

**CYCLISCHE PEPTIDE ALS GLYKOMIMETIKA
FÜR DIE L2/HNK-1-ERKENNUNGSSEQUENZ:
SYNTHESE UND
OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZSTUDIEN**

Der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld vorgelegte

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Doctor rerum naturalium)

vorgelegt von

Dirk Bächle

Bielefeld im Juli 2004

*„Selbst in die arterhaltende Erotik
erregen uns runde Formen.*

*Warum soll ich, ein denkender Mensch,
es denen nachmachen,
die unsere Welt eckig machen?*

*Ich setze den Kampf von
Galileo Galilei fort,
auch meine Welt ist rund.“*

Luigi Colani

Für Ulrike, Clara-Luise, Matilda und Greta

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von
Oktober 2000 bis Juni 2004
an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld
unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. Norbert Sewald
angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Norbert Sewald für die sehr interessante Themenstellung, die gute Betreuung und sein stetes Interesse. Vor allem möchte ich mich aber für sein sehr soziales Verhalten, die Möglichkeit des zwangsfreien Arbeitens und das mir immer entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Eine so positive Arbeitsatmosphäre schafft Kraft auch in Momenten, in denen ein Weiterkommen nicht möglich scheint.

Herrn Professor Dr. Jochen Mattay danke ich für die Übernahmen des Korreferates.

Frau Professor Dr. Melitta Schachner (Zentrum für molekulare Neurobiologie, Institut für Biosynthese neuraler Strukturen, Universität Hamburg) und Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung der Peptidsequenzen und die Versorgung mit dem L2-412-Antikörper. Besonders möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei Frau Dr. Gabriele Loers bedanken, die es mit viel Fleiß geschafft hat, noch rechtzeitig die Neuritenwachstumsexperimente durchzuführen. Zudem bedanke ich mich bei ihr für die Hilfe bei neurologischen Fragen und für die zur Verfügung gestellten Ergebnisse der Zelltests, so dass diese in dieser Arbeit dargestellt werden konnten.

Anke Nieß gilt mein uneingeschränkter Dank für ihre Hilfe im Labor. Sie stand mir immer mit ihrer Erfahrung und Hilfsbereitschaft zur Seite. Auch in den stressigsten Situationen kann man sich auf sie verlassen.

Bei Dr. Micha Jost bedanke ich mich für das sorgfältige Korrekturlesen einiger Teile des Manuskripts.

Thomas Huber danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren, vor allem aber für die Ratschläge zum *Layout* dieser Arbeit.

Kai Jenssen gilt mein Dank für die Diskussionen und Hilfe bezüglich des Peptid-Linkers.

Dr. Katherina Sewald danke ich für ihr Bemühen, mich in die Künste des Biacore®-Geräts einzuführen, sowie für Anregungen und Hilfestellungen auf diesem Gebiet.

Miriam Hagenstein danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Druckvorlage dieser Arbeit.

Den weiteren ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe OCIII danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, für Anregungen und fachliche Diskussionen.

Lutz Wobbe danke ich für die Synthese einiger Peptide während seines sechswöchigen Blockpraktikums.

Gerd Lipinski und Peter Mester danke ich für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren.

Meinen Eltern danke ich für das sehr gute Elternhaus, das ein Grundstein meines Werdegangs ist, sowie die stete finanzielle Unterstützung während meiner Studienzeit, ohne die mein Studium nur schlecht möglich gewesen wäre.

Last, but not least danke ich Ulrike, Clara-Luise, Matilda und Greta für die Freude am Leben, die Aufmunterungen und das Beisammensein - vor allem aber für das Ertragen meiner Launen während des Zusammenschreibens dieser Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Äquiv.	Äquivalent
Ak	Antikörper
Al	Allyl
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>attenuated total reflection</i> (abgeschwächte Totalreflexion)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorosphat
br	breit
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderserumalbumin)
Bum	N- <i>tert</i> -Butoxymethyl
Bzl	Benzyl
CDR	<i>Complementarity-Determining Region</i> (komplementaritätsbestimmende Region)
CHCA	α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
CMTR	5,6-Carboxytetramethylrhodamin
Con A	Concanavalin A
d	Dublett (NMR)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatografie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
Dmab	4- {[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]amino} benzyl
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMB	2,4-Dimethoxybenzyl
DMF	N,N-Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribunucleinsäure)
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i> (dorsales Wurzelganglion)
DTT	Dithiothreitol
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
EDT	1,2-Ethandithiol
Fa.	Firma
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FDU	5'-Fluoro-2'-desoxyuridin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktose
GlcA	Glucuronsäure
GlcNAc	N-Acetylglucose
guan.	guanidinyliert
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-3-oxid-hexafluorphosphat
HBS	HEPES <i>Buffered Saline</i> (HEPES gepufferte Salzlösung)
HBTU	1-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-1 <i>H</i> -benzotriazol-3-oxid-hexafluorphosphat
HCMV	humaner Cytomegalovirus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
HNK	<i>Human Natural Killer Cell</i> (humane natürliche Killerzelle)
HOAt	1-Hydroxy-7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazol
HOBt	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie)
Ig	Immunglobulin
IR	Infrarot-Spektroskopie
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
Le	Lewis-Antigen

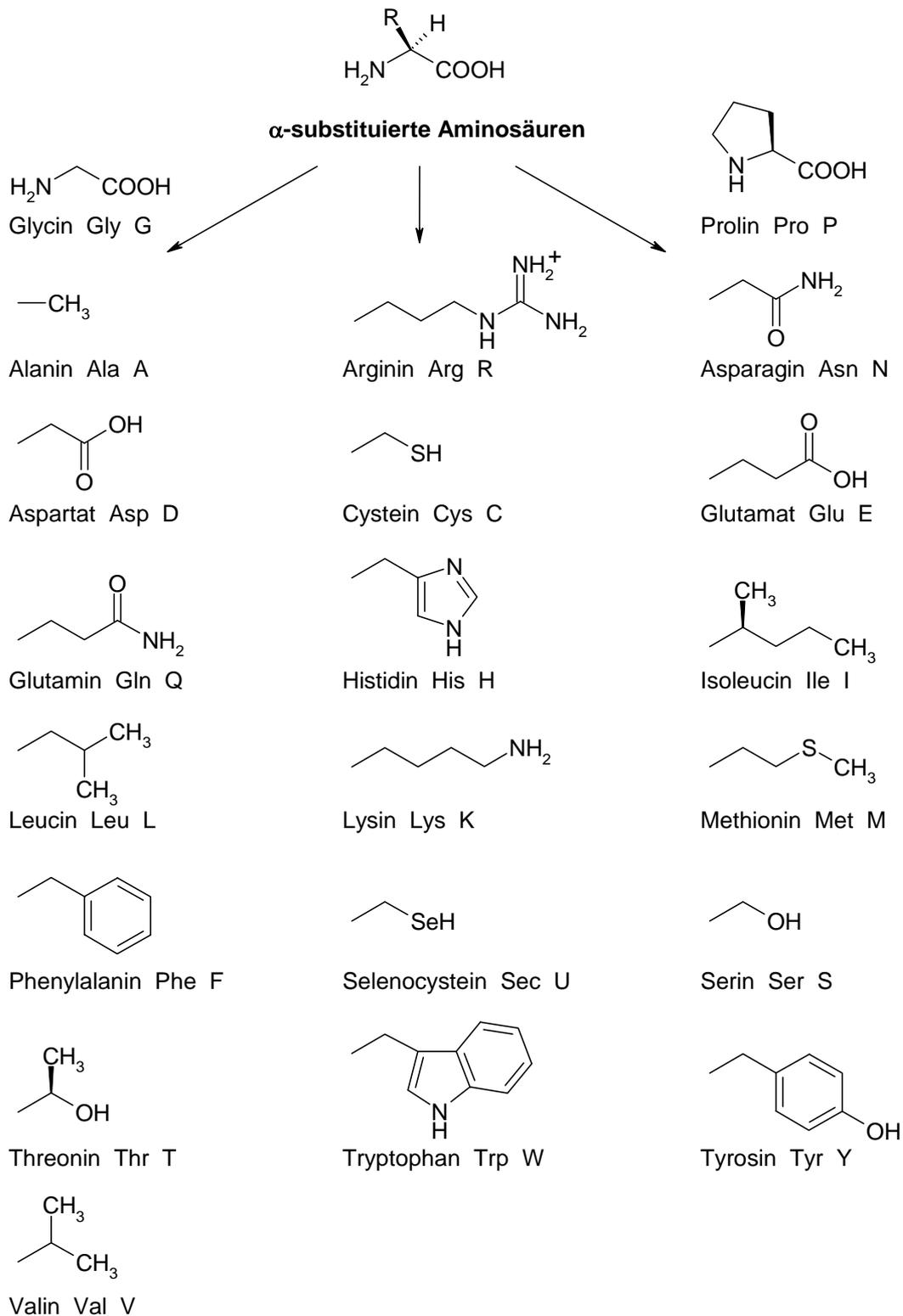
m	Multipllett (NMR)
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption Ionization</i> (matrixunterstützte Laserdesorptions-ionisation)
MCPS	<i>Neisseria meningitidis</i> Kapselpolysaccharid
MS	Massenspektrometrie
NeuAc	Neuraminsäure
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMP	N-Methyl-pyrrolidin-2-on
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (magnetische Kernresonanz)
pAk	polyklonaler Antikörper
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-yl-sulfonyl
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PDEA	2-(Pyridin-2-yl-disulfanyl)-ethylamin
PEG	Polyethylenglykol
PLO	Poly-L-ornithin
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-yl-sulfonyl
PNS	peripheres Nervensystem
pSG	permanente Schutzgruppe
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorphosphat
R ²	Korrelationskoeffizient (lineare Regression)
R _f	Retentionsfaktor (Dünnschichtchromatografie)
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i> (Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie)
RPPD	randomisiertes Peptid <i>Phage-Display</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Response Unit</i>
s	Singulett (NMR)
SGGL	sulfatiertes Glucuronylglycosphingolipid
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese)
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)

UV	Ultraviolett
V _H	variable Region der schweren Kette
t	Triplett (NMR)
TBTU	1-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-1 <i>H</i> -benzotriazol-3-oxid-tetrafluorborat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCFH	Tetramethylchloroformamidiniumhexafluorosphat
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilan
ToF	<i>Time of Flight</i> (Flugzeit)
t _R	Retentionszeit (HPLC)
TR	Totalreflexion
Trt	Trityl
tSG	temporäre Schutzgruppe
Xaa	beliebige Aminosäure
ZNS	zentrales Nervensystem

Aminosäuren

Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode	Aminosäure
Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Aspartat
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutamat
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Sec	U	Selenocystein
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

Struktur der DNA-codierten α -Aminosäuren



Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	ALLGEMEINER TEIL.....	3
2.1	L2/HNK-1-Kohlenhydrat-Erkennungssequenz	3
2.1.1	Struktur des L2/HNK-1-Epitops.....	4
2.1.2	Funktion des L2/HNK-1-Epitops.....	5
2.1.3	Molekulare Interaktionen des L2/HNK-1-Epitops im Nervensystem	7
2.1.4	Funktion des L2/HNK-1-Epitops während der Reinnervation des PNS und des Wachstums von Motoaxonen	9
2.1.5	Antikörper gegen L2/HNK-1-Kohlenhydrate.....	11
2.1.6	Isolierung und Synthese der L2/HNK-1-Kohlenhydrate.....	12
2.2	Molekulare Mimikry von Kohlenhydraten durch Peptide	14
2.2.1	Molekulare Grundlagen.....	18
2.3	Peptide	22
2.3.1	Peptidsynthese	23
2.3.2	Festphasenpeptidsynthese	26
2.3.3	Schutzgruppen.....	28
2.3.4	Cyclopeptide	31
2.4	Oberflächenplasmonresonanz	35
2.4.1	Immobilisierung	38
2.4.2	Massentransfer-Limitierung.....	40
3	AUFGABENSTELLUNG.....	43
4	SPEZIELLER TEIL	45
4.1	Glykomimetikasequenzen	45
4.2	Peptid-Design	47

4.3	Synthese stereoisomerer Peptidbibliotheken.....	50
4.3.1	Zielstrukturen	50
4.3.2	Allgemeine Festphasenpeptidsynthese.....	53
4.3.3	Permanente Schutzgruppen.....	53
4.3.4	Racemisierung.....	55
4.3.5	Knüpfung der ersten Aminosäure an das 2-Chlortrityl-Harz.....	57
4.3.6	Aufbau der linearen Peptidsequenz.....	57
4.3.7	Cyclisierung der Peptide.....	58
4.3.8	Synthese der linearen Ausgangspeptide	70
4.4	Synthese Histidin-haltiger Cyclopeptide	72
4.4.1	Racemisierung und Schutzgruppen von Histidin.....	72
4.4.2	Guanidinylierung.....	74
4.4.3	Synthesestrategien	76
4.4.4	Hydrazinolyse der Guanidiniumgruppe des Nebenprodukts.....	83
4.5	Oberflächenplasmonresonanzstudien	85
4.5.1	Immobilisierung des L2-412-Antikörpers	86
4.5.2	Test der Massentransfer-Limitierung	89
4.5.3	Bindungsstudien der Peptidbibliothek.....	92
4.5.4	Datenanalyse	95
4.5.5	SPR-Analyse der Glykomimetika-Ausgangssequenzen.....	96
4.5.6	SPR-Analyse der TFKLSETTLEYY-Reihe.....	98
4.5.7	SPR-Analyse der TFQLSTRITLPFS-Reihe	100
4.5.8	SPR-Analyse der FLHTRLFV-Reihe.....	102
4.6	Inverse SPR-Experimente	103
4.6.1	Alanin-Scan des Peptids c(SETTIL).....	104
4.6.2	Synthese des Linker-verknüpften Peptids	106
4.6.3	SPR-Experimente mit immobilisiertem Peptid	107
4.7	Neuritenwachstumsexperimente	109
4.7.1	Neuritenwachstumsexperimente mit motorischen Mäuseneuronen.....	109
4.7.2	Peptide der TFKLSETTLEYY-Reihe	110
4.7.3	Peptide der TFQLSTRITLPFS- und FLHTRLFV-Reihe.....	112
4.7.4	Polaritäten der motorischen Mäuseneuriten	115

4.7.5	Neuritenwachstumsexperimente mit humanen Motoneuronen	115
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	117
6	EXPERIMENTELLER TEIL	124
6.1	Materialien und Methoden	124
6.2	Allgemeine Peptidsynthese	128
6.2.1	Allgemeine Synthesevorschriften.....	128
6.2.2	Automatisierte Festphasenpeptidsynthese	130
6.2.3	Cyclisierung der Peptide.....	131
6.2.4	Spaltung geschützter Peptide vom 2-Chlortrityl-Harz	132
6.3	Synthese der Peptide.....	134
6.4	Synthese der Histidin-enthaltenden Cyclopeptide	154
6.4.1	Synthese des Dmab-Linkers	154
6.5	Oberflächenplasmonresonanzmessungen:	172
6.5.1	pH- <i>Scouting</i>	172
6.5.2	Immobilisierung des L2-412-Antikörpers	172
6.5.3	Massentransferexperimente	173
6.5.4	Bindungsexperimente	173
6.5.5	Tabellarische Zusammenfassung der Bindungsexperimente.....	174
6.5.6	Immobilisierung des Linker-Peptids	175
6.5.7	Bindungsexperimente mit Ak L2-412.....	175
6.6	Neuritenwachstumsexperimente	176
6.6.1	Tabellarische Zusammenfassung der Neuritenwachstumsexperimente	176
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	178

1 EINLEITUNG

Die zunehmende Aufklärung molekularer Wechselwirkungen von Peptiden in biologischen Systemen weckt das Interesse, sie als körpereigene Wirkstoffe in der Therapie einzusetzen. Dem gezielten Einsatz von Peptiden als Pharmaka zur Behandlung pathologischer Erkrankungen steht jedoch deren geringe metabolische Stabilität entgegen, da diese zügig von körpereigenen Proteasen im Gastrointestinaltrakt und im Serum abgebaut werden. Zudem fehlen häufig Transportsysteme zum Überwinden von Körperbarrieren. Kleine, lineare Peptide, die leicht synthetisch zugänglich sind, haben außerdem keine definierte Sekundärstruktur und können dadurch zu unspezifischen Interaktionen mit verschiedenen Rezeptoren führen, was einem gezielten Therapieeinsatz entgegensteht.

Es ist daher unbedingt notwendig, Zielpeptide chemisch so zu modifizieren, dass die Bioverfügbarkeit verbessert und die Selektivität erhöht wird. Allein durch die Cyclisierung von Peptiden wird deren metabolische Stabilität entscheidend erhöht, da sie Proteasen keine Angriffsfläche mehr bieten. Der Austausch von L- durch D-Aminosäuren führt des Weiteren zu einer deutlichen Einschränkung der konformationellen Freiheit cyclischer Peptide und neben einer weiter gesteigerten Proteasestabilität unter Umständen zu einer starken Erhöhung der Selektivität bezüglich verwandter Rezeptoren. Es ist außerdem möglich, die Struktur des Peptidgerüsts so zu verändern, dass die peptidische Struktur nicht mehr erkennbar ist. Dabei ist allein das Vorhandensein der pharmakophoren Gruppen in der richtigen dreidimensionalen Anordnung solcher Peptidomimetika ausreichend für die spezifische Wechselwirkung von Substrat und Rezeptor unter Beibehalt des physiologischen Effekts.

Es ist heute durch ausgereifte Techniken möglich, Einblicke in Funktion und Struktur biologisch relevanter Protein- bzw. Peptidsysteme auf molekularer Ebene zu bekommen und durch gezielte Synthese von Protein- bzw. Peptidstrukturen darauf Einfluss zu nehmen. Durch Biosensoren ist es überdies möglich, Echtzeit-Informationen von Substrat-Protein-Interaktionen zu erhalten, um sich so mit minimalem Substanzbedarf thermodynamische und kinetische Informationen von Testsystemen zu verschaffen.

Ein aktuelles Gebiet der Peptidchemie ist der Einsatz von Peptiden als Mimetika biologisch relevanter Strukturen. Aufgrund der schier endlosen Anzahl von Kombinationen proteinogener Aminosäuren ist es möglich, durch *Screenings* von biologischen makromolekularen Rezeptoren gegen riesige randomisierte Peptidbibliotheken potentielle Peptidliganden zu generieren. Dadurch identifizierte Peptidsequenzen können als Startpunkte für weiterführende Studien dienen, um die Wechselwirkungen zu spezifizieren.

Werden derartige *Screenings* auf Rezeptoren für spezifische Kohlenhydratsequenzen angewandt, lassen sich unter Umständen Peptidsequenzen erhalten, die an entsprechenden Rezeptoren binden und folglich als Glykomimetika wirken. Dadurch kann sich Zutritt verschafft werden zu der großen Zahl von Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen im lebenden Organismus, die für eine Vielzahl wichtiger biologischer Prozesse von entscheidender Bedeutung sind. Somit ließen sich durch relativ leicht zugängliche Peptide z. B. spezifische kohlenhydratvermittelte Wechselwirkungen von Zellen beeinflussen, ohne in mühsamen Prozessen die Kohlenhydrate isolieren oder synthetisieren zu müssen.

In dieser Arbeit wird die Synthese und die biosensorische Untersuchung einer Peptidbibliothek vorgestellt. Dabei werden glykomimetische Peptide modifiziert, um diese in affinere und spezifischere Substanzen zu überführen. Die Ausgangspeptide dienen als Kohlenhydratmimetika für die L2/HNK-1-Kohlenhydratsequenz, die in vielen biologischen Abläufen eine wichtige Rolle spielt. Durch die Optimierung der Struktur der Peptidliganden wäre es möglich, eine potentielle Ausgangsverbindung zu erhalten, die als Ausgangspunkt für weitere pharmakologische Untersuchungen dienen könnte. Sie könnte somit zu einem Therapeutikum führen, mit dem es möglich wäre, das Wachstum verletzter motorischer Nerven zu beschleunigen, um Lähmungen von Patienten zu heilen. Des Weiteren wäre es vorstellbar, schwere neurale Erkrankungen zu behandeln, die mit einer Demyelinierung der Nerven einhergehen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Synthese der Peptide und der Untersuchung ihrer biologischen Aktivität, um sie neuronalen Zellexperimenten zuzuführen.

2 ALLGEMEINER TEIL

2.1 L2/HNK-1-Kohlenhydrat-Erkennungssequenz

Moleküle der neuronalen Erkennung sind Kohlenhydrat-tragende Glykoproteine, Glykolipide oder Proteoglykane, die auf der Zelloberfläche oder in der extrazellulären Matrix zu finden sind. Diese Moleküle regulieren Zellwechselwirkungen während der Entwicklung, die Modifizierungen der synaptischen Aktivität, das Wachstum und die Regeneration beschädigter Nervenverbindungen.

Ein funktionell interessantes Glykan dieser molekularen Erkennungsmaschinerie des neuronalen Systems ist das L2/HNK-1-Kohlenhydrat. Entdeckt wurde es 1981 von Abo und Balch, als diese einen monoklonalen IgM-Antikörper aus Mäusen isolierten, der gegen ein Membranantigen einer kultivierten humanen T-Zelllinie gerichtet ist. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper spezifisch mit einem Antigen auf einer Untergruppe humaner natürlicher Killerzellen interagiert, wovon sich der Name HNK-1 (*human natural killer cells*) ableitet. Zudem wurde die proteolytische Stabilität des L2/HNK-1-Epitops erkannt, was auf seine nichtpeptidische Struktur hindeutete.^[1] 1984 wurde durch biochemische Analysen an Glykoproteinen, die das Epitop des HNK-1-Antikörpers tragen, gezeigt, dass das Antigen ein Kohlenhydrat ist und weitere Antikörper, die L2-Antikörper, gegen das Epitop etabliert.^[2] Obwohl zunächst als Antikörper in der Leukozyten-Forschung entwickelt, konnte bald nach der Entdeckung gezeigt werden, dass der HNK-1-Antikörper viele Zellen des neuronalen Systems markierte.^[3] Tabelle 1^[4] zeigt eine Auswahl L2/HNK-1-tragender Glykoproteine, Proteoglykane und Glykolipide.

Tabelle 1: Auswahl von Molekülen, die das L2/HNK-1-Epitop tragen.

Molekylart:	Moleküle:
I Glykoproteine	
a) integrale Membran-Glykoproteine	Mitglieder der Ig-Überfamilie: <i>neural cell adhesion molecule</i> (N-CAM) ^[2] <i>neuron-glia-CAM</i> (Ng-CAM) ^[5] <i>nerve growth factor-inducible large external glycoprotein</i> (NILE) ^[6] <i>ng-CAM related-CAM</i> (Nr-CAM) ^[7] <i>myelin-associated glycoprotein</i> (MAG) ^[8] andere: <i>peripheral myelin glycoprotein</i> (P ₀) ^[9] <i>myelin/oligodendrocyte glycoprotein</i> (MOG) ^[10] <i>Schwann cell membrane glycoprotein</i> (SAG) ^[11] $\alpha 1 \beta 1$ integrin ^[12]
b) Glykoproteine der extrazellulären Matrix	<i>J1, tenascin, cytotoxin, myotendinous antigen, hexabranchion, human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen</i> ^[13] <i>ependymin</i> ^[14]
c) Enzyme	<i>acetylcholinesterase E, butyrylcholinesterase E</i> ^[15] <i>5'-nucleotidase</i> ^[16]
II Proteoglykane	<i>cytotactin-binding proteoglycan</i> ^[17] <i>chondroitin sulphate proteoglycan</i> ^[18]
III Glykolipide	<i>3-sulfolglucuronylneolactotetraosylceramide,</i> <i>3-sulfolglucuronylneolactohexaosylceramide</i> ^[19]

2.1.1 Struktur des L2/HNK-1-Epitops

Die Kohlenhydratstruktur, die mit HNK-1-Antikörpern interagiert, wurde bald nach der Entdeckung des Epitops von Chou^[19] für das antigenpräsentierende Glykolipid humaner peripherer Nervenzellen charakterisiert. Sie wurde als 3-Sulfolglucuronylneolactotetraosylceramid für das sulfatierte Glykosphingolipid SGGL-1 (sulfatiertes Glucuronylglykosphingolipid-1) und als 3-Sulfolglucuronylneolactohexaosylceramid, das aus sich wiederholenden Einheiten von N-Acetyllactosamin aufgebaut ist, für das Glykosphingolipid SGGL-2 charakterisiert. Aus diesen Studien folgte, dass das L2/HNK-1-Epitop zumindest die 3-Sulfolglucuronsäure-Einheit enthält, jedoch schien auch das Neolactosyl-artige Rückgrat essentiell. In Glykoproteinen kommt das Epitop an verzweigten Mannose-reichen Oligosacchariden, N-glykosidisch an Asparagin-Seitenketten gebunden, vor.^[18a, 20] Im Proteoglykan Chondroitinsulfat ist das Epitop über das Poly-(N-acetyllactosaminyl)-Oligosaccharid verankert.^[21] Mit der vollständigen Aufklärung der Struktur des Glykoproteins P₀ und dem Vergleich mit bekannten Strukturen von Glykolipiden

wurde das L2/HNK-1-Epitop als 3-O-Sulfo-GlcA(β -1 \rightarrow 3)Gal(β -1 \rightarrow 4)GlcNAc charakterisiert (Abbildung 1).^[22]

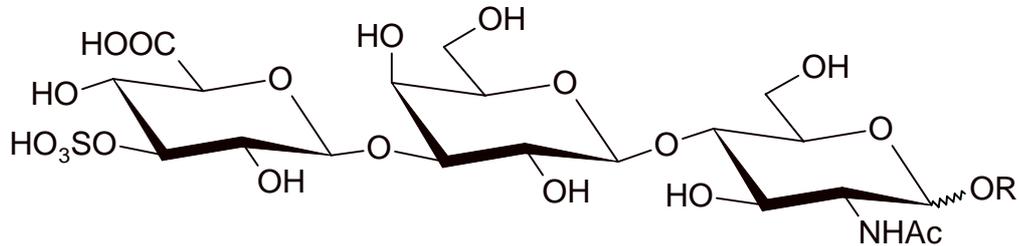


Abbildung 1: Struktur des L2/HNK-1-Epitops (3-O-Sulfo- β -D-glucopyranosyluronsäure)-(1 \rightarrow 3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid^[19c, 22]

2.1.2 Funktion des L2/HNK-1-Epitops

Das L2/HNK-1-Epitop wird von vielen neuronalen Erkennungsmolekülen exprimiert und ist in die Interaktion neuronaler Zellen während der Entwicklung, in die Regeneration des peripheren Nervensystems (PNS), in die Synapsen-Plastizität sowie in pathogene Prozesse involviert. Die hohe phylogenetische Konservierung des L2/HNK-1-Epitops, es wird sowohl in Wirbeltieren, Insekten^[23] als auch in Blutegeln^[24] gefunden, weist auf die Bedeutung der Struktur in biologischen Systemen oder die entwicklungsgeschichtlich frühe Entstehung hin. Die Expression des L2/HNK-1-Epitops ist temporär und lokal auf spezifische Entwicklungsprozesse limitiert und nur Subpopulationen unterschiedlicher Moleküle tragen zu unterschiedlichen Zeiten der Entwicklung das Kohlenhydrat, was auf eine entwicklungsabhängige Feinregulierung der Expression unabhängig von der Proteinsequenz hindeutet. So wird das Epitop im Neuralrohr des Frosches von den ersten Neuronen noch vor der Axonbildung produziert und bleibt auf der Oberfläche des sich bildenden Axons erhalten, bis dieses ausgewachsen ist. Mit fortschreitender Reife des Axons nimmt die Expression des Epitops ab, erscheint aber gleichzeitig in der Myelinschicht. Die Moleküle, die es dabei tragen, sind in Abhängigkeit des Entwicklungsstandes verschieden.^[25] Diese alternierende Expression ist in Nerven verschiedener Spezies nachgewiesen.^[26]

Das L2/HNK-1-Kohlenhydrat ist essentiell für die Migration fetaler Neuralrohr-Zellen in verschiedenartigen Spezies.^[27] Außerdem wird es zumindest bei Ratten, Hasen und Menschen im embryonalen Reizleitungssystem des Herzens gefunden.^[28]

Bei der Selektion und Stabilisierung synaptischer Verbindungen spielt das Kohlenhydrat eine entscheidende Rolle. So erscheint das Epitop auf der mit der Oberfläche von Gliazellen verbundenen ATP spaltenden 5'-Nucleotidase während der frühen postnatalen Entwicklung des visuellen Kortex der Katze zu einer Zeit, in der die Synaptogenese und Umordnung der Synapsenverbindungen stattfindet, und verschwindet nach diesen Vorgängen wieder.^[29] Auch in der sich entwickelnden Hühner-Retina scheint das Epitop, ein Marker für die Differenzierung und Herstellung der finalen synaptischen Konfiguration zu sein.^[30] Überdies wird das Kohlenhydrat mit der Gedächtnisfestigung im Fisch in Zusammenhang gebracht. Intraventrikuläre Injektion von Antikörpern gegen das L2/HNK-1-Epitop und gegen Ependymin, ein sekretorisches Glykoprotein im Hirn, das das Epitop trägt, verursacht verminderte Gedächtnisfestigung, beeinflusst aber nicht das Abrufen bereits gefestigter Kenntnisse.^[31] Bei Mäusen führt die intrahippocampale Applikation von L2-412-Antikörpern zu ähnlichen Ergebnissen, wodurch dem Epitop eine wichtige Funktion in der Hippocampus-abhängigen kontextuellen Gedächtnisbildung in Säugern zugewiesen wird.^[32]

Des Weiteren ist die Kohlenhydratsequenz von immunologischem Interesse, so ist sie in die initiale Bindung des humanen Cytomegalovirus (HCMV), ein β -Herpesvirus, an die Wirtszelle involviert, wobei hier SGGL-Glykolipide eine entscheidende Rolle im Bindungsprozess des Virus spielen.^[33] Der HNK-1-Antikörper gehört zu einer Gruppe von Antikörpern (IgM_K-Ak), die die Remyelinierungen in einem Virus-induzierten Maus-Modell von Multipler Sklerose bewirken. Dabei scheint die Wechselwirkung des HNK-1-Antikörpers mit dem Myelin-assoziierten Glykoprotein (MAG) von Bedeutung zu sein, ein Hauptinhibitor der axonalen Regeneration *in vitro*.^[34] Zudem spielt das Epitop bei der Demyelinierung von Axonen bei neuropathischen Patienten eine Rolle (Kapitel 2.1.5).

In vielen Geweben, die das L2/HNK-1-Epitop präsentieren, bleibt es in Karzinomen erhalten. So wird es im neuroendokrinen Lungenkarzinom, bei von Schwannschen Zellen abgeleiteten Tumoren, vielen Typen von neoplastischen Neuroepithel-Tumoren und Prostata-tumoren gefunden.^[35] Generell scheint das L2/HNK-1-Epitop in den meisten neuroektodermalen und neuroendokrinen Tumoren präsent zu sein.^[36] Somit kann das Kohlenhydrat als *Marker* neurogener Tumore genutzt werden, jedoch nur in Verbindung mit der Detektion durch andere Antikörper, da L2/HNK-1-Antikörper auch weitere nichtkarzinoide Gewebe erkennen.^[37]

2.1.3 Molekulare Interaktionen des L2/HNK-1-Epitops im Nervensystem

Die Feinregulierung von Zellwechselwirkungen stellt eine wichtige Voraussetzung für die Spezifizierung der Nervenzellkontakte dar, was letztlich der geordneten Entwicklung des neuronalen Netzwerks zugrunde liegt. Das zelluläre Wechselspiel in der komplexen Umgebung des Nervensystems wird von Erkennungsmolekülen der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix gesteuert. Die Zellwechselwirkung wird durch Ausbildung molekularer Komplexe mit den entsprechenden Zielmolekülen und durch die Übermittlung des Erkennungssignals ins Zellinnere reguliert. Die Signalübertragung durch *second messenger* Systeme innerhalb der Zelle wirkt sich dabei auf die Ionenkanäle und -pumpen sowie auf das Zytoskelett aus.^[38]

Zu der ständig wachsenden Familie der Erkennungsmoleküle gehören Moleküle mit Immunglobulin-ähnlichen und Fibronectin-homologen Domänen sowie mit epidermalen Wachstumsfaktor-Domänen. Weitere Familien von Erkennungsmolekülen sind Cadherine, Integrine, Proteoglykane, Glykolipide, und Glykan-bindende Lectine. Für die Erkennungsprozesse sind durch diese Moleküle vermittelte Protein-Protein- und Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen verantwortlich, wobei auch Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Interaktionen einen wichtigen Beitrag dazu leisten sollen.^[38] Neben dem L2/HNK-1-Kohlenhydrat-epitop sind z. B. α -2,8-verknüpfte Polysialinsäurederivate und Mannose-reiche Glykane häufig vorkommende Kohlenhydratsequenzen dieser Moleküle. Da Kohlenhydrate mit hoher Spezifität und riesiger Vielfalt in biologischen Systemen unabhängig von der Proteinsequenz synthetisiert und mehrere verschiedene Glykane an eine Glykosylierungsstelle gebunden werden können sowie aufgrund der Tatsache, dass oft viele Glykosylierungsstellen in einem Protein vorhanden sind, stellen Kohlenhydrate in der Zell-Zell-Erkennung - je nach Zelltyp und Entwicklungsstand - eine ideale Möglichkeit zur Adressierung von Proteinen und Zellen dar.

P_0 ist ein neurales Erkennungsmolekül, das im Menschen sowohl Rezeptor als auch Donor des L2/HNK-1-Kohlenhydrats ist. Es ist das Hauptglykoprotein des Myelins im PNS und sowohl in homophilen Protein-Protein- als auch Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen, wie L2/HNK-1-Epitop-Protein-Interaktionen, involviert.^[39] Aufgrund dieser Tatsache wird angenommen, dass Kohlenhydrate und insbesondere das L2/HNK-1-Epitop sowohl an der Bildung der Myelinspirale aus den Schwannschen Zellen während des Myelinaufbaus, als auch an der Stabilisierung der kompakten Myelinschicht im adulten Individuum durch *trans*-Wechselwirkungen von P_0 zwischen gegenüberliegenden Zelloberflächen oder zwischen Zelloberfläche und extrazellulärer Matrix teilhaben. Es scheint ferner möglich, dass P_0 innerhalb der Zellmembran mit sich selbst interagiert (*cis*-Wechselwirkung) und Cluster bildet. Diese sollen zur

Signaltransduktion ins Zellinnere beitragen und die Expression weiterer Erkennungsmoleküle, die für die Myelinierung relevant sind, veranlassen. Dass diese Vorstellung der Signaltransduktion möglich scheint, zeigen Beobachtungen bei P_0 -*Knockout*-Mäusen, bei denen die Expression von Erkennungsmolekülen, die relevant für die Myelinierung sind, stark verändert ist. Überdies scheint P_0 , direkt die Expression des L2/HNK-1-Epitops zu beeinflussen, da in den Myelin-ähnlichen Hüllen motorischer Axone der hypomyelinieren peripheren Nerven der P_0 -*Knockout*-Mäuse keine L2/HNK-1-Immunreaktivität detektierbar ist.^[40]

Weitere Rezeptoren für das L2/HNK-1-Epitop sind die extrazellulären Matrix-Glykoproteine Laminin und Merosin (plazentale Laminin-Isoform),^[41] die beide in verschiedenen Entwicklungsstadien des Nervensystem exprimiert werden und unter anderem das Neuritenwachstum fördern.^[42] Laminin ist ein selbstaggregierendes, multifunktionelles Glykoprotein, das aus drei Untereinheiten ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$) aufgebaut ist.^[43] Die $\alpha 1$ -Kette formt eine superspiralisierte α -Helix (*coiled coil*). Der C-Terminus dieser Kette bildet fünf globuläre G-Domänen (G1-G5) und erfüllt verschiedene Funktionen, so z. B. die Erkennung sulfatierter Kohlenhydrate. Laminin ist Rezeptor der sulfatierten Glykosaminoglykane Heparin und Heparansulfat sowie für das L2/HNK-1-Epitop. Diese werden jedoch von verschiedenen Domänen der fünf G-Untereinheiten der $\alpha 1$ -Kette gebunden. Das L2/HNK-1-Kohlenhydratepitop wird von der G2-Domäne der $\alpha 1$ -Kette komplexiert, wobei bewiesen werden konnte, dass die spezifische Bindung an das L2-HNK-1-Epitop nicht von der nativen Struktur der G2-Domäne abhängt, sondern direkt über die Peptidsequenz KGVSSRSYVGCIGNLEISRST dieser Domäne erfolgt.^[44] Die Blockierung der G2-Domäne führt dabei zur Inhibierung der Bindung von Laminin an Nervenzellen, wodurch gezeigt wurde, dass das L2/HNK-1-Kohlenhydrat direkt an der Adhäsion von Laminin an Zellen beteiligt ist. Das Vorhandensein zweier Bindungstaschen für die strukturell verwandten Glykane und die Inhibierung der Laminin-Bindung machen deutlich, dass sich Heparin bzw. Heparansulfat und das L2/HNK-1-Epitop in ihrer Funktion nicht gegenseitig vertreten können. Da Integrine ebenfalls das Epitop tragen können, ist es denkbar, dass die Interaktion mit Laminin durch das L2/HNK-1-Kohlenhydratepitop vermittelt wird und nicht nur durch Protein-Protein-Interaktionen, zumal die Bindungstaschen beider Moleküle im gleichen Bereich des Laminins liegen.^[44, 45] Es konnte durch die Analyse von Membranfraktionen kleiner zerebraler¹ Neuronen nachgewiesen werden, dass diese ein haupt-L2-412-immunreaktives Glykoprotein bilden, das als neurales Zelladhäsionsmolekül L1 identifiziert wur-

¹ das Großhirn betreffend

de. Die Bindung von L1 an Laminin konnte durch Zugabe von Fab-Fragmenten des L2-412-Antikörpers reduziert werden, was beweist, dass L1 direkt über das L2-HNK-1-Epitop an Laminin komplexiert. Darüber hinaus konnte aufgezeigt werden, dass andere Glykoproteine, die das Kohlenhydratepitop tragen, an der Zelladhäsion an Laminin beteiligt sind.^[44]

Andere Rezeptoren für die L2/HNK-1-Sequenz sind die L- und P-Selectine.^[46] Selectine (E-, L- und P-Typ) sind eine Familie von strukturell und funktionell verwandten Zelloberflächenadhäsionsproteinen, die an Kohlenhydrate binden. Sie sind auf Endothelzellen, Lymphozyten und Blutplättchen zu finden und binden auch Sialyl-Lewis-verbundene Strukturen,^[47] die z. B. beim *Homing* der Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen, wobei nicht bekannt ist, ob die gleichen Bindungsstellen für die beiden Kohlenhydratsequenzen benutzt werden. Sie sind wichtig bei adhäsiven Wechselwirkungen von Zellen des vaskulären Endothels. L2/HNK-1-tragende Glykolipide sind Liganden für L- und P-Selectine, nicht aber für den E-Typ. Dabei ist es nicht entscheidend, ob das Epitop an der Glucuronsäure sulfatiert ist oder nicht, allein das Kohlenhydrat ist hinreichend für die Bindung an Selectine.^[46a] Lymphozyten nutzen Selectine, um L2/HNK-1-tragende Nervenerkennungsmoleküle spezifisch zu binden und stellen somit eine vom L2/HNK-1-Epitop vermittelte mögliche Verbindung zwischen Immun- und Nervensystem dar.^[48] Eventuell sind sie dabei auch in pathogene Demyelinierungsprozesse des ZNS und PNS durch Bindung an L2-HNK-1-präsentierende Moleküle des Myelins beteiligt.

2.1.4 Funktion des L2/HNK-1-Epitops während der Reinnervation des PNS und des Wachstums von Motoaxonen

Auf der Suche nach möglichen Funktionen des L2/HNK-1-Epitops mit monoklonalen Antikörpern konnten Zell-Zell-Wechselwirkungen blockiert werden.^[49] Kompetitionsstudien mit dem isolierten Kohlenhydrat zeigten, dass das Epitop Einfluss auf das Neuritenwachstum, die Adhäsion zwischen Neuronen und Gliazellen sowie die Neuritenfaszikulation² hat.^[50] Hier lieferten insbesondere Untersuchungen an Femoralnerven³ der Maus interessante Ergebnisse. Von besonderem Interesse bei der Feinregulierung der Zell-Zell-Adhäsion im Nervensystem ist die Tatsache, dass das L2/HNK-1-Kohlenhydratepitop in der Maus selektiv von den Myelin-bildenden Schwannschen Zellen motorischer Axone, jedoch nicht auf den Myelin-bildenden Schwannschen Zellen sensorischer Axone und nur schwach in den nicht-myelinierenden Schwannschen-Zellen sensorischer Nerven zweige exprimiert wird. Das L2/HNK-1-Kohlen-

² Bündelung der Neuriten

³ femoral = den Oberschenkel betreffend

hydrat ist in den Motoaxon-bekleidenden Schwannschen Zellen im kompakten Myelin, in der Basalmembran und auf deren Zelloberfläche nachweisbar – in den Bereichen, aus denen motorische Axone nach Schädigung peripheraler Nerven wieder auswachsen. So ist das Epitop im Muskelzweig des Femoralnervs und in der ventralen⁴ Spinalwurzel zu detektieren, aber weder im Hautzweig noch in der dorsalen⁵ Spinalwurzel der adulten Maus.^[51] Analysen der Myelinschichten von Muskel- und Hautzweig der Femoralnerven der adulten Maus zeigen, dass das L2/HNK-1-Epitop sowohl auf SGGL-1 als auch auf SGGL-2 lokalisiert und MAG im Muskelnerv das einzige L2-HNK-1-antikörperreaktive Glykoprotein ist.^[52]

Das L2/HNK-1-Kohlenhydrat fördert *in vitro* selektiv die Entwicklung von Neuriten aus motorischen Axonen, was durch Wachstumsexperimente bewiesen wurde, indem Motoneuronen auf den Haut- und Muskelzweigen tiefgefrorener Sektionen des Femoralnervs wachsen gelassen wurden. Die Neuriten wachsen dabei verstärkt auf den L2/HNK-1-exprimierenden motorischen und weniger auf den sensorischen Zweigen, die das Epitop nicht ausbilden. Im Gegensatz dazu zeigen sensorische Neuronen auf beiden Zweigen das gleiche Neuritenwachstum. Somit wird das Neuritenwachstum motorischer Neurone von L2/HNK-1-enthaltendem Substrat erhöht, während sensorische Neuronen unbeeinflusst bleiben. Ferner ist das Epitop in der Maus zur richtigen Zeit in der richtigen Zellregion präsent, um die Regeneration von Nerven zu beeinflussen, und hat einen selektiven Effekt auf Motoneuronen *in vitro*. So bleibt es im motorischen im Gegensatz zum sensorischen Zweig abgetrennter Nervenstümpfe vierzehn Tage stark exprimiert.^[51b] Es wird vermutet, dass die Funktion des L2/HNK-1-Epitops darauf beruht, dass es für motorische Axone eine wegweisende Prädisposition repräsentiert, um die spezifische Reinnervation ihrer Zielstrukturen zu gewährleisten. So wird das Epitop auch tatsächlich entlang der Route exprimiert, der die motorischen Axone während des Nachwachsens nach einer peripheren Nervenschädigung folgen.^[51c]

Der Femoralnerv erhält von einem dorsalen Wurzelganglion ein sensorisches und ventral ein motorisches Axon, distal dazu teilt er sich in einen Haut- (nur sensorische Axone) und einen Muskelzweig (motorische und sensorische Axone). In einem Experiment wurde zum einen der ventrale Zweig zur Unterbindung der Efferenz⁶ und zum anderen das dorsale Ganglion zur Unterdrückung der Afferenz⁷ gekappt. Im deafferenten Muskelzweig wird die L2/HNK-1-Immunreaktivität nicht beeinflusst und entspricht der nicht-deafferenten Kontrolle. Im Ge-

⁴ ventral = Bauchseite, bauchwärts; ventrales Nervensystem: Reaktion des Gehirns auf sensor. Informationen durch motor. Nervenimpulse

⁵ distal = Rücken, rückwärts; distales Nervensystem: sammelt sensorische Informationen der Sinnesorgane und leitet diese an das Gehirn

⁶ Nervenimpulse von Sinnesorganen zum ZNS - sensorische Informationen

⁷ Nervenimpulse vom ZNS zur Peripherie (z. B. zum Muskel) - motorische Informationen

gensatz dazu ist in defferenten Nerven die L2/HNK-1-Immunreaktivität stark vermindert und nur wenige Schwannsche Zellen reagieren positiv, was auf die Bedeutung motorischer Axone für die L2-HNK-1-Immunreaktivität dieser Zellen hinweist. In weiteren Versuchen wurde der Femoralnerv proximal⁸ durchteilt und nachwachsende Motoaxone wurden daran gehindert, die Muskulatur zu erreichen, um den Einfluss der Zielgewebe zu unterdrücken, die die starke Expression des L2/HNK-1-Epitops im Motoaxon bedingen könnten. Die L2-HNK-1-Immunreaktivität der motorischen Axone bleibt dabei erhalten, während die der Zielort-unterdrückten Hautaxone weiterhin minimal ist. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Expression des L2-HNK-1-Epitops der Schwannschen Zellen des Muskelzweiges unabhängig von der Innervation⁹ des Muskels ist und von der Wechselwirkung zwischen Axon und dieser Zelle abhängt. In Implantationsexperimenten konnte des Weiteren bewiesen werden, dass Schwannsche Zellen, die zuvor mit Motoaxonen assoziiert waren, ihre erworbenen Fähigkeiten in Bezug auf das L2/HNK-1-Kohlenhydrat beibehalten. Sie exprimieren effizienter L2/HNK-1-Kohlenhydrate als Schwannsche Zellen, die zuvor sensorische Axone myelinieren - eine Art „Erinnerung“ an vorherige axonale Verbindungen. Daher beeinflusst die von Schwannschen Zellen vermittelte Expression des L2/HNK-1-Epitops bevorzugt die Reinnervation von Muskelnerven durch Regeneration motorischer Axone des PNS.^[53]

Dass das L2/HNK-1-Epitop wichtig für das Wachstum peripherer Nerven und die Steuerung während der Nervenentwicklung *in vivo* ist, konnte erstmals durch Studien an Embryonen von Zebrafischen gezeigt werden. Diese Experimente, bei denen den Embryonen L2-412-Antikörper injiziert wurden und die zu Störungen des Wachstums einzelner Nerven führten, weisen dem Kohlenhydratepitop eine signifikante Rolle als Regulator des Axonwachstums zu.^[54]

2.1.5 Antikörper gegen L2/HNK-1-Kohlenhydrate

Zusätzlich zum HNK-1-Antikörper^[1] gibt es einige andere Antikörper gegen das Kohlenhydratepitop. Aus Ratten wurden nach der Immunisierung mit einer Plasmamembranfraktion die bereits erwähnten, monoklonalen L2-Antikörper 334 (IgM), 336 (IgG), 344 (IgM), 349 (IgM), 392 (IgM) isoliert. Der IgG-Antikörper L2-412 wurde durch Immunisierung von Ratten mit einer Fraktion aus Membranen isolierter Glykoproteine des Mäusegehirns erhalten.^[2, 55] Alle Antikörper reagieren mit Glykoproteinen oder Glykolipiden, die das L2/HNK-1-Epitop

⁸ zur Körpermitte hin

⁹ Verbindung eines Nerven mit dem Zielgewebe

tragen. Somit ist davon auszugehen, dass sie die gleiche oder eine eng verwandte Kohlenhydrateinheit erkennen. Die Unterschiede der Antikörper bei Immunreaktionen reflektieren wohl unterschiedliche Affinitäten oder kleine strukturelle Differenzen der Epitope.^[55]

Der HNK-1- und der L2-412-Antikörper wurden in Bezug auf ihre Bindungsfähigkeit an synthetische Glykolipide untersucht. Dabei zeigte sich, dass für die Immunreaktivität des HNK-1-Antikörpers die Sulfatgruppe der Glucuronsäureeinheit unbedingt erforderlich ist.^[56] Im Gegensatz dazu erkennt der L2-412-Antikörper sowohl die sulfatierte als auch die unsulfatierte Kohlenhydrateinheit.^[57]

Eine weitere Gruppe von Antikörpern, die das L2/HNK-1-Epitop erkennen, sind autoimmunne humane IgM aus dem Serum neuropathischer Patienten. Diese IgM binden an die Kohlenhydratregion humaner MAG und saurer Glykolipide.^[58] Es wird vermutet, dass die von den Antikörpern erkannten Epitope eine wichtige Rolle in der peripheren Neuropathie spielen. Die kausale Rolle der humanen L2/HNK-1-autoimmunen Antikörper in der Neuropathie wurde durch Beobachtungen bestärkt, die bei Versuchen mit adoleszenten Hühnern gemacht wurden. Durch Injektion von Seren von Patienten mit Gammopathie-assoziiertes Neuropathie wurde die demyelinierende Wirkung demonstriert, wobei die Demyelinierung der bei der humanen Neuropathie ähnelt, was die Involvierung der autoimmunen humanen IgM in die Zerstörung von Nervengewebe unterstreicht.^[59] In adulten Mäusen kommt es zu weniger starken Beschädigungen der Myelinschicht, jedoch werden hier nicht-myelinierende Schwannsche Zellen und Axone, in denen das L2/HNK-1-Epitop exprimiert wird, beschädigt.^[60] Diese Differenzen der beiden Studien liegen wahrscheinlich in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Mäuse begründet. In diesem Zusammenhang ist die Bindung von Interleukin-6 (IL-6) an das L2/HNK-1-Epitop interessant. Interleukine sind Proteine, die die Wechselwirkung von Leukozyten beeinflussen und ermöglichen. Durch Ausschalten des Mäuse-IL-6-Gens wird die experimentelle allergische Encephalomyelitis (EAE) unterdrückt und die damit einhergehende Demyelinierung von Nerven EAE-sensitiver Mäusestämme verhindert.^[61]

2.1.6 Isolierung und Synthese der L2/HNK-1-Kohlenhydrate

Ein Haupthindernis bei der Erforschung der biologischen Funktion des L2/HNK-1-Kohlenhydrats ist die schlechte Verfügbarkeit. Aus biologischen Systemen lässt es sich nur in geringen Mengen isolieren, so liefert ein Kilogramm *boviner canda equina* lediglich 2,5 mg des Epitops. Außerdem ist der Einsatz von aus Rindern gewonnenen Substanzen in klinischen Stu-

dien seit dem auftreten der *bovinen spongiformen Encephalopathie* (BSE) nicht mehr möglich. Hingegen ist die chemische Synthese einer solch komplizierten Kohlenhydratstruktur, wie sie das L2/HNK-1-Epitop darstellt, ein sehr aufwendiger Prozess. Die stereokontrollierte Total-synthese des an SGGL-2 gebundenen Kohlenhydrats ist beschrieben und erfolgt über die Synthese eines Glykoheptosyl-Donors, der dann mit dem Ceramid gekuppelt und anschließend sulfatiert wird.^[62] Eine weitere Synthese eines L2/HNK-1-immunoreaktiven Pentasaccharids, jedoch mit biotinylierter Endfunktion, geht von Tri- und Disaccharid-Einheiten aus mit anschließender Biotinylierung der anomeren OH-Gruppe über einen Aminoethyl-Linker.^[63] Die Synthesen erfordern 15-20 zum Teil recht zeitintensive Synthesestufen, wobei schon von sehr komplexen *building blocks* ausgegangen wird. Sie sind somit kaum von praktischer Bedeutung. Aufgrund der Wichtigkeit in biologischen Systemen wäre es jedoch wünschenswert, hinreichende Mengen des L2/HNK-1-Kohlenhydrats zu besitzen, um seine Funktionen besser aufklären zu können. Von besonderem therapeutischem Interesse sind hierbei die Regeneration verletzter peripherer Nerven, demyelinierende Autoimmun-Krankheiten und die Modulation von Synapsen. Eine mögliche Lösung dieses Problems stellt die Synthese von Mimetika für diese Kohlenhydratstruktur durch andere, leichter zugängliche Stoffklassen dar, wie z. B. die in dieser Arbeit vorgestellte Synthese glykomimetischer Peptide.

Ein möglicher Weg zur Auffindung von Peptiden als Kohlenhydratmimetika ist das randomisierte Peptid *Phage-Display* (RPPD) gegen L2/HNK-1-Antikörper. Randomisierte Peptidbibliotheken liefern dabei eine reichhaltige Quelle molekularer Diversität und bilden eine gute Basis zur Identifizierung möglicher Peptidliganden für den Zielrezeptor. Das RPPD ist eine Selektionstechnik, bei der mit einem Protein eines Bakteriophagen fusionierte Peptide auf der Oberfläche eines Virions exprimiert werden. Das *Phage-Display* stellt eine Verbindung riesiger Bibliotheken randomisierter Peptidsequenzen und der dazugehörigen DNA-Sequenzen dar. Damit ist es möglich, schnell und effizient Peptidliganden für die verschiedensten Zielmoleküle zu erhalten. So wurde ein RPPD mit einer Phagen-Bibliothek mit randomisierten 15-mer Peptiden mit dem L2-412-Antikörper durchgeführt. Die dadurch erhaltene Peptidsequenz mimikriert verschiedene wichtige Funktionen des L2/HNK-1-Kohlenhydratepitops. Es bindet *in vitro* an Motoneurone und fördert *in vitro* im Vergleich zu sensorischen bevorzugt das Neuri-tenwachstum motorischer Axone.^[64]

Trotz der Probleme, die Peptide durch die geringe metabolische Stabilität, die nicht optimale Bioverfügbarkeit sowie die hohe Immunogenität mit sich bringen, stellen Glykomimetika potentielle Leitstrukturen für Wirkstoffe in der Arzneimittelforschung dar.

2.2 Molekulare Mimikry von Kohlenhydraten durch Peptide

Die Mimikry ist eine im Tierreich weitverbreitete Strategie der Tarnung und Verteidigung. Abgeleitet vom Griechischen *mimos* (nachahmen) beschreibt die Mimikry das Imitieren oder das starke Ähneln von Tieren und wurde in der Chemie als Synonym für das Nachahmen chemischer Verbindungen, insbesondere derer Strukturen und Wirkung, durch andere Substanzklassen etabliert.

Das rationale Design biologisch wirkender Substanzen beginnt nach der Entdeckung bioaktiver Naturstoffe oft mit der Modifizierung derer Strukturen. Nach Synthese und Test dieser Verbindungen folgt dann die weitere Strukturoptimierung zur Steigerung der Aktivität und Selektivität. Der Ansatz der molekularen Mimikry zur Verbesserung der Substanzen geht von der Verwendung nichtverwandter Substanzklassen aus, die aber eine vergleichbare oder bessere Wirkung hervorrufen als der Naturstoff selbst.^[65]

Die Suche nach Substanzen, die in der Lage sind, Kohlenhydrate zu mimikrieren (Glykomimetika), ist für viele Gebiete der Biochemie und pharmazeutischen Chemie relevant. Kohlenhydrate sind in viele biologische Prozesse involviert, bei denen die spezifische molekulare Erkennung der Kohlenhydrate durch Proteine der initiale Schritt ist. Diese umfassen z. B. die Immunabwehr und -regulierung, die Regulation der Proteinfaltung und des Proteintransports, die Fertilisation, die Metastasierung sowie Zell-Zell-Wechselwirkung und Zelladhäsion, wie die im vorherigen Kapitel beschriebenen Erkennungsvorgänge im Nervensystem. Da Oligosaccharide auf der Zelloberfläche von Tumorzellen und pathogenen Mikroorganismen spezifisch exprimiert werden, stellen diese Kohlenhydrate mögliche Ziele für Vakzine gegen diese dar.^[66]

Die Entwicklung Kohlenhydrat-haltiger Therapeutika ist jedoch, wie bereits in Kapitel 2.1.6 beschrieben, aufgrund der schwierigen Synthese, dem nur geringen Vorkommen in biologischen Systemen und der Neigung zur schnellen Metabolisierung ein großes Problem.^[66] Zudem sind Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen in der Regel durch niedrige Affinitäten gekennzeichnet, obgleich die Affinität durch multivalente Expression der Kohlenhydrate in physiologischen Systemen erhöht werden kann.^[67] Typischerweise liegen diese Affinitäten im mM-Bereich, wenngleich es auch höher affine Ausnahmen gibt. So bindet das Arabinose-bindende Protein die Arabinose mit einem K_D -Wert von $0,1 \mu\text{M}$ und das Cholera-Toxin, eine heterohexamere Verbindung, die zu der AB_5 -Gruppe bakterieller Toxine gehört, bindet das G_{M1} -Pentasaccharid mit einer Bindungskonstante von $1 \mu\text{M}$. Glykomimetika, die im Vergleich zu

Kohlenhydraten andere Funktionalitäten tragen, können potentiell mit erhöhter Affinität an ihren Rezeptor binden und als Ersatz für Kohlenhydratpitope in Medikamenten Anwendung finden. Weitere Vorteile wären die erhöhte Stabilität gegen abbauende Enzyme und eine bessere Bioverfügbarkeit.

Es gibt eine ganze Reihe Glykomimetika, die in einer starken Strukturverwandtschaft zu Kohlenhydraten stehen. Das Cholera-Toxin, das über die fünf identischen B-Untereinheiten an den Zelloberflächen-Liganden (G_{M1} -Gangliosid) bindet, um die A-Untereinheit in die Zielzelle zu übertragen, kann durch ein Mimetikum des Gangliosids (Abbildung 2) inhibiert werden. Die A-Untereinheit ist ein Enzym, das in die Signaltransduktionskaskaden eingreift, und zu einer Überstimulierung der Adenylat-Cyclase führt.^[68] Das Gangliosid-Analogon, in dem der Glucoserest am reduzierenden Ende des G_{M1} -Gangliosids durch einen Cyclohexandiolrest ersetzt ist, weist nahezu identische konformative und bindende Eigenschaften auf.^[69]

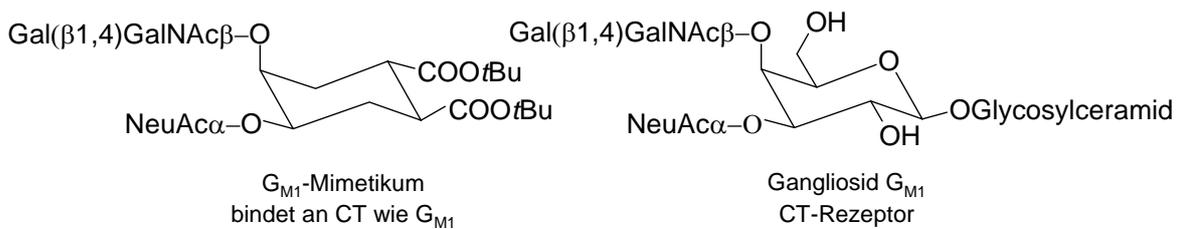


Abbildung 2: Inhibitor der Cholera-Toxin(CT)-Bindung an G_{M1} : ein G_{M1} -Mimetikum auf einem Cyclohexan-Grundgerüst^[69]

Peptide stellen jedoch eine Klasse von Verbindungen dar, die keine Gemeinsamkeiten mit der Struktur von Kohlenhydraten zu haben scheinen. Daher ist bei ihnen der Ursprung ihrer Mimikry nicht evident.^[65] Sie sind jedoch synthetisch leichter zugänglich und können in einer riesigen Vielfalt in Peptidbibliotheken präsentiert werden, die in *Screenings* gegen Kohlenhydrat-bindende Substanzen einsetzbar sind. Zudem sind eine Vielzahl peptidomimetischer Ansätze bekannt, mit deren Hilfe die Strukturen der Peptide weiter optimiert werden können, um die Affinität und metabolische Stabilität zu erhöhen.

Die ersten peptidischen Kohlenhydrat-Mimetika identifizierten 1992 Oldenburg et al.^[70] und Scott et al.^[71] Es sind Liganden des Lectins Concanavalin A (Con A) und stellen Mimetika eines Mannose-enthaltenden Oligosaccharids dar. 1993 wurde von Hoess et al.^[72] das erste Peptid, das die Kohlenhydrat-Bindung an einen Antikörper mimikriert, entdeckt. Das Peptid ist ein Mimetikum des Lewis-Y-Antigens (Le^Y) und könnte sich bei der Entwicklung eines Krebsvakzins als nützlich erweisen. Daraufhin folgte eine Reihe weiterer Peptide, die spezifisch be-

stimmte Kohlenhydrat-Strukturen mimikrieren. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die weiteren bis *dato* entdeckten Kohlenhydrat-Mimetika.

Tabelle 2: Durch biochemische Screenings identifizierte glykomimetische Peptide
Die aufgeführten Peptide stellen meist nur eine Auswahl von weiteren identifizierten Peptiden dar. Mit # gekennzeichnete Peptide rufen auch Immunantworten gegen das Kohlenhydrat hervor.

Jahr	Peptid	Protein-Rezeptor	Kohlenhydrat-Target
1994	SFGSGFGGGY#	anti-GlcNAc mAk; GlcNAc-spezifische Lectine	GlcNAc ^[73]
1995	HFVQH	mIgA C5	<i>Shigella flexneri</i> 5a LPS ^[74]
	DITWDQLWDLMK	E-Selectin	sialyl-Lewis X ^[75]
	CARIYYRYDGTAYC#	mAk 1E4	<i>N. meningitidis</i> C Polysaccharid (Poly- α -(2-9)-sialylsäure) ^[76]
	ARIYYRYDGFAY#		
	cyclo-iWyRyN	Hefe- α -Glucosidase	α -verknüpfte Glucoside ^[77]
1996	GLQYTPSWMLVG#	mAk 2H1	<i>Cryptococcus neoformans</i> Kapselpolysacc. (Glucuronoxylomannan) ^[78]
	SYSWMYE		
1997	YPPYFXXX	mAk AD117m; mAk H11; R.com. Lectin; β -Glucosidase	Lactotetraosylceramid und Neolactotetraosylceramid ^[79]
	YDWLMF	mAk 12A1	<i>C. neoformans</i> Kapselpolysaccharid (<i>Glucuronoxylmannan</i>) ^[80]
	WLWEW	mAk 13F1	
	CYKPLGALTHC#	mIgA I3	<i>Shigella flexneri</i> 5a Lipopolysaccharid (LPS) ^[81]
	CKVPPWARTAC#	mIgA I3, C5	
	YYPYD#, YYRYD#, YYRGD#	anti-Tumor-assoziiertes Lewis-Antigen Ak	Tumor-assoziiertes Lewis-Antigen ^[82]
	DRPVY	mAk SA-3	<i>Streptococcus</i> Gruppe A Zellwandpolysaccharid ^[83]
	MCPPLYSPSACA	mAk Strep 9	<i>Salmonella</i> B O-Antigen ^[83]
	NYPMDH	mAk Se155.4	<i>Shigella flexneri</i> Y LPS O-Antigen ^[83]
	MDWNMHAA	mAk SYA/J6	
	DVFYPPYASGS#	Con A, anti- α -Methyl-mannosid Ak	α -Methyl-mannosid ^[84]
1998	DAHWESWL	IB4-Lectin; anti- α -Gal Ak	Gal- α -(1-3)-Gal ^[85]
	WHWRHRIPLQLAAGR	mAk KA 17	GD1 α Gangliosid ^[86]
	APWLYGPA#	mAk B3	Lewis Y ^[87]
	yryygl	mAk HGAC 39	<i>Streptococcus</i> Gruppe A Zellwandpolysaccharid ^[88]
	FDTGAFDPDWP#	mAk S9	<i>Streptococcus</i> Gruppe A Zellwandpolysaccharid ^[89]
1999	ACTPYAMLPGCK	mAk MG21	polysialyliertes GD3-Gangliosid ⁹⁰
	PHCKVNRGC	mAk SEAM 28	<i>N. meningitidis</i> B Polysaccharid (Poly- α -(2-8)-sialylsäure) ^[91]
	PPSFCPNFIPCTDGL	mAk A15-6B3	<i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i> LPS (Poly- α -4-formamido-perosamin) ^[92]
	YGPWCDDTPQACRSWP	mAk B66-2C8	
2000	DLWDWVVVGKPAG	mAk NS19-9	sialyl-Lewis A ^[93]
	FLLW#	mAk BR55	Lewis Y ^[94]
	IELLQAR	mAk 7LE; E-Selectin	Lewis A; sialyl Lewis X ^[95]

	GEASGLCCRWSSLKGC#	mAk 9C10	<i>N. meningitidis</i> A Polysaccharid ^[96]
2001	DHQRFFV, SHVPNAF	mAk HmenB1, mAk HmenB3	<i>N. meningitidis</i> B Polysaccharid (Poly- α -(2-8)-sialylsäure) ^[97]
	VVSTGSH	mAk HmenB13	
	GMDGTQLDRW#	mAk 2E9	<i>C. neoformans</i> Polysaccharid ^[98]
	YDSeYeSe, EGEWPVYP	RHAMM	Hyaluronan ^[99]
		mAk 2C7	<i>N. gonorrhoeae</i> Zellwandoligosaccharid ^[100]
	FHENWPS#	mAk DJ2.8	<i>Cand. al.</i> Phosphopeptidomannan ^[101]
	FYGRY#	Concanavalin A	α -verk. Mannosid HIV-Hüllprot. ^[84b]
	SGQARVLYSEFINAL#	mAk 4	<i>Strep. pneu.</i> 4 Kapselpolysacc. ^[102]
2002	EWVDV-Konsensusseq.	P-Selectin	Glykoproteinligand 1 (PSGL-1) ^[103]
	ACSWLHQPYC#	mAk 9-2-L379	<i>Meningococ.</i> Lipooligosaccharid ^[104]
	FLHTRL-Konsensusseq.	mAk L2-412	L2/HNK-1-Epitop ^[64]
2003	NCVSPYWCEPLAPSARA	BS-I-B4-Lectin	Gal- α (1-3)-Gal porc. vas. Endothel ^[105]
	IDWNMHAA	Molecular Modelling an <i>SYA/J6-Fab-Fragment</i>	<i>Shigella flexneri</i> Y Lipopolysaccharid O-Antigen ^[106]
2004	GFSYYRPPWIL#	mAk 1E4	<i>N. meningitidis</i> C Kapselpolysacc. ^[107]
	TYDYF	<i>chicken galectin-14</i>	D-Galactose ^[108]

Der größte Teil der in Tabelle 2 aufgeführten Mimetika resultiert aus dem *Screening* gegen Antikohlenhydrat-Antikörper, während nur wenige Glykomimetika für andere Kohlenhydrat-bindende Proteine identifiziert wurden. Einige der Studien zeigen, dass die Peptide nicht nur an Antikohlenhydrat-Antikörper binden, sondern dass diese auch Immunantworten gegen die ursprünglichen Kohlenhydrate hervorrufen.

Zelloberflächenpolysaccharide von Bakterien sind wichtige virulente Faktoren und Antigene. Sie rufen jedoch oft nur schwache immunogene Effekte hervor, wie T-Zell-unabhängige Immunantworten ohne Gedächtnisfunktion oder nur sehr geringe bzw. gar keine Immunantworten bei Kindern unter zwei Jahren. Um diese Probleme zu umgehen, wurden Saccharide mit Proteinen und Peptiden verbunden. Diese Glykokonjugate lieferten eine T-Zell-abhängige Immunantwort und können direkt als Antigene genutzt werden.^[109] Jedoch führt diese Strategie nicht immer zum Erfolg.^[110] Kohlenhydrat-mimikrierende Peptide können dabei, wie in Tabelle 2 zu erkennen ist, durch ihr immunogenes Potential und große Variabilität im Bindungsbereich durch die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR, *complementarity-determining region*) Abhilfe schaffen. Sie bieten zudem im Gegensatz zu den ursprünglichen Kohlenhydraten die Möglichkeit zur Feinregulierung der Immunantwort, z. B. gegen bestimmte Epitope, um Autoimmun-Reaktionen zu verhindern^[83] oder bei pathogenen Kohlenhydratstrukturen, die in ähnlicher Form im Menschen vorkommen.^[111] In Analogie zu Epitopen

spricht man in der Literatur bei Immunantwort-vermittelnden, Kohlenhydrat-mimikrierenden Peptiden von Mimotopen.

Das erste Peptid, dass diese Eigenschaften aufwies, wurde schon 1994 von Shikhman et al. identifiziert. Das Dekapeptid, ein Mimetikum gegen N-Acetylglucosamin, löst in Mäusen als BSA-Konjugat eine anti-GlcNAc-Antwort aus.

Westerink et al.^[76a] identifizierten ein 13-mer Peptid basierend auf der Sequenzanalyse der V_H-CDR3-Region (variable Region der schweren Kette (*heavy*)) des antiidiotypischen Antikörpers anti-id Ak 2-6F9^[112], der das Kapselpolysaccharid (MCPS) von *Neisseria meningitidis* Serogruppe C mimikriert und für dessen glykomimetische Eigenschaften diese Region verantwortlich ist. Da kleine Peptide allein eher geringe Immunantworten auslösen, wurde das Peptid mit einem äußeren Membranlipoprotein von *N. meningitidis* Serogruppe B (Proteosom), das T-Zell-abhängige Immunantworten vermittelt und als Adjuvans eingesetzt, als Mitogen für B-Zellen dient,^[113] komplexiert. Die Immunisierung von Mäusen lieferte eine starke anti-MCPS IgM- und IgG-Antikörper-Antwort und schützte die Mäuse vor einer letalen Dosis von *Neisseria meningitidis* Serogruppe C. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der V_H-CDR-Region des Idiotypen anti-MCPS-Antikörpers mit denen des Anti-anti-Idiotypen Antikörpers aus der Immunisierung der Mäuse zeigte, dass die Bindungsregionen strukturell eng verwandt waren, obwohl sie nicht gleichen Genfamilien angehörten.^[114]

Ein anderes Beispiel immunogener, Kohlenhydrat-mimikrierender Peptide ist das Le^Y-mimikrierende Peptid APWLYGPA. Die Immunisierung mit diesem Peptid induzierte die Bildung von Antikörpern, die an Le^Y binden und Immunisierung mit Le^Y führte zu Antikörpern, die das Peptid binden.^[87] In anderen Studien wurde eine Reihe von Peptiden mit zuvor identifizierten Kohlenhydrat-mimetischen Motiven (YPY, WRY, YRY) gegen Tumor-assoziierte Lewis-Antigene auf ihre immunogene Potenz hin untersucht. Die gebildeten Antikörper hatten die Eigenschaft, das Abtöten von Tumorzelllinien zu stimulieren, die die Kohlenhydrat-Antigene auf ihrer Oberfläche exprimierten. Wie diese und die anderen Studien in Tabelle 2 zeigen, haben glykomimetische Peptide ein großes Potential bei der Entwicklung neuer wirksamer Vakzine.

2.2.1 Molekulare Grundlagen

Durch die biochemischen Untersuchungen konnte die funktionelle Mimikry der Peptide etabliert werden, wobei die molekulare Grundlage der Mimikry damit nicht beschrieben ist. Dass

es sich bei mimetischen Prozessen um eine strukturelle Mimikry handelt, in denen bestimmte Gruppen des Peptids bestimmte funktionelle Gruppen der Kohlenhydrate nachahmen, wurde von einigen Autoren postuliert.^[82a, 87, 115] Bei mimetischen Proteinen wurde durch Strukturaufklärung die strukturelle Mimikry bewiesen, im Kamel V_H-Antikörper-Lysozym-Komplex^[116] und im Schweine α -Amylase-Inhibitor-Komplexes liegen strukturell gleiche Bindungsmotive vor.^[117]

Einige der in Tabelle 2 enthaltenden Peptide zeigen eine breite Kreuzreaktivität, indem sie Antikörper-Antworten gegen eine Vielfalt verschiedener Kohlenhydratstrukturen induzieren und weisen somit auf eine strukturelle Nachahmung von Kohlenhydraten hin. Das Konzept der strukturellen Mimikry entspricht der Immunnetzwerktheorie^[118] von Jerne. In diesem theoretischen Netzwerk stimuliert ein Antigen die Produktion eines Antikörpers (Ak1, ursprünglicher Idiotyp), der wiederum die Bildung eines Antikörpers (Ak2, Anti-Idiotyp) induziert usw. Das Idiotop von Ak2 kann dabei mit dem originalen Antigen strukturell gleich sein, was impliziert, dass dieser die gleiche Form besitzt und die gleichen Bindungskontakte mit Ak1 eingeht wie das ursprüngliche Antigen. Entsprechend diesem Modell kann zwar angenommen werden, dass ein Peptid strukturell mit dem Kohlenhydrat vergleichbar ist, wenn es in der Lage ist, an einen Antikörper gegen dieses Kohlenhydrat zu binden. Jedoch ist eine strukturelle Mimikry dafür nicht unbedingt notwendig. Ist das Peptid strukturell nicht ähnlich und interagiert es mit einer anderen Region oder in einer anderen Art und Weise mit dem Antikörper, so entspricht dies keiner strukturellen Mimikry mehr, aber eine spezifische Kreuzreaktivität bzw. funktionelle Mimikry kann noch immer vorliegen.^[65]

Interessante Ergebnisse in Bezug auf die Art der Mimikry zeigten kristallografische Untersuchungen von Con A und dem Peptid DWWYPYPYASGS^[70], das in biochemischen Studien als funktionelles Mimetikum identifiziert wurde. Ein Vergleich mit einer an Con A bindenden Trimannose, die von dem Peptid mimikriert wird, deutete darauf hin, dass es sich beim Peptid-ConA-Komplex um keine normale strukturelle Mimikry handelt. Das Peptid, das mit anderen Peptiden, die an Con A binden, das YPY-Motiv teilt, ist zwar gerade im Vergleich des YPY-Motivs mit der Trimannose strukturell eng verwandt, jedoch wird das Peptid in einer zu der Kohlenhydrat-Bindungsstelle benachbarten separaten Bindungsregion komplexiert.^[119] Es zeigte sich aber in *Docking*-Studien, dass die Trimannoseeinheit in der Peptid-Bindungsregion wie das Peptid gebunden wird und, dass umgekehrt das Peptid auf gleiche Art und Weise wie das Kohlenhydrat von dessen Bindungsstelle gebunden wird. Diese Experimente wiesen darauf hin, dass es sich bei der Peptid-Bindungsstelle um eine zusätzliche Kohlenhydrat-bindende

de Untereinheit von Con A handelt. Die deutlich höher affine Bindung eines Mannose-reichen Neoglykoproteins im Vergleich zu der Trimannoseeinheit unterstreicht dieses Ergebnis.^[120]

Dass es sich bei der Kohlenhydrat-Mimikry durch Peptide nicht immer um eine strukturelle Mimikry handelt, ist bei der Strukturaufklärung verschiedener mimetischer Peptide und ihrer Rezeptoren erkannt worden. Das Peptid GLQYTPSWMLVG wurde als Mimetikum für das Kapselsaccharid des Pilzes *Cryptococcus neoformans* erhalten. Der Komplex aus dem Dodecapeptid und dem monoklonalen anti-Kohlenhydrat Antikörper zeigt bei Oberflächenplasmonresonanzmessungen einen K_D -Wert von 295 nM und inhibiert die Bindung des mAk an das Polysaccharid. Kristallografische Untersuchungen^[78c] zeigten, dass das Peptid zwei Struktur motive in der Bindungstasche ausbildet, einen β II-Turn und einen inversen γ -Turn, wodurch nahezu alle Aminosäureseitenketten in der Bindungstasche fixiert werden. Zwei nicht besetzte hydrophobe Taschen weisen jedoch auf eine nicht optimale Komplementarität des Mimetikums hin. Zudem unterhält das Peptid nur wenige Kontakte zur schweren Kette des mAk, die oftmals für die Spezifität der Antikörper wichtig ist.^[121] Dieses sind Hinweise darauf, dass es sich hier nicht um eine strukturelle Mimikry handelt, jedoch lässt sich diese Vermutung nicht mit letzter Sicherheit belegen, da keine Kristallstruktur des Kohlenhydrat-mAk-Komplexes vorliegt. Unterstrichen wird der Verdacht aber dadurch, dass das Peptid nur eine schwache Immunantwort in Mäusen auslöst.^[78b] Trotz der schlechten Übereinstimmung mit der Bindungstasche des mAk diente es als Grundlage für ein rational designtes Peptid, das in der Lage sein sollte, mit der schweren Kette des mAk zu interagieren und die Bindungstasche besser auszufüllen. Ausgehend von der Sequenz des Peptids, von dem sechs Aminosäurereste erhalten blieben und durch Anfügen sechs weiterer randomisierter Reste an die N- und C-Termini, wurde eine *Phage-Display*-Bibliothek entwickelt. Das *Screening* lieferte zwar ein längeres, aber 100-fach stärker bindendes Peptid.^[122] Insgesamt weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass das Peptid GLQYTPSWMLVG, obwohl es im Vergleich zu Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen eine hochaffine Bindung mit dem Antikörper eingeht, keine strukturelle Mimikry darstellt.

Ein weiteres Beispiel eines Kohlenhydrat-mimikrierenden Peptids, das nur ein funktionelles Mimetikum darstellt, ist das Oktapeptid MDWNMHAA, ein Mimetikum des Oberflächen O-Antigens des Pathogens *Shigella flexneri* Y.^[83] In kristallografischen Studien zeigte dieses Peptid im Vergleich zum Kohlenhydrat deutliche Abweichungen bei der Bindung an das Fab-Fragment des SYA/J6-Antikörpers, obwohl es vergleichbar affin ist. Es bildet deutlich mehr van-der-Waals-Bindungen aus und involviert im Gegensatz zum Antigen zwölf Wassermoleküle in die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Trotz des Ausbildens einer deutlich

erhöhten Anzahl von Kontakten aufgrund der besseren Komplementarität ist es aufgrund entropischer Effekte kein wesentlich besserer Ligand als das Kohlenhydrat selbst.^[123] Diese Studie führt erstmals den Nachweis auf atomarer Ebene, dass für die Wechselwirkung peptidischer Glykomimetika mit ihren Rezeptoren keine strukturelle Mimikry vorliegen muss.

Insgesamt haben peptidische Kohlenhydrat-Mimetika ein großes Potential in der pharmazeutischen Forschung. Wie in vielen Studien gezeigt werden konnte, sind sie in der Lage, Kohlenhydrate effektiv nachzuahmen und bieten somit die Möglichkeit, diese Strukturen in Organismen effektiv zu inhibieren bzw. sie immunologisch zu vertreten. Sie bieten exzellente Aussichten als Vakzine gegen verschiedene Pathogene und könnten zudem als Antikarzinom-Vakzine ihren Einzug in die Tumor-Therapie halten. Hyaluronan-mimkrierende Peptide, die an den RHAMM-Rezeptor binden, der eine wichtige Rolle bei der Metastase spielt und von Tumorzellen überexprimiert wird, könnten ebenfalls Anwendung in der Tumorbehandlung oder bei der Zelladressierung von Medikamenten gegen Tumore finden.^[99] Peptidliganden für E-Selectine, die das *Rolling* von Leukozyten und ihre Adhäsion an E-Selectine inhibieren, sind wichtige Leitstrukturen für die Entwicklung antiinflammatorischer Therapeutika.^[75, 93, 95]

2.3 Peptide

Peptide und Proteine spielen in praktisch allen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Sie katalysieren als Enzyme chemische Reaktionen, sind als Hormone wichtige Regulatoren biologischer Prozesse oder als Immunglobuline verantwortlich für die Immunabwehr. Sie dienen Mikroorganismen als Toxine zur Verteidigung oder haben antibiotische Eigenschaften. Peptide sind Polyamid-Oligomere mit bis zu 50 Aminosäuren, Oligomere mit mehr als 50 Aminosäuren werden als Proteine bezeichnet. Die Aminosäuren sind durch Amidbindungen (Peptidbindungen) zwischen der Aminogruppe der einen und der Carboxylgruppe der folgenden Einheit verbunden. Natürliche DNA-codierte Peptide und Proteine enthalten 21, in seltenen Fällen auch bis zu 22 verschiedenen α -Aminosäuren. Diese proteinogenen Aminosäuren sind, abgesehen von Glycin, C^α -substituierte Aminosäuren und unterscheiden sich nur durch ihre Seitenketten. Alle DNA-codierten α -Aminosäuren außer Glycin sind chiral und liegen in Proteinen als L-Isomere vor.

Ein Hauptmerkmal der Peptidkette ist die Struktur der Peptidbindungen, wobei die C—N-Bindungen durch die Delokalisierung der freien Elektronenpaare des Carbonylsauerstoffs einen hohen Doppelbindungscharakter tragen (Abbildung 3a). Die Resonanzstruktur der Bindung reduziert die Basizität des Stickstoffatoms und schränkt die Rotation um die C—N-Achse ein. Dadurch wird ihr Starrheit und Planarität verliehen, was wichtige Konsequenzen für die definierte dreidimensionale Struktur der Peptide hat. Die Länge der Bindung liegt mit 0,132

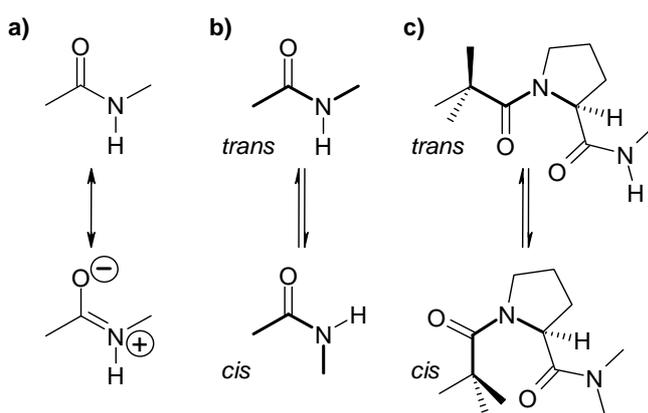


Abbildung 3: a) Resonanzstabilisierung der Peptidbindung; b) *cis/trans*-Isomerie der Peptidbindung; c) *cis/trans*-Isomerie der Xaa-Pro-Bindung^[125]

nm zwischen der Länge einer C—N-Einfach- (0,149 nm) und -Doppelbindung (0,127 nm). Die C_α —CO- und C_α —NH-Bindungen sind dagegen reine Einfachbindungen mit großer Rotationsfreiheit.^[124] Die Rotationsbarriere der Peptidbindung beträgt ca. 105 kJ/mol, was die Existenz zweier Rotamere begründet (Abbildung 3b). In der Regel ist die Peptidbindung *trans*-konfiguriert, jedoch liegen bei ca. 6,5 % der

Xaa—Pro-Bindungen (Abbildung 3c) *cis*-Bindungen vor, wobei die Energie der *trans*-Bindung hier nur 8 kJ/mol niedriger als die der *cis*-Bindung ist.^[125]

2.3.1 Peptidsynthese

Die effiziente Bildung einer Peptidbindung erfordert die Aktivierung der Carboxylgruppe einer Aminosäure mit einer elektronenziehenden Abgangsgruppe. Diese erhöht die positive Partialladung des Carbonylkohlenstoffatoms, wodurch dessen Reaktivität gegenüber der nucleophilen Aminogruppe stark ansteigt. Um den gerichteten Verlauf der Bildung der Peptidbindung zu garantieren, ist es wichtig, unbeteiligte Funktionalitäten mit Schutzgruppen zu maskieren. Dabei werden zwei Arten von Schutzgruppen unterschieden, permanente Schutzgruppen bleiben während der gesamten Synthese mit der wachsenden Peptidkette verbunden und schützen vor allem funktionelle Gruppen der Seitenketten, temporäre Schutzgruppen blockieren dagegen nur während eines Kupplungszyklus die α -Aminogruppen der neuen Aminosäure. Nach anschließender Abspaltung der temporären α -Aminoschutzgruppe kann der nächste α -Amino-geschützte Baustein angefügt werden. Cyclische Wiederholungen dieses Synthesepinzips erlauben die Synthese von Peptiden gewünschter Länge und Sequenz.

Fischer wandte in seiner klassischen Peptidsynthesemethode zur Aktivierung der Carboxylfunktion Säurechloride an.^[126] Die Säurehalogenidmethode spielt zwar heutzutage wie viele der klassischen Methoden eine untergeordnete Rolle, erlebte aber in der vergangenen Dekade eine Renaissance. Seit der Einführung der sogenannten Kupplungsreagenzien werden klassische Methoden zur Peptidsynthese, die darauf basieren, die Säurekomponente vor der eigentlichen Peptidbindungsknüpfung in einer Vorstufe in das aktivierte Derivat zu überführen, nur bei speziellen Syntheseproblemen eingesetzt. Kupplungsreagenzien sind Aktivierungsreagenzien, bei denen die Carboxylgruppe in Anwesenheit der Aminokomponente aktiviert wird.

Die ersten eingeführten Reagenzien dieser Art sind die Carbodiimide (Abbildung 4).^[127] Eine Grundvoraussetzung des Kupplungsreagenzes ist dabei das inerte Verhalten gegenüber primären und sekundären Aminen. Diese Eigenschaft ist bei den Carbodiimiden (**A**) aus theoretischer Sicht nicht ganz erfüllt, da sie mit Aminen zu Guanidinium-Derivaten reagieren können. Diese Nebenreaktion ist aber unter den Bedingungen der Peptidsynthese sehr langsam gegenüber der schnellen Addition der Carboxylgruppe (**B**) und kann daher nicht mit der Säureaktivierung konkurrieren. Die Carbodiimidvariante ist eine der bedeutendsten Aktivierungsmethoden der modernen Peptidchemie. Hierbei sind das N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid^[127]

(DCC) und das N,N' -Diisopropylcarbodiimid^[128] (DIC) die herausragenden Reagenzien. Die Entfernung der als Nebenprodukte entstehenden Harnstoffderivate (**F**) kann Probleme bereiten. Daher finden häufig Carbodiimide Anwendung, deren Harnstoffderivate, wie bei 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid^[129] (EDC), durch Extraktion mit wässriger Säure abtrennbar sind. Ein weiterer Vorteil des letztgenannten Carbodimids ist, dass es auch in wässriger Lösung einsetzbar ist.

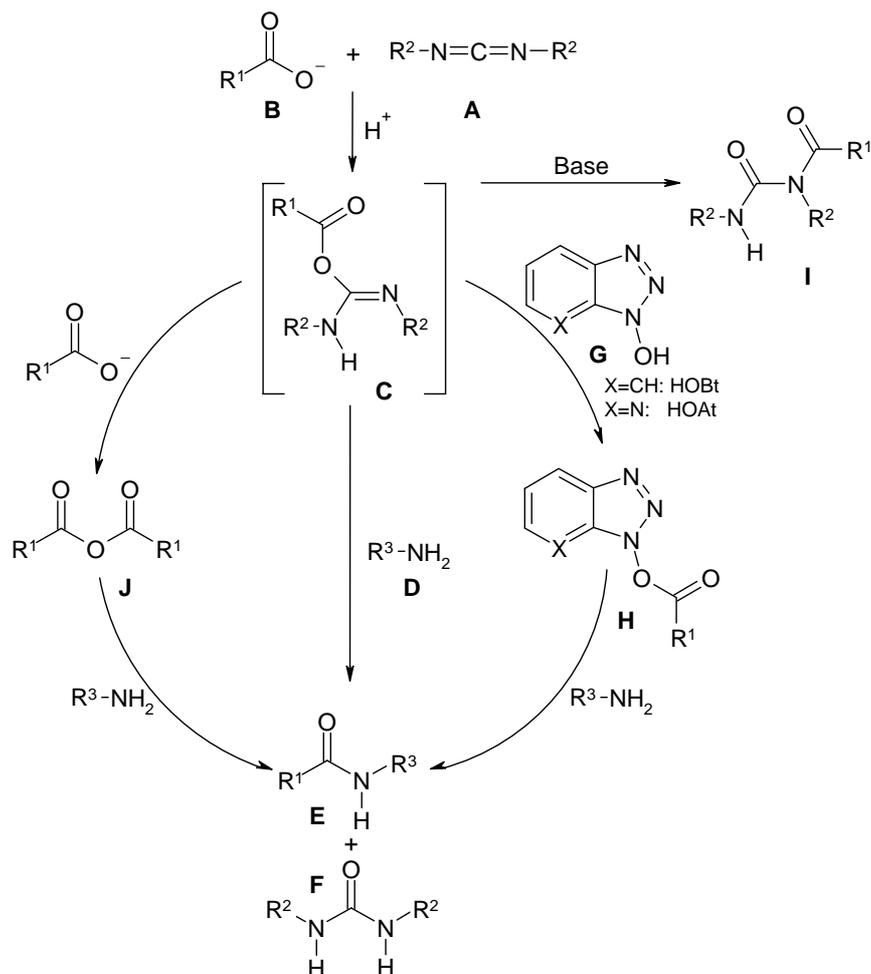


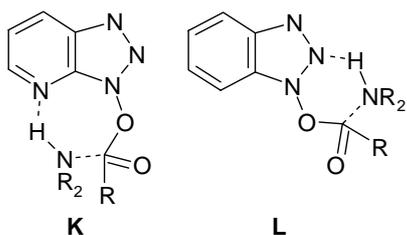
Abbildung 4: Mechanismus der Peptidkupplung durch Carbodiimide

Ein weiteres Problem dieser Methode ist die Racemisierung¹⁰ bzw. Epimerisierung an C^α über Oxazolombildung von N -Acyl-, nicht jedoch Urethan-geschützten Aminosäuren und die basenkatalysierte intramolekulare Acylgruppenwanderung vom O -Acyl- (**C**) zum N -Acyl-Iso-

¹⁰ Hierbei sei bemerkt, dass die beschriebene „Racemisierung“ im klassischen Sinne einer Epimerisierung entspricht, jedoch hat sich in der Peptidchemie der Begriff der „Racemisierung“ etabliert und wird in dieser Arbeit beibehalten - im vollen Bewusstsein, dass es sich im engeren Sinne um eine Epimerisierung handelt und die Racemisierung eigentlich die Entstehung eines epimeren Gemisches beschreibt.

harnstoffderivat (**I**) unter Abbruch der Reaktion. Zur Unterdrückung dieser Nebenreaktionen kann der Reaktionsmischung als Additiv HOBT^[130] oder dessen Aza-Analogon HOAT^[131] (**G**) zugesetzt werden (König-Geiger-Protokoll^[130]). Ein alternativer Syntheseweg entsteht durch die Bildung symmetrischer Anhydride (**J**) durch die Reaktion des O-Acyl-Isoharnstoffderivats (**C**) mit einem weiteren Säureäquivalent (**B**). Das gebildete Anhydrid bildet dann das aktivierte Säurederivat und reagiert mit der Aminofunktion (**D**) weiter zum Peptid (**E**), wobei gleichzeitig die Bildung des N-Acyl-Nebenprodukts (**I**) unterdrückt wird. Aus diesem Grund wird oft mit einem zweifachen Überschuss an Säuredukt gearbeitet und das Carbodiimid dient im engeren Sinne nur der Voraktivierung zur Bildung der Anhydride, bevor die Mischung mit der Aminkomponente versetzt wird.

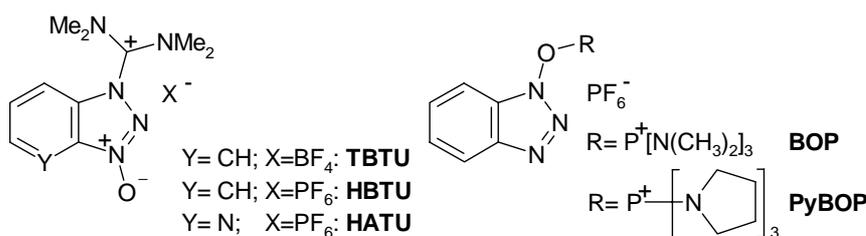
Der durch Zusatz von HOBT und HOAT gebildete Aktivester (**H**) steht mit zwei N-Acyl-Tautomeren im Gleichgewicht, bei denen die Acylgruppe mit jeweils einem der anderen Stickstoffatome der Triazol-Einheit verbunden ist, wobei für die Existenz des 2-N-Acyl-Derivats der strukturelle Beweis aussteht.^[152] Allerdings sind die O-Acyl-Varianten deutlich reaktiver als



ihre N-Acyl-Tautomere.^[133] Der Einsatz von HOAT ist bei racemisierungsanfälligen Kupplungen vorzuziehen, da es im Vergleich zu HOBT die Racemisierung deutlich stärker unterdrückt.^[131] Ein Grund für die höhere Effizienz von HOAT liegt im Nachbargruppeneffekt des 7-Aza-Stickstoffatoms und der Ausbildung eines siebengliedrigen cyclischen Übergangszustandes (**K**).^[134] Hin-

gegen wird beim HOBT-Ester unter Einbeziehung des N-Atoms der 2-Position der Triazolgruppe ein weniger effektiver sechsgliedriger Übergangszustand^[135] (**L**) diskutiert.

HOBT und das Aza-analoge HOAT sind Additive bei Kupplungsreaktionen, die die überaktivierten Zwischenprodukte der Carbodiimidmethode in die weniger reaktiven Aktivester überführen. Sie bilden in Form von Guanidinium- und Phosphoniumsalzen eine eigene Klasse von Kupplungsreagenzien, die gegenwärtig zu den am häufigsten verwendeten Kupplungsreagenzien gehören. Hier seien vor allem die Guanidiniumsalze TBTU^[136], HBTU^[137], sowie das Aza-



analoge HATU^[140] und die Phosphoniumsalze BOP^[138] sowie PyBOP^[139] erwähnt. Wobei der BOP-Ein-

satz zunehmend geringer wird, da es als Nebenprodukt das toxische und kanzerogene Hexa-

methylphosphorsäuretriamid (HMPT) bildet, was bei PyBOP nicht der Fall ist. Die gezeigten Phosphonium- und Guanidiniumsalze sind in Gegenwart einer tertiären Base (z. B. Diisopropylethylamin (DIPEA) oder Collidin (TMP)) in der Lage, die N-geschützte Carboxylkomponente vollständig in den Aktivester (**M**) umzuwandeln (Abbildung 5).^[140] Die Reaktion verläuft dabei über eine Zwischenspezies (**L**), die durch eine intramolekulare Acylgruppenwanderung in den Aktivester überführt wird. Die Vorteile der Guanidinium- und Phosphoniumsalze liegen in der geringen Toxizität, der einfachen Handhabbarkeit, der hohen Reaktionsgeschwindigkeit sowie der sehr geringen Neigung der Aktivester zur Racemisierung.

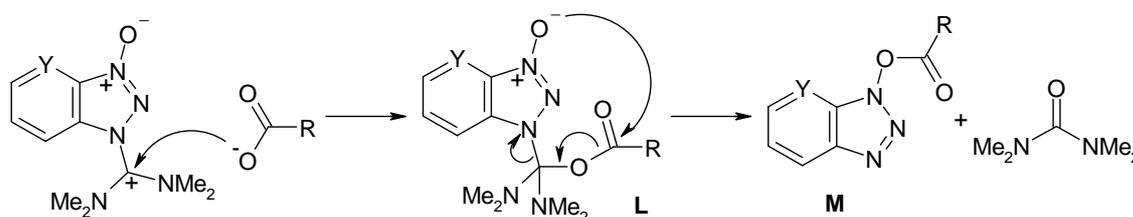


Abbildung 5: Mechanismus der Aminosäureaktivierung mit Guanidiniumsalzen

In Analogie zu den gezeigten Phosphonium-Reagenzien BOP und PyBOP sind seit kürzerem die Uroniumverbindungen O-TBTU bzw. O-HATU synthetisch zugänglich. Diese unterscheiden sich von den Guanidinium-Verbindungen durch die Lage des C⁺(NMe₂)₂-Substituenten, der sich bei diesen „echten“ Uroniumverbindungen, wie für TBTU und HBTU ursprünglich postuliert, am 1-Oxy-Substituenten befindet.^[141] Diese Reagenzien zeichnen sich durch eine deutlich gesteigerte Reaktivität aus, sind jedoch kommerziell noch nicht erhältlich. Ein möglicher Grund der erhöhten Reaktivität liegt in der Lage des oben erwähnten Gleichgewichts der HOBt-Acyl-Derivate. Während bei den Guanidiniumsalzen im Gleichgewicht deutliche Mengen der N-Acyl-Derivate vorliegen, sind bei den Uroniumsalzen unter Verwendung von Collidin als tertiärer Base fast nur die wesentlich reaktiveren O-Aktivester nachweisbar. Jedoch verlagert sich das Gleichgewicht bei Verwendung von DIPEA zugunsten der N-Acyl-Tautomere und die Reaktivität nimmt deutlich ab.^[141]

2.3.2 Festphasenpeptidsynthese

Die klassische Peptidsynthese in Lösung war bis zu Merrifields Entdeckung der Festphasensynthese die dominierende Synthesemethode zur Peptidherstellung. Hierbei laufen alle Reakti-

onsschritte homogen in Lösung ab, wobei das Peptid durch sukzessive Anknüpfung von Aminosäuren vom C-terminalen Ende her aufgebaut wird. Dabei stellt das größte Problem bei der Synthese längerer Peptide die oft auftretende schwere Löslichkeit der wachsenden Peptidkette dar, was zum Teil nur unvollständige Kupplungen gewährleistet und die Synthese längerer Peptide teilweise unmöglich macht.

Die 1963 von Merrifield (Nobelpreis für Chemie 1985) beschriebene Peptidsynthese^[142] an einem unlöslichen polymeren Träger revolutionierte die Peptidchemie nachhaltig und wirkte sich auf viele andere Gebiete der organischen Chemie aus, z. B. Oligonucleotidsynthese und kombinatorische Chemie.

Die Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) folgt dabei einem einfachen,

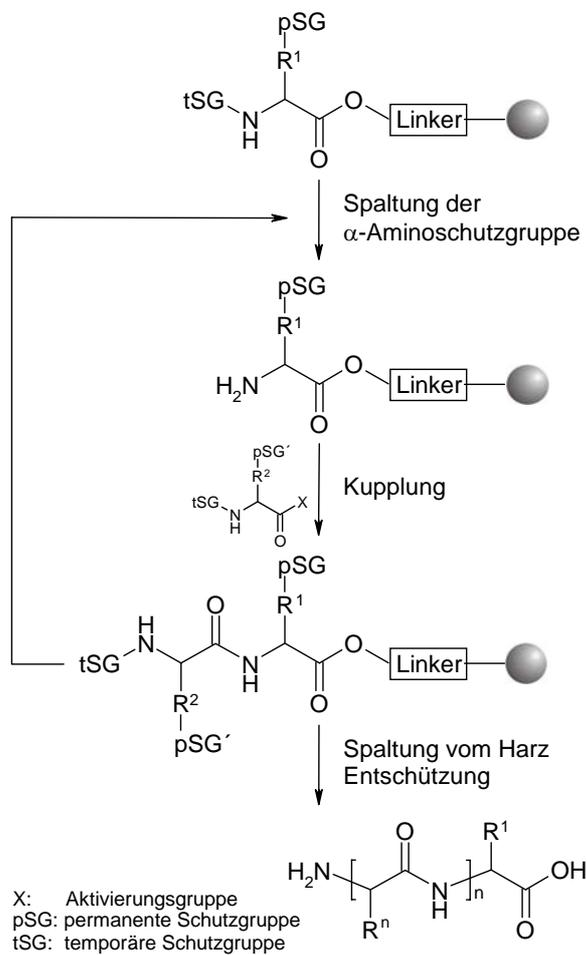


Abbildung 6: Festphasenpeptidsynthese

cyclisch wiederholbaren Schema von α -N-Schutzgruppenabspaltung, C-Aktivierung und Kupplung. In Abbildung 6 ist der schematische Ablauf der SPPS wiedergegeben. Die Synthese beginnt mit dem Anknüpfen des C-Terminus der ersten Aminosäure des Peptids über einen Linker an den polymeren Träger (Synthescharz), wobei die Synthese vom C- zum N-Terminus verläuft. Die α -Aminoschutzgruppe der am Polymer verankerten Aminosäure wird abgespalten und mit einer zuvor oder *in situ* C-terminal aktivierten Aminosäure gekuppelt. Danach beginnt der Synthesecyclus von neuem bis die letzte Aminosäure des Peptids angeknüpft ist. Anschließend wird das Peptid vom Harz abgespalten, dabei entschützt oder im geschützten Zustand weiter derivatisiert. Alle Teilschritte der Synthese laufen dabei in Lösungsmitteln ab, die ein optimales Quellen des Harzes und eine hohe Homogenität garantieren.

Das wachsende Peptid bleibt während der gesamten Synthese am Harz immobilisiert. Reagenzien und Nebenprodukte werden durch Filtrieren des Harzes und Waschen abgetrennt. Um

eine hohe Ausbeute zu gewährleisten, ist es hier möglich, einen hohen Überschuss an Reagenzien einzusetzen, ohne diese aufwändig abtrennen zu müssen. Zudem bietet die Festphasensynthese die Möglichkeit, die Synthese zu automatisieren. Bei der SPPS muss darauf geachtet werden, dass die Kupplungen quantitativ erfolgen. So entstehen z. B. bei einer Ausbeute von 95 % pro Kupplung, die bei der klassischen Synthese in Lösung als gut zu bezeichnen ist, bei einem Peptid aus 100 Aminosäuren nur 0,6 % des gewünschten Produkts. Das heißt, es kommt zu einer großen Anzahl strukturell verwandter, nur schwer trennbarer Fehlsequenzen und insgesamt zu schlechten Ausbeuten. Es müssen deshalb bei der Festphasensynthese die Ausbeuten nahe bei 100 % liegen, um auch bei längeren Sequenzen ein befriedigendes Ergebnis zu erzielen. Eine Kupplungsausbeute von 99,9 % (90,5 % Ausbeute bei 100 AS) ist bei modernen Kupplungsreagenzien üblich und erstrebenswert.

2.3.3 Schutzgruppen

Bei der Wahl geeigneter Schutzgruppen muss auf gewisse Anforderungen der angewandten Gruppen geachtet werden. So ist es entscheidend, dass sich die permanenten und temporären Schutzgruppen so zueinander verhalten, dass sie unabhängig voneinander abgespalten werden können. Alle Schutzgruppen müssen so labil sein, dass sie am Ende der Synthese ohne Schädigung des Peptids entfernt werden können. Für den α -Aminoschutz haben sich Schutzgruppen vom Urethan-Typ, wie Boc und Fmoc, bewährt, während für den Schutz der Carboxylfunktionen vornehmlich Ester, wie Benzyl oder *tert*-Butyl, verwendet werden. Prinzipiell haben sich zwei Schutzgruppenkonzepte etabliert.

Die Boc/Benzyl-Taktik basiert auf der abgestuften Acidolyse der temporären und permanenten Schutzgruppen. Die Boc-Gruppe wird dabei mit 20-50%iger TFA gespalten, während die permanenten Benzylgruppen wegen der erhöhten Säurestabilität nicht angegriffen werden. Sie werden simultan bei der Abspaltung des Peptids vom Harz mit wasserfreier Flusssäure oder anderen starken Säuren entfernt.

Diese Taktik bedingt einige Nachteile, so ist die Synthese von Peptiden mit labilen Peptidbindungen (Asp-Pro und Aib-Pro), die unter den Abspaltbedingungen gespalten werden können, nur schlecht möglich. Die Strategie ist zur Synthese geschützter Peptide nicht anwendbar und erfordert durch den Einsatz von HF, das auch ein großes Gefahrenpotential aufweist, teure Laborausstattungen. Ein Vorteil ist aber, dass Peptide, die zur Ausbildung von β -Faltstrukturen neigen, besser synthetisiert werden können, da diese durch die wiederholte Acidolyse im-

mer wieder aufgebrochen werden und somit die Reaktionen nicht negativ beeinflussen können.

Die Synthese von Peptiden über die Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppentaktik^[143] ist durch die orthogonalen Spaltbedingungen der temporären und permanenten Schutzgruppen der Boc/Benzyl-Taktik überlegen. Als orthogonal werden zwei verschiedene Schutzgruppen bezeichnet, die durch unterschiedliche chemische Mechanismen gespalten werden, wobei die eine im Beisein der anderen gespalten werden kann.^[144] Das Konzept basiert auf dem Einsatz der temporären, basenlabilen Fluorenyl-9-methoxycarbonylgruppe (Fmoc)^[145] (I), die gegenüber sekundären Amininen, wie Piperidin und 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en^[146] (DBU) labil ist (II) (Abbildung 7). Hierbei bietet der Einsatz von Piperidin den Vorteil, dass das reaktive Dibenzofulven (III) abgefangen wird (IV) und sollte daher der Fmoc-Abspaltlösungen immer zugesetzt werden.

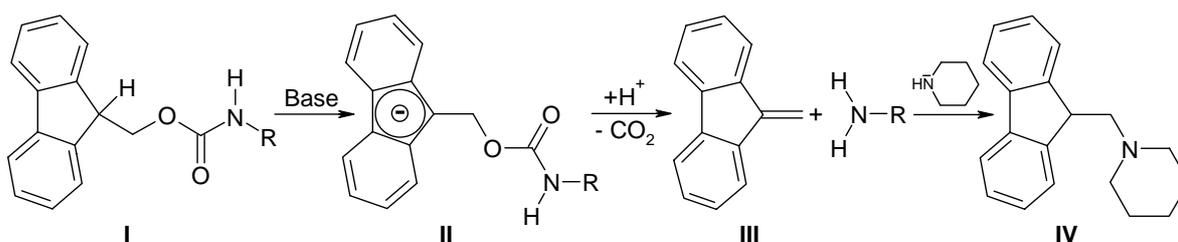


Abbildung 7: Baseninduzierte Spaltung der Fmoc-Gruppe

Der permanente Seitenkettenschutz vom *tert*-Butyl-Typ wird unter sauren Bedingungen deblockiert. Der Zusatz von *Scavengern*, wie Triisopropylsilan (TIS) oder Ethandithiol (EDT), zum Abspaltreagenz dient dabei zum Abfangen reaktiver Carbokationen und verhindert mögliche Nebenreaktionen.^[147] Eine Behandlung der permanenten Schutzgruppen mit 1-2%iger TFA wird toleriert und ermöglicht die Synthese geschützter Peptidfragmente, die nach ihrer Abspaltung vom Harz weiter modifiziert werden können. Die Bildung von β -Faltblattstrukturen kann z. B. durch Zusatz strukturbrechender Lösungsmittel^[148] (DMSO, Trifluorethanol (TFE), Hexafluorisopropanol (HFIP)) unterbunden werden. Weitere Möglichkeiten, die Aggregation und Assoziation der Peptidkette zu verhindern, bestehen im Einbau von Pseudoprolindipeptidderivaten^[149], die nach der Synthese durch die TFA-Spaltung in Threonin- oder Serinreste umgewandelt werden, oder durch den Einsatz von Aminosäurederivaten, die neben der Fmoc-Gruppe z. B. noch einen α -Amino-Hmb-Schutz tragen.^[150]

In Abhängigkeit vom Syntheseproblem kann jedoch auf eine Vielzahl weiterer Schutzgruppen zugegriffen werden. So gibt es Schutzgruppen, die z. B. unter Pd(0)-Katalyse, mit Hydrazin, Thiolen, Fluoriden oder durch Enzyme gespalten werden können.

Die Harze der Festphasensynthese müssen einige Eigenschaften mit sich bringen, um in der Synthese Anwendung zu finden. Sie müssen unter den Reaktionsbedingungen chemisch inert, unlöslich und leicht filtrierbar sein. Dabei hat sich eine Reihe von Polymeren etabliert, wie 1-2 % Divinylbenzen(DVB)-vernetztes Polystyren, Tentagel und Cellulose. Es ist, wie zuvor erwähnt, darauf zu achten, dass sie in den benutzten Lösungsmitteln eine gute Quellbarkeit besitzen. So quillt mit 1-2 % DVB-vernetztes Polystyren in DMF um den Faktor 3,5, in DCM um das Fünffache und in Methanol um den Faktor 0,95.^[151] Das wichtigste Merkmal der Trägermaterialien sind aber deren Linker, wobei es auch hier eine große Anzahl verschiedener Systeme gibt, so dass für jedes Syntheseproblem ein geeignetes Harz gefunden werden kann.

Das klassische von Merrifield eingesetzte Harz (Abbildung 8) ist ein Kopolymer aus Styren und 1-2 % DVB, das durch Chlormethylierung in ein Chlormethylderivat funktionalisiert wird.^[142] An dieses kann dann durch Substitution des Chloratoms durch die Carboxylatgruppe eines Cäsiumsalzes einer N-geschützten Aminosäure die erste Aminosäure geknüpft werden. Das Harz wird in der Boc-Strategie eingesetzt und das Peptid kann durch wasserfreie Flusssäure oder TFMSA vom Polymer gespalten werden.

Bei der Fmoc/*tert*-Butyl-Taktik hat sich als Standard das Wang-Harz^[152] etabliert, ein 1 % DVB-vernetztes Polystyren, an das ein säurelabiler *p*-Hydroxybenzyl-Linker gebunden ist. Es ist säurelabiler als das Merrifield-Harz und kann mit 95%iger TFA gespalten werden, wobei in der Regel auch die permanenten Schutzgruppen entfernt werden. Als Alternative stehen der Strategie sehr säurelabile Linker zur Verfügung, die zur Synthese voll geschützter Peptide genutzt werden können. Hier sei vor allem der *o*-Chlortrityl-Linker (Barlos-Harz)^[153] erwähnt, der durch milde Bedingungen (0,5-1 % TFA bzw. HFIP/DCM 1:4^[154]) gespalten werden kann.

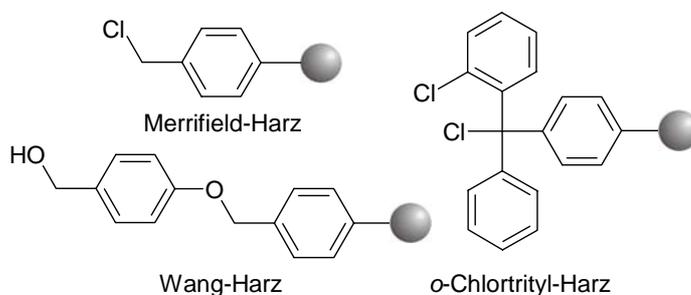


Abbildung 8: Ausgewählte Linker der Fmoc- und Boc-Strategie

Neben den gezeigten Linkern gibt es eine Vielzahl anderer, die unter anderen Bedingungen gespalten werden. Einige seien hier nur kurz erwähnt, so sind *safety-catch*-Linker^[155] gegen diverse Nucleophile labil, wenn sie vor ihrer Spaltung in einem separaten Schritt aktiviert werden. Hydracram-Linker werden unter Pd(0)-Katalyse gespalten,^[156] photolabile Linker durch Licht bestimmter Wellenlänge.^[157]

2.3.4 Cyclopeptide

Neben ihrem Vorkommen als natürliche bioaktive Metaboliten in Form von Hormonen, Antibiotika, Ionen-Transportsystemen, Toxinen etc. sind Cyclopeptide in lebenden Organismen gegenüber proteolytischem Abbau deutlich resistenter als ihre linearen Verwandten und daher oft vielversprechende Kandidaten für die Erforschung pharmakologischer Wirkstoffe. Sie stellen aufgrund ihrer reduzierten konformationellen Flexibilität, sowie der Möglichkeit, bestimmte Funktionalitäten in einer definierten und vorhersagbaren Weise zu präsentieren, z. B. auch interessante Mimetika für die Erforschung der Proteinfaltung dar.^[158] Neben der erhöhten metabolischen Stabilität weisen sie oft eine größere Rezeptor-Selektivität, gesteigerte Aktivität und bessere Bioverfügbarkeit auf. Zudem dienen sie als Analoga biologisch aktiver Peptide zur Aufklärung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung. Durch ihre konformationelle Restriktion sind sie ferner ideale Modellsysteme für Sekundärstrukturelemente und dienen als Modelle zum Mimikrieren von β -Faltblatt- sowie β - und γ -Schleifen-Strukturmotiven.

Von homodeten Cyclopeptiden, die nur Peptidbindungen enthalten, werden die heterodeten Cyclopeptide, die neben Peptidbindungen noch Disulfid-, Ester- bzw. Thioesterbindungen enthalten können, unterschieden.^[125] Auf letztere wird hier jedoch nicht näher eingegangen.

Topologisch werden neben Kopf-Schwanz-Cyclen (über das Peptidrückgrat, *backbone*-Cyclen), Seitenketten-cyclisierte, Seitenkette-Kopf- bzw. Seitenkette-Schwanz-cyclisierte Peptide unterschieden. Dabei sind die kleinsten cyclischen Peptide Cyclodipeptide, Diketopiperazine (DKP), die oft als unerwünschte Nebenprodukte in Lösungs- und Festphasensynthese gebildet werden.^[159] Dabei wird die Bildung der Diketopiperazine z. B. durch die Art der Linker beeinflusst. So begünstigen Linker, die gute Abgangsgruppen bilden, wie die Benzylgruppe des Wang-Harzes, oder elektronenschiebend wirken, die Bildung der DKP, während sterisch anspruchsvolle Linker, wie die des Trityltyps, die Entstehung der DKP unterdrücken.^[153, 160] Diketopiperazine sind als Bausteine für Substanzbibliotheken in der kombinatorischen Chemie für die Arzneimittelforschung von Interesse.^[161] Gezielte Synthesen an der Festphase gehen

dabei entweder von Aminosäuren, die am Harz in sekundäre Amine überführt werden^[161a] oder über die α -Aminogruppe an das Synthescharz gebundene Aminosäuren^[161b] aus.

Für die Synthese homodeter Cyclopeptide mit vier und mehr Aminosäuren sind prinzipiell alle Methoden einsetzbar, die zur Synthese von Peptidbindungen angewandt werden. Jedoch sind Ringschlussreaktionen wesentlich langsamer als die Synthesen von Peptidbindungen in linearen Peptiden, was zu unerwünschten Nebenreaktionen, wie Racemisierung der C-terminalen Aminosäure^[162] oder N-Guanidinylierungen des N-Terminus in Gegenwart von Guanidiniumsalzen,^[163] führen kann (Kapitel 4.3.7). Um das Racemisierungsproblem zu umgehen, sollte, wo möglich, über C-terminale Glycin- oder Prolinreste cyclisiert und auf Kupplungsreagenzien vom HOAt-Typ zurückgegriffen werden, die sich durch sehr geringe Racemisierungen und hohe Ausbeuten auszeichnen.

Des Weiteren besteht das Problem der Cyclooligomerisierung, was bei kleineren Peptiden durch die vornehmlich *trans*-konfigurierte Peptidbindung bedingt ist, da lineare Vorläufer eine gestreckte Konformation bevorzugen. Cyclisierung unter hoher Verdünnung (10^{-3} - 10^{-4} M Peptid-Lösung) minimiert jedoch dieses Problem.

Bei kleinen Peptiden mit weniger als sieben Aminosäureresten hat die Sequenz einen gewissen Einfluss auf die Cyclisierung, so wirken sich Schleifen-induzierende oder *cis*-Peptidbindung-ausbildende Bausteine, wie D-Aminosäuren, Prolin, Glycin bzw. N-alkylierte Aminosäuren, durchaus positiv auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus. So sind reine L-konfigurierte Tetra- und Pentapeptide ohne diese Aminosäuren nur sehr schwer, Tripeptide gar nicht zu cyclisieren. Neben der Cyclisierung des linearen Peptids in Lösung besteht die Möglichkeit der Cyclisierung am Synthescharz (*on-resin*-Cyclisierung) im Anschluss an die Synthese der linearen Sequenz (Abbildung 9). Dabei wird die hohe Verdünnung zur Vermeidung von Oligomeren durch eine geringe Beladung des Harzes erreicht (Pseudoverdünnung). Die Synthese ist mit hohen Überschüssen an Kupplungsreagenzien ausführbar, durch anschließendes Waschen leicht aufzureinigen und automatisierbar. Eine Voraussetzung ist die Immobilisierung des Peptids über eine Seitenkettenfunktion oder über eine Rückgrat-Amidbindung.^[164] Eine zweite ist der Schutz der C-terminalen Carboxylgruppe, wobei in der Fmoc-Chemie vor allem -OAl, -ODmb,^[165] -ODmab als orthogonale Schutzgruppen zu den säurelabilen permanenten und der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe für den C-Terminus einsetzbar sind (dreidimensionales Schutzgruppenkonzept).

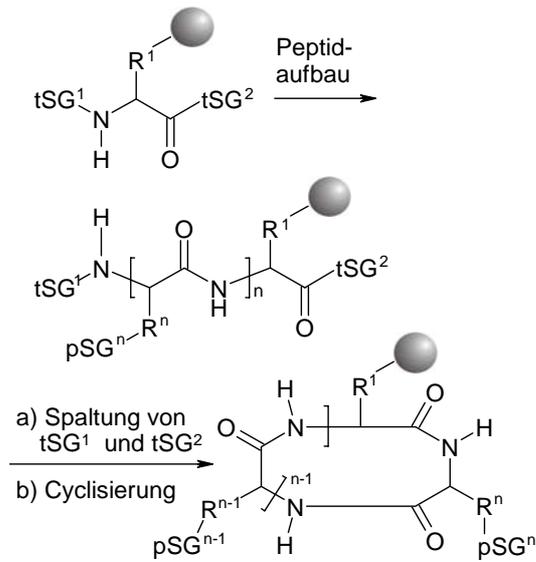


Abbildung 9: *on-resin*-Cyclisierung mit Seitenkettengruppen-Immobilisierung

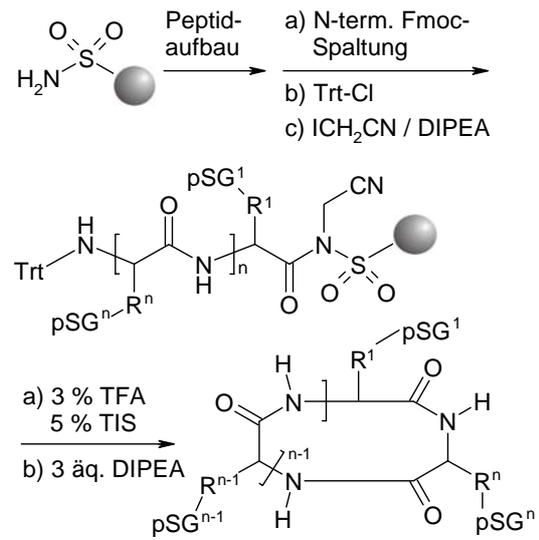


Abbildung 10: Cyclisierung am *safety-catch*-Syntheseharz

Eine Variante der *on-resin*-Cyclisierung stellt die Cyclopeptidsynthese über *safety-catch*-Linker dar (Abbildung 10). Dazu wird das Peptid nach der Synthese der linearen Sequenz N-terminal Trityl-geschützt. Aktivierung des Linkers und anschließende Entschützung des N-Terminus liefert durch intramolekularen nucleophilen Angriff der Aminogruppe auf das terminale Carbonyl-Kohlenstoffatom unter gleichzeitiger Spaltung vom Harz das Cyclopeptid.^[166]

Eine sehr innovative und vorteilhafte Methode basiert auf einer Modifizierung der von Kent entwickelten nativen chemischen Ligation.^[167] Die erste Adaption dieser Technik zur Cyclisierung von Peptiden durch regioselektive intramolekulare Transthioveresterung mit anschließender Ringkontraktion führten Tam und Zhang durch (Abbildung 11).^[168] Diese native Ligationmethode nutzt das Gleichgewicht der Ring-Kette-Tautomere aus, das für lineare Peptide mit N-terminalem Cystein und C-terminalem Thioester existiert. Das in diesem Prozess intermediär generierte Thiolacton unterliegt dann einer irreversiblen Acylgruppenwanderung vom S-Thiolacton zum N-Lactam unter Ausbildung des Rückgrat-cyclisierten Peptids. Diese Methode beinhaltet einige Vorteile gegenüber konventionellen Cyclisierungsmethoden, so kann die Reaktion mit ungeschützten Peptiden in hoch konzentrierten Lösungen (≥ 20 mM) durchgeführt werden. Sie ist konzentrationsunabhängig, ohne dass Oligomere gebildet oder die Ausbeuten beeinflusst werden. Die Cyclisierung verläuft bei milden pH-Werten um 6,0-7,5 und ist auch beim Vorliegen konkurrierender Seitenkettengruppen wie die ϵ -Aminogruppe von Lysin oder von Thiolgruppen weiterer Cysteinreste hoch selektiv.

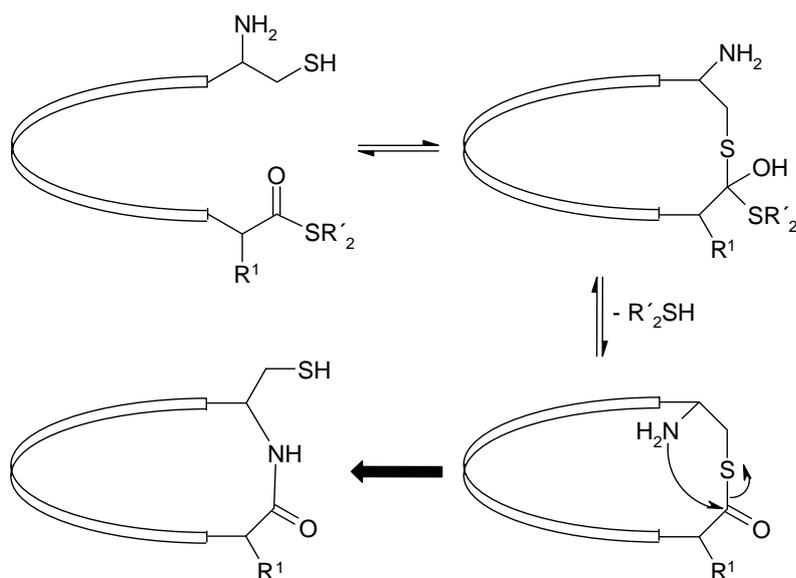


Abbildung 11: Thiol-vermittelte intramolekulare native chemische Ligation

Eine Abwandlung dieser Methode ist die *Thiozip*-Synthese^[169] (Thio-Reißverschluss), bei der Peptide mit N-terminalem Cystein, C-terminalem Thioester und einer oder mehreren weiteren Thiolgruppen cyclisiert werden können. Dabei bildet zunächst die dem C-Terminus nächstgelegene Thiol-Funktion das cyclische Thiolacton aus. Das Thiolacton wandert dann durch Transthioveresterungen über die nächsten Thiolgruppen bis zum N-terminalen Cystein und bildet dort durch die irreversible Acylgruppenwanderung vom S-Thiolacton auf die terminale Aminogruppe das Lactam. Durch die sukzessive Ringexpansion wird die entropische Barriere erniedrigt und dies bedingt sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeiten. Mit dieser Methode könnten sich sehr große Peptid-Makrocyclen aufbauen lassen, die durch andere Methoden nicht zugänglich sind, da sich die Enden der linearen Vorläufer nicht nahe genug kommen.

Ein entscheidender Nachteil dieser Thiol-vermittelten Cyclisierungen ist jedoch der Bedarf eines N-terminalen Cysteins. So wurde von Kent eine Methode entwickelt, bei der kein N-terminales Cystein benötigt wird. Bei dieser Variante wird an die α -Aminogruppe eines N-terminalen Glycins eine Oxyethanthiol-Funktion geknüpft, die in der Lage ist, den Cysteinrest zu mimikrieren. Die Synthese verläuft über die gleichen Zwischenstufen, abschließende reduktive Entfernung der Oxyethanthiol-Funktion mit Zink, liefert das Cyclopeptid.^[170]

Somit stehen für den synthetischen Chemiker eine Vielzahl von Methoden bereit, um je nach Syntheseproblem die gewünschten Cyclopeptide darzustellen und diese in biologischen *Screenings* oder in Modellstudien zu untersuchen.

2.4 Oberflächenplasmonresonanz

Die Messung von Protein-Kohlenhydrat-Bindungskonstanten ist nicht trivial und so wurde eine große Anzahl verschiedener Methoden entwickelt, um diese Affinitäten zu bestimmen. Hier haben sich im wesentlichen vier Techniken durchgesetzt (Hemmung der Hämagglutination (HIA), ELLA-Test (*enzyme-linked lectin assay*), isothermale Mikrokalorimetrie und Oberflächenplasmonresonanz), von denen hier die letztere genauer beschrieben werden soll.

Oberflächenplasmonresonanzmessungen sind sehr populäre Analysemethoden, um qualitative und quantitative Untersuchungen reversibler, makromolekularer Wechselwirkungen biologischer Systeme zu eruieren. Dabei wird die spezifische Bindung eines mobilen Reaktanden an einen auf einer Sensoroberfläche immobilisierten Bindungspartner untersucht, wobei zum Unterschied zu anderen Methoden weder ein Chromophor noch ein *Labeling* des Bindungspartners nötig ist. Die Messung liefert dabei Echtzeit-Informationen über den Bindungsprozess und kann von mM- bis hin zu pM-Affinitäten angewandt werden. Zwei weitere Vorteile insbesondere in Bezug auf die oft nur in sehr geringen Mengen zugänglichen Makromoleküle stellen der nur sehr geringe Substanzbedarf, sowie die geringen Anforderungen bezüglich der Reinheit eines der Bindungspartner dar.

Der Begriff Oberflächenplasmon wurde im Jahr 1960^[171] von Stern und Farrell geprägt, obwohl das Phänomen der Oberflächenplasmonen schon 1912 von Wood^[172] beschrieben wurde, als dieser ein Metallgitter mit in der Einfallsebene polarisiertem Licht, senkrecht zum Gitter, bestrahlte und im reflektierten Licht eine scharfe Linie im Kontinuum beobachtete, die ihre Lage mit dem Einfallswinkel änderte. Erst in den frühen 40er Jahren jedoch wurde das Phänomen als Anregung elektromagnetischer Oberflächenwellen an der Metall-Luft-Grenzfläche erklärt.^[173] Ausgang der 70er Jahre wurde das Potential der Oberflächenplasmonresonanz für die Charakterisierung dünner Schichten^[174] und Verfolgung von Prozessen auf Metalloberflächen^[175] erkannt. Erst 1983 entwickelten Nylander und Liedberg^[176] erste Biosensoren auf Grundlage der Oberflächenplasmonresonanz.

Das theoretische Verständnis von Oberflächenplasmonen leitet sich aus der Plasmabeschreibung der Maxwell-Theorie ab, in der freie Elektronen in Metallen als Elektronenflüssigkeit hoher Dichte (Plasma) beschrieben werden. Oberflächenplasmonen stellen dabei Ladungsdichtefluktuationen auf der Oberfläche dieser Plasmen dar,^[177] Wellen oszillierender Oberflächenladungsdichte, die über die Metalloberfläche wandern.^[178]

Die Oberflächenplasmonen können an dünnen Metallschichten durch reflektierte Photonen oder durch Elektronen, die die Metalloberfläche passieren, unter Resonanzbedingung angeregt werden, wobei im Folgenden nur auf die photonische Anregung eingegangen wird. Die optische Anregung der Plasmonen ist nur an Grenzflächen von Medien mit Dielektrizitätskonstanten entgegengesetzten Vorzeichens (z. B. Metall \leftrightarrow Dielektrikum) möglich,^[179] wobei eine Resonanzkopplung zwischen Licht und freien Metallelektronen erfolgen muss. Hierbei ist eine direkte Anregung der Oberflächenplasmonenwelle an einer planaren Metall–Dielektrikum-Grenzfläche von der Seite des Dielektrikums nicht möglich, da der Impuls der Oberflächenplasmonenwelle immer größer ist als der Impuls des Lichtes im Dielektrikum.^[182] Eine Anregung wird z. B. bei der von Kretschmann und Otto entwickelten Technik der Prismen-Koppler erreicht, die den Effekt der abgeschwächten Totalreflexion (ATR, *attenuated total reflection*)^[180] nutzen. Bei dieser Art von Biosensoren, die auch in dieser Arbeit verwendeten Biacore[®] 3000 Anwendung finden (Abbildung 12), wird Licht an der Grenzschicht zwischen einem Glasprisma, das mit einer sehr dünnen Metallschicht bedampft ist, und einer Probenlösung totalreflektiert.

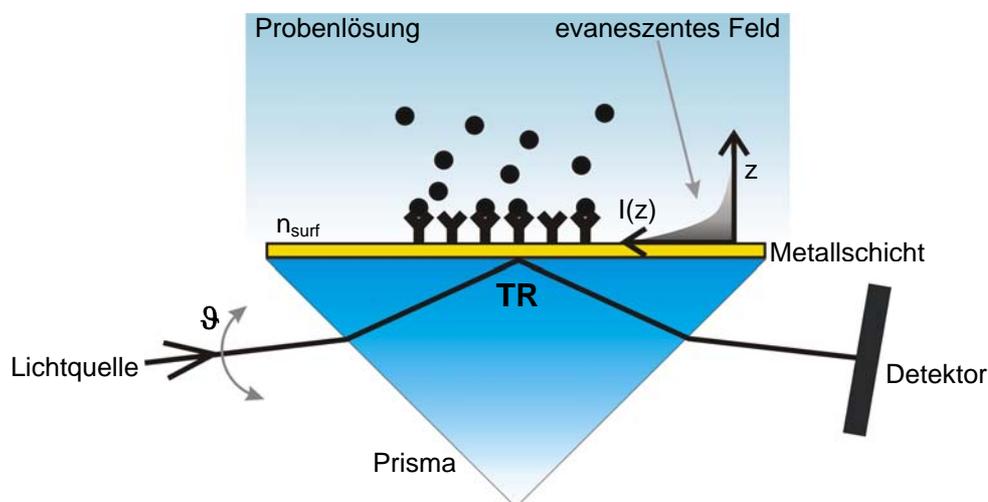


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines SPR-Biosensors mit Prismen-Koppler
(TR: Totalreflexion, n_{surf} : Brechungsindex der Lösung in der Umgebung der Sensoroberfläche, $I(z)$: Intensität des evaneszenten Feldes im Abstand z zur Sensoroberfläche)

Hierbei werden Plasmonen an der äußeren Grenzschicht der Metallschicht in die angrenzende Lösung Resonanz-angeregt, indem eine, durch das einfallende Licht unter Totalreflexion an dem Glasprisma generierte, evaneszente elektromagnetische Welle in die Metallschicht ein-

dringt und oberflächliche Ladungsdichtewellen (Oberflächenplasmonen) erzeugt, die parallel zur Grenzschicht verlaufen. Die Amplitude des elektromagnetischen Feldes der Oberflächenplasmonen fällt dabei exponentiell mit dem Abstand senkrecht zur Oberfläche ab und reicht wenige Hundert Nanometer in das angrenzende Medium des Sensors (Abbildung 13), wobei die Anregung auch innerhalb der Metallschicht erfolgt. Das elektromagnetische Feld der Oberflächenplasmonen ist dabei hoch asymmetrisch verteilt, ca. 90–95 % des Feldes sind im Dielektrikum konzentriert. Die Anregung der Plasmonen kann nur unter einem definierten Einfallswinkel (Resonanzwinkel) erfolgen, wobei der Wellenvektor des Lichts (bzw. Impuls des Photons) der in der Ebene der Metalloberfläche auf den Wellenvektor der Plasmonen trifft, gleichen Betrag und gleiche Richtung bei gleicher Frequenz haben muss. Treten die beiden Wellen in Wechselwirkung miteinander, kommt es durch Resonanz zum Energietransfer. Dieser Effekt wird Oberflächenplasmonresonanz (SPR, *surface plasmon resonance*) genannt.

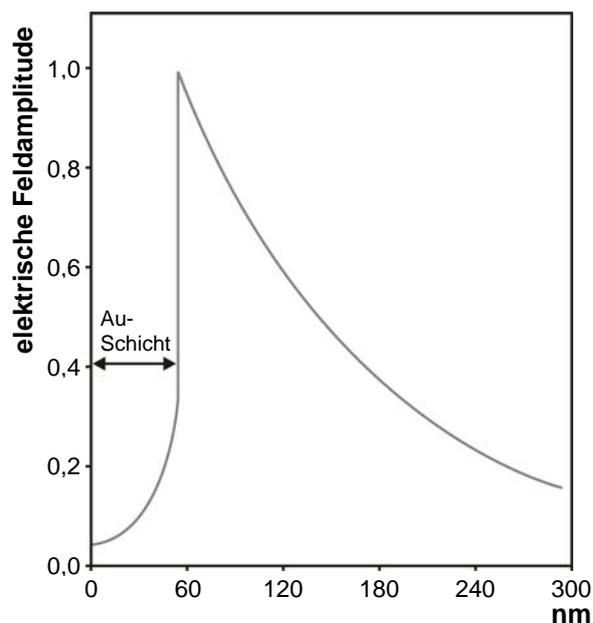


Abbildung 13: Simulierte Amplitude des evaneszenten Feldes als Funktion des Abstandes von der Prisma-Metall-Grenzschicht (normalisiert auf höchsten Wert)

Durch die Resonanzkopplung kommt es zum Energieverlust des reflektierten Lichtes und bei variierendem Einfallswinkel führt sie zu einem scharfen Minimum der Lichtintensität des reflektierten Lichtes (Abbildung 14), dieses Signal wird primär in einem SPR-Spektrum aufgezeichnet. Der Resonanzwinkel hängt dabei direkt vom Brechungsindex (bzw. der Dielektrizitätskonstanten) der Probe in der evaneszenten Welle oberhalb der Sensoroberfläche ab.

Adsorptions- und Desorptionsprozesse von Makromolekülen an der Sensoroberfläche führen zu einer Änderung des lokalen Brechungsindex und haben somit eine Verschiebung des Resonanzwinkels zur Folge, die in guter Näherung bis zu einer Beladung von ca. 50 ng/mm^2 proportional zur Konzentration der Makromoleküle auf der Sensoroberfläche ist.^[181] Da die Eindringtiefe der evaneszenten Welle (maximal 200-400 nm) nur einem Bruchteil der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts entspricht und exponentiell mit dem Abstand zur Metallschicht abfällt (Abbildung 13), ist sie nur für die Metall-Dielektrikum-Grenzschicht sensitiv und Interaktionen mit darüber liegenden Molekülen der angrenzenden Lösung spielen keine Rolle.^[177]

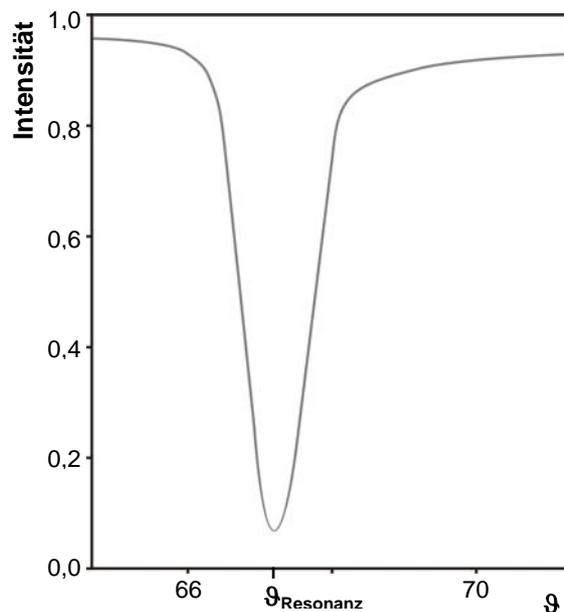


Abbildung 14: Theoretisches SPR-Spektrum an der Grenzfläche Prisma-Silber-Wasser mit dem Intensitätsabfall bei $\vartheta = \vartheta_{\text{Resonanz}}$
 Anregungswellenlänge 632 nm, Ag-Schichtdicke 60 nm, ϑ : Einfallswinkel,
 $\vartheta_{\text{Resonanz}}$: Resonanzwinkel

Andere Biosensoren, die den Effekt der evaneszenten Welle nutzen, sind z. B. Resonanz-Spiegel-Sensoren oder Gitter-Koppler. Sie werden hier nicht weiter beschrieben, besitzen aber eine geringere Empfindlichkeit als die im Biacore[®] 3000 verwendeten Prismen-Koppler, für nähere Einzelheiten sei auf die Literatur verwiesen.^[179, 182]

2.4.1 Immobilisierung

Obwohl SPR-Messungen kein *Labeling* der zu untersuchenden Moleküle voraussetzen, muss einer der Bindungspartner auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden, wobei die Sensor-

oberfläche als makroskopisches *Label* angesehen werden kann. Das Immobilisieren biologischer Makromoleküle ist dabei eher von Nachteil, da die bindenden Liganden in der Regel Moleküle kleineren Molekulargewichts sind und somit zu einem kleineren Bindungssignal führen als ihre makromolekularen Bindungspartner. Ein weiterer Nachteil ist die geringere Sensorbeladung bei häufig reduzierter Aktivität und unspezifischer Adsorption.^[179] Jedoch hängt es vor allem von der Fragestellung und Art beider Reaktanden ab, welcher der beiden Bindungspartner immobilisiert werden kann oder sollte.

Für die Immobilisierung steht eine ganze Reihe verschiedener Techniken zur Verfügung. Eine weit verbreitete Sensoroberfläche ist eine mit der Goldschicht kovalent verbundene carboxymethylierte Dextran-Matrix, die ein flexibles, hydrophiles Gel bildet. Diese Matrix zeichnet aufgrund der gelartigen Struktur eine hohe Bindungskapazität aus, was zu einem Anstieg des SPR-Signals führt, da das evaneszente Feld effektiver wirkt. Im Gegensatz zu reinen Gold- bzw. alkylmodifizierten Oberflächen neigt sie zu geringeren unspezifischen Oberflächensignalen und bietet den Bindungspartnern eine bessere Zugänglichkeit zu den immobilisierten Makromolekülen.^[183] Die Dextran-Matrix kann auf vielfältige Art und Weise derivatisiert werden und erlaubt es, ein breites Spektrum funktioneller Gruppen (-NH₂, -SH, -CHO, -OH, -COOH) anzusprechen (Abbildung 15).

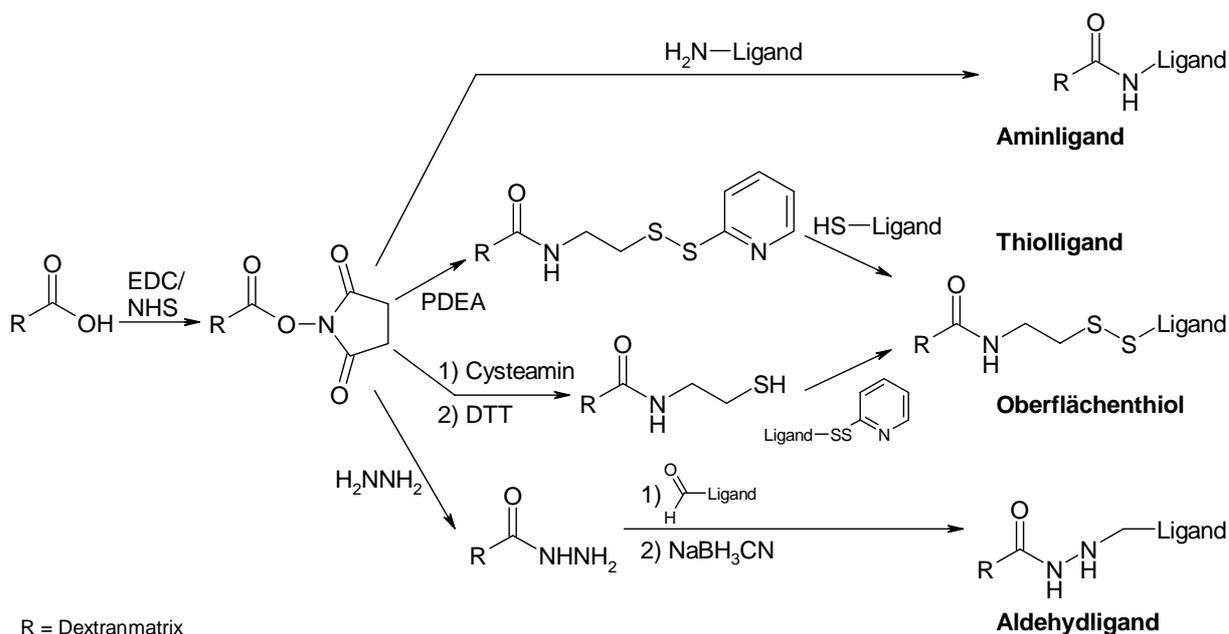


Abbildung 15: Mögliche Derivatisierungen der Dextran-Matrix zur Immobilisierung von Makromolekülen auf der Sensoroberfläche

Eine weitverbreitete Immobilisierungsmethode stellt die Aktivierung der Carboxylgruppen der Dextran-Matrix zum N-Hydroxysuccinimidester mittels N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimid (EDC) (Kapitel 2.3.1) und anschließender Kupplung mit einer Aminogruppe des zu immobilisierenden Moleküls dar (Variante des Wunsch-Weygand-Protokolls^[184]). Die Effektivität der Immobilisierung hängt von der elektrostatischen Anziehung der Moleküle zur negativ geladenen Matrix ab. Daher ist bei Proteinen in Puffern zu arbeiten, deren pH-Wert unterhalb des pI-Wertes liegt^[183a, 185]. Bei unbekanntem pI-Wert wird mittels pH-*Scouting* (SPR-Messung des zu immobilisierenden Proteins mit der Sensoroberfläche bei verschiedenen pH-Werten) der pH-Wert ermittelt, bei dem eine optimale Interaktion zwischen Sensoroberfläche und Protein besteht. Jedoch besteht bei ungünstigem Puffermilieu die Möglichkeit der Denaturierung der Proteine.^[186] Ein weiterer Nachteil der NHS/EDC-Immobilisierungsmethode ist die unspezifische Kupplung an verschiedene NH₂-Gruppen (verschiedene Lysin-Seitenketten) des zu kuppelnden Proteins, was zu Subpopulationen verschiedener Affinitäten führen kann.^[187] Aufgrund dieser Nachteile sind eine Reihe spezifischerer Methoden entwickelt worden, wie der Thiol/Disulfid-Austausch oder die Aldehyd-Kupplung.^[188]

Eine indirekte Kupplungsmethode basiert auf der hohen Affinität der Avidin-Biotin-Wechselwirkung. Dabei wird Avidin bzw. Streptavidin auf der Dextran-Matrix immobilisiert und biotinylierte Makromoleküle gebunden.^[188, 189] Eine verwandte Methode nutzt immobilisierte spezifische Antikörper, die einen der Bindungspartner hoch affin binden.^[190] Es gibt eine Vielzahl weiterer Methoden, die auf verschiedenen Wechselwirkungen beruhen, hier seien nur einige aufgezählt: Chelatbindung von Oligohistidin-Tags über Nickel-Komplexe^[191], Verankerung von mit Lipidankern modifizierten Molekülen in Lipidschichten^[192] und direkte Einbettung von Membranproteinen in membranähnlichen Doppelschichten^[193].

2.4.2 Massentransfer-Limitierung

Bei Bindungsprozessen kann es durch Massentransportprobleme und sterische Effekte auf der Sensoroberfläche zu Artefakten kommen. So führen durch die Immobilisierung hervorgerufene Konformationsänderungen in der Bindungsregion oder sterische Einschränkungen des Zugangs des mobilen Bindungspartners zum Rezeptor zu Änderungen der Bindungseigenschaften. Nichtspezifische Immobilisierungstechniken können zu Subpopulationen verschiedener Orientierungen und Affinitäten führen. Hohe lokale Konzentrationen immobilisierter

Spezies auf der Sensoroberfläche können zur sterischen Beeinflussung benachbarter Bindungsstellen beitragen. Basierend auf empirischen Beobachtungen, dass einfach exponentielle Bindungsprozesse vor allem im unteren Konzentrationsbereich des mobilen Bindungspartners erhalten werden, haben O'Shannessy und Winzor^[194] vorgeschlagen, die Datenanalyse auf solche Bindungsereignisse zu beschränken, die eine einfache 1:1-Kinetik pseudo-erster Ordnung zeigen. Diese Datensätze enthalten die meisten Informationen über die am besten zugänglichen Bindungsstellen, die als beste Vertreter für die Affinität in Lösung angesehen werden können. Signifikante Bindungen zu sterisch beschränkten Orientierungen der Bindungstaschen mit geringeren Affinitäten treten danach nur bei hohen Konzentrationen an mobilen Reaktanden auf.

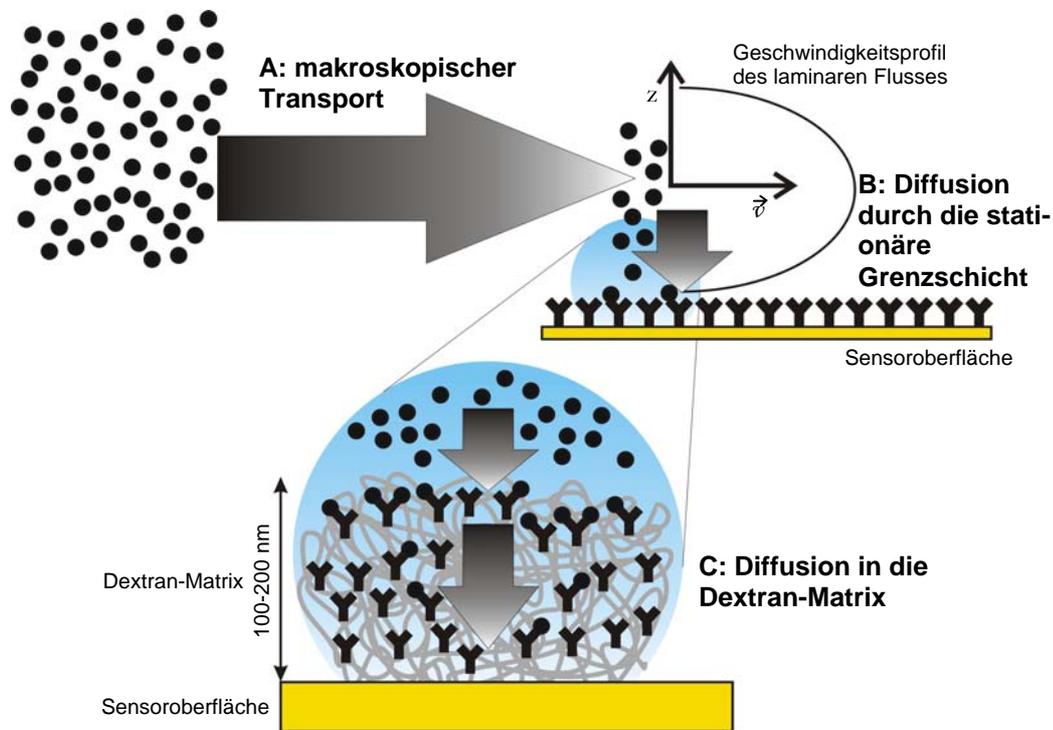


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Faktoren, die den Transport des mobilen Bindungspartners (●) zur Sensoroberfläche mit dem immobilisierten Bindungspartner (Y) beeinflussen

Massentransfer-Limitierungen (Abbildung 16^[178]) können ebenfalls Ursache komplexer Bindungskurven sein. Dabei handelt es sich um Limitierungen der Bindungskinetik durch unzureichenden Transport des mobilen Bindungspartners zur Sensoroberfläche.

Im Unterschied zu Bindungsprozessen homogener verteilter Reaktanden in Lösung müssen im Flusssystem des Biosensors drei zusätzliche Transportstufen beherrscht werden: **A)** der ma-

kroskopische Transport durch das System und über die Sensoroberfläche, der von der Flussgeschwindigkeit der Lösung abhängt; **B**) die Diffusion durch die stationäre Grenzschicht (laminarer Fluss) oberhalb der Sensoroberfläche, die von der Flussgeschwindigkeit der Lösung, der Flusszellengeometrie und dem Diffusionskoeffizienten des mobilen Reaktanden in Lösung bestimmt wird und **C**) die Diffusion durch oder innerhalb der Immobilisierungsmatrix, die von der Größe und Ladung des mobilen Reaktanden, der Dicke und Dichte der Dextranmatrix und dem Diffusionskoeffizienten des mobilen Reaktanden in der Polymerlösung beeinflusst wird.

Sowohl während der Assoziation als auch der Dissoziation kann es zu Massentransfer-Limitierungen kommen, wobei der Effekt als das Nicht-Aufrechterhalten der Ausgangskonzentration der mobilen Spezies auf der Sensoroberfläche und in der Umgebung der Bindungsstellen während des Bindungsprozesses angesehen werden kann. In der Assoziationsphase einer schnellen Oberflächenbindung konkurrieren die immobilisierten Bindungsstellen um ein limitiertes Angebot an Bindungspartnern, was zu einer lokalen Verringerung des mobilen Bindungspartners nahe der Oberfläche führt, da die Regenerierung durch die Transportrate limitiert ist.^[195] In der Dissoziationsphase kommt es durch eine nicht abnehmende Konzentration des mobilen Reaktanden zu einer Rückbindung an nicht besetzte Bindungsstellen, falls die Dissoziationsrate höher ist als die Transportrate. All diese Prozesse beeinflussen die Bindungskinetik und führen zu einer Transport-kontrollierten Bindung, mitunter weit entfernt von der Diffusionskontrolle in Lösung, was zu Geschwindigkeitskonstanten führen kann, die um Größenordnungen kleiner sind als die realen intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten der Wechselwirkung.^[196]

3 AUFGABENSTELLUNG

Zur Optimierung pharmakologisch wirksamer Peptidsequenzen ist es wichtig, Peptide mit definierter dreidimensionaler Struktur potentiellen Rezeptoren anzubieten. Dadurch lassen sich für Wechselwirkungen notwendige strukturelle Voraussetzungen erkennen und mögliche Therapeutika gegebenenfalls verändern, um affinere und spezifischere Wirkstoffe zu generieren.

Basierend auf bekannten über *Phage-Display* gegen den L2-412-Antikörper erhaltenen Peptidsequenzen,^[64] die als Mimetika für das L2/HNK-1-Kohlenhydratepitop dienen, sollen strukturell fixierte cyclische Peptide synthetisiert werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleiten zu können. Die linearen L2/HNK-1-Kohlenhydrat-mimikrierenden Peptide besitzen die Eigenschaft, das Neuritenwachstum motorischer Neurone zu fördern. Mit Hilfe affinerer Cyclopeptide soll diese Eigenschaft gesteigert werden, um eventuell geschädigte Nerven regenerieren zu können. Zudem können affine Cyclopeptide Leitstrukturen für optimierte pharmakologische Substanzen liefern.

Es sollen dabei überlappende hexamere Teilsequenzen der linearen Dodecapeptide TFKLESTTLEYY, TFQLSTRITLPFS und des Oktapeptids FLHTRLFV als Ausgangspunkte für Strukturoptimierungen dienen. Es sollen Hexapeptide durch Cyclisierung und den Einbau von D-Aminosäuren konformativ fixiert und für biologische Systeme stabilisiert werden. Dazu werden Cyclopeptide einem D-Aminosäure-Scan unterworfen, um den strukturellen Einfluss der verschiedenen Peptidkonformationen der Ausgangssequenz auf die Bindungseigenschaften der Cyclopeptide an den L2-412-Antikörper zu untersuchen.

Die linearen Dodecapeptide und ihre randomisierten Peptidsequenzen sollen synthetisiert und als Referenzen für die Struktur-Affinitäts-Beziehungen dienen.

Ausgehend von standardisierten Cyclopeptidsynthesen soll eine optimierte Syntheseroute entwickelt werden, um ungewünschte Nebenreaktionen, wie Cyclodimerisierungen, zu minimieren oder gänzlich zu eliminieren. Dabei sollen verschiedene Synthesewege erarbeitet und verglichen werden.

Des Weiteren ist eine Syntheseroute für Histidin-enthaltende cyclische Peptide zu erarbeiten. Da bei diesen Synthesen unter Standardbedingungen häufig Nebenprodukte unter Veränderung des Imidazolrings des Histidins auftreten, sollen alternative Synthesemethoden entwickelt werden, bei denen diese Nebenprodukte gar nicht auftreten oder deutlich unterdrückt werden.

Zur Untersuchung der Antikörper-Peptid-Wechselwirkungen soll ein Oberflächenplasmonresonanztest entwickelt werden, mit dem die verschiedenen synthetisierten Peptide auf ihre Affinität zum L2-412-Antikörper untersucht werden können. Konzentrationsabhängige Bindungsstudien der Peptide am L2-412-Antikörper sollen dabei Aufschluss über die Komplexeleichgewichtskonstanten der Antikörper-Peptid-Interaktionen geben. Die synthetisierten linearen Ausgangssequenzen und ihre randomisierten linearen Homologen sollen bei diesen Untersuchungen als Referenzen dienen.

Basierend auf den Bindungsstudien soll ein affines Cyclopeptid über einen Alanin-*Scan* ermittelt werden, bei dem der Austausch einer Aminosäure der Sequenz gegen einen Alaninrest die Bindungseigenschaften dieses Cyclopeptids nicht negativ beeinflusst. Darauf stützend soll ein Cyclopeptid synthetisiert werden, das an der Alaninposition mit einem Linker versehen wird, um das Peptid für Oberflächenplasmonresonanzstudien direkt auf der Chipoberfläche zu immobilisieren und inverse Bindungsstudien durchzuführen.

Zur Erhärtung der erhaltenen Ergebnisse der Bindungsstudien sollen die affinen Cyclopeptide in Neuritenwachstumsexperimenten getestet werden, um deren Potenz in Zelltests zu unterstreichen.

Korrelationen der Neuritenwachstumsexperimente und der Oberflächenplasmonresonanzstudien sollen abschließend strukturelle Voraussetzungen für potentielle peptidische Wirkstoffe für die Behandlung beschädigter peripherer motorischer Nerven aufzeigen.

4 SPEZIELLER TEIL

4.1 Glykomimetikasequenzen

In dieser Arbeit wird auf Peptidsequenzen zurückgegriffen, die in der Arbeitsgruppe von Professorin M. Schachner¹¹ erarbeitet wurden. Im Folgenden werden diese Sequenzen und Experimente, die ihre mimetischen Eigenschaften untermauern, kurz beschrieben. Es handelt sich dabei um das bereits erwähnte Peptid von M. Simon-Haldi (Kapitel 2.1.6), das über *Phage-Display* mit einer randomisierten 15mer Peptidbibliothek aus $2 \cdot 10^8$ verschiedenen filamentösen fUSE5-Phagen erhalten wurde.^[64] Jeder der Phagen präsentiert dabei ein 15mer-Peptid, das mit dem pIII-Protein des Phagen N-terminal fusioniert ist. Die Phagen wurden durch *Screening* gegen den L2-412-Antikörper selektiert, wobei gebundene Phagen durch *pH-Shift* eluiert wurden. Phagen darauf folgender *Phage-Display*-Runden wurden nach dem Amplifizieren mit unspezifischen Ratten IgG zum Unterdrücken unspezifischer Wechselwirkungen präinkubiert. Es konnten mit der verwendeten Peptidbibliothek verschiedene Peptide erhalten werden, wobei ein Phage mit der Peptidsequenz FLHTRLFVSDWYHTP näher untersucht wurde. Dieser Phage bindet im Gegensatz zu einem nicht-selektierten Kontrollphagen der Bibliothek an den L2-412-Antikörper. Er bindet nicht an Kontroll-IgG und -IgM der Ratte und nicht an den HNK-1-Antikörper, der nur die sulfatierte Form des L2/HNK-1-Kohlenhydratepitops erkennt. In Kompetitionsstudien hemmen dieser Phage, ein 14mer-Peptid, das die C-terminale Sequenz des Phagenpeptids repräsentiert, und ein synthetisches L2-HNK-1-Kohlenhydrat-

¹¹ Zentrum für molekulare Neurobiologie, Institut für Biosynthese neuraler Strukturen, Universität Hamburg

analogon die Bindung des L2-412-Antikörpers an isolierte L2/HNK-1-Glykolipide gleichermaßen.^[64]

Zur Steigerung der Selektivität wurden *Phage-Display*-Experimente unter modifizierten Elutionsbedingungen durchgeführt. Die gebundenen Phagen wurden nicht durch einen unselektiven pH-*Shift* sondern entweder durch Inkubation mit einer Mischung L2/HNK-1-tragender Glykoproteine des adulten Mäusegehirns oder mit dem synthetischen L2/HNK-1-Kohlenhydratanalogon eluiert. Die hierbei isolierten Phagen tragen interessanterweise Peptide, die alle eine gemeinsame Konsensussequenz tragen. Die isolierten Sequenzen stimmen mit den sechs Resten des N-Terminus des obigen Peptids überein, wobei der Hexasequenz jeweils zwei hydrophobe Aminosäuren folgen. Als übereinstimmendes Motiv der Peptide kann somit folgende Konsensussequenz angegeben werden:

FLHTRLXX, X = hydrophobe Aminosäuren (F, V oder L)^[64]

Weitere Tests zeigten, dass diese Peptidsequenz in der Lage ist, als Kohlenhydratmimetikum für das L2/HNK-1-Epitop zu dienen. Da motorische Neuronen signifikant längere Neuriten als sensorische Neuronen auf L2/HNK-1-Glykolipid-tragenden Substraten ausbilden, wurden Neuritenwachstumsexperimente mit motorischen und sensorischen Neuronen von Hühnerembryonen durchgeführt. Als positive Kontrolle dienten L2/HNK-1-Glykolipide.^[51b] Die Experimente zeigten, dass das 14mer-Peptid und ein kürzeres Oktapeptid mit der Konsensussequenz (FLHTRLFV) die Neuriten motorischer Neuronen deutlich zum Wachstum stimulieren. Während die Positivkontrolle (L2/HNK-1-Glykolipid) das Wachstum der Neuriten ebenfalls stimulierte, besaß ein randomisiertes Peptid diese Eigenschaft nicht. Zudem beeinflussten das 14mer- und das Oktapeptid den Grad der Polarität der Neuriten, der definiert ist durch das Verhältnis der Länge des längsten Neuriten zur Durchschnittslänge aller Neuriten der Zelle. Je höher dabei die Polarität ist, desto größer ist die Neigung eines Neuriten der Zelle sich von den anderen abzuheben, vermutlich ähnlich dem Axon *in vivo*. Hierbei erwies sich jedoch das Oktapeptid im Gegensatz zum 14mer als effektiver, aus welchem Grund ist nicht geklärt. Diese Resultate zeigen, dass die L2/HNK-1-Glykomimetika nicht nur das Neuritenwachstum begünstigen, sondern dass sie besonders im Vergleich zu den vermeintlichen Dendriten das putative Axon stimulieren. Wachstumsexperimente mit Neuronen des dorsalen Wurzelganglions zeigten jedoch bei der Präsenz der verschiedenen Substrate keinen Einfluss, weder auf das Neuritenwachstum noch auf die Polarität.^[64] Diese Studien unterstreichen Beobachtungen, wonach sensorische Neuronen indifferent auf die L2/HNK-1-Kohlenhydratepitope reagieren.^[51b] Zudem konnte direkt die Bindung des Oktamers an die Motoneuronen

nachgewiesen werden, indem biotinyliertes Oktapeptid mit einem Meerrettich-Peroxidase-Streptavidin-Konjugat und anschließender Farbreaktion mit Diaminobenzidin auf dem Motoneuronen nachgewiesen wurde.

Zudem wird auf zwei weitere Peptide zurückgegriffen, die beim *Phage-Display* mit der oben beschriebenen Sequenz erhalten wurde:

TFKLSETTLEYY

TFQLSTRTPFS

Ein auffallendes Merkmal dieser Peptidsequenzen ist der hohe Anteil hydroxylierter, aromatischer sowie cyclischer Aminosäurereste. Von den 15 Aminosäuren der Sequenz FLHTRLFVSDWYHTP gehören zehn zu diesen Gruppen. Sieben der zwölf Aminosäuren der Sequenz TFKLSETTLEYY sind Aminosäuren, die den drei erwähnten Gruppen angehören. In der Sequenz TFQLSTRTPFS gehören sogar acht von zwölf Aminosäuren dazu. Die Anhäufung aromatischer, cyclischer und Hydroxylgruppen-tragender Aminosäuren scheint ein Merkmal von Peptiden zu sein, die Kohlenhydrate mimikrieren. Ein Vergleich mit anderen Kohlenhydratmimetika (Tabelle 2, Seite 16) zeigt Übereinstimmungen in der Art der Aminosäuren, so enthalten viele einen hohen Anteil aromatischer Reste, die den Kohlenhydraten in ihrer Größe und cyclischen Gestalt ähneln könnten.^[197, 81] Die Aminosäuren Serin und Threonin kommen zwar in den bekannten Sequenzen weniger häufig vor, stellen aber offensichtlich durch ihre Hydroxylgruppen eigentlich eine ideale Basis zur Nachahmung etwaiger Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Kohlenhydrat-OH-Gruppen und Rezeptor dar. Diese Sequenzhomologien stellen einen möglichen Hinweis auf die diskutierte strukturelle Mimikry dar (Kapitel 2.2.1).

4.2 Peptid-Design

Ist die Erkennungssequenz eines peptidischen Liganden bekannt, so ist es möglich, durch die Fixierung der räumlichen Struktur eine erhöhte Aktivität und Rezeptorselektivität zu erreichen. Die Verwendung cyclischer Peptide stellt heute ein Standardverfahren für die Bestimmung der biologisch aktiven Konformation und die Entwicklung von Pharmaka dar. Es konnte gezeigt werden, dass Cyclisierungen dazu geeignet sind, hohe Aktivität und Selektivität zu erzielen, wenn die optimale Konformation im Cyclus angenähert ist (*matched-Fall*).^[198] In solchen Fällen erweisen sich die cyclischen Strukturen als deutlich aktiver und selektiver als die linearen Analoga.^[199] Jedoch kommt es häufig durch die Cyclisierung zu einer räumlich fixierten Struktur, in der das Peptid nicht die bioaktive Konformation einnehmen kann (*mismatched-*

Fall), wodurch die Aktivität drastisch vermindert wird. Die Suche nach der optimalen Cyclisierung ist oft ein langer, schwieriger Weg.^[200]

Ist die Konformation einer Peptidsequenz im rezeptorgebundenen Zustand, die „bioaktive Konformation“, nicht bekannt, so stellen zum Auffinden dieser Konformation stereoisomere Peptidbibliotheken eine Möglichkeit dar, die optimale Struktur einzugrenzen (*spatial screening*). Dazu wird die „bioaktive Sequenz“ unter Erhaltung der Konstitution, d. h. aller biologisch relevanter Gruppen, durch bestimmte Strukturbildner systematisch verändert und in verschiedenen Konformationen dem Rezeptor angeboten. Um zu detaillierten Struktur-Wirkungsbeziehungen zu gelangen, müssen die Moleküle in möglichst starrer Konformation fixiert sein, wie es bei Cyclopeptiden der Fall ist. Die Cyclopeptide sollten möglichst klein sein, d. h., maximal sechs Aminosäuren umfassen, da bei größeren Peptiden bereits eine zu hohe Dynamik zu erwarten ist. Durch *backbone*-Cyclisierung ist es möglich, die räumliche Beweglichkeit stark zu reduzieren, und die konformationelle Entropie dieser Cyclopeptide erniedrigt sich dadurch entscheidend. Liegt dabei die biologisch aktive Konformation im Rahmen des *induced fit*, führt die Einschränkung der konformationellen Freiheitsgrade aus entropischen Gründen zu einer erhöhten Bindungsaffinität zum Rezeptor.

Bei homodeten Cyclopeptiden hängt die Konformation entscheidend von der Konfiguration der sie aufbauenden Aminosäuren ab. Wechselwirkungen funktioneller Gruppen der Seitenketten mit dem Peptidrückgrat, wie sie von Serin oder Threonin in der *i*-Position von β -Schleifen oder von Asparagin beschrieben sind,^[201] sowie Verzweigungen am β -C-Atom spielen bei der Ausbildung der Konformation nur eine untergeordnete Rolle. Cyclische Hexapeptide bevorzugen meistens eine Struktur mit zwei β -Schleifen.^[202] Dieses Strukturmotiv spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Tertiärstruktur, der Proteinfaltung und bei der intermolekularen Erkennung. Eine β -Schleife bildet in der Proteinstruktur eine Umkehr der Richtung des Peptidrückgrats und besteht aus einer vier Aminosäurereste umfassenden Sequenz (*i* bis *i*+3). Dabei bilden normalerweise Reste mit starken Schleifen-induzierenden Eigenschaften β -Schleifen aus, wodurch das Polypeptidrückgrat eine Konformation einnimmt, in der der Abstand zwischen C_{α_i} und $C_{\alpha_{i+3}}$ kleiner als 7 Å ist. Es wurden über 10 verschiedene β -Schleifentypen identifiziert und klassifiziert.

In einer β -Schleife ist die CO-Gruppe der Aminosäure der *i*-Position über eine Wasserstoffbrückenbindung mit der NH-Gruppe der Aminosäure der *i*+3-Position verbunden. Es ist zudem bekannt, dass D-Aminosäuren und L-Prolin die *i*+1-Position einer β II'-Schleife stark be-

vorzuzug (Abbildung 17). In diesem Typ der β -Schleife werden bestimmte Torsionswinkel zwischen den Aminosäuren der β -Schleife ($\Phi_{i+1} = 60^\circ$, $\Psi_{i+1} = -120^\circ$, $\Phi_{i+2} = -80^\circ$, $\Psi_{i+2} = 0^\circ$) ausgebildet.

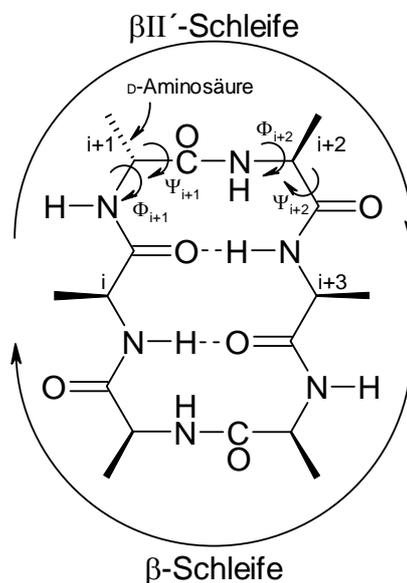


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Struktur eines Cyclohexapeptids mit D-Aminosäure in der $i+1$ -Position

In einem cyclischen Hexapeptid mit L-Aminosäuren der Sequenz ABCDEF und der biologisch aktiven Sequenz ABC stehen demnach drei Konformationen miteinander im Gleichgewicht, in denen die Sequenz ABC jeweils eine andere Position im Ring einnimmt (Abbildung 18a). Da eine D-Aminosäure die $i+1$ -Position in der β II'-Schleife bevorzugt, ist es möglich, durch den gezielten Austausch einer L-Aminosäure der Teilsequenz DEF durch eine entsprechende D-Aminosäure d, e, f, in einem sogenannten D-Aminosäure-Scan je nach Wahl der ausgetauschten Aminosäure, die aktive Sequenz in drei rigiden Konformationen zu fixieren (Abbildung 18b). Dadurch wird die Zielsequenz bei gleicher Konstitution und gleicher Abfolge der funktionellen Gruppen in der Sequenz in unterschiedlichen räumlichen Positionen präsentiert. Eine Korrelation mit der biologischen Aktivität kann somit zu der räumlich optimalen Anordnung führen.^[200]

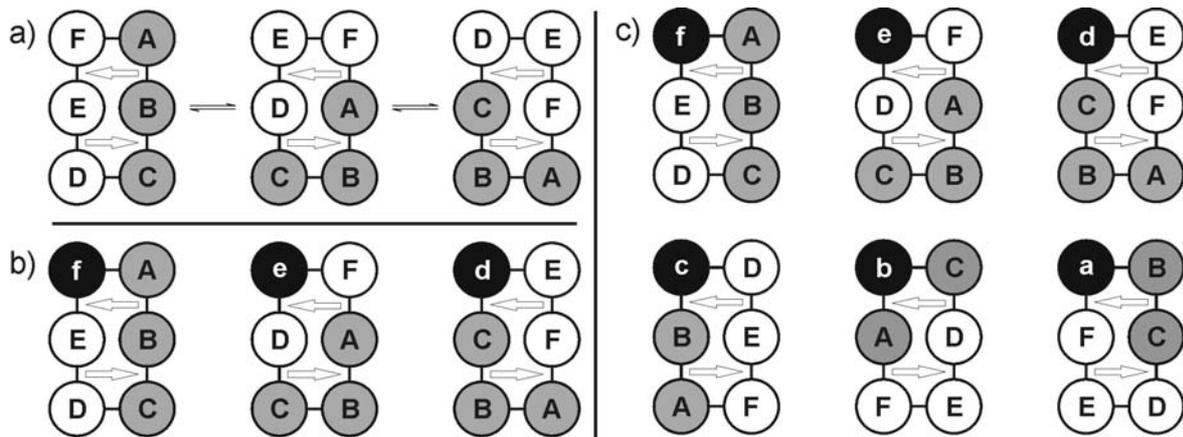


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Strukturen der Cyclohexapeptide

D-Aminosäuren • sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet, die Pfeile symbolisieren die Orientierungen der Wasserstoffbrückenbindungen

Ist die bioaktive Konformation der Hexapeptidsequenz nicht bekannt, lässt sich durch Synthese der sechs Cyclopeptide der Sequenz ABCDEF, in denen jeweils eine der Aminosäuren in der D-Konfiguration vorliegt, die Sequenz ABC in sechs verschiedenen räumlichen Positionen fixieren (Abbildung 18c).^[200] Ein Vergleich der in Abbildung 18c übereinander liegenden Cyclopeptide zeigt aber, dass sich diese in ihrer Struktur sehr ähneln. So ist das Peptid c(ABCDEF) strukturell in das Peptid c(ABcDEF) durch eine 180°-Drehung überführbar. Die beiden Peptide sind jedoch nicht absolut deckungsgleich, da die Aminosäuren A/a und F/f als Enantiomere vorkommen. Dessen ungeachtet ist die Position der Aminosäuren in den β -Schleifen identisch. Infolgedessen lässt sich der D-Aminosäure-Scan eines Cyclohexapeptids durch die Synthese dreier cyclischer Peptide c(aBCDEF), c(AbCDEF), c(ABcDEF) bzw. c(ABCdEF), c(ABCDeF), c(ABCDEF) in guter Näherung vereinfachen, entsprechend Abbildung 18b.

4.3 Synthese stereoisomerer Peptidbibliotheken

4.3.1 Zielstrukturen

Ausgehend von den oben beschriebenen Peptidsequenzen FLHTRLFV, TFKLSETITLEY und TFQLSTRITLPFS werden durch die Synthese verschiedener Cyclohexapeptide stereoisomere Peptidbibliotheken erzeugt. Zur Festlegung der Sequenzen werden die drei Ausgangssequenzen in Hexapeptide mit überlappenden Sequenzen unterteilt. Die erhaltenen Hexamere

werden dann in die cyclischen Peptide überführt, wobei aus jeder Sequenz drei Cyclopeptide unter Austausch je einer L-Aminosäure durch ihr D-Isomer (Abbildung 18b) generiert werden. Festlegung der Hexapeptidsequenzen:

- a) FLHTRLFVS:
FLHTRL.....
.....TRLFVS
- b) TFKLSETTLEYY:
TFKLSE.....
.....LSETTL.....
.....TTLEYY
- c) TFQLSTRTPFS:
TFQLST.....
.....LSTRTL.....
.....RTLTPFS

Ausgehend von diesen Hexapeptidsequenzen stellen folgende Cyclohexapeptide (Tabelle 3) durch den Austausch je einer L-Aminosäure durch ihr D-Isomer die Grundlage der Peptidbibliothek dar. Da, wie oben erwähnt, die Cyclisierung neben affineren Liganden (*matched*-Fall) auch deutlich weniger affine Cyclopeptide (*mismatched*-Fall) hervorbringen kann, dienen die linearen Hexapeptidsequenzen als Referenzen. Dazu wird neben den cyclischen Peptiden jede Hexapeptidsequenz in der linearen all-L-Form synthetisiert, um die Auswirkung der Konformationsänderungen auf die Wechselwirkung zwischen Hexapeptidsequenzen und L2-412-Antikörper besser abschätzen zu können.

Zur Beurteilung des Einflusses der gewählten Hexapeptidsequenzen auf die Peptid-Antikörper-Interaktionen dienen die über *Phage-Display* erhaltenen Ausgangssequenzen der Glykomimetika als Vergleichssubstanzen. Die randomisierten Sequenzen der Ausgangs-peptide dienen zur Kontrolle der Sequenzen insgesamt, denn führen auch diese zu einer Wechselwirkung, so hängt die glykomimetische Wirkung der Ausgangs-peptide nicht von deren Sequenz ab.

Zur genaueren Beurteilung der Reduzierung des D-Aminosäure-*Scans* von sechs auf drei Cyclopeptide pro Hexasequenz wird von den Sequenzen TFKLSE und LSETTL zusätzlich je ein Peptid dargestellt, das einem der drei anderen Peptide der Sequenzreihe (Abbildung 18c) laut obiger Annahme analog ist (Tabelle 3, *kursiv* gesetzte Peptide).

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zu synthetisierenden Peptide, D-Aminosäuren werden der Konvention folgend im Einbuchstabencode mit Kleinbuchstaben abgekürzt:

Tabelle 3: Zielpeptide der Peptidbibliothek

Ausgangssequenz	Peptidreihe	Zielpeptide	Nr.	
a) FLHTRLFV	1) FLHTRL ^[203]	H-FLHTRL-OH*	(1)	
		c(fLHTRL)	(2)	
		c(FIHTRL)*	(3)	
		c(FLhTRL)*	(4)	
		c(FLHtRL)*	(5)	
		c(FLHTrL)*	(6)	
		c(FLHTRL)*	(7)	
	2) TRLFVS	H-TRLFVS-OH	(8)	
		c(tRLFVS)	(9)	
		c(TRLFvS)	(10)	
		c(TRIFVS)	(11)	
b) TFKLSETTLEYY	3) TFKLSE	H-TFKLSE-OH	(12)	
		<i>α</i> (tFKLSE)	(13)	
		c(TfKLSE)	(14)	
		c(TFKLSE)	(15)	
		<i>α</i> (TFKSE)	(16)	
		4) LSETTL	H-LSETTL-OH	(17)
	<i>α</i> (LSETTL)	(18)		
	c(LSETTL)	(19)		
	c(LSETTL)	(20)		
	<i>α</i> (LsETTL)	(21)		
5) TTLEYY	H-TTLEYY-OH	(22)		
	c(tTLEYY)	(23)		
	c(TtLEYY)	(24)		
	c(TTIEYY)	(25)		
c) TFQLSTRTPFS	6) TFQLST	H-TFQLST-OH	(26)	
		c(TFQLsT)	(27)	
		c(TFQLSt)	(28)	
		c(tFQLST)	(29)	
	7) LSTRTL	H-LSTRTL-OH	(30)	
		c(lSTRTL)	(31)	
		c(LsTRTL)	(32)	
		c(LStRTL)	(33)	
	8) RTLPFS	H-RTLPFS-OH	(34)	
		c(RTLPFS)	(35)	
		c(RtLPFS)	(36)	
		c(RTIPFS)	(37)	
	d) lineare Ausgangspeptide			
	FLHTRLFV		H-FLHTRLFV-OH	(38)
TFKLSETTLEYY		H-TFKLSETTLEYY-OH	(39)	
TFQLSTRTPFS		H-TFQLSTRTPFS-OH	(40)	
e) randomisierte Peptide:				
FLHTRLFV		H-HFTLRL-OH	(41)	
TFKLSETTLEYY		H-LTYTEFSYLKET-OH	(42)	
TFQLSTRTPFS		H-TSFTPLRFTSQL-OH	(43)	

* mit * gekennzeichnete Peptide wurden im Rahmen der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit [203] synthetisiert

4.3.2 Allgemeine Festphasenpeptidsynthese

Die Synthese der cyclischen Hexapeptide erfolgt in drei Stufen:

1. Aufbau der linearen Sequenz
2. Cyclisierung
3. Abspaltung der permanenten Schutzgruppen und Aufreinigung über RP-HPLC

Die Darstellung der analogen linearen Hexapeptide geschieht auf gleiche Weise unter Auslassung der Stufe 2. Der Aufbau der linearen Sequenzen verläuft über Festphasenpeptidsynthese (SPPS) am polymeren Träger. Als Syntheseharz wird das 2-Chlortrityl-Harz^[153] verwendet. Der 2-Chlortrityl-Linker bietet den Vorteil, dass synthetisierte lineare Peptide unter Erhalt ihrer permanenten Schutzgruppen mit 0,5-1%iger TFA gespalten werden können. Die an den Seitenfunktionalitäten vollgeschützten Peptide können im Anschluss cyclisiert werden. Die linearen Hexapeptide, die nicht cyclisiert werden, könnten zwar auch mit dem weitaus billigeren Wang-Harz^[152] synthetisiert werden, da bei diesen Peptiden nach Beendigung des Aufbaus der Sequenz die permanenten Schutzgruppen simultan mit der Spaltung vom Harz entfernt werden. Jedoch ist bei diesem Syntheseharz durch die Spaltbedingungen (50-100 % TFA) die Analytik geschützter Peptide z. B. über MALDI-ToF-Massenspektrometrie nicht möglich, was aber bei unklarem Syntheseverlauf zur eindeutigen Charakterisierung der Peptidzwischenstufen vonnöten ist. Aus diesem Grund wird auf den Einsatz des Wang-Harzes verzichtet. Außerdem relativiert sich der Kostenvorteil des Harzes insbesondere bei teuren Aminosäurederivaten, da bei der Beladung des Wang-Harzes unter Verwendung von Standardprotokollen ein viel höherer Überschuss an Aminosäuren eingesetzt wird als dies üblicher Weise beim 2-Chlortrityl-Harz der Fall ist.

4.3.3 Permanente Schutzgruppen

Die Synthese sämtlicher Peptide erfolgt über die Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppentaktik, wobei die α -Aminogruppe mittels der basenlabilen Fluorenyl-9-methoxycarbonylgruppe (Fmoc) geschützt wird. Zum Schutz der Seitengruppenfunktionalitäten bieten sich orthogonal zu spaltende, säurelabile Schutzgruppen an. Im Folgenden wird kurz auf die permanenten Schutzgruppen für die verwendeten trifunktionellen Aminosäuren eingegangen (Abbildung 19).

Der Schutz der ϵ -Aminogruppe des Lysins ist unabdingbar, da Acylierungen dieser Gruppe ansonsten zu verzweigten Peptidketten führen. Einen optimalen Schutz dieser Funktion bietet dabei die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (Boc).

Gleiches gilt für die Carboxylseitenkettenfunktion von Glutamat während der Peptidsynthese. Hier stellen in der Regel die *tert*-Butylester die Standardderivate der Fmoc-Taktik dar.

Durch die starke Basizität der Guanidiniumgruppe des Arginins liegt diese unter normalen Bedingungen in protonierter Form vor, daher wird die Notwendigkeit einer Seitenschutzgruppe kontrovers diskutiert. Bei aktivierten ungeschützten Argininderivaten kann es aber zu ungewollten Cyclisierungen der Seitenkette kommen, wobei δ -Lactame gebildet werden. Nicht zuletzt wegen der besseren Löslichkeit wird die Synthese über die geschützten Argininderivate bevorzugt. Hier besitzt die Gruppe der Tosylschutzgruppen eine besondere Bedeutung, wobei die eng verwandten Pmc^[204] und Pbf-Gruppen^[205] wegen ihrer schnelleren Abspaltkinetik in der Fmoc/*tert*-Butyl-Taktik standardmäßig ihre Anwendung finden. Eine andere Möglichkeit, Arginin-haltige Peptide zu synthetisieren, besteht im Einbau entsprechender Ornithinderivate mit anschließender Umwandlung der δ -Aminogruppe in die Argininseitenkettengruppe.^[206]

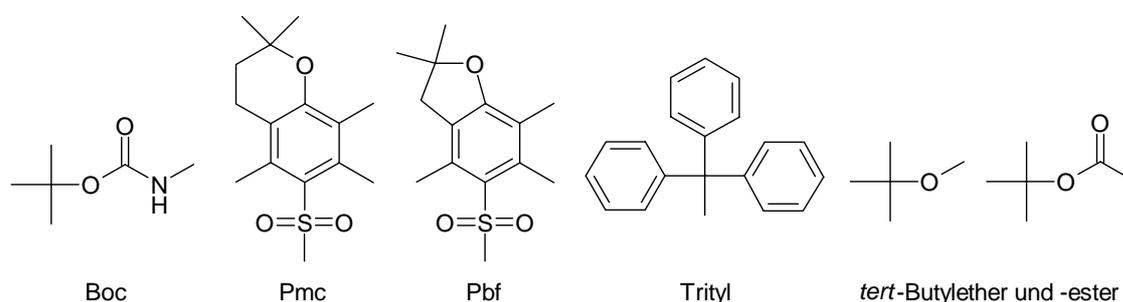


Abbildung 19: Permanente Schutzgruppe der Seitenkettenfunktionen

Bei Glutamin (bzw. Asparagin) kann die Amidgruppe der Seitenkette ungeschützt bleiben, jedoch kann es dann während der Kupplung zur basenkatalysierten Dehydratisierung der Amidgruppe des aktivierten Glutaminderivats unter Ausbildung des entsprechenden Nitrils kommen.^[207] Eine weitere Nebenreaktion von aktiviertem Glutamin ist in Analogie zum Arginin die intramolekulare Cyclisierung der Seitenkette, die zu Glutarimiden^[208] und in schwach saurem Milieu zu Pyroglutamatderivaten^[209] führt. Aus diesen Gründen ist die Synthese mit Seitenketten-geschütztem Glutamin vorzuziehen, obendrein sind die ungeschützten Derivate in DCM und DMF nur sehr schlecht löslich. Überdies wird durch den Seitenkettenschutz die

Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen unterbunden, die zur Stabilisierung von Sekundärstrukturen beitragen und somit zu reduzierten Kupplungsausbeuten führen. Aus diesen Gründen wird in der Fmoc-Taktik bevorzugt mit N-Triptyl-geschützten Derivaten gearbeitet.

Da die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin mit Acylierungsreagenzien reagieren können, werden sie im allgemeinen bei der Fmoc/*tert*-Butyl-Taktik als *tert*-Butylether geschützt.

Die Strategie zum Schutz von Histidinderivaten wird in Kapitel 4.4.1 im Detail diskutiert, hier sei nur angemerkt, dass die Methode der Wahl der Fmoc-Taktik zum Schutz des Imidazolringes meistens Triptyl-geschütztes^[210] Histidin ist.

4.3.4 Racemisierung

Racemisierungen können prinzipiell während jeder Kupplung einer Aminosäure an ein Peptid auftreten. Es gibt zwei Hauptmechanismen, die zur Racemisierung beitragen, so die direkte Enolisierung (Abbildung 20). Hier führt die Abstraktion des α -Protons eines Aminosäurederivats zu einem Carbanion, das reprotoniert werden kann und so zum Verlust der chiralen Integrität führt. Liegt die Aminosäure als freie Säure vor ($R_2 = H$) wird die Enolisierung unter normalen Peptidsynthese-Bedingungen durch die Bildung des Carboxylatanions verhindert. Ist die Aminosäure aber durch einen Ester geschützt oder liegt sie in aktivierter Form vor, kann es zur Racemisierung über diesen Mechanismus kommen. Jedoch hat dieser Mechanismus nur einen geringen Anteil am Racemisierungsgrad während der Aminosäureknüpfung.^[211] Er tritt aber vermehrt bei langsamen Kupplungen auf, wenn sich die aktivierte Spezies genügend lange im basischen Milieu befindet.

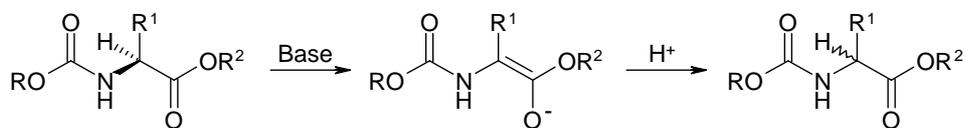
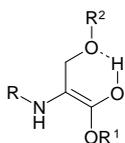


Abbildung 20: Direkte Enolisierung von Aminosäure- und Peptidderivaten

Die erhöhte Racemisierungsgefahr von Serinderivaten^[212] kann ebenfalls auf diesen Mechanismus zurückgeführt werden. Hier wird die Enolform aber über einen sechsgliedrigen Ring stabilisiert, wie nebenstehend gezeigt. Analoge Strukturen tragen zur erhöhten Racemisierung der Cysteinderivate bei.



Der basenkatalysierte Mechanismus der Racemisierung verläuft aber über die Bildung von 5(4H)-Oxazolonen (Abbildung 21).^[213] Diese Intermediate können schnell aus aktivierten Aminosäure- und Peptidderivaten durch Einwirkung von Basen gebildet werden. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Abstraktion des Amidprotons unter simultaner Bildung des Oxazolons.^[214] Abspaltung des α -Protons der Aminosäure führt zu einem resonanzstabilisierten Carbanion, das wiederum reprotoniert werden kann und zum racemischen Oxazolone reagiert. Die Ringöffnung liefert dann das racemische Aminosäure- bzw. Peptidderivat.

Die Rate der Oxazolone-Bildung hängt dabei entscheidend von der Art des α -Aminosubstituenten ab. So verläuft die Entstehung bei einfachen Acyl- oder Benzoyl-substituierten Aminosäuren sowie bei Peptidbindungen sehr schnell. Daher sind Segmentkondensationen und Cyclisierungen besonders betroffene Reaktionen.

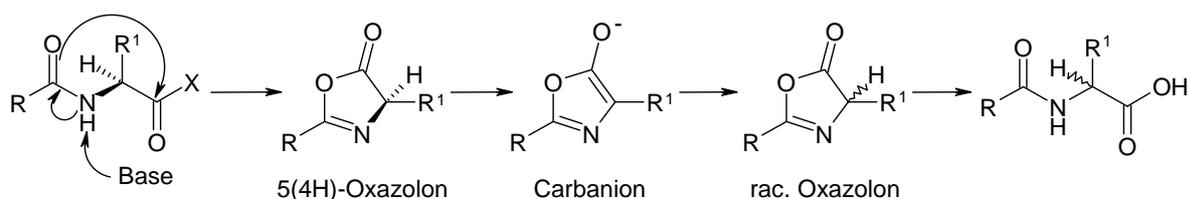


Abbildung 21: Mechanismus der Racemisierung von Aminosäure- und Peptidderivaten durch 5(4H)-Oxazolone-Bildung

Andererseits wird diese Reaktion bei Urethan-geschützten Aminosäurederivaten unterdrückt.^[215] Der Grund für die Unterdrückung liegt darin, dass diese Derivate weniger bereitwillig Oxazolone bilden und dass, falls sie gebildet werden, die Urethangruppe das durch Deprotonierung entstehende Carbanion destabilisiert.^[216] Somit stellt die Racemisierung bei Kuppelungsreaktionen normaler Synthesen linearer Peptide keine Gefahr dar.

Die Bildung von Oxazolonen am C-Terminus von aktivierten Peptiden kann ebenfalls die chirale Integrität der vorletzten Aminosäure negativ beeinflussen. Dabei führt das gebildete Oxazolone durch Deprotonierung des α -H-Atoms der vorletzten Aminosäure zu einem stabilisierten Anion, das nach Reprotonierung wiederum zur Racemisierung dieser Position beiträgt.^[217]

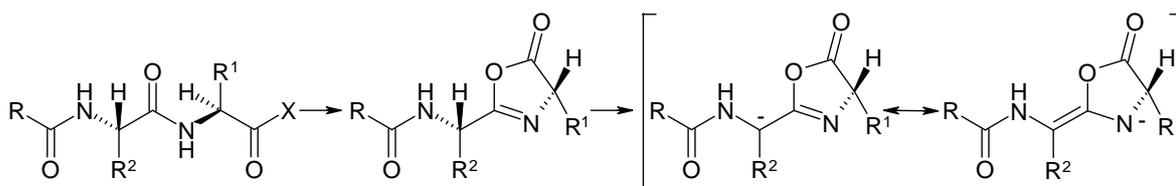


Abbildung 22: Racemisierung der vorletzten Aminosäure eines Peptids über den Oxazolone-Mechanismus

Prinzipiell können alle chiralen DNA-codierten Aminosäuren über den Oxazolone-Mechanismus racemisieren. Jedoch hängt der Grad der Racemisierung der einzelnen Aminosäuren bei definierten Bedingungen von der Art des Lösungsmittels und der Kupplungsmethode ab. In polaren Solvenzien, wie DMF, racemisieren sterisch gehinderte Aminosäuren (Ile, Val) stärker als weniger sterisch anspruchsvolle (Ala, Leu, Phe), jedoch ist diese Ordnung in DCM genau umgekehrt.^[218] Somit ist insbesondere bei Cyclisierungen von Peptiden, die keine Glycin- oder Prolinreste enthalten, darauf zu achten, dass über racemisierungsunempfindliche Aminosäuren cyclisiert wird.

4.3.5 Knüpfung der ersten Aminosäure an das 2-Chlortrityl-Harz

Die Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Linker des Synthescharzes erfolgt in einer separaten Stufe. Bei einer Standardbeladung erfolgt die Substitution des Linker-Chlorids in basischer Lösung mit einem 1,5-fachen Überschuss an Aminosäure in Bezug auf die Linkerbeladung des Harzes. In der Regel werden dabei Beladungen von 1 mmol Fmoc-geschützter Aminosäure pro Gramm Harz erhalten. Werden die Peptide direkt am Harz cyclisiert, wird das Harz mit maximal 0,2-0,3 mmol Aminosäure pro Gramm Harz beladen, um dadurch einen Verdünnungseffekt zu erreichen (Pseudoverdünnung).

Die Beladungsbestimmung erfolgt über die UV-spektroskopische Detektion des Absorptionsmaximums des Piperidin-Dibenzofulven-Adduktes, das bei der Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin entsteht. Das Absorptionsmaximum liegt bei 290 nm und der Substitutionsgrad wird mittels einer Korrelationsgeraden (Kapitel 6.2.1, Protokoll 2) ermittelt.

4.3.6 Aufbau der linearen Peptidsequenz

Der Aufbau der linearen Peptidsequenz erfolgt in einem automatisierten organischen Synthesautomaten nach einem Standardprotokoll (Kapitel 6.2.2). Die basenlabile Fmoc-Gruppe

wird durch eine Mischung aus 2 % DBU^[219] und 2 % Piperidin in DMF gespalten, wobei der Zusatz des Piperidins vor allem zum Abfangen des gebildeten Dibenzofulvens dient.

Die Kupplungen erfolgen aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit, der relativ geringen Racemisierung und Kosten mit TBTU^[136] im basischen Milieu (DIPEA). Um quantitative Umsätze zu erhalten, wird mit dreifachem Überschuss an Kupplungsreagenz und Aminosäure sowie sechsfachem DIPEA-Überschuss in Bezug auf die Harzbeladung gekuppelt. Sollten einzelne Kupplungsschritte nicht komplett verlaufen, werden die Kupplungen wiederholt. Die eingesetzten Lösungsmittel beeinflussen dabei entscheidend die Effizienz und Dauer der Kupplung, hier zeigen Dimethylformamid (DMF), N-Methyl-pyrrolidin-2-on (NMP) und Dimethylsulfoxid (DMSO) die besten Resultate.^[220] Obwohl DMSO den beiden anderen Lösungsmitteln überlegen ist, erfolgen alle Syntheseschritte aus Kostengründen in DMF.

Zur Kontrolle der Synthese wird eine kleine Menge des Harzes nach Syntheseende entnommen, das Peptid gespalten und per RP-HPLC und MALDI-ToF-MS analysiert. Da die erhaltenen Chromatogramme in der Regel Gemische aus dem Peptid, dem Abspaltreagenz, Neben- und Spaltprodukten wiedergeben, können diese nicht näher quantifiziert werden.

4.3.7 Cyclisierung der Peptide

Die Synthesen der Cyclopeptide der FLHTRL-Reihe¹² verlaufen mit einigen Problemen, so entstehen während der Cyclisierung neben den Cyclohexapeptiden auch Cyclodimere als Nebenprodukte. Da diese bei der Aufreinigung der Cyclopeptide über semipräparative RP-HPLC erhebliche Schwierigkeiten verursachen, soll eine Methode entwickelt werden, mit der es möglich ist, die Bildung oligomerer Nebenprodukte vollständig zu unterdrücken.

Die ursprünglich angewandte Methode zur Cyclisierung der Peptide erfolgte in hochverdünnter Lösung mit einer Anfangskonzentration des lineares Peptids von max. 0,2 mM. Dabei wird das Peptid in DMF vorgelegt, anschließend das Kupplungsreagenz HATU und die Base DIPEA hinzugegeben und nach Beendigung der Reaktion aufgearbeitet. Als mögliche Lösung zur Unterdrückung der Oligomerisierung kommen zwei Synthesestrategien in Betracht.

Als Variation der ursprünglichen Methode wird zum einen eine Lösungssynthese unter Zuhilfenahme einer Spritzenpumpe angewandt. Da HATU in basischen Lösungsmitteln jedoch nur sehr begrenzt haltbar ist - so sind nach einer Stunde 64 % HATU in DIPEA-haltigem DMF hydrolysiert^[163] - kann es, ebenso wie das Peptid selbst, nicht im Reaktionskolben vorgelegt

¹² Synthese erfolgte im Rahmen der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit [203]

werden. Zudem würde es zu einer erhöhten Gefahr der Guanidinylierung des N-Terminus beitragen (Abbildung 24). Ein alternatives Kupplungsreagenz zu HATU soll aber aufgrund dessen hoher Reaktionsgeschwindigkeit und effizienter Unterdrückung von Racemisierungen nicht zum Einsatz kommen. Hohe Reaktionsgeschwindigkeiten sind bei diesem Ansatz der Cyclisierung extrem wichtig, um die Ansammlung linearen Edukts in der Reaktionslösung über den Reaktionsverlauf zu verhindern, da es sonst wiederum zur erhöhten Oligomerisierung beitragen würde. Bezüglich der Racemisierung stellen Cyclisierungsreaktionen ebenfalls besondere Ansprüche, da, wie oben bereits erwähnt, Cyclisierungen von Peptiden, die kein C-terminales Glycin oder Prolin enthalten, aufgrund der langsamen Reaktionskinetik einer erhöhten Racemisierungsgefahr unterliegen^[162] Somit wird die Synthese mittels Zweikanal-Spritzenpumpe durchgeführt, mit der das gelöste Peptid und das Kupplungsreagenz gleichzeitig, aber getrennt voneinander, mit sehr langsamer Tropfgeschwindigkeit zu einer DIPEA-haltigen Lösung gegeben werden. Ein weiterer Vorteil dieser Reaktionsführung liegt in der verwendeten Menge DMF, die nur bei maximal 10 % des ursprünglich eingesetzten Volumens liegt. Zum anderen kommt als alternativer, aber weniger vielseitig einsetzbarer Syntheseweg die *on-resin*-Cyclisierung zum Einsatz, bei der der Ringschluss direkt am Syntheseharz erfolgt (Kapitel 2.3.4). Diese Synthesen sind aber auf Aminosäuresequenzen reduziert, die Seitenketten mit funktionellen Gruppen enthalten, über die das Peptid an einem geeigneten Linker immobilisiert werden kann. Sie bieten jedoch gegenüber den Lösungscyclisierungen den Vorteil der leichteren Aufarbeitung. Die Synthese basiert auf einem dreidimensionalen Schutzgruppenkonzept, bei dem der C-Terminus mit einer Schutzgruppe blockiert wird, die orthogonal zu den temporären und permanenten Schutzgruppen des Peptids ist. Es stehen als C-terminale Schutzgruppen verschiedene Alternativen zur Verfügung, so Allylester^[221], die unter Pd(0)-Katalyse gespalten werden, sowie Fluor-labile Trimethylsilylethylester^[222]. Des Weiteren kommen die Dmb-Funktion^[165], die unter sehr milden sauren Bedingungen geschützt wird, sowie die von der Dde-Gruppe^[223] abgeleitete, Hydrazin-labile Dmab-Schutzgruppe^[224] in Frage. Da die selektive Entfernung der Allylester hohe Anforderungen an das Abspaltreagenz stellt und die Silylschutzgruppe gegenüber milden sauren Bedingungen labil ist, was die Analyse der Abspaltung erschwert, finden diese hier keine Verwendung. Ein entscheidender Nachteil der Dmb-Schutzgruppe ist, dass die Synthese des Peptids an einem Linker erfolgen muss, der gegenüber sehr milden sauren Bedingungen inert ist, daher ist z. B. der 2-Chlortrityl-Linker nicht einsetzbar. Die Synthese am Wang-Harz verhindert jedoch eine detaillierte Analyse der geschützten

Peptide. Es ist vor allem nicht möglich, den Verlauf der Entschützung des C-Terminus zu kontrollieren.

Aus diesen Gründen kommt die Dmab-Schutzgruppe zum Einsatz, die zwei entscheidende Vorteile bietet. Zum einen kann sie unter sehr milden Bedingungen (2 % Hydrazin in DMF) gespalten werden und weist zum anderen eine sehr schnelle Abspaltkinetik auf. So ist die Spaltung der Dmab-Gruppe (Abbildung 23) nach 5-7 Minuten komplett vollzogen. Jedoch ist darauf zu achten, dass bei Synthesen mit Fmoc-Schutz dieser ebenfalls während der Hydrazinolyse gespalten wird. Daher wird die Dmab-Schutzgruppe nur als quasi-orthogonal bezeichnet. Mechanistisch verläuft die Spaltung der Dmab-Gruppe unter Cyclokondensation des Hydrazins an die Dimedonuntereinheit unter Bildung eines Tetrahydroindazol-Derivats und Abspaltung eines *p*-Aminobenzylesters. Der labile Ester unterliegt dann einer spontanen 1,6-Eliminierung unter Freisetzung der Carboxylfunktion und eines Chinoniminmethids (Abbildung 23).^[224]

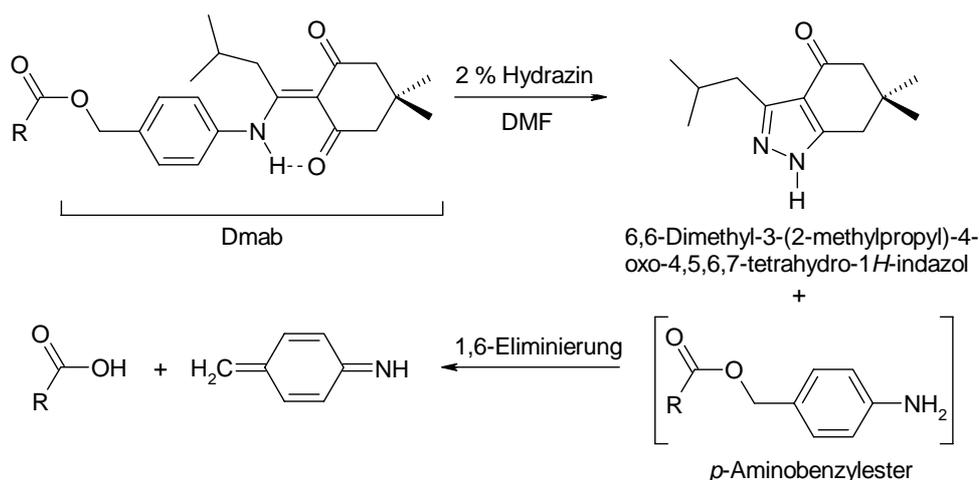


Abbildung 23: Hydrazinolytische Spaltung der Dmab-Schutzgruppe

Als Kupplungsreagenz der *on-resin*-Cyclisierung kommt nicht das HOAt-analoge Guanidiniumsalz HATU sondern das Carbodiimid DIC unter Zusatz des Additivs HOAt zum Einsatz. Dieses wurde für die *on-resin*-Cyclisierung gewählt, da Erfahrungen^[225] zeigten, dass gerade Ringschlussreaktionen am Harz mit Guanidiniumsalzen als Aktivierungsreagenzien zu unerwünschten Nebenreaktionen führen können. Infolge dieser Nebenreaktion wird der N-Terminus des linearen Peptids guanidinyliert und die Acylierung unterbrochen.^[163] Guanidinylie-

rungen^{13, [226]} (Abbildung 24) unter Verwendung HOBt- bzw. HOAt-analoger Kupplungsreagenzien treten vor allem bei Peptidkupplungen auf, die sehr langsam verlaufen, so ist sie bei normalen Synthesen linearer Peptide normalerweise nicht zu beobachten, jedoch bei langsamen Cyclisierungen. Dass diese Nebenreaktion insbesondere beim Ringschluss am Syntheseharz stattfindet, kann am sterischen Anspruch des Linkers liegen, der den Angriff der N-terminalen α -Aminogruppe auf die C-terminale Carboxylfunktion zusätzlich erschwert. Linker vom Trityltyp üben einen großen sterischen Einfluss auf den C-Terminus aus. Dies zeigen die Effekte der Linker in Bezug auf die Bildung der Diketopiperazine (Kapitel 2.3.4).

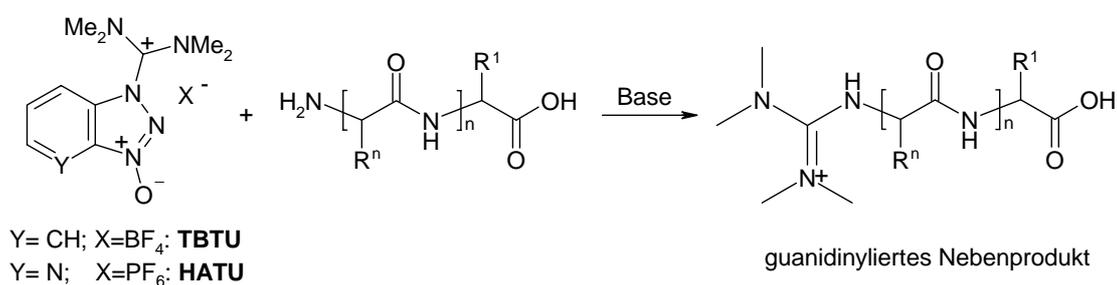


Abbildung 24: Nebenproduktbildung durch N-terminale Guanidinylierung

Um diese Nebenreaktion im voraus auszuschließen, wird auf die Carbodiimide als Aktivierungsreagenzien zurückgegriffen, die aber wesentlich langsamere Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen. Die Reaktionsgeschwindigkeit sollte sich im Gegensatz zur oben beschriebenen Lösungssynthese jedoch nicht negativ auf die Ringschlussreaktion auswirken. Zur Unterdrückung von Racemisierungen wird unter Zusatz von HOAt cyclisiert. Das hier verwendete DIC bietet gegenüber dem klassischen DCC den Vorteil, dass das entstehende Harnstoffderivat bessere Löslichkeitseigenschaften besitzt und ohne Probleme vom Syntheseharz entfernt werden kann.

Als weitere Variante käme die in Kapitel 2.3.4 vorgestellte Cyclisierung am *safety-catch*-Harz^[166] in Frage. Diese wird jedoch aus analytischen Gründen nicht angewandt, da die Aktivierung sehr zeitraubend ist und erst nach 24 h Synthesekontrollen durchgeführt werden können.

Die cyclischen Peptide der Hexasequenzen TFKLSE (**13-16**) und LSETTL (**18-21**) wurden direkt am Harz cyclisiert, zudem wurden einige Cyclopeptide dieser Reihen in Lösung cyclisiert. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Cyclopeptide der beiden Peptid-Reihen und zeigt den

13 Zur Terminologie der Konversion einer Aminogruppe in eine Guanidiniumgruppe durch eine Carbamimidoylgruppe^[227] siehe [226a]. Hier wird die im neuen Houben-Weyl (Peptides Volume E22a)^[226b] gebräuchliche Terminologie (engl.) „*guanidinylation*“ benutzt - in der Hoffnung, dass sich diese als einheitliche Bezeichnung durchsetzt.

Vergleich zwischen der Lösungscyclisierung mittels Spritzenpumpe und der *on-resin*-Cyclisierung. Zur besseren Veranschaulichung sind die Peptidsequenzen entsprechend der Synthesereihenfolge aufgeführt, d. h. Aminosäuren, die rechts in der Klammer stehen, bilden den C-Terminus während der Synthese. So verläuft zum Beispiel die *on-resin*-Cyclisierung des Peptids c(TfKLSE) (**14**) über das C-terminale Glutamat, während der Ringschluss des gleichen Peptids c(SETfKL) in Lösung (**14**) über C-terminales Leucin erfolgt.

Die Wahl der C-terminalen Aminosäure des linearen Vorläuferpeptids muss bei Peptidsequenzen, die keine Glycin- oder Prolinreste enthalten, abgewägt werden. Sie sollten nicht racemisierungsanfällig sein und keine sperrigen Seitenketten tragen, um die Cyclisierung nicht zu erschweren. Deshalb wird hier in der Regel bei den Peptiden, die in Lösung cyclisiert werden, über C-terminales Leucin cyclisiert, da Leucin in DMF nur eine geringe Racemisierungsneigung zeigt.^[218] Der Ringschluss am Synthescharz wird über C-terminales Glutamat durchgeführt, da die alternativen Serin- bzw. Threoninreste ein zu hohes Racemisierungsrisiko tragen und Lysin nur in einer der beiden Hexapeptidsequenzen vorkommt.

Die Cyclisierungen am Harz werden mit einem 80 μmol - und die Lösungscyclisierungen mit einem 100 μmol -Ansatz durchgeführt. Die in obiger Tabelle angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die in hoher Reinheit erhaltenen Peptide nach der Aufreinigung über HPLC. Dabei werden die Ausbeuten auf die ursprünglichen Ansatzgrößen bezogen. Die linearen Rohprodukte für die Cyclisierungen in Lösung werden direkt weiter eingesetzt und nicht aufgereinigt, da dies bei geschützten Peptiden zu problematisch ist. Da die ermittelten Rohausbeuten der linearen Peptide aufgrund anderer Spaltprodukte in der Regel über 100 % liegen, wird bei der Cyclisierung von einer Ansatzgröße von 100 μmol ausgegangen.

Bei der Reinigung der Cyclopeptide über RP-HPLC werden Fraktionen mit zu großer Durchmischung direkt verworfen. Werden nach der Aufreinigung der Peptide mehr als 10 mg sauberes Produkt erhalten, werden Mischfraktionen nicht weiter aufgereinigt. Somit ist bei den Cyclisierungen in Lösung davon auszugehen, dass die Ausbeuten noch hätten gesteigert werden können, jedoch wurde aus Zeit- und Kostengründen darauf verzichtet.

Tabelle 4: Vergleich der Cyclisierung am Harz und in Lösung

Nr.	Peptid	Methode	Ausbeute		Nebenprodukte	
			mg	%	Dimere	andere
13	c(tFKLSE)	<i>on-resin</i>	5	9	+	-
13	c(SEtFKL)	Lösung	23	33	-	-
14	c(TfKLSE)	<i>on-resin</i>	1	2	+	+ ^a
14	c(SETfKL)	Lösung	21	30	-	-
15	c(TFkLSE)	<i>on-resin</i>	6	11	+	-
16	c(TFKISE)	<i>on-resin</i>	-	-	+	-
16	c(FKlSET)	Lösung	14	20	-	-
18	c(TtLLSE)	<i>on-resin</i>	3	6	+	+ ^b
18	c(LSETtL)	Lösung	12	19	-	-
19	c(TTLSE)	<i>on-resin</i>	2	4	+	+ ^b
19	c(LSETTL)	Lösung	30	46	-	-
20	c(TTLSE)	<i>on-resin</i>	-	-	+	+ ^b
20	c(LSETTL)	Lösung	18	28	-	-
21	c(TTLsE)	<i>on-resin</i>	-	-	+	+
21	c(LsETTL)	Lösung	11	17	-	-

^a lineares Peptid; ^b Nebenprodukt mit +14 Da

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, verlaufen die Cyclisierungen in Lösung insgesamt wesentlich besser. So liegen die Ausbeuten mit 17-46 % wesentlich höher als die der *on-resin*-Cyclisierung, die zwischen zwei und elf Prozent liegen, wobei die Peptide (**16**), (**20**) und (**21**) durch Cyclisierung am Harz nicht in reiner Form erhalten werden konnten. Zudem sind bei allen Synthesen am Harz Cyclodimere als Nebenprodukte entstanden. Abbildung 25a zeigt das MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohprodukts der *on-resin*-Cyclisierung von c(TFKISE). Es ist neben dem Produktpeak $[M+Na]^+$ bei $m/z = 940,9$, deutlich das Cyclodimer-Nebenprodukt $([2M+Na]^+)$: $m/z = 1858,8$) zu sehen. Neben weiteren Peaks, die partiell ungeschütztem Produktpeptid und Cyclodimer zuzuordnen sind, enthält das Rohgemisch einen intensiven Peak bei $m/z = 1063,0$, bei dem es sich um N-terminal guanidinyliertes lineares Peptid handelt. Der Peak entspricht der Summe der Massen des linearen Peptids (935,6 g/mol) und der Carbamimidoyl-Einheit^[227] des Diisopropylcarbodiimids ($-C[=N(C_3H_7)]-NH(C_3H_7)$; 127,1 g/mol). Das resultierende guanidinylierte Nebenprodukt liegt aufgrund der hohen Basizität der Guanidinium-

gruppe protoniert vor. Der resultierende Peak entspricht daher im Gegensatz zu anderen Peaks des gezeigten MALDI-ToF-Massenspektrum, die als Alkalimetall-Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ - oder $[M+K]^+$ -Peak vorliegen, dem $[M]^+$ -Peak. Dieser ist wegen der positiven Ladung der Guanidiniumgruppe aber wahrscheinlich deutlich überrepräsentiert (Kapitel 4.4.2). Zudem erscheint der Molekülpeak des entschützten guanidinylierten Nebenprodukts bei $[M]^+$ (guanidinyliert, entschützt): $m/z = 823,4$, während dieser Peak bei negativer Polarität des MALDI-ToF-Massenspektrometers, deutlich unterdrückt, um zwei Masseneinheiten verschoben ist ($[M-2H]^-$: $m/z = 821,4$). Die Tatsache, dass das Carbodiimid bei dieser Cyclisierung in der Lage ist, den N-Terminus zu guanidinylieren, ist ein weiterer Hinweis auf die sehr gehinderte und langsam verlaufende Reaktion, da diese sonst zu langsame Nebenreaktion hier zur Konkurrenzreaktion wird (Kapitel 2.3.1). So waren die Cyclisierungen am Harz auch erst nach 48 h beendet und im Fall von c(TfKLSE) (**14**) wurde nach dieser Zeit noch lineares Edukt nachgewiesen.

Das MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohprodukts der Lösungscyclisierung von c(FKLSET) (**16**) (Abbildung 25b) zeigt hingegen nur Peaks, die direkt dem gewünschten Cyclohexapeptid zuzuordnen sind. Es enthält neben dem Produktpeak bei $m/z = 995,9$ $[M+Na]^+$ nur kleinere Peaks, die dem partiell geschützten Cyclohexapeptid zuzuordnen sind. Es können weder Cyclodimere noch andere Nebenprodukte nachgewiesen werden.

Die Entstehung der Cyclodimere während der *on-resin*-Cyclisierung zeigt, dass trotz vermeintlicher Pseudoverdünnung die Peptide in räumlicher Nähe zueinander am Harz gebunden und nicht homogen im Polymer verteilt sind. Diese Ergebnisse werden auch durch Untersuchungen von Harzkugeln unterstützt, bei denen die Homogenität und Produktverteilung durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ermittelt wurden (Abbildung 26).^[228]

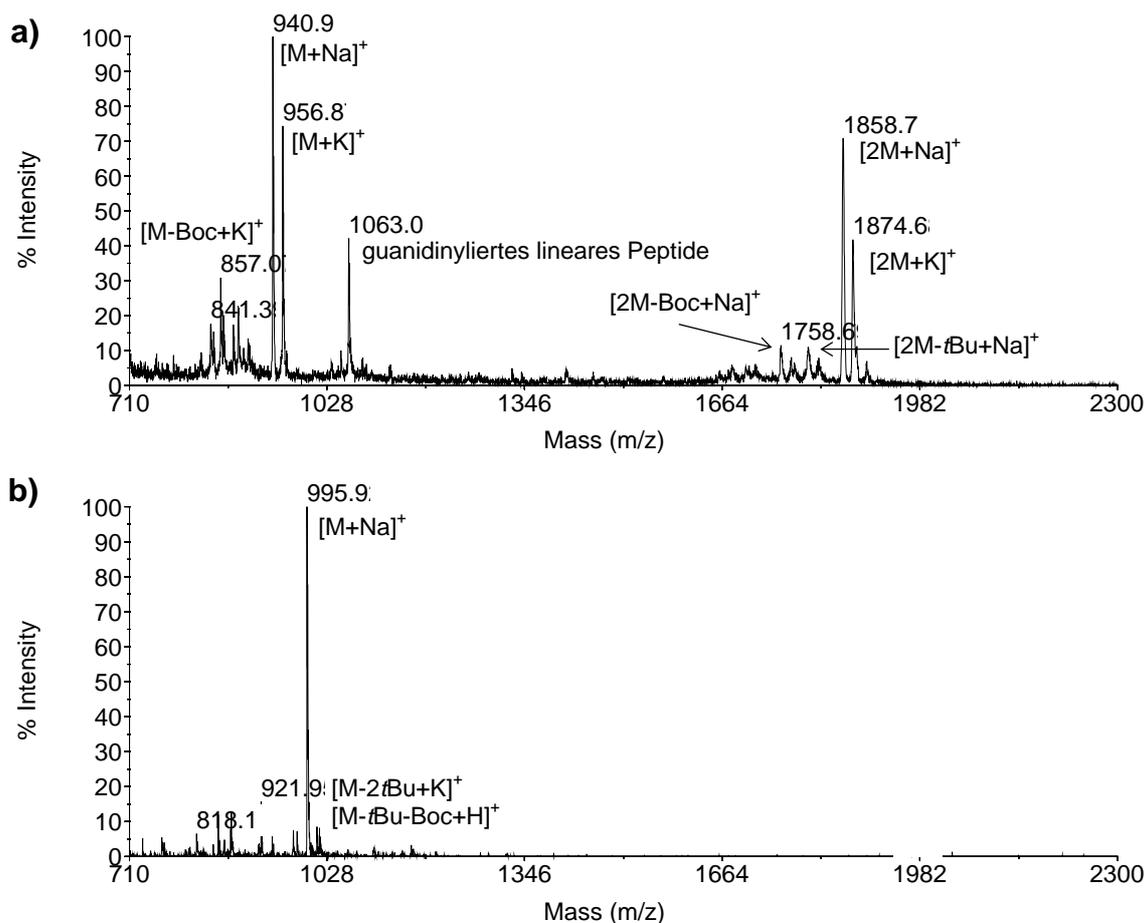


Abbildung 25: Vergleich der MALDI-ToF-Massenspektren der Rohprodukte des geschützten Peptids (**16**) nach a) der *on-resin*-Cyclisierung und b) der Lösungscyclisierung

Sie zeigen zwar bei abgesättigter Harzbeladung eine homogene Produktverteilung im Harz (Abbildung 26a), jedoch führen substöchiometrische Beladungen zu einer inhomogenen Anhäufung der Produktmoleküle im äußeren Bereich der Harzkugeln, während im Innern die Konzentration stark abnimmt (Abbildung 26c-h).^[228] Daher ist eine Cyclodimerisierung trotz niedriger Harzbeladung extrem wahrscheinlich. Zu optimieren wäre die homogene Verteilung durch Zusatz einer organischen Säure (z. B. Benzoesäure), die als Kompetitor eingesetzt wird, um die Linkerplätze konkurriert und so die Homogenität der Aminosäureverteilung erhält (Abbildung 26b). Diese Methode der Harzbeladung wurde hier jedoch nicht durchgeführt.

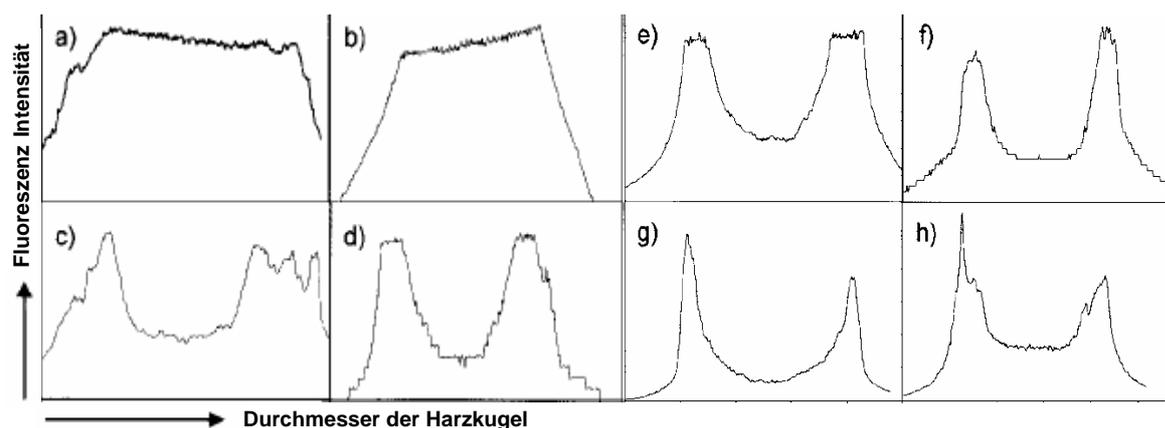


Abbildung 26: Intensitätsprofile physikalischer Harzschnitte aufgenommen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop^[228]

Die Harzkugeln wurden zuvor mit verschiedenen Mengen aktivierten 5,6-Carboxy-
 tetramethylrhodamins (CMTR) oder mit einer Mischung von aktiviertem CMTR und
 Benzoessäure als Kompetitor beladen. a) 1 Äquiv. CMTR; b) 0,02 Äquiv. CMTR, 0,98
 Äquiv. Benzoessäure; c) 0,1 Äquiv. CMTR; d) 0,05 Äquiv. CMTR; e) 0,025 Äquiv.
 CMTR; f) 0,01 Äquiv. CMTR; g) 0,005 Äquiv. CMTR; h) 0,001 Äquiv. CMTR.

Zum Grad der Racemisierung der einzelnen Cyclisierungen kann keine exakte Aussage gemacht werden, da dafür gesonderte detaillierte HPLC-Studien nötig sind. Es müssten epimere Peptide synthetisiert werden, um die Peaks genau zuordnen zu können. Koelutionsstudien könnten dann genauen Aufschluss über die erfolgte Racemisierung geben. Die erhaltenen Chromatogramme weisen aber darauf hin, dass sich die Racemisierung der beiden Cyclisierungsmethoden in der gleichen Größenordnung (1-8 %) bewegt, wobei die Lösungscyclisierung auch hier etwas günstiger scheint, da ihr Racemisierungsanteil eher im unteren angegebenen Bereich liegt. Jedoch lassen die beiden Methoden keinen direkten 1:1-Vergleich zu, da unterschiedliche Kupplungsreagenzien benutzt und über verschiedene C-terminale Reste cyclisiert wird. Die insgesamt etwas besseren Resultate der Cyclisierung in Lösung spiegeln aber die besseren Eigenschaften des Guanidiniumsalzes HATU wider. Dass die Racemisierung der Lösungssynthese in dieser Höhe auftritt, kann auch an der hohen Ausgangskonzentration an DIPEA liegen, das insgesamt zwar nur mit einem zweifachen Überschuss eingesetzt wird, aber gerade zu Beginn der Reaktion liegt der Überschuss bei einem Vielfachen in Bezug auf die tatsächliche Konzentration des Peptids in Lösung. Es kann somit ohne weiteres zu einer Enolisierung oder Oxazolone-Bildung kommen, die zum Verlust der chiralen Integrität führt. Auch eine Racemisierung der vorletzten Aminosäure (Abbildung 22) kommt hierbei in Betracht, was die teilweise recht komplexen Chromatogramme erklären könnte. Die insgesamt höhere Race-

misierung der *on-resin*-Cyclisierung kann an der Wahl der Aminosäure, am Kupplungsreagenz oder am sterisch anspruchsvollen Linker liegen.

Neben den beschriebenen Dimeren kam es bei der Reihe der LSETTL-Peptide noch zu einem weiteren Nebenprodukt, das jedoch unabhängig von der Cyclisierung durch die Art der Aufarbeitung bedingt ist. Dieses Nebenprodukt weist eine um +14 Da erhöhte Masse auf (Abbildung 28), so liegt dessen protoniertes Pseudomolekülion $[M+H]^+$ bei $m/z = 659,8$ im Gegensatz zum $[M+H]^+$ -Peak des Cyclopeptids mit $m/z = 645,9$. Das Nebenprodukt entsteht, wenn das Peptid unter hoher Säurekonzentration vom Harz gespalten wird und zum Waschen des Harzes mit polarem Lösungsmittel Methanol eingesetzt wird. Dadurch wird in der vereinigten Abspaltlösung ein geeignetes Milieu geschaffen, das zur säurekatalysierten Veresterung der Carboxylseitengruppe von Glutamat unter Bildung des Methylesters führt.

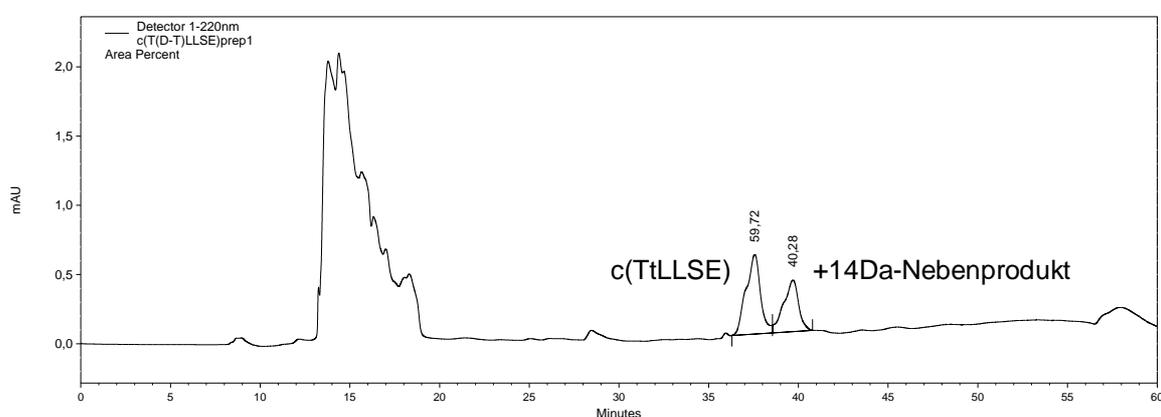


Abbildung 27: Semipräparatives RP-HPL-Chromatogramm des Rohprodukts von $c(TtLLSE)$

Das Nebenprodukt ist dabei nach HPLC-Analyse mit bis zu 40 % der Rohausbeute entstanden (Abbildung 27). Gestärkt wird die Annahme, dass es sich dabei um den Methylester handelt, durch die Tatsache, dass das Nebenprodukt, neben der höheren Retentionszeit im RP-HPL-Chromatogramm, im MALDI-ToF-MS keine Peaks aufweist, die den Pseudomolekülionen der Salze der Säuregruppen entsprechen.

Abbildung 28 zeigt einen Vergleich der MALDI-ToF-Massenspektren des Peptids $c(TtLLSE)$ (**18**) und des um +14 Da schwereren Nebenprodukts. So zeigt das MALDI-ToF-Massenspektrum des Peptids Peaks bei $m/z = 689,9$ $[M-H+2Na]^+$ sowie $m/z = 705,9$ $[M-H+Na+K]^+$, die den Pseudomolekülionen der Salze der Säure entsprechen. Peptide mit sauren Seitenkettengruppen oder freiem C-Terminus zeigen in der Regel zu den üblichen protonierten und Alkali-metall-ionisierten Pseudomolekülionen $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ zusätzliche Peaks

der entsprechenden Salze der Säuregruppen im MALDI-ToF-Massenspektrum. Das um +14 Da schwerere Nebenprodukt zeigt diese zusätzlichen Pseudomolekülonen der Salze nicht. So dass daraus geschlossen werden kann, dass es sich um ein an der Säurefunktion modifiziertes Nebenprodukt handelt.

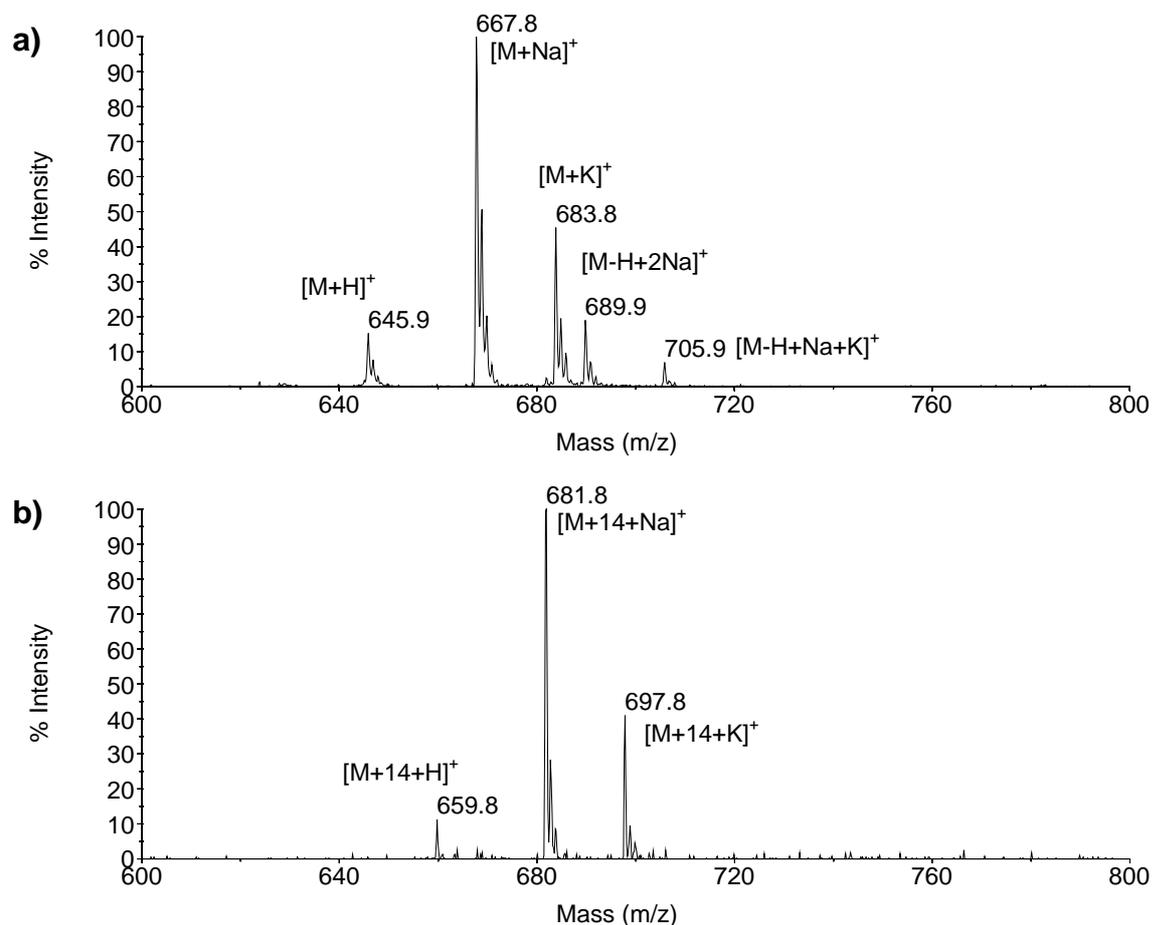


Abbildung 28: Vergleich der MALDI-ToF-Massenspektren von c(TtLLSE) (**18**) und dem +14 Da schwereren Nebenprodukt

Aus den erhaltenen Daten der Cyclisierungen in Tabelle 4 ist insgesamt ersichtlich, dass die Synthese der Cyclopeptide mittels Zweikanal-Spritzenpumpe in Lösung in besserer Ausbeute und mit weniger Nebenprodukten erhalten werden kann. Die Entstehung der Cyclooligomere ist mit dieser Synthesetechnik völlig unterdrückt. Eine bessere Unterdrückung der Racemisierung könnte eventuell durch das Zutropfen von DIPEA über eine weitere Spritzenpumpe erreicht werden. Für die Synthese der anderen Cyclopeptide aus Tabelle 3 wird daher die Cyclisierung in Lösung angewandt.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die dargestellten Cyclopeptide, linearen Analoga und randomisierten Peptide sowie die erhaltenen Ausbeuten:

Tabelle 5: Dargestellte Cyclopeptide und lineare Peptide

Ausgangssequenz	Peptidreihe	Nr. Zielpeptide	Ausbeute	
			mg	%
a) FLHTRLFV	2) TRLFVS	(8) H-TRLFVS-OH	22	30
		(9) c(FVStRL)	8	11
		(10) c(FvSTRl)	12	17
		(11) c(FVSTRl)	15	21
b) TFKLSETTLEYY	3) TFKLSE	(12) H-TFKLSE-OH	38	53
		(13) c(tFKLSE)	23	33
		(14) c(TfkLSE)	21	30
		(15) c(TFKLSE)	6	11
		(16) c(TFKISE)	14	20
		4) LSETTL	(17) H-LSETTL-OH	12
	(18) c(LSETtL)		12	19
	(19) c(LSETTL)		30	46
	(20) c(lSETTL)		18	28
	(21) c(LsETTL)		11	17
	5) TTLEYY		(22) H-TTLEYY-OH	12
		(23) c(tTLEYY)	9	12
(24) c(TtLEYY)		5	7	
(25) c(TTLEYY)		5	7	
c) TFQLSTRTLPFS		6) TFQLST	(26) H-TFQLST-OH	19
	(27) c(TFQLsT)		12	18
	(28) c(TFQLSt)		16	24
	(29) c(tFQLST)		11	16
	7) LSTRTL	(30) H-LSTRTL-OH	23	33
		(31) c(lSTRTL)	13	19
		(32) c(LsTRTL)	16	24
		(33) c(LStRTL)		
	8) RTLPFS	(34) H-RTLPFS-OH	49	68
		(35) c(RTLPFS)	22	31
		(36) c(RtLPFS)	20	29
		(37) c(RTlPFS)	24	34
	d) lineare Ausgangs peptide:		Nr.	
FLHTRLFV	(38) H-FLHTRLFV-OH	31	30	
TFKLSETTLEYY	(39) H-TFKLSETTLEYY-OH	5	3	
	(44) H-TFKLSETTL-OH	16	15	
TFQLSTRTLPFS	(40) H-TFQLSTRTLPFS-OH	12	8	
	(45) H-TFQLSTRTL-OH	15	14	
e) randomisierte Peptide:		Nr.		
FLHTRLFV	(41) H-HFTLRL-OH	47	60	
TFKLSETTLEYY	(42) H-LTYTEFSYLKET-OH	10	7	
TFQLSTRTLPFS	(43) H-TSFTPLRFTSQL-OH	48	45	

4.3.8 Synthese der linearen Ausgangspeptide

Die Synthese der linearen Peptide (44) und (45) wurde durchgeführt, da zwei Proben der linearen Dodecapeptide (39) bzw. (40), die von der Arbeitsgruppe von Professorin M. Schachner¹¹ zur Verfügung gestellt wurden und C-terminal cysteinylt vorlagen, weder in Wasser noch in DMSO oder Mischungen der beiden Lösungsmittel löslich waren. SPR-Studien müssen jedoch in wässrigen Systemen durchgeführt werden, da im Biacore[®] 3000 nur wässrige Puffer mit maximal 10%igem DMSO-Zusatz vermessen werden können. Daher mussten verkürzte lineare Peptide mit eventuell besserer Löslichkeit synthetisiert werden. Die verkürzten linearen Peptide (44) und (45) sollten daher als Referenzen für die SPR-Studien der Peptidreihen 3 und 4 bzw. 6 und 7 dienen, die alle eine gute Löslichkeit in Wasser besitzen. Parallel dazu wurden die Ausgangspeptide (39) und (40) neu synthetisiert. Die Synthese des Peptids (39) TFKLSE-TTLEYYS bereitete dabei erhebliche Probleme, da das Rohprodukt mit einem Deletionspeptid verunreinigt war, dessen Sequenz um einen Threoninrest verkürzt war. Die Synthese des Peptids mit zweifachem Kuppeln aller Threoninreste erzielte ebenfalls kein befriedigendes Ergebnis.

Ein Hauptproblem bei der Synthese längerer linearer Peptide liegt in Sequenz-abhängigen unvollständigen Acylierungsreaktionen. Dabei bereiten nach Merrifield vor allem Peptidsequenzen in Bereich der Reste 12-17 Probleme,^[229] nach Kent hingegen Sequenzen mit einem Abstand von 5-15 Aminosäuren vom C-terminalen Rest am Syntheseharz.^[230] Solche Sequenzen werden auch „schwierige Sequenzen“ (*difficult sequences*) genannt, wobei zufällige und nicht-zufällige (*random* bzw. *nonrandom*) schwierige Sequenzen voneinander unterschieden werden. Beide sind durch reproduzierbare, unvollständige Acylierungen und nur limitierte Verbesserungen durch Mehrfachkupplungen charakterisiert. Willkürliche schwierige Sequenzen sind dabei mit der Einführung sterisch gehinderter Aminosäuren assoziiert, während nichtwillkürliche durch die Sequenz-abhängige Bildung sekundärer Strukturelemente (β -Faltblattstrukturen) bestimmt werden, die weitere Acylierungen verhindern.^[125]

Die letztere Gruppe schwieriger Sequenzen kann durch empirische Berechnungen in gewissem Maße vorhergesagt werden.^[231] Die Neigung einer Aminosäure in einer willkürlichen Helixstruktur vorzukommen und somit die Synthese zu erleichtern, oder aber in einer geordneten Sekundärstruktur, die die Synthese behindert, wird durch ihren P_c^* -Wert ausgedrückt. Hier haben Aminosäuren die keine Bereitschaft zeigen, β -Faltblattstrukturen einzugehen, P_c^* -Werte größer als 1,0 ($P_c^*[\text{Pro}] = 1,64$; $P_c^*[\text{Gly}] = 1,47$). Aminosäuren, die verstärkt in β -Faltblattstruk-

turen zu finden sind, haben hingegen P_c^* -Werte kleiner als 1,0 ($P_c^*[\text{Phe}] = 0,76$; $P_c^*[\text{Leu}] = 0,75$) Die Tendenz einer Peptidkette, eine willkürliche Helixstruktur anzunehmen, wird durch den Mittelwert der Summe aller P_c^* -Werte der einzelnen Aminosäuren der entsprechenden Sequenz ausgedrückt (Gleichung (1)).

$$\langle P_c^* \rangle = (\sum P_c^*) / n \quad (1)$$

Sequenzen mit $\langle P_c^* \rangle$ -Werten > 1.0 zeigen nahezu quantitative Acylierungsreaktionen, während Sequenzen mit Werten von 0,9-1,0 längere Reaktionszeiten oder Mehrfachkupplungen erfordern. Sind die $\langle P_c^* \rangle$ -Werte $< 0,9$ können β -Faltblattstrukturen gebildet werden und hartnäckige Acylierungsprobleme auftreten.

Die Berechnungen der $\langle P_c^* \rangle$ -Werte für die beiden Dodecapeptide **(39)** und **(40)** nach Gleichung (1) liefern folgende Ergebnisse:

$$\langle P_c^* \rangle[\mathbf{39}] = 0,91$$

$$\langle P_c^* \rangle[\mathbf{40}] = 0,98$$

Die Werte der beiden Peptide liegen zwar jeweils im Bereich von 0,9 bis 1,0 und sollten daher durch Mehrfachkupplungen zugänglich sein, jedoch liegen die berechneten $\langle P_c^* \rangle$ -Werte in beiden Fällen in Grenzbereichen. Da die angegebenen Bereiche nur Richtwerte sind und keine absolute Zuordnung darstellen können, scheint Peptid **(39)**, das auch durch Mehrfachkupplungen schlecht zugänglich ist, eine β -Faltblattstruktur auszubilden, die die vollständige Acylierung behindert. Im Falle von Peptid **(40)** ist vor allem dem Vorhandensein des Prolinrestes zu verdanken, dass sich der $\langle P_c^* \rangle$ -Wert nahe 1,0 bewegt. Dass Peptid **(39)** eine β -Faltblattstruktur annimmt, wird durch die Löslichkeit des Rohprodukts untermauert, das in vielen Lösungsmittelgemischen Gele bildet. Es löst sich ohne Gelbildung nur in DMSO und TFA. Gestärkt durch diese Beobachtungen wurde zum Aufbrechen vermeintlicher β -Faltblattstrukturen die Synthese unter Zusatz von DMSO durchgeführt. Dabei wurde das Syntheseharz vor jeder Aminosäurekupplung mit 20 % DMSO in DMF gewaschen und die Kupplungen im gleichen Lösungsmittelgemisch durchgeführt. Diese Synthesestrategie führte zum Erfolg, und es konnte kein Deletionspeptid mehr nachgewiesen werden.

Insgesamt betrachtet verliefen die Synthesen der linearen Hexapeptide unproblematischer als die ihrer cyclischen Analoga. Dennoch wurden auch hier maximale Ausbeuten von nur 68 % erzielt. Ein möglicher Grund dafür könnte in der Bildung von Diketopiperazinen liegen. Ein

anderer Grund kann in der oben beschriebenen, leichten Racemisierbarkeit des Serins bzw. Threonins liegen, da analytische HPL-Chromatogramme den Verdacht nahe legen, dass es schon während der Synthese der linearen Peptide zu Racemisierungen gekommen ist.

Die erhaltenen linearen Peptide **(38)**-**(45)** sind bis auf Peptid **(39)** alle in wässrigem Puffer löslich, Peptid **(39)** unter Zusatz von 1 % DMSO. Somit ist davon auszugehen, dass die erhaltenen C-terminal cysteinylierten Peptide **(39)** und **(40)** nicht mehr in Ordnung waren.

4.4 Synthese Histidin-haltiger Cyclopeptide

4.4.1 Racemisierung und Schutzgruppen von Histidin

Die Synthese der Peptide **(1)** bis **(7)** mit der Sequenz FLHTRL, die in der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit synthetisiert wurden, bereitete unter anderem wegen des Histidinrestes erhebliche Probleme. Allgemein stellt die Synthese Histidin-haltiger Peptide ein besonderes Problem der Peptidchemie dar. Trotz einer breiten Auswahl verschiedener Schutzgruppen sind die Probleme nicht gänzlich gelöst. Schwierigkeiten entstehen durch die zwei nicht äquivalenten aber gleich reaktiven Stickstoffatome des Imidazolrings, die als π - und τ -Stickstoff bezeichnet werden (Abbildung 29) und der mit ihnen verbundenen hohen Racemisierungsanfälligkeit.

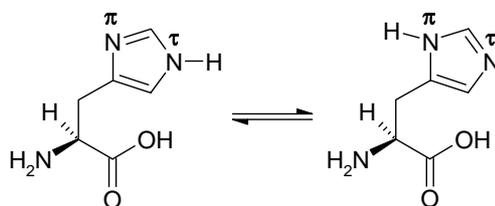


Abbildung 29: Tautomerie des Imidazolrings von L-Histidin

Beim Schutz des Ringsystems ist vor allem die Lage der Schutzgruppe wichtig, da diese entscheidend die Racemisierungsneigung des Histidins beeinflusst. Die Besonderheit des Histidins ist die leichte Racemisierbarkeit während der Aktivierung und Kupplung, auch bei Urethan-geschützter α -Aminogruppe. Neben den normalen Racemisierungsmechanismen verläuft sie hier über zwei zusätzliche Wege (Abbildung 30). Die eine Route erfolgt über den intramolekularen nucleophilen Angriff des π -Stickstoffatoms des Imidazolrings auf die aktivierte Carbonylgruppe unter Ausbildung eines bicyclischen Kations (**A**). Die folgende Enolisierung

führt zum Verlust der chiralen Integrität. Der andere Weg verläuft über die α -Protonen-Abstraktion durch das basische π -Stickstoffatom unter direkter Bildung des zwitterionischen Enolats (**B**). Anschließende Reprotonierung führt zum racemischen Gemisch.^[232]

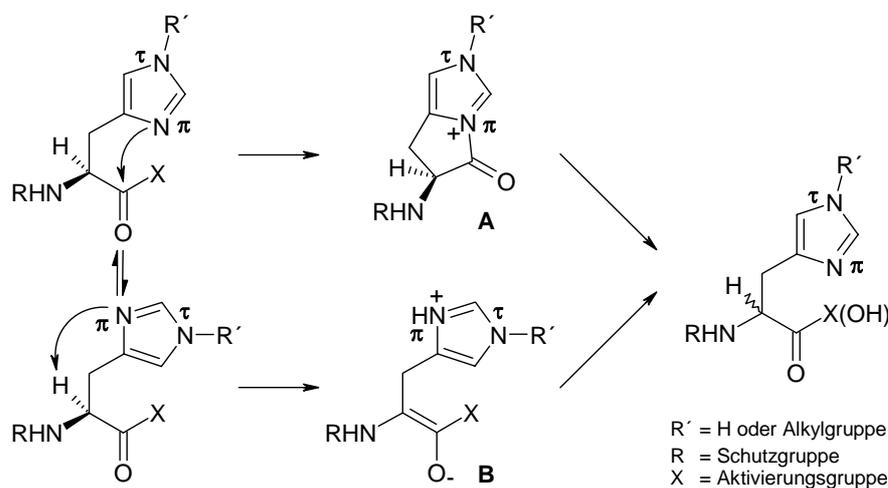


Abbildung 30: Racemisierungsmechanismus des aktivierten Histidins

Da in beiden Mechanismen das π -Stickstoffatom involviert ist, hängt die Unterdrückung der Racemisierung aktivierter Histidinderivate von der effektiven Blockierung dieses Stickstoffatoms ab. Jedoch ist ein regiospezifischer Schutz des π -Stickstoffs recht schwierig, da beide N^{im} -Atome nahezu gleiche Reaktivität zeigen. Eine Alternative stellen Schutzgruppen dar, die einen elektronenziehenden Effekt ausüben und durch die Reduzierung der Elektronendichte im Imidazolring das N^{π} -Atom deaktivieren. Hierbei spielt die Lage der Schutzgruppe keine Rolle, und auch der Schutz des N^{τ} -Atoms unterdrückt die Racemisierung effizient.

In der Fmoc/*tert*-Butyl-Taktik kann die N^{π} -*tert*-Butoxymethylgruppe^[233] (Bum) verwendet werden, die die Racemisierung wirksam unterdrückt. Jedoch sind Bum-Derivate wegen der komplizierten Synthese sehr teuer (sie kosten ca. das 30fache der Trt-Derivate). Zudem bildet sich unter Abspaltbedingungen Formaldehyd, der zu weiteren Nebenreaktionen führt.

Die Methode der Wahl ist die Synthese über Trityl-geschützte Fmoc-Histidinderivate.^[210] Sie sind über das N^{τ} -Atom substituiert, jedoch reduziert die Tritylgruppe die Basizität des Imidazols und der sterische Anspruch verhindert gleichzeitig die basenkatalysierte Enolisierung, so dass diese Derivate unter normalen Bedingungen die Racemisierung effektiv unterdrücken. Probleme bereiten hier vor allem langsame Kupplungen der Segmentkondensation oder Kupplungen nach sterisch anspruchsvollen Aminosäuren.

4.4.2 Guanidinylierung

Die Synthese der Peptidreihe FLHTRL, die zum Großteil im Rahmen einer dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit synthetisiert wurden,^[203] erfolgte ebenfalls mit der Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppentaktik, wobei die N^τ-Trityl-Schutzgruppe für den Schutz der Histidinreste eingesetzt wurde.

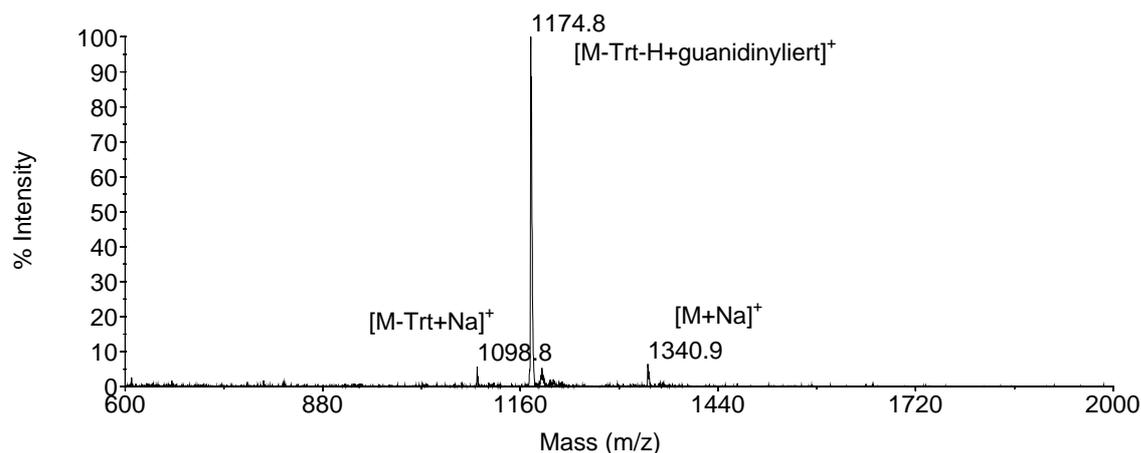


Abbildung 31: MALDI-ToF-MS des Rohprodukts der Cyclisierung eines FLHTRL-Peptids

Probleme bereitete dabei vor allem die große Säurelabilität der Trt-Gruppe. Selbst mittels sehr behutsamer Spaltmethoden ist es nicht möglich, das geschützte Peptid ohne einen größeren Anteil partiell Trt-entschützter Peptide zu erhalten. Auch sehr kurze Abspaltzeiten mit 0,5%iger TFA und direkter Neutralisation mit Pyridin oder Spaltung mit 20%igem HFIP in DCM bzw. Mischungen aus Essigsäure, TFE, DCM (2:2:6) führten zu partiell Trt-entschützten Peptiden. Dabei bereitete vor allem die Cyclisierung der Peptide der FLHTRL-Reihe größere Probleme (Tabelle 3), da es während der Ringschlussreaktion zur Bildung eines N^{im}-guanidinylierten Nebenprodukts kommt (Abbildung 31).

Das in Abbildung 31 gezeigte MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohprodukts der Cyclisierung des Peptids c(FLHTRL) zeigt einen sehr intensiven Basispeak bei $m/z = 1174,8$, der dem Trityl-entschützten und N^{im}-guanidinylierten Nebenprodukt $[M\text{-Trt-H} + \text{C}_5\text{N}_2\text{H}_{12}]^+$ entspricht. Aufgrund der positiven Ladung liegt das Nebenprodukt jedoch deutlich überrepräsentiert vor, was ein Vergleich mit dem analytischen HPL-Chromatogramm zeigt. Während der Anteil des Cyclopeptids im direkten Vergleich mit dem guanidinylierten Nebenprodukt im analytischen HPL-Chromatogramm bei 82,6 % liegt, ist die Intensität des vollgeschützten Cyclopeptids im

MALDI-ToF-MS mit einer Intensität von ca. 7 % in Bezug auf den Basispeaks des Nebenprodukts deutlich unterdrückt. Jedoch beträgt der Anteil des Nebenprodukts nach HPLC-Analyse bei einigen Synthesen bis zu 50 %.

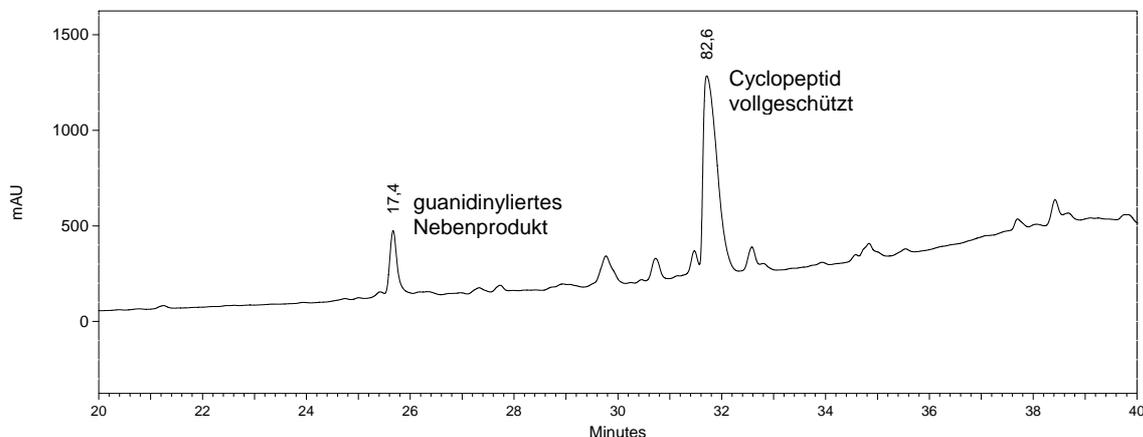


Abbildung 32: Analytisches HPL-Chromatogramm des Rohprodukts von c(FLHTRI) nach der Cyclisierung in Lösung
Die Werte im Chromatogramm geben die Flächenprozentage der Peaks wieder

Ein Beweis, dass es sich bei dem Nebenprodukt um das am Imidazolring des Histidinrestes guanidinylierte Peptid handelt, liefert die Reaktion von Fmoc-His-OAl mit Tetramethylchloroformamidiniumhexafluorophosphat (TCFH) in Gegenwart von Triethylamin (Abbildung 33). Die Umsetzung erfolgt in Analogie zur Synthese der Guanidiniumsalze TBTU^[136] und HATU^[131] aus HOBt bzw. HOAt.

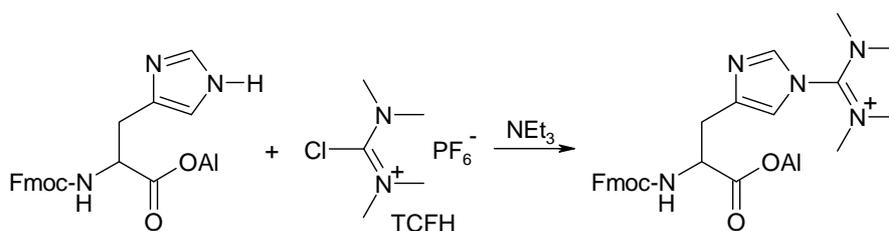


Abbildung 33: Umsetzung von Fmoc-His-OAl mit TCFH

Ob es sich bei dem Produkt um das in Abbildung 33 dargestellte N⁺- oder aber das N^π-Derivat handelt, kann nicht gesagt werden, da das Produkt nicht isoliert werden konnte. Jedoch zeigt das MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohprodukts, dass sich das guanidinylierte Histinderivat gebildet hat (Abbildung 34). Das Massenspektrum zeigt neben schwachen Peaks der

Pseudomolekülonen von Fmoc-His-OAl ($[\text{Edukt}+\text{H}]^+$ bei $m/z = 418,5$; $[\text{Edukt}+\text{Na}]^+$ bei $m/z = 440,5$) bei $m/z = 516,6$ einen intensiven Basispeak des Molekülonen $[\text{M}]^+$.

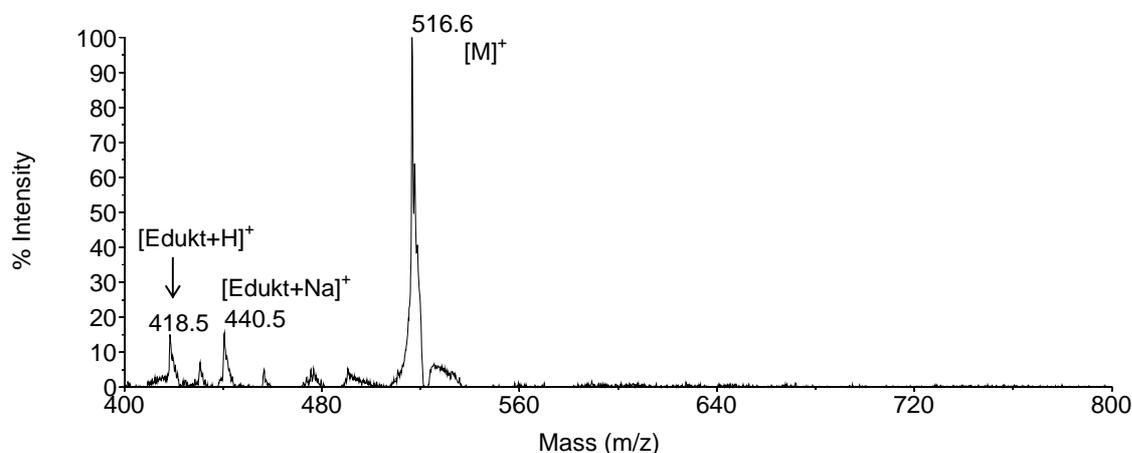


Abbildung 34: MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohprodukts der Umsetzung von Fmoc-His-OAl mit TCFH

4.4.3 Synthesestrategien

Da, wie bereits erwähnt, die Spaltung des geschützten linearen Peptids vom Harz immer einen deutlichen Anteil Trt-entschütztes Peptid bedingt - so entstehen in einer Lösung 0,5%iger TFA nach einer Stunde ca. 75 % Trt-entschütztes Peptid, in 20%iger HFIP-Lösung ca. 45 % - wurden alternative Synthesewege erarbeitet, die die Synthese Histidin-haltiger Cyclopeptide ohne die Bildung des guanidinylierten Nebenprodukts ermöglichen.

Dabei muss von einem Synthesekonzept ausgegangen werden, bei dem keine sauren Abspaltbedingungen Anwendung finden, um die Entstehung des Trt-entschützten linearen Vorläuferpeptids zu verhindern. Es werden drei verschiedene Synthesewege angewandt, von denen zwei Synthesen eine direkte *on-resin*-Cyclisierung erlauben und eine Synthese, in der das lineare Peptid in Lösung cyclisiert wird. Die Peptide, die am Harz cyclisiert werden, werden über den Imidazolring des Histidins immobilisiert und verlaufen über ein dreidimensionales Schutzgruppenkonzept. Hierbei werden die Allyl- bzw. die Dmab-Gruppe als C-terminale Schutzgruppen des Histidins eingesetzt. Das Peptid, das in Lösung cyclisiert wird, wird an einem neuartigen Dmab-Linker synthetisiert, der von der Dmab-Schutzgruppe abgeleitet wurde und wie diese Hydrazin-labil ist.^[234] Eine denkbare Synthese über eine *safety-catch*-Linker-Strategie kann nicht durchgeführt werden, da His(Trt)-Derivate während der Iodacetonitril-Aktivierung des Linkers am Imidazolring alkyliert werden und sich die Peptide zersetzen.^[235]

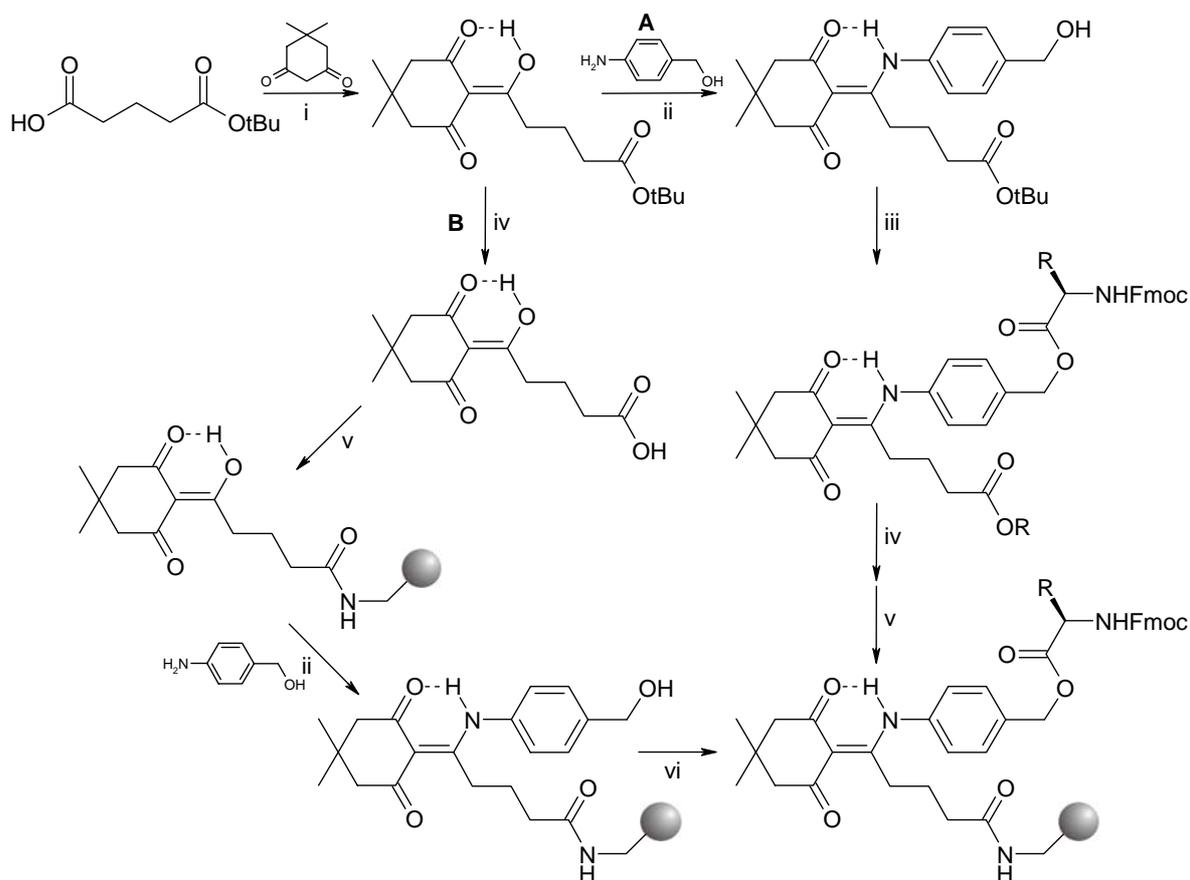


Abbildung 35: Synthese des Dmab-Linker-Harzes mit Fmoc-Aminosäure-Kupplung
 (i) DIC/DMAP, DMF, RT, 1h, 79 %; (ii) THF, Rückfluss, 20h, 74 %; (iii) Fmoc-Leu-F, Pyridin, DCM, RT, 20h, 92 %; (iv) TFA, TIS, H₂O (95:2,5:2,5), 3h; (v) Aminomethylpolystyren-Harz (200-400 Mesh, 0,6 mmol/g), HATU, DIPEA, DMF, 0,27 mmol/g; (vi) Fmoc-Gly-OH, HATU/DIPEA, DMF, 0,16 mmol/g

Die Synthese des Dmab-Linkers kann auf zwei Wegen erfolgen (Abbildung 35). Zunächst wird Dimedon durch DCC/DMAP aktivierte *tert*-Butylglutarsäure acyliert. Das daraus entstandene *C*-Acylierungsprodukt wird entweder über Route **A** an der OH-Gruppe durch *p*-Aminobenzylalkohol substituiert, gefolgt von der Knüpfung der Aminosäure über das Fmoc-Aminosäurefluorid, das durch Umsetzung der Fmoc-geschützten Aminosäure mit Cyanurfluorid darstellbar ist. Anschließende *tert*-Butyl-Spaltung der Glutarsäureeinheit und Immobilisierung am Aminomethyl-Linker-Harz durch DIC/HOAt-vermittelte Kupplung liefert das Aminosäure-beladene Dmab-Linker-Harz. In der alternativen Syntheseroute **B** wird das *C*-Acylierungsprodukt direkt entschützt und an das Aminomethyl-Harz gekuppelt. Die Kondensation des *p*-Aminobenzylalkohols und die Kupplung des Fmoc-Aminosäurefluorids erfolgen direkt am Harz.

Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die Syntheseroute **A**, da die Ausbeuten der Route **B** ab der Beladung des Harzes mit dem entschützten *C*-Acylierungsprodukt nicht bestimmt werden können. Die abschließende Beladungsbestimmung zeigt aber, dass das Harz über die Route **B** mit einer geringeren Beladung vorliegt, was den Rückschluss zulässt, dass die direkte Kondensation des *p*-Aminobenzylalkohols am Harz schlechter verläuft. Die Route **B** hat zwar den Nachteil, dass die Synthese schlechter kontrolliert werden kann, aber den Vorteil, dass beliebige Aminosäurederivate einsetzbar sind. Route **A** ist aber bezüglich der Auswahl der einsetzbaren Aminosäuren limitiert, da vor der Beladung des Aminomethyl-Harzes die *tert*-Butyl-Schutzgruppe der Glutarsäureeinheit abgespalten werden muss. Somit toleriert diese Variante keine säurelabilen permanenten Schutzgruppen, was den Einsatz des Linkers in der Fmoc/*tert*-Butyl-Taktik auf *C*-terminale Aminosäuren ohne Seitengruppenfunktionalitäten reduziert. Eine Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe vor der Aminosäure-Kupplung führte zur Zersetzung des *p*-Aminobenzylalkohol-Substituenten. Alternativ wäre eine andere Schutzgruppe, wie Allyl- oder Dmab-Schutz, der Glutarsäureeinheit vorstellbar.

Als Test für die Synthese mittels Dmab-Linker-Methode wurde ein Cyclopeptid gewählt, das reich an Histidinresten ist. Es handelt sich dabei um das Peptid c(GHGHGHG), ein Heptapeptid, das die Zn(II)-Bindungsstelle der Carboanhydrase mimikriert.^[236] Zum direkten Vergleich wurde das Peptid auf konventionelle Weise am 2-Chlortrityl-Harz synthetisiert, mit 0,5%iger TFA gespalten und unter hoher Verdünnung über eine Zweikanal-Spritzenpumpe cyclisiert (Abbildung 36).

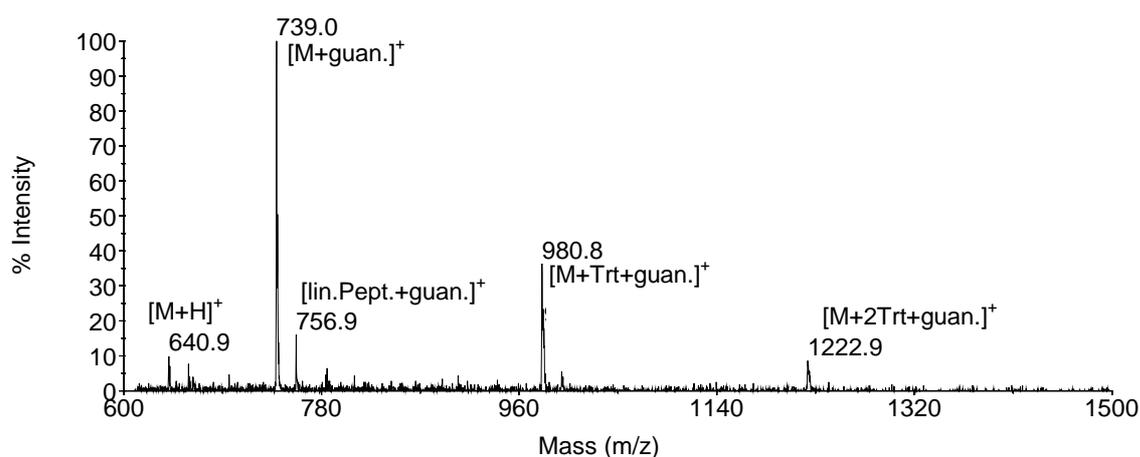


Abbildung 36: MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohprodukts von c(GHGHGHG) nach der herkömmlichen Synthesemethode

Das in Abbildung 36 gezeigte MALDI-ToF-MS zeigt das Rohprodukt der Cyclisierung des Peptids c(GHGHGHG) nach der herkömmlichen Methode. Die Cyclisierung wurde mit 1,1 Äquivalenten HATU, 1,0 Äquivalenten HOAt und 3,3 Äquivalenten DIPEA durchgeführt. Neben dem nur mit geringer Intensität vorkommenden Pseudomolekülion des Zielpeptids $[M+H]^+$ bei $m/z = 640,9$ sind vor allem, die Molekülionen der guanidinylierten Nebenprodukte $[M+guan.]^+$ bei $m/z = 739,0$, $[M+Trt+guan.]^+$ bei $m/z = 980,8$ bzw. $[M+2Trt+guan.]^+$ bei $m/z = 1222,9$ zu erkennen. Zudem liegt ein kleiner Peak bei $m/z = 756,9$, der dem uncyclisierten, guanidinylierten Peptid entspricht.

Die Synthese des Cycloheptapeptids am Dmab-Linker-Harz erfolgt ebenfalls über Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppentaktik und Aufbau der linearen Sequenz durch Kupplung mit TBTU. Das lineare Vorläuferpeptid GH(Trt)GH(Trt)GH(Trt)G wird durch zweimal 10minütige Spaltung mit 2 % Hydrazin in DMF vom Harz gespalten. Die Cyclisierung wird in Analogie zu obiger Synthese mit 1,1 Äquivalenten HATU, 1,0 Äquivalenten HOAt und 3,3 Äquivalenten DIPEA durchgeführt. Die Peptid- und HATU-Lösungen werden über eine Zweikanal-Spritzenpumpe zu der DIPEA-Lösung getropft. Abbildung 37 zeigt das Rohprodukt des entschützten Cyclopeptids c(GHGHGHG) nach erfolgter Cyclisierung. Es ist neben den Pseudomolekülionen $[M+H]^+$ bei $m/z = 641,3$, $[M+Na]^+$ bei $m/z = 663,3$ sowie $[M+K]^+$ bei $m/z = 679,3$ kein guanidinyliertes Nebenprodukt zu erkennen, somit kann diese Synthesemethode auch erfolgreich für die Darstellung Histidin-reicher Cyclopeptide eingesetzt werden.

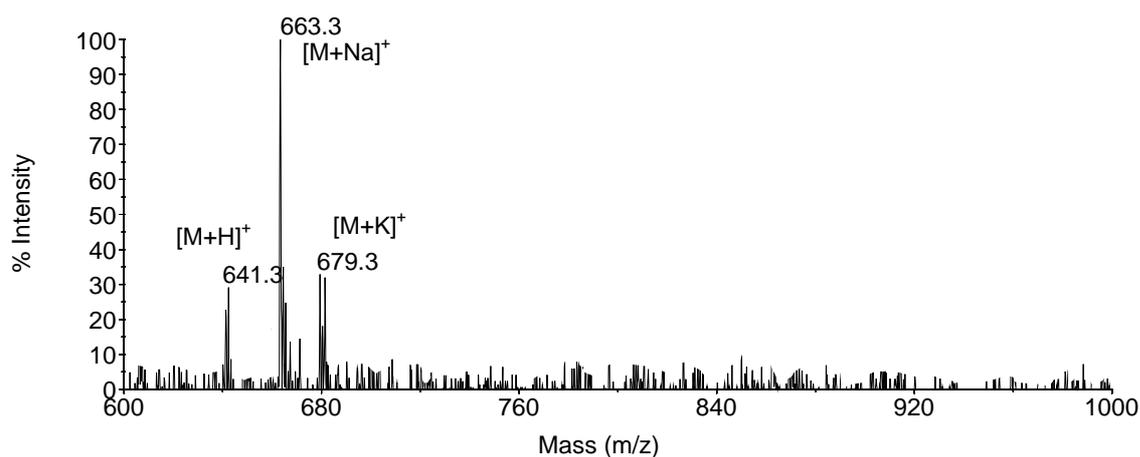


Abbildung 37: MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohprodukts von c(GHGHGHG) nach der Cyclisierung des am Dmab-Linker synthetisierten linearen Vorläuferpeptids

Die beiden anderen Routen über die *on-resin*-Cyclisierung erfolgen durch die direkte Immobilisierung der Histidinderivate am 2-Chlortrityl-Harz über die Imidazol-Seitenkettengruppe. Die α -Carboxy-geschützten Derivate werden zuvor ausgehend von Fmoc-His(Trt)-OH dargestellt (Abbildung 38). Dabei wird das C-terminal Allyl-geschützte Histidinderivat^[237] durch die DCC/HOBt-vermittelte Allylierung mit Allylalkohol erhalten. Durch anschließende Acidolyse wird Fmoc-His-OAl in hoher Ausbeute erhalten. Analog erfolgt die Synthese des am C-Terminus Dmab-geschützten Derivats. Hierbei wird Dmab-OH durch DCC/HOBt eingeführt und die N^{im}-Trityl-Schutzgruppe abschließend mit TFA gespalten.

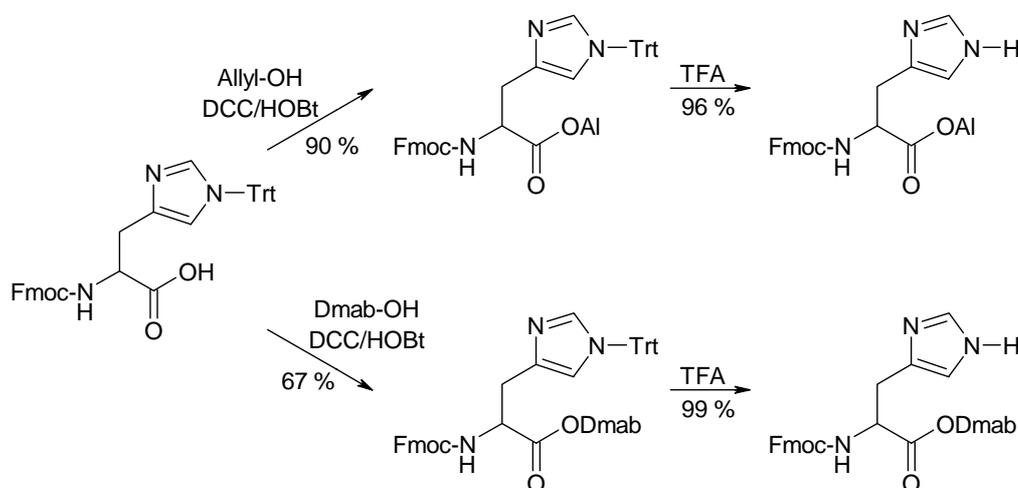


Abbildung 38: Synthese von Fmoc-His-OAl und Fmoc-His-ODmab

Zur Kontrolle der drei verschiedenen Reaktionswege wurde das Peptid c(fLHTRL) (**2**) über diese Routen synthetisiert. Der Aufbau der linearen Peptide erfolgte nach Standardsynthese mit TBTU/DIPEA vermittelter Aminosäurekupplung. Anschließend folgte die Spaltungen der C-terminalen Schutzgruppen bzw. des Hydrazin-labilen Linkers. Hierbei bereitete vor allem die Spaltung der Allylgruppe Probleme. Die Entfernung dieser Gruppe mit Palladium (hier: Pd(PPh₃)₄) verläuft über einen Transfer der Allylgruppe des intermediär gebildeten π -Allyl-Palladium-Komplexes auf ein Nucleophil (*Scavenger*), das in der Lage ist, die Allylgruppe abzufangen (Abbildung 39).

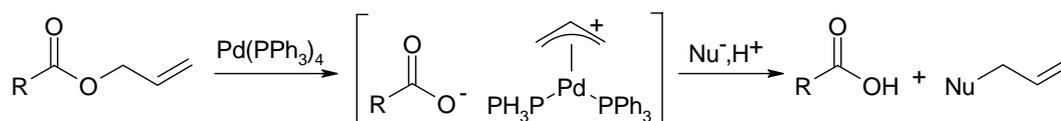


Abbildung 39: Pd-katalysierte Entschützung von Allylestern

Es wurden verschiedene Nucleophile der Abspaltungslösung zugesetzt. Hier verliefen die Spaltungen unter Zusatz von N-Methylmorpholin^[238] bzw. Phenylsilan^[239] als *Scavenger* negativ. Erst durch den Einsatz von Dimedon^[240] als Nucleophil gelang es, die Allylgruppe zu spalten, jedoch erfolgte dies auch nicht zu 100 %. Ob es bei der Spaltung zu einer Übertragung der Allylgruppe auf die Aminofunktion unter Ausbildung eines Allylamins kam, die als Nebenreaktion bekannt ist,^[241] oder ob sich ein Gleichgewichtszustand ausgebildet hat, kann nicht gesagt werden. Auch nach mehrmaligem Spalten mit einem Äquivalent frischem Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) wurde keine komplette Spaltung der Allylgruppe erhalten, so dass das erhaltene Cyclisierungsprodukt neben dem Cyclopeptid noch allyliertes lineares Peptid enthält. Nach RP-HPLC-Analyse beträgt der Anteil an allyliertem Nebenprodukt noch 44 %. Ein entscheidender Nachteil ist zudem, dass die Spaltung unter Inertgas erfolgen soll, somit ist diese Syntheseroute nur schlecht auf einen Syntheseautomaten zu übertragen.

Die Synthese über das C-terminal Dmab-geschützte Peptid verlief weniger problematisch. Jedoch zeigte sich hier bei der Kontrolle der Hydrazinolyse der Dmab-Gruppe im MALDI-ToF-Massenspektrum ein um +105 Da schwereres Nebenprodukt (Abbildung 40), bei dem es sich um *p*-Aminobenzyl-substituiertes Peptid handelt.^[242] Die 1,6-Eliminierung des 4-Aminobenzyl-Intermediats ist langsam genug, dass es im Massenspektrum direkt nach der Hydrazinolyse nachgewiesen werden kann, jedoch zerfällt es nach einiger Zeit in das Zielpeptid.

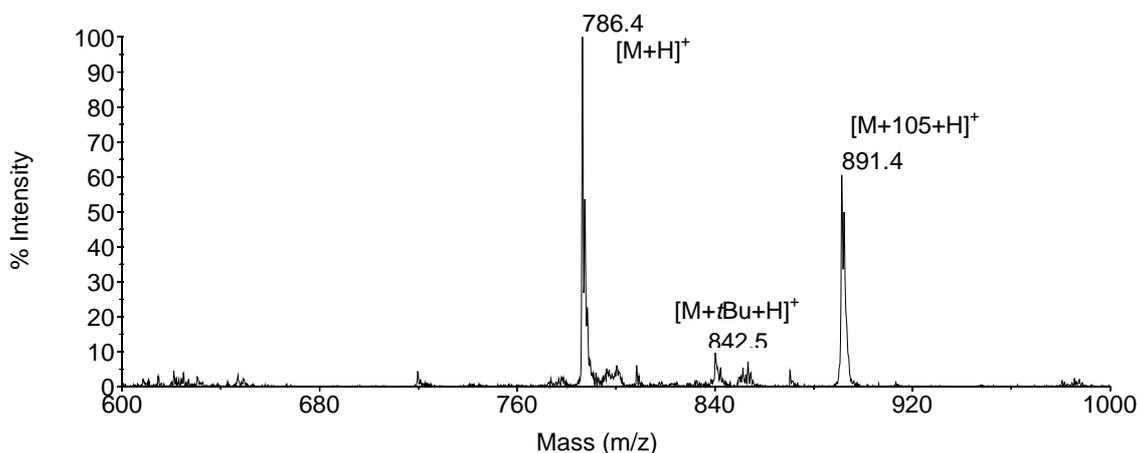


Abbildung 40: MALDI-ToF-Massenspektrum des entschützten linearen Rohprodukts H-fLHTRL-OH (**2**) direkt nach der Hydrazinolyse der Dmab-Schutzgruppe

ie anschließende Cyclisierung verlief ohne Probleme. Weder dimere Nebenprodukte noch guanidinylierte Spezies konnten beobachtet werden (Abbildung 41).

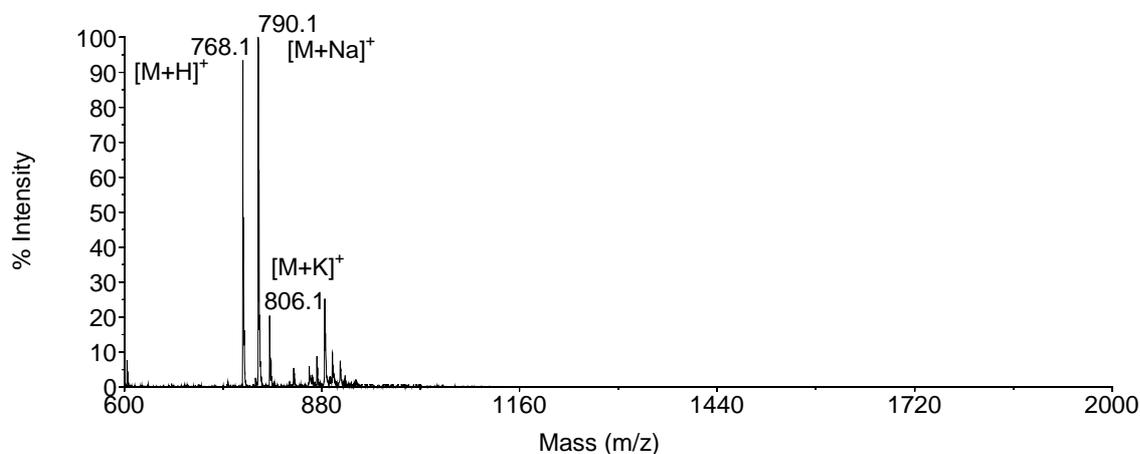
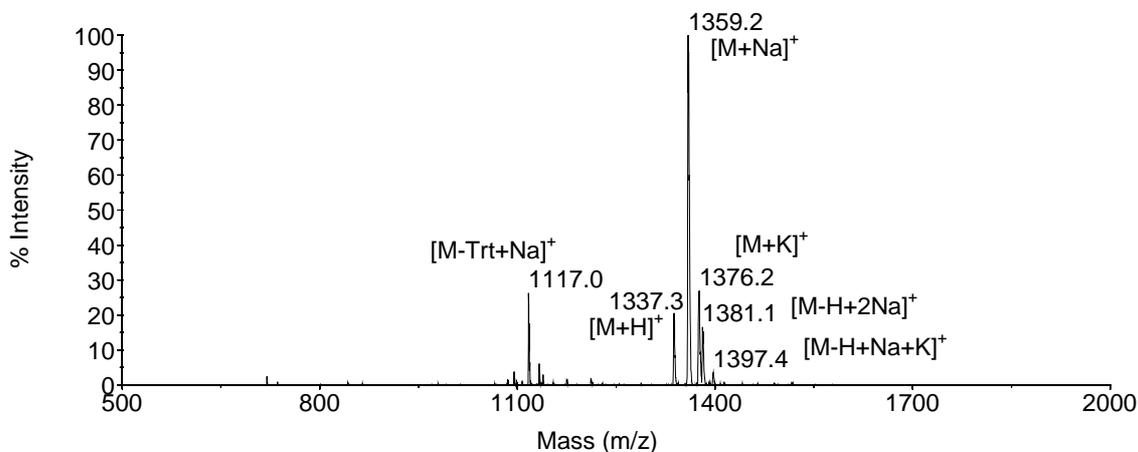


Abbildung 41: MALDI-ToF-Massenspektrum des entschützten cyclischen Rohpeptid c(LHTRL) (**2**) nach der *on-resin*-Cyclisierung

Die Synthese des Peptids (**2**) über den Dmab-Linker-Weg erfolgte ebenfalls problemlos. Die Spaltung des linearen Vorläuferpeptids vom Harz mit 2 % Hydrazin in DMF erfolgt quantitativ nach zweimal 10minütiger Hydrazinolyse. Das Rohprodukt wird nach MALDI-ToF-MS in reiner Form erhalten (Abbildung 42). Die Entstehung des partiell Trt-entschützten Peptids mit dem Pseudomolekülion $[M-\text{Trt}+\text{Na}]^+$ bei $m/z = 1117,0$ ist auf eine Abspaltung während der MALDI-ToF-MS-Messung zurückzuführen. Es konnten nach der Cyclisierung keine guanidi-



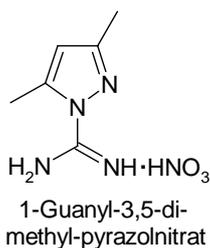
nylierten Nebenprodukte identifiziert werden.

Abbildung 42: MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohprodukts des linearen Peptids H-*f*LHTRL-OH (2**) nach der Hydrazinolyse des Dmab-Linkers**

Im Vergleich der drei angewandten Synthesewege erscheint die Synthese über den Hydrazinlabilen Dmab-Linker am unproblematischsten. Der Vorteil liegt hier vor allem in der freien Wahl der C-terminalen Aminosäure, wenn die Synthese des Linkers über die Route **B** (Abbildung 35) gewählt wird. Somit könnten Glycin-enthaltende Peptide über C-terminales Glycin cyclisiert werden, während die beiden anderen Routen eine Cyclisierung über C-terminales Histidin erfordern und somit einem erhöhten Racemisierungspotential ausgesetzt sind. Zudem erscheint dieser Weg ratsamer, da die Gefahr der Entstehung von Cyclodimeren, obwohl hier bei beiden *on-resin*-Cyclisierungen nicht beobachtet, geringer ist und falls möglich eine vorherige Reinigung der geschützten Vorläuferpeptide möglich wäre.

4.4.4 Hydrazinolyse der Guanidiniumgruppe des Nebenprodukts

Arginin-haltige Peptide lassen sich alternativ zur Einführung über geschützte Argininderivate



durch die selektive Guanidinylierung von Ornithin-enthaltenden Peptiden darstellen. Bei der klassischen Synthese von Arginin-haltigen Peptiden über Ornithin wird das entschützte Ornithin mit 1-Guanyl-3,5-dimethyl-pyrazolnitrat^[243, 244] umgesetzt. Das Reagenz reagiert mit primären Aminen unter Ausbildung von Guanidiniumderivaten.

Nach Analogiebetrachtung dieses Reagenzes mit dem guanidinylierten Imidazolring des Histidins wurde versucht, die entstandenen guanidinylierten Nebenprodukte direkt zu spalten. Die strukturelle Verwandtschaft legt nahe, dass durch Zusatz eines primären Amins zum guanidinylierten Nebenprodukt eine Abspaltung der Guanidiniumgruppe durch nucleophilen Angriff des Amins auf das Kohlenstoffatom dieser Gruppe erfolgen sollte.

Zur Spaltung der unerwünschten Guanidiniumgruppe wird das isolierte guanidinylierte Nebenprodukt von Peptid c(*f*LHRTL) (**2**) in seiner geschützten Form mit 2 % Hydrazin in DMF versetzt. Wie das MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohprodukts der Spaltung in Abbildung 43 zeigt, erfolgt die Spaltung der Guanidiniumgruppe mit Hydrazin glatt zum gewünschten Histidin-entschützten Peptid c(*f*LHTRL) (**2**) mit $m/z = 1098,1$ für das Pseudomolekülion $[M+Na]^+$.

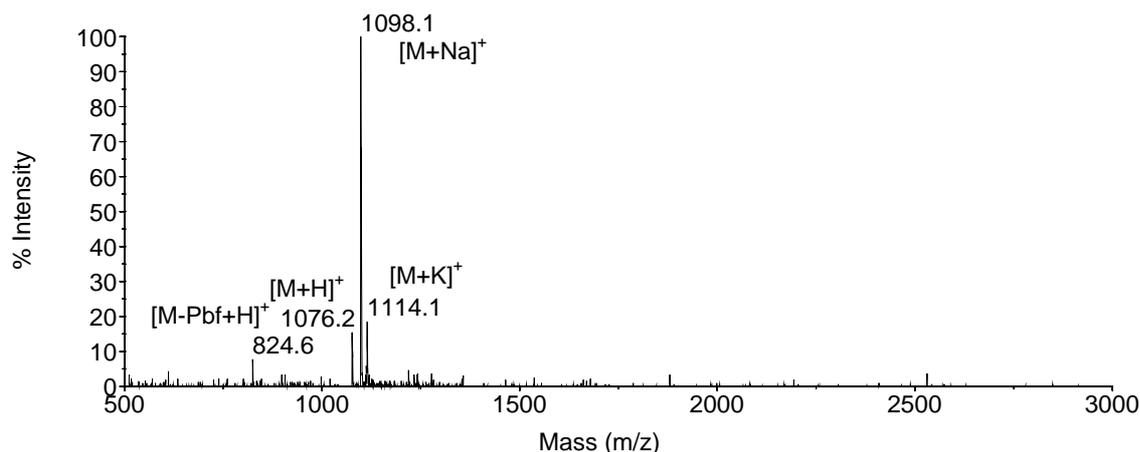


Abbildung 43: MALDI-ToF-Massenspektrum des Rohprodukts des guanidinylierten Nebenprodukts von c(fLHTRL) (2) nach der Umsetzung mit Hydrazin

Somit ist es auch möglich, das erhaltene Nebenprodukt nach der Cyclisierung durch Umsetzung mit Hydrazin direkt in das Zielperpeptid zu überführen. Wird das Rohprodukt des Testpeptids c(GHGHGHG) in gleicher Weise mit 2 % Hydrazin behandelt, erhält man ebenfalls das deguanidinylierte Peptid mit $m/z = 662,8$ für das $[M+Na]^+$ -Ion, wobei das MALDI-ToF-Massenspektrum (Abbildung 44) im Vergleich zum Rohprodukt der Cyclisierung (vergleiche Abbildung 36) nun auch deutlich das Pseudomolekülion $[M+H_2O+Na]^+$ bei $m/z = 680,8$ des nicht cyclisierten Edukts zeigt.

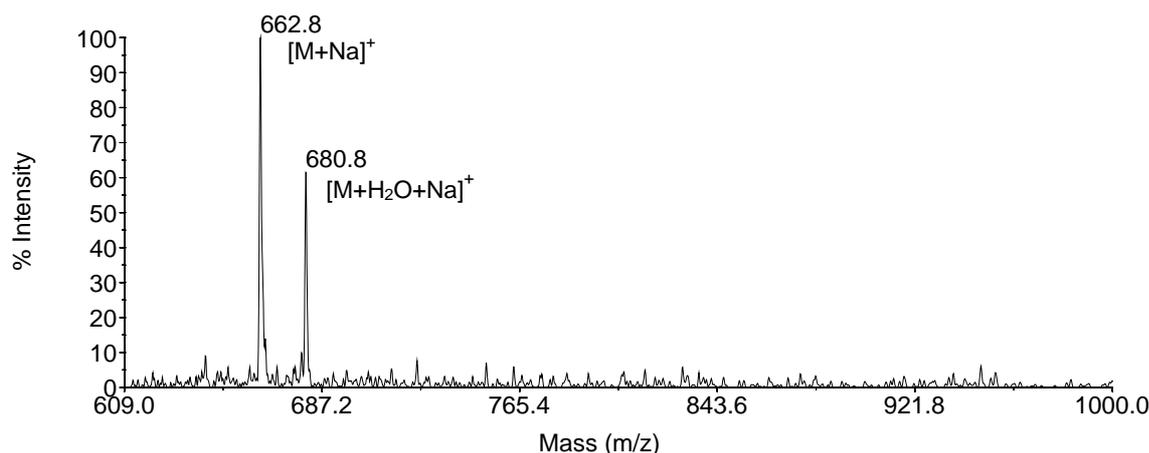


Abbildung 44: MALDI-ToF-Massenspektrum des entschützten Rohprodukts der Cyclisierung von c(GHGHGHG) nach der Umsetzung mit 2 % Hydrazin in DMF (vergleiche Abbildung 36)

4.5 Oberflächenplasmonresonanzstudien

Wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben, stellen Oberflächenplasmonresonanzmessungen eine Methode dar, um Interaktionen zwischen zwei Bindungspartnern zu untersuchen. Die Messungen liefern dabei Echtzeit-Informationen über den Bindungsprozess und können in einem weiten Affinitätsbereich angewandt werden. Insbesondere ist das Biacore®-System ideal geeignet, Wechselwirkungen biologischer Systeme in wässrigen Medien zu untersuchen.

Im Biacore® 3000 ist die Sensoroberfläche Teil eines mobilen Chips, der einen mit Gold beschichteten Glasträger enthält und optisch mit dem Instrument gekoppelt ist. Das Messsystem enthält vier Flusskammern mit einer Größe von 2,10 mm x 0,55 mm x 0,05 mm (Länge x Breite x Höhe) und einer Detektionsfläche von 0,2 mm². Die Flusszellen sind dabei sowohl unabhängig als auch gegeneinander schaltbar, um zeitgleich Referenzmessungen durchzuführen.

Die zeitabhängige Änderung des Brechungsindex in der Umgebung der Sensoroberfläche während der Bindung wird häufig in RU (*resonance units*) angegeben, wobei ein RU in etwa einem Pikogramm des Analyten pro Quadratmillimeter Sensoroberfläche entspricht, übereinstimmend mit einer Winkeländerung von 0,0001°. ^[245, 181a] Bindungskurven, bei denen die Bindung an die Sensoroberfläche in RU gegen die Zeit aufgezeichnet werden, werden als Sensogramme bezeichnet (Abbildung 45).

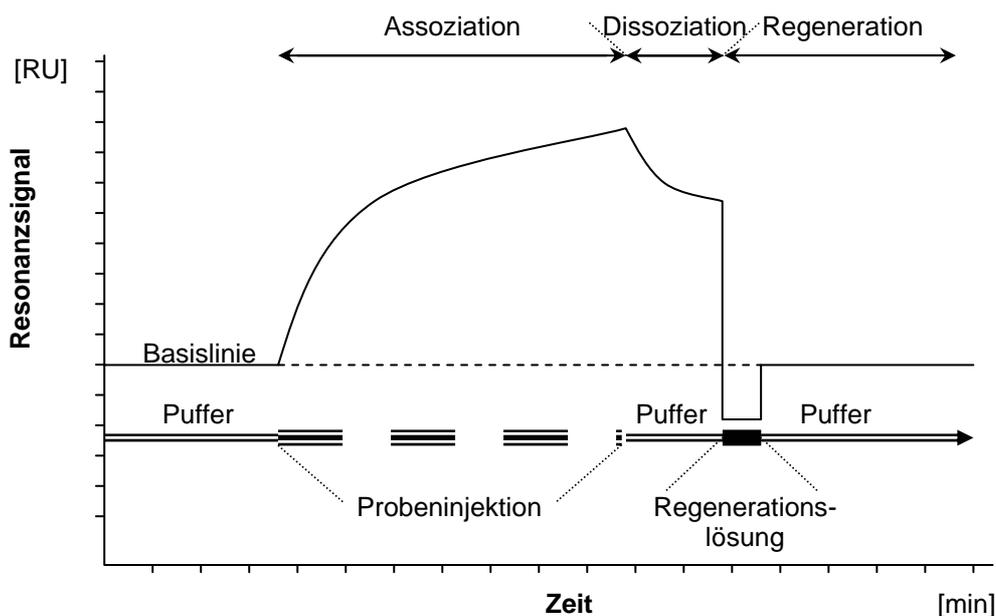


Abbildung 45: Schematisches Sensogramm einer SPR-Messung

Zur Bestimmung der Affinitäten der Peptide der Peptidbibliothek werden die Interaktionen der verschiedenen Peptide mit dem IgG_{rat} L2-412^[2] untersucht. Dabei zeigt ein erhaltenes Sensogramm normalerweise einen wie in Abbildung 45 gezeigten Kurvenverlauf. Der Assoziationsphase, in der die Probe über die Oberfläche mit dem immobilisierten Rezeptor geleitet wird und in der die Bindung erfolgt, schließt sich die Dissoziationsphase an. In dieser werden zuvor gebundene Liganden durch den Systempuffer wieder eluiert. Anschließende Regeneration mit einem geeigneten Regenerationspuffer, führt wieder zum Ausgangszustand.

4.5.1 Immobilisierung des L2-412-Antikörpers

Zur Bestimmung der Affinitäten der Cyclopeptide muss der IgG_{rat}-Antikörper L2-412 auf der Chipoberfläche immobilisiert werden. Für die gesamten hier durchgeführten Messungen wird der CM5-Sensorchip gewählt. Diesen zeichnet eine hohe Stabilität der carboxymethylierten Dextran-Matrix, eine hohe Bindungskapazität und eine große Breite an Kupplungsmöglichkeiten aus. Er ist ideal für die Immobilisierung von Makromolekülen geeignet.

In den durchzuführenden Experimenten werden die Peptide, die eine sehr geringe Masse gegenüber dem Antikörper, mit einer Masse von ca. 143000 Da (Abbildung 46), besitzen, über den immobilisierten Antikörper geleitet. Diese Messmethode führt nur zu einer geringen Massenänderung der Chipoberfläche, weshalb der Antikörper mit einer hohen Beladungsdichte auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden muss, um gut detektierbare Bindungssignale zu erhalten.

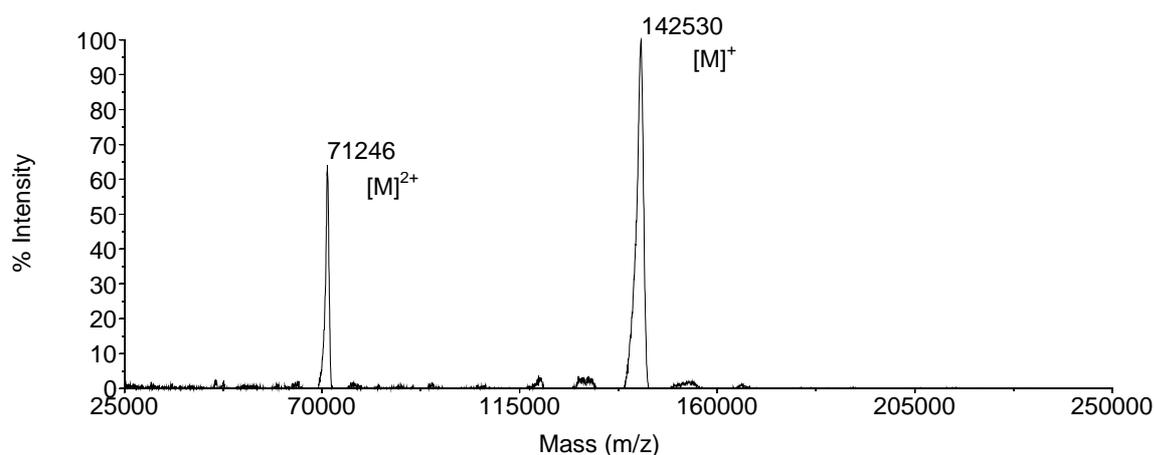


Abbildung 46: MALDI-ToF-Massenspektrum des IgG_{rat}-Antikörpers L2-412

Matrix: Sinapinsäure; Accelerating Voltage: 25 kV; Grid Voltage: 93 %; Guide Wire Voltage: 0,3 %; Delay-Time: 1700 nsec; Low Mass Gate: 4500 Da; Scans: 100

Um eine optimale Durchdringung der negativ geladenen Matrix durch den Antikörper für dessen Immobilisierung zu gewährleisten und da der pI-Wert des Antikörpers unbekannt ist, ist es erforderlich, im pH-*Scouting* den idealen Puffer und pH-Bereich für die Immobilisierung zu eruiieren. Bei zu hohem pH-Wert und negativ geladenem Makromolekül wird dieses von der Matrix abgestoßen, und es kann keine Immobilisierung erfolgen. Zu niedrige pH-Werte erschweren hingegen eine effektive Kupplung.

Bei dem in Abbildung 47 gezeigten pH-*Scouting* wurden 1 μ L der L2-412-Antikörper-Lösung (14 mg/mL) mit je 75 μ L Puffer versetzt und mit einem Fluss von 5 μ L./min fünf Minuten injiziert. Der Kurvenverlauf zeigt, dass neben 10 mM Acetat-Puffern vor allem 5 mM Maleat-Puffer für die Immobilisierung geeignet scheinen. Hierbei zeigt der 5 mM Maleat-Puffer (pH 6,0) die höchsten RU-Werte. Da die Kurven insgesamt einen Verlauf aufweisen, bei dem die maximalen RU-Werte für die jeweiligen Puffer sprunghaft erreicht werden, was sehr stark an ungewünschte *Bulk*-Effekte (durch Änderung der Dichte der Lösungen verursachte sprunghafte Änderung des Signals) erinnert, werden mit dem 5 mM Maleat-Puffer (pH 6,0) verdünnte Antikörperproben vermessen, um einen gleichmäßigen Anstieg des Sensorsignals zu erhalten.

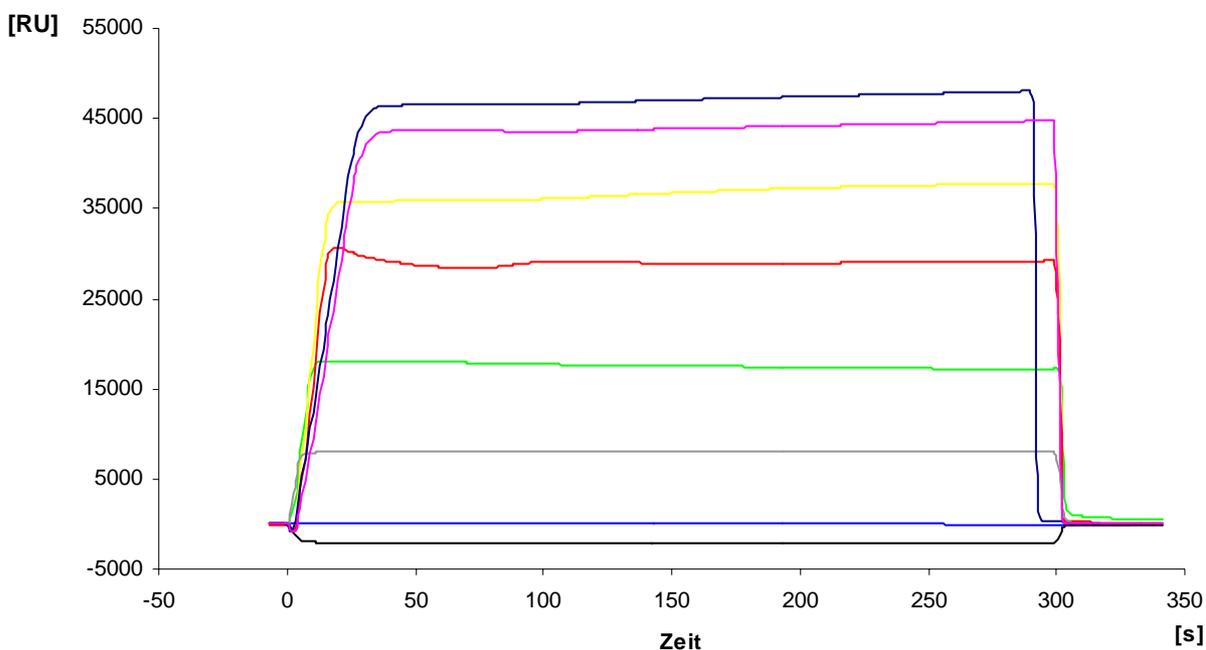


Abbildung 47: pH-*Scouting* des L2-412-Antikörpers
 — Acetat 10 mM pH 5,5 ohne Antikörper; — HPS-EP 10 mM HEPES pH 7,4; — Borat 10 mM, 1 M NaCl pH 8,5; — Acetat 10 mM pH 4,0;
 — Maleat 5 mM pH 5,0; — Acetat 10 mM pH 5,0; — Acetat 10 mM pH 5,5;
 — Maleat 5 mM pH 6,0

Für die Messung der Verdünnungsreihe des L2-412-Antikörpers wird jeweils 1 μL der verdünnten Antikörper-Lösung mit 75 μL des 5 mM Maleat-Puffer (pH 6,0) versetzt und bei einem Fluss von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ für fünf Minuten über die Sensoroberfläche geleitet (Abbildung 48).

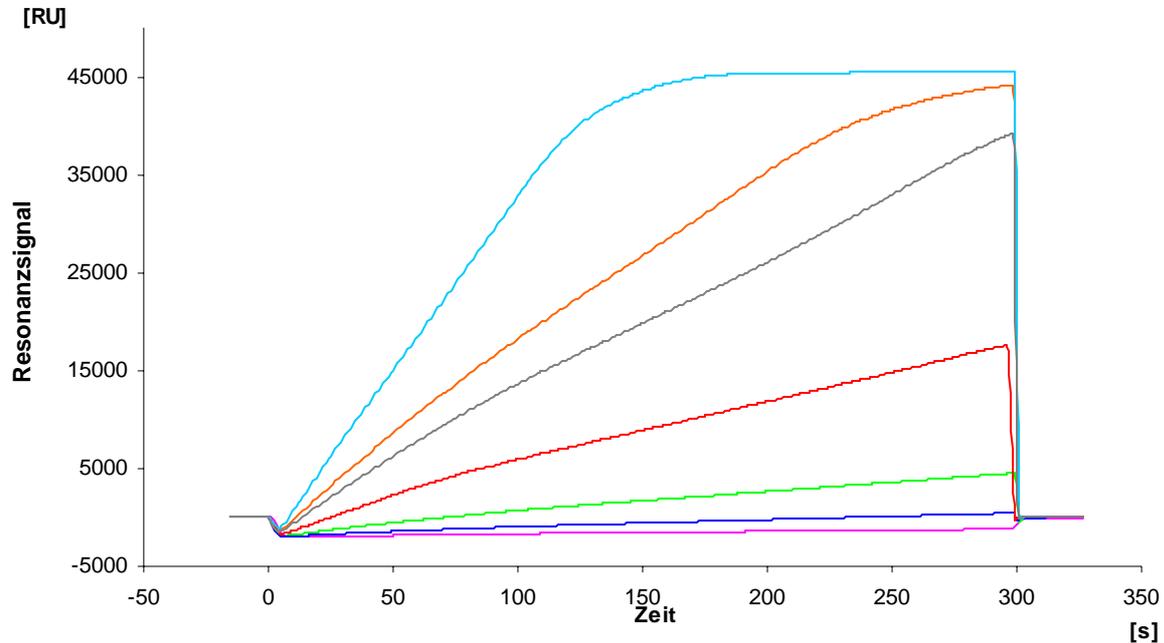


Abbildung 48: Verdünnungsreihe des L2-412-Antikörpers in 5 mM Maleat-Puffer (pH 6,0) je 1 μL 1:100-; 1:40-; 1:30-; 1:10-; 1:6-; 1:5-; 1:3-Verdünnung der Antikörperstammlösung in 75 μL 5 mM Maleat pH 6,0

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass für die Immobilisierung 5 mM Maleat-Puffer (pH 6,0) mit einem Mikroliter einer 1:5-1:6-Verdünnung des Antikörpers in 75 μL des Puffers für die Immobilisierung ideal ist.

Die Immobilisierung des Antikörpers wird mit der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Variante des Wunsch-Weygand-Protokolls^[184] durchgeführt. Diese kann zwar eine nicht einheitliche Orientierung der immobilisierten Rezeptoren hervorrufen, da die Aminogruppen der Makromoleküle unspezifisch angesprochen werden, jedoch garantiert sie eine effiziente Kupplung mit hoher Matrix-Beladung. Die einzelnen Stufen der Immobilisierung (Abbildung 49) werden mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt. Um unspezifische Wechselwirkungen der Peptide mit der Dextran-Matrix des Sensorchips vom Messsignal zu subtrahieren, wird eine Referenzzelle vor die Messzelle geschaltet, in der kein Antikörper immobilisiert wird. In dieser wird die Matrix lediglich aktiviert und anschließend mit Ethanolamin deaktiviert. Zur Aktivierung der Sensoroberfläche (**A**) wird über 14 Minuten eine EDC/NHS-Lösung über

diese geleitet. Anschließend wird der Ak L2-412 mit oben beschriebener Verdünnung in 5 mM Maleat-Puffer (pH 6,0) über 14 Minuten auf der Oberfläche der Messzelle immobilisiert (**B**). Zur Deaktivierung nicht umgesetzter NHS-Ester werden diese mit Ethanolamin (14 Minuten) in beiden Zellen gecappt (**C**).

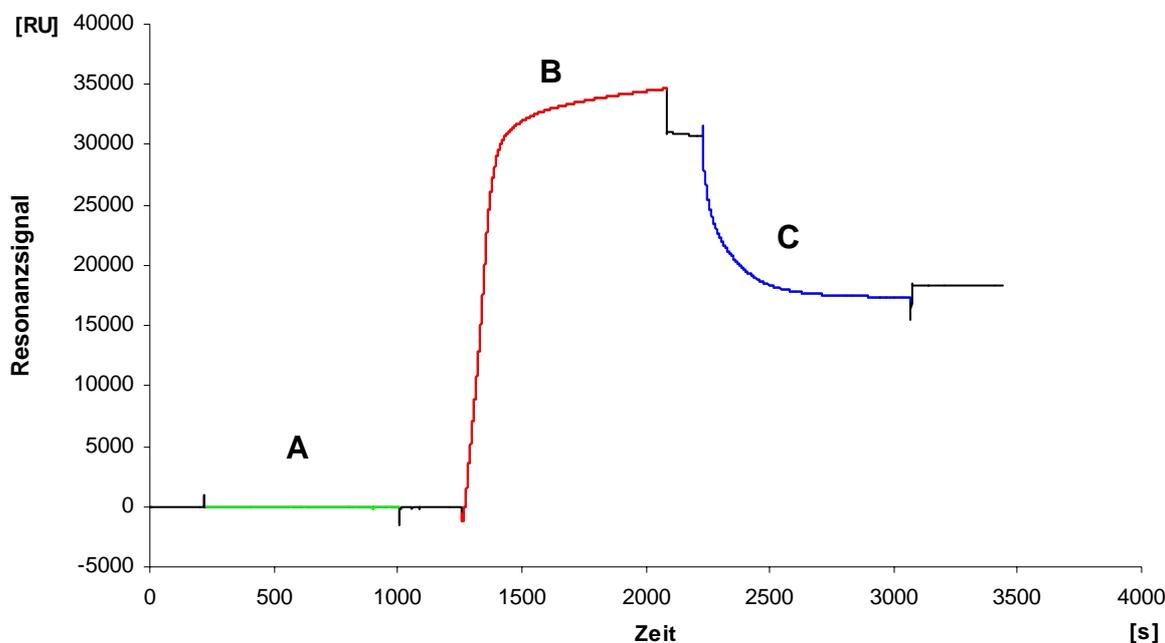


Abbildung 49: Sensogramm der Immobilisierung des L2-412-Antikörpers auf einem CM5-Chip (Immobilisierungsniveau: 18000 RU)
A: EDC/NHS-Aktivierung; **B**: Immobilisierung Ak L2-412; **C**: Capping

Nach der erfolgten Immobilisierung des Antikörpers ist eine Equilibrierung der Sensoroberfläche erforderlich, dafür wird diese mit Systempuffer (HBS-P) über 20 Stunden gespült. Mit der beschriebenen Methode werden Immobilisierungsniveaus von 18000-20000 RU erreicht.

4.5.2 Test der Massentransfer-Limitierung

Wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, kann es während der SPR-Messung zu Massentransfer-Problemen kommen. Diese werden durch Transportlimitierungen der Probenlösung zum Rezeptor verursacht. Hohe Beladungsdichten auf Sensoroberflächen begünstigen dabei diese Effekte. Aus diesem Grund werden Untersuchungen durchgeführt, die Hinweise auf Massentransferprobleme geben können. Werden Proben des Liganden mit gleicher Konzentration aber verschiedenen Flussraten über eine Rezeptoroberfläche geleitet, sollten alle Bindungsereignisse trotz verschiedener Flussgeschwindigkeiten gleiche Bindungskurven zeigen.

Zur Bestimmung, ob bei den hohen Beladungsdichten, mit denen in dieser Arbeit gearbeitet werden, Massentransferprobleme auftreten, wird das Peptid c(StTFQL) (**28**) mit einer Konzentration von 300 μM bei vier verschiedenen Flussraten für 120 Sekunden über die Sensoroberfläche geleitet.

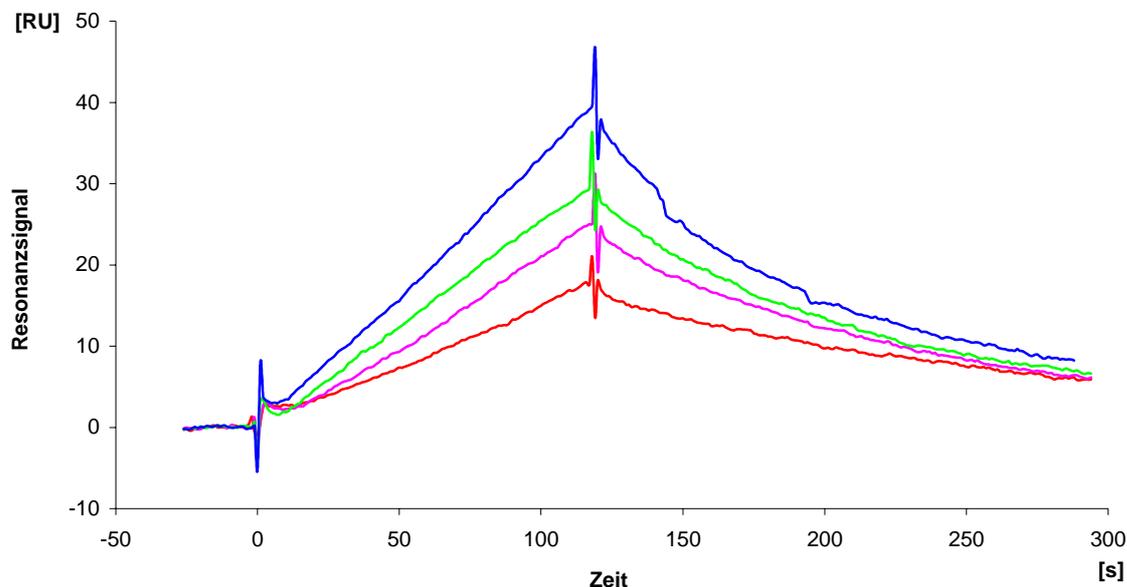


Abbildung 50: Test der Massentransfer-Limitierung (Immobilisierungsniveau 18000 RU)
Flussrate: — 15 $\mu\text{L}/\text{min}$; — 25 $\mu\text{L}/\text{min}$; — 35 $\mu\text{L}/\text{min}$; — 55 $\mu\text{L}/\text{min}$

Wie anhand der Kurvenschar obiger Sensogramme zu erkennen ist, steigt mit der Zunahme der Flussgeschwindigkeit auch das Signal der Bindungskurven an. Es ist somit davon auszugehen, dass es bei der hohen Beladung, wie es auch zu vermuten ist, zu Massentransfer-Limitierungen kommt.

Um den Effekt bei niedrigerer Oberflächenbeladung zu ermitteln, wird eine Sensoroberfläche mit niedrigerer Beladung erzeugt (Abbildung 51). Dazu wird nach der Aktivierung der Oberfläche mit NHS/EDC durch wiederholte, intervallartige Injektionen des Antikörpers (Ak-Lösung analog zur hohen Beladung) eine Oberfläche generiert, die nur ca. 1/3 der Beladung des hohen Immobilisierungsniveaus aufweist.

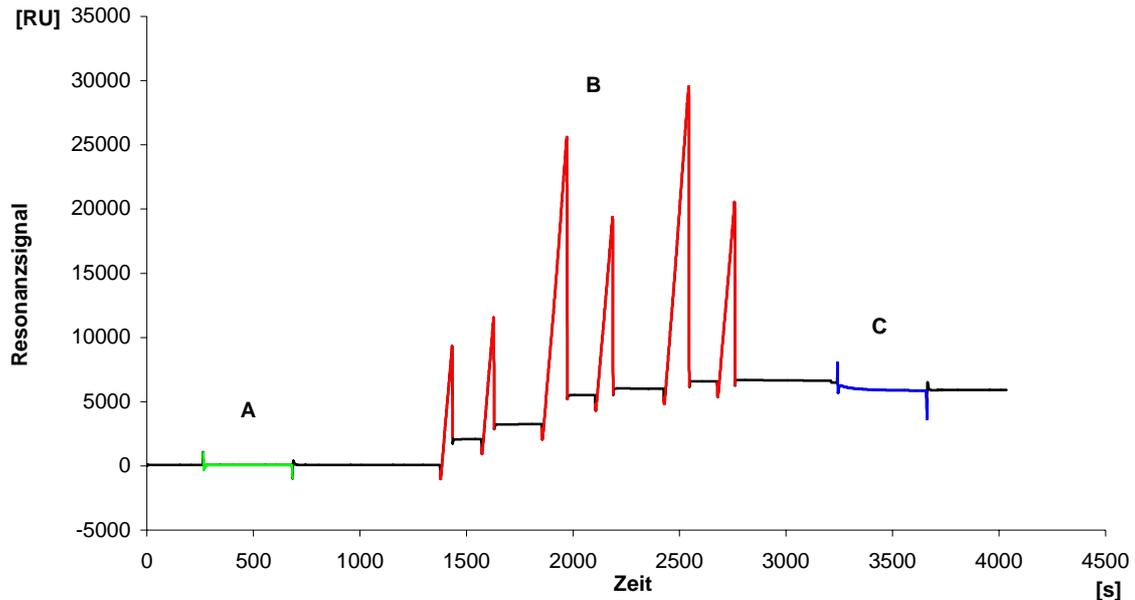


Abbildung 51: Sensogramm der Immobilisierung mit niedrigem Beladungsniveau (5900 RU)
A: NHS/EDC-Aktivierung; **B:** sechs Antikörperinjektionen à 60-120 s; **C:** Capping

Zur Kontrolle der Massentransfer-Limitierung wird wieder das Peptid c(StTFQL) mit einer Konzentration von 300 μM bei verschiedenen Flussraten für 120 Sekunden über die Sensoroberfläche geleitet. Wie anhand Abbildung 52 zu erkennen ist, ist auch bei der niedrigen Immobilisierung eine deutliche Massentransfer-Limitierung zu beobachten. Insgesamt ist das Messsignal im Vergleich zu Sensoroberfläche mit hoher Beladung deutlich niedriger. Während nach 120 Sekunden bei einem Fluss von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ und hohem Immobilisierungsniveau 25 RU erreicht werden, liegt das Signal nach dieser Zeit bei gleicher Flussrate und niedriger Beladung bei ca. 2,5 RU, was lediglich einem Zehntel des Wertes der hohen Immobilisierung entspricht.

Da bei der geringen Beladung ebenfalls Massentransferprobleme auftreten, die erhaltenen Signale aber deutlich niedriger ausfallen, wird für die SPR-Messungen der Peptidbibliotheken die hohe Beladungsdichte der Sensoroberfläche beibehalten. Es ist für die Auswertung nur darauf zu achten, dass diese Effekte die erhaltenen Werte beeinflussen können. Diese gelten jedoch für alle Peptide, so dass es trotzdem möglich sein sollte, unterschiedliche Affinitäten der Peptide zu erhalten. Zwar werden eventuell fehlerbehaftete absolute Werte erhalten, relative Änderungen der Affinitäten je nach Struktur und Sequenz sollten aber zu beobachten sein.

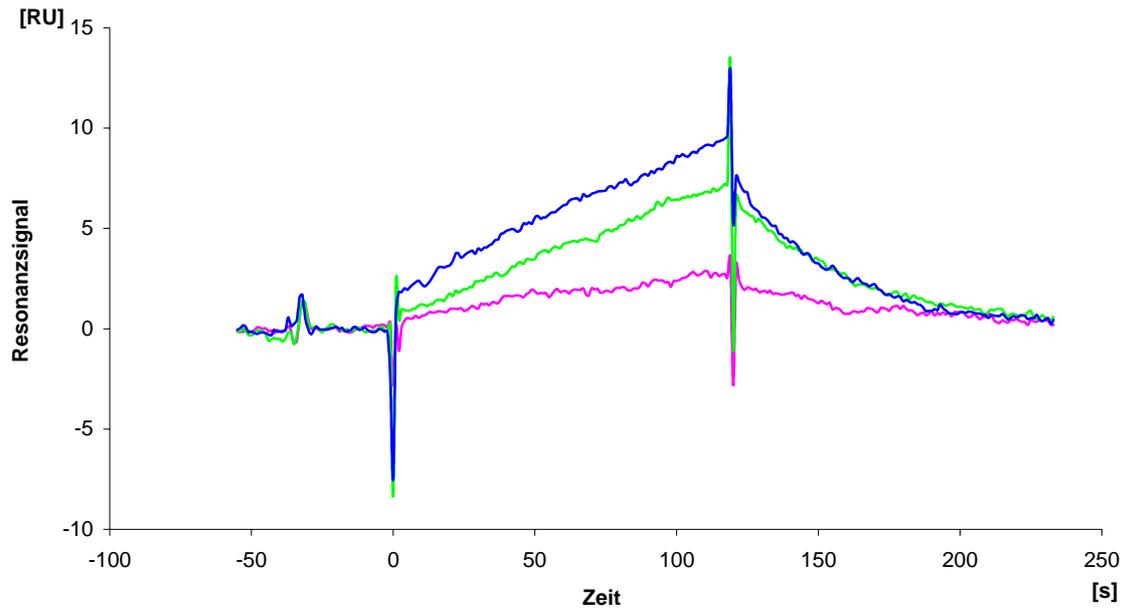


Abbildung 52: Massentransfer-Limitierung bei niedrigem Immobilisierungsniveau (5900 RU)
Flussrate: — 25 µL/min; — 35 µL/min; — 45 µL/min

4.5.3 Bindungsstudien der Peptidbibliothek

Zu Bestimmung der Affinitäten der Peptide (1)-(45) der Peptidbibliothek werden für jedes Peptid Konzentrationsreihen vermessen, aus deren Kurvenscharen sich dann die K_D -Werte bestimmen lassen.

Erste Bindungsstudien der Cyclopeptide wurden in HBS-EP-Puffer (pH 7,4) durchgeführt. Da dieser Puffer jedoch EDTA enthält und sich die Sensoroberfläche durch EDTA-angereicherten Puffer regenerieren ließ, wurde das System auf HBS-P-Puffer (pH 7,4) umgestellt. Durch die Umstellung wurden deutlich bessere Sensogramme erhalten (Abbildung 53).

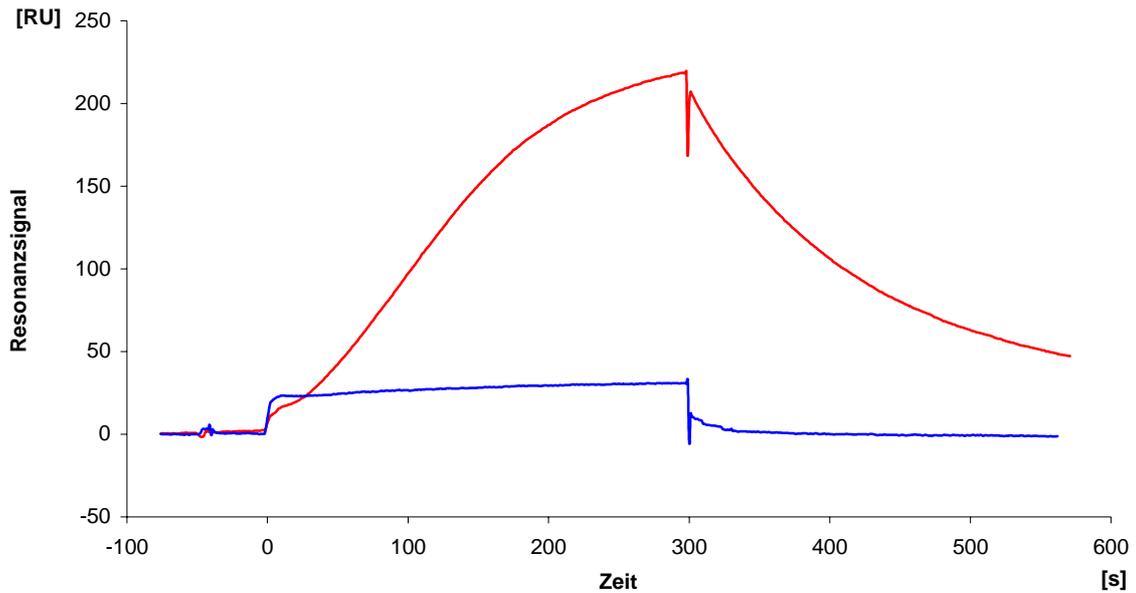


Abbildung 53: Vergleich der Sensogramme von 800 µM c(LsTRTL)
— in HBS-EP-Puffer (pH 7,4); — in HBS-P-Puffer (pH 7,4)

Testmessungen des Peptids c(FLHtRL) (5) zeigten, dass das im HBS-P-Puffer gelöste Peptid mit zunehmender Standzeit abnehmende Resonanzsignale liefert (Abbildung 54). Aus dieser Beobachtung wurde gefolgert, dass es in der Peptidlösung zu Aggregationserscheinungen kommen muss - entweder intermolekular oder zwischen Peptid und Gefäßwand.

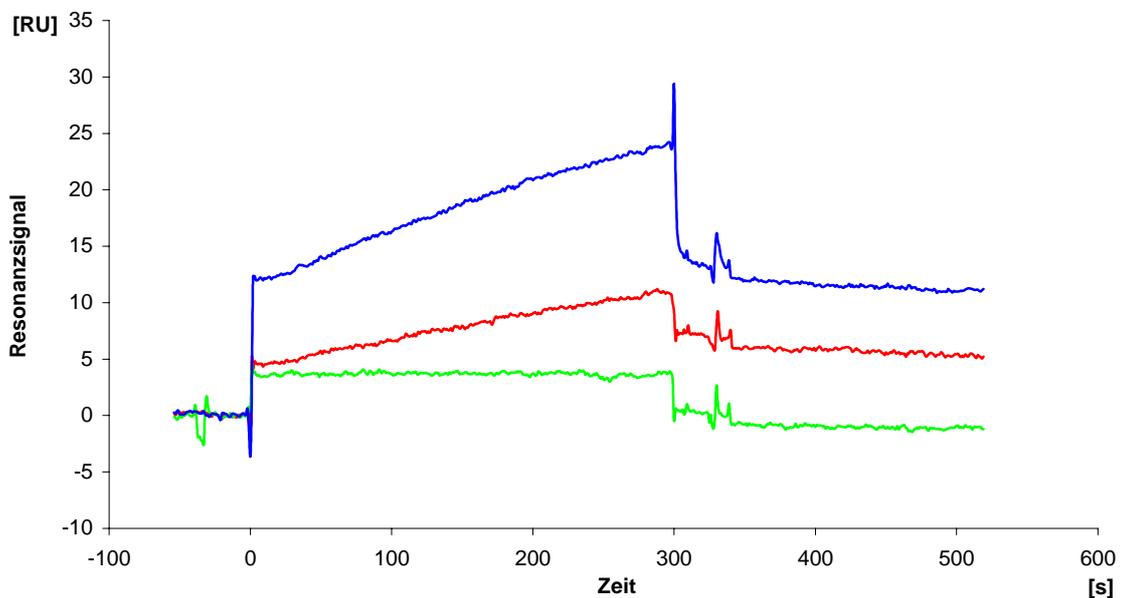


Abbildung 54: Sensogramme des Peptids (5) c(FLHtRL) nach verschiedenen Zeitpunkten des Lösen in HBS-P-Puffer (pH 7,4)
— frisch gelöst; — nach 1 h; — nach 3 h

Um diesen Effekt zu eliminieren, werden Konzentrationsreihen der Peptide in einem Bereich von 50-3000 μM vor der SPR-Messung in hochreinem Wasser angesetzt und anschließend in den Biacore[®]-Vorlagegefäßen lyophilisiert. Erst unmittelbar vor der Injektion werden die lyophilisierten Proben durch das Biacore[®]-Gerät direkt in den Vorlagegefäßen in HBS-P-Puffer gelöst, gemischt und injiziert.

Die Messungen der einzelnen Peptidlösungen der Konzentrationsreihen erfolgen bei einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Dabei verlaufen sie nach folgendem Cyclus. Die Peptide werden während fünf Minuten injiziert und 19 Minuten nach Ende der Injektion wird die Sensoroberfläche zweimal drei Minuten mit 10 mM Glycin (pH 2,5) regeneriert. Hat die Sensoroberfläche danach noch nicht das Basislinienniveau erreicht, wird nochmals Regenerationspuffer injiziert. Abbildung 55 zeigt als Kurvenschar die erhaltenen Sensogramme der Konzentrationsreihe des Peptids (**19**) c(SETTIL).

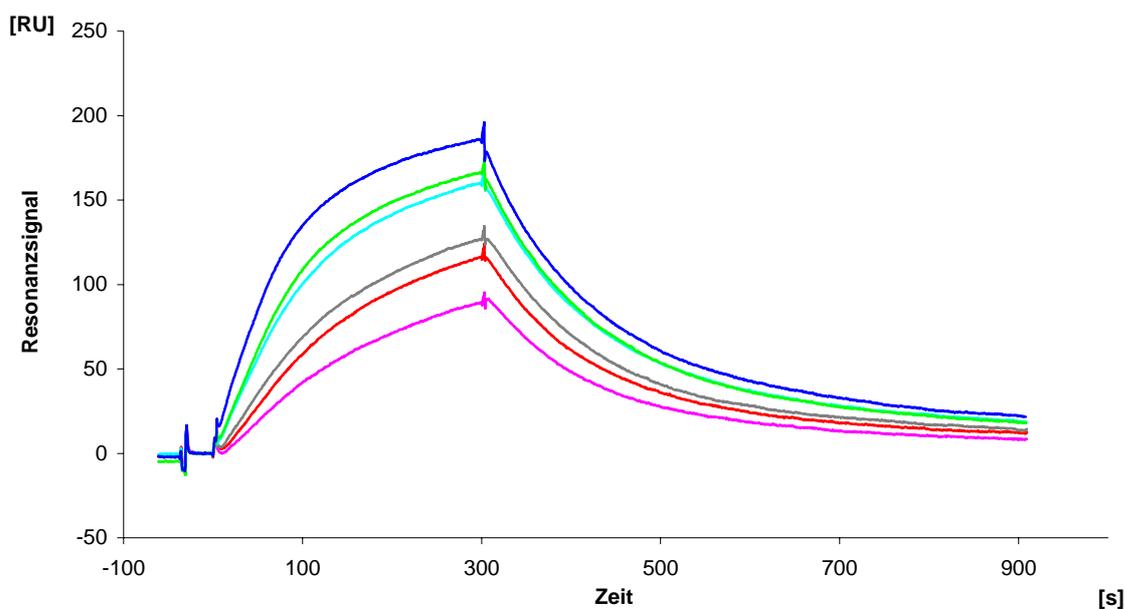


Abbildung 55: Sensogramme der Konzentrationsreihe des Peptids (**19**) c(SETTIL)

— 50 μM ; — 100 μM ; — 200 μM ; — 300 μM ; — 400 μM ; — 500 μM

4.5.4 Datenanalyse

Die Datenanalyse der erhaltenen Kurvenscharen der Konzentrationsreihe erfolgt über lineare Regression der Geraden des Scatchard-Plots^[246], da die Kurvenanpassung über das BIAevaluation3.2-Programm keine befriedigenden Ergebnisse liefert und die angepassten Bindungskurven auch mit Massentransferkorrekturen zum Teil große Abweichungen von den experimentellen Daten zeigen. Die Datenanalyse über Scatchard-Plots wird auch durch die Analyse der randomisierten Peptide (41)-(43) gestützt (Kapitel 4.5.5).

Unter Annahme einer einfachen 1:1-Wechselwirkung zwischen Peptid B und Antikörper A gilt für deren Interaktion im Gleichgewicht

$$K_D = \frac{[AB]}{[A][B]}. \quad (2)$$

Da die Konzentration des Komplexes $[AB]$ gleich der Konzentration an gebundenem Ligand $[B]_b$ ist, folgt aus obiger Gleichung unter Annahme konstanter Konzentration $[B]$ durch unendlich schnellen Austausch mit der darüberfließenden Lösung von B und mit $[A]_{\text{tot}}$ Gesamtbindungsstellen

$$[B]_b = \frac{[B]}{K_D} ([A]_{\text{tot}} - [B]_b). \quad (3)$$

Unter der Voraussetzung, dass die Konzentration adsorbierter Liganden mit dem Sensorsignal R linear korreliert ($[AB] \approx R$)^[11] und konstanter Konzentration $[B] = f_0$, folgt aus Gleichung (3) für das Gleichgewicht der beiden Bindungspartner

$$\frac{R_{\text{eq}}}{f_0} = \frac{R_{\text{max}}}{K_D} - \frac{R_{\text{eq}}}{K_D}. \quad (4)$$

Zur Darstellung des Scatchard-Plots werden der Quotient aus dem Resonanzsignal im Gleichgewicht (R_{eq}) und der Ausgangskonzentration des Peptids (f_0) gegen das Resonanzsignal im Gleichgewicht (R_{eq}) aufgetragen (Abbildung 56). Nach Gleichung (4) gibt die Steigung der angepassten Regressionsgeraden den negativen Kehrwert der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D .

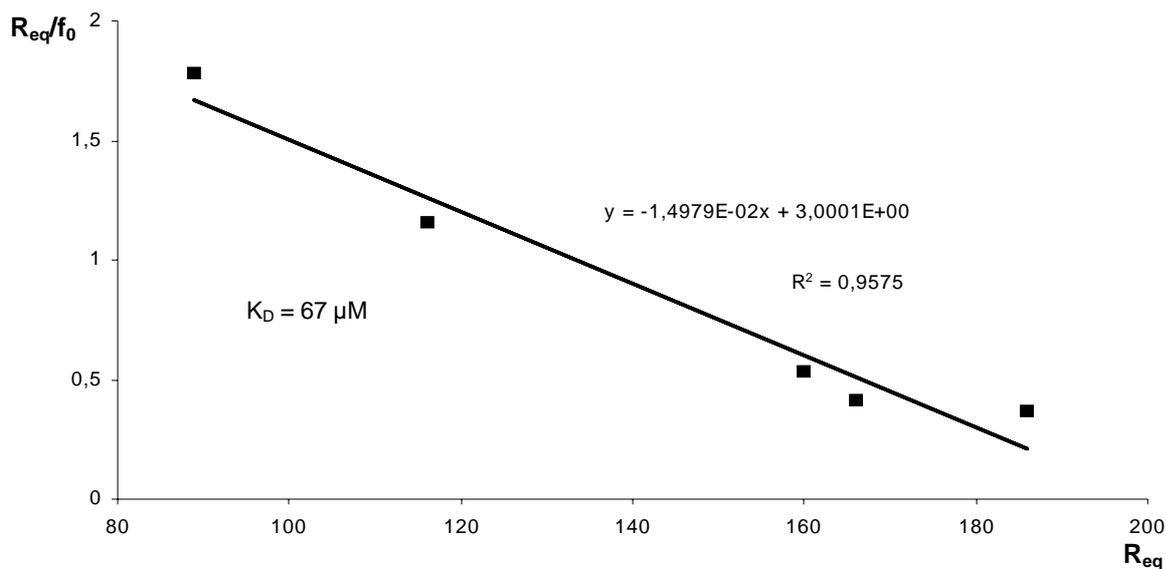


Abbildung 56: Scatchard-Plot der Konzentrationsreihe von c(SETTIL) 50-500 μM
 die schwarze Linie zeigt die Regressionsgerade, y: Geradengleichung;
 R^2 : Korrelationskoeffizient; K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante

Im folgenden Kapitel werden die einzelnen Peptidreihen im Vergleich zu ihren linearen Ausgangspeptiden diskutiert. In der Regel wird zur Analyse der SPR-Daten die lineare Regression der Geraden des Scatchard-Plots für die niedrigen Konzentrationsbereiche bis 500 μM oder 1000 μM durchgeführt, da die Daten für höhere Konzentrationen oft kein lineares Verhalten mehr zeigen. Nur bei linearem Verhalten erfolgt die Analyse über den gesamten Konzentrationsbereich. Diese Abweichung von der Linearität stehen im Einklang mit den in Kapitel 2.4.2 beschriebenen empirischen Beobachtungen, dass einfach exponentielle Bindungsprozesse vor allem im unteren Konzentrationsbereich des mobilen Bindungspartners erhalten werden.^[194] Danach ist die Beschränkung der Datenanalyse auf solche Bindungsereignisse, die eine einfache 1:1-Kinetik pseudo-erster Ordnung zeigen, zulässig, da diese Datensätze die meisten Informationen über die am besten zugänglichen Bindungsstellen enthalten, die als beste Vertreter für die Affinität in Lösung angesehen werden können.

4.5.5 SPR-Analyse der Glykomimetika-Ausgangssequenzen

Als Referenzen für die Peptide der Peptidbibliothek dienen die linearen Ausgangssequenzen der über *Phage-Display* gefundenen Glykomimetika (Peptide (38)-(40)). Die randomisierten Peptide (41)-(43) dienen als Negativkontrollen und sollten im SPR-Experiment keine Bindung zeigen.

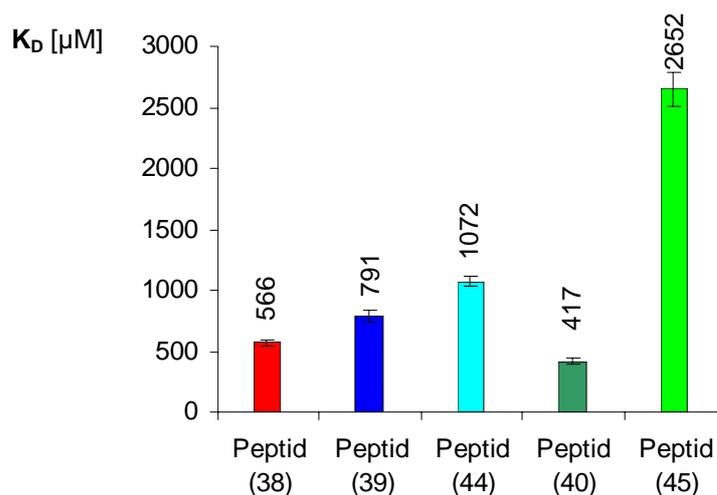


Abbildung 57: Vergleich der K_D -Werte der linearen Ausgangssequenzen

Abbildung 57 zeigt den Vergleich der über Scatchard-Plots erhaltenen K_D -Werte der linearen Peptide H-FLHTRLFV-OH (**38**), H-TFKLSETTLEYY-OH (**39**), H-TFQLSTRITLPFS-OH (**40**). Die Peptide (**44**) und (**45**) sind die C-terminal um drei Aminosäurereste verkürzten Ausgangssequenzen: H-TFKLSETTTL-OH (**44**) und H-TFQLSTRITL-OH (**45**).

Die K_D -Werte der Ausgangssequenzen (**38**)-(40) liegen mit Werten von 417-791 μM in einem Bereich, der auch für Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen typisch ist. Die K_D -Werte der verkürzten Peptide (**44**) und (**45**) zeigen hingegen eine geringere Affinität im Vergleich zu ihren längeren Ausgangssequenzen. Hier zeigt vor allem das Peptid (**45**) eine deutliche Abweichung mit einem K_D -Wert von 2652 μM vom K_D -Wert des Peptids (**40**) mit 417 μM . Diese deutlich geringere Affinität deutet auf eine wichtige Rolle der Wechselwirkung der C-terminalen Aminosäurereste mit dem L2-412-Antikörper hin. Somit sollte für die Cyclopeptide der Peptidreihe 8 mit der Sequenz RITLPFS eine höhere Affinität als für die cyclischen Peptide der Peptidreihen 6 und 7 der Ausgangssequenz TFQLSTRITLPFS erwartet werden. Der nur geringfügig erhöhte K_D -Wert des Peptids (**44**) zeigt dagegen, dass dieses Peptid schon einen Sequenzbereich abdeckt, der für die Bindung des Ausgangssequents an den Antikörper wichtig ist. Somit kann für die ersten beiden Peptidreihen der Sequenz TFKLSETTLEYY eine erhöhte Bindungskonstante erwartet werden.

Die SPR-Messungen der randomisierten Peptide (**41**)-(43) führen ebenfalls zu Bindungskurven, jedoch zeigen die Scatchard-Plots dieser Peptide eine positive Steigung der Geraden (Abbildung 58). Nach Gleichung (4) folgt somit für die K_D -Werte ein negativer Wert, was jedoch physikalisch keinen Sinn macht. Somit stellen die randomisierten Peptide Negativkontrollen

der Ausgangssequenzen dar und die erhaltenen Bindungskurven der randomisierten Peptide sind nicht auf spezifische Interaktionen mit dem Antikörper zurückzuführen.

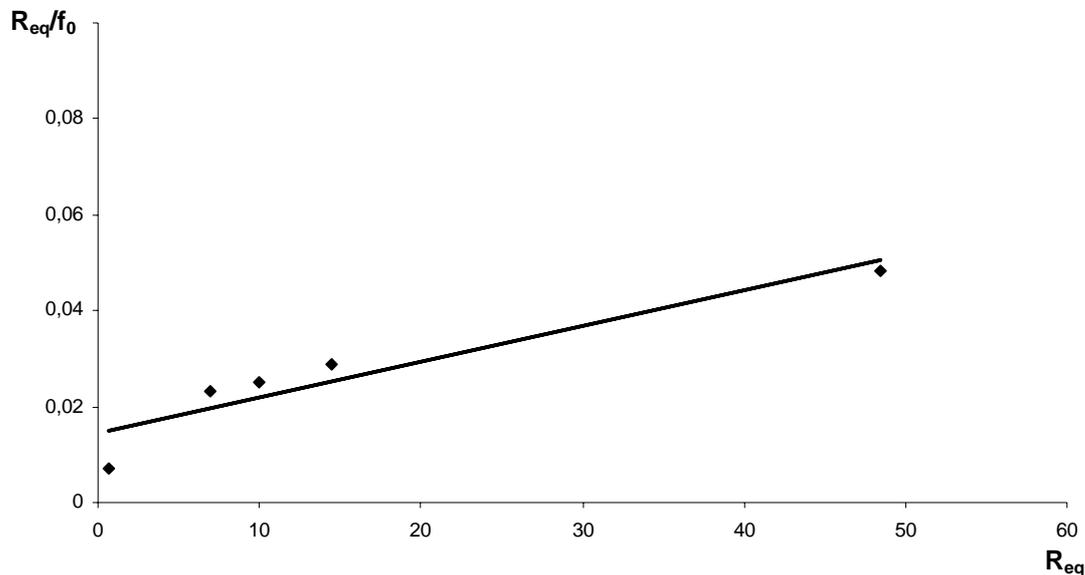


Abbildung 58: Scatchard-*Plot* der Konzentrationsreihe von H-TSFTPLRFTSQL-OH 100-1000 μM

Interessanterweise wird den randomisierten Peptiden durch die Kurvenanpassung des BIA-evaluation-Programms ein positiver K_D -Wert zugeordnet, was nicht im Einklang mit den erhaltenen Scatchard-*Plots* steht. Daher wird die Strategie, die erhaltenen Daten nicht über das Fittingprogramm zu analysieren sondern durch lineare Regression der Scatchard-*Plots*, durch die Resultate der Analyse der randomisierten Peptidsequenzen untermauert.

Ein möglicher Grund für die trotzdem erhaltenen Bindungskurven kann in der unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit der Mess- und der Referenzzelle liegen. Da es während der SPR-Messung zur Interaktion der Peptidlösung mit beiden Matrixoberflächen kommt und diese Wechselwirkung aber aufgrund der unterschiedlichen Beladung der Mess- und der Referenzzelle verschieden sind, führt die Subtraktion der Kurven nicht zu einer Nulllinie. Die erhaltenen Kurven resultieren eher aus einem *Bulk*-Effekt der Peptidlösung als aus einer echten Bindung.

4.5.6 SPR-Analyse der TFKLSETTLEYY-Reihe

Zur Analyse der TFKLSETTLEYY-Ausgangssequenz stehen die Peptide **(12)**-**(25)**, **(39)**, **(44)** sowie das randomisierte lineare Peptid **(42)** zur Verfügung. Die Peptide H-TFKLSETTLEYY-

OH (**39**) und c(TTLEYY) (**25**) werden im Gegensatz zu den anderen Peptiden für die Messung in 1%igem DMSO in HBS-P-Puffer gelöst, da sie nicht in rein wässrigen Puffern löslich sind. Die in Abbildung 59 gegenübergestellten K_D -Werte der Peptide zeigen deutliche Unterschiede in ihren Affinitäten gegenüber dem Ak L2-412 auf. Hier besitzen vor allem in den Peptidreihen 4 und 5 einige Peptide deutlich geringere K_D -Werte als das Referenzpeptid (**39**). Hingegen haben die Peptide der Reihe 3 K_D -Werte, die im Bereich des K_D -Werts des linearen Ausgangs-peptids oder deutlich darüber liegen. Somit ist der N-terminalen Sequenz TFKLSE des Peptids (**39**), nur ein geringer Beitrag zur Wechselwirkung mit dem Antikörper zuzuschreiben. Diese Interaktion wird, nach den K_D -Werten der Peptidreihen 4 und 5 zu urteilen, vor allem auf die mittleren und C-terminalen Bereiche der Ausgangssequenz zurückzuführen sein. Hier zeigen schon die linearen Hexapeptide H-SETTLL-OH (**17**) und H-TTLEYY-OH (**22**) eine deutlich stärkere Interaktion mit dem Antikörper als das Ausgangs-peptid (**39**). Was darauf zurückzuführen sein könnte, dass es zwischen dem N-terminalen Bereich von Peptid (**39**) und dem Antikörper zur Abstoßung kommt, die in den beiden linearen Peptiden (**17**) und (**22**) nicht erfolgen kann.

Die Cyclopeptide der Reihe 5 zeigen zwar auch höhere Affinitäten als das Ausgangs-peptid, jedoch führt hier die Cyclisierung nicht zu einem weiteren Abfall der K_D -Werte im Vergleich zum linearen Hexapeptid (**22**). Somit konnte durch die Cyclisierung dieser Peptide keine affinere Struktur modelliert werden. Jedoch handelt es sich bei Peptid c(TtLEYY) (**24**) um eine klare *mismatched*-Struktur, bei der die Cyclisierung zu einem starken Abfall der Gleichgewichtskonstanten geführt hat.

Der Übergang zu den Cyclopeptiden unter Einbau je einer D-Aminosäure der Peptidreihe 4 führt bei den Peptiden (**18**), (**19**) und (**21**) zu einer weiteren Abnahme der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten und somit höheren Affinität der Peptid-Antikörper-Interaktion. Mit einem K_D -Wert von 67 μM stellt das Peptid c(SETTIL) (**19**) dabei die affinste Verbindung aller Peptide in Abbildung 59 dar. Es handelt sich dabei um den *matched*-Fall, bei dem die Cyclisierung zu einem deutlichen Affinitätsgewinn führt. Dagegen stellt das Peptid (**20**) den *mismatched*-Fall dieser Peptidreihe dar, da hier der K_D -Wert ca. achtmal höher liegt als der des linearen Hexapeptids (**17**). Dass bei den gezeigten Peptiden der Peptidreihe 4 besonders hohe Affinitäten zu beobachten sind, begründet auch die relativ hohe Affinität des verkürzten linearen Peptids (**44**) (Abbildung 57), das im Gegensatz zum anderen verkürzten Peptid (**45**) deutlich affiner ist.

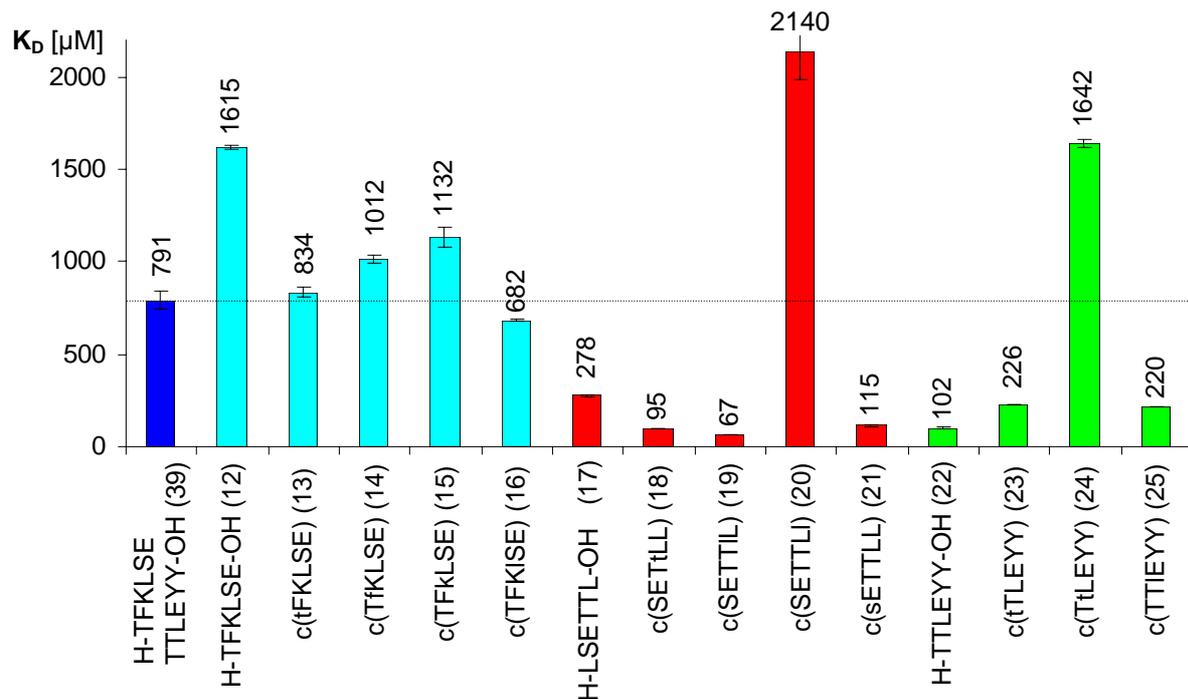


Abbildung 59: Vergleich der K_D -Werte der Peptide (12)-(25) mit der TFKLSETTLEY-OH-Ausgangssequenz
 — Ausgangspeptid; — Peptidreihe 3; — Peptidreihe 4; — Peptidreihe 5;
 gepunktete Linie: $K_D(\text{H-TFKLSETTLEY-OH}) = 791 \mu\text{M}$

Ein Vergleich der K_D -Werte der Peptide c(SETtLL) (18) und c(sETTL) (21) sowie der Peptide c(tFKLSE) (13) und c(TFKISE) (16) zeigt, dass die in Kapitel 4.2 gemachte Annahme, den D-Aminosäure-*Scan* eines Cyclohexapeptids auf die Synthese von drei Cyclopeptiden zu beschränken, eine zulässige Vereinfachung ist. Zwar zeigen diese Peptide keine identischen Affinitäten, was auch nicht angenommen wurde, da ihre Strukturen lediglich ähnlich sind, jedoch liegen die K_D -Werte der Peptidpaare in der gleichen Größenordnung.

4.5.7 SPR-Analyse der TFQLSTRTLPFs-Reihe

Bei den SPR-Studien des Ausgangspeptids H-TFQLSTRTLPFs-OH (40) wurden die Peptide (26)-(37) sowie das verkürzte Peptid (45) untersucht. In Abbildung 60 sind die ermittelten K_D -Werte der einzelnen Peptide gegeneinander aufgetragen.

Auffällig sind hier die geringen Wechselwirkungen der Peptide der Reihe 7 mit dem Antikörper. Sie zeigen alle deutlich geringere Affinitäten als die Ausgangssequenz (40), wodurch sich auch die schlechte Affinität des verkürzten linearen Peptids (45) erklären lässt (Abbildung 57). Die Peptide der Peptidreihe 6 zeigen zwar im Vergleich zur Reihe 7 niedrigere K_D -Werte,

diese sind aber bis auf Peptid **(27)** höher als der Referenzwert des Peptids **(40)**. Das Peptid c(sTTFQL) **(27)** zeigt mit der deutlich gestiegenen Affinität, dass es eine günstigere Struktur für die Wechselwirkung mit dem Antikörper präsentiert.

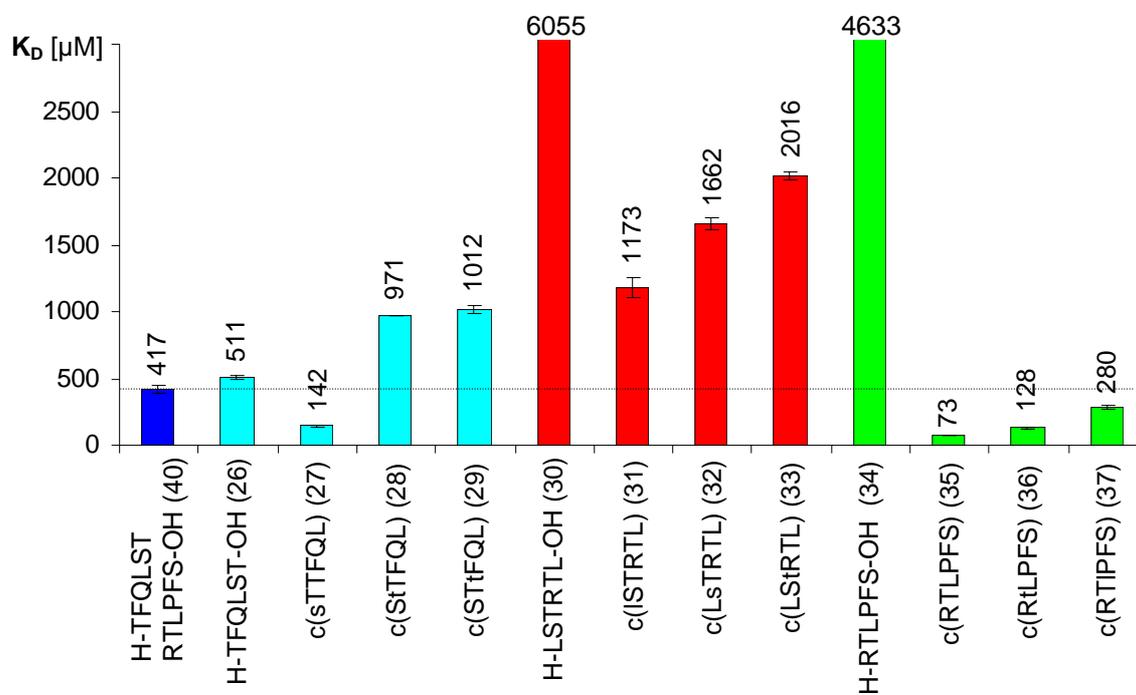


Abbildung 60: Vergleich der K_D -Werte der Peptide **(26)**-**(37)** mit der TFQLSTRTLPLFS-Ausgangssequenz

■ Ausgangssequenz; ■ Peptidreihe 6; ■ Peptidreihe 7; ■ Peptidreihe 8;
 gepunktete Linie: $K_D(\text{H-TFQLSTRTLPLFS-OH}) = 417 \mu\text{M}$

Die höchsten Affinitäten zeigen hier aber die Cyclopeptide **(35)** und **(36)** der Peptidreihe 8. Dass die C-terminale Peptidsequenz RTLPLFS einen entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkung der Ausgangssequenz mit dem Antikörper hat, wurde schon bei der Analyse der verkürzten Peptidsequenz (45) gemutmaßt. Die Peptide c(RTLPLFS) **(35)** und c(RtLPLFS) **(36)** unterstreichen diese Annahme. Das Peptid **(35)** stellt hier insgesamt das affinste Peptid dar und liegt mit einem K_D -Wert von $73 \mu\text{M}$ im gleichen Bereich wie das Peptid c(SETTIL) **(19)** mit einem K_D -Wert von $67 \mu\text{M}$. Es stellt bei diesen Peptiden den *matched*-Fall dar und präsentiert wie Peptid **(19)** dem Ak L2-412 eine hochaffine Struktur.

Die linearen Hexapeptide **(30)** und **(34)** zeigen sehr starke Abweichungen zu den anderen Peptiden in Abbildung 60. Es können jedoch nur Vermutungen angestellt werden, warum gerade die linearen Peptide der beiden Peptidreihen 7 und 8 so niedrige Affinitäten gegenüber dem

Antikörper zeigen. Allein durch die Sequenz können diese hohen K_D -Werte nicht verursacht sein, da sonst die Cyclopeptide (35)-(37) ebenfalls deutlich geringere Interaktionen mit dem Antikörper zeigen sollten. Somit liegt der Verdacht nahe, dass diese Wechselwirkungen eventuell durch den N-Terminus der beiden linearen Peptide verursacht wird. Dieser könnte vielleicht von einer für die Bindung wichtigen Seitenkettengruppe abgestoßen werden. Jedoch erklärt dies nicht, warum die linearen Hexapeptide (17), (22) sowie (26) deutlich geringere K_D -Werte besitzen.

Betrachtet man die Werte der Peptide aus Abbildung 60 insgesamt, scheint die Bindung der Ausgangssequenz (40), lediglich auf die Wechselwirkung der N- sowie C-terminalen Sequenzen zurückzuführen sein, während die mittlere Teilsequenz keinen entscheidenden Beitrag leistet und nicht in die Interaktion involviert scheint. Diese könnte somit der Bindungstasche des Antikörpers abgewandt sein und lediglich als Verknüpfungsglied der beiden Termini dienen.

4.5.8 SPR-Analyse der FLHTRLFV-Reihe

Für die Untersuchung der FLHTRLFV-Ausgangssequenz stehen für die SPR-Messungen die Peptide (1)-(11), sowie (38) zur Verfügung. Dabei zeigen vor allem die Peptide (2)-(7) im höheren Konzentrationsbereich der Scatchard-Plots starke Abweichungen von der Linearität. Hier folgt einem linearen Bereich mit stärker abfallender Steigung bis zu einer Konzentration von ca. 500 μM ein linearer Bereich mit geringer negativer Steigung. Insgesamt zeigen die Peptide der Reihe 1 im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Peptiden keine oder nur minimale Dissoziationskurven. Ihre Resonanzkurven ähneln eher Rechtecksignalen mit einem sofortigen Signalanstieg bei Injektionsbeginn und direktem Signalabfall auf Basislinienniveau nach Injektionsende.

Die K_D -Werte der zwei in Abbildung 61 dargestellten Peptidreihen zeigen voneinander abweichende Affinitätsbereiche. Insgesamt liegen die K_D -Werte der Peptidreihe 2 deutlich höher als die der Peptidreihe 1, so besitzen sie mit Werten zwischen 1278 μM und 3475 μM eine stark verringerte Affinität im Vergleich zum Ausgangspeptid (38) mit einem K_D -Wert von 566 μM . Die Peptide der Peptidreihe 1 liegen hingegen zum Teil im Bereich des Ausgangspeptids (38), Peptid (2) sogar darunter. Dieses Peptid stellt mit einem K_D -Wert von 346 μM den niedrigsten Wert der beiden Peptidreihen dar. Im Vergleich zu den Peptiden in Abbildung 59 und Abbildung 60 liegt dieser Wert jedoch nur im mittleren Bereich der affineren Peptide.

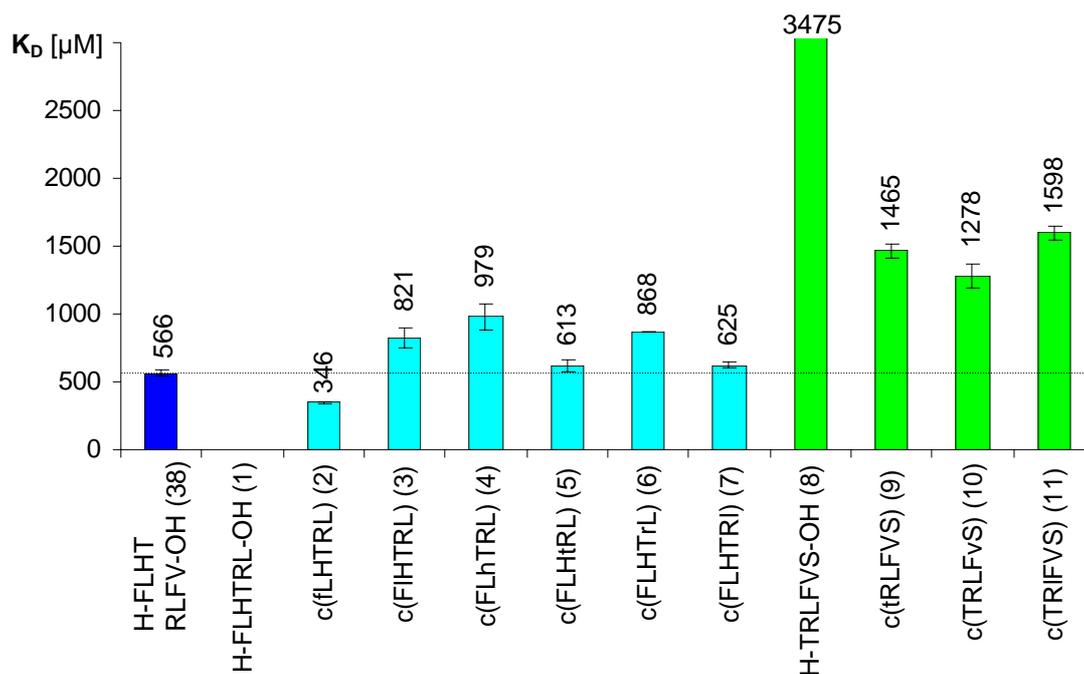


Abbildung 61: Vergleich der K_D -Werte der Peptide (1)-(11) mit der FLHTRLFV-Ausgangssequenz

— Ausgangspeptid; — Peptidreihe 1; — Peptidreihe 2;
 gepunktete Linie: $K_D(\text{H-FLHTRLFV-OH}) = 566 \mu\text{M}$

Von Interesse ist bei den gezeigten K_D -Werten wieder die Affinität der linearen Hexapeptide. Während das Peptid (8) einen sehr hohen K_D -Wert hat, ist die Bestimmung des K_D -wertes von Peptid (1) nicht möglich, da der Scatchard-Plot eine ansteigende Gerade zeigt. Somit stehen die Affinitäten dieser beiden linearen Peptide im Einklang mit den oben beschriebenen Peptiden (30) und (34). Warum gerade die linearen Peptide in den SPR-Experimenten so geringe Affinitäten zeigen, kann abschließend nicht geklärt werden.

4.6 Inverse SPR-Experimente

Zur weiteren Untersuchung der Antikörper-Peptid-Wechselwirkungen sollen inverse SPR-Experimente beitragen, bei denen die Interaktionsstudien in umgekehrter Richtung durchgeführt werden. Dazu ist es nötig, ein affines Peptid auf der Sensoroberfläche zu immobilisieren, um dann die Bindung des L2-412-Antikörpers an dieses Peptid zu untersuchen.

4.6.1 Alanin-*Scan* des Peptids c(SETTIL)

Zur Wahl eines geeigneten Cyclopeptids für die Immobilisierung stehen die hochaffinen Peptide c(SETTIL) (**19**) und c(RTLPFS) (**35**). Es wurde das Peptid (**19**) ausgewählt, da es neben dem niedrigen K_D -Wert auch zur Peptidreihe 4 gehört, die insgesamt sehr affine Peptide hervorgebracht hat. Um das Peptid auf der Sensoroberfläche kovalent zu fixieren, muss es über einen geeigneten Linker verfügen, über den es an die Matrix gebunden wird.

Der Linker muss dabei an einer Stelle des Peptids angebracht werden, die für die Antikörper-Peptid-Interaktion nicht von entscheidender Wichtigkeit ist. Zur Ermittlung dieser Bindungsstelle wird in einem Alanin-*Scan* das Peptid (**19**) durch Austausch je einer Aminosäure gegen eine Alanineinheit in sechs verschiedene Peptide umgewandelt. Durch den Austausch wird dabei die spezifische Wechselwirkung einzelner Aminosäurereste mit dem Antikörper unterbunden, und es können Regionen des Peptids identifiziert werden, die nicht oder nur minimal an der Wechselwirkung zwischen Peptid und Antikörper teilhaben. Diese Stellen können dann gegen geeignete Aminosäurereste ausgewechselt werden, an die ein Linker geknüpft werden kann.

Tabelle 6: Dargestellte Peptide für den Alanin-*Scan* von c(SETTIL)

Nr.	Peptid	Ausbeute	
		mg	%
46	c(SETTIA)	10	17
47	c(ETTILA)	9	14
48	c(TTILSA)	13	22
49	c(TILSEA)	12	20
50	c(ILSETA)	8	13
51	c(SETTaL)	15	25

In Tabelle 6 werden die für den Alanin-*Scan* synthetisierten Cyclopeptide aufgeführt. Die Synthese erfolgt analog zur Darstellung der anderen Cyclopeptide über den Aufbau der linearen Vorläuferpeptide durch Fmoc/*tert*-Butyl-Taktik am säurelabilen 2-Chlortrityl-Harz. Anschließend Spaltung der geschützten Peptide und HATU/HOAt-vermittelte Cyclisierung in Lösung mittels Zweikanal-Spritzenpumpe führt zu den Zielpeptiden.

Die SPR-Bindungsstudien werden analog zu den obigen SPR-Experimenten durchgeführt. Bei einem Fluss von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ wird das Peptid für fünf Minuten über die Sensoroberfläche geleitet, die nach einer Dissoziationsphase mit Glycin-Puffer (pH 2,5) regeneriert wird. Die erhaltenen Daten werden über lineare Regression des Scatchard-*Plot* analysiert. In Abbildung 62 sind die K_D -Werte der einzelnen Peptide des Alanin-*Scans* aufgeführt.

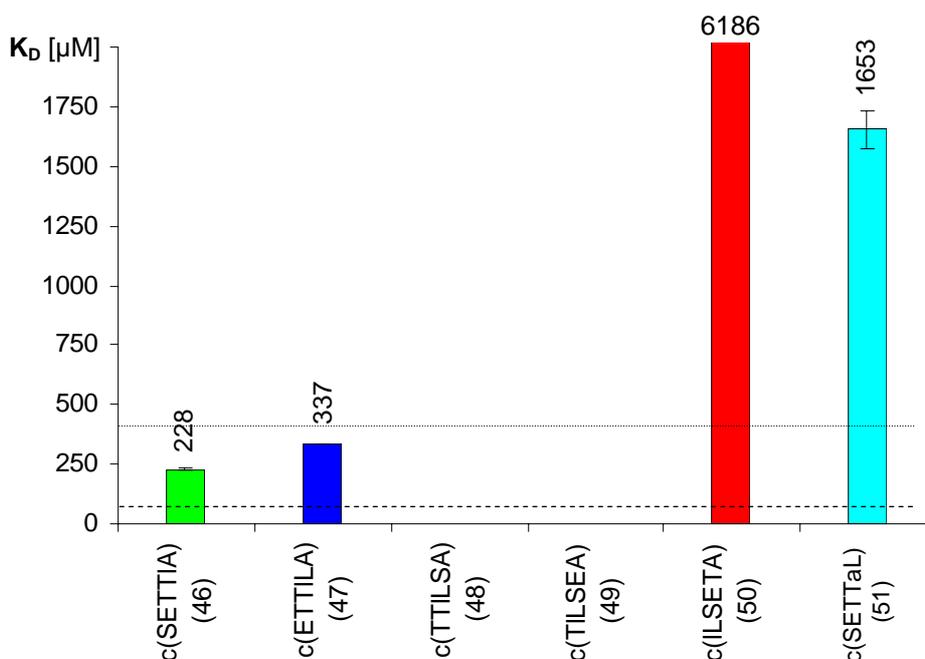


Abbildung 62: Vergleich der K_D -Werte der Peptide des Alanin-*Scans* von Peptid (19) c(SETTIL)

gestrichelte Linie: $K_D(\text{c(SETTIL)}) = 67 \mu\text{M}$;

gepunktete Linie: $K_D(\text{H-TFQLSTRILPFS-OH}) = 417 \mu\text{M}$

Bei der Auswertung der Daten des Alanin-*Scans* ist darauf zu achten, dass bei affinen Cyclopeptiden Aminosäurereste gegen Alaninreste ausgetauscht wurden, die für die Interaktion zwischen Peptid und Ak L2-412 weniger wichtig sind. Bei Peptiden, die dann keine oder nur geringe Affinitäten zeigen, sind hingegen Aminosäurereste ausgetauscht worden, die essentiell für die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung sind.

Die in Abbildung 62 aufgeführten K_D -Werte der Peptide des Alanin-*Scans* zeigen drei Bereiche. Die Peptide (48) und (49) zeigen keine Wechselwirkung mit dem Antikörper (ansteigende Gerade im Scatchard-*Plot*), während die Cyclopeptide (50) und (51) schwache Affinitäten aufweisen. Dagegen besitzen die cyclischen Peptide (46) und (47) noch eine Affinität, die zwar geringer ist als die des ursprünglichen Peptids c(SETTIL) (19) aber deutlich über der des Ausgangspeptids (40) liegt. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der Glutamat-

rest, beide Threonineinheiten sowie der D-Leucinrest für die Interaktion zwischen den Bindungspartnern sehr wichtige Gruppen darstellen. Die Sequenz ETTI sollte somit unverändert bleiben. Die Seitenkettengruppen von L-Leucin und Serin spielen offenbar eine weniger wichtige Rolle. Ihr Austausch führt nur zu einem geringen Verlust der Affinität, wobei das Peptid (**46**), bei dem der L-Leucinrest ausgewechselt wurde, insgesamt den niedrigsten K_D -Wert besitzt. Somit sollte der Austausch des L-Leucin- bzw. Serinrestes von Peptid (**19**) gegen eine Linkereinheit die Bindung des Peptids an den Antikörper am wenigsten negativ beeinflussen.

4.6.2 Synthese des Linker-verknüpften Peptids

Zur Synthese des Linker-verknüpften Cyclopeptids muss zuvor eine Aminosäure synthetisiert werden, die über ihre Seitenkettengruppe mit einem geeigneten Linker verknüpft ist. Diese wird dann während des Aufbaus der linearen Peptidsequenz direkt in das Peptid eingebaut.

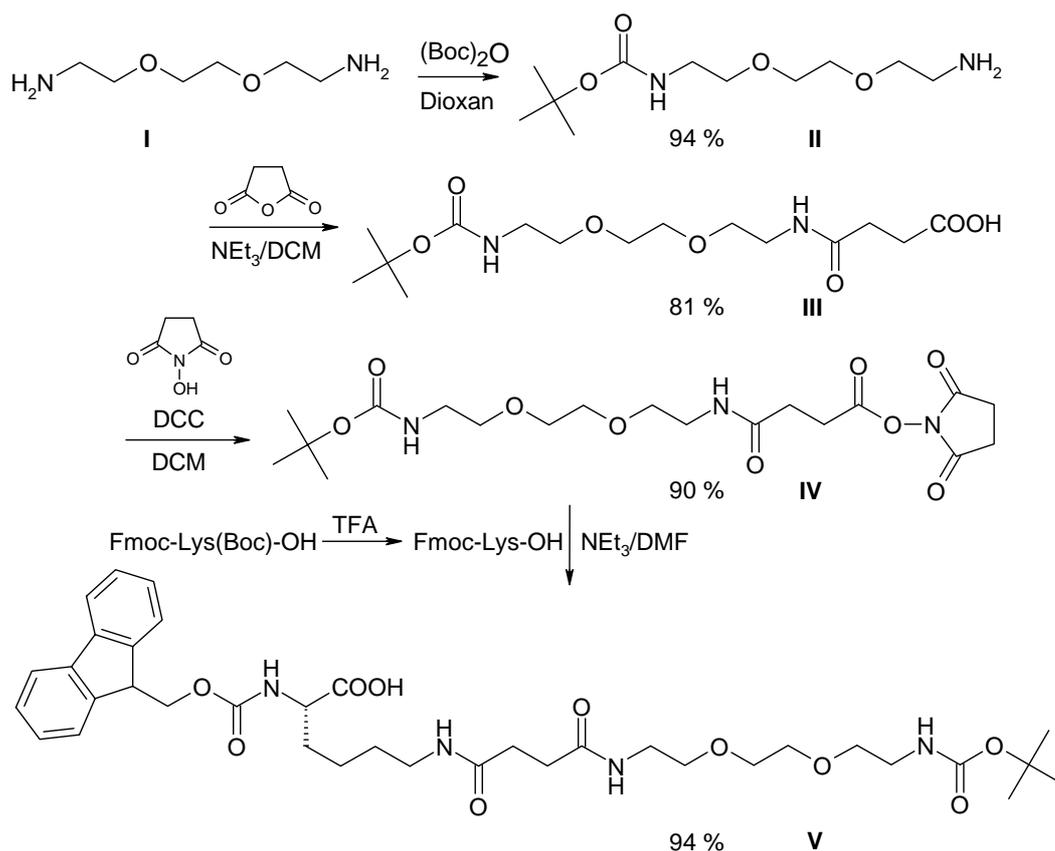


Abbildung 63: Syntheschema von Fmoc-Lysin(Linker)-OH

Als Ausgangsaminosäure dient dabei Fmoc-Lys(Boc)-OH, das über die zuvor entschützte ϵ -Aminogruppe der Seitenkette mit dem Linkermolekül verknüpft wird. Das Syntheschema der Linker-verknüpften Aminosäure ist in Abbildung 63 dargestellt.

Als Linker kommt das hydrophile N-8-Amino-3,6-dioxaoctanyl-bernsteinsäureamid zum Einsatz. Dieses wird in Boc-geschützter Form (**III**) über die Umsetzung von 1,8-Diamino-3,6-octan (**I**) mit Di-*tert*-butyldicarbonat und anschließender Acylierung mit Bernsteinsäureanhydrid zugänglich. Um ungewünschte Nebenreaktionen zu umgehen, wird Verbindung (**III**) in einer separaten Synthesestufe NHS-aktiviert. Der NHS-Aktivester (**IV**) führt durch Kupplung an die ϵ -Aminogruppe von Fmoc-Lysin zum Boc-geschützten Linker-Aminosäurebaustein (**V**).

Zur Durchführung der inversen SPR-Studien wird das Peptid (**46**) c(SETTIA) des Alanin-*Scans* als Grundmotiv für das Linker-substituierte Cyclopeptid gewählt. Dieses Peptid wird zum einen wegen der etwas höheren Affinität und zum anderen wegen des größeren Abstandes der Alanineinheit zu den für die Bindung an den Antikörper essentiellen Glutamat- und Threoninresten dem Peptid (**47**) c(AETTIL) vorgezogen.

Die Synthese des Linker-verknüpften Zielpeptids c(K(Linker)SETTI) (**52**) erfolgt am 2-Chlortrityl-Harz mit C-terminalem D-Leucin analog zu den anderen Cyclopeptiden.

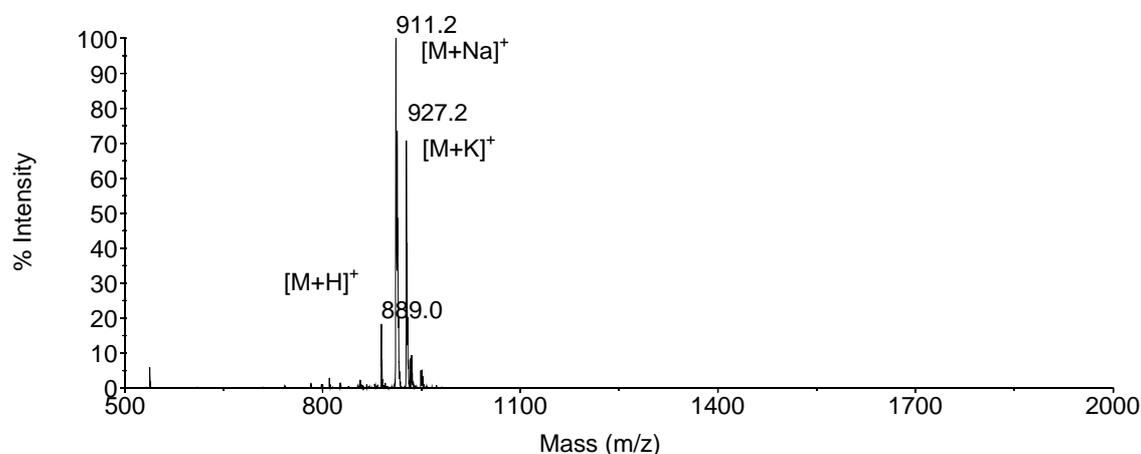


Abbildung 64: MALDI-ToF-Massenspektrum von c(K(Linker)SETTI) (**52**)

4.6.3 SPR-Experimente mit immobilisiertem Peptid

Zur Durchführung der inversen SPR-Experimente wird das Peptid c(K(Linker)SETTI) (**52**) auf einem CM5-Chip immobilisiert. Die Immobilisierung erfolgt in Wasser bzw. 5 mM Maleat-Puffer (pH 6,5), der zuvor beim pH-*Scouting* als geeigneter Immobilisierungspuffer ermittelt wurde. Nach der NHS/EDC-Aktivierung der Dextran-Matrix wird das Peptid (**52**) in drei ver-

schiedenen Konzentrationen über die Sensoroberfläche geleitet (Abbildung 65), da die optimale Konzentration des Peptids zur Immobilisierung im pH-*Scouting* wegen des starken *Bulk*-Effekts der Puffer schlecht abzuschätzen ist. Nach dem abschließenden Ethanolamin-*Capping* wird ein Immobilisierungsniveau von 280 RU erhalten.

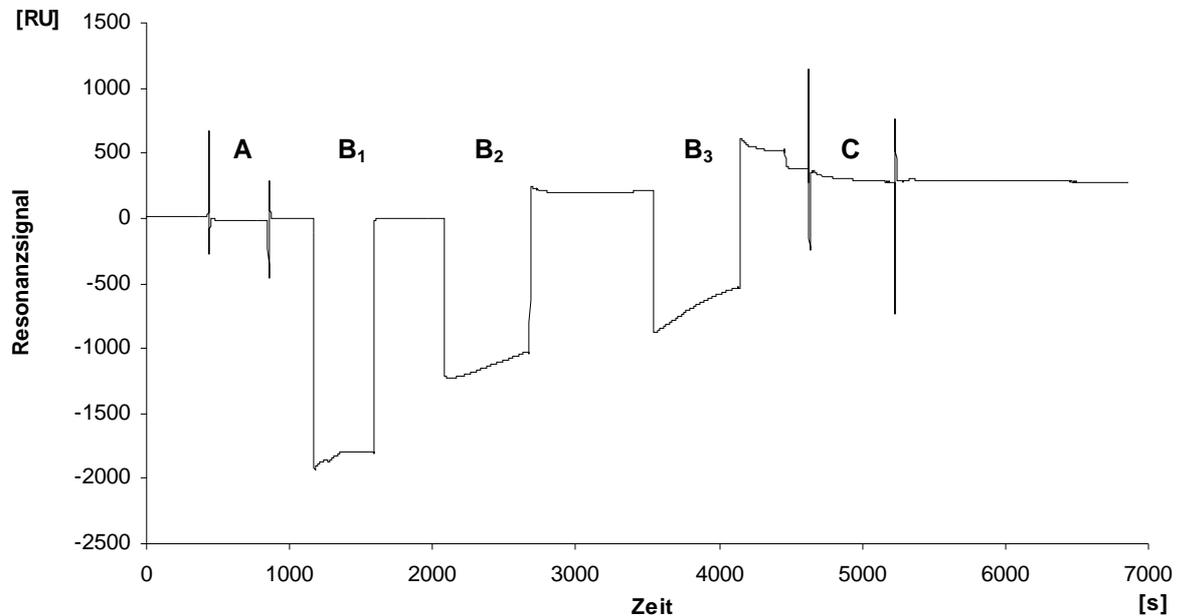


Abbildung 65: Immobilisierung des Peptids c(K(Linker)SETTl) (52) auf einem CM5-Chip (Immobilisierungsniveau: 280 RU)

A: EDC/NHS-Aktivierung; **B:** Immobilisierung c(K(Linker)SETTl); **B₁** 7 min 225 µM (52) in Wasser; **B₂** 10 min 3 mM (52) in 2,5 mM Maleat pH 6,5; **B₃**: 10 min 2,8 mM (52) in 2,5 mM Maleat pH 6,5; **C:** Ethanolamin-*Capping*

Die Bindungsstudien des L2-412-Antikörpers an das immobilisierte Cyclopeptid wurden in HBS-P-Puffer durchgeführt. Es wurden verschiedene in HBS-P-Puffer gelöste Konzentrationen des Antikörpers (8 µg/mL bis 70 µg/mL) getestet, wobei von keinem Konzentrationsbereich Bindungssignale erhalten wurden. Da für weitere Versuche nicht mehr genügend Antikörper zur Verfügung stand, konnten weder höhere Konzentrationen des Antikörpers noch andere Bindungspuffer getestet werden. Zudem könnte die Immobilisierung des Cyclopeptids Probleme bereitet haben, da die Basislinie der Cyclopeptid-immobilisierten Sensoroberfläche stark abfallend verlief. Des Weiteren ist es möglich, dass der Linker des Peptids zu Bindungsproblemen geführt hat, da dieser eventuell durch seine Position die Wechselwirkung mit dem Antikörper hätte unterbinden können. Andererseits könnte seine Länge der limitierende Faktor sein, falls das Peptid nicht in die Bindungsregion des Antikörpers vordringen kann.

4.7 Neuritenwachstumsexperimente

Wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, wird das Wachstum motorischer Neuriten in Anwesenheit L2/HNK-1-tragender Substrate erhöht, während das Wachstum sensorischer Neuriten davon unbeeinflusst bleibt.^[51b] Die gleichen Effekte zeigen, die in Kapitel 4.1 beschriebenen, Wachstumsexperimente von Motoneuriten in Gegenwart glykomimetischer Peptide.^[64]

Um die biologische Aktivität der für diese Arbeit synthetisierten Peptide zu ermitteln und zum Untermauern der Ergebnisse der SPR-Studien, wird eine Auswahl von Peptiden in Wachstumsexperimenten von Motoneuronen untersucht. Diese Versuche werden freundlicherweise von Frau Dr. G. Loers¹⁴ durchgeführt.

4.7.1 Neuritenwachstumsexperimente mit motorischen Mäuseuronen

Zur Untersuchung des Neuritenwachstums werden zunächst motorische Neuronen des Rückenmarks von Mäusembryonen isoliert und diese mit den entsprechenden Substraten 24 h inkubiert. Zum besseren Anhaften der Zellen auf den Böden der Zellkulturgefäße werden diese zuvor mit Poly-L-Ornithin (PLO) beschichtet und anschließend die Substrate (Peptide bzw. Laminin) zugesetzt. Den Wachstumsexperimenten dienen PLO bzw. Kollagen als Negativkontrolle und Laminin, das das Neuritenwachstum fördert,^[42] als Positivkontrolle.

In den Zelltests werden neben den Ausgangspeptiden **(38)**-**(40)**, jeweils die affinsten Peptide der Peptidreihen 1 und 3-8 sowie weniger affine Peptide der Reihen 4 und 5 untersucht. Dabei sollen die letztere zeigen, ob sich die über SPR-Experimente bestimmten Affinitäten in den Wachstumstests widerspiegeln. Zudem dienen die randomisierten linearen Peptide **(41)**-**(43)** als Negativkontrollen und sollten zu keiner Beeinflussung des Wachstums führen.

¹⁴ Zentrum für molekulare Neurobiologie, Institut für Biosynthese neuraler Strukturen, Universität Hamburg, Arbeitsgruppe Prof. M. Schachner

4.7.2 Peptide der TFKLSETTLEYY-Reihe

Erste konzentrationsabhängige Wachstumsexperimente von Mäuseuronen mit dem laut SPR-Studien affinsten Peptid c(SETTIL) (**19**) (Tabelle 7) haben gezeigt, dass das Peptid bei einer Substratmenge von 100 µg/mL (155 µM) das Wachstum der Neuriten mit einem Faktor von 1,72 bezogen auf die Negativkontrollen (PLO, Kollagen) maximal stimuliert. Das Peptid c(TELSTI) stellt die randomisierte Sequenz von Peptid (**19**) dar und zeigt als Negativkontrolle wie PLO und Kollagen ebenfalls keinen Einfluss auf das Wachstum der Neuriten.

Tabelle 7: Neuritenwachstum in Abhängigkeit der Substratmenge von Peptid (19**)**

Substrat	Neuritenlänge [µm]
PLO	96,8 +/- 15,1
Kollagen	99,1 +/- 19,9
Laminin	219,4 +/- 22,8
c(SETTIL) 1 µg/mL	98,4 +/- 13,9
c(SETTIL) 10 µg/mL	133,3 +/- 18,0
c(SETTIL) 50 µg/mL	163,1 +/- 19,9
c(SETTIL) 100 µg/mL	167,0 +/- 20,2
c(TELSTI) 100 µg/mL	98,8 +/- 12,0

Aufgrund dieser Ergebnisse werden die weiteren Wachstumsstudien mit einer Peptidkonzentration von 100 µg/mL durchgeführt. Allerdings wird hierdurch ein direkter Vergleich von Peptiden mit sehr unterschiedlicher Masse erschwert, da nicht bei gleichen Konzentrationen gearbeitet wurde. In Abbildung 66 sind die Ergebnisse der Zelltests der von der Ausgangsequenz (**39**) abgeleiteten Peptide dargestellt. Die Werte beziehen sich auf die prozentuale Abweichung von der PLO-Negativkontrolle.

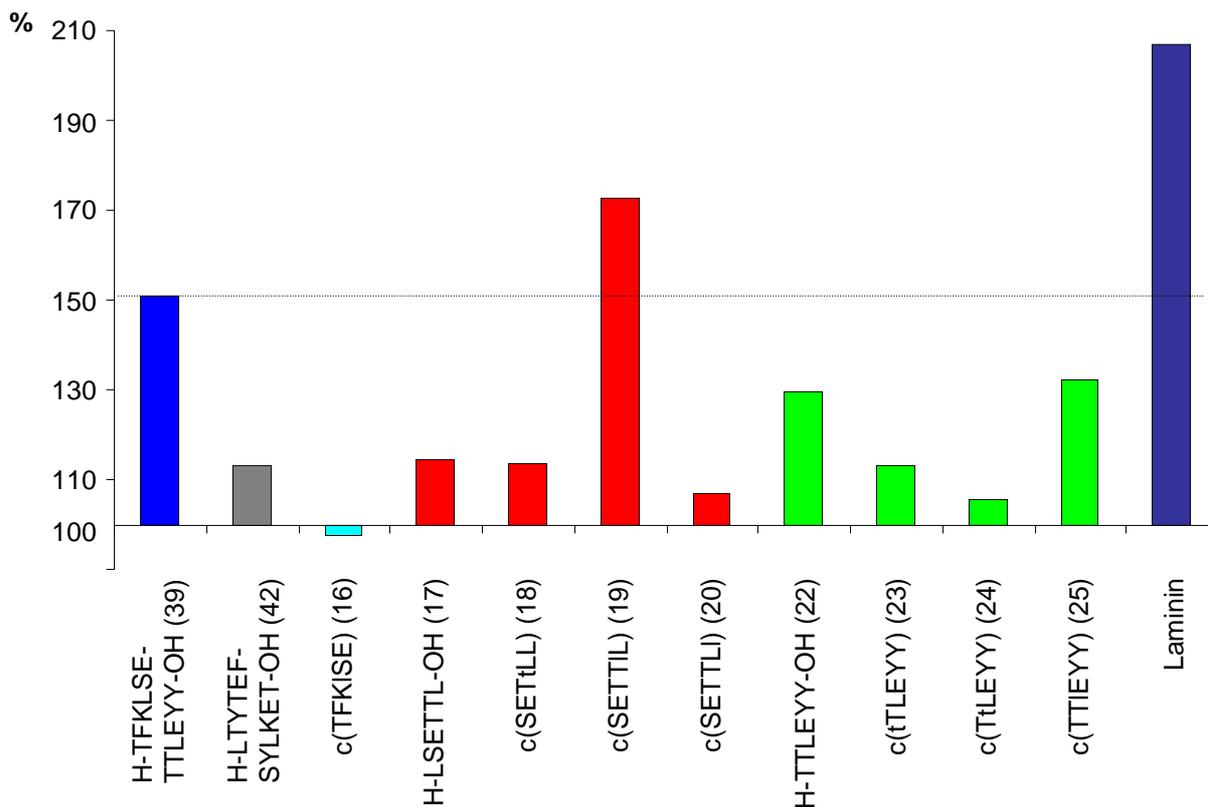


Abbildung 66: Stimulation des Neuritenwachstums motorischer Mäuseneuronen unter Zusatz der vom Ausgangspeptid (39) abgeleiteten Peptide nach 24 h Inkubation (100 µg/mL Peptid, 20 µg/mL Laminin), prozentuale Abweichung bezogen auf PLO (100 %), die gepunktete Linie repräsentiert den %-Wert des Ausgangspeptids (39)
Ergebnisse von Frau Dr. G. Loers¹⁴ zur Verfügung gestellt

In Analogie zu den SPR-Daten (Kapitel 4.5.7, Abbildung 59) besitzt das Peptid c(SETTIL) (19) ($K_D = 67 \mu\text{M}$) auch in den Wachstumsexperimenten der Mäuseneuronen mit einem Faktor von 1,72 bezogen auf die PLO-Negativkontrolle den eindeutig höchsten stimulatorischen Faktor der in Abbildung 66 dargestellten Peptide. Nur die Positivkontrolle Laminin liegt mit einem Faktor von 2,07 über dem Wert von Peptid (19). Auffällig ist bei den dargestellten Daten vor allem der hohe stimulatorische Faktor von 1,51 des linearen Ausgangspeptids (39), da der im Vergleich zu den anderen getesteten Peptiden hohe K_D -Wert (791 µM) dieses Peptids eine geringere Wachstumsbeeinflussung vermuten ließ.

Der Vergleich der Werte in obiger Abbildung der Peptidreihe 4 (Peptide (17)-(20)) mit den SPR-Daten zeigt, dass diese nicht immer direkt miteinander übereinstimmen. Zwar ist, wie zu erwarten, Peptid (19) mit dem kleinsten K_D -Wert das stimulatorisch aktivste und Peptid (20), das laut SPR-Daten eine *mismatched*-Struktur präsentiert, das inaktivste, jedoch liegen die Fak-

toren der beiden anderen Peptide nur auf dem Niveau von Peptid **(42)** mit der randomisierten Peptidsequenz. Hier wäre vor allem für Peptid **(18)** mit einem K_D -Wert von $95 \mu\text{M}$ eine stärkere Stimulation zu erwarten gewesen.

In Peptidreihe 5 (Peptide **(22)**-**(25)**) liegt ebenfalls die Stimulation des Neuritenwachstums von Peptid **(24)**, einer *mismatched*-Struktur laut SPR-Analyse, mit nur 5 % erwartungsgemäß auf dem Niveau von PLO. Die Peptide **(22)** ($K_D = 102 \mu\text{M}$) und **(25)** ($K_D = 220 \mu\text{M}$) zeigen mit einem Faktor von ca. 1,30 die beste Wachstumsstimulierung dieser Reihe. Auffällig ist hier der relativ hohe Wert von Peptid c(TTLEYY) **(25)**, das jedoch mit Peptid c(SETTIL) **(19)** die Teilsequenz TTl teilt. Diese Teilsequenz ist laut Alanin-Scan (Kapitel 4.6.1) wichtig für die Affinität von Peptid c(SETTIL) **(19)** und veranschaulicht im Wachstumsexperiment die Bedeutung dieses Strukturmotivs für die glykomimetische Eigenschaft der beiden Peptide. Peptid c(tTLEYY) **(23)**, das mit $226 \mu\text{M}$ einen ähnlichen K_D -Wert besitzt wie Peptid **(25)**, zeigt eine nur sehr geringe Stimulation, enthält aber auch nicht die TTl-Sequenz der beiden zuvor beschriebene Peptide.

4.7.3 Peptide der TFQLSTRTPFS- und FLHTRLFV-Reihe

Die Ergebnisse der Neuritenwachstumsexperimente der von den Ausgangszeptiden **(40)** und **(38)** abgeleiteten Peptide sind in Abbildung 67 dargestellt. Beide Ausgangszeptide besitzen stimulatorische Einflüsse (Faktor**(40)** = 1,44; Faktor**(38)** = 1,48), die im gleichen Bereich von Ausgangszeptid **(39)** (Faktor**(39)** = 1,50) liegen. Auch hier zeigt wiederum das laut SPR-Analyse affinste Peptid c(RTLPFS) **(35)** der aufgeführten Peptide den höchsten stimulatorischen Faktor, der ähnlich wie im Fall von Peptid **(19)** bei 1,71 liegt. Dieser Befund ist auch deutlich, in den in Abbildung 68 dargestellten mikroskopischen Aufnahmen zu erkennen, bei denen im Fall von Peptid **(35)** **(A)** ähnlich wie bei der Laminin-Kontrolle **(C)** eine deutlich verlängerte Neuritenbildung im Vergleich zur Negativkontrolle **(B)** zu erkennen ist. Die abgebildete Negativkontrolle zeigt das Wachstum auf PLL (Poly-L-Lysin) entspricht aber der PLO-Kontrolle. Interessanterweise zeigen somit die Peptide **(19)** und **(35)** nicht nur annähernd identische K_D -Werte (K_D **(19)** = $67 \mu\text{M}$; K_D **(35)** = $73 \mu\text{M}$), sondern besitzen auch nahezu gleiche stimulatorische Eigenschaften (Faktor**(19)** = 1,72; Faktor**(35)** = 1,71). Die anderen Werte der abgebildeten Peptide weichen mehr oder minder stark von den SPR-Daten ab. So zeigt das Peptid c(RtLPFS) **(36)** mit einem K_D -Wert von $128 \mu\text{M}$ keine stimulatorischen Effekte, während das Peptid c(LsTRTL) **(32)** mit einem K_D -Wert von $1662 \mu\text{M}$ einen deutlichen stimulatorischen

Einfluss (Faktor(32) = 1,31) ausübt. Die wachstumsanregenden Eigenschaften von Peptid (32) könnten mit der mit Peptid (35) übereinstimmenden Teilsequenz T(S)RTL zusammenhängen.

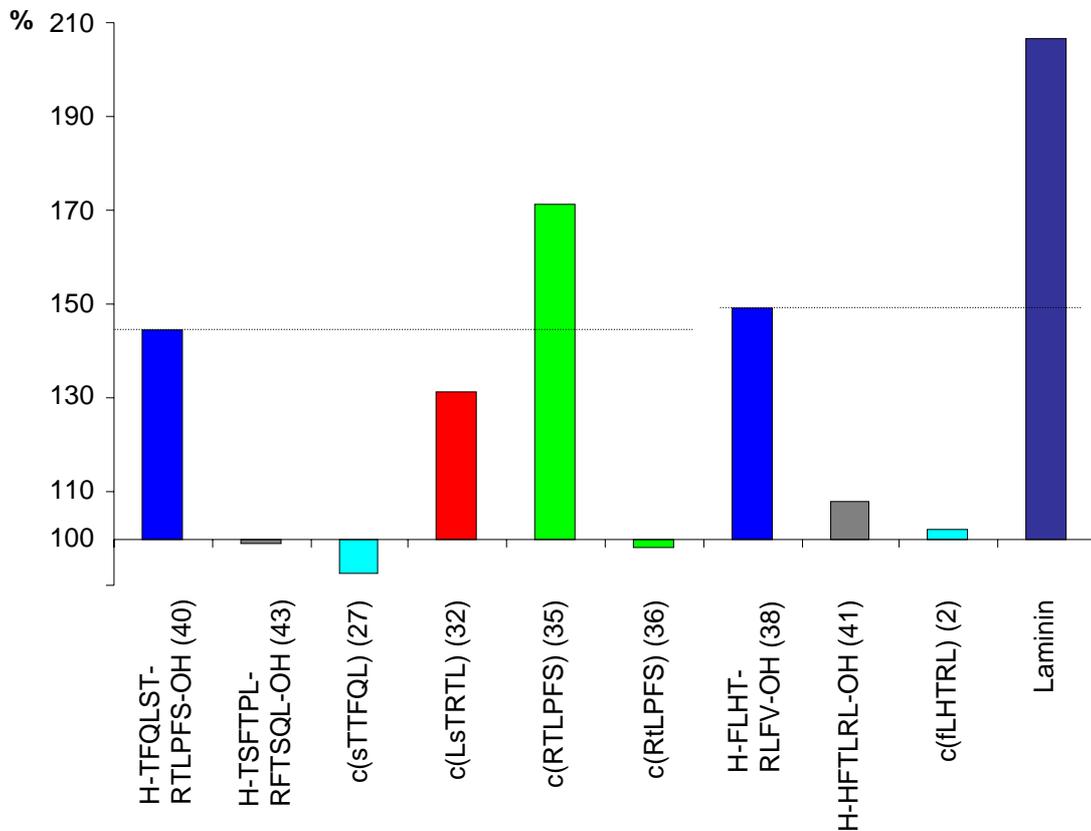


Abbildung 67: Stimulation des Neuritenwachstums motorischer Mäuseuronen unter Zusatz der von den Ausgangs-peptiden (40) und (38) abgeleiteten Peptide nach 24 h Inkubation

(100 µg/mL Peptid, 20 µg/mL Laminin), prozentuale Abweichung bezogen auf PLO (100 %), die gepunkteten Linien repräsentieren die %-Werte der Ausgangs-peptide (40) bzw. (38)

Ergebnisse von Frau Dr. G. Loers¹⁴ zur Verfügung gestellt

Insgesamt betrachtet zeigen die Wachstumsexperimente mit Mäuseuronen, dass die hohen Affinitäten als Ergebnisse der SPR-Studien der Peptide (19) und (35) in den Zellstudien untermauert werden. Sie sind in der Lage, die L2-HNK-1-Kohlenhydratstruktur nicht nur in Peptid-Antikörper-Bindungsstudien sondern auch direkt in Zelltests zu mimikrieren. Die in Bezug auf die SPR-Studien relativ hohen stimulatorischen Faktoren der linearen Ausgangs-peptide (38)-(40) könnten darauf hinweisen, dass es bei der SPR-Analyse zu nicht näher bestimmbareren Beeinträchtigungen gekommen ist, was auch im Einklang mit den zumeist sehr schlechten Bindungseigenschaften der linearen Hexapeptide stünde (Kapitel 4.5.7). Jedoch muss bei der Beurteilung der stimulatorischen Einflüsse auch bedacht werden, dass hier nicht bei konstan-

ten Konzentrationen gearbeitet wurde, wodurch vor allem ein direkter Vergleich der Cyclopeptid mit ihren linearen Ausgangszeptiden erschwert und fehlerbehaftet sein wird.

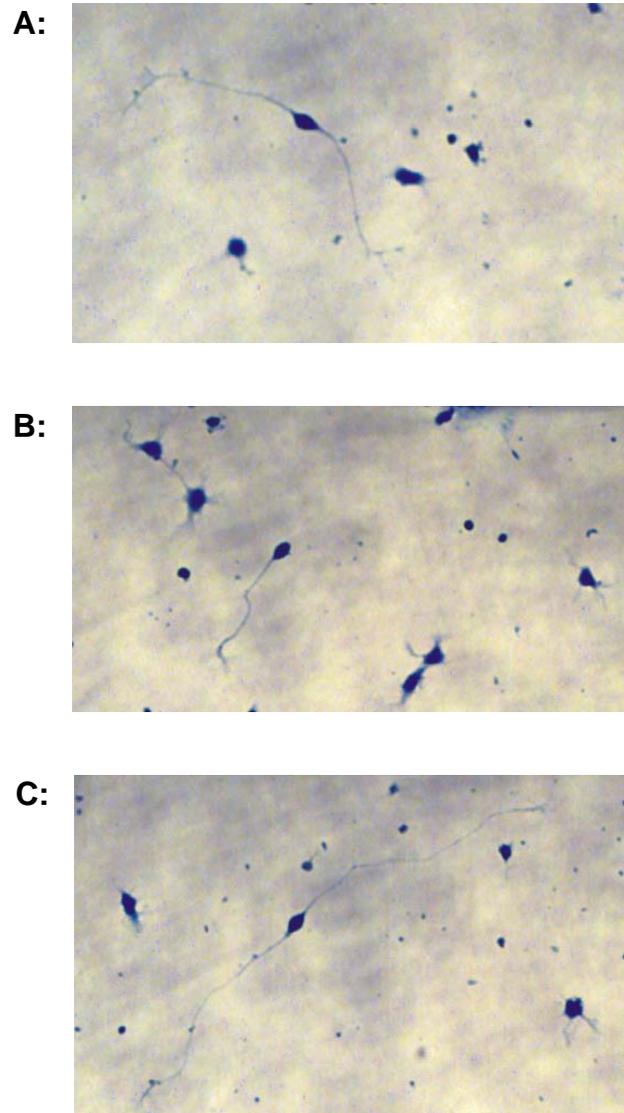


Abbildung 68: Mikroskopische Aufnahmen des Neuritenwachstums nach 24 h Inkubation
A: c(RTLPFS) (100 µg/mL), B: PLL (0,1 %), C: Laminin (20 µg/mL)
Vergrößerung: 200x;
Aufnahmen von Frau Dr. G. Loers¹⁴ zur Verfügung gestellt

4.7.4 Polaritäten der motorischen Mäuseuriten

Der Grad der Polarität, definiert als Verhältnis der Länge des längsten Neuriten zur Durchschnittslänge aller Neuriten der Zelle, ist in Kapitel 6.6.1.1 (Tabelle 10) aufgeführt. Je höher dabei die Polarität ist, desto größer ist die Tendenz eines Neuriten, die anderen Neuriten zu dominieren und vermutlich mit dem Axon *in vivo* zu korrespondieren.

In den Wachstumsexperimenten der motorischen Neuronen von Mäusen liegt die Polarität der Negativkontrolle bei 1,39, während der Wert von Laminin 2,51 beträgt. Die Polarität der meisten getesteten Peptide liegen mit Werten von 1,40 bis 1,60 im unteren Bereich. Bei den Peptiden **(19)** und **(35)** betragen die Werte 1,80 bzw. 1,86 und zeigen damit eine deutlich gesteigerte Tendenz, das Wachstum eines bestimmten Neuriten zu stimulieren. Somit liegen auch hier die beiden stimulatorisch aktivsten Peptide wieder im gleichen Bereich.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Cyclopeptide **(19)** und **(35)** nicht nur das Wachstum beschleunigen, sondern auch das Wachstum des putativen Axons (längster Neurit) stärker beeinflussen als das Wachstum der putativen Dendriten (kürzere Neuriten).

4.7.5 Neuritenwachstumsexperimente mit humanen Motoneuronen

Um die glykomimetischen Eigenschaften der Peptide in Bezug auf humane Motoneuronen zu untersuchen, wurden erste Tests mit den Ausgangspeptiden **(38)**-**(40)** sowie den randomisierten Sequenzen durchgeführt. Dazu wurden analog zu den Mäuseuriten, motorische Neuronen des Rückgrats von Embryonen der 15.-16. Schwangerschaftswoche isoliert und 24 h mit dem Substrat inkubiert. In Abbildung 69 ist die Stimulation des Neuritenwachstums bezogen auf die PLO-Negativkontrolle dargestellt, wie bei den anderen Tests dient auch hier Laminin als positive Kontrolle.

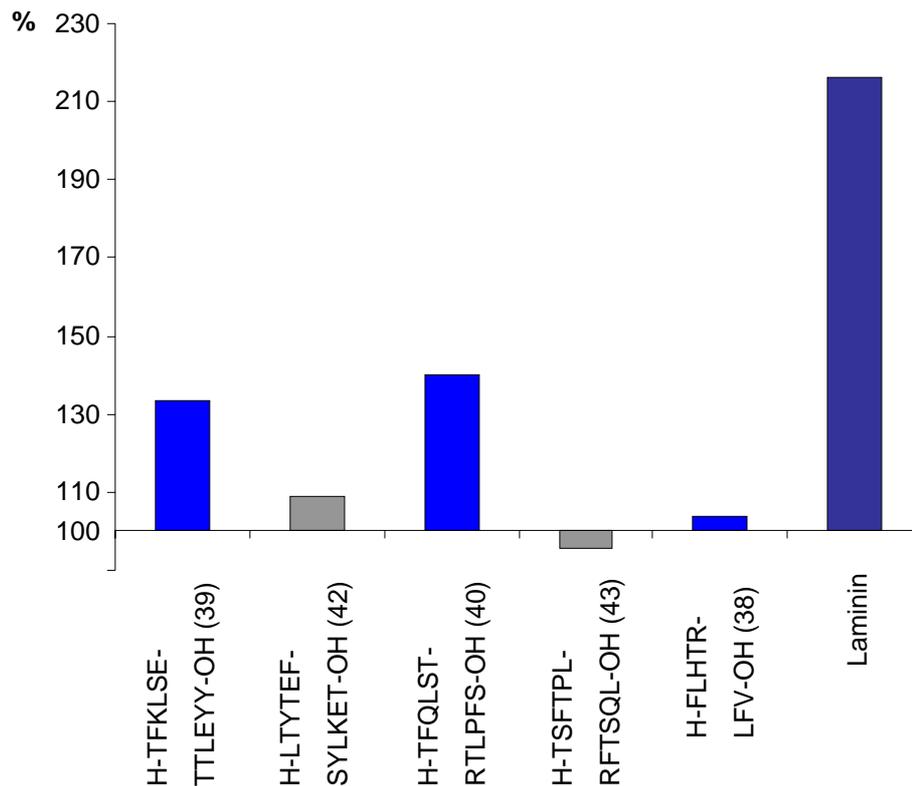


Abbildung 69: Stimulation des Neuritenwachstums humaner Motoneuronen unter Zusatz der Peptide nach 24 h Inkubation
 (100 µg/mL Peptid, 20 µg/mL Laminin), prozentuale Abweichung bezogen auf PLO (100 %)
 Ergebnisse von Frau Dr. G. Loers¹⁴ zur Verfügung gestellt

Während bei den humanen motorischen Neuronen das Peptid **(38)** keine signifikante Stimulation zeigt, führen die Peptide **(39)** und **(40)** auch hier zur Stimulation des Neuritenwachstums. Allerdings liegen die %-Werte für das Peptid **(39)** (Faktor (39) = 1,34) und das Peptid **(40)** (Faktor (40) = 1,40) insgesamt niedriger als bei den motorischen Neuronen von Mäusen, während Laminin im gleichen Bereich stimuliert.

Diese Daten deuten jedoch daraufhin, dass ebenfalls für die affinen Cyclopeptide **(19)** und **(35)** eine signifikante Stimulation des Wachstums humaner Motoneuronen zu erwarten ist, jedoch stehen diese Experimente noch aus.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Glykomimetische Peptide stellen eine ideale Möglichkeit dar, komplexe Kohlenhydratstrukturen zu mimikrieren. Sie sind somit potentielle Ausgangsstrukturen für pharmakologische Wirkstoffe, um direkt die Kohlenhydratfunktionen im Organismus nachzuahmen. Insbesondere besitzen dabei Cyclopeptide mit fünf bis sechs Aminosäureresten aufgrund ihrer rigiden Konformation die Eigenschaft, Peptidteilsequenzen in definierten Schleifenmotiven durch Einführung strukturbildender Aminosäurereste in räumlich je nach Sequenzposition verschiedener Anordnung zu präsentieren. Dadurch ist es möglich, Interaktionen zwischen potentiellen Peptidliganden und biologischen Rezeptoren durch strukturelle Modifikationen zu optimieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf drei Ausgangspeptide **(38)**-**(40)** zurückgegriffen, die über randomisiertes Peptid *Phage-Display* gegen den HNK-1-erkennenden L2-412-Antikörper erhalten wurden. Diese Peptide besitzen die Eigenschaft, die insbesondere im sich entwickelnden Nervensystem wichtige L2-HNK-1-Kohlenhydraterkennungssequenz zu mimikrieren. In biologischen Kontrollexperimenten zeigen sie in Analogie zum L2/HNK-1-Kohlenhydratepitop stimulatorische Einflüsse auf das Neuritenwachstum motorischer, nicht aber sensorischer Neurone. Somit können ausgehend von diesen Glykomimetika affinere Cyclopeptide Startstrukturen für potentielle pharmakologische Therapeutika darstellen, mit denen spezifisch die Regeneration von Motoneuronen beschädigter peripherer Nerven positiv beeinflusst werden könnte. Ebenso wäre die Therapie von autoimmunen Demyelinierungserkrankungen denkbar, die unmittelbar mit dem L2-HNK-1-Kohlenhydratepitop zusammenhängen.

Ausgehend von den drei linearen Peptiden **(38)**-**(40)** wurde eine Peptidbibliothek synthetisiert, die aus cyclischen Hexapeptiden sowie deren linearen Grundsequenzen besteht. Zur konformationellen Restriktion der Cyclopeptide und zur definierten Präsentation der Aminosäureseitenketten wurden die Hexapeptidsequenzen einem D-Aminosäure-*Scan* unterworfen, um somit potentiell affinere Cyclopeptide als die linearen Ausgangspeptide zu erhalten. Die Synthese der Peptide erfolgte über Festphasenpeptidsynthese am säurelabilen 2-Chlortrityl-Harz. Der Aufbau der linearen Sequenzen verlief unter Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppentaktik mit TBTU als Kupplungsreagenz unter Basenzusatz (DIPEA).

Die Cyclisierung der Peptide der Peptidreihen 3 und 4 wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt, um eine Methode zu entwickeln, bei der die Entstehung oligomerer Nebenprodukte unterdrückt wird. Dabei verlief der eine Weg über die *on-resin*-Cyclisierung mit dreidimensionaler Schutzgruppentaktik (Fmoc/*tert*-Butyl/Dmab) und DIC/HOAt als Kupplungsreagenzien, wobei die Carboxylseitengruppe von α -Carboxyl-Dmab-geschütztem Glutamat am Syntheseharz immobilisiert wurde. Der andere Weg erfolgte über die Lösungscyclisierung des linearen Vorläuferpeptids mit einer Zweikanal-Spritzenpumpe unter Verwendung von HATU als Kupplungsreagenz unter hoher Verdünnung, wobei das Peptid und das Kupplungsreagenz simultan zu einer DIPEA-Lösung getropft werden. Es zeigte sich, dass letztere Synthesemethode ohne Probleme verläuft, da sowohl die Entstehung von Cyclodimeren unterdrückt wird als auch Cyclisierung in allen Fällen quantitativ erfolgt. Zudem ist die Wahl der C-terminalen Aminosäure völlig flexibel, was besonders beim Vorhandensein racemisierungsunempfindlicher Aminosäurereste vorteilhaft ist. Hingegen kam es trotz geringer Harzbelastung (Pseudoverdünnung) bei allen *on-resin*-Cyclisierungen zur Bildung der ungewünschten cyclodimeren Nebenprodukte. Die weiteren Synthesen der Cyclopeptide der Peptidreihen 5-8 erfolgte demzufolge über die Lösungscyclisierung mit Spritzenpumpe und HATU als Kupplungsreagenz.

Da die Synthese Histidin-enthaltender Cyclopeptide ein besonderes Problem darstellt,^[203] wurden für diese Peptide alternative Synthesestrategien erarbeitet. Aufgrund der extrem säurelabilen Trityl-Schutzgruppe, die als Standardschutzgruppe in der Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppentaktik dient, kommt es während der Cyclisierung Histidin-haltiger Peptidsequenzen mit Kupplungsreagenzien des Guanidiniumtyps zu einer mehr oder minder starken Guanidinylierung der Imidazol-Seitenkettengruppe des Histidins. Um diese Nebenproduktbildung auszuschalten, wurden drei verschiedene Cyclisierungsstrategien für das Peptid c(fLHTRL) **(2)** unter-

sucht, bei denen keine acidolytische Spaltung von Peptid bzw. temporärer Schutzgruppe vonnöten ist.

Die eine Synthesemethode beruht auf der dreidimensionalen Fmoc/*tert*-Butyl/Allyl-Schutzgruppentaktik und *on-resin*-Cyclisierung, bei der α -Carboxyl-Allyl-geschütztes Histidin über den Imidazolring am 2-Chlortritylharz immobilisiert wurde. Da die nach dem Aufbau der linearen Sequenz folgende Allylspaltung mit Palladium erhebliche Probleme bereitete, konnte mit dieser Methode kein komplett Allyl-entschütztes Peptid erhalten werden. Somit lieferte die Cyclisierung mit HATU neben dem gewünschten Cyclopeptid c(fLHRTL) (**2**) noch C-terminal Allyl-geschütztes acyclisches Nebenprodukt.

Eine verwandte Synthesemethode verlief über ein dreidimensionales Schutzgruppenkonzept mit Dmab-Schutz der α -Carboxylfunktion des Histidins. Die Allyl-analoge Strategie mit *on-resin*-Cyclisierung lieferte nach der Hydrazinolyse und Cyclisierung mit HATU das gewünschte Cyclopeptid c(fLHTRL) (**2**) ohne die Bildung von Cyclodimeren oder guanidinylierten Nebenprodukt.

Die dritte Synthesestrategie verlief über einen neuartigen Linker, der von der Dmab-Schutzgruppe abgeleitet ist und ebenfalls unter milden hydrazinolytischen Bedingungen gespalten wird. Dieser Weg erfordert keine *on-resin*-Cyclisierung und das erhaltene lineare Peptid wurde mittels Lösungscyclisierung unter Verwendung einer Zweikanal-Spritzenpumpe und HATU in das Cyclopeptid (**2**) überführt. Hierbei konnten ebenfalls weder Cyclodimere noch guanidinylierte Spezies beobachtet werden.

Insgesamt ist die letzte Syntheseroute den beiden anderen durch die freie Wahl der C-terminalen Aminosäure überlegen. Daneben besteht bei *on-resin*-Cyclisierungen die Gefahr der Bildung von Cyclodimeren.

Abgeleitet von der Synthese Arginin-haltiger Peptide über die post-synthetische N-Guanidinylierung von Ornithinderivaten wurde außerdem versucht, die am Histidin guanidinylierten Nebenprodukte direkt zu deguanidinylieren. Zur Spaltung der Guanidiniumgruppe wurde das isolierte guanidinylierte Nebenprodukt in seiner geschützten Form mit 2 % Hydrazin in DMF versetzt, wobei die Spaltung der Gruppe das gewünschte Histidin-entschützte Peptid lieferte.

Die insgesamt 45 Peptide der synthetisierten Peptidbibliothek, einschließlich der linearen Ausgangspeptide sowie der randomisierten Ausgangssequenzen, wurden in Oberflächenplasmonresonanz-Experimenten auf ihre Affinität zum L2-412-Antikörper untersucht. Dabei wurde

der Antikörper auf der Chipoberfläche eines Biacore[®]-Sensorchips immobilisiert und die Peptide konzentrationsabhängig analysiert. Die Auswertung über lineare Regression der Scatchard-Plots lieferte die K_D -Werte der einzelnen Peptide. Hierbei zeigten die Ausgangs-peptide K_D -Werte in einem Bereich von 400-800 μM , der für Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen typisch ist. Von den analysierten Cyclopeptiden zeigte eine Reihe von Peptiden K_D -Werte, die zum Teil deutlich darunter lagen. Die affinsten Peptide stellen die Peptide c(SETTIL) (**19**) und c(RTLPFS) (**35**) dar, die mit ihren K_D -Werten von 67 μM (**19**) bzw. 73 μM (**35**) deutlich affinere Strukturen präsentieren (*matched*-Fälle) als die entsprechenden linearen Ausgangs-peptide (**39**) und (**40**). Neben den affineren Peptiden zeigten einige Peptide auch eine deutlich reduzierte Bindungsfähigkeit, so stellt das Peptid c(SET^{*}TIL) (**20**) mit einem K_D -Wert von 2140 μM einen deutlichen *mismatched*-Fall dar, bei dem die Cyclisierung und der Einbau einer D-Aminosäure zu einem drastischen Abfall der Affinität führt, da die für die Wechselwirkung wichtigen Seitenketten dem Antikörper in einer falschen Struktur angeboten werden. Die randomisierten Peptide (**41**)-(**43**) zeigen ansteigende Geraden im Scatchard-Plot und besitzen somit, wie erwartet, keine Bindungseigenschaften gegenüber dem L2-412-Antikörper.

Eine Gegenüberstellung der K_D -Werte der Peptide c(SETtLL) (**18**) und c(sET^{*}TLL) (**21**) und der Peptide c(tFKLSE) (**13**) und c(TFKISE) (**16**) zeigt außerdem, dass die Reduktion des D-Aminosäure-Scans eines Cyclohexapeptids auf drei verschiedene Cyclopeptide eine zulässige Vereinfachung ist. Die Peptide zeigen zwar keine identischen Affinitäten, dennoch liegen die K_D -Werte der Peptidpaare im gleichen Bereich.

Für weitergehende Untersuchungen, vor allem inverse SPR-Experimente, sollte ein Cyclopeptid direkt auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden. Um dieses zu ermöglichen, musste in einem Alanin-Scan des affinen Peptids c(SET^{*}TIL) (**19**), bei dem jeweils eine Aminosäure gegen einen Alaninrest ausgetauscht wird, eine Position in der Peptidsequenz gefunden werden, die gegen eine andere Aminosäure ohne Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften ausgetauscht werden kann. Über diese Aminosäure kann dann ein Linker eingeführt werden, über den das Peptid auf der Sensoroberfläche verankert werden kann.

Die SPR-Analyse der sechs durch den Alanin-Scan erhaltenen Peptide (**46**)-(**51**) zeigt, dass insbesondere die Teilsequenz ET^{*}Tl des Cyclopeptids (**19**) von großer Wichtigkeit für die Interaktion mit dem L-2-412-Antikörper ist. Somit führt ein Austausch dieser Reste zu einer erheblichen Reduzierung der Peptid-Antikörper-Interaktion. Der Ersatz des Serin- bzw. L-Leucinre-

stes zeigt hingegen nur einen geringen Einfluss auf die Affinitäten, womit ein Austausch dieser Reste gegen eine andere Aminosäure möglich sein sollte. Als Linker wurde das hydrophile N-8-Amino-3,6-dioxaoctanyl-bernsteinsäureamid gewählt, das einen genügend großen Abstand zur Dextran-Matrix der Sensoroberfläche garantieren sollte.

Zur Synthese des Linker-Peptids wurde der Linker direkt als *building-block* gekuppelt an Fmoc-Lysin eingesetzt. Das synthetisierte Cyclopeptid wurde anschließend auf der Sensoroberfläche immobilisiert, jedoch konnten mit dem L2-412-Antikörper keine Bindungskurven erhalten werden. Da nicht genügend Antikörper vorlag, konnten erforderliche Optimierungen des Bindungspuffer nicht durchgeführt werden.

Zur Bestätigung der über SPR experimentell bestimmten Affinitäten wurden einige Peptide in Neuritenwachstumstests auf ihre glykomimetischen Eigenschaften untersucht.¹⁵ Dabei stellte sich heraus, dass die in den SPR-Studien affinsten Peptide (**19**) und (**35**) in den Wachstumstests ebenfalls die stärksten stimulatorischen Einflüsse auf das Neuritenwachstum von Motoneuronen der Mäuse ausüben. Beide besitzen mit einem stimulatorischen Faktor von ca. 1,70 auch hier ähnliche Eigenschaften und zeigen einen stärkeren Einfluss auf das Wachstum als ihre linearen Ausgangspeptide mit stimulatorischen Faktoren um 1,50. Jedoch muss hier beachtet werden, dass nicht bei gleichen Substratkonzentrationen gearbeitet wurde, sondern bei konstanten Substratmengen von 100 µg/mL. Somit ist der Vergleich der Peptide insbesondere zwischen linearen Ausgangspeptiden und Cyclopeptiden erschwert.

Die Wachstumsexperimente zeigen teilweise auch deutliche Abweichungen von den erhaltenen SPR-Daten. So zeigen die schon erwähnten Ausgangspeptide relativ hohe stimulatorische Faktoren um 1,50, die anhand der K_D -Werte nicht erwartet wurden. Andere Peptide wie das Peptid c(LsTRTL) (**32**) zeigen im Gegensatz zu den geringen Affinitäten im SPR-Experiment ($K_D(\mathbf{32}) = 1662 \mu\text{M}$) gute Wachstumsstimulierungen (Faktor 1,31), während Peptide mit deutlich besseren Affinitäten, wie c(sTTFQL) (**27**) mit einem K_D -Wert von 142 µM, keinen stimulatorischen Einfluss besitzen (Faktor 0,92). Ebenfalls zeigt das Peptid c(TTIEYY) (**25**) einen deutlichen stimulatorischen Faktor von 1,32, was auf die Teilsequenz TTl zurückzuführen ist, die es mit dem sehr affinen Peptid c(SETTIL) (**19**) teilt. Dieses Ergebnis unterstreicht die Resultate des Alanin-Scans, die auf die Wichtigkeit dieser Teilsequenz hinwiesen und untermauert die Bedeutung der über den Alanin-Scan erhaltenen Sequenz ETTL für die glykomimetische Eigenschaft des Peptids (**19**).

¹⁵ Die Neuritenwachstumsexperimente wurden von Frau Dr. G. Loers, ZMNH Hamburg, durchgeführt.

Zudem zeigen beide Peptide auch einen positiven Einfluss auf den Grad der Polarität der Neuriten. Sie scheinen somit, nicht nur das Wachstum der Neuriten im Allgemeinen anzuregen sondern insbesondere das Wachstum des putativen Axons.

Erste Wachstumsexperimente mit embryonalen, humanen Motoneuronen der Ausgangspeptide **(38)**-**(40)** zeigen auch hier stimulatorische Einflüsse, die daraufhin deuten, dass auch hier die Cyclopeptide **(19)** und **(35)** das Wachstum der Neuriten anregen könnten.

Abschließend kann durch die Ergebnisse der Wachstumsexperimente der Motoneuronen die glykomimetische Funktion der beiden über SPR-Studien ermittelten Peptide c(SETTIL) **(19)** und c(RTLPFS) **(35)** bewiesen werden. Es ist somit gelungen, zwei cyclische Hexapeptide zu ermitteln, die in der Lage sind, die L2/HNK-1-Kohlenhydratsequenz zu mimikrieren. Sie besitzen sowohl die Eigenschaft, an den L2-412-Antikörper zu binden, als auch die Funktion, das L2/HNK-1-Epitop in Zellstudien zu ersetzen, und können damit als Leitstruktur für weitergehende Strukturoptimierungen dienen.

Zur besseren Gegenüberstellung der Ergebnisse müssen in weiteren Untersuchungen konzentrationsabhängige Testreihen die besseren glykomimetischen Eigenschaften der Peptide **(19)** und **(35)** im Vergleich zu den Ausgangspeptiden **(39)** und **(40)** unterstreichen. Weiterführende Experimente mit humanen Motoneuronen der Peptide **(19)** und **(35)** müssen deren Einfluss auf das Neuritenwachstum im humanen System belegen. Des Weiteren wären vergleichende Studien mit L2/HNK-1-tragenden Substraten erforderlich, um direkte Vergleiche zwischen den Glykomimetika und der L2/HNK-1-Kohlenhydratstruktur anzustellen. Ebenso wären SPR-Experimente mit dem L2/HNK-1-Substrat wünschenswert, um die Affinität zwischen L2-412-Antikörper und Kohlenhydratepitop zu bestimmen und mit den K_D -Werten der Peptide zu vergleichen.

Zudem sollen *in vivo* Experimente zeigen, ob die Peptide **(19)** und **(35)** mit den höchsten stimulatorischen Effekten in Regenerationsversuchen nach Verletzung peripherer Nerven von Mäusen regenerierende Eigenschaften besitzen.

In immunologischen Untersuchungen könnte durch Injektion der Peptide, die zur Erhöhung der Immunogenität an geeignete Substrate gekuppelt sind, in Mäusen oder Ratten untersucht werden, ob diese gegen die Peptide Antikörper bilden, die ebenfalls eine L2/HNK-1-

Immunantworten hervorrufen. Dadurch würde ein weiterer Beweis erbracht werden können, dass die Peptide das L2/HNK-1-Kohlenhydratepitop mimikrieren.

Ferner könnten weitere Studien mit dem immobilisierten Linker-Peptid zur Bestimmung der K_D -Werte über inverse Experimente beitragen. Derartige Experimente sind mit deutlich geringerer Oberflächenbeladung durchzuführen, da die hohe Antikörpermasse zu stärkeren Resonanzsignalen führt. Es könnten SPR-Studien durchgeführt werden, die ohne Massentransfer-Limitierungen verlaufen und genauere K_D -Werte erwarten lassen.

Zudem könnte ein Linker-Peptid, das sich in SPR-Studien als affin gegenüber dem L2/HNK-1-Antikörper beweist, ein potentiell *Affinitäts-Label* für die affinitätschromatografische Aufreinigungen des Antikörper aber auch für andere L2/HNK-1-Rezeptoren darstellen und könnte in Biacore[®]-Experimenten als möglicher Ligand zum „Fischen“ neuer makromolekularer L2/HNK-1-Rezeptoren dienen.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Materialien und Methoden

Chromatografie:

Dünnschichtchromatografie:

DC-Fertigplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄), Fa. Merck

Detektion: UV (254 nm), MinUVIS, Fa. Desaga.

Flashchromatografie:

Kieselgel 60 (40-63 µm), Fa. Merck.

Säulenchromatografie:

Kieselgel 60 (63-200 µm), Fa. Merck

HPLC:

analytische HPLC:

Autosampler: Thermo Separation Products AS 100

Controller: Thermo Separation Products SN 4000

Detektor: Thermo Separation Products UV 6000
LP

Pumpe: Thermo Separation Products P 4000

Vorsäule: Vydac™ High Performance Guard
Column Protein & Peptide C18

Säule: Vydac™ 218 TP54 Efficiency Protein
and Peptide, C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm;
Phenomenex®, Jupiter C18, 5 µm, 250 x
4,6 mm

Software: Chrom Quest Version 2.51

Eluent A: 95 % H₂O, 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA
 Eluent B: 95 % Acetonitril, 5 % H₂O, 0,1 % TFA

Methode A: Gradient für die Synthesekontrolle

Zeit (min)	Eluent A	Eluent B	Fluss [mL/min]	UV-Detektion (nm)
0	100	0		
5	100	0		
30	20	80	1	220/254
35	0	100		
45	100	0		
50	100	0		

Methode B: Gradient für die Kontrolle der Reinheit nach der semipräparativen HPLC

Zeit (min)	Eluent A	Eluent B	Fluss [mL/min]	UV-Detektion (nm)
0	100	0		
3	100	0		
20	60	40	1	220/254
25	100	0		
30	100	0		

semipräparative HPLC:

Controller: Thermo Separation Products SN 4000
 Detektor: Thermo Separation Products UV 1000
 Pumpe: Thermo Separation Products P 4000
 Vorsäule: VydacTM High Performance Guard
 Säule: VydacTM 218 TP 1022 Efficiency Protein and Peptide C18, 250 x 22 mm
 Software: Chrom Quest Version 2.51
 Eluent A: 95 % H₂O, 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA
 Eluent B: 95 % Acetonitril, 5 % H₂O, 0,1 % TFA

Methode C: Gradient für die Aufreinigung entschützter Cyclopeptide

Zeit (min)	Eluent A	Eluent B	Fluss [mL/min]	UV-Detektion (nm)
0	92	8		
5	92	8		
40	55	45	5	220 bzw. 254
45	92	8		
50	92	8		

Methode D: Gradient für die Aufreinigung entschützter, hydrophilerer Peptide

Zeit (min)	Eluent A	Eluent B	Fluss [mL/min]	UV-Detektion (nm)
0	92	8		
5	92	8		
40	70	30	5	220 bzw. 254
45	92	8		
48	92	8		

Methode E: Gradient für die Aufreinigung entschützter, sehr hydrophiler Peptide

Zeit (min)	Eluent A	Eluent B	Fluss [mL/min]	UV-Detektion (nm)
0	100	0		
30	85	15		
45	55	45	5	220 bzw. 254
50	100	0		

MALDI-ToF-Massenspektrometer:

Voyager-DETM BioSpectrometryTM Workstation,
Fa. PerSeptive Biosystems

Matrix: 2,5-Dihydroxybenzoesäure, α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure, Sinapinsäure

Laser: LSI-Stickstofflaser, $\lambda = 337$ nm

Pulsbreite: 3 ns

Wiederholungsrate: 20 Hz

Fluglänge: 940 mm

Delay-Time: 100 ns

Accelerating Voltage: 20 000 V

Grid Voltage: 94 %

Guide Wire Voltage: 0,05 %

<i>Scans:</i>	50
<i>Low Mass Gate:</i>	500 Da
<i>Kalibrierung:</i>	Polyethylenglykol, extern
<i>Software:</i>	Voyager Instrument Control Panel Version 5.10, Data Explorer Version 4.0.0.0, Fa. Applied Biosystems POMWIN, M. Meldal, Carlsberg Lab.
<i>NMR-Spektroskopie:</i>	DRX-500 (¹ H-Messfrequenz 500,13 MHz), Fa. Bruker chemische Verschiebung als δ -Skala in ppm.
<i>Oberflächenplasmon- resonanz-Messung:</i>	Biacore [®] 3000, Fa. Biacore AB Sensorchips: CM5-Sensorchip <i>research grade</i> Software: BIAcore 300 Control Software Version 3.0 BIAevaluation Version 3.2 Microsoft [®] Excel 2000
<i>Peptidsynthesizer:</i>	ACT 496 Multiple Organic Synthesizer Fa. Advanced ChemTech Reaktionsgefäße: 16er Teflon [®] -Reaktionsblock Software: Multiple Organic Synthesizer Version 1.33.12
<i>Polarimetrie:</i>	DIP-360, Fa. Jasco
<i>Stickstoffgenerator:</i>	NGM-11, Fa. CMC Instruments
<i>Ultraschallbad:</i>	Sonorex Super 10 P, Fa. Bandelin
<i>UV-Spektrometer:</i>	Unicam Spektralphotometer Helios Gamma, Fa. Spectronic Unicam
<i>Zentrifuge:</i>	Centrifuge 5810 R, Fa. Eppendorf

*Lösungsmittel und Chemikalien:**Lösungsmittel für die Synthese:*

	Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch destilliert und wenn nötig nach gängigen Methoden absolutiert
<i>Dichlormethan:</i>	Calciumchlorid, anschließend Calciumhydrid
<i>Diethylether:</i>	Kaliumhydroxid, anschließend Natrium
<i>N,N-Dimethylformamid:</i>	Ninhydrin (ca. 100 mg/L), 3 h unter Rückfluss, anschließend Vakuumdestillation bei 55 mbar
<i>Ethylacetat:</i>	Calciumchlorid
<i>THF:</i>	Kaliumhydroxid, anschließend Natrium
<i>Toluol:</i>	Natrium

HPLC-Lösungsmittel:

<i>Acetonitril:</i>	Merck (<i>gradient grade</i>)
<i>Wasser, reinst:</i>	Reinstwasseranlage Milli Q, Fa. Millipore
<i>TFA:</i>	Solvay Fluor and Derivative GmbH

*Aminosäurederivate/ Harze /**Kupplungsreagenzien:*

von den Firmen Advanced ChemTech, Aldrich, Bachem, Biacore, Fluka, Iris Biotech, Novabiochem erworben

6.2 Allgemeine Peptidsynthese

6.2.1 Allgemeine Synthesevorschriften

Protokoll 1: Harzbeladung

Für die Beladung des 2-Chlortrityl-Harzes werden für die optimale Beladung aufgrund der Empfindlichkeit des Linkers gegenüber Wasser trockene Lösungsmittel und Aminosäuren benötigt. Die Aminosäuren werden vor dem Einsatz im Hochvakuum getrocknet.

Das Syntheseharz wird 30 min in trockenem DCM quellen gelassen (10 mL/g Harz). Es werden 1,0-1,5 Äquivalente der geschützten Aminosäure (bezogen auf die Linkerbeladung des Harzes) in trockenem DCM gelöst. Vier Äquivalente DIPEA in Bezug auf die Aminosäure werden zu der Aminosäurelösung gegeben. Durch Zusatz von wenig DMF wird bei Bedarf das Lösen der Aminosäure komplettiert.

Die Lösung wird zu dem gequollen Harz gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Ist die Beladung beendet, wird Methanol (1 mL/g Harz) zu der Suspension gegeben und für weitere 15 min geschüttelt, um nicht umgesetzte Linkereinheiten zu deaktivieren. Das Harz wird abfiltriert, mit DCM (4x), DMF (4x) und DCM (4x) intensiv gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nach der Beladungsbestimmung wird ggf. vor längerer Lagerung die Fmoc-Gruppe abgespalten.

Um geringere Beladungen zu erhalten, wird die Menge an eingesetzter Aminosäure reduziert. Aminosäuren, die über ihre Seitenfunktionalitäten immobilisiert werden, werden nach der gleichen Methode an den Linker geknüpft.

Protokoll 2: UV-spektroskopische Beladungsbestimmung

Die Beladungsbestimmung erfolgt über die UV-spektroskopische Detektion des Absorptionsmaximums bei 290 nm des Piperidin-Dibenzofulven-Adduktes.

Zunächst wird eine Küvette mit 3 mL der Abspalllösung befüllt (20 % Piperidin in DMF), um den Nullabgleich der Basislinie des UV-Spektrometers durchzuführen. Dann wird in die Küvette 1 mg des beladenen Harzes eingewogen und die Suspension vermischt. Nach Erreichen eines konstanten Absorptionswertes (A) wird der Wert abgelesen. Die Beladung des Harzes (mmol/g) wird nach folgender Korrelationsgleichung berechnet.^[247]

$$\text{Beladung} = \frac{A}{\text{Einwaage} * 1,65} \quad (5)$$

Protokoll 3: manuelle Fmoc-Spaltung

Vor der Verlängerung der Peptidkette muss die Fmoc-Gruppe abgespalten werden. Außerdem ist es zur längeren Aufbewahrung von beladenen Synthescharzen empfehlenswert, die Fmoc-Gruppe abzuspalten. Dazu wird das 30 min gequollene Harz für 5 min mit 20 % Piperidin in DMF (10 mL/g Harz) versetzt und danach das Harz abfiltriert. Diese Prozedur wird nochmals wiederholt, wobei die Piperidin-Lösung 10 min einwirkt. Nach dem Filtrieren wird das Harz intensiv mit DMF (6-8x) und DCM (3x) neutral gewaschen und im Vakuum getrocknet.

6.2.2 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die Synthese der Peptide erfolgt mit Hilfe eines Syntheseautomaten durch die cyclische Wiederholung des folgenden allgemeinen Syntheseprotokolls:

- Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe
- Waschen nach der Fmoc-Entschützung
- Kupplung der neuen Fmoc-geschützten Aminosäure
- Waschen nach der Kupplung

Dieser Cyclus wird solange wiederholt, bis alle Aminosäuren gekuppelt sind. Danach wird die Fmoc-Schutzgruppe des N-Terminus abgespalten, gefolgt von einem intensiven Waschschrift mit DCM und der Abspaltung des Peptids vom Harz. Die einzelnen Schritte sind Tabelle 8 aufgeführt. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf Synthesen mit 100-300 mg Syntheseharz. Alle Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Liegt die erste Aminosäure am Syntheseharz entschützt vor, entfallen die Stufen 2 und 3 für den ersten Cyclus. Die Reagenzien werden nach Beendigung der jeweiligen Stufe durch Stickstoff abgedrückt. Verlaufen Kupplungen unvollständig, sind die Stufen 4 und 5 für die entsprechende Aminosäure zu wiederholen. Die Synthesekontrolle erfolgt per MALDI-ToF-Massenspektrometrie und analytischer RP-HPLC (Methode A).

Tabelle 8: Standardprotokoll für die automatisierte Peptidsynthese

Stufe	Operation	Reagenzien	Volumen [mL]	Wiederholungen x Zeit [min]
1 ^a	Quellen	DMF	5	2 x 30
2 ^b	Fmoc-Spaltung	2 % DBU, 2 % Piperidin in DMF	4	1 x 5, 1 x 20
3 ^b	Waschen	DMF	5	7 x 7
4	Kupplung	3 Äquiv. Fmoc-Xaa-OH, 3 Äquiv. TBTU, 6 Äquiv. DIPEA in DMF	3-6	1 x 45
5	Waschen	DMF	5	5 x 7
6	Waschen	DCM	5	5 x 5

^a nur zu Beginn der Synthese; ^b nach Beendigung der Synthese zur Entschützung des N-Terminus

6.2.3 Cyclisierung der Peptide

6.2.3.1 Cyclisierung in Lösung

Protokoll 4: Cyclisierung in Lösung

Das geschützte lineare Peptid wird in 10-20 mL DMF gelöst. Das gelöste Peptid wird bei Raumtemperatur mit einer Zugabegeschwindigkeit von max. 1 mL/h mit einer Zweikanal-Spritzenpumpe zu einer Lösung von DIPEA (2-3 Äquivalente bezogen auf das Peptid) in 50 mL DMF getropft. Analog dazu werden 1,0-1,5 Äquivalente HATU und 1,0 Äquivalente HOAt, in der gleichen Menge DMF wie das Peptid gelöst, über die zweite Spritze zu der Lösung getropft. Nach Beendigung der Zugabe wird 30 min nachgerührt und anschließend das Lösungsmittel im Hochvakuum bei maximal 40°C abdestilliert. Zur Entfernung überschüssiger Kupplungsreagenzien und Nebenprodukte wird das Peptid mit eiskaltem Wasser versetzt. Das ausgefallene Cyclopeptid wird bei 0°C und 4000 U/min für 30 min zentrifugiert und vom Überstand dekantiert. Der Rückstand wird in Wasser im Ultraschallbad aufgeschlämmt und lyophilisiert. Die Synthesekontrolle erfolgt über MALDI-ToF-Massenspektrometrie und analytische RP-HPLC (Methode A).

6.2.3.2 *on-resin*-Cyclisierung

6.2.3.2.1 Entschützung der C-terminalen Carboxylgruppe

Protokoll 5: C-terminal Dmab-geschützte Peptide

Das geschützte lineare Peptid wird am gequollenen Harz mit 2 % Hydrazin in DMF versetzt (10 mL/g Harz). Nach 5 min Mixen bei Raumtemperatur wird das Harz abfiltriert und die Prozedur für 10 min wiederholt. Das Peptid wird anschließend intensiv mit 10 % DIPEA in DMF (10x), DMF (10x), DCM (5x) und Diethylether (5x) gewaschen. Die Kontrolle der Dmab-Abspaltung erfolgt über analytische RP-HPLC und MALDI-ToF-Massenspektrometrie.

Protokoll 6: C-terminal Allyl-geschützte Peptide

Das Harz mit dem geschützten linearen Peptid wird in trockenem DCM für 30 min gequollen. Dann werden drei Äquivalente Dimedon und ein Äquivalent Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur unter Argon geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und intensiv mit DMF (5x), 0,5 % DIPEA in DMF (10x), 0,5 % Natriumdiethyldithio-

carbamat-Trihydrat in DMF, DMF (5x) und DCM (5x) gewaschen. Die Kontrolle der Allyl-Spaltung erfolgt über analytische RP-HPLC und MALDI-ToF-Massenspektrometrie.

Protokoll 7: *on-resin*-Cyclisierung mit DIC/HOAt

Das Harz wird für 30 min in DMF gequollen. Anschließend wird das Harz abfiltriert. Es werden 1,5 Äquivalente DIC und 1,0 Äquivalente HOAt gelöst in DMF (10 mL/g Harz) zugegeben. Nach 20 h Schütteln bei Raumtemperatur erfolgt Synthesekontrolle mit MALDI-ToF-MS, verläuft diese negativ werden nochmals 1,5 Äquivalente DIC und 1,0 Äquivalente HOAt zugesetzt und nach maximal 48 h wird die Cyclisierung abgebrochen. Es wird intensiv mit DMF (5x), DCM (5x) gewaschen. Das Peptid wird anschließend unter gleichzeitiger Entfernung der permanenten Schutzgruppen vom Harz gespalten (Protokoll 10).

Protokoll 8: *on-resin*-Cyclisierung mit HATU

Zum gequollenen Harz werden 1,0-1,5 Äquivalente HATU und 1,0 Äquivalente HOAt gelöst in DMF gegeben (10 mL/g Harz). Es wird 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und mit DMF (5x) und DCM (5x) intensiv gewaschen. Die Synthesekontrolle erfolgt mit analytischer RP-HPLC und MALDI-ToF-Massenspektrometrie. Das Peptid wird anschließend unter gleichzeitiger Entfernung der permanenten Schutzgruppen vom Harz gespalten (Protokoll 10).

6.2.4 Spaltung geschützter Peptide vom 2-Chlortrityl-Harz

Protokoll 9 A: TFA-Spaltung:

Vor der Spaltung des Peptids vom Harz wird dieses mit trockenem DCM (5x) gewaschen. Dann wird 0,5-1%ige TFA in DCM zugegeben (20 mL/g Harz) und für 5 min bei Raumtemperatur gemixt. Dieser Vorgang wird 10-15mal wiederholt. Nach Beendigung der Spaltung wird die vereinigte Lösung im Vakuum eingeeengt, wiederholt mit DCM versetzt und wieder eingeeengt. Anschließend wird der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Protokoll 9 B: HFIP-Spaltung:

Das mit DCM gewaschene Harz wird bei Raumtemperatur mit 20 % HFIP in DCM versetzt (10 mL/g Harz) und für 1 h geschüttelt. Die Reaktionsmischung wird abfiltriert und das Harz mit der Spallösung und DCM nachgewaschen. Die Lösung wird im Vakuum eingeeengt und wiederholt mit DCM versetzt und wiederum eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wird in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Protokoll 9 C: Spaltung mit verdünnter Essigsäure/Trifluorethanol:

Das Synthescharz wird mit einer Lösung aus 20 % Essigsäure und 20 % TFE in DCM (10 mL/g Harz) versetzt und bei Raumtemperatur für 1 h geschüttelt. Danach wird Hexan (ca. das 15fache Volumen) zugegeben und im Vakuum eingeengt. Falls nötig, wird weiteres Hexan hinzugesetzt und wiederum eingeengt. Der erhaltene Rückstand wird in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Protokoll 10: Spaltung der permanenten Schutzgruppen

Zur Spaltung der permanenten Schutzgruppen wird das Peptid bzw. das Harz mit dem Peptid mit einer Abspaltlösung aus 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % Wasser versetzt. Alternativ wird Reagenz K (82,5 % TFA, 5 % Phenol, 5 % Wasser, 5 % Thioanisol, 2,5 % EDT) zugegeben. Die Lösung wird bei Raumtemperatur geschüttelt und je nach Schutzgruppen nach 1-3 Stunden bei positiver MALDI-ToF-MS-Kontrolle im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird mit kaltem Diethylether versetzt (ca. 10 mL) und für 30 min auf Eis gestellt. Das ausgefallene, entschützte Cyclopeptid wird bei 0°C und 4000 U/min für 30 min zentrifugiert. Die Lösung wird dekantiert und der Rückstand erneut in kaltem Ether aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wird das erhaltene Rohpeptid in Wasser suspendiert und lyophilisiert. Anschließend wird das Peptid in einem Minimum Lösungsmittel (DMF, DMSO, TFA bzw. Wasser) gelöst und über semipräparative RP-HPLC aufgereinigt. Dabei wird die Elutionslösung bei Peptiden mit aromatischen Seitenketten zusätzlich bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert.

Protokoll 11: Kaiser-Test

Der quantitative Umsatz der Kupplungsreaktionen kann mittels Kaiser-Test kontrolliert werden. In einem Reagenzglas werden dazu 2-3 Tropfen der Lösungen 1-3 zu einer geringen Menge des Synthescharzes gegeben. Die Lösung wird für etwa 5 min auf ca. 100°C erhitzt. Verfärben sich das Synthescharz und die Lösung blau (positive Reaktion) ist die Kupplung nicht quantitativ verlaufen. Bleiben beide farblos bis leicht gelblich (negative Reaktion) ist die Kupplung beendet.

Lösung 1: 5 g Ninhydrin in 100 mL Ethanol

Lösung 2: 80 g Phenol in 20 mL Ethanol

Lösung 3: 2 mL 0,001 M wässrige KCN in 98 mL Pyridin

6.3 Synthese der Peptide

H-TRLFVS-OH (8)

$C_{33}H_{55}N_9O_9$ (721,86 g/mol)

Die Synthese erfolgt an Fmoc-Ser(*t*Bu)-beladenem 2-Chlortrityl-Harz (125 mg, 100 μ mol, Beladung: 0,8 mmol/g). Nach Aufbau der linearen Sequenz und Entschützung des N-Terminus wird das Peptid nach Protokoll 10 unter gleichzeitiger Spaltung vom Harz entschützt. Die Reinigung über RP-HPLC erfolgt mit Methode C.

Ausbeute: 22 mg, 30 μ mol (53 %)

HPLC_{analyt.} (Methode A): $t_R = 13,4$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 722,42 [M+H]⁺; 744,40 [M+Na]⁺; 760,38 [M+K]⁺

gemessen: 722,61 [M+H]⁺; 744,59 [M+Na]⁺; 760,58 [M+K]⁺;

766,60 [M+2Na-H]⁺

c(tRLFVS) (9)

$C_{33}H_{53}N_9O_8$ (703,85 g/mol)

Die Synthese des linearen Vorläufers des Cyclopeptids erfolgt am 2-Chlortrityl-Harz mit C-terminalem Fmoc-Leucin (100 mg, 100 μ mol, Beladung: 1 mmol/g). Die Cyclisierung wird nach Protokoll 4 durchgeführt.

Ausbeute: 8 mg, 11 μ mol (11 %)

HPLC_{analyt.} (Methode A): $t_R = 13,9$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 99

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 704,41 [M+H]⁺; 726,39 [M+Na]⁺; 742,37 [M+K]⁺

gemessen: 704,46 [M+H]⁺; 726,43 [M+Na]⁺; 760,42 [M+K]⁺

c(TRLFvS) (10)

$C_{33}H_{53}N_9O_8$ (703,85 g/mol)

Synthese: analog zu Peptid (9)

Ausbeute: 12 mg, 17 μmol (17 %)

HPLC_{analyt.}(Methode A): $t_R = 14,2$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 98

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 704,41 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 726,39 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 742,37 $[\text{M}+\text{K}]^+$

gemessen: 704,76 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 726,71 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 760,71 $[\text{M}+\text{K}]^+$

c(TRIFVS) (11)

$\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_8$ (703,85 g/mol)

Synthese: analog zu Peptid (9), jedoch mit C-terminalem Fmoc-D-Leucin

Ausbeute: 15 mg, 21 μmol (21 %)

HPLC_{analyt.}(Methode A): $t_R = 14,0$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 97

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 704,41 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 726,39 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 742,37 $[\text{M}+\text{K}]^+$

gemessen: 704,24 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 726,21 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 760,25 $[\text{M}+\text{K}]^+$

H-TFKLSE-OH (12)

$\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_{11}$ (723,83 g/mol)

Das lineare Peptid H-TFKLSE-OH wird mit 125 mg Fmoc-Glu(O β Bu)-beladenem 2-Chlortri-tyl-Harz (100 μmol , Beladung: 0,8 mmol/g) synthetisiert. Nach Beendigung der Synthese wird das Peptid nach Protokoll 10 gespalten und nach Methode C über RP-HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 38 mg, 53 μmol (53 %)

HPLC_{analyt.}(Methode A): $t_R = 12,4$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 724,39 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 746,37 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 762,34 $[\text{M}+\text{K}]^+$

gemessen: 724,60 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 746,57 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 762,54 $[\text{M}+\text{K}]^+$;

768,57 $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$; 784,50 $[\text{M}+\text{K}+\text{Na}-\text{H}]^+$

c(tFKLSE) (13) $C_{33}H_{51}N_7O_{10}$ (705,82 g/mol)

on-resin-Cyclisierung: Das lineare Peptid H-tFKLSE-ODmab wird mit 115 mg (80 μ mol) Fmoc-Glu(O-2-Chlortritylharz)-ODmab (Beladung: 0,7 mmol/g) synthetisiert. Nach Aufbau der linearen Sequenz wird die Dmab-Schutzgruppe nach Protokoll 5 gespalten. Nach der Cyclisierung am Harz nach Protokoll 7 erfolgt die Spaltung vom Harz unter Verwendung von Protokoll 10. Die präparative Reinigung über RP-HPLC mit Methode C liefert das Produkt.

Ausbeute: 5 mg, 7 μ mol (9 %)

HPLC_{analyt.} (Methode B): $t_R = 12,7$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 96

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 706,38 [M+H]⁺; 728,36 [M+Na]⁺; 790,31 [M+K]⁺

gemessen: 706,56 [M+H]⁺; 728,62 [M+Na]⁺; 744,56 [M+K]⁺;

750,62 [M+2Na-H]⁺

Lösungscyclisierung: Das lineare Peptid wird am Fmoc-Leucin-beladenen Harz aufgebaut (100 mg, 100 μ mol, Beladung: 1,0 mmol/g). Nach Beendigung der Synthese wird das geschützte Peptid nach Protokoll 9 B vom Harz gespalten. Die Cyclisierung nach Protokoll 4 unter nochmaligem Zusatz von Kupplungsreagenz liefert nach 48 h und Spaltung der permanenten Schutzgruppen mittels Protokoll 10 das Rohprodukt des Cyclopeptids. Nach präparativer Aufreinigung über RP-HPLC mit Methode C wird das Produkt erhalten.

Ausbeute: 23 mg, 33 μ mol (33 %)

HPLC_{analyt.} (Methode B): $t_R = 12,6$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 98

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 706,38 [M+H]⁺; 728,36 [M+Na]⁺; 790,31 [M+K]⁺

gemessen: 706,63 [M+H]⁺; 728,70 [M+Na]⁺; 744,66 [M+K]⁺;

750,70 [M+2Na-H]⁺; 766,64 [M+K+Na-H]⁺;

c(TfKLSE) (14) $C_{33}H_{51}N_7O_{10}$ (705,82 g/mol)*on-resin-Cyclisierung*: analog Peptid (13)**Ausbeute**: 1 mg, 1 μ mol (2 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B)**: $t_R = 13,0$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 98**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z***:berechnet: 706,38 [M+H]⁺; 728,36 [M+Na]⁺; 790,31 [M+K]⁺gemessen: 706,69 [M+H]⁺; 728,68 [M+Na]⁺; 744,66 [M+K]⁺*Lösungscyclisierung*: analog Peptid (13)**Ausbeute**: 21 mg, 30 μ mol (30 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B)**: $t_R = 13,8$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 98**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z***:berechnet: 706,38 [M+H]⁺; 728,36 [M+Na]⁺; 790,31 [M+K]⁺gemessen: 706,37 [M+H]⁺; 728,15 [M+Na]⁺; 744,12 [M+K]⁺**c(TFkLSE) (15)** $C_{33}H_{51}N_7O_{10}$ (705,82 g/mol)*on-resin-Cyclisierung*: analog Peptid (13)**Ausbeute**: 6 mg, 9 μ mol (11 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B)**: $t_R = 13,5$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 99**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z***:berechnet: 706,38 [M+H]⁺; 728,36 [M+Na]⁺; 790,31 [M+K]⁺gemessen: 706,26 [M+H]⁺; 728,29 [M+Na]⁺; 744,30 [M+K]⁺;750,29 [M+2Na-H]⁺

c(TFKISE) (16) $C_{33}H_{51}N_7O_{10}$ (705,82 g/mol)*on-resin-Cyclisierung*: analog Peptid (13)**Ausbeute**: 0 mg, 0 μ mol (- %)**HPLC_{analyt.}(Methode B)**: $t_R = -$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: -**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z***:berechnet: 706,38 [M+H]⁺; 728,36 [M+Na]⁺; 790,31 [M+K]⁺

gemessen: -

Lösungscyclisierung: analog Peptid (13), jedoch ausgehend von Fmoc-Threonin-beladenem 2-Chlortrityl-Harz**Ausbeute**: 14 mg, 20 μ mol (20 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B)**: $t_R = 12,0$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 99**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z***:berechnet: 706,38 [M+H]⁺; 728,36 [M+Na]⁺; 790,31 [M+K]⁺gemessen: 706,71 [M+H]⁺; 728,73 [M+Na]⁺; 744,70 [M+K]⁺;750,70 [M+2Na-H]⁺**H-LSETTL-OH (17)** $C_{28}H_{50}N_6O_{12}$ (662,75 g/mol)

Das lineare Peptid H-LSETTL-OH wird mit 100 mg (100 μ mol) Fmoc-Leucin-2-Chlortrityl-Harz (Beladung: 1,0 mmol/g) synthetisiert. Nach Beendigung der Synthese wird das Peptid nach Protokoll 10 gespalten und nach Methode C über RP-HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 12 mg, 18 μ mol (18 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B)**: $t_R = 13,1$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 96

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:berechnet: 663,36 [M+H]⁺; 685,34 [M+Na]⁺; 701,31 [M+K]⁺gemessen: 663,22 [M+H]⁺; 685,22 [M+Na]⁺; 701,14 [M+K]⁺;707,14 [M+2Na-H]⁺; 718,15 [M+K+Na-H]⁺**c(LSETtL) (18)**C₂₈H₄₈N₆O₁₁ (644,73 g/mol)

on-resin-Cyclisierung: Das lineare Peptid H-TtLLSE-ODmab wird mit 115 mg (80 µmol) Fmoc-Glu-ODmab-beladenem 2-Chlortrityl-Harz (Beladung: 0,7 mmol/g) synthetisiert. Nach Aufbau der linearen Sequenz wird die Dmab-Schutzgruppe mit Hydrazin nach Protokoll 5 entfernt. Nach der Cyclisierung am Harz mittels Protokoll 7, weiterem Zusatz von Kupplungsreagenz nach 20 h und Beendigung der Cyclisierung nach 48 h erfolgt die Spaltung vom Harz unter Verwendung von Protokoll 10. Die präparative Reinigung über RP-HPLC mit Methode C liefert das Produkt.

Ausbeute: 3 mg, 5 µmol (6 %)**HPLC**_{analyt.} (**Methode B**): t_R = 14,3 min**Reinheit**_{HPLC} (%): 98**MALDI-ToF-MS**_{monoisotopisch} *m/z*:berechnet: 645,74 [M+H]⁺; 667,72 [M+Na]⁺; 683,83 [M+K]⁺gemessen: 645,87 [M+H]⁺; 667,83 [M+Na]⁺; 683,84 [M+K]⁺;689,87 [M+2Na-H]⁺; 705,86 [M+K+Na-H]⁺

Lösungscyclisierung: Das lineare Peptid H-LSETtL-OH wird am Fmoc-Leucin-beladenen Harz aufgebaut (100 mg, 100 µmol, Beladung: 1,0 mmol/g). Nach Beendigung der Synthese wird das geschützte Peptid mit Protokoll 9 B vom Harz gespalten. Die Cyclisierung nach Protokoll 4 liefert nach Spaltung der permanenten Schutzgruppen mittels Protokoll 10 das Rohprodukt des Cyclopeptids. Nach präparativer Aufreinigung über RP-HPLC mit Methode C wird das Produkt erhalten.

Ausbeute: 12 mg, 19 µmol (19 %)**HPLC**_{analyt.} (**Methode B**): t_R = 16,0 min**Reinheit**_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:berechnet: 645,74 [M+H]⁺; 667,72 [M+Na]⁺; 683,83 [M+K]⁺gemessen: 667,55 [M+Na]⁺; 683,51 [M+K]⁺**c(LSETTl) (19)**C₂₈H₄₈N₆O₁₁ (644,73 g/mol)*on-resin-Cyclisierung*: analog Peptid (18)**Ausbeute**: 2 mg, 3 μmol (4 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B)**: t_R = 14,9 min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 99**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:**berechnet: 645,74 [M+H]⁺; 667,72 [M+Na]⁺; 683,83 [M+K]⁺gemessen: 645,73 [M+H]⁺; 667,74 [M+Na]⁺; 683,71 [M+K]⁺*Lösungscyclisierung*: analog Peptid (18), jedoch mit C-terminalem Fmoc-D-Leucin**Ausbeute**: 30 mg, 46 μmol (46 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B)**: t_R = 14,0 min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 100**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:**berechnet: 645,74 [M+H]⁺; 667,72 [M+Na]⁺; 683,83 [M+K]⁺gemessen: 645,93 [M+H]⁺; 668,01 [M+Na]⁺; 683,94 [M+K]⁺;689,89 [M+2Na-H]⁺**c(ISETTL) (20)**C₂₈H₄₈N₆O₁₁ (644,73 g/mol)*on-resin-Cyclisierung*: analog Peptid (18)**Ausbeute**: - mg, - μmol (- %)**HPLC_{analyt.}(Methode B)**: t_R = - min**Reinheit_{HPLC} (%)**: -**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:**berechnet: 645,74 [M+H]⁺; 667,72 [M+Na]⁺; 683,83 [M+K]⁺

gemessen: -

Lösungszyklisierung: analog Peptid (**18**)

Ausbeute: 18 mg, 28 μmol (28 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 15,4$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 645,74 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 667,72 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 683,83 $[\text{M}+\text{K}]^+$

gemessen: 645,76 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 667,76 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 683,69 $[\text{M}+\text{K}]^+$;

689,70 $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$

c(LsETTL) (21)

$\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_{11}$ (644,73 g/mol)

on-resin-Cyclisierung: analog Peptid (**18**)

Ausbeute: 1 mg, 2 μmol (2 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = -$ min

Reinheit_{HPLC} (%): -

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 645,74 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 667,72 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 683,83 $[\text{M}+\text{K}]^+$

gemessen: -

Lösungszyklisierung: analog Peptid (**18**)

Ausbeute: 18 mg, 28 μmol (28 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 16,2$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 98

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 645,74 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 667,72 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 683,83 $[\text{M}+\text{K}]^+$

gemessen: 645,92 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 667,47 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 683,41 $[\text{M}+\text{K}]^+$

H-TTLEYY-OH (22)

$C_{37}H_{52}N_6O_{13}$ (788,86 g/mol)

Das lineare Peptid H-TTLEYY-OH wird ausgehend von 110 mg (100 μ mol) Fmoc-Tyr(*t*Bu)-2-Chlortrityl-Harz (Beladung: 0,9 mmol/g) synthetisiert. Nach Beendigung der Synthese wird das Peptid nach Protokoll 10 abgespalten und nach Methode D über RP-HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 12 mg, 15 μ mol (15 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 13,4$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:

berechnet: 789,37 [M+H]⁺; 811,35 [M+Na]⁺; 827,32 [M+K]⁺

gemessen: 789,02 [M+H]⁺; 811,09 [M+Na]⁺; 827,09 [M+K]⁺;

833,11 [M+2Na-H]⁺; 849,08 [M+K+Na-H]⁺

c(tTLEYY) (23)

$C_{37}H_{50}N_6O_{12}$ (770,85g/mol)

Das lineare Vorläuferpeptid H-EYYtTL-OH wird mit 100 mg (100 μ mol) Fmoc-Leucin-2-Chlortrityl-Harz (Beladung: 1,0 mmol/g) synthetisiert. Nach Beendigung der Synthese wird das lineare, geschützte Peptid nach Protokoll 9 A vom Harz gespalten. Die Cyclisierung nach Protokoll 4 liefert nach Spaltung der permanenten Schutzgruppen mit Reagenz K das Rohprodukt. Dieses wird mit Methode D über RP-HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 9 mg, 12 μ mol (12 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 10,6$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 98

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:

berechnet: 771,36 [M+H]⁺; 793,34 [M+Na]⁺; 809,31 [M+K]⁺

gemessen: 771,65 [M+H]⁺; 793,04 [M+Na]⁺; 809,08 [M+K]⁺

c(TtLEYY) (24)

$C_{37}H_{50}N_6O_{12}$ (770,85g/mol)

Synthese: analog Peptid (23)

Ausbeute: 5 mg, 7 μ mol (7 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 10,8$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 771,36 [M+H]⁺; 793,34 [M+Na]⁺; 809,31 [M+K]⁺

gemessen: 770,70 [M+H]⁺; 792,73 [M+Na]⁺; 808,77 [M+K]⁺;

830,81 [M+K+Na-H]⁺

c(TTIEYY) (25)

C₃₇H₅₀N₆O₁₂ (770,85 g/mol)

Synthese: analog Peptid (**23**), jedoch mit Fmoc-D-Leucin am C-Terminus

Ausbeute: 5 mg, 7 μ mol (7 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 10,8$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 771,36 [M+H]⁺; 793,34 [M+Na]⁺; 809,31 [M+K]⁺

gemessen: 771,39 [M+H]⁺; 793,45 [M+Na]⁺; 809,48 [M+K]⁺

H-TFQLST-OH (26)

C₃₁H₄₉N₇O₁₁ (695,78 g/mol)

Das lineare Peptid (**26**) wird an Fmoc-Thr(*t*Bu)-beladenem 2-Chlortrityl-Harz (125 mg; 100 μ mol; Beladung: 0,8 mmol/g) synthetisiert. Nach Aufbau der linearen Sequenz wird das Peptid mit Protokoll 10 vom Harz gespalten und mit Methode D über RP-HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 19 mg, 27 μ mol (27 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 12,8$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 696,36 [M+H]⁺; 718,34 [M+Na]⁺; 734,31 [M+K]⁺

gemessen: 696,59 [M+H]⁺; 718,59 [M+Na]⁺; 734,68 [M+K]⁺;

740,65 [M+2Na-H]⁺

c(TFQLsT) (27) $C_{31}H_{47}N_7O_{10}$ (677,76 g/mol)

Das lineare Vorläuferpeptid von (27) wird an Fmoc-Leucin-beladenem 2-Chlortrityl-Harz (100 mg; 100 μ mol; Beladung: 1,0 mmol/g) synthetisiert. Nach Aufbau der linearen Sequenz wird das Peptid mit Protokoll 9 A vom Harz gespalten und in Lösung nach Protokoll 4 cyclisiert. Das nach Protokoll 10 entschützte Peptid wird mit Methode D über RP-HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 12 mg, 18 μ mol (18 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** $t_R = 12,7$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 95**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z:**berechnet: 678,35 [M+H]⁺; 700,33 [M+Na]⁺; 716,30 [M+K]⁺gemessen: 678,35 [M+H]⁺; 700,37 [M+Na]⁺; 716,36 [M+K]⁺**c(TFQLSt) (28)** $C_{31}H_{47}N_7O_{10}$ (677,76 g/mol)

Synthese: analog Peptid (27)

Ausbeute: 16 mg, 24 μ mol (24 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** $t_R = 12,9$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 94**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z:**berechnet: 678,35 [M+H]⁺; 700,33 [M+Na]⁺; 716,30 [M+K]⁺gemessen: 678,69 [M+H]⁺; 700,64 [M+Na]⁺; 716,61 [M+K]⁺**c(tFQLST) (29)** $C_{31}H_{47}N_7O_{10}$ (677,76 g/mol)

Synthese: analog Peptid (27)

Ausbeute: 11 mg, 16 μ mol (16 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** $t_R = 12,9$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 93

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:berechnet: 678,35 [M+H]⁺; 700,33 [M+Na]⁺; 716,30 [M+K]⁺gemessen: 678,46 [M+H]⁺; 700,49 [M+Na]⁺; 716,45 [M+K]⁺**H-LSTRTL-OH (30)**C₂₉H₅₅N₉O₁₀ (689,82 g/mol)

Synthese: analog Peptid (22)

Ausbeute: 23 mg, 33 μmol (33 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** t_R = 11,8 min**Reinheit_{HPLC} (%):** 98**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:**berechnet: 690,42 [M+H]⁺; 712,40 [M+Na]⁺; 728,37 [M+K]⁺gemessen: 690,64 [M+H]⁺; 712,62 [M+Na]⁺**c(ISTRTL) (31)**C₂₉H₅₃N₉O₉ (671,80g/mol)

Das lineare Vorläuferpeptid wird an Fmoc-Leucin-beladenem 2-Chlortrityl-Harz (100 mg; 100 μmol; Beladung: 1,0 mmol/g) synthetisiert. Nach Aufbau der linearen Sequenz wird das Peptid mit Protokoll 9 A vom Harz gespalten und in Lösung nach Protokoll 4 cyclisiert. Das nach Protokoll 10 entschlützte Peptid wird mit Methode D über RP-HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 13 mg, 19 μmol (33 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** t_R = 15,2 min**Reinheit_{HPLC} (%):** 97**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:**berechnet: 672,40 [M+H]⁺; 694,39 [M+Na]⁺; 710,36 [M+K]⁺gemessen: 672,73 [M+H]⁺; 694,72 [M+Na]⁺**c(LsTRTL) (32)**C₂₉H₅₃N₉O₉ (671,80g/mol)

Synthese: analog Peptid (31)

Ausbeute: 16 mg, 24 μmol (33 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 15,2$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 672,40 [M+H]⁺; 694,39 [M+Na]⁺; 710,36 [M+K]⁺

gemessen: 673,00 [M+H]⁺; 695,03 [M+Na]⁺; 711,00 [M+K]⁺

c(LStRTL) (33)

C₂₉H₅₃N₉O₉ (671,80g/mol)

Synthese: analog Peptid (31)

Ausbeute: 14 mg, 21 μmol (21 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 14,7$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 99

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 672,40 [M+H]⁺; 694,39 [M+Na]⁺; 710,36 [M+K]⁺

gemessen: 672,74 [M+H]⁺; 694,73 [M+Na]⁺; 710,73 [M+K]⁺

H-RTL PFS-OH (34)

C₃₃H₅₃N₉O₉ (719,85 g/mol)

Das lineare Peptid (34) wird mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-2-Chlortrityl-Harz (125 mg, 100 μmol, Belastung: 0,8 mmol/g) synthetisiert. Nach Aufbau der linearen Sequenz wird das Peptid vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der permanenten Schutzgruppen nach Protokoll 10 gespalten. Die Reinigung über RP-HPLC mit Methode D liefert das Produkt.

Ausbeute: 49 mg, 68 μmol (68 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 12,7$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 720,40 [M+H]⁺; 742,39 [M+Na]⁺; 758,36 [M+K]⁺

gemessen: 720,71 [M+H]⁺; 742,68 [M+Na]⁺; 758,63 [M+K]⁺;

764,68 [M+2Na-H]⁺; 780,62 [M+2Na-H]⁺

c(RTLPFS) (35) $C_{33}H_{51}N_9O_8$ (701,83g/mol)

Das lineare Vorläuferpeptid von (35) wird ausgehend von Fmoc-Prolin-2-Chlortrityl-Harz (145 mg, 100 μ mol, Beladung: 0,7 mmol/g) synthetisiert. Nach Aufbau der linearen Sequenz wird das Peptid vom Harz unter Verwendung von Protokoll 9 A gespalten und nach Protokoll 4 cyclisiert. Die Entfernung der permanenten Schutzgruppen nach Protokoll 10 und Reinigung über RP-HPLC mit Methode C liefert das Produkt.

Ausbeute: 22 mg, 31 μ mol (31 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** $t_R = 15,3$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 100**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z:**berechnet: 702,39 [M+H]⁺; 724,38 [M+Na]⁺; 740,35 [M+K]⁺gemessen: 702,13 [M+H]⁺; 724,14 [M+Na]⁺; 740,26 [M+K]⁺**c(RtLPFS) (36)** $C_{33}H_{51}N_9O_8$ (701,83g/mol)

Synthese: analog Peptid (35)

Ausbeute: 20 mg, 29 μ mol (29 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** $t_R = 16,0$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 100**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z:**berechnet: 702,39 [M+H]⁺; 724,38 [M+Na]⁺; 740,35 [M+K]⁺gemessen: 702,56 [M+H]⁺; 724,53 [M+Na]⁺; 740,51 [M+K]⁺**c(RTIPFS) (37)** $C_{33}H_{51}N_9O_8$ (701,83g/mol)

Synthese: analog Peptid (35)

Ausbeute: 24 mg, 34 μ mol (29 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** $t_R = 15,4$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :berechnet: 702,39 [M+H]⁺; 724,38 [M+Na]⁺; 740,35 [M+K]⁺gemessen: 702,47 [M+H]⁺; 724,43 [M+Na]⁺; 740,48 [M+K]⁺**H-FLHTRLFV-OH (38)**C₅₁H₇₇N₁₃O₁₀ (1032,27 g/mol)

Die Synthese des linearen Ausgangspeptids (**38**) erfolgt an Fmoc-Valin-2-Chlortrityl-Harz (110 mg; 100 μM; Beladung: 0,9 mmol/g). Zur Komplettierung der Kupplungen werden die Aminosäuren Fmoc-Phe-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH doppelt gekuppelt. Nach der Spaltung des Peptids mit Protokoll 10 erfolgt die Aufreinigung mit Methode C über RP-HPLC.

Ausbeute: 31 mg, 30 μmol (29 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** t_R = 15,7 min**Reinheit_{HPLC} (%):** 100**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :**berechnet: 1032,60 [M+H]⁺; 1054,58 [M+Na]⁺; 1070,56 [M+K]⁺gemessen: 1033,69 [M+H]⁺; 1055,72 [M+Na]⁺; 1071,73 [M+K]⁺;1077,83 [M+2Na-H]⁺; 1093,70 [M+K+Na-H]⁺;**H-TFKLSETTLEYY-OH (39)**C₇₀H₁₀₃N₁₃O₂₃ (1494,68 g/mol)

Das Ausgangspeptid (**39**) wird an 110 mg (100 μmol) Fmoc-Tyr(*t*Bu)-2-Chlortrityl-Harz (Beladung: 0,9 mmol/g) synthetisiert. Zur Komplettierung der einzelnen Kupplungsschritte vor allem der Threoninreste wird jede Aminosäure doppelt gekuppelt. Die Kupplung wird analog zu Stufe 4 in Tabelle 8 durchgeführt, jedoch werden die Reagenzien in 20 % DMSO in DMF gelöst. Vor dem Kupplungsschritt wird das Harz mit 20 % DMSO in DMF intensiv gewaschen (4 x 5 mL, 5 min). Das Peptid wird anschließend mit Reagenz K nach Protokoll 10 gespalten und mit Methode D aufgereinigt.

Ausbeute: 5 mg, 3 μmol (3 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** t_R = 14,5 min**Reinheit_{HPLC} (%):** 98

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :berechnet: 1494,74 [M+H]⁺; 1516,72 [M+Na]⁺; 1532,69 [M+K]⁺gemessen: 1494,01 [M+H]⁺; 1516,07 [M+Na]⁺; 1532,20 [M+K]⁺;1538,23 [M+2Na-H]⁺; 1554,19 [M+K+Na-H]⁺**H-TFKLSETTL-OH (44)**C₄₇H₇₈N₁₀O₁₆ (1039,21 g/mol)

Das Peptid (**44**) wird an Fmoc-Leucin-beladenem 2-Chlortrityl-Harz (100 mg, 100 µmol, Beladung: 100 mmol/g) aufgebaut, wobei die Kupplungen mit Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH zweimal durchgeführt werden. Die Spaltung nach Protokoll 10 und Aufreinigung mit Methode D liefert das Produkt.

Ausbeute: 16 mg, 15 µmol (15 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** $t_R = 14,4$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 95**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :**berechnet: 1039,57 [M+H]⁺; 1061,55 [M+Na]⁺; 1077,52 [M+K]⁺gemessen: 1040,29 [M+H]⁺; 1062,32 [M+Na]⁺; 1078,36 [M+K]⁺;1084,38 [M+2Na-H]⁺; 1106,57 [M+3Na-2H]⁺**H-TFQLSTRTPFS-OH (40)**C₆₄H₁₀₀N₁₆O₁₉ (1397,61 g/mol)

Die Synthese des Ausgangspeptids H-TFQLSTRTPFS-OH (**40**) erfolgt an Fmoc-Ser(*t*Bu)-2-Chlortrityl-Harz (125 mg, 100 µmol, Beladung: 0,8 mmol/g). Es werden alle Aminosäuren doppelt gekuppelt. Die Spaltung nach Protokoll 10 mit Reagenz K liefert nach Aufreinigung mit Methode D das Produkt.

Ausbeute: 12 mg, 8 µmol (8 %)**HPLC_{analyt.}(Methode B):** $t_R = 15,4$ min**Reinheit_{HPLC} (%)**: 98

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:berechnet: 1397,74 [M+H]⁺; 1419,72 [M+Na]⁺; 1435,70 [M+K]⁺gemessen: 1397,63 [M+H]⁺; 1419,70 [M+Na]⁺; 1435,65 [M+K]⁺;1441,69 [M+2Na-H]⁺; 1457,73 [M+K+Na-H]⁺**H-TFQLSTRTL-OH (45)**C₄₇H₇₉N₁₃O₁₅ (1066,24 g/mol)

Synthese: analog zu Peptid (44)

Ausbeute: 15 mg, 14 μmol (14 %)**HPLC_{analyt.} (Methode B):** t_R = 14,2 min**Reinheit_{HPLC} (%):** 97**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:**berechnet: 1066,59 [M+H]⁺; 1088,57 [M+Na]⁺; 1104,55 [M+K]⁺gemessen: 1067,50 [M+H]⁺; 1089,55 [M+Na]⁺; 1105,51 [M+K]⁺;1111,58 [M+2Na-H]⁺**H-HFTLRL-OH (41)**C₃₇H₅₉N₁₁O₈ (785,95 g/mol)

Synthese: analog zu Peptid (38), jedoch mit C-terminalem Fmoc-Leucin

Ausbeute: 47 mg, 60 μmol (60 %)**HPLC_{analyt.} (Methode B):** t_R = 8,5 min**Reinheit_{HPLC} (%):** 100**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:**berechnet: 786,46 [M+H]⁺; 808,44 [M+Na]⁺; 824,42 [M+K]⁺gemessen: 786,18 [M+H]⁺; 808,11 [M+Na]⁺**H-LTYTEFSYLKET-OH (42)**C₇₀H₁₀₃N₁₃O₂₃ (1494,68 g/mol)Synthese: analog zu Peptid (40), jedoch mit Fmoc-Thr(*t*Bu)-2-Chlortrityl-Harz**Ausbeute:** 10 mg, 7 μmol (7 %)**HPLC_{analyt.} (Methode B):** t_R = 14,6 min

Reinheit_{HPLC} (%): 99

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:

berechnet: 1494,74 [M+H]⁺; 1516,72 [M+Na]⁺; 1532,69 [M+K]⁺

gemessen: 1494,70 [M+H]⁺; 1516,67 [M+Na]⁺; 1532,87 [M+K]⁺;

1538,74 [M+2Na-H]⁺; 1554,82 [M+K+Na-H]⁺;

1560,85 [M+3Na-2H]⁺; 1577,12 [M+K+2Na-2H]⁺

H-TSFTPLRFTSQL-OH (43)

C₆₄H₁₀₀N₁₆O₁₉ (1397,61 g/mol)

Synthese: analog zu Peptid (40), jedoch mit Fmoc-Leu-2-Chlortrityl-Harz

Ausbeute: 48 mg, 45 μmol (45 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): t_R = 16,1 min

Reinheit_{HPLC} (%): 98

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:

berechnet: 1397,74 [M+H]⁺; 1419,72 [M+Na]⁺; 1435,70 [M+K]⁺

gemessen: 1396,36 [M+H]⁺; 1418,29 [M+Na]⁺; 1434,64 [M+K]⁺;

1440,30 [M+2Na-H]⁺

c(SETTIA) (46)

C₂₅H₄₂N₆O₁₁ (602,65 g/mol)

Das lineare Vorläuferpeptid wird an Fmoc-Alanin-2-Chlortrityl-Harz (100 mg, 100 μmol, Beladung: 1 mmol/g) synthetisiert. Nach Aufbau der linearen Sequenz wird das Peptid vom Harz unter Verwendung von Protokoll 9 A gespalten und nach Protokoll 4 cyclisiert. Die Spaltung der permanenten Schutzgruppen nach Protokoll 10 und Reinigung über RP-HPLC mit Methode C liefert das Produkt.

Ausbeute: 10 mg, 17 μmol (17 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): t_R = 12,7 min

Reinheit_{HPLC} (%): 98

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:

berechnet: 603,30 [M+H]⁺; 625,28 [M+Na]⁺; 641,25 [M+K]⁺

gemessen: 603,28 [M+H]⁺; 626,27 [M+Na]⁺; 642,27 [M+K]⁺

c(ETTILA) (47) $C_{28}H_{48}N_6O_{10}$ (628,73 g/mol)

Synthese: analog Peptid (46)

Ausbeute: 9 mg, 14 μ mol (14 %)**HPLC_{analyt.} (Methode A):** $t_R = 16,6$ min**Reinheit_{HPLC} (%):** 95**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :**berechnet: 629,35 [M+H]⁺; 651,33 [M+Na]⁺; 667,31 [M+K]⁺gemessen: 629,35 [M+H]⁺; 651,50 [M+Na]⁺; 667,52 [M+K]⁺**c(TTILSA) (48)** $C_{26}H_{46}N_6O_9$ (586,69 g/mol)

Synthese: analog Peptid (46)

Ausbeute: 13 mg, 22 μ mol (22 %)**HPLC_{analyt.} (Methode B):** $t_R = 15,2$ min**Reinheit_{HPLC} (%):** 100**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :**berechnet: 587,34 [M+H]⁺; 609,32 [M+Na]⁺; 625,30 [M+K]⁺gemessen: 587,80 [M+H]⁺; 609,83 [M+Na]⁺; 625,84 [M+K]⁺**c(TILSEA) (49)** $C_{27}H_{46}N_6O_{10}$ (614,70 g/mol)

Synthese: analog Peptid (46)

Ausbeute: 12 mg, 20 μ mol (20 %)**HPLC_{analyt.} (Methode B):** $t_R = 15,2$ min**Reinheit_{HPLC} (%):** 100**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :**berechnet: 615,34 [M+H]⁺; 637,32 [M+Na]⁺; 653,29 [M+K]⁺gemessen: 615,75 [M+H]⁺; 637,74 [M+Na]⁺; 653,76 [M+K]⁺

c(ILSETA) (50)

$C_{27}H_{46}N_6O_{10}$ (614,70 g/mol)

Synthese: analog Peptid (46)

Ausbeute: 8 mg, 13 μ mol (13 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 15,8$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 615,34 [M+H]⁺; 637,32 [M+Na]⁺; 653,29 [M+K]⁺

gemessen: 615,47 [M+H]⁺; 637,59 [M+Na]⁺; 653,66 [M+K]⁺

c(SETTaL) (51)

$C_{25}H_{42}N_6O_{11}$ (602,65 g/mol)

Synthese: analog Peptid (46), jedoch mit C-terminalem Fmoc-Leucin

Ausbeute: 15 mg, 25 μ mol (13 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 11,5$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 95

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 603,30 [M+H]⁺; 625,28 [M+Na]⁺; 641,25 [M+K]⁺

gemessen: 603,42 [M+H]⁺; 625,54 [M+Na]⁺; 641,57 [M+K]⁺

c(K(Linker)SETTI) (52)

$C_{38}H_{66}N_9O_{15}$ (889,01 g/mol)

Die Synthese des Linker-verknüpften Peptids (52) erfolgt am 2-Chlortrityl-Harz mit C-terminalem D-Leucin (100 mg, 100 μ mol, Beladung: 1 mmol/g). Nach Aufbau der linearen Sequenz unter Verwendung von Fmoc-Lysin[Linker(Boc)]-OH und Abspalten des geschützten linearen Peptids nach Protokoll 9 B erfolgt die Cyclisierung nach Protokoll 4. Nach der Aufreinigung des entschützten Peptids mit Methode E über RP-HPLC wird das Produkt erhalten.

Ausbeute: 5 mg, 6 μ mol (6 %)

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 11,2$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:berechnet: 889,48 [M+H]⁺; 911,46 [M+Na]⁺; 927,43 [M+K]⁺gemessen: 889,22 [M+H]⁺; 911,16 [M+Na]⁺; 926,99 [M+K]⁺

6.4 Synthese der Histidin-enthaltenden Cyclopeptide

6.4.1 Synthese des Dmab-Linkers

6.4.1.1 Glutarsäure-mono-*tert*-butylester (I)

Zu einer Suspension von 6,84 g (0,06 mol) Glutarsäureanhydrid in 60 mL Toluol werden 3,4 g (0,3 mol) NHS und 1,17 g (0,01 mol) DMAP gegeben. Anschließend werden 28 mL (0,3 mol) *tert*-Butanol sowie 4,2 mL (0,03 mol) Triethylamin zugesetzt. Es wird für 1 d unter Rückfluss erhitzt.

Nach dem Erkalten wird die Lösung eingeeengt, in 30 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 10%iger Zitronensäure gewaschen. Danach wird einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Flashchromatografie (Petrolether:Ethylacetat = 3:1) ergibt das Produkt als leicht gelbliches Öl.

Ausbeute: 4,66 g; 24,8 mmol (41 %)

Summenformel: C₉H₁₆O₄

Molmasse: 188,23 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,92 (m, 2H, CH₂), 2,30 (t, 2H, ³J = 7,3 Hz, CH₂COO*t*Bu), 2,42 (t, 2H, ³J = 7,3 Hz, CH₂COOH), 10,23 (s_{br}, 1H, COOH)

IR (KBr): ν = 2979, 2935, 1728, 1456, 1417, 1392, 1369, 1319, 1253, 1151, 1054 cm⁻¹

6.4.1.2 5-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-5-hydroxy-pentansäure-*tert*-butylester (II)

4,2 g (30 mmol) Dimedon werden in 15 mL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wird eine Mischung aus 4,6 g (24,5 mmol) Glutarsäure-mono-*tert*-butylester und 3,8 mL (24,5 mmol) DIC gelöst in 15 mL DMF getropft. Zu der Reaktionsmischung werden weitere 3 g (21 mmol) Dimedon in 15 mL DMF gegeben. Es wird unter Argon bei Raumtemperatur 24 h gerührt.

Nach den Einengen im Vakuum wird der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit 1 M KHSO_4 -Lösung und fünfmal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung extrahiert. Die vereinigten NaHCO_3 -Phasen werden dreimal mit DCM ausgeschüttelt. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen über NaSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Abschließende Säulenchromatografie (Petrolether: Ethylacetat = 2:1) ergibt das Produkt als oranges Öl. Die Umkristallisation aus Petrolether mit wenig Ethylacetat ergibt gelbe Kristalle.

Ausbeute: 6,02 g; 19,4 mmol (79 %)

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_5$

Molmasse: 310,39 g/mol

Schmelzpunkt: 45°C

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1,08 (s, 6H, CH_3), 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) 1,92 (m, 2H, CH_2), 2,30 (t, 2H, $^3J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{COO}t\text{Bu}$), 2,35 (s, 2H, COCH_2), 2,54 (s, 2H, COCH_2), 3,08 (t, 2H, $^3J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 18,11 (s, 1H, OH)

IR (KBr): $\nu = 3317, 2966, 2933, 1730, 1668, 1556, 1452, 1407, 1390, 1367, 1313, 1257, 1147, 1053$ cm^{-1}

6.4.1.3 Route A:

6.4.1.3.1 5-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-5-(4-hydroxymethylphenylamino)-pentansäure-*tert*-butylester (III)

1,14 g (3,7 mmol) II und 0,91 g (7,4 mmol) *p*-Aminobenzylalkohol werden in 15 mL trockenem THF gelöst und zum Sieden erhitzt. Nach 16 h unter Reflux wird die Lösung eingengt und in Ethylacetat aufgenommen. Es wird fünfmal mit 0,5 M KHSO_4 -Lösung extrahiert und die organische Phase anschließend über NaSO_4 getrocknet. Nach dem Einengen ergibt die Säulenchromatografie (Petrolether:Ethylacetat = 1:1) das Produkt als gelbes Pulver.

Ausbeute: 1,14 g; 2,75 mmol (74 %)

Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{NO}_5$

Molmasse: 415,53 g/mol

Schmelzpunkt: 119-120°C

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1,08 (s, 6H, CH₃), 1,35 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,74 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2,21 (t, 2H, ³J = 7,5 Hz, CH₂COO*t*Bu), 2,40 (s, 2H, COCH₂), 2,50 (s, 2H, COCH₂), 2,91 (m, 2H, CH₂C=), 4,74 (s, 2H, CH₂Ph), 7,15 (m, 2H, CH^{arom}), 7,44 (m, 2H, CH^{arom}), 15,00 (s, 1H, NH)

IR (KBr): ν = 3369, 2969, 2952, 2933, 2867, 1726, 1623, 1598, 1579, 1554, 1458, 1413, 1378, 1355, 1334, 1263 1224, 1155, 1054, 1016 cm⁻¹

6.4.1.3.2 (9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-essigsäurefluorid (IV)

Fmoc-Gly-F

1,8 g (6 mmol) Fmoc-Glycin werden in 30 mL trockenem DCM vorgelegt und 1,62 g (12 mmol) Cyanurfluorid zugegeben. Anschließend werden 0,5 mL Pyridin zugesetzt. Es wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wird mit Eiswasser extrahiert und über NaSO₄ getrocknet. Nach dem Einengen wird aus DCM/Petrolether 1:1 umkristallisiert. Es werden weiße Kristalle erhalten.

Ausbeute: 1,21 g; 2,75 mmol (74 %)

Summenformel: C₁₇H₁₄FNO₃

Molmasse: 299,30 g/mol

Schmelzpunkt: 144,6°C (Lit. 134-135°C)^[248]

6.4.1.3.3 5-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden)-5-{4-[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-acetoxymethyl]-phenylamino}-pentansäure-*tert*-butylester (V)

Fmoc-Gly-Dmab(*t*Bu)-Linker

1,2 g (3,0 mmol) III werden in DCM gelöst und 0,81 g (2,7 mmol) Fmoc-Gly-F (IV) zugegeben. Anschließend werden 218 μ L (2,7 mmol) Pyridin zugesetzt. Es wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Danach wird eingengt und über Säulenchromatografie (Petrolether: Ethylacetat = 1:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als gelbe Kristalle erhalten.

Ausbeute: 1,58 g; 2,27 mmol (86 %)

Summenformel: C₄₁H₄₆N₂O₈

Molmasse: 694,83 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1,08 (s, 6H, CH₃), 1,34 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,75 (m, 2H, CH₂), 2,22 (t, 2H, ³J = 7,3 Hz, CH₂COO*t*Bu), 2,40 (s, 2H, COCH₂), 2,49 (s, 2H, COCH₂), 2,91 (m, 2H, CH₂C=), 4,07 (d, 2H, ³J = 5,4 Hz, C ^{α} H₂), 4,24 (t, 1H, ³J = 7,0 Hz, CH^{Fmoc}), 4,42 (d, 2H, ³J = 7,3 Hz, CH₂^{Fmoc}), 5,22 (s, 2H, CH₂Ph), 5,33 (t, 1H, ³J = 5,2 Hz, NHCH₂), 7,18-7,76 (m, 12H, CH^{arom}), 15,09 (s, 1H, NH)

**6.4.1.3.4 5-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-5-{4-[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-acetoxymethyl]-phenylamino}-pentansäure (VI)
Fmoc-Gly-Dmab-Linker**

1,58 g (2,27 mmol) des *tert*-Butylesters **V** werden mit 10 mL Abspaltreagenz (95 % TFA, 2,5 % TIS, 2,5 % Wasser) versetzt und 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Es wird eingeeengt, in Ethylacetat und DCM aufgenommen. Das Produkt fällt als weiße Kristalle aus.

Ausbeute: 0,99 g; 1,87 mmol (68 %)

Summenformel: C₃₇H₃₈N₂O₈

Molmasse: 638,72 g/mol

Schmelzpunkt: 178-179°C

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 0,99 (s, 6H, CH₃), 1,61 (m, 2H, CH₂), 2,10 (t, 2H, ³J = 7,6 Hz, CH₂COOH), 2,38 (s, 4H, COCH₂), 2,83 (t, 2H, ³J = 7,6 Hz, CH₂C=), 3,85 (d, 2H, ³J = 5,5 Hz, C ^{α} H₂), 4,22 (t, 1H, ³J = 6,7 Hz, CH^{Fmoc}), 4,31 (d, 2H, ³J = 6,7 Hz, CH₂^{Fmoc}), 5,17 (s, 2H, CH₂Ph), 7,81 (t, 1H, ³J = 6,0 Hz, NHCH₂), 7,28-7,89 (m, 12H, CH^{arom}), 12,06 (s_{br}, 1H, COOH), 15,01 (s, 1H, NH)

IR (KBr): ν = 3428, 3288, 3073, 2952, 1749, 1728, 1707, 1626, 1580, 1541, 1451, 1407, 1349, 1280, 1251, 1231, 1186, 1047, 1015, 754

6.4.1.3.5 (2S)-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-methyl-pentansäurefluorid (VII)

Fmoc-Leu-F

2,1g (6 mmol) Fmoc-L-Leucin werden in 30 mL DCM vorgelegt und 0,81 g (6 mmol) Cyanurfluorid zugetropft. Zu dieser Mischung werden 0,5 mL (6 mmol) Pyridin gegeben und 4 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt.

Die Reaktionsmischung wird mit Eiswasser versetzt und der Niederschlag abfiltriert. Die organische Phase wird über NaSO_4 getrocknet und eingengt. Das Produkt wird als weiße Kristalle erhalten.

Ausbeute: 2,06 g; 5,9 mmol (98 %)

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{FNO}_3$

Molmasse: 355,41 g/mol

Schmelzpunkt: 96-97°C (Lit. 95-96°C)^[248]

$[\alpha]_{\text{D}}^{30,8}$: -7,0 (c = 1,02 in Ethylacetat)

6.4.1.3.6 (2S)-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-methylpentansäure-4-[4-tert-butoxycarbonyl-1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-butylamino]-benzylester (VIII)

Fmoc-Leu-Dmab(*t*Bu)-Linker

Zu einer Lösung von 1 g (2,41 mmol) III in 30 mL trockenem DCM werden 0,86 g (2,41 mmol) Fmoc-Leu-F und 195 μL (2,41 mmol) Pyridin gegeben. Es wird bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle: Ethylacetat:Petrolether = 1:1) werden weitere 195 μL Pyridin sowie 0,43 g (1,2 mmol) Fmoc-Leu-F zugesetzt und über Nacht weiter gerührt.

Anschließend wird eingengt und über Säulenchromatografie (Ethylacetat:Petrolether = 1:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als weiße Kristalle erhalten.

Ausbeute: 1,66 g; 2,2 mmol (92 %)

Summenformel: $\text{C}_{45}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_8$

Molmasse: 750,94 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0,95 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 1,08 (s, 6H, C(CH₃)₃), 1,34 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,55-1,71 (m, 3H, CH₂C ^{δ} H), 1,75 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2,22 (t, 2H, ³J = 7,6 Hz, CH₂COO*t*Bu), 2,40 (s, 2H, COCH₂), 2,50 (s, 2H, COCH₂), 2,90 (t, 2H, ³J = 7,8 Hz, CH₂C=), 4,22 (t, 1H, ³J = 6,9 Hz, CH^{Fmoc}), 4,41 (d, 2H, ³J = 6,9 Hz, CH₂^{Fmoc}), 4,46 (m, 1H, C ^{α} H), 5,16-5,22 (m, 3H, CH₂Ph, N ^{α} H), 7,16-7,77 (m, 12H, CH^{arom}), 15,08 (s, 1H, NH)

6.4.1.3.7 (2S)-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-methyl-pentansäure-4-[4-carboxy-1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-butylamino]-benzylester (IX)

Fmoc-Leu-Dmab-Linker

1,5 g (2 mmol) **VIII** werden mit einer Mischung aus 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % Wasser versetzt und 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Es wird im Hochvakuum getrocknet. Das gelbliche Rohprodukt wird direkt bei der Harzbeladung weiter eingesetzt.

Ausbeute: 1,59 g (verunreinigt)

Summenformel: C₄₁H₄₆N₂O₈

Molmasse: 694,83 g/mol

Schmelzpunkt: 162°C

[α]_D²⁴: -18,0 (c = 1 in Methanol)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0,95 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 1,10 (s, 6H, C(CH₃)₃), 1,55-1,71 (m, 3H, CH₂C ^{δ} H), 1,78 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2,33 (m, 2H, CH₂COOH), 2,40 (s, 2H, COCH₂), 2,50 (s, 2H, COCH₂), 2,90 (m, 2H, CH₂C=), 4,19 (t, 1H, ³J = 6,9 Hz, CH^{Fmoc}), 4,35-4,55 (m, 3H, C ^{α} H, CH₂^{Fmoc}), 5,05-5,33 (m, 3H, CH₂Ph, N ^{α} H), 7,13-7,77 (m, 12H, CH^{arom}), 14,93 (s, 1H, NH)

IR (KBr): ν = 3341, 2958, 1718, 1553, 1450, 1419, 1342, 1271, 1168, 1047, 814, 781

6.4.1.3.8 Beladung des Aminomethylpolystyren-Harzes mit Fmoc-Xaa-Dmab-Linker

Das Aminomethylpolystyren-Harz (200-400 Mesh, 0,6 mmol/g) wird für 1 h in DMF (10 mL/g Harz) quellen gelassen. Zum Harz werden 1,2 Äquivalente (bezogen auf die Harzbeladung) Fmoc-Xaa-Dmab-Linker, 1,2 Äquivalent HATU sowie 2,4 Äquivalente DIPEA gegeben. Es wird 2 h geschüttelt. Nach dieser Zeit wird zur Kontrolle der Kupplung ein Kaiser-Test (Protokoll 11) durchgeführt. Bei positivem Test werden nochmals 0,6 Äquivalente HATU, 4 Äquivalente DIPEA sowie 0,5 Äquivalente Fmoc-Xaa-Dmab-Linker zu der Reaktionsmischung gegeben und weiter gerührt.

Fällt der Kaiser-Test negativ aus, wird das Harz abfiltriert und intensiv mit DMF (5x) und DCM (5x) gewaschen.

Beladungsbestimmung: analog Protokoll 2

Fmoc-Gly-Dmab-Linker: 0,33 mmol/g

Fmoc-Leu-Dmab-Linker: 0,27 mmol/g

6.4.1.4 Route B:

6.4.1.4.1 5-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-5-hydroxy-pentansäure (X)

2 g (6,45 mmol) **II** (5-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-5-hydroxy-pentansäure-*tert*-butylester) werden in einer Lösung aus 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % Wasser 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Abschließend wird die Lösung eingeeengt und in Ethylacetat aufgenommen. Es wird fünfmal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert und mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Nach dreimaligem Extrahieren mit Ethylacetat werden die vereinigten organischen Phasen über NaSO₄ getrocknet. Nach dem Einengen wird das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,6 g; 6,3 mmol (98 %)

Summenformel: C₁₃H₁₈O₅

Molmasse: 254,29 g/mol

Schmelzpunkt: 64-65°C

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1,09 (s, 6H, CH₃), 1,99 (m, 2H, CH₂), 2,41 (s, 2H, COCH₂), 2,48 (t, 2H, ³J = 7,3 Hz, CH₂COOH), 2,56 (s, 2H, COCH₂), 3,12 (t, 2H, ³J = 7,0 Hz, CH₂C=), 8,54 (s_{br}, 1H, COOH), 18,16 (s, 1H, OH)

IR (KBr): $\nu = 2963, 2937, 1783, 1725, 1632, 1568, 1420, 1319, 1276, 1226, 1169, 1042, 925, 901, 859, 806$

6.4.1.4.2 Beladung des Aminomethyl-Harzes mit 5-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-5-hydroxy-pentansäure (XI)

1 g Aminomethylpolystyren-Harz (200-400 Mesh, 0,6 mmol/g) wird in 15 mL DMF vorgelegt. 0,38 g (1,5 mmol) der Säure **X** werden in DMF gelöst und 0,2 g (1,5 mmol) HOBt dazugegeben. Diese Mischung wird dem Harz zugesetzt und 0,57 g (1,5 mmol) HATU hinzugegeben. Es wird 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Verläuft der Kaiser-Test (Protokoll 11) positiv werden nochmals 0,28 g (0,75 mmol) HATU zugesetzt und weiter gerührt. Das Harz wird abfiltriert mit DMF (3x) und DCM (3x) intensiv gewaschen und im Vakuum getrocknet.

6.4.1.4.3 Synthese des Dmab-Linker-Harzes (XII)

1 g Harz aus **XI** wird in 10 mL trockenem THF vorgelegt und 150 mg (1,2 mmol) *p*-Aminobenzylalkohol gelöst in THF zugesetzt. Die Suspension wird für 1 d refluxiert. Danach werden weitere 100 mg (0,8 mmol) *p*-Aminobenzylalkohol zugesetzt und für weitere 3 d refluxiert. Das Harz wird abfiltriert und intensiv mit THF (3x), DMF (3x) und DCM (3x) gewaschen.

IR (NaCl): $\nu = 3681, 3617, 3434, 3081, 3062, 3020, 2975, 2925, 2850, 1722, 1673, 1600, 1583, 1538, 1492, 1452, 1423, 1369, 1214, 1170, 1068, 1047, 1029 \text{ cm}^{-1}$

6.4.1.4.4 Fmoc-Gly-OH Beladung des Dmab-Linker-Harzes (XIII)

1 g Dmab-Linker-Harz (**XII**) wird in 15 mL DCM/DMF 9:1 gequollen. Es werden 445 mg (1,5 mmol; 2,5 Äquivalente bezogen auf die Aminomethyl-Harzbeladung) Fmoc-Gly-OH in DMF gelöst und zum Harz gegeben. Anschließend werden 202 mg (1,5 mmol) HOBt, 0,57 g (1,5 mmol) HATU sowie 514 μL (3 mmol) DIPEA zugesetzt. Es wird für 3 h geschüttelt und danach wird das Harz abfiltriert. Es wird intensiv mit DMF, DCM, Methanol (je 3x) gewaschen.

Beladungsbestimmung: 0,16 mmol/g

6.4.1.5 Testpeptid: c(GHGHGHG) (XIV)

$C_{26}H_{33}N_{13}O_7$ (639,64 g/mol)

Das Testpeptid wird herkömmlich über Fmoc/tert-Butyl-Taktik und TBTU-Kupplung im Syntheseautomaten dargestellt (Tabelle 8). Dabei wird das Peptid an zwei verschiedenen Harzen aufgebaut. Die Synthesen werden nur per MALDI-ToF-MS analysiert.

6.4.1.5.1 Syntheseroute A: klassisch an 2-Chlortrityl-Harz

Nach Aufbau der linearen Sequenz an Fmoc-Glycin-beladenem 2-Chlortrityl-Harz (100 mg, 100 μ mol, Beladung: 1 mmol/g) wird das Peptid nach Protokoll 9 A mit 0,5%iger TFA vom Harz gespalten, wobei die Abspaltung mit dem Peptid in einen Vorlagekolben filtriert wird, in dem Pyridin zum Neutralisieren der TFA vorgelegt wird. Die Lösung wird eingeeengt, im Hochvakuum getrocknet und lyophilisiert.

Zur Cyclisierung wird das Peptid (100 μ mol) in 10 mL DMF gelöst und gemeinsam mit einer 10 mL-Lösung von 42 mg (110 μ mol) HATU und 14 mg (0,1 mmol) HOAt über eine Zweikanal-Spritzenpumpe in eine Lösung aus 56 μ L (0,33 mmol) DIPEA in 50 mL DMF getropft (Flussgeschwindigkeit: 0,5 mL/h).

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*: (entschütztes Peptid nach Protokoll 10)

berechnet: 640,27 [M+H]⁺; 662,25 [M+Na]⁺; 678,23 [M+K]⁺;
738,35 [M+guanidinyliert]⁺ ($C_{31}H_{44}N_{15}O_7$)
gemessen: 641,04 [M+H]⁺; 663,11 [M+Na]⁺; 678,99 [M+K]⁺;
658,96 [M+H₂O+H]⁺; 739,23 [M+guanidinyliert]⁺

6.4.1.5.2 Syntheseroute B: an Dmab-Linker-Harz

An 300 mg (100 μ mol) Fmoc-Glycin-beladenes Dmab-Linker-Harz (Beladung: 0,33 mmol/g) wird das Peptid aufgebaut. Das lineare Vorläuferpeptid GH(Trt)GH(Trt)GH(Trt)G wird analog zu Protokoll 5 mit 2 % Hydrazin in DMF gespalten. Anschließend wird das Harz intensiv mit DMF (5x) und DCM (5x) gewaschen. Die organischen Phasen werden vereint, im Vakuum eingeeengt, im Hochvakuum getrocknet und lyophilisiert. Die Cyclisierung erfolgt analog zu Syntheseroute A.

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*: (entschütztes Peptid nach Protokoll 10)

berechnet: 640,27 [M+H]⁺; 662,25 [M+Na]⁺; 678,23 [M+K]⁺
gemessen: 641,30 [M+H]⁺; 663,3 [M+Na]⁺; 697,3 [M+K]⁺

6.4.1.5.3 Spaltung der Guanidiniumgruppe von c(GHGHGHG)

Eine Probe des entschützten guanidinylierten Nebenprodukts von Peptid c(GHGHGHG) wird mit einer 2%igen Hydrazin-Lösung in DMF versetzt. Nach 1 h wird mittels MALDI-ToF-MS kontrolliert.

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*: (entschütztes Peptid nach Protokoll 10)

berechnet: 640,27 [M+H]⁺; 662,25 [M+Na]⁺; 678,23 [M+K]⁺

gemessen: 662,80 [M+Na]⁺; 680,84 [M+H₂O+Na]⁺

6.4.1.6 (2S)-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(imidazol-4-yl)-propion-säureallylester (XV) Fmoc-L-His-OAl

3,25 g (5,24 mmol) Fmoc-His(Trt)-OH werden in 65 mL trockenem DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Zu dieser Lösung werden 1,3 g (6,3 mmol) DCC gelöst in 3,3 mL (48,2 mmol) Allylalkohol gegeben. Nach Zusatz von 0,85 g (6,3 mmol) HOBt wird 1 h bei 0°C gerührt. Die Lösung wird vom Eis genommen und über Nacht bei Raumtemperatur weiter gerührt.

Danach wird die Reaktionsmischung auf 0°C abgekühlt und der Niederschlag abfiltriert. Die Lösung wird im Vakuum am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Es wird dreimal mit 100 mL Carbonat-Puffer pH 9,5 (6,9 g K₂CO₃, 8,4 g NaCO₃ auf 300 mL Wasser) gewaschen. Die Ethylacetatphase wird über NaSO₄ getrocknet und anschließend eingengt. Nach der säulenchromatografischen Aufarbeitung (DCM: Methanol = 10:1) wird Fmoc-His(Trt)-OAl als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3,12 g; 4,73 mmol (90 %)

Summenformel: C₄₃H₃₇N₃O₄

Molmasse: 659,79 g/mol

Schmelzpunkt: 67°C

[α]_D²⁴: -22,0 (c = 1 in Methanol)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 2,83-2,90 (m, 2H, C^βH₂), 4,15-4,55 (m, 6H, C^αH, CH₂^{all}, CH^{Fmoc}, CH₂^{Fmoc}), 5,11-5,25 (m, 2H, CH₂^{al3}) 5,86-5,74 (m, 1H, CH^{al2}), 6,70 (s, 1H, CH^{His}), 7,02-7,05 (m, 6H, CH^{arom, Trt}), 7,75 (d, 1H, ³J = 7,9 Hz, N^αH), 7,25-7,89 (m, 18H, CH^{aromFmoc}, CH^{Trt}, CH^{His})

IR (KBr): $\nu = 3316, 3151, 3040, 2975, 2855, 1770, 1672, 1539, 1450, 1268, 1205, 1135, 1085, 1051, 989, 938, 835, 798$

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:

berechnet: 660,30 [M+H]⁺; 682,28 [M+Na]⁺; 698,26 [M+K]⁺

gemessen: 682,62 [M+Na]⁺; 698,67 [M+K]⁺

3,1 g (4,7 mmol) Fmoc-His(Trt)-OAl wird mit einer Mischung aus 16 mL DCM und 10 mL TFA versetzt und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Da nach dieser Zeit die Spaltung laut MALDI-ToF-MS noch nicht komplettiert ist, werden 0,5 mL TIS zu der Mischung gegeben. Nach einer weiteren Stunde Schütteln bei Raumtemperatur ist die Reaktion beendet. Die Lösung wird im Vakuum eingengt und in Ethylacetat aufgenommen. Es wird dreimal mit 100 mL wässriger 1 M KHSO₄-Lösung gewaschen. Da in der DC-Kontrolle (DCM:Methanol = 10:1) noch Edukt zu erkennen ist, wird die Ethylacetatphase über NaSO₄ getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird in einer Mischung aus 10 mL DCM, 10 mL TFA und 0,5 mL TIS gelöst und für 60 h bei Raumtemperatur gerührt.

Nach dem Einengen wird wie oben aufgearbeitet. Die säulenchromatografische Reinigung (DCM:Methanol = 10:1) ergibt Fmoc-His-OAl als weiße Kristalle.

Ausbeute: 1,96 g; 4,70 mmol (99 %)

Summenformel: C₂₄H₂₃N₃O₄

Molmasse: 417,47 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ [ppm] = 3,06-3,30 (m, 2H, C ^{β} H₂), 4,07 (t, 1H, ³J = 6,7 Hz, CH^{Fmoc}), 4,25 (d, 2H, ³J = 6,1 Hz, CH₂^{Fmoc}), 4,45 (s, 1H, NH^{His}), 4,51-4,62 (m, 3H, C ^{α} H, CH₂^{al1}), 5,17-5,29 (m, 2H, CH₂^{al3}) 5,76-5,81 (m, 1H, CH^{al2}), 6,39 (d, 1H, ³J = 6,1 Hz, N ^{α} H), 7,00 (s, 1H, CH^{His}), 7,20-7,68 (m, 8H, CH^{aromFmoc}), 8,32 (s, 1H, CH^{His})

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:

berechnet: 418,18 [M+H]⁺; 440,16 [M+Na]⁺; 456,13 [M+K]⁺

gemessen: 417,97 [M+H]⁺; 440,02 [M+Na]⁺; 456,07 [M+K]⁺

**6.4.1.7 (2S)-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(imidazol-4-yl)-propionsäure-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-3-methylbutylamino]}-benzylester (XVI)
Fmoc-L-His-ODmab**

2 g (3,2 mmol) Fmoc-His(Trt)-OH werden in 5 mL trockenem DCM gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,43 g (3,2 mmol) HOBt und 1,1 mL (6,4 mmol) DIPEA, gelöst in 5 mL trockenem DCM, gegeben. Nach der Zugabe von 0,66 g (3,2 mmol) DCC und 1,1 g (3,25 mmol) Dmab-OH wird bei Raumtemperatur für 4 d gerührt.

Es wird vom Niederschlag abfiltriert und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt. Nach anschließender Säulenchromatografie (zuerst Petrolether:Ethylacetat = 3:1; anschließend nur Ethylacetat) wird Fmoc-His(Trt)-ODmab als weißes kristallines Produkt erhalten.

Ausbeute: 2,00 g; 2,14 mmol (67 %)

Summenformel: C₆₀H₅₈N₄O₆

Molmasse: 931,15 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0,74 (d, 6H, ³J = 6,7 Hz, CH(CH₃)₂), 1,08 (s, 6H, CH₃), 1,81 (h, 1H, ³J = 6,7 Hz, CH(CH₃)₂), 2,40 (s, 2H, COCH₂), 2,50 (s, 2H, COCH₂), 2,96 (m, 2H, C^βH₂), 3,13 (d, 2H, ³J = 4,3 Hz, CH₂CH), 4,22 (t, 1H, ³J = 7,3 Hz, CH^{Fmoc}), 4,31 (m, 2H, CH₂^{Fmoc}), 4,69 (dt, 1H, ³J = 7,9 Hz, ³J = 4,9 Hz, C^αH), 5,05 (d, 1H, ²J = 12,8 Hz, CHPh), 5,15 (d, 1H, ²J = 12,8 Hz, CHPh), 6,60 (s, 1H, CH^{His}), 6,64 (d, 1H, ³J = 4,3 Hz, NH), 7,01 (m, 2H, CH^{aromBzl}), 7,09-7,10 (m, 6H, CH^{aromTrt}), 7,24-7,35 (m, 11H, CH^{aromTrt}, CH^{aromFmoc}), 7,29 (m, 2H, CH^{aromBzl}), 7,38 (m, 2H, CH^{aromFmoc}), 7,47 (s, 1H, CH^{His}), 7,61 (m, 2H, CH^{aromFmoc}), 7,75 (m, 2H, CH^{aromFmoc}), 15,24 (s, 1H, NH)

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z:

berechnet: 931,41 [M+H]⁺; 953,39 [M+Na]⁺; 969,37 [M+K]⁺

gemessen: 953,85 [M+Na]⁺; 969,33 [M+K]⁺

Die Trityl-geschützte Vorstufe (2 g, 2,14 mmol) wird mit 20 mL Abspaltreagenz (95 % TFA, 2,5 % TIS, 2,5 % Wasser) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Einengen der Lösung werden Nebenprodukte flashchromatografisch (zuerst Petrolether:Ethylacetat = 1:1, anschließend Methanol) entfernt. Die abschließende Säulenchromatografie mit Ethylacetat ergibt das leicht gelbe, pulverförmige Fmoc-His-ODmab.

Ausbeute: 1,47 g; 2,14 mmol (100 %)

Summenformel: C₄₁H₄₄N₄O₆

Molmasse: 688,83 g/mol

Schmelzpunkt: 135°C

[α]_D²⁴: -13,8 (c = 1 in Methanol)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0,71 (d, 6H, ³J = 6,9 Hz, CH(CH₃)₂), 1,06 (s, 6H, C(CH₃)₂), 1,79 (h, 1H, ³J = 6,8 Hz, CH(CH₃)₂), 2,40 (s, 2H, COCH₂), 2,45 (s, 2H, COCH₂), 2,95 (2H, CH₂CH), 3,07-3,30 (m, 2H, C^βH₂), 4,07-4,30 (m, 3H, CHCH₂^{Fmoc}), 4,45 (s, 1H, NH^{His}), 4,69 (m, 1H, C^αH), 5,14 (s, 2H, CH₂Ph), 6,42 (d, 1H, ³J = 4,3 Hz, NH), 6,88 (s, 1H, CH^{His}), 7,03 (m, 2H, CH^{aromBzl}), 7,21 (m, 2H, CH^{aromFmoc}), 7,32 (m, 4H, CH^{aromFmoc}), 7,50 (m, 2H, CH^{aromFmoc}), 7,69 (m, 2H, CH^{aromBzl}), 8,20 (s, 1H, CH^{His}), 15,20 (s, 1H, NH)

IR (KBr): ν = 3283, 3146, 3040, 2958, 2869, 1770, 1671, 1556, 1450, 1417, 1325, 1251, 1203, 1135, 1043, 832, 798

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} *m/z*:

berechnet: 689,33 [M+H]⁺; 711,32 [M+Na]⁺; 727,29 [M+K]⁺

gemessen: 689,40 [M+H]⁺; 711,48 [M+Na]⁺; 727,53 [M+K]⁺

6.4.1.8 (2S)-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-{1/4-[bis(dimethylamino)methylumyl]-(imidazol-4-yl)}-propionsäureallylester (XVII) Fmoc-His(Bis(dimethylamino)methylumyl)-OAl

Zu einer Lösung von 0,34 g (1,2 mmol) Tetramethylchloroformamidiniumhexafluorophosphat (TCFH) in 5 mL trockenem DCM werden 0,5 g (1,2 mmol) Fmoc-His-OAl und 0,17 mL (1,2 mmol) Triethylamin gegeben. Es wird für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit werden weitere 0,1 mL NEt₃ zugegeben, da noch Edukt laut DC-Kontrolle vorhanden ist. Es wird über Nacht gerührt. Nach dem Einengen im Vakuum kann nach der Säulenchromatografie (DCM:Methanol = 10:1) trotz positivem MALDI-ToF-Massenspektrums kein Produkt erhalten werden.

Ausbeute: 0 mg

Summenformel: C₂₉H₃₄N₅O₄

Molmasse: 516,63 g/mol

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :berechnet: 516,26 [M]⁺gemessen: 516,62 [M]⁺**6.4.1.9 Synthese des Peptids: c(fLHTRL) (2)** $C_{37}H_{57}N_{11}O_7$ (767,94 g/mol)

Der Aufbau der linearen Peptide erfolgte nach Standardsynthese mit TBTU/DIPEA vermittelter Aminosäurekupplung im Syntheseautomaten (Tabelle 8). Als Tests der verschiedenen Syntheserouten A-D werden die Synthesen nur mit MALDI-ToF-MS und RP-HPLC analysiert. Lediglich Route B wird präparativ aufgearbeitet.

6.4.1.9.1 Syntheseroute A: klassisch an 2-Chlortrityl-Harz mit Cyclisierung in Lösung

Synthese: analog zur Syntheseroute A des Testpeptids (**XIV**), jedoch mit Fmoc-Leu-2-Chlortrityl-Harz (100 μ mol, 100 mg, Beladung: 1 mmol/g)

HPLC_{analyt.}(Methode A): $t_R = 13,8$ min Hauptprodukt $t_R = 12,4$ min guanidinyliertes Nebenprodukt**Reinheit_{HPLC} (%):** 82,6 % Hauptprodukt

17,4 % guanidinyliertes Nebenprodukt

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :berechnet: 768,45 [M+H]⁺; 790,43 [M+Na]⁺; 806,41 [M+K]⁺;866,54 [M+guanidinyliert]⁺ ($C_{42}H_{68}N_{13}O_7$)gemessen: 768,21 [M+H]⁺; 790,21 [M+Na]⁺; 806,22 [M+K]⁺;866,34 [M+guanidinyliert]⁺ ($C_{42}H_{68}N_{13}O_7$)**6.4.1.9.2 Syntheseroute B: an Dmab-Linker-Harz mit Cyclisierung in Lösung**

Synthese: analog zur Syntheseroute B des Testpeptids (**XIV**), jedoch mit Fmoc-Leu-Dmab-Linker-Harz (81 μ mol, 300 mg, Beladung: 0,27 mmol/g). Anschließendes Fällen in Wasser und Spalten der permanenten Schutzgruppen liefert nach Aufreinigung über RP-HPLC mit Methode D das Produkt.

Ausbeute: 9 mg; 15 μ mol (15 %)

HPLC_{analyt.}(Methode A): $t_R = 13,7$ min

HPLC_{analyt.}(Methode B): $t_R = 12,2$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100 % Hauptprodukt
0 % guanidinyliertes Nebenprodukt

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 768,45 [M+H]⁺; 790,43 [M+Na]⁺; 806,41 [M+K]⁺

gemessen: 768,63 [M+H]⁺; 790,62 [M+Na]⁺; 806,64 [M+K]⁺

6.4.1.9.3 Syntheseroute C: *on-resin*-Cyclisierung über C-terminales His-OAl

Die Synthese erfolgt ausgehend von Fmoc-His-OAl-beladenem 2-Chlortrityl-Harz (75 μ mol, 300 mg, Beladung: 0,25 mmol/g). Nach Aufbau der linearen Sequenz wird die C-terminale Allyl-Schutzgruppe nach Protokoll 6 gespalten. Die Cyclisierung wird nach Protokoll 8 mit 1,5 Äquivalenten HATU durchgeführt.

HPLC_{analyt.}(Methode A): $t_R = 13,4$ min Hauptprodukt

$t_R = 17,2$ min Nebenprodukt (C-terminal allyliertes Edukt)

Reinheit_{HPLC} (%): 55 % Hauptprodukt
44 % Nebenprodukt (C-terminal allyliertes Edukt)

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :

berechnet: 768,45 [M+H]⁺; 790,43 [M+Na]⁺; 806,41 [M+K]⁺;

826,49 [M+Al+H₂O+H]⁺; 848,48 [M+Al+H₂O+Na]⁺

gemessen: 768,31 [M+H]⁺; 790,28 [M+Na]⁺; 806,25 [M+K]⁺;

826,28 [M+Al+H₂O+H]⁺; 848,24 [M+Al+H₂O+Na]⁺

6.4.1.9.4 Syntheseroute D: *on-resin*-Cyclisierung über C-terminales His-ODmab

Der Aufbau der linearen Sequenz erfolgt analog zur Syntheseroute C jedoch mit Fmoc-His-ODmab-beladenem 2-Chlortrityl-Harz (100 μ mol, 400 mg, Beladung: 0,25 mmol/g). Die Spaltung der C-terminalen Schutzgruppe erfolgt nach Protokoll 5.

HPLC_{analyt.}(Methode A): $t_R = 13,6$ min

Reinheit_{HPLC} (%): 100 % Hauptprodukt
0 % guanidinyliertes Nebenprodukt

MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :berechnet: 768,45 [M+H]⁺; 790,43 [M+Na]⁺; 806,41 [M+K]⁺gemessen: 768,09 [M+H]⁺; 790,07 [M+Na]⁺; 806,05 [M+K]⁺**6.4.1.9.5 Spaltung der Guanidiniumgruppe des N^{im}-guanidinylierten Nebenprodukts von c(fLHTRL) (2)**

Die Spaltung der Guanidiniumgruppe des N^{im}-guanidinylierten Nebenprodukts erfolgt mit 2 % Hydrazin in DMF. Dazu wird das geschützte guanidinylierte Nebenprodukt (1175,54 g/mol) mit der Abspalllösung versetzt und nach 1 h über MALDI-ToF-MS analysiert.

HPLC_{analyt.}(Methode A): $t_R = 25,0$ min**MALDI-ToF-MS_{monoisotopisch} m/z :**berechnet: 1076,60 [M+H]⁺; 1098,58 [M+Na]⁺; 1114,55 [M+K]⁺gemessen: 1076,23 [M+H]⁺; 1098,14 [M+Na]⁺; 1114,14 [M+K]⁺**6.4.1.10 Synthese von Fmoc-L-Lys(Linker)-OH****6.4.1.10.1 1-Amino-8-(tert-butyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoctan (XVIII)**

67 mL (458,2 mmol) 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan werden in 100 mL trockenem 1,4-Dioxan vorgelegt. 10 g (45,82 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat gelöst in 100 mL trockenem 1,4-Dioxan werden auf zwei 50 mL Spritzen verteilt und über eine Zweikanal-Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 2,4 mL pro Stunde bei Raumtemperatur zugespritzt.

Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit 150 mL Wasser versetzt. Es wird dreimal mit 120 mL DCM extrahiert. Anschließend werden die organischen Phasen zweimal mit 60 mL Wasser und zweimal mit 60 mL gesättigter NaCl-Lösung nachgewaschen. Die organische Phase wird über NaSO₄ getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird als leicht gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 10,73 g; 43,1 mmol (94 %)**Summenformel:** C₁₁H₂₄N₂O₄**Molmasse:** 248,32 g/mol**¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS):** δ [ppm] = 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,94 (s, 2H, NH₂), 2,90 (t, 2H, ³J = 5,0 Hz, CH₂NH₂), 3,30-3,33 (m, 2H, CH₂NHCO), 3,53-3,55 (m, 4H, OCH₂), 3,60-3,64 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 5,23 (s, 1H, NH)

6.4.1.10.2 N-(8-*tert*-Butyloxycarbonylamino-3,6-dioxaoctyl)-bernsteinsäureamid (XIX)

9,87 g (39,8 mmol) **XVIII** werden in 150 mL trockenem DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Es werden 5,5 mL (39,8 mmol) Triethylamin und 3,98 g (39,8 mmol) Bernsteinsäureanhydrid zugesetzt und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Es wird über Nacht gerührt und anschließend 100 mL DCM zugesetzt. Es wird zweimal mit je 50 mL 5%iger KHSO₄-Lösung extrahiert und die wässrige Phase mit DCM (3x) nachgewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden mit wenig gesättigter NaCl gewaschen, über NaSO₄ getrocknet und eingengt. Nach flashchromatografischer Aufreinigung (DCM: Methanol = 9:1) wird das Produkt als zähes farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 11,2 g; 32,2 mmol (81 %)

Summenformel: C₁₅H₂₈N₂O₇

Molmasse: 348,40 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2,47 (t, 2H, ³J = 6,9 Hz, CH₂CO), 2,58 (t, 2H, ³J = 6,9 Hz, HOOCCH₂), 3,22 (t, 2H, ³J = 5,6 Hz, CH₂NHCO), 3,36 (t, 2H, ³J = 5,5 Hz, CH₂NHCO), 3,49-3,64 (m, 8H, CH₂OCH₂CH₂OCH₂)

6.4.1.10.3 Fmoc-Lysin[Linker(Boc)]-OH (XX)

10,04 g (28,85 mmol) Boc-geschützter Linker (**XIX**) werden in 200 mL trockenem DCM gelöst und mit 3,32 g (28,85 mmol) N-Hydroxysuccinimid, gelöst in DCM unter minimalem Zusatz von DMF, versetzt. Es werden 5,95 g (28,85 mmol) DCC gelöst in DCM und eine Spatelspitze DMAP zugesetzt. Es wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wird der Niederschlag abfiltriert und die DCM-Phase zweimal mit 150 mL 5%iger KHSO₄-Lösung gewaschen. Es wird über NaSO₄ getrocknet und eingengt. Der NHS-Ester wird als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 11,5 g; 30,0 mmol (90 %)

Summenformel: C₂₀H₃₃N₃O₈

Molmasse: 443,50 g/mol

3,65 g (8,2 mmol) NHS-aktivierter Linker werden in DMF gelöst und 1,5 g (4,1 mmol) Fmoc-Lys-OH gelöst in DMF sowie 0,63 mL (4,5 mmol) Triethylamin hinzugesetzt. Es wird bei

Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wird eingeeengt und über Säulenchromatografie (DCM: Methanol = 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2,68 g; 3,8 mmol (94 %)

Summenformel: C₃₆H₅₀N₄O₁₀

Molmasse: 698,82 g/mol

Schmelzpunkt: 106°C

[α]_D²⁴: +9,1 (c = 1 in Methanol)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1,42 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1,48-1,56 (m, 4H, CH₂), 1,70 (m, 1H, CH₂), 1,85 (m, 1H, CH₂), 2,43-2,51 (m, 4H, HNOCCH₂CH₂CONH), 3,17 (t, 2H, ³J = 7,0 Hz, C^εH₂), 3,20 (t, 2H, ³J = 5,6 Hz, CH₂CONHCH₂CH₂O), 3,34 (t, 2H, ³J = 5,5 Hz, Boc-NHCH₂), 3,46-3,59 (m, 8H, CH₂OCH₂CH₂OCH₂), 4,14 (m, 1H, HNCHCOOH), 4,21 (t, 1H, ³J = 7,0 Hz, OCH₂CH), 4,34 (d, 2H, ³J = 7,0 Hz, OCH₂CH), 7,30-7,78 (m, 8H, NH, CH^{aromFmoc})

HPLC_{analyt.} (Methode A): t_R = 24,9 min

Reinheit_{HPLC} (%): 100 %

6.5 Oberflächenplasmonresonanzmessungen:

Für alle Experimente dient HBS-P-Puffer (pH 7,4) als Lauf- und Bindungspuffer und der CM5-Chip als Immobilisierungsmatrix. Vor jeder neuen Messphase wird das Biacore® 3000 mit den *Working-Tools* „Desorb“ und „Sanitize“ von Ablagerungen und möglichen Kontaminationen befreit.

HBS-P-Puffer (pH 7,4): 0,01 M HEPES pH 7,4; 0,15 M NaCl; 0,005 % Tween 20; der pH-Wert wird mit 1 M NaOH und 1 M Salzsäure eingestellt, steril filtriert und im Ultraschallbad entgast

6.5.1 pH-Scouting

Für das pH-Scouting wird der Antikörper zunächst in verschiedenen Puffern gelöst (1 µL in 75 µL) und bei einem Fluss von 5 µL/min über die Sensoroberfläche geleitet.

Puffer:	HPS-EP 10 mM HEPES pH 7,4	Borat 10 mM, 1 M NaCl pH 8,5
	Acetat 10 mM pH 4,0	Acetat 10 mM pH 5,0
	Acetat 10 mM pH 5,5	Maleat 5 mM pH 5,0
	Maleat 5 mM pH 5,0	Maleat 5 mM pH 6,0

Anschließend werden verschiedene Verdünnungen des Antikörpers in 5 mM Maleat pH 6,0 vermessen.

6.5.2 Immobilisierung des L2-412-Antikörpers

Vor der Immobilisierung des Antikörpers werden neue CM5-Chips über das *Working-Tool* „Normalize“ behandelt, um die Sensitivität des Biacore® 3000 zu erhöhen. Alle Immobilisierungsschritte werden bei einer Flussrate von 5 µL/min durchgeführt.

Für die Immobilisierung mit hohem Immobilisierungsniveau erfolgt die Aktivierung der Sensoroberfläche der Referenz- und Messzelle mit 0,05 M NHS- und 0,2 M EDC-Lösung über 14 min. Die Immobilisierung des Antikörpers wird nur in der Messzelle durchgeführt. Zur Immobilisierung wird die L2-412-Antikörperlösung (14 mg/mL) 1:10 verdünnt, 3 µL dieser Lösung in 150 µL 5 mM Maleat-Puffer (pH 6,0) gelöst und für 14 min injiziert. Zur Deaktivierung der nicht umgesetzten NHS-Ester wird durch beide Zellen über 14 min eine Lösung aus 1 M Ethanolamin (pH 8,5) und 1 M NaCl geleitet.

Für das niedrige Immobilisierungsniveau erfolgt die Aktivierung der beiden Zellen analog zu obiger Methode jedoch nur über 7 min. Anschließend wird die Antikörperlösung über kurze Intervalle von 1-2 min über die Messzelle injiziert bis das gewünschte Niveau erreicht ist. Abschließendes *Capping* erfolgt über 7 min mit einer Lösung aus 1 M Ethanolamin (pH 8,5) und 1 M NaCl.

6.5.3 Massentransferexperimente

Die Massentransferexperimente werden für beide Immobilisierungsniveaus mit dem Peptid c(StTFQL) (**28**) durchgeführt. Dabei wird eine 300 μmol Lösung für 120 s bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten (15 mL/min; 25 mL/min; 35 mL/min; 45 mL/min bzw. 55 mL/min) über die Sensoroberfläche geleitet.

6.5.4 Bindungsexperimente

Alle Bindungsexperimente erfolgen bei einem Fluss von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Bevor die Peptide über die Messzelle geleitet werden, durchfließen sie die Referenzzelle, deren Signal vom Signal der Messzelle subtrahiert wird. Die Konzentrationsreihen der Peptide (in der Regel: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 800, 1000, 2000, 3000 μM) werden vor den Messungen in den Biacore®-Vials angesetzt. Dazu wird eine Stammlösung in hochreinem Wasser angesetzt und die entsprechenden Mengen der Peptidlösung in die Gefäße pipettiert. Anschließend wird auf 200 μL aufgefüllt, die Gefäße mit durchstoßenen Deckeln versehen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

Vor Beginn jeder neuen Messung wird die Injektionsnadel in stark EDTA-angereicherten HBS-P-Puffer getaucht, um eventuell anhaftende Peptidreste zu entfernen. Unmittelbar vor der Messung pipettiert das Gerät 200 μL HBS-P-Puffer in die Gefäße und mischt diese je zweimal mit 120 μL der Lösung. Die Peptide TFKLSETTLEY (b39) und c(TTLEY) (b25) werden wegen der Löslichkeitsprobleme mit 1 % DMSO in HBS-P-Puffer (200 μL) gelöst. Die Injektion der Peptide wird über die „*Kinject*“-Funktion durchgeführt. Die Peptidlösung wird für 5 min injiziert, die anschließende Dissoziationsphase dauert 10 min. Danach wird für zweimal 3 min 10 mM Glycin-Lösung (pH 2,5) zur Regenerierung über die Sensoroberfläche geleitet. Ist das Basisliniensignal nach dieser Zeit nicht auf dem Anfangsniveau, wird nochmals für 3 min Regenerationspuffer injiziert.

Die Auswertung erfolgt über lineare Regression der Scatchard-Plots. In der folgenden Tabelle werden die erhaltenen K_D -Werte der einzelnen Peptide aufgeführt.

6.5.5 Tabellarische Zusammenfassung der Bindungsexperimente

Tabelle 9: Über lineare Regression erhaltene K_D -Werte der Peptide (1)-(51)
R²: Korrelationskoeffizient der linearen Regression

Peptid	Nr.	K_D -Wert [μ M]	R ²
H-FLHTRL-OH	1	-	-
c(fLHTRL)	2	346	0,93
c(FIHTRL)	3	821	0,81
c(FLhTRL)	4	979	0,81
c(FLHtRL)	5	613	0,85
c(FLHTrL)	6	868	0,99
c(FLHTRI)	7	625	0,93
H-TRLFVS-OH	8	3475	0,90
c(tRLFVS)	9	1465	0,94
c(TRLFvS)	10	1278	0,85
c(TRIFVS)	11	1598	0,94
H-TFKLSE-OH	12	1615	0,99
c(tFKLSE)	13	834	0,94
c(TfKLSE)	14	1012	0,96
c(TFkLSE)	15	1132	0,91
c(TFKlSE)	16	682	0,99
H-LSETTL-OH	17	278	0,95
c(LSETtL)	18	95	0,99
c(LSETTL)	19	67	0,96
c(LSETTL)	20	2140	0,86
c(LsETTL)	21	115	0,96
H-TTLEYY-OH	22	102	0,97
c(tTLEYY)	23	226	0,98
c(TtLEYY)	24	1642	0,97
c(TTIEYY)*	25	220	0,99
H-TFQLST-OH	26	511	0,96
c(TFQLsT)	27	142	0,95
c(TFQLSt)	28	971	0,99
c(tFQLST)	29	1012	0,94
H-LSTRTL-OH	30	6055	0,94
c(lSTRTL)	31	1173	0,87
c(LsTRTL)	32	1662	0,95
c(LStRTL)	33	2016	0,97
H-RTL PFS-OH	34	4633	0,70
c(RTL PFS)	35	73	0,89
c(RtLPFS)	36	128	0,89
c(RTIPFS)	37	280	0,92

H-FLHTRLFV-OH	38	566	0,93
H-TFKLSETTLEYY-OH*	39	791	0,88
H-TFQLSTRILPFS-OH	40	417	0,87
H-HFTLRL-OH	41	-	-
H-LTYTEFSYLKET-OH	42	-	-
H-TSFTPLRFTSQL-OH	43	-	-
H-TFKLSETTL-OH	44	1072	0,92
H-TFQLSTRILPFS-OH	45	2652	0,89
c(SETTIA)	46	228	0,96
c(ETTILA)	47	337	0,99
c(TTILSA)	48	-	-
c(TILSEA)	49	-	-
c(ILSETA)	50	6186	0,98
c(SETTaL)	51	1653	0,90

* Lösen unter Zusatz von 1 % DMSO

6.5.6 Immobilisierung des Linker-Peptids

Vor der Immobilisierung des Peptids c(K(Linker)SETTL) (**52**) wird ein pH-Scouting mit Wasser, 5 mM Maleat (pH 6,0), 5 mM Maleat (pH 6,5), HBS-P-Puffer (pH 7,4) durchgeführt.

Die Immobilisierung erfolgt bei einem Fluss von 5 μ L/min. Die Aktivierung der Sensoroberfläche der Referenz- und Messzelle wird mit 0,05 M NHS- und 0,2 M EDC-Lösung über 7 min durchgeführt. Die Immobilisierung des Linker-Peptids wird nur in der Messzelle durchgeführt. Zur Immobilisierung wird die Peptid-Lösung durch drei verschiedene Injektionen über die Oberfläche geleitet: 7 min 225 μ M (**52**) in Wasser; 10 min 3 mM (**52**) in 2,5 mM Maleat pH 6,5; 10 min 2,8 mM (**52**) in 2,5 mM Maleat pH 6,5. Zur Deaktivierung der nicht umgesetzten NHS-Ester wird durch beide Zellen über 10 min eine Lösung aus 1 M Ethanolamin (pH 8,5) und 1 M NaCl geleitet. Es wird ein Immobilisierungsniveau von 280 RU erreicht.

6.5.7 Bindungsexperimente mit Ak L2-412

Die Bindungsexperimente werden in HBS-P-Puffer (pH 7,4) mit einer Flussgeschwindigkeit von 25 μ L/min durchgeführt. Der Antikörper wird dabei für 5 min über die Oberfläche geleitet. Es werden drei verschiedene Ak L2-412-Konzentrationen in HBS-P-Puffer vermessen:

8 μ g/mL; 20 μ g/mL; 70 μ g/mL

Es kann kein Bindungssignal beobachtet werden.

6.6 Neuritenwachstumsexperimente

6.6.1 Tabellarische Zusammenfassung der Neuritenwachstumsexperimente

6.6.1.1 Neuritenwachstumsexperimente mit motorischen Mäuseuronen

Tabelle 10: Durchschnittliches Neuritenwachstum von Motoneuronen der Maus auf beschichtetem Substrat

Substrat	Ø-Neuritenlänge [%]	SEM	Polarität
H-TFKLSETTLEYY-OH (39)	150,73	21,37	1,40
H-LTYTEFSYLKET-OH (42)	113,05	21,12	1,31
c(TFKISE) (16)	97,71	29,23	1,75
H-SETTLL-OH (17)	114,44	25,41	1,59
c(SETtLL) (18)	113,56	22,39	1,55
c(SETTIL) (19)	172,45	19,87	
c(SETTLL) (20)	107,08	22,80	1,54
H-TTLEYY-OH (22)	129,44	25,76	1,41
c(tTLEYY) (23)	112,93	25,44	1,70
c(TtLEYY) (24)	105,60	26,80	1,84
c(TTIEYY) (25)	132,22	38,05	1,77
H-TFQLSTRTLPFS-OH (40)	144,34	28,02	1,61
H-TSFTPLRFTSQL-OH (43)	99,06	24,59	1,52
c(sTTFQL) (27)	92,41	19,24	1,88
c(LsTRTL) (32)	131,33	23,80	1,58
c(RTLPFS) (35)	171,12	30,74	1,86
c(RtLPFS) (36)	98,08	27,35	2,00
H-FLHTRLFV-OH (38)	148,94	26,02	1,30
H-HFTLRL-OH (41)	107,99	25,42	1,43
c(fLHTRL) (2)	101,75	24,67	1,30
Laminin	206,78	30,73	2,51
PLO	100,00	18,44	1,39

6.6.1.2 Neuritenwachstumsexperimente mit humanen Motoneuronen

Substrat	Ø-Neuritenlänge [%]	SEM	Polarität
H-TFKLSETTLEY-OH (39)	133,50	26,60	1,69
H-LTYTEFSYLKET-OH (42)	108,89	29,88	2,63
H-TFQLSTRITLPFS-OH (40)	139,87	21,44	1,58
H-TSFTPLRFTSQL-OH (41)	95,65	12,93	1,63
H-FLHTRLFV-OH (38)	103,83	25,50	1,86
Laminin	216,04	30,76	2,66
PLO	100,00	13,06	1,54

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] T. Abo, C. M. Balch, *J. Immunol.* **1981**, *127*, 1024-1029.
- [2] J. Kruse, R. Mailhammer, H. Wernecke, A. Faissner, I. Sommer, C. Goridis, M. Schachner, *Nature* **1984**, *311*, 153-155.
- [3] a) M. Lipinski, K. Braham, J. M. Caillaud, C. Carlu, T. Tursz, T. Feizi, *J. Exp. Med.* **1983**, *158*, 1775-1780; b) S. Schuller-Petrovic, W. Gebhart, H. Lassmann, H. Rumpold, D. Kraft, *Nature* **1983**, *306*, 179-181; c) I. Ando, K. Tamaki, *Br. J. Dermatol.* **1985**, *113*, 175-178.
- [4] M. Uusitalo, T. Kivelä, *Progr. Retinal Eye Resear.* **2001**, *20*, 1-28.
- [5] M. Grumet, S. Hoffman, C.-M. Chuong, G. M. Edelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 7989-7993.
- [6] E. Bock, C. Richter-Landsberg, A. Faissner, M. Schachner, *EMBO J.* **1985**, *4*, 2765-2768.
- [7] M. Grumet, V. Mauro, M. P. Burgoon, G. M. Edelman, B. A. Cunningham, *J. Cell. Biol.* **1991**, *113*, 1399-1412.
- [8] a) R. C. McGarry, S. L. Helfand, R. H. Quarles, J. C. Roder, *Nature* **1983**, *306*, 376-378; b) S. Sato, H. Baba, M. Tanaka, K. Yanagisawa, T. Miyatake, *Biomed. Res.* **1983**, *4*, 489-494; c) M. Tanaka, K. Tanaka, S. Sato, T. Miyatake, *Biomed. Res.* **1984**, *5*, 225-228.
- [9] E. Bollensen, M. Schachner, *Neurosci. Lett.* **1987**, *82*, 77-82.
- [10] D. Burger, A. J. Steck, C. C. A. Bernard, N. Kerlero de Rosbo, *Neurochem.* **1993**, *61*, 1822-1827.
- [11] M. E. Dieperdink, A. O'Neill, G. Magnoni, R. L. Wollmann, R. L. Heinrikson, H. A. Zürcher-Neely, K. Stefansson, *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 2177-2185.
- [12] a) P. Pesheva, A. F. Horwitz, M. Schachner, *Neurosci. Lett.* **1987**, *83*, 303-306; b) T. Lallier, M. Bronner-Fraser, *J. Cell. Biol.* **1992**, *119*, 1335-1345.
- [13] a) M. Grumet, S. Hoffman, K. L. Crossin, G. M. Edelman, *J. Cell. Biol.* **1985**, *113*, 1399-1412; b) J. Kruse, G. Keilhauer, A. Faissner, R. Timpl, M. Schachner, *Nature* **1985**, *316*, 146-148; c) A. Faissner, J. Kruse, R. Chiquet-Ehrismann, E. Mackie, *Differentiation* **1988**, *37*, 104-114; d) A. Faissner, A. Scholze, B. Götz, *Perspect. Dev. Neurobiol.* **1994**, *2*, 53-66.
- [14] V. E. Shashoua, P. F. Daniel, M. E. Moore, F. B. Jungalwala, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *138*, 902-909.
- [15] a) S. Bon, K. Méflah, F. Musset, J. Grassi, J. Massoulié, *J. Neurochem.* **1987**, *49*, 1720-1731; b) P. G. Layer, T. Weikert, R. Alber, *Cell Tissue Res.* **1993**, *8*, 219-226.
- [16] M. Vogel, H. J. Kowalewski, H. Zimmermann, A. Janetzko, R. U. Margolis, H.-E. Wollny, *Biochem. J.* **1991**, *278*, 199-202.

- [17] S. Hoffman, G. M. Edelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2523-2527.
- [18] a) R. K. Margolis, J. A. Ripellino, B. Goossen, R. Steinbrich, R. U. Margolis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *145*, 1142-2560; b) R. C. Krueger Jr., A. K. Hennig, N. B. Schwartz, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12149-12161.
- [19] a) D. K. H. Chou, A. A. Ilyas, J. E. Evans, C. Costello, R. H. Quarles, F. B. Jungalwala, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11717-11725; b) D. K. H. Chou, G. A. Schwarting, J. E. Evans, C. Costello, R. H. Quarles, F. B. Jungalwala, *J. Neurochem.* **1987**, *49*, 865-873; c) T. Ariga, T. Kohriyama, L. Freddo, N. Latov, M. Saito, K. Kon, S. Ando, M. Suzuki, M. E. Hemling, K. L. Rinehart Jr., S. Kusunoki, R. K. Yu, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 848-853.
- [20] a) M. E. Shy, C. A. Gabel, E. C. Victorisz, N. Latov, *J. Neuroimmunol.* **1986**, *12*, 291-298; b) D. D. Mikol, L. Wrabetz, L. S. Marton, K. Stefansson, *J. Neurochem.* **1988**, *50*, 1924-1928; c) D. Burger, M. Simon, G. Perruisseau, A. J. Steck, *J. Neurochem.* **1990**, *54*, 1569-1575.
- [21] D. C. Gowda, R. U. Margolis, R. K. Margolis, *Biochemistry* **1989**, *28*, 4468-4474.
- [22] H. Voshol, W. E. M. van Zuylen, G. Orberger, J. F. G. Vliegthart, M. Schachner, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 22957-22960.
- [23] R. D. Dennis, H. Antonicek, H. Wiegandt, M. Schachner, *J. Neurochem.* **1988**, *51*, 1490-1496.
- [24] M. L. Bajt, B. Schmitz, M. Schachner, B. Zipser, *J. Neurosci. Res.* **1990**, *27*, 276-285.
- [25] R. H. Nordlander, *J. Comp. Neurol.* **1993**, *335*, 538-551.
- [26] a) N. Prasadarao, O. Koul, S. A. Tobet, D. K. H. Chou, F. B. Jungalwala, *J. Neurochem.* **1990**, *55*, 2024-2030; b) D. K. H. Chou, N. Prasadarao, O. Koul, F. B. Jungalwala, *J. Neurochem.* **1991**, *57*, 852-859; c) Y. Hayashi, T. Takemura, K. Hirokawa, *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, *37*, 1147-1152; d) M. J. Cooper, G. M. Hutchins, M. A. Israel, *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 605-615; d) E. Didier, P. Didier, N. Fargeix, J. Guillot, J.-P. Thiery, *J. Dev. Biol.* **1990**, *34*, 421-431.
- [27] M. Bronner-Fraser, *Dev. Biol.* **1987**, *123*, 321-331.
- [28] a) L. Gorza, S. Schiaffino, M. Vitadello, *Brain Res.* **1988**, *457*, 360-366; b) T. Ikeda, K. Iwasaki, I. Shimokawa, H. Sakai, H. Ito, T. Matsuo, *Anat. Embryol. (Berl.)* **1990**, *182*, 553-562.
- [29] M. Vogel, H. Zimmermann, W. Singer, *Eur. J. Neurosci.* **1993**, *5*, 1423-1425.
- [30] C. Andressen, S. Arnhold, K. Ashwell, J. K. Mai, K. Addicks, *Histochem. J.* **1999**, *31*, 331-338.
- [31] a) J. T. Schmidt, M. Schachner, *J. Neurobiol.* **1998**, *37*, 659-671; b) G. Pradel, M. Schachner, R. Schmidt, *J. Neurobiol.* **1999**, *39*, 197-206.
- [32] T. Strelakova, C. T. Wotjak, M. Schachner, *Mol. Cell. Neurosci.* **2001**, *17*, 1102-1113.
- [33] K. Ogawa-Goto, Y. Arao, Y. Ito, T. Ogawa, T. Abe, T. Kurata, S. Irie, H. Akanuma, *J. General Virol.* **1998**, *79*, 2533-2541.

- [34] K. Asakura, D. J. Miller, L. R. Pease, M. Rodriguez, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 7700-7708.
- [35] a) S. P. C. Cole, S. Mirski, R. C. McGarry, R. Cheng, B. G. Campling, J. C. Roder, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 4285-4290; b) J. J. Rusthoven, J. B. Robinson, A. Kolin, P. H. Pinkerton, *Cancer* **1985**, *56*, 289-293; c) Y. Sato, S. Watanabe, T. Kodama, M. Goto, Y. Shimosato, *Jpn. J. Clin. Oncol.* **1985**, *15*, 537-544; d) Z. A. Wahab, G. I. Wright Jr., *Int. J. Cancer* **1985**, *36*, 677-683; e) E. Perentes, L. J. Rubinstein, *Acta Neuropathol. (Berl.)* **1986**, *69*, 227-233.
- [36] a) J.-M. Caillaud, S. Benjelloun, J. Bosq, K. Braham, M. Lipinski, *Cancer Res.* **1984**, *44*, 4432-4439; b) Y. Tsutsumi, *Acta Histochem. Cytochem.* **1984**, *17*, 15-21; c) P.A. Bunn Jr., I. Linnoila, J. D. Minna, D. Carney, A. F. Gazdar, *Blood* **1985**, *65*, 764-768.
- [37] G. Reifenberger, J. Szymas, W. Wechsler, *Acta Neuropathol. (Berl.)* **1987**, *74*, 105-123.
- [38] M. Schachner, R. Martini, *Trends Neurosci.* **1995**, *18*, 183-191.
- [39] a) M. T. Filbin, G. I. Tennekoon, *Neuron* **1991**, *7*, 845-855; b) L. S. Griffith, B. Schmitz, M. Schachner, *J. Neurosci. Res.* **1992**, *33*, 639-648.
- [40] K. P. Giese, R. Martini, G. Lemke, P. Soriano, M. Schachner, *Cell* **1992**, *71*, 565-576.
- [41] a) P. S. Mohan, D. K. H. Chou, F. B. Jungalwala, *J. Neurochem.* **1990**, *54*, 2024-2031; b) H. Hall, L. Liu, M. Schachner, B. Schmitz, *Eur. J. Neurosci.* **1993**, *5*, 34-43.
- [42] a) D. Edgar, R. Timpl, H. Thoenen, *EMBO J.* **1984**, *3*, 1463-1468; b) G. C. Sephel, K. I. Tashiro, M. Sasaki, D. Grestorex, G. R. Martin, Y. Yamada, H. K. Kleinman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *162*, 821-829; c) A. D. Lander, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1990**, *2*, 907-913; d) A. L. Calof, M. R. Campanero, J. J. O'Rear, P. D. Yurchenco, A. D. Lander, *Neuron* **1994**, *13*, 117-130.
- [43] K. Beck, I. Hunter, J. Engel, *FASEB J.* **1990**, *4*, 148-160.
- [44] a) H. Hall, T. Vorherr, M. Schachner, *Glycobiol.* **1995**, *5*, 435-441; b) H. Hall, R. Deutzmann, R. Timpl, L. Vaughan, B. Schmitz, M. Schachner, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 233-242.
- [45] A. P. N. Skubitz, P. C. Letourneau, E. Wayner, L. T. Furcht, *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 1137-1148.
- [46] a) L. K. Needham, R. L. Schnaar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1359-1363; b) P. J. Green, T. Tamatani, T. Watanabe, M. Miyasaka, A. Hasegawa, M. Kiso, C. T. Yuen, M. S. Stoll, T. Feizi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *188*, 244-251; c) D. Asa T. Gant, Y. Oda, B. K. Brandley, *Glycobiol.* **1992**, *2*, 395-399.
- [47] a) M. P. Bevilacqua, R. M. Nelson, *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 379-387; b) T. Feizi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 701-710.
- [48] M. Sammar, S. Aigner, M. Hubbe, V. Schirmacher, M. Schachner, D. Vestweber, P. Altevogt, *Int. Immunol.* **1994**, *6*, 1027-1036.
- [49] G. Keilhauer, A. Faissner, M. Schachner, *Nature* **1985**, *316*, 728-730.
- [50] V. Künemund, F. B. Jungalwala, G. Fischer, D. K. H. Chou, G. Keilhauer, M. Schachner, *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 213-223.

- [51] a) R. Martini, E. Bollensen, M. Schachner, *Devel. Biol.* **1988**, *129*, 330; b) R. Martini, Y. Xin, B. Schmitz, M. Schachner, *Eur. J. Neurosci.* **1992**, *4*, 628-639; c) R. Martini, M. Schachner, T. M. Brushart, *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 7180-7191.
- [52] K. Löw, G. Orberger, B. Schmitz, R. Martini, M. Schachner, *Eur. J. Neurosci.* **1994**, *6*, 1773-1781.
- [53] R. Martini, *J. Neurocytol.* **1994**, *23*, 1-28.
- [54] T. Becker, C. G. Becker, M. Schachner, R. R. Bernhardt, *Mechan. Develop.* **2001**, *109*, 37-49.
- [55] a) A. Noronha, A. Ilyas, R. H. Quarles, H. Antonicek, M. Schachner, *Brain Res.* **1986**, *385*, 237-244; b) M. Schachner, *Ciba Fdn. Symp.* **1989**, *145*, 56-172.
- [56] A. Ilyas, D. K. Chou, F. B. Jungalwala, C. Costello, R. H. Quarles, *J. Neurochem.* **1990**, *55*, 594-601.
- [57] B. Schmitz, M. Schachner, Y. Ito, T. Nakano, T. Ogawa, *Glycoconj. J.* **1994**, *11*, 345-352.
- [58] a) T. Inuzuka, R. H. Quarles, A. B. Noronah, M. J. Dobersen, R. O. Brady, *Neurosci. Lett.* **1984**, *51*, 105-111; b) E. Nobile-Orazio, A. P. Hays, N. Latov, G. Perman, J. Golier, M. E. Shy, L. Freddo, *Neurology* **1984**, *34*, 1336-1342; c) A. Ilyas, M. J. Dobersen, H. J. Willison, R. H. Quarles, *J. Neuroimmunol.* **1986**, *12*, 99-106.
- [59] A. H. Tatum, *Ann. Neurol.* **1993**, *33*, 502-506.
- [60] a) R. Martini, M. Schachner, *J. Cell. Biol.* **1986**, *103*, 2439-2448; b) M. Schachner, R. Martini, H. Hall, G. Orberger, *Progress Brain Res.* **1995**, *105*, 183-188.
- [61] a) A. Boelen, M. A. W. Maas, C. W. G. M. Lowik, M. C. Platvoet, W. M. Wiersinga, *Endocrinology* **1996**, *137*, 5250-5254; b) Y. Okuda, S. Sakoda, H. Fujimara, Y. Saeki, T. Kishimoto, T. Yanagihara, *J. Neuroimmunol.* **1999**, *101*, 188-196 ; c) Y. Okuda, S. Sakoda, Y. Saeki, T. Kishimoto, T. Yanagihara, *J. Neuroimmunol.* **2000**, *105*, 120-123; d) C. Cebo, V. Durier, P. Lagant, E. Maes, D. Florea, T. Lefebvre, G. Strecker, G. Vergoten, J.-P. Zanetta, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12246-12252.
- [62] T. Nakano, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1569-1572.
- [63] A. V. Kornilov, A. A. Sherman, L. O. Kononov, A. S. Shashkov, N. E. Nifant'ev, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 717-730.
- [64] M. Simon-Haldi, N. Mantei, J. Franke, H. Voshol, M. Schachner, *J. Neurochem.* **2002**, *83*, 1380-1388.
- [65] M. A. Johnson, B. M. Pinto, *Aust. J. Chem.* **2002**, *55*, 13-25.
- [66] P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446-2471.
- [67] a) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327; b) J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578; c) R. T. Lee, Y. C. Lee, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 543-551; d) M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908-2953.
- [68] E. A. Merritt, W. G. J. Hol, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 165-171.

- [69] A. Bernardi, A. Checchia, P. Brocca, S. Sonnino, F. Zuccotto, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2032-2036.
- [70] K. R. Oldenburg, D. Loganathan, I. J. Goldstein, P. G. Schultz, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5393-5397.
- [71] J. K. Scott, D. Loganathan, R. B. Easley, X. Gong, I. J. Goldstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5398-5402.
- [72] R. Hoess, U. Brinkmann, T. Handel, I. Pastan, *Gene* **1993**, *128*, 43-49.
- [73] a) A. R. Shikhman, M. W. Cunningham, *J. Immunol.* **1994**, *152*, 4375-4387; b) A. R. Shikhman, N. S. Greenspan, M. W. Cunningham, *J. Immunol.* **1994**, *153*, 5593-5606; c) R. M. H. Ravindranath, W.-Y. Tam, P. Nguyen, A. G. Fincham, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39654-39661.
- [74] E. Bianchi, A. Folgori, A. Wallace, M. Nicotra, S. Acali, A. Phalipon, G. Barbato, R. Bazzo, R. Cortese, F. Felici, A. Pessi, *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 154-160.
- [75] C. L. Martens, S. E. Cwirla, R. Y.-W. Lee, E. Whitehorn, E. Y.-F. Smith, E. Tate, K. J. Koller, P. J. Schatz, W. J. Dower, R. W. Barrett, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21129-21136.
- [76] a) M. A. J. Westerink, P. C. Giardina, M. A. Apicella, T. Kieber-Emmons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4021-4025; b) W. A. Hutchins, T. Kieber-Emmons, G. M. Carlone, M. A. J. Westerink, *Hybridoma* **1999**, *18*, 121-128.
- [77] J. Eichler, A. W. Lucka, C. Pinilla, R. A. Houghten, *Mol. Diversity* **1995**, *1*, 233-240.
- [78] a) P. Valdon, G. Nussbaum, L. F. Boyd, D. H. Margulies, M. D. Scharff, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 11-22; b) P. Valdon, G. Nussbaum, J. Oh, M. D. Scharff, *J. Immunol.* **1998**, *161*, 1829-1836; c) A. C. M. Young, P. Valdon, A. Casadevall, M. D. Scharff, J. C. Sacchettini, *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 622-634.
- [79] T. Taki, D. Ishikawa, H. Hamasaki, S. Handa, *FEBS Lett.* **1997**, *418*, 219-223.
- [80] G. Nussbaum, W. Cleare, A. Casadevall, M. D. Scharff, P. Valdon, *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 685-694.
- [81] A. Phalipon, A. Folgori, J. Arondel, G. Sgaramella, P. Fortugno, R. Cortese, P. J. Sansonetti, F. Felici, *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 2620-2625.
- [82] a) M. Agadjanyan, P. Lou, M. A. J. Westerink, L. A. Carey, W. Hutchins, Z. Steplewski, D. B. Weiner, T. Kieber-Emmons, *Nature Biotechnol.* **1997**, *15*, 547-551; b) P. Lou, M. Agadjanyan, J. Qiu, M. A. J. Westerink, Z. Steplewski, T. Kieber-Emmons, *Mol. Immunol.* **1998**, *35*, 865-879.
- [83] S. L. Harris, L. Craig, J. S. Mehroke, M. Rashed, M. B. Zwick, K. Kenar, E. J. Toone, N. Greenspan, F.-I. Auzanneau, J.-R. Marino-Albernas, B. M. Pinto, J. K. Scott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2454-2459.
- [84] a) K. J. Kaur, S. Khurana, D. M. Salunke, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5539-5543; b) G. Cunto-Amesty, T. K. Dam, P. Luo, B. Monzavi-Karbassi, C. F. Brewer, T. C. van Cott, T. Kieber-Emmons, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30490-30498; c) K. J. Kaur, D. Jain, M. Goel, D. M. Salunke, *Vaccine* **2001**, *19*, 3124-3130.

- [85] a) V. Apostolopoulos, S. A. Lofthouse, V. Popovski, G. Chelvanayagam, M. S. Sandrin, I. F. C. McKenzie, *Nature Biotechnol.* **1998**, *16*, 276-285; b) V. Apostolopoulos, M. S. Sandrin, I. F. C. McKenzie, *J. Mol. Med.* **1999**, *77*, 427-436.
- [86] D. Ishikawa, H. Kikkawa, K. Ogino, Y. Hirabayashi, N. Oku, T. Taki, *FEBS Lett.* **1998**, *441*, 20-24.
- [87] Q. Lou, I. Pastan, *J. Pep. Res.* **1999**, *53*, 252-260.
- [88] C. Pinilla, J. R. Appel, G. D. Campbell, J. Buencamino, N. Benkirane, S. Muller, N. S. Greenspan, *J. Mol. Biol.* **1998**, *283*, 1013-1025.
- [89] S. H. Pincus, M. J. Smith, H. J. Jennings, J. B. Burritt, P. M. Glee, *J. Immunol.* **1998**, *160*, 293-298.
- [90] J. Willers, A. Lucchese, D. Kanduc, S. Ferrone, *Peptides* **1999**, *20*, 1021-1026.
- [91] G. R. Moe, S. Tan, D. M. Granoff, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1999**, *26*, 209-226.
- [92] X. de Bolle, T. Laurent, A. Tibor, F. Godfroid, V. Weynants, J.-J. Lettesson, P. Mertens, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 181-191.
- [93] I. O, T. Kieber-Emmons, L. Otvos, M. Blaszczyk-Thurin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *268*, 106-111.
- [94] P. Luo, G. Canziani, G. Cunto-Amesty, T. Kieber-Emmons, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16146-16154.
- [95] M. N. Fukuda, C. Ohyama, K. Lowitz, O. Matsuo, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, M. Fukuda, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 450-456.
- [96] M. C. Grothaus, N. Srivastava, S. L. Smithson, T. Kieber-Emmons, D. B. Williams, G. M. Carlone, M. A. Westerink, *Vaccine* **2000**, *18*, 1253-1263.
- [97] J. S. Shin, J. S. Lin, P. W. Anderson, R. A. Insel, M. H. Nahm, *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 3335-3342.
- [98] a) H. Zhang, Z. Zhong, L.-A. Pirofski, *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 1158-1164; b) R. Fleuridor, A. Lees, L.-A. Pirofski, *J. Immunol.* **2001**, *166*, 1087-1096.
- [99] M. R. Ziebell, Z.-G. Zhao, B. Luo, Y. Luo, E. A. Turley, G. D. Pestwisch, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1081-1094.
- [100] S. Gulati, J. Ngampasutadol, R. Yamasaki, D. P. McQuillen, P. A. Rice, *Int. Rev. Immunol.* **2001**, *20*, 229-250.
- [101] T. Jouault, C. Fradin, F. Dzierszinski, M. Borg-Van-Zepelin, S. Tomavo, R. Corman, P.-A. Trinel, J.-P. Kerckaert, D. Poulain, *Glycobiology* **2001**, *11*, 693-701.
- [102] G. B. Lesinski, S. L. Smithson, N. Srivastava, D. Chen, G. Widera, M. A. J. Westerink, *Vaccine* **2001**, *19*, 1717-1726.
- [103] T. J. Molenaar, C. C. Appeldoorn, S. A. de Haas, I. N. Michon, A. Bonnefoy, M. F. Hoylaerts, H. Pannekoek, T. J. van Berkel, J. Kuiper, E. A. Biessen, *Blood* **2002**, *100*, 3570-3577.

- [104] P. J. Brett, H. Tiwana, I. M. Feavers, B. M. Charalambous, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 20468-20476.
- [105] J. Zhan, Z. Xia, L. Xu, Z. Yan, K. Wang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 308, 19-22.
- [106] M. A. Johnson, A. A. Eniade, B. M. Pinto, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 781-788.
- [107] D. M. Prinz, S. L. Smithson, M. A. J. Westerink, *J. Immunol. Methods* **2004**, 285, 1-14.
- [108] C. J. Arnusch, S. André, P. Valentini, M. Lensch, R. Russwurm, H.-C. Siebert, M. J. E. Fischer, H.-J. Gabius, R. J. Pieters, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1437-1440.
- [109] a) D. M. Granoff, E. L. Anderson, M. T. Osterholm, S. J. Holmes, J. E. McHugh, R. B. Belshe, F. Medley, T. V. Murphy, *J. Pediatr.* **1992**, 121, 187-194; b) A. A. Lindberg, *Vaccine* **1999**, 17, 28-36.
- [110] a) P. A. Twumasi, S. Kumah, A. Leach, T. J. D. O'Dempsey, S. J. Ceesay, J. Todd, C. V. Broome, G. M. Carlone, L. B. Pais, P. Holder, B. D. Plikaytis, B. M. Greenwood, *J. infect. Dis.* **1995**, 171, 632-638; b) E. L. Anderson, T. Bowers, C. M. Mink, D. J. Kennedy, R. B. Harakeh, L. Pais, P. Holder, G. M. Holder, G. M. Carlone, *Infect. Immun.* **1994**, 62, 3391-3395; c) L. L. Gheesling, G. M. Carlone, L. Pais, P. Holder, S. E. Maslanka, B. D. Plikaytis, M. Achtmann, P. Densen, C. E. Frasch, H. Kayhty, J. P. Mays, L. Nencioni, C. Peeters, D. C. Phipps, J. T. Poolman, E. Rosenqvist, G. R. Siber, B. Thiesen, J. Tai, C. M. Thompson, P. P. Vella, J. D. Wenger, *J. Clin. Microbiol.* **1994**, 32, 1475-1482.
- [111] H. J. Jennings, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1988**, 228, 495-550.
- [112] M. A. J. Westerink, A. A. Campagnari, M. A. Wirth, M. A. Apicella, *Infect. Immun.* **1988**, 56, 1120-1127.
- [113] a) G. H. Lowell, W. R. Ballou, L. F. Smith, R. A. Wirtz, W. D. Zollinger, W. T. Hockmeyer, *Science* **1988**, 240, 800-802; b) G. H. Lowell, L. F. Smith, R. C. Seid, W. D. Zollinger, *J. Exp. Med.* **1988**, 167, 658-663.
- [114] W. A. Hutchins, A. R. Adkins, T. Kieber-Emmons, M. A. J. Westerink, *Mol. Immunol.* **1996**, 33, 503-510.
- [115] T. Kieber-Emmons, P. Lou, J. Qui, M. Agadjanyan, L. Carey, W. Hutchins, M. A. Westerink, Z. Steplewski, *Hybridoma* **1997**, 16, 3-10.
- [116] T. R. Transue, E. de Genst, M. Arabi Ghahroudi, L. Wyns, S. Muyldermans, *Protein Struct. Funct. Genet.* **1998**, 32, 515-522.
- [117] a) M. Machius, L. Vértésy, R. Huber, G. Wiegand, *J. Mol. Biol.* **1996**, 260, 409-421; b) C. Bompert-Gilles, P. Rousseau, P. Rougé, F. Payan, *Structure* **1996**, 4, 1441-1452.
- [118] N. K. Jerne, *Ann. Immunol. (Paris)* **1974**, 125, 373-389.
- [119] D. Jain, K. J. Kaur, B. Sundaravadivel, D. M. Salunke, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 16098-16102.
- [120] D. Jain, K. J. Kaur, M. Goel, D. M. Salunke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 272, 843-839.

- [121] E. A. Kabat, T. T. Wu, *J. Immunol.* **1991**, *147*, 1709-1719.
- [122] D. O. Beenhouwer, P. Valdon, R. May, M. D. Scharff, *Molecular Mimikry, Microbes and Autoimmunity*, (Eds M. W. Cunningham, R. S. Fujinami) ASM Press, Washington D.C. **2000**, Ch. 11.
- [123] N. K. Vyas, M. N. Vyas, M. C. Chervenak, D. R. Bundle, B. M. Pinto, F. A. Quiocho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15023-15028.
- [124] L. Stryer, *Biochemie*, 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford **1996**.
- [125] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim **2002**.
- [126] E. Fischer, *Ber. deut. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2094-2106.
- [127] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [128] B. F. Gisin, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 3102-3106.
- [129] S. Nozaki, *J. Peptide Res.* **1999**, *54*, 162-167.
- [130] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [131] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [132] M. Crisma, G. Valle, V. Moretto, F. Formaggio, C. Toniolo, F. Albericio, *Lett. Pep. Sci.* **1998**, *5*, 247-258.
- [133] K. Barlos, D. Papaionnou, D. Theodoropoulos, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1984**, *23*, 300.
- [134] L. A. Carpino, H. Imazumi, B. M. Foyman, M. J. Vela, P. Henklein, A. El-Faham, J. Klose, M. Bienert, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2253-2256.
- [135] R. D. Gandour, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 295-298.
- [136] V. Dourtoglou, B. Gross, *Synthesis* **1984**, 572-574.
- [137] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- [138] B. Castro, J. R. Dormay, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219-1222.
- [139] J. Coste, D. Le Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [140] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 695-698.
- [141] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 458-461.
- [142] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154.
- [143] C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246-249.
- [144] G. Barany, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7363-7365.
- [145] a) L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749; b) L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.

- [146] J. D. Wade, J. Bedford, R. C. Sheppard, G. W. Tregear, *Pept. Res.* **1991**, *4*, 194-199.
- [147] a) D. S. King, C. G. Fields, G. B. Fields, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *36*, 255-266; b) D. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guidon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742; c) C. G. Fields, G. B. Fields, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6661-6664; d) N. A. Solé, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5399-5403.
- [148] a) E. Oliveira, A. Miranda, F. Albericio, D. Andreu, A. C. M. Paiva, C. R. Nakaie, M. Tominaga, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 300-307; b) M. Narita, S. Honda, H. Umeyama, S. Obana, *Bull. Chem. Soc. Japan* **1988**, *61*, 281-284.
- [149] a) M. Mutter, A. Nefzi, T. Sato, X. Sun, F. Wahl, T. Wöhr, *Pept. Res.* **1995**, *8*, 145-153; b) T. Wöhr, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218-9227.
- [150] a) T. Johnson, M. Quibell, D. Owen, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 369-372; b) C. Hyde, T. Johnson, D. Owen, M. Quibell, R. C. Sheppard, *Int. J. Peptide Res.* **1994**, *43*, 431-440; c) M. Quibell, L. C. Packman, T. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11656-11668; d) W. R. Sampson, H. Patsiouras, N. J. Ede, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 403-409.
- [151] R. Santini, M. C. Griffith, M. Qi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8951-8954.
- [152] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [153] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
- [154] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1994**, 2559-2560.
- [155] a) G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1971**, 636-637; b) M. Pátek, M. Lebl, *Biopolymers* **1998**, *47*, 353-363; c) I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946.
- [156] H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 732-734.
- [157] a) D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1575-1579; b) C. P. Holmes, D. G. Jones, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2318-2319; c) M. C. Fitzgerald, K. Harris, C. G. Shevlin, G. Siuzdak, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 979-982.
- [158] J. N. Lambert, J. P. Mitchell, K. D. Roberts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 471-484.
- [159] a) W. Lukenheimer, H. Zahn, *Liebigs Ann. Chem.* **1970**, *740*, 1-17; b) B. F. Gisin, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 3102-3106.
- [160] a) K. Barlos, D. Gatos, S. Kaposos, G. Papaphotiu, W. Schäfer, Y. Wenqing, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3947-3950; b) K. Akaji, Y. Kiso, L. A. Carpino, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 584-586.
- [161] a) A. K. Szardenings, T. S. Burkoth, H. H. Lu, D. W. Tien, D. A. Campbell, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6573-6593; b) M. del Fresno, J. Alisna, M. Royo, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2639-2642; c) Y. Hamuro, W. J. Marshall, M. A. Scialdone, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 163-172.

- [162] N. L. Benoiton, Y. C. Lee, R. Steinauer, F. M. F. Chen, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *40*, 559-566.
- [163] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [164] J. Alsina, K. J. Jensen, F. Albericio, G. Barany, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2787-2795.
- [165] a) A. Müller, F. Schumann, M. Kokschi, N. Sewald, *Lett. Peptide Sci.* **1997**, *4*, 275-281; b) J. S. McMurray, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7679-7682.
- [166] L. Yang, G. Morriello, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8197-8200.
- [167] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779; b) T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129-149.
- [168] a) L. Zhang, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2363-2370; b) J. P. Tam, Y.-A. Lu, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5599-5602.
- [169] J. P. Tam, Y.-A. Lu, Q. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4316-4324.
- [170] Y. Shao, W. Lu, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3911-3914.
- [171] E. A. Stern, R. A. Farrell, *Phys. Rev.* **1960**, *120*, 130-136.
- [172] R. W. Wood, *Phil. Mag.* **1912**, *23*, 310-315.
- [173] U. Fano, *J. Opt. Soc. Am.* **1941**, *31*, 213-222.
- [174] I. Pockrand, J. D. Swalen, J. G. Gordon, M. R. Philpott, *Science* **1978**, *74*, 237-244.
- [175] J. G. Gordon, M. R. Ernst, *Surface Sci.* **1980**, *101*, 499-506.
- [176] a) C. Nylander, B. Liedberg, I. Lundström, *Sens. Actuat.* **1983**, *4*, 299-304; b) B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, *Biosensors Bioelectron.* **1995**, *10*, i-ix.
- [177] Z. Salomon, H. A. Macleod, G. Tollin, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1331*, 117-129.
- [178] P. Schuck, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 541-566.
- [179] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, *Sens. Actuat. B* **1999**, *54*, 3-15.
- [180] a) E. Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch.* **1968**, *23A*, 2135-2136; b) A. Otto, *Z. Physik* **1968**, *216*, 398-410.
- [181] a) E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *143*, 513-526; b) P. B. Garland, *Q. Rev. Biophys.* **1996**, *29*, 91-117.
- [182] J. Homola, I. Koudela, S. S. Yee, *Sens. Actuat. B* **1999**, *54*, 16-24.
- [183] a) S. Löfkås, B. Johansson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, *21*, 1526-1528; b) S. Löfkås, M. Malmqvist, I. Rönnberg, E. Stenberg, B. Liedberg, *Sens. Actuat. B* **1991**, *5*, 79-84.
- [184] a) E. Wünsch, F. Dress, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 100-104; b) F. Weygand, D. Hoffmann, E. Wünsch, *Z. Naturforsch. B* **1966**, *21*, 426-428.
- [185] B. Johansson, S. Löfkås, G. Lindquist, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 268-277.

- [186] T. A. Morton, D. B. Bennett, E. R. Appelbaum, D. M. Cusimano, K. O. Johanson, J. *Mol. Recog.* **1994**, *7*, 47-55.
- [187] D. J. O'Shannessy, M. Brigham-Burke, K. Peck, *Anal. Biochem.* **1992**, *205*, 132-136.
- [188] a) B. C. Cunningham, J. A. Wells, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 554-563; b) B. Johansson, S. Löfkås, G. Lindquist, A. Edström, R.-M. M. Hillgren, *J. Mol. Recog.* **1995**, *8*, 125-131.
- [189] J.-P. Jost, O. Munch, T. Andersson, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 2788.
- [190] a) R. Karlsson, A. Michaelsson, L. Mattson, *J. Immunol. Methods* **1991**, *145*, 229-240; b) J. L. Pellequer, M. H. V. van Regenmortel, *J. Immunol Methods* **1993**, *166*, 133-143.
- [191] L. Nieba, S. R. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hämäläinen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, A. F. Karlsson, A. Pluckthun, *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 217-228.
- [192] a) J. J. Ramsden, G. I. Bachmanova, A. I. Archakov, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 523-528; b) C. I. Webster, M. A. Cooper, L. C. Packman, D. H. Williams, J. C. Gray, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1618-1624.
- [193] Z. Salomon, H. A. Macleod, G. Tollin, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1331*, 131-152.
- [194] D. J. O'Shannessy, D. J. Winzor, *Anal. Biochem.* **1996**, *236*, 275-283.
- [195] D. R. Hall, J. R. Cann, D. J. Winzor, *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 152-160.
- [196] a) P. Schuck, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1230-1249; b) P. Schuck, A. P. Minton, *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 262-272.
- [197] T. Kieber-Emmons, *Immun. Res.* **1998**, *17*, 95-108.
- [198] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509-520.
- [199] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 709-730.
- [200] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440-1456.
- [201] a) H. Matter, G. Gemmecker, H. Kessler, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45*, 430-440; b) J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167-339.
- [202] R. Schwyzer, P. Sieber, B. Gorup, *Chimia* **1958**, *12*, 90-91.
- [203] D. Bächle, *Synthese cyclischer Peptide als Mimetika für Kohlenhydrat-Erkennungssequenzen*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld **2000**.
- [204] R. Ramage, J. Green, A. J. Blake, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6353-6370.
- [205] L. A. Carpino, H. Schroff, S. A. Triolo, E.-S. M. E. Mansour, H. Wenschuh, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7829-7832.
- [206] a) A. F. S. A. Habeeb, *Can. J. Biochem. Physiol.* **1960**, *38*, 493-501; b) C. Maryanoff, R. C. Stanzione, J. N. Plampin, J. E. Mills, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1882-1884; c) A. E. Miller, J. J. Bischoff, *Synthesis* **1986**, 777-779; d) M. S. Bernatowicz, Y. Wu, G. R. Matsueda, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2497-2502.
- [207] a) R. Paul, A. S. Kende, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4162-4166; b) D. V. Kashelkar, C. Ressler, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2467-2473.

- [208] L. Kisfaludy, I. Schön, M. Renyei, S. Görög, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5588-5589.
- [209] E. Schnabel, H. Klostermeyer, J. Dahlmans, H. Zahn, *Liebigs Ann. Chem.* **1967**, *707*, 227-241.
- [210] P. Sieber, B. Riniker, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6031-6034.
- [211] M. Bodanszky, A. Bodanszky, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1967**, 591-593.
- [212] a) H. Schnabel, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1959**, *314*, 114-130; b) Z. Bohak, E. Katchalski, *Biochemistry* **1963**, *2*, 228-237.
- [213] a) I. Antonovics, G. T. Young, *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 595-601; b) M. Bergmann, L. Zervas, *Biochem. Z.* **1928**, 280; c) M. Goodman, L. Levine, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2918-2922; d) M. Crisma, G. Valle, V. Moretto, F. Formaggio, C. Toniolo, *Pept. Res.* **1995**, *8*, 187-190.
- [214] O. Grahl-Nielsen, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 1588-1589.
- [215] N. L. Benoiton, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **1996**, *40*, 245-254.
- [216] J. H. Jones, M. J. Witty, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 281-282.
- [217] F. Weygand, A. Prox, W. König, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 1446-1450.
- [218] a) N. L. Benoiton, K. Kuroda, F. M. Chen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 403-408; b) N. L. Benoiton, K. Kuroda, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1981**, *17*, 197-204; c) D. Le Nguyen, J.-R. Dormoy, B. Castro, D. Prevot, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 4229-4238.
- [219] J. D. Wade, J. Bedford, R. C. Sheppard, G. W. Tregear, *Pept. Res.* **1991**, *4*, 194-199.
- [220] a) C. Hyde, J. Johnson, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1573-1575; b) J. P. Tam, A. Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12058-12063; c) L. P. Miranda, P.F. Alewood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1181-1186.
- [221] C. S. Pande, S. K. Gupta, J. D. Glass, *Indian J. Chem.* **1987**, *26B*, 957.
- [222] C. K. Marlowe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 437-440.
- [223] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, N. D. Hone, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 778-779.
- [224] W. C. Chan, B. W. Bycroft, D. J. Evans, P. D. White, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2209-2210.
- [225] a) M. Malešević, *β -Amino Acids as Secondary Structure Inducers in Peptides*, Dissertation, Universität Bielefeld **2002**; b) S. Story, J. V. Aldrich, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, *43*, 292-296.
- [226] a) J. H. Wade, *J. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 285-287; b) P. Thamm, W. Kolbeck, H.-J. Musiol, L. Moroder, *Arginine Precursors* (Kapitel 2.6.1.6.), in *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl)*, E22a, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **2002**, 326.
- [227] *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds*. Recommendations 1993, IUPAC and Blackwell Science, Oxford **1993**, 63.

- [228] J. Rademann, M. Barth, R. Brock, H.-J. Egelhaaf, G. Jung, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3884-3889.
- [229] R. B. Merrifield, *Recent Prog. Horm. Res.* **1967**, *23*, 451-482.
- [230] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957-989.
- [231] R. Günther, S. Thust, H.-J. Hofmann, F. Bordusa, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6056-6062.
- [232] P. L. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Raton, New York **1997**.
- [233] R. Colombo, F. Colombo, J. H. Jones, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 292-293.
- [234] S. R. Chhabra, H. Parekh, A. N. Khan, B. W. Bycroft, B. Kellam, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2189-2192.
- [235] B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322-2330.
- [236] K. S. Iyer, J. P. Laussac, B. Sarkar, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1981**, *18*, 468-477.
- [237] G. Sabatino, M. Chelli, S. Mazzucco, M. Ginanneschi, A. M. Papini, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 809-812.
- [238] S. A. Kates, S.B. Daniels, N.A. Solé, G. Barany, F. Albericio, in *Peptides-Chemistry, Structure & Biology, Proc. 13th American Peptide Symposium*, R. S. Hodges, J. A. Smith (Eds.), ESCOM Science Publishers, Leiden **1994**, 113-115.
- [239] M. Dessolin, M. G. Guillerez, N. Thieriet, F. Guibé, A. Loffet, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *32*, 5741-5744.
- [240] F. Albericio, S. A. Kates, *Eur. Pat. Appl.* **1994**, EP 94-104977 19940329.
- [241] F. Guibé, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2967-3042.
- [242] T. Johnson, M. Liley, T. J. Cheeseright, F. Begum, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 2811-2820.
- [243] R. A. B. Bannard, A. A. Casselman, W. F. Cockburn, G. M. Brown, *Canad. J. Chem.* **1958**, *3*, 1541-1509.
- [244] M. Bodanszky, M. A. Ondetti, C. A. Birkhimer, P. L. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4452-4459.
- [245] R. Karlsson, H. Roos, L. Fägerstamm, B. Persson, *Methods: Companion Methods Enzymol.* **1994**, *6*, 99-110.
- [246] G. Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660-672.
- [247] Novabiochem, *Catalog & Peptide Synthesis Handbook* **1999**, 42.
- [248] J.-N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther, G. Sennyey, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1303-1306.

*Alles gelingt dem,
der zu warten versteht.*

Wolfgang Pauli

