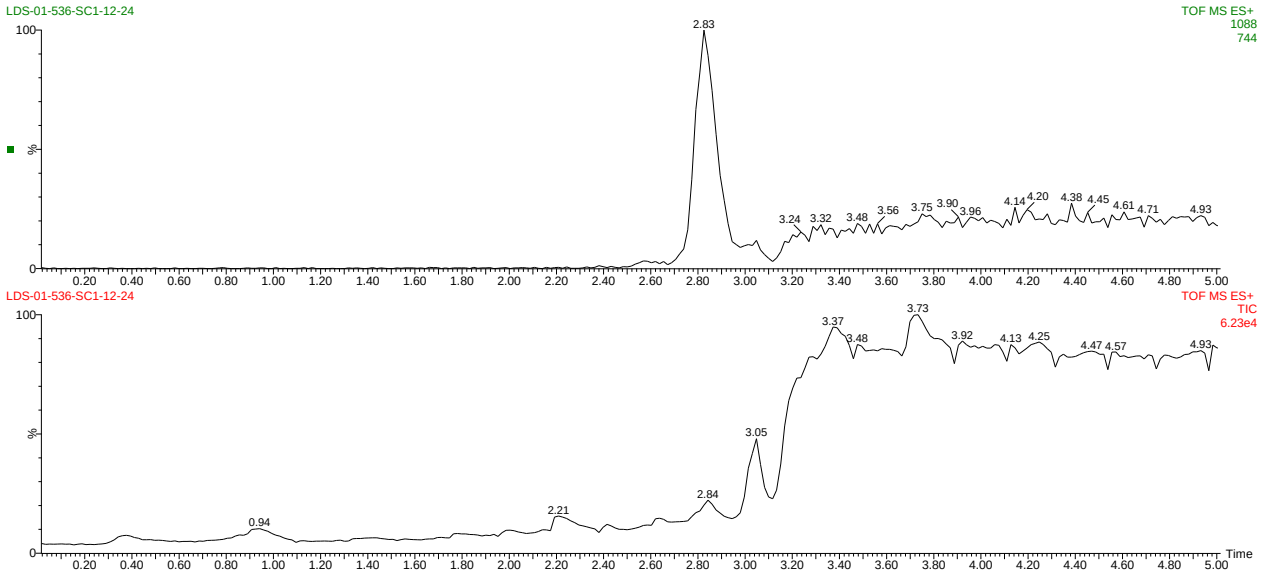


*Abbildung 225: LC-MS Chromatogramm von **80(OH)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1088 (M+H$^+$)) nach Reaktion zwischen **42(OH)**, **78** und PyDiFOP.*

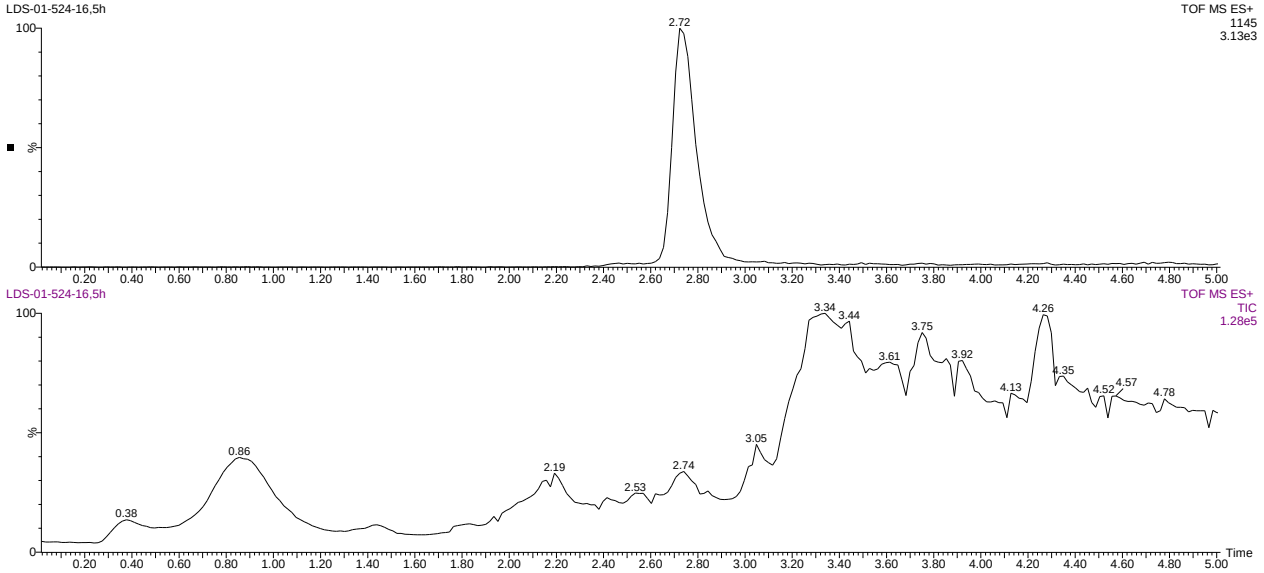


*Abbildung 226: LC-MS Chromatogramm von **81(OH)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1088 (M+H$^+$)) nach Reaktion zwischen **48(OH)**, **78** und PyDiFOP.*

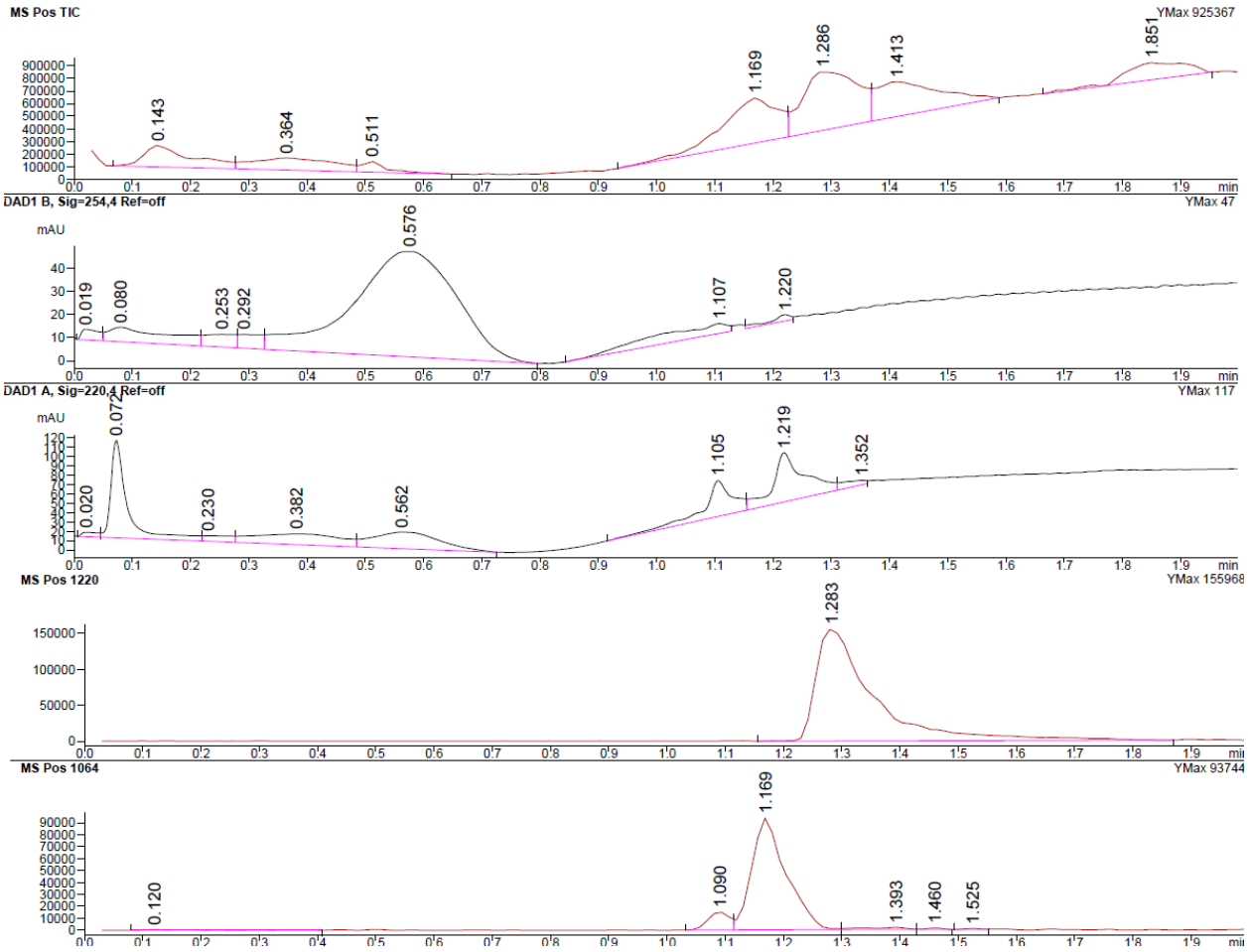


*Abbildung 227: LC-MS Chromatogramm von **108** (m/z (ESI-MS$^+$): 1064 (**108(OH)**+Na$^+$), 1220 (**108(OTIPS)**+Na$^+$)).*

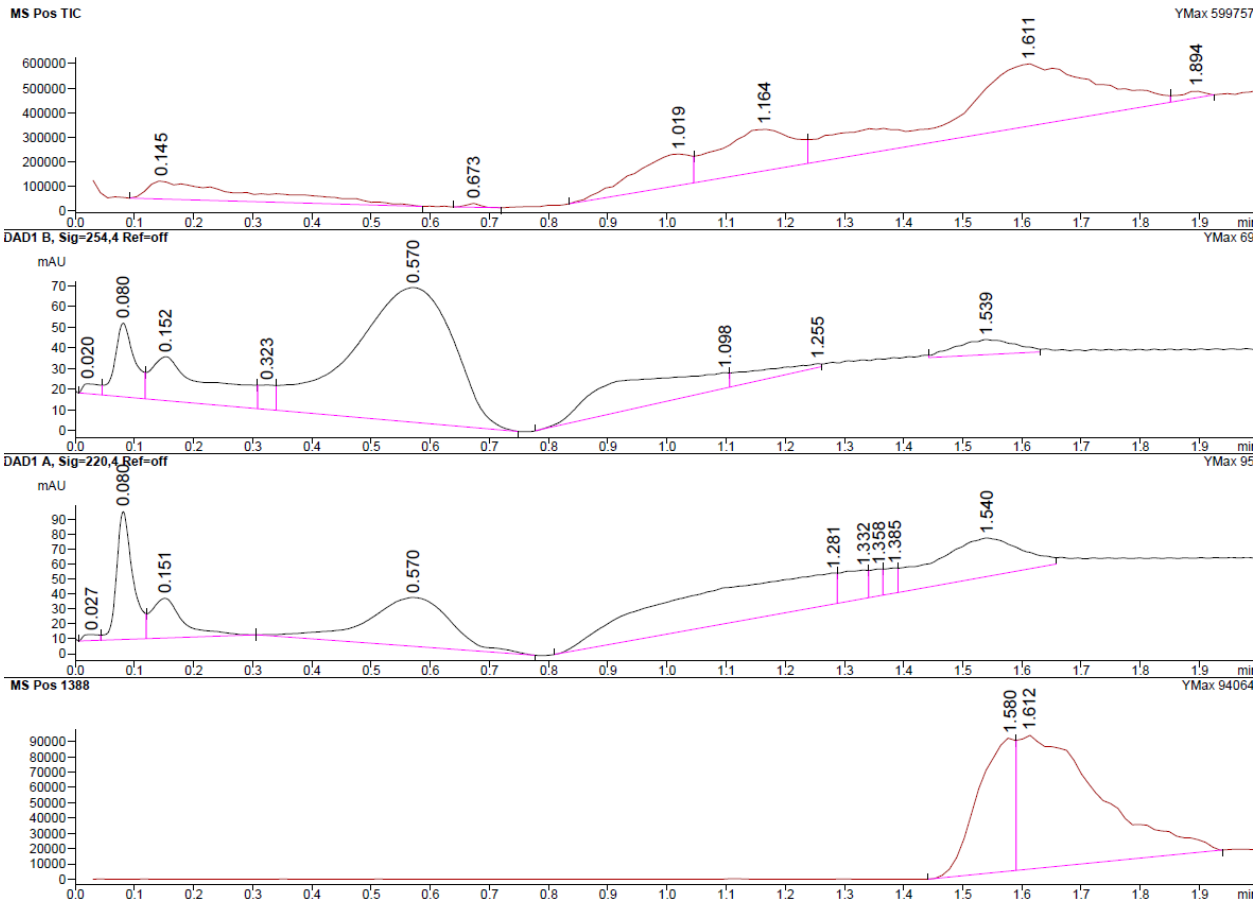


*Abbildung 228: LC-MS Chromatogramm von **109** (m/z (ESI-MS$^+$): 1388(M+Na$^+$)).*

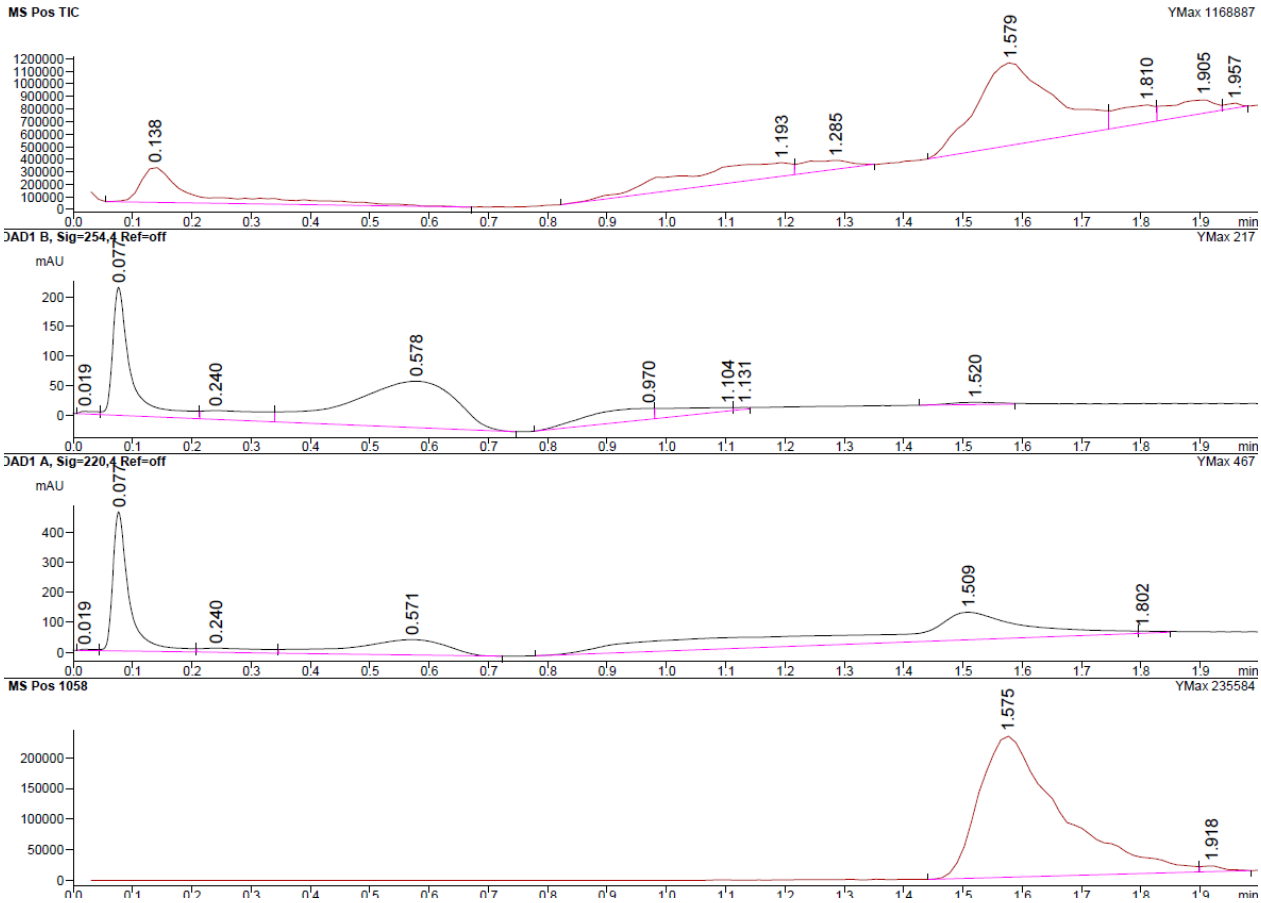


*Abbildung 229: LC-MS Chromatogramm von **110** (m/z (ESI-MS$^+$): 1058(M+H$^+$)).*

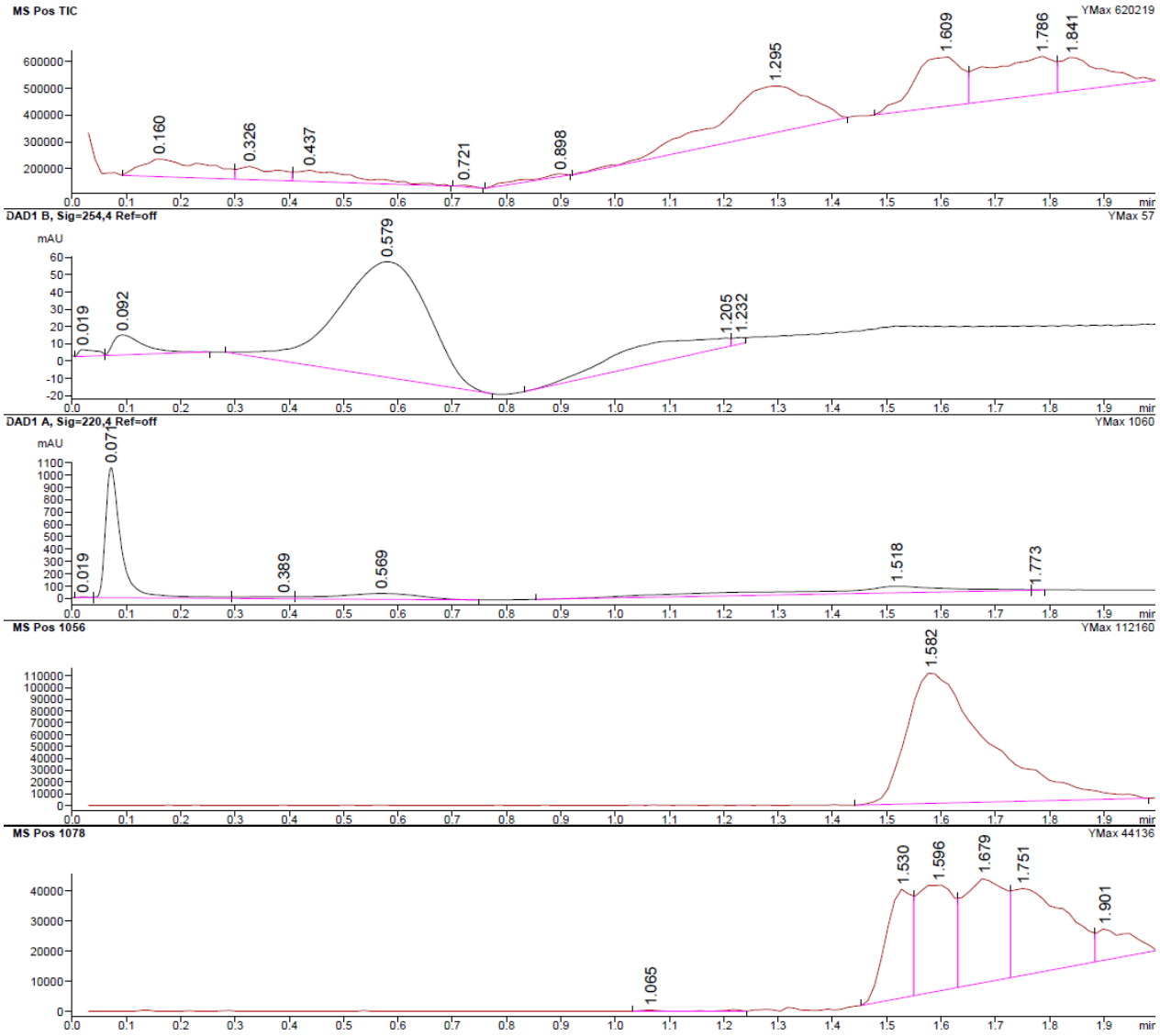


*Abbildung 230: LC-MS Chromatogramm von **111** (m/z (ESI-MS$^+$): 1056 (M+H$^+$), 1078 (M+Na$^+$)).*

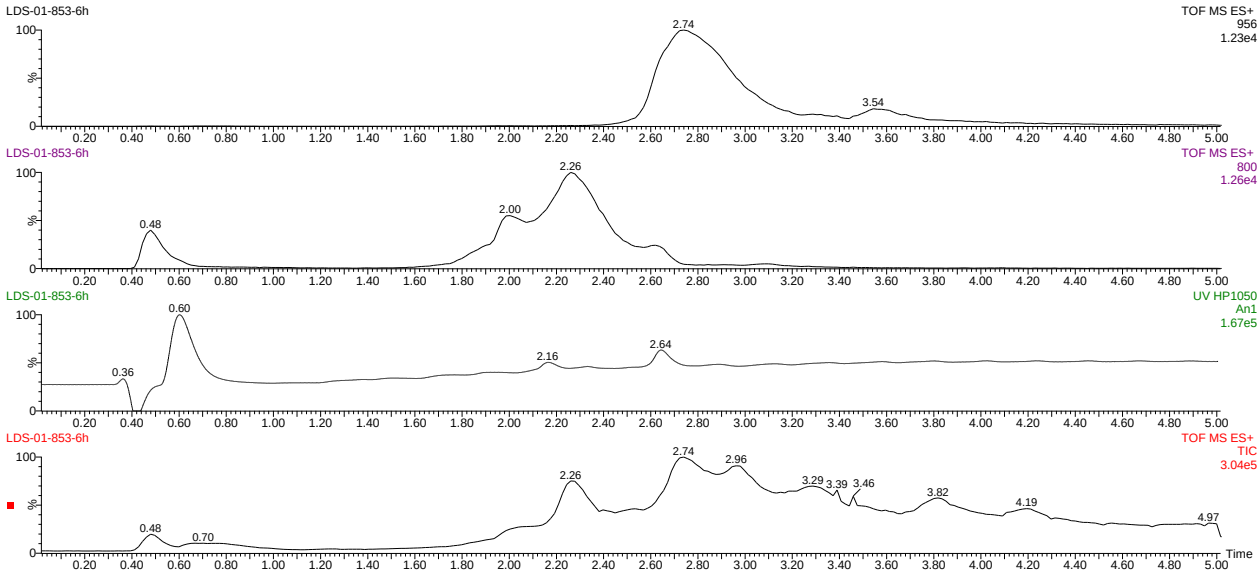


*Abbildung 231: LC-MS Chromatogramm von **112** (m/z (ESI-MS$^+$): 800 (**112(OH)**+H$^+$), 956 (**112(OTIPS)**+H$^+$)).*

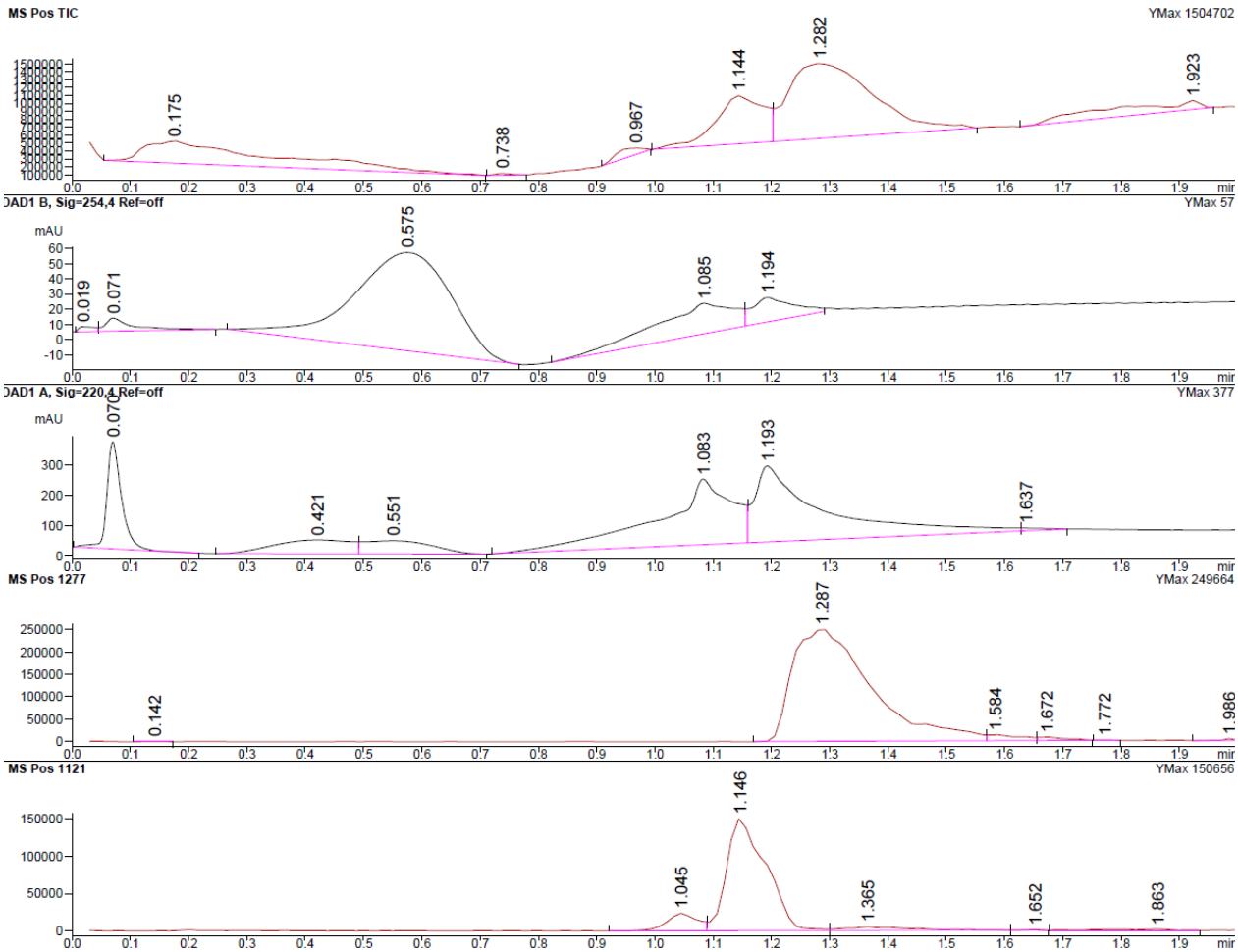


*Abbildung 232: LC-MS Chromatogramm von **113** (m/z (ESI-MS$^+$): 1121 (**113(OH)**+Na$^+$), 1277 (**113(OTIPS)**+Na$^+$)).*

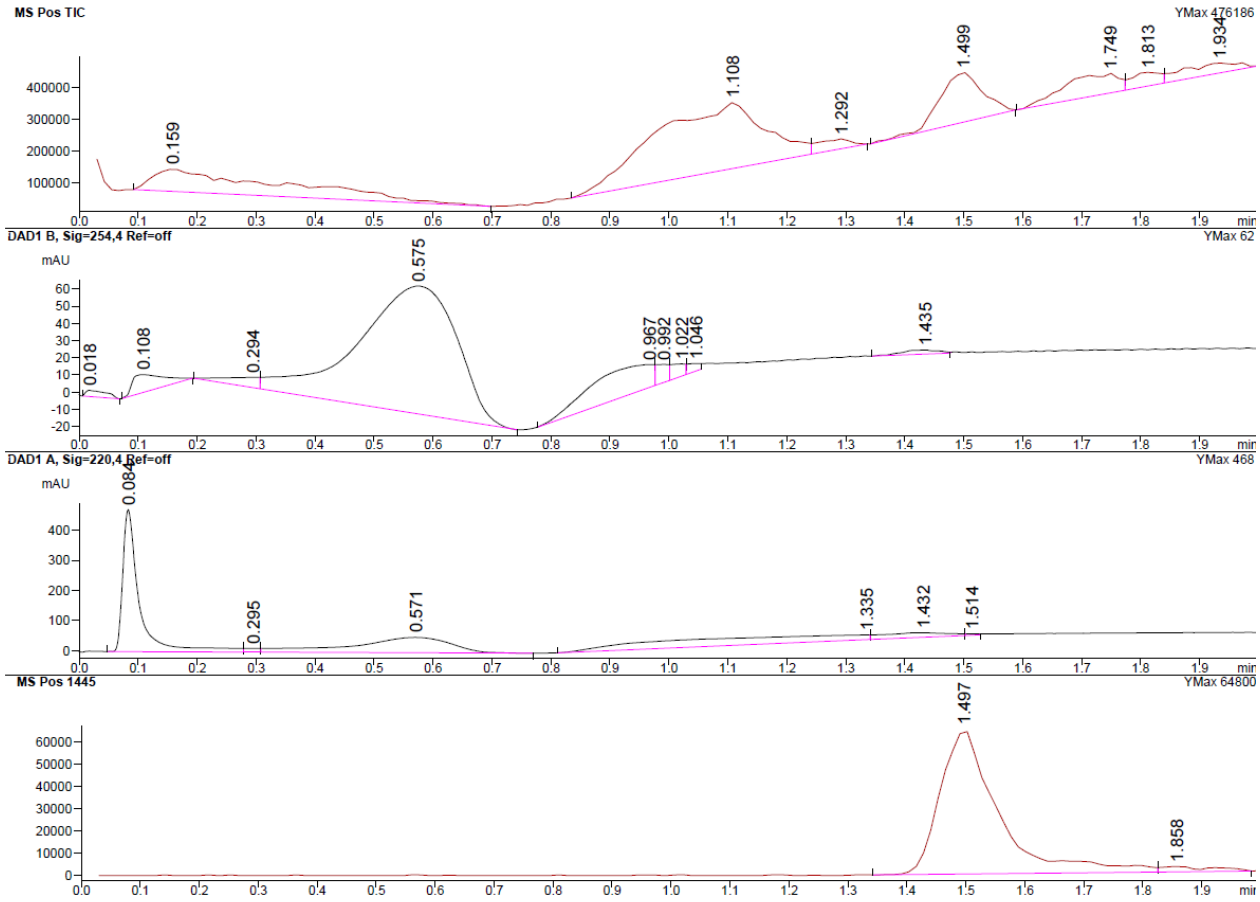


*Abbildung 233: LC-MS Chromatogramm von **114** (m/z (ESI-MS$^+$): 1445(M+Na$^+$)).*

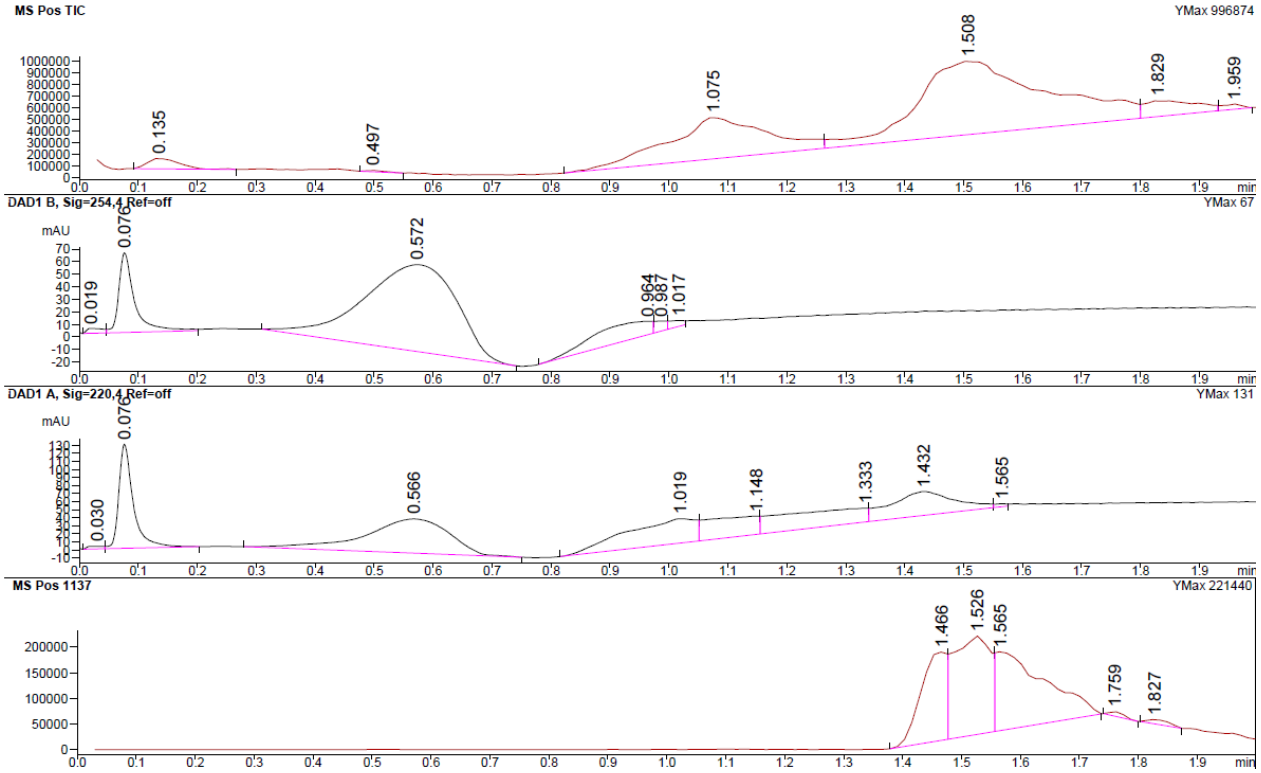


*Abbildung 234: LC-MS Chromatogramm von **115** (m/z (ESI-MS$^+$): 1137(M+Na$^+$)).*

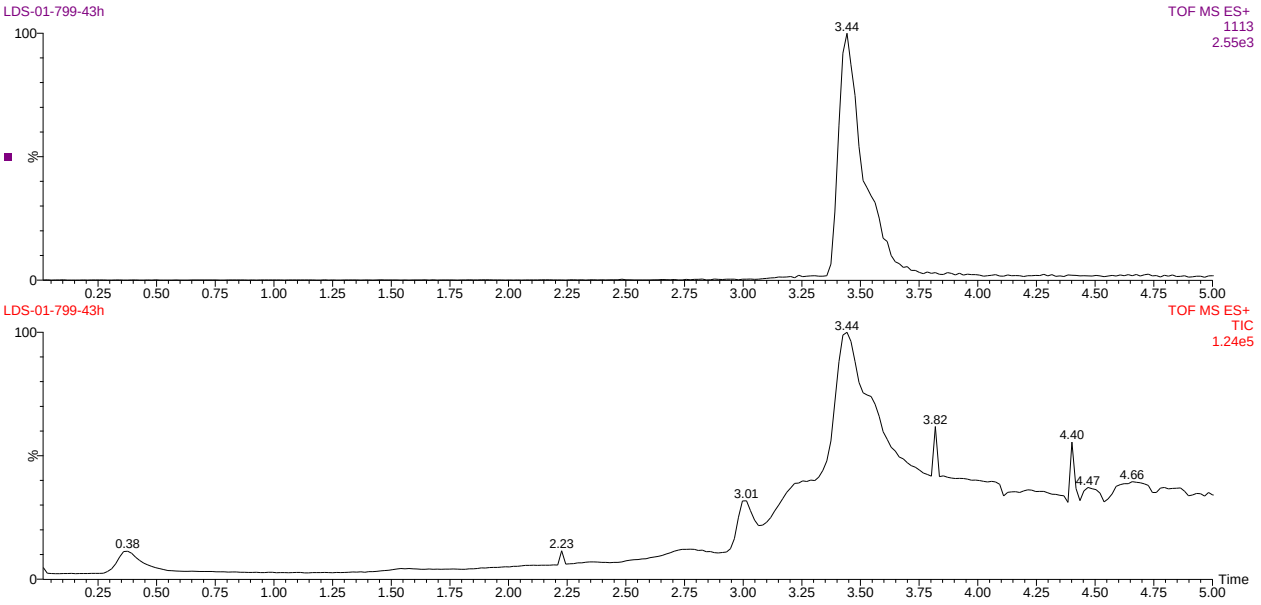


*Abbildung 235: LC-MS Chromatogramm von **116** (m/z (ESI-MS$^+$): 1113 (M+H$^+$)).*

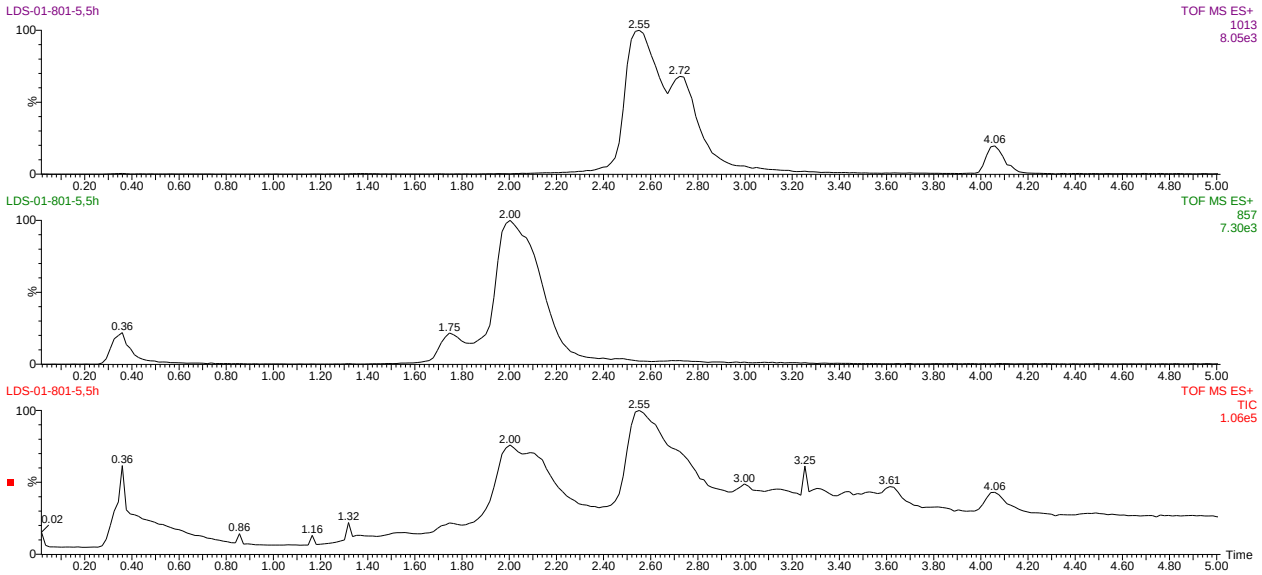


*Abbildung 236: LC-MS Chromatogramm von **117** (m/z (ESI-MS$^+$): 857 (**117(OH)**+H$^+$), 1013 (**117(OTIPS)**+H$^+$)).*

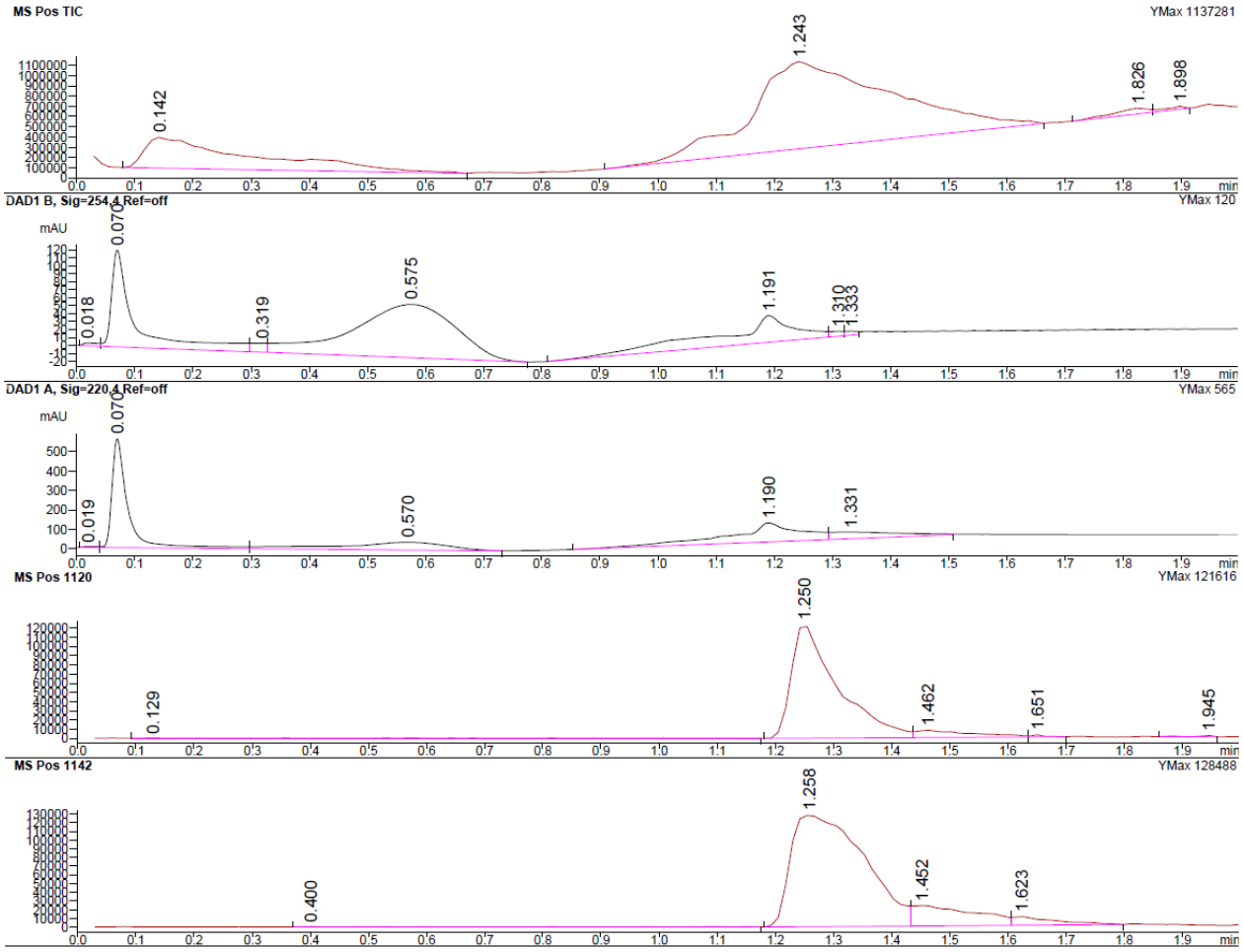


*Abbildung 237: LC-MS Chromatogramm von **121** (m/z (ESI-MS$^+$): 1120 (M+H$^+$), 1142 (M+Na$^+$)).*

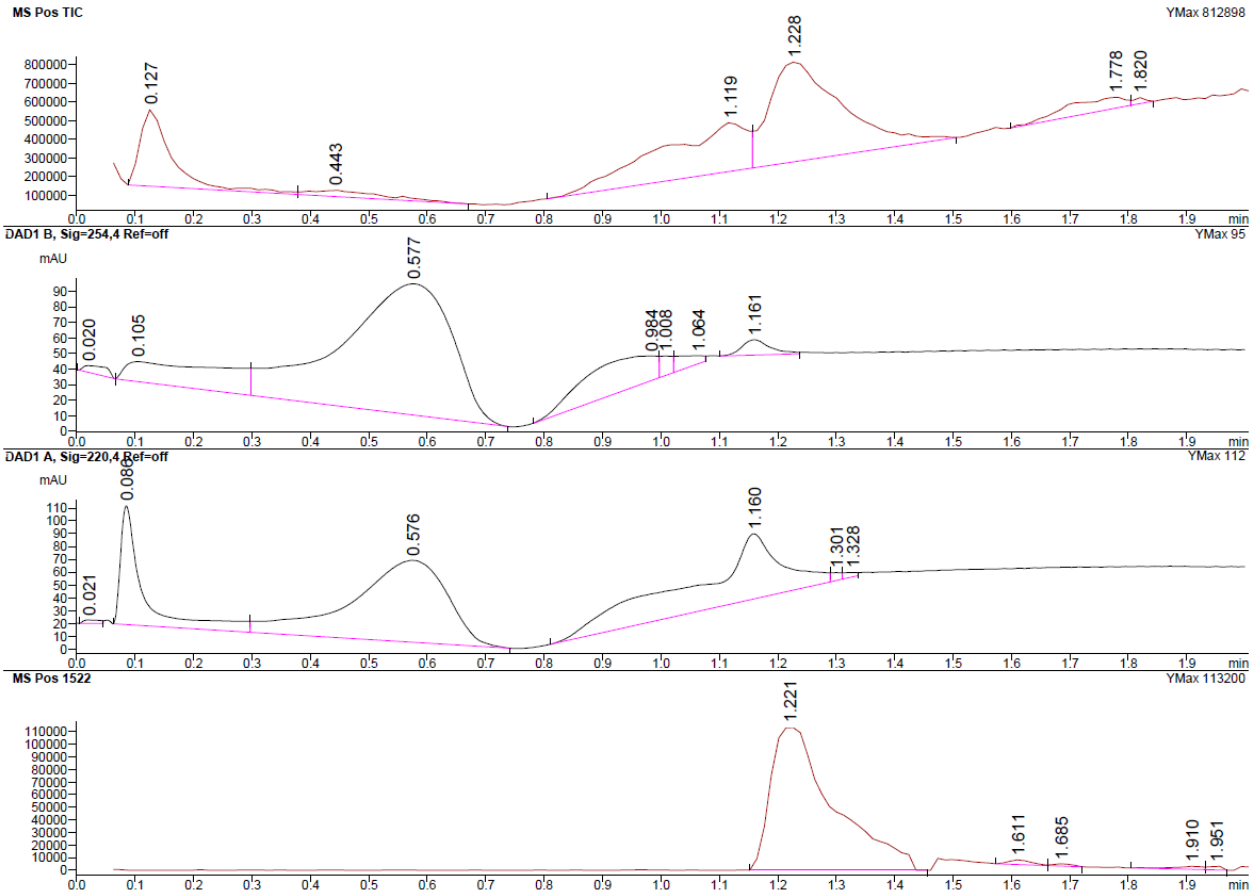


*Abbildung 238: LC-MS Chromatogramm von **124(OTIPS)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1522 (M+Na$^+$)).*

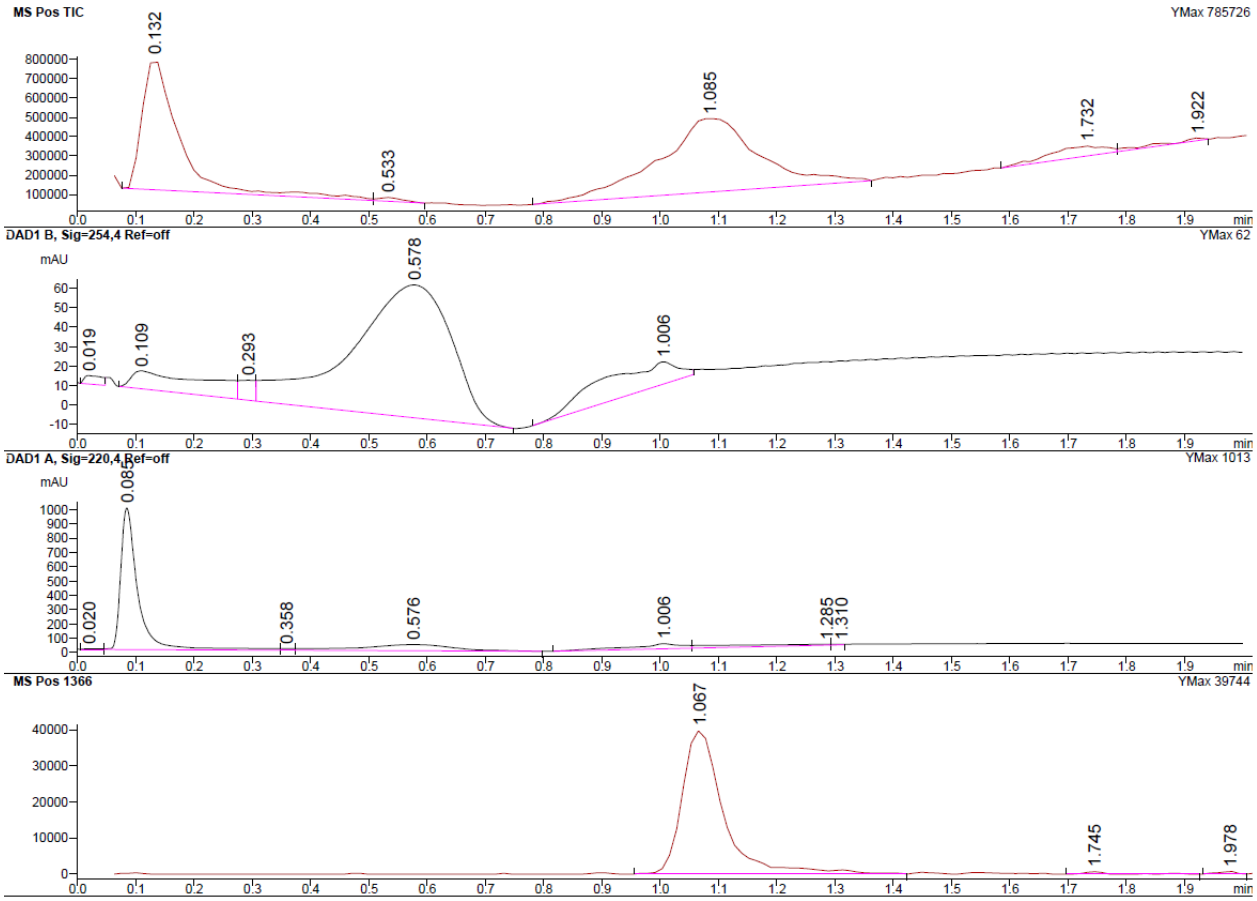


*Abbildung 239: LC-MS Chromatogramm von **124(OH)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1366 (M+Na$^+$)).*

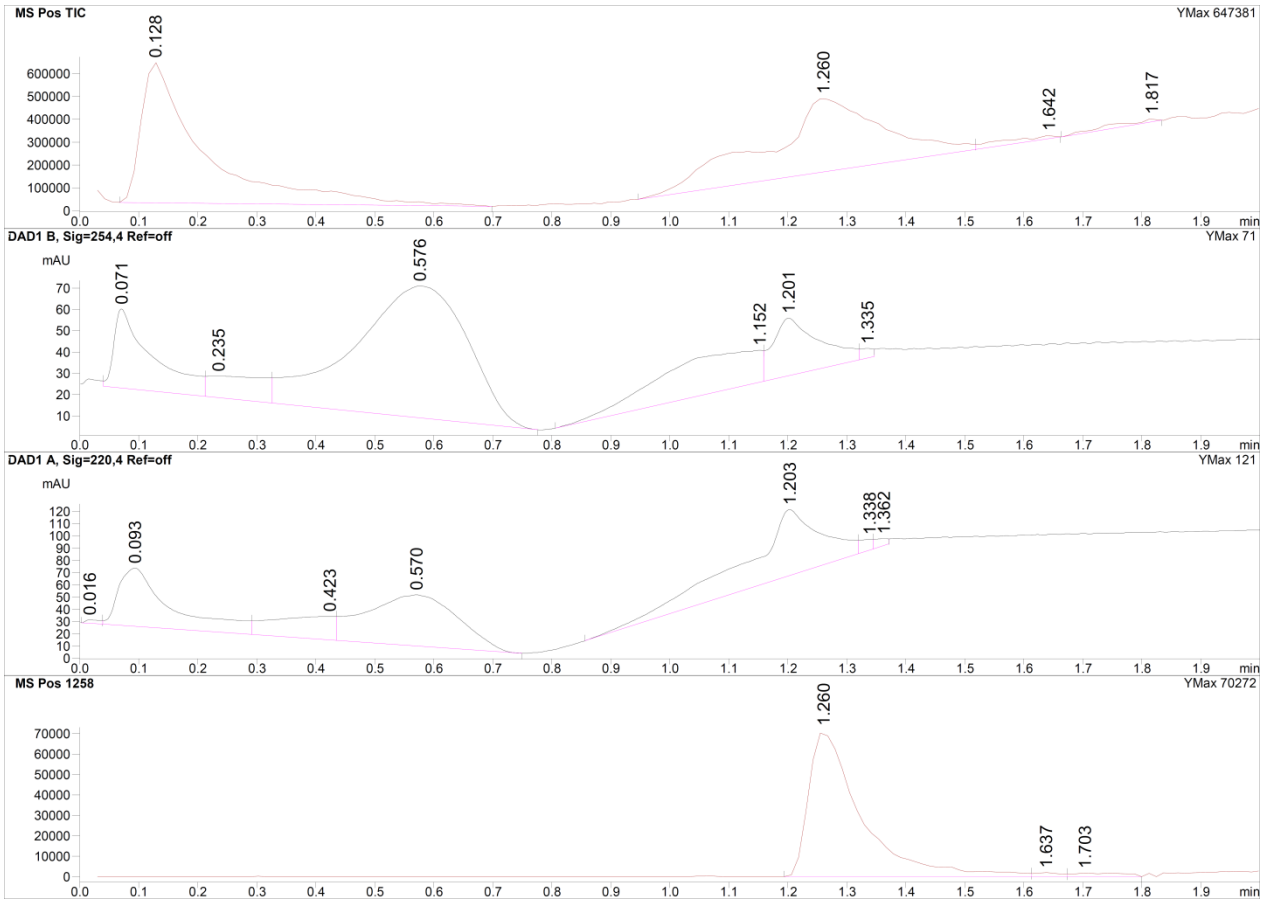


*Abbildung 240: LC-MS Chromatogramm von **125(OTIPS)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1258 (M+H$^+$)).*

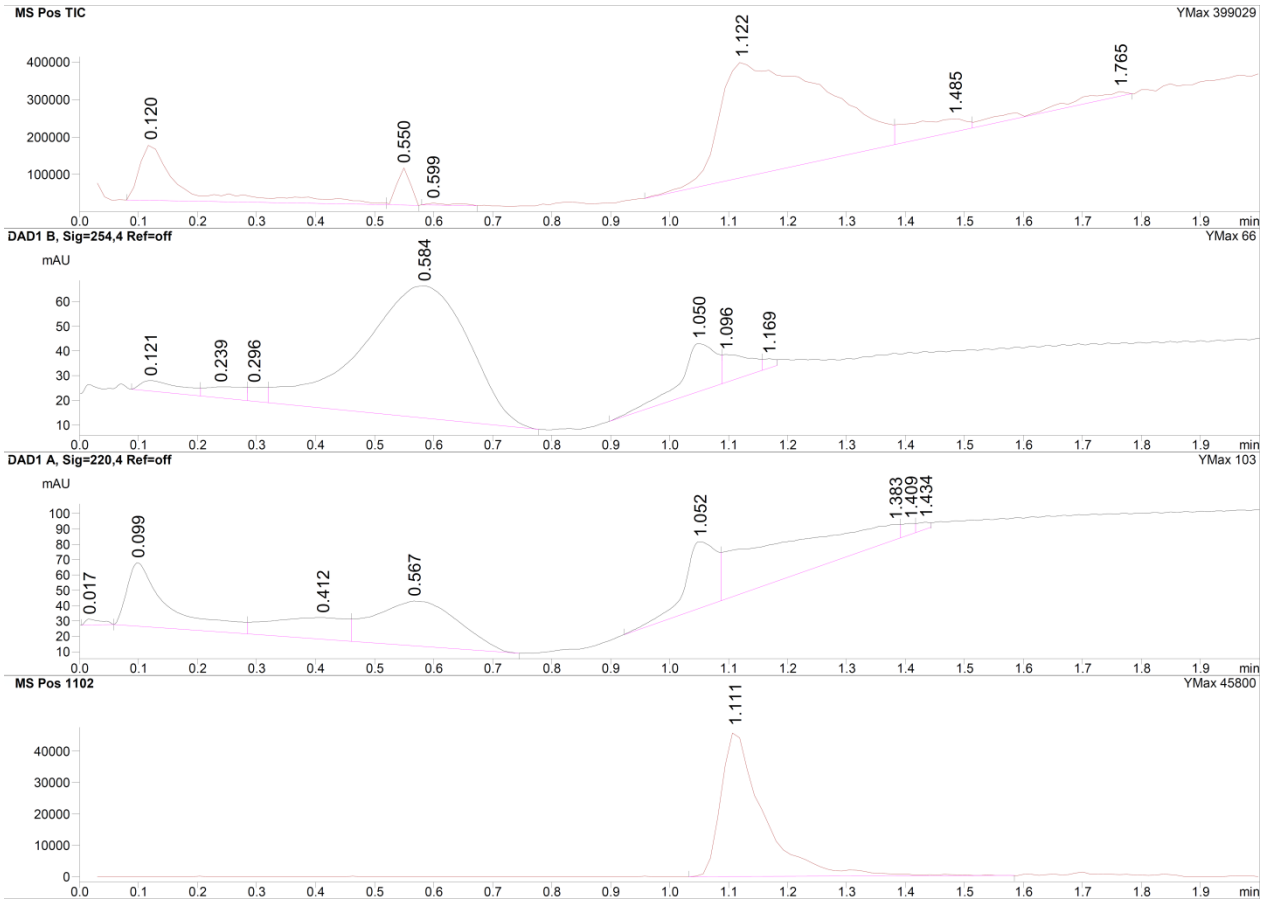


*Abbildung 241: LC-MS Chromatogramm von **125(OH)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1102 (M+H$^+$)).*

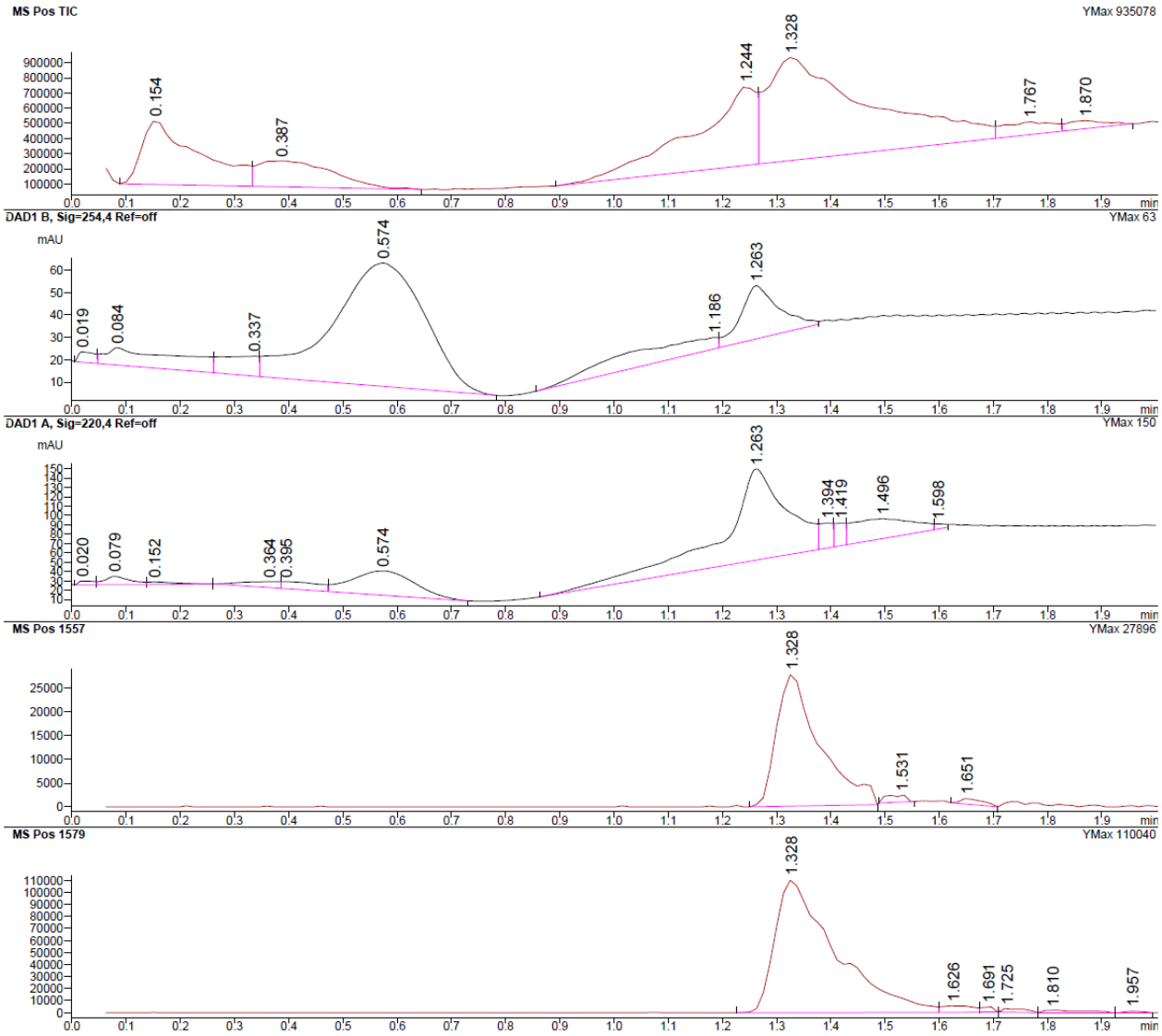


*Abbildung 242: LC-MS Chromatogramm von **126(OTIPS)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1557 (M+ H$^+$), 1579 (M+Na$^+$)).*

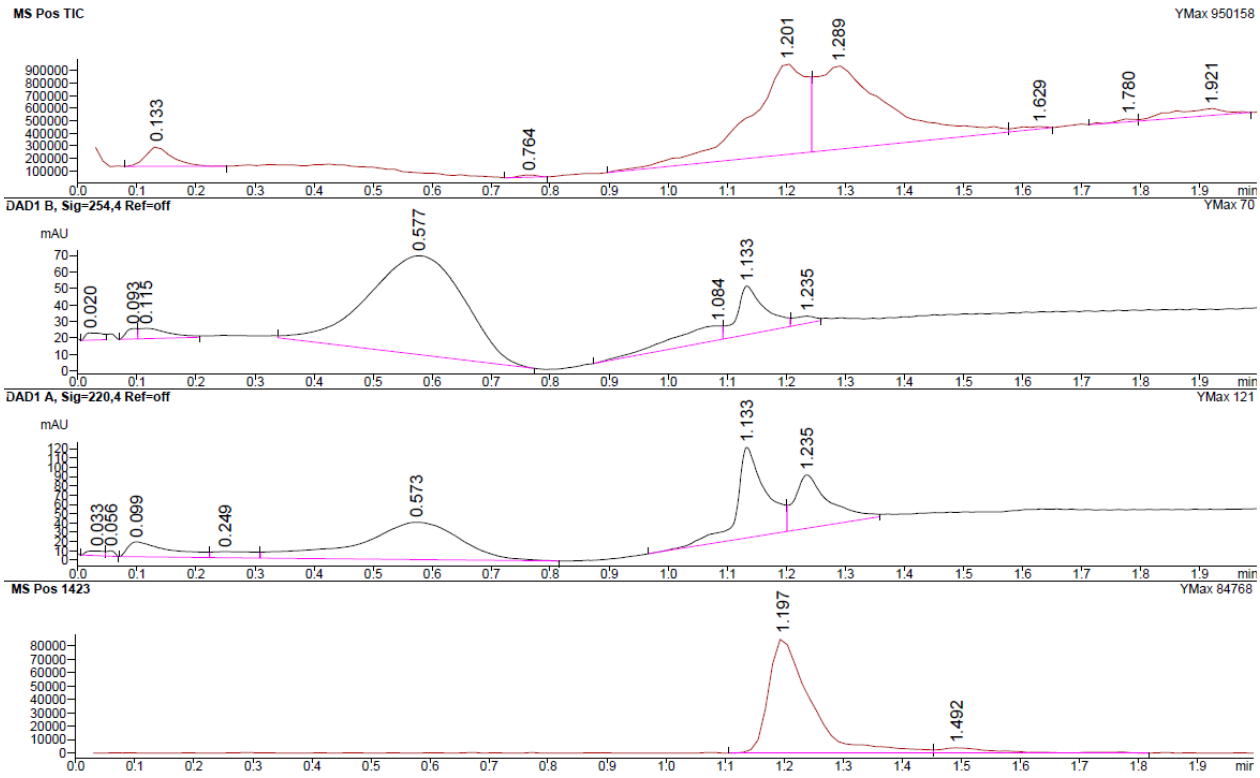


*Abbildung 243: LC-MS Chromatogramm von **126(OH)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1423 (M+Na$^+$)).*

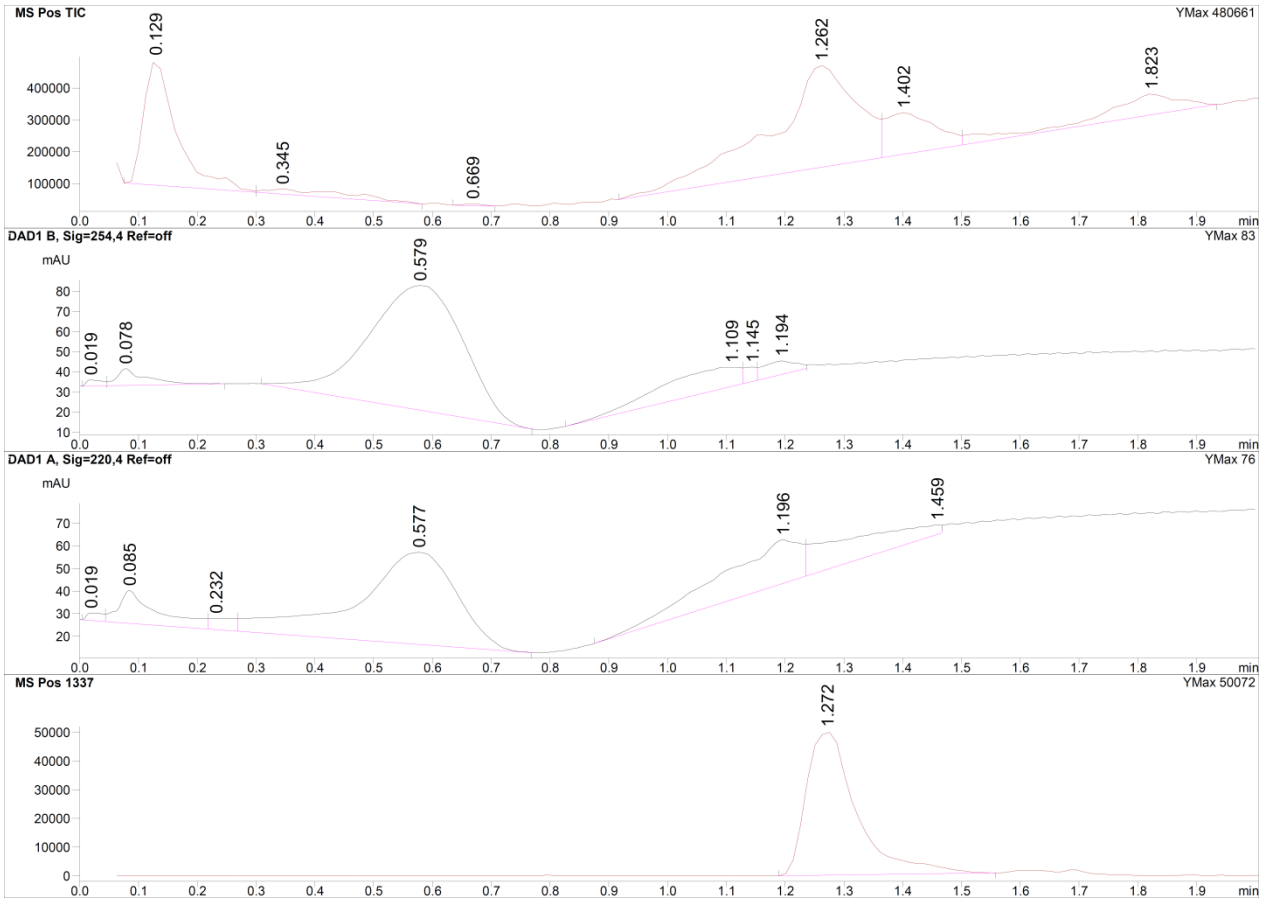


*Abbildung 244: LC-MS Chromatogramm von **127(OTIPS)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1337 (M+Na$^+$)).*

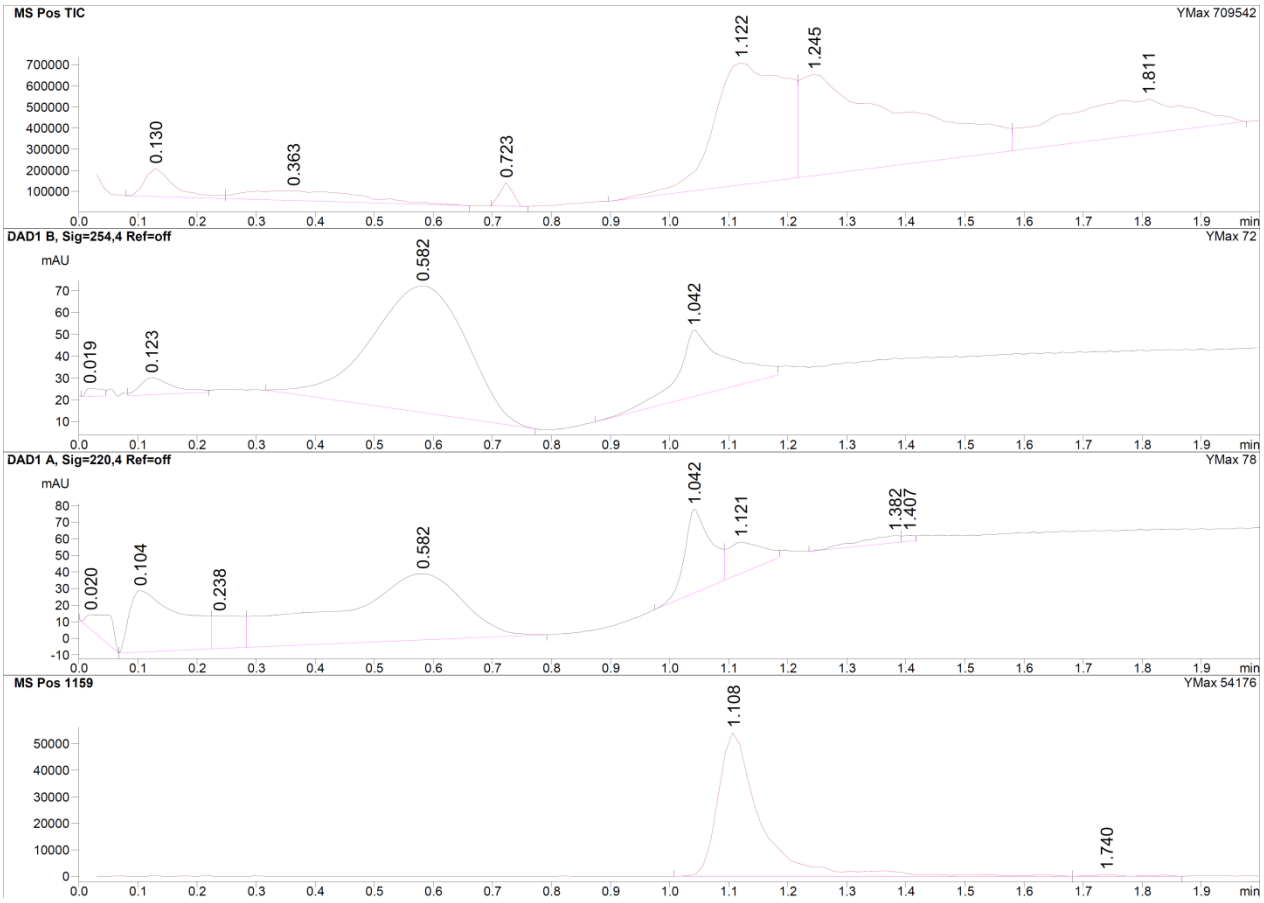


*Abbildung 245: LC-MS Chromatogramm von **127(OH)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1159 (M+H$^+$)).*

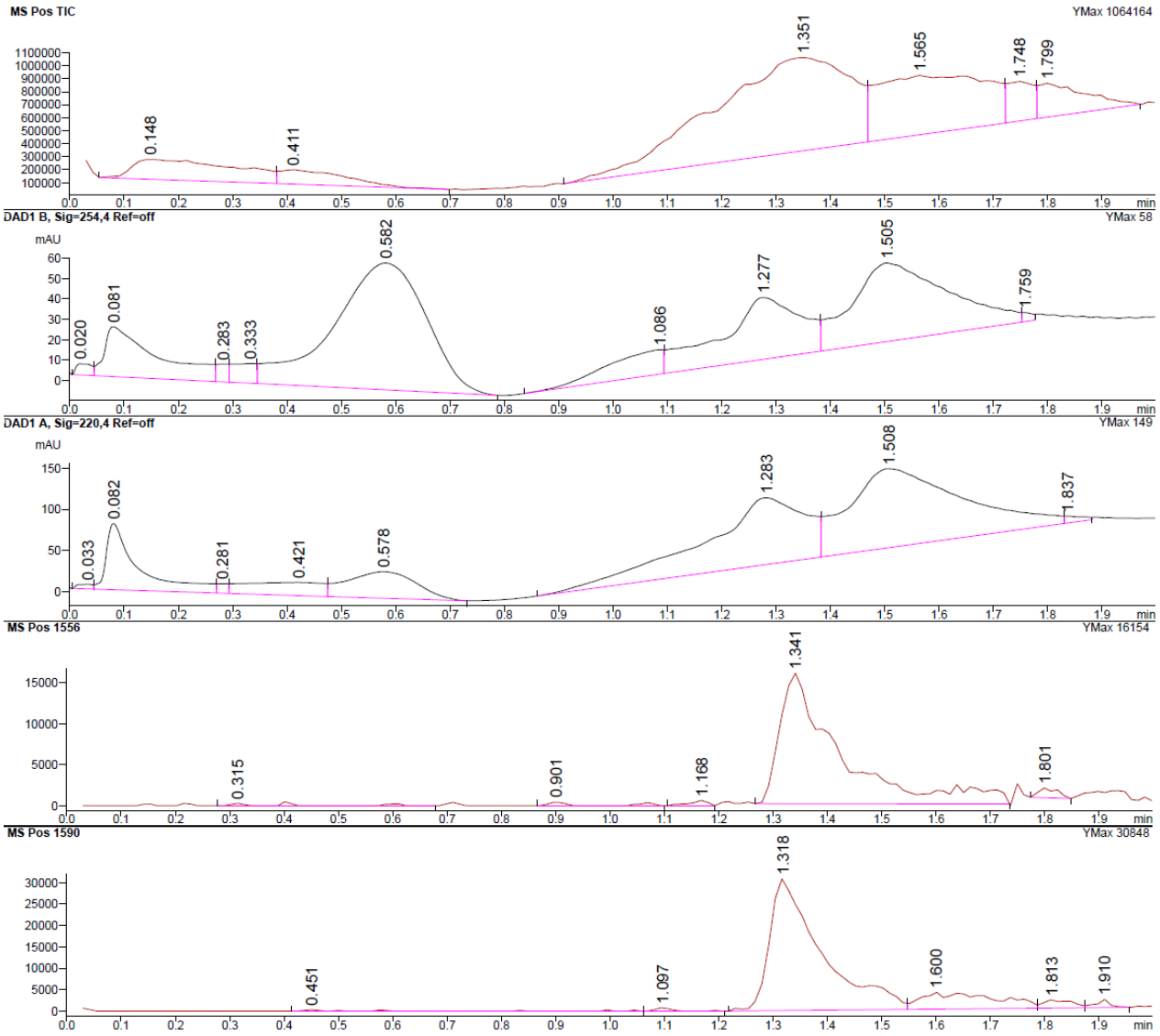


*Abbildung 246: LC-MS Chromatogramm von Mischung aus **128(OTIPS)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1556 (M+Na$^+$)) und **129(OTIPS)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1590 (M+Na$^+$)).*

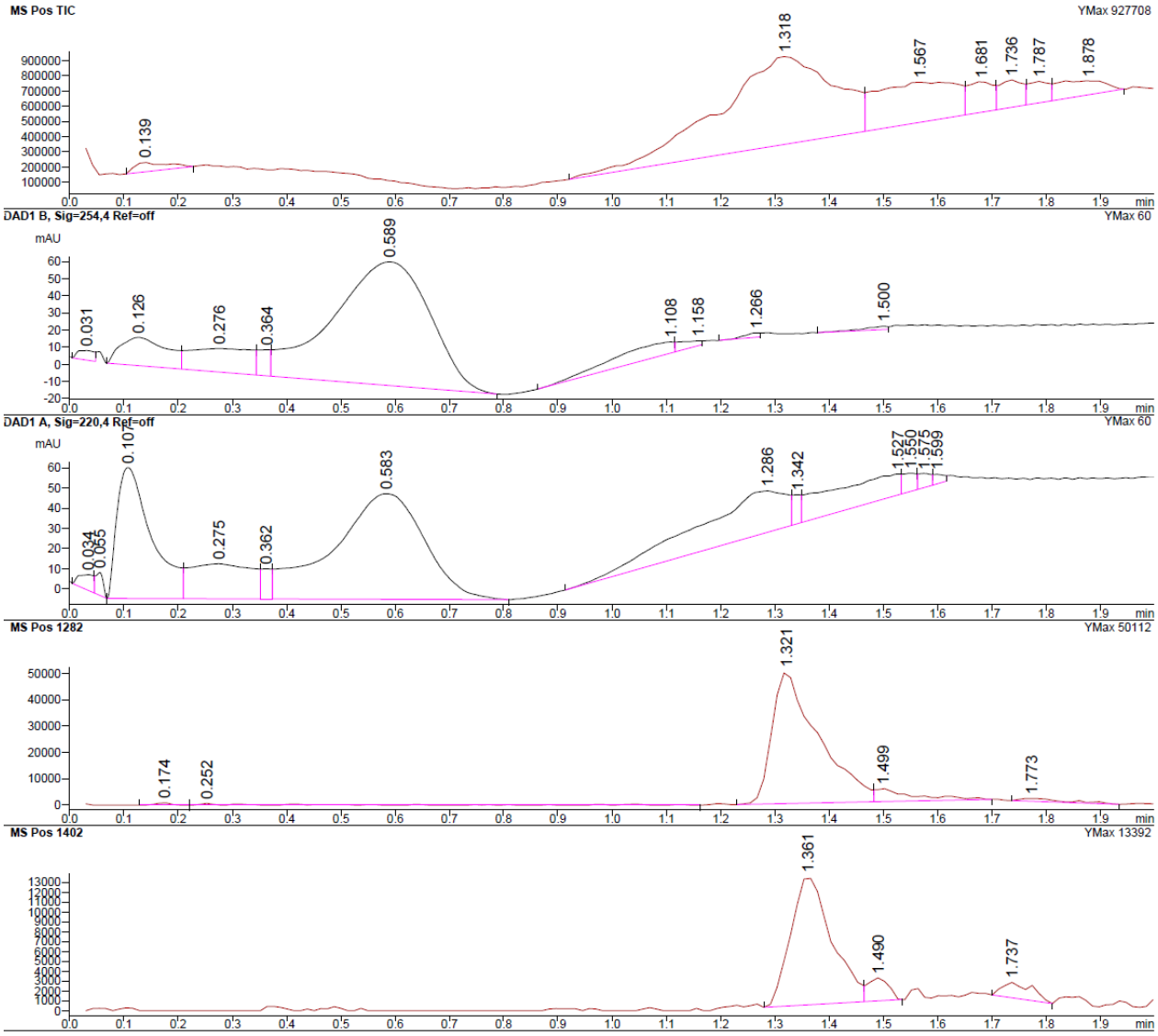


*Abbildung 247: LC-MS Chromatogramm von Mischung aus **131(OTIPS)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1282 (M+Na$^+$)) und **132(OTIPS)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1402 (M+Na$^+$)).*

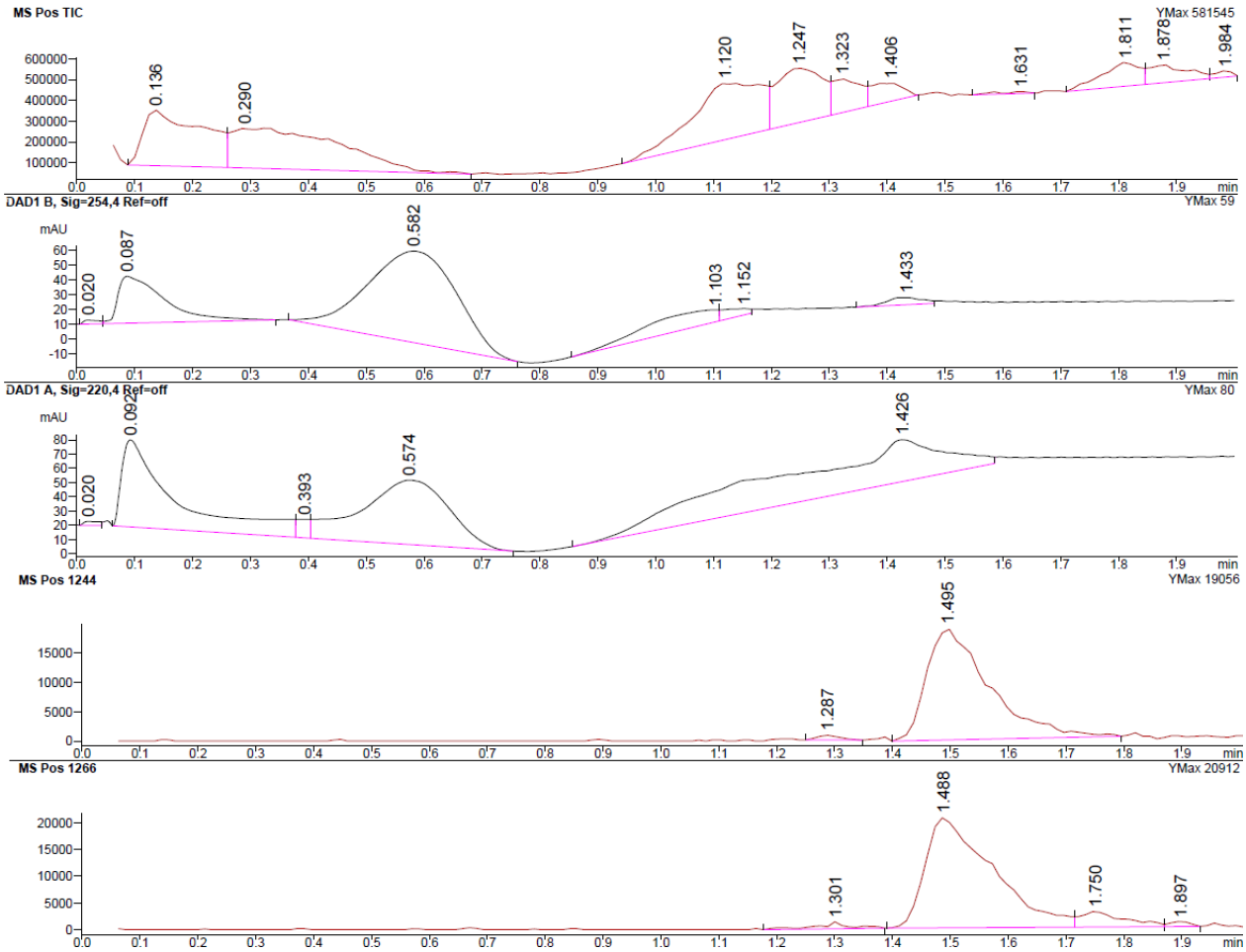


*Abbildung 248: LC-MS Chromatogramm von **80(OTIPS)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1244 (M+H$^+$), 1266 (M+Na$^+$)).*

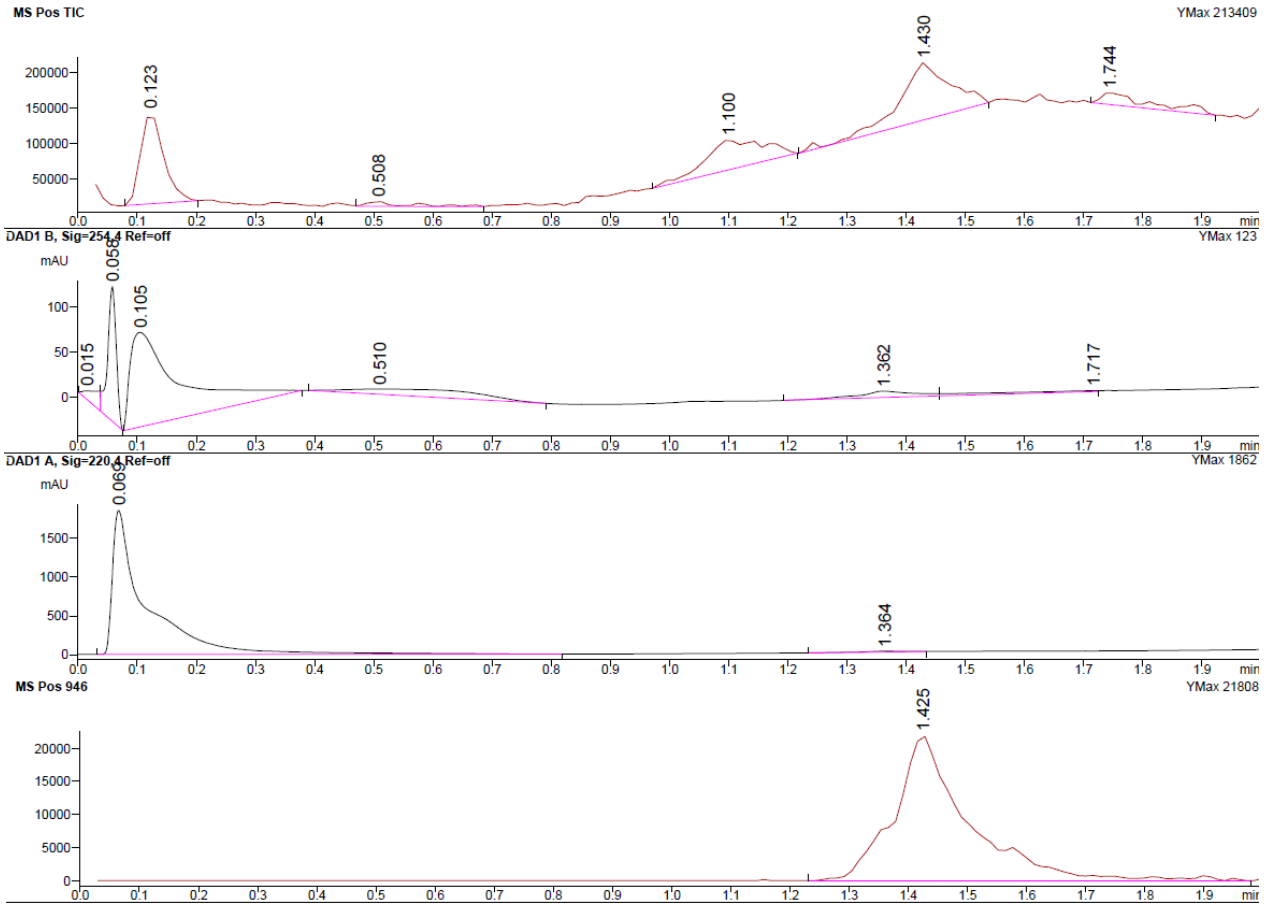


*Abbildung 249: LC-MS Chromatogramm von **138** (m/z (ESI-MS$^+$): 946 (M+H$^+$)).*

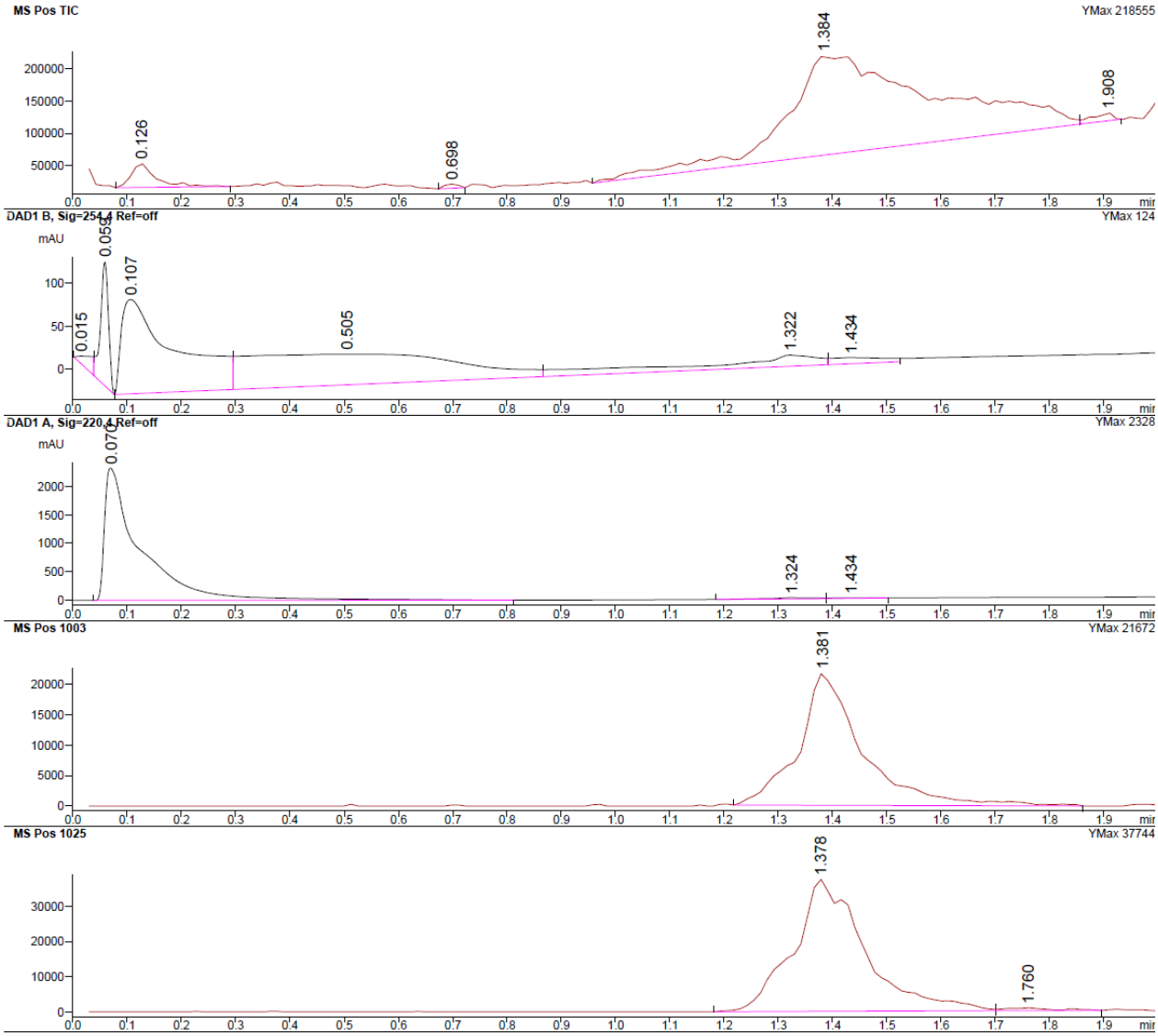


*Abbildung 250: LC-MS Chromatogramm von **139** (m/z (ESI-MS$^+$): 1003 (M+H$^+$), 1025 (M+Na$^+$)).*

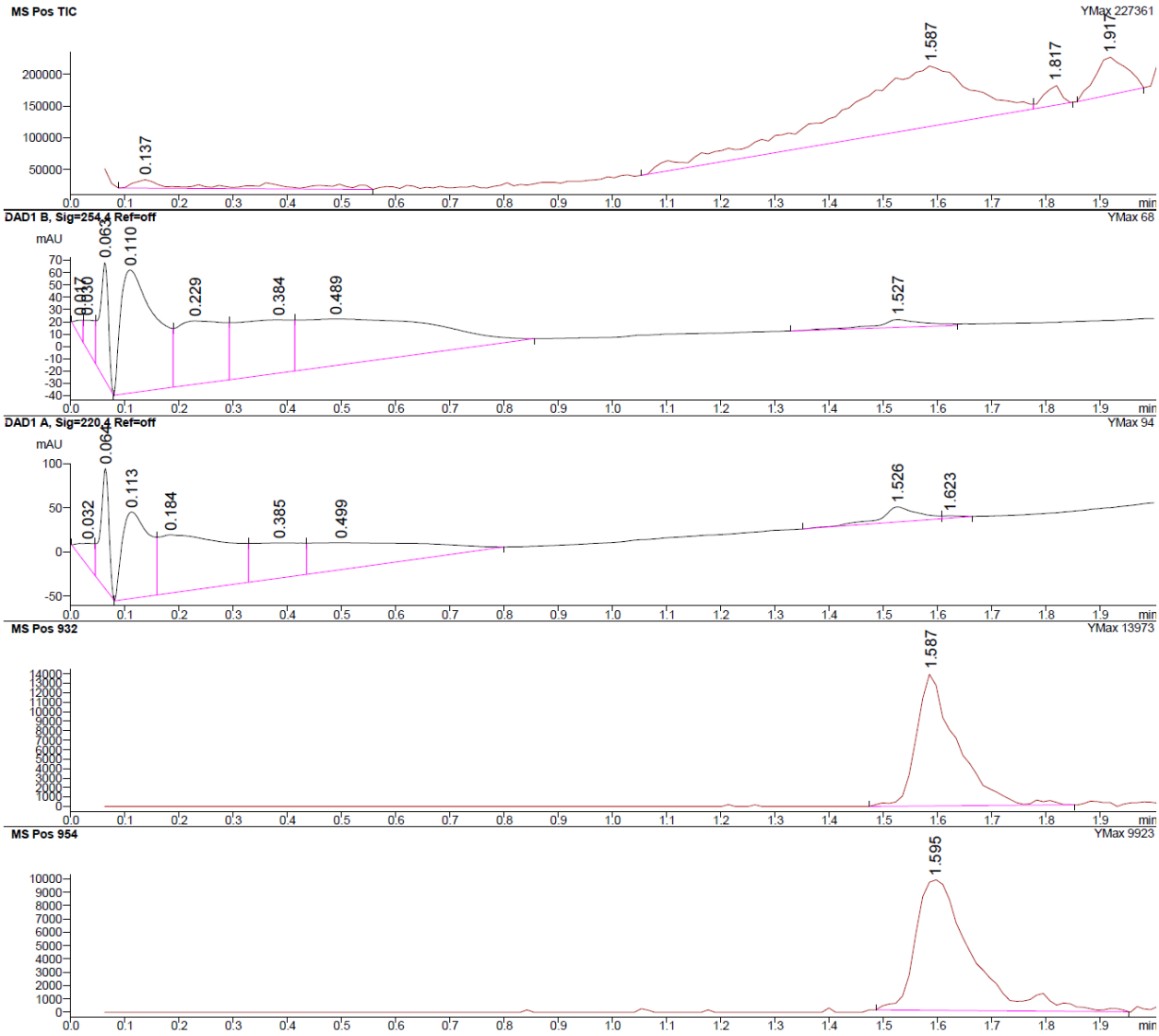


*Abbildung 251: LC-MS Chromatogramm von **137** (m/z (ESI-MS$^+$): 932 (M+H$^+$), 954 (M+Na$^+$)).*

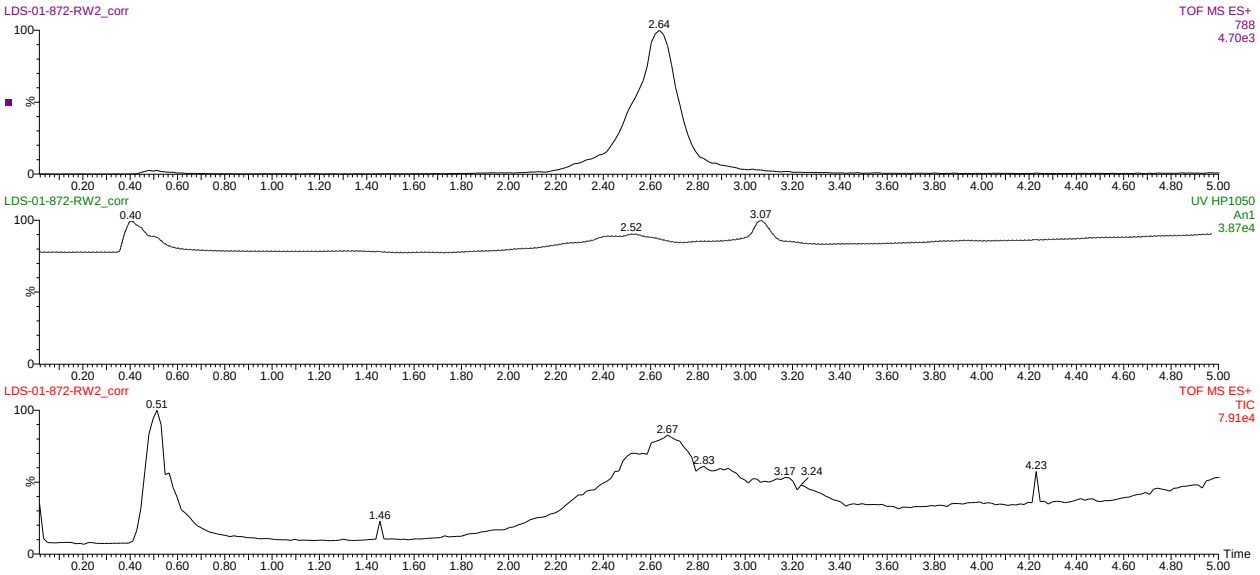


*Abbildung 252: LC-MS Chromatogramm von **4(Disulfid)** (m/z (ESI-MS$^+$): 788 (M+H$^+$)).*

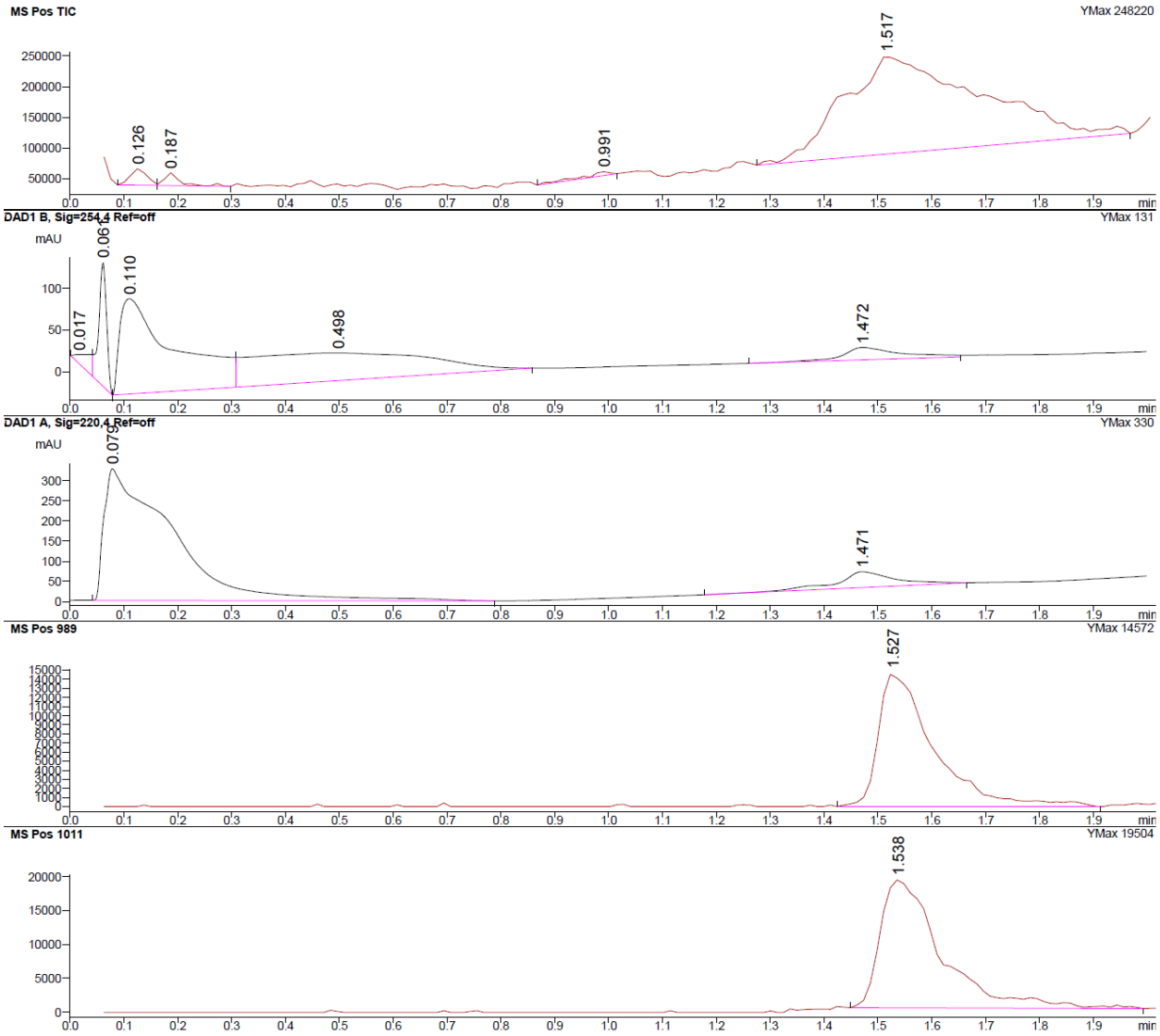


*Abbildung 253: LC-MS Chromatogramm von **140** (m/z (ESI-MS$^+$): 989 (M+H$^+$), 1011 (M+Na$^+$)).*

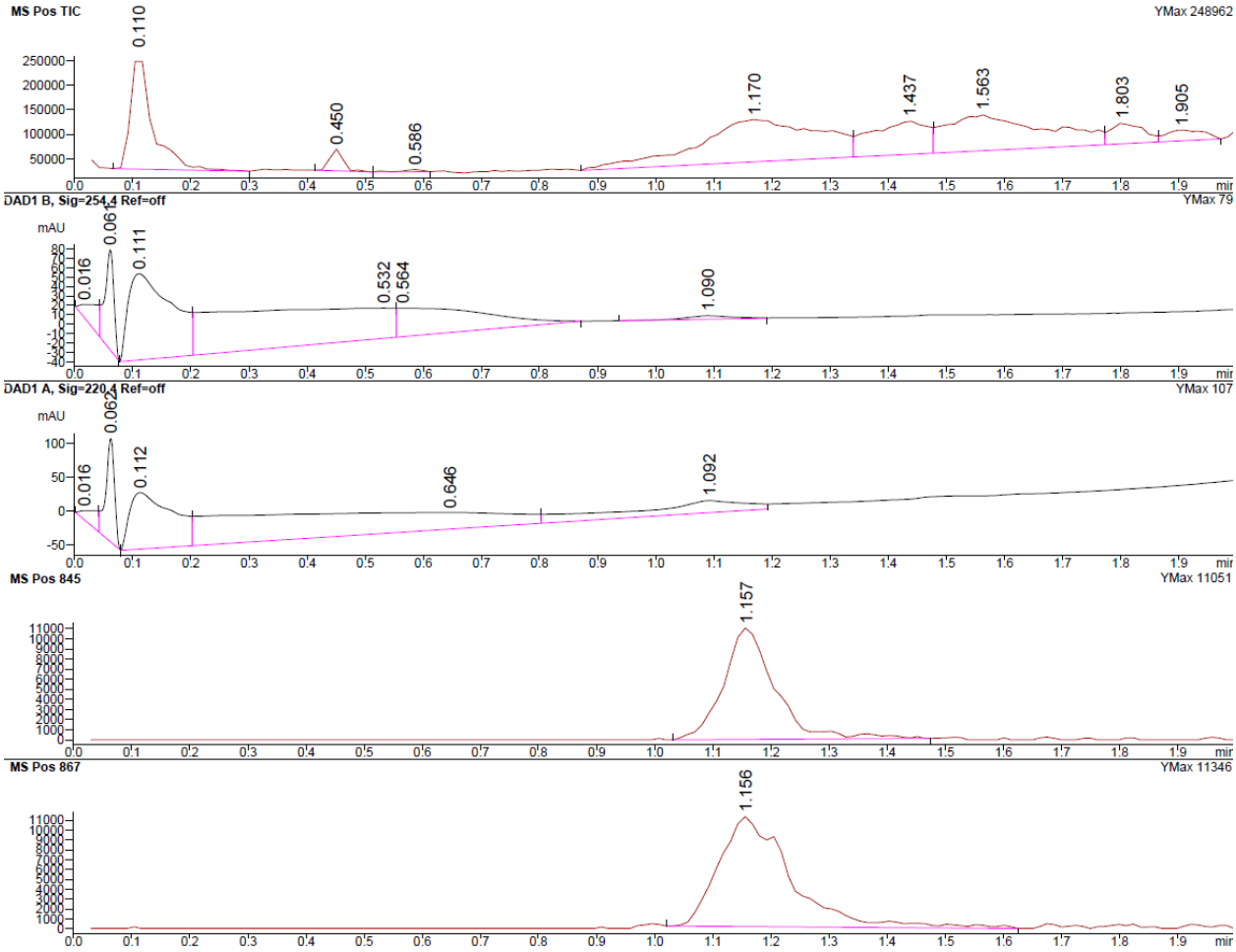


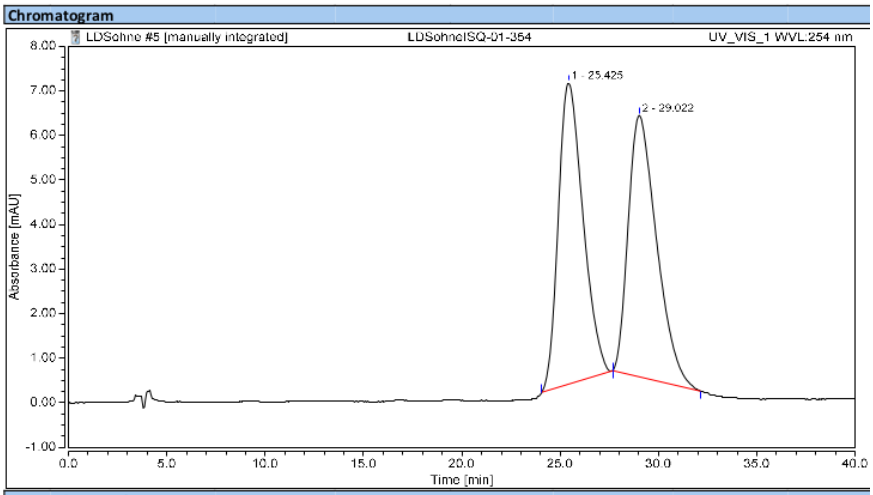
*Abbildung 254: LC-MS Chromatogramm von **5(Disulfid)** (m/z (ESI-MS$^+$): 845 (M+H$^+$), 867 (M+Na$^+$)).*

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	**LDSohneISQ-01-354**	*Run Time (min):*	**40.00**
Vial Number:	**RE8**	*Injection Volume:*	**1.00**
Injection Type:	**Unknown**	*Channel:*	**UV_VIS_1**
Calibration Level:		*Wavelength:*	**254**
Instrument Method:	**40min02.5IPA_1mL**	*Bandwidth:*	**n.a.**
Processing Method:	**Basic Quantitative**	*Dilution Factor:*	**1.0000**
Injection Date/Time:	**14/Jan/19 10:52**	*Sample Weight:*	**1.0000**

Chromatogram



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		25.425	9.810	6.767	49.97	53.55	n.a.
2		29.022	9.822	5.870	50.03	46.45	n.a.
Total:			**19.632**	**12.637**	**100.00**	**100.00**	

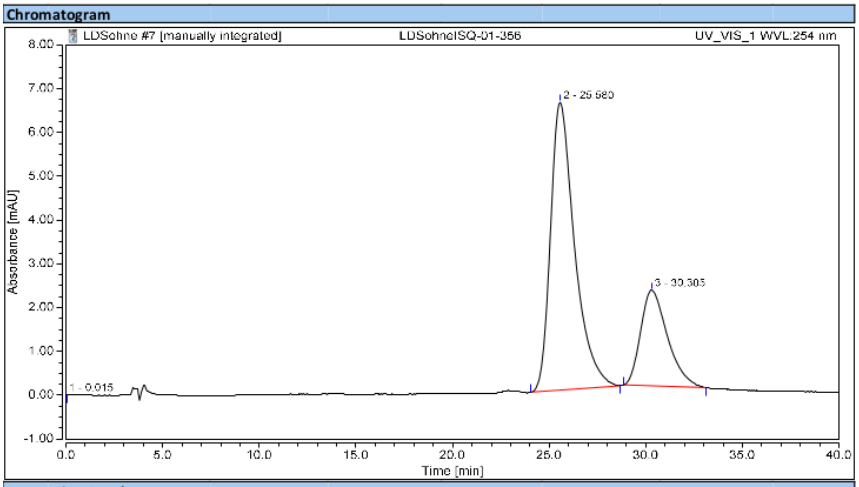
*Abbildung 255: Chirale HPLC von rac-Alkohol **180**.*

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	**LDSohneISQ-01-356**	*Run Time (min):*	**40.00**
Vial Number:	**RE7**	*Injection Volume:*	**1.00**
Injection Type:	**Unknown**	*Channel:*	**UV_VIS_1**
Calibration Level:		*Wavelength:*	**254**
Instrument Method:	**40min02.5IPA_1mL**	*Bandwidth:*	**n.a.**
Processing Method:	**Basic Quantitative**	*Dilution Factor:*	**1.0000**
Injection Date/Time:	**16/Jan/19 10:28**	*Sample Weight:*	**1.0000**

Chromatogram



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		0.015	0.001	0.028	0.01	0.32	n.a.
2		25.580	9.466	6.573	72.91	74.79	n.a.
3		30.305	3.516	2.187	27.08	24.89	n.a.
Total:			**12.982**	**8.788**	**100.00**	**100.00**	

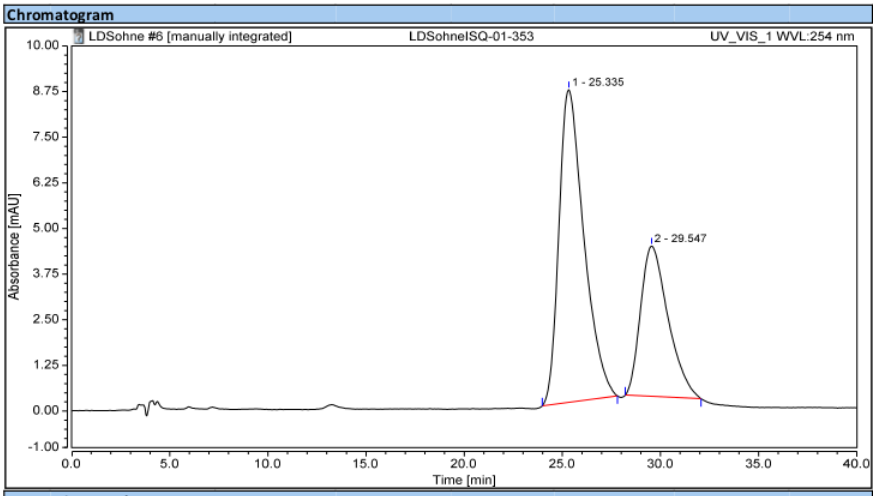
*Abbildung 256: Chirale HPLC von (R)-Alkohol **166** unter Verwendung von Cinchonidin **181.***

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	**LDSohneISQ-01-353**	*Run Time (min):*	**40.00**
Vial Number:	**RE7**	*Injection Volume:*	**1.00**
Injection Type:	**Unknown**	*Channel:*	**UV_VIS_1**
Calibration Level:		*Wavelength:*	**254**
Instrument Method:	**40min02.5IPA_1mL**	*Bandwidth:*	**n.a.**
Processing Method:	**Basic Quantitative**	*Dilution Factor:*	**1.0000**
Injection Date/Time:	**14/Jan/19 12:11**	*Sample Weight:*	**1.0000**

Chromatogram



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		25.335	12.607	8.565	65.34	67.52	n.a.
2		29.547	6.689	4.120	34.66	32.48	n.a.
Total:			**19.295**	**12.685**	**100.00**	**100.00**	

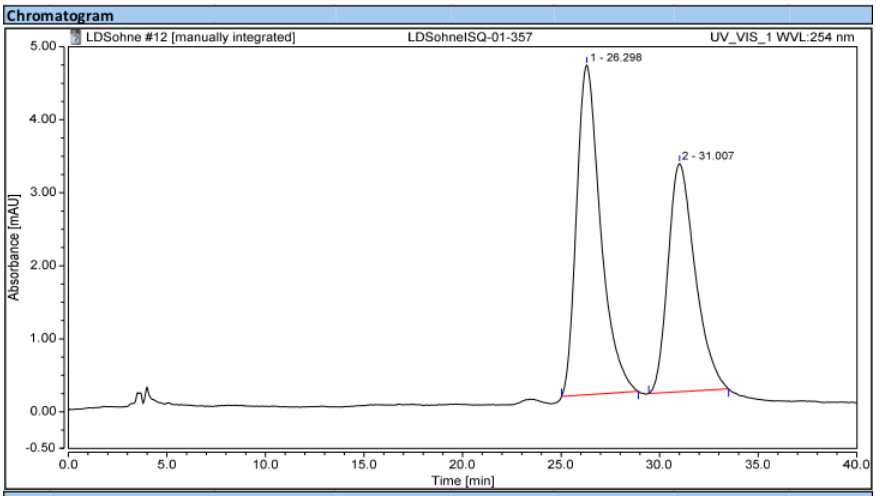
*Abbildung 257: Chirale HPLC von (R)-Alkohol **166** unter Verwendung von Cinchonidin **181** und Pyridin.*

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	**LDSohnelSQ-01-357**	*Run Time (min):*	**40.00**
Vial Number:	**RE7**	*Injection Volume:*	**1.00**
Injection Type:	**Unknown**	*Channel:*	**UV_VIS_1**
Calibration Level:		*Wavelength:*	**254**
Instrument Method:	**40min02.5IPA_1mL**	*Bandwidth:*	**n.a.**
Processing Method:	**Basic Quantitative**	*Dilution Factor:*	**1.0000**
Injection Date/Time:	**18/Jan/19 09:04**	*Sample Weight:*	**1.0000**

Chromatogram



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		26.298	6.380	4.519	56.16	59.10	n.a.
2		31.007	4.980	3.128	43.84	40.90	n.a.
Total:			**11.360**	**7.646**	**100.00**	**100.00**	

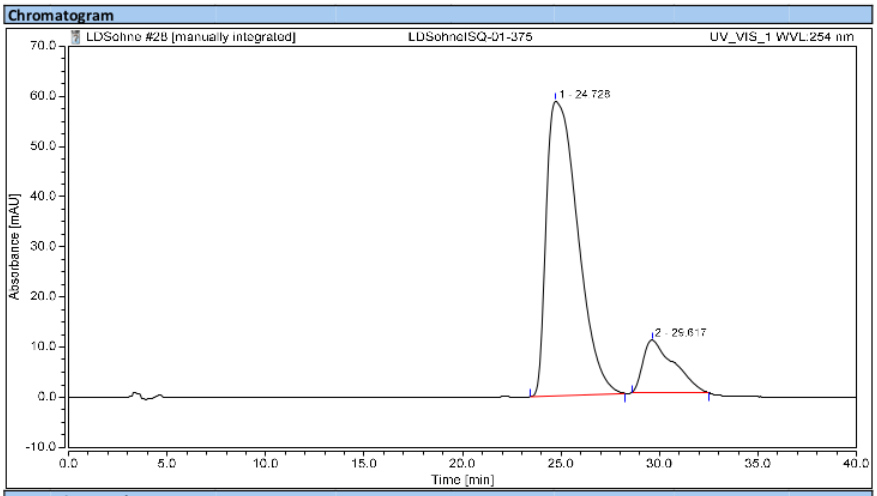
*Abbildung 258: Chirale HPLC von (R)-Alkohol **166** unter Verwendung von **(R)-BINOL**.*

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	**LDSohnelSQ-01-375**	*Run Time (min):*	**40.00**
Vial Number:	**RE7**	*Injection Volume:*	**10.00**
Injection Type:	**Unknown**	*Channel:*	**UV_VIS_1**
Calibration Level:		*Wavelength:*	**254**
Instrument Method:	**40min02.5IPA_1mL**	*Bandwidth:*	**n.a.**
Processing Method:	**Basic Quantitative**	*Dilution Factor:*	**1.0000**
Injection Date/Time:	**07/Mar/19 14:11**	*Sample Weight:*	**1.0000**

Chromatogram



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		24.728	109.060	58.731	85.12	84.82	n.a.
2		29.617	19.061	10.511	14.88	15.18	n.a.
Total:			**128.121**	**69.242**	**100.00**	**100.00**	

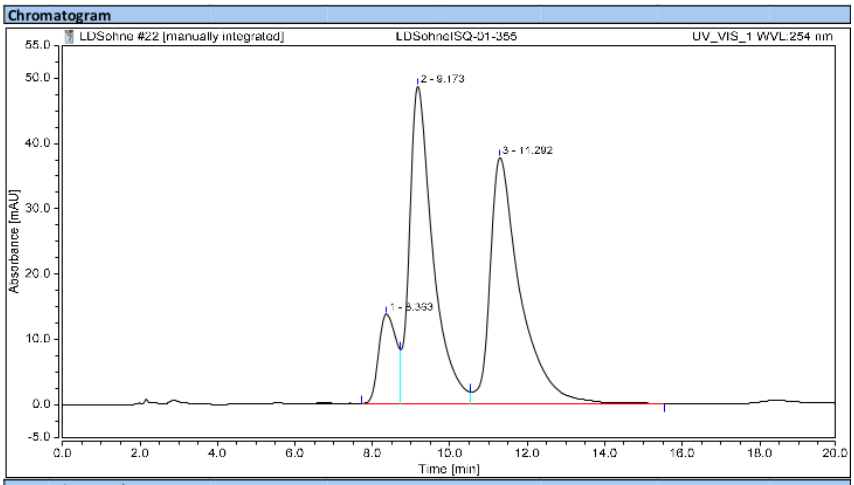
*Abbildung 259: Chirale HPLC von (R)-Alkohol **166** unter Verwendung von (1R,2S)-2-amino-1,2-diphenylethan-1-ol **182.***

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	**LDSohneISQ-01-355**	*Run Time (min):*	**19.95**
Vial Number:	**RE7**	*Injection Volume:*	**5.00**
Injection Type:	**Unknown**	*Channel:*	**UV_VIS_1**
Calibration Level:		*Wavelength:*	**254**
Instrument Method:	**30min02.5IPA_1.5mL**	*Bandwidth:*	**n.a.**
Processing Method:	**Basic Quantitative**	*Dilution Factor:*	**1.0000**
Injection Date/Time:	**28/Jan/19 14:21**	*Sample Weight:*	**1.0000**

Chromatogram



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		8.363	7.276	13.745	9.66	13.73	n.a.
2		9.173	34.069	48.649	45.24	48.60	n.a.
3		11.292	33.956	37.716	45.09	37.67	n.a.
Total:			**75.301**	**100.110**	**100.00**	**100.00**	

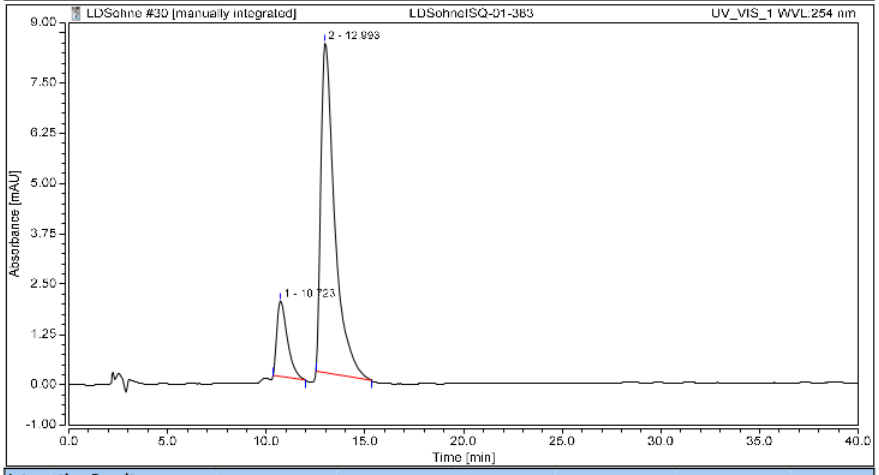
*Abbildung 260: Chirale HPLC von rac-Azid **179**.*

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	**LDSohneISQ-01-383**	*Run Time (min):*	**40.00**
Vial Number:	**RE8**	*Injection Volume:*	**10.00**
Injection Type:	**Unknown**	*Channel:*	**UV_VIS_1**
Calibration Level:		*Wavelength:*	**254**
Instrument Method:	**30min02.5IPA_1.5mL**	*Bandwidth:*	**n.a.**
Processing Method:	**Basic Quantitative**	*Dilution Factor:*	**1.0000**
Injection Date/Time:	**08/Mar/19 12:20**	*Sample Weight:*	**1.0000**

Chromatogram



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		10.723	1.159	1.884	14.82	18.67	n.a.
2		12.993	6.661	8.206	85.18	81.33	n.a.
Total:			**7.820**	**10.090**	**100.00**	**100.00**	

*Abbildung 261: Chirale HPLC von (S)-Azid **157**.*

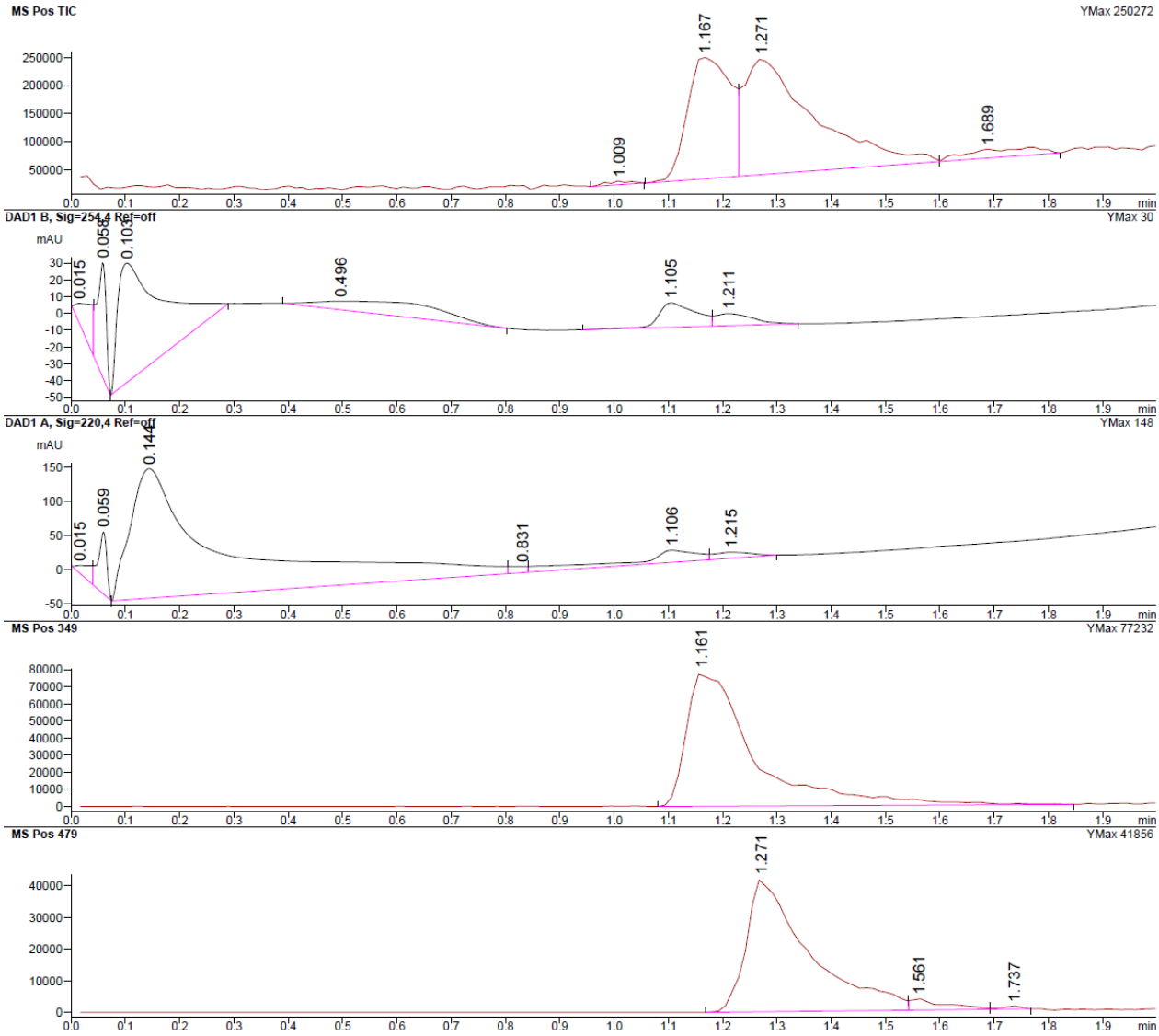


*Abbildung 262: LC-MS Chromatogramm der Mischung aus **194** (m/z (ESI-MS$^+$): 349 (M+Na$^+$)) und **195** (m/z (ESI-MS$^+$): 479 (M+Na$^+$)).*

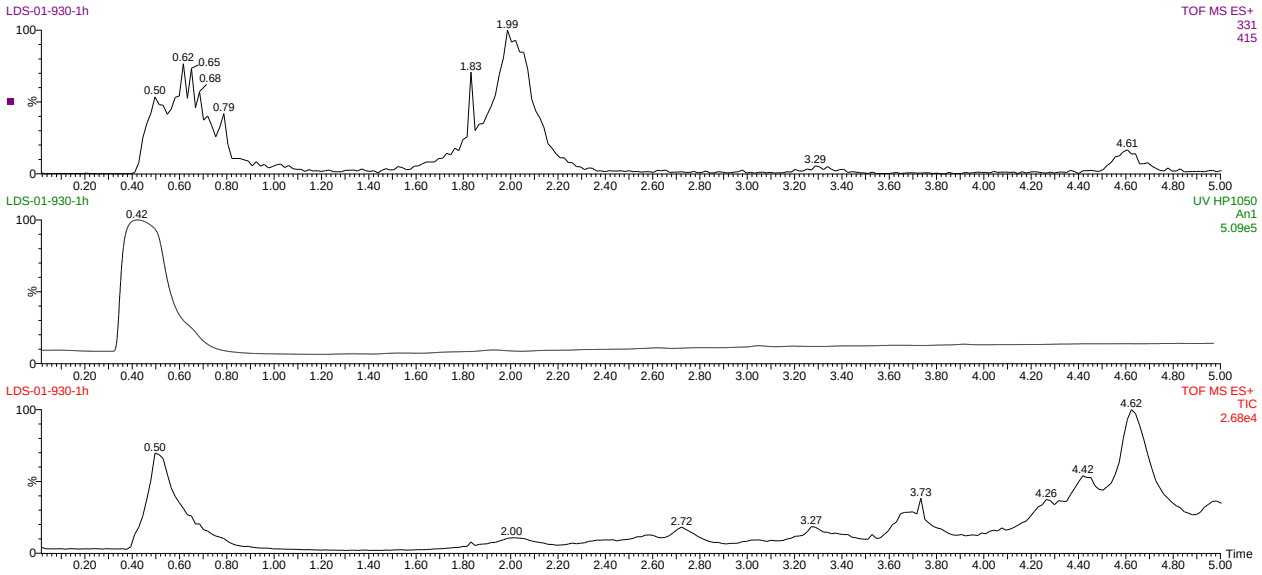


*Abbildung 263: LC-MS Chromatogramm von **218** (m/z (ESI-MS$^+$): 331 (M+H$^+$)).*

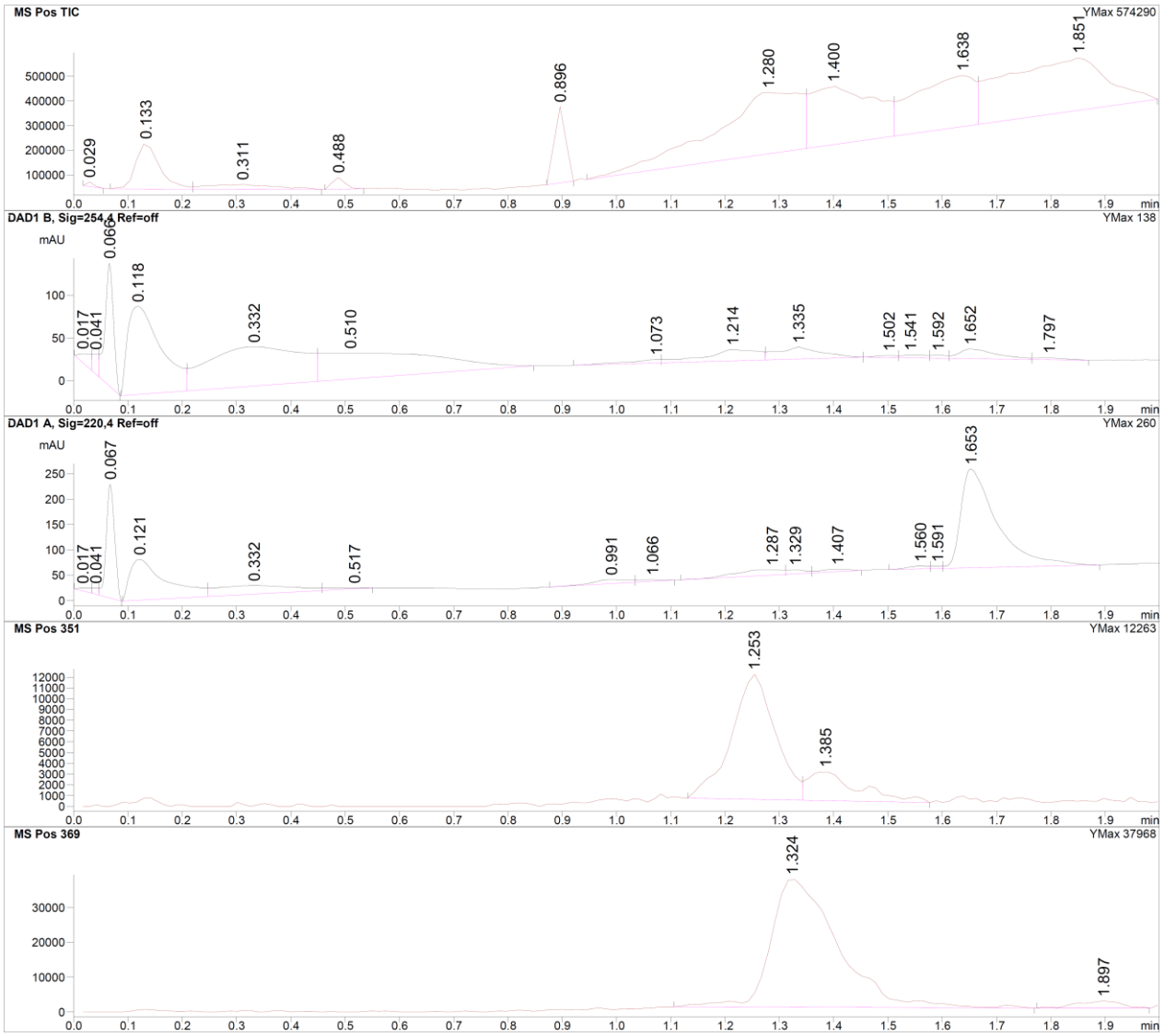


*Abbildung 264: LC-MS Chromatogramm von **219** (m/z (ESI-MS$^+$): 351 (M+Na$^+$), 369 (M+H$_2$O+Na$^+$)).*

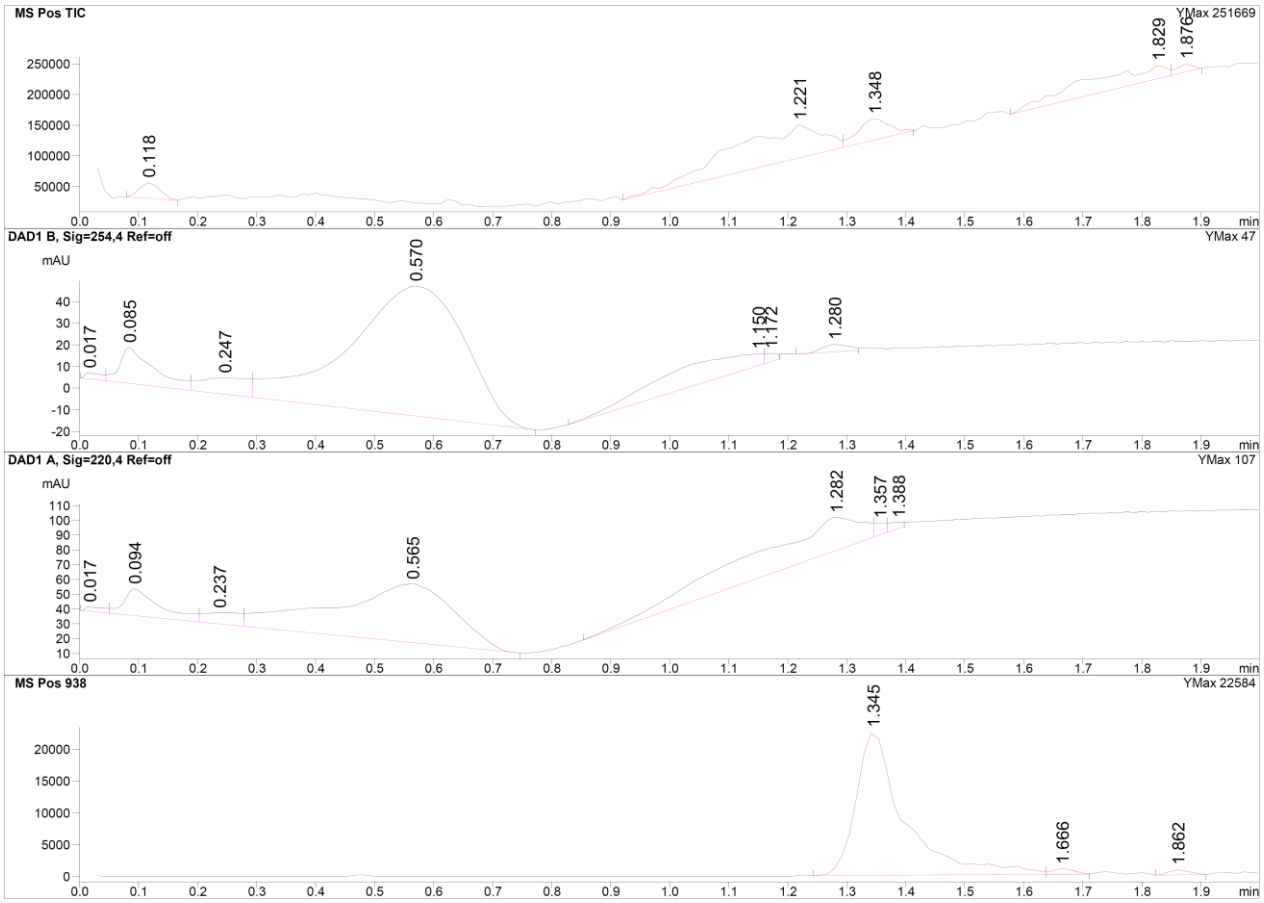


*Abbildung 265: LC-MS Chromatogramm von **145** (m/z (ESI-MS$^+$): 938 (M+H$^+$)).*

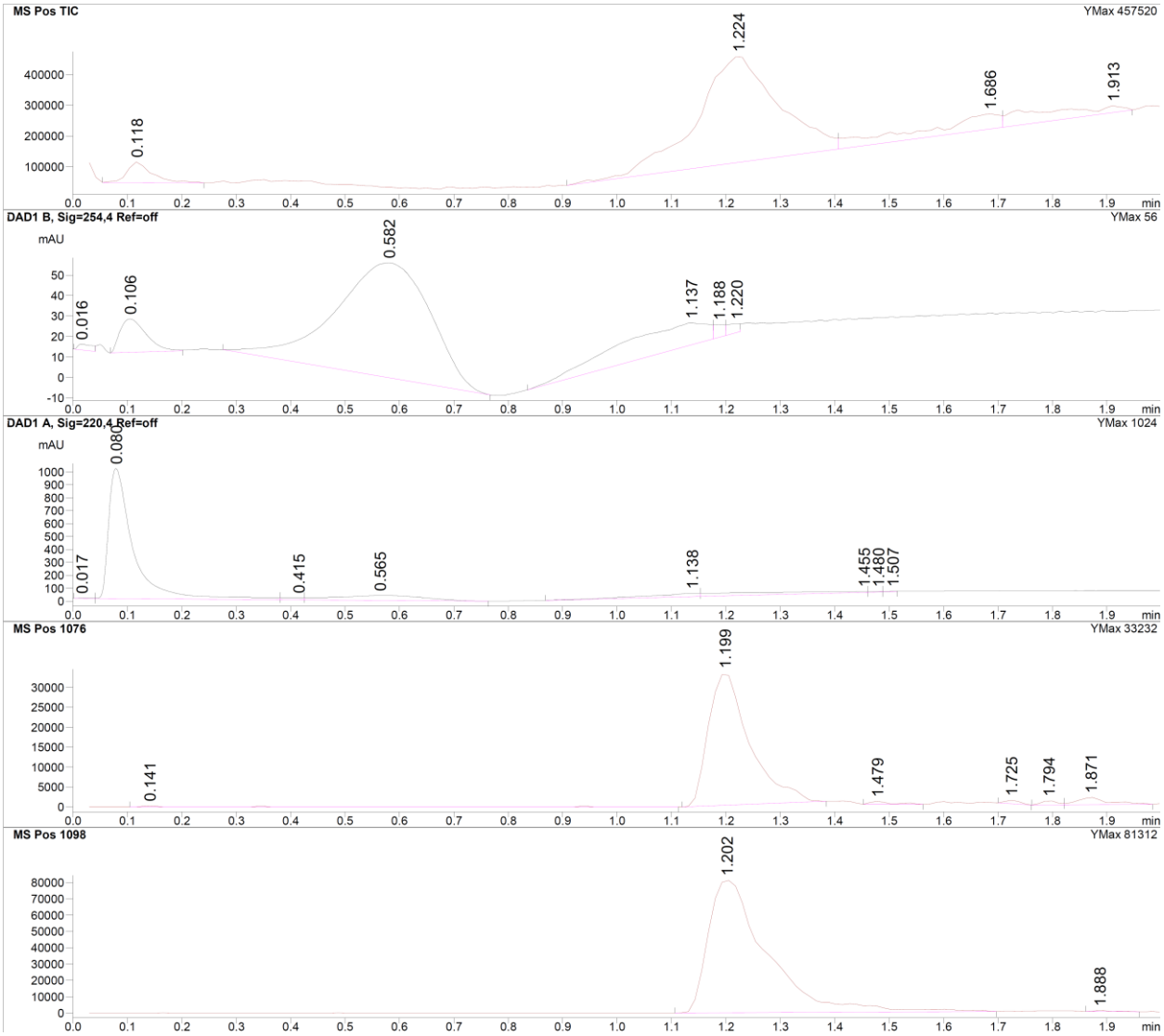


*Abbildung 266: LC-MS Chromatogramm von **221** (m/z (ESI-MS$^+$): 1076 (M+H$^+$), 1098 (M+Na$^+$)).*

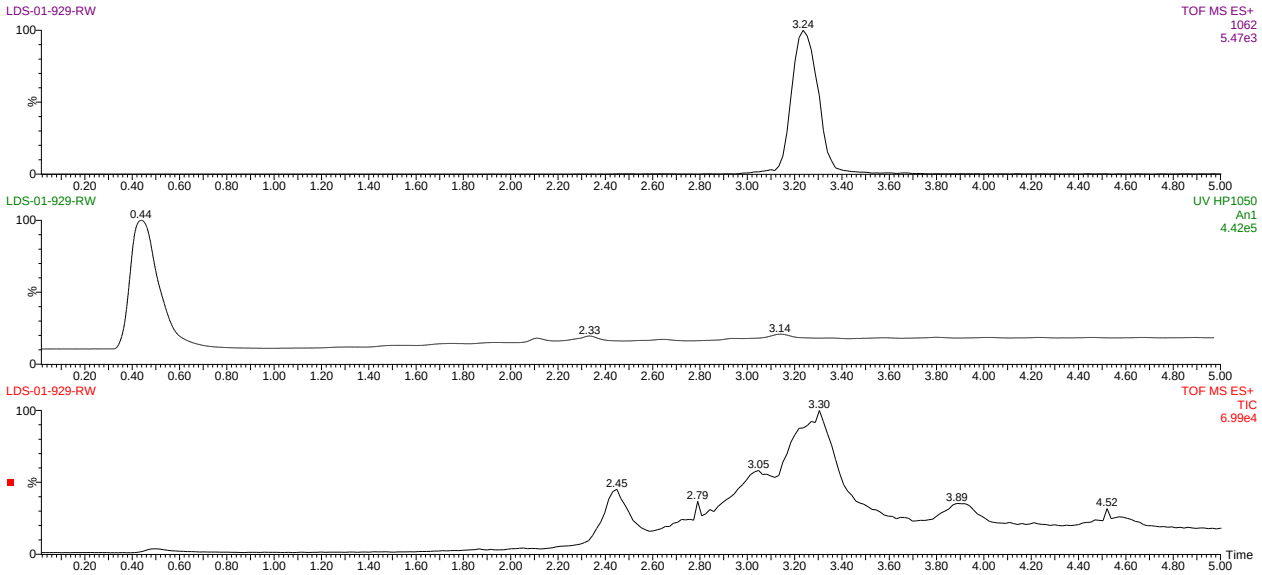


*Abbildung 267: LC-MS Chromatogramm von **222** (m/z (ESI-MS$^+$): 1062 (M+H$^+$)).*

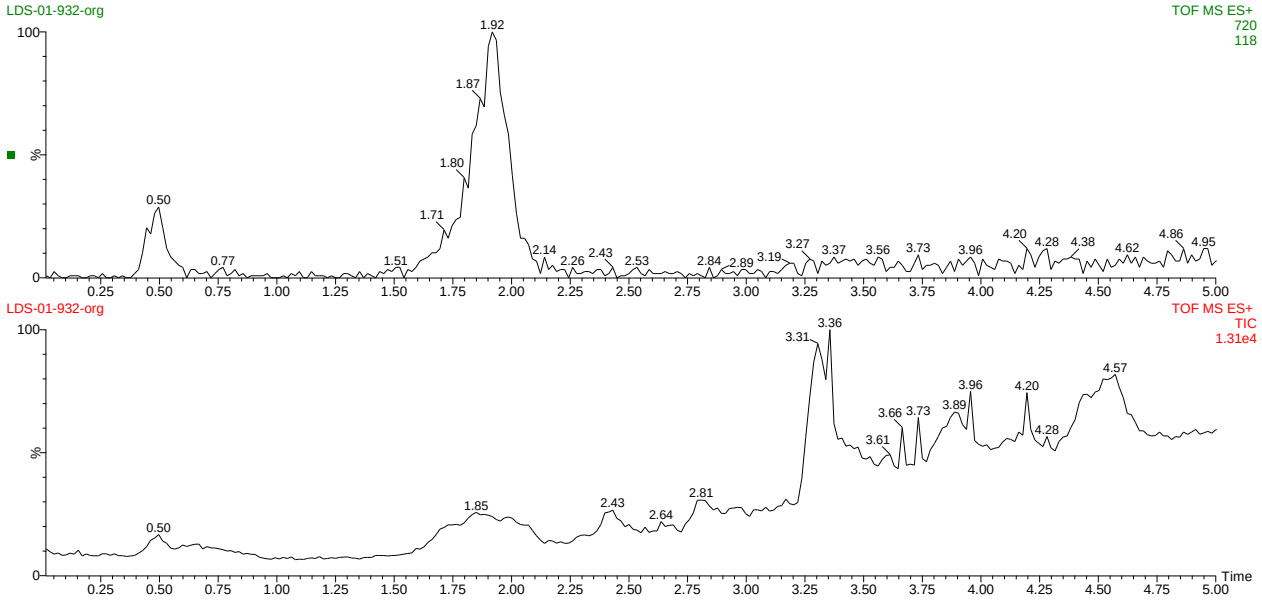


*Abbildung 268: LC-MS Chromatogramm von **223** (m/z (ESI-MS$^+$): 720 (M+H$^+$)).*

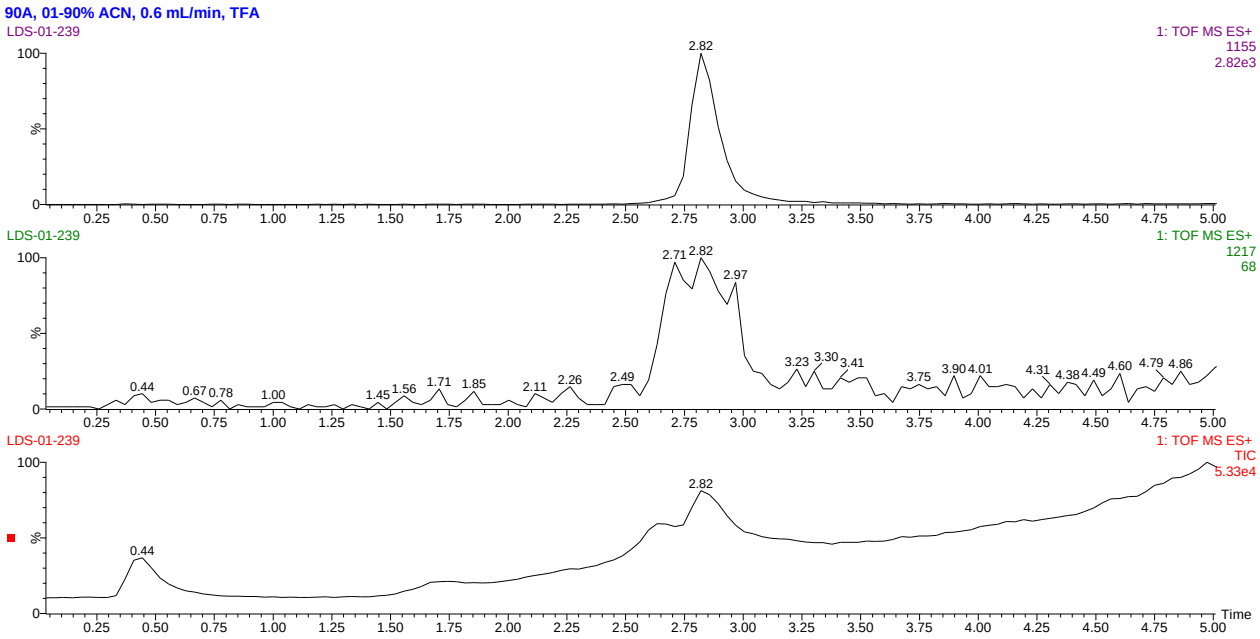


*Abbildung 269: LC-MS Chromatogramm von **MB OB3b(Zn)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1155 (M-Zn+H$^+$), 1217 (M+H$^+$)).*

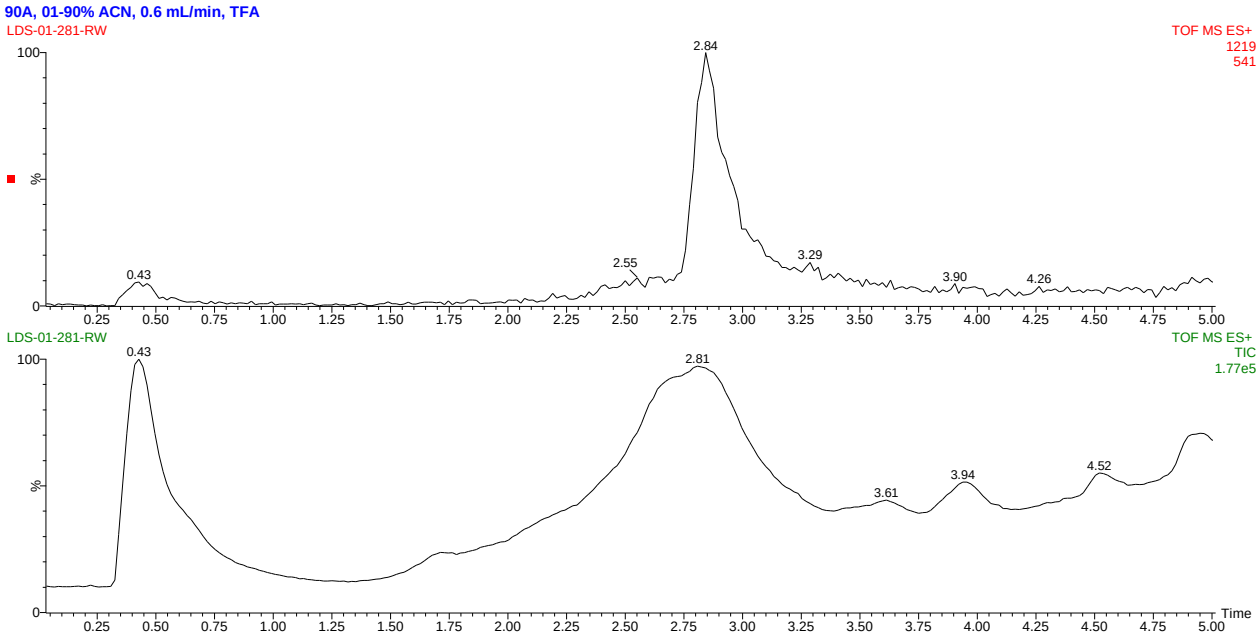


*Abbildung 270: LC-MS Chromatogramm von **MB OB3b(Zn, SH)** unter Verwendung von 50 mM aq. Tris Puffer (pH 8.0) (m/z (ESI-MS$^+$): 1219 (**MB OB3b(Zn, SH)**+H$^+$)).*

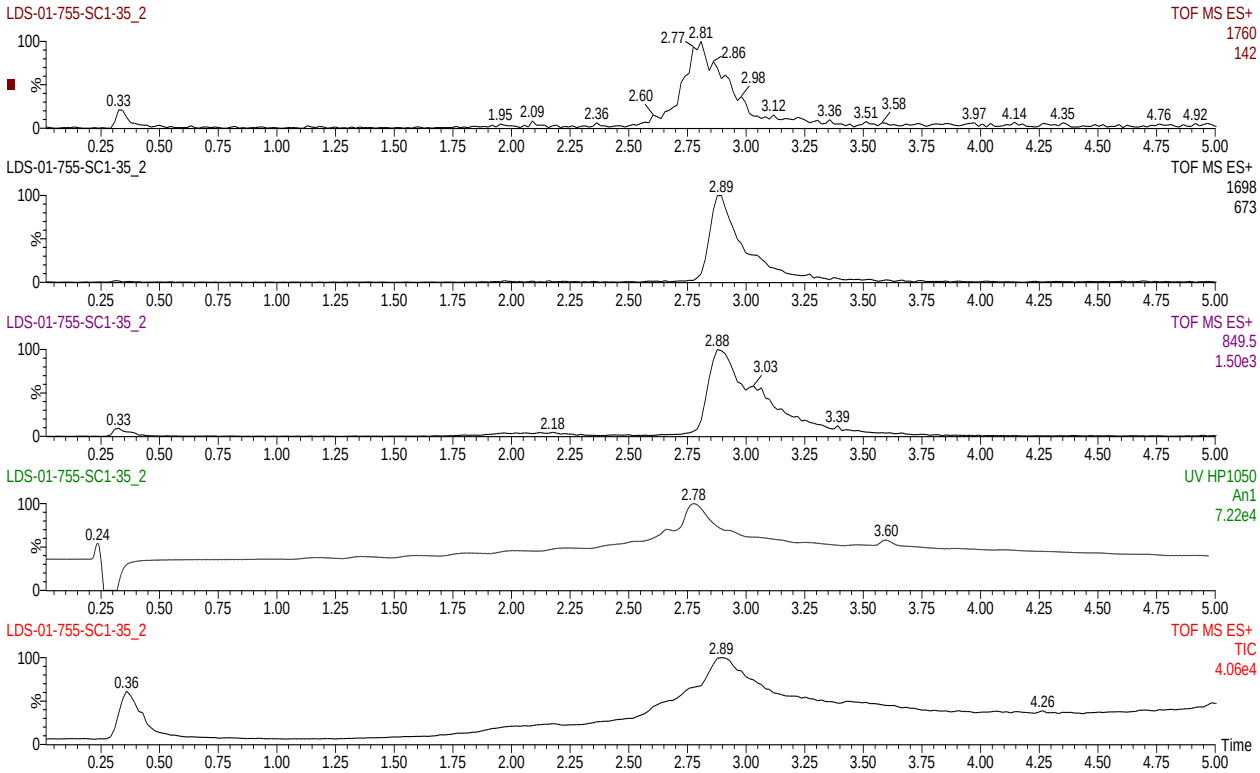


*Abbildung 271: LC-MS Chromatogramm von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Azid)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1760 (M+H$^+$), 1698 (M-Zn+H$^+$), 849.5 (M-Zn+2H$^+$)).*



*Abbildung 272: LC-MS Chromatogramm von **MB OB3b(Zn, Maleimid-short, Azid)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1319 (M-Zn+H$^+$)).*

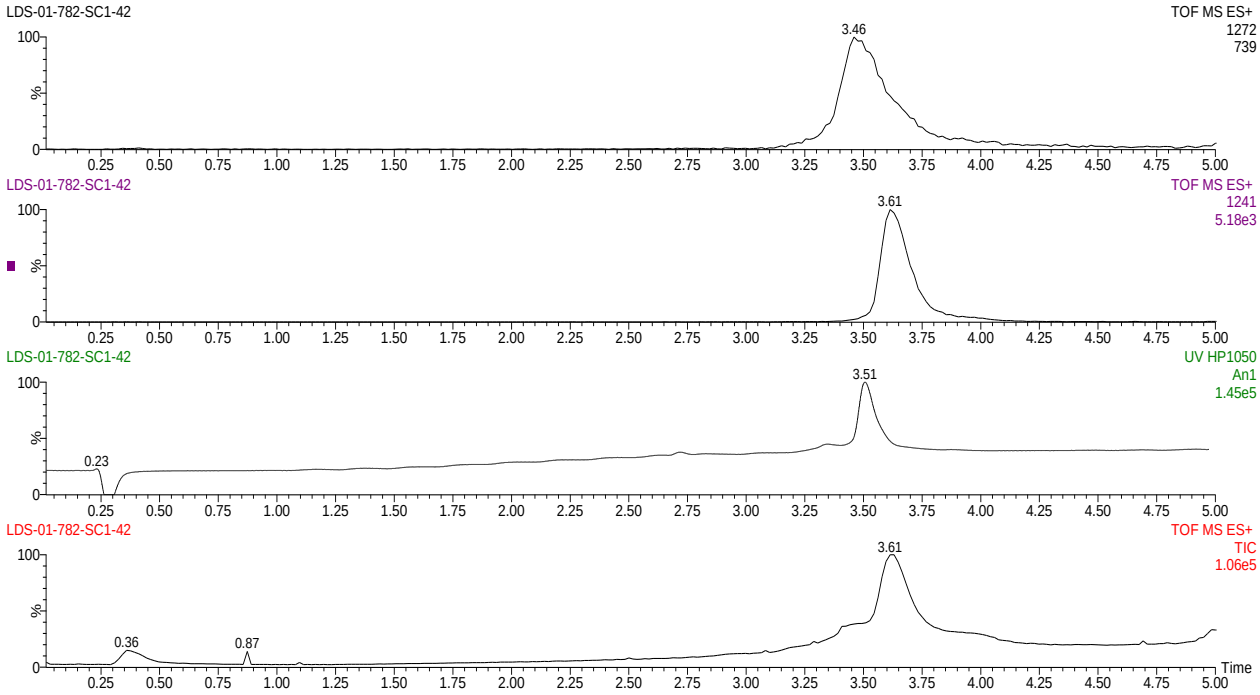


*Abbildung 273: LC-MS Chromatogramm von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Cy-5)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1272 (M$^+$+H$^+$), 1241 (M$^+$-Zn+H$^+$).*

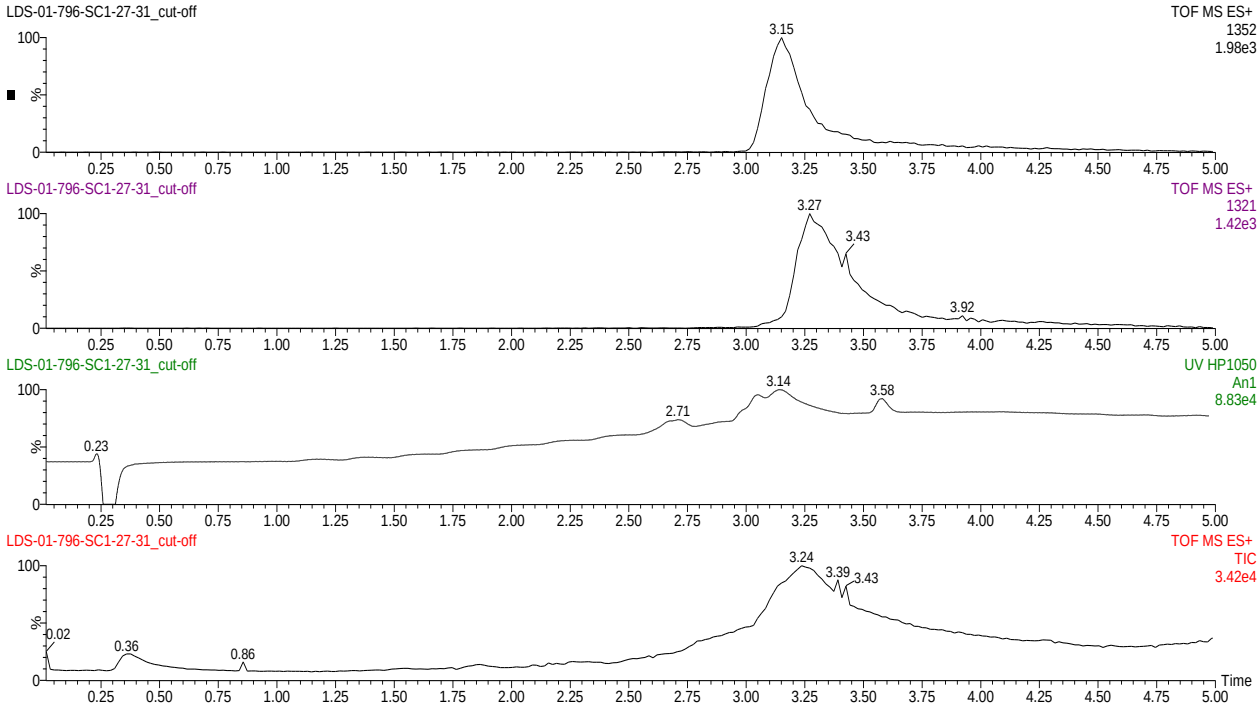


*Abbildung 274: LC-MS Chromatogramm von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Sulfo-Cy-5)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1352 (M^-+3H^+), 1321 (M^--Zn+3H^+).*

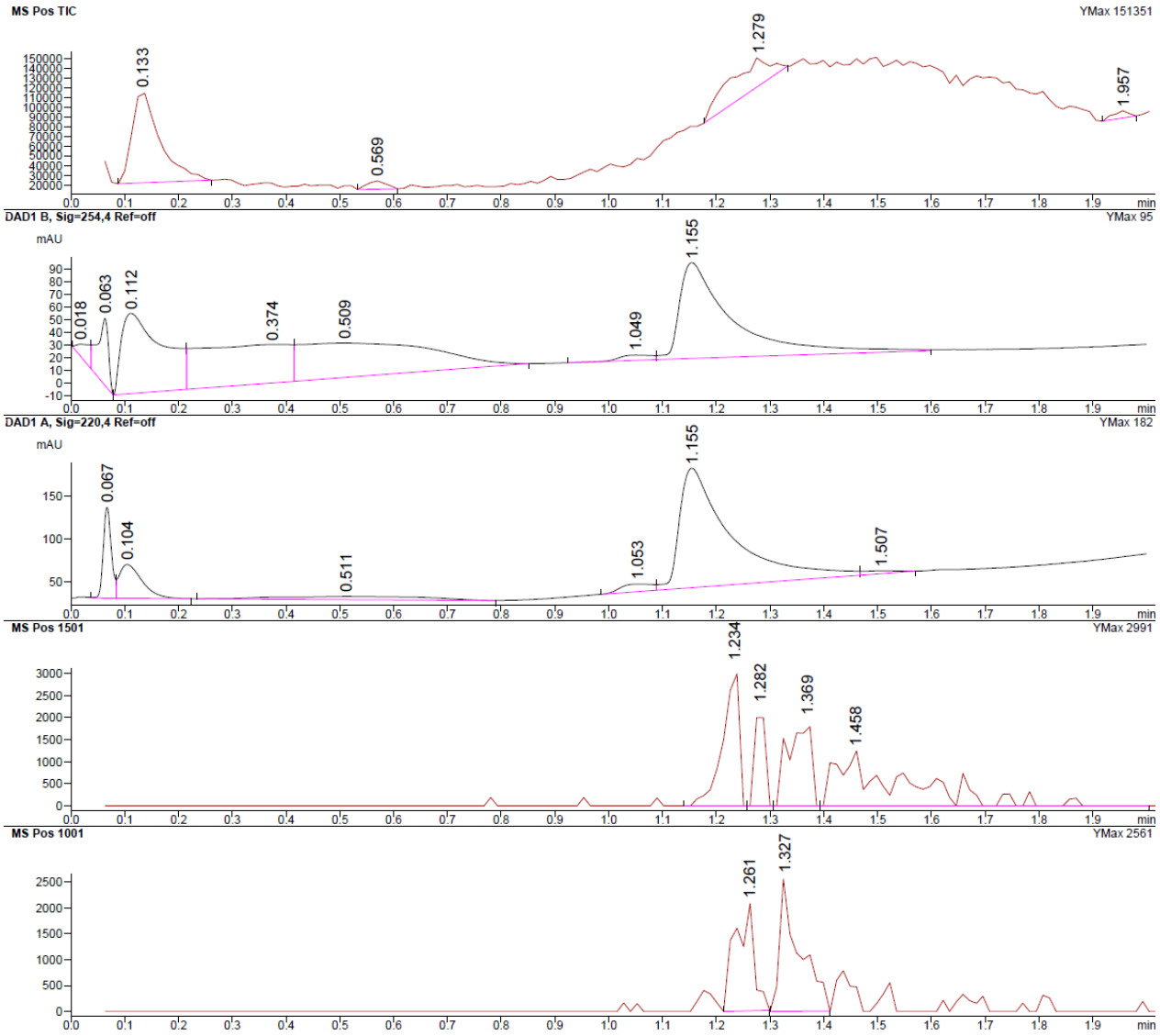


*Abbildung 275:LC-MS Chromatogramm von **MB OB3b(Zn, Maleimid, sNIR)** (m/z (ESI-MS$^+$): 1501 (M^-+2H^+), 1001 (M^-+3H^+).*

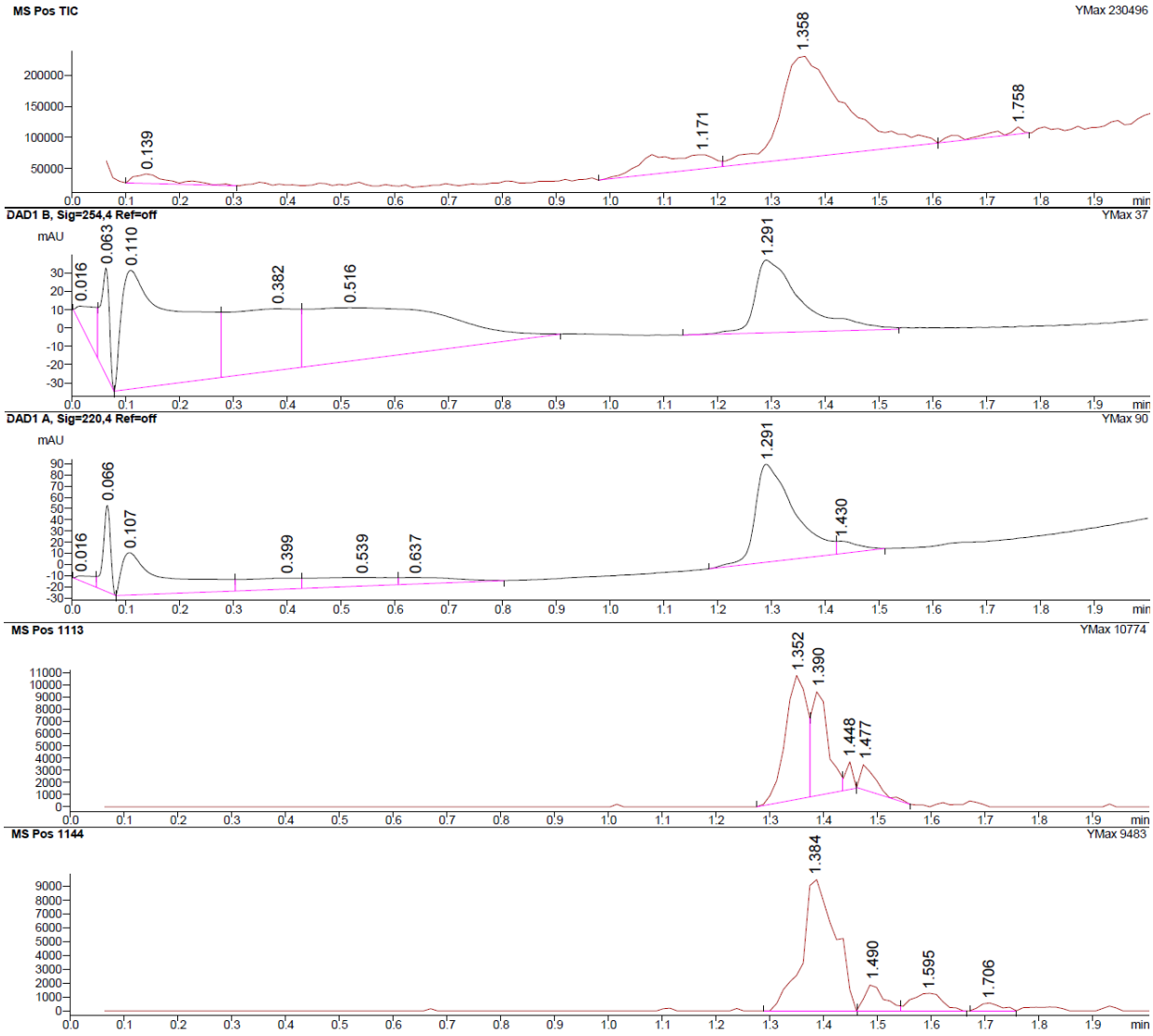


*Abbildung 276: LC-MS Chromatogramm von **MB OB3b(Zn, Maleimid, F)** (m/z (ESI-MS$^+$):1113 (M-Zn$^-$+2H$^+$), 1144 (M$^-$+2H$^+$).*

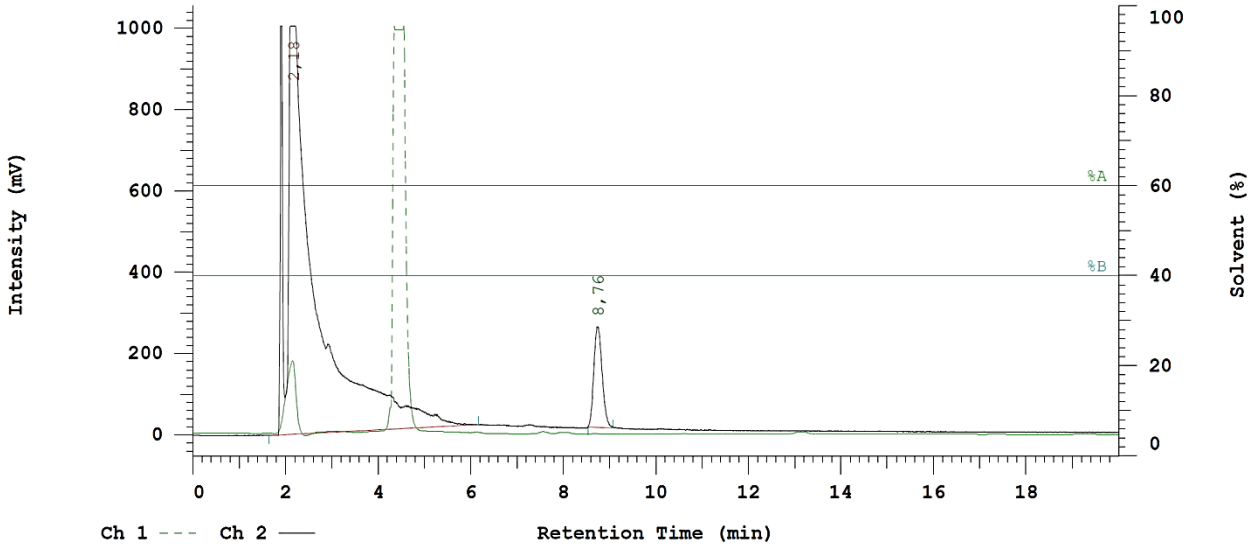


*Abbildung 277: Semi-präparative HPLC-Trennung des ^{18}F-PEG(4)-DBCO-Linker **266** (t_R = 4.46 min) von dem OTs-Vorläufer **264** (t_R = 8.76 min); Ch 1: UV-Spur bei bei einer Wellenlänge von λ = 254 nm, Ch 2: Radioaktivspur mit einer Sättigung des Detektors durch [^{18}F]FNBu$_4$ bei t_R = 2.18 min.*

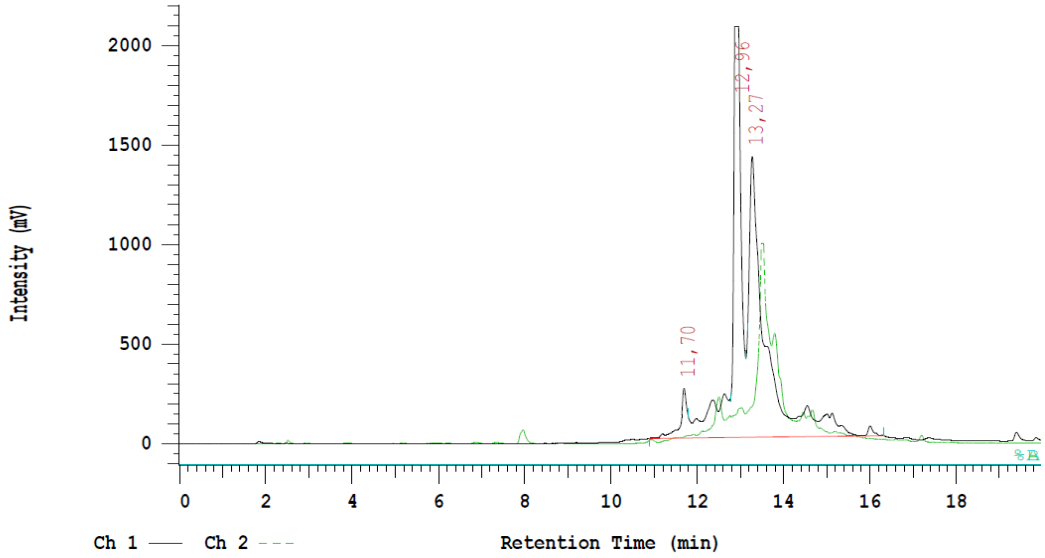


*Abbildung 278: Semi-präparative HPLC-Trennung des **MB OB3b(Zn, Maleimid, ^{18}F)** (t_R = 13.52 min) bei einer Co-Injektion der Referenzverbindung **MB OB3b(Zn, Maleimid, F)** (t_R = 13.27 min); Ch 1: UV-Spur bei bei einer Wellenlänge von λ = 254 nm, Ch 2: Radioaktivspur.*

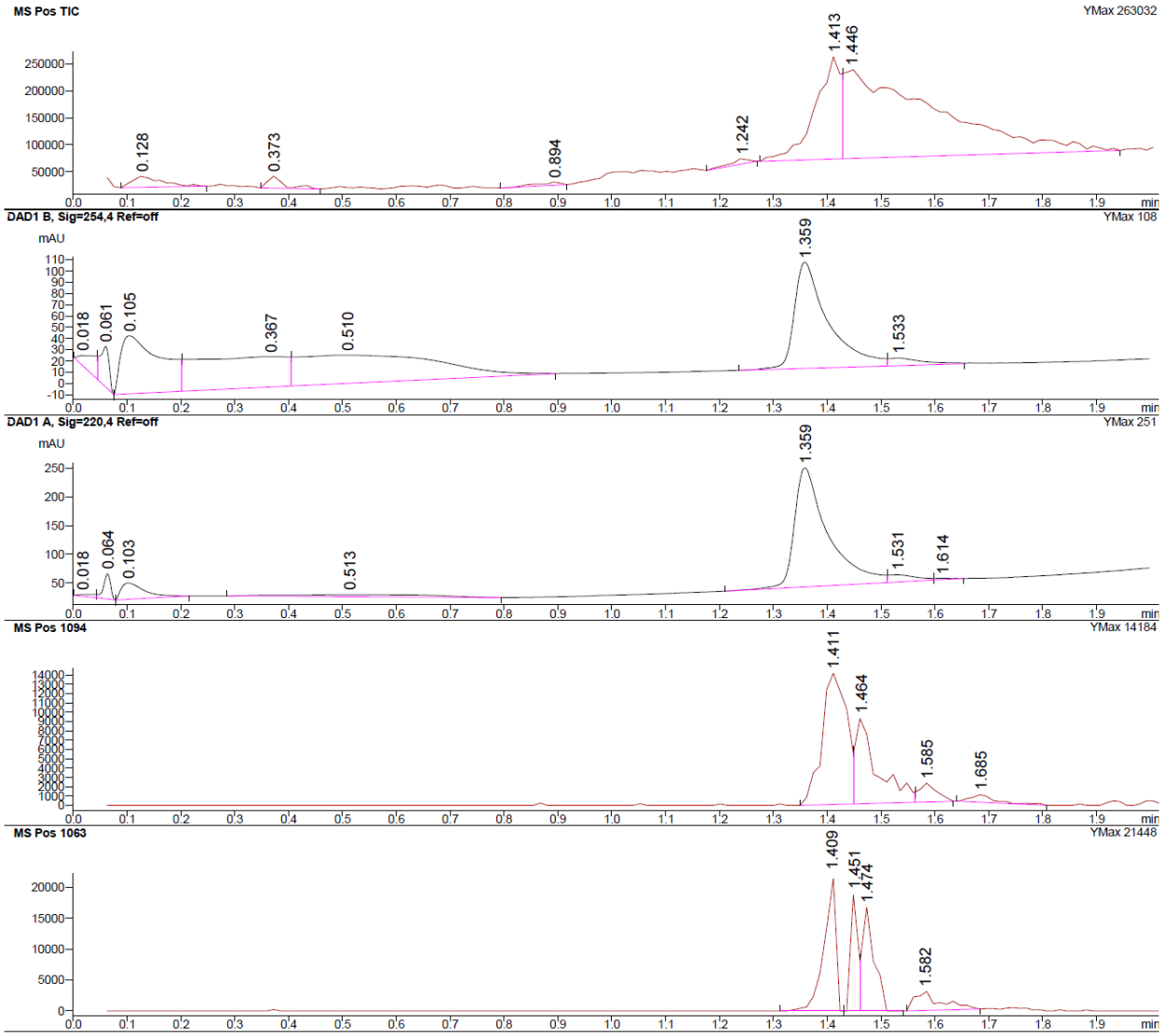


*Abbildung 279: LC-MS Chromatogramm von **MB OB3b(Zn, Maleimid, Diazirin)** (m/z (ESI-MS$^+$):1063 (M-Zn$^-$+2H$^+$), 1094 (M$^-$+2H$^+$).*

6.3 UV-VIS TITRATIONEN

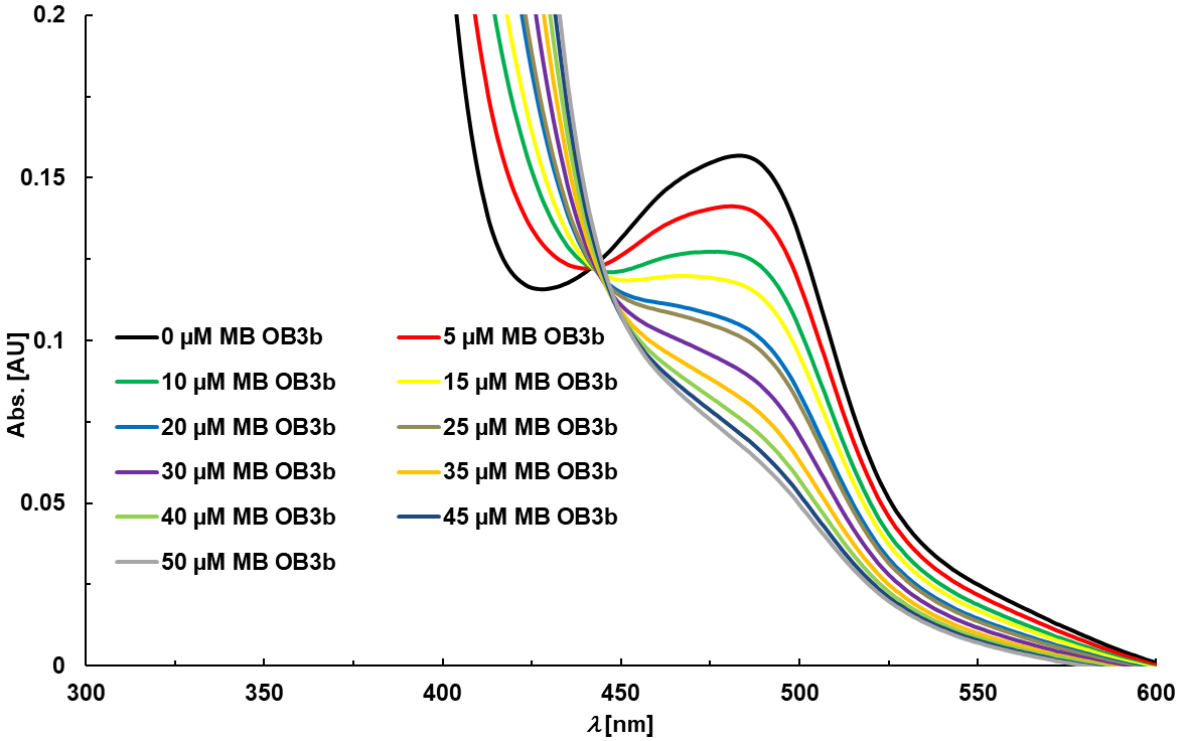


*Abbildung 280: UV-VIS Titration von **MB OB3b** in eine Lösung aus Na_2BCS (5 mM) und Cu^+ (10.2 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C.*

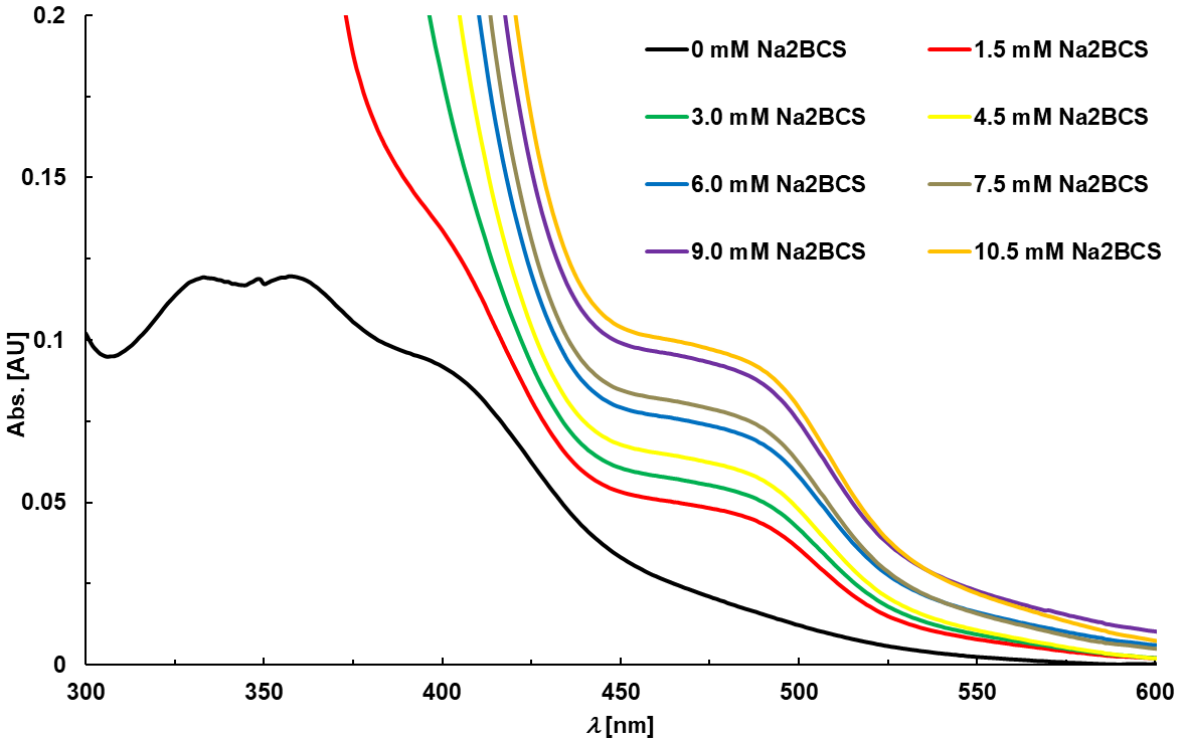


*Abbildung 281: UV-VIS Titration von Na_2BCS in eine Lösung aus **MB OB3b** (5.8 µM) und Cu^+ (5.8 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C.*

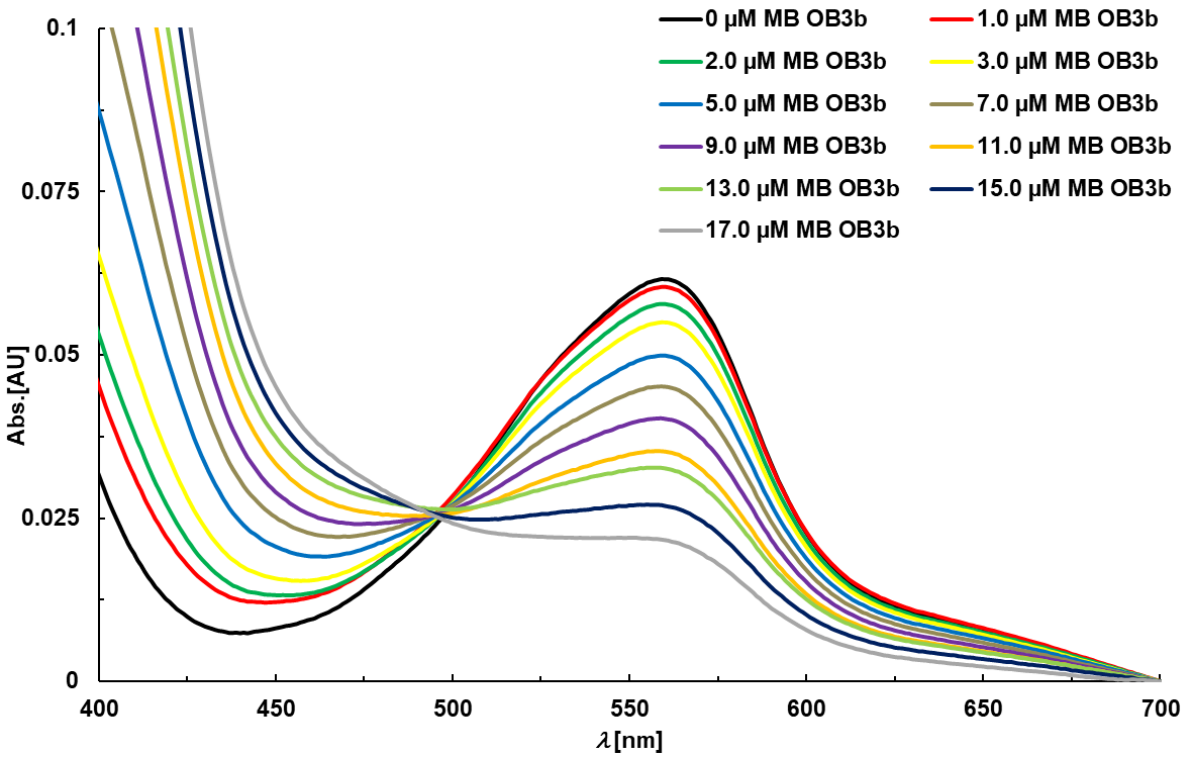


*Abbildung 282: UV-VIS Titration von **MB OB3b** in eine Lösung aus Na_2BCAS (10 mM) und Cu^+ (10.2 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C.*

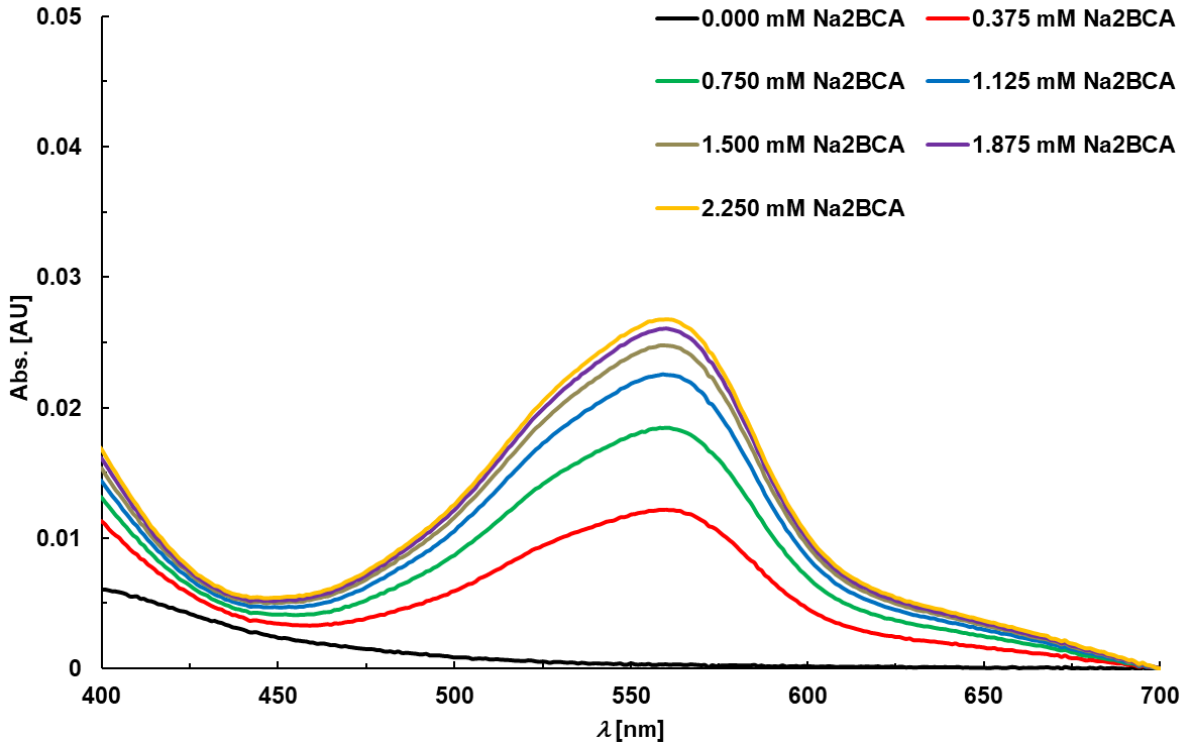


*Abbildung 283: UV-VIS Titration von Na_2BCA in eine Lösung aus **MB OB3b** (0.58 µM) und Cu^+ (5.8 µM) in 20 mM Hepes-Puffer bei pH 7.5 und 25 °C.*

7 LITERATURVERZEICHNIS

[1] B.-E. Kim, T. Nevitt, D. J. Thiele, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 176–185.

[2] F. Peter Guengerich, *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 4603–4605.

[3] The Medical Biochemistry Page, “Iron and Copper Homeostasis,” https://themedicalbiochemistrypage.org/iron-and-copper-homeostasis/ (09.10.2021), **2021**.

[4] forumhome GmbH & Co. KG, “Kupfer,” https://www.med.de/gesundheit/ernaehrung/mineralstoffe/spurenelemente/kupfer.html (13.09.2021), **2013**.

[5] Y. Nose, E. M. Rees, D. J. Thiele, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 604–607.

[6] E. M. Rees, D. J. Thiele, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21629–21638.

[7] R. S. Ohgami, D. R. Campagna, A. McDonald, M. D. Fleming, *Blood* **2006**, *108*, 1388–1394.

[8] M. J. Petris, K. Smith, J. Lee, D. J. Thiele, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9639–9646.

[9] S. Puig, D. J. Thiele, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 171–180.

[10] P. A. Cobine, L. D. Ojeda, K. M. Rigby, D. R. Winge, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 14447–14455.

[11] N. E. Hellman, J. D. Gitlin, *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 439–458.

[12] Z. L. Harris, A. P. Durley, T. K. Man, J. D. Gitlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 10812–10817.

[13] P. de Bie, B. van de Sluis, E. Burstein, P. V. E. van de Berghe, P. Muller, R. Berger, J. D. Gitlin, C. Wijmenga, L. W. J. Klomp, *Gastroenterology* **2007**, *133*, 1316–1326.

[14] M. Riera-Romo, *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 34–51.

[15] T. Kanti Das, M. R. Wati, K. Fatima-Shad, *Arch. Neurosci.* **2014**, *2*, DOI 10.5812/archneurosci.20078.

[16] D. Huster, S. Lutsenko, *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 816–824.

[17] E. M. Santos, J. S. Ball, T. D. Williams, H. Wu, F. Ortega, R. Van Aerle, I. Katsiadaki, F. Falciani, M. R. Viant, J. K. Chipman, et al., *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 820–826.

[18] P. A. Lang, M. Schenck, J. P. Nicolay, J. U. Becker, D. S. Kempe, A. Lupescu, S. Koka, K. Eisele, B. A. Klarl, H. Rübben, et al., *Nat. Med.* **2007**, *13*, 164–170.

[19] H. H.-J. Schmidt, *Dtsch. Ärztebl.* **2003**, *100*, A192–A197.

[20] K. H. Weiss, W. Stremmel, *Hepatitis&more* **2014**, *2*, 18–25.

[21] A. Gomes, G. V Dedoussis, *Ann. Hum. Biol.* **2016**, *43*, 1–8.

[22] E. V. Polishchuk, A. Merolla, J. Lichtmannegger, A. Romano, A. Indrieri, E. Y. Ilyechova, M. Concilli, R. De Cegli, R. Crispino, M. Mariniello, et al., *Gastroenterology* **2019**, *156*, 1173-1189.e5.

[23] J. Lichtmannegger, C. Leitzinger, R. Wimmer, S. Schmitt, S. Schulz, Y. Kabiri, C. Eberhagen, T. Rieder, D. Janik, F. Neff, et al., *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 2721–2735.

[24] C. Eisenbach, O. Sieg, W. Stremmel, J. Encke, U. Merle, *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 1711–1714.

[25] W. Hermann, F. Tietze, T. Villmann, F. Grahmann, A. Wagner, *Nervenarzt* **2000**, *71*, 970–974.

[26] P. Ferenci, K. Caca, G. Loudianos, G. Mieli-Vergani, S. Tanner, I. Sternlieb, M. Schilsky, D. Cox, F. Berr, *Liver Int.* **2003**, *23*, 139–142.

[27] J. M. Walshe, A. K. Dixon, *Lancet* **1986**, *327*, 845–847.

[28] C. S. Palumbo, M. L. Schilsky, *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7*, S65–S65.

[29] A. Ahmad, E. Torrazza-perez, M. L. Schilsky, *Handb. Clin. Neurol.* **2017**, *142*, 193–204.

[30] J. M. Walshe, *Lancet* **1956**, *267*, 25–26.

[31] M. L. Schilsky, *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2001**, *3*, 54–59.

[32] K. H. Weiss, F. Thurik, D. N. Gotthardt, M. Schäfer, U. Teufel, F. Wiegand, U. Merle, D. Ferenci-Foerster, A. Maieron, R. Stauber, et al., *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *11*, 1028-1035.e2.

[33] G. J. Brewer, F. Askari, M. T. Lorincz, M. Carlson, M. Schilsky, K. J. Kluin, P. Hedera, P. Moretti, J. K. Fink, R. Tankanow, et al., *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 378–385.

[34] S. Sirajuddin, A. C. Rosenzweig, *Biochemistry* **2015**, *54*, 2283–2294.

[35] R. Balasubramanian, A. C. Rosenzweig, *Acc Chem Res* **2007**, *40*, 573–80.

[36] R. S. Hanson, T. E. Hanson, *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 439–471.

[37] M. A. Culpepper, A. C. Rosenzweig, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *47*, 483–492.

[38] J. C. Murrell, I. R. McDonald, B. Gilbert, *Trends Microbiol.* **2000**, *8*, 221–225.

[39] J. D. Semrau, A. A. Dispirito, S. Yoon, *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *34*, 496–531.

[40] H. J. Kim, D. W. Graham, A. A. DiSpirito, M. A. Alterman, N. Galeva, C. K. Larive, D. Asunskis, P. M. A. Sherwood, *Science* **2004**, *305*, 1612–1615.

[41] J. D. Semrau, A. A. Dispirito, P. K. Obulisamy, C. S. Kang-Yun, *FEMS Microbiol. Lett.* **2020**, *367*, 1–13.

[42] L. A. Behling, S. C. Hartsel, D. E. Lewis, A. A. DiSpirito, D. W. Choi, L. R. Masterson, G. Veglia, W. H. Gallagher, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12604–12605.

[43] G. E. Kenney, A. W. Goering, M. O. Ross, C. J. DeHart, P. M. Thomas, B. M. Hoffman, N. L. Kelleher, A. C. Rosenzweig, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11124–11127.

[44] A. Baslé, A. El Ghazouani, J. Lee, C. Dennison, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 4515–4518.

[45] B. D. Krentz, H. J. Mulheron, J. D. Semrau, A. A. Dispirito, N. L. Bandow, D. H. Haft, S. Vuilleumier, J. C. Murrell, M. T. McEllistrem, S. C. Hartsel, et al., *Biochemistry* **2010**, *49*, 10117–10130.

[46] A. El Ghazouani, A. Baslé, J. Gray, D. W. Graham, S. J. Firbank, C. Dennison, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 8400–8404.

[47] A. A. DiSpirito, J. D. Semrau, J. C. Murrell, W. H. Gallagher, C. Dennison, S. Vuilleumier, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80*, 387–409.

[48] A. El Ghazouani, A. Baslé, S. J. Firbank, C. W. Knapp, J. Gray, D. W. Graham, C. Dennison, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1378–1391.

[49] D. W. Choi, Y. S. Do, C. J. Zea, M. T. McEllistrem, S. W. Lee, J. D. Semrau, N. L. Pohl, C. J. Kisting, L. L. Scardino, S. C. Hartsel, et al., *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 2150–2161.

[50] P. G. Arnison, M. J. Bibb, G. Bierbaum, A. A. Bowers, T. S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D. J. Campopiano, G. L. Challis, J. Clardy, et al., *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 108–160.

[51] D. D. Luu, A. Joe, Y. Chen, K. Parys, O. Bahar, R. Pruitt, L. J. G. Chan, C. J. Petzold, K. Long, C. Adamchak, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 8525–8534.

[52] G. E. Kenney, L. M. K. Dassama, M.-E. Pandelia, A. S. Gizzi, R. J. Martinie, P. Gao, C. J. DeHart, L. F. Schachner, O. S. Skinner, S. Y. Ro, et al., *Science* **2018**, *359*, 1411–1416.

[53] H. Zischka, J. Lichtmannegger, S. Schmitt, N. Jägemann, S. Schulz, D. Wartini, L. Jennen, C. Rust, N. Larochette, L. Galluzzi, et al., *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 1508–1518.

[54] M. B. Nolt, M. A. Smiley, S. L. Varga, R. T. McClain, S. E. Wolkenberg, C. W. Lindsley, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4698–4704.

[55] K. C. Pugh, L. Gera, J. M. Stewart, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 159–164.

[56] R. Matsueda, S. Higashida, R. J. Ridge, G. R. Matsueda, *Chem. Lett.* **1982**, *11*, 921–924.

[57] A. Tirla, K. M. Wernke, S. B. Herzon, *Org. Lett.* **2021**, *23*, 5457–5460.

[58] A. Ino, Y. Hasegawa, A. Murabayashi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3509–3512.

[59] F. Brunswig, Studien Zum Aufbau von Disulfidbrücken in Methanobactin-Ähnlichen Verbindung (Masterarbeit), Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, **2018**.

[60] S. Mukherjee, H. Verma, J. Chatterjee, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3150–3153.

[61] T. Høeg-Jensen, C. E. Olsen, A. Holm, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1257–1263.

[62] J. Yang, C. Wang, S. Xu, J. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 1382–1386.

[63] B. Kaboudin, V. Yarahmadi, J. Y. Kato, T. Yokomatsu, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 6435–6441.

[64] C. T. Brain, A. Hallett, S. Y. Ko, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3808–3809.

[65] P. Csomós, L. Fodor, P. Sohár, G. Bernáth, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9257–9262.

[66] C. Byrne, K. M. Houlihan, P. Devi, P. Jensen, P. J. Rutledge, *Molecules* **2014**, *19*, 20751–20767.

[67] S. H. Kim, H. J. Kim, S. Y. Koo, S. B. Lee, H. S. Park, S. H. Yoon, S. Y. Paek, I. S. Kwak, D. O. Seo, E. Park, *Indole Compounds as an Inhibitor of Cellular Necrosis*, **2010**, US2010/0210647 A1.

[68] C. M. Cheung, F. W. Goldberg, P. Magnus, C. J. Russell, R. Tumbull, V. Lynch, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12320–12327.

[69] H. Li, M. Hao, L. Wang, W. Liang, K. Chen, *Org. Prep. Proced. Int.* **2009**, *41*, 301–307.

[70] S. Purkayastha, S. Dey, *Analyte Determination Utilizing Mass Tagging Reagents Comprising a Non-Encoded Detectable Label*, **2008**, WO2008/105896A2.

[71] W. Doherty, N. Adler, A. Knox, D. Nolan, J. McGouran, A. P. Nikalje, D. Lokwani, A. Sarkate, P. Evans, *European J. Org. Chem.* **2017**, 175–185.

[72] G. Jürjens, S. M. M. Schuler, M. Kurz, S. Petit, C. Couturier, F. Jeannot, F. Nguyen, R. C. Wende, P. E. Hammann, D. N. Wilson, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12157–12161.

[73] F. T. Boyle, J. M. Wardleworth, *3-Mercaptopyrrolidines as Farnesyl Protein Transferase Inhibitors*, **2005**, US2005/0209217A1.

[74] E. Langkopf, M. Eckhardt, F. Himmelsbach, M. Tadayyon, L. Thomas, R. R. H. Lotz, *Neue 3-Methyl-7-Butinyl-Xanthine, Deren Herstellung Und Deren Verwendung Als Arzneimittel*, **2006**, WO2006/029769A1.

[75] F. Delgado-Jiménez, G. J. Tresadern, A. A. Trabanco-Suárez, *3-Amino-5,6-Dihydro-1H-Pyrazin-2-One Derivatives Useful for the Treatment of Alzheimer´s Disease and Other Forms of Dementia*, **2013**, US2013/0102618A1.

[76] H. Bienayme, *Pyrroloquinoline Derivatives and Their Use as Protein Kinase Inhibitors*, **2009**, US2009/0042876A1.

[77] T. Yamamoto, P. Nair, N. E. Jacobsen, V. Kulkarni, P. Davis, S. W. Ma, E. Navratilova, H. I. Yamamura, T. W. Vanderah, F. Porreca, et al., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5491–5501.

[78] M. E. Due-Hansen, S. K. Pandey, E. Christiansen, R. Andersen, S. V. F. Hansen, T. Ulven, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *14*, 430–433.

[79] B. Belleau, R. R. Martel, G. Lacasse, M. Menard, N. L. Weinberg, Y. G. Perron, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 823–824.

[80] Y. Wang, T. Brewer, Jason, I. Akritopoulou-Zanze, W. Djuric, Stevan, F. Pohlki, W. Braje, A.-L. Relo, *Modulators of 5-HT Receptors and Methods of Use Thereof*, **2010**, WO/2010/124042.

[81] A. Rosowsky, J. E. Wright, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1539–1541.

[82] J. J. Deadman, E. D. Jones, G. T. Le, D. I. Rhodes, N. Thien-Thong, N. A. Van de Graff, L. J. Winfield, *Imidazopyrimidinones and Uses Thereof*, **2010**, WO 2010/000031 A1.

[83] M. F. Fathalla, S. N. Khattab, *J. Chem. Soc. Pak.* **2011**, *33*, 324–332.

[84] C. K. Bradsher, J. B. Bond, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2659–2660.

[85] G. Büttner, G. Wolfrum, *Nitro-Benzotrifluoride*, **1978**, DE2635695A1.

[86] J. L. Burkhart, U. Kazmaier, *Synthesis (Stuttg).* **2011**, 4033–4036.

[87] L. A. Camacho, B. J. Lampkin, B. Vanveller, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7015–7018.

[88] L. A. Camacho, Y. H. Nguyen, J. Turner, B. Vanveller, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 15309–15314.

[89] J. Xie, A. Okano, J. G. Pierce, R. C. James, S. Stamm, C. M. Crane, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1284–1297.

[90] T. K. Tran, Q. Bricaud, M. Oçafrain, P. Blanchard, J. Roncali, S. Lenfant, S. Godey, D. Vuillaume, D. Rondeau, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5628–5640.

[91] T. Ozturk, E. Ertas, O. Mert, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5210–5278.

[92] N. Mahanta, D. M. Szantai-Kis, E. J. Petersson, D. A. Mitchell, *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 142–163.

[93] M. E. Abdelaziz, M. M. M. El-Miligy, S. M. Fahmy, M. A. Mahran, A. A. Hazzaa, *Bioorg. Chem.* **2018**, *80*, 674–692.

[94] L. Hong, W. Lin, F. Zhang, R. Liu, X. Zhou, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5589–5591.

[95] L. Gjonaj, G. Roelfes, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6059–6065.

[96] R. Azzouz, S. Petit, J. B. Rouchet, L. Bischoff, *Synlett* **2014**, *25*, 1843–1846.

[97] F. N. Olsen, M. Tsakos, T. B. Poulsen, *Synlett* **2015**, *26*, 2697–2701.

[98] Z. Rappoport, *CRC Handbook of Tables for Organic Compound Identification*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1984**.

[99] P. Roose, K. Eller, E. Henkes, R. Rossbacher, H. Höke, *Amines, Aliphatic in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2015**.

[100] A. M. Pujol, M. Cuillel, O. Renaudet, C. Lebrun, P. Charbonnier, D. Cassio, C. Gateau, P. Dumy, E. Mintz, P. Delangle, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 286–296.

[101] M. Monestier, P. Charbonnier, C. Gateau, M. Cuillel, F. Robert, C. Lebrun, E. Mintz, O. Renaudet, P. Delangle, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 590–594.

[102] L. D. Hansen, G. W. Fellingham, D. J. Russell, *Anal. Biochem.* **2011**, *409*, 220–229.

[103] Z. Xiao, A. G. Wedd, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 768–789.

[104] P. Bagchi, M. T. Morgan, J. Bacsa, C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18549–18559.

[105] L. Spickschen, Studien Zur Synthese Des Nordfragments von Methanobactin OB3b (Masterarbeit), Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, **2021**.

[106] S. Zuberi, A. Glen, R. C. Hider, S. S. Bansal, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7567–7570.

[107] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. Lou Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739–2742.

[108] A. Gutiérrez, I. Marzo, C. Cativiela, A. Laguna, M. C. Gimeno, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 11088–11095.

[109] F. X. Felpin, S. Girard, G. Vo-Thanh, R. J. Robins, J. Villiéras, J. Lebreton, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6305–6312.

[110] T. Sato, T. Hino, *Tetrahedron* **1976**, *32*, 507–513.

[111] P. Brun, A. Dean, V. Di Marco, P. Surajit, I. Castagliuolo, D. Carta, M. G. Ferlin, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 486–497.

[112] E. Vedejs, S. D. Monahan, *J. Org. Chem* **1996**, *61*, 5192–5193.

[113] Y. S. Cho, D. A. Carcache, Y. Tian, Y. Li, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14358–14359.

[114] R. W. Murray, R. Jeyarama, L. Mohan, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2470–2472.

[115] FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, “Azo polymerization initiators,” https://specchem-wako-jp.fujifilm.com/en/azo/index.htm# (08.10.2021), **2020**.

[116] H. Gui, J. Liu, L. Song, C. Hui, J. Feng, Z. Xu, T. Ye, *Synlett* **2014**, *25*, 138–142.

[117] T. R. Hoye, C. S. Jeffrey, F. Shao, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2451–2458.

[118] S. Kii, K. Maruoka, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1935–1939.

[119] K. Schnitzspahn, *J. Prakt. Chem.* **1902**, *65*, 315–345.

[120] D. P. Spalding, G. W. Moersch, H. S. Mosher, F. C. Whitmore, *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 1596–1598.

[121] R. T. Parfitt, *J. Chem. Soc. C* **1962**, 1966.

[122] R. Keltjens, S. K. Vadivel, R. de Gelder, A. J. H. Klunder, B. Zwanenburg, *European J. Org. Chem.* **2003**, 1749–1758.

[123] G. Molle, P. Bauer, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3481–3487.

[124] T.-P. Loh, J.-R. Zhou, Z. Yin, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1855–1857.

[125] J. Podlech, T. C. Maier, *Synthesis (Stuttg).* **2003**, 633–655.

[126] T. D. Haddad, L. C. Hirayama, B. Singaram, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 642–649.

[127] J. S. Tullis, P. Helquist, *Org. Synth.* **1997**, *74*, 229.

[128] P. Wolbers, A. M. Misske, H. M. R. Hoffmann, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4527–4530.

[129] A. J. Kennedy, T. P. Mathews, Y. Kharel, S. D. Field, M. L. Moyer, J. E. East, J. D. Houck, K. R. Lynch, T. L. MacDonald, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3524–3548.

[130] S. Racine, B. Hegedüs, R. Scopelliti, J. Waser, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 11997–12001.

[131] A. Bongini, R. Camerini, M. Panunzio, E. Bandini, G. Martelli, G. Spunta, *Tetrahedron Asymmetry* **1996**, *7*, 3485–3504.

[132] S. Hünig, M. Schäfer, *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 177–189.

[133] J. Garfunkle, C. Ezzili, T. J. Rayl, D. G. Hochstatter, I. Hwang, D. L. Boger, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4392–4403.

[134] H. Wang, X. Zhu, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 7119–7126.

[135] V. Silvia, A. Baldisserotto, E. Scalambra, G. Malisardi, E. Durini, S. Manfredini, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 383–392.

[136] A. F. Bramwell, I. M. Payne, G. Riezebos, P. Ward, R. D. Wells, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1972**, 2004–2007.

[137] T. A. Bakka, M. B. Strøm, J. H. Andersen, O. R. Gautun, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1119–1123.

[138] K. J. Doyle, C. J. Moody, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3761–3772.

[139] A. Ford, H. Miel, A. Ring, C. N. Slattery, A. R. Maguire, M. A. McKervey, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 9981–10080.

[140] R. Balasubramanian, G. E. Kenney, A. C. Rosenzweig, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 37313–37319.

[141] U. T. Rüegg, J. Rudinger, *Methods Enzymol.* **1977**, *47*, 111–116.

[142] I. Neogi, P. J. Das, F. Grynszpan, *Synlett* **2018**, *29*, 1043–1046.

[143] I. I. Grandberg, N. L. Nam, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1994**, *30*, 540–543.

[144] E. M. Kosower, B. Pazhenchevsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4983–4993.

[145] S. L. Kuan, T. Wang, T. Weil, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 17112–17129.

[146] V. Mangini, V. Maggi, A. Trianni, F. Melle, E. De Luca, A. Pennetta, R. Del Sole, G. Ventura, T. R. I. Cataldi, R. Fiammengo, *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 74–81.

[147] A. Warnecke, F. Kratz, *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 377–387.

[148] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.

[149] A. Krause, A. Kirschning, G. Dräger, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5547–5553.

[150] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279.

[151] M. W. Jones, R. A. Strickland, F. F. Schumacher, S. Caddick, J. R. Baker, M. I. Gibson, D. M. Haddleton, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4064–4066.

[152] M. Piras, A. Testa, I. N. Fleming, S. Dall'Angelo, A. Andriu, S. Menta, M. Mori, G. D. Brown, D. Forster, K. J. Williams, et al., *ChemMedChem* **2017**, *12*, 1142–1151.

[153] K. Lang, C. Li, I. Kim, X. P. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 20902–20911.

[154] L. Castañeda, Z. V. F. Wright, C. Marculescu, T. M. Tran, V. Chudasama, A. Maruani, E. A. Hull, J. P. M. Nunes, R. J. Fitzmaurice, M. E. B. Smith, et al., *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3493–3495.

[155] P. M. Weerawarna, Y. Kim, A. C. G. Kankanamalage, V. C. Damalanka, G. H. Lushington, K. R. Alliston, N. Mehzabeen, K. P. Battaile, S. Lovell, K. O. Chang, et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 300–318.

[156] L. Lázár, M. Nagy, A. Borbás, P. Herczegh, M. Zsuga, S. Kéki, *European J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 7675–7681.

[157] A. A. Kislukhin, C. J. Higginson, V. P. Hong, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6491–6497.

[158] H. Zischka, *Persönliche Gespräche*, **2021**.

[159] J. Mosquera, I. García, L. M. Liz-Marzán, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2305–2313.

[160] B. Ruttkay-Nedecky, L. Nejdl, J. Gumulec, O. Zitka, M. Masarik, T. Eckschlager, M. Stiborova, V. Adam, R. Kizek, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 6044–6066.

[161] N. Billinton, A. W. Knight, *Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 175–197.

[162] Lumiprobe GmbH, “Cyanin-5-DBCO,” https://de.lumiprobe.com/p/cy5-dbco (14.09.2021), **2021**.

[163] Lumiprobe GmbH, “sulfo-Cyanine5 DBCO,” https://de.lumiprobe.com/p/sulfo-cy5-dbco (14.09.2021), **2021**.

[164] M. M. Weitzenberg, Entwicklung Neuartiger Nahinfrarot-Fluoreszenzsonden Für Die Molekulare Bildgebung (Masterarbeit), Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, **2019**.

[165] M. M. Weitzenberg, Unveröffentlichte Ergebnisse, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, **2021**.

[166] E. I. Altinoğlu, J. H. Adair, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2010**, *2*, 461–477.

[167] J. A. Carr, D. Franke, J. R. Caram, C. F. Perkinson, M. Saif, V. Askoxylakis, M. Datta, D. Fukumura, R. K. Jain, M. G. Bawendi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S. A.* **2018**, *115*, 4465–4470.

[168] E. Thimsen, B. Sadtler, M. Y. Berezin, *Nanophotonics* **2017**, *6*, 1043–1054.

[169] J. A. Carr, M. Aellen, D. Franke, P. T. C. So, O. T. Bruns, M. G. Bawendi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, 9080–9085.

[170] G. Hong, S. Diao, J. Chang, A. L. Antaris, C. Chen, B. Zhang, S. Zhao, D. N. Atochin, P. L. Huang, K. I. Andreasson, et al., *Nat. Photonics* **2014**, *8*, 723–730.

[171] D. L. Bailey, D. W. Townsend, P. E. Valk, M. N. Maisey, *Positron Emission Tomography-Basic Sciences*, Springer-Verlag, London, **2005**.

[172] M. A. Willmann, Herstellung Und Evaluation Spezifischer PET-Liganden Unter Anwendung Moderner Radiofluorierungsmethoden, Universität zu Köln, **2021**.

[173] J. M. Link, S. C. Shoner, K. A. Krohn, *AIP Conf. Proc.* **2012**, *1509*, 61–65.

[174] K. Kettenbach, T. L. Ross, *MedChemComm* **2016**, *7*, 654–657.

[175] M. L. Miller, E. E. Roller, R. Y. Zhao, B. A. Leece, O. Ab, E. Baloglu, V. S. Goldmacher, R. V. J. Chari, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4802–4805.

[176] A. Kuzmin, A. Poloukhtine, M. A. Wolfert, V. V. Popik, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2076–2085.

[177] H.-J. Biersack, L. M. Freeman, *Clinical Nuclear Medicine*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2007**.

[178] N. A. Gozmina, V. V. Zaitsev, R. N. Krasikova, *J. Label. Cpd. Radiopharm.* **2001**, *44*, S895–S897.

[179] H. Bayley, J. R. Knowles, *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 69–114.

[180] M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 261–267.

[181] B. Aslam, M. Basit, M. A. Nisar, M. Khurshid, M. H. Rasool, *J. Chromatogr. Sci.* **2017**, *55*, 182–196.

[182] W. Timp, G. Timp, *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaax8978.

[183] X. Chen, Y. Wang, N. Ma, J. Tian, Y. Shao, B. Zhu, Y. K. Wong, Z. Liang, C. Zou, J. Wang, *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 72.

[184] B. Gutfilen, S. Al Souza, G. Valentini, *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, *12*, 3235–3235.

[185] Laboratoire National Henri Becquerel, “Atomic and Nuclear data,” http://www.lnhb.fr/nuclear-data/nuclear-data-table/ (22.11.2021), **2020**

[186] Y. Zhou, J. Li, X. Xu, M. Zhao, B. Zhang, S. Deng, Y. Wu, *Technol. Cancer Res. Treat.* **2019**, *18*, 1–10.

[187] M. D. Bartholomä, *Inorganica Chim. Acta* **2012**, *389*, 36–51.

[188] T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, Y. Fukami, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5592–5595.

[189] Z. M. Qian, H. Li, H. Sun, K. Ho, *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 561–587.

[190] J. S. Goltz, A. W. Wolkoff, P. M. Novikoff, R. J. Stockert, P. Satir, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 7026–7030.

[191] T. dos Santos, J. Varela, I. Lynch, A. Salvati, K. A. Dawson, *PLoS One* **2011**, *6*, DOI 10.1371/journal.pone.0024438.

[192] M. P. Luciano, J. M. Namgoong, R. R. Nani, S. H. Nam, C. Lee, I. H. Shin, M. J. Schnermann, J. Cha, *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 3253–3260.

[193] M. Lovrić, I. Cepanec, M. Litvić, A. Bartolinčić, V. Vinković, *Croat. Chem. Acta* **2007**, *80*, 109–115.

[194] K. C. Nicolaou, A. A. Estrada, M. Zak, S. H. Lee, B. S. Safina, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1378–1382.

[195] Chemikerausschuß der Gesellschaft Deutscher Metallhütten- und Bergleute e.V., Ed. , *Pufferlösungen in Analyse Der Metalle*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1961**.

[196] G. E. Keck, K. H. Tarbet, L. S. Geraci, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8467–8468.

[197] ThermoFisher Scientific, “DMEM, low glucose, GlutaMAX^{TM} Supplement, pyruvate,” https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21885025#/21885025 (03.12.2021), **2021**.

[198] B. M. Kim, J. S. Park, H. Ir, *Diphenyl Sulfate Derivatives and Preparation Method Thereof and Fluorophore Sensor Comprising Thereof*, **2016**, KR2016/0135880 A.

[199] National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, “Spectral Database for Organic Compounds,”https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi (03.06.2019), **2018**.

[200] P. C. Patil, F. A. Luzzio, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 757–759.

[201] T. Kitagawa, M. Nakamura, K. Masai, *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 994–998.

[202] D. J. Foley, R. G. Doveston, I. Churcher, A. Nelson, S. P. Marsden, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 11174–11177.

[203] Carl Roth GmbH + Co KG, “Zellpassage und die Verwendung von Trypsin,” https://www.carlroth.com/medias/Infobroschuere-TrypsinZellpassage-DE.pdf?context=bWFzdGVyfHRlY2huaWNhbERvY3VtZW50c3wzMjMxNDZ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHRlY2huaWNhbERvY3VtZW50cy9oNzQvaGU1LzkwMzQ4NDYzMDYzMzQucGRmfDRkYjVlY2NkNWRmYzc4OWIyMTE4N2E0YjIxYTdkZTVjN2I3OD (22.11.2021), **2021**.

8 INHALTSVERZEICHNIS ZU 6 ANHANG

6 Anhang……..……400
6.1 NMR-Spektren……....…….……400
6.2 HPLC-Chromatogramme…...……...481
6.3 UV-VIS Titrationen……..…….……..…..534

LEBENSLAUF

Name:	Lukas Daniel Schaaf
Geburtsdatum:	04.11.1991 in Bad Wildungen
Nationalität:	Deutsch

Beruflicher und akademischer Werdegang

12.2016 – 03.2022	**Promotionsstudium** an der Leibniz Universität Hannover, Institut für Medizinalchemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. O. Plettenburg; Thema: „Synthese und Untersuchung von Methanobactinderivaten als neue Wirkstoffe gegen Morbus Wilson“
01.2016 – 04.2016	**Industriepraktikum** bei der Symrise AG in Holzminden, Abteilung „Flavors Division, Research and Technology“; Thema: Synthese von langkettigen und (mehrfach) ungesättigten Aldehyden
10.2014 – 11.2016	**Masterstudium** an der Georg-August Universität Göttingen, Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Alcarazo am Institut für organischeund biomolekulare Chemie; Thema: „Enantioselektive Synthese von Carbohelicenen“
10.2011 – 10.2014	**Bachelorstudium** an der Georg-August Universität Göttingen, Bachelorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Llobet am Institut Catalá d´Investigació Química (ICIQ) in Tarragona (Spanien); Thema: „Neue molekulare Katalysatoren zur Wasseroxidation“
08.2002 – 06.2011	**Abitur** an der Alten Landesschule, Korbach

PUBLIKATIONEN

BETREUTE ABSCHLUSSARBEITEN

1) Masterarbeit von Fabian Brunswig (2018); Thema: „Studien zum Aufbau von Disulfidbrücken in Methanobactin- ähnlichen Verbindung“
2) Masterarbeit von Lennart Spickschen (2021); Thema: „Studien zur Synthese des Nordfragments von Methanobactin OB3b“