

# Darstellung und Charakterisierung cyclischer Peptide mit antimykobakterieller Aktivität



## Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Thomas Wetzlar

geboren am 27.02.1989 in Alsfeld

Datum der öffentlichen Verteidigung:

05.03.2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Imming  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Frank Bordusa  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Drittgutachter: PD Dr. Norbert Reiling  
Forschungszentrum Borstel

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>vii</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>viii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tuberkulose.....	1
1.1.1 Krankheitsbild und Diagnostik .....	2
1.1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	3
1.1.3 Therapie der Tuberkulose .....	5
1.2 Prinzipien der Festphasen-Peptidsynthese.....	9
1.2.1 Die feste Phase.....	11
1.2.2 Schutzgruppen .....	12
1.2.3 Kupplungsreagenzien .....	15
1.3 Antimikrobielle Peptide .....	16
1.3.1 Wirkmechanismus der AMP .....	17
1.3.2 Potential und Probleme der AMP .....	18
1.4 Cyclische Peptide mit antimykobakterieller Aktivität.....	19
1.4.1 Wollamide .....	19
1.4.2 Griselimycine.....	21
<b>2. Zielstellung der Arbeit .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
3.1 Synthesen.....	23
3.1.1 Lineare Peptide .....	24
3.1.2 Cyclisierungen .....	29
3.1.3 Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen.....	33
3.2 Anti(myko)bakterielle Wirksamkeit und Cytotoxizität .....	35
3.2.1 Agardiffusionstest .....	35
3.2.2 Minimale Hemmkonzentration und Cytotoxizität .....	42
3.3 Physikochemische und pharmakokinetische Eigenschaften .....	46
3.3.1 Löslichkeit, Lipophilie, Permeabilität und Plasmaproteinbindung .....	47
3.3.2 Metabolische Stabilität in Plasma und Lebermikrosomen .....	51
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>56</b>
4.1 Enantiomer und Epimere des Wollamid B.....	56
4.2 Wollamid-Derivate (Asn → Xxx) .....	59

4.3	Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx).....	62
4.4	Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx) .....	63
4.5	Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx).....	64
4.6	Wollamid-Derivate mit N $\alpha$ -Methyl-Aminosäuren .....	67
4.7	Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide .....	70
4.8	Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide .....	71
4.9	Weitere Derivate.....	72
4.10	MHK <sub>90</sub> gegen <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (RFP).....	75
4.11	Zusammenfassung und Überblick über die Substanzklasse .....	78
4.11.1	Erregerspezifität und -vorhersagekraft.....	78
4.11.2	Pharmakokinetik der Wollamid-Analoga .....	79
4.11.3	Antimykobakterielle Aktivität der Wollamid-Analoga.....	80
4.11.4	Molekularer Wirkungsmechanismus .....	83
<b>5.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>84</b>
<b>6.</b>	<b>Materialien und Geräte .....</b>	<b>86</b>
<b>7.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>87</b>
7.1	Allgemeine Vorschrift zur Festphasen-Peptidsynthese (SPPS).....	87
7.1.1	Beladung der festen Phase .....	87
7.1.2	Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.....	87
7.1.3	Elongation der Peptidkette .....	88
7.1.4	Kupplung an eine N $\alpha$ -Methylaminosäure.....	88
7.1.5	Abspaltung des Peptides vom Harz .....	88
7.2	Allgemeine Vorschriften zur Cyclisierung der linearen Peptide .....	88
7.2.1	Cyclisierung der Tetrapeptide.....	88
7.2.2	Cyclisierung der Penta-/Hexapeptide .....	89
7.2.3	Cyclisierung unter Einbau eines Oxadiazol-Rings .....	89
7.3	Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen .....	89
7.3.1	Abspaltung der Boc-/Trt-/Pbf-Schutzgruppen.....	89
7.3.2	Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe.....	90
7.4	Bestimmung der Reinheit mittels UPLC-MS .....	90
7.5	Bestimmung der Reinheit mittels HPLC-UV .....	90
7.6	Bestimmung der Hemmzone .....	91
7.7	Bestimmung der Hemmzone gegen <i>A. baumannii</i> .....	91
7.8	Bestimmung der MHK <sub>90</sub> gegen <i>Mtb</i> H37Rv ATCC 25618.....	92
7.9	Bestimmung der Cytotoxizität .....	93
7.10	Bestimmung der MHK <sub>90</sub> gegen <i>Mtb</i> H37Rv (RFP).....	93
7.11	Bestimmung der Löslichkeit.....	94
7.12	Bestimmung des chromatographischen Log D .....	94
7.13	Bestimmung der Permeabilität.....	94

7.14	Bestimmung der humanen Serumalbuminbindung .....	95
7.15	Bestimmung der Plasmastabilität .....	95
7.16	Bestimmung der Stabilität in Lebermikrosomen .....	96
<b>8.</b>	<b>Syntheseprotokolle .....</b>	<b>98</b>
8.1	Enantiomer und Epimere des Wollamid B.....	98
8.1.1	H <sub>2</sub> N-D-Val-D-Asn(Trt)-Orn(Boc)-D-Trp(Boc)-D-Leu-Leu-OH (1a) .....	98
8.1.2	Cyclo(D-Val-D-Asn(Trt)-Orn(Boc)-D-Trp(Boc)-D-Leu-Leu) (1b) .....	98
8.1.3	Cyclo(D-Val-D-Asn-Orn-D-Trp-D-Leu-Leu) (1c) .....	99
8.1.4	H <sub>2</sub> N-D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-D-Trp(Boc)-Leu-OH (2a) .....	100
8.1.5	Cyclo(D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-D-Trp(Boc)-Leu) (2b).....	100
8.1.6	Cyclo(D-Leu-Val-Asn-D-Orn-D-Trp-Leu) (2c) .....	101
8.1.7	H <sub>2</sub> N-Leu-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (3a) .....	102
8.1.8	Cyclo(Leu-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (3b) .....	102
8.1.9	Cyclo(Leu-Leu-Val-Asn-D-Orn-Trp) (3c) .....	103
8.1.10	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-D-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (4a) .....	104
8.1.11	Cyclo(Leu-D-Leu-D-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (4b).....	104
8.1.12	Cyclo(Leu-D-Leu-D-Val-Asn-D-Orn-Trp) (4c) .....	105
8.1.13	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-D-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (5a) .....	106
8.1.14	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (5b).....	106
8.1.15	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Asn-D-Orn-Trp) (5c) .....	107
8.2	Wollamid-Derivate (Asn → Xxx) .....	108
8.2.1	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-Pro-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (6a) .....	108
8.2.2	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Pro-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (6b) .....	108
8.2.3	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Pro-D-Orn-Trp) (6c) .....	109
8.2.4	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-β-(4-Thiazolyl)-Ala-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (7a) .....	110
8.2.5	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-β-(4-Thiazolyl)-Ala-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (7b).....	110
8.2.6	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-β-(4-Thiazolyl)-Ala-D-Orn-Trp) (7c) .....	111
8.2.7	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-His(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (8a).....	112
8.2.8	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-His(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (8b) .....	112
8.2.9	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-His-D-Orn-Trp) (8c).....	113
8.2.10	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-β-(4-Pyridinyl)-Ala-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (9a) .....	114
8.2.11	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-β-(4-Pyridinyl)-Ala-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (9b) .....	114
8.2.12	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-β-(4-Pyridinyl)-Ala-D-Orn-Trp) (9c) .....	115
8.2.13	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (10a) .....	116
8.2.14	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (10b) .....	116
8.2.15	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Phe(4-F)-D-Orn-Trp) (10c) .....	117
8.2.16	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (11a) .....	118
8.2.17	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (11b) .....	118
8.2.18	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn-Trp) (11c) .....	119
8.2.19	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (12a) .....	120

8.2.20	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (12b) .....	120
8.2.21	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn-Trp) (12c) .....	121
8.2.22	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-D-Trp(Boc)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (13a) .....	122
8.2.23	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Trp(Boc)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (13b) .....	122
8.2.24	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Trp-D-Orn-Trp) (13c).....	123
8.2.25	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-Asn(DiMe)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (14a).....	124
8.2.26	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn(DiMe)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (14b) .....	124
8.2.27	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn(DiMe)-D-Orn-Trp) (14c) .....	125
8.2.28	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-D-Lys(Alloc)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (15a).....	126
8.2.29	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Lys(Alloc)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (15b) .....	126
8.2.30	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Lys-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (15c) .....	127
8.2.31	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Lys-D-Orn-Trp) (15d).....	128
8.3	Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx).....	129
8.3.1	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Orn(Boc)-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (16a).....	129
8.3.2	Cyclo(Leu-D-Orn(Boc)-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (16b) .....	129
8.3.3	Cyclo(Leu-D-Orn-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn-Trp) (16c) .....	130
8.3.4	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Val-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (17a) .....	131
8.3.5	Cyclo(Leu-D-Val-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (17b).....	131
8.3.6	Cyclo(Leu-D-Val-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn-Trp) (17c) .....	132
8.3.7	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Trp(Boc)-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (18a) .....	133
8.3.8	Cyclo(Leu-D-Trp(Boc)-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (18b) .....	133
8.3.9	Cyclo(Leu-D-Trp-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn-Trp) (18c).....	134
8.4	Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx) .....	135
8.4.1	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Chg-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (19a).....	135
8.4.2	Cyclo(Leu-D-Chg-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (19b).....	135
8.4.3	Cyclo(Leu-D-Chg-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn-Trp) (19c).....	136
8.4.4	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Phe(4-Cl)-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (20a).....	137
8.4.5	Cyclo(Leu-D-Phe(4-Cl)-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (20b).....	137
8.4.6	Cyclo(Leu-D-Phe(4-Cl)-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn-Trp) (20c) .....	138
8.4.7	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Trp(Boc)-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (21a) .....	138
8.4.8	Cyclo(Leu-D-Trp(Boc)-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (21b).....	139
8.4.9	Cyclo(Leu-D-Trp-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn-Trp) (21c) .....	139
8.5	Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx) .....	140
8.5.1	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-OH (22a) .....	140
8.5.2	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Arg(Pbf)-Trp(Boc)) (22b) .....	141
8.5.3	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Arg-Trp) (22c).....	141
8.5.4	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dab(Boc)-Trp(Boc)-OH (23a).....	142
8.5.5	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dab(Boc)-Trp(Boc)) (23b).....	142
8.5.6	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dab-Trp) (23c).....	143
8.5.7	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap(Me,Boc)-Trp(Boc)-OH (24a) .....	144

8.5.8	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap(Me,Boc)-Trp(Boc)) (24b) .....	144
8.5.9	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap(Me)-Trp) (24c) .....	145
8.5.10	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap(Boc)-Trp(Boc)-OH (25a) .....	146
8.5.11	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap(Boc)-Trp(Boc)) (25b).....	146
8.5.12	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap-Trp) (25c) .....	147
8.6	Wollamid-Derivate mit N $\alpha$ -Methyl-Aminosäuren .....	148
8.6.1	H <sub>2</sub> N-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-MeTrp(Boc)-Leu-D-Leu-Val-OH (26a) .....	148
8.6.2	Cyclo(Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-MeTrp(Boc)-Leu-D-Leu-Val) (26b) .....	148
8.6.3	Cyclo(Asn-D-Orn-MeTrp-Leu-D-Leu-Val) (26c) .....	149
8.6.4	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-MeAsn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (27a) .....	149
8.6.5	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-MeAsn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (27b) .....	150
8.6.6	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-MeAsn-D-Orn-Trp) (27c) .....	150
8.6.7	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-MeOrn(Boc)-Trp(Boc)-OH (28a) .....	151
8.6.8	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-MeOrn(Boc)-Trp(Boc)) (28b) .....	152
8.6.9	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn-D-MeOrn-Trp) (28c) .....	152
8.7	Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide .....	153
8.7.1	H <sub>2</sub> N-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Val-OH (29a) .....	153
8.7.2	Cyclo(Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Val) (29b) .....	153
8.7.3	Cyclo(Asn-D-Orn-Trp-Leu-Val) (29c) .....	154
8.7.4	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (30a) .....	155
8.7.5	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (30b).....	155
8.7.6	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Orn-Trp) (30c) .....	156
8.8	Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide .....	157
8.8.1	H <sub>2</sub> N-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (31a).....	157
8.8.2	Cyclo(Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (31b) .....	157
8.8.3	Cyclo(Leu-Val-D-Orn-Trp) (31c).....	158
8.8.4	H <sub>2</sub> N-D-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (32a) .....	158
8.8.5	Cyclo(D-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (32b).....	159
8.8.6	Cyclo(D-Leu-Val-D-Orn-Trp) (32c) .....	159
8.9	Weitere Derivate.....	160
8.9.1	H <sub>2</sub> N-Leu-D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Nal-OH (33a) .....	160
8.9.2	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Nal) (33b).....	160
8.9.3	Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn-D-Orn-Nal) (33c).....	161
8.9.4	H <sub>2</sub> N-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-Leu-D-Leu-Val-OH (34a) .....	162
8.9.5	Cyclo(D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-Leu-D-Leu-Val-Odz/Aryl(4-F)) (34b).....	162
8.9.6	Cyclo(D-Orn-Trp-Leu-D-Leu-Val-Odz/Aryl(4-F)) (34c) .....	163
8.9.7	NH <sub>2</sub> -Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (35a).....	164
8.9.8	Cyclo(Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (35b).....	164
8.9.9	Cyclo(Leu-Val-D-Orn-Trp-Leu-Val-D-Orn-Trp) (35c).....	165
8.9.10	H <sub>2</sub> N-D-Val-D-Orn(Boc)-D-Val-Leu-D-Leu-Trp(Boc)-OH (36a) .....	166

---

8.9.11	Cyclo(D-Val-D-Orn(Boc)-D-Val-Leu-D-Leu-Trp(Boc)) (36b) .....	166
8.9.12	Cyclo(D-Val-D-Orn-D-Val-Leu-D-Leu-Trp) (36c) .....	167
8.10	Lugdunin-Derivate.....	168
8.10.1	NH <sub>2</sub> -Orn(Boc)-D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val-OH (37a).....	168
8.10.2	Cyclo(Orn(Boc)-D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val) (37b) .....	168
8.10.3	Cyclo(Orn-D-Val-Trp-D-Leu-Val-D-Val) (37c).....	169
8.10.4	NH <sub>2</sub> -D-Orn(Boc)-D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val-OH (38a) .....	169
8.10.5	Cyclo(D-Orn(Boc)-D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val) (38b).....	170
8.10.6	Cyclo(D-Orn-D-Val-Trp-D-Leu-Val-D-Val) (38c) .....	170
<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>172</b>
<b>Danksagung .....</b>		<b>190</b>
<b>Lebenslauf .....</b>		<b>192</b>
<b>Publikationen .....</b>		<b>193</b>
<b>Eigenständigkeitserklärung .....</b>		<b>194</b>



## **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zellwand von *M. tuberculosis*<sup>21</sup>
- Abbildung 2: Standardtherapeutika gegen Tuberkulose
- Abbildung 3: Strukturformel der Capreomycine
- Abbildung 4: Allgemeines Schema zur Festphasen-Peptidsynthese
- Abbildung 5: Säure-vermittelte Entschützung der Boc-Gruppe
- Abbildung 6: Umsetzung des Aktiv-Esters
- Abbildung 7: Strukturformel der Wollamide
- Abbildung 8: Strukturformel der Griselimycine
- Abbildung 9: Allgemeines Schema zur Synthese cyclischer Hexapeptide
- Abbildung 10: Beladung des Harzes
- Abbildung 11: Verlängerung der Peptidkette
- Abbildung 12: Abspaltung des linearen Peptids von der unlöslichen Matrix
- Abbildung 13: Backbone-Cyclisierung eines Hexapeptids
- Abbildung 14: Cyclisierung unter Oxadiazol-Einbau
- Abbildung 15: Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen
- Abbildung 16: Enantiomer und Epimere des Wollamid B
- Abbildung 17: Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)
- Abbildung 18: Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)
- Abbildung 19: Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)
- Abbildung 20: Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)
- Abbildung 21: Ausschnitte der N $\alpha$ -H-Signale für Wollamid B aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum
- Abbildung 22: Wollamid-Derivate mit N $\alpha$ -Methyl-Aminosäuren
- Abbildung 23: Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide
- Abbildung 24: Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide
- Abbildung 25: Weitere Derivate
- Abbildung 26: Lugdunin
- Abbildung 27: links: unlösliches Peptid in alternierender L,D-Konfiguration,  
rechts: lösliches Peptid ohne alternierende L,D-Konfiguration
- Abbildung 28: aktive und permeable Wollamid-Derivate

## **Tabellenverzeichnis**

- Tabelle 1: Standardtherapie der sensiblen Tuberkulose
- Tabelle 2: Einteilung der *second-line* Antituberkulotika nach WHO
- Tabelle 3: Überblick über ausgewählte Linker<sup>35</sup>
- Tabelle 4: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Schutzgruppen
- Tabelle 5: Aminosäuresequenzen der linearen Peptide
- Tabelle 6: Aminosäuresequenzen der geschützten Cyclopeptide
- Tabelle 7: Aminosäuresequenzen der entschützten Cyclopeptide
- Tabelle 8: Hemmzonen der Wollamide vs. *M. vaccae* und *M. smegmatis*
- Tabelle 9: Hemmzonen der Wollamide vs. *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. aureus* (MRSA),  
*E. faecalis* (VRE), *E. coli* und *P. aeruginosa*
- Tabelle 10: Hemmzonen der Wollamide vs. *A. baumannii*
- Tabelle 11: MHK<sub>90</sub> vs. *Mtb* H37Rv ATCC 25618 und IC<sub>50</sub> vs. Hep2G der Wollamide
- Tabelle 12: MHK<sub>90</sub> vs. *Mtb* H37Rv (RFP)
- Tabelle 13: Löslichkeit, Lipophilie, Permeabilität und Plasmaproteinbindung der  
Wollamide
- Tabelle 14: Stabilität der Wollamide in Plasma
- Tabelle 15: Stabilität der Wollamide in Lebermikrosomen
- Tabelle 16: Bewertung der aktiven und permeablen Analoga dieser Arbeit

## **Abkürzungsverzeichnis**

2-CTC	2-Chlortritylchlorid
6-Ahx	6-Aminohexansäure
ACN	Acetonitril
ADC	Albumin-Dextrose-Katalase
ADME	Aufnahme-Distribution-Metabolismus-Eliminierung
AG	Arabinogalactan
Ala	Alanin
Alloc	Allyloxycarbonyl
AMP	Antimikrobielle Peptide
Äq	Äquivalente
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Backbone-Amide-Linker
BCG	Bacille Calmette-Guérin
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl
bRo5	Beyond Lipinski's "Rule of 5"
Bum	<i>tert</i> -butoxymethyl
CFU	Koloniebildende Einheiten
Chg	Cyclohexylglycin
Cl <sub>i</sub>	Intrinsische Clearance
CYP	Cytochrom P450-Enzym
Dab	2,4-Diaminobuttersäure
Dap	2,3-Diaminopropionsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DCU	Dicyclohexylharnstoff
DEE	Diethylether
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIM	Phthiocerol-Dimycocerosat
DIPEA	Diisopropylethylamin, Hünig-Base
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

EPC	L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtOAc	Essigsäureethylester
EUCAST	Europäisches Komitee zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung
FBS	Fötales Rinderserum
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenase
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GSK	GlaxoSmithKline
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorphosphat
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
His	Histidin
HKI	Hans-Knöll-Institut
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSA	Humanes Serumalbumin
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
IC <sub>50</sub>	Konzentration, die 50 % des Wachstums inhibiert
IGRA	Interferon-Gamma Release Assay
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
LM	Lösungsmittel
Log D	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient unter Berücksichtigung aller vorliegenden Spezies
Log P	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient einer Spezies
Lys	Lysin
mAGP	Mycolyl-Arabino-Galactan-Peptidoglycan
MEM	Minimales essentielles Medium
MeAsn	N $\alpha$ -Methyl-Asparagin
MeOH	Methanol
MeOrn	N $\alpha$ -Methyl-Ornithin
MeTrp	N $\alpha$ -Methyl-Tryptophan
MHK <sub>90</sub>	Minimale Konzentration einer Substanz, die 90 % des Wachstums einer Bakterienkultur hemmt
MLU	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
MPLC	Flüssigkeitschromatographie bei mittlerem Druck
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie

---

<i>Mtb</i>	Mycobacterium tuberculosis
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Nal	$\beta$ -(2-Naphtyl)-Alanin
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NTM	Nicht-tuberkulöse Mykobakterien
OADC	Ölsäure-Albumin-Dextrose-Katalase
Odz	Oxadiazol
Orn	Ornithin
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PEG	Polyethylenglykol
PG	Peptidoglycan
Phe	Phenylalanin
Pinc	(N-Isocyanoimino)triphenylphosphoran
PK	Pharmakokinetik
PPI	Protein-Protein-Interaktion
ppm	Teile pro Million
PS	Polystyrol
Pro	Prolin
QK	Qualitätskontrolle
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
Ro5	Lipinski's "Rule of 5"
RP	Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RR	Rifampicin-resistent
RT	Raumtemperatur
SG	Schutzgruppe
SM	Small molecule, niedermolekularer Wirkstoff
SPPS	Festphasen-Peptidsynthese
TFA	Trifluoressigsäure
THT	Tuberkulin-Hauttest
TIPS	Triisopropylsilan
$t_R$	Bruttoretentionszeit
Trt	Triphenylmethyl
Trp	Tryptophan
UBC	Universität British Columbia, Vancouver, Kanada
UDP-GT	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase

---

UPLC	Ultra Performance Flüssigkeitschromatographie
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XDR	Extensiv resistent

# 1. Einleitung

## 1.1 Tuberkulose

1 000 000 000 Menschen tötete Tuberkulose innerhalb der letzten beiden Jahrhunderte<sup>1</sup> und ist damit die unangefochtene Nummer 1 unter den infektiösen Erkrankungen als Todesursache. 1.6 Mio. Todesfälle und 10 Mio. Neuerkrankte im Jahr 2017 zeigen, dass Tuberkulose auch weiterhin ein Gesundheitsproblem mit großer Aktualität ist<sup>2</sup>. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind schätzungsweise 23 % der Weltbevölkerung latent mit Tuberkulose infiziert<sup>2</sup> und damit potentiell gefährdet. Sechs Nationen (Indien mit 27 %) beherbergen 50 % der Neuerkrankten<sup>2</sup>. Aber gerade in Zeiten von Massentourismus und Migrationsbewegungen betrifft die Tuberkulose auch Niedriginzidenzregionen wie Europa immer mehr.

„Mehr als hundert Personen mit Tuberkulose infiziert“ titelte Spiegel online am 02. August diesen Jahres<sup>3</sup>. An einer Schule in Baden-Württemberg wurden im Zuge einer Umgebungsuntersuchung über 100 Schüler und Lehrer mit Tuberkulose diagnostiziert. Seit einigen Jahren liest man auch in deutschen Medien wieder vermehrt über Tuberkulose<sup>4-6</sup>. Mit etwa 5000 Erkrankungen jährlich zählt sie hierzulande zu den seltenen Erkrankungen, doch ihr Auftreten ist seit 2015 auf einem hohen Niveau<sup>7</sup>. In 75 % der Fälle sind die Patienten im Ausland geboren<sup>7</sup>. Dies unterstreicht, dass es eine globale Anstrengung benötigt, um das Problem in den Griff zu bekommen. Denn Tuberkulose stoppt nicht an nationalen oder kontinentalen Grenzen. Etwa 100 Menschen sterben pro Jahr in Deutschland an Tuberkulose. Die meisten dieser Fälle betrafen Patienten im Alter von über 70 Jahren. Innerhalb der Industrienationen wie Deutschland gilt Tuberkulose damit als gut behandelbar. Für das Jahr 2017 schätzte die WHO die Inzidenz für eine Koinfektion von HIV und Tuberkulose in Deutschland auf etwa 350 Patienten. Dies entspräche > 0,1 % der Tuberkulosefälle hierzulande<sup>8</sup>. Die nötigen Medikamente stehen zur Verfügung und Risikofaktoren wie Unterernährung oder eine HIV-Infektion sind selten.

Probleme ergeben sich jedoch durch resistente Tuberkulose-Stämme, die sich beispielsweise durch einen verfrühten Therapieabbruch entwickeln oder selektiert werden. Der Therapieerfolg sensibler Erreger liegt in Deutschland bei > 80 %<sup>7</sup>. Im Falle der

multiresistenten (MDR) Tuberkulose sinkt der Erfolg drastisch auf etwa 20 %<sup>7</sup>. Als multiresistent gilt ein Tuberkulose-Stamm, wenn er mindestens gegen die beiden Wirkstoffe Isoniazid und Rifampicin resistent ist. Noch ist der Anteil solcher Fälle in Deutschland mit 3 % gering<sup>7</sup>, jedoch werden neue Antituberkulotika benötigt, um diesen Anteil weiterhin gering zu halten. Der Erreger entwickelt stets weitere Resistenzen, wie das Auftreten extensiv resistenter (XDR) Stämme<sup>9</sup> zeigt, und das hat zur Folge, dass sich die Therapie ebenfalls weiterentwickeln muss.

### **1.1.1 Krankheitsbild und Diagnostik**

Tuberkulose ist eine infektiöse Erkrankung, die hauptsächlich durch das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* ausgelöst wird. Sie befällt in erster Linie die Lunge, kann sich aber prinzipiell im ganzen Körper ausbreiten und sowohl Knochen als auch Weichteile infizieren<sup>7</sup>. Bei der „geschlossenen“, d. h. nicht ansteckenden Tuberkulose werden die Erreger von Immunzellen des Körpers in sogenannten Tuberkeln eingeschlossen. Die betroffene Person zeigt keine Symptome, bleibt jedoch ein Leben lang infiziert. Kommt es zur Schwächung des Immunsystems, bildet sich eine sogenannte „offene“, also ansteckende, Tuberkulose aus. Die Erreger können vom Immunsystem nicht mehr in Schach gehalten werden und erhalten Zugang zu den Atemwegen. Sie werden über den Husten ausgeschieden und können nach längerer Exposition weitere Personen infizieren. Von den etwa 1.7 Mrd. latent Infizierten werden allerdings nur etwa 5 – 10 % tatsächlich eine offene Tuberkulose entwickeln<sup>2</sup>. Jedoch erhöhen Unterernährung und ein supprimiertes Immunsystem das Risiko einer Infektion. Besonders die Koinfektion mit HIV stellt ein großes Problem in vielen afrikanischen Staaten dar. Die Symptome sind eher unspezifischer Art: Fieber, Husten, Müdigkeit und ein auszehrender Gewichtsverlust, welcher der Erkrankung in Deutschland den Namen „Schwindsucht“ einbrachte, zählen zu den häufigsten.

Zur Diagnostik steht eine Vielzahl von Tests zur Verfügung. Einige werden im Folgenden kurz erläutert: Beim Tuberkulin-Hauttest (THT) wird das mykobakterielle Antigen Tuberkulin in die obere Hautschicht gespritzt und eine Verhärtung der Hautstelle zeigt an, dass der Körper bereits vorher Kontakt zu Mykobakterien hatte. Dabei ist zu beachten, dass auch eine erfolgte BCG-Impfung oder eine vorangegangene Infektion mit nicht-



tuberkulösen Mykobakterien (NTM) ein positives Resultat hervorrufen können. Ein möglicherweise falsch-negatives Ergebnis ist bei immungeschwächten Patienten zu bedenken.

Der Interferon-Gamma Release Assay (IGRA) misst die Menge an freigesetztem Interferon-Gamma nach Kontakt mit einem Antigen. Er wird seltener durch eine Schutzimpfung oder durch NTM ausgelöst, weswegen er den THT abgelöst hat, um latente Infektionen zu diagnostizieren<sup>10</sup>.

Beim Röntgen-Thorax sind dunkle Stellen, sogenannte Kavernen, ein Indiz für eine Erkrankung. Dieser Test wird beispielsweise bei allen Migranten vorgenommen, die in Sammelunterkünften beherbergt werden und ist nach der Abklärung tuberkulosebedingter Symptome die zweithäufigste Methode der Tuberkulose-Fallfindung in Deutschland<sup>7</sup>.

Eine Möglichkeit, kurzfristig zu erfahren, ob ein Patient infektiös ist, liefert der mikroskopische Nachweis des Erregers aus dem Sputum. Zur Anfärbung der säurefesten Stäbchen wird die Ziehl-Neelsen-Färbung angewandt. Auch in diesem Fall ist es jedoch nicht möglich, zwischen *M. tuberculosis* und NTM zu unterscheiden. Daher ist im Anschluss immer die Züchtung einer Bakterienkultur notwendig. Aufgrund des langsamen Wachstums benötigt eine solche Kultur drei bis vier Wochen. Der kulturelle Nachweis ist für eine gesicherte Diagnostik essentiell. Mithilfe der Kultur wird zudem überprüft, welche Resistenzen der vorliegende Stamm bereits erworben hat<sup>11</sup>.

### **1.1.2 *Mycobacterium tuberculosis***

*Mycobacterium tuberculosis* ist ein aerobes, unbewegliches Bakterium in Stäbchenform. Es zählt zu den säurefesten Bakterien, da bei der Anfärbung nach Ziel-Neelsen nach Behandlung mit Säure die Färbung anhält<sup>12</sup>. Dies ist der sehr dicken, wachsartigen Lipidschicht geschuldet. Der komplex aufgebaute Zellmantel ist ein massives Verteidigungsbollwerk, welches die Mykobakterien vor oben genannten Säuren sowie Basen und Desinfektionsmitteln schützt<sup>13</sup>. Die Zellwand besteht aus einem oberen und einem unteren Segment. Außerhalb der Cytoplasmamembran im unteren Segment liegt eine Peptidoglycanschicht, welche kovalent an Arabinogalactan gebunden ist.

Das Arabinogalactan ist weiterhin mit den Mykolsäuren verbunden, welche erstmals 1913 aus Mykobakterien isoliert wurden<sup>14</sup>.

Das Peptidoglycan (PG) der meisten Bakterien besteht aus linearen Ketten mit alternierender Zusammensetzung von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure<sup>15</sup>. Im Falle von *Mtb* ist die Muraminsäure teilweise mit Glykolsäure statt Essigsäure verknüpft<sup>16</sup>. Zwei dieser linearen Polysaccharid-Ketten sind stets über kurze Peptide miteinander verbunden.

Das Arabinogalactan (AG) besteht aus den Zuckerkomponenten Arabinose und Galactose, welche in ihrer Furanose-Form vorliegen. Über einen kurzen Linker ist der Galactofuran-Teil an die PG-Schicht gebunden. Von den Monomeren der Galactofuran-Kette in Position 5 zweigen wiederum drei Arabinofuran-Ketten ab<sup>17</sup>. Sowohl PG als auch AG sind durch ihre Zucker- und Aminosäurebausteine sehr hydrophile Elemente der Zellwand. Eine Arabinofuran-Kette trägt weiterhin mehrere sehr lipophile Mykolsäuren, welche über Esterbindungen an Position 5 der Monomere gehalten werden<sup>17</sup>. Bei den Mykolsäuren handelt es sich um sehr langkettige, verzweigte  $\beta$ -Hydroxycarbonsäuren aus 60 – 90 Kohlenstoff-Atomen<sup>17</sup>. Zusammen bilden die drei Bestandteile den mykoly-arabinogalactan-peptidoglycan-Komplex (mAGP), welcher durch seine physische Stabilität und Schichten wechselnder Polarität maßgeblich zur Überlebensfähigkeit des Pathogens beiträgt<sup>16</sup>.

Im oberen Segment befinden sich ungebundene Polysaccharide, Proteine und Lipide. Dazu zählen Phosphatidylinositol-Mannoside, Lipomannan und Lipoarabinomannan (LAM). LAM bindet an Rezeptoren der Makrophagen<sup>18</sup> und spielt eine Rolle in der Aufnahme der Bakterien durch humane Makrophagen<sup>19</sup>. Phthiocerol-Dimycolate (DIM) verringern die Permeabilität des Mykobakterienzellmantels. Durch gezielte Mutation konnte gezeigt werden, dass Mykobakterien ohne DIM sensibler auf Detergenzien reagieren und die Barrierefunktion der Zellmembran eingeschränkt ist<sup>20</sup>.

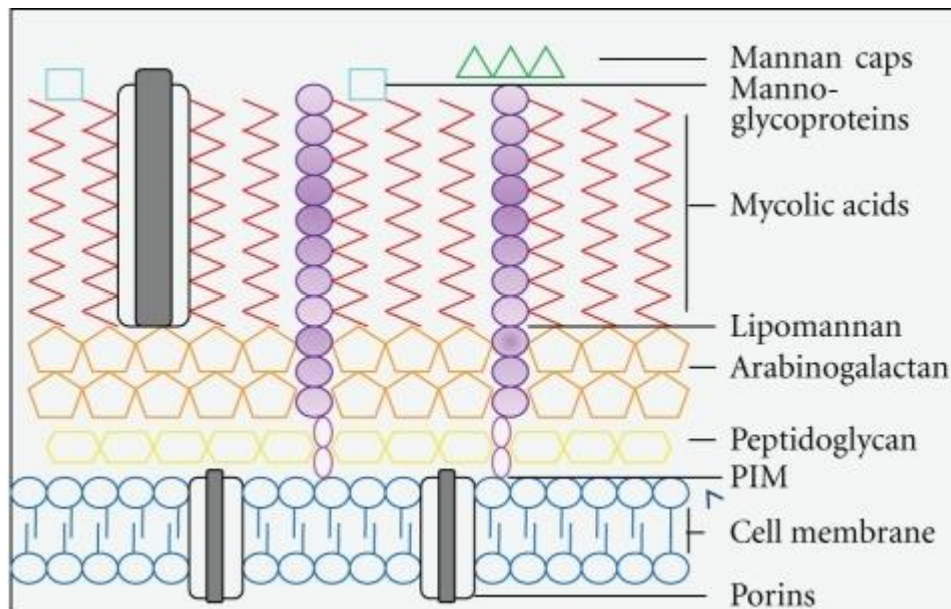


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zellwand von *M. tuberculosis*<sup>21</sup>

### 1.1.3 Therapie der Tuberkulose

#### 1.1.3.1 Die Impfung als Präventivmaßnahme

Zur Prävention existiert ein Lebendimpfstoff aus einem abgeschwächten *Mycobacterium bovis*-Stamm, der nach seinen Entwicklern Bacille Calmette-Guérin (BCG) benannt wurde. In Deutschland wird die Impfung seit 1998 nicht mehr flächendeckend angewandt. Dies ist eine Empfehlung der Ständigen Impfkommission des Robert-Koch-Instituts und geht mit dem Vorschlag der WHO einher, keine generelle Impfung in Populationen mit einem Infektionsrisiko unter 0,1 % durchzuführen<sup>11</sup>. Der Schutz der Impfung ist nicht allumfassend: So schützt der Impfstoff lediglich Kinder und diese nur vor schweren Verläufen, wie der tuberkulösen Meningitis oder der Miliartuberkulose<sup>22</sup>, aber für die Reduzierung der Inzidenzrate der Lungentuberkulose treten je nach Population erhebliche Unterschiede auf (0–80%)<sup>23</sup>. Aufgrund dieses unzureichenden Schutzes vor der Lungentuberkulose, welche die Hapterscheinungsform der Erkrankung darstellt<sup>7</sup>, wird seit Jahrzehnten nach einem neuen Impfstoff geforscht. Bislang erreichte allerdings keiner der Kandidaten die Marktreife.

#### 1.1.3.2 Die medikamentöse Therapie der Tuberkulose

Die medikamentöse Behandlung der Tuberkulose erfolgt stets mittels einer Therapie aus mehreren Wirkstoffen. Einerseits wird die Ausbreitung resistenter Erreger durch die

gleichzeitige Adressierung mehrerer Zielstrukturen geringgehalten, andererseits ist eine Kombinationstherapie notwendig, da sich die Bakterien im Körper in vielen Kompartimenten mit unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeit oder physiologischer Umgebung (pH-Wert, (an)aerob) befinden<sup>11</sup>.

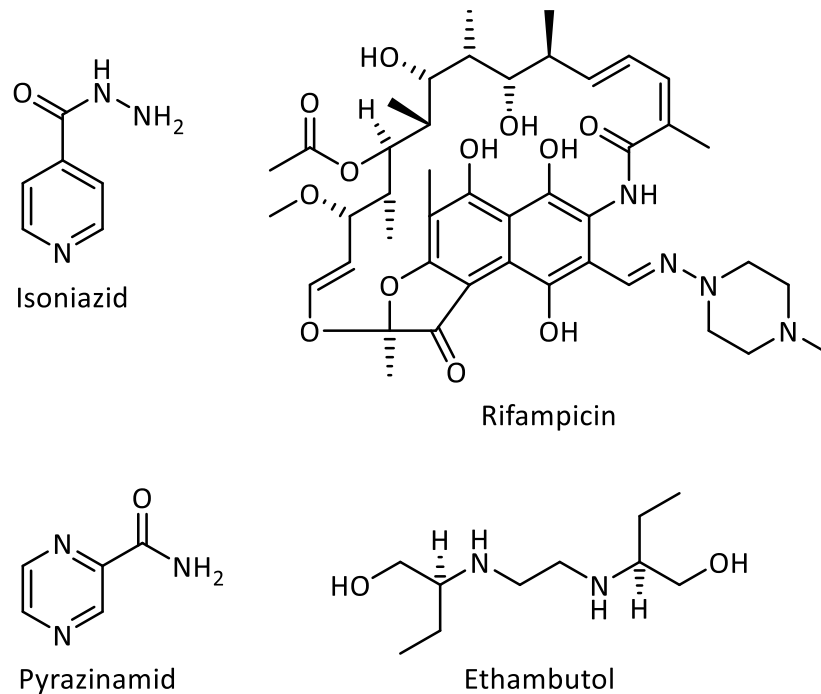


Abbildung 2: Standardtherapeutika gegen Tuberkulose

Bevor mit der Therapie begonnen wird, muss die Resistenzlage geprüft werden. Liegt keine Resistenz gegen einen der oben dargestellten Arzneistoffe vor, wird mit der Standardtherapie<sup>24</sup> begonnen. Die Dauer und Wirkstoffkombination der Standardtherapie sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Standardtherapie der sensiblen Tuberkulose

<b>Initialphase (= 2 Monate)</b>				
<b>Wirkstoffe:</b>	INH	RMP	PZA	ETM
<b>Kontinuitätsphase (= 4 Monate)</b>				
<b>Wirkstoffe:</b>	INH	RMP		

INH = Isoniazid, RMP = Rifampicin, PZA = Pyrazinamid, ETM = Ethambutol

Bei einer Unverträglichkeit gegen einen Wirkstoff oder einer Resistenz des Tuberkulose-Stammes wird die Therapie angepasst. Allgemein wird bei Vorliegen einer Unverträglichkeit oder Mono-resistenz der betroffene Wirkstoff durch ein Fluorchinolon ersetzt und die Therapiedauer auf neun Monate erhöht. Dies kann beispielsweise durch die additive Hepatotoxizität von INH, RMP und PZA bei Patienten mit Leberschädigung notwendig sein. In der Regel wird PZA durch ein weniger hepatotoxisches Medikament ersetzt<sup>24</sup>. Die Ausnahme bildet Rifampicin. Eine Rifampicin-resistente (RR) Tuberkulose wird wie eine MDR-Tuberkulose behandelt.

Die Behandlung der MDR-Tuberkulose sollte in Deutschland in entsprechenden Zentren durchgeführt werden und beginnt mit der molekularbiologischen Identifikation der vorliegenden Resistenzen. In Zukunft werden die molekularbiologischen Verfahren zunehmend durch die Gesamt-Genom-Sequenzierung<sup>25</sup> ersetzt werden. Eingesetzt werden mindestens vier Antituberkulotika der *second-line* Antituberkulotika über einen Zeitraum von 20 Monaten. Der phänotypische Nachweis der Resistenzen wird in jedem Fall nochmals während der Therapie mit einem Kulturnachweis überprüft. Aufgrund der langen Dauer des Kulturnachweises wird mit der Therapie aber bereits nach dem Vorliegen der Resultate der molekularbiologischen Resistenzprüfung begonnen. Die Einteilung der eingesetzten *second-line* Antituberkulotika durch die WHO<sup>26</sup> ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Einteilung der *second-line* Antituberkulotika nach WHO

<b>Gruppe A:</b>	Levofloxacin oder Moxifloxacin Bedaquilin Linezolid
<b>Gruppe B:</b>	Clofazimin Cycloserin oder Terizidon
<b>Gruppe C:</b>	Ethambutol Delamanid Pyrazinamid Imipenem-Cilastin oder Meropenem Amikacin oder Streptomycin Ethionamid oder Prothionamid <i>p</i> -Aminosalicylsäure

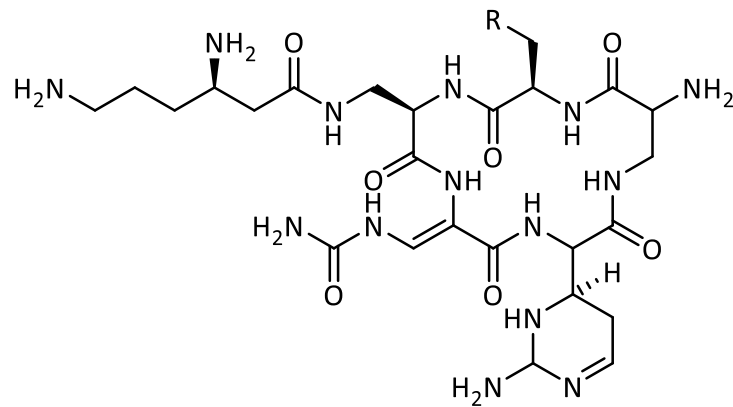
Nach Möglichkeit werden für die Therapie Wirkstoffe der Gruppen A und B eingesetzt. Falls eine Unverträglichkeit oder Resistenz dies nicht zulassen, wird auf Wirkstoffe der Gruppe C zurückgegriffen.

In obiger Tabelle sind die Standardtherapeutika Ethambutol und Pyrazinamid interessanterweise in Gruppe C eingeordnet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass viele MDR-Stämme gegenüber beiden Wirkstoffen resistent sind<sup>27</sup> und der Anfälligkeitstest für beide Wirkstoffe nicht ausreichend verlässlich ist<sup>28</sup>. Bei einem Einsatz dieser beiden Wirkstoffe in der MDR-TB-Therapie sollten sie daher nicht zu den mindestens vier notwendigen wirksamen Medikamenten gezählt werden<sup>24</sup>. Als geheilt gilt ein Patient, wenn die Behandlung ohne Abbruch abgeschlossen ist und mindestens drei aufeinanderfolgende Kulturen im Abstand von mindestens 30 Tagen nach der mindestens siebenmonatigen Intensivphase negativ sind<sup>24</sup>.

### **1.1.3.3 Capreomycine – als Beispiele für antituberkulöse Cyclopeptide**

Unter den derzeit zugelassenen Antituberkulotika finden sich bereits Cyclopeptide. Capreomycin IA und IB sind als polykationische Peptide seit den 1970ern in den USA als *second-line* Antituberkulotika im Einsatz. Das Gerüst der Capreomycine besteht aus einem Makrocyclus aus fünf Aminosäuren. Darunter befinden sich zwei nicht-proteinogene Aminosäuren, die einen Harnstoff oder eine cyclische Guanidin-Funktion enthalten. Zusätzlich zu einem Serin (Capreomycin IA) bzw. Alanin (Capreomycin IB) besteht der Makrocyclus aus zwei Diaminopropionsäuren. Eine dieser ist weiterhin mit einem  $\beta$ -Lysin verknüpft.

Capreomycine binden an die 16S- und 23S-rRNA und inhibieren die Proteinbiosynthese<sup>29</sup>. Eine Resistenz tritt auf, wenn das *tlyA*-Gen inaktiviert wird<sup>30</sup>, welches für eine Methyltransferase kodiert. Ohne die Methylierung betroffener Nukleotide durch die Transferase wird die Bindung der Capreomycine verhindert und die Peptide verlieren ihre Wirksamkeit. Aufgrund geringer oraler Bioverfügbarkeit steht das Medikament nicht zur peroralen Applikation zur Verfügung und wird intravenös verabreicht, was bei der langwierigen Therapie der MDR-Tuberkulose nicht ideal ist.



Capreomycin IA: R = OH

Capreomycin IB: R = H

Abbildung 3: Strukturformel der Capreomycine

## 1.2 Prinzipien der Festphasen-Peptidsynthese

Die Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) nach Merrifield<sup>31</sup> eröffnet den einfachen synthetischen Zugang zu kurzkettigen Peptiden. Im Gegensatz zur Reaktion in flüssiger Phase ist bei der SPPS eine Aminosäure, meistens über ihre Carboxylgruppe, an einen Linker gebunden, der wiederum an einem Harz verankert ist. Diese beiden Bestandteile bilden zusammen die feste Phase (Kapitel 0). Das Peptid wird sukzessive von seinem C-Terminus zum N-Terminus aufgebaut. Um die Bildung der Peptidbindung zu ermöglichen und die korrekte Verknüpfung zu gewährleisten, werden außerdem Schutzgruppen (Kapitel 1.2.2) und Kupplungsreagenzien (Kapitel 1.2.3) benötigt. Abbildung 4 gibt eine schematische Zusammenfassung über den Ablauf der SPPS.

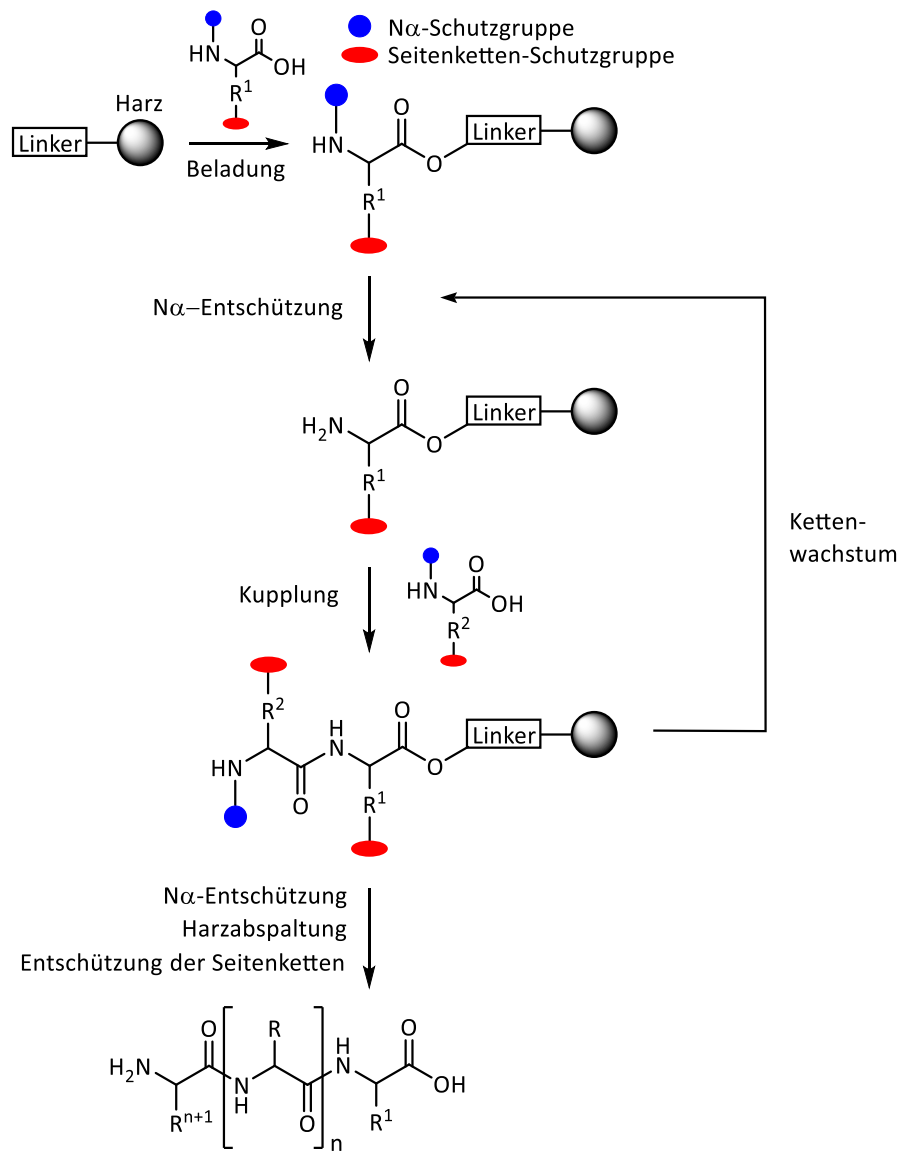


Abbildung 4: Allgemeines Schema zur Festphasen-Peptidsynthese

Der bedeutendste Vorteil der SPPS besteht neben der einfachen Handhabung in der großen Zeitersparnis verglichen mit der Synthese in flüssiger Phase<sup>32</sup>.



### 1.2.1 Die feste Phase

Die feste Phase besteht aus einem Harz und einem Linker. Der Linker ist die Brücke zwischen Peptid und unlöslichem Harz. Die Anforderungen an das Harz sind neben einem hohen Quellvermögen seine chemische Stabilität gegenüber den verwendeten Lösungsmitteln und Reagenzien. Der Linker sollte sich durch eine racemisierungsfreie Verankerung der C-terminalen Aminosäure und durch eine leichte Abspaltung des Peptids auszeichnen.

Häufig genutzte Harze bestehen aus Polystyrol (PS), welches mit 1 % Divinylbenzol quervernetzt wurde, oder aus PS-funktionalisiertem Polyethylenglykol (PEG). Die PS-Harze sind kostengünstig und eignen sich für die Synthese kurzkettiger Peptide, während die Harze auf PEG-Basis für langkettige Peptide Anwendung finden. Die Harze werden entweder mit einer freien Aminofunktion oder mit bereits verankerten Linkern vertrieben.<sup>33</sup>

Der Linker verbrückt das Peptid reversibel mit dem Harz und dient gleichzeitig als Schutzgruppe einer funktionellen Gruppe. In der Regel ist dies die C-terminale Carboxylfunktion. Bei dem seltener genutzten Backbone-Amide-Linker (BAL) ist das Peptid über ein Amid des Peptid-Rückgrats mit dem Linker verbunden<sup>34</sup>. Dadurch ergeben sich eine Vielzahl an Möglichkeiten, wie der C-Terminus nach Abspaltung des Linkers vorliegen kann.

Tabelle 3 gibt Auskunft über den Aufbau einiger Linker und welche funktionelle Gruppe der C-Terminus nach Harzabspaltung annehmen kann.

Tabelle 3: Überblick über ausgewählte Linker<sup>35</sup>

Linkertyp	C-Terminus	Struktur
Aminomethyl (Rink-Amid-Linker)	Peptid-Amid	
Hydroxymethyl (Wang-Linker)	Peptid-Säure	
Backbone-Amid (BAL)	Peptid-Aldehyd, Peptid-Thioester, seitenketten- geschützte Peptid-Säure	
2-Chlorotrylchlorid (2-CTC)	seitenketten- geschützte Peptid-Säure	

All die oben dargestellten Linker werden im sauren Milieu von den Peptiden abgespalten. Aufgrund seiner erhöhten Säurelabilität als Triphenylmethyl-Derivat ist es beim 2-CTC-Linker möglich, die milde Säure 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP) anstelle von Trifluoressigsäure (TFA) zur Spaltung zu verwenden. Auf diese Weise ist es möglich, das Peptid mit intakten Seitenketten-Schutzgruppen zu erhalten. Der Backbone-Amid-Linker bietet zudem noch weitere Möglichkeiten für die funktionelle Gruppe des C-Terminus.

### 1.2.2 Schutzgruppen

Die Aminosäuren als Bausteine der SPPS sind bi- oder trifunktionale Verbindungen. Um die korrekte Verknüpfung zu garantieren, ist es erforderlich, dass die funktionellen Gruppen der Seitenketten durch orthogonale Schutzgruppen blockiert sind. Von Orthogonalität spricht man bei Schutzgruppen, wenn bei der Entfernung einer Schutzgruppenart (Fmoc) eine zweite (Boc) intakt bleibt. Neben der Fmoc-Boc-Strategie

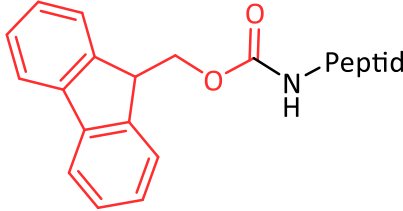
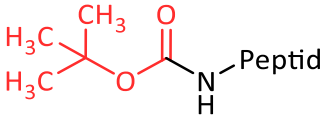
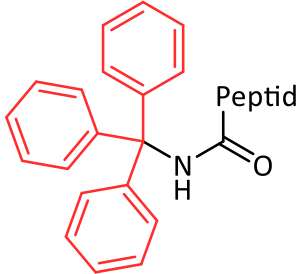
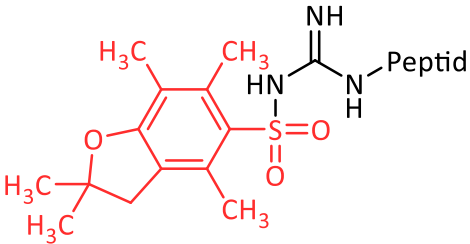
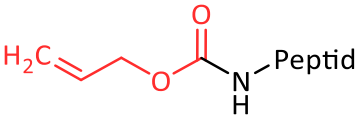
ist gelegentlich auch die Boc-Bzl-Strategie in der SPPS anzutreffen. Allerdings besitzt die Fmoc-Boc-Strategie einige Vorteile, aufgrund derer sie vermehrt genutzt wird: So wird die Fmoc-Gruppe basisch abgespalten, wodurch das freie Amin direkt zur Kupplung bereitsteht. Bei der Boc-Bzl-Variante liegt nach der Entschützung mit einer Säure das Amin protoniert vor und es ist ein zusätzlicher Neutralisationsschritt notwendig. Des Weiteren ist die Fmoc-Abspaltung leichter nachzuverfolgen, da das Spaltprodukt (Dibenzofulven) UV-aktiv ist. Die Entschützung der Seitenketten erfordert in der Boc-Bzl-Variante Fluorwasserstoff, während in der Fmoc-Boc-Variante mit der einfacher zu handhabenden TFA entschützt wird.

Dennoch hat die Boc-Bzl-Strategie ihre Berechtigung. Sie findet ihre Verwendung bei der Synthese basenlabiler Produkte. Dazu zählen Depsipeptide und schwierigere Sequenzen, die durch  $\beta$ -Faltblatt-Ausbildung vermehrt zur Aggregation neigen<sup>36</sup>. Da in dieser Arbeit die Fmoc-Boc-Strategie zur Anwendung kommt, wird nur diese im weiteren Verlauf besprochen. Bei der Fmoc-Boc-Strategie ist die  $\alpha$ -Aminofunktion der Aminosäuren stets durch eine Fmoc-Gruppe geschützt. Die Fmoc-Schutzgruppe<sup>37</sup> ist basenlabil und wird durch Piperidin abgespalten. Bei trifunktionalen Aminosäuren, wie beispielsweise Ornithin, ist das Seitenketten-Amin durch die basenstabile, aber säurelabile Boc-Gruppe geschützt.

Andere Seitenkettenfunktionen sind ebenfalls geschützt, nicht um die korrekte Kupplung zu gewährleisten, sondern um unerwünschte Reaktionen zu unterbinden. So wird das Indol des Tryptophans geschützt, damit das Spaltprodukt der Pbf-Schutzgruppe weniger leicht an das Indol addiert<sup>38</sup>. Die Pbf-Gruppe<sup>39</sup> ist säurelabil und wird für die Blockade der Guanidin-Gruppe des Arginins eingesetzt. Die säurelabile Trt-Gruppe schützt das Seitenketten-Amid des Asparagins, um die Dehydrierung zum Aspartimid zu unterdrücken, welche bei der basen-vermittelten Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen sonst zu erwarten ist<sup>40</sup>. Weiterhin wird das Imidazol aus Histidin mit dieser Gruppe geschützt, um eine Racemisierung zu verringern<sup>41</sup>. Vollständig verhindert wird die Racemisierung jedoch nur durch teure Derivate wie das Bum-geschützte Histidin<sup>42</sup>. Die Alloc-Gruppe<sup>43</sup> ist sowohl basen- als auch säurestabil und stellt eine weitere Dimension der Orthogonalität dar. Sie wird Pd-katalysiert entfernt.

Die verwendeten Schutzgruppen, ihr Einsatz in dieser Arbeit und ihre Orthogonalität sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Schutzgruppen

Schutzgruppe	Struktur	Geschützte Funktion	Orthogonal zu
<b>Fmoc</b> (Fluorenyl-methoxy-carbonyl)		$\alpha$ -Amin	Boc, Trt, Pbf, Alloc
<b>Boc</b> (tert-Butyloxy-carbonyl)		Seitenketten-Amin	Fmoc, Alloc
<b>Trt</b> (Triphenyl-methyl)		Seitenketten-Amid, Imidazol	Fmoc, Alloc
<b>Pbf</b> (2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydro-benzofuran-5-sulfonyl)		Guanidin	Fmoc, Alloc
<b>Alloc</b> (Allyloxy-carbonyl)		Seitenketten-Amin	Fmoc, Boc, Trt, Pbf

Abspaltbare Schutzgruppen in rot dargestellt.

Wie bereits angesprochen, entstehen bei der Entfernung der Schutzgruppen Spaltprodukte, die gegebenenfalls mit dem Peptid reagieren können. Diese Spaltprodukte sind in der Regel elektrophile Kationen oder, wie im Falle der Fmoc-Gruppe, das elektrophile Dibenzofulven. Diese Elektrophile können mit Nukleophilen des Peptides, wie zum Beispiel dem Indol-Ring des Tryptophans, oder der freien Aminogruppe des Ornithins, reagieren. Um dies zu verhindern, verwendet man Scavenger-Reagenzien, welche die

Elektrophile abfangen. Bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe dient Piperidin sowohl als entschützende Base als auch als Scavenger.

Für das entstehende Triphenylmethyl-Kation der Trt-Gruppe oder das *tert*-butyl-Kation der Boc-Gruppe werden Silane, wie das Triisopropylsilan (TIPS), eingesetzt. Sie fungieren als Hydrid-Donatoren und entschärfen das reaktive Carbokation. Das verbleibende Silanylkation reagiert nicht mit dem Peptid. Abbildung 5 zeigt die Entschützung der Boc-Schutzgruppe inklusive der Reaktion mit TIPS.

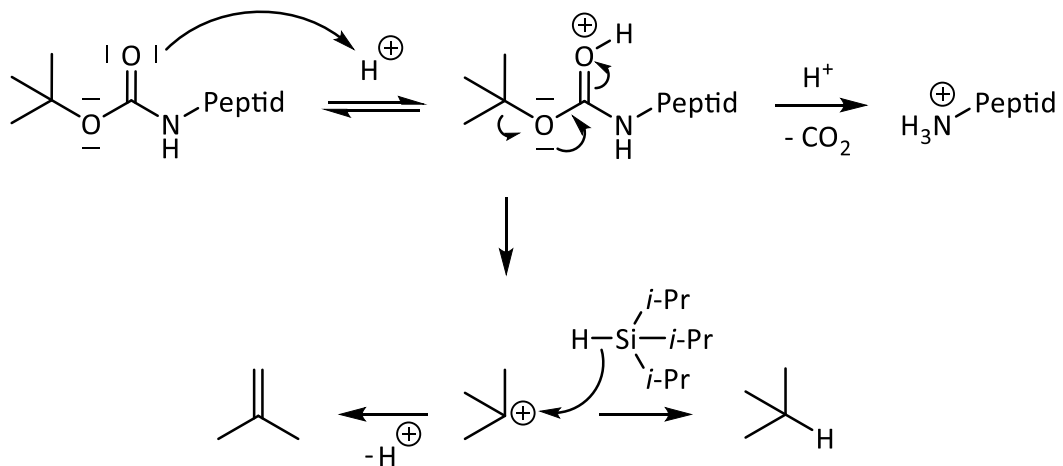


Abbildung 5: Säure-vermittelte Entschützung der Boc-Gruppe

Für das *tert*-butyl-Kation besteht zudem die Möglichkeit zur Deprotonierung. Das entstehende Isobuten verlässt als Gas das Reaktionsgemisch, ohne mit dem Peptid zu reagieren.

### 1.2.3 Kupplungsreagenzien

Kupplungsreagenzien werden zur Ausbildung der Peptidbindung zwischen Amino- und Carboxylgruppe zweier Aminosäuren benötigt. Sie überführen die Carboxylgruppe in ein Elektrophil, das von der nukleophilen Aminogruppe attackiert wird. Die Carbodiimide (DCC, DIC) sind Kupplungsreagenzien einer älteren Generation. Sie überführen die Carboxylgruppe in einen *O*-Acylisoharnstoff und spalten nach Angriff der Aminogruppe ein Harnstoff-Derivat ab. Im Falle von DCC ist der entstehende Harnstoff (DCU) sehr schwer löslich und kann während der SPPS nicht leicht abfiltriert werden. DIC bietet den

Vorteil, dass es ein lösliches Harnstoff-Derivat bildet. Außerdem ist ein Nachteil der Carbodiimid-Klasse, dass das reaktive Intermediat zur Racemisierung neigt. Durch den starken Elektronenzug des *O*-Acylisoharnstoffs kommt es zur Oxazolone-Bildung und bei der darauffolgenden Deprotonierung des  $\alpha$ -Kohlenstoff-Atoms der Aminosäure kommt es zum Verlust der Chiralität.

Um die Racemisierung der aktivierten Aminosäure weitestgehend zu verhindern, wurden Reagenzien entwickelt, die den *O*-Acylisoharnstoff in ein schwächeres Nucleophil überführen. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT<sup>44</sup>) bildet einen Aktiv-Ester, der weiterhin mit dem Amin zum Peptid reagiert, aber gleichzeitig die Racemisierung unterdrückt. In der nächsten Generation der Kupplungsreagenzien, den Aminium- und Phosphoniumsalzen (HATU<sup>45</sup>, PyBOP<sup>46</sup>), ist ein solcher Racemisierungssuppressor direkt integriert.

HATU und PyOAP sind ihren nahen Verwandten HBTU und PyBOP durch ein zusätzliches Stickstoff-Atom ein wenig überlegen. Dieses Stickstoff-Atom koordiniert die Reaktion durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit dem Nucleophil (Abbildung 6).

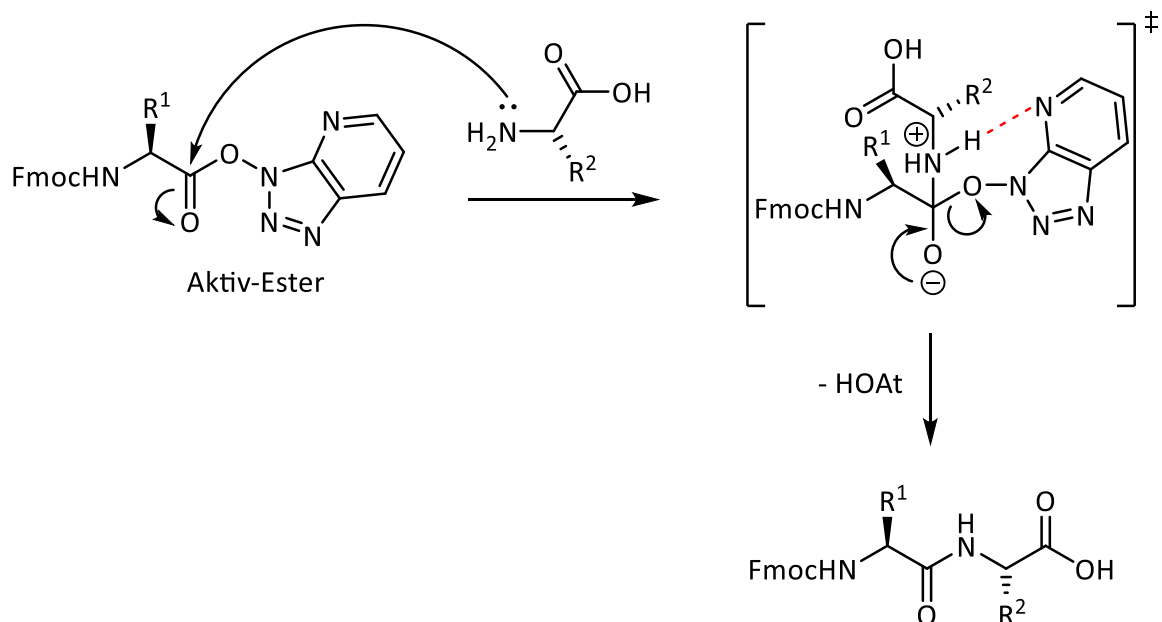


Abbildung 6: Umsetzung des Aktiv-Esters

### 1.3 Antimikrobielle Peptide

Als Peptide bezeichnet man Proteine, die aus - in etwa - nur 100 Aminosäure-Einheiten aufgebaut sind<sup>47</sup>. Im Menschen synthetisierte Peptide bestehen aus den 20

proteinogenen Aminosäuren. Sie erfüllen dort verschiedene Funktionen und kommen als Neurotransmitter<sup>48</sup>, Hormone<sup>49</sup> oder auch in der Immunabwehr<sup>50</sup> vor. Die zur Selbstverteidigung gebildeten antimikrobiellen Peptide (AMP) kommen nicht nur im Menschen, sondern in vielen Spezies<sup>51</sup> wie Insekten, Pflanzen, Pilzen und Bakterien vor. Dies zeigt, welch großes Reservoir an neuen Leitstrukturen diese Substanzklasse bietet. In der Regel sind die AMP mehrfach positiv geladen und besitzen einen hohen Anteil (> 30 %) hydrophober Seitenketten<sup>52</sup>.

### 1.3.1 Wirkmechanismus der AMP

Der Wirkmechanismus der AMP ist nicht vollständig aufgeklärt. Stand der aktuellen Diskussion ist, dass sich mehrfach kationische Peptide zuerst an die äußere Zellmembran der Bakterien anlagern, indem sie entweder die Ladungen der anionischen Lipide an der Membran durch ihre kationischen Seitenketten neutralisieren oder sie Bindungsstellen für zweiwertige Metallionen an der Membranoberfläche besetzen. Für menschliche Zellmembranen besteht eine geringere Affinität, da die Membran durch den Einbau zwitterionischer Lipide wie Phosphatidylcholin deutlich weniger negative Ladungen besitzt<sup>53</sup>. In Folge der Anlagerung wird die Membran gestreckt und ausgedünnt<sup>54</sup>. Ab einer kritischen Konzentration sind die Peptide in der Lage, durch Selbstorganisation Poren innerhalb der Membran zu bilden (barrel-stave-Modell) oder sogar Teile der Membran vollständig zu umschließen und von der restlichen Membran zu separieren (carpet-Modell)<sup>55</sup>. Hier zeigt sich die Bedeutung der Amphiphilie der AMP. Der hydrophobe Teil wird in Richtung der hydrophoben Membran ausgerichtet und der hydrophile Teil bildet im barrel-stave-Modell das Innere der Pore oder zeigt ins umliegende Medium im Falle des carpet-Modells. Durch die Aufhebung der Barrierefunktion der äußeren Membran gelangen vermehrt AMP an die innere Zellmembran. Dort agglomerieren sie nach dem gleichen Prinzip. Wird nun auch das Potential der inneren Membran gestört, kommt es zum Zusammenbruch von pH- und Ionengradienten und schlussendlich zum Zelltod. Dies kann allerdings nicht der einzige Grund für ihre Aktivität sein, da einige AMP bei bakteriziden Konzentrationen keine Depolarisation der Membran hervorrufen.<sup>56-58</sup> Es konnte gezeigt werden, dass neben der Interaktion mit der Zellmembran auch intrazelluläre Targets adressiert werden und beispielsweise die Synthese von DNA<sup>59</sup> oder Proteinen<sup>60</sup> inhibiert werden.

### 1.3.2 Potential und Probleme der AMP

Die AMP füllen als Substanzklasse ein Vakuum zwischen den niedermolekularen Wirkstoffen (SM), die Lipinskis Ro5 erfüllen, und Makromolekülen wie Biologicals. Das Potential, das sich daraus ergibt, und die Hürden, die es zu überwinden gilt, sollen im Folgenden erläutert werden.

Die SM besetzen in der Regel klar definierte Bindungstaschen von Proteinen oder blockieren aktive Zentren von Enzymen<sup>61</sup>. Durch geringe Veränderungen dieser Taschen, wie den Austausch einzelner Aminosäuren, können sich jedoch schnell Resistenzen entwickeln<sup>62</sup>. Die AMP besitzen komplexere Wirkmechanismen, da sie mit der Zellmembran und intrazellulären Targets interagieren, um ihre Wirkung zu entfalten. Die Ausbildung von Resistenzen wird auf diese Weise erschwert, wie das Beispiel Dermaseptin verdeutlicht. Nach zehnfacher Exposition einiger Bakterienarten mit subletalen Mengen von Dermaseptin und einiger klassischer Antibiotika, wie Ciprofloxacin und einem Penicillin, wurde die Veränderung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der Bakterien gegen diese Wirkstoffe überprüft. Während die relative MHK für alle klassischen Antibiotika deutlich gestiegen war, blieb sie für Dermaseptin unverändert<sup>63</sup>. Auch die überwältigende Geschwindigkeit, mit der Cathelicidine Zellen lysieren, lässt den Pathogenen wenig Chance sich anzupassen<sup>64</sup>. Über die von Zasloff<sup>65</sup> entdeckten Magainine schrieb Boman 1995, dass die Zelllyse so schnell stattfindet, dass es technisch schwierig ist, die beteiligten Einzelschritte nachzuverfolgen<sup>66</sup>.

Ohne die Restriktion der Molekülgröße auf 500 Dalton (laut Ro5) sind die AMP in der Lage, neue Targets zu adressieren. Größere, planare Moleküle sind beispielsweise geeignet, sich an die Oberfläche von Proteinen anzulagern, um Protein-Protein-Interaktionen (PPI) zu unterbinden. Die Kontaktfläche, die es dabei zu blockieren gilt, ist mit 1500 – 3000 Quadrat-Angström zu groß für SM<sup>67</sup>. Weiterhin sind dort keine definierten Bindetaschen vorhanden. Stattdessen gilt es hydrophobe, ebene Flächen abzuschirmen.

Die pharmakokinetischen Parameter der AMP sind eine Baustelle, die in ihrer Weiterentwicklung angegangen werden muss. Aufgrund ihrer peptidischen Natur sind sie Substrate vieler Peptidasen. Vor allem die offenkettigen Vertreter leiden an einer geringen metabolischen Stabilität<sup>68</sup>. Während SM oftmals über passive Diffusion die



Zellmembran überqueren, ist diese Absorptionsroute für AMP aufgrund ihrer positiven Nettoladung<sup>69</sup> und der hohen Desolvatisierungsenergie immens erschwert<sup>70</sup>. Bei hydrophoberen Peptiden ist die Permeabilität zwar erleichtert, allerdings kann die Löslichkeit zu einem Problem werden. Diese Faktoren resultieren in einer geringen oralen Bioverfügbarkeit, was die AMP zurzeit von einer peroralen Applikation ausschließt. Da körpereigene Peptide in der Regel in der Nähe ihres Wirkorts sekretiert werden und mit extrazellulären Rezeptoren interagieren, sind eine geringe Permeabilität und metabolische Labilität keine relevanten Schwachstellen. Im Gegenteil, durch den schnellen Abbau kann der Körper die Wirkspiegel schnell anpassen. Einige der AMP, wie Gramicidin S und Polymyxin B, sind wegen ihrer Toxizität nur zur topischen Anwendung geeignet<sup>71</sup>. Für Colistin (Polymyxin E) wurde ein weniger toxisches Prodrug hergestellt, welches zur systemischen Anwendung kommt<sup>72</sup>.

Neben diesen pharmakokinetischen Schwierigkeiten wurden auch einige Defensivstrategien in Bakterien beobachtet, die die Überlebensfähigkeit gegenüber AMP erhöhen. Um die Affinität der kationischen Peptide für Zellmembranen zu verringern, wurde durch Veresterung der Teichonsäuren mit D-Alanin die Anzahl negativer Ladungen in der Membran verringert<sup>73</sup>. Durch einen erhöhten Palmitat-Anteil in Lipid A wurde die Membranfluidität gesenkt und durch vermehrte hydrophobe Wechselwirkung in der Membran die Porenbildung der AMP unterdrückt<sup>74</sup>.

Es wurde auch eine extrazellulär aktive Metalloprotease in Enterobakterien entdeckt, die humanes  $\beta$ -Defensin und andere AMP abbaut<sup>75</sup>.

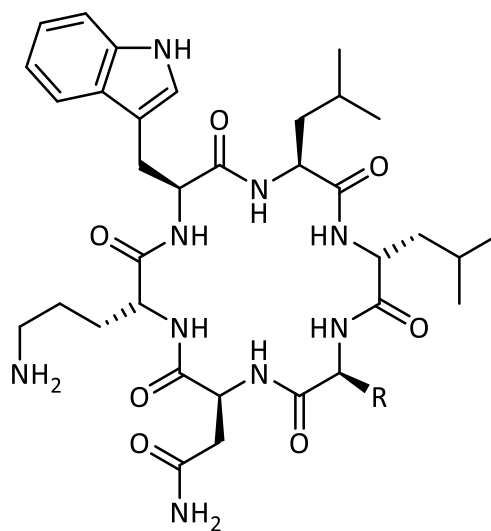
## 1.4 Cyclische Peptide mit antimykobakterieller Aktivität

### 1.4.1 Wollamide

Die im Jahre 2014 aus einer *Streptomyces*-Art isolierten cyclischen Hexapeptide Wollamid A und B sind gegen *Mycobacterium tuberculosis* wirksam<sup>76</sup>. Die Grundstruktur ist ein achtzehngliedriger Makrocyclus, aufgebaut aus sechs Aminosäuren. Die nicht-proteinogene Aminosäure Ornithin und ein Leucin liegen in der D-Konfiguration vor. In ihrer Aktivität und den pharmakokinetischen Eigenschaften sind beide weitestgehend vergleichbar<sup>77</sup>. Der strukturelle Unterschied besteht im Austausch von Valin in Wollamid

B zu *allo*-Isoleucin in Wollamid A. Da Valin die deutlich preiswertere Aminosäure ist, dient Wollamid B in der aktuellen Erforschung dieser Substanzklasse als Leitstruktur.

Die in der Erstpublikation ebenfalls beschriebenen Desotamide, bei denen die Aminosäure D-Ornithin durch Glycin ersetzt wurde, sind inaktiv gegen *Mtb*<sup>76</sup>. In weiteren Veröffentlichungen wurde bestätigt, dass eine basische Aminosäure wie D-Ornithin für die antimykobakterielle Wirkung essentiell ist und dass selbst eine Invertierung zu L-Ornithin zum Wirkverlust führt<sup>78-79</sup>. Wollamid B ist bakterizid gegen nicht-replizierende Tuberkulosebakterien und wirkt wachstumshemmend auf klinische MDR- und XDR-TB-Isolate<sup>80</sup>, sowie infizierte Makrophagen<sup>77</sup>. Weiterhin zeigte sie *in vitro* synergistische Effekte mit Pretomanid und behinderte die Wirkung der meisten *first*- und *second-line* Antituberkulotika nicht<sup>80</sup>. Die Festphasen-Peptidsynthese bietet eine gute Möglichkeit zur Derivatisierung der Leitstruktur. Über den Wirkmechanismus gibt es bislang keine näheren Informationen. Geringe strukturellen Veränderungen führen zu einem Wirkverlust. Daher ist ein molekulares Target vorstellbar. Erste Indizien sprechen gegen einen Effekt auf Zellmembranen<sup>78</sup>. Aufgrund des potenten Wirkprofils, der leichten Synthese und der guten Löslichkeit sowie Plasmastabilität<sup>77</sup> ist Wollamid B ein interessanter Arzneistoffkandidat. Die Permeabilität und die Halbwertszeit in Lebermikrosomen sind zwei Aspekte, die es in der weiteren Entwicklung zu verbessern gilt.



Wollamid A: R = *allo*-Ile

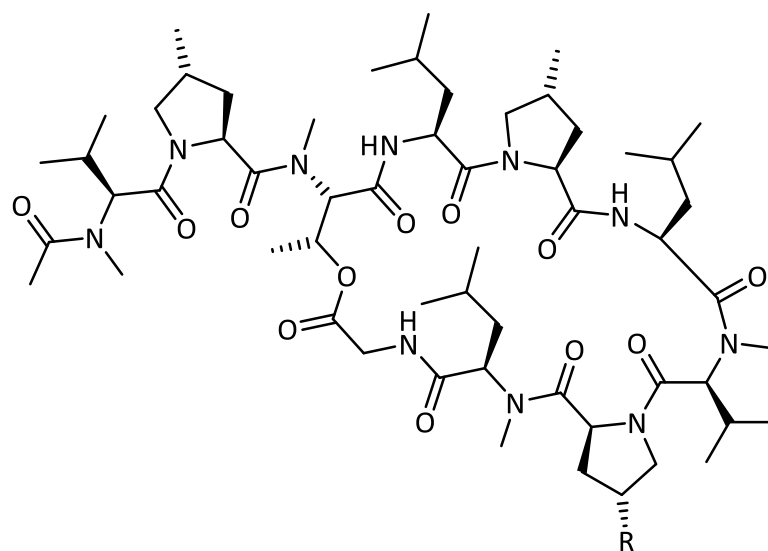
Wollamid B: R = Val

Abbildung 7: Strukturformel der Wollamide

### 1.4.2 Griselimycine

Griselimycin, inklusive seiner Wirkung gegen *Mtb.*, wurde bereits in den 1960ern entdeckt<sup>81</sup>. Das Peptid besteht aus einem Makrocyclus aus acht Aminosäuren mit einer Esterbindung zwischen Threonin und Glycin. Weiterhin beinhaltet die Struktur eine Dipeptid-Seitenkette aus einem Prolin-Derivat und einem N-acetyliertem N-Me-Valin. Insgesamt sind vier der Amid-Stickstoff-Atome methyliert und zwei der drei Proline enthalten eine zusätzliche Methylgruppe an ihrem Pyrrolidin-Ring.

Aufgrund schlechter Bioverfügbarkeit und der Entdeckung von Rifampicin wurde das Projekt vorerst nicht weiterverfolgt. Mit dem Auftreten von Rifampicin-resistenten Stämmen wurde der Druck größer, weitere Antituberkulotika zu entwickeln und man wendete sich Griselimycin erneut zu, weil es gegen Rifampicin-resistente Stämme aktiv ist<sup>82</sup>. Durch einen Cyclohexyl-Rest an dem unsubstituierten Prolin wurde die Leitsubstanz in ein Derivat mit oraler Bioverfügbarkeit überführt<sup>83</sup>. Griselimycin bindet an die  $\beta$ -Untereinheit der DNA-Polymerase von *Mtb* und verhindert wahrscheinlich die DNA-Replikation und -Reparatur<sup>83</sup>. Es wurde eine Resistenzentwicklung durch Überexpression des betreffenden *DnaN*-Gens beobachtet, die keine Auswirkungen auf die Anfälligkeit der Bakterien gegen die Standard-Antituberkulotika hatte<sup>83</sup>.



Griselimycin: R = H

Cyclohexylgriselimycin: R = Cyclohexyl

Abbildung 8: Strukturformel der Griselimycine

## 2. Zielstellung der Arbeit

Das verstärkte Auftreten multiresistenter Erreger, gepaart mit der dünnbesiedelten Pipeline neuer, antibakterieller Wirkstoffe sorgen für ein wiederaufflammendes Interesse an den antimikrobiellen Peptiden (AMP). Es ruht eine Hoffnung auf dieser Klasse, ungenutzte, chemische Entitäten gegen schwer zu therapierende Erreger wie *Mycobacterium tuberculosis* zu beherbergen, da AMP (1) in großer struktureller Vielfalt ubiquitär vorkommen<sup>52</sup>, (2) bisher wenig Resistenzen bekannt sind<sup>52</sup> und (3) sie außerhalb der „Rule of 5“ liegen, welche in der Wirkstoffentwicklung innerhalb der letzten Jahre eventuell strikt befolgt wurde<sup>84</sup>. Insbesondere erfolgreiche antibakterielle Wirkstoffe sind hydrophiler und größer als es die Ro5 "vorschreibt" (s. Kapitel 3.3.1). Das cyclische Hexapeptid Wollamid B wurde 2014 aus *Streptomyces* nov. sp. (MST-115088) in der Wollogorang Station, Australien isoliert und zeigt antimykobakterielle Wirkung<sup>76</sup>. Die Ziele dieser Folgearbeit zum Thema „cyclische Peptide mit antimykobakterieller Aktivität“ umfassen die weitere Bearbeitung der Wollamide mit Bezug auf die vorangegangenen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe<sup>77, 85</sup>. Darunter fallen die chronisch niedrige Permeabilität dieser Substanzklasse sowie die niedrige Stabilität in Lebermikrosomen. Dazu wird die dort beschriebene Möglichkeit zum Austausch Asparagins wahrgenommen und der angesprochene Einfluss der Konfiguration der einzelnen Aminosäuren weiter untersucht. Um die Permeabilität zu verbessern, werden Derivate mit erhöhter Lipophilie und einem Peptidbindungsmimetikum dargestellt. Weiterhin wird eine rationale Strategie zur N $\alpha$ -Methylierung des Peptid-Rückgrats verfolgt. Da die Publikationen anderer Arbeitsgruppen<sup>78-80</sup> hauptsächlich Hexapeptide mit kanonischen Aminosäuren enthalten, werden in dieser Arbeit vermehrt nicht-proteinogene Aminosäuren eingebaut und die Ringgröße des Makrocyclus variiert, um den chemischen Raum der Wollamide in Bezug auf ihre antimykobakterielle Aktivität tiefergehend zu ergründen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Synthesen

Nach dem Protokoll von Chatterjee *et al.*<sup>86</sup> wurden die Wollamid-Derivate in drei Phasen synthetisiert: Zuerst wurden die linearen Peptide aus vier bis sechs Aminosäuren (AS) per Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) vom C-Terminus zum N-Terminus hergestellt und anschließend von der unlöslichen Matrix abgespalten. Im zweiten Schritt wurden die Peptide in Lösung cyclisiert und im dritten Schritt die Seitenketten von ihren Schutzgruppen (SG) befreit.

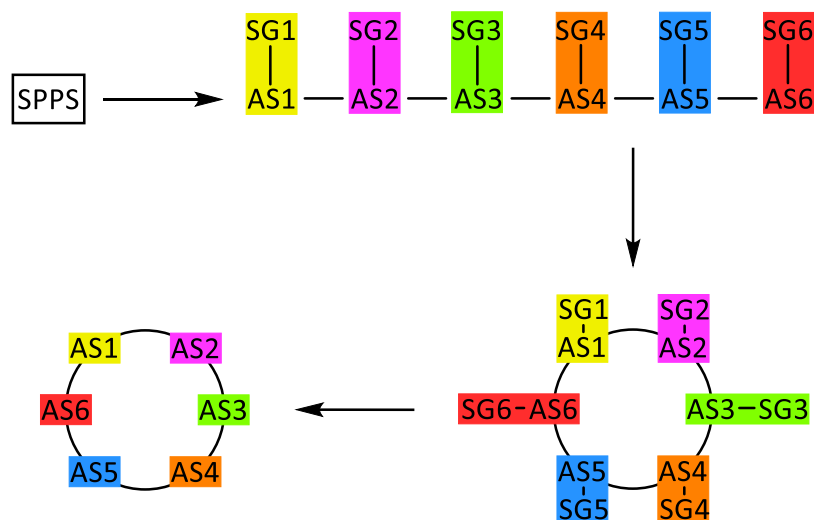


Abbildung 9: Allgemeines Schema zur Synthese cyclischer Hexapeptide

### 3.1.1 Lineare Peptide

Es wurde ein 2-Chlortritylchlorid-Linker (2-CTC) an einem Polystyrol-Harz (PS) mit 1 % Divinylbenzol als Quervernetzer verwendet. PS-Harze sind kostengünstig und eignen sich zur Synthese kurzer Peptide. Der 2-CTC-Linker ist besonders für Tryptophan als C-terminale Aminosäure geeignet<sup>33</sup> und zeichnet sich durch eine geringe Epimerisierung bei der Beladung aus, da keine weitere Aktivierung der Aminosäure nötig ist<sup>87</sup>. Außerdem ist die Verknüpfung zwischen 2-CTC-Linker und C-Terminus des Peptides labil gegenüber schwachen Säuren<sup>87</sup>. Auf diese Weise erhält man das freie Peptid inklusive seiner Seitenketten-Schutzgruppen und eine Cyclisierung in Lösung ist möglich.

Die eingesetzten Aminosäuren wurden enantiomerenrein erworben und verfügten stets über eine Fmoc-Schutzgruppe am  $\alpha$ -ständigen Stickstoff-Atom. Die Stickstoff-Atome der Seitenketten waren durch Boc-/Trt-/Pbf-/ oder Alloc-Gruppen geschützt.

#### 3.1.1.1 Beladung der festen Phase

Die Festphasen-Peptidsynthese begann mit der Beladung der letzten, also der C-terminalen Aminosäure. Dazu wurde die feste Phase in DCM vorgequollen und die Fmoc-geschützte Aminosäure inklusive Hilfsbase zur Deprotonierung der Carboxylfunktion addiert. Anschließend wurden die nicht-beladenen Linker mit Methanol gecappt, damit in den folgenden Schritten des Kettenzuwachses, die hinzugefügte Aminosäure nicht mehr mit dem Linker reagierte.

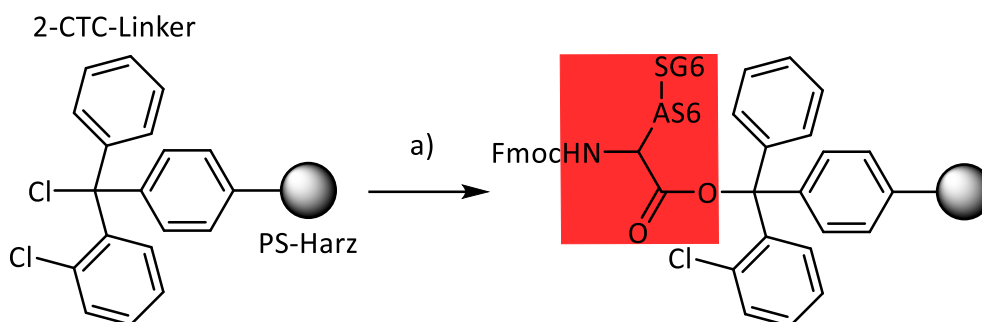


Abbildung 10: Beladung des Harzes

Reaktionsbedingungen:

a) Fmoc-AS6-OH (1.2 Äq.), DIPEA (2.5 Äq.), DCM, 2 h.

Die Methode ist in Kapitel 7.1.1 im Detail beschrieben.

Die Beladung wurde anschließend über den Massenzuwachs des getrockneten Harzes berechnet. Die Beladungen betragen 60 – 90 % der theoretischen maximalen Beladung (1.6 mmol/g). Die Beladung variierte mit der Charge der festen Phase und der beladenen Aminosäure.

### 3.1.1.2 Elongation der Peptidkette

Zur Fortpflanzung der Peptidkette wurde die Fmoc-Schutzgruppe des  $\alpha$ -ständigen Amins mit Piperidin abgespalten. Das entstehende Dibenzofulven wurde durch Piperidin abgefangen, sodass keine Alkylierung der freigelegten Aminofunktion stattfand<sup>87</sup>. Zur Überprüfung der vollständigen Entschützung ist der Kaiser-Test<sup>88</sup> die Standardmethode. Dabei wird ein geringer Teil der festen Phase mit Ninhydrin, Phenol sowie KCN versetzt und die entstehende blaue Färbung weist das entschützte Amin nach. Serin, Aspartat, Asparagin und die sekundäre Aminosäure Prolin geben jedoch keinen positiven Nachweis<sup>87</sup>. In dieser Arbeit wurde die Entschützung über den gebildeten Niederschlag des Addukts aus Piperidin und Dibenzofulven in Wasser überwacht.

Die nächste  $N\alpha$ -Fmoc-geschützte Aminosäure wurde mit HATU als Kupplungsreagenz und Hünig-Base (DIPEA) in 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) an die vorige Aminosäure geknüpft. Für die Peptide mit einer  $N\alpha$ -methylierten Aminosäure (**26a** - **28a**) wurde der Kupplungsschritt für die Aminosäure nach der  $N\alpha$ -methylierten Aminosäure zweimal für zwei Stunden durchgeführt. Dieses Prozedere aus Fmoc-Entschützung und Kupplung wurde bis zur gewünschten Kettenlänge wiederholt. Die Aminosäure-Lösungen wurden für jede Synthese frisch hergestellt. Aufgrund der möglichen Zersetzung Dimethylformamids (DMF) zu Dimethylamin<sup>89</sup>, welches bei der Kupplung als unerwünschtes Nukleophil agieren könnte, wurde NMP als Lösungsmittel für die Kupplungsschritte eingesetzt. Der Linker und das Harz wurden in der folgenden Abbildung als "Matrix" abgekürzt.

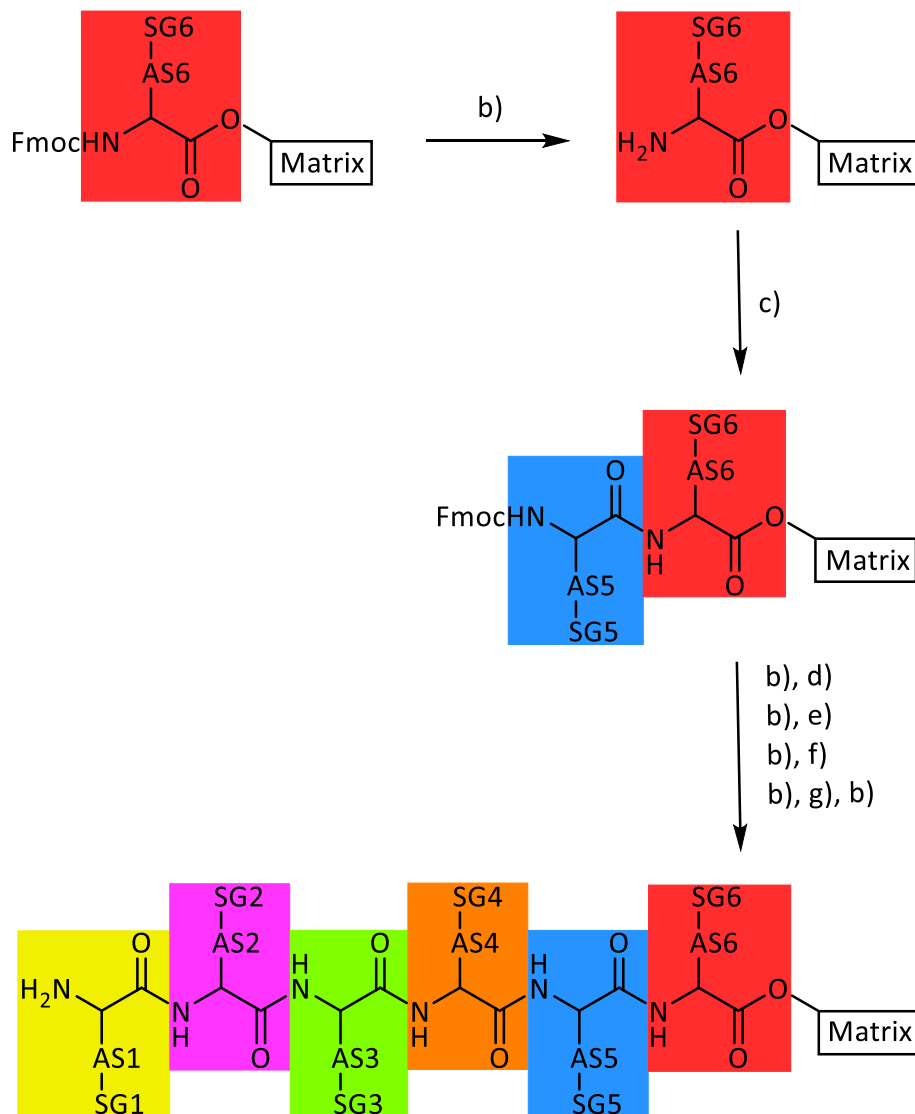


Abbildung 11: Verlängerung der Peptidkette

Reaktionsbedingungen:

b) 20 % Piperidin in DMF, 2x 10 min;

c) Fmoc-AS5-OH (3.0 Äq.), HATU (3.0 Äq.), DIPEA (6.0 Äq.), NMP, 1 h;

d) Fmoc-AS4-OH (3.0 Äq.), HATU (3.0 Äq.), DIPEA (6.0 Äq.), NMP, 1 h;

e) Fmoc-AS3-OH (3.0 Äq.), HATU (3.0 Äq.), DIPEA (6.0 Äq.), NMP, 1 h;

f) Fmoc-AS2-OH (3.0 Äq.), HATU (3.0 Äq.), DIPEA (6.0 Äq.), NMP, 1 h;

g) Fmoc-AS1-OH (3.0 Äq.), HATU (3.0 Äq.), DIPEA (6.0 Äq.), NMP, 1 h.

Die Methoden sind in den Kapiteln 7.1.2 bis 7.1.4 im Detail beschrieben.



### 3.1.1.3 Abspaltung des linearen Peptides von der festen Phase

Um das freie Peptid für die Cyclisierung in Lösung zu erhalten, wurde die Bindung zwischen unlöslicher Matrix und Peptid mit der schwachen Säure 1,1,1,3,3,3-Hexafluorpropanol (HFIP) gespalten. Die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten (Boc, Trt, Pbf) überstehen diesen Schritt unbeschadet, was mittels ESI-MS überprüft wurde.

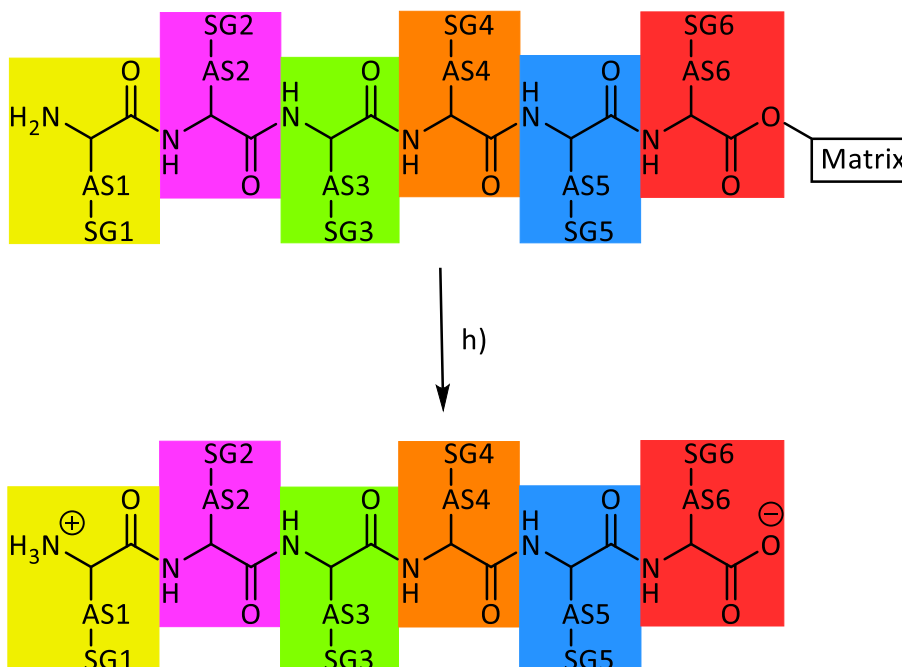


Abbildung 12: Abspaltung des linearen Peptids von der unlöslichen Matrix

Reaktionsbedingungen:

h) 20 % HFIP in DCM, 1 h.

Die Methode ist in Kapitel 7.1.5 im Detail beschrieben.

In Tabelle 5 sind die hergestellten linearen Peptide aufgelistet. In Anlehnung an die Erstveröffentlichung<sup>76</sup> und zur leichteren Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Sequenzen steht Tryptophan in der Tabelle an Position 1, welche den N-Terminus des Peptides markiert. Die tatsächliche Synthese der linearen Peptide erfolgte jedoch in den meisten Fällen mit Tryptophan als C-terminaler Aminosäure.

Tabelle 5: Aminosäuresequenzen der linearen Peptide

Substanz	Aminosäuresequenz					
	1	2	3	4	5	6
<b>Enantiomer und Epimere des Wollamid B</b>						
<b>1a</b>	D-Trp(Boc)	D-Leu	Leu	D-Val	D-Asn(Trt)	Orn(Boc)
<b>2a</b>	D-Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>3a</b>	Trp(Boc)	Leu	Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>4a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	D-Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>5a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)</b>						
<b>6a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Pro	D-Orn(Boc)
<b>7a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	β-(4-Thz)-Ala	D-Orn(Boc)
<b>8a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	His(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>9a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	β-(4-Pyr)-Ala	D-Orn(Boc)
<b>10a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Phe(4-F)	D-Orn(Boc)
<b>11a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn(Boc)
<b>12a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn(Boc)
<b>13a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Trp(Boc)	D-Orn(Boc)
<b>14a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Asn(DiMe)	D-Orn(Boc)
<b>15a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Lys(Alloc)	D-Orn(Boc)
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)</b>						
<b>16a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Orn(Boc)	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn(Boc)
<b>17a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Val	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn(Boc)
<b>18a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Trp(Boc)	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn(Boc)
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)</b>						
<b>19a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Chg	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn(Boc)
<b>20a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Phe(4-Cl)	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn(Boc)
<b>21a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Trp(Boc)	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn(Boc)
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)</b>						
<b>22a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Arg(Pbf)
<b>23a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Dab(Boc)
<b>24a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Dap(Me,Boc)
<b>25a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Dap(Boc)
<b>Wollamid-Derivate mit Nα-Methyl-Aminosäuren</b>						
<b>26a</b>	MeTrp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>27a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	MeAsn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>28a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Asn(Trt)	D-MeOrn(Boc)
<b>Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide</b>						
<b>29a</b>	Trp(Boc)	Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)	
<b>30a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Orn(Boc)	

Substanz	Aminosäuresequenz					
	1	2	3	4	5	6
<b>Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide</b>						
<b>31a</b>	Trp(Boc)	Leu	Val	D-Orn(Boc)		
<b>32a</b>	Trp(Boc)	D-Leu	Val	D-Orn(Boc)		
<b>Weitere Derivate</b>						
<b>33a</b>	Nal	Leu	D-Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>34a</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Orn(Boc)	
<b>35a</b>	Trp(Boc)	Leu	Val	D-Orn(Boc)		

### 3.1.2 Cyclisierungen

#### 3.1.2.1 Backbone-Cyclisierung

Zur Backbone-Cyclisierung wurden 1 mM-Lösungen der linearen Peptide in DMF hergestellt und mit dem Kupplungsreagenz (HATU), zusätzlichem Racemisierungsminderer (HOBt) und Base (DIPEA) versetzt. Die starken Verdünnungen wurden hergestellt, um eine Dimer-Bildung zu reduzieren. Für die Cyclisierung der Tetrapeptide (**31b** und **32b**) wurde das Peptid in DMF gelöst und zur Reaktionslösung über mehrere Stunden zugetropft. Die cyclisierten Tetrapeptide wurden während der Aufarbeitung als Feststoff aus der Ethylacetat-Phase gewonnen. Bei der vorher erwähnten Ein-Topf-Variante entstand aus dem linearen Tetrapeptid **35a** als Hauptprodukt das Octapeptid **35b**, welches in der Ethylacetat-Phase gelöst vorlag.

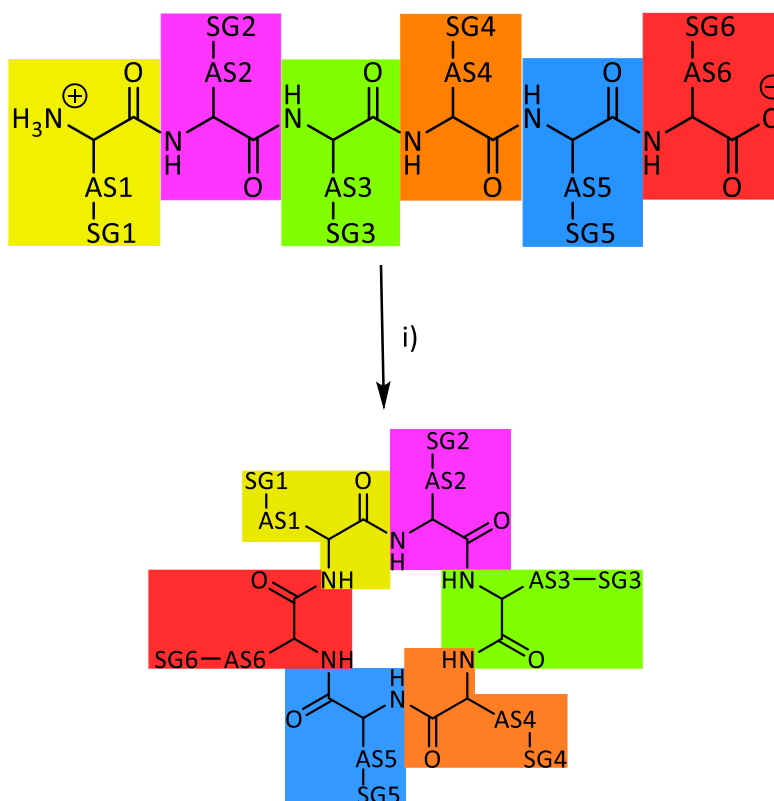


Abbildung 13: Backbone-Cyclisierung eines Hexapeptids

Reaktionsbedingungen:

i) HATU (3.0 Äq.), HOBt (3.0 Äq.), DIPEA (10.0 Äq.), DMF, 0 °C – RT, 3 d.

Die Methoden sind in den Kapitel 7.2.1 und 7.2.2 im Detail beschrieben.

### 3.1.2.2 Cyclisierung unter Einbau eines Oxadiazol-Rings

Das lineare Pentapeptid **34a** wurde unter gleichzeitigem Einbau eines Oxadiazols als Peptidbindungsmimetikum makrocyclisiert<sup>90</sup>. Zur Synthese wird ein Aldehyd und (N-Isocyanoimino)triphenylphosphoran (Pinc) benötigt. Der Oxadiazol-Ring entsteht aus dem C-Terminus des Peptids und dem Isocyanoimin. Die Alkylkette des Aldehyds imitiert im Produkt die Seitenkette (SK) einer sechsten Aminosäure. Das neu entstandene Stereozentrum sorgt für das Auftreten zweier Epimere, welche nicht mit der von Frost *et al.*<sup>90</sup> beschriebenen Methode getrennt werden konnten.

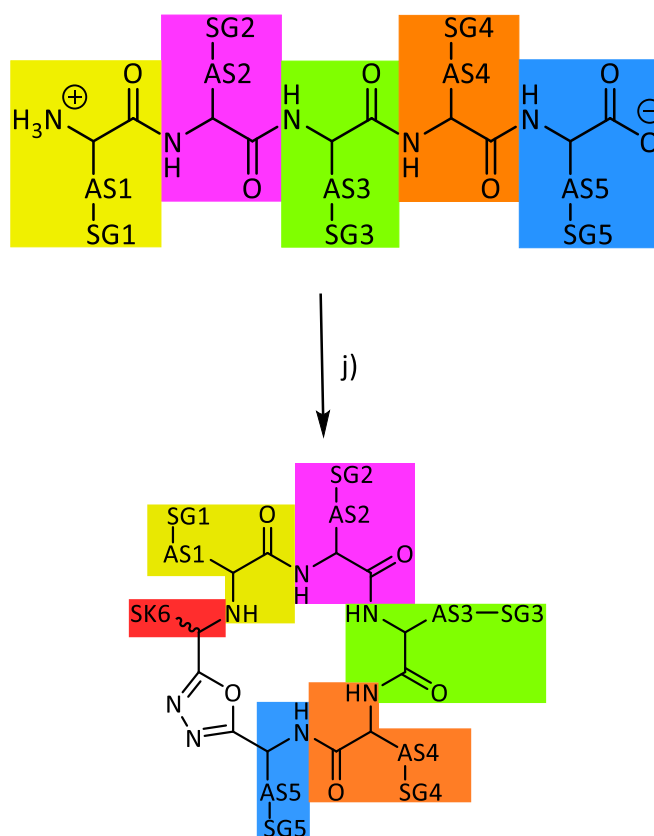


Abbildung 14: Cyclisierung unter Oxadiazol-Einbau

Reaktionsbedingungen:

j) Aldehyd (1.5 Äq.), Pinc (1.0 Äq.),  $\text{HCCl}_3$ , 60 °C, 12 h.

Die Methode ist in Kapitel 7.2.3 im Detail beschrieben.

In Tabelle 6 sind die Produkte der Makrocyclisierungen dargestellt.

Tabelle 6: Aminosäuresequenzen der geschützten Cyclopeptide

Substanz	Aminosäuresequenz					
	1	2	3	4	5	6
<b>Enantiomer und Epimere des Wollamid B</b>						
<b>1b</b>	D-Trp(Boc)	D-Leu	Leu	D-Val	D-Asn(Trt)	Orn(Boc)
<b>2b</b>	D-Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>3b</b>	Trp(Boc)	Leu	Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>4b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	D-Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>5b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)</b>						
<b>6b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Pro	D-Orn(Boc)
<b>7b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	β-(4-Thz)-Ala	D-Orn(Boc)
<b>8b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	His(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>9b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	β-(4-Pyr)-Ala	D-Orn(Boc)
<b>10b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Phe(4-F)	D-Orn(Boc)
<b>11b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn(Boc)
<b>12b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn(Boc)
<b>13b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Trp(Boc)	D-Orn(Boc)
<b>14b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Asn(DiMe)	D-Orn(Boc)
<b>15b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Lys(Alloc)	D-Orn(Boc)
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)</b>						
<b>16b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Orn(Boc)	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn(Boc)
<b>17b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Val	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn(Boc)
<b>18b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Trp(Boc)	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn(Boc)
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)</b>						
<b>19b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Chg	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn(Boc)
<b>20b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Phe(4-Cl)	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn(Boc)
<b>21b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Trp(Boc)	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn(Boc)
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)</b>						
<b>22b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Arg(Pbf)
<b>23b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Dab(Boc)
<b>24b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Dap(Me,Boc)
<b>25b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Dap(Boc)
<b>Wollamid-Derivate mit Nα-Methyl-Aminosäuren</b>						
<b>26b</b>	MeTrp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>27b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	MeAsn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>28b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Asn(Trt)	D-MeOrn(Boc)
<b>Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide</b>						
<b>29b</b>	Trp(Boc)	Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)	
<b>30b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Orn(Boc)	

Substanz	Aminosäuresequenz					
	1	2	3	4	5	6
<b>Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide</b>						
<b>31b</b>	Trp(Boc)	Leu	Val	D-Orn(Boc)		
<b>32b</b>	Trp(Boc)	D-Leu	Val	D-Orn(Boc)		
<b>Weitere Derivate</b>						
<b>33b</b>	Nal	Leu	D-Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn(Boc)
<b>34b</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	Odz/Aryl(4-F)	D-Orn(Boc)

Substanz	Aminosäuresequenz							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>35b</b>	Trp(Boc)	Leu	Val	D-Orn(Boc)	Trp(Boc)	Leu	Val	D-Orn(Boc)

### 3.1.3 Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen

Im letzten Schritt wurden die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten (Boc, Trt, Pbf) mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten. Dabei zerfallen die Schutzgruppen zu CO<sub>2</sub> und einem elektrophilen Kation, welches mit Triisopropylsilan (TIPS) abgefangen wurde, um eine Reaktion mit dem Peptid zu verhindern. Bei der Palladium-katalysierten Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe wurde Phenylsilan als Scavenger eingesetzt<sup>91</sup>.

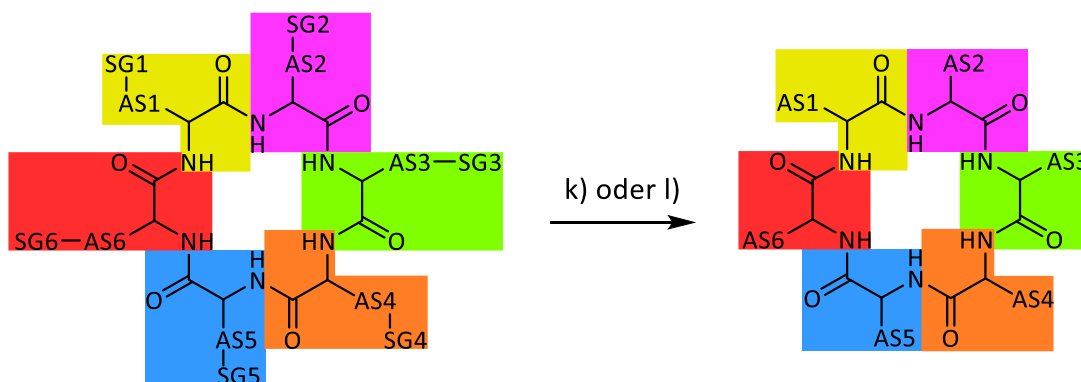


Abbildung 15: Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen

Reaktionsbedingungen:

k) TFA, TIPS, DCM, 1 – 3 h.

l) Phenylsilan (4.0 Äq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (4 mol-%).

Die Methoden sind in den Kapiteln 7.3.1 und 7.3.2 im Detail beschrieben.

In Tabelle 7 sind die Sequenzen der entschützten Cyclopeptide dargestellt.

Tabelle 7: Aminosäuresequenzen der entschützten Cyclopeptide

Substanz	Aminosäuresequenz					
	1	2	3	4	5	6
<b>Enantiomer und Epimere des Wollamid B</b>						
<b>1c</b>	D-Trp	D-Leu	Leu	D-Val	D-Asn	Orn
<b>2c</b>	D-Trp	Leu	D-Leu	Val	Asn	D-Orn
<b>3c</b>	Trp	Leu	Leu	Val	Asn	D-Orn
<b>4c</b>	Trp	Leu	D-Leu	D-Val	Asn	D-Orn
<b>5c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	D-Asn	D-Orn
<b>Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)</b>						
<b>6c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	Pro	D-Orn
<b>7c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	β-(4-Thz)-Ala	D-Orn
<b>8c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	His	D-Orn
<b>9c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	β-(4-Pyr)-Ala	D-Orn
<b>10c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	Phe(4-F)	D-Orn
<b>11c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn
<b>12c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn
<b>13c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	D-Trp	D-Orn
<b>14c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	Asn(DiMe)	D-Orn
<b>15c</b>	Trp(Boc)	Leu	D-Leu	Val	D-Lys	D-Orn(Boc)
<b>15d</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	D-Lys	D-Orn
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)</b>						
<b>16c</b>	Trp	Leu	D-Orn	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn
<b>17c</b>	Trp	Leu	D-Val	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn
<b>18c</b>	Trp	Leu	D-Trp	Val	D-Phe(4-F)	D-Orn
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)</b>						
<b>19c</b>	Trp	Leu	D-Chg	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn
<b>20c</b>	Trp	Leu	D-Phe(4-Cl)	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn
<b>21c</b>	Trp	Leu	D-Trp	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Orn
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)</b>						
<b>22c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Arg
<b>23c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Dab
<b>24c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Dap(Me)
<b>25c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	D-Phe(4-Cl)	D-Dap
<b>Wollamid-Derivate mit Nα-Methyl-Aminosäuren</b>						
<b>26c</b>	MeTrp	Leu	D-Leu	Val	Asn	D-Orn
<b>27c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	MeAsn	D-Orn
<b>28c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	Asn	D-MeOrn



Substanz	Aminosäuresequenz							
	1	2	3	4	5	6		
<b>Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide</b>								
<b>29c</b>	Trp	Leu	Val	Asn	D-Orn			
<b>30c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	D-Orn			
<b>Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide</b>								
<b>31c</b>	Trp	Leu	Val	D-Orn				
<b>32c</b>	Trp	D-Leu	Val	D-Orn				
<b>Weitere Derivate</b>								
<b>33c</b>	Nal	Leu	D-Leu	Val	Asn(Trt)	D-Orn		
<b>34c</b>	Trp	Leu	D-Leu	Val	Odz/Aryl(4-F)	D-Orn		
<b>Weitere Derivate</b>								
Substanz	Aminosäuresequenz							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>35c</b>	Trp	Leu	Val	D-Orn	Trp	Leu	Val	D-Orn

## 3.2 Anti(myko)bakterielle Wirksamkeit und Cytotoxizität

### 3.2.1 Agardiffusionstest

Der Agardiffusionstest ist eine geeignete Methode, um schnell erste Aussagen über das antibakterielle Wirkprofil neuer Substanzen treffen zu können. Auf einer Agarplatte werden die wachsenden Bakterien im Nährmedium ausgebreitet. Die Testsubstanz wird in ein vorgestanztes Loch im Medium gegeben und diffundiert in dieses hinein. Die Wirkstoffkonzentration ist in der Ausstanzung am größten und nimmt nach außen hin ab. Als Hemmzone wird die Fläche mit vermindertem Bakterienwachstum um die Ausstanzung herum bezeichnet. Je potenter die Testsubstanz, desto größer der Durchmesser dieser Fläche. Der Durchmesser der Hemmzone korreliert nicht zwingend mit der minimalen Hemmkonzentration (MHK), da im Agardiffusionstest die Diffusion der Substanz durch das Nährmedium ein Faktor ist, welcher bei Aktivitätsassays in Mikrotiterplatten mit flüssigem Medium entfällt.<sup>92</sup>

#### 3.2.1.1 Aktivität gegen *M. vaccae* und *M. smegmatis*

In einem solchen Agardiffusionstest wurden die synthetisierten Wollamide gegen zwei Mykobakterienstämme (*Mycobacterium smegmatis* SG987, *Mycobacterium vaccae*

10670) getestet. Beide dienen als Modellkeime für *M. tuberculosis*, da sie nicht-pathogen sind und zu den schnell-wachsenden Mykobakterien zählen<sup>93</sup>. *M. smegmatis* bildet beispielsweise bereits nach sieben Tagen sichtbare Kolonien<sup>94</sup>. Zudem können sie in Laboren der Sicherheitsstufe 2 verwendet werden. Für *M. tuberculosis* hingegen wird ein S3-Labor vorgeschrieben und eine hinreichende Kultivierung nimmt aufgrund der deutlich langsameren Wachstumsrate<sup>95</sup> vier Wochen in Anspruch.

Der Assay wurde am Hans-Knöll-Institut (HKI) in Jena unter der Leitung von Frau Dr. Kerstin Voigt durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Hemmzonen der Wollamide vs. *M. vaccae* und *M. smegmatis*

Substanz <sup>a</sup>	Hemmzone [Durchmesser in mm]	
	<i>M. vaccae</i>	<i>M. smegmatis</i>
<b>Wollamid B</b>	17 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>Enantiomer und Epimere des Wollamid B</b>		
<b>1c</b>	14p	14p-P
<b>2c</b>	0	0
<b>3c</b>	17p	0
<b>4c</b>	0	0
<b>5c</b>	11p	0
<b>Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)</b>		
<b>6c</b>	0	0
<b>7c</b>	0	0/A
<b>8c</b>	0	0
<b>9c</b>	0	0
<b>10c</b>	18p	14P
<b>11c</b>	15p	13P/17p
<b>12c</b>	17p	13P
<b>13c</b>	16p	13P
<b>14c</b>	0	0
<b>15c</b>	0	0
<b>15d</b>	15	13
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)</b>		
<b>16c</b>	14p	0
<b>17c</b>	12p	13P
<b>18c</b>	15p	13P
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)</b>		
<b>19c</b>	15p	0
<b>21c</b>	20p	18p-P

Substanz <sup>a</sup>	Hemmzone [Durchmesser in mm]	
	<i>M. vaccae</i>	<i>M. smegmatis</i>
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)</b>		
<b>22c</b>	18p	12P
<b>24c</b>	15p	0
<b>25c</b>	15p	0
<b>Wollamid-Derivate mit <math>\alpha</math>-Methyl-Aminosäuren</b>		
<b>26c</b>	15	0
<b>27c</b>	0	0
<b>28c</b>	0	0
<b>Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide</b>		
<b>30c</b>	11	12
<b>Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide</b>		
<b>31c</b>	0	0
<b>32c</b>	0	0
<b>Weitere Derivate</b>		
<b>33c</b>	12	0
<b>34c</b>	17p	0/A
<b>35c</b>	12	0
<b>Kontrollen</b>		
<b>Ciprofl.<sup>c</sup></b>	21p	20p
<b>LM<sup>d</sup></b>	0	0

<sup>a</sup>Substanzen bei 100 µg/mL getestet, <sup>b</sup>Asfaw, Henok: Design, synthesis and biological evaluation of two classes of antimycobacterial cyclic hexa(depsi)peptides, Universität Halle, 2017, <sup>c</sup>Ciprofloxacin bei 5 µg/mL getestet, <sup>d</sup>Lösungsmittel: DMSO:MeOH (1:10), A = Andeutung einer Hemmung, p = Kolonien in der Hemmzone, P = viele Kolonien in der Hemmzone

Von den beiden Mykobakterienstämmen ist *M. vaccae* gegen die Wollamide sensitiver als *M. smegmatis*. Eine Wirkung gegen *M. smegmatis* geht immer mit einer Wirkung gegen *M. vaccae* einher. Andersherum gilt dieser Zusammenhang nicht. Einzelne Substanzen, wie etwa **10c**, **21c** und **22c**, zeigen eine größere Hemmzone gegen *M. vaccae* als Wollamid B. Die Leitsubstanz selbst ist gegen *M. smegmatis* nicht aktiv.

### 3.2.1.2 Aktivität gegen *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*

Es wurden sechs weitere Testorganismen ausgewählt, um deren Sensitivität gegenüber der Substanzklasse zu evaluieren:

*Bacillus subtilis* ATCC6633 und *Staphylococcus aureus* SG511 dienten zur Überprüfung der Wirksamkeit gegen gram-positive Bakterien. Als Vertreter der gram-negativen Bakterien wurden *Escherichia coli* SG458 und *Pseudomonas aeruginosa* K 799/61 ausgewählt.

Aufgrund der langen Therapiedauer der Tuberkulose von sechs Monaten bis zu zwei Jahren ist eine Breitbandwirkung der Antituberkulotika unerwünscht, weil dadurch die kommensale Bakterienflora im Darm beeinträchtigt wird. Es ist bereits bekannt, dass sich die Zusammensetzung der Darmflora unter Antibiotikatherapie negativ verändern kann. Nützliche Bakterien werden abgetötet und stattdessen breiten sich pathogene Erreger, wie beispielsweise *Clostridium difficile*, im Darm aus<sup>96</sup>. Dadurch erlittene Erkrankungen, wie die antibiotika-assoziierte Diarrhoe, erschweren die Genesung der Patienten zusätzlich.

*P. aeruginosa* ist nach *S. aureus*, den Enterokokken und *E. coli* der vierthäufigste Erreger nosokomial auftretender Infektionen in Deutschland. Durch seine Fähigkeit zur Kontamination von Desinfektionsmitteln und medizinisch-technischen Geräten<sup>97</sup> sowie natürlich vorkommende Resistenzen gegenüber Cephalosporinen früherer Generationen,  $\beta$ -Lactamen und Tetracyclinen<sup>98</sup>, handelt es sich um einen sehr gefährlichen Hospitalismuskeim.

Der Wirkmechanismus der Wollamide konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Erste Ideen, dass die Bakterienmembran beschädigt wird, konnten durch Messungen des Membranpotentials von *S. aureus* NRS70 nicht bestätigt werden<sup>78</sup>. Auch der Versuch, resistente Mutanten zu züchten, ist bis dato nicht geglückt. Ein möglicher Grund waren Diffusionsprobleme im Agar. Es ist möglich, dass ein vollkommen neuartiger Wirkmechanismus vorliegt, der die üblichen Resistenzstrategien der Bakterien umgeht. Aus diesem Grund wurden mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* 134/94 und Vancomycin-resistentem *Enterococcus faecalis* 1528 zwei Testorganismen ausgewählt, für die es ebenfalls von wachsendem Interesse ist, Wirkstoffe mit neuen Wirkmechanismen zu entdecken<sup>99</sup>.

Die hergestellten Wollamid-Derivate wurden am Hans-Knöll-Institut in Jena getestet. Tabelle 9 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 9: Hemmzonen der Wollamide vs. *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. aureus* (MRSA), *E. faecalis* (VRE), *E. coli* und *P. aeruginosa*

Substanz <sup>a</sup>	Hemmzone [Durchmesser in mm]					
	<i>B. subt.</i>	<i>S. aur.</i>	<i>S. aur.</i> (MRSA)	<i>E. faec.</i> (VRE)	<i>E. coli</i>	<i>P. aerug.</i>
<b>Wollamid B</b>	11 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	k. D.	k. D.	0 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>
<b>Enantiomer und Epimere des Wollamid B</b>						
<b>1c</b>	12	12p	0	10	0	0
<b>2c</b>	12	12	0/A	12F	0	0
<b>3c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>4c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>5c</b>	10EK	0	0	10	0	0
<b>Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)</b>						
<b>6c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>7c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>8c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>9c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>10c</b>	11	10	0	10	0	0
<b>11c</b>	13	14	11	12F	11	0
<b>12c</b>	12	12	10	12F	0	0
<b>13c</b>	14	15	12	13	0/A	0
<b>14c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>15c</b>	12	11p	0	0	0	0
<b>15d</b>	11	12	0/A	10	16	0
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)</b>						
<b>16c</b>	11P	0	0	0	0	0
<b>17c</b>	11	11p	0	11	0	0
<b>18c</b>	11	10	0	10	0	0/A
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)</b>						
<b>19c</b>	11	11	10	11	0	0
<b>21c</b>	15	14	12p	11	0	0/A
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)</b>						
<b>22c</b>	12	12	11	12	0	13P
<b>24c</b>	13	12	11	12	0	0
<b>25c</b>	12	13	10p	12	0	0
<b>Wollamid-Derivate mit N<math>\alpha</math>-Methyl-Aminosäuren</b>						
<b>26c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>27c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>28c</b>	0	0	0	0	0	0

Substanz <sup>a</sup>	Hemmzone [Durchmesser in mm]					
	<i>B. subt.</i>	<i>S. aur.</i>	<i>S. aur.</i> (MRSA)	<i>E. faec.</i> (VRE)	<i>E. coli</i>	<i>P. aerug.</i>
<b>Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide</b>						
<b>30c</b>	11	10	0/A	10	0	0
<b>Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide</b>						
<b>31c</b>	11p	0	0	0	0	0
<b>32c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Weitere Derivate</b>						
<b>33c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>34c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>35c</b>	11	11	0	0	0	0
<b>Kontrollen</b>						
<b>Ciprofl.<sup>c</sup></b>	28	18	0	16F	24/32p	27/36p
<b>LM<sup>d</sup></b>	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup>Substanzen bei 100 µg/mL getestet, <sup>b</sup>Asfaw, Henok: Design, synthesis and biological evaluation of two classes of antimycobacterial cyclic hexa(depsi)peptides, Universität Halle, 2017, <sup>c</sup>Ciprofloxacin bei 5 µg/mL getestet, <sup>d</sup>Lösungsmittel: DMSO:MeOH (1:10), A = Andeutung einer Hemmung, EK = einzelne Kolonien in der Hemmzone, p = Kolonien in der Hemmzone, P = viele Kolonien in der Hemmzone, F = Förderung, k. D. = keine Daten.

Bei den gram-positiven Spezies (*B. subtilis*, *S. aureus*, MRSA, VRE) zeichnen sich zwei Trends ab: Bis auf wenige Ausnahmen sind die Wollamide gegen alle vier Vertreter inaktiv oder zeigen Hemmzonen gegen mindestens drei der Bakterienstämme. Methicillin-resistenter *S. aureus* ist dabei der widerstandsfähigste gram-positive Erreger.

Das Wachstum gram-negativer Bakterien (*E. coli* und *P. aeruginosa*) ist von den in dieser Arbeit synthetisierten Derivaten weitestgehend unbeeinträchtigt geblieben. *E. coli* wird lediglich durch **11c** und **15d** gehemmt. Neben Wollamid B selbst ist ansonsten nur **22c** gegen *P. aeruginosa* aktiv. Dies stellt einen Unterschied zu den von Asfaw<sup>100</sup> hergestellten Wollamiden dar, welche im Allgemeinen einen wachstumshemmenden Effekt auf *P. aeruginosa* hatten.

### 3.2.1.3 Aktivität gegen *A. baumannii*

Ein weiterer nosokomial auftretender Erreger mit ausgeprägtem Resistenzprofil ist *Acinetobacter baumannii*. Die WHO listete im Jahr 2017 Bakterien auf, für die neue Antibiotika dringend gesucht werden. Carbapenem-resistenter *A. baumannii* wurde dabei

in die Kategorie mit der höchsten Priorität eingeordnet<sup>99</sup>. Die große Gefahr bei diesem Keim ist vor allem die immer weiter voranschreitende Antibiotikaresistenz durch die Plasmidaufnahme von anderen gram-negativen Bakterien<sup>101</sup>. Auch er zählt daher laut der amerikanischen Gesellschaft für Infektionskrankheiten zu den **ESKAPE**-Erregern (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) für die die therapeutischen Möglichkeiten bereits versiegen<sup>102</sup>. Gegen multiresistente Stämme helfen nur noch einzelne Medikamente wie etwa Colistin. Unter fast 600 klinischen *A. baumannii*-Isolaten waren > 90 % gegenüber Colistin (und drei weiteren von insgesamt 16 getesteten Antiinfektiva) sensitiv<sup>103</sup>. Ähnlich wie Wollamid B ist Colistin ein kationisches Cyclopeptid. Der Makrocyclus besteht aus sieben Aminosäuren und an eine der Seitenketten ist zusätzlich eine C-8-Fettsäure über eine Amidbindung geknüpft.

In einer Auftragsarbeit bei BioSolutions Halle GmbH wurden fünf Wollamid-Derivate gegen einen Stamm ohne Resistenzen (*A. baumannii* ATCC® BAA-1709) getestet. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben des europäischen Komitees für antimikrobielle Empfindlichkeitstests (EUCAST) für den Plattendiffusionstest<sup>104</sup> und ist in Kapitel 7.7 beschrieben. Tabelle 10 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 10: Hemmzonen der Wollamide vs. *A. baumannii*

Substanz <sup>a</sup>	Hemmzone [mm]
<i>A. baumannii</i>	
<b>5c</b>	0
<b>6c</b>	0
<b>12c</b>	0
<b>16c</b>	0
<b>34c</b>	0
<b>Kontrolle</b>	
<b>Gentamycin<sup>b</sup></b>	12

<sup>a</sup>Substanzen bei 100 µg/mL getestet,

<sup>b</sup>Gentamycin bei 10 µg/mL getestet.

Keine der Testsubstanzen zeigte eine Wirkung gegen *A. baumannii*.

### 3.2.2 Minimale Hemmkonzentration und Cytotoxizität

Zur Quantifizierung der Aktivität der synthetisierten Peptide gegenüber dem Zielorganismus *Mycobacterium tuberculosis* wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK<sub>90</sub>) der Substanzen in einem Zellassay bestimmt. Die MHK<sub>90</sub> ist die geringste Konzentration, bei der 90 % des Wachstums von *M. tuberculosis* gehemmt wird.

Um einen toxischen Effekt auf menschliche Zellen frühzeitig zu erkennen, wurden die Verbindungen in einem Cytotoxizitätsassay an humanen Hep2G-Zellen getestet und die antituberkulöse Wirkung der cytotoxischen gegenübergestellt.

#### 3.2.2.1 MHK<sub>90</sub> gegen *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 und Cytotoxizität gegen Hep2G-Zellen

Die MHK<sub>90</sub> gegen *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 und die Cytotoxizität gegen Hep2G-Zellen wurden für einige der hergestellten Testsubstanzen im Rahmen des Open Lab Projekts bei GlaxoSmithKline (GSK) in Tres Cantos, Spanien ermittelt.

Zur Bestimmung der MHK<sub>90</sub> wurden die Testsubstanzen zusammen mit Mykobakterien inkubiert. Anschließend wurde per Färbemethode ermittelt, wie viele Bakterien in den Wells der Mikrotiterplatte überlebt hatten. Dazu wurde der Redox-Farbstoff Resazurin verwendet. Lebende Bakterien reduzieren Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin. Je mehr Bakterien abgetötet werden, desto weniger Resorufin entsteht und desto geringer ist das resultierende Fluoreszenzsignal. Die MHK<sub>90</sub> ist dabei die geringste Konzentration an Testsubstanz, die ein niedrigeres Fluoreszenzsignal als das 2.5-fache des Mittelwerts der Mediumkontrolle erzielt. In den Wells der Mediumkontrolle befand sich lediglich Medium ohne Mykobakterien, sodass Resazurin nicht durch deren Metabolismus umgesetzt werden konnte.

Zur Bestimmung der Cytotoxizität wurden die Testsubstanzen mit humanen Hep2G-Zellen inkubiert. Es wurde die Konzentration ermittelt, die 50 % des Zellwachstums inhibierte (IC<sub>50</sub>). Gemessen wurde bis zu einer Konzentration von 100 µM. Substanzen mit höheren IC<sub>50</sub>-Werten wurden als nicht cytotoxisch eingestuft.

Die Ergebnisse der MHK<sub>90</sub>- und Cytotoxizitätsbestimmung sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die beiden Methoden sind jeweils in den Kapiteln 7.8 (MHK<sub>90</sub>) und 7.9



(Cytotoxizität) erläutert und nach den Protokollen des Kooperationspartners durchgeführt worden.

Tabelle 11: MHK<sub>90</sub> vs. *Mtb* H37Rv ATCC 25618 und IC<sub>50</sub> vs. Hep2G der Wollamide

Substanz	MHK <sub>90</sub> <i>Mtb</i> H37Rv ATCC 25618 [μM]	IC <sub>50</sub> Hep2G-Zellen [μM]
<b>Wollamid B</b>	0.60 <sup>a</sup>	56 <sup>a</sup>
<b>Enantiomer und Epimere des Wollamid B</b>		
<b>1c</b>	5	> 100
<b>2c</b>	40	> 100
<b>3c</b>	> 80	50
<b>4c</b>	> 80	> 100
<b>5c</b>	5	> 100
<b>Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)</b>		
<b>6c</b>	> 80	> 100
<b>7c</b>	40	> 100
<b>8c</b>	80	> 100
<b>9c</b>	40	> 100
<b>10c</b>	40	50
<b>11c</b>	2.5	> 100
<b>12c</b>	1.25	50
<b>13c</b>	2.5	40
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)</b>		
<b>16c</b>	79	> 100
<b>17c</b>	4	79
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)</b>		
<b>19c</b>	4	> 100
<b>20c</b>	3.16	63
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)</b>		
<b>22c</b>	4	63
<b>23c</b>	100	20
<b>24c</b>	10	> 100
<b>Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide</b>		
<b>29c</b>	50	20
<b>Weitere Derivate</b>		
<b>34c</b>	32	> 100

<sup>a</sup>Asfaw, H. et al.; *PLoS One* 2017, 12 (4), 1-21.

Neun der 22 getesteten Cyclopeptide weisen eine  $MHK_{90}$  von  $\leq 5 \mu M$  auf.

Unter den Substanzen der zweiten Gruppe sind die aktivsten der in dieser Arbeit hergestellten Peptide zu finden. **11c** und **13c** erreichen eine  $MHK_{90}$  von  $2.5 \mu M$ , **12c** von  $1.25 \mu M$ . Während **11c** keinerlei Cytotoxizität aufweist, fällt der  $IC_{50}$ -Wert für **12c** und **13c** auf  $50$  bzw.  $40 \mu M$ .

In den folgenden Gruppen sind mit **17c**, **19c**, **20c** und **22c** vier weitere Substanzen mit einstelligen  $MHK_{90}$ . **19c** ist nicht cytotoxisch, während die anderen drei Derivate  $IC_{50}$ -Werte von  $60 - 80 \mu M$  erreichen.

Ein direkter Zusammenhang zwischen Aktivität und Cytotoxizität besteht nicht. Einzelne Vertreter (z. B. **23c**, **29c**) weisen eine deutlich größere Cytotoxizität als antimykobakterielle Potenz auf. Für die Substanzen mit einstelligen  $MHK_{90}$ -Werten ergeben sich Cytotoxizität-Aktivitäts-Quotienten zwischen  $20 - 40$ . Die Leitsubstanz Wollamid B bleibt die aktivste und erreicht einen Quotienten  $> 90$ .

### 3.2.2.2 $MHK_{90}$ gegen *M. tuberculosis* H37Rv (RFP)

Weiterhin wurde die antimykobakterielle Wirksamkeit für alle Derivate, die in der Kooperation mit GSK entstanden, in einem zweiten Assay an der Universität British Columbia in Vancouver, Kanada getestet. Zusätzlich wurden einige Substanzen in beiden Assays getestet, um ihr Verhalten in einem zweiten, unabhängigen Assay zu beobachten. Die hier verwendeten Mykobakterien (*M. tuberculosis* H37Rv) produzieren ein rot-fluoreszierendes Protein (RFP), das neben der Messung der optischen Dichte zur Bestimmung der  $MHK_{90}$  herangezogen wurde. Der ATCC-Typ ist nicht genau bekannt. Die Methode ist in Kapitel 7.10 beschrieben und die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: MHK<sub>90</sub> vs. *Mtb* H37Rv (RFP)

Substanz	MHK <sub>90</sub> <i>Mtb</i> H37Rv (RFP) [ $\mu$ M]
<b>Wollamid-Derivate (Asn <math>\rightarrow</math> Xxx)</b>	
6c	> 100
7c	$\leq$ 1
8c	$\leq$ 5
9c	$\leq$ 0.5
10c	$\leq$ 5
11c	16
12c	15
13c	$\leq$ 0.5
14c*	65
15c*	13
<b>Wollamid-Derivate (Asn <math>\rightarrow</math> D-Phe(4-F) und D-Leu <math>\rightarrow</math> Xxx)</b>	
16c	32
17c	$\leq$ 5
18c*	29
<b>Wollamid-Derivate (Asn <math>\rightarrow</math> D-Phe(4-Cl) und D-Leu <math>\rightarrow</math> Xxx)</b>	
19c	$\leq$ 0.5
21c*	13
<b>Wollamid-Derivate (Asn <math>\rightarrow</math> D-Phe(4-Cl) und D-Orn <math>\rightarrow</math> Xxx)</b>	
22c	$\leq$ 0.5
24c	> 100
25c*	> 100
<b>Wollamid-Derivate mit Na-Methyl-Aminosäuren</b>	
26c*	33
27c*	> 100
28c*	33
<b>Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide</b>	
30c*	$\leq$ 5
<b>Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide</b>	
32c*	> 100
<b>Weitere Derivate</b>	
33c	67
34c	$\leq$ 5
35c*	$\leq$ 1

\*im ersten Assay nicht getestete Wollamid-Derivate.

Insgesamt zeigen in diesem Assay elf der 26 getesteten Substanzen eine  $MHK_{90}$  von  $\leq 5 \mu M$  und sechs dieser Substanzen erreichen sogar eine  $MHK_{90}$  von  $\leq 1 \mu M$ . Zu den vorher nicht getesteten Derivaten (in Tabelle 12 mit \* markiert) gehört das Octapeptid **35c**. Mit einer  $MHK_{90}$  von  $\leq 1 \mu M$  gehört es zu den aktivsten Substanzen in diesem Assay. Die  $N\alpha$ -methylierten Wollamide sind unwirksam gegenüber *M. tuberculosis*, gleiches gilt für das Tetrapeptid **32c**. Für Wollamid B liegen keine Daten vor. Die Daten aus diesem Assay werden losgelöst in Kapitel 4.10 diskutiert.

### 3.3 Physikochemische und pharmakokinetische Eigenschaften

Die Pharmakokinetik (PK) beschreibt den Weg des Arzneistoffes innerhalb eines Organismus. Nach dem **ADME**-Modell durchläuft der Arzneistoff vier Phasen: Zuerst erfolgt die **Aufnahme** in den Blutstrom. Darauf folgt die **Distribution** in tieferliegendes Gewebe. Ab der Einnahme des Wirkstoffs ist er stets chemischer Veränderung durch **Metabolismus**-Reaktionen ausgesetzt. Dabei ist es möglich, dass sowohl Arzneistoff als auch Metabolit<sup>105</sup> oder erst ein entstandener Metabolit pharmakologisch aktiv ist<sup>106</sup>. In der letzten Phase werden der Wirkstoff und seine Metaboliten wieder ausgeschieden. Diese **Eliminierung** geschieht bei wasserlöslichen Substanzen primär über die Niere und den Urin, bei weniger wasserlöslichen über die Leber und den Stuhl.

Innerhalb der letzten Jahrzehnte hat die Berücksichtigung physikochemischer und pharmakokinetischer Parameter bei der Suche nach neuen Wirkstoffkandidaten bereits im frühen Stadium der Projekte an Bedeutung gewonnen. Zuvor lag die Priorität im ersten Schritt der Entwicklung lediglich auf der Potenz der Kandidaten. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine gute *in vitro* Aktivität nicht zwangsläufig eine gute *in vivo* Aktivität versprach. Die darauffolgenden Optimierungsversuche der Leitstrukturen mit unzureichenden PK-Eigenschaften waren mit hohen Entwicklungskosten und einer geringen Erfolgsquote verbunden. Grund dafür war ein unzureichendes Wissen über die pharmakologischen Parameter<sup>107-108</sup>. Im Jahr 1991 wurden beispielsweise noch 40 % der Projekte aufgrund schlechter Pharmakokinetiken eingestellt. Diese Zahl sank im Jahr 2000 auf unter 10 %<sup>109</sup>.

Neben der antibakteriellen Aktivität wurden daher auch physikochemische und pharmakokinetische Eigenschaften der cyclischen Peptide in einer Kooperation mit GlaxoSmithKline (GSK) in Tres Cantos, Spanien untersucht, um weitere Aussagen über die Eignung der Testsubstanzen als potentielle Wirkstoffkandidaten zu sammeln.

### 3.3.1 Löslichkeit, Lipophilie, Permeabilität und Plasmaproteinbindung

Eine erfolgreiche Wirkstoffaufnahme bedingt zunächst die Auflösung der Substanz im Gastro-Intestinal-Trakt und den darauffolgenden Transport in den systemischen Blutkreislauf. Daher sind die Löslichkeit im wässrigen Milieu und die Membranpermeabilität zwei der wichtigsten Faktoren für die Aufnahme peroral applizierter Arzneistoffe<sup>110</sup>.

Proteine im Blutplasma, wie humanes Serumalbumin (HSA) und saures Alpha-1-Glykoprotein (AGP), sind in der Lage, sowohl körpereigene Stoffe als auch Arzneimittel reversibel zu binden<sup>111</sup>. Von beiden Vertretern dieser Plasmaproteine werden hauptsächlich lipophile Substanzen gebunden, um einen Transport dieser weniger wasserlöslichen Substanzen innerhalb des Blutkreislaufs zu gewährleisten. HSA bindet dabei bevorzugt neutrale oder anionische Verbindungen, während AGP affiner für Kationen ist<sup>112-113</sup>. Nur nicht an Plasmaprotein gebundene Arzneistoffe können aus dem Blutstrom heraus in Gewebe diffundieren<sup>114</sup>. Die Rolle der Plasmaproteinbindung (PPB) im Organismus ist sehr komplex. So besitzt das stark an Plasma gebundene Propranolol einen hohen First-Pass-Effekt<sup>115</sup>, während im Falle von Warfarin die Bindung an Albumin eine Art Depotform darstellt, da nur ungebundenes Warfarin in der Leber metabolisiert wird. Weiterhin können renal eliminierte Wirkstoffe eine höhere Halbwertszeit aufweisen, wenn sie an Plasmaproteine gebunden sind und daher keiner glomerulären Filtration unterliegen<sup>115</sup>. Benet und Hoener schrieben 2002 eine viel beachtete Veröffentlichung über die klinische Relevanz der PPB und stellten fest, dass bei einer Verdrängung von an Plasma gebundenem Wirkstoff oder bei einer verminderten Konzentration der Plasmaproteine durch eine Erkrankung nur in seltenen Fällen eine Dosisanpassung notwendig ist<sup>116</sup>. Smith *et al.*<sup>117</sup> folgerten weiter, dass die PPB zwar den Prozentsatz an freiem Wirkstoff bedinge, nicht jedoch die Konzentration des frei vorliegenden Wirkstoffs, welche besser mit der *in vivo* Aktivität korreliere.

Der Zusammenhang zwischen den vier Parametern (Löslichkeit, Lipophilie, Permeabilität und PPB) kann wie folgt zusammengefasst werden: Eine hydrophile Substanz ist leichter wasserlöslich und ist in geringerem Maße an Plasmaprotein gebunden. Jedoch ist die passive Diffusion über lipophile Zellmembranen aufgrund hoher Desolvatisierungsenergien für hydrophile Substanzen in der Regel geringer<sup>118</sup>. Umgekehrt besitzen lipophile Substanzen eine geringere Wasserlöslichkeit und werden vermehrt von Plasmaproteinen gebunden<sup>119-120</sup>. Zellmembranen werden mit steigender Lipophilie leichter überwunden. Bei zu lipophilen Substanzen wurde allerdings ein Verbleiben in der Membran beobachtet, was zur Reduktion der Permeabilität führt<sup>121</sup>. Der Idealfall für eine hohe orale Bioverfügbarkeit ist folglich ein Kompromiss der vier Parameter, damit der Wirkstoff sowohl eine akzeptable Löslichkeit als auch eine schnelle Permeabilität aufweist. Lipinski<sup>122</sup> schrieb bereits 1997 über dieses Zusammenspiel und stellte seine berühmte „Rule of 5“ (Ro5) auf, um Vorhersagen über die Bioverfügbarkeit neuer Wirkstoffkandidaten zu treffen. Es wurde eine Datenbank nach Substanzen in Phase-II-Studien durchsucht und diese nach Molekulargewicht, Lipophilie und Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren sowie –donatoren geordnet. Die Quintessenz war, dass eine Substanz mit

- Molekulargewicht < 500 Da
- Log P-Wert < 5
- < 10 Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptoren
- < 5 Wasserstoffbrückenbindungs-Donatoren

laut Statistik oral bioverfügbar ist. Als Ausnahmen seiner Ro5 nennt Lipinski Substanzen wie Vitamine<sup>123-124</sup> und  $\beta$ -Lactame<sup>125</sup>, die über natürlich vorkommende Transporter aufgenommen werden. Peptidabkömmlinge wurden bei der Datenbankrecherche allerdings explizit nicht berücksichtigt. Sobald beim Design neuer Wirkstoffe einer der Parameter verletzt wurde, erhielten die zuständigen medizinischen Chemiker eine Nachricht und passten die Strukturen an. Somit wurde die Ro5 zu einem Dogma, an das sich unter Umständen zu strikt gehalten wurde<sup>126</sup>. Lipinskis Regeln entstanden retrospektiv aus einer Datenanalyse für die damals vorherrschenden Zielstrukturen, die mittels kleinen chemischen Entitäten adressiert werden. Durch fortlaufende Entschlüsselung des humanen Genoms<sup>127</sup> und Proteoms<sup>128</sup> wurden Targets entdeckt, die

nicht von Ro5-kongruenten Molekülgerüsten beeinflusst werden können. Diese besitzen keine klar definierte Bindungstasche, sondern eher große, ebene Flächen auf der Oberfläche von Proteinen, die zur Unterbrechung von Protein-Protein-Interaktionen abgedeckt werden müssen.

Selbst unter den derzeitigen Standard-Antituberkulotika dient Rifampicin als Beispiel für eine Substanz, die trotz Verletzung der Ro5 oral bioverfügbar ist<sup>129</sup>. Einige der bekanntesten Vertreter bioverfügbarer Substanzen mit peptidischem Ursprung, die ebenfalls außerhalb der Ro5 liegen, sind Cyclosporin A<sup>130-131</sup>, das Veber-Hirschmann-Peptid<sup>132</sup> und das bereits genannte Cyclohexylgriselimycin<sup>83</sup>. Sie fallen in die beyond Rule of 5 (bRo5) Rubrik und erfahren innerhalb der letzten Jahre vermehrte Aufmerksamkeit<sup>126, 133-135</sup>. Die in dieser Arbeit synthetisierten cyclischen Hexapeptide verletzen ebenfalls mehrere der Ro5-Kriterien. Ihre Molekülmasse liegt deutlich über 500 Da und der durch sechs Peptidbindungen aufgebaute Makrocyclus besitzt ungeachtet der Seitenketten bereits mehr als fünf Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren sowie mehr als zehn -akzeptoren. Dass es auch innerhalb der Klasse der cyclischen Hexapeptide bioverfügbare Vertreter gibt, ist in der Literatur hinlänglich beschrieben<sup>136-141</sup>.

Zur Charakterisierung der Aufnahme und Verteilung der Substanzen im Organismus wurden deren Wasserlöslichkeit, Lipophilie, Permeabilität und Bindungsaffinität zu humanem Serumalbumin (HSA) im Rahmen unserer OpenLab-Kooperation von GlaxoSmithKline ermittelt.

Die kinetische Löslichkeit im wässrigen Milieu wurde mittels chemilumineszenter Stickstoffdetektion (CLND) gemessen. Die Lipophilie der Substanzen wurde über deren Retentionsverhalten im Vergleich zu bereits bekannten Substanzen ermittelt und daraus der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (Log D) berechnet. Die Permeabilität wurde in einem Assay mit einer parallelen, künstlichen Membran (PAMPA) bestimmt und die Bindungsaffinität zu humanem Serumalbumin wurde mit einer HPLC-Methode gemessen, deren stationäre Phase immobilisiertes HSA enthält. Die Methoden sind in den Kapiteln 7.11 bis 7.14 beschrieben und die Ergebnisse in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Löslichkeit, Lipophilie, Permeabilität und Plasmaproteinbindung der Wollamide

Substanz	Löslichkeit [µg/mL]	Log D (berechnet)	Permeabilität <sup>a</sup> [nm/s]	Plasmaprotein- bindung <sup>b</sup> [%]
<b>Wollamid B</b>	151 <sup>c</sup>	1.80 <sup>c</sup>	< 3 <sup>c</sup>	73 <sup>c</sup>
<b>Enantiomer und Epimere des Wollamid B</b>				
<b>1c</b>	200	1.81	< 10	74
<b>2c</b>	304	1.71	< 3	63
<b>3c</b>	249	1.80	< 6.5	79
<b>4c</b>	255	1.67	n. d.	63
<b>5c</b>	214	1.67	< 3	71
<b>Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)</b>				
<b>6c</b>	304	2.10	< 3	84
<b>7c</b>	158	2.32	< 10	k. D.
<b>8c</b>	174	1.84	< 3	87
<b>9c</b>	257	2.04	< 6.5	88
<b>10c</b>	280	2.80	11	94
<b>11c</b>	20	2.65	n. d.	95
<b>12c</b>	10	2.77	< 10	96
<b>13c</b>	24	2.49	< 3	97
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)</b>				
<b>16c</b>	258	1.33	< 3	k. D.
<b>17c</b>	58	2.30	< 3	93
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)</b>				
<b>19c</b>	8	2.97	n. d.	98
<b>20c</b>	8	2.89	n. d.	99
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)</b>				
<b>22c</b>	9	2.88	n. d.	98
<b>23c</b>	7	3.31	n. d.	98
<b>24c</b>	8	3.49	< 3	98
<b>Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide</b>				
<b>29c</b>	196	1.16	< 3	74
<b>Weitere Derivate</b>				
<b>34c</b>	328	2.60	13	95

<sup>a</sup>bestimmt mittels PAMP-Assay, <sup>b</sup>entspricht Bindung an HSA, <sup>c</sup>Asfaw, H. *et al.*; *PLoS One* **2017**, *12* (4), 1-21, n. d. = nicht detektiert, k. D. = keine Daten, von GSK gesetzte Richtwerte für die **Löslichkeit**: > 100 µg/mL = leicht löslich, 30 – 100 µg/mL = mittlere Löslichkeit, < 30 µg/mL = schwer löslich; von GSK gesetzte Richtwerte für die **Permeabilität**: > 200 nm/s = schnell permeierend, 10 – 200 nm/s = mittelschnell permeierend, < 10 nm/s = langsam permeierend.



Unter den hergestellten Wollamid-Derivaten konnte die gute Löslichkeit von Wollamid B bei zehn der 22 Substanzen weiter gesteigert werden ( $\geq 200 \mu\text{g/mL}$ ). **34c** war trotz drei aromatischer Funktionen am leichtesten wasserlöslich ( $328 \mu\text{g/mL}$ ). Bei acht Derivaten wurde der von GSK gewählte Richtwert für eine geringe Löslichkeit von  $< 30 \mu\text{g/mL}$  unterschritten.

Als Maß für die Lipophilie wurde der Log D rechnerisch ermittelt. **24c** als lipophilste Substanz (Log D = 3.49) wies dennoch keine Permeabilität auf. Stattdessen waren **34c** mit  $13 \text{ nm/s}$  und **10c** mit  $11 \text{ nm/s}$  die Analoga mit der höchsten Permeabilität und die einzigen, die nach GSK-Richtwerten eben noch in die Kategorie „mittelschnell permeierend“ fallen.

Die Werte für die Plasmaproteinbindung stiegen allgemein auf etwa 90 % an. **20c** wurde sogar zu 99 % von HSA gebunden. Nur **2c** und **4c** mit jeweils 63 % PPB unterschritten den Wert der Leitsubstanz (73 %).

### 3.3.2 Metabolische Stabilität in Plasma und Lebermikrosomen

Nach der Aufnahme des Wirkstoffs aus dem Gastro-Intestinal-Trakt in den Blutkreislauf wird er von der Pfortader direkt zur Leber transportiert, bevor er wieder in den Blutstrom gelangt und im Körper in tieferliegendes Gewebe verteilt wird. Dabei findet in der Leber der Hauptteil des Metabolismus statt<sup>142</sup>. Um 1900 konnte Hedin<sup>143</sup> allerdings auch nachweisen, dass sich im Blutserum von Ochsen proteolytische Enzyme befinden. Der Metabolismus wird dabei in zwei Phasen unterteilt. Zunächst werden in der ersten Phase durch Hydrolasen Bindungen gespalten und durch Monooxygenasen funktionelle Gruppen eingeführt<sup>144</sup> oder freigelegt<sup>145</sup>. Die zu den Hydrolasen zählende Leucin-Aminopeptidase kommt im Plasma von Mäusen vor und spaltet beispielsweise Peptidbindungen nach einem N-terminalen Phenylalanin<sup>146</sup>. Monooxygenasen wie Cytochrom P450-Enzyme (CYP) oder die Flavin-abhängige Monooxygenase (FMO) übertragen ein einzelnes Sauerstoff-Atom auf ihr Substrat und führen somit eine Alkoholfunktion ein<sup>147</sup>. In der zweiten Phase werden an die neu entstandenen funktionellen Gruppen weitere Substanzen konjugiert. Die UDP-Glucuronosyltransferase (UDP-GT) überträgt einen Glucuronsäurerest bevorzugt auf hydrophobe Metabolite, um deren Wasserlöslichkeit und dadurch die renale Eliminierung zu erhöhen.

Die Stabilität in menschlichem und murinem Plasma und Lebermikrosomen wurde bestimmt, um Information zum Metabolismus und der Ausscheidung der Testsubstanzen zu erhalten. Dazu wurde nach zweistündiger Inkubation im Plasma, die Menge an wiedergefundener Testsubstanz gemessen. Die Methode ist in Kapitel 7.15 beschrieben. Die Plasmastabilitäten sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Außerdem wurden als Kennzahlen für die metabolische Stabilität die *in vitro* Clearance und die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) nach der Inkubation mit menschlichen und murinen Lebermikrosomen bestimmt. Daraus wurden die *in vivo* Clearance und die hepatische Ausscheidungsrate errechnet. Die Methode ist in Kapitel 7.16 beschrieben und die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 14: Stabilität der Wollamide in Plasma

Substanz	Plasmastabilität [% verbleibend]	
	Mensch	Maus
<b>Wollamid B</b>	100 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>
<b>Enantiomer und Epimere des Wollamid B</b>		
<b>1c</b>	123	94
<b>2c</b>	96	89
<b>3c</b>	107	90
<b>4c</b>	117	84
<b>Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)</b>		
<b>10c</b>	77	96
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)</b>		
<b>16c</b>	122	97
<b>17c</b>	90	99
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)</b>		
<b>19c</b>	89	94
<b>20c</b>	93	96
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)</b>		
<b>22c</b>	83	89
<b>23c</b>	96	94
<b>24c</b>	92	91
<b>Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide</b>		
<b>29c</b>	100	100
<b>Weitere Derivate</b>		
<b>34c</b>	84	85

<sup>a</sup>Asfaw, H. *et al.*; *PLoS One* **2017**, *12* (4), 1-21.

Die Wiederfindungsrate der meisten Derivate nach zweistündiger Inkubation im Plasma betrug  $\geq 90$  %. Damit weist diese Klasse peptidischer Wirkstoffe eine hervorragende Plasmastabilität auf.

Tabelle 15: Stabilität der Wollamide in Lebermikrosomen

Substanz	Hepatische Extraktionsrate [%]		Mikrosomale Halbwertszeit [min]	
	Mensch	Maus	Mensch	Maus
<b>Wollamid B</b>	56.88 <sup>a</sup>	< 16.83 <sup>a</sup>	56.80 <sup>a</sup>	> 138.60 <sup>a</sup>
<b>Enantiomer und Epimere des Wollamid B</b>				
<b>1c</b>	< 35.08	< 16.27	> 138.60	> 138.60
<b>2c</b>	< 35.08	26.31	> 138.60	75.41
<b>4c</b>	< 35.08	17.28	> 138.60	129.05
<b>5c</b>	50.18	< 16.27	74.28	> 138.60
<b>Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)</b>				
<b>10c</b>	89.59	< 16.27	8.71	> 138.60
<b>11c</b>	77.97	37.62	21.13	44.71
<b>12c</b>	81.23	36.17	17.33	47.47
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)</b>				
<b>16c</b>	< 35.08	< 16.27	> 138.60	> 138.60
<b>17c</b>	85.20	31.79	13.00	57.75
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)</b>				
<b>19c</b>	84.28	29.22	13.97	65.38
<b>20c</b>	65.74	24.23	38.93	84.20
<b>Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)</b>				
<b>22c</b>	80.59	34.65	18.05	50.96
<b>23c</b>	83.40	48.32	14.90	28.76
<b>24c</b>	80.74	47.99	17.86	29.24
<b>Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide</b>				
<b>29c</b>	< 35.08	< 16.27	> 138.60	> 138.60
<b>Weitere Derivate</b>				
<b>34c</b>	< 35.08	< 16.27	> 138.60	> 138.60

<sup>a</sup>Asfaw, H. *et al.*; *PLoS One* **2017**, *12* (4), 1-21, von GSK gewählte Richtwerte für die **hepatische Extraktionsrate**: > 75 % = hohe Clearance, 33 % – 75 % = mittlere Clearance, < 33 % = niedrige Clearance

Den von GSK gesetzten Richtwert einer hohen Clearance (Extraktionsrate > 75 %) überschritten acht der 16 getesteten Substanzen. Dies führt teilweise zu Halbwertszeiten in menschlichen Mikrosomen von weniger als 20 Minuten. Die Substanzreihe des Enantiomers und der Epimere von Wollamid B erwies sich als stabiler als die Leitsubstanz. Weiterhin waren **16c** mit zwei Ornithinen, das Pentapeptid **29c** und das Peptid mit Oxadiazol-Ring **34c** in menschlichen Lebermikrosomen deutlich stabiler als Wollamid B. Vereinzelt fielen große Unterschiede in der Stabilität einer Substanz zwischen Mensch und Maus auf. **10c** hat die niedrigste Halbwertszeit im Menschen von allen getesteten Derivaten, aber war in den Mikrosomen der Maus äußerst stabil. Allgemein zeigte sich die Substanzklasse in den murinen Mikrosomen stabiler als in menschlichen. Lediglich **2c** bildete hier eine Ausnahme.

## 4. Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit diskutiert. Wie in den obigen Tabellen zu erkennen ist, wurden die dargestellten Peptide nach ihrem Substitutionsmuster in neun Gruppen eingeteilt. Jeder Gruppe ist ein Unterkapitel gewidmet. Dort wird zuerst die Rationale für die gewählten Sequenzen der Peptide erläutert. Daraufhin wird die Performance herausstechender Vertreter beschrieben und erkennbare Muster aufgezeigt. Weiterhin werden die Verbindungen mit bereits beschriebenen Derivaten aus unserer<sup>77, 85</sup> und anderer Arbeitsgruppen<sup>78-80, 148-150</sup> verglichen.

Die einzige Ausnahme bildet der *Mtb*-Assay mit der Expression des rot-fluoreszierenden Proteins (Kapitel 3.2.2.2). Die Ergebnisse dieses Assays werden getrennt in Abschnitt 4.10 diskutiert. Dieser Assay wurde zum Ende der Forschungsarbeit durchgeführt, um - wie in der Wirkstoffforschung bei aussichtsreichen Aktivitäten und Verbindungen üblich - die Wirkung in einem zweiten Labor zu verifizieren. Die Ergebnisse dieses Assays sind daher nicht geeignet, die fortlaufenden Gedanken zur synthetischen Arbeit zu verdeutlichen.

Abschließend soll in Abschnitt 4.11 die Substanzklasse der Wollamide im Allgemeinen beurteilt werden.

### 4.1 Enantiomer und Epimere des Wollamid B

Um mehr über die Rolle der einzelnen Aminosäuren zu erfahren, wurden in der Arbeitsgruppe bereits Wollamid-Derivate mit dem Austauschmuster Xxx → Ala (Alanin-Scan) synthetisiert<sup>77</sup>. In Analogie zu diesem Ansatz wurde im Folgenden die Relevanz der Stereozentren betrachtet. Dazu wurden Peptide mit einer Invertierung einer einzelnen Aminosäure (Epimer) oder aller Aminosäuren (Enantiomer) hergestellt.

Im Agardiffusionstest waren alle Testsubstanzen dieser Gruppe inaktiv gegenüber den gram-negativen Bakterien. Einige zeigten eine Aktivität gegen die gram-positiven Erreger. **1c**, **3c** und **5c** hemmten das Wachstum von *M. vaccae*. Obwohl dies in der Regel eine Wirksamkeit gegen *Mtb* versprach, war **3c** inaktiv. **5c** wurde weiterhin aufgrund seiner Aktivität gegen *Mtb* für den Assay gegen *A. baumannii* ausgewählt, zeigte aber keinerlei Effekt.

Unter den Epimeren wies lediglich **5c** (Asn → D-Asn) noch eine antimykobakterielle Aktivität auf (MHK<sub>90</sub> = 5 μM). Die anderen Variationen waren inaktiv gegen *Mtb* (MHK<sub>90</sub> ≥ 40 μM). Ebenfalls inaktiv sind die beiden bereits beschriebenen Epimere (D-Orn → L-Orn<sup>78-79</sup> und L-Leu → D-Leu<sup>78</sup>). Außerdem war das Enantiomer des Wollamid B (**1c**) aktiv (MHK<sub>90</sub> = 5 μM). Tsutsumi *et al.*<sup>78</sup> synthetisierten ebenfalls eine Reihe von Derivaten mit mehreren veränderten Stereozentren. Diese waren jedoch alle inaktiv gegen *Mtb* (MHK ≥ 100 μg/mL). Daraus schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass die originale Konfiguration der Leitsubstanz für die antimykobakterielle Wirkung essentiell ist<sup>78</sup>. In dieser Arbeit konnten mit dem Enantiomer und dem Asn-Epimer allerdings zwei weitere Konfigurationen mit einer Aktivität gegen *M. tuberculosis* entdeckt werden.

Diese beiden Beobachtungen führten zu der Annahme, dass nicht nur die Art der Seitenkette, sondern auch deren Orientierung im Raum durch die Vorgabe der Konfiguration für eine antimykobakterielle Aktivität von Bedeutung sind. Denn obwohl alle Derivate dieses Sets sequenzhomolog zu Wollamid B sind, zeichneten sich erhebliche Unterschiede in deren Wirksamkeit ab. Als Wirkmechanismus wäre daher eine Interaktion mit einer chiralen Bindungstasche eines Proteins vorstellbar. Auch der Ala-Scan legte nahe, den Fokus auf Asn zu richten. Dort ergab nur der Asn → Ala Austausch ein Peptid mit einer Restaktivität (MHK<sub>90</sub> = 20 μM), während alle anderen gänzlich inaktiv waren<sup>77</sup>. Infolgedessen wurden Derivate synthetisiert, bei denen Asparagin ersetzt wurde (s. Kapitel 4.2).

Die Löslichkeit verbesserte sich für alle beschriebenen Derivate mit veränderter Abfolge der Konfiguration der einzelnen Aminosäuren. Wollamid B und sein Enantiomer (**1c**), beide besitzen eine symmetrische Abfolge der Konfiguration cyclo(L-L-D-L-L-D), sind innerhalb dieser Gruppe am wenigsten löslich. Die geringe Permeabilität verbesserte sich für keines der Derivate. Dafür konnten die allgemein gute Plasmastabilität und geringe Cytotoxizität dieser Substanzklasse bestätigt werden und auch die metabolische Stabilität in Lebermikrosomen stieg innerhalb dieser Gruppe, was sich vermutlich durch die erhöhte Anzahl an D-Aminosäuren erklären lässt. Peptide mit in der Natur selten vorkommende D-Aminosäuren werden von peptidspaltenden Enzymen schlechter als Substrate wahrgenommen und daher verlangsamt abgebaut<sup>151-153</sup>. Dies ist neben der Cyclisierung eine bekannte Strategie, um Peptide vor metabolischem Abbau zu schützen<sup>154-155</sup>.

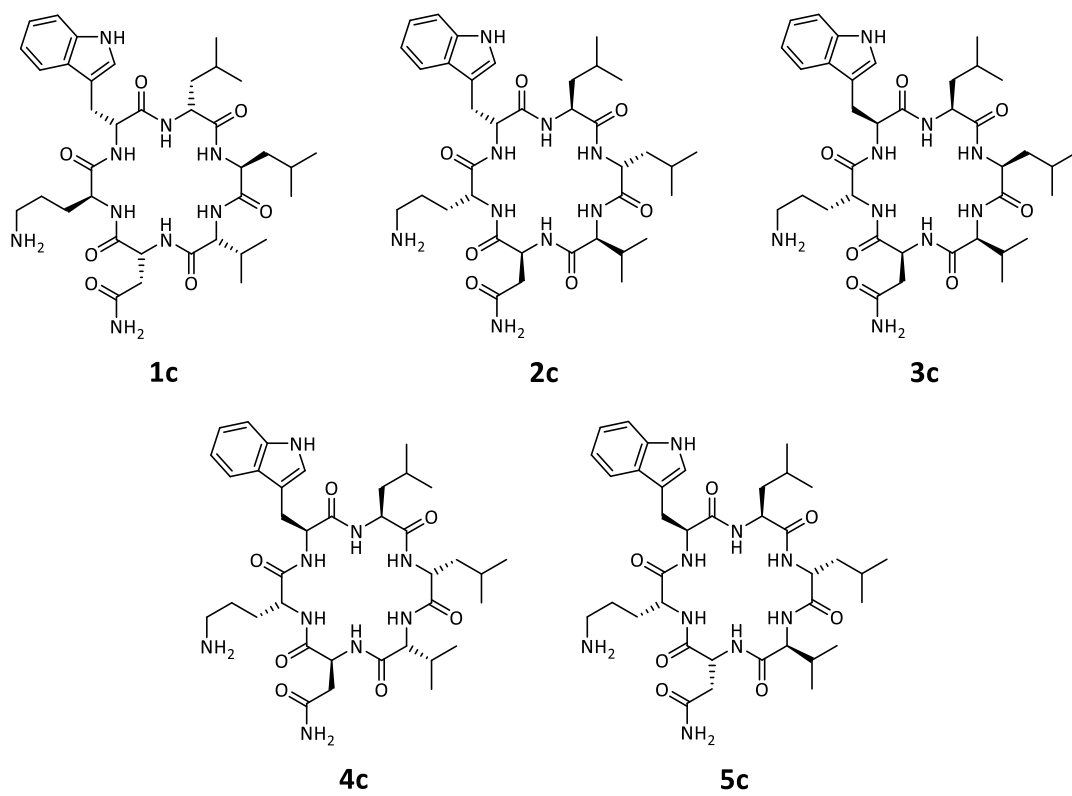


Abbildung 16: Enantiomer und Epimere des Wollamid B



## 4.2 Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)

In diesem Set wurde nach Alternativen zu Asn in Position V gesucht, weil einerseits der Austausch des Asparagins im Alanin-Scan<sup>156</sup> am besten toleriert wurde und andererseits, weil das Asn-Epimer ebenfalls eine antimykobakterielle Wirkung zeigte. Weiterhin sieht man in cyclischen Peptiden mit akzeptabler Permeabilität selten hydrophile Seitenketten wie die von Asn oder Gln<sup>157</sup>.

Im Agardiffusionstest fielen **11c** und **15d** als zwei von insgesamt drei Substanzen auf, die gegen *E. coli* aktiv waren. Weiterhin zeigten nur die Derivate mit einer D-Aminosäure anstelle des Asparagins Hemmzonen gegen die gram-positiven Bakterien, wie auch gegen *M. vaccae*. Für den Assay zur Bestimmung der Hemmzone gegen *A. baumannii* wurden **12c** als antimykobakteriell aktivste Substanz dieser Arbeit und **6c** als inaktives Gegenbeispiel ausgewählt. Beide Substanzen zeigten keine Aktivität.

Eine antimykobakterielle Aktivität zeigten vor allem die Peptide, die eine D-Aminosäure statt Asparagin beinhalteten. Besonders deutlich wurde dies bei der Betrachtung der sequenzhomologen Derivate **10c** und **11c**, da hier die Invertierung des Stereozentrums von L-Phe(4-F) zu D-Phe(4-F) die  $MHK_{90}$  um den Faktor 16 senkte. Der Austausch des Fluor-Atoms zu einem Chlor-Atom (**12c**) verbesserte die Aktivität nochmals um den Faktor 2 ( $MHK_{90} = 1.25 \mu\text{M}$ ). Die von Tsutsumi *et al.*<sup>78</sup> gestellte Anforderung, dass an Position V ein Carbonsäureamid (Asn) für die antimykobakterielle Wirkung erforderlich sei, kann somit zumindest um D-Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten erweitert werden. Mit der Zunahme der antimykobakteriellen Aktivität erhöhte sich jedoch auch die Cytotoxizität in dieser Gruppe (**11c**, **12c**, **13c**) auf  $IC_{50}$ -Werte von 40 - 50  $\mu\text{M}$ .

Für die aktiven Substanzen sank die Wasserlöslichkeit drastisch ab. Dies war allerdings nicht nur durch den Einbau der aromatischen Aminosäure zu erklären, wie die beiden Epimere **10c** und **11c** zeigen. Während **10c** trotz des höchsten Log D-Wertes dieser Gruppe nach GSK-Standards gut wasserlöslich war (280  $\mu\text{g/mL}$ ), sank die Löslichkeit seines Epimers (**11c**) auf 20  $\mu\text{g/mL}$  ab. Eine bessere Erklärung für die abnehmende Löslichkeit liefert die Betrachtung der Konfigurationen. Die schlecht löslichen Substanzen dieser Generation haben gemeinsam, dass Asn durch eine aromatische D-Aminosäure ausgetauscht wurde. Diese Beobachtung zeigte sich erst in dieser Generation. Alle

Derivate der ersten Gruppe (vgl. Kapitel 4.1) mit einer zusätzlichen D-Aminosäure, auch in Position V (Asn → D-Asn), übertrafen sogar die Wasserlöslichkeit der Leitsubstanz. Für die geringe Löslichkeit scheinen folglich die beiden Kriterien, Asn durch eine (1) aromatische Aminosäure in der (2) D-Konfiguration zu ersetzen, zusammen verantwortlich zu sein.

Einen Fortschritt in der passiven Permeabilität wies in dieser Substanzgruppe lediglich **10c** mit einer Permeabilität von 11 nm/s auf. Nach den von GSK gesetzten Richtwerten fällt die Substanz damit gerade in die Kategorie „mittelschnell permeierend“. Da es sich gleichzeitig um die lipophilste Substanz der Gruppe handelt und eine größere Lipophilie allgemein als Grundvoraussetzung für permeable Peptide genannt wird<sup>137, 158-159</sup>, wurde in späteren Gruppen die Lipophilie weiter gesteigert, um die Auswirkung auf die Permeabilität zu beobachten.

Es ist bekannt, dass unsubstituierte Phenylreste in der para-Position labil für Phase-I-Biotransformationen sind<sup>160-164</sup>. Durch einen Austausch des Wasserstoff-Atoms durch ein Fluor-Atom ist diese Stelle für etwaige Hydroxylierungen blockiert<sup>165-166</sup>. Diese substituierten Phenylalanine gehören nicht mehr zu den proteinogenen Aminosäuren und werden daher von peptidspaltenden Enzymen schlechter als Substrate erkannt<sup>167</sup>. Ebenso wurden metabolisch stabilere und permeablere Peptidderivate mit einem Chlor-Atom in para-Position des Phenylalanins beschrieben<sup>168-169</sup>. Daher wurde erwartet, dass die metabolische Stabilität dieser Wollamide steigt oder sich zumindest nicht weiter verschlechtert. Innerhalb der Substanzklasse der Cyclohexapeptide fielen diese Derivate jedoch durch eine deutlich niedrigere Halbwertszeit in Lebermikrosomen verglichen mit der Leitsubstanz auf. Dies lässt sich vermutlich durch die erhöhte Lipophilie der Derivate erklären, welche die Affinität zu oxidierenden Enzymen der Leber erhöht<sup>170-171</sup>.

Die antimykobakterielle Aktivität für **14c** und **15c** wurde an der Universität British Columbia bestimmt und wird in Kapitel 4.10 besprochen.

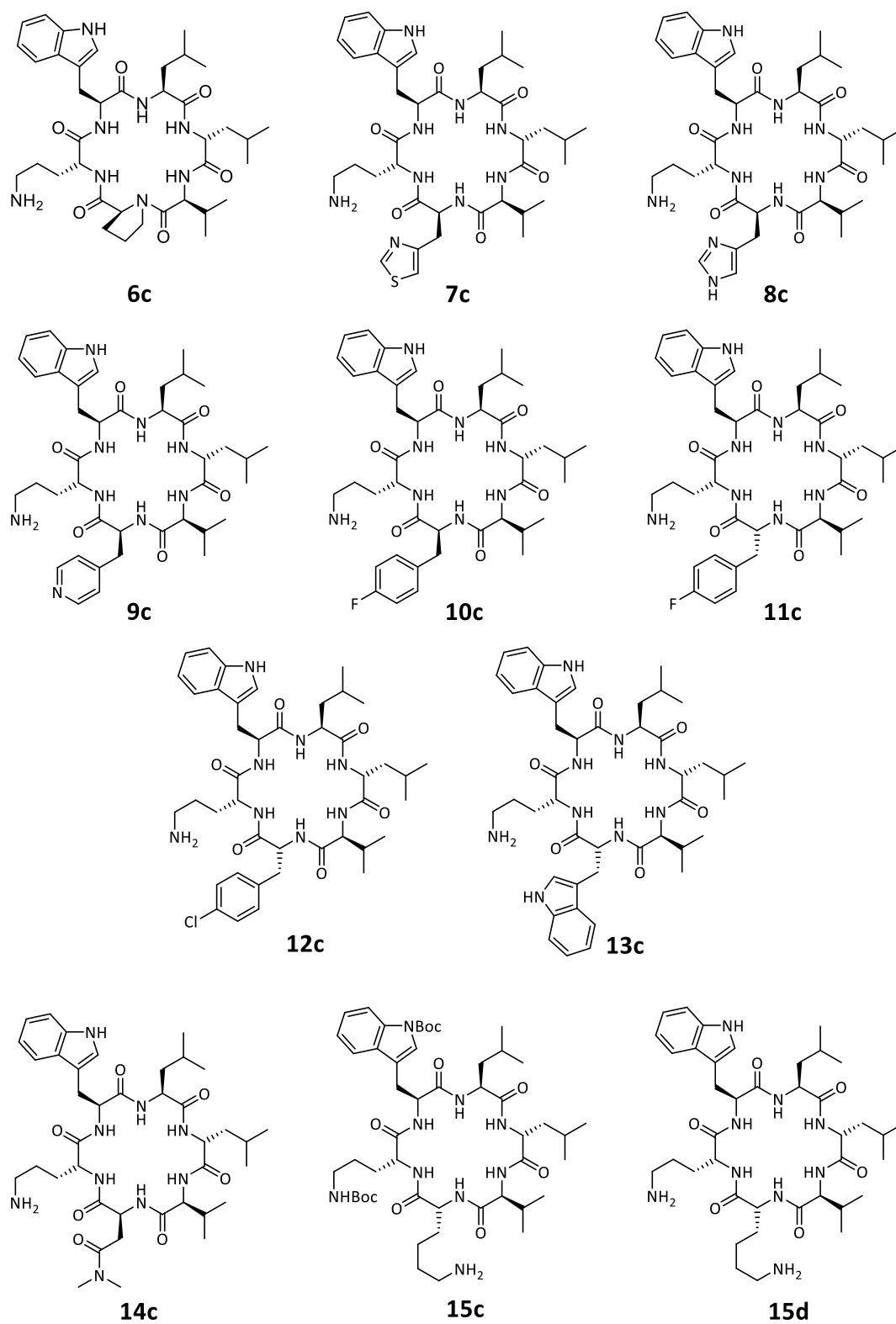


Abbildung 17: Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)

### 4.3 Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)

In dieser und der folgenden Untergruppe wurde Position V mit einem halogenierten Phenylalanin besetzt und Position III (D-Leu) des Wollamid-Grundgerüsts verändert. Ein Austausch des D-Leu mit einer lipophileren Aminosäure führte zu antimykobakterieller Wirkung, während Veränderungen an Position II (Leu) und Position IV (Val) die Aktivität drastisch reduzierten<sup>100</sup>.

Der Trend des wachstumshemmenden Effekts der Wollamid-Abkömmlinge mit einer D-Aminosäure an Position V auf gram-positive Bakterien und *M. vaccae* wurde auch innerhalb dieses Sets bestätigt. **16c** besitzt aufgrund des zweiten Ornithins unter physiologischen Bedingungen eine zweite positive Ladung und wurde daher für den *A. baumannii*-Assay ausgewählt. Eine Aktivität anderer polykationischer Cyclopeptide, wie Gramicidin S<sup>172</sup> und Colistin<sup>103</sup>, gegen *A. baumannii* wurde bereits festgestellt. **16c** war allerdings inaktiv.

**16c** war auch gegen *M. tuberculosis* inaktiv. Dies ist neben der nicht auftretenden Membrandepolarisation<sup>78</sup> ein weiteres Indiz dafür, dass die Wirkung der Wollamide nicht auf unspezifische Effekte ihrer positiven Nettoladung mit der Zellmembran zurückzuführen ist. Die geringfügige Verkleinerung der Seitenkette in **17c** (D-Leu → D-Val, vgl. mit der Muttersubstanz **11c**) war mit einer leicht abgeschwächten antimykobakteriellen Aktivität (MHK<sub>90</sub> = 4 µM) verbunden. In der nächsten Gruppe wurde daher der Effekt sterisch anspruchsvollerer Aminosäuren in Position III betrachtet.

Die im vorherigen Set stark gesunkene Wasserlöslichkeit stieg für **16c** und **17c** wieder. Trotz einer D-Aminosäure in Position V war **16c** leichter löslich als Wollamid B. Dies ist vermutlich auf das zweite Ornithin zurückzuführen. Allerdings existieren bereits zwei Wollamide mit einem zusätzlichen D-Orn anstelle des Asn, welche trotz des zweiten primären Amins eine geringe Wasserlöslichkeit (< 40 µg/mL) aufwiesen<sup>77</sup>. Der Austausch von D-Leu zu D-Val steigerte die Löslichkeit nur geringfügig (vgl. **11c**, **17c**).

Die metabolische Stabilität in menschlichen Lebermikrosomen war für **16c** ebenfalls stark angestiegen. Dies war eine Ausnahme, da ansonsten alle Derivate mit einer aromatischen Aminosäure in Position V eine deutlich geringere mikrosomale Halbwertszeit aufwiesen.

Die bereits erwähnte Korrelation zwischen Lipophilie und Bindungsaffinität zu CYP-Enzymen dient als mögliche Erklärung dieses Phänomens<sup>170-171</sup>. Die sehr gute metabolische Stabilität von **16c** ist daher vermutlich auf die hohe Polarität (Log D = 1.33) zurückzuführen.

Die antimykobakterielle Aktivität für **18c** wurde an der Universität British Columbia bestimmt und wird in Kapitel 4.10 besprochen.

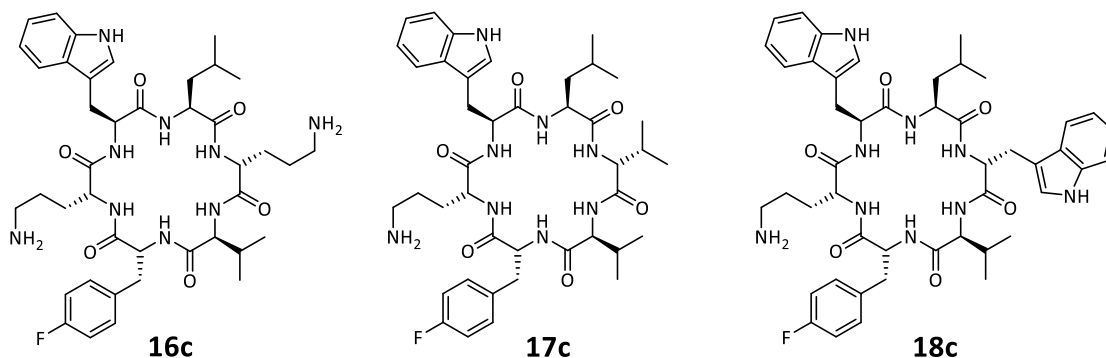


Abbildung 18: Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)

#### 4.4 Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)

Nachdem der Austausch des Fluor-Atoms durch ein Chlor-Atom am Phenylalanin in Position V zu einer Halbierung der  $MHK_{90}$  führte (**11c**, **12c**), wurden drei Wollamide mit D-Phe(4-Cl) synthetisiert, bei denen ebenfalls D-Leu in Position III ersetzt wurde.

Im Unterschied zur vorherigen Gruppe zeigten diese Vertreter auch eine Hemmzone gegen MRSA. Außerdem wies **21c** die größte Hemmzone gegen *M. vaccae* auf (20 mm).

Beide getesteten Wollamide (**19c**, **20c**) zeigten gute antimykobakterielle Aktivität ( $\leq 4 \mu\text{M}$ ). Dennoch besitzt D-Leu in Position III (**11c**, **12c**) die bisher beste Seitenkette für diese Position, da sowohl **17c** mit einer kleineren (D-Val), als auch **19c** mit einer größeren und weniger flexiblen Seitenkette (D-Cyclohexylglycin) einen geringeren Effekt auf *Mtb* ausübten.

Die Vertreter dieser Gruppe sind ebenfalls sehr wenig wasserlöslich und besitzen zusätzlich die größten PPB-Werte ( $\geq 98\%$ ), was auf ihre erhöhte Lipophilie zurückzuführen ist (Log D > 2.8)<sup>119-120</sup>. Substanzen mit einer stark ausgeprägten Bindung an

Plasmaproteine werden in der Regel nur sehr langsam aus der Blutbahn in das Zielgewebe übertreten, da laut der „free drug theory“ nur der freie, nicht an Protein gebundene Anteil zur Permeation zur Verfügung steht<sup>111</sup>. Die Halbwertszeit in menschlichen Lebermikrosomen verdoppelte sich durch den Austausch von D-Leu zu D-Phe(4-Cl) (vgl. **12c**, **20c**), ist aber dennoch deutlich niedriger als für Wollamid B.

Im Assay zur Bestimmung der Permeabilität konnten die beiden gemessenen Substanzen im Akzeptorgefäß nicht detektiert werden. Folglich verblieben sie im Donorgefäß oder lagerten sich an die künstliche Membran an. Der Assay gab keinen Aufschluss darüber, welcher der beiden Fälle eintrat. Dennoch zeigten beide Derivate eine akzeptable Wirksamkeit. Jedoch sind die physikochemischen und pharmakokinetischen Parameter dieser deutlich lipophileren Wollamide im Hinblick auf eine orale Administration nicht wünschenswert.

Die antimykobakterielle Aktivität für **21c** wurde an der Universität British Columbia bestimmt und wird in Kapitel 4.10 besprochen.

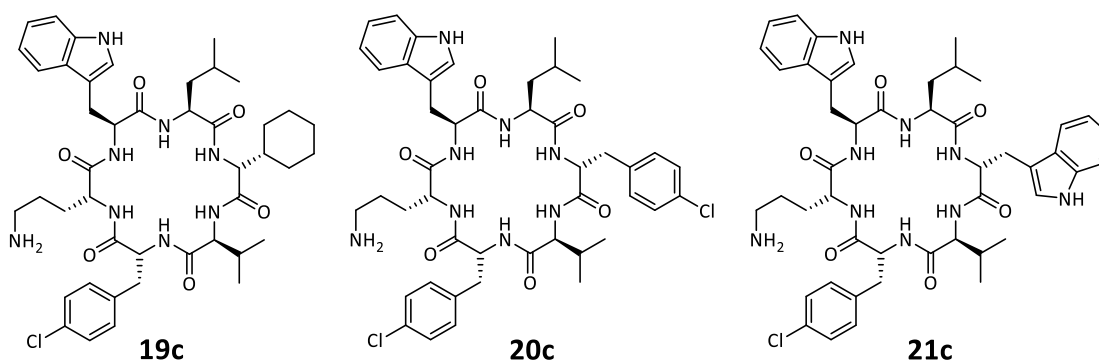


Abbildung 19: Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)

#### 4.5 Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Orn → Xxx)

In vorherigen Veröffentlichungen zu dieser Substanzklasse wurde bereits gezeigt, dass eine basische Funktion für die antimykobakterielle Wirkung essentiell ist<sup>78, 148</sup>. Bisher wurde D-Ornithin durch Aminosäuren mit längerer Kohlenstoffkette ersetzt (D-Lys<sup>80</sup>, D-Arg<sup>77</sup>). Beide Derivate waren ebenfalls wirksam gegen *Mtb*.

Weiterhin führten die zweifache und selbst die dreifache Methylierung des primären Amins zu aktiven Derivaten (MHK = 6.25 µg/mL)<sup>78</sup>. Dies ist insofern bemerkenswert, da

das dreifach methylierte Derivat eine permanent positive Ladung trägt und dementsprechend wahrscheinlich nicht in der Lage ist, durch passive Diffusion Zellmembranen zu passieren. Aufgrund dessen scheint eine passive Diffusion über Zellmembranen nicht im Zusammenhang mit der Wirkung der Wollamide zu stehen. Somit läge das Target entweder nicht im Inneren der Zelle hinter einer Zellmembran oder die Wollamide würden auf anderem Wege in die Bakterien gelangen. Die passive Diffusion ist nicht der einzige Weg, um in die Zelle zu gelangen. Peptide können auch durch Endocytose<sup>158, 173</sup>, parazellulär<sup>174-175</sup>, also zwischen den Zellen hindurch, oder aktiv, unter Energieverbrauch durch Transporter<sup>176</sup>, aufgenommen werden. Schlussendlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Wollamid mit quartärer Ammoniumgruppe eine andere molekulare Wirkungsweise hat als die Wollamide ohne permanente positive Ladung.

Auch das primäre Amin ist bei physiologischem pH-Wert fast vollständig protoniert. Es besteht aber die Möglichkeit zum Ladungsverlust durch Deprotonierung und damit zur passiven Überquerung der Zellmembran<sup>138</sup>. Dies trifft auf das permanent geladene Derivat nicht zu. In diesem Set wurde die Kohlenstoffkette der basischen Aminosäure verkürzt. Falls die positive Ladung durch die beiden umgebenden aromatischen Funktionen besser abgeschirmt wird, wäre eine transzelluläre Aufnahme möglich<sup>177-178</sup>. Außerdem könnte es zu Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen einer der aromatischen Aminosäuren und dem protonierten Amin kommen. Eine Stabilisation von  $\alpha$ -Helices<sup>179-180</sup> und  $\beta$ -Hairpins<sup>181</sup> wurde durch diese Art der Wechselwirkungen bereits beobachtet.

Im Agardiffusionstest wiesen alle getesteten Derivate aus dieser Gruppe eine Hemmzone gegen MRSA auf. Weiterhin war **22c** die einzige Substanz dieser Arbeit, die einen wachstumshemmenden Effekt auf *P. aeruginosa* hatte.

Die Verkürzung der Kohlenstoffkette um eine Methylengruppe (D-Orn  $\rightarrow$  D-Dab) brachte ein inaktives Wollamid (**23c**) hervor, welches eine deutlich erhöhte Cytotoxizität aufwies ( $IC_{50} = 20 \mu M$ ). Allerdings führte der Einbau der N $\beta$ -methylierten D-Dap (**24c**) zu einer nicht cytotoxischen und leicht aktiven Substanz ( $MHK_{90} = 10 \mu M$ ). Der Einbau von D-Arginin statt D-Ornithin ergab ebenfalls ein aktives Derivat ( $MHK_{90} = 4 \mu M$ ).

Die Guanidin-Gruppe erhöhte die Löslichkeit der Substanz nicht. Tatsächlich erhöhte sich aber der Log D-Wert (vgl. **12c**, **22c**). Der leichte Anstieg in der Lipophilie traf auch für den

Austausch D-Orn  $\rightarrow$  D-Arg in Wollamid B zu<sup>77</sup>. In diesem Fall hatte es allerdings sowohl auf die Löslichkeit als auch auf die Permeabilität einen positiven Effekt<sup>77</sup>. Die beiden anderen Substanzen dieser Gruppe waren ebenfalls sehr schlecht löslich, was bei den deutlich gestiegenen Log D-Werten ( $\geq 3.3$ ) und dem eventuell besser abgeschirmten Amin nicht verwunderte. Die Permeabilität der Peptide blieb jedoch gering (**24c**) bzw. wurden **22c** und **23c** nicht im Akzeptorgefäß detektiert.

Die Variationen an Position VI hatten keinen verändernden Einfluss auf die Stabilität der Peptide in menschlichen Lebermikrosomen ( $t_{1/2} < 18$  min).

Die antimykobakterielle Aktivität für **25c** wurde an der Universität British Columbia bestimmt und wird in Kapitel 4.10 besprochen.

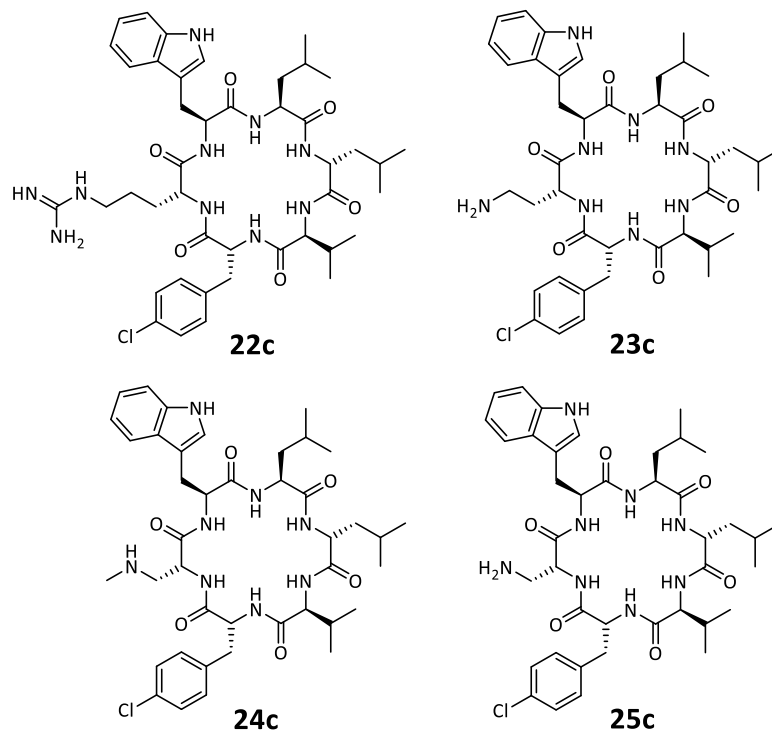


Abbildung 20: Wollamid-Derivate (Asn  $\rightarrow$  D-Phe(4-Cl) und D-Orn  $\rightarrow$  Xxx)



## 4.6 Wollamid-Derivate mit $\alpha$ -Methyl-Aminosäuren

Obwohl die Methylierung der Stickstoff-Atome aus Peptidbindungen keine Grundvoraussetzung für permeable Cyclopeptide ist<sup>182-183</sup>, konnte gezeigt werden, dass impermeable Grundgerüste durch gezielte N-Methylierung in permeable Derivate überführbar sind<sup>137-138, 184</sup>. Auch die bioverfügbaren Peptide Cyclosporin A<sup>133, 136</sup> und Cyclohexylgriselimycin<sup>83</sup> besitzen  $\alpha$ -Methyl-Aminosäuren.

Die Methylierung hat allerdings weitreichende Folgen für die Konformation der resultierenden Peptide und damit auch für deren Eigenschaften. Eine geringere Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren durch N-Methylierung führt zur Reduktion der polaren Oberfläche. In der Theorie sinkt dadurch die Desolvatisierungsenergie, die aufzubringen ist, um angelagerte Wassermoleküle abzustreifen, bevor per passiver Diffusion Zellmembranen überwunden werden<sup>70</sup>. Ungewollte intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen (WBB), die zur Aggregation<sup>183</sup> der Peptide führen und sowohl die Löslichkeit als auch die Permeabilität beeinträchtigen, können gezielt verhindert werden<sup>133</sup>. Eine Steigerung der metabolischen Stabilität ist ebenfalls durch N-Methylierung möglich<sup>138, 185-186</sup>.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich die N-Methylierung unter Umständen als nachteilig erweist. Cyclische Hexapeptide bilden durch intramolekulare WBB häufig Sekundärstrukturen wie  $\beta$ -Schleifen<sup>136</sup> oder  $\gamma$ -Schleifen<sup>182</sup> aus. Dadurch sinkt die Anzahl der WBB-Akzeptoren und -Donatoren, die zur Interaktion mit der Umgebung bereitstehen. Bei einer Methylierung eines an einer intramolekularen WBB beteiligten Stickstoff-Atoms bricht die Sekundärstruktur auf und das resultierende Peptid verbleibt in einer impermeablen Konformation. Zusätzlich besteht das Risiko, dass das Peptid zwar in eine permeable Konformation überführt wird, diese jedoch keine Aktivität mehr aufweist.<sup>141</sup>

Unter Berücksichtigung dieser Vorbetrachtungen wurde mit einem <sup>1</sup>H-NMR-Experiment ein rationaler Versuch unternommen, die NH-Gruppen zu identifizieren, welche an der Oberfläche der dreidimensionalen Peptidstruktur liegen. Diese sind voraussichtlich nicht Teil eines intramolekularen WBB-Netzwerks und erhöhen die polare Oberfläche der Substanz. Für das Experiment wurde Wollamid B in DMSO-*d*<sub>6</sub> vermessen und

anschließend mit einem Zusatz von Wasser erneut vermessen. Im ersten Fall waren alle sechs Wasserstoff-Atome der Peptidbindungen sichtbar. Durch den Zusatz von Wasser sollten diese mit der Zeit durch Deuterium ausgetauscht werden und sich die Signale verkleinern, bis sie vollständig verschwinden. Jedoch waren alle Wasserstoffsignale bereits nach der ersten Messung nach Zugabe von Wasser durch Deuterium ausgetauscht. Daher wurde das ursprüngliche  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum verwendet, um anhand der Integralgrößen zu bestimmen, welche Wasserstoff-Atome am anfälligsten für einen H/D-Austausch waren; die D-Atome stammen aus dem  $\text{DMSO-}d_6$ . Die Zuordnung der Signale geschah mithilfe der Veröffentlichung von Khalil *et al.*<sup>148</sup>

Das Spektrum wurde auf das nicht-austauschende Wasserstoffsignal des C5-Trp (7.13 ppm, s, 1H) normalisiert. In Abbildung 21 links sieht man die Integrale der  $\alpha$ -Wasserstoff-Atome für Tryptophan, D-Leucin und Valin. Das kleinere Integral für Valin deutet gemäß obiger Hypothese an, dass bereits ein Teil dieser Wasserstoff-Atome durch Deuterium ersetzt wurde. Die Integrale für Tryptophan und D-Leucin entsprechen annähernd der Größe des nicht-austauschenden C5-H-Signals des Tryptophans. Daraus wurde geschlossen, dass diese beiden Wasserstoff-Atome für das Lösungsmittel schlechter zugänglich sind. Gleiches wie für Valin gilt auch für D-Ornithin (Abbildung 21 rechts) und Leucin (Abbildung 21 unten), während besagtes Wasserstoff-Atom des Asparagins (Abbildung 21 unten) nicht durch Deuterium ersetzt wurde.

Es ist allerdings wichtig zu beachten, dass die Peptide in  $\text{DMSO-}d_6$  in einer anderen Konformation als in den *in vitro* Versuchen vorliegen können. Dennoch sind diese H/D-Austauschexperimente hilfreich, um mehr über das intramolekulare WBB-Netzwerk von Peptiden zu erfahren<sup>182, 187</sup>.

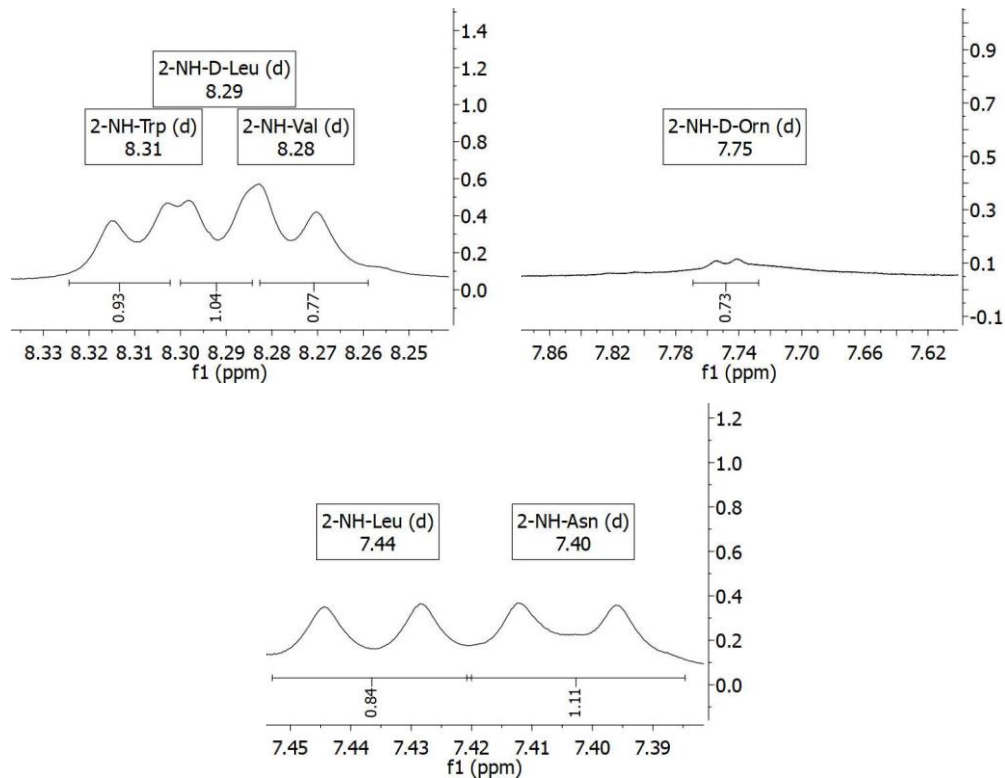


Abbildung 21: Ausschnitte der  $\alpha$ -H-Signale für Wollamid B aus  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum

Im Agardiffusionstest waren die drei Peptide inaktiv, lediglich das Wachstum von *M. vaccae* wurde durch **26c** gehemmt.

Die Permeabilität der drei Derivate wurde bisher nicht bestimmt, da sie erst nach Ablauf des Kooperationsvertrags mit dem OpenLab von GlaxoSmithKline hergestellt wurden. Der Hypothese entsprechend wird eine Steigerung der Permeabilität für **28c** (D-MeOrn) erwartet, nicht aber für **26c** und **27c**.

Ovadia *et al.*<sup>137</sup> entdeckten permeable Grundgerüste cyclischer Hexapeptide durch  $\alpha$ -Methylierung in einem Caco-2 Assay. Dies ist ein Assay zur Bestimmung der Permeabilität, der lebende Zellen statt einer künstlichen Membran nutzt. Es gab keine Korrelation zwischen der Anzahl der N-Methylierungen und der Permeabilität, was die Tragweite der gezielten Methylierung weiter unterstreicht. Im PAMP-Assay erhöhte sich die Permeabilität durch die künstliche Lecithin-Membran nicht. Daher ist es wahrscheinlich, dass diese Peptide nicht transzellulär, sondern parazellulär aufgenommen werden.

Die Methylierung von Leucin und Valin in Wollamid B sollte ebenfalls die Permeabilität erhöhen können. Sowohl das MeVal-Derivat als auch das MeVal-MeAsn-Derivat wurden bereits von Asfaw<sup>77</sup> synthetisiert. Beide zeigten allerdings keine verbesserte Permeabilität im PAMP-Assay. Durch ihre geringe Lipophilie ( $\text{Log } D \leq 2$ ) ist ihr Abschneiden im Caco-2 Assay mit der Möglichkeit zur parazellulären Aufnahme gerade im Hinblick auf die oben genannte Veröffentlichung und die beschriebene parazelluläre Absorption anderer peptidischer Wirkstoffe, wie Desmopressin<sup>175</sup>, von Interesse.

Die antimykobakterielle Aktivität wurde an der Universität British Columbia bestimmt und wird in Kapitel 4.10 besprochen.

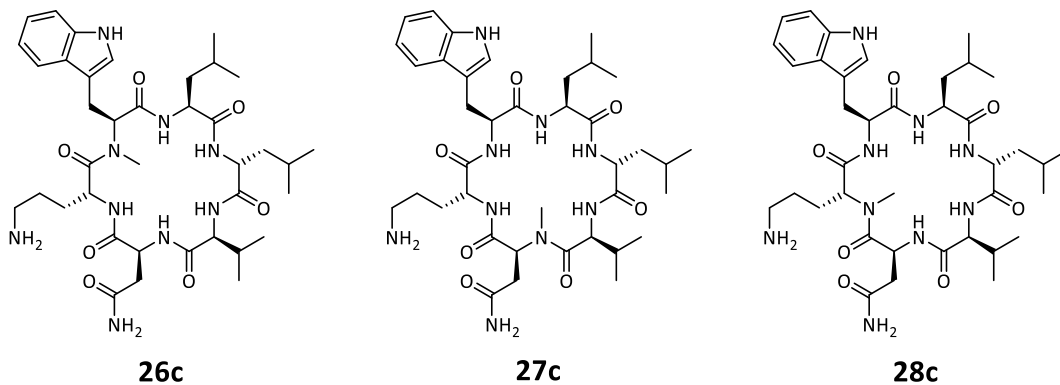


Abbildung 22: Wollamid-Derivate mit  $\alpha$ -Methyl-Aminosäuren

## 4.7 Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide

In den beiden folgenden Gruppen wurde untersucht, ob auch eine Vereinfachung der Leitstruktur einen antimykobakteriellen Effekt erzielt. Ein prominentes Beispiel ist das Veber-Hirschmann-Peptid, bei dem durch Reduktion der Somatostatin-Sequenz auf den Pharmakophor ein stabiles und bioverfügbares Derivat entdeckt wurde<sup>132</sup>.

Zunächst wurde bei zwei Derivaten jeweils eine Aminosäure aus der Sequenz des Wollamid B ausgelassen, bevor cyclisiert wurde. Da nach dem bisherigen Wissensstand sowohl Tryptophan als auch Ornithin als unverzichtbar gelten, wurden sie in dieser und auch bei den in Kapitel 4.8 beschriebenen Tetrapeptiden beibehalten.

Im Agardiffusionstest zeigte **30c** (kein Asn) Hemmzonen gegenüber den Mykobakterienstämmen und den gram-positiven Erregern, wie auch schon andere

antimykobakterielle Derivate. **29c** (kein D-Leu) war inaktiv gegen *M. tuberculosis* ( $\text{MHK}_{90} = 50 \mu\text{M}$ ).

Weiterhin war **29c** das hydrophilste Peptid dieser Arbeit ( $\text{Log D} = 1.16$ ), obwohl es kein Asparagin und damit nicht mehr die polare Carbonsäureamid-Seitenkette enthält. Die große Hydrophilie resultierte nicht in einer deutlich erhöhten Löslichkeit ( $196 \mu\text{g/mL}$ ). Dafür war dieses Peptid sowohl im Plasma als auch in den Mikrosomen von Maus und Mensch über den gesamten Versuchszeitraum stabil.

Die antimykobakterielle Aktivität für **30c** wurde an der Universität British Columbia bestimmt und wird in Kapitel 4.10 besprochen.

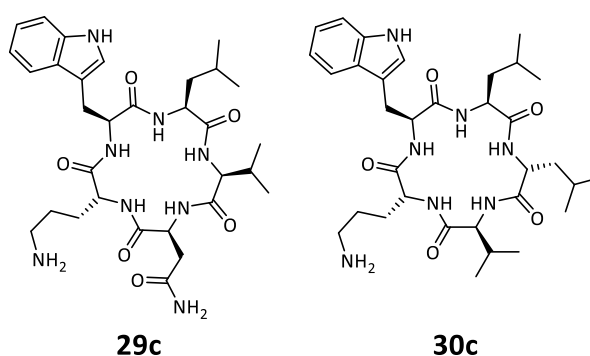


Abbildung 23: Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide

## 4.8 Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide

Beiden synthetisierten Tetrapeptiden fehlt das Asparagin. Bei **31c** ist weiterhin das D-Leucin ausgelassen worden, bei **32c** hingegen fehlt das L-Leucin. Es handelt sich also um zwei Epimere. Cyclisiert wurden sie nicht nach der üblichen Ein-Topf-Variante, sondern nach der unter 7.2.1 beschriebenen Methode. Hierbei wurde das lineare Peptid in DMF gelöst und langsam zur Reaktionsmischung aus Kupplungsreagenz, Racemisierungsinhibitor und Hilfsbase zugetropft, um eine Oligomerisierung der linearen Peptide zu vermeiden.

Im Hemmzonentest waren beide Derivate unauffällig. Lediglich **31c** zeigte einen Hemmhof gegenüber *B. subtilis*.

Die antimykobakterielle Aktivität wurde an der Universität British Columbia bestimmt und wird in Kapitel 4.10 besprochen.

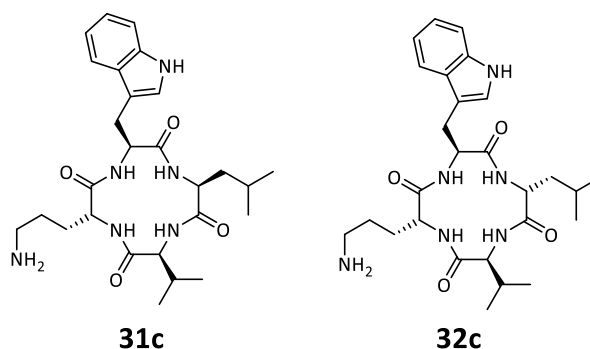


Abbildung 24: Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide

## 4.9 Weitere Derivate

Einige strukturell alleinstehende Derivate wurden in dieser Gruppe zusammengefasst. Tryptophan wurde bisher durch Alanin oder Phenylalanin-Derivate ersetzt<sup>77-78</sup>, was zu inaktiven Wollamiden führte. Dennoch sollte die Suche nach Alternativen für solche bisher als notwendig erachteten Strukturmerkmale nicht eingestellt werden. Daher wurde Tryptophan durch  $\beta$ -(2-Naphtyl)-Alanin ausgetauscht (**33c**). Dies ist ebenfalls eine Aminosäure mit bicyclischer, aromatischer Seitenkette.

In **34c** wurde ein Oxadiazol-Ring (Odz) anstelle einer Peptidbindung eingebaut. Solche und andere Peptidbindungsmimetika<sup>188-189</sup> zeichnen sich durch eine erhöhte metabolische Stabilität aus. Gleichzeitig dirigiert der aromatische Ring den peptidischen Makrocyclus in eine starrere Konformation und unterstützt die Ausbildung intramolekularer WBB, welche die Permeabilität erhöhen<sup>90</sup>. Die Synthese erfolgte in einer Ein-Topf-Variante (siehe 7.2.3) nach Frost *et al*<sup>90</sup>. Zum vorher synthetisierten linearen Pentapeptid werden (N-Isocyanoimino)triphenylphosphoran (Pinc) und eine Carbonylverbindung hinzugegeben. Der Kohlenstoffkörper der Carbonylverbindung imitiert die Seitenkette einer sechsten Aminosäure. Im Unterschied zu den regulären Peptiden erhält man im Makrocyclus einen Odz-Ring und ein Stickstoff-Atom, welches nicht Teil einer Peptidbindung ist, sondern als sekundäres Amin bestehen bleibt (siehe N $\alpha$ -Atom des D-Orn in **34c**). Als Aldehydkomponente wurde 4-Fluoro-Benzaldehyd ausgewählt, da **34c** kurz nach dem aktiven Derivat **11c** entstand. Bei der Synthese entstanden zwei

Diastereomere, weil der ehemalige Carbonylkohlenstoff des Aldehyds im Peptid ein neues Stereozentrum ausbildet. Die beiden Diastereomere konnten mit einer analytischen HPLC nach der in der Veröffentlichung beschriebenen Methode<sup>90</sup> nicht getrennt werden.

Das symmetrische Octapeptid **35c** entstand aus einem linearen Tetrapeptid (**35a**). Während der Cyclisierung nach Methode 7.2.2 bildeten sich zunächst lineare Dimere, bevor der Ringschluss erfolgte.

Der Agardiffusionstest offenbarte eine Wachstumshemmung aller drei Substanzen von *M. vaccae*. Weiterhin war das Octapeptid (**35c**) im Gegensatz zu dem zugehörigen Tetrapeptid (**31c**) sowohl gegen *B. subtilis* als auch *S. aureus* aktiv. Gegen *A. baumannii* wies **34c** keinen wachstumshemmenden Effekt auf.

**34c** zeigte nur eine schwache Aktivität gegen *Mtb* (MHK<sub>90</sub> = 32 µM), wies aber keinerlei Cytotoxizität auf.

Trotz der drei aromatischen Funktionen war **34c** das Peptid mit der besten Wasserlöslichkeit (328 µg/mL) bei gleichzeitig höchster Permeabilität (13 nm/s). Der bereits beschriebene positive Effekt auf die metabolische Stabilität konnte bestätigt werden. Die Plasmastabilität war im Vergleich zu anderen Derivaten der Substanzklasse leicht erniedrigt. 84 % der Substanz verblieben nach zweistündiger Inkubation intakt.

Die antimykobakterielle Aktivität wurde an der Universität British Columbia bestimmt und wird in Kapitel 4.10 besprochen.

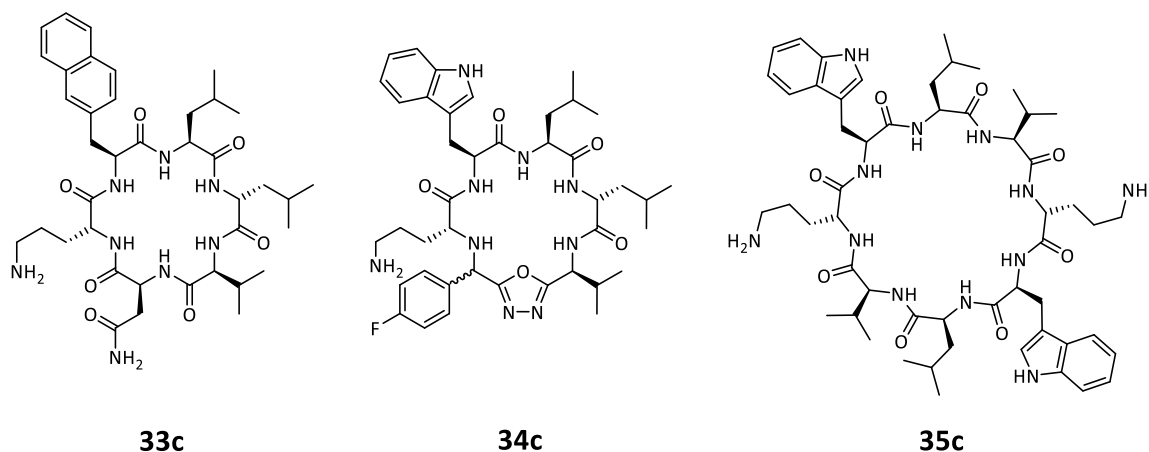


Abbildung 25: Weitere Derivate

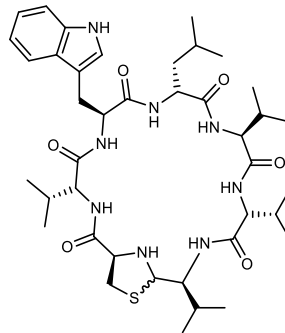
**Exkurs: Lugdunin und das Löslichkeitsproblem alternierender L,D-Cyclopeptide**

Abbildung 26: Lugdunin

Das kürzlich entdeckte Lugdunin<sup>190</sup> ist ein cyclisches Peptid, welches einen Thiazolidin-Ring als Surrogat einer Peptidbindung im Makrocyclus besitzt. Es ist aufgrund seiner Aktivität gegen MRSA aktuell Gegenstand der Forschung<sup>191</sup>.

Auf der Suche nach Strukturanaloga ohne Thiazolidin-Ring, aber mit antimykobakterieller Aktivität, ergab sich ein vollständig unlösliches Derivat: Die Arbeitsgruppe um Prof. Frank Bordusa (MLU Halle) synthetisierte mit einem automatischen Peptidsynthesizer das lineare Pentapeptid Fmoc-D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val-O-2-CTC-Harz, an das L-Orn bzw. D-Orn als sechste Aminosäure gekuppelt wurde. Nach anschließender Cyclisierung entstand mit L-Orn ein Hexapeptid (**37c**), welches sich in keinem Lösungsmittel löste und daher nicht weiter charakterisiert werden konnte. Nur ein Massenspektrum gab einen Hinweis auf das tatsächlich entstandene Produkt. Auch nach der Entschützung mit freier Aminogruppe des Orn, die trotz seiner sehr geringen Löslichkeit laut Massenspektrum zum entschützten Hexapeptid führte, war das Peptid weiterhin unlöslich. Im Falle von D-Orn (**38c**) wurde die abwechselnde L,D-Konfiguration unterbrochen und es ergab sich ein Peptid mit einer Löslichkeit ähnlich zu den Wollamid-Derivaten.



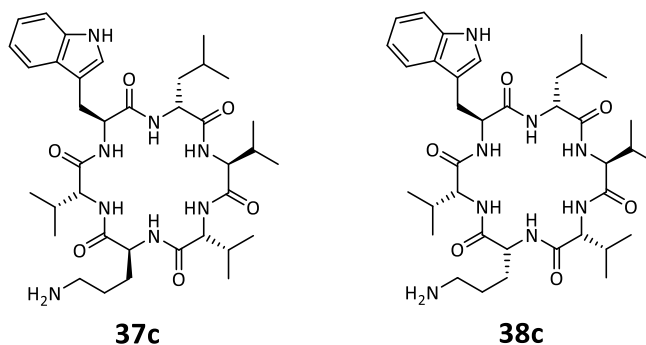


Abbildung 27: links: unlösliches Peptid in alternierender L,D-Konfiguration, rechts: lösliches Peptid ohne alternierende L,D-Konfiguration

Cyclische Hexapeptide mit alternierender L,D-Konfiguration sind in der Lage, Nanoröhren auszubilden. Die einzelnen Ringe liegen dabei in einer planaren  $\beta$ -Faltblattstruktur vor und stapeln sich übereinander, stabilisiert durch Wasserstoffbrückenbindungen der Peptidbindungen<sup>192</sup>. Dies liefert eine mögliche Erklärung für das oben beschriebene Phänomen. Bestehen die einzelnen Ringe lediglich aus Peptidbindungen sind sie in wässrigen und organischen Lösungsmitteln sehr schwer löslich<sup>193-195</sup>. Einige bereits beschriebene etwas besser lösliche Vertreter besitzen eine antimikrobielle Aktivität, indem sie als AMP Poren in Bakterienmembranen einbauen<sup>196</sup>.

Das Peptid in der alternierenden Konfiguration (**37c**) konnte aufgrund seiner schlechten Löslichkeit nicht ausreichend beschrieben werden. Lediglich ein Massenspektrum liegt als Identitätsnachweis vor. **38c** konnte aufgrund der besseren Löslichkeit vollständig charakterisiert werden.

#### 4.10 MHK<sub>90</sub> gegen *M. tuberculosis* H37Rv (RFP)

Zum Ende der synthetischen Arbeiten wurden insgesamt 26 der 36 hergestellten Wollamid-Derivate in einem zweiten *M. tuberculosis* H37Rv Assay an der Universität British Columbia in Kanada getestet. Einmal wurde die Aktivität der Peptide bestimmt, welche nach Ablauf der Kooperation mit GSK entstanden, zum anderen wurde die Chance genutzt, bereits getestete Verbindungen in einem zweiten, unabhängigen Assay zu untersuchen. Die MHK<sub>90</sub>-Daten sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Die Ergebnisse zwischen den beiden Aktivitätsassays wichen erheblich voneinander ab. Daher werden die Ergebnisse nur assayintern und nicht assayübergreifend diskutiert. Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse werden im Folgenden kurz besprochen: Obwohl in beiden Assays der gleiche Bakterienstamm (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv) verwendet wurde, unterscheidet sich der Stamm aus diesem Assay durch die Expressierung eines rot-fluoreszierenden Proteins (tdTomato), welches zur Auswertung genutzt wird. Dazu wurde der Stamm durch den Einbau von Plasmid-DNA (pTEC27) gentechnisch verändert. Das Genom des Mykobakterienstammes von GSK ist nicht verändert worden und daher näher an dem des Wildtyps. Der ursprüngliche H37-Stamm wurde bereits vor über 100 Jahren isoliert<sup>197</sup> und seitdem unter Laborbedingungen weitergezüchtet. Dass auf diesem Wege neue Mutationen durch Nukleotidinsertion oder -deletion entstehen, zeigt eine Arbeit, die die Genome von sechs H37Rv-Stämmen aus unterschiedlichen Laboren sequenziert hat und zu dem Schluss kam, dass die Stämme sich alle unterscheiden und die ATCC-Bezeichnung stets mit anzugeben ist<sup>198</sup>. Dies unterstreicht eine Veröffentlichung, welche auf eine Abweichung der MHK von Pyrazinamid gegen zwei H37Rv-Stämme hinweist, die in der Vergangenheit synonym verwendet wurden<sup>199</sup>.

Weiterhin war ein Unterschied zwischen den beiden Assays die zum Medium zugegebenen Supplemente. Der von GSK verwendete Assay enthielt Albumin zur Bindung toxischer Produkte, Dextrose als Kohlenstoffquelle und Katalase zur Zerstörung von Peroxiden. Zusätzlich zu den drei genannten Supplementen wurde Ölsäure als weitere Kohlenstoffquelle in dem Assay mit rot-fluoreszierendem Protein eingesetzt. Unveresterte Ölsäure allein hemmt das Wachstum von Mykobakterien *in vitro*. Diese Hemmung wird allerdings durch Zugabe von Albumin, welches freie Fettsäuren bindet, wieder aufgehoben<sup>200</sup>. Dass die Wahl der Kohlenstoffquelle eine entscheidende Rolle spielen kann, zeigt das Beispiel der antimykobakterielle Wirkstoffklasse der Pyrimidin-Imidazole<sup>201</sup>. In den *in vitro*-Kulturen wurde Glycerol im Nährmedium eingesetzt. In murinen *in vivo*-Versuchen zeigten die Substanzen jedoch keine Aktivität gegen Mykobakterien. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Pyrimidin-Imidazole in den Glycerolstoffwechsel eingreifen. Da die Mykobakterien in infizierten Mäusen aber auf andere Kohlenstoffquellen zurückgreifen, blieb die Wirksamkeit aus.

Wollamid B, seine Enantiomere und Epimere wurden in diesem Assay nicht getestet.

Innerhalb der zweiten Gruppe, in der Asn ersetzt wurde, zeigten alle Substanzen mit einer aromatischen L-Aminosäure in Position V eine gute Wirksamkeit. Unter den Derivaten mit einer D-Aminosäure war lediglich **13c** (Asn → Trp) aktiv.

Ausgehend von **11c** (Asn → D-Phe(4-F)) ergab der Austausch D-Leu → D-Orn ein noch weniger aktives Derivat, aber ein Valin in dieser Position erhöhte die Aktivität um das Vierfache. **19c** zeigte, dass das größere Cyclohexylglycin an dieser Stelle die Wirksamkeit noch weiter verstärkt, während Tryptophan (**21c**) keine Verbesserung erbrachte.

Die Verkürzung der Kohlenstoffkette führte zum totalen Wirkverlust (**24c, 25c**). Ein D-Arginin in dieser Position ergab ein sehr aktives Peptid.

Aus der Gruppe der  $\alpha$ -Methyl-Peptide war **27c** (MeAsn) inaktiv, während **26c** (MeTrp) und **28c** (MeOrn) nur einen sehr geringen Effekt zeigten ( $\text{MHK}_{90} = 33 \mu\text{M}$ ). Diese Derivate entstanden hauptsächlich mit dem Ziel, die Permeabilität der Klasse zu verbessern. Entspricht eine etwaige permeable Konformation aber nicht mehr der aktiven Konformation, muss nach anderen Wegen gesucht werden, um die Permeabilität ohne Wirkverlust zu steigern. In Kapitel 5 werden einige Vorschläge dazu gemacht.

Das Pentapeptid **30c** (kein Asn) erzielte eine gute Aktivität ( $\text{MHK}_{90} = 5 \mu\text{M}$ ) und gibt damit einen ersten Hinweis darauf, dass der Pharmakophor nicht zwingend auf sechs Aminosäuren angewiesen ist. Allerdings ist das Octapeptid (**35c**) eines der wirksamsten Derivate in diesem Assay. Das zweite Ornithin ist auch in **16c** präsent, sodass die zweite positive Ladung nicht zwingend eine Verbesserung der Wirkung mit sich bringt. Auch der Einbau des Oxadiazol-Rings resultierte in einem Derivat mit einer Wirksamkeit im einstelligen mikromolaren Bereich.

Die Substanzen (**13c, 17c, 19c, 22c**) sollen hier nochmal besonders hervorgehoben werden, da sie in beiden Assays eine gute antimykobakterielle Wirksamkeit zeigten.

## 4.11 Zusammenfassung und Überblick über die Substanzklasse

In der vorliegenden Arbeit wurden 36 cyclische Peptide nach Vorbild der Leitsubstanz Wollamid B synthetisiert, charakterisiert und ihre antibakteriellen und pharmakokinetischen Eigenschaften diskutiert. Der chemische Raum wurde durch einen vermehrten Einbau nicht-proteinogener Aminosäuren tiefer ergründet und erstmals wurden Abkömmlinge mit Variationen in Größe und Verknüpfung des Makrocyclus dargestellt. Neun der Derivate zeigten eine gute Wirksamkeit gegen *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 ( $\text{MHK}_{90} \leq 5 \mu\text{M}$ ). Dabei wurden mit dem Enantiomer und dem Asn-Epimer von Wollamid B zwei neue aktive Stereoisomere entdeckt; denn bis dato führten Änderungen der Konfiguration zu einem Verlust der antimykobakteriellen Aktivität<sup>78</sup>. Im Hinblick auf die Permeabilität wurden zwei Derivate (**10c**, **34c**) mit leicht verbesserter passiver Diffusion über eine künstliche Membran bei gleichzeitig sehr guter Löslichkeit beschrieben. Des Weiteren besitzt **34c** eine hervorragende Stabilität in Lebermikrosomen. Dies unterstreicht, dass es außerhalb Lipinskis Ro5 weitere interessante Gerüste<sup>131-132</sup> für bioverfügbare Substanzklassen peptidischen Ursprungs zu entdecken gibt. Durch den Einbau aromatischer Aminosäuren stieg die Lipophilie der Derivate. Dies hatte keinen Einfluss auf die gemessene Permeabilität und die Stabilität im Plasma. Die Stabilität in Lebermikrosomen wurde jedoch immens kompromittiert, was wahrscheinlich der erhöhten Lipophilie geschuldet ist. Bisher ist es nicht gelungen, ein Wollamid mit hervorragenden Eigenschaften in den vier untersuchten Kategorien (Aktivität, Löslichkeit, Permeabilität und metabolischer Stabilität) darzustellen.

### 4.11.1 Erregerspezifität und -vorhersagekraft

Im Agardiffusionstest fiel auf, dass alle Peptide, die gegen *M. vaccae* inaktiv waren, ebenfalls gegen *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 inaktiv waren. Bei der Durchsicht der Arbeit von Asfaw<sup>100</sup> bestätigte sich dieser Trend bis auf eine Ausnahme eines Peptids mit moderater Aktivität gegen *Mtb* ( $\text{MHK}_{90} = 7.5 \mu\text{M}$ ), aber keiner Hemmzone gegen *M. vaccae*. Umgekehrt galt dieser Zusammenhang nicht: Eine Hemmzone gegen *M. vaccae* ging nicht zwingend mit einer Wirkung gegen *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 einher. Somit zeigt *M. vaccae* gewisse Qualitäten hinsichtlich eines Surrogat-Keims für *M. tuberculosis*, indem er selten falsch negative Ergebnisse liefert.

*M. smegatis* hingegen eignete sich nicht für eine Vorhersage der Aktivität gegen *M. tuberculosis* dieser Cyclohexapeptide.

Eine D-Aminosäure in Position V (Asn) erweiterte das Wirkspektrum der meisten Wollamide auf gram-positive Erreger.

Bis auf einzelne Ausnahmen (**11c**, **22c**) wurde kein wachstumshemmender Effekt auf gram-negative Erreger beobachtet.

#### 4.11.2 Pharmakokinetik der Wollamid-Analoga

Durch die Erhöhung der Lipophilie steigerten sich die gemessene Bindung an humanes Serumalbumin und die Metabolisierung in Lebermikrosomen<sup>117</sup>. Die Permeabilität im PAMP-Assay korrelierte nicht mit der Lipophilie der Substanzen, auch wenn eine Erhöhung der transzellulären Permeabilität aufgrund eines Zuwachses an Lipophilie für Peptide in der Fachliteratur genannt wurde<sup>138, 177, 202-203</sup>. Die basische Aminosäure Ornithin in Position VI scheint die Permeabilität in dieser Hinsicht weitestgehend zu unterbinden. Die gute Aktivität in einem Assay mit Mtb-infizierten Makrophagen ( $IC_{90} < 3 \mu M$ ) zeigt jedoch, dass eine ausreichende Menge Wirkstoff von lebenden Zellen aufgenommen wird, um eine Wirkung auf Mykobakterien innerhalb menschlicher Zellen zu erzielen<sup>100</sup>. Dies legt nahe, dass die Resorption der Wollamide nicht transzellulär, sondern parazellulär<sup>175, 203-204</sup> oder möglicherweise über Transporter erfolgt<sup>137</sup>.

Der Austausch Asn mit einer D-Aminosäure überführte die Peptide in eine wenig lösliche Konformation. **10c** (Asn  $\rightarrow$  L-Phe(4-F)) und **34c** (Odz) wiesen eine deutlich verbesserte Löslichkeit bei leicht verbesserter Permeabilität auf. Solche sogenannten chamäleonartigen Eigenschaften<sup>205</sup> sind durch Konformationsänderung der Peptide je nach Polarität des umgebenden Mediums zu erklären<sup>206</sup> und für bRo5-Substanzen eine Möglichkeit, gute Löslichkeit mit Permeabilität zu kombinieren. Besonders wenn für die Wirkung eine hydrophilere Konformation gefordert ist, ist diese Fähigkeit zur Konformationsanpassung notwendig.

### 4.11.3 Antimykobakterielle Aktivität der Wollamid-Analoga

Insgesamt sind bisher etwa 120 Wollamid-Derivate synthetisiert worden. Wie auch schon von den Entdeckern der Wollamide beschrieben wurde<sup>80</sup>, wurde bisher kein großer Sprung in der antimykobakteriellen Wirksamkeit erreicht. Sehr viele Variationen der Aminosäuresequenz führen zur vollständigen Inaktivität. Bis auf den hier durchgeführten Austausch von Asn zu aromatischen D-Aminosäuren und dem bisher einzigen aktiven Wollamid mit L-Orn (**1c**) führten lediglich kleinere Veränderungen zu aktiven Verbindungen, bei denen Seitenketten ähnlicher Polarität untereinander ersetzt wurden (D-Orn → D-Lys/D-Arg oder Val → Ile).

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Leitsubstanz Wollamid B verglichen mit den aktivsten bzw. zwei permeablen Derivaten dieser Arbeit. Gezeigt ist ihre Performance in den Kategorien: antimykobakterielle Aktivität, Löslichkeit im wässrigen Milieu, passive Permeabilität, Stabilität im Plasma und in Mikrosomen.

Tabelle 16: Bewertung der aktiven und permeablen Analoga dieser Arbeit

Substanz	Aktivität <sup>a</sup>	Löslichkeit <sup>b</sup>	Permeabilität <sup>c</sup>	Plasma-stabilität <sup>d</sup>	Mikrosom. Stabilität <sup>e</sup>
<b>Woll. B</b>	grün	gelb	rot	grün	gelb
<b>1c</b>	grün	grün	gelb	grün	grün
<b>5c</b>	grün	grün	rot	k. D.	grün
<b>10c</b>	rot	grün	grün	gelb	rot
<b>12c</b>	grün	rot	gelb	k. D.	rot
<b>17c</b>	grün	gelb	rot	gelb	rot
<b>19c</b>	grün	rot	rot	gelb	rot
<b>20c</b>	grün	rot	rot	gelb	gelb
<b>22c</b>	grün	rot	rot	gelb	rot
<b>34c</b>	rot	grün	grün	gelb	grün

k. D. = keine Daten

<sup>a</sup>MHK<sub>90</sub> vs. *Mtb.* H37Rv ATCC 25618: grün: 1 - 5 µM, gelb: 6 – 10 µM, rot: > 10 µM

<sup>b</sup>Löslichkeit: grün: ≥ 200 µg/mL, gelb: 100 – 199 µg/mL, rot: < 100 µg/mL

<sup>c</sup>PAMP-Assay: grün: > 10 nm/s, gelb: 3 – 10 nm/s, rot: < 3 nm/s

<sup>d</sup>% verbleibend nach 2 h Inkubation im Plasma: grün: 100 %, gelb: 99 – 75 %, rot: < 75 %

<sup>e</sup>Halbwertszeit in Lebermikrosomen: grün: > 60 min, rot: 30 – 60 min, rot: < 30 min.

Bei einem ersten Blick auf obige Tabelle fällt auf, dass die Substanzklasse gute Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis* zeigt und für lange Zeit im menschlichen Plasma stabil ist. Dennoch ist klar erkennbar, dass die Peptide oft an einer niedrigen passiven Permeabilität und erhöhtem enzymatischen Abbau in Lebermikrosomen leiden. Verglichen mit der Leitsubstanz sind die Derivate **1c**, **5c** und **34c** deutlich stabiler in Mikrosomen und besser wasserlöslich.

Die lipophileren Derivate mit aromatischer D-Aminosäure statt Asn (**12c**, **17c**, **19c**, **20c**, **22c**) sind ebenfalls wirksam, aber deutlich weniger löslich und nicht permeabel. Im Gegensatz dazu haben **10c** und **34c** ihre antimykobakterielle Aktivität verloren, sind aber dennoch äußerst interessante Derivate, da sie eine erhöhte Permeabilität bei gleichzeitig ausgezeichneter Löslichkeit aufweisen.

In Abbildung 28 sind die Strukturformeln der besprochenen Wollamide gezeigt.

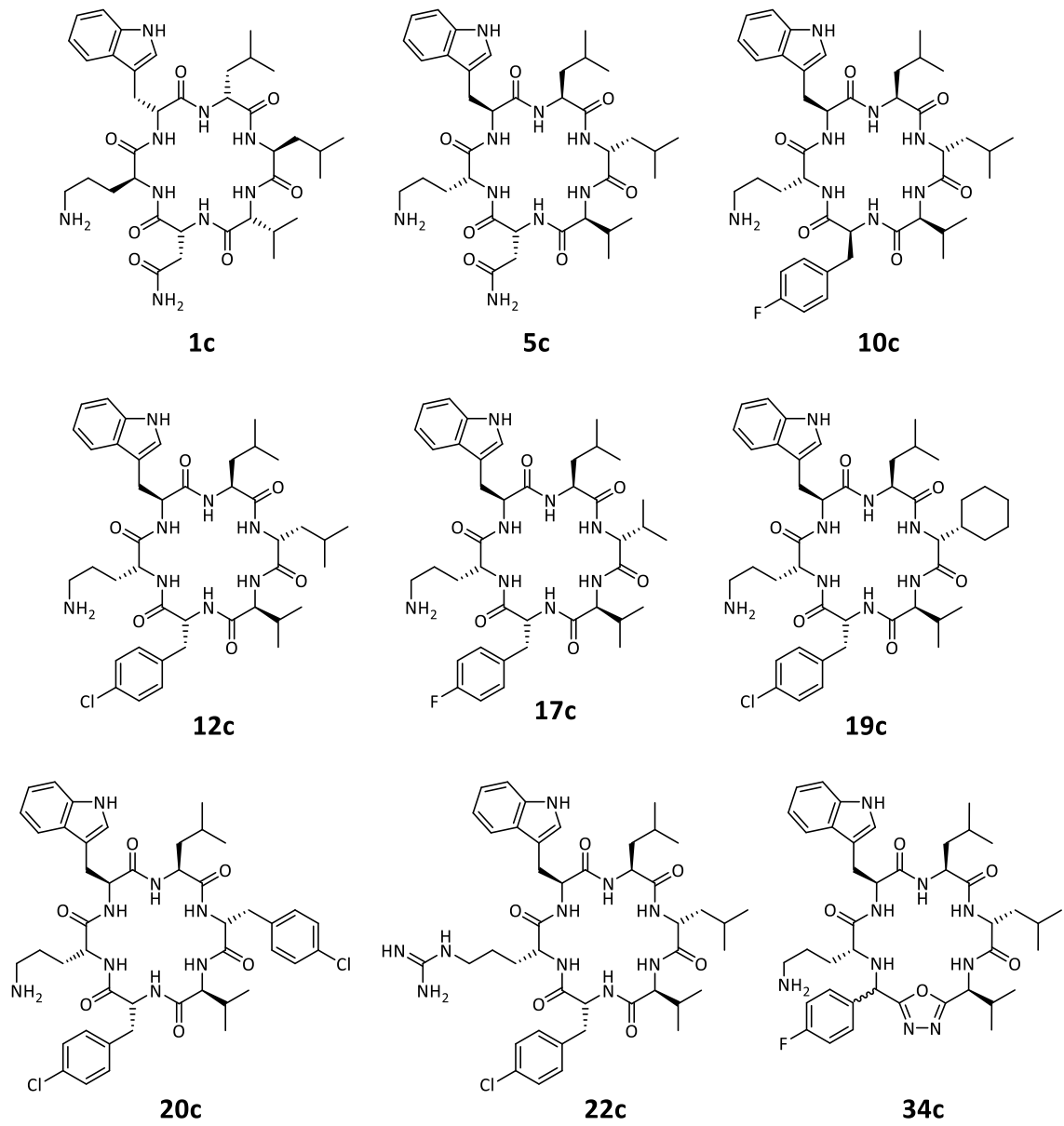


Abbildung 28: aktive und permeable Wollamid-Derivate



#### 4.11.4 Molekularer Wirkungsmechanismus

Da sich die aktiven Derivate nur auf einen kleinen Kreis zulässiger Variationen beschränken und das Enantiomer der Leitstruktur deutlich weniger aktiv ist, ist es durchaus denkbar, dass der Wirkmechanismus von passgenauen Wechselwirkungen mit einer chiralen Bindungstasche einer Zielstruktur abhängig ist<sup>66</sup>. Diesen Gedanken weiterverfolgend könnten Wollamid B und das Asn-Epimer unterschiedliche Taschen oder auch Targets adressieren. Den zuvor betrachteten Wirkmechanismus vieler AMP, unspezifisch mit Zellmembranen zu interagieren, lässt obige Beobachtung zusammen mit der ausbleibenden Depolarisation der Zellmembran<sup>78</sup>, weniger plausibel erscheinen.

Auf der Suche nach dem Wirkmechanismus der Wollamide wurden erste Versuche unternommen, gezielt resistente Mutanten zu züchten. Dies gelang aufgrund von Diffusionsproblemen der Peptide im Agar bisher nicht. So sehr dies weiterführende Annahmen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen beeinträchtigt, kann es auch auf einen Wirkmechanismus hindeuten, der in einen essentiellen Stoffwechselweg eingreift, welcher von Mykobakterien nicht einfach zu kompensieren ist. Gerade im Hinblick auf die Isolierung eines resistenten Stammes<sup>207</sup> gegen die beiden im Jahre 2014 zugelassenen Wirkstoffe Delamanid<sup>208</sup> und Bedaquilin<sup>209</sup>, ist eine Substanzklasse mit einem schwer kompensierbaren Wirkmechanismus von großem Interesse.

## 5. Ausblick

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von **10c** und **34c** in polarer und apolarer Umgebung würde Aufschluss darüber geben, ob die Permeabilität und Löslichkeit durch eine erhöhte Flexibilität ihrer Konformation zu erklären sind. Für das Derivat mit Odz-Ring (**34c**) ist die Trennung der Epimere bedeutsam, um zu erfahren, ob sich die beiden Substanzen in ihren Eigenschaften unterscheiden. Zur weiteren Charakterisierung des Oxadiazols als Peptidbindungsmimetikum ist ein Struktur analogon ohne neues Stereozentrum durch Verwendung eines symmetrischen Ketons<sup>210</sup> von Interesse.

Offen bleibt die Frage, auf welchem Wege die antimykobakterielle Wirkung ausgeübt wird. Die Aufklärung des Wirkmechanismus ist für eine tiefergehende Struktur-Wirkungs-Beziehung essentiell und sollte den nächsten Schritt in der weiterführenden Erforschung dieser Substanzklasse darstellen. Weitere Versuche zur gezielten Züchtung resistenter Stämme sind dabei empfehlenswert, da bei Erfolg durch Genomsequenzierung, Rückschlüsse auf eine Target-Struktur gezogen werden können. Eine weitere Möglichkeit mehr über den Wirkmechanismus erfahren zu können, besteht in der Untersuchung des Proteoms der Bakterien<sup>211</sup>. Dazu wird eine Bibliothek auftretender Markerproteine erstellt, die bei der Behandlung von *Mycobacterium tuberculosis* mit bekannten Antituberkulotika detektiert werden. Anschließend werden die exprimierten Proteine nach Behandlung mit einem neuen Wirkstoff bestimmt. Werden Übereinstimmungen in der Zusammensetzung des Proteoms gefunden, kann dies auf einen verwandten Wirkmechanismus hindeuten. Ob sich die Bakterien nach Wirkstoffexposition in einem teilungsfähigen oder metabolisch aktiven Zustand befinden oder ihre Zellmembran zerstört wurde, kann mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen in der Durchfluss-Zytometrie überprüft werden<sup>212</sup>.

Der aufgeklärte Wirkmechanismus würde zugleich die Frage beantworten, ob eine Aufnahme der Wollamide in die Mykobakterien selbst notwendig ist. Falls die vermutete Zielstruktur nicht intrazellulär zu finden ist, spielt die Permeabilität hauptsächlich eine Rolle für die Bioverfügbarkeit der Substanzklasse. Da bisher nur die transzelluläre Permeabilität der Wollamide im PAMP-Assay bestimmt wurde, ist die Bestimmung der parazellulären Aufnahme in Caco-2 Zellen sinnvoll. Bioverfügbare Derivate des Veber-

Hirschmann-Peptids werden auf diesem Wege resorbiert<sup>138</sup>. Dies zeigt, dass eine Aminosäure mit basischer Seitenkette (Lys) kein Ausschlusskriterium für die Bioverfügbarkeit cyclischer Hexapeptide darstellt. Sollte keine parazelluläre Aufnahme erfolgen, ist eine Maskierung des primärenamins als Prodrug vorstellbar. Allerdings führte eine Acetylierung *in vitro* zum Wirkverlust<sup>78</sup>. Weitere interessante Prodrug-Formen, die enzymatisch das Amin freilegen, sind eine Acylierung mit Palmitinsäure<sup>213</sup> oder eine Coumarin-basierte, Esterase-sensitive Variante<sup>214</sup>.

## 6. Materialien und Geräte

Alle Chemikalien wurden von kommerziellen Herstellern erworben und ohne weitere Reinigung benutzt. Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Für die Festphasen-Peptidsynthese wurden Spritzen (20 mL, Inject<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit zwei Polypropylen-Fritten (20 µm Porosität, 20.6 mm Außendurchmesser, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ausgestattet. Zum Durchmischen der Lösungen während der Festphasen-Peptidsynthese wurde ein Schüttler (Loopster digital, IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland) genutzt. Die Identifizierung der linearen Peptide wurde mittels Elektronenspray-Ionisation-Massenspektrometrie (SSQ 710 C Massenspektrometer, Finnigan MAT GmbH, Bremen, jetzt ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland) durchgeführt. Die DC-Platten (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden zur Detektion mit Licht der Wellenlänge von 254 nm beleuchtet. Zur Aufreinigung diente Normalphasenkieselgel (0.063 – 0.200 mm Partikelgröße, Merck, Darmstadt, Deutschland) als stationäre Phase. Um Substanzen aus ihren TFA-Salzen in die freien Basen zu überführen, wurden Ionentauscher bestehend aus Sulfonsäuregruppen an Kieselgel (Isolute SCX-2, Biotage, Uppsala, Schweden) verwandt. Zur Strukturaufklärung wurden NMR-Proben vermessen (VNMRs, 400 MHz für <sup>1</sup>H-Spektren und DD2 125 MHz für <sup>13</sup>C-Spektren, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und mit der Software MestReNova 8.0.2 (Mestrelab Research S. L., Santiago de Compostela, Spanien) ausgewertet. Die NMR-Daten wurden wie folgt angegeben: chemische Verschiebung in ppm, Multiplizität (s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, br = breit), Kopplungskonstante in Hz, Integralgröße. Die Reinheit wurde mittels analytischer HPLC (Shimadzu, Kyoto Japan; LC-10AD, SIL-HAT auto sampler); XTerra RP-18 Säule (3.5 µM, 3.9 x 100 mm) Firma Waters (Milford, MA, USA) UV-Vis-Detektor SPD-M10A VP PDA 254 nm; Flussrate 0.5 mL/min; Laufmittelgradient aus Wasser und ACN (jeweils inkl. 0.1 % TFA) von 5 % auf 95 % in 15 min durchgeführt. Die Spektren wurden an einem LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit einer Nanoelektrospray-Quelle (Proxeon) aufgenommen. Die Proben wurden mittels statischem Nanoelektrospray ionisiert, hierzu wurden ca. 3-5 µl Probelösung in mit Gold bedampfte Quarzemitter gefüllt und die Quellenspannung wurde auf 1.3 kV eingestellt. Gemessen wurde im positiven Modus, die Auflösung wurde auf 100000 bei m/z 400 gesetzt.

## 7. Methoden

### 7.1 Allgemeine Vorschrift zur Festphasen-Peptidsynthese (SPPS)

#### 7.1.1 Beladung der festen Phase

Das 2-CTC-PS-Harz (1 g, Beladungskapazität: 1.6 mmol/g) wurde in eine 20 mL Spritze mit zwei Polypropylen-Fritten (Porosität 20 µm) überführt und mit DCM für 20 min geschüttelt. Zeitgleich wurde die gewünschte Fmoc-geschützten Aminosäure (1.2 Äq.) zusammen mit DIPEA (2.5 Äq.) in DCM gelöst. Die Aminosäurelösung wurde in die Spritze überführt und für 2 h geschüttelt. Methanol wurde zum Capping in die Spritze aufgezogen und für weitere 15 min geschüttelt. Das Harz wurde mit DCM (fünfmal), einer 1:1-Mischung aus Methanol und DCM (viermal) und Methanol (zweimal) gewaschen. Vor der Lagerung wurde das Harz bei etwa 450 mbar getrocknet, bis keine Aggregate mehr vorhanden waren. Die Beladung des Harzes wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Beladung l} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{(m(\text{brutto}) - m(\text{netto})) * 1000}{(M - 36.46) * m(\text{brutto})}$$

m(brutto) = Masse des beladenen Harzes in Gramm

m(netto) = Masse des reinen Harzes in Gramm

M = molare Masse der Fmoc-geschützten Aminosäure in Gramm pro Mol

Die erreichten Beladungen beliefen sich zwischen 60 – 90 %. Pro Peptidsynthese wurde eine äquivalente Masse zu 0.2 bis 0.4 mmol des beladenen Harzes eingewogen.

#### 7.1.2 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Das beladene Harz wurde mit 20 % Piperidin in DMF (zwei- oder dreimal für 10 min gefolgt von jeweils einem Waschschrift mit DMF) versetzt und die Vollständigkeit der Entschützung durch das Ausbleiben einer Niederschlagbildung des Abbauproduktes der Schutzgruppe mit Piperidin in Wasser überprüft. Abschließend wurde das Harz mit DMF (viermal) gewaschen.

### 7.1.3 Elongation der Peptidkette

Die Fmoc-geschützte Aminosäure (3 Äq.) und HATU (3 Äq.) wurden in NMP gelöst. Kurz vor der Zugabe zum Harz wurde DIPEA (6 Äq.) hinzugefügt und für 1 h gekuppelt. Abschließend wurde das Harz mit DMF (viermal) gewaschen.

### 7.1.4 Kupplung an eine $N\alpha$ -Methylaminosäure

Die Fmoc-geschützte  $N\alpha$ -Methylaminosäure wurde wie in Kapitel 7.1.3 beschrieben gekuppelt. Die darauffolgende Fmoc-geschützte Aminosäure (3 Äq.) und HATU (3 Äq.) wurden in NMP gelöst. Kurz vor der Zugabe zum Harz wurde DIPEA (6 Äq.) hinzugefügt und diesmal für 2 h gekuppelt. Der gesamte Kupplungsschritt wurde noch einmal wiederholt und das Harz mit DMF (viermal) gewaschen.

### 7.1.5 Abspaltung des Peptides vom Harz

Nach erfolgreicher Abspaltung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz mit DCM (zweimal) gewaschen und in DCM für 15 min gequollen. Zur Gewinnung des freien Peptides wurde das Harz in einer Lösung aus 20 % HFIP in DCM für 1 h geschüttelt. Das freie Peptid wurde in einem Kolben aufgefangen und das Harz nochmals mit DCM gespült. Die gesamte DCM-Phase wurde zur Trockene eingengt und ohne weitere Reinigung weiterverwandt.

## 7.2 Allgemeine Vorschriften zur Cyclisierung der linearen Peptide

### 7.2.1 Cyclisierung der Tetrapeptide

Das lineare Tetrapeptid wurde in 50 mL DMF gelöst und über mehrere Stunden zu einer Lösung aus HATU (3 Äq.), HOBt (3 Äq.) und DIPEA (10 Äq.) in DMF bei 0 °C über 3 h getropft. Die finale Konzentration des Peptides in DMF betrug 1 mM. Es wurde für 3 Tage gerührt und auf Raumtemperatur erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde zur Trockene eingengt und mit 40 mL gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung für 10 min gerührt. Anschließend wurden 20 mL EtOAc hinzugegeben und für weitere 5 min gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit jeweils 20 mL EtOAc gewaschen.

Die organischen Phasen wurden gesammelt, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt.

### 7.2.2 Cyclisierung der Penta-/Hexapeptide

Zu einer 1 mM Lösung des Peptides in DMF wurden bei 0 °C HATU (3 Äq.) und HOBt (3 Äq.) zugegeben und, nachdem die beiden Substanzen vollständig gelöst waren, DIPEA (10 Äq.) hinzugefügt. Es wurde für 3 Tage gerührt und auf Raumtemperatur erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde zur Trockene eingeengt und mit 40 mL gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung für 10 min gerührt. Anschließend wurden 20 mL EtOAc hinzugegeben und für weitere 5 min gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit jeweils 20 mL EtOAc gewaschen. Sollte das Peptid teilweise in der EtOAc-Phase präzipitiert sein, wurde der Niederschlag aufgefangen und gewaschen. Die organischen Phasen wurden gesammelt, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt.

### 7.2.3 Cyclisierung unter Einbau eines Oxadiazol-Rings

Das lineare Peptid wurde zusammen mit dem Aldehyd (1.5 Äq.) und Pinc (1.0 Äq.) in Chloroform gelöst und bei 60 °C unter Rückfluss gerührt. Nach 12 h wurde der Reaktionsansatz unter vermindertem Druck eingeengt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt. Das Produkt wurde als Gemisch zweier Diastereomere gewonnen.

## 7.3 Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

### 7.3.1 Abspaltung der Boc-/Trt-/Pbf-Schutzgruppen

Das cyclische Peptid wurde mit einer Lösung aus TFA : TIPS : DCM (1.0 mL : 0.3 mL : 3.0 mL) versetzt und für 1 h bei Peptiden mit ausschließlich Boc-Schutzgruppen, andernfalls für 3 h gerührt. Nach Einengen der Lösung wurde das

Rohprodukt mit Toluol koevaporiert (fünfmal) und mittels Säulenchromatographie gereinigt.

### 7.3.2 Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe

Das Peptid wurde in Methanol und Chloroform gelöst und Phenylsilan (4 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde mit Argon begast und  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (4 mol-%) unter Gegenstrom hinzugefügt. Der Fortschritt der Reaktion wurde per DC-Analyse und ESI-Massenspektrometrie überprüft. Nach vollständigem Abreagieren des Edukts wurde der Katalysator über Celite abfiltriert, die Lösung eingeeengt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt.

## 7.4 Bestimmung der Reinheit mittels UPLC-MS

Die Bestimmung der Reinheit wurde durch die QK-Abteilung (GlaxoSmithKline, Stevenage, Großbritannien) durchgeführt. Es wurde eine UPLC-MS-Methode (Acquity UPLC BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm x 50 mm als Säule) mit einem UV-Diodenarray-Detektor (210 – 350 nm) zur Reinheits- und Identitätskontrolle verwandt. Weiterhin wurde ein Lichtstredetektor genutzt, um Substanzen zu detektieren, die kein UV-Licht absorbieren. Im Allgemeinen beträgt die Reinheit der Produkte  $\geq 90\%$ . Der Assay wurde durch GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Spanien) durchgeführt.

## 7.5 Bestimmung der Reinheit mittels HPLC-UV

Zur Bestimmung der Reinheit an der Martin-Luther-Universität Halle wurde folgende analytische HPLC-Methode (Shimadzu, Kyoto Japan; LC-10AD, SIL-HAT auto sampler) angewandt: An einer RP-18 Säule (XTerra, 3.5  $\mu\text{m}$ , 3.9 x 100 mm, Waters, Milford, MA, USA) mit UV-Detektor (254 nm, SPD-M10A VP PDA) wurden die Testsubstanzen bei einer Flussrate von 0.5 mL/min und einem Gradienten aus Wasser und Acetonitril (jeweils 0.1 % TFA) von 5 % auf 95 % in 15 min vermessen. Im Allgemeinen beträgt die Reinheit der Produkte  $\geq 90\%$ .



## 7.6 Bestimmung der Hemmzone

Der Agardiffusionstest zur Bestimmung der Hemmzonen wurde am Hans-Knöll-Institut in Jena nach der Methode von Krieg *et al.*<sup>215</sup> durchgeführt. Dabei wurden folgende Testkeime verwendet: *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Enterococcus faecalis* (VRE) 1528, *Escherichia coli* SG458, *Mycobacterium smegmatis* SG987, *Mycobacterium vaccae* 10670, *Pseudomonas aeruginosa* K 799/61, *Staphylococcus aureus* SG511 und *Staphylococcus aureus* (MRSA) 134/94. Die Bakterien wurden in Müller-Hinton-Bouillon herangezüchtet. Alle Bakteriensuspensionen wurden frisch hergestellt und die Kulturen für 16 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkonzentration bestimmt und 34 mL Nähragar mit 10<sup>7</sup> Zellen beladen. Die Kulturen wurden bei 6 – 8 °C gelagert und innerhalb von sieben Tagen für den Test verwendet. Dazu wurden 34 mL des Nähragars verflüssigt und mit der berechneten Anzahl an Bakterien bei 48 – 50 °C geimpft. Der Agar wurde sofort auf Testplatten in einer 3 mm dicken Schicht gegossen und zwölf 9 mm große Löcher hineingestanzt. Die Testsubstanzen wurden zunächst in DMSO zu einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst und dann mit Methanol auf 100 µg/mL verdünnt. Je 50 µL der Lösungen wurden in die ausgestanzten Löcher pipettiert. Als Positivkontrolle diente Ciprofloxacin (5 µg/mL) und als Lösungsmittelkontrolle DMSO in Methanol (1:10). Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die Platten makroskopisch ausgewertet. Dazu wurde der Durchmesser der bakterienkulturfreien Zone (Hemmzone) als Einzelbestimmung gemessen und in mm angegeben.

## 7.7 Bestimmung der Hemmzone gegen *A. baumannii*

Die Untersuchung der Substanzen auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben der EUCAST für den Plattendiffusionstest.<sup>104</sup> *Acinetobacter baumannii* ATCC® BAA-1709 wurde auf Nähragar kultiviert und frisches Zellmaterial in NaCl-Pepton-Pufferlösung aufgenommen. Mit einem sterilen Tupfer wurde die Zellsuspension auf Nähragar ausgestrichen. Von den Testsubstanzen (100 mg/mL in Wasser mit 5 % DMSO) wurden jeweils 50 µL steril entnommen und auf sterile Filterplättchen pipettiert. Die getränkten Filterplättchen wurden auf die beimpfte Agarplatte gelegt, bei 30 °C für 3 Tage inkubiert und anschließend ausgewertet. Als

Antibiotika-Kontrolle wurden Gentamycin Filterplättchen (10 µg) verwendet. Der Assay wurde durch BioSolutions Halle GmbH (Halle (Saale)) durchgeführt.

## 7.8 Bestimmung der $MHK_{90}$ gegen *Mtb* H37Rv ATCC 25618

Die Methode wurde in Anlehnung an zwei Veröffentlichungen erstellt<sup>216-217</sup> und wie folgt durchgeführt: Die Messung der minimalen Hemmkonzentrationen fand in 96-Well-Mikrotiterplatten statt. Für jede Testsubstanz wurde eine Verdünnungsreihe (Stammlösung  $c = 10$  mM, 10 Verdünnungsschritte, jeweils 1:1 Verdünnungen) in DMSO hergestellt. 5 µL dieser Lösungen wurden jeweils mit 95 µL Middlebrook 7H9 Medium (Difco, Katalognummer 271310) versetzt. Als Positivkontrolle wurde eine Verdünnungsreihe (8 Schritte, jeweils 1:1 Verdünnungen) beginnend mit 160 µg/mL Isoniazid hergestellt. 5 µL dieser Lösungen wurden ebenfalls mit 95 µL Medium gemischt. Als Lösungsmittelkontrolle dienten jeweils 5 µL DMSO versetzt mit 95 µL Medium. Die verwendete Menge an Zellen wurde auf etwa  $1 \times 10^7$  CFU/mL standardisiert und 1 Teil in 100 Teilen Middlebrook 7H9 Bouillon mit 10 % ADC (Becton Dickinson BBL, Katalognummer 211887) und 0.025 % Tween 80 (Sigma, Katalognummer P4780) verdünnt. 100 µL dieser Mischung wurden in die Wells mit den Testsubstanzen und Isoniazid gegeben. In die am Rand liegenden Wells wurde anstatt von Zellen lediglich 100 µL Medium hinzugegeben. Die Mikrotiterplatten wurden versiegelt, um ein Austrocknen der äußeren Wells zu verhindern, und ohne zu schütteln bei 37 °C für 6 Tage inkubiert. Eine Resazurin-Lösung wurde aus einer Tablette Resazurin (Resazurin-Tabletten zur Milchtestung; BDH, Katalognummer 33088 4Y) und 30 mL sterilem Phosphatpuffer (OXOID, Katalognummer BR14a) hergestellt. 25 µL dieser Lösung wurden jedem Well hinzugefügt und nach 48 h Inkubation die Intensität der Fluoreszenz (Spectramax M5, Molecular Devices, Anregungswellenlänge 530 nm, Emissionswellenlänge 590 nm) gemessen, um die  $MHK$ -Werte zu bestimmen. Für jede Substanz wurde der errechnete Mittelwert aus einer Zweifachbestimmung angegeben. Der Assay wurde durch GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Spanien) durchgeführt.

## 7.9 Bestimmung der Cytotoxizität

Aktiv wachsende HepG2-Zellen wurden mit 5 mL Eagle's MEM (10 % FBS, 1 % NEAA, 1 % Penicillin/Streptomycin) aus einer T-175 TC Flasche entnommen und im Medium dispergiert. Die Zelldichte wurde überprüft, um sicherzustellen, dass neugebildete Monoschichten vor der Ernte nicht zu mehr als 50 % zusammengefließen waren. Die Zellsuspension wurde zu 500 mL desselben Mediums hinzugefügt, sodass die Endkonzentration  $1.2 \times 10^5$  Zellen/mL entsprach. Auf eine Platte mit 384 Wells (Greiner, Katalognummer 781091) wurden jeweils 250 nL der Testsubstanzen mit einem Echo 555 Instrument und 25  $\mu$ L ( $\approx 3000$  Zellen/Well) der Zellsuspension mit einem Multidrop Instrument in die Wells pipettiert. Die Platten wurden bei 37 °C und 80 % relativer Luftfeuchte für 48 h bei 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Anschließend ruhten die Platten und die CellTiter-Glo-Lösung (Promega) für 30 min bei Raumtemperatur, bevor 25  $\mu$ L des CellTiter-Glo jedem Well hinzugefügt wurden. Nach einer Einwirkzeit von 10 min wurden die Platten mit einem View Lux Instrument (PerkinElmer) ausgelesen und die Anzahl der noch lebenden Zellen bestimmt. Der Assay wurde durch GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Spanien) durchgeführt.

Die humanbiologischen Proben wurden ethisch ausgewählt und ihre Verwendung stimmte mit den Bedingungen der Einverständniserklärung überein.

## 7.10 Bestimmung der MHK<sub>90</sub> gegen *Mtb* H37Rv (RFP)

In 96-Well-Mikrotiterplatten wurden 100  $\mu$ L Medium (5 mL OADC und 125  $\mu$ L 20 % Tween 80 auf 45 mL Middlebrook 7H9) gegeben. Für jede zu untersuchende Substanz wurde eine Stammlösung (10 mg/mL) in DMSO hergestellt und diese in zehn Schritten jeweils 1:1 verdünnt. 2  $\mu$ L dieser Verdünnungen wurden in die Wells überführt. Gentamycin (10 mg/mL) und DMSO (1 %) dienten jeweils als Positiv- bzw. Lösungsmittelkontrolle. Zuletzt wurde die Mykobakteriensuspension in jeden Well gegeben, sodass die Endkonzentration  $5 \times 10^5$  CFU/mL ergab. Die Mikrotiterplatten wurden mit Parafilm versiegelt und für 8 Tage bei 37 °C inkubiert. Der *Mtb*-Stamm produziert ein rot-fluoreszierendes Protein. Um die prozentuale Wachstumshemmung

gegenüber Gentamycin zu bestimmen, wurde die Fluoreszenz bestimmt. Für jede Testsubstanz wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt.

### 7.11 Bestimmung der Löslichkeit

Die kinetische Löslichkeit der Testsubstanzen wurde mittels chemilumineszenter Stickstoff-Detektion (CLND) bestimmt. 5 µL einer 10 mM DMSO-Lösung wurden mit Phosphatpuffer (pH 7.4) auf 100 µL verdünnt, für 1 h bei Raumtemperatur gemischt und durch Millipore Multiscreen HTS-PCF Filterplatten (MSSL BPC) filtriert. Das Filtrat wurde mit einer kalibrierten Flussinjektion-CLND vermessen. Der Standardfehler dieser Löslichkeitsbestimmung liegt bei ± 30 µM. Die Obergrenze der Löslichkeit beträgt 500 µM, wenn mit 10 mM DMSO-Lösungen gearbeitet wird. Der Assay wurde durch GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Spanien) durchgeführt.

### 7.12 Bestimmung des chromatographischen Log D

Der chromatographische Hydrophobizitäts-Index (CHI) wurde an einer RP-HPLC-Säule (50 x 2 mm x 3µm Gemini NX C18, Phenomenex, Großbritannien) mit einem schnellen Acetonitril-Gradienten bestimmt. Begonnen wurde mit 100 % Puffer (pH 7.4). Die Indices wurden direkt aus den Retentionszeiten mittels einer Kalibriergeraden bestimmt, die zuvor durch Standardsubstanzen ermittelt wurde. Die CHI-Werte entsprechen ungefähr dem Volumenanteil an organischer Phase, zu dem die Substanz eluiert. Somit können die CHI-Werte mit folgender Formel in chromatographische Log D umgewandelt werden:

$$\text{Chrom LogD} = 0.0857 \times \text{CHI} - 2.00$$

Der durchschnittliche Fehler des Assays liegt bei ± 3 CHI oder ± 0.25 Chrom Log D.

Der Assay wurde durch GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Spanien) durchgeführt.

### 7.13 Bestimmung der Permeabilität

Eine Lösung aus 8 % EPC in 1 % Cholesterol/Decan und eine Lösung aus 1.8 % EPC in 1 % Cholesterol/Decan wurden hergestellt. Die Lipidlösung wurde dann auf

verschießbare 4 mL Gefäße aufgeteilt, mit Parafilm versiegelt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anschließend wurden jeweils  $130\text{ }\mu\text{L}$  der Lösung in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (half-area) überführt. Weiterhin wurde ein  $50\text{ mM}$  Phosphatpuffer ( $\text{pH } 7.4$ ) mit  $0.5\%$  Encapsin vorbereitet. Der Assay wurde mit einem Biomek FX Pipettierautomat und entsprechender Biomek Software durchgeführt. In einer Charge wurden zwei 96-Well-Platten mit mindestens einem Standard auf jeder Platte vermessen. Die Gesamtdauer betrug 4 h. Dabei wurden  $3.5\text{ }\mu\text{L}$  der Lipidlösung auf die Zwischenplatte gegeben und für 12 s geschüttelt.  $250\text{ }\mu\text{L}$  Pufferlösung wurden in die Donor-Wells beziehungsweise  $100\text{ }\mu\text{L}$  in die Akzeptor-Wells gegeben. Nach 45 min Schütteln wurden  $2.5\text{ }\mu\text{L}$  der Testsubstanzen zur Donorseite hinzugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden  $100\text{ }\mu\text{L}$  der Donor- und Akzeptor-Wells mit einer HPLC-Methode vermessen. Die Konzentration der Testsubstanzen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und die Permeabilität in  $\text{nm}/\text{sec}$  angegeben. Der Assay wurde durch GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Spanien) durchgeführt.

### **7.14 Bestimmung der humanen Serumalbuminbindung**

Der Assay zur Bestimmung der Bindung der Testsubstanzen an humanes Serumalbumin (HSA) wurde nach der Methode von Valko *et al.* durchgeführt<sup>218</sup>. Hierbei wurden die Retentionszeiten der Testsubstanzen an einer Säule mit immobilisiertem HSA mit einem UV-Detektor bestimmt. Zur Kalibrierung wurden Substanzen mit bekannten HSA-Bindungswerten vermessen. Die logarithmierten Retentionszeiten wurden gegen die linearisierten prozentualen Plasmaproteinbindungswerte aufgetragen. Die Steigung und der Ordinatenabschnitt wurden genutzt, um die Retentionszeiten der Testsubstanzen in die Bindungswerte an humanes Serumalbumin umzurechnen. Der Assay wurde durch GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Spanien) durchgeführt.

### **7.15 Bestimmung der Plasmastabilität**

Die Plasmastabilität der Testsubstanzen wurde in murinem CD-1 und menschlichem Plasma ermittelt.  $1\text{ }\mu\text{L}$  einer  $10\text{ mM}$  Lösung der Testsubstanz wurde ins Plasma gegeben, um eine  $1\text{ }\mu\text{M}$  Endkonzentration zu erhalten. Für jede Substanz wurden in Triplettmessungen jeweils  $300\text{ }\mu\text{L}$  bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 2 h inkubiert. Zu jedem Messzeitpunkt (0,

15, 30, 60 und 120 min) wurden 50  $\mu\text{L}$  Plasma entnommen. Die Proben wurden mittels Proteinfällung extrahiert. Dazu wurden sie mit 250  $\mu\text{L}$  0.1 %-iger Essigsäure in Acetonitril/Methanol (3:1 v/v) inklusive 1  $\mu\text{M}$  eines internen Standards für 10 min bei 2800 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und in ein LC-MS/MS-System injiziert. Die Peakflächen aus der ersten Probe (entnommen bei 0 min) wurden als 100 % festgesetzt und die Restmenge des Analyten in den darauffolgenden Messungen in Prozent angegeben, um die Halbwertszeit zu bestimmen. Der Assay wurde durch GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Spanien) durchgeführt.

Die humanbiologischen Proben wurden ethisch ausgewählt und ihre Verwendung stimmte mit den Bedingungen der Einverständniserklärung überein.

## 7.16 Bestimmung der Stabilität in Lebermikrosomen

Die Lebermikrosomen menschlichen und murinen Ursprungs wurden von Xenotech erworben. Diese Mikrosomen (endgültige Proteinkonzentration = 0.5 mg/mL),  $\text{MgCl}_2$  (endgültige Konzentration = 5 mM) und die Testsubstanz (endgültige Konzentration = 0.5 M; enthält 5 % DMSO) in 0.1 M Phosphatpuffer (pH = 7.4) wurden bei 37 °C inkubiert und anschließend NADPH (endgültige Konzentration = 1 mM) hinzugefügt. Das Gesamtvolumen betrug 600  $\mu\text{L}$ .

Als Kontrolle wurde 0.1 M Phosphatpuffer (pH = 7.4) statt NADPH hinzugegeben. Außerdem wurde stets eine Kontrollsubstanz pro Spezies getestet. Die Versuche wurden in Einfachmessungen durchgeführt. Jede Substanz wurde für 45 min inkubiert und zu den Zeitpunkten 0, 5, 15, 30 und 45 min wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  Probe entnommen. Die Kontrolle ohne NADPH wurde nach 30 min weiterverarbeitet. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Acetonitril : MeOH (3 : 1) inklusive eines internen Standards gestoppt. Nach Zentrifugieren bei 2500 rpm für 20 min bei 4 °C präzipitierte jegliches Protein. Die Proben wurden daraufhin mittels LC-MS/MS analysiert. In einem Graphen aus dem natürlichen Logarithmus des Peakflächenverhältnisses (Peakfläche der Testsubstanz pro Peakfläche des internen Standards) gegen die Zeit wurde die Steigung bestimmt. Mit Hilfe der folgenden Formeln wurden die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) und die intrinsische Clearance ( $\text{Cl}_i$ ) berechnet:

*Konstante der Eliminationsrate (K)[min<sup>-1</sup>] = -Steigung*

$$\text{Halbwertszeit } (t_{1/2})[\text{min}] = \frac{0.693}{K}$$

$$Cl_i \left[ \frac{\text{mL}}{\text{min} \times \text{g Protein}} \right] = \frac{V \times 0.693}{t_{1/2}}$$

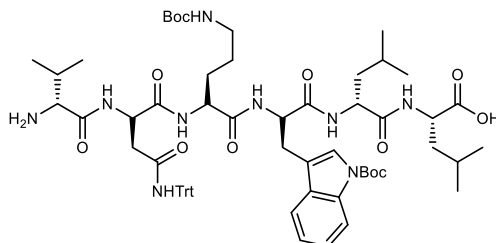
V = Inkubationsvolumen [mL/g mikrosomales Protein]

Der Assay wurde durch GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Spanien) durchgeführt.

## 8. Syntheseprotokolle

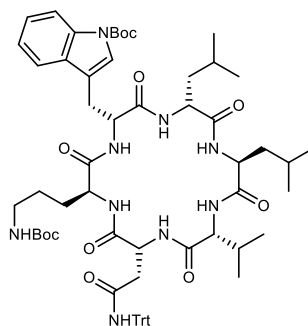
### 8.1 Enantiomer und Epimere des Wollamid B

#### 8.1.1 H<sub>2</sub>N-D-Val-D-Asn(Trt)-Orn(Boc)-D-Trp(Boc)-D-Leu-Leu-OH (1a)



Die Synthese startete mit Fmoc-Leu-OH beladenem Harz (0.30 g, 0.3 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (100 %), ESI-MS berechnet für C<sub>66</sub>H<sub>89</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>: 1199.66, gefunden: 1222.70 [M+Na]<sup>+</sup>.

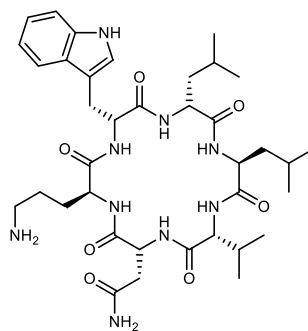
#### 8.1.2 Cyclo(D-Val-D-Asn(Trt)-Orn(Boc)-D-Trp(Boc)-D-Leu-Leu) (1b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid **1a** (0.36 g, 0.3 mmol) mit HATU (0.34 g, 3 Äq.), HOBt (0.12 g, 3 Äq.) und DIPEA (510 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid **1b** zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCCl<sub>3</sub>+MeOH (100+2) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 26 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.1 (100+2), ESI-MS berechnet für C<sub>66</sub>H<sub>87</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>: 1181.65, gefunden: 1204.74 [M+Na]<sup>+</sup>.



### 8.1.3 Cyclo(D-Val-D-Asn-Orn-D-Trp-D-Leu-Leu) (1c)

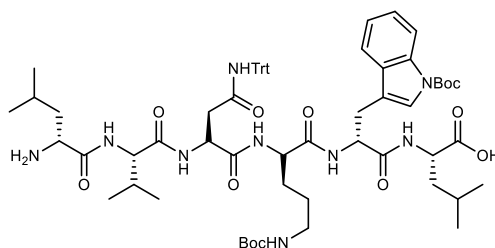


Das Peptid 1b (92 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (80+20+1) gereinigt. Das Produkt 1c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 55 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 99 %,  $t_R = 0.74$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_9\text{O}_7$ : 739.4381, gefunden: 740.4449  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.57 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.08 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.01 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.68 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 4.57 (dd,  $J = 9.5, 4.9$  Hz, 1H), 4.46 (dt,  $J = 19.4, 7.1$  Hz, 2H), 4.31 (dd,  $J = 9.5, 5.4$  Hz, 1H), 4.03 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H), 3.26 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 3.07 (ddd,  $J = 32.0, 15.5, 7.8$  Hz, 2H), 2.79 – 2.60 (m, 3H), 2.30 (dq,  $J = 13.2, 6.7$  Hz, 1H), 1.77 (hept,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 1.56 (dddd,  $J = 47.7, 23.7, 13.3, 6.5$  Hz, 9H), 1.40 – 1.23 (m, 2H), 1.07 – 0.80 (m, 20H).

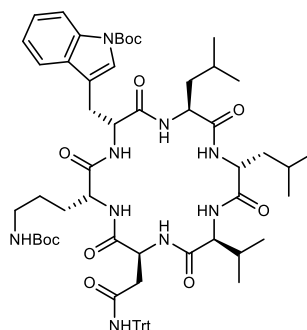
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  175.31, 173.33, 172.62, 172.51, 172.45, 172.14, 171.75, 136.70, 127.07, 123.32, 121.10, 118.55, 117.96, 110.84, 109.17, 60.42, 56.04, 52.06, 51.61, 51.16, 50.07, 40.77, 39.52, 38.86, 35.53, 29.14, 27.24, 25.99, 24.70, 24.52, 23.62, 21.55, 21.37, 21.06, 18.05, 16.55.

### 8.1.4 H<sub>2</sub>N-D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-D-Trp(Boc)-Leu-OH (2a)



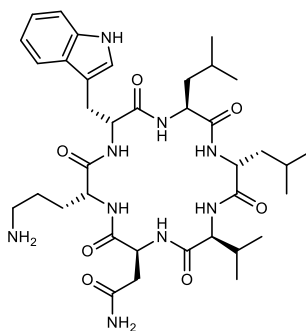
Die Synthese startete mit Fmoc-Leu-OH beladenem Harz (0.21 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (103 %), ESI-MS berechnet für C<sub>66</sub>H<sub>89</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>: 1199.66, gefunden: 1222.69 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.1.5 Cyclo(D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-D-Trp(Boc)-Leu) (2b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 2a (0.25 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 2b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 34 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.4 (200+3), ESI-MS berechnet für C<sub>66</sub>H<sub>87</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>: 1181.65, gefunden: 1204.69 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.1.6 Cyclo(D-Leu-Val-Asn-D-Orn-D-Trp-Leu) (2c)

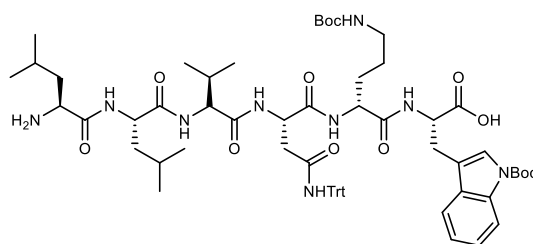


Das Peptid 2b (80 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (70+30+1) gereinigt. Das Produkt 2c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 35 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 94 %,  $t_R = 0.73$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_9\text{O}_7$ : 739.4381, gefunden: 740.4453  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.58 (dd,  $J = 7.9, 1.2$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.09 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.02 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 4.60 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.55 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 4.45 – 4.39 (m, 1H), 4.36 (dd,  $J = 8.9, 6.3$  Hz, 1H), 4.18 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.09 (dd,  $J = 8.5, 5.7$  Hz, 1H), 3.34 (dd,  $J = 14.4, 7.2$  Hz, 1H), 3.28 – 3.22 (m, 1H), 2.86 – 2.68 (m, 2H), 2.52 (td,  $J = 7.1, 1.7$  Hz, 2H), 2.21 (dq,  $J = 13.3, 6.7$  Hz, 1H), 1.69 – 1.42 (m, 6H), 1.36 – 1.21 (m, 4H), 1.14 (dt,  $J = 13.6, 6.8$  Hz, 1H), 1.00 – 0.87 (m, 12H), 0.79 (dd,  $J = 13.4, 6.5$  Hz, 6H).

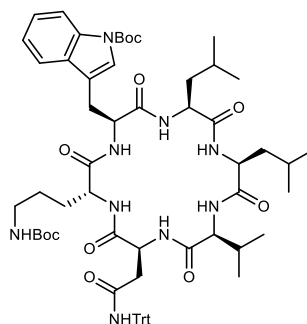
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.71, 173.44, 172.89, 172.84, 172.00, 171.95, 171.74, 136.59, 127.49, 123.12, 121.03, 118.47, 117.99, 110.94, 109.64, 59.07, 54.89, 54.00, 52.16, 51.24, 50.48, 40.10, 39.79, 39.25, 35.91, 30.16, 28.39, 27.36, 26.14, 24.49, 24.08, 21.85, 21.70, 20.82, 20.78, 18.27, 16.46.

### 8.1.7 H<sub>2</sub>N-Leu-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (3a)



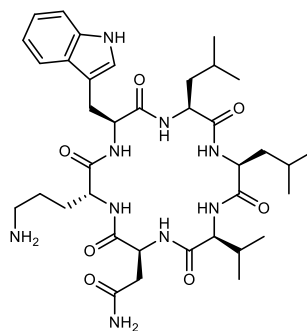
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (88 %), ESI-MS berechnet für C<sub>66</sub>H<sub>89</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>: 1199.66, gefunden: 1222.71 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.1.8 Cyclo(Leu-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (3b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 3a (0.21 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.20 g, 3 Äq.), HOBT (0.07 g, 3 Äq.) und DIPEA (297 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 3b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 39 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.2 (100+3), ESI-MS berechnet für C<sub>66</sub>H<sub>87</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>: 1181.65, gefunden: 1204.65 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.1.9 Cyclo(Leu-Leu-Val-Asn-D-Orn-Trp) (3c)

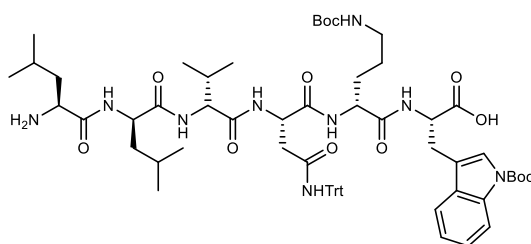


Das Peptid 3b (81 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Gradienten aus  $\text{HCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (80+20+1  $\rightarrow$  50+50+1) gereinigt. Das Produkt 3c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 78 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 93 %,  $t_R = 0.72$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_9\text{O}_7$ : 739.4381, gefunden: 740.4440  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.65 (dt,  $J = 7.9, 1.1$  Hz, 1H), 7.33 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.09 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 7.02 (ddd,  $J = 7.9, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 4.68 (dd,  $J = 8.7, 6.4$  Hz, 1H), 4.60 (dd,  $J = 6.9, 5.2$  Hz, 1H), 4.33 (dd,  $J = 10.7, 4.9$  Hz, 1H), 4.24 (dd,  $J = 8.2, 6.0$  Hz, 1H), 4.13 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 4.04 (dd,  $J = 9.9, 4.9$  Hz, 1H), 3.43 – 3.33 (m, 1H), 3.16 – 3.04 (m, 1H), 2.91 (dd,  $J = 15.8, 5.2$  Hz, 1H), 2.69 (dd,  $J = 15.7, 6.9$  Hz, 1H), 2.59 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.30 – 2.19 (m, 1H), 1.93 – 1.85 (m, 1H), 1.83 – 1.18 (m, 8H), 1.03 – 0.84 (m, 21H).

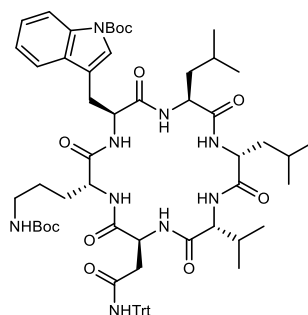
Peakverdopplung  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.16, 174.02, 173.99, 173.89, 173.39, 173.30, 172.94, 172.77, 172.59, 172.16, 171.94, 171.85, 171.60, 171.46, 136.71, 127.10, 127.07, 123.18, 121.09, 118.49, 118.00, 110.89, 109.73, 109.67, 59.31, 59.17, 55.35, 55.23, 54.97, 53.42, 52.78, 52.38, 52.19, 50.79, 50.75, 39.61, 39.45, 39.36, 39.18, 36.79, 36.45, 36.25, 30.22, 30.15, 27.23, 27.06, 26.84, 25.46, 24.73, 24.71, 24.48, 24.43, 22.20, 22.17, 21.87, 21.85, 20.39, 20.38, 20.18, 20.04, 20.02, 18.40, 18.30, 17.11, 16.99.

### 8.1.10 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-D-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (4a)



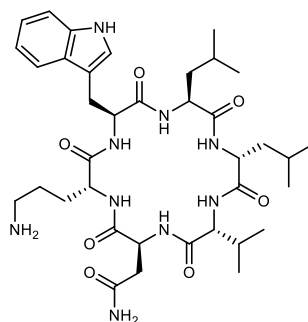
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (95 %), ESI-MS berechnet für C<sub>66</sub>H<sub>89</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>: 1199.66, gefunden: 1200.76 [M+H]<sup>+</sup>.

### 8.1.11 Cyclo(Leu-D-Leu-D-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (4b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 4a (0.23 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.22 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (324 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 4b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (200+2) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 53 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.4 (200+3), ESI-MS berechnet für C<sub>66</sub>H<sub>87</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>: 1181.65, gefunden: 1204.63 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.1.12 Cyclo(Leu-D-Leu-D-Val-Asn-D-Orn-Trp) (4c)

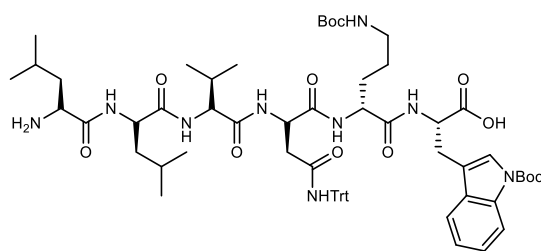


Das Peptid 4b (119 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (70+30+1) gereinigt. Das Produkt 4c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 28 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 84 %,  $t_R = 0.73$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_9\text{O}_7$ : 739.4381, gefunden: 740.4443  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.64 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.34 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.10 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 7.03 (ddd,  $J = 8.0, 7.1, 1.1$  Hz, 1H), 4.73 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 4.60 (dd,  $J = 9.9, 4.9$  Hz, 1H), 4.46 (dd,  $J = 9.0, 5.7$  Hz, 1H), 4.37 (dd,  $J = 10.0, 5.0$  Hz, 1H), 4.23 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 3.98 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 3.42 (dd,  $J = 14.7, 4.9$  Hz, 1H), 3.07 (dd,  $J = 14.7, 9.9$  Hz, 1H), 2.79 (dd,  $J = 15.8, 7.2$  Hz, 1H), 2.62 (dd,  $J = 15.8, 6.3$  Hz, 1H), 2.43 (dq,  $J = 14.6, 7.0$  Hz, 2H), 2.22 (h,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 1.75 – 1.55 (m, 7H), 1.54 – 1.38 (m, 2H), 1.29 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 1.10 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 0.98 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.97 – 0.89 (m, 12H), 0.88 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H).

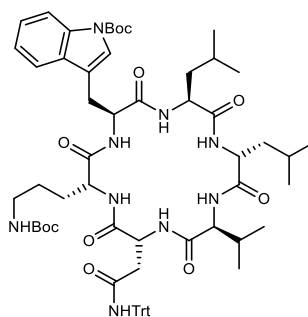
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.74, 173.40, 173.10, 172.93, 172.56, 171.60, 171.46, 136.77, 126.95, 123.51, 121.18, 118.56, 117.99, 110.98, 109.61, 59.36, 55.20, 53.39, 52.67, 51.64, 49.55, 40.21, 40.16, 39.74, 35.66, 29.15, 27.88, 27.13, 27.00, 24.62, 24.61, 24.44, 22.01, 21.99, 21.97, 20.75, 20.21, 18.55, 17.55.

### 8.1.13 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-D-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (5a)



Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (190 %), ESI-MS berechnet für C<sub>66</sub>H<sub>89</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>: 1199.66, gefunden: 1200.77 [M+H]<sup>+</sup>.

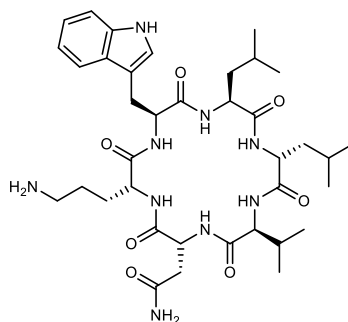
### 8.1.14 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (5b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 5a (0.46 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBT (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 5b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (200+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 55 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.3 (200+3), ESI-MS berechnet für C<sub>66</sub>H<sub>87</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>: 1181.65, gefunden: 1204.67 [M+Na]<sup>+</sup>.



### 8.1.15 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Asn-D-Orn-Trp) (5c)



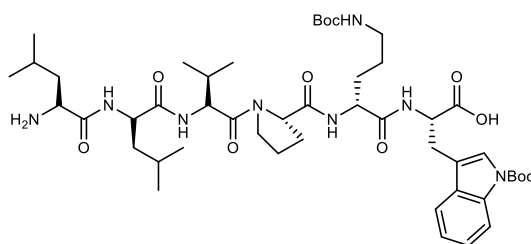
Das Peptid 5b (130 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (70+30+1) gereinigt. Das Produkt 5c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 17 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 100 %,  $t_R = 0.72$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_9\text{O}_7$ : 739.4381, gefunden: 740.4446  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.60 (dt,  $J = 7.9, 1.0$  Hz, 1H), 7.35 (dt,  $J = 8.2, 0.9$  Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.11 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 7.02 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 4.65 (dd,  $J = 8.6, 4.1$  Hz, 1H), 4.53 (dd,  $J = 7.8, 6.5$  Hz, 1H), 4.50 – 4.43 (m, 2H), 4.40 (dd,  $J = 10.7, 4.5$  Hz, 1H), 3.84 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 3.38 (ddd,  $J = 15.0, 4.4, 1.0$  Hz, 1H), 3.12 (dd,  $J = 14.9, 9.5$  Hz, 1H), 2.81 (dd,  $J = 15.9, 4.1$  Hz, 1H), 2.71 (dd,  $J = 15.9, 8.6$  Hz, 1H), 2.51 – 2.37 (m, 2H), 1.96 (dp,  $J = 8.9, 6.7$  Hz, 1H), 1.70 – 1.51 (m, 8H), 1.35 – 1.25 (m, 2H), 1.22 – 1.10 (m, 2H), 1.00 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.93 (q,  $J = 6.0$  Hz, 10H), 0.86 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.75 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.77, 173.11, 173.03, 172.78, 172.70, 172.64, 171.47, 136.79, 126.98, 123.50, 121.27, 118.67, 117.85, 111.03, 109.00, 60.84, 56.24, 52.59, 51.43, 51.04, 50.91, 40.20, 40.07, 39.02, 36.16, 29.24, 29.17, 26.82, 26.68, 24.47, 24.34, 22.18, 21.70, 21.28, 19.98, 18.29, 18.05.

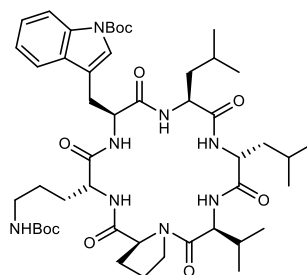
## 8.2 Wollamid-Derivate (Asn → Xxx)

### 8.2.1 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-Pro-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (6a)



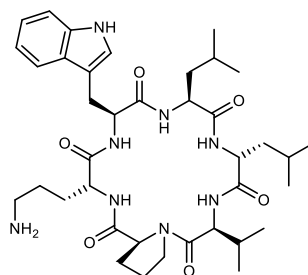
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.24 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (628 %), ESI-MS berechnet für C<sub>48</sub>H<sub>76</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 940.56, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

### 8.2.2 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Pro-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (6b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 6a (1.18 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 6b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (200+3) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 38 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.3 (100+3), ESI-MS berechnet für C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 922.55, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

### 8.2.3 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Pro-D-Orn-Trp) (6c)



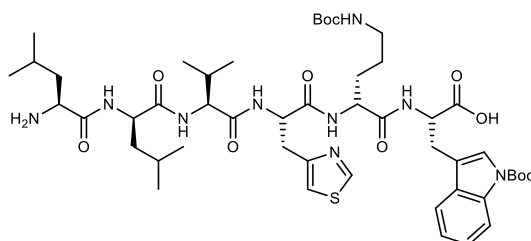
Das Peptid 6b (70 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (85+15+1) gereinigt. Das Produkt 6c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 67 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 93 %,  $t_R = 0.83$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{N}_8\text{O}_6$ : 722.4479, gefunden: 723.4540  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

Es kam zu einer Peakverdopplung im  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektrum.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.91 – 7.82 (m, 1H), 7.62 (d,  $J = 7.9$  Hz, 0H), 7.37 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.34 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.17 – 6.95 (m, 3H), 4.91 (dd,  $J = 9.2, 5.5$  Hz, 1H), 4.45 (ddd,  $J = 15.6, 10.5, 5.9$  Hz, 4H), 4.39 – 4.22 (m, 2H), 3.88 – 3.75 (m, 1H), 3.65 – 3.40 (m, 3H), 3.24 – 2.96 (m, 3H), 2.68 (td,  $J = 7.2, 1.7$  Hz, 2H), 2.32 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 2.28 – 1.82 (m, 8H), 1.81 – 1.44 (m, 10H), 1.32 (td,  $J = 15.4, 14.6, 7.7$  Hz, 1H), 1.06 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 0.99 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 0.90 (ddt,  $J = 19.3, 15.1, 6.6$  Hz, 15H), 0.73 (dd,  $J = 6.5, 3.1$  Hz, 6H).

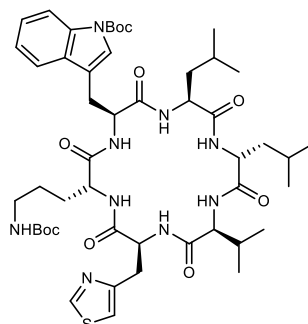
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.17, 173.50, 173.30, 173.04, 172.80, 172.77, 171.87, 171.81, 171.51, 171.39, 170.52, 170.04, 137.06, 136.82, 126.87, 126.70, 123.49, 123.20, 121.66, 121.22, 118.87, 118.60, 118.51, 117.97, 111.14, 110.97, 110.29, 109.64, 61.62, 60.01, 56.33, 55.29, 54.98, 53.16, 52.87, 51.53, 51.13, 50.41, 45.98, 40.36, 40.28, 39.34, 38.91, 37.99, 32.18, 31.45, 30.82, 28.74, 28.21, 27.87, 27.49, 26.38, 25.22, 24.64, 24.56, 24.47, 24.33, 22.33, 22.10, 21.89, 21.28, 21.16, 21.09, 21.02, 20.03, 19.97, 18.77, 17.82, 17.68, 17.13, 16.96.

### 8.2.4 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-β-(4-Thiazolyl)-Ala-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (7a)



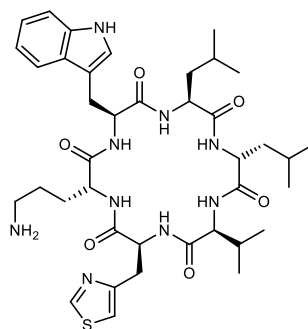
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.23 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (115 %), ESI-MS berechnet für C<sub>49</sub>H<sub>75</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>S: 997.53, gefunden: 1020.51 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.2.5 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-β-(4-Thiazolyl)-Ala-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (7b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 7a (0.20 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBT (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (341 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 7b zu erhalten. Das Produkt fiel aus der EtOAc-Phase aus und wurde nach mehrmaligem Waschen mit DEE als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 29 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.2 (100+2), ESI-MS berechnet für C<sub>49</sub>H<sub>73</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>S: 979.52, gefunden: 1002.48 [M+Na]<sup>+</sup>.

## 8.2.6 Cyclo(Leu-D-Leu-Val- $\beta$ -(4-Thiazolyl)-Ala-D-Orn-Trp) (7c)

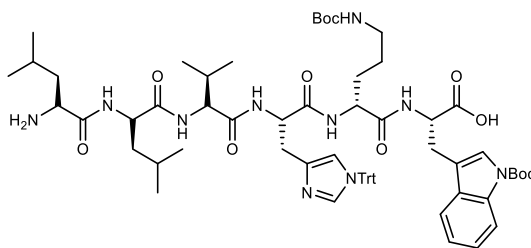


Das Peptid 7b (56 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch MPLC an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (75+25+1) gereinigt. Das Produkt 7c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 62 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 98 %,  $t_R = 0.79$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{39}\text{H}_{57}\text{N}_9\text{O}_6\text{S}$ : 779.4153, gefunden: 780.4219  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  8.94 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.56 (dt,  $J = 7.9, 0.9$  Hz, 1H), 7.28 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.20 – 7.16 (m, 1H), 7.07 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 7.01 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 4.79 (dd,  $J = 11.2, 4.6$  Hz, 1H), 4.51 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H), 4.40 – 4.35 (m, 2H), 4.24 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.94 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 3.41 – 3.34 (m, 1H), 3.28 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 3.00 (dd,  $J = 14.5, 11.2$  Hz, 1H), 2.80 (qdd,  $J = 12.7, 8.8, 6.3$  Hz, 2H), 2.19 – 2.11 (m, 1H), 1.73 (q,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 1.65 – 1.20 (m, 9H), 0.98 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H), 0.92 (dd,  $J = 6.3, 1.3$  Hz, 6H), 0.84 (dd,  $J = 8.4, 6.6$  Hz, 6H), 0.68 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

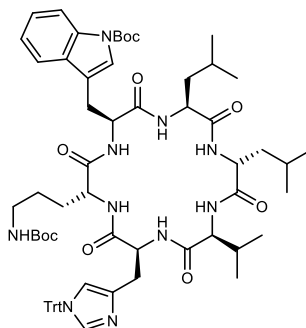
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  175.08, 172.51, 172.40, 172.08, 172.03, 171.93, 153.97, 152.92, 136.72, 127.18, 123.62, 121.30, 118.71, 118.28, 115.86, 110.87, 108.55, 60.02, 55.09, 52.97, 52.62, 51.77, 51.50, 40.80, 39.26, 38.79, 31.73, 28.73, 25.86, 25.58, 24.75, 24.41, 23.06, 21.81, 21.45, 21.16, 21.15, 17.90, 15.85.

### 8.2.7 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-His(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (8a)



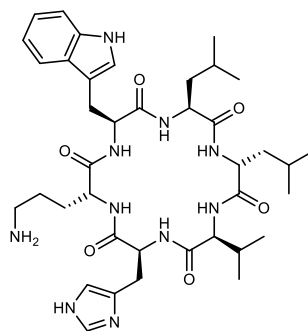
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.24 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (90 %), ESI-MS berechnet für C<sub>68</sub>H<sub>90</sub>N<sub>10</sub>O<sub>11</sub>: 1222.68, gefunden: 1221.83 [M-H]<sup>-</sup>

### 8.2.8 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-His(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (8b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 8a (0.22 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.20 g, 3 Äq.), HOBt (0.07 g, 3 Äq.) und DIPEA (308 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 8b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (200+5) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 44 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.1 (200+6), ESI-MS berechnet für C<sub>68</sub>H<sub>88</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub>: 1204.67, gefunden: 1227.52 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.2.9 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-His-D-Orn-Trp) (8c)

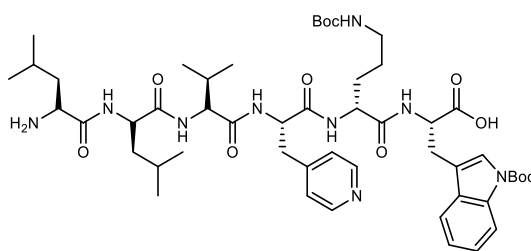


Das Peptid 8b (96 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch MPLC an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (80+20+1) gereinigt. Das Produkt 8c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 44 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 96 %,  $t_R = 0.59$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{39}\text{H}_{58}\text{N}_{10}\text{O}_6$ : 762.4541, gefunden: 763.4604  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.57 (dd,  $J = 7.3, 1.1$  Hz, 2H), 7.31 (dt,  $J = 8.2, 0.9$  Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.07 (ddd,  $J = 8.1, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 6.99 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 6.80 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H), 4.65 (dd,  $J = 9.3, 6.0$  Hz, 1H), 4.55 (dd,  $J = 8.8, 4.2$  Hz, 1H), 4.45 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 4.32 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 4.15 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.02 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H), 3.41 – 3.33 (m, 1H), 3.20 – 3.07 (m, 2H), 2.87 (dd,  $J = 14.6, 9.4$  Hz, 1H), 2.71 – 2.54 (m, 2H), 2.19 (pd,  $J = 7.0, 4.6$  Hz, 1H), 1.68 – 1.06 (m, 12H), 0.97 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.92 (dd,  $J = 6.1, 4.7$  Hz, 5H), 0.86 (dd,  $J = 6.5, 3.4$  Hz, 6H), 0.78 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

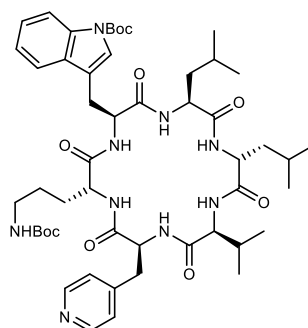
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.30, 172.59, 172.51, 172.10, 171.99, 171.78, 136.71, 134.93, 127.15, 123.52, 121.19, 118.59, 118.11, 110.94, 109.14, 59.68, 54.83, 53.07, 52.88, 52.30, 51.39, 40.86, 39.31, 39.14, 28.95, 26.33, 26.27, 24.71, 24.64, 24.40, 21.53, 21.50, 21.47, 21.16, 18.12, 16.09.

### 8.2.10 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-β-(4-Pyridinyl)-Ala-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (9a)



Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.23 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (124 %), ESI-MS berechnet für C<sub>51</sub>H<sub>77</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>: 991.57, gefunden: 992.52 [M+H]<sup>+</sup>.

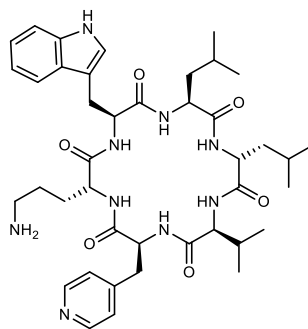
### 8.2.11 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-β-(4-Pyridinyl)-Ala-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (9b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 9a (0.20 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.22 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (341 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 9b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (200+3) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 41 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.1 (200+4), ESI-MS berechnet für C<sub>51</sub>H<sub>75</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>: 973.56, gefunden: 996.53 [M+Na]<sup>+</sup>.



### 8.2.12 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-β-(4-Pyridinyl)-Ala-D-Orn-Trp) (9c)

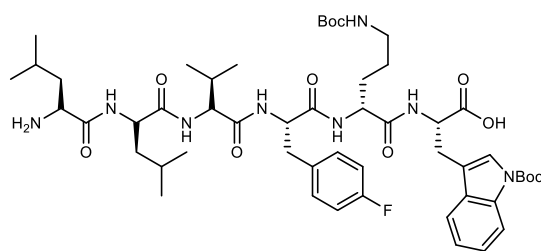


Das Peptid 9b (78 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch MPLC an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (70+30+1) gereinigt. Um die Substanz von ihrem TFA-Salz in die freie Base zu überführen, wurde sie zusätzlich mit einem Ionentauscher aufgearbeitet. Das Produkt 9c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 32 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 99 %,  $t_R = 0.64$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_6$ : 773.4588, gefunden: 774.4649  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  8.41 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2H), 7.59 – 7.50 (m, 1H), 7.32 – 7.28 (m, 2H), 7.26 (dt,  $J = 8.2, 0.9$  Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.05 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.3$  Hz, 1H), 7.00 (ddd,  $J = 8.0, 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 4.70 (dd,  $J = 11.1, 5.0$  Hz, 1H), 4.49 (dd,  $J = 6.9, 5.0$  Hz, 1H), 4.40 (dd,  $J = 8.3, 6.1$  Hz, 1H), 4.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 4.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 3.94 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 3.27 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 3.20 (dd,  $J = 14.1, 4.9$  Hz, 1H), 2.85 – 2.65 (m, 3H), 2.20 – 2.09 (m, 1H), 1.74 – 1.22 (m, 12H), 0.98 – 0.77 (m, 13H), 0.63 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

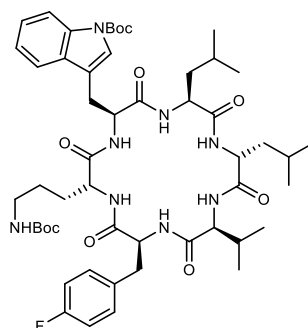
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.51, 172.59, 172.54, 172.10, 171.17, 148.56, 147.96, 136.71, 127.17, 124.89, 123.61, 121.24, 118.65, 118.28, 110.83, 109.00, 59.51, 54.70, 53.34, 52.96, 52.40, 51.48, 41.03, 40.01, 39.01, 38.97, 36.42, 28.77, 26.88, 26.15, 26.09, 24.72, 24.37, 21.67, 21.49, 21.35, 21.13, 18.04, 15.81.

### 8.2.13 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (10a)



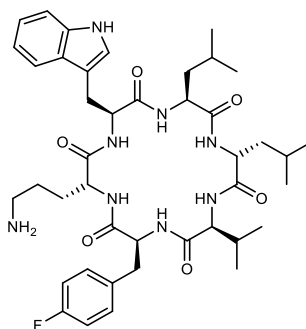
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (202 %), ESI-MS berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>77</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 1008.87, gefunden: 1009.55 [M+H]<sup>+</sup>.

### 8.2.14 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (10b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 10a (0.41 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 10b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (200+3) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 47 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.2 (200+3), ESI-MS berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>75</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 990.56, gefunden: 1013.58 [M+Na]<sup>+</sup>.

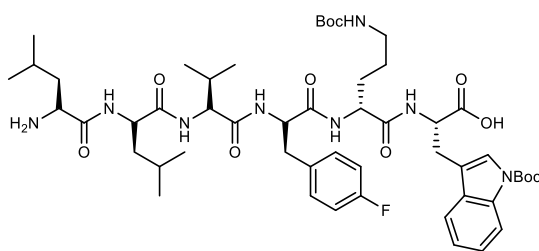
### 8.2.15 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Phe(4-F)-D-Orn-Trp) (10c)



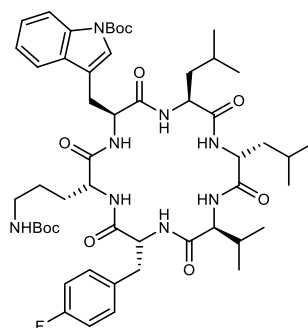
Das Peptid 10b (93 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (90+10+1) gereinigt. Das Produkt 10c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 35 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 87 %,  $t_R = 0.89$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{FN}_8\text{O}_6$ : 790.4542, gefunden: 791.4613  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.56 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.22 – 7.15 (m, 3H), 7.06 (td,  $J = 8.0, 7.5, 1.2$  Hz, 1H), 6.98 (dddd,  $J = 11.1, 8.7, 6.7, 1.6$  Hz, 3H), 4.61 – 4.51 (m, 2H), 4.44 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.29 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.09 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 3.99 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 3.35 (dd,  $J = 14.8, 4.4$  Hz, 1H), 3.18 (dd,  $J = 14.9, 8.4$  Hz, 1H), 3.06 (dd,  $J = 13.8, 6.4$  Hz, 1H), 2.77 (dd,  $J = 13.8, 9.3$  Hz, 1H), 2.48 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.25 – 2.11 (m, 1H), 1.70 – 1.25 (m, 8H), 1.16 (q,  $J = 8.3, 7.7$  Hz, 1H), 0.99 – 0.83 (m, 15H), 0.72 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.39, 172.71, 172.62, 172.14, 171.99, 171.64, 161.80 (d,  $J = 243.5$  Hz), 136.72, 133.05 (d,  $J = 3.3$  Hz), 130.54 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2C), 127.13, 123.54, 121.21, 118.62, 118.19, 114.61 (d,  $J = 21.4$  Hz, 2C), 110.87, 109.08, 59.64, 54.72, 54.44, 53.01, 52.25, 51.48, 40.98, 39.96, 38.90, 36.48, 28.87, 26.76, 26.22, 26.16, 24.70, 24.35, 21.56, 21.43, 21.10, 18.09, 15.91.

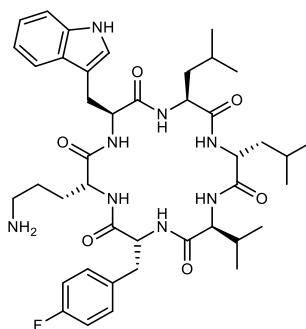
**8.2.16 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (11a)**

Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.24 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (85 %), ESI-MS berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>77</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 1008.87, gefunden: 1031.48 [M+Na]<sup>+</sup>.

**8.2.17 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (11b)**

Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 11a (0.17 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.19 g, 3 Äq.), HOBt (0.07 g, 3 Äq.) und DIPEA (287 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 11b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (200+4) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 49 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.3 (200+4), ESI-MS berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>75</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 990.56, gefunden: 1013.42 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.2.18 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn-Trp) (11c)

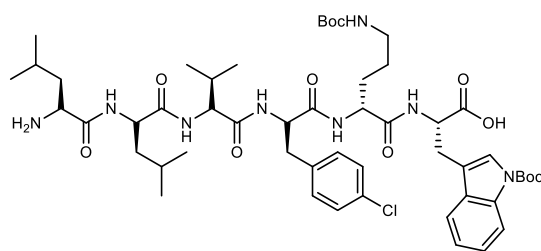


Das Peptid 11b (83 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (80+20+1) gereinigt. Das Produkt 11c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 53 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 100 %,  $t_R = 0.82$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{FN}_8\text{O}_6$ : 790.4542, gefunden: 791.4613  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.62 (dt,  $J = 7.9, 1.0$  Hz, 1H), 7.36 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.30 – 7.25 (m, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.12 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 7.08 – 6.99 (m, 1H), 7.02 – 6.97 (m, 2H), 4.52 – 4.48 (m, 3H), 4.47 (dd,  $J = 5.2, 4.0$  Hz, 1H), 4.41 (dd,  $J = 11.0, 4.1$  Hz, 1H), 3.72 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 3.39 (td,  $J = 14.1, 13.5, 4.1$  Hz, 2H), 3.10 (dd,  $J = 15.0, 9.9$  Hz, 1H), 2.77 (dd,  $J = 14.3, 11.6$  Hz, 1H), 2.39 (tt,  $J = 12.5, 6.2$  Hz, 2H), 1.79 – 1.44 (m, 8H), 1.38 – 1.25 (m, 3H), 1.07 (td,  $J = 15.3, 13.6, 6.4$  Hz, 2H), 0.94 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.91 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H), 0.85 (dd,  $J = 8.2, 6.6$  Hz, 6H), 0.77 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.40 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

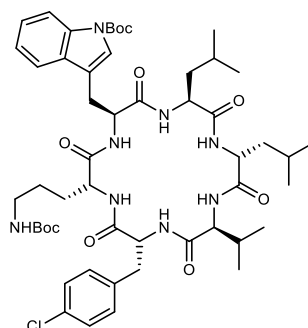
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.89, 173.03, 172.80, 172.48, 172.32, 171.52, 161.90 (d,  $J = 243.6$  Hz),, 136.81, 133.26 (d,  $J = 3.2$  Hz), 130.42 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2C), 126.92, 123.56, 121.28, 118.67, 117.86, 114.80 (d,  $J = 21.5$  Hz, 2C), 111.04, 109.06, 60.78, 56.18, 55.95, 52.62, 51.36, 50.89, 40.38, 40.28, 38.92, 36.08, 29.72, 28.86, 27.17, 26.91, 24.47, 24.35, 22.22, 21.63, 21.34, 19.90, 18.25, 17.63.

### 8.2.19 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (12a)



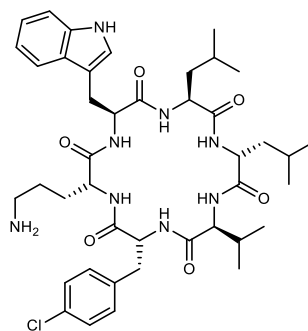
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (181 %), ESI-MS berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>77</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 1024.54, gefunden: 1025.57 [M+H]<sup>+</sup>.

### 8.2.20 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (12b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 12a (0.37 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 12b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (200+2) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 46 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.3 (100+2), ESI-MS berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>75</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 1006.53, gefunden: 1029.52 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.2.21 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn-Trp) (12c)

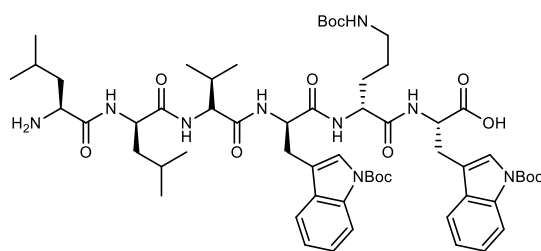


Das Peptid 12b (93 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (93+7+1) gereinigt. Das Produkt 12c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 69 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 94 %,  $t_R = 0.88$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{ClN}_8\text{O}_6$ : 806.4246, gefunden: 807.4312  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.62 (dt,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1H), 7.36 (dt,  $J = 8.2, 0.9$  Hz, 1H), 7.31 – 7.22 (m, 5H), 7.12 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 7.04 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 4.53 – 4.45 (m, 4H), 4.41 (dd,  $J = 11.0, 4.2$  Hz, 1H), 3.71 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 3.44 – 3.35 (m, 2H), 3.10 (dd,  $J = 14.9, 9.8$  Hz, 1H), 2.77 (dd,  $J = 14.3, 11.6$  Hz, 1H), 2.39 (h,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 1.80 – 1.44 (m, 8H), 1.38 – 1.26 (m, 2H), 1.14 – 1.01 (m, 2H), 0.94 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.91 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.85 (dd,  $J = 7.6, 6.6$  Hz, 6H), 0.77 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 0.40 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

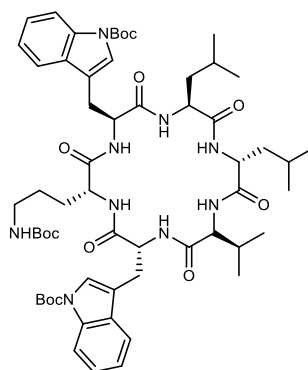
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.88, 173.00, 172.79, 172.48, 172.34, 171.41, 136.81, 136.15, 132.36, 130.31 (2C), 128.24 (2C), 126.93, 123.55, 121.28, 118.67, 117.87, 111.04, 109.05, 60.79, 56.18, 55.71, 52.64, 51.36, 50.89, 40.37, 40.29, 38.93, 36.21, 29.70, 28.84, 27.17, 26.91, 24.47, 24.35, 22.22, 21.65, 21.64, 21.35, 19.91, 18.25, 17.61.

### 8.2.22 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-D-Trp(Boc)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (13a)



Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.23 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (138 %), ESI-MS berechnet für C<sub>59</sub>H<sub>87</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub>: 1129.64, gefunden: 1152.52 [M+Na]<sup>+</sup>.

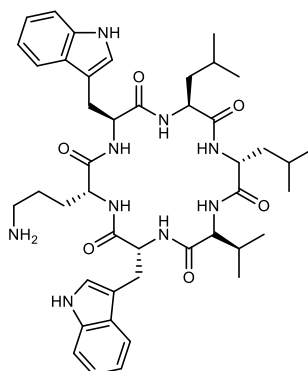
### 8.2.23 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Trp(Boc)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (13b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 13a (0.31 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 13b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 53%, R<sub>f</sub>-Wert = 0.4 (100+1), ESI-MS berechnet für C<sub>59</sub>H<sub>85</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>: 1111.63, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.



### 8.2.24 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Trp-D-Orn-Trp) (13c)

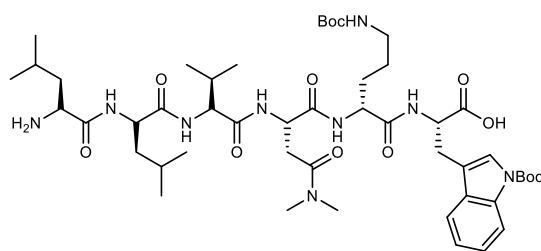


Das Peptid 13b (119 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HClCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (95+5+0.5) gereinigt. Das Produkt 13c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 24 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 100 %,  $t_R = 0.85$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{N}_9\text{O}_6$ : 811.4745, gefunden: 812.4838  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.61 (ddt,  $J = 7.9, 4.5, 1.0$  Hz, 2H), 7.36 (dt,  $J = 8.0, 0.9$  Hz, 1H), 7.31 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.06 (dddd,  $J = 32.7, 15.1, 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 4H), 4.59 (dd,  $J = 10.3, 3.8$  Hz, 1H), 4.53 – 4.43 (m, 3H), 4.39 (dd,  $J = 11.1, 4.2$  Hz, 1H), 3.75 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 3.50 – 3.37 (m, 2H), 3.15 – 3.01 (m, 2H), 2.38 – 2.24 (m, 2H), 1.79 – 1.46 (m, 8H), 1.35 (dddd,  $J = 21.4, 11.2, 8.6, 5.6$  Hz, 3H), 0.93 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 0.90 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 0.86 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.81 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.76 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.37 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

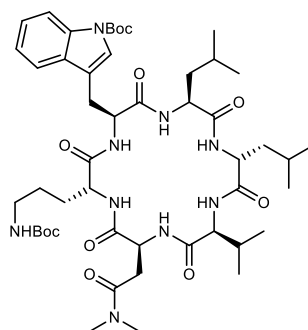
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.87, 173.21, 172.85, 172.61, 172.28, 172.06, 136.83, 136.82, 126.93, 126.91, 123.59, 123.43, 121.28, 121.12, 118.66, 118.42, 117.86, 117.82, 111.05, 110.92, 109.42, 109.07, 60.57, 56.15, 54.98, 52.48, 51.44, 50.88, 40.43, 40.12, 38.82, 29.75, 28.98, 27.27, 27.16, 26.88, 24.44, 24.35, 22.23, 21.68, 21.25, 19.84, 18.23, 17.56.

### 8.2.25 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-Asn(DiMe)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (14a)



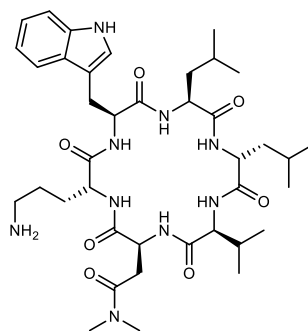
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.35 g, 0.3 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (102 %), ESI-MS berechnet für C<sub>49</sub>H<sub>79</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>: 985.58, gefunden: 1008.60 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.2.26 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn(DiMe)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (14b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 14a (0.30 g, 0.3 mmol) mit HATU (0.35 g, 3 Äq.), HOBt (0.13 g, 3 Äq.) und DIPEA (527 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 14b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 48 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.3 (100+2), ESI-MS berechnet für C<sub>49</sub>H<sub>77</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>: 967.57, gefunden: 991.16 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.2.27 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn(DiMe)-D-Orn-Trp) (14c)

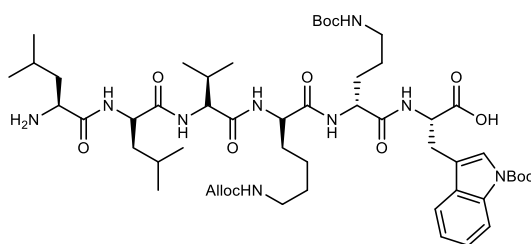


Das Peptid 14b (144 mg, 0.2 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HClCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (80+20+1) und anschließend mit einem Ionenaustauscher gereinigt. Das Produkt 14c wurde als gelber, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 10 %, HPLC (UV) Reinheit: 93 %,  $t_R = 10.51$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{N}_9\text{O}_7$ : 767.4694, gefunden: 768.4762  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.54 (dt,  $J = 7.9, 1.0$  Hz, 1H), 7.32 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.08 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 7.00 (ddd,  $J = 7.9, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 4.77 (dd,  $J = 6.0, 4.9$  Hz, 1H), 4.60 (dd,  $J = 8.8, 4.9$  Hz, 1H), 4.47 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 4.41 (dd,  $J = 8.1, 6.6$  Hz, 1H), 4.28 (dd,  $J = 9.2, 5.8$  Hz, 1H), 4.04 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 3.28 – 3.23 (m, 1H), 3.17 – 3.06 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 2.85 (dd,  $J = 16.7, 4.9$  Hz, 1H), 2.61 – 2.44 (m, 2H), 2.31 (pd,  $J = 7.0, 4.5$  Hz, 1H), 1.85 – 1.71 (m, 1H), 1.72 – 1.17 (m, 11H), 1.05 – 0.94 (m, 9H), 0.90 (dd,  $J = 11.9, 6.1$  Hz, 5H), 0.85 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H).

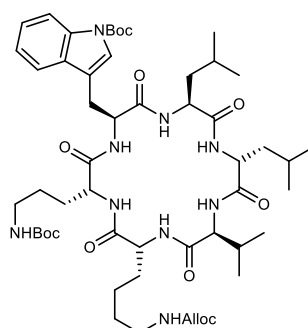
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.75, 172.54, 172.47, 172.34, 172.10, 172.00, 170.78, 136.65, 127.11, 123.33, 121.16, 118.58, 117.97, 110.85, 108.96, 60.19, 55.60, 52.53, 52.00, 51.29, 49.74, 40.50, 40.28, 39.34, 36.38, 34.82, 34.42, 29.03, 27.77, 27.08, 26.51, 24.68, 24.49, 21.57, 21.48, 21.34, 21.03, 18.09, 16.41.

### 8.2.28 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-D-Lys(Alloc)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (15a)



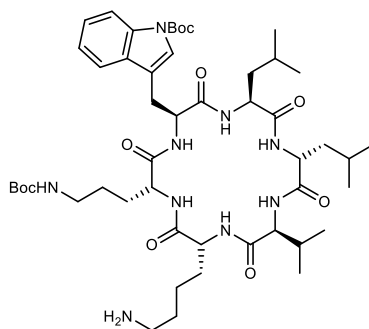
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.44 g, 0.4 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (56 %), ESI-MS berechnet für C<sub>53</sub>H<sub>85</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub>: 1055.63, gefunden: 1078.46 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.2.29 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Lys(Alloc)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (15b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 15a (0.44 g, 0.4 mmol) mit HATU (0.47 g, 3 Äq.), HOBt (0.17 g, 3 Äq.) und DIPEA (697 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 15b zu erhalten. Das Produkt fiel aus der EtOAc-Phase aus und wurde nach mehrmaligem Waschen mit DEE als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 55 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.3 (100+2), ESI-MS berechnet für C<sub>53</sub>H<sub>83</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>: 1037.61, gefunden: 1036.84 [M-H<sup>+</sup>].

### 8.2.30 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Lys-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (15c)

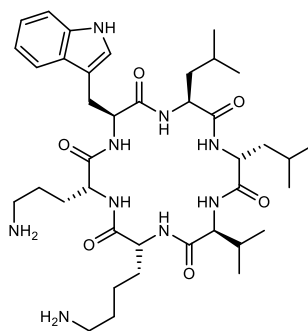


Das Peptid 15b (170 mg, 0.2 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.2 beschriebenen Methode zur Entschützung der Alloc-Funktion mit Phenylsilan und  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in  $\text{HCCl}_3$  und MeOH behandelt. Anschließend wurde zur Trockene eingeeengt, und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (90+10+1) gereinigt. Das Produkt 15c wurde als gelber, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 46 %, HPLC (UV) Reinheit: 99 %,  $t_R = 12.53$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{49}\text{H}_{79}\text{N}_9\text{O}_{10}$ : 953.5950, gefunden: 954.6056  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  8.10 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.61 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.35 – 7.27 (m, 1H), 7.27 – 7.19 (m, 1H), 4.63 – 4.50 (m, 2H), 4.47 (dd,  $J = 8.5, 4.5$  Hz, 1H), 4.28 (dd,  $J = 10.0, 4.9$  Hz, 1H), 4.14 (dd,  $J = 9.7, 3.9$  Hz, 1H), 3.93 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 3.23 (dd,  $J = 20.3, 6.5$  Hz, 1H), 2.91 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 2.68 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.97 (ddd,  $J = 14.2, 7.9, 5.6$  Hz, 2H), 1.67 (s, 10H), 1.76 – 1.05 (m, 17H), 1.41 (s, 9H), 1.00 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.93 (dd,  $J = 13.0, 6.2$  Hz, 9H), 0.81 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.62 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.86, 173.72, 172.61, 172.43, 172.25, 172.07, 149.55, 135.33, 130.10, 124.28, 124.10, 122.43, 118.69, 115.39, 114.82, 83.65, 60.36, 55.28, 54.36, 52.46, 51.70, 50.83, 40.31, 39.90, 39.38, 39.08, 30.79, 30.63, 29.77, 29.32, 27.38 (3x C), 27.03 (3x C), 26.07, 25.46, 24.39, 24.24, 22.78, 22.17, 21.77, 21.12, 19.92, 18.19, 18.10.

### 8.2.31 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Lys-D-Orn-Trp) (15d)



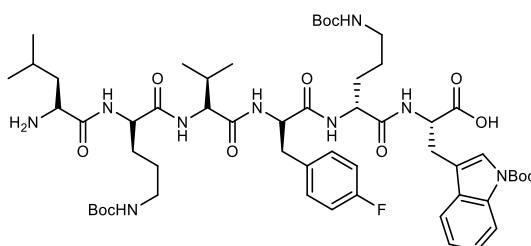
Das Peptid 15c (67 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch exzessives Waschen mit EtOAc gereinigt. Das Produkt 15d wurde als bräunlicher, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 79 %, HPLC (UV) Reinheit: 99 %,  $t_R = 9.27$  min, HRMS berechnet für  $C_{39}H_{63}N_9O_6$ : 753.4901, gefunden: 754.4997  $[M+H]^+$ , 377.7535  $[M+2H]^{2+}$ .

$^1H$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.61 (dt,  $J = 8.0, 0.9$  Hz, 1H), 7.39 – 7.30 (m, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.12 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 7.04 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.0$  Hz, 1H), 4.58 – 4.51 (m, 1H), 4.51 – 4.44 (m, 2H), 4.40 (dd,  $J = 10.3, 4.5$  Hz, 1H), 4.19 (dd,  $J = 9.9, 3.7$  Hz, 1H), 3.90 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 3.41 – 3.34 (m, 1H), 3.12 (dd,  $J = 14.8, 9.4$  Hz, 1H), 2.98 – 2.83 (m, 2H), 2.71 (ddd,  $J = 12.6, 8.6, 6.4$  Hz, 1H), 2.67 – 2.57 (m, 1H), 2.01 (ddd,  $J = 13.5, 9.8, 6.9$  Hz, 2H), 1.79 – 1.49 (m, 13H), 1.37 (dddd,  $J = 37.5, 15.6, 10.7, 5.2$  Hz, 7H), 1.02 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 0.99 – 0.89 (m, 9H), 0.87 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.77 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H).

$^{13}C$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.74, 172.85, 172.76, 172.58, 172.51, 172.33, 136.76, 126.98, 123.51, 121.29, 118.69, 117.85, 111.04, 109.03, 60.68, 56.18, 53.73, 52.26, 51.45, 50.96, 39.85, 39.39, 38.92, 38.75, 30.33, 29.09, 28.52, 26.98, 26.45, 24.46, 24.29, 22.94, 22.40, 22.14, 21.68, 21.21, 20.16, 18.24, 18.02.

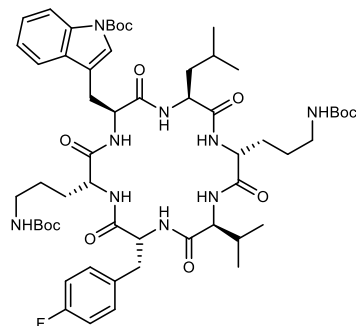
### 8.3 Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-F) und D-Leu → Xxx)

#### 8.3.1 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Orn(Boc)-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (16a)



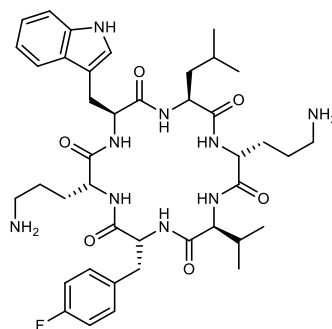
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.2 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (80 %), ESI-MS berechnet für C<sub>56</sub>H<sub>84</sub>FN<sub>9</sub>O<sub>13</sub>: 1109.62, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

#### 8.3.2 Cyclo(Leu-D-Orn(Boc)-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (16b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 16a (0.18 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 16b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 47 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.2 (100+2), ESI-MS berechnet für C<sub>56</sub>H<sub>82</sub>FN<sub>9</sub>O<sub>12</sub>: 1091.61, gefunden: 1114.56 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.3.3 Cyclo(Leu-D-Orn-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn-Trp) (16c)



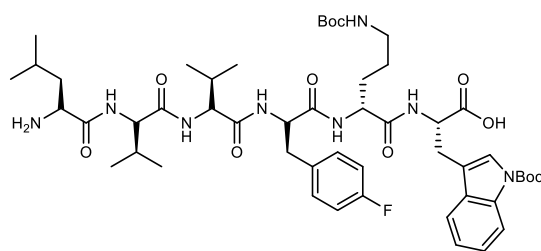
Das Peptid 16b (103 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt mit kaltem EtOAc gewaschen. Das Produkt 16c wurde als gelber, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 30 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 93 %,  $t_R = 0.64$  min, HRMS berechnet für  $C_{41}H_{58}FN_9O_6$ : 791.4494, gefunden: 792.4575  $[M+H]^+$ .

$^1H$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.58 (dt,  $J = 7.9, 0.9$  Hz, 1H), 7.37 (dt,  $J = 8.1, 0.8$  Hz, 1H), 7.33 – 7.25 (m, 3H), 7.12 (ddd,  $J = 8.1, 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 7.07 – 6.95 (m, 3H), 4.65 (dd,  $J = 7.3, 5.8$  Hz, 1H), 4.55 – 4.39 (m, 3H), 4.33 (dd,  $J = 11.1, 4.1$  Hz, 1H), 3.74 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 3.47 – 3.39 (m, 1H), 3.39 – 3.33 (m, 1H), 3.21 (dd,  $J = 14.9, 8.9$  Hz, 1H), 3.04 – 2.85 (m, 2H), 2.85 – 2.73 (m, 2H), 2.68 (dt,  $J = 12.7, 7.1$  Hz, 1H), 1.93 – 1.50 (m, 10H), 1.43 (dt,  $J = 15.4, 6.9$  Hz, 2H), 1.36 – 1.22 (m, 2H), 0.85 (dd,  $J = 10.3, 6.6$  Hz, 7H), 0.73 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.36 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

$^{13}C$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.93, 173.14, 173.02, 173.01, 171.75, 171.48, 161.91 (d,  $J = 243.8$  Hz), 136.77, 133.35 (d,  $J = 3.1$  Hz), 130.37 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2C), 127.00, 123.62, 121.32, 118.69, 117.74, 114.84 (d,  $J = 21.6$  Hz, 2C), 111.11, 108.78, 60.84, 56.68, 56.11, 52.02, 51.77, 51.24, 38.94, 38.76, 36.10, 29.84, 28.92, 28.08, 26.90, 24.29, 23.15, 22.92, 22.22, 19.74, 18.31, 17.53.

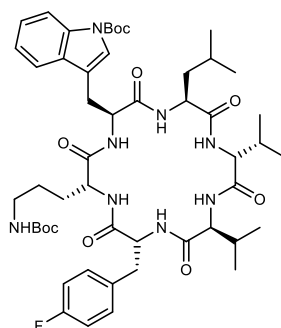


### 8.3.4 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Val-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (17a)



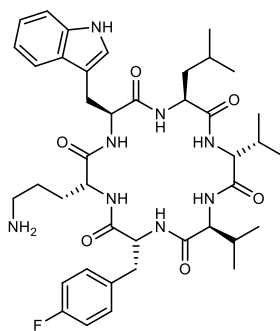
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (73 %), ESI-MS berechnet für C<sub>51</sub>H<sub>75</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 994.55, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

### 8.3.5 Cyclo(Leu-D-Val-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (17b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 17a (0.15 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 17b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 47 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.2 (100+2), ESI-MS berechnet für C<sub>51</sub>H<sub>73</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 976.54, gefunden: 999.46 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.3.6 Cyclo(Leu-D-Val-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn-Trp) (17c)

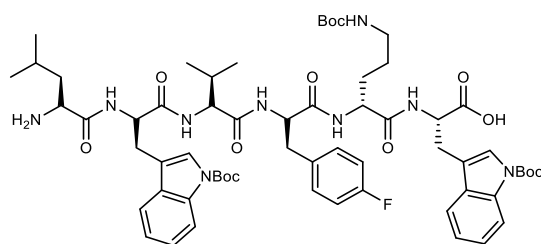


Das Peptid 17b (92 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (180+20+1) gereinigt. Das Produkt 17c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 57 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 96 %,  $t_R = 0.82$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{FN}_8\text{O}_6$ : 776.4385, gefunden: 777.4477  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.63 (dt,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1H), 7.36 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.31 – 7.21 (m, 3H), 7.12 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 7.04 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 7.02 – 6.94 (m, 2H), 4.55 – 4.44 (m, 4H), 4.15 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 3.64 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 3.46 – 3.36 (m, 2H), 3.09 (dd,  $J = 14.9, 10.0$  Hz, 1H), 2.74 (dd,  $J = 14.3, 11.8$  Hz, 1H), 2.44 – 2.30 (m, 2H), 2.10 (dp,  $J = 8.7, 6.6$  Hz, 1H), 1.78 – 1.44 (m, 6H), 1.36 (tdd,  $J = 17.4, 9.0, 5.6$  Hz, 2H), 1.13 – 0.92 (m, 2H), 0.92 – 0.82 (m, 13H), 0.78 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.36 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

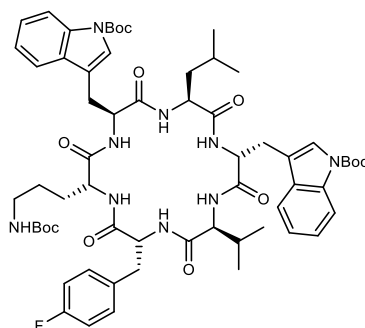
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.04, 172.93, 172.83, 172.51, 171.75, 171.60, 161.89 (d,  $J = 243.7$  Hz), 136.82, 133.37 (d,  $J = 3.1$  Hz), 130.43 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2C), 126.93, 123.56, 121.27, 118.67, 117.88, 114.78 (d,  $J = 21.6$  Hz, 2C), 111.03, 109.09, 61.24, 58.14, 56.15, 55.76, 52.88, 51.13, 40.52, 38.86, 36.24, 30.33, 29.91, 28.60, 27.65, 26.99, 24.37, 22.27, 19.88, 18.45, 18.11, 17.59, 17.45.

### 8.3.7 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Trp(Boc)-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (18a)



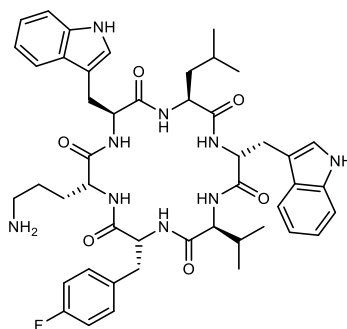
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (78 %), ESI-MS berechnet für C<sub>62</sub>H<sub>84</sub>FN<sub>9</sub>O<sub>13</sub>: 1181.62, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

### 8.3.8 Cyclo(Leu-D-Trp(Boc)-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (18b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 18a (0.18 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 18b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 47 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.3 (100+2), ESI-MS berechnet für C<sub>62</sub>H<sub>82</sub>FN<sub>9</sub>O<sub>12</sub>: 1163.61, gefunden: 1186.51 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.3.9 Cyclo(Leu-D-Trp-Val-D-Phe(4-F)-D-Orn-Trp) (18c)



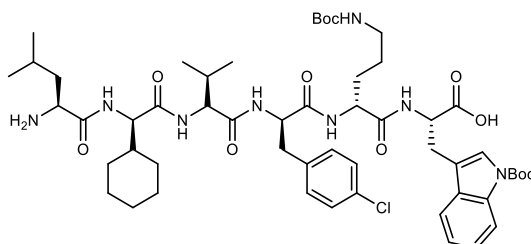
Das Peptid 18b (110 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (170+30+1) und anschließend mit einem Ionenaustauscher gereinigt. Das Produkt 18c wurde als gelber, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 30 %, HPLC (UV) Reinheit: 96 %,  $t_R = 11.42$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{47}\text{H}_{58}\text{FN}_9\text{O}_6$ : 863.4494, gefunden: 864.4584  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.65 (dt,  $J = 7.9, 1.0$  Hz, 1H), 7.61 (dt,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1H), 7.37 (dt,  $J = 8.2, 0.9$  Hz, 1H), 7.28 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.26 – 7.20 (m, 3H), 7.13 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.1$  Hz, 1H), 7.08 – 7.02 (m, 3H), 7.02 – 6.92 (m, 3H), 4.62 (ddd,  $J = 16.3, 9.7, 5.0$  Hz, 2H), 4.53 – 4.42 (m, 3H), 3.49 – 3.41 (m, 2H), 3.35 (dd,  $J = 14.2, 3.6$  Hz, 1H), 3.19 (dd,  $J = 14.0, 9.2$  Hz, 1H), 3.14 – 3.04 (m, 3H), 2.74 (dd,  $J = 14.2, 11.6$  Hz, 1H), 2.43 – 2.28 (m, 2H), 1.76 – 1.61 (m, 2H), 1.62 – 1.41 (m, 3H), 1.35 (dtd,  $J = 11.1, 6.9, 4.4$  Hz, 1H), 1.03 (p,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 0.86 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.80 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.35 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.19 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.78, 172.86, 172.68, 172.32, 171.76, 171.72, 161.85 (d,  $J = 243.6$  Hz), 136.85, 136.56, 133.30 (d,  $J = 3.2$  Hz), 130.43 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2C), 127.42, 126.91, 123.59, 123.09, 121.29, 120.83, 118.68, 118.24, 118.12, 117.92, 114.74 (d,  $J = 21.5$  Hz, 2C), 111.07, 110.72, 109.58, 109.20, 60.97, 56.04, 55.69, 54.11, 52.86, 51.33, 40.44, 39.09, 36.26, 29.64, 28.37, 27.61, 27.10, 24.40, 22.23, 19.98, 17.78, 17.51.

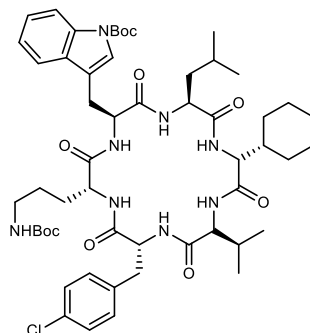
## 8.4 Wollamid-Derivate (Asn → D-Phe(4-Cl) und D-Leu → Xxx)

### 8.4.1 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Chg-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (19a)



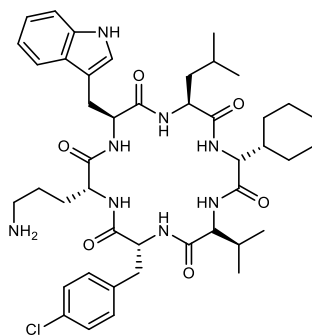
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.23 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (89 %), ESI-MS berechnet für C<sub>54</sub>H<sub>79</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 1050.56, gefunden: 1049.64 [M-H<sup>+</sup>].

### 8.4.2 Cyclo(Leu-D-Chg-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (19b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 19a (0.19 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 19b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+1.5) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 53 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.4 (100+1), ESI-MS berechnet für C<sub>54</sub>H<sub>77</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 1032.55, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

### 8.4.3 Cyclo(Leu-D-Chg-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn-Trp) (19c)

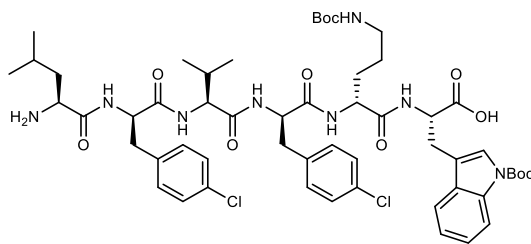


Das Peptid 19b (109 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (93+7+1) gereinigt. Das Produkt 19c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 17 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 98 %,  $t_R = 0.92$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{ClN}_8\text{O}_6$ : 832.4403, gefunden: 833.4497  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.63 (dt,  $J = 7.9, 1.0$  Hz, 1H), 7.36 (dt,  $J = 8.2, 0.9$  Hz, 1H), 7.30 – 7.20 (m, 5H), 7.12 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 7.04 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 4.57 – 4.42 (m, 4H), 4.21 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 3.62 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 3.46 – 3.36 (m, 2H), 3.08 (dd,  $J = 14.9, 10.0$  Hz, 1H), 2.83 – 2.68 (m, 1H), 2.43 – 2.30 (m, 2H), 1.86 – 1.44 (m, 8H), 1.42 – 1.13 (m, 4H), 1.01 (dtdd,  $J = 25.4, 12.7, 9.8, 6.0$  Hz, 4H), 0.86 (t,  $J = 6.6$  Hz, 6H), 0.78 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.35 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

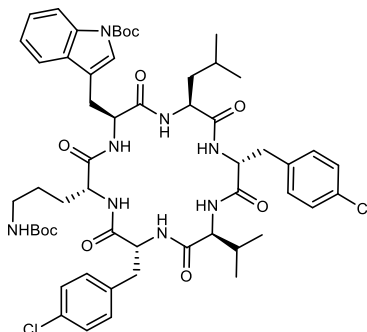
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.06, 172.89, 172.81, 172.46, 171.74, 171.50, 136.82, 136.26, 132.32, 130.33 (2C), 128.23 (2C), 126.92, 123.56, 121.28, 118.67, 117.88, 111.03, 109.10, 61.28, 57.23, 56.15, 55.49, 52.92, 51.07, 40.50, 39.56, 38.88, 36.38, 29.93, 29.34, 28.51, 28.41, 27.58, 26.98, 25.96, 25.49, 25.43, 24.37, 22.27, 19.89, 18.48, 17.56.

#### 8.4.4 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Phe(4-Cl)-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (20a)



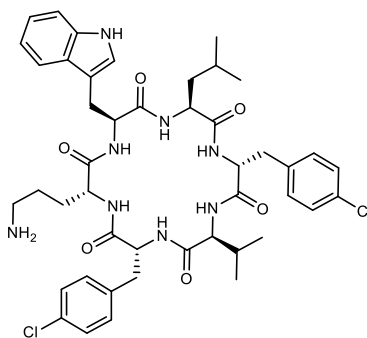
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.24 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (130 %), ESI-MS berechnet für C<sub>55</sub>H<sub>74</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 1092.49, gefunden: 1115.54[M+Na]<sup>+</sup>.

#### 8.4.5 Cyclo(Leu-D-Phe(4-Cl)-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (20b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 20a (0.28 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 20b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+2) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 39 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.4 (100+2), ESI-MS berechnet für C<sub>55</sub>H<sub>72</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 1074.47, gefunden: 1097.55[M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.4.6 Cyclo(Leu-D-Phe(4-Cl)-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn-Trp) (20c)

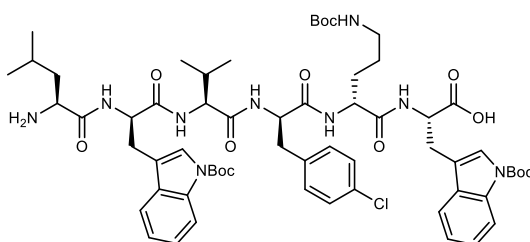


Das Peptid 20b (109 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (95+5+1) gereinigt. Das Produkt 20c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 25 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 98 %,  $t_R = 0.93$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{45}\text{H}_{56}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_6$ : 874.3700, gefunden: 875.3779  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.64 (dt,  $J = 7.9, 0.9$  Hz, 1H), 7.37 (dt,  $J = 8.3, 0.9$  Hz, 1H), 7.28 – 7.17 (m, 10H), 7.12 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 7.05 (ddd,  $J = 8.0, 7.1, 1.1$  Hz, 1H), 4.63 – 4.45 (m, 4H), 4.40 (dd,  $J = 11.1, 4.1$  Hz, 1H), 3.55 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 3.48 – 3.40 (m, 1H), 3.36 (dd,  $J = 14.2, 3.6$  Hz, 1H), 3.09 (dd,  $J = 14.8, 10.1$  Hz, 1H), 2.97 (dd,  $J = 7.7, 3.2$  Hz, 2H), 2.74 (dd,  $J = 14.3, 11.7$  Hz, 1H), 2.42 – 2.28 (m, 2H), 1.73 – 1.43 (m, 6H), 1.40 – 1.24 (m, 2H), 1.08 – 0.95 (m, 2H), 0.85 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.76 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.60 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.28 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

Für das  $^{13}\text{C}$ -Spektrum war nicht genügend Substanz vorhanden.

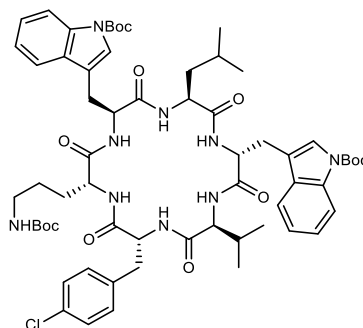
### 8.4.7 $\text{H}_2\text{N}$ -Leu-D-Trp(Boc)-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (21a)





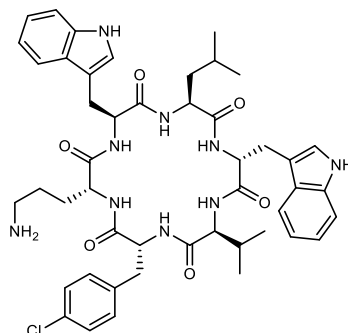
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.24 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (97 %), ESI-MS berechnet für  $C_{62}H_{84}ClN_9O_{13}$ : 1197.59, gefunden: 1198.65  $[M+H]^+$ .

#### 8.4.8 Cyclo(Leu-D-Trp(Boc)-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (21b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 21a (0.23 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.22 g, 3 Äq.), HOBT (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (323  $\mu$ L, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 21b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $HCCl_3+MeOH$  (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 34 %,  $R_f$ -Wert = 0.2 (100+1), ESI-MS berechnet für  $C_{62}H_{82}ClN_9O_{12}$ : 1179.58, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

#### 8.4.9 Cyclo(Leu-D-Trp-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Orn-Trp) (21c)



Das Peptid 21b (109 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie

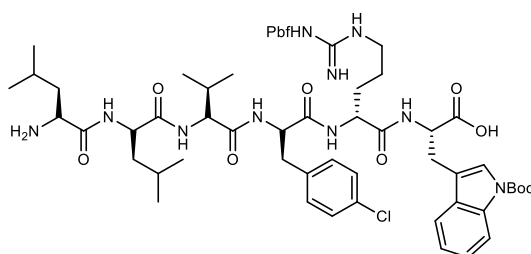
an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (195+5+1) gereinigt. Das Produkt 21c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 49 %, HPLC (UV) Reinheit: 93 %,  $t_R = 15.08$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{47}\text{H}_{58}\text{ClN}_9\text{O}_6$ : 879.4199, gefunden: 880.4297  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.65 (dt,  $J = 7.9, 1.0$  Hz, 1H), 7.61 (dt,  $J = 7.7, 1.0$  Hz, 1H), 7.37 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.28 (dt,  $J = 8.1, 1.0$  Hz, 1H), 7.26 – 7.17 (m, 5H), 7.13 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 7.09 – 7.02 (m, 3H), 6.98 (ddd,  $J = 8.0, 7.1, 1.1$  Hz, 1H), 4.62 (ddd,  $J = 12.7, 9.6, 5.0$  Hz, 2H), 4.55 – 4.44 (m, 3H), 3.50 – 3.40 (m, 2H), 3.35 (dd,  $J = 14.2, 3.7$  Hz, 1H), 3.20 (dd,  $J = 13.9, 9.2$  Hz, 1H), 3.15 – 3.01 (m, 2H), 2.74 (dd,  $J = 14.2, 11.6$  Hz, 1H), 2.41 – 2.24 (m, 2H), 1.79 – 1.60 (m, 2H), 1.60 – 1.42 (m, 3H), 1.41 – 1.21 (m, 2H), 1.06 – 0.93 (m, 2H), 0.86 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.80 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.35 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.19 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.76, 172.86, 172.70, 172.32, 171.70, 171.62, 136.85, 136.56, 136.17, 132.28, 130.33 (2C), 128.19 (2C), 127.43, 126.91, 123.59, 123.09, 121.30, 120.83, 118.68, 118.25, 118.13, 117.92, 111.08, 110.72, 109.59, 109.21, 60.97, 56.02, 55.44, 54.11, 52.95, 51.35, 40.60, 39.09, 36.44, 29.71, 28.35, 27.64, 27.55, 27.11, 24.41, 22.23, 19.98, 17.78, 17.49.

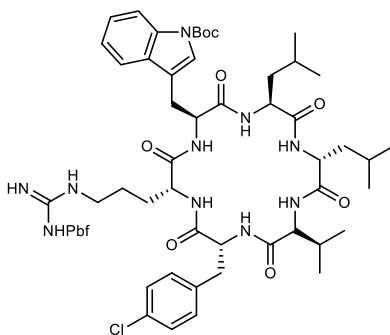
## 8.5 Wollamid-Derivate (Asn $\rightarrow$ D-Phe(4-Cl) und D-Orn $\rightarrow$ Xxx)

### 8.5.1 $\text{H}_2\text{N}$ -Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-OH (22a)



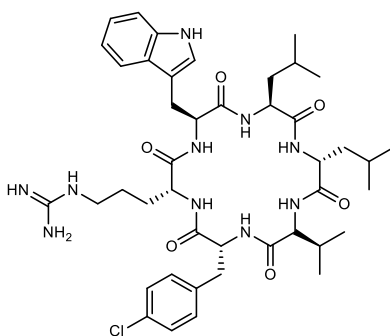
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (139 %), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{61}\text{H}_{87}\text{ClN}_{10}\text{O}_{12}\text{S}$ : 1218.59, gefunden: 1241.51  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

### 8.5.2 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Arg(Pbf)-Trp(Boc)) (22b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 22a (0.34 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340  $\mu$ L, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 22b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCl}_3$ +MeOH (100+2) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 56 %,  $R_f$ -Wert = 0.2 (100+2), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{61}\text{H}_{85}\text{ClN}_{10}\text{O}_{11}$ : 1200.58, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

### 8.5.3 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Arg-Trp) (22c)

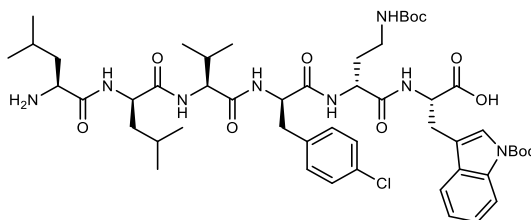


Das Peptid 22b (135 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCl}_3$ +MeOH+ $\text{NH}_3$  (170+30+1) gereinigt. Das Produkt 22c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 46 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 97 %,  $t_R$  = 0.91 min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{43}\text{H}_{61}\text{ClN}_{10}\text{O}_6$ : 848.4464, gefunden: 849.4550  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.61 (dt,  $J = 7.9, 1.0$  Hz, 1H), 7.36 (dt,  $J = 8.2, 0.9$  Hz, 1H), 7.30 – 7.21 (m, 5H), 7.11 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 7.04 (ddd,  $J = 8.1, 7.1, 1.1$  Hz, 1H), 4.59 – 4.44 (m, 4H), 4.39 (dd,  $J = 11.0, 4.2$  Hz, 1H), 3.70 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 3.39 (dd,  $J = 14.5, 4.0$  Hz, 2H), 3.12 (dd,  $J = 14.8, 9.5$  Hz, 1H), 3.02 – 2.91 (m, 1H), 2.90 – 2.83 (m, 1H), 2.78 (dd,  $J = 14.3, 11.5$  Hz, 1H), 1.81 – 1.45 (m, 9H), 1.41 – 1.07 (m, 4H), 0.92 (dd,  $J = 11.4, 6.0$  Hz, 6H), 0.85 (dd,  $J = 6.6, 4.4$  Hz, 6H), 0.76 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.40 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

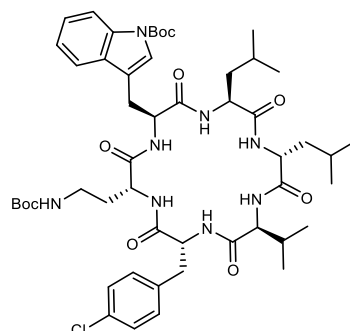
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.92, 172.78, 172.70, 172.48, 172.42, 171.57, 157.07, 136.79, 136.10, 132.40, 130.32 (2C), 128.26 (2C), 126.91, 123.57, 121.31, 118.71, 117.80, 111.05, 108.97, 60.90, 56.28, 55.68, 52.40, 51.35, 50.89, 40.55, 40.29, 38.95, 36.15, 29.38, 28.77, 26.88, 24.49, 24.31, 24.08, 22.20, 21.62, 21.36, 19.91, 18.23, 17.61.

#### 8.5.4 $\text{H}_2\text{N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dab(Boc)-Trp(Boc)-OH}$ (23a)



Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.24 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (85 %), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{51}\text{H}_{75}\text{ClN}_8\text{O}_{11}$ : 1010.52, gefunden: 1033.65  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

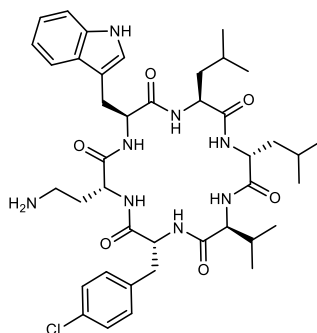
#### 8.5.5 Cyclo( $\text{Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dab(Boc)-Trp(Boc)}$ ) (23b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 23a (0.17 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBT (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340  $\mu\text{L}$ , 10 Äq.) umgesetzt, um das

cyclische Peptid 23b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH}$  (100+2) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 59 %,  $R_f$ -Wert = 0.3 (100+2), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{51}\text{H}_{73}\text{ClN}_8\text{O}_{10}$ : 992.51, gefunden: 1015.71  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

### 8.5.6 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dab-Trp) (23c)



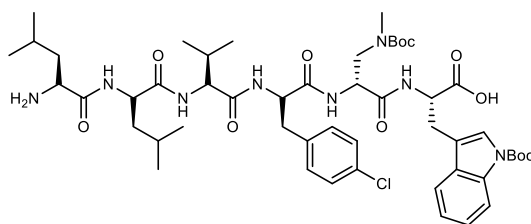
Das Peptid 23b (117 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (96+4+1) gereinigt. Das Produkt 23c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 4 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 96 %,  $t_R = 0.93$  min, ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{ClN}_8\text{O}_6$ : 792.41, gefunden: 793.89  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.60 (dt,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1H), 7.35 (dt,  $J = 8.2, 0.9$  Hz, 1H), 7.32 – 7.21 (m, 5H), 7.11 (ddd,  $J = 8.3, 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 7.03 (ddd,  $J = 8.1, 7.0, 1.0$  Hz, 1H), 4.60 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 4.57 – 4.46 (m, 3H), 4.34 (dd,  $J = 10.8, 4.3$  Hz, 1H), 3.70 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 3.39 (dd,  $J = 14.3, 4.0$  Hz, 1H), 3.38 – 3.30 (m, 1H), 3.15 (dd,  $J = 14.9, 8.9$  Hz, 1H), 2.90 – 2.71 (m, 4H), 1.75 (dp,  $J = 9.3, 6.6$  Hz, 1H), 1.69 – 1.44 (m, 6H), 1.41 – 1.19 (m, 1H), 0.93 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.90 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H), 0.85 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 0.83 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 0.74 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.44 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.75, 172.71, 172.57, 172.47, 171.92, 171.70, 136.78, 136.19, 132.35, 130.34 (2C), 128.25 (2C), 126.97, 123.35, 121.27, 118.68, 117.77,

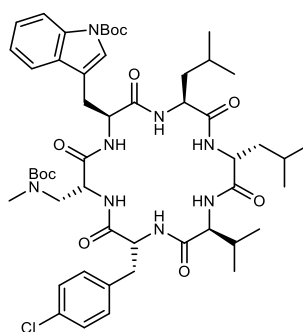
111.01, 108.80, 60.99, 56.17, 55.53, 51.93, 51.81, 51.39, 50.94, 40.15, 38.90, 35.96, 34.40, 28.82, 26.90, 24.49, 24.24, 22.16, 21.59, 21.31, 19.99, 18.27, 17.65, 16.76.

### 8.5.7 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap(Me,Boc)-Trp(Boc)-OH (24a)



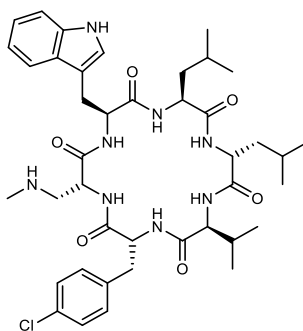
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (94 %), ESI-MS berechnet für C<sub>51</sub>H<sub>75</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 1010.52, gefunden: 1033.43 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.5.8 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap(Me,Boc)-Trp(Boc)) (24b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 24a (0.19 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 24b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+2) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 43 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.2 (100+1), ESI-MS berechnet für C<sub>51</sub>H<sub>73</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 992.51, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

### 8.5.9 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap(Me)-Trp) (24c)

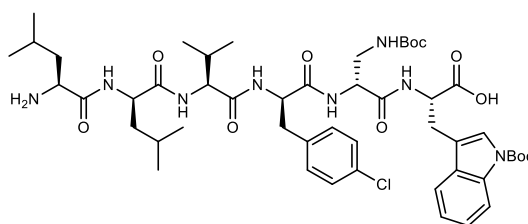


Das Peptid 24b (81 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (193+7+1) gereinigt. Das Produkt 24c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 59 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 99 %,  $t_R = 0.92$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{ClN}_8\text{O}_6$ : 792.4090, gefunden: 793.4182  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.60 (dt,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1H), 7.35 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.31 – 7.21 (m, 5H), 7.11 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.2$  Hz, 1H), 7.03 (ddd,  $J = 8.1, 7.1, 1.1$  Hz, 1H), 4.60 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 4.57 – 4.46 (m, 3H), 4.34 (dd,  $J = 10.8, 4.3$  Hz, 1H), 3.70 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 3.39 (dd,  $J = 14.2, 4.0$  Hz, 1H), 3.39 – 3.30 (m, 1H), 3.15 (dd,  $J = 14.8, 8.9$  Hz, 1H), 2.87 – 2.70 (m, 3H), 2.24 (s, 3H), 1.81 – 1.70 (m, 1H), 1.69 – 1.46 (m, 6H), 1.40 – 1.16 (m, 1H), 0.93 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 0.90 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 0.84 (dd,  $J = 10.6, 6.6$  Hz, 6H), 0.74 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.43 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

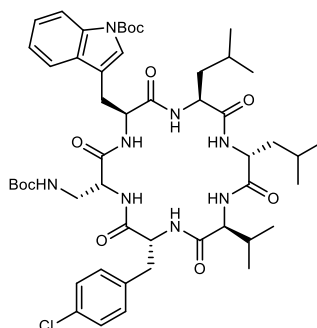
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.75, 172.72, 172.55, 172.47, 171.98, 171.69, 136.78, 136.19, 132.35, 130.34 (2C), 128.25 (2C), 126.98, 123.35, 121.27, 118.68, 117.77, 111.01, 108.80, 60.98, 56.17, 55.53, 51.99, 51.89, 51.39, 50.94, 40.16, 38.90, 35.98, 34.43, 28.82, 26.90, 24.49, 24.24, 22.16, 21.59, 21.31, 19.98, 18.27, 17.65.

### 8.5.10 H<sub>2</sub>N-Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap(Boc)-Trp(Boc)-OH (25a)



Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.24 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (86 %), ESI-MS berechnet für C<sub>50</sub>H<sub>73</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 996.51, gefunden: 997.60 [M+H]<sup>+</sup>

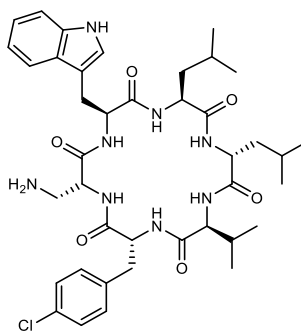
### 8.5.11 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap(Boc)-Trp(Boc)) (25b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 25a (0.17 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.20 g, 3 Äq.), HOBT (0.07 g, 3 Äq.) und DIPEA (289 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 25b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 58 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.2 (100+1), ESI-MS berechnet für C<sub>50</sub>H<sub>71</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 978.50, gefunden: 1001.59 [M+Na]<sup>+</sup>.



### 8.5.12 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Phe(4-Cl)-D-Dap-Trp) (25c)



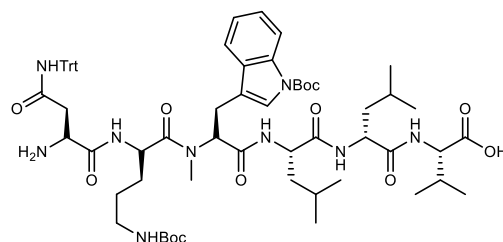
Das Peptid 25b (135 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (195+5+1) gereinigt. Das Produkt 25c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 34 %, HPLC (UV) Reinheit: 99 %,  $t_R = 15.31$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{ClN}_8\text{O}_6$ : 778.3933, gefunden: 779.4018  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.60 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.35 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.26 (tt,  $J = 7.1, 5.2$  Hz, 5H), 7.11 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.03 (dd,  $J = 8.4, 6.5$  Hz, 1H), 4.53 (dtd,  $J = 20.8, 6.9, 6.3, 3.3$  Hz, 5H), 4.34 (dd,  $J = 11.0, 4.2$  Hz, 1H), 3.68 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 3.47 – 3.38 (m, 1H), 3.17 (dd,  $J = 14.9, 8.8$  Hz, 1H), 2.94 – 2.74 (m, 3H), 1.82 – 1.70 (m, 1H), 1.70 – 1.44 (m, 6H), 1.27 – 1.14 (m, 1H), 0.93 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 0.90 (d,  $J = 6.1$  Hz, 4H), 0.86 (d,  $J = 6.5$  Hz, 4H), 0.82 (d,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 0.72 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.42 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.84, 172.74, 172.59, 172.43, 171.93, 171.78, 136.76, 136.19, 132.37, 130.32 (2C), 128.26 (2C), 126.98, 123.28, 121.29, 118.69, 117.76, 111.04, 108.84, 61.08, 56.14, 55.53, 54.76, 51.33, 50.87, 42.88, 40.21, 38.92, 36.07, 28.75, 26.82, 24.49, 24.22, 22.18, 21.60, 21.32, 19.95, 18.31, 17.63.

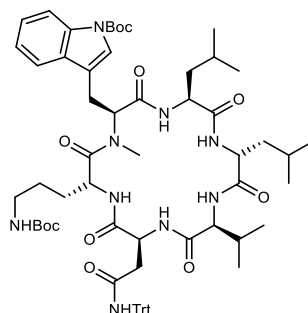
## 8.6 Wollamid-Derivate mit $\alpha$ -Methyl-Aminosäuren

### 8.6.1 $\text{H}_2\text{N-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-MeTrp(Boc)-Leu-D-Leu-Val-OH}$ (26a)



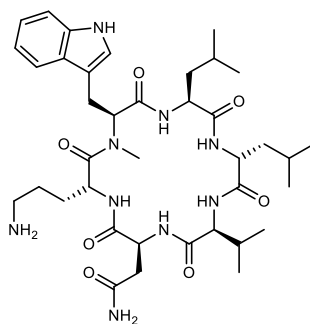
Die Synthese startete mit Fmoc-Val-OH beladenem Harz (0.21 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (132 %), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{67}\text{H}_{91}\text{N}_9\text{O}_{12}$ : 1213.68, gefunden: 1212.78  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

### 8.6.2 $\text{Cyclo(Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-MeTrp(Boc)-Leu-D-Leu-Val)}$ (26b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 26a (0.32 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340  $\mu\text{L}$ , 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 26b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCl}_3+\text{MeOH}$  (100+2) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 64 %,  $R_f$ -Wert = 0.2 (100+2), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{67}\text{H}_{89}\text{N}_9\text{O}_{11}$ : 1195.67, gefunden: 1218.65  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### 8.6.3 Cyclo(Asn-D-Orn-MeTrp-Leu-D-Leu-Val) (26c)

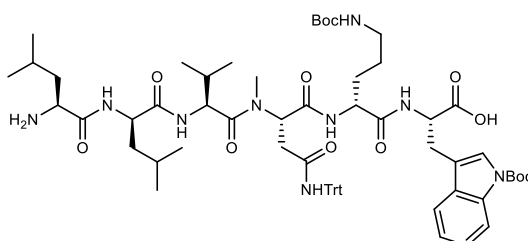


Das Peptid 26b (152 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (170+30+10) gereinigt. Das Produkt 26c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 50 %, HPLC (UV) Reinheit: 98 %,  $t_R = 9.98$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{38}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_7$ : 753.4537, gefunden: 754.4604  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.60 – 7.52 (m, 1H), 7.32 (dt,  $J = 8.1, 0.8$  Hz, 1H), 7.13 – 7.04 (m, 2H), 6.99 (ddd,  $J = 7.9, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 5.67 (dd,  $J = 12.4, 4.4$  Hz, 1H), 4.77 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 4.64 (dd,  $J = 8.0, 6.5$  Hz, 1H), 4.39 (dt,  $J = 8.7, 7.0$  Hz, 2H), 4.29 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 3.67 – 3.55 (m, 1H), 3.17 (dd,  $J = 15.6, 12.4$  Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 2.81 (dd,  $J = 15.3, 7.1$  Hz, 1H), 2.66 (dd,  $J = 15.3, 6.8$  Hz, 1H), 2.38 (pd,  $J = 6.9, 4.5$  Hz, 1H), 2.20 (td,  $J = 6.8, 2.4$  Hz, 2H), 1.84 – 1.50 (m, 7H), 1.40 – 1.20 (m, 2H), 1.07 – 0.86 (m, 20H).

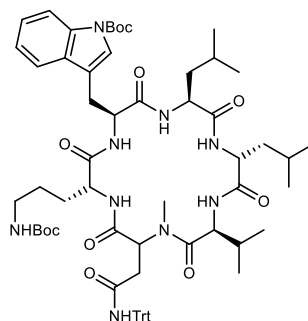
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.01, 173.62, 173.39, 172.26, 171.68, 170.81, 170.69, 136.59, 127.12, 122.93, 121.06, 118.43, 118.05, 110.82, 109.96, 58.47, 58.15, 52.48, 51.25, 49.74, 49.50, 40.74, 40.51, 39.33, 37.24, 30.68, 28.99, 27.80, 27.22, 24.75, 24.49, 23.50, 21.81, 21.44, 21.38, 21.28, 18.41, 15.99.

### 8.6.4 $\text{H}_2\text{N}$ -Leu-D-Leu-Val-MeAsn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (27a)



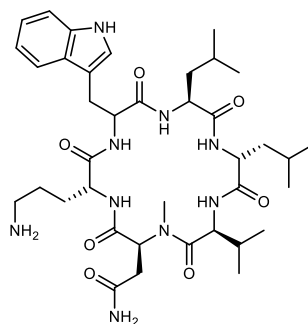
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.17 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (84 %), ESI-MS berechnet für  $C_{67}H_{91}N_9O_{12}$ : 1213.68, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

### 8.6.5 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-MeAsn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (27b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 27a (0.15 g, 0.1 mmol) mit HATU (0.17 g, 3 Äq.), HOBt (0.06 g, 3 Äq.) und DIPEA (255  $\mu$ L, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 27b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $HCCl_3$ +MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 26 %,  $R_f$ -Wert = 0.3 (100+1), ESI-MS berechnet für  $C_{67}H_{89}N_9O_{11}$ : 1195.67, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

### 8.6.6 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-MeAsn-D-Orn-Trp) (27c)



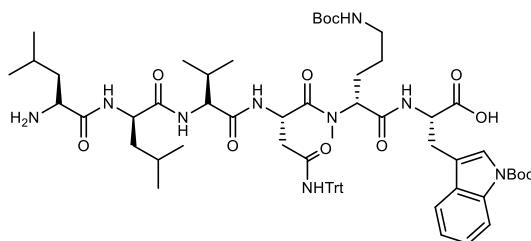
Das Peptid 27b (41 mg, 0.03 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $HCCl_3$ +MeOH+ $NH_3$  (180+20+1)

gereinigt. Das Produkt 27c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 52 %, HPLC (UV) Reinheit: 94 %,  $t_R = 9.89$  min, HRMS berechnet für  $C_{38}H_{59}N_9O_7$ : 753.4537, gefunden: 754.4627  $[M+H]^+$ .

$^1H$  NMR (500 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.61 (dt,  $J = 7.8, 1.1$  Hz, 1H), 7.35 (ddt,  $J = 8.2, 3.7, 0.9$  Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.11 (ddd,  $J = 8.2, 7.1, 1.1$  Hz, 1H), 7.03 (tdd,  $J = 7.0, 1.7, 1.0$  Hz, 1H), 4.68 – 4.60 (m, 1H), 4.56 – 4.53 (m, 1H), 4.53 – 4.44 (m, 1H), 4.38 (ddd,  $J = 11.1, 8.0, 4.3$  Hz, 1H), 4.27 (ddd,  $J = 13.2, 7.9, 5.4$  Hz, 1H), 3.41 (dtd,  $J = 14.5, 3.2, 1.6$  Hz, 1H), 3.23 – 3.06 (m, 2H), 2.87 – 2.77 (m, 2H), 2.57 – 2.38 (m, 2H), 2.03 – 1.91 (m, 1H), 1.80 – 1.00 (m, 12H), 0.98 – 0.69 (m, 21H).

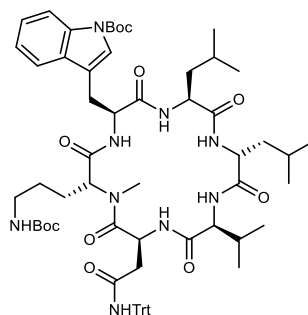
$^{13}C$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.26, 174.14, 173.37, 172.89, 172.79, 172.72, 172.30, 136.80, 126.99, 123.58, 121.29, 118.69, 117.86, 111.04, 109.01, 62.19, 56.19, 51.97, 51.84, 50.85, 48.19, 39.69, 39.59, 39.04, 38.45, 33.61, 30.58, 30.08, 29.89, 29.39, 26.68, 24.30, 22.22, 22.14, 20.44, 19.70, 18.04, 17.36.

### 8.6.7 $H_2N$ -Leu-D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-MeOrn(Boc)-Trp(Boc)-OH (28a)



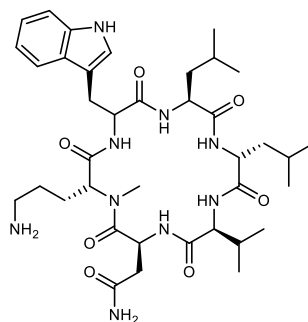
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (116 %), ESI-MS berechnet für  $C_{67}H_{91}N_9O_{12}$ : 1213.68, gefunden: 1236.65  $[M+Na]^+$ .

### 8.6.8 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-MeOrn(Boc)-Trp(Boc)) (28b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 28a (0.28 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBT (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340  $\mu$ L, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 28b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3$ +MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 54 %,  $R_f$ -Wert = 0.1 (100+1), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{67}\text{H}_{89}\text{N}_9\text{O}_{11}$ : 1195.67, gefunden: 1218.80  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### 8.6.9 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn-D-MeOrn-Trp) (28c)



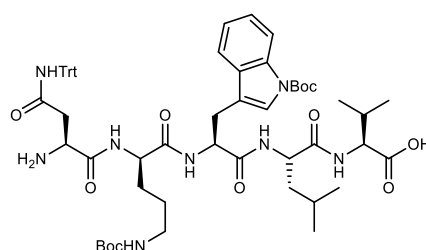
Das Peptid 28b (124 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3$ +MeOH+ $\text{NH}_3$  (150+50+1) gereinigt. Das Produkt 28c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 28 %, HPLC (UV) Reinheit: 90 %,  $t_R$  = 9.95 min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{38}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_7$ : 753.4537, gefunden: 754.4627  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.61 (dt,  $J$  = 7.9, 0.9 Hz, 1H), 7.36 – 7.28 (m, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.09 (ddd,  $J$  = 8.2, 7.1, 1.2 Hz, 1H), 7.01 (ddd,  $J$  = 8.0, 7.1, 1.1 Hz, 1H), 4.69 (dd,  $J$  = 7.0, 5.7 Hz, 1H), 4.59 – 4.42 (m, 3H), 4.09 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 1H), 3.47 – 3.38 (m, 1H), 2.75 (dd,  $J$  = 15.4, 5.7 Hz, 1H), 2.60 (dd,  $J$  = 15.4, 7.1 Hz, 1H), 2.37 – 2.23 (m, 3H), 1.79 – 1.43 (m, 9H), 1.24 (s, 3H), 1.06 – 0.69 (m, 21H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.28, 173.86, 173.13, 172.63, 172.59, 171.76, 170.46, 136.69, 127.27, 123.18, 121.10, 118.47, 118.02, 110.90, 110.22, 59.67, 59.26, 55.60, 51.86, 51.69, 49.38, 40.70, 40.64, 39.03, 37.48, 34.71, 29.03, 25.94, 25.45, 24.48, 24.45, 21.72, 21.59, 21.28, 21.14, 20.14, 18.26, 16.31.

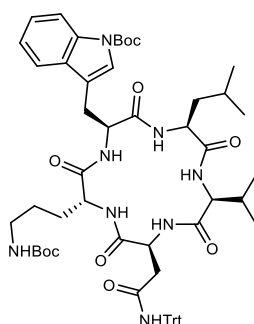
## 8.7 Von Wollamid B abgeleitete Pentapeptide

### 8.7.1 $\text{H}_2\text{N-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Val-OH}$ (29a)



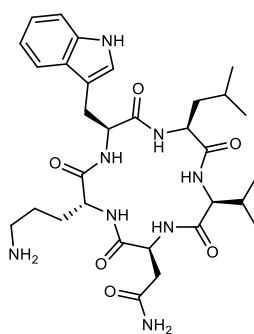
Die Synthese startete mit Fmoc-Val-OH beladenem Harz (0.20 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (133 %), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{60}\text{H}_{78}\text{N}_8\text{O}_{11}$ : 1086.58, gefunden: 1085.55  $[\text{M-H}^+]$ .

### 8.7.2 Cyclo(Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Val) (29b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 29a (0.29 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340  $\mu$ L, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 29b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Gradienten Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3$ +MeOH (100+2) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 52 %,  $R_f$ -Wert = 0.2 (100+2), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{60}\text{H}_{76}\text{N}_8\text{O}_{10}$ : 1068.57, gefunden: 1091.73  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### 8.7.3 Cyclo(Asn-D-Orn-Trp-Leu-Val) (29c)



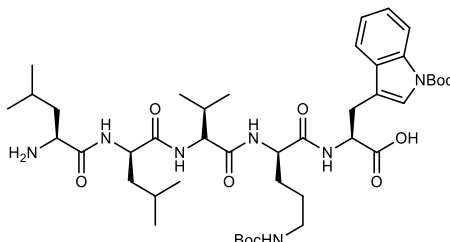
Das Peptid 29b (104 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Gradienten aus  $\text{HCCl}_3$ +MeOH+ $\text{NH}_3$  (83+17+1  $\rightarrow$  50+50+1) gereinigt. Das Produkt 29c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 27 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 94 %,  $t_R$  = 0.67 min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{O}_6$ : 626.3540, gefunden: 627.3602  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.65 – 7.57 (m, 1H), 7.33 (dt,  $J$  = 8.1, 0.9 Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.09 (ddd,  $J$  = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.02 (ddd,  $J$  = 8.0, 7.0, 1.1 Hz, 1H), 4.70 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 4.51 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 4.39 (dd,  $J$  = 8.4, 6.0 Hz, 1H), 4.10 (dd,  $J$  = 9.4, 6.5 Hz, 1H), 3.91 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 3.12 (dd,  $J$  = 14.5, 8.1 Hz, 1H), 3.04 – 2.89 (m, 1H), 2.84 – 2.71 (m, 2H), 2.66 (dd,  $J$  = 15.8, 7.3 Hz, 1H), 2.19 (h,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 1.86 – 1.18 (m, 7H), 0.93 (dd,  $J$  = 8.9, 6.7 Hz, 7H), 0.85 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H), 0.78 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H).



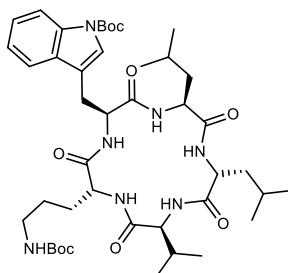
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  172.08, 171.69, 171.61, 171.57, 171.41, 170.75, 136.55, 127.49, 124.02, 121.33, 118.75, 118.54, 111.78, 110.43, 59.89, 53.27, 51.65, 49.27, 41.49, 36.06, 32.26, 28.29, 27.16, 25.18, 23.32, 23.29, 23.27, 22.59, 21.36, 19.60, 19.55.

#### 8.7.4 $\text{H}_2\text{N-Leu-D-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH}$ (30a)



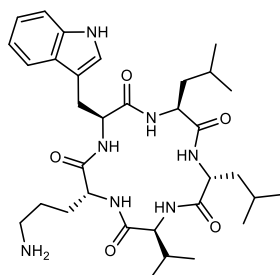
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.33 g, 0.3 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (46 - 51 %), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{43}\text{H}_{69}\text{N}_7\text{O}_{10}$ : 843.51, gefunden: 866.35  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

#### 8.7.5 $\text{Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc))}$ (30b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 30a (0.24 g, 0.3 mmol) mit HATU (0.33 g, 3 Äq.), HOBt (0.12 g, 3 Äq.) und DIPEA (493  $\mu\text{L}$ , 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 30b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3+\text{MeOH}$  (100+4) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 49 %,  $R_f$ -Wert = 0.2 (100+4), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{43}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_9$ : 825.50, gefunden: 824.65  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

### 8.7.6 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-D-Orn-Trp) (30c)



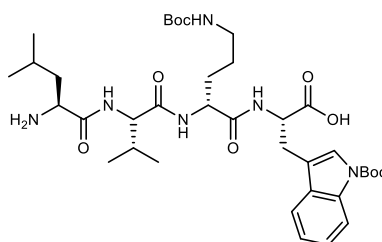
Das Peptid 30b (125 mg, 0.2 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (160+40+3) gereinigt. Das Produkt 30c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 12 %, HPLC (UV) Reinheit: 90 %,  $t_R = 10.63$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}_5$ : 625.3952, gefunden: 626.4054  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.62 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.09 (td,  $J = 8.0, 7.5, 1.2$  Hz, 1H), 7.02 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 4.61 (dd,  $J = 10.6, 4.2$  Hz, 1H), 4.48 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.43 (dd,  $J = 8.6, 5.5$  Hz, 1H), 4.08 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.03 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 3.40 (dd,  $J = 14.7, 4.1$  Hz, 1H), 3.03 (dd,  $J = 14.7, 10.6$  Hz, 1H), 2.41 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.91 (dq,  $J = 13.9, 6.9$  Hz, 1H), 1.72 (dd,  $J = 8.8, 7.0$  Hz, 1H), 1.66 – 1.40 (m, 7H), 1.33 (s, 1H), 1.11 (dq,  $J = 14.6, 6.7$  Hz, 1H), 0.99 – 0.80 (m, 21H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.05, 172.63, 172.44, 172.27, 171.92, 136.73, 127.07, 123.17, 121.11, 118.50, 117.99, 110.87, 109.78, 58.54, 55.23, 53.98, 51.98, 50.74, 40.18, 40.08, 36.88, 30.25, 27.45, 27.11, 27.09, 24.87, 24.49, 21.80, 21.74, 21.13, 20.80, 18.33, 17.27.

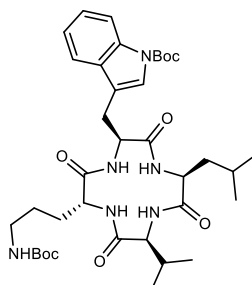
## 8.8 Von Wollamid B abgeleitete Tetrapeptide

### 8.8.1 H<sub>2</sub>N-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (31a)



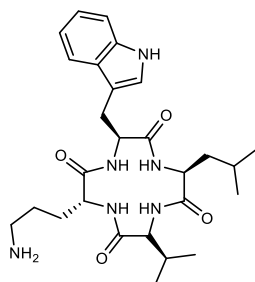
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.47 g, 0.4 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (88 - 103%), ESI-MS berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>: 730.43, gefunden: 753.31 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.8.2 Cyclo(Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (31b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.1 wurde das lineare Peptid 31a (0.26 g, 0.4 mmol) mit HATU (0.40 g, 3 Äq.), HOBt (0.14 g, 3 Äq.) und DIPEA (595 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 31b zu erhalten. Das Produkt fiel aus der EtOAc-Phase aus und wurde nach mehrmaligem Waschen mit DEE als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 28 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.1 (200+3), ESI-MS berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>: 712.42, gefunden: 735.59 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.8.3 Cyclo(Leu-Val-D-Orn-Trp) (31c)

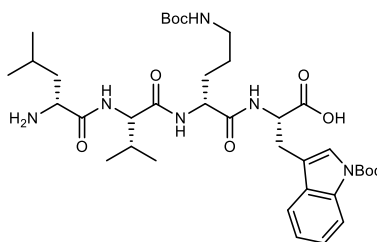


Das Peptid 31b (65 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch exzessives Waschen mit EtOAc gereinigt. Das Produkt 31c wurde als bräunlicher, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 60 %, HPLC (UV) Reinheit: 96 %,  $t_R$  = 9.59 min, HRMS berechnet für  $C_{27}H_{40}N_6O_4$ : 512.3111, gefunden: 513.3180  $[M+H]^+$ .

$^1H$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.56 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.32 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.15 – 7.05 (m, 2H), 7.01 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 4.68 (dd,  $J$  = 9.4, 6.9 Hz, 1H), 4.49 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 3.98 (dd,  $J$  = 9.4, 7.3 Hz, 1H), 3.91 (d,  $J$  = 10.6 Hz, 1H), 3.26 – 3.19 (m, 1H), 3.07 (dd,  $J$  = 14.5, 7.0 Hz, 1H), 2.92 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 2.22 – 2.05 (m, 1H), 1.92 – 1.76 (m, 2H), 1.76 – 1.53 (m, 4H), 1.45 – 1.27 (m, 1H), 1.01 – 0.82 (m, 11H), 0.78 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H).

$^{13}C$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  175.20, 174.06, 173.90, 172.43, 136.63, 127.01, 122.76, 121.10, 118.41, 117.69, 110.88, 108.97, 60.68, 56.34, 56.09, 51.84, 38.91, 38.14, 27.98, 25.51, 25.05, 24.95, 23.67, 21.48, 20.55, 18.17, 17.43.

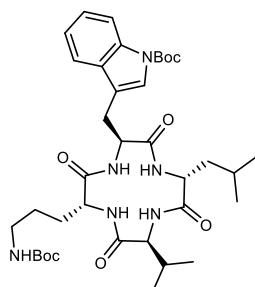
### 8.8.4 $H_2N$ -D-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (32a)



Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.45 g, 0.4 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere

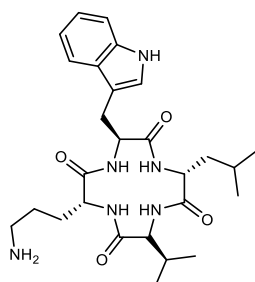
Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (103 %), ESI-MS berechnet für  $C_{37}H_{58}N_6O_9$ : 730.43, gefunden: 753.47  $[M+Na]^+$ .

### 8.8.5 Cyclo(D-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (32b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.1 wurde das lineare Peptid 32a (0.30 g, 0.4 mmol) mit HATU (0.46 g, 3 Äq.), HOBt (0.16 g, 3 Äq.) und DIPEA (680  $\mu$ L, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 32b zu erhalten. Das Produkt fiel aus der EtOAc-Phase aus und wurde nach mehrmaligem Waschen mit DEE als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 70 %, ESI-MS berechnet für  $C_{37}H_{56}N_6O_8$ : 712.42, gefunden: 735.31  $[M+Na]^+$ .

### 8.8.6 Cyclo(D-Leu-Val-D-Orn-Trp) (32c)



Das Peptid 32b (199 mg, 0.3 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch exzessives Waschen mit  $HCCl_3$ :EtOAc (1:1) gereinigt. Das Produkt 32c wurde als gelber, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 24 %, HPLC (UV) Reinheit: 90 %,  $t_R$  = 9.96 min, HRMS berechnet für  $C_{27}H_{40}N_6O_4$ : 512.3111, gefunden: 513.3175  $[M+H]^+$ .

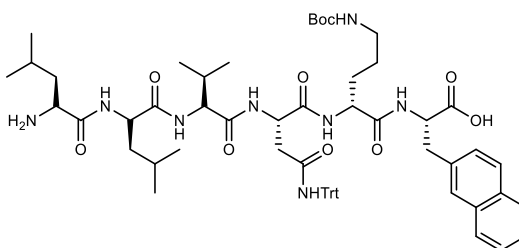
$^1H$  NMR (500 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.55 (dt,  $J$  = 7.9, 0.9 Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J$  = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 7.07 (ddd,  $J$  = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.99 (td,  $J$  = 7.4, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 4.71

(dd,  $J = 9.3, 6.1$  Hz, 1H), 4.43 (dt,  $J = 14.9, 7.4$  Hz, 2H), 3.90 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 3.00 – 2.93 (m, 1H), 2.90 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.15 – 2.05 (m, 1H), 1.89 – 1.78 (m, 1H), 1.73 – 1.49 (m, 4H), 1.47 – 1.27 (m, 2H), 0.93 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 0.88 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.83 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H), 0.80 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.08, 174.03, 173.78, 172.87, 136.59, 127.13, 122.65, 120.95, 118.27, 117.77, 110.79, 109.60, 59.93, 53.83, 51.82, 50.84, 38.83, 36.53, 27.33, 25.02, 24.95, 24.54, 23.57, 21.41, 21.00, 18.16, 17.42.

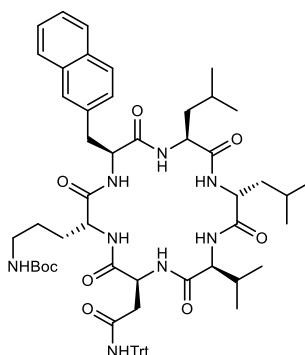
## 8.9 Weitere Derivate

### 8.9.1 $\text{H}_2\text{N-Leu-D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Nal-OH}$ (33a)



Die Synthese startete mit Fmoc-Nal-OH beladenem Harz (0.48 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (115 %), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{63}\text{H}_{82}\text{N}_8\text{O}_{10}$ : 1110.62, gefunden: 1111.57  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

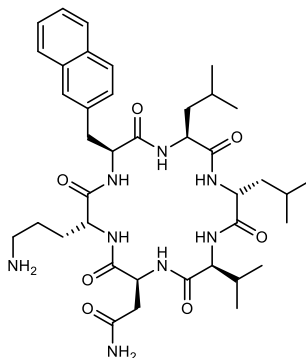
### 8.9.2 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn(Trt)-D-Orn(Boc)-Nal) (33b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 33a (0.24 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.25 g, 3 Äq.), HOBt (0.09 g, 3 Äq.) und DIPEA (374  $\mu\text{L}$ , 10 Äq.) umgesetzt, um das

cyclische Peptid 33b zu erhalten. Das Produkt fiel aus der EtOAc-Phase aus und wurde nach mehrmaligem Waschen mit DEE als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 65 %,  $R_f$ -Wert = 0.3 (100+2), ESI-MS berechnet für  $C_{63}H_{80}N_8O_9$ : 1092.60, gefunden: 1116.18  $[M+Na]^+$ .

### 8.9.3 Cyclo(Leu-D-Leu-Val-Asn-D-Orn-Nal) (33c)

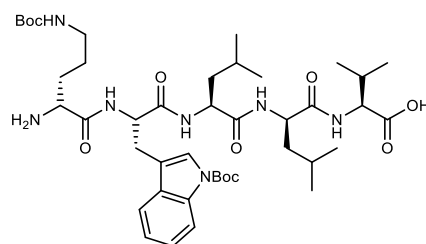


Das Peptid 33b (157 mg, 0.1 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $CHCl_3+MeOH+NH_3$  (170+30+5) gereinigt. Das Produkt 33c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 61 %, HPLC (UV) Reinheit: 96 %,  $t_R$  = 10.46 min, HRMS berechnet für  $C_{39}H_{58}N_8O_7$ : 750.4428, gefunden: 751.4504  $[M+H]^+$ .

$^1H$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.88 – 7.75 (m, 3H), 7.70 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.49 – 7.40 (m, 2H), 7.39 (dd,  $J$  = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 4.69 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 4.64 (dd,  $J$  = 10.3, 4.9 Hz, 1H), 4.52 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 4.44 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 4.21 (dd,  $J$  = 9.1, 5.9 Hz, 1H), 4.08 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 3.36 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 1H), 3.11 – 2.97 (m, 2H), 2.72 (dd,  $J$  = 16.3, 5.2 Hz, 1H), 2.51 – 2.37 (m, 2H), 2.32 (dddt,  $J$  = 11.1, 8.5, 4.4, 2.2 Hz, 1H), 1.70 (dt,  $J$  = 14.2, 7.4 Hz, 2H), 1.65 – 1.40 (m, 6H), 1.28 (s, 3H), 1.02 – 0.95 (m, 9H), 0.92 (dd,  $J$  = 8.2, 6.4 Hz, 9H).

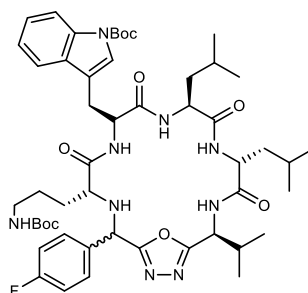
$^{13}C$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.79, 173.42, 172.41, 172.27, 172.12, 171.92, 171.73, 134.35, 133.51, 132.52, 127.79, 127.63, 127.32, 127.18, 126.93, 125.68, 125.31, 59.93, 56.21, 52.62, 52.08, 51.27, 49.90, 40.83, 39.77, 39.41, 37.20, 35.99, 29.11, 26.67, 24.67, 24.50, 21.66, 21.55, 21.25, 21.07, 18.14, 16.36.

### 8.9.4 H<sub>2</sub>N-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-Leu-D-Leu-Val-OH (34a)



Die Synthese startete mit Fmoc-Val-OH beladenem Harz (0.39 g, 0.4 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (127 %), ESI-MS berechnet für C<sub>43</sub>H<sub>69</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>: 843.51, gefunden: 868.08 [M+Na]<sup>+</sup>.

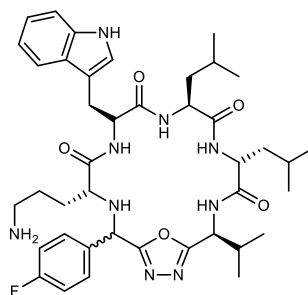
### 8.9.5 Cyclo(D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-Leu-D-Leu-Val-Odz/Aryl(4-F)) (34b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.3 wurde das lineare Peptid 34a (0.43 g, 0.4 mmol) mit para-F-Benzaldehyd (64 µL, 1,5 Äq.) und Pinc (0.12 g, 1 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 34b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCCl<sub>3</sub>+MeOH (100+1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute für beide Diastereomere = 52 %, R<sub>F</sub>-Wert = 0.2 (200+3), ESI-MS berechnet für C<sub>51</sub>H<sub>72</sub>FN<sub>9</sub>O<sub>9</sub>: 973.54, gefunden: 996.56 [M+Na]<sup>+</sup>.



### 8.9.6 Cyclo(D-Orn-Trp-Leu-D-Leu-Val-Odz/Aryl(4-F)) (34c)



Das Peptid 34b (199 mg, 0.2 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch MPLC an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HClCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (185+15+1) gereinigt. Das Produkt 34c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute für beide Diastereomere = 35 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 88 %,  $t_R = 0.86$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{FN}_9\text{O}_5$ : 773.4388, gefunden: 774.4450  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

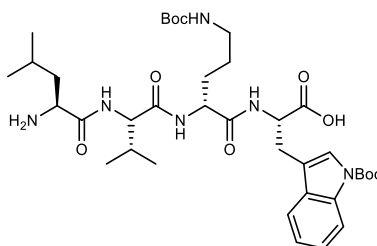
Diastereomerenverhältnis 1:2 an Hand von NMR-Integralen berechnet,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.62 (ddt,  $J = 8.0, 3.8, 1.0$  Hz, 3H), 7.55 – 7.49 (m, 4H), 7.46 – 7.40 (m, 2H), 7.36 – 7.30 (m, 3H), 7.17 (s, 1H), 7.14 (s, 2H), 7.13 – 6.99 (m, 13H), 5.15 (s, 1H), 5.01 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 4.88 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 4.58 (dd,  $J = 8.3, 5.7$  Hz, 2H), 4.40 (ddd,  $J = 18.6, 10.4, 4.8$  Hz, 3H), 4.18 (dd,  $J = 7.8, 6.3$  Hz, 2H), 4.12 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 3.48 – 3.44 (m, 1H), 3.44 – 3.39 (m, 2H), 3.11 (dd,  $J = 14.6, 8.3$  Hz, 2H), 3.07 – 2.97 (m, 3H), 2.35 (dt,  $J = 19.6, 7.1$  Hz, 7H), 2.21 – 2.08 (m, 2H), 1.80 – 1.25 (m, 28H), 1.23 – 1.08 (m, 4H), 1.03 (dd,  $J = 6.7, 2.6$  Hz, 10H), 1.01 – 0.83 (m, 54H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  175.06, 174.35, 172.65, 172.27, 166.91, 166.21, 166.21, 162.76 (d,  $J = 245.9$  Hz), 136.63, 133.60 (d,  $J = 3.1$  Hz), 129.65 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2C), 127.41, 123.69, 121.08, 118.53, 118.02, 114.96 (d,  $J = 21.8$  Hz, 2C), 111.02, 109.15, 59.60, 56.55, 54.98, 52.69, 52.15, 52.02, 40.42, 39.60, 39.00, 30.74, 30.62, 27.81, 27.50, 24.61, 24.38, 22.12, 21.83, 21.27, 19.95, 18.20, 17.87.

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  174.02, 173.15, 172.98, 172.31, 166.88, 165.97, 162.79 (d,  $J = 246.3$  Hz), 136.61, 133.96 (d,  $J = 2.3$  Hz), 129.84 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2C), 127.32, 123.40, 121.11, 117.90, 115.16 (d,  $J = 21.8$  Hz, 2C), 110.94, 109.26, 58.85, 55.20, 53.64,

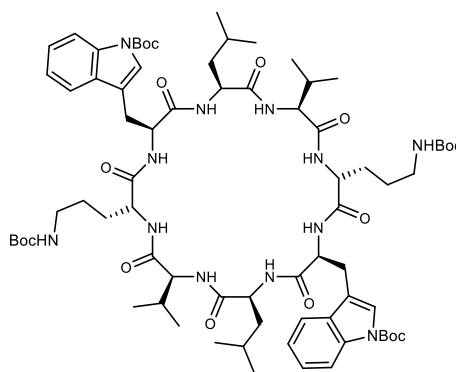
53.27, 51.66, 50.91, 40.53, 40.12, 39.01, 29.58, 27.62, 24.56, 22.02, 21.59, 21.54, 20.16, 18.31, 17.46.

### 8.9.7 NH<sub>2</sub>-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-OH (35a)



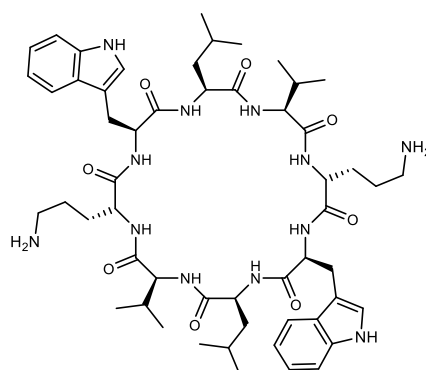
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.44 g, 0.4 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (53 %), ESI-MS berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>: 730.43, gefunden: 729.53 [M-H]<sup>-</sup>.

### 8.9.8 Cyclo(Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Val-D-Orn(Boc)-Trp(Boc)) (35b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 35a (0.16 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.24 g, 3 Äq.), HOBt (0.09 g, 3 Äq.) und DIPEA (357 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 35b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCl<sub>3</sub>+MeOH (200+3) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 24 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.3 (100+3), ESI-MS berechnet für C<sub>74</sub>H<sub>112</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub>: 1424.83, gefunden: 1447.59 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.9.9 Cyclo(Leu-Val-D-Orn-Trp-Leu-Val-D-Orn-Trp) (35c)

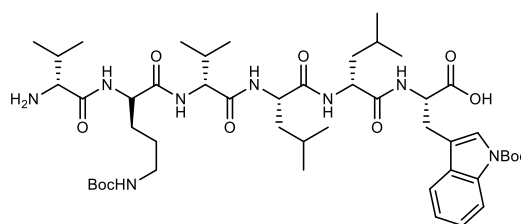


Das Peptid 35b (71 mg, 0.05 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HClCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (160+40+5) gereinigt. Das Produkt 35c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 35 %, HPLC (UV) Reinheit: 94 %,  $t_R = 9.71$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{54}\text{H}_{80}\text{N}_{12}\text{O}_8$ : 1024.6222, gefunden: 1025.6278  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.60 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 2H), 7.31 (dt,  $J = 8.2, 0.8$  Hz, 2H), 7.12 (s, 2H), 7.07 (ddd,  $J = 8.1, 7.1, 1.1$  Hz, 2H), 6.97 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.0$  Hz, 2H), 4.70 (dd,  $J = 10.0, 4.9$  Hz, 2H), 4.43 (dd,  $J = 9.5, 4.4$  Hz, 2H), 4.17 (dd,  $J = 9.2, 5.0$  Hz, 2H), 3.89 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 3.41 (dd,  $J = 14.8, 5.0$  Hz, 2H), 3.15 (dd,  $J = 14.8, 10.0$  Hz, 2H), 2.67 – 2.49 (m, 4H), 2.13 – 1.95 (m, 2H), 1.81 – 1.22 (m, 17H), 1.04 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6H), 0.99 (d,  $J = 6.7$  Hz, 7H), 0.84 (t,  $J = 5.8$  Hz, 13H).

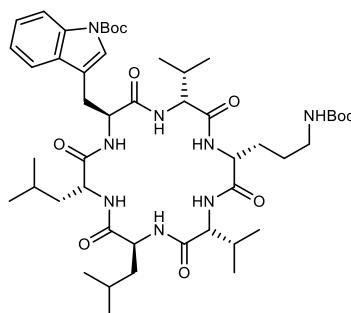
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.43 (2C), 172.71 (2C), 172.53 (4x C), 136.62 (2C), 127.19 (2C), 123.08 (2C), 121.05 (2C), 118.41 (2C), 117.98 (2C), 110.88 (2C), 109.93 (2C), 60.42 (2C), 55.09 (2C), 53.33 (2C), 52.30 (2C), 40.52 (2C), 39.79 (2C), 29.88 (2C), 27.63 (2C), 27.53 (2C), 26.72 (2C), 24.31 (2C), 21.92 (2C), 20.55 (2C), 18.33 (2C), 18.31 (2C).

### 8.9.10 H<sub>2</sub>N-D-Val-D-Orn(Boc)-D-Val-Leu-D-Leu-Trp(Boc)-OH (36a)



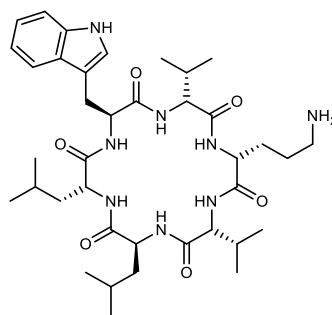
Die Synthese startete mit Fmoc-Trp-OH beladenem Harz (0.22 g, 0.2 mmol) und wurde wie in Kapitel 7.1 beschrieben durchgeführt. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (148 %), ESI-MS berechnet für C<sub>48</sub>H<sub>78</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 942.58, gefunden: 965.47 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.9.11 Cyclo(D-Val-D-Orn(Boc)-D-Val-Leu-D-Leu-Trp(Boc)) (36b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 36a (0.28 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.23 g, 3 Äq.), HOBt (0.08 g, 3 Äq.) und DIPEA (340 µL, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 36b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus HCCl<sub>3</sub>+MeOH (100+2) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 31 %, R<sub>f</sub>-Wert = 0.3 (100+2), ESI-MS berechnet für C<sub>48</sub>H<sub>76</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 924.57, ESI-MS-Gerät stand zu der Zeit nicht zur Verfügung.

### 8.9.12 Cyclo(D-Val-D-Orn-D-Val-Leu-D-Leu-Trp) (36c)



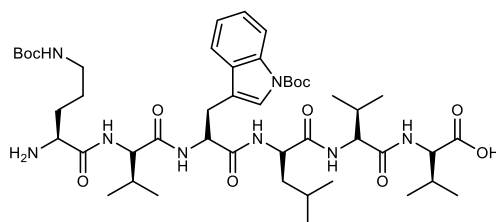
Das Peptid 36b (42 mg, 0.05 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_3$  (180+20+1) gereinigt. Das Produkt 36c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 36 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 97 %,  $t_R = 0.78$  min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_6$ : 724.4636, gefunden: 725.4722  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.59 (dt,  $J = 7.8, 1.0$  Hz, 1H), 7.30 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.11 – 7.04 (m, 2H), 7.00 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 4.60 (dd,  $J = 10.2, 5.7$  Hz, 1H), 4.49 – 4.41 (m, 2H), 4.35 (dd,  $J = 11.8, 3.5$  Hz, 1H), 3.89 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 3.64 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 3.23 (dd,  $J = 13.8, 10.3$  Hz, 1H), 3.12 (dd,  $J = 13.8, 5.7$  Hz, 1H), 2.65 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.11 – 1.94 (m, 2H), 1.91 – 1.38 (m, 12H), 1.07 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.97 (dd,  $J = 10.6, 6.6$  Hz, 6H), 0.93 – 0.82 (m, 9H), 0.65 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 0.44 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.54, 173.39, 173.14, 172.57, 171.61, 136.70, 127.16, 123.26, 120.97, 118.34, 118.00, 110.83, 108.96, 62.34, 59.87, 55.77, 52.58, 51.49, 51.28, 41.00, 40.03, 39.09, 28.88, 28.40, 28.29, 28.09, 26.39, 24.74, 24.41, 22.47, 21.93, 21.10, 19.42, 18.70, 18.08, 17.75, 16.11.

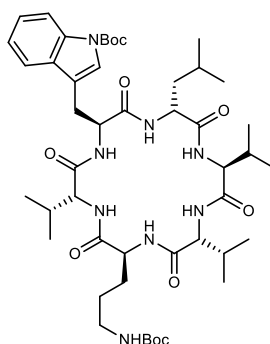
## 8.10 Lugdunin-Derivate

### 8.10.1 NH<sub>2</sub>-Orn(Boc)-D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val-OH (37a)



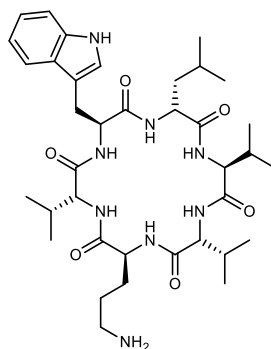
Das lineare Pentapeptid Fmoc-D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val-O-2-CT-Harz (0.22 g, 0.1 mmol) wurde von Bordusa *et al.* bereitgestellt. Wie in Kapitel 7.1 beschrieben wurde Orn(Boc) angefügt und das Peptid vom Harz abgespalten. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (127 %), ESI-MS berechnet für C<sub>47</sub>H<sub>76</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: 928.56, gefunden: 927.80 [M-H]<sup>-</sup>.

### 8.10.2 Cyclo(Orn(Boc)-D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val) (37b)



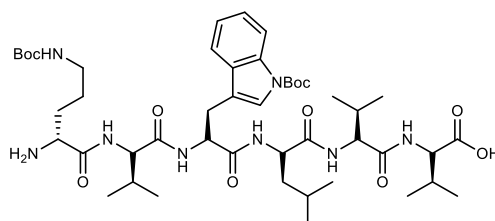
Das lineare Peptid 37a (0.16 g, 0.2 mmol) mit HATU (0.19 g, 3 Äq.), HOBt (0.07 g, 3 Äq.) und DIPEA (287 µL, 10 Äq.) umgesetzt. Das cyclische Peptid 37b präzipitierte als weißer, amorpher Feststoff in DMF. Ausbeute = 33 %, ESI-MS berechnet für C<sub>47</sub>H<sub>74</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 910.55, gefunden: 933.54 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 8.10.3 Cyclo(Orn-D-Val-Trp-D-Leu-Val-D-Val) (37c)



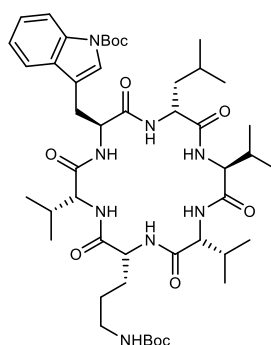
Das Peptid 37b (45 mg, 0.05 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. ESI-MS berechnet für  $C_{47}H_{74}N_8O_{10}$ : 710.45, gefunden: 733.69  $[M+Na]^+$ . Das Rohprodukt konnte aufgrund sehr geringer Löslichkeit nicht weiter gereinigt und charakterisiert werden.

### 8.10.4 $NH_2$ -D-Orn(Boc)D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val-OH (38a)



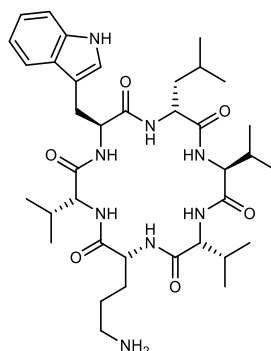
Das lineare Pentapeptid Fmoc-D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val-O-2-CT-Harz (0.22 g, 0.1 mmol) wurde von Bordusa *et al.* bereitgestellt. Wie in Kapitel 7.1 beschrieben wurde D-Orn(Boc) angefügt und das Peptid vom Harz abgespalten. Das lineare Peptid wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Rohausbeute (120 %), ESI-MS berechnet für  $C_{47}H_{76}N_8O_{11}$ : 928.56, gefunden: 927.98  $[M-H]^-$ .

### 8.10.5 Cyclo(D-Orn(Boc)-D-Val-Trp(Boc)-D-Leu-Val-D-Val) (38b)



Nach der Methode aus Kapitel 7.2.2 wurde das lineare Peptid 38a (0.15 g, 0.1 mmol) mit HATU (0.14 g, 3 Äq.), HOBt (0.05 g, 3 Äq.) und DIPEA (204  $\mu$ L, 10 Äq.) umgesetzt, um das cyclische Peptid 38b zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3$ +MeOH (200+3) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 48 %,  $R_f$ -Wert = 0.2 (100+3), ESI-MS berechnet für  $\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{N}_8\text{O}_{10}$ : 910.55, gefunden: 933.49  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### 8.10.6 Cyclo(D-Orn-D-Val-Trp-D-Leu-Val-D-Val) (38c)



Das Peptid 38b (52 mg, 0.06 mmol) wurde entsprechend der in Kapitel 7.3.1 beschriebenen Methode zur Entschützung der Seitenkettenfunktionen mit TFA und TIPS in DCM behandelt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch MPLC an einer Normalphase mit einem Elutionsmittel aus  $\text{HCCl}_3$ +MeOH+ $\text{NH}_3$  (80+20+1) gereinigt. Das Produkt 37c wurde als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Ausbeute = 66 %, UPLC-MS (UV) Reinheit: 88 %,  $t_R$  = 0.71 min, HRMS berechnet für  $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{N}_8\text{O}_6$ : 710.4479, gefunden: 711.4542  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.59 (dt,  $J = 7.8, 1.0$  Hz, 1H), 7.29 (dt,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H), 7.09 – 7.04 (m, 2H), 6.99 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H), 4.72 (dd,  $J = 10.9, 4.1$  Hz, 1H), 4.51 (dd,  $J = 8.3, 5.7$  Hz, 1H), 4.43 (dd,  $J = 9.6, 5.2$  Hz, 1H), 4.19 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 4.00 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 3.66 – 3.55 (m, 1H), 3.43 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 3.01 – 2.91 (m, 1H), 2.66 (hept,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.41 – 2.31 (m, 1H), 2.06 – 1.94 (m, 1H), 1.85 – 1.41 (m, 8H), 1.05 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.99 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 0.96 (t,  $J = 6.8$  Hz, 9H), 0.89 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.84 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.28 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, , Methanol- $d_4$ )  $\delta$  173.58, 173.21, 173.11, 173.09, 171.95, 171.83, 136.81, 127.14, 123.09, 120.92, 118.27, 117.78, 110.82, 110.20, 62.26, 61.04, 59.59, 53.94, 52.53, 51.38, 40.99, 39.94, 28.86, 28.73, 28.53, 28.10, 27.73, 26.31, 24.77, 21.94, 21.13, 18.56, 18.50, 18.45, 18.21, 17.43, 16.21.

## Literaturverzeichnis

1. Paulson, T., A mortal foe. *Nature* **2013**, 502 (7470), S2-S2.
2. WHO, Global tuberculosis report 2018. WHO: Genf, **2018**.
3. Berres, I. Mehr als hundert Personen mit Tuberkulose infiziert - die Fakten. <https://www.spiegel.de/gesundheit/diagnose/tuberkulose-in-deutschland-die-wichtigsten-fragen-und-antworten-a-1280184.html> (accessed 04.09.2019, 15:54 Uhr).
4. joe/dpa Tuberkulose nimmt in Deutschland weiter zu. <https://www.spiegel.de/gesundheit/diagnose/tuberkulose-nimmt-in-deutschland-weiter-zu-a-1140079.html> (accessed 04.09.2019, 16:32 Uhr).
5. 2016 fast 6000 Tuberkulosefälle in Deutschland. <https://www.fr.de/wissen/2016-fast-6000-tuberkulosefaelle-deutschland-11046600.html> (accessed 04.09.2019, 16:49 Uhr).
6. Schweppe, C. Sieben Fälle von Tuberkulose an Münchner Schule. <https://www.welt.de/politik/deutschland/article175438797/Infektion-Sieben-Faelle-von-Tuberkulose-an-Muenchner-Schule.html> (accessed 04.09.2019 16:48 Uhr).
7. Brodhun, B.; Altmann, D.; Hauer, B.; Haas, W., RKI-Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2017. **2018**.
8. WHO; Germany - Tuberculose Profile 2017. [https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO\\_HQ\\_Reports%2FG2%2FPROD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=DE&LAN=EN&outtype=html](https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Reports%2FG2%2FPROD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=DE&LAN=EN&outtype=html) (accessed 10.10.19, 11:44).
9. Jones, K. D.; Hesketh, T.; Yudkin, J., Extensively drug-resistant tuberculosis in sub-Saharan Africa: an emerging public-health concern. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2008**, 102 (3), 219-224.
10. Diel, R.; Loytved, G.; Nienhaus, A.; Castell, S.; Detjen, A.; Geerdes-Fenge, H.; Haas, W.; Hauer, B.; Königstein, B.; Maffei, D., Neue Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. *Pneumologie* **2011**, 65 (06), 359-378.
11. Robert-Koch-Institut Tuberkulose, RKI-Ratgeber. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Tuberkulose.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html) (accessed 06.09.2019, 17:00 Uhr).
12. Madison, B. M., Application of stains in clinical microbiology. *Biotechnic & Histochemistry* **2001**, 76 (3), 119-125.
13. Lee, R. E.; Brennan, P. J.; Besra, G. S., *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. In *Tuberculosis*, Springer: Berlin, **1996**; pp 1-27.
14. Tamura, S., Zur Chemie der Bakterien. I. Mitteilung. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1913**, 87 (2), 85-114.

15. Schleifer, K. H.; Kandler, O., Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* **1972**, *36* (4), 407.
16. Brennan, P. J., Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **2003**, *83* (1-3), 91-97.
17. Barry, C. E.; Crick, D. C.; McNeil, M. R., Targeting the formation of the cell wall core of *M. tuberculosis*. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)* **2007**, *7* (2), 182-202.
18. Velasco-Velázquez, M. A.; Barrera, D.; González-Arenas, A.; Rosales, C.; Agramonte-Hevia, J., Macrophage - *Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. *Microbial pathogenesis* **2003**, *35* (3), 125-131.
19. Strohmeier, G. R.; Fenton, M. J., Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes and infection* **1999**, *1* (9), 709-717.
20. Camacho, L. R.; Constant, P.; Raynaud, C.; Lanéelle, M.-A.; Triccas, J. A.; Gicquel, B.; Daffé, M.; Guilhot, C., Analysis of the Phthiocerol Dimycocerosate Locus of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (23), 19845-19854.
21. Kleinnijenhuis, J.; Oosting, M.; Joosten, L. A.; Netea, M. G.; Van Crevel, R., Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Developmental Immunology* **2011**, 2011.
22. Rodrigues, L. C.; Diwan, V. K.; Wheeler, J. G., Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *International journal of epidemiology* **1993**, *22* (6), 1154-1158.
23. Macgregor, G. A., BCG: Bad News from India. *The Lancet* **1980**, *315* (8163), 73-74.
24. Schaberg, T.; Bauer, T.; Brinkmann, F.; Diel, R.; Feiterna-Sperling, C.; Haas, W.; Hartmann, P.; Hauer, B.; Heyckendorf, J.; Lange, C.; Nienhaus, A.; Otto-Knapp, R.; Priwitzer, M.; Richter, E.; Rumetshofer, R.; Schenkel, K.; Schoch, O. D.; Schonfeld, N.; Stahlmann, R., Tuberculosis Guideline for Adults - Guideline for Diagnosis and Treatment of Tuberculosis including LTBI Testing and Treatment of the German Central Committee (DZK) and the German Respiratory Society (DGP). *Pneumologie* **2017**, *71* (6), 325-397.
25. Walker, T. M.; Kohl, T. A.; Omar, S. V.; Hedge, J.; Elias, C. D. O.; Bradley, P.; Iqbal, Z.; Feuerriegel, S.; Niehaus, K. E.; Wilson, D. J., Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *The Lancet infectious diseases* **2015**, *15* (10), 1193-1202.
26. WHO, *WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment*. Genf, **2019**.
27. Günther, G.; Van Leth, F.; Alexandru, S.; Altet, N.; Avsar, K.; Bang, D.; Barbuta, R.; Bothamley, G.; Ciobanu, A.; Crudu, V., Multidrug-resistant tuberculosis in Europe, 2010–2011. *Emerging infectious diseases* **2015**, *21* (3), 409.

28. Horne, D. J.; Pinto, L. M.; Arentz, M.; Lin, S.-Y. G.; Desmond, E.; Flores, L. L.; Steingart, K. R.; Minion, J., Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO-endorsed phenotypic drug susceptibility testing methods for first-line and second-line antituberculosis drugs. *Journal of clinical microbiology* **2013**, *51* (2), 393-401.
29. Johansen, S. K.; Maus, C. E.; Plikaytis, B. B.; Douthwaite, S., Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *tlyA*-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Molecular cell* **2006**, *23* (2), 173-182.
30. Maus, C. E.; Plikaytis, B. B.; Shinnick, T. M., Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2005**, *49* (2), 571-577.
31. Merrifield, R. B., Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85* (14), 2149-2154.
32. Sheppard, R. C., Introduction - a retrospective viewpoint. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach*, Chan, W. C.; White, P. D., Eds. Oxford University Press: Oxford, **2000**; pp 1-8.
33. Shelton, P. T.; Jensen, K. J., Linkers, Resins, and General Procedures for Solid-Phase Peptide Synthesis. In *Peptide Synthesis and Applications*, 2 ed.; Jensen, K. J.; Shelton, P. T.; Pedersen, S. L., Eds. Springer: New York, **2013**; pp 23-41.
34. Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G., Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides<sup>1,2,3</sup>. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (22), 5441-5452.
35. Pedersen, S. L.; Jensen, K. J., Peptide Release, Side-Chain Deprotection, Work-Up, and Isolation. In *Peptide Synthesis and Applications*, 2 ed.; Jensen, K. J.; Shelton, P. T.; Pedersen, S. L., Eds. Springer: New York, **2013**; pp 43-63.
36. Beyermann, M.; Bienert, M., Synthesis of difficult peptide sequences: a comparison of Fmoc-and Boc-technique. *Tetrahedron letters* **1992**, *33* (26), 3745-3748.
37. Carpino, L. A.; Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92* (19), 5748-5749.
38. Fields, C. G.; Fields, G. B., Minimization of tryptophan alkylation following 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34* (42), 6661-6664.
39. Carpino, L. A.; Shroff, H.; Triolo, S. A.; Mansour, E.-S. M.; Wenschuh, H.; Albericio, F., The 2, 2, 4, 6, 7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. *Tetrahedron letters* **1993**, *34* (49), 7829-7832.

40. Jensen, K. J., Solid-Phase Peptide Synthesis: An Introduction. In *Peptide Synthesis and Applications*, 2 ed.; Jensen, K. J.; Shelton, P. T.; Pedersen, S. L., Eds. Springer: New York, **2013**; pp 1-21.
41. Palasek, S. A.; Cox, Z. J.; Collins, J. M., Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society* **2007**, *13* (3), 143-148.
42. Mergler, M.; Dick, F.; Sax, B.; Schwindling, J.; Vorherr, T., Synthesis and Application of Fmoc-His (3-Bum)-OH. *Journal of Peptide Science* **2001**, *7* (9), 502-510.
43. Kunz, H.; Unverzagt, C., The allyloxycarbonyl (Aloc) moiety - conversion of an unsuitable into a valuable amino protecting group for peptide synthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1984**, *23* (6), 436-437.
44. König, W.; Geiger, R., Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen. *Chemische Berichte* **1970**, *103* (3), 788-798.
45. Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A.; Albericio, F., Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, (2), 201-203.
46. Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B., PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31* (2), 205-208.
47. RÖMPP online; Hartmann-Schreier, J. Proteine. (accessed 12.09.19, 10:27 Uhr).
48. Snyder, S. H., Brain peptides as neurotransmitters. *Science* **1980**, *209* (4460), 976-983.
49. Keverne, E. B.; Curley, J. P., Vasopressin, oxytocin and social behaviour. *Current opinion in neurobiology* **2004**, *14* (6), 777-783.
50. Ganz, T., Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews immunology* **2003**, *3* (9), 710.
51. Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *nature* **2002**, *415* (6870), 389.
52. Giuliani, A.; Pirri, G.; Nicoletto, S., Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences* **2007**, *2* (1), 1-33.
53. Strömstedt, A. A.; Ringstad, L.; Schmidtchen, A.; Malmsten, M., Interaction between amphiphilic peptides and phospholipid membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2010**, *15* (6), 467-478.
54. Chen, F.-Y.; Lee, M.-T.; Huang, H. W., Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophysical journal* **2003**, *84* (6), 3751-3758.

55. Huang, H. W., Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model. *Biochemistry* **2000**, *39* (29), 8347-8352.
56. Hancock, R. E. W.; Chapple, D. S., Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43* (6), 1317-1323.
57. Wu, M.; Maier, E.; Benz, R.; Hancock, R. E., Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **1999**, *38* (22), 7235-7242.
58. Zhang, L.; Dhillon, P.; Yan, H.; Farmer, S.; Hancock, R. E. W., Interactions of Bacterial Cationic Peptide Antibiotics with Outer and Cytoplasmic Membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, *44* (12), 3317-3321.
59. Patrzykat, A.; Friedrich, C. L.; Zhang, L.; Mendoza, V.; Hancock, R. E., Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2002**, *46* (3), 605-614.
60. Boman, H. G.; Agerberth, B.; Boman, A., Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and immunity* **1993**, *61* (7), 2978-2984.
61. Hopkins, A. L.; Groom, C. R., The druggable genome. *Nature reviews Drug discovery* **2002**, *1* (9), 727.
62. Ribeiro, A. L. d. J. L.; Degiacomi, G.; Ewann, F.; Buroni, S.; Incandela, M. L.; Chiarelli, L. R.; Mori, G.; Kim, J.; Contreras-Dominguez, M.; Park, Y.-S., Analogous mechanisms of resistance to benzothiazinones and dinitrobenzamides in *Mycobacterium smegmatis*. *PloS one* **2011**, *6* (11), e26675.
63. Mor, A., Peptide-based antibiotics: A potential answer to raging antimicrobial resistance. *Drug Development Research* **2000**, *50* (3-4), 440-447.
64. Kalfa, V. C.; Jia, H. P.; Kunkle, R. A.; McCray, P. B.; Tack, B.; Brogden, K., Congeners of SMAP29 kill ovine pathogens and induce ultrastructural damage in bacterial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2001**, *45* (11), 3256-3261.
65. Zasloff, M., Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84* (15), 5449-5453.
66. Boman, H. G., Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual review of immunology* **1995**, *13* (1), 61-92.
67. Conte, L. L.; Chothia, C.; Janin, J., The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of molecular biology* **1999**, *285* (5), 2177-2198.

68. Su, C.-M.; Jensen, L.; Heimer, E.; Felix, A.; Pan, Y.-C.; Mowles, T., *In vitro* stability of growth hormone releasing factor (GRF) analogs in porcine plasma. *Hormone and metabolic research* **1991**, *23* (01), 15-21.
69. Hogben, C. A. M.; Tocco, D. J.; Brodie, B. B.; Schanker, L. S., On the mechanism of intestinal absorption of drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1959**, *125*, 275-282.
70. Dougherty, P. G.; Qian, Z.; Pei, D., Macrocycles as protein-protein interaction inhibitors. *Biochemical Journal* **2017**, *474* (7), 1109-1125.
71. Hancock, R. E., Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet infectious diseases* **2001**, *1* (3), 156-164.
72. Gelbe Liste Colistin. [https://www.gelbe-liste.de/produkte/Colistimethat-Natrium-Infectopharm-1-Mio-l-E-Pulver-zur-Herstellung-einer-Injektions-oder-Infusionsloesung\\_545153/fachinformation](https://www.gelbe-liste.de/produkte/Colistimethat-Natrium-Infectopharm-1-Mio-l-E-Pulver-zur-Herstellung-einer-Injektions-oder-Infusionsloesung_545153/fachinformation) (accessed 23.09.19, 14:56).
73. Peschel, A.; Otto, M.; Jack, R. W.; Kalbacher, H.; Jung, G.; Götz, F., Inactivation of the *dlt* Operon in *Staphylococcus aureus* Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274* (13), 8405-8410.
74. McPhee, J. B.; Lewenza, S.; Hancock, R. E., Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* **2003**, *50* (1), 205-217.
75. Belas, R.; Manos, J.; Suvanasuthi, R., *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infection and immunity* **2004**, *72* (9), 5159-5167.
76. Khalil, Z. G.; Salim, A. A.; Lacey, E.; Blumenthal, A.; Capon, R. J., Wollamides: antimycobacterial cyclic hexapeptides from an Australian soil *Streptomyces*. *Organic Letters* **2014**, *16* (19), 5120-3.
77. Asfaw, H.; Laqua, K.; Walkowska, A. M.; Cunningham, F.; Martinez-Martinez, M. S.; Cuevas-Zurita, J. C.; Ballell-Pages, L.; Imming, P., Design, synthesis and structure-activity relationship study of wollamide B; a new potential anti TB agent. *PLoS One* **2017**, *12* (4), e0176088.
78. Tsutsumi, L. S.; Elmore, J. M.; Dang, U. T.; Wallace, M. J.; Marreddy, R.; Lee, R. B.; Tan, G. T.; Hurdle, J. G.; Lee, R. E.; Sun, D., Solid-Phase Synthesis and Antibacterial Activity of Cyclohexapeptide Wollamide B Analogs. *ACS Combinatorial Science* **2018**, *20* (3), 172-185.
79. Chen, Y. X.; Liu, C.; Liu, N.; Wu, Y.; Zhao, Q. J.; Hu, H. G.; Li, X.; Zou, Y., Total Synthesis and Antibacterial Study of Cyclohexapeptides Desotamide B, Wollamide B and Their Analogs. *Chem Biodivers* **2018**, *15* (1).

80. Khalil, Z. G.; Hill, T. A.; De Leon Rodriguez, L. M.; Lohman, R. J.; Hoang, H. N.; Reiling, N.; Hillemann, D.; Brimble, M. A.; Fairlie, D. P.; Blumenthal, A.; Capon, R. J., Structure-Activity Relationships of Wollamide Cyclic Hexapeptides with Activity against Drug-Resistant and Intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2019**, *63* (3), e01773-18.
81. Terlain, B.; Thomas, J., Structure of griselimycin, polypeptide antibiotic extracted Streptomyces cultures. I. Identification of the products liberated by hydrolysis. *Bulletin de la Societe chimique de France* **1971**, *6*, 2349-2356.
82. Toyohara, M. In *Aspects of the antituberculous activity of 27753-RP, a new semisynthetic derivative of griselimycine*, Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie, Elsevier: 1987; pp 737-744.
83. Kling, A.; Lukat, P.; Almeida, D. V.; Bauer, A.; Fontaine, E.; Sordello, S.; Zaburanyi, N.; Herrmann, J.; Wenzel, S. C.; König, C., Targeting DnaN for tuberculosis therapy using novel griselimycins. *Science* **2015**, *348* (6239), 1106-1112.
84. Doak, B. C.; Zheng, J.; Dobritsch, D.; Kihlberg, J., How beyond rule of 5 drugs and clinical candidates bind to their targets. *Journal of medicinal chemistry* **2015**, *59* (6), 2312-2327.
85. Asfaw, H.; Wetzlar, T.; Martinez-Martinez, M. S.; Imming, P., An efficient synthetic route for preparation of antimycobacterial wollamides and evaluation of their in vitro and in vivo efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2018**, *28* (17), 2899-2905.
86. Chatterjee, J.; Laufer, B.; Kessler, H., Synthesis of N-methylated cyclic peptides. *Nature Protocols* **2012**, *7* (3), 432-44.
87. Chan, W. C.; White, P. D., Basic Procedures. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach*, Chan, W. C.; White, P. D., Eds. Oxford University Press: Oxford, **2000**; pp 41-74.
88. Kaiser, E.; Colescott, R.; Bossinger, C.; Cook, P., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical biochemistry* **1970**, *34* (2), 595-598.
89. Comins, D. L.; Joseph, S. P., *N,N*-Dimethylformamide. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* **2001**.
90. Frost, J. R.; Scully, C. C.; Yudin, A. K., Oxadiazole grafts in peptide macrocycles. *Nature Chemistry* **2016**, *8* (12), 1105-1111.
91. Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F., Use of Alloc-amino acids in solid-phase peptide synthesis. Tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38* (41), 7275-7278.
92. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S. K., Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis* **2016**, *6* (2), 71-79.



93. Wang, J.; McIntosh, F.; Radomski, N.; Dewar, K.; Simeone, R.; Enninga, J.; Brosch, R.; Rocha, E. P.; Veyrier, F. J.; Behr, M. A., Insights on the emergence of *Mycobacterium tuberculosis* from the analysis of *Mycobacterium kansasii*. *Genome biology and evolution* **2015**, *7* (3), 856-70.
94. Stahl, D. A.; Urbance, J. W., The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *Journal of Bacteriology* **1990**, *172* (1), 116-124.
95. Gill, W. P.; Harik, N. S.; Whiddon, M. R.; Liao, R. P.; Mittler, J. E.; Sherman, D. R., A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine* **2009**, *15* (2), 211-4.
96. Crowther, G. S.; Wilcox, M. H., Antibiotic therapy and *Clostridium difficile* infection - primum non nocere - first do no harm. *Infect Drug Resist* **2015**, *8*, 333-7.
97. Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene, Gesundheitliche Bedeutung, Prävention und Kontrolle wasser-assoziiertes *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen. *Hygiene & Medizin* **2016**, *41* (2), 1-36.
98. Leclercq, R.; Cantón, R.; Brown, D. F.; Giske, C. G.; Heisig, P.; MacGowan, A. P.; Mouton, J. W.; Nordmann, P.; Rodloff, A. C.; Rossolini, G. M., EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**, *19* (2), 141-160.
99. WHO; WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed 20.08.2019, 10:35).
100. Asfaw, H. Design, synthesis and biological evaluation of two classes of antimycobacterial cyclic hexa(depsi)peptides. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), **2017**.
101. Livermore, D. M.; Woodford, N., The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in microbiology* **2006**, *14* (9), 413-420.
102. Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J., Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases* **2009**, *48* (1), 1-12.
103. Henwood, C. J.; Gatward, T.; Warner, M.; James, D.; Stockdale, M. W.; Spence, R. P.; Towner, K. J.; Livermore, D. M.; Woodford, N., Antibiotic resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* in the UK, and *in vitro* evaluation of tigecycline (GAR-936). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2002**, *49* (3), 479-487.
104. Matuschek, E.; Brown, D. F.; Kahlmeter, G., Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* **2014**, *20* (4), O255-O266.
105. Dahl, S. G., Active metabolites of neuroleptic drugs: possible contribution to therapeutic and toxic effects. *Therapeutic drug monitoring* **1982**, *4* (1), 33-40.

106. Savi, P.; Pereillo, J.; Uzabiaga, M.; Combalbert, J.; Picard, C.; Maffrand, J.; Pascal, M.; Herbert, J., Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thrombosis and haemostasis* **2000**, *84* (11), 891-896.
107. Prentis, R. A.; Lis, Y.; Walker, S. R., Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *British journal of clinical pharmacology* **1988**, *25*, 387-396.
108. Di, L.; Kerns, E. H.; Carter, G. T., Drug-like Property Concepts in Pharmaceutical Design. *Current Pharmaceutical Design* **2009**, *15*, 2184-2194.
109. Kola, I.; Landis, J., Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature reviews Drug discovery* **2004**, *3* (8), 711-715.
110. Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R., A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research* **1995**, *12* (3), 413-420.
111. Bohnert, T.; Gan, L. S., Plasma protein binding: from discovery to development. *J Pharm Sci* **2013**, *102* (9), 2953-94.
112. Fournier, T.; Najet, M.-N.; Porquet, D., Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, *1482*, 157-171.
113. Trainor, G. L., The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* **2007**, *2* (1), 51-64.
114. Fortuna, A.; Alves, G.; Soares-da-Silva, P.; Falcao, A., Optimization of a parallel artificial membrane permeability assay for the fast and simultaneous prediction of human intestinal absorption and plasma protein binding of drug candidates: application to dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide derivatives. *J Pharm Sci* **2012**, *101* (2), 530-40.
115. Lindup, W. E.; Orme, M. C., Plasma protein binding of drugs. *British medical journal* **1981**, *282*, 212-214.
116. Benet, L. Z.; Hoener, B. A., Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* **2002**, *71* (3), 115-21.
117. Smith, D. A.; Di, L.; Kerns, E. H., The effect of plasma protein binding on *in vivo* efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* **2010**, *9* (12), 929-39.
118. Yang, Y.; Engkvist, O.; Llinas, A.; Chen, H., Beyond size, ionization state, and lipophilicity: influence of molecular topology on absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity for druglike compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55* (8), 3667-77.
119. Colmenarejo, G.; Alvarez-Pedraglio, A.; Lavandera, J.-L., Cheminformatic Models to predict binding affinities to human serum albumin. *J Med Chem* **2001**, *44*, 4370-4378.

120. Lázniček, M.; Lázničková, A., The effect of lipophilicity on the protein binding and blood cell uptake of some acidic drugs. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **1995**, *13* (7), 823-828.
121. Wils, P.; Warnery, A.; Phung-Ba, V.; Legrain, S.; Scherman, D., High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1994**, *269* (2), 654-658.
122. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23*, 3-25.
123. Finkler, A. E.; Hall, C. A., Nature of the relationship between vitamin B12 binding and cell uptake. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1967**, *120* (1), 79-85.
124. Chen, C.-P.; Wagner, C., Folate Transport in the Choroid Plexus. *Life Science* **1975**, *16*, 1571-1582.
125. Bretschneider, B.; Brandsch, M.; Neubert, R., Intestinal transport of  $\beta$ -lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H<sup>+</sup>/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharmaceutical research* **1999**, *16* (1), 55-61.
126. Doak, B. C.; Over, B.; Giordanetto, F.; Kihlberg, J., Oral druggable space beyond the rule of 5: insights from drugs and clinical candidates. *Chem Biol* **2014**, *21* (9), 1115-42.
127. Consortium, H. G. S., Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **2004**, *431*, 931-945.
128. Kim, M.-S.; Pinto, S. M.; Getnet, D.; Nirujogi, R. S.; Manda, S. S.; Chaerkady, R.; Madugundu, A. K.; Kelkar, D. S.; Isserlin, R.; Jain, S., A draft map of the human proteome. *Nature* **2014**, *509* (7502), 575.
129. Ellard, G.; Fourie, P., Rifampicin bioavailability: a review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity for ensuring optimal absorption. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **1999**, *3* (11), S301-S308.
130. Follath, F.; Wen, M.; Vozeh, S.; Thiel, G.; Brunner, F.; Loertscher, R.; Lemaire, M.; Nussbaumer, K.; Niederberger, W.; Wood, A., Intravenous cyclosporine kinetics in renal failure. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **1983**, *34* (5), 638-643.
131. Ptachcinski, R. J.; Venkataramanan, R.; Rosenthal, J. T.; Burckart, G. J.; Taylor, R. J.; Hakala, T. R., Cyclosporine kinetics in renal transplantation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **1985**, *38* (3), 296-300.
132. Veber, D. F.; Freidinger, R. M.; Schwenk Perlow, D.; Palevede Jr, W. J.; Holly, F. W.; Stachan, R. G.; Nutt, R. F.; Arison, B. H.; Homnick, C.; Randall, W. C.; Glitzer, M. S.; Saperstein, R.; Hirschmann, R., A potent cyclic hexapeptide analogue of somatostatin. *Nature* **1981**, *292*, 55-58.

133. Ahlbach, C. L.; Lexa, K. W.; Bockus, A. T.; Chen, V.; Crews, P.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S., Beyond cyclosporine A: conformation-dependent passive membrane permeabilities of cyclic peptide natural products. *Future Med Chem* **2015**, *7* (16), 2121-30.
134. DeGoey, D. A.; Chen, H. J.; Cox, P. B.; Wendt, M. D., Beyond the Rule of 5: Lessons Learned from AbbVie's Drugs and Compound Collection. *J Med Chem* **2018**, *61* (7), 2636-2651.
135. Krämer, S. D.; Aschmann, H. E.; Hatibovic, M.; Hermann, K. F.; Neuhaus, C. S.; Brunner, C.; Belli, S., When barriers ignore the "rule-of-five". *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *101*, 62-74.
136. Beck, J. G.; Chatterjee, J.; Laufer, B.; Kiran, M. U.; Frank, A. O.; Neubauer, S.; Ovadia, O.; Greenberg, S.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H., Intestinal permeability of cyclic peptides: common key backbone motifs identified. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (29), 12125-33.
137. Ovadia, O.; Greenberg, S.; Chatterjee, J.; Laufer, B.; Opperer, F.; Kessler, H.; Gilon, C.; Hoffman, A., The effect of multiple N-methylation on intestinal permeability of cyclic hexapeptides. *Molecular pharmaceutics* **2011**, *8* (2), 479-87.
138. Biron, E.; Chatterjee, J.; Ovadia, O.; Langenegger, D.; Brueggen, J.; Hoyer, D.; Schmid, H. A.; Jelinek, R.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H., Improving oral bioavailability of peptides by multiple N-methylation: somatostatin analogues. *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47* (14), 2595-9.
139. Rand, A. C.; Leung, S. S.; Eng, H.; Rotter, C. J.; Sharma, R.; Kalgutkar, A. S.; Zhang, Y.; Varma, M. V.; Farley, K. A.; Khunte, B.; Limberakis, C.; Price, D. A.; Liras, S.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S., Optimizing PK properties of cyclic peptides: the effect of side chain substitutions on permeability and clearance. *Medchemcomm* **2012**, *3* (10), 1282-1289.
140. Ono, S.; Naylor, M. R.; Townsend, C. E.; Okumura, C.; Okada, O.; Lokey, R. S., Conformation and Permeability: Cyclic Hexapeptide Diastereomers. *Journal of chemical information and modeling* **2019**.
141. White, T. R.; Renzelman, C. M.; Rand, A. C.; Rezai, T.; McEwen, C. M.; Gelev, V. M.; Turner, R. A.; Lington, R. G.; Leung, S. S.; Kalgutkar, A. S.; Bauman, J. N.; Zhang, Y.; Liras, S.; Price, D. A.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S., On-resin N-methylation of cyclic peptides for discovery of orally bioavailable scaffolds. *Nature Chemical Biology* **2011**, *7* (11), 810-7.
142. Thiel, M.; Choukèr, A., Leber. In *Die Anästhesiologie*, Springer: **2012**; pp 95-105.
143. Hedin, S. G., On the Presence of a proteolytic Enzyme in the normal Serum of the Ox. *Journal of Physiology* **1903**, *30*, 195-201.

144. Kerlan, V.; Dreano, Y.; Bercovici, J.; Beaune, P.; Floch, H.; Berthou, F., Nature of cytochromes P450 involved in the 2-/4-hydroxylations of estradiol in human liver microsomes. *Biochemical pharmacology* **1992**, *44* (9), 1745-1756.
145. Imaoka, S.; Enomoto, K.; Oda, Y.; Asada, A.; Fujimori, M.; Shimada, T.; Fujita, S.; Guengerich, F.; Funae, Y., Lidocaine metabolism by human cytochrome P-450s purified from hepatic microsomes: comparison of those with rat hepatic cytochrome P-450s. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1990**, *255* (3), 1385-1391.
146. Greene, D. L.; Hau, V. S.; Abbruscato, T. J.; Bartosz, H.; Misicka, A.; Lipkowski, A. W.; Hom, S.; Gillespie, T. J.; Hruby, V. J.; Davis, T. P., Enkephalin Analog Prodrugs: Assessment of *in vitro* conversion, enzyme cleavage characterization and blood-brain barrier permeability. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1996**, *277*, 1366-1375.
147. Pearce, R. E.; Rodrigues, A. D.; Goldstein, J. A.; Parkinson, A., Identification of the Human P450 Enzymes Involved in Lansoprazole Metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1996**, *277*, 805-816.
148. Khalil, Z. G., Wollamides - Antimycobacterial Cyclic Hexapeptides from an Australian Soil Streptomyces. *Organic Letters* **2014**.
149. Tsutsumi, L. S.; Tan, G. T.; Sun, D., Solid-phase synthesis of cyclic hexapeptides wollamides A, B and desotamide B. *Tetrahedron Letters* **2017**, *58* (27), 2675-2680.
150. Chen, Total Synthesis and Antibacterial Study of Wollamide B and analogs. *Chemistry & Biodiversity* **2017**.
151. Carmona, G.; Rodriguez, A.; Juarez, D.; Corzo, G.; Villegas, E., Improved protease stability of the antimicrobial peptide Pin2 substituted with D-amino acids. *The protein journal* **2013**, *32* (6), 456-466.
152. Hamamoto, K.; Kida, Y.; Zhang, Y.; Shimizu, T.; Koichi, K., Antimicrobial Activity and Stability to Proteolysis of Small Linear Cationic Peptides with D-Amino Acid Substitutions. *Microbiology and Immunology* **2013**, *46* (11), 741-749.
153. Feng, Z.; Xu, B., Inspiration from the mirror: D-amino acid containing peptides in biomedical approaches. *Biomolecular concepts* **2016**, *7* (3), 179-187.
154. Borchardt, R. T., Optimizing oral absorption of peptides using prodrug strategies. *Journal of controlled release* **1999**, *62* (1-2), 231-238.
155. Weber, S. J.; Greene, D. L.; Hruby, V. J.; Yamamura, H. I.; Porreca, F.; Davis, T. P., Whole body and brain distribution of [3H]cyclic [D-Pen2, D-Pen5] enkephalin after intraperitoneal, intravenous, oral and subcutaneous administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1992**, *263* (3), 1308-1316.
156. Asfaw, H.; Laqua, K.; Walkowska, A. M.; Cunningham, F.; Martinez-Martinez, M. S.; Cuevas-Zurita, J. C.; Ballell-Pages, L.; Imming, P., Design, synthesis and structure-

activity relationship study of wollamide B; a new potential anti TB agent. *PLoS One* **2017**, *12* (4), 1-21.

157. Bockus, A. T.; McEwen, C. M.; Lokey, R. S., Form and function in cyclic peptide natural products: a pharmacokinetic perspective. *Current topics in medicinal chemistry* **2013**, *13* (7), 821-836.

158. Pauletti, G. M.; Gangwar, S.; Knipp, G. T.; Nerurkar, M. M.; Okumu, F. W.; Tamura, K.; Siahaan, T. J.; Borchardt, R. T., Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. *Journal of controlled release* **1996**, *41*, 3-17.

159. Falanga, A.; Nigro, E.; De Biasi, M. G.; Daniele, A.; Morelli, G.; Galdiero, S.; Scudiero, O., Cyclic Peptides as Novel Therapeutic Microbicides: Engineering of Human Defensin Mimetics. *Molecules* **2017**, *22* (7).

160. Timbrell, J. A.; Marrs, T. C., Biotransformation of xenobiotics. *General, Applied and Systems Toxicology* **2009**.

161. Fitzpatrick, P. F., Tetrahydropterin-Dependent Amino Acid Hydroxylases. *Annual Review of Biochemistry* **1999**, *68*, 355-381.

162. Labbé, L.; Turgeon, J., Clinical pharmacokinetics of mexiletine. *Clinical Pharmacokinetics* **1999**, *37*, 361-384.

163. Butler, T. C., The metabolic hydroxylation of phenobarbital. *J Pharm Exp Ther* **1956**, *116*, 326-336.

164. Stierlin, H.; Faigle, J. W.; Sallmann, A.; Kung, W.; Richter, W. J.; Kriemler, H. P.; Alt, K. O.; Winkler, T., Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren®) in animals and in man. *Xenobiotica* **1979**, *9* (10), 601-610.

165. Rosenblum, S. B.; Huynh, T.; Afonso, A.; Davis Jr., H. R.; Yumibe, N.; Clader, J. W.; Burnett, D. A., Discovery of 1-(4-Fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): A Designed, Potent, Orally Active Inhibitor of Cholesterol Absorption. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 973-980.

166. Penning, T. D.; Talley, J. J.; Bertenshaw, S. R.; Carter, J. S.; Collins, P. W.; Docter, S.; Graneto, M. J.; Lee, L. F.; Malecha, J. W.; Miyashiro, J. M., Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *Journal of medicinal chemistry* **1997**, *40* (9), 1347-1365.

167. Sandberg, B. E.; Lee, C. M.; Hanley, M. R.; Iversen, L. L., Synthesis and biological properties of enzyme-resistant analogues of substance P. *European Journal of Biochemistry* **1981**, *114* (2), 329-337.

168. Weber, S. J.; Abbruscato, T. J.; Brownson, E. A.; Lipkowski, A. W.; Polt, R.; Misicka, A.; Haaseth, R. C.; Bartosz, H.; Hruby, V. J.; Davis, T. P., Assessment of an *in vitro* blood-

- brain barrier model using several [Met5] Enkephalin Opioid Analogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1993**, *266*, 1649-1655.
169. Abbruscato, T. J.; Williams, S. A.; Misicka, A.; Lipkowski, A. W.; Hruby, V. J.; Davis, T. P., Blood-to-Central Nervous System Entry and Stability of Biphalin, a Unique Double-Enkephalin Analog, and its Halogenated Derivatives. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1995**, *276*, 1049-1057.
170. Austin, R. P.; Barton, P.; Cockroft, S. L.; Wenlock, M. C.; Riley, R. J., The Influence of Nonspecific Microsomal Binding on Apparent Intrinsic Clearance, and Its Prediction from Physicochemical Properties. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 1497-1503.
171. Lewis, D. F. V.; Jacobs, M. N.; Dickins, M., Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism. *Drug Discovery Today* **2004**, *9* (12), 530-537.
172. Swierstra, J.; Kapoerchan, V.; Knijnenburg, A.; van Belkum, A.; Overhand, M., Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **2016**, *35* (5), 763-769.
173. Tamai, I.; Sai, Y.; Kobayashi, H.; Kamata, M.; Wakamiya, T.; Tsuji, A., Structure-Internalization Relationship for Adsorptive-Mediated Endocytosis of Basic Peptides at the Blood-Brain Barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1996**, *280*, 410-415.
174. Pauletti, G. M.; Okumu, F. W.; Borchardt, R. T., Effect of size and charge on the passive diffusion of peptides across caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. *Pharmaceutical research* **1997**, *14* (2), 164-168.
175. Lundin, S.; Artursson, P., Absorption of a vasopressin analogue, 1-deamino-8-D-arginine-vasopressin (dDAVP), in a human intestinal epithelial cell line, CaCO-2. *International Journal of Pharmaceutics* **1990**, *64*, 181-186.
176. Brandsch, M.; Knutter, I.; Bosse-Doenecke, E., Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters. *J Pharm Pharmacol* **2008**, *60* (5), 543-85.
177. Knipp, G. T.; Velde, D. G. V.; Siahaan, T. J.; Borchardt, R. T., Effect of beta-turn structure on passive diffusion of peptides in caco-2 monolayers. *Pharmaceutical research* **1997**, *14* (10), 1332-1340.
178. Räder, A. F. B.; Weinmüller, M.; Reichart, F.; Schumacher-Klinger, A.; Merzbach, S.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H., Oral aktive Peptide: Gibt es ein Patentrezept? *Angewandte Chemie* **2018**, *130* (44), 14614-14640.
179. Tsou, L. K.; Tatko, C. D.; Waters, M. L., Simple cation- $\pi$  interaction between a phenyl ring and a protonated amine stabilizes an  $\alpha$ -helix in water. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (50), 14917-14921.

180. Shi, Z.; Olson, C. A.; Kallenbach, N. R., Cation- $\pi$  interaction in model  $\alpha$ -helical peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (13), 3284-3291.
181. Hughes, R. M.; Benschoff, M. L.; Waters, M. L., Effects of Chain Length and N-Methylation on a Cation- $\pi$  Interaction in a  $\beta$ -Hairpin Peptide. *Chemistry – A European Journal* **2007**, *13* (20), 5753-5764.
182. Rezai, T.; Yu, B.; Millhauser, G. L.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S., Testing the Conformational Hypothesis of Passive Membrane Permeability Using Synthetic Cyclic Peptide Diastereomers. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2510-2511.
183. Hill, T. A.; Lohman, R. J.; Hoang, H. N.; Nielsen, D. S.; Scully, C. C.; Kok, W. M.; Liu, L.; Lucke, A. J.; Stoermer, M. J.; Schroeder, C. I.; Chaouis, S.; Colless, B.; Bernhardt, P. V.; Edmonds, D. J.; Griffith, D. A.; Rotter, C. J.; Ruggeri, R. B.; Price, D. A.; Liras, S.; Craik, D. J.; Fairlie, D. P., Cyclic Penta- and Hexaleucine Peptides without N-Methylation Are Orally Absorbed. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *5* (10), 1148-51.
184. Räder, A. F. B.; Reichart, F.; Weinmuller, M.; Kessler, H., Improving oral bioavailability of cyclic peptides by N-methylation. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2018**, *26* (10), 2766-2773.
185. Laufer, R.; Chorev, M.; Gilon, C.; Friedman, Z. Y.; Wormser, U.; Selinger, Z., Persistent action of N-methylated analogs of substance P on rat parotid slices. *FEBS letters* **1981**, *123* (2), 291-294.
186. Wormser, U.; Laufer, R.; Chorev, M.; Gilon, C.; Selinger, Z., Proteolytic resistance and biological activity of N-methylated analogs of [pGlu<sup>6</sup>] substance P<sub>6-11</sub>. *Neuropeptides* **1990**, *16* (1), 41-49.
187. Morita, H.; Kondo, K.; Hitotsuyanagi, Y.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Tomioka, N.; Itai, A.; Itai, Y., Conformational analysis of antitumor cyclic hexapeptides RA series. *Tetrahedron* **1991**, *47* (16/17), 2757-2772.
188. Szelke, M.; Leckie, B.; Tree, M.; Brown, A.; Grant, J.; Hallett, A.; Hughes, M.; Jones, D.; Lever, A., H-77: a potent new renin inhibitor. *In vitro* and *in vivo* studies. *Hypertension* **1982**, *4*, 59-69.
189. Kessler, H., Peptoide-Schlüsselverbindungen für einen neuen Weg zur Entwicklung von pharmazeutischen Wirkstoffen. *Angewandte Chemie* **1993**, *105* (4), 572-573.
190. Zipperer, A.; Konnerth, M. C.; Laux, C.; Berscheid, A.; Janek, D.; Weidenmaier, C.; Burian, M.; Schilling, N. A.; Slavetinsky, C.; Marschal, M.; Willmann, M.; Kalbacher, H.; Schitteck, B.; Brotz-Oesterhelt, H.; Grond, S.; Peschel, A.; Krismer, B., Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* **2016**, *535* (7613), 511-6.
191. Krismer, B.; Peschel, A.; Grond, S.; Zipperer, A.; Konnerth, M. C.; Janek, D.; Kalbacher, H.; Schilling, N. A. Novel Anti-Infective Compound. 2018.



192. De Santis, P.; Morosetti, S.; Rizzo, R., Conformational Analysis of Regular Enantiomeric Sequences. *Macromolecules* **1974**, *7* (1), 52-58.
193. Pavone, V.; Benedetti, E.; Di Blasio, B.; Lombardi, A.; Pedone, C., Regularly Alternating L,D-Peptides. III. Hexacyclic Peptides from Valine or Phenylalanine. *Biopolymers* **1989**, *28*, 215-223.
194. Matthews, J. L.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D., Linear and cyclic  $\beta$  3-oligopeptides with functionalised side-chains (-CH<sub>2</sub>OBn, -CO<sub>2</sub>Bn, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Bn) derived from serine and from aspartic and glutamic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1998**, (20), 3331-3340.
195. Klumpp, C.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A., Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2006**, *1758* (3), 404-412.
196. Fernandez-Lopez, S.; Kim, H.-S.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Krähenbühl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K. M.; Ghadiri, M. R., Antibacterial agents based on the cyclic D,L- $\alpha$ -peptide architecture. *Nature* **2001**, *412*, 452-456.
197. Steenken, W.; Oatway, W. H.; Petroff, S. A., Biological Studies of the Tubercle Bacillus: III. Dissociation and pathogenicity of the R and S variants of the human tubercle bacillus (H37). *Journal of Experimental Medicine* **1934**, *60*, 515-543.
198. Ioerger, T. R.; Feng, Y.; Ganesula, K.; Chen, X.; Dobos, K. M.; Fortune, S.; Jacobs, W. R., Jr.; Mizrahi, V.; Parish, T.; Rubin, E.; Sasseti, C.; Sacchetti, J. C., Variation among genome sequences of H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis* from multiple laboratories. *Journal of Bacteriology* **2010**, *192* (14), 3645-53.
199. Speirs, R. J.; Welch, J. T.; Cynamon, M. H., Activity of n-Propyl Pyrazinoate against Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Investigations into Mechanism of Action of and Mechanism of Resistance to Pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, *39*, 1269-1271.
200. Davis, B. D.; Dubos, R. J., The Binding of Fatty Acids by Serum Albumin, a Protective Growth Factor in Bacteriological Media. *Journal of Experimental Medicine* **1947**, *86*, 215-228.
201. Pethe, K.; Sequeira, P. C.; Agarwalla, S.; Rhee, K.; Kuhen, K.; Phong, W. Y.; Patel, V.; Beer, D.; Walker, J. R.; Duraiswamy, J.; Jiricek, J.; Keller, T. H.; Chatterjee, A.; Tan, M. P.; Ujjini, M.; Rao, S. P.; Camacho, L.; Bifani, P.; Mak, P. A.; Ma, I.; Barnes, S. W.; Chen, Z.; Plouffe, D.; Thayalan, P.; Ng, S. H.; Au, M.; Lee, B. H.; Tan, B. H.; Ravindran, S.; Nanjundappa, M.; Lin, X.; Goh, A.; Lakshminarayana, S. B.; Shoen, C.; Cynamon, M.; Kreiswirth, B.; Dartois, V.; Peters, E. C.; Glynn, R.; Brenner, S.; Dick, T., A chemical genetic screen in *Mycobacterium tuberculosis* identifies carbon-source-dependent growth inhibitors devoid of in vivo efficacy. *Nature communications* **2010**, *1*, 57.
202. Conradi, R. A.; Burton, P. S.; Borchardt, R. T., Physico-chemical and Biological Factors that Influence a Drug's Cellular Permeability by Passive Diffusion. In *Lipophilicity*

- in Drug Action and Toxicology*, Pliska, V.; Testa, B.; van de Waterbeemd, H., Eds. VCH Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim, 1996; Vol. 4, pp 233-252.
203. Okumu, F. W.; Pauletti, G. M.; Velde, D. G. V.; Siahaan, T. J.; Borchardt, R. T., Effect of Restricted conformational flexibility on the permeation of model hexapeptides across caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical research* **1997**, *14*, 169-175.
204. Hess, S.; Ovadia, O.; Shalev, D. E.; Senderovich, H.; Qadri, B.; Yehezkel, T.; Salitra, Y.; Sheynis, T.; Jelinek, R.; Gilon, C.; Hoffman, A., Effect of Structural and conformation modifications, including backbone cyclization of hexapeptides. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50* (24), 6201-6211.
205. Whitty, A.; Zhong, M.; Viarengo, L.; Beglov, D.; Hall, D. R.; Vajda, S., Quantifying the chameleonic properties of macrocycles and other high-molecular-weight drugs. *Drug Discovery Today* **2016**, *21* (5), 712-7.
206. Wang, C. K.; Swedberg, J. E.; Harvey, P. J.; Kaas, Q.; Craik, D. J., Conformational Flexibility Is a Determinant of Permeability for Cyclosporin. *Journal of physical chemistry* **2018**, *122* (8), 2261-2276.
207. Hoffmann, H.; Kohl, T. A.; Hofmann-Thiel, S.; Merker, M.; Beckert, P.; Jatou, K.; Nedialkova, L.; Sahalchik, E.; Rothe, T.; Keller, P. M., Delamanid and bedaquiline resistance in *Mycobacterium tuberculosis* ancestral Beijing genotype causing extensively drug-resistant tuberculosis in a Tibetan refugee. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2016**, *193* (3), 337-340.
208. European Medicines Agency; Deltyba (Delamanid).  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/deltyba> (accessed 09.08.19, 15:00).
209. European Medicines Agency; Sirturo (Bedaquiline).  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/sirturo#authorisation-details-section> (accessed 09.08.19, 15:00).
210. Appavoo, S. D.; Kaji, T.; Frost, J. R.; Scully, C. C.; Yudin, A. K., Development of endocyclic control elements for peptide macrocycles. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140* (28), 8763-8770.
211. Bandow, J. E.; Brotz, H.; Leichert, L. I.; Labischinski, H.; Hecker, M., Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, *47* (3), 948-55.
212. Nebe-von-Caron, G.; Stephens, P.; Badley, R. A., Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Applied Microbiology* **1998**, *84*, 988-998.
213. Stark, H.; Krause, M.; Rouleau, A.; Garbarg, M.; Schwartz, J.-C.; Schunack, W., Enzyme-catalyzed prodrug approaches for the histamine H3-receptor agonist (R)- $\alpha$ -methylhistamine. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2001**, *9* (1), 191-198.

214. Wang, B.; Zhang, H.; Zheng, A.; Wang, W., Coumarin-based prodrugs. Part 3: Structural effects on the release kinetics of esterase-sensitive prodrugs of amines. *Bioorganic & medicinal chemistry* **1998**, *6* (4), 417-426.
215. Krieg, R.; Jortzik, E.; Goetz, A.-A.; Blandin, S.; Wittlin, S.; Elhabiri, M.; Rahbari, M.; Nuryyeva, S.; Voigt, K.; Dahse, H.-M., Arylmethylamino steroids as antiparasitic agents. *Nature communications* **2017**, *8*, 14478.
216. Franzblau, S. G.; Witzig, R. S.; McLaughlin, J. C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernandez, A.; Degnan, M. T.; Cook, M. B.; Quenzer, V. K.; Ferguson, R. M., Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *Journal of clinical microbiology* **1998**, *36* (2), 362-366.
217. Caviedes, L.; Delgado, J.; Gilman, R. H., Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **2002**, *40* (5), 1873-1874.
218. Valko, K., Fast Gradient HPLC Method to determine compounds binding to human serum album relationships with octanol-water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, *92*, 2236 - 2248.

## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Imming für sein Vertrauen in mich und die hervorragende Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit. Ihre gelebte Offene-Tür-Politik führte stets zu lehrreichen Gesprächen über wissenschaftliche und allgemeine Thematiken und gab mir weitere Ideen für die synthetische Arbeit. Auch für die zahlreichen Möglichkeiten meine Ergebnisse auf internationalen Konferenzen präsentieren und mit renommierten Gästen in Ihrer Arbeitsgruppe diskutieren zu dürfen, möchte ich mich auf diesem Wege ganz herzlich bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Frank Bordusa und PD Dr. Norbert Reiling für die Übernahme der beiden Gutachten.

Meinen Eltern danke ich für die großartige Unterstützung, den Rückhalt in jeder Phase meines Lebens und das Wissen, dass ich mich immer auf euch verlassen kann. Dafür bin ich euch sehr dankbar!

Bei den Altdoktoranden Adrian, Henok, Lisa, Marcel und Ruth möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in ihren Kreis, die Hilfestellung während meinen ersten Tagen in Halle sowie all den schönen gemeinsamen Abenden bedanken. Henok gilt mein besonderer Dank für die Einarbeitung in die Peptidsynthese und viele ertragreiche Diskussionen über unser Forschungsthema und über die UEFA Champions League. Ich danke Sabine, Ilona und Julia für das sehr angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung im Laboralltag. Auch bei der nächsten Generation an Doktoranden Andreas, Christoph und Rana möchte ich mich natürlich herzlich für die schöne Zeit bedanken. Aus den immer lustigen Kaffeerunden zu den Mittagspausen oder gelegentlichen Treffen auf ein Bier nach der Arbeitszeit mit euch allen nehme ich viele schöne Erinnerungen mit und hoffe, dass die entstandenen Freundschaften bestehen bleiben.

Weiterhin möchte ich den Kooperationspartnern danken: GlaxoSmithKline gilt mein Dank für die Bereitstellung zahlreicher Aminosäuren zur Synthese und für die sehr umfassende Testung der hergestellten Verbindungen. Im Besonderen danke ich Maria als Ansprechpartnerin des Projekts vor Ort in Tres Cantos für ihre Hilfe.

Dem Hans-Knöll-Institut in Jena und namentlich Frau Dr. Voigt und Frau Weigel danke ich für die Durchführung der Hemmzonentests.

Ein großer Dank gilt Dr. Matthias Schmidt für die Bestimmung der Reinheit der Substanzen mittels HPLC. Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Sinz, namentlich Christoph Hage und Dr. Christian Ihling, danke ich für die Analyse der Verbindungen mittels HRMS.

Für die Unterstützung im Praktikum „Instrumentelle Analytik“ und für die Vorbereitung der Materialien danke ich Frau Herbrich-Peters, Frau Mannd und Herrn Dirk Tänzler. Es hat mir viel Freude bereitet, die Studenten mit Dirk, Christoph und Lisa zu betreuen.

Außerdem danke ich den Studenten, die sich dazu entschieden, mich im Zuge eines Praktikums bei den synthetischen Arbeiten zu unterstützen: Vielen Dank an Tina, Laura, Tamira, Johannes, Thao, Anne, Laura, Robin, Amy, Ulrike, Lea, Elisa, Isabell und Melissa! Ich hoffe, euch hat die Zeit ebenso gut wie mir gefallen und ihr konntet einen Einblick in die Forschungsarbeit an der Universität gewinnen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich meine bisherige Zeit in Halle in guter Erinnerung behalten lassen werden. Alle hier aufzuzählen, würde den Rahmen sprengen. Aber um einige namentlich zu nennen, bedanke ich mich ganz herzlich bei Chris, Sandra, Martin auch für die hilfreichen Korrekturen dieser Arbeit, Tim, Pia, Eric, Ani, Susi, Max, Gesine, Felix, Anton und Philipp mit denen ich innerhalb und außerhalb der Universität viel Schönes erlebt habe.

## Lebenslauf

Berufliche Anschrift:

Thomas Wetzlar

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Kurt-Mothes-Straße 3, 06120 Halle (Saale)

E-Mail: [thomas.wetzlar@pharmazie.uni-halle.de](mailto:thomas.wetzlar@pharmazie.uni-halle.de)

---

seit April 2016	Promotionsstudent in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Imming – Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
Aug. 2015 – März 2016	Gastwissenschaftler – Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
Dez. 2013 – Juli 2015	Apotheker – Stadt-Apotheke Hilgenberg, Schwalmstadt
Dez. 2013	3. Staatsexamen (Approbation als Apotheker)
Mai – Okt. 2013	Pharmazeut im Praktikum – University of Utah
Nov. 2012 – April 2013	Pharmazeut im Praktikum – Stadt-Apotheke Hilgenberg, Schwalmstadt
Sept. 2012	2. Staatsexamen
Aug. 2010	1. Staatsexamen
2008 – 2010	Studium der Pharmazie – Philipps-Universität Marburg
Juni 2008	Allgemeine Hochschulreife – Abitur
2000 – 2008	Schwalmgymnasium, Schwalmstadt

---

Thomas Wetzlar

## **Publikationen**

### **2019**

Poster: Pharma Research Day (Martin-Luther-Universität, Halle): **Antimycobacterial cyclopeptides: Activity and SAR of wollamide B and derivatives** (T. Wetzlar, H. Asfaw, F. Cunningham, M. S. Martinez-Martinez, J. C. Cuevas-Zurita, L. Ballell-Pages, P. Imming)

### **2018**

Veröffentlichung: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters: **An efficient synthetic route for preparation of antimycobacterial wollamides and evaluation of their in vitro and in vivo efficacy** (H. Asfaw, T. Wetzlar, M. S. Martinez-Martinez, P. Imming)

Vortrag: 3rd TRI-SUSTAIN Graduate School (Gaborone, Botswana): **Cyclohexapeptides with antimycobacterial activity**

### **2017**

Poster: Tuberculosis Drug Discovery and Development, Gordon Research Conference (Lucca, Italien): **New antimycobacterial cyclopeptides: Activity and SAR of wollamides and lugdunins** (T. Wetzlar, H. Asfaw, F. Cunningham, M. S. Martinez-Martinez, J. C. Cuevas-Zurita, L. Ballell-Pages, P. Imming)

Poster: Tuberculosis Drug Discovery and Development, Gordon Research Conference (Lucca, Italien): **The antituberculous potential of wollamide B & its synthetic analogues** (H. Asfaw, T. Wetzlar, F. Cunningham, M. S. Martinez-Martinez, L. Ballell-Pages, P. Imming)

## **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.

---

Thomas Wetzlar