

Synthese und Testung neuartiger depsipeptidischer und cyclodepsipeptidischer Antituberkulotika

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Katja Laqua
geb. am 14. August 1984 in Magdeburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter Imming
2. Prof. Dr. Bodo Dobner
3. Prof. Dr. Martin Schlitzer

verteidigt am 22. April 2015

FÜR MEINE ELTERN!

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iii
Abbildungsverzeichnis.....	v
Tabellenverzeichnis.....	vii
1 Tuberkulose und antimykobakterielle Arzneistoffentwicklung.....	1
1.1 Tuberkulose.....	1
1.2 Mycobacterium tuberculosis.....	1
1.3 Sonderfall mykobakterielle Zellwand.....	3
1.4 Therapie der Tuberkulose.....	5
1.5 Antimykobakterielle Arzneistoffentwicklung.....	8
1.6 Pyridomycin.....	11
1.7 Motivation und Zielstellung.....	17
2 Depsipeptidsynthesen: Strategie, Reagenzien.....	18
2.1 Schutzgruppenstrategie.....	18
2.1.1 Tertiäre Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe.....	19
2.1.2 Benzylschutzgruppen.....	19
2.2 Kupplungsreagenzien.....	21
2.2.1 PyBOP.....	21
2.2.2 DCC.....	23
3 Synthesen.....	25
3.1 Synthese neuartiger zyklischer Pyridomycin-Derivate.....	25
3.1.1 Einfach substituierte Analoga.....	27
3.1.2 Zyklisches Depsipeptid mit exozyklischen Alkyl-Seitenketten.....	30
3.1.3 Zyklisches Depsipeptid mit endozyklischem Phenyl-Motiv.....	32
3.1.4 Zyklische Depsipeptide mit Aryl-GABA-Seitenkette.....	35
3.2 Synthese offenkettiger Pyridomycin-Derivate.....	53
3.2.1 Lipophile und hydrophile offenkettige Analoga.....	53
3.2.2 Synthese offenkettiger Pyridylmethylen-Teilstrukturen.....	57
3.3 Synthese der Hydroxy-Methyl-Seitenkette.....	58
3.4 Synthese der exozyklischen 3-Hydroxypicolinsäure.....	61
4 Konfigurationsaufklärung.....	65
5 Mikrobiologische Evaluierung und Targetaufklärung.....	70
5.1 Agardiffusionstest.....	70
5.2 Minimale Hemmkonzentration und Targetevaluierung.....	74
5.2.1 MHK gegen M. smegmatis und M. tuberculosis.....	74
5.2.2 MHK gegen InhA-Overexpressor BCG.....	76
5.3 Effekte an der isolierten mykobakteriellen Proteinkinase B.....	77
5.3.1 PknB-Assay.....	78
5.4 Zytotoxizität und antiproliferativer Effekt.....	82

6	Zusammenfassung und Ausblick.....	84
7	Experimenteller Teil	89
7.1	Mikrobiologische Evaluierung	89
7.1.1	Agardiffusionstest	89
7.1.2	Minimalen Hemmkonzentrationen	90
7.1.3	Zytotoxizität und antiproliferative Effekt an humanen Zellenlinien	91
7.1.4	Effekte am isolierten Enzym	92
7.2	Synthesen	93
7.2.1	Material und Methoden.....	93
7.2.2	Synthesevorschriften	96
8	Literaturverzeichnis.....	I
	Anhang.....	IX
	Anhang I	IX
	Anhang II	IX
	Anhang III	XI
	Liste der Veröffentlichungen	XII
	Danksagung.....	XIII
	Eigenständigkeitserklärung.....	XIV
	Lebenslauf.....	XV

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
Bn	Benzyl
BnOH	Benzylalkohol
Boc	Butyloxycarbonyl
CD	Zirkulardichroismus (<i>circular dichroism</i>)
CE	Cotton-Effekt
CIP	Ciprofloxacin
CPM	<i>counts per minute</i>
DBBT	Dibutylboryltrifluormethansulfonat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DCU	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylharnstoff
DiBoc	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin oder Hünig-Base
DMACl	<i>N,N</i> -Dimethylammoniumchlorid
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylpyridin-4-amin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTS	<i>directly observed therapy-short course</i>
DS	Diastereomer
EMB	Ethambutol
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
GABA	γ -Aminobuttersäure
GSK	GalxoSmithKline
HKI	Hans-Knöll-Institut
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
<i>i</i> -PrOH	Isopropanol
INH	Isoniazid
InhA	NADH-abhängige Enoyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase oder Enoyl-(ACP)-Reduktase
KatG	Oxidoreduktase
LiAlH ₄	Lithiumaluminiumhydrid

Mdeg	Molare Elliptizität (<i>molar degrees of ellipticity</i>)
MDR	<i>multi drug</i> Resistenz
MeOH	Methanol
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MS	Massenspektrometrie
Mtb	Mykobakterium tuberculosis
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
n.b.	Nicht bestimmt oder nicht bekannt
NMR	Kernspinresonanz
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
Pkn	Proteinkinase
PPP	<i>public private partnership</i>
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorosphat
PYR	Pyridomycin
PZA	Pyrazinamid
REMA	Resazurin-Reduktions-Mikrotiterassay
RIF	Rifampicin
RT	Raumtemperatur
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung
STR	Streptomycin
TB	Tuberkulose
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMSCl	Trimethylsilylchlorid
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XDR	<i>extensively drug</i> Resistenz

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1:	ELEKTRONENMIKROSKOPIERUNG VON <i>M. TUBERCULOSIS</i> ⁵	2
ABB. 2:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES NEKROSISIERTEN GRANULOMS OHNE VASKULARISIERUNG, MODIFIZIERT NACH DARTOIS (2014) ¹	3
ABB. 3:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES AUFBAUS DER MYKOBAKTERIELLEN ZELLWAND ¹¹	4
ABB. 4:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MYKOLSÄUREN, WOBEI R ₁ UND R ₂ ALKYLKETTEN MIT EINER KETTENLÄNGE VON C ₇₀ -C ₉₀ DARSTELLEN ⁶	5
ABB. 5:	ANGRIFFSPUNKTE DER ANTITUBERKULOTIKA, MODIFIZIERT NACH ZUMLA ET AL. (2013) ¹⁸ UND RUDOLPH ET AL. (2011) ²⁴ . ERKLÄRUNG DER ABKÜRZUNGEN DER TARGETS SIEHE TEXT.	9
ABB. 6:	STRUKTUR DES PYRIDOMYCINS MIT FARBLICHER MARKIERUNG DER EINZELNEN BAUSTEINE	11
ABB. 7:	ANGRIFFSPUNKT UND WIRKMECHANISMUS VON PYRIDOMYCIN UND ISONIAZID ^{15,62}	13
ABB. 8:	AUSWAHL BEKANNTER INHA-INHIBITOREN, DIE DIE LIPID-BINDETASCHEN ADRESSIEREN ^{61,64,66}	15
ABB. 9:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LIPID- UND NADH-BINDETASCHEN DES INHAS MIT INTEGRIERTEM PYR ⁶²	15
ABB. 10:	AUSZUG MÖGLICHER MODIFIKATIONEN DES ZWÖLFRINGSYSTEMS IM RAHMEN DIESER DISSERTATION	17
ABB. 11:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES DEPSIPEPTIDISCHEN SYNTHESWEGS MIT HILFE EINER SYSTEMATISCHEN SCHUTZGRUPPENSTRATEGIE; DARGESTELLT IST DIE VERKNÜPFUNG VON DREI SYNTHESBAUSTEINEN EINSCHLIEßLICH DER FINALEN ZYKLISIERUNG, WIE FÜR PYR-ANALOGA NÖTIG	18
ABB. 12:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SYNTHESSTRATEGIE DER BENZYLESTER	20
ABB. 13:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KUPPLUNGSREAGENZIEN VOM CARBODIIMID-TYP (OBEN) UND PHOSPHONIUMSALZ-TYP (UNTEN)	21
ABB. 14:	ESTER- UND AMIDSYNTHES MIT HILFE DES KUPPLUNGSREAGENZES PYBOP, NACH KIM ET AL. (1994) ⁹⁴	22
ABB. 15:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AMID- UND ESTERSYNTHES MIT HILFE VON DCC	23
ABB. 16:	CHEMISCHE STRUKTUR DER DERZEIT AKTIVSTEN PYR-DERIVATE ⁹⁹	26
ABB. 17:	SYNTHES DER RINGSYSTEME 8A-B UND 9A-B	28
ABB. 18:	¹ H-NMR-SPEKTRUM VON VERBINDUNG 8B EXEMPLARISCH FÜR ALLE ZWÖLFRINGSYSTEME MIT EXOZYKLISCHER AROMATISCHER ACYLIERUNG	30
ABB. 19:	SYNTHES VON VERBINDUNG 16	32
ABB. 20:	SYNTHES DES BENZYLISIERTEN B-ALANINS	33
ABB. 21:	SYNTHES DES RINGSYSTEMS 24	34
ABB. 22:	ZIELSTRUKTUREN DER 4-AMINO-5-ARYLPENTANSÄUREN	35
ABB. 23:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER NITROALDOL-KONDENSATION ^{110,114}	36
ABB. 24:	SYNTHESSTRATEGIE A UND B ZUR GEWINNUNG DER NITROSTYROLE 27 UND 28	36
ABB. 25:	¹ H-NMR-SPEKTRUM DES (<i>E</i>)-ISOMERS VON VERBINDUNG 28; DARGESTELLT IST DIE CHEMISCHE VERSCHIEBUNG DES METHIN-PROTONS MIT DEN <i>TRANS</i> -STÄNDIGEN SUBSTITUENTEN	37
ABB. 26:	OPTIMIERTE NITROALDOL-SYNTHES	38
ABB. 27:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER REDUKTION DER NITROALDOLKONDENSATIONSPRODUKTE	41
ABB. 28:	REDUKTION DER VERBINDUNGEN 27 UND 28 MIT HILFE VON NATRIUMBORHYDRID	42
ABB. 29:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BILDUNG DES NITRONAT-SALZES ALS REAKTIVE ZWISCHENSTUFE, MODIFIZIERT NACH BHATTACHARJYA (1985) ¹³¹	43
ABB. 30:	KATALYTISCHE REDUKTION DER NITROARYLALKANE MIT ANSCHLIEßENDER HYDROLYSE ENTSTANDENER LACTAME	44
ABB. 31:	BENZYLIERUNG DER 4-AMINO-5-ARYLPENTANSÄUREN	47
ABB. 32:	SYSTEMATISCHE KETTENVERLÄNGERUNG MIT INTERGRIERTER PHENYL-GABA-SEITENKETTE	48
ABB. 33:	FINALER RINGSCHLUSS UND ACYLIERUNG MIT DER 3-HYDROXYPICOLINSÄURE ZUM GEWÜNSCHTEN ZYKLISCHEN ANALOGON	49
ABB. 34:	¹ H-NMR-SPEKTRUM DER ISOLIERTEN DIASTEREOMERE VON VERBINDUNG 46 DS1 (OBEN) UND DS2 (UNTEN) (JEWEILS IN CDCl ₃)	50
ABB. 35:	¹ H-NMR-SPEKTRUM DER ISOLIERTEN DIASTEREOMERE VON VERBINDUNG 47 DS1 (OBEN, IN CDCl ₃) UND DS2 (UNTEN, IN CD ₃ OD)	51

ABB. 36:	¹ H-NMR-SPEKTRUM VON VERBINDUNG 48 DS1 (IN CDCl ₃).....	52
ABB. 37:	SYNTHESE BENZYLIERTER OFFENKETTIGER ANALOGA	54
ABB. 38:	SYNTHESE OFFENKETTIGER HYDROPHILER ANALOGA.....	54
ABB. 39:	SYNTHESE DES OFFENKETTIGEN METHYLESTER-DERIVATS 59.....	56
ABB. 40:	SUBSTITUTION VON VERBINDUNG 59 MIT DER 3-HYDROXYPICOLINSÄURE (7B).....	57
ABB. 41:	DARSTELLUNG DER SYNTHESE DER OFFENKETTIGEN PYRIDYLMETHYLENTEILSTRUKTUREN	57
ABB. 42:	MARKIERUNG DER ZU DERIVATISIERENDEN TEILSTRUKTUR (2R,3S,4S)-4-AMINO-3-HYDROXY-2-METHYL-5-PYRID-3- YLPENTANSÄURE.....	58
ABB. 43:	STEREOSELEKTIVE SYNTHESE MITHILFE DES EVANS-AUXILIARS, MODIFIZIERT NACH EVANS ¹⁵⁰ (L = LIGAND)	59
ABB. 44:	STERISCHER EINFLUSS IN DER AUSBILDUNG BEVORZUGTER <i>ERYTHRO</i> -ENANTIOMERE ¹⁴⁹	60
ABB. 45:	DARSTELLUNG DER BORON-VERMITTELTEN ALDOLADDITION MODIFIZIERT NACH LEITHEISER ET AL. (2003) ¹⁴⁸ , EVANS ET AL. (1981) ¹⁴⁹ UND FEHRENTZ ET AL. (1983) ¹⁵¹	61
ABB. 46:	RETROSYNTHESE DER 3-HYDROXYPICOLINSÄURE	62
ABB. 47:	SYNTHESEWEG ZUR DARSTELLUNG DER 3-HYDROXYPICOLINSÄURE	62
ABB. 48:	OXIDATION VON 3-HYDROXY-2-HYDROXYMETHYLPYRIDIN (71).....	63
ABB. 49:	EXPERIMENTELL ERMITTELTE CD-SPEKTREN DER VERBINDUNGEN 46 DS1 UND DS2 (OBEN) SOWIE 47 DS1 UND DS2 (UNTEN)	67
ABB. 50:	UNTERSUCHTE RÄUMLICH NAHE KERNDIPOLE IM NOESY-EXPERIMENT.....	69
ABB. 51:	DARSTELLUNG DER GEMESSENEN PKNB-AKTIVITÄT AM ISOLIERTEN ENZYM	79
ABB. 52:	PROZENTUALE DARSTELLUNG DER PKNB-INDUKTION UND PKNB-INHIBITION	80
ABB. 53:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ERSTER ABGELEITETER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN.....	86
ABB. 54:	¹ H-NMR-SPEKTRUM VON PYRIDOMYCIN (IN CD ₃ OD)	XI

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 1:	ÜBERBLICK DER <i>FIRST-LINE</i> THERAPEUTIKA ZUR BEHANDLUNG EINER SENSIBLEN TB ¹⁸	6
TAB. 2:	ÜBERBLICK DER ANTITUBERKULOTIKA ZUR BEHANDLUNG DER MDR-TB UND/ODER XDR-TB ^{17,18}	7
TAB. 3:	MINIMALE HEMMKONZENTRATIONEN VON PYRIDOMYCIN	12
TAB. 4:	REAKTIONSBEDINGUNGEN DER <i>STRATEGIE A</i> FÜR DIE SYNTHESE VON VERBINDUNG 25	39
TAB. 5:	REAKTIONSBEDINGUNGEN DER <i>STRATEGIE B</i> FÜR DIE SYNTHESE VON VERBINDUNG 28	40
TAB. 6:	ÜBERSICHT DER VALIDIERUNGSVERSUCHE ZUR SYNTHESE VON VERBINDUNG 32	45
TAB. 7:	AUFLISTUNG DER VARIERTEN REAKTIONSBEDINGUNGEN FÜR DIE ISOLIERUNG VON 57	55
TAB. 8:	AUFLISTUNG DER VARIERTEN REAKTIONSBEDINGUNGEN ZUR SYNTHESE VON 7B	63
TAB. 9:	BEWERTUNG DER HEMMEIGENSCHAFTEN IN ABHÄNGIGKEIT DES GEMESSENEN HEMMHOFES GEMÄß DEM HKI ¹⁶⁹	71
TAB. 10:	ERGEBNISSE DES AGARDIFFUSIONSTESTS	71
TAB. 11:	BEWERTUNG DER ANTIBAKTERIELLEN AKTIVITÄT GEMÄß ERMITTELTEN MHK ¹⁶⁹	74
TAB. 12:	ERGEBNISSE DER BESTIMMUNG DER MHK GEGEN <i>M. SMEGMATIS</i> UND <i>M. TUBERCULOSIS</i>	75
TAB. 13:	AUFLISTUNG DER ERMITTELTEN MHK GEGEN INHA-ÜBEREXPRESSOR <i>M. BOVIS</i> BCG-ZELLEN	77
TAB. 14:	VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER MHKS DER TESTSUBSTANZEN 46 DS1/DS2, 47 DS1, 48 DS1, 59 UND PYR GEGEN <i>M. TUBERCULOSIS</i> H ₃₇ RV UND <i>M. BOVIS</i> BCG PATB45INHA (OE) INKLUSIVE DER ERMITTELTEN PROZENTUALEN PKNB-AKTIVITÄTEN	81
TAB. 15:	ANTIPROLIFERATIVE (GI ₅₀) UND ZYTOTOXISCHE (CC ₅₀) EFFEKTE VON DEN VERBINDUNGEN 46 DS1/DS2 UND 48 DS1	83
TAB. 16:	AUFLISTUNG DER SYNTHETISIERTEN PRODUKTE GEMÄß AAV 1	115
TAB. 17:	AUFLISTUNG DER SYNTHETISIERTEN PRODUKTE GEMÄß AAV 2	117
TAB. 18:	AUFLISTUNG DER SYNTHETISIERTEN PRODUKTE GEMÄß AAV 3	120
TAB. 19:	AUFLISTUNG DER SYNTHETISIERTEN PRODUKTE GEMÄß AAV 4	122
TAB. 20:	AUFLISTUNG DER SYNTHETISIERTEN PRODUKTE GEMÄß AAV 5	126
TAB. 21:	AUFLISTUNG DER SYNTHETISIERTEN PRODUKTE GEMÄß AAV 6	130
TAB. 22:	ERGEBNISSE DES AGARDIFFUSIONSTESTS SYNTHETISCHER ZWISCHENSTUFEN	IX
TAB. 23:	ERGEBNISSE DER PKNB-AKTIVITÄTEN DER TESTSUBSTANZEN 46 DS1/DS2, 47 DS1, 48 DS1, 59 UND PYR	X

Kapitel I

1 TUBERKULOSE UND ANTIMYKOBAKTERIELLE ARZNEISTOFFENTWICKLUNG

1.1 TUBERKULOSE

Die „Große Weiße Pest“ Tuberkulose ist noch immer nicht ausgestorben. Insbesondere in den Entwicklungsländern belegt es nach HIV/AIDS Platz zwei der Haupttodesursachen unter den Infektionskrankheiten. Tuberkulose (TB) tötet durchschnittlich alle 20 Sekunden einen Menschen.¹ Weltweit sind ca. 2 Mrd. Menschen Träger des TB-Erregers, bei 10 bis 15 % bricht eine aktive TB aus. Für das Jahr 2013 berichtete die Weltgesundheitsorganisation (WHO) über weltweit 9.0 Mio.² Neuerkrankungen. Zu den Hochinzidenzgebieten zählen Indien, China, Südostasien und die westliche pazifische Region.² Unter den Neuerkrankungen wurden 1.1 Mio. Patienten als HIV-positiv diagnostiziert. Der WHO zufolge starben 2013 ca. 1.5 Mio. Menschen an einer aktiven TB, wobei davon ca. 0.36 Mio. Tote mit HIV koinfiziert waren.

Für Deutschland sehen die stagnierenden Zahlen weniger dramatisch aus. TB fällt im Niedriginzidenzland Deutschland unter die Meldepflicht. So wurden 2012 dem Robert-Koch-Institut (RKI) 4220 Neuerkrankungen gemeldet (2011: 4317).³ Dies stellt eine Inzidenz von 5.2 pro 100000 Einwohner dar. An einer aktiven TB starben 2012 deutschlandweit 146 Menschen (Inzidenz: 0.2). Eine multiresistente TB wurde bei 65 Neuerkrankungen ermittelt (2.3 %). Über die Prävalenzen gibt es weder von der WHO noch vom RKI stichhaltige Zahlen.

Eine aktive TB kann durch Tröpfcheninfektion übertragen werden.⁴ Ein Tropfen mit einem Durchmesser von 2 bis 5 µm kann 1 bis 3 Bazillen eines der gefährlichsten und cleversten Bakterien in sich tragen.⁴ Typisch für eine TB-Erkrankung ist eine andauernde Müdigkeit, Kraftlosigkeit und ein verstärktes nächtliches Schwitzen. Des Weiteren sind auch anhaltender Gewichtsverlust, mangelnder Appetit und ein persistierender starker Husten mit möglichem blutigem Auswurf ein Indiz für eine aktive TB. Der Auslöser für TB ist das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*).

1.2 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Das von Robert Koch im Jahr 1882 entdeckte *Mycobacterium tuberculosis* (Familie der *Mycobacteriaceae*, Gattung der *Amycolicocci*) ist ein nicht-motiles, stäbchenförmiges, pathogenes Bakterium mit einer Länge von 1 bis 4 µm und einer Breite von 0.2 bis 0.6 µm (Abb. 1).⁵

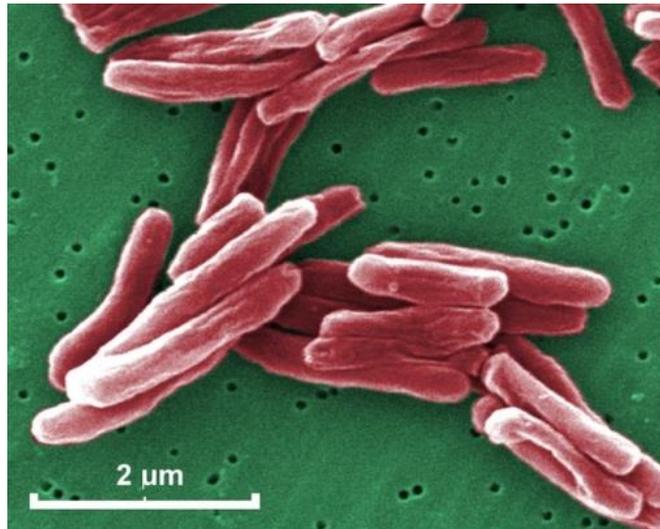


Abb. 1: Elektronenmikroskopaufnahme von *M. tuberculosis*⁵

Dieses TB-Bakterium befällt hauptsächlich die Lunge, was zu einer pulmonalen TB-Form führt. Sind dagegen andere Organe wie beispielsweise Lymphknoten, Gewebe, Gehirn oder andere Organe betroffen, wird von der extrapulmonalen TB gesprochen. Mit einer Zellteilungsrate von 12 bis 24 h gehört *Mtb* zu den langsam wachsenden Bakterien; die Teilungsrate der meisten kultivierenden Bakterien beträgt 15 bis 60 min.⁶ Dieses langsame Wachstum erschwert eine Antibiotikatherapie, die in diesen Zellteilungsprozessen eingreift. Alle für den Menschen obligat pathogenen Tuberkuloseerreger werden als sogenannter *M. tuberculosis*-Komplex zusammengefasst: *Mtb*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti* und *M. pinnipedii*.⁶ Der Haupterreger der humanen TB ist allerdings *Mtb*.

Der opportunistische Keim ist ein fakultativ intrazellulärer Parasit, der sich anaerob in humanen Makrophagen vermehren kann. Infolge einer aerosolen Inhalation der TB-Bakterien kommt es durch alveolare Makrophagen im Zuge der initialen Immunabwehr zur Phagozytose der Bakterien. Die Makrophagen verweilen auf der Oberfläche der Alveolen und die mukoziliäre Reinigung über den Luftweg entfällt. Die Bazillen sind in der Lage, die native Entwicklung des Phagosoms und damit deren eigene Verdauung durch das humane Immunsystem zu verhindern. Durch Unterbindung der normalerweise eintretenden Azidifizierung verbleibt der pH-Wert der phagozytierenden Vakuole in den Makrophagen bei pH = 6.3. Unter diesen Bedingungen kann sich *Mtb* exponentiell vermehren. Während der anfänglichen (initialen) Infektionsphase befinden sich die Makrophagen in einem inaktiven Zustand, in dem es zu einer geringen Ausbildung von reaktiver Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) kommt. Wird hierbei das angeborene Immunsystem aktiviert, kommt es zu einer Zunahme von ROS und RNS, was folglich oxidativen Stress auslöst. Die nun aktivierten Makrophagen rekrutieren weitere Makrophagen und Lymphozyten, welche eine äußere Zellschicht um die primär infizierten Makrophagen ausbilden. Diese Gebilde werden als Granulome bezeichnet (siehe Abb. 2).

Das Innere des Granuloms zeichnet sich durch hypoxische und damit anaerobe Bedingungen aus, die zu nekrotisierendem (käsigem) Gewebe führen. Der Einschluss bzw. die Verkapselung der TB-Bakterien durch diese Granulome führt zu einer verminderten Nährstoffzufuhr, wobei

sich der Stoffwechsel der Bazillen den anaeroben Bedingungen anpasst, bis dieser schlussendlich zum Stillstand kommt. Das dormante Entwicklungsstadium ist erreicht.

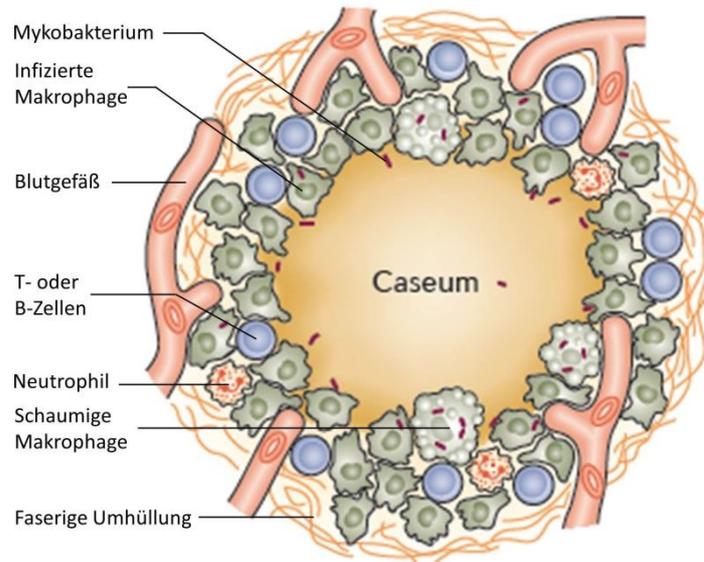


Abb. 2: Schematische Darstellung eines nekrotisierten Granuloms ohne Vaskularisierung, modifiziert nach Dartois (2014)¹

Während des dormanten Stadiums sind die Bakterien in der Lage, in einer anaeroben Umgebung zu überleben, in der keine Replikation stattfindet. Es ist ein physiologisches Stadium des angehaltenen Wachstums. In dieser metabolischen Phase sind die Bakterien gegenüber Antibiotika tolerant.⁴ Dormante Bakterien können in diesen Granulomen über Jahre verweilen, das Stadium der latenten TB ist erreicht. Eine latente TB kann mit einem Risiko von 10 % wieder in eine aktive, symptomatische Form übergehen.⁷ Hierbei sind insbesondere immunsupprimierte Patienten betroffen, bei denen sich durch eine Arzneimitteltherapie oder eine HIV-Erkrankung der Immunstatus verschlechtert hat.

Im Gegensatz zur latenten Form wird unter der bakteriellen Persistenz die vorübergehende Antibiotikatoleranz verstanden, die durch eine Subpopulation von Bazillen verursacht sein kann, die wiederum aufgrund der Abgrenzung im Granulom und der damit unzureichenden Arzneistoffkonzentration hervorgerufen wird. Da diese Toleranz phenotypisch und nur kurzzeitig ist, bleibt das Bakterium genetisch empfindlich gegenüber eingesetzten Arzneistoffen.⁸⁻¹⁰ Dieser Status des eingeschränkten Zellwachstums, der bakteriellen Persistenz, muss im Detail noch genauer aufgeklärt werden.¹⁰

1.3 SONDERFALL MYKOBAKTERIELLE ZELLWAND

Mykobakterien weisen im Vergleich zu anderen Bakteriengattungen einen deutlich abweichenden zellulären Aufbau der äußeren Ummantelung auf. Insbesondere der komplexe

Aufbau der Zellwand findet sich nur bei ihnen.⁶ Eine schematische Darstellung der Zellwand ist in Abb. 3 gezeigt.¹¹

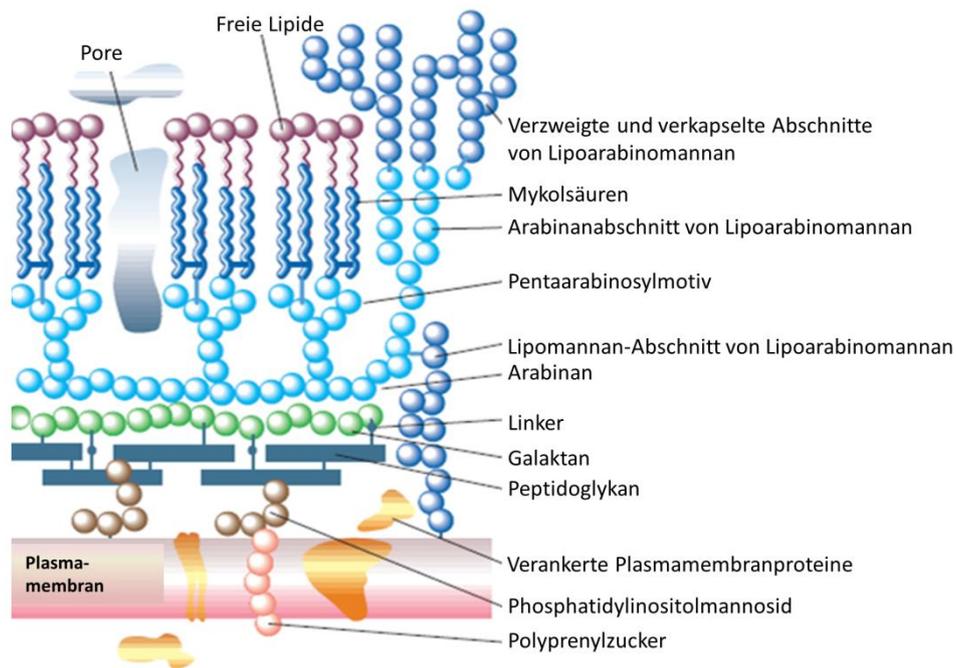


Abb. 3: Schematische Darstellung des Aufbaus der mykobakteriellen Zellwand¹¹

Die mykobakterielle Zellwand zeichnet sich durch geringe Fluidität und Permeabilität aus. Bestehend aus zwei Schichten, einer inneren und einer äußeren Schicht, umgibt der doppelwandige Aufbau die Zellmembran wie eine Kapsel.

Die innere Schicht setzt sich aus drei kovalent verknüpften Heteropolymeren zusammen, dem stark quervernetzten Peptidoglykan (PG), dem Polysaccharid Arabinogalactan (AG) und den verzweigtkettigen Mykolsäuren (MA). Dieser Zusammenschluss ist auch als MA-AG-PG-Komplex (oder mAGP) bekannt.¹²⁻¹⁴ Hierbei erfolgt durch Verknüpfung von PG mit Phosphatidylinositolmannosid (PIM) als Zellwandprotein eine Verankerung an der Plasmamembran. Das AG mit den Arabinoseseitenketten ist zum einen mit PG und zum anderen mit MA kovalent verknüpft. Der MA-AG-PG-Komplex erstreckt sich von der Plasmamembran bis in die äußeren Schichten. Dieser unlösliche Komplex bildet den Hauptbestandteil der Zellwand. Die charakteristischen MAs (Abb. 4) bestehen strukturell aus verzweigten α -Alkyl- β -hydroxyfettsäuren mit einer Kettenlänge von C_{70} - C_{90} ,¹⁵ welche aus kurzen α -Ketten (C_{20} - C_{25}) und langkettigen Meromykolsäuren (C_{56}) aufgebaut sind.^{13,16}

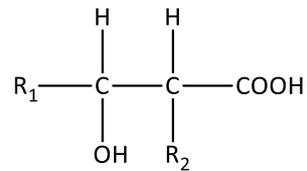


Abb. 4: Schematische Darstellung der Mykolsäuren, wobei R_1 und R_2 Alkylketten mit einer Kettenlänge von C_{70} - C_{90} darstellen⁶

Diese langkettigen Fettsäuren sind kovalent mit den Enden von Arabinose sowie mit den Glykolipiden Trehalose-Monomykolat (TMM) und Trehalose-Dimykolat (TDM, 6,6'-Dimycolyl-trehalose) der äußeren Schicht verestert. Die Mykolsäuren bestimmen zum Großteil den hydrophoben Charakter der Ummantelung (50 % der Trockenmasse) und somit die dicke und wachsartige Beschaffenheit dieser Zellwand, was wiederum in der enormen Widerstandsfähigkeit resultiert.^{6,14}

Die Oberfläche dieser nicht-fluiden Monoschicht wird von nicht-kovalent gebundenen „Kapsel“-Lipiden und Proteinen umgeben, die wiederum die äußere Zellwandschicht ausmachen. Bei diesen „Kapsel“-Lipiden handelt es sich neben TMM und TDM um phenolische Glykolipide, komplexe Polysaccharide, Sulfolipide und Phthioceroldimycolcerosol (PDIM).¹⁴ Neben diesen Lipiden wird die Zellwand von weiteren freien Lipiden durchzogen, bestehend aus Lipomannan (LM) und Lipoarabinomannan (LAM), die ebenfalls die lipophile Beschaffenheit der Zellwand und dessen Fluidität im hohen Maße beeinflussen.^{12,13}

Dieser besondere Aufbau der Zellwand ermöglicht dem Bakterium, sich vor Fremdstoffen wie Antibiotika zu schützen und bildet eine schwer zu überwindende physikalische Barriere. Daher ist es nachvollziehbar, dass die meisten Antituberkulotika genau dort eingreifen: in der Biosynthese der Zellwand bzw. deren Bestandteilen; denn so kann erstens mykobakterien-spezifisch angegriffen und zweitens die mykobakterielle Abwehr empfindlich geschwächt werden.

1.4 THERAPIE DER TUBERKULOSE

Ziel einer Antituberkulotika-Therapie ist die Heilung durch Befreiung des Patienten von *Mtb*.¹⁷ Bleibt eine akute TB unbehandelt, liegt die Mortalitätsrate bei knapp 50%.⁴ Eine Eradikation kann nur durch einen adäquaten Antibiotikaeinsatz erfolgen. Die WHO unterteilt die derzeit verfügbaren Arzneistoffe in Abhängigkeit von deren Einsatz, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit in *first-line* und *second-line* Antituberkulotika. Die *first-line* Therapie besteht in der Applikation oraler Antituberkulotika (siehe Tab. 1). Dabei werden Isoniazid (INH; Zulassung 1952), Pyrazinamid (PZA; Zulassung 1954, tötet auch persistierende Erreger), Ethambutol (EMB; Zulassung 1961), Streptomycin (STR; Zulassung 1944) und das Ansamycin Rifampicin (RIF; Zulassung 1963) eingesetzt. Als Viererkombination werden sie zur Behandlung der sensiblen pulmonalen sowie der extrapulmonalen TB appliziert. Isoniazid ist noch immer die Nummer Eins in der TB-Behandlung und wird in allen Therapieregimen eingesetzt.

Tab. 1: Überblick der *first-line* Therapeutika zur Behandlung einer sensiblen TB¹⁸

Gesamtdauer	Kombination	Anmerkung
6 Monate	2 Monate: INH, RIF, PZA, EMB	Erstbehandlung
	4 Monate: INH, RIF	
8 Monate	2 Monate: INH, RIF, PZA, EMB, STR	erneuter Ausbruch einer akuten TB, nach Ausschluss einer MDR-TB; intensivierte <i>first-line</i> Therapie
	1 Monat: INH, RIF, PZA, EMB	
	5 Monate: INH, RIF, EMB	

Die Erstbehandlung der TB sieht eine sechsmonatige (2 + 4 Monate) Kombinationstherapie aus INH, RIF, PZA und EMB vor (siehe Tab. 1). Dieses in den 1970er Jahren eingeführte Therapieregime verspricht Heilungsraten von 95 %, wobei die Rückfallrate bei ca. 10 % liegt.⁴ Dieses lange Therapieintervall ist aufgrund der langsamen Zellteilung zum Abtöten eventuell vorhandener Persister wichtig.¹⁸

Eine sechsmonatige Kombinationstherapie mit kontinuierlicher Einnahme aller vier Arzneistoffe könnte eine Heilungsrate von 98 % mit einer Rückfallrate von weniger als 5 % erzielen.¹⁹ Dies bedeutet jedoch höhere Therapiekosten und eine längere Belastung des Patienten mit vier Arzneistoffen.

Unter die *second-line* Antituberkulotika fallen die zu injizierenden Aminoglykoside, Polypeptide, Fluorchinolone (wobei hier auch einige oral appliziert werden können) und weitere Antibiotika (Tab. 2). Die *second-line* Antituberkulotika werden zur Behandlung der *multi drug*-resistenten Form (MDR-TB) oder der *extensively drug*-resistenten TB (XDR-TB) eingesetzt. Bei der MDR-TB handelt es sich um eine Resistenz gegenüber den *first-line* Antituberkulotika INH und RIF. Weltweit wurden 2013 0.48 Mio. MDR-Fälle gemeldet, wobei 0.21 Mio. Patienten an den Folgen einer MDR-TB starben.² Nahezu 60 % dieser MDR-Fälle traten in Indien, China und Russland auf.^{2,4} Knapp 20 % der diagnostizierten MDR-Fälle sind auf einen Krankheitsrückfall zurückzuführen.

Entwickeln sich die Resistenzen der MDR-TB weiter, kann daraus eine XDR-TB hervorgehen, eine besondere Form der MDR. Die durchschnittliche Häufigkeit, dass bei einer MDR-TB ein XDR-Fall vorliegt, lag 2013 bei 9 %. Die XDR ist eine MDR-TB mit einer zusätzlichen Resistenz gegen Fluorchinolone und mindestens einem der drei zu injizierenden *second-line* Antituberkulotika (Amikacin, Kanamycin, Capreomycin).

Diese multipel resistenten Formen erschweren eine Arzneistofftherapie. Die absoluten Zahlen der MDR sowie der XDR sind aufgrund schwieriger Labordiagnostik und eines unzureichenden Meldesystems nicht bekannt. Die Behandlung der resistenten TB-Formen dauert 18 bis 24 Monate.

Bei einer bestehenden Resistenz oder bei dem bloßen Verdacht einer INH-Resistenz wird bei der sechsmonatigen Therapie in der viermonatigen Verlängerungsphase zusätzlich EMB zu INH und RIF appliziert. Bei der Behandlung eines erneuten TB-Ausbruchs muss zuvor der MDR-Status des Patienten geklärt werden, wonach sich schlussendlich die Therapie richtet. Beim Vorliegen einer MDR-TB erfolgt eine individuelle Therapie mit *second-line* Antituberkulotika. Die Heilungsrate einer MDR-TB liegt bei 50 bis 70 %.⁴ Eine XDR-Therapie ist sehr viel schwieriger und mit einer hohen Mortalität verbunden.⁴ Mit den derzeit verfügbaren

Antituberkulotika wird eine Heilungsrate von weniger als 50 % erzielt.¹⁹ Vor dem Beginn einer XDR-Therapie muss sichergestellt werden, dass die Mykobakterien gegen mindestens fünf der *second-line* Arzneistoffe noch sensibel sind.

Die WHO untergliedert die Antituberkulotika zur Behandlung der resistenten Formen zusätzlich nach folgenden Gesichtspunkten (Tab. 2): Effektivität, Wirksamkeit, Arzneistoffklasse und Erfahrungen im Einsatz der Arzneistoffe.¹⁸

Die preisintensiven *second-line* Antituberkulotika sind im Allgemeinen weniger potent, zusätzlich verbunden mit einer höheren Rate an toxischen Effekten.^{20,21} Bei den unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAWs) kann es sich um Leber- und Nierenschäden, Neuropathien, Dysglykämie und psychische Veränderungen wie Depressionen handeln.

Tab. 2: Überblick der Antituberkulotika zur Behandlung der MDR-TB und/oder XDR-TB^{17,18}

Gruppe	Antituberkulotika	Anmerkung
Gruppe 1	PZA, EMB, Rifabutin	<i>first-line</i> , orale Applikation, Rifabutin zur Therapie von HIV-Patienten
Gruppe 2	Kanamycin, Amikacin, Capreomycin, STR, Viomycin	<i>second-line</i> , injizierbare Aminoglykoside und Polypeptide
Gruppe 3	Levofloxacin, Moxifloxacin, Ofloxacin	<i>second-line</i> , Fluorchinolone
Gruppe 4	Paraaminosalicylsäure (PAS), Cycloserin, Terizidon, Thionamid, Protionamid	orale bakteriostatische <i>second-line</i> -Therapeutika
Gruppe 5	Clofazimin, Linezolid, Amoxicillin/Clavulanat, Thioacetazon, Imipenem/Cilastatin, hochdosiertes INH, Clarithromycin	<i>third-line</i> ¹⁸ , nicht primär von der WHO empfohlen, bisher unklare Rolle in der TB-Therapie

Eine MDR- bzw. XDR-Therapie kostet pro Patient knapp 150000 bis 300000 €, eine enorme finanzielle Belastung des Gesundheitssystems.²⁰ Aufgrund der langwierigen Therapie und der Tatsache, dass sich die Patienten nach einer ein bis zweiwöchigen Behandlung gesundheitlich wieder wohler fühlen, sinkt die Adherence der Patienten rasch.¹⁰

Die WHO rief daher in den 1990er Jahren²² eine Richtlinie zur direkten Kontrolle bzw. Aufsicht der Tuberkulosebehandlung ins Leben, die „*directly observed therapy-short course*“ (entspricht der überwachten Therapie, DOTS).^{2,18} DOTS ist definiert durch fünf Eckpunkte und dient der internationalen Standardisierung der TB-Bekämpfung: 1) politische und finanzielle Verpflichtung sowie Unterstützung, 2) eindeutige qualitativ abgesicherte Diagnose, 3) standardisierte und verkürzte TB-Behandlung unter direkter, unterstützender Überwachung, 4) standardisiertes Managementsystem zur Überwachung und Bewertung und 5) eine geregelte ununterbrochene Antituberkulotika-Versorgung. Dies soll zum effektiveren Arzneistoffeinsatz, zu verkürzten Therapien und höheren Heilungsraten führen, und folglich die Adherence verbessern. Schlussendlich wird damit auch der Entstehung von Resistenzen entgegengewirkt. Dank dieser Strategie sinken die Inzidenzzahlen weltweit seit 2003 stetig.²² Derzeit laufen Bemühungen, neue Kombinationstherapien zu finden (siehe auch Kapitel 1.5). An die neuen Regime sind erhebliche Anforderungen geknüpft. Diese sollten so verbessert

werden, dass sie 1) die Therapiedauer auf wenige Monate verkürzen, 2) einfach zu applizieren sind (am besten oral), im Idealfall nur einmal täglich oder sogar nur einmal wöchentlich. Des Weiteren sollten die neuen Regime 3) die Resistenzentstehung verhindern oder zurückdrängen und 4) im Fall einer MDR- oder XDR-Therapie kostengünstig sein, zusätzlich begleitet durch weniger UAWs.²³

1.5 ANTIMYKOBAKTERIELLE ARZNEISTOFFENTWICKLUNG

Anforderungen an neue Antituberkulotika

In den führenden Industrieländern ist aufgrund der sinkenden TB-Inzidenz der finanzielle Anreiz für große Pharmafirmen zur Erforschung und Entwicklung neuer Antituberkulotika gering. Die bisherige Forschungspipeline ist daher ein Verdienst aus Zusammenschlüssen vieler Institutionen und Initiativen zur Bekämpfung dieser Erkrankung (ein Erfolg für Nichtregierungsorganisationen - NGOs). Entscheidende Rollen nehmen neben dem „*Orphan Drug Act*“ für eine schnellere Zulassung insbesondere die „*private-public-partnerships*“ (PPPs) ein.²⁴ Sie vereinen und koordinieren Stiftungen, Universitäten, private Forschungslabore und Unternehmen im Netzwerk und fördern so die dezentrale Forschung. Unter die PPPs zählen die *Stop TB Partnership*²⁵ der WHO, die Kollaboration zwischen der *Tres Cantos Open Lab Stiftung* mit GlaxoSmithKline (GSK), die *Global Alliance for TB Drug Development* (TB Alliance)²⁶ und das europäische Konsortium *More Medicines for Tuberculosis* (MM4TB).²⁴ Lange Zeit war es sehr ruhig in Hinblick auf eine wachsende, innovative TB-Pipeline. Mit RIF wurde 1963 das letzte Antituberkulotikum zur Behandlung der sensitiven TB-Form zugelassen. Damit ein Arzneistoff zur TB-Behandlung zugelassen wird, sollte er folgende Kriterien erfüllen: 1) Aufgrund zahlreicher Resistenzen muss der Arzneistoff einen neuen Wirkmechanismus aufweisen und im Optimalfall (ein) neue(s) Targets angreifen. Er sollte ähnlich dem INH bakterizide Eigenschaften mit einer *rapid-kill kinetic* besitzen, im Unterschied zu INH auch unter anaeroben Bedingungen wirken und in alle metabolische Stadien des *Mtb* aktiv eingreifen können. Idealerweise sollte dieses Target auch direkt mit der Entstehung einer Persistenz verbunden sein. Da eine lange Therapie gleichzeitig mit dem Vorhandensein von Persistenz²⁷ korreliert, ist 2) eine Wirksamkeit gegenüber intra- und extrazellulär persistierende Erreger essentiell.⁸ Des Weiteren sollte der neue Arzneistoff 3) zur Behandlung von MDR- und/oder XDR-TB eingesetzt werden können, ohne Kreuzresistenzen zu bereits existierenden Arzneistoffen aufzuweisen. Mithilfe des neuen Arzneistoffes sollte es möglich sein, 4) die geltenden Therapieoptionen zu erweitern und im besten Fall durch neue Kombinationsstrategien zu verbessern. Aufgrund häufig auftretender HIV Co-Infektionen und der damit verbundenen essentiellen antiretroviralen Therapie (ART) darf der neue Arzneistoff 5) nicht über die hepatischen Oxidoreduktasen des Cytochrom P450-Systems metabolisiert werden, die Hauptenzyme für die Metabolisierung der eingesetzten Arzneimittel einer ART.²⁸ All dies sind hohe Anforderungen auf der Suche nach neuen Antituberkulotika.^{4,29}

Aktueller Forschungsstand

Ein Überblick über die neuen Targets und Antituberkulotika ist in Abb. 5 gezeigt. Die lang bekannten Fluorchinolone Moxifloxacin und Gatifloxacin, beides Hemmer der bakteriellen Topoisomerase II, befinden sich derzeit in der Phase 3 der klinischen Entwicklung für eine Neuzulassung als Antituberkulotika. Beide Stoffe bieten eine gute Substitutionsmöglichkeit von EMB oder INH im Therapieregime, wodurch der Behandlungszeitraum von sechs auf vier Monate verkürzt werden kann. Die TB Alliance rechnet sogar mit der Zulassung eines auf fluorchinolonbasierenden neuen Therapieregimes im Jahr 2015.^{23,30}

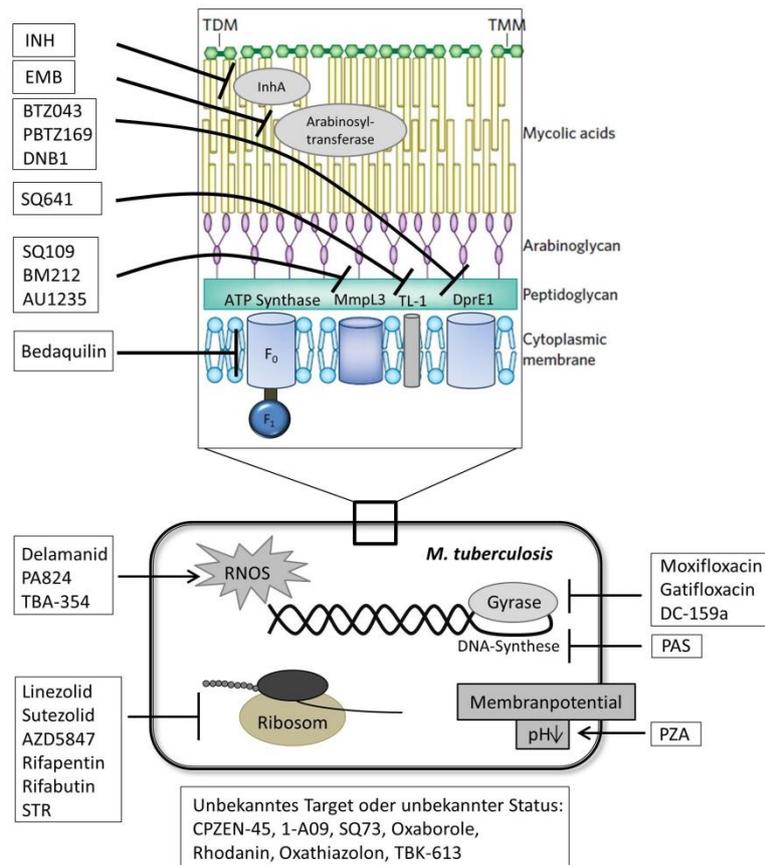


Abb. 5: Angriffspunkte der Antituberkulotika, modifiziert nach Zumla et al. (2013)¹⁸ und Rudolph et al. (2011)²⁴. Erklärung der Abkürzungen der Targets siehe Text.

Innerhalb der Stoffklasse der Ansamycine, Inhibitoren der DNA-abhängigen RNA-Polymerase, wird derzeit eine Substitution des Rifampicins untersucht. Sowohl Rifapentin (erhielt 2010 die EU-Zulassung) als auch Rifabutin weisen bessere pharmakologische Eigenschaften auf, wie z. B. kürzere Halbwertszeiten und weniger Interaktionen mit metabolischen CYP-Enzymen.²³ Mit Bedaquilin (TMC207), einem Diarylchinolin, wurde 2012 durch die amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde FDA erstmals wieder ein neues Antituberkulotikum zugelassen.³¹ Es wurde im Status des *Orphan drugs* zur Behandlung der MDR-TB und als Reserveantibiotikum gegen die sensible TB zugelassen. Zusätzlich ist es gegen dormante TB-Bakterien wirksam. Das sich derzeit noch in der klinischen Phase 2 befindliche Bedaquilin

hemmt die mykobakterielle ATP-Synthase, wodurch direkt der Protonentransport in die Zelle von *Mtb* und damit der Energiehaushalt gestört wird (siehe Abb. 5).^{4,18,32} Aufgrund dieses neuen Targets liegen zurzeit noch keine Kreuzresistenzen zu bekannten Antituberkulotika vor. In der Wirkstoffgruppe der Nitroimidazole stehen mit PA-824, einem Nitroimidazooxazin, und Delamanid (OPC-67683), einem Nitroimidazooxazol, gleich zwei potente Antituberkulotika mit neuem Wirkmechanismus zur Verfügung. Nach einer Aktivierung durch die intrazelluläre deazaflavin-abhängige Nitroreduktase (Ddn) kommt es zur Freisetzung von NO und anderen reaktiven N-Zwischenstufen, was zu einer NO-Vergiftung der Cytochrom C Oxidase führt.^{4,18} Diese Nitroimidazole töten die *Mtb*-Bazillen sowohl im aeroben (replizierenden) als auch im anaeroben (nicht-replizierenden) Milieu. Des Weiteren wird eine Hemmung der Mykolsäure-Biosynthese vermutet, die aber noch weiter aufgeklärt werden muss.¹⁸ PA-824 befindet sich derzeit in der klinischen Phase 2 und Delamanid in der klinischen Phase 3 der Entwicklung.²⁵ Delamanid erhielt 2013 die amerikanische und 2014 die europäische Zulassung als Reserveantibiotikum zur Behandlung der MDR-TB.³³

Mit dem Ethylendiamin SQ109, einer Weiterentwicklung des Ethambutols, befindet sich ein weiterer vielversprechender neuer Arzneistoff in der klinischen Phase 2.²¹ SQ109 ist ein Hemmer des kürzlich charakterisierten MmpL3-Transporters (mykobakterielles Membranprotein 3) in der Zellwand von *Mtb*, wodurch die Mykolsäure-Biogenese gestört wird.^{14,18,34,35} Des Weiteren befinden sich noch die Oxazolidinone Linezolid, Sutezolid und AZD5847 in der klinischen Entwicklung der Phase 2. Sie binden an die 23S-rRNA der 50S-Untereinheit der Ribosome und hemmen so die mykobakterielle Translation. Sutezolid (PNU-100480) weist im Vergleich zu Linezolid, vermutlich aufgrund des substituierten Thiomorpholinringes, ein günstigeres Nebenwirkungsprofil auf.^{18,25}

Auch die präklinische Phase ist mit einigen Analoga bekannter Arzneistoffgruppen gefüllt. Neben dem Nitroimidazol-Backup TBA-354 ist hier auch das DC-159a als neues Fluorchinolon zu finden. SQ641, ein Capuramycin-Analogon, weist als Inhibitor der Translokase-1 (TL-1) einen weiteren neuen Angriffspunkt in der Zellwandbiosynthese auf.^{18,36} Mit CPZEN-45, ein Caprazamycin-Abkömmling, und dem Dipiperidin SQ609 sind noch zwei weitere Vertreter in der Prälinik zu nennen. Vielversprechend scheint auch eine Hemmung der Decaprenylphosphoryl- β -D-ribose-2'-epimerase (DprE1)³⁷ zu sein. So blockiert eine Hemmung dieses Enzyms die Arabinansynthese und damit die Zellwandbiosynthese. Derzeit untersuchte Inhibitoren sind die Benzothiazinone BTZ043³⁸ (MHK = 2.3 nM) und das präklinische PBTZ169 (MHK = 0.42 nM)³⁹ sowie das Dinitrobenzamid DNB1.

Hinsichtlich antimykobakterieller Naturstoffe füllt sich die TB-Pipeline langsam. Mehrere neue Übersichtsartikel verdeutlichen das zunehmende Interesse in der Naturstoffforschung im Kampf gegen *Mtb*.⁴⁰⁻⁴³ Mit Stevastelin, einem Depsipeptid aus Penicillinkulturen, steht derzeit beispielsweise eine Leitstruktur für die Entwicklung mykobakterieller Phosphatase A Inhibitoren (IC_{50} = 8.8-28.7 μ M) zur Verfügung.⁴⁴ Weiterhin scheint mit Cyclomarin A ein potentes antimykobakterielles Naturprodukt charakterisiert worden zu sein. Cyclomarin A ist ein zyklisch-peptidisches Antibiotikum mit bakteriziden Effekten (MHK_{90} = 2.5 μ M) sowohl gegen die replizierende als auch gegen die dormante, nicht-replizierende *Mtb*. Der genaue Wirkmechanismus muss noch aufgeklärt werden; vermutet wird derzeit eine Modulation der

caseinolytischen Protease ClpC1.^{45,46} Durch Lee (2014) wurde mithilfe der Spectinamide das Repertoire für Leitstrukturen der antimykobakteriellen Naturstoffe erweitert.^{47,48} Diese semisynthetisch gewonnenen Naturprodukte adressieren die mykobakteriellen Ribosomen, ohne bestehende Kreuzresistenzen zu anderen Ribosom-Inhibitoren.

Der vielversprechendste Kandidat in der antimykobakteriellen Naturstoffforschung ist derzeit das Depsipeptid Pyridomycin, welches mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) von 0.72 μM aktuell das wirksamste Antituberkulotikum darstellt.⁴⁹

1.6 PYRIDOMYCIN

Mit Pyridomycin (PYR) rücken depsipeptidische Antituberkulotika als potentielle Leitstrukturen wieder verstärkt in den Fokus der Arzneistoffforschung.^{49,50} Lange Zeit galt die Entwicklung und Synthese derart komplexer Naturprodukte als unattraktives Target.^{48,51} Mithilfe intensiver Kooperationen zahlreicher pharmazeutischer Unternehmen und Institutionen erlebt die naturstoffgeleitete Wirkstoffentwicklung derzeit einen neuen Aufschwung.⁵²

Chemie und antimykobakterielles Potential

Das 1953 erstmals durch Maeda et al.⁵³ beschriebene PYR gehört zu der Klasse der zyklischen Depsipeptide. Depsipeptide sind Verbindungen, die sowohl Ester- als auch Amidstrukturen beinhalten.⁵⁴ Pyridomycin, 10(S)-Hydroxy-6(S)-(3-hydroxypicolinamido)-5(R),11(R)-di-methyl-2-(1-methylpropyliden)-9(S)-(3-pyridylmethyl)-8-aza-1,4-dioxa-cyclododecan-3,7,12-trion, wurde aus *Streptomyces pyridomyceticus* sowie aus *Dactylosporangium fulvum* gewonnen.^{49,55} Beide gehören der Gattung der Actinobacteriae an.^{56,49}

Pyridomycin lässt sich in vier Bausteine zerlegen (Abb. 6):

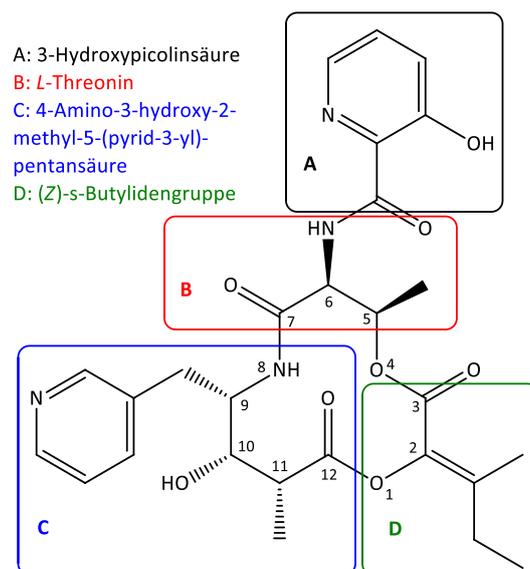


Abb. 6: Struktur des Pyridomycins mit farblicher Markierung der einzelnen Bausteine

Die 3-Hydroxypicolinsäureseitenkette (Teilstruktur A) ist durch eine Amidbindung mit dem *L*-Threonin (Teilstruktur B) verknüpft, unter Ausbildung einer phenylogenen Carbonsäure. Diese Aminosäure ist weiterhin mit der (*Z*)-2-Hydroxy-3-methylpent-2-ensäure (Teilstruktur D) verestert, wobei es sich hier um eine semizyklische (*Z*)-Butylidengruppe am C-2 handelt. Pyridomycin ist das bisher einzig bekannte Depsipeptid mit dieser Enolsäure.⁵⁷ Auf der anderen Seite des Zwölfringsystems ist die Teilstruktur der 4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-5-pyridinpentansäure (Teilstruktur C) über ein Amid mit dem *L*-Threonin in den Ring integriert. Mithilfe der Röntgenkristallanalyse konnte durch Koyama et al. (1967)⁵⁴ die absolute Konfiguration der fünf Chiralitätszentren ermittelt werden: 5*R*, 6*S*, 9*S*, 10*S*, 11*R*. Mit einer relativen Molekularmasse von 540.56^{54,58} gehört PYR zu den mittelgroßen Ringsystemen, wobei es vier Wasserstoff-Donator- und zehn Wasserstoff-Akzeptorstellen aufweist. Pyridomycin ist ein natürlich vorkommendes antimykobakterielles Molekül mit einer MHK von 0.39 µg/ml (0.72 µM) gegen *Mtb* (siehe Tab. 3), wohingegen es nur geringe bis keine antibakterielle Aktivität gegenüber grampositive und gramnegative Bakterien aufweist.^{49,53} Mit einer minimalen bakteriziden Konzentration (MBC) von 0.62 bis 1.25 µg/ml (entsprechen 1.11 bis 2.23 µM) gegen *M. tuberculosis* H₃₇Rv wirkt PYR außerdem bakterizid. Hartkoorn et al. konnte 2012 eine zehnfach stärkere Aktivität des PYRs nachweisen als 60 Jahre zuvor Maeda et al. (1953);^{49,53} eine Auflistung aller MHKs ist in Tab. 3 zusammengestellt. In dieser Arbeit werden ausschließlich die aktuelleren MHKs von Hartkoorn et al. (2012)⁴⁹ zum Vergleich herangezogen.

Tab. 3: Minimale Hemmkonzentrationen von Pyridomycin

Teststamm	MHK nach Hartkoorn et al. ⁴⁹		MHK nach Maeda et al. ⁵³	
	[µg/ml]	[µM]	[µg/ml]	[µM]
<i>M. tuberculosis</i>	0.39	0.72	2-5	3.6-8.9
<i>M. tuberculosis</i> 607*	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	1.6	2.9
<i>M. bovis</i>	0.39	0.72	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
<i>M. smegmatis</i>	0.78	1.39	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
<i>M. avium</i>	12.5	22.3	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
<i>M. phlei</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	1.6	2.9
<i>E. coli</i>	>100	>100	25	44.6
<i>S. paratyphi</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	12.5	22.3

* nicht-pathogener, schnellwachsender *Mtb*-Stamm⁵⁹; *n.b.* = nicht bekannt.

Molekulares Target

Der molekulare Wirkmechanismus von PYR wurde 2012 während der Entstehung dieser Dissertation aufgeklärt. So konnte durch Hartkoorn et al. (2012)⁴⁹ gezeigt werden, dass PYR das Wachstum der nicht-replizierenden *Mtb nicht* hemmt, also eine Inhibition dormanter Bakterien nicht möglich war. Das Target muss daher in der schnellwachsenden Stoffwechsel-

phase zu finden sein.⁵⁶ Jedoch ist PYR durchaus in der Lage, intrazelluläre Bakterien in infizierten Makrophagen im Wachstum zu hemmen.⁴⁹

Mithilfe der *whole-genome* Sequenzanalyse von PYR-resistenten Stämmen und durch Charakterisierung der SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) konnte das Target schlussendlich identifiziert werden. Es wurde eine einzige Mutation im *inhA*-Gen durch Austausch der Aminosäure Asp148 gegen ein Glycinrest gefunden, wobei sich Asp148 in direkter Nähe zur NADH-Bindestelle befindet. Die Arbeitsgruppe um Prof. Stewart Cole, Lausanne (Schweiz) wies damit das Genprodukt von *inhA*, die NADH-abhängige Enoyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase InhA, als Target von PYR nach — also genau das Isoniazid-Target. Die Hemmung von InhA führt zu einer Hemmung der Mykolsäurebiosynthese in der Zellwand der Mykobakterien, wodurch die Mykolsäuren in der Zelle akkumulieren und es zum Zelltod kommt.¹⁵ Im Fall von INH erfolgt nach einer Aktivierung durch die Oxidoreduktase KatG die Ausbildung eines INH-NADH-Addukts (siehe Abb. 7). Diese Katalase-Peroxidase oxidiert INH zum Acyl-Radikal, welches anschließend mit dem Cofaktor Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) das kovalente Addukt ausbildet.⁶⁰ Das bakterizide INH tötet *Mtb* mit einer MHK von 0.05 µg/ml (0.36 µM) bis 0.16 µg/ml (1.17 µM).^{15,49,61}

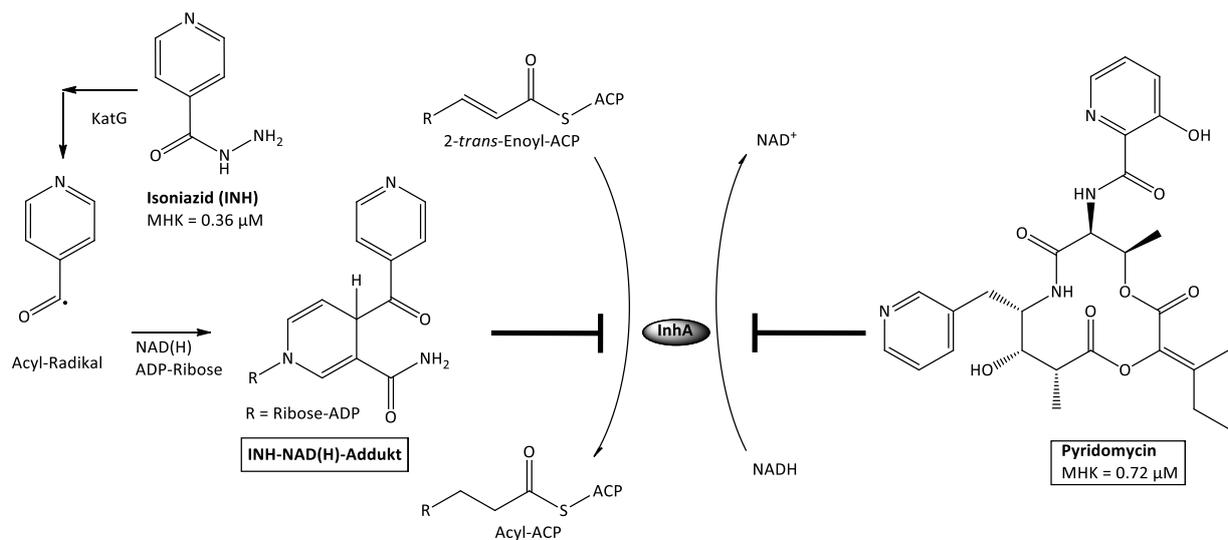


Abb. 7: Angriffspunkt und Wirkmechanismus von Pyridomycin und Isoniazid^{15,62}

PYR hemmt sowohl die isolierte Wildtypform des InhAs ($IC_{50} = 3.2 \mu\text{g/ml}$) als auch die S94A-Mutante, welche für die INH-Resistenz verantwortlich ist. Die Wildtyp-InhA besitzt eine höhere Affinität für NADH als die mutierten Enzyme InhA(S94A) und InhA(D148G). Die D148G-Mutante von InhA wird durch PYR nicht gehemmt. Diese PYR-Resistenz (D148G) geht daher auf eine veränderte NADH-Bindestelle mit verringerter Bindungsaffinität nicht nur für NADH, sondern auch für PYR zurück. PYR scheint somit als direkter kompetitiver Inhibitor zu NADH seine antimykobakterielle Wirkung auszuüben. Es greift somit am gleichen Target wie die Antituberkulotika INH und Ethionamid an, allerdings über einen anderen Mechanismus.

PYR anstelle von INH? Eine Abschätzung

Die Frage, die sich nun ergibt: Stellt PYR ein alternatives Antituberkulotikum zum INH dar? Mit einer ungefähren Mutationsrate von 3×10^{-6} pro Zellteilung treten unter einer INH-Therapie INH-Resistenzen auf — eine der am häufigsten vorkommenden Resistenzen unter einer Antituberkulotika-Therapie (siehe auch Kapitel 1.4).⁶³ Mit einer relativen Häufigkeit von 60 bis 70 % tritt diese INH-Resistenz aufgrund einer Mutation im *katG*-Gen auf,⁶⁴ welches die KatG kodiert. Viel seltener (8 bis 43 %)¹⁹ basiert eine INH-Resistenz auf einer Mutation in der Promoterregion im *inhA*-Gen, die eine Zunahme der Proteinexpression zur Folge hat.⁶⁴ Letztere *inhA*-Mutation führt zu einer Abnahme der Empfindlichkeit von InhA gegenüber PYR und somit zu einer Kreuzresistenz zwischen INH und PYR. Es konnte gezeigt werden, dass PYR (MHK = 0.3 bis 0.6 µg/ml) gegenüber INH-resistenten klinischen Isolaten mit einer *katG*-Mutation wirksam ist. PYR könnte, in Abhängigkeit von dessen Bioverfügbarkeitsprofil, gegebenenfalls einen Ersatz zur Behandlung INH-resistenter Keime darstellen, wenn die Mutation im *katG*-Gen lokalisiert ist.

Die Zunahme INH-resistenter *Mtb*-Stämme brachte eine Vielzahl an neuen Forschungsprojekten hervor. Ziel ist es, direkte InhA-Inhibitoren zu finden, die zum einen keine vorherige KatG-Aktivierung benötigen und demnach auf einem anderen Weg als dem bekannten INH-NADH-Addukt mit InhA interagieren und die zum anderen gegen INH-resistente Stämme wirksam sind. Bislang ist PYR der einzige direkte kompetitive InhA-Inhibitor ohne vorgeschaltete Bioaktivierung.^{49,62} Alternative, allosterische Modulatoren als direkte InhA-Inhibitoren, die außerhalb der katalytischen Tasche binden, sind bislang nicht beschrieben.⁶¹ Mit GSK und der TB Alliance sind zwei der größten TB-Forschungsgruppen genannt, die hinsichtlich der Evaluierung neuer (direkter) InhA-Inhibitoren große Datenbanken mit Millionen von Substanzen gescreent (Target-basiertes Screening) haben.¹⁰ Derzeit befinden sich einige Leitstrukturen aus diesem Screening in der Weiterentwicklung (siehe auch Abb. 8).^{10,61,64,65} Trotz der sehr guten antimykobakteriellen Aktivitäten der von GSK entwickelten direkten InhA-Inhibitoren konnten bislang jedoch keine In-Vivo-Effekte im akuten TB-Mausmodell nachgewiesen werden.⁶⁵ Am kritischsten scheint die Übertragung der erzielten In-Vitro-Ergebnisse auf die In-Vivo-Aktivität zu sein.⁶⁵ So belegte Encinas et al. (2014) beispielsweise eine geringe Korrelation zwischen dem antituberkulotischen In-Vitro- und In-Vivo-Profil direkter InhA-Inhibitoren, was es aber noch weiter aufzuklären gilt.⁶⁵ Diese Inaktivität kann mit einer schlechten Bioverfügbarkeit begründet werden. Inwieweit PYR mit dem neuen Wirkmechanismus ein besseres In-Vivo-Wirkprofil aufweist, muss in weiterführenden Untersuchungen erst noch erforscht werden.

Neben PYR zählen zu den derzeit bekannten direkten (nicht-kompetitiven) InhA-Inhibitoren, die keine vorgeschaltete KatG-Aktivierung benötigen, das Triclosan⁶⁶ als Vertreter der Alkyldiphenylether, die 2-Amino-1,3,4-thiadiazol-Derivate als Vertreter der Methylthiazole^{64,67} sowie die Diethylpyrazol-Derivate⁶⁵ (siehe auch Abb. 8). Mit Ausnahme des PYRs haben die genannten InhA-Inhibitoren weiterhin die Adressierung der Lipidsubstrat-Bindetasche des InhAs gemein; eine Bindung in der NADH-Bindetasche erfolgt dagegen nicht.^{61,62} InhA setzt sich aus einer Lipidsubstrat-, in der das Substrat 2-*trans*-Dodecenyl-CoA gebunden wird, und einer NADH-Bindungstasche zusammen (Abb. 9).

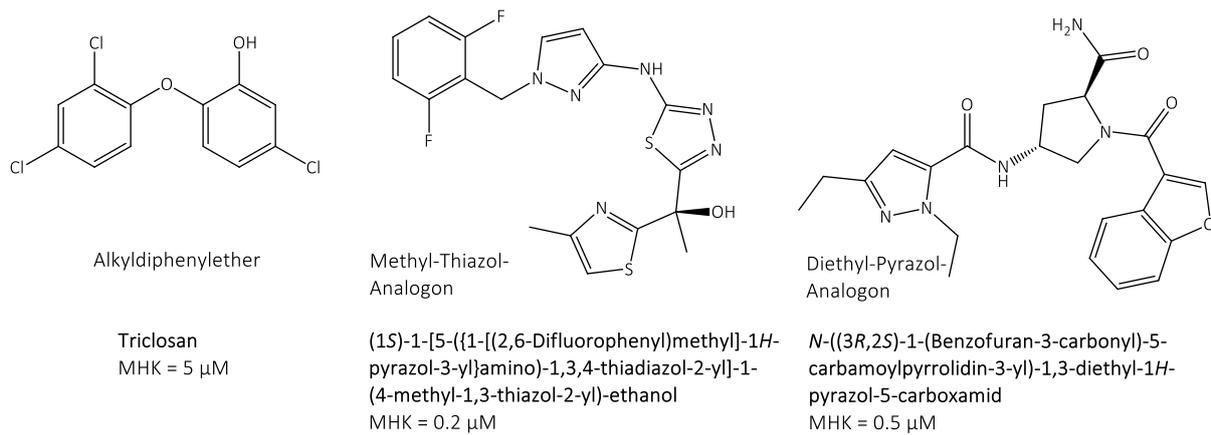


Abb. 8: Auswahl bekannter InhA-Inhibitoren, die die Lipid-Bindetasche adressieren^{61,64,66}

Für das PYR konnte Hartkoorn et al. (2013) mittels Röntgenkristallanalyse nachweisen, dass dessen antituberkulotische Aktivität aufgrund einer dualen Bindung sowohl in der Substrat- als auch in der NADH-Bindetasche und die damit einhergehende Blockade des InhAs hervorgerufen wird (Abb. 9).⁶² Somit verfügt PYR über einen weiteren wichtigen neuen Wirkmechanismus der dualen Besetzung beider Taschen.

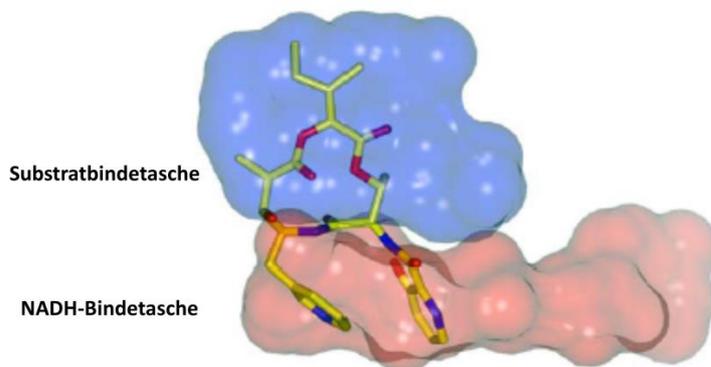


Abb. 9: Schematische Darstellung der Lipid- und NADH-Bindetasche des InhAs mit integriertem PYR⁶²

Unabhängig von den Ergebnissen von Hartkoorn et al. (2012) wurde zehn Jahre zuvor von Waters et al. (2002) eine mögliche Kinasehemmung als Wirkmechanismus des PYRs beschrieben (siehe auch Kapitel 5.3.1).^{49,68}

Mtb besitzt fünf Hauptklassen von Kinasen und Phosphatasen, die die Signaltransduktion im Bakterium vermitteln.⁶⁹ Eine dieser Klassen sind die „eukaryotisch-ähnlichen“-Serin-/Threonin-Proteinkinasen (STPKs).⁷⁰ Das *Mtb*-Genom kodiert 11 STPKs, die mit den Deskriptoren PknA bis PknL unterschieden werden, wobei *Mtb* neben den im Vergleich zu anderen Bakterien unterrepräsentierten Zweikomponentensignalsystemen einen außergewöhnlich hohen Anteil an STPKs aufweist.^{69,71-73} In *Mtb* liegen die folgenden drei STPKs als attraktive Targets konserviert vor: PknG (fördert das intrazelluläre Überleben des Bakteriums in den

Makrophagen des Wirts) und die zwei essentiellen transmembranären Rezeptorkinasen PknA und PknB.⁷² Bis auf PknA und PknB haben die Kinasen keinen Einfluss auf das Zellwachstum und die Zellteilung von *Mtb*.⁶⁹

Als Substrat der mykobakteriellen Serin/Threonin-Kinasen wird die Enoyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase InhA durch PknA, PknB, PknH und geringfügig durch PknF phosphoryliert und damit direkt biochemisch reguliert.⁷⁴ Demzufolge wird genau das Target des PYRs biochemisch beeinflusst. Hierbei weist die PknB die größte regulatorische Aktivität gegenüber InhA auf.^{71,73-76} Eine Phosphorylierung von InhA führt zu einer Abnahme der Bindungsaffinität gegenüber dem Cofaktor NADH. Folglich wird die De-Novo-Mykolsäurebiosynthese aufgrund der Phosphorylierung durch PknB negativ beeinflusst.^{73,74}

Für die InhA wird eine STPK-abhängige Phosphorylierung während der nicht-replizierenden dormanten Phase diskutiert, was zu einer Inhibition der InhA-Aktivität führt.⁷³ PknB wird vorwiegend während der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert.^{73,77} Ortega et al. (2014) wies zudem nach, dass eine PknB-Aktivität für die Reaktivierung der Zellen aus dem hypoxischen Stadium und damit für deren erneute Replikation essentiell ist.⁷⁸

Demnach kommt der PknB eine zentrale Rolle durch die Phosphorylierung zahlreicher intrazellulärer Substrate, die unter anderem in der Zellwandbiosynthese involviert sind, zuteil.^{71,73}

Der negativ regulierenden PknB-Aktivität auf die InhA stehen jedoch die postulierte Kinasehemmung des PYRs und der gleichzeitig durch Hartkoorn et al. erwiesenen InhA-hemmenden Eigenschaften gegenüber.^{49,68} Demnach müsste die Kinasehemmung eine herabgesetzte Phosphorylierung der Substrate und die damit einhergehende verminderte Aktivitätshemmung von InhA zur Folge haben, vorausgesetzt die Hemmung der Kinase ist auf die PknB beschränkt. Daher stellt sich die Frage, ob eine höhere effektive Konzentration an PYR mit der daraus resultierenden Kinasehemmung benötigt wird, um gleichzeitig voll aktives InhA hemmen zu können.

Aufgrund dieser regulatorischen Effekte des PknBs würde eine durch beispielsweise PYR bedingte herabgesetzte PknB-Aktivität zu erheblichen Veränderungen in der Zellmorphologie führen. Demnach hat sowohl eine gesteigerte (durch Hemmung der InhA) als auch eine verminderte PknB-Aktivität eine Hemmung der Zellteilung und des Zellwachstums zur Folge. Zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase in *Mtb* ist daher die stringente Regulierung der PknB-Expression und der Substratphosphorylierung durch PknB essentiell, wodurch die mykobakterielle PknB ein hervorragendes Target für die Entwicklung neuer Antituberkulotika darstellt.⁷⁹

Die hier genannten möglichen Wirkmechanismen des PYRs, Hemmung der InhA sowie mögliche direkte Regulierung von PknB, lassen die Vermutung eines bisher unbekanntes dualen Wirkmechanismus zu. Pyridomycin eignet sich daher hervorragend als Leitstruktur zur Entwicklung neuer Antituberkulotika.

1.7 MOTIVATION UND ZIELSTELLUNG

Es besteht eine dringende Notwendigkeit in der Entwicklung neuer sicherer Antituberkulotika. Naturstoffe spielten in der TB-Pipeline lange Zeit eine untergeordnete Rolle. Die vorliegende Dissertation soll daher einen Beitrag zur naturstoffbasierten antimykobakteriellen Arzneistoffentwicklung leisten, unter Berücksichtigung des Naturstoffs PYR als geeignete Leitstruktur. Aufgrund der Komplexität dieses Naturproduktes wird die Totalsynthese von PYR selbst als ungeeignet angesehen. Seine biotechnische Gewinnung, soweit sie bisher in kleinerem Stil versucht wurde, scheint auch keine ausreichenden Mengen zu erbringen. Daher ist die Synthese einfacher herstellbarer Derivate essentiell, auch um Struktur-Wirkungsbeziehungen zu gewinnen.

Eine Literaturrecherche zu Beginn dieser Arbeit lieferte ausschließlich PYR-Derivate mit unbekanntem antimykobakteriellen Eigenschaften.⁸⁰⁻⁸³ Bei diesen publizierten Abwandlungen lag der Schwerpunkt in der Derivatisierung der schwer zugänglichen semizyklischen (*Z*)-Butylidengruppe (Abb. 6). Im Gegensatz dazu richtet sich das besondere Augenmerk der vorliegenden Arbeit auf die Darstellung neuartiger, einfach zugänglicher PYR-Analoga, basierend auf einer zielgerichteten Modifikation dieser Leitstruktur (siehe Abb. 10).

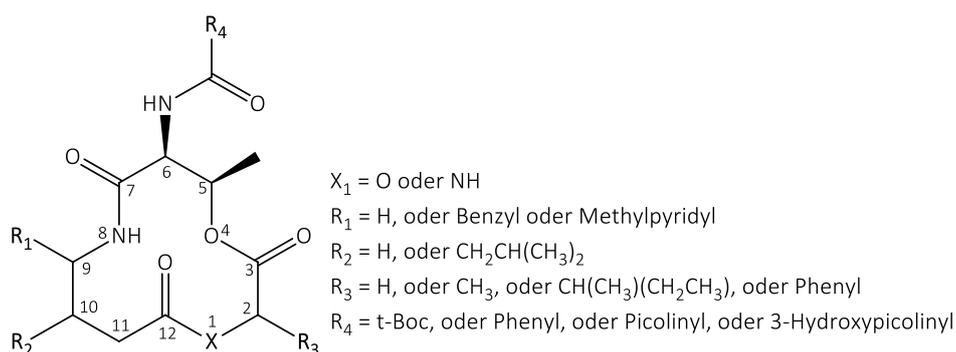


Abb. 10: Auszug möglicher Modifikationen des Zwölftringsystems im Rahmen dieser Dissertation

Der Focus lag zum einen in der Synthese einfach substituierter γ -Aminobuttersäure-Seitenketten (siehe auch Abb. 6). Zum anderen sollte die (*Z*)-Butylidengruppe an Position C-2 durch Substitution exozyklischer verzweigter und nicht-verzweigter Alkylgruppe sowie durch Einführung eines lipophilen Phenylrings variiert werden. Die Modifikation der exozyklischen Arylcarbonsäure an Position N-6 sollte klären, ob die 3-Hydroxypicolinsäure essentielles Strukturelement ist. Durch die vergleichende Synthese von sowohl ringgeschlossenen als auch ringoffenen Derivaten sollte die Bedeutung der zyklischen Depsipeptidstruktur analysiert werden. Alle Analoga sollten *in vitro* auf antimykobakterielle Aktivitäten untersucht werden, um ferner Struktur-Wirkungsbeziehungen (*structure-activity-relationships* - SARs) ableiten zu können. Die gewonnenen Derivate sollten zusätzlich zur Klärung eines möglichen dualen Wirkmechanismus in Enzymassays gegen InhA und PknB evaluiert werden.

Kapitel II

2 DEPSIPEPTIDSYNTHESEN: STRATEGIE, REAGENZIEN

Depsipeptidische Strukturen, wie im Fall vom PYR, sind durch das gleichzeitige Vorliegen von Amid- und Esterbindungen gekennzeichnet. Ähnlich wie in der Peptidchemie erfordert die Synthese dieses depsipeptischen Aufbaus den strategischen Einsatz von Schutzgruppen, um einen effizienten Aufbau der Zielmoleküle gewährleisten zu können. Diese Verknüpfung ist mittels repetitiver Abfolge von Amid- und Esterbindungsreaktionen mit anschließender Schutzgruppenspaltung möglich (siehe dazu Abb. 11).

Der in dieser Arbeit durchgeführte depsipeptidische Syntheseweg wird im Folgenden ausführlicher beschrieben. Dabei werden nur die Kupplungsreagenzien und Schutzgruppen erläutert, die in der vorliegenden Dissertation auch tatsächlich eingesetzt wurden.

In Abb. 11 ist exemplarisch die systematische Schutzgruppenstrategie von drei zu verknüpfenden Synthesebausteinen mit finaler Zyklisierung dargestellt.

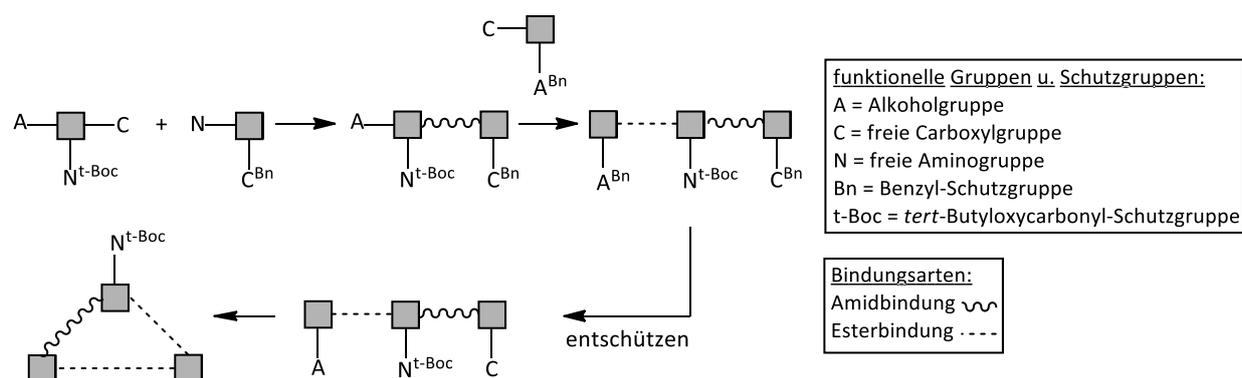


Abb. 11: Schematische Darstellung des depsipeptidischen Synthesewegs mithilfe einer systematischen Schutzgruppenstrategie; Dargestellt ist die Verknüpfung von drei Synthesebausteinen einschließlich der finalen Zyklisierung, wie für PYR-Analoga nötig

Aufgrund ihrer Stabilität startete der Syntheseweg mit der Knüpfung einer Amidbindung. Dem folgte die Veresterung der freien Alkoholfunktion mit einer freien Carbonsäure. Schlussendlich erfolgte nach vorheriger Schutzgruppenspaltung die Zyklisierung. Diese wurde durch eine weitere Veresterung realisiert.

2.1 SCHUTZGRUPPENSTRATEGIE

Die Einführung von Schutzgruppen dient dem Schutz funktioneller Gruppen vor Zerstörung oder unerwünschter Reaktionen mit anderen funktionellen Gruppen. Diese Schutzgruppen

müssen synthetisch leicht einzuführen und gegenüber verschiedenen Reaktionsbedingungen stabil sein. Des Weiteren müssen sie einfach und selektiv unter spezifischen Bedingungen wieder abzuspalten sein. Das orthogonale Schutzgruppenprinzip bedeutet das gleichzeitige Vorhandensein unterschiedlicher Schutzgruppenklassen, die getrennt und unabhängig voneinander entfernt werden können.⁸⁴

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Arten von funktionellen Gruppen mithilfe von Schutzgruppen geblockt: alkoholische Strukturen, primäre aliphatische Amine und Carboxylgruppen. Hierbei erfolgte der Einsatz der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (t-Boc) zum Schutz der terminalen N^α-Gruppe entsprechender Aminosäuren. Unter Einsatz der Benzyl-Schutzgruppe konnten sowohl endständige freie Alkoholfunktionen als Benzylether als auch Carboxylgruppen in Form eines Benzylesters geschützt werden.

Im Folgenden werden die verwendeten Schutzgruppen im Detail betrachtet.

2.1.1 TERTIÄRE BUTYLOXYCARBONYL-SCHUTZGRUPPE

Zum Schutz einer N^α-Gruppe können primäre und sekundäre Aminogruppen in Carbamidsäureester (Urethan-Derivate) überführt werden, z. B. in Form der tertiären Butyloxycarbonylgruppe (t-Boc).⁸⁴ Sie dient dem Schutz der nukleophilen Aminogruppe vor unerwünschten Reaktionen mit möglichen Elektrophilen wie Carbonylgruppen. Ist das gewünschte t-Boc-geschützte Edukt kommerziell nicht erhältlich, so kann die t-Boc-Gruppe unter milden Reaktionsbedingungen einfach und effizient mit dem Di-*tert*-Butyldicarbonat (Boc₂O) in einem THF-Wassergemisch unter basischen Bedingungen eingeführt werden.⁸⁵ Dies war in der vorliegenden Arbeit in allen Fällen quantitativ möglich. Ein großer Vorteil ist die einfache Spaltung dieser Aminoschutzgruppe mithilfe moderat starker Säurelösungen wie der Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan im Verhältnis 1:1 (siehe Kapitel 3). Es bildet sich ein Trifluoracetatsalz der Aminogruppe, bei gleichzeitiger Abspaltung des leicht flüchtigen Isobutens und Kohlenstoffdioxids. Diese Entschützung verlief in der Arbeit durchgehend quantitativ (Kapitel 7.2). Die t-Boc-Gruppe weist mit der raumfüllenden Isobutylfunktion eine hohe Stabilität gegenüber basischen Reaktionsbedingungen auf, wodurch der Einsatz von Hilfsbasen für andere Reaktionsschritte ermöglicht wird. Des Weiteren ist die t-Boc-Gruppe bei einer katalytischen Hydrierung, z. B. beim Abspalten möglicher Benzylschutzgruppen, stabil.

2.1.2 BENZYLSCHUTZGRUPPEN

Benzylschutzgruppen dienen unter anderem dem Schutz alkoholischer Funktionen und dem Schutz des C-Terminus freier Carboxylgruppen vor unerwünschten Nebenreaktionen.⁸⁴ Sie können einfach und unter milden Reaktionsbedingungen eingeführt werden. Hierbei wird zwischen Benzylester und Benzylether unterschieden. Diese Art von Schutzgruppen wurde in der vorliegenden Arbeit über verschiedene Wege synthetisiert. Nachfolgend wird auf drei Möglichkeiten zur Synthese des Benzylesters eingegangen.

Eine etablierte Methode zur Darstellung von Benzylestern ist 1) die Reaktion von Säurechloriden mit Benzylalkohol (BnOH). Hierbei erfolgt mithilfe von Thionylchlorid die Aktivierung

der freien Carboxylgruppe zum entsprechenden Säurechlorid.⁸⁶ Das Säurechlorid wird durch den im Überschuss vorliegenden BnOH nukleophil angegriffen. Alternativ kann 2) durch Verwendung der protischen *p*-Toluolsulfonsäure (*p*-TsOH) eine säurekatalysierte Veresterung durchgeführt werden.⁸⁷ Eine dritte Möglichkeit für die Benzylestersynthese stellt die Verwendung von Trimethylsilylchlorid (TMSCl) dar. Das eingesetzte TMSCl dient als saurer Katalysator und Dehydratisierungsreagenz. Der sich *in situ* bildende Silylester wird durch die gleichzeitige Freisetzung von katalytischen Mengen an HCl sofort mit dem vorliegenden BnOH unter Ausbildung des gewünschten Benzylesters substituiert.⁸⁸

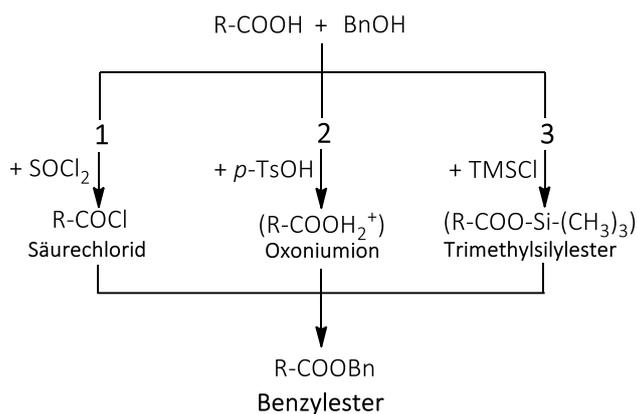


Abb. 12: Schematische Darstellung der Synthesestrategie der Benzylester

Die Alternativmethoden 2) und 3) wurden bei Misserfolg der Reaktion 1) angewandt. Alle Produkte wurden ohne weitere Reinigung als Hydrochlorid-Salze der nächsten Reaktion zugeführt, mit Ausnahme der Tosylate (Methode 2). Aus ihnen wurden zuvor im alkalischen Milieu die freien Basen isoliert.

Im Vergleich zur Estersynthese spielte die Benzylethersynthese in dieser Arbeit aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit vieler Ether eine untergeordnete Rolle. Die Synthese des Ethers konnte jedoch durch die Reaktion einer Halogenessigsäure mit Benzylalkohol unter Einsatz von KOH realisiert werden (siehe auch Kapitel 3).⁸⁹

Eine Spaltung von Benzylestern und Benzylethern ist standardmäßig durch katalytische Hydrogenolyse unter Verwendung von elementarem Palladium auf Aktivkohle (Pd/C) und Wasserstoffgas möglich. Hierbei ist das flüchtige Toluol das einzige Nebenprodukt. Die heterogene Hydrierung stellt bekanntlich quantitativ und qualitativ eine sehr gute und saubere Methode zur Abspaltung von Benzyl-Schutzgruppen dar,⁹⁰ was sich bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Umsetzungen bestätigte.

2.2 KUPPLUNGSREAGENZIEN

Die Synthese von Amid- und Estern erfordert eine vorherige Aktivierung der Carbonsäuregruppe. So würde sich bei gleichzeitigem Vorliegen eines primären Amins und einer Carbonsäure ohne vorherige Aktivierung und bei niedrigen Temperaturen lediglich das entsprechende Salz bilden. Unter Einsatz von Kupplungsreagenzien (siehe Abb. 13) ist diese Synthese unter milden Reaktionsbedingungen möglich.

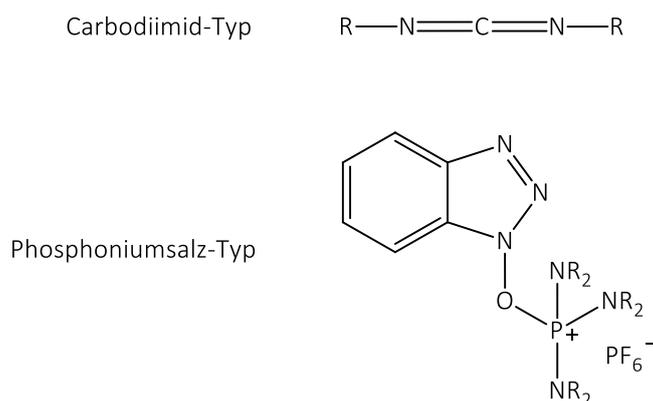


Abb. 13: Schematische Darstellung der Kupplungsreagenzien vom Carbodiimid-Typ (oben) und Phosponiumsalz-Typ (unten)

Mithilfe dessen erfolgt eine Aktivierung der freien Carboxylgruppe, welche anschließend mit einer freien Amino- oder Alkoholgruppe unter Ausbildung eines Amids oder Esters reagieren kann.⁹¹ Die aktivierten Carbonsäuren werden dabei nicht isoliert. Derzeit werden insbesondere Kupplungsreagenzien vom Carbodiimid- und Phosponiumsalz-Typ eingesetzt. Die Vor- und Nachteile gängiger Kupplungsreagenzien werden in Übersichtsartikeln sowohl von Montalbetti et al. (2005) als auch von El-Faham et al. (2011) ausführlich zusammengefasst.^{92,93}

Im nachfolgenden Abschnitt werden der Carbodiimid- sowie der Phosponiumsalz-Typ im Detail näher erklärt, da sie in dieser Arbeit für die Amid- und Estersynthesen herangezogen wurden.

2.2.1 PyBOP

Das in dieser Dissertation am häufigsten eingesetzte Kupplungsreagenz ist das Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP). PyBOP kann sowohl für die Amid- als auch für die Estersynthese eingesetzt werden (siehe Abb. 14).

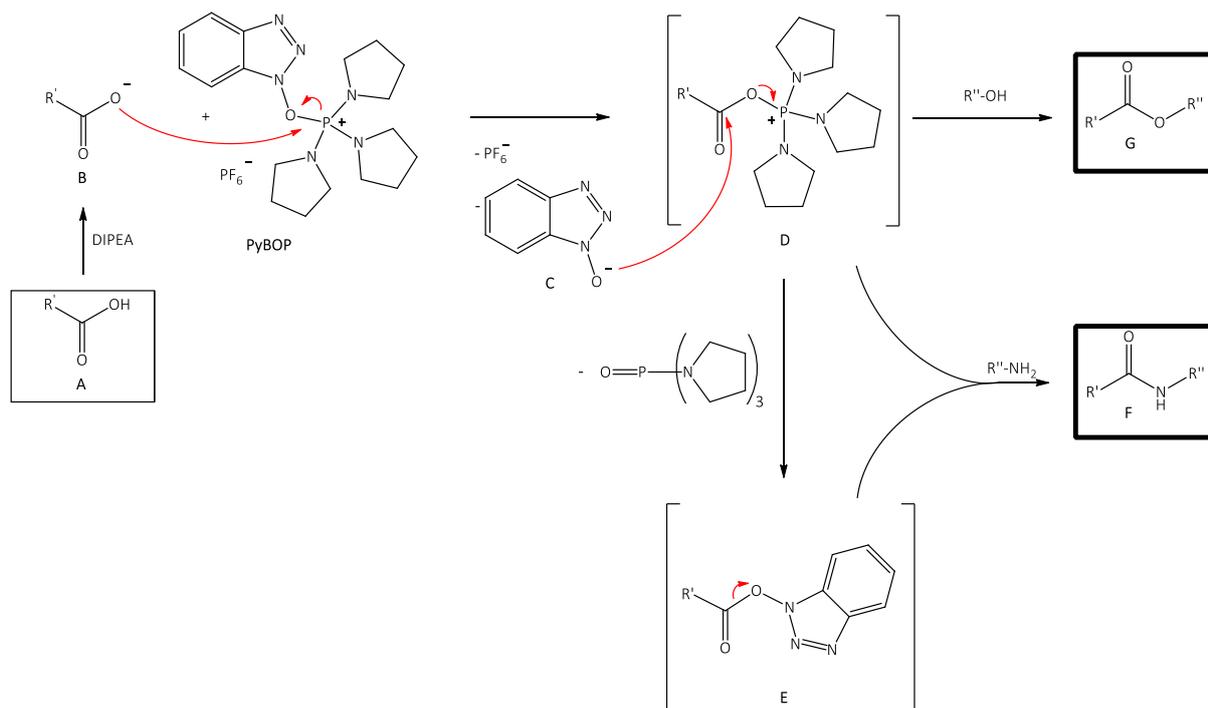


Abb. 14: Ester- und Amidsynthese mithilfe des Kupplungsreagenzes PyBOP, nach Kim et al. (1994)⁹⁴

Das stabile Kupplungsreagenz PyBOP kann direkt dem Amin- und Carbonsäuregemisch ergänzt werden.^{91,94} Die freie Carboxylgruppe der umzusetzenden Carbonsäure (A) wird unter Einwirkung einer Base (mindestens ein Äquivalent⁹³) deprotoniert. Als Hilfsbasen eignen sich tertiäre Amine wie *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA, Hünig-Base) oder Triethylamin (TEA). Das entstandene Carboxylat-Ion (B) reagiert daraufhin mit dem Phosphoniumsalz des PyBOPs, wodurch dieses unter Ausbildung des Acyloxyphosphoniumsalzes (D) acyliert wird. Komponente D ist sehr reaktiv und daher in der Lage, mit nukleophilen Reaktionspartnern wie Amino- oder freien Hydroxylgruppen unter Amid- (F) oder Esterbildung (G) zu reagieren.⁹⁴ Aufgrund der hohen Reaktivität kann D mit dem in Lösung befindlichen Oxanion des 1-Hydroxybenzotriazols (C) nukleophil reagieren. Es bildet sich der weniger reaktive Benzotriazolester (E) aus. Komponente E kann folglich nur durch starke Nucleophile wie primäre Amine angegriffen werden.

Mithilfe von PyBOP kann der Reaktionsverlauf so gesteuert werden, dass bevorzugt der Ester oder das Amid entsteht. Bei niedrigen Temperaturen (bei ca. -20 °C) wird die Folgereaktion von D nach E unterdrückt. Folglich steht für eine Veresterung ausreichend reaktives Acyloxyphosphoniumsalz (D) zur Verfügung. Bei Raumtemperatur liegt dagegen E als Hauptkomponente vor, was eine Amidsynthese begünstigt.⁹⁴

In der vorliegenden Arbeit wurde, wenn nicht anders beschrieben, PyBOP als Mittel der Wahl für die quantitative Veresterung und Amidierung eingesetzt. An dieser Stelle sei jedoch vermerkt, dass weder in dieser Arbeit noch durch Kim et al. (1994) Strukturen untersucht wurden, die gleichzeitig Amino- und Alkoholgruppen besitzen. Daher lässt sich nicht genau klären, in wieweit die Veresterung bei niedrigen Temperaturen tatsächlich mit der Amidierung in Konkurrenz steht.

2.2.2 DCC

Als alternatives Kupplungsreagenz zum PyBOP wurde das *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) verwendet.⁹¹ Hierbei erfolgt die Aktivierung der freien Carboxylgruppe durch Bildung eines instabilen, reaktiven *O*-Acylisoharnstoffderivates (Abb. 15). Auch hier ist der vorherige Einsatz einer Hilfsbase wie DIPEA zur Deprotonierung der Carbonsäure essentiell. Das so entstandene reaktive Zwischenprodukt kann mit nukleophilen Reaktionspartnern wie primären Aminen oder Alkoholen unter Amid- oder Esterbildung reagieren (siehe Abb. 15; Wege A bis C). Neben dem gewünschten Amid oder Ester bildet sich simultan der schwerlösliche *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff (DCU).⁹³

Des Weiteren kann auch eine irreversible Bildung eines weniger reaktiven *N*-Acylharnstoffderivates aufgrund einer *O*→*N*-Migration eine Ausbeuterniedrigung zur Folge haben (siehe Weg A und B).⁹² Die Bildung dieses unerwünschten *N*-Acylharnstoffs ist stark lösungsmittelabhängig. So verläuft die Reaktion in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) wesentlich schneller als im Dichlormethan (DCM).⁹³

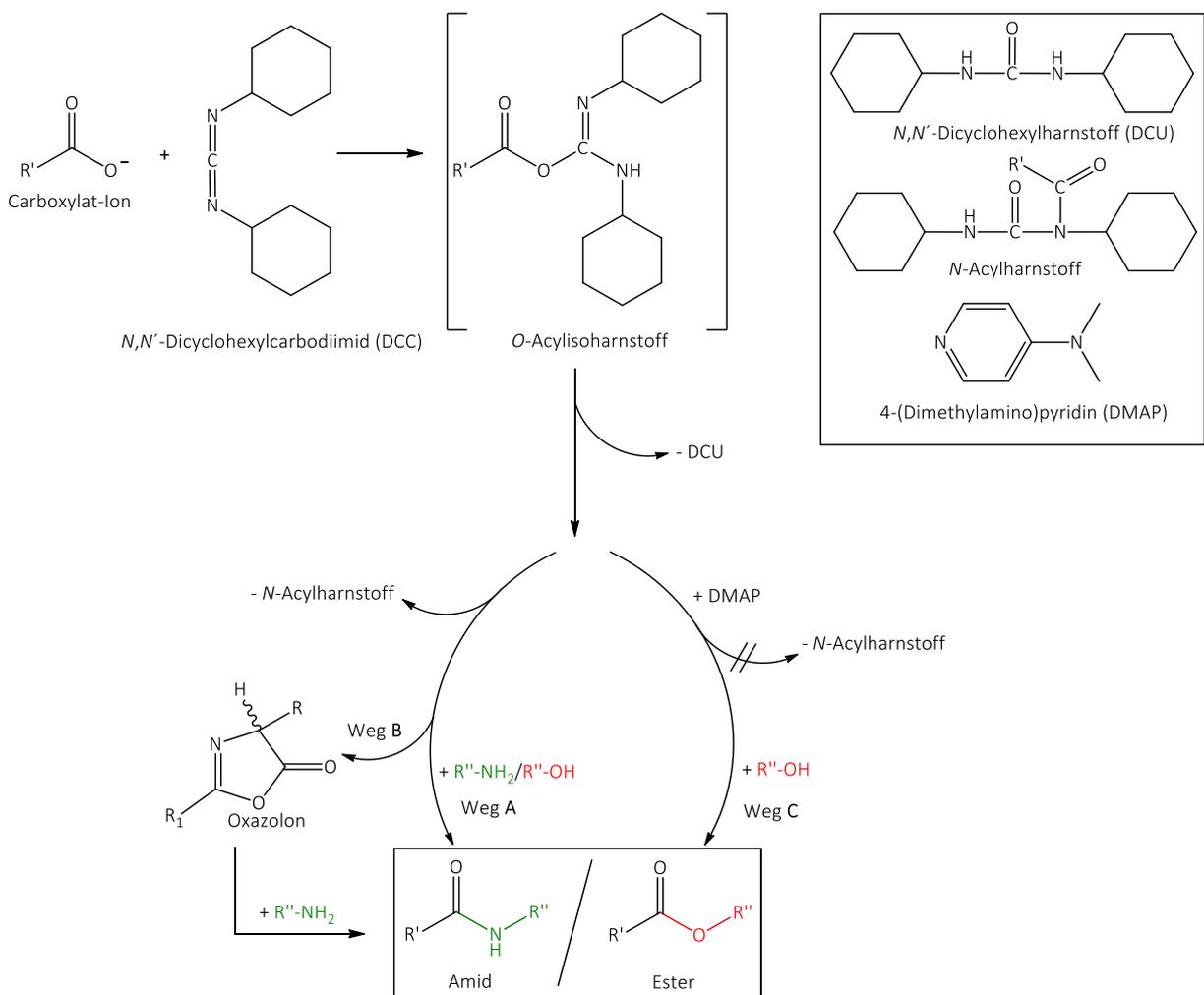


Abb. 15: Schematische Darstellung der Amid- und Estersynthese mithilfe von DCC

Als nachteilig ist weiterhin die mögliche Racemisierung einzelner Aminosäure-Bausteine im Zuge der Peptidknüpfungsreaktion zu nennen.⁹³ Hierbei kann es zum Verlust der Konfiguration des aktivierten Peptides bzw. Depsipeptides aufgrund von Deprotonierung kommen. Dies kann durch Enolatbildung oder durch Oxazolombildung (Weg B) via Zyklisierung des *O*-Acylisoharnstoffs geschehen.⁹³ Eine anschließende Aminolyse liefert folglich das entsprechende racemische Peptid- bzw. Depsipeptidgemisch, welches jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte.

Eine quantitative Veresterung war in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) und DCC gemäß einer Steglich-Veresterung möglich (Weg C).⁹⁵ Als Acylgruppenüberträger katalysiert DMAP die Reaktion des aktivierten Carboxylats mit dem entsprechenden Alkohol.⁹⁶ Der Einsatz von DMAP verhindert unerwünschte intramolekulare Nebenreaktionen wie die Entstehung des *N*-Acylharnstoffs. Folglich kann dies zu einer Ausbeutenerhöhung führen.^{91,92} Aufgrund der genannten Nachteile des DCCs (schwerlösliche Nebenprodukte, größere Gefahr der Racemisierung oder Epimerisierung) wurde dieses Kupplungsreagenz nur beim Versagen von PyBOP eingesetzt.

Kapitel III

3 SYNTHESSEN

Der folgende Abschnitt befasst sich ausführlich mit der Darstellung depsipeptidischer Zielstrukturen. Erläutert wird die Synthese zyklischer und offenkettiger PYR-Derivate, die nach einem strategischen Baukastenprinzip systematisch aufgebaut werden.

Der erste Teilabschnitt beschreibt die Synthese verschiedener zyklischer PYR-Abwandlungen. Hierbei werden unter anderem einfach substituierte Zwölfringsysteme sowie zyklische Depsipeptide mit integrierter Aryl-GABA-Einheit in Betracht gezogen. Diese Zielverbindungen sollen anschließend in die Evaluierung möglicher SARs eingehen. Der kritischste Syntheseschritt stellt die Zyklisierung zum zwölfgliedrigen Ring dar. Ein Zwölfringsystem gehört zu der Gruppe der mittleren Ringgrößen ($n = 7-13$).⁵¹ Sie weisen daher etwas größere Ringspannungen als Ringsysteme mit $n \geq 14$ auf — sie sind also energetisch ungünstiger. Demnach kann es hier vermehrt zur Ausbildung zyklischer Dimere oder Oligo- bzw. Polymere kommen. Um dem entgegen zu wirken, wurde im Zuge der Ausbeutenoptimierung das Arbeiten bei hoher Verdünnung ($c \leq 1$ mM) realisiert. Dies begünstigt die Bildung zyklischer Monomere, da die langsam ablaufenden intramolekularen Reaktionen im Gegensatz zur schnellen intermolekularen Wechselwirkung bevorzugt werden.^{97,98}

Die im zweiten Teilabschnitt beschriebenen Synthesen offenkettiger Derivate sollte die Notwendigkeit eines Ringsystems *per se* klären. Hierbei lag der Fokus unter anderem auf der Synthese lipophiler und hydrophiler Derivate. Des Weiteren wird ein kurzer Einblick in die möglichen Synthesen einer 4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-5-phenylpentansäure sowie der exozyklischen 3-Hydroxypicolinsäure aufgezeigt, beides charakteristische Strukturmerkmale des PYRs.

3.1 SYNTHESE NEUARTIGER ZYKLISCHER PYRIDOMYCIN-DERIVATE

Derzeit ist die Synthese von lediglich acht Derivaten des PYRs im Detail beschrieben, wobei jedoch nur für die im Jahr 2012 veröffentlichten Analoga der Dihydropyridomycine eine antimykobakterielle Aktivität evaluiert wurde (Abb. 16).^{80,83,99,100} Für die von Altmann et al. (2014) patentierten 500 PYR-Derivate wurde die mögliche antituberkulotische Aktivität bislang noch nicht geklärt.¹⁰⁰ Demnach war es zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit unmöglich, SARs aufzustellen.

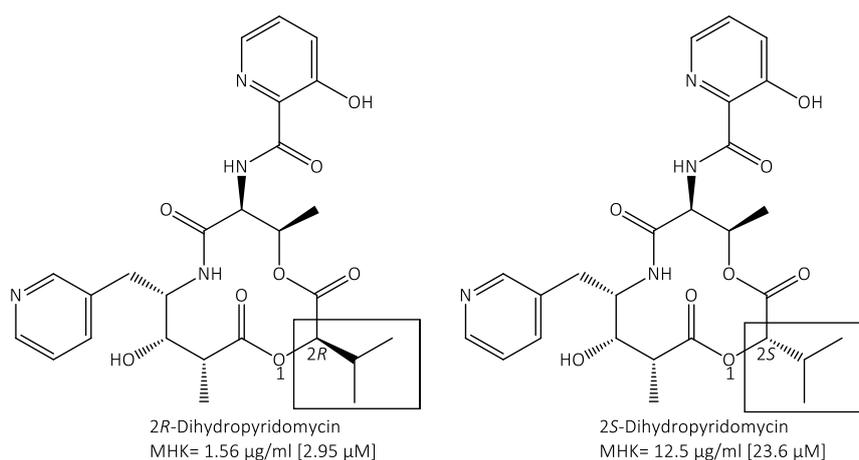


Abb. 16: Chemische Struktur der derzeit aktivsten PYR-Derivate⁹⁹

Alle bisher publizierten Abwandlungen befassen sich vorrangig mit der Vollsynthese des PYRs mit besonderem Augenmerk auf Derivatisierungen der (*Z*)-*s*-Butylidengruppe (siehe Abb. 16). Die erstmals in den 80er Jahren durch Kinoshita et al. (1989) beschriebene Totalsynthese umfasst mindestens 15 Syntheseschritte.¹⁰¹ Hierbei lag die Gesamtausbeute für das Ringsystem inklusive der schwer zugänglichen „Enol“-Seitenkette bei 7.1 %. Mit der Synthese der Dihydropyridomycine im Jahr 2012 konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses charakteristische Strukturelement keinen großen Einfluss auf die antimykobakterielle Wirksamkeit hat. So führte die Substitution der Butylidengruppe gegen eine Isopropylgruppe (Abb. 16) zu keinem Aktivitätsverlust (MHK (*R*-Isomer) = 2.9 µM).⁹⁹ Einfacher substituierte Derivate besitzen demnach ein zunehmendes Interesse. Die Gesamtausbeute des Zwölftrings lag bei 20 % ausgehend von der Pyridyl-GABA-Komponente (2*R*,3*S*)-4-(Dibenzylamino)-3-hydroxy-2-methyl-5-(pyridin-3-yl)pentansäure.⁹⁹

Das erste „abgespeckte“ PYR-Derivat, das 6-(3-Hydroxypicolinoylamino)-5-methyl-1,4-dioxa-8-aza-cyclododecane-3,7,12-trion, synthetisierte bereits 1970 Kinoshita et al. in acht Schritten ausgehend von der Kondensation der 4-(Benzylloxycarbonylamino)buttersäure und des *t*-Butylglykolsäureesters (Struktur dargestellt in Abb. 17 in Kapitel 3.1.1, Verbindung **8b**). Hierüber liegen jedoch keine Daten hinsichtlich antimykobakterieller Aktivität vor.⁸⁰

Pyridomycin ist aus PYR-produzierenden Stämmen prinzipiell biotechnisch zugänglich. Eine Isolierung erweist sich jedoch derzeit als wenig ertragreich. 2011 gelang es Huang et al. mithilfe von halbsynthetisch gewonnenen Analoga, den Biosyntheseweg des PYRs aufzuklären.⁵⁷ Das Augenmerk lag hierbei insbesondere in der Substitution der exozyklischen 3-Hydroxypicolinsäure mit folgenden Gruppen: Picolinsäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure, 2-Fluorbenzoesäure und 2-Chlorbenzoesäure. Aufgrund fehlender antimykobakterieller Daten konnte hierzu ebenfalls keine SAR aufgestellt werden. Die in dieser Arbeit synthetisierten PYR-Derivate sollen einen Beitrag zur Vorhersage essentieller SARs leisten. Hierfür wurde der Substitutionsgrad am Zwölftringssystem schrittweise erhöht.

Dieser Abschnitt befasst sich zunächst mit der Synthese einfach substituierter zyklischer Depsipeptide sowie der Synthese komplexer substituierter, neuartiger Ringsysteme. Als

Referenz-Grundkörper wurde das in der Literatur bereits bekannte 6-(3-Hydroxypicolinoylamino)-5-methyl-1,4-dioxa-8-aza-cyclododecane-3,7,12-trion (**8b**) mit herangezogen und synthetisiert (siehe Abb. 17).⁸⁰

3.1.1 EINFACH SUBSTITUIERTE ANALOGA

Der erste Schritt der systematischen Kettenverlängerung beinhaltete die Kupplung von *N*-Boc-*L*-Threonin mit dem Benzylester **1** (Abb. 17). Dieser γ -Aminobuttersäurebenzylester (**1**) wurde über das Säurechlorid der γ -Aminobuttersäure unter Verwendung von Thionylchlorid in BnOH mit einer Ausbeute von ca. 60 % synthetisiert.⁸⁶ Für die Amidbildung zu **2** erwies sich PyBOP in Dichlormethan als bestes Kupplungsreagenz. Die Verwendung von DCC als alternatives Kupplungsreagenz erzielte keine Umsetzung. Das Dipeptid **2** wurde anschließend unter Verwendung von PyBOP mit zwei verschiedenen Glykolsäurederivaten (**3a** und **3b**) zu den Depsipeptiden **4a** (70 %) und **4b** (58 %) verestert.⁹⁴ Hierbei wurde das Dipeptid **2** zum einen mit der gemäß Literatur synthetisierten 2-(Benzylloxy)essigsäure⁸⁹ (**3a**, 63 %) und zum anderen mit der kommerziell erhältlichen (*R*)-(+)-2-Benzylloxypropionsäure (**3b**) verestert. Ein vergleichender Umsatz von **2** mit **3a** zum gewünschten Depsipeptid **4a** nach einer Steglich-Reaktion unter Verwendung von DCC lieferte lediglich eine Ausbeute von 30 %.

Die anschließende katalytische Hydrogenolyse zur Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen zu den Produkten **5a** und **5b** unter Verwendung von Pd/C (10%) erfolgte quantitativ. Im Nachhinein konnte jedoch mitunter die Bildung eines unerwünschten Substitutionsproduktes beobachtet werden. So kam es aufgrund einer nukleophilen Substitution durch Methanol zur Methylesterbildung. Dies wurde insbesondere bei stark konzentrierten Reaktionsgemischen beobachtet. Eine Hydrolyse des Methylesters war nicht möglich (siehe dazu Kapitel 3.2.1). Folglich war ein Ringschluss unmöglich. Durch Austausch des Methanols gegen das sterisch anspruchsvollere Isopropanol wurde dieses Problem behoben. Dies wurde fortan für die Darstellung der entschützten offenkettigen Strukturen **22** und **45-46** berücksichtigt (Kapitel 3.1.3 und 3.1.4.2).

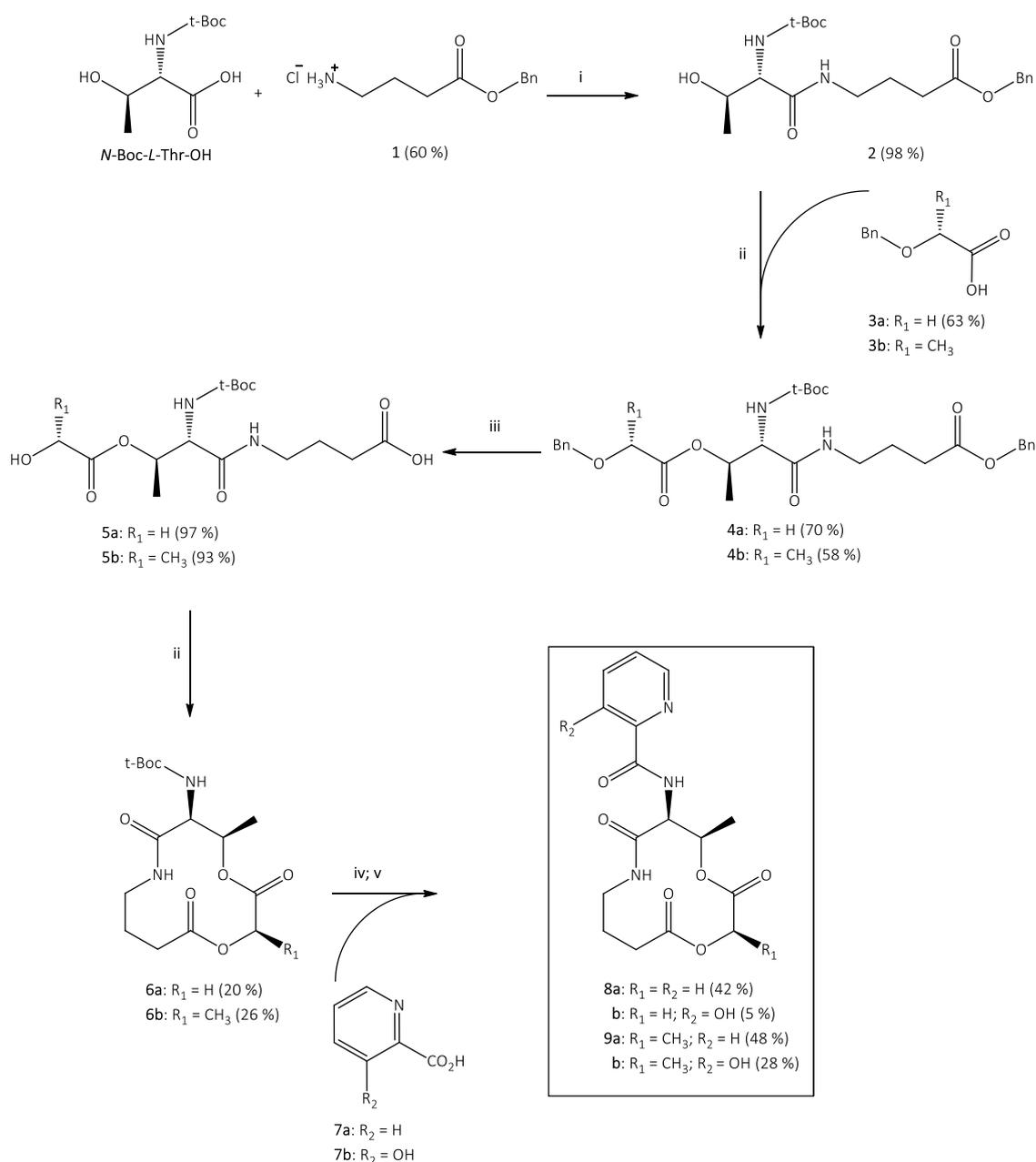


Abb. 17: Synthese der Ringsysteme **8a-b** und **9a-b**

Reaktionsbedingungen: i) PyBOP, DIPEA, DCM, RT, 16 h; ii) DIPEA, DCM, -20°C , 15 min, PyBOP, RT, 5 h; iii) Pd/C (10 %), H_2 , MeOH, 4 bar, RT, 24 h; iv) TFA/DCM, 0°C , 5 min; v) DIPEA, PyBOP, DMF, RT, 3 d.

Der anschließende Einsatz von PyBOP und DIPEA führte mittels Esterbindungsknüpfung zur erfolgreichen Synthese der Zwölfringe **6a** und **6b**. Zur Vermeidung von Substanzverlust wurde auf zusätzliche Wasch- bzw. Extraktionsschritte verzichtet. Aufgrund einer fehlenden UV-Aktivität (unzureichend großes chromophores System) erwies sich die Umkristallisation aus Ethylacetat, zur Isolierung der Monomere **6a** und **6b**, im Gegensatz zur Flüssigchromatographie als zielführender. Nasschemische Nachweismethoden beispielsweise mithilfe von Bromthymolblau¹⁰², sensitives Detektionsmittel insbesondere für lipophile Strukturen, oder Iod zeigten keine positiven Farbreaktionen.

Eine Entstehung eventueller intermolekularer Nebenprodukte wie Oligomere oder Polymere konnte nicht völlig ausgeschlossen werden. Diese Nebenprodukte wurden jedoch nur in Spuren nach zusätzlichen Extraktionsschritten mithilfe der ESI-MS spektrometrisch nachgewiesen.

Mit Ausbeuten von 20 % (**6a**) bis 26 % (**6b**) war die Synthese der Ringschlüsse vergleichbar erfolgreich wie die in der Literatur beschriebene Synthese von Kinoshita et al. (1978).⁸⁰ Der finale Schritt beinhaltete die Abspaltung der t-Boc-Schutzgruppe mithilfe von TFA in Dichlormethan (1:1) (Schritt iv) mit sofortiger nukleophiler Substitution der so entstandenen freien Aminogruppe mit den entsprechenden Pyridyl-Carbonsäuren (Schritt v). Auf eine Isolierung des entschützten Ringsystems musste aufgrund einer möglichen *O*→*N*-Acylgruppenwanderung der nukleophilen Aminogruppe verzichtet werden. Als Pyridyl-Carbonsäuren wurden entweder Picolinsäure (**7a**) oder 3-Hydroxypicolinsäure (**7b**) verwendet, die mithilfe von PyBOP in DMF das freie Amin acylierten. Nach einer Reaktionsdauer von 3 d bei 37 °C wurden die Zielverbindungen **8a-9b** in zufriedenstellenden Ausbeuten isoliert.⁸⁰ Mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HR-MS) wurden ausschließlich acylierte Monomere nachgewiesen.

In Abb. 18 ist, repräsentativ für alle Ringsysteme, das ¹H-NMR-Spektrum von **8b** gezeigt, an welchem die charakteristischen Signale des Ringsystems erläutert werden. Zu den auffälligsten Signalen gehören die magnetisch nicht äquivalenten diastereotopen Protonen der Methylengruppe an Position C-2. Die Anisochronie der Protonen der Methylengruppe weist auf eine stabil unterschiedliche magnetische Umgebung der beiden H-Atome und folglich auf eine konformative Starre des Ringsystems hin. Die geminalen Protonen besitzen aufgrund der gehinderten Rotation unterschiedliche chemische Verschiebungen. Demnach ist das eine Proton (2'-H) bei 4.91 ppm stärker tieffeldverschoben und das stärker abgeschirmte 2-H bei 4.51 ppm zu finden. Die geminale Kopplung hat eine Kopplungskonstante von 15 Hz (²J-Kopplung) mit einem ausgeprägten Dacheffekt. Dieselben diastereotopen Protonen zeigen in der offenkettigen Vorstufe (**5a-b**) keine ausgeprägten Unterschiede hinsichtlich der chemischen Verschiebung ($\delta \sim 4.15$ ppm) und der Feinaufspaltung der Signale (siehe Kapite 7.2.2.3). Dies ist erst nach Ringschluss und dem damit verbundenen Verlust an Flexibilität möglich (Verlust der magnetischen Äquivalenz). Dadurch stellt die Verschiebung und Anisochronie der Methylenprotonen in den Zwölfringsystemen einen guten Indikator für einen erfolgten Ringschluss dar.

Des Weiteren ist im ¹H-NMR-Spektrum ein tieffeldverschobenes breites Dublett bei $\delta = 8.7$ ppm zu finden. Dieses kann dem Proton der NH-Gruppe an Position C-6 aufgrund der direkten Nachbarschaft zu einem aromatischen, elektronenziehenden System – wie der 3-Hydroxypicolinsäure – zugeordnet werden. Als elektronenziehender Substituent beeinflusst der Aromat weiterhin direkt die Signallage von 6-H. Infolge der veränderten chemischen Umgebung bei **8b** erfolgte hier im Vergleich zur Vorstufe **6a** ($\delta = 4.21$ ppm) eine Tieffeldverschiebung um ca. 0.4 ppm zu $\delta = 4.61$ ppm (siehe Kapitel 7.2.2.3) – ein weiterer Indikator für den erfolgreichen Ringschluss.

Weiterhin zeigt das ¹H-NMR-Spektrum ein ausgeprägtes Singulett bei $\delta = 11.63$ ppm, welches dem Proton der 3-Hydroxypicolinsäure (Pic-OH) zuzuordnen ist. Diese Tieffeldlage kann

ausschließlich mit dem sauren Charakter dieser substituierten phenylogenen Carbonsäure erklärt werden ($pK_a = 9.17$).⁵⁸

Insgesamt kann mithilfe der chemischen Verschiebung und der Signalaufspaltung der eben genannten Protonen 2/2'-H, NH-6, 6-H und Pic-OH ein ringgeschlossenes System sowie eine erfolgreiche exozyklische Acylierung nachgewiesen werden.

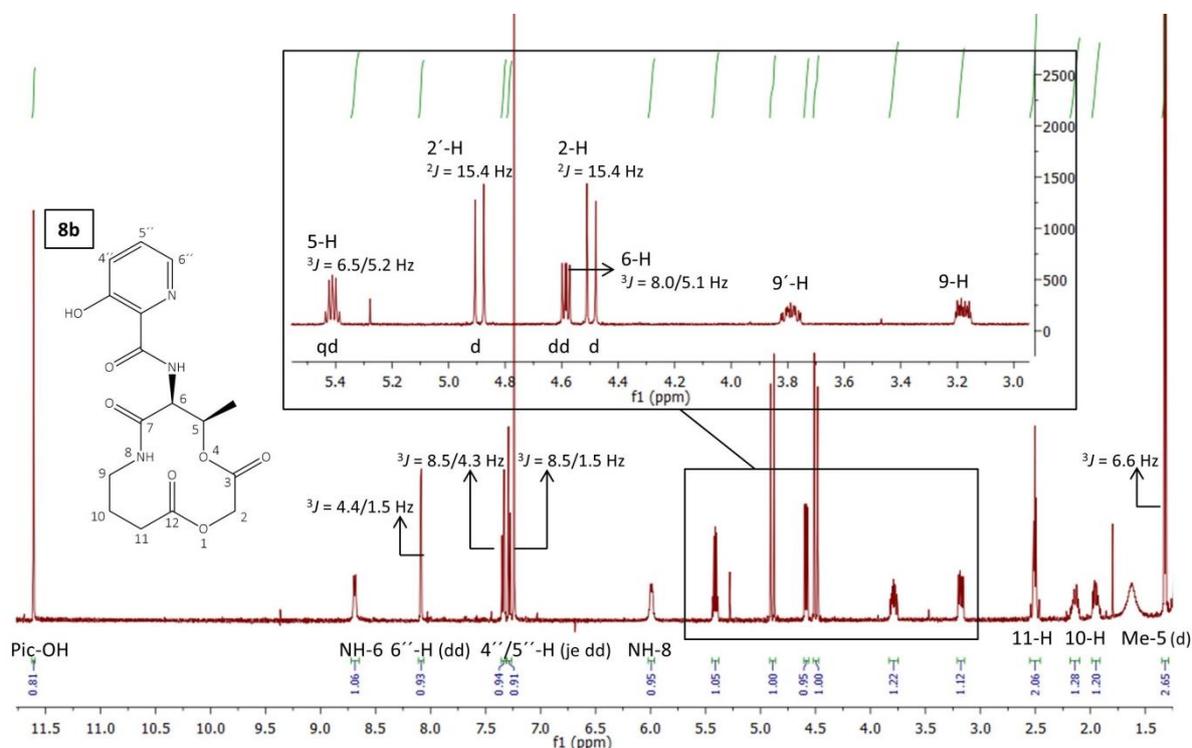


Abb. 18: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung 8b exemplarisch für alle Zwölfringsysteme mit exozyklischer aromatischer Acylierung

Die in diesem Abschnitt beschriebenen einfach substituierten PYR-Derivate **8a-b** und **9a-b** konnten somit in nur sechs Syntheseschritten erfolgreich gewonnen werden. Zur Aufklärung möglicher SARs wurden sie anschließend hinsichtlich antimikrobieller, antimykobakterieller und antimykotischer Aktivität untersucht (siehe Kapitel 5).

3.1.2 ZYKLISCHES DEPSIPEPTID MIT EXOZYKLISCHEN ALKYL-SEITENKETTEN

Wie bereits in Kapitel 1.7 erwähnt, sollten zur Aufstellung von SARs unter anderem verzweigte Alkylgruppen an Position C-2 und/oder C-10 eingeführt oder gegebenenfalls ausgetauscht werden. Für die Realisierung dieser Synthese wurde auf kommerziell erhältliche Grundbausteine zurückgegriffen.

Die entsprechende Derivatisierung des PYR-Moleküls als Leitstruktur sah wie folgt aus: 1) Eingliederung von Pregabalin als „GABA“-Analogon, 2) Austausch des semizyklischen Dehydroisoleucins in Position 2 gegen kommerziell erhältliches *L*-Isoleucin, 3) der dadurch bedingte Austausch der Esterbindung an Position 12 gegen eine Amidgruppe, 4) Einführung der Picolin-säure anstelle der 3-Hydroxypicolinsäure und 5) Auslassen des schwerzugänglichen Pyridyl-

methyl-Substituenten (vergleiche Abb. 19). Diese Variation des Depsipeptids wurde durch Synthese von Verbindung **16** realisiert.

Der erste Reaktionsschritt in der Kettenverlängerung stellt die Verknüpfung des Antiepileptikums Pregabalin mit Isoleucin dar (Verbindung **12**, Abb. 19). Zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen aufgrund der freien Carboxylgruppe des *L*-Isoleucins (Ile) wurde diese mithilfe von *p*-TsOH und BnOH in den entsprechenden Benzylester **10** überführt (Schritt i).¹⁰³ Das dabei ausfallende Salz, ein Tosylat, wurde in Ether gewaschen und anschließend in die freie Base überführt.¹⁰⁴ Eine Benzylierung über das entsprechende Säurechlorid, in Anlehnung an Verbindung **1** aus Kapitel 3.1.1, mithilfe von Thionylchlorid war nicht möglich. Hierbei konnte keine Umsetzung festgestellt werden. Weiterhin musste im Vorfeld die freie Aminogruppe des Pregabalins mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc₂O) unter Ausbildung von Verbindung **11** (Schritt iii) geschützt werden.

Nach Spaltung der *t*-Boc-Gruppe im sauren Reaktionsmedium (TFA/DCM; Schritt v) erfolgte die sofortige Kupplung des entschützten Amins der Zwischenstufe von **12**. Unter Verwendung von PyBOP und der Hilfsbase DIPEA konnte somit das Intermediat von **12** erfolgreich mit *N*-Boc-*L*-Threonin zu **13** umgesetzt werden. Die nachfolgende katalytische Hydrogenolyse mit Pd/C (10%) bei 5 bar Wasserstoffdruck lieferte mit 90 % eine sehr gute Ausbeute an **14**. Der endgültige Ringschluss wurde unter Verwendung von DIPEA und PyBOP bei -20 °C mit graduelltem Temperaturanstieg bis Raumtemperatur durchgeführt (Schritt vii).

Als Produkt konnte der gewünschte Zwölfring **15** mittels ESI-MS detektiert werden. Auf die zeitintensive Isolierung dieses zyklischen Depsipeptids mittels Flüssigchromatographie wurde aufgrund schwacher UV-Aktivität verzichtet; alternative nasschemische Detektionen wie beispielsweise mit Molybdätophosphorsäure blieben erfolglos. Stattdessen bewährte sich die direkte Umsetzung mit Picolinsäure. Infolgedessen konnte das PYR-Derivat **16** mit einer Ausbeute von 16 % erfolgreich synthetisiert werden.

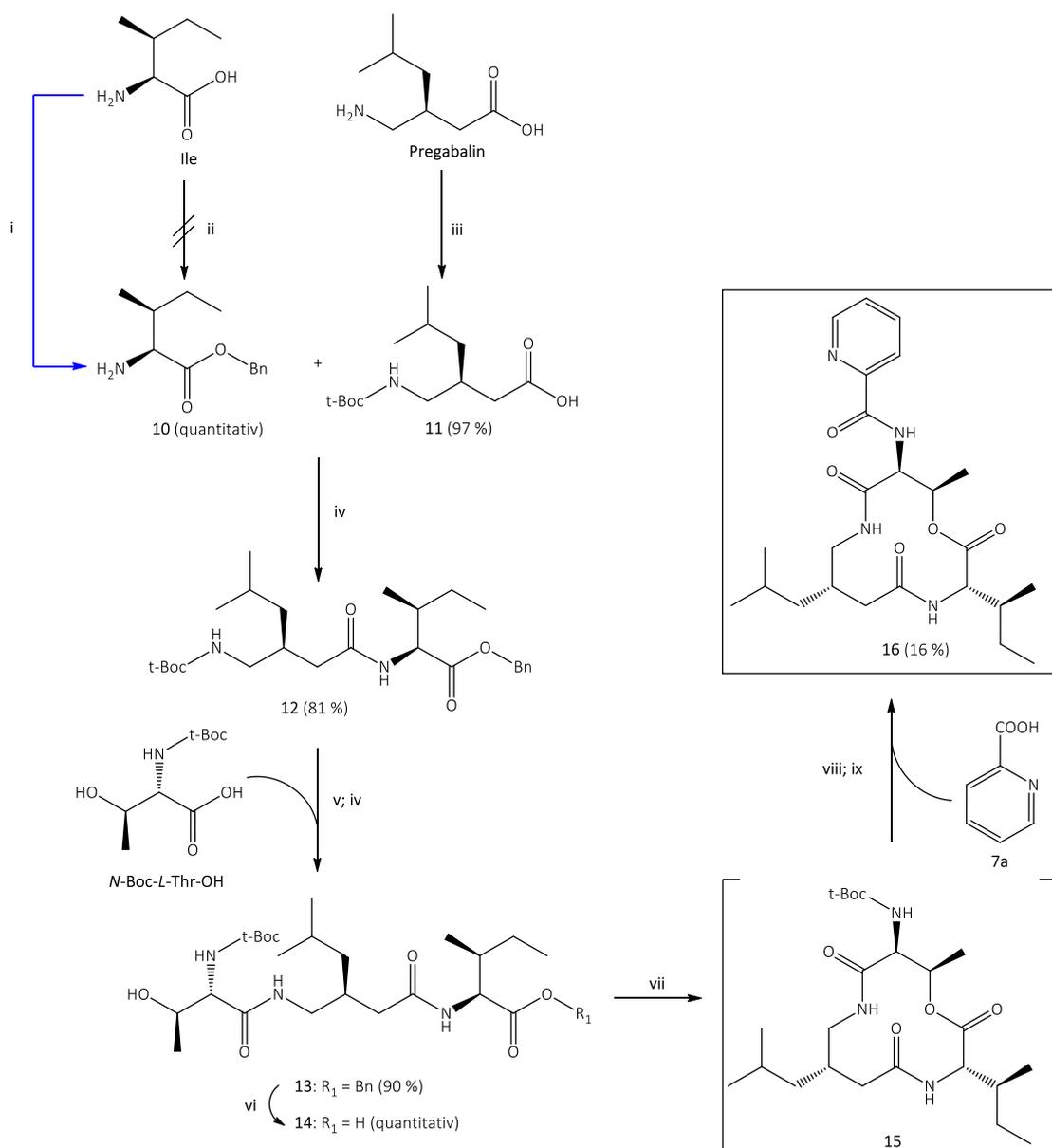


Abb. 19: Synthese von Verbindung 16

Reaktionsbedingungen: i) *p*-TsOH, BnOH, Toluol, 135 °C, 5 h; ii) SOCl₂, BnOH, Rückfluss, 4 h; iii) Boc₂O, THF, H₂O, NaHCO₃, RT, 16 h; iv) PyBOP, DIPEA, DCM, RT, 5 h; v) TFA/DCM, RT, 1 h; vi) Pd/C (10%), H₂, 5 bar, MeOH, 6 h; vii) DIPEA, DCM, -20 °C, 15 min, PyBOP, RT, 5 h; viii) TFA/DCM, RT, 5 min; ix) DIPEA, PyBOP, DMF, 37 °C, 4 d.

3.1.3 ZYKLISCHES DEPSIPEPTID MIT ENDOZYKLISCHEM PHENYL-MOTIV

Die semizyklische „Dehydroisoleucin-Domäne“ des PYRs wird durch zwei wesentliche Eigenschaften gekennzeichnet: Lipophilie und Planarität (siehe Abb. 6 grüne Markierung). Um eben dieses Teilstück des PYR-Moleküls hinsichtlich SARs zu untersuchen, wurde es durch einen planaren Ring ausgetauscht. Hierfür wurde stellvertretend der Phenylring in den Zwölfring integriert (Verbindung 24, Abb. 21).

3.1.3.1 Benzylierung von β -Alanin

Ausgangspunkt der Kettenverlängerung stellte nach Abb. 20 die Benzylierung des kommerziell verfügbaren biogenen β -Alanins dar. Die Veresterung mit BnOH zu **17** ist prinzipiell mithilfe von Thionylchlorid oder durch protische Säuren wie *p*-TsOH sowie mithilfe von Trimethylsilylchlorid (TMSCl) möglich (vergleiche Kapitel 2.1.2).

Die Benzylierung des β -Alanins benötigte jedoch eine Reihe von Optimierungsschritten (siehe Abb. 20). Eine Überführung des β -Alanins in das entsprechende Säurechlorid mit anschließender Benzylierung war nicht möglich (Thionylchlorid, BnOH, Rückfluss). Jedoch konnte das β -Alanin über das Tosylat **18** mit *p*-TsOH in Anlehnung an Li et al. (2010)⁸⁷ in den Benzylester überführt werden. Aufgrund unvollständiger Umsetzungen mit nicht-reproduzierbaren Ausbeuten erwies sich diese Methode jedoch als wenig geeignet. Schlussendlich gelang es, das Hydrochlorid **17** durch Verwendung von TMSCl in BnOH erfolgreich zu synthetisieren.¹⁰⁵ Reaktionszeiten von 10 h und länger bei Raumtemperatur führten zu einer Ausbeutenerhöhung auf 90 %. Eine Verkürzung der Reaktionsdauer auf 4 h bei höherer Temperatur (100 °C) gemäß Büttner et al. (2005) hatte dagegen einen unvollständigen Umsatz zur Folge.¹⁰⁶ Die hier genannten Synthesemöglichkeiten weisen sowohl Vor- als auch Nachteile auf. So unterscheiden sie sich hinsichtlich zeitintensiver Aufarbeitungsschritte, Sicherheit, Entsorgungsproblemen sowie milden und scharfen Reaktionsbedingungen. Dies spiegelt sich in der Ausbeute des Produktes wider. Für die Synthese von Verbindung **17** bewährte sich demnach die Veresterung unter Einsatz der Lewis-Säure TMSCl als effizienteste Methode.^{88,107} Die Vorteile waren: milde Reaktionsbedingungen, einfache Durchführung, einfache Aufarbeitung und sehr gute Ausbeuten.

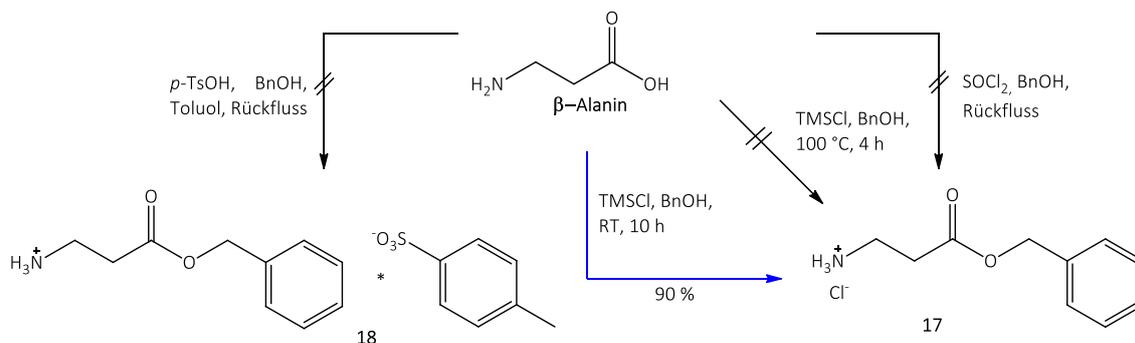


Abb. 20: Synthese des benzylierten β -Alanins

3.1.3.2 Kettenverlängerung und Synthese des Zwölfringes **24**

Der Abb. 21 ist die Synthese des Zwölfringes **24** zu entnehmen. In dieser wird die systematische Kettenverlängerung gezeigt, beginnend mit der Kupplung des benzylierten Alanins **17** mit *N*-Boc-*L*-Threonin zum Produkt **19** unter Verwendung des Carbodiimids DCC. Im Zuge der Amidierung und der Veresterung versagte das Kupplungsreagenz PyBOP. Stattdessen wurden die Ausgangsstoffe unverändert zurückgewonnen. Hier zeigte sich der Einsatz von DCC für die Kupplung der 2-(Benzyloxy)benzoesäure (**20**) mit **19** gemäß einer

Steglich-Veresterung als vorteilhaft gegenüber von PyBOP. Das gewünschte Depsipeptid **21** wurde mit einer Ausbeute von 61 % gewonnen (Schritt ii).

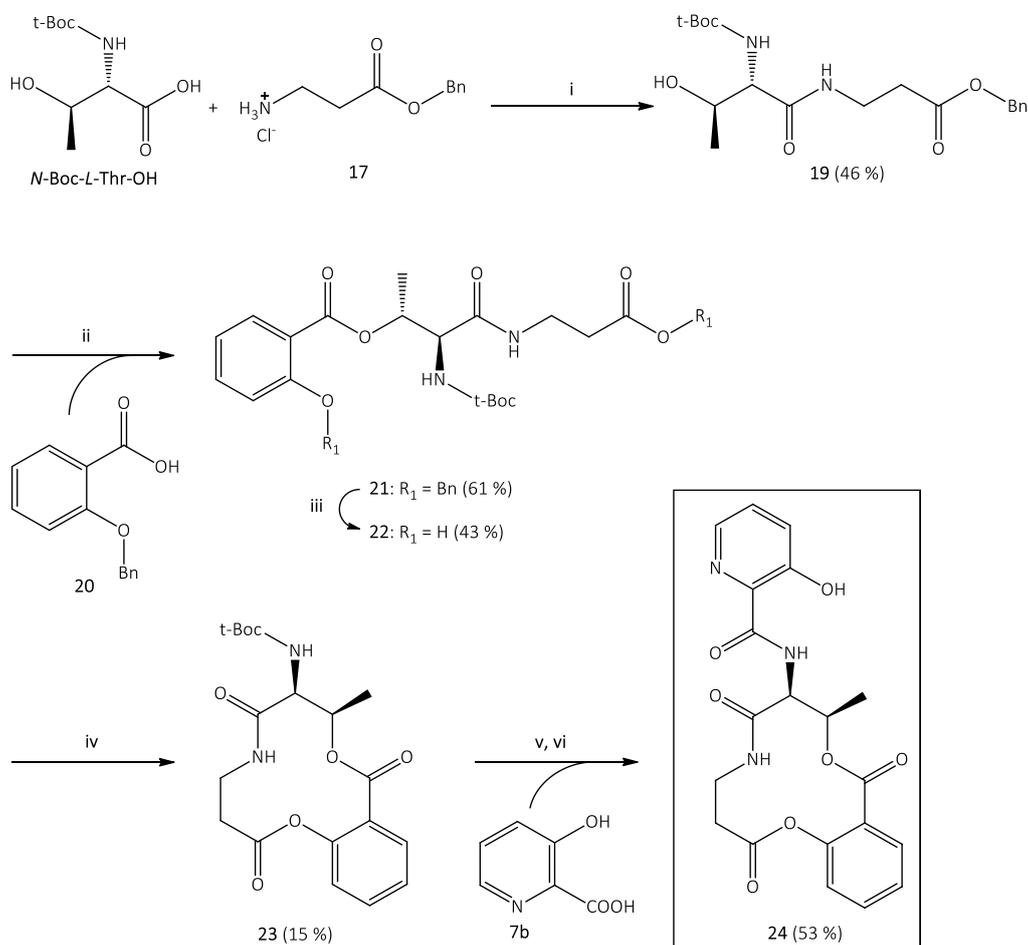


Abb. 21: Synthese des Ringsystems **24**

Reaktionsbedingungen: i) DCC, DCM, RT, 5 h; ii) DMAP, DCC, DCM, RT, 16 h; iii) Pd/C (10%), H₂, 5 bar, i-PrOH, RT, 5 h; iv) DIPEA, DCM, -20 °C, 30 min, PyBOP, RT, 5 d; v) TFA/DCM, 0 °C, 30 min; vi) DIPEA, PyBOP, DMF, RT, 3 d.

Eine anschließende Hydrogenolyse mithilfe von Pd/C (10%) lieferte das entschützte Depsipeptid **22**. Dieses wurde ohne weitere Reinigungsschritte zum Endprodukt **23** gemäß Kim et al. (1994) umgesetzt (Schritt iv).⁹⁴ PyBOP erwies sich in den zuvor durchgeführten Ringschlüssen als effektives Kupplungsreagenz (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2) und wurde daher für die Zyklisierung von Verbindung **22** erneut erfolgreich eingesetzt (Ausbeute von 15 % an **23**). Um die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte wie Oligomere oder Polymere weitestgehend zu verhindern, erfolgte die Synthese in hoher Verdünnung ($c \leq 1$ mM).^{97,98} Dem Ringschluss zur Verbindung **23** schloss sich die Spaltung der t-Boc-Schutzgruppe an. Das so entstandene freie Amin wurde schlussendlich *in situ* mit **7b** zum gewünschten PYR-Analogon **24** acyliert.

3.1.4 ZYKLISCHE DEPSIPEPTIDE MIT ARYL-GABA-SEITENKETTE

In Hinblick auf PYR als Leitstruktur zyklischer Depsipeptide mit integrierter 4-Amino-5-arylpentansäure-Teilstruktur sollten im Zuge dieser Arbeit entsprechende Analoga synthetisiert werden. Dies beinhaltet die Synthese dieses chiralen Bausteins sowie dessen diastereomerer Folgeprodukte. Im Verlauf dieses Abschnitts wird für die Syntheseprodukte die Teilbezeichnung der Diastereomere 1 (DS1) und 2 (DS2) eingeführt, welche jedoch nicht mit der definierten Angabe einer *R*- oder *S*-Konfiguration gleichzusetzen sind. Eine entsprechende Konfigurationsaufklärung erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt in Kapitel 4.

3.1.4.1 Synthese der 4-Amino-5-arylpentansäure-Leitstrukturen

Der folgende Teilabschnitt befasst sich mit der Darstellung der 4-Amino-5-phenyl- und 4-Amino-5-(pyrid-3-yl)pentansäure-Seitenketten, wobei die Synthese der zuletzt genannten Teilstruktur bislang noch nicht beschrieben wurde.

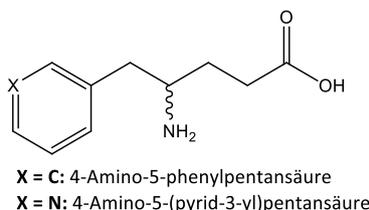


Abb. 22: Zielstrukturen der 4-Amino-5-arylpentansäuren

Synthese der Nitroaldolkondensationsprodukte (= Produkte der Henry-Reaktion)

Als limitierender Faktor zur Darstellung der GABA-Derivate stellte sich die anfängliche Nitroaldolreaktion, eine Henry-Reaktion, heraus (siehe Abb. 23 und Abb. 24).

Im Allgemeinen läuft die Henry-Kondensation in einer Zwei-Schrittsynthese ab. Zunächst erfolgt eine katalysierte Nitroaldol-Addition eines entsprechenden Aldehyds mit einem CH₂-aziden primären Nitroalkan, wobei β -Nitroalkohole gewonnen werden (Abb. 23). Die β -Nitroalkohole können zum gewünschten energieärmeren α,β -ungesättigten Nitroalkan dehydrieren.^{108,109} Nitroalkene stellen wichtige Ausgangsverbindungen in der organischen Synthese dar.¹¹⁰⁻¹¹² Mithilfe der Henry-Reaktion ist die Knüpfung neuer C-C-Bindungen möglich. Eine Nitroaldol-Kondensation ist reversibel und kann säure- oder basenkatalysiert ablaufen.¹¹³ Letzteres fand in dieser Arbeit Anwendung.

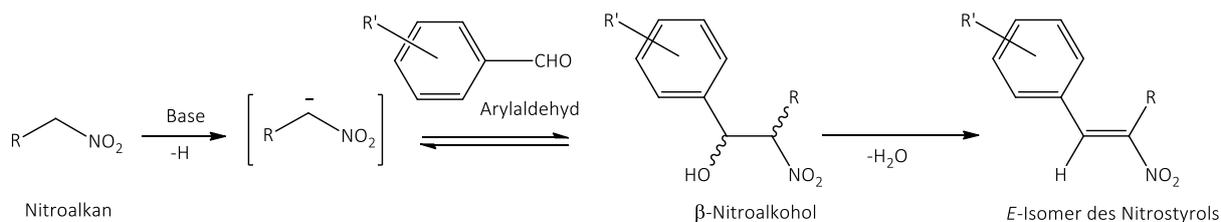


Abb. 23: Schematische Darstellung der Nitroaldol-Kondensation^{110,114}

Als Katalysatoren können beispielsweise primäre (*n*-Butylamin), sekundäre (*N,N*-Diethylamin), tertiäre Amine (DIPEA), anorganische Basen (NaOH) oder quartäre Ammoniumsalze (*N,N*-Dimethylammoniumchlorid (DMACl)) eingesetzt werden.^{111,113}

Des Weiteren begünstigen protische und aprotische Lösungsmittel aber auch lösungsmittelfreie Reaktionsbedingungen eine Nitroaldol-Reaktion unterschiedlich stark.¹¹¹

In dieser Arbeit wird die basenkatalysierte Kondensation eines entsprechenden aromatischen Aldehyds, zum einen Nicotinaldehyd für die Darstellung des 4-Nitro-5-(pyrid-3-yl)pent-4-ensäuremethylesters (**27**) und zum anderen Benzaldehyd für die Darstellung des 4-Nitro-5-phenylpent-4-ensäuremethylesters (**28**), mit dem kommerziell erhältlichen 4-Nitrobutylmethylmylester als CH-azider Komponente erläutert.

Hierfür wurden zwei mögliche Synthesestrategien entwickelt. In Abb. 24 ist die Synthese schematisch zusammengefasst, wobei die *Strategie A* eine Zwei-Schrittsynthese und die *Strategie B* eine Ein-Schrittsynthese darstellt.

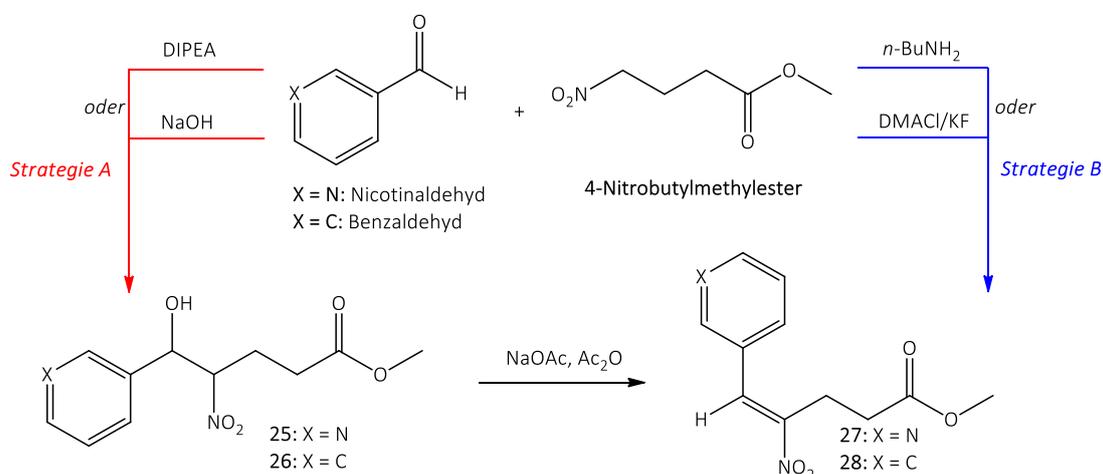


Abb. 24: Synthesestrategie A und B zur Gewinnung der Nitrostyrole **27** und **28**

Die *Synthesestrategie A* erfolgte unter Einsatz der Hilfsbasen DIPEA oder NaOH. Somit konnten die arylsubstituierten β -Nitroalkohole **25** und **26** als Zwischenstufe gewonnen werden. Durchgeführt wurden diese Synthesen in Anlehnung an die Vorschriften von Burger et al. (1975).¹¹⁵ Um jedoch eine unerwünschte nukleophile Substitution über die Bildung einer Schiff'schen Base zu vermeiden, wurde zunächst das primäre *n*-Butylamin ($pK_a = 10.6$) gegen das tertiäre DIPEA ($pK_a = 10.5$) ausgetauscht.¹¹⁶ Verglichen mit *n*-Butylamin weist DIPEA keine nukleophilen Eigenschaften auf, ist aber in der Basizität gleichwertig.

Schlussendlich lagen die isolierten Nitroalkohole als diastereomeres Gemisch vor, was allerdings aufgrund der nachfolgenden Dehydratisierung unproblematisch war.¹¹⁰ Demnach war eine Trennung der einzelnen Diastereomere nicht nötig. Die Eliminierung von Wasser lieferte mithilfe des Gemischs Acetanhydrid-Natriumacetat als wasserziehende Komponente die entsprechenden Nitrostyrole **27** und **28**.^{117,118} Hierbei erfolgte zunächst eine Acetylierung der Hydroxygruppe mit anschließender Verseifung der entstandenen Estergruppierung.

Mithilfe der *Strategie B* konnte die direkte Nitroaldol-Kondensation des elektrophilen aromatischen Aldehyds mit dem CH-aziden Nitroester etabliert werden (vergleiche Abb. 24). Hierfür erwies sich der Einsatz des *n*-Butylamins als vorteilhaft.¹¹⁵

Dem Hauptprodukt der Nitroaldol-Kondensation ist die (*E*)-Konfiguration zuzuschreiben, also der *trans*-ständige ω -arylsubstituierte Nitrovinylcarbonsäureester (siehe Abb. 23 und Abb. 24).^{108,112,114} Dies wurde für die Produkte **27** und **28** mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestätigt. Die Bildung des entsprechenden (*Z*)-Isomers wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Das (*E*)-Isomer scheint somit das thermodynamisch und –kinetisch stabilere Konformer darzustellen. In der Abb. 25 ist beispielhaft die chemische Verschiebung des Methin-Protons der Vinylgruppe von Verbindung **28** dargestellt. Das Methin-Proton dieses (*E*)-Isomers wird aufgrund des Anisotropieeffekts der Nitrogruppe stärker entschirmt als ein entsprechendes Proton des (*Z*)-Isomers.¹⁰⁸ Bei dem (*E*)-Isomer liegt die chemische Verschiebung demnach bei $\delta = 8.12$ ppm (vergleichbar zu dem berechneten Wert von $\delta = 8.10$ ppm). Dahingegen wäre nach Inkrementberechnungen die chemische Verschiebung des abgeschirmten Protons des (*Z*)-Isomers bei $\delta = 6.40$ ppm zu erwarten (Abb. 25).

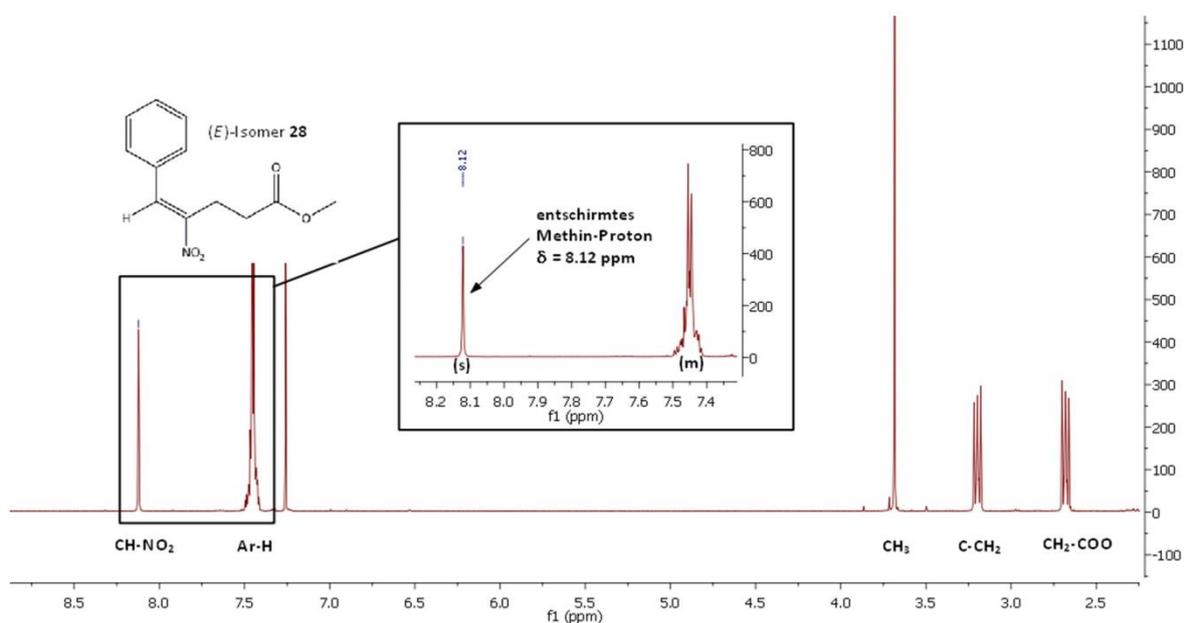


Abb. 25: ¹H-NMR-Spektrum des (*E*)-Isomers von Verbindung **28**; dargestellt ist die chemische Verschiebung des Methin-Protons mit den *trans*-ständigen Substituenten

Für die Synthese des Kondensationsprodukts **27** bewährte sich insbesondere *Strategie A* mit der Zwischenstufe über den 5-Hydroxy-4-nitro-5-(pyridin-3-yl)-pentansäuremethylester (**25**) (siehe Abb. 24 und Abb. 26). Im Zuge der Optimierung der Henry-Reaktion wurden in An-

lehnung an Burger et al. (1957), Tabolin et al. (2009) und Altenbach et al. (2004) verschiedene Reaktionsbedingungen umgesetzt (vergleiche Abb. 26).^{115,118,119}

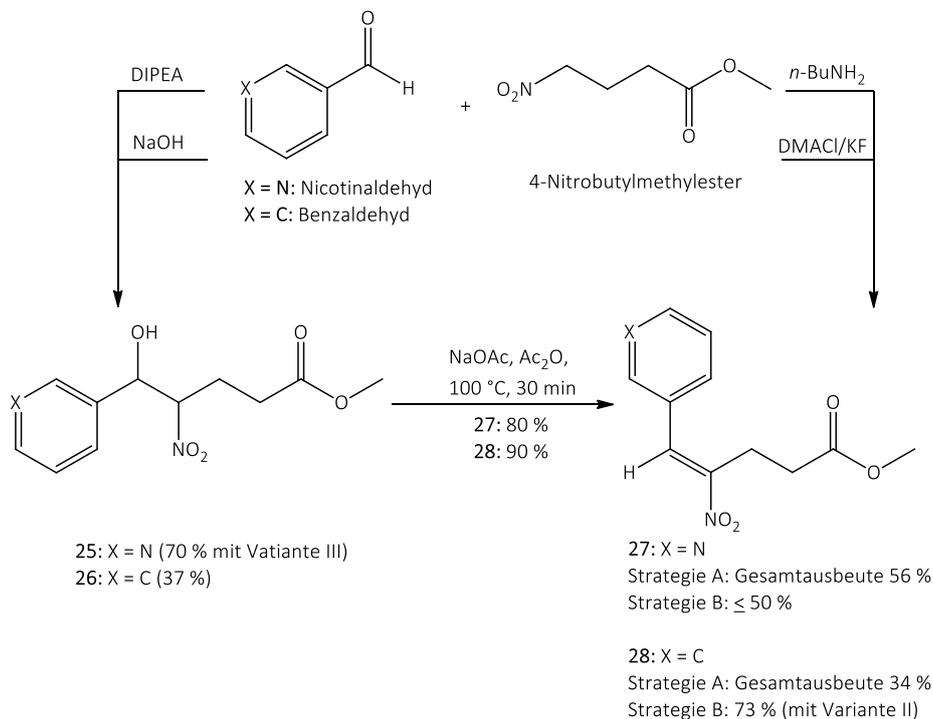


Abb. 26: Optimierte Nitroaldol-Synthesen

Hierbei wurden unter anderem die Stoffmenge des eingesetzten DIPEA (0.5 Äq., 1.0 Äq., 2.0 Äq. oder 2.5 Äq.), die Reaktionstemperatur (RT oder $60\text{ }^\circ\text{C}$) und die Reaktionsdauer (von 4 h-6 h, 24 h, 48 h bis 4 d) variiert (vergleiche Tab. 4). Es konnten jedoch nur maximale Ausbeuten von 55 % erzielt werden. Erst durch folgende Optimierung konnte ein Ausbeutenanstieg für Verbindung **25** erzielt werden: die Edukte (je 1.0 Äq.) werden zusammen mit DIPEA (3.5 Äq.) in Toluol unter Rückfluss für 24 h erhitzt, die Ausbeute lag bei 70 % (Variante III in Tab. 4). Eine Zusammenstellung der optimierten Syntheseschritte für Verbindung **25** ist in der Tab. 4 aufgelistet. Der Einsatz an überschüssigem Nitrocarbonsäureester führte zu keiner Ausbeutenerhöhung. Überschüssiger Nitrocarbonsäureester sollte das Reaktionsgleichgewicht zu Gunsten des Produktes beeinflussen.^{108,109,118,120}

Tab. 4: Reaktionsbedingungen der *Strategie A* für die Synthese von Verbindung 25

Versuchsnummer	I	II	III	IV
Hilfsbase	DIPEA			NaOH
Äquivalente	0.5-1.0	2.0	3.5	1.25
sonstige Reaktionsbedingungen	60 °C, 3 h	THF, RT, 4 d	Toluol, Reflux, 24 h	H ₂ O/MeOH, 0 °C → RT, 5 h
Ausbeute	55 %	< 25 %	70 %	quantitativ
in Anlehnung an Lit.	Tabolin et al. ¹¹⁹ , Burger et al. ¹¹⁵	Altenbach et al. ¹¹⁸ , Yoshimoto et al. ¹²¹	Tabolin et al. ¹¹⁹	Houshbar et al. ¹²² , Organikum ¹²³

Alternativ zum DIPEA wurde der Einsatz einer wässrigen NaOH-Lösung (1.25 Äq.) in Methanol bei 0 °C überprüft (Versuchsnummer IV). Hierbei erfolgte lediglich eine dünnschichtchromatographische Mitverfolgung des Reaktionsverlaufs. Das primäre Ziel war auch hier die Kondensationsreaktion zum 4-Nitro-5-(pyrid-3-yl)-pent-4-ensäuremethylester (**27**).^{122,123} Es wurde eine quantitative Umsetzung des Nicotinaldehyds mit dem 4-Nitrobutylmethylester zu **25**, nicht aber zur gewünschten Verbindung **27** beobachtet.

Der *Strategie A* schließt sich gemäß Abb. 26 die Dehydratisierung an. Diese konnte mithilfe von Acetanhydrid und trockenem Natriumacetat nach nur 30 min bei 100 °C, mit einer Ausbeute von 80 % an 4-Nitro-5-(pyrid-3-yl)-pent-4-ensäuremethylester (**27**), realisiert werden.^{117,118} Dies bedeutete für Verbindung **27** eine Gesamtausbeute von 56 %.

Die modifizierte *Strategie B*, unter Verwendung von *n*-Butylamin, erbrachte keine nennenswerte Zunahme der Ausbeute an Produkt **27**.^{115,119} Dabei wurden die Edukte in geringen Mengen Toluol gelöst und *n*-Butylamin als Initiator der Reaktion in katalytischen Mengen (0.05 Äq.) ergänzt. Das Gemisch wurde anschließend auf 140 °C erhitzt. Nach einer Reaktionsdauer von 24 h wurde kein vollständiger Umsatz der Edukte beobachtet; die Ausbeute lag bei circa 50 %. Ferner konnten Synthesen mit Toluolüberschuss nur Ausbeuten von maximal 15 % erzielen. Eine Optimierung zur Darstellung von **27** war auf diesem Wege nicht möglich. Eine sukzessive Erhöhung der Hilfsbase (0.1 Äq., 0.5 Äq., 1.0 Äq.) sowie die Variation der Reaktionsdauer (von 6 h, 24 h, 48 h bis 100 h) lieferte keine bis mäßige Umsetzungen (max. 20 %). Längere Reaktionszeiten begünstigen zudem die Polymerisation des Nitroalkens.^{110,117}

Ein Wechsel des Wasserschleppers Toluol gegen das niedriger siedende Chloroform hatte schlechtere Ausbeuten zur Konsequenz. Dies kann mit einer hohen Aktivierungsenergie für die Nitroaldol-Kondensation begründet werden, die nur mithilfe hoher Reaktions Temperaturen erzielt werden kann.

Als Alternative zum *n*-Butylamin wurde der Nutzen des basischen Kaliumfluorids (KF) in Kombination mit der schwachen Säure *N,N*-Dimethylammoniumchlorid (DMACl) untersucht.^{124,125} Ionische Fluoride weisen eine vergleichbare Basizität gegenüber Carbonsäuren bzw. Nitroalkanen wie metallorganische Verbindungen auf.¹²⁶ Daher wurde die fluoridunterstützte Nitroaldol-Kondensation in Betracht gezogen. Es wurden jedoch nur geringe Ausbeuten von 19 % an **27** erzielt. Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass für die Synthese von **27** bevorzugt *Strategie A* anzuwenden ist (gemäß Abb. 26).

Für die Synthese des Analogons 4-Nitro-5-phenylpent-4-ensäuremethylesters (**28**) erwies sich die Zwischenstufe **26** der Henry-Reaktion als wenig zielführend (Abb. 26). So wurde **26** gemäß *Strategie A* durch die Nitroaldol-Addition von Benzaldehyd mit dem 4-Nitrobutylmethylester nur in mäßigen Ausbeuten isoliert. Die maximal erzielte Umsetzung lag unter DIPEA-Anwendung bei 30 % und unter NaOH-Einsatz bei 37 %. Dies konnte in Anlehnung an die Synthese von **25** durch Variation der Reaktionsbedingungen nicht gesteigert werden. Jedoch erwies sich *Strategie B* für die Synthese von **28** als vielversprechend. Die Kondensationsreaktion wurde wie folgt optimiert: ein Gemisch der Edukte (je 1.0 Äq.) und *n*-Butylamin (0.05 Äq.) wurden mit dem im Unterschuss vorliegenden Toluol für 4-6 h auf 160 °C erhitzt (Variante II in Tab. 5). Mit einer Ausbeute von 73 % lag so die Synthese an Verbindung **28** vergleichsweise hoch. Als limitierender Faktor erwies sich demnach die eingesetzte Lösungsmittelmenge und die damit erzielte Reaktionstemperatur. Erst die Verwendung des im Unterschuss vorliegenden höhersiedenden, apolaren und aprotischen Toluols gewährleistete akzeptable und reproduzierbare Ausbeuten. Ein möglicher Wechsel des Lösungsmittels Toluol gegen Xylol sowie lösungsmittelfreie Kondensationsreaktionen könnten aussichtsreiche Optimierungsvarianten für zukünftige Nitroaldol-Reaktionen basierend auf *Strategie B* darstellen.

Eine Zusammenfassung der Optimierungsversuche für **28** gemäß *Strategie B* kann der Tab. 5 entnommen werden. Die Synthese des 4-Nitro-5-phenylpent-4-ensäuremethylesters (**28**) benötigte somit keine langen Reaktionszeiten, keinen Überschuss des kommerziell schwer erhältlichen Nitrobutylmethylesters oder des *n*-Butylamins. Die Bildung möglicher Nebenprodukte wie Dimere der Nitrostyrole oder Dinitroverbindungen wurden weder unter *Strategie A* noch unter *Strategie B* beobachtet.

Tab. 5: Reaktionsbedingungen der *Strategie B* für die Synthese von Verbindung **28**

Versuchs-Nr.	I	II	III	IV
Hilfsbase	<i>n</i> -BuNH ₂			
Äquivalente	0.05	0.05	0.05 → 1.0	0.05
sonstige Reaktionsbedingungen	Toluol im Überschuss, Reflux, 4 d	Toluol im Unterschuss, Reflux, 6-7 h	CHCl ₃ im Überschuss, Reflux, 16 d	10 Äq. Benzaldehyd, CHCl ₃ im Überschuss, Reflux, 9 h
Ausbeute	35 %	73 %	20 %	41 %
in Anlehnung an Lit.	Tabolin et al. ¹¹⁹			

In Bezug auf die erzielten Beobachtungen können nachfolgende Rückschlüsse abgeleitet werden: Demnach führt *Strategie A* über die Nitroaldol-Addition insbesondere für π -Elektronenmangelaromaten wie dem Nicotinaldehyd zum gewünschten Produkt. Für die Umsetzung π -elektronenreicherer Aromaten, wie Benzaldehyd, sollte jedoch bevorzugt die *Strategie B* mit der Nitroaldol-Kondensation angewandt werden. Dieses Erkenntnis ist mit dem in der Literatur beschriebenen Reaktionsverhalten unterschiedlich elektronenreicher Aromaten kongruent.^{109,110,120} So konnte beispielsweise nach der Umsetzung des Nicotin-

aldehyds mit Nitromethan das Olefin nur mithilfe der Nitroalkohol-Zwischenstufe gewonnen werden. Auch Rodriguez et al. (2011) beschreiben unterschiedliche Reaktivitäten und Reaktionsprodukte, wenn entweder π -Elektronenmangelaromaten oder π -elektronenreiche Aromaten kondensiert werden sollen. Eine Nitroaldol-Addition benötigt eine genau definierte Basizität sowie ausreichend lange Reaktionszeiten, um zufriedenstellende Ausbeuten erzielen zu können.¹¹⁰

Auf der Suche nach effektiven Ein-Schrittsynthesen für die Henry-Reaktion werden zahlreiche und verschiedenste Methoden in der Literatur beschrieben. Die publizierten Verfahren, wie der Einsatz von Mikrowellen, Ultraschall, stereoselektiven Katalysatoren, lösungsmittelfreien Reaktionsbedingungen, diverse Basen u. v. m., sind jedoch nur für eine begrenzte und spezifische Auswahl an Reaktionen und Synthesen anwendbar.^{108-110,120,121,127,128} Oft bildet sich ein Gemisch bestehend aus beiden Reaktions- und vielen Nebenprodukten, was schlechte Ausbeuten zur Folge hat. Demnach muss die optimale Reaktionsbedingung aus diesem großen Repertoire sondiert und für das gewünschte Produkt entsprechend individuell angepasst werden.

Reduktion der Nitroaldolkondensationsprodukte zum entsprechenden Nitroarylalkan

Nachdem die α,β -ungesättigten Nitroaryl-Substitutionsprodukte erfolgreich synthetisiert werden konnten, mussten sie gemäß Abb. 27 zum primären Amin (**29**, **30**) reduziert und schlussendlich sauer hydrolysiert (**31**, **32**) werden. Im Zuge der Reduktion kam es zur Ausbildung eines racemischen Gemischs. Im Folgenden wird die Reduktion der Nitroaldolkondensationsprodukte im Detail erläutert.

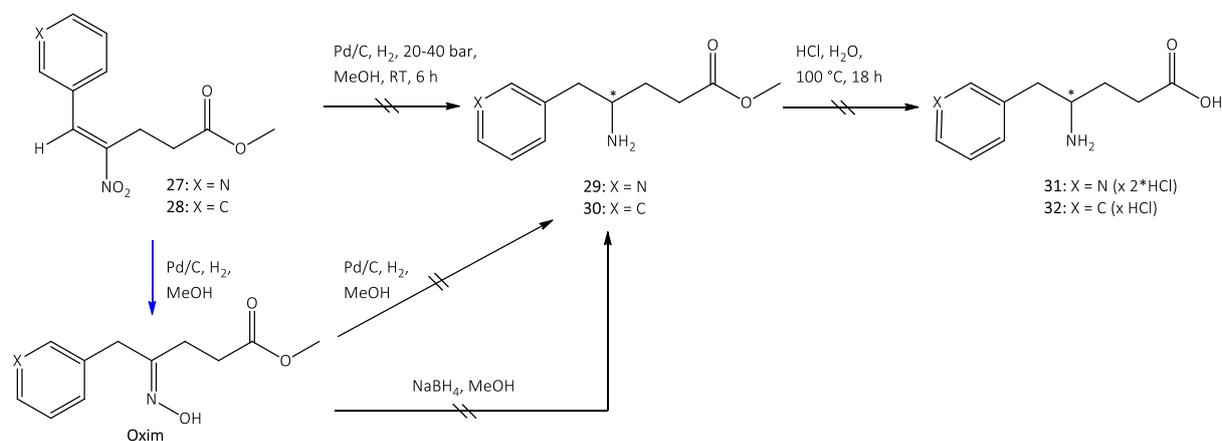


Abb. 27: Schematische Darstellung der Reduktion der Nitroaldolkondensationsprodukte

Am aussichtsreichsten erschien zunächst eine Reduktion mithilfe der katalytischen heterogenen Hydrierung (vergleiche Abb. 27). Hierbei sollten die Verbindungen **27** und **28** mit elementarem Wasserstoff über Pd/C (10 %) zu den Aminen **29** und **30** reduziert werden (gemäß einer Ein-Schrittsynthese).^{117,129} Folglich wurden die Edukte **27** und **28** bei einem Wasserstoffdruck von 20 bis 40 bar über Pd/C (10 %) bis zu sechs Stunden in Methanol oder wässriger methanolischer Lösung bei Raumtemperatur hydriert (vergleiche Abb. 27). Die

Synthesen wurden sowohl mit Säurezusatz, wie beispielsweise Essigsäure¹²⁹ oder Salzsäure¹³⁰, als auch ohne Säurezusatz durchgeführt. Die Reaktionen waren jedoch nicht erfolgreich. Stattdessen blieb die Reduktion der α,β -ungesättigten Nitroverbindungen auf der Stufe des entsprechenden Oxims mit mäßigen Ausbeuten stehen, welches mittels GC-MS und ¹H-NMR-Spektroskopie analytisch nachgewiesen werden konnte. Oxime stellen gängige Zwischenstufen bei der Reduktion von α,β -ungesättigten Nitroalkanen dar.^{90,117,120,129} Es war jedoch im Verlauf dieser Arbeit nicht möglich, das entstehende Oxim mithilfe von Metallhydriden wie Natriumborhydrid oder erneuter katalytischer Hydrierung bis zum gewünschten Amin zu reduzieren. Der Einsatz des reaktiveren Lithiumaluminiumhydrids konnte aufgrund geringer Selektivität des Reduktionsmittels nicht erfolgen. Hierdurch wäre eine Reduktion der Carboxylgruppe zum primären Alkohol erfolgt. Auch stellte zunächst die Reduktion mithilfe von Metallen wie Zink, Eisen oder Zinn in Kombination mit konzentrierter Salzsäure aufgrund des hydrolyseempfindlichen Methylesters keine Alternative dar. Folglich war der Syntheseweg gemäß Abb. 27 zur Gewinnung der 4-Amino-5-phenylpentansäure (**31**) und 4-Amino-5-pyridylpentansäure (**32**) über die Stufe der primären Aminomethylester **29** und **30** nicht möglich. Es musste ein alternativer Synthesepfad aufgestellt werden.

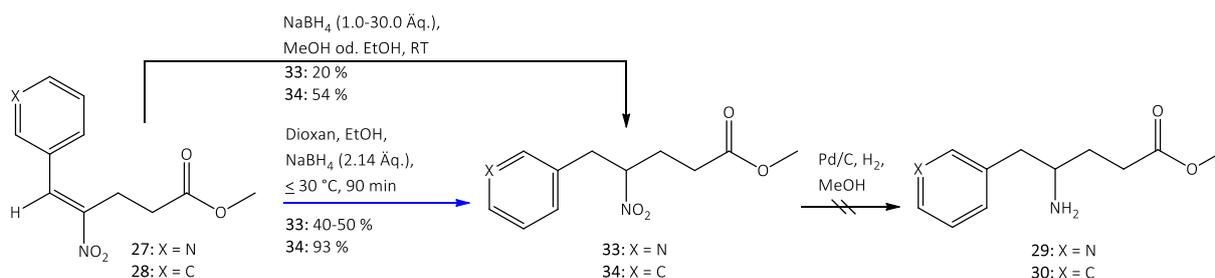


Abb. 28: Reduktion der Verbindungen **27** und **28** mithilfe von Natriumborhydrid

Im Zuge der Optimierung des Synthesewegs wurde die Zwei-Schrittsynthese etabliert.^{90,124} Dies sah zunächst die Reduktion der konjugierten Doppelbindung mithilfe von Natriumborhydrid vor. Dem sollte sich die katalytische Hydrierung der isolierten Nitroalkane **33** und **34** zu den Produkten **29** und **30** anschließen (siehe Abb. 28).¹²⁴ Aufgrund der konjugierten Teilstruktur Aryl-CH=CH-NO₂ mit der Nitrogruppe als elektronenziehender Komponente ist eine nukleophile Addition durch Wasserstoff beziehungsweise Hydride an die aktivierte Doppelbindung möglich. Die reduzierten Intermediate **33** und **34** konnten demnach aus den Verbindungen **27** und **28** mit Natriumborhydrid wie folgt gewonnen werden: die Edukte wurden in Methanol oder Ethanol gelöst, das Reduktionsmittel (1.0-30.0 Äq.) unter Eiskühlung portionsweise ergänzt und die Suspension über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.¹¹⁸ Es konnten jedoch nur geringe Ausbeuten erzielt werden. Dies kam hauptsächlich durch Extraktionsprobleme, insbesondere für Verbindung **33** (Ausbeute: ca. 20 %; für **34**: 37-54 %), zustande.

Grund war die Bildung eines reaktiven Nitronat-Salzes aus dem Nitrostyrol-derivat und Natriumborhydrid (Abb. 29).¹³¹ Das *in situ* entstehende Nitronat-Salz bedingt als reaktive

Zwischenstufe eine Ausbeuterniedrigung aufgrund der möglichen Bildung vieler Nebenprodukte wie Dimere oder Polymere.

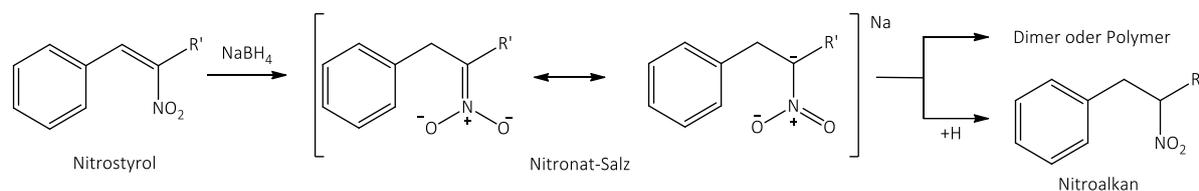


Abb. 29: Schematische Darstellung der Bildung des Nitronat-Salzes als reaktive Zwischenstufe, modifiziert nach Bhattacharjya (1985)¹³¹

Um dies zu umgehen, wurde fortan die Synthese der Nitroalkane gemäß Bhattacharjya et al. (1985) als reverse bzw. umgekehrte Addition der Reaktanden durchgeführt.¹³¹ Das Reduktionsmittel (2.14 Äq.) wurde als Suspension eines Gemisches aus aprotischem (z. B. Dioxan) und protischem Lösungsmittel (wie Ethanol) vorgelegt. Parallel wurde das Nitrostyrol als Edukt ebenfalls in Dioxan gelöst. Dioxan stellte ein hervorragendes Lösungsmittel für Nitrostyrole dar. Es fällte gleichzeitig das schwerlösliche Nitronat-Salz aus, wodurch Nebenreaktionen unterdrückt werden. Das gelöste Edukt wurde anschließend innerhalb von 45 min langsam zu der Suspension getropft. Für die Synthese von **34** stellten sich 30 °C als optimale Reaktionstemperatur heraus. Nach weiteren 45 min war die Reaktion beendet und überschüssiges Natriumborhydrid wurde mit Essigsäure zerstört. Für den 4-Nitro-5-phenylpentansäuremethylester (**34**) konnte eine Ausbeute von 93 % erzielt werden.

Die Synthese des 4-Nitro-5-pyridylpentansäuremethylesters (**33**) erwies sich als diffiziler. Mit Ausbeuten im Bereich von 40 bis 50 % fielen diese eher mäßig aus. Aufgrund des basischen Charakters des Pyridylrings musste nach der Zerstörung des überschüssigen Natriumborhydrids im essigsäuren Reaktionsgemisch auf eine genaue pH-Werteinstellung von $\text{pH} \geq 9$ geachtet werden. Anderenfalls entstanden Extraktionsprobleme. Weiterhin musste zur Vermeidung einer ungewollten Salzbildung das schwach saure Extraktionsmittel Chloroform gegen Ethylacetat ausgetauscht werden. Das Produkt kristallisierte, vermutlich in Form eines Hydrochlorids, anderenfalls nicht reproduzierbar aus.

Des Weiteren zeigten sich im Rahmen der Syntheseoptimierung für **33** starke Reaktionszeit- und Temperaturabhängigkeiten. So wurden bei einer längeren Gesamtreaktionsdauer von mehr als 90 min bei 30 °C unerwünschte Nebenprodukte nachgewiesen. Hierbei kam es teilweise zur Substitution des Methylesters durch Ethanol. Deutlich störender erwies sich jedoch die Bildung einer unbekanntenen Verunreinigung (bis zu 10 % gemäß $^1\text{H-NMR}$ -Auswertung, kristalline Substanz). Diese konnte chromatographisch nicht vom Produkt **33** abgetrennt werden, was auf eine ähnliche chemische Struktur schließen lässt.

Nachdem die Nitroalkane erfolgreich synthetisiert werden konnten, erfolgte im zweiten Schritt die Reduktion der Nitrogruppe (vergleiche Abb. 28 und Abb. 30). Hierfür wurden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen: die katalytische Hydrierung, die zuerst im Detail beschrieben wird, und die Reduktion nach Béchamp¹³², auf die nur kurz eingegangen werden soll. Demnach wurden zunächst die Verbindungen **33** und **34** unter Verwendung von Pd/C

(10 %) katalytisch hydriert. Im Zuge dieser Synthese wurden anstelle der 4-Amino-5-aryl-pentansäuremethylester die γ -Lactame **35** (50 %) und **36** (70 %) isoliert (siehe Abb. 30). Aufgrund der *in situ* gebildeten primären Aminogruppe kann ein intramolekularer nukleophiler Angriff am Carboxyl-Kohlenstoffatom der Estergruppe unter Ringschluss zum γ -Lactam erfolgen.^{127,133,134}

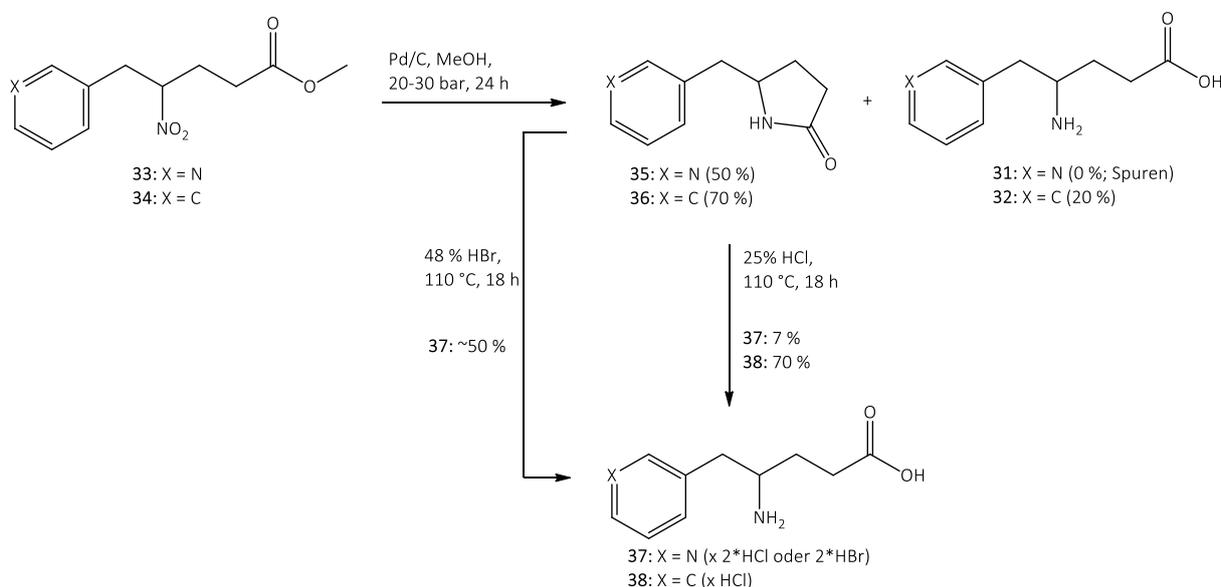


Abb. 30: Katalytische Reduktion der Nitroaryllane mit anschließender Hydrolyse entstandener Lactame

Im Verlauf der Umsetzung des 4-Nitro-5-phenylpentansäuremethylesters (**34**) konnte zusätzlich das gewünschte Produkt, die 4-Amino-5-phenylpentansäure (**32**), nachgewiesen werden. Die Isolierung von **32** war jedoch stark konzentrationsabhängig. Aufgrund dessen wurde zur Optimierung dieser Synthese eine Evaluierung der erforderlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt (siehe Tab. 6).

Demnach konnte das Produkt **32** bei einer Mindestkonzentration von 0.12 M des Edukts **34** in Methanol mit einer maximalen Ausbeute von 20 % isoliert werden (vergleiche Versuchsnummer F und I). Unterhalb dieser Grenzkonzentration wurde ausschließlich das γ -Lactam **36** oder nicht umgesetztes Edukt wiedergewonnen (Versuchsnummern A bis D). Das Arbeiten mit konzentrierteren Reaktionsgemischen an **34** ($c > 0.12$ M) steigerte die Ausbeute von durchschnittlich 19 % dagegen nicht (Versuchsnummer G).

Schlussendlich waren die optimierten Reaktionsbedingungen für die Hydrierung von **34** wie folgt: das Edukt wurde in Methanol gelöst, wobei eine Mindestkonzentration von 0.12 M gewährleistet sein musste. Nach Zusatz von Pd/C (10 %) wurde das Reaktionsgemisch bei einem Wasserstoffdruck von 20 bar für 24 h, beziehungsweise für eine schnellere Umsetzung bei 30 bar für 4 h, hydriert. Die quantitative Synthese des Lactams konnte bereits nach vier Stunden bei 10 bar beobachtet werden (Versuchsnummer C). Ein Wechsel des Katalysators Pd/C (10 %) gegen das basischere Palladiumhydroxid ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (10 %)) lieferte keine Ausbeutenerhöhung (**32**: 18 %).

Tab. 6: Übersicht der Validierungsversuche zur Synthese von Verbindung 32

Versuchs-Nr.	Einwaage Edukt 34 [mg]	Lösungsmittelvolumen ^{a)} [ml]	Konzentration von 34 in Lösung	H ₂ -Druck ^{b)} [bar]	Zeit [min]	Art des Produkts [Ausbeute]
A	90.8	55	7.3 mM	10	30	34
B	100	55	7.7 mM	10	90	34 & 36 (Gemisch)
C	99.3	55	7.6 mM	10	240	36
D	133	70	8.0 mM	30	30	34 & 36 (Gemisch)
E	93.6	55	7.2 mM	30	90	32 [<2 %] 36 [98 %]
F	560	20	0.12 M	20	24 h	32 [20 %] 36 [80 %]
G	560	10	0.24 M	20	24 h	32 [19 %] 36 [81 %]
H	200	7 (je 3.5 ml MeOH+H ₂ O)	0.12 M	20	24 h	32 [14 %] 36 [86 %]
I	1.54 g	55	0.12 M	30	240	32 [18 %] 36 [82 %]

a) Lösungsmittel: gelöst in Methanol, wenn nichts anderes angegeben ist; b) eingesetzter Katalysator: Pd/C (10 %); Mr (**34**) = 237.10 g/mol.

Neben der Konzentrationsabhängigkeit wurde zusätzlich eine Lösungsmittelabhängigkeit festgestellt. So wurde in Isopropanol anstelle von Methanol für die Umsetzung von **34** nur das Lactam **36** isoliert, wohingegen für das Pyridyl-GABA-Derivat **33** keine Umsetzung beobachtet wurde.

Im Gegensatz zu **32** war eine Isolierung der analogen 4-Amino-5-pyridylpentansäure (**31**) als GABA-Analogon nicht möglich (siehe Abb. 30). Deren Bildung konnte bei folgenden Reaktionsbedingungen nur in Spuren nachgewiesen werden: das Edukt **33**, gelöst in Methanol ($c = 0.12 \text{ M}$), wurde bei 50 bis 60 bar Wasserstoffdruck über Pd/C (10 %) für 4 bis 24 h bei Raumtemperatur hydriert. Das γ -Lactam **35** wurde dabei mit einer Ausbeute von 50 % gewonnen. Mithilfe eines salzsauren Reaktionsgemisches von **33** (1 M HCl, Pd/C (10 %), 30 bar, 5 h, Raumtemperatur) sollte das Produkt **31** alternativ als Hydrochlorid-Salz ausgefällt werden, was jedoch nicht zielführend war.

Wie bereits erwähnt, wurde als alternative Nitrogruppenreduktion (für die Gewinnung der Verbindungen **29** und **30**) die Reaktion nach Béchamp in Betracht gezogen (Mechanismus nicht gezeigt).¹³² Hierbei erfolgte eine Redoxreaktion mithilfe von Ammoniumchlorid und Eisen zum primären Amin **30**. Aufgrund einer parallel eintretenden Lactamisierung stellte diese Methode keine Alternative zur katalytischen Hydrierung dar und wurde somit nicht weiter verfolgt.

Die Synthese fünfgliedriger Ringsysteme wie γ -Lactame ist aufgrund geringer Ringspannung thermodynamisch und -kinetisch begünstigt. Außerdem sind γ -Lactame hydrolysestabiler als γ -Lactone und können beispielsweise erst durch Kochen in konzentrierten Säuren geöffnet werden.¹³⁵ Eine alternative katalytische Hydrogenolyse der γ -Lactame benötigt ebenfalls drastische Reaktionsbedingungen wie hohe Drücke und lange Reaktionszeiten, um die Ringspannung überwinden zu können.¹³⁶ Dementsprechend erzielte eine im Zuge dieser Arbeit durchgeführte Hydrogenolyse von **35**, im wässrigen Methanol über Pd/C (10 %) bei einem Wasserstoffdruck von 30 bar, nach 24 h keinen Erfolg. Letztendlich kam nur die Hydrolyse der γ -Lactame in Frage (Abb. 30).

Für die saure Hydrolyse von **36** wurde das Rohprodukt mit 25%iger Salzsäure versetzt.^{137,138} Mit einer Ausbeute von 70 % konnte Verbindung **38** als Hydrochlorid aus Ether auskristallisiert werden. Zur Vermeidung einer erneuten Veresterung sollte auf Methanol oder Ethanol als Fällungsmittel verzichtet werden.

In Anlehnung an die Synthese von **38** wurde für die 4-Amino-5-pyridylpentansäure (**37**) unter gleichen Reaktionsbedingungen lediglich eine Ausbeute von 7 % erzielt. Limitierender Faktor hierfür war die Isolierung bzw. Kristallisation des Dihydrochlorid-Salzes aus dem sirupartigen Rückstand des Reaktionsgemisches. So musste Produkt **37** im Gegensatz zu **38** zunächst zweimal aus Aceton und anschließend nochmals aus Ethanol (1x) umkristallisiert werden. Letzteres hatte aufgrund des zweimaligen Waschschriffs mit Aceton keine erneute Veresterung zur Folge. Jedoch führte diese dreifache Umkristallisation zu einer Ausbeuterniedrigung. Alternative Lösungsmittel wie wässriges Ethanol¹³⁹, Ether, Ethylacetat, Chloroform, Methyl-*tert*-butylether (MTBE) u. a. erwiesen sich als ungeeignete Fällungsmittel. Eine alternative Isolierung der freien Basenform von **37** in Anlehnung an Griffith et al. (1964) mit überschüssigem TEA in Ethanol war nicht zielführend.¹⁴⁰

Als zweites Hydrolysereagenz wurde konzentrierte wässrige HBr-Lösung in Betracht gezogen (siehe Abb. 30). Hierbei kann das Kristallisationsverhalten aufgrund des erhöhten lipophilen Charakters des entstehenden Dihydrobromid-Salzes verbessert werden.¹⁴¹ Verbindung **37** wurde unter Einsatz von 48 %iger HBr-Lösung als Dihydrobromid erfolgreich synthetisiert. Die Umkristallisation erfolgte in einem Gemisch aus Aceton und Ethylacetat im Verhältnis 8:1 (1x). Hierbei betrug die Ausbeute ca. 50 %. Somit führte der Wechsel des Hydrolysereagenzes für die Synthese von **37** zu einer Ausbeutenerhöhung, was einen vielversprechenden Ansatzpunkt für zukünftige Optimierungen in der Synthese von γ -Aminobuttersäurederivaten darstellt.

Benzylierung der 4-Amino-5-arylpentansäuren

Nachdem die 4-Amino-5-arylpentansäuren **32**, **37** und **38** erfolgreich synthetisiert werden konnten, mussten diese für die Kettenverlängerung mit einer entsprechenden Schutzgruppe versehen werden. In Anlehnung an die in Kapitel 2.1 geplante Schutzgruppenchemie schloss sich somit die Benzylierung der freien Carboxylfunktion an (siehe Abb. 31).

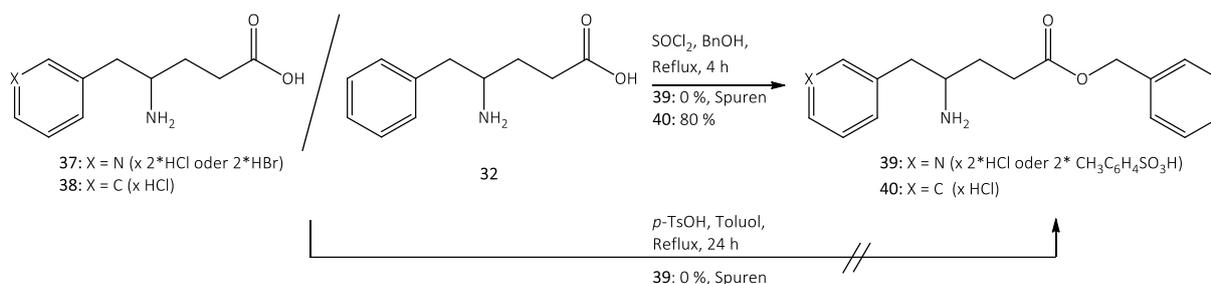


Abb. 31: Benzylierung der 4-Amino-5-arylpentansäuren

Hierfür standen verschiedene Methoden zur Verfügung. Gemäß Kapitel 2.1.2 wurde zunächst der Einsatz von Thionylchlorid und BnOH überprüft.⁸⁶ Für Verbindung **37** wurde jedoch keine Umsetzung festgestellt. Dagegen war Produkt **40** mit einer sehr guten Ausbeute von 80 % als Hydrochlorid isolierbar (razemisches Gemisch).

Als Alternativmethode zur Darstellung von **39** wurde die 4-Amino-5-pyridylpentansäure (**37**) zusammen mit BnOH und *p*-TsOH als saurer Katalysator in Toluol für 24 h erhitzt. Auch hierbei wurde lediglich das Edukt quantitativ zurückgewonnen. Die Synthese des Benzylierungsprodukts **39** wird derzeit in aktuellen Arbeiten untersucht.

3.1.4.2 Kettenverlängerung

Aufgrund der erfolglosen Synthese der benzylierten 4-Amino-5-pyridylpentansäure befasst sich das folgende Kapitel nur mit der Kettenverlängerung basierend auf der 4-Amino-5-phenylpentansäure-Grundstruktur.

Wie schon in den Kapiteln 3.1.1 bis 3.1.3 erwähnt, stellt der initiale Syntheseschritt die Kupplung der GABA-Derivate mit *N*-Boc-*L*-Threonin dar. Hierfür wurde das Hydrochlorid **40** mithilfe von PyBOP in Dichlormethan bei Raumtemperatur zum entsprechenden Amid **41** umgesetzt (Abb. 32, Schritt i).

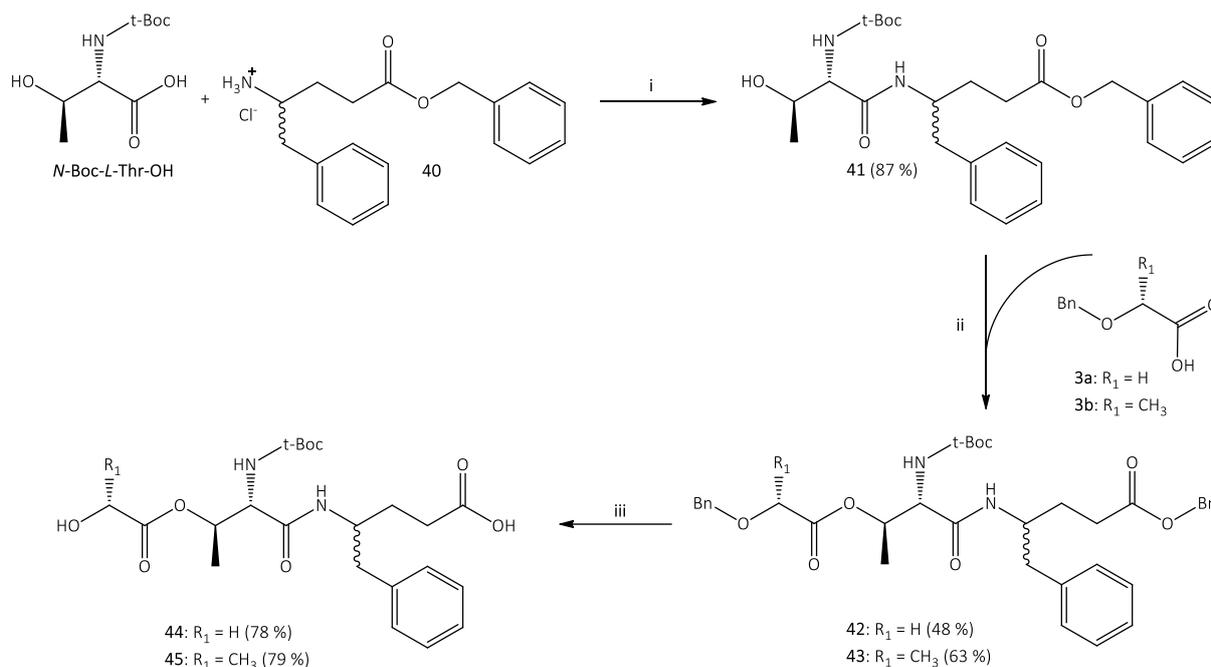


Abb. 32: Systematische Kettenverlängerung mit integrierter Phenyl-GABA-Seitenkette

Reaktionsbedingungen: i) PyBOP, DIPEA, DCM, RT, 16 h; ii) DIPEA, DCM, -20 °C, 15 min, PyBOP, RT, 16 h; iii) Pd/C (10 %), H₂, *i*-PrOH, 4 bar, RT, 24 h.

Das Peptid **41** wurde anschließend auf bekanntem Weg⁹⁴ mit den Glykolsäurederivaten **3a**⁸⁹ und **3b** verestert (vergleiche Kapitel 3.1.1 bis 3.1.3). Die Synthese der depsipeptidischen Strukturen **42** (48 %) und **43** (63 %) erfolgte nicht quantitativ (Schritt ii). Vielmehr wurde nicht umgesetztes Edukt wiedergewonnen. Eine Änderung der Reaktionsbedingungen führte zu keiner Ausbeutenerhöhung. Hierbei wurden unter anderem folgende Parameter variiert: Verlängerung der Reaktionszeiten von 18 Stunden auf 6 Tage sowie Änderung der stöchiometrischen Verhältnisse sowohl von **3a/b** (1.1 bis 2.0 Äq.), DIPEA (1.5 bis 3.5 Äq.) als auch von PyBOP (1.1 bis 1.3 Äq.).

Das peptidische Produkt **41** sowie die depsipeptidischen Produkte **42** und **43** wurden als diastereomeres Gemisch im Verhältnis 1:1 synthetisiert. Eine chromatographische Trennung der Diastereomere sowie eine fraktionierte Kristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln waren nicht erfolgreich. Somit wurde das Diastereomergemisch für die nachfolgende katalytische Hydrogenolyse eingesetzt. Unter Verwendung von Pd/C (10 %) in Isopropanol konnte nach einer Reaktionszeit von 24 h bei Atmosphärendruck die entschützten Produkte **44** (78 %) und **45** (79 %) als weiße Feststoffe isoliert werden (Schritt iii).

3.1.4.3 Ringschluss mit anschließender Acylierung

Die finalen Schritte für die Synthese eines entsprechenden PYR-Analogons mit einer integrierten GABA-Seitenkette sind in Abb. 33 dargestellt. Unter starker Verdünnung ($c \leq 1$ mM) erfolgte mithilfe von PyBOP in Dichlormethan der Ringschluss von **44** und **45**.

Hierbei konnten die t-Boc-geschützten diastereomeren (DS) Produkte **46 DS1** und **DS2** sowie **47 DS1** und **DS2** isoliert werden.

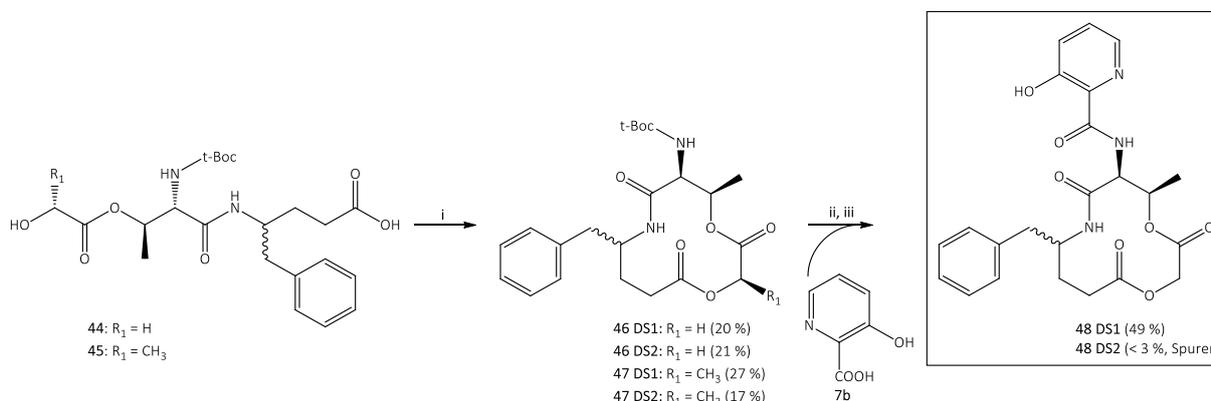


Abb. 33: Finaler Ringschluss und Acylierung mit der 3-Hydroxypicolinsäure zum gewünschten zyklischen Analogon

Reaktionsbedingungen: i) DIPEA, DCM, $c \leq 1$ mM, -20 °C, 15-30 min, PyBOP, RT, 48-72 h; ii) TFA/DCM, 0 °C, 5 min; iii) DIPEA, PyBOP, DMF, RT, 3 d.

Im Gegensatz zu den Vorstufen **44** und **45** war eine chromatographische Trennung der einzelnen Diastereomere der Produkte **46** und **47** möglich. Zunächst musste hierfür das Rohprodukt mithilfe von Chloroform chromatographisch vorgereinigt werden, damit unter Verwendung von MTBE als Fließmittel die Isomere säulenchromatographisch getrennt werden konnten. Die Stereoisomere von Produkt **46** wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit einer Ausbeute von 20 % für das **DS1** und 21 % für das **DS2** synthetisiert. Für **47** wurde ein Verhältnis von 3:2 für **DS1** (27 %) und **DS2** (17 %) ermittelt, wobei sich dieses abweichende Verhältnis insbesondere auf die mehrstufige chromatographische Isolierung des Isomers **47 DS2** zurückführen lässt.

Die Auswertung der charakteristischen Signalaufspaltung sowie der chemischen Verschiebung der Protonen der Methylen- bzw. Methingruppe an Position C-2 im ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **46** und Verbindung **47** (vergleiche Kapitel 3.1.1) bestätigten den erfolgreichen Ringschluss. Zudem wurde massenspektrometrisch die mögliche Isolierung unerwünschter Dimere oder Polymere ausgeschlossen.

Die diastereotopen Methylenprotonen 2-H sind aufgrund der eingeschränkten räumlichen Flexibilität von **46** sowohl bei **DS1** (2-H: $\delta = 4.31$ ppm, $^2J = 15.7$ Hz; 2'-H: $\delta = 4.99$ ppm, $^2J = 15.7$ Hz) als auch bei **DS2** (2-H: $\delta = 4.13$ ppm, $^2J = 12.7$ Hz; 2'-H: $\delta = 5.03$ ppm, $^2J = 12.3$ Hz) als breite Dubletts mit zum Teil ausgeprägtem Dacheffekt bei unterschiedlicher chemischer Verschiebung zu finden (siehe Abb. 34).

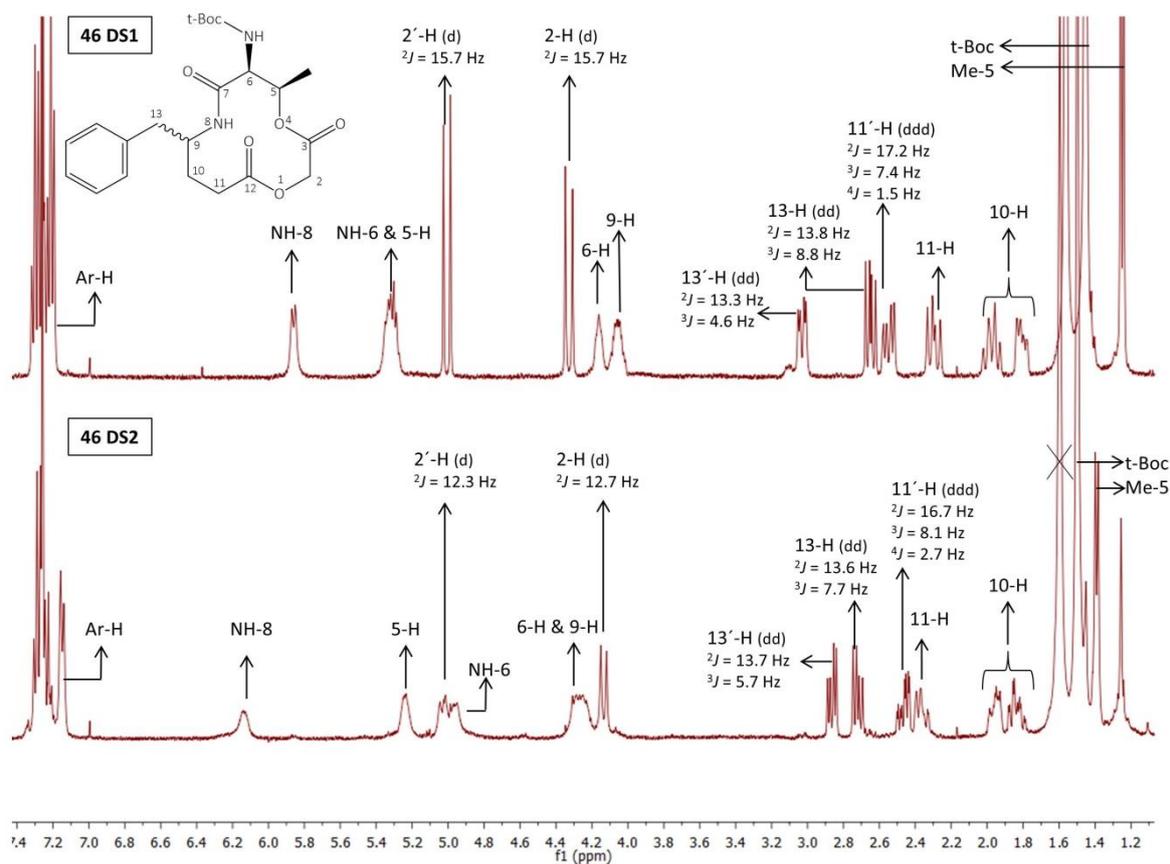


Abb. 34: ^1H -NMR-Spektrum der isolierten Diastereomere von Verbindung 46 DS1 (oben) und DS2 (unten) (jeweils in CDCl_3)

Die Signallage des Methinprotons der Position 2-H unterscheidet sich bei **47 DS1** und **DS2** stärker. Dieses Proton ist im Fall von **DS1** ($\delta = 5.20$ bis 5.35 ppm) stärker tieffeldverschoben als bei dem analogen Isomer **DS2** ($\delta = 4.63$ bis 4.71 ppm) (Abb. 35). Der Unterschied in der chemischen Verschiebung kommt möglicherweise aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Anordnung der Kopplungspartner, bedingt durch die zusätzlich eingeführte *R*-konfigurierte Methylgruppe an Position C-2 und die damit einhergehende Änderung der Ringkonformation, zustande.

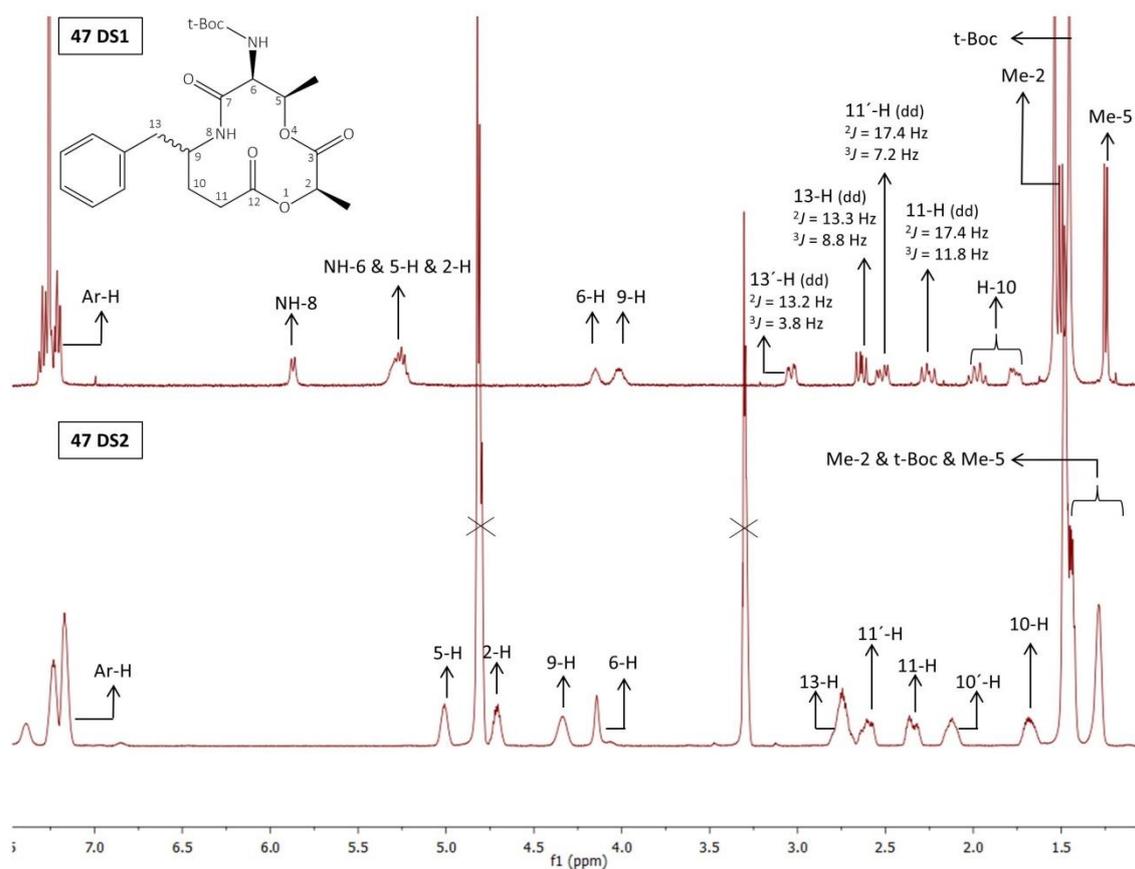


Abb. 35: ^1H -NMR-Spektrum der isolierten Diastereomere von Verbindung **47 DS1** (oben, in CDCl_3) und **DS2** (unten, in CD_3OD)

Der letzte Reaktionsschritt beinhaltet die exozyklische Acylierung des t-Boc-geschützten Zwölfringssystems **46** mit 3-Hydroxypicolinsäure (**7b**) (siehe Abb. 33; Schritte ii und iii). Nachdem Verbindung **46 DS1** mithilfe von TFA in Dichlormethan in das freie Amin überführt wurde, musste dieses zur Vermeidung einer $O \rightarrow N$ -Acygruppenwanderung *in situ* acyliert werden. Eine Reaktionszeit von drei Tagen bei Raumtemperatur ermöglichte die Synthese des Pyridomycinderivats **48 DS1** mit einer Ausbeute von 49 %. Das entsprechende ^1H -NMR-Spektrum ist in Abb. 36 gezeigt. In Anlehnung an die detaillierte spektroskopische Auswertung von Verbindung **8b** aus Kapitel 3.1.1 (Abb. 18) sollen die charakteristischen Signale von **48 DS1** hier nur kurz erläutert werden.

Aufgrund der direkten Nachbarschaft zu der 3-Hydroxypicolinsäure als elektronenziehendem Substituent sind nachfolgende Signale deutlich tieffeldverschoben: das NH-Signal der Amidbindung an Position NH-8 ($\delta = 8.70$ ppm) und das Proton 6-H bei $\delta = 4.57$ ppm. Letzteres bedeutet eine Tieffeldverschiebung um ca. 0.4 ppm im Vergleich zu **46 DS1** ($\delta = 4.16$ ppm, Abb. 34). Diese veränderte Signallage repräsentiert die erfolgreiche Acylierung des entschütztenamins mit der aromatischen Carbonsäure. Zusätzlich kann die erfolgreiche Substitution mit **7b** mithilfe des entschirmten Protons der phenolischen, aziden Hydroxygruppe bei $\delta = 11.72$ ppm bestätigt werden (vergleiche Kapitel 3.1.1).

Die erfolgreiche Substitution des **DS1** von Verbindung **46** konnte nicht auf das entsprechende **DS2** für die Darstellung von **48 DS2** übertragen werden. Verbindung **48 DS2** war synthetisch

grundsätzlich zugänglich. Die Isolierung war jedoch nur mit einer sehr geringen Ausbeute (< 3 %, Spuren) verbunden. Demnach stand **48 DS2** für eine mikrobielle Aktivitätsbestimmung und möglicher ableitender SARs nicht zur Verfügung und sollte in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden.

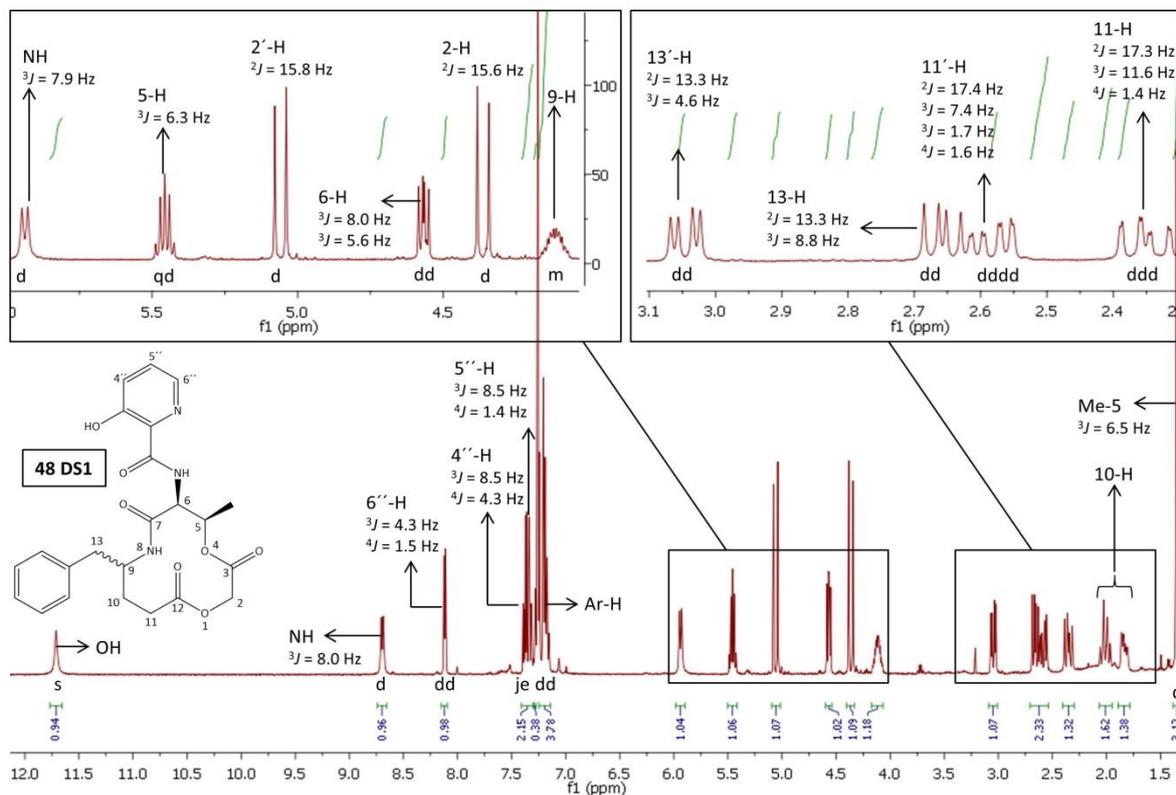


Abb. 36: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **48 DS1** (in CDCl₃)

Für die anschließende mikrobiologische Evaluierung standen die nicht-acylierten Ringsysteme **46** und **47** sowie das direkte PYR-Analogon **48 DS1** als Testsubstanzen zur Verfügung. An dieser Stelle sei vorweggenommen, dass sich bezüglich der Substitution mit der 3-Hydroxypicolinsäure (**48 DS1**) kein Zusatznutzen abzeichnete (siehe Kapitel 5). Dies veranlasste uns, auf eine weitere Umsetzung der Derivate **47 DS1** und **DS2** mit der aromatischen Carbonsäure zu verzichten.

3.2 SYNTHESE OFFENKETTIGER PYRIDOMYCIN-DERIVATE

Das folgende Kapitel befasst sich mit der Synthese offenkettiger PYR-Derivate. Ein Ringsystem mit eingeschränkten Konformationen führt zu einer zielgerichteteren Targetbindung als entsprechende offenkettige Strukturen.⁵¹ Der mögliche Verlust an Entropie im Zuge der Targetbindung kann bei einem Ringsystem ungleich geringer ausfallen und folglich zu einer stärkeren Bindung an der Targetoberfläche führen.¹⁴² Aufgrund dieser Eigenschaften kann ein Ringsystem die ideale Molekülform aufweisen, passend für die vorgesehene Bindungstasche. Jedoch kann ein Verlust in der Molekülflexibilität auch die Affinität zur Zielstruktur herabsetzen. Dies ist insbesondere dann kritisch, wenn sich Ligand und Zielstruktur für eine wirkungsvolle Interaktion in ihrer räumlichen Orientierung beeinflussen müssen (Schlüssel-Schloss-Prinzip).

Während der Anfertigung dieser Arbeit war hinsichtlich Bindungsmodus und kinetischer Interaktion des PYRs am Target nur wenig bekannt. Dies veranlasste uns, zusätzlich zu den ringgeschlossenen Systemen offenkettige Varianten zu synthetisieren und mit den analogen Ringsystemen zu vergleichen. Zur Klärung eines möglichen Einflusses der Picolinsäure-Teilstruktur (siehe Kapitel 1.6 in Abb. 6) auf die mögliche antimykobakterielle Aktivität wurden verschiedene aromatische Carbonsäuren (**7a-d**) an die offenkettigen depsipeptidischen Zwischenstufen substituiert (siehe Abb. 37). Hierbei wurden sowohl lipophile (benzylierte (**49-56**) oder methylierte (**60**)) als auch hydrophile (debenzylierte) Zwischenstufen (**57**) gewonnen und mikrobiologisch untersucht. Des Weiteren sollte die Notwendigkeit der exozyklischen Pyridinmethylenteilstruktur geklärt werden (siehe Kapitel 1.6 mit Abb. 6). Hierfür wurden zwei offenkettige Varianten synthetisiert (**64, 65**), welche ebenfalls hinsichtlich antimykobakterieller Aktivität untersucht wurden. Im Zuge dessen sollte auch die Bedeutung der integrierten Aminosäure Threonin durch Austausch mit Glycin als einfachster Vertreter der essentiellen Aminosäuren bewertet werden (siehe Abb. 41).

3.2.1 LIPOPHILE UND HYDROPHILE OFFENKETTIGE ANALOGA

Als lipophile offenkettige Analoga werden zunächst die depsipeptidischen Zwischenstufen mit integrierter Benzylschutzgruppe betrachtet, an deren Threonin-Partialstruktur die aromatischen Carbonsäuren **7a-d** substituiert wurden. Zur Aktivitätsklärung hydrophiler offenkettiger Depsipeptide wurden die Benzylschutzgruppen der erhaltenen lipophilen Analoga abgespalten und die entsprechende freie Carbonsäure ebenfalls mikrobiologisch untersucht. Die Einführung zusätzlicher hydrophiler Gruppen erfolgte unter der Hypothese, dass die Ausbildung neuer polarer Interaktionen in der Bindetasche in Form von Wasserstoffbrückenbindungen die Bindungsaffinität im Target begünstigt. Abschließend wird alternativ auf einen entsprechenden Methylester als lipophile depsipeptidische offenkettige Variante eingegangen.

Benzylierte und debenzylierte offenkettige Strukturen

Die bereits in Kapitel 3.1.1 gewonnenen depsipeptidischen Zwischenprodukte **4a** und **4b** wurden mithilfe von TFA nach bekanntem Verfahren zur Hydrolyse der Boc-Schutzgruppe

umgesetzt. Die nachfolgende Acylierung des freien Amins erfolgte entweder mit der Picolinsäure (**7a**), mit der 3-Hydroxypicolinsäure (**7b**), der 3-Fluorpicolinsäure (**7c**) oder mit der Salicylsäure (**7d**). Der Austausch von **7b** mit **7c** entspricht dem Austausch der Hydroxygruppe als potentiellm Wasserstoffbrückenakzeptor und -donator gegenüber Fluor als reinem Wasserstoffbrückenakzeptor. Die Einführung der Salicylsäure soll die Notwendigkeit des Pyridinmotivs *per se* klären. Die Substitutionsprodukte **49** bis **56** konnten mit ausreichenden bis zufriedenstellenden Ausbeuten von 16 bis 52 % gewonnen werden (siehe Abb. 37).

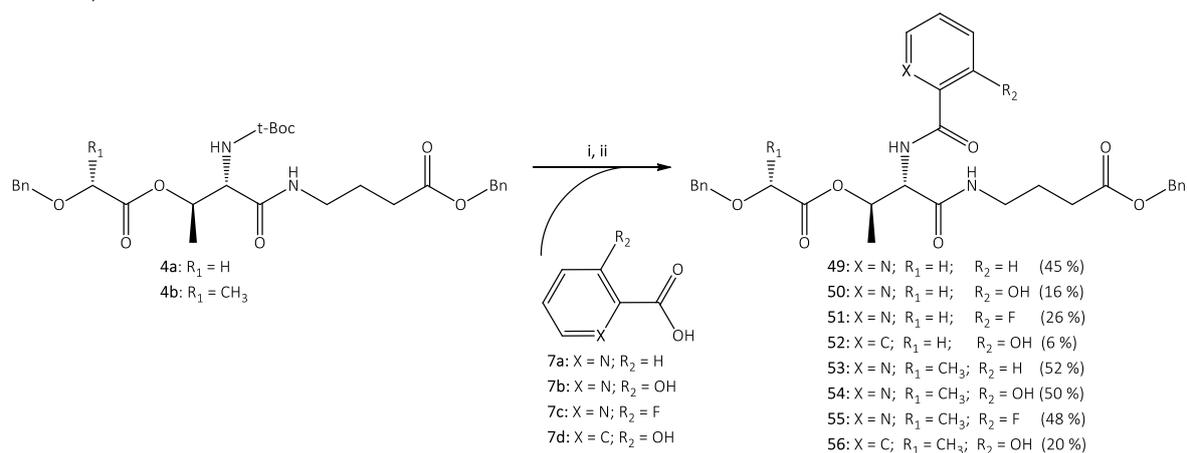


Abb. 37: Synthese benzylierter offenkettiger Analoga

Reaktionsbedingungen: i) TFA/DCM (1:1), 0 °C, 1 h; ii) PyBOP, DCM, DIPEA, RT, 18 h.

Die so generierten offenkettigen Verbindungen wurden direkt für die antimykobakteriellen Testungen eingesetzt. Mit den noch vorhandenen Benzylschutzgruppen weisen sie einen deutlich lipophilen Charakter auf. Dadurch ist eine Penetration durch die lipophile mykobakterielle Zellwand möglicherweise erleichtert.

Im Vergleich dazu sollten mögliche biologische Effekte entsprechender hydrophiler Abkömmlinge ohne Benzylschutzgruppen untersucht werden. Hierfür wurde zunächst eine Auswahl von Derivaten hydrogenolytisch gespalten. Zur Schutzgruppenspaltung wurden stellvertretend Depsipeptid **53** und **54** katalytisch hydriert (Abb. 38).

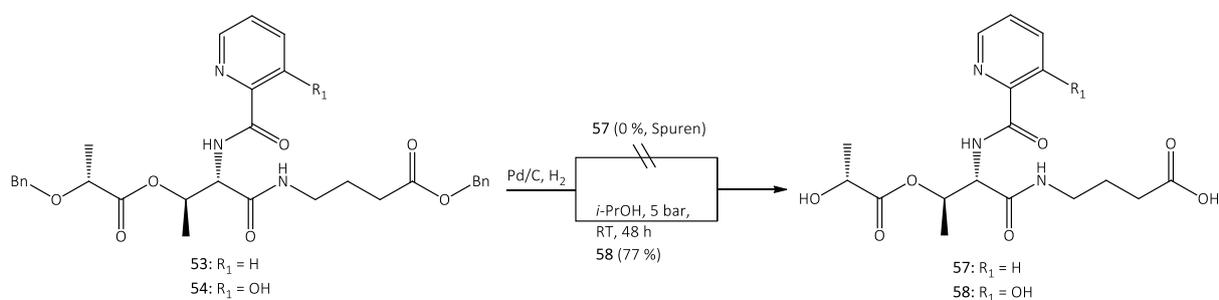


Abb. 38: Synthese offenkettiger hydrophiler Analoga

Es zeigte sich, dass nur die mit der 3-Hydroxypicolinsäure substituierte Verbindung **54** mit guter Ausbeute (77 %) hydriert werden konnte. Im Zuge der Syntheseoptimierung für **57** und **58** wurde zudem eine Lösungsmittelabhängigkeit festgestellt. Demnach musste zur Vermeidung unerwünschter Substitutionsprodukte wie Methylester Methanol als Lösungsmittel vermieden werden. Als gute Alternative konnte Isopropanol für die Synthese von **58** etabliert werden. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: das Edukt **54** wurde bei 5 bar Wasserstoffdruck für 48 h bei Raumtemperatur entschützt.

Die Synthese von **57** war trotz Variationen der Reaktionsbedingungen, die in Tab. 7 zusammengefasst sind, nicht möglich.

Tab. 7: Auflistung der variierten Reaktionsbedingungen für die Isolierung von **57**

Versuchsnummer	Lösungsmittel	Wasserstoffdruck	Reaktionsdauer	Beobachtungen
1	Methanol	5 bar	24 h	Bildung eines unerwünschten Methylesters
2	Isopropanol	5 bar	24 h-4 d	Unvollständige Umsetzung
3	Ethylacetat	10 bar	36 h	Reaktionsstopp auf Stufe des Benzylethers sowie Bildung zahlreicher Nebenprodukte

In Anlehnung an die vorhergehenden Hydrogenolysen wurde das Edukt **53** zunächst in Methanol bei 5 bar Wasserstoffdruck für 24 h hydriert (Versuchsnummer 1). Aufgrund der eingangs erwähnten beobachteten Bildung unerwünschter Substitutionsprodukte musste Methanol gegen ein vergleichbares protisches, polares Lösungsmittel wie Isopropanol umgestellt werden (Versuchsnummer 2). Der Lösungsmittelwechsel von Methanol zu Isopropanol war im Gegensatz zu **58** bei **57** nicht zielführend. So konnte unter Isopropanol keine vollständige Umsetzung nach einer Reaktionsdauer von bis zu vier Tagen beobachtet werden. Als weitere Alternative zum Methanol wurde das polare aber aprotische Ethylacetat untersucht (Versuchsnummer 3). Nach einer Reaktionszeit von 36 h wurde jedoch nur der Benzylether von **57** sowie zahlreiche Nebenprodukte nachgewiesen, wobei eine denkbare quantitative Reduktion des Benzylesters zum Benzylether nicht völlig ausgeschlossen werden konnte. Unpolare Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran konnten aufgrund schlechter Löslichkeit des Edukts nicht eingesetzt werden.

Bis zu diesem Zeitpunkt hatte sich Palladium (Pd/C) als geeigneter Katalysator für die hier durchgeführten hydrogenolytischen Spaltungen von Benzylestern und -ethern erwiesen. In weiterführenden Arbeiten hätte aufgrund der erfolglosen Isolierung von Verbindung **57** bei der Synthese offenkettiger, depsipeptidischer Strukturen ein Austausch des Katalysators in Betracht gezogen werden können. Im Zuge der biologischen Aktivitätsbestimmungen konnten jedoch erste negative Tendenzen hinsichtlich der antimikrobiellen Eigenschaften von **49** bis **56** sowie von Verbindung **58** nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5). Daher wurde auf die Weiterentwicklung dieser offenkettigen, hydrophilen Strukturen verzichtet.

Methylierte Säurederivate

Wie bereits erwähnt, kann eine katalytische Hydrierung einer hochkonzentrierten methanolischen Reaktionsmischung zur Bildung von Substitutionsprodukten wie Methylester führen. So auch im Fall der depsipeptidischen Vorstufe **43** (siehe Abb. 39). Hier erfolgte eine Veresterung der Carboxylfunktion bei 4 bar Wasserstoffdruck (Pd/C (10%)) bei einer Konzentration des Ausgangsstoffs von 0.02 M. Mit Verbindung **59** wurde folglich der Methylester von Verbindung **45** synthetisiert, welcher als diastereomeres Gemisch isoliert wurde. Aufgrund der depsipeptidischen Grundstruktur war eine milde Hydrolyse des Methylesters nicht möglich.¹⁴³ Die Verseifung mithilfe einer 0.1 M isopropanolischen NaOH-Lösung bei pH = 8-9 und 0 °C führte zur Hydrolyse beider Estergruppen. Dagegen konnte unter Verwendung einer 1 M Lithiumhydroxidlösung bei 0 °C bis 100 °C kein Umsatz festgestellt werden.¹⁴⁴

Beide offenkettigen Varianten (**45** und **59**) stellen grundsätzlich die Vorstufen des Ring-systems **47** dar. Auf Grundlage dieser drei Strukturderivate könnte folglich ein direkter Vergleich hinsichtlich antimykobakterieller Aktivität zwischen hydrophilen (**45**) und lipophilen (**59**) offenkettigen sowie ringgeschlossenen (**47**) Analoga gezogen werden (siehe Kapitel 5).

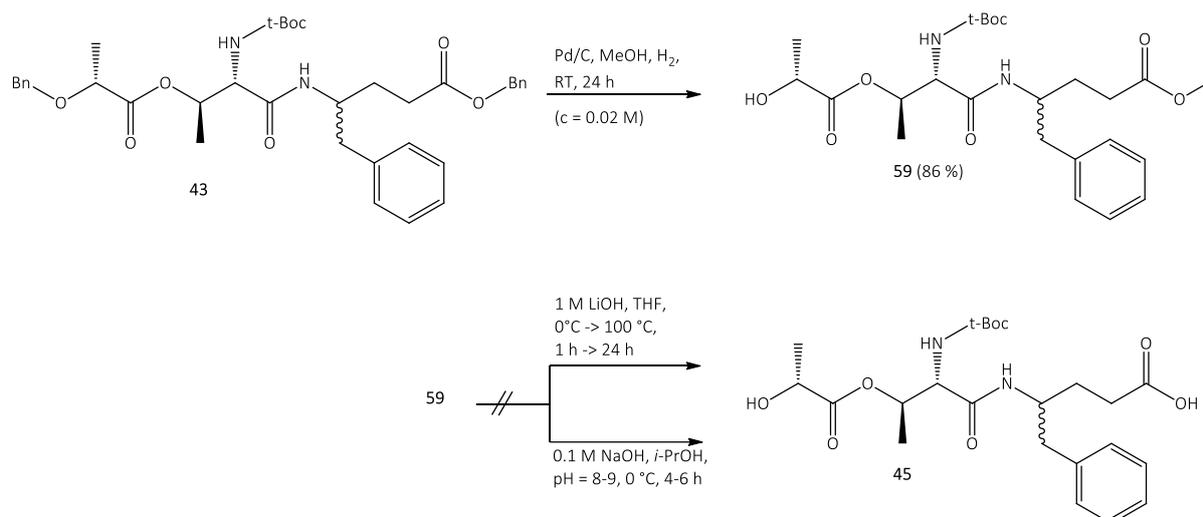


Abb. 39: Synthese des offenkettigen Methylester-Derivats **59**

Nachdem der offenkettige depsipeptidische Methylester nicht zur freien Carbonsäure **45** hydrolysiert werden konnte, wurde Verbindung **59** stattdessen in Anlehnung an die Synthese der Derivate **49** bis **56** mit der 3-Hydroxypicolinsäure (**7b**) substituiert (siehe Abb. 40). Somit konnte mit Verbindung **60** ein weiteres lineares PYR-Analogon synthetisiert werden, welches mit einer Ausbeute von 14 % als diastereomeres Gemisch gewonnen wurde und in die antimykobakterielle Untersuchung einging.

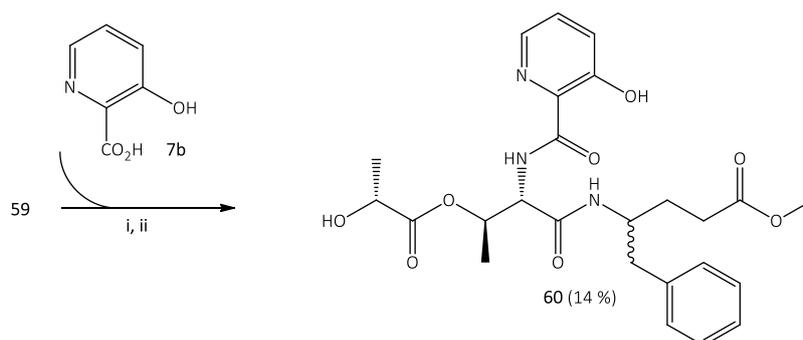


Abb. 40: Substitution von Verbindung 59 mit der 3-Hydroxypicolinsäure (7b)

Reaktionsbedingungen: i) TFA/DCM (1:1), 5 min, 0 °C; ii) PyBOP, DIPEA, RT, 18 h.

3.2.2 SYNTHESE OFFENKETTIGER PYRIDYMETHYLEN-TEILSTRUKTUREN

Des Weiteren sollte die Notwendigkeit der exozyklischen Pyridylmethylen-gruppierung für einen antimykobakteriellen Effekt geklärt werden. Hierfür wurden die Teilstrukturen **64** und **65** synthetisiert, die sich hinsichtlich der integrierten Aminosäure unterscheiden (siehe Abb. 41). Verbindung **65** stellt eine abgeleitete Teilstruktur des nativen Threonin-Substitutionsmusters im PYR dar (siehe auch Kapitel 1.6). Dagegen sollte mit **64** durch Austausch des Threonins gegen Glycin die strukturelle Notwendigkeit des Threonins geklärt werden.

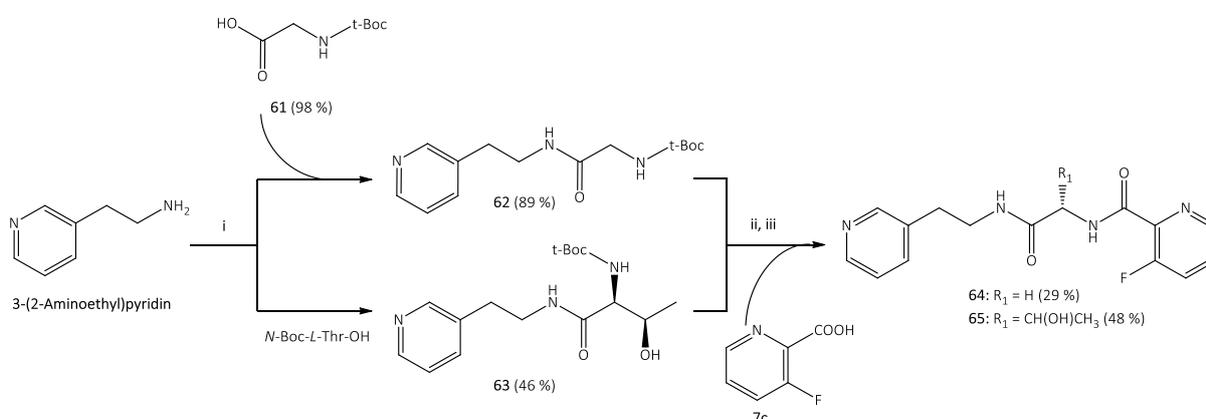


Abb. 41: Darstellung der Synthese der offenkettigen Pyridylmethylenteilstrukturen

Reaktionsbedingungen: i) PyBOP, DIPEA, DCM, RT, 16 h; ii), TFA/DCM (1:1), RT, 1h; iii) DIPEA, PyBOP, RT, 5 h.

Als Surrogat der Pyridylmethylen-Struktur wurde 3-(2-Aminoethyl)pyridin in die offenkettigen Teilstrukturen **64** und **65** eingebaut. Dazu wurde zunächst 3-(2-Aminoethyl)pyridin mit *N*-Boc-*L*-Threonin beziehungsweise *N*-Boc-*L*-Glycin (**61**) amidiert. Mithilfe von PyBOP als geeignetem Kupplungsreagenz konnte Verbindung **62** mit einer Ausbeute von 89 % und Verbindung **63** mit 46 % erfolgreich isoliert werden. Die anschließende Boc-Spaltung mithilfe von TFA und die Acylierung mit 3-Fluorpicolininsäure (**7c**) lieferte die Derivate **64** (29 %) und **65** (48 %).

Auch diese beiden Teilstrukturen des PYRs gingen in die antimykobakterielle Evaluierung ein, um SARs aufstellen zu können.

3.3 SYNTHESE DER HYDROXY-METHYL-SEITENKETTE

Pyridomycin weist insgesamt fünf Stereozentren auf. Allein drei davon sind in der *threo*-3-Hydroxy-4-aminobuttersäure-Teilstruktur der (2*R*,3*S*,4*S*)-4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-5-pyrid-3-ylpentansäure integriert (siehe Abb. 42).¹⁴¹ Diese Teilstruktur ist aufgrund einer Vielzahl von möglichen Interaktionen, beispielsweise als Wasserstoffbrückendonator und –akzeptor, in der Bindetasche besonders interessant. Die komplexe stereoselektive Synthese der drei Asymmetriezentren wurde bereits 1975 von Kinoshita et al. sowie 1976 durch Katsuki et al. publiziert.^{82,141} Mit acht beziehungsweise zehn Syntheseschritten konnten im Zuge dieser stereoselektiven Reaktion nur geringe Ausbeuten des gewünschten Produkts erzielt werden. Auch Horlacher et al. (2012) war es, ebenfalls mit acht Reaktionsschritten, nicht möglich, auf kurzem Wege dieses Strukturmotiv zu synthetisieren.⁹⁹ Demnach war ein Teilprojekt dieser Arbeit, einen optimierten einfacheren Syntheseweg für das Pentansäure-Motiv zu finden. Zur Vereinfachung sollte sich zunächst auf die Synthese eines entsprechenden Phenyl-Analogons mit nur wenigen Syntheseschritten konzentriert werden.

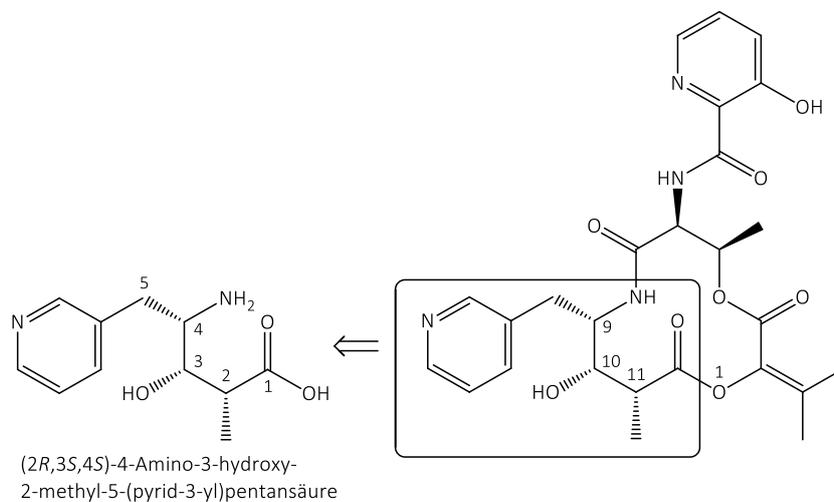


Abb. 42: Markierung der zu derivatisierenden Teilstruktur (2*R*,3*S*,4*S*)-4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-5-pyrid-3-ylpentansäure

Retrosynthetisch betrachtet, handelt es sich bei der 4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-5-pyrid-3-ylpentansäure um das Produkt der Aldoladdition einer Propionsäure und eines Pyridyl-Aminoaldehyds. Im folgenden Abschnitt soll beispielhaft die stereoselektive Aldoladdition nach Evans erläutert werden.

Aldoladdition nach Evans

Die stereoselektive Aldoladdition von Substraten mit ein oder mehreren Stereozentren wurde insbesondere in der Naturstoffsynthese intensiv erforscht.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ In dieser Arbeit wurde die

Aldoladdition nach Evans angewandt. Diese ist eine der am besten untersuchten Varianten zur stereoselektiven Knüpfung neuer C-C-Bindungen, die sich dabei spezifischer Hilfsmoleküle bedient (= Evans-Auxiliare).¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

Als chirale Auxiliare werden chirale Oxazolidinone verstanden, die die entstehende Konfiguration des Produkts entscheidend beeinflussen, wie zum Beispiel das (*S*)-4-Isopropyl-3-propionyl-oxazolidin-2-on. Unter Einsatz von Borverbindungen, hier das Dibutylboryltrifluormethansulfonat (DBBT), wird ein sterisch anspruchsvolles *Z*-Boron-Enolat generiert.¹⁴⁹ Dieses führt durch eine kovalente Bindung an das entsprechende elektrophile Aldehyd zu einer bevorzugten Bildung eines bestimmten Isomers (Abb. 43).¹⁵⁰

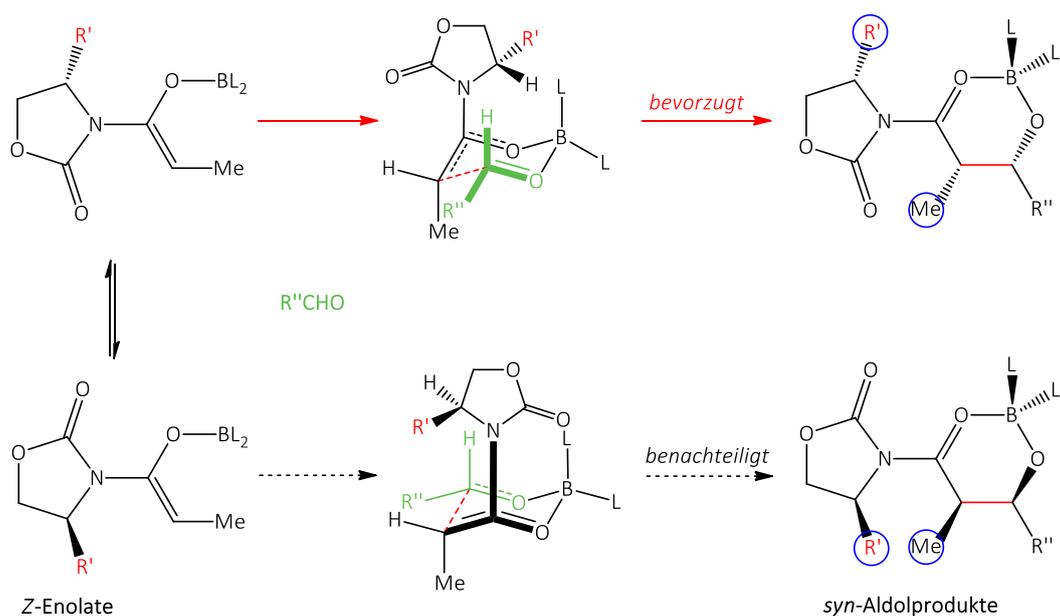


Abb. 43: Stereoselektive Synthese mithilfe des Evans-Auxiliars, modifiziert nach Evans¹⁵⁰ (L = Ligand)

Der Abb. 43 sind die sterischen Wechselwirkungen (grün hervorgehoben) als sesselförmiger Übergangszustand zu entnehmen. Diese Interaktion wird durch das Borenolat mit dem Aldehyd hervorgerufen. Demnach wird die Konformation des Borenolats eingenommen, die zu den geringsten räumlichen Interaktionen durch die Substituenten $-R$ und $-Me$ führt (blau eingekreist). Die obere räumliche Sesseldarstellung ist aufgrund der geringeren sterischen Hinderung gegenüber der energetisch ungünstigeren Konformation unten (gestrichelter Pfeil) bevorzugt. Dieser Mechanismus führt überwiegend zu *erythro*-konfigurierten Produkten,^{149,150} also Produkten mit Substituenten, die in derselben Raumebene angeordnet sind (*syn*-Aldolprodukte). In Abhängigkeit des Substitutionsmusters des eingesetzten Oxazolidinons bildet sich eine *erythro*-Variante bevorzugt (im Verhältnis $> 300:1$, siehe Abb. 44). Dies hat jedoch zur Folge, dass im Zuge der Evans-Synthese der 4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-5-phenylpentansäure nur *S*-konfigurierte Stereozentren generiert werden. Nichtsdestotrotz soll der stereoselektive Syntheseweg als Leitmotiv für diese Teilstruktur eingesetzt werden.

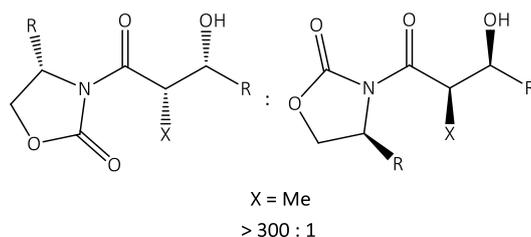


Abb. 44: Sterischer Einfluss in der Ausbildung bevorzugter *erythro*-Enantiomere¹⁴⁹

Kernstück der Anwendung der Evans-Synthese auf das Pentansäure-Motiv ist die Kondensation des chiralen Auxiliars (*S*)-4-Isopropyl-3-propionyl-oxazolidin-2-on¹⁴⁹ mit Boc-Phenylalaninal (**67**) zum stereoselektiven Aldol-Kondensationsprodukt **68** (siehe Abb. 45). In Anlehnung an Fehrentz et al. (1983) wurde zunächst das *N*-Methoxy-*N*-methylamid **66** durch Kupplung des kommerziell erhältlichen *N*-Boc-*L*-Phenylalanins mit *O,N*-Dimethylhydroxylamin in guten Ausbeuten isoliert und anschließend mithilfe von Lithiumaluminiumhydrid zum gewünschten Aldehyd **67** reduziert (Abb. 45).^{147,151} Hierbei wird die Bildung eines intramolekularen Komplexes der *in situ* vorliegenden Lithiumsalze mit dem sich bildenden Aldehyd vermutet. Durch Zugabe von Natriumhydrogensulfat wurde der Komplex zu **67** hydrolysiert. Der so generierte Aldehyd **67** war für zwei Wochen unter Argonatmosphäre bei RT oxidationsstabil. Die nachfolgende Aldolkondensation mit dem Evans-Auxiliar lieferte das reine Diastereomer **68** in 75 % Ausbeute. Das *syn*-Aldolprodukt **68** sollte anschließend in Anlehnung an Evans et al. (1981) mit 2 M wässriger KOH-Lösung hydrolysiert werden, um die gewünschte stereoselektive 4(*S*)-Amino-3(*S*)-hydroxy-2(*S*)-methyl-5-phenylpentansäure **69** isolieren zu können.¹⁴⁹ Theoretisch kann hierbei das Oxazolidinon unverändert aus der Reaktion wiedergewonnen und erneut eingesetzt werden. Jedoch erfolgte neben der Hydrolyse des Oxazolidinons auch die Hydrolyse der Boc-Schutzgruppe. Demnach war eine Isolierung von **69** nicht erfolgreich. Alternativ könnte stattdessen eine Hydrolyse in Anlehnung an Cai et al. (2011) und Leitheiser et al. (2003) unter Einsatz von Lithiumhydroperoxid (LiOOH: eine Lösung von LiOH in H₂O₂) durchgeführt werden,^{147,148} was einen guten Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten bietet.

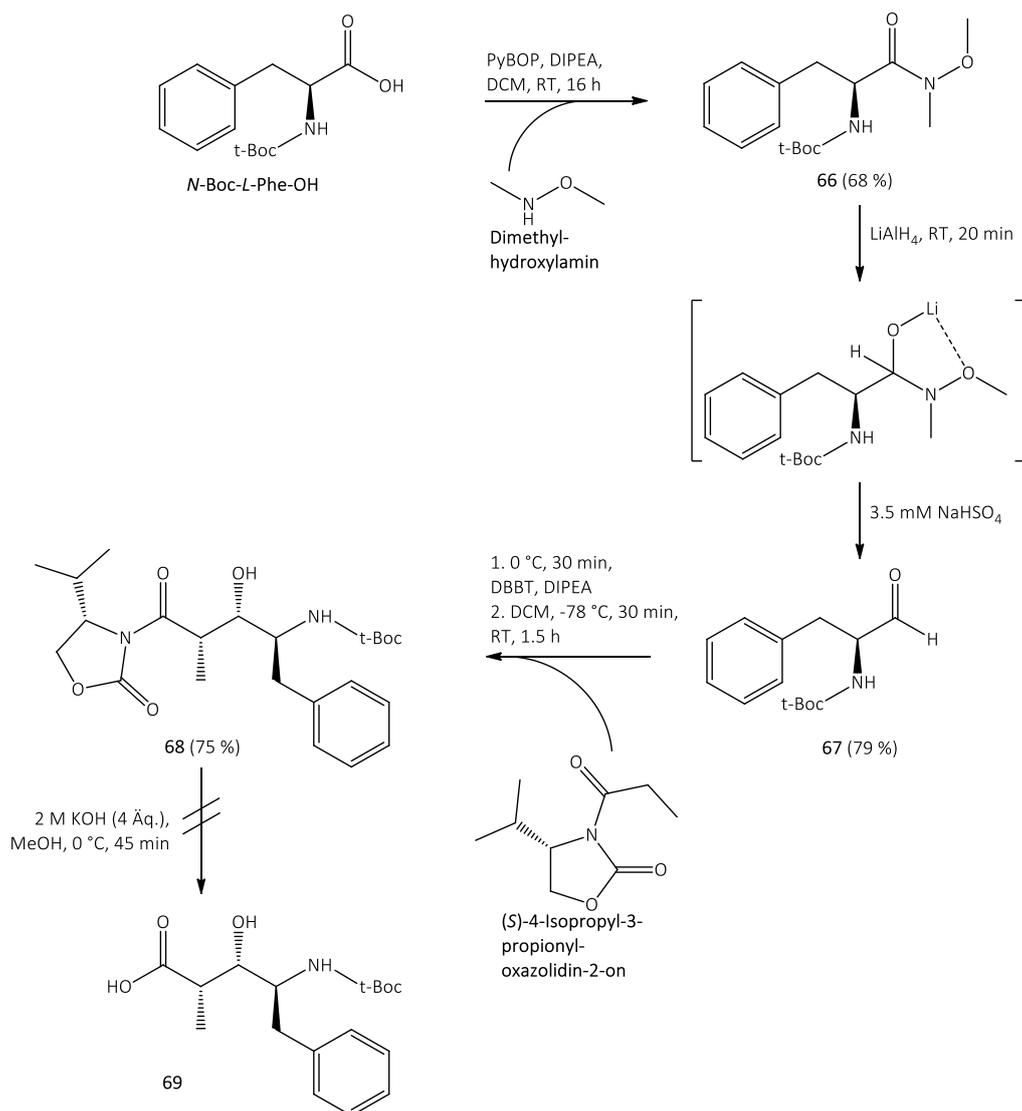


Abb. 45: Darstellung der Boron-vermittelten Aldoladdition modifiziert nach Leitheiser et al. (2003)¹⁴⁸, Evans et al. (1981)¹⁴⁹ und Fehrentz et al. (1983)¹⁵¹

Der hier aufgeführte Reaktionsweg zeigt eine gute Möglichkeit auf, um die synthetisch anspruchsvolle Seitenkette mit S-konfigurierten Stereozentren systematisch in nur fünf Reaktionsschritten aufbauen zu können. Um daraus ein entsprechendes Ringsystem mit diesem integrierten Strukturmerkmal zu synthetisieren, bedarf es ca. zehn bis zwölf nachfolgender Reaktionsschritte, was im Rahmen weiterführender Arbeiten realisiert werden könnte.

3.4 SYNTHESE DER EXOZYKLISCHEN 3-HYDROXYPICOLINSÄURE

Mit der exozyklisch substituierten 3-Hydroxypicolinsäure (**7b**) weist PYR ein weiteres besonderes Strukturmerkmal auf. Diese kommerziell erhältliche heteroaromatische Carbonsäure sollte aus ökonomischen Gründen selbst synthetisiert werden.

Retrosynthetisch kann **7b** aus 3-Pyridol (**70**) über das 3-Hydroxy-2-hydroxymethylpyridin (**71**) als Zwischenstufe aufgebaut werden (Abb. 46).

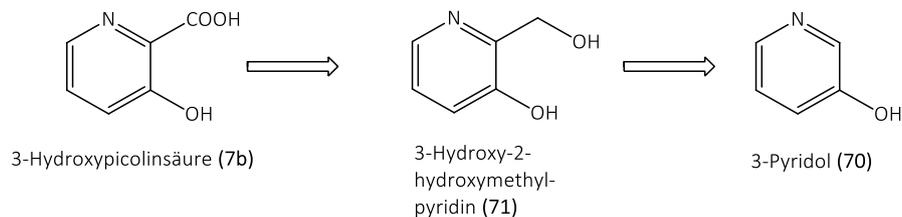


Abb. 46: Retrosynthese der 3-Hydroxypicolinsäure

In Anlehnung an Urbanski¹⁵² sollte folgender Syntheseweg realisiert werden: Einer erfolgreichen elektrophilen aromatischen Substitution von Formaldehyd an 3-Pyridol (**70**) in *ortho*-Position sollte sich eine Oxidation zu 3-Hydroxypicolinsäure (**7b**) anschließen (siehe Abb. 47 und Abb. 48).

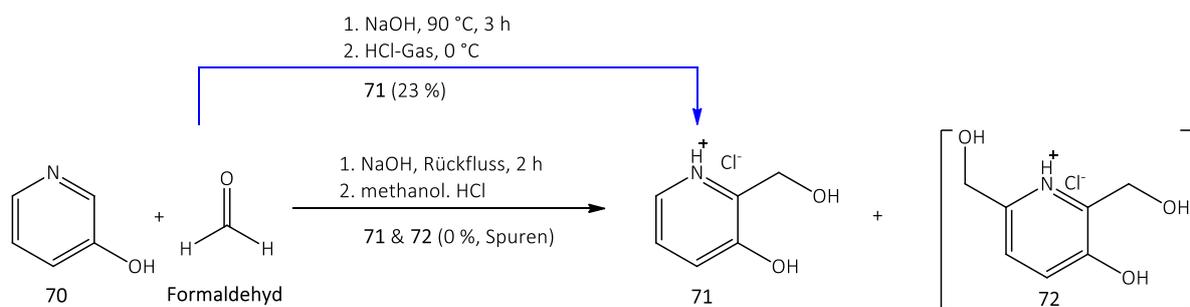


Abb. 47: Syntheseweg zur Darstellung der 3-Hydroxypicolinsäure

Hierfür wurde das 3-Pyridol mit einer 10%igen NaOH-Lösung versetzt und 36%ige Formaldehydlösung ergänzt. Nach dem das Reaktionsgemisch 2 h unter Rückfluss erhitzt wurde, sollte das kristalline Produkt **71** mithilfe einer methanolischen Salzsäure ausfallen. Die Verbindung **71** konnte zwar erfolgreich synthetisiert werden, es kam jedoch aufgrund des positiven mesomeren Effekts (+M-Effekt) der Hydroxylgruppe zur gleichzeitigen Substitution in *para*-Position zum entsprechenden 2,6-Bis-(hydroxymethyl)pyridin-3-ol (**72**). Die gleichzeitige Entstehung des möglichen *para*-Nebenprodukts 6-(Hydroxymethyl)pyridin-3-ol konnte dagegen ausgeschlossen werden. Das Substitutionsprodukt **72** konnte mittels ESI-MS und ¹H-NMR analytisch nachgewiesen werden.

Bereits Heinert et al. (1958)¹⁵³ beschrieb die simultane Entstehung von **72**, welche nicht vermieden werden kann. Es ist jedoch möglich, dieses Nebenprodukt vom Produkt zu separieren. Die Trennung erwies sich jedoch als sehr aufwendig und war nur durch mehrfache fraktionierte Kristallisation möglich.¹⁵³ Durch Einleitung von HCl-Gas erfolgte die Kristallisation von **71** und des eventuell nicht umgesetzten Edukts **70** – Nebenprodukt **72** verblieb dagegen in Lösung. Das so gewonnene Feststoffgemisch wurde anschließend mit gesättigter, frisch

hergestellter ethanolischer Salzsäure umkristallisiert. Hierbei verblieb das Edukt in Lösung und das Produkt fiel als kristalliner Feststoff aus.^{153,154}

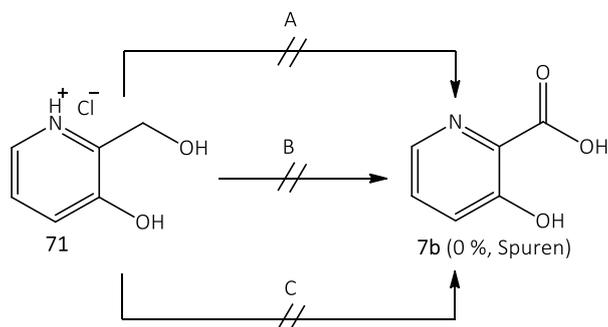


Abb. 48: Oxidation von 3-Hydroxy-2-hydroxymethylpyridin (**71**)

Die Verbindung **71** sollte anschließend oxidiert werden, wobei drei verschiedene Reaktionsbedingungen (Varianten A bis C) untersucht wurden (siehe Abb. 48 und Tab. 8). Es wurde die Einsatzmöglichkeit sowohl von Kalium- als auch Natriumpermanganat als Oxidationsmittel überprüft.^{152,155,156}

Tab. 8: Auflistung der variierten Reaktionsbedingungen zur Synthese von **7b**

Variante	Reaktionsbedingungen	Literatur
A	NaMnO ₄ oder KMnO ₄ (je 6 Äq.), H ₂ O, Na ₂ CO ₃ , 0 °C, 16-48 h	Urbanski (1946) ¹⁵²
B	NaMnO ₄ (1.5 Äq.), H ₂ O, 3 h, 80 °C, → RT, 16 h	Sheehan (1966) ¹⁵⁶
C	Pd/C (10 %) (0.025 Äq.), NaBH ₄ (0.1 Äq.), KOH, Druckluft, MeOH, RT, 24 h	An et al. (2011) ¹⁵⁷

Für die Isolierung der nicht-ionisierten Form von **7b** wurde zusätzlich auf eine korrekte pH-Werteinstellung von 0.5 bis 3.5 geachtet (pK_a (2-CO₂H) = 3.90; pK_a (3-OH) = 9.24).¹⁵⁸ Es war jedoch nicht möglich, die 3-Hydroxypicolinsäure (**7b**) über diesen Weg zu isolieren, vielmehr wurde überwiegend das Edukt zurück gewonnen. Verbindung **7b** wurde lediglich in Spuren nachgewiesen. Die Reaktionsbedingungen der Variante A waren wie folgt: das Edukt **71** wurde in Wasser gelöst und entweder Kalium- oder Natriumpermanganat im 6fachen Überschuss ergänzt.¹⁵² Das violette Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 0 °C gerührt – es konnte keine Umsetzung festgestellt werden. Auch Variante B mit 1.5 Äquivalenten Natriumpermanganat bei 80 °C für 3 h zeigte keine erfolgreiche Reaktion.¹⁵⁶ Als Alternative (Variante C) wurde eine durch einen heterogenen Katalysator vermittelte Oxidation des primären Alkohols bei Raumtemperatur im wässrigen Milieu untersucht.¹⁵⁷ Mithilfe von Pd/C (10 %), KOH und Natriumborhydrid sollte eine mögliche Oxidation an Luft überprüft werden. Natriumborhydrid diente der schnellen Reaktivierung der eventuell oxidierten Palladiumoberfläche, bevor eine Reduktion der Carbonylgruppe durch das Natriumborhydrid stattfinden kann. Entgegen den

Literaturangaben konnte **7b** nur in Spuren detektiert werden. Stattdessen wurde **71** quantitativ wiedergewonnen.

Bereits 1965 wurde durch Sheehan et al.¹⁵⁶ auf die Komplexität der Synthese der 3-Hydroxypicolinsäure hingewiesen, welche durch viele Syntheseschritte und folglich geringe Ausbeuten gekennzeichnet ist. Die katalysatorvermittelte Oxidation scheint von allen bisher untersuchten Wegen der Vielversprechendste zu sein. Für zukünftige Arbeiten sollte die Oxidation weiter optimiert werden, beispielsweise durch Einleitung elementaren Sauerstoffs anstelle der einfachen Reaktion an Luft.

Kapitel IV

4 KONFIGURATIONS-AUFKLÄRUNG

Naturprodukte mit struktureller Komplexität und Dreidimensionalität können zielgerichteter, stärker und somit effektiver an einem therapeutischen Target binden, als es für kleine und flexiblere Moleküle sowohl synthetischen als auch natürlichen Ursprungs möglich ist.⁴⁸ Die genannte Komplexität basiert insbesondere auf stereogenen Zentren. Für die Aufklärung der Bindung eines Arzneistoffs an seinem Target spielt daher sehr oft die Stereochemie eine entscheidende Rolle. Dabei muss die exakte räumliche Orientierung eines Atoms in Bezug zum Gesamtmolekül aufgeklärt werden. Die Bestimmung relativer oder absoluter Konfigurationen stellt im Zuge der strukturellen Analyse u. a. von Naturstoffen einen essentiellen Bestandteil dar.

Es können hierbei ein oder mehrere Stereozentren im Molekül vorkommen, so dass Enantiomere oder Diastereomere entstehen. Die in dieser Arbeit synthetisierten Zielverbindungen **46** und **47** wurden chromatographisch in die Diastereomere **DS1** und **DS2** getrennt (vergleiche dazu Kapitel 3.1.4). Die Diastereomere der Verbindung **46** besitzen insgesamt drei Stereozentren an den Positionen C-5(*R*), C-6(*S*) und C-9, wohingegen Derivat **47** vier Chiralitätszentren an den Positionen C-2(*R*), C-5(*R*), C-6(*S*) und C-9 aufweist. Infolge des nicht-stereoselektiven Synthesewegs konnte für C-9 beider Epimerenpaare die absolute *R*- oder *S*-Konfiguration nicht zugeordnet werden. Bedingt durch die Enantiomerenreinheit der kommerziell erhältlichen Edukte war die Konfiguration der übrigen Stereozentren bekannt.

Die absolute Konfiguration eines Chiralitätszentrums kann direkt mithilfe der anomalen Röntgenbeugung bestimmt werden. Existieren dagegen ein oder mehrere Referenzzentren im Molekül kann die absolute Konfiguration des zu bestimmenden Chiralitätszentrums mithilfe der normalen Röntgendiffraktion in einer Kristallstrukturanalyse ermittelt werden.

Weiterhin kann eine Charakterisierung der absoluten Konfiguration indirekt bzw. relativ durch einen spektroskopischen Vergleich mit Referenzsubstanzen mit bekannter absoluter Konfiguration, beispielsweise unter Anwendung der NMR-Anisotropiemethode, erfolgen.¹⁵⁹ Des Weiteren können chiroptische Methoden wie die UV-Absorption oder der Zirkulardichroismus¹⁵⁹⁻¹⁶¹ (CD) zur indirekten Bestimmung einer unbekanntenen Konfiguration herangezogen werden.

Auf diese Methoden soll im Folgenden zur Aufklärung des unbekanntenen Stereozentrums am C-9 der depsipeptidischen Strukturen **46 DS1/2** und **47 DS1/2**, sowie **48 DS1** als synthetisches Folgeprodukt von **46 DS1**, eingegangen werden. An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, dass für einen Vergleich unter Zuhilfenahme von Referenzsubstanzen keine strukturell verwandten Verbindungen zur Verfügung standen.

Röntgenstrukturanalyse

Mithilfe der Röntgendiffraktometrie kann die absolute Anordnung der Atome in einem Einkristall durch Beugung (Diffraktion) von monochromatischer Röntgenstrahlung am Kristallgitter bestimmt werden.¹⁵⁹ Unter Anwendung der anomalen Röntgendiffraktion wird der anomale Dispersionseffekt zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur an einem Einkristall ausgenutzt. Wird hierfür eine Probe, die ein Schwermetallatom enthält, mit monochromatischer Röntgenstrahlung nahe der Absorptionskante dieses Schwermetallatoms bestrahlt, tritt eine anomale Dispersion auf, die bei Enantiomeren gegensätzlich ist.^{159,162}

Anhand des aufgezeichneten Beugungsmusters lassen sich Rückschlüsse auf die Geometrie und die Anordnung der Atome schließen.¹⁶³ Existieren im Molekül jedoch Chiralitätszentren mit bekannter Konfiguration, können diese Chiralitätszentren als interne Referenzkonfiguration herangezogen werden.¹⁶² Letztere Voraussetzung für eine Röntgenkristallanalyse ohne Anwendung der anomalen Dispersion war für die Verbindungen **46 DS1/DS2** und **48 DS1** mit zwei und den Verbindungen **47 DS1/DS2** mit insgesamt drei bekannten absoluten Konfigurationen gegeben. Hierfür sind jedoch Kristalle der Verbindungen **46**, **47** und **48** höchster Qualität die Grundvoraussetzung (wie ein regelmäßiger Aufbau des Kristallgitters).

Anstelle von Einkristallen kann auch die Röntgenpulverdiffraktometrie angewendet werden. Dafür werden allerdings größere Substanzmengen von mindestens 10 mg benötigt. Diese standen für die Verbindungen **46 DS1/2**, **47 DS1/2** oder **48 DS1** leider nicht zur Verfügung und folglich konnte die Röntgenpulverdiffraktometrie nicht durchgeführt werden.

Im Zuge der Bestimmung der unbekanntenen Konfiguration an C-9 wurde stellvertretend Verbindung **48 DS1** zur Klärung dieses Sachverhalts eingesetzt. Die dadurch erzielten Ergebnisse der Strukturaufklärung sollen direkt auf die Vorstufe **46 DS1** übertragen werden, da hier die gleiche Konfiguration für C-9 angenommen wurde. Umgekehrt können dadurch Rückschlüsse auf das Diastereomer 2 von **46** gezogen werden.

Für die Kristallzüchtung wurde Verbindung **48 DS1** unterschiedlichen Lösungsmitteln ausgesetzt (wie z. B. Tetrahydrofuran, Diisopropylether, MTBE, Diethylether sowie Chloroform). Es konnten jedoch unter Verwendung von polaren und apolaren Lösungsmitteln keine sauberen Einkristalle von **48 DS1** gezüchtet werden. Vielmehr wurde Verbindung **48 DS1** als agglomerierter nicht-kristalliner bzw. amorpher Feststoff gewonnen, wodurch eine Röntgen-einkristalldiffraktometrie nicht möglich war. Demnach wurde eine Alternativmethode zur Bestimmung der unbekanntenen Konfiguration in Betracht gezogen – der Zirkulardichroismus.

Zirkulardichroismus

Die chiroptischen Methoden basieren auf der Bestimmung der Wechselwirkungen der chiralen Moleküle mit links- und rechtszirkular polarisiertem Licht. Zu diesen Methoden zählen unter anderem der elektronische (ECD) sowie der Schwingungszirkulardichroismus (VCD).¹⁶⁰ Chirale Substanzen drehen die Polarisationssebene des linear polarisierten Lichts entweder nach links oder nach rechts. Bei dem Zirkulardichroismus wird die Differenz der Absorption (ΔA oder $\Delta \epsilon$) zwischen dem links- (A_L) und dem rechtszirkular (A_R) polarisiertem Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen vermessen.

Bei der ECD werden die Absorptionsdifferenzen im UV-vis- und bei der VCD im mittleren IR-Wellenlängenbereich aufgenommen. Grundvoraussetzung für die chiroptischen Vermessungen des ECDs ist das Vorhandensein eines Chromophors. In Abhängigkeit von der Chiralität wird entweder das links- oder das rechtszirkular polarisierte Licht stärker absorbiert. Ein CD-Spektrum stellt somit die wellenlängenabhängige Differenz der Absorptionen dar ($\Delta A = A_L - A_R$).¹⁶¹

Ein CD-Spektrum kann durch theoretische quantenchemische Kalkulationen simuliert werden.¹⁶¹ Hierbei wird ein CD-Spektrum für eine vermutete relative Konfiguration berechnet. Durch Vergleich der Spektren des berechneten mit dem experimentell bestimmten CD-Spektrum kann die absolute Konfiguration indirekt ermittelt werden.

In Kooperation mit Frau Dr. Porzel vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB, Halle/Saale) wurden die CD-Spektren der einzelnen Diastereomere (oben: **46**, unten: **47**) experimentell bestimmt (Abb. 49).

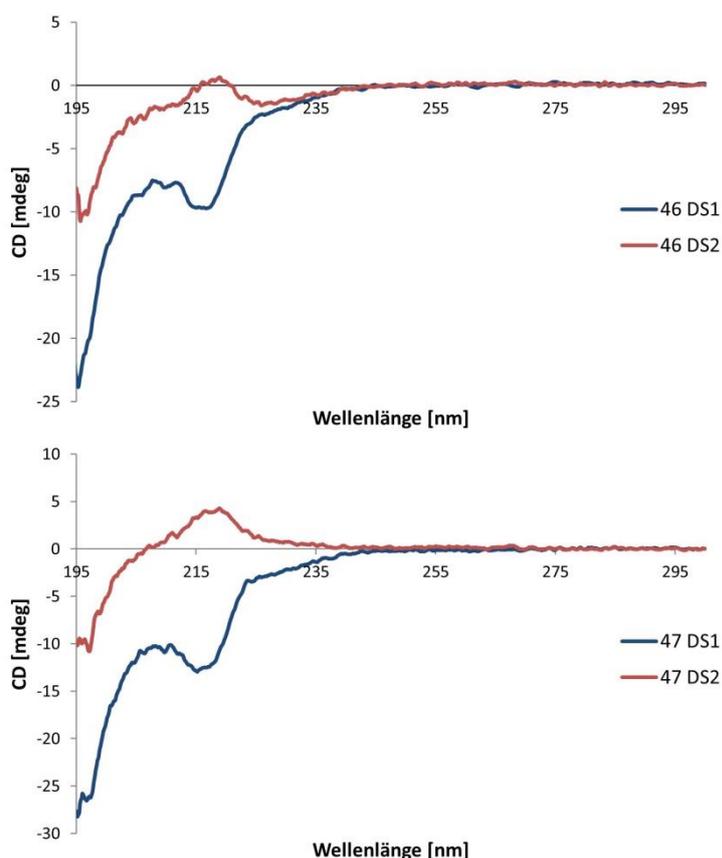


Abb. 49: Experimentell ermittelte CD-Spektren der Verbindungen 46 DS1 und DS2 (oben) sowie 47 DS1 und DS2 (unten)

Die blauen Liniendiagramme stellen das CD-Spektrum der Isomere 1 und die roten Liniendiagramme die der Isomere 2 dar. Demnach können den Diastereoisomeren mit gleicher räumlicher Anordnung an C-9 vergleichende Cotton-Effekte (CE) im CD-Spektrum zugeordnet werden. Der Cotton-Effekt repräsentiert die spezifische Absorptionsänderung im Wellenlängenbereich der Absorptionsbande einer chiralen Substanz. Somit entspricht der Cotton-

Effekt dem Nulldurchgang einer Absorptionsbande, wodurch es mit dem Absorptionsmaximum einer Substanz gleichzusetzen ist. Hierbei kann ein bathochromes energieärmeres Maximum, positiver CE, oder ein hypsochromes energiereicheres Minimum, negativer CE, auftreten. Dieser CE ist substanz- bzw. chromophorabhängig.

Das Absorptionsmaximum der untersuchten Substanzen liegt im Bereich von ca. 240 nm, was einen einheitlichen Chromophor bestätigt. Für die Diastereomere 1 konnte ein negativer CE bei 216.6 nm (**46**) und 215.5 nm (**47**) ($\theta = -9.729$ mdeg bzw. -12.97 mdeg) bestimmt werden, wohingegen die Diastereomere 2 bei 218.9 nm (**46** und **47**; $\theta = +0.64$ mdeg bzw. $+4.28$ mdeg) einen positiven CE zeigten. Somit wurden in Abhängigkeit der vorliegenden Stereochemie verschiedene CEs nahe dem Absorptionsmaximum festgestellt. Demnach muss es sich bei den Isomeren 1 der Verbindungen **46** und **47** um dieselbe Konfiguration handeln, mit entgegengesetzter Konfiguration zu den Diastereomeren 2.

Diese experimentell bestimmten Spektren sollten anschließend mit den vorhergesagten, berechneten CD-Spektren verglichen werden. Die quantenchemische Berechnung wurde durch Herrn Dr. Brandt (IPB, Halle/Saale) unternommen. Eine Generierung kalkulierter CD-Spektren war jedoch nicht möglich. Den erfolglosen Berechnungen können mehrere Ursachen zugrunde liegen: verschiedene Lösungsmittelleffekte, intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Testverbindung und Lösungsmittel oder Aggregation der gelösten Substanz aufgrund von Dimerisierung oder Komplexierung von Ionen innerhalb des Moleküls.¹⁶⁴ Dies sind Faktoren, die es in den aufwendigen Berechnungen zu berücksichtigen gilt. Bruhn et al. (2013) weisen ebenfalls darauf hin, dass in einigen Fällen ein ECD nicht zur Bestimmung der absoluten Konfiguration ausreichend ist.¹⁶⁵ Erst mithilfe weiterer chiroptischer Methoden oder durch Vergleich mit Referenzsubstanzen könnte dieses Problem gelöst werden.

NMR-spektroskopische Analyse

Eine Voraussetzung zur Berechnung von ECDs ist ein aussagekräftiges, energieoptimiertes dreidimensionales Strukturmodell der zu analysierenden Substanz. Dieses kann anhand von NMR-spektroskopischen Analysen wechselwirkender, koppelnder Kerne aufgestellt werden.

Mithilfe von zweidimensionalen NOESY-Experimenten (*nuclear overhauser enhancement spectroscopy* - NOESY) gleichartiger ^1H -Kerne kann eine räumliche Abstandsmessung koppelnder Kerne ermöglicht werden. Hierbei werden die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen homonuklearer ^1H -Kerne durch den Raum bestimmt, wobei der maximale Abstand bei ca. 3 Å liegt. Durch Analyse charakteristischer Kreuzsignale im 2D-NMR-Spektrum können Rückschlüsse auf korrelierende, räumlich nahe Kerne gezogen werden.

Für das NOESY-Experiment wurden stellvertretend Verbindungen **46 DS1** und **DS2** untersucht. Das Augenmerk lag insbesondere in der Abstandsmessung der Protonen 6-H und 9-H (siehe Abb. 50). Ein entsprechendes Kreuzsignal würde demnach einen Abstand von maximal 3 Å zueinander nachweisen, wodurch beide Protonen in derselben räumlichen Ebene zu finden wären. Die erhaltenen NOESY-Spektren zeigten jedoch kein charakteristisches Signal dieser relevanten Protonen; demnach betrug der Abstand der untersuchten Kerndipole mehr als 3 Å. Folglich wurde eine räumliche Kopplung zwischen 6-H und 9-H ausgeschlossen. Es war

daher nicht möglich, aussagekräftige 3D-Modelle anhand der NOESY-Spektren und somit relative Konfigurationsanalysen aufzustellen.

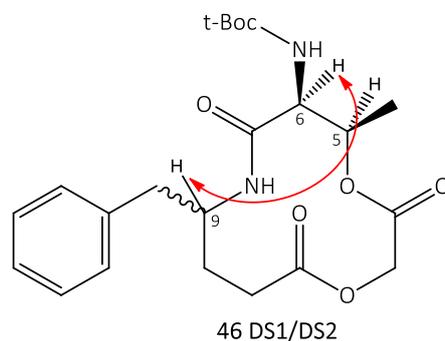


Abb. 50: Untersuchte räumlich nahe Kerndipole im NOESY-Experiment

Alternativ können durch Berechnungen von Kopplungskonstanten strukturabhängige Aussagen und somit Zuordnungen interagierender Atomkerne ermöglicht werden. Dadurch sind Vorhersagen relevanter Dieder- bzw. Torsionswinkel der Kopplungspartner und damit deren skalare räumliche Anordnung bzw. der Ringkonformation möglich.¹⁶⁶ Für die Strukturaufklärung der Verbindungen **46**, **47** und **48** standen jedoch nicht ausreichend gut aufgelöste NMR-Signale (also sehr schmale scharfe, nicht überlappende Kopplungsmuster) zur Verfügung (siehe dazu Kapitel 3.1.4.3 und 7.2.2.3). Folglich konnte die Analyse der Kopplungskonstanten nicht zur detaillierten Strukturaufklärung herangezogen werden. Es bietet dennoch einen guten Ansatzpunkt für zukünftige NMR-Experimente, um beispielsweise mithilfe höherer Frequenzen hochaufgelöste NMR-Spektren zu generieren.

Zusammenfassend konnten CD-Spektren der Diastereomere generiert werden, welche in zukünftigen Arbeiten als mögliche Referenzspektren herangezogen werden können. Im Zuge dieser Arbeit war es mithilfe des CDs jedoch nicht möglich, die absolute Konfiguration des Stereozentrums am C-9 der **DS1** und **DS2** zu bestimmen. Als Kohärenzmethode benötigt diese strukturell verwandte Referenzsubstanzen, dem gleichzeitig ein aussagekräftiges computerbasiertes 3D-Modell zugrunde liegt. In weiterführenden Arbeiten wird derzeit die stereoselektive Synthese der Zielverbindung **46 DS1** oder **DS2** als Alternative diskutiert. Schlussendlich wären damit der direkte Vergleich und die Zuordnung der Spektren zu der vorliegenden Konfiguration möglich.

Als vielversprechende Methode sollte weiterhin die Röntgenstrukturanalyse zur Konfigurationsbestimmung in Betracht gezogen werden. Hier könnte beispielsweise die Röntgenpulverdiffraktometrie durch Analyse getrennter diastereomerer Vorstufen aussagekräftige Ergebnisse hinsichtlich des möglichen diastereomeren Produkts liefern.

Kapitel V

5 MIKROBIOLOGISCHE EVALUIERUNG UND TARGETAUFKLÄRUNG

Das folgende Kapitel erläutert die mikrobiologische Evaluierung der in Kapitel 3 synthetisierten Testverbindungen. Zunächst wurden diese Reinsubstanzen mittels Agardiffusionstest qualitativ auf mögliche antibakterielle und antimykotische Eigenschaften untersucht. Wurde hierbei eine Wachstumshemmung festgestellt, erfolgte anschließend eine quantitative Auswertung durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).¹⁶⁷ Zur Aufklärung des zellulären Targets und des Wirkmechanismus wurden die MHKs an InhA exprimierenden Mykobakterien und die Aktivität an der isolierten Proteinkinase B (PknB) untersucht. Dies sollte die Enoyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase (Enoyl-(ACP)-Reduktase) InhA als mögliches Target der PYR-Derivate bestätigen und einen vermuteten dualen Wirkmechanismus evaluieren (vergleiche Kapitel 1.6). Um zytotoxische und antiproliferierende Effekte ausschließen zu können, wurden die wachstumshemmenden Substanzen hinsichtlich dieser zellschädigenden Eigenschaften untersucht.

5.1 AGARDIFFUSIONSTEST

Die Agardiffusionsmethode stellt eine vereinfachte und rein qualitative mikrobiologische Aktivitätsbestimmung dar. Hierbei erfolgt ausschließlich eine visuelle Auswertung der Hemmhöfe. Als Hemmhof wird die Zone bezeichnet, in der kein Bakterienwachstum feststellbar ist; dieser wird als Durchmesser angegeben.¹⁶⁸ Der Agardiffusionstest wurde in Kooperation mit dem Hans-Knöll-Institut (HKI) in Jena unter Leitung von Dr. Ramm und Dr. Voigt gemäß standardisierter Vorschriften nach der DIN-Norm 58940-8¹⁶⁹ sowie dem Deutschen Arzneibuch¹⁷⁰ durchgeführt (siehe auch Kapitel 7.1.1).

Für die Untersuchung der antimykobakteriellen Aktivitäten wurden die schnellwachsenden nicht-pathogenen Testorganismen *Mycobacterium vaccae* IMET 10670, *Mycobacterium aurum* SB66 und *Mycobacterium smegmatis* SG987 eingesetzt. Für eine erste mykobakterielle Aktivitätsbestimmung eignen sich die oben genannten Stämme hervorragend als Surrogat für *Mtb*.^{71,171} Für weitere antimikrobielle Evaluierungen wurden zusätzlich *Bacillus subtilis* ATCC 6633 als Vertreter der grampositiven Keime und *Escherichia coli* SG 458 als Vertreter der gramnegativen Bakterien untersucht. Des Weiteren erfolgte ein antimykotischer Wachstumshemmtest unter Einsatz der Hefe *Sporobolomyces salmonicolor* 549 als Vertreter der Eukaryoten. Als Referenzsubstanzen dienten entweder Isoniazid (INH) oder Ciprofloxacin (CIP) und das Antimykotikum Amphotericin B. Zur einheitlichen Einstufung der wachstumshemmenden Eigenschaften wurde die Bewertungsskala gemäß der Methodenbeschreibung des HKIs basierend auf der DIN-Norm 58940-8 herangezogen (siehe Tab. 9).¹⁶⁹

Tab. 9: Bewertung der Hemmeigenschaften in Abhängigkeit des gemessenen Hemmhofs gemäß dem HKI¹⁶⁹

Hemmhofdurchmesser [mm]	Bewertung
<15	keine Wirkung
15-20	moderate Wirkung
21-25	gute Wirkung
>25	sehr gute Wirkung

Demnach zeigte eine Substanz sehr gute Hemmeigenschaften, wenn der sich gebildete Hemmhof einen Durchmesser größer als 25 mm hatte. Keine Hemmung wurde dagegen bei weniger als 15 mm Durchmesser angezeigt. Eine Auflistung der getesteten Substanzen und die entsprechenden Ergebnisse im Wachstumshemmtest sind in der Tab. 10 erfasst. Als Testsubstanzen wurden die Boc-geschützte Ringsysteme (**23**; **46 DS1/DS2**; **47 DS1/DS2**), die aromatisch-acylierten Ringsysteme (**8a-b**; **9a-b**; **16**; **24**; **48 DS1**) und die offenkettigen Verbindungen gemäß Kapitel 3.2 untersucht (**49-56**; **58-60**; **64-65**).

Tab. 10: Ergebnisse des Agardiffusionstests

Verbindung	Hemmhofdurchmesser [mm] (n = 1)					
	<i>M. vaccae</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sp. salmonicolor</i>
Neuartige zyklische Pyridomycin-Derivate						
<i>einfach substituierte Analoga</i>						
8a	0	0	0	0	0	0
8b	0	0	0	0	0	0
9a	0	0	0	0	0	0
9b	0	0	0	0	0	0
<i>exozyklisch verzweigte Seitenketten an Position C-2 und C-11</i>						
16	0	0	0	0	0	0
<i>endozyklisches Phenyl-Motiv</i>						
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
<i>exozyklischer Phenylmethylen-Substituent an Position C-9</i>						
46 DS1	31	0	21	0	0	0
46 DS2	26	0	17	0	0	0
47 DS1	0	0	0	0	0	0
47 DS2	0	0	0	0	0	0
48 DS1	29	0	17	0	0	0
Offenkettige Pyridomycin-Derivate						
<i>benzylierte und debenzylierte Struktur motive</i>						
49	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0

Verbindung	Hemmhofdurchmesser [mm] (n = 1)					
	<i>M. vaccae</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sp. salmonicolor</i>
53	11	12	0	0	12	0
54	14	11	11	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0
58	18	0	0	0	0	0
<i>Methylester-Abkömmlinge</i>						
59	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0
<i>Pyridylmethylen-Teilstruktur</i>						
64	0	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	0	0
<i>Referenzsubstanzen^{a)}</i>						
CIP	22	33	20	31	31	-
INH	23	<i>n.b.</i>	15	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	-
Amphotericin B	-	-	-	-	-	17

a) die angegebenen Hemmhöfe der Referenzsubstanzen entsprechen dem arithmetischen Mittel;

n.b. = nicht bestimmt; *c*(Testsubstanzen) = 100 µg/ml; *c*(CIP) = 5 µg/ml; *c*(INH) = 100 µg/ml; *c*(Amphotericin B) = 10 µg/ml.

Wie aus der Tab. 10 ersichtlich wird, zeigte keine der Verbindungen eine antimykotische Aktivität. Zur Vervollständigung des möglichen antimykotischen, antimikrobiellen und antimykobakteriellen Profils wurden zusätzlich die langkettigen synthetischen Zwischenstufen **4a-b**, **5a-b**, **13-14**, **21-22**, **42-45** mikrobiologisch evaluiert. Erwartungsgemäß konnten keine wachstumshemmenden Effekte beobachtet werden (siehe Tab. 22 im Anhang I).

Die einfach substituierten Analoga (**8a/b** und **9a/b**) erwiesen sich im Agardiffusionstest als unwirksam. Demnach wirkten sich die unsubstituierten Positionen C-2, C-9, C-10 und C-11 negativ auf eine Wachstumshemmung aus. Ähnliches musste sowohl für das Derivat **16** mit exozyklischer verzweigt-kettiger Alkylgruppe als auch für die Derivate **23** und **24** mit endozyklischem Phenylring festgestellt werden. Folglich konnte der Austausch des semizyklischen „Dehydroisoleucins“ durch Einführung lipophiler Substituenten am C-2 in Form von verzweigt-kettigen Alkylgruppen oder in Form eines lipophilen planaren Phenylrings keinen inhibierenden Effekt auslösen. Gleiches musste für die Einführung exozyklischer Aromaten wie der Picolinsäure (**8a**, **9a**, **16**) und 3-Hydroxypicolinsäure (**8b**, **9b**, **24**) festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu wurden für die Boc-geschützten Diastereomere **46 DS1** und **46 DS2** sowie für den acylierten Ring **48 DS1** in Abhängigkeit vom mykobakteriellen Stamm moderate bis sehr gute antimykobakterielle Effekte ermittelt. Hierbei scheint der Testkeim *M. vaccae* in Bezug auf die Testverbindungen sensitiver als *M. smegmatis* zu sein. Verbindung **48 DS1** als PYR strukturell nahe stehendes Derivat mit der 3-Hydroxypicolinsäure zeigte überraschenderweise schwächere antimykobakterielle Effekte als ihre Carbamat-Vorstufe **46 DS1**. Demnach erwies sich insbesondere für Verbindung **46 DS1** die t-Boc-Substitution für eine myko-

bakterielle Wachstumshemmung als vorteilhaft. Der antimykobakterielle Effekt von **46 DS2** war vergleichbar mit der von **48 DS1**. Mit Ausnahme der 3-Hydroxypicolinsäuresubstitution weisen die zyklischen Derivate **46** und **48** mit der Phenylmethylengruppe an C-9 und der fehlenden Alkylierung an C-2 das gleiche Substitutionsmuster auf, was der antimykobakteriellen Wachstumshemmung förderlich war.

Überraschenderweise erzielten die PYR-Analoga **47 DS1** und **47 DS2** mit der zusätzlichen Methylgruppe an C-2 keine Wachstumshemmung. Als Grund für den Wirkverlust wird eine sterische Hinderung im Target vermutet, die möglicherweise durch den Verlust an Entropie im Zuge der Targetbindung an der Zelloberfläche zustande kommt.¹⁴² Abweichende Wirkmechanismen von **47 DS1/DS2** im Vergleich zu den Derivaten **46** konnten jedoch grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden (vergleiche Kapitel 5.2 und 5.3).

Als vorteilhaft ist ergänzend die mikrobielle Spezifität der aktiven Testsubstanzen gegen Mykobakterien zu erwähnen. So wurden weder die grampositiven noch die gramnegativen Bakterien in ihrem Wachstum gehemmt.

In Bezug auf die offenkettigen PYR-Derivate (**49-58, 59-60, 64-65**) konnten keine bis moderate antimikrobiellen Effekte beobachtet werden. So waren die lipophilen Methylester-Varianten **59** und **60** der zyklischen Verbindung **47** mikrobiologisch inaktiv. Inwieweit auch hier die negative Wachstumshemmung auf einen möglichen anderen Wirkmechanismus ähnlich der Verbindung **47** zurückzuführen ist, wird in Kapitel 5.3 analysiert. Wie bereits erwähnt, waren alle offenkettigen synthetischen Zwischenstufen inaktiv, interessanterweise auch die direkten Vorstufen (**42-45**) der aktiven Ringsysteme **46** und **48**. Die Ringsysteme **46** und **48** führten demnach womöglich aufgrund der eingeschränkten Konformation zu einer zielgerichteten Targetbindung als die entsprechenden offenkettigen Strukturen.⁵¹

Die kleinen Zielmoleküle **64** und **65**, repräsentativ für die Pyridylmethylen-Teilstruktur, zeigten ebenfalls keine antimykobakteriellen Effekte. Inwieweit ein Austausch der 3-Hydroxypicolinsäure als Wasserstoffbrückenakzeptor und –donator gegen die 3-Fluorpicolinsäure als reiner Wasserstoffbrückenakzeptor die fehlende Wachstumshemmung hervorrief, kann nicht eindeutig geklärt werden. Offensichtlich ist jedoch die erhöhte Hydrophilie dieser Derivate. Im Vergleich zu den langkettigen oder zyklischen PYR-Analoga kann daher zusätzlich von einer erschwerten Permeation durch die lipophile mykobakterielle Zellwand ausgegangen werden. Mithilfe dieser Ergebnisse können vorläufige Rückschlüsse bezüglich der Ringstruktur *per se* gezogen werden. Eine zyklische Verbindung kann mittels passiver Diffusion einfacher durch die Zellwand permeieren als ein vergleichbares offenkettiges Derivat, weil in der zyklischen Struktur polare funktionelle Gruppen intrazellulär im Ring maskiert werden. Die Folge ist eine partielle Erhöhung der nach außen gerichteten Lipophilie.⁵¹ Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nicht die Anzahl der polaren Gruppen für eine Targetbindung entscheidend ist, sondern die Qualität beziehungsweise die Art und Weise der nicht-kovalenten Interaktionen.

Überdies sind ringgeschlossene Systeme wegen der vorliegenden eingeschränkten Ringkonformation bezüglich der räumlichen Freiheitsgrade beziehungsweise der Entropie begünstigt.¹⁴² Eine Bindung am Zieltarget kann zielgerichteter, koordinierter und stärker erfolgen. Langkettige Derivate weisen strukturell bedingt größere konformative

Freiheitsgrade auf, was einer zielgerichteten Interaktion am Target entgegenwirken kann. Demnach sollten sich zukünftige Arbeiten hauptsächlich auf die Synthese zyklischer Strukturen mit PYR als Leitstruktur fokussieren.

5.2 MINIMALE HEMMKONZENTRATION UND TARGETEVALUIERUNG

Für die im Agardiffusionstest als positiv bewerteten Verbindungen wurde anschließend die MHK ermittelt. Unter der MHK wird die geringste Konzentration verstanden, die noch zu einer Hemmung des Bakterienwachstums führt.^{167,172} Hierfür wurden die inhibierenden Effekte der Reinsubstanzen an den mykobakteriellen Stämmen *M. smegmatis* SG987 und *M. tuberculosis* H₃₇Rv untersucht.

Zur Überprüfung des zellulären Targets wurden weiterhin die MHKs der wachstumshemmenden Testsubstanzen an InhA-überexprimierenden *M. bovis* BCG-Zellen bestimmt. Eine Erhöhung der MHK-Werte signalisiert, dass InhA tatsächlich das zelluläre Target der Testverbindungen ist. Sollten jedoch ähnliche MHKs erhalten werden, ist dies ein Indiz für einen anderen Angriffspunkt als die vermutete Enoyl-(ACP)-Reduktase.

5.2.1 MHK GEGEN *M. SMEGMATIS* UND *M. TUBERCULOSIS*

Die MHK-Bestimmung gegen *M. smegmatis* erfolgte gemäß den Richtlinien des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).¹⁷³ Die Testsubstanzen wurden entsprechend der inhibierenden Eigenschaften gegenüber schnellwachsenden Mykobakterien wie folgt bewertet (Tab. 11):¹⁶⁹

Tab. 11: Bewertung der antibakteriellen Aktivität gemäß ermittelter MHK¹⁶⁹

MHK [µg/ml]	Bewertung
> 100	keine antibakterielle Aktivität
50-12.5	schwache antibakterielle Aktivität
6.25-1.56	mittlere antibakterielle Aktivität
< 1.56	starke antibakterielle Aktivität

Demnach weisen Substanzen mit einer MHK größer als 100 µg/ml keine antibakteriellen Effekte auf, wohingegen eine MHK kleiner als 1.56 µg/ml eine starke antibakterielle Aktivität anzeigt. Die entsprechenden MHKs der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen sind in Tab. 12 dargestellt. Hierbei erfolgte unter Verwendung von *M. smegmatis* als nicht-pathogener *Mtb*-Ersatzkeim⁷¹ nach einer Inkubationszeit von 48 h eine visuelle und nach 72 h nach Zugabe von Resazurin (= Alamarblau) eine Auswertung gemäß des Resazurin-Reduktions-Mikrotiterassays (REMA oder Alamarblau-Assay).¹⁷⁴ Der REMA gehört zu den am häufigsten eingesetzten Mikrotiterassays in der antimykobakteriellen Arzneistoffforschung.⁹

REMA nutzt die Fähigkeit von lebensfähigen Zellen Resazurin (nicht-fluoreszierend, blau) zum fluoreszierenden Resorufin (pink) und Dihydroresorufin zu reduzieren. Die Intensität der

Fluoreszenz ist direkt proportional zur Anzahl an lebenden Zellen. Als Referenzsubstanz wurde Ciprofloxacin (CIP) verwendet.

Die Bestimmung der MHK an *M. tuberculosis* H₃₇Rv erfolgte in Kooperation mit GlaxoSmith-Kline (GSK) in Tres Cantos (Madrid, Spanien). Im Gegensatz zu dem Resazurin-Mikrotiterassay wurde durch GSK die MHK mittels ATP-Biolumineszenz ermittelt. ATP ist ein Indikator für metabolisch aktive, also lebensfähige Zellen. Der ATP-Biolumineszenz-Assay ist ein Proliferationsassay basierend auf der Luciferase-Luciferin-Reaktion.¹⁷⁵ In Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen katalysiert die Luciferase die Lichtemission durch Oxidation des Luciferins und Dephosphorylierung des ATPs. Die Intensität des emittierten Lichts ist direkt proportional zur Menge des ATPs und demnach zur Anzahl lebensfähiger Zellen.¹⁷⁶

Im Gegensatz zum REMA induziert der ATP-Biolumineszenz-Assay den Zelltod, wodurch nur Endpunktkontrollen durchgeführt werden können.¹⁷⁵ Der ATP-Assay liefert jedoch aufgrund einer kürzeren Inkubationszeit mit dem Substrat deutlich schnellere Ergebnisse als im Vergleich zum REMA.^{9,175} Mithilfe des REMA ist die Untersuchung von kinetischen Veränderungen in der Zellproliferation, der Viabilität und der metabolischen Aktivität möglich. Um folglich erste antituberkulotische Tendenzen bestimmen zu können, erwies sich der ATP-Assay von GSK als vorteilhaft. Eine Auswertung der antimykobakteriellen Aktivität an *M. tuberculosis* H₃₇Rv erfolgte nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen. Als Referenzsubstanz wurde INH eingesetzt.

Tab. 12: Ergebnisse der Bestimmung der MHK gegen *M. smegmatis* und *M. tuberculosis*

Verbindung	MHK					
	<i>M. smegmatis</i> SG987 (n = 1)				<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv (n = 3)	
	[µg/ml]		[µM]		[µg/ml]	[µM]
	48 h	72 h	48 h	72 h		
46 DS1	3.12	6.25	7.2	14.4	1.74	4
46 DS2	12.5	12.5	28.8	28.8	3.47	8
47 DS1	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	56.06	125
47 DS2	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	56.06	125
48 DS1	6.25	6.25	13.7	13.7	3.64	8
INH	<i>n.b.</i>	4 ¹⁷⁷	<i>n.b.</i>	29.2	0.04	0.31
PYR^{a)}	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	0.39 ⁴⁹	0.72
CIP	0.2	0.2	0.52	0.52	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>

n.b. = nicht bestimmt; a) MHK = 1.2 – 2.3 µM gegen *M. smegmatis* mc² 155⁴⁹.

Für Verbindung **46 DS1** konnte eine MHK von 3.12 µg/ml (7.2 µM) und für **48 DS1** eine MHK von 6.25 µg/ml (14.4 µM) nach 48 h Inkubationszeit ermittelt werden. Dies entspricht einer mittleren antibakteriellen Aktivität gegen den Testorganismus *M. smegmatis*. Für das Isomer **46 DS2** (MHK = 12.5 µg/ml bzw. 28.8 µM) wurde ein schwacher inhibierender Effekt verzeichnet.

Im Vergleich zu dem schnellwachsenden *M. smegmatis* konnten gegenüber dem pathogenen *M. tuberculosis* H₃₇Rv-Stamm stärkere inhibierende Effekte im unteren mikromolaren Bereich

ermittelt werden. Demnach hemmt **46 DS1** mit einer MHK von 1.74 µg/ml (4 µM) das Wachstum von *Mtb* am stärksten. Im Gegensatz dazu inhibieren **46 DS2** und **48 DS1** die *Mtb*-Zellen in ihrem Wachstum gleichermaßen gut (8 µM). Diese MHKs spiegeln somit auch das antimykobakterielle Verhalten der Testsubstanzen im Agardiffusionstest wider.

Folglich konnte für das Carbamat des Diastereomers 1 von Verbindung **46** der stärkste wachstumshemmende Effekt nachgewiesen werden. Hierbei scheint sowohl die Substitution mit der verzweigten Alkylgruppe (t-Boc-Gruppe) als auch die Konfiguration an Position C-9 der antituberkulotischen Aktivität förderlich zu sein. Eine Substitution mit der 3-Hydroxypicolinsäure (**48 DS1**) wirkte sich auf die Wachstumshemmung negativ aus (Faktor von zwei, MHK = 3.64 µg/ml bzw. 8 µM) (vergleiche Erläuterungen im Kapitel 5.1).

Durch die Bestimmung der MHK an *Mtb* konnte weiterhin die bereits beobachtete mikrobielle Inaktivität der Verbindungen **47 DS1** und **DS2** bestätigt werden (beide mit MHK = 56.1 µg/ml). Dies lässt wiederholt die Vermutung zu, dass die zusätzliche Methylgruppensubstitution an Position C-2 die Aktivität negativ beeinflusst oder möglicherweise ein anderes zelluläres Target adressiert wird (siehe auch Kapitel 5.1). Ein Beitrag zur Aufklärung der unterschiedlich inhibierenden Effekte der Boc-geschützten Derivate **46** und **47** sowie der Endverbindung **48 DS1** soll mithilfe der Aktivitätsbestimmungen am isolierten Target-Enzym PknB ermöglicht werden (siehe Kapitel 5.3.1). Zusammenfassend wurden in Abhängigkeit der vorliegenden Zielstrukturen MHKs gegen *M. tuberculosis* im mikromolaren Bereich erzielt.

5.2.2 MHK GEGEN INHA-OVEREXPRESSOR BCG

Mithilfe der Bestimmung der MHK an InhA-überexprimierenden Bakterien (*Overexpressor* - *OE*) sollte der Wirkmechanismus der wachstumshemmenden Depsiptide aufgeklärt und InhA als Target bestätigt werden. Eine Überexpression von InhA in *M. bovis* resultiert in einer Erhöhung der MHK, wenn tatsächlich die Enoyl-(ACP)-Reduktase InhA als Target adressiert wird. Die Untersuchungen wurden wiederum von GSK in Tres Cantos durchgeführt.

Hierfür wurden die MHKs gegen den Kontrollstamm *M. bovis* pATB45 und dem InhA-OE-Stamm *M. bovis* BCG pATB45:InhA ermittelt. Dem gentechnisch veränderten Kontrollstamm wurde eine Promotorregion für eine InhA-Überexpression eingebaut, ohne das Enzym InhA selbst aufzuweisen. Mithilfe der Kontrolle wird demnach eine MHK-Änderung aufgrund einer möglichen genetischen Modifikation im Zuge der InhA-Überexpression berücksichtigt. Im Gegensatz dazu besitzt der InhA-OE-Stamm neben der eingeführten Promotorregion zusätzlich auch InhA. Die Ergebnisse des REMAs sind in der Tab. 13 aufgelistet. Als Referenzsubstanzen wurden zum einen ein GSK-interner InhA-Inhibitor GSK826625A und zum anderen INH herangezogen.

Tab. 13: Auflistung der ermittelten MHK gegen InhA-Überexpressor *M. bovis* BCG-Zellen

Verbindung	MHK			Verhältnis der MHKs aus OE / Kontrolle
	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv (n = 3)	<i>M. bovis</i> BCG pATB45 (Kontrolle) (n = 2)	<i>M. bovis</i> BCG pATB45:InhA (OE) (n = 2)	
	[µM]			
46 DS1	4	7.8	7.8	1.0
46 DS2	8	62.5	125	2.0
48 DS1	8	62.5	62.5	1.0
INH	0.31	0.8	12.5	15.6
GSK826625A	1.23	1.6	12.5	7.8

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass für keine der depsipeptidischen Strukturen eine Zunahme der MHK am InhA-Overexpressor-Stamm ermittelt werden konnte. Lediglich Derivat **46 DS2** zeigte eine mäßige Erhöhung der Hemmkonzentration um den Faktor zwei, was jedoch im Vergleich zu den Referenzsubstanzen vernachlässigbar klein ist (Faktor von 7.8 bis 15.6). Auffallend ist weiterhin die scheinbar geringere Sensitivität des *M. bovis* BCG-Stamms gegenüber den Testsubstanzen. Die ermittelten MHKs liegen ca. um den Faktor zwei bis acht höher als im Vergleich zum *M. tuberculosis*-Stamm. Franzblau et al. (2012) und Altaf et al. (2010) weisen unter anderem daraufhin, dass die Wahl des richtigen Teststammes, um aktive Inhibitoren finden zu können, maßgeblich sein kann.^{9,178} So können Testsubstanzen beispielsweise gegenüber dem Ersatzstamm *M. bovis* BCG eine geringe Aktivität aufweisen, dagegen jedoch den Standardstamm *M. tuberculosis* H₃₇Rv im Wachstum effektiv hemmen. Folglich muss zur Überprüfung der Ergebnisse in weiterführenden Arbeiten zusätzlich die MHK an InhA-überexprimierenden *M. tuberculosis*-Stamm bestimmt werden. Nur so kann eine eindeutige vergleichende Aussage über den möglichen Wirkmechanismus getroffen werden.

Aufgrund dieser Testergebnisse wird die Enoyl-(ACP)-Reduktase InhA vorläufig *nicht* als das zelluläre Target der in dieser Arbeit untersuchten Testverbindungen angesehen. Folglich muss die belegte, wenn auch im Vergleich zum Standard INH geringere, mykobakterielle Wachstumshemmung aufgrund eines anderen, noch unbekanntem Wirkmechanismus zustande kommen. Die Aufklärung eines möglichen dualen Wirkmechanismus ist demnach mithilfe der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich.

5.3 EFFEKTE AN DER ISOLIERTEN MYKOBAKTERIELLEN PROTEINKINASE B

Wie im Kapitel 1.7 angeführt, sollte im Zuge dieser Arbeit ein vermuteter dualer Wirkmechanismus des PYRs aufgeklärt werden. Das PYR-Target, die Enoyl-(ACP)-Reduktase InhA, wird durch Phosphorylierung durch die Serin/Threonin-Kinasen PknA, PknB und PknH in seiner Aktivität reguliert. Aufgrund der größten regulatorischen Aktivität des PknBs auf InhA sollte diese Kinase als mögliches zweites Target des PYRs überprüft werden.⁷³ Eine Phosphorylierung von InhA führt zu einer Abnahme der Bindungsaffinität gegenüber dem

Cofaktor NADH. Folglich wird die De-Novo-Mykolsäurebiosynthese aufgrund der Phosphorylierung durch PknB negativ beeinflusst.^{73,74}

Die aktiven Testverbindungen **46 DS1**, **46 DS2** und **48 DS1** sowie die Analoga **47 DS1** und **59** als Negativkontrollen wurden hinsichtlich möglicher Effekte an der isolierten mykobakteriellen PknB untersucht.

5.3.1 PKNB-ASSAY

Die hier aufgeführten PknB-Aktivitätsbestimmungen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Yossef Av-Gay, University of British Columbia (Vancouver, Kanada) durchgeführt. Hierbei wurde ein substanzbedingter Effekt auf die PknB-Autophosphorylierung untersucht, um somit mögliche Rückschlüsse auf eine entsprechende Enzymaktivität ziehen zu können. Dem Gemisch aus PknB und Testverbindung wurde radioaktiv markiertes ATP zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten und der Isolierung der Kinase konnte die PknB-Aktivität durch Messung der emittierten radioaktiven Strahlung in *counts per minute* (cpm) quantifiziert werden.

Zusätzlich zu den synthetisierten Testverbindungen stand uns PYR als Reinsubstanz zur Verfügung. Im Gegensatz zu Waters et al. (2002), die den pyridomycinhaltigen Streptomycin-extrakt⁶⁸ untersucht hatten, konnten also Effekte des reinen PYRs auf PknB untersucht werden.

Im Zuge der Erfassung dieser Messergebnisse stand keine adäquate Referenzsubstanz zur Validierung des Assays und der Messergebnisse zur Verfügung. Der durch Drews et al. (2001) publizierte antimykobakterielle PknB-Inhibitor H-7 löste in dem in dieser Arbeit verwendeten Enzymassays keinen Effekt aus.¹⁷⁹ Dies bekräftigt die durch Fernandez et al. (2006) bereits festgestellte Erkenntnis, dass H-7 womöglich die PknA, nicht aber die PknB zu hemmen vermag.⁷⁶ Somit können die erzielten Ergebnisse lediglich eine Tendenz hinsichtlich einer PknB-Aktivität vermitteln, weiterführende Untersuchungen sind jedoch zwingend notwendig. Die Abb. 51 zeigt die Ergebnisse der gemessenen PknB-Aktivität in Abhängigkeit von den eingesetzten Substanzkonzentrationen der Verbindungen **46 DS1**, **46 DS2**, **47 DS1**, **48 DS1**, **59** und vom PYR (Originaldaten siehe Anhang II). Das Stereoisomer 2 von Verbindung **47** stand zum Zeitpunkt der Enzymtestung noch nicht zur Verfügung.

In Bezug auf die vermessene Radioaktivität signalisiert eine Abnahme der radioaktiven Strahlung eine PknB-Inhibition, also eine herabgesetzte Enzymaktivität. Demgegenüber ist die Zunahme der gemessenen Radioaktivität mit einer erhöhten Enzymaktivität im Sinne einer PknB-Induktion gleichgesetzt. Die prozentuale Inhibition sowie Induktion im Vergleich zur nativen PknB-Aktivität ist in der Abb. 52 dargestellt. Fehlende Datenpunkte beruhen auf der schwankenden Kinaseaktivität aufgrund der natürlichen Variabilität eines biologischen Assays. Aus dem Balkendiagramm der Abb. 51 wird ersichtlich, dass die eingesetzte PknB eine unterschiedliche Grundaktivität aufweist (Datenpunkte bei 0 μ M). Durch die Berücksichtigung der relativen prozentualen Abweichung der Testergebnisse zu der nativen Enzymaktivität kann diese Schwankung vernachlässigt werden und die Datenpunkte miteinander verglichen werden (siehe Abb. 52).

Gemäß der Abb. 52 zeigten **46 DS1** (MHK = 4 μM) und **46 DS2** (MHK = 8 μM) die stärksten inhibierenden Effekte. Hierbei wurde eine PknB-Hemmung von 61 % für **46 DS1** und 57 % für **46 DS2** bei einer Substanzkonzentration von 4.8 μM hervorgerufen. Die inhibierende Konzentration ist für das Analogon **46 DS1** mit der erzielte MHK an *Mtb* vergleichbar (siehe Kapitel 5.2). Verbindung **46 DS2** wies im Vergleich zu **46 DS1** eine geringere Aktivitätssteigerung bei Zunahme der Substanzkonzentration auf. So wurde für **46 DS2** eine Zunahme der PknB-Hemmung um lediglich 5 Prozentpunkte von 52 % bei 2.4 μM auf 57 % bei 4.8 μM festgestellt. Im Gegensatz dazu stieg der inhibierende Effekt von **46 DS1** um 12 Prozentpunkte von 49 % bei 2.4 μM auf 61 % bei 4.8 μM . Folglich wurde für das Analogon **46 DS2** eine geringere PknB-Aktivität nachgewiesen, was mit dem größeren MHK-Wert von 8 μM gleichgesetzt werden kann (siehe auch Tab. 14).

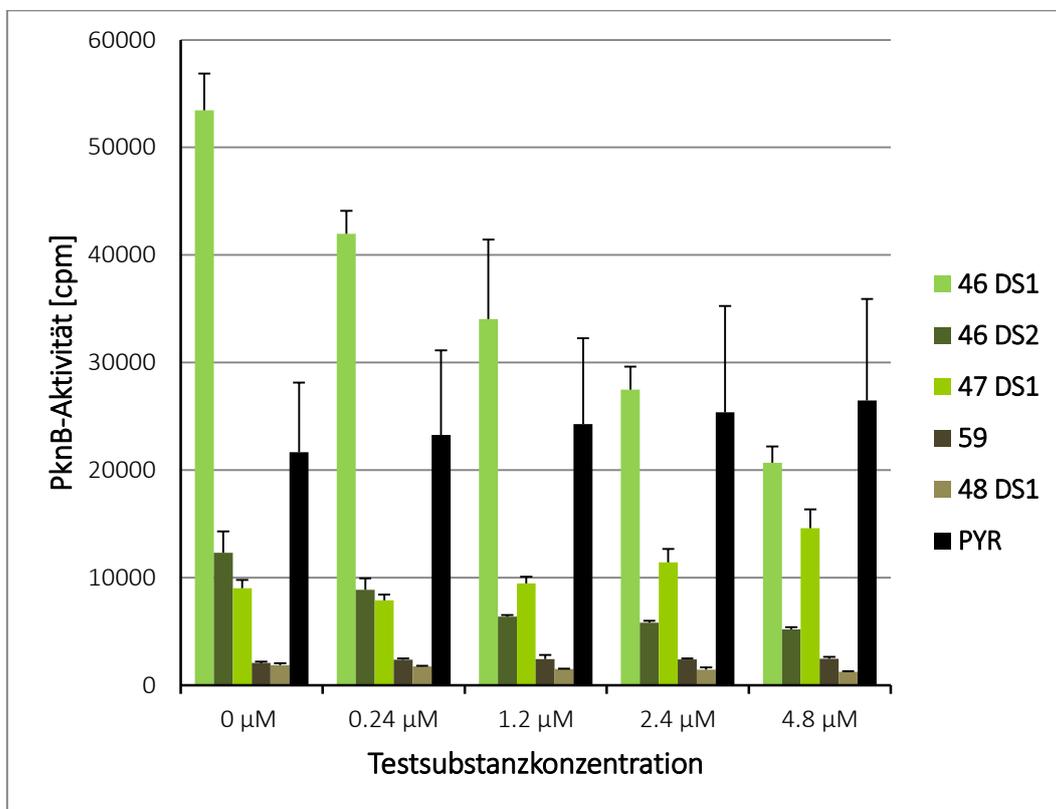


Abb. 51: Darstellung der gemessenen PknB-Aktivität am isolierten Enzym

$n = 3$; Inkubationszeit 30 min; $c(\text{PknB}) = 2.4 \mu\text{M}$ für die Vermessung der Verbindungen **46 DS1/DS2**, **47 DS1**, **59** und **PYR**; $c(\text{PknB}) = 1.2 \mu\text{M}$ für die Vermessung der Verbindung **48 DS1**.

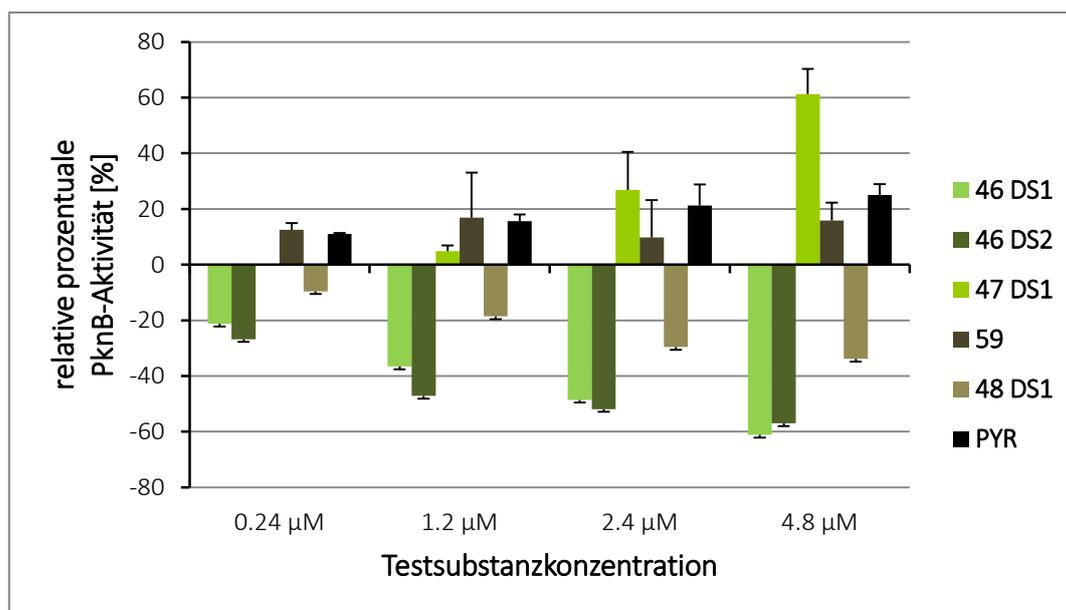


Abb. 52: Prozentuale Darstellung der PknB-Induktion und PknB-Inhibition

Das Folgeprodukt **48 DS1** (MHK = 8 µM) zeigte dagegen einen deutlich schwächeren inhibierenden Effekt. Bei der Testsubstanzkonzentration von 4.8 µM wurde eine PknB-Hemmung von nur 34 % ermittelt. Verbindung **48 DS1** wies zudem eine zweifach geringere Grundaktivität gegen PknB als vergleichsweise **46 DS1** auf. So musste im Zuge der Generierung des Enzymassays die eingesetzte PknB-Konzentration bei der Untersuchung von **48 DS1** halbiert werden, von üblichen 2.4 µM (für die Vermessung von **46 DS1/DS2**, **47 DS1**, **59** und **PYR**) auf 1.2 µM, um eine erkennbare PknB-Aktivitätsänderung detektieren zu können. Anhand der unterschiedlichen PknB-Aktivitäten der Verbindungen **46 DS1/DS2** und **48 DS1** lassen sich erste Rückschlüsse über mögliche SARs ziehen. Die Substitution mit der 3-Hydroxypicolinsäure (**48 DS1**) wirkte sich negativ auf den inhibierenden PknB-Effekt aus. Wohingegen die raumfüllende t-Boc-Gruppe (**46 DS1/DS2**) zu einer Aktivitätssteigerung gegen PknB führte. Diese Ergebnisse spiegeln somit die bereits in den Kapiteln 5.1 und 5.2 ermittelten antimykobakteriellen Aktivitätsunterschiede in Abhängigkeit vom exozyklischen Substitutionsmuster wider.

Tab. 14: Vergleichende Darstellung der MHKs der Testsubstanzen 46 DS1/DS2, 47 DS1, 48 DS1, 59 und PYR gegen *M. tuberculosis* H₃₇Rv und *M. bovis* BCG pATB45InhA (OE) inklusive der ermittelten prozentualen PknB-Aktivitäten

Verbindung	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv [μM]	<i>M. bovis</i> BCG pATB45InhA (OE) [μM]	PknB-Inhibition ^{a)} [%]	PknB-Induktion ^{a)} [%]
46 DS1	4	7.8	61 ^{b)}	-
46 DS2	8	125	57 ^{b)}	-
47 DS1	125	<i>n.b.</i>	-	61 ^{b)}
48 DS1	8	62.5	34 ^{c)}	-
59	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	-	16 ^{b)}
PYR	0.72 ⁴⁹⁾	<i>n.b.</i>	-	25 ^{b)}

n.b. = nicht bestimmt; a) $c(\text{Testsubstanz}) = 4.8 \mu\text{M}$; b) $c(\text{PknB}) = 2.4 \mu\text{M}$; c) $c(\text{PknB}) = 1.2 \mu\text{M}$.

Im Vergleich zu **46 DS1/DS2** fallen in Abb. 51 und Abb. 52 die gesteigerten Enzymaktivitäten bei Inkubation mit **47 DS1** (MHK = 125 μM) und PYR (MHK = 0.72 μM) auf. Interessanterweise wies **47 DS1** einen stärkeren induzierenden Effekt als PYR auf. Bei einer Substanzkonzentration von 4.8 μM wurde durch **47 DS1** eine Kinaseinduktion von 61 % erzielt, wobei PYR bei der gleichen Konzentration nur eine halb so große Aktivitätssteigerung (25 %) auslöste. Die zusätzliche Methylgruppensubstitution an Position C-2 (**47 DS1**) beeinflusst demnach die antimykobakterielle Aktivität im hohen Maße. Demzufolge unterscheiden sich die Wirkmechanismen der Depsipeptide **46** und **47** in Bezug auf die Ergebnisse des PknB-Assays deutlich voneinander, was sich wiederum in der mykobakteriellen Wachstumshemmung widerspiegelt (vergleiche Tab. 14).

Interessanterweise zeigte die Testverbindung (**47 DS1**, MHK = 125 μM) mit den stärksten induzierenden Effekten am isolierten PknB-Enzym kaum antimykobakterielle Aktivität. Folglich kann hier eine PknB-Induktion nicht mit einer erhöhten Inhibition der De-Novo-Mykolsäurebiosynthese nach Molle et al. (2010) und der damit verbundenen Wachstumshemmung begründet werden.⁷³ Um dies abschließend zu bestätigen, muss in weiterführenden Arbeiten zusätzlich die MHK von **47 DS1** an InhA-überexprimierenden *Mtb*-Zellen bestimmt werden. Nur so kann InhA als Target endgültig ausgeschlossen werden.

Festzuhalten ist, dass anhand der Ergebnisse des PknB-Assays und der erzielten mykobakteriellen Wachstumshemmung der Wirkmechanismus des PYRs nicht mit dem Wirkmechanismus der Testverbindungen aus dieser Arbeit vergleichbar ist. Die moderaten PknB-induzierenden Effekte des PYRs könnten dagegen durchaus mit einer gesteigerten Mykolsäurebiosynthesehemmung aufgrund einer gesteigerten Phosphorylierung der InhA und der resultierenden antituberkulotischen Wachstumshemmung (MHK = 0.72 μM) verknüpft sein. Dies muss in weiterführenden Untersuchungen im Detail geklärt werden.

Die Ergebnisse der PYR-induzierenden Wirkung auf PknB stehen allerdings im Widerspruch zu der durch Waters et al. (2002) publizierten PknB-Inhibition durch einen pyridomycinhaltigen Streptomycinextrakt. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass bisher unbekannt wachstumshemmende Inhaltsstoffe des Streptomycinextrakts dafür verantwortlich waren. Aufgrund der biochemischen InhA-Regulierung durch PknB wurde diese Kinase als mögliches

zweites Target vermutet. Inwieweit noch andere Kinasen als die PknB durch PYR biochemisch beeinflusst werden könnten, muss in zukünftigen Arbeiten analysiert werden. Interessant wäre auch die Fragestellung, ob die Enzym-Inhibitoren **46 DS1** und **DS2** sowie **48 DS1** ähnliche Effekte gegenüber anderen mykobakteriellen Kinasen aufweisen, oder ob hier schon eine Selektivität gegenüber PknB gezeigt werden konnte. PknB ist keine Kinase, die ausschließlich in Actinobakterien vorkommt. So liegen beispielsweise PknB-ähnliche Kinasen auch in grampositiven Bakterien wie *B. subtilis* vor.⁷⁶ Da jedoch die Derivate **46** und **48** keinen Einfluss auf das Bakterienwachstum von *B. subtilis* zeigten (vergleiche Kapitel 5.1), kann davon ausgegangen werden, dass insbesondere mykobakterielle Kinasen adressiert werden – oder der antimykobakterielle Effekt nicht mit der Kinasehemmung zusammenhängt. Mithilfe weiterer Kinaseassays könnte dies geklärt werden. Inwieweit diese Selektivität auch auf humane Kinasen übertragbar ist, muss noch aufgeklärt werden. Erste zytotoxische und antiproliferative Untersuchungen an humanen Zelllinien zeigten allerdings keine zellschädigenden Effekte (siehe Kapitel 5.4).

Verbindung **59**, als Vertreter der offenkettigen Variante von **47**, zeigte keine PknB-aktivierenden oder -inhibierenden Eigenschaften. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen des Agardiffusionstests (Kapitel 5.1), in welchem **59** keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien hatte. Aufgrund der strukturellen Analogie zum Ringsystem **47** wurde jedoch ein ähnlicher Wirkmechanismus zu **47** angenommen. Mithilfe der Enzymassay-Ergebnisse von **47 DS1** kann dies jedoch nicht bestätigt werden. Vielmehr scheint der Methylester **59** stellvertretend für die biologische Inaktivität aller offenkettigen Derivate zu stehen. Demzufolge zeigte **59** weder am Ganzzell-Modell noch am isolierten Enzym einen biologischen Effekt.

Mithilfe dieser PknB-Aktivitäten wurde teilweise eine direkte Korrelation zwischen den MHKs und der Kinaseaktivität festgestellt. Weiterführende Untersuchungen müssen das Potential der Verbindungen **46 DS1/DS2** und **48 DS1** als mykobakterielle PknB-Inhibitoren eruieren. Dies kann beispielsweise durch die Bestimmung der inhibitorischen Konzentration mithilfe des IC_{50} -Werts evaluiert werden. Bisher sind keine selektiven mykobakteriellen PknB-Inhibitoren bekannt, deren IC_{50} -Wert mit der entsprechenden MHK korreliert.^{71,75,76} Demnach bieten diese Ergebnisse eine aussichtsreiche Grundlage für die Entwicklung antimykobakterieller PknB-Inhibitoren.

5.4 ZYTOTOXIZITÄT UND ANTIPROLIFERATIVER EFFEKT

Aktive Testsubstanzen aus Kapitel 5.1 und 5.2 wurden weiterhin hinsichtlich ihrer antiproliferativen und zytotoxischen Effekte an humanen Zelllinien untersucht. Hierfür wurde die Zytotoxizität an HeLa-Zellen durch Bestimmung der zytotoxischen Konzentration CC_{50} ermittelt. Der CC_{50} -Wert stellt die Konzentration einer Testsubstanz dar, die 50 % der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle tötet. Unter Verwendung der Endothelzellen HUVEC und der myeloischen Leukämiezelllinie K-562 wurde ein möglicher antiproliferativer Effekt untersucht. Hierfür wurde der GI_{50} -Wert (Wachstumshemmung) ermittelt. Dies ent-

spricht der Konzentration, bei der 50 % der Zellen in ihrem Wachstum gehemmt werden. Die Ergebnisse sind in der Tab. 15 zusammengefasst.

Die Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst (Stammlösung: 1 mg/ml) und anschließend mit DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) bis zu einer Anfangskonzentration von 5 µg/ml verdünnt. Trotz der zytotoxischen Eigenschaften von DMSO war das Lösungsmittel aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit der Testverbindungen zwingend notwendig. Das toxische Lösungsmittel verhinderte jedoch die Bestimmung höher konzentrierter Testlösungen. Die Substanzen galten als nicht-zellschädigend, wenn kein Effekt unterhalb oder gleich dieser Grenzkonzentration von 5 µg/ml detektiert wurde.

Tab. 15: Antiproliferative (GI₅₀) und zytotoxische (CC₅₀) Effekte von den Verbindungen 46 DS1/DS2 und 48 DS1

Verbindung	Antiproliferativer Effekt				Zytotoxizität	
	HUVEC GI ₅₀		K-562 GI ₅₀		HeLa CC ₅₀	
	[µg/ml]	[µM]	[µg/ml]	[µM]	[µg/ml]	[µM]
46 DS1	>5	>11.5	>5	>11.5	>5	>11.5
46 DS2	>5	>11.5	>5	>11.5	>5	>11.5
48 DS1	>5	>11.0	>5	>11.0	>5	>11.0

n = 2; Inkubationszeit von 72 h.

Gemäß den in der Tab. 15 aufgelisteten GI₅₀- und CC₅₀-Werten wurden für die untersuchten depsipeptidischen Substanzen keine zellschädigenden Effekte detektiert (GI₅₀ und CC₅₀ > 5 µg/ml).

In Hinblick auf PYR waren die Ergebnisse der fehlenden zellschädigenden Wirkungen der Testverbindungen übereinstimmend. Für PYR wurde durch Hartkoorn et al. (2012) ein CC₅₀-Wert von 100 µg/ml an humanen Leberzelllinien (HepG2) und 50 µg/ml an humanen Lungenepithelzelllinien (A549) ermittelt.⁴⁹ Hierbei lag der Selektivitätsindex für PYR bei > 100, wodurch PYR deutlich selektiver *M. tuberculosis*-Zellen im Wachstum beeinflusst als humane Zelllinien. Auch erste In-Vivo-Zytotoxizitätsuntersuchungen durch Maeda et al. (1953) zeigten lediglich eine schwache akute Toxizität nach einer intraperitonealen Injektion von 833 mg/kg Körpergewicht im Mausmodell.⁵³

Kapitel VI

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In den vergangenen 21 Jahren starben ca. 30 Mio. Menschen an der aggressivsten bakteriellen Infektionskrankheit: Tuberkulose. Tuberkulose stellt insbesondere in den Entwicklungsländern sowie in Osteuropa eine große medizinische und gesellschaftliche Herausforderung dar. Die Ausbreitung multiresistenter Tuberkuloseerkrankungen forciert diese wachsende Gesundheitsbedrohung. Umso deutlicher wird der dringende Bedarf hochpotenter antituberkulotischer Arzneistoffe.

Aufgrund der langwierigen oralen Tuberkulosebehandlung sind zudem Arzneistoffe notwendig, die auf ökonomischem Weg produziert werden können und hoch-spezifisch für *M. tuberculosis* sind. Nur so ist es möglich, unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Resistenzentwicklungen so weit wie möglich zu reduzieren. Um hier einen Beitrag zu leisten, wird zunehmend auf bereits vergessene antituberkulotisch wirksame Strukturen wie die des Pyridomycins zurückgegriffen. Diese Art von Naturprodukten eignet sich wegen ihres modularen Aufbaus (Depsipeptid) hervorragend als Leitstruktur für die Entwicklung neuer antimykobakterieller Arzneistoffe. Im Fall des Pyridomycins konnte zudem von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, wie alte bzw. langbekannte antimykobakterielle Strukturen zur Identifizierung neuer Targets bzw. neuer Angriffspunkte an bereits bekannten Targets beitragen können. Pyridomycin adressiert das langbekannte Isoniazid-Target, die Enoyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase, InhA über eine neue „*mode of action*“, in dem es in der NADH-Bindetasche bindet.

Neuartige depsipeptidische und cyclodepsipeptidische Antituberkulotika

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren nur acht Pyridomycin-Analoga publiziert, jedoch ohne Angabe der antimykobakteriellen Eigenschaften. Im Verlauf der Anfertigung dieser Dissertationsschrift nahm das allgemeine Interesse bezüglich des Pyridomycins als potentiell Antituberkulotikum zu. Mit der hier verfassten Arbeit war es möglich, mit insgesamt 12 zyklischen, depsipeptidischen Endverbindungen sowie zahlreichen offenkettigen Varianten das Portfolio der zur Verfügung stehenden Substanzen zu erweitern. So gelang es, durch ein strategisches Baukastenprinzip neben ringgeschlossenen auch offenkettige Depsipeptide erfolgreich zu synthetisieren. Es wurden einfach-substituierte Zwölfringe, zyklische Systeme mit exozyklischen verzweigten Alkylgruppen, mit endozyklischem Phenyl-Motiv und mit integrierter Phenylmethylen-Seitenkette synthetisiert. Letztere Variation zeigte den größten Einfluss auf eine antimykobakterielle Aktivität.

Um depsipeptidische und cyclodepsipeptidische Strukturen mit einer integrierten Pyridyl-GABA-Seitenkette zu erhalten, wurden Optimierungsstrategien zur Synthese dieser Teil-

struktur entwickelt. Letztendlich war erstmals die erfolgreiche und reproduzierbare Synthese der 4-Amino-5-(pyrid-3-yl)pentansäure möglich, was eine sehr gute Grundlage für die zukünftige Darstellung von Zwölfringsystemen mit diesem Strukturmerkmal darstellt.

Weiterhin konnten neben den zyklischen depsipeptidischen Strukturen auch vergleichende ringoffene, langkettige Analoga erfolgreich synthetisiert werden. Hierbei lag das Augenmerk sowohl auf Benzylester- und entsprechend debenzilyerte Hydrierungsprodukten, als auch auf Methylester-Derivate. Letztere sind stellvertretend für die direkte offenkettige Variante der zyklischen Phenylmethylen-GABA-Analoga anzusehen. Zur weiteren Analyse möglicher Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden zusätzlich Teilstrukturen der Pyridylmethylen-Seitenkette hergestellt.

Des Weiteren wurde die systematische stereoselektive Synthese der (2*S*,3*S*,4*S*)-4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-5-phenylpentansäure beschrieben. Obwohl eine Isolierung der freien 4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-5-phenylpentansäure nicht möglich war, bietet der beschriebene Reaktionsweg sehr gute Anknüpfungspunkte für weiterführende stereoselektive Synthesestrategien. Dies ermöglicht das charakteristische Strukturmerkmal in zukünftigen zyklischen Depsipeptiden zu integrieren und gegebenenfalls als Grundlage für die Synthese eines Pyridyl-Analogons auszunutzen.

Mikrobiologische Evaluierung und abgeleitete Struktur-Wirkungsbeziehungen

Zur Bestimmung des antibakteriellen Profils der Testverbindungen wurden diese *in vitro* mikrobiologisch evaluiert. Mithilfe des Agardiffusionstests an grampositiven, gramnegativen sowie mykobakteriellen Bakterienstämmen wurden erste selektive, antimykobakteriell aktive Verbindungen verifiziert. Durch die anschließende Quantifizierung mittels Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen an *M. smegmatis* und *M. tuberculosis* konnte das anti-tuberkulotische Potential einiger zyklischer Zielverbindungen (minimale Hemmkonzentration im unteren mikromolaren Bereich) bestätigt werden. Basierend auf drei aktiven zyklischen Depsipeptiden als Pyridomycin-Analoga können Struktur-Wirkungsbeziehungen nur mit Bedacht formuliert werden. Mithilfe dessen sind jedoch erste Tendenzen erkennbar (siehe Abb. 53):

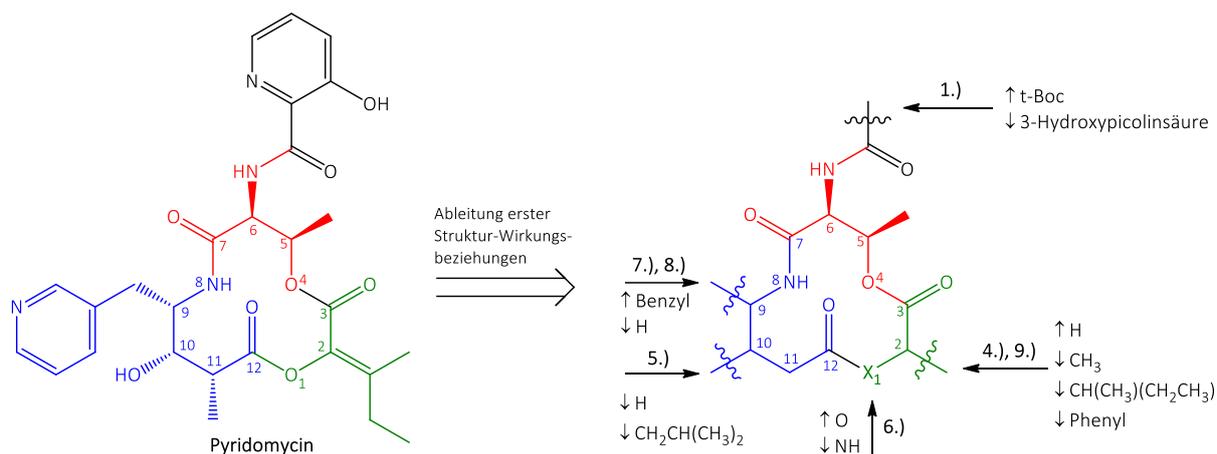


Abb. 53: Schematische Darstellung erster abgeleiteter Struktur-Wirkungsbeziehungen

Auflistung der farbig markierten Teilstrukturen: 3-Hydroxypicolinsäure; *L*-Threonin; (*Z*)-*s*-Butylidengruppe; 4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-5-(pyrid-3-yl)pentansäure;

Die Nummerierungen zählen die ersten abgeleiteten Struktur-Wirkungsbeziehungen auf, entsprechende detaillierte Erläuterungen sind im Text wiederzufinden; ↑ kennzeichnet einen positiven Einfluss und ↓ einen negativen Einfluss auf die antimykobakterielle Aktivität.

1.) Die Hydroxypicolinsäure-Seitenkette war wider Erwarten für eine antibakterielle Aktivität nicht essentiell. Derivate mit diesem Strukturelement zeigten keine oder nur moderate Aktivitäten. Folglich scheint die 3-Hydroxypicolinsäure für eine Bindung in einer enzymatischen Tasche keine Voraussetzung zu sein. Interessanterweise erwiesen sich dagegen verzweigte Alkylgruppen wie die *t*-Boc-Gruppe als vorteilhaft. Inwieweit hierdurch mögliche lipophile Wechselwirkungen im Target ausschlaggebend sind, muss im Detail noch eruiert werden.

2.) Bezüglich der Inaktivität aller offenkettigen Derivate wird die Notwendigkeit der Zwölfringsysteme verdeutlicht. Nur die Ringsysteme sind in der Lage aufgrund der eingeschränkten konformativen Struktur koordiniert am Target zu binden.

3.) Weiterhin wiesen die offenkettigen Verbindungen, mit Ausnahme von Verbindung **59** und **60**, eine erhöhte Polarität auf. Die mikrobiologische Inaktivität kann aufgrund der erhöhten Hydrophilie mit einer geringen Permeabilität durch die Zellwand begründet werden. Zudem ist ein Verlust an Entropie durch die zusätzlichen polaren Gruppen und die damit einhergehenden neuen nicht-kovalenten Wechselwirkungen denkbar, wodurch die Affinität zum Target reduziert wird.

4.) Der Austausch der semizyklischen (*Z*)-*s*-Butylidengruppe durch einen Phenylring (Verbindung **24**), zur Imitierung der Lipophilie und Planarität der Doppelbindung, erzielte keine wachstumshemmenden Resultate. Womöglich führte insbesondere dieser Austausch zu einer herabgesetzten und ungenügenden Hydrophobie aufgrund des Fehlens der lipophilen Alkylkette.

5.) Die Eingliederung von Pregabalin als GABA-Analogen (Verbindung **16**) erzielte ebenfalls keine antimykobakteriellen Effekte. Denkbar wäre hier ein Wegfall essentieller Wasserstoff-

brückenbindungen im Target aufgrund der Substitution der Hydroxygruppe an Position C-10 gegen die verzweigte Alkylkette des Pregabalins.

6.) Weiterhin konnte die Verschiebung (Verbindung **24**) oder die Ersetzung (Verbindung **16**) von Estergruppen die Aktivität nicht verbessern beziehungsweise erhöhen. Womöglich kann dies mit dem Verlust essentieller Wasserstoffbrückenbindungen in einer enzymatischen Bindetasche begründet werden.

7.) Das Fehlen jeglicher Arylmethylgruppen an Position C-9 führte zu einer mikrobiellen Inaktivität. Demzufolge liegt es nahe, dass diese für eine Interaktion in der Bindetasche Wirkungsvoraussetzung sind.

8.) Für die isolierten Diastereomere mit integrierter Phenylmethylengruppe an C-9 konnten unterschiedliche antimykobakterielle Aktivitäten verzeichnet werden. Demnach muss die vorliegende relative Konfiguration einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Wirksamkeit ausüben. Eine Bestimmung des Stereozentrums ist demzufolge zwingend notwendig, vorzugsweise durch Röntgenstrukturanalysen.

9.) Der alleinige Austausch der Dehydroisoleucingruppe an C-2 gegen eine Methylgruppe (Verbindungen **47**) führte zum absoluten Wirkverlust. Trotz des gleichbleibenden Benzylsubstituenten an Position C-9 führte die zusätzliche Alkylgruppensubstitution zu einem anderen Wirkprofil. Inwieweit dadurch eine Änderung der Ringkonformation oder eine enzymatische Bindung negativ beeinflusst werden, kann nur mithilfe von Röntgenkristallstrukturanalysen aufgeklärt werden.

Im Rahmen der Anfertigung dieser Dissertationsarbeit wurden zielgerichtete Modifikationen dieses komplexen Naturstoffs dargestellt.

Targetaufklärung

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Aufklärung des molekularen Targets der Testsubstanzen. Basierend auf der Leitstruktur Pyridomycin wurden hierbei zwei potentielle Zierstrukturen untersucht: InhA und Proteinkinase B. Hierfür wurde zum einen die minimale Hemmkonzentration an *M. bovis* BCG InhA-Überexpressorzellen bestimmt. Infolge dessen wurde überraschenderweise das Pyridomycintarget *nicht* als das Target der aktiven Substanzen dieser Arbeit ermittelt. Zum anderen wurden die Testverbindungen hinsichtlich möglicher Effekte am isolierten PknB-Enzym untersucht.

Durch Bestimmung der PknB-Aktivität sollte ein bivalenter Wirkmechanismus aufgedeckt werden, wobei eine PknB-Induktion mutmaßlich mit einer gesteigerten InhA-Hemmung einhergeht. In Abhängigkeit von der vorliegenden Struktur konnten inhibierende sowie induzierende Effekte auf die Proteinkinase B festgestellt werden: Substanzen mit einer hemmenden PknB-Wirkung waren im antimykobakteriellen Wachstumshemmtest die potentesten Depsipeptide. Dahingegen zeigten zyklische Pyridomycin-Analoga mit stark PknB-induzierender Wirkung keine *M. tuberculosis*-Wachstumshemmung. Im Widerspruch dazu steht das sehr potente Antituberkulotikum Pyridomycin, für das eine mäßige PknB-Aktivitätssteigerung ermittelt werden konnte. Für Pyridomycin ist damit eine direkte Korrelation zwischen einer gesteigerten PknB-Aktivität und einer erhöhten InhA-Hemmung nachweisbar.

Dies sind jedoch zunächst erste Tendenzen und bedarf weiterer Untersuchungen. Es konnte damit allerdings das vielseitige Potential dieses antituberkulotischen Naturstoffs als Leitstruktur bestätigt werden.

Schlussendlich muss in zukünftigen Untersuchungen eine quantitative Einstufung der PknB-inhibitorischen Eigenschaften der aktiven Testverbindungen **46** und **48** erfolgen. Dies kann mithilfe der Bestimmung des IC_{50} -Werts am isolierten PknB ermöglicht werden. Erst dadurch ist eine Charakterisierung und Vergleichbarkeit des Inhibitor-Typs möglich; ob ein reversibler, irreversibler, kompetitiver oder nicht-kompetitiver Mechanismus vorliegt. Ähnliches muss für das agonistische Verhalten der Verbindung **47** und Pyridomycin aufgeklärt werden. Inwieweit eine Selektivität für die mykobakterielle PknB gegenüber anderen bakteriellen oder humanen Kinasen vorliegt, muss noch weiter untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Schrift bieten vielseitige Ansätze für weiterführende Depsipeptidsynthesen, wobei Pyridomycin als hervorragende Leitstruktur für die Entwicklung neuartiger cyclodepsipeptidischer Antituberkulotika bestätigt wurde. Fortan sollten sich zukünftige Arbeiten auf die Darstellung ringgeschlossener Depsipeptide fokussieren. Hierbei sollten insbesondere Derivate mit exozyklischer Pyridylmethylen-Teilstruktur an C-9 berücksichtigt werden, um detailliertere Struktur-Wirkungsbeziehungen in Bezug auf Pyridomycin und den aktiven Verbindungen **46** und **48 DS1** ableiten zu können. Von großem Interesse könnten zudem Strukturabwandlungen von **46 DS1/DS2** mit Variation der exozyklischen t-Boc-Gruppe an Position NH-6 darstellen, wobei der Fokus auf der Substitution von lang- sowie kurzkettigen Alkylgruppen liegen sollte.

Inwieweit allein die Proteinkinase B das vielversprechende Target dieser PYR-Abwandlungen darstellt, gilt es in weiterführenden Untersuchungen zu evaluieren. Die Ergebnisse können weiterhin dabei helfen, das Verständnis zwischen einer biochemischen Regulation von InHA durch die Proteinkinase B aufzuklären.

Kapitel VII

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 MIKROBIOLOGISCHE EVALUIERUNG

7.1.1 AGARDIFFUSIONSTEST

Der Agardiffusionstest wurde am Hans-Knöll-Institut in Jena durchgeführt gemäß der DIN-Norm 58940 und dem Deutschen Arzneibuch von 1990.^{169,170}

Herstellen des Inokulums und der Testplatten

Für die Untersuchung der antibakteriellen und antimykobakteriellen Aktivitäten wurden folgende Testkeime verwendet: *Mycobacterium vaccae* IMET 10670 (200 µl), *Mycobacterium aurum* SB66 (100 µl), *Mycobacterium smegmatis* SG987 (100 µl), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (100 µl), *Escherichia coli* SG 458 (100 µl). Des Weiteren wurden die Substanzen mithilfe der Hefe *Sporobolomyces salmonicolor* 549 (400 µl) hinsichtlich antimykotischer Eigenschaften untersucht. Zur Herstellung des Inokulums wurden den entsprechenden Teststämmen einzelne Kolonien entnommen und auf Schrägagar kultiviert. Aus diesem Schrägagar wurde für die eigentliche Testung schließlich die Stammlösung an Bakterienkultur hergestellt. Da die Mykobakterien während der Kultivierung zum Verklumpen neigen, wurden sie zur Vermeidung dessen auf Glasperlen gezüchtet. Zur Gewinnung der Stammlösung wurde der Agar mittels NaCl-Lösung (5 ml) verflüssigt, um so die Keime vom Agar zu lösen. Diese Suspension der Testorganismen wurden bis zu einer optischen Dichte von McFarland Standard 0.5 (Fa. bioMérieux) weiter verdünnt (entspricht einer Bakteriendichte von 10^8 Zellen/ml) und in steriles 34 ml geschmolzenes Nährmedium (Müller-Hinton-Bouillon, 30 min bei 50 °C im Wasserbad) inokuliert bzw. suspendiert; das entsprechende Volumen an Inoculum ist in den Klammern neben den Testorganismen notiert. Nachdem dieses Gemisch luftblasenfrei in die Petrischalen gegossen wurde, wurden nach Erkalten des Agars (ca. 30 min) 12 gleichgroße Löcher á 9 mm Durchmesser in den Agar gestanzt.¹⁶⁷

Plattenbelegung und Testkonzentrationen

Aus allen Testsubstanzen wurde mittels DMSO eine 1 mg/ml-Stammlösung hergestellt. Dieser Stammlösung wurden 50 µl entnommen und mit Methanol (450 µl) bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt. Als Blindprobe diente eine 10%-ige DMSO-Lösung verdünnt in MeOH (V/V) (ebenfalls 50 µl). Als Referenzsubstanzen wurden sowohl Isoniazid (100 µg/ml) oder Ciprofloxacin (5 µg/ml gelöst in Aqua dest.) als auch Amphotericin B (10 µg/ml) eingesetzt. Die so präparierten Petrischalen wurden bei 37 °C (für die Bakterienkulturen) und 30 °C (für die Hefekultur) inkubiert.

Auswertung der Hemmhöfe

Die ausschließlich visuelle Auswertung der Hemmhöfe erfolgt nach 24 h. Als Hemmhof wird die Zone bezeichnet, in der kein Bakterienwachstum feststellbar ist, dieser wird als Durchmesser in mm angegeben. Es erfolgten ausschließlich Einmalbestimmungen.

7.1.2 MINIMALEN HEMMKONZENTRATIONEN

Bestimmung der MHK an *M. smegmatis*

Die Durchführung erfolgte am Hans-Knöll-Institut unter der Leitung von Frau Dr. Voigt. Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration, also die geringste Konzentration, die noch zu einer Hemmung des Bakterienwachstums führt, wurde das Mikrodilutionsverfahren mit dem Reihenverdünnungstest in 96-Wellplatten durchgeführt gemäß der Richtlinie CLSI.^{167,173}

Zur Herstellung des Inoculums wurden 20 ml der Nährlösung, bestehend aus Glycerin (1 %), Fleischextrakt (0.5 %), Pepton (pankreatisch aus Casein, 0.5 %), NaCl (0.3 %), und Aqua dest., mit 0.5 ml Mykobakterienkultur beimpft. Hierbei wurde *Mycobacterium smegmatis* SG987 als Testkeim eingesetzt. Diese Kultur wurde für 48 h bei 32 °C geschüttelt und anschließend nach dem McFarland Standard 0.5 eingestellt und gegebenenfalls verdünnt (Endkonzentration in der MT-Platte 5×10^5 KBE/ml). Die Test- und Referenzsubstanzen wurden auf eine Ausgangskonzentration von 400 µg/ml eingestellt. Hierfür wurde die Stammlösung der Testsubstanzen (1 mg in 1 ml DMSO) mit Methanol bis zur gewünschten Ausgangskonzentration verdünnt. In die gesamte Mikrotiterplatte wurden anschließend 50 µl Müller-Hinton Bouillon pipettiert sowie 50 µl der Prüfsubstanzen (Reihe 1, A-E), 50 µl Referenz (Ciprofloxacin oder Isoniazid; Reihe 1, F) und 50 µl Lösungsmittel (Reihe 1-12, G). Die Prüfsubstanzen wurden anschließend von Reihe 1 bis 12 in Halbschritten verdünnt, beginnend mit einer Anfangskonzentration von 100 µg/ml in Reihe 1 bis 0.05 µg/ml in Reihe 12. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von 50 µl Inoculum zur gesamten Platte. Die Lösungsmitteltoleranz liegt hierbei bei maximal 5 %.

Die Auswertung der Wachstumshemmung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48 h visuell und nach 72 h nach Zugabe von Resazurin durch Bestimmung der Fluoreszenz des Metaboliten Resorufin mithilfe des automatischen Plattenreaders Nephelocan Ascent 1.4 (Labsystems, Vantaa, Finnland) bei $\lambda = 630$ nm.¹⁷⁴

Bestimmung der MHK an *M. tuberculosis* (ATP-Biolumineszenz)

Die Bestimmung der MHK an *M. tuberculosis* H₃₇Rv erfolgte durch unseren Kooperationspartner GSK in Tres Cantos (Madrid, Spanien).

In einem Mikrodilutionsverfahren wurde als Negativkontrolle DMSO und als Referenzsubstanz INH (0.1 mg/ml) eingesetzt. Die Testsubstanzen wurden auf eine Stammkonzentration von 10 mM in DMSO verdünnt und 250 µl in jedes Well der 384-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend weiter verdünnt mit DMSO zur gewünschten Verdünnungsreihe (11 zweifach Verdünnungen von Reihe 1-12 und 13-24) (Endkonzentration von DMSO: 1 %). Das Inokulum von *M. tuberculosis* wurde auf keimbildende Zellen von 1×10^7 CFU/ml ($OD_{600} = 0.125$) eingestellt, weiter verdünnt bis auf 1×10^5 CFU/ml mithilfe von Middlebrook 7H9 Brühe (Difco 27310), mit Zusatz von 10 % ADC (Becton Dickinson 262710) und 0.025 % Tyloxapol

(Sigma T8761). Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen wurden 10 µl BacTiter-Glo™ Microbial Cell viability Assay (Promega G8231)¹⁷⁶ in jedes Well ergänzt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Lumineszenz wurde bei allen Wellenlängen durch Spectramax M5 bestimmt, mit einer Integrationszeit von 250 ms.

Bestimmung der MHK an *M. bovis* BCG InhA-Überexpressorzellen

Die Bestimmung der MHK an *M. bovis* BCG InhA-überexprimierenden Zellen erfolgte durch GSK Tres Cantos (Madrid, Spanien) unter Anwendung des standardisierten REMAs.⁶⁵

Es wurden zehn zweifach Verdünnungen in DMSO der Testsubstanzen hergestellt. In einer 96-Well Polystyren-Mikrotiterplatte wurden 5 µl der Substanzlösung zu 95 µl Middlebrook 7H9 Medium gegeben. Als Positivkontrolle wurden INH und GSK826625A und als Blindkontrolle DMSO verwendet. Das Inokulum, bestehend aus dem Überexpressorstamm *M. bovis* BCG pATB45:InhA und dem Kontrollstamm *M. bovis* BCG pATB45, wurde auf eine keimbildende Zahl von $1 \cdot 10^5$ CFU/ml im Middlebrook 7H9 Medium eingestellt. 100 µl des Inokulums wurden zu der gesamten 96-Wellplatte ergänzt mit Ausnahme von Well H7 bis H12 (Blindkontrollen). Die Platten wurden anschließend bei 37 °C für 6 Tage inkubiert.

Es wurde eine Resazurinlösung hergestellt, eine in 30 ml steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöste Resazurin-Tablette (Resazurintablette für Milchtestungen; VWR International Ltd. Ref.-Nr. 330884Y). Diese Resazurinlösung (25 µl pro Well) wurde ergänzt. Die Fluoreszenzmessung (Spectramax M5, Molecular Devices, $\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm) erfolgte nach 48 h Inkubationszeit.

7.1.3 ZYTOTOXIZITÄT UND ANTIPROLIFERATIVE EFFEKT AN HUMANEN ZELLENLINIEN

Für die Beurteilung eines toxischen Effekts, der durch die aktiven Testverbindungen ausgelöst werden könnte, wurden die Zytotoxizität und der antiproliferative Effekt an humanen Zelllinien untersucht. Hierfür wurden die Testsubstanzen in DMSO gelöst um eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml zu erhalten, welche anschließend mit DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) bis zu einer Anfangskonzentration von 5 µg/ml weiter verdünnt wurde.

Unter Verwendung der Zelllinien HUVEC (ATCC CRL-1730) und K-562 (DSM ACC 10) wurde der antiproliferative Effekt der Testsubstanzen untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37 °C erfolgte die Bestimmung des GI_{50} -Wertes (Wachstumshemmung). Dieser GI_{50} -Wert gibt die Konzentration an, bei der 50 % der Zellen in ihrer Proliferation, also Wachstum, gehemmt werden. Unter Verwendung von HeLa-Zellen (DSM ACC 57) erfolgte die Ermittlung möglicher zytotoxischer Effekte ausgewählter Testsubstanzen. Hierbei gingen wieder nur die Substanzen ein, die im Wachstumshemmtest positiv waren. Für die Beurteilung wurde der CC_{50} -Wert (zytotoxische Konzentration) nach einer Inkubation von 72 h bei 37 °C bei einer befeuchteten Atmosphäre und 5 % CO_2 -Gehalt ermittelt. Für die Bestimmung der zellproliferierenden Eigenschaften der Testverbindungen auf K-562 wurde die Zahl der lebensfähigen Zellen in Multiwellplatten mithilfe des CellTiter-Blue1-Assays unter Verwendung von Resazurin untersucht. Hierbei ist das Signal des CellTiter-Blue1 Reagenz direkt proportional zur Anzahl der lebensfähigen Zellen. Adhärente HUVEC- und HeLa-Zellen

wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit 0.05 % Methyleneblau angefärbt (für 15 min.). Nachdem der Farbstoff ausgewaschen wurde (0.2 ml einer 0.33 M HCl-Lösung) wurde die optische Dichte bei $\lambda = 660$ nm ermittelt (SUNRISE microplate reader, TECAN, Schweiz).

7.1.4 EFFEKTE AM ISOLIERTEN ENZYM

Mykobakterielle Proteinkinase PknB

Die hier aufgeführten PknB-Aktivitätsuntersuchungen und der damit eingesetzte Kinaseassay entstand im Zuge einer Kooperation mit Prof. Dr. Yossef Av-Gay, University of British Columbia (Vancouver, Kanada).

Es erfolgte eine quantitative Bestimmung der Autophosphorylierung der mykobakteriellen Proteinkinase B. Hierfür wurden die Testverbindungen in 50 μ l DMSO gelöst, um eine Stammlösung von 0.02 mg/ml zu erhalten. Diese Stammlösung wurde anschließend bis zu den Testkonzentrationen von 0.24 μ M, 1.2 μ M, 2.4 μ M, 4.8 μ M und 12 μ M verdünnt, wobei die DMSO-Belastung schlussendlich zwischen 1.6-1.8 % lag. Als Blindwert diente bei allen Versuchen die isolierte Proteinkinase mit einer Konzentration von 2.4 μ M. Für die PknB-Kinase Reaktion wurde ein Gemisch aus 6.5 μ l PknB (2.4 μ M), 6.5 μ l der entsprechenden Konzentration an Inhibitor, Tris-HCl mit pH = 7.4 (20 mM), $MgCl_2$ (5 mM), $MnCl_2$ (5 mM) und Dithiothreitol (Mercaptoethanol, 1 mM) hergestellt. Aufgrund der geringeren Aktivität der Verbindung **48 DS1** musste eine PknB-Konzentration von 1.2 μ M eingesetzt werden, um folglich überhaupt einen Effekt detektieren zu können. Einer entsprechenden Inkubationszeit (30 Minuten) folgte die Zugabe von 10 μ Ci [γ - 32 P] ATP. Dieses radioaktiv-markierte Gemisch wurde bei RT für weitere 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von Laemmli-Probenpuffer (SDS, Mercaptoethanol, Tris-Puffer, Glycerol, Bromphenolblau) und Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Mittels SDS-Gelelektrophorese erfolgte die Proteinreinigung. Nach abschließender Autoradiographie und Anfärben mit Coomassie-Blau oder Silberfarbe wurden die PknB-Proteinbanden sichtbar gemacht. Eine Quantifizierung der erfolgten PknB-Autophosphorylierung konnte mittels Szintillationszählers (Fa. Beckman) bestimmt werden. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

7.2 SYNTHESSEN

7.2.1 MATERIAL UND METHODEN

Geräte

Chromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄-Platten der Firmen Merck oder Macherey-Nagel durchgeführt. Beschichtet waren diese mit 0.20 mm Kieselgel 60. Die Visualisierung wurde mittels UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm oder 365 nm oder durch Detektion mithilfe von einer Jodkammer und/oder mittels Besprühen einer Ninhydrin-Lösung gewährleistet.

Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte entweder an Kieselgel Geduran SI 60 (0.040-0.063 mm) oder Geduran SI 60 (0.063-0.200 mm).

Massenspektrometrie

Die ESI-Massenspektren wurden an einem LCQ-Classic-Spektrometer der Firma Thermo Finnigan vermessen. Die positive und negative Ionisation wurde bei einer Kapillartemperatur von 220 °C, einer Spannung von 4.5 kV und einem Scanbereich von 50-2000 durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurde eine Stammlösung in Chloroform oder Methanol erstellt und nach einer weiteren Verdünnung mit Methanol injiziert (20 µl/min).

Hochaufgelöste ESI-MS-Spektren sind an einem Bruker Apex III 70e Fouriertransformations-Ionenzyklonresonanz Massenspektrometer aufgenommen worden.

Schmelzpunkt

Alle Schmelzpunkte wurden an einem Boëtius-Heiztischmikroskop vermessen. Es handelt sich um nicht korrigierte Schmelzpunkte bzw. Schmelzbereiche.

Elementaranalyse

Die Elementaranalyse wurde an einem LECO CHNS-932 Analysenautomaten im automatischen Mikroverfahren bestimmt. Die Ergebnisse sind auf die zweite Nachkommastellen gerundet.

Katalytische Hydrierung

Die katalytische Hydrierung wurde in Autoklaven der Firma Parr Instruments, Instrumental Company, Serie 5500 oder Serie 4790 durchgeführt.

NMR-Spektroskopie

Die ¹H- und ¹³C-NMRs wurden bei einer Temperatur von 25 °C aufgenommen. Dabei wurden folgende Geräte verwendet:

- VNMRS 400 (Agilent Technologies) mit 400 MHz Arbeitsfrequenz für ¹H-NMR und 100 MHz für ¹³C-NMR

- INOVA 500 (Varian) mit 500 MHz Arbeitsfrequenz für ^1H -NMR und 125 MHz für ^{13}C -NMR

Die Kopplungskonstanten (J) sind in Hertz (Hz) und die chemische Verschiebung (δ) in parts per million (ppm) angegeben. Die Multiplizitäten sind wie folgt dokumentiert: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qui = Quintett, m = Multipllett, br = breites Signal).

Circulardichroismus (CD)

Die CD-Spektren wurden am Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle (Saale) in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Porzel an einem J-815-Spektropolarimeter vermessen. Die Scangeschwindigkeit betrug 50 nm/min bei einer Bandbreite von 1.00 nm. Die Proben wurden in Methanol (schwebstofffrei) bis zu einer durchschnittlichen Konzentration von 0.024 % (w/v) gelöst.

Reagenzien und Lösungsmittel

Alle verwendeten und nicht in der Folge aufgeführten Chemikalien und Reagenzien stammen aus Beständen der Chemikalienausgabe des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, alle übrigen Chemikalien sind kommerziell erhältlich (Bezugsquelle in Klammern). Die Referenzsubstanz Pyridomycin entstammte einer Schenkung von Shuangjun Lin, Shanghai Jiao Tong University (Shanghai); isoliert aus *Streptomyces pyridomyceticus*.

Methanol (MeOH) und Dichloromethan (DCM), als auch Dimethylformamid (DMF) und 1,4-Dioxan wurden nach der Destillation über aktiviertem Molekularsieb (4 Å) trocken gelagert. Chloroform (CHCl_3), Methyl-*tert*-butylether (MTBE), *n*-Butylamin und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) wurden vor dem Gebrauch destilliert. Für die katalytische Hydrierung wurde ausschließlich MeOH mit einer HPLC-Reinheit oder Isopropanol (*i*-PrOH) *par analytics* (99 %) verwendet. Ethanol (EtOH) wurde als unvergällter 96 %iger Alkohol eingesetzt.

(*R*)-(+)-2-Benzyloxypropionsäure (Alfa Aesar)
 (*S*)-4-Isopropyl-4-methyl-3-propionyl-oxazolidin-2-on (Sigma Aldrich)
 2,4,5,6-Tetraamnoprimidin (Alfa Aesar)
 2-Benzyloxybenzoesäure (Alfa Aesar)
 2-Hydroxy-5-Nitrobenzoesäure (Sigma Aldrich)
 3-(2-Aminoethyl)-pyridin-2*HBr (Sigma Aldrich)
 3-Hydroxypicolinsäure (Alfa Aesar)
 4-(Dimethylamino)-pyridin (Merck)
 4-Nitro-buttersäuremethylester (Sigma Aldrich)
 DiBoc (Acros Organics)
 Dibutylboryltrifluormethansulfonat (Sigma Aldrich)
N,O-Dimethylhydroxylamin-HCl (Carbolution)
 Isoleucin (Acros Organics)
 Lithium 3-Fluoropyridine-2-Carboxylate (Sigma Aldrich)
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (Alfa Aesar)

7 | Experimenteller Teil

Nicotinaldehyd (VWR)

Pd/C (10 %), Wassernass-Gehalt = 62.3 %, E 106 R/W 10 % (Degussa)

Picolinsäure (Acros Organics)

Pregabalin (Pfizer)

PyBOP (Carbolution oder Bachem oder Carl Roth)

t-Boc-Phe-OH (Carbolution)

t-Boc-Thr-OH (Polypeptide oder Carbolution)

Trifluoressigsäure (Merck)

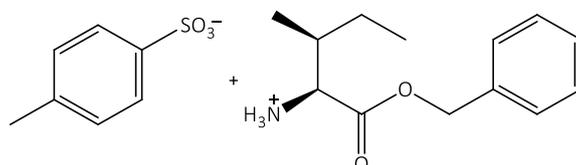
Trimethylchlorsilan (Acros Organics)

β -Alanin (Sigma Aldrich)

7.2.2 SYNTHESVORSCHRIFTEN

7.2.2.1 Synthese von Pyridin-2-carbonsäure(3-sec-butyl-7-isobutyl-12-methyl-2,5,10-trioxa-1-oxa-4,9-diaza-cyclododec-11-yl)-amid (16)

L-Isoleucinbenzylestertosylat

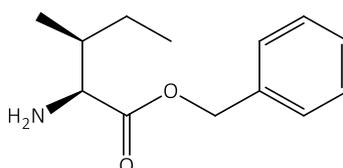


Das *L*-Isoleucin (2.41 g, 18.3 mmol) und das *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (4.2 g, 22.1 mmol) werden gemischt, mit 9.5 ml BnOH angeteigt und in 15 ml Toluol aufgenommen. Die Lösung wird am Wasserabscheider unter Rückflusskühlung 5 h auf 135 °C erhitzt.

Nach Abkühlung wird ein Teil des Toluols unter Vakuum eingedampft und der Rückstand in ca. 75 ml Et₂O aufgenommen. Es bildet sich zügig ein voluminöser weißer Niederschlag, welcher abgesaugt und mit Et₂O gewaschen wird (55 %, 3.96 g).¹⁰³

R_f (CHCl₃/MeOH/NH₃ 98:2:0.5): 0.84, **¹H NMR:** (CDCl₃): δ [ppm]: 0.74 (t, 3 H, *J* = 7.4 Hz, CH₃-CH₂-CH-), 0.84 (d, 3 H, *J* = 7.0 Hz, CH₃-CH-), 1.19 (m, 1H, CH₃-CH₂CH-), 1.33 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH-), 1.93 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH-CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃-Ar), 4.00 (m, 1H, ⁺NH₃-CH-CO-), 5.02 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz, -COO-CHH-Ar), 5.13 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz, -COO-CHH-Ar), 7.10 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 7.28 (m, 5H, -COO-CH₂-Ar-H), 7.75 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 8.19 (bs, 3H, ⁺NH₃CHCO-); **ESI-MS:** ber. 326.4724, gef. 222.07 [M+H]⁺, 442.85 [2 M+H]⁺.

L-Isoleucinbenzylester (10)

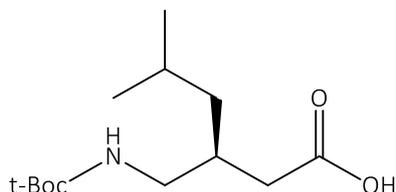


Das *L*-Isoleucinbenzylestertosylat (1.47 g, 3.74 mmol) wird unter Eiskühlung in 4.0 ml CHCl₃ suspendiert und langsam mit TEA (0.57 ml, 4.12 mmol) versetzt. Die Lösung wird mit ca. 75 ml Et₂O gemischt und es entsteht ein weißer, flockiger Niederschlag, dieser wird abfiltriert. Wenn das Filtrat noch nicht frei von Niederschlag ist, muss ein weiteres Mal filtriert werden. Das klare Filtrat wird am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt. Die freie Base des *L*-Isoleucinbenzylesters wird als eine ölige Flüssigkeit gewonnen, die nach einigen Tagen erstarrt (99 %, 825 mg). Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁰⁴

¹H NMR: (CDCl₃): δ [ppm]: 0.78 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃-CH₂-CH-), 0.83 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃-CH-), 1.10 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH-), 1.33 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH), 1.69 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH-CH₃), 3.35

(d, 1H, $J = 5.1$ Hz, $\text{NH}_2\text{-CH-CO-}$), 5.03 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, $-\text{COO-CHH-Ar}$), 5.09 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, COO-CHH-Ar), 7.05 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, $\text{NH}_2\text{-}$), 7.21-7.27 (m, 5H, $\text{COOCH}_2\text{-Ar-H}$).

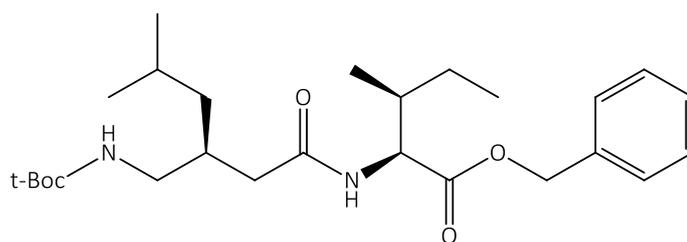
t-Boc-Pregabalin (11)



In einem Kolben werden DiBoc (1.386 g, 6.36 mmol) und Pregabalin (850 mg, 5.35 mmol) in 7.5 ml THF gelöst. Dazu wird eine Lösung von NaHCO_3 (494 mg, 5.89 mmol, gelöst in 5 ml H_2O) gegeben und der Ansatz bei RT über Nacht gerührt. Die zu Beginn trübe Reaktionsmischung ist nach abgeschlossener Reaktion eine klare Lösung. Der Ansatz wird mit 1 M HCl auf $\text{pH} \approx 2$ eingestellt und mit DCM (2x) extrahiert. Die Dichlormethanphasen werden vereinigt, über MgSO_4 getrocknet und am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Das Reaktionsprodukt wird als farblose viskose Flüssigkeit gewonnen, die im Kühlschrank erstarrt und ohne weitere Reinigung verwendet werden kann (97 %, 1.35 g).

$^1\text{H NMR}$: (CDCl_3): δ [ppm]: 0.85 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 1.13 (bs, 2H, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH-}$), 1.40 (s, 9H, *t-Boc*), 1.62 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 2.06 (bs, 1H, $(\text{CH}_2)_3\text{-CH-}$), 2.23 (m, 2H, $\text{COOH-CH}_2\text{-}$), 3.03 (m, 2H, *t-Boc-NH-CH}_2\text{-}), 4.87 (bs, 1H, $-\text{NH}$), 10.39 (bs, 1H, $-\text{COOH}$).*

2-[(S)-3-(tert-Butoxycarbonylaminomethyl)-5-methyl-hexanoylamino]-3-methyl-pentansäurebenzylester (12)

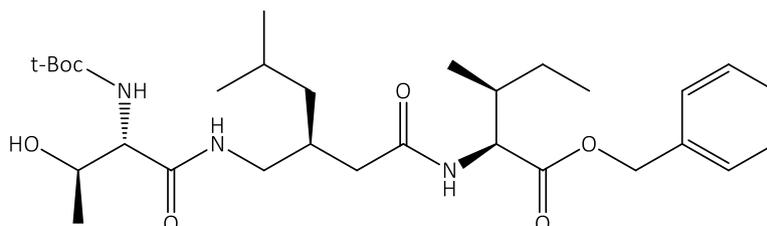


T-Boc-Pregabalin (520 mg, 2.01 mmol) wird in 5 ml DCM gelöst und PyBOP (1.15 g, 2.21 mmol), DIPEA (0.546 ml, 3.22 mmol) und *L*-Isoleucinbenzylester (444 mg, 2.01 mmol) werden ergänzt. Der Ansatz rührt bei RT für 5 h. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum eingengt und der Rückstand kann direkt chromatographisch (EtOAc/Hexan 1:1) gereinigt werden, wobei Verbindung **12** als farblose Flüssigkeit gewonnen wird, die im Kühlschrank erstarrt (81 %, 750 mg).

R_f (EtOAc/Hexan 1:1): 0.93; $^1\text{H NMR}$: (CDCl_3): δ [ppm]: 0.78-0.84 (m, 12H, $\text{CH}_3\text{-}$), 1.05 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH-}$), 1.16 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CHH-CH-}$), 1.34 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CHH-CH-}$), 1.35 (s, 9H, *t-Boc*), 1.54 (m, 1H, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}$), 1.82-1.93 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-CH-}$, $(\text{CH}_2)_3\text{-CH-}$), 2.00-

2.15 (m, 2H, CH-CH₂-CO-), 2.73-2.82 (m, 1H, -NH-CHH-), 3.30-3.39 (m, 1H, -NH-CHH-), 4.49 (m, 1H, -NH₂-CH-CO-), 4.66-4.74 (bt, 1H, -NH), 5.03 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz, -COO-CHH-Ar), 5.13 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz, -COO-CHH-Ar), 7.18-7.27 (m, 5H, -COO-CH₂-Ar-H); **ESI-MS**: ber. 462.622, gef. 485.23 [M+Na]⁺.

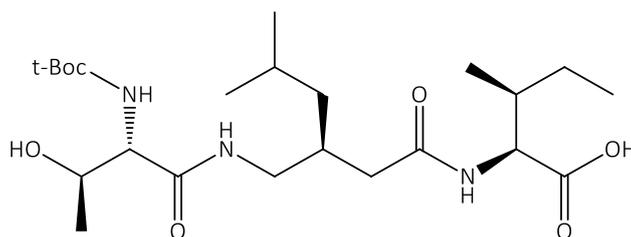
2-{3-[(2-tert-Butoxycarbonylamino-3-hydroxy-butyrylamino)-methyl]-5-methyl-hexanoylamino}-3-methyl-pentansäurebenzylester (13)



Verbindung **12** (1.14 g, 2.47 mmol) wird in TFA/DCM (2.0 ml/2.0 ml) gelöst und bei RT 1 h gerührt. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand je dreimal mit Toluol gewaschen. Dieser Prozess wird mit CHCl₃ wiederholt (3x). Das freie Amin wird in 5.0 ml DCM aufgenommen. Nach Zugabe von PyBOP (1.41 mg, 2.72 mmol), DIPEA (0.671 ml, 3.95 mmol) und *N*-Boc-*L*-Thr-OH (541 mg, 2.47 mmol) wird der Ansatz bei RT 3 h gerührt. Nach dem Einengen des Lösungsmittels unter Vakuum wird der ölige Rückstand direkt chromatographisch mit EtOAc/Hexan (1:1) gereinigt. Das gewünschte Produkt liegt anschließend als weißer Feststoff vor (90 %, 1.25 g).

R_f (EtOAc/Hexan 1:1): 0.24; **¹H NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 0.86-0.89 (m, 9H, CH₃-), 0.92 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃-CH-CH₂-CH₃), 1.08-1.14 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂-CH₃), 1.12 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃-CH-OH), 1.26 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, (CH₃)₂-CH-CH₂-CH-), 1.37-1.43 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂-CH₃), 1.46 (s, 9H, *t*-Boc), 1.67 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH-CH₃), 1.93-2.00 (bs, 1H, (CH₂)₃-CH-), 2.05-2.15 (m, 2H, -CH-CH₂-CO-), 2.20 (m, 1H, -NH-CH₂-CH-), 3.26 (bs, 1H, -NH-CH₂-CH-), 3.92 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH₃-CH-OH), 4.32 (dq, 1H, *J* = 6.5/1.9 Hz, *t*-Boc-NH-CH-CO-), 4.62 (dd, 1H, *J* = 8.4/4.9 Hz, -NH-CH-COO-CH₂-Ar), 5.13 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz, -COO-CH₂-Ar), 5.22 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz, -COO-CH₂-Ar), 5.54 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, -NH), 7.01-7.08 (bs, 1H, -NH), 7.16 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, -NH), 7.31-7.38 (m, 5H, -COOCH₂-Ar-H); **¹³C NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 11.6, 15.8, 18.7, 22.6, 22.7, 25.2, 28.3, 34.2, 37.2, 39.1, 41.7, 42.4, 56.9, 58.0, 66.7, 67.1, 80.3, 128.4, 128.6, 135.4, 156.6, 172.6, 172.7, 172.9; **ESI-MS**: ber. 563.7260, gef. 586.21 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₃₀H₄₉N₃O₇: C 63.92, H 8.76, N 7.45; Gef.: C 63.37, H 8.78, N 7.26; **HR-MS**: ber. 564.3649 [M+H]⁺, 586.3468 [M+Na]⁺; Gef.: 564.3638, 586.3456.

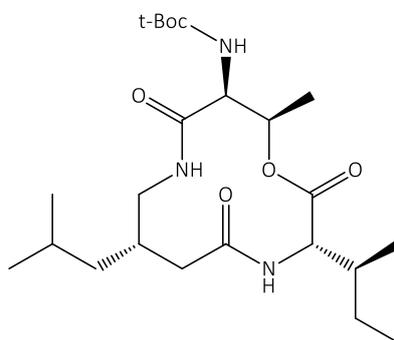
(3-sec-Butyl-7-isobutyl-12-methyl-2,5,10-trioxo-1-oxa-4,9-diaza-cyclododec-11-yl)carbaminsäure-tert-butylester (14)



Bei einem Wasserstoffdruck von 5.0 bar wird Verbindung **13** (944 mg, 2.0 mmol), gelöst in 50 ml Methanol, 6 h mithilfe von Pd/C (10 %) (eine Spatelspitze) hydriert. Die Suspension wird über Celite® filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Es entsteht ein weißer Feststoff, welcher ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt werden kann (150 mg, quantitativ).

Smp.: 81-82 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃): δ [ppm]: 0.87-0.98 (m, 12H, -CH₃), 1.10-1.29 (m, 7H, CH₃-CH-CH₂-CH₃, CH₃-CH-OH, (CH₃)₂-CH-CH₂-CH-), 1.46 (s, 9H, *t*-Boc), 1.49-1.55 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂-CH₃), 1.64 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH-CH₃), 1.89-1.98 (bs, 1H, (CH₂)₃-CH-), 2.06-2.15 (m, 1H, -NH-CH₂-CH-), 2.18-2.33 (m, 2H, -CH-CH₂-CO-), 3.12-3.35 (m, 1H, -NH-CH₂-CH-), 3.96-4.04 (m, 1H, CH₃-CH-OH-), 4.24-4.32 (m, 1H, *t*-Boc-NH-CH-CO-), 4.47-4.54 (m, 1H, -NH-CH-COOH), 5.65 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, -NH), 7.06-7.15 (bs, 1H, -NH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ (ppm): 11.5, 15.7, 18.8, 22.6, 25.2, 28.3, 33.4, 36.8, 39.6, 42.4, 43.1, 57.2, 58.7, 66.9, 80.6, 156.7, 172.3, 173.6, 174.6; **ESI-MS:** ber. 473.6034, gef. 374.23 [M+H-*t*-Boc]⁺, 496.27 [M+Na]⁺; **HR-MS:** ber. 496.2998 [M+Na]⁺; Gef.: 496.2993.

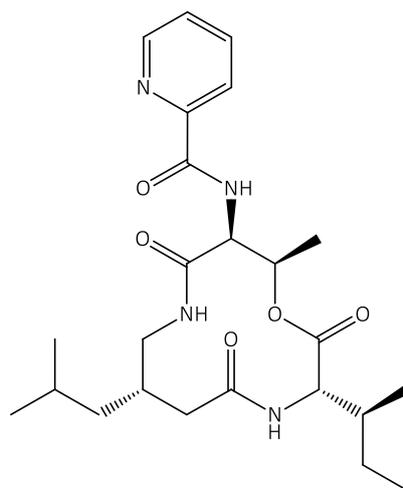
N-[(7S)-3-(butan-2-yl)-12-methyl-7-(2-methylpropyl)-2,5,10-trioxo-1-oxa-4,9-diazacyclododecan-11-yl]carbaminsäure-tert-butylester (15)



Das Zwischenprodukt **14** (150 mg, 0.32 mmol) wird in 5.0 ml DCM gelöst. Der Ansatz wird mit einem Septum verschlossen und mit Argon durchströmt. Diese Lösung wird auf -20 °C heruntergekühlt. Anschließend erfolgt die langsame Injektion von DIPEA (0.158 ml, 0.93 mmol) und in DCM gelöstes PyBOP. Die PyBOP-Lösung (182 mg, 0.35 mmol) muss zuvor ebenfalls unter Argon gesetzt werden. Nach 15-minütigem Rühren bei -20 °C wird der Ansatz langsam

auf RT erwärmt und weitere 5 h gerührt, dabei ist eine langsam entstehende Trübung zu beobachten. Nach Zugabe von ca. 30 ml DCM wird der Ansatz mit NaHSO₄ (2x), Brine (1x), gesättigter NaHCO₃-Lösung (1x) und Brine (1x) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Es entsteht ein öliger Rückstand, der direkt für den nächsten Reaktionsschritt verwendet wird.

Pyridin-2-carbonsäure-(3-sec-butyl-7-isobutyl-12-methyl-2,5,10-trioxo-1-oxa-4,9-diaza-cyclododec-11-yl)amid (16)



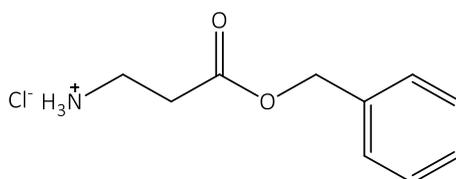
Verbindung **15** (241 mg, 0.53 mmol) wird in TFA/DCM (1.0 ml/1.0 ml) gelöst und 5 Minuten gerührt. Das TFA/DCM-Gemisch wird bei max. 40 °C am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird in 2.0 ml DMF gelöst und unter Eiskühlung mit DIPEA (180 µl) neutralisiert. Eine vorbereitete Lösung (braune Färbung), bestehend aus Picolinsäure (65 mg, 0.53 mmol), PyBOP (308 mg, 0.59 mmol) und DIPEA (0.135 ml, 0.8 mmol), wird dem Ansatz zugegeben. Die Reaktion erfolgt bei 37 °C in einem Thermoshaker unter ständiger Bewegung. Nach 4 Tagen wird der Ansatz unter Vakuum konzentriert und mit CHCl₃/MeOH/NH₃ (97:3:1) chromatographisch gereinigt. Das Produkt liegt anschließend als farbloser Feststoff vor (16 %, 40 mg).

R_f (CHCl₃/MeOH/NH₃ 98:2:0.5): 0.46; **Smp.:** 102-109 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃): δ [ppm]: 0.84-0.90 (m, 9H, CH₃-CH-CH₃, CH₃-CH-CH₃, CH₃-CH₂-CH-), 0.96 (d, 3H, J = 6.4 Hz, CH₃-CH-CH₂-CH₃), 1.06 (m, 2H, (CH₃)₂-CH-CH₂-CH-), 1.11-1.20 (m, 1H, CH₃-CH-CH₃), 1.33 (d, 3H, J = 6.4 Hz, CH₃-CH-OH), 1.53-1.63 (m, 2H, CH₃-CH-CH₂-CH₃), 1.82-1.89 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH-CH₃), 1.88-1.93 (m, 1H, -CH-CH₂-CO-), 2.27-2.35 (bs, 1H, -NH-CH₂-CH-), 2.42 (d, 1H, J = 14.7 Hz, -CH-CH₂-CO-), 3.02 (d, 1H, J = 13.7 Hz, -NH-CH₂-CH-), 3.34 (m, 1H, -NH-CH₂-CH-), 4.51 (t, 1H, J = 9.5 Hz, -NH-CH-CO-(Ile)), 4.71 (m, 1H, -NH-CH-CO-), 5.52-5.56 (m, 1H, CH₃-CH-OOC-), 6.50 (d, 1H, J = 5.9 Hz, -NH), 6.55 (d, 1H, J = 9.8 Hz, -NH), 7.48-7.51 (m, 1H, Ar-H), 7.88 (m, 1H, Ar-H), 8.17 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Ar-H), 8.69 (m, 1H, Ar-H), 8.70 (m, 1H, -NH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 10.8, 15.8, 16.7, 22.5, 22.9, 24.6, 25.2, 33.1, 34.2, 41.8, 43.1, 45.9, 56.1, 57.9, 71.3, 122.7, 126.9, 137.6, 148.8, 165.3, 168.6, 170.4, 172.7; **ESI-MS:** ber. 460.566, gef. 483.38 [M+Na]⁺, 459.18 [M-H]⁻;

Anal. ber.. für $C_{24}H_{36}N_4O_5$: C 62.59, H 7.88, N 12.16; Gef.: C 61.07, H 7.49, N 11.62; **HR-MS:** ber. 461.2783 $[M+H]^+$, 483.2583 $[M+Na]^+$; Gef.: 461.2753, 483.2574.

7.2.2.2 Synthese von 3-Hydroxy-N-(8-methyl-2,6,10-trioxo-2,3,4,5,6,7,8,10-octahydro-1,9,5-benzodioxazacyclododecin-7-yl)pyridin-2-carboxamid (24)

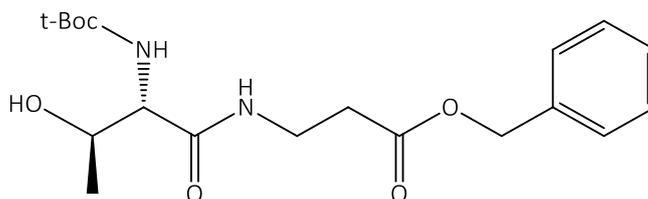
3-(Benzyloxy)-3-oxopropan-1-ammoniumchlorid (17)



Zu einer Suspension aus β -Alanin (890 mg, 10.0 mmol) in 50 ml BnOH wird unter Rühren über 10 Minuten TMSCl (3.18 ml, 25.0 mmol) zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend in 650 ml Et_2O gegossen, wobei unter Eiskühlung ein weißer Feststoff ausfällt. Dieser wird filtriert und nochmals mit Et_2O gewaschen (90.4 %, 1.95 g, berechnet als HCl). Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹⁰⁵

Smp.: 83 °C; **1H NMR:** (D_2O) δ [ppm]: 2.76 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, $NH_3^+-CH_2-$), 3.18-3.22 (m, 2H, $-CH_2-COO-$), 5.12 (s, 2H, $-CH_2-Ar$), 7.33-7.36 (m, 5H, $-Ar-H$); **ESI-MS:** ber. 179.216, gef. 180.02 $[M+H]^+$; **Anal.** ber. für $C_{10}H_{14}ClNO_2$: C 55.69, H 6.54, Cl 16.44, N 6.49; Gef.: C 55.36, H 6.30, Cl 16.33, N 6.81.

Benzyl-3-(2-[[tert-butoxy]carbonyl]amino)-3-hydroxybutanamid)propansäureester (19)

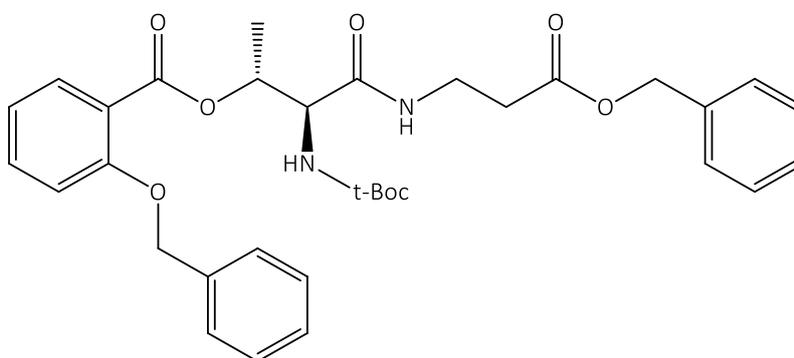


N-Boc-*L*-Thr-OH (1.31 g, 6.0 mmol) wird in 12 ml DCM gelöst und Verbindung **17** (537 mg, 2.50 mmol) zusammen mit DCC (743 mg, 3.60 mmol) unter Rühren hinzugefügt. Das Gemisch rührt bei RT für 5 h. Das sich bildende DCU fällt sofort als weißer Niederschlag aus.

Das DCU wird filtriert und mit DCM nachgewaschen. Die organische Phase wird mit 1 M HCl, 1 M $KHCO_3$ und Wasser gewaschen und anschließend über $MgSO_4$ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen wurde, erfolgt eine chromatographische Reinigung mit $CHCl_3$. Produkt **19** wird dabei als farbloser Sirup gewonnen, welcher nach längerem Stehen erstarrt (45.8 %, 435 mg).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.61; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.15 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, -CH₃), 1.44 (s, 9H, t-boc), 2.58 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz, -CO-NH-CH₂-CH₂-), 2.92 (bs, 1H, -NH), 3.52-3.56 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO-), 4.00 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz, -CH-CH-CO-NH-), 4.32(dq, 1H, *J* = 6.5 /2.3 Hz, CH₃-CH-), 5.12 (s, 2H, -CH₂-Ar), 5.48 (bd, 1H, -OH), 7.03 (bs, 1H, -NH), 7.32-7.38 (m, 5H, -Ar-H); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 18.3, 28.3, 34.0, 35.0, 58.3, 66.6, 66.8, 80.3, 128.3, 128.4, 128.6, 135.6, 156.4, 171.5, 171.9; **ESI-MS:** ber. 380.435, gef. 403.03 [M+Na]⁺, 381.25 [M+H]⁺; **Anal.** ber. für C₁₉H₂₈N₂O₆: C 59.98, H 7.42, N 7.36; Gef.: C 59.63, H 7.45, N 7.53.

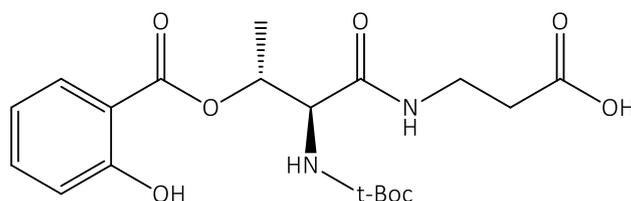
Benzyl-3-{3-[2-(benzyloxy)benzoyloxy]-2-[[tert-butoxy]carbonyl]amino}butanamid}-propansäureester (21)



Benzyloxybenzoesäure (**20**) (297 mg, 1.30 mmol) wird in 10 ml DCM gelöst und DMAP (37 mg, 0.30 mmol) ergänzt. Verbindung **19** (383.8 mg, 1.01 mmol) wird ebenfalls in 10 ml DCM gelöst und unter Rühren dem Reaktionsgemisch ergänzt. Nach 5 Minuten wird DCC (268 mg, 1.30 mmol), gelöst in 15 ml DCM, hinzugegeben. Der Ansatz wird über Nacht gerührt, das ausfallende DCU filtriert und die organische Phase mit gesättigter NH₄Cl-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wird das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Die entstehende ölige Flüssigkeit wird mit Heptan/EtOAc 8:2 chromatographisch gereinigt. Das Produkt wird als weißer Feststoff isoliert (61 %, 363 mg).

Smp.: 77 °C; **R_f** (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.86; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.29 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, -CH₃), 1.43 (s, 9H, t-boc), 2.41-2.54 (m, 2H, -CO-NH-CH₂-CH₂-), 3.30-3.38 (m, 1H, -CH₂-CHH-COO-), 3.44-3.52 (m, 1H, -CH₂-CHH-COO-), 4.23 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, -CH-CH-CONH-), 4.92 (s, 2H, -COO-CH₂-Ar), 5.23 (s, 2H, -Ar-O-CH₂-Ar), 5.54-5.57 (m, 2H, -NH, -COO-CH-CH-), 6.65-6.75 (m, 1H, -NH), 6.97-7.01 (m, 2H, -Ar-H), 7.24-7.46 (m, 11H, -Ar-H), 7.80 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, -Ar-H); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 16.0, 28.2, 33.8, 35.0, 57.6, 66.3, 70.7, 71.0, 80.2, 114.0, 120.5, 120.8, 127.2, 128.2, 128.2, 128.3, 128.5, 128.7, 132.3, 133.6, 135.6, 136.3, 155.5, 157.9, 165.1, 168.9, 171.9; **ESI-MS:** ber. 590.663, gef. 613.17 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₃₃H₃₈N₂O₈: C 67.10, H 6.48, N 4.74; Gef.: C 66.37, H 6.47, N 5.16.

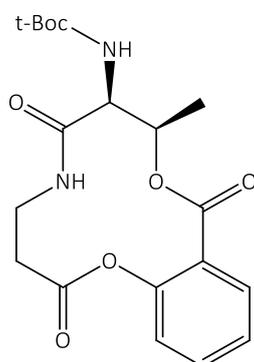
3-(2-[[tert-butoxy]carbonyl]amino)-3-(2-hydroxybenzoyloxy)butanamid)propansäure (22)



Verbindung **21** (1.06 g, 1.80 mmol) wird in 150 ml *i*-PrOH gelöst und Pd/C (10 %) zugegeben. Nach Einleitung von Wasserstoff wird das heterogene Gemisch bei RT und 5 bar für 5 h hydriert. Nach Filtration über Celite® kann der weiße Feststoff ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet werden (43.3 %, 320 mg).

Smp.: 100-104 °C; $^1\text{H NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: 1.37 (s, 9H, t-boc), 1.50 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.36-2.50 (m, 0.4H, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.53.-2.64 (m, 1.6H, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.43-3.54 (m, 1H, $-\text{CHH}-\text{COOH}$), 3.54-3.67 (m, 1H, $-\text{CHH}-\text{COOH}$), 4.37 (d, 0.2H, $J = 9.7$ Hz, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 4.79 (dd, 0.8H, $J = 9.1/6.2$ Hz, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 5.41-5.47 (m, 0.8H, $-\text{COO}-\text{CH}-\text{CH}-$), 5.58 (d, 0.2H, $J = 9.6$ Hz, $-\text{COO}-\text{CH}-\text{CH}-$), 5.60-5.70 (m, 0.8H, $-\text{NH}$), 5.70-5.77 (m, 0.2H, $-\text{NH}$), 6.72 (t, 0.2H, $J = 6.9$ Hz, $-\text{NH}$), 6.86 (t, 0.8H, $J = 7,3$ Hz, $-\text{NH}$), 6.89-6.99 (m, 1H, $-\text{Ar}-\text{H}$), 7.29-7.36 (m, 0.2H, $-\text{Ar}-\text{H}$), 7.37-7.49 (m, 1.8H, $-\text{Ar}-\text{H}$), 7.79 (d, 0.8H, $J = 7.7$ Hz, $-\text{Ar}-\text{H}$), 7.92 (d, 0.2H, $J = 7.4$ Hz, $-\text{Ar}-\text{H}$), 10.58-10.65 (m, 1H, $-\text{OH}$); $^{13}\text{C NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: 16.7, 12.1, 33.5, 34.5, 57.4, 71.8, 81.3, 112.3, 117.6, 119.2, 130.0, 135.9, 156.4, 161.7, 169.1, 169.3, 175.9; **ESI-MS**: ber. 410.418, gef. 433.05 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 409.15 $[\text{M}-\text{H}]^-$; **Anal.** ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8$: C 55.60, H 6.39, N 6.83; Gef.: C 55.62, H 6.34, N 6.97.

N-(8-methyl-2,6,10-trioxo-2,3,4,5,6,7,8,10-octahydro-1,9,5-benzodioxazacyclododecin-7-yl)carbaminsäure-tert-butylester (23)

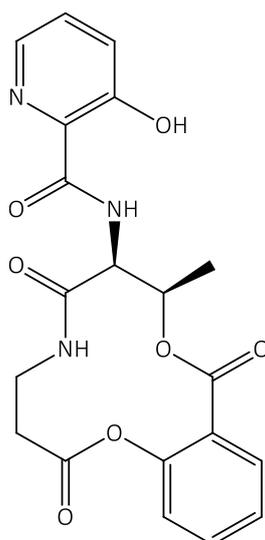


Verbindung **22** (320 mg, 0.78 mmol) wird in 740 ml DCM gelöst und mit Argon geflutet. Nach der Injektion von DIPEA (1.33 ml, 7.80 mmol) wird das Gemisch bei -20 °C für 30 Minuten gerührt. Anschließend wird PyBOP (1.83 g, 3.51 mmol) in 40 ml DCM gelöst und langsam dem Reaktionsgemisch ergänzt. Das Gemisch wird daraufhin langsam auf RT erwärmt und für 5 d

gerührt. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer entfernt und das Produkt chromatographisch gereinigt (CHCl_3). Nach dem Umkristallisieren mit MTBE resultiert das Produkt als weißer Feststoff (14.8 %, 45.1 mg).

Smp.: 201-206 °C (sublimiert bei 179 °C); **R_f** (MTBE): 0.77; **¹H NMR:** (CDCl_3) δ [ppm]: 1.35 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1.44 (s, 9H, t-boc), 2.91 (t, 2H, $J = 5.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 3.43-3.60 (m, 1H, $-\text{OCO}-\text{CHH}-\text{CH}_2-$), 3.72-3.83 (m, 1H, $-\text{OCO}-\text{CHH}-\text{CH}_2-$), 4.33-4.42 (m, 1H, $-\text{NHCO}-\text{CH}-\text{CH}-$), 5.29-5.38 (m, 1H, $-\text{NH}$), 5.45 (td, 1H, $J = 6.2/2.1$ Hz, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{OCO}-$), 6.59 (t, 1H, $J = 6.2$ Hz, $-\text{NH}$), 7.12 (dd, 1H, $J = 8.1/0.7$ Hz, $-\text{Ar}-\text{H}$), 7.35 (dt, 1H, $J = 7.6/0.9$ Hz, $-\text{Ar}-\text{H}$), 7.55 (dt, 1H, $J = 7.8/1.7$ Hz, $-\text{Ar}-\text{H}$), 7.90 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, $-\text{Ar}-\text{H}$); **¹³C NMR:** (CDCl_3) δ [ppm]: 14.5, 28.2, 34.0, 35.8, 56.3, 72.4, 80.5, 123.6, 124.5, 126.5, 132.0, 133.3, 148.4, 154.9, 164.4, 169.1, 170.2; **ESI-MS:** ber. 392.403, gef. 415.09 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺; **Anal.** ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7$: C 58.16, H 6.16, N 7.14; Gef.: C 57.71, H 5.99, N 7.31.

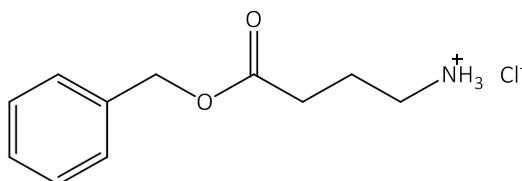
3-Hydroxy-N-(8-methyl-2,6,10-trioxo-2,3,4,5,6,7,8,10-octahydro-1,9,5-benzodioxacyclododecin-7-yl)pyridine-2-carboxamid (24)



Verbindung **23** (40.4 mg, 0.103 mmol) wird in TFA/DCM (160 μl /160 μl) bei 0 °C gelöst und für 30 Minuten gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum bei unter 40 °C entfernt und der Rückstand in 700 μl DMF aufgenommen. Der Rückstand wird anschließend mithilfe von DIPEA unter Eiskühlung neutralisiert. Die erfolgreiche Schutzgruppenspaltung wird mittels ESI-MS bei 293.09 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (ber. 292.29) detektiert. PyBOP (64.3 mg, 0.124 mmol), 3-Hydroxypicolinsäure (28.7 mg, 0.206 mmol) und DIPEA (61 μl , 0.361 mmol) werden in 700 μl DMF gelöst und mit Argon begast. Die freie Base von **23** wird in die Reaktionslösung injiziert. Das schwarze Reaktionsgemisch rührt daraufhin bei RT für 3 d. Nachdem das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt wurde, wird der Rückstand chromatographisch (MTBE) gereinigt. Verbindung **24** resultiert als weißer Feststoff (52.6 %, 22.4 mg).

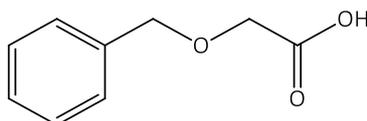
Smp.: 193-197 °C; **R_f** (MTBE): 0.53; **¹H NMR:** (CDCl_3) δ [ppm]: 1.42 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz, $-\text{CH}_3$), 2.87 (t, 0.4 H, $J = 4.3$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CHH}-\text{NHCO}-$), 2.91 (t, 0.6 H, $J = 4.3$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CHH}-\text{NHCO}-$), 2.99-3.08

(m, 1H, -CH₂-CHH-NHCO-), 3.47-3.56 (m, 1H, -OCO-CHH-CH₂-), 2.86-3.95 (m, 1H, -OCO-CHH-CH₂-), 4.80 (dd, 1H, $J = 7.9/4.5$ Hz, -NH-CO-CH-CH-), 5.56-5.63 (m, 1H, -CH-CH-OCO-), 6.60 (bdd, 1H, -NH), 7.15 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, -Ar-H), 7.34-7.42 (m, 3H, -Ar-H), 7.60 (dt, 1H, $J = 7.7/1.6$ Hz, -Ar-H), 8.00 (dd, 1H, $J = 7.8/1.5$ Hz, -Ar-H), 8.12 (dd, 1H, $J = 4.1/1.5$ Hz, -Ar-H), 8.80 (bd, 1H, -NH), 11.70 (bs, 1H, -OH); ¹³C NMR: (CDCl₃) δ [ppm]: 14.6, 34.1, 35.9, 54.5, 71.3, 123.8, 124.0, 126.4, 126.6, 129.1, 130.6, 132.5, 133.7, 139.9, 148.7, 157.8, 164.3, 168.0, 168.6, 170.3; **ESI-MS**: ber. 413.381, gef. 436.21 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₂₀H₁₉N₃O₇: C 58.11, H 4.63, N 10.16; Gef.: C 57.39, H 4.89, N 9.64; **HR-MS**: ber. 414.1301 [M+H]⁺, 436.11197 [M+Na]⁺, 412.1143 [M-H]⁻; Gef.: 414.1294, 436.1112, 412.1149.

7.2.2.3 Synthese der zyklischen, einfach substituierten und Aryl-GABA-Analoga4-(Benzyloxy)-4-oxobutan-1-ammoniumchlorid (1)

Unter Rühren und Eiskühlung erfolgt innerhalb von 30 Minuten die tropfenweise Zugabe von Thionylchlorid (20 ml, 275.7 mmol) zu einer Suspension aus γ -Aminobuttersäure (4 g, 38.8 mmol) in BnOH (50 ml, 480 mmol). Die hellgelbe Lösung wird langsam bis zur Siede erhitzt und 4 h gerührt. Die resultierende Lösung wird auf RT abgekühlt und 50 ml Et₂O ergänzt. Über Nacht fällt in der Kälte ein weißer Feststoff aus, der anschließend filtriert und nochmals mit EtOH/Et₂O (1:1) umkristallisiert wird. Die sich bildenden weißen Kristalle werden filtriert und für ca. 12 h an der Vakuum-Ölpumpe getrocknet (55 %, 4.89 g, berechnet als HCl). Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.⁸⁶

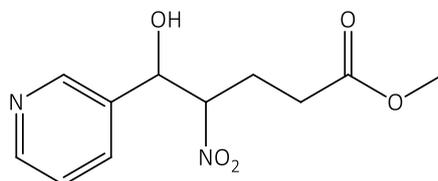
Smp.: 114-116 °C (Lit.: 115-116 °C)⁸⁶; **¹H NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 2.1 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.51 (m, 2H, -COO-CH₂-CH₂), 3.1 (m, 2H, -CH₂-NH₃), 5.08 (s, 2H, -CH₂-COO-), 7.3 (m, 5H, Ar-H), 8.22 (bs, 2H, -NH); **ESI-MS:** ber. 193.24, gef. 194.02 [M+H]⁺.

2-Benzyloxyessigsäure (3a)

In einem mit Thermometer und Rückflusskühler ausgestatteten Dreihalskolben wird unter Argonatmosphäre BnOH (12.5 ml, 120.4 mmol) in 14.5 ml THF gelöst. Anschließend wird KOH (5.06 g, 90.3 mmol) in vier gleichen Teilen (à 1.27 g) zur Reaktionslösung gegeben. Die Temperatur darf dabei maximal 40 °C erreichen. Der hellgelbe Brei wird anschließend mithilfe von einem Eisbad auf 10 °C herab gekühlt. In vier gleichen Portionen erfolgt die schrittweise Zugabe der Bromessigsäure (4.18 g, 30.1 mmol). Das Reaktionsgemisch wird unter Rühren bei 70 °C für 1.5 h erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird Wasser ergänzt und das Produkt mit MTBE extrahiert. Die wässrige Phase wird mit MTBE (4x) gewaschen. Diese organische Phase enthält noch durchschnittlich 3 Äq. BnOH und muss daher separat gesammelt werden. Die wässrige Phase wird anschließend mit konz. HCl angesäuert und mit MTBE (2x) extrahiert. Das Lösungsmittel wird über MgSO₄ getrocknet und am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Das hellgelbe, flüssige Reaktionsprodukt kann ohne weitere Reinigungsschritte für die nachfolgenden Reaktionen verwendet werden (63 %, 3.15 g). Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.⁸⁹

$^1\text{H NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: 4.14 (s, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 4.64 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 7.29-7.37 (m, 5H, $\text{Ar}-\text{H}$), 10.6 (bs, 1H, $-\text{COOH}$); **ESI-MS**: ber. 166.1739, gef. 167.17 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

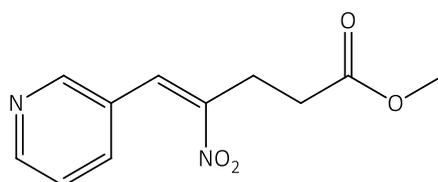
5-Hydroxy-4-nitro-5-(pyridin-3-yl)pentansäuremethylester (25)



In einem Zweihalskolben werden 4-Nitrobutylsäuremethylester (3.6 ml, 28.14 mmol), Nicotinaldehyd (3.96 ml, 42.21 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (16.8 ml, 98.5 mmol) in Toluol gelöst. Das Gemisch wird 16 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer eingengt und der Rückstand ohne weiteren Waschvorgang chromatographisch gereinigt. Ein Fließmittelgemisch aus Heptan/EtOAc (7:3) ermöglicht die Rückgewinnung von nicht umgesetztem 4-Nitrobutylsäuremethylester. Ein anschließender Wechsel des Fließmittelgemischs zu $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9.8:0.2 \rightarrow 9.4:0.6) liefert das gewünschte gelblich, ölige diastereomere Produktgemisch im Verhältnis 8:2 (69 %, 4.93 g).

Rf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1): 0.53; $^1\text{H NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: (Diastereomeregemisch 3:2) 1.66-1.75 (m, 0.7H, $-\text{CHH}-\text{COO}-$), 2.05-2.15 (m, 0.5H, $-\text{CHH}-\text{COO}-$), 2.19-2.47 (m, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$), 3.61/3.62 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 4.74-4.86 (m, 1H, $-\text{CH}-\text{NO}_2$), 5.06 (d, 0.6H, $J = 8.8$ Hz, $-\text{CH}-\text{OH}$), 5.24 (d, 0.4H, $J = 5.5$ Hz, $-\text{CH}-\text{OH}$), 7.29-7.37 (m, 1H, $5'-\text{H}$), 7.76-7.80 (m, 1H, $4'-\text{H}$), 8.37-8.44 (m, 2H, $2'-\text{H}/6'-\text{H}$); **ESI-MS**: ber. 254.2393, gef. 255.15 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 253.17 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$.

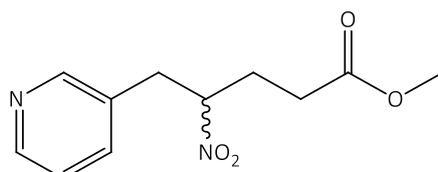
(E)-4-Nitro-5-(pyridin-3-yl)pent-4-ensäuremethylester (27)



In einem ausgeheizten Dreihalskolben werden Verbindung **25** (4.93 g, 19.4 mmol) und wasserfreies NaOAc (1.76 g, 21.5 mmol) vorgelegt und Acetanhydrid (51.3 ml) ergänzt. Die Suspension wird für 30 Minuten auf 100°C erhitzt. Der Rückstand wird auf Eiswasser gegossen und mithilfe von Na_2CO_3 erfolgt eine Alkalisierung auf $\text{pH} = 8$, bis die Gasbildung abgeschlossen ist. Das Produkt wird mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum eingengt. Eine chromatographische Reinigung mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:0 \rightarrow 98:2) liefert das gewünschte braune, ölige Produkt, das aufgrund möglicher Polymerisation im Kühlschrank zu lagern ist (80 %, 3.66 g).¹¹⁷

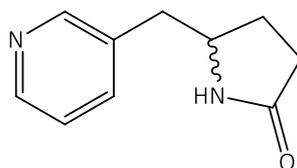
Rf (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.72-0.78; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 2.69 (t, 2H, *J* = 7.47 Hz, -CH₂-COO-), 3.14 (t, 2H, *J* = 7.47 Hz, -C-CH₂-), 3.67 (s, 3H, -CH₃), 7.57 (dd, 1H, *J* = 7.89/4.98 Hz, 5'-H), 7.99-8.01 (m, 1H, 4'-H), 8.06 (s, 1H, -CH-NO₂-), 8.71-8.73 (m (dd), 1H, 6'-H), 8.79 (bd, 1H, 2'-H); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 171.90, 151.86, 149.88, 149.44, 137.23, 130.87, 128.49, 124.10, 77.30, 77.19, 76.98, 76.67, 52.00, 31.56, 22.82; **ESI-MS:** ber. 236.224, gef. 237.07 [M+H]⁺; **Anal.** ber. für C₁₁H₁₂N₂O₄: C 55.93, H 5.12, N 11.86; Gef.: C 55.34, H 5.25, N 12.35.

4-Nitro-5-(pyridin-3-yl)pentansäuremethylester (33)



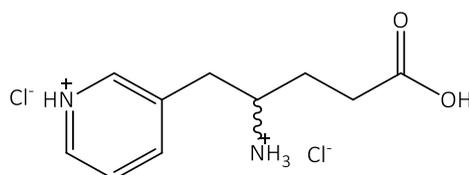
In einem 50ml-Zweihalskolben wird NaBH₄ (690 mg, 18.45 mmol, 2.17 Äq.) in 4.4 ml EtOH und 14 ml Dioxan suspendiert. Verbindung **27** (2 g, 8.5 mmol) wird in 14 ml Dioxan gelöst und langsam (innerhalb von 45 min) zur obigen Suspension getropft, wobei eine Temperatur von max. 30 °C eingehalten werden muss. Nach weiteren 45 Minuten, Endpunktkontrolle erfolgt mittels DC, wird das Reaktionsgemisch mit einem Eis/Wassergemisch verdünnt. Anschließend erfolgt die Zugabe einer 50%igen Essigsäurelösung (~25 ml) bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu beobachten ist. Die saure Lösung wird vorsichtig mit Na₂CO₃ auf einen pH-Wert von pH ≥ 9 eingestellt. Das Produkt wird anschließend mit EtOAc extrahiert (3x) und die vereinten organischen Phasen 3x mit Wasser und 1x mit Brine gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wird das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt und das Produkt (klar, ölig) chromatographisch mit MTBE oder CHCl₃ gereinigt (41 %, 838.7 mg).

Rf (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.61; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 2.39-2.45 (m, 4H, -CH₂-CH₂-COO-), 3.14 (dd, 1H, *J* = 14.5/5.3 Hz, Ar-CHH-CH-), 3.31 (dd, 1H, *J* = 14.5/9 Hz, Ar-CHH-CH-), 3.69 (s, 3H, -CH₃), 4.81-4.88 (m, 1H, -CH-NO₂), 7.60 (ddd, 1H, *J* = 7.9/4.8/0.9 Hz, 5'-H), 8.51 (td, 1H, *J* = 7.9/2.3 Hz, 4'-H), 8.28 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, 2'-H), 8.55 (dd, 1H, *J* = 4.8/1.7 Hz, 6'-H); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 28.6, 29.6, 36.5, 52.1, 87.3, 125.4, 133.5, 139.4, 146.7, 147.7, 172; **ESI-MS:** ber. 238.239, gef. 239.17 [M+H]⁺; **Anal.** ber. für C₁₁H₁₄N₂O₄: C 55.46, H 5.92, N 11.76; Gef.: C 55.33, H 5.84, N 12.18.

5-(Pyridin-3-ylmethyl)pyrrolidin-2-on (35)

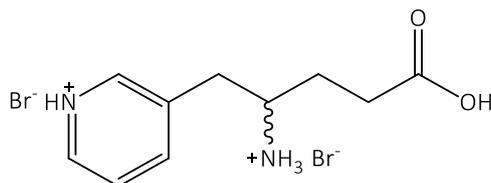
Verbindung **33** (678 mg, 2.85 mmol) wird in einem Autoklaven in 55 ml MeOH (HPLC Reinheit) gelöst. Nach Zugabe von einer Spatelspitze Pd/C (10 %) erfolgt die Einleitung von Wasserstoff bis zu einem Druck von 30 bar. Nach einer Reaktionszeit von 5 h bei RT wird der Katalysator über Celite® filtriert und das Lösungsmittel unter Vakuum einrotiert. Das 5-(Pyridin-3-ylmethyl)pyrrolidin-2-on kann nach chromatographischer Reinigung mithilfe von CHCl₃/MeOH (9:1) als roter Sirup gewonnen werden (76 %, 379 mg). Im Zuge der Optimierung hat sich jedoch die Verwendung des Produktgemischs ohne weitere Reinigungsschritte bewährt.

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.25; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.56-1.65 (m, 1H, -CHH-CH₂CO-), 1.91-2.02 (m, 2H, -CH₂-CO-), 2.12-2.17 (m, 1H, -CHH-CH₂-CO-), 2.89 (dd, 1H, *J* = 13.9/6.9 Hz, -CHH-CH-), 3.03 (dd, 1H, *J* = 13.9/3.3 Hz, -CHH-CH-), 3.95-4.00 (m, 1H, -CH-NH-), 7.20 (dd, 1H, *J* = 7.8/4.9 Hz, 5'-*H*), 7.57 (td, 1H, *J* = 7.8 Hz, 4'-*H*), 8.41-8.42 (m, 2H, 2'-*H*/6'-*H*), 10.6 (bs, 0.5H, -NH); **¹³C NMR:** 20.4, 27.0, 35.4, 59.5, 124.1, 132.9, 139.0, 146.7, 149.3, 170.9.

4-Amino-5-(pyridin-3-yl)pentansäure (37)3-(2-Azaniumyl-4-carboxybutyl)pyridin-1-iumdichlorid

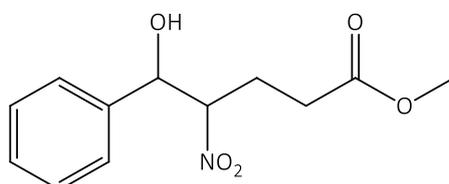
Das Produktgemisch von **35** (200 mg, 1.1 mmol) wird in 7.3 ml einer 25%igen HCl-Lösung suspendiert. Das Gemisch wird anschließend unter Rückfluss für 24 h erwärmt, wobei sich der Feststoff in der Hitze löst. Die wässrige Phase wird daraufhin mit Et₂O gewaschen und am Rotationsverdampfer vorsichtig eingeeengt. Der rotbraune sirupartige Rückstand wird zweimal mit Aceton und einmal mit EtOH umkristallisiert, wobei ein dunkelweißer Feststoff resultiert (7 %, 20 mg, berechnet als Dihydrochlorid).

R_f (Aceton/1-Butanol/Eisessig/Wasser 3.5:3.5:1:2): 0.37 (Detektion mittels Ninhydrin-Lösung); **Smp.:** 204-210 °C; **¹H NMR:** (D₂O) δ [ppm]: 1.87-1.92 (m, 2H, -CH₂-CH₂-), 2.46-2.49 (m, 2H, -CH₂-COO-), 3.18-3.2 (m, 2H, -CH₂-CH-), 3.65-3.72 (m, 1H, -CH-NH₂-), 3.98-8.01 (m, 1H, 5'-*H*), 8.48-8.50 (m, 1H, 4'-*H*), 8.66 (bd, 1H, *J* = 5.6 Hz, 6'-*H*), 8.70 (bs, 1H, 2'-*H*); **ESI-MS:** ber. 194.2304, gef. 195.19 [M+H]⁺; **Anal.** ber. für C₁₀H₁₆Cl₂N₂O₂: C 44.96, H 6.04, Cl 26.54, N 10.49; Gef.: C 44.50, H 5.87, Cl 27.02, N 10.26.

3-(2-Azaniumyl-4-carboxybutyl)pyridin-1-iumdibromid

Das Produktgemisch von **35** (200 mg, 1.1 mmol) wird in 7.3 ml 48%iger HBr suspendiert und 24 h unter Rückfluss erwärmt, wobei sich der Feststoff in der Hitze löst. Nachdem die wässrige Phase mit Et₂O gewaschen wurde, wird diese vorsichtig am Rotationsverdampfer eingengt. Das resultierende braune Öl wird mit Aceton/Et₂OAc (8:1) umkristallisiert, wobei das Produkt als brauner Feststoff isoliert wird (~50 %, 200 mg, berechnet als Dihydrobromid).

R_f (Aceton/1-Butanol/Eisessig/Wasser 3.5:3.5:1:2): 0.37 (Detektion mittels Ninhydrin-Lösung); **Smp.:** 204-210 °C; **¹H NMR:** (D₂O) δ [ppm]: 1.88-1.92 (m, 2H, -CH₂-CH₂-), 2.48-2.50 (m, 2H, -CH₂-COO-), 3.19-3.20 (m, 2H, -CH₂-CH-), 3.67-3.70 (m, 1H, -CH-NH₂-), 7.98-8.02 (m, 1H, 5'-H), 8.50 (bd, 1H, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 8.66 (bd, 1H, *J* = 4.9 Hz, 6'-H), 8.70 (bs, 1H, 2'-H); **¹³C NMR:** (D₂O) δ [ppm]: 26.6, 29.5, 35.0, 51.2, 127.6, 136.4, 140.4, 141.4, 147.9, 176.5; **Anal.** ber. für C₁₀H₁₆Br₂N₂O₂: C 33.73, H 4.53, Br 44.88, N 7.87; Gef.: C 30.76, H 4.11, Br 37.29, N 7.78.

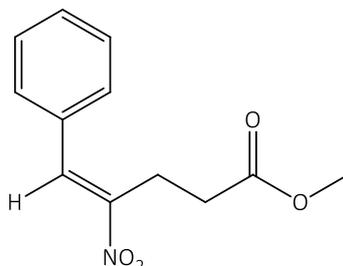
5-Hydroxy-4-nitro-5-phenylpentansäuremethylester (26)

Es werden Benzaldehyd (27.6 ml, 272 mmol) und 4-Nitrobuttersäuremethylester (3.5 ml, 27.2 mmol) in 22 ml MeOH gelöst und auf 0 °C gekühlt. Eine äquimolare Menge NaOH (1.088 g, 27.2 mmol) wird in 2.18 ml H₂O und 22 ml MeOH gelöst. Die Laugenlösung wird langsam zur methanolischen Benzaldehydlösung getropft, wobei eine Temperatur von maximal 5 °C eingehalten werden muss. Anschließend wird das Reaktionsgemisch unter Eiskühlung weitere 30 Minuten gerührt. Zu der entstehenden bräunlichen trüben Lösung wird eine eisgekühlte doppelt molare Menge 20%ige HCl geben (9.9 ml) und das Produkt anschließend mit Et₂O extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten org. Phasen über MgSO₄ wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen und das Produkt mittels Heptan/EtOAc (7:3) chromatographisch gereinigt, wobei ein gelbes Öl isoliert wird (37 %, 2.53 g).

R_f (Heptan/EtOAc 7:3): 0.3; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: (Diastereomeregemisch 2:1) 1.70-1.79 (m, 0.8H, -CHH-COO-), 2.06-2.46 (m, 3.8H, -CHH-COO-, -CH₂-CH₂-COO-), 3.61/3.62 (s, 3H, -CH₃), 4.74-4.84 (m, 1H, -CH-NO₂), 5.03 (d, 0.8H, *J* = 8.8 Hz, -CH-OH), 5.23 (d, 0.4H, *J* = 4.9 Hz, -CH-OH), 7.31-7.43 (m, 5H, *Ar-H*); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 22.9, 25.5, 29.7, 29.9, 51.9, 74.2,

75.5, 91.6, 92.4, 126.1, 126.9, 128.75, 128.79, 129.1, 129.2, 129.4, 138.2, 138.3, 172.0, 172.5;
ESI-MS: ber. 253.095, gef. 276.00 $[M+Na]^+$; **Anal.** ber. für $C_{12}H_{15}NO_5$: C 56.91, H 5.97, N 5.53;
 Gef.: C 57.47, H 5.82, N 5.67.

(E)-4-Nitro-5-phenylpent-4-ensäuremethylester (28)



Dehydratisierung von 26 gemäß Strategie A

In einem ausgeheizten 50ml-Zweihalskolben werden **26** (2.5 g, 9.9 mmol) und wasserfreies NaOAc (0.902 g, 11 mmol) vorgelegt und Acetanhydrid (26.2 ml) ergänzt. Die Suspension wird für 30 Minuten auf 100 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird daraufhin auf Eiswasser gegossen und Na_2CO_3 ergänzt, bis die Gasentwicklung abgeschlossen ist. Das Produkt wird mit EtOAc extrahiert (3x) und die vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet und am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Der gelbe Rückstand muss anschließend 24 h am Hochvakuum trocknen, um mögliche Reste der Essigsäure zu entfernen. Das Produkt kann ohne weitere Reinigung für die nächsten Reaktionsschritte verwendet werden (91 %, 2.1 g).

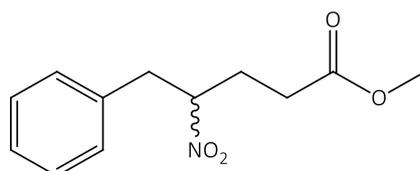
R_f (Heptan/EtOAc 7:3) 0.43; R_f ($CHCl_3$ /MeOH 9:1): 0.79; 1H NMR: ($CDCl_3$) 2.67 (t, 2H, $J = 7.82$ Hz, $-CH_2-COO-$), 3.19 (t, 2H, $J = 7.63$ Hz, $-C-CH_2-$), 3.67 (s, 3H, $-CH_3$), 7.44-7.46 (m, 5H, *Ar-H*), 8.11 (s, 1H, $-CH-NO_2-$); **ESI-MS:** ber. 235.236, gef. 254.08 $[M+H_2O+H]^+$; **Anal.** ber. für $C_{12}H_{13}NO_4$: C 61.27, H 5.57, N 5.95; Gef.: C 61.57, H 5.62, N 6.16.

Henry-Kondensation gemäß Strategie B

Eine Lösung, bestehend aus Benzaldehyd (1.64 ml, 16.2 mmol), 4-Nitrobutansäuremethylester (2 ml, 16.2 mmol) und *n*-Butylamin (81 μ l, 0.05 Äq.) in 9 ml Toluol, wird inklusive Wasserabscheider für 6 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei muss eine Reaktionstemperatur von mind. 140 °C erreicht werden, wobei es zu einer Farbänderung von hellgelb zu dunkelbraun kommt. Der harzartige Rückstand wird anschließend mit 1 M $KHSO_4$ -Lösung und EtOAc aufgenommen und ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit EtOAc extrahiert (3x), die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer eingengt und der dunkelbraune sirupartige Rückstand mithilfe von Heptan/EtOAc (7:3) chromatographisch gereinigt, wobei ein hellgelber Sirup gewonnen wird, der aufgrund möglicher Polymerisation im Kühlschrank zu lagern ist (73 %, 2.77 g).¹¹⁷

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.79; **R_f** (Heptan/EtOAc 7:3): 0.48; **¹H NMR:** (CDCl₃) 2.67 (t, 2H, *J* = 7.82 Hz, -CH₂-COO-), 3.19 (t, 2H, *J* = 7.63 Hz, -C-CH₂-), 3.67 (s, 3H, -CH₃), 7.44-7.46 (m, 5H, *Ar-H*), 8.11 (s, 1H, -CH-NO₂-); **ESI-MS:** ber. 235.2359, gef. 254.08 [M+H₂O]⁺; **Anal.** ber. für C₁₂H₁₃NO₄: C 61.27, H 5.57, N 5.95; Gef. C 61.57, H 5.62, N 6.16.

4-Nitro-5-phenylpentansäuremethylester (34)

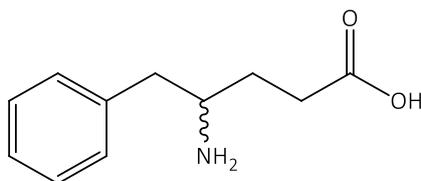


In einem 250-ml Zweihalskolben mit Thermometer und Tropftrichter wird NaBH₄ (919.8 mg, 24.3 mmol, 2.16 Äq.) in 25 ml Dioxan und 8 ml Ethanol suspendiert. Anschließend wird Verbindung **28** (2.64 g, 11.2 mmol), gelöst in 25 ml Dioxan, innerhalb von 45 Minuten zu der Suspension getropft. Dabei muss eine Temperatur von 30 °C eingehalten werden. Das Gemisch rührt anschließend weitere 45 Minuten bei RT. Das Reaktionsgemisch wird daraufhin mit einem Eis-Wassergemisch verdünnt und so lange 50%ige Essigsäure ergänzt, bis die Wasserstoffbildung beendet ist. Nach der Extraktion mit CHCl₃ (3x) werden die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (3x) und Brine (1x) gewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer nach Trocknung über MgSO₄ eingengt. Nach der chromatographischen Reinigung (CHCl₃) wird das Produkt als hellgelbes Öl gewonnen (93.4 %, 2.49 g).

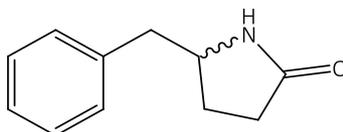
R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.8; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.99-2.07 (m, 2H, -CH₂-COO-), 2.09-2.17 (m, 1H, -CHH-CH₂-), 2.23-2.28 (m, 1H, -CHH-CH₂-), 2.95 (dd, 1H, *J* = 14.3/5.5 Hz, *Ar-CHH-CH*-), 3.13 (dd, 1H, *J* = 14.3/8.8 Hz, *Ar-CHH-CH*-), 3.51 (s, 3H, -CH₃), 4.70-4.77 (m, 1H, -CH-NO₂), 7.06-7.20 (m, 5H, *Ar-H*); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 28.3, 29.9, 40.0, 51.9, 88.7, 127.5, 128.9, 128.9, 135.1, 172.2; **ESI-MS:** ber. 237.2518, gef. 260.20 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₁₂H₁₅NO₄: C 60.75, H 6.37, N 5.9; Gef. C 60.91, H 6.53, N 5.76.

4-Amino-5-phenylpentansäure (32) und 5-Benzylpyrrolidin-2-on (36)

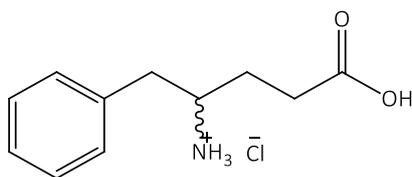
Zu einer Lösung von Verbindung **34** (560 mg, 2.4 mmol, 0.12 M) in 20 ml MeOH (HPLC Reinheit) wird eine Spatelspitze Pd/C (10 %) gegeben. Für die erfolgreiche Isolierung von **32** muss eine Konzentration von **34** von $c \geq 0.12$ M eingehalten werden. Die Suspension wird anschließend in einem Autoklaven überführt und ein Wasserstoffdruck von 20 bar eingestellt. Das heterogene Gemisch rührt bei RT für 24 h. Nach Beendigung der Hydrierung erfolgt die Filtration des Katalysators über Celite® und das Filtrat wird am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Die freie 4-Amino-5-phenylpentansäure (**32**) kann nach Zugabe von einigen Tropfen EtOAc oder Aceton ausgefällt werden. Der sich bildende weiße Feststoff wird abgesaugt (20 %, 95.3 mg). In dem verbleibenden Filtrat befindet sich das quantitativ gebildete Lactam **36**, welches ohne weitere Reinigung für die anschließende Hydrolyse verwendet werden kann (roter Sirup).¹⁸⁰

4-Amino-5-Phenylpentansäure (32)

Smp.: 182 °C (lit: 189-191.5 °C)^{181,182}; **¹H NMR:** (D₂O) δ [ppm]: 1.81-1.87 (m, 2H, -CH₂-CH₂-), 2.28 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-COO-), 2.79 (dd, 1H, *J* = 14.3/8.4 Hz, -CHH-CH-), 3.02 (dd, 1H, *J* = 14.3/5.7 Hz, -CHH-CH-), 3.43-3.5 (m, 1H, -CH-NH₂-), 7.23-7.36 (m, 5H, *Ar-H*); **¹³C NMR:** (D₂O) δ [ppm]: 28.6, 33.6, 38.1, 53.2, 127.5, 129.1, 129.4, 135.8, 181.3; **ESI-MS:** ber. 193.242, gef. 194.07 [M+H]⁺, 192.25 [M-H]⁻. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^{138,181}

5-Benzylpyrrolidin-2-on (36)

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.22-0.36; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.67-1.76 (m, 1H, -CHHCH₂CO-), 1.92-2.02 (m, 2H, -CH₂-CO-), 2.13-2.20 (m, 1H, -CHH-CH₂-CO-), 2.83 (dd, 1H, *J* = 13.5/7.8 Hz, -CHH-CH-), 3.17 (dd, 1H, *J* = 13.4/2.6 Hz, -CHH-CH-), 3.97-4.02 (m, 1H, -CH-NH-), , 6.14 (bs, 1H, -NH), 7.15-7.29 (m, 5H, *Ar-H*); **ESI-MS:** bef. 175.227, gef. 176.19 [M+H]⁺, 198.03 [M+Na]⁺. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^{181,183}

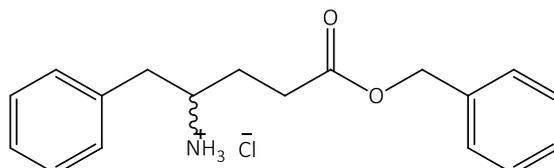
4-Carboxy-1-phenylbutan-2-ammoniumchlorid (38)

In einem Rundkolben wird Verbindung **36** (2.58 g, 14.7 mmol) in 98 ml einer 25%igen HCl-Lösung emulgiert. Das Reaktionsgemisch wird bei 110 °C für 18 h gekocht, wobei eine bräunliche Lösung entsteht. Diese anschließend auf RT abgekühlte Lösung wird mit Et₂O gewaschen und die saure Wasserphase am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Der weißlich, braune Rückstand wird mit Aceton umkristallisiert. Die milchig trübe Lösung wird über eine Fritte abgesaugt und der resultierende weiße Feststoff im Exsikator über Nacht getrocknet. (68.7 %, 2.32 g, berechnet als HCl).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1; Ninhydrin): 0.07; **MP:** 148-150 °C; **¹H NMR:** (D₂O) δ [ppm]: 1.88-1.93 (m, 2H, -CH₂-CH₂-), 2.48 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-COO-), 2.83 (dd, 1H, *J* = 14.3/8.1 Hz, -CHH-CH-),

3.00 (dd, 1H, $J = 14.3/6.2$ Hz, -CHH-CH-), 3.52-3.57 (m, 1H, -CH-NH₃-), 7.24-7.37 (m, 5H, Ar-H); ¹³C NMR: (D₂O) δ [ppm]: 27.1, 29.8, 37.9, 52.4, 127.6, 129.1, 129.4, 135.5, 176.9; **ESI-MS**: ber. 193.2423, gef. 193.99 [M+H]⁺; **Anal.** ber. für C₁₁H₁₆ClNO₂: C 57.52, H 7.02, Cl 15.43, N 6.1; Gef.: C 57.31, H 6.80, Cl 15.76, N 6.09. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^{138,181}

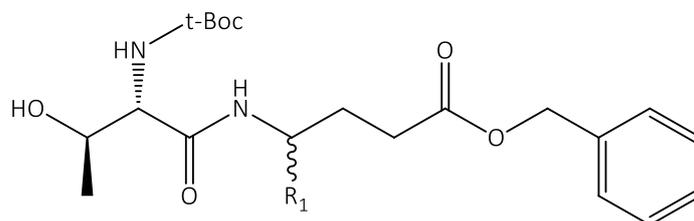
5-(Benzyloxy)-5-oxo-1-phenylpentan-2-ammoniumchlorid (40)



In einem mit Tropftrichter und Rückflusskühler versehenen Rundkolben werden **38** (1.64 g, 7.11 mmol) und **32** (308 mg, 1.59 mmol) in BnOH (11.14 ml, 107.65 mmol) suspendiert. Unter Rühren und Eiskühlung erfolgt die tropfenweise Zugabe von Thionylchlorid (4.5 ml, 62 mmol). Anschließend wird das Gemisch 4 h unter Rückfluss erwärmt, wobei sich der weiße Feststoff löst und in eine gelbliche Lösung übergeht. Nach Abkühlen auf RT wird Et₂O ergänzt und die eintretende Kristallisation in der Kälte abgeschlossen. Der weiße Feststoff wird filtriert und mit Et₂O/EtOH (1:1) umkristallisiert, wobei eine milchig trübe Lösung entsteht, aus der sich das Produkt als weißer Feststoff abfiltrieren lässt (79.6 %, 2.21 g, berechnet als HCl).

R_f (CHCl₃/MeOH/TEA 89:10:1): 0.65; **MP**: 161-163 °C; ¹H NMR: (CDCl₃) δ [ppm]: 2.01-2.06 (m, 2H, -CH₂-CH₂-), 2.55-2.69 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO-CH₂-), 2.93 (dd, 1H, $J = 13.7/8.60$ Hz, Ar-CHH-CH-), 3.23 (dd, 1H, $J = 13.7/5.5$ Hz, Ar-CHH-CH-), 3.56-3.61 (m, 1H, -CH-NH₂), 5.02 (s, 2H, -COO-CH₂-Ar), 7.2-7.33 (m, 10H, Ar-H), 8.53 (bs, 3H, -NH); ¹³C NMR: (D₂O) δ [ppm]: 27.1, 29.9, 37.9, 52.2, 67.2, 127.5, 128.4, 128.7, 128.83, 129.08, 129.3, 135.47, 135.50, 174.5; **ESI-MS**: ber. 283.36, gef. 284.10 [M+H]⁺; **Anal.** ber. für C₁₈H₂₂ClNO₂: C 67.6, H 6.93, Cl 11.09, N 4.38; Gef.: C 67.1, H 6.792, N 4.312.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Amidierung von *N*-Boc-*L*-Thr-OH mit den entsprechenden GABA-Analoga



Tab. 16: Auflistung der synthetisierten Produkte gemäß AAV 1

#	R ₁	Ausbeute [%]
2	-H	98
41	-CH ₂ Ar	87

In einem Rundkolben werden DIPEA, *N*-Boc-*L*-Thr-OH, PyBOP und das entsprechende benzylierte GABA-Derivate gemischt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in DCM gelöst und bei RT für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand mit EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wird mit 1 M KHSO₄ (3x), mit Wasser (1x), 5 %ige NaHCO₃-Lösung und mit Brine (je 3x) gewaschen. Die Ethylacetatphase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wird chromatographisch mithilfe von CHCl₃ gereinigt.

4-(2-((*Tert*-butoxy)carbonylamino)-3-hydroxybutanamino)butansäurebenzylester (2)

Gemäß AAV 1 werden DIPEA (13.0 ml, 76.45 mmol), *N*-Boc-*L*-Thr-OH (5.54 g, 25.3 mmol), PyBOP (14.87 g, 28.6 mmol) und Verbindung **1** (4.89 g, 21.3 mmol) gemischt. Dem Reaktionsgemisch werden 360 ml DCM ergänzt. Die Lösung wird bei RT für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand mit EtOAc aufgenommen. Die anschließende Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 1. Das zurückbleibende hellbraune Öl wird chromatographisch mit CHCl₃ gereinigt, wodurch das Produkt (siehe Tab. 16) als hellgelber viskoser Sirup gewonnen wird (98 %, 8.28 g).

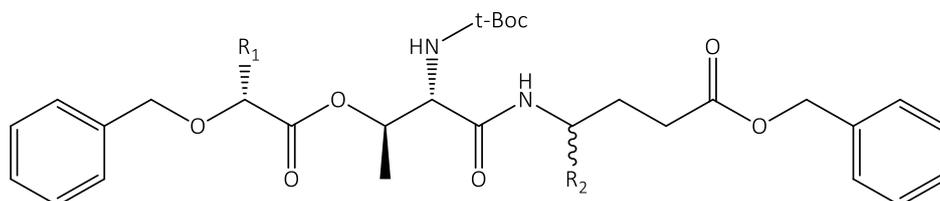
R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.6-0.65; ¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 1.16 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz, -CH₃), 1.44 (s, 9H, *t*-Bu), 1.82-1.85 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.4 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, -CH₂-COO-), 3.2-3.36 (m, 2H, -NH-CH₂-), 3.98 (d, 2H, *J* = 6.85 Hz, -CH-CO-NH-), 4.34 (dq, 1H, *J* = 6.3/2.1 Hz, CH₃-CH-CH-), 5.1 (s, 2H, -COO-CH₂-Ar), 5.5 (d, 1H, -NH), 6.78 (bs, 1H, -NH), 7.31-7.37 (m, 10H, Ar-H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 18.3, 24.5, 28.3, 31.5, 38.7, 57.9, 66.4, 66.6, 80.4, 128.2, 128.3, 128.6, 135.8, 156.6, 171.8, 172.9; **ESI-MS**: ber. 394.462, gef. 417.06 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₂₀H₃₀N₂O₆: C 60.9; H 7.67; N 7.1; Gef.: C 60.43, H 7.80, N 7.10.

4-(2-(((tert-butoxy)carbonylamino)-3-hydroxybutanamido)-5-phenylpentansäurebenzylester (41)

Gemäß AAV 1 werden DIPEA (4.33 ml, 25.49 mmol), *N*-Boc-*L*-Thr-OH (1.84 g, 8.4 mmol) und PyBOP (4.96 g, 9.54 mmol) in 120 ml DCM gelöst. Anschließend wird Verbindung **40** (2.28 g, 7.12 mmol) ergänzt und das Gemisch bei RT für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand mit EtOAc aufgenommen. Die anschließende Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 1. Der sirupartige Rückstand wird mit CHCl₃ chromatographisch gereinigt, wobei ein weißer Feststoff gewonnen wird (87 %, 3.02 g, vergleiche Tab. 16).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.83; **MP**: 115-118 °C; **¹H NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 1.03 (d, 1.5H, *J* = 6.4 Hz, -CH₃), 1.08 (d, 1.5H, *J* = 6.5 Hz, -CH₃), 1.43 (2s, 9H, *t*-Boc), 1.64-1.74(m, 1H, -CHH-CH₂-), 1.89-1.98 (m, 1H, -CHH-CH₂-), 2.36-2.43 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO-), 2.76-2.8 (dd, 2H, *J* = 16.1/6.9 Hz, -CH-CH₂-Ar), 3.90 (dd, 0.5H, *J* = 8.1/2.2 Hz, -CH-CO-NH-), 3.92-3.94 (m, 0.5H, -CH-CO-NH-), 4.16-4.3 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar, -CH-CH₃), 5.09 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz, -CH₂-Ar), 5.39 (2 bd, 1H, -OH/NH), 6.48 (bt, 1H, -NH), 7.15-7.37 (m, 10H, *Ar*-H); **¹³C NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 18.3, 28.2, 28.3, 29.1, 29.2, 30.9, 31.0, 41.3, 41.4, 49.9, 50.0, 66.39, 66.4, 66.6, 80.3, 126.62, 128.20, 128.22, 128.23, 128.3, 128.4, 128.5, 128.52, 129.27, 129.3, 135.78, 135.8, 137.5, 156.5, 171.3, 173.0, 173.1; **ESI-MS**: ber. 484.5845, gef. 507.03 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₂₇H₃₆N₂O₆: C 66.92, H 7.49, N 5.78; Gef.: C 66.92, H 7.36, N 5.82.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Kettenverlängerung – Veresterung mit den entsprechenden Glykolsäurederivaten



Tab. 17: Auflistung der synthetisierten Produkte gemäß AAV 2

#	R ₁	R ₂	Ausbeute [%]
4a	-H	-H	70
4b	-CH ₃	-H	58
42	-H	-CH ₂ Ar	48
43*	-CH ₃	-CH ₂ Ar	63

*hier gilt eine abweichende Vorschrift

In einem Rundkolben mit Innenthermometer werden entweder 2-Benzyloxyessigsäure (**3a**) oder (*R*)-(+)-2-Benzyloxypropionsäure (**3b**) und DIPEA oder TEA in DCM gelöst, mit Argon begast und anschließend auf -20 °C gekühlt. Dem Reaktionsgemisch werden entweder Verbindung **2** oder **41**, gelöst in DCM, ergänzt. Die resultierende Lösung rührt bei -20 °C für 15 min. Währenddessen wird PyBOP in DCM gelöst und nach Ablauf der Reaktionszeit langsam in das Reaktionsgemisch injiziert, welches daraufhin bei RT für 5-18 h rührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit werden gegebenenfalls wenige Mengen DCM ergänzt. Die organische Phase wird mit 1 M KHSO₄ (3x), 5 %ige NaHCO₃-Lösung (1x) und mit Brine (je 3x) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer eingengt und der Rückstand chromatographisch mit CHCl₃ oder MTBE gereinigt.

4-(3-{[2-(Benzyloxy)acetyl]oxy}-2-[[tert-butoxy]carbonyl]amino}butanamido)butansäurebenzylester (4a)

Gemäß AAV 2 wird ein Gemisch bestehend aus Verbindung **3a** (1.41 g, 8.5 mmol) und DIPEA (2.17 ml, 12.8 mmol) in 4 ml DCM gelöst, mit Argon begast und auf -20 °C gekühlt. Verbindung **2**, gelöst in 10 ml DCM, wird zur oben genannten Lösung gegeben, welche anschließend bei -20 °C für 15 min rührt. Währenddessen wird PyBOP (4.42 g, 8.8 mmol) ebenfalls in 4 ml DCM gelöst und nach Ablauf der Reaktionszeit in das Reaktionsgemisch injiziert. Dieses Gemisch rührt bei RT für 5 h. Die anschließende Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 2. Nach einer chromatographischen Reinigung des gelben Rückstands mit CHCl₃ wird ein farbloser Sirup gewonnen, der im Kühlschrank langsam erstarrt (70 %, 3.26 g, vergleiche Tab. 17).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.69; **¹H NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 1.25 (d, 3H, *J* = 6.25 Hz, -CH₃), 1.41 (s, 9H, *t*-Bu), 1.72-1.79 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.32 (m, 2H, -CH₂-COO-), 3.11-3.27 (m, 2H, -NH-CH₂-), 4.04 (d, 2H, *J* = 1.24 Hz, -O-CH₂-COO-), 4.27-4.28 (bd, 1H, -CH-CO-NH-), 4.54 (d, 2H, *J* = 1.24 Hz, -O-CH₂-Ar), 5.06 (s, 2H, -COO-CH₂-Ar), 5.41-5.45 (m, 1H, CH₃-CH-O-), 5.49 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, -NH), 6.83 (bt, 1H, -NH), 7.26-7.31 (m, 10H, *Ar*-H); **¹³C NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 16.2, 24.4, 28.3, 31.9, 39.0, 57.6, 66.4, 67.3, 70.7, 73.3, 80.5, 127.99, 128.07, 128.2, 128.3, 128.5, 128.6, 135.8, 137.0, 155.7, 168.8, 169.0, 173.0; **ESI-MS**: ber.: 542.6206, gef.: 565.04 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₂₉H₃₈N₂O₈: C 64.19, H 7.06, N 5.16; Gef.: C 63.44, H 7.17, N 4.90.

4-[(2S,3R)-3-[(2R)-2-(benzyloxy)propanoyloxy]-2-[(tert-butoxy)carbonylamino]butanamido]butansäurebenzylester (4b)

Gemäß AAV 2 wird ein Gemisch bestehend aus Verbindung **3b** (458 mg, 2.54 mmol) und DIPEA (648 µl, 3.81 mmol) in 1.2 ml DCM gelöst und unter Argonatmosphäre auf -20 °C gekühlt. Verbindung **2** (1 g, 2.54 mmol) wird ebenfalls in 1.2 ml DCM gelöst und dem Reaktionsgemisch ergänzt, welches daraufhin bei -20 °C für 15 min rührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird PyBOP (1.32 g, 2.54 mmol) ergänzt, welches sich erst bei RT löst. Das Reaktionsgemisch rührt bei RT über Nacht. Nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgt eine Verdünnung des Gemisches mit DCM. Die Aufarbeitung wird anschließend gemäß AAV 2 durchgeführt. Eine chromatographische Reinigung mit CHCl₃ und Heptan/EtOAc 7:3 liefert das gewünschte Produkt (siehe Tab. 17) als weißen Feststoff (58 %, 815 mg).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.86; **Smp.**: 104 °C; **¹H NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 1.2 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, -CH₃), 1.32 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, -CH₃), 1.38 (s, 9H, *t*-Boc), 1.75 (qui, 2H, *J* = 7.1 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.33 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, -CH₂-COO-), 3.1 (m, 1H, -NH-CHH-), 3.26 (m, 1H, -NH-CHH-), 4.03 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz, -O-CH-CH₃-), 4.22 (bd, 1H, -NH-CH-CH-), 4.43 (d, 1H, *J* = 11.6 Hz, -CHH-Ar-), 4.61 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz, -CHH-Ar-), 5.10 (s, 2H, -COO-CH₂-Ar-), 5.33 (bd, 1H, NH), 5.45 (m, 1H, CH₃-CH-CH-), 6.41 (m, 1H, -NH), 7.31-7.36 (m, 10H, *Ar*-H); **¹³C NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 16.2, 18.6, 24.4, 28.2, 31.5, 38.9, 57.6, 66.4, 70.4, 71.8, 74.2, 80.5, 127.7, 127.9, 128.2, 128.3, 128.48, 128.54, 135.8, 137.4, 155.7, 168.8, 171.8, 172.9; **ESI-MS**: ber.: 556.647, gef.: 579.14 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₃₀H₄₀N₂O₈: C 64.73, H 7.24, N 5.03; Gef.: C 64.89, H 7.07, N 5.00.

4-[(2R,3R)-3-[[2-(benzyloxy)acetyl]oxy]-2-[(tert-butoxy)carbonylamino]butanamido]-5-phenylpentansäurebenzylester (42)

Gemäß AAV 2 wird ein Gemisch bestehend aus Verbindung **3a** (267 mg, 1.49 mmol) und TEA (721 µl, 5.2 mmol, 3.5 Äq. zur Säure) in 20 ml DCM gelöst. Unter Argonatmosphäre wird das Gemisch auf -20 °C gekühlt. Daraufhin wird Verbindung **41** (652.9 mg, 1.35 mmol), gelöst in 15 ml DCM, ergänzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit bei -20 °C für 15 min wird das zuvor in einem separaten Spitzkolben gelöste PyBOP (913 mg, 1.76 mmol, 15 DCM) langsam zum Reaktionsansatz getropft. Das Gemisch wird schrittweise auf RT erwärmt und für 18 h gerührt. Anschließend wird die Lösung mit DCM verdünnt und die organische Phase gemäß AAV 2 gewaschen und aufgearbeitet. Eine abschließende chromatographische Reinigung mit

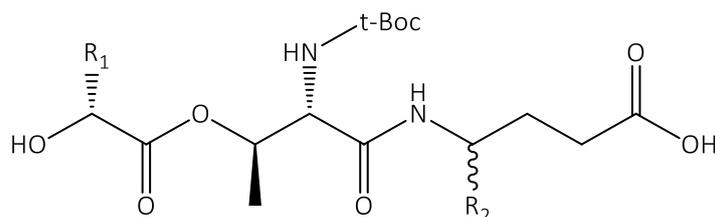
MTBE liefert das gewünschte Produkt als weißen Feststoff, wobei es als Diastereomeren-gemisch vorliegt (48 %, 408 mg, vergleiche Tab. 17).

R_f (MTBE): 0.81; **Smp.:** 90-100 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: Diastereomeren-gemisch (1:1): 1.05 (d, 1.4H, *J* = 6.2 Hz, -CH₃), 1.23 (d, 1.2H, *J* = 6.5 Hz, -CH₃), 1.45 (2s, 9H, *t*-Boc), 1.55-1.65 (m, 1H, -CHH-CH₂-), 1.83-1.9 (m, 1H, -CHH-CH₂-), 2.26-2.35 (m, 1H, -CH₂-CHH-COO-), 2.38 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-CHH-COO-), 2.64 (dd, 0.4H, *J* = 13.7/7.1 Hz, -CH-CHH-Ar), 2.72-2.79 (d/dd, 1.4H, *J* = 6.7 Hz, *J* = 13.7/6.1 Hz, -CH-CHH-Ar), 3.97-4.5 (m, 2H, -O-CH₂-COO-), 4.10-4.24 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar, -CH-NH-CO-), 4.51-4.60 (m, 2H, -O-CH₂-), 5.09 (2s, 2H, -CH₂-Ar), 5.28 (2bd, 0.8H, NH), 5.33-5.43 (m, 1H, -CH-OCO-), 6.2 (2bd, 1H, -NH), 7.12-7.36 (m, 15H, *Ar*-H); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 15.7, 16.1, 28.2, 28.3, 28.5, 29.1, 30.9, 41.08, 41.1, 50.3, 50.5, 66.4, 66.5, 67.2, 67.3, 70.55, 70.6, 73.29, 73.3, 76.8, 77.0, 77.2, 77.3, 80.5, 126.61, 126.64, 128.06, 128.1, 128.2, 128.27, 128.3, 128.4, 128.48, 128.49, 128.5, 128.5, 129.3, 135.7, 135.8, 136.9, 137.35, 137.4, 155.6, 168.4, 168.8, 173.2; **ESI-MS:** ber. 632.74, gef. 655.32 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₃₆H₄₄N₂O₈: C 68.34, H 7.01, N 4.43; Gef.: C 68.32; H 7.42; N 4.35.

4-(3-[[2-(benzyloxy)propanoyl]oxy]-2-[[tert-butoxy]carbonyl]amino]butanamido)-5-phenyl-pentansäurebenzylester (43)

Gemäß AAV 2 wird zu einer Lösung, bestehend aus Verbindung **3b** (1.23 g, 6.84 mmol) und DIPEA (3.7 ml, 27.8 mmol) in 50 ml DCM, bei -20 °C unter Argonatmosphäre Verbindung **41** (3.02 g, 6.23 mmol, gelöst in 50 ml DCM) ergänzt. Das Gemisch rührt bei -20 °C für 15 min. Anschließend erfolgt die tropfenweise Zugabe von in 50 ml DCM gelöstem PyBOP (3.56 g, 6.84 mmol). Die Lösung wird schrittweise auf RT erwärmt und bei selbiger Temperatur gerührt, wobei mittels DC der Endpunkt der Reaktion detektiert wird (4-6 d). Das Reaktions-gemisch wird mit DCM verdünnt und gemäß AAV 2 aufgearbeitet. Eine anschließende chro-matographische Reinigung (CHCl₃) liefert das gewünschte Produkt als weißen Feststoff, wobei das Produkt als diastereomeres Gemisch vorliegt. (63 %, 3.89 g, vergleiche Tab. 17).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.92; **Smp.:** 120-124 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: Diastereomeren-gemisch (1:1): 1.06 (d, 1.1H, *J* = 6.4 Hz, -CH₃), 1.23 (d, 1.8H, *J* = 6.5 Hz, -CH₃), 1.35 (d, 1.9H, *J* = 6.9 Hz, -CH₃), 1.39 (d, 1.1H, *J* = 6.9 Hz, -CH₃), 1.42 (s, 3.9H, *t*-boc), 1.45 (s, 5.6H, *t*-boc), 1.52-1.62 (m, 1H, -CHH-CH₂-), 1.79-1.89 (m, 1H, -CHH-CH₂-), 2.28-2.39 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO-), 2.54 (dd, 0.6H, *J* = 13.6/7.5 Hz, -CH-CH₂-Ar), 2.71-2.78 (m, 1.4H, -CH-CH₂-Ar), 4.0 (dq, 1H, *J* = 6.7 Hz, -CH-CH₃), 4.06-4.24 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar, -CH-NH-CO-), 4.43 (2d, 1H, *J* = 11.6 Hz, -OCHH-), 4.6 (2d, 1H, *J* = 11.5 Hz, *J* = 11.6 Hz, -OCHH-), 5.08 (2s, 2H, -CH₂-Ar), 5.3-5.41 (m/dd, 2H, *J* = 6.4/4.3 Hz, -NH, -CH-OCO-), 6.16-6.24 (2d, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 8.5 Hz, -NH), 7.09-7.37 (m, 15H, *Ar*-H); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 15.8, 16.1, 18.6, 28.2, 28.3, 28.3, 29.1, 30.9, 31.0, 41.1, 41.2, 50.3, 50.6, 57.7, 57.9, 66.4, 70.2, 71.9, 71.9, 74.1, 74.2, 80.4, 126.6, 126.6, 127.0, 127.8, 127.9, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.3, 128.5, 128.5, 128.5, 128.6, 128.6, 129.3, 129.3, 135.8, 137.4, 155.7, 168.4, 168.5, 171.8, 171.9, 173.1, 173.1; **ESI-MS:** ber. 646.769, gef. 669.25 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₃₇H₄₆N₂O₈: C 68.71, H 7.17, N 4.33; Gef.: C 68.49, H 7.23, N 4.37.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Benzylschutzgruppenspaltung – Hydrogenolyse

Tab. 18: Auflistung der synthetisierten Produkte gemäß AAV 3

#	R ₁	R ₂	Ausbeute [%]
5a	-H	-H	97
5b	-CH ₃	-H	93
44*	-H	-CH ₂ Ar	78
45	-CH ₃	-CH ₂ Ar	79

*hier gilt eine abweichende Vorschrift

In einem Autoklaven wird das entsprechende Depsipeptid in MeOH (HPLC-Reinheit) oder *i*-PrOH (p.a) gelöst und Pd/C (10 %) ergänzt. Das heterogene Gemisch rührt anschließend bei RT bei einem Wasserstoffdruck von 4 bar für 24 h. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch über Celite® filtriert, mit MeOH oder *i*-PrOH gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das gewonnene Produkt kann ohne weitere Aufarbeitung für nachfolgende Synthesen und als Testsubstanz eingesetzt werden.

4-(2-[(Tert-butoxy)carbonyl]amino)-3-[(2-hydroxyacetyl)oxy]butanamido)butansäure (5a)

Gemäß AAV 3 wird **4a** (500 mg 0.92 mmol) in 60 ml MeOH gelöst und hydriert. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels wird das Produkt (siehe Tab. 18) als klarer Sirup gewonnen (97 %, 267.5 mg).

¹H NMR: (CDCl₃) δ [ppm]: (CDCl₃) δ [ppm]: 1.25-1.26 (m, 3H, -CH₃), 1.42 (s, 9H, -*t*-Boc), 1.79-1.86 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.33-2.36 (m, 2H, -CH₂-COO-), 3.27-3.3 (m, 2H, -NH-CH₂-), 4.14-4.15 (m, 2H, -O-CH₂-COO-), 4.32 (bd, 1H, -NH-CH-CH-), 5.43-5.5 (m, 1H, CH₃-CH-CH-), 5.86 (bd, 1H, -NH) 7.4 (bd, 1H, -NH/OH); ESI-MS: ber. 362.38, gef. 385.16 [M+Na]⁺, 361.06 [M-H]⁻; Anal. ber. für C₁₅H₂₆N₂O₈: C 49.72, H 7.23, N 7.73; Gef.: C: 49.54, H 7.44, N: 8.08.

4-(2-[(Tert-butoxy)carbonyl]amino)-3-[(2-hydroxypropanoyl)oxy]butanamido)butansäure (5b)

Gemäß AAV 3 wird **4b** (1.78 g, 3.2 mmol) in 60 ml MeOH gelöst und hydriert. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels wird das Reaktionsprodukt (siehe Tab. 18) als weißer Feststoff isoliert (93 %, 1.12 g).

Smp.: 96-97 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.16-1.22 (m, 3H, -CH₃), 1.22-1.28 (m, 3H, -CH₃), 1.30 (s, 9H, -*t*-Boc), 1.67-1.76 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.24-2.3 (m, 2H, -CH₂-COO-), 3.07-3.27 (m, 2H, -NH-CH₂-), 4.13-4.22 (m, 1H, HO-CH-CH₃), 4.3 (bd, 1H, -NH-CH-CH-), 5.25 (bs, 1H, -CH₃-CH-CH-), 6.15 (bd, 1H, -NH/OH), 7.4 (bd, 1H, -NH/OH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 16.6, 20.2, 24.1, 28.3, 31.1, 38.9, 57.8, 67.3, 71.5, 80.8, 156.3, 169.8, 174.3, 176.9; **ESI-MS:** ber. 376.40, gef. 399.07 [M+Na]⁺, 375.13 [M-H]⁻; **Anal.** ber. für C₁₆H₂₈N₂O₈: C 51.05, H 7.5, N 7.44; **Gef.:** C 51.45, H 7.57, N 7.57.

4-(2-(((Tert-butoxy)carbonyl)amino)-3-((2-hydroxyacetyl)oxy)butanamido)-5-phenylpentansäure (44)

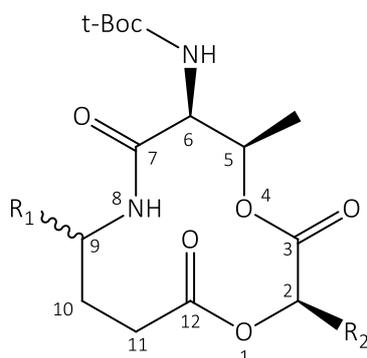
Gemäß AAV 3 wird **42** (316 mg, 0.5 mmol) in 60 ml *i*-PrOH gelöst und hydriert. Das Filtrat muss anschließend chromatographisch gereinigt werden (MTBE/EtOH: 100:0 → 50:50). Das Produkt wird schlussendlich als weißer Feststoff isoliert (78 %, 332 mg).

Smp.: 123-125 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.15-1.30 (m, 3H, -CH₃), 1.45 (s, 9H, *t*-Boc), 1.60-1.80 (2m, je 1H, -CH-CH₂-CH₂-), 2.14-2.26 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO-), 2.68-2.84 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar), 4.04-4.35 (m, 4H, HO-CH₂-COO-, -CH-CH₂-Ar, -CH-NH-CO-), 5.37-5.61 (m, 0.6H, -NH), 7.12-7.29 (m, 5H, *Ar*-H); **¹³C NMR:** (CD₃OD) δ [ppm]: 15.6, 15.8, 27.3, 31.9, 32.1, 40.5, 50.5, 59.8, 70.98, 71.0, 79.7, 125.9, 126.0, 127.95, 127.98, 128.93, 138.1, 170.14, 170.16, 171.8, 172.1; **ESI-MS:** ber. 452.22, gef. 475.15 [M+Na]⁺, 451.18 [M-H]⁻; **HR-MS** ber. 475.2056 [M+Na]⁺, 451.2079 [M-H]⁻; **Gef.:** 475.2050; 451.2081.

4-(2-(((tert-butoxy)carbonyl)amino)-3-((2-hydroxypropanoyl)oxy)butanamido)-5-phenylpentansäure (45)

Gemäß AAV 3 wird **43** (450 mg, 0.70 mmol) in 45 ml *i*-PrOH gelöst und hydriert. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels wird das Reaktionsprodukt als weißer Feststoff gewonnen (79 %, 256 mg, vergleiche Tab. 18).

Smp.: 111-114 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.12 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz, -CH₃), 1.24 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz, -CH₃), 1.37 (dd, 3H, *J* = 14.6/7.0 Hz, -CH₃), 1.45 (s, 9H, -*t*-Boc), 1.63-1.77 (m, 1H, -CH-CHH-CH₂-), 1.77-1.93 (m, 1H, -CH-CHH-CH₂-), 2.25-2.40 (m, 2H, CH₂-CH₂-COOH), 2.68-2.88 (m, 2H, -CH₂-Ar), 4.07-4.34 (m, 3H, -CONH-CH-; -CH-CH-CONH-; CH₃-CH-COO-), 5.30-5.37 (m, 1H, -COO-CH-CH-), 5.55-5.61 (m, 1H, -NH), 5.83-5.88 (m, 1H, -NH), 6.60-6.65 (m, 1H, -OH), 6.72-6.78 (m, 1H, -OH), 7.12-7.29 (m, 5H, *Ar*-H); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 16.3, 16.6, 20.3, 20.5, 28.3, 28.9, 30.7, 30.8, 41.1, 41.3, 50.5, 50.9, 57.9, 58.0, 59.8, 67.1, 67.3, 71.2, 71.3, 80.8, 80.9, 126.6, 126.6, 128.5, 128.5, 129.3, 129.4, 137.4, 137.4, 156.2, 168.8, 169.1, 173.9, 174.4, 176.9, 177.1; **ESI-MS** ber.: 466.52, gef.: 489.18 [M+Na]⁺, 465.16 [M-H]⁻; **Anal.** ber. für C₂₃H₃₄N₂O₈: C 59.21, H 7.35, N 6.00; **Gef.:** C 58.64, H 7.06, N 6.17.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV 4): Finaler Ringschluss

Tab. 19: Auflistung der synthetisierten Produkte gemäß AAV 4

#	R ₁	R ₂	Gesamtausbeute [%]
6a	-H	-H	20
6b	-H	-CH ₃	26
46*	-CH ₂ Ar	-H	41
47*	-CH ₂ Ar	-CH ₃	44

* hier gilt eine abweichende Vorschrift

Die gesamte Reaktion läuft unter Argonatmosphäre ab. Das entsprechende hydrierte Produkt aus AAV 3 wird in DCM gelöst. Anschließend wird DIPEA injiziert, das Gemisch auf -20 °C gekühlt und 15 min gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird in DCM gelöstes PyBOP langsam ergänzt und das Reaktionsgemisch schrittweise auf RT erwärmt, bei welcher es über Nacht oder länger rührt. Daraufhin wird das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird anschließend ohne weitere Waschschrte chromatographisch mithilfe von CHCl₃ oder MTBE gereinigt oder mit EtOAc umkristallisiert.

N-(5-methyl-3,7,12-trioxa-1,4-dioxa-8-azacyclododecan-6-yl)carbaminsäure-tert-butylester (6a)

Gemäß AAV 4 wird **5a** (635.3 mg, 1.75 mmol) in 60 ml DCM gelöst. Anschließend wird DIPEA (446 µl, 2.63 mmol) injiziert und das Gemisch auf -20 °C gekühlt und für 15 min gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird PyBOP ergänzt (913 mg, 1.75 mmol, gelöst in 50 ml DCM) und das Reaktionsgemisch bei RT für 3 d gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand chromatographisch mit CHCl₃ vorgereinigt. Anschließend wird

jede einzelne durch Chromatographie gewonnene Fraktion mit EtOAc versetzt, wobei sukzessiv das Produkt als weißer Feststoff ausfällt.

Aufgrund der geringen Ausbeute und der damit zur Verfügung stehenden Substanzmenge wurde das gesamte Produkt für den nachfolgenden Reaktionsschritt verwendet (20 %, 115.3 mg, vergleiche Tab. 19).

Smp.: 217 °C (lit. Smp. 216-217 °C); **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.26 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, 5-Me), 1.43 (s, 9H, *t*-Boc), 1.93 und 2.10 (je m, 2H, 10-*H*), 2.48 (m, 2H, 11-*H*), 3.19 and 3.71 (je m, 2H, 9-*H*), 4.21 (m, 1H, 6-*H*), 4.51 and 4.80 (je d, 2H, *J* = 15 Hz, 2-*H*), 5.26 (m, 1H, 5-*H*), 5.34 (m, 1H, -*NH*), 5.98 (br d, 1H, -*NH*); **ESI-MS:** ber. 344.36, gef. 366.97 [M+Na]⁺.

N-(2,5-dimethyl-3,7,12-trioxo-1,4-dioxa-8-azacyclododecan-6-yl)carbaminsäure-tert-butylester (6b)

Gemäß AAV 4 wird **5b** (1.15 g, 3.06 mmol) in 10 ml DCM gelöst. Anschließend wird DIPEA (779 µl, 4.59 mmol) injiziert, das Reaktionsgemisch auf -20°C gekühlt und für 15 min gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird PyBOP ergänzt (1.59 g, 3.06 mmol, gelöst in 4 ml DCM) und bei RT für 48 h gerührt. Anschließend wird das DCM am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt und der braune Rückstand mit EtOAc versetzt, wobei langsam das Produkt als weißer, perlmutartiger Feststoff ausfällt. Sollte sich kein Feststoff abscheiden, wird das Lösungsmittel wieder abgezogen und der Vorgang wiederholt. Aufgrund der geringen Ausbeute und der damit zur Verfügung stehenden Substanzmenge wurde das gesamte Produkt für den nachfolgenden Reaktionsschritt verwendet (26 %, 289 mg, vergleiche Tab. 19).

Smp.: 235-239 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.25 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, 5-Me), 1.44 (s, 9H, *t*-Boc), 1.52 (d, 3H, *J* = 7 Hz, 2-Me), 1.87 (m, 1H, 10'-*H*), 2.17 (m, 1H, 10-*H*), 2.46 (m, 2H, 11-*H*), 3.15 (m, 1H, 9'-*H*), 3.72 (m, 1H, 9-*H*), 4.18 (m, 1H, 6-*H*), 5.24 (m, 2H, 2-*H* und 5-*H*), 5.33 (bd, 1H, -*NH*), 5.9 (bd, 1H, -*NH*); **ESI-MS:** ber. 358.387, gef. 381.00 [M+Na]⁺.

N-(9-benzyl-5-methyl-3,7,12-trioxo-1,4-dioxa-8-azacyclododecan-6-yl)carbaminsäure-tert-butylester (46)

Gemäß AAV 4 wird **44** (159.7 mg, 0.353 mmol) in 250 ml DCM gelöst, wobei eine Endkonzentration von $c \leq 1$ mM eingehalten wird. Anschließend wird DIPEA (600 µl, 3.53 mmol) injiziert und eine Temperatur von -20°C eingestellt. Bei selbiger Temperatur wird das Gemisch für 15 min gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgt die tropfenweise Zugabe von PyBOP (827.4 mg, 1.59 mmol, gelöst in 110 ml DCM). Das Reaktionsgemisch wird langsam auf RT erwärmt und 3 d gerührt. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand chromatographisch mit MTBE gereinigt, wobei die Diastereomere (siehe Tab. 19) getrennt als weißer Feststoff isoliert werden (41 %, 63 mg, Verhältnis 1:1). **ESI-MS:** ber. 434.21, gef. 457.10 [M+Na]⁺.

Diastereomer 1: 20 %, 30.8 mg; R_f (MTBE): 0.80; **Smp.:** 105-109 °C; $^1\text{H NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: 1.23 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, 5-Me), 1.43 (s, 9H, *t*-Boc), 1.75-1.82 (m, 1H, 10'-H), 1.91-2.00 (m, 1H, 10-H), 2.24-2.31 (m, 1H, 11-H), 2.53 (ddd, 1H, $J = 17.2/7.4/1.5$ Hz, 11'-H), 2.63 (dd, 1H, $J = 13.3/8.8$ Hz, -CHH-Ar), 3.01 (dd, 1H, $J = 13.3/4.6$ Hz, CHH-Ar), 3.99-4.08 (m, 1H, 9-H), 4.10-4.16 (m, 1H, 6-H), 4.31 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, 2-H), 4.99 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, 2'-H), 5.27-5.33 (m, 2H, 5-H, -NH), 5.84 (bd, 1H, -NH), 7.17-7.29 (m, 5H, Ar-H); $^{13}\text{C NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: 13.7, 26.5, 28.2, 29.7, 31.3, 41.8, 53.2, 55.4, 61.6, 62.0, 69.5, 80.3, 126.6, 128.5, 129.4, 137.6, 154.6, 165.3, 166.4, 167.4, 175.1; **HR-MS:** ber. 435.2132 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 457.1951 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Gef.: 435.2122, 457.1942.

CD (MeOH): 216.6 nm, $\Delta\epsilon = -9.729$ mdeg.

Diastereomer 2: 21 %, 32.2 mg; R_f (MTBE): 0.62; **Smp.:** 165-175 °C; $^1\text{H NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: 1.39 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz, 5-Me), 1.5 (s, 9H, *t*-Boc), 1.79-1.88 (m, 1H, 10'-H), 1.92-1.99 (m, 1H, 10-H), 2.33-2.4 (m, 1H, 11-H), 2.47 (ddd, 1H, $J = 16.7/8.1/2.7$ Hz, 11'-H), 2.72 (dd, 1H, $J = 13.6/7.7$ Hz, -CHH-Ar), 2.87 (dd, 1H, $J = 13.7/5.7$ Hz, CHH-Ar), 4.13 (d, 1H, $J = 12.7$ Hz, 2-H), 4.22-4.31 (m, 2H, 6-H, 9-H), 4.95 (bd, 1H, -NH), 5.03 (d, 1H, $J = 12.3$ Hz, 2'-H), 5.24 (m, 1H, 5-H), 6.13 (bd, 1H, -NH), 7.15 (d, 2H, $J = 7.14$ Hz, Ar-H), 7.21-7.31 (m, 3H, Ar-H); $^{13}\text{C NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: 16.1, 27.6, 28.3, 31.1, 41.7, 50.7, 59.2, 62.0, 73.9, 81.0, 126.7, 128.6, 129.3, 137.1, 155.3, 166.1, 168.5, 172.8; **HR-MS:** ber. 435.2132 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 457.1951 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Gef.: 435.2123, 457.1943.

CD (MeOH): $\Delta\epsilon = 218.9$ nm, +0.64 mdeg; 225.9nm, -1.60 mdeg.

N-(9-benzyl-2,5-dimethyl-3,7,12-trioxo-1,4-dioxa-8-azacyclododecan-6-yl)carbaminsäure-tert-butylester (47)

Gemäß AAV 4 wird **45** (235.0 mg, 0.504 mmol) in 530 ml DCM gelöst, wobei eine Endkonzentration von $c \leq 0.001$ M eingehalten wird. Anschließend wird DIPEA (857 μl , 5.04 mmol) injiziert und eine Temperatur von -20 °C eingestellt. Bei selbiger Temperatur wird das Gemisch 30 min gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgt die tropfenweise Zugabe von PyBOP (1.19 g, 2.27 mmol, gelöst in 20 ml DCM). Das Reaktionsgemisch wird langsam auf RT erwärmt und 3 d gerührt. Daraufhin wird das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand chromatographisch zunächst mit CHCl_3 und anschließend mit MTBE (2x) gereinigt, wobei die Diastereomere getrennt als weißer Feststoff isoliert werden (44 %, 99 mg, Verhältnis 3:2, vergleiche Tab. 19). **ESI-MS:** ber. 448.51, gef. 471.18 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

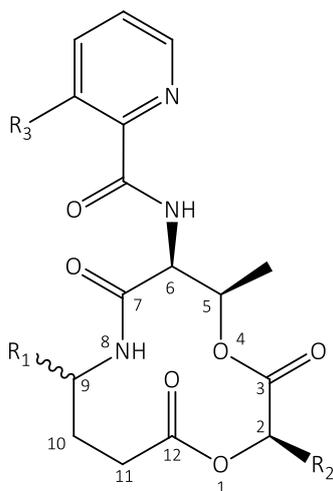
Diastereomer 1: 27 %; 60 mg; R_f (MTBE): 0.82; **Smp.:** 178-180 °C; $^1\text{H NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: 1.24 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 5-Me), 1.45 (s, 9H, *t*-Boc), 1.50 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz, 2-Me), 1.71-1.80 (m, 1H, 10-H), 1.91-2.03 (m, 1H, 10'-H), 2.25 (dd, 1H, $J = 17.4/11.8$ Hz, 11-H), 2.51 (dd, 1H, $J = 17.4/7.2$ Hz, 11'-H), 2.63 (dd, 1H, $J = 13.3/8.8$ Hz, Ar-CHH-), 3.03 (dd, 1H, $J = 13.2/3.8$ Hz, -Ar-CHH-), 3.96-4.07 (m, 1H, 9-H), 4.12-4.19 (m, 1H, 6-H), 5.20-5.35 (m, 3H, -NH, 5-H, 2-H), 5.89 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, -NH), 7.16-7.34 (m, 5H, -Ar-H); $^{13}\text{C NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: 13.9, 16.3,

26.3, 28.3, 31.4, 42.0, 53.4, 55.4, 66.8, 69.3, 80.3, 126.6, 128.5, 128.8, 129.4, 137.7, 154.6, 167.6, 168.4, 175.5; **Anal.** ber. für $C_{23}H_{32}N_2O_7$: C 61.59, H 7.19, N 6.25; Gef.: C 60.80; H 7.07; N 6.19; **HR-MS**: ber. 449.2289 $[M+H]^+$, 471.2107 $[M+Na]^+$; Gef.: 449.206, 471.2127.

CD (MeOH): $\Delta\epsilon = 215.5 \text{ nm}$, -12.97 mdeg .

Diastereomer 2: 17 %; 39 mg; **R_f** (MTBE): 0.46; **R_f** (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.71; **Smp.**: 182-186 °C; **¹H NMR**: (CD₃OD) δ [ppm]: 1.21-1.29 (m, 3H, 5-Me), 1.37-1.48 (m, 12H, *t*-Boc, 2-Me), 1.59-1.69 (m, 1H, 10-H), 2.04-2.12 (m, 1H, 10'-H), 2.26-2.34 (m, 1H, 11-H), 2.53-2.61 (m, 1H, 11'-H), 2.65-2.75 (m, 2H, Ar-CH₂-), 4.02-4.13 (m, 1H, 6-H), 4.25-4.34 (m, 1H, 9-H), 4.63-4.71 (m, 1H, 2-H), 4.94-4.99 (m, 1H, 5-H), 7.09-7.24 (m, 5H, Ar-H); **¹³C NMR**: (CD₃OD) δ [ppm]: 14.8, 15.1, 26.1, 27.3, 28.4, 40.9, 48.8, 59.4, 70.3, 72.7, 80.0, 126.1, 128.0, 129.0, 137.9, 156.2, 170.2, 170.3, 172.9; **Anal.** ber. für $C_{23}H_{32}N_2O_7$: C 61.59, H 7.19, N 6.25; Gef.: C 60.84; H 7.72; N 6.25; **HR-MS**: ber. 449.2289 $[M+H]^+$, 471.2107 $[M+Na]^+$; Gef.: 449.2302, 471.2122.

CD (MeOH): $\Delta\epsilon = 218.9 \text{ nm}$, $+4.28 \text{ mdeg}$.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV 5): Acylierung

Tab. 20: Auflistung der synthetisierten Produkte gemäß AAV 5

#	R ₁	R ₂	R ₃	Ausbeute [%]
8a	-H	-H	-H	42
8b	-H	-H	-OH	5
9a	-H	-CH ₃	-H	48
9b	-H	-CH ₃	-OH	28
48 DS1*	-CH ₂ Ar	-H	-OH	49
48 DS2*	-CH ₂ Ar	-H	-OH	< 3 (Spuren)

*hier gilt eine abweichende Vorschrift

Das entsprechende Zwölfriingsystem aus AAV 4 wird in einer Mischung aus TFA/DCM (1:1) bei 0 °C gelöst. Das Gemisch rührt bei RT für 5 min. Anschließend wird das Lösungsmittel bei einer maximalen Wasserbadtemperatur von 40 °C evakuiert. Die erfolgreiche Schutzgruppen-spaltung wird mittels ESI-MS überwacht. Der resultierende braune Sirup wird in DMF gelöst und unter Eiskühlung durch Zugabe von DIPEA neutralisiert. PyBOP, die entsprechende Säure und DIPEA werden in DMF gelöst, was häufig mit einer Farbänderung des Reaktionsgemischs einhergeht. Die Lösung des entschützten Zwölfriingsystems wird langsam zu diesem Gemisch injiziert. Nach einer Reaktionszeit von 4 d bei 37 °C wird das Gemisch ohne weiteren Waschschritt chromatographisch gereinigt.

N-(5-methyl-3,7,12-trioxo-1,4-dioxa-8-azacyclododecan-6-yl)pyridine-2-carboxamid (8a)

Gemäß AAV 5 wird **6a** (50 mg, 0.145 mmol) in TFA/DCM (248 μ l/248 μ l) bei 0 °C gelöst und bei RT für 5 min gerührt. Nach der erfolgreichen Schutzgruppenspaltung (ESI-MS: ber. 244.244, gef. 245.09 [M+H]⁺) wird der Rückstand mit 1.0 ml DMF aufgenommen und gemäß AAV 5 neutralisiert. PyBop (85.3 mg, 0.164 mmol), **7a** (35.7 mg, 0.29 mmol) und DIPEA (37 μ l, 0.22 mmol) werden in 1.0 ml DMF gelöst. Der neutralisierte Rückstand von **6a** wird in das Gemisch injiziert. Nach Ablauf der Reaktionszeit gemäß AAV 5 erfolgt die chromatographische Reinigung des dunkelbraunen Rückstands mit CHCl₃, wobei das Produkt (siehe Tab. 20) als ein weißer Feststoff isoliert wird (42 %, 21 mg).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.7; **Smp.:** 189 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.34 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz, 5-Me), 1.96 (m, 1H, 10-H), 2.16 (m, 1H, 10'-H), 2.51 (m, 2H, 11-H), 3.21 and 3.76 (je m, 2H, 9-H), 4.52 und 4.87 (je d, 2H, *J* = 15.3 Hz, 2-H), 4.68 (dd, 1H, *J* = 8.2/5.0 Hz, 6-H), 5.42 (m, 1H, 5-H), ca. 6.0 (br d, 1H, -NH), 7.47 (ddd, 1H, *J* = 7.43/4.7/1.17 Hz, 5''-H), 7.86 (m, 1H, *J* = 7.6/1.56 Hz, 4''-H), 8.17 (d, 1H, 3''-H), 8.61 (m, 1H, 6''-H), 8.76 (d, 1H, -NH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 14.3, 24.0, 32.9, 40.4, 55.1, 61.8, 70.1, 122.6, 126.7, 137.7, 148.15, 148.15, 163.86, 165.6, 167.4, 174.7; **ESI-MS:** ber. 349.339, gef. 372.22 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₁₇H₁₉N₃O₆: C 55.01; H 5.44; N 12.03; Gef.: C 55.53; H 5.34, N 10.72.

3-Hydroxy-N-(5-methyl-3,7,12-trioxo-1,4-dioxa-8-azacyclododecan-6-yl)pyridine-2-carboxamid (8b)

Gemäß AAV 5 wird **6a** (61.7 mg, 0.179 mmol) in TFA/DCM (306 μ l/306 μ l) bei 0 °C gelöst und bei RT für 5 min gerührt. Nach der erfolgreichen Schutzgruppenspaltung (ESI-MS: ber. 244.244, gef. 245.09 [M+H]⁺) wird der Rückstand mit 1.0 ml DMF aufgenommen und gemäß AAV 5 neutralisiert. PyBop (105.2 mg, 0.202 mmol), **7b** (49.8 mg, 0.358 mmol) und DIPEA (45.6 μ l, 0.27 mmol) werden in 1.5 ml DMF gelöst. Der neutralisierte Rückstand von **6a** wird in das Reaktionsgemisch injiziert. Nach Ablauf der Reaktionszeit gemäß AAV 5 erfolgt die chromatographische Reinigung des dunkelbraunen Rückstandes mit CHCl₃, wobei das Produkt als weißer Feststoff isoliert wird (5 %, 3 mg, vergleiche Tab. 20).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.62-0.68; **R_f** (Benzol/Aceton 1:1): 0.65 (lit. 0.68); **Smp.:** 238.5-243 °C; (lit. 253-255 °C); **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.34 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, 5-Me), 1.94-2.00 (m, 1H, 10-H), 2.12-2.20 (m, 1H, 10'-H), 2.51-2.54 (m, 2H, 11-H), 3.17-3.22 und 3.77-3.84 (je m, 2H, 9-H), 4.51 und 4.91 (je d, 2H, *J* = 15.4 Hz, 2-H), 4.61 (dd, 1H, *J* = 8.0/5.1 Hz, 6-H), 5.40-5.45 (qd, 1H, *J* = 6.5/5.2 Hz, 5-H), 6.01 (br d, 1H, -NH), 7.30 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.5 Hz, 5''-H), 7.34 (dd, 1H, *J* = 8.5/4.3 Hz, 4''-H), 8.11 (dd, 1H, *J* = 4.4/1.5 Hz, 6''-H), 8.7 (br d, 1H, -NH), 11.63 (s, 1H, -OH); **ESI-MS:** ber. 365.338, gef. 388.11 [M+Na]⁺, 364.11 [M-H]⁻; **HR-MS:** ber. 366.1319 [M+H]⁺, 388.1119 [M+Na]⁺; Gef.: 366.1292, 388.1108.

N-(2,5-dimethyl-3,7,12-trioxo-1,4-dioxa-8-azacyclododecan-6-yl)pyridine-2-carboxamid (9a)

Gemäß AAV 5 wird **6b** (100 mg, 0.279 mmol) in TFA/DCM (477 μ l/954 μ l) bei 0 °C gelöst und bei RT für 5 min gerührt. Nach der erfolgreichen Schutzgruppenspaltung (ESI-MS:

ber. 258.271, gef. 281.07 [M+Na]⁺) wird der Rückstand mit 2.0 ml DMF aufgenommen und gemäß AAV 5 neutralisiert. PyBop (162.5 mg, 0.312 mmol), **7a** (68.7 mg, 0.558 mmol) und DIPEA (71.1 µl, 0.419 mmol) werden in 2.0 ml DMF gelöst. Der neutralisierte Rückstand von **6b** wird in das Reaktionsgemisch injiziert. Nach Ablauf der Reaktionszeit gemäß AAV 5 erfolgt eine chromatographische Reinigung mit CHCl₃, das Produkt wird als weißer Feststoff isoliert (48 %, 49 mg, vergleiche Tab. 20).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.72; **Smp.**: 204-207 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.35 (d, 3H, *J* = 6.65 Hz, 2-Me), 1.54 (d, 3H, *J* = 7 Hz, 5-Me), 1.85-1.92 (m, 1H, 10-H), 2.17-2.25 (m, 1H, 10'-H), 2.42-2.55 (m, 2H, 11-H), 3.17-3.22 (m, 1H, 9-H), 3.71-3.79 (m, 1H, 9'-H), 4.66 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz/5.28 Hz, 6-H), 5.25 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, 2-H), 5.35-5.41 (m, 1H, 5-H), 6.0 (bd, 1H, -NH), 7.45-7.48 (m, 1H, 5''-H), 7.87 (dt, 1H, *J* = 7.7 Hz/1.56 Hz, 4''-H), 8.17-8.18 (m, 1H, 3''-H), 8.58-8.59 (m, 1H, 6''-H), 8.76 (bd, 1H, -NH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 14.4, 16.3, 23.4, 32.8, 40.4, 54.8, 69.43, 69.50, 122.7, 126.6, 137.8, 147.9, 148.7, 163.5, 167.4, 168.5, 175.3; **ESI-MS:** ber. 363.36, gef. 386.18 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₁₇H₂₁N₃O₆: C 56.19, H 5.83, N 11.56 Gef.: C 55.91; H 5.54; N 11.29.

N-(2,5-dimethyl-3,7,12-trioxo-1,4-dioxa-8-azacyclododecan-6-yl)-3-hydroxypyridine-2-carboxamid (9b)

Gemäß AAV 5 wird **6b** (189 mg, 0.528 mmol) in TFA/DCM (902 µl/902 µl) bei 0 °C gelöst und bei RT für 5 min gerührt. Nach der erfolgreichen Schutzgruppenspaltung (ESI-MS: ber. 258.271, gef. 281.07 [M+Na]⁺) wird der Rückstand mit 3.7 ml DMF aufgenommen und gemäß AAV 5 neutralisiert. PyBop (308 mg, 0.591 mmol), **7b** (147 mg, 1.056 mmol) und DIPEA (134.4 µl, 0.792 mmol) werden in 3.7 ml DMF gelöst. Der neutralisierte Rückstand von **6b** wird in das Reaktionsgemisch injiziert. Nach Ablauf der Reaktionszeit gemäß AAV 5 erfolgt eine chromatographische Reinigung mit CHCl₃/MeOH (100:0 → 90/10) des braunen Rückstands, wobei das Produkt (siehe Tab. 20) als weißer Feststoff isoliert wird (28 %, 55.3 mg).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.73; **Smp.**: 230 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.4 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, 2-Me), 1.58 (d, 3H, *J* = 7 Hz, 5-Me), 1.84-1.92 (m, 1H, 10-H), 2.2-2.3 (m, 1H, 10'-H), 2.46-2.53 (m, 2H, 11-H), 3.31-3.37 (m, 1H, 9-H), 3.52-3.61 (m, 1H, 9'-H), 4.68 (dd, 1H, *J* = 8.25/4.7 Hz, 6-H), 5.12 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, 2-H), 5.34 (m, 1H, 5-H), 6.44 (bd, 1H, -NH), 7.57 (dd, 1H, *J* = 4.7/4.5 Hz, 5''-H), 7.62 (m (dd), 1H, 4''-H), 8.19 (dd, 1H, *J* = 4.1/1.6 Hz, 6''-H), 9.29 (bd, 1H, -NH), 11.66 (s, 1H, -OH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 14.4, 16.3, 23.4, 32.8, 40.5, 54.4, 69.1, 69.6, 126.9, 129.0, 130.2, 139.3, 158.0, 166.8, 167.8, 168.5, 175.5; **ESI-MS:** ber. 379.3645, gef. 402.21 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₁₇H₂₁N₃O₇: C 53.82; H 5.54; N 11.08; Gef.: C 52.46; H 5.18; N 10.66; **HR-MS:** ber. 380.1459 [M+H]⁺, 402,1277 [M+Na]⁺; Gef.: 380.14495, 402,1269.

*N-(9-benzyl-5-methyl-3,7,12-trioxo-1,4-dioxo-8-azacyclododecan-6-yl)-3-hydroxypyridine-2-carboxamid (48)***Diastereomer 1:**

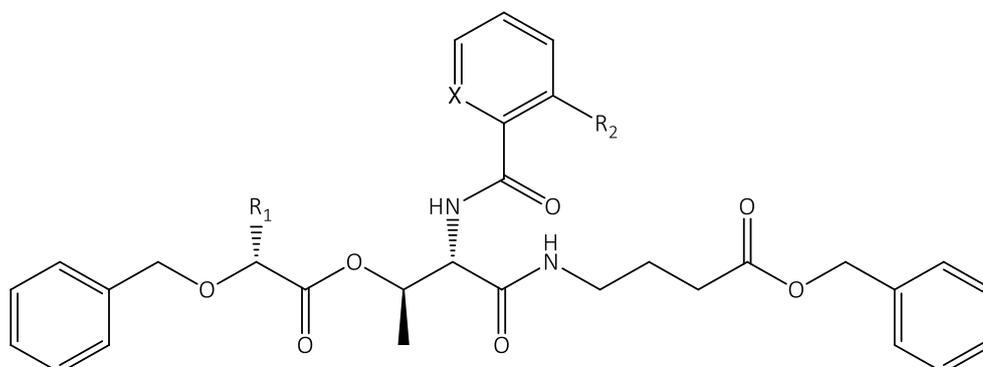
Gemäß AAV 5 wird **46 DS1** (60 mg, 0.138 mmol) in TFA/DCM (236 μ l/236 μ l) bei 0 °C gelöst und bei RT für 30 min gerührt. Nach der erfolgreichen Schutzgruppenspaltung (ESI-MS: ber. 334.367, gef. 357.27 [M+Na]⁺, 335.07 [M+H]⁺) wird der Rückstand in 1.0 ml DMF gelöst und gemäß AAV 5 neutralisiert. PyBOP (86.3 mg, 0.166 mmol), **7b** (38.4 mg, 0.276 mmol) und DIPEA (81.5 μ l, 0.48 mmol) werden in 1.0 ml DMF gelöst. Der neutralisierte Rückstand von **46 DS1** wird in das Reaktionsgemisch injiziert. Das Gemisch rührt anschließend bei RT für 4 d. Der Rückstand wird mit CHCl₃ chromatographisch gereinigt. Das Produkt (siehe Tab. 20) wird als weißer Feststoff isoliert (49 %, 29.5 mg).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.8; **Smp.:** 224-225 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.35 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, 5-Me), 1.80-1.87 (m, 1H, 10-H), 1.96-2.06 (m, 1H, 10'-H), 2.35 (ddd, 1H, *J* = 17.3/11.6/1.37 Hz, 11-H), 2.58 (ddd, 1H, *J* = 17.4/7.4/1.8 Hz, 11'-H), 2.66 (dd, 1H, *J* = 13.3/8.8 Hz, -CHH-Ar), 3.04 (dd, 1H, *J* = 13.3/4.6 Hz, CHH-Ar), 4.07-4.16 (m, 1H, 9-H), 4.36 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, 2-H), 4.57 (dd, 1H, *J* = 8.0/5.6 Hz, 6-H), 5.06 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, 2'-H), 5.45 (dq, 1H, *J* = 6.3 Hz, 5-H), 5.94 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, -NH), 7.15-7.28 (m, 5H, Ar-H), 7.33 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.4 Hz, 5''-H), 7.38 (dd, 1H, *J* = 8.5/4.3 Hz, 4''-H), 8.12 (dd, 1H, *J* = 4.3/1.5 Hz, 6''-H), 8.70 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, -NH), 11.72 (s, 1H, -OH); **¹³C NMR:** 14.1, 26.5, 31.3, 41.8, 53.4, 54.1, 61.7, 68.8, 126.5, 126.6, 128.5, 129.0, 129.4, 130.6, 137.5, 139.7, 157.9, 165.3, 166.4, 168.1, 175.4; **ESI-MS:** ber. 455.461, gef. 456.11 [M+H]⁺, 478.25 [M+Na]⁺, 454.17 [M-H]⁻. **HR-MS:** ber. 478.1591 [M+Na]⁺, 454.1595 [M-H]⁻; Gef.: 478.1583, 454.1620.

Diastereomer 2:

Gemäß AAV 5 wird **46 DS2** (29.3 mg, 0.07 mmol) in TFA/DCM (120 μ l/120 μ l) bei 0 °C gelöst und bei RT für 30 min gerührt. Der Rückstand wird in 0.5 ml DMF gelöst und gemäß AAV 5 neutralisiert. PyBOP (43.7 mg, 0.084 mmol), **7b** (19.5 mg, 0.14 mmol) und DIPEA (41.6 μ l, 0.245 mmol) werden in 1.0 ml DMF gelöst. Der neutralisierte Rückstand von **46 DS2** wird in das Reaktionsgemisch injiziert. Das Gemisch rührt anschließend bei RT für 3 d. Der Rückstand wird mit CHCl₃ chromatographisch gereinigt. Das Produkt (siehe Tab. 20) wird als weißer Rückstand isoliert, der aufgrund der geringen Menge nicht weiter eingesetzt werden konnte (\leq 3 %, Spuren).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.9; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.34 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, 5-Me), 1.81-1.86 (m, 1H, 10-H), 1.96-2.06 (m, 1H, 10'-H), 2.29-2.39 (m, 2H sollte 1H sein für 11-H), 2.59 (dd, 1H, *J* = 17.6/7.5 Hz, 11'-H), 2.67 (dd, 1H, *J* = 13.2/8.9 Hz, -CHH-Ar), 3.05 (dd, 1H, *J* = 13.1/4.6 Hz, CHH-Ar), 4.08-4.17 (m, 2H sollte 1H sein für 9-H), 4.36 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, 2-H), 4.55-4.58 (m, 1H, 6-H), 5.06 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, 2'-H), 5.43-5.49 (m, 1H, 5-H), 5.93 (d, 1H, *J* = 6.5 Hz, -NH), 7.16-7.39 (m, 7H, Ar-H, 5''-H, 4''-H), 8.12 (dd, 1H, *J* = 4.0/0.9 Hz, 6''-H), 8.7 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, -NH), 11.70 (s, 1H, -OH); Es wäre eine zusätzliche Reinigung nötig gewesen, was aufgrund der geringen Substanzmenge jedoch nicht realisierbar war. **ESI-MS:** ber. 455.461, gef. 478.14 [M+Na]⁺, 454.17 [M-H]⁻.

7.2.2.4 Synthese der offenkettigen, benzylierten und debenzylierten VerbindungenAllgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV 6): Acylierung der depsipeptidischen Zwischenstufen

Tab. 21: Auflistung der synthetisierten Produkte gemäß AAV 6

#	X	R ₁	R ₂	Ausbeute [%]
49	N	-H	-H	45
50	N	-H	-OH	16
51	N	-H	-F	26
52	C	-H	-OH	6
53	N	-CH ₃	-H	52
54	N	-CH ₃	-OH	50
55	N	-CH ₃	-F	48
56	C	-CH ₃	-OH	20

Die gesamte Reaktion verläuft unter Argongasatmosphäre. Die benzylierten offenkettigen Depsipeptide werden in TFA/DCM (1:2) bei 0 °C gelöst und für eine Stunde bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer bei einer maximalen Wasserbadtemperatur von 40 °C abgezogen, wobei das entsprechende Trifluoressigsäure-Salz als braune zähe Masse zurückbleibt. Der Rückstand wird mit DMF aufgenommen und unter Eiskühlung durch Zugabe von DIPEA neutralisiert. In einem zweiten Reaktionsgefäß wird PyBOP, die entsprechende Säure und DIPEA in DMF gelöst. Zu dieser Lösung wird das neutralisierte, gelöste Salz der Trifluoressigsäure langsam injiziert und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das DMF wird unter Vakuum eingedampft und der Rückstand in EtOAc gelöst. Die organische Phase wird mit 1 M KHSO₄ und Brine gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wird das EtOAc am Vakuumrotationsverdampfer entfernt. Die anschließende chromatographische Reinigung erfolgt unter Verwendung von MTBE oder CHCl₃ als Fließmittel.

4-(3-[[2-(benzyloxy)acetyl]oxy]-2-(pyridin-2-ylformamido)butanamido]butansäurebenzylester (49)

Gemäß AAV 6 wird **4a** (165 mg, 0.304 mmol) in TFA/DCM (523 μ l/1.05 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT für 1 h gerührt. Der Rückstand wird mit 2.5 ml DMF aufgenommen und gemäß AAV 6 neutralisiert. PyBOP (190.5 mg, 0.37 mmol), **7a** (75.2 mg, 0.61 mmol) und DIPEA (154.8 μ l, 0.912 mmol) werden in 2.5 ml DMF gelöst und der gelöste Rückstand des Trifluoracetatsalzes von **4a** ergänzt. Das Gemisch rührt anschließend bei RT über Nacht. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 6, wobei ein farbloser Sirup gewonnen wird (45 %, 75 mg, vergleiche Tab. 21).

R_f (MTBE): 0.34; **¹H NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 1.33 (d, 3H, J = 6.4 Hz, -CH₃), 1.79 (qui, 2H, J = 7.1 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.35 (t, 2H, J = 7.2 Hz, -CH₂-CH₂-COO-), 3.17-3.24 (m, 1H, -CHH-CH₂-CH₂-), 3.25-3.32 (m, 1H, -CHH-CH₂-CH₂-), 4.12 (s, 2H, -O-CH₂-COO-), 4.56 (d, 1H, J = 11.7 Hz, -O-CHH-Ar), 4.60 (d, 1H, J = 11.6 Hz, -O-CHH-Ar), 4.77 (dd, 1H, J = 8.8/3.8 Hz, -CH-NH-CO-), 5.04 (s, 2H, -CH₂-Ar), 5.65-5.69 (m, 1H, -CH-CH-OOC-), 6.73 (bt, 1H, J = 5.7 Hz, -NH), 7.36–7.26 (m, 10H, -Ar-H), 7.45 (ddd, 1H, J = 7.6/4.8/1.2 Hz, 5'-H), 7.85 (dt, 1H, J = 7.7/1.7 Hz, 4'-H), 8.17 (td, 1H, J = 7.9/1.1 Hz, 3'-H), 8.57 (ddd, 1H, J = 4.8/1.7/0.9 Hz, 6'-H), 8.77 (bd, 1H, -NH); **¹³C NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 16.7, 24.3, 31.6, 39.1, 56.53, 66.4, 67.4, 70.5, 73.3, 122.5, 126.7, 127.9, 128.2, 128.3, 128.5, 128.6, 135.8, 137.1, 137.5, 148.4, 148.9, 164.8, 168.4, 169.2, 173.1; **ESI-MS**: ber. 547.599, gef. 570.24 [M+Na]⁺, 548.13 [M+H]⁺, 546.07 [M-H]⁻; **Anal.** ber. für C₃₀H₃₃N₃O₇: C 65.8, H 6.07, N 7.67; Gef.: C 65.92, H 6.00, N 7.831.

4-(3-[[2-(benzyloxy)acetyl]oxy]-2-[[3-hydroxypyridin-2-yl]formamido]butanamido]butansäurebenzylester (50)

Gemäß AAV 6 wird **4a** (300 mg, 0.55 mmol) in TFA/DCM (943 μ l/1.89 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT für 1 h gerührt. Der Rückstand wird in 3.9 ml DMF gelöst und gemäß AAV 6 neutralisiert. PyBOP (343 mg, 0.66 mmol), **7b** (153 mg, 1.1 mmol), und DIPEA (280 μ l, 1.65 mmol) werden in 3.9 ml DMF gelöst und der gelöste Rückstand des Trifluoracetatsalzes von **4a** ergänzt. Das Gemisch rührt anschließend bei RT über Nacht. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 6, wobei ein brauner Sirup gewonnen wird (16 %, 46.9 mg, vergleiche Tab. 21).

R_f (MTBE): 0.70; **¹H NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 1.33 (d, 3H, J = 6.4 Hz, -CH₃), 1.78 (qui, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.36 (t, 2H, J = 7.1 Hz, -CH₂-CH₂-COO-), 3.33 – 3.16 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 4.13 (s, 2H, -O-CH₂-COO-), 4.57 (d, 1H, J = 11.6 Hz, -O-CHH-Ar), 4.61 (d, 1H, J = 11.6 Hz, -O-CHH-Ar), 4.67 (dd, 1H, J = 8.6/3.7 Hz, -CH-NH-CO-), 5.05 (s, 2H, -CH₂-Ar), 5.61-5.67 (m, 1H, -CH-CH-OOC-), 6.63 (bt, 1H, -NH), 7.40–7.27 (m, 12H, 4'-H, 5'-H, Ar-H), 8.09 (dd, 1H, J = 4.2/1.5 Hz, 6'-H), 8.76 (bd, 1H, -NH), 11.68 (bs, 1H, -OH); **¹³C NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 16.5, 24.2, 29.7, 31.7, 39.3, 56.1, 66.4, 67.4, 70.2, 73.4, 126.6, 127.98, 128.04, 128.20, 128.29, 128.49, 128.56, 129.1, 130.5, 157.9, 167.7, 168.9, 169.0, 173.2; **ESI-MS**: ber. 563.598, gef. 564.14 [M+H]⁺, 586.22 [M+Na]⁺, 562.19 [M-H]⁻; **Anal.** ber. für C₃₀H₃₃N₃O₈: C 63.93, H 5.9, N 7.46; Gef.: C 63.60, H 5.97, N 7.39.

4-(3-[[2-(benzyloxy)acetyl]oxy]-2-[(3-fluoropyridin-2-yl)]formamido]butanamido)butansäurebenzylester (51)

Das Lithiumsalz der 3-Fluorpicolinsäure (**7c**) (120 mg, 0.85 mmol) wird in Wasser gelöst und mit konz. H₂SO₄ auf pH = 2 eingestellt. Die freie 3-Fluorpicolinsäure wird mit DCM extrahiert (3x) und die organischen Phasen werden vereinigt. Nachdem Evakuieren des Lösungsmittels verbleibt die isolierte Säure, die nicht weiter gereinigt werden muss. Gemäß AAV 6 wird **4a** (200 mg, 0.37 mmol) in TFA/DCM (634 µl/1.27 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT für 1 h gerührt. Der Rückstand wird mit 2.5 ml DMF aufgenommen und gemäß AAV 6 neutralisiert. PyBOP (231 mg, 0.44 mmol), die freie 3-Fluorpicolinsäure und DIPEA (188.4 µl, 1.11 mmol) werden in 2.5 ml DMF gelöst und der gelöste Rückstand des Trifluoracetatsalzes von **4a** ergänzt. Das Gemisch rührt anschließend bei RT über Nacht. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 6, wobei ein hellgelber Sirup gewonnen wird (26 %, 54 mg, vergleiche Tab. 21).

R_f (MTBE): 0.26; **¹H NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 1.34 (s, 3H, -CH₃), 1.79 (qui, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.36 (t, 2H, J = 7.1 Hz, -CH₂-CH₂-COO-), 3.16-3.33 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 4.12 (s, 2H, -O-CH₂-COO-), 4.57 (d, 1H, J = 11.6 Hz, -O-CHH-Ar), 4.61 (d, 1H, J = 11.7 Hz, -O-CHH-Ar), 4.72 (dd, 1H, J = 8.5/3.9 Hz, -CH-NH-CO-), 5.07 (s, 2H, -CH₂-Ar), 5.65 (dq, 1H, -CH-CH-OOC-), 6.53 (bt, 1H, -NH), 7.3-7.37 (m, 10H, Ar-H), 7.48-7.58 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 8.4 (d, 1H, J = 4.2 Hz, 6'-H), 8.56 (bd, 1H, J = 8.3 Hz, -NH); **ESI-MS**: ber. 565.59, gef. 566.12 [M+H]⁺, 588.24 [M+Na]⁺, 564.08 [M-H]⁻; **Anal.** ber. für C₃₀H₃₂FN₃O₇: C 63.71, H 5.7, N 7.43; Gef.: C 63.33, H 5.74, N 7.09.

4-(3-[[2-(benzyloxy)acetyl]oxy]-2-[(2-hydroxyphenyl)]formamido]butanamido)butansäurebenzylester (52)

Gemäß AAV 6 wird **4a** (300 mg, 0.55 mmol) in TFA/DCM (943 µl/1.89 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT für 1 h gerührt. Der Rückstand wird mit 3.9 ml DMF aufgenommen und gemäß AAV 6 neutralisiert. PyBOP (343 mg, 0.66 mmol), **7d** (153 mg, 1.1 mmol) und DIPEA (280 µl, 1.65 mmol) werden in 3.9 ml DMF gelöst und der gelöste Rückstand des Trifluoracetatsalzes von **4a** ergänzt. Das Gemisch rührt anschließend bei RT über Nacht. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 6, wobei ein farbloser Sirup gewonnen wird (6 %, 18.8 mg, vergleiche Tab. 21).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.83; **¹H NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 1.31 (d, 3H, J = 6.5 Hz, -CH₃), 1.79 (qui, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.37 (t, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂-COO-), 3.16-3.23 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 4.13 (s, 2H, -O-CH₂-COO-), 4.57 (d, 1H, J = 11.8 Hz, -O-CHH-Ar), 4.58 (d, 1H, J = 11.6 Hz, -O-CHH-Ar), 4.65 (dd, 1H, J = 7.1/4.7 Hz, -CH-NH-CO-), 5.08 (s, 2H, -CH₂-Ar), 5.53-5.59 (m, 1H, -CH-CH-OOC-), 6.73 (bt, 1H, -NH), 6.85 (t, 1H, J = 7.6 Hz, -Ar-H), 6.98 (d, 1H, J = 8.4 Hz, -Ar-H), 7.29-7.47 (m, 15H, -Ar-H, -NH), 11.93 (bs, 1H, -OH); **¹³C NMR**: (CDCl₃) δ [ppm]: 16.03, 24.16, 31.67, 39.38, 56.08, 66.51, 67.51, 70.08, 73.42, 113.57, 118.56, 118.95, 125.98, 127.96, 128.17, 128.22, 128.33, 128.57, 134.75, 135.67, 136.81, 161.60, 167.91, 169.19, 169.95, 173.14; **ESI-MS**: ber. 562.61; gef. 585.24 [M+Na]⁺, 561.20 [M-H]⁻; **Anal.** ber. für C₃₁H₃₄N₂O₈: C 66.18, H 6.09, N 4.98; Gef.: C 65.00, H 6.107, N 4.946.

4-(3-[[2-(benzyloxy)propanoyl]oxy]-2-(pyridin-2-ylformamido)butanamido)butansäurebenzylester (53)

Gemäß AAV 6 wird **4b** (200 mg, 0.36 mmol) in TFA/DCM (617 μ l/1.23 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT 1 h gerührt. Der Rückstand wird in 2.5 ml DMF gelöst und gemäß AAV 6 neutralisiert. PyBOP (225 mg, 0.432 mmol), **7a** (88.6 mg, 0.72 mmol) und DIPEA (183.3 μ l, 1.08 mmol) werden in 2.5 ml DMF gelöst und das gelöste Trifluoracetatsalz von **4b** ergänzt. Das Gemisch wird anschließend bei RT über Nacht gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 6, wobei ein gelber Sirup gewonnen wird (52 %, 181 mg, vergleiche Tab. 21).

R_f (CHCl₃/MeOH 9.5/0.5): 0.66; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.33 (d, 3H, J = 6.45 Hz, -CH₃), 1.39 (d, 3H, J = 6.84 Hz, -CH₃), 1.72-1.78 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.33 (t, 2H, J = 7.1 Hz, -CH₂-CH₂-COO-), 3.06-3.14 (m, 1H, -CHH-CH₂-CH₂-), 3.25-3.33 (m, 1H, -CHH-CH₂-CH₂-), 4.07 (q, 1H, J = 6.8 Hz, -CH-OC), 4.44 (d, 1H, J = 11.7 Hz, -O-CHH-), 4.66 (d, 1H, J = 11.54 Hz, -O-CHH-), 4.73-4.76 (dd, 1H, J = 8.88/3.9 Hz, -CH-NH-CO-), 5.03 (s, 2H, -CH₂-Ar), 5.62-5.68 (m, 1H, -CH-CH-OOC-), 6.62-6.64 (m, 1H, -NH), 7.25-7.36 (m, 10H, Ar-H), 7.43-7.46 (ddd, 1H, J = 7.6/4.9/1.2 Hz, 5'-H), 7.84 (dt, 1H, J = 7.7/1.76 Hz, 4'-H), 8.15-8.17 (td, 1H, J = 7.8/0.98 Hz, 3'-H), 8.57-8.59 (m, 1H, 6'-H), 8.76 (bd, 1H, -NH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 16.7, 18.6, 24.2, 31.5, 39.0, 56.4, 66.2, 70.4, 71.8, 74.1, 122.3, 126.5, 127.74, 127.78, 128.06, 128.1, 128.15, 128.33, 128.45, 135.7, 137.31, 137.46, 148.40, 148.84, 164.8, 168.4, 171.9, 172.9; **ESI-MS:** ber. 561.63, gef. 584.14 [M+Na]⁺, 559.97 [M-H]⁻; **Anal.** ber. für C₃₁H₃₅N₃O₇: C 66.3, H 6.28, N 7.48; Gef.: C 66.68, H 6.58, N 6.81.

4-(3-[[2-(benzyloxy)propanoyl]oxy]-2-[(3-hydroxypyridin-2-yl)formamido]butanamido)butansäurebenzylester (54)

Gemäß AAV 6 wird **4b** (350 mg, 0.63 mmol) wird in TFA/DCM (1.08 ml/2.16 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT für 1 h gerührt. Der Rückstand wird in 4.4 ml DMF gelöst und gemäß AAV 6 neutralisiert. PyBOP (175.3 mg, 1.26 mmol), **7b** (175.3 mg, 1.26 mmol), und DIPEA (320 μ l, 1.89 mmol) werden in 4.4 ml DMF gelöst der gelöste Rückstand des Trifluoracetatsalzes von **4b** ergänzt. Das Gemisch wird bei RT über Nacht gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 6, wobei ein gelber Sirup gewonnen wird der langsam nachdunkelt (50 %, 181 mg, vergleiche Tab. 21).

R_f (CHCl₃/MeOH 9.5:0.5): 0.72; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.33 (d, 3H, J = 6.35 Hz, -CH₃), 1.41 (d, 3H, J = 6.84 Hz, -CH₃), 1.72-1.78 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.34 (t, 2H, J = 7.1 Hz, -CH₂-CH₂-COO-), 3.07-3.14 (m, 1H, -CHH-CH₂-CH₂-), 3.26-3.33 (m, 1H, -CHH-CH₂-CH₂-), 4.09 (q, 1H, J = 6.8 Hz, -CH-OC), 4.46 (d, 1H, J = 11.5 Hz, -O-CHH-), 4.65 (d, 1H, J = 11.72 Hz, -O-CHH-), 4.68 (dd, 1H, J = 8.88/4.15 Hz, -CH-NH-CO-), 5.05 (s, 2H, -CH₂-Ar), 5.59-5.64 (m, 1H, -CH-CH-OOC-), 6.64 (bt, 1H, -NH), 7.24-7.37 (m, 12H, 4'-H, 5'-H, Ar-H), 8.1 (dd, 1H, J = 4.1/1.47 Hz, 6'-H), 8.7 (bd, 1H, -NH), 11.67 (s, 1H, -OH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 16.5, , 18.52, 24.1, 31.6, 39.2, 55.9, 66.3, 70.1, 70.9, 71.9, 74.23, 126.07, 127.76, 127.85, 128.14, 128.22, 128.40, 128.4, 129.0, 135.7, 137.4, 139.9, 157.7, 167.7, 169.1, 171.8, 173.1; **ESI-MS:** ber. 577.625, gef. 578.17 [M+H]⁺, 600.25 [M+Na]⁺, 576.18 [M-H]⁻; **Anal.** ber. für C₃₁H₃₅N₃O₈: C 64.46, H 6.11, N 7.27; Gef.: C 64.77, H 6.19, N 7.77.

4-(3-[[2-(benzyloxy)propanoyl]oxy]-2-[(3-fluoropyridin-2-yl)formamido]butanamido)butan-säurebenzylester (55)

Das Lithiumsalz der 3-Fluorpicolinsäure (**7c**) (200 mg, 1.36 mmol) wird in Wasser gelöst und mit konz. H₂SO₄ auf pH = 2 eingestellt. Die freie 3-Fluorpicolinsäure wird mit DCM extrahiert (3x) und die organischen Phasen werden vereinigt. Nachdem Evakuieren des Lösungsmittels verbleibt die isolierte Säure, die nicht weiter gereinigt werden muss. Gemäß AAV 6 wird **4b** (350 mg, 0.63 mmol) in TFA/DCM (1.08 ml/2.16 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT für 1 h gerührt. Der Rückstand wird mit 4.4 ml DMF aufgenommen und gemäß AAV 6 neutralisiert. PyBOP (394 mg, 0.756 mmol), die freie 3-Fluorpicolinsäure und DIPEA (183.3 µl, 1.08 mmol) werden in 4.4 ml DMF gelöst und der gelöste Rückstand des Trifluoracetatsalzes von **4b** ergänzt. Das Gemisch rührt anschließend bei RT über Nacht. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 6, wobei ein gelber Sirup gewonnen wird (48 %, 167 mg, vergleiche Tab. 21).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.79-0.86; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.31 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, -CH₃), 1.37 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, -CH₃), 1.71-1.79 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.32 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, -CH₂-CH₂-COO-), 3.05-3.14 (m, 1H, -CHH-CH₂-CH₂-), 3.24-3.33 (m, 1H, -CHH-CH₂-CH₂-), 4.05 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz, -CH-CH₃), 4.43 (d, 1H, *J* = 11.6 Hz, -O-CHH-), 4.64 (d, 1H, *J* = 11.6 Hz, -O-CHH-), 4.76 (dd, 1H, *J* = 8.6/4.3 Hz, -CH-NH-CO-), 5.04 (s, 2H, -CH₂-Ar), 5.57-5.63 (m, 1H, -CH-OCO-), 6.66 (bt, 1H, -NH), 7.21-7.35 (m, 10H, *Ar*-H), 7.47 (dd, 1H, *J* = 8.4/4.1 Hz, 5'-H), 7.49-7.55 (m, 1H, 6'-H), 8.38 (dt, 1H, *J* = 4.2/1.4 Hz, 4'-H), 8.57 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, -NH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 16.8, 18.6, , 24.3, 31.6, 39.1, 56.0, 66.3, 70.5, 71.9, 74.2, 126.2, 127.8, 128.1, 128.2, 128.4, 128.5, 135.8, 136.7, 137.5, 144.2, 157.9, 160.7, 162.6, 168.4, 172.0, 172.9; **ESI-MS:** ber. 579.62, gef. 602.22 [M+Na]⁺, 578.14 [M-H]⁻; **Anal.** ber. für C₃₁H₃₄FN₃O₇: C 64.24, H 5.91, N 7.25; Gef.: C 64.49, H 6.134, N 6.878.

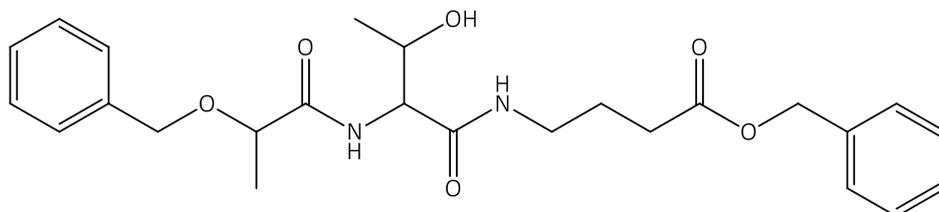
4-(3-[[2-(benzyloxy)propanoyl]oxy]-2-[(2-hydroxyphenyl)formamido]butanamido)butan-säurebenzylester (56)

Gemäß AAV 6 wird **4b** (300 mg, 0.54 mmol) wird in TFA/DCM (922 µl/1.84 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT für 1 h gerührt. Der Rückstand wird in 4.0 ml DMF gelöst und gemäß AAV 6 neutralisiert. PyBOP (337 mg, 0.648 mmol), **7d** (149 mg, 1.08 mmol) und DIPEA (275 µl, 1.62 mmol) werden in 4.0 ml DMF gelöst und der gelöste Rückstand des Trifluoracetatsalzes von **4b** ergänzt. Das Gemisch wird bei RT über Nacht gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 6, wobei ein farbloser Sirup gewonnen wird (20 %, 161 mg, vergleiche Tab. 21).

R_f (MTBE): 0.72; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.30 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, -CH₃), 1.40 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, -CH₃), 1.77 (qui, 2H, *J* = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2.36 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂-COO-), 3.07-3.14 (m, 1H, -CHH-CH₂-CH₂-), 3.26-3.33 (m, 1H, -CHH-CH₂-CH₂-), 4.11 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz, -CHOC-), 4.49 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz, -O-CHH-), 4.60-4.63 (m, 2H, -O-CHH-, -CH-NH-CO-), 5.08 (s, 2H, -CH₂-Ar), 5.51-5.56 (m, 1H, -CH-CH-OOC-), 6.54 (bt, 1H, -NH), 6.84-6.87 (m (dt), 1H, 5'-H), 6.97-6.99 (m(d), 1H, 3'-H), 7.28-7.43 (m, 13H, 4'-H, 6'-H, *Ar*-H, -NH), 11.93 (s, 1H, -OH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 16.2, 18.6, 24.2, 27.0, 31.7, 39.3, 49.4, 56.1, 66.5, 70.0, 72.0, 72.8, 74.4, 113.7, 118.5, 119.0, 126.1, 127.8, 128.0, 128.2, 128.3, 128.5, 128.6, 134.7, 135.7, 137.3,

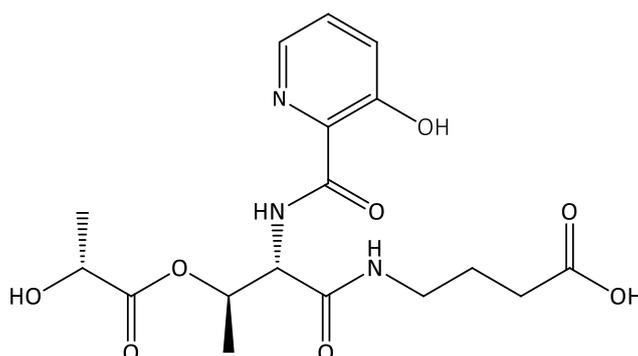
161.5, 168.0, 170.0, 172.1, 173.1; **ESI-MS**: ber. 576.6368, gef. 599.21 $[M+Na]^+$, 575.10 $[M-H]^-$; **Anal.** ber. für $C_{32}H_{36}N_2O_8$: C 66.65, H 6.29, N 4.86; Gef.: C 66.10, H 6.23, N 4.88.

Produkt einer $O \rightarrow N$ Acylgruppenwanderung: 4-{2-[2-(benzyloxy)propanamido]-3-hydroxybutanamido}butansäureester



Ausbeute: 17.3 %; **Smp.:** 103-104 °C; 1H NMR: ($CDCl_3$) δ [ppm]: 1.14 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, $-CH_3$), 1.40 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, $-CH_3$), 1.83 (qui, 2H, $J = 7.1$ Hz, $-CH_2-CH_2-CH_2-$), 2.38 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, $-CH_2-CH_2-COO-$), 3.38–3.19 (m, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_2-$), 4.00 (q, 1H, $J = 6.8$ Hz, $-CH-CO-$), 4.24 (dd, 1H, $J = 8.1/1.9$ Hz, $-CH-NH_2$), 4.40 (dq, 1H, $J = 6.4/1.9$ Hz, $-CH-CH_3$), 4.63-4.55 (m, 2H, $-O-CH_2-$), 5.10 (s, 2H, $-CH_2-Ar$), 6.84 (bt, 1H, $J = 5.5$ Hz, $-NH$), 7.39–7.28 (m, 10H, $Ar-H$), 7.58 (bd, 1H, $J = 8.0$ Hz, $-NH$); ^{13}C NMR: ($CDCl_3$) δ [ppm]: 18.3, 18.4, 24.6, 31.4, 38.6, 56.1, 65.9, 66.4, 71.9, 75.4, 127.8, 128.1, 128.20, 128.23, 128.5, 128.6, 135.8, 136.9, 171.2, 172.7, 174.7; **Anal.** ber. für $C_{25}H_{32}N_2O_6$: C 65.77, H 7.07, N 6.14; Gef.: C 65.37, H 7.15, N 5.52.

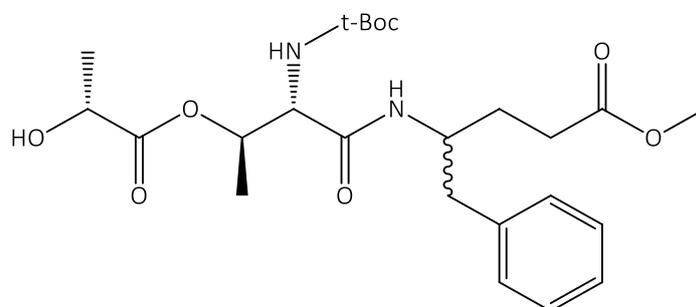
4-(2-(3-Hydroxypicolinamido)-3-(((R)-2-hydroxypropanoyl)oxy)butanamido)butansäure (58)



In einem Autoklaven wird Verbindung **54** in *i*-PrOH (p.a) gelöst und eine Spatelspitze Pd/C (10 %) ergänzt. Das heterogene Gemisch rührt anschließend bei RT bei einem Wasserstoffdruck von 5 bar für 24 h. Das Reaktionsgemisch wird anschließend über Celite® filtriert, mit *i*-PrOH gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Das rote sirupartige Produkt bedarf keiner weiteren Reinigung (77 %, 26.7 mg).

1H -NMR: ($CDCl_3$) δ [ppm]: 1.33 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, $-CH_3$), 1.39 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, $-CH_3$), 1.87 (qui, 2H, $J = 6.6$ Hz, $-CH_2-CH_2-CH_2-$), 2.37-2.41 (m, 2H, $-CH_2-CH_2-COO-$), 3.27-3.35 (m, 1H, $-CHH-CH_2-CH_2-$), 3.37-3.46 (m, 1H, $-CHH-CH_2-CH_2-$), 4.32 (q, 1H, $J = 6.9$ Hz, $-CH-OH$), 4.79 (dd, 1H, $J =$

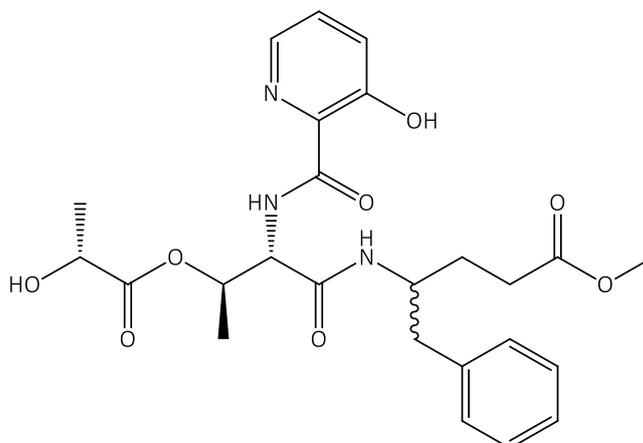
9.1/3.7 Hz, $-CH-NH-CO-$), 5.61 (dq, 1H, $J = 6.5/3.8$ Hz, $-CH-CH-OOC-$), 6.82 (bt, 1H, $-NH$), 7.33-7.62 (m, 1H, $5'-H$), 7.40 (dd, 1H, $J = 8.5/4.3$ Hz, $4'-H$), 8.12 (dd, 1H, $J = 4.3/1.4$ Hz, $6'-H$), 8.71 (bd, 1H, $-NH$), 11.59 (s, 1H, $-OH$); **ESI-MS**: ber. 397.379, gef. 420.19 $[M+Na]^+$, 396.17 $[M-H]^-$; **Anal.** ber. $C_{17}H_{23}N_3O_8$: C 51.38, H 5.83, N 10.57; Gef.: C 50.26; H 6.16, N 8.83; **HR-MS**: ber. 397.1485 $[M+H]^+$, 420.1383 $[M+Na]^+$; Gef.: 398.1556, 420.1374, 396.1411.

7.2.2.5 Synthese der methylierten offenkettigen Derivate4-(2-[[[(tert-butoxy)carbonyl]amino]-3-[(2-hydroxypropanoyl)oxy]butanamido]-5-phenylpentansäuremethylester (59)

Verbindung **43** (2.52 g, 3.89 mmol) wird in 200 ml MeOH (HPLC-Reinheit) gelöst und Pd/C (10 %) ergänzt ($c = 0.02$ M). Das heterogene Gemisch wird in einen Autoklaven überführt und mit Wasserstoff begast (4 bar). Das Reaktionsgemisch wird bei RT über Nacht gerührt. Nach anschließender Filtration über Celite® wird das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand chromatographisch mit CHCl_3 gereinigt, wobei das Produkt als weißer Feststoff isoliert wird (86 %, 1.61 g).

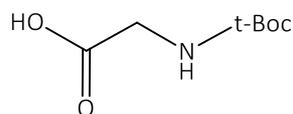
R_f (MTBE): 0.70; **Smp.:** 115-117 °C; **¹H NMR:** (CDCl_3) δ [ppm]: 1.12-1.14 (m, 1H, $-\text{CH}_3$), 1.25 (d, 2H, $J = 6.5$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1.33 (d, 2.4H, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1.37 (d, 0.6H, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1.45 (2s, 9H, *t*-Boc), 1.61-1.72 (m, 1H, $-\text{CHH}-\text{CH}_2-$), 1.82-1.91 (m, 1H, $-\text{CHH}-\text{CH}_2-$), 2.28-2.35 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$), 2.67-2.88 (m, 2H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 3.64 (s, 3H, $-\text{COO}-\text{CH}_3$), 4.06-4.25 (m, 3H, $-\text{CH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ar}$, $-\text{CH}-\text{NH}-\text{CO}-$), 5.32-5.44 (m, 2H, $-\text{NH}$, $-\text{CH}-\text{OCO}-$), 6.42 (bd, 1H, $-\text{NH}$), 7.14-7.29 (m, 5H, *Ar-H*); **¹³C NMR:** (CDCl_3) δ [ppm]: 16.2, 16.4, 20.35, 20.42, 27.0, 28.2, 28.4, 28.9, 30.7, 30.8, 41.1, 41.2, 50.4, 50.7, 51.80, 51.83, 57.8, 58.0, 67.0, 71.1, 71.2, 80.5, 126.6, 128.5, 129.3, 137.3, 137.4, 155.7, 168.6, 168.7, 174.1, 174.3; **ESI-MS:** ber. 480.551, gef. 503.17 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; **Anal.** ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8$: C 59.98, H 7.55, N 5.83; Gef.: C 60.05, H 7.82, N 5.89.

4-{3-[(2-hydroxypropanoyl)oxy]-2-[(3-hydroxypyridin-2-yl)formamido]butanamido}-5-phenylpentansäuremethylester (60)



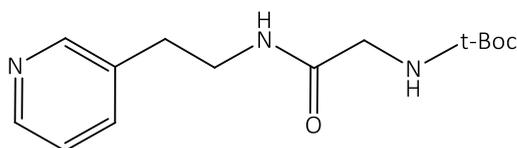
Verbindung **59** (300 mg, 0.62 mmol) wird in TFA/DCM (1.06 ml/2.12 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT für 30 min gerührt. Der Rückstand wird in 9.0 ml DMF gelöst und unter Eiskühlung mit DIPEA neutralisiert. PyBOP (355 mg, 0.68 mmol), **7b** (172.5 mg, 1.24 mmol) und DIPEA (316 μ l, 1.86 mmol) werden in 9.0 ml DMF gelöst und der gelöste Rückstand des Trifluoracetatsalzes von **59** ergänzt. Das lilafarbene Gemisch wird anschließend bei RT über Nacht gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 6 mit anschließender chromatographischer Reinigung mit CHCl₃/MeOH (99:1), wobei ein farbloser Sirup als Diastereomergemisch gewonnen wird (14 %, 43.6 mg).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.49; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 1.20-1.34 (m, 6H, -CH₃), 1.67-1.77 (m, 1H, -CHH-CH₂-), 1.84-1.91 (m, 1H, -CHH-CH₂-), 2.25-2.45 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO-), 2.70-2.89 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar), 3.63 (2s, 3H, -COO-CH₃), 4.12-4.32 (m, 2H, -CH-CH₃, -CH-CH₂-Ar), 4.60 (2 dd, 1H, *J* = 8.8/4.4 Hz, -CH-NH-CO-), 5.50-5.60 (m, 1H, -CH-OCO-), 6.42 (2bd, 1H, *J* = 8.8 Hz, -NH), 7.09-7.22 (m, 5H, *Ar-H*), 7.32-7.35 (m, 1H, 4'-*H*), 7.40 (2dd, 1H, *J* = 8.5/4.3 Hz, 5'-*H*), 8.13 (2dd, 1H, *J* = 4.3/1.4 Hz, 6'-*H*), 8.62 (2bd, 1H, *J* = 8.7 Hz, -NH), 11.59 (2s, 1H, -OH); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 14.1, 16.4, 16.8, 20.3, 20.4, 22.7, 28.4, 28.6, 29.7, 30.8, 31.9, 40.9, 41.1, 50.9, 51.0, 51.8, 51.9, 56.1, 56.4, 67.0, 67.1, 70.6, 70.8, 126.6, 126.7, 128.4, 128.5, 129.2, 129.3, 137.2, 139.9, 157.9, 167.46, 167.53, 174.37, 174.41; **ESI-MS:** ber. 501.529, gef. 524.18 [M+H]⁺; 500.15 [M-H]⁻; **Anal.** ber. für C₂₅H₃₁N₃O₈: C 59.87, H 6.23, N 8.38; Gef.: C 59.92, H 7.21, N 6.25; **HR-MS:** ber. 502.2190 [M+H]⁺, 524.2009 [M+Na]⁺; Gef.: 502.2203, 524.2020.

7.2.2.6 Synthese der offenkettigen Pyridylmethylen-Teilstrukturent-Boc-N-Gly-OH (61)

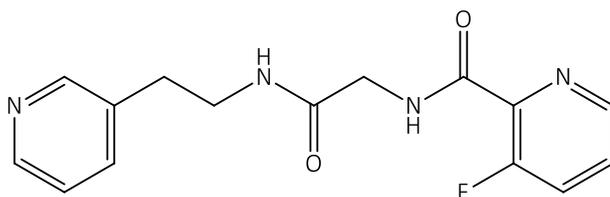
In einem Rundkolben werden DiBoc (1.36 g, 6.24 mmol) und Glycin (391 mg, 5.21 mmol) in 5.0 ml THF gelöst. Dem Gemisch wird eine Lösung von NaHCO_3 (579 mg, 6.89 mmol, 1.3 Äq., gelöst in 10 ml H_2O) ergänzt und der Ansatz bei RT bei 16 h gerührt. Die zu Beginn trübe Reaktionsmischung ist nach abgeschlossener Reaktion eine klare Lösung. Der Ansatz wird mit 1 M HCl auf pH = 2 eingestellt und mit DCM (2x) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über MgSO_4 getrocknet und am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Das Produkt wird als weißer Feststoff gewonnen und kann ohne Reinigung für weitere Reaktionsschritte verwendet werden (98 %, 899 mg).

Smp.: 84-87 °C; **$^1\text{H NMR}$:** (CDCl_3) δ [ppm]: 1.45 (s, 9H, *t-Boc*), 3.88-3.98 (m, 2H, -NH- CH_2 -CO-), 5.07 (bs, 1H, -NH), 9.90-10.62 (bs, 1H, -COOH);

N-[(2-Pyridin-3-yl-ethylcarbamoyl)-methyl]carbaminsäure-tert-butylester (62)

Verbindung **61** (99 mg, 0.56 mmol) wird in 5.0 ml DCM gelöst. Daraufhin werden PyBOP (311 mg, 0.6 mmol, 1.6 Äq.), DIPEA (0.5 ml, 2.9 mmol, 5.2 Äq.) und 3-Aminoethylpyridin*2HBr (156 mg, 0.55 mmol) ergänzt. Es entsteht eine klare Lösung, die bei RT für 16 h gerührt wird. Der gesamte Ansatz wird am Vakuumrotationsverdampfer eingengt und der ölige Rückstand wird direkt chromatographisch mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ (90:10:1) gereinigt. Das Reaktionsprodukt wird als hellgelbe, viskose Flüssigkeit gewonnen (89 %, 136 mg).

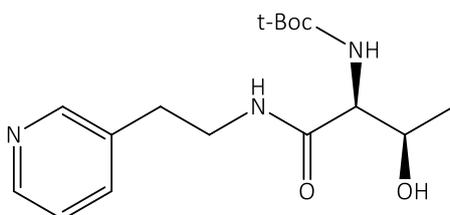
R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1): 0.47; **$^1\text{H NMR}$:** (CDCl_3) δ [ppm]: 1.37 (s, 9H, *t-boc*), 2.78 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ar- CH_2 - CH_2), 3.47 (q, 2H, $J = 8.0$ Hz, - CH_2 - CH_2 -NH), 3.69 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, -CO- CH_2 -NH), 5.60 (s, 1H, - CH_2 -NH-CO-), 6.97 (s, 1H, - CH_2 -NH-COO-*t-Boc*), 7.16 (m, 1H, Ar-H), 7.48 (m, 1H, Ar-H), 8.35 (m, 2H, Ar-H); **ESI-MS:** ber. 279.3348, gef. 279.97 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 302.07 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-Fluoro-pyridin-2-carbonbsäure-[(2-pyridin3-yl-ethylcarbamoyl)ethyl]amid (64)

Verbindung **62** (136 mg, 0.49 mmol) wird in TFA/DCM (2.5 ml/2.5 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT 1 h gerührt. Der gesamte Ansatz wird am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt, in Toluol aufgenommen (3x) und wieder eingeeengt (3x). Danach wird die Prozedur mit CHCl₃ wiederholt (3x). Eine mit 1 M H₂SO₄ auf pH = 2 eingestellte Lösung des Lithiumsalzes der 3-Fluorpicolinsäure (**7c**) (72 mg, 0.49 mmol) in ca. 15 ml Wasser wird mit DCM (3x) extrahiert. Die Dichlormethanphasen werden vereinigt und über MgSO₄ getrocknet.

In den 3-Fluorpicolinsäure haltigen Dichlormethanphasen wird der Rückstand der Trifluor-essigsäurespaltung von Verbindung **3** direkt gelöst. Zu dieser Lösung erfolgt die Zugabe von PyBOP (280 mg, 0.54 mmol, 1.1 Äq.) und DIPEA (0.238 ml, 1.4 mmol, 2.9 Äq.). Das Gemisch rührt bei RT für 5 h Reaktionszeit. Das Lösungsmittel wird evakuiert und der Rückstand chromatographisch mit CHCl₃/MeOH/NH₃ (90:10:1) gereinigt. Eine eventuell notwendige zweite chromatographische Trennung kann mit dem CHCl₃/MeOH (97:3) durchgeführt werden. Verbindung **4** wird als weißer Feststoff isoliert (29 %, 43 mg).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.47; **Smp.:** 138 °C; **¹H NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 2.83 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, Ar-CH₂-CH₂-), 3.52 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz, Ar-CH₂-CH₂-NH), 4.13 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, NH-CH₂-CO-), 7.13 (m, 2H, *Ar-H*), 7.50 (m, 3H, *Ar-H*), 8.39 (m, 3H, *Ar-H*), 8.49 (m, 1H, *Ar-H*); **¹³C NMR:** (CDCl₃) δ [ppm]: 32.8, 40.5, 43.3, 123.5, 126.2, 126.3, 128.4, 134.5, 136.4, 136.9, 144.2, 147.7, 150.0, 158.2, 160.4, 162.9, 168.8; **ESI-MS:** ber. 302.304, gef. 303.21 [M+H]⁺, 325.18 [M+Na]⁺; **Anal.** ber. für C₁₅H₁₅FN₄O₂: C 59.60, H 5.00, N 18.53; Gef.: C 58.87, H 4.95, N 17.94; **HR-MS:** ber.: 303.1258 [M+H]⁺, 325.1076 [M+Na]⁺; Gef.: 303.1265, 325.1082.

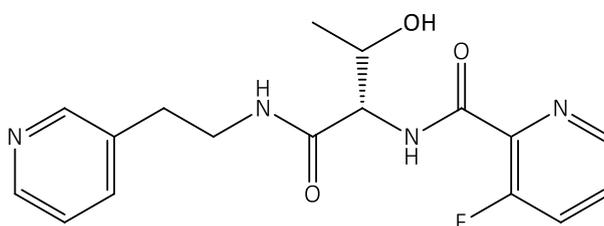
N-[2-Hydroxy-1-(2-pyridin-3-yl-ethylcarbamoyl)-propyl]carbaminsäure-tert-butylester (63)

N-Boc-L-Thr-OH (153 mg, 0.70 mmol) wird in 5.0 ml DCM gelöst. Es werden PyBOP (400 mg, 0.77 mmol, 1.1 Äq.), DIPEA (0.713 ml, 4.2 mmol, 6 Äq.) und 3-Aminoethylpyridin*2HBr (200 mg, 0.70 mmol) ergänzt. Die klare Lösung wird bei RT für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wird evakuiert und der Rückstand chromatographisch mit CHCl₃/MeOH/NH₃ (90:10:1)

gereinigt. Nach der Reinigung liegt das Produkt als gelbe viskose Flüssigkeit vor (46 %, 148 mg).

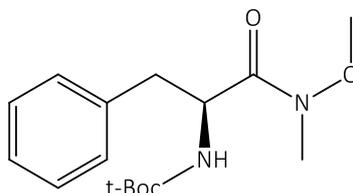
R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.40; **¹H NMR**: (CDCl₃): δ [ppm]: 1.10 (d, 3H, *J* = 6.26 Hz, CH₃-Thr), 1.38 (s, 9H, *t*-Boc), 2.79 (m, 2H, *J* = 6.8 Hz, Ar-CH₂-CH₂), 3.47 (dd, 2H, *J* = 13.2/6.8 Hz, Ar-CH₂-CH₂-NH), 4.00 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, CH₃-CH-OH), 4.27 (m, 1H, -NH-CH-CO-), 5.63 (d, 1H, -NH), 7.04 (bs, 1H, -OH), 7.20 (m, 1H, *Ar-H*), 7.51 (m, 1H, *Ar-H*), 8.39 (m, 2H, *Ar-H*); **ESI-MS**: ber. 323.387, gef. 323.99 [M+H]⁺, 346.07 [M+Na]⁺.

3-Fluoro-pyridin-2-carbonsäure[2-hydroxy-1-(2-pyridin-3-yl-ethylcarbamoyl)-propyl]amid (65)



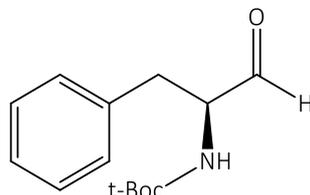
Verbindung **63** wird (148 mg, 0.46 mmol) in TFA/DCM (2.0 ml/2.0 ml) bei 0 °C gelöst und bei RT für 1 h gerührt. Das Lösungsmittel wird evakuiert, der Rückstand wird mit Toluol aufgenommen (3x) und wieder eingeengt (3x). Die Prozedur wird mit CHCl₃ (3x) wiederholt. In einem Scheidetrichter wird eine wässrige Lösung des Lithiumsalzes der 3-Fluorpicolinsäure (**7c**) (80 mg, 0.54 mmol, 1.2 Äq.) mit Hilfe von 1 M H₂SO₄ auf pH = 2 eingestellt und mit DCM (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet. Das aus Verbindung **5**, durch Trifluoressigsäurespaltung, gewonnene freie Amin wird in diesen Dichlormethanphasen gelöst. Dem Gemisch werden PyBOP (263 mg, 0.51 mmol) und DIPEA (0.251 ml, 1.48 mmol) ergänzt. Der Ansatz wird bei RT für 16 h gerührt. Das Gemisch wird am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand direkt chromatographisch CHCl₃/MeOH/NH₃ (90:10:1) gereinigt. Verbindung **6** wird als weißer Feststoff isoliert (47.8 %, 76 mg).

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1): 0.40; **Smp.:** 168-172 °C; **¹H NMR**: (CDCl₃): δ [ppm]: 1.10 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz, CH₃-Thr), 1.19 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz, CH₃-Thr), 2.80-2.89 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 3.48-3.61 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂-NH), 4.31-4.36 (m, 1H, CH₃-CH-OH), 4.44-4.48 (m, 1H, -NH-CH-CO-), 6.98 (m, 1H, -OH), 7.12 (m, 1H, -NH), 7.14-7.17 (m, 1H, *Ar-H*), 7.26-7.28 (m, 1H, *Ar-H*), 7.50-7.58 (m, 3H, *Ar-H*), 8.42-8.48 (m, 2H, *Ar-H*), 8.70 (d, 1H, -NH); **ESI-MS**: ber. 346.3562, gef. 369.20 [M+Na]⁺; **HR-MS**: ber. 347.152 [M+H]⁺, 369.1339 [M+Na]⁺; Gef.: 347.1528, 369.1346.

7.2.2.7 Synthesebeitrag für die Darstellung der Hydroxy-Methyl-SeitenketteSynthese des [1-(Methoxy-methylcarbamoyl)-2-phenylethyl]carbaminsäure-tert-butylesters (66)

In einem Rundkolben wird *N*-Boc-*L*-Phe-OH (1.0 g, 3.7 mmol) in 15 ml DCM gelöst. DIPEA (660 μ l, 3.9 mmol) und PyBOP (2.13 g, 4.1 mmol) werden ergänzt. Nach einigen Minuten wird Dimethylhydroxylamin*HCl (398 mg, 4.1 mmol) ergänzt und weitere 660 μ l DIPEA hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 60 min gerührt. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer eingedunstet und chromatographisch mit EtOAc/Hexan (1:1) gereinigt. Das Produkt wird als viskose Flüssigkeit gewonnen (68 %, 772 mg,).

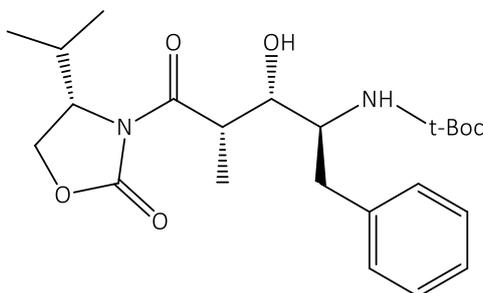
R_f (EtOAc/Hexan 1:1): 0.53; $^1\text{H NMR}$: (CDCl_3): δ [ppm]: 1.28 (s, 9H, *t*-Boc), 2.73-2.96 (m, 2H, - CH_2 -Ar), 3.03 (s, 3H, - N-CH_3), 3.52 (s, 3H, - O-CH_3), 4.46 (s, 1H, - NH-CH-CO), 5.30 (s, 1H, -NH), 7.05-7.19 (m, 5H, *Ar-H*); **ESI-MS**: ber. 308.373, gef. 331.01 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

N-(1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbaminsäure-tert-butylester (67)

Verbindung **66** (887 mg, 2.89 mmol) wird in 10 ml Et_2O gelöst, darauf folgt die langsame Zugabe von LiAlH_4 (137 mg, 3.61 mmol). Während der Reaktion wird eine kräftige Gasbildung beobachtet. Nach 20 min wird sehr vorsichtig eine wässrige NaHSO_4 -Lösung (601 mg NaHSO_4 in 10 ml Wasser, 5.1 mmol, 1.75 Äq.) zum Ansatz gegeben um überschüssiges LiAlH_4 umzusetzen, was wieder zu einer heftigen Gasentwicklung führt. Diese wässrige Mischung wird mit weiteren 25 ml Et_2O versetzt und die organische Phase abgetrennt. Der wässrige Rückstand, indem sich ein seifenartiger Niederschlag befindet, wird nochmals mit Et_2O (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 3 M HCl (3x), gesättigter NaHCO_3 -Lösung (3x) und Brine (3x) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Vakuumrotationsverdampfer eingedunstet. Das farblose, viskose Produkt ist unter Argon zwei Wochen bei RT oxidationsstabil (79 %, 562 mg). Für eine weitere Reinigung mittels Säulenchromatographie ist das Produkt, aus Stabilitätsgründen, nicht geeignet. Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.¹⁵¹

$^1\text{H NMR}$: (CDCl_3): δ [ppm]: 1.43 (s, 9H, *t*-Boc), 2.82-3.14 (m, 2H, CH_2 -Ar), 4.41 (s, 1H, -NH-CH-CO-), 5.11 (s, 1H, -NH), 7.15-7.32 (m, 5H, *Ar-H*), 9.61 (s, 1H, -CHO).

N-[(3S)-3-hydroxy-4-methyl-5-oxo-5-[(4S)-2-oxo-4-(propan-2-yl)-1,3-oxazolidin-3-yl]-1-phenylpentan-2-yl]carbaminsäure-tert-butylester (68)



Das (S)-4-Isopropyl-4-methyl-3-propionyl-oxazolidin-2-on (255 mg, 1.38 mmol) wird bei 0 °C in 10 ml DCM gelöst und mit Argon begast. Nach erfolgter Injektion von DBBT (413 mg, 1.51 mmol einer 1.0 M Lösung) und DIPEA (280 µl, 1.65 mmol) wird der Ansatz bei 0 °C für 30 min gerührt. Daraufhin wird das Reaktionsgemisch auf -78 °C gekühlt.

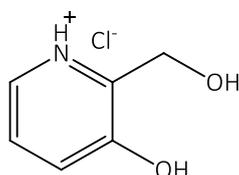
Das Zwischenprodukt **67** (374 mg, 1.51 mmol) wird in 10 ml DCM gelöst und in das DBBT-Gemisch langsam hinzutropft. Das Reaktionsgemisch wird bei -78 °C für 30 min und anschließend bei RT für 90 min gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit ist die Argonatmosphäre nicht mehr notwendig. Der Ansatz wird auf 0 °C gekühlt und es werden 10 ml Phosphatpuffer (pH = 7.0 R4 nach Ph. Eur. 7.0) und 30 ml einer MeOH/30 % H₂O₂-Mischung (2:1) ergänzt, anschließend wird für 1 h gerührt.

Das DCM wird evakuiert und das Produkt wird mit Et₂O extrahiert (3x). Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5 % NaHCO₃-Lösung und Brine gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Der gelblich, ölige Rückstand wird chromatographisch mit CHCl₃ gereinigt. Im Gegensatz zu Cai et al. (2011)¹⁴⁷ und Leitheiser et al. (2003)¹⁴⁸ liegt das Produkt als farbloser Sirup vor. Ein Umkristallisieren aus EtOAc/Hexan führt zu keiner Feststoffisolierung (75 %, 448 mg).

Phosphate-Puffer pH 7.0 (Ph. Eur. 7.0): 28.4 g Na₂HPO₄ und 18.2 g KH₂PO₄ werden in 500 ml destilliertem H₂O gelöst.

R_f (CHCl₃): 0.15; **¹H NMR:** (CDCl₃)^{147,148}: δ [ppm]: 0.86 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃-CH-CH₃), 0.89 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃-CH-CH₃), 1.33 (s, 9H, *t*-Boc), 1.39 (m, 3H, -CH-CH₃), 2.23-2.30 (m, 1H, CH₃-CH-CH₃), 2.86 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, Ar-CH₂-CH-), 3.80-3.84 (m, 2H, -O-CH₂-CH-), 3.92-3.98 (m, 1H, -NH-CH-CH-OH), 4.12 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, -CH-OH), 4.32 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, -N-CH-CH₂-), 4.43-4.47 (m, 1H, -CO-CH-CH₃), 4.83-4.87 (m, 1H, -NH), 7.16-7.27 (m, 5H, Ar-H); **ESI-MS:** ber. 434.526, gef. 457.08 [M+Na]⁺.

7.2.2.8 Synthesebeitrag zur Synthese der exozyklischen 3-Hydroxypicolinsäure 3-Hydroxy-2-hydroxymethylpyridin-HCl (71)



Zu einem Gemisch aus 3-Hydroxypyridin (4.0 g, 42.0 mmol) und 10%ige NaOH-Lösung (1.68 g in 16.8 ml H₂O) wird 3.4 ml 37%iges Formaldehyd (42.0 mmol) gegeben. Dieses wird auf 90 °C für 3 h erhitzt. Nach Zugaben von 2.4 ml Essigsäure (42.0 mmol) rührt das Gemisch für 30 min. Die Wasserphase wird am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt und der ölige Rückstand mit 40 ml Aceton bei RT über Nacht gerührt. Der sich bildende Feststoff wird filtriert und mit 10.5 ml warmen Aceton (2x) gewaschen. Sollte kein Feststoff ausfallen, wird die Wasserphase nochmals eingeeengt und nochmals Aceton ergänzt. Das gesammelte Aceton wird wiederholt mit 40 ml Aceton verdünnt bis kein Feststoff mehr ausfällt. Die organische Phase wird am Vakuumrotationsverdampfer konzentriert und bei 0 °C HCl-Gas eingeleitet. Nach 15 min wird der Feststoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen (2x) und der Rückstand mit gesättigter ethanolischer HCl-Lösung (20-30 ml) bei 0 °C für 1-2 h gerührt. Nach nochmaligem Waschen des Feststoffs mit EtOH verbleibt ein weißer Feststoff (23 %, 1.56 g, berechnet als HCl).

Smp.: 209 °C¹⁵²⁻¹⁵⁴; **¹H-NMR:** (D₂O) δ [ppm]: 4.90 (s, 2H, -CH₂OH), 7.69 (dd, 1H, *J* = 8.61/5.87 Hz, 5-*H*), 7.83 (dd, 1H, *J* = 8.61/1.17 Hz, 4-*H*), 8.12 (dd, 1H, *J* = 5.87/1.17 Hz, 6-*H*); **ESI-MS:** ber. 125.13, gef. 126.02 [M+H]⁺.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Dartois, V., *The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells*. Nature Reviews Microbiology **2014**.
2. WHO *Global Tuberculosis Report 2013* World Health Organisation: **2014**.
3. *Epidemiologisches Bulletin*, 11/12; Robert Koch Institut: Berlin, **2014**, 91-102.
4. Koul, A., et al., *The challenge of new drug discovery for tuberculosis*. Nature **2011**, 469, 483-490.
5. <http://www.microbiologyinpictures.com>, aufgerufen am 27.10.2014.
6. Koch, O., et al., *Biologie der Mykobakterien und neue molekulare Targets*. Pharmazie in unserer Zeit **2012**, 41, 19-26.
7. Berry, M. P. R., et al., *transcriptional signature in human tuberculosis*. Nature **2010**, 466, 973-977.
8. Balganes, T. S., et al., *Rising standards for tuberculosis drug development*. Trends in pharmacological sciences **2008**, 29, 576-81.
9. Franzblau, S. G., et al., *Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis **2012**, 92, 453-488.
10. Sacchettini, J. C., et al., *Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator Mycobacterium tuberculosis*. Nature Reviews Microbiology **2008**, 6, 41-52.
11. Park, S.-H., et al., *CD1-restricted T-cell responses and microbial infection*. Nature **2000**, 406, 788-792.
12. Hett, E. C., et al., *Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective*. Microbiology and Molecular Biology Reviews **2008**, 72, 126-156.
13. Brennan, P. J., *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis **2003**, 83, 91-97.
14. Tahlan, K., et al., *SQ109 Targets MmpL3, a Membrane Transporter of Trehalose Monomycolate Involved in Mycolic Acid Donation to the Cell Wall Core of Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2012**, 56, 1797-1809.
15. Vilchèze, C., et al., *The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics*. Annual review of microbiology **2007**, 61, 35-50.
16. Brennan, P. J., et al., *The envelope of mycobacteria*. Annual Review of Biochemistry **1995**, 64, 29-63.
17. <http://www.tbfacts.org/tb-treatment.html>, Stop TB Partnership: aufgerufen am 26.10.2014.
18. Zumla, A., et al., *Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens*. Nature Reviews Drug Discovery **2013**, 12, 388-404.
19. Zhang, Y., et al., *Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis **2009**, 13, 1320-1330.
20. Mütterlein, R., *Resistenzen importiert aus Russland*. Pharmazie in unserer Zeit **2012**, 41, 73-75.
21. Spigelman, M. K., *New tuberculosis therapeutics: a growing pipeline*. The Journal of infectious diseases **2007**, 196 Suppl, S28-34.
22. Lange, C., et al., *Advances in the diagnosis of tuberculosis*. Respirology (Carlton, Vic.) **2010**, 15, 220-40.
23. Ginsberg, A. M., *Drugs in development for tuberculosis*. Drugs **2010**, 70, 2201-14.
24. Rudolph, I., et al., *Tuberkulose: Schwindsucht ist nicht verschwunden*. Pharmazeutische Zeitung **2011**, 8, 18-27.
25. <http://www.newtbdrugs.org/pipeline.php>, Stop TB Partnership: aufgerufen am 26.10.2014.
26. <http://www.tballiance.org/portfolio/clinical-portfolio>, TB Alliance: aufgerufen am 26.10.2014.
27. Ma, Z., et al., *Toward an optimized therapy for tuberculosis? Drugs in clinical trials and in preclinical development*. Clinics in chest medicine **2009**, 30, 755-68.

28. Lienhardt, C., et al., *New drugs and new regimens for the treatment of tuberculosis: review of the drug development pipeline and implications for national programmes*. Current opinion in pulmonary medicine **2010**, 16, 186-93.
29. Shi, R., et al., *Development of New Anti-tuberculosis Drug Candidates*. The Tohoku Journal of Experimental Medicine **2010**, 221, 97-106.
30. Diacon, A. H., et al., *14-day bactericidal activity of PA-824, bedaquiline, pyrazinamide, and moxifloxacin combinations: a randomised trial*. The Lancet **2012**, 1-8.
31. FDA Application No. 204384.
32. Andries, K., et al., *A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis*. Science (New York, N.Y.) **2005**, 307, 223-7.
33. <http://www.newtbdrugs.org/blog/?s=delamanid>, Stop TB Partnership: aufgerufen am 26.10.2014.
34. Cole, S. T., *Transporter targeted in tuberculosis*. nature chemical biology **2012**, 8, 326-327.
35. Janin, Y. L., *Antituberculosis drugs: ten years of research*. Bioorganic & medicinal chemistry **2007**, 15, 2479-513.
36. Bogatcheva, E., et al., *Chemical modification of capuramycins to enhance antibacterial activity*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **2010**, 66, 578-587.
37. Trefzer, C., et al., *Benzothiazinones Are Suicide Inhibitors of Mycobacterial Decaprenylphosphoryl- β -D-ribofuranose 2'-Oxidase DprE1*. Journal of the American Chemical Society **2011**, 134, 912-915.
38. Makarov, V., et al., *Benzothiazinones kill Mycobacterium tuberculosis by blocking arabinan synthesis*. Science (New York, N.Y.) **2009**, 324, 801-4.
39. Makarov, V., et al., *Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones*. EMBO Molecular Medicine **2014**.
40. Copp, B. R., et al., *Natural product growth inhibitors of Mycobacterium tuberculosis*. Natural product reports **2007**, 24, 278-97.
41. Kishore, N., et al., *Alkaloids as potential anti-tubercular agents*. Fitoterapia **2009**, 80, 149-63.
42. Liu, X., et al., *Exploring anti-TB leads from natural products library originated from marine microbes and medicinal plants*. Antonie van Leeuwenhoek **2012**, 102, 447-461.
43. Bologa, C. G., et al., *Emerging trends in the discovery of natural product antibacterials*. Current Opinion in Pharmacology **2013**, 13, 678-687.
44. Manger, M., et al., *Discovery of Mycobacterium Tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase A (MptpA) Inhibitors Based on Natural Products and a Fragment-Based Approach*. ChemBioChem **2005**, 6, 1749-1753.
45. Schmitt, E. K., et al., *The Natural Product Cyclomarin Kills Mycobacterium Tuberculosis by Targeting the ClpC1 Subunit of the Caseinolytic Protease*. Angewandte Chemie International Edition **2011**, 50, 5889-5891.
46. Vasudevan, D., et al., *Structural basis of mycobacterial inhibition by cyclomarin A*. J Biol Chem **2013**, 288, 30883-91.
47. Lee, R. E., et al., *Spectinamides: a new class of semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux*. Nat Med **2014**, 20, 152-158.
48. Barry, C. E., *Tuberculosis: Drug discovery goes au naturel*. Nature **2014**, 506, 436-437.
49. Hartkoorn, R. C., et al., *Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin – nature's isoniazid*. EMBO Molecular Medicine **2012**, 4, 1-11.
50. Wright, G. D., *Back to the future: a new 'old' lead for tuberculosis*. EMBO Molecular Medicine **2012**, 4, 1029-1031.
51. Wolfson, W., *Grabbing for the Ring: Macrocycles Tweak the Conventions of Drug Making*. Chemistry & Biology **2012**, 19, 1356-1357.
52. Cain, C., *Excited about cycling*. BioCentury **2012**, 1-7.
53. Maeda, K., et al., *A new antibiotic, pyridomycin*. Journal of antibiotics, Series A **1953**, 6, 140.
54. Koyama, G., et al., *The Structure of Pyridomycin*. Tetrahedron Letters **1967**, 37, 3587-3590.
55. Shomura, T., et al., *Dactylosporangium fulvum sp. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology **1986**, 36, 166-169.

56. Zhang, M., et al., *Streptomycin-Starved Mycobacterium tuberculosis 18b, a Drug Discovery Tool for Latent Tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2012**, 56, 5782-5789.
57. Huang, T., et al., *Identification and characterization of the pyridomycin biosynthetic gene cluster of Streptomyces pyridomyceticus NRRL B-2517*. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 1-24.
58. Ogawara, H., et al., *The chemistry of pyridomycin*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1968**, 16, 679-687.
59. Garson, et al., *Strain Specificity and Production of Antibiotic Substances: VIII. Production of a Grisein-Like Antibiotic by a Strain of Streptomyces Griseus*. *PNAS* **1948**, 34, 232-239.
60. Rawat, R., *The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100, 13881-13886.
61. Shirude, P. S., et al., *Methyl-Thiazoles: A Novel Mode of Inhibition with the Potential to Develop Novel Inhibitors Targeting InhA in Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of medicinal chemistry* **2013**, 56, 8533-8542.
62. Hartkoorn, R. C., et al., *Pyridomycin bridges the NADH- and substrate-binding pockets of the enoyl reductase InhA*. *Nature Chemical Biology* **2013**, 10, 1-4.
63. Weeken, D., et al., *Wirkstoffe gegen Mycobacterium tuberculosis in klinischer Anwendung*. *Pharmazie in unserer Zeit* **2012**, 41, 35-47.
64. Ballell Pages Lluís, et al. *(Pyrazol-3-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine and (Pyrazol-3-yl)-1,3,4-thiazol-2-amine compounds*. WO002010118852A1, 13.04.2010, **2010**.
65. Encinas, L., et al., *Encoded Library Technology as a Source of Hits for the Discovery and Lead Optimization of a Potent and Selective Class of Bactericidal Direct Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis InhA*. *Journal of medicinal chemistry* **2014**, 57, 1276-1288.
66. Parikh, S. L., et al., *Inhibition of InhA, the Enoyl Reductase from Mycobacterium tuberculosis*, by. *Society* **2000**, 39, 7645-7650.
67. Castro Pichel Julia, et al. *3-Amino-Pyrazole Derivatives Useful Against Tuberculosis*. WO2012049161A1, 11.10.2011, **2012**.
68. Waters, B., et al., *Identifying protein kinase inhibitors using an assay based on inhibition of aerial hyphae formation in Streptomyces*. *Journal of antibiotics* **2002**, 55, 407-416.
69. Chao, J., et al., *Protein kinase and phosphatase signaling in Mycobacterium tuberculosis physiology and pathogenesis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2010**, 1804, 620-627.
70. Av-Gay, Y., et al., *The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology* **2000**, 8, 238-44.
71. Loughheed, K. E. A., et al., *Effective inhibitors of the essential kinase PknB and their potential as anti-mycobacterial agents*. *Tuberculosis* **2011**, 91, 277-286.
72. Magnet, S., et al., *Leads for antitubercular compounds from kinase inhibitor library screens*. *Tuberculosis* **2010**, 90, 354-360.
73. Molle, V., et al., *Phosphorylation of InhA inhibits mycolic acid biosynthesis and growth of Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **2010**, 78, 1591-1605.
74. Khan, S., et al., *Phosphorylation of Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase InhA Impacts Mycobacterial Growth and Survival*. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 37860-37871.
75. Chapman, T. M., et al., *Substituted aminopyrimidine protein kinase B (PknB) inhibitors show activity against Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, 22, 3349-3353.
76. Fernandez, P., et al., *The Ser/Thr Protein Kinase PknB Is Essential for Sustaining Mycobacterial Growth*. *Journal of Bacteriology* **2006**, 188, 7778-7784.
77. Kang, C.-M., et al., *The Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape*. *Genes & Development* **2005**, 19, 1692-1704.
78. Ortega, C., et al., *Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr Protein Kinase B Mediates an Oxygen-Dependent Replication Switch*. *PLoS Biol* **2014**, 12, 1-11.

79. Chawla, Y., et al., *Protein Kinase B (PknB) of Mycobacterium tuberculosis Is Essential for Growth of the Pathogen in Vitro as well as for Survival within the Host*. Journal of Biological Chemistry **2014**, 289, 13858-13875.
80. Kinoshita, et al., *Synthetic Studies of Pyridomycin. II. Synthesis of a Model Twelve-membered Ring Compound Related to Pyridomycin*. Bulletin of the Chemical Society of Japan **1978**, 51, 869-871.
81. Kinoshita, M., et al., *Synthetic Studies on Pyridomycin. III. Chiral Synthesis of (2R, 2S)-(-)-2, 3-Dihydroxy-3-methylpentanoic Acid from Sugar Derivative*. Bulletin of the Chemical Society of Japan **1978**, 51, 3595-3598.
82. Kinoshita, M., et al., *Synthesis of (2R, 3S, 4S)-4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-5-(3-pyridyl)pentanoic Acid Present in Antibiotic Pyridomycin*. Bulletin of the Chemical Society of Japan **1975**, 48, 2081-2083.
83. Kinoshita, M., et al., *Synthetic Studies of Pyridomycin. IV. Synthesis of a Model Twelve-membered Ring Compounds Designed for Construction of Intact Ring System with Exocyclic (Z)-s-Butylidene Side Chain in Pyridomycin*. Bulletin of the Chemical Society of Japan **1985**, 58, 3298-3308.
84. Lloyd-Williams, P., et al., *Protection schemes for peptide synthesis*. In Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, 1 ed.; CRC Press LLC: Barcelona, **1997**, 8-12.
85. Meyers, a. I., et al., *Oxidation of Oxazolines and Thiazolines to Oxazoles and Thiazoles. Application of the Kharasch-Sosnovsky Reaction*. The Journal of organic chemistry **1996**, 61, 8207-8215.
86. Simpkins, W. J., et al. *US 4,786,647*. **1988**.
87. Li Shuwei, et al. *Deuterium isobaric tag reagents for quantitative analysis*. WO2010104981A2, 10.03.2010, **2010**.
88. Brook, M. A., et al., *A Simple Procedure for the Esterification of Carboxylic Acids*. Synthesis **1983**, 201-203.
89. Linn, K., et al., *Practical preparation of benzyloxyacetic acids*. Tetrahedron Letters **2008**, 49, 3762-3765.
90. Zymalkowski, F., *Katalytische Hydrierungen*. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart: **1965**, Vol. 61.
91. Lloyd-Williams, P., et al., *Chain elongation*. In Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, 1 ed.; CRC Press LLC: **1997**, 48-55.
92. Montalbetti, C. A. G. N., et al., *Amide bond formation and peptide coupling*. Tetrahedron **2005**, 61, 10827-10852.
93. El-Faham, A., et al., *Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup*. Chemical Reviews **2011**, 111, 6557-6602.
94. Kim, M., *"BOP" as a reagent for mild and efficient preparation of esters*. Tetrahedron Letters **1994**, 35, 5603-5606.
95. Neises, B., et al., *Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids*. Angewandte Chemie International Edition **1978**, 17, 522-524.
96. Steglich, W., et al., *N,N-Dimethyl-4-pyridinamine, a Very Effective Acylation Catalyst*. Angewandte Chemie International Edition in English **1969**, 8, 981.
97. Malesevic, M., et al., *An improved method for the solution cyclization of peptides under pseudo-high dilution conditions*. Journal of Biotechnology **2004**, 112, 73-77.
98. Xu, Y., et al., *Total synthesis of hirsutellide A*. Tetrahedron Letters **2005**, 46, 4377-4379.
99. Horlacher, O. P., et al., *Synthesis and Antimycobacterial Activity of 2,1'-Dihydropyridomycins*. ACS Medicinal Chemistry Letters **2012**, 4, 264-268.
100. Altmann, K.-H., et al. *Pyridomycin based compounds exhibiting an antitubercular activity*. WO 2014/040709 A1, 04.09.2013, **2014**.
101. Kinoshita, M., et al., *Total synthesis of pyridomycin*. Tetrahedron letters **1989**, 30, 7419-7422.
102. Jatzkewitz, H., et al., *On thin layer chromatography of cerebral lipids, their conversion and decomposition products* Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie **1960**, 320, 251-7.

103. Deimer, K.-H., *Blockierung und Schutz der alpha-Carboxyfunktion*. In *Methoden der Organischen Chemie*, 1 ed.; Houben-Weyl: Vol. 15, 348.
104. Miller, H. K., et al., *Benzyl Esters of Amino Acids*. *Journal of the American Chemical Society* **1952**, 74, 1092-1093.
105. Tietze, L. F., et al., *Synthesis and Biological Evaluation of a Novel Pentagastrin- Toxin Conjugate Designed for a Targeted Prodrug Monotherapy of Cancer*. *International Journal of Molecular Sciences* **2008**, 9, 821-837.
106. Büttner, F., et al., *Cyclic β -Tetra- and Pentapeptides: Synthesis through On-Resin Cyclization and Conformational Studies by X-Ray, NMR and CD Spectroscopy and Theoretical Calculations*. *Chemistry - A European Journal* **2005**, 11, 6145-6158.
107. Nakao, R., et al., *A Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids Using Chlorosilanes*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1981**, 54, 1267-1268.
108. Rokhum, L., et al., *One-pot solid phase synthesis of (E)-nitroalkenes*. *Tetrahedron letters* **2013**, 54, 5500-5504.
109. Rodríguez, J. M., et al., *Straightforward synthesis of nitroolefins by microwave- or ultrasound-assisted Henry reaction*. *Tetrahedron Letters* **2011**, 52, 2629-2632.
110. Ballini, R., et al., *Nitroaldol Reaction in Aqueous Media: An Important Improvement of the Henry Reaction*. *The Journal of organic chemistry* **1997**, 62, 425-427.
111. Luzzio, F. A., *The Henry reaction: recent examples*. *Tetrahedron* **2001**, 57, 915-945.
112. Mühlstädt, M., et al., *Nitrovinylverbindungen. III. Nitrovinylcarbonsäureester durch Kondensation von ω -Nitrocarbonsäureestern mit aromatischen Aldehyden*. *Journal für Praktische Chemie* **1975**, 317, 919-925.
113. Crowell, T. I., et al., *Kinetic Evidence for a Schiff Base Intermediate in the Knoevenagel Condensation*. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, 75, 1075-7
114. Yamamura, K., et al., *The Preparation of Geometrical Isomers of β -Nitrostyrene and Their Addition Reactions with Ethanol*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1971**, 44, 2440-2443.
115. Burger, A., et al., *Some Pyridylnitroalkenes, Nitroalkanols, and Alkylamines*. *The Journal of Organic Chemistry* **1957**, 22, 143-144.
116. Jencks, W. P., et al., *Ionization constants of acids and bases*. In *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, Fasman, G. D., ed., Ed. CRC Press: Cleveland, **1976**, 305-351.
117. Hass, H. B., et al., *nitro alkene derivatives*. *The Journal of organic chemistry* **1950**, 15, 8-14.
118. Altenbach, R. J., et al., *Synthesis and Structure-Activity Studies on N-[5-(1H-Imidazol-4-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthalenyl]methanesulfonamide, an Imidazole-Containing α 1A-Adrenoceptor Agonist*. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, 47, 3220-3235.
119. Tabolin, A. a., et al., *Rearrangement of 3-alkylidene-2-siloxy-tetrahydro-1,2-oxazines (ASENA). A new approach toward the synthesis of 3- α -hydroxyalkyl-5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines*. *Tetrahedron* **2009**, 65, 4578-4592.
120. Kuster, George J. T., et al., *Novel Five/Five- and Six/Five-Membered Bicyclic Nitroso Acetals from High-Pressure-Promoted Cyclisation Reactions of p-Methoxybenzyl Vinyl Ether, 1-Nitro-2-heteroaryl Ethenes, and Mono- and Di-Substituted Olefins*. *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, 2001, 553-560.
121. Yoshimoto, J., et al., *Aqua-aminoorganoboron Catalyst: Engineering Single Water Molecule to Act as an Acid Catalyst in Nitro Aldol Reaction*. *Chemistry Letters* **2008**, 37, 1294-1295.
122. Houshdar Tehrani, M., et al., *Synthesis of Baclofen; an Alternative Approach*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **2003**, 2, 1-3.
123. Schwetlick, K., *Allgemeine Arbeitsvorschrift für Aldolisierungen*. In *Organikum*, Wiley-VCH: Weinheim, **2009**, Vol. 23, 527-528.
124. Dauzonne, D., et al., *A Convenient Route to Substituted Phenylalanines*. *Communications, Synthesis* **1987**, 4, 399-401.
125. Kato, K., et al., *Synthesis of (R,S)-[4-¹¹C]baclofen via Michael addition of nitromethane labeled with short-lived ¹¹C*. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, 19, 6222-4.
126. Clark, J. H., *Fluoride ion as a base in organic synthesis*. *Chemical Reviews* **1980**, 80, 429-452.

127. Blay, G., et al., *Enantioselective Henry addition of methyl 4-nitrobutyrate to aldehydes. Chiral building blocks for 2-pyrrolidinones and other derivatives.* *Organic letters* **2010**, 12, 3058-61.
128. Fornicola, R. S., et al., *A New Synthesis of α -Amino Acid Derivatives Employing Methyl Nitroacetate as a Versatile Glycine Template.* *The Journal of organic chemistry* **1998**, 63, 3528-3529.
129. Stochdorph, G. D., et al. *DE 848 197.* **1952**.
130. Suh, Y.-G., et al., *Novel Potent Antagonists of Transient Receptor Potential Channel, Vanilloid Subfamily Member 1: Structure–Activity Relationship of 1,3-Diarylalkyl Thioureas Possessing New Vanilloid Equivalents.* *Journal of medicinal chemistry* **2005**, 48, 5823-5836.
131. Bhattacharjya, A., et al., *Sodium Borohydride Reduction of Nitrostyrenes by Reverse Addition: A Simple and Efficient Method for the Large-Scale Preparation of Phenylnitroethanes.* *Synthesis* **1985**, 886-887.
132. Helal, C. J., et al., *Use of Structure-Based Design to Discover a Potent, Selective, In Vivo Active Phosphodiesterase 10A Inhibitor Lead Series for the Treatment of Schizophrenia.* *Journal of medicinal chemistry* **2011**, 54, 4536-4547.
133. Baldoli, C., et al., *Michael Addition of Nitromethan to non-racemic chiral Cr(CO)₃ Complexes of Ethyl cinnamate Derivatives: Stereoselective Synthesis of (R)-(-)-Baclofen.* *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 2007-2014.
134. Desideri, N., et al., *Synthesis and Binding Properties to GABA Receptors of 3-Hydroxypyridinyl- and 3-Hydroxypiperidinyl-Analogues of Baclofen.* *Archiv der Pharmazie* **1992**, 325, 29-33.
135. Wan, P., et al., *The kinetics and mechanism of acid catalysed hydrolysis of lactams.* *Canadian Journal of Chemistry* **1980**, 58, 2423-2432.
136. Wegner, M. M., et al., *Catalytic Hydrogenation of Some Acylguanidines.* *Journal of Organic Chemistry* **1978**, 43, 3840-3844.
137. Luo, Q.-L., et al., *Inhibitors of type I MetAPs containing pyridine-2-carboxylic acid thiazol-2-ylamide. Part 1: SAR studies on the determination of the key scaffold.* *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, 15, 635-8.
138. Nasopoulou, M., et al., *A versatile annulation protocol toward novel constrained phosphinic peptidomimetics.* *The Journal of organic chemistry* **2007**, 72, 7222-8.
139. Niemann, C., et al., *The Synthesis of the Three Isomeric dl-beta -Pyridylalanines.* *the American Chemical Society* **1942**, 80, 1678-1682.
140. Griffith, R. K., et al., *The Synthesis of Polymers and Copolymers of β -(3-Pyridyl)-DL-alanine.* *The Journal of organic chemistry* **1964**, 29, 2658-2662.
141. Katsuki, T., et al., *The Stereoselective Synthesis of threo-3-Hydroxy-4-amino Acids.* *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1976**, 49, 3287-3290.
142. Núñez, S., et al., *Target–drug interactions: first principles and their application to drug discovery.* *Drug Discovery Today* **2012**, 17, 10-22.
143. Mattsson, S., et al., *A mild hydrolysis of esters mediated by lithium salts.* *Tetrahedron letters* **2007**, 48, 2497-2499.
144. Akwabi-Ameyaw Adwoa A, et al. *Farnesoid X receptor agonists* WO002009005998A1, **2009**.
145. Palomo, C., et al., *Current progress in the asymmetric aldol addition reaction.* *Chemical Society Reviews* **2004**, 33, 65.
146. Palomo, C., et al., *The Aldol Addition Reaction: An Old Transformation at Constant Rebirth.* *Chemical European Journal* **2002**, 8, 37-44.
147. Cai, X., et al., *Deglycobleomycin A6 analogues modified in the methylvalerate moiety.* *Bioorganic & medicinal chemistry* **2011**, 19, 3831-3844.
148. Leitheiser, C. J., et al., *Solid-Phase Synthesis of Bleomycin Group Antibiotics. Construction of a 108-Member Deglycobleomycin Library.* *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 8218-8227.
149. Evans, D. A., et al., *Enantioselectiv Aldol Condensations: Erythro-Selective Chiral Aldol Condensations via Boron Enolates.* *Journal of American Chemical Society* **1981**, 103, 2127-2129.
150. Evans, D. A., *The Aldol Reaction In Advanced Organic Chemistry, Lecture Number 27:* **2006**.

151. Fehrentz, J.-A., et al., *An Efficient Synthesis of Optically Active α -(*t*-Butoxycarbonylamino)-aldehyds from α -Amino Acids*. Communications Synthesis **1983**, 8, 676-678.
152. Urbanski, T., *Contributions to the chemistry of pyridine. Part I. Condensation of β -hydroxypyridine with formaldehyde in alkaline medium*. Journal of the Chemical Society (Resumed) **1946**, 243, 1104-1105.
153. Heinert, D., et al., *Studies on pyridoxine and pyridoxal analogs--I : The synthesis of substituted pyridinealdehydes*. Tetrahedron **1958**, 3, 49-61.
154. Dabak, K., *Pyridine and Benzene Templated Potential Peptidomimetics*. Turk J Chem **2002**, 26, 955-963.
155. Singer, A. W., et al., *Picolinic Acid Hydrochloride*. Organic Syntheses **1940**, 20, 79.
156. Sheehan, J. T., *3-hydroxypicolinic acid and some of its derivatives*. The Journal of Organic Chemistry **1966**, 31, 636-638.
157. An, G., et al., *Pd/C and NaBH₄ in Basic Aqueous Alcohol: An Efficient System for an Environmentally Benign Oxidation of Alcohols*. Synthesis **2010**, 477-485.
158. Saleh, M. S., et al., *Acid dissociation and solution equilibria of some pyridinecarboxylic acids*. The Analyst **1992**, 117, 1003.
159. Kong, L.-Y., et al., *Determination of the absolute configuration of natural products*. Chinese Journal of Natural Medicines **2013**, 11, 193-198.
160. Nugroho, A. E., et al., *Circular dichroism calculation for natural products*. Journal of Natural Medicines **2013**, 68, 1-10.
161. Bringmann, G., et al., *The Assignment of Absolute Stereostructures through Quantum Chemical Circular Dichroism Calculations*. European Journal of Organic Chemistry **2009**, 2009, 2717-2727.
162. Flack, H. D., et al., *The use of X-ray crystallography to determine absolute configuration*. Chirality **2008**, 20, 681-690.
163. Allenmark, S., et al., *Determination of absolute configuration—An overview related to this Special Issue*. Chirality **2008**, 20, 606-608.
164. Polavarapu, P. L., *Molecular Structure Determination Using Chiroptical Spectroscopy: Where We May Go Wrong?* Chirality **2012**, 24, 909-920.
165. Bruhn, T., et al., *SpecDis: Quantifying the Comparison of Calculated and Experimental Electronic Circular Dichroism Spectra*. Chirality **2013**, 25, 243-249.
166. Bifulco, G., et al., *Determination of Relative Configuration in Organic Compounds by NMR Spectroscopy and Computational Methods*. Chemical Reviews **2007**, 107, 3744-3779.
167. Afonin, S., et al., *4-Fluorophenylglycine as a Label for ¹⁹F NMR Structure Analysis of Membrane-Associated Peptides*. ChemBioChem **2003**, 4, 1151-1163.
168. Yan, S., et al., *Syntheses and antibacterial activity studies of new oxazolidinones from nitroso Diels–Alder chemistry*. Bioorg Med Chem Lett **2010**, 20, 1302-1305.
169. DIN Beiblatt zu DIN 58940-8; Medizinische Mikrobiologie. Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika.; **2004**, Beuth Verlag.
170. *Deutsches Arzneibuch*. In Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart, **1990**, Vol. 9. Auflage, 47-48 und 424-430.
171. Devulder, G., et al., *A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus Mycobacterium as a model*. Int. J. Syst. Evol. Micr. **2005**, 55, 293-302.
172. Yan, L., et al., *Discovery of N-[(4R)-6-(4-Chlorophenyl)-7-(2,4-dichlorophenyl)-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[2,3-b]pyridin-4-yl]-5-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (MK-5596) as a Novel Cannabinoid-1 Receptor (CB1R) Inverse Agonist for the Treatment of Obesity*. Journal of medicinal chemistry **2010**, 53, 4028-4037.
173. Wikler, M. A., et al., *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Seventh Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): **2006**.

174. Palomino, J. C., et al., *Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, 46, 2720-2722.
175. Zumpe, C., et al., *Comparison of potency assays using different read-out systems and their suitability for quality control*. *J Immunol Methods* **2010**, 360, 129-40.
176. Promega, *BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay Protocol*. In *Technical Bulletin*, **12/12**.
177. Wube, A. A., et al., *Sesquiterpenes from Warburgia ugandensis and their antimycobacterial activity*. *Phytochemistry* **2005**, 66, 2309-2315.
178. Altaf, M., et al., *Evaluation of the Mycobacterium smegmatis and BCG models for the discovery of Mycobacterium tuberculosis inhibitors*. *Tuberculosis* **2010**, 90, 333-337.
179. Drews, S. J., et al., *A protein kinase inhibitor as an antimycobacterial agent*. *FEMS microbiology letters* **2001**, 205, 369-374.
180. Kerr, M. S., et al., *An Efficient Synthesis of Achiral and Chiral 1, 2, 4-Triazolium Salts : Bench Stable Precursors for N-Heterocyclic Carbenes N-Heterocyclic carbenes have become a notable area of research since the first stable carbene was reported a ligand in transition*. *Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, 5725-5728.
181. Tseng, C. C., et al., *Stereochemical Studies. XLIV. Exploitation of the New Synthetic Scheme for Chiral Additives Usable in Asymmetric Syntheses. Novel Syntheses of optically Active γ -*. *Chemical Pharm Bull* **1977**, 25, 29-40.
182. Buchschacher, P., et al., *Beitrag zur asymmetrischen Synthese bicyclischer Verbindungen unter Katalyse mit optisch aktiven Aminosäuren. Synthese von (S)-2-Pyrrolidin-propionsäure und (R)-4-Amino-5-phenylvaleriansäure*. *Helvetica Chimica Acta* **1977**, 60, 2747-2755.
183. Ackermann, J., et al., *Approaches to the Synthesis of Cytochalasans Part 9. A versatile concept leading to all structural types of cytochalasans*. *Helvetica Chimica Acta* **1990**, 73, 122-132.

ANHANG

ANHANG I

Ergebnisse des Agardiffusionstests langkettiger, synthetischer Zwischenstufen

Tab. 22: Ergebnisse des Agardiffusionstests synthetischer Zwischenstufen

Verbindung	Hemmhofdurchmesser [mm]					
	<i>M. vaccae</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sp. salmonicolor</i>
4a	0	0	0	0	0	0
4b	0	0	0	0	0	0
5a	0	0	0	0	0	0
5b	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0
<i>Referenzsubstanzen^a</i>						
CIP	22	33	20	31	31	-
INH	23	<i>n.b.</i>	15	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	-
Amphotericin B	-	-	-	-	-	17

a) die angegebenen Hemmhöfe der Referenzsubstanzen entsprechen dem arithmetischen Mittel;

n.b. = nicht bestimmt; $c(\text{Testsubstanzen}) = 100 \mu\text{g/ml}$; $c(\text{CIP}) = 5 \mu\text{g/ml}$; $c(\text{INH}) = 100 \mu\text{g/ml}$; $c(\text{Amphotericin B}) = 10 \mu\text{g/ml}$.

ANHANG II

Ergebnisse der Radioaktivitätsmessung der Testsubstanzen **46 DS1/DS2**, **47 DS1**, **48 DS1**, **59** und **PYR** an der isolierten Proteinkinase B

Für die Testsubstanzen **46 DS1**, **48 DS1** und **59** war eine Auswertung der PknB-Aktivität bei der Testsubstanzkonzentration von 12 μM nicht eindeutig möglich (persönliche Information von Prof. Dr. Av-Gay). Um eine einheitliche Bewertung der enzymatischen Aktivitäten aller Testverbindungen zu gewährleisten, wurden die PknB-Effekte von **46 DS2**, **47 DS1** und **PYR** der Substanzkonzentration von 12 μM bei der Auswertung nicht berücksichtigt (siehe Tab. 23).

Tab. 23: Ergebnisse der PknB-Aktivitäten der Testsubstanzen 46 DS1/DS2, 47 DS1, 48 DS1, 59 und PYR

Substanz- konzentration [μM]	Radioaktivität [cpm]			
	I	II	III	Mittelwert
46 DS1				
0	50791	52226	57324	53447
0.24	41374	44349	40171	41964.7
1.2	25540	37429	39146	34038.3
2.4	25148	28121	29230	27499.7
4.8	20113	22422	19520	20685
12	-	-	-	-
46 DS2				
0	13941	10102	12891	12311.3
0.24	8206	8323	10116	8881.7
1.2	6525	6404	6239	6389.3
2.4	5661	5754	6028	5814.3
4.8	5182	5030	5419	5210.3
12	4249	5022	5504	4925
47 DS1				
0	9788	9061	8269	9039.3
0.24	8500	7482	7705	7895.7
1.2	10027	9600	8769	9465.3
2.4	11155	12784	10374	11437.7
4.8	15794	15432	12580	14602
12	18126	16793	15965	16961.3
48 DS1				
0	1706	2052	1866	1874.7
0.24	1707	1811	1728	1748.7
1.2	1531	1501	-	1516
2.4	1673	1269	1474	1472
4.8	1189	1286	-	1237.5
12	-	-	-	-
59				
0	2173	2001	2087	2087
0.24	2407	2286	2484	2392.3
1.2	2540	2013	2776	2443
2.4	2330	2525	2345	2400
4.8	2615	2226	2521	2454
12	-	-	-	-
PYR				
0	18914	29074	16991	21659.7
0.24	18595	32365	18821	23260.3
1.2	22187	33095	17572	24284.7
2.4	19634	36793	19682	25369.7
4.8	23122	37145	19190	26485.7
12	25091	40341	28470	31300.7

$n = 3$; Inkubationszeit 30 min; $c(\text{PknB}) = 2.4 \mu\text{M}$ für die Vermessung der Verbindungen **46 DS1/DS2**, **47 DS1**, **59** und **PYR**; $c(\text{PknB}) = 1.2 \mu\text{M}$ für die Vermessung der Verbindung **48 DS1**.

ANHANG III

^1H -NMR-Spektrum von Pyridomycin

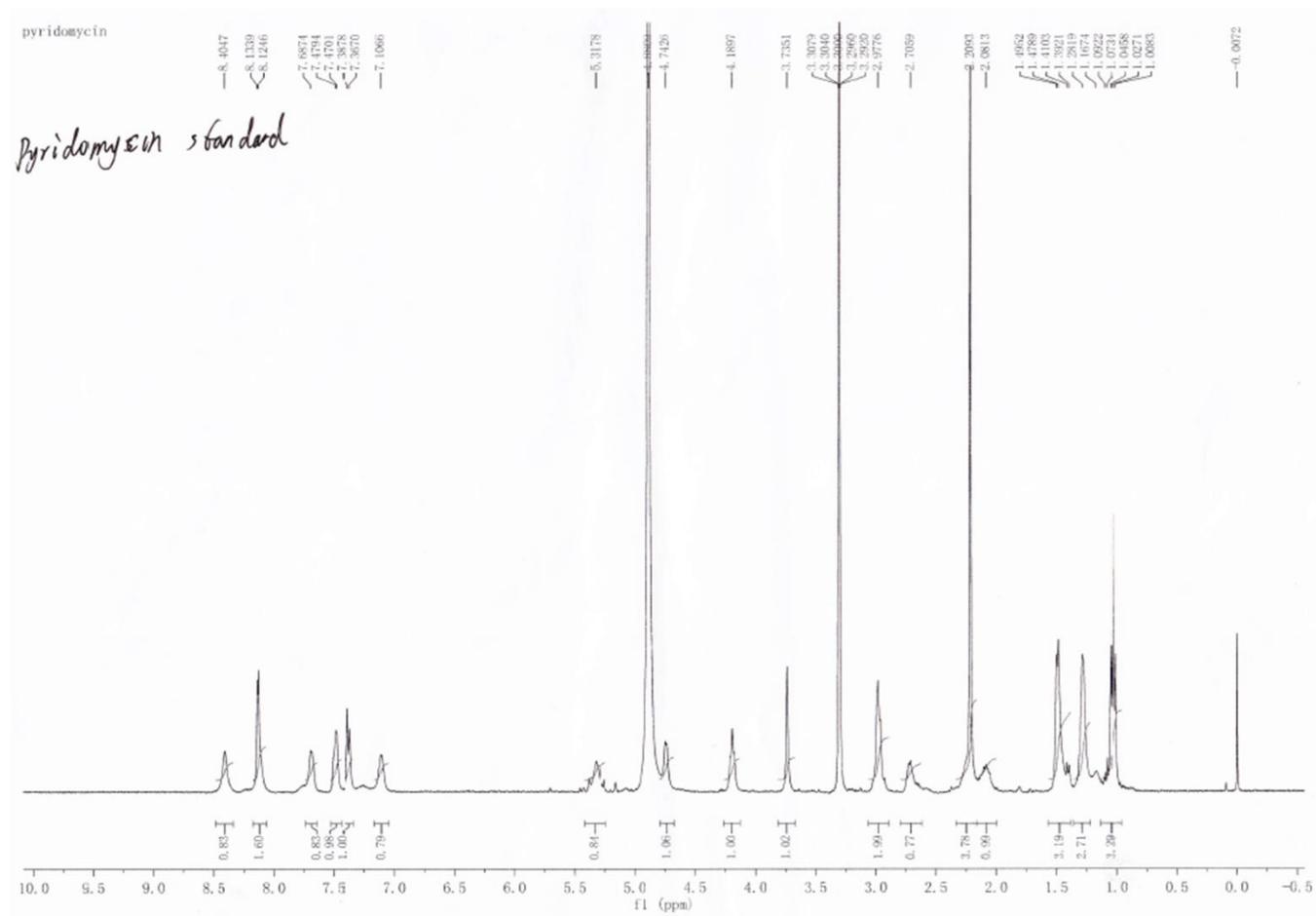


Abb. 54: ^1H -NMR-Spektrum von Pyridomycin (in CD_3OD)

Zur Verfügung gestellt durch Shuangjun Lin, Shanghai Jiao Tong University (Shanghai).

LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen

K. Laqua, P. Imming

Tuberkulose: Der Naturstoff Pyridomycin hat dasselbe Target wie Isoniazid.

PHARMAKON **2013**, 1, 11.

K. Laqua, I. Rudolph, P. Imming

Die Suche nach neuen Antituberkulotika: Bessere Suchstrategien, hoffnungsvolle Kandidaten

Pharmazie in unserer Zeit, **2012**, 41, 48-57.

I. Rudolph, K. Laqua, P. Imming

Tuberkulose: Schwindsucht ist nicht verschwunden

Pharmazeutische Zeitung, **2011**, 156, 18-27.

Poster

K. Laqua, M. Ramm, P. Imming

A new synthetic pathway towards pyridomycin derivatives and ring-opened congeners with antimycobacterial evaluation

Gordon Research Conference

21.07. - 26.07.2013, Lucca (Barga), Italy

M. Klemm, K. Laqua, P. Imming

Synthetic pathways to 12-membered cyclic depsipeptides and amide analogues of pyridomycin

Gordon Research Conference

21.07. - 26.07.2013, Lucca (Barga), Italy

K. Laqua, P. Imming

Synthesis and biological evaluation of pyridomycin analogues as antimycobacterial substances

Tuberculosis 2012- Biology, pathogenesis, intervention strategies

11.09. - 15.09.2012, Paris, France

K. Laqua, A. Richter, M. Ramm, U. Moellmann, P. Imming

Pyridomycin: evaluating its antimycobacterial potential through the synthesis and testing of new analogues

International Congress on Natural Products Research

28.07. - 01.08.2012, New York City, USA

DANKSAGUNG

Ein gebührender Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Peter Imming, der mir die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertationsschrift gegeben hat. Mit Rat und Tat stand er mir bei der Bearbeitung dieses interessanten und spannenden Themas zur Seite, wobei insbesondere auch die angenehmen und konspirativen Kaffee- und Teepausen zum Gelingen beigetragen haben.

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde erst durch die zahlreichen und intensiven Kooperationen mit dem Hans-Knöll-Institut in Jena, mit GlaxoSmithKline in Madrid, mit Prof. Dr. Av-Gay in Vancouver und Frau Dr. Porzel und Herr Dr. Brandt vom Leibniz-Institut in Halle ermöglicht. Den Kooperationspartnern gebührt ein großer Dank, ohne die ein Gelingen nicht möglich gewesen wäre.

Für das kritische Gegenlesen der Arbeit danke ich Ines und Simon herzlichst.

Aus der Arbeitsgruppe möchte ich Sabine und Ilona für die vielen netten Gespräche in den kleinen Pausen danken. An Ilona geht zudem ein großer Dank für die unermüdliche Nachsynthese zahlreicher Zwischenstufen.

Meine Anerkennung möchte ich weiterhin Frau Brandt und Frau Mannd für die unermüdliche Vermessung der Elementaranalysen zollen, die die eine oder andere Überstunde gekostet haben mag.

Als mein erster Diplomand möchte ich Dipl. Pharmazeut Adrian Richter sowie Apothekerin Linda Liebe für die sehr angenehme Diplomzeit danken. Die Diplomzeit war neben der vielseitigen synthetischen Leistung beider auch durch eine freundschaftliche Zusammenarbeit gekennzeichnet.

Neben Hackbällchen, Weinverkostungen und Fußball-Live-Übertragungen danke ich Marcel und Adrian für die diversen interessanten Fachdiskussionen, die durchaus auch ein (gewolltes) offenes Ende hatten.

Für die abwechslungsreichsten interdisziplinären wie außerdisziplinären Gespräche, Diskussionen und Ausflüge sorgten sowohl Lily, Aline, Tody als auch Ines. Uns verbindet die gemeinsame Zeit auf dem Pfad zur Erlangung des akademischen Grades, wobei die Zeit daraus eine Freundschaft hat entstehen lassen! Ich möchte keine Minute missen.

Der uneingeschränkte Dank gilt jedoch meinen Eltern und meiner Zwillingsschwester Anja. Mit unermesslicher Geduld haben sie sich die Hochs und die Tiefs anhören müssen und mir mit dem einen oder anderen beruhigenden Zuspruch ungemein weitergeholfen.

Meinem Freund und Lebenspartner Ralf danke ich herzlichst für die unendlichen unterstützenden Stunden bei allen Lebenslagen, die maßgeblich für die Anfertigung dieser Arbeit entscheidend waren. Wad mud, dad mud!

EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die daraus wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung weder im In- noch im Ausland zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Hofheim am Taunus, den 22. Dezember 2014

Katja Laqua

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Katja Laqua
Adresse: Rheingaustraße 75
65719 Hofheim am Taunus
Geburtsdaten: 14.08.1984 in Magdeburg,
Geschlecht: weiblich

Berufspraxis

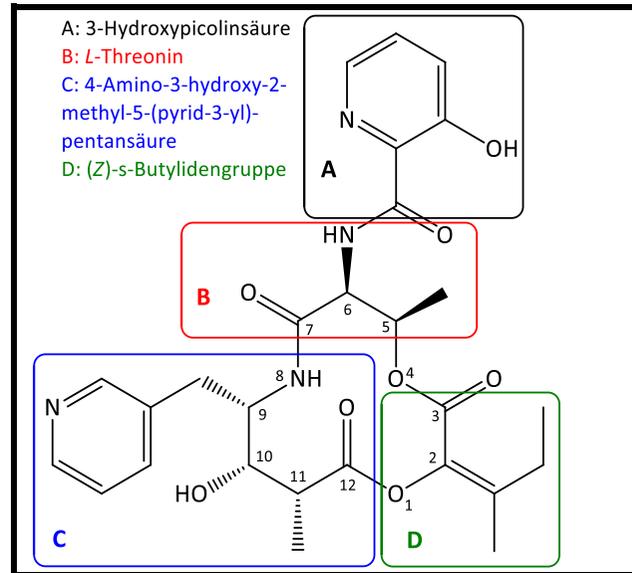
Seit 05/2014 AMCAPHARM Pharmaceutical GmbH
Qualitätskontrolle
05/2010-04/2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Anfertigung einer
Dissertationsschrift, Institut für Pharmazie unter der Leitung von Prof.
Dr. Imming (Pharmazeutische Chemie)
„Synthese und Testung neuartiger depsipeptidischer und cyclo-
depsipeptidischer Antituberkulotika“
01/2011-12/2012 Apothekerin (Teilzeit), Riebeck-Apotheke, Halle (Saale)
12/2009-04/2010 Apothekerin (Vollzeit), Stephanus-Apotheke, Halle (Saale)

Ausbildung

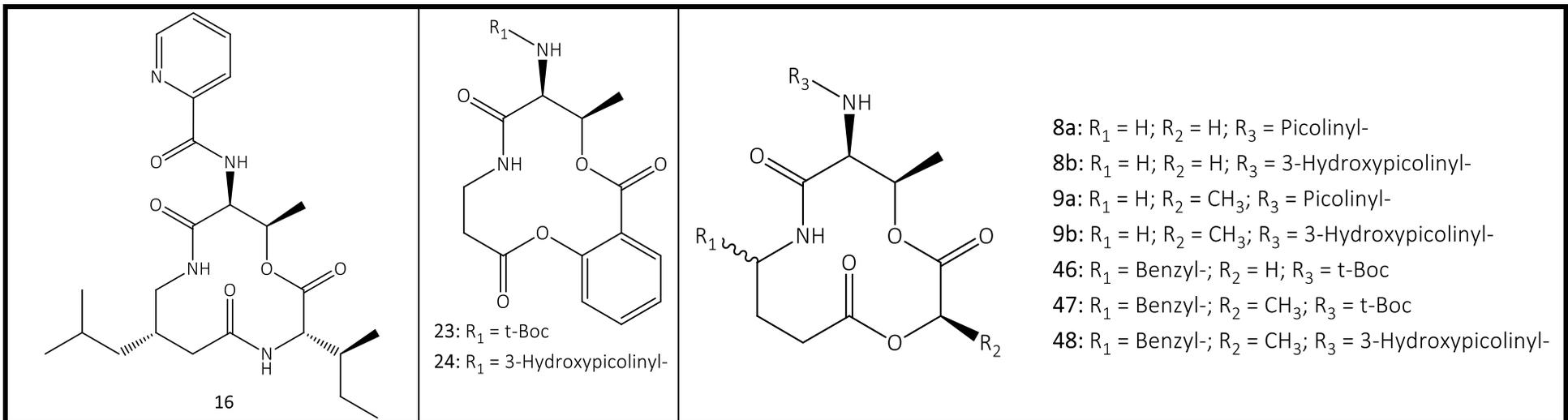
11/2009 Drittes Staatsexamen, Approbation als Apothekerin
05/2009-10/2009 Zweite Hälfte des Praktischen Jahres, Rosen-Apotheke, Halle (Saale)
11/2008-04/2009 Erste Hälfte des Praktischen Jahres, Institut für Pharmazie,
Prof. Dr. Imming (Pharmazeutische Chemie),
„Synthese pharmakologisch interessanter Protoberberin-Derivate“
10/2004-10/2008 Studium der Pharmazie; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2008 Zweites Staatsexamen
09/2006 Erstes Staatsexamen
08/1998-07/2004 Kurfürst-Joachim-Friedrich-Gymnasium Wolmirstedt, Abitur
08/1995-07/1998 Immanuel-Kant-Gymnasium, Magdeburg

Zusatz: Auflistung der Endverbindungen

Pyridomycin



Zyklische PYR-Analoga



Zusatz: Auflistung der Endverbindungen

Offenkettige PYR-Analoga

