UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Offen im Denken

Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden als Inhibitoren für Serinproteasen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Steffen Köcher

geboren in Hattingen

Fakultät für Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2014 bis Dezember 2017 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Markus Kaiser am Zentrum für medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 11.4.18

Gutachter: Prof. Dr. Markus Kaiser

Prof. Dr. Michael Ehrmann

Vorsitzender: Prof. Dr. Gebhard Haberhauer

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Offen im Denken

ub universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/45955
URN: urn:nbn:de:hbz:464-20200527-101424-9

Alle Rechte vorbehalten.

Teile dieser Dissertation sind in folgender Publikation enthalten:

Steffen Köcher, Juliana Rey, Jens Bongard, André N. Tiaden, Michael Meltzer, Peter J. Richards, Michael Ehrmann, and Markus Kaiser; *Tailored Ahp-cyclodepsipeptides as Potent Non-covalent Serine Protease Inhibitors*; Angew. Chem. Int. Ed. **2017**, 56, 8555–8558

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

2 Theoretische Grundlagen ... 3

2.1 Serinproteasen ... 3
2.1.1 Katalytische Triade ... 3
2.1.2 Inhibition von Serinproteasen ... 6
2.1.3 Chymotrypsin, Trypsin und Elastase ... 11
2.1.4 Humane HtrA-Proteasen ... 12

2.2 Festphasensynthese von Peptiden ... 16
2.2.1 Prinzip der Festphasensynthese ... 16
2.2.2 Peptidkupplung und Kupplungsreagenzien ... 17
2.2.3 Feste Phase und Linker ... 20
2.2.4 Synthesestrategien und Schutzgruppen ... 23

2.3 Ahp-Cyclodepsipeptide ... 25
2.3.1 Struktur und Aufbau ... 25
2.3.2 Wechselwirkung mit biologischen Systemen ... 27
2.3.3 Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden ... 29

3 Zielsetzung ... 35

4 Ergebnisse und Diskussion ... 37

4.1 Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden ... 37
4.1.1 Retrosynthetische Analyse ... 37
4.1.2 Entwicklung einer Totalsynthesestrategie für Ahp-Cyclodepsipeptide ... 39
4.1.3 Biologische Evaluierung von Tasipeptin A und B ... 49

4.2 Entwicklung, Design und biologische Evaluierung von HTRA-Inhibitoren ... 51
4.2.1 Entwicklung einer Leitsequenz ... 51
4.2.2 Einfluss spezifischer Positionen auf die Inhibition der humanen HtrA-Proteasen ... 53
4.2.3 Kombination von Derivaten zur Verbesserung der Selektivität und Inhibition ... 62
4.2.4 Zellkultur-basierte Evaluierung der Inhibition von HTRA1 ... 65
4.2.5 Derivatisierung der P_1-Position und biochemische Evaluierung dieser Derivate ... 68
4.2.6 Optimierung der Verbindung **32** durch Derivatisierung der P_2'-Position und biochemische Evaluierung dieser Derivate ... 74

5 Zusammenfassung und Ausblick ... 79

6 Summary and Outlook ... 82

7 Experimenteller Teil ... 85
7.1 Arbeitsmaterialien und Instrumente ... 85
7.1.1 Chemikalien ... 85
7.1.2 Festphasensynthese von Peptiden (SPPS) ... 85
7.1.3 Mit Flüssigchromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (LC-MS) ... 85
7.1.4 Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ... 86
7.1.5 Säulenchromatographie ... 86
7.1.6 Dünnschichtchromatographie (DC) ... 86
7.1.7 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) ... 86
7.2 Synthese des Ahp-Vorläufers: *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl) -(L)-5-hydroxynorvalin-1-allylester ... 87
7.3 Allgemeine Methoden zur Festphasensynthese von Peptiden. ... 88
7.3.1 Methode A: Beladung des Harzes ... 88
7.3.2 Methode B: Bestimmung der Harzbeladung ... 88
7.3.3 Methode C: Aminosäurekupplung ... 88
7.3.4 Methode D: Fmoc-Entschützung ... 89
7.3.5 Methode E: Veresterung eines sek. Alkohols ... 89
7.3.6 Methode F: Kupplung einer Aminosäure auf eine N-methylierte Aminosäure ... 89
7.3.7 Methode G: Spaltung des Allylesters ... 90
7.3.8 Methode H: Zyklisierung des Peptides ... 90
7.3.9 Methode I: Abspaltung von der festen Phase ... 90
7.3.10 Methode J: Festphasensynthese des Ahp-Cyclodepsipeptid-Vorläufers ... 90
7.3.11 Methode K: Dess-Martin Oxidation und finale Synthese des Ahp-Cyclodepsipeptide ... 91
7.4 Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden ... 92

8 Literaturverzeichnis ... 133

9 Anhang ... 146
9.1 Abkürzungsverzeichnis ... 146
9.2 Abbildungsverzeichnis ... 149
9.3 Tabellenverzeichnis ... 152
9.4 Lebenslauf ... 153
9.5 Erklärung ... 156
9.6 Danksagung ... 157

1 Einleitung

Proteolytische Enzyme spielen in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen eine große Rolle und können diese sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Die Proteasen gehören zu den besonders gut untersuchten Enzymklassen und für viele von ihnen sind bereits dreidimensionale Strukturen, Wechselwirkungen oder biologische Aufgaben bekannt.

Basierend auf ihrem katalytischen Mechanismus werden die Enzyme in sechs bzw. sieben Klassen unterteilt: Aspartat-, Cystein-, Glutamat-, Metallo-, Threonin- und Serinproteasen.[1] Als „siebte“ Klasse werden gelegentlich auch die Asparagin-Peptidasen genannt, obwohl diese streng-genommen eigentlich auch als Asparagin-Lyasen charakterisiert werden können.[2]

Neben der Einteilung in katalytische Klassen existiert auch noch die sogenannte MEROPS-Klassifikation der Proteasen, in welche die Enzyme in unterschiedliche Clans und Familien eingeteilt werden.[3] Eine der größten und biomedizinisch-relevantesten Proteasefamilien sind in dieser Nomenklatur die S1-Serinproteasen. Diese sind an einer Vielzahl von wichtigen Prozessen wie z. B. der Verdauung oder der Blutgerinnung beteiligt. Eine Fehlregulation dieser Proteasen kann hingegen zu schweren Krankheiten wie z. B. der Bildung eines Emphysem, Schlaganfall oder Krebs führen.[4] Dementsprechend wurden bereits für viele Serinproteasen chemische Inhibitoren als Medikamente entwickelt. Ein bekanntes Beispiel dafür ist das Peptid Bivalirudin (Handelsname Angiox®).[5] Dieses wird zur Vermeidung von Thrombosen eingesetzt, indem es an die Serinprotease Thrombin bindet, welche an der Blutgerinnung beteiligt ist.[6]

Im Gegensatz zu Thrombin und anderen klassischen „Modell“-Serinproteasen wie z. B. Elastase, Chymotrypsin oder Trypsin sind speziellere Serinproteasen wie z. B. die HtrA-Proteasen (high temperature requirement A) noch wenig erforscht, obwohl sie auch wichtige biologische Funktionen übernehmen. So scheinen HtrA-Proteasen eine entscheidende Rolle in der Proteinqualitätskontrolle zu spielen. HTRA1 ist ein klassischer Vertreter dieser Proteasen, deren Hyperaktivität wiederum mit den Volkskrankheiten Arthritis und altersbedingter Makuladegeneration in Verbindung gebracht wird.[7] Medikamente zur Behandlung dieser Erkrankungen durch chemische Modulation der Serinprotease HTRA1 sind bisher noch nicht verfügbar.

Um solche bisher unzureichend erforschte Proteasen wie HTRA1 zu untersuchen, sind geeignete chemische Inhibitoren mit hoher Hemmpotenz und Selektivität notwendig. Durch den Einsatz solcher Verbindungen als chemische Sonden können Funktionen, Strukturen und die Regulation dieser Proteasen studiert werden. Auch können aus solchen Sonden in einem zweiten Schritt eventuell neuartige Medikamente entwickelt werden.

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer chemischer Inhibitoren orientieren sich viele Forschungsgruppen häufig an Naturstoffen. Der Vorteil ist, dass diese Verbindungen in ihren Eigenschaften einzigartig sind, eine große chemische Vielfalt und biochemische Spezifität zeigen. Ein bedeutender Fund war z. B. die Entdeckung des Penicillins, einem β-Lactam, welches kovalent an das aktive Zentrum der bakteriellen Serinprotease Transpeptidase bindet und diese somit effizient inhibiert.[8]

Die Moleküle der Naturstoffklasse der Ahp-Cyclodepsipeptide (Ahp: 3-Amino-6-Hydroxy-2-Piperidon) könnten einen solchen Ausgangspunkt zur Entwicklung neuartiger Inhibitoren darstellen. Durch einen speziellen Bindungsmodus sind diese Moleküle in der Lage, die Aktivität von Serinproteasen wie Elastase, Trypsin und Chymotrypsin teils im nanomolaren Bereich zu hemmen.[9–11] Die Synthese und die biologische Evaluierung dieser Naturstoffklasse wurden bisher jedoch nur rudimentär bearbeitet.[12–14]

Diese Arbeit ist die erste, die sich mit der Entwicklung einer praktikablen Synthesestrategie, der systematischen Derivatisierung und der vergleichsweise breiten biologischen Evaluierung dieser zyklischen Peptide befasst.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Serinproteasen

Nahezu 40% aller proteolytischen Enzyme können als Serinproteasen klassifiziert werden. Diese sind in allen Domänen des Lebens zu finden und an vielen wichtigen physiologischen Prozessen, wie zum Bespiel der Verdauung, der Hämostase, dem Zelltod, der Signalübermittlung, der Reproduktion und der Immunreaktion beteiligt.[1,15–18] In vielen biologischen Prozessen arbeiten diese dabei in der Form von Enzymkaskaden, in welchen ausgewählte Proteasen weitere Proteasen durch limitierte Proteolyse aktivieren. Ein klassisches Beispiel hierzu ist die Regulation der Blutgerinnung, in welcher unterschiedlichste Serinproteasen involviert sind, die sich gegenseitig durch Proteolyse aktivieren.[19,20]

2.1.1 Katalytische Triade

Wie der Name Serinproteasen bereits vermuten lässt, spielt bei diesen die Aminosäure Serin, welche sich im aktiven Zentrum des Enzyms befindet, eine besondere Rolle. Diese katalysiert jedoch nicht allein die Hydrolyse, sondern fungiert in Wechselwirkung mit einem weiteren Histidin- und Aspartat-Rest, welche zusammen die sogenannte katalytische Triade bilden. Als aktives Zentrum bezeichnet man den Bereich des Enzyms, in welchem die Hydrolyse der Proteine bzw. Peptiden, den so genannten Substraten, stattfindet. In Abb. 1 ist die Spaltung eines Peptides im aktiven Zentrum schematisch dargestellt. Als Beispiel ist die Serinprotease Chymotrypsin gegeben. Bei dieser Protease besteht die katalytische Triade aus den Aminosäuren Histidin 57 (His57), Aspartat 102 (Asp102) und Serin 195 (Ser195; die Zahlen geben die Positionen in der Aminosäuresequenz der Protease an).[1,15,18,21]

Im ersten Schritt deprotoniert das Imidazol des Histidins die Hydroxygruppe des Serins. Die Carbonsäureeinheit des Aspartats wechselwirkt dabei mit dem Imidazolring, sodass die Basizität des Imidazols erhöht wird. Der negativ-geladene Sauerstoff kann nun die Amidbindung in einem Peptid nukleophil angreifen, sodass ein tetraedrisches Intermediat entsteht. Dieses Zwischenprodukt wird durch das sogenannte „oxyanion hole“ (*deutsch*: Oxyanion-Loch) stabilisiert. Der Bereich ist

eine positiv geladene Tasche, welche durch das Peptidrückgrat der Aminosäuren Gly193 und Ser195 induziert wird. Im Folgenden wird ein Proton des positiv geladenen Imidazols (His57-H^+) auf das Peptid übertragen und der N-terminale-Teil des Peptides abgespalten. Der C-terminale-Teil verbleibt an der Seitenkette des Serins und wird Acylenzym-Intermediat genannt. Im nächsten Schritt wird ein Wassermolekül deprotoniert und das Hydroxidanion greift nucleophil das Acylenzym an. Dabei entsteht ein weiteres tetraedrisches Zwischenprodukt, welches ebenfalls durch das „Oxyanion hole“ stabilisiert wird. Das Imidazol überträgt wieder ein Proton und der C-terminale-Teil des Peptides wird abgespalten.[1,15,18,21–23]

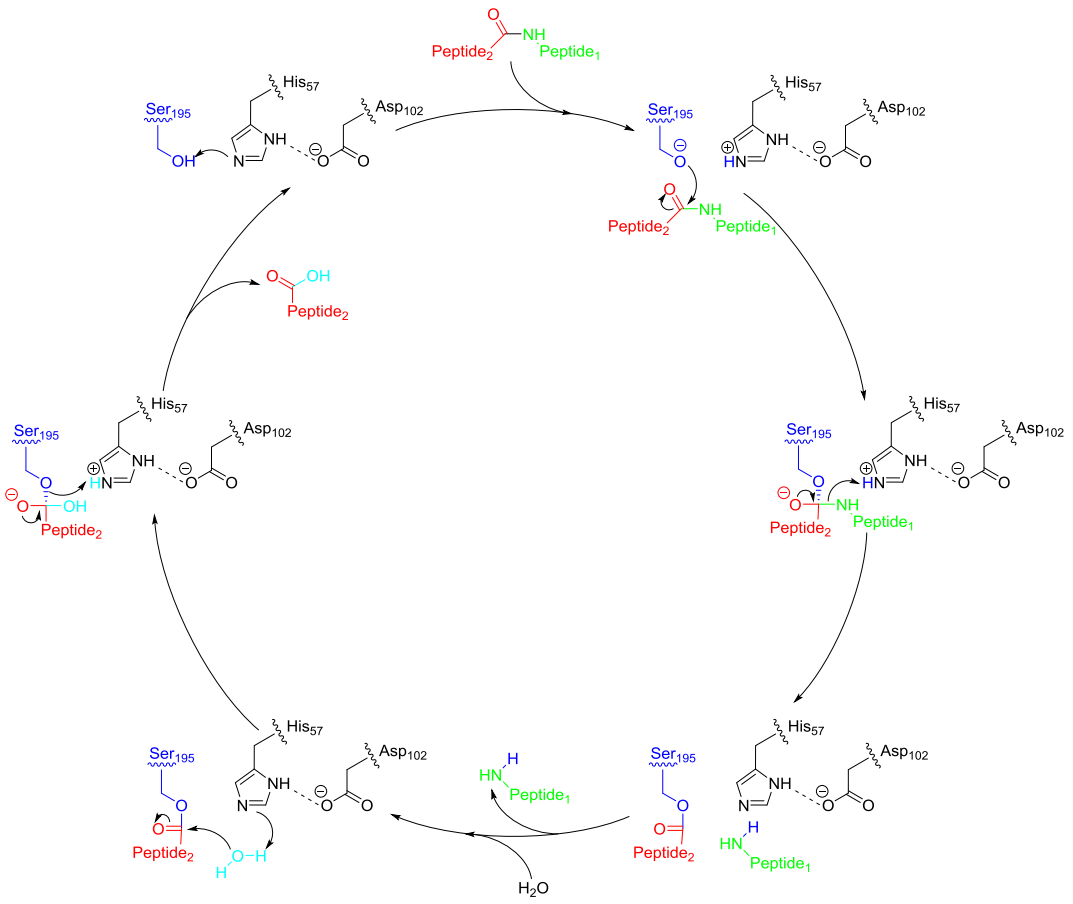


Abb. 1: Katalysezyklus einer Serinprotease mit der katalytischen Triade: His57 Asp102 Ser195. (Modifiziert nach L. Hedstrom[15]; G. Dodson[24]; A. R. Buller et al.[25]).

Bei der globalen Betrachtung der Hydrolyse von Peptidbindungen wechselwirken die Seitenketten des Peptides mit den sogenannten Enzymtaschen. Um diese Wechselwirkungen zu beschreiben, bedient man sich der Nomenklatur nach Schechter und Berger.[26] Hierbei betrachtet man den Bindungsmodus ausgehend von der zu schneidenden Peptidbindung. Durch die Spaltung ergibt sich ein

Carbonsäure-Teil (C-Terminus) und ein Amin-Teil (N-Terminus). Beim letzten Teil werden die Aminosäuren von P_1 bis P_n nummeriert und die korrespondierenden Enzymtaschen von S_1 bis S_n. Für den C-terminalen-Teil gilt dieselbe Nomenklatur, jedoch wird der Notation ein „‘ “ hinzugefügt (P_1‘ bis P_n‘ und S_1‘ bis S_n‘; siehe Abb. 2).[26]

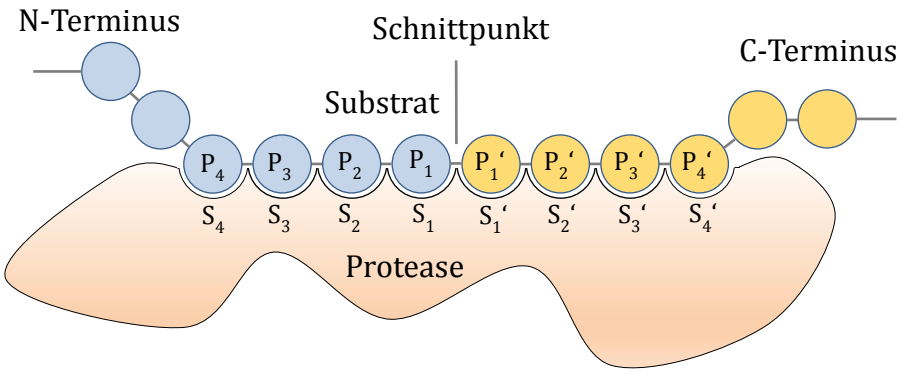


Abb. 2: Nomenklatur nach Schechter und Berger. (Modifiziert nach Turk, 2006).[27]

Neben der Spaltung von Amidbindungen können Serinproteasen auch andere Substrate wie z. B. Anilidene, Ester oder Thioester spalten.[15]

Neben dem oben erwähnten Chymotrypsin zählen viele weitere Proteasen zu den klassischen S1-Serinproteasen mit der His57-Asp102-Ser195-Triade, wie zum Beispiel Trypsin oder Elastase. Es existieren jedoch noch weitere Serinproteasen, wie z. B. solche mit einer katalytischen Duade wie Lactoferrin (Lys73-Ser259) oder mit nur einem Serin im aktiven Zentrum wie die Aminopeptidase DmpA (Ser250).[28,29]

Generell können Proteasen hinsichtlich ihrer statistisch-signifikanten Ähnlichkeit in Struktur und Sequenz erfasst werden. Die Informationen werden in der sogenannten „MEROPS-Datenbank für proteolytische Enzyme“ gesammelt. Hier werden die Proteasen nach ihrem katalytischen Mechanismus und hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz in sogenannte Clans und Familien eingeteilt. [3,30]

Eine Übersicht über alle bekannten Serinprotease-Clans ist in Tab. 1 gezeigt. Es existieren 13 verschiedene Clans, die sich wiederum in insgesamt 40 Familien unterteilen. Die Spezifität gibt an, nach welchen Aminosäuren die Proteasen des Clans die Peptidbindung generell spalten können. Das katalytische System beschreibt die essentiellen Komponenten des aktiven Zentrums.[1,21]

Tab. 1: Übersicht über bekannte Serinproteasen.[1,21]

Clan	Familien	Beispiel	katalytisches System	Spezifität
PA	12*	Trypsin	His, Asp, Ser	A, D, F, G, K, Q, R, W, Y
SB	2	Subtilisin, sedolisin	Asp, His, Ser	F, W, Y
SC	2	Prolyloligopeptidase	Ser, Asp, His	G, P
SE	6	D-Ala–D-Ala carboxypeptidase	Ser, Lys	D, A
SF	3	LexA peptidase	Ser, Lys/His	A
SH	2	Cytomegalovirus	His, Ser, His	A
SJ	1	Lon peptidase	Ser, Lys	K, L, M, R, S
SK	2	Clp peptidase	Ser, His, Asp	A
SP	3	Nucleoporin	His, Ser	F
SQ	1	Aminopeptidase DmpA	Ser	A, G, K, R
SR	1	Lactoferrin	Lys, Ser	K, R
SS	14	L,D-Carboxypeptidase	Ser, Glu, His	K
ST	5	Rhomboid	His, Ser	D

*In diesem Clan befinden sich sieben zusätzliche Familien mit einem aktiven Cystein als Nukleophil.

2.1.2 Inhibition von Serinproteasen

Eine Fehlregulation von Serinproteasen kann im menschlichen Körper zu unkontrollierten bzw. unerwünschten Proteolysereaktionen führen, was schließlich zu schweren Krankheiten wie z. B. Emphyseme, Schlaganfall, Krebs, Alzheimer, Entzündungen oder Arthritis führen kann. Daher kann eine selektive und potente Inhibition solcher Serinproteasen einen erheblichen therapeutischen Nutzen darstellen.[4]

Aufgrund der Bedeutung der Serinproteasehemmung sind bereits vielfältige Inhibitoren dieser Enzymklasse bekannt. Dabei unterscheidet man generell zwischen kovalenten und nicht-kovalenten Inhibitoren. Ein „Klassiker“ für kovalente Inhibitoren ist z. B. Diisopropylfluorphosphat, (DFP). Dieses Nervengift inhibiert verschiedenste Proteasen und bindet dabei kovalent-irreversibel an die Hydroxygruppe des aktiven Serins (siehe Abb. 3).[15]

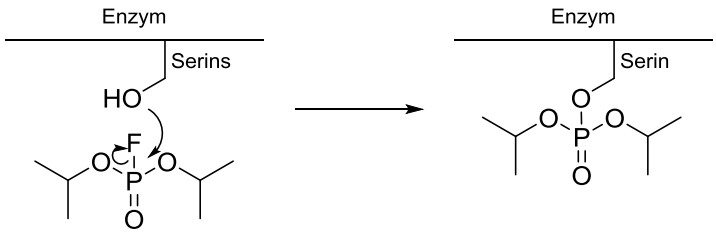


Abb. 3: Bindung des DFP an eine Serinprotease. (Modifiziert nach L. Hedstrom, 2002)[15]

Um eine höhere Protease-Selektivität zu erreichen, wurden Substrat-ähnlichere Phosphonylfluoridanaloga entwickelt (z. B. Phenylalaninanaloga zur Hemmung von Chymtrypsin). Obwohl diese eine bessere Selektivität zeigen, ist ihr Einsatz nur eingeschränkt möglich, da die P-F-Bindung in physiologischen Puffern hydrolysiert. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurden α-Aminoalkyldiphenyl-phosphonatester synthetisiert. Diese konnten später zu peptidischen Verbindungen weiterentwickelt werden. Die elektronegative Phenoxy-Abgangsgruppe ist dabei notwendig, um den Phosphor für den nucleophilen Angriff durch das Serin zu aktivieren. Sind elektronenziehende Substituenten an dem Ringsystem vorhanden, so erhöht dies das Inhibitionspotential. Wird diese reaktive Gruppe (die man auch einen „*warhead*" nennt) mit einem Di- oder Tripeptid versehen, wird eine effizientere Hemmung erreicht, da die Aminosäuren zusätzlich mit den Proteasen wechselwirken können. In anderen Projekten wurde versucht, den peptidischen Teil zusätzlich mit der S'-Seite der Protease wechselwirken zu lassen (siehe Abb. 4).[31–33]

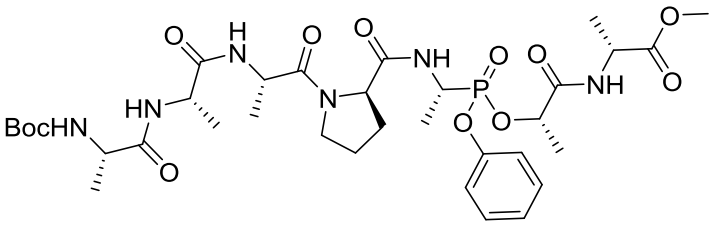


Abb. 4: Inhibitor, der mit der S- und der S'-Seite einer Protease wechselwirken kann.[15]

Eine weitere kovalente Inhibitorenklasse sind Halomethylketone. Diese binden ebenfalls kovalent und irreversibel an das aktive Zentrum. Zum Mechanismus der Inhibition mit einem peptidischen Chloromethylketon existieren zwei Vorschläge, die in Abb. 5A zusammengefasst sind.[4]

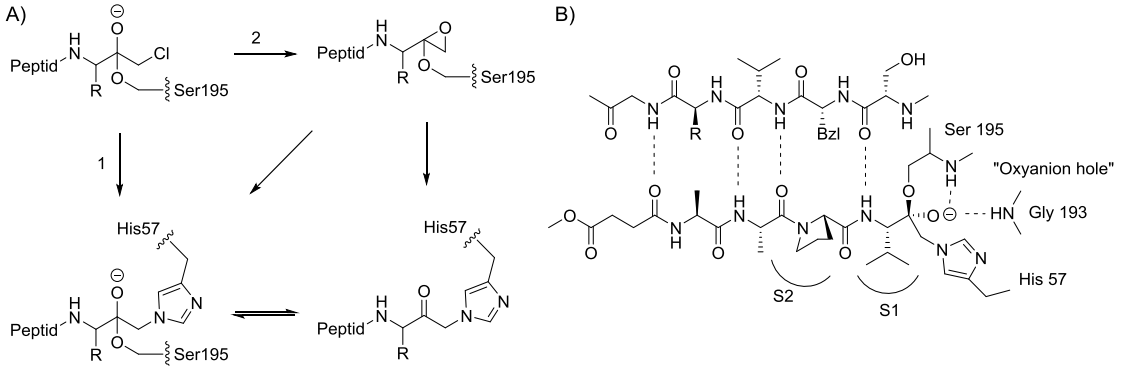


Abb. 5: A) Mechanismus der Inhibition durch Halomethylketone ; B) Bindungsmodus eines peptidischen Halomethylketons an Elastase.[34][35]

In beiden Varianten greift zunächst die Hydroxidgruppe des Ser195 nukleophil die Carbonylfunktion an. Nach Poulos et al. (Reaktionsweg 1) wird das Chloratom direkt durch den nukleophilen Stickstoff des Imidazols substituiert.[34]

Die Gruppe von Powers postuliert einen anderen Mechanismus (Reaktionsweg 2). Dabei formt das Hemiacetal im ersten Schritt ein Epoxid durch die Substitution des Chloratoms. Dieser Drei-Ring wird dann nukleophil von der Seitenkette des His57 angegriffen. Der Inhibitor kann somit sowohl monovalent als auch bivalent binden.[35] Die Bindungsvarianten stehen in einem Gleichgewicht.

Durch die Kombination des Chloromethylketons mit einem Peptid kann das Inhibitionspotential gesteigert werden. Abb. 5B zeigt die bivalente Bindung des Inhibitors MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-CH_2Cl an Elastase. Zudem wechselwirkt der peptidische Teil des Moleküls mit den Enzymtaschen S1 und S2. Das Peptidrückgrat bildet mit einem Teil der Protease ein antiparalleles β-Faltblatt aus. Durch die Besetzung des „Oxyanion hole“ wird die Bindung zwischen dem Inhibitor und dem Enzym zusätzlich stabilisiert.[36]

Zu einer weiteren großen kovalenten Inhibitorenklasse gehören die Boronsäurederivate. Der Inhibitionsmechanismus ist ähnlich zu den oben genannten Verbindungen. Das trigonale Bor kann durch sein unbesetztes p-Orbital eine weitere Bindung eingehen. Wechselwirkt der Inhibitor mit der Protease, so wird das „Oxyanion hole“ von einer OH-Gruppe der Boronsäure besetzt, wie zum Beispiel bei dem Inhibitor Phenylethanboronsäure (siehe Abb. 6).[15,31]

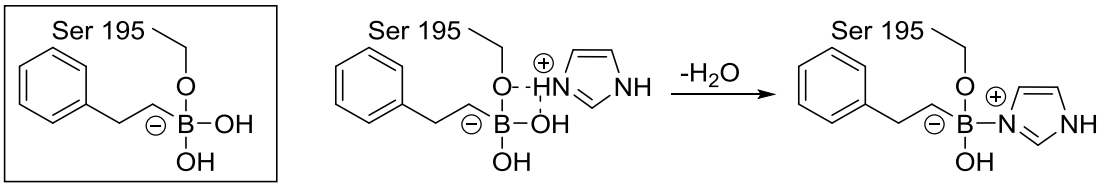


Abb. 6: Phenylethanboronsäure (Kasten) und Verstärkung der Inhibition durch das His57.[31,37,38]

Die Wechselwirkung des His57 mit dem Inhibitor kann auch bei dieser Klasse den Effekt verstärken. Tsilikounas et al. zeigten, dass der protonierte Imidazolring des His57 ein Proton übertragen kann, sodass Wasser eliminiert wird und das Histidin an das Bor koordinieren kann (siehe Abb. 6).[38,39] Dabei konnte gezeigt werden, dass diese peptidischen Boronsäurederivate zwar kovalente, nichtsdestotrotz jedoch noch reversible Inhibitoren für bestimmte Serinproteasen sind. α-Aminoboronsäure-Derivate zeigen häufig eine hohe Hemmpotenz und können durch geeignete Derivatisierung auch eine hohe Selektivität erreichen. Allerdings sind auch diese nicht selektiv für Serinproteasen, sondern können z. B. auch Threoninproteasen hemmen.

Auch viele Naturstoffe oder Naturstoffklassen zeigen eine inhibierende Wirkung gegenüber Serinproteasen. Dazu zählen z. B. Peptidaldehyd-Naturstoffe wie zum Beispiel Leupeptin oder Antipain. Diese sind jedoch sehr unselektiv und inhibieren nicht nur Serinproteasen, sondern auch Cystein- und Threoninproteasen. Weitere Vertreter der Naturstoff-basierten Serinproteaseinhibitoren sind z. B. die Aeruginosine, welche hervorragende Hemmeigenschaften gegenüber Thrombin und Trypsin zeigen. Charakteristisches Merkmal dieser Substanzklasse ist eine 2-Carboxy-6-octahydroindol-Aminosäure, welche häufig von einer D-Aminosäure, einem Hydroxyphenylmilchsäurederivat und einem Argininderivat umgeben ist. Die außerordentliche Hemmung der Protease Thrombin lässt sich durch den molekularen Bindungsmodus erklären: die Aeruginosine wechselwirken in nahezu optimaler Weise mit den S_1, S_2 und der S_4 Taschen des Thrombins. Die S_4-Tasche wurde als D-S_3 definiert, da die Verbindungen mit einem D-Phenylalanin der Protease wechselwirken (siehe Abb. 7).[40]

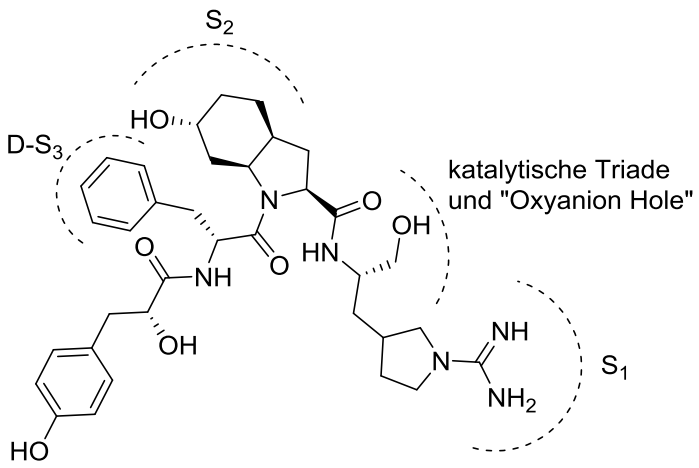


Abb. 7: Vorhergesagte Wechselwirkung des Naturstoffes Aeruginosin 298A mit der Protease Thrombin.[40]

Neben linearen Peptiden sind auch Cyclopeptid-Naturstoffe mit Serinprotease-Hemmeigenschaften bekannt.[41] Klassische Vertreter sind z B. die Naturstoffe Cyclotheonamide A-E, Cyclotheonellazole A–C oder Planktocyclin, die zum Teil sogar im nanomolaren Bereich inhibieren. Einige dieser zyklischen Peptiden können dabei auch mit der S'-Seite einer Protease wechselwirken.[42–45]
Nicht nur peptidische, sondern auch andere Naturstoffklassen wie Terpene, Zuckerderivate oder Moleküle mit aromatischen/heteroaromatischen Systemen, wie Anthracen- oder Isocumarinderivate wurden schon als effiziente Inhibitoren von Serinprotease beschrieben.[31,46–49]

Einer der wichtigsten Naturstoffvertreter der Serinproteasen sind die Penicilline. Diese β-Lactame können den Aufbau von Zellwänden in Bakterien verhindern, indem sie irreversibel an die Serinprotease Transpeptidase binden und werden daher regelmäßig als Antibiotika in der Therapie eingesetzt. Dabei „imitiert" die molekulare Struktur der Penicilline die (D)Ala-(D)Ala-Substratstruktur der Transpeptidase.[50] Strukturell-verwandt mit den Penicilline sind die Cepheme. Im Vergleich zu den Penicillinen, welche eine Tetrahydrothiazoleinheit besitzen, verfügen diese über eine Dihydro-1.3-Thiazeneinheit und zeigen ebenfalls antibiotische Wirkung. Die 5. Generation dieser Verbindungsklasse, wie zum Beispiel Ceftobiprol, oder Ceftarolin, wird als Antibiotikum gegen MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) eingesetzt.[51]

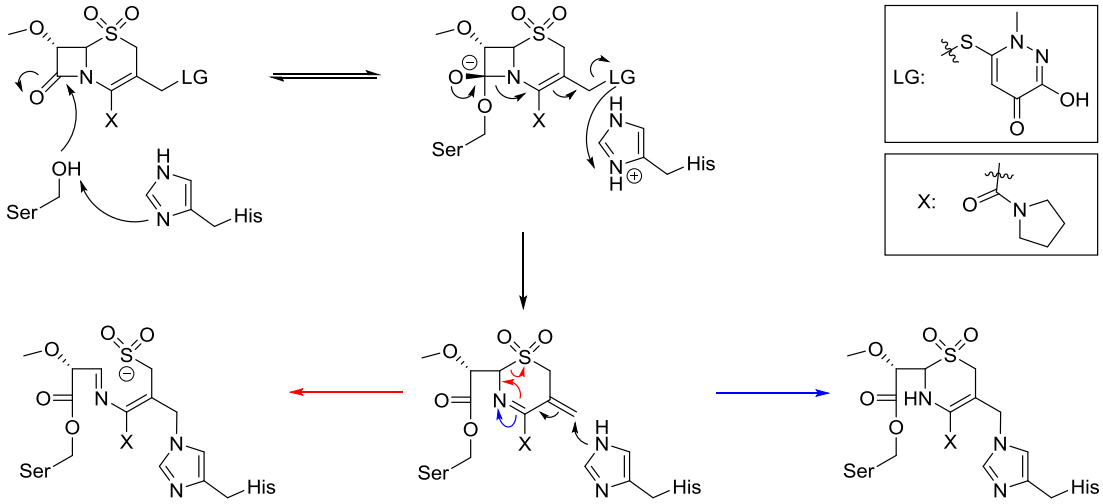


Abb. 8: Transpeptidase-Inhibiton durch Cepheme; Rot: Hemmung unter Öffnung der Thiazeneinheit; Blau: Hemmung unter Erhalt der Thiazeneinheit.[52]

Als Inhibitionsmechanismus wird dabei ein nukleophiler Angriff des deprotonierten Serins am β-Lactamring angenommen. Dies führt dann zu einer Elektronenverschiebung im Wirkstoff und letztendlich zu einer Bildung einer Doppelbindung unter Abspaltung einer Abgangsgruppe. An dieser Doppelbindung erfolgt nun der nucleophile Angriff des Histidins in einer Art Michael-Addition. Die weitere Elektronenumlagerung kann nun mit und ohne Thiazenringöffnung erfolgen (siehe Abb. 8).

2.1.3 Chymotrypsin, Trypsin und Elastase

Eine der größten und biochemisch-relevantesten Familien der Serinproteasen ist die „Familie S1“, welche dem Clan PA zugeordnet wird. Die S1-Proteasen werden dabei noch detaillierter nach ihrem ursprünglichen Organismus unterschieden und in die Subklassen S1-A bis S1-E eingeteilt. [3,30,53]

In diesem Kapitel werden die typischen Vertreter der S1-A-Serinproteasen näher erläutert. Dazu gehören Chymotrypsin, Trypsin und Elastase. Sie sind sogenannte Endopeptidasen, die Polypeptide in kleinere Peptide abbauen (im Vgl.: Exopeptidasen spalten Peptide endständig, sodass Aminosäuren, Di- und Tripeptide frei werden). Wie bereits in Kapitel 2.1.1 erwähnt, besitzen alle drei Enzyme eine His57-Asp102-Ser195-Triade. Die Hydrolyse eines Substrates oder die Bindung eines Inhibitors wird bei diesen Proteasen häufig über die Stärke der Wechselwirkung zwischen dem P_1-Rest und der S_1-Tasche bestimmt. Wechselwirken weitere Reste des Inhibitors mit dem Enzym, so führt dies natürlich

noch zu einer weiteren Verbesserung bzw. Beschleunigung der Inhibition bzw. des Substratabbaus.[54,55]

In Chymotrypsin bilden die Reste Ser189, Gly216 und Gly226 eine tiefe hydrophobe Tasche in der S_1-Position. Die Protease kann somit gut mit unpolaren, voluminösen Aminosäuren wechselwirken. Im Vergleich zu Alanin präferiert Chymotrypsin Phenylalanin über das 50000-fache mehr.[15,21,56]

Die Kombination von Asp189, Gly216 und Gly226 formt eine negativ-geladene Tasche und ist bei Trypsin zu finden. Das Enzym schneidet daher vorwiegend nach den Aminosäuren Arginin oder Lysin in der P_1-Position.[15,21,56]

Elastase hingegen bevorzugt kleine aliphatische Aminosäuren in der P_1-Position. Die Tasche ist wesentlich kleiner als bei Chymotrypsin oder Trypsin. Besonders Valin oder Isoleucin sind hier gut geeignet. Ihre Spezifität erhält die Tasche durch die Aminosäuren Val216 und Thr226. Bei Elastase ist jedoch auch die P_3-Seitenkette relevant. So ist die Acylierungsrate bei einem „passenden Rest“ um das 100-fache gegenüber einen nicht-optimalen Rest erhöht.[15,56,57]

2.1.4 Humane HtrA-Proteasen

Das Aggregieren von fragmentierten, fehlgefalteten oder fehlgeleiteten Proteinen kann wichtige biologische Prozesse behindern und zu zellulären Fehlfunktionen führen. Um diesen potentiell-toxischen Aggregaten entgegenzuwirken, verwendet die Zelle Enzyme, die Proteinsubstrate neu falten oder, falls nicht mehr möglich, abbauen. Solche Aggregat-abbauende Proteasen sind somit besonders wichtig in der Proteinqualitätskontrolle, da sie eine schützende und regulierende Funktion besitzen. Sie kommen sowohl in Einzellern als auch in Mehrzellern vor.[7,58]

Diese Funktionen werden auch von den Proteasen der HtrA-Familie (*engl.*: high temperature requirement A) übernommen. Sie gehören wie Elastase zum PA-Clan, sind jedoch der Familie S1C zugeordnet. Es wurden bereits über 180 Mitglieder der HtrA-Familie in verschiedensten Organismen identifiziert.

Alle HtrA-Proteasen besitzen eine S1-Serinprotease-ähnliche Domäne und mindestens eine C-terminale PDZ-Domäne. Darüber hinaus unterscheiden sie sich voneinander in weiteren Punkten, z. B. durch die Präsenz einer Signalsequenz (SS), einem Transmembransegment (TM) oder weiteren N-terminalen Domänen wie z. B.

einer IGFBP- oder Kazal-Proteaseinhibitor (Kl)-artigen Domänen. Eine Auswahl an HtrA-Familienmitgliedern ist in Abb. 9 dargestellt.[59,60]

Abb. 9: Domänensstruktur ausgewählter HtrA-Familienmitglieder.[59]

Strukturell sind alle HtrA-Proteasen ähnlich aufgebaut. Die Grundstruktur dieser Proteasen ist ein trichterförmiges Trimer, welches durch Wechselwirkungen der Proteasendomänen gebildet wird und bei der die PDZ-Domänen nach außen ragen. Neben den Trimeren können einige HtrA-Proteasen jedoch auch höhere Oligomere bilden, bei welchen sich die Trimere in höhere Oligomere wie z. B. Hexamere, 12-mere oder 24-mere zusammenlagern. Während einige HtrA-Proteasen wie HTRA2 und DegS in ihrer inaktiven als auch in ihrer aktiven Form als Trimere auftreten, ändert sich die Struktur bei anderen HtrA-Proteasen wie DegP und HTRA1 mit der Aktivierung. Bindet hier ein Substrat bzw. ein allosterischer Aktivator an das Enzym, so wird die Protease unter der Bildung höherer Oligomere aktiviert.[7]

Aufgrund der Oligomerstruktur können die einzelnen Untereinheiten mit benachbarten Einheiten „kommunizieren“, wodurch eine kooperative bzw. allosterische Regulation der Proteasefunktion möglich wird. Strukturell wird die Aktivierung der Protease durch eine Kaskade von Reorierentierungen einzelner Proteinsegmente gesteuert. Dabei lagern sich einige Loops, schleifenförmige Sekundärstrukturelemente, um. Bei der HtrA-Protease DegS wird z. B. die Umlagerung des Loops L3 durch Bindung eines Aktivators an die PDZ-Domäne

ausgelöst. Dabei interagiert ein Arginin des Loop L3 mit dem Loop LD der Nachbaruntereinheit und induziert die korrekte Ausrichtung der Loops L1, L2 und LD. Dieser Prozess bringt die Protease in die aktive Form und geht mit einem disorder-to-order-Übergang einher.[7,61]

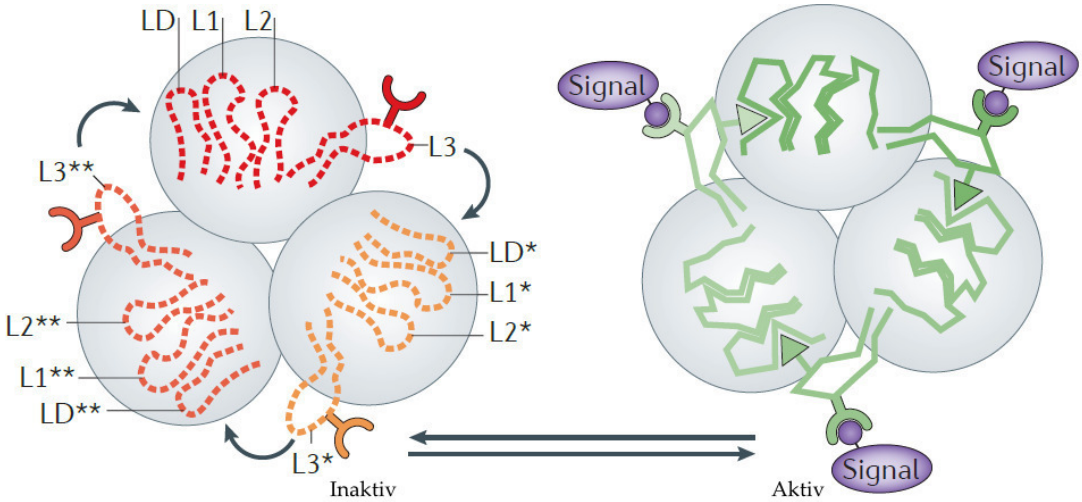


Abb. 10: Aktivierungskaskade einer HTRA-Protease. (Modifiziert nach T. Clausen et al, 2011).[7]

Die Aktivierung der humanen Protease HTRA1 ist im Prinzip ähnlich. Diese wird allerdings bereits durch eine Wechselwirkung des Substrates mit der Proteasedomäne ausgelöst, um das aktive Zentrum und den Loop L3 neu zu ordnen, da bei dieser Protease das Substrat direkt mit dem Loop L3 wechselwirkt und nicht auf ein externes Signal angewiesen ist. Daher kann eine Aktivierung von HTRA1 allein durch Substratbindung induziert werden.[7]

Nach der Aktivierung kann die Protease ihre Funktionen übernehmen. Die S1-Serinproteasedomäne und die PDZ-Domäne sind über einen Linker miteinander verbunden. Bei einigen HtrA-Proteasen wie z. B. DegP wirken dabei die Protease- und PDZ-Domäne bei der „Verarbeitung" eines Substrates zusammen. So bindet dieses zunächst an die PDZ-Domäne und wird dann im aktiven Zentrum gespalten, anschließend erfolgt eine Reorientierung des Substrates, wodurch eine prozessiver Abbau des Substrates erreicht wird.[61]

Die PDZ-Domäne bevorzugt die Wechselwirkung mit hydrophoben Aminosäuren und bindet C-terminal an die letzten drei bis vier Reste eines Zielproteins. Somit ist sie generell für die Protein-Protein-Wechselwirkung verantwortlich.[62][61]

Die am besten untersuchten humanen HtrA-Proteasen sind HTRA1 und HTRA2. Diese scheinen in einigen Erkrankungen wie z. B. Arthritis, Krebs, altersbedingte

Makuladegeneration, Parkinson oder Alzheimer eine wichtige Rolle zu spielen.[7,63-65]

So konnte ein Anstieg der Expression von HTRA1 bei Osteoarthritis beobachtet werden.[66] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Zellwachstum von Krebszellen *in vitro* und *in vivo* durch Überexpression von HTRA1 gehemmt wird. Es wird daher vermutet, dass HTRA1 als Tumorsupressor fungiert. Im Kontrast dazu wird die Expression in Melanomen und Fibroblasten in Ovarialkarzinomen herunterreguliert.[7]

Die Verfügbarkeit von Molekülen zur chemisch-biologischen Charakterisierung von humanen HtrA-Proteasen sind bis heute begrenzt. So existiert für HTRA2 bislang nur ein Inhibitor, das Thiobarbitursäurederivat Ucf-101, welches durch ein „high-throughput screening“ entdeckt wurde (siehe Abb. 11).[67] Diese Verbindung ist jedoch nicht selektiv, sondern hat weitere off-targets.[68] Auf der Basis einer Boronsäure hat die Firma Novartis AG des Weiteren einen Inhibitor für HTRA1 entwickelt, der jedoch auch nicht spezifisch für diese Protease ist. So hemmt dieser Inhibitor z. B. auch die Serinprotease Chymotrypsin bereits bei einer Konzentration von 1 µM.[69]

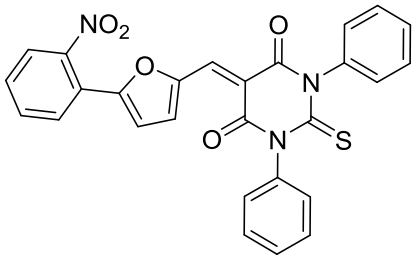


Abb. 11: Chemische Struktur des HTRA2-Inhibitors Ucf-101.[67]

2.2 Festphasensynthese von Peptiden

In den frühen 60er Jahren des 20. Jahrhunderts ist es Robert Bruce Merrifield zum ersten Mal gelungen, ein Tetrapeptid mit Hilfe einer festen Phase zu synthetisieren. Für diese Leistung wurde ihm 20 Jahre später der Nobelpreis verliehen.[70] Diese Entwicklung vereinfachte die langwierige, mühsame und anspruchsvolle Aufreinigung von Peptiden während der Synthese in der flüssigen Phase.[71] Durch weitere systematische Entwicklung der Festphasensynthese von Peptiden, kurz SPPS (*engl.: Solid Phase Peptide Synthesis*) sind heutzutage Syntheseroboter erhältlich, die auf Basis dieses Konzeptes voll- oder semiautomatische Synthesen von Peptiden durchführen. Die Methode ist heute die Wahl, um viele Peptide parallel herzustellen. Bei großen Ansätzen oder sehr schwierigen Peptiden kann die Lösungssynthese jedoch immer noch sinnvoll sein.[72]

2.2.1 Prinzip der Festphasensynthese

Die Festphasensynthese besteht prinzipiell aus zwei „Komponenten“: Zum einen aus der festen Phase, welche aus einem unlöslichen Polymer mit einem Linker und dem darauf aufzubauenden Peptid besteht und zum anderen aus der flüssigen Phase, durch die Edukte und Reagenzien zugeführt werden.[71,73]

Der Linker ist das Bindeglied zwischen der unlöslichen polymeren Stützstruktur und dem zu synthetisierenden Peptid. Die erste Aminosäure wird über den Linker an das sogenannte Harz (feste Phase) gebunden. Die Synthese erfolgt in der Regel vom C-Terminus zum N-Terminus. Die erste Aminosäure wird daher über die Carbonsäure an der festen Phase verankert. Dabei müssen das Amin und die funktionellen Gruppen der Seitenkette mit orthogonalen Schutzgruppen versehen sein, um diese selektiv abzuspalten. Dies gilt auch für alle weiteren Aminosäuren. Ist die erste Aminosäure auf dem Harz verankert, wird die N-terminale Schutzgruppe abgespalten, die der Seitenkette bleibt bestehen. Die Carbonsäure der nächsten Aminosäure kann mit Hilfe von Reagenzien und unter der Bildung einer Amidbindung an die erste Aminosäure gekuppelt werden. Anschließend wird die N-terminale Schutzgruppe abgespalten und eine weitere Aminosäure kann gekuppelt werden. Dieser alternierende Prozess von Abspalten der N-terminalen Schutzgruppe und der Kupplung einer Aminosäure wird so oft wiederholt, bis die gewünschte Aminosäuresequenz synthetisiert ist. Zum Schluss werden die

Schutzgruppen der Seitenkette und das Peptid vom festen Träger abgespalten, sodass das freie Peptid erhalten wird (vergl. Abb. 12).[71,73]

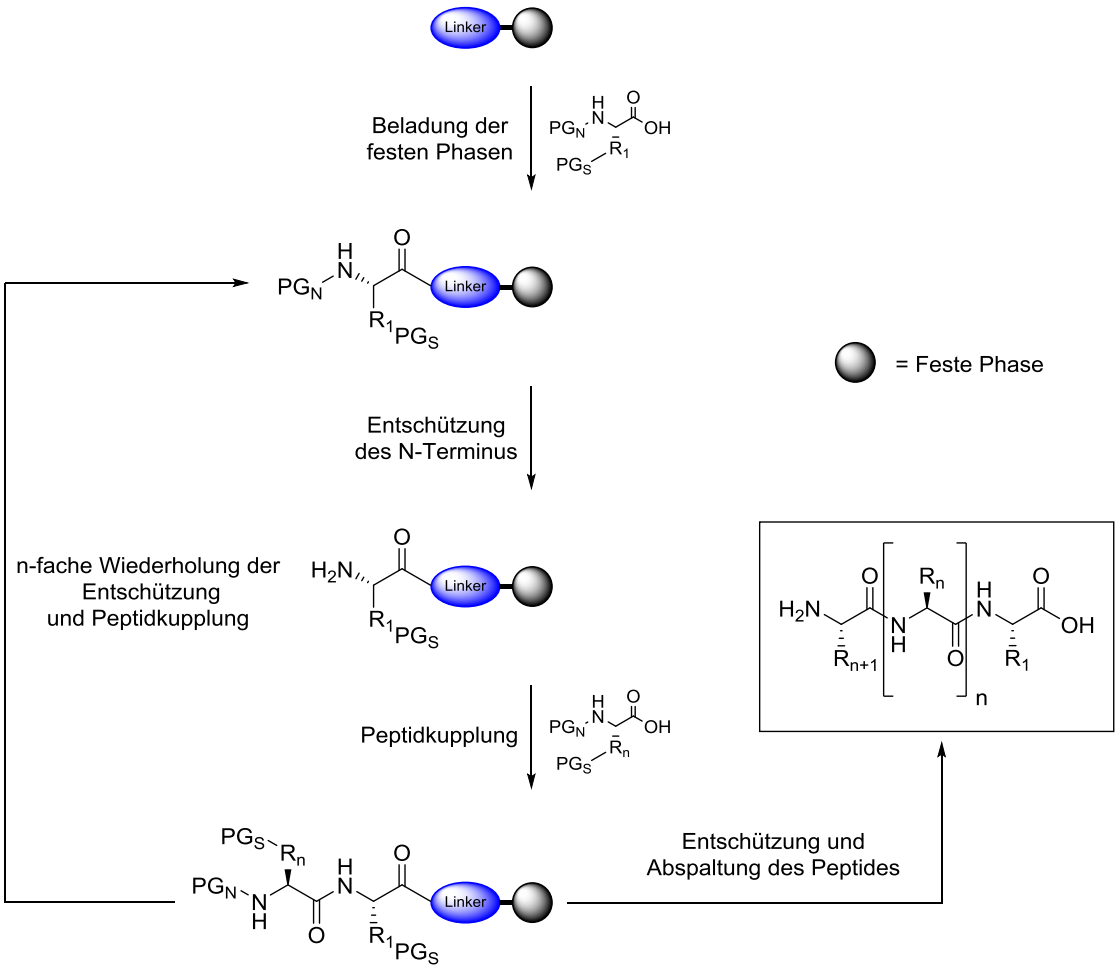


Abb. 12: Schematische Darstellung der Festphasensynthese eines Peptides; R = Seitenkette der Aminosäure; PG_S = Schutzgruppe der Seitenkette: PG_N = Schutzgruppe des Amins.[74]

2.2.2 Peptidkupplung und Kupplungsreagenzien

Die Bildung einer Peptidbindung ist eine Kondensationsreaktion einer Carbonsäure mit einer Aminogruppe. Erst bei einer Temperatur von 200 °C tritt jedoch eine solche Kondensationsreaktion spontan ein.[75] Soll diese jedoch unter milden Reaktionsbedingungen geschehen, so ist eine Voraktivierung der Carbonsäure notwendig.[76] Die Aminogruppe kann dann nukleophil den aktivierten C-Terminus angreifen und die Amidbindung (Peptidbindung) bilden. Wenn bei der Peptidsynthese die korrespondierenden Amino- bzw. Carboxylgruppen ungeschützt sind, verläuft die Reaktion jedoch unkontrolliert. Dabei können zyklische Peptide, unerwünschte Sequenzabfolgen und Polymere entstehen. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass alle funktionellen Gruppen blockiert werden, die

nicht an der Bildung der Amidbindung beteiligt sind. Die Schutzgruppen müssen temporär und reversibel sein.[74,76,77] Der dazu notwendige Arbeitsablauf lässt sich in drei Schritte unterteilen:[74]

1. Herstellung von C- bzw. N-terminal geschützten Aminosäuren, wodurch die Aminosäure ihre zwitterionischen Eigenschaften verliert.
2. Synthese der Amidbindung durch die Überführung der Carbonsäure, der N-terminal geschützten Aminosäure, in ein aktives Intermediat. Dieses ermöglicht, dass die Aminogruppe der zweiten Aminosäure nukleophil unter Wasserabspaltung angreift und die Amidbindung geformt wird.
3. Vollständige oder selektive Abspaltung von Schutzgruppen, um entweder das gewünschte Produkt zu erhalten oder um die Peptidsynthese fortzusetzen.

Abb. 13 zeigt das generelle Prinzip der Bildung einer Amid-/Peptidbindung. Die C-terminale Schutzgruppe ist im Falle der Festphasensynthese das Harz.

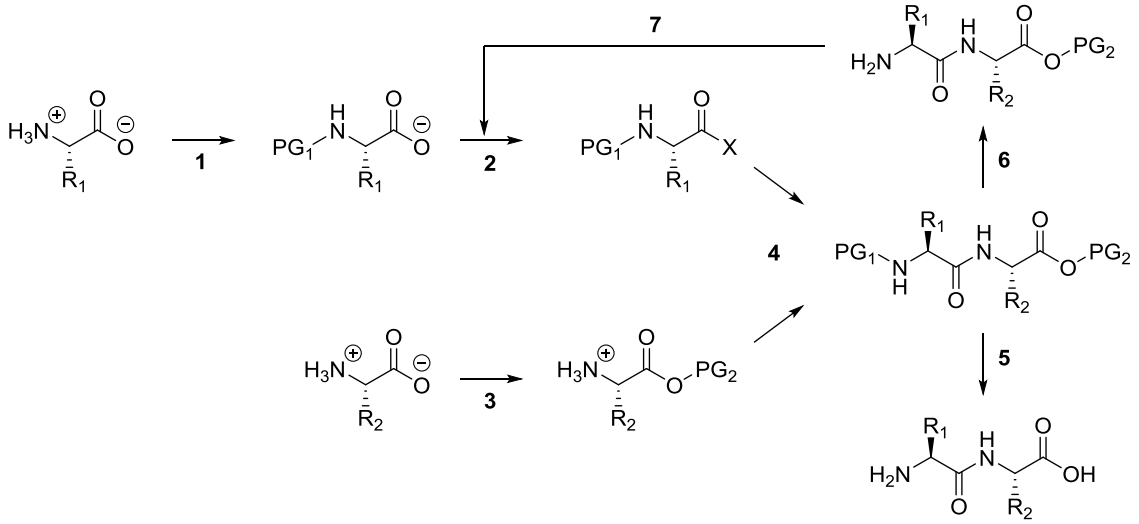


Abb. 13: Peptidkupplungsprozess; 1) N-terminale Schützung; 2) Aktiverung des C-Terminus; 3) C-terminale Schützung; 4) Peptidkupplung; 5) bei gewünschtem Produkt Abspaltung aller Schutzgruppen; 6) Abspaltung N-terminaler Schutzgruppen; 7) weitere Aminosäuren kuppeln: → Aktivierung → Peptidkupplung → Schutzgruppen abspalten etc.; PG = Schutzgruppe, PG_1 ist im Falle der Festphasensynthese das Harz mit dem Linker.[74]

Zur Aktivierung der Carbonsäure steht ein breites Reagenzspektrum zur Verfügung. Dafür werden z. B. Carbodiimide[78], Chloroformiate[79] oder Guanidinium/ Uroniumsalze[80] eingesetzt.

Eine Mischung aus HBTU ((2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) sowie HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) wird häufig zur Aktivierung und damit zur Kupplung von Aminosäuren in der Festphasensynthese verwendet.[81]

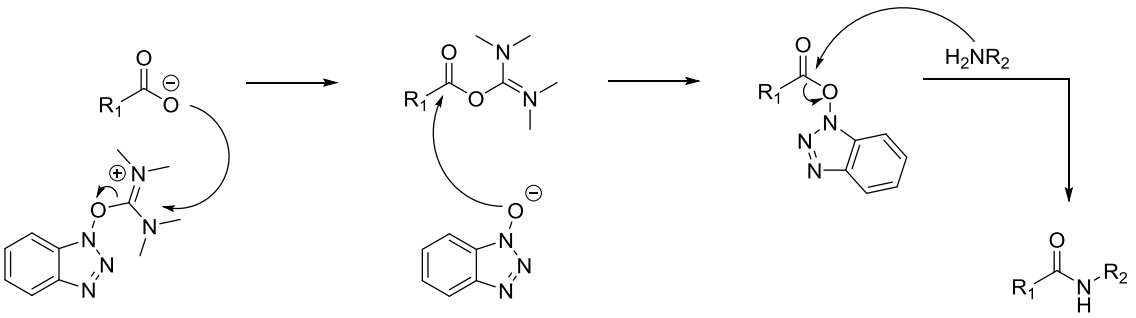


Abb. 14: Mechanismus der HBTU/HOBt-Peptidkupplung.[74]

Die zu aktivierende Carbonsäure wird durch eine Base deprotoniert und greift nukleophil an dem positiv polarisierten Kohlenstoffatom des Aktivierungsreagenzes an. Durch diese Reaktion wird ein OBt-Anion frei. Im nächsten Schritt kann das OBt-Anion den gebildete O-Acylisoharnstoff nukleophil angreifen, sodass ein hoch reaktiver Ester und Tetramethylharnstoff entsteht. Das Amin greift schließlich den Aktivester an, wodurch das OBt-Anion frei und die Peptidbindung gebildet wird (siehe Abb. 14).[74]

Die Reaktion wird von zahlreichen Nebenreaktionen begleitet. Um diese zu unterdrücken, muss HOBt im Überschuss vorhanden sein, denn die Aminosäuren können während der Kupplung durch Bildung von Enolaten oder Oxazolonen racemisieren.[82,83] Des Weiteren können inerte N-Acylharnstoffderivate entstehen[84], was durch Zugabe eines Überschusses an HOBt effektiv unterdrückt wird.[85–87] Nebenreaktionen, wie die Bildung von N-Caboxyanhydriden oder Diketopiperazinen bei N-methylierten Aminosäuren sowie die Reaktion des Kupplungsreagenzes mit dem freien Amin, sind jedoch weitere Nebenreaktionen, die auftreten können.[82] Allgemein werden Racemisierungen vermieden, wenn Carbamatschutzgruppen und/oder sterisch gehinderte bzw. schwache Basen zur Deprotonierung eingesetzt werden.

Neben dem häufig eingesetzten Reagenz HOBt existieren weitere Verbindungen wie HODhat (3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-5-azabenzo-1,2,3-triazen) oder das verwandte HOAt (1-Hydroxy-7-azabenzotriazol), welche in Abbildung 17 dargestellt sind. Die Unterdrückung der Racemisierung ist bei diesen beiden

Verbindungen erheblich effizienter, da sie zusätzlich über den Stickstoff des Pyridinrings koordinieren können. Die Effizienz kann durch die Zugabe von Kupfersalzen nochmals gesteigert werden.[88,89,90]

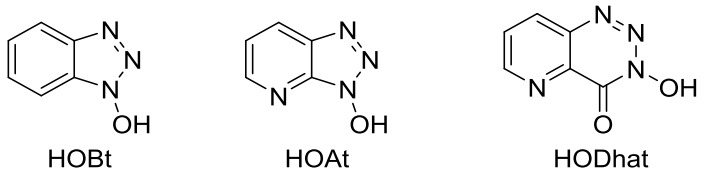


Abb. 15: Kupplungsreagenzien zur Unterdrückung der Racemisierung während einer Peptidkupplungsreaktion.[77]

Diese „Standardkupplungsreagenzien“ sind bei sterisch anspruchsvolleren Aminen wie z. B. 2-Aminoisobutylsäure oder sekundären Aminen auf Grund der geringeren Nucleophilie häufig ungeeignet.[77] Um diese Amine trotzdem zu kuppeln, muss die Carbonsäure stärker aktiviert werden. Dies ist zum Beispiel möglich mit Phosphoniumsalzen[91] wie PyBroP (Bromo-tripyrrolidino-phosphoniumhexa-fluorophosphat)[92] oder BOP-Cl (Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinchlorid)[93].

2.2.3 Feste Phase und Linker

Bis heute wurde eine große Anzahl von Reaktionen von der flüssigen Phase auf die Festphasensynthese übertragen. Einen Einfluss auf diese Reaktionen hat die Beschaffenheit der festen Phase[94], welche im Allgemeinen ein unlösliches Polymer ist, jedoch auch aus Metalloxidnanopartikeln bestehen kann.[94,95]

Die feste Phase, auch Harz genannt, lässt sich in drei Klassen unterteilen: Harz aus Polystyrol, Polyethylenglycol oder mit Polyethylenglycol-funktionalisiertem Polystyrol.[96,97]

Die am häufigsten verwendeten Polystyrolharze sind mit 1-2% Divinylbenzol vernetzt. In DCM, DMF und Toluol laufen die Reaktionen am besten ab, weil das Harz in ihnen besonders gut quillt und somit die Poren freigibt, in denen sich die meisten reaktiven Zentren befinden. In polaren Lösungsmitteln wie Wasser oder Methanol quellen Polystyrolharze jedoch nur minimal.[94]

Besteht die feste Phase aus dem Copolymer Polystyrol und Polyethylenglycol (50-70%), so weist das Harz deutlich unterschiedliche Eigenschaften auf. Das Harz wechselwirkt deutlich besser mit polaren Lösungsmitteln und zeigt im Allgemeinen

einen höheren Quellgrad, wodurch eine höhere Beladung möglich ist und eine größere chemische Stabilität erreicht wird.[94]
Die Harze der CLEAR-Familie (*Cross-Linked Ethoxylate Acrylate Resin*) basieren auf nahezu reinem Polyethylenglycol, welches mit 2-Aminoethylmethacrylat, Ethoxylattrimethylolpropantriacrylat oder anderen Acrylaten quervernetzt ist.[98] Dieses wird für lange, komplexe und hydrophobe Peptide empfohlen. Es zeigt eine hohe thermische und chemische Stabilität. Zudem ist ein nochmals höherer Quellgrad in DMF, DCM, Wasser und weiteren polaren sowie unpolaren Lösungsmitteln zu erwarten. Des Weiteren reduzieren die Harze auf PEG-Basis die intra- und intermolekulare Aggregation der Peptide während der Synthese.[99]

Um eine Festphasensynthese zu beginnen, wird das Startmaterial auf dem Harz verankert. Dazu ist auf der festen Phase ein Linker installiert, mit dem das Startmolekül eine kovalente Bindung eingeht. Der Linker ist im weitesten Sinne eine bifunktionelle Schutzgruppe, da sie mit dem Harz und dem Startmolekül verbunden ist. Zwischen Linker und Harz befindet sich der sogenannte Spacer, der Einfluss auf die Beladungs- und Abspaltungseffizienz nimmt.[94] Spacer und Linker werden im Folgenden als Linker zusammengefasst.

In den letzten 50 Jahren wurde eine Vielzahl an Linkern für die Festphasensynthese entwickelt. Somit ist die Verfügbarkeit von unterschiedlichen Linkern für verschiedenste Fragestellungen mittlerweile äußerst groß.[94]
Der Chloromethyl-Linker, auch besser bekannt als der sogenannte Merrifield-Linker, ist zu Beginn der Entwicklung der Festphasensynthese entstanden.[99] Dieser ist geeignet, um Carbonsäuren auf der festen Phase zu verankern. Die Säure wird dazu mit Caesiumcarbonat deprotoniert und durch eine Substitutionsreaktion auf das Harz gebracht. Wenn das gewünschte Produkt synthetisiert ist, wird es z. B. mit Flusssäure bei 0 °C abgespalten. Da Flusssäure eine sehr toxische Verbindung ist, wurden weitere Linker entwickelt, deren Abspaltreagenzien ungefährlicher sind. Als Beispiel sind hier der Wang-[100], SASRIN- (Super Acid-Sensitive Resin)[101] oder 2-CTC (2-Chlorotritylchlorid)-Linker zu nennen. Bei diesen kann das Produkt mit 20 %iger bzw. 0.1 bis 1 %iger TFA-Lösung (Trifluoressigsäure) abgespalten werden.[94] Um das Wang-und SASRIN-Harz zu beladen, wird zu der N-terminal geschützten Aminosäure ein Kupplungsreagenz gegeben. Der resultierende Aktivester wird dann nukleophil von dem Linker angegriffen, sodass sich eine

Esterbindung bildet und die Carbonsäure auf dem Harz verankert wird. Die Beladung des „2-CTC-Harzes“ erfolgt ähnlich wie die des „Merrifield-Harzes“.

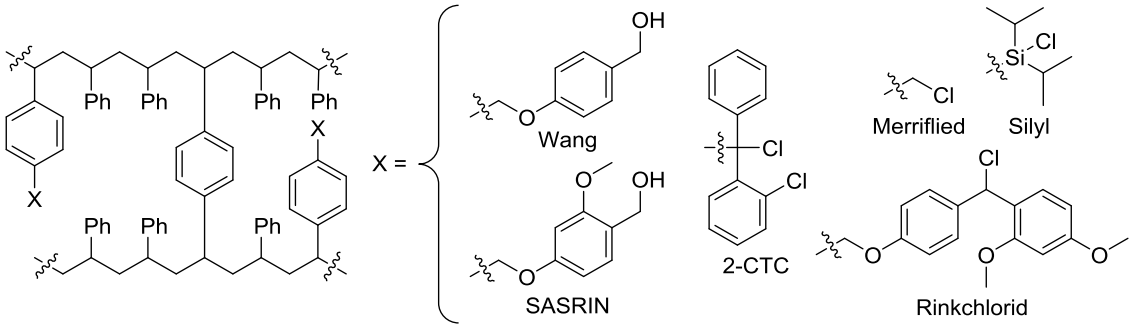


Abb. 16: Ausschnitt eines Polystyrenharzes mit unterschiedlichen Linkern.[94]

Der Vorteil des 2CTC-Harzes ist, dass der Linker auch für andere Nukleophile wie Alkohole, Thiole oder Amine genutzt werden kann, da das Produkt unter vergleichsweise milden Bedingungen abgespalten werden kann. Des Weiteren wird die Bildung von Diketopiperazinen sterisch gehindert.[102,103,103] Für Alkohole können auch Silyl- oder Rinkchlorid-Linker eingesetzt werden. Die Abspaltung kann mild mit TBAF (Tetrabutylammoniumfluorid) oder mit 5%iger TFA-Lösung erfolgen.[94] In Abb. 16 ist ein Ausschnitt eines Polystyrolharzes mit unterschiedlichen Linkern dargestellt.

Die hier beschriebenen Abspaltungsmethoden verwenden elektrophile Säuren oder nucleophile Moleküle wie TBAF. Die verwendeten Linker definieren dabei die benötigte Abspaltungsmethode und müssen entsprechend dem Syntheseproblem angepasst werden. Eine elegante und praktische Methode ist die zyklisierende Abspaltung. Bei diesem Ansatz wird das Peptid an der festen Phase synthetisiert und durch die Zyklisierung abgespalten. Dies konnten z.B. Rosenbaum et al. bei der Synthese von Stylostatin 1 zeigen.[104] Dabei wurde ein Hydrazin-Linker verwendet. Nach der Synthese des linearen Peptides wurde dieser zu einer Azogruppe oxidiert. Durch das Einleiten der Zyklisierung auf der festen Phase wird Stickstoff und das zyklische Peptid frei. Bei einem milderen Ansatz wird der sogenannte Safety-Catch-Linker eingesetzt. Dieser ermöglicht es nach der Peptidsynthese, Teile des Linkers abzuspalten, was die eigentliche Freisetzung des Produktes initiiert.[102] Eine physikalische Methode, um Peptide abzuspalten, zeigten Kumar et al. Sie verankerten das photolabile Molekül 3-Nitro-4-Bromomethylbenzoesäure auf dem Harz und konnten das anschließend synthetisierte Peptid mittels UV-Strahlung (350 nm) abspalten.[105] Peptide können des Weiteren auch enzymatisch

abgespalten werden, wodurch die hoch chemo-, regio- und stereoselektive Arbeitsweise der Enzyme ausgenutzt werden können.[106] Außerdem kennt man mittlerweile auch sogenannte Safety-Catch-Linker, welche zwei Aktivierungsschritte zur Einleitung der Abspaltung benötigen und damit besonders inert für chemische Synthesen an der festen Phase sind.[107]

2.2.4 Synthesestrategien und Schutzgruppen

Die Synthese von Peptiden läuft in der Regel vom C- zum N-Terminus. Um ein definiertes Produkt zu erhalten, ist es nötig, Schutzgruppen für das Amin und die Seitenketten einzuführen. Dies verhindert Nebenreaktionen wie zum Beispiel Polymerisationen. Die Schutzgruppe des N-Terminus muss sich orthogonal zu den Schutzgruppen der Seitenketten verhalten, sodass diese selektiv abspaltbar sind.[74]

Im Laufe der Zeit haben sich für die Festphasenpeptidsynthese zwei Konzepte durchgesetzt:

Bei der Merrifield-Strategie ist der N-Terminus mit einer Boc-Schutzgruppe (*tert*-Butyloxycarbonyl) und die Seitenketten mit Bn- (Benzyl) oder verwandten Schutzgruppen versehen. Die N-terminale Boc-Schutzgruppe wird in der Regel mit einer 50%igen TFA-Lösung abgespalten. Wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, lässt sich das Produkt mit Flusssäure vom Harz abspalten. Mit dem selben Reagenz werden auch die Schutzgruppen der Seitenketten entfernt. Die Nachteile dieser Strategie sind die giftige Flusssäure, der hohe apparative Aufwand, eine leichte Sensitivität des Linkers gegenüber TFA und das Auftreten von säurekatalysierten Nebenreaktionen.[99,108]

Das zweite Konzept ist die Fmoc-Strategie. Dabei wird der N-Terminus mit dem basenlabilen Fmoc geschützt und die Seitenketten mit den säurelabilen Gruppen *t*-Bu (*tert*-Butyl) oder Boc versehen. Die Fmoc-Schutzgruppe wird in den meisten Fällen mit sekundären Aminen wie Piperidin, Dimethylamin oder Diethylamin entfernt.[109] Durch den Einsatz von TFA oder anderen starken Säuren kann das fertige Peptid von der festen Phase abgespalten werden. Die *t*-Bu/Boc-Schutzgruppen der Seitenketten können im selben Schritt entfernt werden und sind damit orthogonal zu der Fmoc-Schutzgruppe.[110]

Der Vorteil dieser Strategie ist die hohe Flexibilität. Zum einen können viele verschiedene Linker verwendet werden (auch säurelabile), zum anderen sind die

Schutzgruppen Fmoc/*t*-Bu nicht nur untereinander orthogonal, sondern auch mit vielen weiteren Schutzgruppen kombinierbar.[110] So können zum Beispiel Silylschutzgruppen für Alkohole (z.B. TBDMS: *tert*-Butyldimethylsilyl) oder Ester eingeführt werden, die selektiv mit Fluoriden abgespalten werden können. Amine lassen sich mit Dde-Gruppen (1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl) oder als Phthalimid vor Nebenreaktionen schützen. Die Abspaltung erfolgt gegebenenfalls selektiv mit Hydrazin.[109,111] Mit Allyl und Benzyl bzw. Alloc und Benzyloxycarbonyl lassen sich Carbonsäure bzw. Amine schützen, die in Lösung mit Wasserstoff und Palladium abgespalten werden können. Allyl- und Alloc-Schutzgruppen können sogar mit der löslichen Verbindung Tetrakis(triphenylphosphine)palladium an der festen Phase entfernt werden.[74,109] Neben den chemisch abspaltbaren Gruppen können funktionelle Einheiten auch enzymatisch oder photoinduziert entschützt werden. In Abb. 17 ist ein theoretisches Peptid dargestellt, bei dem jede Schutzgruppe vor der Abspaltung vom Harz selektiv entfernt werden kann.

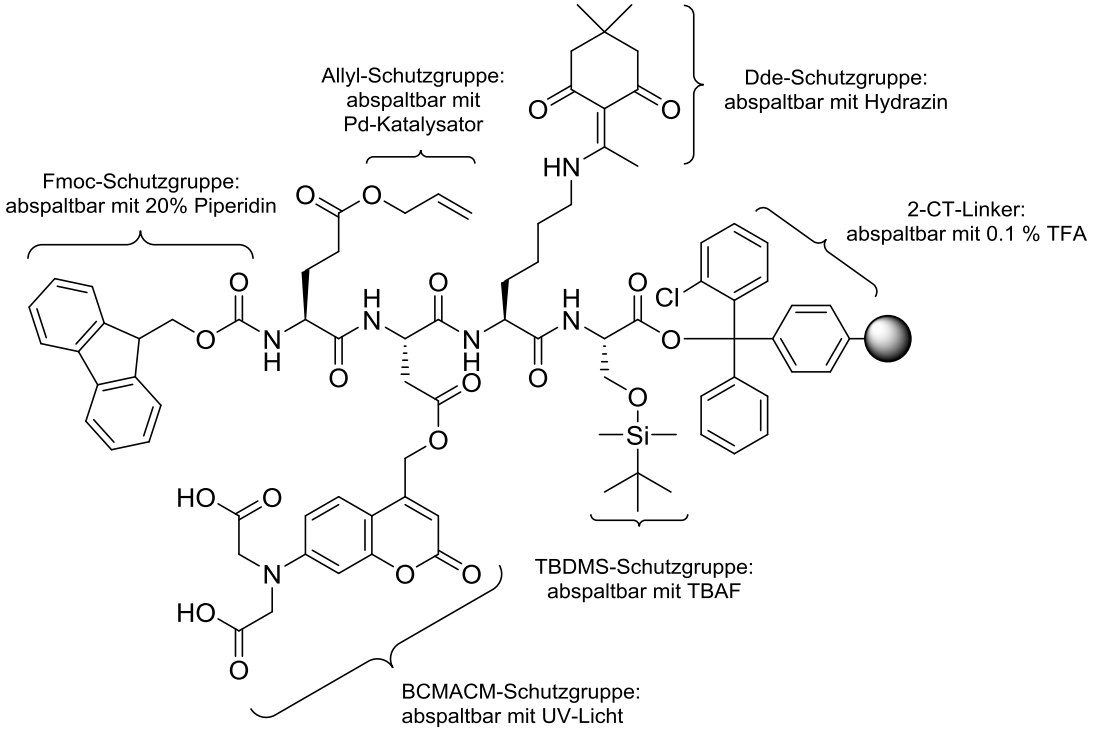


Abb. 17: Modellpeptid mit verschiedensten orthogonalen Schutzgruppen.

Der photolabile Linker kann bei einer Wellenlänge von 405 nm abgespalten werden (BCMACM, 7-[Bis(Carboxymethyl)amino]coumarin-4-yl}methyl).[112] So ist es prinzipiell möglich, auch Seitenketten selektiv zu modifizieren.

2.3 Ahp-Cyclodepsipeptide

2.3.1 Struktur und Aufbau

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 erwähnt, können zyklische Peptide als Inhibitoren für Serinproteasen eingesetzt werden. Eine besondere Klasse unter diesen Naturstoffen sind die Ahp-Cyclodepsipeptide.

Der Naturstoff Dolastatin 13 war die erste Verbindung dieser Klasse, die 1989 von Pettit et al. aus *Dofabeffa auricularia* (Seehasen) isoliert und charakterisiert wurde.[113,114] Dabei konnte festgestellt werden, dass die Verbindung das Wachstum von lymphatischen Leukämiezellen effektiv inhibierte. Mittlerweile sind weit über 100 Verbindungen dieser Naturstoffklasse isoliert worden. Die Moleküle können prinzipiell aus Blaugrünalgen, Wasserblüten oder Frischwasser extrahiert werden, wo sie in der Regel von Cyanobakterien produziert werden.[115–117]

Wie der Name bereits sagt, sind die Ahp-Cyclodepsipeptide zyklische Depsipeptide, die jedoch zusätzlich noch eine exocyclische Seitenkette besitzen. Der Ring ist 19-gliedrig und aus sechs Aminosäuren aufgebaut. Der Wortteil „Depsi“ verrät, dass es innerhalb des Zyklus eine Esterbindung vorhanden ist. Besonders ungewöhnlich ist die Ahp-Einheit, wobei „Ahp“ für „3-Amino-6-Hydroxy-2-Piperidon“ steht.[113]

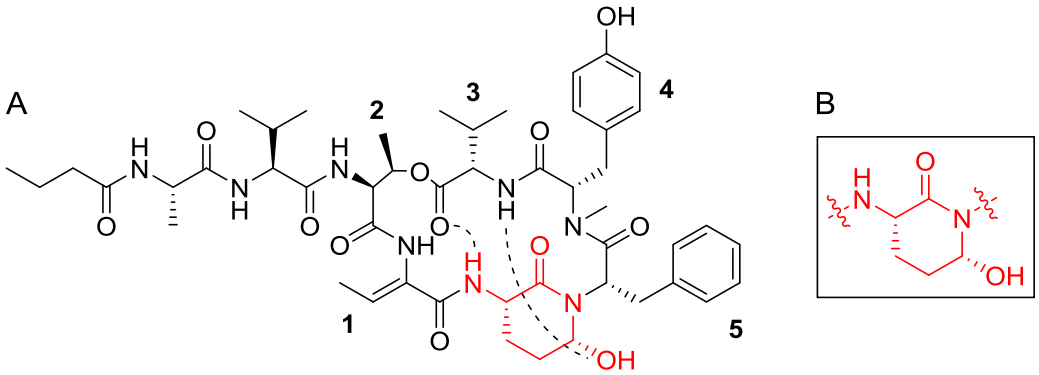


Abb. 18: A) Ahp-Cyclodepsipeptid Lyngbyastatin 7; B) die Ahp-Einheit (rot).[118]

Durch diesen zweiten Zyklus sind zwei benachbarte Aminosäuren zusätzlich über eine Seitenkette und einen N-Terminus miteinander verknüpft. Als Beispiel ist in Abb. 18 das Ahp-Cyclodepsipeptid Lyngbyastatin 7 dargestellt.[118]

Allgemein lässt sich die Molekülklasse in zwei Bereiche unterteilen: In den Ring und in die Seitenkette. Die Seitenkette besteht in der Regel aus bis zu drei Aminosäuren und einer Fettsäure oder aus bis zu drei Aminosäuren und einem Glycerinderivat,

welches methyliert, sulfatiert oder phosphoryliert vorliegt.[113][119][120] Alle Aminosäuren kommen allgemein in der (L)-Konfiguration vor. Es gibt jedoch auch Ausnahmen. In dem Naturstoff A90720 ist ein Leucin in der (D)-Konfiguration vorhanden.[121] Die Seitenketten der Aminosäuren können sowohl zyklisch, aromatisch als auch aliphatisch sein und entsprechend Carbonsäuren, Guanidin-, Amid-, Amino- oder Hydroxygruppen tragen.[117,118,122] In einigen Naturstoffen konnten auch Hydroxycarbonsäuren wie Hydroxyphenylmilchsäure oder Hydroxy-3-methyl-pentansäure in der Seitenkette nachgewiesen werden.[123–126]

In Position 1 und 5 (siehe Abb. 18) sind aliphatische und aromatische Aminosäuren mit und ohne weitere funktionellen Gruppen zu finden (zum Beispiel: Tetrahydro-Tyrosin/Tyrosin, Glutamin, Isoleucin, Valin etc.).[121,123,127] Die Esterbindung (Position 2 und 3) wird in der Regel immer über die β-Hydroxygruppe eines *2S,3R*-Threonins und der Carbonsäure eines Valins oder Isoleucins aufgebaut. Die einzigen Ausnahmen stellen die Verbindungen Nostopeptin A und B dar. In diesen Molekülen ist das Threonin durch ein 3-Hydroxy-4-Methylprolin ersetzt.[123,128]

In Position 4 findet man ausschließlich aromatische Aminosäuren, deren N-Terminus einfach methyliert ist. Die Aminosäuren lassen sich von Phenylalanin oder Tyrosin ableiten und zeigen dabei häufig Halogen-, Hydroxy- oder Methoxysubstitutionen in Meta- und/oder Parastellung (ausgehend vom β-Kohlenstoff). Eine Substitution in Orthostellung konnte bisher nicht beobachtet werden.[121,123,127] Das Molekül Micropeptin 103 besitzt als einziges bisher isoliertes Ahp-Cyclodepsipeptid ein aromatisches Tryptophan in der Position 4.[10]

Strukturell ist der Macrozyklus ellipsenförmig aufgebaut. Grund dafür ist zum einen die N-methylierte Aminosäure, die das *cis*/*trans*-Gleichgewicht der Peptidbindung in Richtung *cis*-Anordnung verschiebt[9,11,129], zum anderen die Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken-bindungen zwischen der Ahp-Einheit und der Aminosäure in Position drei (Aminogruppe des Ahp → C-Terminus der Aminosäure in Position drei; Hydroxidgruppe des Ahp → N-Terminus der Aminosäure in Position drei; siehe Abb. 18). Diese tragen zur Form und zur Stabilisierung der Verbindung bei.[9,11]

Von den Ahp-Cyclodepsipeptiden lassen sich weitere verwandte Verbindungsklassen ableiten. Bei den Amp-Cyclodepsipeptiden (*Amp für: 3-Amino-6-Methoxy-2-Piperidon*) ist die Hydroxygruppe der Ahp-Einheit durch eine Methoxygruppe ersetzt (siehe Abb. 19 A). Diese zeigen im Vergleich zu einer

Verbindung mit gleicher Aminosäuresequenz eine stärkere Inhibition von Trypsin.[130] Ebenso gibt es Naturstoffe, die auf die Seitenkette und die Esterbindung verzichten, wodurch sich ein 18-gliedriger Ring ergibt (siehe Abb. 19 B). Des Weiteren konnte eine Verbindung isoliert werden, bei der die Ahp-Einheit eine intramolekulare Kondensationsreaktion mit der Seitenkette der Aminosäure in Position 5 einging. Das Produkt stellt ein Oxazolidin dar (siehe Abb. 19 C). Die Oxazolidinverbindung zeigt schlechtere Inhibitionseigenschaften als das ursprüngliche Ahp-Cyclodepsipeptid.[131]

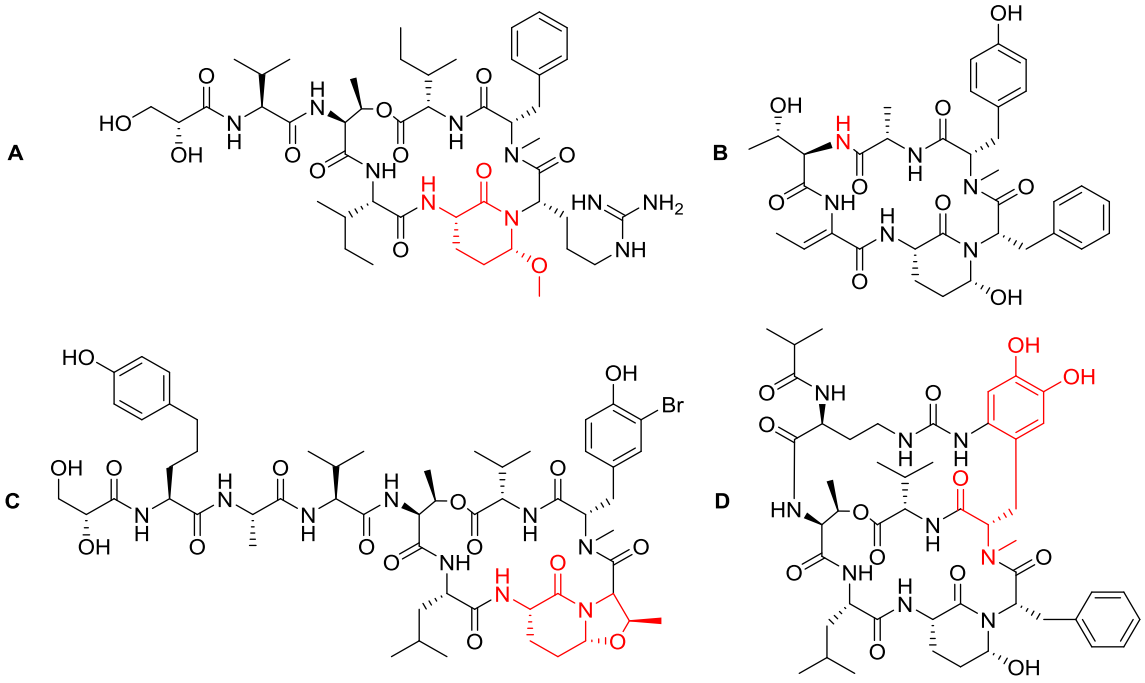


Abb. 19: A) Micropeptin MZ859 mit Amp-Einheit; B) Actinosynneptide A (ohne Esterbindung); C) Largamide D Oxazolidin; D) FR901277.

Ein weiterer ungewöhnlicher Vertreter ist FR901277. Bei diesem Naturstoff ist die Seitenkette mit dem Aromaten in Position 5 verknüpft, so dass das Molekül zwei Zyklen aufweist (siehe Abb. 19 D).[132]

2.3.2 Wechselwirkung mit biologischen Systemen

In vielen Studien wurde bereits gezeigt, dass Ahp-Cyclodepsipeptide hervorragende Inhibitoren für verschiedenste Serinproteasen und dem Wachstum einiger Krebszelllinien sind.[113,126]

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 behandelt, wechselwirken gewöhnliche lineare peptidische Inhibitoren häufig nur mit der S_1- bis zu der S_4-Seite und binden

zusätzlich an das aktive Zentrum. Dabei liegt eine kovalente und häufig irreversible Bindung vor. Der Bindungsmodus eines Ahp-Cyclodepsipeptides unterscheidet sich jedoch erheblich von diesen klassischen Inhibitoren.[132]

Dieser Naturstoffklasse ist es aufgrund ihrer starren Struktur möglich ähnlich wie ein Substrat an Proteasen zu binden. Dies bedeutet, dass sie gleichzeitig mit der S- und der S'-Seite wechselwirken können. Im Detail ist es dem Molekül möglich von S_4-Seite bis zur S_3' mit den Proteasen zu interagieren. In Abb. 20 ist der Bindungsmodus eines Ahp-Cyclodepsipeptides schematisch dargestellt.[9,11,132]

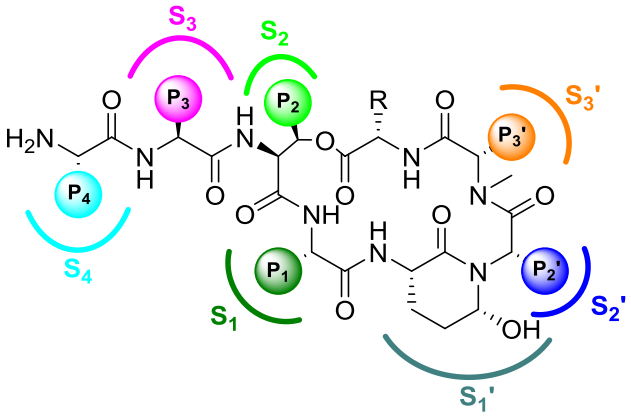


Abb. 20: Bindungsmodus eines Ahp-Cyclodepsipeptides.

Die S-Seite wird von den Resten der Seitenkette, dem Threonin und der Aminosäure in P_1 besetzt, die S'-Seite hingegen von der Ahp-Einheit der Aminosäure in P_2' und dem aromatischen Rest in P_3'. Die formale Schnittstelle liegt somit zwischen der Ahp-Einheit und der benachbarten N-terminalen Aminosäure (P_1).[9,11,132]

Die Moleküle werden jedoch nicht wie gewöhnliche Peptide gespalten. Dabei sind zwei Effekte von großer Bedeutung. Zum einen die intramolekularen Wasserstoffbrücken, die den Ring stabilisieren und so die Aminogruppe der Ahp-Einheit als vermeintliche Abgangsgruppe nahe der Carbonylgruppe „fixieren". Auf der anderen Seite besetzt die Ahp-Einheit einen wichtigen Teil des aktiven Zentrums und kann so das katalytische Wasser verdrängen, welches zur Spaltung der Peptidbindung nötig ist. Diese Wechselwirkungen bringen das System in einen thermodynamisch sehr günstigen Zustand, wodurch die Hydrolyse der Peptidbindung verhindert wird.[9,11,132]

Die molekularen Wechselwirkungen zwischen dem Naturstoff und der Protease wurden mit Hilfe der Röntgenkristallographie bestimmt. Bis heute wurden vier Ahp-Cyclodepsipeptid-Enzym-Komplexe kristallographisch untersucht. In der

ersten Studie wurde das Depsipeptid A90720A mit der Protease Trypsin kristallisiert und untersucht. Das in Position P_1 befindliche Arginin wechselwirkt klassisch mit dem Aspartat in der S_1-Tasche der Protease und dessen Carbonylgruppe besetzt das „Oxyanion hole".[9] Matern et al. kristallisierten die Verbindung Scyptolin A mit der Protease Elastase (pankreatische Schweineelastase). Sie zeigten, dass der Naturstoff zusätzlich über drei Seitenketten mit einem Wassermolekül wechselwirkt, welches wiederum eine Wasserstoffbrücke zu einer Glutaminseitenkette der Protease ausbildete. Die so aufgebaute ideale tetraedrische Struktur verstärkt den Ring zusätzlich.[11] Salvador et al. zeigte ähnliche Effekte bei der Bindung des Depsipeptids Lyngbyastatin 7 an Elastase (pankreatische Schweineelastase). Dieses bildet u. a. ein Wasserstoffbrückennetzwerk zu Wassermolekülen aus, die wiederum mit der Protease wechselwirken. Eine tetraedrische Struktur mit einem Wassermolekül, welches sich nahe dem aktiven Zentrum aufhält, konnte auch hier beobachtet werden.[118] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure Abu (2-Amino-2-Butensäure) in Position P_1 einen großen Einfluss auf die Wechselwirkung hat. Dies wurde erwartet, da Elastase kleine aliphatische und hydrophobe Aminosäuren in dieser Position bevorzugt.[118] Der FR901277-Elastase-Komplex (pankreatische Schweineelastase) wurde von Nakanishi et al. untersucht (siehe Abb. 19). Sie vermuten, dass die Ahp-Einheit nur geringe Wechselwirkungen mit der Protease aufweist und so für chemische Modifikationen zur Verfügung steht. Zwischen der Brücke und der Grundstruktur treten weitere Wasserstoffbrückenbindung auf, wodurch es weiter stabilisiert wird. Das Citrullin wechselwirkt dabei deutlich stärker mit der pankreatischen Schweineelastase als mit der menschlichen Leukozyten-Elastase. Hier ist es deutlich flexibler.[132]

Alle Studien konnten zeigen, dass der Macrozyklus des jeweiligen Ahp-Cyclodepsipeptides während die Bindung/Inhibition intakt bleibt und kein Acyl-Enzym-Intermediat gebildet wird.

2.3.3 Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden

Die Entwicklung von Synthesestrategien zur Darstellung von Ahp-Cyclodepsipeptiden ist sowohl im akademischen als auch im industriellen Umfeld erfolgt. Die Methoden lassen sich, wie die allgemeine Peptidsynthese auch, in zwei

Strategien unterteilen: Lösungssynthesen, die bisher am häufigsten angewendet wurden und eine Festphasensynthese, welche bis heute die aktuellste Synthese darstellt. In den letzten 15 Jahren wurden vier akademische Artikel und mehrere Patente zu der Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden veröffentlicht.[14,119,133,134]

Yokokawa et al. konnten 2002 als erste die Totalsynthese eines Ahp-Cyclodepsipeptides (Somamid A) berichten.[12]

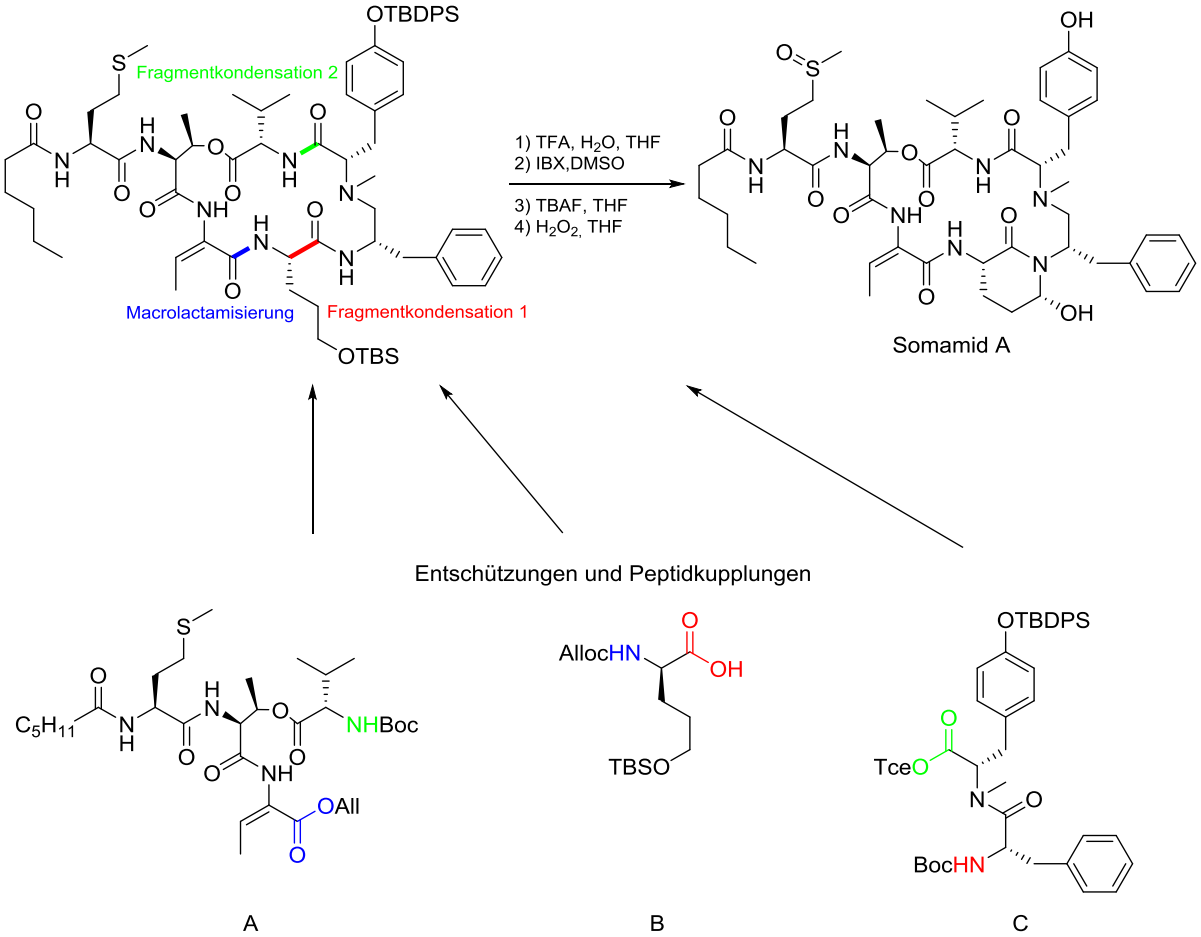


Abb. 21: Synthesestrategie zur Darstellung von Somamide A.[12]

In Abb. 21 ist die Synthesestrategie schematisch dargestellt. Es wurden drei Peptidfragmente synthetisiert. Für Fragment A wurde das Amin eines Methioninmethylester mit Capronsäure acetyliert. Der Methylester wurde mit Lithiumhydroxid verseift und im nächsten Schritt ein Threoninallylester mit Hilfe von DEPC (Diethyldicarbonat) gekuppelt. Das erhaltene Dipeptid wurde dann mittels eines Carbodiimid (EDC) und DMAP (Dimethyaminopyridin) mit Boc-Val-OH verestert. Der Allylester des Threonins wurde unter Palladium-Katalyse mit Morpholin abgespalten und mit einem weiteren Threoninallylester gekuppelt.

Aufgrund des freien Alkohols ließ sich das Threonin mit Hilfe des Martins-Sulfuran dehydratisieren, sodass das Fragment A erhalten wurde.[12]

Fragment B wurde aus Glutamat hergestellt, bei welchem C- und N-Terminus geschützt und die Seitenketten ungeschützt waren (Alloc-Glu-OBlz). Die freie Carbonsäure wurde mit Natriumborhydrid und Ethylchloroformiat zum Alkohol reduziert, welcher dann mit einer Silylschutzgruppe versehen wurde. Im letzten Schritt wurde der Benzylester mit Lithiumhydroxid gespalten.[12]

Das Dipeptid, Fragment C, wurde dann durch die Kupplung eines Boc- geschützten Phenylalanins (Boc-Phe-OH) mit einem geschützten Tyrosintrichloroethylester (H-Tyr(TBDPS)-OTce) synthetisiert.[12]

Wie in Abb. 21 gezeigt, wurde aus diesen Bausteinen zuerst ein lineares Peptid durch Fragmentkondensation erhalten, welches dann durch eine Macrolactamisierung cyclisiert wurde. Der Alkohol des ehemaligen Fragments B wurde dann entschützt und mit IBX (1-hydroxy-1,2-benziodoxol-3(1H)-one-1-oxide) sowie DMSO (Dimethylsulfoxid) zum Aldehyden oxidiert, welcher dann in einer spontanen Gleichgewichtsreaktion mit dem N-Terminus der benachbarten Aminosäure die sechsgliedrige Ahp-Einheit bildete. Durch die Zugabe von TBAF konnte dann die Seitenkette des Tyrosins entschützt werden. Die einfache Oxidation des Schwefels mit Wasserstoffperoxid ergab schlussendlich den Naturstoff Somamide A.[12]

Zwei Jahre später synthetisierten Yokokawa et al. mit Micropeptin T20 ein weiteres Derivat dieser Naturstoffklasse. Die verwendete Strategie war vergleichbar mit dem ersten Ansatz. Zusätzlich führten sie in dieser Arbeit auch weiterführende Studien zur Zyklisierung des Aldehyds zur Ahp-Einheit durch.[119]

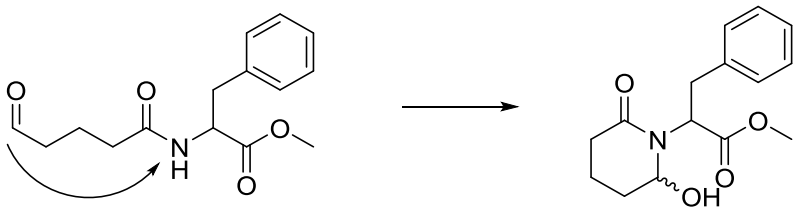


Abb. 22: Modellverbindung zur Evaluierung der Ahp-Zyklisierung.[119]

Dazu nutzten sie eine Modellverbindung (siehe Abb. 22), welche sie mit verschiedenen Salzen, Säuren, wässrigen Pufferlösungen und organischen Lösungsmitteln versetzen. Dabei konnten sie zeigen, dass sich das gewünschte

Piperidon in einem wässrigen Phosphatpuffer am besten bildete. Des Weiteren zeigten sie, dass die Ahp-Einheit gegenüber Wasserstoff und TBAF stabil ist.[119]
Luo et al. adaptierten die Synthesestrategie und konnte somit den Naturstoff Lyngbyastatin 7 herstellen.[134]
Eine Festphasensynthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden konnte durch Stolze et al. etabliert werden. In dieser Arbeit wurde der Proteaseinhibitor Symplocamid A dargestellt. Im Fokus der Veröffentlichung stand dabei die Entwicklung eines Syntheseansatzes an der festen Phase. Hierzu wurde einerseits eine Synthese eines Buildingblocks für den Ahp-Vorläufer als auch eine Methode zur Generierung eines Aldehyds bei der Abspaltung von der festen Phase etabliert. Die 8-stufige Synthese für den Ahp-Vorläufer beginnt dabei mit der Reduktion der Seitenkette von Boc-Glu-OBn zum 5-Hydroxynorvalin. Der Alkohol wurde anschließend mit einer Silylgruppe und das Amin mit einer zweiten Boc-Gruppe geschützt. Die Benzylschutzgruppe wurde dann mit Wasserstoff entfernt und der sich so ergebende freie C-Terminus als Allylester geschützt. Nach dem Entfernen der TBDMS-Schutzgruppe mit $CuCl_2$ wurde der Alkohol mit Dess-Martin-Periodinan zum Aldehyd oxidiert. Dieses Produkt wurde dann mit einem Wittig-Reagenz umgesetzt, sodass der Ahp-Vorläufer erhalten werden konnte (siehe Abb. 23).[14]

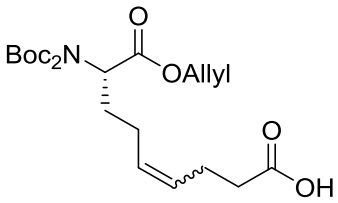


Abb. 23: Synthese des Ahp-Vorläufer-Moleküls nach Stolze et al.[14]

Dieser Baustein wurde dann auf ein Amin-Harz geladen und der Naturstoff konnte dann mit einer „Standard"- Fmoc-SPPS vollständig am Harz synthetisiert werden. Die Abspaltung vom Harz erfolgte oxidativ mit Osmiumtetroxid und Natriumperiodat, wodurch der Aldehyd gebildet wurde, der wiederum spontan die Ahp-Einheit bildete.[14]

Bei dem patentierten Verfahren der Novartis AG wurden mehrere Derivate der Naturstoffklasse synthetisiert. Das Peptid wurde hierzu linear an der festen Phase mit der Fmoc-Strategie synthetisiert, inklusive der Veresterung. Als Ahp-Vorläufer wurde die Aminosäure 5,5-Bis(phenylmethoxy)-Norvalin eingesetzt, anschließend

das Peptid abgespalten und über den freien C- und N-Terminus zyklisiert. Im letzten Schritt wurde die Ahp-Einheit durch Oxidation generiert.[133]

Die Novartis AG etablierte dabei zwei Varianten zur Synthese einer Aminosäure, aus der die Ahp-Einheit generiert werden konnte.

In der ersten Variante wurde Acreloin bromiert und mit Benzylalkohol zu einem 1-Bromoacetal umgesetzt. Das so entstandene Diethylacetamidomalonat wurde deprotoniert und mit 1-Bromoacetal umgesetzt. Die Ester wurden mit Kaliumhydroxid verseift und durch Erhitzen eine Decarboxylierungsreaktion eingeleitet. Das Enzym Acylase spaltete dann stereoselektiv die Acylgruppe des L-Isomers ab, wodurch dieses im letzten Schritt Fmoc-geschützt werden konnte (siehe Abb. 24). Der Aldehyd war hierbei als Ketal geschützt und wird durch die Behandlung mit Wasserstoff wieder frei.[133]

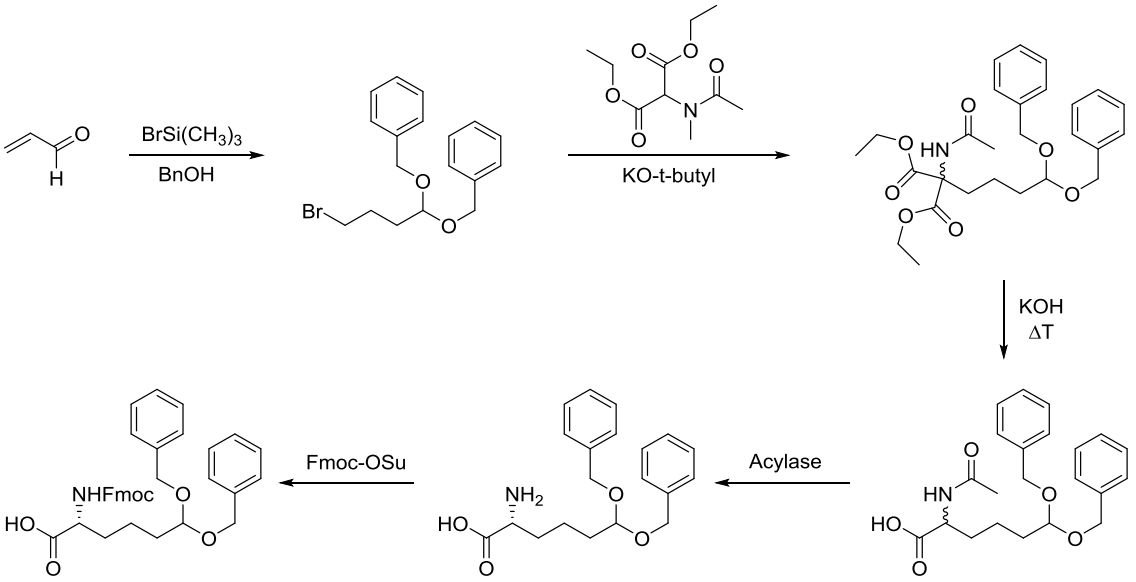


Abb. 24: Synthese I des Ahp-Vorläufers nach Novartis AG.[133]

In einem zweiten Ansatz wird die Aminosäure 5-Oxo-Norvalin als Ausgangsmaterial für die Ahp-Einheit verwendet. Dabei sind das Amin und die Carbonsäure vollständig geschützt (Bn_2-Nva(5Oxo)-OBn). Der Aldehyd wurde als Acetal und das Amin mit Fmoc geschützt.[133] Die Ahp-Cyclodepsipeptidanaloga wurden wie in der ersten Variante synthetisiert. Der Aldehyd wurde mit Wasserstoff entschützt und damit die Bildung der Ahp-Einheit eingeleitet.

Viehrig et al. untersuchte die Biosynthese der Ahp-Cyclodepsipeptide. Es wurde vorgeschlagen, dass der Organismus zunächst das lineare Peptid synthetisiert, dann die Aminosäure in P_3‘ Position methyliert und anschließend den Zyklus über die

Esterbindung aufbaut. An Position P_1‘ ist zu Beginn ein Prolin, welches zum Hydroxyprolin oxidiert und dann zur stabileren Ahp-Einheit umgelagert wird.[13]

3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine praktikable Synthesestrategie für Ahp-Cyclodepsipeptide zu entwickeln. Die Strategie soll so gestaltet werden, dass verschiedenste Derivate dieser Naturstoffklasse synthetisiert werden können. In einem zweiten Schritt sollen Inhibitoren für spezifische Proteasen entworfen und optimiert werden.

Eine Vielzahl von Krankheiten basiert auf der Hyperaktivität von Proteasen. Die Inhibition solcher Enzyme ist somit eine Möglichkeit, die Krankheiten zu bekämpfen. Die industrielle und akademische Forschung ist daher fortlaufend an neuen Molekülen zur Hemmung von Proteasen interessiert. Häufig sind dies niedermolekulare Verbindungen, die kovalent oder nicht-kovalent an die Zielprotease binden. Zu den weniger erforschten und nicht-kovalent-bindenden Molekülen gehören die Ahp-Cyclodepsipeptide.[135] Diese konnten bis heute nur eine geringe Aufmerksamkeit erlangen, unter anderem weil noch keine geeigneten Verfahren zur chemischen Darstellung dieser interessanten Verbindungen existieren. Dies ist bedauernswert, da die Verbindungen ein hohes Potential zur Hemmung von Serinproteasen besitzen. Sie zeigen damit pharmazeutische Relevanz und können für zukünftige Medikamente Bedeutung[62] erlangen.[136] Die synthetische Zugänglichkeit konnte bereits von mehreren Gruppen gezeigt werden, jedoch sind diese Synthesewege immer noch sehr aufwendig und langwierig. Außerdem beschränken sich die Synthesen auf ausgewählte Naturstoffe und vernachlässigen die Derivatisierung, sowie Erforschung der entsprechenden Struktur-Wirkungsbeziehungen.[12,14,119,134] Die Übertragung auf eine automatisierte oder semi-automatisierte Synthese ist somit nur eingeschränkt möglich. Diese Lücken im synthetischen Ansatz und in der biologischen Evaluierung sollen durch diese Arbeit geschlossen werden.

Die Synthesestrategie soll dabei anhand des Naturstoffes Tasipeptin A entwickelt werden[137], welche so gestaltet sein wird, dass sie auf weitere Naturstoffe oder synthetische Derivate angewendet werden kann.

Durch das Erreichen des synthetischen Ziels können im Anschluss Verbindungen hergestellt werden, die es ermöglichen, Struktur-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen. Um den Einfluss einzelner Positionen auf die Inhibition zu erforschen, werden die entsprechenden Strukturelemente gezielt verändert.

Es ist bekannt, dass Ahp-Cyclodepsipeptide neben anderen Naturstoffen und synthetischen Verbindungen klassische Serinproteasen wie Trypsin, Chymotrypsin und Elastase inhibieren. Für speziellere Serinproteasen wie die humanen HtrA-Proteasen existieren bis heute jedoch nur wenige oder keine Inhibitoren. Aus diesem Grund wird eine Leitsequenz auf Basis eines Ahp-Cyclodepsipeptides entwickelt, mit der es möglich sein wird, HTRA1, -2 und -3 zu inhibieren. Von diesem Punkt aus können mit Hilfe der zuvor entwickelten Synthesestrategie einzelne Positionen verändert werden. Durch die systematische Derivatisierung lässt sich die Selektivität und das Inhibitionspotential verbessern.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden

4.1.1 Retrosynthetische Analyse

Wie in Kapitel 2.3.3 bereits beschrieben, sind wenige Synthesestrategien für Ahp-Cyclodepsipeptide bekannt. Die bisherigen Syntheserouten sind eher langwierig, aufwendig und unpraktikabel. Um Struktur-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen, ist die Herstellung von vielen Derivaten notwendig. Daher ist die Entwicklung einer neuen praktikablen Synthesestrategie erforderlich.

Die literaturbekannten Lösungssynthesen sind sehr aufwendig, da die Aufreinigungsschritte zeitintensiv sind. Für das angestrebte Ziel sind diese Strategien daher ungeeignet. Besonders zielführend sollte jedoch eine Festphasensynthese sein, da sie zeitsparend und automatisierbar ist. Vorstellbar ist die Verwendung der von Stolze et al. entwickelten Synthesestrategie an der festen Phase. Diese Strategie bringt die üblichen Vorteile einer Festphasensynthese mit, birgt jedoch auch einige Nachteile. Die Herstellung des Ahp-Vorläufers umfasst eine 8-stufige Synthese, die zwar mit guten Ausbeuten (≥84 % je Stufe) durchgeführt werden kann, aber immer noch sehr zeitintensiv ist.[14] Die Abspaltung des Peptides von der festen Phase und die eigentliche Bildung der Ahp-Einheit ist auch verbesserungsfähig. Diese wird u.a. oxidativ mit dem giftigen und flüchtigen Reagenz Osmiumtetroxid durchgeführt. Daraus folgt, dass keine ungeschützten nicht aromatischen C-C-Doppelbindungen in dem Ahp-Cyclodepsipeptid vorhanden sein dürfen. Das kann ein großer Nachteil sein, da sich z.B. Dehydrothreonin in vielen Naturstoffen befindet und der zusätzliche Entschützungsschritt Einbußen in der Ausbeute mit sich bringt.

Die aufgeführten Gründe machen es nötig, eine neue Synthesestrategie zu etablieren. Sie muss praktikabel sein und erlauben, flexibel verschiedenste Aminosäuren in die Ahp-Struktur einzubringen und somit zielgerichtete Derivate zu synthetisieren.

Daher wurde eine neue retrosynthetische Analyse durchgeführt, welche in Abb. 25 dargestellt ist.

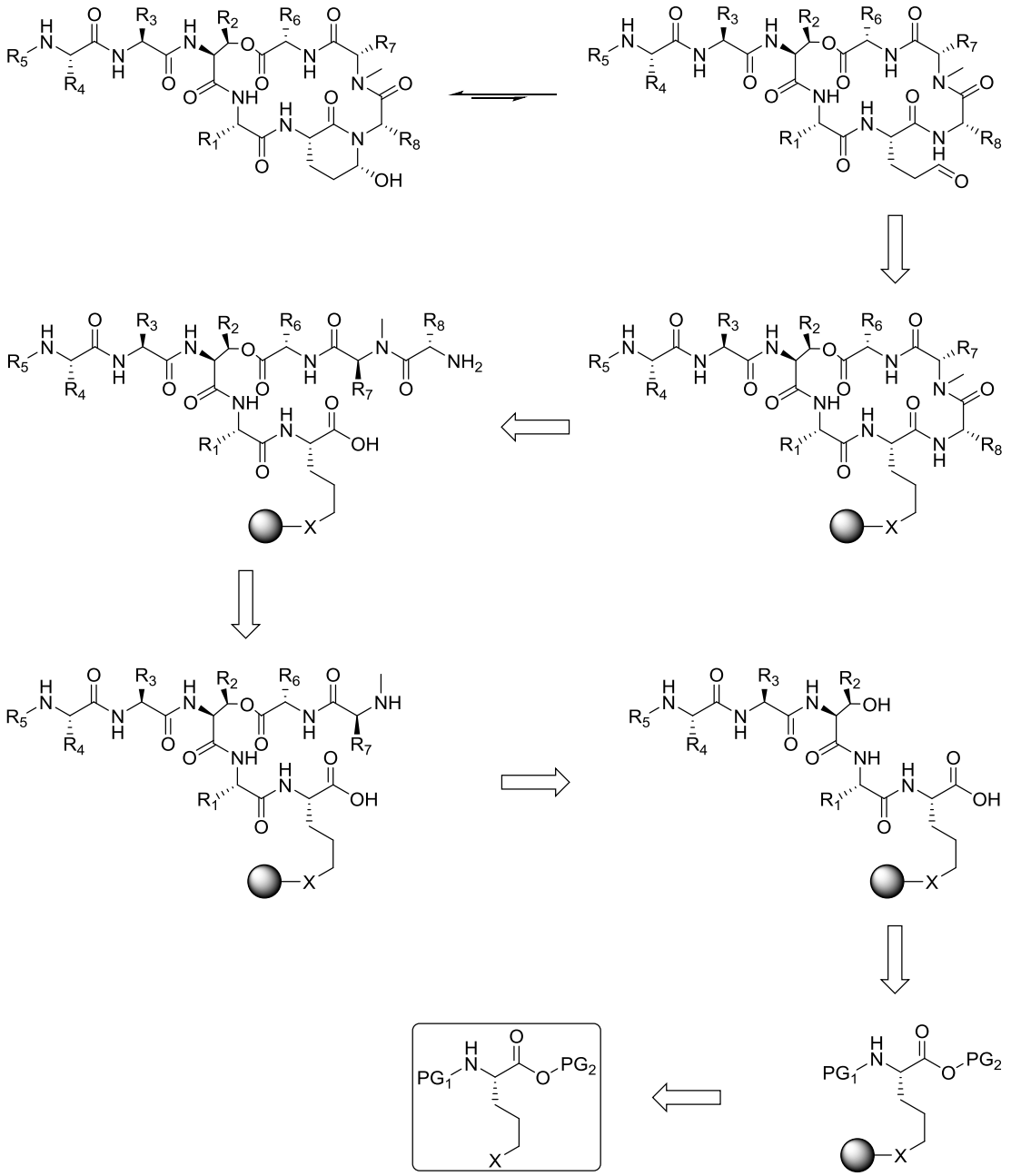


Abb. 25: Retrosynthetische Analyse zur Festphasen-basierten Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden

Die Ahp-Einheit ist ein Hemiaminal, welches im Gleichgewicht mit dem entsprechenden Aldehyd steht. Die Bildung der Ahp-Einheit ist ein besonders kritischer Schritt, da sowohl zwei Stereoisomere entstehen können, als auch zwei entsprechende Hydroxyprolinverbindungen. Zudem ist das Hemiaminal säure- und basenlabil, was zu einer Dehydratisierung der Verbindungen führen kann. Abb. 26 zeigt die sechs möglichen Reaktionsprodukte.

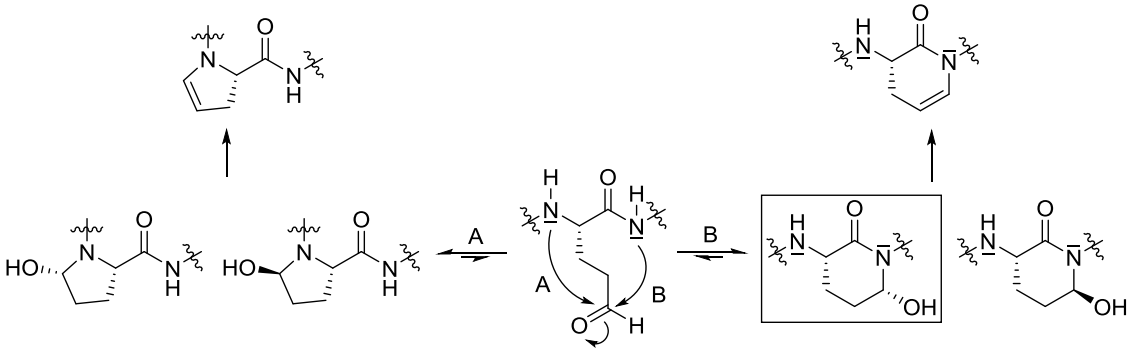


Abb. 26: Mögliche Reaktionsprodukte aus dem Aldehyd; gewünschte Ahp-Einheit, siehe Kasten

Aufgrund der Labilität wurde die „Bildung“ des Hemiaminals für die letzte Synthesestufe geplant. Die Einführung des Aldehyds kann durch eine Oxidation eines Alkohols oder eines Amins in Lösung erfolgen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Synthese des cyclischen Peptides auf der festen Phase. Mittlerweile gibt es viele Literaturbeispiele, in denen erfolgreich von Macrolactamisierungen auf der festen Phase berichtet wurden, so dass dieser Ansatz als praktikabel eingeschätzt werden kann. Weitere erwartete schwierige Schritte sind die Kupplung der „letzten“ Aminosäure, da sie auf ein sekundäres Amin erfolgt, welches somit sterisch gehindert und weniger nukleophil ist, als auch die Veresterung des Threonins, da der sekundäre Alkohol der Seitenkette vergleichsweise unreaktiv ist. Die ersten vier Aminosäurebausteine bzw. die N-methylierte Aminosäure sollen mittels Standardreagenzien gekuppelt werden.

Als Startmaterial dient eine Aminosäure, deren C- und N-Terminus geschützt ist. Sie soll mit der Seitenkette auf das Harz geladen. Der in Lösung synthetisierte Ahp-Vorläufer dient als Ankerpunkt. Das ist sinnvoll, da dieser nicht verändert wird und in allen Verbindungen vorhanden ist. Somit ist es möglich, alle anderen Positionen zu variieren und flexibel auf entsprechende Anforderungen an das Molekül zu reagieren.

4.1.2 Entwicklung einer Totalsynthesestrategie für Ahp-Cyclodepsipeptide

Die Synthesestrategie wurde anhand des Naturstoffes Tasipeptin A (**1**) (siehe Abb. 27) entwickelt. Parallel wurde auch Tasipeptin B (**2**) synthetisiert. Diese Verbindungen wurden gewählt, da sich keine funktionellen Gruppen in den

Aminosäuresequenzen befinden und so der Fokus auf den Aufbau der Ahp-Einheit, sowie des Zyklus gelegt werden konnte. Dennoch wurde bei der Entwicklung darauf geachtet, dass das Molekül prinzipiell funktionelle Gruppen tragen könnte. Das dies möglich ist, wird in Kapitel 4.2.6 gezeigt.

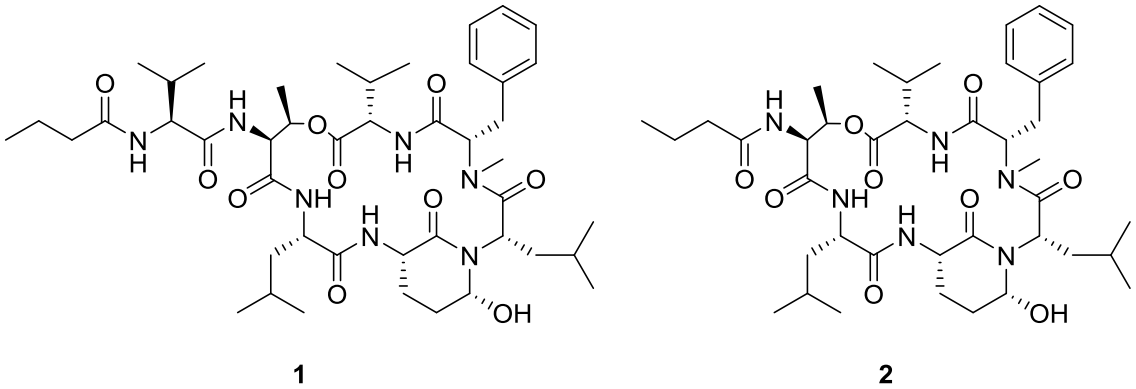


Abb. 27: Chemische Struktur der Ahp-Cyclodepsipeptide Tasipeptin A (1) und Tasipeptin B (2).

Um zu einem späteren Zeitpunkt in der Arbeit mehrere Derivate parallel synthetisieren zu können, wurde die Festphasensynthese gewählt. Zur Entwicklung einer praktikablen Synthese sollte die Fmoc-Strategie verwendet werden, wodurch flexibel auf mögliche Probleme reagiert werden konnte.

Die Entwicklung der Synthese startete mit der Wahl des Ahp-Vorläufers. Die Ahp-Einheit ist ein sechsgliedriger Ring, welcher aus einem Teil des Peptid-rückgrates und aus drei Kohlenstoffatomen aufgebaut ist. Der Vorläufer sollte somit eine Aminosäure sein, welche in der L-Konfiguration verfügbar ist. Die Seitenkette sollte die drei Kohlenstoffatome innehaben und über eine funktionelle Gruppe verfügen, die auf der festen Phase verankert werden kann. Während der Abspaltung des Peptides sollte sich der Aldehyd bilden oder nach der Freisetzung unter milden standardisierte Reaktionsbedingungen synthetisierbar sein. Des Weiteren mussten der C- und der N-Terminus über Schutzgruppen verfügen, die orthogonal abspaltbar sind.

Als mögliche Kandidaten wurden Ornithin (Orn) und Glutaminsäure (Glu) ermittelt. Beide besitzen drei linear verknüpfte Kohlenstoffatome in der Seitenkette und eine endständige funktionelle Gruppe. Der N-Terminus war Fmoc- und der C-Terminus als Allylester geschützt.

Zunächst wurde untersucht, ob es möglich ist, einen Aldehyden direkt in die Seitenketten der Aminosäuren einzuführen und dann auf das Harz zu laden. Dazu

wurde versucht, das Fmoc-geschützte Ornithin katalytisch zum Aldehyd zu oxidieren, was J. Srogl et al. an aliphatischen Aminen zeigte.[138] Nachteil dieser einstufigen Methode ist, dass die Carbonsäure nachträglich als Allylester hätte geschützt werden müssen.

Als Katalysator wurde Kupfer(I)-3-methylsalicylat eingesetzt. Dieser sollte die Reaktion bei 50 °C mit Hilfe von Luftsauerstoff initiieren. Nach 20 Stunden Reaktionszeit konnte kein Edukt oder Produkt identifiziert werden. Ursache hierfür könnte die höhere Komplexität des Startmaterials sein, wodurch deutlich mehr Nebenreaktionen auftreten können (Vergl. Abb. 28).

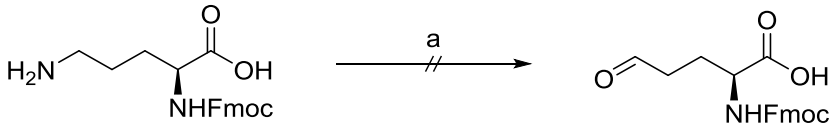


Abb. 28: Versuchte Synthese eines Ahp-Vorläufers aus Fmoc-Orn-OH nach J. Srogl et al.[138]
(a) Kuper(I)-3-methylsalicylat, Ascorbinsäure, DMAc, 50 °C, 20 h.

Der zweite Ansatz umfasste eine zweistufige Synthese. Als Startmaterial wurde Glutaminsäure verwendet, welche wie oben beschrieben geschützt war. Die Reduktion der Carbonsäure zum Alkohol erfolgte im ersten Schritt. Dazu wurde die freie Carbonsäure mit Triethylamin deprotoniert und bei 0 °C mit Isobutylchloroformiat versetzt, sodass ein gemischtes Anhydrid entstand. Als Hydridspender wurde Natriumborhydrid eingesetzt, welches die reaktive Verbindung zum Alkohol reduzierte. Nach insgesamt einer Stunde konnte so das geschützt 5-Hydroxynorvalin (Fmoc-Hnv-OAll) erhalten werden. Nach einer Anpassung der Äquivalenten des Natriumborhydrids ($NaBH_4$) und des Isobutylchloroformiats (IBCF) konnte eine Ausbeute von bis zu 72 % erzielt werden (vergleiche Abb. 29/Kasten). Ein Upscaling des Reaktionansatzes war nur bedingt möglich. Dies führte zu Einbußen in der Ausbeute.

Diese milde Reduktionsmethode wurde gewählt, um den Erhalt des Allylesters zu sichern und um zu garantieren, dass die Fmoc-Schutzgruppe nicht abgespalten wird, was grundsätzlich bei der Verwendung von komplexen Hydriden auftreten kann.

In einem Testansatz wurde die Oxidation des Alkohols zum Aldehyden überprüft. Aus anderen Studien, bei denen Boc-geschützte-Amine verwendet wurden, war bekannt, dass die Aldehyde intramolekular Hemiaminale bilden.[14] Es wurde vermutet, dass dies hier nicht möglich ist, da mit Fmoc eine deutlich voluminösere und sterisch anspruchsvollere Schutzgruppe verwendet wurde. Wie erwartet war

eine Oxidation mit Dess-Martin-Periodinan möglich. Das Produkt 5-Oxo-Norvalin scheint jedoch so reaktiv zu sein, dass es mit dem Fmoc-geschützten Amin einen Fünfring bildet und das Hemiaminal entsteht (siehe Abb. 29).

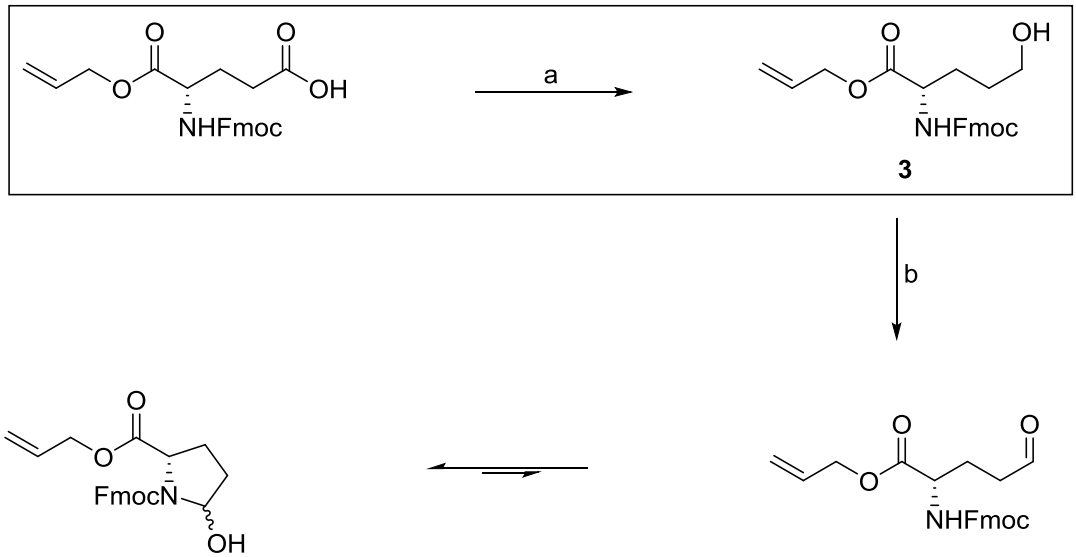


Abb. 29: Synthese des Ahp-Vorläufers aus Fmoc-Glu-OAll. (a): i) Et_3N (3 eq), IBCF (3 eq), THF, 0°C, 30 min., 92%; ii) $NaBH_4$ (5 eq), H_2O, rt, 30 min.; (b): Dess-Martin-Periodinan (1.5 eq), DCM, rt, 30 min.

Der Ansatz zeigt, dass Fmoc-Glu-OAll generell als Startmaterial geeignet ist. Ohne Mehraufwand ist eine direkte Verankerung des Aldehyds auf dem Harz jedoch nicht möglich. Es wurde daher entschieden, dass die Verbindung **3** auf die feste Phase geladen wird. So sollte nach der Synthese des Zyklus und der Abspaltung des Peptides eine Oxidation zum Aldehyden möglich.

Als Linker wurde 2-Chlorotritylchlorid verwendet, da dieser einerseits effizient mit Alkoholen beladen werden kann als auch das synthetisierte Produkt unter relativ milden Bedingungen mit TFA (Trifluoressigsäure) abspaltbar ist. Die feste Phase bestand aus Polystyrol, welches mit 2% Divinylbenzol vernetzt war.

Die Beladung des Harzes erfolgte unter trockenen Bedingungen. Als Lösungsmittel wurde das stark-quellende DCM verwendet, sodass die reaktiven Zentren zur Beladung sehr gut erreichbar waren. Hierzu wurde das am Hochvakuum getrocknete Startmaterial Fmoc-Hnv-OAll (**3**) in DCM gelöst. Nach der Zugabe zu der getrockneten festen Phase wurde Pyridin hinzugefügt, welches den Alkohol deprotonierte. Das Alkoholat (**3**) griff nukleophil das zentrale Kohlenstoffatom des Linkers (**4**) an, wodurch das Chlorid substituiert wurde. Der Ahp-Vorläufer wurde

somit am Harz verankert (**5**, siehe Abb. 30).[139] Nicht abreagierte reaktive Zentren wurden dann in einem zweiten Schritt mit Methanol geblockt.

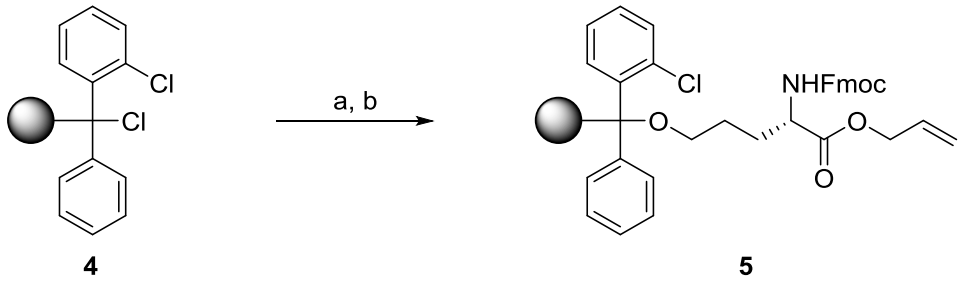


Abb. 30: Beladung des 2-CTC-Harzes mit Fmoc-Hnv-OAll (3). (a) Fmoc-Hnv-OAll (1 eq*), Pyridin (3 eq*), DCM, rt, 72 h; *Bezogen auf die Beladung; (b) DCM/MeOH/DIPEA(17:2:1), rt, 3x 5 min.

Es wurde eine Beladung von 0.2 mmol/g angestrebt. Um diese zu erreichen, musste das 1.5-fache an Startmaterial (**3**) eingesetzt werden, da der deprotonierte Alkohol auch mit dem Allylester zum stabilen sechsgliedrigen Lacton reagiert.

Nach der Verankerung des Ahp-Vorläufers (**3**) wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Dazu wurde das Harz mit einer 40 %igen Piperidinlösung und ein zweites Mal mit einer 20 %igen Piperidinlösung behandelt.

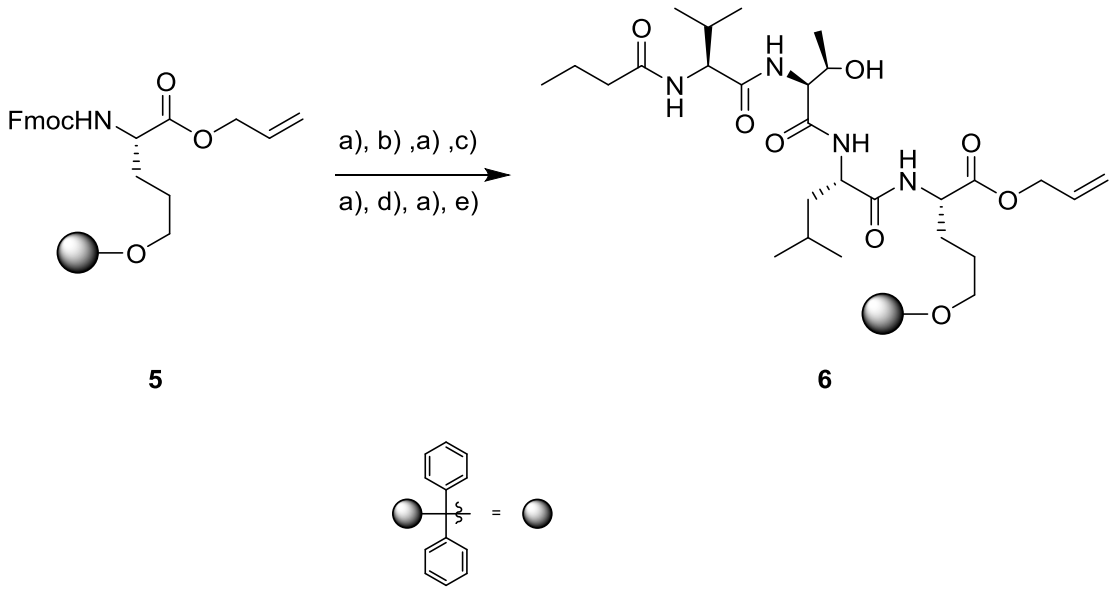


Abb. 31: Kupplung der ersten vier Aminosäurebausteine. (a) 40 % Piperidin in DMF (v/v), rt, 3 min, ii) 20 % Piperidin in DMF (v/v), rt, 12 min; (b) Fmoc-Leu-OH (4 eq*), HBTU/HOBt (4 eq*), DIPEA (4 eq*), DMF, rt, 45 min; (c) Fmoc-Thr-OH (4 eq*), HBTU/HOBt (4 eq*), DIPEA (4 eq*), DMF, rt, 45 min; (d) Fmoc-Val-OH (4 eq*), HBTU/HOBt (4 eq*), DIPEA (4 eq*), DMF, RT, 45 min; (e) i) Butansäure (4 eq*), HBTU/HOBt (4 equiv*), DIPEA (4 eq*), DMF, rt, 45 min; Butansäure (8 eq*), HBTU/HOBt (4 equiv*), DIPEA (8 eq*), DMF, rt, 45 min. ; Ausbeute: ~ 90 % über sieben Stufen nach LC-MS-Analyse; *Bezogen auf die Beladung.

Nach abwechselnden Waschschritten mit DMF und DCM konnte ein Fmoc-geschütztes Leucin gekuppelt werden. Dazu wurden die Kupplungsreagenzien HBTU/HOBT, die Base DIPEA (Diisopropylethylamin) und die Aminosäure in DMF gelöst, zu dem Harz gegeben und bei Raumtemperatur für 45 Minuten geschüttelt. Nach dem Entfernen der Reaktionslösung wurde das Harz mit DMF sowie DCM gewaschen. Dann wurde mit den oben genannten Reagenzien alternierend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und das Peptidfragment gekuppelt. Mit den Verbindungen Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Val-OH und Butansäure wurde das Peptid verlängert (**6**). Nach einer LC-MS-Analyse ließ sich feststellen, dass die Kupplung der Fettsäure unvollständig war. Die Reaktion musste wiederholt werden. Dazu wurden die Äquivalente an Butansäure sowie an Base erhöht und die Reagenzien ein weiteres Mal zu der festen Phase gegeben (siehe Abb. 31).

Der sekundäre Alkohol der Seitenkette des Threonins ist vergleichsweise unreaktiv und weniger nukleophil. Daher konnte die OH-Gruppe während der Verknüpfung der ersten vier Peptidfragmente ungeschützt bleiben. Dies erspart einen zusätzlichen Entschützungsschritt, der voraussichtlich Einbußen in der Ausbeute bedeutet hätte.

Zum Aufbau der Esterbindung wurde die Steglich-Variante gewählt. Dazu wurde DIC (Diisopropylcarbodiimid) und DMAP (4-Dimetyhlaminopyridin) als Katalysator eingesetzt. Das Carbodiimid aktiviert die Carbonsäure des Valins. Das DMAP ist nucleophiler als der Alkohol und greift den Aktivester unter Bildung eines *N*-Acylpyridiniumions an. Die Zwischenstufe ist elektrophil genug, um vom Alkohol angegriffen zu werden. Das DMAP wird abgespalten und der Ester (**7**) gebildet.[140,141]

Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen, waren die Reaktionsbedingungen anzupassen, welche in Tab. 2 dargestellt sind.

Die literaturbekannten Reaktionsbedingungen[141] führten zu einer geringen Ausbeute. Daher wurde die Reaktionszeit und -temperatur erhöht. Die Temperaturerhöhung führte zu der Bildung eines weißen Niederschlages, der sich weder in polaren noch in apolaren Lösungsmitteln löste. Bei der Verwendung von HBTU statt DIC und der Erhöhung des DCM Anteils konnte keine Verbesserung der Ausbeute beobachtet werden.

Tab. 2: Optimierung der Reaktionsbedingungen des Veresterungsschrittes

LM-Verhältnis (DCM:DMF)	Temp. [°C]	Zeit [h]	Wiederholungen	Reagenzien	Ausbeute* [%]
3:1	rt	2	4	DIC/DMAP	**<10**
3:1	rt	24	2	DIC/DMAP	**<10**
3:1	40	72	1	DIC/DMAP	**<10**
3:1	40	24	1	HBTU/DMAP	**<10**
9:1	40	24	1	DIC/DMAP	**<10**
DCM/ DIPEA	40	1	5	DIC/DMAP	**>75**

* nach LC-MS-Analyse

Wurde die Reaktion in reinem DCM und bei 40 °C durchgeführt, konnte eine deutliche Steigerung der Ausbeute festgestellt werden. Um die Löslichkeit von Fmoc-Val-OH zu erhöhen, wurde DIPEA zur Reaktionslösung gegeben. Da DMAP bei erhöhter Temperatur nicht langzeitstabil ist[142], wurde dieser Schritt fünfmal für eine Stunde wiederholt. In Abb. 32 ist der Veresterungsschritt schematisch dargestellt.

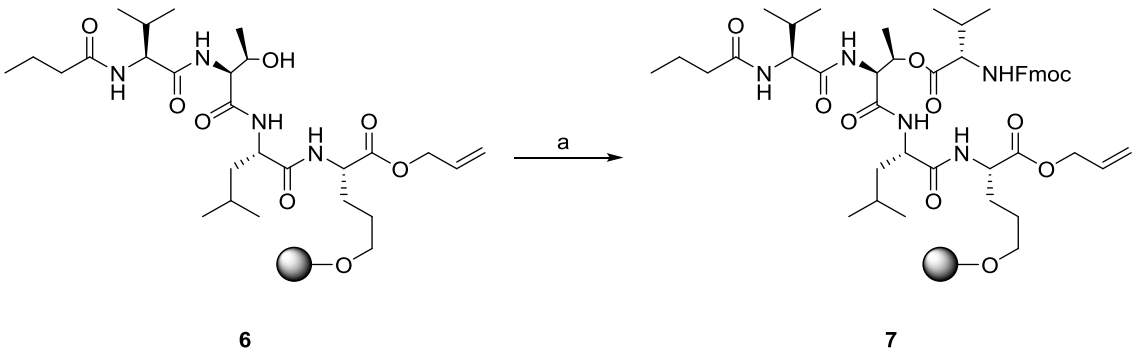


Abb. 32: Veresterung des Threonins mit Fmoc-Val-OH. Fmoc-Val-OH (10 eq*), DIC (10 eq*), DMAP (0.5 eq*), DIPEA (10 eq*), DCM, 40 °C, 5 x 1h; *Bezogen auf die Beladung.

Auf die Veresterung folgte die Entschützung des N-Terminus mit Piperidin und die Kupplung der N-methylierten Fmoc-geschützten Aminosäure Phenylalanin.

Es wurden die Standardreagenzien HBTU und HOBt verwendet, um die Verbindung **8** zu erhalten (siehe Abb. 33).

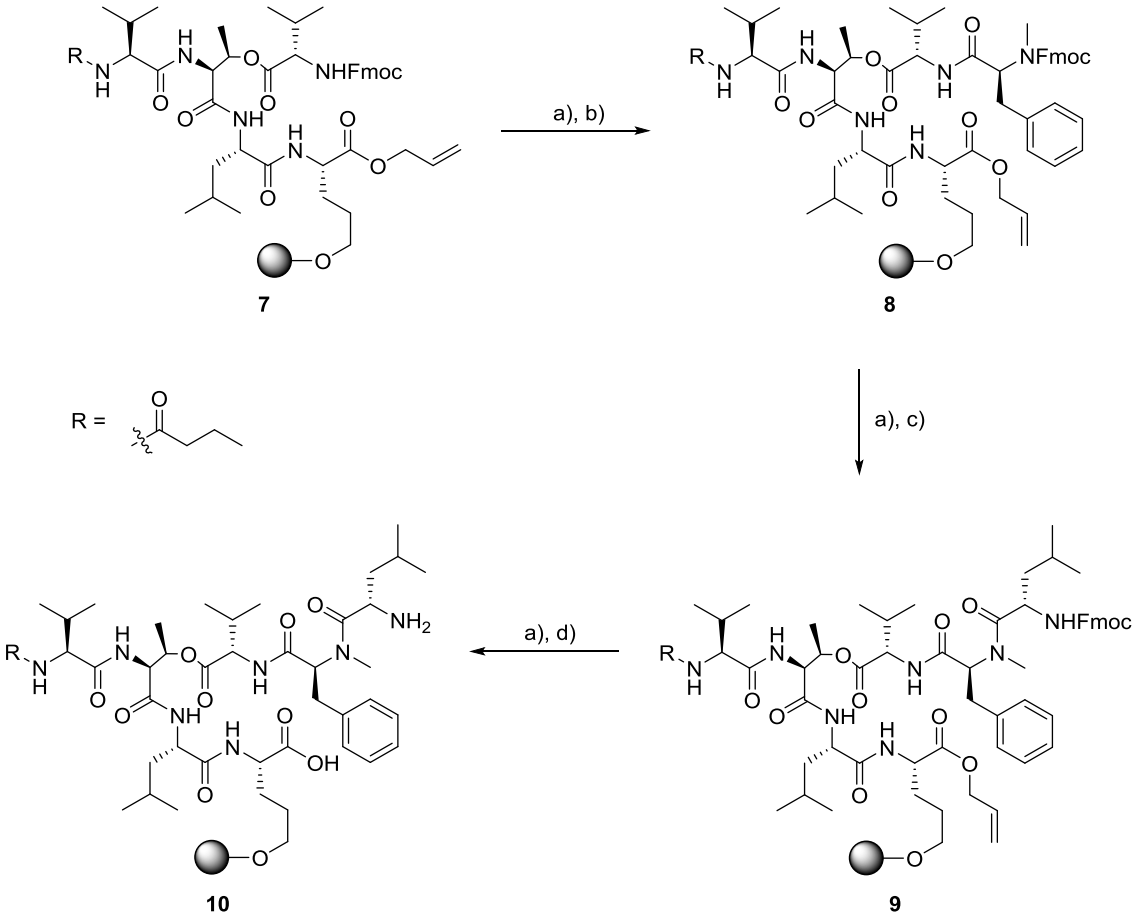


Abb. 33: Kupplung von Fmoc-Me-Phe-OH sowie Fmoc-Leu-OH; Entschützung des C-Terminus. (a) 40 % Piperidin in DMF (v/v), rt, 3 min, ii) 20 % Piperidin in DMF (v/v), rt, 12 min; (b) Fmoc-Me-Phe-OH (4 eq*), HBTU/HOBt (4 eq*), DIPEA (4 eq*), DMF, rt, 45 min; (c) Fmoc-Leu-OH (4 eq*), PyBrOP (4 eq*), DIPEA (4 eq*), DCM, 40 °C,6 x 1h; (d) Morpholin (24 equiv*), $Pd(PPh_3)_4$ (1 eq*), DCM, rt, 2h; * Bezogen auf die Beladung.

Im Anschluss wurde die Fmoc-Schutzgruppe des methylierten Amins abgespalten. Die nächste zu kuppelnde Aminosäure war Fmoc-Leucin. Auf Grund des weniger nukleophilen und sterisch gehinderten N-Terminus mussten Reagenzien eingesetzt werden, die einen reaktiveren Aktivester bildeten.[76] Hierzu wurde PyBroP und HOBt gewählt, was jedoch nur zu einer geringen Ausbeute führte. Die Wiederholung des Reaktionsschrittes führte ebenfalls nicht zum gewünschten Umsatz. Daher wurden einige Reagenzien und Reaktionsbedingungen zur Optimierung dieses Reaktionsschrittes getestet, welche in Tab. 3 dargestellt sind.

Tab. 3: Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Kupplung auf die N-methylierte Aminosäure von Tasipeptin A

Lösungsmittel	Reagenz	Temperatur [°C]	Ausbeute [%][a]
DMF	PyBroP/HOBt	rt	**<30**
DCM	PyBroP	rt	**<30**
DCM	BOP-Cl	rt	**<30**
DCM	PyBrop	40	**>70**[b]

[a] über vier Stufen nach LC-MS-Analyse, [b] nach fünfmaliger Wiederholung

Die beste Ausbeute konnte mit PyBroP bei einer Temperatur von 40 °C erreicht werden. Um die Löslichkeit des Fmoc-Leucins zu erhöhen, wurde DIPEA hinzugegeben. Reagenzien sowie Aminosäure wurden nach einer Stunde durch neue ausgetauscht und der Vorgang fünfmal wiederholt, sodass die Verbindung **9** erhalten wurde (siehe Abb. 33).

Nach dem Kuppeln der letzten Aminosäure konnte die Carbamatschutzgruppe Fmoc mit Piperidin abgespalten werden. Anschließend wurde der C-Terminus des Ahp-Vorläufers entschützt. Dazu wurde unter trockenen Bedingungen Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium(0) und Morpholin in DCM zum Harz gegeben. Die Palladiumverbindung fungierte als Katalysator und koordinierte an die C-C-Doppelbindung des Allylesters. Dem Morpholin war es dann möglich, die Allylschutzgruppe nukleophil anzugreifen und so abzuspalten (siehe Abb. 33)[143].

Nach der Abspaltung der Schutzgruppen lagen der C- und N-Terminus der Verbindung **10** ungeschützt vor. Die Macrolactamisierung auf der festen Phase wurde durch die Zugabe von PyBOP/HOBt und DIPEA eingeleitet. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden zeigte eine LC-MS-Analyse einen vollständigen Umsatz des Peptides **10** und das Produkt **11**. Eine Zyklisierung mit den Standardkupplungsreagenzien HBTU/HOBT führte zu dem gleichen Ergebnis (siehe Abb. 34).

Um die Synthese an der festen Phase zu beenden, wurde das Peptid **11** mit Hilfe von Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten. Die zyklische Verbindung **12** wurde mittels präparativer-HPLC aufgereinigt und es konnte eine Ausbeute von 13 % bezogen auf die Beladung bestimmt werden.

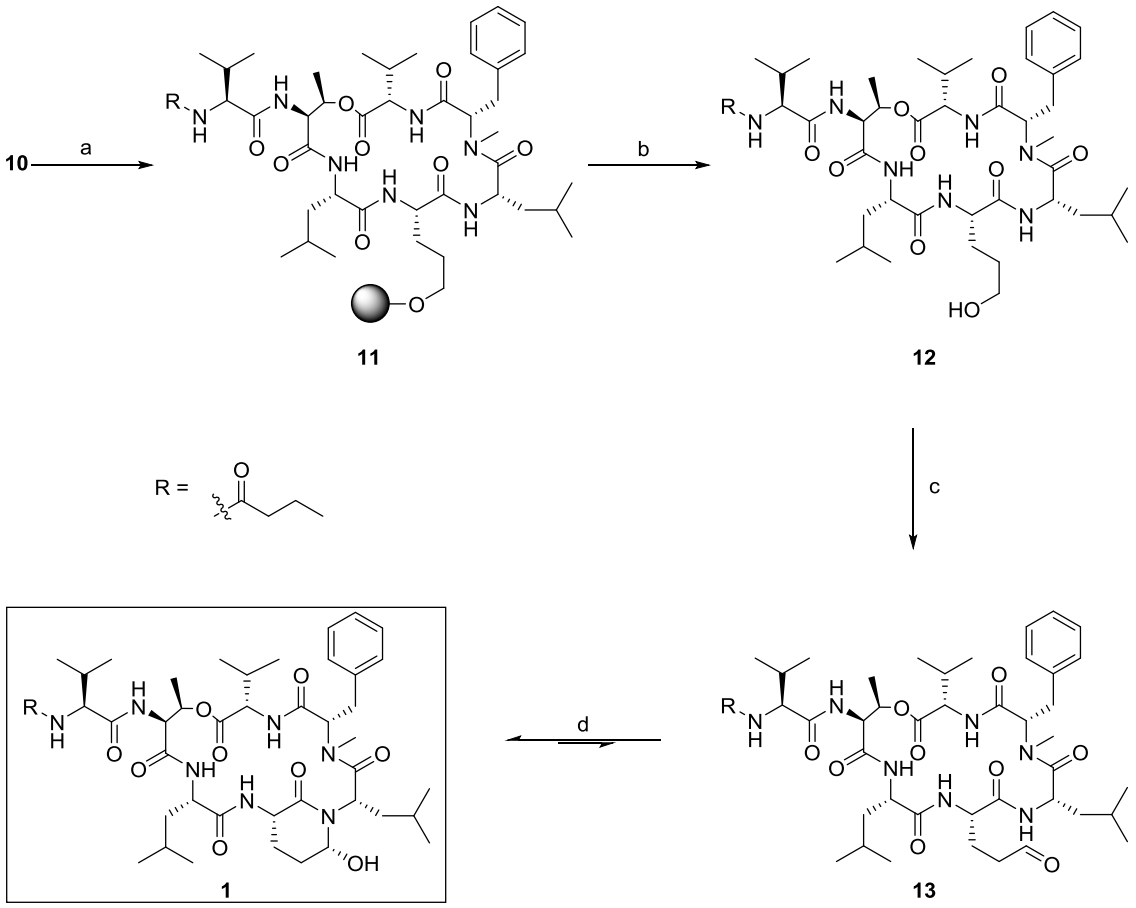


Abb. 34: Zyklisierung, Abspaltung vom Harz, Oxidation und Bildung der Ahp-Einheit. (a) HBTU/HOBt (4 eq*), DIPEA (4 eq*), DMF, rt, 2h; (b) TFA/TIS/H_2O (95:2.5:2.5), rt, 2h, 13 %; (c) Dess–Martin Periodinan (1.5 eq), DCM, rt, 1.5 h; (d) ACN:H_2O (1:1), rt, 72 h, 15 %; * Bezogen auf die Beladung.

Der primäre Alkohol **12** wurde mit Dess-Martin-Periodinan versetzt und so über 1.5 Stunden zum Aldehyden **13** oxidiert. Eine LC-MS-Analyse zeigte einen Umsatz von nahezu 100 %. Aufgrund der unvollständigen Zyklisierung des Aldehyds und der Bildung von Hydroxyprolinderivaten konnten mehrere Produkte mit der erwarteten Masse identifiziert werden (vergl. Abb. 26). Möglich ist auch, dass die Ahp-Einheit mit entgegengesetzter Stereochemie gebildet wird. Die Verbindung mit der korrekten Ausrichtung der OH-Gruppe in der Ahp-Einheit kann jedoch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zu dem gegenüberliegenden Valin ausbilden. Dies führt zu einem Energiegewinn und verschiebt das Gleichgewicht auf die Seite des Naturstoffes.

Zum Einstellen des Gleichgewichtes wurde das oxidierte Produkt 72 Stunden in einer Mischung aus Acetonitril/Wasser (1:1) gerührt und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **1** konnte mit einer Ausbeute von 15 %

isoliert werden. Über alle Stufen ergibt sich somit eine Ausbeute von 1.9 % (bezogen auf die Harzbeladung). Der Vergleich der NMR-Daten der synthetisierten Verbindung **1** mit den literaturbekannten NMR-Daten des isolierten Naturstoffes bestätigte die somit erreichte, erste Totalsynthese von Tasipeptin A (**1**). Mittels des gleichen Reaktionsweges wurde in einem zweiten Ansatz auch Tasipeptin B (**2**) mit einer Ausbeute über alle Stufe von 0.7 % synthetisiert.

Die hier entwickelte Totalsynthese für Ahp-Cyclodepsipeptide kann auch auf andere Sequenzen übertragen werden. Dabei können diese prinzipiell auch funktionelle Gruppen tragen. Sie müssen jedoch gegenüber Dess-Martin-Periodinan stabil sein (z.B.: Carbonsäuren, Amide, Harnstoffe, Guanidine). Sind die funktionellen Einheiten mit säurelabilen Schutzgruppen versehen, werden diese während der Abspaltung des Peptides vom Harz entfernt. In Kapitel 4.2.6 sind solche synthetisierten Verbindungen beschrieben worden. Können die funktionellen Gruppen durch das Reagenz oxidiert werden (z.B.: Alkohole), so könnten diese mit hydrierlabilen Schutzgruppen versehen sein. Wird das Peptid vom Harz abgespalten, bleiben diese Schutzgruppen bestehen. Nach der Oxidation können diese mit Wasserstoff entfernt werden, ohne dass die Ahp-Einheit beschädigt wird.

4.1.3 Biologische Evaluierung von Tasipeptin A und B

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Ehrmann der Universität Duisburg-Essen, wurden die Verbindungen Tasipeptin A und B sowie alle weiteren synthetisierten Verbindungen hinsichtlich ihres Inhibitionspotentials gegenüber Serinproteasen untersucht. Juliana Rey, Dr. Jens Bongard und Dr. Michael Melzer führten die entsprechenden biochemischen Analysen durch.
Als „Standardproteasen“ kamen Chymotrypsin, Trypsin sowie Elastase und die drei humanen Proteasen HTRA1, -2 und -3 zum Einsatz. Die Inhibition konnte durch Enzymkinetikexperimente bestimmt werden. Dazu wurden chromogene peptidische Substrate eingesetzt. Diese konkurrierten mit der synthetisierten Verbindung um die Wechselwirkung mit dem Enzym. Verdaut das Enzym das Substrat, so wird ein Farbstoff freigesetzt, welcher photometrisch detektiert werden kann. Je weniger Farbstoff freigesetzt wird, desto besser bindet die zu untersuchende Verbindung an die Protease und desto besser wird diese gehemmt.

In Tab. 4 sind die biochemischen Inhibitionsdaten in Form von K_i-Werten dargestellt.

Tab. 4: Biochemische Inhibitionsdaten von Tasipeptin A und B. a) Humane HtrA-Proteasen. b) Humanes Pankreas-Chymotrypsin. c) Humane neutrophile Elastase. d) Bovines Trypsin.

	K_i [µm]					
	HTRA1[a]	**HTRA2[a]**	**HTRA3[a]**	**Chymo-Trypsin[b]**	**Elastase[c]**	**Trypsin[d]**
Tasipeptin A (**1**)	> 50	2.9	3.4	> 50	0.228	> 50
Tasipeptin B (**2**)	> 50	> 50	> 50	6.3	5.0	> 50

Beide Naturstoffe inhibieren wie aus dem bekannten Bindungsmodus erwartet Elastase im nanomolaren bzw. im niedrigen mikromolaren Bereich. Dagegen wird Trypsin von beiden Verbindungen bis zu einer Konzentration von 50 µM nicht inhibiert.

Die Hemmung von Chymotrypsin erfolgt nur durch Tasipeptin B. Die Verbindung zeigt jedoch bei einer Konzentration von bis zu 50 µM keine Inhibition gegenüber HTRA1, -2 und -3. Dagegen ist es Tasipeptin A möglich, HTRA2 und HTRA3 im niedrigen mikromolaren Bereich zu inhibieren.

Das Inhibitionspotential der beiden Verbindungen zeigt deutliche Unterschiede. Werden die Strukturen der beiden Moleküle verglichen, so fällt auf, dass diese sich lediglich durch ein Valin in der Seitenkette unterscheiden. Dadurch ist Tasipeptin A in der Lage, auch mit der S_4-Tasche zu wechselwirken. Dieser Umstand, und dass die S_3-Tasche durch ein Valin anstatt einer Butylgruppe besetzt wird, verbessert die Inhibition von Elastase um den Faktor >20. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, die einen signifikanten Einfluss der P_3-Position auf die Hemmung der Elastase berichtet.[15]

Neben der Verbesserung des Inhibitionspotentials gegenüber Elastase ist es Tasipeptin A zusätzlich möglich, HTRA2 und -3 im niedrigen mikromolaren Bereich zu inhibieren. Dies ist ebenfalls auf die verlängerte Seitenkette des Naturstoffes zurückzuführen, da Tasipeptin B diese Eigenschaften nicht besitzt.

Dies ist das erste Mal, dass gezeigt werden konnte, dass ein Ahp-Cyclodepsipeptid in der Lage ist, HTRA2 und -3 zu inhibieren. Dies ist besonders interessant, weil die Verfügbarkeit von HTRA2-Inhibitoren deutlich begrenzt ist.[7]
Werden die Inhibitionsdaten von HTRA2 mit denen von Elastase verglichen, so ist Tasipeptin A gegenüber Elastase um den Faktor 10 selektiver.

4.2 Entwicklung, Design und biologische Evaluierung von HTRA-Inhibitoren

4.2.1 Entwicklung einer Leitsequenz

Um die Spezifität der Inhibitorenklasse gegenüber HtrA-Proteasen zu erhöhen, wurde eine neue Aminosäuren-Leitsequenz (**14**) entwickelt. Dazu wurde die sogenannte Spezifitätsmatrix aus der MEROPS-Datenbank analysiert. Diese gibt die Präferenz jeder Enzymtasche der humanen HtrA-Proteasen für jede proteinogene Aminosäure an. Durch die Kombination der Daten ergab sich eine neue Aminosäuresequenz (**14**). Diese Methode zum Designen des Inhibitors ist nur möglich, weil die Ahp-Cyclodepsipeptide wie Substrate an die Proteasen binden, dabei jedoch nicht gespalten werden. Die hieraus abgeleitete, neue Leitsequenz (**14**) ist von P_4 bis P_3'/P_x in Abb. 35 dargestellt. Die Position P_x im Molekül kann keiner Enzymtasche direkt zugeordnet werden und spielt, laut Literatur, nur eine untergeordnete Rolle bei der Inhibition.[9]

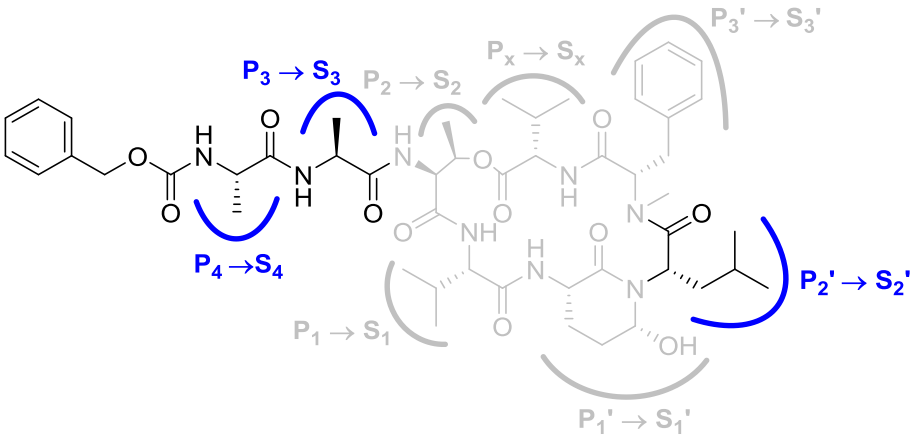


Abb. 35: Leitsequenz für einen generellen Inhibitor von humanen HtrA-Proteasen auf Basis eines Ahp-Cyclodepsipeptides.

Ein Ahp-Cyclodepsipeptid besteht in der Regel aus acht Aminosäuren, von denen drei mit Hilfe der MEROPS-Datenbank bestimmt wurden (Abb. 35, blau markiert). Die fünf anderen Aminosäuren sind aus peptidischen Inhibitoren sowie Substraten bekannt oder in den meisten literaturbekannten Ahp-Cyclodepsipeptiden vorhanden (Abb. 35, grau markiert).

Für P_4 sowie P_3 wurde ein Alanin und für P_2‘ ein Leucin durch die MEROPS-Datenbank ermittelt. Für die Position P_1 wurde Valin gewählt, da bekannt ist, dass die S_1-Tasche von humanen HtrA-Proteasen sehr gut mit kleinen hydrophoben Aminosäuren wechselwirkt.[7] In der P_3‘-Position ist in jedem Naturstoff eine N-methylierte aromatische Aminosäure zu finden. Daher wurde hier Phenylalanin gewählt. In den Positionen P_X und P_2 ist in vielen Molekülen der Naturstoffklasse ein Valin bzw. ein Threonin vorhanden. Die Aminosäuren wurden entsprechend eingesetzt. Der freie N-Terminus der Seitenketten, welcher sich durch den Threoninester ergibt, wurde mit einer Cbz-Schutzgruppe versehen. Für die Synthese ist die Schützung des ersten N-Terminus essentiell. So kann das lineare Molekül synthetisiert, dann verzweigt und im Anschluss zyklisiert werden. Die Cbz-Schutzgruppe ist orthogonal zur Fmoc-Schutzgruppe, gegenüber TFA stabil und könnte in zukünftigen Studien bei Bedarf, nach der Oxidation des Alkohols, mit Wasserstoff abgespalten werden. Das Naturstoff-Analogon **14** wurde nach der in Kapitel 4.1.2 entwickelten Methode synthetisiert.

Die Leitsequenz **14** wurde biochemisch evaluiert. Die Daten sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Biochemische Inhibitionsdaten der Leitsequenz 14. a) Humane HtrA-Proteasen. b) Humanes Pankreas-Chymotrypsin. c) Humane neutrophile Elastase. d) Bovines Trypsin.

	K_i [µM]					
#	**HTRA1[a]**	**HTRA2[a]**	**HTRA3[a]**	**Chymo-trypsin[b]**	**Elastase[c]**	**Trypsin[d]**
14	8.2	4.1	2.0	> 50	0.038	> 50

Im Vergleich zu den Naturstoffen Tasipeptin A (**1**) und B (**2**) kann das neu-entworfene Ahp-Cyclodepsipeptid auch HTRA1 im niedrigen mikromolaren Bereich inhibieren. Wie die Inhibition von HTRA2 war auch die Hemmung von HTRA1 durch Ahp-Cyclodepsipeptide bisher unbekannt und in der Literatur noch nicht

beschrieben. Das Ergebnis ist insofern relevant, da auch für HTRA1 nur sehr wenige Inhibitoren zur Verfügung stehen.[7]

Elastase wird von dieser Verbindung besonders gut gehemmt (im nanomolaren Bereich). Dies war jedoch zu erwarten, da die S_1-Tasche der Protease mit einem Valin besonders gut wechselwirkt. Damit liegt die Selektivität im Vergleich mit allen anderen getesteten Proteasen auf der Seite von Elastase.

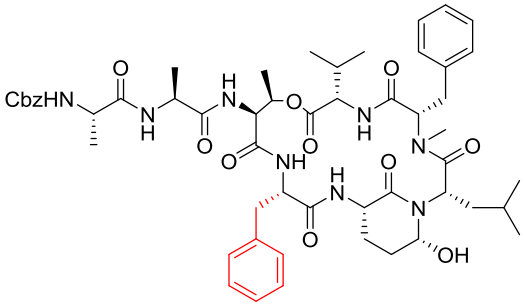
Um weitere Inhibitionsmöglichkeiten und die Selektivität zu analysieren, wurde die Aktivität der HtrA-Proteasen DegQ, DegP und DegS in Anwesenheit der Leitsequenz **14** untersucht. Eine Hemmung der Proteasen konnte nicht festgestellt werden. Auf eine biologische Evaluierung aller weiteren Verbindungen mit diesen Enzymen wurde in der Folge verzichtet, da das Hauptaugenmerk auf der Hemmung human-relevanter Serinproteasen liegen sollte.

4.2.2 Einfluss spezifischer Positionen auf die Inhibition der humanen HtrA-Proteasen

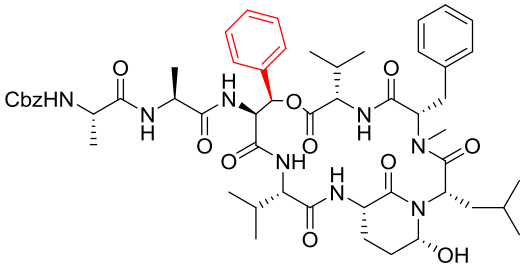
Um den Einfluss einzelner Positionen im Molekül auf die Inhibition zu untersuchen, wurde ein sogenannter Phenylalanin-Scan durchgeführt. Dazu wurden sechs weitere Derivate der neuen Leitsequenz **14** synthetisiert, bei denen je eine Aminosäure durch ein Phenylalanin ausgetauscht wurde. Die Ahp-Einheit blieb von diesem Scan ausgeschlossen. Diese Prozedur wurde gewählt, da davon auszugehen war, dass der Einfluss durch den großen, voluminösen Rest des Phenylalanins ausgeprägter ist als durch kleinere Aminosäuren. So können Veränderungen des Inhibitionspotentials schneller identifiziert werden.[144]

Die synthetisierten Derivate sind in Abb. 36 (Seite 54) dargestellt. Neben den Phenylalanin-Derivaten wurden weitere Verbindungen hergestellt, um das Inhibitionspotential zu verbessern bzw. Effekte auf diese zu untersuchen.

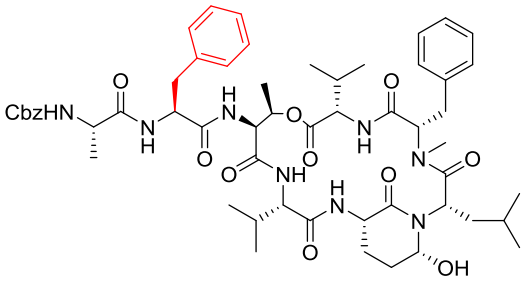
Mit der in Kapitel 4.1.2 beschriebenen neuen Synthesestrategie konnten diese Naturstoffanaloga und alle weiteren Derivate dieser Arbeit hergestellt werden. Die Verbindungen wurden mit Hilfe des Syntheseroboters „Syro I“ der Firma „MultiSynTech“ synthetisiert. Die Peptidkupplungen, die Veresterung, das Abspalten von Schutzgruppen und die Zyklisierung konnte zum Ende der Arbeit vollautomatisch durchgeführt werden. Die Beladung des Harzes und die Oxidation des Alkohols wurden manuell durchgeführt.



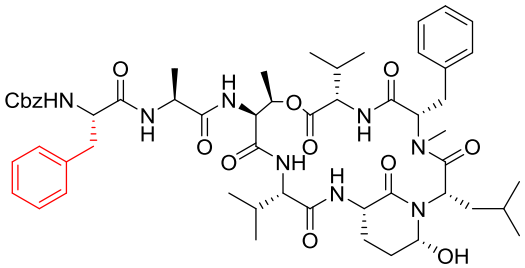
15



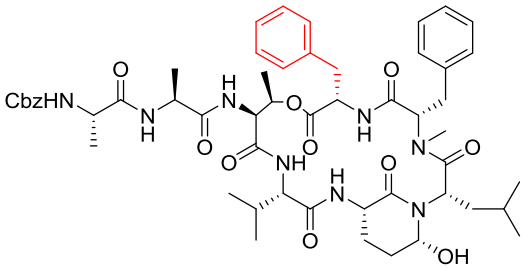
16



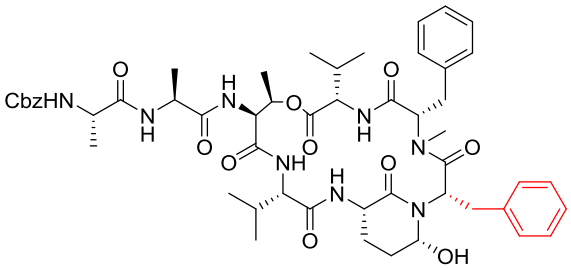
17



18



19



20

Abb. 36: Übersicht der chemischen Strukturen der aus der Festphasensynthese erhalten Derivate (15-20) des Phenylalanin-Scans

Die Ausbeute der synthetisierten Derivate lag zwischen 0.6 und 6.3 %. Die Verbindungen wurden hinsichtlich ihres Inhibitionspotentials gegenüber den bekannten Proteasen aus Kapitel 4.1.3 und 4.2.1 untersucht. Die entsprechenden K_i-Werte sind in Tab. 6 (Seite 55) angegeben.

Wie aus dem bekannten Bindungsmodus erwartet, wirkt sich das Ersetzten des Valins durch ein Phenylalanin in der P_1-Position positiv auf die Inhibition von Chymotrypsin aus, da die Protease an dieser Stelle besonders gut mit einem Phenylalanin-Rest wechselwirkt.[15] Für den Inhibitor **15** konnte ein K_i-Wert von

0.372 µM bestimmt werden. HTRA1- bis -3 konnten bis zu einer Konzentration 50 µM nicht gehemmt werden. Eine Inhibition von Elastase ist aufgrund des großen Restes ebenfalls nicht mehr gegeben. Andere Veränderungen scheint Elastase jedoch zu tolerieren, so wird diese von allen weiteren Verbindungen im niedrigen mikromolaren und im höheren nanomolaren Bereich inhibiert. Dagegen wird Trypsin und Chymotrypsin von keiner weiteren Verbindung gehemmt.

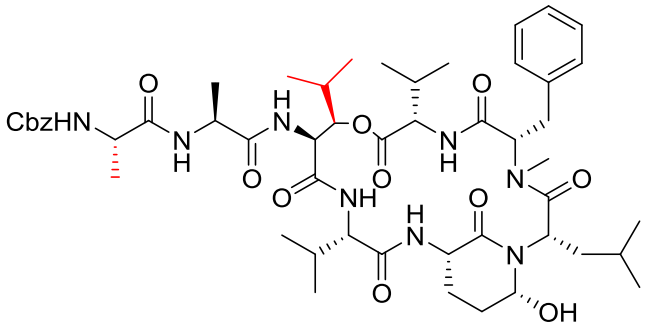
Tab. 6: Biochemische Inhibitonsdaten des Phenylalanin-Scans (14-20). a) Humane HtrA-Proteasen. b) Humanes Pankreas-Chymotrypsin. c) Humane neutrophile Elastase. d) Bovines Trypsin.

		K_i [µM]					
#	**Pos.**	**HTRA1[a]**	**HTRA2[a]**	**HTRA3[a]**	**Chymo-trypsin[b]**	**Elastase[c]**	**Trypsin[d]**
14	**-**	8.2	4.1	2	> 50	0.038	> 50
15	**P_1**	> 50	> 50	> 50	0.372	> 50	> 50
16	**P_2**	> 50	0.8	8.7	> 50	0.587	> 50
17	**P_3**	> 50	0.492	> 50	> 50	0.332	> 50
18	**P_4**	> 50	> 50	> 50	> 50	6.4	> 50
19	**P_x**	> 50	2.2	9.5	> 50	0.317	> 50
20	**P_2‘**	10.3	2.1	> 50	> 50	8.0	> 50

Die Aminosäure in der P_2-Position wurde durch ein β-Hydroxyphenylalanin ausgetauscht. Die Verbindung **16** ist das erste Ahp-Cyclodepsipeptid, dessen Esterbindung nicht aus einem Threonin oder einem Hydroxyprolinderivat aufgebaut ist. Eine Hemmung der Aktivität von HTRA1 konnte nicht mehr nachgewiesen werden. So scheint diese Protease kleinere Aminosäuren in der S_2-Tasche zu bevorzugen. Denkbar ist, dass die Besetzung der S_1-Tasche und der S_2-Tasche für die Inhibition essentiell ist oder dass der sterische Anspruch des Moleküls zu groß ist, um mit der Protease zu wechselwirken.

Die Inhibitionseigenschaften bezüglich HTRA2 konnten verbessert werden. Diese Verbesserung liegt mit 0.8 µM im oberen nanomolaren Bereich. Ebenso konnte die Selektivität gesteigert werden. Dazu können die Verhältnisse der K_i-Werte verglichen werden. Im Fall der Leitsequenz **14** liegt das Verhältnis von HTRA2 zu

Elastase bei etwa „100“. Bei der Verbindung **16** ist das Verhältnis bei etwa „1“. Um die Hemmung weiter zu optimieren und den Einfluss der Position P_2 genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich das Derivat **21** mit einer Ausbeute von 6.3 % hergestellt (siehe Abb. 37).



21

Abb. 37: Derivat der Leitsequenz mit einem β-Hydroxyleucin in Position P_2.

Das β-Hydroxyphenylalanin wurde durch β-Hydroxyleucin ersetzt, da aus einem Substrat-Screening bekannt ist, dass HTRA2 auch Leucin in der S_2-Tasche präferiert.[145] Des Weiteren wirkt sich diese Modifikation auch positiv auf die Hemmung von HTRA1 aus, welches nun wieder inhibiert wird. In Tab. 7 sind die entsprechenden K_i-Werte angegeben.

Tab. 7: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 21. a) Humane HtrA-Proteasen. b) Humanes Pankreas-Chymotrypsin. c) Humane neutrophile Elastase. d) Bovines Trypsin.

		K_i [µM]					
#	**Pos.**	**HTRA1[a]**	**HTRA2[a]**	**HTRA3[a]**	**Chymo-trypsin[b]**	**Elastase[c]**	**Trypsin[d]**
21	**P_2**	2.431	0.258	0.480	> 50	0.018	>50

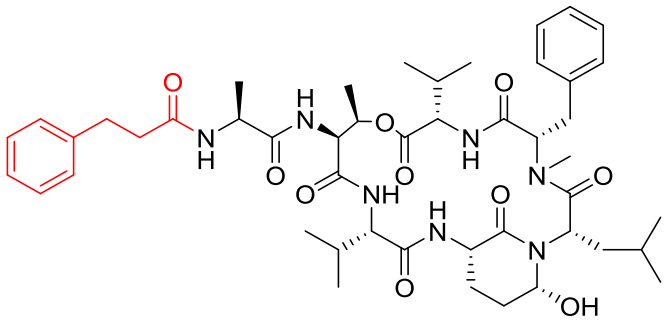
Durch den Austausch konnte die Affinität hinsichtlich HTRA2 verbessert werden und der K_i liegt nun bei 0.258 µM. Ebenso wird nun HTRA3 im mittleren nanomolaren Bereich gehemmt. Die Selektivität gegenüber Elastase nimmt zu, ist jedoch zu HTRA2 im Vergleich zur Leitsequenz **14** um den Faktor 10 verbessert worden.

Zusätzlich kann die Aktivität von HTRA1 gehemmt werden, was durch das Einbringen des Phenylrestes in P_2-Position nicht mehr möglich war. Dies bestätigt

die Vermutung, dass der sterische Anspruch der Verbindung **16** zu groß war, um mit dieser Protease zu interagieren.

Durch die Veränderung der Position P_3 konnte die Verbindung **17** synthetisiert werden. Diese kann HTRA2 im mittleren nanomolaren Bereich hemmen (K_i = 0.492 µM) und ist damit einer der besten Inhibitoren für dieses Enzym. Die Verbesserung des Inhibitors hat im Vergleich zu der Verbindung **16** kaum einen Einfluss auf die Selektivität gegenüber Elastase und HTRA2. Die Daten zeigen, dass HTRA2 im Vergleich zu den beiden anderen HTRA-Proteasen prinzipiell selektiv adressiert werden kann, da nur diese und Elastase gehemmt wird.

Wird in die P_4-Postion ein Phenylalanin „eingebaut" (Verbindung **18**), so ist es lediglich möglich, Elastase signifikant zu inhibieren. Alle anderen Proteasen werden bei einer Konzentration >50 µM nicht gehemmt. Neben dem Phenylalanin ist durch die Cbz-Schutzgruppe ein weiterer großer Rest in diesem Bereich vorhanden. Es ist zu vermuten, dass das Molekül in diesem Bereich zu voluminös und damit sterisch zu anspruchsvoll ist, sodass keine Tasche des Enzyms besetzt werden kann. Um ein besseres Verständnis für die Interaktion des Moleküls mit den Proteasen in diesem Bereich zu erlangen, wurde ein weiteres Derivat (**22**) synthetisiert.



22

Abb. 38: Derivat der Leitsequenz mit einer Hydrozimtsäure statt Cbz-Phe-OH.

Bei dieser Verbindung **22** wurde das Cbz-geschützte Phenylalanin durch eine Hydrozimtsäure ersetzt (siehe Abb. 38). Diese soll ein Phenylalanin ohne Aminogruppe imitieren. Das Derivat konnte mit einer Ausbeute von 2.1% dargestellt werden. Die zugehörigen Inhibitionsdaten sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 22. a) Humane HtrA-Proteasen. b) Humanes Pankreas-Chymotrypsin. c) Humane neutrophile Elastase. d) Bovines Trypsin.

		K_i [µM]					
#	**Pos.**	**HTRA1[a]**	**HTRA2[a]**	**HTRA3[a]**	**Chymo-trypsin[b]**	**Elastase[c]**	**Trypsin[d]**
22	**P_4**	>50	3.99	9.49	>50	0.007	>50

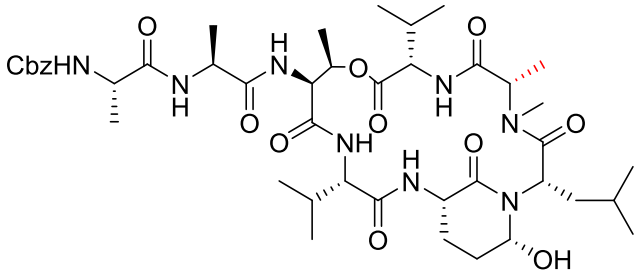
Die Aktivität der Proteasen HTRA2 und -3 wird wieder gehemmt. Die K_i-Werte sind vergleichbar mit denen der Leitsequenz (**14**). Der Unterschied ist jedoch, dass HTRA1 nicht inhibiert wird. Dies lässt vermuten, dass die Proteasen-Schutzgruppen-Wechselwirkung eine Konformationsänderung des Enzyms induziert, wodurch die entsprechenden Verbindungen global mit der Protease wechselwirken können. Ebenso vorstellbar ist, dass die eigentliche Interaktion der Cbz-Gruppe mit der Protease essentiell für die Inhibition von HTRA1 ist. Die Cbz-Schutzgruppe könnte dann mit der S_5-Tasche wechselwirken. Dies würde prinzipiell bedeuten, dass eine Verlängerung der Seitenkette durch weitere Aminosäuren die Besetzung zusätzlicher Enzymtaschen ermöglicht. Dadurch könnten selektivere und potentere Inhibitoren synthetisiert werden.

Nach bisherigen kristallographischen Studien von Ahp-Cyclodepsipeptiden ist der Einfluss der Aminosäure in der P_X-Position bei der Inhibition von Elastase oder Trypsin nur marginal.[9,11,115] So wurden lediglich schwache van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der Proteasenoberfläche beobachtet. Um dies genauer zu studieren, wurde das erste Ahp-Cyclodepsipeptid mit einem Phenylalanin in der P_x-Position synthetisiert (Verbindung **19**). Der Einfluss scheint größer zu sein als bisher angenommen. So steigen die K_i-Werte für fast alle getesteten Proteasen. Unerwartet verzehnfacht sich der K_i-Wert für Elastase. Für die Inhibition von HTRA2 scheint ein Phenylalanin-Rest in dieser Position günstig zu sein. Im Vergleich zur Leitsequenz verdoppelt sich die Affinität zu der Protease, was zu einer Halbierung des K_i-Wertes führt. Anhand dieser Daten ist zu vermuten, dass die Position bei der Verwendung der passenden Aminosäure einen entsprechenden Einfluss auf das Inhibitionspotential hat. Die Hemmung von HTRA1 scheint mit diesem Derivat nicht mehr möglich zu sein. Auch hier ist vermutlich der sterische Anspruch das

Hindernis. Dieser Fakt bestätigt die Vermutung des Einflusses auf das Inhibitionspotential der Position P_X.

Die P_1'-Position wird nicht verändert, da dies die Ahp-Einheit betrifft, welche die Verbindung stabilisiert und maßgeblich für die Inhibition der Proteasen verantwortlich ist.
Im nächsten Schritt wurde die Position P_2' mit einem Phenylalanin versehen und das Derivat entsprechend getestet. Die Inhibition von HTRA2 ist wie bei der Verbindung **20** im niedrigen mikromolaren Bereich möglich. Eine Hemmung der HTRA1-Aktivität ist ebenfalls zu beobachten. Dessen K_i-Wert ist im Vergleich zur Leitsequenz (**14**) leicht erhöht, jedoch hat die Selektivität gegenüber Elastase abgenommen. Ein voluminöser und sterisch anspruchsvoller Rest in der P_2'-Tasche scheint für die Standardprotease ungünstiger zu sein. Das Verhältnis der K_i-Werte (HTRA1 & Elastase) beträgt etwa 1, wohingegen dieses mit der Leitsequenz **14** bei etwa 220 liegt. Damit konnte die Selektivität um das 167-fache gesteigert werden. Diese Position zeigt somit Potential zur Derivatisierung, um die Selektivität der Leitsequenz (**14**) gegenüber HTRA1 zu verbessern.
Besonders interessant ist, dass die Verbindung **20** die erste ist, die eine größere Affinität zu HTRA2 aufzeigt als zu Elastase. Diese Eigenschaft ist bisher bei keiner Verbindung zu erkennen und gegenüber keiner anderen HTRA-Protease zu beobachten.

In der Position P_3' befindet sich, wie in allen natürlichen Ahp-Cyclodepsipeptiden, eine aromatische Aminosäure, hier Phenylalanin. Um die Abhängigkeit dieser Position auf die Inhibition zu untersuchen, wurde eine Verbindung synthetisiert, bei der das N-methylierte Phenylalanin durch ein N-methyliertes Alanin ausgetauscht wurde. Die Verbindung wurde mit einer Ausbeute von 1.1 % bezogen auf die Beladung synthetisiert. Auch dies ist das erste dargestellte und bekannte Ahp-Cyclodepsipeptid, welches keine aromatische Aminosäure in der P_3'-Position besitzt. Das Molekül ist in Abb. 39 dargestellt.



23

Abb. 39: Synthetisiertes Ahp-Cyclodepsipeptid ohne aromatische Aminosäure in Position P_3'

NMR-Studien haben gezeigt, dass zwischen dem Aminosäurerest aus Position P_2‘ und den aromatischen Protonen Wechselwirkungen bestehen.[137] Wie stark sich dies auf die geometrische Struktur auswirkt und wie dieses das Inhibitionspotential beeinflusst, ist bis jetzt unbekannt.

Wie erwartet, fehlt das charakteristische Signal im negativen ppm-Bereich im NMR-Spektrum. Es wurden keine zusätzlichen oder unerwarteten Signale gefunden. Daher ist davon auszugehen, dass zwischen den Resten keine Wechselwirkungen stattfinden. Zunächst war zu vermuten, dass dies die geometrische Struktur und das Inhibitionspotential leicht beeinflusst. Die Inhibitionsdaten sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 23. a) Humane HtrA-Proteasen. b) Humanes Pankreas-Chymotrypsin. c) Humane neutrophile Elastase. d) Bovines Trypsin.

		K_i [µM]					
#	**Pos.**	**HTRA1[a]**	**HTRA2[a]**	**HTRA3[a]**	**Chymo-trypsin[b]**	**Elastase[c]**	**Trypsin[d]**
23	**P_3‘**	> 50	6.896	> 50	> 50	0.1079	Aktivierung

Das Ahp-Cyclodepsipeptid **23** ohne die typische aromatische Aminosäure in P_3‘-Position ist in der Lage, die Aktivität von HTRA2 im unteren mikromolaren Bereich zu hemmen. Ein Einfluss dieser Position auf die Inhibition ist gegeben, jedoch ist dieser nach den vorliegenden Daten für HTRA2 nur gering. Elastase wird im nanomolaren Bereich inhibiert. Die Selektivität gegenüber Elastase hat etwa um den Faktor zwei abgenommen. Da HTRA1 und -3 nicht inhibiert werden, scheint eine Modifikation dieser Position nur dann sinnvoll zu sein, wenn das aromatische System bestehen bleibt.

Ein neuer Effekt, der in Verbindung mit Ahp-Cyclodepsipeptiden so noch nicht beschrieben wurde, ist die Aktivierung von Trypsin. Die aus Kapitel 2.3.2 bekannte Kristallstruktur des Ahp-Cyclodepsipeptides A90720A mit der Protease Trypsin verdeutlicht, dass die aromatische Seitenkette in der P_3‘-Position eine wichtige Bindung mit der Protease eingeht.[9] Da die Verbindung **23** keine aromatische Seitenkette in dieser Position besitzt, ist es dieser vermutlich nicht mehr möglich, an der üblichen Stelle zu binden. Denkbar ist, dass das Naturstoffanalogon an einer anderen Stelle mit der Protease wechselwirkt und so allosterisch aktiviert.[146]

Ausgehend von der Leitsequenz **14** konnte durch den Phenylalanin-Scan und die Synthese weiterer Derivate der Einfluss einzelner Positionen auf das Inhibitionspotential und die Selektivität analysiert werden. Eine Verbesserung der Affinität gegenüber HTRA1 kann durch Modifikation der Position P_2 erfolgen. Dabei scheinen kleine aliphatische Reste die Wechselwirkungen zu verstärken und somit die Protease besser zu inhibieren. Durch eine Veränderung der Position P_2‘ kann die Selektivität beeinflusst werden (Verbindung **20**). Der Austausch durch Phenylalanin erhöht die Affinität gegenüber HTRA1 und verringert diese gegenüber Elastase. Dies verwundert nicht, da die Spezifitätsmatrix aus der MEROPS-Datenbank zeigt, dass häufiger Leucin und Glycin in dieser Position zu finden sind als Phenylalanin.[3]
Alle weiteren Veränderungen hatten negative Auswirkungen auf die Inhibition von HTRA1, sodass die Protease bei einer Konzentration > 50 µM nicht mehr gehemmt wurde.
Die biochemischen Daten zeigen zusätzlich, dass das Inhibitionspotential gegenüber HTRA2 durch die Positionen P_2, P_3, P_x und P_2‘ positiv beeinflusst werden kann (bezogen auf die Leitsequenz **14**). In Bezug auf das Inhibitionspotential sind besonders die Positionen P_2 und P_3 hervorzuheben (Verbindung **16** und **17**). Die jeweilige Besetzung dieser Positionen durch ein Phenylalanin verschiebt die Gleichgewichtskonstante in den nanomolaren Bereich. Ein kleiner Rest (β-Hydroxyleucin, **21**) in der Position P_2 führt ebenso zu einer verbesserten Inhibition, ist jedoch weniger selektiv. Die Besetzung der S_3-Tasche mit einem Phenylalanin scheint hinsichtlich der Selektivität interessant zu sein, da nur zwei Proteasen (HTRA2 und Elastase) inhibiert werden. Die Besetzung des S_x-Bereiches durch einen aromatischen Rest resultiert eine Halbierung des K_i-Wertes im Vergleich zu Leitsequenz (**14**). Die Position P_2‘ spielt bei der Selektivität eine große

Rolle. Die Besetzung der korrespondierenden Tasche verbessert die Selektivität gegenüber HTRA2 im Vergleich zu Elastase. Die Besetzung anderer Positionen führte zu schlechteren Ergebnissen.
Die Hemmung von HTRA3 ist auch durch das Einbringen des Phenylalanins in der Position P_2 und P_x möglich, die K_i-Werte sind im Vergleich zur Leitsequenz **14** erhöht. Die Selektivität nimmt jedoch zu. Durch das Einführen des β-Hydroxyleucins in die Position P_2, wird das Inhibitionspotential verbessert und verschiebt sich in den nanomolaren Bereich.

Das Einführen eines Phenylalanins in die verschiedenen Positionen brachte teils positive Ergebnisse hinsichtlich des Inhibitionspotentials und der Selektivität. Die Daten zeigen, dass die Zugänglichkeit für einen HTRA2-Inhibitor größer ist als für einen HTRA1- oder HTRA3-Inhibitor. Im Vergleich zu HTRA1 und -3 liegt die Selektivität der Inhibitoren aus Kapitel 4.2.2 in der Regel auf der Seite von HTRA2. Daraus lässt sich ableiten, dass Ahp-Cyclodepsipeptide anscheinend brauchbarere Inhibitoren für HTRA2 sind. Die Affinität zu HTRA1 ist häufig gering, sollte aber durch geeignete Optimierung verbesserungsfähig sein.
Die Daten sind jedoch in einen gewissen Kontext zu bringen. So ist es durchaus möglich, dass gewisse Positionen, die sich im Phenylalanin-Scan als unzureichend erwiesen, durch die Besetzung mit anderen Aminosäuren als wichtig herausstellen. Trotz dieser Unschärfe sind die erhobenen Daten wichtig, um die Möglichkeiten dieser Inhibitorenklasse abschätzen zu können und um Inhibition in Abhängigkeit von bestimmten Positionen genauer zu untersuchen.
Des Weiteren lassen die K_i-Werte vermuten, dass der klassische Bindungsmodus von Ahp-Cyclodepsipeptiden zu Elastase oder Trypsin auch für die HtrA-Proteasen gilt. Dies implizieren die Inhibitionsdaten des Phenylalanin-Scans, da auch das Einführen und Entfernen des voluminösen Restes auf der P'-Seite zu einer Veränderung der K_i-Werte führte. Zusätzlich scheint die P_x-Position einen größeren Einfluss auf die Inhibition zu haben als bisher angenommen.

4.2.3 Kombination von Derivaten zur Verbesserung der Selektivität und Inhibition

Durch die biologische Evaluierung der Derivate (aus Kapitel 4.2.2) konnte gezeigt werden, dass verschiedene Seitenketten in spezifischen Positionen unterschiedliche

Einflüsse auf die Inhibition haben. Um die positiven Effekte verschiedener Reste in einem Molekül zu vereinen, wurde eine Kombination von vielversprechenden Verbindungen angestrebt. Es wurde erwartet, dass das resultierende Molekül hinsichtlich Inhibitionspotential und Selektivität verbessert wird.

Aufgrund der guten Ergebnisse hinsichtlich der Hemmung von HTRA2 wurden zwei Derivate ausgewählt. Verbindung **17** trägt ein Phenylalanin in Position P_3 und sticht durch seine vergleichsweise hohe Selektivität hervor. Diese inhibiert lediglich zwei Proteasen und ist ein nanomolarer Hemmer für HTRA2. Die Verbindung **21,** welche mit einem β-Hydroxyleucin in Position P_2 synthetisiert wurde, inhibiert hingegen vier Proteasen, ist jedoch ein noch besserer Hemmer für HTRA2.

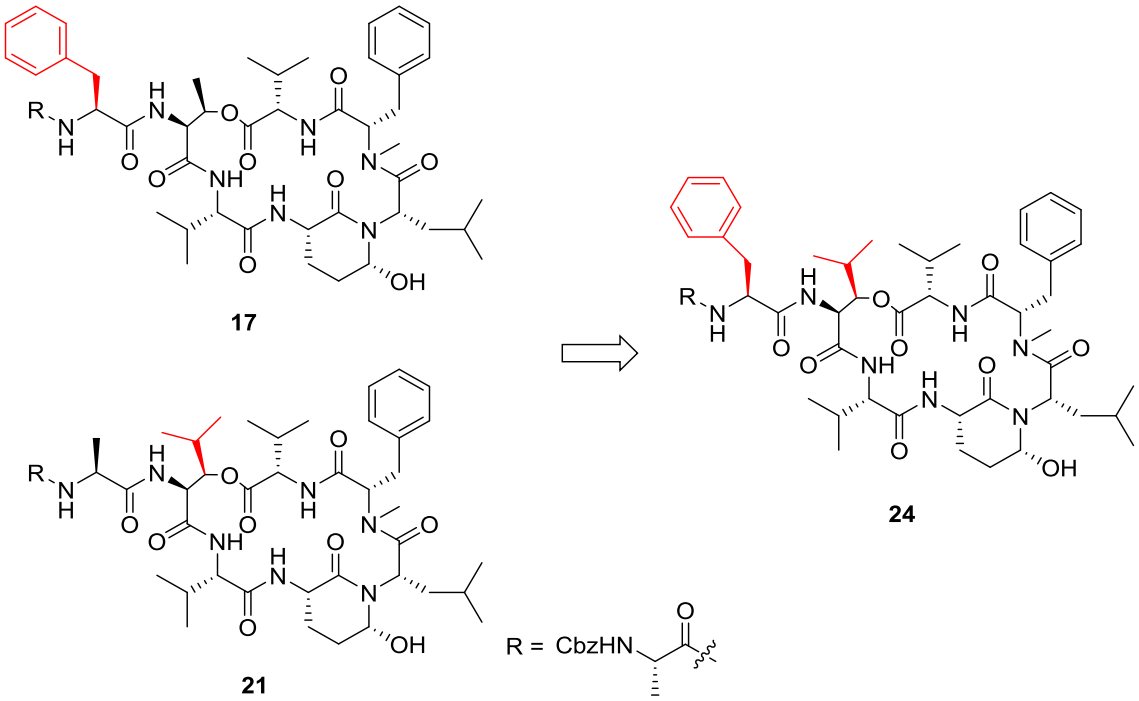


Abb. 40: Entwurf eines kombinierten Inhibitors aus den Verbindungen 17 und 21

Die eingeführten Reste wurden auf die Leitsequenz übertragen und so die neue Verbindung **24** mit einer Ausbeute von 0.5 % synthetisiert. In Abb. 40 ist das neue Molekül dargestellt.

Tab. 10 zeigt die biochemischen Inhibitionsdaten der Verbindung **24** und die der beiden ursprünglichen Inhibitoren. Neben den gezeigten Proteasen wurde auch die Inhibition gegenüber Trypsin und Chymotrypsin untersucht. Eine Hemmung bei einer Konzentration von >50 µM konnte nicht nachgewiesen werden.

Tab. 10: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindungen 17, 21 und 24.
a) Humane HtrA-Proteasen. b) Humane neutrophile Elastase.

			K_i [µM]			
#	**Pos.**	**Substitution**	**HTRA1[d]**	**HTRA2[d]**	**HTRA3[d]**	**Elastase[b]**
17	**P3**	Ala →Phe	> 50	0.492	> 50	0.332
21	**P2**	Thr → Leu(2-OH)	2.431	0.2582	0.48	0.018
24	**P2** **P3**	Thr → Leu(2-OH) Ala →Phe	>50	>50	>50	1.935

Der erwartete positive Effekt war nicht nachgeweisbar. Die Verbindung **24** hemmte keine der getesteten humanen HtrA-Proteasen bei einer Konzentration >50 µM. Lediglich Elastase wurde inhibiert. Im Vergleich zur Leitsequenz nimmt die Affinität deutlich ab, nämlich um den Faktor 50.

Zu vermuten ist, dass die Positionen P_2 und P_3 jeweils mit einem ähnlichen Bereich der Protease wechselwirken. Dies wäre möglich, wenn keine definierten oder sich stark abgrenzenden Enzymtaschen vorliegen würden. In den Molekülen **17** und **21** sind die jeweiligen benachbarten Aminosäuren der Positionen P_2 bzw. P_3 klein und somit sterisch nicht anspruchsvoll. Diesen Verbindungen ist es wie gezeigt möglich, die HtrA-Proteasen zu inhibieren. Da in der neuen Verbindung **24** zwei vergleichsweise große Reste benachbart sind, hindern diese sich gegenseitig und unterdrücken so die Wechselwirkung mit der Protease. Zudem ist denkbar, dass der sterische Anspruch so groß ist, dass eine globale Wechselwirkung nicht mehr möglich ist.

Ein ähnliches Phänomen konnte bereits beim Einsatz der Verbindung **18** als potentieller Inhibitor beobachtet werden. Durch das Einführen des Phenylalanins in Position P_4 lagen auch bei diesem Derivat zwei große Seitenketten nebeneinander und die Hemmung der HtrA-Proteasen war nicht mehr möglich.

Dies verdeutlicht nochmals, dass die auch Wechselwirkungen zwischen den Resten P_2 bis P_4 und der Protease einen großen Einfluss auf die Inhibition der HtrA-Proteasen haben.

Eine praktische Erklärung der Ergebnisse bezieht sich auf die Polarität der Derivate. Wie alle anderen synthetisierten Moleküle sind die Verbindungen **24** und **18** unpolar und in dem modifizierten Bereich besonders hydrophob. Da die

biochemischen Assays im wässrigen Medium stattfinden, führt dies vermehrt zu intermolekularen Wechselwirkungen. Damit stehen diese Moleküle für die Inhibition nicht mehr zur Verfügung.

4.2.4 Zellkultur-basierte Evaluierung der Inhibition von HTRA1

Wie gezeigt ist die Hemmung der Aktivität von HTRA1, -2 und -3 mit maßgeschneiderten Ahp-Cyclodepsipeptiden und mit Naturstoffen dieser Klasse möglich.

Eine Übertragung der Ergebnisse auf biologisch-komplexere Modelle konnte bisher jedoch noch nicht gezeigt werden. So ist es durchaus möglich, dass eine Inhibition in solchen Assays nicht mehr gegeben ist, da die Verbindungen z. B. mit anderen Proteinen wechselwirken oder metabolisch instabil sind.

Bisher sind alle synthetisierten Verbindungen besonders potent gegenüber HTRA2. Während der Anfertigung dieser Arbeit stand kein Assay zur Verfügung, mit dem die Aktivitätshemmung von HTRA2 in einem Zellkulturmodell bestimmt werden konnte. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit Dr. A. N. Tiaden und Priv.-Doz. Dr. P. J. Richards von der Universität Zürich das Inhibitionspotential gegenüber HTRA1 in einem zellbasierten Assay untersucht.

Tiaden et al. zeigten bereits 2012 die Abhängigkeit der Osteogenese von HTRA1.[147] Für die Untersuchung werden humane Stromazellen (hBMSCs) aus Knochenmark entnommen und die Knochenbildung nachverfolgt. Für die Differenzierung der Stromazellen wird die Proteolyseaktivität von HTRA1 benötigt. Die Mineralisation der Matrix ist somit HTRA1-Aktivitätsabhängig und kann mit dem Farbstoff Alizarinrot-S sichtbar gemacht werden

Zur Evaluierung der biologischen Aktivität der Ahp-Cyclodepsipeptide in einem zellbasierten Assay wurde die Verbindung **21** verwendet. Diese zeigte bis dahin die größte Hemmung gegenüber HTRA1. Die Matrixmineralisation wurde mit dem Naturstoffanalogon in An- und Abwesenheit von HTRA1, sowie in Anwesenheit der proteolytisch-inaktiven Form HTRA1SA, verfolgt. Die Mineralisation konnte mit Hilfe von Absorptionsmessungen bei 570 nm quantifiziert werden, da das Alizarinrot-S mit kristallinem Calciumphosphat wechselwirkt und die Probe rot färbt.[148]

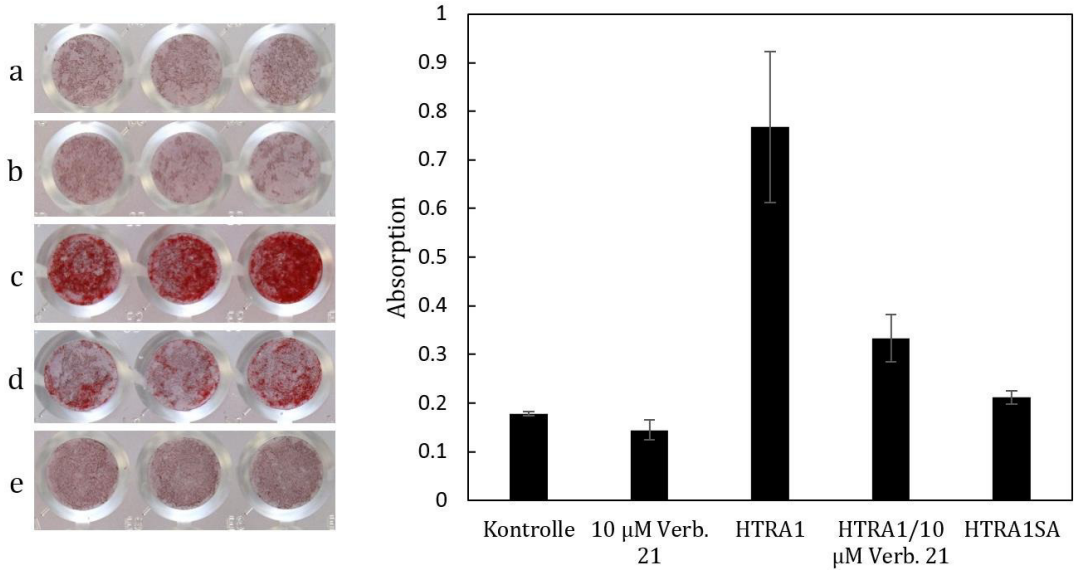


Abb. 41: Zellkultur-basierte Evaluierung der HTRA1-Inhibition. a) DMSO-Kontrolle b) 10 µM Verbindung **21** c) HTRA1 d) 10 µM Verbindung **21**/HTRA1 e) HTRA1SA; Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen.

Die eingefärbten Proben und die daraus erhaltenen Absorptionsdaten sind in Abb. 41 dargestellt. Um sicherzustellen, dass die Färbung auf die Aktivität der Protease zurückzuführen ist und nicht auf verwendete Reagenzien, wurden Kontrollproben erstellt. Die DMSO-Kontrolle, die Proben mit der Verbindung **21** ohne HTRA1 und mit der inaktiven Form HTRA1SA zeigen, wie erwartet, nahezu keine Färbung. Bei der Abwesenheit des Inhibitors zeigt das Experiment, wie erwartet, eine deutliche Rotfärbung, was auf die Aktivität von HTRA1 zurückzuführen ist. Ist die Verbindung **21** jedoch anwesend, so ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Die Verbindung hemmt HTRA1 und die Probe ist nur leicht rot gefärbt.

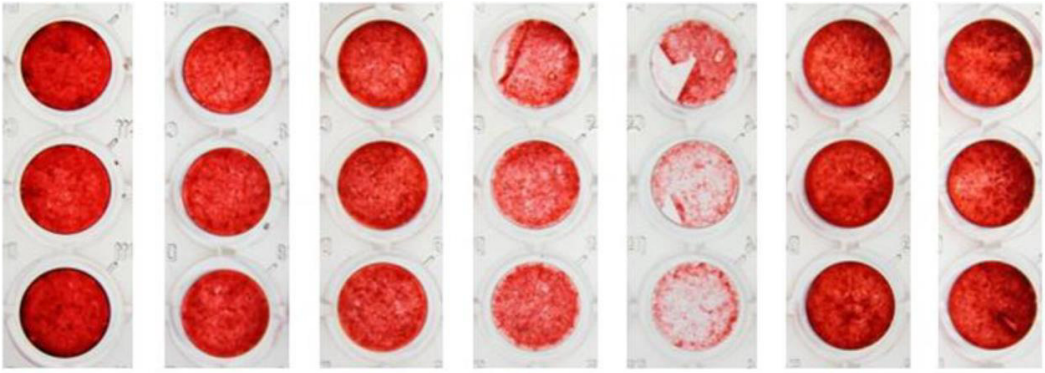


Abb. 42: Konzentrationsabhängige Aktivitätshemmung von HTRA1. a) HTRA1 + **21** (0.1 µM); b) HTRA1 + **21** (1 µM); c) HTRA1 + **21** (5 µM); d) HTRA1 + **21** (10 µM); e) HTRA1 + **21** (20 µM); f) HTRA; g) HTRA1 + DMSO

Da die Mineralisierung von der HTRA1-Aktivität abhängig ist, bedeutet dieses Ergebnis, dass die Protease auch in einem komplexeren System von einem Ahp-Cyclodepsipeptid signifikant inhibiert werden kann.

In einem zweiten Experiment konnte des Weiteren gezeigt werden, dass diese Hemmung auch dosisabhängig ist. Dazu wurden die entsprechenden Proben mit Konzentrationen zwischen 0.1 µM bis 20 µM an Verbindung **21** versetzt. Diese Abhängigkeit ist in Abb. 42 zu sehen.

4.2.5 Derivatisierung der P_1-Position und biochemische Evaluierung dieser Derivate

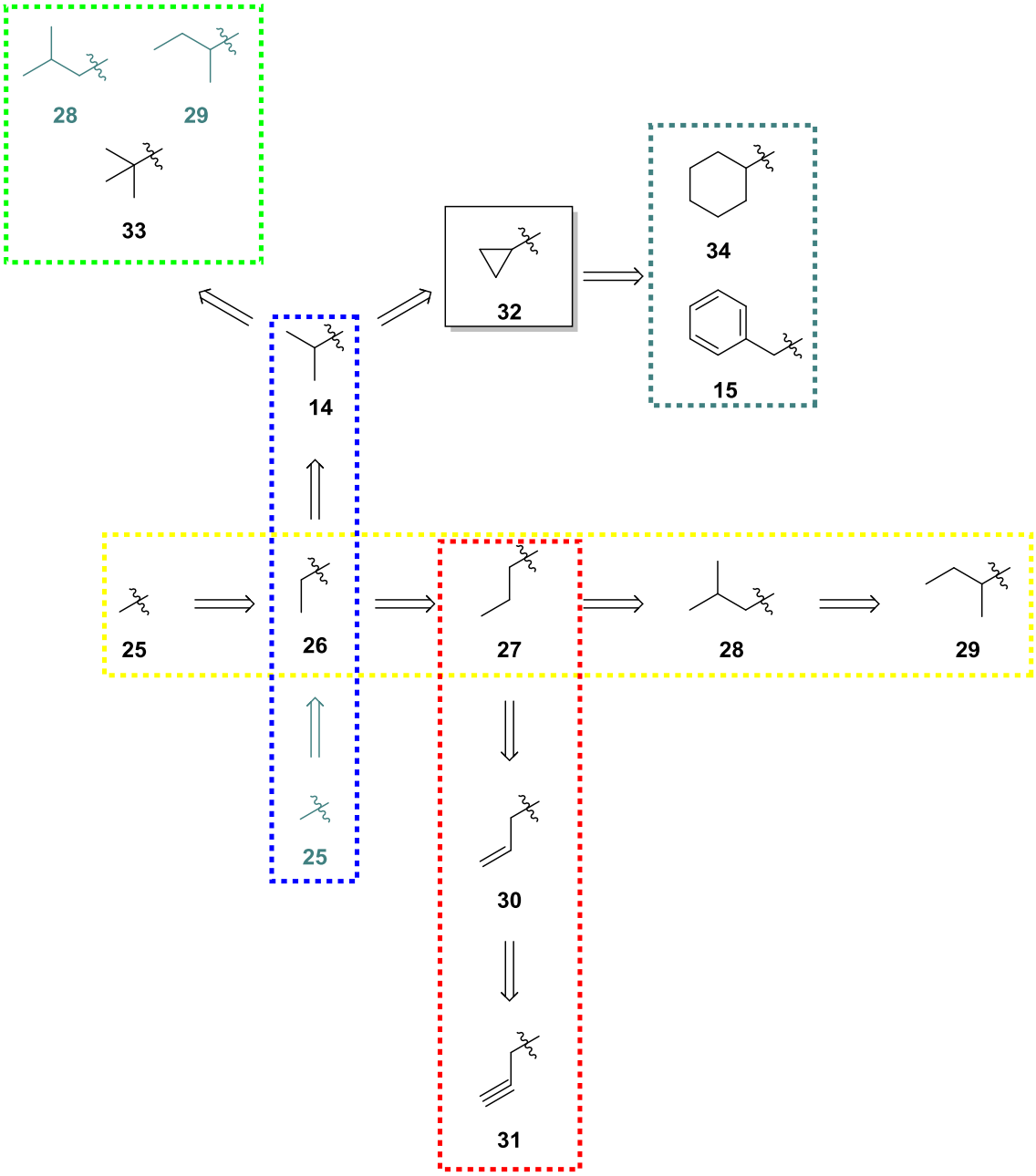
Die hier vorgestellten Verbindungen konkurrieren mit einem Substrat um die Bindung an die Protease. Je besser der Inhibitor mit dem Enzym wechselwirkt, umso stärker wird das Substrat verdrängt und desto besser ist der inhibitorische Effekt.

Die Besetzung der S_1-Tasche spielt bei der Hemmung der Aktivität von Serinproteasen eine entscheidende Rolle. Trypsin und Chymotrypsin wechselwirken in dieser Position in der Regel hervorragend mit basischen bzw. voluminösen Aminosäuren. Dies kann bei der Entwicklung spezifischer Inhibitoren genutzt werden, denn sowohl Elastase als auch HTRA1 bis -3 wechselwirken in dieser Position besonders gut mit kleinen hydrophoben Aminosäuren.[7] Derivate mit diesen Aminosäuren in der P_1-Position sollten erheblich selektiver gegenüber den vier zuletzt genannten Proteasen sein. Gezeigt wurde dies bereits mit der Leitsequenz **14** (siehe Kapitel 4.2.1).

Die bisher synthetisierten Verbindungen zeigten in der Regel eine höhere Selektivität gegenüber Elastase im Vergleich zu den HTRA-Proteasen. Wie bereits in Kapitel 4.2.3 dargestellt, scheint eine einfache Kombination nicht möglich zu sein, um dies umzukehren.

Um den großen Einfluss der S_1-Tasche zu nutzen, wurde die P_1-Position verändert. Es konnten zehn weitere Derivate hergestellt werden (siehe Abb. 43; Seite 69).

Entsprechend der Literatur wurden Aminosäuren mit kleinen hydrophoben Seitenketten ausgewählt. Dabei wurden sowohl zyklische als auch aliphatische Reste verwendet. Systematisch wurden die Seitenketten verlängert, verzweigt sowie Doppel- und Dreifachbindungen eingefügt. Des Weiteren wurden solche Aminosäuren gewählt, welche in einer entsprechenden Menge kommerziell verfügbar waren, um möglichst viele Derivate zu generieren. Die Verbindungen konnten mit einer Ausbeute von 0.6 % bis 2.9 % synthetisiert werden. Abb. 43 zeigt eine Übersicht über die hergestellten Moleküle und der systematischen Veränderung ihrer Reste. Die Derivate wurden wie die bisherigen Verbindungen hinsichtlich ihres Inhibitionspotentials gegen die bekannten Proteasen untersucht.



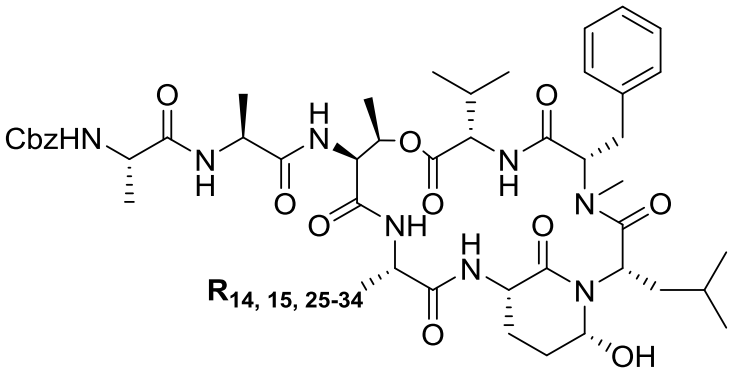


Abb. 43:Systematische Derivatisierung der P_1-Position

.

Bei der Synthese des ersten P_1-Derivates wurde das Valin zunächst durch ein Alanin (**25**) ausgetauscht. Die Seitenkette wurde bei den nächsten Verbindungen systematisch verlängert, sodass ein Ethyl- (**26**) und ein Propylrest (**27**) eingeführt wurde. Der Propylrest wurde verzweigt und Derivate mit einem Leucin sowie Isoleucin synthetisiert (siehe Abb. 43, gelber Kasten). Auf die Herstellung einer Verbindung mit einem Glycin in der P_1-Position wurde verzichtet, da dieses nur im geringen Maße mit den Proteasen wechselwirken würde. Die Tab. 11 zeigt die biochemischen Inhibitionsdaten dieser Verbindungen.

Tab. 11: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindungen 25-29. a) Humane HTRA-Proteasen. b) Humanes Pankreas-Chymotrypsin. c) Humane neutrophile Elastase. d) Bovines Trypsin. R: „eingesetzte“ Aminosäure in Position P_1.

		K_i [µM]					
#	**R**	**HTRA1[a]**	**HTRA2[a]**	**HTRA3[a]**	**Chymo-trypsin[b]**	**Elastase[c]**	**Trypsin[d]**
25	Ala	4.26	0.26	0.982	>50	0.026	Aktiv.
26	Abu	2.973	0.696	1.46	>50	0.473	Aktiv.
27	Nva	7.003	0.694	> 50	1.248	0.127	Aktiv.
28	Leu	>50	2.8	> 50	2.1	3.4	> 50
29	Ile	>50	>50	>50	>50	0.498	Aktiv.

Die Daten zeigen einen Trend bei den evaluierten HTRA-Proteasen. Dabei wird tendenziell die Affinität des Moleküls zu den Proteasen geringer, je länger und verzweigter die Seitenkette der Aminosäure ist. HTRA3 kann im niedrigen mikromolaren Bereich inhibiert werden. Die Protease toleriert in der S_1-Tasche eine Seitenkette, die maximal zwei “Kohlenstoffatome“ lang ist. Ist die Seitenkette länger (**27**) und wird sie dazu noch verzweigt (**28**, **29**), scheint sie nicht zu passen und eine Inhibition ist nicht mehr möglich. Die Sequenzen der Verbindungen **1** (Tasipeptin A) und **29** unterscheiden sich nur in den Positionen P_3 und P_4. **1** hemmt im Gegensatz zu **29** auch HTRA3. Daraus lässt sich schließen, dass diese Reste mitentscheidend für die Inhibition sind.

Eine höhere Toleranz gegenüber längeren Seitenketten zeigt HTRA2. Durch das Einbringen eines Methyl- (**25**), Ethyl- (**26**) oder Propylrestes (**27**) kann die Protease

im mittleren bzw. oberen nanomolaren Bereich inhibiert werden. Durch das endständige Verzweigen der Propylkette (**28**) ist eine Hemmung noch möglich. Wird jedoch eine Methylgruppe am β-C-Atom eingefügt (**29**), kann eine Inhibition unter 50 µM nicht mehr detektiert werden.

Der Trend lässt sich tendenziell auch bei HTRA1 erkennen. Jedoch hemmt das Derivat mit einer Ethylseitenkette (**26**) die Aktivität besser als eines mit einer Methylseitenkette (**25**). Die Protease toleriert auch einen Propylrest in der S_1-Tasche, wobei diese im niedrigen mikromolaren Bereich inhibiert wird. Die Affinität zwischen Inhibitor und Protease nimmt deutlich ab, wenn die Seitenkette verzweigt wird (**28**, **29**).

Elastase wird von allen Verbindungen im nanomolaren bzw. niedrigen mikromolaren Bereich inhibiert. Um Chymotrypsin zu hemmen, wird ein Propylrest benötigt. Eine Verzweigung am γ-C-Atom (**28**) verbessert die Affinität, wohingegen eine Methylgruppe am β-C-Atom (**29**) diese verschlechtert. Dieses Ergebnis ist im Ansatz so erwartet worden. Trypsin wird durch alle Verbindungen aktiviert, eine Ausnahme zeigt Verbindung **28.**

Die Selektivität gegenüber HTRA1 bis -3 im Vergleich zu Elastase konnte bei allen Verbindungen deutlich verbessert werden, wenn sie einen K_i-Wert <50 µM aufwiesen (teilweise um den Faktor 200).

Die S_1-Taschen der HTRA-Proteasen haben unterschiedliche Affinitäten zu gleichen Resten. Durch das Korrelieren der Inhibitionsdaten mit der Größe der Seitenketten lässt sich vermuten, dass die Größe der S_1-Tasche von HTRA2 zu HTRA1 zu HTRA3 abnimmt, da HTRA2 fast alle Reste toleriert und HTRA3 die wenigsten.

Tab. 12: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindungen 27, 30 und 31. a) Humane HtrA-Proteasen. b) Humanes Pankreas-Chymotrypsin. c) Humane neutrophile Elastase. d) Bovines Trypsin. R: „eingesetzte“ Aminosäure in Position P_1.

		K_i [µM]					
#	**R**	**HTRA1[a]**	**HTRA2[a]**	**HTRA3[a]**	**Chymo-Trypsin[b]**	**Elastase[c]**	**Trypsin[d]**
27	Nva	7.003	0.694	> 50	1.248	0.127	Aktivierung
30	Allyl	>50	1.377	0.838	0.329	0.156	>50
31	Pra	>50	n.t.	17.85	1.011	0.198	n.t.

Passend zu dem Derivat **27**, welches ein Norvalin (n-Propyl) in der P_1-Position trägt, wurden Verbindungen mit einem Allyl- (**30**) und einem Propargylrest (**31**) hergestellt (siehe Abb. 43, roter Kasten). Durch das Einbringen der π-Bindungen büßen die Reste Flexibilität ein und haben eine andere Geometrie. Die Inhibitionsdaten sind in Tab. 12 dargestellt.

Die neuen Reste konnten die Hemmung der Proteasen nicht verbessern, jedoch zeigen sie zumindestens teilweise noch ausgeprägte Hemmeigenschaften. So hemmen die Derivate **30** und **31** HTRA3. Das war nicht zu erwarten, da eine Inhibition durch die flexiblere Verbindung **27** nicht nachgewiesen werden konnte. HTRA2 kann durch das Ahp-Cyclodepsipeptid **30** ebenfalls inhibiert werden, wohingegen die Affinität zu HTRA1 nur gering ist und eine Inhibition bei einer Konzentration >50 µM nicht nachgewiesen werden konnte. Die Selektivität zu den HtrA-Proteasen gegenüber Elastase nimmt tendenziell ab.

Chymotrypsin wird, wie erwartet, im nanomolaren bzw. niedrigen mikromolaren Bereich inhibiert. Ebenfalls im unteren nanomolaren Bereich wird Elastase gehemmt.

Die Daten zeigen, dass eine Versteifung des Restes in der P_1-Position eher ungünstig für die Hemmung ist. Eine Inhibition ist teilweise möglich, jedoch wird durch die lange Seitenkette auch die Affinität zu Chymotrypsin erhöht.

Tab. 13: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 14, 25-27, 32 und 33. a) Humane HtrA-Proteasen. b) Humanes Pankreas-Chymotrypsin. c) Humane neutrophile Elastase. d) Bovines Trypsin. R: „eingesetzte“ Aminosäure in Position P_1.

		K_i [µM]					
#	**R**	**HTRA1[a]**	**HTRA2[a]**	**HTRA3[a]**	**Chymo-Trypsin[b]**	**Elastase[c]**	**Trypsin[d]**
25	Ala	4.26	0.26	0.982	>50	0.026	Aktiv.
26	Abu	2.973	0.696	1.46	>50	0.473	Aktiv.
14	Val	8.2	4.1	3	>50	0.019	> 50
32	cPr	1.235	1.11	0.736	2.274	1.933	>50
33	Tle	Aktiv.	>50	8.332	>50	4.317	Aktiv.
27	Nva	7.003	0.694	> 50	1.248	0.127	Aktiv.

Ausgehend von den Verbindungen **25** und **26** wurden weitere Derivate entworfen. Zu diesen beiden Verbindungen passt die Leitsequenz **14.** Diese trägt ein Valin in der P_1-Position, welches eine Verzweigung des Ethylrestes darstellt (siehe Abb. 43, blauer Kasten).

Durch das Einführen einer weiteren Methylgruppe am β-C-Atom konnte ein sterisch anspruchsvolleres Derivat mit einer *tert*-Butyl-Gruppe (**33**) synthetisiert werden. In der Verbindung **32** sind die Methylreste verknüpft. Dazu wurde ein Cyclopropylglycin in die P_1-Position gebracht, welches wiederum gegenüber Valin leicht-veränderte sterische Ansprüche hat. Die passenden Inhibitionsdaten dieser Reihe sind in Tab. 13 dargestellt.

Durch das Einbringen des Cyclopropylrestes in die Position P_1 kann die Aktivität aller evaluierten HtrA-Proteasen im niedrigen mikromolaren und im oberen nanomolaren Bereich gehemmt werden. Besonders hervorzuheben ist, dass das Derivat **32** die erste Verbindung ist, die gegenüber HTRA1 im Vergleich zu Elastase selektiver ist. Die Selektivität gegenüber HTRA1 konnte im Vergleich zur Leitsequenz (**14**) um den Faktor 670 verbessert werden. Die Selektivität gegenüber HTRA2 und -3 nimmt ebenfalls zu. Die Verbindung ist der bisher beste Inhibitor für HTRA1 und HTRA3 in dieser Arbeit. Die Aktivität der zuletzt genannten Protease kann im nanomolaren Bereich gehemmt werden. Unerwartet ist jedoch, dass die Verbindung auch Chymotrypsin inhibiert.

Die Verbindung **33** mit einem *tert*-Butylrest in der P_1-Position inhibiert lediglich HTRA3 und Elastase, was vermutlich auf die sterische Hinderung zurückzuführen ist. HTRA1 und Trypsin werden zudem sogar aktiviert.

In der Reihe Ala (**25**), Abu (**26**), Val (**14**) (Methyl → Ethyl → *iso*-Propyl) nimmt das Inhibitionspotential der HTRA-Proteasen tendenziell mit steigender Anzahl der Kohlenstoffatome ab. Dieser Trend ist bereits in der Reihe Ala (**25**), Abu (**26**), Nva (**27**) zu erkennen (Methyl → Ethyl → n-Propyl; siehe Tab. 11).

Aufgrund der Größe der Reste lässt sich die Form der S_1-Taschen abschätzen. HTRA3 wird, im Gegensatz zu HTRA1 und -2, von der Verbindung **27** (n-Propyl) nicht inhibiert. Da alle eine hydrophobe S_1-Tasche besitzen, ist davon auszugehen, dass diese bei HTRA3 etwas flacher ist. Zusätzlich scheint diese im oberen Teil auch etwas breiter zu sein oder sich besser verformen zu lassen, denn die Verbindung **14** (*iso*-Propyl) inhibiert alle drei Proteasen, doch das Derivat **33** (*tert*-Butyl), welches

sterisch deutlich anspruchsvoller ist, hemmt ausschließlich HTRA3. Es ist davon auszugehen, dass der *tert*-Butylrest nicht in die S_1-Taschen von HTRA1 und-2 passt oder dass diese Taschen weniger verformbar sind.

Die S_1-Taschen von HTRA1 und -2 scheinen tiefer zu sein als bei HTRA3, unterscheiden sich jedoch. Die Inhibitionsdaten zeigen, dass die Affinität von Verbindung **27** (n-Propyl) zu HTRA2 um den Faktor 10 größer ist und die Verbindung **28** (*iso*-Butyl) ausschließlich HTRA2 inhibiert. Daher lässt sich vermuten, dass die P1-Bindungsstelle von HTRA2 im Vergleich zu HTRA1 im unteren Teil der Tasche etwas breiter oder besser verformbar ist.

Zu der abgeschätzten Taschenform passen auch die Inhibitionsdaten der Verbindung **32**. HTRA2 mit einer vermeintlich flachen S_1-Tasche kann als einzige untersuchte HtrA-Protease im nanomolaren Bereich inhibiert werden.

Dies kann jedoch nur eine grobe Abschätzung sein, da die Enzymtaschen durchaus in der Lage sind, sich bis zu einem gewissen Grad zu verformen.

Um zu zeigen, dass ausschließlich kleinere Reste in die S_1-Tasche passen, wurde ein weiteres Derivat mit einem Cyclohexylrest synthetisiert. Wie erwartet inhibiert die Verbindung **34** keine der untersuchten HtrA-Proteasen. Es konnte lediglich die Hemmung von Chymotrypsin nachgewiesen werden. Der K_i-Wert ist mit dem von Verbindung **15** vergleichbar. Die Inhibitionsdaten sind in Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 15 und 34. a) Humane HtrA-Proteasen. b) Humanes Pankreas-Chymotrypsin. c) Humane neutrophile Elastase. d) Bovines Trypsin. R: „eingesetzte“ Aminosäure in Position P_1.

#	R	HTRA1[a]	HTRA2[a]	HTRA3[a]	Chymo-Trypsin[b]	Elastase [c]	Trypsin[d]
15	Phe	>50	> 50	> 50	0.371	> 50	> 50
34	cHex	Aktiv.	>50	>50	0.274	>50	Aktivierung

4.2.6 Optimierung der Verbindung **32** durch Derivatisierung der P_2‘-Position und biochemische Evaluierung dieser Derivate

Um die Bindung zwischen dem Ahp-Cyclodepsipeptid und den humanen HtrA-Proteasen besser zu verstehen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Kenny Bravo Rodriguez, bioinformatische Kalkulationen durchgeführt. Durch molekulares

Docking konnte die Wechselwirkung der Leitstruktur **14** mit der Protease HTRA1 modelliert werden.

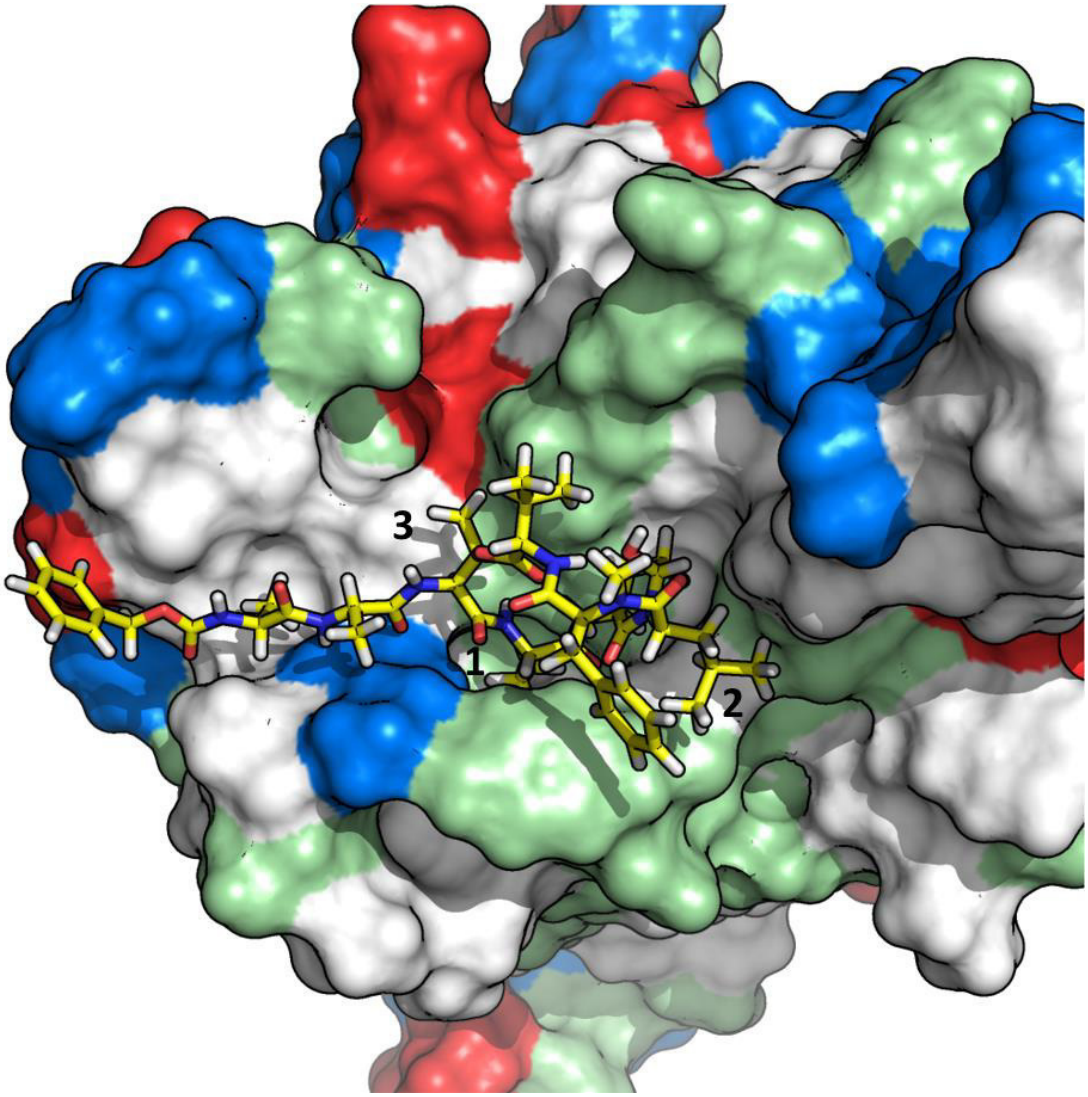


Abb. 44: Modellierter Bindung des Ahp-Cyclodepsipeptids 14 an die Protease HTRA1.

Abb. 44 zeigt den aus diesen Berechnungen erhaltenen, modellierten Ahp-Cyclodepsipeptid-HTRA1-Komplex. Die Protease ist mittels einer Oberflächenrepräsentation dargestellt. Die positiv-geladenen Aminosäuren sind dabei blau abgebildet, die negativ-geladenen rot, die polaren grün und die hydrophoben Bereiche weiß. Das Modell zeigt, dass die Protease nur wenige ausgeprägte Taschen ausbildet, mit denen Aminosäuren starke Wechselwirkungen eingehen können. Der mit '1' markierte Bereich stellt die S_1-Tasche dar. Rechts daneben (vom Molekül teilweise verdeckt) liegt die Ahp-Einheit. Die Seitenkette des Ahp-Cyclodepsipeptids ragt in einen unpolaren Bereich. Der mit einer '2' markierte

Teil des Inhibitors ist die P_2'-Position. Deren Seitenkette ist von zwei polaren Arealen umgeben.

Die molekularen Docking-Ergebnisse lassen sich nur teilweise mit den Daten aus der biochemischen Evaluation korrelieren. Wie in Kapitel 4.2.2 gezeigt, wird die Inhibition durch das Einführen eines Leucins in die Position P_2 verbessert. Dieses Ergebnis wird durch das molekulare Docking bestätigt, denn in diesem Bereich sind hydrophobe Aminosäuren zu finden (siehe Abb. 44, Markierung '3').
Ein weiteres Docking-Experiment zeigt, dass die S_2'-Tasche von Elastase durch einen großen hydrophoben Bereich gebildet wird. Bei HTRA1 wird dieser Bereich unter anderem von polaren Aminosäuren gebildet. Diese Kalkulationen lassen also vermuten, dass durch das Einbringen polarer Seitenketten in die P_2'-Position die Selektivität und das Inhibitionspotential gegenüber HTRA1 gesteigert werden kann.

Für die Derivatisierung wurde die Verbindung **32** gewählt und nicht wie sonst die Leitsequenz **14**. Mit dem Cyclopropylrest in der Position P_1 zeigte das Molekül **32** die besten Selektivitäts- und Inhibitionseigenschaften gegenüber HTRA1. Aus Kapitel 4.2.2 ist bekannt, dass die Kombination von zielführenden Resten nicht zwangsläufig zu einem besseren Inhibitor führt. Dennoch wurden verbesserte K_i-Werte erwartet. Die Wechselwirkungen mit der S_1-Tasche sind essentiell und es werden polare anstatt hydrophobe Seitenketten eingefügt. Die Positionen P_1/P_2' sind nicht benachbart, sodass keine sterischen Hinderungen auftreten können.

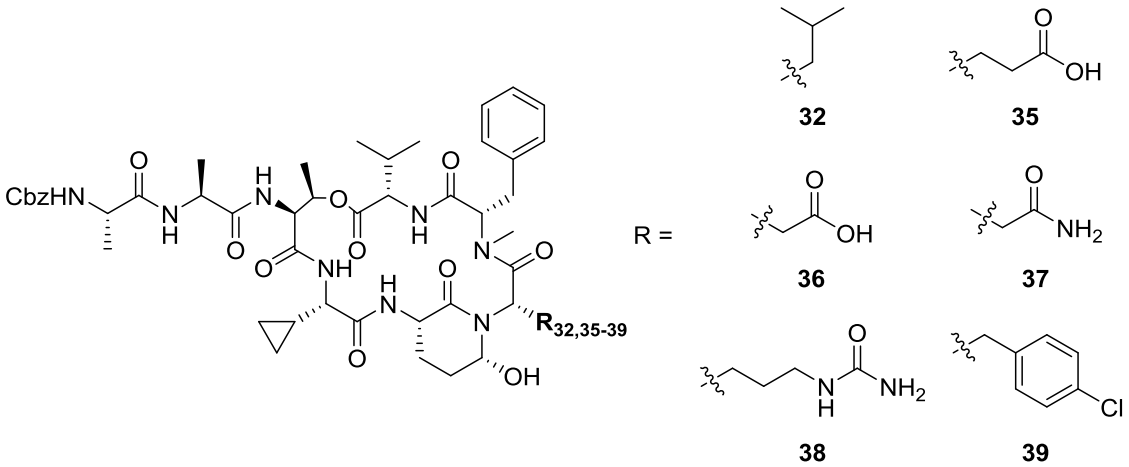


Abb. 45: Derivate der Verbindung 32.

In Abb. 45 sind die synthetisierten Verbindungen dargestellt. Es wurden verschiedene polare Gruppen gewählt, sowie die Länge der Seitenketten variiert. Des Weiteren wurde ein 4-Chloro-Phenylalanin ausgewählt, da der Phenylalanin-

Scan zeigte, dass die Besetzung der S_2‘-Tasche durch einen voluminösen Rest bezüglich der Selektivität günstig war. Durch das Chloratom bekommt die Seitenkette eine leicht polare Eigenschaft.

Die Verbindungen wurden hinsichtlich ihres Inhibitionspotentials gegenüber HTRA1 untersucht. Alle weiteren Proteasen wurden bis zum Ende dieser Arbeit nicht evaluiert. Die biochemischen Inhibitionsdaten sind in Tab. 15 dargestellt.

Tab. 15: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 32, 35 bis 39.
a) Humane HTRA-Proteasen. b) Humane neutrophile Elastase.

		K_i [µM]			
#	**P_2‘**	**HTRA1[a]**	**HTRA2[a]**	**HTRA3[a]**	**Elastase[b]**
32	Leu	1.24	1.11	< 50	1.93
35	Glu	5.2	n.b.	n.b.	n.b.
36	Asp	> 50	n.b.	n.b.	n.b.
37	Asn	1.66	n.b.	n.b.	n.b.
38	Cit	0.70	n.b.	n.b.	n.b.
39	4-Cl-Phe	0.065	n.b.	n.b.	0.003

Die Verbindung **35** trägt ein Glutamat in der Position P_2‘. Das Derivat inhibiert die Protease im niedrigen mikromolaren Bereich, ist jedoch mit einem K_i-Wert von 5.2 µM etwas schlechter als die Ausgangsverbindung **32**.

Die gleiche funktionelle Gruppe trägt Aspartat, welches im Derivat **36** ebenfalls die Position P_2‘ einnimmt. Dieser Verbindung **36** ist es nicht möglich, die Protease zu inhibieren. Die neue Seitenkette ist im Vergleich zu Glutamat um eine CH_2-Einheit verkürzt. Es war zu erwarten, dass das Molekül im niedrigen mikromolaren Bereich inhibiert. Dies ist jedoch nicht der Fall und es ist zu vermuten, dass die Seitenkette mit anderen Bereichen des Moleküls wechselwirkt und so die Inhibition verhindert.

Die Carbonsäure wurde durch ein Amid ersetzt, wodurch das Derivat **37** synthetisiert werden konnte. Die Verbindung inhibiert im Vergleich zum Molekül **36** bei gleicher Kettenlänge, die Protease im niedrigen mikromolaren Bereich. Zu vermuten ist, dass die Verbindung **37** in der Lage ist, mit näherliegenden polaren Bereichen zu wechselwirken.

Die Verbindung **38** mit einem Citrullin in der Position P_2‘ hemmt die Aktivität der Protease im nanomolaren Bereich. Dabei könnte sowohl die Kettenlänge als auch die funktionelle Gruppe eine Rolle spielen.

Der bisher beste, nicht-kovalente Inhibitor für die Serinprotease HTRA1 ist die Verbindung **39**. Die Einführung eines 4-Chlorophenylalanins verbessert die Hemmung im Vergleich zu dem Derivat **32** um den Faktor 20. Somit ist die Inhibition mit einem K_i-Wert von 0.065 µM im nanomolaren Bereich möglich.

Aus den Daten lässt sich schließen, dass prinzipiell die Einführung eines polaren Restes positiv ist. Durch die Modifikation der P_2‘-Position lässt sich die Affinität der Ahp-Cyclodepsipeptide zu der Protease HTRA1 erheblich steigern. Zusätzlich scheint sich die Kombination eines voluminösen und hydrophoben Restes mit einem polaren Halogen sehr positiv auf das Inhibitionspotential auszuwirken.
Die Verbesserung des Inhibitors steigert unerwartet auch die Hemmung von Elastase. So liegt der K_i-Wert bei 0.003 µM.

Die Verbindungen **35** bis **39** konnten mit einer Ausbeute zwischen 0.3 % und 2.4 % synthetisiert werden. Durch die Herstellung dieser Derivate konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die entwickelte Synthesestrategie auch auf Derivate mit chemisch-anspruchsvolleren funktionellen Gruppen angewendet werden kann. Bei der Synthese wurden TFA-labile Standardschutzgruppen eingesetzt. Während des Abspaltens des Peptides von der festen Phase konnten diese entfernt werden. Die verwendeten freien funktionellen Gruppen waren dabei unter den Oxidationsbedingungen stabil.
Bei der finalen Aufreinigung der Verbindung **36** konnten vier verschiedene Produkte isoliert werden. Dabei handelt es sich um das gewünschte Ahp- und Hydroxyprolin-Produkt sowie dessen jeweilige dehydratisierte Varianten. Bei den übrigen Verbindungen (**35**, **37**-**39**) konnten nach der Oxidation ebenfalls Nebenprodukte identifiziert werden. Daher ist zu vermuten, dass die Aminosäure in der P_2‘-Position einen Einfluss auf die Ausbildung der Ahp-Einheit besitzt. Hier sind sterische Wechselwirkungen denkbar, die das Ausbilden des Hydroxyprolins begünstigen oder polare Interaktionen, welche eine Dehydratisierungsreaktion ermöglichen. Die Verbindung **36** hat die längste und flexibelste Seitenkette und zeigt die meisten Nebenprodukte, was diese Vermutung bestätigt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Eine Fehlregulation von Serinproteasen ist die molekulare Basis bzw. beeinflusst eine Vielzahl von Erkrankungen wie Arthritis, altersbedingte Makuladegeneration, Parkinson oder Alzheimer. Hemmstoffe dieser Proteasen können dementsprechend vielversprechende Wirkstoffe darstellen. Zur Hemmung von Serinproteasen werden bisher Moleküle aus unterschiedlichsten Verbindungsklassen eingesetzt; viele dieser Verbindungen haben jedoch nur begrenzte Hemmpotenz oder -selektivität. Deshalb ist immer noch eine Entwicklung neuer Inhibitoren bzw. Inhibitorklassen nötig, um die Selektivität und das Inhibitionspotential zu steigern, sowie die Zugänglichkeit zu Wirkstoffen für speziellere Serinproteasen zu ermöglichen. Häufig werden Naturstoffe als Grundgerüst verwendet, welche bei einem Screening inhibitorische Eigenschaften zeigten.[8]

Die Verbindungen der Naturstoffklasse der Ahp-Cyclodepsipeptide wechselwirken sowohl mit den S- also auch mit den S‘-Taschen der Serinproteasen und stellen potente Inhibitoren ausgewählter Serinproteasen wie z. B. Elastase, Chymotrypsin oder Trypsin dar.[9] Die Inhibition anderer Serinproteasen wurde bisher nicht gezeigt. Obwohl bereits Syntheserouten zu diesen Naturstoffen in der Literatur berichtet wurden, sind alle diese Synthesen vergleichsweise aufwendig und unpraktisch und ermöglichen nur begrenzt die Aufstellung medizinalchemisch-relevanter Struktur-Wirkungsbeziehungen.[12,14,119,134]

Dementsprechend wurde im ersten Teil der Arbeit die Entwicklung einer neuen praktikablen Synthesestrategie für Ahp-Cyclodepsipeptid durchgeführt. Diese wurde anhand des Naturstoffes Tasipeptin A etabliert. Die etablierte Strategie ist dabei eine Mischung aus Flüssig- und Festphasensynthese. Als Ausgangspunkt wurde eine Glutaminsäure verwendet, deren Aminogruppe durch Fmoc und deren Carbonsäure als Allylester geschützt war. Durch die Bildung eines gemischten Anhydrids und anschließender Behandlung mit Natriumborhydrid konnte die freie Seitenkette zum Alkohol reduziert werden. C- und N-Terminus waren weiterhin geschützt und das 5-Hydroxynorvalin wurde mit Hilfe von Pyridin auf der festen Phase verankert, wobei 2-Chlorotritylchlorid als Linker verwendet wurde. Mit der Fmoc-Strategie wurden die Peptidfragmente in der Reihenfolge Valin, Threonin, Valin und Butansäure gekuppelt. Als Aktivierungsreagenzien wurde HBTU/HOBt und zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen Piperidin verwendet. Im nächsten

Schritt konnte der ungeschützte sekundäre Alkohol des Threonins unter DMAP-Katalyse und Valin-Aktivierung mit DIC verestert werden. Nach dem Kuppeln eines N-methylierten Phenylalanins wurde Fmoc-Leu-OH mit PyBrOP aktiviert und als letzte Aminosäure gekuppelt. Fmoc wurde entfernt und der Allylester mit Hilfe eines Palladium-Katalysators und Morpholin gespalten. Durch eine Festphasen-Macrolactamisierung wurde der Zyklus erhalten, welcher mit Trifluoressigsäure von der festen Phase abgespalten wurden. Der freie Alkohol des Zyklus wurde in Lösung mit Dess-Martin-Periodinan zum Aldehyd oxidiert, welcher das Hemiaminal, die Ahp-Einheit, bildete. Tasipeptin A konnte mit einer Ausbeute von 1.9 % synthetisiert werden. Durch die biologische Evaluierung konnte gezeigt werden, dass nicht nur Elastase, sondern auch zum ersten Mal mit dieser Verbindungsklasse die humanen HTRA2 und -3-Proteasen gehemmt werden können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde auf Basis des Ahp-Cyclodepsipeptides eine Leitsequenz entwickelt, mit der es möglich war, auch HTRA1 zu hemmen, dessen Hyperaktivität Krankheiten wie Arthritis oder altersbedingte Makuladegeneration verursacht. Um spezifische Einflüsse von Positionen im Molekül auf die Inhibition zu untersuchen, wurden ein Phenylalanin-Scan durchgeführt und weitere Derivate synthetisiert. Durch das Einführen eines Phenylalanins (**20**) in die P_2‘ Position konnte eine Verbesserung der Selektivität gegenüber HTRA1 im Vergleich zu Elastase beobachtet werden. Wird das Threonin in Position P_2 durch Hydroxy-Phenylalanin (**16**) oder Hydroxyleucin (**21**) ersetzt, kann HTRA2 im nanomolaren Bereich inhibiert werden. Wird Phenylalanin in die P_3-Position eingeführt (**17**), sind ähnliche K_i-Werte bestimmt worden. Um inhibitorische Effekte zu verbessern, scheint eine einfache Kombination von Derivaten nicht möglich zu sein. Durch das Einführen eines Hydroxyleucins in Position P_2 und eines Phenylalanins in P_3 (**24**) konnte lediglich Elastase inhibiert werden.

Die Besetzung der S_1-Tasche spielt bei Serinproteasen eine entscheidende Rolle.[15] Um sowohl das Inhibitionspotential also auch die Selektivität zu verbessern, wurden weitere Derivate synthetisiert, bei denen systematisch die P_1-Position verändert wurde. Entsprechend der Literatur wurden Aminosäuren mit kleinen hydrophoben Seitenketten ausgewählt, die sowohl zyklische als auch aliphatische Reste aufwiesen.[7,15] Systematisch wurden die Seitenketten verlängert, verzweigt, sowie Doppel- und Dreifachbindungen eingefügt. Die synthetisierte Verbindung **32** trägt ein Cyclopropylglycin in der P_1-Position und ist die erste, die eine höhere Affinität

gegenüber HTRA1 im Vergleich zu Elastase zeigt. Beide können im niedrigen mikromolaren Bereich gehemmt werden. Um die Inhibition und die Selektivität weiter zu verbessern, wurden auf dieser Grundlage neue Moleküle synthetisiert. Molekulare Docking-Experimente zeigten, dass das Einführen von polaren Resten in die P_2'-Position günstig ist. So wurde unter anderem ein Derivat **39** mit einem 4-Chloro-Phenylalanin-Rest synthetisiert. Diese Modifikation verbessert die Inhibition von HTRA1 signifikant und konnte mit einem K_i-Wert von 0.065 µM in den nanomolaren Bereich verschoben werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine effektive Fest-Flüssigphasensynthese für Ahp-Cyclodepsipeptide entwickelt werden, welche auch funktionelle Gruppen toleriert. Durch die Synthese von 29 Derivaten und deren biologischer Evaluierung konnten wichtige Informationen über die Inhibitionseigenschaften dieser Naturstoffklasse gewonnen werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, maßgeschneiderte Inhibitoren zu synthetisieren. Zudem konnten die bisher potentesten, nicht-kovalenten Inhibitoren für HTRA1 und HTRA2 entwickelt werden.

In Zukunft sollten weitere Positionen des Moleküls systematisch verändert werden, um die Selektivität und die Inhibition zu verbessern. Durch das Aufnehmen einer Kristallstruktur eines Ahp-Cyclodepsipeptid-HTRA1-Komplexes könnten Wechselwirkungen noch besser nachvollzogen und Derivate zielgerichteter synthetisieren werden.
Ein anderer Ansatz ist die Modifikation der Seitenkette des Zyklus. Diese endet mit einem N-Terminus. Würde die Synthese der Seitenkette mit einer Dicarbonsäure beginnen, so wird die Abfolge von C- → N-Terminus zu N- → C-Terminus geändert werden. Die Seitenkette endet dann mit einer Carbonsäure, welche wiederum an die PDZ-Domäne der HTRA1-Protease binden kann.[7] So ergäbe sich ein „bivalenter" Inhibitor, welcher voraussichtlich selektiver und potenter wäre.

6 Summary and Outlook

Hyperactivity of serine proteases is involved in several severe human disorders such as arthritis, age-related macular degeneration, Parkinson's or Alzheimer's disease, suggesting that molecular inhibition of serine proteases may represent a promising approach to combat these diseases Accordingly, a wide variety of compound classes for serine protease inhibition have been developed in the last decades; however, despite years of research, many of them still harbor disadvantages such as low inhibition potency or selectivity. Accordingly, the development of new inhibitors and inhibitor classes for improving inhibition selectivity and potency as well as to generate customized inhibitors for specific serine proteases is still a scientifically challenging task. To this end, natural products with suitable inhibitory properties are frequently used as a scaffold for compound development.[8]

The the natural product class of Ahp-cyclodepsipeptides act as non-covalent serine proteases inhibitors. They interact with the S- and the S 'pockets, and thus show a high inhibition potential vs. various serine proteases such as elastase, chymotrypsin, and trypsin. Although several synthetic approaches to this compound class have been reported in the last years, all of them are rather complicated and impractical for medicinal chemistry purposes.

Accordingly, the first part of this work deals with the development of an alternative practical synthesis strategy for generating Ahp-cyclodepsipeptides. To this end, a chemical synthesis of the natural product Tasipeptin A was established. The resulting strategy turned out to be a mixture of liquid and solid phase synthesis. Glutamic acid was thereby used as a starting point for the synthesis. To this end, the amino group of glutamic acid was protected by Fmoc while the carboxylic acid residue was protected as an allyl ester. The formation of a mixed anhydride and subsequent treatment with sodium borohydride then reduced the free side chain carboxylic acid to an alcohol moiety. As the protecting groups on the C and N terminus were maintained, the 5-hydroxynorvaline residue could subsequently be anchored on the 2-chlorotrityl resin via its OH group using pyridine as a base. By usage of the Fmoc SPPS strategy, the amino acids valine, threonine, valine and butyric acid were subsequently coupled to the resin, using HBTU/HOBt as the activation and piperidine as the Fmoc deprotection reagents. In the next step, the

unprotected secondary alcohol of threonine was esterified with valine via DMAP catalysis and DIC activation. After coupling of an N-methylated phenylalanine residue, Fmoc-Leu-OH was coupled after PyBrOP activation. Fmoc was removed and the allyl ester cleaved with morpholine under palladium catalysis. Solid-phase macrolactamization, followed by cleavage from the solid phase with trifluoroacetic acid. Resulted in the cyclized alcohol precursor that was oxidized in solution with Dess-Martin periodinane to the aldehyde. This aldehyde spontaneously formed the hemiaminal Ahp unit. Tasipeptin A was synthesized with a yield of 1.9% (based on the initial resin loading). Subsequent biochemical evaluation of its inhibitory properties then demonstrated that this natural product inhibits the human proteases HTRA2 and -3 in the low micromolar range.

In the second part of the work, inhibitors of HTRA1 based on Ahp-cyclodepsipeptide structure were developed. HTRA1 hyperactivity causes diseases such as arthritis or age-related macular degeneration. To this end, systematic variations of a starting Ahp-cyclodepsipeptide inhibitor, e.g. via a phenylalanine scan, were performed. These studies revealed that for example introduction of a phenylalanine residue (**20**) into the P_2' position results in an improvement in HTRA1 inhibition selectivity. Substitition of the threonine residue in position P_2 by hydroxy-phenylalanine (**16**) or hydroxyl leucine (**21**) results in nanomolar HTRA2 inhibitors. Finally, introduction of phenylalanine in the P_3 position (**17**), similar Ki values have been determined.

A proper occupation of the S1 pocket plays a decisive role in the inhibition of serine proteases.[15] To improve the inhibition potential and the selectivity of the Ahp-cyclodepsipeptides for HTRA1, further derivatives were synthesized in which the P1 position was systematically altered. According to the literature, amino acids with small hydrophobic side chains with cyclic or aliphatic residues should be beneficial for HTRA1 inhibition.[7,15] Several derivatives with extended, branched and double and triple bond-carrying side chains were incorporated in this position and one derivative, compound **32** with a cyclopropyl residue, was the first derivative that displayed more potent HTRA1 than elastase inhibition; both are inhibited in the low micromolar range. To further improve inhibition and selectivity, molecular docking experiments were then performed that showed that the introduction of polar residues into the P_2'-position may further enhance inhibition properties. Accordingly, a set of P2’-modified derivatives were synthesized and one derivative

(**39**) bearing a 4-chloro-phenylalanine residue at this position displayed potent HTRA1 inhibition in the nanomolar range (with a K_i value of 0.065 µM). In addition, these studies also demonstrated the effectiveness of the established solid-liquid-phase synthesis of Ahp cyclodepsipeptides as these derivatives also harbored chemically more challenging functional groups.

The synthesis of overall 29 derivatives and their biochemical evaluation provided important information about the inhibition properties of the Ahp- natural product class and demonstrated that this compound class allows the synthesis of tailor-made inhibitors. In addition, the most potent noncovalent inhibitors of HTRA1 and HTRA2 were developed.

In the future, further positions of the Ahp-cyclodepsipeptide scaffold should be systematically altered for further improving inhibition selectivity and potency. These studies could be guided by structural studies from crystallographic analyses of Ahp-cyclodepsipeptide-HTRA1 complexes,.

An alternative approach to “better” inhibitors could be introduce PDZ domain binding sequences at the N-terminus of the Ahp-cyclodepsipeptides, thereby enabling interactions of the Ahp-cyclodepsipeptides not only with the protease domain but also with the PDZ domains of HtrA proteases. Such bivalent inhibition modes may not only improve binding but also other pharmacological parameters such as compound solubility[7].

7 Experimenteller Teil

7.1 Arbeitsmaterialien und Instrumente

7.1.1 Chemikalien

Aminosäuren, Reagenzien und Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufreinigung von den Firmen Iris Biotech, Biosolve Chemicals, Carbolution Chemicals, ABCR, Novabiochem, Riedel de Häen, Merck, Fluka, Carl Roth, Fisher Scientific Sigma Aldrich, TCI Chemicals, Bernd Kraft, Acros Organics oder VWR Chemicals verwendet. Die wasserfreien Lösungsmittel wurden in der besten verfügbaren Qualität von Sigma Aldrich oder Acros Organics bezogen. Eine weitere Trocknung wurde nicht durchgeführt.

7.1.2 Festphasensynthese von Peptiden (SPPS)

Die Festphasensynthese von Peptiden wurden an dem Syntheseroboter Syro I der Firma MultiSynTech durchgeführt. Der Roboter ist mit dem Syro-Heizblock und dem Syro-Inertgas-Modul ausgestattet.

7.1.3 Mit Flüssigchromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (LC-MS)

Die Analyse der Reaktionskontrolle und der Endverbindungen wurden mit einem LC-MS-System von Thermo Scientific durchgeführt. Das Gerät enthält den UV-Detektor Thermo Scientific Accela™ mit der chromatographischen Säule Eclipse XDB-C18 5 µm von Agilent und den Massenspektrometer Thermo Scientific LCQ Fleet™ ESI-MS. Die Peaks wurden bei 210 nm, 254 nm und 280 nm detektiert. Für die Analyse wurde ein linearer Gradient des Lösungsmittels A (0.1% Ameisensäure in Wasser) in Lösungsmittel B (0.1% Ameisensäure in Acetonitril) mit einer Flussrate von 1 mL min^{-1} verwendet. Es wurde folgender Gradient benutzt: 0 min./10 % A → 1 min. /10 % A → 10 min. /100 % A → 12 min. /100 % A → 15 min. /10 % A.

7.1.4 Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Aufreinigung der Verbindungen wurde mit Hilfe der präparativen Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durchgeführt. Es wurde ein Prominence UFLC System von Shimadzu (Peak-Detektion bei 210 nm) verwendet, welches mit der Umkehrphasen-Säule Luna® 5 µm C18(2), 100 x 21.20 mm von Phenomenex ausgestattet war. Es wurden lineare Gradienten von Acetonitril in Wasser mir 0.1 % TFA bei einer Flussrate von 25 mL min^{-1} angewendet.

7.1.5 Säulenchromatographie

Bei der Aufreinigung der Produkte mit Hilfe der Säulenchromatographie wurden Glassäulen mit Kieselgel der Firma Acros (Partikelgröße 35 – 70 µm) verwendet.

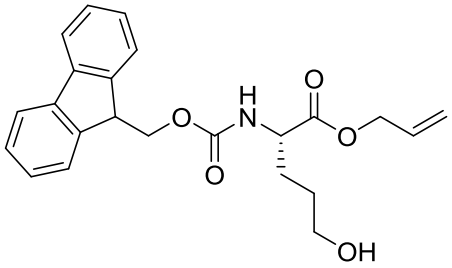
7.1.6 Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatographie (DC) wurde mit Kieselgel-beschichteten Aluminium-Platten (60 F_{254}) der Firma Merck Millipore durchgeführt. Die Detektion der Verbindungen in Form von sogenannten Spots erfolgte durch die Bestrahlung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm und/oder 366 nm oder wahlweise durch Anfärben mit einer Kaliumpermanganat-Lösung (1.5 g $KMnO_4$, 10 g K_2CO_3, 1.25 ml 10 % aq. NaOH in 200 ml Wasser).

7.1.7 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance II 400 (400 MHz für ^{1}H- und 100 MHz für ^{13}C-NMR) oder an einem Bruker Avance II 700 (700 MHz für ^{1}H- und 176 MHz für ^{13}C-NMR) aufgenommen. Die ^{1}H-Spektren werden wie folgt beschrieben: die chemische Verschiebung (δ) in ppm (kalibriert auf das charakteristische Signal des undeuterierten Lösungsmittels), die Multiplizität (s, Singulett; d, Doublett; t, Triplett; dd, Dublett von Dublett; dt, Dublett von Triplett; q, Quartett; m, Multiplett), die Kopplungskonstante J in Hertz (Hz) und die Anzahl der Protonen (H).
Für die Spektren der ^{13}C-Kerne wird die Verschiebung (δ) in ppm angegeben.

7.2 Synthese des Ahp-Vorläufers: *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(L)-5-hydroxynorvalin-1-allylester



3

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(L)-Glutaminsäure-1-allylester (1.00 g, 2.44 mmol, 1) wurden in trockenem THF (150 mL) unter Argonatmosphäre gelöst. Triethylamin (1.01 mL, 7.33 mmol, 3 eq) und Isobutylchloroformiat (1.26 mL, 9.77 mmol, 4 eq) wurden bei Raumtemperatur hinzugefügt. Die Suspension wurde gerührt und nach 15 min wurde Natriumborhydrid (557 mg, 14.66 mmol, 6 eq) gelöst in Wasser (50 mL) langsam hinzugetropft. Die leicht trübe Lösung wurde für weitere 15 min gerührt. Die Reaktion wurde mit einer 1 M aq. Kaliumhydrogensulfatlösung (50 mL) gequenched und das Produkt mit DCM (3x 100 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. (DCM : Methanol (50:1)).

Die Verbindung **3** konnte mit einer Ausbeute von 695 mg (1.76 mmol, 72 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

TLC (EA:CH(1:1)): R_f = 0.33; LC-MS (ESI): t_R = 8.65 min; *m/z* = 395.8 $[M + H]^+$, 418.1 $[M + Na]^+$, 377.7 $[M + H - OH]^+$, 337.7 $[M + H - OAll]^+$, berechnet. für $C_{23}H_{25}NO_5$: 395.17.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 7.90 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.83 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.73 (dd, J =7.4, 2.2 Hz, 2H), 7.42 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 5.95 – 5.85 (m, 1H), 5.31 (dq, J= 17.3, 1.8 Hz, 1H), 5.21 (dt, J = 10.5, 1.6 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 4.52 – 4.41 (m, 1H), 4.36 – 4.17 (m, 3H), 4.13 – 4.04 (m, 1H), 3.40 (tt, J = 6.4, 3.1 Hz, 2H), 1.85 – 1.77 (m, 1H), 1.70 – 1.61 (m, 1H), 1.57 – 1.40 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): δ 172.14, 156.12, 143.79, 140.70, 132.38, 127.61, 127.03, 125.23, 120.09, 117.66, 65.64, 64.69, 60.00, 53.81, 46.62, 28.83, 27.44.

7.3 Allgemeine Methoden zur Festphasensynthese von Peptiden.

7.3.1 Methode A: Beladung des Harzes

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(L)-5-Hydroxynorvalin-1-allylester (103 mg, 0.26 µmol, 1 eq) wurde in trocknem DCM gelöst und Pyridin (63 µL, 0.78 mmol, 3 eq) dazugegeben. Die Lösung wurde unter Inertgas zu dem 2-Chlorotritylchlorid-Harz gegeben (1 g, max. Ausgangsbeladung: 1.2 mmol g^{-1}). Die Suspension wurde 72 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt, anschließend wurde die Lösung abgesaugt und das Harz mit DMF gewaschen (2x 1min). Im nächsten Schritt wurde das Harz mit einer Lösung aus DCM/MeOH/DIPEA (85:10:5) behandelt (3x 15 min) und alternierend mit DMF (3x 1 min) und DCM (3x 1 min) gewaschen.

7.3.2 Methode B: Bestimmung der Harzbeladung

Eine Aliquot des beladenen Harzes (~ 10 mg) wurde für 20 min mit einer frischen 20 %-Piperidine/DMF-Lösung (5 mL) behandelt. Das Harz wurde entfernt und aus der Lösung Verdünnungen angesetzt. Anschließend konnte die UV-Absorption dieser bei einer Wellenlänge von 301 nm mit Hilfe eines UV-Spektrometers gemessen werden.

Die Beladung des Harzes mit der Einheit [mmol g^{-1}] wurde mit Hilfe der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\beta = \frac{A \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot m \cdot F}$$

A ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 301 nm, V das gesamte Volumen, ε der Extinktionskoeffizient des abgespaltenen Fmoc, d die Schichtdicke der Küvette, m die Masse des Harzes und F der Verdünnungsfaktor.

Die berechnete Harzbeladung war die Grundlage für die Berechnung der zu verwendenden Äquivalenten an Reagenzien.

7.3.3 Methode C: Aminosäurekupplung

Die Kupplung der Aminosäuren wurden mit Hilfe des Syntheseroboters Syro I durchgeführt. Als Syntheseprotokoll wurde das Syro I- Standardkupplungs-programm verwendet. Dazu wurde die entsprechende Fmoc-geschützte

Aminosäure (4 eq) in 0.2 M HOBt/DMF gelöst. Die Aminosäurelösung, HBTU (4 eq) in DMF sowie DIPEA (4 eq) wurden durch den Roboter zum Harz gegeben (Gesamtvolumen: 5.5 mL) und für 45 min geschüttelt. Die Lösung wurde abgesaugt und das Harz mit DMF gewaschen (3x 1 min).

7.3.4 Methode D: Fmoc-Entschützung

Die Entschützungen des Amins konnten an dem Syntheseroboter Syro I mit dessen Standardprotokoll durchgeführt werden. Eine 40 %ige Piperdin/DMF - Lösung (6 mL) wurden zum Harz gegeben und die Suspension für 3 min geschüttelt. Nach dem Absaugen der Abspaltlösung wurde die feste Phase 12 min mit einer 20%igen Piperdin/DMF-Lösung (6 mL) behandelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz mit DMF gewaschen (6x 1 min).

7.3.5 Methode E: Veresterung eines sek. Alkohols

Die Veresterung des sek. Alkohols wurde am Syntheseroboter Syro I mit einer selbstprogrammierten Methode durchgeführt. Die entsprechende Aminosäure (10 eq) und DIPEA (10 eq) wurden in DCM (4 mL) gelöst und zum Harz gegeben. Es folgte die Zugabe von in DCM (0.75 mL) gelösten DMAP (0.5 eq) und DIC (10 eq). Die erhaltende Suspension wurde geschüttelt und auf 40 °C erhitzt. Nach 60 min wurde die Lösung entfernt und das Harz mit DCM gewaschen (3x 1 min). Die gesamte Veresterungsstufe wurde vier weitere Male wiederholt. Zum Ende wurde das Harz mit DMF gewaschen (5x 1min).

7.3.6 Methode F: Kupplung einer Aminosäure auf eine N-methylierte Aminosäure

Die Kupplung einer Aminosäure auf eine sek. Aminogruppe wurde am Syntheseroboter Syro I mit einer selbstprogrammierten Methode durchgeführt. PyBrop (4 eq) und die entsprechende Aminosäure (4 eq) sowie DIPEA (4 eq) wurden jeweils in DCM (je 2.5 mL) gelöst. Nach der Zugabe zum Harz wurde die Suspension geschüttelt und auf 40 °C erwärmt. Nach 60 min wurde die Lösung entfernt und das Harz mit DCM gewaschen (3x 1 min). Die Prozedur wurde fünfmal wiederholt und das Harz am Ende mit DMF gewaschen (5x 1 min).

7.3.7 Methode G: Spaltung des Allylesters

Die Spaltung des Allylesters wurde am Syntheseroboter Syro I mit einer selbstprogrammierten Methode durchgeführt. Es wurde das Schutzgas-Modul verwendet und als Inertgas Argon eingesetzt.
Das Harz wurde fünfmal unter Schutzgas mit trockenem DCM (5 mL) gewaschen. Anschließend wurden eine Lösung aus Tetrakis(triphenylphosphine)-palladium(0) (0.5 eq) und Morpholin (24 eq) in trocknem DCM (5.5 mL) unter Inertgas hinzugegeben. Die Suspension wurde für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, die Lösung entfernt und das Harz mit DCM (3x 1min), DMF (3x 1 min) und NMP (3x 1min) gewaschen. Nach einer Behandlung des Harzes mit einer 0.02 M Lösung aus Natriumdiethyldithiocarbamat in NMP (3x 5 min) wurde es erneut mit NMP (3x 1 min), DMF (3x 1 min) und DCM (3x 1min) gewaschen.

7.3.8 Methode H: Zyklisierung des Peptides

Die Zyklisierung des Peptides wurde am Syntheseroboter Syro I mit einer selbstprogrammierten Methode durchgeführt. HBTU (4 eq), HOBt (4 eq) sowie DIPEA (4 eq) wurden in DMF (5 mL) gelöst und zu dem Harz gegeben. Die Suspension wurde geschüttelt und die Lösung nach 4 h abgesaugt. Das Harz wurde mit DMF (3x 1min), NMP (3x 1min), DMF (3x 1 min) und DCM (3x 1min) gewaschen.

7.3.9 Methode I: Abspaltung von der festen Phase

Das Harz wurde mit einer Lösung aus TFA/Triisopropylsilan/H_2O (95:2.5:2.5. 9 mL) für 2 h behandelt. Die Abspaltlösung wurde in einen Kolben überführt und das Harz mit (3x 1 min, je 9 mL) gewaschen. Die Lösungen wurden vereinigt. DCM und TFA wurden unter reduziertem Druck verdampft bzw. unter reduziertem Druck mit Toluol co-verdampft. Der resultierende Feststoff wurde am Hochvakuum getrocknet.

7.3.10 Methode J: Festphasensynthese des Ahp-Cyclodepsipeptid-Vorläufers

Fmoc-Hnv-OAll wurden mit der Methode A auf das 2-Chlorotritylchlorid-Harz geladen. Die Beladung des Harzes wurde mit Hilfe der Methode B bestimmt (β = 0.2 mmol g^{-1}). Anschließend wurde das Harz (1000 mg, 0.2 mmol) in einen

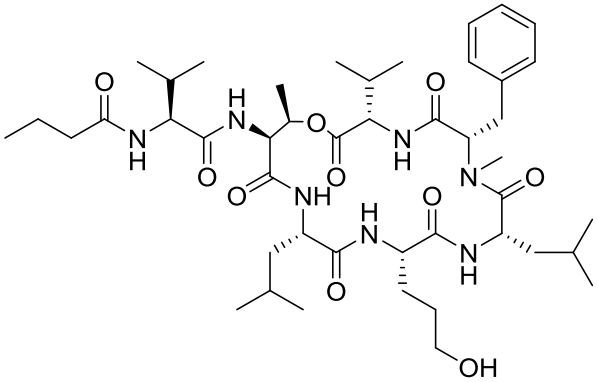
Reaktor überführt und für die Synthese am Syntheseroboter Syro I verwendet. Mit Hilfe der Methoden C und D wurden die ersten vier Aminosäuren gekuppelt. Dazu wurde alternierend Fmoc abgespalten (Methode D) und die Aminosäuren gekuppelt (Methode C). Unter der Verwendung von Methode E wurde das Peptid mit der Fmoc-geschützten Aminosäure verestert. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit Methode D abgespalten und durch den Einsatz von Methode C die N-methylierte sowie Fmoc-geschützte Aminosäure gekuppelt. Nach einer weiteren Fmoc-Abspaltung (Methode D) wurde die letzte Fmoc-geschützte Aminosäure mit Hilfe der Methode F gekuppelt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde abgespalten (Methode D) und mit Hilfe von Methode G der Allylester gespalten. Durch den Einsatz von Methode H wurde das Peptid zyklisiert. Der Reaktor wurde aus dem Syntheseroboter genommen und das Peptid mit der Methode I vom Harz abgespalten.

7.3.11 Methode K: Dess-Martin Oxidation und finale Synthese des Ahp-Cyclodepsipeptide

Der aufgereinigte Ahp-Cyclodepsipeptid-Vorläufer (1 eq) und Dess-Martin Periodinan (1.5 eq) wurden in DCM (10 mL) gelöst. Die leicht trübe Lösung wurde für 1.5 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck verdampft und in Acetonitril/Wasser (1:1. 5 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde über Nacht gerührt. Nach einer HPLC-Aufreinigung und anschließender Entfernung des Lösungsmittels konnte das Ahp-Cyclodepsipeptid erhalten werden.

7.4 Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden

3.3,8-Anhydro(Butanyl-L-Valyl-L-Threonyl-L-Leucyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)

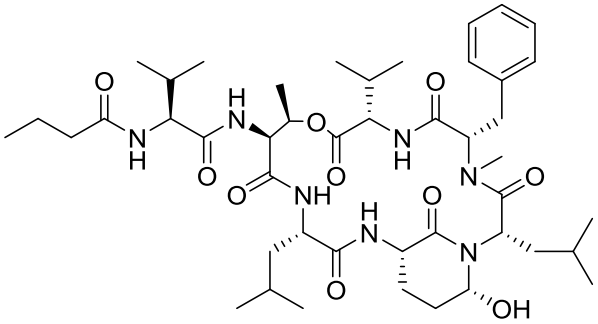


40

Die Verbindung **40** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 22.2 mg (25.5 mmol, 12.7 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.38 min; *m/z* = 872.34 $[M + H]^+$, 894.50 $[M + Na]^+$, 916.98 $[M + 2Na]^+$, 1742.40 $[2M + H]^+$, 1764.64 $[2M + Na]^+$;
berechnet für $C_{45}H_{73}N_7O_{10}$: 871.54.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Butanyl-L-Leucyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)



1

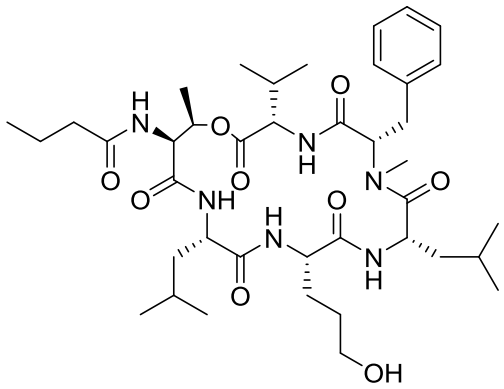
Die Verbindung **1** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 3.3 mg (3.8 mmol, 14.9 %; über alle Stufen: 1.9 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.00 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.30 – 7.21 (m, 6H), 8.71 (d, J = 9.6 (Hz, 1H), 8.40 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.71 – 5.54 (m, 1H), 5.43 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 5.18 – 5.13 (m, 1H), 4.84 (dd, J = 11.5, 3.2 Hz, 1H), 4.63 – 4.40 (m, 4H), 4.12 – 3.98 (m, 2H), 3.51 (dd, J = 14.1, 2.7 Hz, 1H), 2.96 – 2.90 (m, 1H), 2.73 (s, 3H), 2.43 – 2.06 (m, 3H), 1.86 – 1.43 (m, 7H), 1.26 – 1.15 (m, 4H), 1.06 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.99 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 0.96 – 0.77 (m, 15H), 0.75 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.69 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.64 – 0.57 (m, 6H), -0.59 (dt, J = 14.4, 11.9 Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d6): δ 173.06, 172.50, 171.20, 170.87, 170.72, 169.95, 166.32, 166.29, 135.40, 131.08, 129.92, 128.42, 81.02, 79.90, 71.09, 68.60, 59.72, 55.68, 54.89, 53.72, 49.91, 37.01, 31.73, 30.75, 29.38, 28.78, 26.32, 23.96, 23.40, 23.29, 23.14, 21.01, 19.52, 19.46, 18.93, 18.60, 18.33, 16.92, 13.54.

LC-MS (ESI): t_R = 8.83 min; *m/z* = 870.0 $[M + H]^+$, 852.0 $[M + H - H_2O]^+$, 892.5 $[M + Na]^+$, 1760.4 $[2M + Na]^+$, berechnet für $C_{45}H_{71}N_7O_{10}$: 869.5.

3.2,7-Anhydro(Butanyl-L-Threonyl-L-Leucyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)

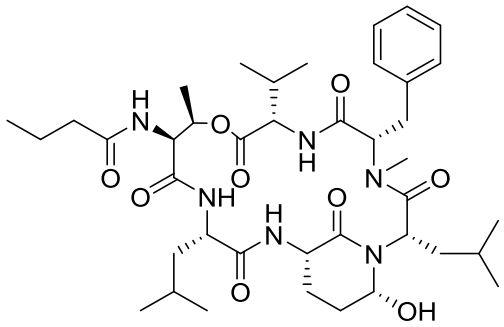


41

Die Verbindung **41** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 16.2 mg (21.0 mmol, 10.5 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.28 min; *m/z* = 773.53 $[M + H]^+$, 795.65 $[M + Na]^+$, 1545.79 $[2M + H]^+$, 1566.85 $[2M + Na]^+$; berechnet für $C_{40}H_{64}N_6O_9$: 772.47.

3.2,7-Anhydro-C$^{5.5}$,N$^{2.6}$-Cyclo(Butanyl-L-Valyl-L-Threonyl-L-Leucyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)



2

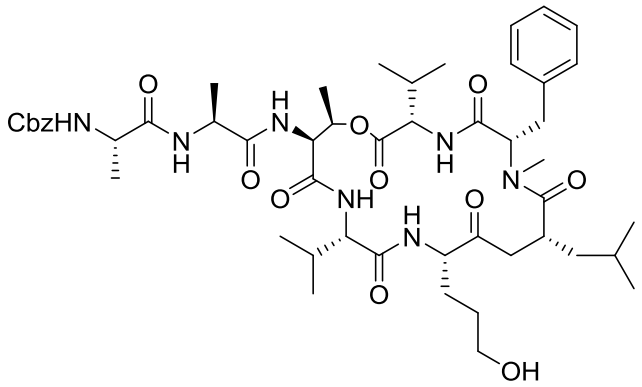
Die Verbindung **2** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.0 mg (1.3 mmol, 6.2 %; über alle Stufen: 0.7 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (700 MHz, $CDCl_3$): δ 7.34 – 7.15 (m, 6H), 6.91 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.95 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.51 – 5.48 (m, 1H), 5.45 (dd, J = 11.7, 3.3 Hz, 1H), 5.21 – 5.15 (m, 1H), 4.89 (dd, J = 11.0, 4.4 Hz, 1H), 4.74 (dd, J = 9.2, 1.2 Hz, 1H), 4.62 – 4.51 (m, 2H), 3.52 – 3.45 (m, 1H), 2.95 (s, 1H), 2.92 (s, 3H), 2.51 – 2.44 (m, 1H), 2.38 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.18 – 2.13 (m, 1H), 2.12 – 2.03 (m, 1H), 2.00 – 1.96 (m, 1H), 1.88 (m, 1H), 1.77 – 1.74 (m, 2H), 1.69 – 1.54 (m, 1H), 1.51 – 1.47 (m, 1H), 1.43 (dd, J = 6.7, 1.3 Hz, 1H), 1.35 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.23 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.01 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.94 (dd, J = 8.6, 6.7 Hz, 6H), 0.92 – 0.86 (m, 7H), 0.72 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.50 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.40 – 0.36 (m, 1H), 0.09 (s, 1H).

^{13}C NMR (176 MHz, $CDCl_3$): δ 174.23, 174.11, 172.54, 171.36, 170.40, 169.61, 169.29, 137.17, 129.30, 129.10, 126.89, 77.19, 77.01, 76.83, 74.96, 71.66, 62.23, 57.47, 54.94, 53.42, 52.19, 50.73, 48.74, 39.22, 38.37, 37.44, 33.98, 31.20, 31.00, 29.71, 29.55, 24.78, 24.30, 23.59, 23.23, 21.86, 21.66, 21.31, 19.16, 18.77, 18.28, 18.24, 13.65.

LC-MS (ESI): t_R = 8.51 min; *m/z* = 770.9 $[M + H]^+$, 753.4 $[M + H - H_2O]^+$, 793.6 $[M + Na]^+$, 1562.9 $[2M + Na]^+$, berechnet für $C_{40}H_{62}N_6O_9$: 770.46.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)

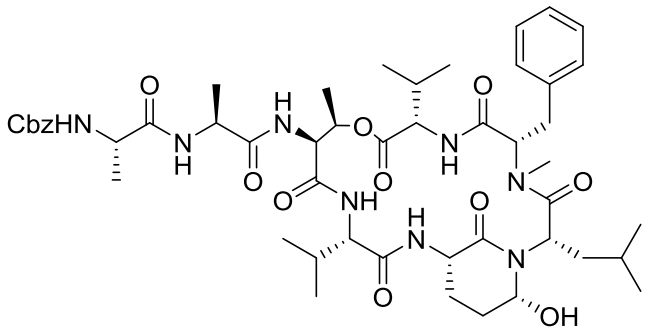


43

Die Verbindung **43** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 9.9 mg (10.3 mmol, 5.1 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 7.97 min; *m/z* = 965.21 $[M + H]^+$, 987.34 $[M + Na]^+$, 1927.61 $[2M + H]^+$, 1951.10 $[2M + Na]^+$; berechnet für $C_{50}H_{73}N_7O_{12}$: 963.53.

3.2,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)



14

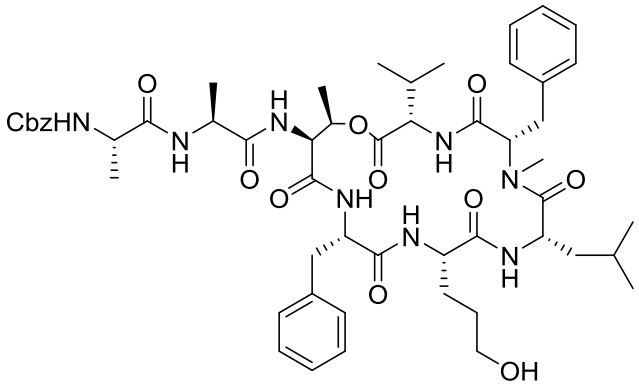
Die Verbindung **14** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 3.5 mg (3.8 mmol, 35.4 %; über alle Stufen: 5.1 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.18 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.51 – 7.10 (m, 12H), 5.98 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 5.65 – 5.55 (m, 1H), 5.08 – 5.02 (m, 3H), 4.89 (s, 1H), 4.78 – 4.70 (m, 2H), 4.61 – 4.51 (m, 1H), 4.52 – 4.43

(m, 1H), 4.44 – 4.34 (m, 1H), 4.29 (dd, J = 9.5, 4.0 Hz, 1H), 4.08 (p, J = 7.2 Hz, 1H), 2.92 – 2.74 (m, 1H), 2.74 (s, 3H), 2.55 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 2.21 – 2.16 (m, 1H), 2.12 – 2.03 (m, 1H), 1.75 – 1.72 (m, 3H), 1.60 – 1.42 (m, 1H), 1.26 – 1.19 (m, 12H), 0.87 (dd, J = 6.7, 5.2 Hz, 3H), 0.85 – 0.75 (m, 6H), 0.74 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.67 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.43 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.33 – 0.21 (m, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 8.27 min; *m/z* = 962.8 $[M + H]^+$, 945.0 $[M + H - H_2O]^+$, 985.4 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{49}H_{70}N_8O_{12}$: 962.51.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Phenyalanyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)

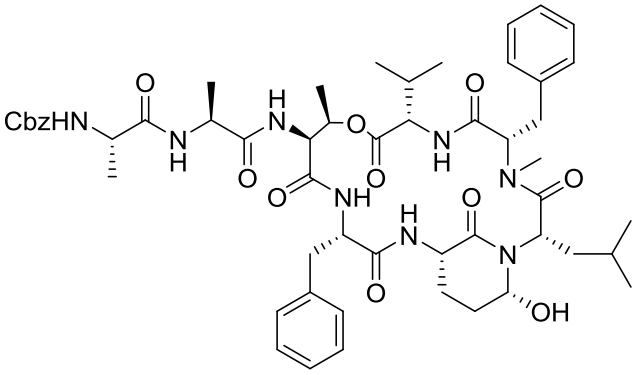


44

Die Verbindung **44** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 8.5 mg (8.4 mmol, 4.2 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.34 min; *m/z* = 1013.38 $[M + H]^+$, 1035.44 $[M + Na]^+$; berechnet für $C_{53}H_{72}N_8O_{12}$: 1012.53.

3.2,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Phenylalanyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)



15

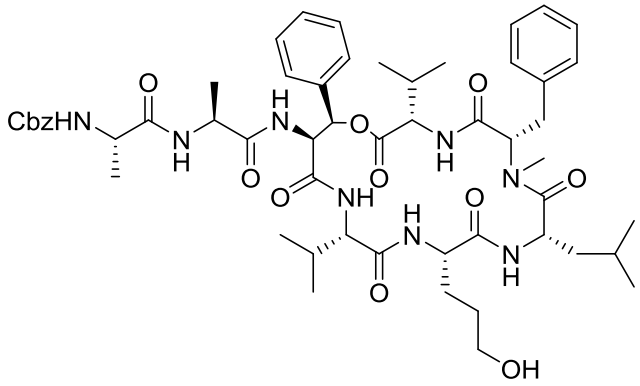
Die Verbindung **15** wurde mit der allgemeinen „Methode K" hergestellt. Es konnten 1.1 mg (1.1 mmol, 13.0 %; über alle Stufen: 0.6 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (700 MHz, DMSO-d6): δ 8.86 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.51 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 8.49 (d, J =7.5 Hz, 1H), 8.34 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.33 – 7.03 (m, 17H), 5.60 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.43 (t, J =5.3 Hz, 1H), 5.09 – 5.06 (m, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.65 (dd, J = 9.7, 3.3 Hz, 1H), 4.58 – 4.3 (m, 1H), 4.51 – 4.41 (m, 3H), 4.30 – 4.24 (m, 2H), 4.04 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 14.1, 2.8 Hz, 1H), 2.91 – 2.85 (m, 1H), 2.83 (dd, J = 14.1, 5.0 Hz, 1H), 2.74 (s, 3H), 2.62 – 2.57 (m, 1H), 2.33 – 2.25 (m, 1H), 1.80 – 1.76 (m, 1H), 1.68 – 1.60 (m, 1H), 1.54 – 1.44 (m, 2H), 1.18 (dd, J = 7.2, 2.6 Hz, 6H), 1.02 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.93 (td, J = 14.0, 13.5, 3.3 Hz, 1H), 0.88 – 0.82 (m, 1H), 0.79 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.69 (dd, J = 9.1, 6.7 Hz, 6H), 0.62 (d, J = 6.7 Hz, 3H), -0.67 (t, J = 12.4 Hz, 1H).

^{13}C NMR (176 MHz, DMSO-d6): δ 202.86, 173.87, 173.51, 172.11, 171.71, 171.64, 171.04, 170.80, 169.90, 166.46, 155.85, 139.40, 137.45, 137.34, 130.39, 129.32, 129.12, 128.52, 127.90, 127.55, 126.80, 80.43, 73.69, 65.83, 62.86, 60.22, 58.87, 56.09, 55.38, 53.87, 50.95, 49.66, 47.61, 47.37, 37.45, 33.74, 31.39, 30.05, 29.21, 26.81, 23.86, 23.77, 21.24, 20.08, 19.97, 19.83, 17.24, 16.42, 15.40, 14.56, 1.63.

LC-MS (ESI): t_R = 8.77 min; *m/z* = 1011.6 $[M + H]^+$, 993.0 $[M + H + - H_2O]^+$, 1033.4 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{53}H_{70}N_8O_{12}$: 1010.51.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-3-Hydroxy-Phenylalanyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)

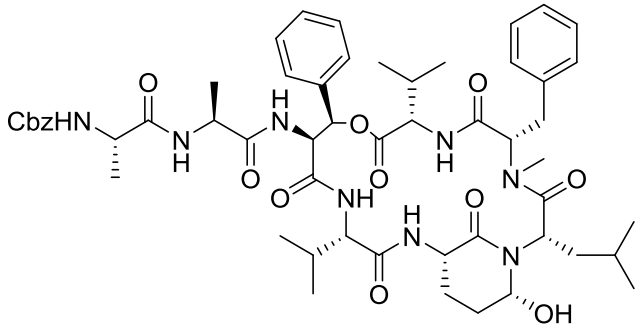


45

Die Verbindung **45** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 3.8 mg (3.7 mmol, 1.9 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.49 min; *m/z* = 1027.36 $[M + H]^+$, 1049.46 $[M + Na]^+$;
berechnet für $C_{54}H_{74}N_8O_{12}$: 1026.54.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-3-Hydroxy-Phenylalanyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)



16

Die Verbindung **16** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.0 mg (1.0 mmol, 26.4 %; über alle Stufen: 0.5 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

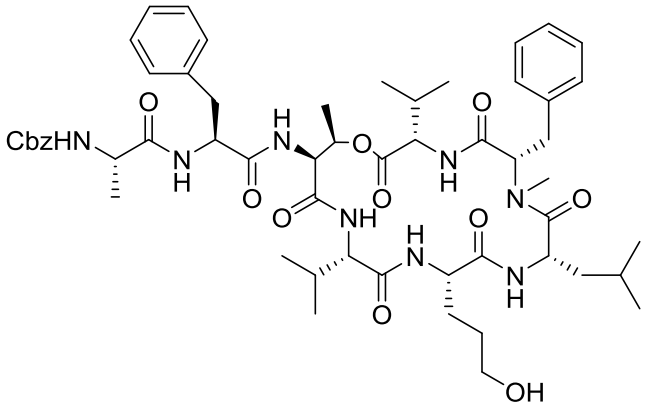
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.90 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.46 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 8.39 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.37 – 7.18 (m, 16H), 6.14 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.67 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.47 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 5.03 –

4.96 (m, 2H), 4.95 – 4.87 (m, 2H), 4.82 – 4.77 (m, 2H), 4.59 – 4.53 (m, 1H), 4.49 – 4.39 (m, 2H), 4.20 – 4.08 (m, 2H), 3.73 – 3.62 (m, 1H), 3.04 – 2.91 (m, 1H), 2.78 (s, 3H), 2.46 – 2.19 (m, 1H), 1.84 – 1.74 (m, 2H), 1.69 – 1.45 (m, 2H), 1.25 (d, J = 6.9 Hz, 4H), 1.16 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 0.93 (t, J = 11.8 Hz, 1H), 0.86 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.81 (t, J = 6.9 Hz, 6H), 0.74 (dd, J = 13.2, 6.7 Hz, 6H), 0.61 (d, J = 6.5 Hz, 3H), -0.61 (t, J = 12.4 Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d6): δ 173.05, 172.44, 172.32, 171.24, 170.94, 169.90, 169.31, 165.80, 159.85, 138.86, 137.61, 136.88, 129.80, 128.60, 128.31, 128.18, 127.76, 127.58, 127.42, 126.44, 125.57, 80.07, 72.34, 68.65, 65.38, 62.49, 58.13, 55.44, 54.98, 54.19, 47.26, 47.05, 31.86, 29.63, 28.77, 28.66, 25.83, 23.15, 19.46, 19.38, 18.94, 18.62, 18.45, 17.03, 16.85.

LC-MS (ESI): t_R = 8.82 min; *m/z* = 1025.3 $[M + H]^+$, 1007.2 $[M + H - H_2O]^+$, 1047.6 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{54}H_{72}N_8O_{12}$: 1024.53.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Phenylalanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)

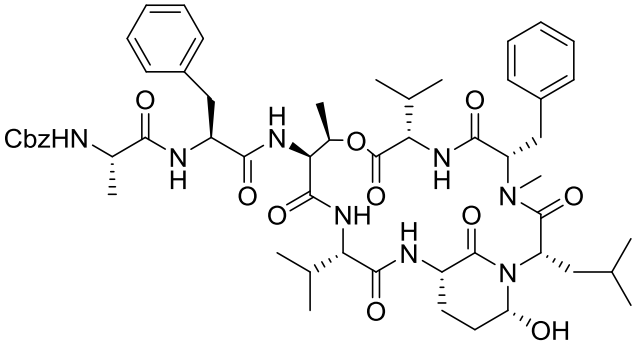


46

Die Verbindung **46** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 9.7 mg (9.3 mmol, 4.7 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.85 min; *m/z* = 1041.45 $[M + H]^+$, 1063.56 $[M + Na]^+$; berechnet für $C_{55}H_{76}N_8O_{12}$: 1040.56.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Phenylalanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)



17

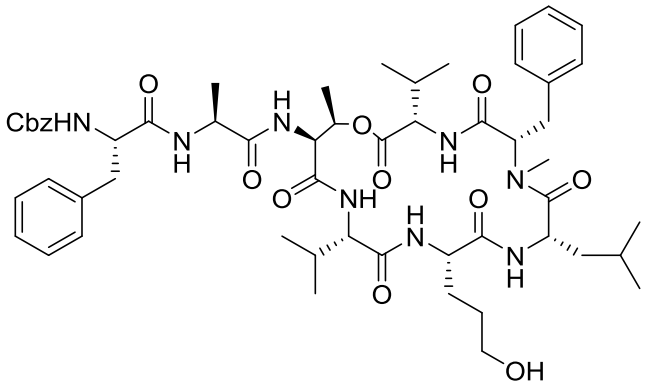
Die Verbindung **17** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.4 mg (1.3 mmol, 14.5 %; über alle Stufen: 0.7 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (700 MHz, DMSO-d6): δ 8.83 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 8.33 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 7.41 – 7.01 (m, 16H), 5.67 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.44 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 5.17 (qd, J = 6.2, 1.9 Hz, 1H), 4.93 (s, 2H), 4.88 – 4.84 (m, 2H), 4.69 (dd, J = 9.7, 3.3 Hz, 1H), 4.59 (dd, J = 9.8, 2.0 Hz, 1H), 4.50 – 4.42 (m, 2H), 4.18 – 4.11 (m, 1H), 4.09 – 4.05 (m, 1H), 3.64 – 3.59 (m, 1H), 3.22 (dd, J = 14.4, 4.8 Hz, 1H), 2.92 – 2.82 (m, 1H), 2.80 (dd, J = 14.5, 9.5 Hz, 1H), 2.73 (s, 3H), 2.39 – 2.28 (m, 1H), 1.81 – 1.79 (m, 1H), 1.76 – 1.70 (m, 1H), 1.62 – 1.57 (m, 1H), 1.50 – 1.47 (m, 1H), 1.24 (s, 2H), 1.14 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.11 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.7 Hz, 4H), 0.79 (dd, J = 13.8, 6.8 Hz, 6H), 0.73 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.70 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.57 (d, J = 6.6 Hz, 4H), -0.69 (t, J = 12.3 Hz, 1H).

^{13}C NMR (176 MHz, DMSO-d6): δ 173.04, 171.33, 171.25, 171.03, 170.90, 170.25, 169.74, 166.36, 155.31, 138.81, 137.98, 136.94, 129.86, 129.16, 128.55, 128.19, 127.98, 127.56, 127.25, 79.98, 72.69, 65.34, 62.43, 58.28, 55.62, 54.93, 54.71, 53.97, 52.61, 49.57, 47.17, 39.53, 37.11, 35.49, 33.27, 31.72, 30.89, 29.58, 28.84, 28.76, 23.41, 23.22, 19.52, 19.45, 19.37, 18.63, 18.40, 16.83, 16.20.

LC-MS (ESI): t_R = 7.47 min; *m/z* = 1039.2 $[M + H]^+$, 1021.1 $[M + H - H_2O]^+$, 1061.5 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{55}H_{74}N_8O_{12}$: 1038.54

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Phenylalanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)

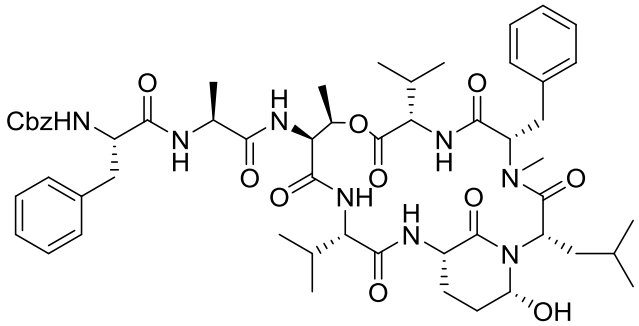


47

Die Verbindung **47** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 6.6 mg (6.3 mmol, 3.2 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.86 min; *m/z* = 1041.39 $[M + H]^+$, 1063.45 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{55}H_{76}N_8O_{12}$: 1040.56.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Phenylalanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)



18

Die Verbindung **18** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 2.1 mg (2.0 mmol, 31.9 %; über alle Stufen: 1.0 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

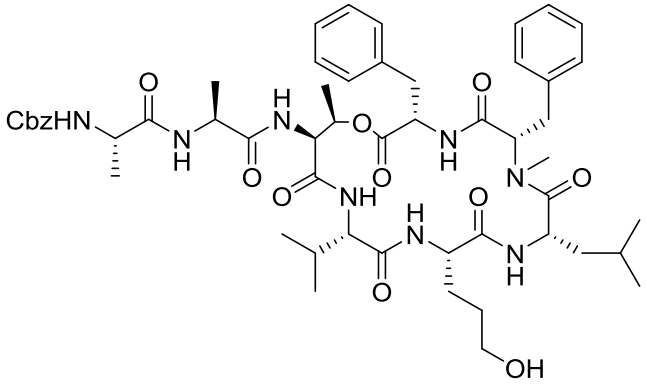
^{1}H NMR (700 MHz, DMSO-d6): δ 8.98 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.80 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.43 – 6.89 (m, 17H), 5.68 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.45 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 5.12 – 5.09 (m, 1H), 4.96 (dd, J = 11.6, 3.0 Hz, 1H), 4.76

(d, J = 2.8 Hz, 2H), 4.63 (dd, J = 9.8, 1.7 Hz, 1H), 4.58 (q, J = 7.3 Hz, 1H), 4.55 – 4.51 (m, 1H), 4.45 (d, J = 9.4 Hz, 2H), 4.08 (dd, J = 9.7, 8.0 Hz, 1H), 3.86 (dd, J = 14.1, 2.7 Hz, 1H), 3.39 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.96 – 2.90 (m, 2H), 2.78 (s, 3H), 2.65 – 2.59 (m, 1H), 2.34 – 2.30 (m, 1H), 1.81 – 1.78 (m, 1H), 1.76 – 1.70 (m, 1H), 1.68 – 1.62 (m, 1H), 1.58 – 1.51 (m, 1H), 1.50 – 1.48 (m, 1H), 1.30 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.10 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.96 – 0.90 (m, 1H), 0.87 – 0.80 (m, 6H), 0.77 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.71 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.63 (d, J = 6.7 Hz, 3H), -0.57 – -0.67 (m, 1H).

^{13}C NMR (176 MHz, DMSO-d6): δ 173.52, 173.11, 172.35, 171.77, 171.32, 169.89, 166.82, 156.05, 139.35, 138.42, 137.17, 130.41, 129.51, 129.17, 128.71, 128.46, 127.83, 127.42, 80.51, 73.80, 65.76, 65.38, 62.94, 58.67, 56.32, 55.95, 55.18, 54.00, 47.60, 32.07, 30.13, 29.32, 29.20, 23.95, 23.70, 20.19, 19.89, 19.13, 18.82, 17.22, 16.64, 15.64, 15.54.

LC-MS (ESI): t_R = 9.40 min; *m/z* = 1039.0 $[M + H]^+$, 1021.0 $[M + H - H_2O]^+$, 1061.4 $[M + Na]^+$ berechnet für: $C_{55}H_{74}N_8O_{12}$: 1038.54.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Phenylalanin)

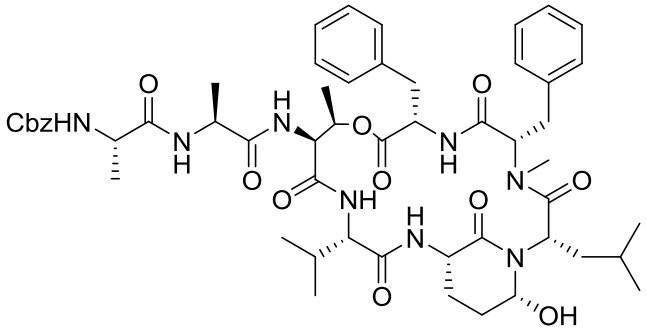


48

Die Verbindung **48** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 19.7 mg (19.5 mmol, 9.7 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.30 min; *m/z* = 1013.45 $[M + H]^+$, 1035.52 $[M + Na]^+$; berechnet für: $C_{53}H_{72}N_8O_{12}$: 1012.53.

3.3,8-Anhydro-C$^{5.5}$,N$^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Phenylalanin)



19

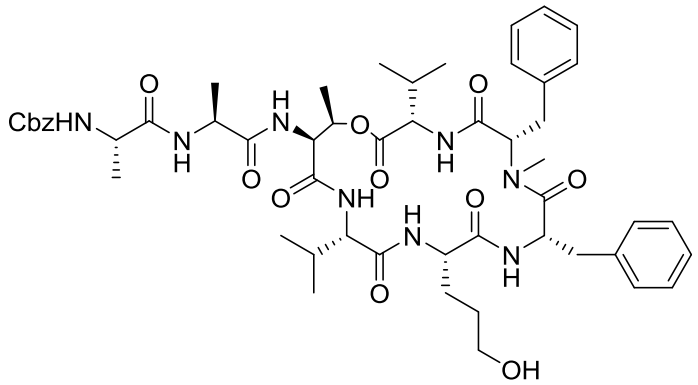
Die Verbindung **19** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 13.2 mg (13.1 mmol, 67.1 %; über alle Stufen: 6.6 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (700 MHz, DMSO-d6): δ 9.23 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 8.59 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 8.46 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.38 – 7.04 (m, 16H), 5.74 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.61 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 5.16 – 5. (m, 1H), 4.93 – 4.86 (m, 3H), 4.71 (dd, J = 11.5, 3.2 Hz, 1H), 4.65 (dd, J = 9.8, 2.1 Hz, 1H), 4.56 – 4.50 (m, 3H), 4.27 – 4.20 (m, 1H), 4.17 – 4.13 (m, 1H), 3.71 – 3.65 (m, 1H), 2.67 – 2.60 (m, 1H), 2.51 (s, 3H) 1.90 – 1.86 (m, 1H), 1.82 – 1.72 (m, 1H), 1.66 – 1.62 (m, 2H), 1.40 (d, J = 3.9 Hz, 3H), 1.24 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.21 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 1.11 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.93 (t, J = 13.1 Hz, 1H), 0.85 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.78 – 0.76 (m, 8H), 0.61 (d, J = 6.7 Hz, 3H), -0.53 (dd, J = 18.5, 6.5 Hz, 1H).

^{13}C NMR (176 MHz, DMSO-d6): δ 173.24, 172.38, 171.91, 171.77, 171.05, 170.51, 170.33, 169.51, 166.44, 155.35, 138.97, 137.71, 136.90, 129.70, 128.96, 128.55, 128.21, 128.07, 127.44, 127.12, 118.08, 80.26, 73.55, 65.31, 62.48, 59.75, 58.37, 54.92, 54.71, 53.70, 51.85, 49.32, 47.26, 47.02, 37.74, 36.65, 32.49, 31.69, 31.28, 28.85, 28.24, 26.34, 23.50, 23.29, 20.77, 19.68, 19.52, 18.71, 18.25, 15.99, 15.45, 14.09, 1.16.

LC-MS (ESI): t_R = 8.76 min; *m/z* = 1011.2 $[M + H]^+$, 993.1 $[M + H - H_2O]^+$, 1033.1 $[M + Na]^+$, berechnet für: $C_{53}H_{70}N_8O_{12}$: 1010.51.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Phenylalanyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)

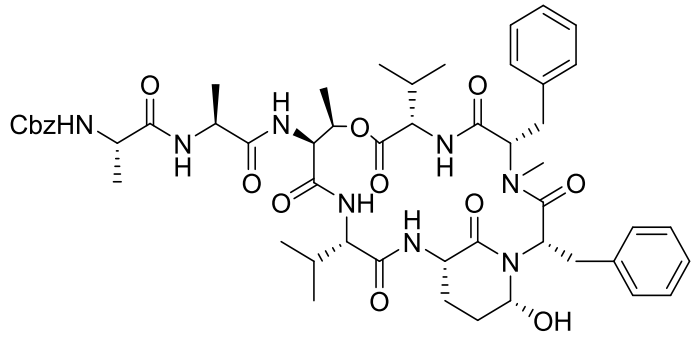


49

Die Verbindung **49** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 11.2 mg (11.2 mmol, 5.6 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.16 min; *m/z* =999.68 $[M + H]^+$,1021.72 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{52}H_{70}N_8O_{12}$: 998.51.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Phenylalanyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)



20

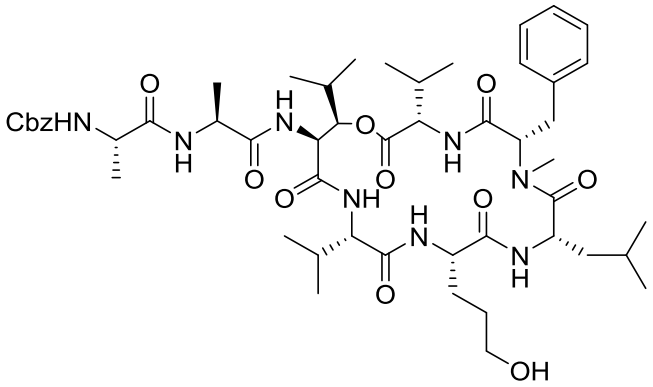
Die Verbindung **20** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 2.6 mg (2.6 mmol, 23.3 %; über alle Stufen: 1.3 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (700 MHz, DMSO-d6): δ 8.80 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.28 – 7.10 (m, 15H), 5.64 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.42 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 5.14 – 5.10

(m, 2H), 5.00 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.96 – 4.88 (m, 2H), 4.71 – 4.66 (m, 2H), 4.60 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.29 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.24 (p, J = 7.4 Hz, 1H), 3.98 (dd, J = 9.7, 7.5 Hz, 1H), 3.86 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 2.90 (t, J = 12.8 Hz, 1H), 2.78 (s, 3H), 2.33 – 2.27 (m, 1H), 2.21 – 2.17 (m, 2H), 2.04 – 1.95 (m, 1H), 1.73 – 1.71 (m, 1H), 1.67 – 1.63 (m, 1H), 1.52 – 1.49 (m, 1H), 1.47 – 1.45 (m, 1H), 1.26 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.21 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 1.10 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.81 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.74 – 0.70 (m, 9H).

LC-MS (ESI): t_R = 8.58 min; *m/z* = 997.1 $[M + H]^+$, 979.0 $[M + H - H_2O]^+$, 1019.5 $[M + Na]^+$, berechnet für: $C_{52}H_{68}N_8O_{12}$: 996.50.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-3-Hydroxy-Leucyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-Methyl-N-Phenylalanyl-L-Valin)

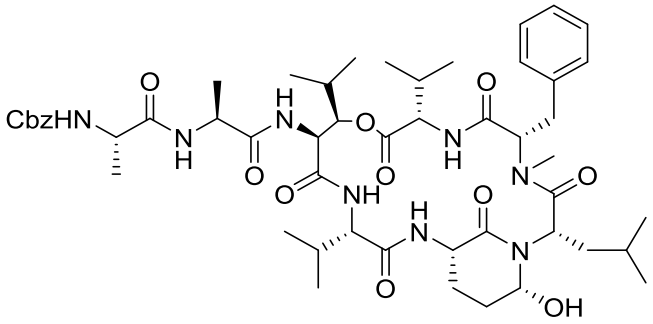


50

Die Verbindung **50** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 33.8 mg (34.1 mmol, 17.0 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.16 min; *m/z* =993.48 $[M + H]^+$,1015.54 $[M + Na]^+$; berechnet für: $C_{51}H_{84}N_7O_{12}$: 992.56.

3.3,8-Anhydro-C$^{5.5}$,N$^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-3-Hydroxy-Leucyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)



21

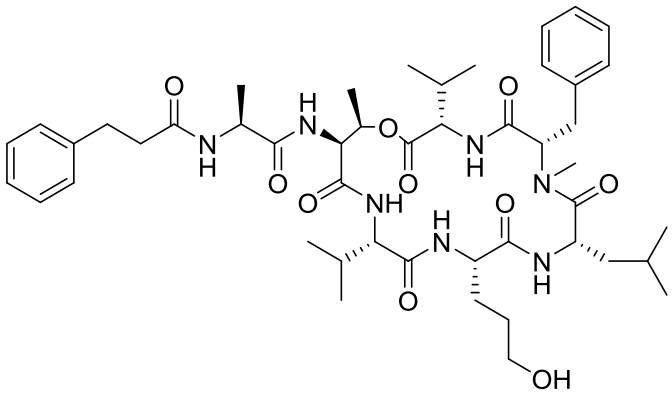
Die Verbindung **21** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 12.5 mg (12.6 mmol, 37.1 %; über alle Stufen: 6.3 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.33 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.99 – 7.96 (m, 2H), 7.45 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.42 – 7.09 (m, 12H), 5.93 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.15 – 5.06 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.93 (dd, J = 9.7, 3.0 Hz, 1H), 4.87 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.81 – 4.74 (m, 1H), 4.54 (dd, J = 11.1, 4.0 Hz, 1H), 4.50 – 4.43 (m, 1H), 4.43 – 4.35 (m, 1H), 4.30 (dd, J = 9.6, 4.0 Hz, 1H), 4.07 (p, J = 7.2 Hz, 1H), 3.22 (dd, J = 14.3, 2.9 Hz, 1H), 2.82 (dd, J = 14.1, 11.6 Hz, 1H), 2.75 (s, 3H), 2.69 – 2.55 (m, 1H), 2.45 – 2.31 (m, 1H), 2.30 – 2.16 (m, 1H), 2.01 – 1.91 (m, 1H), 1.84 – 1.64 (m, 3H), 1.58 – 1.51 (m, 1H), 1.20 (d, J = 7.0 Hz, 6H), 0.91 (dd, J = 6.9, 4.3 Hz, 6H), 0.86 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.81 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.77 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.68 (dd, J = 10.2, 6.7 Hz, 7H), 0.43 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.27 – 0.21 (m, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d6): δ 172.62, 172.15, 171.64, 170.38, 169.91, 169.84, 169.42, 169.15, 158.75, 137.53, 137.02, 129.23, 128.57, 128.32, 127.73, 127.64, 126.42, 73.37, 67.26, 65.29, 60.51, 56.95, 55.61, 52.46, 49.82, 48.57, 47.65, 47.56, 33.88, 30.81, 30.62, 27.76, 23.79, 23.53, 22.24, 19.65, 19.21, 19.05, 18.44, 18.14, 18.04, 16.16.

LC-MS (ESI): t_R = 8.67 min; *m/z* = 991.0 $[M + H]^+$, 973.2 $[M + H - H_2O]^+$, 1013.5 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{51}H_{74}N_8O_{12}$: 990.54.

3.3,8-Anhydro(Phenylethancarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)

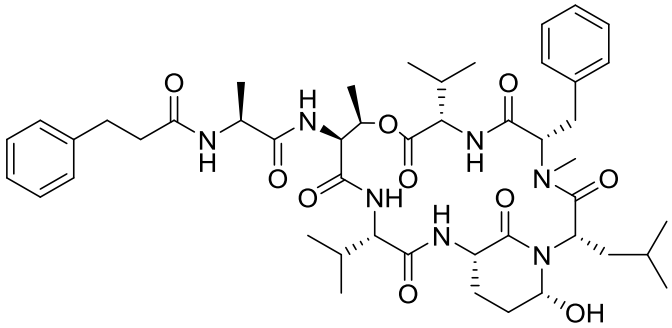


51

Die Verbindung **51** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 5.1 mg (5.7 mmol, 2.9 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.21 min; *m/z* =892.52 $[M + H]^+$,914.68 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{47}H_{69}N_7O_{10}$: 891.51.

3.3,8-Anhydro(Phenylethancarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Phenylalanyl-L-Valin)



22

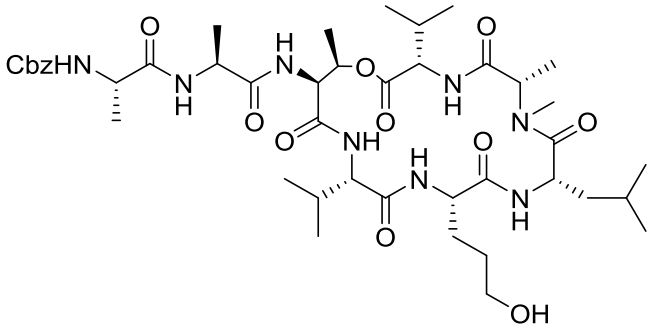
Die Verbindung **22** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 3.7 mg (4.2 mmol, 72.7 %; über alle Stufen: 2.1 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.73 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.41 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 8.27 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.32 – 7.22 (m, 10H), 5.44 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 5.15 (dd, J = 6.3, 2.4 Hz, 1H), 4.84 (dd, J = 11.5, 3.1 Hz,

1H), 4.77 – 4.69 (m, 1H), 4.63 (dd, J = 9.6, 3.5 Hz, 1H), 4.60 – 4.53 (m, 1H), 4.50 (dd, J = 14.0, 6.7 Hz, 1H), 4.43 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.06 (dd, J = 9.6, 7.8 Hz, 1H), 3.59 – 3.46 (m, 1H), 2.96 (dd, J = 14.1, 11.5 Hz, 1H), 2.85 (m, 2H), 2.74 (s, 4H), 2.46 – 2.24 (m, 2H), 1.86 – 1.68 (m, 2H), 1.68 – 1.45 (m, 2H), 1.21 (dt, J = 7.4, 3.7 Hz, 5H), 1.08 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.86 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 0.78 (m, 12H), 0.70 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 0.66 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 0.61 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.43 (d, J = 6.5 Hz, 1H), -0.60 (t, J = 12.3 Hz, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 8.56 min; *m/z* = 890.25 $[M + H]^+$, 872.23 $[M + H - H_2O]^+$, 912.67 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{51}H_{74}N_8O_{12}$: 889.49.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

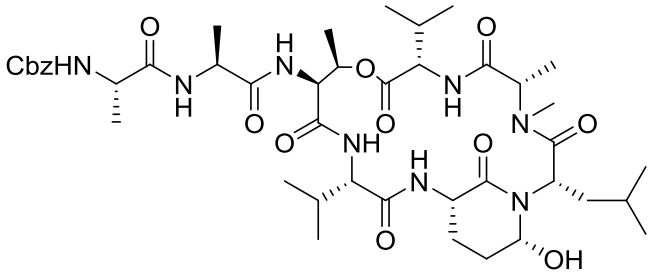


52

Die Verbindung **52** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 9.0 mg (10.1 mmol, 5.1 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 7.08 min; *m/z* =889.31 $[M + H]^+$,911.47 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{47}H_{69}N_7O_{10}$: 891.51.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



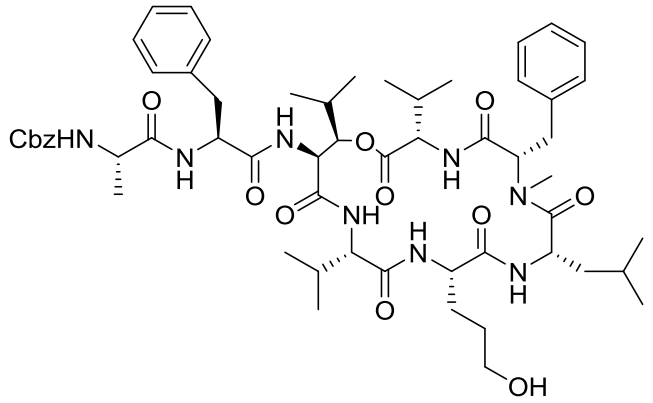
23

Die Verbindung **23** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.9 mg (2.1 mmol, 21.2 %; über alle Stufen: 1.1 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.74 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 8.55 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.37 – 7.28 (m, 6H), 7.25 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.69 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.46 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 5.10 – 5.06 (m, 1H), 5.02 (d, J = 3.3 Hz, 3H), 4.94 – 4.87 (m, 1H), 4.61 – 4.32 (m, 4H), 4.29 – 3.99 (m, 3H), 2.56 (s, 3H), 1.94 – 1.74 (m, 2H), 1.70 – 1.47 (m, 2H), 1.39 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.23 (d, J = 5.4 Hz, 3H), 1.20 – 1.10 (m, 5H), 1.04 (t, J = 6.2 Hz, 7H), 0.98 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.91 – 0.85 (m, 4H), 0.84 – 0.71 (m, 6H), 0.68 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

LC-MS (ESI): t_R = 7.47 min; *m/z* = 887.08 $[M + H]^+$, 869.06 $[M + H - H_2O]^+$, 909.45 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{43}H_{66}N_8O_{12}$: 886.48.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Phenylalanyl-L-3-Hydroxy-Leucyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

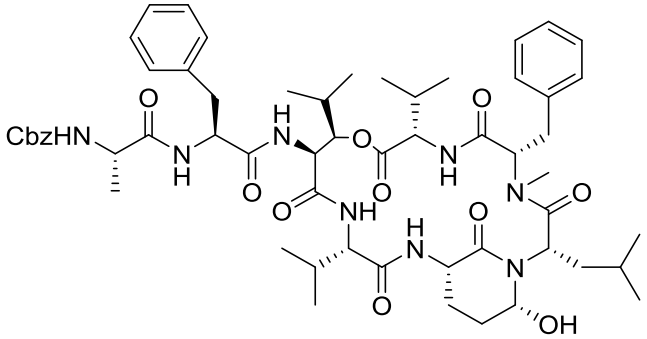


53

Die Verbindung **53** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 3.6 mg (3.4 mmol, 1.7 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 9.29 min; *m/z* =1069.51 $[M + H]^+$,1091.66 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{57}H_{80}N_8O_{12}$: 1068.59.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Phenylalanyl-L-3-Hydroxy-Leucyl-L-Valyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



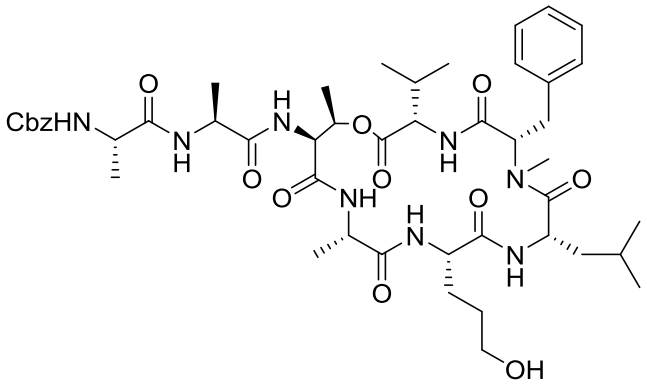
24

Die Verbindung **24** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.0 mg (0.9 mmol, 27.8 %; über alle Stufen: 0.5 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (700 MHz, DMSO-d6): δ 9.05 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.45 – 8.41 (m, 1H), 8.24 (t, J = 8.5 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 7.36 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.34 – 7.18 (m, 15H), 5.65 – 5.61 (m, 1H), 5.48 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 5.11 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 4.94 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 4.79 (m, 3H), 4.60 (m, 1H), 4.56 – 4.52 (m, 1H), 4.41 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.12 (q, J = 7.8 Hz, 1H), 4.08 – 4.01 (m, 2H), 3.64 – 3.56 (m, 1H), 2.87 (m, 1H), 2.74 (s, 5H), 2.12 (m, 1H), 1.80 – 1.72 (m, 2H), 1.56 (m, 2H), 1.48 (dd, J = 12.3, 6.8 Hz, 1H), 1.14 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 0.83 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 0.77 (d, J = 6.6 Hz, 12H), 0.68 (t, J = 6.6 Hz, 3H), 0.54 (d, J = 6.5 Hz, 3H), -0.69 (t, J = 12.4 Hz, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 9.47 min; *m/z* = 1067.30 $[M + H]^+$, 1049.19 $[M + H - H_2O]^+$, 1089.67 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{57}H_{78}N_8O_{12}$: 1066.57.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Alanyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

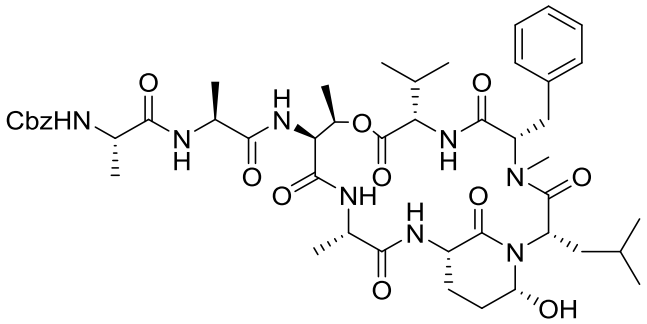


54

Die Verbindung **54** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 3.0 mg (3.2 mmol, 1.6 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 7.67 min; *m/z* =937.49 $[M + H]^+$,959.59 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{47}H_{68}N_8O_{12}$: 936.50.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L- Threonyl -L-Alanyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



25

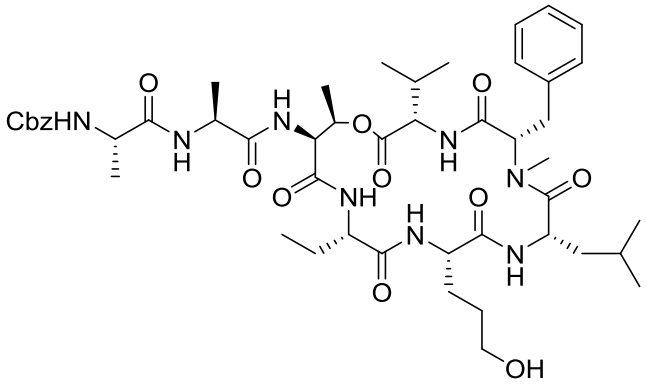
Die Verbindung **25** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.2 mg (1.3 mmol, 40.1 %; über alle Stufen: 0.6 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.81 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.44 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.40 – 7.10 (m, 12H), 5.60 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.44 – 5.38 (m, 1H), 5.13 (dt, J = 6.3, 3.6 Hz, 1H), 4.90 (d, J = 2.2 Hz, 2H), 4.65 (dd, J = 9.6, 3.4 Hz, 1H), 4.49 (dd, J = 8.6, 6.0 Hz, 2H), 4.41 (dd, J = 9.1, 5.9 Hz, 2H), 4.32 – 4.22 (m, 1H), 4.09 (q, J = 5.4 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 3.17 (d, J = 4.8

Hz, 1H), 2.89 (dd, J = 13.8, 11.2 Hz, 1H), 2.74 (s, 3H), 1.90 – 1.82 (m, 1H), 1.62 (s, 1H), 1.50 (dt, J = 10.6, 4.8 Hz, 2H), 1.22 (dd, J = 14.6, 7.0 Hz, 8H), 1.06 (dd, J = 19.5, 6.5 Hz, 6H), 0.92 (t, J = 12.9 Hz, 1H), 0.81 (dd, J = 8.7, 6.7 Hz, 6H), 0.70 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.60 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

LC-MS (ESI): t_R = 7.98 min; *m/z* = 935.23 $[M + H]^+$, 917.28 $[M + H - H_2O]^+$, 957.61 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{47}H_{66}N_8O_{12}$: 934.48.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Ethyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

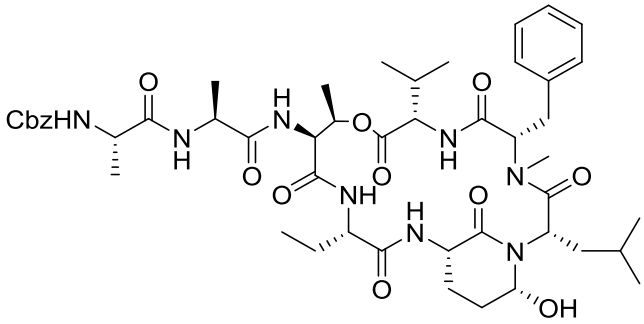


55

Die Verbindung **55** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 1.5 mg (1.6 mmol, 1.6 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 7.81 min; *m/z* =951.53 $[M + H]^+$,973.68 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{48}H_{70}N_8O_{12}$: 950.51.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Ethyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



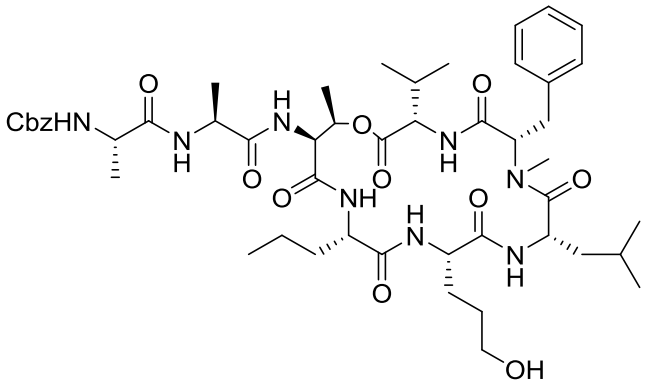
26

Die Verbindung **26** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.2 mg (1.3 mmol, 80.1 %; über alle Stufen: 1.3 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.83 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.44 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.36 – 7.09 (m, 12H), 5.42 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.91 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 4.66 (dd, J = 9.7, 3.3 Hz, 1H), 4.58 – 4.47 (m, 3H), 4.42 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.32 – 4.19 (m, 2H), 3.85 – 3.73 (m, 1H), 2.89 (dd, J = 13.9, 11.4 Hz, 1H), 2.75 (s, 3H), 1.82 (dd, J = 12.3, 6.2 Hz, 1H), 1.69 – 1.58 (m, 1H), 1.57 – 1.47 (m, 3H), 1.36 (m, 1H), 1.28 – 1.17 (m, 9H), 1.04 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.94 (m, 1H), 0.84 – 0.77 (m, 9H), 0.70 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.61 (d, J = 6.5 Hz, 3H), -0.62 (t, J = 12.4 Hz, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 8.13 min; *m/z* = 949.65 $[M + H]^+$, 931.18 $[M + H - H_2O]^+$, 971.72 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{48}H_{68}N_8O_{12}$: 948.50.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Propyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

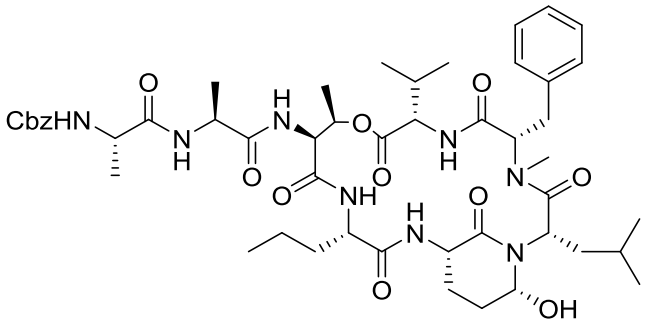


56

Die Verbindung **56** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 2.8 mg (2.9 mmol, 2.9 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.04 min; *m/z* =965.52 $[M + H]^+$,987.67 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{49}H_{72}N_8O_{12}$: 964.53.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Propyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



27

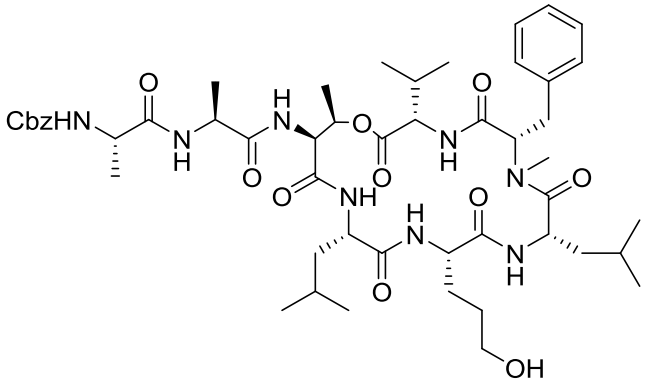
Die Verbindung **27** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.0 mg (1.0 mmol, 35.8 %; über alle Stufen: 1.0 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.84 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 8.48 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 8.12 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.39 – 7.03 (m, 13H), 5.42 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 5.10 (m, 1H), 4.90 (s, 3H), 4.66 (dd, J = 9.7, 3.3 Hz, 1H), 4.59 – 4.44 (m, 3H), 4.41 – 4.21 (m, 3H), 3.79 (dd, J = 14.1, 2.6 Hz, 1H), 2.90 (dd, J = 13.9, 11.5 Hz, 1H), 2.74 (s, 3H), 1.88 – 1.78 (m, 1H),

1.62 (m, 1H), 1.50 (dt, J = 11.1, 4.8 Hz, 2H), 1.39 (m, 2H), 1.28 – 1.18 (m, 9H), 1.05 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.99 – 0.87 (m, 1H), 0.85 – 0.76 (m, 9H), 0.69 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.60 (d, J = 6.6 Hz, 4H), -0.64 (t, J = 12.4 Hz, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 8.31 min; *m/z* = 963.18 $[M + H]^+$, 945.36 $[M + H - H_2O]^+$, 985.64 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{49}H_{70}N_8O_{12}$: 962.51.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Leucyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

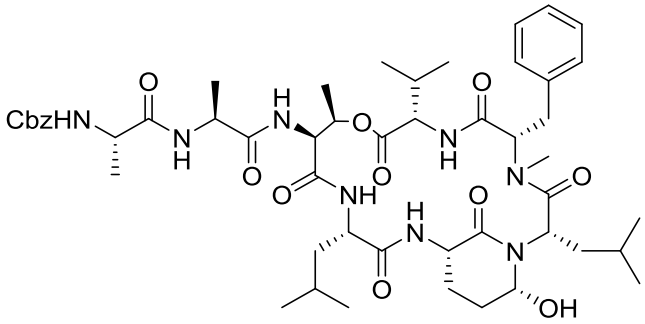


57

Die Verbindung **57** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 40.1 mg (41.0 mmol, 20.5 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.29 min; *m/z* =979.48 $[M + H]^+$, 1001.57 $[M + Na]^+$; berechnet für: $C_{50}H_{74}N_8O_{12}$: 978.54.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Leucyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



28

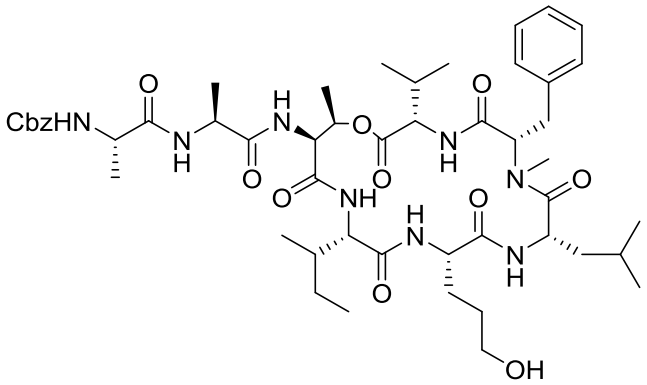
Die Verbindung **28** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 11.8 mg (12.1 mmol, 29.5 %; über alle Stufen: 6.0 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.84 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 8.54 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 8.48 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 7.38 – 7.03 (m, 11H), 5.70 – 5.48 (m, 1H), 5.45 – 5.36 (m, 1H), 5.09 (dt, J = 7.9, 5.6 Hz, 1H), 4.90 (s, 3H), 4.67 (dd, J = 9.7, 3.2 Hz, 1H), 4.58 – 4.48 (m, 3H), 4.40 – 4.21 (m, 3H), 3.84 – 3.72 (m, 1H), 2.94 – 2.87 (m, 1H), 2.75 (s, 3H), 2.45 – 2.24 (m, 2H), 1.88 – 1.78 (m, 1H), 1.65 – 1.55 (m, 1H), 1.49 (q, J = 5.8, 3.4 Hz, 2H), 1.45 – 1.32 (m, 2H), 1.31 – 1.09 (m, 8H), 1.05 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.99 – 0.73 (m, 12H), 0.69 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.58 (d, J = 6.5 Hz, 3H), -0.67 (t, J = 12.4 Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d6): δ 173.33, 173.12, 171.96, 171.18, 170.49, 169.48, 166.25, 155.37, 138.91, 136.85, 129.92, 128.67, 128.05, 127.43, 127.10, 126.39, 79.77, 73.18, 65.35, 62.35, 58.35, 55.56, 53.60, 49.27, 47.66, 47.03, 46.94, 38.86, 37.05, 30.90, 29.58, 28.72, 23.95, 23.32, 23.25, 23.17, 21.16, 19.54, 19.45, 19.17, 16.70, 15.95, 15.27.

LC-MS (ESI): t_R = 8.31 min; *m/z* = 977.13 $[M + H]^+$, 959.07 $[M + H - H_2O]^+$, 999.51 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{50}H_{72}N_8O_{12}$: 976.53.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Isoleucyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

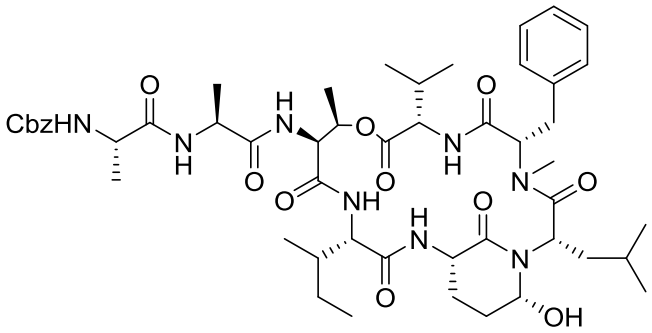


58

Die Verbindung **58** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 5.5 mg (5.6 mmol, 2.8 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.21 min; *m/z* =979.53 $[M + H]^+$, 1001.61 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{50}H_{74}N_8O_{12}$: 978.54.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Isoleucyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



29

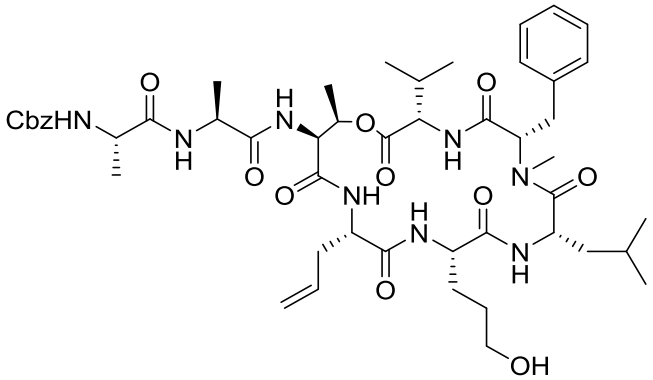
Die Verbindung **29** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 2.3 mg (2.4 mmol, 41.9 %; über alle Stufen: 1.2 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.90 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 8.04 (dd, J = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 7.42 – 7.01 (m, 12H), 5.44 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.13 – 5.04 (m, 1H), 4.91 (d, J = 5.4 Hz, 3H), 4.67 (dd, J = 9.6, 3.2 Hz, 1H), 4.59

– 4.42 (m, 4H), 4.34 – 4.23 (m, 1H), 4.11 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.84 – 3.73 (m, 1H), 2.90 (dd, J = 13.9, 11.4 Hz, 1H), 2.75 (s, 3H), 2.33 (m, 1H), 1.79 (dd, J = 12.4, 6.8 Hz, 1H), 1.55 (m, 4H), 1.34 (dqd, J = 14.7, 7.3, 3.0 Hz, 1H), 1.22 (dd, J = 18.4, 7.1 Hz, 9H), 1.04 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 1.01 – 0.86 (m, 1H), 0.78 (dt, J = 22.8, 6.8 Hz, 12H), 0.69 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.60 (d, J = 6.6 Hz, 3H), -0.62 (t, J = 12.4 Hz, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 8.63 min; *m/z* = 977.20 $[M + H]^+$, 959.25 $[M + H - H_2O]^+$, 999.61 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{50}H_{72}N_8O_{12}$: 976.53.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Allyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

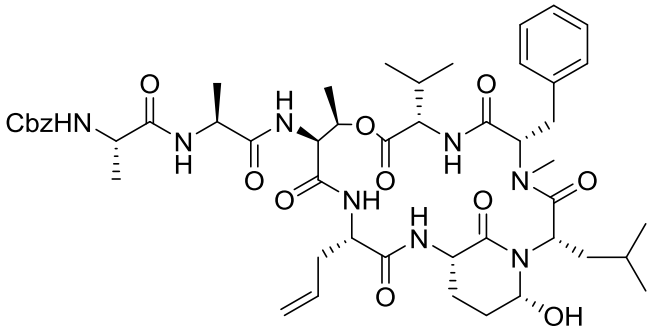


59

Die Verbindung **59** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 4.4 mg (4.6 mmol, 4.6 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 7.97 min; *m/z* =963.57 $[M + H]^+$, 985.69 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{49}H_{70}N_8O_{12}$: 962.5.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Allyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



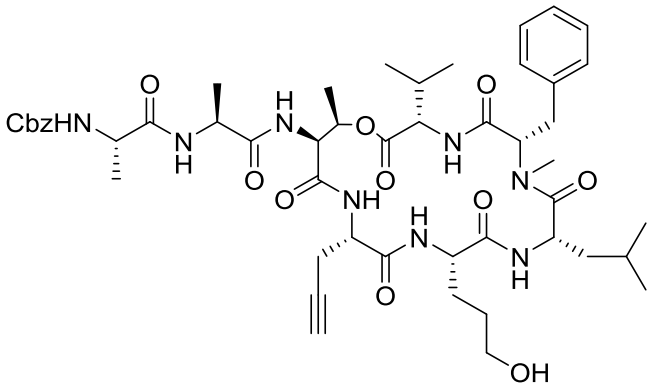
30

Die Verbindung **30** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.1 mg (1.1 mmol, 25.1 %; über alle Stufen: 1.1 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.83 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.45 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.44 – 7.01 (m, 13H), 5.62 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.42 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.16 – 5.11 (m, 1H), 5.07 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 5.04 – 4.99 (m, 2H), 4.90 (d, J = 6.0 Hz, 3H), 4.66 (dd, J = 9.7, 3.3 Hz, 1H), 4.53 – 4.47 (m, 3H), 4.38 (dd, J = 12.1, 7.9 Hz, 2H), 4.32 – 4.26 (m, 1H), 3.79 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 2.89 (dd, J = 13.8, 11.3 Hz, 1H), 2.74 (s, 3H), 2.40 – 2.07 (m, 3H), 1.86 – 1.80 (m, 1H), 1.62 (s, 1H), 1.54 – 1.44 (m, 3H), 1.20 (d, J = 7.3 Hz, 4H), 1.07 – 1.01 (m, 4H), 0.90 – 0.82 (m, 2H), 0.80 (t, J = 5.9 Hz, 7H), 0.69 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.60 (d, J = 6.5 Hz, 3H), -0.63 (t, J = 12.5 Hz, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 8.31 min; *m/z* = 961.32 $[M + H]^+$, 943.30 $[M + H - H_2O]^+$, 983.70 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{49}H_{68}N_8O_{12}$: 960.50.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Propagyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

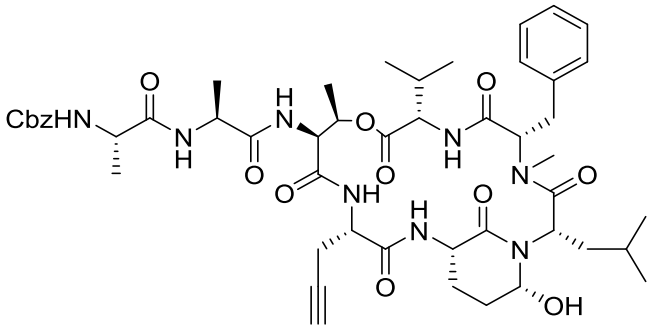


60

Die Verbindung **60** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 4.4 mg (4.6 mmol, 4.6 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 7.88 min; *m/z* =961.58 $[M + H]^+$, 983.71 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{49}H_{68}N_8O_{12}$: 960.5.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Propagyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

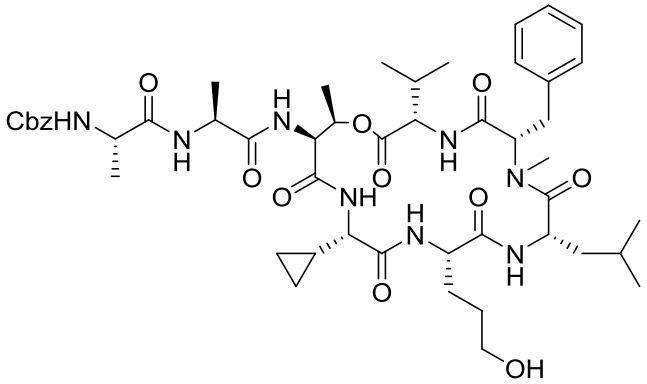


31

Die Verbindung **31** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 2.4 mg (2.5 mmol, 54.7 %; über alle Stufen: 2.5 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.23 min; *m/z* = 959.30 $[M + H]^+$, 941.21 $[M + H - H_2O]^+$, 981.69 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{49}H_{66}N_8O_{12}$: 958.48.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

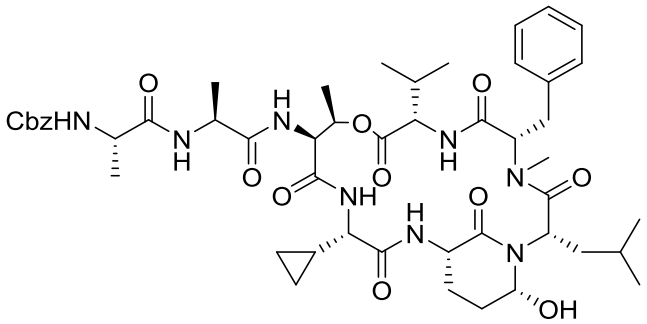


61

Die Verbindung **61** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 2.7 mg (2.8 mmol, 2.8 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 7.88 min; *m/z* =963.59 $[M + H]^+$, 985.66 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{49}H_{70}N_8O_{12}$: 962.51.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



32

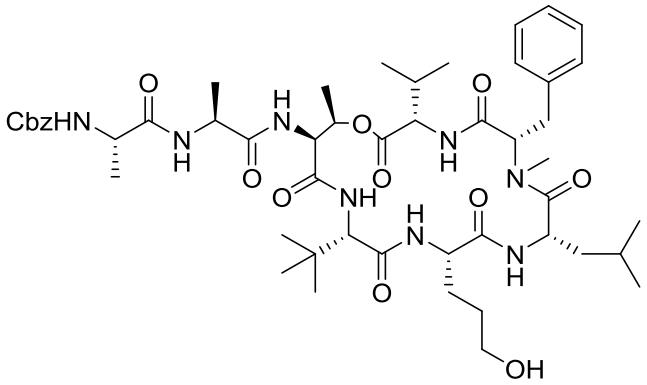
Die Verbindung **32** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 2.0 mg (2.1 mmol, 74.2 %; über alle Stufen: 2.1 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.80 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.45 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.26 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.41 – 7.02 (m, 12H), 5.69 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.41 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 5.13 – 5.05 (m, 1H), 4.92 – 4.82 (m, 3H), 4.64 (dd, J = 9.7,

3.3 Hz, 1H), 4.61 – 4.42 (m, 3H), 4.40 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.32 – 4.21 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.79 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 2.89 (dd, J = 14.0, 11.4 Hz, 1H), 2.73 (s, 4H), 2.44 – 2.22 (m, 1H), 1.78 (dd, J = 12.4, 6.4 Hz, 1H), 1.66 – 1.44 (m, 2H), 1.20 (d, J = 7.2 Hz, 5H), 1.04 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.99 – 0.82 (m, 2H), 0.78 (dd, J = 6.8, 3.9 Hz, 7H), 0.68 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.60 (d, J = 6.6 Hz, 4H), 0.45 – 0.29 (m, 3H), 0.13 (m, 1H), -0.63 (t, J = 12.4 Hz, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 8.14 min; *m/z* = 961.31 $[M + H]^+$, 943.27 $[M + H - H_2O]^+$, 983.70 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{49}H_{66}N_8O_{12}$: 960.50.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-tert.-Butyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

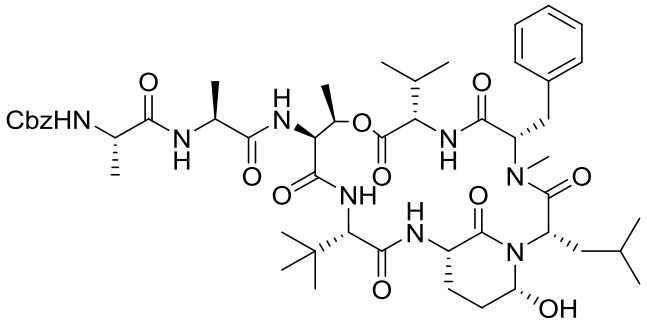


62

Die Verbindung **62** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 5.9 mg (6.0 mmol, 6.0 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.21 min; *m/z* =979.57 $[M + H]^+$, 1001.79 $[M + Na]^+$; berechnet für: $C_{50}H_{74}N_8O_{12}$: 978.54.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-tert.-Butyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



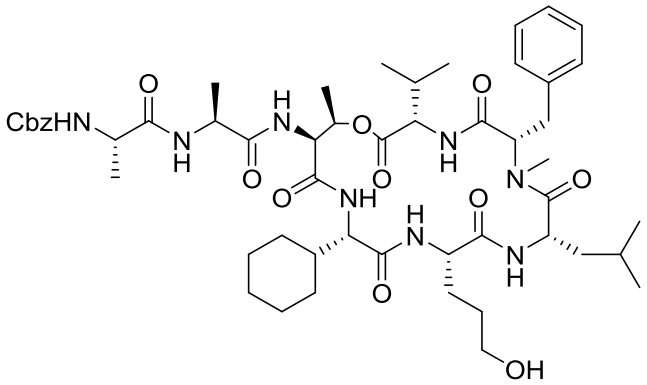
33

Die Verbindung **33** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.4 mg (1.4 mmol, 23.8 %; über alle Stufen: 1.4 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.89 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.53 – 8.45 (m, 2H), 7.94 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 7.50 – 7.44 (m, 1H), 7.41 – 7.05 (m, 11H), 5.66 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 5.12 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 5.03 (s, 1H), 4.89 (d, J = 14.1 Hz, 3H), 4.66 (dd, J = 9.7, 3.2 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 4.57 – 4.48 (m, 2H), 4.28 (q, J = 8.4, 7.6 Hz, 1H), 4.19 – 4.14 (m, 1H), 3.78 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 2.96 – 2.84 (m, 1H), 2.75 (d, J = 1.4 Hz, 3H), 2.36 – 2.24 (m, 1H), 1.76 (dd, J = 12.1, 7.1 Hz, 1H), 1.68 (d, J = 26.3 Hz, 2H), 1.51 (m, 3H), 1.21 (d, J = 7.6 Hz, 4H), 1.06 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.85 (s, 11H), 0.80 (dd, J = 6.8, 2.7 Hz, 6H), 0.69 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.62 (d, J = 6.6 Hz, 3H), -0.60 (t, J = 12.4 Hz, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 8.55 min; *m/z* = 977.43 $[M + H]^+$, 959.33 $[M + H - H_2O]^+$, 999.78 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{50}H72N_8O_{12}$: 976.53.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclohexyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

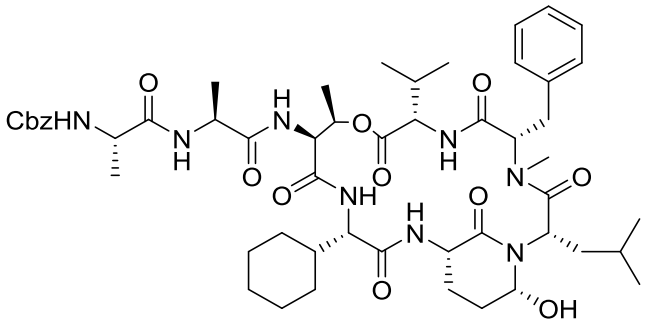


63

Die Verbindung **63** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 6.5 mg (6.5 mmol, 6.5 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.47 min; *m/z* =1005.67 $[M + H]^+$, 1027.74 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{52}H_{76}N_8O_{12}$: 1004.56.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclohexyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Leucyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



34

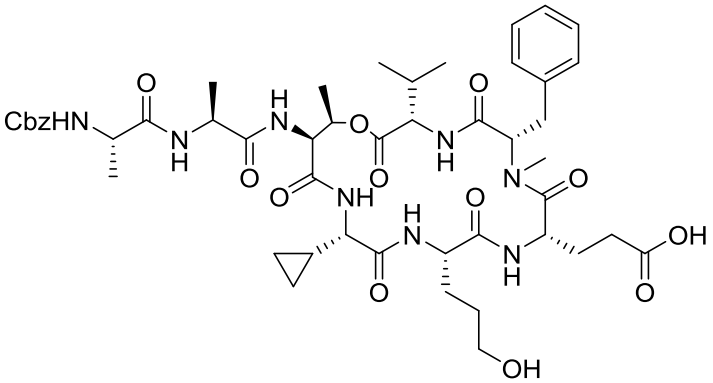
Die Verbindung **34** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 2.9 mg (2.9 mmol, 44.7 %; über alle Stufen: 2.9 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.86 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.51 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.38 – 7.02 (m, 12H), 5.65 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 5.42 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 5.10 (m, 1H), 4.90 (s, 3H), 4.66 (dd, J = 9.7, 3.1 Hz, 1H), 4.60 – 4.42 (m, 5H), 4.34 – 4.21 (m, 1H), 4.09 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.86 – 3.74 (m, 1H),

2.95 – 2.83 (m, 1H), 2.74 (s, 3H), 2.41 – 2.26 (m, 1H), 1.80 (dd, J = 12.4, 6.7 Hz, 2H), 1.56 – 1.38 (m, 2H), 1.25 – 1.17 (m, 13H), 1.05 (t, J = 7.6 Hz, 5H), 0.97 – 0.85 (m, 2H), 0.80 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.69 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.62 (d, J = 6.6 Hz, 4H), -0.61 (t, J = 12.4 Hz, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 8.93 min; *m/z* = 1003.33 $[M + H]^+$, 985.51 $[M + H - H_2O]^+$, 1025.81 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{52}H_{74}N_8O_{12}$: 1002.54.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Glutamyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

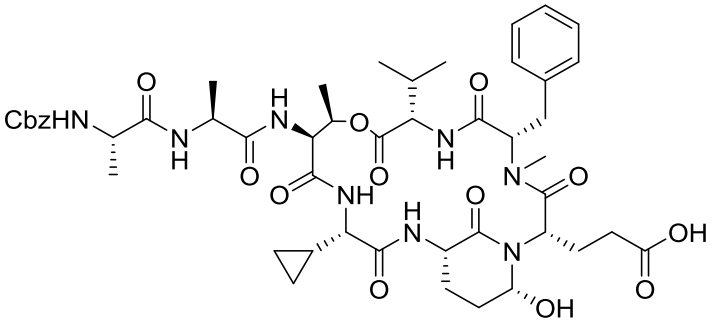


64

Die Verbindung **64** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 17 mg (17.4 mmol, 17.4 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 6.67 min; *m/z* =979.45 $[M + H]^+$, 1001.74 $[M + Na]^+$; berechnet für: $C_{48}H_{66}N_8O_{14}$: 978.47.

3.3,8-Anhydro-C$^{5.5}$,N$^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Glutamyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



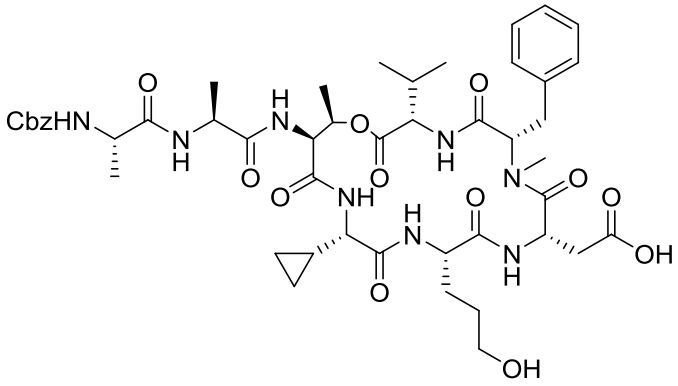
35

Die Verbindung **35** wurde mit der allgemeinen „Methode K" hergestellt. Es konnten 1.8 mg (1.8 mmol, 10.6 %; über alle Stufen: 1.8 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.29 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.24 (t, J = 9.2 Hz, 2H), 7.16 – 6.92 (m, 11H), 5.79 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.25 (dt, J = 7.4, 6.0 Hz, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.64 (dt, J = 6.5, 3.0 Hz, 2H), 4.48 (dd, J = 9.6, 4.5 Hz, 1H), 4.36 (dd, J = 9.2, 1.3 Hz, 1H), 4.27 – 4.16 (m, 3H), 3.85 (m, 1H), 3.70 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 14.2, 2.9 Hz, 1H), 2.58 (dd, J = 14.0, 11.6 Hz, 1H), 2.50 (s, 3H), 1.90 – 1.81 (m, 1H), 1.63 – 1.47 (m, 2H), 1.46 – 1.32 (m, 1H), 1.23 (dt, J = 8.6, 6.1 Hz, 2H), 0.98 (dt, J = 13.8, 7.5 Hz, 13H), 0.63 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.52 – 0.47 (m, 4H), 0.32 (m, 1H), 0.11 (m, 1H), 0.01 (m, 1H), -0.09 (m, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 7.05 min; *m/z* = 977.27 $[M + H]^+$, 959.28 $[M + H - H_2O]^+$, 999.60 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{48}H_{64}N_8O_{14}$: 976.45.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Aspartyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

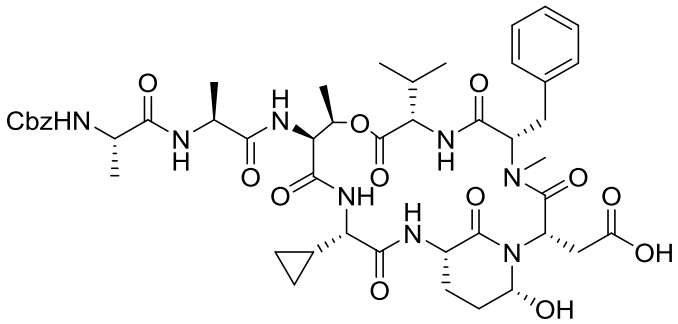


65

Die Verbindung **65** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 3 mg (3.1 mmol, 3.1 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 6.67 min; *m/z* =965.47 $[M + H]^+$, 987.59 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{47}H_{64}N_8O_{14}$: 964.45.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Aspartyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

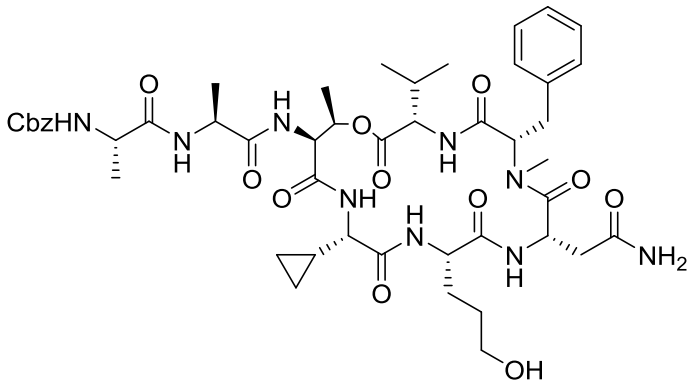


36

Die Verbindung **36** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 0.3 mg (0.3 mmol, 10.0 %; über alle Stufen: 0.3 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 7.05 min; *m/z* = 963.00 $[M + H]^+$, 945.31 $[M + H - H_2O]^+$, 985.61 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{47}H_{62}N_8O_{14}$: 962.44.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Asparaginyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

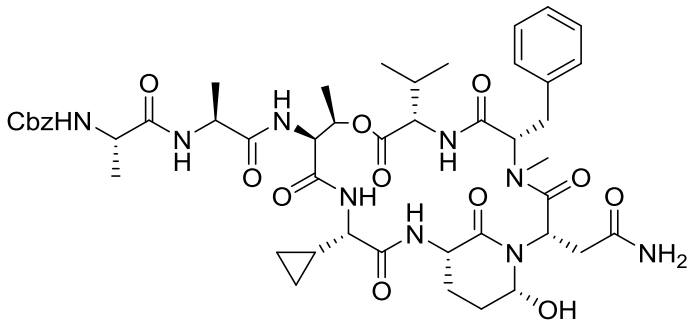


66

Die Verbindung **66** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 14.4 mg (15.0 mmol, 15.0 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 6.43 min; *m/z* =964.48 $[M + H]^+$, 986.51 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{47}H_{65}N_9O_{13}$: 963.47.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Asparaginyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



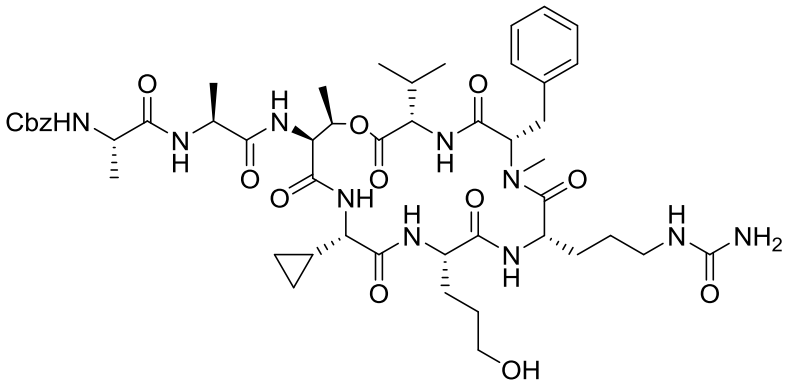
37

Die Verbindung **37** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 2.3 mg (2.4 mmol, 16.0 %; über alle Stufen: 2.4 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.27 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.17 – 6.93 (m, 12H), 6.72 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 5.68 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.26 (dt, J = 7.5, 5.9 Hz, 1H), 4.98 (m, 2H), 4.80 (s, 2H), 4.76 (t, J = 3.1 Hz, 1H), 4.48 (dd, J = 9.5, 4.3 Hz, 1H), 4.37 (dd, J = 9.2, 1.4 Hz, 1H), 4.23 (p, J = 7.1 Hz, 1H), 4.06 (ddd, J = 12.3, 9.0, 6.6 Hz, 1H), 3.86 (p, J = 7.2 Hz, 1H), 3.73 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 3.02 (dd, J = 14.0, 5.1 Hz, 1H), 2.65 (dd, J = 13.9, 9.3 Hz, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.19 (dd, J = 14.8, 9.6 Hz, 1H), 1.86 (s, 1H), 1.56 (dt, J = 15.3, 11.1 Hz, 3H), 1.25 (dd, J = 14.7, 5.4 Hz, 1H), 1.07 – 0.97 (m, 7H), 0.94 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.64 (d, J = 6.8 Hz, 4H), 0.50 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.33 (m, 1H), 0.16 – 0.07 (m, 1H), 0.01 (m, 1H), -0.09 (m, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 6.50 min; *m/z* = 962.23 $[M + H]^+$, 944.21 $[M + H - H_2O]^+$, 984.55 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{47}H_{63}N_9O_{13}$: 961.45.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Citrullyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

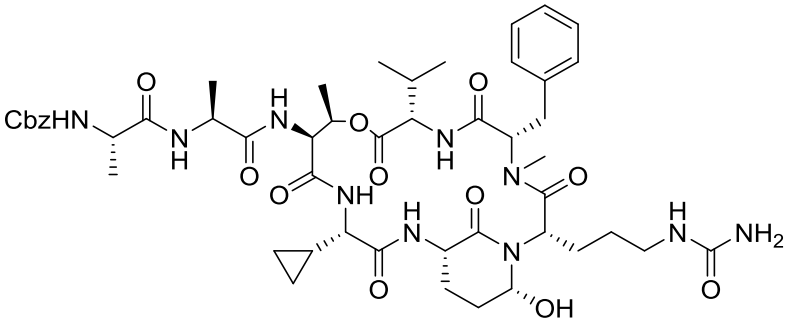


67

Die Verbindung **67** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 3.0 mg (3.0 mmol, 3.0 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 6.45 min; *m/z* =1007.45 $[M + H]^+$, 1029.61 $[M + Na]^+$; berechnet für: $C_{49}H_{70}N_{10}O_{13}$: 1006.51.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-Citrullyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



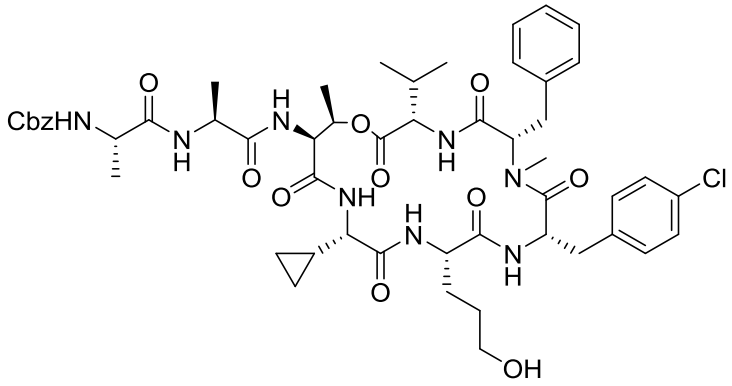
38

Die Verbindung **38** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 1.1 mg (1.1 mmol, 36.7 %; über alle Stufen: 1.1 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.53 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.05 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.51 – 7.43 (m, 2H), 7.44 – 7.14 (m, 11H), 5.99 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.50 (m, 1H), 5.34 (d, J = 10.1 Hz, 2H), 5.01 (d, J = 4.0 Hz, 3H), 4.95 – 4.86 (m, 2H), 4.72 (dd, J = 9.5, 4.4 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 4.42 (m, 3H), 4.08 (m, 2H), 3.94 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 2.88 – 2.76 (m, 1H), 2.72 (s, 3H), 2.67 (m, 3H), 2.33 (m, J = 1.9 Hz, 1H), 2.22 – 2.03 (m, 1H), 1.75 (dd, J = 17.8, 11.0 Hz, 3H), 1.22 (dt, J = 13.0, 7.4 Hz, 11H), 1.09 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 0.84 (dd, J = 17.5, 6.8 Hz, 6H), 0.72 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.55 (td, J = 8.6, 4.0 Hz, 2H), 0.35 (m, 2H), 0.23 (m, 1H), 0.14 (m, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 6.38 min; *m/z* = 1005.33 $[M + H]^+$, 987.42 $[M + H - H_2O]^+$, 1027.64 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{49}H_{68}N_{10}O_{13}$: 1004.50.

3.3,8-Anhydro(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-4-Chloro-Phenylalanyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)

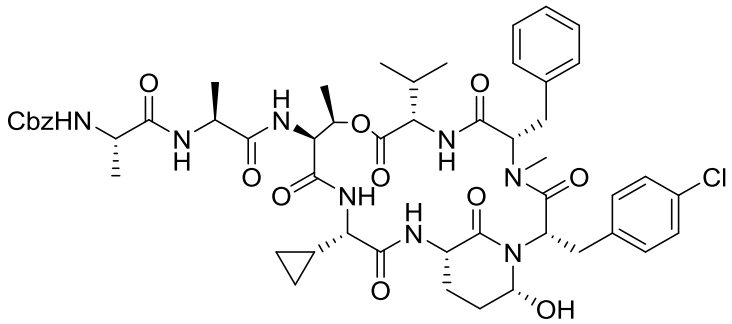


68

Die Verbindung **68** wurde mit der allgemeinen „Methode J“ synthetisiert. Es konnten 3.5 mg (3.4 mmol, 3.4 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

LC-MS (ESI): t_R = 8.41 min; *m/z* =1031.56 $[M + H]^+$, 1053.63 $[M + Na]^+$;
berechnet für: $C_{52}H_{67}ClN_8O_{12}$: 1030.46.

3.3,8-Anhydro-$C^{5.5}$,$N^{2.6}$-Cyclo(Benzoxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Threonyl-L-Cyclopropyl-Glycyl-L-5-Hydroxy-Norvalyl-L-4-Chloro-Phenylalanyl-L-N-Methyl-Alanyl-L-Valin)



39

Die Verbindung **39** wurde mit der allgemeinen „Methode K“ hergestellt. Es konnten 0.5 mg (0.5 mmol, 14.3 %; über alle Stufen: 0.5 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.49 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.50 – 7.18 (m, 14H), 7.06 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.82 – 6.75 (m, 2H), 6.07 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 5.42 (q, J = 6.6 Hz, 1H), 5.05 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.92 (dd, J =

11.5, 2.9 Hz, 1H), 4.73 – 4.63 (m, 2H), 4.55 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 4.45 (p, J = 7.0 Hz, 1H), 4.08 (m, 1H), 3.80 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 3.68 (dt, J = 12.1, 8.4 Hz, 1H), 3.14 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 2.90 – 2.81 (m, 1H), 2.79 (s, 3H), 2.44 – 2.30 (m, 1H), 2.08 (h, J = 6.9 Hz, 1H), 1.64 (dt, J = 24.6, 16.9 Hz, 3H), 1.26 – 1.19 (m, 8H), 1.16 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.90 – 0.84 (m, 3H), 0.76 – 0.70 (m, 4H), 0.51 (m, 1H), 0.31 (m, 1H), 0.20 (dt, J = 9.8, 4.8 Hz, 1H), 0.09 (dt, J = 9.7, 4.9 Hz, 1H).

LC-MS (ESI): t_R = 6.51 min; *m/z* = 1029.02 $[M + H]^+$, 1011.39 $[M + H - H_2O]^+$, 1051.63 $[M + Na]^+$, berechnet für $C_{52}H_{65}ClN_8O_{12}$: 1028.44.

8 Literaturverzeichnis

[1] M. J. Page, E. Di Cera, *Serine peptidases*, *Cellular and molecular life sciences* **2008**, *65*, 1220.

[2] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, A. Bateman, *Asparagine peptide lyases*, *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 38321.

[3] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, R. Finn, *Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*, *Nucleic acids research* **2016**, *44*, D343-50.

[4] J. C. Powers, J. L. Asgian, Ö. D. Ekici, K. E. James, *Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases*, *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 4639.

[5] P. W. Serruys, P. Vranckx, K. Allikmets, *Clinical development of bivalirudin (Angiox)*, *International journal of clinical practice* **2006**, *60*, 344.

[6] *Thrombin-specific anticoagulation with bivalirudin versus heparin in patients receiving fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction*, *The Lancet* **2001**, *358*, 1855.

[7] T. Clausen, M. Kaiser, R. Huber, M. Ehrmann, *HTRA proteases*, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2011**, *12*, 152.

[8] F. E. Koehn, G. T. Carter, *The evolving role of natural products in drug discovery*, *Nature reviews. Drug discovery* **2005**, *4*, 206.

[9] A. Y. Lee, T. A. Smitka, R. Bonjouklian, J. Clardy, *Atomic structure of the trypsin-A90720A complex*, *Chemistry & biology* **1994**, *1*, 113.

[10] M. Murakami, S. Kodani, K. Ishida, H. Matsuda, K. Yamaguchi, *Micropeptin 103, a Chymotrypsin Inhibitor from the Cyanobacterium Microcystis viridis (NIES-103)*, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 3035.

[11] U. Matern, C. Schleberger, S. Jelakovic, J. Weckesser, G. E. Schulz, *Binding structure of elastase inhibitor scyptolin A*, *Chemistry & biology* **2003**, *10*, 997.

[12] F. Yokokawa, T. Shioiri, *Total synthesis of somamide A, an Ahp (3-amino-6-hydroxy-2-piperidone)-containing cyclic depsipeptide*, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 8673.

[13] K. Viehrig, F. Surup, K. Harmrolfs, R. Jansen, B. Kunze, R. Müller, *Concerted action of P450 plus helper protein to form the amino-hydroxy-piperidone moiety of the potent protease inhibitor crocapeptin*, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 16885.

[14] S. C. Stolze, M. Meltzer, M. Ehrmann, M. Kaiser, *Solid phase total synthesis of the 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp) cyclodepsipeptide and protease inhibitor Symplocamide A*, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2010**, *46*, 8857.

[15] L. Hedstrom, *Serine Protease Mechanism and Specificity*, *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 4501.

[16] H. Neurath, *Evolution of proteolytic enzymes*, *Science* **1984**, *224*, 350.

[17] S. R. Coughlin, *Thrombin signalling and protease-activated receptors*, *Nature* **2000**, *407*, 258.

[18] O. D. Ekici, M. Paetzel, R. E. Dalbey, *Unconventional serine proteases*, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2008**, *17*, 2023.

[19] R. B. Sim, A. Laich, *Serine proteases of the complement system*, *Biochemical Society Transactions* **2000**, *28*, 545.

[20] D. Collen, H. R. Lijnen, E. F. Plow, *The fibrinolytic system in man*, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **1986**, *4*, 249.

[21] E. Di Cera, *Serine proteases*, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology life* **2009**, *61*, 510.

[22] G. Schoellmann, E. Shaw, *Direct Evidence for the Presence of Histidine in the Active Center of Chymotrypsin **, *Biochemistry* **2002**, *2*, 252.

[23] D. M. Blow, *The tortuous story of Asp…His…Ser*, *Trends in Biochemical Sciences* **1997**, *22*, 405.

[24] G. Dodson, *Catalytic triads and their relatives*, *Trends in Biochemical Sciences* **1998**, *23*, 347.

[25] A. R. Buller, C. A. Townsend, *Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, E653-61.

[26] N. M. Hooper, *Proteases*, *Essays In Biochemistry* **2002**, *38*, 1.

[27] B. Turk, *Targeting proteases*, *Nature reviews. Drug discovery* **2006**, *5*, 785.

[28] H. Cheng, N. V. Grishin, *DOM-fold*, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2005**, *14*, 1902.

[29] D. R. Hendrixson, J. Qiu, S. C. Shewry, D. L. Fink, S. Petty, E. N. Baker, A. G. Plaut, J. W. St. Geme, *Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine-rich sites*, *Molecular Microbiology* **2003**, *47*, 607.

[30] N. D. Rawlings, F. R. Morton, C. Y. Kok, J. Kong, A. J. Barrett, *MEROPS*, *Nucleic acids research* **2008**, *36*, D320-5.

[31] B. Walker, J. F. Lynas, *Strategies for the inhibition of serine proteases*, *Cellular and molecular life sciences* **2001**, *58*, 596.

[32] L. A. Lamden, F. A. Bartlett, *Aminoalkylphosphonofluoridate derivatives*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1983**, *112*, 1085.

[33] J. Oleksyszyn, J. C. Powers, *Irreversible inhibition of serine proteases by peptide derivatives of (.alpha.-aminoalkyl)phosphonate diphenyl esters*, *Biochemistry* **2002**, *30*, 485.

[34] T. L. Poulos, R. A. Alden, S. T. Freer, J. J. Birktoft, J. Kraut, *Polypeptide Halomethyl Ketones Bind to Serine Proteases as Analogs of the Tetrahedral Intermediate*, *Journal of Biological Chemistry* **1976**, *251*, 1097.

[35] J. C. Powers in *Methods in Enzymology*, Elsevier, **1977**, pp. 197–208.

[36] W. An-Zhi, I. Mayr, W. Bode, *The refined 2.3 Å crystal structure of human leukocyte elastase in a complex with a valine chloromethyl ketone inhibitor*, *Federation of the European Biochemical Societies Letters* **1988**, *234*, 367.

[37] Matthews D. A., Alden R. A., Birktoft J. J., Freer S. T. and, *X-ray crystallographic study of boronic acid adducts with subtilisin BPN' (Novo)*, *Journal of Biological Chemistry*, *1975*, 7120.

[38] E. Tsilikounas, C. A. Kettner, W. W. Bachovchin, *Identification of serine and histidine adducts in complexes of trypsin and trypsinogen with peptide and nonpeptide boronic acid inhibitors by proton NMR spectroscopy*, *Biochemistry* **2002**, *31*, 12839.

[39] Kettner, C. A. and Shevni A. B., *Inhibition of the serine Inhibition of the serine proteases leukocyte elastase, pancreatic elastase, cathepsin G and chymotrypsin by peptide boronic acids*, *Journal of Biological Chemistry* **259**, *1984*, 5106.

[40] K. Ersmark, J. R. Del Valle, S. Hanessian, *Aeruginosine*, *Angewandte Chemie* **2008**, *120*, 1220.

[41] B. E. Maryanoff, H.-C. Zhang, M. N. Greco, K. A. Glover, J. A. Kauffman, P. Andrade-Gordon, *Cyclotheonamide derivatives*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1995**, *3*, 1025.

[42] Y. Nakao, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Three more cyclotheonamides, C, D, and E, potent thrombin inhibitors from the marine sponge Theonella swinhoei*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1995**, *3*, 1115.

[43] S. D. Lewis, A. S. Ng, J. J. Baldwin, N. Fusetani, A. M. Naylor, J. A. Shafer, *Inhibition of thrombin and other trypsin-like serine proteinases by cyclotheonamide A*, *Thrombosis Research* **1993**, *70*, 173.

[44] M. Issac, M. Aknin, A. Gauvin-Bialecki, N. de Voogd, A. Ledoux, M. Frederich, Y. Kashman, S. Carmeli, *Cyclotheonellazoles A-C, Potent Protease Inhibitors from the Marine Sponge Theonella aff. swinhoei*, *Journal of natural products* **2017**, *80*, 1110.

[45] H. I. Baumann, S. Keller, F. E. Wolter, G. J. Nicholson, G. Jung, R. D. Süssmuth, F. Jüttner, *Planktocyclin, a cyclooctapeptide protease inhibitor produced by the freshwater cyanobacterium Planktothrix rubescens*, *Journal of natural products* **2007**, *70*, 1611.

[46] R. Salah El Dine, A. R. Abdel Monem, A. M. El-Halawany, M. Hattori, E. Abdel-Sattar, *HCV-NS3/4A protease inhibitory iridoid glucosides and dimeric*

foliamenthoic acid derivatives from Anarrhinum orientale, *Journal of natural products* **2011**, *74*, 943.

[47] A. Jedinák, T. Maliar, D. Grancai, M. Nagy, *Inhibition activities of natural products on serine proteases*, *Phytotherapy research* **2006**, *20*, 214.

[48] J. W. Harper, K. Hemmi, J. C. Powers, *Reaction of serine proteases with substituted isocoumarins*, *Biochemistry* **2002**, *24*, 1831.

[49] J. C. Powers, C.-M. Kam in *Methods in Enzymology*, Elsevier, **1994**, pp. 442–457.

[50] R. R. Yocum, R. Rasmussen, L. Strominger, *The Mechanism of Action of Penicillin*, *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255*, 3977.

[51] L. C. Chan, L. Basuino, B. Diep, S. Hamilton, S. S. Chatterjee, H. F. Chambers, *Ceftobiprole- and ceftaroline-resistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2015**, *59*, 2960.

[52] W. B. Knight, A. L. Maycock, B. G. Green, B. M. Ashe, P. Gale, H. Weston, P. E. Finke, W. K. Hagmann, S. K. Shah, J. B. Doherty, *Mechanism of inhibition of human leukocyte elastase by two cephalosporin derivatives*, *Biochemistry* **2002**, *31*, 4980.

[53] M. Drag, G. S. Salvesen, *Emerging principles in protease-based drug discovery*, *Nature reviews. Drug discovery* **2010**, *9*, 690.

[54] R. Baggio, Y. Q. Shi, Y. Q. Wu, Abeles, *From good substrates to good inhibitors*, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3351.

[55] R. C. Thompson, E. R. Blout, *Evidence for an Extended Active Center in Elastase*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1970**, *67*, 1734.

[56] J. J. Perona, C. S. Craik, *Structural basis of substrate specificity in the serine proteases*, *Protein science : a publication of the Protein Society* **1995**, *4*, 337.

[57] R. L. Stein, A. M. Strimpler, H. Hori, J. C. Powers, *Catalysis by human leukocyte elastase*, *Biochemistry* **2002**, *26*, 1305.

[58] M. J. Page, E. Di Cera, *Evolution of peptidase diversity*, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 30010.

[59] T. Clausen, C. Southan, M. Ehrmann, *The HtrA Family of Proteases*, *Molecular Cell* **2002**, *10*, 443.

[60] G. Hansen, R. Hilgenfeld, *Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response*, *Cellular and molecular life sciences* **2013**, *70*, 761.

[61] T. Clausen, C. Southan, M. Ehrmann, *The HtrA family of proteases*, *Molecular Cell* **2002**, *10*, 443.

[62] Z. Songyang, *Recognition of Unique Carboxyl-Terminal Motifs by Distinct PDZ Domains*, *Science* **1997**, *275*, 73.

[63] J. Chien, M. Campioni, V. Shridhar, A. Baldi, *HtrA Serine Proteases as Potential Therapeutic Targets in Cancer*, *Current Cancer Drug Targets* **2009**, *9*, 451.

[64] H. R. Coleman, C.-C. Chan, F. L. Ferris, E. Y. Chew, *Age-related macular degeneration*, *The Lancet* **2008**, *372*, 1835.

[65] J. M. Milner, A. Patel, A. D. Rowan, *Emerging roles of serine proteinases in tissue turnover in arthritis*, *Arthritis and rheumatism* **2008**, *58*, 3644.

[66] S. I. Hu, M. Carozza, M. Klein, P. Nantermet, D. Luk, R. M. Crowl, *Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage*, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 34406.

[67] L. Cilenti, Y. Lee, S. Hess, S. Srinivasula, K. M. Park, D. Junqueira, H. Davis, J. V. Bonventre, E. S. Alnemri, A. S. Zervos, *Characterization of a novel and specific inhibitor for the pro-apoptotic protease Omi/HtrA2*, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 11489.

[68] J. B. Baell, G. A. Holloway, *New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays*, *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 2719.

[69] S. Grau, A. Baldi, R. Bussani, X. Tian, R. Stefanescu, M. Przybylski, P. Richards, S. A. Jones, V. Shridhar, T. Clausen et al., *Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 6021.

[70] R. B. Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149.

[71] M. Stawikowski, G. B. Fields, *Introduction to peptide synthesis*, *Current protocols in protein science* **2012**, *Chapter 18*, Unit 18.1.

[72] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis*, *Molecular Biotechnology* **2006**, *33*, 239.

[73] P. D. White, W. C. Chan (Eds.) *The practical approach series*, *Vol. 222*, Oxford University Press, New York, **2000**.

[74] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides*. *Chemistry and biology*, WILEY-VCH, Weinheim, **2009**.

[75] B. S. Jursic, Z. Zdravkovski, *A Simple Preparation of Amides from Acids and Amines by Heating of Their Mixture*, *Synthetic Communications* **1993**, *23*, 2761.

[76] E. Valeur, M. Bradley, *Amide bond formation*, *Chemical Society reviews* **2009**, *38*, 606.

[77] A. El-Faham, F. Albericio, *Peptide coupling reagents, more than a letter soup*, *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 6557.

[78] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *A New Method of Forming Peptide Bonds*, *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77*, 1067.

[79] J. R. Vaughan, R. L. Osato, *Preparation of Peptides Using Mixed Carboxylic Acid Anhydrides*, *Journal of the American Chemical Society* **1951**, *73*, 5553.

[80] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge et al., *The uronium/guanidinium Peptide coupling reagents*, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2002**, *41*, 441.

[81] C. G. Fields, D. H. Lloyd, R. L. Macdonald, K. M. Otteson, R. L. Noble, *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis*, *Peptide research* **1991**, *4*, 95.

[82] M. Bodanszky, J. Martinez, *Side Reactions in Peptide Synthesis*, *Synthesis* **1981**, *1981*, 333.

[83] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis 1*, *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 9678.

[84] E. Gross, J. Meienhofer, *Major Methods of Peptide Bond Formation*. *The Peptides Analysis, Synthesis, Biology, Volume 1*, Elsevier Science, Burlington, **1979**.

[85] F. Weygand, A. Prox, W. König, *Racemisierung bei Peptidsynthesen*, *Chemische Berichte* **1966**, *99*, 1451.

[86] W. König, R. Geiger, *Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden*, *Chemische Berichte* **1970**, *103*, 788.

[87] G. Windridge, E. C. Jorgensen, *1-Hydroxybenzotriazole as a racemization-suppressing reagent for the incorporation of im-benzyl-L-histidine into peptides*, *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 6318.

[88] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents*, *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 2279.

[89] L. A. Carpino, J. Xia, A. El-Faham, *3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-5-azabenzo-1,2,3-triazene*, *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 54.

[90] T. Miyazawa, T. Otomatsu, Y. Fukui, T. Yamada, S. Kuwata, *Racemization-free and efficient peptide synthesis by the carbodiimide method using 1-hydroxybenzotriazole and copper(II) chloride simultaneously as additives*, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1988**, 419.

[91] G. Gawne, G. W. Kenner, R. C. Sheppard, *Acyloxyphosphonium salts as acylating agents. Synthesis of peptides*, *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91*, 5669.

[92] J. Coste, E. Frerot, P. Jouin, *Coupling N-Methylated Amino Acids Using PyBroP and PyCloP Halogenophosphonium Salts*, *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 2437.

[93] J. Diago-Meseguer, A. L. Palomo-Coll, J. R. Fernández-Lizarbe, A. Zugaza-Bilbao, *A New Reagent for Activating Carboxyl Groups; Preparation and Reactions of N,N -Bis[2-oxo-3-ox-azolidinyl]phosphorodiamidic Chloride*, *Synthesis* **1980**, *1980*, 547.

[94] P. J. H. Scott (Ed.) *Linker strategies in solid-phase organic synthesis*, Wiley, Chichester, West Sussex, **2010**.

[95] C. Farre, M. Lansalot, R. Bazzi, S. Roux, C. A. Marquette, G. Catanante, L. J. Blum, N. Charvet, C. Louis, C. Chaix, *Automated oligonucleotide solid-phase synthesis on nanosized silica particles using nano-on-micro assembled particle supports*, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2010**, *26*, 4941.

[96] E. Bayer, *Towards the Chemical Synthesis of Proteins*, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **1991**, *30*, 113.

[97] M. Meldal, *Pega*, *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 3077.

[98] M. Kempe, G. Barany, *CLEAR*, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 7083.

[99] V. Mäde, S. Els-Heindl, A. G. Beck-Sickinger, *Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides*, *Beilstein journal of organic chemistry* **2014**, *10*, 1197.

[100] S.-S. Wang, *p -Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p -Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments*, *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95*, 1328.

[101] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Peptide synthesis by a combination of solid-phase and solution methods I*, *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 4005.

[102] K. C. Nicolaou, R. Hanko, W. Hartwig (Eds.) *Handbook of Combinatorial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, **2002**.

[103] S. Bräse, S. Dahmen in *Handbook of Combinatorial Chemistry* (Eds.: K. C. Nicolaou, R. Hanko, W. Hartwig), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, **2002**, pp. 59–169.

[104] C. Rosenbaum, H. Waldmann, *Solid phase synthesis of cyclic peptides by oxidative cyclative cleavage of an aryl hydrazide linker—synthesis of stylostatin 1*, *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 5677.

[105] K. S. Kumar, V. N. Rajasekharan Pillai, *Synthesis of peptide-N-alkylamides on a new PS-TTEGDA polymer support using photolabile anchoring group*, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 10437.

[106] J. Weiler, *Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays*, *Nucleic acids research* **1997**, *25*, 2792.

[107]U. Grether, H. Waldmann, *An Enzyme-Labile Safety Catch Linker for Synthesis on a Soluble Polymeric Support*, *Chemistry* **2001**, *7*, 959.

[108]K. Hsieh, M. Demaine, S. Gurusidaiah, *Side reactions in solid-phase peptide synthesis and their applications*, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1996**, *48*, 292.

[109]A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Amino acid-protecting groups*, *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 2455.

[110]G. B. Fields, R. L. Nobel, *Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids*, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1990**, *35*, 161.

[111]J. J. Díaz-Mochón, L. Bialy, M. Bradley, *Full orthogonality between Dde and Fmoc*, *Organic letters* **2004**, *6*, 1127.

[112]B. Briand, N. Kotzur, V. Hagen, M. Beyermann, *A new photolabile carboxyl protecting group for native chemical ligation*, *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 85.

[113]G. R. Pettit, Y. Kamano, C. L. Herald, C. Dufresne, R. L. Cerny, D. L. Herald, J. M. Schmidt, H. Kizu, *Antineoplastic agent. 174. Isolation and structure of the cytostatic depsipeptide dolastatin 13 from the sea hare Dolabella auricularia*, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 5015.

[114]T. M. Gosliner, D. W. Behrens, G. C. Williams, *Coral Reef Animals of the Indo-Pacific*, Sea Challengers, Monterey, California, **1996**.

[115]R. Bonjouklian, T. A. Smitka, A. H. Hunt, J. L. Occolowitz, T. J. Perun, L. Doolin, S. Stevenson, L. Knauss, R. Wijayaratne, S. Szewczyk et al., *A90720A, a serine protease inhibitor isolated from a terrestrial blue-green alga Microchaete loktakensis*, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 395.

[116]E. von Elert, L. Oberer, P. Merkel, T. Huhn, J. F. Blom, *Cyanopeptolin 954, a chlorine-containing chymotrypsin inhibitor of Microcystis aeruginosa NIVA Cya 43*, *Journal of natural products* **2005**, *68*, 1324.

[117]H.-S. Kang, A. Krunic, J. Orjala, *Stigonemapeptin, an Ahp-containing depsipeptide with elastase inhibitory activity from the bloom-forming freshwater cyanobacterium Stigonema sp*, *Journal of natural products* **2012**, *75*, 807.

[118]L. A. Salvador, K. Taori, J. S. Biggs, J. Jakoncic, D. A. Ostrov, V. J. Paul, H. Luesch, *Potent elastase inhibitors from cyanobacteria*, *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56*, 1276.

[119]F. Yokokawa, A. Inaizumi, T. Shioiri, *Synthetic studies of the cyclic depsipeptides bearing the 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp) unit. Total synthesis of the proposed structure of micropeptin T-20*, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1459.

[120]C. Jakobi, K. L. Rinehart, R. Neuber, K. Mez, J. Weckesser, *Cyanopeptolin SS, a disulphated depsipeptide from a water bloom*, *Phycologia* **1996**, *35*, 111.

[121]M. Namikoshi, K. L. Rinehart, *Bioactive compounds produced by cyanobacteria*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **1996**, *17*, 373.

[122]B. Bister, S. Keller, H. I. Baumann, G. Nicholson, S. Weist, G. Jung, R. D. Süssmuth, F. Jüttner, *Cyanopeptolin 963A, a chymotrypsin inhibitor of Microcystis PCC 7806*, *Journal of natural products* **2004**, *67*, 1755.

[123]M. Welker, H. von Döhren, *Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis*, *FEMS microbiology reviews* **2006**, *30*, 530.

[124]K. Harada, T. Mayumi, T. Shimada, K. Fujii, F. Kondo, H. D. Park, M. F. Watanabe, *Co-production of microcystins and aeruginopeptins by natural cyanobacterial bloom*, *Environmental toxicology* **2001**, *16*, 298.

[125]U. Matern, L. Oberer, R. A. Falchetto, M. Erhard, W. A. König, M. Herdman, J. Weckesser, *Scyptolin A and B, cyclic depsipeptides from axenic cultures of Scytonema hofmanni PCC 7110*, *Phytochemistry* **2001**, *58*, 1087.

[126]J. Weckesser, C. Martin, C. Jakobi, *Cyanopeptolins, depsipeptides from cyanobacteria*, *Systematic and Applied Microbiology* **1996**, *19*, 133.

[127]M. Nagarajan, V. Maruthanayagam, M. Sundararaman, *SAR analysis and bioactive potentials of freshwater and terrestrial cyanobacterial compounds*, *Journal of applied toxicology* **2013**, *33*, 313.

[128]T. Okino, S. Qi, H. Matsuda, M. Murakami, K. Yamaguchi, *Nostopeptins A and B, Elastase Inhibitors from the Cyanobacterium Nostoc minutum*, *Journal of natural products* **1997**, *60*, 158.

[129]A. I. Fernández-Llamazares, J. Spengler, F. Albericio, *Review backbone N-modified peptides*, *Biopolymers* **2015**, *104*, 435.

[130]E. Zafrir, S. Carmeli, *Micropeptins from an Israeli fishpond water bloom of the cyanobacterium Microcystis sp*, *Journal of natural products* **2010**, *73*, 352.

[131]S. Matthew, R. Ratnayake, M. A. Becerro, R. Ritson-Williams, V. J. Paul, H. Luesch, *Intramolecular modulation of serine protease inhibitor activity in a marine cyanobacterium with antifeedant properties*, *Marine drugs* **2010**, *8*, 1803.

[132]Isao Nakanishi, Takayoshi Kinoshita, Akihiro Sato, Toshiji Tada, *Structure of Porcine Pancreatic Elastase Complexed with FR901277*, *Biopolymers* **2000**, 434.

[133]M. Acemoglu, H. Hellstern, B. Riss, C. Sprecher, US 2014/0100353 A1.

[134]D. Luo, Q.-Y. Chen, H. Luesch, *Total Synthesis of the Potent Marine-Derived Elastase Inhibitor Lyngbyastatin 7 and in Vitro Biological Evaluation in Model Systems for Pulmonary Diseases*, *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, *81*, 532.

[135]P. Zhou, J. Huang, F. Tian, *Specific noncovalent interactions at protein-ligand interface*, *Current medicinal chemistry* **2012**, *19*, 226.

[136]P. Goettig, V. Magdolen, H. Brandstetter, *Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs)*, *Biochimie* **2010**, *92*, 1546.

[137]P. G. Williams, W. Y. Yoshida, R. E. Moore, V. J. Paul, *Tasipeptins A and B*, *Journal of natural products* **2003**, *66*, 620.

[138]J. Srogl, S. Voltrova, *Copper/ascorbic acid dyad as a catalytic system for selective aerobic oxidation of amines*, *Organic letters* **2009**, *11*, 843.

[139]H. Hayatsu, H. G. Khorana, *Polynucleotides. LXXII. Deoxyribooligonucleotide synthesis on a polymer support*, *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 3880.

[140]B. Neises, W. Steglich, *Einfaches Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren*, *Angewandte Chemie* **1978**, *90*, 556.

[141]M. Tsakos, E. S. Schaffert, L. L. Clement, N. L. Villadsen, T. B. Poulsen, *Ester coupling reactions--an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products*, *Natural product reports* **2015**, *32*, 605.

[142]D. P. Wang, L. C. Chang, M. T. Wang, *Stability of 4-DMAP in solution*, *Drug development and industrial pharmacy* **2001**, *27*, 997.

[143]P. D. Jeffrey, S. W. McCombie, *Homogeneous, palladium(0)-catalyzed exchange deprotection of allylic esters, carbonates and carbamates*, *The Journal of Organic Chemistry* **1982**, *47*, 587.

[144]B. Rist, M. Entzeroth, A. G. Beck-Sickinger, *From micromolar to nanomolar affinity*, *Journal of medicinal chemistry* **1998**, *41*, 117.

[145]L. Vande Walle, P. van Damme, M. Lamkanfi, X. Saelens, J. Vandekerckhove, K. Gevaert, P. Vandenabeele, *Proteome-wide Identification of HtrA2/Omi Substrates*, *Journal of proteome research* **2007**, *6*, 1006.

[146]R. O. Hynes, *Integrins*, *Cell* **2002**, *110*, 673.

[147]A. N. Tiaden, M. Breiden, A. Mirsaidi, F. A. Weber, G. Bahrenberg, S. Glanz, P. Cinelli, M. Ehrmann, P. J. Richards, *Human serine protease HTRA1 positively regulates osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mineralization of differentiating bone-forming cells through the modulation of extracellular matrix protein*, *Stem cells (Dayton, Ohio)* **2012**, *30*, 2271.

[148]H. Paul, A. J. Reginato, H. R. Schumacher, *Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid*, *Arthritis and rheumatism* **1983**, *26*, 191.

[149]*IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983*, *European journal of biochemistry* **1984**, *138*, 9.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Es wurde der empfohlene Dreibuchstabencode nach *IUPAC-IUB joint commission on bio-chemical nomenclature (JCBN)* zur abgekürzt der Aminosäuren verwendet.[149]

°C	Grad Celsius
#	Nummer
%	Prozent
µ	mikro
Abb.	Abbildung
Ahp	3-Amino-6-Hydroxy-2-Piperidon
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl
BOP-Cl	Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)Phosphinsäurechlorid
Cbz	Benzoxycarbonyl
CH	Cyclohexan
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dublett
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diispropylethylamin
DMAc	Dimethylacetamid
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

dt	Dublett von Triplett
EA	Ethylacetat
eq	Äquivalente
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	und andere (lat. et alii)
Fmoc	N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)
g	Gramm
h	Stunden (hour)
HBTU	(2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (High pressure liquid chromatography)
HTRA	High-temperature requirement A
Hz	Herz
J	Kopplungskonstante
K_i	Gleichgewichtskonstante
L	Liter
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (liquid chromatography mass spectrometry)
LM	Lösungsmittel
m	milli
M	mol/L
M	Mega
m	Multiplett
m/z	Masse pro Ladung
min	Minuten

NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
PyBrop	Bromotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett
R_f	Retentionsfaktor
rt	Raumtemperatur
s	Singulett
SPPS	Festphasensynthese von Peptiden (Solid phase peptide synthesis)
t	Triplett
Tab.	Tabelle
tert	Tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
t_R	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
β	Beta
δ	chemische Verschiebung

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Katalysezyklus einer Serinprotease mit der katalytischen Triade: His57 Asp102 Ser195.. 4

Abb. 2: Nomenklatur nach Schechter und Berger. (Modifiziert nach Turk, 2006).[27] 5

Abb. 3: Bindung des DFP an eine Serinprotease. (Modifiziert nach L. Hedstrom, 2002)[15] 7

Abb. 4: Inhibitor, der mit der S- und der S'-Seite einer Protease wechselwirken kann.[15] 7

Abb. 5: A) Mechanismus der Inhibition durch Halomethylketone ; B) Bindungsmodus eines peptidischen Halomethylketons an Elastase.[34][35] 8

Abb. 6: Phenylethanboronsäure (Kasten) und Verstärkung der Inhibition durch das His57.[31,37,38] 9

Abb. 7: Vorhergesagte Wechselwirkung des Naturstoffes Aeruginosin 298A mit der Protease Thrombin.[40] 10

Abb. 8: Transpeptidase-Inhibiton durch Cepheme; Rot: Hemmung unter Öffnung der Thiazeneinheit; Blau: Hemmung unter Erhalt der Thiazeneinheit.[52] 11

Abb. 9: Domänensstruktur ausgewählter HtrA-Familienmitglieder.[59] 13

Abb. 10: Aktivierungskaskade einer HTRA-Protease. (Modifiziert nach T. Clausen et al, 2011).[7] 14

Abb. 11: Chemische Struktur des HTRA2-Inhibitors Ucf-101.[67] 15

Abb. 12: Schematische Darstellung der Festphasensynthese eines Peptides. 17

Abb. 13: Peptidkupplungsprozess; 18

Abb. 14: Mechanismus der HBTU/HOBt-Peptidkupplung.[74] 19

Abb. 15: Kupplungsreagenzien zur Unterdrückung der Racemisierung während einer Peptidkupplungsreaktion.[77] 20

Abb. 16: Ausschnitt eines Polystyrenharzes mit unterschiedlichen Linkern.[94] 22

Abb. 17: Modellpeptid mit verschiedensten orthogonalen Schutzgruppen. 24

Abb. 18: A) Ahp-Cyclodepsipeptid Lyngbyastatin 7; B) die Ahp-Einheit (rot).[118] 25

Abb. 19: A) Micropeptin MZ859 mit Amp-Einheit; B) Actinosynneptide A (ohne Esterbindung); C) Largamide D Oxazolidin; D) FR901277. 27

Abb. 20: Bindungsmodus eines Ahp-Cyclodepsipeptides. 28

Abb. 21: Synthesestrategie zur Darstellung von Somamide A.[12] 30

Abb. 22: Modellverbindung zur Evaluierung der Ahp-Zyklisierung.[119] 31

Abb. 23: Synthese des Ahp-Vorläufer-Moleküls nach Stolze et al.[14] 32

Abb. 24: Synthese I des Ahp-Vorläufers nach Novartis AG.[133] 33

Abb. 25: Retrosynthetische Analyse zur Festphasen-basierten Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden 38

Abb. 26: Mögliche Reaktionsprodukte aus dem Aldehyd; gewünschte Ahp-Einheit, siehe Kasten 39

Abb. 27: Chemische Struktur der Ahp-Cyclodepsipeptide Tasipeptin A (1) 40

Abb. 28: Versuchte Synthese eines Ahp-Vorläufers aus Fmoc-Orn-OH nach J. Srogl et al.[138] 41

Abb. 29: Synthese des Ahp-Vorläufers aus Fmoc-Glu-OAll.. 42

Abb. 30: Beladung des 2-CTC-Harzes mit Fmoc-Hnv-OAll (3) 43

Abb. 31: Kupplung der ersten vier Aminosäurebausteine.. 43

Abb. 32: Veresterung des Threonins mit Fmoc-Val-OH. Fmoc-Val-OH. 45

Abb. 33: Kupplung von Fmoc-Me-Phe-OH sowie Fmoc-Leu-OH; Entschützung des C-Terminus. 46

Abb. 34: Zyklisierung, Abspaltung vom Harz, Oxidation und Bildung der Ahp-Einheit.. 48

Abb. 35: Leitsequenz für einen generellen Inhibitor von humanen HtrA-Proteasen auf Basis eines Ahp-Cyclodepsipeptides. 51

Abb. 36: Übersicht der chemischen Strukturen der aus der Festphasensynthese erhalten Derivate (15-20) des Phenylalanin-Scans 54

Abb. 37: Derivat der Leitsequenz mit einem β-Hydroxyleucin in Position P_2. .. 56

Abb. 38: Derivat der Leitsequenz mit einer Hydrozimtsäure statt Cbz-Phe-OH 57

Abb. 39: Synthetisiertes Ahp-Cyclodepsipeptid ohne aromatische Aminosäure in Position P_3' 60

Abb. 40: Entwurf eines kombinierten Inhibitors aus den Verbindungen 17 und 21 63

Abb. 41: Zellkultur-basierte Evaluierung der HTRA1-Inhibition. 66

Abb. 42: Konzentrationsabhängige Aktivitätshemmung von HTRA1. 66

Abb. 43: Systematische Derivatisierung der P_1-Position 69

Abb. 44: Modellierter Bindung des Ahp-Cyclodepsipeptids 14 an die Protease HTRA1. 75

Abb. 45: Derivate der Verbindung 32. 76

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über bekannte Serinproteasen.[1,21] 6

Tab. 3: Optimierung der Reaktionsbedingungen des Veresterungsschrittes 45

Tab. 4: Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Kupplung auf die N-methylierte Aminosäure von Tasipeptin A 47

Tab. 5: Biochemische Inhibitionsdaten von Tasipeptin A und B.. 50

Tab. 6: Biochemische Inhibitionsdaten der Leitsequenz 14.. 52

Tab. 7: Biochemische Inhibitonsdaten des Phenylalanin-Scans (14-20).. 55

Tab. 8: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 21. 56

Tab. 9: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 22.. 58

Tab. 10: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 23.. 60

Tab. 11: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindungen 17, 21 und 24. ... 64

Tab. 12: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindungen 25-29. 70

Tab. 13: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindungen 27, 30 und 31.. .. 71

Tab. 14: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 14, 25-27, 32 und 33. 72

Tab. 15: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 15 und 34. 74

Tab. 16: Biochemische Inhibitionsdaten der Verbindung 32, 35 bis 39. 77

9.4 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde

in der Online-Version aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Der Lebenslauf wurde

in der Online-Version aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Der Lebenslauf wurde

in der Online-Version aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Synthese von Ahp-Cyclodepsipeptiden als Inhibitoren für Serinproteasen"

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Januar 2018

9.6 Danksagung

Es gibt viele Personen, welche mich in den letzten Jahren auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Kaiser für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die hervorragende Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und die wissenschaftlichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Michael Ehrmann danke ich für die Übernahme des Koreferats, den freundlichen Umgang und für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen sowie Anstöße. Ein weiterer Dank gilt dem Vorsitzenden meines Disputationsverfahrens Herrn Prof. Dr. Gebhard Haberhauer.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung meiner Arbeit, sowie für die Möglichkeit der Mitwirkung in dem Sonderforschungsbereich 1093 „Chemie an Proteinen“.

Frau Juliana Rey, Herrn Dr. Jens Bongard und Herrn Dr. Michael Melzer muss ich ausdrücklich für die Evaluierung meiner Verbindungen danken, ohne diese wäre meine Arbeit so nicht möglich gewesen.

Für die Einarbeitung in die Festphasenpeptidsynthese danke ich Frau Dr. Yvonne Blass und Herrn Dr. Timon Mönig. Bei Herrn Dr. Daniel Krahn möchte ich mich besonders für die vielen, nicht nur wissenschaftlichen Diskussionen bedanken. Für den freundschaftlichen Umgang, die Unterstützung bei schwierigen Fragestellungen und die wissenschaftlichen Diskussionen in den letzten Jahren möchte mich bei meinen Laborpartnern Dr. Anna-Laura Schmitz, Elvan Yilmaz und Florian Schulz bedanken.

Bei Svenja Kernchen und Svenja Blaskowski möchte ich mich für die Hilfe bei bürokratischen Fragestellungen und der Bestellung von Chemikalien bedanken. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kaiser und der Arbeitsgruppe Saccà danke ich für eine stets lustige und entspannende Mittagspause, den tollen Unternehmungen sowie für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ich danke meiner gesamten Familie für die Unterschätzung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit. Dabei muss ich besonders meinen Eltern danken. Durch eure finanzielle und emotionale Unterstützung habt ihr mir immer

die Möglichkeit gegeben, das zu tun an dem ich Freude habe. Ohne euch wäre die „Mission Doktor der Chemie“ schon zu Beginn des Studiums gescheitert. Meiner Frau Mandy danke ich für die Kraft und den Zuspruch, den sie mir in schwierigen Phasen gegeben hat. Du hast einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen ehemaligen Studienkollegen, vor allem Alexander Heinemann und Dr. Christian Erdmann und den Mitgliedern des Jungchemikerforums Essen-Duisburg danke ich für die zahlreichen Unternehmungen und Urlaube während der Doktorarbeit und des Chemiestudiums. Anschließend möchte ich mich bei meinen Freunden außerhalb der Universität bedanken, besonders bei Stephan Zitzler, dass sie mich unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Freuden hatten. Zum Schluss möchte mich bei Dr. Anastasios Sykoudis für die stetige Zuversicht bedanken.