

Title	プラスバシンA3の全合成と作用機序解明に向けた研究
Author(s)	勝山, 彬
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第13173号
Issue Date	2018-03-22
DOI	10.14943/doctoral.k13173
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/88765
Туре	theses (doctoral)
File Information	Akira_Katsuyama.pdf



プラスバシン A3の全合成と作用機序解明に向けた研究

北海道大学大学院生命科学院 生命科学専攻 生命医薬科学コース 創薬科学研究教育センター有機合成医薬学部門

勝山 彬

2018年3月

略号表

Ac	acetyl
acac	acetylacetonate
Al	allyl
Ala	alanine
aq.	aqueous
Arg	arginine
Asp	aspartic acid
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Bz	benzoyl
Cbz	benzyloxycarbonyl
CD	circular dichroism
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole
Chol	cholesterol
COSY	correlation spectroscopy
Ср	cyclopentadienyl
Су	cyclohexyl
DBD	4-N,N-(dimethylaminosulfonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole
DEAD	diethyl azodicarboxylate
DET	diethyl tartrate
DMAP	4-N,N-dimethylaminopyridine
DME	1,2-dimethoxyethane
DMF	N,N-dimethylformamide
DMP	Dess-Martin periodinane
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
EPC	egg phosphatidylcholine
ESIMS	electrospray ionization mass spectrometry
Et	ethyl
Fib	fibroin

FITC	fluorescein isothiocyanate
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
GlcNAc	N-actetylglucosamine
Glu	glucose
Gly	glycine
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol
HMDS	1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	1-hydroxy-1,2,3-benzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
H-bond	hydrogen bond
ⁱ Pr	isopropyl
IR	infrared spectroscopy
ITC	isothermal titration calorimetry
JU-3CR	Joullié-Ugi three-component reaction
LC	liquid chromatography
MD	molecular dynamics
Me	methyl
MIC	minimum inhibitory concentration
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
Ms	methanesulfonyl
MS	mass spectrometry
MSSA	Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus
MS4A	molecular sieves 4A
Mur	muramic acid
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMM	<i>N</i> -methylmorpholine
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
OPM	orientations of proteins in membranes

Orn	ornithine
PBPs	penicillin binding proteins
PDB	protein data bank
PDR	pan-drug-resistant
Pf	phenylfluorenyl
Ph	phenyl
Pht	phthaloyl
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
ppm	parts per million
Pro	proline
PSA	polar surface area
РуВОР	(benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimetylamino)phosphonium hexafluorophosphate
РуАОР	$(7-azabenzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium\ hexafluorophosphate$
QCM	quartz crystal microbalance
r.d.s.	rate determining step
rt	room temperature
sat.	saturated
Ser	serine
TFFH	fluoro-N,N,N',N'-tetramethylformamidinium hexafluorophosphate
TBHP	tert-butyl hydroperoxide
'Bu	<i>tert</i> -butyl
Tf	trifluoromethanesulfonyl
TFA	trifluoroacetic acid
TFE	2,2,2-trifluoroethanol
THF	tetrahydrofran
Thr	threonine
TIPS	triisopropylsilyl
TLC	thin layer chromatography
TMS	trimethylsilyl
Troc	2,2,2-trichloroethyl
ТЗР	propylphosphonic anhydride

UDP	uridine-5'-diphosphate
UMP	uridine-5'-monophosphate
U-4CR	Ugi four-component reaction
VRE	vancomycin-resistant Enterococci
VRSA	vancomycin-resistant Staphylococcus aureus
XDR	extensivery drug resistant

目次

序論	1
本論	11
第一章 ジアステレオ多様的 Joullié-Ugi 反応と反応機構解析	11
第一節 Joullié-Ugi 反応の立体選択性と溶媒効果	15
第二節 基質適応範囲の検討	18
第三節 ジアステレオ選択性に対する電子効果と速度論的解析	22
第四節 推定反応機構	28
第二章 プラスバシン A3 とジデオキシ誘導体の全合成	31
第一節 プラスバシン A3の逆合成解析(合成経路 1)	31
第二節 プラスバシン A3 の合成研究(合成経路 1)	36
第三節 プラスバシン A3の逆合成解析(合成経路 2)	43
第四節 プラスバシン A3の合成研究(合成経路 2)	44
第五節 プラスバシン A3の逆合成解析(合成経路 3)	48
第六節 プラスバシン A3の全合成(合成経路 3)	50
第七節 ジデオキシ誘導体の合成	56
第三章 プラスバシン A3 誘導体の生物活性	60
第一節 プラスバシン A3 誘導体と天然物の構造と生物活性の比較	60
第二節 プラスバシン A3 に対する薬剤耐性と耐性株に対するゲノムシークエンス解析	62
第四章 細胞壁生合成前駆体の固相全合成	64
第一節 合成計画	64
第二節 ネリルリピド I, II と Park ヌクレオチドおよび蛍光標識体の固相全合成	68
第五章 プラスバシン A3 の作用機序に関する研究	77
第一節 プラスバシン A3 とネリルリピド II の相互作用解析	77
第二節 リポソームとプラスバシン A3の相互作用	79
第三節 プラスバシン A3 とリピド II 誘導体の分子動力学シミュレーション	81
第四節 プラスバシン A3 の推定作用機序	90
結語	91
謝辞	92
実験の部	93
参考文献	163

序論

感染症治療の要となる抗菌薬の開発研究は 20 世紀に精力的に行われた。この結果、数多くの抗菌薬が 開発されるに至り、一時人類は感染症を完全に制圧したとさえ考えられるようになった。しかし、近年、 薬剤耐性菌が出現し、既存の抗菌薬による治療が困難になってきている。Figure 1 は抗菌薬開発とそれに 対する薬剤耐性菌の出現の年表である¹。1950 年に導入されたテトラサイクリンに対する耐性菌はその 9 年後に報告されているが、最近開発されたセフタロリンに対する耐性は 1 年後に生じている。このよ うに、近年では、病原菌が薬剤耐性獲得までに要する時間が短くなっており、新規抗菌薬を開発するにあ たり、薬剤耐性を生じにくい性質を有するリードを選択することが重要であると考えられる。



Figure 1. Developing antibacterial resistance

抗菌薬の作用機序として、ペプチドグリカンの生合成を阻害するものが数多く知られている。ペプチ ドグリカンの生合成経路を Figure 2 に示す。まず、細胞質において、酵素 MurA、MurB により UDP-GleNAc とホスホエノールピルビン酸から UDP-MurNAc が合成される²⁴。続いて MurC-F により L-Ala、D-Glu、 L-Lys、D-Ala-D-Ala が順次縮合されることで Park ヌクレオチドが合成される⁵。次に、MraY により糖ペ プチド部が UMP の脱離を伴いウンデカプレニルリン酸へと転位されることでリピド I が合成される⁶⁷。 このリピド I は、続く MurG により GleNAc が付加され、リピド II となる⁸。リピド II は近年見出され たフリッパーゼである MurJ により細胞外側へと移動し^{9,10}、これがペニシリン結合タンパク質(PBPs)の 働きにより重合することでペプチドグリカンが生合成される¹¹。この一連の生合成経路の中でも、ペプチ ドグリカン生合成の最終段階であるリビド II の重合過程は、細胞外で進行するため、化合物の膜透過性 を考慮する必要がないことから、抗菌薬の標的として適している。ペニシリン等のβ-ラクタム系抗菌薬は



Figure 2. Biosynthesis of peptidoglycan

リピド II の重合を担うペニシリン結合タンパク質(penicillin binding proteins: PBPs)に結合することでリピ ド II の生合成を阻害するが、これに対しては数多くの耐性菌が報告されている¹²。一方で、現在臨床の 場で用いられているバンコマイシンは、酵素の基質となるリピド II の D-Ala-D-Ala 末端に直接結合するこ とでペプチドグリカンへの重合を阻害し¹³、バンコマイシンと Ac-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala ペプチドとの結合 に関しては、X 線結晶構造が解かれている(Figure 3, PDB ID: IFVM)¹⁴。



Figure 3. X-ray crystal structure of vancomycin-Ac-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala complex (green: vancomycin)

バンコマイシンに対する耐性菌の報告は、その導入から 16 年後であり、他のクラスの抗菌薬と比較し て薬剤耐性に高い抵抗性を有する(Figure 1)。薬剤耐性獲得のメカニズムの一つとして、薬剤の標的分子 の変異により、薬剤と標的分子の結合親和性が低下するメカニズムが挙げられる。酵素阻害剤に対する 耐性の場合、薬剤の結合を阻害するような変異を持つ酵素は、元の酵素と同様に基質を認識することが 可能であり、酵素反応の進行、続く変異前と同様の機能を発揮する生成物の産生により、薬剤耐性を獲得 に至る(Figure 4a)。一方、バンコマイシンのような基質阻害剤に対する耐性の場合、基質の変異は生成物 の変異として引き継がれる(Figure 4b)。この変異生成物が、元の生成物と同等の機能を発揮できなければ、 生物は死に至ることとなり、結果的に薬剤耐性を生じない。従って、基質阻害剤は酵素阻害剤と比較し て、薬剤耐性を生じにくいものと考えられる。バンコマイシンの例では、バンコマイシンが結合できない 変異リビド II から生合成されたペプチドグリカンは、細胞壁としての機能が弱まり、抗菌薬非存在下で さえも生存できないため、薬剤耐性に対して抵抗性を有すると考察できる。



Figure 4. Mechanism of drug resistance

リビド Π に結合して抗菌作用を示す天然物としては、バンコマイシンの他にテイクソバクチン¹⁵ やラ モプラニン¹⁶、カタノシン B^{17,18}、マンノペプチマイシン-δ^{19,20} が知られており、特にテイクソバクチン に対しては、in vitro の系において、薬剤耐性菌の出現がほとんど認められないことが報告されている (Figure 5)¹⁵。以上のように、リビド Π に結合する天然物は薬剤耐性が生じにくい性質を有していると考え られ、新規抗菌薬のリード化合物として理想的である。



Figure 5. Natural products targeting to lipid II



Table 1. Antibacterial activity of plusbacin A3

Strain	MIC (µg/mL)	
	vancomycin	plusbacin A ₃
<i>S. aureus</i> NCTC8325 Mu50	1.56 12.5	0.78 1.56
<i>E. faecalis</i> SR1004 SR7914	1.56 >50	3.13 1.56
<i>E. faecium</i> SR15941 SR7917	1.56 >50	3.13 3.13

Figure 6. Chemical structure of plusbacin A₃

プラスバシン A₃(1)は、1992 年にグラム陰性菌であるシュードモナス属から単離された 28 員環ノナデ プシペプチドであり、*allo*-D-Thr、*threo*-β-ヒドロキシ-Asp [Asp(β-OH)]の両エナンチオマー、2 つの *trans*-3-ヒドロキシ-L-Pro [Pro(3-OH)]の計 5 個の非天然アミノ酸と 3-ヒドロキシイソヘキサデカン酸を含んで いる(Figure 6)^{21,22}。本化合物は、広範囲のグラム陽性菌に対し、バンコマイシンと同様にペプチドグリカ ン生合成を阻害し、抗菌活性を有することが知られている(Table 1)²³。またバンコマイシン耐性株に対し ても同様の阻害作用を有することから、バンコマイシンとは異なる機構でペプチドグリカンの生合成を 阻害することが示唆されている。プラスバシン A₃の抗菌活性は細胞壁成分の添加によって阻害されるこ と、ペプチドグリカンの生合成のみならず、リビド II を含むリビド中間体の生合成も阻害することから、 その標的分子は細胞壁生合成酵素ではないと考えられている²³。また、プラスバシン A₃類縁体であるエ ンペドペプチン (Figure 7a)はリビド II に結合することで重合を阻害するが、結合位置はバンコマイシン とは異なり、エンペドペプチンの二箇所のカルボン酸とリビド II のジリン酸が Ca²⁺を介して結合すると 考えられている(Figure 7b)²⁴。これらの情報より、プラスバシン A₃の標的分子もリビド II であることが示 唆される。

a)





a) Chemical structure of empedopeptin

b) Inhibition mechanism of empedopeptin



現在問題となっているバンコマイシン耐性菌の耐性メカニズムは、バンコマイシンの結合部位である D-Ala-D-Ala 末端の変異であるが²⁵、結合部位の異なるプラスバシン A₃はこの耐性の影響を受けず、バンコ マイシンと同程度の強い抗菌活性を示す。研究開始当初、プラスバシン A₃の作用機序に関する知見は上 述の報告のみであったが、ごく最近、Schaefer らにより固体 NMR を用いたプラスバシン A₃の作用機序 解明に関する報告がなされ、プラスバシン A₃が 2 つの作用機序を有する可能性が示唆された(Figure 8)²⁶。 一つはペプチドグリカンの末端にリピド II が組み込まれる過程を阻害するものであり(Figure 8b, A)、も う一方は細胞膜上の ABC トランスポーターに結合し、その機能を阻害するというものである(Figure 8b, B)。この作用機序はエンペドペプチンでの報告と異なり、プラスバシン A₃の作用機序に関してはさらな る検討の余地がある。





筆者はプラスバシン A₃が、バンコマイシンと同様に薬剤耐性に対して抵抗性を有すると予想し、リピド II に結合するという仮定のもとプラスバシン A₃の詳細な作用機序の解明を目指し、研究に着手した。



プラスバシン A₃の全合成は 2007 年に VanNieuwenhze らによって達成されている(Scheme 1)²⁷。3-ヒド ロキシイソヘキサデカン酸は、ラセミ体のβ-ヒドロキシエステルからアマノリパーゼ PS を用いる速度論 的光学分割を経て合成し、ペプチドカップリングによって合成した 4 つのセグメント a-d の脱水縮合と D-Ser、D-*threo*-β-ヒドロキシ-Asp 間でのマクロラクタム化により 28 員環を構築することで全合成を達成 している。しかし、本合成法において出発物質として用いている *trans*-3-ヒドロキシ-L-Pro の合成は多工 程を要し^{*1}、構造活性相関研究を見据えた誘導体合成へと展開するのは困難であるといえる。

*¹ Park らは D-グルコノラクトンからアリルグリシン誘導体を経由して 14 工程で (Scheme 2)²⁸、Chandrasekhar らは 3-ブチン-1-オールから Sharpless 不斉エポキシ化を経て 15 工程で *trans*-3-ヒドロキシ-L-Pro を合成している(Scheme 3)²⁹。



Scheme 3. Synthesis of trans-3-hydroxy-L-Pro by Chandrasekhar et al.



筆者は、非天然アミノ酸の合成法として有用である Ugi 反応(U-4CR)³⁰ 及び Joullié-Ugi 反応(JU-3CR)に 着目した³¹。Ugi 反応はカルボン酸、カルボニル化合物、アミン、イソシアニドの 4 成分反応、Joullié-Ugi 反応は Ugi 反応におけるカルボニル化合物とアミンを環状イミンへと変換した 3 成分反応である(Scheme 4)。これらの多成分反応は、基質の種類を変更するのみで多様性に富んだ生成物を容易に与える合成化学 上興味深い反応である。

Scheme 4. Ugi reaction and Joullié-Ugi reaction



筆者は、プラスバシン A₃のような中分子ペプチドの合成の際に Joullié-Ugi 反応の利点を最大限利用す ることを目的として、任意のジアステレオマーを得ることのできるジアステレオ多様的な反応への展開 を検討した(第一章)。次に、本反応を用いて非天然アミノ酸である Pro(3-OH)を構築することでプラス バシン A₃の効率的な合成法の開発を行い、プラスバシン A₃ とその誘導体の全合成を行った(第二章)。 また、プラスバシン A₃の詳細な作用機序解明を目的としてリピド II との相互作用を調べ、作用機序に関 する考察を行った(第三、四、五章)。以下、その詳細について述べる。 第一章 ジアステレオ多様的 Joullié-Ugi 反応と反応機構解析

不斉炭素を有する化合物の立体選択的な合成は現代有機合成化学の重要なテーマの一つであり、特に 不斉触媒を用いたエナンチオ選択的な有機合成化学の進歩は目覚ましいものがある。一方で複数の不斉 炭素を有する化合物のジアステレオ選択的な合成は、不斉反応が発展した今日においても未だ難しい課 題である。エナンチオ選択的な合成においては、利用する不斉源の立体化学を反転させることで二つの エナンチオマーのうち望みの一方を同様の反応条件下で合成することができる。一方、ジアステレオ選 択的な反応については、二つのジアステレオマーのどちらか一方を選択的に得る手法は数多く開発され ているが、異なるジアステレオマーを同様の反応条件下で合成することは容易ではない。実際に、不斉炭 素を複数有する複雑な化合物の合成においては、望みとしないジアステレオマーからの立体反転や出発 物質・合成経路そのものの見直しが散見される。この問題点を解決するべく、最近ではエナンチオ選択的 合成と同様に、同じ出発物質から同様の反応条件を利用していずれのジアステレオマーも選択的に合成 できる手法が研究されている。このような要件を満たす反応は「ジアステレオ多様的な反応」と呼ばれ、 出発物質が有する不斉点を利用した合成法の他、不斉触媒を利用したエナンチオ選択的かつジアステレ オ多様的な反応まで、近年いくつかの報告がなされるようになっている³²⁻³⁶。

JU-3CR は Ugi 反応におけるカルボニル化合物とアミンの代わりに環状イミンを用いる反応である。前 者はイミンを出発物質として用い、後者はイミンを反応系中で発生させるという相違点があるものの、 両者は共にイミン、カルボン酸、イソシアニド間での反応であるという点で同様の反応機構で進行して いると考えるのが妥当である。このように 3 成分以上の化合物が one-pot で反応するという性質上、これ らの反応の反応機構は複雑であり、これまでに Ugi 反応の反応機構については数多くの研究がなされ、 長い間議論されてきた。





この反応機構において、新たに生じる不斉点の制御に重要となる本反応の律速段階については、Ugiらによって Mumm 転位であると提唱され、そこに至るまでの個々の反応は全て平衡反応であると考えられ

てきた³⁷。しかし、近年この仮説を覆すいくつかの研究事例が報告されている。Lessard ら Codée らは、 計算化学的手法により本反応の律速段階がイソシアニド付加の段階であり、この段階が不可逆的である ことを提唱している^{40,41}。また、Furman らは、酸素官能基を有する6員環または5員環イミンを用いた JU-3CR の立体選択性が、Woerpel らによって提唱されたオキソカルベニウムイオンに対するアリル化反 応における立体電子効果⁴² と同様に、イソシアニドの付加の段階における立体電子効果で説明できると 述べている⁴³。このように Ugi 反応、JU-3CR の反応機構については発見から 50 年以上経った現在でも 議論がなされており、ここから本反応の反応機構の複雑さを伺い知ることができる。

筆者はまず、α位に酸素置換基を有する一置換光学活性 5 員環イミンを用いた JU-3CR のジアステレオ 選択性に関して検討することを計画した。この反応を用いることで、プラスバシン A₃の構成要素となっ ている非天然アミノ酸である 3-hydroxy-Pro を一段階で構築することができる。これまでの報告例では、 α位にフェノキシ基またはベンジルオキシ基が置換した 5 員環イミンを用いた場合、*cis* 体がやや優先的 に生成するものの、立体選択性の発現は困難であることが報告されている(Scheme 5a, b)^{31,43}。一方で、五 員環イミンのβ位にベンジルオキシ基が置換した場合、同様に *cis* 体が優先するものの、立体選択性が向 上することがわかっている(Scheme 5c)⁴³。本章では、JU-3CR において同一の出発物質から両ジアステレ オマーをそれぞれ選択的に得る条件を見出したため、これに関して述べた後に、立体選択性の制御に重 要となる本反応の律速段階を明らかにし、本反応の反応機構に関する詳細な知見を得たため、これにつ いて詳述する。



Scheme 5. Joullié-Ugi reaction of five-membered cyclic imine

第一節 Joullié-Ugi 反応の立体選択性と溶媒効果

先に述べたように、α位にフェノキシ基またはベンジルオキシ基が置換した一置換5員環イミンを用いた JU-3CR においては、生成物のジアステレオ選択性が低い。筆者は、立体障害の大きいシロキシ基を組み込んだイミンを用いることで立体選択性が向上するものと考え、シリル基の中でも嵩高い TIPS 基で置換したイミン 4a を用いた反応を検討することにした。5員環イミン 4a は、Schwartz 試薬を用いた Ganem らの方法 (Scheme 6)⁴⁴を参考に、ラクタム 3a から合成することにした。

Scheme 6. Synthesis of cyclic imine by Ganem et al.







市販の γ -アミノ酸 2 を HMDS、o-キシレン中で還流することでラクタム化し⁴⁵、水酸基のシリル化を行い TIPS 体 3a とした。このラクタムを Schwartz 試薬により還元したところ、良好な収率で 5 員環イミン 4a を得た(Scheme 7)。なおイミン 4a は溶液中で三量体 5a との平衡混合物として存在した。望みのイミン を合成できたことから、続いて JU-3CR のジアステレオ選択性に関して検討を行った(Table 2)。



Table 2. Optimization of reaction conditions

まずモデル基質として 3-フェニルプロピオン酸 (7a)、t-ブチルイソシアニド (6a)を用い、反応条件の 検討を行った。カルボン酸 7a、5 員環イミン 4a、イソシアニド 6a それぞれ 1 等量を 0.1 M の濃度でトル エン中、室温下で反応させたところ、Joullié-Ugi 成績体 trans-8a と cis-8b が、合計収率 63%で得られた (Table 2, entry 1)。両ジアステレオマーはハイフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより容 易に分離可能であり、ジアステレオ比は trans/cis = 15/85 であった。なお、各ジアステレオマーの立体配 置の決定は Joullié らの報告を参考に、¹H NMR スペクトルにおけるαプロトンの多重度 (trans 体は一重 線、cis 体は二重線) により決定した ³¹。次に反応溶媒の検討を行った。トルエンと同様の非極性溶媒で ある CH₂Cl₂を用いた場合では cis 体を優先して与えた(entry 2)。一方、プロトン性極性溶媒である 'PrOH、 MeOH、トリフルオロエタノール(TFE), ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)を用いた場合にはジアス テレオ選択性の逆転がみられ、HFIP を用いた場合は trans/cis = 82/18 で trans 体を優先して与えた(entries 3-6)。また、非プロトン性極性溶媒である THF やアセトニトリルをもちいた際は選択性、収率ともに低 下した(entries 7, 8)。次にトルエン、または HFIP を溶媒として反応温度の検討を行った(entries 9-12)。い ずれの溶媒においても、反応温度を下げてもジアステレオ選択性に変化が見られないが、高温で反応を 行うとジアステレオ選択性が低下することがわかった。以上の結果より、本反応の最適温度は室温とし、 次にα-シロキシ基の立体障害の増大によりジアステレオ選択性の向上を狙うこととした。TIPS 基よりも 立体障害の大きいシリル基としてトリス(トリメチルシリル)シリル基(以下スーパーシリル基)^{*2}を選 択し、イミン 4b^{*3}を用いてトルエンまたは HFIP を溶媒として反応を検討した(entries 13, 14)。トルエン中 ではジアステレオ選択性(*trans/cis* = 27/73)、収率ともに低下したことから、本反応系において、αシロキ シ基の立体障害は *cis* 体の生成には不利であることが示唆された。一方 HFIP 中では若干の収率の低下が 見られたものの完全な立体選択性で *trans* 体が得られた。

以上の検討結果から、*trans* 体を選択的に得るためには、スーパーシリル基で保護したイミン 4b を用い て、HFIP 中で反応を行い、*cis* 体を選択的に得るには TIPS 基で保護したイミン 4a を用いて、トルエン中 で反応を行えばよいことが明らかとなった。しかし、同一の出発物質から任意のジアステレオマーを合 成する反応という点と収率に着目するのであれば、TIPS 基で保護したα-ヒドロキシイミン 4a を用いるの が最適であると判断し、次に基質適応範囲の検討を行うこととした。

^{*2}スーパーシリル基が置換した化合物は 1964 年に Smith らによってはじめて合成された ⁴⁶。その後 1994 年に Apeloig ら によってその立体的かさ高さが 'Bu 基と同程度であることが報告された ⁴⁷。これは Si-Si 結合距離が 3.0 Å程度と通常の有 機化合物で見られる結合の 1.5~2 倍であるため中心ケイ素原子付近での立体障害が減少しているためである。2006 年、山 本らは、スーパーシリル基が置換したシリルエノールエーテルを利用した *syn* 選択的アルドール反応を報告している (Scheme 8)⁴⁸。この反応においてスーパーシリル基はその立体障害により選択性を向上させるとともに、生成物において、 長い Si-Si 結合が遠隔位に存在するカルボニル基を求核付加から守ることで、副反応である多重アルドール反応を防ぐ役割 を果たしている(Scheme 9)。すなわち、中心付近は比較的立体障害が小さいのに対し、離れた位置では強力な立体障害を生 じるという傘のような構造がスーパーシリル基の特徴とみなすことができる。

Scheme 8. Aldol reaction by Yamomoto et. al.



Scheme 9. Effect of supersilyl group for aldol reaction

$$SiO$$
 + $HNTf_2 (0.05 mol\%)$ O OSi
H + $HHTf_2 (0.05 mol\%)$ O OSi
CH₂Cl₂, -20 °C H + HTf_2
*3 イミン 4b は 4a と同様の合成経路によって合成した。
Si = Si(TMS)₃ 87%
= TBS <10%

第二節 基質適応範囲の検討

続いてシロキシイミン 4a を用いた JU-3CR におけるカルボン酸について基質適応範囲の検討を行った (Table 3)。トルエン中においてはイソ酪酸(7b)を用いると収率が低下し、ピバル酸(7c)を用いた場合には反 応が進行せず、原料回収となった^{*4}。また、芳香族カルボン酸 7d では問題なく反応が進行するものの、 α , β -不飽和カルボン酸 7e では収率が低下した。 α -アミノ酸もカルボン酸として用いることができ、Val 保 護体 7f を用いた場合でも選択性と収率の低下は見られなかった。





*4 カルボン酸α位のかさ高さに伴う収率の低下は、カルボン酸の立体障害の増大か酸性度の低下によるものと考えられ るが、そのどちらが原因であるのついてはこの結果から断定することはできない。 一方で、HFIP 中では **7a**-f のいずれのカルボン酸を用いた場合でも立体選択性を損なうことなく良好な 収率で目的化合物を得ることができた。これは酸性度の高いアルコールである HFIP ($pK_a = 9.3$)がイミン の活性化に関与し、イミニウムイオンの反応性が向上したためと考えられる。なお **7c** を用いた際の生成 物である **9c** は ¹H NMR スペクトルにおいてブロードなピークを与え、 α プロトンの多重度による立体決 定が行えなかったため、以下に述べるような立体化学の推定を行った。

9c 以外のいずれの場合にも、*trans* 体がより低極性の化合物であり、ここから **9c** においても低極性の 化合物が *trans* 体であると予想される。また、構造が類似している **9b** の ¹H NMR スペクトルでは両ジア ステレオマー間で明確な違いが見られる(Figure 10)。3-Hydroxy-Pro 部&位の二つのプロトンが *trans* 体で は 3.8 ppm 付近に重なって観測されるのに対し、*cis* 体では 3.8 ppm 付近と 3.6 ppm に分かれて観測され る。さらに 3-hydroxy-Pro 部y位のプロトンは *trans* 体では 2.2 ppm 付近と 2.0 ppm 付近に、*cis* 体では 2.3 ppm、2.1 ppm 付近に観測される。**9c** はどちらのジアステレオマーも ¹H NMR スペクトルにおいて **9b** と 類似の化学シフト値を与えることからも、低極性化合物が *trans* 体であることが示唆される。さらに 'Bu 基が置換した窒素原子上の水素原子に対する差 NOE 測定の結果、*trans* 体と推定されるジアステレオマ ーではβプロトンとの間にはほとんど相関が見られなかったのに対し、*cis* 体と推定されるジアステレオ マーではβプロトンとの間に相関が見られた(Figure 11)。Macromodel を用いた分子力学計算により得られ た最安定配座における NH-β水素間の距離は *trans* 体で 4.40 Å、*cis* 体で 3.86 Åであることから、差 NOE 測定からも上記の推測を支持する結果が得られた(Figure 12)。









Figure 11. Results of NOE experiment of 9c





以上の検討結果より、本反応はトルエン中では立体障害の大きいカルボン酸を用いると反応が進行し ないか、収率が低下するという制約があるものの、*cis* 選択的、*trans* 選択的条件いずれにおいても立体選 択性に対する顕著な影響は見られないことが明らかとなった。

Table 4. Scope of isocyanides

6c

10c

11/89



次にイソニアニドについて基質適応範囲の検討を行った(Table 4)。トルエン中では第三級イソシアニド 6a、第一級イソシアニド 6b、芳香族イソシアニド 6c いずれを用いた場合でも立体選択性の大きな変化は 見られず cis 体を選択的に与え、その収率は第一級イソシアニド 6b を用いた場合には低下し、芳香族イ ソシアニド 6c を用いた場合では向上した。

72

93

46/54

一方で HFIP 中においては、Table 2、entry 6 と比較すると、カルボン酸の検討の際とは異なりイソシア ニドの構造により立体選択性に大きな変化が見られた。第一級イソシアニド 6b、芳香族イソシアニド 6c ともに良好な収率で目的化合物を与えるものの、第一級イソシアニド 6b ではジアステレオ選択性が低下 し(*trans/cis* = 74/26)、芳香族イソシアニド 6c ではジアステレオ選択性はほとんど発現せず cis 体が若干優 先する結果となった(*trans/cis* = 46/54)。このような立体選択性の変化の要因として立体効果と電子効果が 考えられる。まず立体効果に着目すると、一般に sp²炭素原子に対する付加反応は、速度論的にも熱力学 的にも、立体障害の少ない面から反応した生成物が得られるため、本反応の様なイミンに対する付加反 応も同様に考えることができる。第三級イソシアニド 6a、第一級イソシアニド 6b を比較するとより立体 障害の大きい 6a において、より高い面選択性が得られたことを説明することができる。しかし、平面性 の高い芳香族イソシアニド 6c とは明確な比較が難しい。次に電子効果に着目すると第三級 sp³炭素原子、 第一級 sp³炭素原子、sp²炭素原子の順に電子不足となっており、より電子豊富なイソシアニドが *trans* 体 を優先して与えたと考えることができる。そこで立体選択性に関してさらなる知見を得ることを目的と してこのような立体効果を除外し、電子効果のみを検証する反応系で立体選択性を調べることとした。 第三節 ジアステレオ選択性に対する電子効果と速度論的解析

JU-3CR の立体選択性に対するイソシアニドの電子効果を調べるために、フェニルイソシアニド 6c の p 位に種々の置換基 X を持つイソシアニド 6d-6g を用いて反応を行った(Table 5)。ジアステレオ選択性に イソシアニドの電子効果が影響するのであれば、置換基 X の電子供与性・求引性によりジアステレオ選 択性が変化することが予想される。

Table 5. Effect of electron density of isocyanide on diastereoselectivity



検討の結果、トルエン中での反応の場合、これまでの検討結果と同様にいずれのイソシアニドを用いた 場合でも約90:10のジアステレオ選択性で cis 体を優先して与えることが明らかになり、イソシアニドの 電子効果はジアステレオ選択性に影響しないことがわかった。また、電子求引性基の影響によりイソシ アニドの求核性が低下すると収率が低下する傾向が見られ、最も電子求引性が大きいニトロ基を有する 6g を用いた場合には反応が進行しなかった。

次に HFIP 中での検討を行った。その結果、予想通り置換基 X の電子求引性・供与性とジアステレオ選 択性の間には相関が見られることがわかった。すなわち、メトキシ基、メチル基、水素原子、クロル基、 ニトロ基と電子供与性が低下していく順(電子求引性が増大する順)で *trans/cis* 比が 60/40、53/47、46/54、 38/62、17/83 と順に変化していき、最も電子供与性の大きいメトキシ基の場合に *trasn* 体が、最も電子求 引性の大きいニトロ基の場合に *cis* 体がより選択的に得られることが明らかになった。 以上の検討結果から、HFIP 中においては、本反応のジアステレオ選択性は溶媒効果とイソシアニドの 電子効果によって大きく影響を受け、イソシアニドの立体効果やカルボン酸の構造はジアステレオ選択 性にほとんど影響を与えないことがわかった。そこで次に、イソシアニドの電子効果と反応速度の関係 を物理化学的に解析することで本反応の反応機構と律速段階について考察し、ジアステレオ選択性が溶 媒によって変化する要因を明らかにすることとした。

反応における電子効果を詳細に解析するために、本反応系において Hammett 則が成立するかを調べる こととした⁴⁹。通常 Hammett プロットでは置換基定数 σ に対して反応速度定数 kの対数をプロットする。 本反応では trans 体、cis 体二つのジアステレオマーが生成するため、Hammett プロットをとるためにはそ れぞれのジアステレオマーが生成する反応を区別し、その反応速度定数 k_{trans} 、 k_{cis} についての解析を行う 必要がある。しかし本反応は非常に進行が速く、反応速度定数を算出することができなかった。そこで Anslyn らの報告⁵⁰を参考に、ジアステレオ比の対数(log(trans/cis))を用いて Hammett プロットをとること とした。log(trans/cis)の値は k_{trans} 、 k_{cis} の対数の差(log k_{trans} - log k_{cis})と等しいと見なすことができるため、 log(trans/cis)の値を用いて Hammett 則が成立すれば、反応機構について詳細な考察が可能になると考えた。



反応のジアステレオ比に関して Hammett プロットをとった結 果、直線関係が得られたことから本反応系では Hammett 則が成 立することが明らかとなり、トルエン中と HFIP 中で傾きの異な る直線が得られた(Figure 13)^{*5}。このプロットにより得られる直 線の傾きから、*trans* 体と *cis* 体が生成するそれぞれの反応の反 応定数の差 $\Delta \rho$ (= $\rho_{trans} - \rho_{cis}$)は、トルエン中で-0.06、HFIP 中で -0.78 と求められた。後述するように、Hammett 則では反応定数 ρ を用いることにより律速段階までの電子状態の収支を推測す ることができる。二つのジアステレオマーが生成する反応におい

Figure 13. Hammett plot

て両ジアステレオマーが同一の反応機構(イミンのどちらの面で反応するかという点のみ異なる)で生 成する場合、どちらのジアステレオマーが生成する機構においてもその電子状態は同様に変化すると考 えることができる。よって、このような場合は反応定数の差ムpは0に近い値となる。以上の様な理由から ムp=-0.06となるトルエン中において、両ジアステレオマーは同様の機構で生成し、イミンに対する面選 択性によってジアステレオ選択性が生じていることが推測される。

一方、HFIP 中ではΔp = -0.78 であるため、両ジアステレオマーが生成する反応の反応定数が異なる値 を示すことがわかる。この結果は両ジアステレオマーが生成する機構で電子状態の変化の仕方が異なる ことを意味しており、両ジアステレオマーが異なる機構で生成していることを示唆する。なお、同一反応 機構において、律速段階が変化したために立体選択性が変化したという可能性は一本の直線からなるプ ロット結果により除外することができる。よって HFIP 中では二つの反応機構が競争し、そのどちらを経 るかにより異なるジアステレオマーが生成することが示唆された。この結果は、立体選択性の低下の要 因が、複数の反応機構が競争しているためであるという仮説を証明するものである。

*5Hammett plot は置換安息香酸の pKaを用いて、置換基の電子求引性・供与性を定量的に表現した置換基定数σ(電子供 与性は負、電子求引性は正の値)に対し、反応速度定数の対数(lnk)、または平衡定数の対数(lnK)をプロットしたものであ る。プロットが直線となれば、反応速度または平衡定数が置換基の電子求引性・供与性によってある一定の影響を受ける ことを意味しており、その影響の度合いを表すのが、反応定数ρである。この関係は Hammett 式として式①のように表さ れ、反応定数pの符号からは律速段階までの電子密度の変化を知ることができる。

 $log(k_X/k_H) = \rho\sigma$ (X は芳香環上の置換基)・・・①

次にそれぞれの具体的な反応機構がどのようなものであるのかを決定するため、それぞれの $\rho_{trans} \ge \rho_{cis}$ の値を推定することとした。Hammett 則では反応定数 ρ の符号が重要であるが、反応定数の差 $\Delta\rho$ ではそれぞれの符号の情報は失われてしまう。すなわち、HFIP 中での $\Delta\rho = -0.78$ は $①\rho_{trans} < 0$ かつ $\rho_{cis} < 0$ 、 $②\rho_{trans} < 0$ かつ $\rho_{cis} > 0$ 、 $③\rho_{trans} > 0$ かつ $\rho_{cis} > 0$ のいずれの場合でも成立しうる。そこで $\rho_{trans} \ge \rho_{cis}$ の符号を見積もるために競争実験を行うこととした。



イミン 4a、カルボン酸 7a それぞれ 1 等量に対し、電子密度の異なる二種類のイソシアニド 6d (σ = +0.22)、6f (σ = -0.28)を 1 等量ずつ作用させ、どちらのイソシアニドがより多く消費されるかを調べた (Table 6)。その結果、HFIP 中において cis 体ではメトキシ体とクロル体の生成比(OMe/Cl)が 27/15 であり、 trans 体では OMe/Cl=36/7 と、どちらにおいてもより電子豊富な 6d からの生成物が得られた。またこの 傾向はトルエン中においても同様であることもわかった。

この結果は生成物の立体化学によらず、トルエン中及び HFIP 中のいずれの反応条件においても電子豊富なイソシアニドの方が速く反応することを示している。これは Hammett 則において、どちらの溶媒を用いた場合でも $\rho_{trans} < 0$ かつ $\rho_{cis} < 0$ であることを意味しており、HFIP 中では $\Delta \rho = -0.78$ であることから、 $\rho_{trans} < \rho_{cis} < 0$ 、トルエン中では $\Delta \rho = -0.06$ より $\rho_{trans} = \rho_{cis} < 0$ であることがわかった。

以上の解析結果から、JU-3CR の律速段階と、それぞれの溶媒中における反応機構の相違点について重 要な知見を得ることができる。一般的に Hammett 則において、p<0の反応は律速段階までの過程で芳香 環から電子が流出する反応であると見なすことができる。第一章冒頭で述べたように、JU-3CR の律速段 階については二通りの主張が存在する。そこでそれぞれの主張に基づいて、律速段階までの反応機構を イソシアニドの関与する段階に着目して Figures 14, 15 に示した。



Figure 14. Possible reaction mechanism of JU-3CR (irreversible isocyanide addition)



Figure 15. Possible reaction mechanism of JU-3CR (reversible isocyanide addition)

まず、イソシアニドの付加が律速段階の場合、反応は芳香環から電子が流出する遷移状態を経て進行するため、ρ<0となることが予想される(Figure 14)。

次に、Mumm 転位が律速段階の場合を考える。この場合は Figure 15, 1-4 に示したような多段階の平衡 反応を経て、段階 5 でイミダートが不可逆的に脱離する。多段階反応に対する Hammett 解析は複雑であ るが、この場合は芳香環から電子が流出する段階 1、4 と芳香環に電子が流入する段階 2、5 を経るため、 それぞれの段階でのρが互いに打ち消し合って最終的にρは 0 に近くなると予想される。以上の考察と、 ρ<0という実験結果を比較すると、JU-3CR は Figure 14 で示したようにイソシアニドの付加を律速段階 として進行していることが示唆された。 次に反応機構に対する溶媒効果を考察した。Hammett 則では、前述したようにその符号が大きな意味を 持つが、その絶対値も重要である。反応定数 ρ の絶対値は律速段階の遷移状態に至るまでに芳香環から流 出する、もしくは芳香環に流入する電子密度の程度を反映している。すなわち $\rho < 0$ の反応では、その絶 対値が大きいほど芳香環からの電子の流出が大きいことを示唆し、これは遷移状態において生じる正電 荷がより大きいことを意味している。そこで、上記の様に反応定数が遷移状態の電荷分布を反映するの であれば、反応定数の差 $\Delta \rho$ はそれぞれのジアステレオマーが生じる過程の律速段階における電荷分布の 差を反映していると考えることができる。トルエン中での $\Delta \rho$ は0に近い値をとることから、*cis*体、*trans* 体はともに芳香環が同程度の正電荷を帯びた遷移状態を経ると推察できる。一方、HFIP 中では $\Delta \rho = -0.78$ であることから *trans* 体が生成する際の遷移状態では *cis* 体が生成する際の遷移状態よりも芳香環が大き な正電荷を帯びていることが示唆される(Figure 16)。





このような反応定数の差は、イミニウムイオンの対カチオンであるカルボキシラートイオンの効果を 考慮することで説明することができる。カルボキシラートイオンは負電荷を帯びた化学種であるため、 正電荷を帯びたイミニウムイオンとの静電相互作用によって遷移状態におけるイミニウムイオンの正電 荷を弱める働きがあると考えられる。すなわち、上記のような相互作用が存在せず、イミニウムイオンと イソシアニドが二分子で反応する場合は、遷移状態に至るまでにイソシアニドから多くの電子が流出す る必要があるが(Figure 16, **TS**-*trans*)、イミニウムイオン、カルボキシラートイオン、イソシアニドの三成 分からなる遷移状態を経て反応が進行するのであれば、イミニウムイオンの正電荷の一部をカルボキシ ラートイオンが引き受けることができるため、イソシアニドから流出する電子は相対的に少なくなる (Figure 16, **TS**-*cis*)。よって *cis* 体が生成する際には三分子からなる遷移状態をとり、イミニウムイオンの 正電荷をカルボキシラートイオンの負電荷が安定化しながら反応が進行していることが示唆された。

27

第四節 推定反応機構

以上の実験結果とその解析結果に矛盾しない反応機構を以下のように推定した。本反応はトルエン中 と HFIP 中で異なる経路をとるため、まずトルエン中での反応機構を Figure 17 に示す。トルエンのよう な非極性溶媒は、イオン性化学種を溶媒和により安定化することができないうえ、誘電率が低いことか らカチオン-アニオン間の静電相互作用を強化する傾向がある⁵¹。よって、イミンとカルボン酸の酸塩基 反応によってイミニウムイオンとカルボキシラートイオンが生成し、これが互いに相互作用することで 接触イオン対(I)が生成する。この接触イオン対(I)ではカルボキシラートイオンがシロキシ基の逆面に位 置してその面を遮蔽しているため、イソシアニドの付加は面選択的に進行し、カルボキシラートイオン が位置する面とは逆の面から付加する。この際、SN2 反応様の遷移状態(TS1)をとることでイミニウムイ オンが帯びる正電荷の一部はカルボキシラートイオンによって安定化され、*cis* 体を与える。この SN2 反 応様の反応機構は熱力学的に不安定と予想される *cis* 体が非極性溶媒中において優先して得られること を合理的に説明することができる^{*6}。この機構では *trans* 体、*cis* 体のどちらも同じ反応機構で生成するこ とから、Figure 13 に示した Hammett プロットの傾きが小さいこととも矛盾しない。



Figure 17. Proposed reaction mechanism in toluene

*⁶Woerpel らはテトラヒドロピランアセタールの C-及び O-グリコシル化において同様の報告を行っている ⁵²。TMSOTf を用いてグリコシルドナーの活性化を行うと、イオン対であるグリコシルトリフラートが生成し、この中間体からの反応 は非極性溶媒中では S_N2 反応が優先し、高極性溶媒中では S_N1 反応が優先する結果が得られている(Scheme10)。



次にHFIP中での推定反応機構を示す(Figure 18)。HFIP は非常に極性の高い溶媒であり、トルエンとは 対照的にカチオン-アニオン間の静電相互作用を弱め、それぞれのイオンを効果的に溶媒和する性質を 有している。この性質により、イミニウムイオンとカルボキシラートイオンそれぞれが単独で溶媒和さ れた溶媒介在イオン対(II)が安定化され、系中は I と II の平衡状態となる。この溶媒介在イオン対(II)のイ ミニウムイオンに対するイソシアニドの付加はシロキシ基の立体障害によりシロキシ基とは逆の面で進 行し、TS1 よりもイソシアニドが正電荷を帯びる遷移状態(TS2)を経て trans 体が生成する。この遷移状態 では TS1 とは異なりカルボキシラートイオンが溶媒によって隔てられており、カルボキシラートイオン の持つ負電荷は遷移状態の安定化に関与しない。

この反応機構で最も重要な点は cis 体は TS2 を経て生成しないことである。すなわち、反応系中に共存 する接触イオン対(I)からトルエン中と同様の機構で cis 体が生成する。このようにそれぞれのジアステレ オマーが異なる機構で生成することは Figure 13 に示した Hammett プロットの傾きが大きいことから示唆 される。



Figure 18. Proposed reaction mechanism in HFIP
以上のように筆者は、α位に酸素置換基を有する一置換光学活性 5 員環イミンを用いた JU-3CR をジア ステレオ多様的な反応へと展開することに成功した。また反応の速度論的解析と Hammett 解析の結果か ら、本反応の律速段階がイミニウムイオンに対するイソシアニドの付加の段階であることを明らかにし た。同様の解析から本反応が二つの異なるイオン対中間体を経て進行していることを証明し、それぞれ のイオン対に対する溶媒効果によって立体選択性が変化することも明らかとした。本研究は多成分反応 をジアステレオ多様的反応へ展開できたという点で特徴的であり、また、未だ不斉反応が報告されてい ない Ugi 反応や JU-3CR の不斉化へ向けた知見を提供するものであるといえる。次章では、本反応を利用 したプラスバシン A₃ とその誘導体の全合成について詳細を述べる。 第二章 プラスバシン A3の合成研究

第一節 プラスバシン A3の逆合成解析(合成経路1)

第一章でジアステレオ多様的 JU-3CR を開発したので、次に本反応を用いたプラスバシン A₃の合成研 究を行った。まず、プラスバシン A₃の逆合成解析を行う前に本反応の基質適応範囲について調べること とし、β-ヒドロキシ-Asp 由来のイソシアニドの合成を行った。なお、Asp-β-カルボン酸の保護基としてベ ンジルエステル、*t*-ブチルエステルを用いると、α-アシルアミノ基との環化反応によりイミドが生成する ことが知られており(Figure 19)、この副反応を抑制するために嵩高いシクロへキシルエステルが用いられ



 $R = {}^{t}Bu \text{ or } Bn$

Figure 19. Aspartimide formation

る ⁵³。このことから筆者はイソシアニドのカルボン酸の保 護基としてシクロヘキシルエステルを用いることとした。 シクロヘキシルエステルは TfOH/TFA や、アニソール/無水 HF などの強酸性溶媒を用いることで除去することができ る ⁵⁴。



検討に用いたイソシアニド 17 の合成を Scheme 11 に示した。D-Ser 由来の Garner アルデヒドから調製 した文献既知のアルコール 11⁵⁵ に対し、水酸基の TIPS 化、末端オレフィンのオゾン分解と、生じたアル デヒドの Kraus 酸化を行うことでカルボン酸 12 を合成した。続いてカルボン酸 12 からシクロヘキシル エステル 13 への変換を試みた。シクロヘキサノールとの脱水縮合では複雑な混合物を与え、収率が低下 した(Table 7, entry 1)。シクロヘキサノールとの光延反応においても収率の改善は見られなかった(entry 2)。 そこで 3-ブロモシクロヘキセンとの S_N2 反応によりシクロヘキセニルエステル 14 へと変換した後に、接 触水素還元によりシクロヘキシルエステル 13 へと導いた ⁵⁶。この際、シクロヘキセニル基の除去が競争 して起こるのを防ぐために、Pd-フィブロイン(Pd/Fib)⁵⁷を触媒として用いた。次に、得られたシクロヘキ シルエステル 13 のイソプロビリデン基と Boc 基を TFA により除去し、N-ホルミルサッカリン ⁵⁸を用い てアミン選択的にホルミル化を行うことでアルコール 15 を得た。このアルコール 15 を Jones 酸化の条件 に付し、得られたカルボン酸をアリルエステルとして保護することでホルムアミド 16 を得た。これをト リホスゲンにより脱水することでイソシアニド 17 を合成した。 JU-3CR の検討に用いるカルボン酸 19 は D-Ser (18)のアミノ基を Boc 化した後、水酸基とカルボン酸を TIPS 基で保護し、MeOH, H₂O 存在下で K₂CO₃を作用させることにより TIPS エステルをカルボン酸へと 変換することで合成した(Scheme 12)。



合成したイソシアニド 17、カルボン酸 19、イミン 4a を用いて HFIP 中で JU-3CR を行ったところ、反応 は複雑な混合物を与え、望みの JU-3CR 成績体 20 は全く得られなかった(Scheme 13a)。また、より単純な 基質であるイソシアノ酢酸エステル 21 を用いた場合も同様に複雑な混合物を与え、イソシアノ基β位の カルボニル基の存在が本反応の進行の可否に影響することが示唆された(Scheme 13b)。

Scheme 13. JU-3CR using β -isocyanoesters



αイソシアノカルボキサミドは分子内環化反応によりオキサゾリンを与えることが Zhu らによって報告されている(Scheme 14)⁵⁹。反応溶液の ESI-MS スペクトルの解析結果からイソシアニド1分子とイミン2分子が結合した化合物の存在が示唆されたことから、イミンと三量体の平衡にオキサゾリンが加わることによってヘテロ三量体 23 が生成し、望みとする反応が進行しなかったと考察した(Scheme 15)。



5a

この結果を踏まえ、イソシアノ基β位のエステルを還元したイソシアニド用いることで JU-3CR が進行 すると考えた。シクロヘキシルエステル 13 から、イソプロピリデン基と Boc 基の除去、N-ホルミル化、 水酸基の Troc 化を経て合成したホルムアミド 24 をトリホスゲンにより脱水しイソシアニド 25 を合成し た。このイソシアニド 25 とカルボン酸 19、イミン 4a を用いて HFIP 中で JU-3CR を行ったところ、望み の *trans*-26 が収率 57%で得られたため、この基質を用いて全合成を行うこととした(Scheme 16)。

Scheme 16. JU-3CR using isocyanide 25



以上の検討結果を踏まえて筆者が立案したプラスバシンA3の逆合成解析を示す(Figure 20)。



Figure 20. Retrosynthetic analysis of plusbacin A₃: 1st approach

プラスバシン A₃のエステル部位はマクロラクトン化によって合成終盤で構築することとし、環化前駆体は三つのセグメント 27、28、29のアミド縮合により合成することとした。トリペプチド 27 はイミン 4a、カルボン酸 19、イソシアニド 25 を用いた JU-3CR によって合成し、テトラペプチド 29 はイミン 4a、 カルボン酸 34、イソシアニド 33 を用いた JU-3CR によって合成できるテトラペプチドと D-threo-β-ヒド ロキシ-Asp 保護体 32 とのアミド縮合により合成することとした。JU-3CR に用いるイソシアニドはβ-ア シロキシイソシアニドとし、JU-3CR の後にカルボン酸への酸化を行うことを計画した。カルボン酸 28 は 3-ヒドロキシイソへキサデカン酸と allo-D-Thr 保護体 31 から導くこととし、3-ヒドロキシイソへキサデ カン酸は既知のβ-ラクトン 30 から合成することを計画した。

第二節 プラスバシン A3の合成研究(合成経路1)

まず合成に必要な各ユニット化合物を合成した。以下にその詳細を述べる。

ŌTIPS

Scheme 17. Synthesis of protected D-threo-β-hydroxy Asp 32

BocHN

36



D-*threo*-β-ヒドロキシ-Asp 保護体 18 は L-Ser からイソシアニド 17、19 の合成と同様にして合成したシ クロヘキシルエステル *ent*-13 から合成した。シクロヘキシルエステル *ent*-13 を Jones 酸化することで、 イソプロピリデン基の除去と生じた第一級アルコールの酸化を行い、カルボン酸 35 を得た²⁷。得られた カルボン酸 35 をアリル基で保護し、TFA による Boc 基の除去を経て D-*threo*-β-ヒドロキシ-Asp 保護体 32 を合成した(Scheme 17)。

quant.

CyO₂C

32

OTIPS

Scheme 18. Synthesis of isocyanide 33

DMF

92%



イソシアニド 33 の合成を Scheme 18 に示す。文献既知のアルコール 37⁶⁰ に対して、酸による Boc 基の 除去、N-ホルミルサッカリンを用いたアミン選択的なホルミル化、水酸基の Troc 化を行うことでホルム アミド 38 とし、これをトリホスゲンにより脱水することでイソシアニド 33 を合成した。

Scheme 19. Synthesis of protected allo-D-Thr 17



allo-D-Thr 保護体 31 は allo-D-Thr (39)を適切に保護し、TFA により Boc 基を除去することで合成した (Scheme 19)。

カルボン酸 28 の合成は以下のように行った(Scheme 15)。Nelson らの報告に従い、10-ウンデセナール とケテンとの触媒的不斉[2+2]付加環化反応によりβ-ラクトン 30⁶¹を収率 94%、不斉収率 92% ee で合成し た。このβ-ラクトン 30 に対し第二世代 Grubbs 触媒存在下、2-メチル-3-ブテン-2-オールを三炭素源とし てクロスメタセシス反応を行うことで⁶²、脂溶性側鎖を伸張しアリルアルコール 41 を得た^{*7}。これを Burgess 試薬⁶³により脱水することでジエンとした後、接触水素還元によりβ-ラクトン 42 へと導いた。 続いて、β-ラクトン環を加水分解し、ヘキサンから再結晶することで(*R*)-3-ヒドロキシイソヘキサデカン 酸(43)を光学純品として収率 80%で得た。次に *allo*-D-Thr 保護体 31 とのアミド縮合、ベンジル基の除去 を経てカルボン酸 28 を合成した。

Scheme 20. Synthesis of carboxylic acid 28



^{*7}クロスメタセシス反応において、三炭素源として 3-メチル-1-ブテンを用いると 3-メチル-1-ブテンや生成物のオレフィンがより熱力学的に安定な三置換オレフィンへと異性化し、そこからさらにオレフィンメタセシスが進行することで炭素 鎖長の異なる化合物からなる混合物が得られた。また生成物と出発物質の分離も困難であった。この異性化を抑制するとともに生成物の分離を容易にするために三炭素源として 2-メチル-3-ブテン-2-オールを用いている。



まず、JU-3CR 成績体 *trans*-26 に対する Troc 基の除去を検討した(Scheme 21)。亜鉛-銅合金により除 去を試みたがリン酸ニ水素カリウム水溶液を酸として用いた場合は反応が進行せず(Table 8, entry 1)、塩 化アンモニウムを用いた場合は Troc 基が還元された脱クロロ体 46 が中程度の収率で得られた(entry 2)。 この脱クロロ体 46 が生成する機構は次のように考えられる(Scheme 22)。

Scheme 22. Proposed mechanism of reductive dechlorination



まず *trans*-26 の炭素 – 塩素結合が金属亜鉛に酸化的付加し、これによって生成した有機亜鉛化合物が プロトン化されることにより脱クロロ体 46 が得られたと考察した。この副反応を抑えるためにプロトン 源のない条件下で一電子還元を行えるヨウ化サマリウムを用いたところ、中程度の収率で目的のアルコ ール 45 を得ることができたが、この条件下においても脱クロロ体 46 が生成した(entry 3)。そこで、Lewis 酸を用いた炭酸エステルの加溶媒分解条件として Troc 体 *trans*-26 をメタノール中、金属サマリウムとヨ ウ素で処理したところ、メタノリシス反応が進行し望みとするアルコール 45 を収率 95%で得ることがで きた ⁶⁴ (entry 4)。



次に得られたアルコール 45 をアミン 27 へと変換した(Scheme 23)。アルコール 45 を Dess-Martin 酸化 ⁶⁵ することでアルデヒドとし、これを Kraus 酸化 ⁶⁶によってカルボン酸へと変換したのち、カルボキシ 基のアリル化と Boc 基の除去を経てアミン 27 を得た。このアミンはシリカゲルカラムクロマトグラフ ィーによる精製を行わずに次の反応に用いた。





テトラペプチド 29 は JU-3CR を利用して合成した(Scheme 24)。イソシアニド 33、イミン 4a、カルボン 酸 34 を HFIP 中で反応させることで *trans/cis* = 54/46 で *trans* 体を若干優先して得た。Scheme 21 と同様に して、MeOH 中で金属サマリウムとヨウ素を用いて *trans*-48 の Troc 基を除去した後、接触水素還元によ る Cbz の除去と、生じた第一級アミンに対するジアゾ転位反応⁶⁷によってアジドアルコール 49 を得た。 このアルコールを Dess-Martin 酸化、Kraus 酸化の二工程でカルボン酸へと酸化し^{*8}、D-threo-β-ヒドロキシ -Asp 保護体 32 とアミド縮合することで対応するテトラペプチド 29 を合成した。

**5-アミノアルコールを酸化すると、中間体のアルデヒドが生成するとともに Cbz 基で保護されたアミンが分子内環化 を起こし、生じたヘミアミナール中間体がさらに酸化されることで&-ラクタムが生成することが明らかになった(Scheme 25)。アルコール 49 では、アミンを解離性プロトンを有さないアジドとして保護することでこの副反応を防いでいる。 Scheme 25. Lactam formation



望みのセグメントを合成したので、プラスバシン A₃の全合成に向けてセグメントの連結と最終段階の マクロラクトン化反応を行った(Scheme 26)。テトラペプチド 29 の N 末端 Boc 基を除去し、カルボン酸 28 とアミド縮合することでヘキサペプチド 52 を二工程収率 63%で得た。C 末端アリル基とアジド基の還 元を行い、生じたアミンを Goodman 試薬⁶⁸によりグアニジル化することで Orn 側鎖を Arg 側鎖へと変換 した。このカルボン酸 53 をアミン 11 と縮合し、C 末端アリル基を除去することでマクロラクトン化前駆 体のヒドロキシカルボン酸 54 を得た。この化合物は不安定であったことからシリカゲルカラムクロマト グラフィーによる精製を行わず、続くマクロラクトン化反応を行った。



Scheme 26. Attempt to synthesize plusbacin A₃

Scheme 27. Attempt to synthesize plusbacin A₃



ヒドロキシカルボン酸 54 に対するマクロラクトン化条件を検討した。EDCI と DMAP を用いる一般的 な脱水縮合条件や光延反応によるエステル化では反応が進行しなかったものの、TFFH (55)^{*9} を用いてカ ルボン酸を酸フッ化物へと活性化する条件のみ、望みのマクロラクトンと分子量が一致する化合物が得 られた。NMR スペクトルでは構造を決定することはできなかったため、脱保護条件に付すこととした (Scheme 27)。VanNieuwenhze らの報告を参考にアニソール存在下、無水フッ化水素を用いる脱保護反応を 行い、反応の粗生成物を LC-MS によって分析した。

*9Fluoro-*N,N,N',N'*-tetramethylformamidinium hexafluorophosphate (TFFH)はカルボン酸を温和な条件下、酸フッ化物に変換 する縮合剤であり 1995 年に Faham らによって報告された ⁶⁹。立体障害の大きいアミノ酸の縮合にはしばしば酸塩化物を 中間体とした方法が用いられるが、アスパラギン酸から生じる酸塩化物は容易に分子内環化を起こす。一方で酸フッ化物 は酸塩化物に比べて安定性が高く、アスパラギン酸から環化反応を起こすことなく酸フッ化物を調製できる ⁷⁰。 LC-MS 分析の結果を Figure 21 に示す。反応粗生成物(a)では複数のピークが見られ、特に保持時間 27 分から 32 分の間にプラスバシン A₃ と同一の分子量及び、その加水分解体の分子量を有するピークが複数得られた(c)。いずれのピークが望みの化合物であるかを確認するため、プラスバシン A₃の標品との比較を行った。天然物は保持時間 28 分から 29 分の間に一つのピークが見られたため(b)、保持時間からは 粗生成物(c)におけるピーク A、B、C のいずれかが望みの化合物であると推定された。

反応粗生成物と標品をダブルインジェクションした LC-MS チャートを Figure 21d に示す。このチャートから天然物はピーク B と一致したが、ピーク B の分子量はプラスバシン A₃の加水分解体と同じであることから、反応粗生成物には望みの化合物が含まれていないことが明らかになった。





c) chromatogram of crude product





無水フッ化水素を用いた脱保護反応は VanNieuwenhze らによって報告されていることから、以上の結 果はヒドロキシカルボン酸 54 に対するマクロラクトン化が進行していなかったためであると推察され る。カルボン酸と TFFH から生成する酸フッ化物中間体 56 は反応性が高く、分子内には求核性を有する アミド結合が存在する。よって、酸フッ化物と水酸基が離れた配座をとっていたために、アミド酸素原子 や窒素原子が反応することで、望みとしない位置で分子内環化反応が進行したものと考察した(Scheme 28)。

Scheme 28. Possible side reaction



ヒドロキシカルボン酸 54 は望みのエステル結合を構築するのに適していないと考え、次に分子間での エステル化によりエステル結合を構築する経路で合成研究を行うこととした。 第三節 プラスバシン A3の逆合成解析(合成経路 2)

第二節で述べたように、プラスバシン A₃のエステル部位はマクロラクトン化では構築できなかった。 そこで分子間エステル化を経由する新しい合成経路を考案した。以下にその逆合成解析を示す(Figure 22)。





プラスバシン A₃の 28 員環構造は VanNieuwenhze らと同じ位置でのマクロラクタム化により構築する こととし、環化前駆体は第二節で述べたのと同様に JU-3CR を用いて合成できるカルボン酸 57 と、アル コール 58 とのエステル化、JU-3CR を用いて合成できるペンタペプチド 59 とのアミド化を経て合成する こととした。本合成経路では、カルボン酸をより単純な基質とすることで、マクロラクトン化で構築する ことができなかったエステル部位の構築が容易になると考えられる。 第四節 プラスバシン A₃の合成研究(合成経路 2)

まず、エステル化反応の検討に用いるカルボン酸57とアルコール58の合成を行った。

Scheme 29. Synthesis of carboxylic acid 57



カルボン酸 57 はアルコール 45 を Dess-Martin 酸化、Kraus 酸化の二工程で酸化することによって合成した(Scheme 29)。

Scheme 30. Synthesis of alcohol 58



アルコール **58** はβ-ラクトン **30** を加水分解することによって得られるβ-ヒドロキシカルボン酸 **61** のカ ルボン酸をアリル基で保護することによって合成した(Scheme 30)。



次にカルボン酸 57 とアルコール 58 を用いるエステル化の検討を行った(Scheme 31)。EDCI、DMAP を用いた一般的なエステル縮合条件下では、エステル結合は形成されるものの、シロキシ基がβ脱離し た化合物 63 が得られた(Table 9, entry 1)。これはカルボン酸の活性化に伴いアズラクトンが生成し、α水 素の酸性度が上昇したことが原因と考察した(Scheme 32)。なお、生成物のオレフィンの幾何異性は未決 定である。

Scheme 32. Mechanism of the side reaction



縮合剤として T3P⁷¹を用いた場合は反応が進行せず(entry 2)、TFFH を用いた場合は基質の分解が進行した(entry 3)。また、DEAD や角田試薬 ⁷²を用いた光延反応条件も試みたが、いずれも反応は進行しない結果となった(entries 4, 5)。最後に Lewis 酸として Dy(OTf)₃を用いた条件 ⁷³においても望みの化合物 62 は 全く得られなかった(entry 6)。

Table 9, entry1 の結果からアズラクトンの形成を抑制することができれば、副反応のβ脱離が抑制できる と考えられたため、このような環化反応を抑制するべく、アミノ基をカーバメートで保護することとし た。





化合物 11 から導いたアミノ基を Boc 基で保護した threo-β-ヒドロキシ-Asp 保護体 ent-35 と、ヒドロキ シカルボン酸 43 のカルボン酸をアリル基で保護したアルコール 64 を用いて脱水縮合を行うと、収率 77% で望みのエステル 65 が得られ、シロキシ基の脱離は見られなかった(Scheme 33)。続く変換を見据え、65 の Boc 基を酸性条件下で除去することでアミン 66 を得た。このアミンから誘導できるイソシアニドはα-イソシアノカルボニル構造を有するため、第一節で述べたように JU-3CR の基質として適していないと考 えられる。そこで、このアミンを C 末端がカルボン酸である Pro(3-OH)と脱水縮合することで合成を進め ることとし、再度合成経路の変更を行った。







上図に筆者が再度考案した逆合成解析を示す(Figure 23)。28 員環の構築は VanNieuwenhze らの報告と 同じ位置でのマクロラクタム化により行うこととし、環化前駆体は Pro(3-OH)セグメント 67、69 とアミ ン 66、68 から合成することとした。*C* 末端がカルボン酸である Pro(3-OH)セグメント 67、69 は JU-3CR により直接合成することができないため、コンバーチブルイソシアニドを用いた JU-3CR により合成する こととした。 Scheme 34. Example of convertible isocyanide by Borthwick et al.



Borthwick らは、コンバーチブルイソシアニド 73^{*10}を用いて合成した Ugi 成績体 74 のベンジル基を 除去して得たフェノール 75 に対して、1,1'-carbonyldiimidazole (CDI, 76)を作用させることで、カルボニル 基を *N*-アシルオキサゾリジノン 77 として活性化し、これを加水分解することでカルボン酸 78 へと変換 している(Scheme 34)⁷⁴。この報告を参考に同様の芳香族イソシアニドを用いて Pro(3-OH)セグメント 67、 69 の合成を行うこととした。

*10Ugi 反応により、生成物にはイソシアニド由来のアミド結合が構築されるが、これを他の官能基へと変換することがで きれば、有機合成化学上さらに有用である。このような観点の元、このアミド結合を選択的にカルボン酸やエステルへと 変換できるイソシアニド 79-81 が考案されている ⁷⁵⁻⁷⁷ (Scheme 35)。これらはコンバーチブルイソシアニドと呼ばれイソシ アニド 73 はその中でも温和な条件下、アミド結合を他の官能基へと変換できる。

Scheme 35. Convertible isocyanide



コンバーチブルイソシアニドを用いた JU-3CR により Pro(3-OH)セグメントを合成することとし、まず はセグメント 67 の合成を行った(Scheme 36)。



五員環イミン 4a と p-Ser 保護体 82、コンバーチブルイソシアニド 83 を用いて HFIP 中で JU-3CR を行った。その結果 Joullié-Ugi 成績体は得られたものの、望みとしないジアステレオマー*cis*-84 が収率 64%で 優先して得られ、望みの *trans*-84 の収率は 22%であった(*trans*//*cis*=74/26)。望みのジアステレオマー*trans*-84 のアセチル基を三価サマリウムを用いて除去し、*N-アシルオキ*サゾリジノンを経てアリルエステル 85 へと変換した。このアリル基を 0 価バラジウム触媒を用いて除去することでセグメント 67 を合成した。 このように、JU-3CR のジアステレオ選択性に課題を残すものの、コンバーチブルイソシアニド 83 を用 いて Pro(3-OH)セグメントを合成することができた。第一章で述べたように、本反応のジアステレオ選択 性はイソシアニドの電子密度に影響を受け、電子豊富なイソシアニドを用いた際に *trans* 選択性は向上す る。イソシアニド 83 はイソシアノ基に電子求引性の *sp*²炭素原子が結合しており、この電子求引性誘起 効果により、*cis* 体が優先して得られたものと考えられる。そこで福山、菅らにより報告された第三級ア ルキル基を有するイソシアニド 86⁷⁸を用いたところ、ジアステレオ選択性は改善し、望みのジアステレ オマ*-trans*-87 が収率 51%で得られた(*trans*/*cis*=58/42)。この *trans*-87 に 'BuOK を作用させると、フェノ ールの脱離に伴い分子内環化反応が進行し、*N-アシルオキ*サゾリジノン 88 が得られた。これを加水分解 することで、セグメント 67 へと導いた。



次に同様の合成法を用いてもう一方の Pro(3-OH)セグメント 69 の合成を行った(Scheme 37)。*Allo*-D-Thr (39)のアミンを Boc 化し、D-Ala 保護体との縮合と、第二級水酸基の TIPS 化を経てジペプチド 89 を三工 程収率 97%で得た。接触水素還元によりベンジル基を除去することで得られたカルボン酸 90 と五員環イ ミン 4a、コンバーチブルイソシアニド 86 を用いた HFIP 中での JU-3CR により、Joullié-Ugi 成績体 *trans*-91 を得た。これを *N*-アシルオキサゾリジノンを経由してカルボン酸へと変換し、セグメント 69 を合成 した。





残りのセグメント 68 は D-threo-β-ヒドロキシ-Asp 保護体 32 と Arg 保護体 92 の縮合と、Boc 基の除去 を経て合成した(Scheme 38)。



Scheme 39. Total synthesis of plusbacin A₃

4 つのセグメントの合成を終えたので、プラスバシン A3 の全合成に向けてセグメントの連結を行った (Scheme 39)。カルボン酸 67 とアミン 66 の縮合によりテトラデプシペプチド 94 を得た後、C 末端のアリ ル基を除去することでカルボン酸 95 を合成した。また、カルボン酸 69 とアミン 68 から脱水縮合と N末 端 Boc の除去によりアミン 97 を合成した。合成したアミン 97 とカルボン酸 95 を縮合し、収率 64%で環

化前駆体を得た。C 末端のアリル基と N 末端 Boc を除去し、EDCI と HOAt を用いてマクロラクタム化を 行うと、環化反応が進行し、望みの環化体 99 が三工程収率 60%で得られた。この環化体 99 に対してア ニソール存在下無水フッ化水素を作用させることですべての保護基を除去し、プラスバシン A3 の全合成 を達成した。合成したプラスバシン A3 の逆相 HPLC 分析を行ったところ(Figure 24)、保持時間は 10.6 min であり天然物と完全に一致した(Figure 24a, d, e)。





Figure 24. HPLC analysis of synthetic plusbacin A₃

また、合成品と天然物の¹HNMR スペクトルの比較を行った(Figure 25)。両者のスペクトルはほとんどの部分で良い一致を示した(Figure 25a, b)。ペプチドのイオン型による僅かなスペクトルの違いが見られたため、両者を 1:1 で混合し、¹HNMR スペクトルを測定したところ、一つのスペクトルに収束した(Figure 23c)。従って、合成品が天然物と確かに一致することが確認できた。



Figure 25. Comparison of ¹H NMR spectra of synthetic and natura lplusbacin A₃

以上より、筆者はプラスバシン A3の全合成を達成した(Scheme 40)。



Scheme 40. Summary of synthesis of plusbacin $A_3(1)$



プラスバシン A₃の全合成を達成したため、次に誘導体の合成に着手した。序論で述べたようにプラス バシン A₃ はその類縁体であるエンペドペプチンと同様の作用機序で抗菌活性を示すと考えられており、 この際に Ca²⁺とカルボン酸の結合が重要であると考えられる。そこで、*threo*-β-ヒドロキシ-Asp の水酸基 はプラスバシン A₃の抗菌活性に影響しないと考え、合成に多段階を要すこのアミノ酸残基を Asp に変換 したジデオキシ誘導体 100 を設計した(Figure 26)。





ジデオキシ誘導体 100 はプラスバシン A₃の全合成に用いたセグメントの *threo*-β-ヒドロキシ-Asp 残基 を Asp 残基に変換したセグメントを用いて同様に合成することができると考え、セグメントの合成を行 った。

Scheme 41. Synthesis of amine 103



市販の D-Asp 保護体 101 の保護基を適切に変換し、得られたアミンと Arg 保護体 92 とのペプチドカッ プリングによりジペプチド 102 を三工程収率 89%で得た。得られたジペプチド 102 の Boc 基を除去する ことで望みのアミン 103 を得た(Scheme 41)。 Scheme 42. Synthesis of amine 106



3-ヒドロキシイソヘキサデカン酸(43)のカルボン酸をアリル基で保護した後、L-Asp 保護体 104 と脱水 縮合することでエステル 105 を得た。このエステルの Boc 基を酸性条件下除去することでアミン 106 を 塩酸塩として得た(Scheme 42)。



Scheme 43. Completion of synthesis of plusbacin A₃ analoge **100**

望みの二つのセグメントを合成したので、プラスバシン A₃の全合成と同様、セグメントの連結と環化 反応を行った(Scheme 43)。セグメント 67 と 106 の脱水縮合とアリル基の除去により 108 を、103 と 69 の 脱水縮合と Boc 基の除去により 110 をそれぞれ合成した。合成した 108 と 110 をアミド縮合することで 鎖状ノナデプシペプチド 111 を収率 90%で得た。次に、C 末端アリル基と N 末端 Boc 基をそれぞれ除去 し、高希釈条件下で EDCI、HOAt を作用させることでマクロラクタム化を行い、三工程収率 48%で環化

体 112 を合成した。最後に、全ての保護基をアニソール存在下、無水フッ化水素を用いて除去し、逆相 HPLCによる精製を経て、ジデオキシ誘導体 100 を収率 76%で得た。

以上のように筆者は Joulli-Ugi 反応を鍵反応としたプラスバシン A₃(1)の全合成を達成し、本合成経路 を利用してプラスバシン A₃のジデオキシ誘導体 100 も合成した。続く第三章では合成したプラスバシン A₃とジデオキシ誘導体 100 の生物活性について述べることとする。

第三章 プラスバシン A3 及び誘導体の生物活性

第一節 プラスバシン A3 誘導体と天然物の構造と生物活性の比較

	iviius ^α (μg/mL)	
Strain	plusbacin $A_3(1)$	dideoxy analogue 100
Smith (MSSA)	2	-
MSSA1 (MSSA)	2	>128
MR-6 (MRSA)	1	>128

Table 10. Minimum inhibitory concentrations of 1 and 100

^a minimum inhibitory concentration

合成したプラスバシン A₃ とジデオキシ誘導体 100 の抗菌活性を測定した (Table 10)。プラスバシン A₃ は黄色ブドウ球菌(Smith, MSSA1, MR-6)に対して MIC 値 1-2 μg/mL で抗菌活性を示したのに対し、ジデ オキシ誘導体 100 の MIC 値は MSSA1、MR-6 のいずれに対しても 128 μg/mL 以上であり、抗菌活性は認 められなかった。この結果はプラスバシン A₃ (1)に含まれる *threo*-β-ヒドロキシ-Asp の水酸基が活性に必 須であることを示している。活性消失の理由として、分子内水素結合の様式が変化したことによる化合 物配座の変化が考えられたため、CD スペクトルを用いて、化合物の配座の比較を行った。



Figure 27. CD spectra of 1 and 100

Figure 27 に 1 と 100 の CD スペクトルを示した。青線で示したプラスバシン A₃ スペクトルは 223 nm 付近に正の、203 nm 付近に負の極大が見られる。これに対し、赤線で示したジデオキシ誘導体のスペク トルには正の極大が見られなかった。このように CD スペクトルから、両者の二次構造が大きく異なる ことが示唆された。従って、プラスバシン A₃ の *threo*-β-ヒドロキシ-Asp の水酸基は分子内水素結合によ り環状ペプチドの構造を活性配座に保つ役割を担っていると考えられ、この水素結合については第五章 で詳述する。以上のように、抗菌活性に対する水酸基とプラスバシン A₃の構造の重要性を示すことが できた点は、今後の構造活性相関研究に有用な情報を与えるものといえる。 第二節 プラスバシン A3 に対する薬剤耐性と耐性株に対するゲノムシークエンス解析

序論で述べたようにリピド II に結合する化合物は薬剤耐性に抵抗性示すものが多く、プラスバシン A 3も同様の性質を示すものと予想される。そこで、プラスバシン A3 に対する薬剤耐性がどの程度生じる のかを調べることとした。黄色ブドウ球菌 Smith 株に対しプラスバシン A3 を低濃度で作用させ、時間経 過に伴い MIC 値が増大する割合を調べた。また、一般的な抗菌薬の一例としてリファンピシンを、薬剤 耐性に抵抗性を示す化合物としてバンコマイシンを用いて同様の実験を行った。その結果、リファンピ シンの MIC 値は 3 日後に 32000 倍に増大するのに対し、プラスバシン A3 の MIC 値は 25 日後においても 8 倍の増大にとどまった(Figure 28)。これはバンコマイシンと比較しても 4 倍の値であり、プラスバシン A3 が薬剤耐性に抵抗性を有することを明らかにした。



Figure 28. Resistance acquisition during serial passaging in the presence of sub-MIC levels of antimicrobials. The x axis is the number of days, and the y axis is the highest concentration of the cells during passaging.

次に、この実験により得られたプラスバシン A₃耐性株に対するゲノムシークエンス解析を行った。解 析の結果、いくつかのタンパク質をコードする遺伝子に変異が見られた。この結果を Figure 29 に示す。 Figure 29 に示した変異によりタンパク質の機能がどのように変化したかは不明であるため、詳細な議論 はできないものの、VraE に対する変異は、リピド II に結合する抗菌ペプチドであるナイシンに対する耐 性株からも同様に報告されており⁷⁹、この結果はプラスバシン A₃の標的分子がリピド II である可能性を 支持する結果であると考えられる。

Protein	Mutation
alpha/beta hydrolase	Arg48His; Ile18Thr
ArcR	Ser27Pro
Bacteriophage	Val2Leu
Capsular polysaccharide synthesis enzyme CapA	lle50Val
Di-tripeptide ABC transporter	Gly61Val
Hypothetical protein	Tyr154fs
Integraço: 7 total mutations	*402fs; Glu393fs; Glu397*; His383fs;
	Lys398*; Lys398Asn; Val400del
Lip2	*602del
Phage tail protein	His72Tyr; Ser41Ala
Putative periplasmic-iron-binding protein BitC	Ser88Leu
Putative uncharacterized protein	Leu7Ser
Similar to two-component response regulator	Ser105Leu
Transposase	Asp24Asn; Phe153Leu; Ser151Pro
VraE	Pro325Ala

Figure 29. List of proteins associated with plusbacin A_3 -resistant S. aureus

suggested by the genome sequence analysis

第四章 細胞壁生合成前駆体の固相全合成

第一節 合成計画

これまでに述べたように、プラスバシン A₃の標的分子はリピド II であることが示唆されるが、どのような結合様式で結合するのかは未解明であった。この結合様式を解明することができれば、プラスバシン A₃をリードとした新規抗菌薬の設計指針が得られるものと考え、次にプラスバシン A₃とリピド II の 相互作用を調べることを計画した。

リピド II は細菌の膜成分であるが、その存在量は極めて少なく、グラム陰性細菌の場合には一細胞あ たり 2000 分子程度しか存在しない⁸⁰。このような背景から、リピド II やその生合成前駆体のリピド I、 Park ヌクレオチドの量的供給を目的として、これまでにこれら細胞壁生合成前駆体及びその誘導体の化 学合成が報告されている。Scheme 44 に VanNieuwenhze らにより報告されたリピド I 及びリピド II の初の 全合成例を示す^{81,82}。いずれも同様の合成戦略により全合成が達成されている。ペプチドセグメント 113 または 117 と糖セグメント 114 もしくは 118 との脱水縮合により糖ペプチドを合成し、このリン酸基を イミダゾリドとして活性化することで 115、119 へと導いている。この活性化されたリン酸に対しウンデ カプレニルリン酸 116 を反応させることでリピド I、リピド II の全合成を達成している。





また、Park ヌクレオチド (122)の初の全合成は Hitchcock らにより達成されており、ウリジン 5'-モノリ ン酸から調製したモルホリデート 121 とモノリン酸 120 を用いたリン酸基間の縮合により全合成が達成 されている(Scheme 45)⁸³。非対称ジリン酸化の際に活性化するモノリン酸が異なるという違いがあるもの の、いずれの例でも、リン酸基間の縮合には 4 日から 2 週間の長時間を要し、その収率も低いことが問 題であった。

Scheme 45. First total synthesis of Park nucleotide (122)



リビド II はペプチド、糖、ジリン酸、脂溶性側鎖という性質の異なる成分を同一分子内に有しており、 上記のような液相での合成の場合、化合物の単離・精製操作が煩雑になると考えられる。そこで筆者はリ ビド II の合成を固相法で行うことを計画した。固相法では全ての中間体を固相樹脂上で扱うため、液相 法で問題となる単離・精製操作を簡便に行うことができる。また、固相合成法はペプチド部や糖部の構造 を変化させた誘導体を網羅的に合成するのにも適しており、プラスバシン A₃の作用機序解明のためにも 適した方法であると考えられる。

Scheme 46. Synthesis of Park nucleotide analogue (123)



黒須らは、結核菌の Park ヌクレオチドの蛍光誘導体 123 の合成を報告しており、その際にペプチド 117 は Boc 固相合成法により合成し、その後は液相で合成が行われている(Scheme 46)⁸⁴。従って、糖部の導入 と低反応性が問題となっているジリン酸化をいかにして固相上で行うかが重要であると予想される。


Figure 30. Reported analogues

Figure 30 にこれまで合成されたリピド I, II、Park ヌクレオチドの誘導体の例を示した。ダンシル Park ヌクレオチド (124)は MraY 阻害剤のアッセイの基質として用いられる^{85,86}。また、より短い脂溶性側鎖 を有する蛍光標識リピド I 125 は酵素反応を用いて合成がなされている⁸⁷。リピド II の誘導体としてはよ り短い脂溶性側鎖である neryl 基を有するネリルリピド II (126)⁸⁸ や脂溶性側鎖部位に蛍光標識が施され た 127⁸⁹が報告されている。

以上の知見を踏まえ、プラスバシン A₃ との結合親和性評価を行うために、より単純な neryl 基を有する **126** を合成標的として設定した。また、固相合成の有用性を示すべく、リピド I や Park ヌクレオチド 及びその蛍光標識体の合成へも適用可能な合成法を開発することとした。



Figure 31. Retrosynthetic analysis of neryl-lipid II (126)

ネリルリビド II (126)の逆合成解析を Figure 31 に示す。リビド II のジリン酸結合は酸性条件化で酸素 原子がプロトン化を受けることによりリン酸基の脱離能が上昇し、容易に加水分解される。また、ジリン 酸が脱離基として働くことで N-アセチルムラミン酸 (MurNAc)のアノマー結合の開裂が進行しうる。従 って、Fmoc ペプチド固相合成法で一般的に用いられる酸性条件下での脱樹脂反応は利用できないと予想 した。そこで、塩基性水溶液で加水分解することで脱樹脂可能なポリエチレングリコール型ヒドロキシ メチル安息香酸(HMBA-PEG)樹脂を固相担体として選択した。リビド II の Lys 残基のアミノ基に蛍光基 を導入することを見据え、Lys 残基の保護基は弱塩基性条件下選択的に除去できる Fmoc 基を選択し、カ ルボン酸と水酸基の保護基はそれぞれ、脱樹脂と同時に除去できるベンジルエステルまたは、アセチル 基とした。固相担持ネリルリビド II 128 は固相担持テトラペプチド 129 に対して二糖ユニット 130 を縮 合し、続いて neryl リン酸から導けるイミダゾリド 131 との固相上でのジリン酸化を行うことで合成する こととし、固相担持テトラペプチド 129 は Fmoc 法と Alloc 法を用いて合成することとした。本合成経路 は二糖ユニット 130 を単糖ユニット 132 に変更することでリビド I 誘導体や Park ヌクレオチドの合成へ も応用可能である。 第二節 ネリルリピド I, II と Park ヌクレオチドおよび蛍光標識体の固相全合成

まず、合成に用いるユニット化合物の合成を行った。

Scheme 47. Synthesis of monosaccharide unit 132



単糖ユニット 132 は D-GlcNAc(133)から合成した文献既知のムラミン酸保護体 134⁹⁰ から合成した (Scheme 47)。ムラミン酸保護体 134 のベンジリデンアセタールを酸性条件下で除去し、生じた 1,3-ジオ ールをアセチル基で保護した。ベンジルエーテルを加水素分解し、生じた水酸基に対してホスホロアミ ダイトを作用させて得た亜リン酸エステルを、過酸化水素を用いて酸化することで糖リン酸 137 を得た。 最後にフェニルスルホニルエチル基を DBU を用いたβ脱離反応により除去し、単糖ユニット 132 を合成 した。

Scheme 48. Synthesis of disaccharide unit 130



二糖ユニット 130 は D-GlcNAc(133)と D-グルコサミン(138)から合成した文献既知の二糖 139⁹⁰から同様 に合成した(Scheme 48)。二糖 139 のベンジル基を除去して得られたアルコールをリン酸エステル 140 へ と変換し、フェニルスルホニルエチル基を除去することで 130 を得た。

Scheme 49. Synthesis of imidazolide 131



イミダゾリド 131 はネリルリン酸アンモニウム塩(141)⁹¹をトリエチルアミン塩へと変換したのち、CDI と反応させることで合成した(Scheme 49)。このイミダゾリド 131 は単離することなく次の反応に用いた。

Scheme 50. Solid-phase synthesis of glycopeptide 146



ユニット化合物の合成を終えたので、まずはネリルリピド II (126)の合成を行った(Scheme 50)。HMBA-PEG樹脂に担持された Fmoc-D-Ala 142 を出発物質とし、Fmoc 法により Fmoc-D-Ala-OH、Alloc-L-Lys(Fmoc)-OH を順次縮合した。ここで α -アミノ基の保護基を Alloc 基に変更したため、以降は Alloc 法を用いて Alloc-D-Glu-OBn と二糖ユニット 130 を縮合した。二糖ユニット 130 の縮合では 130 の L-Ala 残基のエピ メリ化が懸念されたが、縮合剤として PyAOP、塩基として弱塩基である acridine (145)を用い、DMF と CH₂Cl₂の混合溶媒*¹¹で反応を行うことでエピメリ化を抑制しつつ縮合を行った。また、二糖ユニット 130 は 1.5 当量用い、この縮合を二回行うことで反応は定量的に進行した。なお、各アミド縮合の進行は Kaiser 試験により確認した。

*11アミノ酸の縮合ではアズラクトンの形成に伴い、活性化されたカルボン酸のα位の異性化が進行する。異性化を抑制す るために HOBt のような添加剤が利用されるが、反応溶媒もこの異性化に影響を与え、CH₂Cl₂のような非極性溶媒を共溶 媒とすることで異性化を抑制できることが報告されている⁹²。



Scheme 51. Optimization of diphosphate formation



Figure 32. Time course of diphosphate formation

固相上での糖ペプチドの合成を達成したため、次にリン酸基間の縮合を行った。前述のように過去の 合成例ではリン酸基間の縮合に長時間を要し、その収率も低いことが問題であった。固相合成では撹拌 効率の低下から、反応速度が更に低下することが予想されたため、固相上でのリン酸基間の縮合に先立 ち、液相で反応条件の最適化を行うこととした。

N-アセチル-D-グルコサミン保護体 147 から合成した文献既知の糖リン酸 148⁹³ をモデル基質とし、Park ヌクレオチドの合成に用いるモルホリデート 121 とのリン酸基間の縮合を検討した(Scheme 51)。反応は DMF 溶媒中 25 ℃で行い、³¹P NMR で追跡した。過去の例を参考に活性化剤として 1*H*-tetrazole (150)を用 いたところ、24時間後の収率は18%であった(Table 11, entry 2)。本反応は活性化剤が121のモルホリン窒素原子をプロトン化することで活性化し、反応が進行する。そこで、より酸性度の大きい活性化剤を用いて引き続き検討を行うこととした。*pK*a 4.2 の 151 や *pK*a 3.7 の 152 を用いると、収率はそれぞれ 48%、47%まで向上した(entries 3,4)。次に関根らにより報告された 153 (*pK*a 2.9)⁹⁴ を用いたところ、58%というこれまでで最も高い収率が得られた(entry 5)。本反応の時間経過を Figure 32 に示した。狙い通り活性化剤の酸性度の向上に伴い反応速度が増大していることがわかり、153 を用いた場合は 24 時間で反応が定常状態に達することが明らかになった。以上の検討より、ジリン酸化の活性化剤は 153 が最適であると決定し、次に固相上でのリン酸基間の縮合を行うことでネリルリビド II (126)の合成を行った。



固相担持糖ペプチド 146 のアリル基を Pd(PPh₃)₄と PhSiH₃を用いて除去し、イミダゾリド 131 を活性化 剤 153 存在下で反応させた。固相上での反応性の低下から反応温度を 50 ℃としたところ、リン酸基間の 縮合が進行し、154 を得た。この Fmoc 基をピペリジンを用いて除去した後、ベンジル基とアセチル基の 除去と脱樹脂を LiOH を用いて THF、MeOH、H₂O 混合溶媒中で行った。得られた粗生成物を逆相 HPLC により精製し、ネリルリピド II (126)を得た。合成した 126 のスペクトルデータは文献値⁸⁸ と良い一致を 示し、ここにネリルリピド II (126)の固相全合成を総収率 21%で達成した (Scheme 52)。 Scheme 53. Solid-phase synthesis of neryl-lipid I (157) and Park nucleotide (122)



次に確立した合成経路を用いてネリルリピド I (157)と Park ヌクレオチド (122)の合成も行った(Scheme 53)。固相担持テトラペプチド 129 に対して単糖ユニット 132 を同様の条件下縮合し、155 を得た。この アリル基を 0 価パラジウム触媒を用いて除去し、ネリルリピド II (126)の合成と同様に 131 とのジリン酸 基間の縮合と脱保護、脱樹脂を行うことでネリルリピド I (157)の固相合成を総収率 20%で達成した。固 相担持糖ペプチド 155 からリン酸基間の縮合に用いる 131 をウリジン 5'-モノリン酸から誘導されるモル ホリデート 121 へと変更し、同様の変換を行うことで Park ヌクレオチド (122)の固相合成も達成した。合成した 122 のスペクトルデータは文献値 ⁹⁵と良い一致を示した。

以上のように筆者はネリルリピド II (126)、ネリルリピド I (157)、Park ヌクレオチド (122)の固相全合 成を達成した。本合成法は用いるユニットを変更することでこれら 3 種類の化合物を迅速に合成するこ とが可能であり、糖ペプチド部の変換も自在に行うことができる効率的なものである。 Lipids I, II 及び Park ヌクレオチドに蛍光基を導入した蛍光標識体は細胞壁生合成酵素の機能評価に用 いられる^{86,96}。確立した合成経路は Lys 残基のアミノ基に化学修飾の導入が可能な経路となっているた め、ネリルリピド II (126)、ネリルリピド I (157)、Park ヌクレオチド (122)の Lys 残基にそれぞれ異なる 蛍光基を導入した蛍光標識体の合成を行うこととした。



Scheme 54. Solid-phase synthesis of DBD-neryl-lipid II (159)

固相担持ネリルリピド II (154)の Fmoc 基をピペリジンを用いて除去し、生じたアミンに対してイソチ オシアネート 159 を作用させることで DBD 基をチオウレアを介して導入した。続いて塩基性条件下での 脱保護と脱樹脂を行い、逆相 HPLC により精製することで、DBD-ネリルリピド II (160)を合成した(Scheme 54)。 Scheme 55. Solid-phase synthesis of FITC-neryl-lipid I (162)



同様の合成経路でフルオレセインを導入した FITC-ネリルリピド I (162)を合成した(Scheme 55)。固相 担持 neryl リピド I 156 の Fmoc 基を除去し、得られたアミンと FITC (161)を反応させることでフルオレ セインを導入し、脱保護と脱樹脂を行うことで FITC-ネリルリピド I (162)を得た。

Scheme 56. Solid-phase synthesis of dansyl-Park nucleotide (124)



同様にしてダンシル Park ヌクレオチド (124)も合成した(Scheme 56)。固相担持 Park ヌクレオチド 158 の Fmoc 基を除去し、ダンシルクロライドとのスルホニル化を行った。DMF を反応溶媒とした際には反 応が進行せず、これは Park ヌクレオチドの極性が高いために、DMF 中では固相樹脂の凝集が起こったた めであると考察した。そこで含水溶媒中で反応を行ったところスルホニル化は完結し、脱保護と脱樹脂 を経て dansyl ダンシル Park ヌクレオチド (124)を得た。標品とのスペクトルデータの比較は、合成した 124 を陽イオン交換により Na⁺塩へと変換して行い、得られたスペクトルデータは標品と良い一致を示し た。

Scheme 57. Enzymatic reaction of dansyl Park nucleotide (124)



前述のようにダンシル Park ヌクレオチド (124)は酵素 MraY の基質となることで、阻害剤評価に用い られている(Scheme 57)。そこで、合成した 124 が実際に MraY の基質となるのかを確認することとした。 ダンシル Park ヌクレオチド (124)とウンデカプレニルリン酸(116)を黄色ブドウ球菌由来の MraY 存在下 インキュベートし、反応の進行を TLC により追跡した(Figure 33)。ダンシル Park ヌクレオチド (124)か ら生成したダンシルリピド I (163)のスポットは 160 や 162 と近い位置に新たに現れ(Figure 33, lane a-d)、 MraY 阻害剤であるツニカマイシン⁹⁷を加えたところ(Figure 33, lane e)、163 の生成量の減少が見られた ことから、合成した 124 が MraY の基質となり 163 へと変換されたことが示唆された。



Figure 33. TLC analysis of enzymatic reaction

以上のように、筆者は lipids I, II 及び Park ヌクレオチドに蛍光基を導入した蛍光標識体 124、160、 162 の固相合成を達成し、本合成法が細胞壁生合成前駆体の誘導体合成に適していることを示した。続 く第五章では合成したネリルリピド II (126)とプラスバシン A₃の相互作用と、プラスバシン A₃の作用機 序に関する研究について述べる。 第五章 プラスバシン A₃の作用機序に関する研究

第一節 プラスバシン A3 とネリルリピド II の相互作用解析

プラスバシン A₃ とネリルリピド II の結合親和性を評価するにあたり、リピド II とバンコマイシンの 相互作用に関する知見を参考にすることとした。バンコマイシンはリピド II の D-Ala-D-Ala 末端に結合す ることが知られており、Ac-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala ペプチドとの結合の解離定数と熱力学的パラメーターは、 等温滴定カロリメトリー(ITC)により測定されている(Table 12)%。ITC 測定は修飾が不要であるうえ、解離 定数と各種熱力学的パラメーターを同時に測定できることから、プラスバシン A₃とリピド II の結合親和 性評価にも適していると考えた。そこで ITC を用いて結合親和性を測定することとし、ポジティブコン トロールとしてバンコマイシンを用いて同様の測定を行うことを計画した。

Table 12. Thermodynamic parameterfor complexation of vancomycin withAc-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala

<i>K</i> _d (μM)	2.1±0.3
<i>∆G</i> ⁰ (kJ · mol⁻¹)	-32.4±0.4
<i>∆H</i> ⁰ (kJ∙mol⁻¹)	-40.1±1.0
<i>T∆S</i> ⁰ (kJ · mol⁻¹)	-7.7±1.0



Figure 34. ITC raw data and binding isotherms for antibiotics interacting with neryl-lipid II. a) 200 μ M vancomycin was titrated into 20 μ M neryl-lipid II (+ 2% DMSO). b) 400 μ M plusbacin A₃ was titrated into 40 μ M neryl-lipid II (+ 4% DMSO). buffer: 10 mM sodium phosphate (pH 7.3), 150 mM NaCl, 0.9 mM CaCl₂

ネリルリピド II (20 μ M)に対してバンコマイシン(200 μ M)を滴定したところ、バンコマイシンは文献値 とよく一致する K_d 値 2.1 μ M の結合親和性を示した(Figure 34a)。一方プラスバシン A₃ はバンコマイシン よりも高濃度(400 μ M)条件においても結合親和性を示さなかった(Figure 34b)。従って、プラスバシン A₃ の結合部位はバンコマイシンが結合する D-Ala-D-Ala 末端ではなく、本測定条件下ではネリルリピド II と 結合しないことが明らかとなった。

細菌のリピド II は細胞膜上に存在しており、プラスバシン A₃ の脂溶性側鎖は細胞膜と相互作用する ことが予想される。実際、プラスバシン A₃ の脂溶性側鎖は抗菌活性に必須であることが Schaefer らに より報告されている⁹⁹。上記の実験結果から、プラスバシン A₃ とネリルリピド II の結合には細胞膜の 存在が必須であると考え、次にプラスバシン A₃ と細胞膜の相互作用について調べることとした。

第二節 リポソームとプラスバシン A3の相互作用

プラスバシン A₃の類縁体であるエンペドペプチンについては、水晶振動子マイクロバランス(QCM)法 を用いて脂質膜との相互作用が調べられている(Table 13)²³。Table 13 で示したようにエンペドペプチンと リン脂質膜の親和性は K_d 値 0.77 μ M を示し、その親和性は Ca²⁺存在下で更に増大することが報告されて いる。

Table 13. Binding affinity of empedopeptin to phospholipid membrane

	<i>k</i> _a (M-1⋅s-1)	<i>k</i> _d (s ⁻¹)	<i>K</i> _d (μM)	
without Ca2+	2835±507	2.10±0.86×10 ⁻³	0.77±0.41	
1.25 mM Ca ²⁺	4736±1262	1.47±0.70×10 ⁻³	0.30±0.11	
association rate (k) dissociation (k) rate and overall hinding affinity (K) of				

association rate (k_a), dissociation (k_d) rate and overall binding affinity (K_d) of empedopeptin.

プラスバシン A₃と細胞膜の相互作用をより簡便に調べるために、細胞膜を脂質二重膜からなるリポ ソームで摸倣し、プラスバシン A₃との相互作用を調べた。プラスバシン A₃は2つのカルボン酸と一つ のグアニジンを有しているため、中性条件下では一価の負電荷を帯びる。この負電荷により、リポソー ムの脂質膜上にプラスバシン A₃が挿入するとリポソームのゼータ電位^{*12}が低下する(Figure 35)。





*12 リポソームの表面は電荷を有する極性官能基が存在し、この電荷に起因する表面電荷により、これとは逆の電荷を有 する水溶液中のイオンはリポソーム膜の近傍に位置する。このイオンはリポソームとともに運動し、このようなリポソー ムに伴ってイオンの移動が起こる面をすべり面とよび、無限遠を基準としてすべり面の電位をゼータ電位と定義する。 卵黄ホスファチジルコリン(EPC)とコレステロール(Chol)からなるリポソームに対しプラスバシン A₃ を加えたところ、コントロールの DMSO を添加した時と比べてゼータ電位は低下し、濃度依存性も確認 することができた(Table 14, Figure 36)。従ってプラスバシン A₃は、脂溶性側鎖を脂質二重膜に挿入し、 リポソーム上に局在することが明らかとなった。また、抗菌活性が消失したジデオキシ誘導体 100 につ いても同様の結果が得られた(Table 14, Figure 36)。この結果からプラスバシン A₃はその脂溶性側鎖を用 いて細胞膜に挿入することが示唆されるが、この過程には *threo*-β-ヒドロキシ-Asp の水酸基は関与しな いことが明らかとなった。

|--|

plusbacin A ₃ (%)	0	0.5	1	2	4
average size (nm)	144.7	137.9	140.1	136.9	143.6
zeta potential (mV)	-16.1	-19.3	-20.8	-20.6	-22.0

A solution of 0.55 mM liposome (EPC:Chol = 7:3) in 10 mM sodiumphosphate (pH 7.3 + 1% DMSO) was treated with plusbacin A_3 .

Table 15.	Properties	of the I	iposome	treated	with	100
-----------	------------	----------	---------	---------	------	-----

100 (%)	0	0.5	1	2	4	
average size (nm)	144.7	139.9	137.1	138.0	141.3	
zeta potential (mV)	-16.1	-20.1	-20.4	-22.8	-22.3	
A solution of 0.55 mM liposome (EPC:Chol = 7:3) in 10 mM						





以上より、プラスバシン A₃は細胞膜に挿入した後にリピド II と相互作用すると予想される。そこ で、細胞膜上での両者の相互作用や、脂質膜の役割に関する知見を得るべく、分子動力学計算を用いた 分子シミュレーションを行うこととした。次節ではこの結果について述べる。 第三節 プラスバシン A₃とリピド II 誘導体の分子動力学シミュレーション

これまで、述べたように、プラスバシン A₃とリピド II の相互作用を直接観測することはできず、リピド II との結合には、細胞膜との相互作用が重要である可能性が示唆された。メカニズム解明のための研究指針を見出す一助とするべく、計算化学的手法により、プラスバシン A₃とリピド II の相互作用を調べることを計画した。

創薬化学研究において計算化学の果たす役割は年々大きくなっている。タンパク質と低分子化合物の 相互作用に関してはドッキング計算が一般的に用いられる。ドッキング計算は、タンパク質の"くぼみ"を 結合ポケットに指定し、低分子化合物の三次元構造が結合ポケットの三次元構造に近づくような結合様 式を探索する。結合ポケットを指定するという性質上、ドッキング計算を行う対象は、タンパク質のよう に安定な高次構造を取っているものに限定される。一方、計算対象となる系の原子と結合を"球"と"バネ" のように捉え、その時間経過を求める分子動力学計算はタンパク質と低分子化合物の複合体の動的性質 を調べる目的で利用される。しかし、分子動力学計算によりタンパク質と低分子化合物の結合形成・乖離 という一連のイベントを求める場合、計算コストが増大することから、これを達成した例は数例のみで ある^{100,101}。リピドIIはタンパク質と比較して遥かに分子量が小さい鎖状化合物であり、最近リン脂質膜 上のリピド II の分子動力学シミュレーションが報告され、糖ペプチド部及び、脂溶性側鎖は大きく運動 することが示された¹⁰²。このように安定な配座を持たない化合物に対する相互作用を計算化学により求 める際には、ドッキング計算よりも分子動力学計算が適していると考えられる。さらに、リピド Ⅱ を対 象とする系は原子数が少ないため、計算コストも低下することから、プラスバシン A₃との相互作用をシ ミュレーションすることが十分可能であると考えた。そこで、リピド Ⅱ 誘導体とプラスバシン A₃が、脂 質二重膜存在下でどのような挙動を示すのかを、分子動力学シミュレーションにより調べることとした。 本節ではプラスバシン A3 とリピド II の相互作用に関して、分子動力学シミュレーション結果から推測さ れることについて詳述する。

まず、脂質二重膜上にリピドIIを導入した初期構造を作成した。初期構造の作成にあたり、ファルネシ ルリピドIIとナイシンの複合体のNMR構造(PDB ID: 1WCO)¹⁰³を参考にした。Orientation of Proteins in Membranes (OPM)データベース^{*13}からこのNMR構造をダウンロードし、ナイシンの構造を削除後、1palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC)膜を配置した(Figure 37a)。この構造に対してシュレディンガ ー社の計算プログラムdesmondを用いて50 nsecのMD計算を行い、50 nsec後の構造をFigure 37bに示した。



Figure 37. MD simulation of lipid II analogue

初期構造ではリピド II の糖ペプチド部が脂質膜に接しているのに対し、50 nsec 後の構造では糖ペプ チド部は溶液側に露出し、過去の報告と同様に、リピド II の配座は大きく変化することがわかった。ま たこの間のリピド II の動きを解析するため GlcNAc1 位炭素原子(Figure 38, B)、Lys-ε窒素原子(Figure 38, C)、末端 D-Ala-α炭素原子(Figure 38, D)と farnesyl 基 1 位炭素原子(Figure 38, A)間の距離を調べた(Figure 39)。その結果、これらの距離の変化が大きく、リピド II は柔軟な構造を有することが示唆された。



*¹³膜タンパク質に対する計算では、タンパク質に対して適した座標に脂質膜を配置する必要がある。Protein Data Banc (PDB) から得たタンパク質の三次元構造に対し、脂質膜を配置する場合、脂質膜の座標の決定が煩雑になる。OPM データベース は PDB データを元にタンパク質と脂質膜の位置関係を計算し、そのデータを加えた構造情報のデータベースである。 以上の結果より、50 nsec 後の構造を新たな初期構造として選択し、この系にプラスバシン A₃を加えて 再度 MD シミュレーションを行うこととした。まず、プラスバシン A₃の三次元構造を作成した。プラス バシン A₃の構造情報に関しては Wohlrab が DMSO-*d*₆ 中での NMR 構造を報告しており(Figure 40)¹⁰³、 Figure 41 に示すような分子内水素結合の存在が示唆されている。そこでこの報告を参考に、シュレディ ンガー社の計算プログラム Prime を用いてプラスバシン A₃の安定配座を探索し、これらの水素結合様式 に最も近い構造を選択した(Figure 42)。





Figure 40. NMR structure of plusbacin A₃¹⁰³

Figure 41. Intramolecular hydrogen bond¹⁰³



Figure 42. Selected structure of plusbacin A₃

Figure 37b の構造の溶液中に Figure 42 で示した構造のプラスバシン A₃を二分子配置し、MD シミュレーションの初期構造を作成した(Figure 43a)。この構造に対し、2 µsec の分子動力学シミュレーションを実施した。溶液中のプラスバシン A₃ はリピド II に接触することはあるものの、強固な結合は形成されなかった(Figure 43b)。その後、一分子のプラスバシン A₃ は脂質二重膜に挿入し(Figure 43c)、最終的にもう一分子のプラスバシン A₃ も脂質二重膜に挿入した(Figure 43d)。

a) t = 0 nsec

b) *t* = 400 nsec







d) *t* = 2 μsec



Figure 43. Snapshot of MD simulation (blue: plusbacin A₃-1, pink: plusbacin A₃-2, green: lipid II analogue, gray: membrane)

第一節で述べたように、脂質二重膜非存在下ではプラスバシン A₃ はリピド II と結合せず、MD 計算の 結果から溶液中のプラスバシン A₃ と脂質二重膜中のリピド II の結合は弱いことが示唆された。また、脂 質二重膜上でのリピド II とプラスバシン A₃ の直接の相互作用は見られず、このイベントをシミュレーシ ョンするには、さらに長時間のシミュレーションが必要であると考えられる。しかし、第二節で述べたリ ポソームを用いた実験の結果と同様に、プラスバシン A₃ が脂質二重膜に挿入することが計算化学からも 支持された。これらの結果より、脂質膜に挿入することでプラスバシン A₃ の配座が変化し、リピド II に 結合する可能性があると考えた。そこで、溶液中と脂質膜中での配座を比較するため、MD シミュレーシ ョンで得られた構造に対してコンフォメーションのクラスタリングを行うこととした。





MD シミュレーションにおける 2 nsec ごとの構造を抽出した計 2002 個のプラスバシン A₃の構造に対 してコンフォメーションのクラスタリングを行い、得られたデンドログラムを Figure 44 に示す。このデ ンドログラムにおいてマージ距離約 3.7 (Figure 44 赤破線) でクラスタリングを行い、クラスター1-10 に 分類した。各クラスターはクラスター番号が近いほど似た配座であることを示している。このクラスタ ーを用いて、溶液中と脂質膜中のプラスバシン A₃の配座を比較した。



Figure 45. Time course of distribution of conformation



Figure 47. Structure of plusbacin A₃

Figure 45 上段はクラスターの時間分布を示しており、二分子のプラスバシン A₃ はそれぞれ色分けして 表記している。下段は、Figure 47 赤矢印で示したプラスバシン A₃の 3-ヒドロキシイソへキサデカン酸部 3 位炭素原子の脂質二重膜からの距離の時間経過を示しており、ここから青で示したプラスバシン A₃分 子は約 1.7 µsec、緑で示した分子は約 0.9 µsec のシミュレーション時間で脂質膜への挿入を起こしている ことがわかる。脂質膜への挿入前後のクラスターの分布を比較すると、その分布が異なる。青色で示した 分子では溶液中で主にクラスター8,9 を脂質膜中で 1,2 を用いており、緑で示した分子は溶液中ではクラ スター4,5 を、脂質膜中ではクラスター4 を取っている。この結果から、クラスター1-4 は脂質膜中で優 先し、クラスター5-10 は溶液中で優先する配座であることが示唆される。

Figure 46. Relationship between conformation and distance between β-hydroxy-Asps

次に、クラスター間の構造の差異を調べるため、抗菌活性に必須であった 2 つのβ-ヒドロキシ-Asp 残 基のβ炭素原子(Figure 47 青矢印)間の距離を調べた。Figure 46 は、Figure 45 上段の図を 2 つのβ-ヒドロキ シ-Asp 残基β炭素原子間の距離で色分けしたものであり、ここからクラスター1-4 はこの距離が短く、一 方クラスター5-10 はこの距離が長くなっている。ここから、2 つのβ-ヒドロキシ-Asp 残基間の分子内水素 結合の存在が示唆され、この水素結合は脂質膜中で形成されやすいと推察される。 2 つのβ-ヒドロキシ-Asp 残基間の水素結合について調べるため、分子動力学シミュレーションにおける 0.1 nsec ごとの構造を抽出して調べた結果、脂質膜中(Figure 48a)、溶液中(Figure 48b)ともにβ-ヒドロキシ-Asp 残基間の分子内水素結合が見られる構造が存在した。



Figure 48. Intramolecular hydrogen bond of plusbacin A3

次に、このような分子内水素結合を有する構造の数を解析した。脂質プラスバシン A₃の 3-ヒドロキシ イソヘキサデカン酸部 3 位炭素原子の脂質二重膜からの距離が 30 Å 以下の構造を脂質膜上に存在する構 造とみなすと、Figure 45 青色で示した分子は *t*=881.0 nsec で、緑で示した分子は *t*=1703.3 nsec で脂質膜 に挿入している(Figure 49)。脂質膜中、溶液中の構造の中でβ-ヒドロキシ-Asp 残基間の分子内水素結合が 見られる構造の数をそれぞれ求め、二分子のプラスバシン A₃ での値を平均すると、脂質二重膜中では 21%、溶液中では 3.7%の構造がこの水素結合を形成していた。プラスバシン A₃の配座自由度が大きいた め、脂質膜中においても、この水素結合が形成される時間が約 20%であったと考察でき、これは Figure 44 で示したデンドログラムからも示唆されるが、この結果の解釈については、溶液中での NMR 構造の 解析等の実験データとの比較が必要である。なお、この水素結合は第三章で述べたジデオキシ誘導体と の CD スペクトルの差の要因であると考察でき、脂質膜中ではこの水素結合によりプラスバシン A₃の配 座が溶液中とは異なると考えられる。

molecule	time (nsee)	location	number of s	number of structures		
	time (fisec)	location	H-bond	total		
plusbacin A ₃	0-880.9	solution	993	8809		
(blue)	881.0-2000.0	membrane	2988	11192		
plusbacin A ₃	0-1703.2	solution	36	17032		
(green)	1703.3-2000.0	membrane	0	2970		

Figure 49. Structural analysis

第一節から第三節までの結果を踏まえ、プラスバシン A₃の推定反応機構を考察した。溶液中のプラス バシン A₃はリビド II と結合せず、まず細胞膜へ挿入が起こる。つぎに、膜状に移動したプラスバシン A₃ は、β-ヒドロキシ-Asp 残基を介した分子内水素結合が形成されることで配座の変化が起こる。この水素 結合によりプラスバシン A₃は溶液中とは異なる配座をとってリビド II と結合し、その重合を阻害してい るものと推察される(Figure 50)。以上の機構は計算のみの実験結果を伴わない、全くの推測ではあるが、 今後この機構を実験的に検証するべく、リポソーム存在下でリビド II とプラスバシン A₃の結合を調べる 実験系を構築し、詳細を検討する予定である。



Figure 50. Proposed mechanism of plusbacin A₃

結語

- 1) 五員環イミンを用いる JU-3CR の立体選択性を溶媒により制御し、各ジアステレオマーを同一の出発 物質から得るジアステレオ多様的 JU-3CR を開発した。
- 2) JU-3CR の反応速度論的解析から二つの異なる反応機構が競争していることを証明し、その結果立体 選択性の変化が生じることを明らかにした。
- 3) JU-3CR を用いるプラスバシン A₃の効率的合成法を確立し、プラスバシン A₃の全合成及び ジデオキシ誘導体の合成を行った。
- プラスバシン A₃が抗菌活性を示すために必要な配座は *threo*-β-ヒドロキシ-Asp 部位の水酸基に よって保たれていることを明らかにした。
- 5) 固相合成法を用いた細胞壁生合成前駆体群の合成法を確立した。
- 6) 脂質膜非存在下ではプラスバシン A₃はリピド II と結合せず、プラスバシン A₃はリポソームと相互 作用することから、細胞膜脂質二重層に挿入することが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究科 市川 聡 教授に心より感謝します。

本研究を進めるにあたり、懇切丁寧な御指導、有益な御助言を賜りました北海道大学大学院 薬学研究科 松田 彰 特任教授に心より感謝します。

本研究を進めるにあたり、懇切丁寧な御指導、有益な御助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究科 薬師寺 文華 講師に心より感謝します。

本研究を行うにあたり、有益な御指導を賜り、活発な御討論をしていただきました北海道医療大学 薬学部 佐藤 浩輔 講師、慶應義塾大学理工学部 松丸 尊紀 特任助教に心より感謝します。

本論文を審査して頂き、有益なる御助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究科 周東 智 教授、 並びに、北海道大学大学院理学研究院 谷野 圭持 教授に心より感謝いたします。

プラスバシン A3の標品を提供していただいた塩野義製薬株式会社に深く感謝致します。

フッ化水素装置について御教授いただいた大阪大学蛋白質研究所 北條 裕信 教授に感謝致します。

生物活性測定を行っていただいた帝京大学医真菌研究センター 浜本 洋 准教授に感謝いたします。

リポソーム作成について御指導いただいた、北海道大学大学院薬学研究科 山田 勇磨 准教授に感 謝いたします。

分子動力学計算に関して御指導いただいた産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング 研究センター 広川 貴次 研究チーム長に感謝いたします。

日々活発な御討論、御助言をいただきました北海道大学大学院 創薬科学研究教育センター有機合成 医薬学部門の皆様に心より感謝します。

最後に、筆者の学生生活を経済的、精神的に支えてくれた両親、妹に感謝します。

実験の部

NMR スペクトルは、JEOL JNM-ECA-500、JEOL JMM-ECS-400、JEOL JNM-ECX-400P を用いて測定した。¹H NMR および ¹³C NMR の化学シフトは、テトラメチルシランを内部標準としたときのδ値を ppm で、スピン結合定数 J 値を Hz で表示した。

シグナルの多重度は、s: singlet、d: doublet、t: triplet、q: quartet、sept: septet、m: multiplet、br: broad の略号 を用いて示した。またシグナルの帰属は¹H-¹H COSY スペクトルに基づいて行った。

質量分析は、Thermo Scientific Exactive を用いて測定した。

IR スペクトルは、日本分光 FT/IR-460 を用いて測定した。

CD スペクトルは日本分光 Jasco J720 を用いて測定した。

反応溶媒として用いた塩化メチレン、アセトニトリルは五酸化二リンより蒸留したものを用いた。 MeOH、トルエンは金属ナトリウムより蒸留したものを用いた。水は脱イオン水を Millipore Millia-Q[®] Advantage A10[®] 超純水製造装置で精製したものを用いた。その他の試薬および溶媒については特に記載 のない限り市販のものを用いた。

TLC は Merck silica gel 60 F₂₅₄を用いた。

順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、充填剤として Merck silica gel 60 (0.063-0.200)、Kanto Chemical Silica Gel 60N (spherical, neutral, 63-210 µm)を用いた。フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーには充填剤として Kanto Chemical Silica Gel 60N (spherical, neutral, 40-50 µm)を用いた。

SH シリカゲルは Fuji Silysia Chemical LTD. Scavenger SH silica を用いた。

セライト濾過には nacalai tesque Celite 545 を用いた。

第一章

(S)-3-(Triisopropylsiloxy)-2-pyrrolidinone (3a)

A suspension of (S)-4-amino-2-hydroxybutylic acid (2, 16.6 g, 139 mmol) and HMDS (210 mL) in o-xylene (260 mL) was treated with TMSCl (300 µL, 2.37 mmol) at 145 °C for 14 h. OTIPS The mixture was concentrated in vacuo, and the residue in EtOH (270 mL) was treated with 1 M aq. HCl (30 mL) for 10 min. The mixture was concentrated in vacuo to afford a crude lactam. A suspension of the crude lactam and imidazole (24.9 g, 366 mmol) in CH₂Cl₂ (200 mL) was treated with TIPSCl (31.3 mL, 146 mmol) at room temperature for 13 h. The reaction was quenched with MeOH (10 mL), and the mixture was concentrated in vacuo. The residue was diluted with AcOEt, and the organic phase was washed with 1 M aq. HCl, sat. aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by silica gel column chromatography (ϕ 10 cm \times 20 cm, 1-15% AcOEt/hexane) to afford **3a** (27.3 g, 105 mmol, 76% over 2 steps) as a pale yellow oil. ¹H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 7.72 (br s, 1H, NH), 4.26 (dd, 1H, α -CH, J_{α -CH, β -CH = J_{α -CH, β -CH = 8.0 Hz), 3.19-3.13 (m, 1H, γ -CH), 3.09 (ddd, 1H, γ -CH, J_{γ -CH, β -CH} = J_{γ -CH, β -CH</sub> = J_{γ} -CH, γ -CH = 8.0 Hz), 2.33 (dddd, 1H, β-CH, $J_{β$ -CH, β-CH = 12.6, $J_{β$ -CH, α-CH = $J_{β}$ -CH, γ-CH = 8.0, $J_{β$ -CH, γ-CH = 2.9 Hz), 1.81 (ddd, 1H, β-CH, $J_{β$ -CH, β-CH = 12.6, $J_{\beta-CH,\alpha-CH} = J_{\beta-CH,\gamma-CH} = J_{\beta-CH,\gamma-CH} = 8.0$ Hz), 1.18-0.95 (m, 21H, <u>Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 177.2, 70.5, 38.5, 32.1, 17.9, 17.9, 12.5, 12.2; ESIMS-LR m/z 280/17 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₃H₂₇O₂NNaSi 280.1703, found 280.1705; $[\alpha]^{20}$ _D -30.72 (*c* 0.63, CHCl₃).

(S)-3-[Tris(trimethylsilyl)siloxy]-2-pyrrolidinone (3b)

A susupension of (S)-4-amino-2-hydroxybutylic acid (2, 500 mg, 4.2 mmol) and HMDS (6.0 mL) in *o*-xylene (10 mL) was treated with TMSCl (10 μ L, 79 μ mol) at 145 °C for 22.5 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue in EtOH (4 mL) was treated with 1 M *aq*. HCl (1 mL) for 10 min. The mixture was concentrated *in vacuo* to afford a crude

lactam. A suspension of the crude lactam and DMAP (616 mg, 5.0 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL) was treated with chlorotris(trimethyl)silane (1.20 g, 5.0 mmol) at room temperature for 25.5 h. The reaction was quenched with MeOH (1.0 mL) and the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with AcOEt, and the organic phase was washed with 1 M *aq*. HCl, *sat. aq*. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (3-40% AcOEt/hexane) to afford **3b** (965 mg, 2.77 mmol, 66% over 2 steps) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 5.38 (br s, 1H, NH), 3.90 (dd, 1H, α-CH, β -CH = J_{α -CH, β -CH = 7.7 Hz}), 3.38-3.31 (m, 1H, γ -CH), 3.22 (ddd, 1H, γ -CH, J_{γ -CH, γ -CH = 9.2, J_{γ} -CH, β -CH = 7.7 J₂-CH, β -CH = 8.7 Hz}), 2.38-2.31 (m, 1H, β -CH), 1.99-1.90 (m, 1H, β -CH), 0.21 (s, 27H, CH₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 176.6, 73.8, 38.5, 31.8, 0.4; ESIMS-LR *m/z* 370.15 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₃H₃₃O₂NNaSi₄ 370.1481, found 370.1479; [α]²⁰_D – 45.27 (*c* 0.71, CHCl₃).

(3*S*)-3-(Triisopropylsiloxy)-4,5-dihydropyrrole (4a) (4*S*,9*S*,14*S*)-4,9,14-Tris(triisopropylsiloxy)-1,6,11-triazatetracyclo[10.3.0.0^{2,6}.0^{7,11}]pentadecane (5a)



A solution of **3a** (51 mg, 0.20 mmol) in THF (0.5 mL) was added to a suspension of $(Cp)_2Zr(H)Cl$ (124 mg, 0.48 mmol) in THF (0.5 mL) at -20 °C over 30 min. The whole mixture was warmed to room temperature, and stirred for 6 h. To the mixture, ice cold hexane was added, and insolubles were filterd off through

a Celite pad, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford equilibrium mixture of **4a** and **5a** (40 mg, 0.17 mmol, 84%) as a yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a equilibrium mixture of **4a** and **5a**). Selected data for **4a**: δ 7.54 (s, 1H, N=C*H*), 4.90 (m, 1H, α -C*H*), 4.07-3.99 (m, 1H, γ -C*H*), 3.77-3.68 (m, 1H, γ -C*H*), 1.72-1.58 (m, 2H, β -C*H*), 1.42-0.88 (m, 21H, <u>'Pr</u>₃Si); Selected data for **5a**: δ 4.23 (m, 9H, β -C*H*), 2.98 (m, 3H, α -C*H*), 2.92 (m, 9H, δ -C*H*), 2.58 (m, 9H, δ -C*H*), 2.25-2.15 (m, 9H, γ -C*H*), 1.72-1.58 (m, 9H, γ -C*H*), 1.42-0.88 (m, 63H, <u>'Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, a equilibrium mixture of **4a** and **5a**) δ 168.6, 137.7, 132.5, 130.2, 128.4, 89.3, 79.0, 77.4, 73.7, 60.1, 45.0, 32.7, 18.2, 18.1, 18.0, 12.5, 12.2; ESIMS-LR *m/z* 242.19 [(M+H)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₃H₂₈ONSi 242.1935, found 242.1935.

(3*S*)-3-[Tris(trimethylsilyl)siloxy]]-4,5-dihydropyrrole (4b) (4*S*,9*S*,14*S*)-4,9,14-Tris[tris(trimethylsilyl)siloxy]]-1,6,11-triazatetracyclo[10.3.0.0^{2,6}.0^{7,11}]pentadecane (5b)



A solution of **3b** (35 mg, 0.10 mmol) in THF (1.0 mL) was treated with $(Cp)_2Zr(H)Cl$ (77 mg, 0.30 mmol) at 0 °C for 5 min. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 50 min. To the mixture, ice cold hexane was added, and insolubles were filterd off through a Celite pad, and the filtrate

was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by short silica gel column chromatography (50% AcOEt/hexane) to afford equilibrium mixture of **4b** and **5b** (10 mg, 0.030 mmol, 30%) as a white foam. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several confomers of a equilibrium mixture of **4b** and **5b**). Selected data for **4b**: δ 7.48-7.343 (m, 1H, N=C*H*), 4.50 (dd, 1H, α-C*H*, $J_{\alpha-CH, \beta-CH} = J_{\alpha-CH, \beta-CH} = 6.9$ Hz), 4.03-3.94 (m, 1H, γ-C*H*), 3.76-3.67 (m, 1H, γ-C*H*), 1.72-1.48 (m, 2H, β-C*H*), 0.34-0.02 (m, 27H, C*H*₃Si). Selected data for **5b**: δ 3.92-3.80 (m, 3H, β-C*H*), 2.92 (ddd, 9H, δ-C*H*, $J_{\delta-CH, \delta-CH} = J_{\delta-CH, \gamma-CH} = 8.6$, $J_{\delta-CH, \gamma-CH} = 2.9$ Hz), 2.63 (d, 3H, α-C*H*, $J_{\alpha-CH, \beta-CH} = 5.2$ Hz), 2.47 (ddd, 9H, δ-C*H*, $J_{\delta-CH, \delta-CH} = J_{\delta-CH, \gamma-CH} = 8.6$ Hz), 2.20-2.08 (m, 9H, β-C*H*), 1.48-1.41 (m, 9H, β-C*H*), 0.34-0.02 (m, 81H, C*H*₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, a equilibrium mixture of **4b** and **5b**) δ 168.3, 114.1, 112.6, 89.5, 83.2, 77.8, 60.3, 45.5, 32.6, 32.5, 0.9, 0.7, 0.6, 0.6, 0.4, 0.1, -0.4; ESIMS-LR *m/z* 332.17 [(M+H)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₃H₃₄ONSi₄ 332.1712, found 332.1714.

General procedure of Joullié-Ugi reaction

A solution of imine, carboxylic acid in solvent was treated with isocyanide at room temperature for the amount of time indicated. The mixture was then concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by high-flash silica gel column chromatography to afford the product.

(2*S*,3*S*)-*N-tert*-Butyl-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*trans*-8a) (2*R*,3*S*)-*N-tert*-Butyl-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*cis*-8a)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine 4a (29.0 mg, 0.12 mmol), 3-phenylpropionic acid (7a, 18.0 mg, 0.12 mmol) and *tert*-butyl isocyanide (6, 13.6 µL, 0.12 mmol) in toluene (1.2 mL). The mixture was stirred at room

temperature for 25 h. Purification by high-flash silica gel column chromatography (10-60% AcOEt/hexane) afforded trans-8a (4.9 mg, 0.017 mmol, 14%) as a yellow oil and cis-8a (27.8 mg, 0.059 mmol, 49%) as a yellow oil. Data for trans-8a: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.30-7.15 (m, 5H, Ph), 6.87 (s, 1H, 'BuNH), 4.72 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, J_{3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH} = 3.5 Hz), 4.33 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH), 3.66-3.44 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.08-2.91 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.66 (m, 2H, PhCH₂), 2.21 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -Pro- γ -Pro-} $Pro-\delta-CH = 12.4$, J_3 -hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- β -CH = 3.5 Hz), 1.92 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_3 -hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- $Pro-\gamma-CH = 12.4, J_{3-hydroxy-Pro-\gamma-CH, 3-hydroxy-Pro-\delta-CH} = 6.9$ Hz), 1.29 (s, 9H, ^{*i*}Bu), 1.13-0.95 (m, 21H, ^{*i*}Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 173.0, 172.7, 169.2, 168.4, 141.2, 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 126.3, 84.3, 73.1, 71.9, 69.8, 51.6, 51.1, 45.9, 45.1, 36.8, 36.3, 34.5, 32.1, 31.0, 30.9, 28.8, 28.7, 18.1, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 497.32 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₇H₄₆O₃N₂NaSi 497.3170, found 497.3175; [α]²⁰_D –19.45 (*c* 3.18, CHCl₃). Data for *cis*-8a: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.32-7.10 (m, 5H, Ph), 5.51 (s, 1H, ^{*t*}BuN*H*), 4.40 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro-β-C*H*, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H* = 10.3, *J*_{3-hydroxy-Pro-β-C*H*, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*, 3-hydrox}} hydroxy-Pro-y-CH = 6.5, J₃-hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- α -CH = 7.0 Hz), 4.28 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH, J₃-hydroxy-Pro- α -CH, 3-hydroxy-Pro- α -Pro- α -Pr hydroxy-Pro-β-CH = 7.0 Hz), 3.68 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.27 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH}, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hyd hydroxy-Pro- δ -CH = J₃-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 7.8, J₃-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 7.3 Hz), 3.03-2.89 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.65-2.44 (m, 2H, PhCH₂), 2.44-2.33 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 2.13-1.94 (m, 1H, 3-hydroxy-Proγ-CH), 1.34 (s, 9H, 'Bu), 1.14-1.00 (m, 21H, 'Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.4, 171.6, 168.3, 167.6, 141.5, 141.4, 128.6, 128.5, 126.2, 126.2, 73.2, 71.9, 64.8, 63.3, 51.6, 44.6, 43.5, 36.6, 35.7, 32.1, 31.3, 31.3, 30.9, 28.8, 18.2, 18.1, 18.0; ESIMS-LR *m/z* 497.32 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₇H₄₆O₃N₂NaSi 497.3170, found 497.3171; $[\alpha]^{19}_{D}$ +11.33 (*c* 1.39, CHCl₃).

(2*S*,3*S*)-*N-tert*-Butyl-1-(3-phenylpropanoyl)-3-[tris(trimethylsilyl)siloxy]pyrrolidine-2-carboxamide (*trans*-8b)

(2R,3S)-N-tert-Butyl-1-(3-phenylpropanoyl)-3-[tris(trimethylsilyl)siloxy]pyrrolidine-2-carboxamide (cis-8b)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4b** (33.2 mg, 0.10 mmol), 3-phenylpropionic acid (**7a**, 15.0 mg, 0.10 mmol) and *tert*-butyl isocyanide (**6**, 11.3 μ L, 0.10 mmol) in toluene (1.0 mL). The mixture was stirred at

room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography (10-45% AcOEt/hexane) afforded *trans*-8b (6.4 mg, 0.011 mmol, 11%) as a white solid and *cis*-8b (17. 3 mg, 0.031 mmol, 31%) as a white

solid. Data for *trans*-8b: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.31-7.17 (m, 5H, Ph), 6.95 (s, 1H, 'BuNH), 4.30 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, J_{3-hydroxy-Pro-β-CH}, 3-hydroxy- $Pro-\gamma-CH = 3.5$ Hz), 4.21 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH), 3.52-3.41 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH), 3.06-2.91 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.66-2.61 (m, 2H, PhCH₂), 2.25-2.16 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.82 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, J₃-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 13.2, J₃-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = 6.3 Hz), 1.30 (s, 9H, ^tBu), 0.18 (s, 27H, CH₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 173.1, 172.9, 169.1, 169.1, 141.2, 141.1, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 126.4, 126.3, 77.0, 72.5, 69.5, 69.2, 51.2, 51.1, 45.8, 45.7, 36.4, 36.3, 34.3, 33.1, 31.0, 28.7, 28.7, 28.7, 28.7, 2.1, 0.3, -0.5, -0.6, -2.2; ESIMS-LR m/z 587.30 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₇H₅₂O₃N₂NaSi₄ 587.2947, found 587.2960; [α]¹⁹D -37.36 (c 2.95, CHCl₃). Data for cis-8b: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.30-7.16 (m, 5H, Ph), 5.40 (s, 1H, 'BuNH), 4.21 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH, J₃hydroxy-Pro-α-CH, 3-hydroxy-Pro-β-CH = 6.9 Hz), 3.94 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, J₃-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 10.3, $J_{3-hydroxy-Pro-\beta-CH, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH} = J_{3-hydroxy-Pro-\beta-CH, 3-hydroxy-Pro-\alpha-CH} = 6.9 \text{ Hz}), 3.67-3.61 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-\delta-CH),$ 3.18 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J₃-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J₃-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 9.8, J₃-hydroxy-Pro- γ -Pro- γ -P $Pro-\delta-CH_{2}$ 3-hydroxy- $Pro-\gamma-CH = 6.9$ Hz), 3.01-2.91 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.64-2.41 (m, 2H, PhCH₂), 2.29-2.19 (m, 1H, 3hydroxy-Pro-γ-CH), 2.04-1.97 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.34 (s, 9H, ^tBu), 0.20 (s, 27H, CH₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 173.5, 170.1, 140.8, 128.7, 128.5, 126.5, 71.6, 59.8, 51.7, 45.3, 35.9, 33.1, 31.1, 28.7, 2.3, 2.1, -0.6. -2.1. -2.2; ESIMS-LR m/z 587.30 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₇H₅₂O₃N₂NaSi₄ 587.2947, found 587.2951; $[\alpha]^{20}_{D}$ +42.82 (*c* 1.73, CHCl₃).

(2*S*,3*S*)-*N-tert*-Butyl-1-isobutylyl-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*trans*-9b) (2*R*,3*S*)-*N-tert*-Butyl-1-isobutylyl-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*cis*-9b)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol), isobutylic acid (**7b**, 9.3 μ L, 0.10 mmol) and *tert*-butyl isocyanide (**6**, 11.3 μ L, 0.10 mmol) in HFIP (1.0 mL). The mixture was stirred at room temperature for 60 min.

Purification by high-flash silica gel column chromatography (10-40% AcOEt/hexane) afforded *trans-9b* (25.5 mg, 0.062 mmol, 62%) as a white solid and *cis-9b* (3.6 mg, 0.009 mmol, 9%) as a white solid. Data for *trans-9b*: ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.38 (s, 1H, 'BuN*H*), 4.57-4.54 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -C*H*), 4.23 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*), 3.80-3.71 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*), 2.85 (sept, 1H, CH₃C*H*C(C=O), *J*_{CH₃C*H*C(C=O), *CH*₃C*H*C(C=O) = 6.9 Hz), 2.24 (dddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- γ -C*H* = 12.6, *J*_{3-hydroxy-Pro- γ -C*H*, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*, 3-hydroxy-Pro- β -C*H* = 4.0 Hz), 2.01-1.95 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*), 1.32 (s, 9H, 'Bu), 1.19-1.02 (m, 27H, CH₃CHC(C=O), $\frac{i}{Pr_3}$ Si); ¹³C NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 179.3, 179.2, 171.6, 78.5, 75.8, 71.8, 71.2, 52.7, 52.3, 46.6, 46.2, 35.2, 33.6, 33.3, 33.2, 28.8, 19.8, 19.6, 19.3, 19.1, 18.5, 18.5; ESIMS-LR *m/z* 435.30 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₂H₄₄O₃N₂NaSi 435.3013, found 435.3018; [α]²⁰_D – 59.34 (*c* 2.55, CHCl₃). Data for *cis-9b*: ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.23 (s, 1H, 'BuN*H*), 4.62 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H* = 7.5, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H* = 9.8, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H*, 3-hydroxy-Pro- β -C*H* = 6.9 Hz), 4.35 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- α -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H* = 7.5 Hz), hydroxy-Pro- α -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H* = 7.5 Hz),}}}}}}}}}}}}

3.80 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-\delta-CH} = 9.8$, $J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH} = 9.7, $J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH} = 2.9 Hz), 3.56 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-<math>\delta$ -CH} = 9.8, $J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH} = J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-

(2*S*,3*S*)-*N-tert*-Butyl-1-pivaloyl-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*trans-*9c) (2*R*,3*S*)-*N-tert*-Butyl-1-pivaloyl-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*cis*-9c)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol), pivalic acid (**7c**, 10.2 mg, 0.10 mmol) and *tert*-butyl isocyanide (**6**, 11.3 μ L, 0.10 mmol) in HFIP (1.0 mL). The mixture was stirred at room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography

(10-40% AcOEt/hexane) afforded *trans*-9c (27.7 mg, 0.065 mmol, 65%) as a white solid and *cis*-9c (3.6 mg, 0.012 mmol, 12%) as a white solid. Data for *trans*-9c: ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.24 (s, 1H, 'BuN*H*), 4.46 (br s, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*), 4.24 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-C*H*), 3.89 (br s, 2H, 3-hydroxy-Pro-δ-C*H*), 2.24 (br s, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H*), 1.97 (br s, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H*), 1.32 (s, 9H, <u>'Bu</u>NH), 1.28 (s, 9H, <u>'Bu</u>C(=O)), 1.19-1.02 (m, 21H, <u>'Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 179.5, 172.1, 74.7, 73.3, 52.3, 47.8, 40.1, 36.2, 28.8, 27.8, 18.5, 18.5, 13.6, 13.4, 13.2; ESIMS-LR *m/z* 449.32 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₃H₄₆O₃N₂NaSi 449.3170, found 449.3171; [α]²⁰_D –36.35 (*c* 2.77, CHCl₃). Data for *cis*-9c: ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 6.98 (s, 1H, 'BuN*H*), 4.59 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro-β-C*H*, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*, 3.93 (br s, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*), 3.73 (br s, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-C*H*), 2.32-2.17 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-C*H*), 2.16-2.08 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H*), 1.33 (s, 9H, <u>'Bu</u>NH), 1.26 (s, 9H, <u>'Bu</u>C(=O)), 1.19-1.06 (m, 21H, <u>'Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 179.2, 170.9, 72.4, 67.6, 52.3, 47.4, 35.0, 35.0, 29.0, 27.9, 27.7, 18.7, 18.6, 13.6, 13.4; ESIMS-LR *m/z* 449.32 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₃H₄₆O₃N₂NaSi 449.3170, found 449.3177; [α]²⁰_D +1.86 (*c* 0.50, CHCl₃).}

(2*S*,3*S*)-1-Benzoyl-*N-tert*-butyl-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*trans*-9d) (2*R*,3*S*) -1-Benzoyl-*N-tert*-butyl-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*cis*-9d)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol), benzoic acid (**7d**, 12.2 mg, 0.10 mmol) and *tert*-butyl isocyanide (**6**, 11.3 μ L, 0.10 mmol) in HFIP (1.0 mL). The mixture was stirred at room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography

(10-40% AcOEt/hexane) afforded trans-9d (33.5 mg, 0.075 mmol, 75%) as a white solid and cis-9d (5.3 mg, 0.012

mmol, 12%) as a white solid. Data for *trans-9d*: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.50-7.34 (m, 5H, Ph), 6.77 (s, 1H, 'BuNH), 4.85 (br s, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -CH), 4.52 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH), 3.61-3.52 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 2.28-2.20 (m, 1H, 3-hydroxy-Proγ-CH), 1.93-1.86 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.35 (s, 9H, ^tBu), 1.16-0.94 (m, 21H, ^tPr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 172. 5, 171.5, 169.1, 168.7, 136.4, 130.3, 130.2, 128.5, 126.9, 126.8, 76.0, 73.6, 73.3, 69.7, 51.6, 51.3, 48.3, 45.2, 34.8, 32.1, 28.8, 18.1, 18.0, 12.2, 12.1; ESIMS-LR m/z 469.29 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₅H₄₂O₃N₂NaSi 469.2857, found 469.2869; [α]²¹_D -71.52 (*c* 3.35, CHCl₃). Data for *cis*-9d: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.61-7.32 (m, 1H, PhCH=CH), 5.62 (s, 1H, 'BuNH), 4.70-4.62 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH), 4.51 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH, J_{3-hydroxy-Pro-α-CH}, 3-hydroxy-Pro-β-CH = 6.3 Hz), 3.93-3.69 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.42 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy} hydroxy-Pro- δ -CH = J₃-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = J₃-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 7.5 Hz), 2.28-2.14 (m, 1H, 3hydroxy-Pro-γ-CH), 2.04-1.96 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.36 (s, 9H, ^{*t*}Bu), 1.19-1.00 (m, 21H, ^{*i*}<u>Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 171.0, 170.7, 167.9, 167.6, 137.0, 136.0, 133.3, 130.3, 130.1, 129.9, 128.4, 128,4, 127.4, 127.0, 73.2, 72.1, 66.2, 65.3, 51.5, 47.9, 47.8, 44.1, 33.4, 30.6, 28.8, 28.6, 18.2, 18.1, 12.4, 12.2; ESIMS-LR m/z 469.29 $[(M+Na)^+]$; ESIMS-HR calcd for C₂₅H₄₂O₃N₂NaSi 469.2857, found 469.2864; $[\alpha]^{20}_D$ +12.82 (*c* 2.93, CHCl₃). (2S,3S)-N-tert-Butyl-1-cinnamoyl-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (trans-9e)

(2R,3S)-N-tert-Butyl-1-cinnamoyl-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (cis-9e)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol), *trans*-cinnamic acid (**7e**, 14.8 mg, 0.10 mmol) and *tert*-butyl isocyanide (**6**, 11.3 μ L, 0.10 mmol) in HFIP (1.0 mL). The mixture was stirred at room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography (10-40% AcOEt/hexane) afforded *trans*-**9e** (36.1 mg, 0.076 mmol, 76%) as a white solid and *cis*-**9e** (6.5 mg, 0.012 mmol,

14%) as a white solid. Data for *trans*-9e: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.74 (d, 1H, PhC*H*=CH, *J*_{PhCH=CH} = 15.8 Hz), 7.56 (dd, 2H, H-2, *J*_{H-2, H-3} = 7.5, *J*_{H-2, H-4} = 1.7 Hz), 7.42-7.34 (m, 3H, H-3, H-4), 7.03 (s, 1H, 'BuN*H*), 6.81 (d, 1H, PhC*H*=CH, *J*_{PhCH=CH} = 15.8 Hz), 4.81 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro-β-C*H*, *3*-hydroxy-Pro-γ-C*H* = 3.4 Hz), 4.48 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*), 3.89-3.75 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*), 2.35-2.26 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*), 2.05-1.99 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*), 1.33 (s, 9H, 'Bu), 1.15-1.02 (m, 21H, <u>'Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 169.2, 168.7, 166.6, 143.9, 143.0, 135.1, 134.8, 130.2, 130.0, 129.0, 128.9, 128.1, 118.0, 117.3, 73.0, 72.1, 70.0, 51.7, 51.1, 45.9, 45.3, 34.4, 32.2, 28.8, 18.1, 12.4, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 495.30 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₇H₄₄O₃N₂NaSi 495.3013, found 495.3021; [α]¹⁹_D –95.60 (*c* 3.61, CHCl₃). Data for *cis*-9e: ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.69 (d, 1H, PhC*H*=CH, *J*_{PhCH=CH} = 15.5 Hz), 7.54-7.47 (m, 2H, H-2), 7.39-7.32 (m, 3H, H-3, H-4), 6.72 (d, 1H, PhC*H*=CH, *J*_{PhCH=CH} = 15.5 Hz), 5.55 (s, 1H, 'BuN*H*), 4.53 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- α -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- α -C*H*, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- α -C*H*, 3-hydroxy-Pro- α -C*H* = 6.9, *J*_{3-hydroxy-Pro- α -C*H* = 6.3 Hz), 4.42 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- α -C*H*, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*, 3-hydro}}}}}}}

 $_{CH} = 6.9$ Hz), 3.98 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\delta$ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\delta$ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH,

(2*R*,3*S*)-1-[(*S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-methylbutylyl]-*N-tert*-butyl-3-(triisopropylsiloxy)-pyrrolidine-2-carboxamide (*cis*-9f)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4a** (12.0 mg, 0.05 mmol), Boc-Val-OH (**7f**, 11.0 mg, 0.05 mmol) and *tert*-butyl isocyanide (**6**, 5.7 μ L, 0.05 mmol) in HFIP (500 μ L). The mixture was stirred at room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography

(10-40% AcOEt/hexane) afforded *trans-9f* (15.2 mg, 0.028 mmol, 56%) as a pale yellow oil and *cis-9f* (6.2 mg, 0.011 mmol, 23%) as a pale yellow oil. Data for *trans*-9f: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 6.71 (s, 1H, 'BuNH), 5.15 (d, 1H, Val-NH, J_{Val-NH}, Val- α -CH = 9.2 Hz), 4.76 (br s, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -CH), 4.35 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH), 4.33 (dd, 1H, Val- α -CH, $J_{Val-\alpha-CH}$, $J_{$ CH, Val-β-CH = 8.6 Hz), 3.91 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH} = 8.6, J_{3-hydroxy-Pr}}} hydroxy-Pro-Y-CH = J3-hydroxy-Pro-&-CH, 3-hydroxy-Pro-&-CH, 3-hydroxy-Pro-&-A, $Pro-\delta-CH = J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH} = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} = 2.3 \text{ Hz}), 2.29-2.21 \text{ (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH)} =$ Pro-γ-CH), 2.02-1.95 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, Val-β-CH), 1.42 (s, 9H, Boc-'Bu), 1.29 (s, 9H, 'BuNH), 1.13-1.01 (m, 21H, ${}^{1}Pr_{3}Si$), 0.99 (d, 3H, Val- γ -CH, $J_{Val-\gamma-CH}$, $J_{al-\beta-CH} = 6.9$ Hz), 0.94 (d, 3H, Val- γ -CH, $J_{Val-\gamma-CH}$, $J_{al-\beta-CH} = 6.3$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 173.1, 168.9, 155.8, 79.7, 72.8, 69.5, 56.8, 51.2, 46.1, 34.6, 31.8, 28.8, 28.4, 19.5, 18.1, 17.6, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 564.38 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₈H₅₅O₅N₃NaSi 564.3803, found 564.3809; [α]²¹_D –51.78 (*c* 1.52, CHCl₃). Data for *cis*-9f: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 6.00 (s, 1H, 'BuNH), 4.97 (d, 1H, Val-NH, Jval-NH, Val-α-CH = 10.3 Hz), 4.53-4.41 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, Val-α-CH), 4.17 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH, J_{3-hydroxy-Pro-α-CH}, 3-hydroxy-Pro-_{β-CH} = 7.3 Hz), 4.00-3.93 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.53-3.41 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 2.35-2.24 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, 2.15-1.97 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, Val-β-CH), 1.43 (s, 9H, Boc-'Bu), 1.37 (s, 9H, ¹BuNH), 1.16-1.02 (m, 21H, ⁱPr₃Si), 0.93-0.86 (m, 6H, Val-γ-CH); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 171.5, 171.2, 168.3, 167.5, 156.2, 155.8, 79.9, 79.6, 73.2, 72.0, 64.2, 63.3, 57.7, 56.2, 51.6, 51.5, 44.7, 43.7, 32.4, 31.6, 30.6, 30.2, 28.8, 28.8, 28.5, 28.4, 19.9, 19.8, 18.2, 18.1, 17.9, 17.5, 12.3; ESIMS-LR m/z 564.38 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{28}H_{55}O_5N_3NaSi 564.3803$, found 564.3809; $[\alpha]^{20}D - 8.21$ (c 1.81, CHCl₃).

(2*S*,3*S*)-*N*-Butyl-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*trans*-10b) (2*R*,3*S*)-*N*-Butyl-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*cis*-10b)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol), 3-phenylpropionic acid (**7a**, 15.0 mg, 0.10 mmol) and butyl isocyanide (**6b**, 10.5 μ L, 0.10 mmol) in HFIP (1.0 mL). The mixture was

stirred at room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography (3-20-40% AcOEt/hexane) afforded trans-10b (28.5 mg, 0.060 mmol, 60%) as a pale yellow oil and cis-10b (9.8 mg, 0.021 mmol, 21%) as a pale yellow oil. Data for trans-10b: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.32-7.16 (m, 5H, Ph), 7.00 (br s, 1H, BuNH), 4.79 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -CH, J_{3-hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 3.5 Hz), 4.43 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH), 3.66 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -} CH, J_3 -hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 9.2, J_3 -hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 11.5, J_3 -hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 6.9Hz), 3.48 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 9.2 Hz),}} 3.25-3.06 (m, 2H, H-1), 3.04-2.93 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.76-2.63 (m, 2H, PhCH₂), 2.21 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J₃-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 13.2, J₃-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5, J₃-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 9.2, $J_{3-hydroxy-Pro-\gamma-CH}$, $J_{3-hydroxy-Pro-\beta-CH} = 3.5$ Hz), 1.94 (dd, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-\gamma-CH}$, $J_{3-hydroxy-$ 13.2, *J*_{3-hydroxy-Pro-y-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH} = 6.9 Hz), 1.48-1.41 (m, 2H, H-2), 1.39-1.23 (m, 2H, H-3), 1.14-0.96 (m, 21H, $\frac{i}{Pr_3}$ Si), 0.91 (t, 3H, H-4, $J_{H-4, H-3} = 7.5$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 176.2, 173.2, 169.9, 168.8, 141.1, 140.1, 140.6, 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 126.3, 76.6, 73.0, 71.6, 69.1, 45.9, 45.2, 39.4, 39.2, 36.7, 36.3, 35.6, 34.4, 32.0, 31.6, 31.5, 31.0, 30.9, 20.2, 18.1, 13.9, 13.8, 12.1; ESIMS-LR m/z 497.32 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{27}H_{46}O_3N_2NaSi$ 497.3170, found 497.3179; $[\alpha]^{20}D$ – 38.51 (*c* 2.85, CHCl₃). Data for *cis*-10b: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.31-7.16 (m, 5H, Ph), 5.61 (dd, 1H, BuNH, $J_{NH, H-1} = J_{NH, H-1} = 4.6$ Hz), 4.48 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-\beta-CH, 3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH = $J_{3-hydroxy-Pro-\gamma-CH} = J_{3-hydroxy-Pro-\gamma-CH}$ Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = $J_{3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH}$, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 (d, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 Hz), 4.37 (d, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 Hz), 4.37 Hz), 4.37 (d, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 Hz), 4.37 Hz), 4.37 (d, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 Hz), 4.37 Hz), 4.37 (d, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 Hz), 4.37 Hz), 4.37 (d, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 Hz), 4.37 Hz), 4.37 (d, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 Hz), 4.37 Hz), 4.37 Hz), 4.37 (d, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 Hz), 4.37 Hz), 4.37 (d, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4.37 Hz), 4.37 Hz), 4.37 (d, 1H, $J_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 4 3-hydroxy-Pro-β-CH = 6.9 Hz), 3.65 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, J₃-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-C hydroxy-Pro-γ-CH = 6.9 Hz), 3.30-3.14 (m, 3H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, H-1), 2.99-2.92 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.67-2.51 (m, 2H, PhCH₂), 2.09-2.02 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.98-1.88 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.51-1.39 (m, 2H, H-2), 1.39-1.24 (m, 2H, H-3), 1.13-0.99 (m, 21H, ^{*i*}Pr₃Si), 0.91 (t, 3H, H-4, *J*_{H-4, H-3} = 7.5 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 172.7, 171.8, 168.8, 168.5, 141.4, 141.3, 128.6, 128.6, 126.3, 73.5, 71.9, 65.3, 63.4, 44.8, 43.9, 39.6, 39.5, 36.4, 35.8, 32.6, 32.1, 31.7, 31.7, 31.3, 30.9, 20.3, 18.1, 18.1, 18.0, 13.9, 13.8, 12.3, 12.3; ESIMS-LR m/z 497.32 $[(M+Na)^+]$; ESIMS-HR calcd for C₂₇H₄₆O₃N₂NaSi 497.3170, found 497.3173; $[\alpha]^{20}D$ +8.51 (*c* 1.65, CHCl₃).
(2*S*,3*S*)-*N*-Phenyl-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*trans*-10c) (2*R*,3*S*)-*N*-Phenyl-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*cis*-10c)

The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine 4a (24.1 mg, 0.10 mmol),



3-phenylpropionic acid (7a, 15.0 mg, 0.10 mmol) and phenyl isocyanide (6c, 10.3 mg, 0.10 mmol) in HFIP (1.0 mL). The mixture was stirred at room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography (3-15-35% AcOEt/hexane) afforded

trans-10c (21.2 mg, 0.043 mmol, 43%) as a pale vellow solid and *cis*-10c (24.9 mg, 0.050 mmol, 50%) as a pale yellow solid. Data for trans-10c: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 9.59 (s, 1H, PhNH), 7.49 (d, 2H, H-2, $J_{H-2, H-3} = 7.5$ Hz), 7.30 (dd, 2H, H-3, $J_{3,2} = J_{3,4} = 7.5$ Hz), 7.28-7.16 (m, 5H, Ph), 7.08 (t, 1H, H-4, J_{4.3} = 7.5), 4.95 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, J_{3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy} $Pro-\gamma-CH = 2.9$ Hz), 4.66 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH), 3.65 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH}$, $Pro-\delta-CH = 8.6, J_3-hvdroxy-Pro-\delta-CH, 3-hvdroxy-Pro-\gamma-CH = 11.5, J_3-hvdroxy-Pro-\delta-CH, 3-hvdroxy-Pro-\gamma-CH = 6.9 Hz), 3.47 (dd, 1H, 3-hvdroxy-Pro-\gamma-CH = 11.5, J_3-hvdroxy-Pro-\delta-CH, 3-hvdroxy-Pro-\gamma-CH = 11.5, J_3-hvdroxy-Pro-\gamma-CH = 11.5, J_3-hvdroxy-Pro-\gamma-Pro-\gamma-Pro-\gamma-Pro-\gamma-Pro-\gamma-Pro-\gamma-Pro-\gamma-Pro-\gamma-Pro-\gamma-P$ Pro-δ-CH, J₃-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = J₃-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 8.6 Hz), 3.09-2.97 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.77-2.65 (m, 2H, PhCH₂), 2.24 (dddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, J_{3-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 12.6, J_{3-hydroxy-Pro-γ-CH} = 12.6, J_{3-hydroxy-}} γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5, J₃-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J₃-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- β -CH = 2.9 Hz), 2.01 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 12.6, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 6.9 Hz), 1.16-1.02}} (m, 21H, ^{*i*}<u>Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 174.2, 168.1, 140.9, 138.2, 129.0, 128.7, 128.4, 126.4, 124.2, 119.9, 72.3, 69.5, 46.1, 36.4, 34.4, 31.0, 18.1, 12.1; ESIMS-LR m/z 517.29 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{29}H_{42}O_{3}N_{2}N_{2}N_{3}Si 517.2857$, found 517.2866; $[\alpha]^{19}D - 47.16$ (*c* 2.12, CHCl₃). Data for *cis*-10c: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.47 (d, 2H, H-2, $J_{2,3}$ = 8.6 Hz), 7.46 (s, 1H, PhN*H*), 7.33-7.12 (m, 7H, H-3, Ph), 7.06 (t, 1H, H-4, $J_{4,3} = 8.6$ Hz), 4.60 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-\beta-CH, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH} = J_{3-hydroxy-Pro-\beta-CH, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH} = 9.2$, $J_{3-hydroxy-Pro-\beta-CH, 3-hydroxy-Pro-\alpha-CH} = 6.9$ Hz), 4.55 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH, J_{3-hydroxy-Pro-α-CH, 3-hydroxy-Pro-β-CH} = 6.9 Hz), 3.78-3.70 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.38 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = J_{3-hydroxy-Pro}}}}}</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub> Pro-&-CH, 3-hydroxy-Pro-y-CH = 9.2 Hz), 3.01-2.93 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.71-2.56 (m, 2H, PhCH₂), 2.16-2.09 (m, 1H, 3hydroxy-Pro-γ-CH), 2.01-1.95 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.11-0.98 (m, 21H, ⁱPr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 173.1, 172.0, 167.5, 166.9, 141.3, 141.1, 138.1, 137.4, 129.1, 128.6, 128.6, 128.6, 128.5, 128.4, 126.3, 124.6, 123.7, 119.9, 119.7, 73.9, 72.2, 66.2, 64.1, 45.0, 44.2, 36.4, 35.9, 32.7, 32.2, 31.4, 30.9, 18.4, 18.3, 18.1, 18.0, 12.9, 12.5, 12.3, 12.3; ESIMS-LR m/z 517.29 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₉H₄₂O₃N₂NaSi 517.2857, found 517.2872; $[\alpha]^{19}_{D}$ +15.36 (*c* 2.49, CHCl₃).

(2*S*,3*S*)-*N*-(4-Methoxyphenyl)-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*trans*-10d)

(2*R*,3*S*)-*N*-(4-Methoxyphenyl)-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*cis*-10d)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol), 3phenylpropionic acid (**7a**, 15.0 mg, 0.10 mmol) and *p*-methoxyphenyl isocyanide (**6d**,

13.3 mg, 0.10 mmol) in HFIP (1.0 mL). The mixture was stirred at room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography (3-15-35% AcOEt/hexane) afforded trans-10d (27.4 mg, 0.052 mmol, 52%) as a pale yellow solid and *cis*-10d (18.6 mg, 0.035 mmol, 35%) as a pale yellow solid. Data for *trans*-10d: 1 H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 9.41 (s, 1H, ArNH), 7.40 (d, 2H, H-2, J_{2.3} = 8.6 Hz), 7.28-7.15 (m, 5H, Ph), 6.83 (d, 1H, H-3, J_{3.2} = 8.6 Hz), 4.94 (d, 1H, 3hydroxy-Pro- β -CH, J_{3-hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 2.9 Hz), 4.63 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH), 3.78 (s, 3H, OCH₃),} 3.65 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 10.9, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 10.9, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 10.9,}}}}</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub> hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 6.3 Hz), 3.47 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J3-hydroxy-Pro- δ -Pro- $Pro-\delta-CH_{2}$ 3-hydroxy- $Pro-\gamma-CH = 8.6$ Hz), 3.09-2.97 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.77-2.65 (m, 2H, PhCH₂), 2.24 (dddd, 1H, 3hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 13.2, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 10.9, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hy}}} hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J₃-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- β -CH = 2.9 Hz), 2.00 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J₃-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy hydroxy-Pro-γ-CH = 13.2, J₃-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = 6.3 Hz), 1.15-1.02 (m, 21H, $\frac{iPr_3Si}{2}$ Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125) MHz) & 174.0, 167.8, 156.3, 140.9, 131.4, 128.7, 128.4, 126.4, 121.4, 114.1, 72.4, 69.4, 55.6, 46.1, 36.3, 34.4, 31.0, 18.1, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 547.30 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₃₀H₄₄O₄N₂NaSi 547.2963, found 547.2967; $[\alpha]^{21}$ D – 37.55 (c 2.74, CHCl₃). Data for *cis***-10d**: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) & 7.46 (s, 1H, ArNH), 7.38 (d, 2H, H-2, J_{2,3}=8.6 Hz), 7.32-7.13 (m, 7H, H-3, Ph), 6.80 (d, 1H, H-3, J_{3,2} = 8.6 Hz), 4.59 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, J_{3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH} = 9.2, J₃₋₂ hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = J_3 -hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- α -CH = 6.9 Hz), 4.55 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH, J_3 -hydroxy-Pro- α -Pro- α Pro-α-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = 6.9 Hz), 3.82-3.67 (m, 4H, OCH₃, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.38 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ- $CH, J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-\delta-CH} = J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH} = J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH} = 9.2 \text{ Hz}), 2.98$ $(dd, 2H, C(=O)CH_2, J_{C(=O)CH, PhCH} = J_{C(=O)CH, PhCH} = 8.1 Hz), 2.71-2.48 (m, 2H, PhCH_2), 2.16-2.07 (m, 1H, 3-hydroxy-1), 2.16-2.07 (m, 1H, 3-hydroxy-1), 2.16-2.07 (m, 2H, PhCH_2), 2.16-2.07 (m, 2H, PhC$ $Pro-\gamma-CH$, 1.98 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH, $3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH, $3-hydrox-Pro-<math>\gamma$ -CH, 3-hydrox-Pro-<math>hydroxy-Pro-y-CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 6.9 Hz), 1.13-0.94 (m, 21H, ^{*i*}Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 173.2, 172.0, 167.2, 166.6, 156.6, 156.1, 141.4, 141.2, 140.7, 131.5, 130.7, 128.7, 128.6, 128.4, 126.4, 126.3, 121.6, 121.5, 114.3, 113.9, 73.9, 72.2, 66.2, 64.0, 55.6, 45.0, 44.3, 36.5, 35.9, 35.6, 32.7, 32.3, 31.4, 31.0, 18.1, 18.1, 12.4, 12.3; ESIMS-LR m/z 547.30 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{30}H_{44}O_4N_2NaSi$ 547.2963, found 547.2972; $[\alpha]^{21}D$ +12.74 (*c* 1.86, CHCl₃).

(2*S*,3*S*)-1-(3-Phenylpropanoyl)-*N*-(*p*-tolyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*trans*-10e) (2*R*,3*S*)-1-(3-Phenylpropanoyl)-*N*-(*p*-tolyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*cis*-10e)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol), 3phenylpropionic acid (**7a**, 15.0 mg, 0.10 mmol) and *p*-tolyl isocyanide (**6e**, 11.8 mg, 0.10 mmol) in HFIP (1.0 mL). The mixture was stirred at

room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography (3-15-35% AcOEt/hexane) afforded trans-10e (25.6 mg, 0.050 mmol, 50%) as a pale yellow solid and cis-10e (22.3 mg, 0.044 mmol, 44%) as a pale yellow solid. Data for *trans*-10e: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 9.47 (s, 1H, ArNH), 7.37 (d, 2H, H-2, $J_{2,3} = 8.6$ Hz), 7.27-7.16 (m, 5H, Ph), 7.10 (d, 1H, H-3, *J*_{3, 2} = 8.6 Hz), 4.94 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH} = 2.9 Hz), 4.64 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH), 3.64 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 9.2, J₃-} hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 13.8, J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 6.3 Hz), 3.46 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -A, 3-hydroxy-Pro- δ hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = J3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 9.2 Hz), 3.08-2.97 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.77-2.64 (m, 2H, PhCH₂), 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.24 (dddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, J_{3-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 13.2, J_{3-hydroxy-}} $Pro-\gamma-CH, 3-hydroxy-Pro-\delta-CH = 13.8, J_3-hydroxy-Pro-\gamma-CH, 3-hydroxy-Pro-\delta-CH = 9.2, J_3-hydroxy-Pro-\gamma-CH, 3-hydroxy-Pro-\beta-CH = 2.9 Hz), 1.99 (dd, 3)$ 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 13.2, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 6.3 Hz), 1.15-1.02}} (m, 21H, ^{*i*}Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 174.1, 167.9, 140.9, 135.6, 133.7, 129.5, 128.7, 128.4, 126.4, 119.9, 72.3, 69.5, 46.1, 36.4, 34.4, 31.0, 21.0, 18.1, 12.1; ESIMS-LR m/z 531.10 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{30}H_{44}O_3N_2NaSi 531.3013$, found 531.3022; $[\alpha]^{20}D - 42.41$ (c 2.56, CHCl₃). Data for cis-10e: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.40 (s, 1H, ArNH), 7.35 (d, 2H, H-2, $J_{2,3} = 8.0$ Hz), 7.30-7.13 (m, 5H, Ph), 7.07 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 8.0$ Hz), 4.58 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -CH, $J_{3-2} = 3.0$ Hz), 7.30-7.13 (m, 5H, Ph), 7.07 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 8.0$ Hz), 4.58 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -CH, $J_{3-2} = 3.0$ Hz), 4.58 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -Pro- β -Pr hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = J_3 -hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 8.6, J_3 -hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- α -CH = 6.9 Hz), 4.55 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH, J_{3-hydroxy-Pro- α -CH, 3-hydroxy-Pro- β -CH = 6.9 Hz), 3.78-3.67 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH), 3.38} (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-\delta-CH} = J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH = $J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-<math>\delta$ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hyd hydroxy-Pro-y-CH = 8.6 Hz), 3.01-2.93 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.70-2.56 (m, 2H, PhCH₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.15-2.08 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH), 1.98 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 7.5, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -Dro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -Dro- γ -Dro-}}}}}}</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub>3-hydroxy-Pro-δ-CH = $J_{3-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH} = 8.6$ Hz), 1.13-0.94 (m, 21H, $\frac{iPr_{3}Si}{iS}$); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) 8 175.9, 173.1, 172.0, 167.2, 166.7, 141.3, 141.1, 140.9, 135.6, 134.9, 134.1, 133.3, 129.6, 129.2, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 126.9, 126.3, 119.9, 119.8, 74.9, 72.2, 66.1, 64.0, 44.9, 44.2, 36.4, 35.9, 32.7, 32.2, 31.4, 31.1, 30.9, 21.0, 18.3, 18.1, 18.0, 12.3, 12.3; ESIMS-LR m/z 531.10 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₃₀H₄₄O₃N₂NaSi 531.3013, found 531.3023; $[\alpha]^{21}_{D}$ +16.13 (*c* 2.23, CHCl₃).

(2*S*,3*S*)-*N*-(4-Chlorophenyl)-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*trans*-10f)

(2*R*,3*S*)-*N*-(4-Chlorophenyl)-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*cis*-10f)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol) 3phenylpropionic acid (**7a**, 15.0 mg, 0.10 mmol) and *p*-chlorophenyl isocyanide (**6f**, 13.8 mg, 0.10 mmol) in HFIP (1.0 mL). The mixture was

stirred at room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography (3-15-35% AcOEt/hexane) afforded trans-10f (18.5 mg, 0.035 mmol, 35%) as a white solid and cis-9f (30.7 mg, 0.058 mmol, 58%) as a white solid. Data for *trans*-10f: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 9.71 (s, 1H, ArNH), 7.43 (d, 2H, H-2, J_{2,3} = 9.2 Hz), 7.27-7.16 (m, 7H, Ph, H-3), 4.94 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, J_{3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH} = 2.9 Hz), 4.63 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH), 3.65 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydrox}-Pro- δ -CH = 8.6, J_{3-hydrox}-}}}}}}}}}}}}}}}}}</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub> CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 6.9 Hz), 3.47 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J3-hydroxy-Pro- δ -Pro- δ -Pr hydroxy-Pro-y-CH = 8.6 Hz), 3.09-2.97 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.78-2.66 (m, 2H, PhCH₂), 2.21 (dddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J₃-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 13.2, J₃-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5, J₃-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 8.6, $J_{3-hydroxy-Pro-\gamma-CH, 3-hydroxy-Pro-\beta-CH} = 2.9$ Hz), 2.01 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-\gamma-CH, 3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH = 13.2, $J_{3-hydroxy-Pro-\gamma-CH, 3-hydroxy-Pro-\delta-CH} = 6.9$ Hz), 1.16-1.01 (m, 21H, <u>ⁱPr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 174.3, 168.2, 140.8, 136.8, 129.0, 129.0, 128.7, 128.4, 126.5, 121.1, 72.2, 69.5, 46.2, 36.3, 34.4, 30.1, 18.1, 12.1; ESIMS-LR m/z 551.25 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₉H₄₁O₃N₂ClNaSi 551.2467, found 551.2474; [α]²¹_D -32.97 (c 1.85, CHCl₃). Data for *cis*-10f: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.80 (s, 1H, ArNH), 7.37 (d, 2H, H-2, J_{2,3} = 8.6 Hz), 7.30-7.13 (m, 7H, H-3, Ph), 4.61 (ddd, 1H, 3hydroxy-Pro- β -CH, J₃-hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = J₃-hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 8.6, J₃-hydroxy-Pro- β -CH, 3-hydroxy-Pro- β -Pro- β α-CH = 6.9 Hz), 4.58 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH, J_{3-hydroxy-Pro-α-CH}, 3-hydroxy-Pro-β-CH = 6.9 Hz), 3.76 (ddd, 1H, 3hydroxy-Pro-&-CH, J₃-hydroxy-Pro-&-CH, 3-hydroxy-Pro-&-CH = J₃-hydroxy-Pro-&-CH, 3-hydroxy-Pro-y-CH = 9.8, J₃-hydroxy-Pro-&-CH, 3-hydroxy-Proγ-CH = 3.5 Hz), 3.40 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, J₃-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = 9.8, J₃-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3γ-*CH* = *J*₃-hydroxy-Pro-δ-*CH*, 3-hydroxy-Pro-γ-*CH* = 9.2 Hz), 3.01-2.94 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.72-2.64 (m, 2H, PhCH₂), 2.16-2.09 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 2.00-1.94 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.10-0.93 (m, 21H, ⁱPr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 172.0, 167.8, 141.1, 137.1, 129.1, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.1, 126.4, 126.3, 121.1, 120.5, 72.3, 64.1, 45.2, 44.3, 35.9, 32.8, 31.1, 31.0, 18.1, 18.0, 12.3, 12.1; ESIMS-LR m/z 551.25 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₉H₄₁O₃N₂ClNaSi 551.2467, found 551.2470; $[\alpha]^{21}D - 12.90$ (*c* 3.07, CHCl₃).

(2*S*,3*S*)-*N*-(4-Nitrophenyl)-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (*trans*-10g)

(2R,3S)-N-(4-Nitrophenyl)-1-(3-phenylpropanoyl)-3-(triisopropylsiloxy)pyrrolidine-2-carboxamide (cis-10g)



The corresponding compounds were prepared following general procedure using imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol), 3phenylpropionic acid (**7a**, 15.0 mg, 0.1 mmol) and *p*-nitrophenyl isocyanide (**6g**, 14.8 mg, 0.10 mmol) in HFIP (1.0 mL). The mixture

was stirred at room temperature for 60 min. Purification by high-flash silica gel column chromatography (3-15-35% AcOEt/hexane) afforded *trans*-10g (6.9 mg, 0.013 mmol, 13%) as a yellow solid and *cis*-10g (33.7 mg, 0.062 mmol, 62%) as a yellow solid. Data for trans-10g: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 10.29 (s, 1H, ArNH), 8.17 (d, 2H, H-3, $J_{3,2}$ = 9.2 Hz), 7.62 (d, 2H, H-2, $J_{2,3}$ = 9.2 Hz), 7.27-7.16 (m, 5H, Ph), 4.96 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, J_{3-hydroxy-Pro-β-CH}, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 2.9 Hz), 4.66 (s, 1H, 3hydroxy-Pro- α -CH), 3.68 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J₃-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 9.2, J₃-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -H, 3-hydro hydroxy-Pro-γ-CH = 11.5, $J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH} = 6.9$ Hz), 3.50 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, $J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hyd$ hydroxy-Pro-δ-CH = *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH} = 9.2 Hz), 3.12-2.97 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.80-2.69 (m, 2H, PhCH₂), 2.20 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 13.2, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 11.5,}} J_3 -hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 9.2, J_3 -hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- β -CH = 2.9 Hz), 2.04 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_3 -hydroxy-Pro- γ -CH, hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 13.2, J₃-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = 6.9 Hz), 1.16-0.99 (m, 21H, $\frac{iPr}{3}$ Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 174.8, 168.8, 144.1, 143.5, 140.7, 128.7, 128.4, 126.5, 125.1, 119.4, 71.9, 69.7, 46.3, 36.2, 34.4, 30.9, 18.1, 12.1; ESIMS-LR m/z 562.27 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₉H₄₁O₅N₃NaSi 562.2708, found 562.2712; $[\alpha]^{20}$ – 6.22 (*c* 0.68, CHCl₃). Data for *cis*-10g: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of two rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 9.15 (s, 1H, ArNH), 7.92 (d, 2H, H-3, J_{3,2} = 9.2 Hz), 7.41 (d, 2H, H-2, J_{H-2, H-3} = 9.2 Hz), 7.34-7.18 (m, 5H, H-3, Ph), 4.76 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH, J_{3-hydroxy-Pro-α-CH, 3-hydroxy-Pro-β-CH} = 6.9 Hz), 4.68 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH} = 9.2, *J*_{3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH} = $J_{3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-α-CH} = 6.9$ Hz), 3.83 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, $J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH} = J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH}$ hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 9.5, J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 2.9 Hz), 3.44 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -H, 3hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 9.5, J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 9.7, J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 9.2 Hz), 3.07-2.95 (m, 2H, C(=O)CH₂), 2.76 (dd, 1H, PhCH₂, *J*_{PhCH}, PhCH = 15.5, *J*_{PhCH}, *C*(=O)CH = 9.2, *J*_{PhCH}, *C*(=O)CH = 6.9 Hz), 2.63 (dd, 1H, PhCH₂, *J*_{PhCH, PhCH} = 15.5, *J*_{PhCH, C(=O)CH} = 9.2, *J*_{PhCH, C(=O)CH} = 6.3 Hz), 2.40 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 12.0, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = 9.5, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH =}}} 9.2, J_{3-hydroxy-Pro-γ-CH}, 3-hydroxy-Pro-β-CH = 9.2 Hz), 2.20-2.13 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.10-0.91 (m, 21H, ¹Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.3, 168.8, 144.4, 142.6, 140.7, 128.8, 128.3, 126.5, 124.3, 118.5, 72.4, 64.3, 45.4, 35.7, 33.0, 31.0, 18.0, 17.0, 12.3; ESIMS-LR m/z 562.27 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₉H₄₁O₅N₃NaSi 562.2708, found 562.2712; $[\alpha]^{20}_{D}$ –70.67 (*c* 3.37, CHCl₃).

Competition experiment

entry 1

A solution of imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol) and 3-phenylpropionic acid (**7a**, 15.0 mg, 0.1 mmol) in toluene (500 μ L) was treated with a solution of *p*-methoxyphenyl isocyanide (**6d**, 13.3 mg, 0.10 mmol) and *p*-chlorophenyl isocyanide (**6f**, 13.8 mg, 0.10 mmol) in toluene (500 μ L) at room temperature for 4.5 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (3-15-35% AcOEt/hexane) to afford a mixture of *trans*-**10** and a mixture of *cis*-**10**. The mixture of *trans*-**10** was further purified by high-flash silica gel column chromatography (0-10-20% AcOEt/hexane) to afford *trans*-**10d** (3.6 mg, 0.0067 mmol, 7%) as a pale yellow solid and *trans*-**10f** (0.3 mg, 0.0006 mmol, 1%) as a white solid. The mixture of *cis*-**10d** (30.4 mg, 0.058 mmol, 58%) as a pale yellow solid and *cis*-**10f** (8.0 mg, 0.015 mmol, 15%) as a white solid.

A solution of imine **4a** (24.1 mg, 0.10 mmol) and 3-phenylpropionic acid (**7a**, 15.0 mg, 0.1 mmol) in HFIP (500 μ L) was treated with a solution of *p*-methoxyphenyl isocyanide (**6d**, 13.3 mg, 0.10 mmol) and *p*-chlorophenyl isocyanide (**6f**, 13.8 mg, 0.10 mmol) in HFIP (500 μ L) at room temperature and stirred for 4.5 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (3-15-35% AcOEt/hexane) to afford a mixture of *trans*-10 and a mixture of *cis*-10. The mixture of *trans*-10d (18.8 mg, 0.036 mmol, 36%) as a pale yellow solid and *trans*-10f (3.9 mg, 0.0074 mmol, 7%) as a white solid. The mixture of *cis*-10d (14.2 mg, 0.027 mmol, 27%) as a pale yellow solid and *cis*-10f (7.7 mg, 0.015 mmol, 15%) as a white solid.

第二章

(S)-2-[(R)-3-(tert-Butoxycarbonyl)-2,2-dimethyloxazolidin-4-yl]-2-(triisopropylsiloxy)acetic acid (12)



A mixture of 11 (412 mg, 1.60 mmol) and 2,6-lutidine (373 µL, 3.20 mmol) in CH₂Cl₂ (16 mL) was treated with TIPSOTf (473 µL, 1.76 mmol) at -78 °C for 5 min. The mixture was $\frac{1}{4}$ CO₂H warmed to -50 °C and stirred for 80 min. The reaction was quenched with MeOH, and the mixture was partitioned between AcOEt and 1 M aq. HCl. The organic phase was washed with

sat. aq. NaHCO₃, H₂O, and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated in vacuo. A mixture of the residue in CH_2Cl_2 (16 mL) was bubbled with O₃ at -18 °C for 30 min. Dimethylsulfide (4.2 mL, 47 mmol) was added to the mixture, and the whole mixture was stirred for 1 h. The mixture was concentrated in vacuo, and the residue and 2methylbut-2-ene (1 mL, 21. 5 mmol) in THF/BuOH (9 mL/9 mL) was treated with NaH₂PO₄ · 2H₂O (998 mg, 6.40 mmol) and NaClO₂ (289 mg, 3.20 mmol) in H₂O (3 mL) at room temperature for 3 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography ($\phi 2.5$ cm $\times 6$ cm, 2% MeOH/CHCl₃) to afford 12 (578 mg, 1.34 mmol, 84% over 3 steps) as yellow oil.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ 12.7 (br s, 1H, CO₂H), 4.60-4.54 (m, 1H, H-1'), 4.29-4.13 (m, 1H, H-5), 4.09-3.90 (m, 2H, H-4, H-5), 1.42 (m, 15H, Me, 'Bu), 1.08-0.90 (m, 21H, 'Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 175.1, 156.1, 81.1, 80.5, 71.6, 68.1, 55.0, 42.8, 31.3, 28.4, 18.0, 17.8, 17.5, 17.5, 13.6, 13.1, 12.4, 12.0; ESIMS-LR m/z 430.26 $[(M+H)^{-}]$; ESIMS-HR calcd for C₂₁H₄₀O₆NSi 430.2630, found 430.2633; $[\alpha]^{20}_{D}$ +19.08 (*c* 0.46, CHCl₃).

Cyclohex-2-enyl (S)-2-[(R)-3-(tert-butoxycarbonyl)-2,2-dimethyloxazolidin-4-yl]-2-(triisopropylsiloxy)acetate (14)



A mixture of 12 (17.4 mg, 0.040 mmol) and Cs₂CO₃ (26 mg, 0.080 mmol) in THF (400 $\mu L)$ was treated with 3-bromocyclohexene (6.4 $\mu L,$ 0.056 mmol) at room temperature for 11 h. 3-Bromocyclohexene (1.4 µL, 0.012 mmol) was added to the mixture, which was stirred for 20 min. The mixture was diluted with AcOEt, and

partitioned between AcOEt and H2O. The organic phase was washed with H2O and brine, dried (Na2SO4), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (ϕ 1 cm \times 2.5 cm, 10% Et₂O/hexane) to afford 14 (16.9 mg, 0.033 mmol, 83%) as a colorless oil.

¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz, a mixture of several rotamers of two diastereomers at 20 °C, selected data for the major rotamer): δ 5.94-5.88 (m,1H, H-2"), 5.79-5.66 (m, 1H, H-3"), 5.31-5.24 (m, 1H, H-1"), 4.78-4.75 (m, 1H, H-1'), 4.51-4.46 (m, 1H, H-5), 4.44-4.39 (m, 1H, H-5), 4.03-3.97 (m, 1H, H-4), 2.11-1.93 (m, 2H, H-4"), 1.92-1.57 (m, 4H, H-5", H-6"), 1.57-1.38 (m, 15H, Me, 'Bu), 1.15-0.97 (m, 21H, 'Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 171.2, 171.2, 170.9, 170.9, 152.6, 152.1, 152.1, 132.7, 132.6, 132.3, 132.1, 126.2, 126.0, 125.8, 125.7, 95.2, 95.2, 94.4, 80.4, 80.3, 70.9, 70.4, 70.3, 69.1, 69.0, 68.8, 68.8, 63.2, 63.1, 62.9, 62.8, 61.2, 60.3, 28.7, 28.7, 28.6, 28.5, 28.3, 28.3, 26.7, 25.9, 25.8, 25.0, 24.9, 24.3, 23.0, 19.2, 19.2, 18.9, 18.2, 18.1, 18.0, 18.0, 18.0, 12.1; ESIMS-LR m/z 534.32 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₇H₄₉O₆NNaSi 534.3221, found 534.3324.

Cyclohexyl (S)-2-[(R)-3-(tert-butoxycarbonyl)-2,2-dimethyloxazolidin-4-yl]-2-(triisopropylsiloxy)acetate (13)



A mixture of **14** (15.2 mg, 0.030 mmol) and Pd-Fib (2.5% Pd) (7.5 mg) in AcOEt (6 mL) was vigorously stirred at room temperature for 3 h under H₂ atmosphere. The catalyst was filtered off, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (ϕ 1.5cm × 1 cm, CHCl₃) to afford **13** (15.0 mg, 0.029

mmol, 98%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 4.79-4.73 (m, 1H, H-1"), 4.73 (d, 1H, H-1', $J_{1',4} = 5.2$ Hz), 4.48 (dd, 1H, H-5, $J_{H-5, H-5} = 9.2$, $J_{5,4} = 2.3$ Hz), 3.99 (ddd, 1H, H-4, $J_{4,1'} = 5.2$, $J_{4,5} = 5.8$, $J_{4,5} = 2.3$ Hz), 3.93 (dd, 1H, H-5, $J_{5,4} = 5.8$, $J_{5,5} = 9.2$ Hz), 1.98-1.81 (m, 2H, H-2"), 1.77-1.67 (m, 2H, H-2"), 1.52-1.30 (m, 21H, H-3", H-4", 'Bu, Me), 1.13-1.01 (m, 21H, <u>'Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 171.0, 170.7, 152.6, 152.1, 95.2, 94.4, 80.4, 80.3, 73.8, 73.3, 70.9, 70.3, 63.1, 62.8, 61.2, 60.3, 35.6, 31.8, 31.7, 31.7, 31.6, 26.7, 25.8, 25.5, 25.4, 25.4, 24.2, 24.1, 24.0, 23.9, 23.9, 23.0, 18.1, 18.0, 18.0, 17.9, 17.8, 12.5, 12.4, 12.4, 12.1; ESIMS-LR *m*/*z* 536.34 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₇H₅₁O₆NNaSi 536.3378, found 536.3387; [α]²⁰_D +33.94 (*c* 1.21, CHCl₃).

Cyclohexyl (2*S*, 3*R*)-3-(formylamino)-4-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyloxy)-2-(triisopropylsiloxy)butanoate (24)

 $H = \begin{bmatrix} 0 & 4 & 0 \\ 0 & 4 & 0 \\ 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 2' \end{bmatrix}$

A mixture of **13** (103 mg, 0.200 mmol) in CH_2Cl_2 (1 mL) was treated with TFA (1 mL) at 0 °C for 30 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was

washed with $H_2O(\times 2)$ and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude aminoalcohol. A mixture of the crude aminoalcohol in THF (2 mL) was treated with *N*-formylsaccharin (66 mg, 0.30 mmol) for 30 min. *N*-Formylsaccharin (44 mg, 0.20 mmol) was added to the mixture, and the whole mixture was stirred for 15 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude formamide **15**. A mixture of the crude formamide **15** and NMM (66 μ L, 0.60 mmol) in THF (2 mL) was treated with TrocCl (41 μ L, 0.30 mmol) at 0 °C for 25 min. The mixture was warmed to room temperature, and stirred for 35 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* and stirred for 35 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and stirred for 35 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with H₂O (×2) and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo.* The residue was purified by silica gel column chromatography (ϕ 1×4 cm, 40% AcOEt/hexane) to afford compound **24** (109 mg, 0.19 mmol, 94% over 3 steps) as a pale yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.20 (s, 1H, CHO), 6.08 (d, 1H, NHCHO, $J_{NHCHO, 3} = 8.6$ Hz), 4.85-4.67 (m, 5H, CH₂CCl₃, H-1', H-3), 4.60 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 2.3$ Hz), 4.38 (dd, 1H, H-4, $J_{4,3} = 5.7$, $J_{4,4} = 10.6$ Hz), 4.27 (dd, 1H, H-4, $J_{4,3} = 7.5$, $J_{4,4} = 10.6$ Hz), 1.91-1.82 (m, 2H, H-2'), 1.78-1.69 (m, 2H, H-2'), 1.45-1.11 (m, 6H, H-3', H-4'), 1.10-1.02 (m, 21H, $\frac{i}{Pr_3}$ Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 170.7, 170.0, 163.5, 153.6, 94.3, 77.1, 75.1, 74.7, 72.1, 70.5, 67.5, 65.8, 54.3, 49.7, 31.8, 31.7, 31.5, 25.3, 24.0, 23.9, 18.1, 18.0, 12.6, 12.5; ESIMS-LR *m/z* 600.15 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₃H₄₀O₇NCl₃NaSi 598.1539, found 598.1532; [α]²⁰_D +5.18 (*c* 0.54, CHCl₃).

Cyclohexyl (2S, 3R)-4-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyloxy)-3-isocyano-2-(triisopropylsiloxy)butanoate (25)



A mixture of compound **24** (11.5 mg, 0.020 mmol) and NMM (13.4 μ L, 0.12 mmol) in CH₂Cl₂ (400 μ L) was treated with triphosgene (4.7 mg, 0.016 mmol) at -78 °C for 45 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃ (1 mL), and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with H₂O (×2) and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (ϕ 0.5 × 2 cm, 10% AcOEt/hexane) to afford compound **25** (9.8 mg, 0.018 mmol,

90%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 4.96 (dddd, 1H, H-1', $J_{1',2'} = J_{1',2'} = 9.2$, $J_{1',2'} = J_{1',2'} = 4.0$ Hz), 4.80 (s, 2H, CH₂CCl₃), 4.57 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.4$ Hz), 4.51 (dd, 1H, H-4, $J_{4,3} = 6.9$, $J_{4,4} = 10.9$ Hz), 4.46 (dd, 1H, H-4, $J_{4,3} = 5.7$, $J_{4,4} = 10.9$ Hz), 4.23 (ddd, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.4$ Hz, $J_{3,4} = 5.7$, $J_{3,4} = 6.9$ Hz), 1.97-1.87 (m, 2H, H-2'), 1.78-1.72 (m, 2H, H-2'), 1.51-1.12 (m, 6H, H-3', H-4'), 1.11-1.03 (m, 21H, $\frac{i}{Pr_3}$ Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 168.9, 161.6, 153.4, 94.1, 75.2, 71.2, 70.0, 56.3, 31.7, 31.6, 25.3, 23.9, 18.0, 12.6; IR (neat) v 2138.67 cm⁻¹; ESIMS-LR *m/z* 580.14 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₃H₃₈O₆NCl₃NaSi 580.1426, found 580.1426; [α]²²_D+1.98 (*c* 1.00, CHCl₃).

Formyl-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Asp(O-cyclohexyl)-Oallyl (16)



A solution of the crude alcohol **15** (45.2 mg, 0.11 mmol) in acetone (2 mL) was treated with 2.5 M Jones reagent (132 μ L, 0.33 mmol) at 0 °C for 4 h. The reaction was quenched with ^{*i*}PrOH (1.0 mL), and the mixture was partitioned between Et₂O and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude carboxylic acid. A mixture of the crude carboxylic acid and Cs₂CO₃ (53.8 mg, 0.165 mmol) in DMF (1 mL) was treated with allyl bromide (14.3 μ L, 0.165 mmol) at room temperature for 14 h. The mixture was

partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (3-10-20% AcOEt/hexane) to afford **xx** (12.1 mg, 0.027 mmol, 24% over 4 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.25 (s, 1H, CHO), 6.29 (d, 1H, β-hydroxy-Asp-N*H*, *J*_{β-hydroxy-Asp-N*H*, β-hydroxy-Asp-α-C*H* = 9.7 Hz), 5.92 (dddd, 1H, He, *J*_{He, Ha} = 17.2, *J*_{He, Hb} = 10.3, *J*_{He, H-1} = *J*_{He, 1} = 6.3 Hz), 5.35 (dd, 1H, Ha, *J*_{Ha, He} = 17.2, *J*_{Ha, H} = 1.8 Hz), 5.28 (dd, 1H, Hb, *J*_{Hb, He} = 10.3, *J*_{Hb, H-1} = 1.8 Hz), 5.16 (dd, 1H, β-hydroxy-Asp-α-C*H*, *J*_{β-hydroxy-Asp-α-C*H*, *J*_{β-hydroxy-Asp-β-C*H*, *J*_β, *J*_{β-1}, *J*_β, *J*_β, *J*_β, *J*_β, *J*_β, *J*_β, *J*_β, *J*_β, *J*_β, *}}}</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub>*

Allyl cyclohexyl (2S, 3S)-2-isocyano-3-(triisopropylsiloxy)butandioate (17)



A mixture of compound 16 (4.3 mg, 0.016 mmol) and NMM (15.8 µL, 0.14 mmol) in CH₂Cl₂ (300 μ L) was treated with triphosgene (5.7 mg, 0.019 mol) at -78 °C for 1.5 h. The reaction was quenched with sat. aq. NaHCO₃ (1 mL), and the mixture was partitioned between AcOEt and sat. aq. NaHCO3. The organic phase was washed with H₂O (×2) and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated in vacuo to afford a crude isocyanide 15 as a pale yellow oil. This compound was directly used to the next

reaction without further purification.

Boc-D-Ser(O-triisopropylsilyl)-OH (19)

TIPSO HO₂C NHBoc

A suspension of 18 (1.05 g, 10.0 mmol) and sat. aq. NaHCO₃ (40 mL) in THF (80 mL) was treated with (Boc)₂O (3.22 mL, 14.0 mmol) at 0 °C for 10 min. The mixture was warmed to room temperature, and stirred for 13 h. Di-tert-butyl dicarbonate (0.92 mL, 4.0 mmol) was added to the

mixture, which was stirred for 2 h. The mixture was partitioned between hexane and H₂O, and the aqueous phase was saturated with Na₂SO₄. The aqueous phase was acidified with 1 M aq. HCl, and extracted with AcOEt. The organic phase was dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated in vacuo to afford a crude alcohol. A mixture of the crude alcohol and imidazole (4.77 g, 70 mmol) in CH₂Cl₂ (100 mL) was treated with TIPSCl (7.46 mL, 35 mmol) at 0 °C for 10 min. The mixture was warmed to room temperature, and stirred for 4 h. Imidazole (0.68 g, 10 mmol) and TIPSCI (1.07 mL, 5 mmol) was added to the mixture, which was stirred for 2 h. The mixture was concentrated in vacuo, and the residue was partitioned between AcOEt and 1 M aq. HCl. The organic phase was washed with sat. aq. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude silyl ester. A mixture of the crude silyl ester in THF/MeOH (60 mL/30 mL) was treated with K₂CO₃ (1.93 g, 14 mmol) at room temperature for 30 min. Water (20 mL) was added to the mixture, which was stirred for 1.5 h. The mixture was partirioned between hexane and H₂O. The aqueous phase was extracted with $CHCl_3/MeOH = 9/1$, and the organic phase was dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated in vacuo. The residue was diluted with AcOEt, which was washed with 0.5 M aq. HCl/brine = 1/1 and 1 M aq. HCl, dried(Na₂SO₄), filtered, and concentrated in vacuo afford 19 (3.46 g, 9.96 mmol, quant. over 3 steps) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 5.36 (d, 1H, D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-N*H*, D-Ser- α -*CH* = 9.6 Hz), 4.39 (dd, 1H, D-Ser- β -*CH*, *J*_{D-Ser-}} β -CH, D-Ser- β -CH = 10.3, J D-Ser- β -CH, D-Ser- α -CH = 9.6 Hz), 4.19 (dd, 1H, D-Ser- β -CH, J D-Ser- β -CH, D-Ser- β -CH = 10.3, J D-Ser- β -CH, D-Ser- β -CH, D-Ser- β -CH = 10.3, J D-Ser- β -CH, D-Ser- β -CH = 10.3, J D-Ser- β -CH, D-Ser- β -CH = 10.3, J D-Ser- β -Ser- β -CH = 10.3, J D-Ser- β -CH = 10.3, J D-Ser- β -CH = 10.3, J D-Ser- β -Ser- β $_{\text{D-Ser-}\alpha-CH}$ = 4.0 Hz), 3.91 (dd,1H D-Ser- α -CH, $J_{\text{D-Ser-}\alpha-CH}$, $_{\text{D-Ser-}\beta-CH}$ = 9.6, $J_{\text{D-Ser-}\alpha-CH}$, $_{\text{D-Ser-}\beta-CH}$ = 4.0 Hz), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.18-0.89 (m, 21H, <u>Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 176.0, 155.7, 80.3, 64.0, 55.5, 28.4, 17.9, 11.9; ESIMS-LR m/z 360.41 [(M-H)⁻]; ESIMS-HR calcd for C₁₇H₃₅O₅NNaSi 384.2177, found 384.2199; [α]²⁰D -33.51 (*c* 0.88, CHCl₃).

Cyclohexyl (2S,3R)-3-{[Boc-D-Ser(O-triisopropylsilyl)-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro]amino}-4-

[(2,2,2-trichloroethoxycarboxyl)oxy]-2-triisopropylsiloxybutanoate (*trans*-26)

Cyclohexyl (2S,3R)-3-{[Boc-D-Ser(O-triisopropylsilyl)-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-D-Pro]amino}-4-

[(2,2,2-trichloroethoxycarboxyl)oxy]-2-triisopropylsiloxybutanoate (cis-26)



A solution of 4a (52 mg, 0.24 mmol) and 19 (289 mg, 0.80 mmol) in HFIP (1 mL) was treated with a solution of 25 (88 mg, 0.24 mmol) in HFIP (2 mL) at room temperature for 24 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-20% acetone/hexane) to afford *trans*-26 (105 mg, 0.0904 mmol, 57%) as a colorless solid and *cis*-26 (32 mg, 0.028 mmol, 17%) as a colorless solid.

Data for *trans*-26: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.17 (d, 1H, C-3-N*H*, *J*_{C-3-N*H*, H-3} = 9.2 Hz), 5.58 (d, 1H, D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-N*H*, D-Ser- α -C*H* = 8.1 Hz), 4.78-4.69 (m, 1H, H-1'), 4.77 (s, 2H, C*H*₂CCl₃), 4.67 (br d, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H* = 3.4 Hz), 4.62-4.53 (m, 4H, D-Ser- β -C*H*, H-3, H-2), 4.35 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*), 4.25 (d, 2H, H-4, *J*_{H-4}, H-3 = 6.9 Hz), 3.95 (dd, 1H, D-Ser- α -C*H*, *J*_{D-Ser- α -C*H*, D-Ser- β -C*H* = 4.6, *J*_{D-Ser- α -C*H*, D-Ser- β -C*H* = 9.8 Hz), 3.82-3.75 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*), 2.21-2.13 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*), 1.94 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- δ -C*H* = 5.7, *J*_{3-hydroxy-Pro- γ -C*H*, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H* = 13.2 Hz), 1.86-1.48 (m, 4H, H-2'), 1.43 (s, 9H, 'Bu), 1.38-1.20 (m, 6H, H-3', H-4'), 1.19-0.95 (m, 63H, <u>'Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 170.8, 170.4, 169.5, 155.4, 153.5, 94.5, 79.4, 74.1, 73.6, 70.6, 69.6, 65.9, 63.7, 54.3, 50.7, 45.6, 34.1, 31.6, 31.3, 28.5, 25.3, 23.9, 23.8, 18.1, 12.5, 12.1, 12.0; ESIMS-LR *m*/*z* 1184.55 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₅₃H₁₀₀O₁₂N₃Cl₃NaSi₃ 1182.5573, found 1182.5568; [α]²⁰_D - 6.85 (*c* 0.59, CHCl₃).}}}}}}

Data for *cis*-26: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 6.60 (d, 1H, C-3-N*H*, *J*_{C-3-N*H*, H-3} = 7.6 Hz), 5.09 (d, 1H, D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-N*H*, D-Ser- α -*CH* = 8.6 Hz), 4.85-4.69 (m, 4H, *CH*₂CCl₃, H-2, H-1'), 4.62-4.52 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro- β -*CH*, H-3), 4.49-4.28 (m, 2H, D-Ser- β -*CH*), 4.37 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -*CH*, *J*_{3-hydroxy-Pro- α -*CH*, 3-hydroxy-Pro- β -*CH* = 6.9 Hz), 4.25 (d, 1H, H-4, *J*_{H-4}, H-3 = 6.9 Hz), 4.26 (dd, 1H, H-4, *J*_{H-4}, H-3 = 5.8, *J*_{D-Ser- β -*CH* = 10.3 Hz), 3.99 (dd, 1H, D-Ser- α -*CH*, *J*_{D-Ser- β -*CH* = 5.3, *J*_{D-Ser- α -*CH*, *j*-Ser- β -*CH* = 10.3 Hz), 3.99 (dd, 1H, D-Ser- α -*CH*, *J*_{D-Ser- β -*CH* = 5.3, *J*_{D-Ser- α -*CH*, *j*-Ser- β -*CH* = 10.3 Hz), 3.90-3.81 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -*CH*), 3.81-3.68 (m, 1H, H-4, 3-hydroxy-Pro- δ -*CH*), 2.37-2.27 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -*CH*), 2.19-2.11 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -*CH*), 1.96-1.87 (m, 2H, H-2'), 1.78-1.67 (m, 2H, H-2'), 1.41 (s, 9H, 'Bu), 1.49-1.20 (m, 6H, H-3', H-4'), 1.18-0.97 (m, 63H, <u>'Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 171.2, 171.1, 170.9, 168.6, 168.1, 167.9, 155.5, 154.6, 153.6, 153.4, 94.5, 89.3, 79.6, 79.2, 79.0, 77.1, 75.2, 74.8, 74.6, 73.7, 73.2, 71.6, 70.3, 70.2, 65.9, 65.3, 64.2, 63.8, 63.1, 60.1, 53.9, 53.5, 51.7, 51.1, 45.0, 44.7, 43.8, 33.3, 32.7, 31.8, 31.8, 31.6, 30.5, 28.5, 28.4, 25.4, 24.2, 24.2, 24.1, 18.2, 18.1, 18.0, 12.5, 12.4, 12.3, 12.2, 12.0, 12.0; ESIMS-LR *m/z* 1184.55 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₅₃H₁₀₀O₁₂N₃Cl₃NaSi₃ 1182.5573, found 1182.5570; [α]²⁰_D +8.48 (*c* 0.59, CHCl₃).}}}}}}}

Boc-(3R)-3-(triisopropylsiloxy)-D-Asp(O-cyclohexyl)-Oallyl (36)



A mixture of *ent-13* (179 mg, 0.348 mmol) in acetone (23 mL) was treated with 2.5 M Jones reagent (557 μ L, 1.39 mmol) at 0 °C for 4.5 h. The reaction was quenched with ^{*i*}PrOH (3.0 mL), and the mixture was partitioned between Et₂O and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica

gel column chromatography (ϕ 2 × 4 cm, 2% MeOH/CHCl₃) to afford **35** (60 mg, 0.123 mmol, 35 %, 79% based on 45% conversion) as a yellow oil, and the unreacted starting material (99 mg, 0.193 mmol, 55%) was recoverd. A mixture of **35** (9.8 mg, 0.020 mmol) and Cs₂CO₃ (13 mg, 0.040 mmol) in DMF (0.2 mL) was treated with allylbromide (2.6 µL, 0.030 mmol) at room temperature for 11 h. The mixture was partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (ϕ 0.5 × 2 cm, CHCl₃) to afford **36** (9.7 mg, 0.018 mmol, 92%) as a yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 5.92 (dddd, 1H, H_c, $J_{Hc, Ha} = 17.2$, $J_{Hc, Hb} = 10.3$, $J_{Hc, H-1} = J_{Hc, 1} = 5.8$ Hz), 5.35 (dd, 1H, Ha, $J_{Ha, Hc} = 17.2$, $J_{Ha, Hc} = 17.2$, $J_{Ha, Hc} = 1.8$ Hz), 5.26 (dd, 1H, Hb, $J_{Hb, Hc} = 10.3$, $J_{Hb, H-1} = 1.8$ Hz), 5.24 (d, 1H, D-β-hydroxy-Asp-NH, $J_{D-\beta-hydroxy-Asp-NH, D-\beta-hydroxy-Asp-\alpha-CH} = 10.4$ Hz), 4.95 (d, 1H, D-β-hydroxy-Asp-β-CH, $J_{D-\beta-hydroxy-Asp-\beta-CH, D-\beta-hydroxy-Asp-\alpha-CH} = 1.7$ Hz), 4.83-4.75 (m, 1H, H-1'), 4.78 (dd, 1H, D-β-hydroxy-Asp- α -CH, $J_{D-\beta-hydroxy-Asp-\alpha-CH, D-\beta-hydroxy-Asp-\beta-CH, D-\beta-hydroxy-Asp-<math>\alpha$ -CH, $J_{D-\beta-hydroxy-Asp-\alpha-CH, D-\beta-hydroxy-Asp-\beta-CH, D-\beta-hydroxy-Asp-<math>\alpha$ -CH, $J_{D-\beta-hydroxy-Asp-\alpha-CH, D-\beta-hydroxy-Asp-<math>\alpha$ -CH, $J_{D-\beta-hydroxy-Asp-}{\alpha}$, $J_{D-\beta-hydroxy-Asp-\alpha-CH, D-\beta-hydroxy-Asp-<math>\alpha$ -CH, $J_{D-\beta-hydroxy-Asp-}{\alpha}$, $J_{D-\beta-hydroxy-A$

(S)-5-[(Benzyloxycarbonyl)amino]-2-(formylamino)pentyl 2,2,2-trichloroethyl carbonate (38)



Alcohol **37** (2.11 g, 6.00 mmol) was treated with 4 M HCl/dioxane (30 mL) at room temperature for 15 min. The mixture was concentrated *in vacuo* to afford a crude amine hydrochloride salt. A solution of the crude amine hydrochloride salt and Et₃N (904 μ L, 6.00 mmol) in THF (30 mL) was treated with *N*-formylsaccharin (1.39 g, 6.60 mmol) at

room temperature for 40 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq.* HCl. The orgnic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude formamide. A mixture of the crude formamide and NMM (1.45 mL) in THF (30 mL) was treated with TrocCl (909 μ L, 6.60 mmol) at 0 °C for 10 min. The mixture was partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with 1 M *aq.* HCl, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-1-2% MeOH/CHCl₃) to afford **38** (1.67 g, 3.66 mmol, 61% over 3 steps) as a yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.19 (s, 1H, CHO), 7.41-7.29 (m, 5H, Ph), 5.97 (d, 1H, NHCHO, $J_{\text{NHCHO}, \text{H-2}} = 7.7$ Hz), 5.09 (s, 2H, PhCH₂), 4.98-4.89 (m, 1H, C-5-NH), 4.77 (s, 2H, CH₂CCl₃), 4.38-4.19 (m, 3H, H-1, H-2), 3.28-3.13 (m, 2H, H-5), 1.68-1.48 (m, 4H, H-3, H-4); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 164.7, 161.5, 156.7, 153.8, 153.7, 136.5, 128.5, 128.1, 127.9, 94.3, 94.2, 76.8, 70.6, 70.0, 66.5, 51.4, 46.7, 40.4, 40.2, 28.2, 27.9, 26.3, 26.1; ESIMS-

LR m/z 455.95 [(M+H)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₇H₂₂O₆N₂Cl₃ 455.0538, found 455.0542; [α]²⁰_D –11.19 (c 0.95, CHCl₃).

(S)-5-[(Benzyloxycarbonyl)amino]-2-isocyanopentyl 2,2,2-trichloroethyl carbonate (33)



A solution of compound **38** (547 mg, 1.20 mmol) and NMM (793 μ L, 7.20 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) was treated with triphosgene (285 mg, 0.96 mmol) at -78 °C and stirred for 30 min. The mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with *sat. aq.* NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated

in vacuo. The residue was purified by silica gel column chromatography (ϕ 2 cm × 6 cm, 35% AcOEt/hexane) to afford **33** (442 mg, 1.01 mmol, 84%) as a pale yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.49-7.22 (m, 5H, Ph), 5.10 (s, 2H, PhC*H*₂), 4.86-4.72 (m, 3H, C*H*₂CCl₃, C-5-N*H*), 4.28 (d, 2H, H-1, $J_{1,2} = 5.5$ Hz), 3.99-3.88 (m, 1H, H-2), 3.33-3.19 (m, 2H, H-5), 1.82-1.64 (m, 4H, H-3, H-4); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 158.8, 156.6, 153.6, 136.5, 128.7, 128.3, 128.2, 94.1, 68.9, 66.9, 53.1, 40.0, 28.3, 26.3; IR (neat) v 2140.60 cm⁻¹; ESIMS-LR *m/z* 469.07 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₇H₂₀O₅N₂Cl₃ 437.0432, found 437.0429; [α]²²_D -0.88 (*c* 1.00, CHCl₃).

Boc-allo-D-Thr(O-triisopropylsilyl)-OBn (40)

466.3006; $[\alpha]^{20}_{D}$ –20.10 (*c* 0.75, CHCl₃).

BocHN CO₂Bn A suspension of **39** (595 mg, 5.0 mmol) and *sat. aq.* NaHCO₃ (7.5 mL) in THF (15 mL) was treated with (Boc)₂O (2.07 mL, 9.0 mmol) at room temperature for 4 d. The mixture was partitioned between hexane and H₂O, and the aqueous phase was saturated with Na₂SO₄. The

aqueous phase was acidified with 1 M *aq*. HCl, and extracted with AcOEt. The organic phase was dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude carboxylic acid. A solution of the crude carboxylic acid and K₂CO₃ (828 mg, 6.0 mmol) in DMF (25 mL) was treated with BnBr (713 µL, 6.0 mmol) at room temperature for 24 h. The mixture was partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude alcohol. A solution of the crude alcohol and 2,6-lutidine (1.16 mL, 10.0 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL) was treated with TIPSOTf (1.48 mL, 5.5 mmol) at -78 °C. Then the mixture was warmed to -50 °C, and stirred for 190 min. The reaction was quenched with MeOH (2 mL), and partitioned between AcOEt and *sat. aq*. NaHCO₃. The organic phase was washed with 1 M *aq*. HCl, *sat. aq*. NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (3-20% AcOEt/hexane) to afford **40** (1.93 g, 4.14 mmol, 83% over 3 steps) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.38-7.29 (m, 5H, Ph), 5.37 (d, 1H, *allo*-D-Thr-NH, *Jallo*-D-Thr-α-CH = 8.0 Hz), 5.23 (d, 1H, PhCH, *J*_{PhCH}, PhCH = 12.1 Hz), 5.15 (d, 3H, *allo*-D -Thr-γ-CH, *Jallo*-D-Thr-γ-CH, *allo*-D-Thr-γ-CH = 6.3 Hz), 1.08-1.01 (m, 21H, <u>'Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 170.2, 155.4, 135.6, 128.6, 128.4, 79.8, 70.3, 67.0, 60.1, 28.4, 20.7, 18.1, 18.1, 12.6; ESIMS-LR *m/z* 466.40 [(M+H)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₅H₄₄O₅NSi 466.2983, found

(R)-4-(11-Hydroxy-11-methyldodec-9-enyl)oxetan-2-one (41)



A solution of **30** (1.84 g, 8.75 mmol) and 2-methylbut-3-en-2-ol (7.35 mL, 70.0 mmol) in CH_2Cl_2 (80 mL) was treated with 2nd generation Grubbs catalyst (371 mg, 0.44 mmol) under reflux for 3.5 h. The mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (40% AcOEt/hexane) to afford **41** (1.87 g, 6.97 mmol, 80%) as a black

oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.63-5.56 (m, 2H, H-12, H-13), 4.55-4.46 (m, 1H, H-3), 3.51 (dd, 1H, H-2, $J_{2,2} = 16.5$, $J_{2,3} = 6.0$ Hz), 3.06 (dd, 1H, H-2, $J_{2,2} = 16.5$, $J_{2,3} = 4.6$ Hz), 2.06-1.93 (m, 2H, H-11), 1.92-1.81 (m, 1H, H-4), 1.80-1.68 (m, 1H, H-4), 1.50-1.13 (m, 20H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-15); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 168.5, 137.9, 127.2, 71.4, 70.7, 42.9, 34.7, 32.2, 29.9, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 24.9; ESIMS-LR *m/z* 291.19 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₆H₂₈O₃Na 291.1931, found 291.1929; [α]²⁰_D +12.82 (*c* 0.16, CHCl₃).

(R)-4-(11-Methyldodecayl)oxetan-2-one (42)



A solution of **41** (685 mg, 2.55 mol) in THF (20 mL) was treated with Burgess reagent (463 mg, 1.94 mmol) at room temperature for 10 min. Burgess reagent (231 mg, 0.97 mmol) was added to the mixture and stirred for 15 min. Hexane (20 mL) was added to the mixture, the precipitate was filtered off through a Celite pad, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. A mixture of the residue and PtO₂ (104 mg, 0.46 mmol) in MeOH

(15 mL) was vigorously stirred at room temperature for 20 min under H₂ atmosphere. The catalyst was filtered off through a Celite pad, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-4% AcOEt/hexane) to afford **42** (431 mg, 1.69 mmol, 66% over 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.55-4.47 (m, 1H, H-3), 3.41 (dd, 1H, H-2, $J_{2,2} = 16.5$, $J_{2,3} = 5.5$ Hz), 3.06 (dd, 1H, H-2, $J_{2,2} = 16.5$, $J_{2,3} = 4.6$ Hz), 1.92-1.67 (m, 2H, H-4), 1.58-1.08 (m, 19H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14), 0.86 (d, 6H, H-15, $J_{15,14} = 6.9$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 168.5, 71.5, 43.2, 39.2, 34.8, 30.1, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 28.1, 27.5, 25.0, 22.8; ESIMS-LR *m/z* 477.21 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₆H₃₀O₂Na 277.2138, found 277.2134; [α]²⁰_D +22.19 (*c* 0.30, CHCl₃).

(R)-3-Hydroxy-14-methylpentadecanoic acid (43)



A mixture of **42** (346 mg, 1.36 mmol) in THF (8 mL) was treated with a solution of NaOH (82 mg, 2.04 mmol) in H₂O (8 mL) at room temperature for 1 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between 1 M *aq*. HCl and AcOEt. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The

mp 66-67 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.08-4.00 (m, 1H, H-3), 2.59 (dd, 1H, H-2, $J_{2,2} = 17.0, J_{2,3} = 3.2$ Hz), 2.48 (dd, 1H, H-2, $J_{2,2} = 17.0, J_{2,3} = 8.7$ Hz), 1.63-1.40 (m, 5H, H-4, H-5, H-14), 1.39-1.20 (m, 16H, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 0.86 (d, 6H, H-15, $J_{15, 14} = 6.4$ Hz); $[\alpha]^{20}{}_{D} -15.40$ (*c* 0.50, CHCl₃). This is a known compound reported in ref. 26.

residue was recrystalized from hexane to afford 43 (296 mg, 1.09 mmol, 80%) as white crystal.

(R)-(3-Hydroxy-14-methylpentadecanyl)-allo-D-Thr(O-triisopropylsilyl)-OBn (44)



Compound **40** (373 mg, 0.80 mmol) was treated with 25% TFA/CH₂Cl₂ (8 mL) at room temperature for 10 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude amine

31. A solution of the crude amine **31**, **43** (218 mg, 0.80 mmol), NaHCO₃ (202 mg, 2.40 mmol) and HOAt (327 mg, 2.40 mmol) in CH₂Cl₂ (8.0 mL) was treated with EDCI (460 mg, 2.40 mmol) at room temperature for 60 min. The mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃, and the organic phase was washed with 1 M *aq.* HCl, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (30% AcOEt/hexane) to afford **44** (425 mg, 0.69 mmol, 86%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.37-7.31 (m, 5H, Ph), 6.57 (d, 1H, *allo*-D-Thr-N*H*, *J_{allo}-D-Thr-NH*, *allo*-D-Thr-α-C*H* = 7.7 Hz), 5.24 (d, 1H, PhC*H*, *J*_{PhCH}, PhC*H* = 12.0 Hz), 5.15 (d, 1H, PhC*H*, *J*_{PhCH}, PhC*H* = 12.0 Hz), 4.62 (dd, 1H, *allo*-D-Thr-α-C*H*, *J_{allo}-D-Thr-α-CH*, *allo*-D-Thr-α-C*H*, *allo*-D-Thr-β-C*H*, *allo*

(R)-(3-Hydroxy-14-methylpentadecanyl)-allo-D-Thr(O-triisopropylsilyl)-OH (28)



A mixture of **44** (298 mg, 0.48 mmol) and 10% Pd/C (30 mg) in MeOH (8 mL) was vigorously stirred at room temperature for 5 h under H₂ atmosphere. The catalyst was filtered off through a Celite pad, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford **28** (254 mg, 0.48 mmol, 99%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.87 (d, 1H, *allo*-D-Thr-N*H*, *J_{allo-D-Thr-NH*, *allo*-D-Thr-α-*CH* = 8.2 Hz), 4.59 (dd, 1H, *allo*-D-Thr-α-*CH*, *J_{allo-D-Thr-α-CH*, *J_{allo-D-Thr-α-CH*, *J_{allo-D-Thr-α-CH*, *allo*-D-Thr-β-*CH*, *J_{allo-D-Thr-α-CH*, *allo*-D-Thr-β-*CH*, *J_{allo-D-Thr-α-CH*, *allo*-D-Thr-β-*CH*, *J_{allo-D-Thr-α-CH* = 3.6, *J_{allo-D-Thr-β-CH*, *J_{allo-D-Thr-α-CH* = 6.3 Hz), 4.05-3.96 (m, 1H, H-3), 2.40 (dd, 1H, H-2, *J*_{2,2} = 15.1, *J*_{2,3} = 3.2 Hz), 2.34 (dd, 1H, H-2, *J*_{2,2} = 15.1, *J*_{2,3} = 9.7 Hz), 1.59-1.45 (m, 1H, H-14), 1.28 (d, 3H, *allo*-D-Thr-γ-*CH*, *J_{allo-D-Thr-γ-CH*, *allo-D-Thr-γ-CH* = 6.3 Hz), 1.35-1.18 (m, 20H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 1.09-1.00 (m, 21H, <u>iPr</u>₃Si), 0.85 (d, 6H, H-15, *J*_{15,14} = 6.4 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 173.2, 172.7, 69.1, 69.0, 58.7, 43.4, 39.2, 36.9, 30.1, 29.9, 29.8, 29.8, 29.8, 29.7, 28.1, 27.5, 25.7, 22.8, 20.1, 19.1, 18.1, 18.1, 17.8, 12.5, 12.4; ESIMS-LR *m*/*z* 552.41 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₉H₅₉O₅NNaSi 552.4055, found 552.4070; [α]²⁰_D –35.94 (*c* 0.45, CHCl₃).}}}}}}}}}}

Cyclohexyl (2*S*,3*R*)-3-{[Boc-D-Ser(O-triisopropylsilyl)-(3*S*)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro]amino}-4-hydroxy-2-triisopropylsiloxybutanoate (45)

Cyclohexyl (2*S*,3*R*)-3-{[Boc-D-Ser(O-triisopropylsilyl)-(3*S*)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro]amino}-4-[(2,2-dichloroethoxycarboxyl)oxy]-2-triisopropylsiloxybutanoate (46)



A mixture of *trans*-26 (7.1 mg, 0.0061 mmol) in THF (50 μ L) was treated with 0.1 M THF solution of SmI₂ (300 μ L, 0.03 mmol) at room temperature and stirred for 1 min. The reaction was quenched with air, and the mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with 1 M *aq*. HCl, *sat. aq*. NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The

residue was purified by silica gel column chromatography (φ 0.5 cm×2 cm, 5-15% AcOEt/hexane) to afford **45** (3.4 mg, 0.0034 mmol, 50%) as a colorless oil and **46** (3.8 mg, 0.0034 mmol, 50%) as a colorless oil. Data for **45**: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.85 (d, 1H, C-3-N*H*, *J*_{C-3-N*H*, 3} = 8.7 Hz), 5.49 (d, 1H, D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-α-C*H*} = 6.4 Hz), 4.79-4.68 (m, 1H, H-1'), 4.64 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro-β-C*H*, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H* = 2.8 Hz), 4.54-4.46 (m, 2H, H-2, D-Ser-α-C*H*), 4.40 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-C*H*), 4.31-4.23 (m, 1H, H-3), 3.93 (dd, 1H, D-Ser-β-C*H*, *J*_{D-Ser-β-C*H*, D-Ser-α-C*H* = 5.0, *J*_{D-Ser-β-C*H*, D-Ser-β-C*H* = 10.1 Hz), 3.85-3.73 (m, 4H, H-4, D-Ser-β-C*H*, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H*, 3.73-3.64 (m, 1H, H-4), 2.50 (t, 1H, O*H*, *J*_{OH}, 4 = 6.9 Hz), 2.29-2.15 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H* = 12.8 Hz), 1.89-1.65 (m, 2H, H-2'), 1.64-1.19 (m, 6H, H-3', H-4'), 1.42 (s, 9H, 'Bu), 1.18-0.94 (m, 63H, <u>'Pra</u>Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 171.6, 170.1, 169.1, 155.7, 79.7, 74.1, 74.0, 71.3, 70.3, 63.3, 61.7, 54.9, 54.4, 45.6, 34.0, 31.6, 31.5, 28.5, 25.4, 23.9, 18.1, 12.4, 12.1, 12.0; ESIMS-LR *m/z* 1008.65 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for}}}}

C₅₀H₉₉O₁₀N₃NaSi₃ 1008.6531, found 1008.6542; [α]²⁰_D -6.32 (*c* 0.30, CHCl₃).

Data for **46**: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.11 (d, 1H, C-3-N*H*, *J*_{C-3-N*H*, 3} = 9.2 Hz), 5.86 (dd, 1H, H-3", *J*_{3", 2"} = *J*_{3"}, 2" = 6.3 Hz), 5.58 (d, 1H, D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-A-CH} = 8.0 Hz), 4.76-4.69 (m, 1H, H-1'), 4.67 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H*, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H* = 3.5 Hz), 4.60-4.52 (m, 4H, D-Ser- β -C*H*, H-2, H-3), 4.50 (dd, 1H, H-2", *J*_{2", 3"} = 6.3, *J*_{3", 3"} = 7.5 Hz), 4.47 (dd, 1H, H-2", *J*_{2", 3"} = 6.3, *J*_{3", 3"} = 7.5 Hz), 4.47 (dd, 1H, H-2", *J*_{2", 3"} = 6.3, *J*_{3", 3"} = 7.5 Hz), 4.35 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*), 4.21 (d, 2H, H-4 *J*_{4, 3} = 6.9 Hz), 3.95 (dd, 1H, D-Ser- α -C*H*, *J*_{D-Ser- α -C*H*, *D*-Ser- β -C*H* = 4.6, *J*_{D-Ser- α -C*H*, *D*-Ser- β -C*H* = 9.8 Hz), 3.84-3.75 (m, 2H, H-4, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*), 2.21-2.11 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*), 1.94 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H* = 5.8, *J*_{3-hydroxy-Pro- γ -C*H*, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H* = 5.8, *J*_{3-hydroxy-Pro- γ -C*H*, 3-1.20 (m, 15H, H-3', H-4', ⁷Bu), 1.20-0.82 (m, 63H, $\frac{i}{PT_3}$ Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 170.9, 170.8, 170.4, 169.4, 155.4, 79.4, 74.0, 73.6, 71.4, 70.7, 69.6, 68.0, 65.8, 65.1, 63.7, 55.1, 54.4, 34.1, 31.6, 31.3, 29.8, 28.5, 28.1, 25.3, 23.8, 18.3, 18.1, 12.5, 12.1, 12.0; ESIMS-LR *m*/*z* 1148.60 [(M+Nal)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₅₃H₁₀₁O₁₂N₃Cl₂NaSi₃ 1148.5962, found 1148.5975; [α]²⁰_D – 9.84 (*c* 0.69, CHCl₃).}}}}}}}

Boc-D-Ser(O-triisopropylsilyl)-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Asp(O-cyclohexyl)-Oallyl (47)



A solution of **45** (151 mg, 0.153 mmol) in THF (2 mL) was treated with Dess-Martin periodinane (1.27 g, 3.0 mmol) at room temperature for 55 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* Na₂S₂O₃*/sat. aq.* NaHCO₃ = 1/1, and the mixture was partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude aldehyde. A solution of the crude aldehyde, NaH₂PO₄ • 2H₂O (70.2 mg, 0.45 mmol) and 2-methylbut-2-ene (100 µL) in THF/[/]BuOH/H₂O (900 µL/900 µL/150 µL) was treated with a solution of NaClO₂ (40.7 mg, 0.45 mmol) in H₂O (150 µL) at room temperature for 50 min. The mixture was

partitioned between AcOEt and 1 M *aq.* HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude carboxylic acid. A solution of the crude carboxylic acid and Cs₂CO₃ (78.2 mg, 0.24 mmol) in DMF (1.5 mL) was treated with allyl bromide (18.2 μ L, 0.21 mmol) at room temperature for 16 h. The mixture was partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (50% AcOEt/hexane) to afford **47** (83.5 mg, 0.080 mmol, 53% over 3 steps) as a pale yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.33 (d, 1H, β-hydroxy-Asp-NH, *J*_{β-hydroxy-Asp-NH, β-hydroxy-Asp-α-CH = 9.2 Hz), 5.89 (dddd, 1H, Hc, *J*_{Hc, Ha} = 17.2, *J*_{Hc, Hb} = 10.3, *J*_{Hc, 1} = *J*_{Hc, 1} = 5.7 Hz), 5.53 (d, 1H, D-Ser-NH, *J*_{D-Ser-A}-*CH* = 9.2 Hz), 5.32 (d, 1H, Ha, *J*_{Ha, Hc} = 17.2 Hz), 5.24 (d, 1H, Hb, *J*_{Hb, Hc} = 10.3 Hz), 5.00 (br d, 1H, β-hydroxy-Asp-α-CH, *J*_{β-hydroxy-Asp-α-CH, β-hydroxy-Asp-NH = 9.2 Hz), 4.94 (br s, 1H, β-hydroxy-Asp-β-CH), 4.76-4.68 (m, 1H, H-1'), 4.69 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-β-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-α-CH} = 2.9 Hz), 4.64-4.54 (m, 3H, D-Ser-α-CH, H-1), 4.41 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH), 3.94 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-σ-CH}), 3.94 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-σ-CH}), 3.69 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-σ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-σ-CH}), 1.94 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-σ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-σ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-σ-CH} = 12.6, *J*_{3-hydroxy-Pro-σ-CH = 5.7 Hz), 1.83-1.60 (m, 4H, H-2'), 1.52-1.17 (m, 15H, 'Bu, H-3', H-4'), 1.13-0.83 (m, 63H, <u>Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 170.3, 169.8, 169.5, 168.8, 155.2, 131.5, 119.2, 79.2, 74.2, 73.4, 72.7, 69.6, 66.6, 64.1, 55.8, 54.2, 45.6, 34.2, 31.6, 31.2, 28.5, 25.3, 23.8, 23.7, 18.1, 18.0, 18.0, 12.5, 12.1, 12.0; ESIMS-LR *m/z* 1062.67 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₅₃H₁₀₁O₁₁N₃NaSi₃1062.6636, found 1062.6665; [α]²⁰_D -10.20 (*c* 0.68, CHCl₃).}}}}}}}}}}}}}}}

(2S)-5-[(Benzyloxycarbonyl)amino]-2-[(Boc-D-Ala-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro)amino]pentyl2,2,2-trichloroethyl carbonate (*trans*-48)2,2,2-(2S)-5-[(Benzyloxycarbonyl)amino]-2-[(Boc-D-Ala-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-D-Pro)amino]pentyl2,2,2-trichloroethyl carbonate (*cis*-48)2,2,2-



A solution of **4a** (771 mg, 3.19 mmol) and **34** (1.61 mg, 8.52 mmol) in HFIP (25 mL) was treated with a solution of **33** (932 mg, 2.13 mmol) in HFIP (10 mL) at room temperature for 19.5 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃.

The organic phase was washed with sat. aq. NaHCO3, H2O and brine, dried (Na2SO4), filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (5-25% acetone/hexane) to afford trans-48 (794 mg, 0.91 mmol, 43%) as a colorless oil and cis-48 (666 mg, 0.77 mmol, 36%) as a colorless oil. Data for trans-48: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.38-7.28 (m, 5H, Ph), 6.96 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-NH, J_{3-hydroxy}- $P_{\text{ro-NH, H-2}} = 8.7 \text{ Hz}$, 5.30 (br s, 1H, C-5-NH), 5.16 (d, 1H, D-Ala-NH, $J_{\text{D-Ala-NH, D-Ala-CH}} = 6.8 \text{ Hz}$), 5.11 (d, 1H, PhCH, J_{PhCH}, _{PhCH} = 12.2 Hz), 5.06 (d, 1H, PhCH, J_{PhCH}, _{PhCH} = 12.2 Hz), 4.79 (d, 1H, Cl₃CCH, J_{Cl3CCH}, _{Cl3CCH} = 11.9 Hz), 4.75 (d, 1H, Cl₃CCH, J_{Cl₃CCH}, Cl₃CCH = 11.9 Hz), 4.78-4.70 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH), 4.41 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH), 4.36 (dq, 1H, D-Ala-α-CH, J_{D-Ala-α-CH, D-Ala-NH} = 6.8, J_{D-Ala-α-CH, D-Ala-β-CH} = 6.9 Hz), 4.22-4.12 (m, 2H, H-1), 4.11-3.99 (m, 1H, H-2), 3.81 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, J₃-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3 hydroxy-Pro-γ-CH = 8.7 Hz), 3.63 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, J3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = J3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3hydroxy-Pro-γ-CH = J₃-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 8.7 Hz), 3.27-3.12 (m, 2H, H-5), 2.22-2.07 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH), 1.97 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 12.8, J_{3-hydroxy-Pro- γ -CH, 3-hydroxy-Pro- β -CH =}} 8.7 Hz), 1.71-1.45 (m, 4H, H-3, H-4), 1.41 (s, 9H, 'Bu), 1.24 (d, 3H, D-Ala-β-CH, J_{D-Ala-β-CH, D-Ala-α-CH} = 6.9 Hz), 1.16-0.94 (m, 21H, ⁱPr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 173.5, 169.5, 156.6, 155.7, 153.9, 136.7, 128.6, 128.3, 128.2, 94.5, 80.2, 77.0, 73.3, 69.9, 69.6, 66.7, 48.3, 48.2, 45.3, 40.6, 33.9, 28.5, 18.0, 16.2, 18.0, 17.1, 12.0; ESIMS-LR m/z 889.32 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{38}H_{61}O_{10}N_4Cl_3NaSi$ 889.3115, found 889.3136; $[\alpha]^{20}D$ -2.53 (c 4.57, CHCl₃).

Data for *cis*-48: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.39-7.24 (m, 5H, Ph), 6.02 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-N*H*, *J*₃-hydroxy-Pro-N*H*, *H*-2 = 8.7 Hz), 5.66-5.57 (m, 1H, C-5-N*H*), 5.40 (d, 1H, D-Ala-N*H*, *J*_{D-Ala-N*H*, D-Ala-α-C*H* = 8.2 Hz), 5.15 (d, 1H, PhC*H*, *J*_{PhC*H*, PhC*H* = 12.4 Hz), 5.05 (d, 1H, PhC*H*, *J*_{PhC*H*, PhC*H* = 12.4 Hz), 4.77 (d, 1H, Cl₃CC*H*, *J*_{Cl₃CC*H*, Cl₃CC*H* = 11.9 Hz), 4.72 (d, 1H, Cl₃CC*H*, *J*_{Cl₃CC*H*, Cl₃CC*H* = 11.9 Hz), 4.73-4.66 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -C*H*), 4.46 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*, *J*₃-hydroxy-Pro- α -C*H*, *J*₃-hydroxy-Pro- β -C*H* = 5.5 Hz), 4.48-4.42 (m, 1H, D-Ala- α -C*H*), 4.30 (dd, 1H, H-1, *J*_{1,1} = 11.0, *J*_{1,2} = 2.8 Hz), 4.25-4.10 (m, 2H, H-1, H-2), 3.84-3.64 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*), 3.24-3.13 (m, 2H, H-5), 2.16-2.00 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*), 1.70-1.47 (m, 4H, H-3, H-4), 1.41 (s, 9H, 'Bu), 1.27 (d, 3H, D-Ala- β -C*H*, *J*_{D-Ala- β -C*H*, *J*_{D-Ala- α -C*H* = 6.9 Hz), 1.13-0.97 (m, 21H, <u>iPr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 173.5, 167.6, 156.6, 155.5, 153.9, 136.8, 128.5, 128.4, 128.1, 128.0, 127.8, 94.3, 80.0, 76.8, 76.3, 71.7, 70.8, 66.6, 65.6, 48.2, 47.8, 45.2, 40.6, 34.1, 29.7, 28.5, 25.5, 18.2, 18.1, 18.0, 12.3, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 889.31 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₃₈H₆₁O₁₀N₄Cl₃NaSi 889.3115, found 889.3127; [α]²⁰D -19.12 (*c* 0.52, CHCl₃).}}}}}}}

N-[(*S*)-4-Azide-1-(hydroxymethyl)butyl]-[(Boc-D-Ala-(3*S*)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro)]amide (49)



A mixtue of compound *trans*-48 (495 mg, 0.57 mmol) and metallic Sm (85.7 mg, 0.57 mmol) in MeOH (15 mL) was treated with I_2 (145 mg, 0.57 mmol) at room temperature for 110 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* Na₂S₂O₃. The mixture was partitioned between Et₂O and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with 1 M *aq.* HCl and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude alcohol. A

mixture of the crude alcohol and Pd black (46 mg) in 5% AcOH/MeOH (10 mL) was vigorously stirred at room temperature for 3.5 h under H₂ atmosphere. The catalyst was filtered off through a Celite pad, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford a crude aminoalcohol. A mixture of the crude aminoalcohol, K₂CO₃ (394 mg, 2.85 mmol) and CuSO₄·5H₂O (1.4 mg, 0.006 mmol) in MeOH (10 mL) was treated with imidazole-1-sulfonyl azide hydrogen sulfate (464 mg, 1.71 mmol) at room temperature for 10.5 h. The mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (5-25% acetone/hexane) to afford **49** (292 mg, 0.50 mmol, 88% over 3 steps) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.70 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-N*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro-N*H*, H-2 = 8.6 Hz), 5.04 (d, 1H, D-Ala-N*H*, *J*_{D-Ala-N*H*, D-Ala-α-C*H* = 5.7 Hz), 4.76 (br s, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*), 4.51 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-C*H*), 4.34 (dq, 1H, D-Ala-α-C*H*, *J*_{D-Ala-α-C*H*, D-Ala-N*H* = 5.7, *J*_{D-Ala-α-C*H*, D-Ala-β-C*H* = 6.9 Hz), 3.96-3.88 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-C*H*), 3.88-3.81 (m, 1H, H-2), 3.72 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-C*H*, 3-hydroxy-Pro-δ-C*H* = *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-C*H*, 3-hydroxy-Pro-δ-C*H*, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H* = 8.6 Hz), 3.08 (br s, 1H, O*H*), 2.07-1.99 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H*), 1.66-1.54 (m, 4H, H-3, H-4), 1.44 (s, 9H, 'Bu), 1.31 (d, 3H, D-Ala-β-C*H*, *J*_{D-Ala-β-C*H*, D-Ala-α-C*H* = 6.9 Hz), 1.16-1.02 (m, 21H, <u>'Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 173.4, 169.3, 156.1, 80.4, 73.8, 70.2, 64.6, 51.8, 51.3, 48.5, 45.3, 33.8, 28.5, 28.0, 25.7, 18.0, 16.5, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 585.48 [(M+H)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₇H₅₃O₆N₆Si 585.3790, found 585.3823; [α]²⁰D-13.90 (c 2.60, CHCl₃). **H-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Asp(O-cyclohexyl)-OAllyl (32)**}}}}}}}



A solution of **36** (20.6 mg, 0.039 mmol) in CH₂Cl₂ (300 μ L) was treated with TFA (100 μ L) at room temperature for 15 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford **32**.

The amine was directly used to the next reaction without futher purification.

(2*S*)-5-Azide-2-[Boc-D-Ala-(3*S*)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro]amino-*N*-[(3*R*)-3-(triisopropylsiloxy)-D-Asp(O-cyclohexyl)-Oallyl]pentanamide (29)



A solution of **49** (23.0 mg, 0.039 mmol) in THF (500 μ L) was treated with Dess-Martin periodinane (33.1 mg, 0.078 mmol) at room temperature for 130 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* Na₂S₂O₃/*sat. aq.* NaHCO₃ = 1/1, and the mixture was partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude aldehyde. A solution of the crude aldehyde, NaH₂PO₄ • 2H₂O (18.3 mg, 0.12 mmol) and 2-methylbut-2-ene (50 μ L) in

THF/BuOH/H₂O (600 μ L/600 μ L/100 μ L) was treated with a solution of NaClO₂ (18.3 mg, 0.12 mmol) in H₂O (100

 μ L) at room temperature for 130 min. The mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq.* HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude carboxylic acid. A mixture of the crude carboxylic acid, amine **32** (0.039 mmol), NaHCO₃ (9.8 mg, 0.12 mmol) and HOAt (15.9 mg, 0.12 mmol) in CH₂Cl₂ (400 μ L) was treated with EDCI (22.4 mg, 0.12 mmol) at room temperature for 140 min. The mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with 1 M *aq.* HCl, *sat. aq.* NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo.* The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (40% AcOEt/hexane) to afford **29** (17.2 mg, 0.17 mmol, 44% over 3 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.32 (d, 1H, Orn- α -NH, $J_{\text{Orn-}\alpha-\text{NH}, \text{Orn-}\alpha-\text{CH}} = 8.2$ Hz), 6.90 (d, 1H, β -hydroxy-Asp-NH, J_{β} -hydroxy-Asp-NH, β -hydroxy-Asp- α -CH = 9.6 Hz), 5.92 (dddd, 1H, H_c, $J_{Hc, Ha} = 17.9$, $J_{Hc, Hb} = 11.0$, $J_{Hc, H-1} = J_{Hc, 1} = 5.9$ Hz), 5.34 (dd, 1H, Ha, $J_{Ha, Hc} = 17.9$, $J_{Ha, 1} = 17.9$, 1.4 Hz), 5.36-5.31 (m, 1H, D-Ala-NH), 5.26 (dd, 1H, H_b, $J_{Hb, Hc} = 11.0$, $J_{Hb, H-1} = 1.4$ Hz), 5.02 (dd, 1H, β -hydroxy-Asp- α -CH, J_β-hydroxy-Asp- α -CH, β-hydroxy-Asp-NH = 9.6, J_β-hydroxy-Asp- α -CH, β-hydroxy-Asp- β -CH = 1.8 Hz), 4.93 (d, 1H, β-hydroxy-Asp-NH = 9.6, J_β-hydroxy-Asp- α -CH, β-hydroxy-Asp- β -CH = 1.8 Hz), 4.93 (d, 1H, β-hydroxy-Asp- α -CH, β-hydroxy-Asp- α -Asp- α -As Asp-β-CH, *J*_{β-hydroxy-Asp-β-CH, β-hydroxy-Asp-α-CH} = 1.8 Hz), 4.78-4.70 (m, 2H, H-1', 3-hydroxy-Pro-β-CH), 4.67 (dddd, 1H, H-1, $J_{1,1} = 13.3$, $J_{1,Hc} = 5.9$, $J_{1,Hc} = J_{1,Ha} = 1.4$ Hz), 4.56 (dddd, 1H, H-1, $J_{1,1} = 13.3$, $J_{1,Hc} = 5.9$, $J_{1,Hc} = J_{1,Ha} = 1.4$ Hz), 4.47 (dq, 1H, D-Ala- α -CH, J_D-Ala- α -CH, D-Ala- α -CH, D-Ala- α -CH, D-Ala- β -CH = 6.9 Hz), 4.40 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH), 4.34 (ddd, Orn- α -CH, $J_{\text{Orn-}\alpha-\text{CH}, \text{Orn-}\alpha-\text{NH}} = 8.2$, $J_{\text{Orn-}\alpha-\text{CH}, \text{Orn-}\beta-\text{CH}} = J_{\text{Orn-}\alpha-\text{CH}, \text{Orn-}\beta-\text{CH}} = 9.6$ Hz), 3.80 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, J₃-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = J₃-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydro CH), 3.29 (ddd, 1H, Orn-δ-CH, J_{Orn-δ-CH}, Orn-δ-CH = 9.2, J_{Orn-δ-CH}, Orn-γ-CH = J_{Orn-δ-CH}, Orn-γ-CH = 5.0 Hz), 3.26 (ddd, 1H, Orn- δ -CH, $J_{\text{Om}-\delta-CH, \text{Orn}-\delta-CH} = 9.2$, $J_{\text{Om}-\delta-CH, \text{Orn}-\gamma-CH} = J_{\text{Orn}-\delta-CH, \text{Orn}-\gamma-CH} = 5.0$ Hz), 2.31-2.16 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -CH), 2.04-1.95 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.95-1.78 (m, 4H, Orn-β-CH, H-2'), 1.76-1.62 (m, 4H, Orn-γ-CH, H-2'), 1.43 (s, 9H, ^tBu), 1.47-1.18 (m, 6H, H-3', H-4'), 1.30 (d, 3H, D-Ala-β-CH, J_{D-Ala-β-CH} = 6.9 Hz), 1.17-0.95 (m, 42H, ^{*i*}Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 173.3, 170.6, 169.8, 169.6, 168.7, 155.4, 131.5, 119.3, 79.8, 74.4, 73.1, 72.7, 69.3, 66.6, 55.9, 52.7, 51.0, 48.1, 45.2, 34.0, 31.7, 31.4, 28.8, 28.4, 25.3, 24.8, 23.9, 23.9, 18.0, 18.0, 17.9, 12.5, 12.1; ESIMS-LR m/z 1030.61 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₄₉H₈₉O₁₁N₇NaSi₂ 1030.6051, found 1030.6079; $[\alpha]^{20}$ _D –18.03 (*c* 1.72, CHCl₃).

(2*S*)-5-Azide-2-{[(3*R*)-3-hydroxy-14-methylpentadecanoyl]-*allo*-D-Thr(O-triisopropylsiloxy)-Boc-D-Ala-(3*S*)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro}amino-*N*-[(3*R*)-3-(triisopropylsiloxy)-D-Asp(O-cyclohexyl)-Oallyl]pentanamide (52)



A mixture of **29** (195 mg, 0.193 mmol) in CH₂Cl₂ (1.5 mL) was treated with TFA (500 μ L) at room temperature for 35 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude amine. A mixture of the crude amine, **28** (112.5 mg, 0.212 mmol), NaHCO₃ (53.4 mg, 0.636 mmol) and HOAt (86.6 mg, 0.636 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) was treated with EDCI (121.9 mg, 0.636 mmol) at room temperature for 20 h. The mixture was partitioned between AcOEt

and sat. aq. NaHCO3. The organic phase was washed with 1 M aq. HCl, sat. aq. NaHCO3, H2O and brine, dried

(Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (40% AcOEt/hexane) to afford **52** (173 mg, 0.122 mmol, 63% over 2 steps) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.46 (d, 1H, D-Ala-NH, $J_{D-Ala-NH, D-Ala-Q-CH} = 7.4$ Hz), 7.22 (Orn- α -NH, $J_{Orn-NH, Orn-Q-CH} = 8.2$ Hz), 6.84 (d, 1H, D- β -hydroxy-Asp-NH, $J_{D-\beta-hydroxy-Asp-NH, D-\beta-hydroxy-Asp-\alpha-CH} = 9.6$ Hz), 6.52 (d, 1H, *allo-D-Thr-NH*, *Jallo-D-Thr-NH*, *allo-D-Thr-NH*, *allo-D-Th* 5.92 (dddd, 1H, H_c, $J_{Hc, Ha} = 17.4$, $J_{Hc, Hb} = 11.0$, $J_{Hc, 1'} = J_{Hc, 1'} = 6.0$ Hz), 5.33 (d, 1H, H_a, $J_{Ha, Hc} = 17.4$ Hz), 5.25 (d, 1H, H_b, $J_{Hb, Hc} = 11.0$ Hz), 5.01 (dd, 1H, D- β -hydroxy-Asp- α -CH, $J_{D-\beta}$ -hydroxy-Asp- α -CH, $D-\beta$ -hydroxy-Asp-NH = 9.6, $J_{D-\beta}$ -hydroxy-Asp- α -CH, $J_{D-\beta}$ -hydroxy-Asp- α -Asp- α -As Asp-α-CH, D-β-hydroxy-Asp-β-CH = 1.8 Hz), 4.78-4.61 (m, 4H, allo-D-Thr-α-CH, 3-hydroxy-Pro-β-CH, H-1', H-1''), 4.56 (dd, 1H, $J_{1',1'}$ = 13.3, J_{1',H_c} = 6.0 Hz), 4.49-4.40 (m, 2H, D-Ala-α-CH, allo-D-Thr-β-CH), 4.35 (ddd, 1H, Orn-α-CH, J_{Orn-2} α-CH, Orn-α-NH = 8.2, J_{Orn-α-CH, Orn-β-CH} = J_{Orn-α-CH, Orn-β-CH} = 7.3 Hz), 4.30 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH), 4.08-3.98 (m, 1H, H-3), 3.86-3.78 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.64 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH}, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.64 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.64 (ddd, 1H), 3.64 (ddd, 1H), 3.64 (ddd, 1H), 3.64 (ddd), 3.64 (ddd δ -CH = J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 9.6 Hz), 3.34 (ddd, 1H, Orn-δ-CH, J_{Orn-δ-CH}, J_{Orn-δ-CH})}} $O_{TT-\delta-CH} = 12.8, J_{OTT-\delta-CH, OTT-\gamma-CH} = J_{OTT-\delta-CH, OTT-\gamma-CH} = 6.9 \text{ Hz}, 3.28 \text{ (ddd, 1H, OTT-\delta-CH, J_{OTT-\delta-CH, OTT-\delta-CH} = 12.8, J_{OTT-\delta-CH, OTT-\delta-CH} = 12.8, J_{OTT-\delta-CH} = 12.8, J_{$ *CH*, Orn-γ-*CH* = *J*_{Orn-δ-CH}, Orn-γ-*CH* = 6.9 Hz), 2.38 (dd, 1H, H-2, *J*_{2, 2} = 13.7, *J*_{2, 3} = 2.8 Hz), 2.28-2.09 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, H-2"), 2.01-1.66 (m, 6H, Orn-β-CH, Orn-γ-CH, H-2"), 1.63-1.18 (m, 38H, D-Ala-β-CH, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-3", H-4", 'Bu), 1.18-0.93 (m, 63H, <u>Pr</u>₃Si), 0.85 (d, 6H, H-15, J_{H-15}, H-14 = 6.9 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.7, 172.4, 170.9, 169.8, 169.7, 169.5, 168.8, 131.5, 119.4, 74.6, 73.7, 72.8, 69.6, 69.5, 68.4, 66.8, 59.4, 55.9, 52.8, 47.0, 45.4, 43.9, 39.2, 28.1, 34.1, 31.8, 31.6, 30.1, 30.0, 29.9, 29.8, 29.1, 28.1, 27.6, 25.5, 25.4, 24.9, 24.0, 22.8, 19.6, 18.2, 18.2, 18.1, 18.0, 17.3, 12.6, 12.6, 12.1; ESIMS-LR m/z 1441.96 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{73}H_{138}O_{13}N_8NaSi_3$ 1441.9583, found 1441.9631; $[\alpha]^{20}D - 17.02$ (*c* 0.67, CHCl₃).

[(*3R*)-3-Hydroxy-14-methylpentadecanoyl]-*allo*-D-Thr(O-triisopropylsiloxy)-Boc-D-Ala-(*3S*)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro-Arg(Cbz)₂-(*3R*)-3-(triisopropylsiloxy)-D-Asp(O-cyclohexyl)-Oallyl (53)



A solution of **52** (143.6 mg, 0.101 mmol) and morpholine (35.2 μ L, 0.404 mmol) in THF (2 mL) was treated with Pd(PPh₃)₄ (3.5 mg, 0.003 mmol) at room temperature for 30 min. The mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The catalyst was removed by SH-silica gel column chromatography (ϕ 1 cm × 4 cm, 1% MeOH/CHCl₃), and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford a crude carboxylic acid. A mixture of the crude carboxylic acid and Pd black (28 mg) in 50% AcOH/MeOH (2 mL) was vigorously

stirred at room temperature for 3.5 h under H₂ atmosphere. The catalyst was filtered off through a Celite pad, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford a crude amine. A susupension of the crude amine and Et₃N (41.8 μ L, 0.30 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was treated with *N*, *N'*-diBoc-*N''*-triflylguanidine (58.7 mg, 0.15 mmol) at room temperature for 17.5 h. The mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (1% MeOH/CHCl₃) to afford **53** (118 mg, 0.074 mmol, 73% over 3 steps) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 11.47 (br

s, 1H, Arg- ω -N*H*), 10.61 (br s, 1H, Arg- δ -N*H*), 8.29 (m, 1H, *allo*-D-Thr-N*H*), 7.91 (br s, 1H, Arg- α -N*H*), 7.69 (d, 1H, D- β -hydroxy-Asp-N*H*, *J*_{D- β -hydroxy-Asp-N*H*, *D*- β -hydroxy-Asp- α -C*H* = 10.1 Hz), 7.44 (d, 1H, D-Ala-N*H*, *J*_{D-Ala-N*H*, *D*-Ala- α -C*H* = 8.2 Hz), 5.22-5.18 (m, 1H, D- β -hydroxy-Asp- α -C*H*), 4.82-4.62 (m, 4H, D- β -hydroxy-Asp- β -C*H*, *allo*-D-Thr- α -C*H*, 3-hydroxy-Pro- β -C*H*, H-1'), 4.58-4.14 (m, 5H, D-Ala- α -C*H*, *allo*-D-Thr- β -C*H*, Arg- α -C*H*, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*, C-3-O*H*), 4.02-3.91 (m, 1H, H-3), 3.79-3.64 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*), 3.52-3.24 (m, 2H, Arg- δ -C*H*), 2.45 (dd, 1H, H-2, *J*_{2,2} = 15.6, *J*_{2,3} = 2.7 Hz), 2.30 (dd, 1H, H-2, *J*_{2,2} = 15.6, *J*_{2,3} = 9.2 Hz), 2.13-1.64 (m, 12H, H-4, H-2', 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*, Arg- β -C*H*, Arg- γ -C*H*), 1.50 (s, 9H, 'Bu), 1.48 (s, 9H, 'Bu), 1.61-1.20 (m, 39H, *allo*-D-Thr- γ -C*H*, D-Ala- β -C*H*, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-3', H-4'), 1.20-0.95 (m, 63H, <u>'Pr</u>₃Si), 0.85 (d, 6H, H-15, *J*_{15,14} = 6.4 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 173.8, 173.1, 171.4, 170.4, 170.3, 169.1, 163.6, 156.3, 153.3, 132.2, 128.7, 122.3, 118.4, 83.2, 79.4, 74.5, 74.2, 72.4, 70.4, 69.5, 68.7, 59.5, 56.3, 53.0, 47.7, 45.5, 44.1, 40.7, 39.2, 37.7, 33.7, 31.6, 31.4, 30.1, 30.0, 29.9, 29.8, 29.8, 28.4, 28.2, 28.1, 28.0, 27.6, 26.0, 25.6, 25.4, 23.9, 22.8, 19.7, 18.4, 18.2, 18.2, 18.1, 16.1, 13.0, 12.6, 12.5, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 1596.09 [(M+H)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₈₁H₁₅₅O₁₇N₈Si₃ 1596.0813, found 1596.0860; [α |²⁰_D-15.30 (*c* 1.55, CHCl₃).}}

Boc-D-Ser(O-triisopropylsilyl)-(3*S*)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro-(3*S*)-3-(triisopropylsiloxy)-Asp(O-cyclohexyl)-OH (57)



A solution of **45** (87.9 mg, 0.089 mmol) in THF (3 mL) was treated with Dess-Martin periodinane (945 mg, 2.23 mmol) at room temperature for 60 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* Na₂S₂O₃*/sat. aq.* NaHCO₃ = 1/1, and the mixture was partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude aldehyde. A solution of the crude aldehyde, NaH₂PO₄·2H₂O (41.7 mg, 0.27 mmol) and 2-methylbut-2-ene (50 µL) in THF/BuOH/H₂O (450 µL/100 µL) was treated with a solution of NaClO₂ (24.1 mg, 0.27 mmol) in H₂O

 $(50 \ \mu\text{L})$ at room temperature for 50 min. The mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-1-2% MeOH/CHCl₃) to afford **57** (52.6 mg, 0.053 mmol, 59% over 2 steps) as a colorless solid.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.18 (d, 1H, β-hydroxy-Asp-NH, *J*_{β-hydroxy-Asp-NH, β-hydroxy-Asp-α-CH = 6.9 Hz), 5.55 (d, 1H, D-Ser-NH, *J*_{D-Ser-NH, D-Ser-α-CH = 8.1 Hz), 4.99-4.90 (m, 2H, β-hydroxy-Asp-α-CH, β-hydroxy-Asp-β-CH), 4.78-4.71 (m, 1H, H-1), 4.67-4.58 (m, 2H, D-Ser-α-CH, 3-hydroxy-Pro-β-CH), 4.37 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH), 3.94 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-γ-CH = 8.6 Hz), 2.21-2.11 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.98 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-γ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-γ-CH = 13.2, *J*_{3-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, *J*_{3-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 6.3 Hz), 1.87-1.63 (m, 4H, H-2), 1.57-1.19 (m, 6H, H-3, H-4), 1.19-0.88 (m, 63H, <u>'Pr</u>3Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 170.9, 169.7, 155.3, 79.6, 74.5, 73.8, 72.3, 63.9, 55.6, 54.4, 45.9, 34.4, 31.5, 31.3, 28.5, 25.3, 23.8, 34.4, 31.5, 31.3, 28.5, 25.3, 23.8, 18.1, 18.0, 12.4, 12.1, 12.0; ESIMS-LR *m/z* 1022.63 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₅₀H₉₇O₁₁N₃NaSi₃ 1022.6323, found 1022.6338; [α]²⁰ – 4.19 (*c* 0.43, CHCl₃).}}}}}}}}}}}}</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub>

(R)-3-Hydroxytridec-12-enoic acid (61)



A mixture of 3 (105 mg, 0.50 mmol) in THF (2 mL) was treated with a solution of NaOH (22 mg, 0.55 mmol) in H₂O (2 mL) at room temperature for 40 min. The mixture was partitioned between 1 M aq. HCl and AcOEt, and the organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated in vacuo. The residue was recrystalized from hexane to afford 61 (83 mg, 0.36 mmol, 73%) as a white solid.

mp 55-56 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) 5.81 (dddd, 1H, H-12, $J_{12, Hb} = 17.4$, $J_{H-12, Ha} = 10.5$, $J_{12, 11} = J_{12, 11} = 6.9$ Hz), 4.99 (d, 1H, H_b, $J_{Hb, 12} = 17.4$ Hz), 4.93 (d, 1H, Ha, $J_{Ha, 12} = 10.5$ Hz), 4.08-3.98 (m, 1H, H-3), 2.58 (dd, 1H, H-2), 4.08-3.98 (m, 2H, H-3), 2.58 (dd, 2H, H-2), 4.08-3.98 (m, 2H, H-3), 4.08 (m, 2H, H-3), 4.08-3.98 (m, 2H, H-3), 4.08 (m, 2H, H-3), 4.08 (m, 2H, H-3), 4.08 (m, 2H, H-3), 4. $J_{2,2} = 16.5, J_{2,3} = 3.2$ Hz), 2.48 (dd,1H, H-2, $J_{2,2} = 16.5, J_{2,3} = 8.7$ Hz), 2.03 (ddd, 2H, H-11, $J_{11,10} = J_{11,10} = J_{11,12} =$ 6.9 Hz), 1.61-1.24 (m, 14H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 178.2, 139.3, 114.3, 68.1, 41.2, 36.6, 33.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.2, 29.0, 25.6; ESIMS-LR *m/z* 229.18 [(M+H)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{13}H_{25}O_3$ 229.1798, found 229.1822; $[\alpha]^{20}D - 14.56$ (*c* 0.53, CHCl₃).

Allyl (R)-3-hydroxytridec-12-enoate (58)



A suspension of 61 (114 mg, 0.50 mmol) and Cs₂CO₃ (195 mg, 0.60 mmol) in DMF (5 mL) was treated with allyl bromide (51.8 µL, 0.60 mmol) at room temperature for 3 h. The mixture was partitioned between AcOEt and H₂O, and the organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (20% Et₂O/hexane) to afford

58 (70.5 mg, 0.26 mmol, 53%) as a colorless oil.

¹ H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 5.90 (ddd, 1H, H_c, $J_{\text{He, Ha}} = 17.2$, $J_{\text{He, Hb}} = 10.9$, $J_{\text{He, H-1'}} = J_{\text{He, H-1'}} = 5.7$ Hz), 5.79 (ddd, 1H, H-12, $J_{12, Hd} = 17.4$, $J_{12, He} = 10.4$, $J_{12, 11} = J_{12, 11} = 6.3$ Hz), 5.31 (d, 1H, Ha, $J_{Ha, He} = 17.2$ Hz), 5.24 (d, 1H, Hb, J_{Hb} , J_{Hb} $H_{e} = 10.3 Hz$), 4.97 (ddd, 1H, H_d, $J_{Hd, 12} = 17.4$, $J_{Hd, 11} = 3.5$, $J_{Hd, 11} = 1.7 Hz$), 4.91 (d, 1H, H_e, $J_{He, 12} = 10.4 Hz$), 4.60 $(d, 2H, H-1', J_{1', H^c} = 5.7 \text{ Hz}), 4.03-3.96 \text{ (m, 1H, H-3)}, 2.91 \text{ (s, 1H, OH)}, 2.52 \text{ (dd, 1H, H-2, } J_{2,2} = 16.6, J_{2,3} = 3.5 \text{ Hz}),$ 2.42 (dd, 1H, H-2, $J_{2,2} = 16.6$, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 2.02 (ddd, 2H, H-11, $J_{11,12} = J_{11,10} = 6.3$, $J_{11,10} = 6.9$ Hz), 1.55-1.47 (m, 2H, H-4), 1.46-1.23 (m, 12H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.8, 139.3, 132.0, 118.7, 114.2, 68.1, 65.4, 41.4, 36.6, 33.9, 29.6, 29.5, 29.2, 29.0, 25.6; ESIMS-LR *m/z* 291.11 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{16}H_{29}O_3$ 296.2111, found 269.2131; $[\alpha]^{20}D_{-15.40}$ (c 0.50, CHCl₃).

Cyclohexyl 1-[(allyloxycarbonyl)methyl]undec-10-enyl 2-[Boc-D-Ser(O-triisopropylsilyl)-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Prolaminobutendioate (62)



A solution of 57 (5.0 mg, 0.0050 mmol), 58 (2.0 mg, 0.0075 mmol) and DMAP (0.61 mg, 0.0050 mmol) in CH₂Cl₂ (50 µL) was treated with EDCI (1.0 mg, 0.0050 mmol) at room temperature for 130 mim. The mixture was partitioned between AcOEt and 1 M aq. HCl. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (25% Et₂O/hexane), PTLC (25% Et₂O/hexane), and flash silica gel column chromatography (\$0.5 cm×1.5 cm, 25% Et₂O/hexane) to afford 62 (2.1 mg,

0.0020 mmol, 39%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 5.91 (dddd, H_C, *J*_{Hc, Ha} = 17.2, *J*_{Hc, Hb} = 10.9, *J*_{Hc, H-1}' = *J*_{Hc, H-1}' = 5.8 Hz), 5.80 (dddd, H-12, *J*_{12, Hd} = 17.2, *J*_{12, H3} = 10.3, *J*_{12, 11} = *J*_{12, 11} = 6.3 Hz), 5.66 (D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-N*H*, *D*-Ser-α-*CH* = 8.6 Hz), 5.52 (s, 1H, dehydro-Asp-β-C*H*), 5.38-5.30 (m, 1H, H-3), 5.31 (dd, 1H, Ha, *J*_{Ha, Hc} = 17.2 Hz), 5.24 (d, 1H, Hb, *J*_{Hb, Hc} = 10.9 Hz), 4.99 (dd, 1H, Hd, *J*_{Hd, 12} = 17.2 Hz), 4.92 (d, 1H, He, *J*_{He, 12} = 10.3 Hz), 4.88-4.81 (m, 1H, H-1"), 4.72-4.64 (m, 2H, D-Ser-α-C*H*, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*), 4.58 (d, 2H, H-1', *J*_{1', Hc} = 5.8 Hz), 4.50 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-*CH*), 3.98 (dd, 1H, D-Ser-β-C*H*, *J*_{D-Ser-β-C*H*, D-Ser-β-C*H* = 9.8, *J*_{D-Ser-β-C*H*, D-Ser-α-C*H* = 8.0 Hz), 3.89-3.76 (m, 3H, D-Ser-β-C*H*, 3-hydroxy-Pro-δ-*CH*), 2.72 (dd, 1H, H-2, *J*_{2,2} = 15.7, *J*_{2,3} = 6.8 Hz), 2.59 (dd, 1H, H-2, *J*_{2,2} = 15.7, *J*_{2,3} = 5.7 Hz), 2.20-2.11 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H*), 2.07-1.95 (m, 3H, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H*, H-11), 1.81 (m, 2H, H-2"), 1.71 (m, 2H, H-2"), 1.50-1.18 (m, 20H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-3", H-4"), 1.14-0.94 (m, 42H, *i*<u>Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 170.1, 155.4, 139.4, 132.1, 118.7, 114.3, 79.6, 73.9, 73.4, 73.4, 73.0, 72.3, 69.9, 65.6, 54.1, 45.5, 39.2, 38.8, 34.4, 34.0, 33.8, 32.1, 31.6, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 28.5, 25.4, 25.1, 24.9, 23.7, 22.8, 18.1, 18.1, 14.3, 12.1, 12.0; ESIMS-LR *m*/*z* 1098.68 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₅₇H₁₀₁O₁₂N₃NaSi₂ 1098.6816, found 1098.6824; [α]²⁰_D - 1.66 (*c* 0.18, CHCl₃).}}}

Allyl (R)-3-hydroxytridec-12-enoate (64)



A suspension of **43** (136 mg, 0.50 mmol) and Cs_2CO_3 (228 mg, 0.70 mmol) in DMF (5 mL) was treated with allyl bromide (60.5 μ L, 0.70 mmol) at room temperature for 10 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and H₂O, and the organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in*

vacuo. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-10-15% AcOEt/hexane) to afford **64** (117 mg, 0.38 mmol, 75%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.89 (dddd, 1H, H_c, $J_{Hc, Ha} = 17.2$, $J_{Hc, Hb} = 10.5$, $J_{Hc, I'} = J_{Hc, I'} = 6.0$ Hz), 5.30 (dd, 1H, Ha, $J_{Ha, Hc} = 17.2$, $J_{Ha, I'} = 1.2$ Hz), 5.22 (dd, 1H, Hb, $J_{Hb, Hc} = 10.3$, $J_{Hb, I'} = 1.2$ Hz), 4.58 (dd, 2H, H-1', $J_{I', Hc} = 5.7$, $J_{I', Ha} = J_{I', Hb} = 1.2$, Hz), 4.03-3.95 (m, 1H, H-3), 2.98 (s, 1H, OH), 2.51 (dd, 1H, H-2, $J_{2, 2} = 16.5$, $J_{2, 3} = 3.2$ Hz), 2.41 (dd, 1H, H-2, $J_{2, 2} = 16.5$, $J_{2, 3} = 3.2$ Hz), 2.41 (dd, 1H, H-2, $J_{2, 2} = 16.5$, $J_{2, 3} = 8.7$ Hz), 1.55-1.44 (m, 1H, H-14), 1.44-1.37 (m, 2H, H-4), 1.37-1.08 (18H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 0.83 (d, 6H, H-15, $J_{15, 14} = 6.9$ Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.8, 131.9, 118.6, 68.1, 65.4, 41.4, 39.1, 36.6, 30.0, 29.8, 29.7, 29.7, 28.0, 27.5, 25.6, 22.8; ESIMS-LR *m*/*z* 335.26 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₉H₃₆O₃Na 335.2557, found 335.2564; [α]²⁰_D -10.09 (*c* 0.57, CHCl₃).

Boc-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Asp(O-cyclohexyl)-OH (ent-35)



A mixture of **13** (342 mg, 0.67 mmol) in acetone (26 mL) was treated with 2.5 M Jones reagent (910 μ L, 2.3 mmol) at 0 °C for 4.5 h. The reaction was quenched with ^{*i*}PrOH (4.0 mL), and the mixture was partitioned between Et₂O and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in*

vacuo. The residue was purified by silica gel column chromatography (ϕ 2 × 4 cm, 2% MeOH/CHCl₃) to afford *ent*-**35** (115 mg, 0.1235 mmol, 35 %, 71% based on 49% conversion) as a yellow oil, and the unreacted starting material (176 mg, 0.34 mmol, 51%) was recoverd.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 5.26 (d, 1H, L- β -hydroxy-Asp-N*H*, *J*_{D- β -hydroxy-Asp-N*H*, *D*- β -hydroxy-Asp- α -*CH* = 9.2 Hz), 4.95 (br s, 1H, L- β -hydroxy-Asp- β -*CH*), 4.83-4.74 (m, 2H, L- β -hydroxy-Asp- α -*CH*, H-1), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.87-1.81 (m, 2H, H-2), 1.55-1.21 (m, 6H, H-3), 1.85-1.81 (m, 2H, H-2), 1.55-1.81 (m, 2H, H-2), 1.55-1}

H-4), 1.42 (s, 9H, 'Bu), 1.18-1.01 (m, 21H, <u>'Pr₃Si</u>); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 174.8, 169.9, 155.6, 80.5, 74.6, 72.9, 57.3, 31.6, 31.4, 28.3, 25.4, 23.9, 23.8, 18.0, 18.0, 12.8, 12.5; ESIMS-LR *m*/*z* 510.28 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₄H₄₅O₇NNaSi 510.2858, found 510.2854; [α]²⁰_D -1.20 (*c* 1.77, CHCl₃).

Depsipeptide 65



A solution of **64** (23.2 mg, 0.074 mmol), *ent-***35** (30.3 mg, 0.062 mmol) and DMAP (7.6 mg, 0.062 mmol) in CH₂Cl₂ (600 μ L) was treated with EDCI (23.8 mg, 0.12 mmol) at –18 °C for 1 min. The mixture was warmed to 0 °C, and stirred for 24 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed

with *sat. aq.* NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-3-5% AcOEt/hexane) to afford **65** (37.4 mg, 0.048 mmol, 77%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 5.90 (dddd, 1H, H_c, $J_{Hc, Ha} = 17.2$, $J_{Hc, Hb} = 10.3$, $J_{Hc, 1'} = J_{Hc, 1'} = 5.8$ Hz), 5.31 (dd, 1H, Ha, $J_{Ha, Hc} = 17.2$, $J_{Ha, 1'} = 1.2$ Hz), 5.25-5.16 (m, 3H, Hb, H-3, L-β-hydroxy-Asp-N*H*), 4.86 (d, 1H, L-β-hydroxy-Asp-β-C*H*, $J_{L-\beta-hydroxy-Asp-β-C$ *H*, L-β-hydroxy-Asp-α-C*H*= 1.8 Hz), 4.82-4.75 (m, 1H, H-1"), 4.69 (dd, L-β-hydroxy-Asp-α-C*H* $, 1H, <math>J_{L-\beta-hydroxy-Asp-α-C$ *H*, L-β-hydroxy-Asp-α-C*H* $= 9.8, <math>J_{L-\beta-hydroxy-Asp-α-C$ *H*, L-β-hydroxy-Asp-β-C*H*, L-β-hydroxy-Asp-α-C*H* $= 1.8 Hz), 4.58 (d, 2H, H-1', <math>J_{1', Hc} = 5.8$ Hz), 2.69 (dd, 1H, H-2, $J_{2, 2} = 15.5$, $J_{2, 3} = 6.3$ Hz), 2.58 (dd, 1H, H-2, $J_{2, 2} = 15.5$, $J_{2, 3} = 6.9$ Hz), 1.88-1.81 (m, 2H, H-2"), 1.76-1.61 (m, 4H, H-2", H-3"), 1.56-1.46 (m, 3H, H-4, H-14), 1.41 (s, 9H, ⁴Bu), 1.46-1.19 (m, 22H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-3", H-4"), 1.17-1.01 (m, 21H, ^{*i*}Pr₃Si), 0.85 (d, 6H, H-15, $J_{15, 14} = 6.9$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 170.3, 169.9, 169.6, 155.3, 132.1, 118.7, 79.9, 74.4, 43.0, 72.7, 65.5, 57.6, 39.2, 39.0, 33.8, 31.7, 31.4, 30.1, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.6, 28.4, 28.3, 28.1, 27.5, 25.4, 25.1, 24.0, 23.9, 22.8, 18.1, 18.1, 18.0, 12.8, 12.5; ESIMS-LR *m/z* 804.54 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C4₃H₇₉O₉NNaSi 804.5416, found 804.5419; [α]²⁰_D -7.60 (*c* 0.36, CHCl₃).

2-[Boc-D-Ser(OBn)-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro]aminophenyl acetate (trans-84)

2-[Boc-D-Ser(OBn)-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-D-Pro]aminophenyl acetate (cis-84)



A solution of **4a** (241 mg, 1.00 mmol) and **82** (443 mg, 1.50 mmol) in HFIP (2 mL) was treated with a solution of **83** (242 mg, 1.50 mmol) in HFIP (3 mL) at room temperature for 2 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-5-10-40% AcOEt/hexane) to afford

trans-84 (167 mg, 0.22 mmol, 22%) as a yellow oil and *cis*-84 (489 mg, 0.64 mmol, 64%) as a colorless foam. Data for *trans*-84: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 9.44 (s, 1H, Ar-N*H*), 8.24 (d, 1H, H-6, $J_{6,5} = 8.1$ Hz), 7.38-7.24 (m, 5H, Ph), 7.18 (ddd, 1H, H-5, $J_{5,6} = 8.1, J_{5,4} = 5.7, J_{5,3} = 2.9$ Hz), 7.10-7.04 (m, 2H, H-3, H-4), 5.23 (d, 1H, D-Ser-N*H*, $J_{D-Ser-\alpha-CH} = 8.1$ Hz), 4.97 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\beta$ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH} = 2.9 Hz), 4.75 (ddd, 1H, D-Ser- α -CH, $J_{D-Ser-\alpha-CH, D-Ser-NH} = 8.1, J_{D-Ser-\alpha-CH} = J_{D-Ser-\alpha-CH, D-Ser-<math>\beta$ -CH} = 6.3 Hz), 4.63 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH), 4.54 (s, 2H, PhCH), 3.89 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\delta$ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\delta$ -CH} = 10.1, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 6.9, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\delta$ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\delta$ -CH} = 10.1, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH} = 6.9, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\delta$ -CH} = 0.1, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH} = 6.9, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH} = 0.1, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH} = 6.9, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH} = 0.1, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\gamma$ -CH} = 6.9, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH} = 0.1, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH} = 0.9, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH} = 0.1, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH} = 0.9, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH} = 0.1, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH} = 0.9, J_{3-hydroxy-Pro- δ -C Pro-δ-*CH*, 3-hydroxy-Pro-γ-*CH* = 5.8 Hz), 3.83 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-*CH*, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-*CH*, 3-hydroxy-Pro-δ-*CH* = 10.1, *J*_{3-hydroxy-Pro-δ-*CH*, 3-hydroxy-Pro-δ-*CH* = 9.2 Hz), 3.67-3.59 (m, 2H, D-Ser-β-*CH*), 2.46 (s, 3H, *CH*₃), 2.30-2.21 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-*CH*), 2.03 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-*CH*, *J*_{3-hydroxy-Pro-γ-*CH*, 3-hydroxy-Pro-γ-*CH* = 12.6, *J*₃-hydroxy-Pro-γ-*CH*, 3-hydroxy-Pro-δ-*CH* = 5.8 Hz), 1.38 (s, 9H, ^{*I*}Bu), 1.13-1.00 (m, 21H, ^{*i*}Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.0, 169.3, 167.7, 155.3, 140.1, 137.6, 130.6, 128.6, 127.9, 127.7, 126.3, 124.3, 122.3, 121.9, 80.3, 73.4, 72.5, 69.9, 69.7, 52.3, 45.9, 34.0, 28.3, 21.2, 18.1, 12.1; ESIMS-LR *m*/*z* 720.37 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₃₇H₅₅O₈N₃NaSi 720.3651, found 720.3651; [α]²⁰_D –40.50 (*c* 0.53, CHCl₃).}}}

Data for *cis*-84: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.94 (d, 1H, H-6, $J_{6,5} = 7.5$ Hz), 7.67 (s, 1H, Ar-N*H*), 7.31-7.21 (m, 5H, Ph), 7.18-7.05 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 5.31 (d, 1H, D-Ser-N*H*, $J_{D-Ser-\alpha-CH} = 8.6$ Hz), 4.72 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*, D-Ser-α-C*H*), 4.62 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\alpha$ -C*H*, J_{3-h

Boc-D-Ser(OBn)-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro-Oallyl (85)



A solution of *trans*-84 (98.6 mg, 0.129 mmol) in MeOH was treated with $SmCl_3$ · $6H_2O$ (94.1 mg, 0.258 mmol) at room temperature for 48 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude phenol. A mixture of the crude phenol in CH₂Cl₂ (1.3 mL) was treated with 1,1'-

carbonyldiimidazole (105 mg, 0.65 mmol) at room temperature for 40 min. Allyl alcohol (175 μ L, 2.6 mmol) and DMAP (15.8 mg, 0.129 mmol) was added to the mixture, which was stirred for 250 min. The mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (3-13-20% AcOEt/hexane) to afford **85** (58.0 mg, 0.096 mmol, 74% over 2 steps) as a colorless oil.

$[\alpha]^{20}_{D} - 0.90 (c \ 1.29, \text{CHCl}_3).$

Boc-D-Ser(OBn)-(3*S*)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro 2-methyl-1-phenoxycarbonyloxypropylamide (*trans*-87) Boc-D-Ser(OBn)-(3*S*)-3-(triisopropylsiloxy)-D-Pro 2-methyl-1-phenoxycarbonyloxypropylamide (*cis*-87)



A solution of **4a** (362 mg, 1.5 mmol) and **82** (664 mg, 2.3 mmol) in HFIP (10 mL) was treated with a solution of **86** (493 mg, 2.3 mmol) in HFIP (5 mL) at room temperature for 18 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by high-flash silica gel column

chromatography (0-5-10-20-35% AcOEt/hexane) to afford *trans-***87** (575 mg, 0.76 mmol, 51%) as a white foam and *cis-***87** (421 mg, 0.56 mmol, 37%) as a white foam.

Data for *cis*-87: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.40-7.16 (m, 10H, Ph), 5.85 (s, 1H, 1-N*H*), 5.33 (d, 1H, D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-N*H*, *D*-Ser- α -C*H* = 8.1 Hz), 4.68-4.61 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro- β -C*H*, D-Ser- α -C*H*), 4.59 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn, Bn} = 12.3 Hz), 4.52 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn, Bn} = 12.3 Hz), 4.41-4.30 (m, 3H, H-2, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*), 3.86-3.80 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*), 3.74-3.64 (m, 3H, D-Ser- β -C*H*, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*), 2.23-2.15 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*), 2.08-2.01 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H*), 1.41 (s, 9H, ^{*i*}Bu), 1.40 (s, 3H, 1-Me), 1.38 (s, 3H, 1-Me), 1.15-0.99 (m, 21H, ^{*i*}Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 170.8, 170.1, 167.9, 155.4, 154.8, 153.7, 153.6, 151.3, 151.2, 137.9, 137.6, 129.5, 128.5, 128.4, 127.9, 127.7, 127.6, 126.0, 121.1, 121.1, 79.8, 79.6, 73.6, 73.5, 73.0, 72.8, 72.5, 71.9, 71.6, 70.5, 65.6, 63.1, 53.7, 53.3, 51.8, 45.2, 43.5, 33.6, 30.4, 28.4, 28.3, 24.1, 23.9, 23.6, 18.1, 18.0, 18.0, 12.5, 12.3, 12.0; ESIMS-LR *m/z* 778.41 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₄₀H₆₁O₉N₃NaSi 778.4069, found 778.4063; [α]²⁰_D +1.01 (*c* 0.92, CHCl₃).}

Boc-D-Ser(OBn)-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro-OH (67)



A suspension of *trans*-87 (55.0 mg, 0.073 mmol) and MS4A (60 mg) in THF (1.5 mL) was treated with 1 M 'BuOK in THF (77 μ L, 0.077 mmol) at 0 °C for 10 min. 1 M 'BuOK in THF (77 μ L, 0.077 mmol) was added to the mixture at 0 °C and stirred for 10 min. The reaction was guenched with 1 M *ag*. HCl, and the mixture was partitioned between AcOEt

and 1 M aq. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford crude oxazolidinone. A solution of the crude oxazolidinone in THF (1.2 mL) was treated with 1 M aq. LiOH (99.0 μ L, 0.099 mmol) at room temperature for 40 min. The reaction was quenched with 1 M aq. HCl, and the mixture

was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-2% MeOH/CHCl₃ + 0.1% AcOH) to afford **67** (19.6 mg, 0.35 mmol, 48% over 2 steps) as a white foam.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.36-7.24 (m, 5H, Ph), 5.40 (d, 1H, D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-N*H*, D-Ser- α -*CH* = 10.3 Hz), 4.82-4.72 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-β-*CH*, D-Ser- α -*CH*), 4.51 (s, 2H, Bn), 4.47 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -*CH*), 3.94-3.85 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro- δ -*CH*), 3.68-3.57 (m, 2H, D-Ser- β -*CH*), 2.19-2.08 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -*CH*), 2.03-1.94 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- γ -*CH*), 1.42 (s, 9H, ^{*i*}Bu), 1.15-0.95 (m, 21H, ^{*i*}<u>Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.3, 171.6, 155.4, 137.6, 128.6, 127.9, 127.7, 80.4, 73.5, 73.4, 70.1, 69.4, 52.2, 46.1, 34.1, 28.4, 18.0, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 563.32 [(M–H)[–]]; ESIMS-HR calcd for C₂₉H₄₇O₇N₂Si 563.3158, found 563.3162; [α]²⁰_D –27.39 (*c* 0.33, CHCl₃).}

Boc-allo-D-Thr(O-triisopropylsilyl)-D-Ala-OBn (89)

BocHN H TIPSO

A suspension of **30** (595 mg, 5.0 mmol) in *sat. aq.* NaHCO₃ (7.5 mL) and THF (15 mL) was treated with (Boc)₂O (2.07 mL, 9.0 mmol) at room temperature for 36 h. The mixture was diluted with H₂O, and partitioned between hexane and H₂O, and the aqueous phase was saturated with Na₂SO₄. The aqueous phase was acidified with 1 M *aq.* HCl and extracted

with AcOEt. The organic phase was dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude carboxylic acid. A solution of the crude carboxylic acid, Boc-D-Ala-OBn·HCl (1.29 g, 6.0 mmol), NaHCO₃ (840 mg, 10.0 mmol) and HOBt · H₂O (1.35 g, 10.0 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) was treated with EDCI (1.93 g, 10.0 mmol) at 0 °C for 3.5 h. The mixture was warmed to room temperature, and stirred for 14.5 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and sat. aq. NaHCO₃. The organic phase was washed with 1 M aq. HCl, sat. aq. NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude alcohol. A solution of the crude alcohol and 2,6-lutidine (873 µL, 7.5 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) was treated with TIPSOTf (1.83 mL, 5.50 mmol) at -78 °C for 15 min. The mixture was warmed to -50 °C, and stirred for 55 min. The reaction was quenched with MeOH (3.0 mL), and the mixture was partitioned between AcOEt and sat. aq. NaHCO₃. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (\$\phi 3 cm \times 7 cm, AcOEt) to afford 89 (2.59 g, 4.8 mmol, 97% over 3 steps) as a white solid. mp 85-86 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.39-7.31 (m, 5H, Ph), 6.93 (d, 1H, D-Ala-NH, *J*_{D-Ala-NH, D-Ala-α-CH} = 7.5 Hz), 5.17 (s, 2H, PhCH), 5.06 (br s, 1H, allo-D-Thr-NH), 4.61 (dq, 1H, D-Ala-α-CH, J_D-Ala-α-CH, D-Ala-α-CH, D-A Ala- β -CH = 7.5 Hz), 4.38 (dq, 1H, *allo*-D-Thr- β -CH, *Jallo*-D-Thr- β -CH, *allo*-D-Thr- α -CH = 5.7, *Jallo*-D-Thr- β -CH, *allo*-D-Thr- γ -CH = 6.3 Hz), 4.11 (dd, 1H, *allo*-D-Thr- α -CH, *Jallo*-D-Thr- α -CH, *allo*-D-Thr- β -CH = *Jallo*-D-Thr- β -CH, *allo*-D-Thr-NH = 5.7 Hz), 1.44 (s, 9H, ¹Bu), 1.41 (d, 3H, D-Ala- β -CH, $J_{\text{D-Ala}-\beta$ -CH, $\text{D-Ala}-\alpha$ -CH = 7.5 Hz), 1.18 (d, 3H, *allo*-D-Thr- γ -CH, J_{allo} -D-Thr- γ -CH, J_{allo} -D-Thr- β -CH = 6.3 Hz), 1.11-1.02 (m, 21H, ^{*i*}Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.5, 169.6, 135.4, 128.8, 128.6, 128.3, 68.6, 67.3, 48.2,

28.4, 19.4, 18.7, 18.2, 18.1, 12.5; ESIMS-LR m/z 559.32 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₈H₄₈O₆N₂NaSi 559.3174, found 559.3175; [α]²⁰_D -3.78 (*c* 0.56, CHCl₃).

Boc-allo-D-Thr(O-triisopropylsilyl)-D-Ala-OH (90)



A mixture of **89** (1.88 mg, 3.50 mmol) and 10% Pd/C (188 mg) in AcOEt (30 mL) was vigorously stirred at room temperature for 25 min under H₂ atmosphere. The catalyst was filtered off through a Celite pad, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford **90** (1.56 mg, 3.49 mmol, quant.) as a white solid.

mp 170-172 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.07 (d, 1H, D-Ala-N*H*, *J*_{D-Ala-N*H*, *D*-Ala-α-*CH* = 5.2 Hz), 5.28 (br s, 1H, *allo*-D-Thr-N*H*), 4.57 (dq, 1H, D-Ala-α-C*H*, *J*_{D-Ala-α-C*H*, *D*-Ala-N*H* = 5.2, *J*_{D-Ala-α-C*H*, *D*-Ala-β-C*H* = 7.5 Hz), 4.36 (dq, 1H, *allo*-D-Thr-β-C*H*, *J_{allo-D}-Thr-β-CH*, *J_{allo-D}-Thr-α-CH* = 4.6, *J_{allo-D}-Thr-β-CH*, *allo*-D-Thr-γ-C*H* = 6.3 Hz), 4.16 (dd, H, *allo*-D-Thr-α-C*H*, *J_{allo-D}-Thr-α-CH* = 4.6, *J_{allo-D}-Thr-β-CH*, *allo*-D-Thr-β-C*H*, *J_{D-Ala-β}-CH*, *J_{D-Ala-β}-CH*, *J_{D-Ala-β}-CH*, *J_{D-Ala-β}-CH* = 7.5 Hz), 1.43 (s, 9H, ^{*t*}Bu), 1.20 (d, 3H, *allo*-D-Thr-γ-C*H*, *J_{allo-D}-Thr-γ-CH*, *allo*-D-Thr-β-C*H* = 6.3 Hz), 1.09-1.03 (m, 21H, ^{*i*}Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 175.7, 170.1, 68.6, 48.3, 28.3, 18.3, 18.2, 18.1, 12.6; ESIMS-LR *m*/*z* 469.27 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₁H₄₂O₆N₂NaSi 4692704, found 469.2708; [α]²⁰D - 5.67 (*c* 0.52, CHCl₃).}}}

Boc-D-*allo*-Thr(O-triisopropylsilyl)-D-Ala-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro 2-methyl-1-phenoxycarbonyloxy-propylamide (*trans*-91)

Boc-D-*allo*-Thr(O-triisopropylsilyl)-D-Ala-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-D-Pro 2-methyl-1-phenoxycarbonyloxy-propylamide (*cis*-91)



A solution of **4a** (58.4 mg, 0.24 mmol) and **90** (161 mg, 0.36 mmol) in HFIP (2 mL) was treated with a solution of **86** (79.5 mg, 0.32 mmol) in HFIP (2 mL) at room temperature for 25 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (5-15-

25-35% AcOEt/hexane) to afford *trans-91* (106 mg, 0.12 mmol, 49%) as a yellow foam and *cis-91* (64.1 mg, 0.071 mmol, 29%) as a white solid.

Data for *trans*-91: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.38 (dd, 2H, *m*-Ph, *J_{m*-Ph, *o*-Ph} = *J_m*-Ph, *p*-Ph = 7.5 Hz), 7.23 (t, 1H, *p*-Ph, *J_p*-Ph, *m*-Ph = 7.5 Hz), 7.18 (d, 2H, *o*-Ph, *J_p*-Ph, *m*-Ph = 7.5 Hz), 7.14 (br s, 1H, D-Ala-N*H*), 6.81 (s, 1H, 1-N*H*), 5.08 (br s, 1H, *allo*-D-Thr-N*H*), 4.75 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- β -C*H*, 3-hydroxy-Pro- γ -C*H* = 2.3 Hz), 4.67-4.59 (m, 1H, D-Ala- α -C*H*), 4.45-4.39 (m, 2H, *allo*-D-Thr- β -C*H*, H-2), 4.38 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -C*H*), 4.34 (d, 1H, H-2, *J*_{2,2} = 10.3 Hz), 4.17-4.13 (m, 1H, *allo*-D-Thr- α -C*H*), 3.80 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- δ -C*H*, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- δ -C*H*, 1.94 (d, 1H, H-2, *J*_{2,2} = 10.3 Hz), 4.17-4.13 (m, 1H, *allo*-D-Thr- α -C*H*), 3.80 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -C*H*, *J*_{3-hydroxy-Pro- δ -C*H*,}}}}</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub>

Data for *cis*-91: mp 100-101 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.39 (dd, 2H, *m*-Ph, *J*_{*m*-Ph} = *J*_{*m*-Ph} = 7.5 Hz), 7.24 (t, 1H, *p*-Ph, *J*_{*p*-Ph}, *m*-Ph = 7.5 Hz),

7.19 (d, 2H, o-Ph, $J_{p-Ph, m-Ph} = 7.5$ Hz), 7.19 (d, 1H, D-Ala-NH, $J_{D-Ala-\alpha-CH} = 6.9$ Hz), 5.76 (s, 1H, 1-NH), 5.02 (br s, 1H, *allo*-D-Thr-NH), 4.69 (dt, 1H, D-Ala- α -CH, $J_{D-Ala-\alpha-CH, D-Ala-<math>\alpha$ -CH} = J_{D-Ala- α -CH, D-Ala-NH} = 6.9 Hz), 4.54 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- β -CH, $J_{3-hydroxy-Pro-<math>\beta$ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- β -CH, J_{3-h

Boc-D-allo-Thr(O-triisopropylsilyl)-D-Ala-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro-OH (69)



A suspension of *trans*-91 (34.6 mg, 0.038 mmol) and MS4A (40 mg) in THF (400 μ L) was treated with 1 M ^{*t*}BuOK in THF (80 μ L, 0.080 mmol) at 0 °C for 25 min. The reaction was quenched with 1 M *aq*. HCl, and the mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford crude oxazolidinone. A solution of the crude oxazolidinone in THF (400 μ L) was treated with 1 M *aq*. LiOH (68.0 μ L, 0.068

mmol) at room temperature for 1 h. The reaction was quenched with 1 M *aq*. HCl, and the mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-2% MeOH/CHCl₃ + 0.1% AcOH) to afford **69** (19.5 mg, 0.027 mmol, 72% over 2 steps) as a white foam. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.18(d, 1H, D-Ala-N*H*, *J*_{D-Ala- α -C*H* = 8.1 Hz}), 5.23 (d, 1H, *allo*-D-Thr-N*H*, *J_{allo-D}-Thr-\alpha-C<i>H* = 6.9 Hz}), 4.84 (dq, 1H, D-Ala- α -C*H*, *J*_{D-Ala- α -C*H*, D-Ala- α -C*H*, D-Ala- α -C*H*, D-Ala- α -C*H*, J, J-Ala- α -C*H*, J}}

= 6.3 Hz), 1.14-1.01 (m, 42H, $\frac{i}{Pr_3}Si$); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 173.8, 170.6, 169.5, 156.1, 73.1, 69.5, 68.7, 46.9, 45.7, 34.0, 28.4, 19.6, 18.2, 18.1, 18.0, 17.9, 12.5, 12.1; ESIMS-LR *m*/*z* 714.46 [(M–H)[–]]; ESIMS-HR calcd for C₃₅H₆₈O₈N₃Si₂ 714.4550, found 714.4559; [α]²⁰_D –10.9 (*c* 1.10, CHCl₃).

Boc-Arg(Cbz)₂-(3R)-3-(triisopropylsiloxy)-Asp(O-cyclohexyl)-Oallyl (93)



A solution of **36** (65.8 mg, 0.13 mmol) was treated with 25% TFA/CH₂Cl₂ (2 mL) at room temperature for 20 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford crude amine. A mixture of the crude amine, Boc-Arg(Cbz)₂-OH (81.2 mg, 0.15 mmol), ⁱPr₂NEt (43.5 μ L, 0.25 mmol) and HOAt (34.0 mg, 0.25 mmol) in CH₂Cl₂ (1.3 mL) was treated with EDCI (47.9 mg, 0.25

mmol) at room temperature for 4.5 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with 1 M *aq.* HCl, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-15-35% AcOEt/hexane) to afford **93** (82.2 mg, 0.086 mmol, 69% over 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 9.44 (br s, 1H, Arg- ω -N*H*), 9.23 (br s, 1H, Arg- δ -N*H*), 7.41-7.24 (m, 10H, Ph), 6.91 (d, 1H, D- β -hydroxy-Asp-N*H*, *J*_{D- β -hydroxy-Asp- α -C*H* = 9.2 Hz), 5.87 (dddd, 1H, H_c, *J*_{He, Ha} = 17.2, *J*_{He, Hb} = 10.3, *J*_{He, H-1} = *J*_{He, 1} = 6.3 Hz), 5.31 (dd, 1H, H_a, *J*_{Ha, He} = 17.2, *J*_{Ha, 1} = 1.2 Hz), 5.27-5.19 (m, 3H, Bn, H_b), 5.14 (s, 2H, Bn), 5.04-4.98 (m, 2H, D- β -hydroxy-Asp- α -C*H*, Arg- α -N*H*), 4.93 (d, 1H, D- β -hydroxy-Asp- β -C*H*, *J*_{D- β -hydroxy-Asp- β -C*H*, *J*_{D- β -hydroxy-Asp- α -C*H* = 2.3 Hz), 4.75-4.69 (m, 1H, H-1'), 4.61 (dd, 1H, H-1, *J*_{1, 1} = 13.2, *J*_{1, He} = 6.3 Hz), 4.54 (dd, 1H, H-1, *J*_{1, 1} = 13.2, *J*_{1, He} = 6.3 Hz), 4.20-4.13 (m, 1H, Arg- α -C*H*), 3.97 (dd, 2H, Arg- δ -C*H*, *J*_{Arg- δ -C*H*, *Arg-\gamma-C<i>H* = 8.1, *J*_{Arg- δ -C*H*, *Arg-\gamma-C<i>H* = 6.3 Hz), 1.85-1.76 (m, 3H, Arg- β -C*H*, H-2'), 1.72-1.62 (m, 4H, Arg- γ -C*H*, H-2'), 1.58-1.15 (m, 7H, Arg- β -C*H*, H-3', H-4'), 1.41 (s, 9H, 'Bu), 1.15-0.99 (m, 21H, <u>'Pr</u>₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.0, 169.6, 168.8, 163.9, 160.6, 155.9, 155.6, 137.1, 134.8, 131.4, 128.9, 128.4, 127.8, 119.3, 80.0, 74.4, 72.6, 68.9, 67.0, 66.6, 55.9, 54.2, 44.4, 31.6, 31.3, 29.3, 28.3, 25.3, 25.2, 23.8, 23.8, 18.0, 17.9, 12.5; ESIMS-LR *m*/*z* 974.49 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C49H₇₃O₁₂N₅NaSi 974.4917, found 974.491; [α]²⁰D - 5.84 (*c* 0.41, CHCl₃).}}}}}

Depsipeptide 94



Depsipeptide **65** (31.2 mg, 0.040 mmol) was treated with 25% TFA/CH₂Cl₂ (500 μ L) at room temperature for 1 h. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between Et₂O and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford crude amine **66**. This compound was directly used to the next reaction without further purification. A mixture of the crude amine **66**, **67** (20.9 mg, 0.037 mmol), ^{*i*}Pr₂EtN (12.9 μ L, 0.074 mmol) and HOAt (10.1 mg, 0.078 mmol)

in CH₂Cl₂ (400 μ L) was treated with EDCI (14.1 mg, 0.074 mmol) at room temperature for 1 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with 1 M *aq.* HCl, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (3-10-15-20% AcOEt/hexane) to afford **94** (38.2 mg, 0.031 mmol, 84% over 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 7.37-7.22

(m, 6H, Ph, L-β-hydroxy-Asp-N*H*), 5.91 (dddd, 1H, H_e, *J*_{He, Ha} = 17.2, *J*_{He, Ha} = 10.3, *J*_{He, H-1}' = *J*_{He, 1}' = 5.8 Hz), 5.60 (d, 1H, D-Ser-*NH*, *J*_{D-Ser-*NH*, D-Ser-*α*-*CH* = 8.6 Hz), 5.31 (dd, 1H, H_a, *J*_{Ha, Hc} = 17.2, *J*_{Ha, 1}' = 1.8 Hz), 5.23 (dd, 1H, H_b, *J*_{Hb, Hc} = 10.3, *J*_{Hb, 1}' = 1.2 Hz), 5.25-5.15 (m, 1H, H-3), 4.95 (dd, L-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1H, *J*_{L-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1H, *J*_{L-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1-β-hydroxy-Asp-*α*-*CH*, 1-1"), 4.59 (d, 2H, H-1', *J*_{1', Hc} = 5.8 Hz), 4.56 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn, Bn} = 12.6 Hz), 4.49 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn}, Bn = 12.6 Hz), 4.47 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-*α*-*CH*), 3.91-3.84 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-*δ*-*CH*), 3.72-3.60 (m, 3H, 3-hydroxy-Pro-*δ*-*CH*, D-Ser-*β*-*CH*), 2.69 (dd, 1H, H-2, *J*_{2, 2} = 15.5, *J*_{2, 3} = 5.7 Hz), 2.57 (dd, 1H, H-2, *J*_{2, 2} = 15.5, *J*_{2, 3} = 7.4 Hz), 2.18-2.09 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-*γ*-*CH*), 1.93 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-*γ*-*CH*, *J*-hydroxy-Pro-*γ*-*CH*, 3-hydroxy-Pro-*γ*-*CH*, 3-hydroxy-Pro-*γ*-*}}}*

Boc-D-*allo*-Thr(O-triisopropylsilyl)-D-Ala-(3*S*)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro-Arg(Cbz)₂-(3*R*)-3-(triisopropylsiloxy)-Asp(O-cyclohexyl)-Oallyl (96)



Dipeptide **93** (44.8 mg, 0.047 mmol) was treated with 25% TFA/CH₂Cl₂ (500 μ L) at room temperature for 30 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between Et₂O and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford crude amine **68**. This compound was directly used to the next reaction without further purification. A mixture of the crude amine **68**, **69** (28.6 mg, 0.040 mmol), ^{*i*}Pr₂NEt (13.9 μ L, 0.080

mmol) and HOAt (10.9 mg, 0.080 mmol) in THF (400 μ L) was treated with EDCI (15.3 mg, 0.080 mmol) at room temperature for 11 h. The mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with 1 M *aq.* HCl, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (3-15-35% AcOEt/hexane) to afford **96** (55.9 mg, 0.036 mmol, 90% over 2 steps) as a colorless oil.

 CH), 1.90-1.77 (m, 4H, Arg-β-*CH*, 3-hydroxy-Pro-γ-*CH*, H-2'), 1.72-1.54 (m, 5H, Arg-β-*CH*, Arg-γ-*CH*, H-2'), 1.54-1.23 (m, 6H, H-3', H-4'), 1.38 (s, 9H, 'Bu), 1.28 (d, 3H, D-Ala-β-*CH*, $J_{D-Ala-β-CH}$, D-Ala-α-CH = 6.9 Hz), 1.18 (d, 3H, *allo*-D-Thr-γ-*CH*, $J_{allo-D-Thr-γ-CH}$, $J_{allo-D-Thr-β-CH} = 6.3$ Hz), 1.14-0.99 (m, 63H, P_{T3} Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.2, 172.0, 171.0, 169.9, 169.8, 169.7, 169.1, 169.0, 168.9, 168.8, 164.1, 163.9, 160.8, 160.7, 156.0, 156.0, 155.9, 137.2, 137.0, 135.1, 134.9, 131.7, 131.4, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.1, 127.9, 127.8, 119.1, 79.9, 74.3, 73.7, 73.0, 72.7, 69.9, 68.9, 67.0, 66.6, 60.6, 55.9, 54.2, 52.8, 52.5, 47.4, 45.1, 44.5, 33.7, 31.6, 31.6, 31.4, 28.3, 28.0, 25.4, 25.3, 25.2, 23.9, 23.8, 19.7, 18.2, 18.1, 18.0, 18.0, 17.4, 12.5, 12.4, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 1572.89 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₇₉H₁₃₂O₁₇N₈NaSi₃ 1571.8910, found 1571.8886; [α]²⁰_D -13.48 (*c* 0.28, CHCl₃).

H-D-allo-Thr(O-triisopropylsilyl)-D-Ala-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro-Arg(Cbz)₂-(3R)-3-

(triisopropylsiloxy)-Asp(O-cyclohexyl)-Oallyl (97)



Liner depsipeptide 98





A solution of **94** (34.9 mg, 0.028 mmol) and morpholine (9.8 μ L, 0.14 mmol) in THF (400 μ L) was treated with Pd(PPh₃)₄ (1.6 mg, 0.0014 mmol) at room temperature for 20 min. The mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The catalyst was removed by SH-silica gel column chromatography (ϕ 2 cm × 2 cm, 2% MeOH/CHCl₃), and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford a crude carboxylic acid **95**. A mixture of the crude carboxylic acid **95**, **97**

(0.030 mmol), ^{*i*}Pr₂NEt (9.9 µL, 0.057mmol) and HOAt (7.7 mg, 0.057 mmol) in THF (300 µL) was treated with EDCI (10.9 mg, 0.057 mmol) at room temperature for 15 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with *sat. aq*. NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-10-20-35% AcOEt/hexane) to afford **98** (47.8 mg, 0.018 mmol, 64% over 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 9.44 (br s, 1H, Arg- ω -N*H*), 9.22 (br s, 1H, Arg- δ -N*H*), 7.41-7.21 (m, 11H, Ph, β-hydroxy-Asp-N*H*), 7.10 (d, 1H, β-hydroxy-Asp-N*H*, *J*_{β-hydroxy-Asp-N*H*, β-hydroxy-Asp- ω -*CH* = 9.2 Hz), 7.04 (d, 1H, D-Ala-N*H*, *J*_{D-Ala-N*H*, D-Ala- ω -*CH* = 6.3 Hz), 6.89 (d, 1H, Arg- α -N*H*, *J*_{Arg- α -N*H*, Arg- α -*CH* = 8.1 Hz), 6.55 (d, 1H, *allo*-D-Thr-N*H*, *J*_{*allo*-D-Thr-N*H*, *allo*-D-Thr- α -*CH* = 8.6 Hz), 5.92 (dddd, 1H, H_c, *J*_{Hc}, H_a = 17.2, *J*_{Hc}, H_b = 10.3, *J*_{Hc}, 1' = *J*_{Hc}, 1' = 6.3 Hz), 5.67 (d, 1H, D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser- α -*CH* = 8.6 Hz), 5.31 (d, 1H, H_a, *J*_{Ha}, H_c = 17.2), 5.28-5.21 (m, 3H, Bn, H_b), 5.18-5.09 (m, 1H, H-3), 5.13 (s, 2H, Bn), 5.02 (d, 1H, β-hydroxy-Asp- α -*CH*, *β*-hydroxy-Asp- α -*CH*, *β*-hydroxy-}}}}}

Asp-β-CH), 4.78-4.63 (m, 7H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, D-Ser-α-CH, Cy-1, H-1'), 4.59-4.41 (m, 6H, D-Ala-α-CH, allo-D-Thr- α -CH, 3-hydroxy-Pro- α -CH, Bn), 4.35 (ddd, 1H, Arg- α -CH, $J_{Arg-\alpha-CH, Arg-\alpha-NH} = 8.1$, $J_{Arg-\alpha-CH, Arg-\beta-CH} = J_{Arg-\alpha-CH}$ $_{CH, Arg-\beta-CH} = 7.5 \text{ Hz}$, 4.29 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH), 4.23 (qd, 1H, *allo*-D-Thr- β -CH, *J_{allo-D-Thr-\beta-CH*, *allo-D-Thr-\alpha-CH* =} Jallo-D-Thr-B-CH, allo-D-Thr-Y-CH = 6.3 Hz), 4.04-3.97 (m, 1H, Arg-δ-CH), 3.97-3.83 (m, 2H, Arg-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.73-3.61 (m, 3H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, D-Ser-β-CH), 3.57 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, J_{3-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-} hydroxy-Pro-δ-CH = J₃-hydroxy-Pro-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 8.6 Hz), 3.51-3.44 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 2.67 (dd, 1H, H-2, $J_{\text{H-2, H-2}} = 14.4$, $J_{\text{H-2, H-3}} = 4.0$ Hz), 2.39 (dd, 1H, H-2, $J_{\text{H-2, H-2}} = 14.4$, $J_{\text{H-2, H-3}} = 8.6$ Hz), 2.20-2.08 (m, 3H, 3hydroxy-Pro-γ-CH), 1.92 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, J_{3-hydroxy-Pro-γ-CH}, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Prohydroxy-Pro-δ-CH = 6.3 Hz), 1.88-1.55 (m, 14H, Arg-β-CH, Arg-γ-CH, H-4, Cy-2), 1.55-1.46 (m, 1H, H-14), 1.46-1.18 (m, 36H, allo-D-Thr-γ-CH, D-Ala-β-CH, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, Cy-3, Cy-4), 1.43 (s, 9H, ^{*t*}Bu), 1.18-0.94 (m, 105H, ^{*i*}<u>Pr</u>₃Si), 0.86 (d, 6H, H-15, $J_{15, 14} = 6.3$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.2, 171.0, 170.7, 170.0, 169.9, 169.6, 169.3, 169.1, 168.9, 168.8, 168.6, 164.1, 160.7, 156.1, 155.3, 138.2, 137.2, 135.1, 131.7, 129.0, 128.9, 128.8, 128.5, 128.4, 128.4, 128.4, 128.1, 128.0, 127.9, 127.6, 119.1, 79.5, 74.3, 74.3, 73.8, 73.6, 73.4, 73.2, 72.9, 72.7, 72.6, 70.7, 70.0, 69.7, 69.5, 69.0, 67.1, 66.7, 59.2, 55.9, 52.7, 52.0, 47.8, 45.5, 45.1, 44.6, 40.7, 39.2, 33.9, 33.8, 33.7, 31.7, 31.4, 31.3, 30.1, 29.9, 29.8, 29.8, 28.5, 28.3, 28.1, 27.6, 25.3, 23.9, 22.8, 20.6, 18.2, 18.2, 18.1, 18.0, 17.6, 12.7, 12.7, 12.6, 12.3, 12.1; ESIMS-LR m/z 2643.61 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{138}H_{235}O_{27}N_{11}NaSi_5 2641.6092$, found 2641.6105; $[\alpha]^{20}D - 12.33$ (*c* 0.17, CHCl₃).

Fully protected plusbacin A₃ 99



A solution of **98** (32.6 mg, 0.012 mmol) and morpholine (4.3 μ L, 0.05 mmol) in THF (300 μ L) was treated with Pd(PPh₃)₄ (1.4 mg, 0.0012 mmol) at room temperature for 20 min. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The catalyst was removed by SH-silica gel column chromatography (ϕ 2 cm × 2 cm, 2% MeOH/CHCl₃), and the filtrate was

concentrated *in vacuo* to afford crude carboxylic acid. The carboxylic acid was treated with 25% TFA/CH₂Cl₂ (300 μ L) at room temperature for 15 min. The mixture was concentrated *in vacuo* to afford crude amino acid. A mixture of the crude amino acid, ^{*i*}Pr₂NEt (21.6 μ L, 0.12 mmol) and HOAt (16.9 mg, 0.12 mmol) in THF (12.5 mL) was treated with EDCI (23.8 mg, 0.12 mmol) at room temperature for 13 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with *sat. aq*. NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-10-25% AcOEt/hexane) to afford **99** (18.3 mg, 0.0074 mmol, 60% over 3 steps) as a pale yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 9.43 (br s, 1H, Arg- ω -N*H*), 9.24 (br s, 1H, Arg- δ -N*H*), 8.09 (d, 1H, D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-N*H*, D-Ser- α -*CH* = 6.3 Hz), 7.76 (d, 1H, Arg- α -N*H*, *J*_{Arg- α -N*H*, Arg- α -*CH* = 8.6 Hz), 7.61 (d, 1H, D-Ala-N*H*, *J*_{D-Ala-N*H*, D-Ala- α -*CH* = 6.9 Hz), 7.54-7.19 (m, 11H, Ph, *allo*-D-Thr-N*H*), 7.00 (d, 1H, β -hydroxy-Asp-N*H*, *J*_{β -hydroxy-Asp-N*H*, β -hydroxy-Asp- α -*CH* = 10.7 Hz), 6.69 (d, 1H, β -hydroxy-Asp-N*H*, *J*_{β -hydroxy-Asp- α -*CH* = 10.1 Hz), 5.35 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn, Bn} = 12.1 Hz), 5.29-5.23 (m, 2H, β -hydroxy-Asp-}}}}}

 β -CH, Bn), 5.19 (d, 1H, Bn, $J_{Bn, Bn} = 12.1$ Hz), 5.18 (dd, 1H, β -hydroxy-Asp- α -CH, J_{β -hydroxy-Asp- α -CH, β -hydroxy-Asp-NH = hydroxy-Asp-β-CH, 3-hydroxy-Pro-β-CH, Bn), 4.99 (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-β-CH, J_{3-hydroxy-Pro-β-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH} = 1.2 Hz), 4.95-4.88 (m, 1H, D-Ser- α -CH), 4.83 (br d, 1H, β -hydroxy-Asp- α -CH, J_{β -hydroxy-Asp- α -CH, β -hydroxy-Asp-NH = 10.7), 4.77-4.55 (m, 4H, D-Ala-α-CH, H-3, Cy-1), 4.51-4.35 (m, 6H, Arg-α-CH, allo-D-Thr-α-CH, allo-D-Thr-β-CH, 3-hydroxy-Pro-α-CH, Bn), 4.34 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH), 4.16-4.10 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 4.05-3.99 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH), 3.80 (dd, 1H, D-Ser- β -CH, $J_{D-Ser-\beta-CH, D-Ser-\beta-CH} = J_{D-Ser-\beta-CH, D-Ser-\alpha-CH} = 9.2$ Hz), 3.75-3.64 (m, 1H, Arg- δ -CH), 3.58 (dd, 1H, D-Ser- β -CH, J_D-Ser- β -CH, D-Ser- β -CH = 9.2, J_D-Ser- β -CH, D-Ser- α -CH = 5.8 Hz), 3.44 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J₃-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J₃-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 9.2 Hz), 3.08-3.01 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-*CH*), 2.64 (dd, 1H, H-2, *J*_{2,2} = 15.5, *J*_{2,3} = 5.7 Hz), 2.41-2.32 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-*CH*), 2.23 (dd, 1H, H-2, J_{2,2} = 15.5, J_{2,3} = 3.0 Hz), 1.92 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, J_{3-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH} = 13.2, *J*_{3-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH} = 5.7 Hz), 1.88-1.55 (m, 16H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, Arg-β-CH, Arg-γ-CH, H-4, Cy-2), 1.56-1.47 (m, 1H, H-14), 1.46-1.12 (m, 36H, allo-D-Thr-γ-CH, D-Ala-β-CH, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, Cy-3, Cy-4), 1.12-0.92 (m, 105H, $\underline{Pr_3Si}$), 0.86 (d, 6H, H-15, $J_{15, 14} = 6.3$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 172.6, 172.6, 172.4, 172.0, 171.1, 170.8, 170.1, 169.7, 169.1, 167.1, 164.1, 160.9, 156.1, 138.0, 137.4, 134.9, 129.2, 128.9, 128.7, 128.6, 128.5, 128.2, 127.7, 127.3, 75.7, 74.9, 74.4, 74.3, 73.9, 73.5, 73.3, 72.9, 71.7, 17.5, 69.8, 69.2, 67.4, 67.1, 62.3, 56.7, 54.6, 52.8, 51.7, 47.0, 46.2, 65.5, 44.7, 40.4, 39.2, 34.0, 33.3, 31.8, 31.7, 31.7, 31.6, 31.4, 31.2, 30.1, 29.9, 29.8, 29.8, 29.6, 28.1, 27.6, 25.8, 25.5, 25.4, 25.2, 24.1, 23.9, 22.8, 19.6, 18.3, 18.3, 18.1, 18.0, 18.0, 17.6, 12.6, 12.6, 12.5, 12.3, 12.1, 12.1; ESIMS-LR m/z 2484.52 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{130}H_{221}O_{24}N_{11}NaSi_5 2483.5150$, found 2483.5200; $[\alpha]^{20}D - 2.47$ (c 0.35, CHCl₃).

Plusbacin A₃ (1)



To a solution of **99** (19.2 mg, 7.8 μ mol) in anisole (1 mL) in an HF reaction apparatus, HF gas was distilled at -78 °C to a total volume of approximately 10 mL. The mixture was warmed to 0 °C and stirred for 1 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the crude material was triturated with Et₂O and centrifuged. The crude material was purified by riverse phase HPLC (YMC-Pack R&D ODS D-ODS-5-A, 250 × 20 mm, 0.1% TFA 47.5% MeCN/H₂O) to afford **1** (6.6 mg, 5.2 μ mol, 67%), after

freeze drying, as a white powder.

¹H NMR (CD₃CN/D₂O/TFA = 500/500/1, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 5.20-5.13 (m, 1H, H-3), 5.13-5.07 (m, 1H, Arg-α-C*H*), 5.04 (d, 1H, β-hydroxy-Asp-α-C*H*, $J_{\beta-hydroxy-Asp-α-C$ *H* $}, <math>J_{\beta-hydroxy-Asp-α-C$ *H* $}, \beta-hydroxy-Asp-α-C$ *H*, β-hydroxy-Asp-β-C*H*), 4.86 (d, 1H, β-hydroxy-Asp-β-C*H* $, <math>J_{\beta-hydroxy-Asp-β-CH} = 2.9$ Hz), 4.93-4.90 (m, 2H, β-hydroxy-Asp-α-C*H*, β-hydroxy-Asp-β-C*H*), 4.86 (d, 1H, β-hydroxy-Asp-β-C*H*, $J_{\beta-hydroxy-Asp-β-CH} = 2.9$ Hz), 4.81-4.65 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*), 4.63-4.57 (m, 1H, D-Ser-α-C*H*), 4.42-4.30 (m, 3H, 3-hydroxy-Pro-α-C*H*, *allo*-D-Thr-α-C*H*), 4.15-4.12 (m, 1H, *allo*-D-Thr-β-C*H*), 3.96-3.83 (m, 2H, D-Ala-α-C*H*, 3-hydroxy-Pro-δ-C*H*), 3.81-3.71 (m, 2H, D-Ser-β-C*H*), 3.71-3.62 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-δ-C*H*), 3.61-3.51 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-C*H*), 3.12-3.02 (m, 2H, Arg-δ-C*H*), 2.63-2.42 (m, 2H, H-2), 2.15-174 (m, 4H, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H*), 1.62-1.51 (m, 4H, Arg-β-C*H*, H-4), 1.50-1.34 (m, 3H, Arg-γ-C*H*, H-14), 1.28-1.04 (m, 21H, *allo*-D-Thr-γ-C*H*, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 1.03 (d, 3H, *J*_{D-Ala-β-C*H*, D-Ala-}

 $_{\alpha-CH}$ = 6.3 Hz), 0.80 (d, 6H, H-15, $J_{15, 14}$ = 6.3 Hz)

ESIMS-LR *m*/*z* 1156.58 [(M–H)[–]]; ESIMS-HR calcd for $C_{50}H_{82}O_{20}N_{11}$ 1156.5743, found 1156.5770; [α]²⁰_D +7.17 (*c* 0.06, EtOH).

HPLC (column: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II; eluent: 47.5% MeCN/H₂O (0.1% TFA); flow 1 mL/min; detection: UV 210 nm) Retention time: natural product (10.6 min), synthetic product (10.6 min), double injection (10.8 min) (for detail in figure S1).



Figure S1. Chromatogram of HPLC.
Boc-Arg(Cbz)₂-D-Asp(OBn)-Oallyl (102)



A solution of **101** (162 mg, 0.50 mmol) and Cs₂CO₃ (326 mg, 1.00 mmol) in DMF (5 mL) was treated with allyl bromide (60.6 μ L, 0.70 mmol) at room temperature for 5 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude ester. The crude ester was treated with 4 M HCl/AcOEt (5 mL) at room temperature for

20 min. The mixture was concentrated *in vacuo* to afford a crude amine hydrochloride salt. A mixture of the crude amine hydrochloride salt, Boc-Arg(Cbz)₂-OH (326 mg, 0.60 mmol), ^{*i*}Pr₂NEt (261 μ L, 1.5 mmol) and HOAt (136.1 mg, 1.00 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was treated with EDCI (191.7 mg, 1.00 mmol) at room temperature for 45 min. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with 1 M *aq.* HCl, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (3-30-60% AcOEt/hexane) to afford **102** (352 mg, 0.45 mmol, 89% over 3 steps) as a white solid.

mp 108-109 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.45 (br s, 1H, Arg- ω -N*H*), 9.29 (br s, 1H, Arg-δ-N*H*), 7.43-7.24 (m, 15H, Ph), 7.18 (d, 1H, Arg- α -N*H*, *J*_{Arg- α -N*H*, *A*_{Arg- α -C*H*} = 6.3 Hz), 5.78 (dddd, 1H, H_c, *J*_{He, Ha} = 17.2, *J*_{He, Hb} = 10.3, *J*_{He, 1} = *J*_{He, 1} = 4.6 Hz), 5.35 (dd, 1H, Ha, *J*_{Ha, He} = 17.2, *J*_{Ha, 1} = 1.7 Hz), 5.46-5.40 (m, 1H, D-Asp-N*H*), 5.24 (s, 2H, Bn), 5.18 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn, Bn} = 13.2 Hz), 5.24 (dd, 1H, Hb, *J*_{Hb, He} = 10.3, *J*_{Hb, H-1} = 1.2 Hz), 5.13 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn, Bn} = 13.2 Hz), 5.08 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn, Bn} = 12.1 Hz), 5.04 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn, Bn} = 12.1 Hz), 4.76 (ddd, 1H, D-Asp- α -C*H*, *J*_{D-Asp- α -C*H*}}</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub>

Depsipeptide 105



A solution of **37** (60.0 mg, 0.22 mmol) and Cs₂CO₃ (108 mg, 0.33 mmol) in DMF (2 mL) was treated with allyl bromide (28.5 μ L, 0.33 mmol) at room temperature for 4 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and H₂O. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude alcohol. A

solution of the crude alcohol, Boc-Asp(OBn)-OH (85.4 mg, 0.26 mmol) and DMAP (32.3 mg, 0.26 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) was treated with EDCI (101.6 mg, 0.53 mmol) at -18 °C for 1 min. The mixture was warmed to 0 °C, and stirred for 15 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with *sat. aq*. NaHCO₃ and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-4-10-20% AcOEt/hexane) to afford **105** (123 mg, 0.21 mmol, 95% over 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) δ 7.38-7.30 (m, 5H, Ph), 5.78 (dddd, 1H, H_c, *J*_{He, Ha} = 17.2, *J*_{He, Hb} = 10.3, *J*_{He, 1} = *J*_{He, 1} = 5.7 Hz), 5.46 (d, 1H, Asp-N*H*, *J*_{Asp-N*H*, Asp- α -*cH* = 8.6 Hz), 5.31 (ddd, 1H, H_a, *J*_{Ha, Hc} = 17.2, *J*_{Ha, 1} = 2.9, *J*_{Ha, 1} = 1.7 Hz), 5.28-5.21 (m, 2H, H-3, H_b), 5.13 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn, Bn} = 12.0 Hz), 5.10 (d, 1H, Bn, *J*_{Bn, Bn} = 12.0 Hz), 4.58 (d, 2H, H-1', *J*_{1', Hc} = 5.7 Hz), 4.54 (ddd, 1H, Asp- α -*CH*, *J*_{Asp- α -*CH*, *A*_{Sp- α -*CH*, *A*_{Sp- α -*CH*, *J*_{Asp- α -*CH*, *J*_A}}}}}</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub>

Depsipeptide 107



Ester **105** (62.3 mg, 0.106 mmol) was treated with 4 M HCl/AcOEt (2 mL) at room temperature for 25 min. The mixture was concentrated *in vacuo* to afford amine **106** as a hydrochloride salt. This compound was directly used to the next reaction without further purification. A solution of the crude amine **106**, **79** (54.2 mg, 0.096 mmol), ^{*i*}Pr₂NEt (51.9 μ L, 0.30mmol) and HOAt (36.8 mg, 0.19 mmol) in CH₂Cl₂(1 mL) was treated with EDCI (36.8 mg, 0.12

mmol) at room temperature for 185 min. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with *sat. aq*. NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (5-15-20% AcOEt/hexane) to afford **107** (96.1 mg, 0.093 mmol, 97% over 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.49 (d, 1H, Asp-N*H*, *J*_{Asp-N*H*, *Asp-α-CH* = 8.0 Hz), 5.89 (dddd, 1H, H_c, *J*_{He, Ha} = 17.2, *J*_{He, Hb} = 10.3, *J*_{He, 1'} = *J*_{He, 1'} = 4.6 Hz), 5.39 (d, 1H, D-Ser-N*H*, *J*_{D-Ser-A-CH} = 6.9 Hz), 5.30 (d, 1H, Ha, *J*_{Ha, He} = 17.2 Hz), 5.25-5.18 (m, 2H, Hb, H-3), 5.10 (s, 2H, Bn), 4.74-4.65 (m, 3H, Asp-α-CH, D-Ser-α-CH, 3-hydroxy-Pro-β-CH), 4.61-4.48 (m, 4H, Bn, H-1'), 4.43 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro-α-CH), 3.84-3.74 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.61 (d, 2H, D-Ser-β-C*H*, *J*_{D-Ser-β-CH, D-Ser-α-CH = 6.3 Hz), 2.95 (dd, 1H, Asp-β-C*H*, *J*_{Asp-β-CH}, *Asp-β-CH*, *Asp-β-C}}*

$Boc-D-\textit{allo}-Thr (O-triisopropylsilyl)-D-Ala-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro-Arg (Cbz)_2-D-Asp (OBn)-Oallylow (Cbz)_2-D-Asp (Cbz)_2-D-Asp (OBn)-Oallylow (Cbz)_2-D-Asp (OBn)-Oallylow (Cbz)_2-D-Asp (OBn)-Oallylow (Cbz)_2-D-Asp (OBn)-Oallylow (Cbz)_2-D-Asp (Cbz)_2-D-Asp$

(109)



Dipeptide **102** (94.5 mg, 0.120 mmol) was treated with 4 M HCl/AcOEt (2 mL) at room temperature for 15 min. The mixture was concentrated *in vacuo* to afford amine **103** as a hydrochloride salt. This compound was directly used to the next reaction without further purification. A solution of the crude amine **103**, **81** (71.6 mg, 0.10 mmol), ^{*i*}Pr₂NEt (55.7 μ L, 0.30 mmol) and HOAt (27.2 mg, 0.20 mmol) in THF (1 mL) was treated with EDCI (38.3 mg, 0.20

mmol) at room temperature for 4 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and 1 M *aq.* HCl. The organic phase was washed with *sat. aq.* NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-20-35% AcOEt/hexane) to afford **109** (119 mg, 0.086 mmol, 86% over 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.45 (br s, 1H, Arg-ω-N*H*), 9.30 (br s, 1H, Arg-δ-N*H*), 7.64 (br s, 1H, D-Ala-N*H*), 7.43-7.24 (m, 17H, Ph, Arg- α -NH, D-Asp-NH), 5.93 (br s, 1H, *allo*-D-Thr-NH), 5.80 (ddd, 1H, H_c, $J_{Hc, Ha} = 17.2$, $H_{b}, J_{Hb, Hc} = 10.9, J_{Ha, 1} = 1.2 \text{ Hz}, 5.15-5.06 \text{ (m, 4H, Bn)}, 4.88 \text{ (ddd, 1H, D-Asp-}\alpha-CH, J_{D-Asp-}\alpha-CH, J_{D-Asp-}\alpha-CH,$ $D-Asp-\beta-CH = J_{D-Asp-\alpha-CH, D-Asp-\beta-CH} = 5.8 \text{ Hz}), 4.60 \text{ (d, 1H, 3-hydroxy-Pro-}\beta-CH, J_{3-hydroxy-Pro-}\beta-CH, 3-hydroxy-Pro-}\beta-CH, 3-hydroxy-Pro-}\beta-$ 4.55 (ddd, 1H, H-1, $J_{1,1} = 13.2$, $J_{1,Hc} = J_{1,Hc} = 5.7$, $J_{1,Hb} = 1.2$ Hz), 4.52 (ddd, 1H, H-1, $J_{1,1} = 13.2$, $J_{1,Hc} = J_{1,Hc} = 5.7$, J_{1, Ha} = 1.2 Hz), 4.43-4.31 (m, 3H, D-Ala-α-CH, allo-D-Thr-β-CH, 3-hydroxy-Pro-α-CH), 4.26 (ddd, 1H, Arg-α-CH, $J_{\text{Arg-}\alpha-CH, \text{Arg-}NH} = J_{\text{Arg-}\alpha-CH, \text{Arg-}\beta-CH} = 7.5, J_{\text{Arg-}\alpha-CH, \text{Arg-}\beta-CH} = 4.6 \text{ Hz}), 4.15-4.10 \text{ (m, 1H, allo-D-Thr-}\alpha-CH), 4.06 \text{ (ddd, b)}$ 1H, Arg- δ -CH, $J_{\text{Arg-}\delta-\text{CH}, \text{Arg-}\delta-\text{CH}} = 14.3$, $J_{\text{Arg-}\delta-\text{CH}, \text{Arg-}\gamma-\text{CH}} = J_{\text{Arg-}\delta-\text{CH}, \text{Arg-}\gamma-\text{CH}} = 7.5$ Hz), 3.92-3.78 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH, Arg-δ-CH), 3.50-3.43 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 2.89 (d, 2H, D-Asp-β-CH, J_{D-Asp-β-CH} = 5.8 Hz), 2.07-1.89 (m, 3H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, Arg-β-CH), 1.79 (m, 1H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH), 1.73-1.64 (m, 1H, Argγ-CH), 1.60-1.50 (m, 1H, Arg-γ-CH), 1.35 (s, 9H, 'Bu), 1.30 (d, 3H, D-Ala-β-CH, J_{D-Ala-β-CH}, D-Ala-α-CH = 6.9 Hz), 1.24 (d, 3H, *allo*-D-Thr- γ -CH, *J_{allo}*-D-Thr- γ -CH, *allo*-D-Thr- β -CH = 6.3 Hz), 1.18-0.94 (m, 42H, ^{*i*}Pr₃Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) 8 172.7, 171.5, 170.8, 170.6, 170.0, 169.1, 164.1, 160.9, 156.1, 137.1, 136.0, 135.1, 131.8, 128.9, 128.8, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 118.5, 80.0, 74.2, 70.7, 69.2, 69.1, 67.1, 66.7, 66.2, 60.5, 53.7, 49.4, 47.6, 45.4, 44.5, 36.7, 33.8, 28.4, 27.6, 25.8, 20.2, 18.3, 18.2, 18.1, 18.0, 16.6, 12.7, 12.1; ESIMS-LR m/z 1407.73 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for $C_{71}H_{108}O_{16}N_8NaSi_2$ 1407.7314, found 1407.7311; $[\alpha]^{19}D - 5.16$ (*c* 3.95, CHCl₃).

H-D-allo-Thr(O-triisopropylsilyl)-D-Ala-(3S)-3-(triisopropylsiloxy)-Pro-Arg(Cbz)₂-D-Asp(OBn)-Oallyl (110)



Pentapeptide **109** (60.9 mg, 0.044 mmol) was treated with 25% TFA/CH₂Cl₂ (500 μ L) at room temperature for 40 min. The reaction was quenched with *sat. aq.* NaHCO₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford **110**. The amine was directly used to the next reaction without purification.

Liner depsipeptide 111



A solution of **107** (41.5 mg, 0.040 mmol) and morpholine (10.3 μ L, 0.12 mmol) in THF (500 μ L) was treated with Pd(PPh₃)₄ (2.3 mg, 0.002 mmol) at room temperature for 20 min. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The catalyst was removed by SH-silica gel column chromatography (ϕ 1 cm × 3 cm, 1% MeOH/CHCl₃), and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford a crude carboxylic acid **108**. A mixture of

the crude carboxylic acid **108**, **110** (0.044 mmol), ^{*i*}Pr₂NEt (12.9 µL, 0.080mmol) and HOAt (10.9 mg, 0.080 mmol) in THF (400 µL) was treated with EDCI (15.3 mg, 0.080 mmol) at room temperature for 23 h. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with *sat. aq*. NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-20-40% AcOEt/hexane) to afford **111** (82.9 mg, 0.036 mmol, 90% over 2 steps) as a pale yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 9.42 (br s, 1H, Arg-ω-NH), 9.24 (br s, 1H, Arg-δ-NH), 7.49 (d, 1H, Asp-NH, J_{Asp-NH, Asp-α-CH} = 8.0 Hz), 7.46 (d, 1H, allo-D-Thr-NH, $J_{allo-D-Thr-NH, allo-D-Thr-\alpha-CH} = 5.2$ Hz), 7.44-7.14 (m, 27H, Ph, Asp-NH, Arg- α -NH), 6.87 (d, 1H, D-Ala-NH, $J_{D-Ala-NH}$, $J_{D _{NH, D-Ala-\alpha-CH} = 8.0 \text{ Hz}$, 5.80 (ddd, 1H, H_c, $J_{Hc, Ha} = 17.2$, $J_{Hc, Hb} = 10.9$, $J_{Hc, 1'} = J_{Hc, 1'} = 5.8 \text{ Hz}$), 5.48 (d, 1H, D-Ser-NH, $J_{\text{D-Ser-NH, D-Ser-}\alpha-CH} = 6.9 \text{ Hz}$, 5.29-5.05 (m, 11H, Bn, Ha, Hb, H-3), 4.77 (ddd, 1H, Asp- α -CH, $J_{\text{Asp-}\alpha-CH, \text{Asp-}NH} = J_{\text{Asp-}\alpha-CH}$ $_{CH, Asp-\beta-CH} = J_{Asp-\alpha-CH, Asp-\beta-CH} = 5.7 \text{ Hz}$, 4.72-4.24 (m, 13H, D-Ser- α -CH, allo-D-Thr- α -CH, allo-D-Thr- β -CH, D-Alaα-CH, Asp-α-CH, 3-hydroxy-Pro-α-CH, 3-hydroxy-Pro-β-CH, Bn, H-1'), 4.07-4.39 (m, 1H, Arg-α-CH), 3.89-3.64 (m, 5H, Arg-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.61 (d, 2H, D-Ser-β-CH, J_D-Ser-β-CH, D-Ser-β-CH, 3-Ser-β-CH, 3-Ser-β-Se 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 2.98-2.81 (m, 4H, Asp-β-CH), 2.46 (dd, 1H, H-2, J_{2,2} = 14.9, J_{2,3} = 6.3 Hz), 2.35 (dd, 1H, H-2, J_{2, 2} = 14.9, J_{2, 3} = 6.3 Hz), 2.13-1.83 (m, 9H, Arg-β-CH, Arg-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, H-4), 1.79 (dd, 1H, 3hydroxy-Pro-γ-CH, J_{3-hydroxy-Pro-γ}-CH, 3-hydroxy-Pro-γ-CH = 13.2, J₃-hydroxy-Pro-γ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH = 6.3 Hz), 1.75-1.44 (m, 3H, H-4, H-14), 1.39 (s, 9H, 'Bu), 1.33-0.92 (m, 87H, D-Ala-β-CH, allo-D-Thr-γ-CH, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, i Pr₃Si), 0.86 (d, 6H, H-15, $J_{15,14} = 6.9$ Hz); 13 C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.7, 171.6, 170.7, 170.5, 170.4, 170.2, 170.1, 169.7, 169.1, 164.1, 160.8, 156.1, 155.7, 137.8, 137.1, 135.9, 135.7, 135.0, 131.8, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 158.4, 128.4, 128.3, 128.0, 127.8, 127.7, 118.5, 80.1, 74.1, 73.7, 73.4, 73.4, 70.5, 69.9, 69.6, 69.2, 69.1, 67.1, 66.7, 66.3, 59.3, 53.4, 52.4, 49.4, 49.3, 47.8, 45.6, 45.3, 44.5, 40.9, 36.3, 36.0, 34.1, 33.8, 32.1, 30.1, 29.9, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 28.5, 28.1, 28.0, 27.6, 25.7, 25.3, 22.8, 22.7, 20.3, 19.4, 18.3, 18.3, 18.2, 18.2, 18.1, 16.6, 12.8, 12.6, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 2314.29 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₂₂H₁₈₇O₂₅N₁₁NaSi₃ 2313.2900, found 2313.2915; $[\alpha]^{20}D$ -5.52 (*c* 0.18, CHCl₃).

Fully protected dideoxy plusbacin A₃ 112



A solution of **111** (34.5 mg, 0.015 mmol) and morpholine (5.2 μ L, 0.06 mmol) in THF (300 μ L) was treated with Pd(PPh₃)₄ (1.7 mg, 0.002 mmol) at room temperature for 25 min. The mixture was diluted with AcOEt, and partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The catalyst was removed by SH-silica gel column chromatography (ϕ 1 cm × 2 cm, 1% MeOH/CHCl₃), and the filtrate was

concentrated *in vacuo* to afford crude carboxylic acid. A solution of the carboxylic acid in CH₂Cl₂ (150 μ L) was treated with 50% TFA/CH₂Cl₂ (150 μ L) at room temperature for 15 min. The mixture was concentrated *in vacuo* to afford crude amino acid. A mixture of the crude amino acid, ^{*i*}Pr₂NEt (26.3 μ L, 0.15mmol) and HOAt (20.6 mg, 0.15 mmol) in THF (15 mL) was treated with EDCI (28.9 mg, 0.15 mmol) at room temperature for 14 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl. The organic phase was washed with *sat. aq*. NaHCO₃, H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-20-40% AcOEt/hexane) to afford **112** (15.5 mg, 0.0073 mmol, 48% over 3 steps) as a white foam.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.41 (br s, 1H, Arg-ω-NH), 9.38 (br s, 1H, Arg-δ-NH), 7.64 (d, 1H, D-Ser-NH, J_{D-Ser}-NH), 7.64 (d, 1H, D-Ser-NH), 7.64 $_{NH, D-Ser-\alpha-CH} = 5.2 \text{ Hz}$, 7.61 (d, 1H, D-Ala-NH, $J_{D-Ala-NH, D-Ala-\alpha-CH} = 2.9 \text{ Hz}$), 7.44-7.19 (m, 28H, Ph, Asp-NH, allo-D-Thr-N*H*, Arg-α-N*H*), 7.08 (d, 1H, Asp-N*H*, J_{Asp-N*H*, Asp-α-C*H* = 9.8 Hz), 5.37 (d, 1H, Bn, J_{Bn, Bn} = 12.1 Hz), 5.21 (d, 1H,} Bn, *J*_{Bn, Bn} = 12.1 Hz), 5.21-4.98 (m, 8H, Bn, Asp-α-CH, H-3), 4.74 (ddd, 1H, Asp-α-CH, *J*_{Asp-α-CH, Asp-NH} = 9.8, *J*_{Asp-} α -CH, Asp-β-CH = 4.6, JASp-α-CH, Asp-β-CH = 4.0 Hz), 4.60-4.54 (m, 3H, D-Ser-α-CH, 3-hydroxy-Pro-β-CH), 4.51 (s, 1H, 3hydroxy-Pro- α -CH), 4.43 (s, 2H, Bn), 4.41 (dd, 1H, *allo*-D-Thr- α -CH, *Jallo*-D-Thr- α -CH, *allo*-D-Thr- α allo-D-Thr- β -CH = 4.0 Hz), 4.34 (s, 1H, 3-hydroxy-Pro- α -CH), 4.33 (dq, 1H, allo-D-Thr- β -CH, J_{allo} -D-Thr- β -CH, allo-D-Thr- β -D-Thr- β -CH, allo-D-Thr- β -D = 4.0, $J_{allo-D-Thr-\beta-CH, allo-D-Thr-\gamma-CH}$ = 6.3 Hz), 4.28 (dq, 1H, D-Ala- α -CH, $J_{D-Thr-\alpha-CH, D-Ala-NH}$ = 2.9, $J_{D-Ala-\alpha-CH, D-Ala-\beta-CH}$ = 6.3 Hz), 4.14 (ddd, Arg-α-CH, J = 10.3, J = 9.4, J = 4.0 Hz), 4.01-3.93 (m, 3H, Arg-δ-CH, 3-hydroxy-Pro-δ-CH), 3.89 (dd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J_{3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = 9.2 Hz), 3.85-}} 3.77 (m, 2H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, D-Ser- β -CH), 3.69 (dd, 1H, D-Ser- β -CH, J_{D-Ser- β -CH, D-Ser- β -CH, D-Ser} α -CH = 5.2 Hz), 3.48 (ddd, 1H, 3-hydroxy-Pro- δ -CH, J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- δ -CH = J3-hydroxy-Pro- δ -CH, 3-hydroxy-Pro- γ -CH = $J_{3-hydroxy-Pro-\delta-CH, 3-hydroxy-Pro-\gamma-CH} = 9.2$ Hz), 3.29 (dd, 1H, Asp- β -CH, $J_{Asp-\beta-CH, Asp-\beta-CH} = 17.8$, $J_{Asp-\beta-CH, Asp-\alpha-CH} = 4.6$ Hz), 3.00 (dd, 1H, Asp- β -*CH*, *J*_{Asp- β -*CH*, *A*_{Sp- β -*CH*} = 16.6, *J*_{Asp- β -*CH*, *A*_{Sp- α -*CH*} = 7.5 Hz), 2.75 (dd, 1H, Asp- β -*CH*, *J*_{Asp- β -*CH*, *J*_A}}}</sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub> Asp-β-CH = 17.8, $J_{Asp-β-CH, Asp-α-CH}$ = 4.6 Hz), 2.66 (dd, 1H, Asp-β-CH, $J_{Asp-β-CH, Asp-β-CH}$ = 16.6, $J_{Asp-β-CH, Asp-α-CH}$ = 7.5 Hz), 2.51 (dd, 1H, H-2, J_{2,2} = 16.6, J_{2,3} = 4.0 Hz), 2.51 (dd, 1H, H-2, J_{2,2} = 16.6, J_{2,3} = 9.2 Hz), 1.98-1.67 (m, 9H, 3-hydroxy-Pro-γ-CH, Arg-β-CH, Arg-γ-CH, H-4), 1.56-1.46 (m, 3H, H-4, H-5, H-14), 1.46-1.36 (m, 1H, H-5), 1.25 (d, 3H, *allo*-D-Thr-γ-CH, *J*_{allo}-D-Thr-β-CH</sub> = 6.3 Hz), 1.29-0.95 (m, 79H, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, ^{*i*}Pr₃Si), 1.14 (d, 3H, D-Ala- β -CH, $J_{D-Ala-\theta-CH} = 6.9$ Hz), 0.86 (d, 6H, H-15, $J_{15, 14} = 6.9$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) & 172.7, 172.6, 171.5, 171.3, 171.2, 170.4, 170.0, 169.8, 169.4, 168.1, 164.2, 161.1, 156.3, 138.0, 137.1, 135.9, 135.8, 134.8, 129.0, 128.8, 128.6, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.7, 127.4, 74.9, 74.3, 73.4, 73.1, 71.0, 70.4, 69.5, 69.4, 69.0, 67.2, 66.6, 66.5, 59.7, 53.3, 52.9, 49.7, 47.9, 47.4, 45.5, 44.6, 39.8, 39.2,

36.0, 35.8, 33.8, 33.5, 33.3, 30.1, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 28.1, 27.6, 26.3, 25.6, 25.5, 22.8, 20.5, 18.4, 18.3, 18.1, 15.8, 12.7, 12.2, 12.1; ESIMS-LR *m/z* 2156.20 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₁₁₄H₁₇₃O₂₂N₁₁NaSi₃ 2155.1957, found 2155.1961; [α]²⁰_D –35.86 (*c* 1.55, CHCl₃).

Dideoxy plusbacin A₃ (100)



To a solution of **112** (15.4 mg, 7.2 μ mol) in anisole (1 mL) in an HF reaction apparatus, HF gas was distilled at -78 °C to a total volume of approximately 10 mL. The mixture was warmed to 0 °C and stirred for 1 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, and the crude material was triturated with Et₂O and centrifuged. The crude material was purified by riverse phase HPLC (YMC-Pack R&D ODS D-ODS-5-A, 250 × 20 mm, 0.1% TFA 45% MeCN/H₂O) to afford **100** (7.4 mg, 5.5 μ mol, 76%), after freeze drying, as a white powder.

¹H NMR (CD₃CN/D₂O/TFA = 500/500/1, 500 MHz, a mixture of several rotamers at 20 °C, selected data for the major rotamer) δ 5.14-5.06 (m, 1H, Arg-α-C*H*), 5.11-5.00 (m, 1H, H-3), 4.79-4.52 (m, 3H, D-Ser-α-C*H*, Asp-α-C*H*), 4.43-4.04 (m, 5H, *allo*-D-Thr-β-C*H*, 3-hydroxy-Pro-α-C*H*, 3-hydroxy-Pro-β-C*H*), 3.99-3.79 (m,1H, D-Ser-β-C*H*), 3.77-3.46 (m, 6H, *allo*-D-Thr-α-C*H*, 3-hydroxy-Pro-δ-C*H*, D-Ser-β-C*H*), 3.12-3.01 (m, 2H, Arg-δ-C*H*), 2.92-2.62 (m, 4H, Asp-β-C*H*), 2.57-2.38 (m, 2H, H-2), 2.15-1.81 (m, 4H, 3-hydroxy-Pro-γ-C*H*), 1.78-1.59 (m, 2H, Arg-β-C*H*), 1.58-1.37 (m, 4H, Arg-γ-C*H*, H-4, H-14), 1.32-1.02 (m, 25H, Arg-γ-C*H*, D-Ala-β-C*H*, *allo*-D-Thr-γ-C*H*, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 0.80 (d, 6H, H-15, $J_{15, 14} = 6.9$ Hz); ESIMS-LR *m/z* 1126.60 [(M+H)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₅₀H₈₄O₁₈N₁₁ 1126.5990, found 1126.6008; [α]²⁰_D –10.78 (*c* 0.58, EtOH).

HPLC (column: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II; eluent: 45% MeCN/H₂O (0.1% TFA); flow 1 mL/min; detection: UV 210 nm) Retention time: 13.4 min (for detail in Figure S2).



Figure S2. Chromatogram of HPLC.

第三章

CD measurement

CD spectra were obtained at 25 °C on a Jasco J720. The solution containing samples (1.7 mg/mL each) in EtOH was prepared, and the spectra were subtranted from EtOH spectrum.

Antimicrobial activity assay

Antimicrobial susceptibility was determined by broth microdilution assay according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). Briefly, plusbacin A₃ was serially diluted with cation-adjusted Muller–Hinton Broth (MHB; Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes NJ, USA) to obtain a final concentration of 128 μ g/mL to 0.125 μ g/mL in the wells of a 96-well round-bottomed plate. *Staphylococcus aureus* Smith ATCC13709 was grown overnight in 5 mL tryptic soy broth (TSB: Becton Dickinson and Company) at 37 °C with agitation. The culture was diluted with cation-adjusted MHB to obtain approximately 5 x 10⁶ colony forming units (CFU)/mL. 10 μ L of the diluted cells were added to each well containing 90 μ L of plusbacin A₃, and mixed well. The plates were incubated at 37 °C and MIC was determined after 20 h as the minimum concentration that did not allow visible growth of bacteria.

Resistance studies

Staphylococcus aureus Smith ATCC13709 was cultured at 37 °C aerobically in TSB. The full growth was diluted 100-fold with MHB and grown to exponential phase. The exponentially growing cells were further diluted to obtain an OD₆₀₀ of 0.01 in 1 mL MHB containing 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 8-fold MIC of plusbacin A₃ or vancomycin or rifampicin. Cells were grown at 37°C with agitation and the cultures from the second highest concentration that allowed visible growth at 24 h were diluted 100-fold with MHB containing different concentrations of respective antibiotics. The sequential culturing was continued for 25 days. After final passage, three independent colonies from plusbacin A₃ treated cells were isolated and their resistance towards plusbacin A₃ was confirmed by MIC determination.

The plusbacin A₃ resistant *S. aureus* Smith strains were cultured at 37 °C aerobically in TSB containing 4 µg/mL plusbacin A₃. Genomic DNA was isolated using Qiagen DNA-blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer's recommendation using lysostaphin for bacterial lysis. Barcoded library of 400 base-read was prepared after the fragmentation of 100 ng of the DNA using Ion Xpress[™] Plus Fragment Library Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA). The libraries were enriched in an Ion 318[™] Chip v2 using Ion Chef (ThermoFischer Scientific), and subsequent sequencing was performed in Ion PGM System (ThermoFischer Scientific). Assembly of the resulting reads and SNP analysis was conducted in the CLC Genomics Workbench ver 9.5.3. (CLC bio, Aarhus, Denmark).

第四章

Benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanine phenylsulfonylethyl ester (135)



Compound **134** (1.75 g, 2.46 mmol) was treated with 60% AcOH/H₂O (60 mL) at 90 °C for 1 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was crystalized by CHCl₃/Et₂O to afford **135** (1.21 g, 1.94 mmol, 79%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.91 (d, 2H, *o*-PhSO₂, $J_{o, m} = 7.3$ Hz), 7.69 (t, 1H, *p*-PhSO₂, $J_{p, m} = 7.3$ Hz), 7.59 (dd, 2H, *m*-PhSO₂, $J_{m, o} = J_{m, p} = 7.3$ Hz), 7.40-7.29 (m, 5H, Ph), 6.92 (d, 1H, Ala-N*H*, $J_{Ala-NH, Ala-\alpha-CH} = 7.3$ Hz), 5.04 (d, 1H, 2-N*H*, $J_{2-NH, 2} = 9.6$ Hz), 4.91 (d, 1H, H-1, $J_{1, 2} = 3.6$ Hz), 4.71 (d, 1H, Bn, J = 11.9 Hz), 4.47 (d, 1H,

Bn, J = 11.9 Hz), 4.50-4.37 (m, 2H, PhSO₂CH₂CH₂), 4.29 (dq, 1H, Ala- α -CH, $J_{Ala-\alpha-CH, Ala-NH} = J_{Ala-\alpha-CH, Ala-\beta-CH} = 7.3$ Hz), 4.23 (ddd, 1H, H-2, $J_{2,1} = 3.6$, $J_{2,2-NH} = 9.6$, $J_{2,3} = 10.1$ Hz), 4.16 (q, 1H, Lac- α -CH, $J_{Lac-\alpha-CH, Lac-\beta-CH} = 6.9$ Hz), 3.83 (d, 2H, H-6, $J_{6,5} = 3.2$ Hz), 3.76-3.65 (m, 2H, H-5, H-4), 3.58 (dd, 1H, H-3, $J_{3,2} = J_{3,4} = 10.1$ Hz), 3.47-3.33 (m, 2H, PhSO₂CH₂CH₂), 1.92 (s, 3H, NAc), 1.42 (d, 3H, Lac- β -CH, $J_{Lac-\beta-CH, Lac-\alpha-CH} = 6.9$ Hz), 1.33 (d, 3H, Ala- β -CH, $J_{Ala-\beta-CH, Ala-\alpha-CH} = 7.3$ Hz). This is a known compound reported in ref 87.

Benzyl-N-acetyl-4,6-diacetylmuramyl-L-alanine phenylsulfonylethyl ester (136)



PhO₂S

A mixture of **135** (1.12 g, 1.80 mmol) in pyridine (20 mL) was treated with Ac₂O (406 μ L, 4.32 mmol) at room temperature for 1 d. Ac₂O (102 μ L, 1.08 mmol) was added to the mixture, which was stirred for 24 h. The reaction was quenched with MeOH, then the resulting mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃, and the organic phase was washed with 1 M *aq.* HCl and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (50-85-100%)

AcOEt/hexane) to afford 136 (955 mg, 1.35 mmol, 75%) as a colorless foam.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.92 (d, 2H, *o*-PhSO₂, *J_o*, *m* = 6.9 Hz), 7.68 (t, 1H, *p*-PhSO₂, *J_p*, *m* = 7.5 Hz), 7.59 (dd, 2H, *m*-PhSO₂, *J_m*, *o* = 6.9, *J_m*, *p* = 7.5 Hz), 7.41-7.56 (m, 5H, Ph), 6.85 (d, 1H, Ala-N*H*, *J*_{Ala-N*H*, Ala-α-C*H* = 6.9 Hz), 5.81 (d, 1H, 2-N*H*, *J*_{2-N*H*, 2} = 9.2 Hz), 5.07 (dd, 1H, H-4, *J*₄, *3* = *J*₄, *5* = 9.8 Hz), 4.88 (d, 1H, H-1, *J*₁, *2* = 4.0 Hz), 4.69 (d, 1H, Bn, *J* = 11.5 Hz), 4.50 (d, 1H, Bn, *J* = 11.5 Hz), 4.48-4.40 (m, 2H, PhSO₂CH₂C*H*₂), 4.38 (ddd, 1H, H-2, *J*₂, *1* = 4.0, *J*₂, *2*-N*H* = 9.2, *J*₂, *3* = 9.8 Hz), 4.20 (dd, 1H, H-6, *J*₆, *6* = 12.0, *J*₆, *5* = 4.6 Hz), 4.13 (dq, 1H, Ala-α-C*H*, *J*_{Ala-α-C*H*, Ala-α-C*H*, *A*_{la-A}-*CH*, *A*_{la-A}-*CH*, *A*_{la-A}-*CH*, *A*_{la-A}-*CH*, *J*_{Lac-α-C*H*, *J*_{Lac-α-C*H*, *J*_{Lac-α-C*H*, *J*_{Lac-α-C*H*, *J*_{Lac-β-C*H*} = 6.3 Hz), 3.91 (ddd, 1H, H-5, *J*₅, *6* = 2.3, *J*₅, *6* = 4.6, *J*₅, 4= 9.8 Hz), 3.64 (dd, 1H, H-3, *J*₃, *2* = *J*₃, *4* = 9.8 Hz), 3.50-3.38 (m, 2H, PhSO₂C*H*₂C*H*₂), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 1.88 (s, 3H, NAc), 1.30 (d, 3H, Lac-β-C*H*, *J*_{Lac-β-C*H*, *J*_{Lac-β-C*H*, *J*_{Lac-β-C*H*} = 6.3 Hz), 1.29 (d, 3H, Ala-β-C*H*, *J*_{Ala-β-C*H*, Ala-α-C*H* = 6.9 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.2, 171.8, 170.9, 170.4, 169.5, 139.3, 136.7, 134.2, 129.6, 128.9, 128.7, 128.5, 128.3, 97.2, 78.9, 78.6, 70.4, 69.5, 68.7, 62.3, 58.2, 55.1, 53.1, 48.1, 23.5, 21.0, 20.9, 18.7, 17.0; ESIMS-LR *m*/z 729.23 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₃₃H₄₂O₁₃N₂NaS 729.2230, found 729.2299; [*α*]²⁰_D +68.36 (*c* 0.23, CHCl₃).}}}}}}}}}

Glycosylphosphate 137



A mixture of **136** (424 mg, 0.60 mmol) and 10% Pd/C (600 mg) in MeOH (6 mL) was vigorously stirred under H₂ atmosphere at room temperature for 2.5 h. 10% Pd/C (600 mg) was added to the mixture and vigorously stirred for 8 h under H₂ atmosphere. 10% Pd/C (300 mg) was added to the mixture and vigorously stirred for 12 h under H₂ atmosphere. The catalyst was filtered off through a Celite pad, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford a crude lactol. A mixture of the lactol and 5-(benzylthio)-1*H*-tetrazole (208 mg, 1.08

mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL) was treated with diallyl N,N-diisopropylphosphoramidite (238 µL, 0.90 mmol) at 0 °C for 5 min. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 h. 5-(Benzylthio)-1H-tetrazole (138 mg, 0.72 mmol) and diallyl N,N-diisopropylphosphoramidite (159 µL, 0.60 mmol) was added to the mixture and stirred for 1h. The mixture was partitioned between CH_2Cl_2 and sat. aq. NaHCO₃, and the organic phase was washed with H_2O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo* to afford a crude phosphite. A mixture of the phosphite in THF (6 mL) was treated with 30% H₂O₂ (600 µL) at -78 °C for 5 min. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 2.5h. The reaction was quenched with sat. aq. Na₂S₂O₃ at 0 °C, and the mixture was partitioned between AcOEt and sat. aq. NaHCO₃. The organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (50-100% AcOEt/hexane-0-1-2% MeOH/AcOEt) to afford 137 (180 mg, 0.23 mmol, 39% over 3 steps) as a colorless foam. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.93 (d, 2H, *o*-PhSO₂, *J*_{*o*, *m*} = 7.4 Hz), 7.67 (t, 1H, *p*-PhSO₂, *J*_{*p*, *m*} = 7.5 Hz), 7.60 (dd, 2H, *m*-PhSO₂, $J_{m, o} = 7.4$, $J_{m, p} = 7.5$ Hz), 6.76 (d, 1H, Ala-NH, $J_{Ala-NH, Ala-\alpha-CH} = 6.9$ Hz), 6.55 (d, 1H, 2-NH, $J_{2-NH, 2}$ = 8.6 Hz), 6.01-5.88 (m, 2H, Hc), 5.70 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2} = 2.9$, $J_{1,P} = 5.8$ Hz), 5.40 (dd, 1H, Ha, $J_{Ha,Hc} = 17.2$, $J_{Ha,1'}$ = 1.2 Hz), 5.38 (dd, 1H, Ha, $J_{\text{Ha, Hc}}$ = 17.2, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.31 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, $J_{\text{Hb, Hc}}$ = 10.3, $J_{\text{Ha, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, J_{\text{Hb, Hc}} = 10.3, $J_{\text{Hb, 1'}}$ = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, J_{\text{Hb, 1'}} = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, J_{\text{Hb, 1'}} = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, J_{\text{Hb, 1'}} = 1.2 Hz), 5.30 (dd, 1H, Hb, J_{\text{Hb, 1'}} 1H, H_b, $J_{Hb, Hc} = 10.3$, $J_{Ha, 1'} = 1.2$ Hz), 5.14 (dd, 1H, H-4, $J_{4,3} = 10.3$, $J_{4,5} = 9.8$ Hz), 4.64-4.55 (m, 4H, H-1'), 4.53-4.44 (m, 2H, PhSO₂CH₂CH₂), 4.41-4.35 (m, 1H, H-2), 4.24 (dq, 1H, Ala- α -CH, 7.5, $J_{Ala-\alpha}$ -CH, Ala-NH = $J_{Ala-\alpha}$ -CH, Ala- β - $_{CH} = 6.9$ Hz), 4.20 (dd, 1H, H-6, $J_{6,6} = 12.0$, $J_{6,5} = 4.0$ Hz), 4.13-4.05 (m 2H, H-5, H-6), 4.03 (q, 1H, Lac- α -CH, J_{Lac-} α -CH, Lac- β -CH = 6.3 Hz), 3.69 (dd, 1H, H-3, $J_{3,2} = J_{3,4} = 10.3$ Hz), 3.52-3.41 (m, 2H, PhSO₂CH₂CH₂), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.34 (d, 3H, Lac- β -CH, $J_{Lac-\beta-CH, Lac-\alpha-CH} = 6.3$ Hz), 1.33 (d, 3H, Ala- β -CH = 6.3 Hz), 1.34 (d, 3H, Ala- β -CH = 6.3 Hz), 1.35 (d, 3H, Ala- β -Ala- β -Ala-CH, J_{Ala-β-CH}, Ala-α-CH = 7.5 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.3, 171.6, 170.9, 170.8, 169.3, 139.2, 134.3, 132.2, 132.2, 132.0, 132.0, 129.6, 128.2, 119.4, 119.3, 78.4, 77.0, 70.3, 69.1, 69.0, 69.0, 68.9, 61.8, 58.2, 55.0, 53.3, 53.3, 48.1, 25.1, 23.3, 20.9, 20.9, 18.9, 17.2; ³¹P NMR (CDCl₃, 202 MHz) δ -1.8; ESIMS-LR *m/z* 799.21 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₃₂H₄₅O₁₆N₂NaPS 799.2120, found 799.2125; [α]²⁰_D +49.99 (*c* 1.49, CHCl₃).

Glycosylphosphate 132



A mixture of **137** (212 mg, 0.27 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) was treated with DBU (44.8 µL, 0.30 mmol) at room temperature for 40 min. The mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl, and the aqueous phase was extracted with AcOEt (×2). Combined organic phase was dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-1-2% MeOH/CH₂Cl₂) to afford **132** (149 mg, 0.25 mmol, 90%) as a colorless foam.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.47 (d, 1H, 2-N*H*, *J*_{2-N*H*, 2} = 8.0 Hz), 6.86 (d, 1H, Ala-N*H*, *J*_{Ala-N*H*, Ala- α -C*H* = 6.3 Hz), 5.98-5.88 (m, 2H, Hc), 5.72 (dd, 1H, H-1, *J*_{1, 2} = 3.4, *J*₁ P = 6.3 Hz), 5.39 (dd, 1H, Ha, *J*_{Ha, Hc} = 16.6, *J*_{Ha, 1}' = 1.2 Hz), 5.38 (dd, 1H, Ha, *J*_{Ha, Hc} = 17.2, *J*_{Ha, 1}' = 1.2 Hz), 5.30 (d, 2H, Hb, *J*_{Hb, Hc} = 10.3 Hz), 5.12 (dd, 1H, H-4, *J*_{4, 3} = *J*_{4, 5} = 9.2 Hz), 4.62-4.55 (m, 4H, H-1'), 4.37 (qd, 1H, Ala- α -C*H*, *J*_{Ala- α -C*H*, Ala- β -C*H*, Ala- β -C*H*, 3.75 (dd, 1H, H-3, *J*_{3, 2} = *J*_{3, 4} = 9.7 Hz), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 1.97 (s, 3H, NAc), 1.47 (d, 3H, Ala- β -C*H*, *J*_{Ala- β -C*H*, *J*_{Ala- α -C*H* = 7.5 Hz), 1.33 (d, 3H, Lac- β -C*H*, *J*_{Lac- β -C*H*, Lac- α -C*H* = 6.3 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 174.4, 173.4, 171.7, 170.7, 170.8, 169.4, 132.1, 132.0, 131.9, 131.8, 119.5, 119.2, 96.8, 96.8, 78.3, 76.7, 70.4, 69.3, 69.2, 69.0, 69.0, 61.9, 53.5, 53.4, 48.5, 23.0, 20.9, 20.8, 19.2, 17.5; ³¹P NMR (CDCl₃, 202 MHz) δ -2.7; ESIMS-LR *m/z* 631.19 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₂₄H₃₇O₁₄N₂NaP 631.1875, found 631.1882; [α]²⁰_D +63.23 (*c* 3.80, CHCl₃). **Glycosylphosphate 140**}}}}}



A mixture of **139** (497 mg, 0.50 mmol) and 10% Pd/C (600 mg) in MeOH/EtOH = 1/1 (10 mL) was vigorously stirred under H₂ atmosphere at room temperature for 24 h. The catalyst was filtered off through a Celite pad, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford a crude lactol. A mixture of the lactol and 1*H*-tetrazole (70 mg, 1.0 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was treated with diallyl *N*,*N*-diisopropylphosphoramidite (198 μ L, 0.75 mmol) at 0 °C for 5 min. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 1.5 h.

Diallyl *N*,*N*-diisopropylphosphoramidite (49.5 μ L, 0.19 mmol) was added to the mixture and stirred for 10 min. The mixture was cooled to -50 °C, and treated with 80% ^{*t*}BuOOH (1 mL) for 1 h. The reaction was quenched with *sat. aq.* Na₂S₂O₃, and the mixture was partitioned between AcOEt and *sat. aq.* NaHCO₃. The organic phase was washed with H₂O and brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-1-2-5% MeOH/AcOEt) to afford **140** (271 mg, 0.25 mmol, 50% over 2 steps) as a colorless foam.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.93 (d, 2H, *o*-PhSO₂, *J*_{*o*, *m*} = 7.5 Hz), 7.70 (t, 1H, *p*-PhSO₂, *J*_{*p*, *m*} = 7.5 Hz), 7.66-7.58 (m, 3H, *m*-PhSO₂, 2-N*H*), 7.18 (d, 1H, Ala-N*H*, *J*_{Ala-N*H*, Ala-α-C*H* = 8.1 Hz), 6.10 (d, 1H, 2'-N*H*, *J*_{2'-N*H*, 2'} = 8.6 Hz), 5.98-5.87 (m, 3H, Hc, H-1), 5.37 (dd, 1H, Ha, *J*_{Ha, Hc} = 17.2, *J*_{Ha, 1'} = 1.2 Hz), 5.35 (dd, 1H, Ha, *J*_{Ha, Hc} = 17.2, *J*_{Ha, 1'} = 1.2 Hz), 5.26 (d, 1H, Hb, *J*_{Hb, Hc} = 10.3 Hz), 5.24 (d, 1H, Hb, *J*_{Hb, Hc} = 10.3 Hz), 5.20 (dd, 1H, H-3', *J*_{3', 4'} = 9.8, *J*_{3', 2'} = 10.9 Hz), 5.11 (dd, 1H, H-4', *J*_{4', 3'} = *J*_{4', 5'} = 10.9 Hz), 4.64 (q, 1H, Lac-α-CH, *J*_{Lac-α-CH}, Lac-β-CH = 6.3 Hz), 4.61-4.54 (m, 3H, H-1', H-1''), 4.54-4.48 (m, 4H, PhSO₂CH₂CH₂, H-1''), 4.39 (dq, 1H, Ala-α-CH, *J*_{Ala-α-CH}, Ala-NH = 8.1, *J*_{Ala-α-CH}, Ala-β-CH}

= 7.5 Hz), 4.35-4.27 (m, 2H, H-6, H-6'), 4.23 (dd, 1H, H-6, $J_{H-6, H-6}$ = 12.6, $J_{6, 5}$ = 3.4 Hz), 4.09 (dd, 1H, H-6', $J_{6', 6'}$ = 12.6, $J_{6', 5'}$ = 2.3 Hz), 4.02-3.85 (m, 4H, H-2, H-2', H-4, H-5), 3.68-3.63 (m, 1H, H-5'), 3.55 (dd, 1H, H-3, $J_{3, 4}$ = $J_{H-3, H-2}$ = 10.1 Hz), 3.51 (t, 2H, PhSO₂CH₂CH₂, $J_{PhSO_2CH_2CH_2}$, PhSO₂CH₂CH₂ = 5.7 Hz), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, NAc), 1.99 (s, 3H, NAc), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.38 (d, 3H, Lac-β-CH, $J_{Lac-\beta-CH, Lac-\alpha-CH}$ = 6.9 Hz), 1.35 (d, 3H, Ala-β-CH, $J_{Ala-\beta-CH, Ala-\alpha-CH}$ = 7.5 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 174.8, 171.8, 171.4, 171.3, 171.2, 171.0, 170.7, 169.5, 139.1, 134.3, 132.4, 129.6, 128.3, 118.8, 118.7, 99.8, 95.7, 95.7, 75.0, 74.0, 72.2, 72.2, 71.2, 68.7, 68.6, 68.6, 68.6, 68.4, 62.2, 61.9, 58.4, 55.1, 54.9, 53.9, 53.8, 48.1, 23.4, 23.1, 21.0, 20.8, 20.7, 18.9, 17.3; ³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz) δ -2.3; ESIMS-LR *m*/*z* 1086.31 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₄₄H₆₂O₂₃N₃NaPS 1086.3125, found 1086.3120; [α]²⁰_D + 8.24 (*c* 1.24, CHCl₃).

Glycosylphosphate 130



A mixture of **140** (127 mg, 0.12 mmol) in CH₂Cl₂ (1.5 mL) was treated with DBU (19.4 μ L, 0.13 mmol) at room temperature for 40 min. The mixture was partitioned between AcOEt and 1 M *aq*. HCl, and the aqueous phase was extracted with AcOEt (×2). Combined organic phase was dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash silica gel column chromatography (0-5-10% MeOH/CH₂Cl₂) to afford **130** (100 mg, 0.11 mmol, 93%) as a colorless foam.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.92 (d, 1H, 2-N*H*, *J*_{2-N*H*, 2} = 4.0 Hz), 7.73 (d, 1H, Ala-N*H*, *J*_{Ala-N*H*, Ala-α-*CH* = 7.5 Hz), 6.49 (d, 1H, 2'-N*H*, *J*_{2-N*H*, 2'} = 9.7 Hz), 5.95-5.84 (m, 3H, Hc, H-1), 5.37 (d, 2H, Ha, *J*_{Ha, Hc} = 17.2 Hz), 5.25 (dd, 1H, Hb, *J*_{Hb, Hc} = 10.3, *J*_{Ha, 1'} = 1.2 Hz), 5.24 (dd, 1H, Hb, *J*_{Hb, Hc} = 10.3, *J*_{Hb, 1'} = 1.2 Hz), 5.12-5.05 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.71 (q, 1H, Lac-α-*CH*, *J*_{Lac-α-*CH*, Lac-β-*CH* = 6.3 Hz), 4.59-4.52 (m, 3H, H-1', H-1''), 4.52-4.45 (m, 2H, H-1''), 4.45 (dq, 1H, Ala-α-*CH*, *J*_{Ala-α-*CH*, Ala-α-*CH*, *A*_{la-α-*CH*, Ala-α-*CH* = 7.5 Hz), 4.31 (dd, 1H, H-6, *J*_{6.6} = 12.6, *J*_{6.5} = 4.6 Hz), 4.22 (d, 1H, H-6, *J*_{6.6} = 12.6, *J*_{6.5} = 3.4 Hz), 4.17-4.09 (m, 1H, H-2'), 4.08 (dd, 1H, H-6, *J*_{6.6} = 12.6, *J*_{6.5} = 2.3 Hz), 3.97 (dd, 1H, H-4, *J*_{4.5} = *J*_{4.3} = 9.7 Hz), 3.92-3.86 (m, 1H, H-2), 3.77-3.71 (m, 1H, H-5), 3.66-3.58 (m, 2H, H-5, H-3'), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, NAc), 2.00 (s, 3H, NAc), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.48 (d, 3H, Ala-β-*CH*, *J*_{Ala-β-*CH*, Ala-α-*CH* = 7.5 Hz), 1.35 (d, 3H, Lac-β-*CH*, *J*_{Lac-β-*CH*, Lac-α-*CH* = 6.3 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 175.7, 174.3, 171.8, 171.1, 171.1, 170.6, 169.5, 132.1, 132.0, 132.0, 131.9, 119.1, 118.9, 99.3, 95.6, 95.5, 73.7, 73.0, 72.3, 72.0, 71.7, 69.1, 69.0, 68.9, 68.8, 68.5, 62.5, 61.9, 54.7, 53.9, 53.9, 48.8, 23.3, 23.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.7, 18.7, 16.8; ³¹P NMR (CDCl₃, 202 MHz) δ -3.2; ESIMS-LR *m*/*z* 918.29 [(M+Na)⁺]; ESIMS-HR calcd for C₃₆H₅₄O₂₁N₃NaP 918.2880, found 918.2885; [α]²⁰_D +7.00 (*c* 0.21, CHCl₃).}}}}}}

Neryl phosphoryl imidazolide (131)



Neryl phosophate ammonium salt (141, 2.9 mg, 0.012 mmol) was coevaporated with Et_3N (20 μ L) in pyridine (1 mL) twice. The residue was coevaporated with toluene (1 mL) twice to afford neryl phosphate triethylamine

salt. A mixture of the phosphate salt in DMF was treated with 1,1'-carbonyldiimidazole (9.5 mg, 0.059 mmol) at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with MeOH (100 μ L) and stirred for 30 min. The mixture was concentrated *in vacuo* and co-evaporated with toluene twice to afford **131**. This compound was used without further purification.

³¹P NMR (DMSO-*d*₆, 162 MHz) δ –9.6.

Procedure for the synthesis of 129

Each HMBA-PEG resin (150 mg, 0.71 mmol) was placed in a 5 mL polypropylene syringe fitted with a polyethylene filter disc. Each resin was agitated with CH₂Cl₂ (1.5 mL, 1 h), After removal of CH₂Cl₂, a solution of Fmoc-D-Ala-OH·H₂O (69 mg, 0.21 mmol) and N,N-dissopropylcarbodiimide (33 µL, 0.21 mmol) in DMF (1 mL) was added at 0 °C. Each mixture was agitated for 40 min. 4-Dimethylaminopyridine (2.5 mg, 0.021 mmol) was added to the mixture at 0 °C, which was warmed to room temperature. After agitation for 1 h at room temperature, solvent and soluble reagents were removed by suction. All resins were subjected to the following washing treatment with DMF (2 mL \times 3), EtOH/CH₂Cl₂ = 1/1 (2 mL \times 3), CH₂Cl₂ (2 mL \times 3) and DMF (2 mL \times 3). The resins were treated with Bz₂O (48 mg, 0.021 mmol) in 20% pyridine/DMF (1 mL) at room temperature for 1 h, and the resins were washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL ×3) to afford 142. The amount of loading on the resin was determined as follow. Dried 142 (6.0 mg) was agitated with DMF (2 mL) for 30 min, and DBU (40 µL) was added to the mixture. The mixture was agitated for 30 min. The supernatant was diluted with DMF and MeCN and subjected to UV measurement at 294 nm. The loading rate was determined to be 0.39 mmol/g from the observed absorbance (0.172). The resins 142 were treated with piperidine/DMF (1:4, 5 min, then 1:9, 15 min) to remove the Fmoc group, and the resins were washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3). A solution of Fmoc-D-Ala-OH \cdot H₂O (94 mg, 0.28 mmol), HBTU (105 mg, 0.28 mmol) and ⁱPr₂NEt (97 µL, 0.57 mmol) in DMF (750 µL) was added to the resins, which were agitated for 2 h. All the resins were washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3) to afford 143. Kaiser test indicated the completion of the all coupling reactions. The loading rate was determined as described above. Namely, dried 143 (4.9 mg) was agitated with DMF (2 mL) for 30 min, DBU (40 µL) was added to the mixture. The mixture was agitated for 30 min. The supernatant was diluted with DMF and MeCN and subjected to UV measurement at 294 nm. The yield was determined to be quantitative from the observed absorbance (0.135). The resins 143 were treated with piperidine/DMF (1:4, 5 min, then 1:9, 15 min) to remove Fmoc group, and the resins were washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3). A solution of Alloc-L-Lys(Fmoc)-OH (96 mg, 0.21 mmol), HBTU (68 mg, 0.21 mmol) and ⁱPr₂NEt (72 µL, 0.43 mmol) in DMF (750 µL) was added to the resins, which were agitated for 2 h. All the resins were washed with DMF (2 mL \times 3) and CH₂Cl₂ (2 mL \times 3) to afford 144. Kaiser test indicated the completion of the all coupling reactions. The amount of loading on the resin was determined as follow. Namely, dried 144 (5.3 mg) was agitated with DMF (2 mL) for 30 min, DBU (40 μ L) was added to the mixture. The mixture was agitated for 30 min. The supernatant was diluted with DMF and MeCN and subjected to UV measurement at 294 nm. The yield was determined to be 87% over 2 steps from the observed absorbance (0.107). The resins 144 were treated with a solution of BH₃·Me₂NH (25 mg, 0.43 mmol) in EtOH (600 μ L) for 5min, then a solution of Pd(PPh₃)₄ (16 mg, 0.014 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added to the mixture. The mixture was agitated for 15 min. All the resins were washed with 0.5% Pr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), 0.5%(w/v) sodium diethyldithiocarbamate/DMF (1 mL×8), MeOH (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3). A solution of Alloc-D-Glu-OBn (68 mg, 0.21 mmol), HBTU (68 mg, 0.21 mmol) and ${}^{i}Pr_2NEt$ (72 µL, 0.43 mmol) in DMF (750 µL) was added to the resins, which were agitated for 2 h. All the resins were washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL ×3). Kaiser test indicated the completion of the all coupling reactions. The resin was dried in vacuo to afford 129 (194 mg, 0.055 mmol, 0.28 mmol/g, 89% over 2 steps). The yield was calculated by weighing resins.

Procedure for the synthesis of 146

Resin-bound peptide **129** (100 mg, 0.028 mmol) was placed in a 5 mL polypropylene syringe fitted with a polyethylene filter disc. The resin was agitated with CH_2Cl_2 (1.5 mL, 1 h). After removal of CH_2Cl_2 , the resin was treated with a solution of $BH_3 \cdot Me_2NH$ (18 mg, 0.33 mmol) in EtOH (600 µL) for 5 min, then a solution of $Pd(PPh_3)_4$ (13 mg, 0.011 mmol) in CH_2Cl_2 (1 mL) was added to the mixture. The mixture was agitated for 15 min. The resin was washed with 0.5% 'Pr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), 0.5%(w/v) sodium diethyldithiocarbamate/DMF (1 mL×8), MeOH (2 mL×3) and DMF/CH₂Cl₂ = 1/1 (2 mL×3). A solution of **130** (49 mg, 0.055 mmol), PyAOP (38 mg, 0.073 mmol), HOAt (5.0 mg, 0.037 mmol), and **145** (20 mg, 0.11 mmol) in DMF/CH₂Cl₂ (2 mL×3) and DMF/CH₂Cl₂ = 1/1 (2 mL×3). A solution of **130** (49 mg, 0.055 mmol), PyAOP (38 mg, 0.073 mmol), HOAt (5.0 mg, 0.037 mmol), and **145** (20 mg, 0.11 mmol) in DMF/CH₂Cl₂ (2 mL×3) and DMF/CH₂Cl₂ = 1/1 (2 mL×3). A solution of **130** (49 mg, 0.055 mmol), PyAOP (38 mg, 0.073 mmol), HOAt (5.0 mg, 0.037 mmol), and **145** (20 mg, 0.11 mmol) in DMF/CH₂Cl₂ (2 mL×3) and DMF/CH₂Cl₂ = 1/1 (2 mL×3). A solution of **130** (49 mg, 0.055 mmol), PyAOP (38 mg, 0.073 mmol), HOAt (5.0 mg, 0.037 mmol), and **145** (20 mg, 0.11 mmol) in DMF/CH₂Cl₂ (2 mL ×3). The resin was added to the resin which was agitated for 3 h. The resin was added to the resin which was agitated for 3 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3). The resin was treated with a solution of Ac₂O (10 µL, 0.11 mmol) and 'Pr₂NEt (19 µL, 0.11 mmol) in DMF (700 µL) for 30 min. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3). Kaiser test indicated the completion of the coupling reaction. The resin was dried *in vacuo* to afford **146** (156 mg, 0.028 mmol, 0.18 mmol), 0.18 mmol/g, quantitative over 2 steps).

Diphosphate 149



A solution of **121** (16.5 mg, 0.024 mmol) and **148** (12.7 mg, 0.024 mmol) in DMF (250 μ L) was treated with **153** (5.3 mg, 0.024 mmol) at 25 °C for 24 h. The mixture was oncentrated *in vacuo*. The residue was purified by high-flash ODS column chromatography (0-10% MeCN/25 mM *aq*. AcOH · Et₃N). The product was further purified by reversed phase HPLC (YMC-Pack

R&D ODS-A, 250×20 mm, 8% MeCN/25 mM *aq*. AcOH·Et₃N) to afford **149** (6.9 mg, 0.0074 mmol, 31%) as a white powder, after freeze drying.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ 9.53 (d, 1H, 2"-N*H*, *J*_{2"-N*H*, 2"} = 9.2 Hz), 7.93 (d, 1H, H-6, *J*_{6, 5} = 6.3 Hz), 5.75 (s, 1H, H-1'), 5.56 (d, 1H, H-5, *J*_{5, 6} = 7.5 Hz), 5.37-5.32 (m, 1H, H-1"), 5.08 (dd, 1H, H-3, *J*_{3, 2} = 9.2, *J*_{3, 4} = 9.7 Hz), 4.93 (dd, 1H, H-4, *J*_{4, 3} = *J*_{4, 5} = 9.5 Hz), 4.19-3.91 (m, 9H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-2", H-5", H-6"), 3.11-3.07 (m, 2H, CH₃C*H*₂N), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.94 (s 3H, OAc), 1.85 (s, 3H, OAc), 1.83 (s, 3H, NAc), 1.17 (t, 3H C*H*₃C*H*₂N); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 170.1, 170.1, 169.6, 169.3, 163.2, 150.8, 140.8, 139.5, 101.7, 93.9, 82.8, 71.6, 67.4, 67.7, 68.4, 67.7, 61.5, 50.9, 47.7, 45.5, 22.3, 20.5, 20.4, 19.0, 11.0, 8.6; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆, 202 MHz) δ -11.3 (d, *J*_{P,P} = 26.3 Hz), -14.1 (d, *J*_{P,P} = 26.3 Hz); ESIMS-LR *m*/*z* 732.11 [(M–H)[–]]; ESIMS-HR calcd for C₂₃H₃₂O₂₀N₃P₂ 732.1072, found 732.1060; [α]²⁰_D +10.94 (*c* 0.60, DMSO-*d*₆).

Neryl-lipid II (126)



Resin-bound peptide **147** (12.4 mg, 2.2 μ mol) was placed in a 5 mL polypropylene syringe fitted with a polyethylene filter disc. The resin was agitated with CH₂Cl₂ (1 mL, 1 h). After removal of CH₂Cl₂, the resin was treated with a solution of Pd(PPh₃)₄ (2.0 mg, 1.7 μ mol) and PhSiH₃ (8.9 μ L, 73 μ mol) in

CH₂Cl₂ (300 μ L) for 2 h. The resin was washed with 0.5% ⁱPr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), 0.5%(w/v) sodium diethyldithiocarbamate/DMF (1 mL×8), MeOH (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL×3) and DMF (2 mL×3). The resin was treated with a solution of 131 (12 µmol) and 153 (2.6 mg, 12 µmol) in DMF (300 µL) at 50 °C for 3 d. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL×3) to afford 154. The resin was treated with piperidine/DMF (1:4, 5 min, then 1:9, 15 min) to remove the Fmoc group, and the resin was washed with 0.5% ⁱPr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) and THF (2 mL ×3). The resin was treated with 2 M aq. LiOH/MeOH/THF = 1/1/2 (400 µL) at 0 °C, then warmed to room temperature and agitated for 2 h. The supernatant was neutralized by 1 M aq. HCl (220 µL) and purified with reversed phase HPLC (YMC-Pack R&D ODS-A, 250 × 20 mm, 15% MeCN/50 mM aq. NH₄HCO₃) to afford **126** (0.8 mg, 0.64 µmol, 21% over 12 steps) as a white powder after freeze drying. ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 5.47-5.41 (m, 2H, H-1, H-2"), 5.22-5.17 (m, 1H, H-6"), 4.62 (d, 1H, H-1', J_{1', 2'} = 8.6 Hz), 4.45 (dd, 2H, H-1", $J_{1",2"} = J_{1",P} = 6.9$ Hz), 4.33 (q, 1H, Ala- α -CH, $J_{Ala-\alpha-CH, Ala-\beta-CH} = 7.5$ Hz), 4.28-4.12 (m, 5H, Ala-α-CH, Lys-α-CH, D-Glu-α-CH, H-2), 4.11 (q, 1H, Lac-α-CH, J_{Lac-α-CH} = 7.5 Hz), 3.97-3.88 (m, 4H, H-4, H-6, H-6'), 3.81 (dd, 1H, H-3, J_{3,4} = J_{3,2} = 9.7 Hz), 3.77-3.69 (m, 3H, H-5, H-2', H-6'), 3.55 (dd, 1H, H-3', J_{3',4'} = J_{3', 2'} = 8.6 Hz), 3.44-3.38 (m, 2H, H-4', H-5'), 3.00 (t, 1H, Lys-ε-CH, J_{Lys-ε-CH}, Lys-δ-CH = 7.5 Hz), 2.31 (t, 2H, D-Gluγ-CH, J_{D-Glu-γ-CH}, p-Glu-β-CH = 8.6 Hz), 2.20-2.10 (m, 5H, D-Glu-β-CH, H-4", H-5"), 2.05 (s, 3H, NAc), 1.99 (s, 3H, NAc), 1.93-1.85 (m, 1H, D-Glu-β-CH), 1.85-1.75 (m, 2H, Lys-β-CH), 1.77 (s, 3H, 3"-Me), 1.74-1.65 (m, 2H, Lys-δ-CH), 1.69 (s, 3H, 7"-Me), 1.62 (s, 3H, 7"-Me), 1.51-1.41 (m, 2H, Lys-γ-CH), 1.45 (d, 3H, Ala-β-CH, J_{Ala-β-CH}, Ala-α- $_{CH} = 7.5 \text{ Hz}$), 1.44 (d, 3H, Ala- β -CH, $J_{Ala-\beta-CH, Ala-\alpha-CH} = 6.9 \text{ Hz}$), 1.37 (d, 3H, Ala- β -CH, $J_{Ala-\beta-CH, Ala-\alpha-CH} = 7.5 \text{ Hz}$), 1.33 (d, 3H, Lac-β-CH, $J_{Lac-β-CH, Lac-α-CH} = 6.9$ Hz); ³¹P NMR (D₂O, 202 MHz) δ -10.2 (d, $J_{P,P} = 21.4$ Hz), -12.7 (d, $J_{P,P} = 21.4 \text{ Hz}$; ESIMS-LR m/z 630.24 [(M-2H)²⁻]; ESIMS-HR calcd for C₄₉H₈₂O₂₆N₈P₂ 630.2413, found 630.2425; $[\alpha]^{20}_{D}$ +10.00 (*c* 0.08, MeOH).

The analytical data for synthetic **126** were in good agreement with the previously reported data.⁸⁷

Procedure for the synthesis of 155

Resin-bound peptide **129** (150 mg, 0.042 mmol) was placed in a 5 mL polypropylene syringe fitted with a polyethylene filter disc. The resin was agitated with CH₂Cl₂ (1.5 mL, 1 h). After removal of CH₂Cl₂, the resin was treated with a solution of BH₃·Me₂NH (13 mg, 0.22 mmol) in EtOH (600 μ L) for 5 min, then a solution of Pd(PPh₃)₄ (8.4 mg, 7.3 μ mol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added to the mixture. The mixture was agitated for 15 min. The resin was washed with 0.5% ⁱPr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), 0.5%(w/v) sodium diethyldithiocarbamate/DMF (1 mL×8), MeOH (2 mL×3) and DMF/CH₂Cl₂ = 1/1 (2 mL×3). A solution of **132** (50 mg, 0.082 mmol), PyAOP (57 mg, 0.11 mmol), HOAt (7.5 mg, 0.055 mmol), and **145** (30 mg, 0.16 mmol) in DMF/CH₂Cl₂ (700 μ L) was added to the resin which

was agitated for 3 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) and DMF/CH₂Cl₂ = 1/1 (2 mL×3). A solution of **132** (50 mg, 0.082 mmol), PyAOP (57 mg, 0.11 mmol), HOAt (7.5 mg, 0.055 mmol), and **145** (30 mg, 0.16 mmol) in DMF/CH₂Cl₂ (700 μ L) was added to the resin which was agitated for 3 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3). The resin was treated with a solution of Ac₂O (16 μ L, 0.16 mmol) and ^{*i*}Pr₂NEt (29 μ L, 0.16 mmol) in DMF (800 μ L) for 30 min. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3). Kaiser test indicated the completion of the coupling reaction. The resin was dried *in vacuo* to afford **155** (189 mg, 0.042 mmol, 0.22 mmol/g, quantitative over 2 steps). The yield was calculated by weighing resin.

Neryl-lipid I (157)



Resin-bound peptide **155** (9.4 mg, 2.1 μ mol) was placed in a 5 mL polypropylene syringe fitted with a polyethylene filter disc. The resin was agitated with CH₂Cl₂ (1 mL, 1 h). After removal of CH₂Cl₂, the resin was treated with a solution of Pd(PPh₃)₄ (1.9 mg, 1.6 μ mol) and PhSiH₃ (8.4 μ L,

69 μ mol) in CH₂Cl₂ (400 μ L) for 2 h. The resin was washed with 0.5% ^{*i*}Pr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), 0.5% (w/v) sodium diethyldithiocarbamate/DMF (1 mL×8), MeOH (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) and DMF (2 mL×3). The resin was treated with a solution of 131 (11 µmol) and 153 (2.4 mg, 11 µmol) in DMF (300 µL) at 50 °C for 2 d. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL×3) to afford **156**. The resin was treated with piperidine/DMF (1:4, 5 min, then 1:9, 15 min) to remove the Fmoc group, and the resin was washed with 0.5% ⁱPr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) and THF (2 mL ×3). The resin was treated with 2 M aq. LiOH/MeOH/THF = 1/1/2 (400 µL) at 0 °C, then warmed to room temperature and agitated for 2 h. The supernatant was neutralized by 1 M aq. HCl (210 µL) and purified with reversed phase HPLC (YMC-Pack R&D ODS-A, 250 × 20 mm, 15% MeCN/50 mM aq. NH₄HCO₃) to afford 157 (0.6 mg, 0.55 µmol, 20% over 12 steps) as a white powder after freeze drying. ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 5.47-5.42 (m, 2H, H-1, H-2'), 5.20 (t, 1H, H-6', *J*_{6'.5'} = 6.9 Hz), 4.49-4.43 (m, 2H, H-1'), 4.33 (q, 1H, Ala- α -CH, $J_{Ala-\alpha-CH, Ala-\beta-CH} = 6.9$ Hz), 4.26 (q, 1H, Ala- α -CH, $J_{Ala-\alpha-CH, Ala-\beta-CH} = 7.5$ Hz), 4.23-4.18 (m, 2H, Ala-α-CH, Lys-α-CH), 4.17-4.08 (m, 3H, D-Glu-α-CH, Lac-α-CH, H-2), 3.98-3.93 (m, 1H, H-5), 3.91-3.86 (m, 1H, H-6), 3.84 (dd, 1H, H-6, $J_{6, 6} = 12.6$, $J_{6, 5} = 4.0$ Hz), 3.80 (dd, 1H, H-3, $J_{3, 4} = J_{3, 2} = 9.7$ Hz), 3.64 (dd, 1H, H-4, J_{6, 6} = 12.6, $J_{6, 5} = 4.0$ Hz), 3.80 (dd, 1H, H-3, $J_{3, 4} = J_{3, 2} = 9.7$ Hz), 3.64 (dd, 1H, H-4, J_{6, 6} = 12.6). $J_{4,3} = 9.7, J_{4,5} = 10.3$ Hz), 3.00 (t, 1H, Lys- ϵ -CH, $J_{Lys-\epsilon$ -CH, Lys- δ -CH = 7.5 Hz), 2.31 (t, 2H, D-Glu- γ -CH, $J_{D-Glu-\gamma$ -CH, D-Glu- γ -CH, $J_{D-Glu-\gamma}$ -CH $\beta_{-CH} = 8.0 \text{ Hz}$, 2.20-2.10 (m, 5H, D-Glu- β -CH, H-4', H-5'), 2.00 (s, 3H, NAc), 1.93-1.85 (m, 1H, D-Glu- β -CH), 1.85-1.75 (m, 2H, Lys-β-CH), 1.77 (s, 3H, 3'-Me), 1.73-1.66 (m, 2H, Lys-δ-CH), 1.69 (s, 3H, 7'-Me), 1.62 (s, 3H, 7'-Me), 1.51-1.42 (m, 2H, Lys-γ-CH), 1.45 (d, 3H, Ala-β-CH, J_{Ala-β-CH}, Ala-α-CH = 6.9 Hz), 1.41 (d, 3H, Ala-β-CH, J_{Ala-β-CH}, Ala-β-CH, α -CH = 6.9 Hz), 1.37 (d, 3H, Ala- β -CH, $J_{Ala-\beta-CH, Ala-\alpha-CH}$ = 7.5 Hz), 1.33 (d, 3H, Lac- β -CH, $J_{Lac-\beta-CH, Lac-\alpha-CH}$ = 7.5 Hz); 31 P NMR (D₂O, 202 MHz) δ -10.2 (d, J_{P,P} = 21.4 Hz), -12.7 (d, J_{P,P} = 21.4 Hz); ESIMS-LR m/z 528.70 [(M-2H)²⁻]; ESIMS-HR calcd for $C_{41}H_{69}O_{21}N_7P_2$ 528.7016, found 528.7025; $[\alpha]^{20}D + 20.42$ (*c* 0.06, MeOH).

Park nucleotide (122)



Resin-bound peptide **155** (9.4 mg, 2.1 μ mol) was placed in a 5 mL polypropylene syringe fitted with a polyethylene filter disc. The resin was agitated with CH₂Cl₂ (1 mL, 1 h). After removal of CH₂Cl₂, the resin was treated with a solution of Pd(PPh₃)₄ (1.9 mg, 1.6 μ mol) and PhSiH₃ (8.4 μ L, 69 μ mol) in CH₂Cl₂ (400 μ L) for 2 h. The resin was

washed with 0.5% ⁱPr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), 0.5%(w/v) sodium diethyldithiocarbamate/DMF (1 mL×8), MeOH (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) and DMF (2 mL×3). The resin was treated with a solution of **121** (7.6 mg, 11 µmol) and **153** (2.4 mg, 11 µmol) in DMF (300 µL) at 50 °C for 3 d. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) to afford **158**. The resin was treated with piperidine/DMF (1:4, 5 min, then 1:9, 15 min) to remove the Fmoc group, and the resin was washed with 0.5% ⁱPr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) and THF (2 mL ×3). The resin was treated with 2 M *aq*. NaOH/MeOH/THF = 1/1/2 (400 µL) at 0 °C, then warmed to room temperature and agitated for 2 h. The supernatant was neutralized by 1 M *aq*. HCl (220 µL) and purified with reversed phase HPLC (YMC-Pack R&D ODS-A, 250 × 20 mm, 1% MeCN/50 mM *aq*. NH₄HCO₃) to afford **122** (1.4 mg, 1.2 µmol, 44% over 12 steps) as a white powder, after freeze drying.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 7.96 (d, 1H, H-6, *J*₆, *s* = 8.0 Hz), 5.99 (d, 1H, H-1', *J*_{1', 2'} = 5.2 Hz), 5.97 (d, 1H, H-5, *J*₅, *6* = 8.0 Hz), 5.47 (dd, 1H, H-1", *J*_{1", 2"} = 2.9, *J*_{1", P} = 7.5 Hz), 4.39-4.30 (m, 3H, Ala-α-CH, H-2', H-3'), 4.30-4.09 (m, 9H, H-4', H-5', H-2", Ala-α-CH, Lac-α-CH, Lys-α-CH, D-Glu-α-CH), 3.98-3.94 (m, 1H, H-5"), 3.88 (dd, 1H, H-6", *J*_{6", 6"} = 12.6, *J*_{6", 5"} = 2.3 Hz), 3.84 (dd, 1H, H-6", *J*_{6", 6"} = 12.6, *J*_{6", 5"} = 4.0 Hz), 3.80 (dd, 1H, H-3", *J*_{3", 4"} = *J*_{3", 2"} = 10.3 Hz), 3.65 (dd, 1H, H-4", *J*_{4", 3"} = 10.3, *J*_{4", 5"} = 9.7 Hz), 3.01 (t, 1H, Lys-ε-CH, *J*_{Lys-ε-CH}, *L*_{ys-δ-CH} = 7.5 Hz), 2.31 (t, 2H, D-Glu-γ-CH, *J*_{D-Glu-γ-CH, D-Glu-β-CH), 1.85-1.74 (m, 2H, Lys-β-CH), 1.74-1.65 (m, 2H, Lys-δ-CH), 1.52-1.41 (m, 2H, Lys-γ-CH), 1.45 (d, 3H, Ala-β-CH, *J*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-α-CH} = 6.9 Hz), 1.37 (d, 3H, Ala-β-CH, *J*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-CH}, *J*_{Ala-β-CH}, *J*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-CH}, *A*_{Ala-β-}}

The analytical data for synthetic 1 were in good agreement with the previously reported data.⁹⁴

Neryl-lipid II DBD analogue 160



Resin-bound peptide 147 (12.4 mg, 2.9 μ mol) was placed in a 5 mL polypropylene syringe fitted with a polyethylene filter disc. The resin was agitated with CH₂Cl₂ (1 mL, 1 h). After removal of CH₂Cl₂, the resin was treated with a solution of Pd(PPh₃)₄ (2.0 mg, 1.7 μ mol) and PhSiH₃ (8.9 μ L, 73 μ mol) in CH₂Cl₂ (300 μ L)

for 2 h. The resin was washed with 0.5% $^{i}Pr_2NEt/CH_2Cl_2$ (2 mL×3), 0.5%(w/v) sodium diethyldithiocarbamate/DMF (1 mL×8), MeOH (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) and DMF (2 mL×3). The resin was treated with a solution of **131** (12

μmol) and **153** (2.6 mg, 12 μmol) in DMF (300 μL) at 50 °C for 3 d. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) to afford **154**. The resin was treated with piperidine/DMF (1:4, 5min, then 1:9, 15 min) to remove the Fmoc group, and the resin was washed with 0.5% ^{*i*}Pr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL ×3). The resin was treated with a solution of DBD-NCS (2.5 mg, 8.7 μmol) and ^{*i*}Pr₂NEt (1.5 μL, 8.7 μmol) in DMF (400 μL) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) and THF (2 mL ×3). Kaiser test indicated the completion of the coupling reaction. The resin was treated with 2 M *aq*. LiOH/MeOH/THF = 1/1/2 (400 μL) at 0 °C, then warmed to room temperature and agitated for 2 h. The supernatant was neutralized by 1 M *aq*. HCl (220 μL) and purified with reversed phase HPLC (YMC-Pack R&D ODS-A, 250 × 20 mm, 23% MeCN/50 mM *aq*. NH₄HCO₃) to afford **160** (0.5 mg, 0.32 μmol, 11% over 13 steps) as a yellow powder, after freeze drying.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 8.22 (d, 1H, H-a, $J_{a,b} = 7.5$ Hz), 8.13 (d, 1H, $J_{b,a} = 7.5$ Hz), 5.45 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2} = 3.4$, $J_{1,P} = 6.3$ Hz), 5.41 (t, 1H, H-2", $J_{2",1"} = 6.9$ Hz), 5.13 (t, 1H, H-6", $J_{6",5"} = 6.9$ Hz), 4.62 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 8.6$ Hz), 4.43 (dd, 2H, H-1", $J_{1',2'} = J_{1'',P} = 6.3$ Hz), 4.35 (q, 1H, Ala- α -CH, $J_{Ala-\alpha}$ -CH, $Ala-\beta$ -CH = 6.9 Hz), 4.26 (q, 1H, Ala- α -CH, $J_{Ala-\alpha}$ -CH, $Ala-\beta$ -CH = 6.9 Hz), 4.26 (q, 1H, Ala- α -CH, $J_{Ala-\alpha}$ -CH, $Ala-\beta$ -CH = 6.9 Hz), 4.26 (q, 1H, Ala- α -CH, $J_{Ala-\alpha}$ -CH, $Ala-\beta$ -CH = 6.9 Hz), 4.26 (q, 1H, Ala- α -CH, $J_{Ala-\alpha}$ -CH, $I_{Ac}-\beta$ -CH = 6.9 Hz), 4.26 (q, 1H, Ala- α -CH, $J_{Ala-\alpha}$ -CH, $I_{Ac}-\beta$ -CH = 6.9 Hz), 3.98-3.87 (m, 4H, H-4, H-6, H-6'), 3.80 (dd, 1H, H-3, $J_{3,H-4} = J_{3,2} = 9.7$ Hz), 3.77-3.61 (m, 5H, H-5, H-2', H-6', Lys- ϵ -CH), 3.55 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'} = J_{3',2'} = 8.0$ Hz), 3.44-3.37 (m, 2H, H-4', H-5'), 2.86 (s, 3H, SO₂Me), 2.72 (s 3H, SO₂Me), 2.38-2.29 (m, 2H, D-Glu- γ -CH), 2.20-2.02 (m, 5H, D-Glu- β -CH, H-4", H-5"), 2.04 (s, 3H, NAc), 1.98 (s, 3H, NAc), 1.93-1.78 (m, 3H, D-Glu- β -CH, Lys- β -CH), 1.74 (s, 3H, 3"-Me), 1.76-1.68 (m, 2H, Lys- δ -CH), 1.65 (s, 3H, 7"-Me), 1.58 (s, 3H, 7"-Me), 1.55-1.40 (m, 2H, Lys- γ -CH), 1.44 (d, 3H, Ala- β -CH, $J_{Ala-\beta$ -CH, $Ala-\alpha$ -CH = 7.5 Hz), 1.43 (d, 3H, Ala- β -CH, $J_{Ala-\beta$ -CH, $Ala-\alpha$ -CH = 6.9 Hz), 1.32 (d, 3H, Lac- β -CH, $J_{Ala-\beta$ -CH, $J_{Ala-\beta}$ -CH, $I_{Ala-\alpha}$ -CH = 6.9 Hz), 1.32 (d, 3H, Lac- β -CH, $J_{Lac-\beta}$ -CH, $I_{Ac-\alpha-CH} = 6.9$ Hz), 1.36 (d, 3H, Ala- β -CH, $J_{Ala-\beta}$ -CH, $I_{Ac-\alpha-CH} = 6.9$ Hz), 1.32 (d, $J_{H}, Lac-<math>\beta$ -CH, $I_{Ac-\alpha-CH} = 6.9$ Hz); ³¹P NMR (D₂O, 202 MHz) δ -10.2 (d, $J_{P,P} = 21.4$ Hz), -12.7 (d, $J_{P,P} = 21.4$ Hz); ESIMS-LR m/z 772.25 [(M-2H)²⁻]; ESIMS-HR calcd for C₅₈H₉₀O₂₉N₁₂P₂S₂ 772.2432, found 772.2453; [α]²⁰_D + 28.56 (c 0.05, MeOH).

Neryl-lipid I FITC analogue 162



Resin-bound peptide **155** (9.4 mg, 2.1 μ mol) was placed in a 5 mL polypropylene syringe fitted with a polyethylene filter disc. The resin was agitated with CH₂Cl₂ (1 mL, 1 h). After removal of CH₂Cl₂, the resin was treated with a solution of Pd(PPh₃)₄ (1.9 mg, 1.6 μ mol) and PhSiH₃ (8.4 μ L, 69 μ mol) in CH₂Cl₂ (400 μ L) for 2 h. The resin was washed with 0.5% ^{*i*}Pr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), 0.5%(w/v) sodium

diethyldithiocarbamate/DMF (1 mL×8), MeOH (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) and DMF (2 mL×3). The resin was treated with a solution of **131**(11 µmol) and **153** (2.4 mg, 11 µmol) in DMF (300 µL) at 50 °C for 3 d. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) to afford **156**. The resin was treated with piperidine/DMF (1:4, 5 min, then 1:9, 15 min) to remove the Fmoc group, and the resin was washed with 0.5% ^{*i*}Pr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3). The resin was treated with a solution of FITC isomer I (3.2 mg, 8.6 µmol) and ^{*i*}Pr₂NEt (2.8 µL, 16 µmol) in DMF (400 µL) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3) and CH₂Cl₂ (2 mL×3).

DMF (400 μ L) for 2 h. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL×3) and THF (2 mL×3). Kaiser test indicated the completion of the coupling reaction. The resin was treated with 2 M aq. LiOH/MeOH/THF = 1/1/2(400 µL) at 0 °C, then warmed to room temperature and agitated for 2 h. The supernatant was neutralized by 1 M aq. HCl (210 µL) and purified with reversed phase HPLC (YMC-Pack R&D ODS-A, 250 × 20 mm, 15% MeCN/50 mM aq. NH₄HCO₃) to afford 162 (1.2 mg, 0.81 µmol, 30% over 13 steps) as a yellow powder, after freeze drying. ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 7.70 (s, 1H, H-f), 7.57 (d, 1H, H-d, $J_{d,e} = 8.0$ Hz), 7.37 (d, 1H, H-e, $J_{e,d} = 8.0$ Hz), 7.29 $(d, 2H, H-c, J_{c,b} = 8.6 Hz), 6.71-6.67 (m, 4H, H-a, H-b), 5.46-5.39 (m, 2H, H-1, H-2'), 5.17-5.12 (m, 1H, H-6'), 4.47-$ 4.41 (m, 2H, H-1'), 4.35 (q, 1H, Ala-α-CH, J_{Ala-α-CH}, Ala-β-CH = 7.5 Hz), 4.28 (q, 1H, Ala-α-CH, Ala-β-CH = 7.5 Hz), 4.28 (q, 1H, Ala-β-CH, Ala-β-CH = 7.5 Hz), 4.28 (q, 1H, Ala-β-CH, Ala-β-CH = 7.5 Hz), 4.28 (q, 1H, Ala-β-CH, Ala-β-CH, Ala-β-CH = 7.5 Hz), 4.28 (q, 1H, Ala-β-CH, Al Hz), 4.25-4.07 (m, 5H, Ala-α-CH, Lys-α-CH, D-Glu-α-CH, Lac-α-CH, H-2), 3.97-3.92 (m, 1H, H-5), 3.87 (d, 1H, H-6, $J_{6,6} = 12.6$ Hz), 3.82 (dd, 1H, H-6, $J_{6,6} = 12.6$, $J_{6,5} = 4.0$ Hz), 3.77 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4} = J_{3,2} = 9.7$ Hz), 3.67-3.69 (m, 3H, H-4, Lys-ε-CH), 2.33-2.27 (m, 2H, D-Glu-γ-CH), 2.18-2.04 (m, 5H, D-Glu-β-CH, H-4', H-5'), 1.99 (s, 3H, NAc), 1.94-1.74 (m, 3H, D-Glu-β-CH, Lys-β-CH), 1.73 (s, 3H, 3'-Me), 1.72-1.63 (m, 2H, Lys-δ-CH), 1.66 (s, 3H, 7'-Me), 1.58 (s, 3H, 7'-Me), 1.51-1.40 (m, 2H, Lys-γ-CH), 1.43 (d, 3H, Ala-β-CH, J_{Ala-β-CH} = 6.9 Hz), 1.39 (d, 3H, Ala-β-CH, J_{Ala-β-CH, Ala-α-CH} = 6.9 Hz), 1.36 (d, 3H, Ala-β-CH, J_{Ala-β-CH, Ala-α-CH} = 6.9 Hz), 1.32 (d, 3H, Lac-β-CH, $J_{\text{Lac-B-CH, Lac-}\alpha-CH} = 7.5 \text{ Hz}$; ³¹P NMR (D₂O, 202 MHz) δ -10.2 (d, $J_{P,P} = 21.4 \text{ Hz}$), -12.7 (d, $J_{P,P} = 21.4 \text{ Hz}$); ESIMS-LR m/z 723.22 [(M-2H)²⁻]; ESIMS-HR calcd for C₆₂H₈₀H₂₆N₈P₂S 723.2195, found 723.2214; $[\alpha]^{20}D$ +20.18 (c 0.12, MeOH).

Dansyl Park nucleotide (124)



Resin-bound peptide **155** (9.4 mg, 2.1 μ mol) was placed in a 5 mL polypropylene syringe fitted with a polyethylene filter disc. The resin was agitated with CH₂Cl₂ (1 mL, 1 h). After removal of CH₂Cl₂, the resin was treated with a solution of Pd(PPh₃)₄ (1.9 mg, 1.6 μ mol) and PhSiH₃ (8.4 μ L, 69 μ mol) in CH₂Cl₂ (400 μ L) for 2 h. The resin was washed with 0.5% ^{*i*}Pr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3),

0.5%(w/v) sodium diethyldithiocarbamate/DMF (1 mL×8), MeOH (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL×3) and DMF (2 mL×3). The resin was treated with a solution of **121** (7.6 mg, 11 µmol) and **153** (2.4 mg, 11 µmol) in DMF (300 µL) at 50 °C for 3 d. The resin was washed with DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) to afford **158**. The resin was treated with piperidine/DMF (1:4, 5 min, then 1:9, 15 min) to remove the Fmoc group, and the resin was washed with 0.5% 1 Pr₂NEt/CH₂Cl₂ (2 mL×3), DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL×3). The resin was treated with a mixture of dansyl chloride (7.3 mg, 27 µmol) in 0.25 M *aq*. NaHCO₃/acetone = 1/1 (400 µL) for 2 h. The resin was washed with MeOH (2 mL×3), DMF (2 mL×3), CH₂Cl₂ (2 mL ×3) and THF (2 mL×3). Kaiser test indicated the completion of the coupling reaction. The resin was treated with 2 M *aq*. NaOH/MeOH/THF = 1/1/2 (400 µL) at 0 °C, then warmed to room temperature and agitated for 2 h. The supernatant was neutralized by 1 M *aq*. HCl (200 µL) and purified with reversed phase HPLC (YMC-Pack R&D ODS-A, 250 × 20 mm, 15% MeCN/50 mM *aq*. NH₄HCO₃) and converted into the ammonium salt by ion exchange chromatography (Dowex 50WX4 50-100) to afford **124** (1.0 mg, 0.71 µmol, 26% over 13 steps) as a slightly green powder, after freeze drying.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 8.50 (d, 1H, H-a, $J_{a,b} = 8.6$ Hz), 8.40 (d, 1H, H-f, $J_{f,c} = 8.6$ Hz), 8.30 (d, 1H, H-c, $J_{c,b} = 7.5$ Hz), 7.92 (d, 1H, H-6, $J_{H-6,H-5} = 8.0$ Hz), 7.76 (dd, 1H, H-e, $J_{e,f} = 8.6$, $J_{e,d} = 7.5$ Hz), 7.74 (dd, 1H, H-b, $J_{b,a} = J_{b,c} = 8.6$ Hz), 7.55 (d, H-d, $J_{d,c} = 7.5$ Hz), 5.95 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 4.6$ Hz), 5.93 (d, 1H, H-5, $J_{5,6} = 8.0$ Hz), 5.46 (dd, 1H, H-1", $J_{1',2''} = 2.9$, $J_{1'',P} = 7.5$ Hz), 4.35 (dd, 1H, H-2', $J_{2',1'} = 4.6$, $J_{2',3'} = 8.0$ Hz), 4.29-4.17 (m, 6H, Ala-α-CH, H-3', H-4' H-5'), 4.17-4.07 (m, 4H, H-5', H-2'', Lac-α-CH, D-Glu-α-CH), 3.97-3.92 (m, 1H, H-5''), 3.88-3.71 (m, 3H, H-3'', H-6'', Lys-α-CH), 3.65-3.59 (m, 2H, H-4'', H-6''), 3.00 (s, 6H, dansyl-NMe), 2.95 (t, 1H, Lys-ε-CH, $J_{Lys-e-CH}$, $J_{Lys-e-CH} = 7.5$ Hz), 2.23 (t, 2H, D-Glu-γ-CH, $J_{D-Glu-γ-CH, D-Glu-β-CH} = 6.9$ Hz), 2.16-2.06 (m, 1H, D-Glu-β-CH), 1.99 (s, 3H, NAc), 1.90-1.80 (m, 1H, D-Glu-β-CH), 1.42 (d, 3H, Ala-β-CH, $J_{Ala-β-CH, Ala-α-CH} = 7.5$ Hz), 1.38 (d, 3H, Ala-β-CH, $J_{Ala-β-CH, Ala-α-CH} = 6.3$ Hz), 1.31 (d, 3H, Lac-β-CH, $J_{Lac-β-CH, Lac-α-CH} = 6.9$ Hz), 1.30 (d, 3H, Ala-β-CH, $J_{Ala-β-CH}$, J_{A

For comparison with the reported data, a part of the product was converted into the sodium salt by ion exchange chromatography (Dowex 50WX4 50-100).

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 8.50 (d, 1H, H-a, $J_{a, b} = 8.6$ Hz), 8.32 (d, 1H, H-f, $J_{f, e} = 8.6$ Hz), 8.26 (d, 1H, H-c, $J_{c, b} = 7.5$ Hz), 7.77 (d, 1H, H-6, $J_{H-6, H-5} = 8.0$ Hz), 7.71 (dd, 1H, H-e, $J_{e, f} = 8.6$, $J_{e, d} = 7.5$ Hz), 7.69 (dd, 1H, H-b, $J_{b, a} = 8.6$, $J_{b, c} = 7.5$ Hz), 7.41 (d, H-d, $J_{d, e} = 7.5$ Hz), 6.01 (d, 1H, H-1', $J_{1', 2'} = 5.2$ Hz), 5.85 (d, 1H, H-5, $J_{5, 6} = 7.5$ Hz), 5.46 (dd, 1H, H-1", $J_{1", 2"} = 3.4$, $J_{1", P} = 6.9$ Hz), 4.35-4.10 (m, 10H, H-2', Ala-α-CH, H-3', H-4' H-5', H-2", D-Glu-α-CH), 4.07 (q, 1H, Lac-α-CH, $J_{Lac-\alpha-CH, Lac-\beta-CH} = 7.5$ Hz), 3.97-3.91 (m, 1H, H-5"), 3.88-3.71 (m, 3H, H-3", H-6", Lys-α-CH), 3.66-3.58 (m, 2H, H-4", H-6"), 2.93 (t, 1H, Lys-ε-CH, $J_{Lys-ε-CH, Lys-δ-CH} = 6.3$ Hz), 2.88 (s, 6H, dansyl-NMe), 2.23 (t, 2H, D-Glu-γ-CH, $J_{D-Glu-β-CH} = 7.5$ Hz), 2.15-2.05 (m, 1H, D-Glu-β-CH), 1.98 (s, 3H, NAc), 1.90-1.80 (m, 1H, D-Glu-β-CH), 1.41 (d, 3H, Ala-β-CH, $J_{Ala-β-CH, Ala-α-CH} = 6.9$ Hz), 1.38 (d, 3H, Ala-β-CH, $J_{Ala-β-CH, Ala-α-CH} = 6.3$ Hz), 1.29 (d, 3H, Lac-β-CH, $J_{Lac-β-CH, Lac-α-CH} = 7.5$ Hz), 1.29 (d, 3H, Lac-β-CH, $J_{Lac-β-CH, Lac-α-CH} = 7.5$ Hz), 1.29 (d, 3H, Lac-β-CH, $J_{Lac-β-CH, Lac-α-CH} = 7.5$ Hz), 1.29 (d, 3H, Lac-β-CH, Lys-δ-CH), 1.13-1.02 (m, 1H, Lys-γ-CH), 1.02-0.93 (m, 1H, Lys-γ-CH).



Conditions

column: YMC-Pack R&D ODS-A; eluent: 15% MeCN/50 mM aq. NH4HCO3;

flow 8 mL/min; detection: UV 210 nm

Figure S3. HPLC analysis of 126.



Conditions

column: YMC-Pack R&D ODS-A; eluent: 15% MeCN/50 mM *aq*. NH₄HCO₃; flow 8 mL/min; detection: UV 210 nm

Figure S4. HPLC analysis of 157.



Conditions

column: YMC-Pack R&D ODS-A; eluent: 1% MeCN/50 mM aq. NH4HCO3;

flow 8 mL/min; detection: UV 254 nm

Figure S5. HPLC analysis of 122.



Conditions

column: YMC-Pack R&D ODS-A; eluent: 23% MeCN/50 mM *aq*. NH₄HCO₃; flow 8 mL/min; detection: UV 254 nm

Figure S6. HPLC analysis of 160.



Conditions

column: YMC-Pack R&D ODS-A; eluent: 15% MeCN/50 mM aq. NH4HCO3;

flow 8 mL/min; detection: UV 254 nm

Figure S7. HPLC analysis of 162.



Conditions

column: YMC-Pack R&D ODS-A; eluent: 15% MeCN/50 mM *aq*. NH₄HCO₃; flow 8 mL/min; detection: UV 254 nm **Figure S8.** HPLC analysis of **124**.

compound 122		compound 126			compound 124		
Synthetic	Reported	:	Synthetic	Reported		Synthetic	Reported
(500 MHz)	(600 MHz)	(4	500 MHz)	(400 MHz)		(500 MHz)	(500 MHz)
7.96	7.94	Ę	5.47-5.41	5.45-5.39		8.50	8.48
5.99	5.96-5.94	Ę	5.22-5.17	5.20-5.14		8.32	8.27
5.97			4.62	4.60		8.26	8.23
5.47	5.45		4.45	4.42		7.77	7.90
4.39-4.30	4.36-4.03		4.33	4.31		7.71	7.70-7.65
4.30-4.09		2	4.28-4.12	4.28-4.19		7.69	
3.98-3.94	3.94-3.91		4.11	4.20-4.05		7.41	7.38
3.88	3.87-3.80	6	3.97-3.88	3.96-3.85		6.01	5.95-5.91
3.84			3.81	3.82-3.76		5.85	
3.80	3.77	3	3.77-3.69	3.75-3.67		5.46	5.46
3.65	3.62		3.55	3.56-3.49			4.34-4.32
3.01	2.98	3	3.44-3.38	3.42-3.35		4.35-4.10	4.29-4.23
2.31	2.28			3.18		4.07	4.23-4.10
2.20-2.12	2.14-2.12		3.00	2.98			4.10-4.06
2.02	1.98		2.31	2.30		3.97-3.91	3.96-3.93
1.92-1.85	1.89-1.65	2	2.20-2.10	2.15-2.09		3.88-3.71	3.85-3.59
1.85-1.74			2.05	2.03		3.66-3.58	
1.74-1.65		-	1.93-1.85	1.97		2.93	2.90
1.52-1.41	1.44-1.31	-	1.85-1.75			2.88	2.85
1.45			1.77	1.75		2.23	2.27-2.21
1.41		-	1.74-1.65			2.15-2.05	2.14-2.05
1.37			1.69	1.67		1.98	1.99
1.34			1.62	1.60		1.90-1.80	1.88-1.81
		-	1.51-1.41			1.41	1.41
			1.45	1.43		1.38	1.38
			1.44	1.42		1.29	1.30
			1.37	1.35		1.29	
1.33 1.31 1.33-1.15						1.42-1.39	
							1.26-1.15
						1.13-1.02	1.13-1.03
						1.02-0.93	1.03-0.94

Table S1. Comparison of ¹H NMR spectra in D₂O

Optimization of the diphosphate formation

General procedure of diphosphate formation

A solution of **121** (21 mg, 0.030 mmol) and **148** (16 mg, 0.030 mmol) in DMF (300 μ L) was treated with activator (0.030 mmol) at 25 °C. The reactions were monitored by ³¹P NMR. The signals for the corresponding diphosphate are found at d –11.3 and –14.1 ppm (²*J*_{P, P} = 26.3 Hz). The yields were determined by the ratio of the integral value of diphosphate peak to the sum of the integral value of all signals.

Investigation of the enzyme reaction

Reactions were carried out in 0.5 mL Eppendorf tube. Reaction mixtures contained, in a final volume of 10 μ L, 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), 40 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 0.2% Triton X-100, 6% glycerol, 1% DMSO, 100 μ M C₅₅-P and 100 μ M **31**. The reactions were initiated by the addition of *Staphylococcus aureus* MraY enzyme (55 ng/0.5 μ L). After 5 h incubation at room temperature, the reaction was monitored by silica gel TLC (NH₄OH/^{*i*}PrOH = 2/5, detection: UV 365 nm).

第五章

ITC experiment

ITC experimentw were performed using isothermal titration calorimeter VP-ITC (MicroCal, USA). Each experiment consisted of 19 consecutive injections (0.4-2 μ L) of antiabcterial in 10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 0.9 mM CaCl₂ buffer (pH 7.3) (+2-4% DMSO) into the microcalorimetric reaction cell (110 μ L) charged with solution of neryl-lipid II (**126**) in the same buffer solution.

Preparation of liposome

Egg phosphatidylcholine (EPC), cholesterol (Chol) were obtained from the NOF corporation (Tokyo, Japan). Lipid stock solution prepared in chloroform/MeOH (=1/1) were stored at -20 °C untile used. A lipid film was formed on the bottom of a glass tube cy evaporating a chloroform/EtOH solution containg 0.55 mM lipids [EPC/Chol (=7/3)]. After the film was formed, 250 μ M of 10 mM sodium phosphate (pH 7.3) was added followed by incubation for 15 min at room temperature and sonication for 15 min. Particle diameter and PDI, indicators of particle-size distribution, were measured using a dyncamic light scattering (DLS) method (Zatasizer Nano ZS; Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Sample were prepared in 10 mM sodium phosphate (pH 7.3) at 25 °C and the value of particle disameters are shown in the form of volume distribution. The zeta potential of the samples were also determined in 10 mM sodium phosphate (pH 7.3) at 25 °C using a Zatasizer Nano ZS.

Liposome expriment

A solution of the liposome in 10 mM sodium phosphate (pH 7.3) (0.55 mM, 50 μ L) was treated with 25, 50, 100, 200 μ M of **1** or **100** in DMSO/10 mM sodium phosphate (pH 7.3) (=1/9). The mixture was incubated for 10 min at room temperature. Particle diameter, PDI and the zeta potential of the samples were determined at 25 °C using a Zatasizer Nano ZS.

MD simulation

MD simulation was performed with a molecular dynamics softoware program, Desmond. Conformational search of plusbacin A₃ was performed with a software program, Prime. Two molecules of plusbacin A₃ were randomly arranged in the simulation box.

Force field: OPLS3 Solvent box: TIP3P (nutrized by 150 mM NaCl) Themostat method: Lagevin 参考文献

(1) Ventola, C. L. Parmacy and Therapeutics 2015, 40, 277, The antibiotic resistance crisis.

(2) Höltje, J. V. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 181, Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*.

(3) Cassidy, P. J.; Kahan, F. M. *Biochemistry* **1973**, *12*, 1364, Stable enzyme-phosphoenolpyruvate intermediate in the synthesis of uridine-5'-diphospho-*N*-acetyl-2-amino-2-deoxyglucose 3-0-enolpyruvyl ether.

(4) Benson, T. E.; Marquardt, J. L.; Marquardt, A. C.; Etzkorn, F. A.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2024, Overexpression, purification, and mechanistic study of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase.

(5) Van Heijenoort, J. *Glycobbiology* **2001**, *11*, 25R, Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan.

(6) Bugg, T. D. H.; Lloyd, A. J.; Roper, D. I. *Infect. Dis. Drug Targets* **2006**, *6*, 85, Phospho-MurNAc-pentapeptide translocase (MraY) as a target for antibacterial agents and antibacterial proteins.

(7) Bouhss, A.; Mengin-Lecreulx, D.; Le Beller, D.; Van Heijenoort, J. *Mol. Microbiol.* **1999**, *34*, 576, Topological analysis of the MraY protein catalysing the first membrane step of peptidoglycan synthesis.

(8) Bugg, T. D. H.; Walsh, C. T. *Nat. Prod. Rep.* **1992**, *9*, 199, Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance.

(9) Sham, L-T.; Butler, E. K.; Lebar, M. D.; Kahne, D.; Bernhardt, T. G.; Ruiz, N. *Science* **2014**, *345*, 220, MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis.

(10) Kuk, A. C. Y.; Mashalidis, E. H.; Lee, S.-Y. *Nat. Struct. Mol. Boil.* **2017**, *24*, 171, Crystal structure of the MOP flippase MurJ in an inward-facing conformation.

(11) Goffin, C.; Ghuysenm J.-M.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 1079, Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs.

(12) Poole, K. Cell. Mol. Life. Sci. 2004, 61, 2200, Resistance to beta-lactam antibiotics.

(13) Nieto, M.; Perkins, H. R. *Biochem. J.* **1971**, *123*, 773. Physicochemical properties of vancomycin and iodovancomycin and their complexes with diacetyl-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine.

(14) Rekharsky, M.; Hesek, D.; Lee, M.; Meroueh, S. O. Inoue, Y.; Mobashery, S. J. Am. Chem. Soc. **2006**, *128*, 7736, Thermodynamics of interaction of vancomycin and synthetic surrogates of bacterial cell wall.

(15) Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J.; Spoering, A. L.; Engels, I.; Conlon, B. P.; Mueller, A.; Hughes, D. E.; Epstein, S.; Jones, M.; Lazarides, L.; Steadman, V. A.; Cohen, D. R.; Felix, C. R.; Fetterman, K. A.; Millett, W. P.; Nitti, A. G.; Zullo, A. M.; Chem. C.; Lewis, K. *Nature* **2015**, *517*, 455. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance.

(16) Pallanza, R.; Berti, M.; Scotti, E.; Arioli, V. J. Antibbiot. **1984**, 37, 318, A-16686, a new antibiotic from Actinoplanes. II. Biological properties.

(17) O'Sullivan, J.; McCullough, J. E.; Tymiak, A. A.; Kirsch, D. R.; Trejo, W. H.; Principe, P. A. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1740, Lysobactin, a novel antibacterial agent produced by Lysobacter sp. I. Taxonomy, isolation and partial characterization.

(18) von Nussbaum, F.; Anlauf, S.; Benet-Buchholz, J.; Häbich, D.; Köbberling, J.; Musza, L.; Telser, J.; Rübsamen-Waigmann, H.; Brunner, N. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2039, Structure and total synthesis of lysobactin

(katanosin B).

(19) Rusin, A.; Singh, G.; Severin, A.; Yang, Y.; Dushin, R. G.; Sutherland, A. G.; Minnick, A.; Greenstein, M.; May, M. K.; Shlaes, D. M.; Bradfold, P. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 728, Mechanism of action of the mannopeptimycins, a novel class of glycopeptide antibiotics active against vancomycin-resistant gram-positive bacteria.

(20) Fuse, S.; Koinuma, H.; Kimbara, A.; Izumikawa, M.; Mifune, Y.; He, H.; Shin-ya, K.; Takahashi, T.; Doi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12011, Total synthesis and stereochemistry revision of mannopeptimycin aglycone.

(21) Shoji, J.; Hinoo, H.; Katayama, T.; Matsumoto, K.; Tanimoto, T.; Hattori, T.; Higashiyama, I.; Miwa, H.; Motokawa, K.; Yoshida, T. *J. Antibot.* **1991**, *45*, 817. Isolation and chracterization of new peptide antibiotics, plusbacin A₁-A₄ and B₁-B₄.

(22) Shoji, J.; Hinoo, H.; Katayama, T.; Nakagawa, Y.; Ikenishi, Y.; Iwatani, K.; Yoshida, T. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 824, Structures of new peptide antibiotics, plusbacins A₁-A₄ and B₁-B₄.

(23) Maki, H.; Miura, K.; Yamano, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1823, Katanosin B and plusbacin A₃, inhibitors of peptidoglycan synthesis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

(24) Muller, A.; Munch, D.; Schmidt, Y.; Reder-Christ, K.; Schiffer, G.; Bendas, G.; Gross, H.; Sahl, H.-G.; Schneider, T.; Brotz-Oesterhelt, H. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 20270, Lipodepsipeptide empedopeptin inhibits cell wall biosynthesis through Ca²⁺-dependent complex formation with peptidoglycan precursors.

(25) Périchon, B.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 4580, VanA-type vancomycin-resistant Staphylococcus aureus.

(26) O'Connor, R. D.; Singh, M.; Chang, J.; Kim, S. J.; VanNieuwenhze, M.; Schaefer, J. J. Phys. Chem. B 2017, 121, 1499, Dual mode of action for plusbacin A3 in *Staphylococcus aureus*.

(27) Wohlrab, A.; Lamer, R.; VanNieuwenhze, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4175, Total synthesis of plusbacin A₃: A depsipeptide antibiotic active against vancomycin-resistant bacteria.

(28) Kim, J. H.; Yang, M. S.; Lee, W. S.; Park, K. H. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1998, 2877, Chirospecific synthesis of 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol and 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-xylitol via one-pot cyclisation.

(29) Kumar, T.; Chandrasekhar, S. *Synthesis* **2012**, *44*, 2889, Asymmetric syntheses of all stereoisomers of 3-hydroxyproline; A constituent of several bioactive compounds.

(30) Ugi, I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, *1*, 8. The α -addition of immonium ions and anions to isonitriles accompanied by secondary reactions.

(31) Nutt, R. F.; Joullié, M. M. J. Am. Chem. Soc. **1982**, 104, 5852, The four-component condensation: A new versatile method for the synthesis of substituted prolyl peptides.

(32) Oliveira, M. T.; Luparia, M.; Aydisio, D.; Maulide, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13149, Dual catalysis becomes diastereodivergent.

(33) Morgen, M.; Bretzke, S.; Li, P.; Menche, D. Org. Lett. 2010, 12, 4494, Stereodivergent synthesis of 1,3-synand -anti-tetrahydropyrimidinones.

(34) Martínez, J. I.; Villar, L.; Uria, U.; Carrillo, L.; Reyes, E.; Vicario, J. L. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 3627, Bifunctional squaramide catalysts with the same absolute chirality for the diastereodivergent access to densely functionalised cyclohexanes through enantioselective domino reactions. Synthesis and mechanistic studies.

(35) Krautwald, S.; Schafroth, M. a.; Sarlah, D.; Carreira, E. M. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 3020, Stereodivergent α -allylation of linear aldehydes with dual iridium and amine catalysis.

(36) Engl, O. D.; Fritz, S. P.; Käslin, A.; Wennemers, H. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5454, Organocatalytic route to dihydrocoumarins and dihydroquinolinones in all stereochemical configurations.

(37) Dömling, A; Ugi, I. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2000, 39, 3168, Multicomponent reactions with isocyanides.

(38) Bock, H.; Ugi, I. J. Prakt. Chem. 1997, 339, 385, Multicomponent reactions. II. Stereoselective synthesis of

1(S)-camphor-2-cis-methylidene-isocyanide and its application in Passerini- and Ugi-reaction.

(39) Medeiros, G. A; da Silva, W. A; Bataglion, G. A; Ferreira, D. A. C.; de Oliveira, H. C. B.; Eberlin, M. N.; Neto,

B. A. D. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 338, Probing the mechanism of the Ugi four-component reaction with charge-tagged reagents by ESI-MS(/MS).

(40) van Rijssel, E. R.; Goumans, T. P. M.; Lodder, G.; Overkleeft, H. S.; Van Der Marel, G. A.; Codée, J. D. C. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3026, Chiral pyrroline-based Ugi-three-component reactions are under kinetic control.

(41) Chéron, N.; Ramozzi, R.; Kaïm, L. El; Grimaud, L.; Fleurat-Lessard, P. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1361, Challenging 50 years of established views on Ugi reaction: A theoretical approach.

(42) Larsen, C. H.; Ridgway, B. H.; Shaw, J. T.; Smith, D. M.; Woerpel, K. A. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 10879, Stereoselective C-glycosylation reactions of ribose derivatives: Electronic effects of five-membered ring oxocarbenium ions.

(43) Szcześniak, P.; Maziarz, E.; Stecko, S.; Furman, B. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 3621, Synthesis of polyhydroxylated piperidine and pyrrolidine peptidomimetics via one-pot sequential lactam reduction/Joullié-Ugi reaction.

(44) Schedler, D. J. A.; Godfrey, A. G.; Ganem, B. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5035, Reductive deoxygenation by Cp₂ZrHCl : Selective formation of imines via zirconation/hydrozirconation of amides.

(45) Davies, C. D.; Elliott, M. C.; Hill-Cousins, J.; Khan, M. U. a; Maqbool, T.; Wood, J. L. *Synlett* **2008**, *14*, 2028, A concise diastereoselective approach to the left-hand side of batzelladine A.

(46) Gilman, H.; Smith, C. L. J. Chem. Inf. Model. 1989, 53, 160, Tetrakis(trimethylsilyl)silane.

(47) Frey, J.; Schottland, E.; Rappoport, Z.; I, D. B.-Z.; Nakash, M.; Botoshansky, M.; Kaftory, M.; Yitzhak Apeloig. **1994**, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 2555, The effective 'size' of the tris(trimethylsilyl)silyl group in several molecular environment.

(48) Boxer, M. B.; Yamamoto, H. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 48, Tris(trimethylsilyl)silyl-governed aldehyde cross-aldol cascade reaction.

(49) Hammett, L. P. Chem. Rev. 1935, 17, 125, Some relations between reaction rates and equilibrium constants.

(50) Lin, C. Y.; Giuliano, M. W.; Ellis, B. D.; Miller, S. J.; Anslyn, E. V. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 4085. From substituent effects to applications: enhancing the optical response of a four-component assembly for reporting *ee* values

(51) Brak, K.; Jacobsen, E. N. Angew. Chemie Int. Ed. 2013, 52, 534, Asymmetric ion-pairing catalysis.

(52) Kendale, J. C.; Valentín, E. M.; Woerpel, K. A. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3684, Solvent effects in the nucleophilic substitutions of tetrahydropyran acetals promoted by trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate: trichloroethylene as solvent for stereoselective *C*- and *O*-glycosylations.

(53) Tam, J. P.; Wong, T-W.; Riemen, M. W.; Tjoeng, F-S.; Merrifield, R. B. *Tetraahedron Lett.* **1979**, *42*, 4033, Cyclohexyl ester as a new proteting group for aspartyl peptide to minimize aspartimide formation in acidic and basic

treatments.

(54) Zhao, M.; Peng, S.; Wang, Y. J. Prakt. Chem. 1999, 341, 668, Studies on the hybrid peptides of fibrinogen fragments.

(55) Srivastava, A. K.; Panda, G. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4675, Total synthesis of (–)-balanol, all stereoisomers, their *N*-tosyl analogues, and fully protected ophiocordin: An easy route to hexahydroazepine cores from garner aldehydes.

(56) Nishiyama, T.; Ishizuka, S.; Shikama, S.; Kurita, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 233, An efficient synthesis of *N-tert*-butoxycarbonyl-*O*-cyclohexyl-L-tyrosine.

(57) Ikawa, T.; Sajiki, H.; Hirota, K. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2217, Highly chemoselective hydrogenation method using novel finely dispersed palladium catalyst on silk-fibroin: Its preparation and activity.

(58) Cochet, T.; Bellosta, V.; Greiner, A.; Roche, D.; Cossy, J. *Synlett* **2011**, 1920, *N*-Formylsaccharin: A new formylating agent.

(59) Pirali, T.; Tron, G. C.; Masson, G.; Zhu, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5275, Ammonium chloride promoted threecomponent synthesis of 5-iminooxazoline and its subsequent transformation to macrocyclodepsipeptide.

(60) Martin, O. R.; Zhou, W.; Wu, X.; Front-Deschamps, S.; Moutel, S.; Schindl, K.; Jeandet, P.; Zbaeren, C.; Bauer, J. A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6000, Synthesis and immunobiological activity of an original series of acyclic lipid a mimics based on a pseudodipeptide backbone.

(61) Nelson, S. G.; Peelen, T. J.; Wan, Z. J. Am. Chem. Soc. **1999**, 121, 9742, Catalytic asymmetric acyl halidealdehyde cyclocondensations. A strategy for enantioselective catalyzed cross aldol reactions.

(62) Chatterjee, A. K.; Choi, T. L.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 11360, A general model for selectivity in olefin cross metathesis.

(63) Atkins, G. M. Jr.; Burgess, E. M. J. Am. Chem. Soc. **1968**, 90, 4744, The reaction of an N-sulfonylamine inner salt.

(64) Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *78*, 4155, Readily accessible 12-I-5¹ oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones.

(65) Kraus, G. A.; Roth, B. J. Org. Chem. 1980, 45, 4825, Synthetic studies toward vertucarol. 2. Synthesis of the AB ring system.

(66) Yanada, R.; Negoro, N.; Bessho, K.; Yanada, K. *Synlett* **1995**, 1261, Mettallic samarium and iodine in alcohol. deacylation and dealkyloxycarbonylation of protected alcohols and lactams.

(67) Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3797, An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent : Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride.

(68) Feichtinger, K.; Zapf, C.; Sings, H. L.; Goodman, M. J. Org. Chem. **1998**, 63, 3804, Diprotected triflylguanidines: A new class of guanidinylation reagents.

(69) Carpino, L. A.; El-Faham, A. J. Am. Chem. Soc. **1995**, 117, 5401, Tetramethylfluoroformamidinium hexafluorophosphate: A rapid-acting peptide coupling reagent for solution and solid phase peptide synthesis.

(70) Carpino, L. A.; Sadat-Aalaee, D.; Chao, H. G.; Deselms, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651, ((9-Fluorenylmethyl)oxy)carbonyl (Fmoc) amino acid fluorides. Convenient new peptide coupling reagents applicable to the Fmoc/*tert*-butyl strategy for solution and solid-phase syntheses.

(71) Hiebl, J.; Alberts, D. P.; Banyard, A. F.; Baresch, K.; Baumgartner, H.; Bernwieser, I.; Bhatnagar, P. K.; Blanka, M.; Bodenteich, M.; Chen, T.; Esch, P. M.; Kollmann, H.; Lantos, I.; Leitner, K.; Mayrhofer, G.; Patel, R.; Rio, A; Rovenszky, F.; Stevenson, D.; Tubman, K. D.; Undheim, K.; Weihtrager, H.; Welz, W.; Winkler, K. *J. Pept. Res.* 1999, *54*, 54, Large-scale synthesis of hematoregulatory nonapeptide SK&F 107647 by fragment coupling.

(72) Tsunoda, T.; Nagaku, M.; Nagino, C.; Kawamura, Y.; Ozaki, F.; Hioki, H.; Ito, S. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2531, Carbon-carbon bond formation with new Mitsunobu reagents.

(73) de Leseleuc, M.; Collins, S. K. ACS Catal. 2015, 5, 1462, Direct macrolactonization of seco acids via hafnium(IV) catalysis.

(74) Borthwick, A. D.; Davies, D. E.; Exall, A. M.; Hatley, R. J. D.; Hughes, J. A.; Irving, W. R.; Livemore, D. G.; Sollis, S. L.; Nerozzi, F.; Valko, K. L.; Allen, M. J.; Perren, M.; Shabbir, S. S.; Woollard, P. M.; Price, M. A. *J. Med. Chem.* **2006**, *46*, 4159. 2,5-Diketopiperazines as potent, selective, and orally bioavailable oxytocin antagonists. 3. Synthesis, pharmacokinetics, and in vivo potency.

(75) Pirrung, M. C.; Ghorai, S. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 11772, Versatile, fragrant, convertible isonitriles.

(76) Lindhorst, T.; Bock, H.; Ugi, I. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7411, A new class of convertible isocyanides in the Ugi four-component reaction.

(77) van der Heijden, G.; Jong, J. A. W. (Sjaak); Ruijter, E.; Orru, R. V. A. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 984. 2-Bromo-6isocyanopyridine as a universal convertible isocyanide for multicomponent chemistry.

(78) Rikimaru, K.; Yanagisawa, A.; Kan, T.; Fukuyama, T. *Heterocycles* **2007**, *73*, 403, A versatile synthesis of α -amino acid derivatives via the Ugi four-component condensation with a novel convertible isonitrile.

(79) Hiron, A.; Falord, M.; Valle, J.; Débarbouillé, M.; Msadek, T. *Mol. Microbiol.* **2011**, *81*, 602, Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: a novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters.

(80) Breukink, E.; de Kruijff, B. Nat. Rev. Drug Discov. 2006, 5, 321, Lipid II as a target for antibiotics.

(81) VanNieuwenhze, M. S.; Maulidin, S. C.; Zia-Ebrahimi, M., Aikins, J. A.; Blaszczak, L. C. J. Am. Chem. Soc. **2001**, *123*, 6983, The total synthesis of lipid I.

(82) VanNieuwenhze, M. S.; Maulidin, S. C.; Zia-Ebrahimi, M., Winger, B. E.; Hornback, W. J.; Saha, S. L.; Aikins, J. A.; Blaszczak, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3656, The first total synthesis of lipid II: The final monomeric intermediate in bacterial cell wall biosynthesis.

(83) Hitchcock, S. A.; Eid, C. N.; Aikins, J. A.; Zia-Ebrahimi, M.; Blaszczak, L. C. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 1916, The first total synthesis of bacterial cell wall precursor UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide (Park nucleotide).

(84) Li, K.; Kurosu, M. *Heterocycles* **2008**, *76*, 455, Synthetic studies on *Mycoabcterium Tuberculosis* specific fluorescent Park's nucleotide probe.

(85) Brandish, P. E.; Burnham, M. K.; Lonsdale, J. T.; Southgate, R.; Inukai, M.; Bugg, T. D. H.; *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7609, Slow binding inhibition of phospho-*N*-acetylmuramyl-pentapeptide-translocase (*Escherichia coli*) by mureidomycin A.

(86) Wohnig, S.; Spork, A. P.; Koppermann, S.; Mieskes, G.; Nicolas, G.; Jahn, R.; Ducho, C. *Chem. Eur. J.* 2016, 22, 17813, Totay synthesis of dansylated Park's nucleotide for high-throughput MraY Assays.

(87) Mitachi, K.; Siricilla, S.; Klaić, L.; Clemons, W. M.; Kurosu, M. Tetrahedron Lett. 2015, 56, 3441,

Chemoenzymatic synthesis of water-soluble lipid I fluorescent probes.

(88) Mitachi, K.; Mohan, P.; Siricilla, S.; Kurosu, M.; *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4554, One-pot protection-glycosylation reaction for synthesis of lipid II analogues.

(89) Liu, C.-Y.; Guo, C.-W.; Chang, Y.-F.; Wang, J.-T.; Shih, H.-W.; Hsu, Y.-F.; Chen, C.-W.; Chen, S.-K.; Wang, Y.-C.; Cheng, T.-J. R.; Ma, C.; Wong, C.-H.; Fang, J.-M.; Cheng, W.-C. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1608, Synthesis and evaluation of a new fluorescent transglycosylase substrate: Lipid II-based molecule possessing a dansyl-C20 polyprenyl moiety.

(90) Saha, S. L.; VanNieuwenhze, M. S.; Hornback, W. J.; Aikins, J. A.; Blaszczak, L. C. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3575, Synthesis of an orthogonally protected precursor to the glycan repeating unit of the bacterial cell wall.

(91) Angell, Y. M.; Han, Y. H.; Albericio, F.; Barany, G. *Peptides Frontiers of Peptide Science* **2006**, 339, Minimization of cycstein racemization during stepwise solid-phase peptide synthesis.

(92) Bosco, M.; Massarweh, A.; Iatmanen-Harbi, S.; Bouhss, A.; Chantret, I.; Busca, P.; Moore, S. E. H.; Gravier-Pelletier, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 952, Synthesis and biological evaluation of chemical tools for the study of dolichol linked oligosaccharide diphosphate (DLODP).

(93) Sekine, M.; Ohkubo, A.; Seio, K. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5478, Proton-block strategy for the synthesis of oligodeoxynucleotides without base protection, capping reaction, and P-N bond cleavage reaction.

(94) Chen, K.-T.; Chen, P.-T.; Lin, C.-K.; Huang, L.-Y.; Hu, C.-M.; Chang, Y.-F.; Hsu, H.-T.; Cheng, T.-J. R.; Wo, Y.-T.; Cheng, W.-C. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31579, Structural investigation of Park's nucleotide on bacterial translocase MraY: Discovery of unexpected MraY inhibitors.

(95) Auger, G.; Crouvoisier, M.; Caroff, M.; van Heijenoort, J.; Blanot, D. *Lett. Pept. Sci.* **1997**, *4*, 371, Synthesis of an analogue of the lipoglycopeptide membrane intermediate I of peptidoglycan biosynthesis.

(96) Takatsuki, A.; Arima, K.; Tamura, G. J. Antibiot. **1971**, 24, 215, Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and chranterization of tunicamycin.

(97) Nitani, Y.; Kikuchi, T.; Kakoi, K.; Hanamaki, S.; Fujisawa, I; Aoki, K. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1422, Crystal structure of the complexes between vancomycin and cell-wall precursor analogs.

(98) Kim, S. J.; Singh, M.; Wohlrab, A.; Yu, T.-Y.; Patti, G. J.; O'Connor, R. D.; VanNieuwenhze, M.; Schaefer, J. *Biochemisty* **2013**, *52*, 1973, The isotridecanyl side chain of plusbacin-A₃ is essential for the transglycosylase inhibition of peptidoglycan biosynthesis.

(99) Shan, Y.; Kim, E. T.; Eastwood, M. P.; Dror, R. O.; Seeliger, M. A.; Shaw, D. E. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9181, How dose a drug molecule find its target binding site.

(100) Kohlhoff, K. J.; Shukla, D.; Lawrenz, M.; Bowman, G. R.; Konerding, D. E.; Belov, D.; Altman, R. B.; Pande, V. S. *Nat. Chem.* 2014, *6*, 15, Cloud-based simulation on Google Exacycle reveal ligand-modulation of GPCR activation pathways.

(101) Witzke, S.; Petersen, M.; Carpenter, T. S.; Khalid, S. *Biochemistry* **2016**, *55*, 3303, Molecular dynamics simulations reveal the conformational flexibility of lipid II and its loose association with the defensin plectasin in the *Staphylococcus aureus* membrane.

(102) Hsu, S.-T. D.; Breukink, E.; Tischenko, E.; Lutters, M. A. G.; de Kruijff, D.; Kaptein, R.; Bonvin, A. M. J. J.; van Nuland, N. A. J. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel

antibiotics.

(103) Wohlrab, A. M. UC San Diego Electronic Theses and Dissertations 2017, Total synthesis of depsipeptide antibiotics.

筆者の論文

(104) Katsuyama, A.; Sato, K.; Yakushiji, F.; Matsumaru, T.; Ichikawa, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2018**, *66*, 84. Solid-phase modular synthesis of Park nucleotide and lipid I and lipid II analogues.

(105) Katsuyama, A.; Paudel, A.; Panthee, S.; Hamamoto, H.; Kawakami, T.; Hojo, H.; Yakushiji, F.; Ichikawa, S. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 3771, Total synthesis and antibacterial investigation of plusbacin A₃.

(106) Katsuyama, A.; Matsuda, A.; Ichikawa, S. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2552, Revisited mechanistic implications of the Joullié–Ugi three-component reaction.