

**SYNTHESE UND SCREENING EINER  
KOMBINATORISCHEN REZEPTORBIBLIOTHEK  
FÜR BIOLOGISCH RELEVANTE TETRAPEPTIDE**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES  
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT  
WÜRZBURG

vorgelegt von  
Diplom-Chemiker  
**Martin Heil**  
aus  
Rheda-Wiedenbrück

Würzburg 2004

Eingereicht am: \_\_\_\_\_  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: \_\_\_\_\_

2. Gutachter: \_\_\_\_\_

der Dissertation

1. Prüfer: \_\_\_\_\_

2. Prüfer: \_\_\_\_\_

3. Prüfer: \_\_\_\_\_

des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Carsten Schmuck von Oktober 2000 bis März 2002 am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln und im Zeitraum von April 2002 bis April 2004 am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg angefertigt.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind an folgender Stelle veröffentlicht worden:

C. Schmuck, M. Heil: "C-Terminus of  $\beta$ -Amyloid with a Tripeptide-based Cationic Receptor: A Combinatorial Approach to a Quantitative Understanding of Peptide Binding"; *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 633-636.

C. Schmuck, M. Heil: "Peptide Binding by One-armed Receptors in Water: Screening of a Combinatorial Library for Binding of Val-Val-Ile-Ala"; *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1232-1236.

M. Schäfer, C. Schmuck, M. Heil, H. J. Cooper, C. L. Hendrickson, M. J. Chalmers, A. G. Marshall: "Determination of the Gas-phase Activation Energy for the Unimolecular Dissociation of a Non-covalent Complex by Infrared Multiphoton Dissociation Tandem Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry"; *J. Am. Soc. Mass. Spec.* **2003**, *14*, 1282-1289.

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2000 bis März 2002 am Institut für organische Chemie an der Universität zu Köln und von April 2002 bis April 2004 am Institut für organische Chemie an der Julius Maximilian Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Carsten Schmuck durchgeführt.

In erster Linie möchte ich Prof. Dr. Carsten Schmuck herzlich für die Möglichkeit danken, ein außerordentlich interessantes Thema im Bereich der bioorganischen Chemie bearbeiten zu dürfen. Sein stetes Interesse und viele fruchtbare Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Danken möchte ich auch Dr. Peter Frey von der Novartis AG in Basel für die Durchführung der *in vitro* Assays zur Inhibierung der Fibrillenbildung und Dr. Mathias Schäfer für die Durchführung der ESI-MS IRMPD Untersuchungen.

Besonders hervorzuheben sind auch meine Laborkollegen Stefanie Baumann, Lars Geiger, Svea Graupner, Barbara Hartl, Michael Schwegmann und Wolfgang Wienand, die für eine (fast) immer gute Zusammenarbeit und angenehme Atmosphäre gesorgt haben. Nicht vergessen darf man die Arbeitskreismitglieder in Köln und die neu dazu gekommenen in Würzburg, die für ein gutes Miteinander und ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Für die Durchführung analytischer Messungen und die Unterstützung bei der Auswertung danke ich Dr. Hans Schmickler, Ingrid Hoven, Kathrin König, Dr. Mathias Schäfer (Köln) und Dr. Matthias Grüne, Elfriede Ruckdeschel und Dr. Michael Büchner (Würzburg) ganz herzlich.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit möchte ich mich bei Volker Bickert, Daniel Rupprecht, Michael Schwegmann und Nicholas Walden bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Magali Dousset, ohne ihre moralische Unterstützung wären weite Teile der hier vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN UND AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>- 3 -</b>
2.1	BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN .....	- 3 -
2.1.1	<i>Alzheimer</i> .....	- 3 -
2.1.2	<i>Antibiotika</i> .....	- 9 -
2.2	STAND DER FORSCHUNG .....	- 14 -
2.2.1	<i>Guanidine als Carboxylatrezeptoren</i> .....	- 14 -
2.2.2	<i>Modelle für Peptidrezeptoren</i> .....	- 19 -
2.3	AUFGABENSTELLUNG .....	- 29 -
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>- 34 -</b>
3.1	SYNTHESE DER REZEPTORBIBLIOTHEK .....	- 35 -
3.2	BESTIMMUNG VON BINDUNGSKONSTANTEN FÜR DAS ALZHEIMER MODELLPEPTID .....	- 37 -
3.2.1	<i>Screening in Methanol</i> .....	- 37 -
3.2.2	<i>Screening in Wasser</i> .....	- 49 -
3.2.3	<i>Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung</i> .....	- 59 -
3.2.4	<i>Synthese der Rezeptoren</i> .....	- 59 -
3.2.5	<i>Synthese der Liganden</i> .....	- 66 -
3.2.6	<i>Die Methode der Wahl</i> .....	- 68 -
3.2.7	<i>Titrationen zur Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung</i> .....	- 74 -
3.2.8	<i>Bestimmung der Dissoziationsenergien über Massenspektrometrie</i> .....	- 79 -
3.2.9	<i>In vitro Assay zur Inhibierung der Fibrillenbildung</i> .....	- 83 -
3.3	ENTSCHÜTZUNG DER BIBLIOTHEK .....	- 91 -
3.4	BESTIMMUNG VON BINDUNGSKONSTANTEN FÜR DAS PEPTIDOGLYCAN MODELLPEPTID .....	- 92 -
3.4.1	<i>Screening in Wasser</i> .....	- 92 -
3.4.2	<i>Synthese der Rezeptoren</i> .....	- 104 -
3.4.3	<i>Synthese der Liganden</i> .....	- 105 -
3.4.4	<i>NMR Titration für die Peptidoglycan Modellverbindung</i> .....	- 106 -
3.4.5	<i>UV- und Fluoreszenztitrationen für das Peptidoglycan Modellpeptid</i> .....	- 107 -
<b>4</b>	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>- 120 -</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>- 123 -</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>- 129 -</b>
<b>7</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>- 135 -</b>
7.1	SYNTHESE DER 512 MITGLIEDER UMFASSENDEN REZEPTORBIBLIOTHEK 35 .....	- 140 -
7.2	ENTSCHÜTZUNG DER 512 MITGLIEDER UMFASSENDEN BIBLIOTHEK 138.....	- 142 -
7.3	SYNTHESE DER FLUORESCENZMARKIERTEN TETRAPEPTIDE .....	- 143 -
7.3.1	<i>Synthese des fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH 43</i> .....	- 146 -
7.3.2	<i>Synthese der wasserlöslichen fluoreszenzmarkierten Tetrapeptide</i> .....	- 148 -
7.4	SYNTHESE DER REZEPTOREN .....	- 157 -
7.4.1	<i>Synthese der Carboxylat-Bindungsstelle</i> .....	- 157 -
7.4.2	<i>Versuch der Synthese von Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptoren auf Wang-Harz</i> .....	- 169 -

7.4.3	<i>Allgemeine Vorschrift zur Synthese der tripeptidischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren auf Rink-Amid Harz</i> .....	- 171 -
7.4.4	<i>Synthese des wasserlöslichen Trivalinrezeptors</i> .....	- 181 -
7.5	SYNTHESE DER LIGANDEN FÜR DIE BINDUNGSSTUDIEN IN LÖSUNG.....	- 183 -
7.6	DURCHFÜHRUNG DES FLUORESZENZSCREENINGS .....	- 189 -
7.6.1	<i>Screening für das Alzheimer Modellpeptid</i> .....	- 189 -
7.6.2	<i>Screening für das Peptidoglycan Modellpeptid</i> .....	- 191 -
7.7	DATEN ZU DEN BINDUNGSSTUDIEN IN LÖSUNG.....	- 192 -
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>- 195 -</b>
8.1	LITERATURVERZEICHNIS .....	- 195 -
8.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	- 201 -
8.3	WICHTIGE STRUKTURFORMELN .....	- 203 -
8.4	LEBENS LAUF UND ERKLÄRUNG.....	- 205 -

# 1 Einleitung

Viele Proteine üben ihre biologische Funktion als Bestandteile von molekularen Komplexen aus. Ihre Wirkungsweise wird oft durch spezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen bestimmt. Diese Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle bei der Genregulation, der strukturellen Anordnung von Gerüsten einer Zelle, der Immunantwort oder bei der Kommunikation zwischen Zellen.<sup>[1-3]</sup> Die Modulation dieser Interaktionen kann die Funktion bestimmter Proteine innerhalb einer Zelle wesentlich beeinflussen. Die Beeinflussung von Protein-Protein-Wechselwirkungen könnte daher sowohl für die Untersuchung physiologischer zellulärer Prozesse als auch für die Behandlung zahlreicher Krankheiten interessant sein.<sup>[4]</sup>

Kontaktflächen zwischen interagierenden Proteinen können bis zu  $600 \text{ \AA}^2$  betragen,<sup>[5-7]</sup> jedoch tragen häufig nur wenige Aminosäurereste signifikant zur Stärke der intermolekularen Wechselwirkung bei.<sup>[8]</sup> In letzter Zeit ist es gelungen solche so genannten „Hot Spots“ auf Proteinoberflächen zu identifizieren.<sup>[6, 9, 10]</sup> Sie umfassen nur einige wenige Aminosäuren lange Peptidsequenzen, die aber essentiell für die biologische Funktion sind. *Hamachi et al.* haben eine unnatürliche Aminosäure in ein Ribonuclease C Protein eingebaut und konnten zeigen, dass die Aktivität des modifizierten Enzyms von der Cu(II) Konzentration abhängt. Sie schlugen einen Mechanismus vor, bei der eine durch Kupfer induzierte Dimerisierung eine Schlüsselrolle einnimmt.<sup>[11]</sup>

Ziel des Chemikers ist es nun, Strukturen zu evaluieren, die Protein-Protein Wechselwirkungen imitieren können, um zunächst grundsätzlich etwas über die Struktur-Wirkungsbeziehung von Proteinen zu lernen. Später können die neu gewonnenen Erkenntnisse dazu genutzt werden, Ansätze für die Entwicklung von Therapeutika und für die medizinische Diagnostik zu finden. Ein wichtiges Hilfsmittel des Chemikers zur Targetvalidierung und Entdeckung neuer Wirkstoffklassen stellt dabei die Kombinatorische Chemie dar. Mit deren Hilfe ist es möglich, innerhalb kürzester Zeit große Substanzbibliotheken herzustellen und auf ihre Wechselwirkungen mit einem biologisch interessantem Target zu untersuchen.<sup>[12-14]</sup> Im Falle der nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Proteinen erfordert dies allerdings einen Paradigmenwechsel, weg von kleinen Molekülen, die *Lipinskis* „Rule of 5“ (weniger als 5 Wasserstoffbrückenbindungsdonoren, weniger als 10 Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren, einen *Log P* kleiner als 5 und einer molekularen Masse unter 500)<sup>[15]</sup> entsprechen, da das primäre Ziel nicht die Entwicklung neuer Therapeutika ist, sondern vielmehr das Verständnis von intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Proteinen im Vordergrund steht.

Dass die Beeinflussung von Protein-Protein Wechselwirkungen in der Tat ein erfolgreiches Konzept für die Entwicklung neuer medizinischer Anwendungen sein kann, zeigen z. B. die

RGD-Mimetika, die *Kessler et al.* entwickelt haben.<sup>[16]</sup> RGD ist ein Tripeptid aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure, das als ubiquitäre Zellerkennungssequenz für eine große Zahl an Integrinrezeptoren dient.<sup>[17]</sup> *Kessler* konnte zeigen, dass es möglich ist, mit cyclischen RGD-Mimetika das Tumorwachstum zu beeinflussen<sup>[18, 19]</sup> Ein weiteres Beispiel für die Beeinflussung von Protein-Protein Wechselwirkungen mit kleinen Molekülen erreichte *Hamilton* mit synthetischen Antagonisten für den Bak BH3/Bcl-xL Komplex, einer Proteindomäne, die bei der Entstehung von Krebs eine Rolle spielt. Der Antagonist besteht aus einem Oligoamid, das eine helikale Struktur besitzt, die an die BH3 Domäne bindet und so ihre Funktion beeinflusst.<sup>[20]</sup>

Es zeigt sich, dass in der Tat auch kleine, synthetische Strukturen auf peptidischer Basis dazu in der Lage sind, sehr effektiv mit Proteinen oder Proteinfragmenten zu wechselwirken. Niedermolekulare Modellsysteme können so zu einem besseren Verständnis von Protein-Protein Wechselwirkungen beitragen, da sie mit Hilfe von physikalisch organischen Methoden deutlich besser charakterisiert werden können als makromolekulare Proteinstrukturen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den intermolekularen Wechselwirkungen von peptidischen Rezeptoren und biologisch relevanten Tetrapeptiden, die als Test für Protein-Protein Wechselwirkungen dienen können.

## 2 Grundlagen und Aufgabenstellung

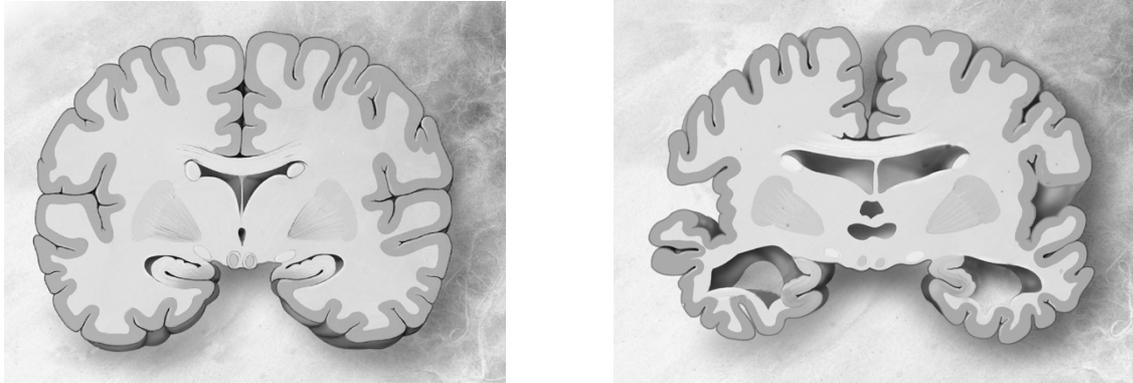
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Methoden der organischen Chemie synthetische Rezeptoren für kleine Peptide zu entwickeln und die Struktur-Wirkungsbeziehungen physikalisch-chemisch zu charakterisieren. Als Zielpeptide dienen zum einen das C-terminale Fragment des Amyloid- $\beta$  Proteins ( $A\beta$  1–42) L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH und zum anderen die C-terminale Sequenz eines Glycopeptids, das beim Zellwandaufbau *Gram* positiver Bakterien eine Schlüsselrolle einnimmt. Das Amyloid- $\beta$  Protein ist maßgeblich an der Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit beteiligt und bildet durch Selbstaggregation fibrillare Ablagerungen, die im Verdacht stehen Gehirnzellen zu zerstören.<sup>[21-31]</sup> Das Tetrapeptid D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH stellt das C-terminale Ende eines Glycopeptids dar, das durch Quervernetzung durch eine Transpeptidase zur Stabilität der Zellwand von Bakterien beiträgt. Diese Sequenz ist gleichzeitig auch der Angriffspunkt von Antibiotika aus der Klasse der Glycopeptide wie Vancomycin, das als letzte Waffe im Kampf gegen multiresistente Bakterienstämme eingesetzt wird.<sup>[32-37]</sup> Beiden Peptiden gemein ist ein freier C-Terminus. In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, das Carboxylate durch Guanidiniocarboxylpyrrole selbst in sehr polaren Lösemitteln mit hohen Assoziationskonstanten gebunden werden.<sup>[38-40]</sup> In der vorliegenden Arbeit sollte durch die Methoden der kombinatorischen Chemie eine Bibliothek aus Tripeptiden mit einer Guanidiniocarboxylpyrrol-Kopfgruppe als Carboxylat-Bindungsstelle aufgebaut werden und auf ihre Fähigkeit getestet werden Oligopeptide selektiv in hochpolaren Lösemitteln zu erkennen.

### 2.1 Biochemische Grundlagen

#### 2.1.1 Alzheimer

Das erste Modellpeptid, das für die vorliegende Doktorarbeit als Ligand ausgewählt wurde ist das C-terminale Fragment des Amyloid- $\beta$  Proteins, das bei der Entstehung der Alzheimer'sche Krankheit (AD) eine zentrale Rolle spielt. Im Nachfolgenden soll dieses Protein in Zusammenhang mit AD kurz dargestellt werden. Die Alzheimer'sche Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung, die zu den häufigsten Todesursachen für Menschen im fortgeschrittenen Alter zählt.<sup>[22]</sup> AD ist die Hauptursache für altersbedingte Demenz und beinhaltet einen fortschreitenden Gedächtnisverlust, eine Abnahme in der Fähigkeit einfache Tätigkeiten auszuüben, Desorientierung, Lernschwierigkeiten, Verlust von Sprachfähigkeiten und Persönlichkeitsänderungen. Die Alzheimer'sche Krankheit wurde 1907 als erstes von dem Deutschen Alois Alzheimer beschrieben. Bei der Autopsie einer Frau beobachtete er eine deutliche Abnahme an Nervenzellen im Gehirn und die teilweise Zerstörungen einiger Teile des Gehirns durch neurofibrillare Ablagerungen und so genannten Amyloid Plaques, heute die

sicheren Kennzeichen für Alzheimer. Ob die neurofibrillaren Ablagerungen und die Amyloid Plaques nun Ursache oder Folge der Alzheimer'schen Krankheit sind, ist aktueller Gegenstand der Forschung und wird im Folgenden noch näher beleuchtet.



*Abbildung 2.1: Vergleich eines Gehirns einer gesunden Person (links) mit einer Person, die schwer an Alzheimer erkrankt ist (rechts). Deutlich zu erkennen ist die fortschreitende Zerstörung von Nervenzellen, die zu einem Abbau an Gehirnmasse führt.<sup>[41]</sup>*

Die tatsächliche Ursache für AD ist bisher noch unklar, allerdings gibt es zwei unterschiedliche Hypothesen, die versuchen die Entstehung von AD zu erklären. Zum einen die Amyloid-Hypothese,<sup>[24]</sup> die die Amyloid Plaques für die pathologische Spezies hält und zum anderen die Tau-Hypothese, bei der das  $\tau$ -Protein eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Alzheimer einnimmt. Das  $\tau$ -Protein ist ein Protein, das an Mikrotubuli bindet und durch Hyperphosphorylierung sehr stark zur Bildung von amorphen Ablagerungen neigt. Beide Hypothesen gehen von einer Art infektiösem Protein aus, deren nichtnatürliche Faltung und darauf folgende Bildung von Protein-Plaques und Proteinaggregaten zu den der AD zugeordneten Symptomen führt.

Die Amyloid Hypothese, auf die hier das Hauptaugenmerk gelegt wird, geht davon aus, dass die Anreicherung von  $A\beta$  im Gehirn die primäre Ursache für die Entstehung der Krankheit ist. Alle anderen Beobachtungen, z. B. die Bildung von Fibrillen, die das  $\tau$ -Protein enthalten, rühren von dem Ungleichgewicht zwischen Expression und Metabolisierung von  $A\beta$ . Für die Amyloid Hypothese gibt es drei grundlegende Beobachtungen, die diese stark unterstützen.

- Zunächst verursachen Mutationen auf dem Gen, das das  $\tau$ -Protein kodiert einen zeitweiligen Gedächtnisverlust einhergehend mit dem Parkinson Syndrom. Diese neurodegenerative Störung wird durch starke Ablagerungen des  $\tau$ -Proteins im Gehirn begleitet, ohne dass es aber zu Ablagerung von Amyloid Plaques kommt. Dies legt nahe, dass selbst eine starke Ablagerung des  $\tau$ -Proteins, verursacht durch Mutationen, keine Ablagerung des Amyloid Proteins induziert.
- Als zweites wird die Amyloid Hypothese dadurch unterstützt, dass in transgenen Mäusen, die sowohl humanes Alzheimer Precursor Protein (APP) als auch humanes  $\tau$ -Protein überexprimieren, zunächst nur Ablagerungen von  $\tau$  gefunden werden, die

Menge an Amyloid Plaques bleibt dagegen unverändert. Das Amyloid Protein A $\beta$  stellt seinerseits auch nur einen Metaboliten von APP dar. Dies zeigt, dass die Entstehung von Plaques mit der Menge an mutantern APP einhergeht, das über einen anderen Metabolismus abgebaut wird. Außerdem kann kein Zusammenhang zwischen der vermehrten Ablagerung des  $\tau$ -Proteins und einer daraus folgenden Bildung von Amyloid Fibrillen gezogen werden.

- Als drittes ist der Zusammenhang zwischen der Ablagerung von Fibrillen mit der Expression an Apolipoprotein E (apoE) zu nennen. Transgene Mäuse wurden mit einem Mangel an apoE leidenden Mäusen gekreuzt, daraufhin wurde die cerebrale Ablagerung von A $\beta$  deutlich reduziert. Dies zeigt einen genetischen Zusammenhang zwischen dem Mangel an apoE und der Expression von A $\beta$ , unabhängig von der Menge an  $\tau$ -Protein.<sup>[24]</sup>

Geht man davon aus, dass die Amyloid Hypothese der richtige Weg für die Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit ist, muss man sich mit dem zentralen Peptid und seiner Biochemie etwas näher beschäftigen. Das Amyloid Protein ist ein kurzes 39-42 Aminosäuren langes Peptid, über dessen Funktion man bisher wenig weiß. Allerdings ist bekannt, dass A $\beta$  mit der Plasmamembran wechselwirkt und diese Wechselwirkung die Fibrillogenese begünstigt.<sup>[42]</sup> Das Amyloid Peptid selbst stellt einen Metaboliten des Alzheimer Precursor Proteins (APP) dar. APP ist ein transmembranes Glykoprotein das in verschiedenen Zelltypen exprimiert wird – über dessen Funktion ist bislang jedoch wenig bekannt. Es verfügt über eine lange N-terminale extrazelluläre Region, eine einzelne membranumspannende Sequenz und über einen kurzen C-terminalen, cytoplasmatischen Teil.<sup>[22]</sup> Es ist auf dem Gen 21 lokalisiert und umfasst 18 Exons (170 kb), die für ein etwa 700 Aminosäuren langes Peptid kodieren. Einige Isoformen enthalten eine Kunitz Proteaseinhibitor Domäne in einer extrazellulären Schleife, diese besitzen dann die Fähigkeit, als Thrombin Inhibitor in die Kaskade für die Blutkoagulation einzugreifen. Zudem befindet sich in allen APP Isoformen eine Heparin bindende Domäne in der Nähe des N-Terminus und jeweils eine Zink und eine Kupfer bindende Domäne, die für die Struktur und Stabilität von APP verantwortlich sein könnten. Alle Isoformen, bis auf zwei Ausnahmen, verfügen über das A $\beta$ -Fragment. APP wird durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Secretasen in kleinere Fragmente gespalten, ausschließlich der Weg über die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Secretase führt zu pathologischem A $\beta$ .<sup>[43, 44]</sup> Der normale Metabolismus über die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Secretase führt nicht zu fibrillaren Strukturen und ist nicht pathologisch. Secretasen sind weit verbreitete Enzyme, die nicht spezifisch für APP sind.



A $\beta$  (1-40) in Lösung in einer helikalen Struktur vorliegt, die sich erst durch Oligomerisierung in eine  $\beta$ -Faltblattstruktur umwandelt.

Zudem kann man anhand der in Abbildung 2.3 dargestellten elektrostatischen Oberfläche die Aufteilung in einen hydrophilen N-terminalen und einen sehr hydrophoben C-terminalen Part erkennen. Diese starken Unterschiede in der Polarität zeigen den besonderen Entstehungsweg des Amyloid Proteins an, da die  $\gamma$ -Secretase APP in der Membran schneidet.

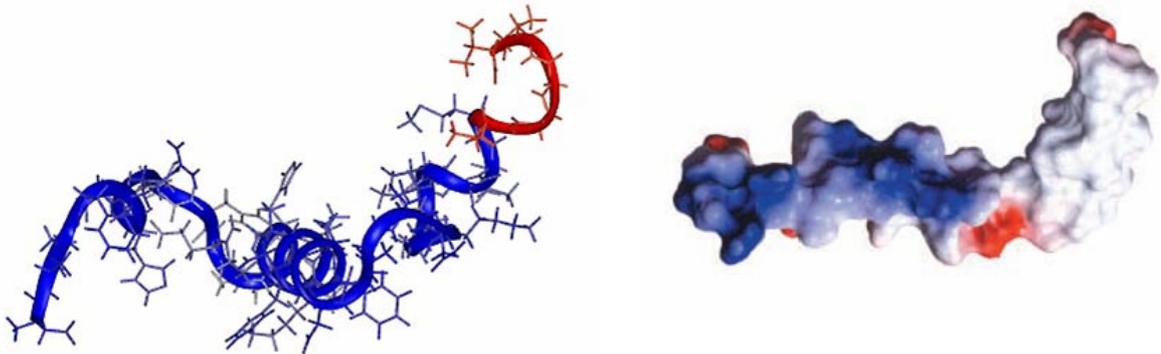


Abbildung 2.3: NMR-Struktur von A $\beta$  (1-40). Für die Selbstaggregation ist unter anderem der hier in rot gekennzeichnete C-Terminus verantwortlich. Auf der rechten Seite ist die elektrostatische Oberfläche von A $\beta$  (1-40) dargestellt.<sup>[52, 53]</sup>

Über die Struktur der Amyloid Fibrillen ist bislang nur sehr wenig bekannt, da diese Fibrillen nichtkristallin, unlöslich und aus diesem Grunde weder mit Röntgenstrukturanalysen, noch mit NMR-spektroskopischen Methoden in Lösung aufgeklärt werden konnten.

Durch MAS-NMR Untersuchungen an  $\beta$ -Amyloid Fibrillen von A $\beta$  (1-40) konnte gezeigt werden, dass sich in der Nähe des N-Terminus eine ungeordnete Sequenz von etwa acht Aminosäuren befindet, daran schließen sich zwei  $\beta$ -Faltblätter (12-24 und 30-40) und ein  $\beta$ -turn Element an, das von einer Salzbrücke zwischen den Aminosäureresten 23-28 stabilisiert wird. Mit den Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats kann es zu anderen Peptiden ein  $\beta$ -Faltblatt ausbilden.<sup>[55, 56]</sup>

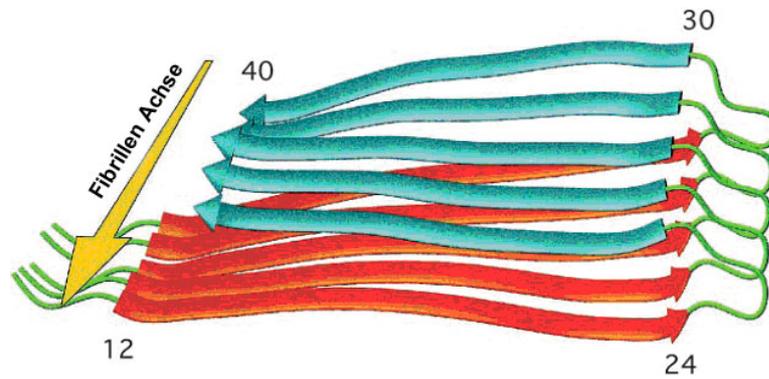


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Struktur für die Bildung von Amyloid Fibrillen von  $A\beta$  (1-40). Gezeigt sind fünf Peptide, die ein paralleles  $\beta$ -Faltblatt ausbilden; die untere Hälfte (rot) stellt den polaren Teil von  $A\beta$  dar, die obere Hälfte (blau) die unpolaren Seitenketten.<sup>[55]</sup>

Unklar ist jedoch weiterhin, welche Quartärstruktur für die Toxizität von  $A\beta$  verantwortlich ist. Ungeachtet dessen ergeben sich aus den vorangehenden Betrachtungen mehrere mögliche Therapieansätze für AD. Ein möglicher Angriffspunkt ist ein effizienter Secretasehemmer, der den pathologischen Weg der Spaltung von APP nicht mehr zulässt.<sup>[57]</sup> Jedoch sind Secretasen nicht auf APP spezialisiert, so dass unerwünschte Wirkungen äußerst wahrscheinlich sind. Weiterhin hemmen einige Antibiotika (z. B. Rifampicin) die Bildung von Fibrillen,<sup>[58]</sup> dies stellt aber nur einen zufälligen Effekt neben der eigentlich gewünschten, antibiotischen Wirkung dar. Eine weitere Methode ist eine Impfung, die allerdings bisher nur an Mäusen getestet wurde.<sup>[59]</sup>

Der Nachteil all dieser Strategien und schon angewendeten Therapeutika ist der oft sehr unklare Wirkmechanismus, die Nebenwirkungen und der bislang noch unklare Beweis des Ursprungs von AD. Solange man weder Klarheit über die genaue Ursache von AD, noch über einen Wirkort der Therapeutika hat, ist man auf „*trial and error*“ für die Auffindung neuer Therapiestrategien angewiesen. Einen Ausweg bieten dagegen kleine chemische Modelle, anhand derer man etwas über die Selbstaggregation von  $A\beta$  lernen kann und die möglicherweise die Aggregation von  $A\beta$  inhibieren können. Aus diesen Erkenntnissen könnten sich dann neue Therapiekonzepte oder auch verbesserte Diagnosemöglichkeiten für die Detektion von Amyloid Plaques *in vivo* entwickeln. Die hier vorliegende Arbeit setzt genau hier, bei der Entwicklung von kleinen chemischen Modellen zur Evaluierung von Struktur-Wirkungsbeziehungen an. Durch Modellstudien von synthetischen Rezeptoren mit Oligopeptiden, die eine klassische physikalisch chemische Untersuchung erlauben, können vielleicht Rückschlüsse auf Mechanismen gezogen werden, die einen Beitrag zur Diagnose oder Therapie der Alzheimer'schen Krankheit leisten können.

## 2.1.2 Antibiotika

Das zweite Modellpeptid, das Thema dieser Arbeit ist, ist die C-terminale Sequenz des Glycopeptids, das beim Aufbau der Zellwand von Prokaryonten eine wichtige Rolle spielt. Zudem ist dieses Peptid Angriffspunkt der Glycopeptid-Antibiotika. Aus diesem Grund wird kurz auf die Wirkungsweise von Antibiotika eingegangen. Antibiotika sind Stoffe, die von Bakterien oder Pilzen gebildet werden und das Wachstum anderer Organismen beeinträchtigen. Heutzutage wird der Begriff Antibiotika auch auf synthetische antibakterielle Substanzen ausgedehnt.<sup>[60]</sup> Die Entdeckung von Penicillin und seine Entwicklung zum antibakteriellen Wirkstoff während des zweiten Weltkrieges galt als Triumph des Menschen über die Bakterien. Dieser Triumph währte allerdings nicht lange, da Bakterien sich sehr schnell auf die neuen „Feinde“ einstellten und Resistenzen ausbilden konnten.

Antibiotika besitzen vielfältige Angriffspunkte, um die Bakterien am Wachstum zu hindern. Denn zum einen greifen sie in die Protein-Biosynthese des Bakteriums ein, zum anderen hindern sie das Bakterium am Aufbau der Zellwand, eine weitere Angriffsstelle bietet die Inhibierung der DNA Replikation (Abbildung 2.5).<sup>[33, 61]</sup>  $\beta$ -Lactame binden an die Transpeptidase und inhibieren so die Verknüpfung der Peptidoglycane. Vancomycin bindet das terminale D-Ala-D-Ala des Pentapeptids aus dem Peptidoglycan und inhibiert so die Biosynthese der Zellwand *Gram*-positiver Bakterien. Einige andere wichtige Antibiotika greifen in die Proteinbiosynthese des Bakteriums ein, wie z. B. die Makrolidantibiotika, Tetracycline und Oxazolidinone. Diese Antibiotika binden an die Peptidyltransferase und hindern so das Bakterium am Wachstum. Der Wirkungsort einer weiteren Klasse von Antibiotika, der Fluorchinolone, ist die DNA-Gyrase. Die Gyrase ist ein Enzym, das die Faltung der DNA beeinflusst. Die Fluorchinolone (Ciprofloxacin) bindet kovalent an dieses Enzym und behindert so die korrekte Faltung der DNA. Gegen alle Antibiotika haben Bakterien allerdings relativ schnell Resistenzmechanismen entwickelt, so dass ein Bedarf an der Entwicklung neuer antibiotischer Wirkstrukturen erforderlich ist.

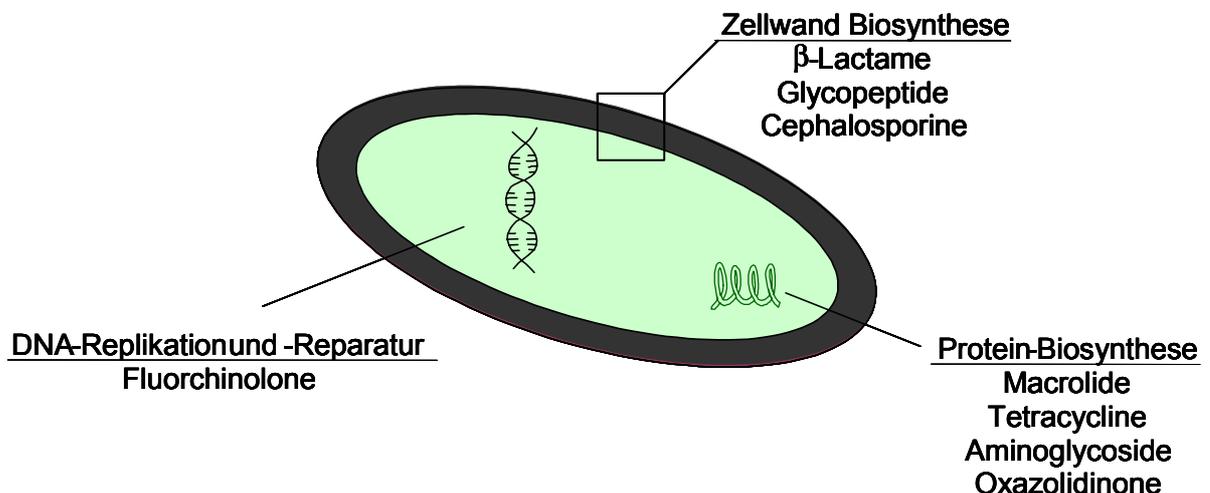


Abbildung 2.5: Bakterienzelle mit Angriffspunkten für Antibiotika.<sup>[62]</sup>

Es herrscht ein ständiger Wettlauf der Entwicklung neuer Antibiotika gegen die Resistenzbildung von Bakterien. Diese Resistenzbildung geschieht über vielfältige Mechanismen, darunter wäre der aktive Transport des Antibiotikums aus der Zelle über spezielle Pumpmechanismen zu nennen (Tetracycline). Eine weitere Möglichkeit des Bakteriums ist die Metabolisierung des Antibiotikums und die daraus folgende Inaktivierung des Antibiotikums.  $\beta$ -Lactame werden z. B. durch spezielle Enzyme ( $\beta$ -Lactamasen) durch Öffnung des Lactamrings unschädlich gemacht.

Ein anderer Resistenzweg, der für  $\beta$ -Lactamantibiotika beschränkt ist, ist die Mutation der Transpeptidase (PBP-Mutanten, Penicillin bindende Proteine), so dass das Antibiotikum nicht mehr andocken kann. Für die Ausbildung einer Resistenz bei Vancomycin zeichnet sich unter anderem eine Umprogrammierung der Zielstruktur des Antibiotikums von D-Ala-D-Ala zu D-Ala-D-Lac verantwortlich, so dass die Bindungsaffinität zu gering wird und die antibiotische Wirksamkeit aufgehoben wird.<sup>[60-62]</sup> Eine kurze Zusammenstellung verschiedener Antibiotika, der Zielstrukturen und den dazugehörigen Resistenzmechanismen findet sich in der nachfolgenden Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1: Antibiotika-Zielstrukturen und Resistenzmechanismen<sup>[33]</sup>

ANTIBIOTIKUM	ZIELSTRUKTUREN	RESISTENZMECHANISMUS
<i>Zellwand</i>		
$\beta$ -Lactame	Transpeptidase/Transglycosylase (PBPs)	$\beta$ -Lactamasen, PBP-Mutanten
Vancomycin	D-Ala-D-Ala-Termini von Peptidoglycan und Lipid II	Umprogrammierung von D-Ala-D-Ala zu D-Ala-D-Lac oder D-Ala-D-Ser
<i>Proteinsynthese</i>		
Erythromycine	Peptidyltransferase/Ribosomen	rRNA-Methylierung/Export
Tetracycline	Peptidyltransferase	Wirkstoffexport
Aminoglycoside	Peptidyltransferase	Wirkstoffmodifizierung
Oxazolidinone	Peptidyltransferase	unbekannt
<i>DNA-Replikation/Reparatur</i>		
Fluorchinolone	DNA-Gyrase	Gyrase-Mutationen

Zwei klassische und wichtige Antibiotika, die die Zellwand Biosynthese inhibieren, stellen das Penicillin aus der Klasse der  $\beta$ -Lactame und das Vancomycin dar. Beide Antibiotika inhibieren die Zellwandbiosynthese *Gram*-positiver Bakterien. *Gram*-positive Bakterien besitzen nur eine einzige Zellwand, die ca. 500 Å dick ist und aus etwa 20 Schichten Peptidoglycan besteht, *Gram*-negative Bakterien besitzen eine Zellwand, die sowohl aus einer

Peptidoglycanschicht, als auch aus einer Lipidschicht besteht. Durch die Peptidoglycanschicht erhält das Bakterium die notwendige mechanische Stabilität und schützt die Bakterien bei Änderungen des osmotischen Drucks, durch den die Zellen sonst zerrissen würden. Der Aufbau der Zellwand aus Peptidoglycaneinheiten wird durch Transglycosylasen und Transpeptidasen erreicht. Während die Transglycosylasen für die Verlängerung der Glycanstränge verantwortlich sind, wird durch die Transpeptidase eine Quervernetzung der Peptidoglycane erreicht. Die mechanische Stabilität *Gram*-positiver wie auch *Gram*-negativer Bakterien erzielt die Zellwand durch die Quervernetzung benachbarter Polysaccharidketten durch eine Transpeptidase, die den C-terminalen D-Alaninrest des Pentapeptids L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH abspaltet und die dabei freigesetzte Carbonsäure durch eine Peptidbindung mit der Aminofunktion der Lysin Seitenkette einer benachbarten Polysaccharidkette verknüpft (Abbildung 2.6).

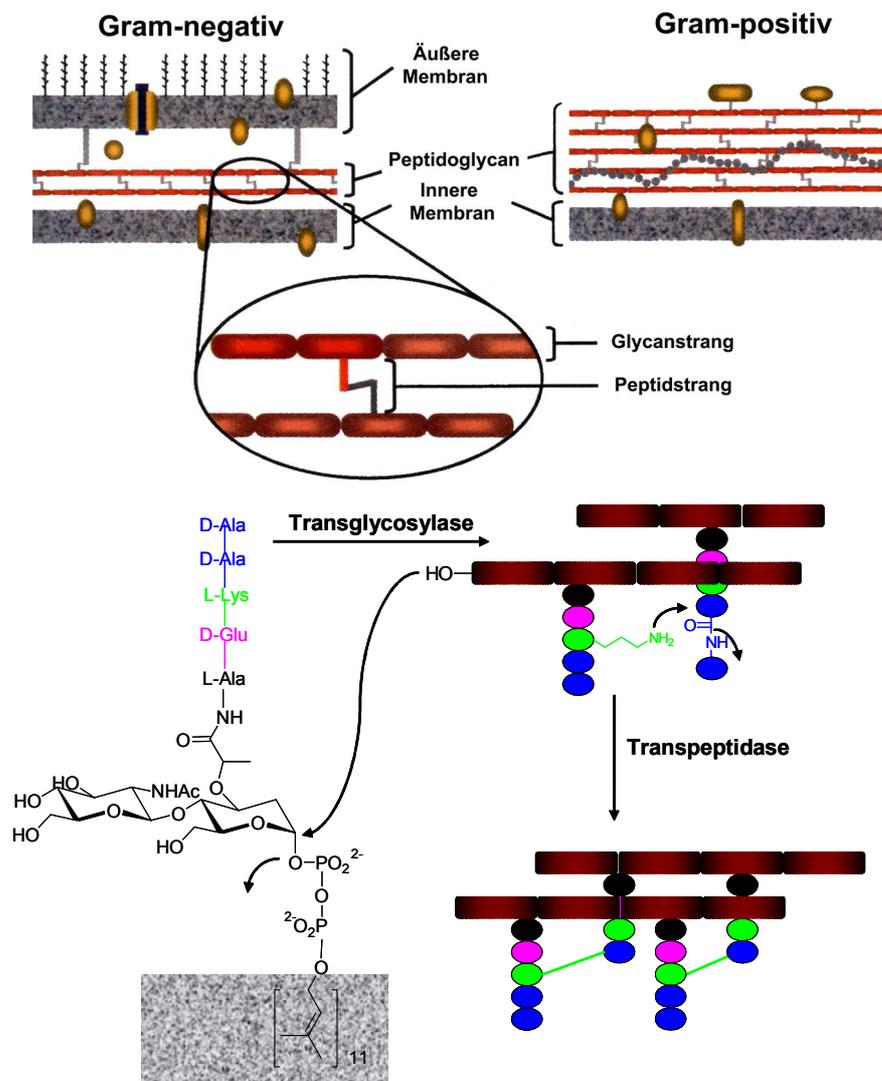


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (oben). Gram-positive Bakterien besitzen nur eine einzige Zellwand, die durch die Quervernetzung der Peptidoglycane stabilisiert werden (unten).<sup>[33, 62]</sup>

Als bislang letzte Waffe im Kampf gegen Infektionen gilt das 1956 bei *Eli Lilly* entdeckte Vancomycin,<sup>[63]</sup> das die Biosynthese der Zellwand von *Gram*-positiven Bakterien durch Komplexierung des C-terminalen Rests D-Ala-D-Ala-OH effektiv inhibiert. *Gram*-negative Bakterien haben gewöhnlich eine deutlich dünnere Peptidoglycanschicht, dafür aber eine weitere Schicht – bestehend aus Lipiden, Proteinen und Lipopolysacchariden – die eine Permeabilitätsbarriere für Substanzen wie Vancomycin darstellt. Der weitgehend aufgeklärte Wirkmechanismus des Vancomycins und verwandter Glycopeptid Antibiotika beruht auf der molekularen Erkennung des C-terminalen Dipeptids D-Ala-D-Ala-OH des Glycopeptids, das aus einem Pentapeptid und einem Disaccharid aufgebaut ist. Die Disaccharidvorstufe wird durch die Membran transportiert und durch eine Transglycosylase an die wachsende Polysaccharidkette angeknüpft. Durch die sehr stabile Bindung des Antibiotikums zu dem Dipeptid D-Ala-D-Ala-OH gelingt es, die Quervernetzung an diesem Teil des Glycopeptids zu verhindern und so den Prozess des Aufbaus der Zellwand zu unterbinden.<sup>[34]</sup> Vancomycin besteht aus einem peptidischem Rückgrat aus sieben Aminosäuren, das über mehrere Aryletherbrücken zu einem starren Gerüst zusammengefügt wird. Am zentralen modifizierten Tyrosin befindet sich noch ein Zuckerrest, der für die Aktivität des Vancomycins von entscheidender Bedeutung ist. Darüber hinaus wird die antibiotische Wirksamkeit durch eine Dimerisierung von Vancomycin deutlich gesteigert.<sup>[64]</sup> Die Erkennung des D-Ala-D-Ala allein kann den Wirkmechanismus nicht vollständig erklären, da Vancomycinderivate, die am Saccharidrest hydrophobe Substituenten tragen, antibiotische Aktivität gegen eigentlich resistente Stämme aufweisen.<sup>[65, 66]</sup> Vancomycin weist mit seiner schalenförmigen Struktur eine optimale Präorganisation gegenüber dem Zielliganden auf und zeigt eine nahezu ideale sterische und elektronische Komplementarität (Abbildung 2.7). Die hohe Bindungsaffinität von Vancomycin zu D-Ala-D-Ala-OH ( $10^5$ - $10^6$  M<sup>-1</sup> in Wasser)<sup>[67]</sup> stammt von einem Zusammenspiel von verschiedenen nichtkovalenten Wechselwirkungen. Im Einzelnen ist dies die Bindung des Carboxylatanions des C-terminalen Alanin in der Tasche der drei Amid-NH Gruppen der Reste 2-4 des Antibiotikums und der hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Alanin-Methylgruppen und den Kohlenwasserstoffabschnitten des Antibiotikums. Die Bindung in dieser Tasche ist stark von der R,R,S,R-Konfiguration der Reste abhängig. Zudem kommen noch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem acetyliertem Dipeptid und dem Antibiotikum hinzu.

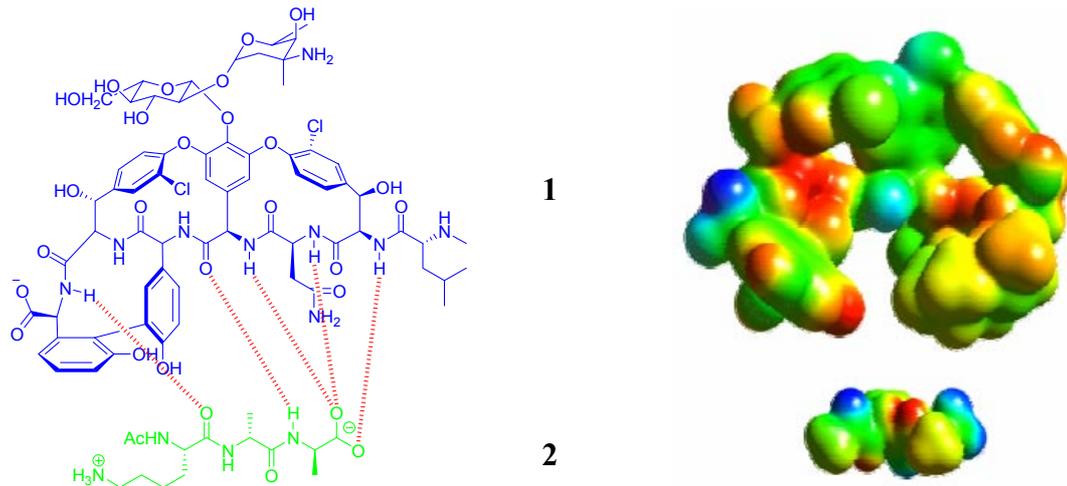


Abbildung 2.7: (links) Gezeigt ist der Bindungsmodus von Vancomycin (blau) und dem selektiven Liganden L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (grün). (rechts) Anhand der farblichen Codierung erkennt man die elektronische Komplementarität zwischen Vancomycin und dem Liganden.

Resistenzen von *Enterokokken* gegen Glycopeptid Antibiotika sind schon seit längerer Zeit bekannt, eine Resistenz gegen die besonders pathogenen methicillinresistenten Stämme von *Staphylococcus aureus* (MRSA), die bereits eine Vielzahl von Todesfällen verursacht haben, wurde erst kürzlich berichtet.<sup>[68]</sup> Die Resistenz beruht unter anderem auf dem Einsatz eines anderen Intermediats bei der Synthese der Zellwand. In den resistenten Stämmen wird das terminale D-Alanin des Pentapeptids durch ein D-Lactat ersetzt. Aufgrund dessen wird die Bindungsaffinität von Vancomycin um den Faktor 1000 herabgesetzt und ist nicht mehr ausreichend stark, um die Zellwandbiosynthese zu inhibieren.<sup>[32, 69]</sup> Die Abschwächung der Bindungsaffinität stammt hauptsächlich aus dem Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Antibiotikum und der terminalen Amidbindung. In neueren Arbeiten konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine starke Bindung zu dem Peptidoglycan nicht unbedingt für eine hohe Wirksamkeit des Vancomycins erforderlich ist.<sup>[64]</sup> Augenscheinlich spielen noch weitere Mechanismen, außer der Bindung des C-terminalen Restes D-Ala-D-Ala für die antibiotische Wirksamkeit eine Rolle. Gerade aus diesem Grund ist es wichtig, mehr über die Prozesse der molekularen Erkennung von Peptiden und Proteinen zu lernen, damit man zukünftig gezielt Leitstrukturen für die Entwicklung von Therapeutika entwerfen kann.

## 2.2 Stand der Forschung

Wie zuvor gezeigt werden konnte, basieren wichtige biologische Prozesse auf der molekularen Erkennung oder Selbsterkennung von Peptiden mit freiem C-Terminus durch natürliche Rezeptoren. Auf Grund der hohen konformativen Flexibilität von Proteinen ist das gezielte Design von effizienten Rezeptoren für Peptide immer noch außerordentlich anspruchsvoll. Eine zusätzliche Herausforderung zu der konformativen Flexibilität stellt die Effektivität und Bindungsstärke der nichtnatürlichen Peptidrezeptoren unter physiologischen oder zumindest wässrigen Bedingungen dar. Viele, ausschließlich auf Wasserstoffbrücken basierende synthetische Systeme verlieren bei Zugabe einer geringen Menge an polaren Lösemitteln nahezu vollständig ihre bindenden Fähigkeiten. Der Grund liegt in der starken Solvensabhängigkeit der Stärke von Wasserstoffbrücken.

Möchte man biologische Prozesse auf molekularer Ebene genauer verstehen und nachahmen, ist man auf wässrige Systeme angewiesen. In diesem Kapitel wird ein kurzer Überblick über Rezeptoren gegeben, die in der Lage sind, Peptide mit freiem C-Terminus selektiv in polaren Lösemitteln zu erkennen. In der chemischen Literatur existieren nur sehr wenige Beispiele für eine selektive und starke Wechselwirkung zwischen künstlichen Rezeptorsystemen für peptidische Liganden in wässriger Umgebung. Im Nachfolgenden soll zunächst auf Guanidine als ein effektives Modell zur Komplexierung von Carboxylaten eingegangen werde, anschließend werden aktuelle Arbeiten zu künstlichen Peptidrezeptoren vorgestellt, die zum Teil Basis dieser Arbeit sind.

### 2.2.1 Guanidine als Carboxylatrezeptoren

Die Bindungsstärke jedes Systems aus Rezeptor und Ligand setzt sich aus der Summe der einzelnen Wechselwirkungen zusammen. Die Stärke der einzelnen Wechselwirkungen variiert stark mit dem Lösemittel, in dem das System untersucht wird. In polaren Lösemitteln gewinnen hydrophobe Wechselwirkungen gegenüber den polaren an Bedeutung, so dass für Rezeptoren in wässriger Lösung andere elektronische und sterische Eigenschaften an Bedeutung gewinnen. Ein sehr weit verbreitetes und effektives Bindungsmotiv für Carboxylate stellt die Guanidiniumeinheit dar. Dieses Bindungsmotiv wird in natürlichen Rezeptorsystemen durch die Aminosäure Arginin repräsentiert. Es gibt eine ganze Reihe synthetischer Rezeptoren, die eine Guanidiniumeinheit zur Komplexierung von Anionen enthalten. *Anslyn* entwickelte einen Trisguanidinrezeptor **3** auf der Basis eines Triethylbenzol-Gerüsts, der in der Lage ist, Citrat mit einer Bindungskonstante von  $7000 \text{ M}^{-1}$  in Wasser zu binden.<sup>[70-72]</sup> Andere nutzen die Fähigkeit von Rezeptoren auf Guanidiniumbasis zur Extraktion von Carboxylaten aus der wässrigen Phase in die organische Phase. Darunter fällt z. B. der Guanidinium Rezeptor **4** von *Davis*, der auf einem Steroidgerüst basiert und zusätzlich noch zwei Carbamate enthält.<sup>[73]</sup> Er ist in der Lage aus einer racemischen Mischung

von Aminosäuren (vorzugsweise Ac-D/L-Val oder Ac-D/L-Phe) bevorzugt die L-Enantiomer mit einer Präferenz von 9:1 zu extrahieren. Auf dem gleichen Prinzip der Extraktion beruht der Rezeptor **5**, den *Lehn* und *de Mendoza* ausgehend von einem bicyclischen Guanidin synthetisiert haben.<sup>[74]</sup> Durch die Einführung von zwei Naphthoyl-Resten besitzt der Rezeptor eine große hydrophobe Oberfläche und weist bei der Extraktion eine Begünstigung für aromatische Aminosäuren wie Tryptophan auf. Ein weiteres interessantes Beispiel für die Nutzung von Guanidinium-Kationen zur Erkennung von Carboxylaten hat *Hamilton* mit Bisguanidinrezeptoren des Typs **6** etabliert, die  $\alpha$ -Helixstrukturen in aspartatreichen Peptiden stabilisieren können. Dabei zeigt sich, dass die Wechselwirkung besonders stark ist, wenn sich ein Aspartat an jeder vierten Position befindet.<sup>[75-77]</sup>

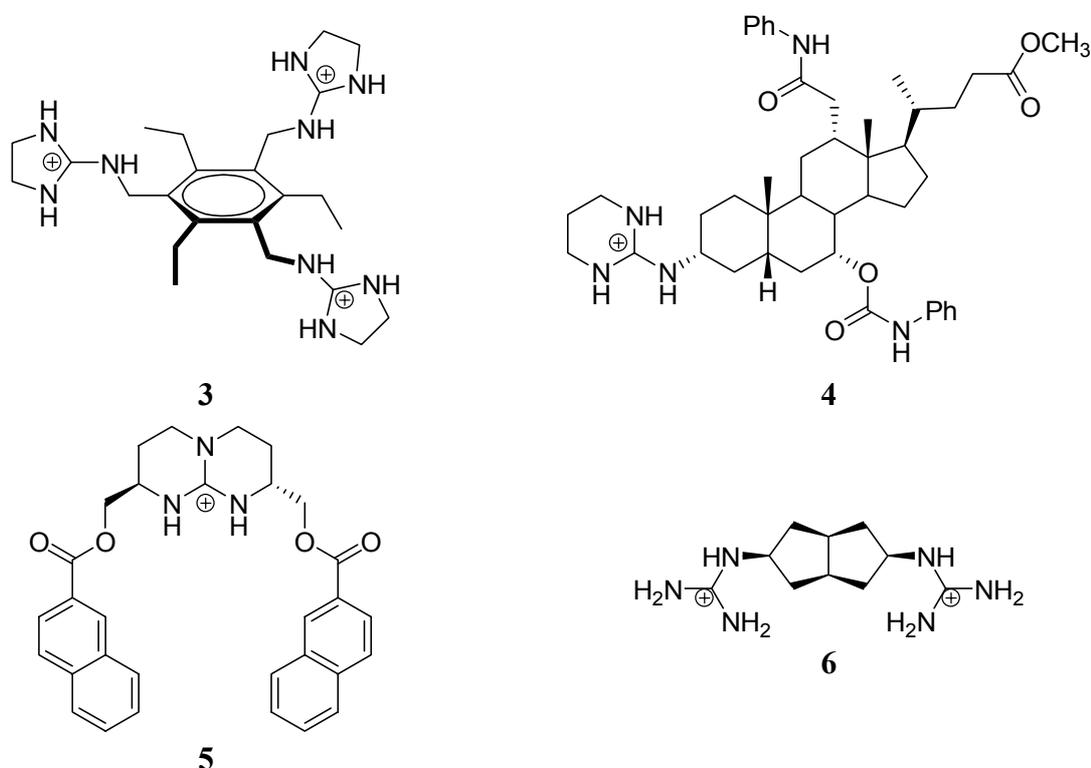


Abbildung 2.8: Rezeptoren für die Komplexierung von Carboxylaten in wässrigen und organischen Lösemitteln.

Die Wechselwirkung von einfachen Guanidinen mit Carboxylaten in wässrigen Lösemitteln ist jedoch ausgesprochen schwach. So benötigt man für eine ausreichend starke Komplexierung von Anionen in wässrigen Lösemitteln Rezeptoren, die mindestens zwei, besser drei oder mehr Guanidiniumeinheiten besitzen (wie **3** und **6**). Darüber hinaus sind die Synthesen für diese Rezeptoren zum Teil sehr aufwändig, so dass einfachere und vor allem bessere Rezeptorsysteme wünschenswert sind. In neueren Arbeiten von *Schmuck* wurden die Eigenschaften von Guanidinen soweit verbessert, dass sie auch in wässrigen Lösemitteln eine effektive Komplexierung von Carboxylaten ermöglichen.<sup>[38-40, 78-81]</sup> Mit Hilfe von theoretischen Berechnungen und umfangreichen Synthesen wurde ein neues Bindungsmotiv

für Carboxylate entwickelt, dass in der Lage ist, Carboxylate in wässrigen Systemen sehr stark zu binden. Bei dem Design dieses Bindungsmotivs spielten verschiedene Überlegungen eine Rolle. Die erhöhte Acidität der Acylguanidinium-Protonen im Vergleich zu einfachen Guanidinium-Kationen erleichtert die Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Darüber hinaus kann die Ionenpaarbildung durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zum Pyrrol und zum Amid-NH verstärkt werden. Ein weiterer Grund für die Stärke der Wechselwirkung zwischen dem Guanidiniocarbonylpyrrol und einem Carboxylat liegt in der Planarität des Bindungsmotives und der damit perfekten Präorganisation für eine Komplexierung.

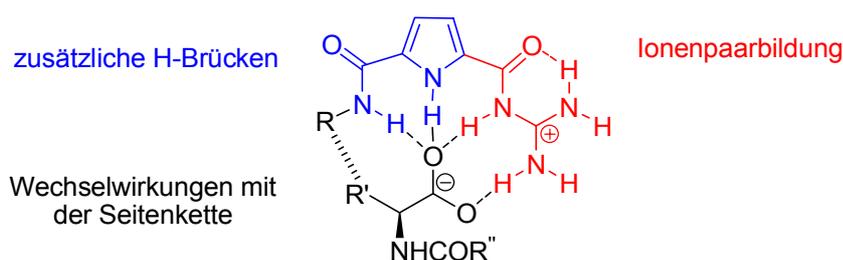


Abbildung 2.9: Wechselwirkungen zwischen dem von Schmock entwickeltem Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv und einem Aminosäurecarboxylat.

Um abschätzen zu können, welchen Beitrag zur Stabilität der Wechselwirkung zwischen einem Carboxylat und einem Guanidinium-Kation eine zusätzliche Wasserstoffbrücke liefert, wurde das einfache Guanidinium-Kation **7** sukzessive um jeweils eine Acylfunktion oder Wasserstoffbrücke erweitert, bis man zum Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptor **11** kam. Bindungsstudien gegen *N*-Acetyl-Alanincarboxylat wurden NMR spektroskopisch in einer wässrigen Lösung, die 40 % DMSO enthielt, durchgeführt. Die Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid **7** zu dem Alaninderivat führte zu keiner Änderung der Verschiebung der Signale im Spektrum der Aminosäure. In dieser hochpolaren Umgebung konnte keine Bindung für Carboxylat und Guanidin nachgewiesen werden. Das Acylguanidin **8** zeigte unter den gleichen Bedingungen eine Bindungskonstante von  $50 \text{ M}^{-1}$ . Ein weiterer, deutlicher Anstieg der Bindungskonstante konnte durch die Einführung eines Pyrrols am Acylguanidinium erreicht werden. Das einfache Guanidiniocarbonylpyrrol **9** zeigte eine Bindungskonstante von  $130 \text{ M}^{-1}$ , aber erst eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung über ein Amid in der 5-Position (**10**) ließ die Bindungskonstante auf  $770 \text{ M}^{-1}$  ansteigen. Durch die Anknüpfung eines chiralen Aminosäurebausteins in der 5-Position erhielt man einen potenziell enantioselektiven Aminosäurerezeptor **11**, der in der Lage ist, in diesem polaren Lösemittelgemisch *N*-Acetyl-Alanincarboxylat mit einer Bindungskonstante von  $1610 \text{ M}^{-1}$  zu erkennen. Dieser Rezeptor zeigt sogar eine leichte Präferenz für L-Aminosäuren gegenüber der enantiomeren D-Form.<sup>[40]</sup>

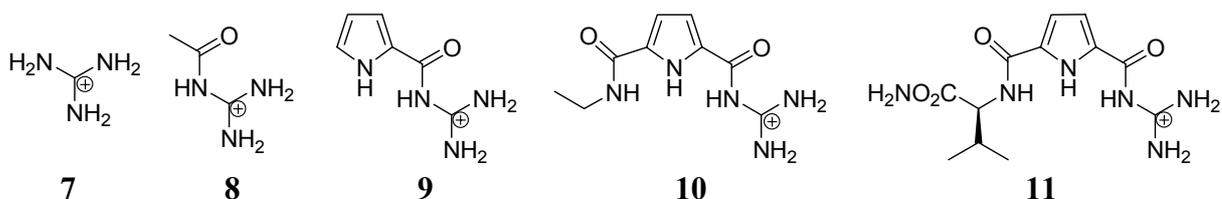


Abbildung 2.10: Gegenüberstellung verschiedener Guanidine als Bindungsmotiv für Carboxylate. Verbesserung der Bindungseigenschaften in wässrigen Lösungen um den Faktor 30, wenn man das einfache Acylguanidin **8** mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol **11** vergleicht.

Durch diese Untersuchungen konnte *Schmuck* semiquantitativ die Beiträge der einzelnen Strukturelemente dieser Klasse an Rezeptoren für Carboxylate bestimmen. Der größte Teil der Bindungsenergie stammt demnach von der Ausbildung eines Ionenpaares und nur ein geringer Teil von der Seitenkette. Mit einer Ausdehnung des Systems an der Seitenkette sollte sich der Beitrag allerdings deutlich erhöhen und somit zu einer besseren stereoselektiven Erkennung führen. Das Ergebnis der Untersuchungen von *Schmuck* war eine Art supramolekularer „Struktur-Wirkungsbeziehung“ zur Klärung der Bindungseigenschaften der Guanidiniocarbonylpyrrol Rezeptoren.<sup>[40]</sup>

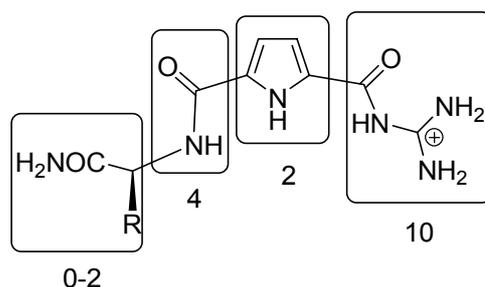


Abbildung 2.11: Semiquantitative energetische Beiträge der individuellen Wechselwirkungen der Komplexierung von Carboxylaten durch Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren in  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Ein Paradebeispiel für eine sehr starke Bindung von Carboxylatanionen über ein Acylguanidin bildet die Selbsterkennung des Zwitterions **12**. Dieses Zwitterion trägt auf der einen Seite eine Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheit als Carboxylat bindendes Element und auf der anderen Seite eine Carbonsäure. In Lösung bildet sich ein extrem stabiles Homodimer, dessen Stabilität sich auch dadurch zeigt, dass **12** in allen gängigen Lösemitteln nahezu unlöslich ist. Aus diesem Grunde konnte die Komplexstabilität nur abgeschätzt werden, sie liegt aber mindestens bei  $K \geq 10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Mit dem Zwitterion **12** konnte aufgrund der geringen Löslichkeit eine Dimerisierungskonstante über NMR nicht direkt bestimmt werden. Aus diesem Grund wurden die Pyrrolcarbonsäure **13** und das Guanidiniocarbonylpyrrol **9** als Modellverbindungen verwendet, da sie jeweils einer Hälfte des Zwitterions **12** entsprechen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass sich in reinem DMSO ein sehr stabiler 1:1 Komplex bildet.

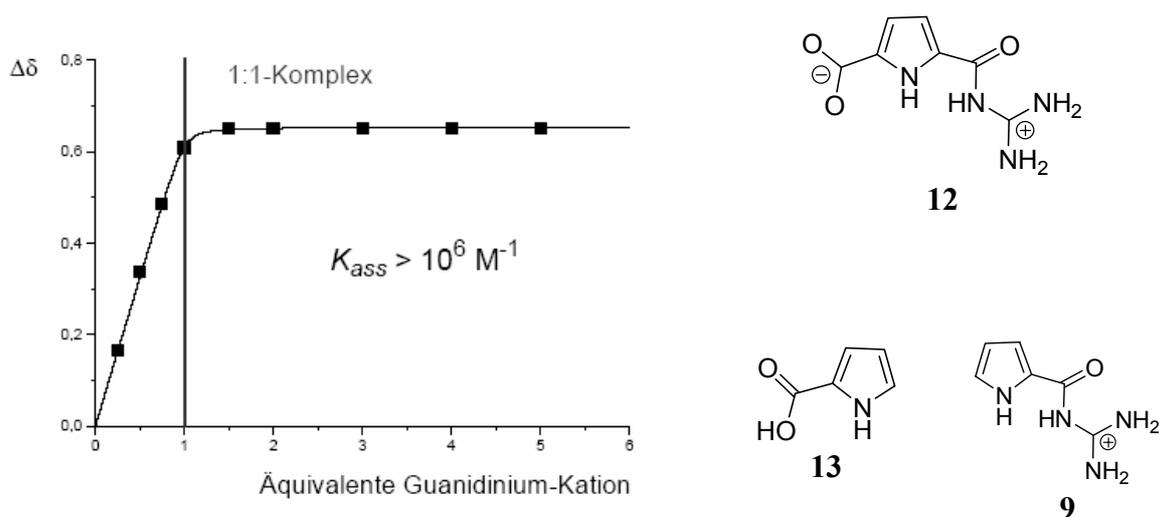


Abbildung 2.12: Bindungsisotherme der NMR Titration von **9** gegen **13** in reinem DMSO; aufgrund des extremen Verlaufs der Bindungsisotherme kann die Bindungskonstante nur abgeschätzt werden, die direkte Bestimmung einer Bindungsisotherme von **12** war aufgrund der geringen Löslichkeit nicht möglich.

Durch die Arbeiten von *Wienand* und *Schmuck* konnte weiterhin der Beitrag der ionischen Wechselwirkung des Guanidiniocarbonylpyrrol- Bindungsmotives durch die Synthese eines neutralen Analogons bestimmt werden. Zur Erhöhung der Löslichkeit der zwitterionischen Verbindung **12** wurde ein Syntheseweg gewählt, der an der 3,4 Position die Einführung eines lipophilen und hydrophilen Restes erlaubte, so dass die Löslichkeit sowohl in polaren als auch in unpolaren Lösemittelgemischen deutlich höher ausfällt. Während das Zwitterion **12** eine Bindungskonstante  $>10^{10} \text{ M}^{-1}$  in reinem DMSO aufweist, konnte für das neutrale Analogon **14** mit Hexyl-Seitenketten schon bei einem Zusatz von nur 5 % DMSO in Chloroform nur eine Bindungskonstante von  $10 \text{ M}^{-1}$  bestimmt werden. Demgegenüber weist das hydrophile Analogon **15** in Wasser, das 2,5 % DMSO enthält eine Bindungskonstante von  $170 \text{ M}^{-1}$  auf. Dies zeigt die außerordentliche Wichtigkeit der Ionenpaarbildung für die Stabilität des supramolekularen Komplexes. Die Stabilität der Dimere wird fast ausschließlich durch die Salzbrücke bestimmt.



Abbildung 2.13: neutrales Analogon **14** und in Wasser gut lösliches Zwitterion **15** der zwitterionischen Struktur **12**.

Durch Röntgenstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass die Homodimerisierung des Bindungsmotivs für das neutrale Analogon **14** und die zwitterionische Struktur **12** nahezu identisch ist. An der Kristallstruktur erkennt man deutlich die Planarität des Bindungsmotives und die perfekte Komplementarität zwischen dem Guanidiniocarbonylpyrrol und dem Carboxylat.

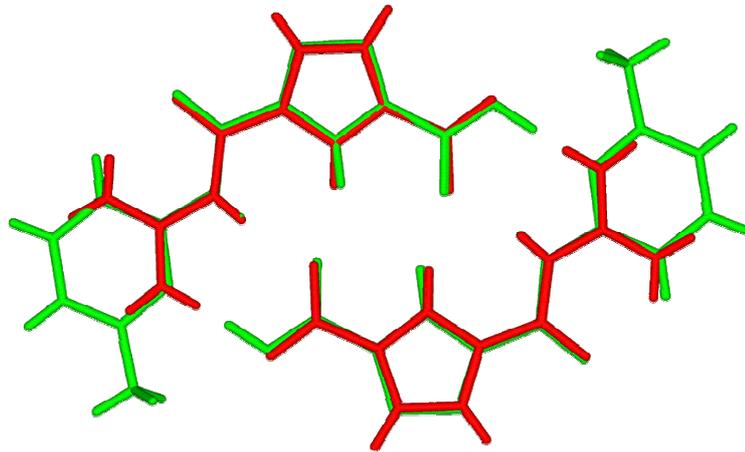


Abbildung 2.14: Überlagerung der dimeren Festkörperstrukturen des zwitterionischen Guanidiniocarbonylpyrrols **12** (rot) und des neutralen Analogons **14** (grün), die Seitenketten an Position 3 und 4 wurden der Übersichtlichkeit halber nicht abgebildet.

Es konnte gezeigt werden, dass Guanidiniocarbonylpyrrole ein sehr effizientes Erkennungsmotiv für Carboxylate darstellen und sich als zentraler Baustein für die Synthese von Rezeptoren zur Erkennung von Peptiden mit freiem C-Terminus hervorragend eignen sollten. Ausgehend von einer starken Wechselwirkung zwischen Carboxylat und Guanidiniocarbonylpyrrol kann man durch eine geeignete Wahl der Seitenkette einen Rezeptor für Oligopeptide entwerfen.

### 2.2.2 Modelle für Peptidrezeptoren

Im folgenden Kapitel soll ein Überblick über einige synthetische Rezeptoren für Peptide mit freien C-Termini unter besonderer Berücksichtigung der Bindungseigenschaften in polaren Lösemitteln gegeben werden. In der Literatur sind einige Beispiele für effiziente Peptidrezeptoren bekannt, die wenigsten von ihnen weisen jedoch Bindungseigenschaften in polaren Lösemitteln wie Wasser auf, üblicherweise bricht eine sehr starke Bindung in Chloroform bei der Zugabe geringer Mengen an polaren Lösemitteln wie DMSO zusammen. Wie schon im vorhergehenden Kapitel gezeigt wurde, eignen sich Guanidiniocarbonylpyrrole hervorragend zur Komplexierung von Carboxylaten in polaren Lösemitteln. Daraufhin hat *Schmuck* chirale Moleküle wie **11** synthetisiert und auf ihre Fähigkeit, Aminosäurecarboxylate zu komplexieren untersucht. Dabei zeigte sich, dass selbst ein Rezeptor mit nur einer chiralen Position in der Lage ist, Ac-L-Ala mit  $1610 \text{ M}^{-1}$  Ac-D-Ala

jedoch nur mit  $670 \text{ M}^{-1}$  zu erkennen. Dies stellt eine erstaunliche Bevorzugung von L- im Gegensatz zu D-Aminosäuren dar. Unter Berücksichtigung von molekulardynamischen Rechnungen gibt es bei der Komplexbildung von D-Alanin eine ungünstige repulsive Wechselwirkung zwischen der Methylgruppe der Aminosäure und der Isopropyl-Seitenkette des Rezeptors, die in dem Komplex mit dem L-Enantiomer nicht auftritt. Bemerkenswert ist auch der sehr große Unterschied zwischen der Komplexbildung von Acetat mit  $3380 \text{ M}^{-1}$  und dem sterisch anspruchslosen Formiat mit nur  $350 \text{ M}^{-1}$  – offensichtlich spielen Solvatationseffekte bei der Effektivität des Bindungsvorgangs eine wichtige Rolle.<sup>[40]</sup>

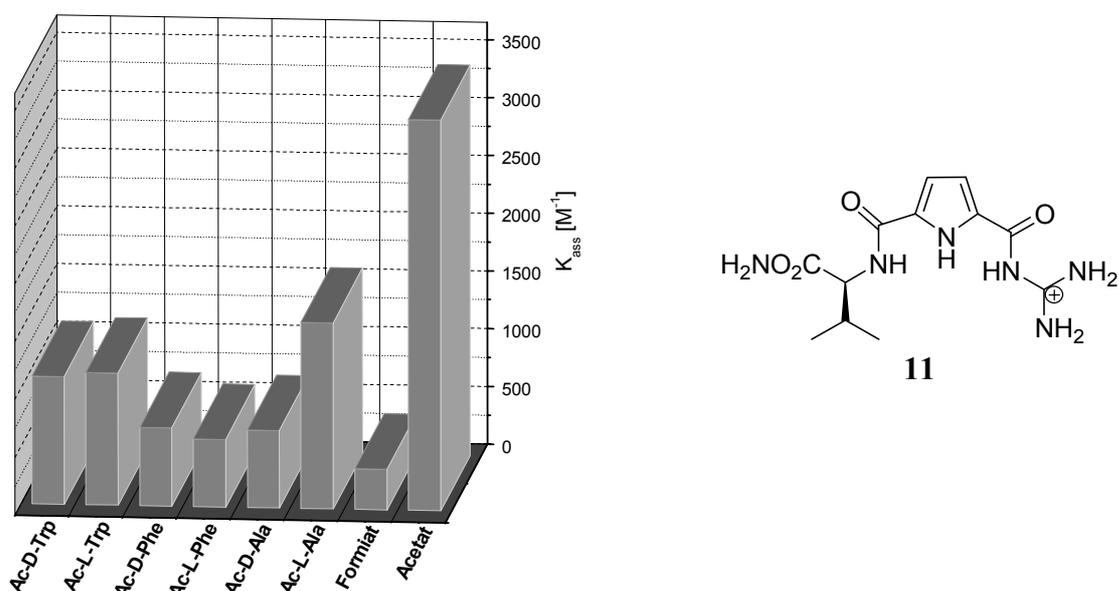


Abbildung 2.15: Gegenüberstellung der Bindungskonstanten (in  $\text{M}^{-1}$ ) des chiralen Guanidiniocarbonylrezeptors **11** mit verschiedenen acetylierten D- und L-Aminosäuren.

Ein Peptidrezeptor für Dipeptide mit freiem C- und N-Terminus entwickelten *Mizutani et al.* auf der Basis eines Zink-Porphyrin-Rezeptors und testeten ihn in Methanol und einem Borat-Puffer über Fluoreszenz und UV-Titrationen, dabei ergab sich für das Dipeptid L-His-L-His **16** eine Bindungskonstante von  $610 \text{ M}^{-1}$  in einem Borat-Puffer in Wasser. Wie man an der Struktur des Rezeptors **17** leicht erkennen kann, stammt der größte Teil der Bindungsenergie von der Wechselwirkung zwischen dem Zink und den freien Elektronenpaaren des Stickstoffs des Liganden und von hydrophoben Wechselwirkungen wie  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen. Dies wird zudem verdeutlicht durch die Tatsache, dass der Rezeptor **17** einen einfachen Dipyridylethan-Liganden **18**, der ein sehr potenter Chelatligand für Metallkomplexe ist, mit einer Assoziationskonstante von  $3.4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  in Wasser bindet.<sup>[82]</sup>



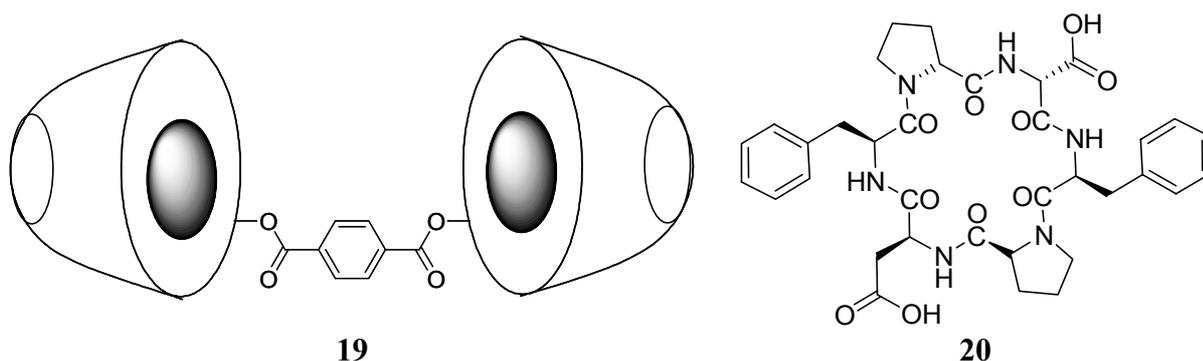


Abbildung 2.17: Der Cyclodextrin Rezeptor (**19**), mit der sekundären nach innen zeigenden Seite, ist ideal präorganisiert für die aromatischen Ringe des cyclischen Hexapeptids **20**.

In Anlehnung an  $\beta$ -Faltblatt Strukturen von Peptiden mit zusätzlichen polaren Ankergruppen für den positiv geladenen N-Terminus und den negativ geladenen C-Terminus hat *Schneider* Rezeptoren wie **21** und **22** gestaltet, die in der Lage sind, Tripeptide in Wasser sequenzselektiv mit moderaten Bindungskonstanten zu erkennen. Als Ankergruppe für das Carboxylat diente ein quartäres Ammoniumion, für das positiv geladene Ammoniumkation des N-Terminus wurde ein Kronenether eingesetzt. Die Bindungskonstante von Triglycin (**24**) fällt in Wasser auf 1/50 der Stärke der Bindungskonstante in Methanol, die über NMR Titrations auf  $10500 \text{ M}^{-1}$  gegen den Rezeptor **21** bestimmt wurde. Der Rezeptor **21** zeigt jedoch eine klare Längenselektivität, da es Tripeptide generell deutlich besser bindet als Dipeptide. Bindet man in die Rezeptorstruktur einen hydrophoben Dansylrest ein (**22**), kann man etwas über die lipophilen Wechselwirkungen, die in einem polaren Lösemittel eine größere Rolle spielen sollten, aussagen. In einer Reihe von Fluoreszenztitrations gegen verschiedenen Tripeptide konnte gezeigt werden, dass eine Präferenz für aromatische Aminosäuren in der 2-Position besteht. Vergleicht man z. B. die Bindungskonstante für das Tripeptid **23** gegenüber der NMR Titration gegen **21** und der Fluoreszenztitration mit **22**, so steigt die Bindungskonstante um den Faktor 10 auf  $1700 \text{ M}^{-1}$  an, wogegen die Bindungskonstante beim Triglycin unverändert bei  $200 \text{ M}^{-1}$  bleibt.<sup>[84]</sup> *Schneider* konnte so mit dieser einfachen, nicht chiralen Rezeptorstruktur sowohl eine Längenpräferenz als auch eine Sequenzselektivität für aromatische Aminosäuren zeigen.

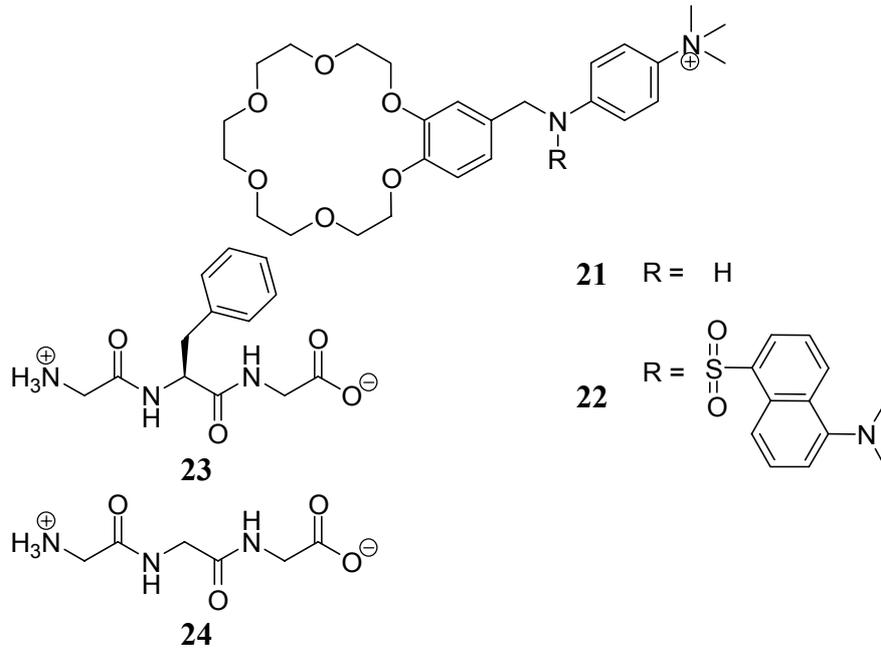


Abbildung 2.18: Peptidrezeptor nach Schneider mit einem Kronenether als Bindungstasche für den N-Terminus und einem quartärem Ammoniumsalz für den C-Terminus eines Tripeptids.

Die  $\beta$ -Faltblattstruktur stellt eine bedeutende Sekundärstruktur von Proteinen dar. Pathogene  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind die potentielle Ursache einiger Krankheiten (siehe Abschnitt 2.1.1). *Kelly* und *LaBrenz* haben ein Modellsystem synthetisiert, dessen strukturelle Ausrichtung der Anordnung einer  $\beta$ -Faltblattstruktur in wässriger Lösung entspricht. Dabei haben sie, ausgehend von einem Dibenzofuran-Gerüst alternierend eine hydrophobe und eine basische Aminosäure angebracht, um den pinzettenförmigen Rezeptor **25** darzustellen. Als Liganden haben sie ein Peptid gewählt, das alternierend eine hydrophobe und eine saure Aminosäure enthält und somit elektronisch ein komplementäres Verhalten aufweist. Diese Modellverbindungen zeigen ein ausgeprägtes Verhalten zur Ausbildung von antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern.<sup>[85]</sup>

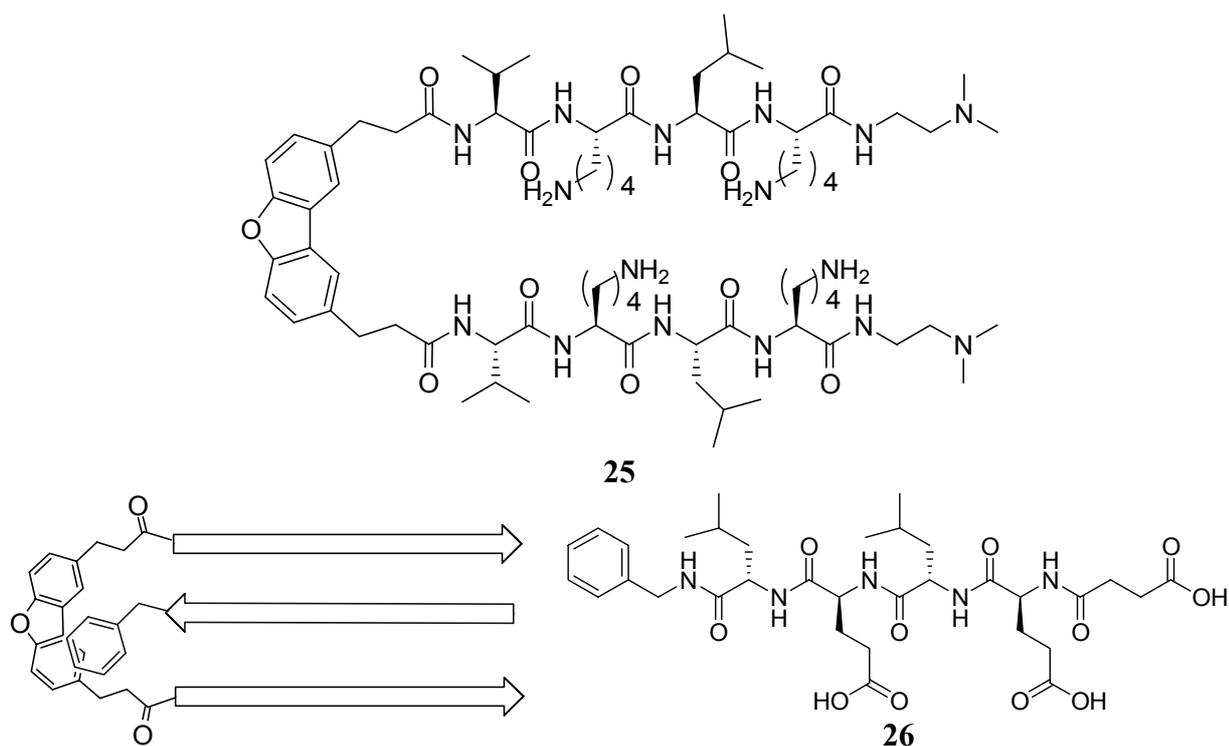


Abbildung 2.19: Peptidrezeptor zur Stabilisierung von  $\beta$ -Faltblättern nach Kelly und LaBrenz

Ein weiteres Beispiel, bei dem es gelungen ist, Oligopeptide mit künstlichen Rezeptoren in Wasser selektiv zu erkennen, erreichte *Kilburn* mit pinzettenförmigen Rezeptoren wie **27** auf der Basis eines Guanidinium-Kations als Carboxylat-Bindungsstelle (CBS) mit kombinatorisch variierten Tripeptid Seitenarmen. In einem zusätzlichen Reaktionsschritt wurde bei der Synthese der Rezeptorbibliothek ein Codierungsstrang aus einem Tripeptid eingeführt, der anschließend über einen Edman Abbau identifiziert werden kann. Er testete eine Bibliothek aus etwa 2200 Mitgliedern auf ihre Aktivität gegen ein farbstoffmarkiertes Tripeptid L-Glu(*t*Bu)-L-Ser(*O**t*Bu)-L-Val-OH **28** auf der festen Phase in einem Boratpuffer bei einem pH-Wert von 9.2. Durch dieses Screening wurden weniger als 1 % der Mitglieder der Bibliothek intensiv gefärbt. Eine anschließende Sequenzierung des Codierungsstrangs durch Edman-Abbau ergab eine Präferenz für L-Pro an Position 1, für eine aliphatische Aminosäure an Position 2 und für L-Met an Position 3. Dieser Rezeptor wurde anschließend in Lösung synthetisiert und auf seine Bindungseigenschaften gegen das Peptid **28** getestet. Dies ergab eine Bindungskonstante von  $82000 \text{ M}^{-1}$  in einer wässrigen Lösung, die 15 % DMSO enthielt. Der Rezeptor zeigte eine gute Bindungsaffinität zu dem Tripeptid, allerdings konnte keine Bindungsaktivität gegenüber dem entschützten Peptid **29** und seinem Enantiomer gefunden werden. Dies zeigt die enorme Bedeutung von hydrophoben Wechselwirkungen bei der effektiven Komplexierung von Liganden in polaren Lösemitteln. Ebenso konnte für das biologisch relevante Dipeptid D-Ala-D-Ala-OH in einem Screening mit der gleichen Rezeptorbibliothek keine bindende Sequenz gefunden werden.

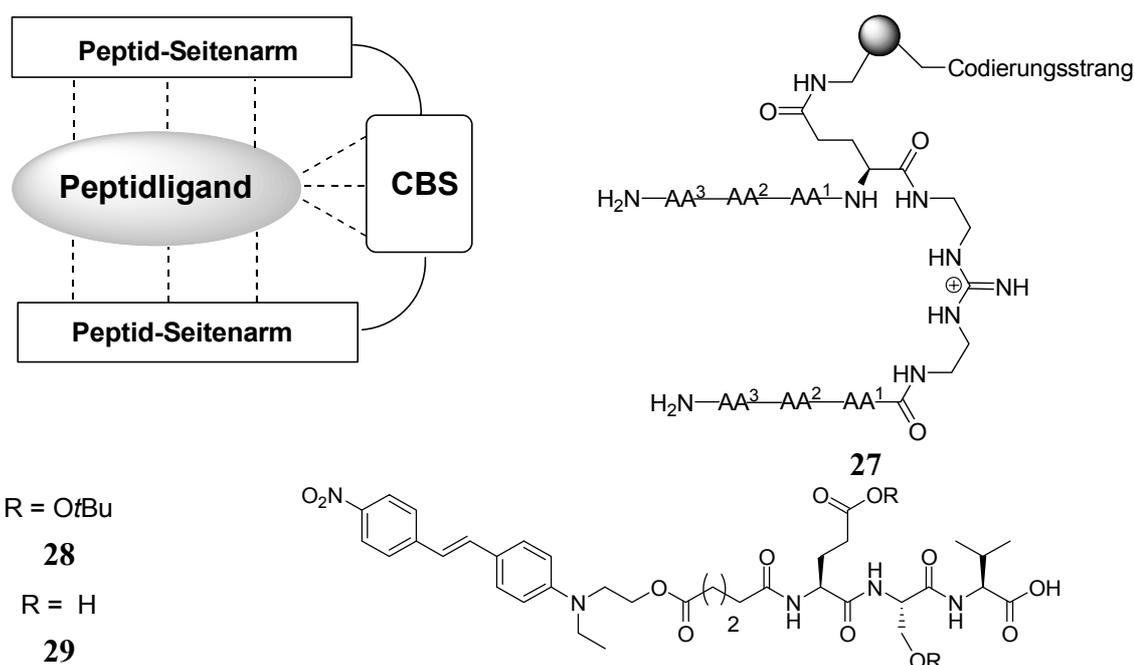


Abbildung 2.20: Rezeptordesign für Tripeptide mit freiem C-Terminus nach Kilburn, Auffindung aktiver Sequenzen auf der festen Phase in hochpolaren Lösemitteln

Als erstem ist es *Ellman* gelungen durch einen kombinatorischen Ansatz einen synthetischen Rezeptor für den biologisch relevanten Liganden, das Tripeptid L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH, zu entwickeln. Der Entwurf der Rezeptorbibliothek **30** ist angelehnt an das Antibiotikum Vancomycin, dabei wurde die Bindungstasche des Antibiotikums für das C-terminale Carboxylat übernommen und an der freien Aminofunktion eine Tripeptidsequenz kombinatorisch aufgebaut. So wurde eine Bibliothek aus 39000 unterschiedlichen Rezeptoren synthetisiert und gegen die beiden biologisch relevanten Tripeptide L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **2** und L-Lys-D-Ala-D-Lac-OH **31** auf ihre Bindungseigenschaften getestet.<sup>[86]</sup> In dieser Bibliothek wurde eine Vorauswahl an Rezeptoren durch ein Fluoreszenzscreening durchgeführt und die besten Rezeptoren anschließend synthetisiert und Bindungsaffinitäten über Mikrokalorimetrie bestimmt. Die besten Rezeptoren weisen dabei eine Bindungskonstante von  $100000 \text{ M}^{-1}$  auf, eine etwa um eine Zehnerpotenz geringere Bindungsaffinität auf als Vancomycin. Demgegenüber verschlechtert sich die Bindungskonstante, wenn man zur Peptidsequenz **31** des resistenten Stammes übergeht, nur um den Faktor 3-5. Dies zeigt, dass die Bibliothek dazu in der Lage ist, sehr effizient biologisch relevante Tripeptide zu binden, jedoch ist die Selektivität beim Übergang vom Peptid zum Depsipeptid nicht sehr stark ausgeprägt. Man kann davon ausgehen, dass nahezu jedes C-terminal ungeschützte Peptid mit einer identischen Bindungskonstante gebunden wird, da der größte Teil der Bindungsenergie vermutlich von der Bindung des Carboxylats zu der synthetischen Bindungstasche stammt. In weiteren Untersuchungen wurde eine Bibliothek aus 27000 Mitgliedern gegen Vancomycin resistente *E. faecium* auf ihre antibiotische Wirkung getestet.<sup>[87]</sup>

Nichtsdestotrotz ist diese Bibliothek ein gutes Beispiel für ein effizientes Rezeptordesign für biologisch relevante Peptide unter physiologischen Bedingungen. Die größte Herausforderung besteht immer noch in der Komplexierung polarer Liganden in Wasser.

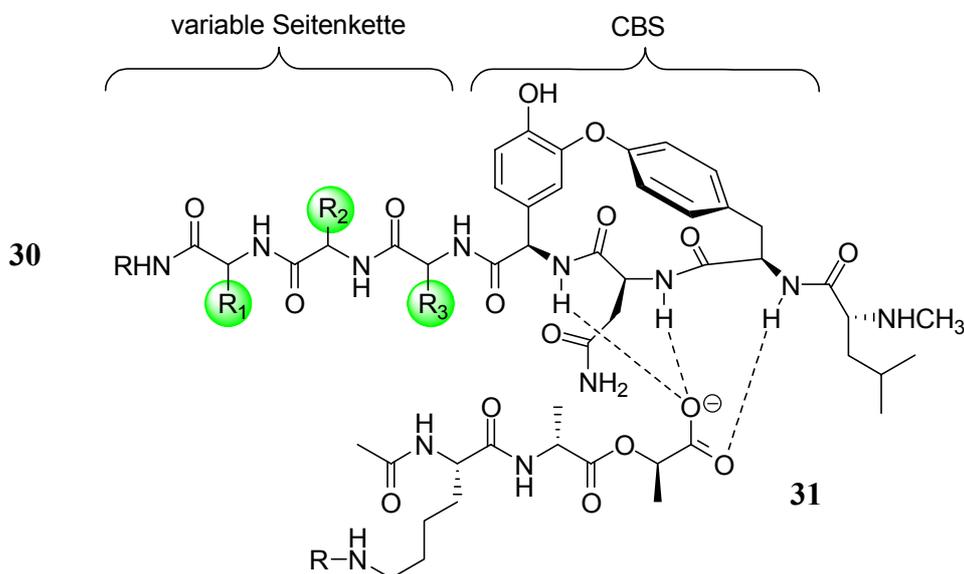
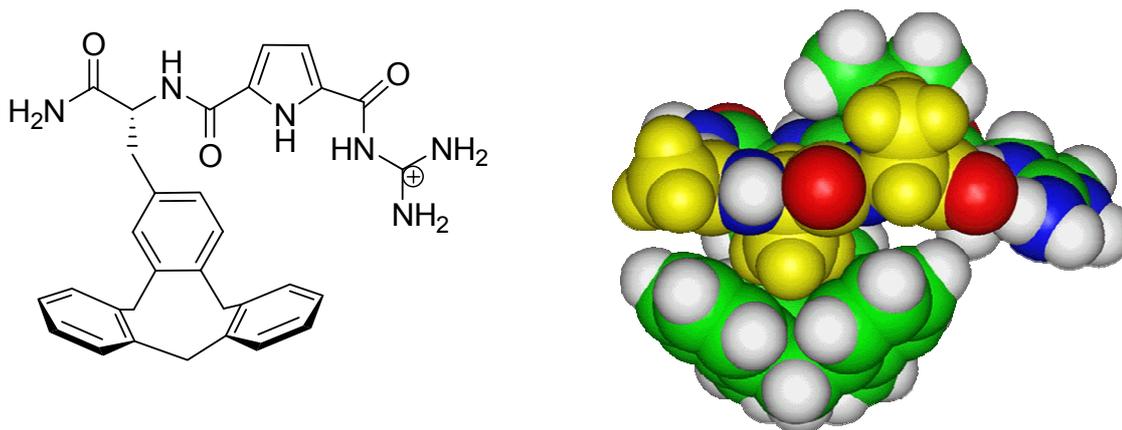


Abbildung 2.21: Darstellung der Rezeptorbibliothek **30** mit dem Liganden **31**.

Einen effektiven Rezeptor für die biologisch sehr wichtige Dipeptidsequenz D-Ala-D-Ala-OH entwickelten *Schmuck* und *Wienand* durch ein rationales Design des Rezeptors **32**.<sup>[88]</sup> Der Rezeptor besteht aus einer mit einer Cyclotribenzyl-Gruppe modifizierten Aminosäure und dem von *Schmuck* entwickelten Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein als Carboxylat-Bindungsstelle. Durch eine vielstufige Synthese eines monofunktionalisierten Cyclotribenzylens und anschließender Umsetzung mit einem Alaninderivat konnte die Rezeptorstruktur **32** realisiert werden. Wie man in der theoretisch berechneten Struktur des Rezeptors **32** mit D-Ala-D-Ala-OH als Liganden deutlich erkennen kann, befindet sich die Methylgruppe des zweiten Alanins des Liganden in der hydrophoben konkaven Schale, die vom Cyclotribenzylen aufgespannt wird. Zusätzlich zu diesen hydrophoben Wechselwirkungen, die vor allen in polaren Lösemitteln eine wichtige Rolle spielen, wird das C-terminale Carboxylat durch das Guanidiniocarbonylpyrrol komplexiert. Erste UV-spektroskopische Untersuchungen in einer Lösung aus 10 % DMSO in Wasser ergaben für dieses System bei einem pH-Wert von 6.1 in einem BisTris Puffer Bindungskonstanten von etwa  $33000 \text{ M}^{-1}$ ,<sup>[89]</sup> die bislang höchste gemessene Bindungskonstante für einen rational entworfenen Rezeptor für eine biologisch wichtige Dipeptidsequenz. Dies zeigt, dass es für kleine Rezeptor-Ligand-Systeme möglich ist, *de novo* einen Rezeptor zu entwickeln, der in polaren Lösemitteln eine starke Bindung zeigt.



32

Abbildung 2.22: Der Peptidrezeptor **32** nach Schmuck sowie die theoretisch berechnete Struktur des Rezeptor-Ligand-Komplexes mit *N*-Ac-D-Ala-D-Ala-OH. Deutlich zu erkennen ist die konkave Schale des Cyclotribenzylens, in die eine Methylgruppe des Alanins hineinragt.

Kürzlich ist es *Schmuck* und *Geiger* gelungen, den *de novo* entworfenen Peptidrezeptor **33** für Dipeptide in Wasser zu synthetisieren.<sup>[90]</sup> Neben dem äußerst effizienten Guanidiniocarbonylpyrrol Bindungsmotiv für Carboxylate wurde eine zusätzliche ionische Wechselwirkung über ein Imidazol in die Rezeptorstruktur integriert. Dieser Rezeptor weist für einfache Dipeptide wie *L*-Val-*L*-Val-OH oder *L*-Ala-*L*-Ala-OH eine Bindungskonstante von  $54300 \text{ M}^{-1}$  bzw.  $30600 \text{ M}^{-1}$  in Wasser mit 10 % DMSO auf. Damit gehört dieser Rezeptor zu den bisher besten Peptidrezeptoren in Wasser. Vergleicht man die Bindungsdaten von **33** für Dipeptide mit denen für einfache acetylierte Aminosäuren, erkennt man, dass Aminosäurecarboxylate etwa um den Faktor 10 schlechter gebunden werden. Dies zeigt den Einfluss der zusätzlichen Wechselwirkung mit dem Imidazoliumkation an, die bei der Komplexierung von einfachen Aminosäuren aus sterischen Gründen nicht zur Verfügung steht.

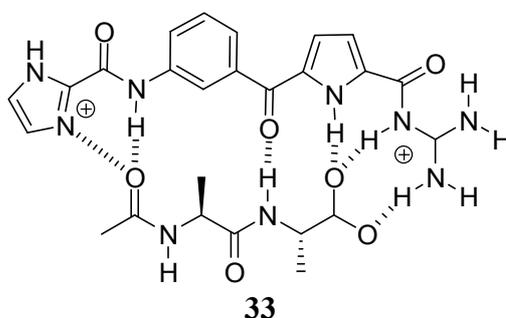


Abbildung 2.23: *De novo* entworfener Dipeptidrezeptor nach Schmuck. Das starre Gerüst erlaubt eine optimale Präorganisation für *N*-acetylierte Dipeptide.

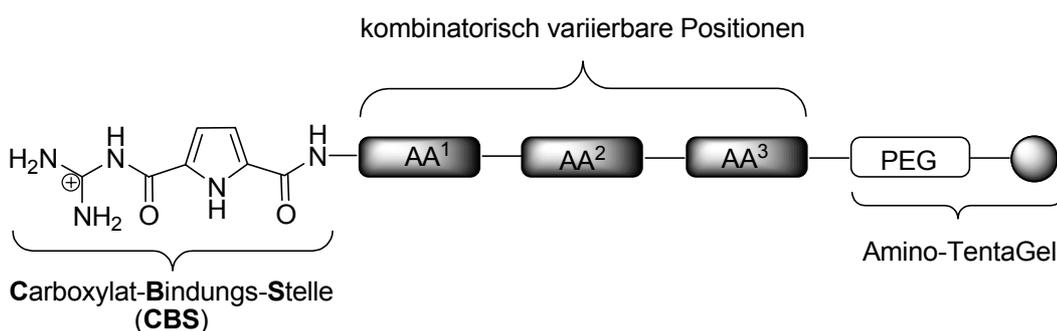
Sowohl kombinatorische Arbeiten, wie die Beispiele von *Kilburn* und *Ellman* als auch rational entworfene Rezeptoren wie die Beispiele von *Breslow* und *Schmuck* zeigen, dass es

prinzipiell möglich ist, Peptide in polaren Lösemitteln selektiv zu erkennen. Die gezielte Entwicklung einer Bindungstasche eines synthetischen Rezeptors für ein vorgegebenes Peptid ist allerdings immer noch ein sehr herausforderndes Ziel. Eine der Ursachen liegt in der hohen konformativen Flexibilität von Peptiden. Zudem ist das Verständnis der nichtkovalenten Wechselwirkungen, die bei dem molekularem Erkennungsprozess zwischen Rezeptor und Peptid eine wichtige Rolle spielen noch unzureichend.<sup>[91]</sup> Die Rezeptorbibliothek **27** von *Kilburn* zeigte eine hohe Effizienz bei der Bindung des hydrophoben Liganden **28**, war aber nicht in der Lage das entschützte Peptid **29** zu binden.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene, erfolgreiche Konzepte zum Design eines effektiven Peptidrezeptors genutzt. Es wurde mit Hilfe der kombinatorischen Chemie eine Rezeptorbibliothek aufgebaut, die das rational entworfene Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv für Carboxylate enthielt. Durch die Kombination des Bindungsmotivs für Carboxylate und einer kombinatorisch variierten Seitenkette sollte es möglich sein, Oligopeptide mit ausreichender Selektivität in Wasser erkennen zu können.

## 2.3 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von synthetischen Rezeptoren für biologisch relevante Tetrapeptide mit freiem C-Terminus. Als biologisch relevante Tetrapeptide wurden dabei zwei verschiedene Peptide ausgewählt. Zunächst die C-terminale Sequenz des Amyloid Peptids A $\beta$  (1-42) L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH, die eine Selbsterkennungsregion für die Aggregation des Proteins bei der Ausbildung von Amyloid Plaques darstellt. Als zweites Peptid wurde das deutlich polarere Tetrapeptid D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH das die C-terminale Ende des Glycopeptids darstellt, das für die Quervernetzung der Peptidoglycanschichten bei Bakterien verantwortlich ist. Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, eignen sich Guanidiniocarbonylpyrrole hervorragend für die Komplexierung eines anionischen Carboxylats in polaren Lösemitteln. Da selbst das valinsubstituierte Guanidiniocarbonylpyrrol **11** schon eine gewisse Enantio- und Stereoselektivität gegenüber einigen acetylierten Aminosäuren besaß (siehe Abbildung 2.15), schien es sinnvoll, dieses Konzept zu übernehmen und zu erweitern. Die allgemeine Struktur der Rezeptoren besteht aus einem linearen Tripeptid an dessen N-Terminus ein kationisches Guanidiniocarbonylpyrrol angeknüpft wird. Um gleichzeitig eine ganze Bibliothek an Rezeptoren darstellen zu können wurde ein Ansatz der kombinatorischen Chemie gewählt und die Rezeptorsequenzen auf einem polymeren Träger synthetisiert. Als polymerer Träger soll Amino-TentaGel dienen, das in Wasser gute Quelleigenschaften besitzt. Es sollte eine 512 Mitglieder umfassende kombinatorische Rezeptorbibliothek synthetisiert und auf ihre Bindungseigenschaften für drei unterschiedliche Tetrapeptide mit freiem C-Terminus, sowohl an der festen Phase, als auch in Lösung untersucht.



34

Abbildung 2.24: Schematischer Aufbau der Rezeptorbibliothek **34**, ausgehend von Amino-TentaGel wird kombinatorisch ein Tripeptid aufgebaut, das als Kopfgruppe eine Carboxylat-Bindungsstelle enthält.

Durch den Einsatz eines peptidischen Rückgrats beim Rezeptordesign kann man, aufgrund ihrer vielfältigen chemischen Struktur, eine Vielzahl nichtkovalenter Wechselwirkungen für die Komplexierung nutzen. Die 20 proteinogenen Aminosäuren stellen das komplette Spektrum

an Polarität zur Verfügung, ausgehend von basischen Aminosäuren wie Lysin und Arginin, über saure Aminosäuren wie Glutaminsäure bis hin zu aliphatischen (Valin, Leucin) oder aromatischen (Phenylalanin, Tryptophan). Zusätzlich stehen mit Serin und Tyrosin weitere Aminosäuren mit Wasserstoffbrückenbindungsdonoren zur Verfügung. Bei der Rezeptorsynthese kann somit auf das umfangreiche Reservoir an natürlichen Aminosäuren sowie deren optimierten Methoden zur Verknüpfung zu Peptiden zurückgegriffen werden.<sup>[92-94]</sup> Zudem stellen Aminosäuren chirale Bausteine dar, so dass eine stereoselektive Erkennung von Peptiden möglich sein sollte. Diese Rezeptoren sollten dazu in der Lage sein Tetrapeptide mit freiem C-Terminus selektiv zu erkennen. Dabei wird davon ausgegangen, dass die kationische Guanidiniocarbonylpyrrol-Kopfgruppe ein Ionenpaar mit dem anionischen Carboxylat des Tetrapeptids ausbildet und für die notwendige Stabilität der Wechselwirkung in polaren Lösemitteln sorgt. Das peptidische Rückgrat des Rezeptors erlaubt die Ausbildung einer ganzen Reihe von nichtkovalenten Wechselwirkungen mit dem tetrapeptidischen Liganden, die für die Selektivität verantwortlich sein sollen. Das Tetrapeptid soll mit einem Fluoreszenzlabel versehen werden, damit man Bindungsenergien sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmen kann.

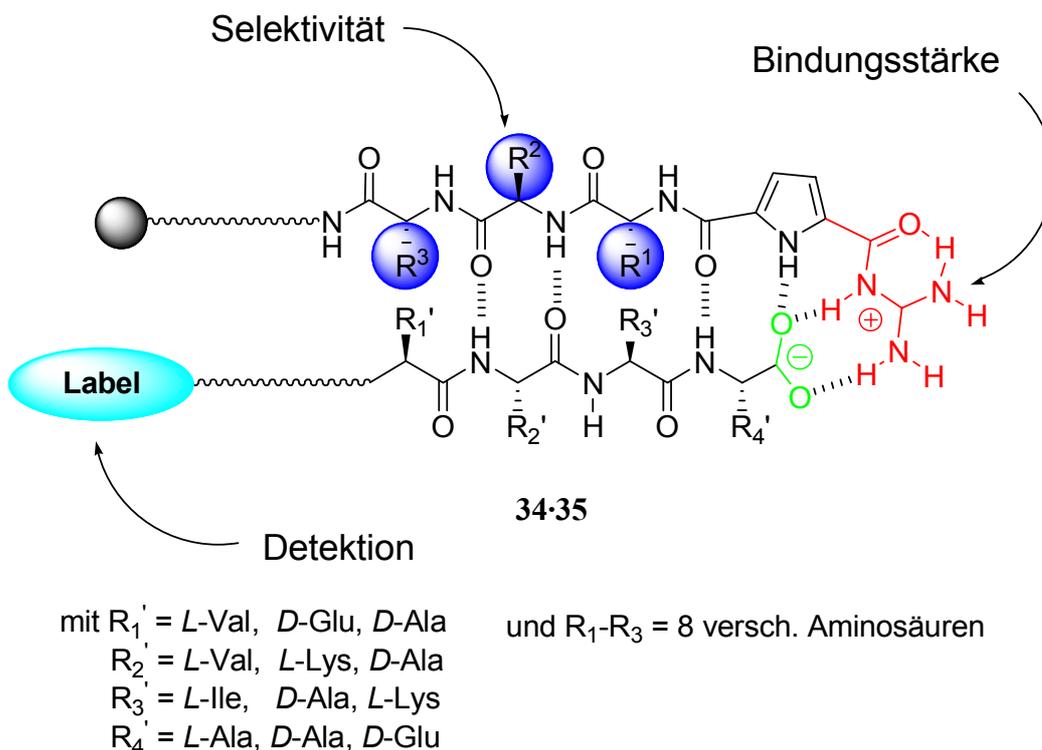


Abbildung 2.25: Schematische Darstellung des Bindungsmodus eines Tetrapeptids **35** mit einem tripeptidischen Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptor **34**.

Die Synthese der Rezeptorbibliothek soll von einer an Amino-TentaGel immobilisierten Aminosäure ausgehen, wobei die Anknüpfung weiterer Bausteine kombinatorisch nach der „Split and Mix“<sup>[95-98]</sup> Methode durchgeführt werden soll. Mit Hilfe der

Radiofrequenzcodierung nach IRORI<sup>[99-101]</sup> soll eine 512 Mitglieder umfassende Rezeptorbibliothek dargestellt werden. Durch den Einsatz der IRORI Radiofrequenzcodierung ist es möglich, die Anzahl der Syntheseschritte zu minimieren, da nicht auf jeder Stufe ein chemisches Tagging<sup>[102]</sup> erforderlich ist, wie z. B. mit den Polyhalogenbenzolen, die *Still* zum Decodieren von Substanzbibliotheken benutzt hat.<sup>[103]</sup> Somit kann durch 3 Reaktionsschritte, bei denen jeweils 8 verschiedene Aminosäuren eingesetzt werden eine 512 ( $8^3$ ) Mitglieder umfassende Tripeptidbibliothek synthetisiert werden, die anschließend mit dem Bindungsmotiv für Carboxylate umgesetzt wird.

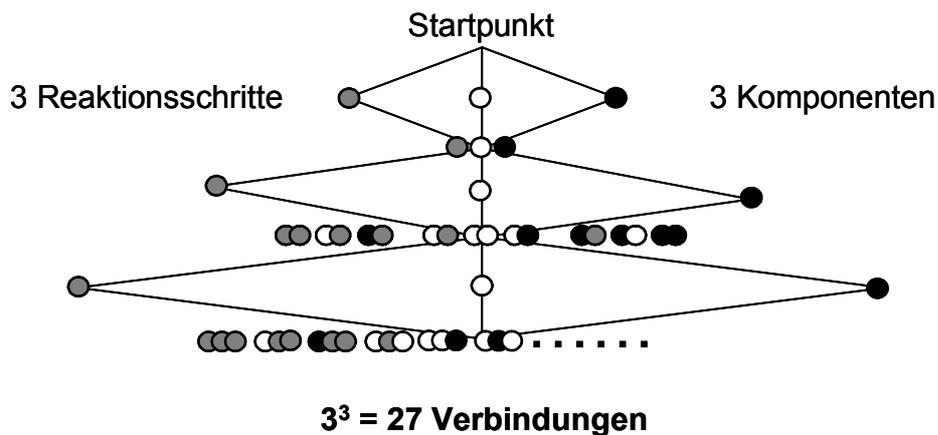


Abbildung 2.26: Schematische Darstellung kombinatorischer Synthese nach der „Split and Mix“ Methode.

Die IRORI Radiofrequenzcodierung ermöglicht es zudem durch den Einsatz eines ca. 30 mg Polymer fassenden Mikroreaktors die Synthese von einigen Mikromol Substanz pro synthetisierter Rezeptorsequenz, so dass ausreichend Substanz für weitergehende qualitative und quantitative Untersuchungen zur Verfügung steht. Das Harz wird, zusammen mit einem in Glas eingeschmolzenen Radiofrequenzchip, in einen Kunststoffreaktor gegeben. Auf dem Radiofrequenzchip befindet sich ein binärer Code, der von einer Lesestation abgelesen werden kann, somit kann jedem Mikroreaktor ein einzigartiger Syntheseweg zugewiesen werden.



Abbildung 2.27: IRORI MikroKan, das bis zu 30 mg Polymer aufnehmen kann mit einem Tag zur Identifizierung der auf dem Harz synthetisierten Verbindung.

Für das Screening auf Bindungseigenschaften sollen verschiedene biologisch relevante Tetrapeptide mit freiem C-Terminus synthetisiert werden. Für die leichte Identifizierung von Bindungsaktivität sollen die Liganden mit einem Fluoreszenzlabel – vorzugsweise Dansyl – versehen werden, da die Fluoreszenzspektroskopie eine sehr empfindliche Methode darstellt, um auch geringe Unterschiede gut zu erfassen. Darüber hinaus gibt es verschiedene bildgebende Methoden, wie z. B. die Fluoreszenzmikroskopie, die Fluoreszenz nutzen können, um Bindungsaktivität nachzuweisen. Der Abstandshalter zwischen Peptidrückgrat und Fluoreszenzlabel dient dazu, um Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Peptid auszuschließen (Abbildung 2.28).

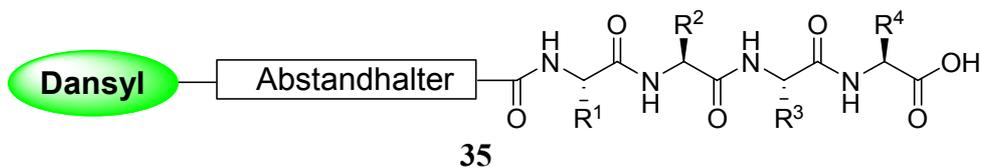


Abbildung 2.28: Schematische Darstellung eines fluoreszenzmarkierten biologisch relevanten Tetrapeptids mit freiem C-Terminus und einem Abstandshalter zwischen Fluoreszenzlabel und Peptid.

Zunächst soll in einem „on bead“ Assay die Bindungsaktivität aller Mitglieder der Rezeptorbibliothek gegenüber den verschiedenen Liganden qualitativ bestimmt werden, um optimale Bedingungen für die quantitative Bestimmung von Bindungskonstanten zu erhalten. Durch den Einsatz eines Fluoreszenzlabels sollte es möglich sein in einer qualitativen Untersuchung auf Bindungseigenschaften mittels eines Fluoreszenzmikroskops Aussagen über die Güte der Bibliothek zu treffen.<sup>[104, 105]</sup> Dabei soll die Rezeptorbibliothek mit einem farbstoffmarkierten Peptid inkubiert werden, dies ermöglicht eine schnelle qualitative Analyse auf Bindungseigenschaften. Eine Decodierung ist bei diesem Schritt nicht möglich, da durch den Einsatz der IRORI Radiofrequenzcodierung nicht mehr jedes einzelne Harzkügelchen mit einem Codierungsstrang versehen werden muss.

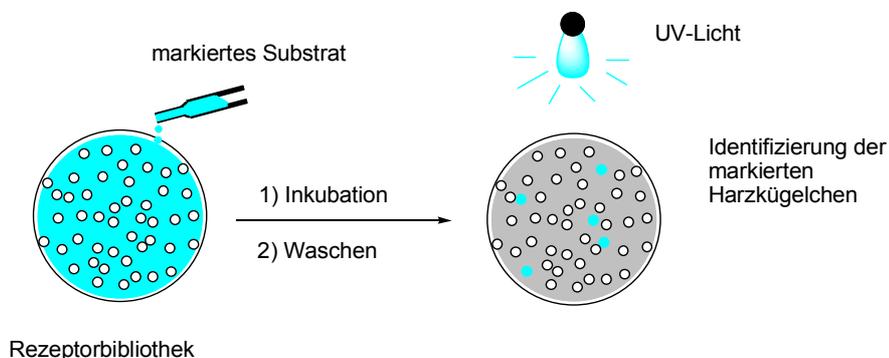
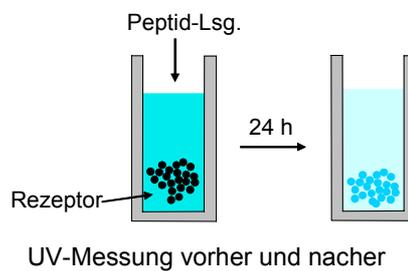


Abbildung 2.29: Schematische Darstellung des „on bead“ Assays zur Identifizierung aktiver Peptidrezeptoren innerhalb der Bibliothek.

Zur weitergehenden Analyse sollen die Bindungskonstanten für alle Mitglieder der Bibliothek gegenüber den jeweiligen Liganden quantitativ bestimmt werden. Durch den Einsatz der IRORI Technik zur Darstellung von Substanzbibliotheken ist es möglich, mikromolare Mengen jedes Mitglieds einer Bibliothek zu erhalten, so dass auch eine quantitative Bestimmung der Bindungskonstanten auf der festen Phase möglich ist.<sup>[106-108]</sup> Die quantitative Bestimmung der Bindungskonstanten soll nach einem ähnlichen Verfahren ablaufen wie das qualitative Screening unter Ausnutzung des farbstoffmarkierten Peptids. Durch eine quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensität oder der Absorption des Farbstoffs steht ein Reporter zur Verfügung, mit dem sich für einen 1:1 Komplex Bindungskonstanten leicht ausrechnen lassen.



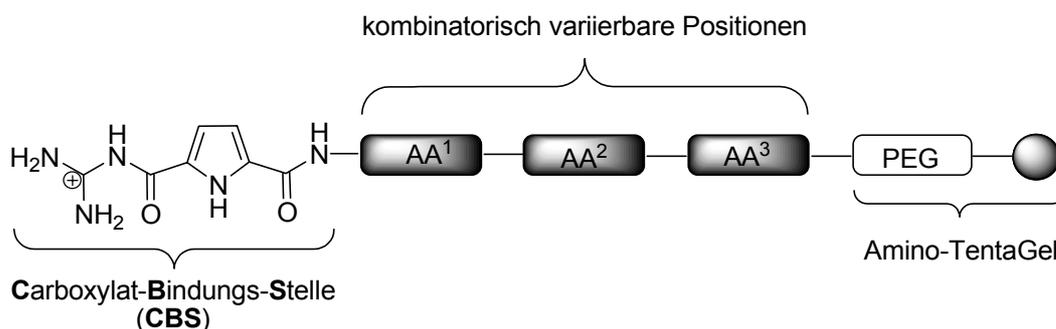
*Abbildung 2.30: Bestimmung der Bindungskonstante auf der festen Phase über UV- oder Fluoreszenzspektroskopie. Durch eine einfache Differenzmessung der Absorption vor und nach der Inkubierung kann die Assoziationskonstante bestimmt werden.*

Die quantitative Bestimmung von Bindungskonstanten einer Rezeptorbibliothek stellt einen großen Fortschritt gegenüber der üblichen Methode der Bestimmung der Güte einer Bibliothek dar, da sie sich nicht darauf beschränkt, die Ergebnisse eines qualitativen Screenings zu nutzen. Mit dieser Methode kann auf Selektivitätsunterschiede genauer eingegangen werden und definierte Struktur-Aktivitätsbeziehungen bestimmt werden.

Nach der erfolgreichen quantitativen Bestimmung der Bindungskonstanten „on bead“ sollen einige Rezeptorsequenzen in Lösung auf Bindungseigenschaften getestet werden. Dabei kann man auf das umfangreiche Arsenal zur quantitativen Bestimmung nichtkovalenter Wechselwirkungen eingehen. Dies bietet den Vorteil, dass die durch das „on bead“ Screening gewonnenen Erkenntnisse mit den Ergebnissen in Lösung verglichen werden können. Zusätzlich zu der physikalisch organischen Charakterisierung sollen Strukturvorschläge der supramolekularen Komplexe mit Hilfe von theoretischen Berechnungen gewonnen werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Rezeptorbibliothek auf der Basis eines Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotivs für Carboxylate synthetisiert und auf Bindungseigenschaften für drei verschiedene Tetrapeptide getestet. Die 512 Mitglieder umfassende Bibliothek enthielt acht verschiedene Aminosäuren, im einzelnen waren dies Glutaminsäurebenzylester, Leucin, *t*-Boc-Lysin, *t*-Bu-Serin, Tryptophan, *t*-Bu-Tyrosin und Valin. Die Synthese erfolgte auf Amino-TentaGel.



AA<sup>1</sup>, AA<sup>2</sup>, AA<sup>3</sup> = Glu, Leu, Lys, Ser, Trp, Tyr, Val

34

*Abbildung 3.1:* Schematischer Aufbau der Rezeptorbibliothek **34**, ausgehend von Amino-TentaGel wird kombinatorisch ein Tripeptid aufgebaut, das als Kopfgruppe eine Carboxylat-Bindungsstelle enthält.

Die Arbeit gliedert sich in zwei verschiedene Teile. Zunächst wurde die noch mit Schutzgruppen versehene Rezeptorbibliothek gegen das unpolare Tetrapeptid L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH auf Bindungseigenschaften getestet. Für das aliphatische Tetrapeptid sollten hydrophobe Wechselwirkungen bei der Bindung des Liganden durch die Rezeptorbibliothek eine herausragende Rolle spielen. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Evaluierung von Bindungseigenschaften für das Tetrapeptid D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH sowie dessen inverse Sequenz D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Glu-OH. Für diese beiden sehr polaren Liganden sollten ionische Wechselwirkungen einen größeren Einfluss auf die Bindungsaktivität haben. Aus diesem Grunde wurden die Schutzgruppen der Aminosäuren der Rezeptorbibliothek für das Screening gegen diese Liganden entfernt.

Die qualitative Bestimmung von Bindungskonstanten für die Bibliothek wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzscreening durchgeführt. Ein Tetrapeptid mit freiem C-Terminus wurde über einen Abstandshalter mit einem Fluoreszenzmarker, in diesem Falle ein N,N-Dimethylaminonaphthalinsulfonsäurerest (Dansyl) versehen. Dieser Fluoreszenzmarker zeigt bei Bestrahlung mit UV-Licht eine intensiv grüne Fluoreszenz. Der Abstandshalter zwischen Peptid und Dansylrest sollte gewährleisten, dass keine Wechselwirkung zwischen

Fluoreszenzmarker und Peptid vorlag, die die Bindungseigenschaften des Tetrapeptids beeinflusste.

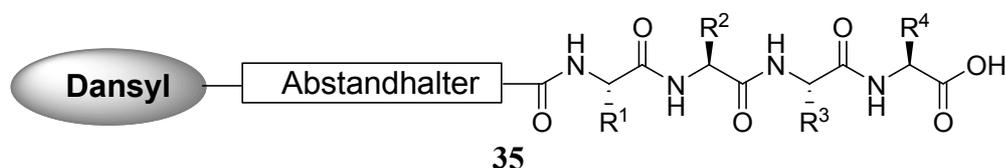


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau der fluoreszenzmarkierten Tetrapeptide mit freiem C-Terminus.

Im Anschluss an die quantitative Bestimmung von Bindungskonstanten an der festen Phase wurden ausgewählte Mitglieder der Rezeptorbibliothek nachsynthetisiert und auf ihre Bindungseigenschaften in Lösung getestet.

### 3.1 Synthese der Rezeptorbibliothek

Die kombinatorische Synthese der 512 Mitglieder umfassenden Bibliothek erfolgte nach der „Split and Mix“ Methode<sup>[13, 109, 110]</sup> auf Amino-TentaGel als fester Phase in IRORI *MikroKans* und der IRORI Radiofrequenzcodierung<sup>[99, 100]</sup> zur einfachen und schnellen Identifizierung der einzelnen Mitglieder der Bibliothek. Die Radiofrequenzcodierung beruht auf einem Mikrochip, auf dem sich ein binärer elfstelliger Code befindet, der über einen speziellen Radiofrequenzpuls abgefragt werden kann. Um den Chip gegen Lösemiteleinflüsse und Temperaturänderungen inert zu machen, wurde er in eine Glashülle eingeschmolzen. Die IRORI *MikroKans* sind kleine Kunststoffreaktoren aus Polyethylen, die ein lösemitteldurchlässiges feines Netz mit einem Durchmesser von 74  $\mu\text{m}$  besitzen. Aus diesem Grunde musste darauf geachtet werden, dass der Durchmesser der Harzkügelchen ausreichend groß war, um einen Verlust an Harz durch das Gitter der *MikroKans* zu verhindern. Durch Vorversuche konnte gezeigt werden, dass eine durchschnittliche Größe der Harzkügelchen von 130  $\mu\text{m}$  ausreicht, um die Diffusion durch das Netz zu verhindern. Bei der Synthese in IRORI *MikroKans* ist es möglich bis zu 30 mg Harz pro synthetisierte Verbindung zu verwenden. Dadurch kann man, bei einer Beladung des Harzes mit funktionellen Gruppen von  $0.22 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , mikromolare Mengen jedes Mitglieds der Bibliothek erhalten.

Die Synthese der Tripeptidbibliothek erfolgte nach einem Standardprotokoll mit PyBOP als Kupplungsreagenz und Fmoc-geschützten Aminosäuren. Auf jeder Synthesestufe wurden acht verschiedene geschützte L-Aminosäuren eingesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das komplette Spektrum an Polarität, Hydrophobie und sterischem Anspruch ausgeschöpft wurde. Als einfache aliphatische Aminosäuren wurden Valin und Leucin eingesetzt, als aromatische

Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin (geschützt als *t*-Butylether), als basische Aminosäure Lysin (geschützt als *t*-Butylcarbamat), als saure Aminosäure Glutaminsäure, geschützt als Benzylester, und schließlich Serin, ebenfalls als *t*-Butylether geschützt. Die Diversität der Bibliothek ist trotz ihrer relativ kleinen Größe ausgesprochen hoch. Zunächst wurde eine isopyknotische Lösung (die Dichte des Lösemittels entspricht exakt der Dichte des Harzes) aus Amino-TentaGel in Dichlormethan und Hexan (1:8) hergestellt und zwar so, dass jeweils 30 mg Harz in 300  $\mu$ L Lösung enthalten waren. In jedes *MikroKan* wurden 300  $\mu$ L der isopyknotischen Lösung gegeben, damit alle die gleiche Menge Harz enthielten. Auf der Basis von Amino-TentaGel (130  $\mu$ m) wurde nach Standardprotokoll<sup>[95, 111]</sup> mit Fmoc-geschützten Aminosäuren und PyBOP als Kupplungsreagenz die 512 Mitglieder umfassende Bibliothek aus Tripeptiden synthetisiert. Für eine schnelle, qualitative Analytik wurde ein Kaiser-Test durchgeführt, mit dem man freie Aminofunktionen am polymeren Träger detektieren kann. Bei Anwesenheit von freien Aminofunktionen färben sich die Polymerkügelchen tiefblau. Um eine quantitative Kupplung zu gewährleisten, wurde jeder Kupplungsschritt zweifach ausgeführt. Als letzter Schritt wurde die freie Aminofunktion des Tripeptids mit dem Zwitterion **12** in DMF und PyBOP als Kupplungsreagenz mit NMM als Base umgesetzt. Diese Kupplung erforderte etwas basischere Reaktionsbedingungen und eine auf 24 Stunden verlängerte Reaktionszeit als die standardisierte Fmoc-Kupplung von Aminosäuren. Dieser Kupplungsschritt wurde ebenfalls zweimal durchgeführt, um einen quantitativen Umsatz zu gewährleisten. Ein negativer Kaiser-Test zeigte auch hier einen quantitativen Umsatz an, da Guanidine durch diese Farbreaktion nicht angefärbt werden können.

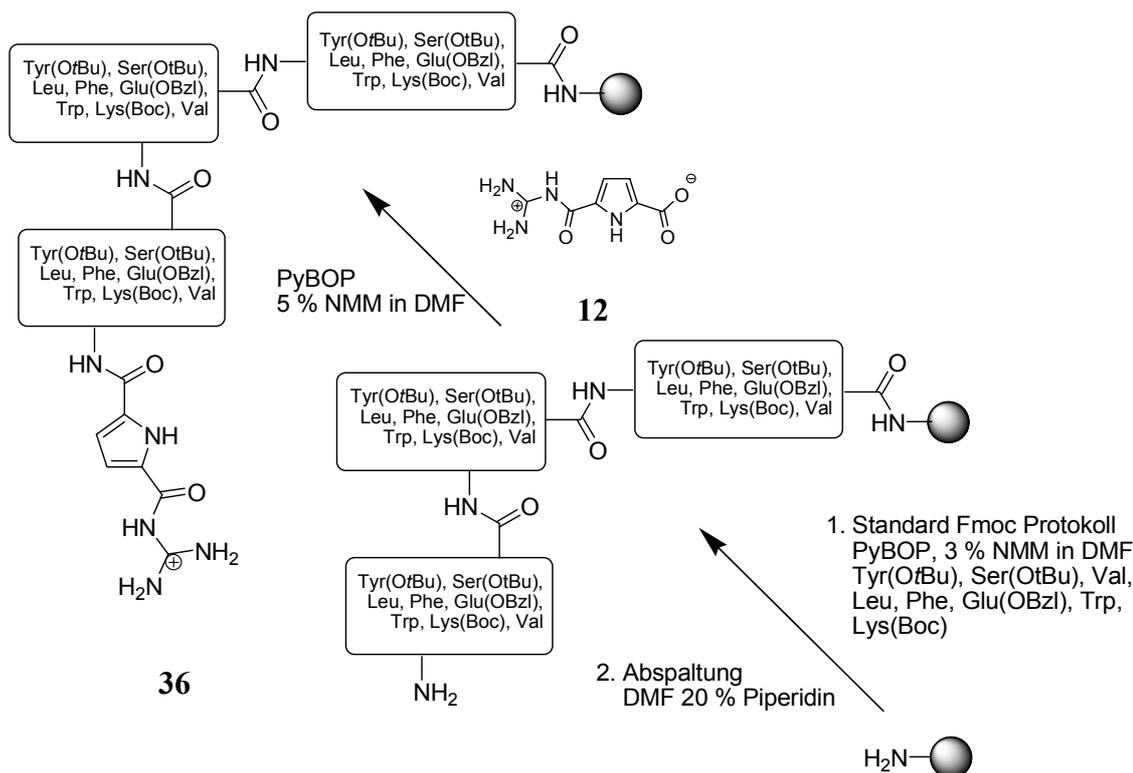


Abbildung 3.1: Synthese der 512 Mitglieder umfassenden geschützten Bibliothek 36 auf TentaGel.

Nach erfolgreicher Synthese der Bibliothek wurden die in den *MikroKans* befindlichen Harzkügelchen intensiv mit Dichlormethan, Diethylether und Methanol gewaschen, um letzte Reste an Reagenzien und DMF zu entfernen. Anschließend wurden die *MikroKans* im Membranpumpenvakuum getrocknet. Nach Trocknen wurde jedes Mitglied der Bibliothek in ein kleines, wieder verschließbares Gefäß überführt und die Menge an Harz genau bestimmt. Eine kleine Menge an Harz aus jedem *MikroKan* wurde zurückbehalten, um später Vorversuche zur Bestimmung von Bindungskonstanten auf der festen Phase durchführen zu können.

## 3.2 Bestimmung von Bindungskonstanten für das Alzheimer Modellpeptid

### 3.2.1 Screening in Methanol

Die Untersuchung auf die Bindungseigenschaften sollte mittels Fluoreszenzspektroskopie erfolgen, so dass ein Fluoreszenzlabel als Sonde für die Detektion eingeführt werden musste. Als idealer Reporter für die Detektion erschien Dansyl als Fluorophor, da es eine sehr hohe Quantenausbeute zeigt, leicht einzuführen und preiswert ist. Um zu vermeiden, dass die intermolekularen Wechselwirkungen von dem Fluoreszenzlabel beeinflusst werden, wurde zwischen dem Fluorophor und dem Peptid ein Abstandshalter eingefügt. Über diesen

Abstandshalter kann sowohl die Entfernung zwischen Peptid und Fluoreszenzlabel als auch die Löslichkeit in wässrigen Lösemitteln beeinflusst werden. Zunächst wurde das Fluoreszenzlabel mit dem Abstandhalter über eine Zweiphasenreaktion in wässriger Natronlauge und Dichlormethan in einer sehr guten Ausbeute von 95 % erhalten, eine Reinigung erfolgte durch einfaches Ausschütteln.

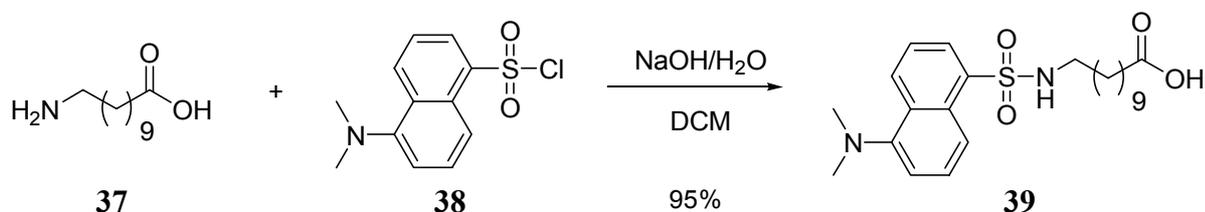


Abbildung 3.2: *Synthese des Fluoreszenzlabels mit Alkylspacer.*

Die Synthese des Liganden ging von Wang Harz aus, das einen *p*-Hydroxybenzylalkohol Linker besitzt und unter milden Bedingungen mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan abgespalten werden kann, wodurch man direkt die freie Carbonsäure in sehr guten Ausbeuten und hoher Reinheit erhält. Zunächst wurde an Wang Harz die erste Aminosäure durch eine Kupplung von Fmoc-L-Alanin mit Diisopropylcarbodiimid, *l*-Hydroxybenzotriazol und DMAP in einer Mischung aus Dichlormethan und DMF (8:2) für 20 Stunden gekuppelt. Der Umsatz der Reaktion konnte nicht durch einen Kaiser-Test kontrolliert werden, da eine freie Hydroxylfunktion keinen positiven Kaisertest gibt. Andere Farbtests auf freie Hydroxylfunktionen sind nicht eindeutig, so dass dieser Syntheseschritt wiederholt wurde. Nach Abspalten der Schutzgruppe wurden die weiteren drei Aminosäuren nach Standardprotokoll an die feste Phase gebracht. Anschließend wurde die freie Aminosäure mit dem zuvor synthetisierten Dansyllinker in DMF und mit PyBOP als Kupplungsreagenz umgesetzt. Nach Abspalten des Produkts mit einer 1:1 Mischung aus Dichlormethan und Trifluoressigsäure von der festen Phase wurde das fluoreszenzmarkierte Peptid **43** in einer sehr guten Gesamtausbeute von 90 % erhalten.

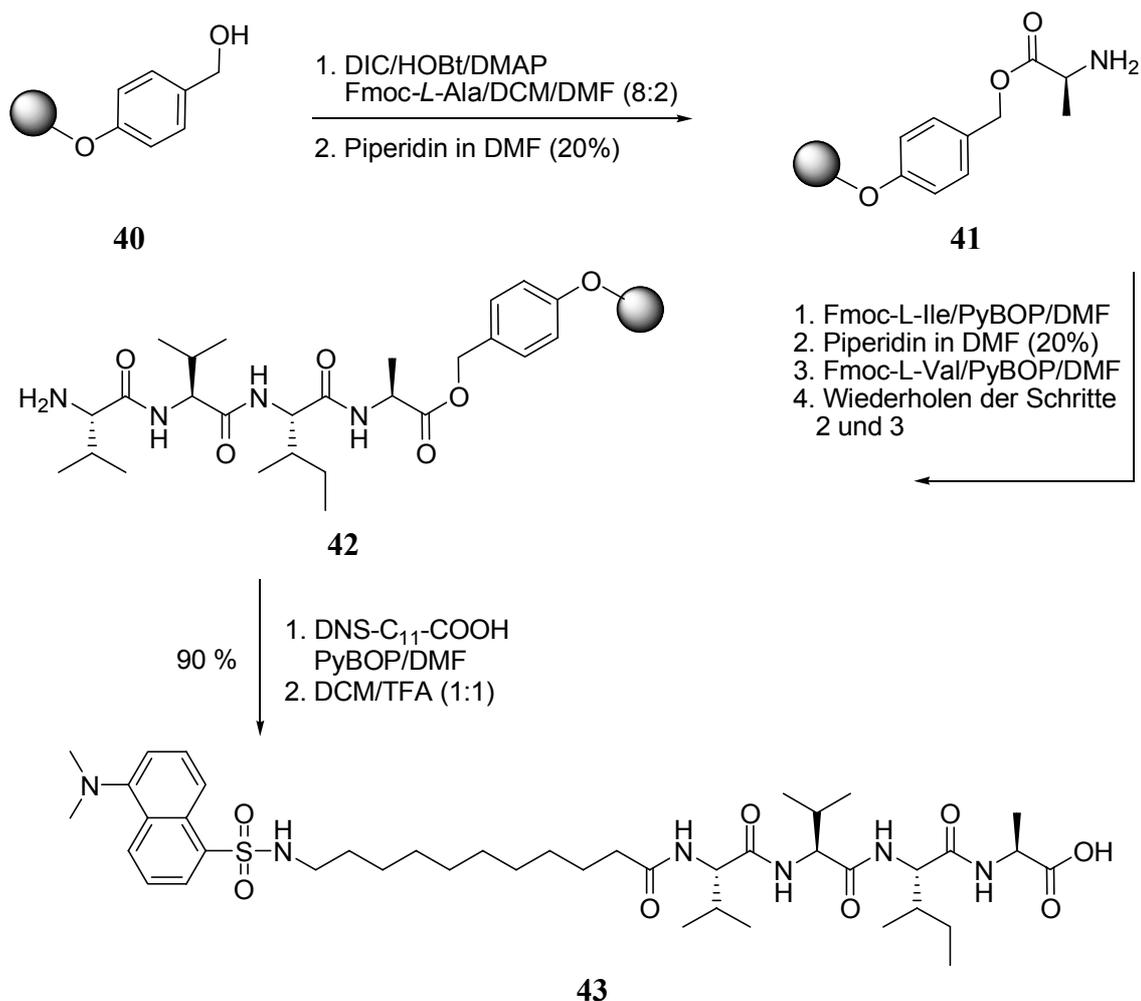
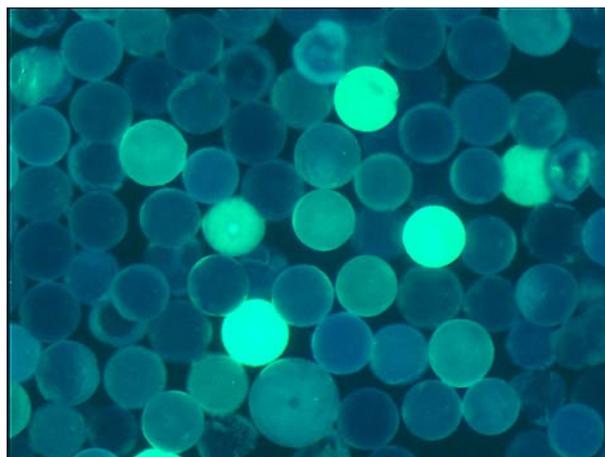


Abbildung 3.3: Synthese des fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids **43** L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH auf Wang Harz mit einer Gesamtausbeute von 90 %.

Das fluoreszenzmarkierte Peptid **43** sollte ein geeigneter Ligand für den Test auf Bindungseigenschaften in wässriger Lösung darstellen. Es zeigte sich aber, dass diese Peptidsequenz in Wasser vollständig unlöslich war, selbst ein Zusatz von 10 % DMSO reichte nicht aus, um mikromolare Mengen des Peptids **43** in Lösung zu bringen. Es stellte sich heraus, dass die Löslichkeit in reinem Methanol ausreichend groß war, so dass zunächst ein Screening der Rezeptorbibliothek **34** in dem bereits sehr polaren Lösemittel Methanol durchgeführt wurde.<sup>[112]</sup> Bei dem ersten Screening in Methanol lag noch die Bibliothek mit allen Schutzgruppen an den Seitenketten vor. Zunächst musste jedoch der richtige Konzentrationsbereich bestimmt werden, um bindende von nicht bindenden Sequenzen zu unterscheiden. Dafür wurde zunächst aus jedem *MikroKan* eine geringe Menge Harz entnommen und in einem Gefäß vereint, so dass man die gesamte Rezeptorbibliothek gleichzeitig qualitativ untersuchen konnte. Die Rezeptorbibliothek wurde dafür für 18 Stunden mit einer 13  $\mu$ M Lösung des fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids **43** inkubiert. Anschließend wurde das Harz einmal mit Methanol gewaschen, um nichtgebundenen Liganden zu entfernen. Die verbleibende Fluoreszenz der Harzkügelchen sollte somit

Bindungsaktivität anzeigen. Es zeigte sich, dass man bei einer Konzentration des fluoreszenzmarkierten Substrats von  $13 \mu\text{M}$  in Methanol das komplette Spektrum an Fluoreszenzintensität erhalten konnte. Dies zeigt, dass selbst in dem bereits sehr polaren Lösemittel Methanol eine selektive Erkennung des Liganden **43** durch einige wenige Rezeptoren erreicht werden kann. Schon mit diesen ersten qualitativen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Rezeptorbibliothek **36** dazu in der Lage ist das fluoreszenzmarkierte Tetrapeptid **43** selektiv in polaren Lösemitteln zu erkennen.



*Abbildung 3.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Rezeptorbibliothek **36** gegen das markierte Tetrapeptid **43** bei einer Konzentration von  $13 \mu\text{M}$  in Methanol. Stark leuchtende Harzkügelchen zeigen stark bindende Rezeptorsequenzen an.*

Um nachzuweisen, dass die beobachteten Fluoreszenzunterschiede ausschließlich aus der Wechselwirkung der Rezeptorbibliothek und dem Tetrapeptid stammen, wurden drei Kontrollexperimente durchgeführt. Mit diesen Kontrollexperimenten kann gezeigt werden, dass mögliche Nebeneffekte, wie z. B. eine selektive Fluoreszenzlöschung oder die Wechselwirkung des Fluoreszenzlabels mit der Bibliothek keine Rolle spielen.

Das erste Kontrollexperiment sollte zeigen, dass das Tetrapeptid **43** allein mit TentaGel zu keiner erhöhten Fluoreszenz des TentaGel führte, also dass eine Wechselwirkung des polymeren Trägers mit dem Peptid ausgeschlossen werden konnte. Dafür wurde eine  $26 \mu\text{M}$  Lösung des dansylierten Tetrapeptids **43** in Methanol für 18 Stunden mit TentaGel Harz inkubiert, das Harz anschließend einmal mit Methanol gewaschen und die Harzkügelchen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Es konnte keine erhöhte Fluoreszenz gegenüber unbehandeltem TentaGel festgestellt werden, alle Harzkügelchen zeigten die gleiche, sehr geringe Fluoreszenz (siehe Abbildung 3.5).

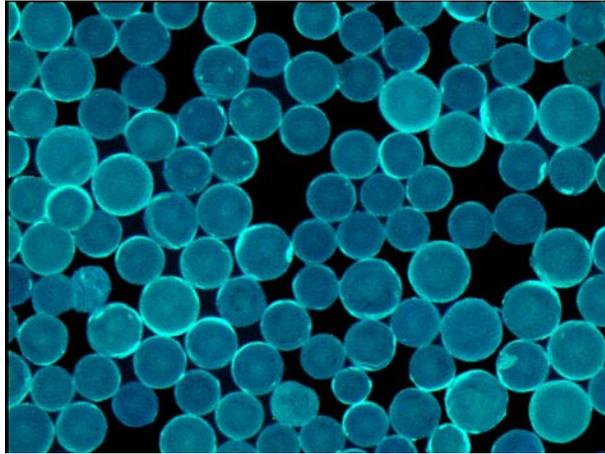


Abbildung 3.5: *Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von TentaGel gegen das dansylierte Tetrapeptid 43.*

In einem zweiten Experiment wurde die Rezeptorbibliothek **36** mit einer sehr hohen Konzentration ( $264 \mu\text{M}$ ) des Tetrapeptids **43** für 18 Stunden in Methanol inkubiert. Unter diesen Bedingungen sollten alle Mitglieder der Rezeptorbibliothek nach der Inkubierung stark fluoreszieren, da der Bindungsvorgang konzentrationsabhängig ist und bei dieser Konzentration keine Konkurrenz unterhalb einzelner Mitglieder der Bibliothek stattfindet. Weisen alle Rezeptoren etwa die gleiche Fluoreszenzintensität auf, kann eine selektive Fluoreszenzlöschung ausgeschlossen werden, da diese konzentrationsunabhängig wäre. In der Tat zeigte sich, dass alle Mitglieder der Rezeptorbibliothek bei der Inkubation mit einer hochkonzentrierten Lösung des dansylierten Tetrapeptids **43** eine intensive Fluoreszenz zeigten.

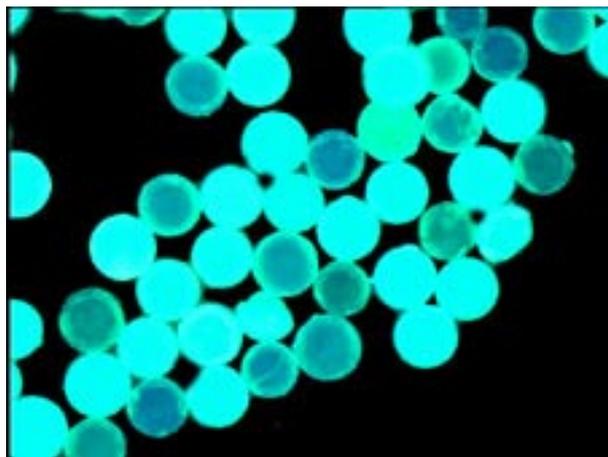


Abbildung 3.6: *Inkubierung der Bibliothek 36 mit einer  $264 \mu\text{M}$  Lösung des fluoreszenzmarkierten Liganden 43, alle Rezeptoren zeigen in etwa die gleiche Fluoreszenz, eine selektive Fluoreszenzlöschung kann deshalb ausgeschlossen werden.*

Ein letztes Kontrollexperiment, das durchgeführt werden musste, um zu zeigen, dass die Fluoreszenzunterschiede nicht von einer selektiven Wechselwirkung der Rezeptoren mit dem

Fluoreszenzlabel stammten, war die Inkubation der Bibliothek mit dem Fluoreszenzlabel. Für diese Kontrolle wurde der Methylester des Fluoreszenzlabels benötigt, da die freie Carbonsäure mit den Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptoren über ein Ionenpaar eine starke Wechselwirkung ausbilden könnte und so zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte. Ausgehend von der Aminocarbonsäure **37** wurde der Methylester in einer Ausbeute von 82 % dargestellt, der anschließend mit Dansylchlorid **38** in Dichlormethan und NMM als Base in einer Ausbeute von 65 % in die entsprechende dansylierte Verbindung **44** umgesetzt wurde.

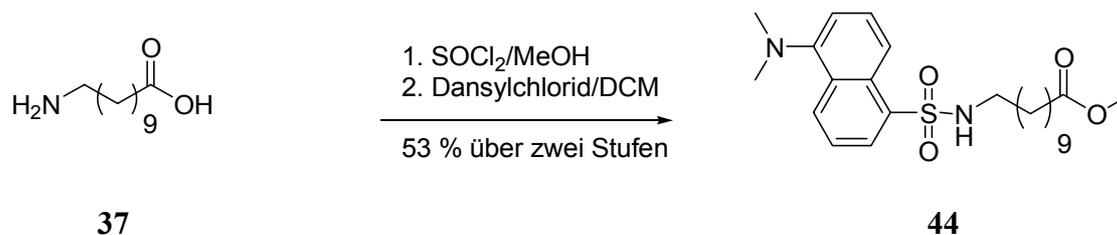


Abbildung 3.7: *Synthese des Methylesters **44** des Fluoreszenzmarkers für Kontrollexperimente.*

Die Bibliothek wurde zunächst nur mit dem Methylesters des Fluoreszenzlabels **44** für 18 Stunden inkubiert, anschließend mit Methanol gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dabei konnte nur eine geringe Restfluoreszenz und keine Selektivität bei den Mitgliedern der Rezeptorbibliothek festgestellt werden.

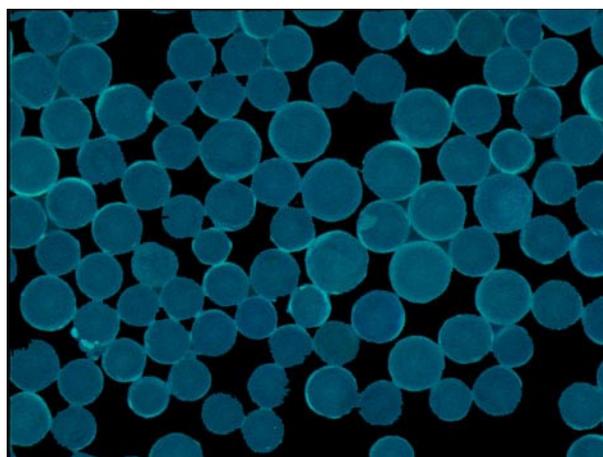


Abbildung 3.8: *Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Rezeptorbibliothek gegen das Fluoreszenzlabel **44***

Ein weiterer Aspekt, der in Voruntersuchungen beleuchtet werden sollte, war der Einfluss des freien Carboxylats auf die Stärke der Bindungsaktivität. Dabei wurde zunächst der Methylester des Liganden **45** synthetisiert, indem die freie Säure zunächst mit Oxalylchlorid und einigen Tropfen DMF als Katalysator in das entsprechende Säurechlorid umgewandelt wurde und anschließend mit Methanol bei Raumtemperatur über Nacht zum Methylester **45**

umgesetzt wurde. Eine anschließende säulenchromatographische Reinigung des Produktgemischs führte in einer Ausbeute von 50 % zu der gewünschten Verbindung **45**.

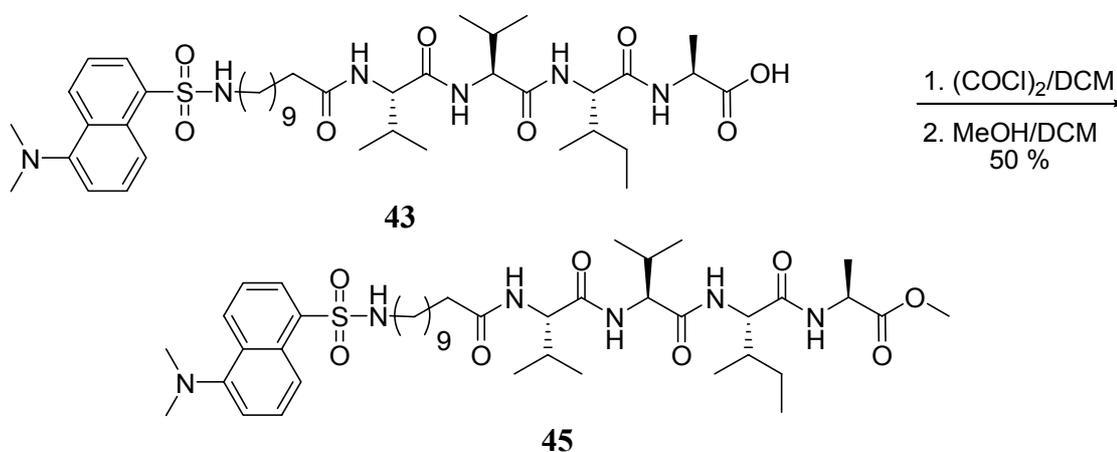


Abbildung 3.9: Synthese des fluoreszenzmarkierten Methylesters **45** des Alzheimer Modell Peptids.

Mit einer 26  $\mu\text{M}$  Lösung des Methylesters in Methanol wurde die Rezeptorbibliothek für 24 Stunden inkubiert, anschließend mit Methanol gewaschen und die Harzkügelchen unter dem Mikroskop beobachtet. Dabei konnte man deutlich erkennen, dass durchaus Unterschiede in der Fluoreszenzaktivität vorhanden sind, diese aber nicht sehr ausgeprägt – verglichen mit der freien Carbonsäure – waren. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die ionischen Wechselwirkungen zwischen dem Carboxylat des Liganden und dem Guanidiniocarbonylpyrrol des Rezeptors den größten Teil der Bindungsenergie liefern. Anhand der Abbildung 3.10 erkennt man deutlich unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten, verglichen mit Abbildung 3.4 ist die Fluoreszenzintensität aber viel geringer. Dies ist ein Kennzeichen für eine deutlich geringere Bindungsstärke, als bei der Inkubierung der Rezeptorbibliothek mit dem C-terminal ungeschützt vorliegenden Liganden.



Abbildung 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Rezeptorbibliothek, die mit einer 26  $\mu\text{M}$  Lösung des fluoreszenzmarkierten Methylester **45** für 24 h inkubiert wurde.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Fluoreszenzunterschiede bei der Inkubierung der Rezeptorbibliothek mit dem dansylierten Tetrapeptid ausschließlich von der Wechselwirkung des Peptids mit dem Rezeptor stammen, war es möglich, quantitativ Bindungskonstanten auf der festen Phase zu bestimmen. Die Beladung des Trägermaterials für die Synthese der Bibliothek (Amino-TentaGel) wurde in einem Vorversuch exakt bestimmt (siehe Experimenteller Teil unter generelle analytische Methoden). Die Kupplungsschritte verliefen quantitativ, so dass Fehlsequenzen eine zu vernachlässigende Rolle spielten. Durch die IRORI™ Radiofrequenzcodierung waren etwa 6  $\mu\text{mol}$  Substanz pro Rezeptor vorhanden, eine ausreichende Menge, um Bindungskonstanten auf der festen Phase für jede Rezeptorsequenz zu bestimmen. Für die Bestimmung der Bindungskonstanten wurde eine genau abgewogene Menge an festphasengebundenem Rezeptor mit 2 mL einer 26  $\mu\text{M}$  Lösung des fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids **43** in Methanol für 18 Stunden inkubiert. Die Fluoreszenzintensität der Lösung des Tetrapeptids wurde vor und nach der Inkubierungszeit gemessen. Die Fluoreszenzintensität des dansylmarkierten Tetrapeptids nimmt linear mit der Konzentration zu, so dass eine Kalibrierkurve, die die Konzentration mit der Fluoreszenzintensität korreliert, aufgenommen werden konnte. Aus der Differenz der Fluoreszenzintensität konnte die Assoziationskonstante ermittelt werden. Durch eine einfache Messung der Fluoreszenzintensität und einer zuvor aufgenommenen Kalibrierkurve sind alle Konzentrationen berechenbar, die für eine Bestimmung einer Bindungskonstante notwendig sind. Alle Fluoreszenzuntersuchungen wurden in Multititerplatten an einem *Tecan Spectra Fluor Plus* HTS Gerät bei einer Anregungswellenlänge von 310 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm durchgeführt.

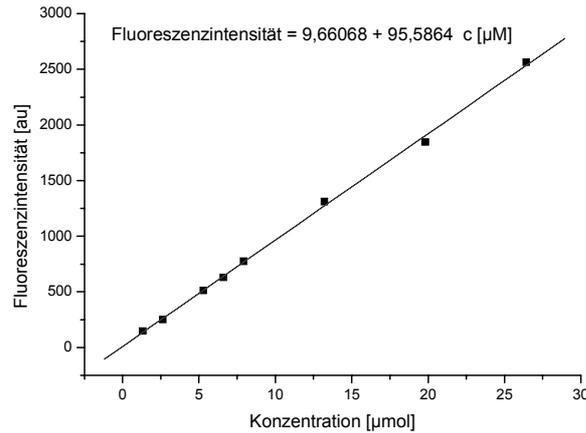


Abbildung 3.11: Kalibrierkurve für das dansylierte Tetrapeptid **43** in Methanol mit Tetramethylammoniumhydroxid als Gegenion, Anregung bei 310 nm Emission bei 535 nm, aufgenommen mit einem Tecan Spectra Fluor Plus HTS Plattenleser in einer 96 well Titerplatte befüllt mit jeweils 200 µl.

Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich, dass die Assoziationskonstante  $K$  für einen 1:1 Komplex aus dem Quotienten aus Rezeptor-Ligand-Komplex  $[RL]$  und den Konzentrationen and freiem Rezeptor  $[R]$  und freiem Liganden  $[L]$  gebildet wird.

$$K = \frac{[RL]}{[R] \cdot [L]} \tag{3.1}$$

Aus der Restfluoreszenz der überstehenden Lösung konnte die Konzentration an freiem Liganden  $[L]$  bestimmt werden. Die Menge an Harz, und somit die Konzentration des Rezeptors  $R_0$  ist durch die genaue Einwaage bekannt. Genauso bekannt ist die Gesamtkonzentration des Liganden  $L_0$ , die die Fluoreszenzintensität am Beginn der Inkubierungszeit darstellt. Die Differenz der Fluoreszenzintensität zwischen Anfang und Ende der Inkubierungszeit, korreliert mit der zuvor aufgenommenen Eichgerade stellt die Konzentration des gebildeten Komplexes aus Substrat und Ligand dar. Somit kann man mit Hilfe einer Einpunktmessung der Fluoreszenzintensität die Assoziationskonstante  $K$  auf der festen Phase für jedes Mitglied der Bibliothek bestimmen. Die Konzentration des freien Rezeptors  $[R]$  kann man nach

$$[R] = R_0 - [RL] \tag{3.2}$$

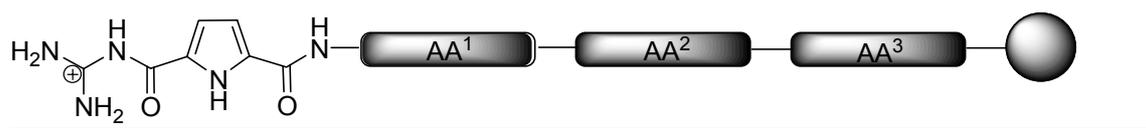
bestimmen. Ein ähnlicher Zusammenhang gilt für die Konzentration an freiem Liganden:

$$[RL] = L_0 - [L] \tag{3.3}$$

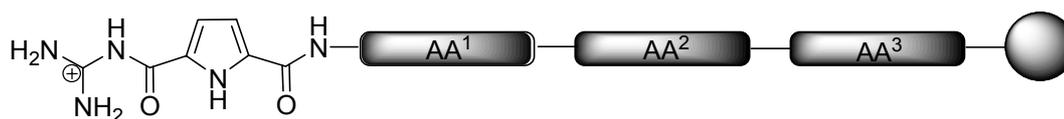
Da die Konzentrationen des Rezeptor Ligand-Komplexes  $[RL]$ , die Konzentration an freiem Rezeptor  $[R]$  und an freiem Ligand  $[L]$  alle aus der Messung der Fluoreszenz vor und nach der Inkubierung genau bestimmbar sind, kann man die Bindungskonstante direkt über Gleichung (3.1) bestimmen. Durch die genaue Einwaage der Menge an Harz kann  $R_0$  aus der Einwaage bestimmt werden, die Konzentration an freiem Ligand nach Ende der Äquilibrierung  $[L]$  ist durch die Restfluoreszenz gegeben; ebenso ist die Konzentration des Liganden  $L_0$  durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität vor Beginn der Äquilibrierung bekannt. Die Konzentration des Rezeptor-Ligand Komplexes  $[RL]$  ist ebenfalls bekannt, sie stellt die Differenz der Fluoreszenzintensität des Liganden vom Anfang und Ende dar (3.3). Mit Hilfe der Gleichung (3.1) konnten exemplarisch für 12 Mitglieder der Bibliothek Bindungskonstanten über Fluoreszenzuntersuchungen bestimmt werden.<sup>[113]</sup> Die Auswahl dieser 12 Mitglieder der Rezeptorbibliothek fand über eine optische Selektion nach Inkubierung der gesamten Bibliothek in *MikroKans* mit einer 16  $\mu\text{M}$  Lösung des Tetrapeptids in Methanol statt. Anschließend wurden aus jedem *MikroKan* einige Harzkügelchen entnommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten wurden die sechs besten und die sechs schlechtesten Rezeptoren ausgesucht und für diese die Bindungskonstanten bestimmt.

Die so erhaltenen Bindungskonstanten (Tabelle 3.1) zeigen, dass die Bindung zu dem dansylierten Tetrapeptid **43** selbst in einem so polaren Lösemittel wie Methanol sehr stark ist. Zudem handelt es sich um einen kompetitiven Bindungsvorgang gegenüber Formiat als Gegenion für die Guanidiniocarbonylrezeptoren. Die beiden besten Rezeptoren **46** und **47** binden das Tetrapeptid mit einer Bindungskonstante von nahezu  $10000 \text{ M}^{-1}$ . Die absoluten Bindungskonstanten für die Rezeptoren sollten noch deutlich höher liegen. Darüber hinaus zeigt sich, dass kleine Veränderungen in der Rezeptorstruktur sehr starke Änderungen in den Bindungseigenschaften hervorrufen. Innerhalb der zwölf bestimmten Bindungskonstanten variieren die Bindungskonstanten um den Faktor 100.

Tabelle 3.1: Relative Bindungskonstanten (in  $\text{M}^{-1}$ ) des „on bead“ Bindungsassays für die Komplexierung der Mitglieder der Rezeptorbibliothek gegen das dansylierte Tetrapeptid **43** in einem kompetitiven Bindungsassay gegen Formiat.



<b>46</b>	CBS	Val	Val	Phe	$9800 \text{ M}^{-1}$
<b>47</b>	CBS	Val	Val	Val	$9300 \text{ M}^{-1}$
<b>48</b>	CBS	Lys(Boc)	Val	Phe	$4600 \text{ M}^{-1}$
<b>49</b>	CBS	Lys(Boc)	Val	Val	$4500 \text{ M}^{-1}$



<b>50</b>	CBS	Phe	Val	Val	3700 M <sup>-1</sup>
<b>51</b>	CBS	Val	Leu	Lys(Boc)	1800 M <sup>-1</sup>
<b>52</b>	CBS	Phe	Val	Lys(Boc)	370 M <sup>-1</sup>
<b>53</b>	CBS	Lys(Boc)	Glu(OBzl)	Val	340 M <sup>-1</sup>
<b>54</b>	CBS	Val	Glu(OBzl)	Phe	250 M <sup>-1</sup>
<b>55</b>	CBS	Lys(Boc)	Glu(OBzl)	Lys(Boc)	130 M <sup>-1</sup>
<b>101</b>	CBS	Phe	Glu(OBzl)	Phe	120 M <sup>-1</sup>
<b>102</b>	CBS	Phe	Glu(OBzl)	Val	80 M <sup>-1</sup>

Wenn man die relativen Bindungsdaten für die Rezeptoren vergleicht, ist es möglich, einige strukturelle Besonderheiten, die eine effektive Komplexierung des Tetrapeptids **43** ermöglichen, zu beschreiben. Zunächst einmal ist auffällig, dass ein Austausch von Phenylalanin gegen Valin an Position AA<sup>3</sup> (**46**, verglichen mit **47**; oder **48** mit **49** sowie **101** und **102**) keinen Einfluss auf die Bindungsaktivität hat. Findet der Austausch von Valin gegen Phenylalanin jedoch an Position AA<sup>1</sup> statt (**46** verglichen mit **50**, oder **54** mit **102**) fällt die Bindungskonstante auf etwa die Hälfte. Dies zeigt, dass die Position AA<sup>1</sup> einen größeren Effekt auf die Gesamtbindungsstärke hat als AA<sup>3</sup>. Findet ein Austausch von Valin gegen Lys(Boc) an Position AA<sup>1</sup> statt (**46** verglichen mit **48** und **47** verglichen mit **49**) fällt die Bindungskonstante um etwa die Hälfte, genau wie beim Austausch Phenylalanin und Valin. Es kann deshalb darauf geschlossen werden, dass die Valin Wechselwirkung mit dem dazu komplementären Isoleucin besonders günstig ist. Findet der Austausch von Valin gegen Lys(Boc) jedoch an Position AA<sup>3</sup> statt, sinkt die Bindungskonstante dramatisch auf etwa ein Zehntel (**50** gegen **52**). Befindet sich in der AA<sup>2</sup> Position Glutaminsäure geschützt als Benzylester, führt dies zu einem nahezu vollständigen Verlust an Bindungsaktivität. Die Ursachen, die zu diesem dramatischen Abfall an Bindungsaktivität führen, sind noch nicht klar, jedoch kann man annehmen, dass der Benzylester ausreichend flexibel ist, um intramolekular über eine Kationen- $\pi$  Wechselwirkung eine Schleife zu bilden, der für den Liganden über eine  $\beta$ -Faltblatt Stabilisierung nicht mehr zugänglich ist.<sup>[114]</sup> Unterstützt wird dies durch Kraftfeldrechnungen, die eine Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung zwischen dem Benzylester der Glutaminsäure und positiven Guanidinium vorschlagen. Zusätzlich zu dieser Wechselwirkung trägt eine  $\pi$ - $\pi$ -Stapelung zwischen dem Pyrrol und dem Phenylrest des Phenylalanins einen Teil zur Stabilität dieser Struktur bei. Offensichtlich ist das Molekül ausreichend flexibel und die Wechselwirkung stark genug, um zumindest in polaren Lösemitteln die Carboxylat-Bindungsstelle durch einen Benzylester zu besetzen, so dass keine Bindungstasche für ein Carboxylat mehr vorhanden ist.

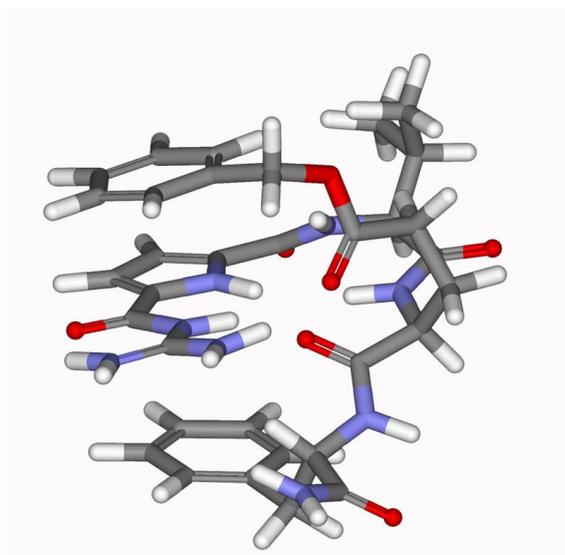


Abbildung 3.12: Molekulardynamische Rechnung von CBS-Val-Glu(OBzl)-Phe-NH<sub>2</sub> **54**, gut zu erkennen ist die Kationen- $\pi$  Wechselwirkung zwischen dem Phenylring der Schutzgruppe und dem positiven Guanidinium-Kation und einer zusätzlichen  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkung zwischen einem Phenylalanin und dem Pyrrol.

Es konnte schon gezeigt werden, dass Guanidiniocarbonylpyrrole in Methanol über Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen sehr stabile Komplexe mit elektronenarmen Aromaten wie Pikrinsäure bilden können.<sup>[115]</sup> Um etwas mehr über die Struktur der intermolekularen Komplexe des Tetrapeptids **98** und einem Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptor aussagen zu können, wurden Kraftfeldrechnungen (Macromodel 8.0, Amber\*, GB/SA Wasser Kontinuum Modell) durchgeführt, die eine  $\beta$ -Faltblattstruktur mit Wasserstoffbrückenbindungen über das Amidrückgrat und zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkungen vorschlagen. Diese molekulardynamischen Rechnungen stehen in guter Übereinstimmung mit Rechnungen, die für die Stabilisierung von  $A\beta$  durch Selbsterkennung ebenfalls  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausbilden.<sup>[116, 117]</sup> Experimentelle Hinweise für das Vorliegen einer solchen Struktur lieferten NMR spektroskopische Untersuchungen. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Trivalinrezeptors **47** und des Tetrapeptids **98** wurde auf reines DMSO als Lösemittel zurückgegriffen. Trotz dieses denkbar schlechten Lösemittels für die Detektion von NOE-Signalen konnte ein schwacher Effekt zwischen den Alaninprotonen des Peptids und dem CH-Protonen des Pyrrols beobachtet werden. Weitere intermolekulare NOE Signale zwischen den Methylprotonen des Rezeptors und den Liganden konnten nicht nachgewiesen werden, da sämtliche Methylprotonen in einem sehr engen definierten Bereich des Spektrums zu finden waren und so nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Zudem wiesen die Amidprotonen des Rezeptors einen, wenn auch geringen, komplexinduzierten Shift auf, wenn man die Spektren des Rezeptors allein mit einer 1:1 Mischung aus Rezeptor und Ligand vergleicht.

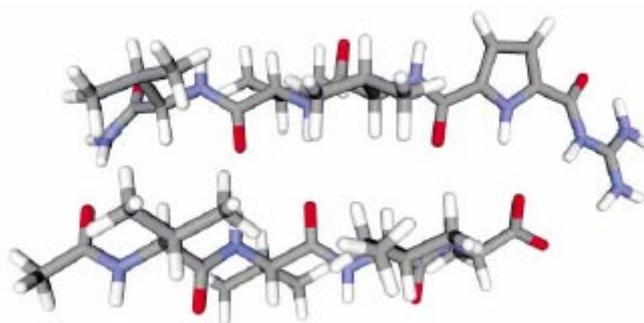


Abbildung 3.13: Vorgeschlagene Struktur für den Komplex aus dem Rezeptor **47** (oben) und dem tetrapeptidischen Liganden *Ac-L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala* **98** (unten). Er bildet eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aus Wasserstoffbrücken mit zusätzlichen stabilisierenden hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und dem Ionenpaar aus Carboxylat und dem Guanidinium Kation.

Durch das qualitative Screening in Methanol und der anschließenden Bestimmung der Bindungskonstanten auf der festen Phase konnte gezeigt werden, dass einige Mitglieder der Rezeptorbibliothek **36** in der Lage sind das Alzheimer Modell Peptid **43** in Methanol selektiv und mit hohen Assoziationskonstanten zu binden. Damit konnte bereits der Erfolg des Konzeptes gezeigt werden, selektive Rezeptoren für ein biologisch relevantes Tetrapeptid über kombinatorische Methoden zu entwickeln. Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptoren sind dazu in der Lage Tetrapeptide in polar protischen Lösemitteln selektiv und mit hohen Bindungskonstanten zu erkennen. Dabei scheint eine  $\beta$ -Faltblattkonformation für den Bindungsvorgang günstig zu sein. Erstaunlich ist die ausgeprägte Bevorzugung von Rezeptoren mit hydrophoben Seitenketten, was eine Stabilisierung über hydrophobe Wechselwirkungen stark unterstützt. Ausgehend von diesen ersten, sehr vielversprechenden Ergebnissen, soll im Folgenden ein Weg gefunden werden, Bindungskonstanten auch in wässrigen Lösemitteln zu bestimmen.

### 3.2.2 Screening in Wasser

Für die Erhöhung der Löslichkeit des Alzheimer Modellpeptids in wässrigen Lösemitteln wurde nach einem Weg gesucht, eine Triethylenglykoseitenkette an den N-Terminus des Peptides anzubringen. Dieses sollte die Löslichkeit des Peptides in Wasser so weit erhöhen, dass auf den Zusatz organischer Lösemittel bei einem Screening in Wasser vollständig verzichtet werden konnte. Als Linker bot sich Triethylenglykol **61** an, dass zu einer  $\alpha$ -Amino- $\omega$ -Carbonsäure bifunktionalisiert werden sollte, damit es optimal in der Festphasensynthese eingesetzt werden kann. Die erste Synthese zu dem gewünschten Baustein **60** ging von chloresubstituierten Triethylenglykol **56** aus, dass in Dichlormethan mit Bortrifluoretherat zum Ethylester **58** in einer guten Ausbeute von 67 % umgesetzt wurde.<sup>[118]</sup> Anschließend wurde das Chlorid mit Natriumazid in DMF in das Azid **59** überführt. Die folgende Verseifung des Ethylesters mit Lithiumhydroxid verlief quantitativ, jedoch war die Isolierung des sehr polaren Produkts aus der wässrigen nicht immer erfolgreich, so dass starke

Ausbeuteschwankungen auftraten. Die Reduktion des Azids zum Amin **60** verlief im Hochdruckautoklaven in Methanol bei einem Wasserstoffdruck von 35 bar wiederum quantitativ. Es war keine weitere Reinigung außer einer einfachen Filtration des Pd/C-Rückstands und der Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck nötig. Es lag somit eine gut einsetzbare Syntheseroute zu der wasserlöslichen Aminocarbonsäure **60** vor. Die Reinigung der Zwischenstufen erfolgte bei den hochsiedenden Ölen durch fraktionierte Kugelrohrdestillationen.

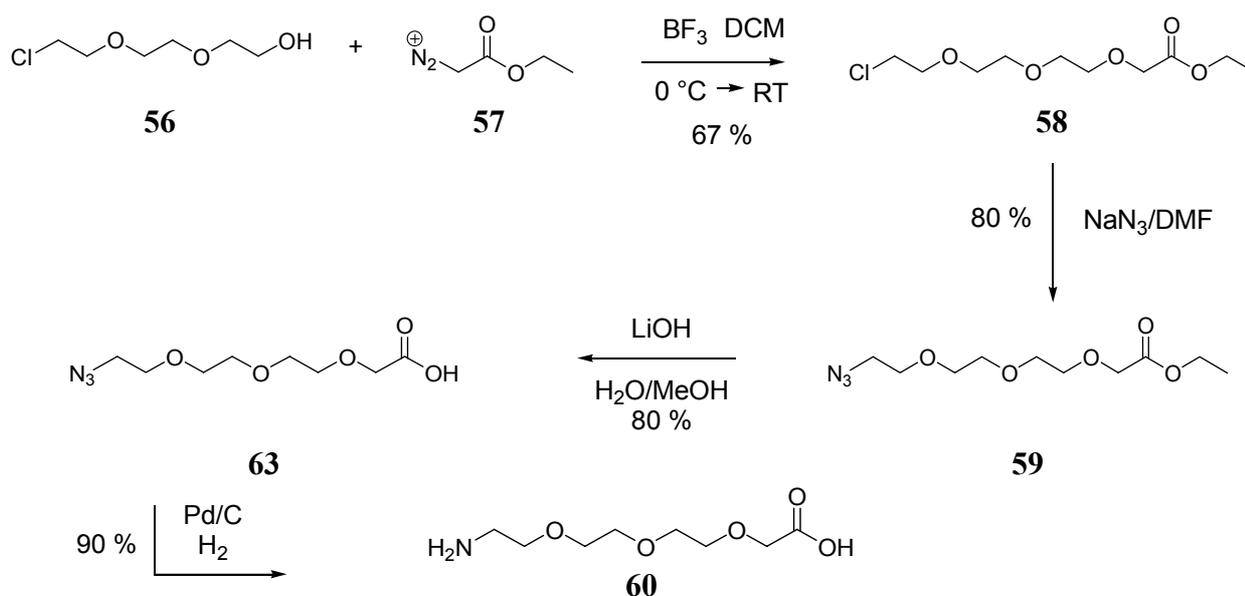


Abbildung 3.14: Syntheseroute zu dem Triethylglykollinker **60** ausgehend von chlor-substituiertem Triethylglykol **56**.<sup>[118]</sup>

Trotz der relativ einfachen Synthese zu dem Linker **60** wurde eine alternative, kürzere Route zu dem Linker **60** entwickelt, mit der man in kürzerer Zeit größere Mengen an der gewünschten  $\alpha$ -Amino- $\omega$ -carbonsäure herstellen konnte. Ausgehend von dem sehr preiswert erhältlichen Triethylglykol **61**. Technisches Triethylglykol wurde über Molsieb getrocknet und im Hochvakuum destilliert und anschließend mit Mesylchlorid in THF in das Mesylat umgewandelt. Dies wurde wiederum mit Natriumazid in siedendem Ethanol zum Azid **62** mit einer Ausbeute von 67% umgesetzt. Die Einführung der Carbonsäure durch Bromessigsäure in DMF mit Kaliumhydroxid gelang in einer Ausbeute von 40%. Eine Reinigung erfolgte bis zu der Carbonsäure auf jeder Stufe durch Kugelrohrdestillation. Die nachfolgende Reduktion mit Wasserstoff und Pd auf Kohle gelang wiederum problemlos, so dass relativ leicht größere Mengen an dem Linker **60** erhalten werden konnten.<sup>[119]</sup>

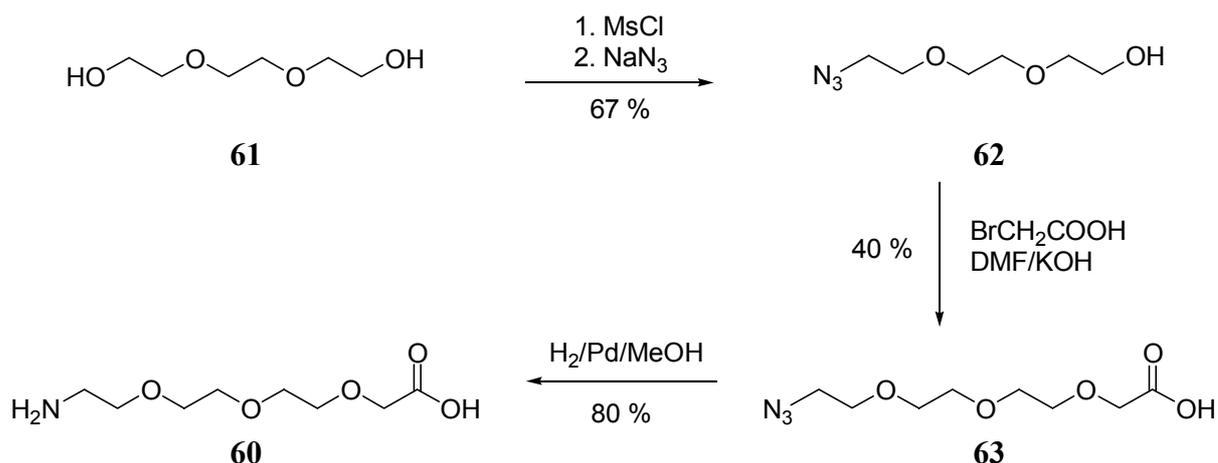


Abbildung 3.15: Syntheseroute zu dem wasserlöslichen Linker **60** nach Jeong.<sup>[119]</sup>

Es standen somit zwei Wege zur Verfügung, um die Aminocarbonsäure **60** zu erhalten. Eine Umsetzung mit Dansylchlorid sollte nun leicht das polare Analogon zu dem aliphatischen Linker **39** liefern. Die Einführung der Dansylgruppe gestaltete sich jedoch deutlich schwieriger als zunächst anzunehmen war. In einem ersten Versuch, bei dem vergleichbare Reaktionsbedingungen wie bei dem aliphatischen Linker verwendet wurden, (Zweiphasenreaktion, Dichlormethan/Wasser Natriumhydroxid als Base) ließen sich geringe Mengen des gewünschten Produktes erhalten (Ausbeuten  $\leq 10\%$ ). Dieser Reaktionsverlauf war leider nicht mehr reproduzierbar, oder führte nicht zu einer einheitlichen Produktbildung. Weitere Versuche, z. B. die Umsetzung der Carbonsäure mit Dansylchlorid in Dichlormethan oder THF mit einem tertiären Amin als Base, führten ebenfalls zu Produktgemischen. Eine säulenchromatographische Reinigung, sowohl auf Kieselgel als auch auf einer Umkehrphase führte zu einer Zersetzung des Produkts.

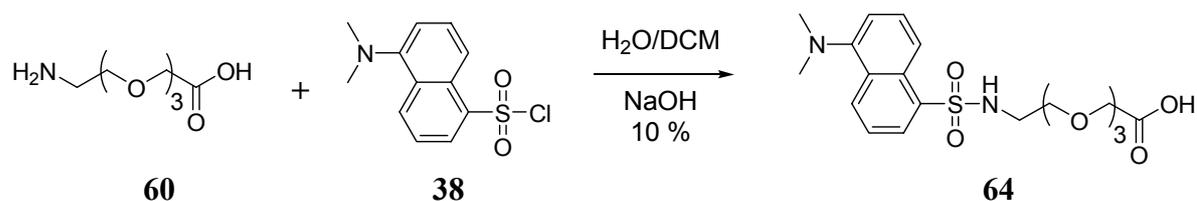


Abbildung 3.16: Synthese des dansylierten, wasserlöslichen Linkers **64**.

Da sich die die Synthese des fluoreszenzmarkierten dansylierten wasserlöslichen Linkers **64** nicht analog zu der Synthese des alkylierten Linkers **39** durchführen ließ, wurde nach einem alternativen Weg für die Einführung eines polaren Spacers gesucht. Ein Ausweg bot die Festphasensynthese, bei der sowohl das Peptid als auch der Abstandhalter sukzessive am Harz aufgebaut werden und anschließend sauer von der festen Phase abgespalten wurden. Die Synthese ging von Wang Harz (**40**) aus, an dem zunächst das gewünschte Peptid nach einem Standardprotokoll, ausgehend vom C-Terminus synthetisiert wurde. Anschließend wurde die

freie Aminofunktion mit Bernsteinsäureanhydrid **192** umgesetzt, so dass man eine freie Carbonsäure erhält. Diese Carbonsäure wurde mit einem großen Überschuss an dem Diamin **193** mit PyBOP als Kupplungsreagenz umgesetzt, wobei das Diamin sowohl als Base zur Deprotonierung der Carbonsäure als auch als Reagenz diente. An die freie Aminofunktion wurde – analog zu der Umsetzung einesamins mit Dansylchlorid in Lösung – das Fluoreszenzlabel **38** in Dichlormethan mit Triethylamin als Base in 20 Stunden an die feste Phase gebracht. Nach ausgiebigen Waschvorgängen konnte das fluoreszenzmarkierte Tetrapeptid **65** durch Abspaltung mit einer 1:1 Mischung aus Dichlormethan und Trifluoressigsäure in reiner Form als grünlicher Feststoff erhalten werden. Durch die Einführung eines Abstandhalters mit einer Triethylenglykoleinheit stieg die Löslichkeit in wässrigen Lösemitteln um ein Vielfaches an, so dass es nunmehr möglich war, ein Screening in Wasser durchzuführen.

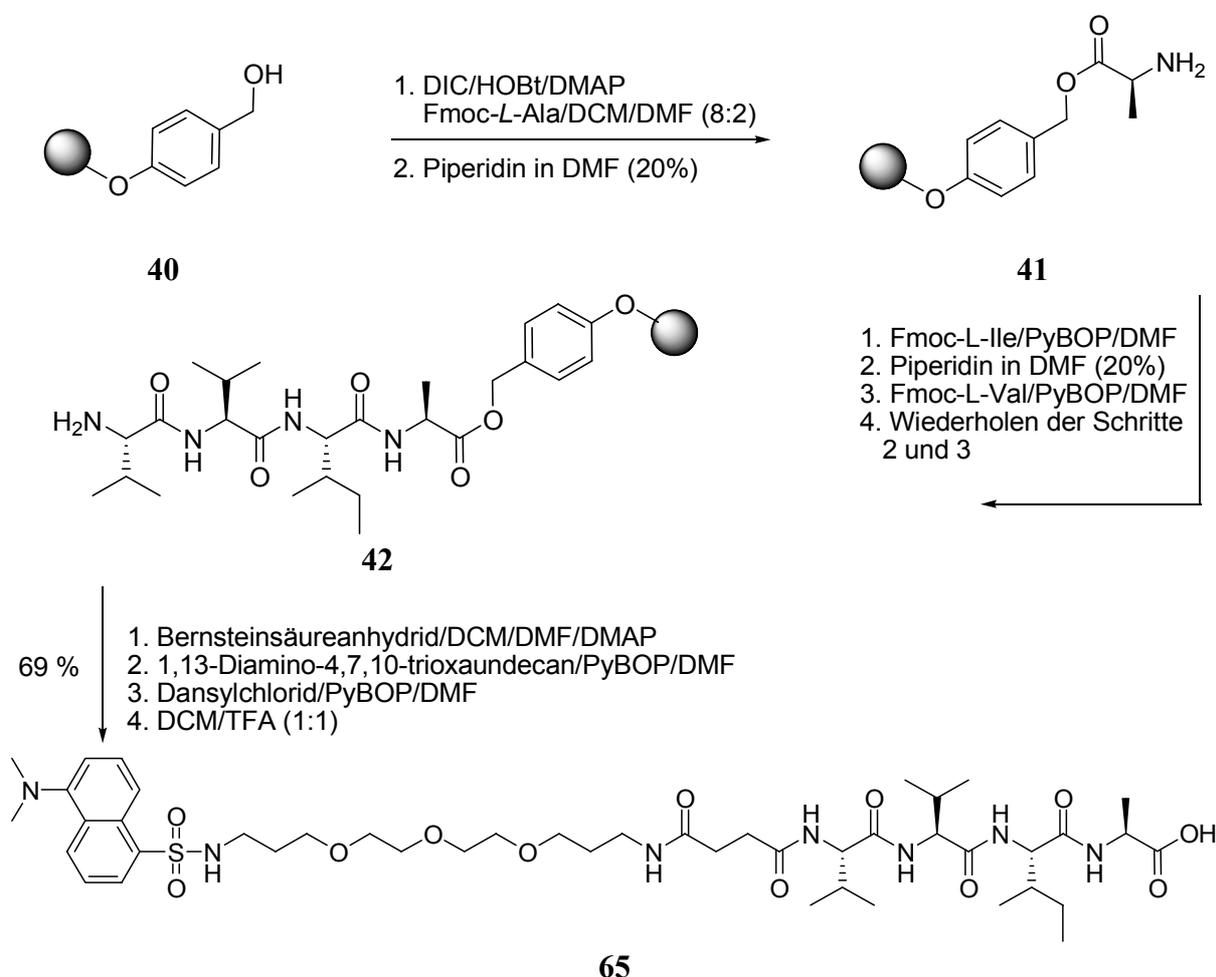
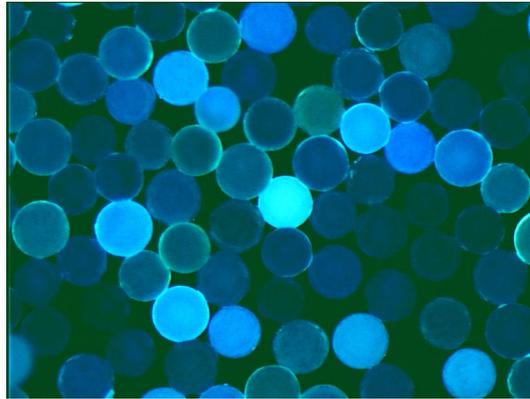


Abbildung 3.17: Synthese des wasserlöslichen Liganden **65** für das Screening gegen den C-Terminus des Alzheimer Proteins.

Durch die Synthese des besser wasserlöslichen Analogons **65** war es nunmehr möglich, die Rezeptorbibliothek ebenfalls in wässriger Lösung auf Bindungseigenschaften zu untersuchen.

Zunächst wurden, wie schon im vorangegangenen Kapitel gezeigt, Voruntersuchungen über Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass schon bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  des Fluoreszenzlabels **65** in einem BisTris Puffer bei pH 6 große Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz und damit auch in der Selektivität der Bibliothek vorhanden waren, so dass ein Screening viel Erfolg versprach.

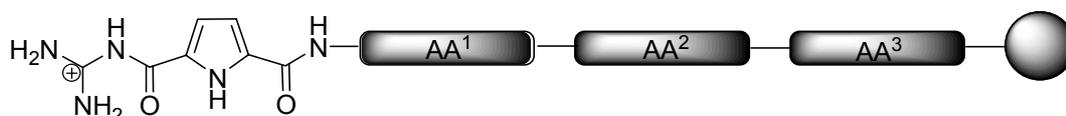


*Abbildung 3.18: „on bead“ Bindungsassay in Wasser (100  $\mu\text{M}$  BisTris Puffer, pH 6). Die starke Fluoreszenzaktivität einiger Harzkügelchen zeigt eine selektive Bindung des Liganden **65** bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zu einigen der Guanidiniocarbonylpyrrolen der Rezeptorbibliothek **36** an.*

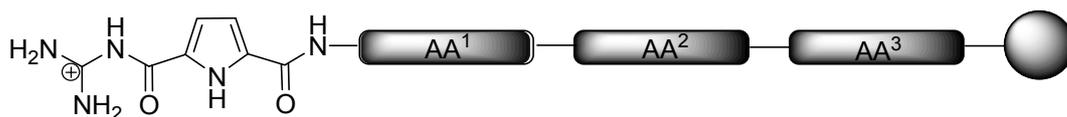
Für das Screening in Wasser wurden nicht, wie beim vorangegangenen Screening in Methanol, nur einige Sequenzen ausgewählt, sondern in diesem Fall wurden alle 512 Mitglieder der Rezeptorbibliothek auf Bindungseigenschaften überprüft, um bessere Aussagen über die Güte der Bibliothek zu treffen. Die Vorgehensweise ist identisch zu dem zuvor beschriebenen Screening. Es wurde eine 5  $\mu\text{M}$  Lösung aus dem dansylierten Tetrapeptid **65** in einem BisTris Puffer (100  $\mu\text{M}$  und 1.5 mmol NaCl) bei pH 6.1 erstellt und mit den einzelnen Mitgliedern der Rezeptorbibliothek für 20 Stunden inkubiert. Durch eine Vergleichsmessung der Fluoreszenzintensität vor und nach der Inkubierung und einer zuvor erstellten Kalibrationskurve konnten so Bindungskonstanten für jedes einzelne Mitglied der Rezeptorbibliothek bestimmt werden. Anhand der Tabelle 3.2 kann man erkennen, dass die Bindungskonstanten von etwa 20  $\text{M}^{-1}$  für die schlechtesten Rezeptoren bis zu etwa 4000  $\text{M}^{-1}$  für die besten Rezeptoren variieren. Es wurden nur eine Auswahl an gut und schlecht bindenden Rezeptoren dargestellt. Eine Ausnahme bildet die Rezeptorsequenz **66**, die als einziges Mitglied der Bibliothek ohne Schutzgruppen an den Seitenketten vorlag, da sie getrennt von den anderen Mitgliedern synthetisiert wurde. Diese Sequenz weist eine erstaunlich hohe Bindungskonstante von 8800  $\text{M}^{-1}$  in Wasser auf. Die Unterschiede zwischen den besten und den schlechtesten Rezeptoren variieren um den Faktor 200! Berücksichtigt man zudem noch die hohe Konzentration an Kochsalz im Puffer, die die ionischen Wechselwirkungen negativ beeinflusst, erkennt man die Wichtigkeit von hydrophoben Wechselwirkungen bei der Erkennung des Tetrapeptids **65**. Vergleicht man die erhaltenen

Bindungsdaten mit den Assoziationskonstanten, die bei dem Assay in Methanol bestimmt wurden, fällt auf, dass die Rezeptoren mit aliphatischen Seitenketten wie **47** nicht mehr zu den besten Rezeptoren gehören, sie liegen bei der Bestimmung von Bindungskonstanten in Wasser im mittleren Bereich ( $1340 \text{ M}^{-1}$  im Vergleich zu  $9300 \text{ M}^{-1}$ ). Generell liegen die Bindungskonstanten deutlich geringer als bei der Bestimmung der Bindungskonstanten in Methanol.

Tabelle 3.2: Bestimmung der Bindungskonstanten der 512 Mitglieder umfassenden Rezeptorbibliothek gegen das dansylierte Tetrapeptid **65** ( $5 \mu\text{M}$  mit  $100 \mu\text{M}$  BisTris Puffer und  $1.5 \text{ mmol NaCl}$ ) bei pH 6.1, dargestellt sind ausgewählte gute und schlechte Rezeptoren..



<b>66</b>	CBS	Lys	Leu	Lys	$8800 \text{ M}^{-1}$
<b>67</b>	CBS	Lys(Boc)	Ser(OtBu)	Phe	$4190 \text{ M}^{-1}$
<b>68</b>	CBS	Tyr(OtBu)	Leu	Ser(OtBu)	$4010 \text{ M}^{-1}$
<b>69</b>	CBS	Lys(Boc)	Lys(Boc)	Glu(OBzl)	$2920 \text{ M}^{-1}$
<b>70</b>	CBS	Lys(Boc)	Phe	Val	$2880 \text{ M}^{-1}$
<b>71</b>	CBS	Lys(Boc)	Tyr(OtBu)	Tyr(OtBu)	$2610 \text{ M}^{-1}$
<b>72</b>	CBS	Lys(Boc)	Tyr(OtBu)	Val	$2560 \text{ M}^{-1}$
<b>73</b>	CBS	Lys(Boc)	Phe	Phe	$2500 \text{ M}^{-1}$
<b>74</b>	CBS	Lys(Boc)	Val	Tyr(OtBu)	$2460 \text{ M}^{-1}$
<b>75</b>	CBS	Lys(Boc)	Lys(Boc)	Phe	$2410 \text{ M}^{-1}$
<b>76</b>	CBS	Lys(Boc)	Phe	Tyr(OtBu)	$2400 \text{ M}^{-1}$
<b>77</b>	CBS	Lys(Boc)	Lys(Boc)	Val	$2230 \text{ M}^{-1}$
<b>78</b>	CBS	Lys(Boc)	Tyr(OtBu)	Leu	$2030 \text{ M}^{-1}$
<b>79</b>	CBS	Lys(Boc)	Lys(Boc)	Leu	$2010 \text{ M}^{-1}$
<b>80</b>	CBS	Tyr(OtBu)	Phe	Val	$2000 \text{ M}^{-1}$
<b>81</b>	CBS	Leu	Tyr(OtBu)	Leu	$1770 \text{ M}^{-1}$
<b>47</b>	CBS	Val	Val	Val	$1340 \text{ M}^{-1}$
<b>83</b>	CBS	Lys(Boc)	Phe	Glu(OBzl)	$640 \text{ M}^{-1}$
<b>54</b>	CBS	Phe	Glu(OBzl)	Val	$560 \text{ M}^{-1}$
<b>84</b>	CBS	Glu(OBzl)	Trp	Leu	$110 \text{ M}^{-1}$
<b>85</b>	CBS	Tyr(OtBu)	Glu(OBzl)	Phe	$100 \text{ M}^{-1}$



<b>86</b>	CBS	Val	Trp	Glu(OBzl)	100 M <sup>-1</sup>
<b>87</b>	CBS	Ser(OtBu)	Glu(OBzl)	Ser(OtBu)	100 M <sup>-1</sup>
<b>88</b>	CBS	Val	Ser(OtBu)	Glu(OBzl)	100 M <sup>-1</sup>
<b>89</b>	CBS	Ser(OtBu)	Glu(OBzl)	Glu(OBzl)	90 M <sup>-1</sup>
<b>90</b>	CBS	Ser(OtBu)	Glu(OBzl)	Leu	90 M <sup>-1</sup>
<b>91</b>	CBS	Glu(OBzl)	Trp	Glu(OBzl)	90 M <sup>-1</sup>
<b>92</b>	CBS	Tyr(OtBu)	Trp	Glu(OBzl)	80 M <sup>-1</sup>
<b>93</b>	CBS	Tyr(OtBu)	Tyr(OtBu)	Glu(OBzl)	80 M <sup>-1</sup>
<b>94</b>	CBS	Glu(OBzl)	Trp	Lys(Boc)	70 M <sup>-1</sup>
<b>95</b>	CBS	Ser(OtBu)	Trp	Glu(OBzl)	30 M <sup>-1</sup>
<b>96</b>	CBS	Ser(OtBu)	Glu(OBzl)	Lys(Boc)	20 M <sup>-1</sup>
<b>97</b>	CBS	Ser(OtBu)	Glu(OBzl)	Trp	20 M <sup>-1</sup>

Vergleicht man die Bindungskonstanten innerhalb der Tabelle, so fällt auf, dass 13 von 15 Rezeptorsequenzen, die in diesem Assay gut binden, eine Lys(Boc) Seitenkette an Position AA<sup>1</sup> benachbart zum Guanidiniocarbonylpyrrol besitzen. Die Rezeptoren **69**, **75** und **77** unterscheiden sich, wie auch **70**, **73** und **76** nur in der Position AA<sup>3</sup> voneinander, die Bindungskonstante bleibt aber in etwa gleich. Diese sechs Rezeptoren gehören alle zu den gut bindenden Sequenzen in diesem Assay. In Position AA<sup>3</sup> sitzt in allen Fällen eine hydrophobe Aminosäure (Leucin, Phenylalanin oder Valin) wird diese jedoch gegen eine Glutaminsäure ausgetauscht, fällt die Bindungskonstante auf 640 M<sup>-1</sup>. Dies zeigt die Wichtigkeit von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem ersten Valin (Val<sup>39</sup>) und der hydrophoben Seitenkette des Rezeptors. Dies ist auch in guter Übereinstimmung mit Modellstudien an biologischen Systemen, bei der die Wechselwirkungen zwischen Val<sup>39</sup> und der korrespondierenden Aminosäure die Aggregation von A $\beta$  begünstigen.<sup>[120]</sup> Die ausgeprägte Bevorzugung von großen, flexiblen Seitenketten für eine starke Wechselwirkung, wie sie ein Lysin mit einer *tert*-Butylcarbamatschutzgruppe darstellt, deutet auf die Ausbildung einer hydrophoben Mikroumgebung hin. Möglicherweise wird das Lösemittel aus der Bindungstasche gedrängt und somit das Ionenpaar, das über das Guanidiniocarbonylpyrrol-Kation und das Carboxylat gebildet wird, stabilisiert. Eine Stabilisierung des Ionenpaares über eine zusätzliche Salzbrücke kann auch die überraschend hohe Bindungskonstante des trikationischen Rezeptors **66** erklären, der in diesem Assay die höchste Bindungskonstante aufweist.

Ein Kennzeichen aller schlechten Rezeptoren ist das Vorhandensein mindestens einer Glu(OBzl) Seitenkette. Unabhängig von der Position an der sie sitzt, führt es zu einem nahezu vollständigen Verlust an Bindungsaktivität. Die einzige Ausnahme bildet der Rezeptor **69**, der an AA<sup>1</sup> und AA<sup>2</sup> jeweils ein Lys(Boc) und an AA<sup>3</sup> ein Glu(OBzl) enthält. Der Verlust an Bindungsaktivität bei Vorhandensein eines Glu(OBzl) Restes lässt darauf schließen, dass die benzylische Schutzgruppe eine Assoziation mit dem Tetrapeptid nicht mehr zulässt. Die gleiche Beobachtung konnte auch schon bei der Bestimmung der Bindungskonstanten in Methanol gemacht werden. Als Konsequenz ergibt sich daraus, dass die Bindungsenergie hauptsächlich von der ionischen Wechselwirkung zwischen Carboxylat und Guanidiniocarbonylpyrrol stammt. Steht die Carboxylat-Bindungsstelle nicht mehr für ein Ionenpaar zur Verfügung (siehe Abbildung 3.12) sinkt die Bindungskonstante dramatisch.

Um einen besseren Einblick und eine Vorstellung vom Bindungsmodus zu bekommen, wurden erneut molekulardynamische Rechnungen herangezogen (Macromodel V 8.0, Amber\* Kraftfeld, GB/SA Wasser Kontinuum Modell, 100 ps Simulation, 1.5 fs Intervall bei 300 K). Anhand der berechneten Komplexstruktur aus dem Tetrapeptid **98** und dem Rezeptor CBS-L-Lys(Boc)-L-Ser(O*t*Bu)-L-Phe-NH<sub>2</sub> **99** (bzw. **67**) erkennt man, dass ein  $\beta$ -Faltblatt ausgebildet wird, das durch die Ionenpaarwechselwirkung aus Guanidinium-Kation und Carboxylat Anion und Wasserstoffbrückenbindungen über das Amidrückgrat stabilisiert wird. Darüber hinaus wird der Komplex durch zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen der Boc-Schutzgruppe des Lysins an Position AA<sup>1</sup> stabilisiert, die perfekt in die Lücke passt, die zwischen dem Valin<sup>39</sup> und dem Isoleucin<sup>41</sup> aufgespannt wird. Man kann den Komplexierungsvorgang als eine Art Minimierung der hydrophoben Oberfläche in Wasser verstehen.

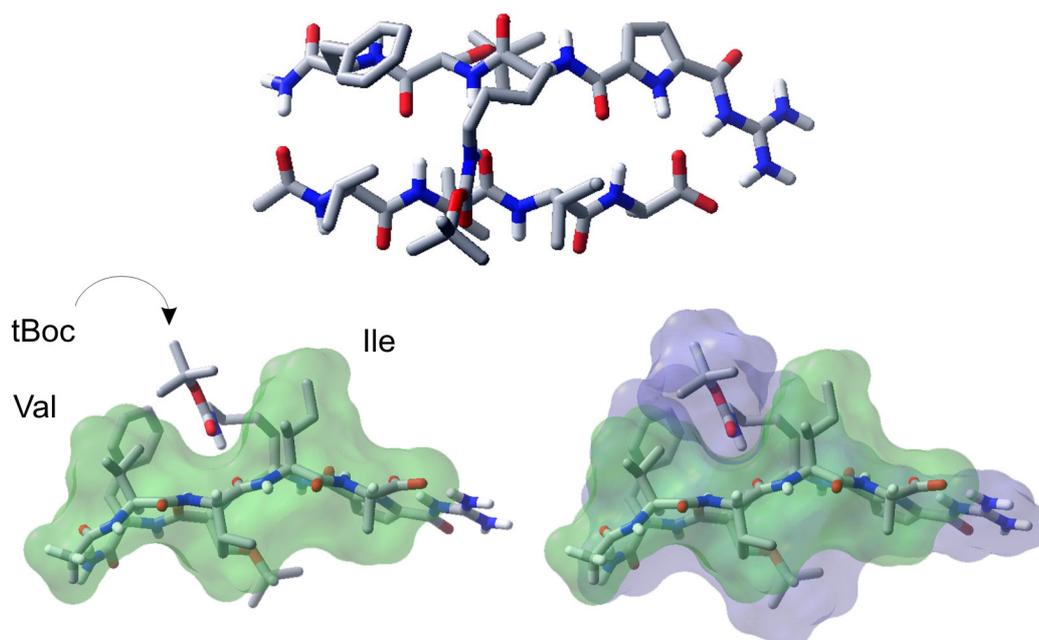


Abbildung 3.19: (oben) Gerechnete Struktur des Komplexes aus dem Tetrapeptid *Ac-L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH* **98** und dem Rezeptor *CBS-Lys(Boc)Ser(OtBu)Phe* **99**. (unten) Lösungsmittelzugängliche Fläche des Liganden (grün) und des Rezeptors (blau), die Boc-Gruppe der Lysin Seitenkette passt perfekt in die hydrophobe Lücke, die durch das erste Valin und Isoleucin aufgespannt wird.

Der erste Eintrag in der Tabelle 3.2 weist mit  $8800 \text{ M}^{-1}$  die höchste Bindungskonstante innerhalb der Bibliothek auf, ist aber auch das einzige Mitglied der Bibliothek, welches keine Schutzgruppen an den Seitenketten trägt, da es eine Sequenz darstellt, die getrennt von den anderen Rezeptoren auf einem anderen Weg synthetisiert wurde. Die Assoziationskonstante ist etwa doppelt so groß wie bei den guten Rezeptoren, die eine Schutzgruppe am Lysin tragen. Dies zeigt, dass in diesem Fall ionische Wechselwirkungen gegenüber den hydrophoben eine größere Rolle spielen. Die Komplexierung der negativen Ladung des Carboxylats über das Guanidinium-Kation und über eine zusätzliche positive Ladung an der Lysin-Seitenkette kann die größere Stabilität dieses Komplexes erklären. Molekulardynamische Rechnungen unterstützen diese Annahme durch eine pinzettenförmige Anordnung von Guanidinium- und Lysin-Kation, dass das negative Carboxylat über eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung komplexiert.

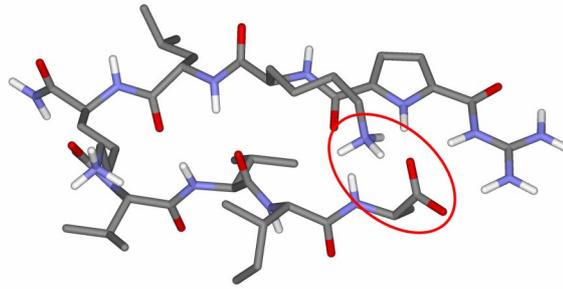


Abbildung 3.20: Berechnete Struktur des Komplexes aus dem trikationischen Rezeptor CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys **100** (oben) und Ac-L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH **98** (unten). Deutlich zu erkennen die pinzettenförmige Anordnung von Lysin und Guanidinium für das Carboxylat. Unpolare Wasserstoffatome sind der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

Durch das Fluoreszenzscreening in Methanol und in Wasser konnten einige strukturelle Eigenschaften evaluiert werden, die benötigt werden, um das Alzheimer Modell Peptid L-Val<sup>39</sup>-L-Val<sup>40</sup>-L-Ile<sup>41</sup>-L-Ala<sup>42</sup>-OH in polaren Lösemitteln selektiv zu erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb einer relativ kleinen Bibliothek mit einer hohen Diversität Selektivitätsunterschiede bis zu einem Faktor von 200 auftreten. Mit Hilfe eines Bindungsmotives für Carboxylate und einer Vielzahl an hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen ist es gelungen, selektiv Peptide zu erkennen. Durch geringfügige Änderungen des Rezeptordesigns sollte es so auch möglich sein, andere biologisch relevante Peptide in Wasser oder ähnlich polaren Lösemitteln selektiv zu erkennen. Der nächste Schritt ist die Übertragung der Ergebnisse auf die feste Phase. Durch die Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung, kann zum einen die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen fester Phase und Lösung gezeigt werden.<sup>[121]</sup> Darüber hinaus ist es aber auch möglich weitergehende Einblicke in die Struktur nichtkovalenter Komplexe zu erhalten.

### 3.2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung

Nachdem umfassende Bindungsstudien auf der festen Phase durchgeführt wurden, stellte sich die Frage, ob die Ergebnisse auch auf Bindungskonstanten in Lösung übertragbar sind. Zur Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung benötigte man sowohl Rezeptoren als auch Liganden, die synthetisch möglichst einfach zugänglich sind und möglichst in reinem Wasser löslich sind, so dass die Ergebnisse zu dem Festphasenassay vergleichbar sind. Ein ideales Werkzeug, um Peptide oder Peptoide (wie die hier dargestellten Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptoren) zu synthetisieren, bietet die Festphasensynthese.<sup>[92]</sup> Für die Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung steht eine ganze Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung, angefangen von der klassischen NMR-Titration, über UV- und Fluoreszenztitrationen, sowie durch mikrokalorimetrische und auch massenspektrometrische Verfahren.<sup>[108, 122-124]</sup>

### 3.2.4 Synthese der Rezeptoren

Für die Synthese von Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptoren auf der festen Phase wurde bisher das Zwitterion **12** verwendet, das jedoch in nahezu allen Lösemitteln kaum löslich ist, so dass Reaktionen mit diesem Zwitterion sehr lange Reaktionszeiten und hohe Überschüsse an Reaktand erforderten. In unserem Arbeitskreis wurde eine Synthese entwickelt, die zu einem besser löslichen und reaktiveren Analogon des Zwitterions führt. Die Reaktionszeiten bei der Einführung der Carboxylat-Bindungsstelle konnten deutlich reduziert werden. Ein Schlüsselschritt stellt dabei die Einführung eines geschützten Guanidinium-Bausteins dar, der die Löslichkeit der Carboxylat-Bindungsstelle deutlich erhöht. Die Synthese geht von Guanidiniumhydrochlorid aus, das mit Di-*tert*-butyldicarbonat **101** in sehr guten Ausbeuten von 93 % in das entsprechende einfach geschützte Guanidiniumderivat **102** umgewandelt werden konnte.<sup>[125]</sup>

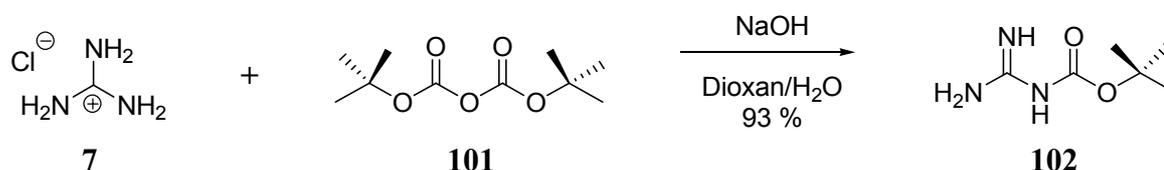


Abbildung 3.21: Synthese des besser löslichen und reaktiveren Guanidinium-Bausteins **102**.

Die Umesterung in den Benzylester **104** erfolgte durch Erhitzen des Methylester **103**<sup>[38]</sup> in Benzylalkohol mit katalytischen Mengen Natriumbenzylat in einer Ausbeute von 85 %. Die freie Carbonsäure des Pyrrols **104** wurde mit HCTU in einer Mischung aus Dichlormethan und DMF, das 5 % NMM enthielt, mit Boc-Guanidin **102** gekuppelt. Eine säulenchromatographische Reinigung führte zu dem orthogonal geschützten Pyrrolbaustein **105** in einer Ausbeute von 83 %. Die Spaltung des Benzylesters mit Wasserstoff unter

Palladiumkatalyse in Methanol oder THF lieferte den gewünschten Baustein **106** in einer Ausbeute von 90 %, der sehr gut in der Festphasensynthese eingesetzt werden konnte. Eine Umesterung des Methylesters **103** in den Benzylester **104** war erforderlich, da sich herausstellte, dass unter stark basischen Bedingungen, die für die Entschützung des Methylesters notwendig waren, das *t*-Butyloxyguanidin eine relativ gute Abgangsgruppe darstellte, so dass die Entschützung zu einem großen Teil die 1*H*-Pyrrol-2,5-dicarbonsäure lieferte. Darüber hinaus war die Extraktion der geschützten Carboxylat-Bindungsstelle **106** aus der wässrigen Phase außerordentlich schwierig, so dass die Ausbeuten bei diesem letzten Schritt sehr gering waren.

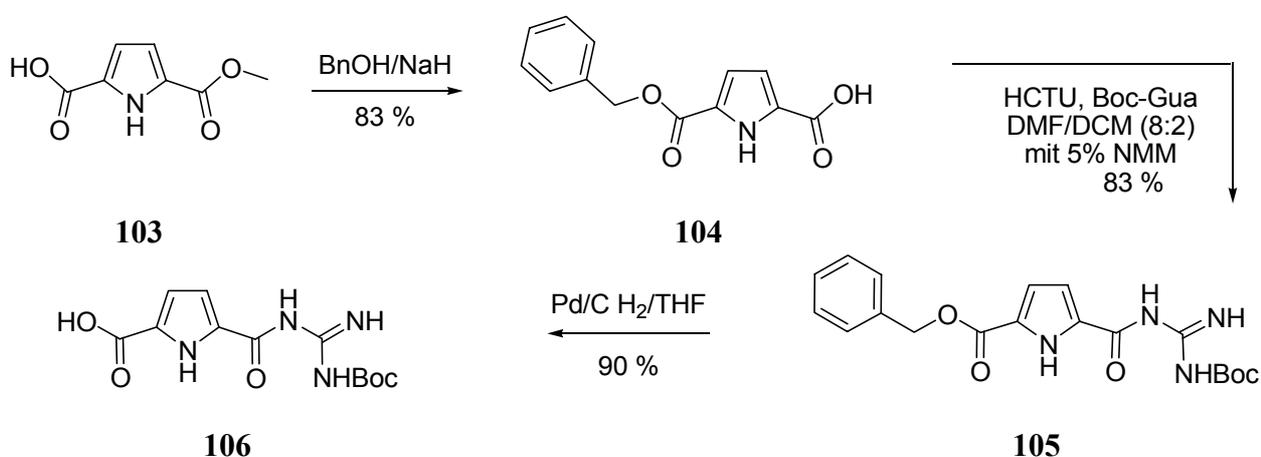


Abbildung 3.22: Dreistufige Synthese des in organischen Lösemitteln gut löslichen Guanidiniocarbonylpyrrol-Bausteins **106**, der in einer Gesamtausbeute von etwa 62 % erhalten werden kann.

Die ersten Rezeptorsynthesen erfolgten an dem schon zuvor für die Synthese der Liganden verwendeten Wang Harz. Es konnten so einige Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren erhalten werden, die eine C-terminale Carbonsäure besaßen. Unter anderem wurde so der Rezeptor **107** dargestellt. Die freie Säure des peptidischen Restes sollte anschließend in Lösung in ein Amid oder einen Ester umgewandelt werden. Dabei wurde zunächst versucht, die Carbonsäure mit *i*-Butylchloroformiat in einen Aktivester umzuwandeln, der dann mit Methylamin in das entsprechende Amid überführt werden sollte. Bei dieser Reaktion fand kein Umsatz statt, bzw. das entstandene Produktgemisch konnte säulenchromatographisch nicht getrennt werden. Die Säurechloridkupplung mit Thionylchlorid in Methanol schlug ebenfalls fehl. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit der freien Carbonsäure **108** und des daraus entstandenen Methylesters war eine Reinigung auf dieser Stufe nur schwer möglich. Aus diesem Grunde wurde nach einem alternativen Syntheseweg für die Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren gesucht, bei dem die Abspaltung vom Harz keine freie Carbonsäure, sondern direkt einen Ester oder ein Amid liefert.

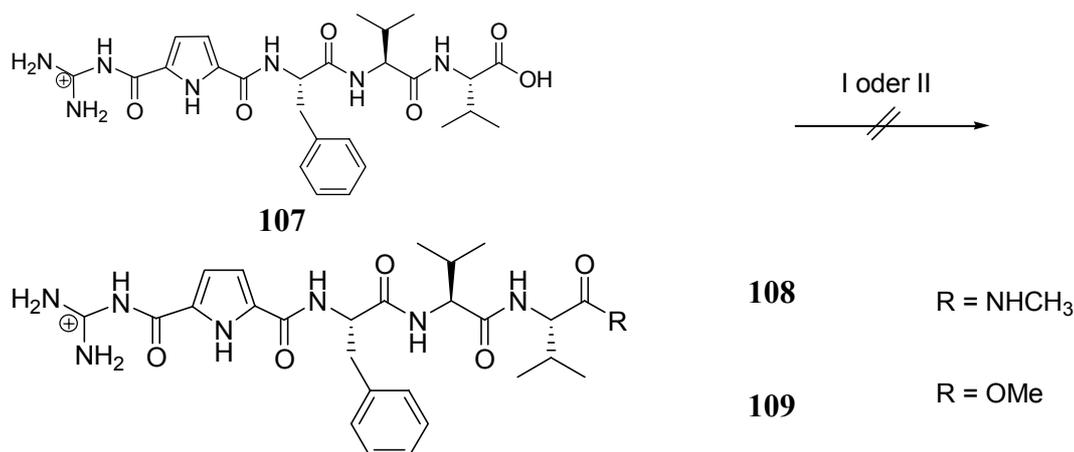


Abbildung 3.23: Versuch der Synthese der Rezeptoren **108** oder **109** aus der freien Carbonsäure **107** durch Umsetzung mit *i*-Butylchloroformiat und Methylamin (I) oder durch die Reaktion mit Thionylchlorid in Methanol (II).

Ein ideales, kommerziell erhältliches Harz stellt das Rink-Amid Harz **110** dar. Rink-Amid besitzt ein Polystyrolgerüst, das mit Dimethoxydiphenylmethylamin funktionalisiert wurde. Dieses Harz liefert durch saure Abspaltung mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan direkt das Säureamid und erlaubt eine klassische Fmoc-Strategie zum Aufbau der peptidischen Seitenkette. Die Synthese erfolgte vom C-Terminus zum N-Terminus, so dass als letzter Schritt die Einführung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Bausteins **106** erfolgte. Das Pyrrol **106** wurde mit PyBOP als Kupplungsreagenz in DMF, das 5 % NMM enthielt, für 16 Stunden geschüttelt. Bei Bedarf (positiver Kaiser-Test) wurde der Kupplungsschritt wiederholt. Auf diese Weise konnten die Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren der generellen Struktur **112** in guten Ausbeuten und hoher Reinheit erhalten werden.

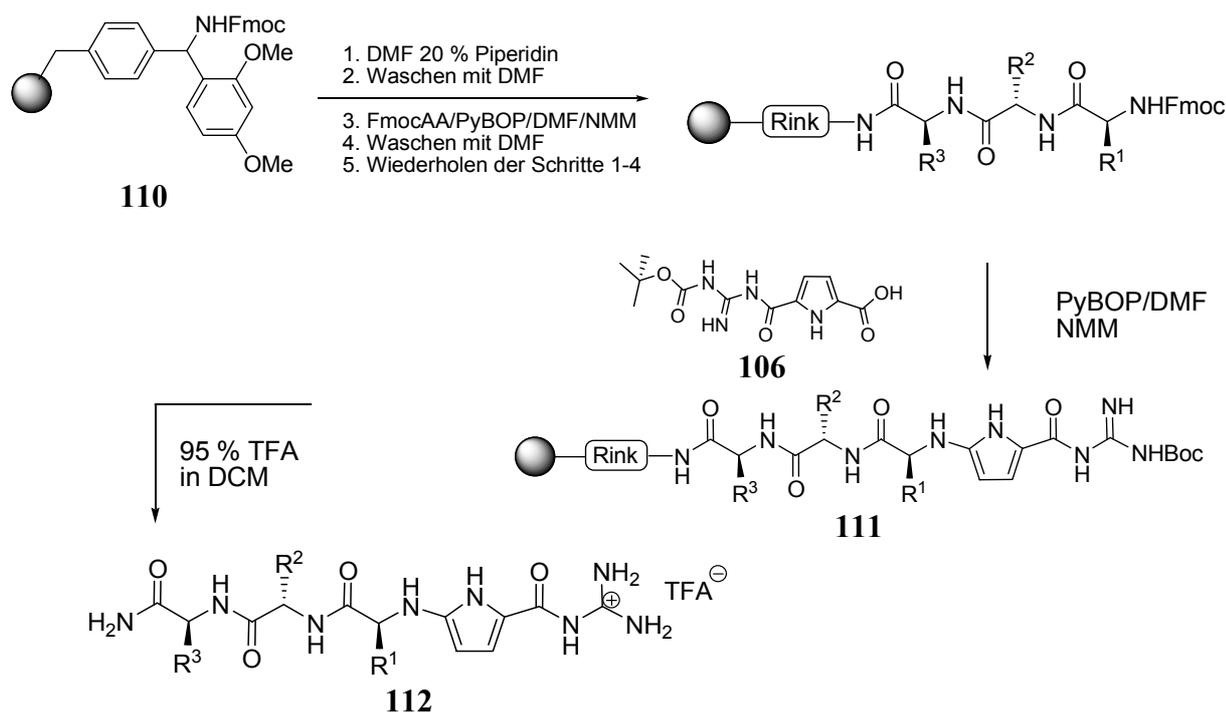
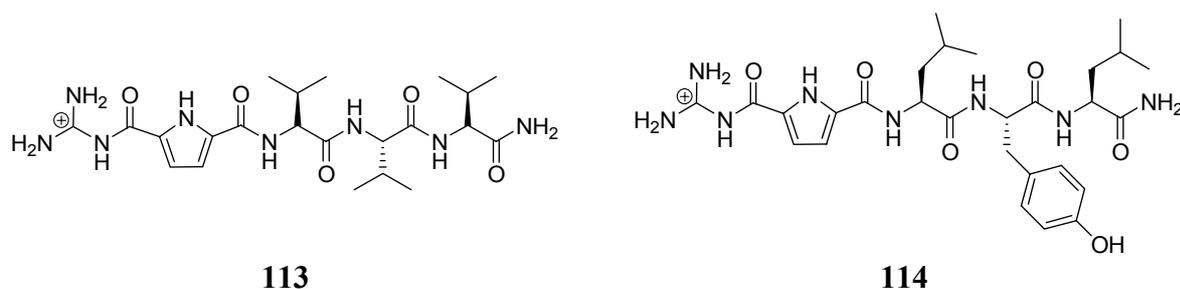
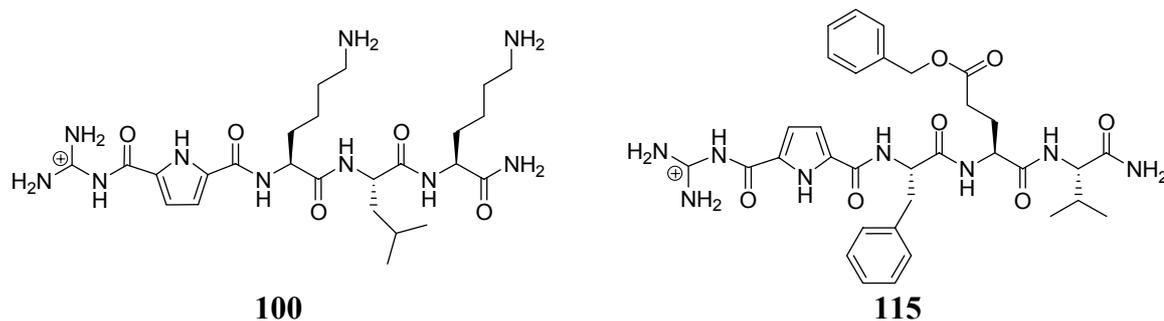


Abbildung 3.24: Syntheschema der Rezeptoren an Rink-Amid Harz, Peptidsynthese erfolgte nach Standardprotokoll, die Anbindung der CBS nach einem etwas modifiziertem Standardprotokoll, die Abspaltung vom Harz erfolgte mit 95 % TFA in Dichlormethan.

Nach diesem Protokoll wurden vier verschiedene Rezeptoren für die Bestimmung von Bindungskonstante des Alzheimer Modellpeptids in Lösung synthetisiert. Die erste Rezeptorsequenz war der Trivalinrezeptor **113**, die bei der Bestimmung der Bindungskonstanten in Methanol die höchste Assoziationskonstante aufwies ( $9300 \text{ M}^{-1}$  in Methanol,  $1340 \text{ M}$  in Wasser). Weiterhin wurde der mäßig guter Rezeptor CBS-L-Leu-L-Tyr-L-Leu-NH<sub>2</sub> **114** ( $1770 \text{ M}^{-1}$  in Wasser) in Lösung synthetisiert. Die einzige Sequenz bei dem Screening in Wasser, die keine Schutzgruppen an den Lysinseitenketten besaß CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys-NH<sub>2</sub> **100** ( $8800 \text{ M}^{-1}$  in Wasser), wurde ebenso synthetisiert wie der Rezeptor **115**, der bei beiden Assays eine sehr geringe Bindungskonstante zeigte ( $80 \text{ M}^{-1}$  in Methanol und  $560 \text{ M}^{-1}$  in Wasser).





Es zeigte sich, dass der Trivalinrezeptor **113** eine sehr geringe Löslichkeit besaß. Deshalb wurde nach einem Weg gesucht, die Löslichkeit des Rezeptors in polaren Lösemitteln deutlich zu erhöhen. Dabei waren zwei Wege denkbar. Zum einen erhöht sich die Löslichkeit von Guanidiniocarbonylpyrrolen durch Einführung von Triethylglykol-Seitenketten an den beiden freien Positionen des Pyrrols, zum anderen ist eine Einführung einer Triethylglykolkette am C-Terminus des peptidischen Rezeptors denkbar. Die erste Route wurde von *Wienand* verfolgt. Er konnte zeigen, dass das wasserlösliche Zwitterion **15** in einer siebenstufigen Synthese mit einer guten Gesamtausbeute von 10 % zugänglich war. Ausgehend vom Trimethylpyrrolester **116**, der durch Oxidation der Methylgruppe und anschließender Veresterung zu einem orthogonal geschützten Diester umgewandelt wurde, wurden die Methylgruppen mit NBS bromiert. Die Bromide wurden durch Triethylglykol substituiert, der Ethylester gespalten und die Umsetzung mit Boc-Guanidin lieferte die Vorstufe **117** des wasserlöslichen Zwitterions **15**, das durch saure Abspaltung der Schutzgruppen erhalten wurde.<sup>[88]</sup>

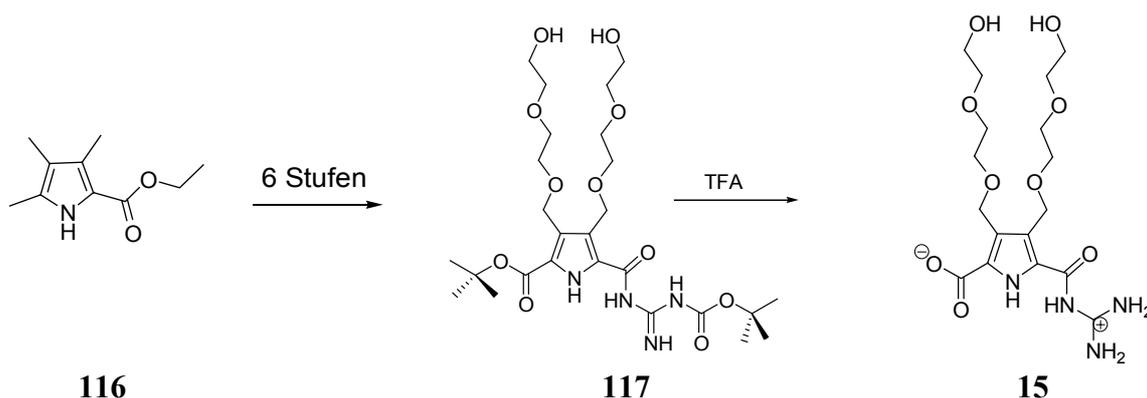


Abbildung 3.25: Synthese der wasserlöslichen Carboxylat-Bindungsstelle nach *Wienand*.

Für den optimalen Einsatz in der Festphasensynthese ist ein Baustein wünschenswert, der sowohl eine gute Reaktivität als auch eine hohe Löslichkeit in gängigen Lösemitteln aufweist. Damit erscheint eine Synthese, die als Schlüsselzwischenstufe orthogonale Schutzgruppen an Carbonsäure und Guanidinium aufweist, perfekt geeignet. Die Syntheseroute von *Wienand*

führt zu der Schlüsselzwischenstufe **117**, bei der gleichzeitig beide Schutzgruppen abgespalten werden, so dass man direkt das Zwitterion **15** erhält.

Wünschenswert ist eine Syntheseroute, die den orthogonal geschützten Pyrrolbaustein **118** liefert, den man durch Hydrogenolyse in das triethylenglykolsubstituierte Analogon von **106** überführen kann. Als Vorläufer zu dem orthogonal geschützten Guanidiniocarbonylpyrrol **118** dient ein Diester **120**, der an der 3- und 4-Position  $\alpha$ -bromiert ist. Dieser sollte über das Trimethylpyrrol **116** leicht zugänglich sein.

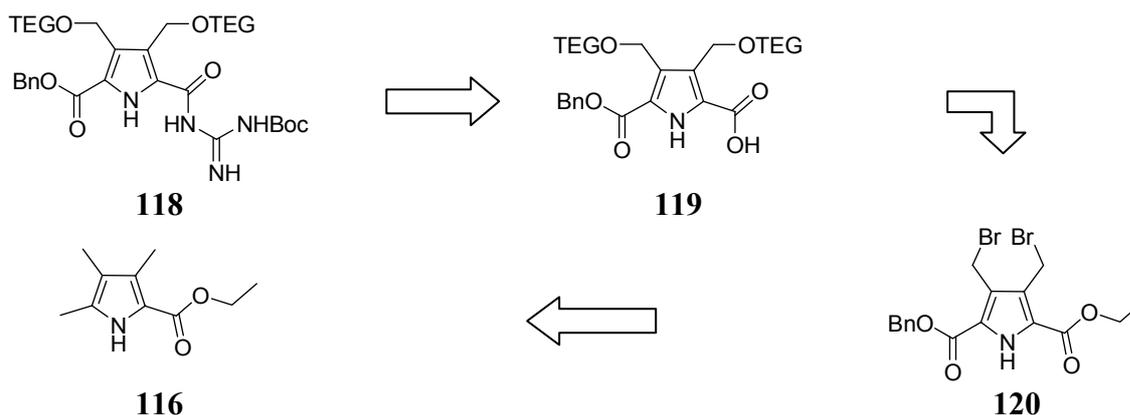


Abbildung 3.26: Retrosynthese der wasserlöslichen geschützten CBS.

Für erste Testreaktionen wurde nicht das Trimethylpyrrol **116**, sondern das diethylsubstituierte Derivat **121** verwendet, das durch eine Reaktion von Sulfurylchlorid in Eisessig leicht und in guten Ausbeuten in die entsprechende Säure **122** umgewandelt werden konnte. Die Umsetzung zu dem Benzylester **123** erfolgte mit Benzylchlorid in Dichlormethan mit einer Base in einer Ausbeute von 63 %. Die anschließende Bromierung mit NBS in Tetrachlorkohlenstoff und AIBN führte zu einer Zersetzung des Produkts, durch Säulenchromatographie konnte in keiner Fraktion das gewünschte Pyrrol nachgewiesen werden. Ein zweiter Syntheseweg, der zu dem dibromierten Benzylester **126** führen sollte, ging ebenfalls vom Ethylester **121** aus, der in Benzylalkohol mit Natriumhydrid in den entsprechenden Benzylester mit einer Ausbeute von 81 % umgewandelt werden konnte.<sup>[126]</sup> Eine anschließende Oxidation der Methylgruppe in 2-Position lieferte die Säure **125**. Die nachfolgende Bromierung in Tetrachlorkohlenstoff mit NBS und DIAD führte hauptsächlich zu einer Decarboxylierung der freien Carbonsäure. Die thermische Decarboxylierung bei mehrfach substituierten Pyrrolen kann jedoch auch präparativ genutzt werden.<sup>[127]</sup> Unter diesen Bedingungen war das Dibromid **126** bzw. **127** somit nicht zugänglich. Aufgrund dieser Schwierigkeiten schon zu Beginn der Synthesesequenz wurde nach Wegen gesucht, wie man die Wasserlöslichkeit unter geringerem synthetischen Aufwand erhöhen und gleichzeitig die Carboxylat-Bindungsstelle unverändert lassen kann, da nicht ausgeschlossen ist, dass die Triethylenglykol-Seitenketten mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol wechselwirken.

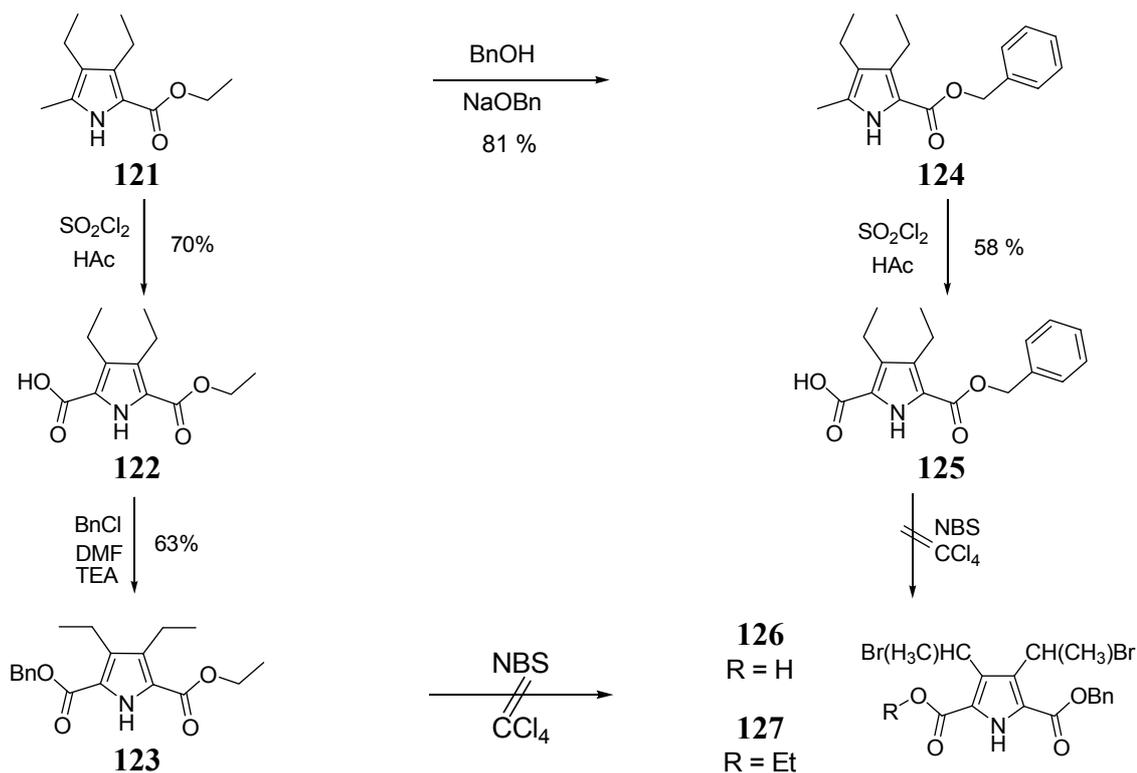


Abbildung 3.27: Versuch der Synthese zu den beiden Dibromiden **126** und **127** ausgehend von dem Pyrrol **121**.

Letztendlich wurde auf eine ähnliche Strategie wie bei den wasserlöslichen tetrapeptidischen Liganden mit Fluoreszenzlabel zurückgegriffen, die allerdings etwas modifiziert werden musste. Wie zuvor sollten die Rezeptorsynthesen an Rink-Amid Harz durchgeführt werden. Der Trivalinrezeptor **128** wurde ausgehend von Rink-Amid Harz **110**, an das zunächst in einer zweistufigen Reaktionssequenz Bernsteinsäureanhydrid und nachfolgend 1,13-Diamino-4,7,10-trioxaundecan angebracht wurde, synthetisiert. An der anschließend vorhandenen freien Aminofunktion wurde über Standardfestphasenmethoden die Tripeptidsequenz synthetisiert, bevor mit der geschützten Carboxylat-Bindungsstelle **106** der Rezeptor fertig gestellt wurde. Anschließendes Behandeln des Harzes mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan lieferte den Rezeptor **128** nach zweimaligem Lyophilisieren in einer guten Ausbeute von 79 %.

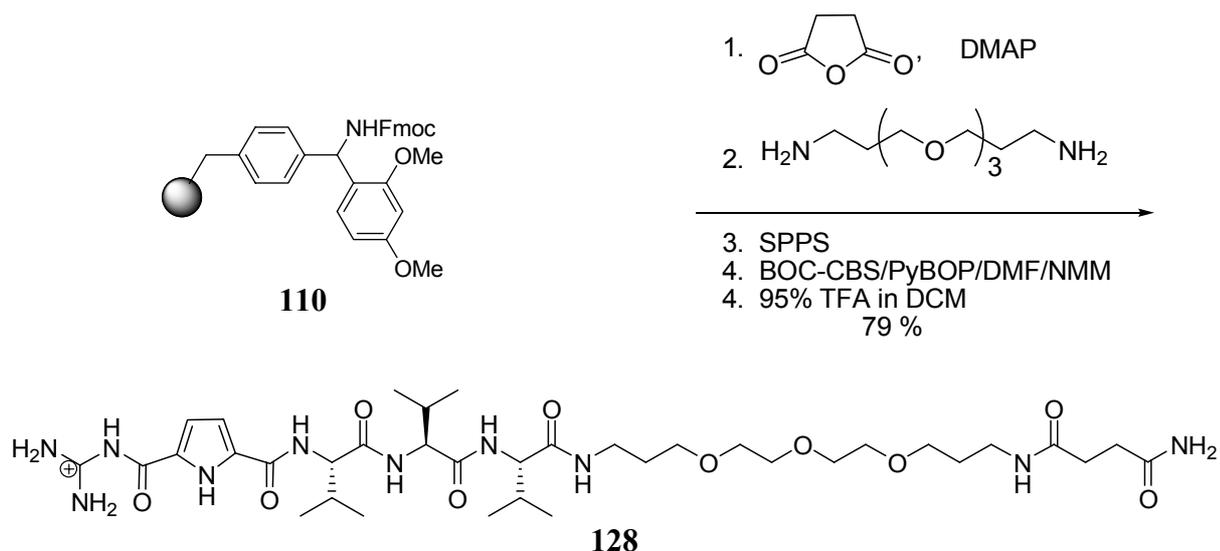


Abbildung 3.28: Synthese des triethylglykolsubstituierten Trivalinrezeptors **128**.

Für die Bestimmung der Bindungskonstanten in Lösung für das Alzheimer Modellpeptid konnten auf diese Weise fünf Rezeptoren synthetisiert werden.

### 3.2.5 Synthese der Liganden

Neben der Synthese der Rezeptoren in Lösung musste das Alzheimer Modellpeptid **98** ebenfalls dargestellt werden. Zunächst wurde das acetylierte Alzheimer-Modell-Peptid Ac-L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH **98**, ausgehend von Wang Harz **40** synthetisiert. Nach Abspalten von der festen Phase mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan wurde das Peptid **98** in einer Ausbeute von 89 % in analytisch reiner Form erhalten.

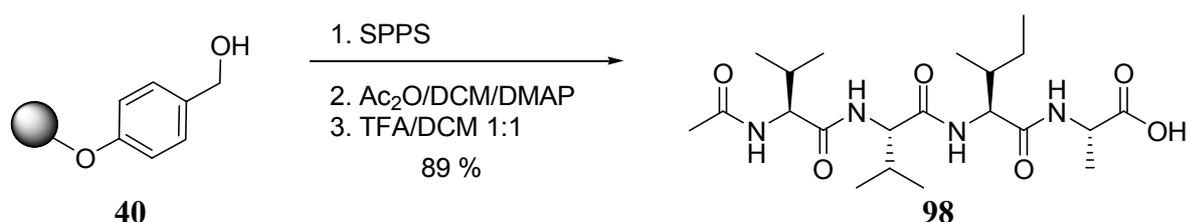


Abbildung 3.29: Synthese des acetylierten Alzheimer Modell Peptids **98**.

Aufgrund der geringen Löslichkeit des Tetrapeptids **98** in Wasser wurde die *N*-Acetylgruppe gegen ein Triethylglykol ausgetauscht, so dass sich die Löslichkeit in polaren Lösemitteln wie Wasser deutlich erhöhen sollte. Die für die Synthese benötigte Triethylglykolcarbonsäure **130** wurde durch die Reaktion von Triethylglykol mit Bromessigsäure in DMF und Kaliumhydroxid erhalten. Eine Reinigung erfolgte über eine fraktionierte Kugelrohrdestillation. Die Ausbeute war mit 15 % relativ gering und das Produkt noch mit Resten von Triethylglykol verunreinigt, was die Weiterreaktion jedoch nicht störte.



von wenigen Tagen und führt zu Ablagerungen des Peptids. Die Struktur der Ablagerungen ist jedoch unbekannt, es könnte sich jedoch in der Tat um amyloidartige Aggregate handeln.

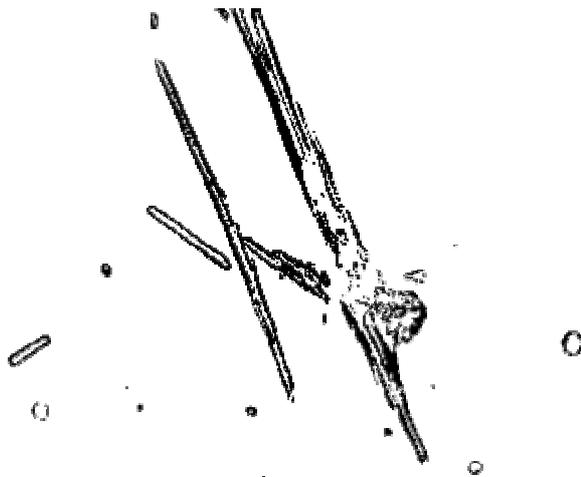


Abbildung 3.32: Peptidablagerungen einer  $5 \cdot 10^{-4}$  M Lösung des Tetrapeptids 132 in einem BisTris Puffer bei pH 6.0.

### 3.2.6 Die Methode der Wahl

Nachdem sowohl die Synthese einiger Rezeptoren als auch der Liganden erfolgreich abgeschlossen wurde, sollten Bindungskonstanten in Lösung bestimmt werden. Die Bedingungen zur Bestimmung der Bindungsaffinität in Lösung sollten möglichst identisch zu denen an der festen Phase sein, d. h. bei einem konstanten pH-Wert und in möglichst reinem Wasser ohne Zusätze von organischen Lösemitteln. Prinzipiell stehen verschiedene physikalisch-organische Methoden zur Verfügung, die wichtigsten sind die Bestimmung des Assoziationsverhaltens über optische Spektroskopie wie UV- oder Fluoreszenztitrationen sowie über IR-spektroskopische Methoden und die NMR-Spektroskopie.

Die Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten, die am weitesten verbreitet ist und neben der reinen Größe der Assoziationskonstante auch noch Informationen über die Struktur des supramolekularen Komplexes liefern kann, ist die NMR-Spektroskopie. Grundlage der Bestimmung von Bindungskonstanten über die NMR-Spektroskopie ist die veränderte chemische Umgebung einzelner Atome durch die supramolekulare Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand. Dabei kann sich die Lage eines Signals eines Protons des Rezeptors durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zum Liganden verändern. Die Differenz zwischen der Verschiebung des ungebundenen Zustands und des komplexierten Zustands wird als komplexinduzierter Shift bezeichnet. Für einfache 1:1 Komplexe sowie für Homodimerisierungen und andere stöchiometrisch eindeutige Aggregate können Gleichungen entwickelt werden, die die beobachtete Verschiebung mit der Bindungskonstante in Relation setzen. Die Bindungskonstante kann dann durch eine nichtlineare Regressionsanalyse aus den experimentellen Daten unter Berücksichtigung von Gleichung (3.4) bestimmt werden. Für eine einfache 1:1 Komplexierung ergibt sich somit ein Zusammenhang, der durch Gleichung (3.4)

beschrieben wird. Die beobachtete Verschiebung  $\delta_{\text{beo}}$  ist eine Funktion der Ausgangskonzentrationen des Rezeptors und des Liganden ( $[R_0]$  und  $[L_0]$ ), der chemischen Verschiebung des freien Rezeptors  $\delta_R$  sowie der Größe des komplexinduzierten Shifts  $\Delta\delta$  und der Dissoziationskonstante  $K_{\text{diss}}$ .

$$\delta_{\text{beo}} = \delta_R + \frac{\Delta\delta}{2 \cdot [R_0]} \cdot \left\{ K_{\text{diss}} + [R_0] + [L_0] - \sqrt{(K_{\text{diss}} + [R_0] + [L_0])^2 - 4 \cdot [R_0] \cdot [L_0]} \right\} \quad (3.4)$$

Für die Bestimmung von Bindungskonstanten über NMR-Titrationsen benötigt man Rezeptoren und Liganden, die in ausreichender Konzentration (ca. 1-100 mM) in einem geeigneten Lösemittel löslich sind, einen signifikanten komplexinduzierten Shift besitzen und deren Signallagen eindeutig zugeordnet werden können. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von Bindungskonstanten bietet die UV- und die Fluoreszenzspektroskopie. Durch eine supramolekulare Komplexierung eines Guanidiniocarbonylpyrrol Rezeptors ändert sich der elektronische Zustand des Moleküls. Ein Carboxylat, das ein Ionenpaar zu einem Guanidiniocarbonylpyrrol ausbildet, gibt Elektronendicht an das Pyrrol, dies resultiert in einer Veränderung des UV Spektrums. Durch die Assoziation ändert sich die Absorption im UV Spektrum signifikant, der supramolekulare Komplex besitzt einen anderen molaren Absorptionskoeffizienten. Dies kann dazu benutzt werden, Bindungskonstanten über UV-Titrationsen zu bestimmen. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von Bindungskonstanten bietet die Fluoreszenzspektroskopie unter Ausnutzung der Eigenfluoreszenz des Pyrrols. Guanidiniocarbonylpyrrole besitzen eine schwache, jedoch charakteristische Eigenfluoreszenz bei etwa 330 nm, die ebenfalls zur Bestimmung von Bindungskonstanten genutzt werden kann. Der Vorteil der Fluoreszenzspektroskopie liegt in der hohen Sensitivität, so dass Rezeptorkonzentrationen von weniger als 0.1 mM ausreichen, um eine Assoziationskonstante zu bestimmen. Somit ist es möglich, Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen zu untersuchen, die über NMR aus Löslichkeitsgründen nicht mehr durchgeführt werden können. Durch die hohe Empfindlichkeit der Messmethode steht mit der Fluoreszenzspektroskopie ein hilfreiches Werkzeug zur Bestimmung von Bindungskonstanten bereit. Im nachfolgenden werden die theoretischen Grundlagen und die experimentellen Bedingungen zur Bestimmung von Bindungskonstanten über die Fluoreszenz- und UV-Spektroskopie noch einmal genauer dargestellt.

Zur Bestimmung von Bindungskonstanten via UV oder Fluoreszenztitrationsen muss man die Observable Absorption bzw. Fluoreszenzemission in Zusammenhang mit der Assoziationskonstante  $K$  bringen. Die Änderung der Absorption beruht dann auf einem Bindungsmodus, wenn das Substrat und der Substrat-Ligand-Komplex signifikant unterschiedliche Absorptionseigenschaften aufweisen. Zwingend erforderlich ist dabei ein unterschiedlicher molarer Absorptionskoeffizient. Im Spektrum wird die Wellenlänge

gesucht, an der sich das Absorptionsverhalten maximal ändert, eine Auftragung der Ligandenkonzentration gegen die Änderung der Absorption bei konstanter Temperatur liefert dann die Bindungsisotherme. An diese so erhaltene Bindungsisotherme kann man über nichtlineare Regressionsmethoden eine Funktion anpassen, die als eine von mehreren Variablen die Bindungskonstante enthält. Im Folgenden soll die dafür zugrunde gelegte Formel kurz entwickelt werden. Diese Formel gilt sowohl für UV-Titrationen, bei denen eine Änderung der Absorption festgestellt wird, als auch für Fluoreszenztitrationen, die eine Änderung der Fluoreszenzintensität aufweisen. Mit folgenden Parametern kann man die Abhängigkeit der Observablen  $\Delta A$  und  $x$  mit der Bindungskonstanten  $K$  in Zusammenhang bringen.

$A$	=	Absorption
$\Delta A$	=	Änderung der Absorption
$K$	=	Assoziationskonstante
$\varepsilon$	=	molarer Absorptionskoeffizient
$\Delta\varepsilon$	=	Änderung der molaren Absorptionskoeffizienten von Substrat, Ligand und Substrat-Ligand-Komplex
$d$	=	Schichtdicke der Probe in cm
$R_t$	=	Rezeptorkonzentration total
$[L]$	=	freie Ligandenkonzentration
$L_t$	=	Ligandenkonzentration total

Im einfachsten Fall, einer 1:1 Komplexierung, kann man das Massenwirkungsgesetz aufstellen und man erhält folgenden Ausdruck.

$$K = \frac{[RL]}{[R] \cdot [L]} \quad (3.5)$$

Man wählt eine Wellenlänge aus, bei der die molaren Absorptionskoeffizienten des Rezeptors und des Liganden unterschiedlich sind. Die Absorption der Lösung wird dann beschrieben durch:

$$A = \varepsilon_R \cdot [R] + \varepsilon_L \cdot [L] + \varepsilon_{RL} \cdot [RL] \quad (3.6)$$

Außerdem gilt:

$$L_t = [L] + [RL] \Leftrightarrow [L] = L_t - [RL] \quad (3.7)$$

sowie

$$R_t = [R] + [RL] \Leftrightarrow [R] = R_t - [RL] \quad (3.8)$$

und

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_{RL} - \varepsilon_R - \varepsilon_L \quad (3.9)$$

Wobei  $R_t$  und  $L_t$  die Gesamtkonzentrationen an Ligand und Rezeptor darstellen. Durch Einsetzen von Gleichung (3.7) und (3.8) in Gleichung (3.6) und unter Berücksichtigung von Gleichung (3.9) erhält man einen Ausdruck, der die Absorption in Abhängigkeit der molaren Absorptionskoeffizienten der drei beteiligten Spezies  $R_t$ ,  $L_t$  und dem Komplex aus Rezeptor und Ligand  $[RL]$  beschreibt:

$$A = \varepsilon_R \cdot R_t + \varepsilon_L \cdot L_t + \Delta\varepsilon \cdot [RL] \quad (3.10)$$

Die Konzentration des Komplexes  $[RL]$  ist unbekannt und abhängig von der Assoziationskonstante  $K$ , die durch das Massenwirkungsgesetz gegeben ist. Ersetzt man den unbekanntem Term  $[RL]$  durch Gleichung (3.5) erhält man:

$$A = \varepsilon_R \cdot R_t + \varepsilon_L \cdot L_t + \Delta\varepsilon \cdot K \cdot [R] \cdot [L] \quad (3.11)$$

Substituiert man den Term  $[RL]$  in Gleichung (3.5) durch (3.8) formt nach  $[R]$  um und setzt dies in Gleichung (3.11) ein, ergibt sich:

$$A = \varepsilon_R \cdot R_t + \varepsilon_L \cdot L_t + \frac{R_t \cdot K \cdot \Delta\varepsilon \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \quad (3.12)$$

In dieser Gleichung gibt es nun außer der Assoziationskonstante  $K$  noch die unbekannte freie Ligandenkonzentration  $[L]$ , die über eine Taylorreihe, die nach dem ersten Glied abgebrochen werden kann, in guter Näherung durch die Gesamtligandenkonzentration  $L_t$  ersetzt werden kann.

$$[L] = g(L_t) + g'(L_t) \cdot ([L]_i - L_t) \quad (3.13)$$

Dies ergibt die genäherte Konzentration  $[L]$  in Abhängigkeit von der Gesamtligandenkonzentration und der Bindungskonstanten  $K$ .

$$[L] = L_t - \frac{K \cdot R_t \cdot L_t}{(1 + K \cdot L_t)^2 + K \cdot R_t} \quad (3.14)$$

Setzt man nun den in Gleichung (3.14) enthaltenen Ausdruck in (3.12) ein erhält man:

$$A = \varepsilon_R \cdot R_t + \varepsilon_L \cdot L_t + \frac{K \cdot R_t \cdot \Delta\varepsilon \cdot \left[ L_t - \frac{K \cdot R_t \cdot L_t}{(1 + K \cdot L_t)^2 + K \cdot R_t} \right]}{K \cdot \left[ L_t - \frac{K \cdot R_t \cdot L_t}{(1 + K \cdot L_t)^2 + K \cdot R_t} \right] + 1} \quad (3.15)$$

Die Änderung der Rezeptor- und der Ligandenkonzentration durch Verdünnung kann man durch einen Verdünnungsfaktor  $x$  beschreiben, so dass als Observable für die Konzentrationen  $R_t$  und  $L_t$  der dimensionslose Faktor  $x$  bleibt.

$$x = \frac{\text{zugegebenes Titrationsvolumen}}{\text{Volumen des vorgelegten Rezeptors}} \quad (3.16)$$

Mit der bekannten Ausgangskonzentration des Rezeptors zu Beginn der Titration kann man die Verdünnung in die Gleichung einbeziehen,

$$R_t = \frac{R_0}{1 + x} \quad (3.17)$$

Weiterhin ändert sich die Ligandenkonzentration mit der Zugabe an Volumen nach:

$$L_t = \frac{L_0 \cdot x}{1 + x} \quad (3.18)$$

$R_0$  und  $L_0$  stellen dabei die Konzentrationen der zuvor hergestellten Stammlösungen dar. Setzt man nun die erhaltenen Ausdrücke von  $R_t$  und  $L_t$  in (3.15) ein, erhält man eine Gleichung, die

nur noch von den beiden Observablen  $\Delta A$  und  $x$  und von den Variablen  $K$  und  $\Delta \varepsilon$  abhängig ist.

$$A = \frac{\varepsilon_R \cdot R_0}{1+x} + \frac{\varepsilon_0 \cdot L_0 \cdot x}{1+x} + \frac{K \cdot \frac{R_0}{1+x} \cdot (\varepsilon_{RL} - \varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot \left[ \frac{L_0 \cdot x}{1+x} - \frac{K \cdot \frac{R_0 \cdot L_0 \cdot x}{(1+x)^2}}{\left(1 + K \cdot \frac{L_0 \cdot x}{1+x}\right)^2 + K \cdot \frac{R_0}{1+x}} \right]}{K \cdot \left[ \frac{L_0 \cdot x}{1+x} - \frac{K \cdot \frac{R_0 \cdot L_0 \cdot x}{(1+x)^2}}{\left(1 + K \cdot \frac{L_0 \cdot x}{1+x}\right)^2 + K \cdot \frac{R_0}{1+x}} \right] + 1} \quad (3.19)$$

Der Einfachheit halber kann man den ersten Term durch die Startabsorption ersetzen, die über folgenden Zusammenhang mit dem molaren Absorptionskoeffizienten  $\varepsilon_R$  des Rezeptors zusammenhängt:

$$A_R = \varepsilon_R \cdot R_t \Leftrightarrow A_R = \frac{A_0}{1+x} \quad (3.20)$$

Wird dies in der Formel für die Bindungskonstante (3.19) berücksichtigt, erhält man:

$$A = \frac{A_0}{1+x} + \frac{\varepsilon_0 \cdot L_0 \cdot x}{1+x} + \frac{K \cdot \frac{R_0}{1+x} \cdot (\varepsilon_{RL} - \varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot \left[ \frac{L_0 \cdot x}{1+x} - \frac{K \cdot \frac{R_0 \cdot L_0 \cdot x}{(1+x)^2}}{\left(1 + K \cdot \frac{L_0 \cdot x}{1+x}\right)^2 + K \cdot \frac{R_0}{1+x}} \right]}{K \cdot \left[ \frac{L_0 \cdot x}{1+x} - \frac{K \cdot \frac{R_0 \cdot L_0 \cdot x}{(1+x)^2}}{\left(1 + K \cdot \frac{L_0 \cdot x}{1+x}\right)^2 + K \cdot \frac{R_0}{1+x}} \right] + 1} \quad (3.21)$$

Dies ist nun die Formel für die nichtlineare Regressionsanalyse, die uns die gewünschten Variablen  $K$  und  $\Delta \varepsilon$  liefert.<sup>[108]</sup>  $\Delta \varepsilon$  setzt sich nach Gleichung (3.9) aus der Differenz der molaren Absorptionskoeffizienten des Komplexes aus Rezeptor und Ligand  $\varepsilon_{RL}$  des Rezeptors  $\varepsilon_R$  und des Liganden  $\varepsilon_L$  zusammen. Die molaren Absorptionskoeffizienten des Rezeptors und des Liganden kann man aus einer unabhängigen Messung berechnen, den molaren Absorptionskoeffizienten des Komplexes kann man grob abschätzen. Durch eine Anpassung der Assoziationskonstante  $K$  und dem molaren Absorptionskoeffizienten  $\varepsilon_{RL}$  mit Hilfe von

Gleichung (3.21) an die experimentell ermittelte Bindungsisotherme kann man die Bindungskonstante  $K$  erhalten. Eine Anpassung für  $K$  liefert nur dann sinnvolle Werte, wenn die Änderung des molaren Absorptionskoeffizienten  $\Delta\epsilon$  ausreichend groß ist. Gleichung (3.21) kann sowohl für UV- als auch für Fluoreszenztitrationen verwendet werden, da die physikalischen Ursachen (Änderung der Elektronendichte) mit Hilfe beider spektroskopischer Methoden verfolgt werden können. Ein Vorteil der Fluoreszenzspektroskopie liegt in der höheren Empfindlichkeit, so dass geringe Unterschiede besser beobachtet werden können als bei der UV-Spektroskopie.

### 3.2.7 Titrations zur Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung

Für das Alzheimer Modellpeptid **98** wurde versucht, Bindungskonstanten in Lösung zu bestimmen. In einer ersten Versuchsreihe wurde das Tetrapeptid **98** gegen den Trivalinrezeptor **113** in reinem DMSO gemessen. Die Löslichkeit der Verbindungen bei einem Wasseranteil höher als 20 % war zu gering, um ausreichende Mengen an Rezeptor und Ligand in Lösung zu bringen. Um schnell eine Aussage treffen zu können, ob eine NMR Titration Erfolg verspricht, wurde eine 1:1 Mischung aus Rezeptor und Ligand hergestellt und NMR spektroskopisch untersucht. Wie schon in Abschnitt 3.2.1 erwähnt wurde, konnten die komplexinduzierten Verschiebungen der Amidprotonen nicht für eine quantitative Bestimmung der Bindungskonstante genutzt werden. Eine qualitative Analyse der Spektren zeigte allerdings einen schwachen NOE zwischen den Methylprotonen des Liganden und den CH-Protonen des Rezeptors (Abbildung 3.33).

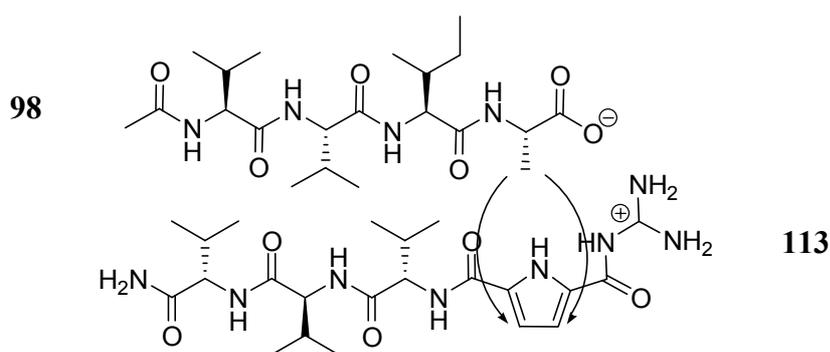
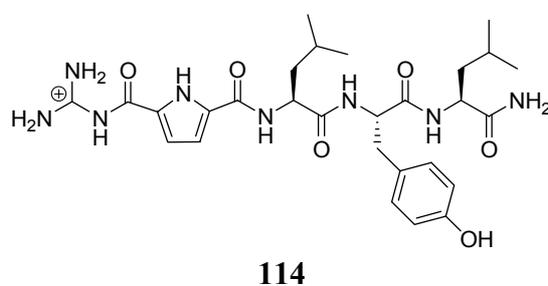
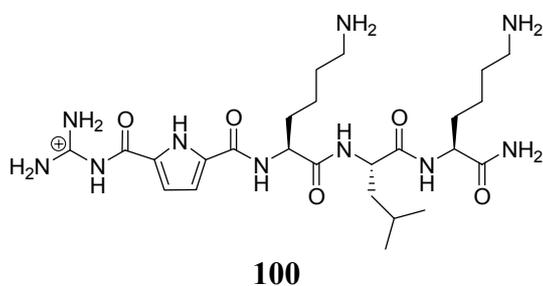
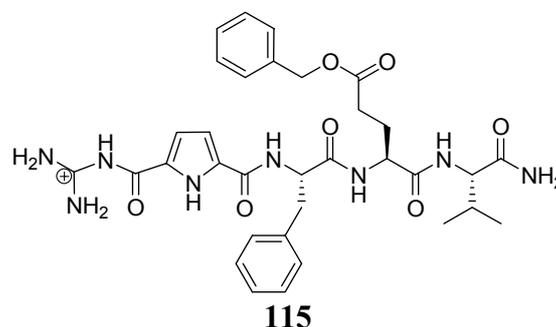
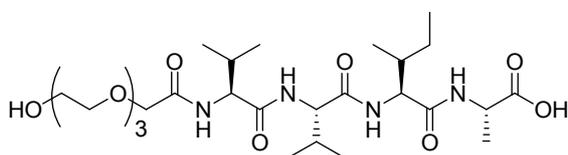
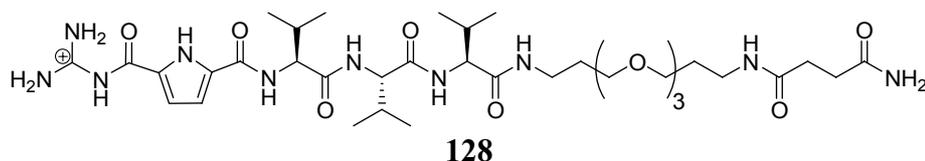


Abbildung 3.33: NOE-Kontakt zwischen den Alaninprotonen des Tetrapeptids **98** und dem Trivalinrezeptor **113**.

Die semiquantitativen Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass es zum einen zwingend erforderlich war, Rezeptoren und Liganden zu synthetisieren, die bessere Löslichkeitseigenschaften in Wasser aufwiesen, so wie es schließlich mit der Synthese des triethylglykolsubstituierten Liganden **132** und dem besser wasserlöslichen Rezeptor **128** gelungen ist. Aus diesem Grunde wurde bei diesem Liganden versucht, Bindungskonstanten über UV- und Fluoreszenzspektroskopie zu bestimmen. Die Löslichkeit des Tetrapeptids **132**

in reinem Wasser betrug maximal  $5 \cdot 10^{-4}$  M, was für eine Bestimmung von Bindungskonstanten über UV- oder Fluoreszenzspektroskopie vollkommen ausreichend ist. Wie zuvor erwähnt, neigte das triethylenglykolsubstituierte Tetrapeptid **132** zur Bildung von Ablagerungen, daher musste die Peptidlösung vor jeder Titration frisch angesetzt werden. Zunächst wurden einige UV-Titrations mit den relativ leicht löslichen Liganden **100**, **114**, **128** und **115** durchgeführt. Dafür wurden die Rezeptoren in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-5}$  M in einem BisTris Puffer ( $1.5 \cdot 10^{-3}$  M) bei einem pH-Wert von 6.0 gelöst und 2000  $\mu$ L dieser Lösung in einer Küvette vorgelegt. Dazu wurde der in dem gleichen Puffer gelöste Ligand **132** bei einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-4}$  M zutitriert, bis die Küvette komplett gefüllt war (maximal 3500  $\mu$ L). Die Auswertung erfolgte entweder über eine von der Firma *Bio Logic* vertriebene Software *Specfit/32*<sup>TM</sup>, die eine einfache Anpassung der experimentellen Daten über einen größeren Wellenlängenbereich ermöglicht, oder über die Anpassung der Bindungsisotherme nur einer Wellenlänge mit Hilfe von Gleichung (3.21). Für drei der synthetisierten Rezeptoren war es möglich, Bindungskonstanten über *Specfit/32*<sup>TM</sup> zu bestimmen. Für den Rezeptor **100**, der die höchste Bindungskonstante ( $8800 \text{ M}^{-1}$ ) bei dem Festphasenassay in Wasser aufwies, wurde über eine UV-Titration eine Bindungskonstante von  $6025 \text{ M}^{-1}$  bestimmt. Für den Trivalinrezeptor **128**, der auf der festen Phase eine Bindungskonstante von  $1340 \text{ M}^{-1}$  aufwies, konnte, in relativ guter Übereinstimmung, eine Bindungskonstante von  $2660 \text{ M}^{-1}$  bestimmt werden. Eine ebenso gute Übereinstimmung zeigte der Rezeptor **114** ( $1770 \text{ M}^{-1}$  auf der festen Phase), bei dem die Bindungskonstante durch eine UV-Titration bei  $1800 \text{ M}^{-1}$  lag. UV-Titrations wurden ebenfalls für den Rezeptor **115** durchgeführt, die Bindungskonstante ( $560 \text{ M}^{-1}$  auf der festen Phase) war aber offensichtlich zu gering. Eine Anpassung der Bindungsisotherme nach Gleichung (3.21) an die experimentellen Daten führte zu keinem Ergebnis. Alle vier ausgewählten Rezeptoren zeigen in Lösung vergleichbare Bindungskonstanten mit der festen Phase, so dass Wechselwirkungen mit dem polymeren Träger eine untergeordnete Rolle spielen. Ähnliches konnte *Still* bereits für den Vergleich von Bindungsdaten zeigen, die er auf der festen Phase und über HPLC chromatographische Methoden erhalten hatte.<sup>[121]</sup>





Neben der Auswertung über *Specfit/32*<sup>TM</sup>, das eine komfortable Möglichkeit bietet, Bindungsdaten direkt aus den Spektren zu berechnen, wurde ebenfalls eine Auswertung einer einzelnen Wellenlänge über Gleichung (3.21) versucht. Die nichtlineare Kurvenregression erlaubte aber nur bedingt eine Bestimmung der Bindungskonstanten. Um diesen vermeintlichen Widerspruch zu klären, hilft es, sich die Bindungsisotherme bei der Titration etwas genauer anzuschauen (Abbildung 3.34). In dieser Abbildung wurde der Verlauf der Absorption der Titration mit dem berechneten Verlauf der Abnahme der Absorption des Rezeptors, der allein durch die Verdünnung stammt, gegenübergestellt. Die beiden Datensätze sind nahezu kongruent. Man kann daraus schließen, dass die molaren Absorptionskoeffizienten des Rezeptors und des Rezeptor-Ligand-Komplexes nahezu identisch sind. Erst in einem Bereich, bei dem mehr als sechs Äquivalente an Ligand zutitriert wurden, kann man Unterschiede zwischen der reinen Verdünnung des Rezeptors und dem Titrationsverlauf erkennen.

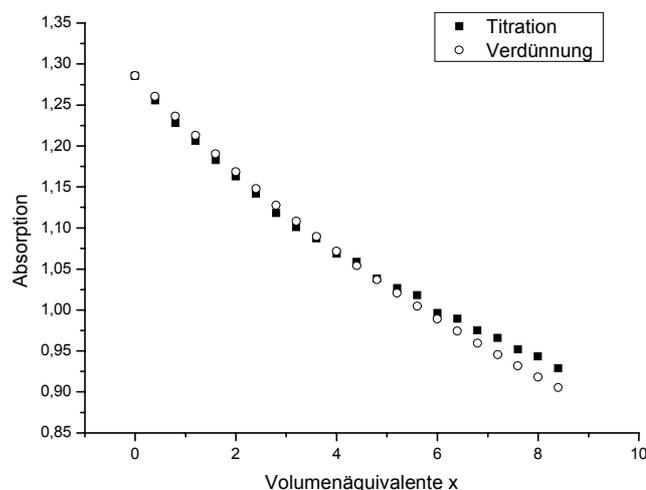


Abbildung 3.34: Verlauf der Absorption(300 nm) der Titration von CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys-NH<sub>2</sub> **100** ( $5.5 \cdot 10^{-5} M^1$ ) gegen das Tetrapeptid **132** ( $5.5 \cdot 10^{-4} M^1$ ) bei einem pH-Wert von 6.3 in einem BisTris Puffer ( $8.0 \cdot 10^{-4} M^1$ ).

Versucht man dennoch aus den Daten unter Berücksichtigung von Gleichung (3.21) eine Assoziationskonstante zu berechnen, erhielt man deutlich unterschiedliche Assoziationskonstanten. Der molare Absorptionskoeffizient des Rezeptors  $\epsilon_R$  konnte aus dem Startwert der Absorption berechnet werden, der molare Absorptionskoeffizient des Liganden wurde durch eine unabhängige Messung bestimmt. Die Parametrisierung erfolgte so, dass zunächst, bis auf die unbekanntenen Werte des molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_{RL}$  und die Assoziationskonstante  $K$ , alle Werte als bekannt vorausgesetzt wurden. Die unterschiedlichen Variablen wurden nach und nach in die Regressionsanalyse einbezogen, so dass über diese Methode eine Bindungskonstante für den Rezeptor **100** und das Tetrapeptid **1329** zu  $16800 \text{ M}^{-1}$  bestimmt werden konnte. Der rechnerische Fehler, der dabei für die Bindungskonstante bestimmt wurde, ist relativ hoch, er betrug 60 % der berechneten Bindungskonstante, so dass innerhalb der berechneten Fehlergrenzen die Werte, die über *Specfit/32*<sup>TM</sup> und über Gleichung (3.21) vergleichbar bleiben. Bei *Specfit/32*<sup>TM</sup> besteht keine Möglichkeit die zu variierenden Parameter zu beeinflussen.

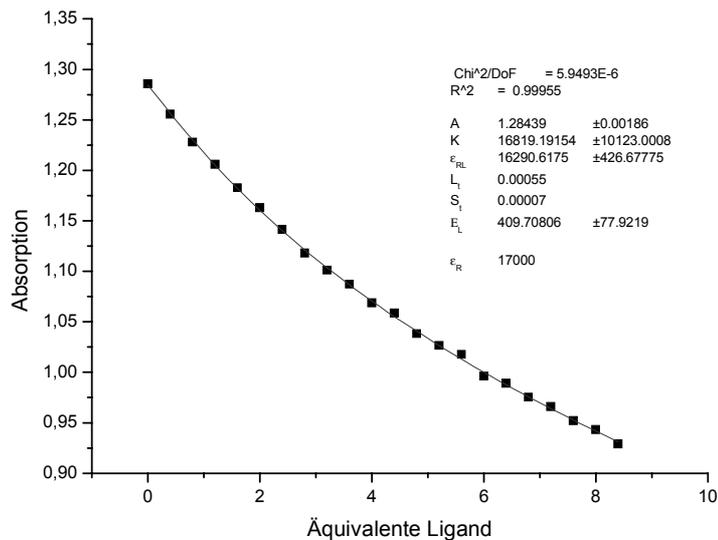


Abbildung 3.35: Bindungsisotherme (300 nm) für die Bestimmung der Bindungskonstanten des Rezeptors **100** und dem Alzheimer Modellpeptid **132**.

Mit Hilfe empfindlicherer Fluoreszenzmessungen sollte versucht werden, die Bindungskonstanten über eine weitere, unabhängige Methode zu verifizieren. Für dieses Experiment wurden deutlich niedrigere Konzentrationen benötigt als bei den UV Titrationsen. Die Fluoreszenzintensität war wiederum stark zeitabhängig, so dass selbst nach einer Wartezeit von über 40 Minuten keine Konstanz erreicht werden konnte. Die Küvette wurde nach jeder Messung aus dem Spektrometer entnommen und es wurde eine gewisse Menge an Ligand zutitriert und die Küvette geschüttelt. Dadurch kann vermehrt Luft in die Probe gelangen und so eine Änderung der Fluoreszenz auftreten. Bekannt ist, dass die

Fluoreszenzintensitäten durch Sättigung mit verschiedenen inerten Gasen deutlich beeinflusst werden. <sup>[128]</sup>

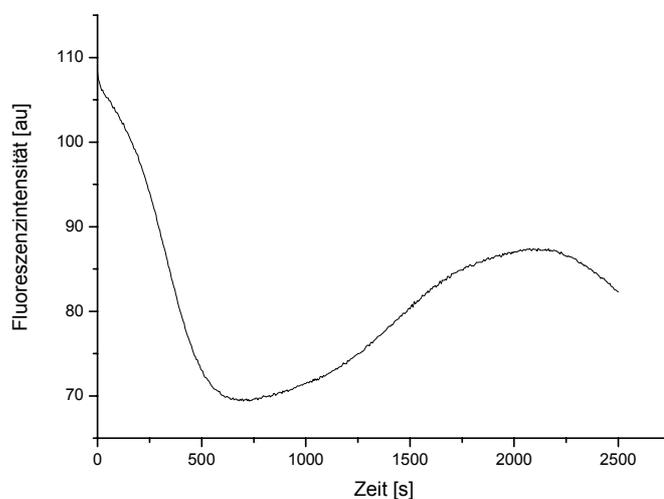


Abbildung 3.36: Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität des triethylglykolsubstituierten Trivalinrezeptors **128** bei einer Wellenlänge von 330 nm.

Über Fluoreszenzspektroskopie konnten für diese Rezeptoren keine Bindungskonstanten bestimmt werden. Eine Bestimmung über UV-Titrationen war demgegenüber erfolgreich. Es konnten über UV-Titrationen für drei Rezeptoren Bindungskonstanten bestimmt werden, die in der gleichen Größenordnung wie die Bindungskonstanten auf der festen Phase lagen.

### 3.2.8 Bestimmung der Dissoziationsenergien über Massenspektrometrie

Dissoziationsenergien von nichtkovalenten Komplexen können über massenspektrometrische Verfahren in der Gasphase durch FT-ICR IRMPD (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Infrarot Multiphoton Dissoziation) Methoden bestimmt werden. Dabei wird der zu untersuchende nichtkovalente Komplex in einer Ionenfalle isoliert und seine Intensität relativ zu den Produkt-Ionen bei Bestrahlung mit einem Laser bekannter Energiedichte gemessen. Liegen ausreichend besetzte Schwingungsenergieniveaus in der Nähe der Frequenz des eingestrahlt Lasers stellt sich eine Boltzmann ähnliche Verteilung der Energieniveaus ein und die Energiedichte des Lasers kann näherungsweise mit einer internen Temperatur des bestrahlten Moleküls korreliert werden.<sup>[122-124, 129]</sup> Bisher wurde diese Methode entwickelt, um Dissoziationsenergien von kovalenten Bindungen zu bestimmen. Unter bestimmten Voraussetzungen, z. B. eine hohe Komplexstabilität des nichtkovalenten Assoziats, ist es auch möglich, nichtkovalente Dissoziationsenergien zu messen.

In diesem Experiment wurde die Dissoziationsenergie des unimolekularen Zerfalls eines nichtkovalenten Komplexes aus dem kationischen Rezeptor **113** und dem acetyliertem Modellpeptid **98** durch Massenspektrometrie in der Gasphase bestimmt. Die Dissoziationsrate wurde als Funktion der infraroten Strahlungsenergie eines CO<sub>2</sub>-Lasers in einem FT-ICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) Massenspektrometer mit Elektronenspray Ionisation bestimmt. Der Rezeptor **113** und der Ligand **98** wurden in DMSO gelöst und mit Methanol zu einer 1·10<sup>-4</sup> M Lösung verdünnt. Die FT-ICR Messungen wurden bei einer Durchflussrate von 300 nL/min durchgeführt. Die Ionen wurden isoliert und durch Bestrahlung mit einem 40 W kontinuierlichen CO<sub>2</sub>-Laser bei unterschiedlichen Energiedichten in einem Zeitraum zwischen einer und 120 Sekunden aufgeheizt. Während der Bestrahlung mit dem Laser wurde für unterschiedliche Energiedichten die Intensität des nichtkovalenten Komplexes bei  $m/z = 935$  in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Die Stärke der nichtkovalenten Bindung zwischen Rezeptor und Ligand musste niedriger sein als die schwächste kovalente Bindung, da ansonsten innerhalb des Komplexes ein kovalenter Bindungsbruch erfolgen kann. Erfolgt ein kovalenter Bindungsbruch, kann die IRMPD Methode nicht mehr zur Bestimmung der Stärke der nichtkovalenten Wechselwirkungen herangezogen werden. In dem Massenspektrum (Abbildung 3.37) treten sowohl der nichtkovalente Komplex, der Rezeptor **113** als Monokation ( $m/z = 493$ ), der Ligand **98** als Kation und auch Fragmente aus der Zerfallsreaktion auf.

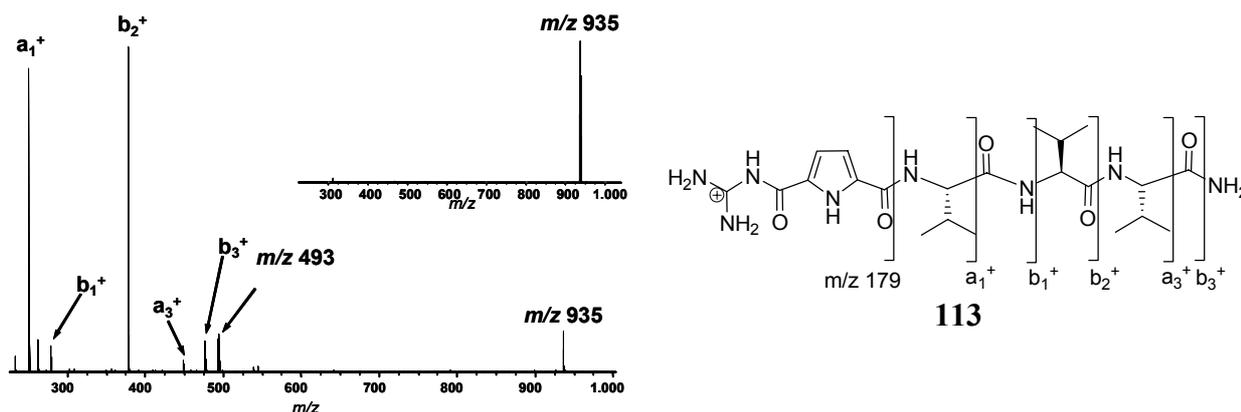


Abbildung 3.37: ESI IRMPD FT-ICR Massenspektrum des isolierten nichtkovalenten Komplexes  $[113 + 98 + H]^+$  bei  $m/z = 935$ , das isolierte Ion wird für 5 s mit  $7.1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$  bestrahlt und zerfällt in einem unimolekularen Prozess und bildet Fragmente. Oben rechts ist das ESI FT-ICR Massenspektrum des Rezeptors und des Liganden nach Isolierung in der Ionenfalle zu sehen.

Um zu unterscheiden, ob die niedermolekularen Fragmente  $a_1^+$ - $a_3^+$  und  $b_1^+$ - $b_3^+$  durch einen kovalente Bindungsbruch innerhalb des nichtkovalenten Komplexes entstanden, oder ob es sich um unvermeidbare sekundäre Fragmentierungen im Anschluss an die Dissoziation des Komplexes handelt, wurde ein Resonanzexperiment durchgeführt. Bei diesem Resonanzexperiment wurde  $m/z$  935 in einer ICR Zelle isoliert, mit dem Laser bestrahlt und kontinuierlich  $m/z$  493 emittiert, ohne dass Fragmente zu beobachten waren. Daraus konnte man folgern, dass die Fragmentationen, die in Abbildung 3.37 beobachtet wurden, ausschließlich Sekundäreffekte des primären Produktion bei  $m/z = 493$  darstellen, die folglich bei Emission dieses Ions ausbleiben müssen.

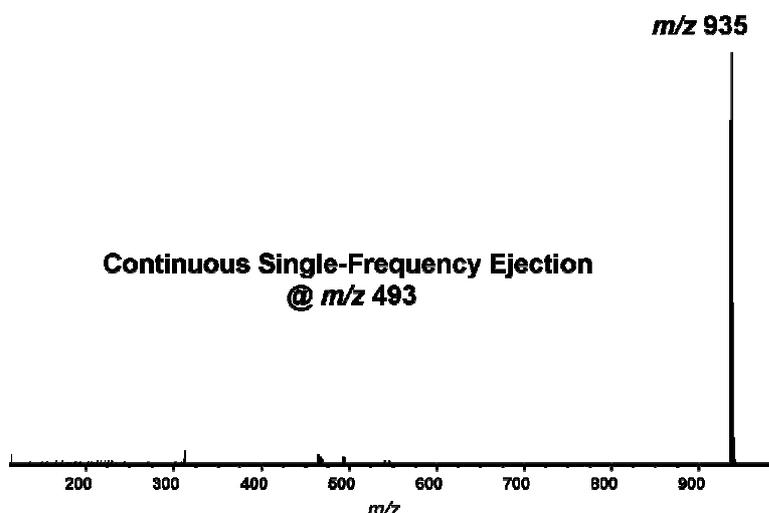


Abbildung 3.38: Resonanzexperiment, der nichtkovalente Komplex wurde via ICR isoliert und für 2.55 s bei einer Energiedichte von  $7.1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$  bestrahlt, das Rezeptorkation  $[113+H]^+$  trat dabei kontinuierlich auf und wurde ausgeblendet, Fragmentationen konnten nicht beobachtet werden.

Die Intensität des protonierten Komplexes  $[113 + 98 + H]^+$  wurde relativ zu dem primären Fragment  $[113 + H]^+$  bei verschiedenen Energiedichten des  $CO_2$ -Lasers bestimmt. Dabei nahm die Intensität mit der Energiedichte bzw. der internen Temperatur des Adduktes stark ab. Eine Auftragung der Bestrahlungszeit gegen den natürlichen Logarithmus des Komplexes, in Abhängigkeit von dem Vorkommen des primären Fragments  $m/z = 493$ , lieferte einen linearen Zusammenhang, durch den man eine unimolekulare Fragmentierung nach einer Kinetik 1. Ordnung über IRMPD in der Gasphase annehmen konnte.

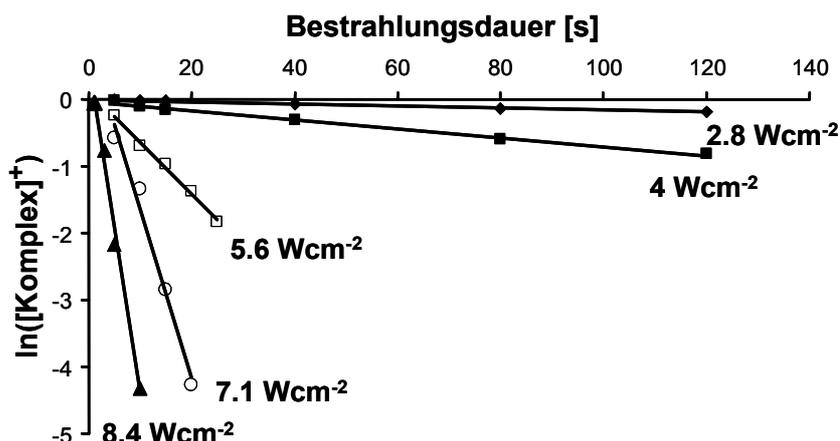


Abbildung 3.39: Auftragung der Bestrahlungszeit bei unterschiedlichen Energien des  $CO_2$ -Lasers gegen den natürlichen Logarithmus des protonierten Komplex  $[113 + 98 + H]^+$  ( $m/z = 935$ ) relativ zum Verhältnis zu dem primären Fragment  $113$  ( $m/z = 493$ ).

Mit der bekannten Strahlungsenergie des Lasers, dem linearen Zusammenhang zwischen Lebensdauer und zugeführter Energie des nichtkovalenten Komplexes konnte unter Annahme eines unimolekularen Zerfalls eine Dissoziationskonstante  $k_{diss}$  für jede Auftragung von Bestrahlungsdauer, Laserenergie und Konzentration des nichtkovalenten Komplexes berechnet werden. Trägt man den natürlichen Logarithmus der Dissoziationskonstanten gegen den natürlichen Logarithmus der Energiedichte des Lasers für den protonierten Komplex  $[113 + 98 + H]^+$  auf, kann man aus der Steigung über

$$E_{a_1}^{laser} = -\frac{d \cdot \ln k_{diss}}{d \cdot \ln P_{laser}} = qh\nu \frac{d \cdot \ln k_{diss}}{d \cdot \ln P_{laser}} \quad (3.22)$$

die Aktivierungsenergie  $E_a^{Laser}$  berechnen. In Gleichung (3.22), die von *Dunbar* abgeleitet wurde, ist  $E_a^{Laser}$  die Aktivierungsenergie (eV),  $q$  die Verteilungsfunktion der Schwingungsniveaus bei der absorbierten Strahlung des Lasers,  $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum,  $\nu$  die Frequenz des Lasers,  $k_{diss}$  die Dissoziationskonstante erster Ordnung,  $P_{laser}$  die Energiedichte der Einstrahlquelle ( $W \cdot cm^{-2}$ ) und  $k_B$  die Boltzmannkonstante ( $J \cdot K^{-1}$ ). Mit dieser Näherung konnte die Aktivierungsenergie für den unimolekularen Zerfall des nichtkovalenten Komplexes nach einer Kinetik erster Ordnung durch eine Auftragung des

natürlichen Logarithmus der Dissoziationskonstanten gegen den natürlichen Logarithmus der Energiedichte des Lasers bestimmt werden. Die Steigung liefert eine Aktivierungsenergie von 0.67 eV (bestimmt nach Gleichung (3.22)). Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem Zerfall kovalenter Komplexe. Für die Dissoziation von einfach protoniertem Leucin Enkephalin und Bradykinin wurden die Aktivierungsenergie für die kovalente Dissoziation über IRMPD Methoden nach Gleichung (3.22) zu 1.1-1.3 eV bestimmt.<sup>[124]</sup>

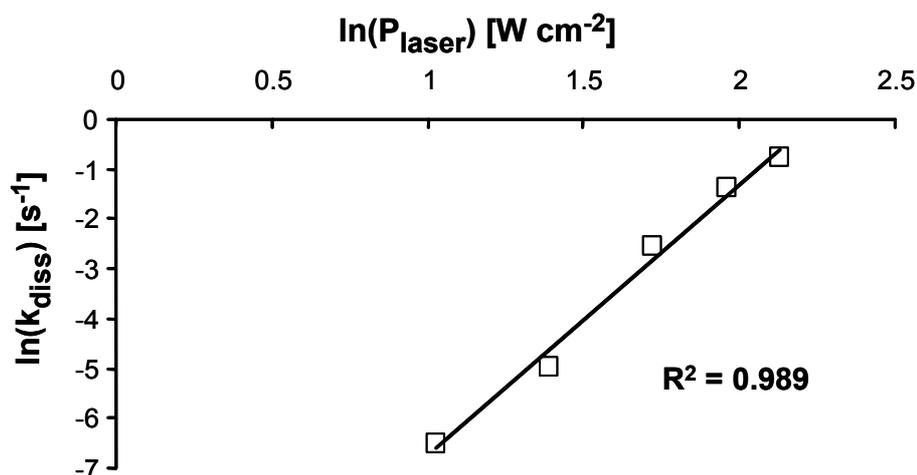


Abbildung 3.40: Bestimmung der Aktivierungsenergie für den unimolekularen Zerfall aus der Steigung der Auftragung des natürlichen Logarithmus der Dissoziationskonstante  $k_{\text{diss}} [\text{s}^{-1}]$  und dem natürlichen Logarithmus der Energiedichte des Lasers  $p_{\text{laser}} [\text{W cm}^{-2}]$ .

Diese Studie ist die bislang erste erfolgreiche IRMPD Bestimmung der Dissoziationsenergie eines nichtkovalenten Peptid-Ligand Komplexes.<sup>[130]</sup> Die Näherung, mit der die Aktivierungsenergie bestimmt wurde, wurde für kovalente Dissoziationen entwickelt. Schwache nichtkovalente Wasserstoffbrücken besitzen nur etwa 5 % der Stärke einer kovalenten Bindung, es ist daher fraglich, ob sich eine Boltzmann-ähnliche Energieverteilung über den gesamten nichtkovalenten Komplex ausbilden kann. Eine ideale Boltzmannverteilung erfordert zum einen eine beliebig lange Lebensdauer des Komplexes und zum anderen einen schwarzen Strahler als Energiequelle. Die Energieverteilung des IR-Lasers wird durch den Faktor  $q$  beschrieben, und dadurch an einen schwarzen Strahler angenähert. Dies stellt eine Unsicherheit bei der Bestimmung der Aktivierungsenergie dar, ändert aber nichts an den erhaltenen Zerfallskinetiken. Trotzdem stellt der Zahlenwert, der für die Aktivierungsenergie erhalten werden konnte, eine gute Näherung für die Stabilität nichtkovalenter Komplexe in der Gasphase dar. Der Unterschied für die nichtkovalente Dissoziation des Trivalinrezeptors **113** und des Tetrapeptids **98**, verglichen mit der kovalenten Dissoziation bei z. B. Bradykinin beträgt etwa 0.5 eV. Vielleicht kann durch bessere Näherungen, die die Grundlage der Bestimmung von Aktivierungsenergien für die Dissoziation nichtkovalenter Komplexe bilden, die Aussagekraft von  $E_{a_1}^{\text{laser}}$  noch erhöht werden.

### 3.2.9 *In vitro* Assay zur Inhibierung der Fibrillenbildung

In Zusammenarbeit mit der *Novartis AG* in Basel wurden Tests zur Inhibierung der Fibrillenbildung *in vitro* mit einigen Rezeptoren durchgeführt. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse werden die beiden Tests im Folgenden kurz beschrieben. Bei den Tests geht es um die quantitative Bestimmung an fibrillaren Strukturen von A $\beta$  (1-40) und A $\beta$  (1-42) mit Hilfe spektroskopischer Methoden.

Thioflavin T (**133**) interagiert mit aggregierten Fibrillen aus synthetischem A $\beta$ , indem es einen starken bathochromen Shift im Fluoreszenzspektrum aufweist. Dieser Shift tritt ausschließlich mit dem Vorhandensein fibrillarer Strukturen auf, Thioflavin T zeigt keine Wechselwirkung mit monomerem A $\beta$ , da der bathochrome Shift im Spektrum durch Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid, das die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen zerstört, wieder verloren geht. Darüber hinaus zeigt Thioflavin T keine Abhängigkeit des Fluoreszenzspektrums von der Salzkonzentration. *LeVine* konnte einen Fluoreszenzassay entwickeln, mit dem es möglich war, die Verzögerung der Bildung amyloider Strukturen zu bestimmen.<sup>[131, 132]</sup> Ein Maß für die Güte der Inhibierung der Fibrillenbildung ist die Verzögerung des Anstiegs der Fluoreszenz bei 482 nm.

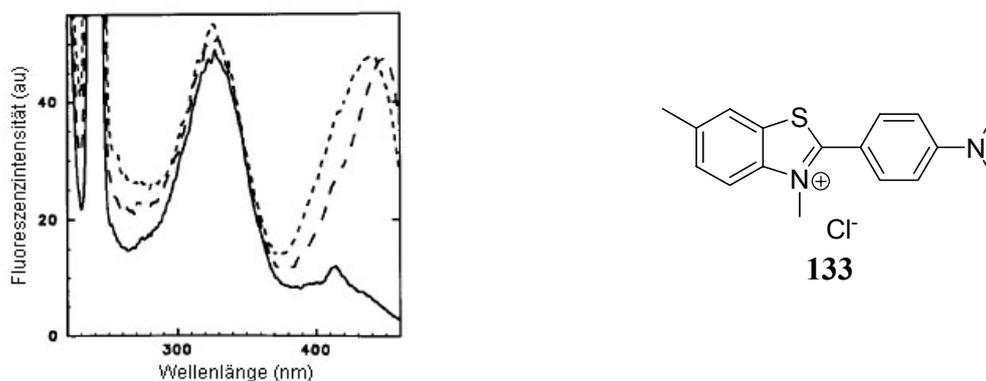


Abbildung 3.41: Thioflavin T Fluoreszenzspektrum in Abwesenheit (schwarze Linie) und in Anwesenheit von A $\beta$  (gestrichelte Linie).

Kongorot **134**, ein Diazofarbstoff mit zwei Sulfonsäuren, zeigt eine charakteristische Änderung im UV-Spektrum bei Anwesenheit von amyloidartigen Strukturen. *Klunk et al.* entwickelten einen Assay, bei dem es möglich ist, über die UV Absorption des Kongorots aggregiertes A $\beta$  quantitativ zu bestimmen.<sup>[133]</sup> Genutzt wird dabei der bathochrome Shift des Kongorots von 481 nm zu 541 nm, wenn es an  $\beta$ -Faltblatt Strukturen bindet. Durch einen quantitativen Vergleich der Spektren von dem Farbstoff allein und dem mit A $\beta$  konjugierten Farbstoff kann die Menge an Amyloid Plaques bestimmt werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus dem Thioflavin T Assay ergibt sich so ein Bild über die Fähigkeit der Rezeptoren, die Fibrillenbildung *in vitro* zu verzögern.

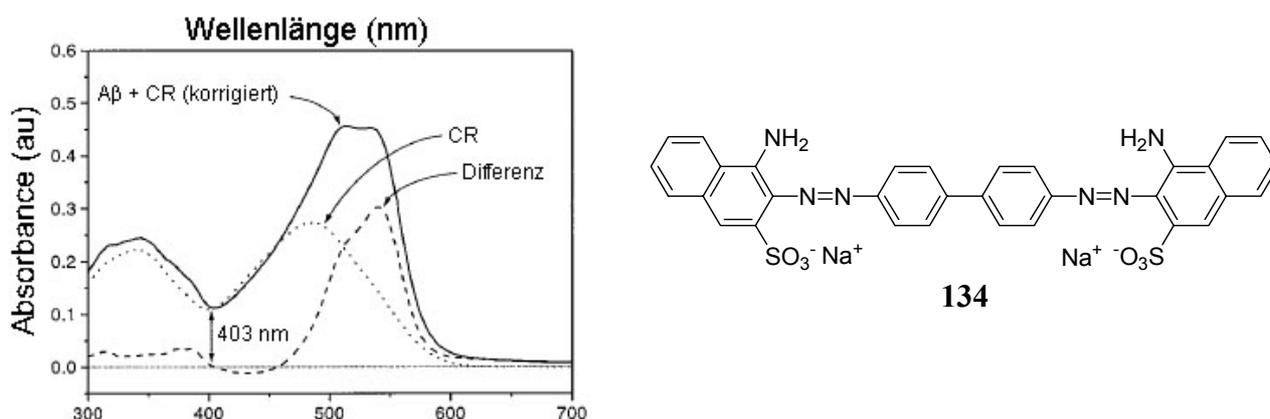
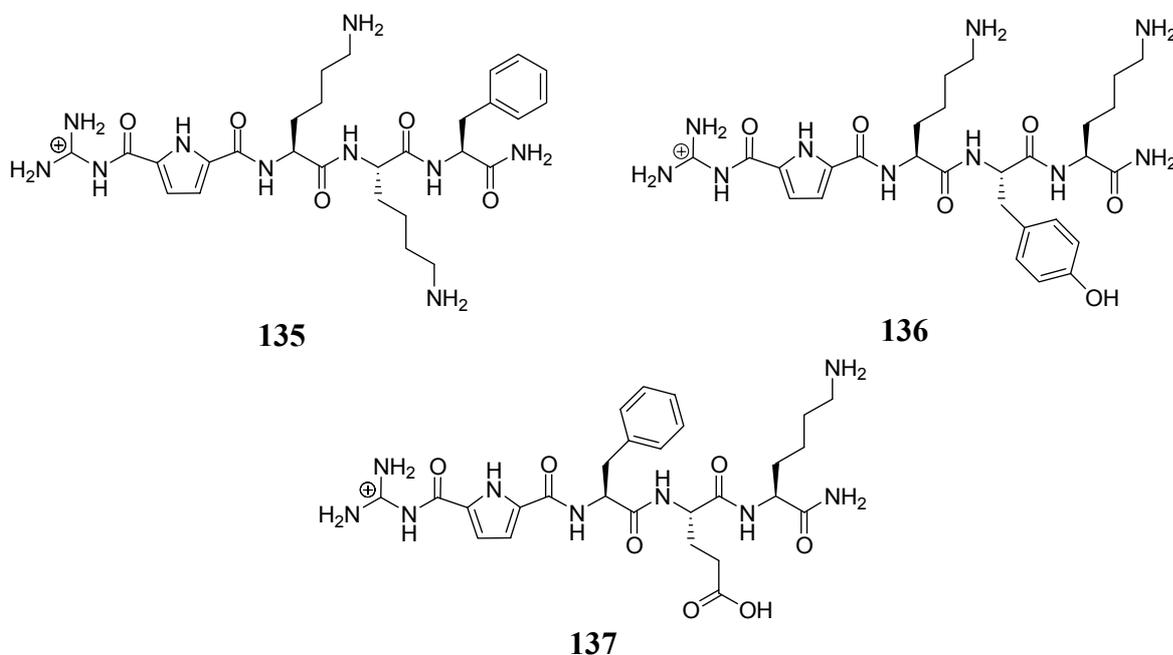


Abbildung 3.42: UV-Spektrum von Kongorot **134** allein (····), des Spektrums von Kongorot, das mit synthetischen A $\beta$  wechselwirkt (---) und der Differenz der beiden Spektren (-·-·-).

Bei diesem Test wurden vier Rezeptoren ausgewählt und auf die inhibierenden Eigenschaften gegenüber dem Amyloid Protein A $\beta$  (1-42) getestet. Besonderer Wert wurde dabei auf eine hohe Löslichkeit der Rezeptoren in wässrigen Lösemitteln gelegt, da die Konzentrationen, die für diesen Assay benötigt wurden, relativ hoch lagen. Aus diesem Grunde wurden zwei trikationische Rezeptoren **135** und **136** sowie der Rezeptor **137**, der sowohl ein Lysin als auch eine Glutaminsäure in der Seitenkette enthält und der Trivalinrezeptor mit Triethylglykollinker **128** gewählt, da er beim Screening in Methanol die höchste Bindungskonstante aufwies, in Wasser jedoch nur zu den moderaten Bindern zählte.



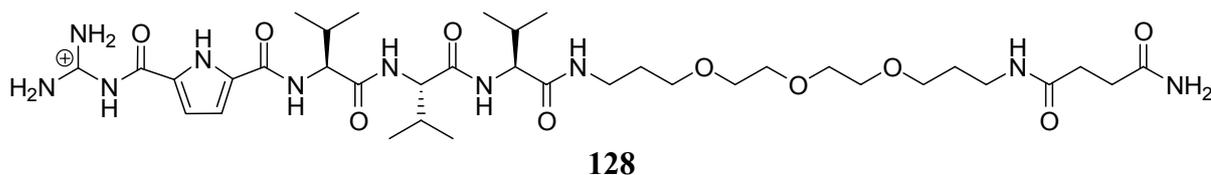


Abbildung 3.43: Ausgewählte Rezeptoren für die Inhibierung der Fibrillenbildung des Amyloid Proteins A $\beta$  (1-42).

Zunächst wurde das Amyloid Protein A $\beta$  (1-42) durch Lösen in Hexafluorisopropanol (HFIP) monomerisiert. HFIP wurde durch Überleiten von Stickstoff entfernt und der Rückstand in DMSO gelöst, so dass eine Stammlösung von 0.6 mM entstand. Die Stammlösungen der Rezeptoren wurden in DMSO mit einer Konzentration von 20 mM hergestellt. Die Konzentration der Rezeptoren bei dem Assay zur Inhibierung der Fibrillenbildung betrug 1 mM bzw. 100  $\mu$ M. Der Assay wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Zu 90  $\mu$ L eines Phosphatpuffers bei einem pH-Wert von 7.2 (25 mM und 120 mM Natriumchlorid), der 5  $\mu$ M Thioflavin T enthielt, wurden 5  $\mu$ L der Stammlösung der Rezeptoren und 5  $\mu$ L der Stammlösung des monomerisierten A $\beta$  (1-42) in DMSO gegeben. Die Konzentrationen an Amyloid Protein betragen 30  $\mu$ M und die Konzentration an Rezeptor 1 mM bzw. 100  $\mu$ M, so dass der Überschuss an Rezeptor in dem ersten Fall 33:1 und im letzteren 3:1 betrug. Die Mikrotiterplatten wurden für sechs Tage bei 37 C auf einem *Perkin-Elmer* LS-50B Fluorimeter fluoreszenzspektroskopisch bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm und einer Emissionswellenlänge von 482 nm in regelmäßigen Abständen untersucht. Als Kontrolle diente sowohl die Fluoreszenzemission des Rezeptors allein, ohne Zusatz von A $\beta$  (1-42) und die Aggregation von A $\beta$  ohne Anwesenheit von Rezeptor. Am Ende des Experiments wurden die Fibrillen quantitativ über den Kongorot Assay bestimmt. Drei der Rezeptoren (**136**, **135** und **137**) zeigten bei einer Konzentration von 1 mM eine leichte Inhibitorwirkung bei dem Thioflavin T Assay. Sie verlängerten die Zeit bis zum Start der Fibrillenbildung um einige Stunden, bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M waren alle drei inaktiv. Anhand der Grafiken kann man erkennen, dass die Fibrillenbildung lediglich verzögert, jedoch nicht unterbunden wurde. Nach 24 Stunden erreichte die Fluoreszenzintensität einen maximalen Wert und blieb anschließend nahezu konstant.

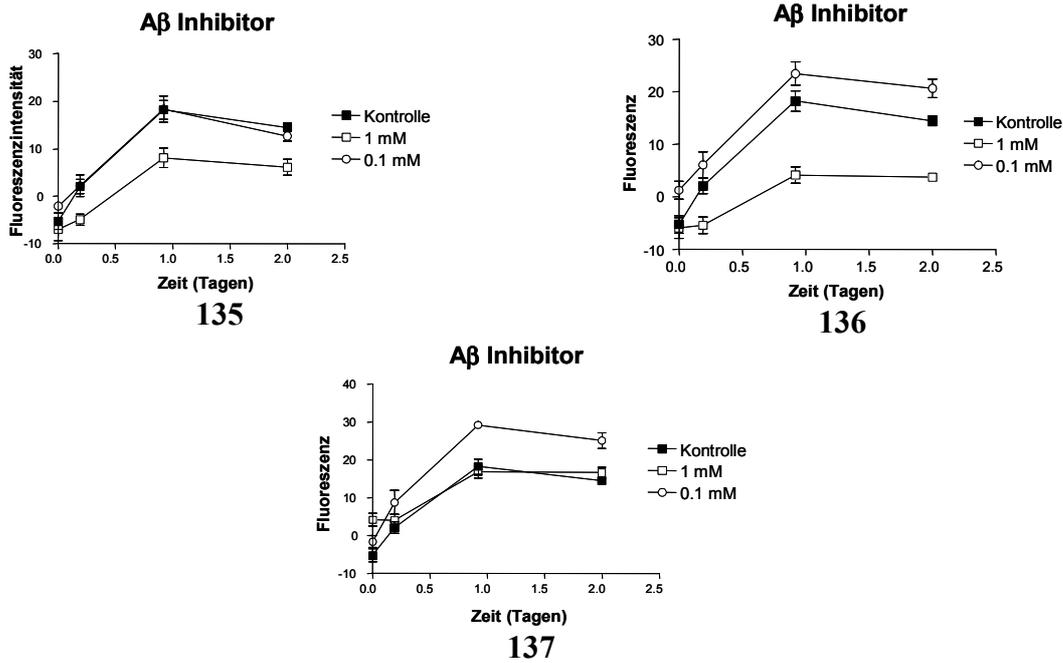


Abbildung 3.44: Thioflavin T Assay der Rezeptorsequenzen 136, 135 und 137.

Der Trivalinrezeptor **128** zeigte unter den gewählten Bedingungen eine starke Eigenfluoreszenz, so dass die Werte korrigiert werden mussten. Dennoch beschleunigte die Anwesenheit einer Konzentration von 1 mM dieses Rezeptors die Bildung von Fibrillen. Bei einer Reduzierung der Konzentration des Rezeptors auf 100  $\mu$ M konnte kein Effekt auf die Bildung der Fibrillen festgestellt werden.

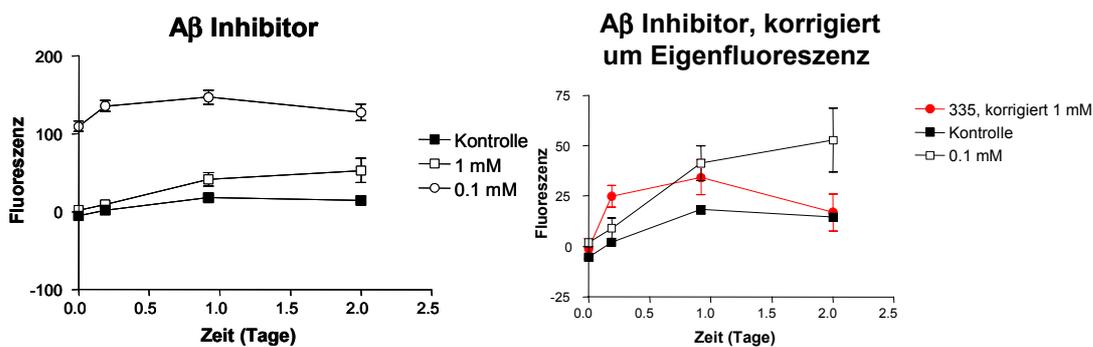


Abbildung 3.45: Thioflavin T Assay von **128** mit A $\beta$  korrigiert um die Eigenfluoreszenz von **128**.

Nach der sechs Tage dauernden Versuchsreihe wurden die Fibrillen mit dem oben beschriebenen Kongorot Test quantitativ bestimmt. Die Rezeptoren **136**, **135** und **137** verminderten die Fibrillenbildung bei einer Rezeptorkonzentration von 1 mM um 80 bis 95 % (**137**). Bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M wurde für **135** eine Reduktion der Fibrillen um 40 % beobachtet, bei **137** konnte keine Reduktion gegenüber der Aggregation von A $\beta$  beobachtet werden. Überraschenderweise verminderte **136** bei einer Konzentration von 100  $\mu$ m die Bildung von Fibrillen um 95 %. Demgegenüber verstärkte der Trivalinrezeptor

**128** die Bildung von Fibrillen bei einer Konzentration von 1 mM. die Menge an durch Kongorot gefärbten Proteinablagerungen nahm um 170 % zu.

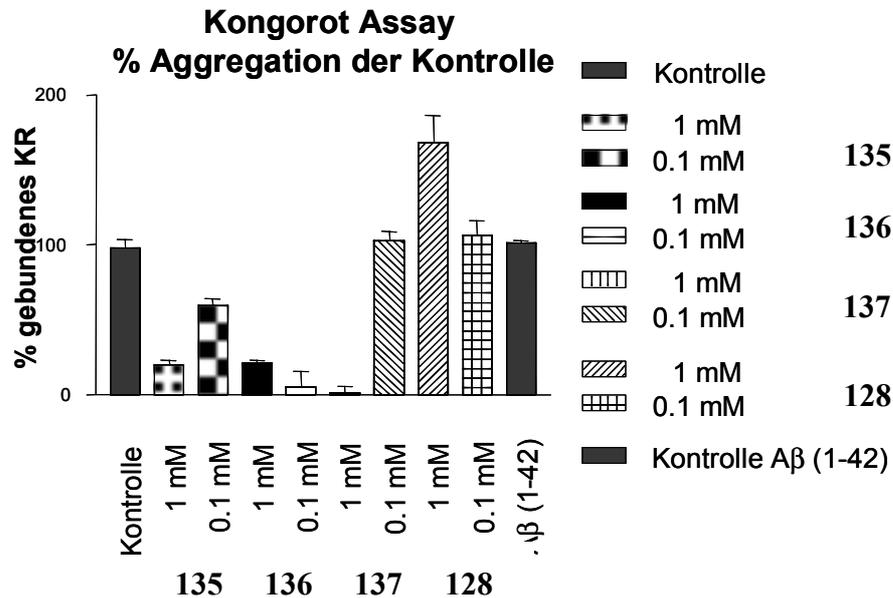
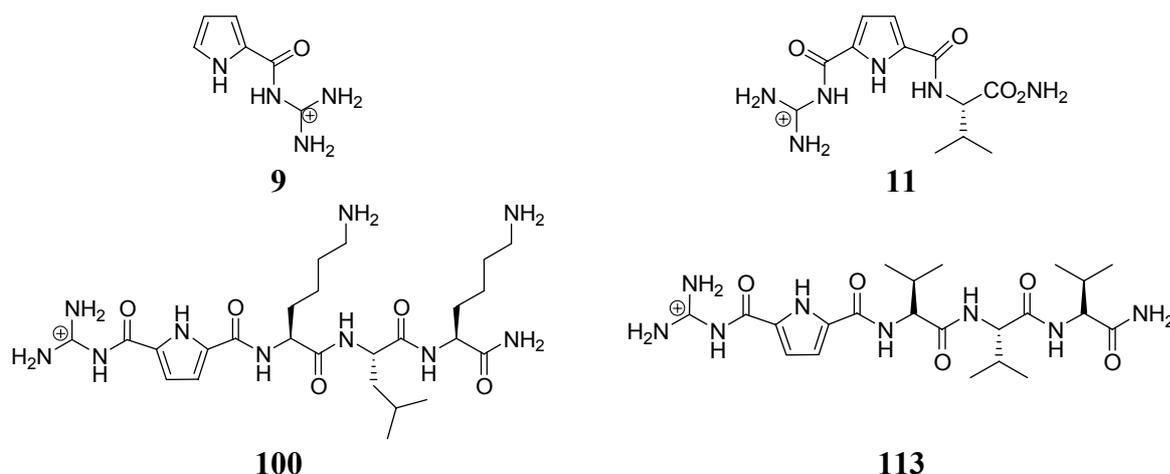


Abbildung 3.46: Balkendiagramm der Ergebnisse des Kongorot Assays zur Bestimmung der Menge an Fibrillen nach einer 6 Tage dauernden Inkubierung..

Die Untersuchungen zeigen, dass alle vier Rezeptoren mit Aβ wechselwirken. Es kann zwischen einer kinetischen Beeinflussung und einer Verminderung der Fibrillenbildung unterschieden werden. Während der Thioflavin T Assay die Kinetik der Fibrillenbildung betrachtet, wird bei dem Kongorot Assay die Menge der Fibrillen quantifiziert. Der Rezeptor **135** zeigte eine verzögernde Wirkung auf die Bildung und eine quantitative Verminderung der Fibrillen sowohl bei einer Konzentration von 1 mM, wie auch bei 0.1 mmol. Der Rezeptor **136** zeigt nur bei der hohen Konzentration eine deutliche Verlangsamung der Fibrillen, ist aber offensichtlich ein sehr effizienter Inhibitor für die quantitative Bildung der Ablagerungen. Der triethylenglykolsubstituierte Trivalinrezeptor **128** beschleunigte die Bildung der Aggregate gegenüber dem Blindversuch. Bei diesem Rezeptor scheint aber das Vorhandensein der Triethylenglykolseitenkette die Inhibitoreigenschaften deutlich zu verändern. Die Mechanismen der Inhibierung oder Beschleunigung der Fibrillenbildung sind jedoch weiterhin unklar.

Nach diesen ersten vielversprechenden Ergebnissen wurden die vier Rezeptoren noch gegen das um zwei Aminosäuren kürzere Amyloid Protein Aβ (1-40) getestet, das deutlich weniger zur Selbstaggregation neigt als Aβ (1-42). Die Ergebnisse aus diesem Assay würden Rückschlüsse auf den Wirkort der Rezeptoren zulassen. Darüber hinaus wurden noch weitere Rezeptoren (**113** und **100**) und Vorstufen, wie z. B. das einfache Guanidiniocarbonylpyrrol **9** und das valinsubstituierte Guanidiniocarbonylpyrrol **11** auf ihre Fähigkeit getestet, die Fibrillenbildung der Amyloid Proteine Aβ (1-40) und Aβ (1-42) zu verzögern. Mit Hilfe des

Guanidiniocarbonylpyrrols **9** konnte getestet werden, inwiefern das Guanidiniummotiv für die Verzögerung der Fibrillenbildung benötigt wird. Das valinsubstituierte Guanidiniocarbonylpyrrol **11** stellt eine Zwischenstufe zwischen dem einfachen Guanidiniocarbonylpyrrol **9** und den tripeptidischen Rezeptoren dar. Der Rezeptor **113** ist, abgesehen von der fehlenden Triethylenglykolkette identisch mit dem Rezeptor **128**, so dass Unterschiede in der Aktivität bei diesem Assay ausschließlich auf die Triethylenglykolseitenkette zurückzuführen wären. Die Guanidiniocarbonylpyrrol-Verbindung **100** ist dem Rezeptor **136** sehr ähnlich, so dass hier auch ähnliche Ergebnisse erwartet werden.



In der zweiten Versuchsreihe mit dem Amyloid Protein A $\beta$  (1-42) zeigte sich, dass keiner der vier Rezeptoren **9**, **11**, **100** und **113** in dem Thioflavin T Assay eine Verzögerung der Fibrillenbildung verursachte, weder bei einer Konzentration von 1.0 mmol noch bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M. Auch bei der abschließenden Quantifizierung der gebildeten Fibrillen konnte keine Verminderung der Fibrillen gegenüber der Blindprobe gemessen werden. Allerdings zeigte das Pyrrol **9** bei dem Kongorot Assay eine vollständige Inhibierung der Bindung der Fibrillen, sowohl bei einer Konzentration von 1 mM, als auch bei 0.1 mM. Dies lässt auf eine spezifische Wechselwirkung des Guanidiniocarbonylpyrrols mit dem Farbstoff Kongorot schließen.

Für das Amyloid Protein A $\beta$  (1-40) musste die Konzentration des Peptids aufgrund der benötigten kritischen Konzentration für die Nukleationsbildung von 33  $\mu$ M für A $\beta$  (1-42) auf 100  $\mu$ M heraufgesetzt werden. Es wurden sowohl die Rezeptoren **128**, **136**, **135** und **137**, als auch die Substanzen **9**, **11**, **113** und **100** in dem Thioflavin T Assay und dem Kongorot Assay eingesetzt. Sieben von acht Substanzen beeinflussten die mittels Thioflavin T Assays bestimmte Bildung der Fibrillen von A $\beta$  (1-40) nicht, unabhängig in welcher Konzentration die Substanzen vorlagen. Eine Ausnahme bildete jedoch der Rezeptor **128**. Hier wurde unter den Versuchsbedingungen wiederum eine Verstärkung der Aggregation, wie auch schon bei A $\beta$  (1-42) festgestellt. Bei der abschließenden quantitativen Bestimmung der gebildeten

Fibrillen aus A $\beta$  (1-40) mit Hilfe des Kongorot Assay wurde beobachtet, dass das einfache Guanidiniocarbonyl **9** die Kongorot Bindung vollständig inhibierte. Der Trivalinrezeptor mit Triethylenglykolketten **128** führte zu einer starken Stimulation der Kongorot Bindung (+340 % bei 1 mM, +50 % bei 0.1 mM). Lediglich der Rezeptor **137** zeigte eine starke Reduktion der Kongorot Bindung bei 1 mM (-95 %). Der Effekt war auch noch bei 0.1 mM zu beobachten, mit einer Verminderung um 39 % jedoch deutlich weniger ausgeprägt.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das einfache Guanidiniocarbonylpyrrol **9** nicht ausreicht, um die Fibrillenbildung zu verzögern. Die Verminderung der Fibrillenbildung aus dem Kongorotassay scheint ausschließlich auf einer Wechselwirkung mit dem Farbstoff zu beruhen. Das Guanidiniocarbonylpyrrol **9** zeigt wahrscheinlich eine stärkere Affinität zu dem Farbstoff als zu dem Protein. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus dem Thioflavin T Assay, da **9** hier keinen Effekt zeigte. Vergleicht man die beiden Trivalinrezeptoren **128** und **113** miteinander, die sich ausschließlich durch das Vorhandensein einer Triethylenglykolkette bei **128** unterscheiden, erkennt man, dass **128** sowohl bei A $\beta$  (1-42), als auch bei A $\beta$  (1-40) zu einer beschleunigten Bildung von Fibrillen bei dem Thioflavin T Assay neigt. Der einfache Trivalinrezeptor **113** zeigt hier keinen Effekt. Die Beobachtungen konnten bei dem Kongorot Assay gemacht werden, der einfache Trivalinrezeptor **128** zeigte keinen Effekt. Der hydrophilere Rezeptor **128** führte zu einer vermehrten Bildung von Fibrillen. Die Wechselwirkung zwischen Protein und Rezeptor, die zu einer vermehrten Bildung von Fibrillen führt, stammt offensichtlich ausschließlich von der Interaktion des Triethylenglykollinkers mit dem Amyloid-Protein. Bei dem Test der acht Substanzen gegen die beiden Amyloid-Proteine A $\beta$  (1-42) und A $\beta$  (1-40) gab es nur einen Rezeptor (**137**), der die Menge an entstandenen Fibrillen im Vergleich zur Kontrolle herabsetzte, alle anderen Substanzen erwiesen sich als inaktiv. Im Vergleich zu A $\beta$  (1-42) inhibierten die getesteten Rezeptoren die Fibrillenbildung deutlich schlechter. Dies lässt zwei Schlussfolgerungen zu. Zum einen kann darauf geschlossen werden, dass der Wirkort der Substanzen tatsächlich der C-Terminus des Amyloid Proteins A $\beta$  (1-42) ist, so dass die Auswirkungen auf A $\beta$  (1-40) geringer ausfallen. Zum anderen zeigte sich, dass die Hydrophilie der getesteten Rezeptoren mit der Fähigkeit die Fibrillenbildung zu verzögern korreliert. Während die aliphatischen Seitenketten bei **11**, **128** und **113** keinen oder sogar einen beschleunigenden Effekt auf den Nukleationsprozess hatten, inhibierten die hydrophileren Sequenzen **136**, **135** und **137** die Fibrillenbildung signifikant. Etwas aus dem Rahmen fällt CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys **100**, das für keines der beiden Proteine einen Effekt zeigte, obwohl es strukturell sehr ähnlich zu **136** ist. Allerdings waren die Bedingungen für die Assays bei den Proteinen A $\beta$  (1-42) und A $\beta$  (1-40) nicht identisch, da für A $\beta$  (1-40) eine dreifach höhere Konzentration benötigt wurde als für A $\beta$  (1-42). Vergleichbar sind deshalb die Ergebnisse bei einer Konzentration von 0.1 mM bei den Tests gegen A $\beta$  (1-42) und der höheren Konzentration von 1 mM bei den Tests gegen A $\beta$  (1-40). Zieht man nur diese Ergebnisse in Betracht, zeigt sich eine deutliche Inhibierung der Fibrillenbildung (sowohl

kinetisch, als auch quantitativ) bei den Rezeptoren **135** und **136** für A $\beta$  (1-42), wogegen außer **137** keine der getesteten Substanzen einen inhibierenden Effekt auf A $\beta$  (1-40) besitzt. Dies lässt auf den C-Terminus des Amyloid Proteins A $\beta$  (1-42) als Wirkort für die Inhibierung schließen. Es ist möglich, mit einfachen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren den Nukleationsprozess bei der Ablagerung von Amyloid Proteinen zu verzögern und auch quantitativ die Menge an gebildeten Fibrillen zu verringern. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass gerade polykationische Rezeptoren die Fibrillenbildung deutlich effektiver inhibieren als neutrale oder einfach geladene Rezeptoren. Die hier entwickelten Rezeptoren zur Inhibierung der Bildung von Fibrillen arbeiten ebenfalls im mikromolaren Bereich, wie die Oligopeptide, die *Soto* als „ $\beta$ -Sheet-breaker“ bezeichnet hat. <sup>[134-137]</sup> Weiterhin hat *Soto* Pentapeptide (Ac-LPFFD) synthetisiert, die *in vitro* ähnlich effektiv wie die hier getesteten Rezeptoren waren. Zusätzlich wurde dort aber auch eine *in vivo* Aktivität festgestellt, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Eine ähnliche Strategie, die auf die Erkennungssequenz der Aminosäuren 16-20 des Amyloid Proteins abzielt (vgl. Abschnitt 2.1.1), verfolgte *Kiessling*, die ebenfalls Oligopeptide synthetisierte, die die Erkennungssequenz KLVFF enthielten. <sup>[47, 138]</sup> Die von *Kiessling* erhaltenen Ergebnisse stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den hier erhaltenen, da sie feststellte, dass polykationische Oligopeptide sowohl die Bildung von Fibrillen hemmen als auch die Neurotoxizität von A $\beta$  verringern.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden, ausgehend von einer kombinatorischen Rezeptorbibliothek, effektive Rezeptoren für ein Alzheimer Modellpeptid gefunden und auf fester Phase und in Lösung auf Bindungseigenschaften untersucht. Die dabei getesteten Rezeptoren zeigten sogar eine *in vitro* Aktivität bei der Verzögerung und der Verminderung von Amyloid Plaques des Alzheimer Proteins A $\beta$  (1-42). Diese Rezeptoren inhibierten spezifisch die Bildung von Plaques bei A $\beta$  (1-42), für die um zwei Aminosäuren verkürzte Sequenz A $\beta$  (1-40) waren sie deutlich weniger geeignet. Das lässt auf eine Wechselwirkung der Rezeptoren mit dem C-Terminus des Proteins schließen.

### 3.3 Entschützung der Bibliothek

Nachdem erfolgreich die 512 Mitglieder umfassende Bibliothek gegen das Alzheimer Modellpeptid auf Bindungseigenschaften sowohl in Methanol als auch in Wasser getestet wurde, sollte die gleiche Bibliothek ohne Schutzgruppen auf ihre Bindungsaktivität gegenüber zwei weiteren Liganden getestet werden. Zum einen das, gegenüber dem Alzheimer Modellpeptid deutlich polarere D-Glu-D-Lys-D-Ala-D-Ala-OH, das eine zentrale Rolle bei der Quervernetzung von Peptidoglycanschichten in Bakterien spielt, und zum anderen dessen inverses Peptid D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Glu-OH, um die Bibliothek auf Sequenzselektivität zu prüfen. Ein Screening der Bibliothek ohne Schutzgruppen gegenüber diesen beiden Liganden scheint aufgrund der Polarität der Liganden Erfolg versprechender, da polare und im Besonderen ionische Wechselwirkungen eine wichtigere Rolle spielen sollten. Innerhalb der Bibliothek lagen mit den Aminosäuren Lysin, Tyrosin, Serin und Glutaminsäure vier Aminosäuren mit drei unterschiedlichen Schutzgruppen vor. Lysin enthielt eine säurelabile Boc-Schutzgruppe, Serin und Tyrosin enthielten einen *t*-Butylether und Glutaminsäure lag als Benzylester vor. Die Entfernung der Ether- und Carbamatschutzgruppen sollte durch einfache Behandlung mit einer starken organischen Säure vollzogen werden können. Demgegenüber wird ein Benzylester klassisch durch Hydrogenolyse gespalten. Es wurde aber berichtet, dass sich Benzylester ohne die Bildung von Nebenreaktionen bei Raumtemperatur innerhalb von 16 Stunden mit einer Lösung von Bromwasserstoff (25 %) in Eisessig quantitativ in die entsprechenden Carbonsäuren überführen ließen.<sup>[139-141]</sup> Unter diesen Bedingungen werden auch die säurelabilen Carbamate und Ether sehr leicht gespalten. Für eine Testreaktion wurde Asparaginsäuredibenzylester verwendet. Die Abspaltung des  $\beta$ -Benzylesters erfolgte quantitativ innerhalb von drei Stunden, so dass eine um das doppelte verlängerte Reaktionszeit für die Abspaltung des  $\gamma$ -Benzylesters der Glutaminsäure auf der festen Phase ausreichend war. Nach der Entschützung musste das Harz noch sehr sorgfältig gewaschen werden, um noch anhaftende Essigsäure zu entfernen. Aus diesem Grunde wurde das Harz zunächst drei Mal mit Methanol, anschließend mit einer 5:1 Mischung aus Methanol und einer 100 mmol/L Lösung aus Natriumcarbonat in Wasser, dann wieder zwei Mal mit Methanol, dass 5 mmol/L BisTris Puffer enthielt und zum Abschluss noch zwei Mal mit Methanol gewaschen.

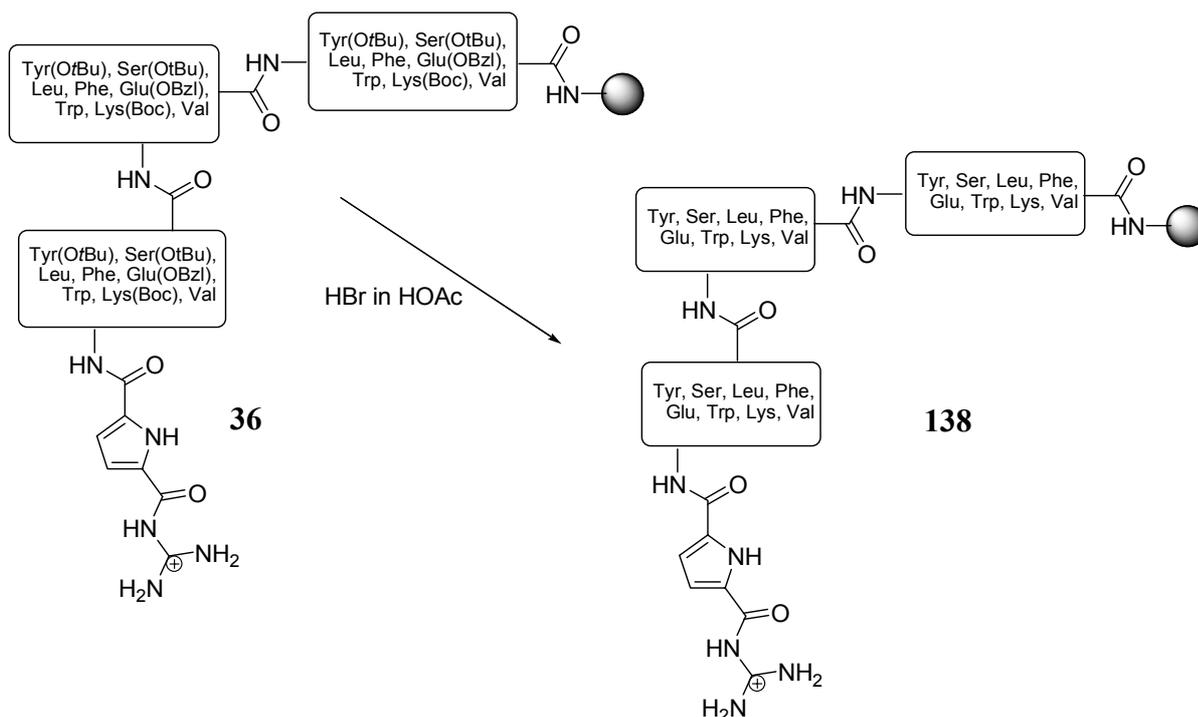


Abbildung 3.47: Entfernung der Schutzgruppen der Bibliothek durch Behandlung der Rezeptoren mit Bromwasserstoff in Eisessig.

Mit dieser nun entschützten Bibliothek wurde ein Screening gegen den Liganden, der den C-terminalen Teil des Glycopeptids *Gram* positiver Bakterien repräsentiert, durchgeführt. Zusätzlich sollte noch die inverse Sequenz auf Bindungseigenschaften getestet werden. Für dieses Screening mussten jedoch geeignete Liganden synthetisiert werden, mit denen eine quantitative Bestimmung des Assoziationsverhaltens möglich ist.

### 3.4 Bestimmung von Bindungskonstanten für das Peptidoglycan Modellpeptid

#### 3.4.1 Screening in Wasser

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich fluoreszenzmarkierte Peptide mit Glykollinker wie **65** leicht über eine Festphasensynthese synthetisieren ließen, wurden nach der gleichen Vorgehensweise die Liganden **139** und **140** synthetisiert. Um sicherzustellen, dass die Tetrapeptide eine ausreichende Löslichkeit in Wasser besitzen, wurde auch hier Triethylenglykol als polarer, wasserlöslicher Spacer eingesetzt. Ausgehend von Wang Harz wurde zunächst das Tetrapeptid an die feste Phase gebracht, anschließend die freie Aminofunktion mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt und die entstandene Carbonsäure mit dem Diaminotriethylenglykol **193** gekuppelt, so dass im letzten Schritt das Fluoreszenzlabel Dansylchlorid **38** eingeführt werden konnte. Durch Behandeln des Harzes mit einer 1:1 Mischung aus Dichlormethan und Trifluoressigsäure konnten die fluoreszenzmarkierten

Peptide vom Harz abgespalten werden. Anschließend wurde das Trifluoracetatsalz drei Mal in einer 0.01 N Salzsäure gelöst und lyophilisiert, um das Hydrochloridsalz zu erhalten. Man erhielt so grünlich weiße, leicht hygroskopische Feststoffe in guten Ausbeuten (83 % bzw. 89 %).

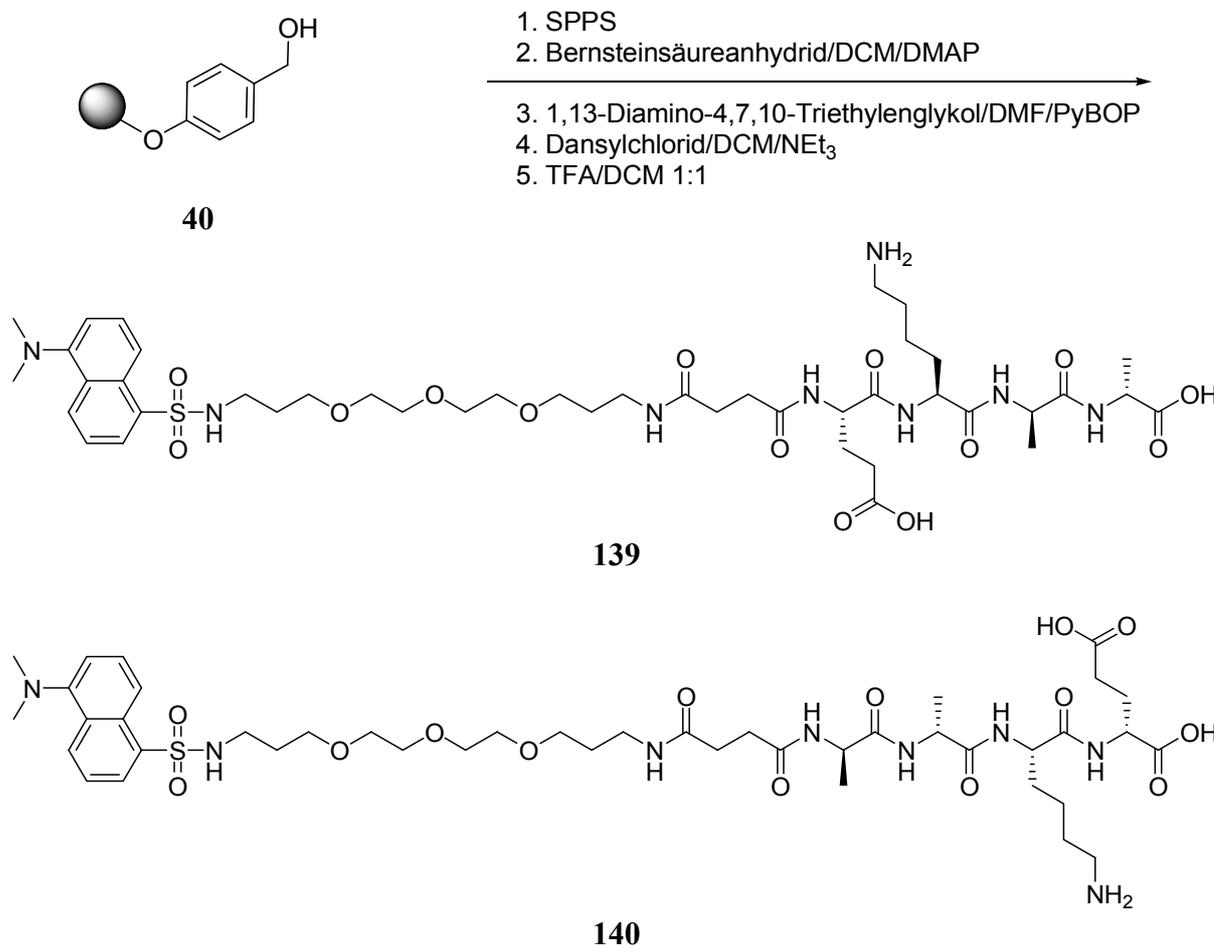


Abbildung 3.48: Synthese der fluoreszenzmarkierten Tetrapeptide **139** und **140** auf Wang-Harz

Das Screening der Bibliothek mit den beiden polaren Liganden **139** und **140** erfolgte in reinem Wasser mit einem BisTris Puffer unter ähnlichen Bedingungen wie bei dem zuvor beschriebenen Screening gegen das Alzheimer Modellpeptid. Zunächst wurden für das Tetrapeptid **139** Voruntersuchungen durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für die quantitative Bestimmung von Bindungskonstanten zu ermitteln. Für das Vorscreening wurde eine 5  $\mu$ M Lösung des fluoreszenzmarkierten Peptids **139** in Wasser mit 20  $\mu$ M Puffer und einem pH-Wert von 6.0 hergestellt. Von jedem Mitglied der Rezeptorbibliothek **138** wurden einige Harzkügelchen entnommen, so dass die gesamte Bibliothek auf Bindungseigenschaften getestet werden konnte. Etwa 100 mg des Harzes (etwa 10<sup>3</sup> Harzkügelchen) wurden für 20 Stunden mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid inkubiert, anschließend mit Wasser

gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Dabei konnte man deutlich Unterschiede in der Fluoreszenzaktivität innerhalb der 512 Mitglieder umfassenden Bibliothek beobachten. Selbst diese geringe Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Peptid reichte aus, um Selektivitätsunterschiede zu erkennen.

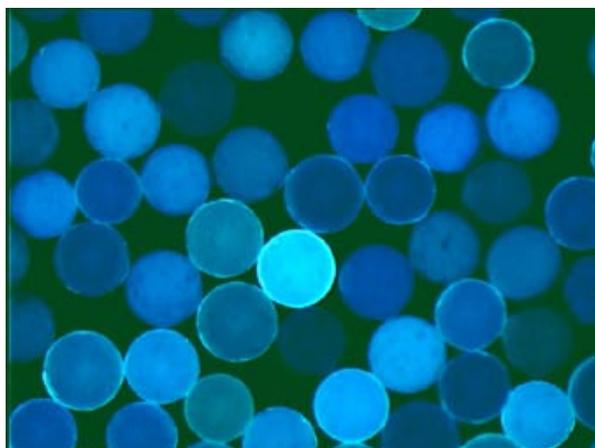
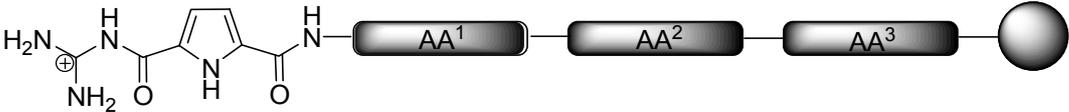


Abbildung 3.49: Fluoreszenzspektroskopische Aufnahme des qualitativen Screenings des inversen Liganden **139** gegen die entschützte Bibliothek **138**.

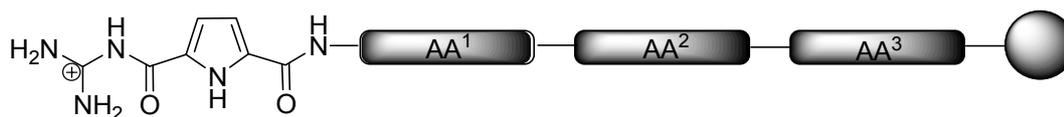
Nach diesen erfolgreichen Vorversuchen wurde die gesamte Bibliothek zunächst gegen das fluoreszenzmarkierte Tetrapeptid Dansyl-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **139** auf Bindungseigenschaften getestet. Dazu wurde eine Stammlösung aus dem Tetrapeptid ( $39\ \mu\text{M}$ ) in einem BisTris Puffer ( $400\ \mu\text{M}$ ) bei einem pH-Wert von 5.9 hergestellt und jedes isolierte Mitglied der Rezeptorbibliothek mit 2 mL der Stammlösung für 20 Stunden inkubiert. Die Fluoreszenz der Lösung wurde nach der Inkubierung durch Entnahme von  $200\ \mu\text{L}$  der überstehenden Lösung mit Hilfe eines *Tecan Spectra Fluor Plus* HTS Geräts in Multititerplatten bestimmt. Durch eine zuvor durchgeführte Kalibrierung des HTS Geräts konnten aus der Fluoreszenzintensität alle Konzentrationen berechnet werden, die für eine Bestimmung der Assoziationskonstanten nach Gleichung (3.1) notwendig sind. Innerhalb der Rezeptorbibliothek variierten die Bindungskonstanten von etwa  $20\ \text{M}^{-1}$  für die schlechtesten Rezeptoren bis hin zu  $15000\ \text{M}^{-1}$  für die besten Rezeptoren. Das bedeutet einen Faktor von über 700! Für eine Bibliothek, die nur eine moderate Größe dafür aber eine große Diversität besitzt, eine sehr starke Differenzierung der Bindungskonstanten. Innerhalb der Bibliothek zeigten sich einige Tendenzen, die gute und schlechte Rezeptoren auszeichneten. Anhand der Tabelle kann man erkennen, dass polykationische Rezeptoren für eine starke Bindung besser geeignet sind (6 der besten 9 Rezeptoren enthalten zwei Lysine an Position AA<sup>1</sup> und AA<sup>2</sup>) als ungeladene oder Rezeptoren mit einer formal einfach negativen Ladung. Eine Lysinseitenkette in Position AA<sup>1</sup> tritt in 13 von 15 gut bindenden Rezeptoren auf. Diese guten Bindungseigenschaften könnten mit einer zusätzlichen Stabilisierung der Guanidiniumkation-Carboxylat Wechselwirkung durch ein Lysinkation erklärt werden, analog zu dem trikationischen Rezeptor **66** (vgl. Abbildung 3.20) bei der Komplexierung des Alzheimer

Modellpeptids. Auffällig ist auch hier, dass Rezeptoren, die eine Glutaminsäure an beliebiger Position enthalten, kaum Bindungsaktivität zeigen. Die strukturell nur an Position AA<sup>2</sup> unterschiedlichen Rezeptoren **143** und **164** zeigen den Einfluss eines kationischen Lysins und einer anionischen Glutaminsäure besonders deutlich, während der zweifach positiv geladene Rezeptor **143** eine Bindungskonstante von etwa 15000 M<sup>-1</sup> gegen das Tetrapeptid **139** aufweist zeigt der formal neutral geladene Rezeptor **164** nur eine Bindungskonstante von 130 M<sup>-1</sup>, eine Abnahme der Bindungsaktivität um den Faktor 100 bei einem Austausch einer Aminosäure! Demgegenüber bleibt die Bindungskonstante unverändert, wenn man ein Lysin an Position AA<sup>3</sup> gegen ein Leucin austauscht (**66** gegen **152**). Im Falle eines Austausch von einem Lysin gegen ein Tyrosin nimmt die Bindungskonstante sogar von 5900 auf 12300 M<sup>-1</sup> zu (**147** verglichen mit **154**). Führt man den Austausch eines Lysins gegen ein Leucin an Position AA<sup>1</sup> durch, sinkt die Bindungskonstante von 7900 auf 5400 M<sup>-1</sup> (**66** verglichen mit **155**). Hier wird deutlich, dass die Aminosäure an Position AA<sup>1</sup> generell einen größeren Einfluss hat als an Position AA<sup>3</sup>. Einen Abfall der Bindungskonstante von 10000 M<sup>-1</sup> auf 5300 M<sup>-1</sup> beobachtet man bei dem Austausch eines Lysins gegen einen Glutaminsäurerest (**150** verglichen mit **156**). Rezeptoren, die ausschließlich aliphatische und aromatische Aminosäuren enthalten, befinden sich weder bei den besonders guten, noch bei den besonders schlechten Rezeptoren, darüber hinaus hat es kaum einen Einfluss, an welcher Position sich protische oder aliphatische Seitenketten befinden. Ionische Wechselwirkungen spielen bei der Erkennung des polaren Liganden **139** eine deutlich größere Rolle als hydrophobe Wechselwirkungen.

Tabelle 3.3: Bestimmung der Bindungskonstanten der 512 Mitglieder umfassenden Rezeptorbibliothek **138** gegen das dansylierte Tetrapeptid **139** (39  $\mu$ M mit 400  $\mu$ M BisTris Puffer und) bei pH 5.9, dargestellt sind einige ausgewählte gute und schlechte Rezeptoren.



<b>141</b>	CBS	Lys	Lys	Phe	17120 M <sup>-1</sup>
<b>142</b>	CBS	Lys	Lys	Leu	15340 M <sup>-1</sup>
<b>143</b>	CBS	Lys	Lys	Glu	15340 M <sup>-1</sup>
<b>144</b>	CBS	Lys	Ser	Lys	13210 M <sup>-1</sup>
<b>145</b>	CBS	Lys	Phe	Lys	12860 M <sup>-1</sup>
<b>146</b>	CBS	Lys	Lys	Ser	12680 M <sup>-1</sup>
<b>147</b>	CBS	Lys	Tyr	Tyr	12320 M <sup>-1</sup>
<b>148</b>	CBS	Lys	Lys	Lys	12000 M <sup>-1</sup>
<b>149</b>	CBS	Lys	Lys	Val	11500 M <sup>-1</sup>

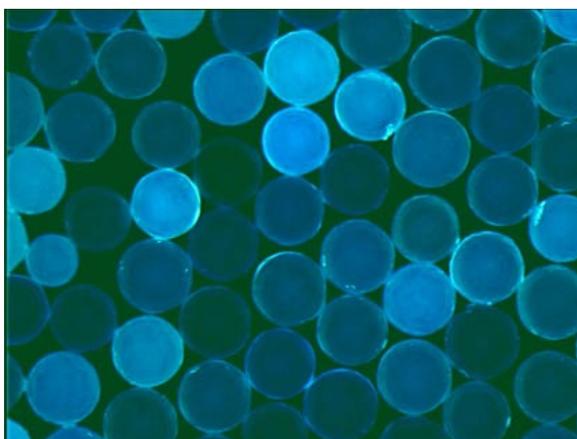


150	CBS	Leu	Trp	Lys	10000 M <sup>-1</sup>
151	CBS	Lys	Leu	Phe	8800 M <sup>-1</sup>
66	CBS	Lys	Leu	Lys	7860 M <sup>-1</sup>
152	CBS	Lys	Leu	Leu	7600 M <sup>-1</sup>
153	CBS	Phe	Lys	Lys	6200 M <sup>-1</sup>
154	CBS	Lys	Tyr	Lys	5860 M <sup>-1</sup>
155	CBS	Leu	Leu	Lys	5390 M <sup>-1</sup>
156	CBS	Leu	Trp	Glu	5310 M <sup>-1</sup>
157	CBS	Phe	Glu	Lys	1570 M <sup>-1</sup>
158	CBS	Glu	Glu	Lys	690 M <sup>-1</sup>
159	CBS	Val	Phe	Phe	660 M <sup>-1</sup>
160	CBS	Leu	Val	Lys	540 M <sup>-1</sup>
161	CBS	Val	Tyr	Val	310 M <sup>-1</sup>
162	CBS	Trp	Glu	Tyr	270 M <sup>-1</sup>
163	CBS	Val	Glu	Phe	200 M <sup>-1</sup>
164	CBS	Lys	Glu	Glu	130 M <sup>-1</sup>
165	CBS	Glu	Glu	Leu	115 M <sup>-1</sup>
166	CBS	Glu	Trp	Val	100 M <sup>-1</sup>
167	CBS	Phe	Trp	Glu	70 M <sup>-1</sup>
168	CBS	Glu	Ser	Phe	60 M <sup>-1</sup>
169	CBS	Val	Trp	Glu	50 M <sup>-1</sup>
170	CBS	Glu	Tyr	Glu	25 M <sup>-1</sup>
171	CBS	Ser	Glu	Tyr	20 M <sup>-1</sup>
172	CBS	Tyr	Tyr	Glu	1 M <sup>-1</sup>

Mit diesem Screening auf Bindungseigenschaften konnte gezeigt werden, dass peptidische Rezeptoren auf der Basis eines Guanidiniocarbonylpyrrols als Carboxylat-Bindungsstelle sehr geeignet dafür sind, Peptide in hochpolaren Lösemitteln selektiv mit guten Bindungskonstanten zu erkennen. Es stellte sich aber auch die Frage, ob Peptide auch sequenzselektiv erkannt werden können. Zu diesem Zweck wurde die inverse Sequenz **140** des biologisch wichtigen Tetrapeptids **139** synthetisiert. Es konnte davon ausgegangen

werden, dass dieses Peptid ebenfalls von einigen Mitgliedern der Bibliothek mit guten Bindungskonstanten gebunden wird. Wichtig sind in diesem Zusammenhang die Unterschiede der Bindungskonstanten bei identischen Rezeptoren, die Rückschlüsse auf die sequenzselektive Erkennung von Peptiden zulassen.

Für das Vorscreening des Liganden **140** gegen die Rezeptorbibliothek **138** wurde eine 5  $\mu\text{M}$  Lösung des fluoreszenzmarkierten Peptids **140** in Wasser mit 20  $\mu\text{M}$  Puffer und einem pH-Wert von 6.0 hergestellt und mit der Bibliothek für 20 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Harzkügelchen einmal mit Wasser gewaschen, um lose anhaftenden Fluoreszenzmarker zu entfernen. Eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit dem Liganden **140** inkubierten Bibliothek zeigte deutliche Unterschiede in der Fluoreszenzintensität. Für den inversen Liganden **140** existierten ebenfalls gut bindende Rezeptoren

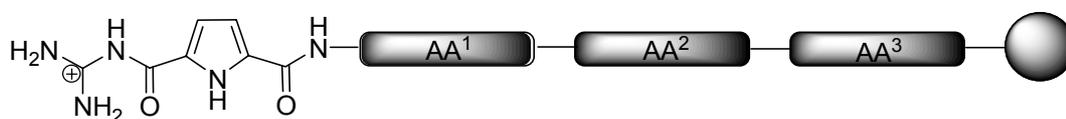


*Abbildung 3.50: Fluoreszenzspektroskopische Aufnahme des qualitativen Screenings des inversen Liganden **140** gegen die entschützte Bibliothek **138**.*

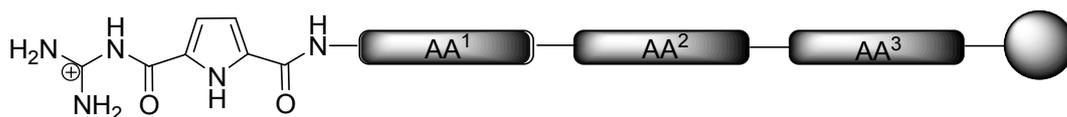
Das Screening wurde analog zu den vorangehenden durchgeführt. Es wurde eine Stammlösung des fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids (38.4  $\mu\text{M}$ ) in einem BisTris Puffer (410  $\mu\text{M}$ ) mit einem pH-Wert von 6.2 hergestellt und jedes Mitglied der Bibliothek für 18 Stunden mit je 2 mL der Stammlösung inkubiert. Durch eine Messung der Fluoreszenzintensität vor und nach der Inkubierung und einen Vergleich mit einer zuvor aufgenommenen Eichgerade konnten die Bindungskonstanten für die Wechselwirkung zwischen dem Liganden **140** und der entschützten Bibliothek **138** bestimmt werden. Die Bindungskonstanten zu dem inversen Liganden **140** lagen deutlich niedriger als die Bindungskonstanten, die für das „richtige“ Peptid **139** bestimmt wurden. Die Bindungskonstanten nahezu aller Mitglieder der Bibliothek nahmen um etwa  $\frac{2}{3}$  ab, bezogen auf die Ergebnisse des vorherigen Screenings. Einige strukturelle Besonderheiten, die bei dem quantitativen Screening auf Bindungseigenschaften entdeckt wurden, werden etwas genauer beleuchtet. Befindet sich in Position AA<sup>1</sup> und AA<sup>2</sup> jeweils ein Lysin, wird die Bindungskonstante durch einen aliphatischen Rest in Position AA<sup>3</sup> wie Phenylalanin, Leucin

und Valin kaum beeinflusst (**141**, **142** und **148**). Interessanterweise steigt die Bindungskonstante bei einem Austausch von Lysin gegen Glutaminsäure an Position AA<sup>3</sup> (**143** verglichen mit **148**) von 4300 M<sup>-1</sup> auf 5720 M<sup>-1</sup> an, entgegen dem Trend der Abnahme der Bindungskonstante beim Einbau von Glutaminsäure. Demgegenüber steht eine deutliche Zunahme der Bindungskonstante bei Austausch von Tyrosin gegen Lysin an Position AA<sup>3</sup> (**147** und **154**) von 3330 M<sup>-1</sup> auf 4490 M<sup>-1</sup>.

*Tabelle 3.4: Bestimmung der Bindungskonstanten der 512 Mitglieder umfassenden Rezeptorbibliothek **138** gegen das dansylierte Tetrapeptid **140** (38.4 μM mit 410 μM BisTris Puffer und) bei pH 6.2. Dargestellt sind die Bindungskonstanten der gleichen Sequenzen, die auch für das vorhergehende Screening gezeigt wurden.*



<b>141</b>	CBS	Lys	Lys	Phe	4790 M <sup>-1</sup>
<b>142</b>	CBS	Lys	Lys	Leu	5590 M <sup>-1</sup>
<b>143</b>	CBS	Lys	Lys	Glu	5720 M <sup>-1</sup>
<b>144</b>	CBS	Lys	Ser	Lys	5700 M <sup>-1</sup>
<b>145</b>	CBS	Lys	Phe	Lys	5990 M <sup>-1</sup>
<b>147</b>	CBS	Lys	Tyr	Tyr	3330 M <sup>-1</sup>
<b>148</b>	CBS	Lys	Lys	Lys	4300 M <sup>-1</sup>
<b>149</b>	CBS	Lys	Lys	Val	5490 M <sup>-1</sup>
<b>150</b>	CBS	Leu	Trp	Lys	2930 M <sup>-1</sup>
<b>151</b>	CBS	Lys	Leu	Phe	2690 M <sup>-1</sup>
<b>66</b>	CBS	Lys	Leu	Lys	3350 M <sup>-1</sup>
<b>152</b>	CBS	Lys	Leu	Leu	3140 M <sup>-1</sup>
<b>153</b>	CBS	Phe	Lys	Lys	2790 M <sup>-1</sup>
<b>154</b>	CBS	Lys	Tyr	Lys	4490 M <sup>-1</sup>
<b>155</b>	CBS	Leu	Leu	Lys	2570 M <sup>-1</sup>
<b>157</b>	CBS	Phe	Glu	Lys	504 M <sup>-1</sup>
<b>158</b>	CBS	Glu	Glu	Lys	170 M <sup>-1</sup>
<b>159</b>	CBS	Val	Phe	Phe	200 M <sup>-1</sup>
<b>161</b>	CBS	Val	Tyr	Val	140 M <sup>-1</sup>
<b>162</b>	CBS	Trp	Glu	Tyr	90 M <sup>-1</sup>



<b>163</b>	CBS	Val	Glu	Phe	110 M <sup>-1</sup>
<b>164</b>	CBS	Lys	Glu	Glu	100 M <sup>-1</sup>
<b>165</b>	CBS	Glu	Glu	Leu	120 M <sup>-1</sup>
<b>166</b>	CBS	Glu	Trp	Val	140 M <sup>-1</sup>
<b>167</b>	CBS	Phe	Trp	Glu	100 M <sup>-1</sup>
<b>168</b>	CBS	Glu	Ser	Phe	160 M <sup>-1</sup>
<b>169</b>	CBS	Val	Trp	Glu	60 M <sup>-1</sup>
<b>170</b>	CBS	Glu	Tyr	Glu	130 M <sup>-1</sup>
<b>171</b>	CBS	Ser	Glu	Tyr	30 M <sup>-1</sup>
<b>172</b>	CBS	Tyr	Tyr	Glu	20 M <sup>-1</sup>

Obwohl die Bindungskonstanten für das inverse Peptid **140**, verglichen mit dem Liganden **139** im Allgemeinen deutlich niedriger lagen, gibt es einen Rezeptor, der beide Peptide in etwa gleich gut bindet. Der Rezeptor **154** bindet das Tetrapeptid **139** mit einer Bindungskonstanten von 5860 M<sup>-1</sup> und die inverse Sequenz **140** mit 4490 M<sup>-1</sup>.

Im Anschluss an das Screening auf Bindungsaktivität wurden molekulardynamische Rechnungen durchgeführt, um einen Einblick in die molekulare Ebene des Bindungsvorgangs zu erhalten. Vor allen Dingen wurde ein Augenmerk darauf gelegt, warum der fluoreszenzmarkierte Ligand **140** deutlich schlechter gebunden wurde als der Ligand **139**. Für die Rechnungen wurde nicht das fluoreszenzmarkierte Peptid inklusive dem Triethylenglykolspacer benutzt, sondern die beiden acetylierten Tetrapeptide **173** und **174**. Zunächst wurde für diese beiden Peptide eine energieminierte Struktur (Amber\*, Wasser Solvation, 4000 Schritte) berechnet. Im Falle des Tetrapeptids Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173** kann man deutlich erkennen, dass das Lysin Kation in der Lage ist die, Carboxylatgruppe der Glutaminsäure über ein Ionenpaar zu komplexieren. Das C-terminale Carboxylat ist für eine gleichzeitige intermolekulare Komplexierung zu weit entfernt. Für die inverse Peptidsequenz Ac-D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Glu-OH **174** gestaltet es sich etwas anders. In diesem Fall sind beide Carboxylate direkt benachbart, so dass eine gleichzeitige intramolekulare Komplexierung der Carboxylate mit Wasserstoffbrückenbindungen über das Lysinkation möglich ist. Für eine intermolekulare Komplexierung muss für Ac-D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Glu-OH **174** die günstige Struktur, bei der beide Carboxylate über das Lysinkation gebunden werden, aufgebrochen werden, bevor ein externes Rezeptormolekül mit einem freien Carboxylat wechselwirken kann. Für das Tetrapeptid Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (**173**), das nur ein Carboxylat intramolekular komplexieren

kann, muss weniger Energie aufgebracht werden, um mit einem Rezeptormolekül wechselzuwirken. Dies kann ein Grund dafür sein, dass die Rezeptoren das Tetrapeptid **173** deutlich besser binden als die inverse Sequenz Ac-D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Glu-OH (**174**).

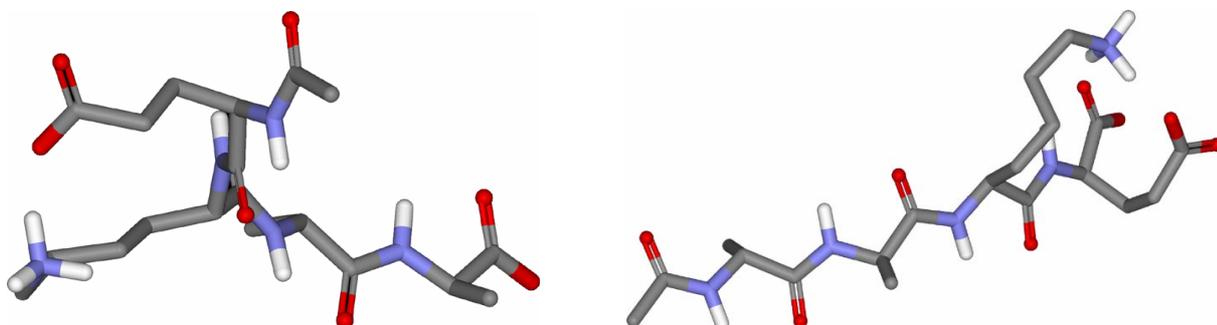


Abbildung 3.51: Berechnete Struktur (Amber\*, Wasser Solvation, Konformationsuche) der beiden tetrapeptidischen Liganden. (links) Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (**173**), das Carboxylat der Glutaminsäure wird durch das Lysin-Kation intramolekular komplexiert, das C-terminale Carboxylat liegt frei vor. (rechts) Ac-D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Glu-OH (**174**) beide Carboxylate werden durch das Lysin-Kation komplexiert. Der Übersichtlichkeit halber wurden alle unpolaren Wasserstoffe weggelassen.

Für weitere Rechnungen wurde der beste Rezeptor **135** (respektive **141**) für das Tetrapeptid **173** herangezogen und eine energieminierte Struktur für die nichtkovalenten Komplexe aus dem Rezeptor und den beiden Tetrapeptiden **173** und **174** bestimmt und anschließend verglichen. Während **135** das Tetrapeptid **173** mit einer Assoziationskonstante von  $17120 \text{ M}^{-1}$  bindet, sinkt die Bindungskonstante in dem Fluoreszenzassay gegen das Tetrapeptid **174** auf etwa  $\frac{1}{3}$  des Wertes ( $4800 \text{ M}^{-1}$ ). Aus der berechneten Struktur für den nichtkovalenten Komplex aus **135** und **173** kann man entnehmen, dass das C-terminale Carboxylat in der Bindungstasche des Guanidiniocarbonylpyrrols liegt und durch ein zusätzliches Lysin des Rezeptors stabilisiert wird. Das Carboxylat der Glutaminsäure wird intramolekular durch ein Lysin und zusätzlich intermolekular durch ein weiteres Lysin des Rezeptors über eine Salzbrücke gebunden. Das Phenylalanin spielt für die Stabilität der Wechselwirkung nur eine untergeordnete Rolle. Die Rezeptoren **141**, **142** und **143**, die sich nur durch eine Aminosäure an Position AA<sup>3</sup> unterscheiden weisen eine ähnliche Bindungskonstante wie **135** auf.

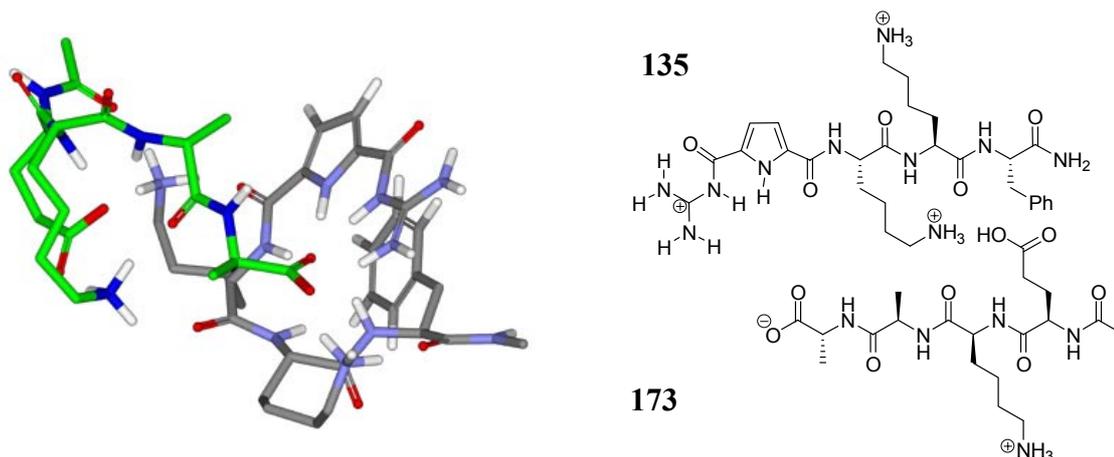


Abbildung 3.52: Berechnete Struktur des Liganden **173** mit dem Rezeptor **135**.

Berücksichtigt man nun die berechnete Struktur des inversen Peptids **174** mit dem Rezeptor **135**, ergibt sich ein etwas anderes Bild. In diesem Fall liegt die Carbonsäure der Glutaminsäure in der vom Guanidiniocarbonylpyrrol aufgespannten Bindungstasche. Stabilisiert wird die Wechselwirkung durch eine zusätzliche ionische Wechselwirkung mit einem Lysin des Rezeptors. Das C-terminale Carboxylat wird ausschließlich über eine Salzbrücke zwischen dem zweiten Lysin des Rezeptors gebunden. Das Lysin des Tetrapeptids zeigt offenbar eine Kation- $\pi$  Wechselwirkung mit dem Phenylalanin des Rezeptors. Insgesamt ist die Summe der Wechselwirkung geringer und dementsprechend eine Komplexierung weniger effizient.

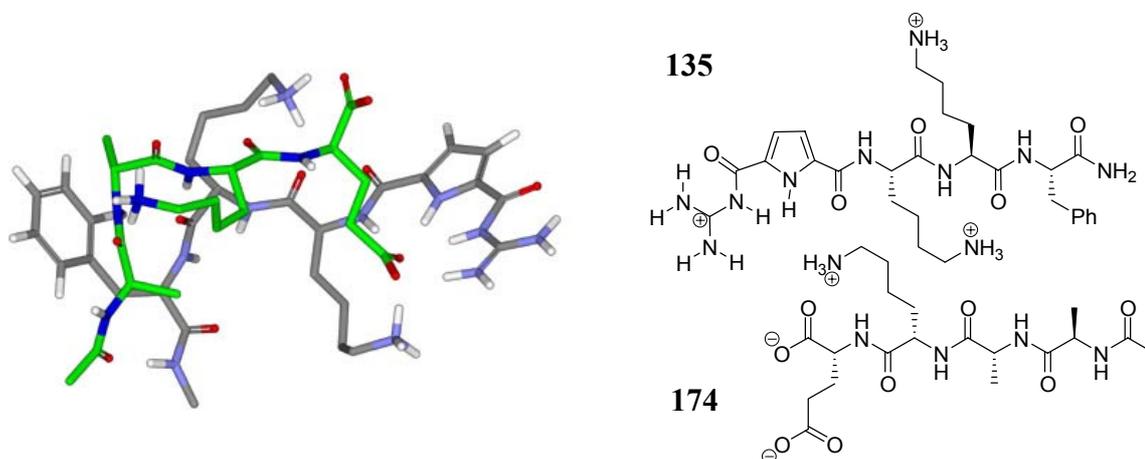


Abbildung 3.53: Berechnete Struktur des Liganden **174** mit dem Rezeptor **135**.

Zieht man die berechnete Struktur des Liganden **173** mit dem Rezeptor **136** (respektive **154**) zur Erklärung des Bindungsmodus heran, kann man erkennen, dass das C-terminale Carboxylat des Liganden in der Bindungstasche des Guanidiniocarbonylpyrrols liegt und zusätzlich durch ein Lysinkation des Rezeptors stabilisiert wird. Das Carboxylat der Glutaminsäure wird ausschließlich durch ein Lysin des Rezeptors gebunden. Die aromatische Seitenkette des Tyrosins schirmt den hydrophoben Teil des Liganden ab, die Hydroxylfunktion des Tyrosins bildet Wasserstoffbrücke mit dem Lysin des Liganden aus.

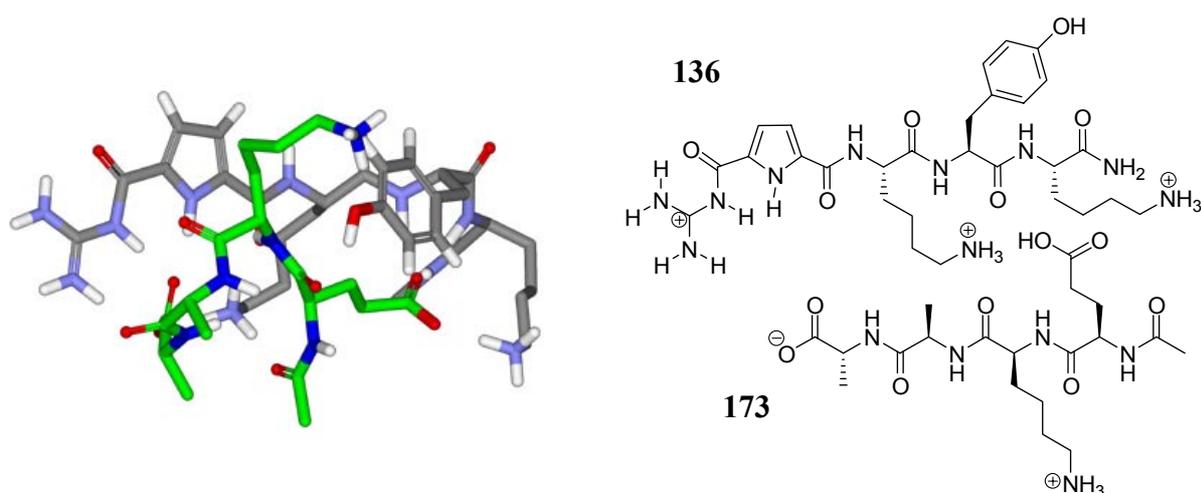


Abbildung 3.54: Berechnete Struktur des Liganden **173** mit dem Rezeptor **136**.

Vergleicht man diese Struktur mit der inversen Sequenz **174** und dem Rezeptor **136** kann man erkennen, dass in diesem Fall beide Carboxylate in der Bindungstasche liegen, die durch das Guanidiniocarbonylpyrrol aufgespannt wird. Auffällig ist, dass die Lysine des Rezeptors in diesem Fall nicht an der Komplexierung der Carboxylate beteiligt sind. Hier schirmen die polaren Reste den hydrophoben Teil des Moleküls vom Lösemittel (Wasser) ab und ermöglichen so, trotz eines anderen Bindungsmodus, eine gute Komplexierung. Dies zeigt sich auch in den ähnlichen Bindungskonstanten an der festen Phase für die Liganden **173** und **174** mit  $5860 \text{ M}^{-1}$  bzw.  $4490 \text{ M}^{-1}$ .

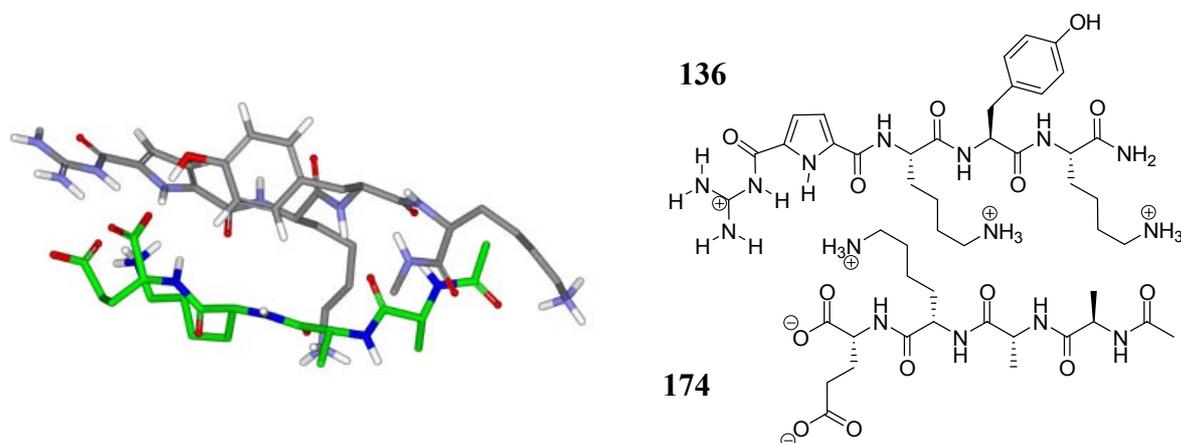


Abbildung 3.55: Berechnete Struktur des Liganden **174** mit dem Rezeptor **136**.

Die molekulardynamischen Rechnungen der Rezeptor-Ligand-Komplexe zusammen mit den experimentellen Ergebnissen des Festphasenassays zeigten, dass für diese Rezeptorklasse ionische Wechselwirkungen mit den Tetrapeptiden **173** und **174** eine deutlich größere Rolle spielten als hydrophobe Wechselwirkungen. Alle gut bindenden Sequenzen enthielten jeweils mindestens eine polare Seitenkette, vorzugsweise Lysin. Hydrophobe Wechselwirkungen

traten bei der Erkennung der Liganden in den Hintergrund. Bei dem Screening wurde kein gut bindender Rezeptor gefunden, der ausschließlich hydrophobe Seitenketten enthielt. Dagegen eignen sich trikationische Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren hervorragend für die Komplexierung des biologisch wichtigen Tetrapeptids Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (**173**) in Wasser. Bemerkenswert ist dabei die ausgeprägte Sequenzselektivität. **173** wird etwa um den Faktor 3 besser gebunden als die inverse Sequenz **174**. Für weitergehende Untersuchungen wurden einige Rezeptorsequenzen und die entsprechenden Tetrapeptide synthetisiert und in Lösung auf Bindungseigenschaften untersucht.

### 3.4.2 Synthese der Rezeptoren

Für die Bestimmungskonstanten in Lösung für das Antibiotika Modell Peptid **173** und dessen inverse Sequenz **174** wurden fünf Sequenzen ausgewählt. Die Synthese erfolgte, wie schon für die Rezeptoren des Alzheimer Modellpeptids an Rink-Amid Harz. Auf die Einführung eines Triethylglykolspacers zur Erhöhung der Löslichkeit in Wasser konnte bei den ausgewählten Rezeptoren verzichtet werden, da genügend polare Seitenketten für eine ausreichende Löslichkeit sorgten.

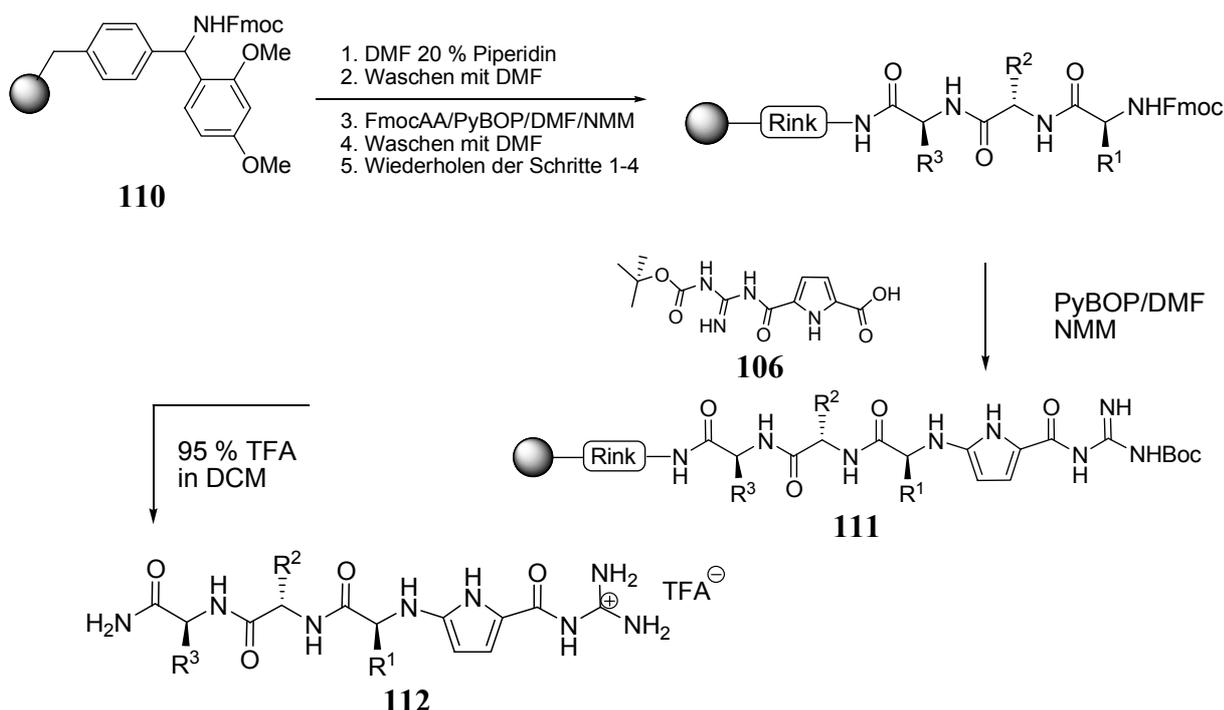
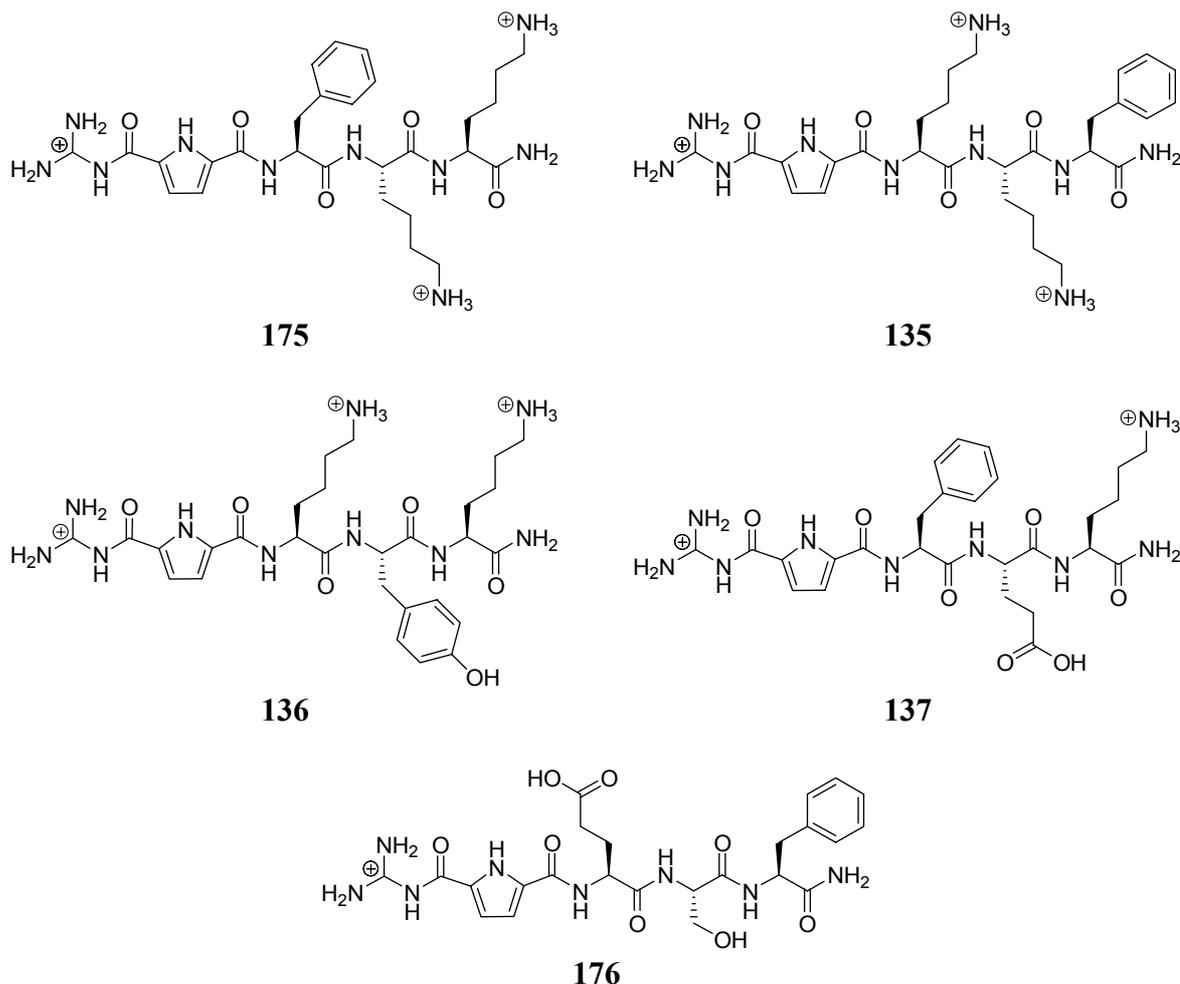


Abbildung 3.56: Syntheschema der Rezeptoren an Rink-Amid Harz, Peptidsynthese erfolgte nach Standardprotokoll, die Anbindung der CBS nach einem etwas modifiziertem Standardprotokoll, die Abspaltung vom Harz erfolgte mit 95 % TFA in Dichlormethan.

Unter den fünf ausgewählten Rezeptoren befand sich die bei dem Assay am stärksten bindende Sequenz CBS-L-Lys-L-Lys-L-Phe-NH<sub>2</sub> (**135**), die eine Bindungskonstante von 17120 M<sup>-1</sup> für das Tetrapeptid **173** und 4790 M<sup>-1</sup> für das Tetrapeptid **174** aufwies. Weiterhin wurden zwei moderat bindende Sequenzen ausgewählt: CBS-L-Phe-L-Lys-L-Lys-NH<sub>2</sub> **175** (6200 M<sup>-1</sup> bzw. 2790 M<sup>-1</sup>) und CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub> **136** (5860 M<sup>-1</sup> bzw. 4490 M<sup>-1</sup>). Der letztere Rezeptor stellt eine der wenigen Rezeptorsequenzen dar, der beide Peptide mit ähnlichen Bindungskonstanten erkennen kann. Um das komplette Spektrum der Bindungsaktivität abzudecken, wurden noch zwei schlecht bindenden Sequenzen ausgewählt: CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH<sub>2</sub> **137** (1570 M<sup>-1</sup> bzw. 500 M<sup>-1</sup>) und CBS-L-Glu-L-Ser-L-Phe-NH<sub>2</sub> **176** (60 M<sup>-1</sup> bzw. 160 M<sup>-1</sup>).



Somit konnten fünf verschiedene Rezeptoren für die Bindungsstudien in Lösung synthetisierte werden.

### 3.4.3 Synthese der Liganden

Die Tetrapeptide Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173** und die inverse Sequenz Ac-D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Glu-OH **174** wurden auf Wang Harz nach einem Standardprotokoll synthetisiert. Da beide Peptide sowohl eine Lysin-Seitenkette und eine Glutaminsäure-Seitenkette enthielten, konnte auf eine zusätzliche Triethylenglykolkarbonsäure zur Erhöhung der Löslichkeit in wässrigen Lösemitteln verzichtet werden. Beide Peptide waren in ausreichenden Konzentrationen in Wasser löslich ( $> 1 \cdot 10^{-3}$  M), um Bindungsstudien in Lösung durchzuführen. Die Peptide wurden nach der Abspaltung durch mehrmaliges Lyophilisieren mit einer 0.01 N Salzsäure in das Chlorid umgewandelt, da das zunächst vorhandene Trifluoacetat bei den Bindungsstudien stören könnte.

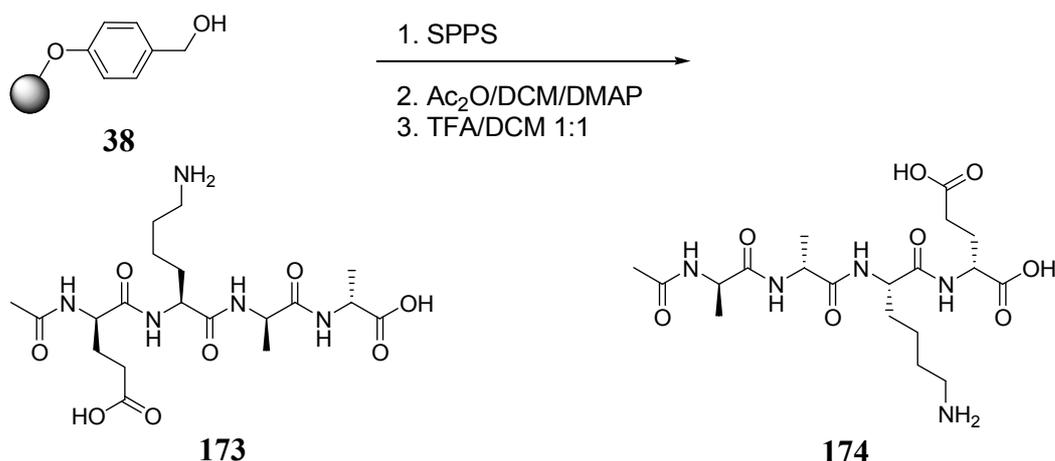
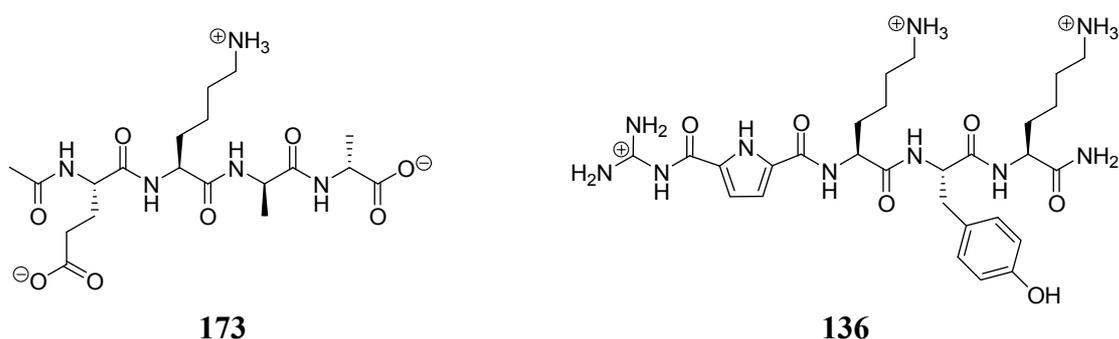


Abbildung 3.57: Synthese der beiden Tetrapeptide **173** und **174** für die Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung an Wang Harz

Nachdem sowohl die Rezeptoren, als auch die entsprechenden Liganden erfolgreich synthetisiert worden waren, musste nur noch eine geeignete Methode gefunden werden, um Bindungskonstanten in Lösung zu bestimmen.

### 3.4.4 NMR Titration für die Peptidoglycan Modellverbindung

Obwohl die Voraussetzungen für eine NMR Titration aufgrund der großen Anzahl an Protonen ungünstig erschienen, wurde trotzdem versucht, über NMR Spektroskopie Bindungskonstanten in Lösung zu bestimmen. Für die NMR Titration wurde das Tetrapeptid Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173** und der Rezeptor **136** verwendet. Die Löslichkeit des Tetrapeptids und des Rezeptors waren in Wasser ausreichend groß, so dass nur ein Zusatz von 10 % DMSO für die Titrationsexperimente ausreichte.



Es wurde eine Stammlösung des Tetrapeptids ( $1.8 \cdot 10^{-2}$  M) hergestellt und zu einer  $8.1 \cdot 10^{-4}$  M Lösung des Rezeptors titriert und nach jeder Zugabe ein Spektrum mit Lösemittelunterdrückung aufgenommen. Für einige der Protonen des Rezeptors konnte man eindeutig einen geringen komplexinduzierten Shift beobachten. Überraschenderweise wurden die aromatischen Protonen des Tyrosins ebenfalls geringfügig tieffeldverschoben. Da die aromatischen Signale nicht von den Protonen des Liganden überlagert wurden konnte man

Bindungsisothermen für diese Protonen erhalten. Die Signallagen der Amidprotonen und der Guanidiniumprotonen des Rezeptors wurden von den Amidprotonen des Liganden überdeckt, so dass es leider nicht möglich war die amidischen Protonen des Rezeptors über den Titrationsverlauf zu beobachten. Die absoluten Verschiebungen für die aromatischen Protonen sind sehr gering ( $< 0.1$  ppm), jedoch kann man zu Beginn der Titration einen steilen Anstieg der Verschiebung beobachten (bis etwa 2 Äquivalente Ligand). Im weiteren Verlauf der Titration stellt sich ein Plateau ein, das für eine vollständige Komplexierung des Rezeptors spricht. Die Form der Bindungsisotherme spricht für eine starke Komplexierung. Durch die geringen Änderungen der chemischen Verschiebung und zu wenig Messpunkten im entscheidenden Bereich (0-2 eq) ließ sich die Bindungsisotherme nach Gleichung (3.4) nicht anpassen. Eine Bestimmung der Bindungskonstanten über NMR war auf diesem Wege leider nicht möglich. Interessant war jedoch die Tatsache, dass selbst die Tyrosin-Seitenkette am Bindungsmodus beteiligt ist. Hierbei könnte es sich um eine hydrophobe Wechselwirkung mit der Alkylketten des Lysins aus dem Liganden handeln.

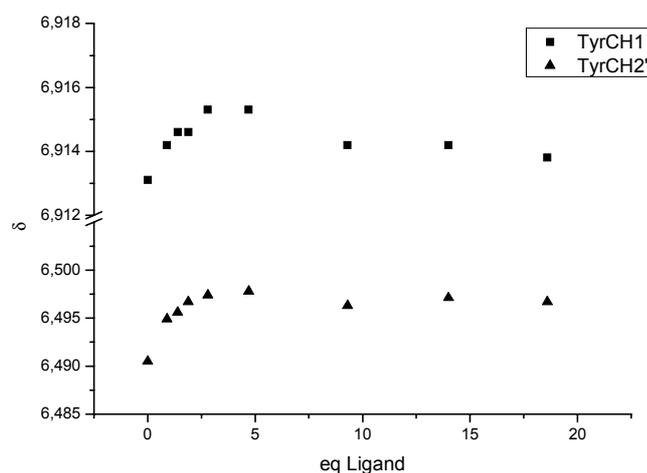


Abbildung 3.58: Bindungsisothermen für die beiden aromatischen Protonen der Tyrosin-Seitenkette des Rezeptors 136.

Es konnte so gezeigt werden, dass nicht nur die Carboxylat-Bindungsstelle über das Guanidiniocarbonylpyrrol für die Bindungsstärke verantwortlich ist, sondern dass auch die Seitenketten an der Bindung teilnehmen und sie signifikant beeinflussen.

### 3.4.5 UV- und Fluoreszenztitrations für das Peptidoglycan Modellpeptid

Die durchgeführten UV Titrations wurden bei einem konstanten pH-Wert und einer konstanten Rezeptorkonzentration durchgeführt. Die Stammlösungen für den Puffer, den Rezeptor und den Liganden wurden vor jeder Titration frisch angesetzt. Die Konzentrationen für die Rezeptoren lagen bei  $5 \cdot 10^{-5}$  M, für die Liganden bei  $1.0 \cdot 10^{-3}$  M, der pH-Wert wurde auf  $\text{pH } 6.0 \pm 0.1$  eingestellt. Der Rezeptor wurde vorgelegt und zu dieser Lösung der Ligand

zutitriert und nach jeder Zugabe ein Spektrum aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte zum einen über die in Gleichung (3.21) dargestellten Formel über eine nichtlineare Kurvenanpassung bei einer konstanten Wellenlänge oder über eine von der Firma *Bio Logic* vertriebenen Software *Specfit/32™* über einen größeren Wellenlängenbereich. Die Änderungen der UV Absorption spiegelt die Änderung der elektronischen Verhältnisse des nichtkovalenten Komplexes gegenüber dem ungebundenen Guanidiniocarbonylpyrrol Rezeptor dar. Beobachtet wurde der  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang im Pyrrolsystem. Das Maximum der Absorption liegt für die Pyrrolverbindung bei etwa 300 nm. Überlagert wird die Änderung von der konzentrationsabhängigen Abnahme der Pyrrolabsorption durch den Verdünnungseffekt. Die Gesamtabsoption setzt sich aus der Summe der Absorptionen des Rezeptors, des Komplexes und des Liganden zusammen (vgl. Gleichung (3.6)), wobei der Ligand im UV Bereich einen sehr kleinen Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon < 250 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) besitzt. Zunächst sollte eine Bindungskonstante für das biologisch relevante Peptid **173** über UV-spektroskopische Methoden für die am besten bindende Sequenz **141** (respektive **135**) aus der Tabelle 3.3 in Lösung bestimmt werden. Dafür wurde eine  $5.40\cdot 10^{-5} \text{ M}$  Lösung des Rezeptors **135** in einem BisTris Puffer ( $1.02\cdot 10^{-3} \text{ M}$  bei pH 6.15) hergestellt und von dieser Lösung 2000  $\mu\text{L}$  in einer Küvette vorgelegt. Zusätzlich wurde eine  $1.02\cdot 10^{-3} \text{ M}$  Lösung des Tetrapeptids **173** in einem BisTris Puffer ( $1.02\cdot 10^{-3} \text{ M}$  bei pH 6.15) hergestellt. Es wurden jeweils 20  $\mu\text{L}$  des Liganden (pro Zugabe etwa 0.2 eq des Liganden in Bezug auf den Rezeptor) in die Küvette gegeben und ein Spektrum aufgenommen. In Abbildung 3.62 ist die Übereinanderlagerung der erhaltenen Spektren dargestellt.

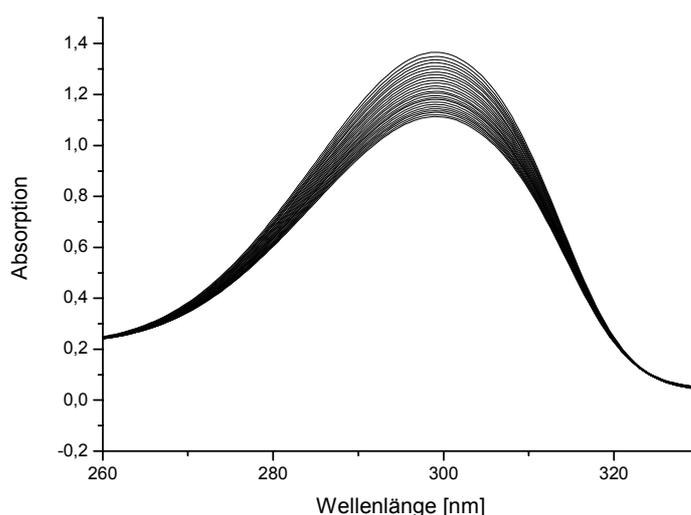


Abbildung 3.59: Datensatz der UV-Titration von CBS-L-Lys-L-Lys-L-Phe-NH<sub>2</sub> **135** ( $5.4\cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) gegen Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173** ( $1.02\cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) in einem BisTris Puffer ( $1.02\cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) und einem pH Wert von 6.15.

Für eine Auswertung über Gleichung (3.21) wurde das Maximum der Pyrrolabsorption bei 300 nm ausgewählt. In Abbildung 3.60 wurde die Bindungsisotherme bei 300 nm, die bei der

Titration erhalten wurde, mit der berechneten reinen Verdünnung des Rezeptors **135** übereinander gelegt. Bis zu einem Bereich von vier Äquivalenten Ligand sind beide Kurven nahezu deckungsgleich. Erst danach zeichnen sich leichte Unterschiede ab. Der Absorptionskoeffizient des Rezeptor-Ligand-Komplexes liegt offenbar geringfügig über dem Absorptionskoeffizienten des reinen Rezeptors, was dafür spricht, dass Elektronendichte vom Carboxylat zum Guanidiniocarbonylpyrrol abgegeben wird. Der Effekt ist nicht sehr stark ausgeprägt, dies lässt aber keine Rückschlüsse auf die absolute Bindungskonstante zu.

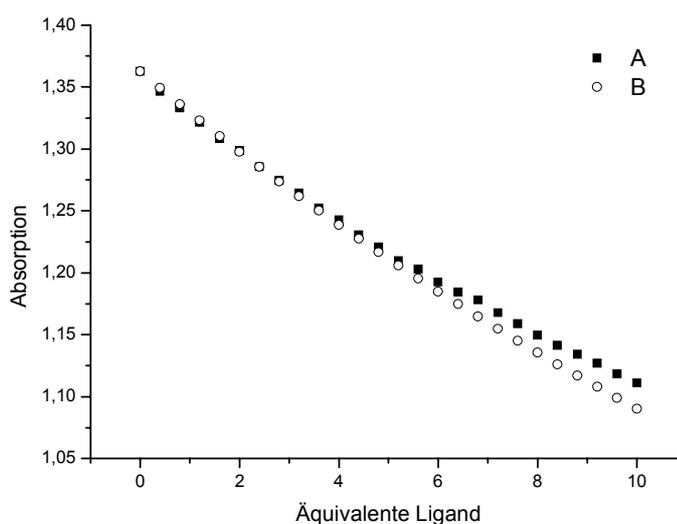


Abbildung 3.60: Übereinanderlagerung der Bindungsisotherme der Titration bei 300 nm (A) und der berechneten Abnahme der Absorption durch Verdünnung (B) bei der Titration von CBS-L-Lys-L-Lys-L-Phe-NH<sub>2</sub> **135** gegen Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173**.

Anschließend wurde versucht, eine Bindungskonstante über eine nichtlineare Regressionsanalyse aus den Daten der Bindungsisotherme aus Abbildung 3.61 unter Benutzung von Gleichung (3.21) zu bestimmen. Der richtigen Initialisierung der möglichen variablen Parameter  $A$ ,  $K$ ,  $\epsilon_R$ ,  $\epsilon_L$  und  $\epsilon_{RL}$  kam dabei eine besondere Bedeutung zu. Den Startwert der Absorption  $A$  konnte man als gegeben und daher als konstanten Wert vorgeben. Die molaren Absorptionskoeffizienten für den Rezeptor und den Liganden konnten in einer unabhängigen Messung zu  $25300 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$  für den Rezeptor **135** und  $200 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$  für den Liganden **173** bei 300 nm bestimmt werden. Die Parameter  $K$  (die Bindungskonstante) und der molare Absorptionskoeffizient des Rezeptor-Ligand-Komplexes  $\epsilon_{RL}$  ist zwingend notwendig eine Variable. Unter dieser Annahme konnte durch die nichtlineare Regression eine Bindungskonstante von  $11000 \text{ M}^{-1}$  für den Rezeptor **135** und den Liganden **173** erhalten werden. In einer zweiten Messung, die auf den gleichen Annahmen beruhte, wurde eine Bindungskonstante von  $12500 \text{ M}^{-1}$  bestimmt. Innerhalb der Fehlergrenzen (geschätzt  $\pm 20\%$ ) eine sehr gute Übereinstimmung.

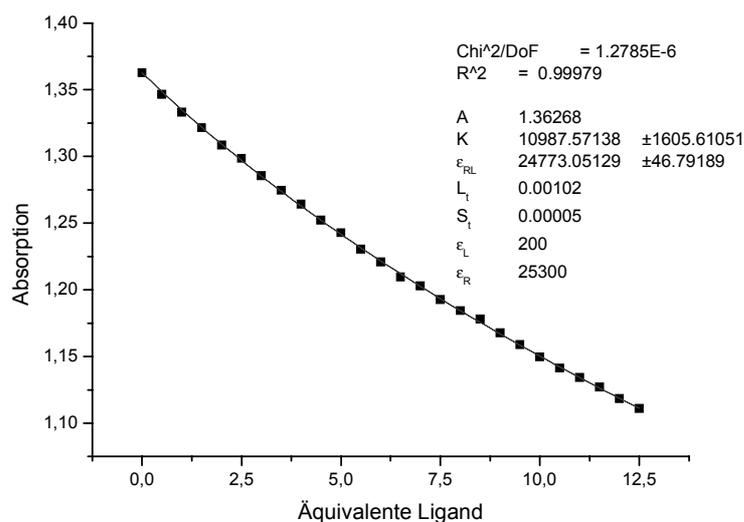


Abbildung 3.61: Bindungsisotherme (300 nm) für die UV-Titration von CBS-L-Lys-L-Lys-L-Phe-NH<sub>2</sub> **135** ( $5.4 \cdot 10^{-5}$  M) gegen Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173** ( $1.02 \cdot 10^{-3}$  M).

Anschließend wurde versucht, die Bindungskonstante über *Specfit/32*<sup>TM</sup> zu berechnen. Das Programm wendet ebenfalls ein iteratives nichtlineares Verfahren an, um aus den Daten unter Benutzung einer Gleichung wie (3.21) eine Bindungskonstante zu berechnen. Allerdings kann man die Parameter, die die Grundlage zur Berechnung der Bindungskonstanten bilden, nicht einzeln verändern, oder als Konstante vorgeben. Die Auswertung ergab für beide Titrationsen, unter Berücksichtigung der Bindungsisotherme bei 300 nm, eine Bindungskonstante von  $1000 \text{ M}^{-1}$ . Wurde als Grundlage ein Wellenlängenbereich von 260-340 nm festgelegt, konnte nur eine Bindungskonstante von  $400 \text{ M}^{-1}$  bestimmt werden.

Vergleicht man die Bindungskonstante, die über eine UV-Titration erhalten wurde ( $11000$  und  $12500 \text{ M}^{-1}$ ), mit der Bindungskonstante auf der festen Phase ( $17100 \text{ M}^{-1}$ ), stehen diese Bindungskonstanten in erstaunlich guter Übereinstimmung. Innerhalb der Fehlergrenzen, die auf mindestens 20 % abgeschätzt wurden, waren die erhaltenen Ergebnisse identisch.

Für einen weiteren Rezeptor **136**, der das Tetrapeptid Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173** auf der festen Phase mit einer Assoziationskonstante von  $5860 \text{ M}^{-1}$  bindet, wurde ebenfalls versucht, Bindungskonstanten über UV spektroskopische Methoden zu erhalten. Für diesen Rezeptor wurde eine  $1.04 \cdot 10^{-5}$  M Stammlösung in einem BisTris Puffer ( $1.03 \cdot 10^{-3}$  M) bei einem pH-Wert von 6.15 hergestellt. Die Konzentration des Tetrapeptides betrug  $6.8 \cdot 10^{-4}$  M, der pH-Wert ebenfalls 6.15. In Abbildung 3.62 sind die erhaltenen Absorptionsspektren, die bei der Titration erhalten wurden, abgebildet. Man kann deutlich einen isosbestischen Punkt bei 285 nm erkennen. Das Vorliegen eines isosbestischen Punktes ist ein Indiz für eine 1:1 Komplexierung.<sup>[108]</sup> Ein weiterer Hinweis für das Vorliegen eines 1:1 Komplexes ist das ausschließliche Auftreten eines 1:1 Komplexes in der Gasphase, bestimmt bei anderen Rezeptor Substrat Komplexen.

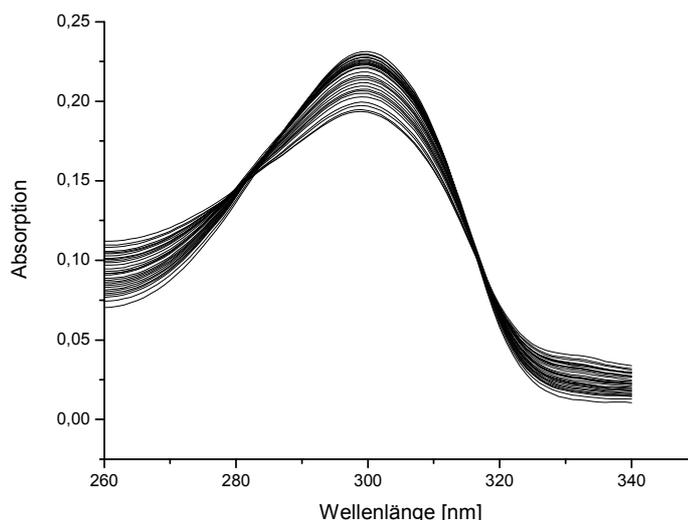


Abbildung 3.62: Datensatz der UV-Titration von CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub> **136** ( $1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) gegen Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173** ( $1.07 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

In Abbildung 3.63 wurde der Absorptionsverlauf des Rezeptors bei 299 nm – der durch die Verdünnung abnimmt – der bei der Titration erhaltenen Bindungsisotherme bei 299 nm gegenübergestellt. Der nichtkovalente Komplex aus Rezeptor **136** und Ligand **173** besitzt einen höheren Absorptionskoeffizienten als der Rezeptor. Die Zunahme des molaren Absorptionskoeffizienten für diese Rezeptor-Ligand Kombination ist deutlich stärker, als in dem vorigen Beispiel. Eine Interpretation dieses Verlaufes spricht für die Erhöhung der Elektronendichte des Pyrrols aufgrund der Komplexbildung. Das negative Carboxylat schiebt Elektronendichte zum positiven Guanidiniocarbonylpyrrol. Neben den Ergebnissen aus den computergestützten Berechnungen des nichtkovalenten Komplexes (siehe Abbildung 3.54) ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass die Salzbrücke entscheidenden Einfluss auf die Komplexstabilität hat.

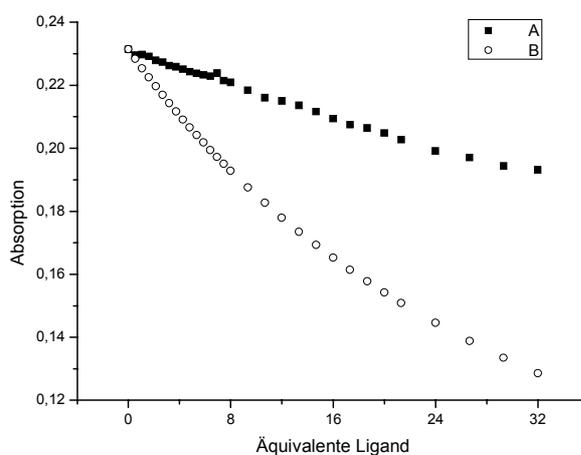


Abbildung 3.63: Gegenüberstellung der UV-Titration von Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173** gegen CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub> **136** (A) und der reinen berechneten Verdünnungskurve des Rezeptors **136** bei 299 nm (B).

Die Auswertung der Bindungsisotherme nach Gleichung (3.21) erfolgte unter den gleichen Annahmen wie die Bestimmung der Bindungskonstante in dem vorangegangenen Beispiel. Der molare Absorptionskoeffizient des Rezeptors **136** wurde zu  $22250 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$  bestimmt. Der Startwert der Titration wurde ebenfalls als konstant vorausgesetzt. Der molare Absorptionskoeffizient des Liganden **173** wurde durch eine gesonderte Messung auf  $200 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$  bestimmt. Unter diesen Voraussetzungen konnte die Bindungskonstante zu  $6900 \text{ M}^{-1}$  bestimmt werden. Versucht man hier eine Auswertung über *Specfit/32*<sup>TM</sup> und zieht den gesamten spektralen Bereich von 260-340 nm für die Auswertung in Betracht, kann eine Bindungskonstante von  $6160 \text{ M}^{-1}$  ( $10^{3.79\pm 0.1} \text{ M}^{-1}$ ) bestimmt werden. Zieht man hingegen nur die Wellenlänge des Absorptionsmaximums bei 299 nm für die Auswertung hinzu, fällt die Bindungskonstante auf  $3000 \text{ M}^{-1}$  ( $10^{3.47\pm 0.25} \text{ M}^{-1}$ ). Gleichzeitig mit der Abnahme der Bindungskonstante bei der Einengung des spektralen Bereichs nimmt der rechnerische Fehler deutlich zu, so dass beide Werte dennoch vergleichbar erscheinen.

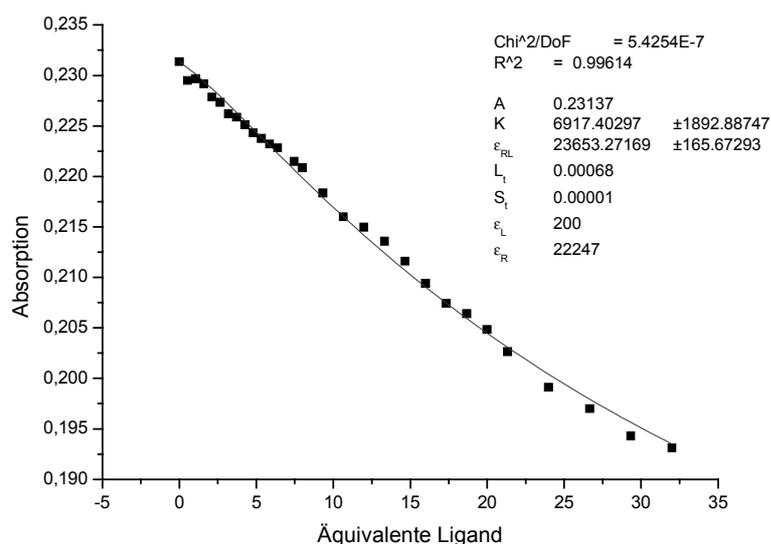


Abbildung 3.64: Bindungsisotherme (299 nm) für die Bestimmung der Bindungskonstante des Rezeptors CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub> **136** und des Tetrapeptids Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173**.

Über die UV-Spektroskopie war es möglich, Bindungskonstanten für zwei Rezeptoren zu bestimmen. Die erhaltenen Assoziationskonstanten lagen in der gleichen Größenordnung wie auf der festen Phase. Für einen dritten Rezeptor CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH<sub>2</sub> **137**, der auf der festen Phase eine Bindungskonstante von  $1570 \text{ M}^{-1}$  für den Liganden **173** zeigte, konnten über UV spektroskopische Methoden unter Benutzung von Gleichung (3.21), Assoziationskonstanten nicht reproduzierbar erhalten werden. In einer ersten Messung wurde die Assoziationskonstante zu  $15200 \text{ M}^{-1}$  bestimmt und in einer zweiten Messung, die direkt im Anschluss mit den gleichen Stammlösungen erfolgte, konnte nur eine Assoziationskonstante von  $5800 \text{ M}^{-1}$  beobachtet werden. Allerdings ergab hier die

Auswertung über *Specfit/32*<sup>TM</sup> unter Berücksichtigung eines Wellenlängenbereiches von 295-305 nm für die erste Titration eine Bindungskonstante von 5000 M<sup>-1</sup>. Für die zweite Titration lag die Assoziationskonstante mit einem Wert von 3200 M<sup>-1</sup> auf einem ähnlichen Niveau, so dass für diesen Rezeptor eine Bindungskonstante zwischen 3000 und 5000 M<sup>-1</sup> angenommen werden kann. In der nachfolgenden Tabelle sind die erhaltenen Bindungskonstanten noch einmal aufgelistet. Je besser die Rezeptoren für die Bindung des tetrapeptidischen Liganden geeignet sind, desto reproduzierbarer sind die Bindungskonstanten bei unabhängigen Messungen.

*Tabelle 3.5: Vergleich der Bindungskonstanten auf der festen Phase mit den über UV Spektroskopie erhaltenen Bindungskonstanten.*

	K <sub>ass</sub> auf der festen Phase	K <sub>ass</sub> in Lösung
CBS-L-Lys-L-Lys-L-Phe-NH <sub>2</sub> <b>135</b>	17120 M <sup>-1</sup>	11000 und 12500 M <sup>-1</sup>
CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH <sub>2</sub> <b>136</b>	5860 M <sup>-1</sup>	6160 und 6900 M <sup>-1</sup>
CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH <sub>2</sub> <b>137</b>	1570 M <sup>-1</sup>	15200 und 5800 M <sup>-1</sup> bzw. 5000 und 3200 M <sup>-1</sup>

Neben den gut und schnell durchführbaren UV-Titrationsen wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, Bindungskonstanten in Lösung zu bestimmen.

Wie schon bei dem Alzheimer Modellpeptid versucht wurde, sollte eine weitere unabhängige Methode benutzt werden, um Bindungskonstanten in Lösung zu bestimmen. Die Eigenfluoreszenz des Pyrrols bei 330 nm kann dafür genutzt werden. Problematisch bei der Nutzung der Fluoreszenzeigenschaften des Pyrrols ist die Tatsache, dass bei einer Anregung bei 300 nm die Fluoreszenzbande von der Ramanbande des Wassers überlagert wurde. Üblicherweise wird bei Fluoreszenzspektren für die Anregung der gesamte Wellenlängenbereich genutzt und die Emission separiert nach Wellenlängen beobachtet. Die Ramaneneigenschaften sind abhängig von der eingestrahnten Wellenlänge des Lichts, so dass ihm Falle des Pyrrols, sowohl die Ramanbande als auch die Pyrrolfluoreszenz beobachtet wird. Durch einen synchronen Aufnahmemodus, bei der ein definierter Abstand zwischen der eingestrahnten und der beobachteten Wellenlänge besteht, konnte die Ramanbande des Wassers vollständig ausgeblendet werden konnte. Der Stokes Shift für Guanidiniocarbonylpyrrole beträgt etwa 20 nm. Eine Anregung bei 310 nm führte zu einer maximalen Emission bei 330 nm.

Die Fluoreszenztitrationsen wurden bei einem konstanten pH-Wert von 6.1 durchgeführt, um zu gewährleisten, dass das Acylguanidinium protoniert und das Carboxylat deprotoniert

vorliegt und damit eine optimale Komplexierung durch ein Ionenpaar ermöglicht wird. Dabei wurde wiederum auf einen BisTris Puffer zurückgegriffen, der in einem etwa 100fachen Überschuss, bezogen auf den vorgelegten Rezeptor, vorlag. Im Laufe der Voruntersuchungen zeigte sich, dass der pH-Wert der Pufferlösungen über lange Zeit stabil und die Pufferkapazität erhalten blieb, sich die Fluoreszenzeigenschaften jedoch massiv änderten. Aufgrund einer Alterung der Lösung entstand ein sehr intensives Maximum bei einer Wellenlänge von 300-325 nm, das den Bereich des zu beobachtenden Signals bei 330 nm für die Pyrrolfluoreszenz überlagerte. Zusammen mit einer geringen Stabilität von Substrat und Ligand in Lösung ergab sich, dass man alle Lösungen direkt vor der Titration jedes Mal frisch ansetzen musste.

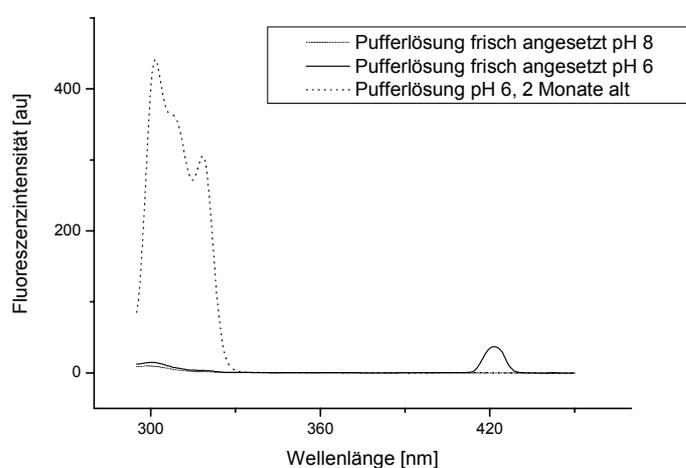


Abbildung 3.65: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Pufferlösung von ihrem Alter. 3 Monate alte Pufferlösung mit einem pH-Wert von 6 (···), frische Pufferlösung, ebenfalls mit einem pH-Wert von 6 (—) und eine frisch erstellte Pufferlösung mit einem pH-Wert von 8 (---).

Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich zudem, dass die Pyrrolfluoreszenz stark konzentrationsabhängig war. Bei höheren Konzentrationen ( $> 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ ) nahm die Intensität der Fluoreszenz bei reiner Verdünnung zu, zudem konnte eine Verschiebung des Emissionsmaximum von einigen Nanometern beobachtet werden. Aus diesem Grunde musste für jeden Rezeptor eine Verdünnungsreihe aufgenommen werden, um einen Konzentrationsbereich für die Fluoreszenz zu bestimmen, bei dem ein Verhalten nach *Lambert-Beer* angenommen werden konnte. Es konnte jedoch bisher nicht geklärt werden, ob die Abnahme der Fluoreszenz bei höherer Konzentration eine unspezifische Fluoreszenzlöschung durch den Rezeptor darstellt, oder durch eine Selbstaggregation und daraus resultierende Fluoreszenzänderung hervorgerufen wird. Da bei den UV-Titrationen kein vergleichbarer Effekt beobachtet werden konnte, spricht vieles für eine unspezifische Fluoreszenzlöschung. Aus diesem Grunde musste für jeden Rezeptor ein Konzentrationsbereich ermittelt werden, der den linearen Bereich des Spektrums darstellt. Eine Rezeptorkonzentration von  $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  erwies sich als geeignet. Verdeutlichen lässt sich

dies anhand von zwei Grafiken, die eine zeigt die Rohdaten der Verdünnungsreihe, die andere beschreibt den Verlauf der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Konzentration bei einer gegebenen Wellenlänge.

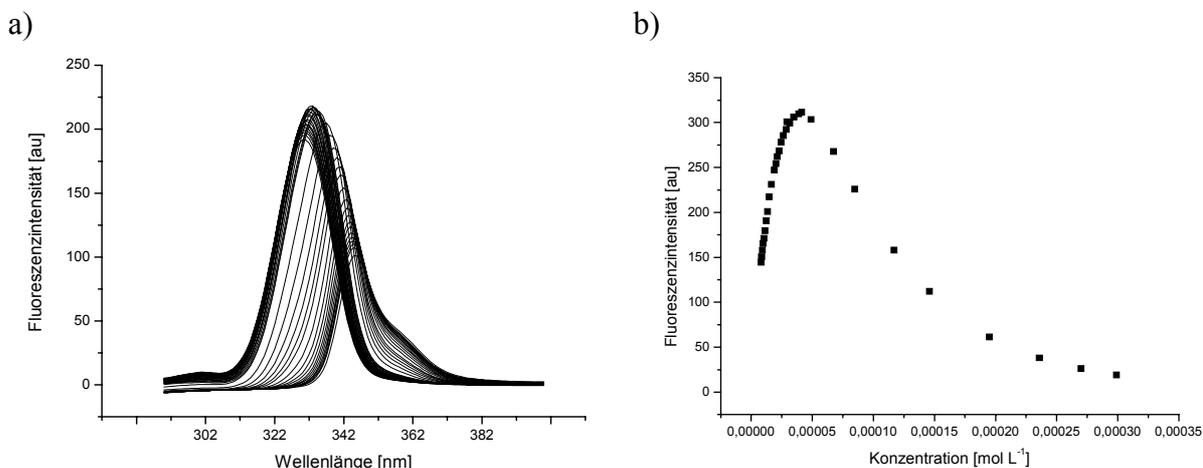


Abbildung 3.66: Verdünnungsreihe für den Rezeptor CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub>. **136**  
 a) Rohdaten der Titration, mit zunehmender Konzentration an Substrat tritt eine bathochrome Verschiebung des Maximums auf und die Fluoreszenzintensität verringert sich. b) Bei einer Konzentration unter  $5 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1}$  tritt normales Verhalten nach Lambert Beer auf und die Fluoreszenzaktivität nimmt linear ab.

Die Gesamtintensität der Fluoreszenz setzt sich aus den Beiträgen des Rezeptors, des Liganden und des Komplexes aus Rezeptor und Ligand zusammen (vgl. Gleichung (3.6)). Der Betrag für den Beitrag des Rezeptors und des Liganden konnte dabei nach Gleichung (3.19) exakt bestimmt werden. Der Ligand **173** zeigte im Fluoreszenzspektrum eine charakteristische Bandenstruktur und zwar auch in einem Bereich, in dem die Emissionsbande des Substrats lag. Aus diesem Grunde musste durch eine Verdünnungsreihe für den Liganden **173** dessen Anteil an der Fluoreszenzintensität bei der Titration bestimmt werden. Das Tetrapeptid zeigte drei verschiedene Maxima, bei 260, 320 und 340 nm, wobei die ersten beiden auch von der Pufferlösung stammen konnten. Das Maximum bei 340 nm repräsentierte die Fluoreszenzbande des protonierten Lysins.

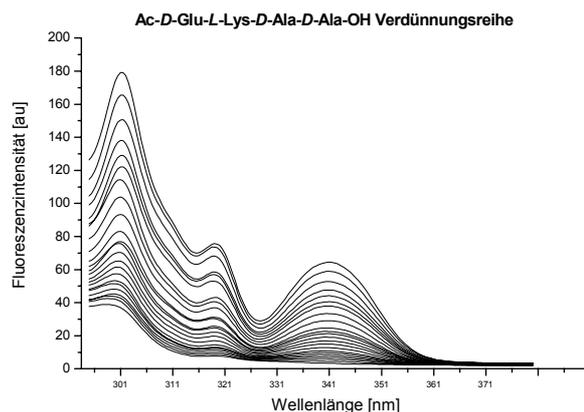


Abbildung 3.67: Verdünnungsreihe für das Tetrapeptid *Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH 173* in einem Konzentrationsbereich von 0 bis  $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Deutlich zu erkennen sind drei Absorptionsmaxima bei 301, 320 und 341 nm.

Das Maximum der Emission bei der Fluoreszenztitration der Rezeptoren gegen den Liganden **173** lag bei einer Wellenlänge von etwa 328-332 nm. In diesem Bereich zeigte der Ligand ebenfalls eine geringe Fluoreszenzintensität. Mit Gleichung (3.23) lässt sich das Verhalten sehr gut beschreiben, so dass man einen exakten Wert für den *Lambert-Beer* Koeffizienten bei der beschriebenen Wellenlänge erhalten konnte. Für 329 nm wurde die Anpassung dargestellt.

$$A_L = \varepsilon_L \cdot L_t \Leftrightarrow A_L = \frac{\varepsilon_L \cdot L_0 \cdot x}{1 + x} \quad (3.23)$$

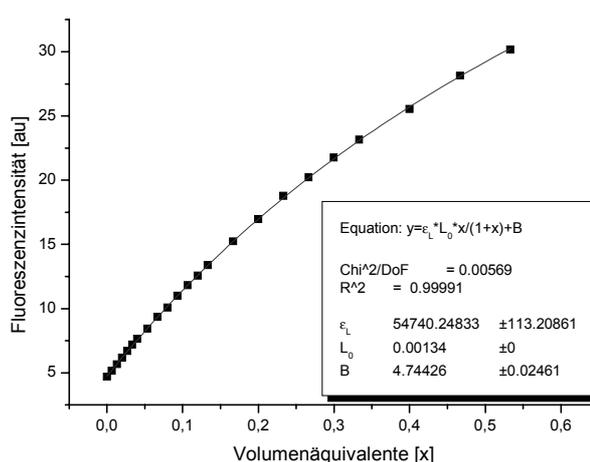


Abbildung 3.68: Graphische Anpassung der Fluoreszenzintensität des Tetrapeptids **173** bei 329 nm an die experimentellen Daten mit Hilfe von Gleichung (3.23).

Die Fluoreszenzintensität der Rezeptoren war stark zeitabhängig, der Grund für die Zeitabhängigkeit ist unklar. Zum Teil kann dieses Phänomen auf einen Eintritt von Luft durch das Schütteln der entgasten Probe nach jeder Zugabe von Liganden zurückgeführt werden. Ein Großteil des eingetretenen Fremdgases sollte allerdings durch das Behandeln der Küvette

im Ultraschallbad wieder entfernt worden sein. Literaturbekannt ist allerdings, dass sich die Fluoreszenzeigenschaften durch Sättigung einer Probe mit unterschiedlichen inerten Gasen und auch Sauerstoff oder Luft deutlich ändern.<sup>[128]</sup> Dies ist in relativ guter Übereinstimmung mit den hier erhaltenen Beobachtungen, jedoch erklärt es nicht die Tatsache, dass die Proben eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität aufwiesen, wenn sie nach einer gewissen Zeit aus dem Probenraum entfernt wurden und ohne Schütteln direkt wieder in den Probenhalter eingesetzt wurden. Die Intensitätsänderung betrug zum Teil weit über 20 % der gesamten Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 3.35). Dieses Phänomen kann mit einer Fluoreszenzlöschung nicht erklärt werden, da Fluoreszenzlebensdauern nur im Bereich von einigen Nanosekunden liegen.<sup>[142]</sup> Bei der Durchführung der Fluoreszenztitrationen musste nach jeder Zugabe des Liganden so lange gewartet werden, bis die Fluoreszenzintensität einen konstanten Wert angenommen hatte. Je nach Rezeptor nahm dies zwischen 10 min und weit über 45 min in Anspruch. Aus diesem Grund konnte nur für einen einzigen Rezeptor eine Bindungskonstante über eine Fluoreszenztitration bestimmt werden. In der nachfolgenden Abbildung ist der Datensatz für die Fluoreszenztitration von CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub> **136** gegen Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173** dargestellt. Das Maximum der Fluoreszenzemission des Substrats bei 329 nm wurde von der Fluoreszenzemission des Liganden überlagert.

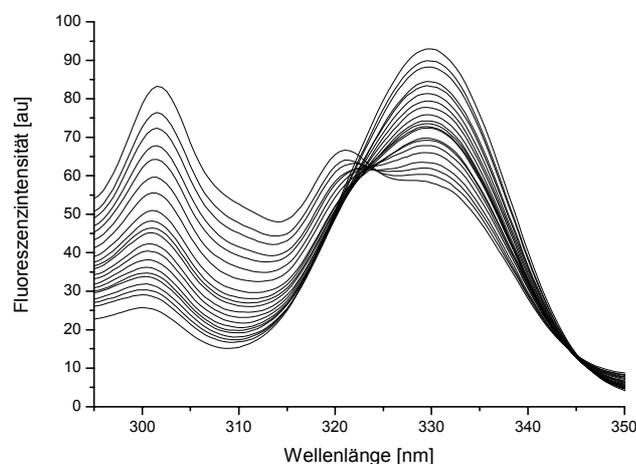


Abbildung 3.69: Datensatz der Fluoreszenztitration von CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub> **136** ( $1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) gegen Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173** ( $1.07 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Die Wellenlänge maximaler Veränderung im Spektrum liegt an dem Maximum der Fluoreszenzintensität für das Pyrrol bei 329 nm. Durch die Anpassung der experimentellen Daten der Bindungsisotherme von 329 nm durch eine nichtlineare Regressionsanalyse nach Gleichung (3.21) konnte die Bindungskonstante zu  $K = 6170 \text{ M}^{-1}$  bestimmt werden. Dies ist in erstaunlich guter Übereinstimmung mit den Werten der UV-Titration ( $K = 6160 \text{ M}^{-1}$ ) und dem Festphasenassay ( $K = 5860 \text{ M}^{-1}$ ). Somit konnten über drei unabhängige Messungen nahezu identische Bindungskonstanten erhalten werden.

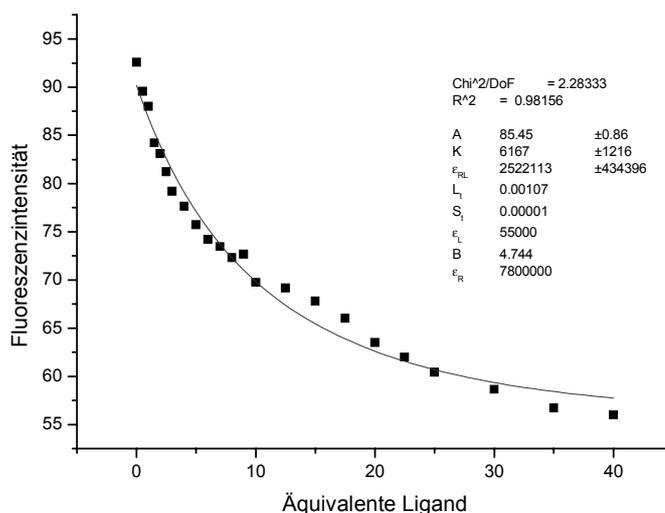


Abbildung 3.70: Bindungsisotherme bei 329 nm für das System CBS-LysTyrLys-NH<sub>2</sub> **136** gegen Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173**. Die Titration wurde bis zu einem etwa 40fachen Überschuss an Ligand zu Substrat durchgeführt, um eine vollständige Komplexbildung des Substrats zu gewährleisten.

Für einen weiteren Rezeptor CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH<sub>2</sub> **137**, der eine geringe zeitabhängige Fluoreszenz aufwies, konnte ebenfalls die Bindungskonstante über eine Fluoreszenztitration bestimmt werden. Durch die nichtlineare Regressionsanalyse der experimentellen Daten der Bindungsisotherme bei 329 nm konnte eine Bindungskonstante zu 22000 M<sup>-1</sup> bestimmt werden. Vergleicht man die so erhaltenen Daten mit den Bindungskonstanten, die auf der festen Phase (1560 M<sup>-1</sup>) und in Lösung über UV Spektroskopie (15000 und 5800 M<sup>-1</sup> durch Berechnung der Bindungskonstanten aus der Bindungsisotherme bei 300 nm mit Hilfe von Gleichung (3.21), 5000 und 3200 M<sup>-1</sup> durch Berechnung der Bindungskonstante über *Specfit/32*<sup>TM</sup>), erscheinen die Werte nicht mehr vergleichbar. Ein Unterschied zu der Bestimmung der Bindungskonstanten über UV Spektroskopie bestand bei der Anzahl der zutitrierten Äquivalente. Während bei den UV Titrationen etwa 20 Äquivalente Ligand zutitriert worden waren, wurden bei der Fluoreszenztitration bis zu 60 Äquivalente Ligand zutitriert. Mit zunehmender Menge an Ligand nimmt auch die Gesamtionenkonzentration zu. Eine höhere Gesamtionenkonzentration kann zu einer unspezifischen Fluoreszenzlöschung führen und so die Bestimmung der Bindungskonstante verfälschen.<sup>[143]</sup>

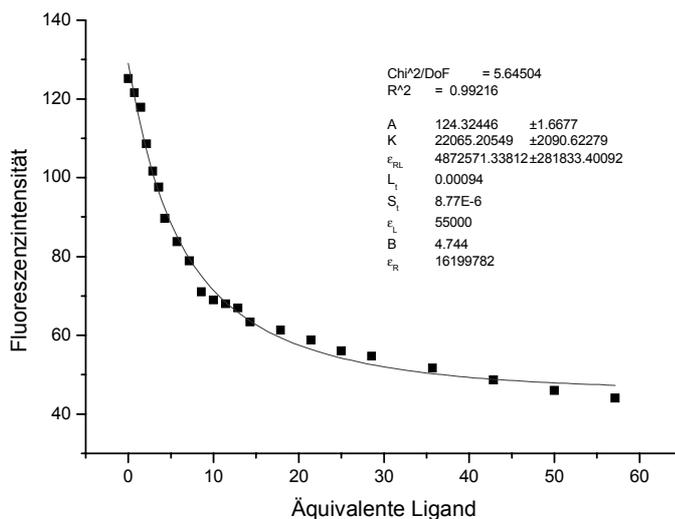


Abbildung 3.71: Bindungsisotherme (329 nm) für die Fluoreszenztitration von CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH<sub>2</sub> **137** gegen Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173**.

Für die inverse Sequenz **174** des biologisch wichtigen Peptids **173** wurden sowohl einige UV-Titrations wie Fluoreszenztitrations durchgeführt. Eine Bestimmung von Bindungskonstanten aus den erhaltenen Bindungsisothermen über nichtlineare Regressionsmethoden war nicht möglich. Auch durch Ausnutzung eines größeren Wellenlängenbereichs, der über *Specfit/32*<sup>TM</sup> leicht ausgewertet werden konnte, war keine Bestimmung von Bindungskonstanten möglich. Die Bindungskonstanten für das Tetrapeptid **174** waren – verglichen mit **173** – deutlich niedriger. Eine geringere Bindungskonstante bedeutet aber auch geringere Veränderung der spektralen Eigenschaften, so dass eine Auswertung der Bindungsisotherme nach Gleichung (3.21) zu sehr großen Fehlern führt.

## 4 Ausblick

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, mit einem kombinatorischen Ansatz effiziente Rezeptoren für biologisch relevante Tetrapeptide zu finden. Die nachfolgende Bestimmung von Bindungskonstanten auf der festen Phase für drei unterschiedliche Liganden ermöglichte eine umfangreiche Betrachtung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen. Polykationische Rezeptoren scheinen besonders dafür geeignet sind, Peptide mit freiem C-Terminus in Wasser mit hohen Assoziationskonstanten zu komplexieren. Zusätzlich zu den Ergebnissen auf der festen Phase konnten auch Bindungskonstanten in Lösung bestimmt werden, um zu zeigen, dass die Bindungskonstanten auf der festen Phase in der gleichen Größenordnung liegen wie in Lösung.

Im Anschluss an diese Arbeit sollen noch umfangreichere Bindungsstudien in Lösung erfolgen. Mit Hilfe der UV-, Fluoreszenz- oder auch NMR-Spektroskopie sollte es möglich sein, weitere Bindungsdaten, insbesondere für den inversen Liganden **174** des biologisch relevanten Peptids **173** zu erhalten. Darüber hinaus sollen noch weitere Möglichkeiten genutzt werden, mehr Informationen über die Struktur und die Eigenschaften der nichtkovalenten Komplexe zu erhalten. Eine geeignete Methode, um die Enthalpie, die Entropie und auch die genaue Komplexstöchiometrie eines Komplexes zu bestimmen, bietet die Mikrokolorimetrie.<sup>[144]</sup> Ebenfalls interessant und leicht durchführbar wäre eine indirekte Bestimmung von Assoziationskonstanten über eine Verdrängungstitration. Unter Ausnutzung der guten Komplexierungseigenschaften von Guanidiniocarbonylpyrrolen für Carboxylate kann man ein fluoreszenzaktives Carboxylat einsetzen, das bei Zugabe eines Liganden freigesetzt wird. Die Änderung der Fluoreszenz von gebundenen Carboxyfluorescein im Vergleich zu ungebundenen kann für die Bestimmung von Bindungskonstanten genutzt werden. Dies erlaubt zum einen die kompetitive Bestimmung von Bindungskonstanten, so dass auch sehr hohe Assoziationskonstanten (vgl. Abbildung 2.12) mit dieser Methode bestimmt werden können, zum anderen wird die Sensitivität durch die hohe Fluoreszenz des Carboxyfluoresceins deutlich erhöht.

In Zusammenarbeit mit dem SFB 630 ist eine Charakterisierung und Bestimmung von Sekundärstrukturen von nichtkovalenten Komplexen aus Guanidiniocarbonylpyrrolen und biologisch relevanten Peptiden über IR- und Ramanspektroskopische Methoden geplant. Die IR- und Ramanspektroskopie liefern detaillierte Informationen über den strukturellen Aufbau von organischen und biologischen Molekülen. Sie sind hervorragend dazu geeignet, die Sekundärstruktur von Proteinen zu bestimmen, da sie extrem sensitiv auf intermolekulare Wechselwirkung und die Änderung der Sekundärstruktur reagieren.<sup>[145-148]</sup> Durch IR- und Ramanspektroskopie können verbesserte Struktur-Aktivitätsbeziehungen für die Bindung von Guanidiniocarbonylpyrrolen mit peptidischen Liganden erhalten werden.

Durch die Veränderung der Lagen der Amidbanden im nichtkovalenten Komplex verglichen mit den isolierten Verbindungen, können Informationen über den Bindungsmodus erhalten werden. In Voruntersuchungen konnte bereits erste Resonanzramanexperimente von Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren auf der festen Phase durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals IRMPD Untersuchungen an einem nichtkovalenten Komplex durchgeführt. Es konnte so die außerordentlich Stabilität eines nichtkovalenten Komplexes aus einem Tetrapeptid und einem Guanidiniocarbonylpyrrol-rezeptor gezeigt werden. Im Anschluss an diese Arbeit sollen auch für die beiden anderen verwendeten Liganden Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH **173**, sowie dessen inverse Sequenz **174**, IRMPD Untersuchungen durchgeführt werden, um Aktivierungsenergien für die Dissoziation des nichtkovalenten Komplexes zu erhalten. Diese könnten dann auch mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen verglichen werden, so dass man Aussagen über stabilisierende oder destabilisierende Effekte von Ionenpaaren in der Gasphase treffen kann.

Neben der Anwendung neuer, effizienterer Methoden zur Bestimmung von Bindungskonstanten sind weitergehende *in vitro* und vielleicht auch *in vivo* Untersuchungen der hier dargestellten Rezeptoren außerordentlich interessant. Für einige gut bindende Rezeptoren für das Alzheimer Modellpeptid **98** konnte bereits eine *in vitro* Aktivität zur Verminderung und Verzögerung der Fibrillenbildung über klassische Assays nachgewiesen werden. Der nächste Schritt stellt einen Test auf eine *in vivo* Aktivität der gefundenen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren dar. *Soto et al.* konnten eine Reduzierung der Menge an amyloiden Strukturen *in vivo* an transgenen Mäuse mit einfachen Pentapeptiden nachweisen.<sup>[134]</sup> Es ist demnach nicht unrealistisch, dass die hier verwendeten Rezeptoren ebenfalls eine *in vivo* Aktivität zeigen könnten. Für gut bindende Rezeptoren des Modellpeptids für die Quervernetzung von Peptidoglycanen in Bakterien sind *in vitro* Untersuchungen ebenfalls denkbar und aussichtsreich.<sup>[149]</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Rezeptorbibliothek auf Bindungseigenschaften untersucht, die ausschließlich natürliche Aminosäuren in der Seitenkette enthielt. Mit dieser Bibliothek konnte eine selektive Erkennung von verschiedenen Tetrapeptiden in wässriger Lösung erreicht werden. In Zukunft sollen auch Rezeptorbibliotheken dargestellt werden, die zusätzlich nichtnatürliche Aminosäuren enthalten können. Dies erweitert die strukturelle Vielfalt der Bibliothek, zudem können durch maßgeschneiderte Bausteine optimierte Rezeptoren für ein bestimmtes Ziel entworfen werden.

Durch den Einbau von Aminosäuren mit fluorophoren Gruppen<sup>[150-154]</sup> in die Rezeptorbibliotheken kann man empfindliche Biosensoren entwerfen, die sehr sensitiv auf ihre Umgebung reagieren können, z. B. können sie durch eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften einen Sensor für eine hydrophobe Umgebung darstellen.

Weiterhin eignen sich zum Beispiel die von *Geiger* und *Schmuck* entwickelten Argininanaloga **177**.<sup>[155]</sup> Peptide, die diese nichtnatürliche Aminosäuren enthalten, könnten deutlich verbesserte Bindungseigenschaften für anionische Liganden aufweisen, als Peptide, die nur aus proteinogenen Aminosäuren aufgebaut sind. Neben der verbesserten Komplexierung von polaren Gruppen wurde in unserem Arbeitskreis auch eine nichtnatürliche Aminosäure entwickelt, die eine selektive Komplexierung von Methylgruppen erlauben könnte. Das von *Wienand* und *Schmuck* entwickelte cyclotribenzylensubstituierte Alanin **178**<sup>[88]</sup> weist eine Kavität auf, die eine hydrophobe Schale aufspannt, in die eine Methylgruppe perfekt hineinpasst.

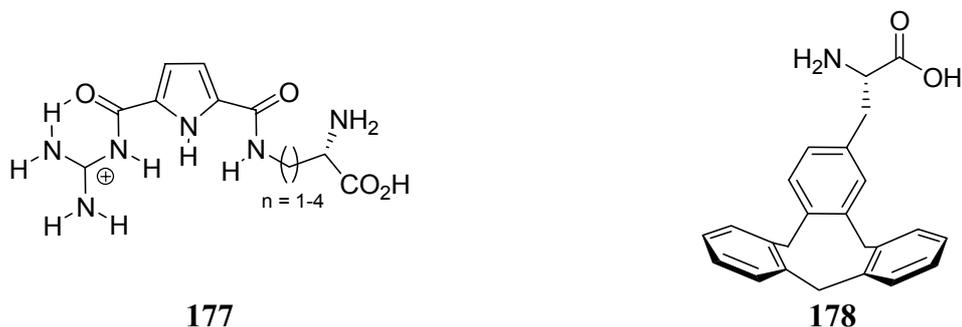


Abbildung 4.1: Nichtnatürliche Aminosäuren wie die Argininanaloga **177** und eine auf Cyclotribenzylen basierende Aminosäuren **178**, die sich für die Synthese von Peptidrezeptoren eignen.

Mit solchen maßgeschneiderten Bibliotheken können Struktur-Stabilitätsbeziehungen zwischen biologisch relevanten Peptiden und synthetischen Rezeptoren besser bestimmt werden, so dass solche Untersuchungen einen Beitrag zum besseren Verständnis von Protein-Protein Wechselwirkungen beitragen können. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen könnten neue Peptidomimetika oder auch Leitstrukturen für die Entwicklung von Therapeutika entwickelt werden.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit konnte eine 512 Mitglieder umfassende kombinatorische Rezeptorbibliothek auf der Basis eines Guanidiniocarbonylpyrrols mit einer tripeptidischen Seitenkette dargestellt werden (Abbildung 5.1). Die kombinatorische Synthese der Bibliothek erfolgte nach der „*Split and Mix*“ Methode<sup>[13, 109, 110]</sup> auf Amino-TentaGel als fester Phase in IRORI *MikroKans* unter Benutzung der IRORI Radiofrequenzcodierung<sup>[99, 100]</sup> zur Dekodierung der einzelnen Mitglieder der Bibliothek. Die Bibliothek ist für die selektive Erkennung von Tetrapeptiden mit freien C-Termini konzipiert. Als Zielliganden wurden zwei biologisch relevante Modellpeptide ausgewählt. Zum einen das Alzheimer Modellpeptid L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH, das die C-terminale Sequenz des Amyloid  $\beta$ -Proteins (1-42) repräsentiert, das im Zusammenhang mit der Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit gebracht wird.<sup>[21, 22, 24-26, 56, 156]</sup> Zum anderen wurde das Tetrapeptid D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH ausgewählt, das im Zusammenhang mit der antibakteriellen Wirksamkeit von Antibiotika eine wichtige Rolle spielt.<sup>[33, 34, 62, 157]</sup>

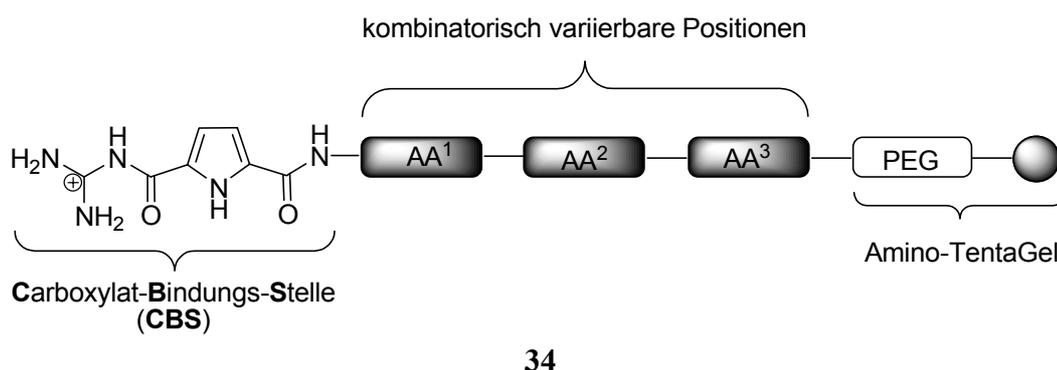
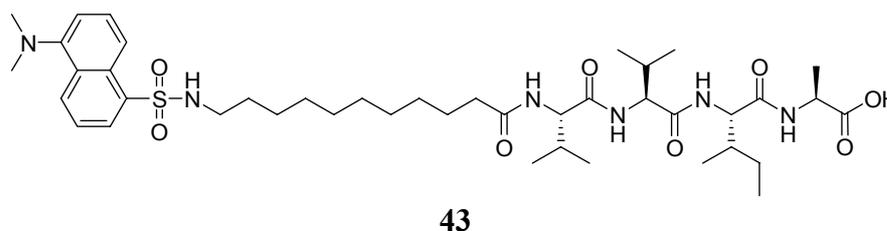


Abbildung 5.1: Schematischer Aufbau der Rezeptorbibliothek **34**.

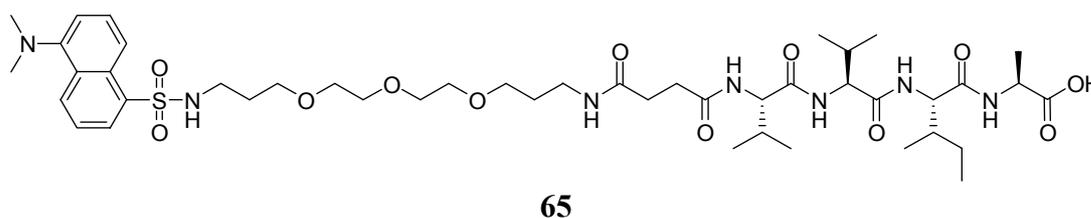
Die Bestimmung von Bindungskonstanten auf der festen Phase erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzscreenings, wobei die intensive Fluoreszenz eines Dansylrestes ausgenutzt wurde.



Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Mitglieder der Rezeptorbibliothek **34** in der Tat in der Lage ist, selbst in einem so polaren Lösemittel wie Methanol, das dansylierte Tetrapeptid **43** zu erkennen. Exemplarisch wurden für 12 verschiedene Rezeptoren

Bindungskonstanten bestimmt. Der beste Rezeptor (CBS-L-Val-L-Val-L-Phe **46**) erkennt das Alzheimer Modellpeptid mit einer Assoziationskonstanten von  $9700 \text{ M}^{-1}$ , dies zeigt die hervorragende Eignung der Guanidiniocarbonylpyrrol Rezeptoren für die Komplexierung eines vorgegebenen biologisch relevanten Peptids. Es war möglich mit einer Rezeptorbibliothek moderater Größe, Struktur-Aktivitätsbeziehungen zwischen einem Modellpeptid und einem synthetischen Rezeptor aufzudecken. In diesem Assay zeigte sich, dass Rezeptoren mit aliphatischen Seitenketten an Position AA<sup>1</sup>-AA<sup>3</sup> besonders dafür geeignet sind, diese Sequenz zu binden. Befand sich dagegen eine Glutaminsäure, geschützt als Benzylester, in Position AA<sup>2</sup>, führte dies zu einem vollständigen Verlust an Bindungsaktivität. Diese Effekte lassen sich auf der Basis von berechneten Strukturen verstehen.

Der hydrophile Ligand **65** erlaubte die Bestimmung von Bindungskonstanten in Wasser. Die Bindungskonstanten in diesem Assay variierten von  $4200 \text{ M}^{-1}$  für die besten Rezeptoren bis zu  $20 \text{ M}^{-1}$ , also einem vollständigen Verlust der Bindungsaktivität, für die schlechtesten Rezeptoren. Hierbei zeigte sich, dass die Mehrzahl gut bindender Rezeptoren in Position AA<sup>1</sup> eine Lys(Boc) Seitenkette aufwiesen.



Auf diesen Erkenntnissen basierend, wurden molekulardynamische Rechnungen durchgeführt. Diese ließen den Schluss zu, dass ein mit einer Boc-Gruppe geschütztes Lysin als hydrophober „Stöpsel“ in den Zwischenraum passt, der durch das erste Valin und das Isoleucin aufgespannt wird.

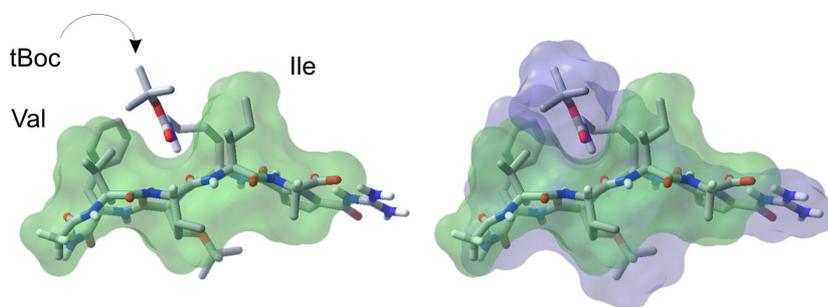


Abbildung 5.2: Lösungsmittelzugängliche Fläche des Liganden **98** (grün) und des Rezeptors **99** (blau), die Boc-Gruppe der Lysin Seitenkette passt perfekt in die hydrophobe Lücke, die durch das erste Valin und Isoleucin aufgespannt wird.

Noch deutlich besser bindet eine Sequenz, die keine Schutzgruppen an den Lysinseitenketten besaß (CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys **66**). Sie wies mit einer Bindungskonstante von  $8800 \text{ M}^{-1}$  die höchste in diesem Assay auf. Die guten Bindungseigenschaften für den Rezeptor **66** liegen molekulardynamischen Rechnungen zufolge an einer zusätzlichen ionischen Wechselwirkung der Lysinseitenkette mit dem Carboxylat.

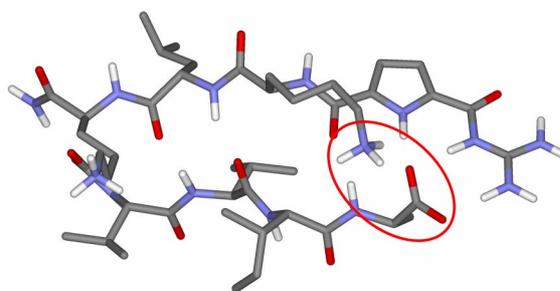


Abbildung 5.3: Berechnete Struktur des Komplexes aus dem trikationischen Rezeptor CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys **100** (oben) und Ac-L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH **98** (unten). Deutlich zu erkennen die pinzettenförmige Anordnung von Lysin und Guanidinium für das Carboxylat. Unpolare Wasserstoffatome sind der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

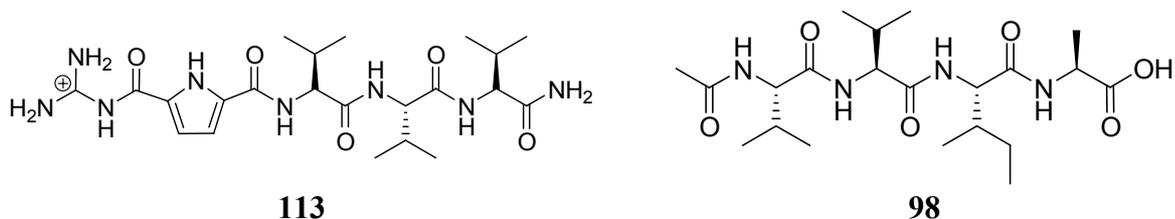
Die auf der festen Phase erhaltenen Ergebnisse konnten durch die Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung durch UV-Titrations bestätigt werden.

Tabelle 5.1: Gegenüberstellung der Bindungskonstanten auf der festen Phase des Assays in Methanol und in Wasser mit den in Lösung erhaltenen Bindungskonstanten.

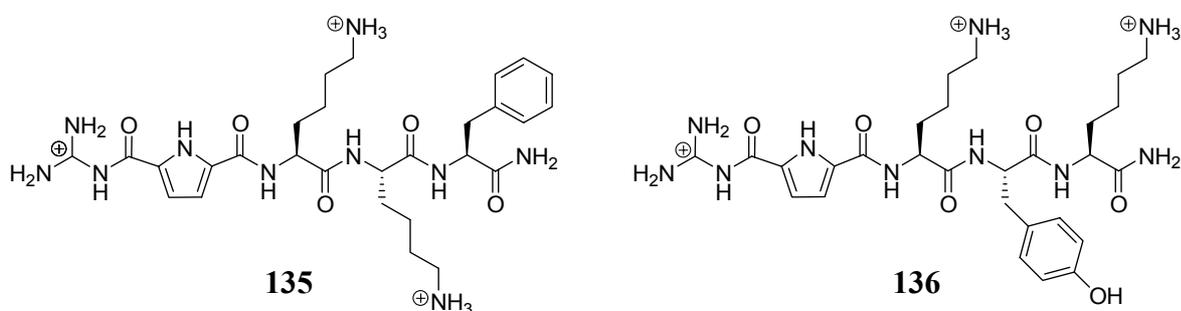
	$K_{\text{ass}}$ Festphase Methanol	$K_{\text{ass}}$ Festphase Wasser	$K_{\text{ass}}$ UV-Titrations in Lösung
CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys	nicht vorhanden	$8800 \text{ M}^{-1}$	$6025 \text{ M}^{-1}$
CBS-L-Val-L-Val-L-Val	$9300 \text{ M}^{-1}$	$1340 \text{ M}^{-1}$	$2660 \text{ M}^{-1}$
CBS-L-Leu-L-Tyr-L-Leu	nicht vorhanden	$1770 \text{ M}^{-1}$	$1800 \text{ M}^{-1}$
CBS-L-Phe-L-Glu(OBn)-L-Val	$80 \text{ M}^{-1}$	$560 \text{ M}^{-1}$	nicht bestimmbar

Es konnte somit gezeigt werden, dass kationische Guanidiniocarboxylpyrrole sich für die Komplexierung des Alzheimer Modellpeptids **98** – selbst in Wasser – hervorragend eignen. Für die Komplexierung kann eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur angenommen werden. Unterstützt wird diese Annahme durch NMR Untersuchungen, die sowohl einige NOE Signale aufweisen, die für eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur sprechen als auch Kopplungskonstanten besitzen, die üblicherweise für solche Strukturen beobachtet werden. Weiterhin wurden für den Trivalinrezeptor **113** und dem Alzheimer Modellpeptid **98** Dissoziationsexperimente in der Gasphase über IRMPD ESI-MS Methoden in einer Kooperation mit Dr. Mathias Schäfer an

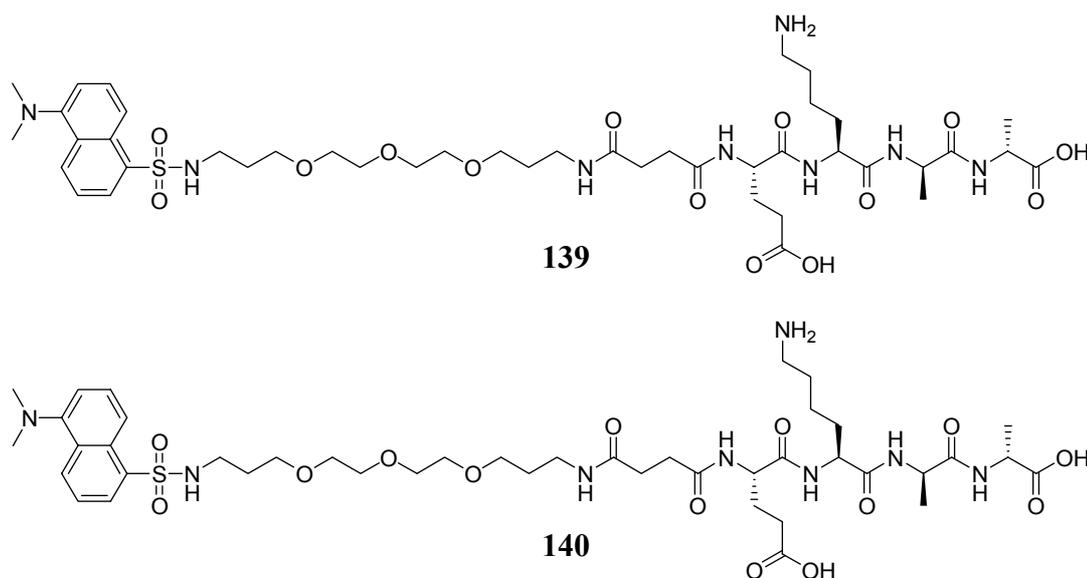
der Universität zu Köln durchgeführt. Dabei konnte die Aktivierungsenergie für den Zerfall des nichtkovalenten Komplexes auf 0.67 eV bestimmt werden. Dieser Wert ist ein Maß für die Bindungsstärke des nichtkovalenten Komplexes. Dies stellt das bisher erste Beispiel der Bestimmung der Aktivierungsenergie für die Dissoziation eines nichtkovalenten Komplexes über IRMPD dar.<sup>[130]</sup>



Neben diesen physikalisch organischen Untersuchungen wurden von Dr. Peter Frey von der Novartis AG in Basel auch *in vitro* Untersuchungen zur Inhibierung der Fibrillenbildung der Amyloid Proteine A $\beta$  (1-42) und A $\beta$  (1-40) mit ausgewählten Rezeptoren durchgeführt. Für die kinetische und quantitative Inhibierung der Fibrillenbildung konnten zwei Rezeptoren (**135** und **136**) gefunden werden, die den Nukleationsprozess bei beiden Peptiden signifikant verzögerten und auch zu einer geringeren Menge an gebildeten Amyloid-Plaques gegenüber der Kontrolle führten. Ionische Wechselwirkungen beeinflussen die Menge und Geschwindigkeit der Bildung von Fibrillen.



Die Bestimmung von Bindungseigenschaften der Rezeptorbibliothek **34** gegen das Tetrapeptid D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH, das im Zusammenhang mit der Entwicklung von neuen Antibiotika steht, wurde ebenfalls über fluoreszenzspektroskopische Methoden auf der festen Phase durchgeführt. In diesem Fall wurde nicht nur das biologisch relevante Peptid **139**, sondern auch die inverse Sequenz **140** auf Bindungsaktivität untersucht.



Hierbei zeigte sich, dass der Ligand **139** mit deutlich höheren Bindungskonstanten auf der festen Phase erkannt wird als das inverse Peptid **140**. Die Bindungskonstanten für **139** liegen für die besten Rezeptoren bei  $17000 \text{ M}^{-1}$ , für die inverse Sequenz **140** nur bei  $5500 \text{ M}^{-1}$ , obwohl beide Liganden für Rezeptoren mit einem oder zwei Lysinen an Position  $\text{AA}^1$ ,  $\text{AA}^2$  oder  $\text{AA}^3$  die höchsten Bindungskonstanten aufwiesen. Der Faktor der Bindungskonstanten zwischen sehr gut bindenden Rezeptoren und schlecht bindenden Rezeptoren betrug für beide Peptide über 200! Die besseren Bindungseigenschaften von D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH im Vergleich zu der inversen Sequenz konnten durch molekulardynamische Rechnungen darauf zurückgeführt werden, dass das inverse Peptid **174** beide Carboxylate intramolekular über eine Salzbrücke mit der Lysin-Seitenkette stabilisieren kann, während **173** nur eine Salzbrücke zu einem der beiden Carboxylate ausbilden kann und das andere Carboxylat somit für eine effektive Komplexierung mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol zur Verfügung steht. Bei **174** stehen beide Carboxylate für eine intermolekulare Komplexierung nur eingeschränkt zur Verfügung.

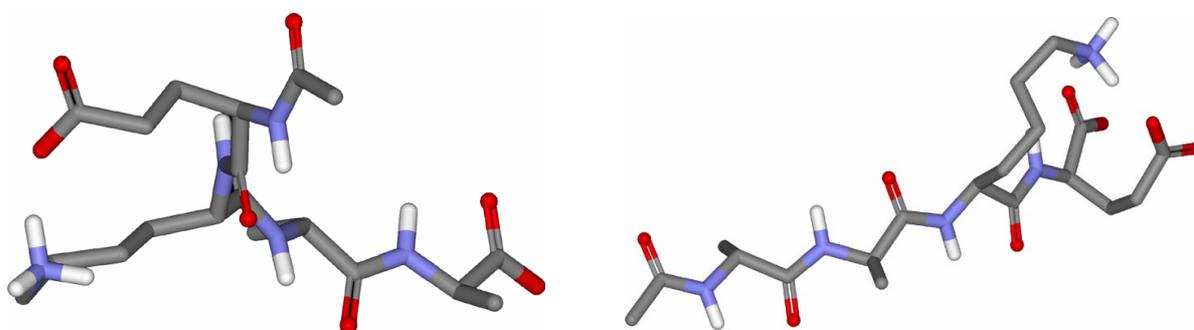


Abbildung 5.4: Berechnete Struktur von Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (**173**) (links) und Ac-D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Glu-OH (**174**) (rechts).

Die auf der festen Phase erhaltenen Bindungskonstanten für das Peptidoglycan-Modellpeptid **173** konnten ebenfalls durch die Bestimmung von Bindungskonstanten in Lösung durch UV- und Fluoreszenztitrationsen bestätigt werden.

*Tabelle 5.2: Vergleich der Bindungskonstanten auf der festen Phase mit den über UV- und Fluoreszenzspektroskopie erhaltenen Bindungskonstanten.*

	$K_{\text{ass}}$ auf der festen Phase	$K_{\text{ass}}$ in Lösung
CBS-L-Lys-L-Lys-L-Phe-NH <sub>2</sub> <b>135</b>	17120 M <sup>-1</sup>	11800 M <sup>-1</sup>
CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH <sub>2</sub> <b>136</b>	5860 M <sup>-1</sup>	6550 M <sup>-1</sup>
CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH <sub>2</sub> <b>137</b>	1570 M <sup>-1</sup>	4100 M <sup>-1</sup>

Kationische Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren sind in der Lage anionische Tetrapeptide mit hohen Assoziationskonstanten, selbst in so polaren Lösemitteln wie Wasser, zu binden. Abschließend kann gesagt werden, dass die Komplexstabilitäten von einer fein abgestimmten Kombination von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkung abhängen. Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit entwickelten Systeme stellen eines der wenigen Beispiele für künstliche Rezeptoren dar, die eine Komplexierung in Wasser erlauben.<sup>[83, 84, 86, 158-160]</sup> Mit dieser kombinatorisch entwickelten Rezeptorbibliothek konnte ein weiterer Schritt auf dem Weg zu einem zu einem „Baukasten“ für Peptidrezeptoren gemacht werden.

## 6 Summary

A medium sized combinatorial library of 512 members was synthesized on a solid support. Its structure was based on a cationic guanidiniocarbonyl pyrrole receptor as a carboxylate binding motif and a tripeptidic side chain to provide selectivity. The library was synthesized on Amino-TentaGel according to a standard Fmoc protocol following the „*split and mix*“ approach<sup>[13, 109, 110]</sup> in combination with the IRORI-radio frequency tagging technology.<sup>[99, 100]</sup> The library was designed for the molecular recognition of peptides with an unprotected C-terminus. Two different biological important peptide models were chosen as targets for the determination of binding constants on solid support as well as in solution: The C-terminal sequence of the Amyloid  $\beta$ -protein (1-42) L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH, which is known to be critical for the seeding of amyloid formation and hence has strong implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease<sup>[21, 22, 24-26, 56, 156]</sup> and the tetrapeptide D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH, which is linked to the antibacterial efficacy of some antibiotics like vancomycin.<sup>[33, 34, 62, 157]</sup>

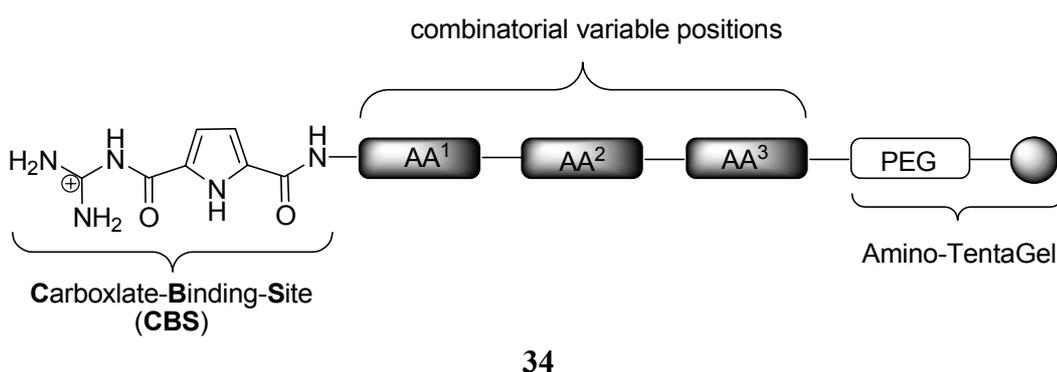
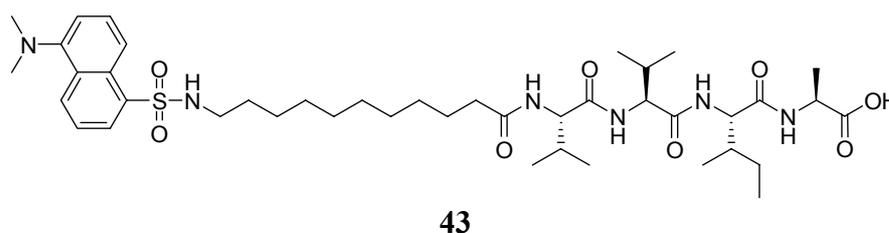


Figure 6.1: Schematic representation of the receptor library **34**.

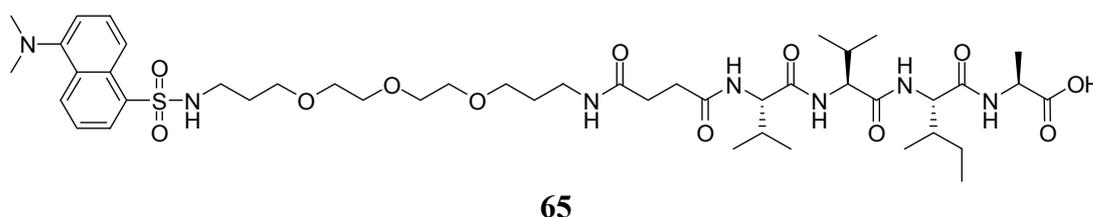
The determination of the binding constants on solid support was accomplished by a fluorescence binding assay, using the intense fluorescence activity of a dansyl group attached to the tetrapeptide.



Indeed, some members of the receptor library **34** are able to recognize tetrapeptide **43** with high binding constants, even in a polar protic solvent like methanol. For 12 different receptor

sequences the binding constants were determined quantitatively. The best receptor among them (CBS-L-Val-L-Val-L-Phe **46**) showed a binding constant of  $9700\text{ M}^{-1}$  with the model peptide **43**. This demonstrates the ability of cationic guanidiniocarbonyl pyrrole receptors for binding a given peptide with high association constants even in a highly competitive solvent. Therefore it is possible to reveal structural properties that favor or disfavor the interaction between the peptide and the receptors. Receptor sequences with aliphatic side chains at the position AA<sup>1</sup>-AA<sup>3</sup> were most appropriate for binding the tetrapeptide **43**. A glutamic acid benzylester in position AA<sup>2</sup> led to a total loss of binding.

The hydrophilic ligand **65** allowed the determination of binding constants even in water. In this assay the binding constants varied from  $20\text{ M}^{-1}$  for the worst receptor sequences to  $4200\text{ M}^{-1}$  for the best receptors, a discrimination of a factor of 200 among this moderately sized library. The majority of good binders had a Lys(Boc) side chain at position AA<sup>1</sup>.



On the basis calculated structures for the best receptor, the high preference for Lys(Boc) at position AA<sup>1</sup> next to the guanidinium cation might be due to favorable hydrophobic interactions between the bulky *t*Boc group and the first (Val) and third (Ile) amino acid of the tetrapeptide. According to MD simulations, the *t*Boc group is positioned in the gap between these two residues. This minimizes the solvent-accessible surface (Figure 6.2)

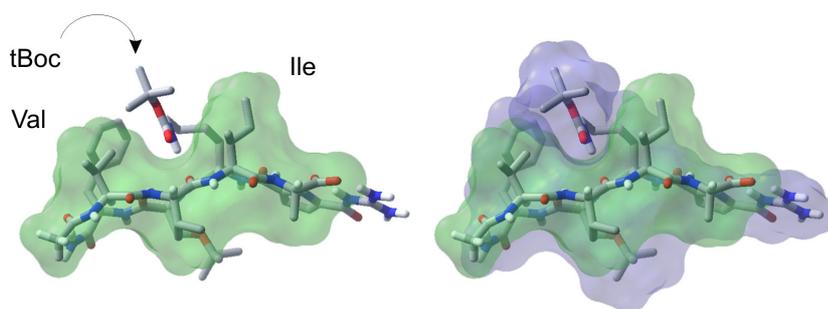


Figure 6.2: Solvent-accessible surface of the substrate (green) and the receptor (blue). The *t*Boc group fits perfectly into the hydrophobic gap between the first Val and the Ile.

The receptor CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys **66**, which was the only sequence with unprotected side chains showed an extraordinary high binding constant of  $8800\text{ M}^{-1}$ . The higher affinity of the tris-cationic receptor **66** for the tetrapeptide results from the additional positive charges on the lysine chains, which favor the complexation of the negatively charged tetrapeptide, as can be seen in the calculated structure shown below (Figure 6.3).

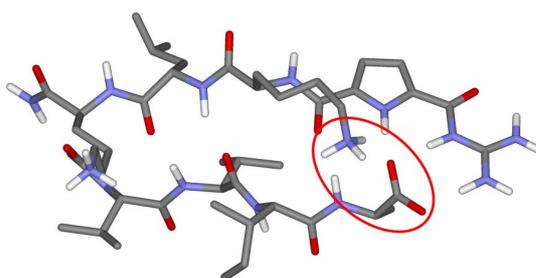


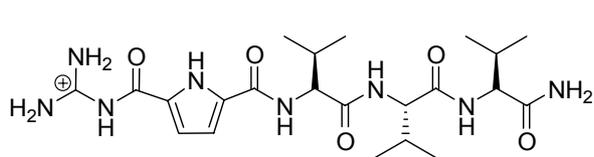
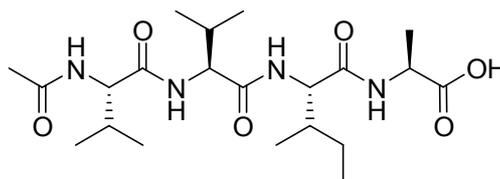
Figure 6.3: Calculated structure for the complex of the receptor **66** (above) and the tetrapeptide **98**.

The binding constants determined on bead could be confirmed by the determination of binding constants of some receptors in solution by UV titrations.

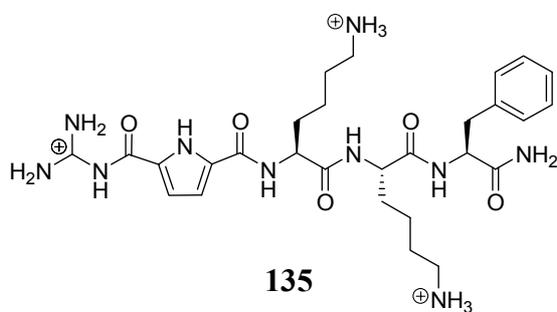
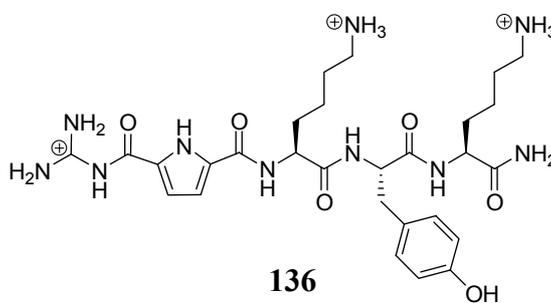
Table 6.1: Comparison of binding studies on bead and in solution

	$K_{\text{ass}}$ solid phase methanol	$K_{\text{ass}}$ solid phase water	$K_{\text{ass}}$ UV-titration in solution
CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys	not available	8800 M <sup>-1</sup>	6025 M <sup>-1</sup>
CBS-L-Val-L-Val-L-Val	9300 M <sup>-1</sup>	1340 M <sup>-1</sup>	2660 M <sup>-1</sup>
CBS-L-Leu-L-Tyr-L-Leu	not available	1770 M <sup>-1</sup>	1800 M <sup>-1</sup>
CBS-L-Phe-L-Glu(OBn)-L-Val	80 M <sup>-1</sup>	560 M <sup>-1</sup>	too low

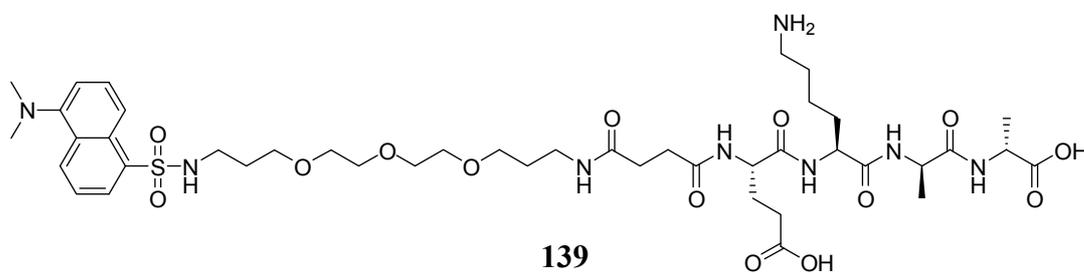
In conclusion, cationic Guanidiniocarbonylpyrrole receptors are able to form stable complexes with the Alzheimer model peptide even in highly polar solvents. A  $\beta$ -sheet like structure for the complexation can be assumed, supported by calculations and NMR measurements. Furthermore, the activation energy for the dissociation of the noncovalent complex of the trivaline receptor **113** with the Alzheimer model peptide **98** in the gas phase was determined via IRMPD ESI-MS methods, done by Dr. Mathias Schäfer from the University of Cologne. The activation energy for the decay of the noncovalent complex was determined to be 0.67 eV. The activation energy for the dissociation is linked to the complex stability in solution. This is the first example of determination of an activation energy for the dissociation of a noncovalent complex with IRMPD ESI-MS techniques.<sup>[130]</sup>

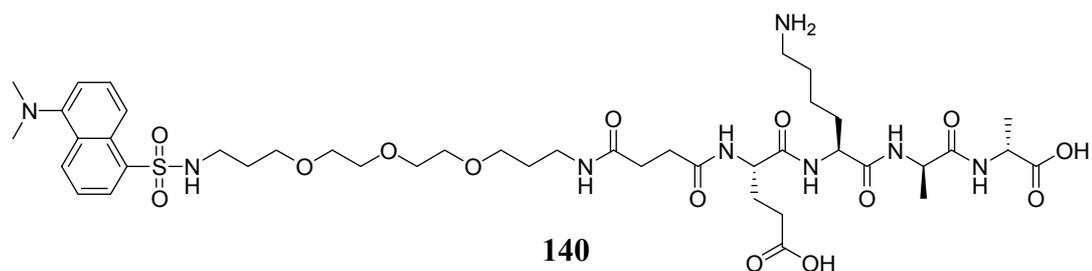
**113****98**

Dr. Peter Frey from Novartis AG in Basel performed studies on the ability of cationic guanidiniocarbonylpyrrole receptors identified in the library screening to inhibit fibril formation of A $\beta$  (1-42) and A $\beta$  (1-40) *in vitro*. Two receptor sequences (**135** and **136**) were capable of kinetic and quantitative reduction of the formation of fibrils of both proteins. Polycationic receptors reduce the amount of fibrils significantly. The herein found guanidiniocarbonyl pyrrole receptors are low molecular weight inhibitors of fibril formation.

**135****136**

The determination of binding properties of the tetrapeptide D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH with the receptor library **34** was also performed by a fluorescence assay. This ligand is related to bacterial growth and therefore to the development of new antibiotics. For the test of sequence selective peptide binding there we used the fluorescent peptide **139** and the inverse sequence **140**.

**139**



The ligand **139** showed distinct higher binding constants on solid phase than the inverse peptide **140**. The association constants of **139** for the best receptors are about  $17000 \text{ M}^{-1}$ . For the inverse sequence the best binders are in the region of  $5500 \text{ M}^{-1}$ . The tendencies of good binders were, however similar for both sequences. Receptors having two lysine residues at position AA<sup>1</sup>, AA<sup>2</sup> or AA<sup>3</sup>, belonged to the best binders in both assays. The binding constants vary from the best to the worst receptors by a factor of 200 for both sequences! The better binding properties of D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH in contrast to the inverse sequence can be attributed to the intramolecular stabilization of both carboxylates by the lysine side chain for the peptide **174**. The peptide **173** is able to form only one intramolecular salt bridge from the lysin and the glutamic acid residue. The free C-terminal carboxylate is hence available for the complexation with a guanidiniocarbonyl pyrrole moiety. As can be clearly seen in figure 6.4 the strong intramolecular complexation of both carboxylates by the lysine side chain of **174** probably inhibits the formation of intermolecular complexes to guanidiniocarbonylpyrrole receptors to some extent.

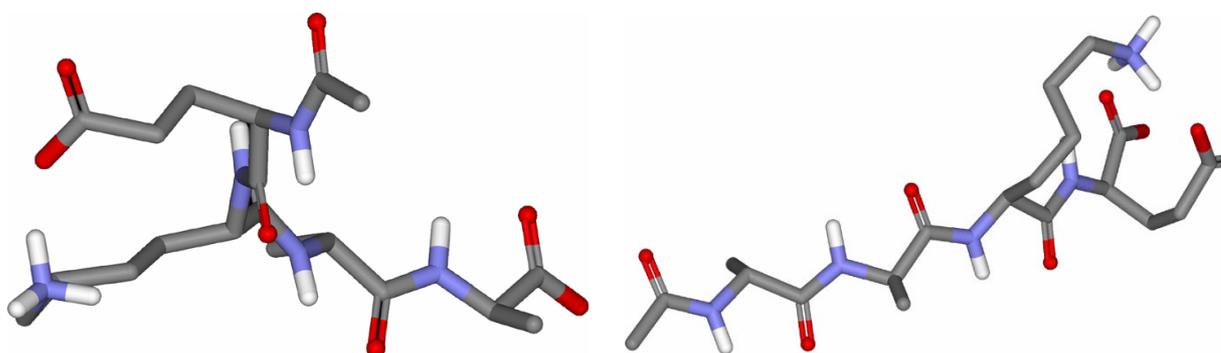


Figure 6.4: Calculated structure of Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (**173**) (left) and Ac-D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Glu-OH (**174**) (right).

The binding constants determined on solid support for the peptidoglycan-model peptide **173** could be again confirmed by the determination of binding constants in solution via UV- and fluorescence titrations.

*Table 6.1: Comparison of binding constants on solid support and in solution*

	$K_{\text{ass}}$ on solid support	$K_{\text{ass}}$ in solution
CBS-L-Lys-L-Lys-L-Phe-NH <sub>2</sub> <b>135</b>	17120 M <sup>-1</sup>	11800 M <sup>-1</sup>
CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH <sub>2</sub> <b>136</b>	5860 M <sup>-1</sup>	6550 M <sup>-1</sup>
CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH <sub>2</sub> <b>137</b>	1570 M <sup>-1</sup>	4100 M <sup>-1</sup>

Cationic guanidiniocarbonylprrole receptors are able to recognize tetrapeptides with free carboxylate with high association constants, even in highly polar solvents like methanol or water. As a concluding remark, it can be mentioned that complex stabilities of these peptidic ligands depend on a fine tuned combination of electrostatic and hydrophobic interactions. With this combinatorial receptor library another step on the way to a molecular toolbox for peptide receptors has been done.

There are very few examples in literature of molecular recognition of biological relevant targets by artificial receptors.<sup>[6, 86]</sup>

## 7 Experimenteller Teil

### Allgemeine experimentelle Bedingungen

*Lösemittel:* Alle verwendeten Lösemittel wurden destilliert. Wasserfreie Lösemittel wurden wie folgt erhalten: Tetrahydrofuran und Diethylether durch Refluxieren über Natrium mit Benzophenon als Indikator und anschließendes abdestillieren; Dichlormethan, N-Methylmorpholin, Triethylamin und Toluol durch Refluxieren über Calciumhydrid und anschließendes abdestillieren; Methanol durch Refluxieren über Magnesiumspänen und anschließendes abdestillieren; DMF durch Refluxieren über Calciumhydrid unter vermindertem Druck und anschließendes Abdestillieren (etwa 20 Volumenprozent Vorfraktion wurden verworfen).

*Schutzgas:* Als Schutzgas wurde Stickstoff 99.996 % oder Argon 99.998 % der Firma *Linde*, getrocknet über Blaugel und Phosphorpentoxid sowie desoxygeniert mit BTS-Katalysator der Firma *BASF* verwendet.

*Dünnschichtchromatographie (DC):* Es wurden Kieselgel-Fertigfolien des Typs POLYGRAM Sil G/UV mit einer Schichtdicke von 0.25 mm und Fluoreszenz-Indikator der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Lampe ( $\lambda = 254$  nm), durch Anfärben in der Iodkammer oder durch Besprühen mit einer Ninhydrin-Lösung.

*Säulenchromatographie:* Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel des Typs MN-Kieselgel 60, 0.040-0.063 mm / 230-240 mesh ASTM der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Lösemittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

*Kombinatorische Parallelsynthese am polymeren Träger:* Das Ordnen und Identifizieren der Verbindungen am polymeren Träger wurde mit einem Accu Tag<sup>TM</sup> - 100 Combinatorial Chemistry System der Firma *IRORI* durchgeführt. Die Reaktionen wurden in *MikroKans* der Firma *IRORI* mit einer Porenweite von 74  $\mu$ m durchgeführt.

### Generelle analytische Methoden

*Schmelzpunkte:* Die Messung der Schmelzpunkte erfolgte in offenen Glaskapillaren mit einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur nach *Tottoli* der Firma *Büchi*. Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

*Kernresonanzspektroskopie:* Die Kernresonanzspektren wurden an den AC 250, AC 300, AC 400 und DMX 600 Spektrometern der Firma *Bruker* bei 25 °C aufgenommen. Die Angaben der chemischen Verschiebung beziehen sich auf das Lösemittel als inneren Standard und wurden in  $\delta$ -Werten angegeben, Die Kopplungskonstanten  $J$  wurden in Hertz (Hz) angegeben. Für die Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint. = Quintett, dxd = Dublett vom Dublett und m = Multipllett. Alle Spektren wurden nach erster Ordnung interpretiert, die Zuordnung der  $^1\text{H}$ - und der  $^{13}\text{C}$ -Signale erfolgte mittels Literatur.<sup>[161, 162]</sup>

*FT-Infrarotspektroskopie (FT-IR):* Alle Infrarotspektren wurden an einem FT-IR 1600 der Firma *Perkin-Elmer* gemessen. Die Lage der Banden wurde in Wellenzahlen  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] angegeben. Die Bandenintensitäten wurden mit vs = very strong, s = strong, m = medium, w = weak und gegebenenfalls mit br = broad bezeichnet.<sup>[162, 163]</sup>

*Ultraviolettspektroskopie:* Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren erfolgte mit einem *Beckmann* DU 640 Spektrometer, einem *JASCO* V570 oder einem *JASCO* V 530 Spektrometer und Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm.

*Fluoreszenzspektroskopie:* Alle Fluoreszenzmessungen erfolgten an einem *JASCO* FP 6500 Spektrometer und wurden in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm durchgeführt.

*Mikroskopie:* Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem *Zeiss* Axioplan Mikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung oder an einem *Olympus* BX 51 durchgeführt.

*Massenspektrometrie:* Die ESI-Massenspektren wurden mit einem *Finnigan* MAT 900 S, bei einem Fluss von 2 nl/min und einer Kapillarspannung von 3.6 kV gemessen.

*Schüttelapparatur:* Als Schüttler wurde ein KS 125 basic oder ein KS 130 Laborschüttler der Firma *IKA* verwendet.

*Detektion von freien Aminofunktionen an polymeren Trägern (Kaiser-Test):*<sup>[164]</sup> Es wurden Lösungen aus Ninhydrin (1.00 g) in Ethanol (10 mL) und Phenol (40 g) in Ethanol (10 mL) angesetzt. Einige Harzkügelchen des zu analysierenden Polymers wurden mit je 0.5 mL der beiden Lösungen versetzt und für eine Minute auf 100 °C erhitzt. Polymerkügelchen mit freien Aminofunktionen färbten sich tiefblau, während Harz ohne freie Aminofunktionen farblos blieb.

*Quantifizierung der Anknüpfung von Fmoc-geschützten Aminosäuren am festen Träger:* Um die an TentaGel-Harzen gebundenen Fmoc-Aminosäuren quantifizieren zu können wurde eine Kalibrierkurve in DMF erstellt, die die Konzentration des Fmoc-Piperidin-Adduktes mit der Extinktion korreliert. Es wurden Fmoc-L-Leucin (35.3 mg, 0.1 mmol) 10 Minuten mit 20 % Piperidin in DMF (10 mL) geschüttelt und danach auf 100 mL aufgefüllt. Die so erhaltene Lösung des Fmoc-Piperidin-Adduktes wurde mit DMF weiter verdünnt. Im Konzentrationsbereich von  $0.05 \text{ mM}^{-1}$  bis  $0.25 \text{ mM}^{-1}$  ergab sich bei 300 nm ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Extinktion. Die Kalibrierung wurde mehrfach durchgeführt. Der molare Extinktionskoeffizient wurde zu  $\epsilon = 8972 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bestimmt. Durch die Extinktion der Abspaltlösung konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten die jeweilige Beladung des Harzes ermittelt werden.

*Bestimmung der realen Beladung des verwendeten TentaGel-Harzes:* Es wurden zwei Mal je 100 mg TentaGel genau eingewogen und in einen Scheidetrichter mit Fritte und Absaughahn überführt. Das Harz wurde für 3 Stunden mit DMF (10 mL) geschüttelt, damit eine ausreichende Quellung des Harzes gewährleistet wurde. Anschließend wurde das DMF abfiltriert und das Harz mit einer 3 %igen NMM-Lösung in DMF (10 mL) versetzt. Dazu wurde Fmoc-L-Leu (2.5 eq), sowie PyBOP (2.5 eq) (bezogen auf die theoretische Beladung) des Harzes unter Argon zu der Reaktionsmischung gegeben und das Reaktionsgefäß über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Harz drei Mal mit DMF (je 10 mL) gewaschen, wobei das Harz mit jeder Waschlösung 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt wurde. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde abgespalten, indem das Harz zwei Mal mit einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF (je 10 mL) für 20 min geschüttelt wurde. Das Harz wurde noch dreimal mit DMF (je 10 mL) gewaschen, wobei jeder Vorgang durch zehnmütiges Schütteln mit der Waschlösung begleitet wurde. Die aufgefangenen Abspalt- und Waschlösungen wurden auf je 100 mL aufgefüllt und die UV-Extinktionen der resultierenden Lösungen bestimmt. Anhand der zuvor aufgenommenen Eichgeraden konnte die Beladung des Harzes quantifiziert werden. Für eine Charge wurde die Beladung auf  $0.23 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ , für die zweite auf  $0.22 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$  bestimmt.

### **Allgemeine Reaktionsvorschriften für die festphasengestützte Synthese von Peptiden auf einem polymeren Träger**

*Anbringung der ersten Aminosäure auf Wang-Harz:* Wang-Harz (300 mg,  $1.1 \text{ mmol/g}$ ,  $0.33 \text{ mmol}$ , 1.0 eq) wurde in einer Mischung aus Dichlormethan und DMF (8:2) für 30 min quellen gelassen. Das Lösemittelgemisch wurde abgesaugt und erneut eine Mischung aus Dichlormethan und DMF (8:2) zugegeben. Zu dem Harz wurden NMM (3 %, 300 mL) die Fmoc-geschützte Aminosäure ( $0.66 \text{ mmol}$ , 2.0 eq), HOBt (90 mg,  $0.66 \text{ mmol}$ , 2.0 eq), DIC (85 mg, 105 mL,  $0.66 \text{ mmol}$ , 2.0 eq) und DMAP (10 mg) hinzugegeben und die

Reaktionsmischung für 16 Stunden bei Raumtemperatur über Argon geschüttelt. Das Lösemittelgemisch wurde abgesaugt und das Harz drei Mal mit Dichlormethan (je 10 mL) gewaschen. Um sicherzustellen, dass die Hydroxylfunktion des Harzes vollständig zum Ester umgesetzt wird, wurde der Kupplungsschritt wiederholt, indem man die Aminosäure (0.33 mmol, 1.0 eq), HOBt (45 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq), DIC (45 mg, 55 mL, 0.33 mmol, 1.0 eq) und DMAP (10 mg) hinzugibt und für weitere 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon schüttelt. Das Lösemittelgemisch wurde abgesaugt und drei Mal mit Dichlormethan (je 10 mL) und einmal mit DMF (10 mL) gewaschen. Im Anschluss an den Waschvorgang wurde die Schutzgruppe abgespalten.

*Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom polymeren Träger:* Die Fmoc-Schutzgruppe wurde abgespalten, indem man das Harz zweimal mit einer Mischung aus DMF (je 8 mL), das 20 % Piperidin enthält für 15 min schüttelt und das Harz anschließend mindestens viermal mit DMF (je 8 mL) wäscht, um letzte Reste an Piperidin zu entfernen.

*Anbringung der ersten Aminosäure auf Rink-Amid Harz:* Vor der Anbringung der ersten Aminosäure auf Rink-Amid Harz musste die Fmoc-Schutzgruppe am Harz abgespalten werden. Zunächst lässt man das Harz (300 mg, 0.74 mmol/g, 0.22 mmol, 1.0 eq) für 30 min in DMF (10 mL) quellen. Anschließend wird die Schutzgruppe abgespalten. Das Harz wird in DMF (8 mL), das 3 % NMM enthält, suspendiert, dazu wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure (0.55 mmol, 2.5 eq) und PyBOP (290 mg, 0.55 mmol, 2.5 eq) gegeben und das Reaktionsgefäß für vier bis fünf Stunden geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt und das Harz zweimal mit DMF (je 8 mL) gewaschen bevor die Schutzgruppe abgespalten wurde.

*Peptidsynthese auf der festen Phase:* Das Harz wurde in DMF (8 mL), das 3 % NMM enthält, suspendiert, dazu wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure (0.55 mmol, 2.5 eq) und PyBOP (290 mg, 0.55 mmol, 2.5 eq) gegeben und Reaktionsgefäß vier bis fünf Stunden geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt und das Harz zweimal mit DMF (je 8 mL) gewaschen bevor die Schutzgruppe abgespalten wurde.

*Abspaltung der Produkte vom polymeren Träger:* Bevor das Produkt vom polymeren Träger abgespalten werden kann, musste es sorgfältig gewaschen werden, um letzte Reste an DMF zu entfernen, da schon Spuren an DMF die Ausbeuten an Produkt dramatisch senken. Das Harz wurde zunächst mindestens dreimal mit Dichlormethan (je 8 mL), anschließend dreimal mit Methanol (je 8 mL) einmal mit Diethylether (8 mL) und zum Abschluss noch zweimal mit Dichlormethan (je 8 mL) gewaschen. Nach kurzem Trocknen im Membranpumpenvakuum wurde das Produkt vom Harz abgespalten werden.

1. *Wang-Harz*: Das getrocknete, vollständig von DMF befreite Harz wurde mit einer 1:1 Mischung aus trockenem Dichlormethan und TFA (8 mL) für zwei bis drei Stunden geschüttelt, wobei das Harz eine tiefrote Farbe annahm. Das Lösemittel wurde abgesaugt und das Harz noch einmal mit wenig frischer Abspaltlösung (2 mL) gewaschen. Die braune bis rote Reaktionslösung, wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck auf 2-3 mL eingengt und mit dem 10fachen Volumen an trockenem Diethylether versetzt, woraufhin weiße Feststoffe erhalten werden konnten.

2. *Rink-Amid Harz*: Das getrocknete, vollständig von DMF befreite Harz wurde mit einer Mischung aus TFA, das 5 % trockenes Dichlormethan enthält (8 mL) für zwei bis drei Stunden geschüttelt, wobei das Harz eine tiefrote Farbe annahm. Das Lösemittel wurde abgesaugt und das Harz noch einmal mit wenig frischer Abspaltlösung (2 mL) gewaschen. Die braune bis rote Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck auf 2-3 mL eingengt und mit dem 10fachen Volumen an trockenem Diethylether versetzt, woraufhin weiße erhalten werden konnten.

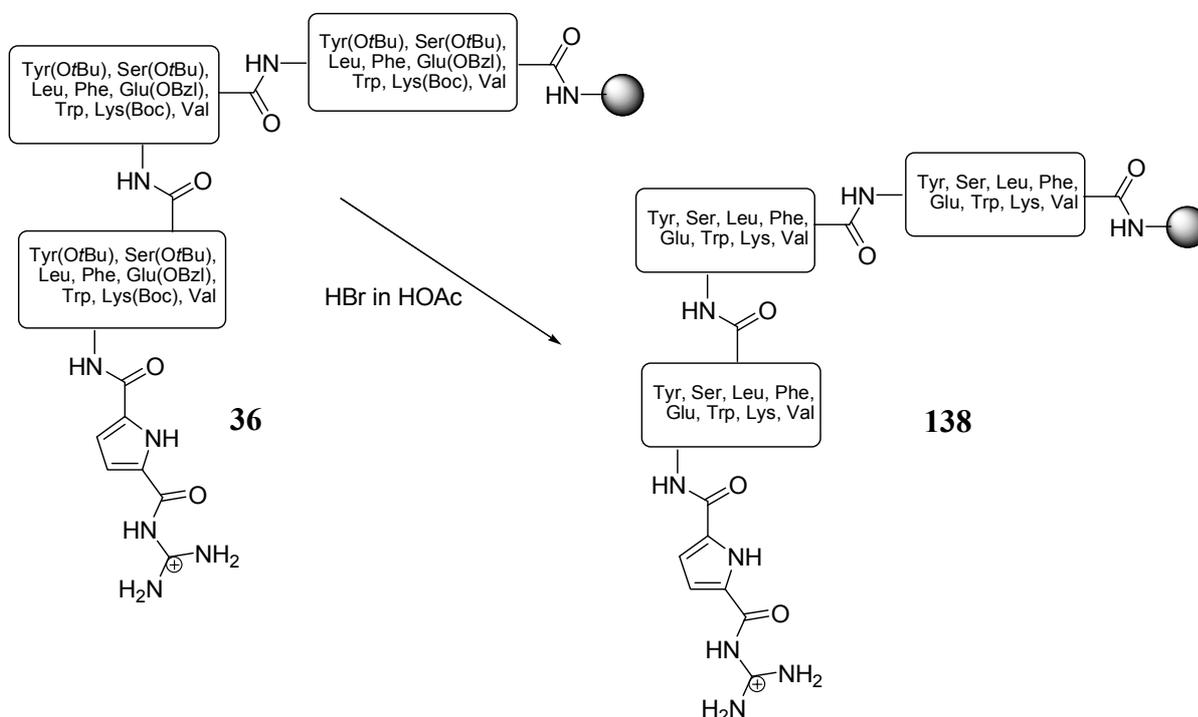
Die Feststoffe wurden über eine P4 Fritte abgesaugt und mit trockenem Diethylether (20 mL) gewaschen. Anschließend wurde das Produkt in wenig destilliertem Methanol aufgenommen, mit verdünnter Salzsäure (2 mL) und bidestilliertem Wasser (30 mL) versetzt und lyophilisiert. Auf diese Weise können voluminöse weiße Feststoffe erhalten werden.



einer Lösung aus DMF und 3 % NMM (jeweils 200 mL) bedeckt und für drei Stunden quellen gelassen. Das Lösemittel wurde durch frisches DMF (je 100 mL) ersetzt und in den einzelnen Reaktionsgefäßen die entsprechende Fmoc-geschützte Aminosäure Fmoc-L-Glu(OBn) **179**, Fmoc-L-Leu **180**, Fmoc-L-Lys(Boc) **181**, Fmoc-L-Phe **182**, Fmoc-L-Ser(OtBu) **183**, Fmoc-L-Trp **184**, Fmoc-L-Tyr(OtBu) **185** und Fmoc-L-Val **186** (2.90 mmol, 6.9 eq bezogen auf die theoretische Beladung des Harzes) und PyBOP (1510 mg, 2.90 mmol, 2.5 eq bezogen auf die theoretische Beladung des Harzes) gegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die überstehende Lösung färbte sich dabei gelb. Das Lösemittel wurde abgesaugt und die *MikroKans* sorgfältig mit DMF (drei Mal mit je 150 mL pro Glasreaktor) gewaschen. Nach jedem Kupplungsschritt wurden aus jedem Reaktionsgefäß zwei *MikroKans* geöffnet, einige Harzkügelchen entnommen und ein Kaiser-Test durchgeführt. Ein negativer Kaiser-Test zeigte einen quantitativen Umsatz der Aminofunktion zum Amid an. Die Mikroreaktoren wurden vereinigt und die Schutzgruppe durch Behandeln des Harzes mit einer Lösung aus DMF und 20 % Piperidin abgespalten (zwei Mal mit je 400 mL). Anschließend wurde das Harz noch sorgfältig mit DMF gewaschen (vier Mal je 300 mL) um letzte Reste des Piperidins zu entfernen. Die Mikroreaktoren wurden entsprechend ihrer Rezeptorsequenz auf die acht Glasreaktoren verteilt, um die weiteren Aminosäurebausteine anzubringen.

Die Mikroreaktoren der Peptidbibliothek wurden sorgfältig mit DMF gewaschen, vereinigt und mit einer 5 %igen Lösung von NMM in DMF (400 mL) versetzt. Dazu wurde PyBOP (11.97 g, 23.0 mmol, 6.8 eq, bezogen auf die Menge an Harz) und das Zwitterion (4.54 g, 23.0 mmol, 6.8 eq, bezogen auf die Menge an Harz) hinzu gegeben und für 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Mit zunehmender Reaktionsdauer ging der anfänglich vorhandene Feststoff in Lösung. Das Lösemittel wurde abgesaugt und es wurde erneut DMF (400 mL), das Zwitterion (1.00 g, 5.07 mmol, 1.5 eq) und PyBOP (5.25 g, 10.1 mmol, 3.0 eq) zu den Mikroreaktoren gegeben und für 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die leicht gelbliche Lösung wurde abgesaugt und die *MikroKans* dreimal mit DMF (je 300 mL) gewaschen. Aus mehreren Mikroreaktoren wurden einige Harzkügelchen entnommen und jeweils ein Kaiser-Test durchgeführt, der in allen Fällen negativ ausfiel. Anschließend wurden die Mikroreaktoren mit Dichlormethan (2 Mal mit je 400 mL), Diethylether (2 Mal mit je 400 mL), Methanol (400 mL) und noch einmal mit Diethylether (400 mL) gewaschen und an der Membranpumpe getrocknet.

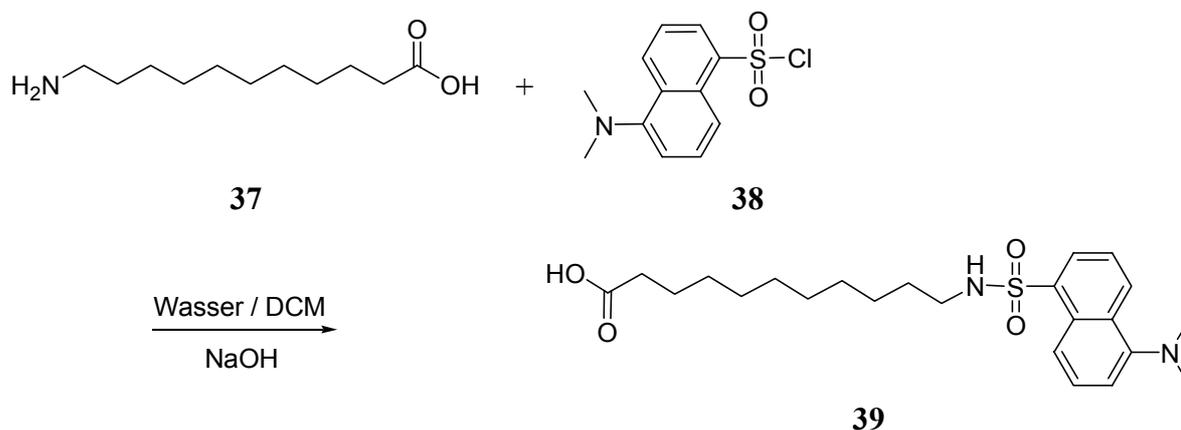
## 7.2 Entschützung der 512 Mitglieder umfassenden Bibliothek 138



Die isolierten Mitglieder der Bibliothek wurden mit einer 30 %ige Lösung aus HBr in Eisessig (je 3 mL) versetzt und für acht Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Rollrandfläschchen (5 mL) wurden mit Methanol aufgefüllt (je 2 mL) und die Reaktionslösung vom Harz dekantiert. Das Harz wurde wiederum mit Methanol (5 mL) bedeckt und für eine Stunde geschüttelt und anschließend das Lösemittel vom Harz dekantiert. Diese Prozedur wurde noch zwei Mal mit Methanol, einmal mit einer Mischung aus Methanol und einer Lösung aus Natriumcarbonat (100 mM) (5:1), anschließend wieder zwei Mal mit Methanol, das BisTris-Puffer enthielt (5 mM), und zum Abschluss noch zwei Mal mit Methanol wiederholt. Durch diese acht Waschvorgänge konnte eine vollständige Entfernung von anhaftender Essigsäure gewährleistet werden. Nach dem Entfernen der Schutzgruppen wurde das Harz getrocknet.

### 7.3 Synthese der fluoreszenzmarkierten Tetrapeptide

#### Synthese des alkylsubstituierten Fluoreszenzmarkers 39



$\alpha$ -Amino- $\omega$ -undecansäure **37** (1208 mg, 6.0 mmol, 2.0 eq) wurde in Wasser (25 mL) und NaOH (960 mg) gelöst und auf 5 °C gekühlt. Dansylchlorid **38** (809 mg, 3.0 mmol, 1.0 eq) wurde in Dichlormethan (35 mL) gelöst und zu der Säure gegeben. Die zweiphasige Mischung wurde über Nacht bei 0°C gerührt und anschließend noch 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde auf pH 3 gebracht und mit Diethylether (200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden intensiv mit 1 N Salzsäure extrahiert und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer wurde konnte das Produkt **39** (1.28 g, 98 %, 2.9 mmol) an der Ölpumpe getrocknet.

$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$

M.W. = 434.59  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

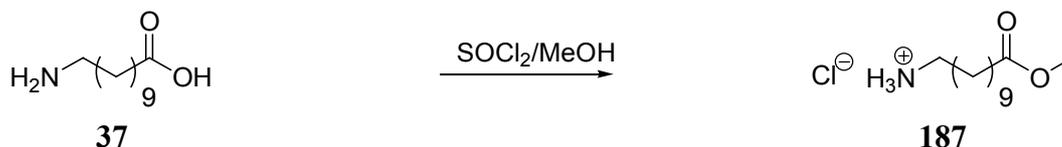
**Ausbeute:** 1.28 g, 98 %, 2.9 mmol

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 1.05 – 1.41 (br s, 16 H;  $\text{CH}_2$ ), 1.58 (q, 2 H;  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 2.31 (t, 2 H;  $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$ ), 2.85-2.88 (m, 7 H;  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.84 (s, 1 H; NH), 7.14 (d, 1 H; CH), 7.47-7.56 (m, 2 H; CH), 8.21-8.29 (m, 2 H; CH), 8.51 (d, 1 H; CH);

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 24.6-29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 34.0 ( $\text{CH}_2$ ), 43.2 ( $\text{CH}_2$ ), 45.4 ( $\text{CH}_3$ ), 115.1-130.3 (aryl-CH), 134.7, 151.6 (aryl-C), 179.6 ( $\text{COOH}$ );

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3287 (w), 2929-2854 (s), 1708 (s), 1320 (m), 1144 (m), 791 (m).

### Darstellung von $\alpha$ -Amino- $\omega$ -undecansäuremethylester **187**



$\alpha$ -Amino- $\omega$ -undecansäure **37** (4.00 g, 20 mmol, 1.0 eq) wurde in absolutem Methanol (30 mL) suspendiert und mit einigen Tropfen DMF versetzt. Thionylchlorid (3.57 g, 30 mmol, 1.5 eq) wurde langsam zu der Suspension getropft und die Mischung für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das zähe farblose Öl aus einer Diethylether/Methanol Mischung umkristallisiert. Es wurde **187** (4.15 g, 16.5 mmol, 82 %) als weiße Kristalle erhalten.

$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{ClNO}_2$

M.W. = 251.79  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Ausbeute:** 4.15 g, 82 %, 16.5 mmol

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.23 (br, 12 H;  $\text{CH}_2$ ), 1.56-1.65 (m, 4 H;  $\text{CH}_2$ ), 2.27 (t, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 2.93 (m, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 3.63 (s, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 7.09 (s, 3 H;  $\text{NH}_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 24.9, 26.3, 27.3, 29.0, 29.1, 29.2, 29.3, 29.3, 34.0, 40.3, (CH<sub>2</sub>), 51.4 (CH<sub>3</sub>), 174.2 (C<sub>q</sub>).

### Synthese des dansylierten $\alpha$ -Amino- $\omega$ -undecansäuremethylesters **44**



Dansylchlorid (216 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq) **38** wurde in Dichlormethan (20 mL) gelöst, mit NMM (0.2 mL) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Suspension wurde portionsweise  $\alpha$ -Amino- $\omega$ -undecansäuremethylester **187** (227 mg, 0.9 mmol, 1.1 eq) gegeben und die Mischung für 48 Stunden gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Die klare gelbe Lösung wurde mit Dichlormethan (20 mL) verdünnt und drei Mal mit verdünnter Salzsäure (je 20 mL), einmal mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung (20 mL) und einmal mit gesättigter Natriumchlorid Lösung (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Zurück bleibt ein gelber Feststoff **44** (234 mg, 0.5 mmol, 65 %).



$$\text{M.W.} = 448.62 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

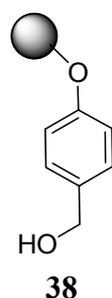
**Ausbeute:** 234 mg, 65 %, 0.5 mmol

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 1.06–1.23 (m, 14 H;  $\text{CH}_2$ ), 1.57 (m, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 2.29 (t, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 2.87 (m, 8 H;  $\text{CH}_2$  und  $\text{CH}_3$ ), 3.64 (s, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 4.53 (t, 1 H; NH), 7.16 (d, 1 H; CH), 7.52 (m, 2 H; CH), 8.22 (m, 2 H; CH), 8.51 (d, 1 H; CH);

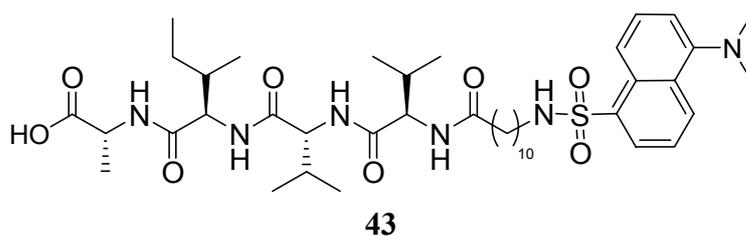
**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 24.9, 26.3, 28.9, 29.0, 29.1, 29.2, 29.2, 29.3, 29.5, 34.0, 43.3 ( $\text{CH}_2$ ), 45.4, 51.4 ( $\text{CH}_3$ ), 115.1, 118.6, 123.2, 128.3, 129.6, 129.9 (CH) 130.4, 134.7, 152.0, 174.2 ( $\text{C}_q$ );

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3309 (s), 2921 (s), 2849 (s), 1723 (s), 1576 (w), 1455 (m), 1431 (m), 1332 (m), 1271 (w), 1210 (m), 1173 (m), 1066 (w), 786 (m), 631 (m).

### 7.3.1 Synthese des fluoreszenzmarkierten Tetrapeptids L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH **43**



1. FmocAla / DIC / DMAP  
DCM / DMF
  2. 20 % Piperidin in DMF
  3. FmocAA / PyBOP / DMF
  4. 20 % Piperidin in DMF
- 
5. Wiederholen der Schritte 3 und 4
  6. DANSYL-Linker / PyBOP / DMF
  7. 50 % TFA in DCM



Für die Synthese des fluoreszenzmarkierten Substrats wurde an Wang-Harz (500 mg, 1.08 mmol/g, 0.60 mmol, 1.0 eq) nach einer Standardvorschrift Fmoc-Ala (374 mg, 1.20 mmol, 2.0 eq) mit Diisopropylcarbodiimid (152 mg, 1.20 mmol, 2.0 eq) und DMAP (6 mg, 0.1 eq) angeknüpft. Diese Kupplung wurde zwei Mal durchgeführt, um eine quantitative Umsetzung der Hydroxylfunktion des Wang-Linkers zu gewährleisten. Die nachfolgende Abspaltung der Schutzgruppe unter Standardbedingungen (20 % Piperidin in DMF) verlief quantitativ (Ausbeutebestimmung via UV). Die anschließende Synthese der Tripeptideinheit Isoleucin, Valin, Valin (1.50 mmol, 2.5 eq, 530 mg [Isoleucin], 509 mg [Valin]) an der festen Phase durch Kupplung mit PyBOP (780 mg, 1.50 mmol, 2.5 eq) in DMF und anschließender Entschützung verlief ebenfalls quantitativ (UV-Ausbeute 95-99 %), nach einer Standardvorschrift. Eine weitere Reinigung durch Chromatographie war nicht erforderlich. Das Harz wurde sehr sorgfältig mit Dichlormethan (fünf Mal je 10 mL), Methanol (drei Mal je 10 mL), Diethylether (drei Mal je 10 mL) und wiederum Dichlormethan (drei Mal je 10 mL) gewaschen, da Spuren an DMF die Ausbeuten bei der Abspaltung des Produktes vom Harz drastisch verringern. Das fluoreszenzmarkierte Peptid wurde unter Standardbedingungen vom Harz abgespalten, so konnten 470 mg (0.58 mmol, 96 %) des Peptids **43** erhalten werden.



$$\text{M.W.} = 817.09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

**Ausbeute:** 470 mg, 96 %, 0.58 mmol

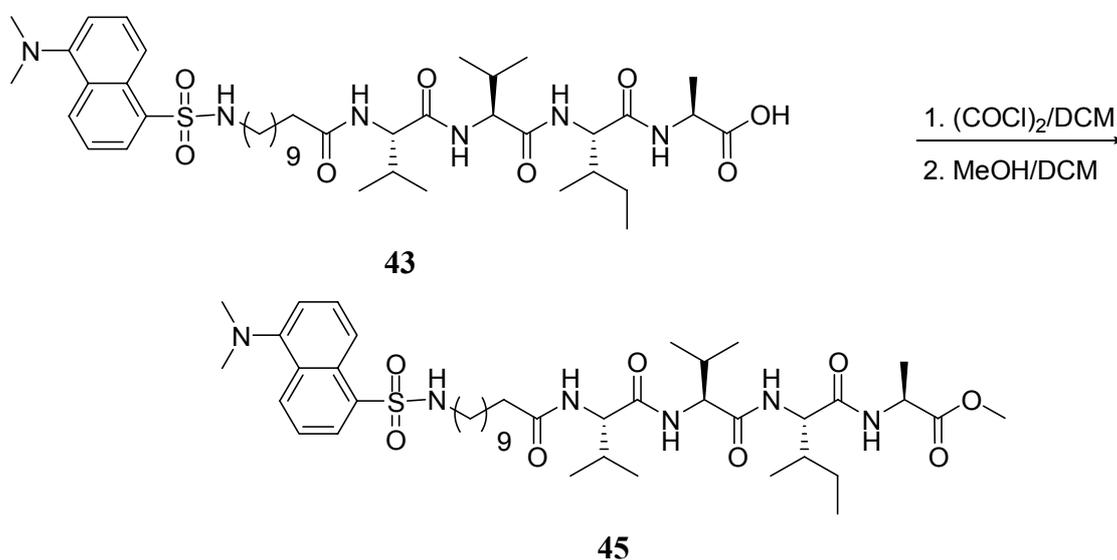
**Smp.:** 215 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 0.78–0.84 (m, 20 H; CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 0.96 – 1.24 (m, 20 H; CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1.42 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 1.69 (m, 1 H; CH), 1.91 (m, 1 H; CH), 2.10 (m, 1 H; CH), 2.75 (q, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.84 (s, 6 H; CH<sub>3</sub>), 4.17 (m, 4 H; CH), 7.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1 H; CH), 7.59 (d·d, 2 H; CH), 7.71 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 9.2 Hz, 1 H; NH), 7.82 (m, 3 H; NH), 8.08 (d·d, 1 H; CH), 8.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.0 Hz, 1 H; NH), 8.31 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.6 Hz, 1 H; CH), 8.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.5 Hz, 1 H; CH);

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 11.1, 15.3, 17.2, 18.3, 18.4, 19.3, 19.4, (CH<sub>3</sub>), 24.3, 25.6, 26.0, 28.5, 28.7, 28.9, 28.9, 29.0, 29.1 (CH<sub>2</sub>), 35.3 (CH<sub>2</sub>), 36.9 (CH), 42.5 (CH<sub>2</sub>), 45.3 (CH<sub>3</sub>), 47.6, 56.5, 57.8, 57.9 (CH), 115.4, 119.7, 123.8, 127.9, 128.5, 129.3 (CH), 136.5, 151.0, 170.7, 170.8, 171.3, 172.4, 174.0 (C<sub>q</sub>);

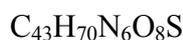
**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3283 (s), 2958 (s), 2930 (s), 2855 (m), 1710 (vs), 1636 (s), 1542 (m), 1457 (w), 1395 (w), 1319 (w), 1203 (w), 1142 (w), 791 (w).

### Synthese des Methylesters **45** aus dem fluoreszenzmarkierten Tetrapeptid **43**



Das Peptid **43** (50 mg, 0.06 mmol, 1.0 eq) wurde in einem inertisierten, ausgeheizten Kolben vorgelegt und in Dichlormethan (6 mL) und zwei Tropfen absoluten DMF suspendiert. Zu dieser Suspension wurde Oxalylchlorid (30 mg, 0.24 mmol, 4.0 eq) langsam über ein Septum zugegeben und die Mischung für drei Stunden unter Argon refluxiert. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und der gelbe, ölige Rückstand in Dichlormethan (4 mL) und absolutem Methanol (2 mL) aufgenommen und über Nacht bei

Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Chloroform, Methanol, Triethylamin 99:5:1) am Chromatotron getrennt. Auf diese Weise konnten 25 mg (50 %, 0.03 mmol) des Methylesters erhalten werden.



$$\text{M.W.} = 831.11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

**Ausbeute:** 25 mg, 50 %, 0.03 mmol

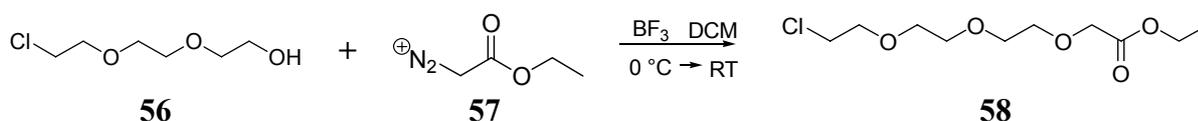
**R<sub>f</sub>:** 0.81 (Kieselgel; Chloroform, Methanol, Triethylamin 99:5:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):** im <sup>1</sup>H NMR Spektrum konnten die Signale nicht eindeutig zugeordnet werden, da zu wenig Substanz zur Verfügung stand. Aus der Verteilung der Intensitäten der 6 Methylprotonen des Dansylrestes ( $\delta = 2.81$ ) im Vergleich zu den drei neu dazu gekommenen Protonen des Methylesters ( $\delta = 3.57$ ) wurde auf die Bildung des Methylesters geschlossen.

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 831 [M+H]<sup>+</sup>, 728 [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 615 [M-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 516 [C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

### 7.3.2 Synthese der wasserlöslichen fluoreszenzmarkierten Tetrapeptide

**Darstellung von Ethyl-2-(2-(2-(2-chlorethoxy)ethoxy)ethoxy)acetat (**58**)<sup>[118]</sup>**



Chlortriethylenglykol **56** (5.18 g, 30.6 mmol, 1.0 eq) wurde in absolutem Dichlormethan (90 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurden unter Argon Diazoessigsäureethylester **57** (3.45 g, 30.6 mmol, 1.0 eq) zugetropft, Anschließend wurden einige Tropfen BF<sub>3</sub>-Etherat (0.2 mL) zugegeben und die Mischung über Nacht auf Raumtemperatur gebracht, dabei färbte sich die Reaktionsmischung von hellgelb nach dunkelbraun. Zugabe von weiterem BF<sub>3</sub>-Etherat führte zu keiner weiteren Gasentwicklung mehr. Zum Abbruch der Reaktion wurde eine 0.2 N Natriumhydroxid-Lösung (10 mL) hinzugegeben, für 10 min gerührt und anschließend die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit Wasser (10 mL) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck

am Rotationsverdampfer entfernt. Das zurückbleibende dunkelbraune Öl wurde durch eine Kugelrohrdestillation gereinigt, wodurch **58** 5.21 g (20.5 mmol, 67 %) als farbloses Öl erhalten wurde.



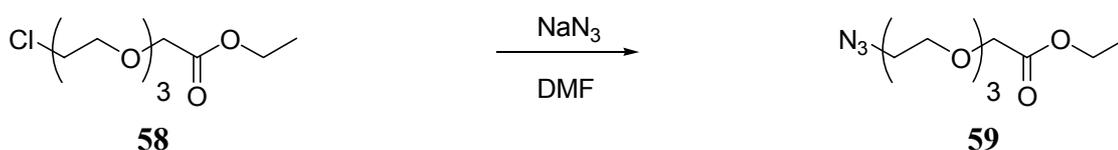
$$\text{M.W.} = 254.70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

**Ausbeute:** 5.21 g, 67 %, 20.5 mmol

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 1.23$  (t, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 3.54-3.74 (m, 10 H;  $\text{CH}_2$ ), 4.09 (s, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 4.15 (q, 2 H;  $\text{CH}_2$ );

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 14.11$  ( $\text{CH}_3$ ), 42.6, 68.6, 70.5, 70.5, 70.6, 70.6, 70.8, 71.3 ( $\text{CH}_2$ ), 170.3 ( $\text{C}_q$ ).

#### Darstellung von Ethyl-2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)acetat (**59**)<sup>[118]</sup>



Zu einer Lösung des Esters **58** (5.18 g, 20.4 mmol, 1.0 eq) in absolutem DMF (50 mL) wurde Natriumazid (1.91 g, 29.5 mmol, 1.5 eq) gegeben und die Suspension fünf Stunden bei 100 °C erhitzt. Ausgefallenes Natriumchlorid wurde abfiltriert, das DMF unter verminderten Druck am Rotationsverdampfer entfernt und die entstandene Suspension in Dichlormethan (50 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde zwei Mal mit Wasser (je 20 mL) gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das zurückbleibende gelbe Öl durch eine Kugelrohrdestillation gereinigt. Auf diese Weise erhält man das Azid **59** in einer Ausbeute von 82 % (4.38 g, 16.7 mmol).

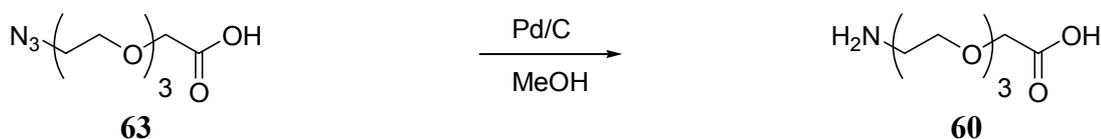


$$\text{M.W.} = 261.28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

**Ausbeute:** 4.38 g, 82 %, 16.7 mmol



### Darstellung von 2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)essigsäure (**60**)<sup>[118]</sup>



Das Azid **63** (2.80 g, 12.0 mmol, 1.0 eq) wurde in Methanol (40 mL) gelöst und unter Argon mit Pd/C (300 mg) versetzt. Die Suspension wurde in einem Hochdruckautoklaven bei einem Wasserstoffdruck von 35 bar über Nacht gerührt. Das Pd/C-Gemisch wurde über Celite abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und man erhielt **60** als ein gelbes Öl (2.25 g, 10.9 mmol, 91 %).

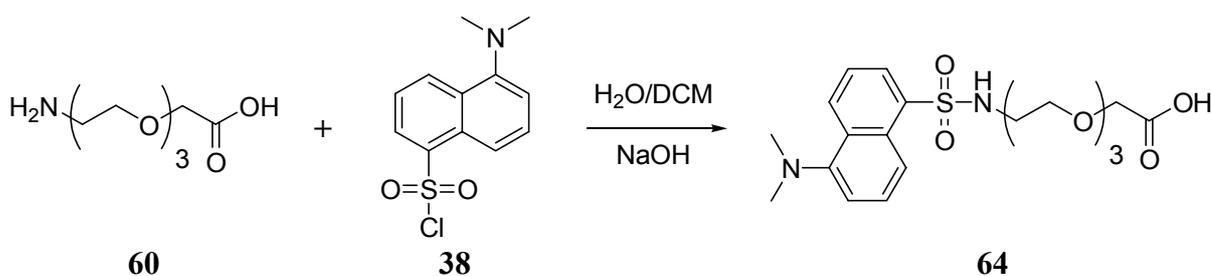
$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_5$

M.W. = 207.22  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Ausbeute:** 2.25 g, 91 %, 10.9 mmol

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 3.10 (m, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 3.58-3.70 (m, 10 H;  $\text{CH}_2$ ), 3.88 (s, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 7.31 (bs, 2 H;  $\text{NH}_2$ ).

### Synthese des dansylmarkierten Triethylglykollinkers (**64**)

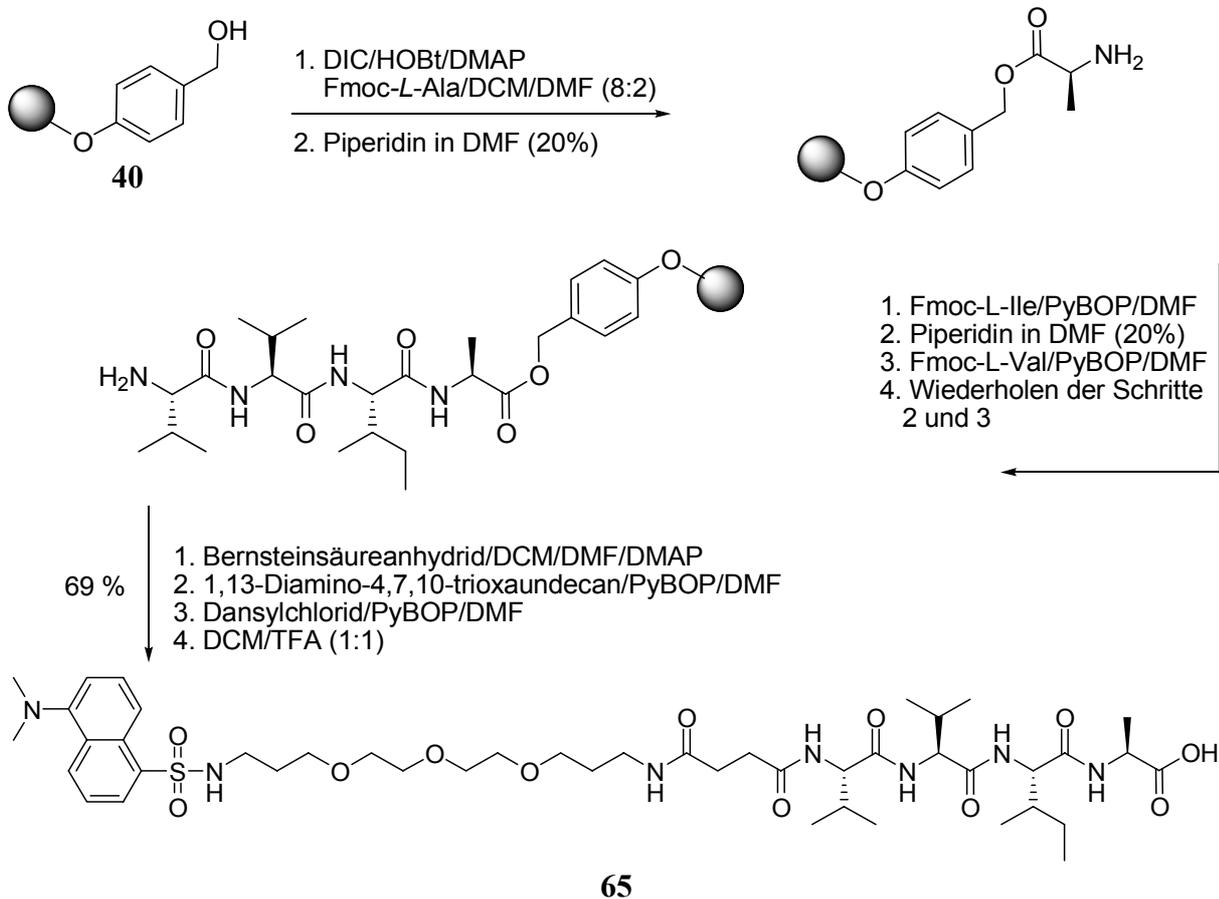


Die Ethylenglykolcarbonsäure **60** (600 mg, 2.9 mmol, 3.0 eq) wurde in Wasser (10 mL) gelöst und mit NaOH (300 mg, 15 mmol, 7.5 eq) versetzt. Dazu wurde Dichlormethan (10 mL) und Dansylchlorid **38** (270 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) gegeben und die zweiphasige Mischung über Nacht intensiv gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan (je 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Das zurückbleibende stark fluoreszierende Öl wurde im Vakuum getrocknet. Es konnten 90 mg (0.2 mmol, 20 %) der wasserlöslichen dansylierten Verbindung **64** erhalten werden.

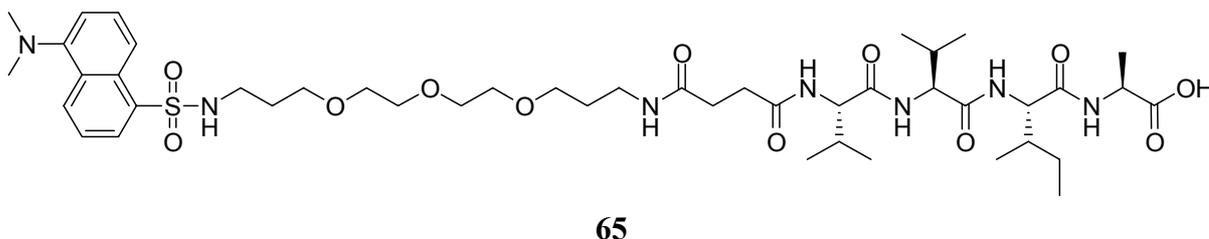
C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>SM.W. = 440.51 g·mol<sup>-1</sup>**Ausbeute:** 90 mg, 20 %, 0.20 mmol

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 2.86 (s, 6 H; CH<sub>3</sub>), 3.09 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.1 Hz, 2 H; CH<sub>2</sub>) 3.39 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 3.48-3.75 (m, 8 H; CH<sub>2</sub>), 5.80 (s, 2 H; NH), 7.15 (d×d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.9 Hz, <sup>5</sup>J<sub>H-H</sub> = 0.8 Hz, 1 H; CH); 7.49 (d×d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.5 Hz, 1 H; CH), 7.53 (d×d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.5 Hz, 1 H; CH), 8.21 (d×d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.3 Hz, <sup>5</sup>J<sub>H-H</sub> = 1.2 Hz, 1 H; CH), 8.30 (d×t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.7 Hz, <sup>5</sup>J<sub>H-H</sub> = 0.8 Hz, 1 H; CH), 8.51 (d×t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.5 Hz, <sup>5</sup>J<sub>H-H</sub> = 1.1 Hz, 1 H; CH);

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 43.0 (1 C; CH<sub>2</sub>), 45.4 (CH<sub>3</sub>), 61.6, 69.4, 70.2, 70.3, 72.6 (7 C; CH<sub>2</sub>), 115.1, 119.0, 123.1, 128.2, 129.3 129.6 (CH), 129.8, 130.3, 135.0, 151.8, 160.6 (CH).

**Synthese des fluoreszenzmarkierten Alzheimer Modellpeptids 65**

Das fluoreszenzmarkierte Tetrapeptid **65** wurde auf Wang-Harz nach Standardprotokoll synthetisiert. Dazu wurde Wang-Harz (300 mg, 1.11 mmol/g, 0.33 mmol, 1.0 eq) für eine Stunde in DMF vorgequollen und dann die erste Aminosäure Fmoc-L-Ala (205 mg, 0.66 mmol, 2.0 eq) mit DIC (0.66 mmol, 2.0 eq) und DMAP (0.03 mmol, 0.1 eq) in einer DMF/Dichlormethan Mischung (2/8) für 20 Stunden gekuppelt. Dieser Reaktionsschritt wurde wiederholt, um eine quantitative Umsetzung der freien OH-Gruppen zu gewährleisten. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde durch zweimaliges Behandeln des Harzes mit Piperidin in DMF (20 %) entfernt. Die anderen drei Aminosäuren (L-Ile, L-Val, L-Val) wurden ebenfalls nach einer Standardvorschrift angebracht: 2.5 eq der Aminosäure, PyBOP (430 mg, 0.83 mmol, 2.5 eq) wurden in DMF, das 3 % NMM enthält, für 4 Stunden geschüttelt und anschließend die Schutzgruppe mit Piperidin in DMF (20 %) abgespalten. Die freie Aminofunktion des Tetrapeptids wurde mit Bernsteinsäureanhydrid (330 mg, 3.30 mmol, 10.0 eq) in einer DMF/Dichlormethan Mischung (10 mL, 2/8) für 3 Stunden gekuppelt. Die resultierende freie Carbonsäure wurde mit 1,13-Diamino-4, 7,10-trioxa-undecan (730 mg, 3.30 mmol, 10.0 eq) und PyBOP (430 mg, 0.83 mmol, 2.5 eq) in DMF, das 3 % NMM enthält, für 4 Stunden gekuppelt. Das freie Amin wurde anschließend mit Dansylchlorid **38** (270 mg, 1.00 mmol, 3.0 eq) für 20 Stunden umgesetzt. Nach sorgfältigem Waschen wurde das Produkt innerhalb von 3 Stunden mit einer 1:1 Mischung aus Dichlormethan und TFA abgespalten. Das Lösungsmittel wurde zu einem großen Teil am Rotationsverdampfer entfernt und das entstandene orangene Öl mit trockenem Diethylether behandelt, woraufhin **65** (69 %, 210 mg, 0.22 mmol) als hellgrüner Feststoff ausfiel, der analytisch rein war.



$C_{45}H_{73}N_7O_{12}S$ ,

M.W. = 935.17  $g \cdot mol^{-1}$

**Ausbeute:** 69 %, 210 mg, 0.22 mmol

**Smp.:** 246 °C (Zersetzung)

**$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 0.76-0.83 (m, 18 H; 6  $CH_3$ ), 1.06 (m, 1 H;  $CH_2$ ), 1.23 (d,  $^3J_{H-H}$  = 7.3 Hz, 3 H;  $CH_3$ ), 1.41 (m, 1 H;  $CH_2$ ), 1.51 (q,  $^3J_{H-H}$  = 6.6 Hz, 2 H;  $CH_2$ ), 1.58 (q,  $^3J_{H-H}$  = 6.8 Hz, 2 H;  $CH_2$ ), 1.70 (m, 1 H;  $CH_2$ ), 1.94 (m, 1 H; CH), 2.24-2.42 (m, 4 H;  $CH_2$ ), 2.83 (s, 6 H;  $CH_3$ ), 3.04 (m, 3 H; CH), 3.20-3.23 (m, 4 H;  $CH_2$ ), 3.34-3.51 (m, 12 H;  $CH_2$ ),

4.12-4.20 (m, 4 H; CH), 7.25 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$  Hz, 1 H; CH), 7.65 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 9.0$  Hz, 1 H; NH), 7.77 (t,  $^3J_{\text{H-H}} = 5.6$  Hz, 1 H; NH), 7.79 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$  Hz, 1 H; NH), 7.82 (t,  $^3J_{\text{H-H}} = 5.8$  Hz, 1 H; NH), 7.84 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$  Hz, 1 H; NH), 8.09 (d×d,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$  Hz,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$  Hz, 1 H; CH), 8.11 (m, 1 H; NH), 8.29 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 8.6$  Hz, 1 H; CH), 8.45 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 8.6$  Hz, 1 H; CH);

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 11.1, 15.3, 17.2, 18.2, 18.5, 19.3$  (CH<sub>3</sub>), 24.4, 29.3, 29.5, 30.2, 30.4, 35.9, 36.8 (CH<sub>2</sub>), 31.0, 31.2, (CH), 45.2 (CH<sub>3</sub>), 47.6, 56.5, 57.9, 58.1 (CH), 67.4, 68.2, 69.5, 69.6, 69.7, 69.8 (CH<sub>2</sub>), 115.3, 119.3, 123.7, 127.9, 128.5, 129.2 (CH), 129.2, 129.5, 136.1, 151.4, 170.7, 170.9, 171.2, 171.4, 171.7, 174.0 (C<sub>q</sub>);

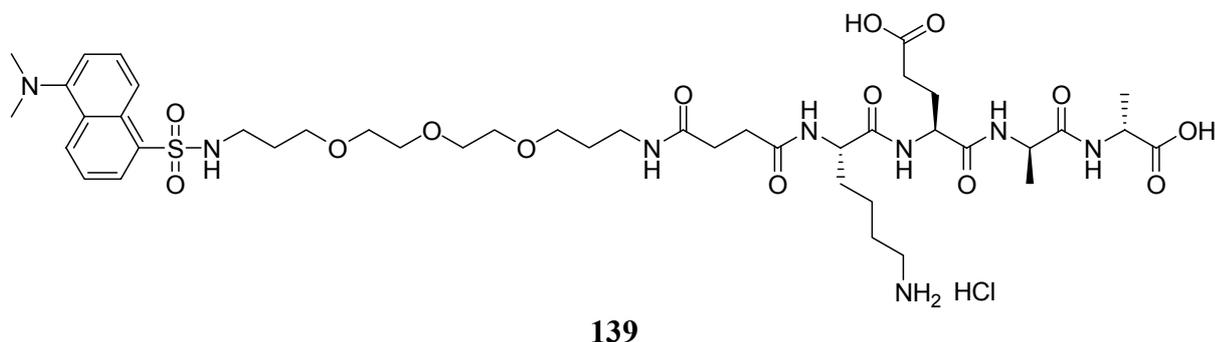
**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 958 [M+Na]<sup>+</sup>, 936 [M+H]<sup>+</sup>, 758 [M-C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup>, 576 [C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S+K]<sup>+</sup>;

**HR-MS (pos. ESI):** 936.511 (berechnet für C<sub>45</sub>H<sub>74</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>S<sup>+</sup>: 936.511);

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3422 (s), 3286 (s), 2963 (m), 2927 (s), 2873 (m), 1636 (s), 1541 (m), 1457 (w), 1396 (w), 1198 (w), 1143 (w), 795 (w).

### Synthese des fluoreszenzmarkierten Modellpeptids für das Peptidoglycan Modellpeptid **139**

Das fluoreszenzmarkierte Peptid **139** wurde nach der gleichen Vorschrift, wie das Alzheimer Modell Peptid **65** synthetisiert.



C<sub>43</sub>H<sub>69</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>14</sub>S

M.W. = 989.57 g·mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:** 152 mg, 46 %, 0.15 mmol

Smp.: 172 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 1.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.1 Hz 3 H; CH<sub>3</sub>), 1.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.3 Hz 3 H; CH<sub>3</sub>), 1.21-1.35 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 1.50-1.60 (m, 6 H; CH<sub>2</sub>), 1.63 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.72 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.83 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 2.20-2.40 (m, 6 H; CH<sub>2</sub>), 2.71 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.82 (q, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.0 Hz, 2 H; CH<sub>2</sub>), 3.03 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 3.09 (s, 6 H; CH<sub>3</sub>), 3.21-3.24 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 3.32-3.37 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 3.39-3.43 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 3.44-3.50 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 4.13-4.20 (m, 3 H; CH), 4.27 (m, 1 H; CH), 7.73 (m, 3 H; ar-CH), 7.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5.1 Hz, 1 H; NH), 7.96 (s, 3 H; NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.98 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.7 Hz, 1 H; NH), 8.02 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.7 Hz, 1 H; NH), 8.06-8.15 (m, 3 H; CH), 8.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1 H; NH), 8.56 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5.3 Hz, 1 H; NH), 8.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.3 Hz, 1 H; NH);

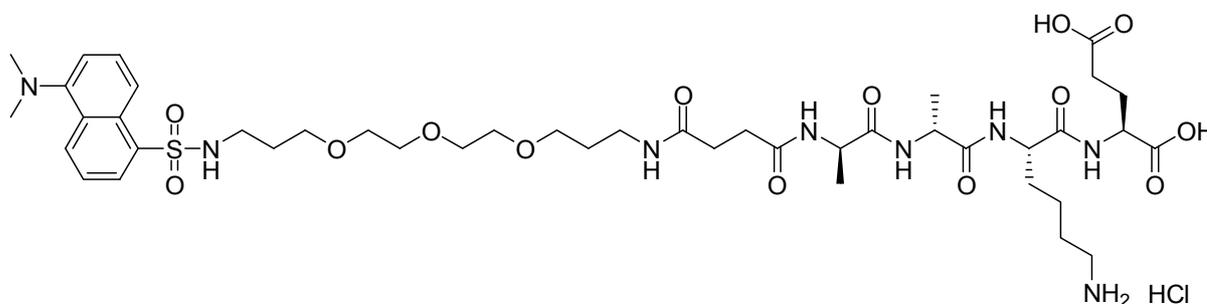
**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 17.3, 18.3 (CH<sub>3</sub>), 22.4, 25.9, 26.0, 26.6, 27.2, 29.5, 29.6, 30.4, 30.9, 30.9, 31.0, 36.0, 38.6 (CH<sub>2</sub>), 40.2 (CH<sub>3</sub>), 45.8, 47.4, 47.8, 52.4 (CH), 67.2, 68.0, 69.3, 69.4, 69.5, 69.6 (CH<sub>2</sub>), 125.1, 125.3, 125.5, 127.8, 128.6, 129.0, 129.1 (CH), 136.6, 145.5, 171.2, 171.5, 171.7, 172.0, 172.3, 174.0, 174.1 (C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 953 [M<sup>+</sup>], 864 [C<sub>40</sub>H<sub>62</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>S<sup>+</sup>], 665 [C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S<sup>+</sup>], 536 [C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sup>+</sup>], 454 [C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sup>+</sup>];

**HR-MS (pos. ESI)** 953.467 (berechnet für C<sub>43</sub>H<sub>68</sub>N<sub>8</sub>O<sub>14</sub>S<sup>+</sup> 953.465);

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3430 (s), 3286 (s), 2938 (m), 2868 (m), 1732 (m), 1653 (s), 1541 (m), 1458 (w), 1396 (w), 1320 (w), 1212 (w), 1143 (w), 795 (w).

### Synthese des fluoreszenzmarkierten inversen Modellpeptids für das Peptidoglycan Modellpeptid 140



140

C<sub>43</sub>H<sub>69</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>14</sub>S

M.W. = 989.57 g·mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:** 165 mg, 52 %, 0.17 mmol

**Smp.:** 106 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 1.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.1 Hz 3 H; CH<sub>3</sub>), 1.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.1 Hz 3 H; CH<sub>3</sub>), 1.25-1.35 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 1.49-1.60 (m, 6 H; CH<sub>2</sub>), 1.66 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.77 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.96 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 2.22 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.4 Hz, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.30-2.39 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 2.70 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.83 (q, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5.9 Hz, 2 H; CH<sub>2</sub>), 3.03 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 3.14 (s, 6 H; CH<sub>3</sub>), 3.21-3.24 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 3.31-3.37 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 3.38-3.42 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 3.44-3.50 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 4.14-4.23 (m, 4 H; CH), 7.77 (m, 2 H; ar-CH), 7.84 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.2 Hz, 2 H; ar-CH), 7.95 (t, 1 H; NH), 7.99 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 1 H; NH), 8.00 (s, 3 H; NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.06 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5.2 Hz, 1 H; NH), 8.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.9 Hz, 1 H; NH), 8.18 (m, 2 H; ar-CH), 8.61 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.1 Hz, 1 H; NH), 8.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.4 Hz, 1 H; NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 17.7, 17.8 (CH<sub>3</sub>), 22.3, 26.5, 26.6, 29.5, 29.6, 30.1, 31.0, 31.1, 31.4, 36.0, 38.6, 40.2 (CH<sub>2</sub>), 46.2 (CH<sub>3</sub>), 48.7, 49.1, 51.2, 52.6 (CH), 67.5, 68.2, 69.5, 69.7, 69.8, 69.9 (CH<sub>2</sub>), 125.4, 127.3, 127.8, 128.4, 129.0, 129.1 (CH), 136.7, 171.7, 172.0, 172.2, 172.5, 172.7, 173.2, 173.9 (C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 953 [M<sup>+</sup>], 806 [M<sup>+</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>4</sub>], 678 [M<sup>+</sup>-C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>], 607 [C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sup>+</sup>], 536 [C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sup>+</sup>], 452 [C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sup>+</sup>];

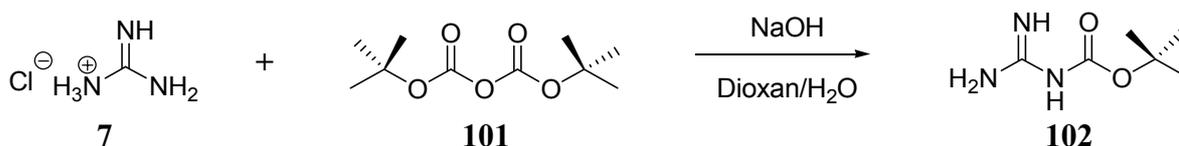
**HR-MS (pos. ESI)** 953.466 (berechnet für C<sub>43</sub>H<sub>68</sub>N<sub>8</sub>O<sub>14</sub>S<sup>+</sup> 953.465);

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3413 (s), 3268 (s), 2925 (m), 1732 (m), 1647 (s), 1542 (m), 1450 (w), 1321 (w), 1320 (w), 1214 (w), 1143 (w), 795 (w).

## 7.4 Synthese der Rezeptoren

### 7.4.1 Synthese der Carboxylat-Bindungsstelle

#### Darstellung von N-*t*-Butyloxycarbonylguanidin **102**<sup>[125]</sup>



Guanidiniumhydrochlorid **7** (29.3 g, 275 mmol, 5.0 eq) und Natriumhydroxid (12.0 g, 300 mmol, 5.5 eq) wurden in Wasser (50 mL) vorgelegt. Dazu wurde eine Lösung von Boc<sub>2</sub>O **101** (12.0 g, 55 mmol, 1.0 eq) in Dioxan (100 mL) über einen Zeitraum von 8 Stunden bei 0 °C zugetropft. Anschließend wurde die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Im Anschluss daran wurde Wasser (50 mL) zu der Reaktionsmischung gegeben und dreimal mit Ethylacetat (je 300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Man erhielt **102** (8.19 g, 51.4 mmol, 94 %) als einen weißen Feststoff, der an der Ölpumpe getrocknet wurde.

C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

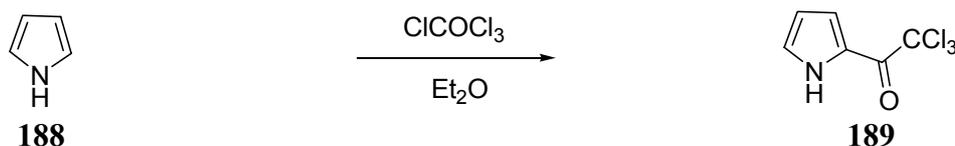
M.W. = 159.19 g·mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:** 8.19 g, 94 %, 51.4 mmol

**Smp:** 215 °C (Zersetzung)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.35 (s, 9 H; CH<sub>3</sub>), 6.92 (bs, 4 H; NH);

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 28.6 (CH<sub>3</sub>), 76.0, 163.0, 163.5 (C<sub>q</sub>).

**Darstellung von 2-Trichloracetyl-1H-pyrrol **189****<sup>[165]</sup>

In einem 2 L Dreihalsrundkolben wurde trockener Diethylether (300 mL) und Trichloracetylchlorid (280 g, 1.54 mol, 1.03 eq) vorgelegt und mit Argon gespült. Anschließend wurde Pyrrol (**188**) (100.0 g, 1.49 mol, 1.0 eq) in trockenem Ether (700 mL) gelöst und über einen Präzisionstropftrichter innerhalb von drei Stunden zugetropft. Die Reaktionslösung färbte sich dabei violett und erhitzte sich zum Sieden. Nach vollständiger Zugabe des Pyrrols wurde noch eine Stunde weiter refluxiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam mit einer Lösung aus Kaliumcarbonat (130 g, 0.93 mol, 0.6 eq) in Wasser (400 mL) versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit Diethylether (300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Aktivkohle (5 g) versetzt und über Celite filtriert. Die rötliche etherische Phase wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und der zurückbleibende dunkelgraue Feststoff aus Hexan umkristallisiert. Auf diese Weise wurde das metallisch glänzende Produkt **189** (275 g, 1.29 mol, 87 %) erhalten.



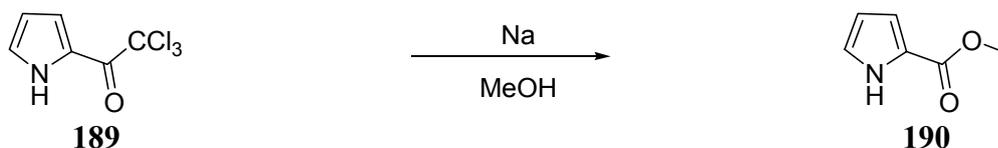
$$\text{M.W.} = 212.46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

**Ausbeute:** 275 g, 87 %, 1.29 mol

**Smp.:** 72-74 °C

**R<sub>f</sub>:** 0.34 (Kieselgel; Hexan, Ethylacetat 10:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 6.38 (d-d, 1 H; CH), 7.17 (d, 1 H; CH), 7.39 (m, 1 H; CH), 9.58 (bs, 1 H; NH).

**Darstellung von 2-Methoxycarbonyl-1*H*-pyrrol (190)**

In absolutem Methanol (750 mL) wurde Natrium (2.60 g, 110 mmol, 0.14 eq) gelöst und auf Raumtemperatur abgekühlt. Trichloracetylpyrrol **189** (185 g, 870 mmol, 1.0 eq) wurde portionsweise innerhalb von 30 min hinzugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Diethylether (1000 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 3 N Salzsäure (65 mL) und anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (65 mL) gewaschen. Die etherische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, auf 300 mL eingengt und mit Aktivkohle (3 g) versetzt. Die Aktivkohle wurde heiß über Celite abfiltriert. Beim Abkühlen bildeten sich farblose Kristalle, die abfiltriert und mit wenig kaltem Diethylether gewaschen wurden. Es wurde 2-Methoxycarbonyl-1*H*-pyrrol **190** (95.2 g, 760 mmol, 87 %) als farblose Kristalle erhalten.

$\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$

M.W. = 125.13 g·mol<sup>-1</sup>

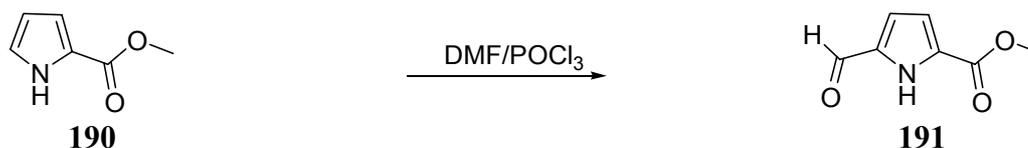
**Ausbeute:** 95.2 g, 87 %, 760 mmol

**Smp:** 73 °C

**Rf:** 0.32 (Kieselgel; Hexan, Ethylacetat 6:4)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 3.75 (s, 3 H; CH<sub>3</sub>), 6.16 (m, 1 H; py-CH), 6.78 (m, 1 H; py-CH), 7.00 (m, 1 H; py-CH), 11.87 (s, 1 H; py-NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 51.6 (CH<sub>3</sub>), 110.2, 114.1, 123.1 (py-CH), 127.4 (py-C<sub>q</sub>), 160.3 (C<sub>q</sub>).

**Darstellung von 5-Formyl-2-methoxycarbonyl-1H-Pyrrol **191****<sup>[166]</sup>

In einem 2 L-Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Tropftrichter und Thermometer wurde DMF (28.8 g, 396 mmol, 30.3 mL, 1.1 eq) vorgelegt und auf 5-10 °C abgekühlt. Dazu wurde langsam Phosphorylchlorid (60.8 g, 396 mmol, 36.4 mL) zugetropft und darauf geachtet, dass die Temperatur 10 °C nicht überstieg. Nach beendeter Zugabe wurde das Eisbad entfernt, 15 min bei RT gerührt und Dichlormethan (90 mL) hinzugegeben. Es wurde erneut auf etwa 5-10 °C abgekühlt und innerhalb von einer Stunde der Methylester **190** (40.0 g, 354 mmol, 1.0 eq), gelöst in Dichlormethan (150 mL), zu der gekühlten Lösung zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch 20 min zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde eine Lösung aus Natriumacetat (270 g, 1.98 mol, 5.0 eq) und Wasser (360 mL) zur Reaktionsmischung zugetropft. Es wurde nochmals 15 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Erkalten wurde die wässrige Phase abgetrennt und mit Diethylether (drei Mal mit je 300 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter Natriumcarbonatlösung (je 50 mL) gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Eluent Essigester/Hexan 4/6) gereinigt. Es wurden 32.0 g (209 mmol, 59 %) 5-Formyl-2-methoxycarbonyl-1H-Pyrrol **191** als weiße Kristalle erhalten.

$\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3$

M.W. = 153.14 g·mol<sup>-1</sup>

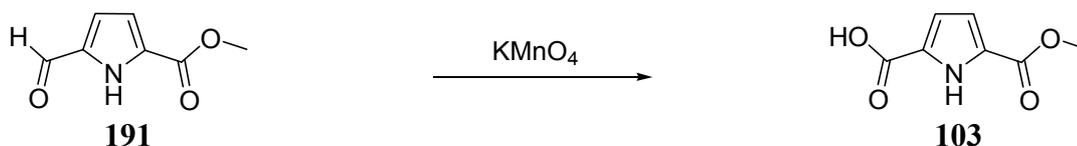
**Ausbeute:** 32.0 g, 59 %, 209 mmol

**Smp:** 84 °C

**R<sub>f</sub>:** 0.48 (Kieselgel; Hexan, Ethylacetat 6/4)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 3.90 (s, 3 H; CH<sub>3</sub>), 6.91 (m, 2 H; py-CH), 9.65 (s, 1 H; CHO), 9.96 (s, 1 H; py-NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 52.2 (CH<sub>3</sub>), 115.7, 119.7 (py-CH), 128.1, 134.5 (py-C<sub>q</sub>), 160.8 (C<sub>q</sub>).

**Darstellung von 5-Methoxycarbonyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure **103****<sup>[38]</sup>

In einem 1 L Dreihalskolben wurde der Aldehyd **191** (25.0 g, 163 mmol, 1.0 eq) in Aceton (250 mL) vorgelegt. Dazu wurde eine Lösung aus Kaliumpermanganat (51.5 g, 326 mmol, 2.0 eq) in einer 1:1 Mischung aus Aceton und Wasser (500 mL) innerhalb von zwei Stunden zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für eine Stunde auf 45 °C erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung überschüssigen Kaliumpermanganats wurden 4.0 g Natriumdithionit zu der Reaktionsmischung gegeben und der entstandene Braunstein abfiltriert. Der Filterkuchen wurde mit einer Mischung aus Aceton und Wasser (50 mL) gewaschen. Die basische Lösung wurde zur Entfernung des Edukts einmal mit Chloroform (300 mL) gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase vorsichtig mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2 angesäuert, wobei das gewünschte Produkt ausfiel. Der Niederschlag wurde abgesaugt, sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Es wurden 20.0 g (118 mmol, 74 %) der Carbonsäure **103** erhalten werden.

$\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_4$

M.W. = 169.14 g·mol<sup>-1</sup>

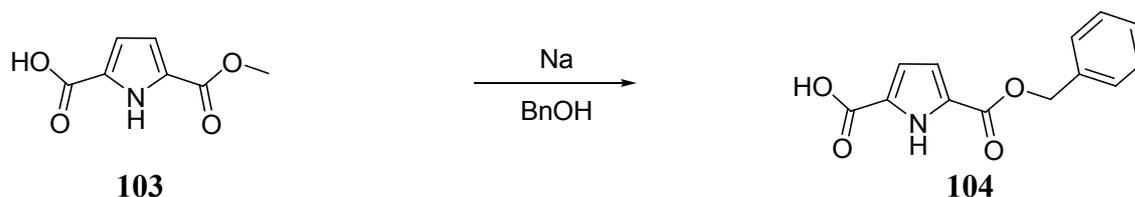
**R<sub>f</sub>:** 0.54 (Kieselgel; Chloroform, Methanol, Essigsäure 90/8/2)

**Ausbeute:** 20.0 g, 74 %, 118 mmol

**Smp.:** 242 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 3.76 (s, 3 H; CH<sub>3</sub>), 6.77 (m, 2 H; py-CH), 12.45 (s, 1 H; py-NH); 12.81 (bs, 1 H; COOH);

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 51.7 (CH<sub>3</sub>), 115.3, 115.5 (py-CH), 126.1, 128.1 (py-C<sub>q</sub>), 160.5 161.4 (C<sub>q</sub>).

Umesterung des Methylesters **103** in den Benzylester **104**

Natrium (3.50 g, 153 mmol, 1.03 eq) wurde in Benzylalkohol (400 mL) gelöst. In die Natriumbenzylatlösung wurde der Methylester **103** (25.0 g, mmol, 1.0 eq) suspendiert und über Nacht bei 140 °C gerührt. Die zähe weißlich glänzende Suspension wurde mit Cyclohexan (2 L) versetzt und der Feststoff abfiltriert. Anschließend wurde der Feststoff in Wasser (200 mL) suspendiert und die Lösung mit verdünnter Salzsäure auf pH 3-4 angesäuert. Der Feststoff wurde erneut filtriert und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Man erhielt den Benzylester **104** in einer Ausbeute von 83 % (30.3 g, 122 mmol) als weißen Feststoff.

$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_4$

M.W. = 245.24 g·mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0.59 (Kieselgel; Dichlormethan, Essigester, Eisessig 10:10:0.1)

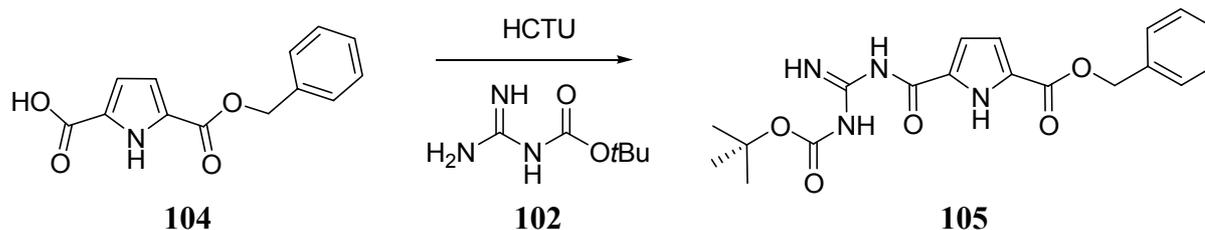
**Ausbeute:** 30.3 g, 83 %, 122 mmol

**Smp.:** 234 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 5.28 (s, 2 H; CH<sub>2</sub>), 6.76 (m, 1 H; py-CH), 6.83 (m, 1 H; py-CH), 7.30-7.47 (m, 5 H; CH), 12.54 (s, 1 H; py-NH); 12.82 (bs, 1 H; COOH);

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 65.7 (CH<sub>2</sub>), 115.3, 115.8 (py-CH), 126.1, 126.6 128.1, 128.2, 128.6, 136.4, 159.8 161.4 (C<sub>q</sub>).

## Kupplung des Benzylesters **104** mit Boc-Guanidin **102**



Der Benzylester **104** (250 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) wurde in einer Mischung (10 mL) aus Dichlormethan und DMF (8/2) gelöst, dazu wurde NMM (200 mg, 2.0 mmol, 2.0 eq) und HCTU (420 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) gegeben und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach einem weiteren Äquivalent Base NMM (100 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) wurde Boc-Guanidin (**102**) (160 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) hinzu gegeben und die Mischung für 3 Stunden unter Argon gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser (20 mL) versetzt und viermal mit Diethylether (je 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (20 mL), einmal mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (20 mL) und anschließend mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gewaschen. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das zurückbleibende zähe Öl säulenchromatographisch (Kieselgel; Ethylacetat/Hexan/Triethylamin 50/50/1) gereinigt, man erhielt die Carboxylat-Bindungsstelle **105** 320 mg (0.83 mmol, 83 %).

$C_{19}H_{22}N_4O_5$

M.W. = 386.41 g·mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0.55 (Kieselgel; Ethylacetat, Hexan, Triethylamin; 50/50/1)

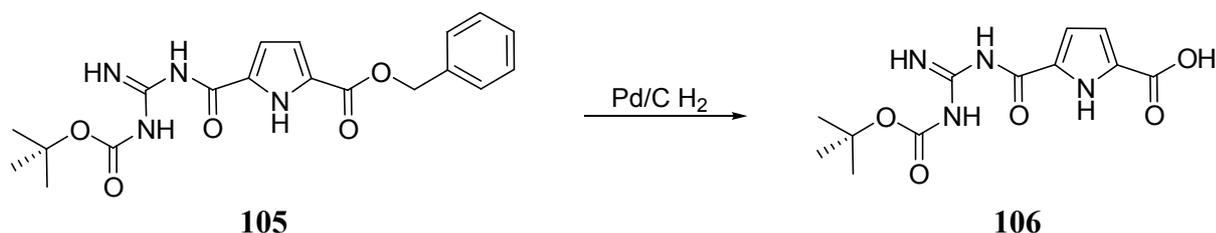
**Ausbeute:** 320 mg, 83 %, 0.83 mmol

**Smp.:** 161 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO):** δ = 1.45 (s, 9 H; CH<sub>3</sub>), 5.30 (s, 2 H; CH<sub>2</sub>), 6.80-6.86 (m, 2 H; py-CH), 7.30-7.44 (m, 5 H; CH) 8.55 (bs, 1 H; NH), 9.30 (bs, 1 H; NH), 10.72 (bs, 1 H; NH), 11.60 (bs, 1 H; NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 27.9 (CH<sub>3</sub>), 65.7 (CH<sub>2</sub>) 116.0, 128.1, 128.2, 128.6, 136.4, 158.5, 160 (C<sub>q</sub>).

## Darstellung von 2-((*t*-Butyloxycarbonyl)guanidiniocarbonyl)-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure **106**<sup>[167]</sup>



Unter Argon in einen 50 mL Schlenk Kolben wurde Palladium auf Kohle (440 mg) in THF (20 mL) suspendiert. Dazu wurde der Benzylester **105** (4.36 g, 11.3 mmol, 1.0 eq) gelöst in absolutem THF (80 mL) gegeben. In diese Suspension wurde bis zur vollständigen Entschützung des Benzylesters Wasserstoff durchgeleitet (etwa 5 Stunden). Der Fortschritt der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Bei der Reaktion wurde das Ausfallen eines weißen Feststoffs beobachtet. Nach Beendigung der Wasserstoffeinleitung wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne eingengt und das zurückbleibende schwarze Produkt in heißem absoluten DMF (200 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde Aktivkohle (500 mg) gegeben und über Celite heiß filtriert. Nach Abkühlen der Lösung wurde die 2fache Menge an Wasser (400 mL) zu dem organischen Lösemittel gegeben, um die Carbonsäure **106** auszufällen. Die milchig weiße Suspension wurde über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen und über einen P4 Glasfiltertiegel filtriert. Der Filterkuchen wurde sorgfältig mit Wasser nachgewaschen und im Exsikkator getrocknet wurde. Es wurden 3.01 g (10.2 mmol, 90 %) der Pyrrolcarbonsäure **106** erhalten werden.

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5$

M.W. = 296.28 g·mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:** 3.01 g, 90 %, 10.2 mmol

**Smp.:** >290 °C (Zersetzung)

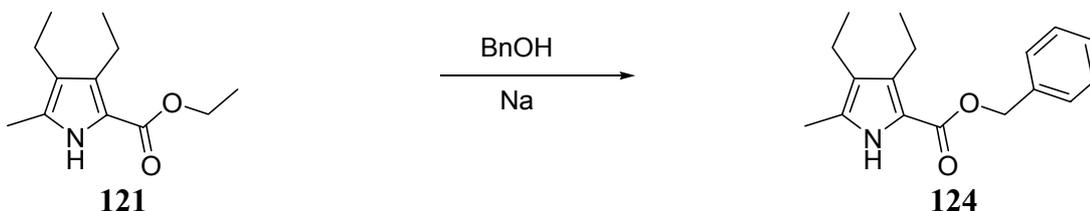
**Rf:** 0.48 (Kieselgel, Dichlormethan, Methanol, Triethylamin 10:1:0.1)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO):**  $\delta$  = 1.45 (s, 9 H; CH<sub>3</sub>), 5.30 (s, 2 H; CH<sub>2</sub>), 6.80-6.86 (m, 2 H; py-CH), 7.30-7.44 (m, 5 H; CH) 8.55 (bs, 1 H; NH), 9.30 (bs, 1 H; NH), 10.72 (bs, 1 H; NH), 11.60 (bs, 1 H; NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 27.9 (CH<sub>3</sub>), 81.3 (C<sub>q</sub>), 114.0, 115.3 (py-CH), 126.2, 133.1, 155.7, 158.4, 161.7, 168.0 (C<sub>q</sub>);

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3393 (s), 2958 (m), 1650 (s), 1542 (m), 1435 (w), 1319 (w).

**Darstellung von 3,4-Diethyl-5-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäurebenzylester **124**<sup>[168]</sup>**



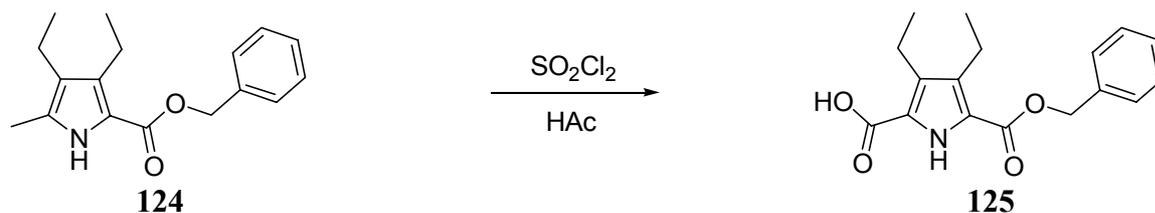
Der Pyrrolcarbonsäureethylester **121** (15.0 g, 72 mmol, 1.0 eq) wurde in Benzylalkohol (40 mL, 41.8 g, 387 mmol, 5.4 eq) gelöst und zum Sieden erhitzt. Dazu wurde eine zuvor hergestellte Natriumbenzylatlösung aus Benzylalkohol (10 mL) und Natriumhydrid in 55 % Weißöl (150 mg, 3.5 mmol, 0.05 eq) in kleinen Portionen zugegeben. Nach Zugabe von einem mL der Natriumbenzylatlösung färbte sich die Reaktionsmischung dunkel und Ethanol entwich. Es wurde so lange neues Benzylat zugegeben, bis keine Reaktion mehr eintrat. Die Reaktion wurde unter einem ständigen Argonstrom durchgeführt. Nach Abkühlen der Mischung wurde die dunkelbraune Lösung in Methanol (100 mL), das Eisessig (2 mL) enthielt, gegossen. Unter Eiskühlung wurde anschließend eine Lösung aus Methanol und Wasser (je 150 mL) zugegeben, woraufhin ein gelblich brauner Feststoff ausfiel. Die Fällung wurde durch die Zugabe von Wasser (50 mL) vervollständigt. Der Feststoff wurde abgesaugt und das Rohprodukt aus Methanol (60 mL) umkristallisiert. Auf diese Weise konnten 15.8 g (58.3 mmol, 81 %) des Benzylesters **124** erhalten werden.

$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_2$

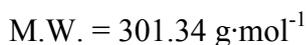
M.W. = 271.35  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Ausbeute:** 15.8 g, 81 %, 58.3 mmol

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 0.99 (t, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 1.06 (t, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 2.11 (s, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 2.30 (q, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 2.66 (q, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 5.21 (s, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 7.22-7.34 (m, 5 H; ar-CH) 8.56 (bs, 1 H; NH).

**Darstellung von 5-Benzyloxycarbonyl-3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure **125**<sup>[168]</sup>**

Der Benzylester **124** (10.0 g, 36.9 mmol, 1.0 eq) wurde in Eisessig (30 mL) gelöst. Dazu wurde Sulfurylchlorid (8.9 mL, 14.95 g, 110.5 mmol, 3.0 eq) in Eisessig (10 mL) unter Argon innerhalb von 2.5 Stunden zugetropft, wobei die Temperatur immer zwischen 15 und 25 C gehalten wurde. Die Reaktionsmischung wurde noch für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf Eiswasser (40 mL) gegossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Produkt mit reichlich Wasser (200 mL) neutral gewaschen. Der gelbe Rückstand wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet und aus Methanol/Hexan umkristallisiert. Die Carbonsäure **125** wurde in einer Ausbeute von 42 % (4.70 g, 15.6 mmol) erhalten.

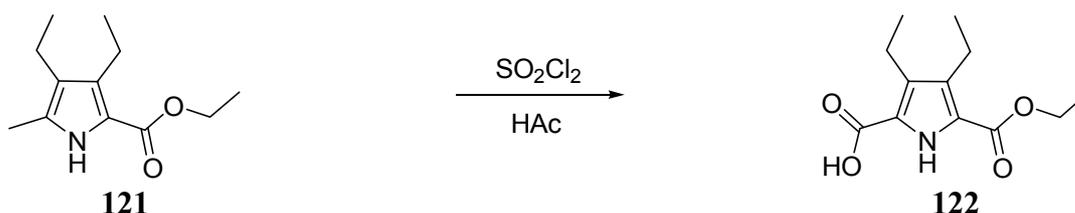


**Ausbeute:** 4.70 g, 42 %, 15.6 mmol

**Smp.:** 174 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 1.04-1.10 (m, 6 H; CH<sub>3</sub>), 2.65-2.72 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 5.27 (s, 2 H; CH<sub>2</sub>), 7.26-7.36 (m, 5 H; CH), 9.42 (s, 1 H; py-NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 15,7, 15.8 (2 C; CH<sub>3</sub>), 17.8, 66.5 (3 C; CH<sub>2</sub>), 128.4, 128.4, 128.6 (5 C; CH) 120.3, 122.1, 133.7, 135.2, 135.6 160.4, 165.8 (7 C; C<sub>q</sub>).

**Darstellung von 5-Ethoxycarbonyl-3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure **122**<sup>[169]</sup>**

Der Ethylester **120** (10 g, 47.8 mmol, 1.0 eq) wurde in Eisessig (30 mL) gelöst. Dazu wurde Sulfurylchlorid (11.5 mL, 19.40 g, 143.4 mmol, 3.0 eq) in Eisessig (10 mL) unter Argon innerhalb von 2.5 Stunden zugetropft, wobei die Temperatur 20 °C nicht überstieg. Die Reaktionsmischung wurde nach beendigter Zugabe des Sulfurylchlorids noch für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf Eiswasser (50 mL) gegossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Produkt mit Wasser (250 mL) neutral gewaschen. Der gelbe Rückstand wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet und aus Methanol/Hexan umkristallisiert. Die Carbonsäure **122** wurde in einer Ausbeute von 72 % (8.23 g, 34.4 mmol) erhalten.



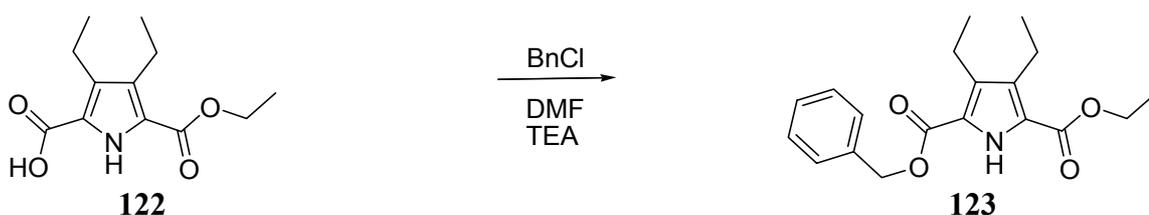
$$\text{M.W.} = 239.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

**Ausbeute:** 8.23 g, 72 %, 34.4 mmol

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0.86 (m, 6 H; CH<sub>3</sub>), 2.46 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 4.05 (q, 2 H; CH<sub>2</sub>), 6.16 (bs, 1 H; COOH), 9.37 (s, 1 H; py-NH);

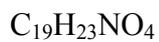
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 13.7, 15.2, 15.3 (3 C; CH<sub>3</sub>), 16.9, 17.1, 59.7 (3 C; CH<sub>2</sub>), 120.2, 121.2, 132.1, 132.4, 160.0, 161.7 (6 C; C<sub>q</sub>).

### 5-Ethoxycarbonyl-3,4-diethyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäurebenzylester (**123**)<sup>[170]</sup>



Die Pyrrolcarbonsäure **122** (5.00 g, 20.8 mmol, 1.0 eq) wurde in DMF (60 mL) gelöst und unter Eiskühlung mit frisch destilliertem Benzylchlorid (35 mL, 38.5 g, 304 mmol, 14.6 eq) und Triethylamin (35 mL) versetzt. Anschließend wurde die Mischung für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Die Suspension wurde im Ölpumpenvakuum bei 80-100 °C bis zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in Chloroform (400 mL) gelöst und zwei Mal mit Wasser (je 150 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand aus Dichlormethan und Hexan

umkristallisiert. Auf diese Weise konnten 4.31 g (13.1 mmol, 63 %) des Diesters **123** erhalten werden.



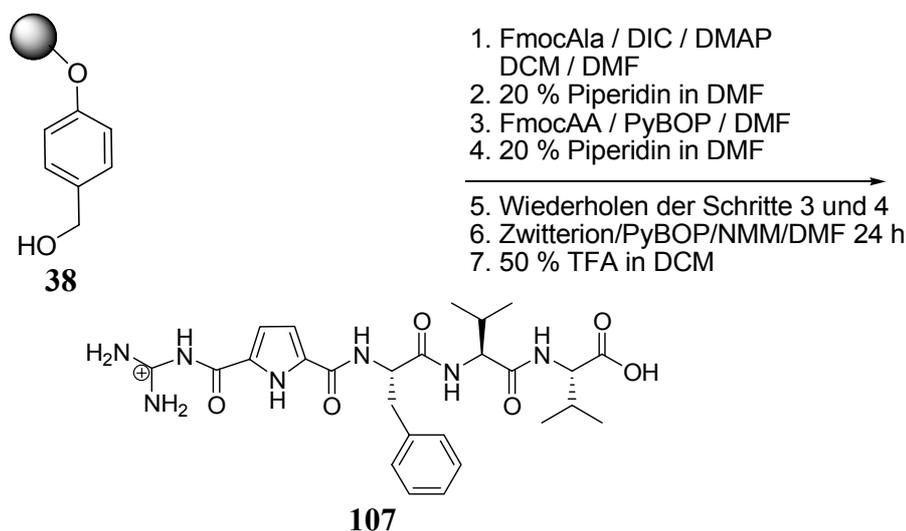
M.W. = 329.39 g·mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:** 4.31 g, 63 %, 13.1 mmol

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 1.45 (m, 9 H; CH<sub>3</sub>), 3.44 (m, 6 H; CH<sub>2</sub>), 4.80 (s, 2 H; CH<sub>2</sub>), 7.38-7.56 (m, 5 H; CH).

## 7.4.2 Versuch der Synthese von Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptoren auf Wang-Harz

### Synthese von CBS-L-Phe-L-Val-L-Val-OH



An Wang-Harz **38** (400 mg, 1.08 mmol/g, 0.43 mmol, 1.0 eq) wurde Fmoc-Val (365 mg, 1.08 mmol, 2.5 eq) mit DIC (136 mg, 1.08 mmol, 2.5 eq) und DMAP (20 mg, 0.2 eq) nach einer Standardvorschrift angeknüpft. Diese Kupplung wurde zwei Mal durchgeführt, um eine quantitative Umsetzung der Hydroxylfunktion des Wang-Linkers zu gewährleisten. Die nachfolgende Abspaltung der Schutzgruppe unter Standardbedingungen (20 % Piperidin in DMF) verlief quantitativ (Ausbeutebestimmung via UV). Die anschließende Kupplung mit Valin (365 mg, 1.08 mmol, 2.5 eq) und Phenylalanin (419 mg, 1.08 mmol, 2.5 eq) erfolgte unter Standardbedingungen mit PyBOP (560 mg, 1.08 mmol, 2.5 eq) in DMF, das 3 % NMM enthielt. Die anschließende Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe nach Standardvorschrift verlief ebenfalls quantitativ. Anschließend wurde das freie Amin des Tripeptids mit dem Zwitterion (**12**) (212 mg, 1.08 mmol, 2,5 eq) und PyBOP (560 mg, 1.08 mmol, 2.5 eq) in DMF (10 mL), das 5 % NMM enthielt für 24 Stunden gekuppelt. Das Harz wurde sehr sorgfältig mit Dichlormethan (5-mal je 10 mL), Methanol (3-mal je 10 mL), Diethylether (3-mal je 10 mL) und wiederum Dichlormethan (3-mal je 10 mL) gewaschen. Der Rezeptor wurde von der festen Phase unter Standardbedingungen abgespalten.



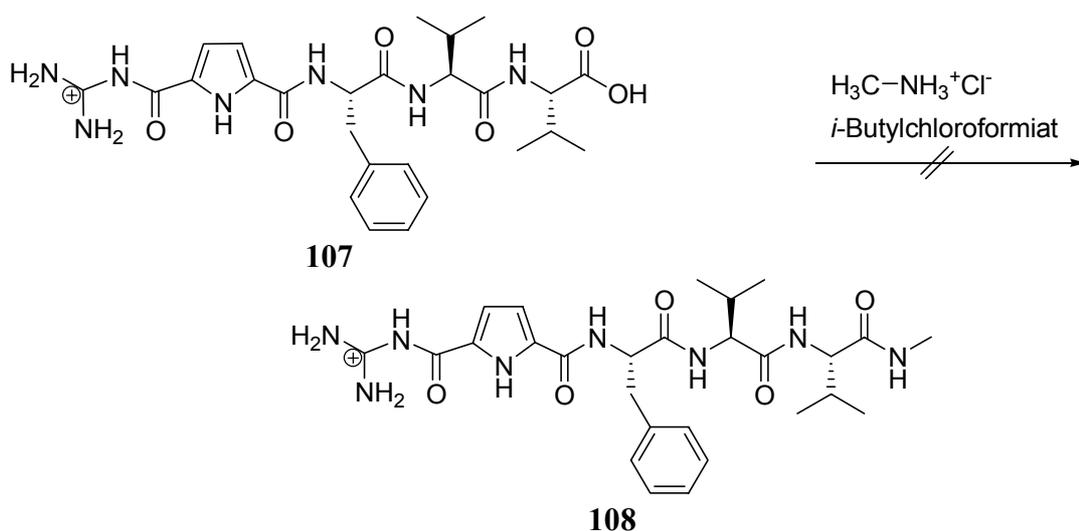
$$\text{M.W.} = 655.62 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

**Ausbeute:** 279 mg, 99 %, 0.43 mmol

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 0.81-0.92 (m, 12 H; 4 CH<sub>3</sub>), 2.05 (m, 2 H; CH), 2.85 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 3.06 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 4.13 (m, 1 H; CH), 4.30 (m, 1 H; CH), 4.83 (m, 1 H; CH), 6.84 (m, 1 H; py-CH), 7.05 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.10-7.38 (m, 6 H; ar-CH; NH<sub>2</sub>), 7.95 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.9 Hz, 1 H; NH), 8.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 9.2 Hz, 1 H; NH), 8.51 (s, 4 H; gua-NH<sub>2</sub>), 8.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.3 Hz, 1 H; NH), 9.60 (bs, 1 H; COOH), 11.42 (s, 1 H; gua-NH), 12.46 (s, 1 H; py-NH);

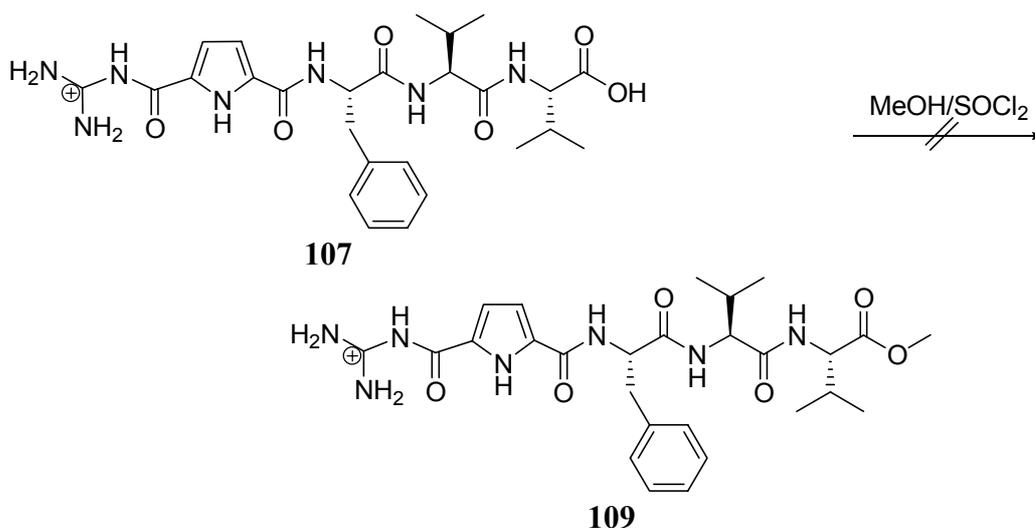
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 18.2, 18.4, 19.3, 19.4 (CH<sub>3</sub>), 29.9, 30.4 (CH), 54.2, 57.4, 57.8 (CH), 113.5, 115.5 (py-CH), 126.6, 132.4 (py-C<sub>q</sub>), 125.8, 128.2, 129.4 (ar-CH) 132.4 (ar-C<sub>q</sub>) 155.4 (gua-C<sub>q</sub>), 158.9, 159.9, 171.3, 171.4, 173.0 (C<sub>q</sub>).

### Versuch der Synthese des Methylamids 108



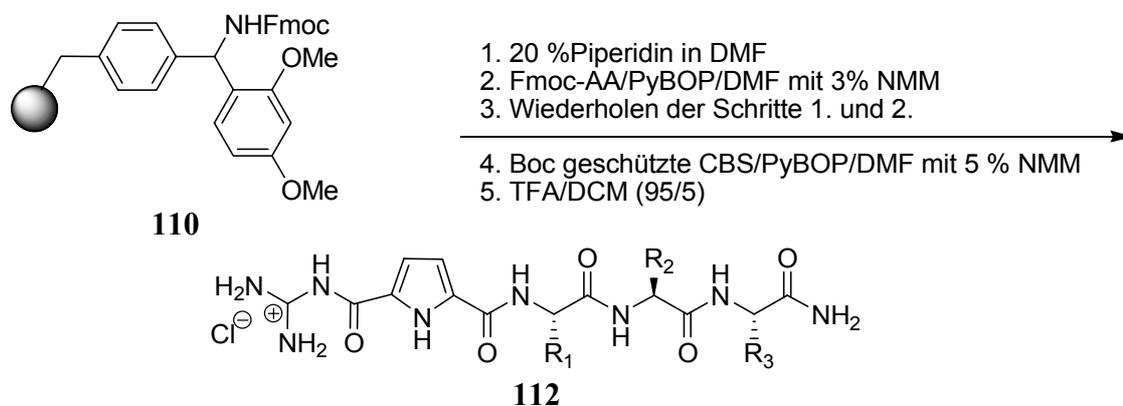
Die Carbonsäure **107** (100 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq) wurde in einem inertisierten und ausgeheizten Schlenkcolben vorgelegt und in Dichlormethan (10 mL) suspendiert. Die Suspension wurde auf -40 °C gekühlt NMM (60 mg, 0.33 mmol, 2.2 eq) zugegeben und langsam nacheinander *i*-Butylchloroformiat (550 mg, 0.33 mmol, 2.2 eq) und NMM (30 mg, 0.17 mmol, 1.1 eq) zugegeben. Nach einer Stunde Rühren bei dieser Temperatur wurde zu dieser gelben Suspension Methylaminhydrochlorid (12 mg, 0.17 mmol, 1.1 eq) zugegeben und die Mischung über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel; Methanol, Dichlormethan, Triethylamin 3:7:0.1) gereinigt. Das gewünschte Produkt **108** konnte aber in keiner Fraktion nachgewiesen werden.

### Versuch der Synthese des Methylesters **109**



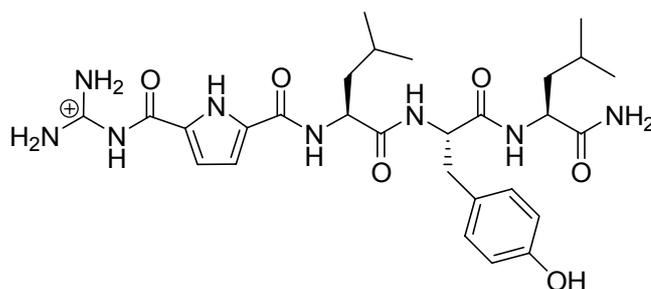
Die Carbonsäure **107** (100 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq) wurde in einem inertisierten und ausgeheizten Kolben vorgelegt und in absoluten Methanol (10 mL) suspendiert. Zu der Suspension wurde langsam Thionylchlorid (40 mg, 0.33 mmol, 2.2 eq) zugegeben, woraufhin sich die Carbonsäure in löste. Anschließend wurde die Mischung noch über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Eine Umkristallisation aus Methanol/Ether führte nicht zum Erfolg, ebenso wenig konnte das Produkt **109** durch Säulenchromatographie erhalten werden.

### 7.4.3 Allgemeine Vorschrift zur Synthese der tripeptidischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren auf Rink-Amid Harz



Die Synthese der Rezeptoren auf Rink-Amid Harz erfolgte nach einem Standardprotokoll: Rink-Amid Harz **100** (300 mg, 0.74 mmol/g, 0.22 mmol) wurde für 1.5 Stunden in DMF vorgequollen. Die Fmoc Schutzgruppe wurde durch Behandlung des Harzes mit Piperidin in DMF (20 %) für 20 min entfernt, dieser Schritt wurde wiederholt und das Harz anschließend

sorgfältig mit DMF gewaschen. Anschließend wurden die Aminosäuren nach folgender Vorschrift gekuppelt: 2.5 eq der Fmoc Aminosäure und 2.5 eq PyBOP wurden in DMF, das 3 % NMM enthält, für 4 h geschüttelt. Ein negativer Kaiser Test zeigte eine quantitative Umsetzung an, bei Bedarf wurde der Kupplungsschritt wiederholt. Die Schutzgruppe wurde durch Schütteln des Harzes mit einer Lösung aus Piperidin in DMF (20 %) für 20 min abgespalten. Diese Prozedur wurde ebenfalls wiederholt. Nach fünfmaligem Waschen mit DMF (je 10 mL) wurde die nächste Aminosäure eingeführt. Eine Ausbeutebestimmung erfolgte über die UV Absorption des Fmoc-Piperidin Adduktes bei 300 nm und durch einen Kaisertest. Das Anbringen der 5-Guanidiniocarbonylpyrrol-2-carbonsäure wurde unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt: 2.5 eq der Carbonsäure, 2.5 eq PyBOP und DMF mit 5 % NMM wurden für 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Um eine quantitative Umsetzung zu gewährleisten, wurde der letzte Kupplungsschritt mit 1.0 eq Carbonsäure wiederholt. Das Produkt wurde nach intensivem Waschen mit DMF, Methanol, Diethylether und Dichlormethan mit einer Dichlormethan/TFA Mischung (5:95) vom Harz abgespalten. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das zurückbleibende gelbe bis braune Öl mit trockenem Diethylether behandelt. Das weiße Trifluoracetat Salz wurde in Methanol (1 mL) gelöst, mit 0.1 N Salzsäure (4 mL) angesäuert, mit Wasser (40 mL) versetzt und lyophilisiert. Diese Prozedur wurde noch ein zweites Mal durchgeführt. Auf diese Weise wurden voluminöse weiße Feststoffe erhalten, die analytisch rein waren.

**CBS-L-Leu-L-Tyr-L-Leu-NH<sub>2</sub> 114****114** $C_{28}H_{41}ClN_8O_6$ M.W. = 585.67 g·mol<sup>-1</sup>**Ausbeute:** 110 mg, 81 %, 0.18 mmol**Smp.:** 194 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 0.79-0.88 (m, 12 H; 4 CH<sub>3</sub>), 1.41-1.57 (m, 6 H; 2 CH<sub>2</sub>, 2 CH), 2.71 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 2.89-2.94 (m, 1 H; CH), 4.18 (m, 1 H; CH), 4.37-4.48 (m, 2 H; CH), 6.55 (d, 2 H; <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.5 Hz, ar-CH), 6.88 (m, 1H; py-CH), 6.97 (s, 1H; NH<sub>2</sub>), 6.98 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.5 Hz, 2 H; ar-CH), 7.09 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.49 (m, 1 H; py-CH), 7.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.6 Hz, 1 H; NH), 8.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.1 Hz, 1 H; NH), 8.42 (s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 8.53 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.8 Hz, 1 H; NH), 8.60 (s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 11.92 (s, 1 H; gua-NH), 12.48 (s, 1 H; py-NH);

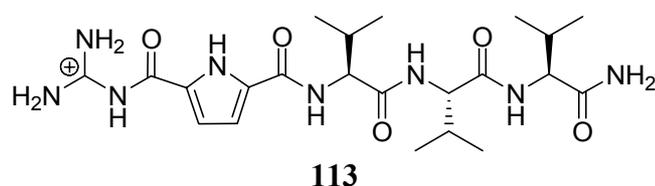
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 21.7 (2 CH<sub>2</sub>), 23.1, 23.2, 24.2, 24.4 (CH<sub>3</sub>), 36.2, 40.7, 41.2 (CH<sub>2</sub>), 51.1, 51.5, 54.4 (CH), 113.8, 115.8 (py-CH), 125.9, 132.5 (py-C<sub>q</sub>), 115.0, 128.0 (ar-CH) 130.2, 155.9 (ar-C<sub>q</sub>) 155.6 (gua-C<sub>q</sub>), 159.0, 159.9, 170.8, 172.0, 174.0 (C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 585 [M<sup>+</sup>], 568 [M<sup>+</sup>-NH<sub>2</sub>], 455 [M<sup>+</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O], 292 [M<sup>+</sup>-C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>], 179 [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>;

**HR-MS (pos. ESI)** 585.315 (berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>: 585.3149);

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3407 (s), 3286 (s), 2958 (m), 2931 (m), 1701 (s), 1638 (s), 1542 (m), 1514 (m), 1473 (w), 1278 (m), 1194 (w).

### CBS-L-Val-L-Val-L-Val-NH<sub>2</sub> 113



C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>5</sub>

MW = 494.58 g·mol<sup>-1</sup>

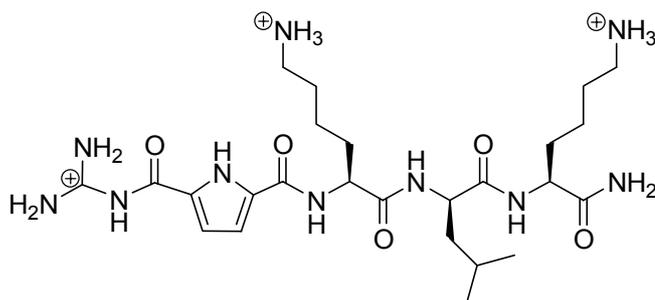
**Ausbeute:** 170 mg, 70 %, 0.32 mmol (500 mg Rink-Amid Harz)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 0.82-0.85 (m, 18 H; 6 CH<sub>3</sub>), 1.93-1.95 (m, 2 H; 2 CH), 2.05 (m, 1 H; CH), 4.10 (m, 1 H; CH), 4.17 (m, 1 H; CH), 6.91 (m, 1 H; py-CH), 7.02 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.12 (m, 1 H; py-CH), 7.30 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.8 Hz, 1 H; NH), 8.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.7 Hz, 1 H; NH), 8.40 (s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 8.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.5 Hz, 1 H; NH), 8.57 (s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 11.32 (s, 1 H; gua-NH), 12.72 (s, 1 H; py-NH);

**$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 17.9, 18.4, 18.5, 19.2, 19.3, 19.3$  ( $\text{CH}_3$ ), 30.1, 30.4, 30.6, 57.4, 58.1, 57.9, ( $\text{CH}$ ), 113.9, 115.0 ( $\text{py-CH}$ ), 125.6, 132.4 ( $\text{py-C}_q$ ), 155.1 ( $\text{gua-C}_q$ ), 159.9, 170.7, 170.7, 170.9 ( $\text{C}_q$ );

**MS (ESI, DMSO/H $_2$ O) m/z:** 493 [ $\text{M}^+$ ], 377 [ $\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$ ], 278 [ $\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$ ], 179 [ $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_4\text{O}_2^+$ ].

### CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys-NH $_2$ 100



**100**

$\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{Cl}_3\text{N}_{10}\text{O}_5$

M.W. = 674.06  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Ausbeute:** 109 mg, 0.16 mmol, 73 %

**$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 0.82$  (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$  Hz, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 0.87 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 6.6$  Hz, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 1.25-1.77 (m, 15 H;  $\text{CH}_2 + \text{CH}$ ), 2.72-2.80 (m, 4 H;  $\text{CH}_2$ ), 4.13 (m, 1 H;  $\text{CH}$ ), 4.26 (m, 1 H;  $\text{CH}$ ), 4.43 (m, 1 H;  $\text{CH}$ ), 6.90 (m, 1 H;  $\text{py-CH}$ ), 7.03 (s, 1 H;  $\text{NH}_2$ ), 7.18 (m, 1 H;  $\text{py-CH}$ ), 7.29 (s, 1 H;  $\text{NH}_2$ ), 7.73 (d, 1 H;  $\text{NH}$ ), 7.75 (s, 6 H;  $\text{NH}_3^+$ ), 8.15 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 8.1$  Hz, 1 H;  $\text{NH}$ ), 8.53 (s, 2 H;  $\text{gua-NH}_2$ ), 8.54 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$  Hz, 1 H;  $\text{NH}$ ), 8.67 (s, 2 H;  $\text{gua-NH}_2$ ), 11.51 (s, 1 H;  $\text{gua-NH}$ ), 12.49 (s, 1 H;  $\text{py-NH}$ );

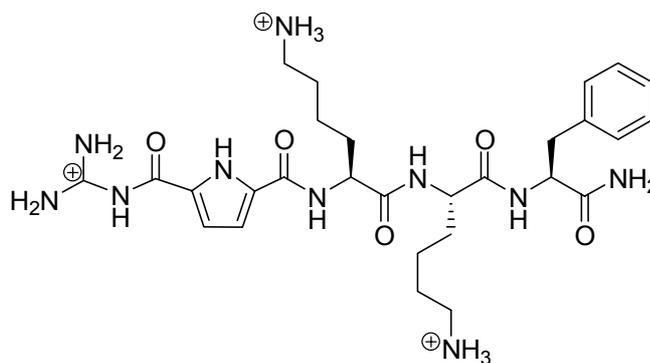
**$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 21.6$  (2  $\text{CH}_3$ ), 22.3 ( $\text{CH}$ ), 22.7, 23.3, 24.4, 26.8, 31.5, 31.6, 38.8, 38.9 ( $\text{CH}_2$ ), 51.5, 52.3, 52.9 ( $\text{CH}$ ), 113.8, 115.3 ( $\text{py-CH}$ ), 125.8, 132.5 ( $\text{py-C}_q$ ), 155.4 ( $\text{gua-C}_q$ ), 158.7, 160.1, 171.8, 171.9, 173.5 ( $\text{C}_q$ );

**MS (ESI, DMSO/H $_2$ O) m/z:** 565 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , 283 [ $\text{M}+2\text{H}$ ] $^{2+}$ , 274 [ $\text{M}^+ - \text{NH}_2$ ] $^{2+}$ , 189 [ $\text{M}+3\text{H}$ ] $^{3+}$ , 179 [ $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_4\text{O}_2^+$ ];

**HR-MS (pos. ESI) 565.358** (berechnet für  $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_8\text{O}_6^+$ : 565.3574);

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3337 (s), 3073 (s), 2952 (m), 1676 (s), 1551 (m), 1487 (w), 1280 (w), 1202 (w), 1135 (w), 838 (w), 723 (w).

**CBS-L-Lys-L-Lys-L-Phe-NH<sub>2</sub> 135**



**135**

$\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_{10}\text{O}_5\text{Cl}_3$

M.W. = 706.3  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Ausbeute:** 151 mg, 98 %, 0.21 mmol

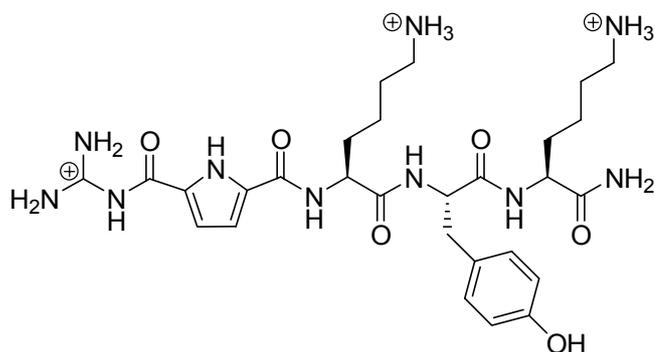
**Smp.:** 247 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 1.16-1.28 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 1.29-1.42 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 1.44-1.75 (m, 8 H; CH<sub>2</sub>), 2.66-2.71 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.73-2.79 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.80-2.86 (m, 1 H; CH), 2.98-3.02 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 4.12-4.17 (m, 1 H; CH), 4.40-4.45 (m, 2 H; CH), 6.91 (s, 1 H; py-CH), 7.12 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.18-7.25 (m, 5 H; ar-CH), 7.45 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.60 (m, 1 H; py-CH), 7.88 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.1 Hz, 1 H; NH), 7.92 (bs, 6 H; NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.8 Hz, 1 H; NH), 8.51 (s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 8.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.6 Hz, 1 H; NH), 8.71 (s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 12.17 (s, 1 H; gua-NH), 12.52 (s, 1 H; py-NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 22.3, 22.7, 26.6, 26.7, 31.2, 31.3, 37.8, 38.7, 40.2 (CH<sub>2</sub>), 53.0, 53.0, 53.8 (CH), 113.8, 116.0 (py-CH), 125.8, 132.5 (py-C<sub>q</sub>), 126.4, 128.2, 129.4 155.7 (gua-C<sub>q</sub>), 137.9, 159.1, 159.9, 171.3, 171.8, 173.0 (C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 599 [M<sup>+</sup>], 377 [C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>], 300 [M+H<sup>+</sup>], 179 [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>];

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3326 (s), 3061 (s), 2949 (m), 1702 (s), 1654 (s) 1541 (m), 1472 (w), 1276 (w), 1198 (w), 815 (w), 754 (w).

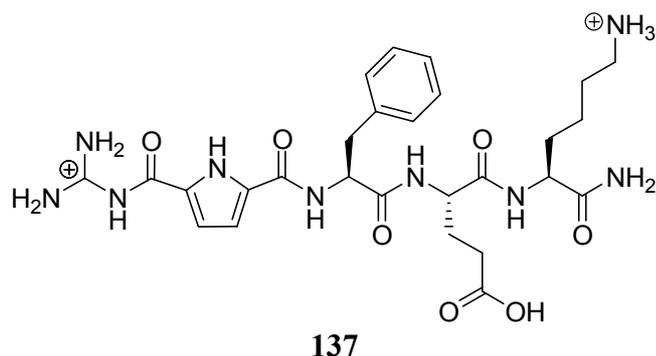
**CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub> 136****136**C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>N<sub>10</sub>O<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub>M.W. = 722.3 g·mol<sup>-1</sup>**Ausbeute:** 110 mg, 69 %, 0.15 mmol**Smp.:** 209 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 1.20-1.32 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 1.47-1.69 (m, 6 H; CH<sub>2</sub>), 1.65-1.70 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.69-2.77 (m, 5 H; CH<sub>2</sub>), 2.90-2.96 (m, 1 H; CH), 4.33-4.43 (m, 2 H; CH), 6.59 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.6 Hz, 2 H; ar-CH), 6.91 (s, 1 H; py-CH), 7.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.6 Hz, 2 H; ar-CH), 7.06 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.25 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.61 (m, 1 H; py-CH), 7.87 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.1 Hz, 1 H; NH), 7.97 (bs, 6 H; NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.1 Hz, 1 H; NH), 8.53 (s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 8.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.6 Hz, 1 H; NH), 8.72 (s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 9.18 (bs, 1H; OH), 12.15 (s, 1 H; gua-NH), 12.51 (s, 1 H; py-NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 22.3, 22.6, 26.7, 26.8, 31.3, 31.536.3, 38.7 (CH<sub>2</sub>), 52.4, 53.2, 54.6 (CH), 113.8, 116.0 (py-CH), 115.0, 130.2 (ar-CH), 125.8, 132.5 (py-C<sub>q</sub>), 155.8 (gua-C<sub>q</sub>), 127.9, 156.0, 159.9, 171.0, 171.6, 173.5 (C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 615 [M+H<sup>+</sup>], 437 [M<sup>+</sup>- C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>], 308 [M+H<sup>++</sup>], 179 [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>];

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3421 (s), 2938 (m), 1710 (s), 1654 (s), 1558 (m), 1477 (w), 1268 (w), 1194 (w), 821 (w), 758 (w).

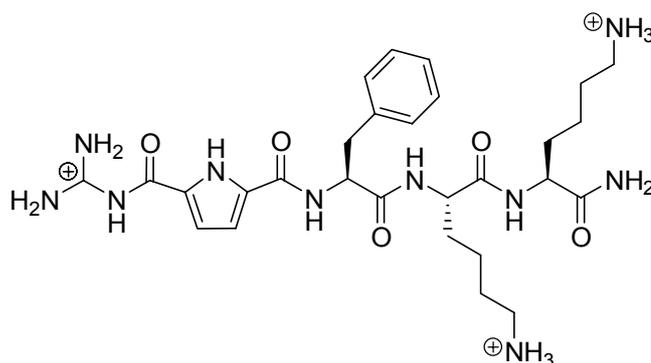
**CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH<sub>2</sub> 137**C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>N<sub>9</sub>O<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>M.W. = 672.56 g·mol<sup>-1</sup>**Ausbeute:** 145 mg, 98 % 0.21 mmol**Smp.:** 170 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 1.25-1.38 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 1.48-1.58 (m, 3 H; CH<sub>2</sub>), 1.62-1.71 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 1.78-1.86 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.90-1.99 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 2.22-2.29 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.90-2.96 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 2.70-2.75 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.86-2.92 (m, 1 H; CH), 3.11-3.16 (m, 1 H; CH), 4.13-4.18 (m, 1 H; CH), 4.23-4.29 (m, 1 H; CH), 4.71-4.77 (m, 1 H; CH), 6.83 (s, 1 H; py-CH), 7.03 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.14 (m, 1 H; ar-CH), 7.23 (m, 2 H; ar-CH), 7.33 (m, 2 H; ar-CH), 7.36 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.53 (m, 1 H; py-CH), 7.90 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.1 Hz, 1 H; NH), 7.94 (bs, 3 H; NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.6 Hz, 1 H; NH), 8.52 (s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 8.68 (s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 8.77 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.3 Hz, 1 H; NH), 12.07 (s, 1 H; gua-NH), 12.42 (s, 1 H; py-NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 22.3, 26.7, 27.3, 30.4, 31.5, 37.5, 38.7 (CH<sub>2</sub>), 52.3, 52.5, 54.6 (CH), 113.5, 116.0 (py-CH), 126.5, 128.3, 129.3 (ar-CH), 125.8, 132.4 (py-C<sub>q</sub>), 155.8 (gua-C<sub>q</sub>), 138.2, 155.8, 159.1, 171.0, 171.7, 173.5, 174.1 (C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 600 [M<sup>+</sup>], 455 [M<sup>+</sup>+Na- C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>], 308 [C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>+Na<sup>+</sup>], 179 [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>];

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3394 (s), 3052 (m), 2949 (s), 1698 (s), 1654 (s), 1542 (m), 1477 (w), 1278 (w), 1190 (w), 848 (w), 753 (w).

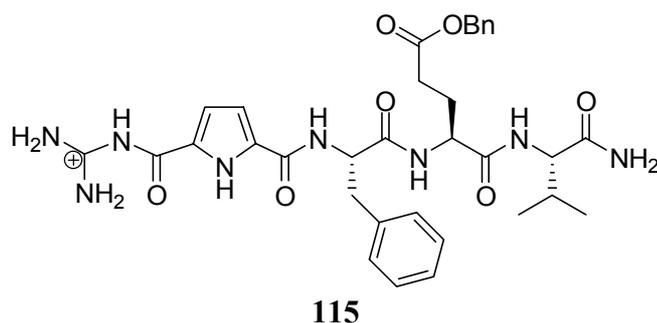
**CBS-L-Phe-L-Lys-L-Lys-NH<sub>2</sub> 175****175**C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>N<sub>10</sub>O<sub>5</sub>Cl<sub>3</sub>M.W. = 706.3 g·mol<sup>-1</sup>**Ausbeute:** 115 mg, 74 %, 0.16 mmol**Smp.:** 202 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 1.25-1.40 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 1.47-1.57 (m, 6 H; CH<sub>2</sub>), 1.68 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.71-2.78 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 2.87 (m, 1 H; CH), 3.13 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 4.17 (m, 1 H; CH), 4.27 (m, 1 H; CH), 4.76 (m, 1 H; CH), 6.84 (m, 1 H; py-CH), 7.05 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.14 (s, 1 H; py-CH), 7.17 (m, 1 H; ar-CH), 7.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.7 Hz, 2 H; ar-CH), 7.32 (m, 2 H; ar-CH), 7.37 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.78 (bs, 6 H; NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.87 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.1 Hz, 1 H; NH), 8.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.4 Hz, 1 H; NH), 8.54 (b s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 8.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.4 Hz, 1 H; NH), 8.69 (b s, 2 H; gua-NH<sub>2</sub>), 11.51 (s, 1 H; gua-NH), 12.40 (s, 1 H; py-NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 22.3, 22.4, 26.8, 26.9, 31.3, 31.7, 37.5, 38.8, 40.4 (CH<sub>2</sub>), 52.2, 52.7, 54.3 (CH), 113.6, 115.2 (py-CH), 126.5, 132.2 (py-C<sub>q</sub>), 128.2, 129.4 (ar-CH), 158.7 (gua-C<sub>q</sub>), 138.1, 155.0, 159.0, 171.3, 171.5, 173.5 (C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 599 [M<sup>+</sup>], 377 [C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>], 300 [M+H<sup>2+</sup>], 179 [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>];

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3328 (s), 3062 (m), 2938 (s), 1676 (s), 1558 (m), 1286 (w), 1202 (m), 1135 (m), 836 (w), 722 (w).

**CBS-L-Phe-L-Glu(OBn)-L-Val-NH<sub>2</sub> 115**C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub>ClM.W. = 697.18 g·mol<sup>-1</sup>**Ausbeute:** 121 mg, 79 %, 0.17 mmol**Smp.:** 177 °C

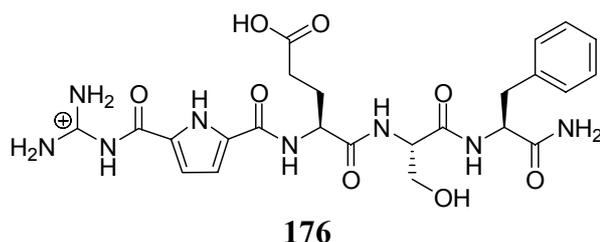
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 0.83 (m, 6 H; CH<sub>3</sub>), 1.82-2.00 (m, 3 H; CH; CH<sub>2</sub>), 2.40 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.82 (m, 1 H; CH), 3.11 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 4.09 (m, 1 H; CH), 4.33 (m, 1 H; CH), 4.75 (m, 1 H; CH), 5.07 (s, 2 H; CH<sub>2</sub>), 6.81 (m, 1 H; py-CH), 7.03 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.13 (m, 1 H; ar-CH), 7.22 (m, 2 H; ar-CH), 7.26-7.36 (m, 6 H; ar-CH), 7.38 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.42 (m, 1 H; py-CH), 7.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.8 Hz, 1 H; NH), 8.46 (bd, 4 H; NH<sub>2</sub>), 8.46 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.8 Hz, 1 H; NH), 8.68 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.3 Hz, 1 H; NH), 11.84 (s, 1 H; gua-NH), 12.42 (s, 1 H; py-NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 17.9, 19.4 (CH<sub>3</sub>), 30.3, 30.7, 37.6, 65.6 (CH<sub>2</sub>), 52.3, 54.2, 57.4 (CH), 113.5, 115.8 (py-CH), 125.7, 128.0, 128.1, 128.2, 128.6, 129.3 (ar-CH), 126.4, 132.3 (py-CH), 136.3, 138.1 (ar-C<sub>q</sub>), 155.5, 158.9, 159.8, 170.8, 171.5 (C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 661 [M<sup>+</sup>], 545 [C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>], 300 [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>], 179 [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>];

**HR-MS (pos. ESI)** 661.310 (berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>: 561.3098);

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3422 (s), 2963 (m), 2940 (m), 1697 (s), 1654 (s), 1539 (w), 1268 (w), 1186 (m).

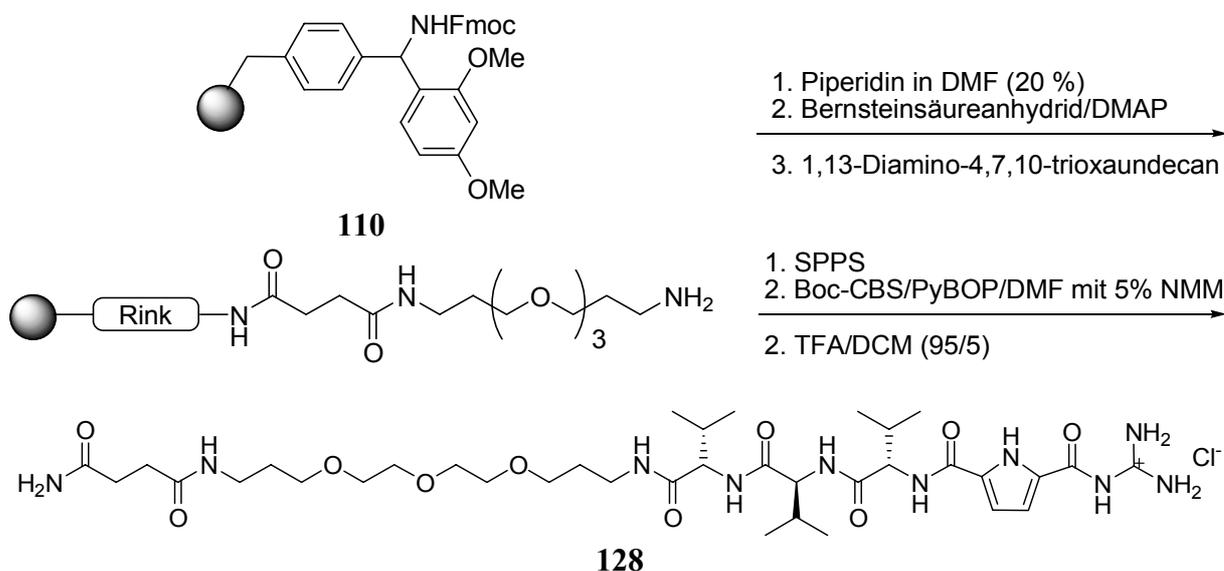
**CBS-L-Glu-L-Ser-L-Phe-NH<sub>2</sub> 176**C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>ClM.W. = 596.01 g·mol<sup>-1</sup>**Ausbeute:** 97 mg, 74 %, 0.16 mmol**Smp.:** 198 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 1.86 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.98 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 2.30 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.84 (m, 1 H; CH), 3.06 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 3.54 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 4.28 (q, 1 H; CH), 4.38-4.50 (m, 2 H; CH), 5.08 (bs, 1 H; OH), 6.91 (m, 1 H; py-CH), 7.03 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.14 (m, 1 H; py-CH), 7.18 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.21-7.26 (m, 5 H; ar-CH), 7.33 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 8.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.3 Hz, 1 H; NH), 8.07 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.3 Hz, 1 H; NH), 8.49 (bs, 4 H; NH<sub>2</sub>), 8.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.8 Hz, 1 H; NH), 11.35 (s, 1 H; gua-NH), 12.11 (bs, 1 H; COOH), 12.55 (s, 1 H; py-NH);

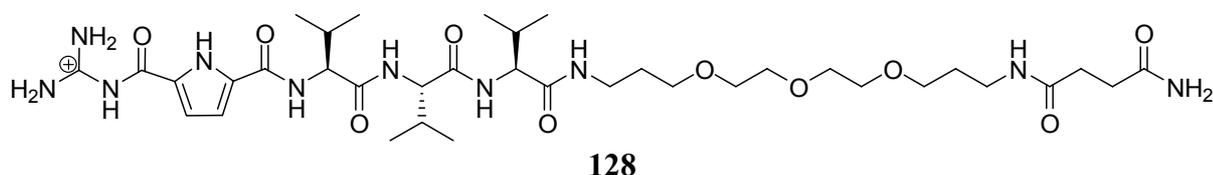
**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 30.4, 30.5, 37.2, 61.8 (CH<sub>2</sub>), 52.5, 54.1, 55.2 (CH), 113.8, 115.4 (py-CH), 126.4, 128.2, 129.2 (ar-CH), 125.9, 132.4 (py-CH), 138.1 (ar-C<sub>q</sub>), 155.3, 159.2, 169.9, 171.4, 173.0, 174.0 (C<sub>q</sub>);

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3380 (s), 3327 (s), 2958 (m), 2927 (m), 1699 (s), 1654 (s), 1552 (w), 1282 (m), 1200 (w), 756 (w).

## 7.4.4 Synthese des wasserlöslichen Trivalinrezeptors



Rink-Amid Harz **110** (300 mg, 0.74 mmol/g, 0.22 mmol) wurde für 1.5 Stunden in DMF vorgequollen. Anschließend wurde die Schutzgruppe durch zweimaliges Schütteln für 20 min mit einer Lösung aus Piperidin in DMF (20 %) entfernt. Das Harz wurde mit einer Lösung (10 mL) aus Bernsteinsäureanhydrid (220 mg, 2.2 mmol, 10 eq) und DMAP (27 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq) gelöst in einer Mischung aus DMF und Dichlormethan für 4 Stunden geschüttelt. Die freie Carbonsäure wurde mit 1,3-Diamino-4,7,10-trioxaundecan **193** (490 mg, 2.2 mmol, 10 eq) und PyBOP (290 mg, 0.55 mmol, 2.5 eq) für drei Stunden in DMF (10 mL) umgesetzt. An der so erhaltenen freien Aminofunktion wurde die Tripeptidereinheit nach einer Standardmethode gekuppelt. Das Anbringen des Guanidiniocarbonylpyrrol Bausteins **106** erfolgte unter ähnlichen Bedingungen wie eine Standardkupplung. Die Säure **106** (165 mg, 0.55 mmol, 2.5 eq) und PyBOP (290 mg, 0.55 mmol, 2.5 eq) wurde in DMF (10 mL), das 5 % NMM enthielt gelöst und für 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon geschüttelt. Um einen quantitativen Reaktionsverlauf zu gewährleisten, wurde diese Prozedur wiederholt. Die Abspaltung des Rezeptors **128** erfolgte durch Schütteln des Harzes mit einer Mischung aus Dichlormethan und TFA (0.25 mL/4.75 mL) für drei Stunden. Das Lösemittelgemisch wurde abgesaugt und das Harz mit einer geringen Menge der Abspalllösung gewaschen. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck bis auf etwa 2 mL eingengt und das verbleibende gelbe bis rötliche Öl mit trockenem Diethylether (30 mL) versetzt. Der dabei ausgefallene weiße Feststoff wurde abgesaugt, mit wenig trockenem Diethylether gewaschen und getrocknet. Um das Hydrochlorid Salz zu erhalten wurde das Trifluoracetat Salz des Rezeptors in wenig (1 mL) Methanol gelöst und mit 0.1 N Salzsäure (4 mL) angesäuert und lyophilisiert. Diese Prozedur wurde noch drei Mal wiederholt, um eine quantitative Umsalzung zu gewährleisten.

**CBS-L-Val-L-Val-L-Val-TEG-NH<sub>2</sub> 128**C<sub>36</sub>H<sub>63</sub>ClN<sub>10</sub>O<sub>10</sub>M.W. = 831.4 g·mol<sup>-1</sup>**Ausbeute:** 74 %, 97 mg, 0.16 mmol**Smp.:** 198 °C

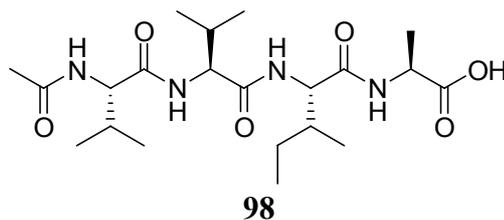
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 0.81-0.88 (m, 18 H; CH<sub>3</sub>), 1.59 (m, 4 H; CH), 1.85-2.09 (m, 3 H; CH), 2.25 (s, 4 H; CH<sub>2</sub>), 3.05 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 3.35-3.45 (m, 12 H; CH<sub>2</sub>), 4.07 (m, 1 H; CH), 4.18 (m, 1 H; CH), 4.46 (m, 1 H; CH), 6.83 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 6.90 (m, 1 H; py-CH), 7.24 (s, 1 H; NH<sub>2</sub>), 7.36 (m, 1 H; py-CH), 7.69 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.8 Hz, 1 H; NH), 7.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5.5 Hz, 1 H; NH), 7.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5.5 Hz, 1 H; NH), 8.06 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.8 Hz, 1 H; NH), 8.44 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.3 Hz, 1 H; NH), 8.36-8.50 (br s, 4 H; gua-NH<sub>2</sub>), 11.65 (s, 1 H; gua-NH), 12.70 (s, 1 H; py-NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 18.4, 18.5, 18.6, 19.3, 19.3, 19.4 (CH<sub>3</sub>), 29.4, 29.5, 30.3, 30.4, 30.6, 30.7, 30.8 (3 CH; 2 CH<sub>2</sub>, 2 N-CH<sub>2</sub>), 35.8, 35.9 (CH<sub>2</sub>), 58.0, 58.1, 58.3 (CH), 68.1, 68.2, 69.7, 69.7, 69.9, 69.9 (O-CH<sub>2</sub>), 114.1, 115.6 (py-CH), 125.7, 132.6 (py-C<sub>q</sub>), 155.5 (gua-C<sub>q</sub>), 158.5, 159.9, 170.7, 170.8, 171.0, 171.4, 173.6 (C<sub>q</sub>);

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3403 (s), 3292 (s), 2963 (m), 2868 (m), 1695 (m), 1637 (s), 1558 (m), 1472 (w), 1294 (w), 1320 (w), 1254 (w).

## 7.5 Synthese der Liganden für die Bindungsstudien in Lösung

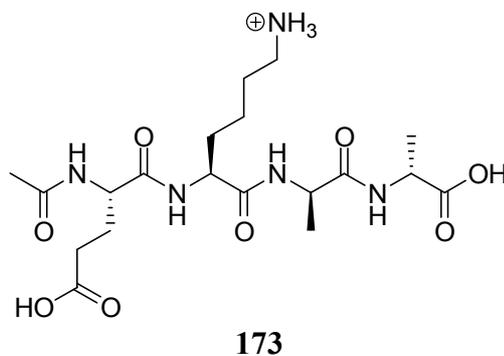
Die Tetrapeptide **98**, **173** und **174** wurden auf Wang-Harz **40** nach einem Standardprotokoll synthetisiert: Wang Harz **40** (300 mg, 1.11 mmol/g, 0.33 mmol, 1.0 eq) wurde für 1.5 Stunden in einer Mischung (10 mL) aus Dichlormethan und DMF (8/2) vorgequollen. Die erste Aminosäure wurde mit DIC (85 mg, 105  $\mu$ L, 0.66 mmol, 2.0 eq), DMAP (6 mg, 0.05 mmol, 0.15 eq) und der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure (0.66 mmol, 2.0 eq) in einer Mischung (10 mL) aus Dichlormethan/DMF (8/2) an die feste Phase bei einer Reaktionszeit von 20 Stunden gekuppelt. Diese Prozedur wurde wiederholt, um einen quantitativen Umsatz zu gewährleisten. Anschließend wurde die Schutzgruppe nach Standardvorschrift entfernt. Anschließend wurden die anderen Aminosäuren nach Standardvorschrift an die feste Phase gekuppelt. Die Fmoc-geschützte Aminosäure (0.83 mmol, 2.5 eq) wurde zusammen mit PyBOP (432 mg, 0.83 mmol, 2.5 eq) in DMF (10 mL) das 3 % NMM enthielt gelöst und zu dem Harz gegeben und über Argon für vier Stunden geschüttelt. Das Lösemittel wurde abgesaugt, das Harz mit DMF (10 mL) gewaschen und mit einigen Harzkügelchen ein Kaiser-Test durchgeführt. Bei einem positiven Kaiser-Test wurde der Kupplungsschritt noch einmal wiederholt. Die Schutzgruppe wurde mit 20 % Piperidin in DMF (8 mL), wie oben beschrieben, entfernt. Die freie Aminofunktion des Tetrapeptids wurde anschließend für drei Stunden mit Essigsäureanhydrid (340 mg, 3.3 mmol, 10.0 eq) und DMAP (40 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq) in einer Mischung (10 mL) aus Dichlormethan und DMF Mischung (8/2) behandelt. Anschließend wurde das Harz sehr sorgfältig mit DMF (drei Mal je 10 mL), Methanol (vier Mal je 10 mL), Diethylether (vier Mal je 10 mL) und Dichlormethan (fünf Mal je 10 mL) gewaschen, um jegliche Reaktanden und letzte Spuren von DMF zu entfernen. Nach kurzem Trocknen des Harzes im Membranpumpenvakuum wurde das Produkt durch Behandeln des Harzes mit einer Dichlormethan/TFA Mischung (6 mL, 1:1) für drei Stunden von der festen Phase abgespalten. Das Lösemittel wurde abgesaugt und das Harz noch mit der Abspaltungslösung (2-3 mL) nachgewaschen. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bis auf 2 bis 3 mL eingeeengt und das resultierende braune bis rote Öl mit trockenem Diethylether behandelt, woraufhin weiße amorphe Feststoffe erhalten werden konnten. Diese Feststoffe wurden in Methanol gelöst, mit etwa 0.1 N Salzsäure (5 mL) und Wasser (30-40 mL) versetzt und lyophilisiert. Daraufhin konnten voluminöse weiße Substanzen erhalten werden, die analytisch rein waren.

**Ac-L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH (98)**C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>M.W. = 442.55 g·mol<sup>-1</sup>**Ausbeute:** 109 mg, 64 %, 0.25 mmol**Smp.:** 200 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 0.77-0.83 (m, 18 H; 6 CH<sub>3</sub>), 1.06 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.3 Hz 3 H; CH<sub>3</sub>), 1.42 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.69 (m, 1 H; CH), 1.84 (s, 3 H; CH<sub>3</sub>), 1.92 (m, 2 H; CH), 4.14-4.18 (m, 4 H; CH), 7.70 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.8 Hz, 1 H; NH), 7.83 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.8 Hz, 1 H; NH), 7.87 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 9.1 Hz, 1 H; NH), 8.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.0 Hz, 1 H; NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 10.9, 15.2, 17.1, 18.2, 18.3, 19.2, 19.2, 22.5 (8 C; CH<sub>3</sub>), 24.1 (CH<sub>2</sub>), 30.3, 30.4, 36.7, 47.5, 56.4, 57.8, 57.9 (7 C; CH), 169.3, 170.6, 170.7, 171.2, 173.9 (5 C; C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 465 [M+Na<sup>+</sup>], 354 [M<sup>+</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>], 241 [C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>].

**Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (173)**C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>ClM.W. = 495.95 g·mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:** 52 %, 82 mg, 0.17 mmol

**Smp.:** 187 °C

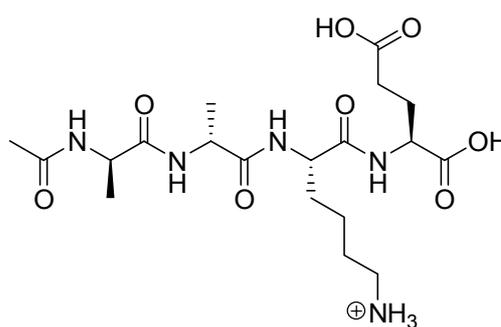
**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 1.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.0 Hz 3 H; CH<sub>3</sub>), 1.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.3 Hz 3 H; CH<sub>3</sub>), 1.21-1.35 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 1.49-1.56 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>), 1.63 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.72 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.83 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.84 (s, 3 H; CH<sub>3</sub>), 2.23 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 2.72 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>), 4.15-4.22 (m, 3 H; CH), 4.30 (m, 1 H; CH), 7.93 (b s, 3 H; NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.9 Hz, 1 H; NH), 8.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.6 Hz, 1 H; NH), 8.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.6 Hz, 1 H; NH), 8.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.3 Hz, 1 H; NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 16.9, 18.2, 22.4 (CH<sub>3</sub>), 22.1, 26.4, 27.1, 30.1, 31.0, 38.4 (CH<sub>2</sub>), 47.4, 47.6, 52.1, 52.4 (CH), 169.8, 171.2, 171.6, 171.9, 174.0, 174.1 (C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 460 [M<sup>+</sup>+H], 396 [M<sup>+</sup>+Na-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>2</sub>], 389 [C<sub>18</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>], 290 [C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup>], 203 [C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub>-Na<sup>+</sup>];

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3422 (s), 3074 (s), 2922 (s), 1728 (m), 1654 (s), 1542 (m), 1459 (w), 1378 (w), 1213 (m), 1170 (m), 1046 (w) 826 (w).

**Ac-D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Glu-OH (174)**



**174**

C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>Cl

M.W. = 495.95 g·mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:** 98 %, 220 mg, 0.21 mmol (als Trifluoracetatsalz)

**Smp.:** 154 °C

**$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 1.19$  (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$  Hz, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 1.23 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$  Hz, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 1.25-1.34 (m, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 1.47-1.56 (m, 3 H;  $\text{CH}_2$ ), 1.69 (m, 1 H;  $\text{CH}_2$ ), 1.81 (m, 1 H;  $\text{CH}_2$ ), 1.84 (s, 3 H;  $\text{CH}_3$ ), 1.98 (m, 1 H;  $\text{CH}_2$ ), 2.29 (t,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.9$  Hz, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 2.75 (m, 2 H;  $\text{CH}_2$ ), 4.16-4.29 (m, 4 H; CH), 7.72 (b s, 3 H;  $\text{NH}_3^+$ ), 7.85 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 8.2$  Hz, 1 H; NH), 8.04 (m, 2 H; NH), 8.11 (d,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$  Hz, 1 H; NH), 12.44 (b s, 1 H; COOH);

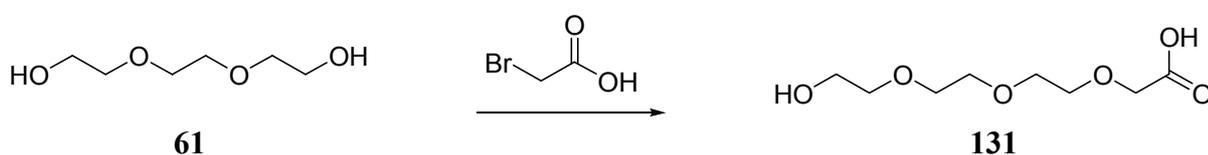
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 18.1, 18.2, 22.6$  ( $\text{CH}_3$ ), 22.1, 26.3, 26.7, 30.2, 31.5, 38.9 ( $\text{CH}_2$ ), 48.5, 48.7, 51.4, 52.0 (CH), 169.5, 171.6, 172.2, 172.5, 173.2, 173.9 ( $\text{C}_q$ );

**MS (ESI, DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$ ) m/z:** 460 [ $\text{M}^+ + \text{H}$ ] [ $\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ ] $^+$  [ $\text{M}^+ - \text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$ ] $^+$ ;

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3423 (s), 3071 (s), 2927 (s), 1729 (m), 1655 (s), 1542 (m), 1450 (w), 1374 (w), 1210 (m), 1172 (m).

## Synthese des wasserlöslichen Tetrapeptids 132

### Synthese der Triethylenglykolarbonsäure<sup>[171]</sup>



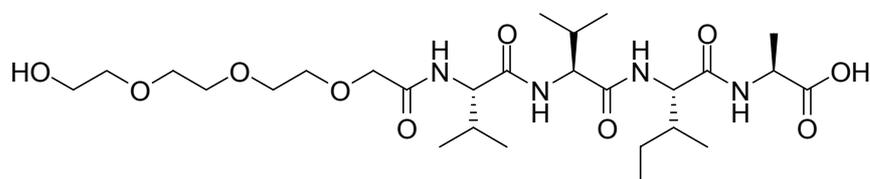
Natrium (0.40 g, 17.4 mmol, 2.0 eq) wurde in destilliertem Triethylenglykol (10.0 mL) bei 100 °C gelöst. Zu der heißen Lösung wurde Bromessigsäure (1.25 g, 9.0 mmol, 1.0 eq) gegeben und die resultierende Lösung für 10 Stunden bei 100 °C gerührt. Überschüssiges Triethylenglykol wurde durch Kugelrohrdestillation unter vermindertem Druck entfernt. Zu dem zurückbleibendem bräunlichen Öl wurde Wasser (2 mL) und konzentrierte Salzsäure (0.5 mL) gegeben und die ausgefallenen Salze abgesaugt. Es wurde Wasser (5 mL) zugegeben und drei Mal mit Dichlormethan (je 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Das zurückbleibende gelbe Öl wurde noch im Ölpumpenvakuum getrocknet. Eine Ausbeute von **130** konnte nicht bestimmt werden, da das Produkt noch mit geringen Mengen an unumgesetzten Triethylenglykol verunreinigt war.

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_6$

M.W. = 208.21  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 3.75\text{-}3.79$  (m, 12 H;  $\text{CH}_2$ ), 4.27 (s, 2 H;  $\text{CH}_2$ ).

### Festphasensynthese für das wasserlösliche Tetrapeptid **132**



**132**

Ausgehend von Wang-Harz **40** (300 mg, 1.1 mmol/g, 0.33 mmol, 1.0 eq) wurde nach Standardmethoden das Tetrapeptid aufgebaut **132**. Die erste Aminosäure wurde mit DIC (85 mg, 105  $\mu\text{L}$ , 0.66 mmol, 2.0 eq) DMAP (6 mg, 0.05 mmol, 0.15 eq) und Fmoc-Alanin (205 mg, 0.66 mmol, 2.0 eq) in einer Mischung (10 mL) aus Dichlormethan und DMF (8/2) an die feste Phase bei einer Reaktionszeit von 20 h gekuppelt. Nach Abspalten der Schutzgruppe wurden die drei weiteren Aminosäure nach einer Standardvorschrift ans Harz gekuppelt:

Fmoc-Isoleucin (293 mg, 0.83 mmol, 2.5 eq), PyBOP (432 mg, 0.83 mmol, 2.5 eq) in DMF (10 mL) mit 3 % NMM, zwei Mal Fmoc-Valin (282 mg, 0.83 mmol, 2.5 eq), PyBOP (432 mg, 0.83 mmol, 2.5 eq) in DMF (10 mL) mit 3 % NMM. Anschließend wurde das Harz sehr sorgfältig mit DMF (drei Mal je 10 mL), Methanol (vier Mal je 10 mL), Diethylether (vier Mal je 10 mL) und Dichlormethan (fünf Mal je 10 mL) gewaschen. Anschließend wurde das Harz mit der Triethylglykolsäure **131** (690 mg, 10 eq, 3.3 mmol) und PyBOP (432 mg, 0.83 mmol, 2.5 eq) in DMF (10 mL) mit 3 % NMM innerhalb von 5 Stunden an die feste Phase gekuppelt und anschließend sorgfältig mit DMF (drei Mal je 10 mL), Methanol (vier Mal je 10 mL), Diethylether (vier Mal je 10 mL) und Dichlormethan (fünf Mal je 10 mL) gewaschen. Nach kurzem Trocknen des Harzes im Membranpumpenvakuum wurde das Produkt durch Behandeln des Harzes mit einer Dichlormethan/TFA Mischung (6 mL, 1/1) für drei Stunden von der festen Phase abgespalten. Das Lösemittel wurde abgesaugt und das Harz noch mit der Abspalllösung (2 bis 3 mL) nachgewaschen. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bis auf 2.3 mL eingengt und das resultierende braune bis rote Öl mit trockenem Diethylether behandelt, woraufhin ein weißer amorpher Feststoff erhalten werden konnten. Dieser Feststoff wurden in Methanol gelöst, mit 0.1 N Salzsäure (5 mL) und Wasser (30-40 mL) versetzt und lyophilisiert. Daraufhin konnte das Peptid **132** in einer Ausbeute von 58 % erhalten werden.



M.W. = 590.71 g·mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:** 110 mg, 0.19 mmol, 58 %

**Smp.:** 216 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 0.76-0.83 (m, 18 H; 6 CH<sub>3</sub>), 1.07 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.3 Hz 3 H; CH<sub>3</sub>), 1.42 (m, 1 H; CH<sub>2</sub>), 1.69 (m, 1 H; CH), 1.94 (m, 2 H; CH), 3.46-3.59 (m, 12 H; CH<sub>2</sub>), 3.92 (s, 2 H; CH<sub>2</sub>), 4.12-4.18 (m, 4 H; CH), 7.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 9.1 Hz, 1 H; NH), 7.72 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.8 Hz, 1 H; NH), 8.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.8 Hz, 1 H; NH), 8.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.1 Hz, 1 H; NH);

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 11.0, 15.3, 17.2, 18.0, 18.0, 18.5, 19.3 (CH<sub>3</sub>), 24.3 (CH<sub>2</sub>), 30.4, 31.1, 36.8, 47.4, 56.5, 57.7, 58.1 (CH), 67.6, 67.7, 67.8, 68.4, 69.7, 69.9, 72.5 (O-CH<sub>2</sub>), 168.9, 170.4, 170.6, 170.7, 173.9 (C<sub>q</sub>);

**MS (ESI, DMSO/H<sub>2</sub>O) m/z:** 613 [M+Na<sup>+</sup>], 502 [M<sup>+</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>2</sub>], 389 [C<sub>18</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>], 290 [C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup>], 203 [C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub>-Na<sup>+</sup>];

**HR-MS (pos. ESI)** 613.342 (berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>Na<sup>+</sup>: 613.3424);

**FT-IR (KBr Pressling):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3281 (s), 2965 (s), 2924 (s), 2841 (m), 1737 (s), 1637 (m), 1542 (m), 1457 (w), 1227 (w), 1124 (w).

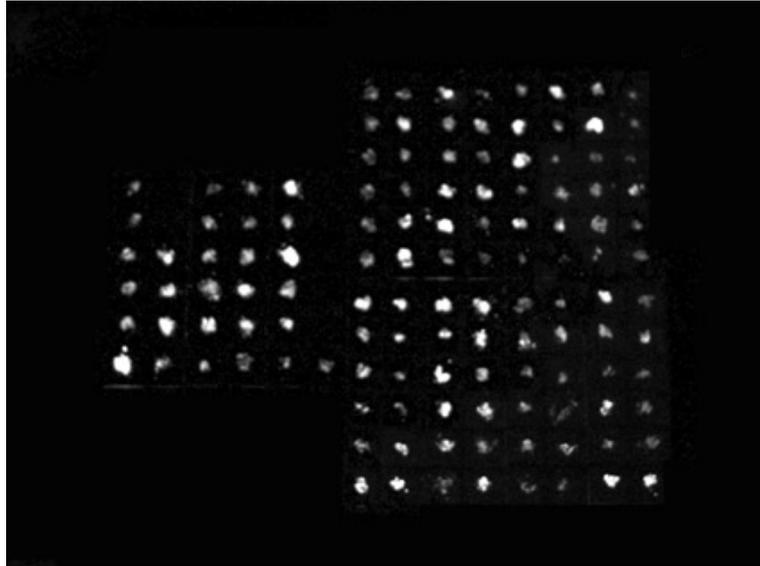
## 7.6 Durchführung des Fluoreszenzscreenings

*Durchführung des Fluoreszenzscreenings:* Das Fluoreszenzscreening wurde an einem Tecan Spectra Fluor Plus Gerät mit 96 Well Multititerplatten bei einer Anregungswellenlänge von 310 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm durchgeführt.

### 7.6.1 Screening für das Alzheimer Modellpeptid

*Screening auf Bindungseigenschaften des Alzheimer Modellpeptids 43 in Methanol:* Es wurde eine Stammlösung (1000 mL) aus dem Tetrapeptid **43** (21.2 mg, 26  $\mu\text{mol}$ ) und Tetramethylammoniumhydroxid (2.40 mg, 26  $\mu\text{mol}$ ) und Methanol hergestellt. Aus der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe zwischen 2 bis 26  $\mu\text{M}$  erstellt. Aus jeder dieser Lösungen wurden drei Mal je 200  $\mu\text{L}$  entnommen, in eine Kavität einer Titerplatte gefüllt und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Aus der Auftragung der Konzentration gegen die Fluoreszenzintensität wurde die Steigung bestimmt, mit deren Hilfe sich jeder Fluoreszenzintensität eine Konzentration zuordnen ließ; die Steigung betrug 1245  $\mu\text{M}^{-1}$ .

Die noch in den *MikroKans* befindlichen festphasengebundenen Rezeptoren wurden mit einer 26  $\mu\text{M}$  Lösung (400 mL) des fluoreszenzmarkierten Peptids **43** für 18 Stunden geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgesaugt und die *MikroKans* einmal mit Methanol (400 mL) gewaschen. Die *MikroKans* wurden geöffnet und aus jedem eine geringe Harz entnommen und auf einen Objektträger gegeben. Die isolierten Mitglieder der Bibliothek wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Anhand der sichtbaren unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten wurden 12 Sequenzen ausgewählt, darunter 6 gut bindende und 6 schlecht bindende. Eine genau abgewogene Menge der Rezeptoren wurde in ein wiederverschließbares Gefäß überführt und mit 2 mL der oben hergestellten Stammlösung für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurden zwei Mal je 200  $\mu\text{L}$  der überstehenden Lösung entnommen und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Durch eine Bestimmung der Fluoreszenzintensität vor und nach der Inkubierung konnte die Bindungskonstante nach Gleichung (3.1) berechnet werden.



*Abbildung 7.1: UV-Licht Aufnahme der Bibliothek nach der Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid. Helle Bereiche zeigen gute Rezeptoren an, dunkle Bereiche zeigen schlechte Rezeptoren an.*

*Screening auf Bindungseigenschaften des Alzheimer Modellpeptids 65 in Wasser:* Es wurde eine Stammlösung (1000 mL) aus dem Tetrapeptid **65** (4.7 mg, 5.0  $\mu\text{mol}$ ) in einer wässrigen BisTris Lösung (21.2 mg, 101  $\mu\text{mol}$ ), die Natriumchlorid (87 mg, 1.50 mmol) enthielt, hergestellt. Aus der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe zwischen 1 und 5  $\mu\text{M}$  aufgenommen. Die Steigung der ermittelten Eichgerade betrug  $146 \mu\text{M}^{-1}$ .

Eine genau abgewogene Menge jedes Rezeptors wurde in ein wiederverschließbares Gefäß überführt und mit 2 mL der 5  $\mu\text{M}$  Stammlösung des fluoreszenzmarkierten Peptids **65** für 18 Stunden im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden zwei Mal je 200  $\mu\text{L}$  der überstehenden Lösung entnommen und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Aus der Differenz der Fluoreszenzintensitäten konnten nach Gleichung (3.1) die Bindungskonstanten bestimmt werden.

### 7.6.2 Screening für das Peptidoglycan Modellpeptid

*Screening auf Bindungseigenschaften des Peptidoglycan Modellpeptids 139 in Wasser:* Es wurde eine Stammlösung (1000 mL) aus dem Tetrapeptid (38.8 mg, 39.2  $\mu\text{mol}$ ) in einer wässrigen BisTris Lösung (83.1 mg, 397  $\mu\text{mol}$ ) hergestellt. Mit der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe zwischen 2 und 39  $\mu\text{M}$  erstellt. Aus jeder dieser Lösungen wurden drei Mal je 200  $\mu\text{L}$  entnommen, in eine Kavität einer Titerplatte gefüllt und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Steigung der ermittelten Eichgerade betrug 605  $\mu\text{M}^{-1}$ . Zu jedem Mitglied der Bibliothek wurden 2 mL der Stammlösung gegeben und in einem verschlossenen Gefäß im Dunklen für 18 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden zwei Mal je 200  $\mu\text{L}$  der überstehenden Lösung entnommen und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Aus der Differenz der Fluoreszenzintensitäten konnten nach Gleichung (3.1) die Bindungskonstanten bestimmt werden.

*Screening auf Bindungseigenschaften des inversen Peptidoglycan Modellpeptids 140 in Wasser:* Es wurde eine Stammlösung (1000 mL) aus dem Tetrapeptid **140** (38.0 mg, 38.4  $\mu\text{mol}$ ) in einer wässrigen BisTris Lösung (86.1 mg, 411  $\mu\text{M}$ ) hergestellt. Mit der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe zwischen 2 und 38  $\mu\text{M}$  erstellt. Aus jeder dieser Lösungen wurden drei Mal je 200  $\mu\text{L}$  entnommen, in eine Kavität einer Titerplatte gefüllt und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Steigung der ermittelten Eichgerade betrug 255  $\mu\text{M}^{-1}$ . Zu jedem Mitglied der Bibliothek wurden 2 mL der Stammlösung gegeben und in einem verschlossenen Gefäß im Dunklen für 18 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden zwei Mal je 200  $\mu\text{L}$  der überstehenden Lösung entnommen und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Aus der Differenz der Fluoreszenzintensitäten konnten nach Gleichung (3.1) die Bindungskonstanten bestimmt werden.

## 7.7 Daten zu den Bindungsstudien in Lösung

### Titrationen mit dem Liganden TEG-L-Val-L-Val-L-Ile-L-Ala-OH **132**

Für die Messungen wurde eine Stammlösung des Puffers frisch angesetzt, so dass für die Rezeptorlösung und die Ligandenlösung die gleichen Pufferkonzentration gilt. Der pH Wert wurde vor der Titration auf einen konstanten Werte eingestellt und nach der Titration auf Konstanz getestet. Innerhalb der Fehlergrenzen des pH-Meters ( $\pm 0.1$  Einheiten) war der pH-Wert bei den Titrationen konstant.

Für die UV Titrationen des Liganden **132** wurde nur eine Rezeptorlösung und eine Pufferlösung verwendet, da die Messungen innerhalb von zwei Tagen durchgeführt wurden.

*Einwaage Puffer:* 40.73 mg BisTris, aufgefüllt auf 250 mL und mit 0.1 N HCl auf pH 6.30 eingestellt.

*Einwaage Ligand:* 3.235 mg **173**, aufgefüllt auf 10 mL Pufferlösung und mit 0.1 N NaOH auf pH 6.20 eingestellt.

### UV-Titration mit CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys-NH<sub>2</sub> **100**

*Einwaage Rezeptor:* 0.503 mg auf 10 mL mit Pufferlösung aufgefüllt und anschließend auf 1:2 verdünnt.

*Konzentration Rezeptor:*  $3.70 \cdot 10^{-5}$  M

*Konzentration Ligand:*  $5.50 \cdot 10^{-4}$  M

*Konzentration Puffer:*  $8.0 \cdot 10^{-4}$  M, pH 6.20

2000  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 1000  $\mu$ L der Stammlösung des Liganden zutitriert

### UV-Titration mit CBS-L-Leu-L-Tyr-L-Leu-NH<sub>2</sub> **114**

*Einwaage Rezeptor:* 0.435 mg auf 10 mL mit Pufferlösung aufgefüllt und anschließend auf 1:2 verdünnt.

*Konzentration Rezeptor:*  $3.50 \cdot 10^{-5}$  M

*Konzentration Ligand:*  $5.50 \cdot 10^{-4}$  M

*Konzentration Puffer:*  $8.0 \cdot 10^{-4}$  M, pH 6.20

2000  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 1000  $\mu$ L der Stammlösung des Liganden zutitriert

**UV-Titration mit CBS-L-Val-L-Val-L-Val-TEG 128**

*Einwaage Rezeptor:* 0.685 mg auf 10 mL mit Pufferlösung aufgefüllt

*Konzentration Rezeptor:*  $8.20 \cdot 10^{-5}$  M

*Konzentration Ligand:*  $5.50 \cdot 10^{-4}$  M

*Konzentration Puffer:*  $8.0 \cdot 10^{-4}$  M, pH 6.20

2000  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 1000  $\mu$ L der Stammlösung des Liganden zutitriert

**Titrationen mit dem Liganden Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH 173**

Für die jeweiligen Messungen wurde eine Stammlösung des Puffers frisch angesetzt, so dass für die Rezeptorlösung und die Ligandenlösung die gleichen Pufferkonzentration gilt. Der pH-Wert wurde vor der Titration auf einen konstanten Werte eingestellt und nach der Titration auf Konstanz getestet. Innerhalb der Fehlergrenzen des pH-Meters ( $\pm 0.1$  Einheiten) war der pH-Wert bei den Titrationen konstant.

Für die UV Titrationen des Liganden **173** wurde nur eine Rezeptorlösung und eine Pufferlösung verwendet, da die Messungen innerhalb von zwei Tagen durchgeführt wurden.

*Einwaage Puffer:* 159.2 mg BisTris, aufgefüllt auf 500 mL und mit 0.1 N HCl auf pH 6.23 eingestellt.

*Einwaage Ligand:* 25.40 mg **173**, aufgefüllt auf 50 mL mit der Pufferlösung und mit 0.1 N NaOH auf pH 6.15 eingestellt.

**UV-Titration mit CBS-L-Lys-L-Lys-L-Phe-NH<sub>2</sub> 135**

*Einwaage Rezeptor:* 3.475 mg auf 10 mL Pufferlösung aufgefüllt und anschließend auf 1:10 verdünnt.

*Konzentration Rezeptor:*  $4.91 \cdot 10^{-5}$  M

*Konzentration Ligand:*  $1.02 \cdot 10^{-3}$  M

*Konzentration Puffer:*  $1.52 \cdot 10^{-3}$  M, pH 6.15

1. Messung: 2000  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 600  $\mu$ L Ligand zutitriert

2. Messung: 2000  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 1100  $\mu$ L Ligand zutitriert

UV-Titration mit CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub> **136**

*Einwaage Rezeptor:* 3.680 mg auf 10 mL Pufferlösung aufgefüllt und anschließend auf 1:10 verdünnt.

*Konzentration Rezeptor:*  $5.08 \cdot 10^{-5}$  M

*Konzentration Ligand:*  $1.02 \cdot 10^{-3}$  M

*Konzentration Puffer:*  $1.52 \cdot 10^{-3}$  M, pH 6.15

1. Messung: 2000  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 1000  $\mu$ L Ligand zutitriert

2. Messung: 2000  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 1100  $\mu$ L Ligand zutitriert

UV-Titration mit CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH<sub>2</sub> **137**

*Einwaage Rezeptor:* 3.650 mg auf 10 mL Pufferlösung aufgefüllt und anschließend auf 1:10 verdünnt.

*Konzentration Rezeptor:*  $5.40 \cdot 10^{-5}$  M

*Konzentration Ligand:*  $1.02 \cdot 10^{-3}$  M

*Konzentration Puffer:*  $1.52 \cdot 10^{-3}$  M, pH 6.15

1. Messung: 2000  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 1000  $\mu$ L Ligand zutitriert

2. Messung: 2000  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 1020  $\mu$ L Ligand zutitriert

Fluoreszenztitrationen mit CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub> **136**

*Konzentration Rezeptor:*  $1.04 \cdot 10^{-5}$  M

*Konzentration Ligand:*  $6.79 \cdot 10^{-4}$  M

*Konzentration Puffer:*  $1.02 \cdot 10^{-3}$  M, pH 6.20

1500  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 1100  $\mu$ L Ligand zutitriert

Fluoreszenztitration mit CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH<sub>2</sub> **137**

*Konzentration Rezeptor:*  $8.77 \cdot 10^{-6}$  M

*Konzentration Ligand:*  $9.4 \cdot 10^{-4}$  M

*Konzentration Puffer:*  $1.02 \cdot 10^{-3}$  M, pH 6.20

2000  $\mu$ L Rezeptorlösung vorgelegt, 900  $\mu$ L Ligand zutitriert

## 8 Anhang

### 8.1 Literaturverzeichnis

- [1] T. Kortemme, D. Baker, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 91-97.
- [2] B. Ma, T. Elkayam, R. Nussinov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5772-5777.
- [3] S. Jones, J. M. Thornton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13-20.
- [4] T. Berg, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2566-2586.
- [5] K. Burgess, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 826-835.
- [6] M. W. Peczuh, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479-2494.
- [7] W. E. Stites, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1233-1250.
- [8] A. G. Cochran, *Chem. & Biol.* **2000**, *7*, R85-R94.
- [9] M. Peczuh, B. Orner, A. Hamilton, *Chemistry in Britain* **2000**, 43-45.
- [10] A. L. Blume, J. Beasley, N. I. Goldstein, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2000**, *55*, 347-356.
- [11] I. Hamachi, Y. Yamada, T. Matsugi, S. Shinkai, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1503-1511.
- [12] A. Berkessel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 409-419.
- [13] F. Balkenhohl, C. v. d. Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488.
- [14] D. L. Boger, J. Desharnais, K. Capps, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4270-4309.
- [15] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- [16] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biopolymers* **2003**, *24*, 4385-4415.
- [17] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491-497.
- [18] G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717-2725.
- [19] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.
- [20] J. T. Ernst, J. Becerril, H. S. Park, H. Yin, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 553-558.
- [21] B. Austen, M. Manca, *Chemistry in Britain* **2000**, 28-31.
- [22] A. B. Clippingdale, J. D. Wade, C. J. Barrow, *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 227-249.
- [23] D. I. Dominguez, B. De Strooper, *Trends in Pharm. Sci.* **2002**, *23*, 324-330.
- [24] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, *297*, 353-356.
- [25] J. T. Jarrett, E. P. Berger, J. Peter T. Lansbury, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693-4697.
- [26] J. Peter T. Lansbury, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 317-321.
- [27] B. A. Yankner, *Neuron* **1996**, *16*, 921-932.
- [28] J. Peter T. Lansbury, K. S. Kosik, *Chem. & Biol.* **2000**, *7*, R9 -R12.
- [29] R. Baumeister, S. Eimer, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3148-3152.
- [30] D. J. Selkoe, *Physiological Rev.* **2001**, *81*, 741-766.
- [31] D. J. Selkoe, *Science* **1997**, *275*, 630-631.
- [32] V. L. Healy, I. A. Lessard, D. I. Roper, J. R. Knox, C. T. Walsh, *Chem. & Biol.* **2000**, *7*, 109-119.

- [33] B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 752-789.
- [34] D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1264-1286.
- [35] K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2230-2287.
- [36] G. D. Wright, C. T. Walsh, *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 468-473.
- [37] S. J. Brickner, *Chem. & Ind.* **1997**, 131-135.
- [38] C. Schmuck, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2397-2403.
- [39] C. Schmuck, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1779-1781.
- [40] C. Schmuck, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 709-718.
- [41] [www.alzheimers.org](http://www.alzheimers.org), **2003**.
- [42] Y. Verdier, M. Zarandi, B. Penke, *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 229-248.
- [43] L. Dumery, F. Bourdel, Y. Soussan, A. Fialkowsky, S. Viale, P. Nicolas, M. Reboud-Ravaux, *Pathol. Biol.* **2001**, *49*, 72-85.
- [44] J. P. T. Lansbury, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 260-267.
- [45] K.-i. Watanabe, T. Segawa, K. Nakamura, M. Kodaka, T. Konakahara, H. Okuno, *J. Pept. Res.* **2001**, *58*, 342-346.
- [46] J. P. T. Lansbury, P. R. Costa, J. M. Griffiths, E. J. Simon, M. Auger, K. J. Halverson, D. A. Kocisko, Z. S. Hendsch, T. T. Ashbury, R. G. S. Spencer, B. Tidor, R. G. Griffin, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 990-998.
- [47] T. L. Lowe, A. Strzelec, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7882-7889.
- [48] L. O. Tjernberg, D. J. E. Callaway, A. Tjernberg, S. Hahne, C. Lilliehöök, L. Terenius, J. Thyberg, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12619-12625.
- [49] K.-I. Watanabe, K. Nakamura, S. Akikusa, T. Okada, M. Kodaka, T. Konakahara, H. Okuno, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *290*, 121-124.
- [50] P. P. Mager, *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 403-430.
- [51] M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11064-11077.
- [52] H. Sticht, P. Bayer, D. Willbold, S. Dames, C. Hilbich, K. Beyreuther, R. W. Frank, P. Rosch, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 293-305.
- [53] O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A. M. D'Ursi, P. A. Temussi, D. Picone, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 5642-5648.
- [54] R. Riek, P. Güntert, H. Döbeli, B. Wipf, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5930-5936.
- [55] A. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16742-16747.
- [56] L. K. Thompson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 383-385.
- [57] S. Dorrell, *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 316-317.
- [58] L. Helmuth, *Science* **2000**, *290*, 1273.
- [59] C. Janus, J. Pearson, J. McLaurin, P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, M. A. Chishti, P. Horne, D. Heslin, J. French, H. T. J. Mount, R. A. Nixon, M. Mercken, C. Bergon, P. E. Fraser, P. S. Georg-Hyslop, D. Westaway, *Nature* **2000**, *408*, 979-982.
- [60] T. K. Ritter, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3616-3641.
- [61] G. D. Wright, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 563-569.
- [62] C. T. Walsh, *Nature* **2000**, *406*, 775-781.

- [63] M. H. McCormick, W. M. Stark, G. E. Pittenger, R. C. Pittenger, J. M. McGuire., *Antibiot. Annu.* **1956**, 606-611.
- [64] R. K. Jain, J. Trias, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8740-8741.
- [65] L. Chen, D. Walker, B. Sun, S. Walker, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5658-5663.
- [66] R. Kerns, S. D. Dong, S. Fukuzawa, J. Carbeck, J. Kohler, L. Silver, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12608-12609.
- [67] M. Nieto, H. R. Perkins, *Biochem. J.* **1971**, *123*, 780-803.
- [68] M. C. Enright, D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann, B. G. Spratt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7687-7692.
- [69] J. Pootoolal, J. Neu, G. D. Wright, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 381-408.
- [70] S. L. Wiskur, H. Ait-Haddou, J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 963-972.
- [71] A. Metzger, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 911-914.
- [72] A. Metzger, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 682-684.
- [73] B. Baragana, A. G. Blackburn, P. Breccia, A. P. Davis, J. d. Mendoza, J. M. Padron-Carillo, P. Prados, J. Riedner, J. G. de Vries, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2931-2936.
- [74] A. Echavarren, A. Galán, J. d. Mendoza, A. Salmerón, J.-M. Lehn, *Helvetica Chimica Acta* **1988**, *71*, 685-693.
- [75] M. D. Best, S. L. Tobey, E. V. Anslyn, *Coordination Chem. Rev.* **2003**, *240*, 3-15.
- [76] P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 503-532.
- [77] P. A. Gale, *Coordination Chem. Rev.* **2003**, *240*, 191-221.
- [78] C. Schmuck, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3063-3067.
- [79] C. Schmuck, W. Wienand, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 452-459.
- [80] C. Schmuck, M. Heil, M. Dechantsreiter, U. E. Hackler, *J. Ass. Lab. Automation* **2002**, *6*, 51-53.
- [81] C. Schmuck, L. Geiger, *Current Organic Chemistry* **2003**, *7*, 1485-1502.
- [82] T. Mizutani, K. Wada, S. Kitagawa, *Chem. Commun* **2002**, 1626-1627.
- [83] R. Breslow, Z. Yang, R. Ching, G. Trojandt, F. Odobel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3536-3537.
- [84] M. A. Hossain, H.-J. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11208-11209.
- [85] S. R. LaBrenz, J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1655-1656.
- [86] G. Greiveldinger, R. Xu, L. E. Marenus, A. Cooper, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**.
- [87] K. A. Ahrendt, J. A. Olsen, M. Wakao, J. Trias, J. A. Ellman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1683-1686.
- [88] W. Wienand, *Dissertation* **2002**, Universität zu Köln.
- [89] D. Rupprecht, C. Schmuck, *unveröffentlichte Ergebnisse* **2004**.
- [90] C. Schmuck, L. Geiger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *submitted*.
- [91] C. Schmuck, *ChiuZ* **2001**, *35*, 356-366.
- [92] J. Jones, *Synthesen von Aminosäuren und Peptiden*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1995**.
- [93] M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, 2. ed., Springer Verlag, Berlin, **1993**.
- [94] M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, 2. ed., Springer Verlag, Berlin, **1994**.

- [95] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448.
- [96] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82-83.
- [97] A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *37*, 487-493.
- [98] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, *354*, 84-86.
- [99] X.-Y. Xiao, Z. Parandoosh, M. P. Nova, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *62*, 6029-6033.
- [100] K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, S. Barluenga, G.-Q. Cao, R. L. Affleck, J. E. Lillig, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9954-9967.
- [101] M. Fasaro, R. B. W. Jr., *Chem. & Ind.* **1998**, 777-780.
- [102] S. A. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5381-5383.
- [103] A. Borchardt, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 373-374.
- [104] R. Arienzo, J. D. Kilburn, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 711-719.
- [105] M. Conza, H. Wennemers, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2696-2698.
- [106] K. Hirose, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2001**, *39*, 193-209.
- [107] Y. Cheng, T. Suenaga, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1813-1814.
- [108] K. A. Connors, *Binding Constants*, John Wiley & Sons, New York, **1987**.
- [109] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 375-391.
- [110] K. Frobel, T. Krämer, *ChiuZ* **1996**, *30*, 270-285.
- [111] D. Hudson, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 617-624.
- [112] M. Heil, Universität zu Köln (Köln), **2000**.
- [113] C. Schmuck, M. Heil, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 633-636.
- [114] N. Zacharias, D. A. Dougherty, *Trends in Pharm. Sci.* **2002**, *23*, 281-287.
- [115] C. Schmuck, M. Heil, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1253 - 1256.
- [116] M. O. Chaney, S. D. Webster, Y.-M. Kuo, A. E. Roher, *Protein Engineering* **1998**, *11*, 761-767.
- [117] C. Hetényi, T. Körtvélyesi, B. Penke, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2001**, *542*, 25-31.
- [118] D. Boumrah, M. M. Campbell, S. Fenner, R. G. Kinsman, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6977-6992.
- [119] S. W. Jeong, D. O'Brien, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4799-4802.
- [120] C. Hetényi, Z. Szabo, E. Klement, Z. Datki, T. Körtvélyesi, M. Zarandi, B. Penke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 931-936.
- [121] P. W. Smith, G. Chang, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1587-1590.
- [122] W. D. Price, R. A. Jockusch, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3474-3484.
- [123] P. D. Schnier, W. D. Price, E. F. Strittmatter, E. R. Williams, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 771-780.
- [124] K. Paech, R. A. Jockusch, E. R. Williams, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 9761-9766.
- [125] M. Goodman, M. Tomioka, C. J. Creighton, C. W. Zapf, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1133-1136.
- [126] J. B. Paine, D. Dolphin, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2826-2835.
- [127] H. Volz, M. Holzbecher, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1510-1513.

- [128] M. Furst, H. Kallmann, F. H. Brown, *J. Chem. Phys.* **1957**, *26*, 1321-1332.
- [129] R. C. Dunbar, *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 2537-2548.
- [130] M. Schäfer, C. Schmuck, M. Heil, A. Cooper, C. L. Hendrickson, M. J. Chalmers, A. G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 1282-1289.
- [131] H. LeVine, *Prot. Sci.* **1993**, *2*, 404-410.
- [132] H. Inouye, D. A. Kirschner, *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 123-129.
- [133] W. E. Klunk, R. F. Jacob, R. P. Mason, *Anal. Biochem.* **1999**, *266*, 66-76.
- [134] B. Permanne, C. Adessi, G. P. Saborio, S. Fraga, M.-J. Frossard, J. Van Dorpe, I. Dewachter, W. A. Banks, F. v. Leuven, C. Soto, *FASEB J.* **2002**, *16*, 860-863.
- [135] C. Adessi, C. Soto, *Drug Development Res.* **2002**, *56*, 184-193.
- [136] C. Adessi, M.-J. Frossard, C. Boissard, S. Fraga, S. Bieler, T. Ruckle, F. Vilbois, S. M. Robinson, M. Mutter, W. A. Banks, C. Soto, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13905-13911.
- [137] C. Soto, M. S. Kindy, M. Baumann, B. Frangione, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *226*, 672-680.
- [138] J. Ghanta, C.-L. Shen, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29525-29528.
- [139] S. Sano, S. Kawanashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3480-3484.
- [140] H. Sachs, E. Brand, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 4610.
- [141] G. Losse, H. Jeschkeit, W. Langenbeck, *Chem. Ber.* **1963**, *96*, 204-212.
- [142] G. Wedler, 3. ed., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1987**.
- [143] A. R. Watkins, *J. Chem. Phys.* **1973**, *77*, 1207-1210.
- [144] I. Wadsö, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 79-86.
- [145] R. J. H. Clark, R. E. Hester, *Spectroscopy of Biological Systems*, John Wiley & Sons, Chichester, **1986**.
- [146] R. Vogel, F. Siebert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 518-523.
- [147] P. R. Carey, *J. Biol. Chem.* **1999**, *38*, 26625-26628.
- [148] R. Petry, M. Schmitt, J. Popp, *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 14-30.
- [149] N. Berthaud, J.-F. Desnottes, *J. Antimicrobial Chemotherapy* **1997**, *39 Suppl. A*, 99-102.
- [150] M. Nitz, A. R. Mezo, M. H. Ali, B. Imperiali, *Chem. Commun* **2002**, 1912-1913.
- [151] I. Dufau, H. Mazarguil, *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 6063-6066.
- [152] B. E. Cohen, T. B. McAnaney, E. S. Park, Y. N. Jan, S. G. Boxer, L. Y. Jan, *Science* **2002**, *296*, 1700-1703.
- [153] B. Imperiali, G. K. Walkup, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6727-6731.
- [154] T. Carell, H. Schmid, M. Reinhard, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8741-8747.
- [155] L. Geiger, PhD thesis, Universität Würzburg **2004**.
- [156] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, *297*, 353-356.
- [157] M. A. Cooper, D. H. Williams, *Chem. & Biol.* **1999**, *6*, 891-899.
- [158] C. Schmuck, V. Bickert, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4579-4581.
- [159] T. Schrader, S. Rensing, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2161 - 2164.
- [160] K. B. Jensen, T. M. Braxmeier, M. Demarcus, J. Frey, J. D. Kilburn, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1300 - 1307.

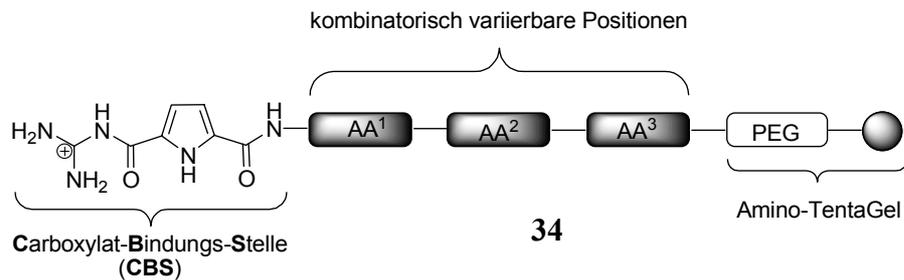
- [161] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 2. ed., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1992**.
- [162] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1997**.
- [163] H. Günzler, M. H. Heise, *IR-Spektroskopie - Eine Einführung*, 3. ed., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1996**.
- [164] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [165] J. W. Harbuck, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3618-3621.
- [166] R. M. Silverstein, E. Ryskiewicz, C. Willard, *Org. Syntheses* **1956**, *36*, 74-77.
- [167] L. Geiger, C. Schmuck, *unveröffentlichte Ergebnisse*, **2002**.
- [168] J. B. Paine, D. Dolphin, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5598-5604.
- [169] U. Eisner, A. Lichtarowicz, R. P. Linstead, *J. Chem. Soc.* **1957**, 733-739.
- [170] S. e. Bari, J. Iturraspe, B. Frydman, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 2255-2266.
- [171] Y. Nakatsuji, N. Kawamura, M. Okahara, *Synthesis* **1981**, 42-43.

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	I	Isoleucin
μL	Mikroliter	IR	Infrarotspektroskopie
μM	Mikrometer	IRMPD	Infrarot Multiphoton Laser Dissoziation
A	Alanin	K	Bindungskonstante, Lysin
Å	Ångström	K <sub>ass</sub>	Assoziationskonstante
Abb.	Abbildung	K <sub>dim</sub>	Dimerisierungskonstante
abs.	absolut/absolutiert	K <sub>diss</sub>	Dissoziationskonstante
Ac	Acetyl	L	Liter, Leucin
AD	Alzheimer'sche Krankheit	M	Molar
AIBN	Azaisobutyronitril	M	Methionin
Ala	Alanin	m/z	Masse pro Ladung
Ala	Alanin	Me	Methyl
apoE	Apolipoprotein E	mg	Milligramm
APP	Alzheimer Precursor Protein	MHz	Megahertz
aq.	wässrig	min	Minute(n)
Asp	Asparaginsäure	mm	Millimeter
Aβ	Amyloid Beta Protein	mM	Millimolar
BisTris	2,2-Bis-(hydroxymethyl)-2,2',2''- nitrilotriethanol	mm	Millimol
Bn	Benzyl	MS	Massenspektrometrie
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	N	Normal
bzw.	beziehungsweise	N	Asparagin
ca.	circa	NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
CBS	Carboxylat-Bindungsstelle	neg.	negativ
d	Tag(e)	NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
D	Asparaginsäure	NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
δ	chemische Verschiebung	NMR	Kernresonanzspektroskopie
d. h.	das heißt	o	ortho
DC	Dünnschichtchromatographie	OAc	Acetat
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	p	para
DCM	Dichlormethan	pos.	positiv
dest.	destilliert	ppm	parts per million

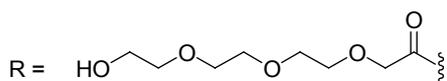
DIC	Diisopropylcarbodiimid	PyBOP	1-Benzotriazolyl-oxyl-trispyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
DIPEA	Diisopropylethylamin	R	allgemeiner Rest, Arginin
DMAP	<i>p</i> - <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin	R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	RGD	Arginyl-Glycinyl-Aspartat
DMSO	Dimethylsulfoxid	RP	Reverse Phase Kieselgel
E	Glutaminsäure	RT	Raumtemperatur
E. coli	Escherichia coli	S	Serin
EE	Essigsäureethylester	Smp.	Schmelzpunkt
EI	Elektronenstoßionisation	SPPS	solid phase peptide synthesis
ESI	Elektronensprayionisation	T	Tryptophan
Et	Ethyl	Tab.	Tabelle
F	Phenylalanin	TEG	Triethylenglykol
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl	<i>tert</i> -Bu/ <i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
g	Gramm	TFA	Trifluoressigsäure
G	Glycin	THF	Tetrahydrofuran
ges.	gesättigt	u. a.	unter anderem
h	Stunde	UV	Ultraviolett
H	Histidin	V	Valin
HAc	Essigsäure/Eisessig	W	Tryptophan
HCTU	O-(1H-6-Chlorbenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorphosphat	w. o.	wie oben
HPLC	Hochleistungs-flüssigchromatographie	Y	Tyrosin
HR-MS	hochauflösende Massenspektrometrie	z. B.	zum Beispiel
Hz	Hertz	z. T.	zum Teil

### 8.3 Wichtige Strukturformeln

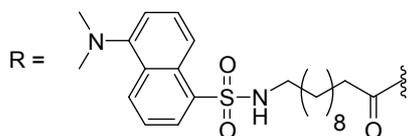


R = Ac

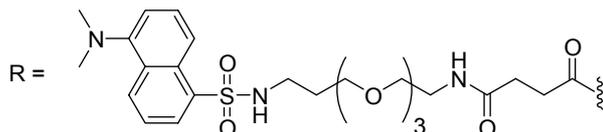
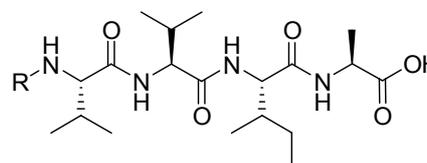
**98**



**132**



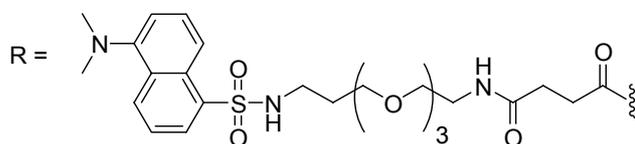
**43**



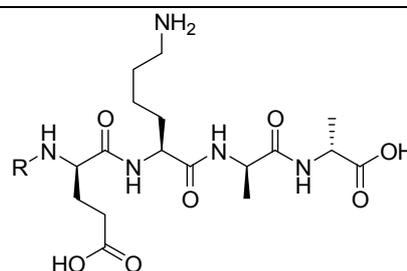
**65**

R = Ac

**173**

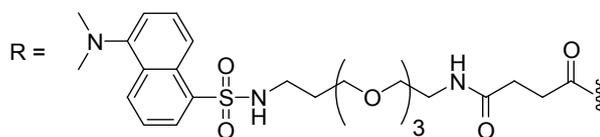


**139**

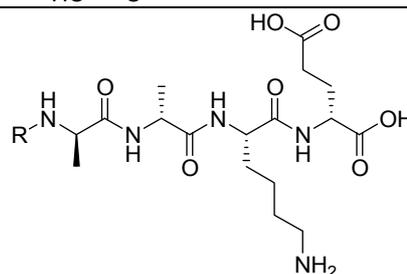


R = Ac

**174**



**140**



**CBS-L-Lys-L-Leu-L-Lys-NH<sub>2</sub>**  
**100**

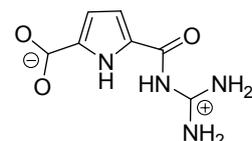
**CBS-L-Val-L-Val-L-Val-NH<sub>2</sub>**  
**113**

**CBS-L-Lys-L-Lys-L-Phe-NH<sub>2</sub>**  
**135**

**CBS-L-Phe-L-Glu-L-Lys-NH<sub>2</sub>**  
**137**

**CBS-L-Lys-L-Tyr-L-Lys-NH<sub>2</sub>**  
**136**

**CBS-L-Phe-L-Lys-L-Lys-NH<sub>2</sub>**  
**175**



**12**



## 8.4 Lebenslauf und Erklärung

### PERSÖNLICHE ANGABEN

Name	Martin Heil
Familienstatus	ledig
Nationalität	deutsch
Geburtsdatum	21.05.1975
Geburtsort	Rheda-Wiedenbrück (NRW)

### WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG

07/1994	Abitur Einstein Gymnasium Rheda-Wiedenbrück
10/1994	Immatrikulation an der Universität zu Köln im Fach Chemie (Diplom)
04/1997	Diplom-Vorprüfung
10/1999	Diplom-Hauptprüfung
10/1999-08/2000	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Berkessel unter Anleitung von Dr. Carsten Schmuck Titel: <i>Kombinatorische Rezeptorbibliotheken für biologisch relevante Tetrapeptide</i>
10/2000-04/2004	Doktorarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. Carsten Schmuck in Köln (10/2000-3/2002) und Würzburg (04/2002-2004) Titel: <i>Synthese und Screening einer kombinatorischen Rezeptorbibliothek für biologisch relevante Tetrapeptide</i>

## VERÖFFENTLICHUNGEN

1. C. Schmuck, M. Heil: "Anion-Dependent Dimerization of a Guanidiniocarbonyl Pyrrole Cation in DMSO"; *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1253-1256.
2. C. Schmuck, M. Heil, M. Dechantsreiter, U. E. Hackler: „Stereoselective Complexation of Amino Acid Carboxylates in Aqueous Solutions: Automated Parallel Synthesis of a Guanidiniocarbonyl-Pyrrole Receptor Library“; *JALA (J. Ass. Laboratory Automation)* **2001**, *6*, 51-53.
3. C. Schmuck, M. Heil: C-Terminus of  $\beta$ -Amyloid with a Tripeptide-based Cationic Receptor: A Combinatorial Approach to a Quantitative Understanding of Peptide Binding"; *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 633-636.
4. C. Schmuck, M. Heil: "Peptide Binding by One-armed Receptors in Water: Screening of a Combinatorial Library for Binding of Val-Val-Ile-Ala"; *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1232-1236.
5. M. Schäfer, C. Schmuck, M. Heil, H. J. Cooper, C. L. Hendrickson, M. J. Chalmers, A. G. Marshall: "Determination of the Gas-phase Activation Energy for the Unimolecular Dissociation of a Non-covalent Complex by Infrared Multiphoton Dissociation Tandem Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry"; *J. Am. Soc. Mass. Spec.* **2003**, *14*, 1282-1289.

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation "SYNTHESE UND SCREENING EINER KOMBINATORISCHEN REZEPTORBIBLIOTHEK FÜR BIOLOGISCH RELEVANTE TETRAPEPTIDE" selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

---

(Martin Heil)