Design, Synthese und Analyse CD4-bindender Peptidomimetika

Entwicklung von HIV-Entry-Inhibitoren



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg

> Vorgelegt von Axel T. Neffe aus Hamburg

> > Hamburg, 2004



Fachbereich Chemie

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
Gutachter: Prof. Dr. Hans Paulsen
Tag der Disputation: 4. Februar 2004

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde von Januar 2000 bis November 2003 im Institut für Organische Chemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. C. Meier, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas, seine wertvolle und freundliche Unterstützung und Hilfestellung sowie seine Diskussionsbereitschaft, die entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Science is facts. Just as houses are made of stones, so is science made of facts. But a pile of stones is not a house and a collection of facts is not necessarily science.

> Jules Henri Poincaré (1854–1912) französischer Wissenschaftler und Autor.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des SFB 470/B2 und des GRK 464 finanziell gefördert.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Medikamentenentwicklung	1
1.2	Peptide, Glycopeptide und deren Mimetika	3
1	2.1 Peptidomimetika	5
	1.2.1.1 Veränderungen in den Seitenketten	5
	1.2.1.2 Veränderungen des <i>backbones</i>	6
	1.2.1.3 Mimetika von Di- und Tripeptiden und Festlegung von Sekundärstrukturen	10
	1.2.1.4 Wirkmimetika	10
1.3	Die HIV-Infektion	11
1	3.1 Der CD4 Rezeptor	17
1	3.2 Die Bindung vom GP120 an das CD4	19
1.4	Vergleich der CD4-GP120- und der CD4-MHC Klasse II-Protein-	
We	chselwirkung	21
2	METHODEN	22
2.1	Molecular Modelling	22
2.2	Charakterisierung und Konformationsanalyse von Peptiden	23
2.3	Bindungsstudien	24
2	3.1 Surface Plasmon Resonance (SPR)	24
2	3.2 Die Saturation Transfer Difference (STD)-NMR Spektroskopie	26
3	AUFGABENSTELLUNG	29
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	30
4.1	Molecular Dynamics Rechnung der Röntgenstruktur	30
4.2	<i>in silico</i> Alanin-Scan	31
4.3	Design der Liganden	34
		Ι

4.4	Synthese der Liganden I und II	44
4.5	Struktur- und Konformationsanalyse der beiden Liganden	49
4.6	Biacore-Ergebnisse	51
4.7	STD-Ergebnisse	54
4.7	.1 Titration Ligand I	55
4.7	.2 Titration Ligand II	56
4.7	.3 Epitope Mapping	58
4.8	Proteolysestabilität	59
4.9	Design der Bibliothek	63
4.10	Synthese der Aromaten	70
4.11	Synthese der Bibliothek	71
4.12	Biacore-Ergebnisse der Bibliothek	71
4.13	Weitere STD-NMR Untersuchungen	78
4.1	3.1 Ligand IV	78
4.1	3.2 Ligand VII	80
4.14	Design und Synthese einer zweiten Bibliothek	81
4.1	4.1 SPR Ergebnisse	83
4.15	Vergleich Modelling/Biacore	86
4.16	Structure Activity Relationships (SAR)	88
4.17	Modelling der Glycostrukturen	89
4.18	Syntheseversuche	93
4.1	8.1 Substituierte Hydroxyprolinole	93
4.1	8.2 Versuch der Synthese von Glyco-Ligand C	95
5 Z	ZUSAMMENFASSUNG	97

Π

6	SUM	MARY	99
7	EXP	ERIMENTELLER TEIL	101
7.1	Ge	räte und Methoden:	101
7.2	Ch	emikalien	103
7.3	7.3 SPR-Experimente		105
7.4	ST	D-Titrationsexperimente	106
7.5	Sy	nthesen	108
7	.5.1	AAV 1: Festphasensynthese	108
7	.5.2	AAV 2: Abspaltung vom 2'-Chlorotritylharz	109
7	.5.3	AAV 3: Knüpfung der Carbamatbindung	109
7	.5.4	AAV 4: Schutzgruppenabspaltung	109
7	.5.5	AAV 5: Reinigung der Peptidomimetika per HPLC	110
7	.5.6	Darstellung und Charakterisierung der Peptidomimetika	110
7	.5.7	Darstellung weiterer Verbindungen	162
7.6	Pr	oteolytischer Verdau der Peptidomimetika mit Pronase aus Streptomyces	
gris	seus		181
8	LITE	RATUR	182
9	тох	IKOLOGISCHE DATEN	189
10	DA	NKSAGUNG	193
11	LE	BENSLAUF	195

III

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
ACD	available chemicals database
ACHPA	(3S,4S)-4-Amino-5-cyclohexyl-3-hydroxypentansäure
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
αΝΟΑ	(1'-Naphthyloxy)essigsäure
AK	Antikörper
βΝΟΑ	(2'-Naphthyloxy)essigsäure
βΝΤΡ	(2'-Naphthyl-3-thio)propionsäure
Boc	tertButyloxycarbonyl
CCA	4-Hydroxy-α-cyanozimtsäure
CCR5/CXCR4	Chemokinrezeptoren
CD4	cluster of differentiation 4
Chg	Cyclohexylglycin
ChinOA	(8'-Chinolyloxy)essigsäure
COSY	correlated spectroscopy
CumOA	(6'-(4'-Methyl)cumarinyloxy)essigsäure
CV	column volume
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(N,N-Dimethyl)aminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxy ribonucleic acid
DSS	sodium 4,4-dimethyl4-silapentane-1-sulfonate
EE	Ethylacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESI	electron spray ionization

Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl
GlcNAc	2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose
GP120	Glycoprotein mit einer Molmasse von 120 kD
GP41	Glycoprotein mit einer Molmasse von 41 kD
HAART	highly active antiretroviral therapy
HBS-EP	HEPES buffered saline containing EDTA and surfactant P20
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leucocyte antigen
НМВС	hetero multiple bond correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	hetero single quantum coherence
HTS	high throughput screening
Нур	Hydroxyprolin
K _D	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
k _{off}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
kon	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionization – time of flight
MD	molecular dynamics
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
Mmt	Monomethoxytriphenylmethyl
MS	Massenspektrometrie
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	nuclear magentic resonance
nnRTI	nicht nukleosidische/nukleotidische Reverse
	Transkriptase Inhibitoren
NOE	nuclear Overhauser enhancement

NOESY	nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
nRTI	nukleosidische/nukleotidische Reverse Transkriptase
	Inhibitoren
PE	Petrolether
PI	Protease Inhibitoren
PND	prinzipiell neutralisierende Domäne
QSAR	quantitative structure activity relationships
RNA	ribonucleic acid
ROESY	rotating frame nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
RP-HPLC	reversed phase high performance liquid chromatography
RTI	Reverse Transkriptase Inhibitoren
RU	response units
Sar	Sarcosin
SAR	structure activity relationships
sCD4	soluble CD4
SPR	surface plasmon resonance
ssRNA	single strand ribonucleic acid
STD	saturation transfer difference
TBDMS	tertButyldimethylsilyl
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium
	tetrafluoroborate
tBu	<i>tert.</i> -Butyl
TCTU	5-chloro-1-H-Benzotriazolium-1-
	[bis(dimethylamino)methylene] tetrafluoroborate
TFA	trifluoro acetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilyl
TOCSY	total correlated spectroscopy
Trt	Trityl

Verzeichnis der Aminosäuren

Aminosäuren	Abkürzung	Code-Buchstabe
Alanin	Ala	А
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	Ν
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	С
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	Ε
Glycin	Gly	G
Histidin	His	Н
Isoleucin	Ile	Ι
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	К
Methionin	Met	М
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	Р
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	Т
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 Einleitung

1.1 Medikamentenentwicklung

Während bis vor ca. 150 Jahren Ärzten bei der Behandlung von Krankheiten nur empirisch gefundene Naturheilmittel zur Verfügung standen, ist seitdem die gezielte Suche nach aktiven Verbindungen in den Vordergrund gedrungen.^{1, 2} Im Kern geht es darum, ein medizinisches Problem (dies können Krankheiten, Verletzungen oder auch Alterungserscheinungen sein) durch die Gabe von im (menschlichen) Körper aktiven Substanzen zu vermindern oder ganz zu beheben. Für die gezielte Suche nach diesen Wirkstoffen (Abbildung 1) ist es zunächst notwendig, das Problem mit Hilfe moderner Analysemethoden auf molekularer Ebene genau zu beschreiben. Anhand dieser Daten kann ein Modell entwickelt werden und ein Angriffspunkt (*target*) für einen Wirkstoff validiert werden.

Erfolgreiches *screening* auf Binder dieses *targets* ergeben *hits*, von denen sich aufgrund ihrer chemischen und pharmakologischen Eigenschaften nur wenige als Leitstrukturen eignen. In der *screening*-Phase der Medikamentenentwicklung wird heute vielfach das *high throughput screening* (HTS) eingesetzt, mit der man in kurzer Zeit Substanzbibliotheken durchsuchen kann. Die zahlreichen Substanzen sind durch kombinatorische Synthese zugänglich, in der mehr oder weniger frei mögliche Binder eines *targets* variiert werden. Sie können auch bei der breit angelegten Suche in pflanzlichen und tierischen Organismen anfallen. Dort werden grob aufgereinigte Naturstoffextrakte gegen *targets* getestet. Trotz der geringen Wahrscheinlichkeit eines *hits* ist das HTS im Vergleich zur gezielten Synthese aktiver Verbindungen effektiv genug, da sehr viele Verbindungen in kurzer Zeit untersucht und auch völlig neue Wirkstoffklassen gefunden werden. Als Leitstrukturen für die weiteren Untersuchungen kommen auch natürliche Wirkstoffe, bekannte Medikamente (*Metoo*-Forschung) oder *de novo* entwickelte Liganden in Betracht. Um die in Abbildung 1 blau hervorgehobene Optimierungs- und Designphase geht es in dieser Arbeit. Design beinhaltet die computergestützten Verfahren (siehe auch Abschnitt 2.1) wie Docking und Datenbanksuche, aber auch die rationale Selektion wahrscheinlich günstiger Ansätze.



Abbildung 1: Kurze Übersicht über die verschiedenen Stadien der Medikamentenentwicklung. Die blau hervorgehobene Design- und Optimierungsphase ist Gegenstand dieser Arbeit Die Analytik umfasst neben der Charakterisierung der Verbindungen auch die Struktur-Wirkungsbeziehungen (structure activity relationships, SAR bzw. quantitative structure activity relationships QSAR) und die nichtbiologischen Aktivitätsbestimmungen (z.B. nuclear magnetic resonance NMR, enzyme linked immunosorbent assay ELISA und surface plasmon resonance SPR). Verbindungen, die die biologische Aktivitätsbestimmung erfolgreich überstehen, gehen in die Entwicklungsphase. Dabei werden die pharmakologischen Eigenschaften und die Toxizität genauer untersucht, eine geeignete Applikationsform muss gefunden und die Synthese für großtechnische Anforderungen optimiert werden. Nach Tierversuchen und rechtlichen Zulassungsverfahren wird Schluss zum am Menschen die Verträglichkeit, Verfügbarkeit und Wirksamkeit des Medikaments getestet.

In allen Stadien der Medikamentenentwicklung kann sich eine Verbindung oder sogar eine ganze Verbindungsklasse als ungeeignet herausstellen; sie kann nicht (genug) aktiv sein, zu toxisch, zu teuer, schwere Nebenwirkungen hervorrufen oder auch abhängig machen. Nur ca. 0,02% der *hits* werden zu Medikamenten. Zudem dauert die Entwicklung eines neuen Medikaments sehr lange (5-15 Jahre) und ist sehr kosteninstensiv (150-500 Mio US-\$). Die Medikamentenentwicklung ist ein langwieriger Prozess, an dem Wissenschaftler verschiedener Fachrichtungen eng miteinander arbeiten müssen, u.a. Chemiker, Biologen, Physiker, Mediziner und Informatiker.

1.2 Peptide, Glycopeptide und deren Mimetika

Peptide sind häufig überaus biologisch aktiv. Typische Vertreter der bioaktiven Peptide sind z.B. zahlreiche Hormone oder Antibiotika (siehe Abbildung 2).³

NH2-AGC ^{KNF} F	Val ·> Orn > Leu > D-Phe →P ro
W	∮
COOH-CSTFTK	Pro < D-Phe < Leu < Orn< Val
Somatostatin	Gramicidin S

Abbildung 2: Beispiele für bioaktive Peptide. Somatostatin ist ein humanes Hormon des Hypotalamus, das unter anderem auf die Hypophyse wirkt. Gramicidin S ist ein antibiotisches Decapeptid mit der für Peptidantibiotika typischen Cyclisierung und der Verwendung von nichtproteinogenen Aminosäuren. Es ist auch für Eukaryonten stark toxisch.

Peptide sind auf Grund ihrer biologischen Aktivität und der einfachen, automatisierbaren Synthese häufig ein erster Ansatzpunkt in der Wirkstoffentwicklung. Obwohl Peptide biologisch überaus aktiv sein können, ist die gezielte Verwendung von Peptiden als Wirkstoff in biologischen Systemen schwierig, da sie eine Reihe von Eigenschaften haben, die sie als Wirkstoffe unattraktiv machen:^{2,4}

- sie werden zu schnell von Proteasen im Serum hydrolysiert.

- sie sind zu gut wasserlöslich und werden daher schlecht aufgenommen und/oder schnell renal ausgeschieden.

- sie sind häufig konformationell sehr flexibel. Dies führt zu einer schlechten Bindungskinetik.

- sie sind meist nicht oral verfügbar, da sie im Magen oder Darm verdaut bzw. hydrolysiert werden.

Unter den bioaktiven Peptiden und Proteinen kommen vielfach mit Kohlenhydraten verknüpfte Spezies, die Glycopeptide und –proteine, vor.⁵ Der Kohlenhydratanteil kann dabei von unter 1 % bis über 80 % reichen, so dass die physikalischen Eigenschaften der Glycoproteine teilweise mehr denen von Polysacchariden ähneln.³ Die Kohlenhydratstrukturen haben Einfluss auf die Faltung oder Konformation des Peptids,⁶ tragen einen Teil der Information bei der Wechselwirkung mit anderen Molekülen oder sorgen für das korrekte *targeting*.^{7, 8} Glycosylierung beeinflusst auch die Stabilität von Peptiden und Proteinen (i.A. kommt es durch die Glycosylierung zu einer Verlängerung der Serumhalbwertszeit). Zuckerstrukturen auf Krankheitserregern dienen häufig der Maskierung von Antigenen, da Kohlenhydrate immunologisch deutlich schlechter erkannt werden als peptidische Strukturen.

Die Kohlenhydrate in Glycoproteinen sind kovalent über Aminosäureseitenketten mit dem Peptid verknüpft. Man unterscheidet *O*- und *N*-Typen, wobei *O*-Typen häufiger vorkommen. Bei ihnen ist der Zucker über die Hydroxylgruppe von Ser, Thr, Tyr, Hyp etc. gebunden. Bei den *N*-Typen findet die Bindung am Asn statt. Alle *N*-Typ Glycopeptide besitzen zudem noch ein gleiches Pentasaccharid, die sogenannte *core*-Struktur. In Mikroorganismen kommt sehr selten noch eine S-Verknüpfung über Cys vor.

1.2.1 Peptidomimetika

Peptidomimetika sind Verbindungen, die von ihrer Gestalt oder ihrer Wirkung her den Peptiden ähneln,⁹ aber nicht deren beim gezielten Einsatz unerwünschte Eigenschaften haben. Peptidomimetische Veränderungen führen zu einer höheren Bioverfügbarkeit, Aktivität und Selektivität der Verbindungen. Inzwischen sind sehr viele Peptidomimetika gut untersucht und zum Teil durch automatisierbare Synthese zugänglich. Peptidomimetika kann man in folgende Klassen einteilen:

1.2.1.1 Veränderungen in den Seitenketten

Im Genom werden nur zwanzig verschiedene α-Aminosäuren codiert. Diese unterscheiden sich in den Seitenketten. In manchen Organismen vorkommend oder kommerziell verfügbar sind aber eine ganze Reihe von Aminosäuren mit modifizierten Seitenketten, die andere Funktionalitäten bzw. sterische Ansprüche in die Peptide einführen können (siehe Abbildung 3).



Abbildung 3: Aminosäuren mit nicht genetisch codierten Seitenketten, teilweise natürlich vorkommend (posttranslationale Modifikation), teilweise artifiziell.

1.2.1.2 Veränderungen des backbones

Die Veränderung des *backbones* führt normalerweise zu einer höheren Proteolysestabilität, da keine natürliche Peptidbindung mehr da ist, die von Enzymen erkannt und gespalten werden kann. Bei geeigneter Wahl der Verknüpfung kann man zu einer günstigeren Anordnung der Seitenketten in der Bindungstasche kommen, insbesondere der Abstand der Seitenketten voneinander kann so optimiert werden. Dazu stehen folgende Varianten zur Verfügung:

D-Aminosäuren

Die Verwendung von D- statt L-Aminosäuren führt zu einer anderen Anordnung der Aminosäuren in der Bindungstasche. Sie werden u.a. gerne verwendet, wenn cyclische Strukturen synthetisiert werden sollen, da sie häufig einen 'Knick' in der Peptidkette verursachen (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4: Vergleich von D-Ala und L-Ala sowie zwischen den Konformationen der Peptide GMfPS (links) und GMFPS (rechts). Das D-Phe führt zu einem Knick im *backbone* (dargestellt durch das blaue *tube*).

Als Beispiel ist hier die Untersuchung der beiden willkürlich ausgesuchten Peptide GMfPS und GMFPS gewählt. Diese wurden über 1000 Schritte in einer *molecular dynamics* (MD) Rechnung verfolgt, wobei sich an der Position der D-Aminosäure im GMfPS ein Knick im *backbone* als energetisch günstigste Konformation darstellt.

Zusätzliche backbone-Substitution

Wenn eine Aminosäure zusätzliche *backbone-*Substitutionen besitzt (z.B. *N*-Methylglycin (Sarcosin) oder 2-Aminoisobuttersäure (Aib), Abbildung 5), so hat dies einen Einfluss auf die Rigidität der entsprechenden Peptide, eine Veränderung bei biologischen Wechselwirkungen und eine höhere Lipophilie zur Folge.



Abbildung 5 : Beispiele einer zusätzlichen *backbone*-Subsitution: N-Methylglycin (Sarcosin) und 2-Aminoisobuttersäure.

<u>Peptoide</u>

Peptoide tragen die Seitenketten am amidischen N statt am C. Diese Verbindungsklasse ist gut per Festphasensynthese zugänglich.^{10, 11} Da die Verbindungen nicht mehr chiral sind, sind sie konformationell häufig zu flexibel, um eine starke Bindung einzugehen. Außerdem sind keine Wasserstoffbrückenbindungen zu amidischen Wasserstoffen des *backbones* mehr möglich, da diese nicht mehr vorhanden sind. Die Erfahrung zeigt, dass rein peptoidische Strukturen kaum noch die Bindungsaktivität der zu Grunde liegenden Peptide zeigen, aber einzelne peptoidische Ersetzungen können durchaus interessant sein.¹² Um die Anordnung der Seitenketten beizubehalten, werden die Peptoide quasi-retro synthetisiert (Austausch Carboxy/Aminoende, siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: Ein Peptid im Vergleich zum Peptoid. Beim Peptoid sitzen die Seitenketten am amidischen N. Die Peptoide sind nicht chiral und haben weniger Möglichkeiten zur Wasserstoffbrückenbindung.

Andere Verknüpfungen als Amidbindungen

Beispiele hierfür sind u.a. (Thio)carbamate,¹³⁻¹⁶ β -Peptide, vinyloge Peptide, Sulfonamide^{17, 18} oder (Thio)Harnstoffe (mehr Beispiele in Abbildung 7).¹⁹⁻²³ Diese Ersetzungen sind dazu geeignet, den Abstand zwischen Seitenkette optimal einzustellen, da sie zum Teil ein oder mehrere Atome mehr als normale Peptide besitzen.



Abbildung 7: Ersetzung der Amidbindung durch ähnliche funktionelle Gruppen. Alle diese Verbindungen sind synthetisch über die Festphasensynthese zugänglich.

1.2.1.3 Mimetika von Di- und Tripeptiden und Festlegung von Sekundärstrukturen

Entscheidend für die Kinetik von Assoziationsreaktionen ist die stabile Konformation der Bindungspartner. Für Proteine ist diese oft gegeben, während Peptide flexibler sind. Mimetika von Di- oder Tripeptiden werden häufig durch Ringstrukturen erzeugt, die an den geeigneten Stellen Substituenten tragen, welche die Aminosäureseitenketten imitieren. Durch den starren Ring wird jedoch eine bestimmte Konformation vorgegeben (z.B. *cis*-Amidbindung, β -*turn* etc.), die dann für günstigere Wechselwirkungen sorgt (Abbildung 8).²⁴

Oligopeptidomimetika, in denen der Carbonylkohlenstoff durch ein tetraedrisches Atom (z.B. sp³-C, P) mit einer daran gebundenen Hydroxylgruppe ersetzt ist, binden besonders gut an proteolytische Enzyme, da hier der tetraedrische Übergangszustand der katalysierten Reaktion imitiert wird. Häufig erreicht man mit diesen Verbindungen eine totale Blockierung des entsprechenden Enzyms (z.B. Protease Inhibitoren, PIs).²⁵ Typische Beispiele hierfür sind die Statine oder auch Diaminodiole.



cis-Peptidbindungsmimetikum

Ala-Pro-Mimetikum (*turn*-induzierend)

. CO2H



Ein Diaminodiol (Inhibitor der Aspartatproteasen)

Abbildung 8 : Beispiele für Struktur und Eigenschaften von Oligopeptidmimetika.

1.2.1.4 Wirkmimetika

Wirkmimetika von Peptiden haben überhaupt keine peptidische Struktur mehr, aber dieselbe Wirkung wie natürliche Peptide oder Proteine. Ein Beispiel ist Morphin (siehe Abbildung 9), das die Wirkung der körpereigenen Enkephaline besitzt.³ Wirkmimetika sind das eigentliche Ziel des Wirkstoffdesigns; die natürlich vorkommenden Vertreter mit ihren vielen Stereozentren und dem oligocyclischen Aufbau sind synthetisch jedoch nur schwer zugänglich.



Abbildung 9: Morphin, das natürlich vorkommende Wirkmimetikum der körpereigenen Enkephaline (hier als Beispiel: Met-Enkephalin).

1.3 Die HIV-Infektion

Anfang der 1980er Jahre traten die ersten Fälle einer Krankheit auf, die dann als AIDS (*acquiered immunodeficiency syndrome*) bezeichnet wurde: Das Immunsystem von meist jungen Menschen brach völlig zusammen, so dass sie an Infektionen von Erregern starben, die im Allgemeinen als harmlos gelten. Unabhängig voneinander konnten Robert Gallo und Luc Montagnier 1983 den Erreger dieser Erkrankung entdecken: das HIV (*human immunodeficiency virus*).



Abbildung 10: Aufbau des HIV-Nucleocapsids.

Die äußere Hülle eines HI-Virions (Abbildung 10) wird durch eine Lipiddoppelschicht gebildet, mit der mehrere Proteine (HLA, GP41, GP120) assoziiert sind. Das transmembrane GP41 liegt als Trimer vor und bindet an der Außenseite nichtkovalent an das ebenfalls trimere GP120. Dieses ist für die Erkennung von Wirtszellen zuständig. Die ssRNA des Virus wird zusammen mit der Reversen Transkriptase, der HIV-Protease, der Integrase und einigen weiteren Bestandtteilen von mehreren Proteinhüllen (aus P17, P6 und P24) umgeben. Die Wirtszellen dieses Retrovirus sind Zellen, die für die Immunabwehr verantwortlich sind (T-Helfer-Zellen und Makrophagen).

Der zeitliche Ablauf einer HIV-Infektion (Abbildung 11) sieht folgendermaßen aus: Nach einer kurzen akuten Phase mit hohem Virustiter etwa 4 Wochen nach der Infektion, die sich bei manchen Patienten mit grippeähnlichen Symptomen manifestiert, kommt es danach zu einer lange anhaltenden, klinisch unauffälligen Phase. Nach durchschnittlich 3-8 Jahren sinkt die Zahl der CD4+-Zellen bei gleichzeitigem Anstieg der Viruslast (mind. eine Größenordnung) rapide ab (von normal 500-1200/mL auf weniger als 200/mL); dadurch und durch die opportunistischen Infektionen wird das Krankheitsbild AIDS definiert. Das Virus wird durch Blut- und Blutprodukte sowie bei ungeschütztem sexuellen Verkehr übertragen.



Abbildung 11: Zeitlicher Ablauf von HIV-Infektionen. Mit der Abnahme der Zahl der CD4⁺-Zellen steigt die Mortalität stark an, da dass Immunsystem die Fähigkeit verliert, Krankheitserreger zu bekämpfen.

Die Bildung von Impfstoffen (die auch finanziell sehr wünschenswert wäre) ist bisher wegen der großen Anzahl verschiedener Virusstämme und der hohen Mutationsrate des HIV erfolglos geblieben.²⁶⁻²⁹ Da auch keine medikamentöse Heilung der HIV-Infektion bekannt ist, ist der einzige Schutz vor den Folgen einer HIV-Infektion die Vermeidung einer Ansteckung.

Die nötige Aufklärung über die Übertragung von HIV-Infektionen, AIDS und seine Folgen, aber auch Sexualität im Allgemeinen ist aus politischen und religiösen Gründen in vielen Ländern ein Problem. Dies führt vor allem in Entwicklungsländern zu einer massiven Ausbreitung der HIV-Infektionen. In einigen Gegenden Afrikas beträgt die Durchseuchungsrate der Leute im erwerbsfähigen Alter über 80%; dies führt in wahrscheinlich spätestens 10 Jahren zu einer regelrechten Entvölkerung von Gebieten, mit drastischen Folgen für die politische und wirtschaftliche Stabilität ganzer Regionen und dem Zusammenbruch der Infrastruktur. Aber auch in den USA und Europa steigt die Neuansteckungsrate wieder an; einerseits ist den ,Safer-Sex'-Kampagnen in vielen Staaten das Budget zusammengestrichen worden, andererseits sorgten Falschmeldungen über den

,Durchbruch' in der HIV-Forschung oder angebliche ,Heilmittel' dafür, dass HIV verharmlost wird.

Der Replikationszyklus des Virus konnte geklärt werden (Abbildung 12). Der erste Schritt der Infektion humaner Zellen mit HIV besteht in der Wechselwirkung des viralen Oberflächenproteins GP120 (vergleiche Abbildung 15) mit dem CD4. Das GP120 ist ein Glycoprotein mit einer Molmasse von 120 kDa, wovon etwa 50% Kohlenhydrate sind.³⁰ Es liegen 22-24 N-Typ-Oligosaccharide (komplex und hochmannosidisch, evtl. auch Hybrid-Typen) im Protein vor (vergleiche Abbildung 57). Das GP120 liegt trimer vor und ist nicht kovalent an das ebenfalls trimere, transmembrane GP41 gebunden, mit dem es gemeinsam in einer Kette exprimiert wird. Durch die Wechselwirkung mit dem CD4 wird ein weiteres Epitop des GP120 freigelegt (V3-loop),³¹ und erst dann kann der Corezeptor CCR5 bzw. CXCR4 gebunden werden. Anschließend erfolgt die GP41-vermittelte Membranverschmelzung zwischen Virus und Zelle und das Erbgut sowie Proteine des Virus werden freigesetzt.³² Durch die Reverse Transkriptase (RT) wird die single strand ribonucleic acid (ssRNA) des Virus in DNA umgeschrieben und durch die Integrase in die zelleigene DNA integriert. Dann werden von der Zelle neue Virusproteine erzeugt, die durch die Protease zurechtgeschnitten werden. Danach finden sich alle Bestandteile des neuen Virus zusammen (Assembly) und neue Viruspartikel knospen.



Abbildung 12: HIV-Infektionszyklus. A: Molekulare Erkennung der Wirtszelle; B+C: Membranfusion und Freisetzung der Virusproteine und RNA; D: Reverse Transkription der ssRNA in DNA; E: Integration der neu erzeugten DNA in das Genom der Wirtszelle; F: Produktion der HIV-Proteine und –RNA; G: *Assembly*; H: Knospung neuer Virionen.

Es gibt eine Korrelation zwischen der Art des Corezeptors und dem Fortschritt der Erkrankung. Zunächst ist CCR5 der Angriffspunkt; er kommt auf Makrophagen vor (die entsprechend aktiven Virusstämme bezeichnet man als M-trop). Spät in der Infektion greifen die T-tropen Stämme T-Helfer-Zellen über CXCR4 an; dabei kommt es zu einem raschen Fortschritt der Erkrankung. Die T-tropen Stämme tragen dabei weniger Kohlenhydratstrukturen als die M-tropen; offensichtlich sind die M-tropen Stämme weniger infektiös, sind aber nicht so leicht durch das Immunsystem zu erkennen, da die Zucker die Peptidepitope abschirmen. Die T-tropen Stämme sind viel virulenter, werden jedoch zu Beginn der Infektion vom Immunsystem besser neutralisiert. Bricht das Immunsystem in einer späten Phase der Infektion zusammen, so vermehren sich die T-tropen Stämme schneller.

Die Behandlung der HIV-Infektion beschränkt sich immer noch auf eine Verlangsamung der Infektion. Dazu wird zur Zeit eine Mehrfachtherapie eingesetzt (Zwei- oder Dreifachkombination verschiedener Präparate, sog. HAART (*highly* *active anti retroviral therapy*)),³³ die die Vermehrung des Virus im Schritt der Reversen Transkriptase (nRTIs und nnRTIs) oder der Protease (PIs) vermindert.^{25, 34-36} Da HIV eine sehr hohe Mutationsrate besitzt, kommt es relativ schnell zur Resistenzbildung. Zudem sind die Medikamente extrem teuer, so dass sie nur in den Erstwelt-Staaten flächendeckend eingesetzt werden können. Außerdem ist die Einnahme der Medikamente zeitlich genau zu befolgen, um einen Behandlungserfolg zu erzielen.

Es herrscht also dringender Bedarf nach neuen Medikamenten.³⁷ Neben der reversen Transkription und proteolytischen Spaltung von HIV Precursor Proteinen sind auch die anderen Schritte des HIV-Replikationszyklus mögliche *targets* für Wirkstoffe.

Verbindungen, die die Anheftung des Virus an eine Wirtszelle oder die Membranverschmelzung behindern, bezeichnet man als Entry-Inhibitoren.³⁸⁻⁴⁴ Die Idee dafür wurde geboren, als festgestellt wurde, dass ein Teil der Bevölkerung ein defektes Gen trägt, das dafür sorgt, dass der für die Infektion essentielle Corezeptor nicht vollständig exprimiert wird. Das Fehlen des Corezeptors führt nicht zu Beschwerden. Bei heterozygoten Trägern dieses Allels schreitet jedoch eine HIV-Erkrankung deutlich langsamer voran, homozygote Träger erkranken gar nicht. Inzwischen ist mit Pentafusid[™] ein peptidischer Wirkstoff auf dem Markt, der die Membranfusion verhindert. Dieser Wirkstoff muss zweimal täglich subcutan gespritzt werden, ist aber gut verträglich und führt wie alle erfolgreichen anti-HIV-Medikamente zu einem Anstieg der Zahl der CD4+-Zellen sowie zu einem raschen Absinken der virus load. Eine ganze Reihe weiterer Verbindungen dieser Wirkstoffklasse (häufig Peptid-basierend) sind inzwischen in der klinischen Erprobung. Neben den Liganden der HIV-Proteine sind auch Vertreter der Entry-Inhibitoren denkbar, die an das entsprechende humane Protein binden und es dadurch für HIV unzugänglich machen. Auf diese Weise wird man eine schnelle Resistenzbildung durch die hohe Virusmutationsrate umgehen, handelt sich aber unter Umständen Probleme ein, wenn durch den Wirkstoff die normale Funktion des Proteins behindert wird. Dies könnte zu Nebenwirkungen wie z.B. einer Immunsupression führen.

Auch Inhibitoren der Integrase und des *Assemblys* werden intensiv untersucht.³⁷ Die Integrase kann durch eine Vielzahl von Stoffen inhibiert werden, jedoch erst kürzlich

konnte mit den 1,3-Diketosäuren eine Verbindungsklasse identifiziert werden, die sowohl *in vivo* aktiv ist, als auch spezifisch auf die HIV-Integrase wirkt. Durch die 1,3-Diketosäuren wird selektiv der *strand transfer* Schritt der Integraseaktivität inhibiert. Das *Assembly* neuer Viruspartikel wird durch die viralen Proteine *gag* und *vpu* gesteuert. Das peptidische Motiv GPG ist hierbei als wichtig für Inhibierung des *Assemblys* erkannt worden, nachdem vorher vermutet wurde, dass Verbindungen dieses Typs auf den *Entry* wirken. Dies lag wegen der Verwandtheit zur prinzipell neutralisierenden Domäne (PND) GPGRAF aus der V3-loop des GP120 nahe. Sowohl bei den Integrase- als auch den *Assembly*-Inhibitoren ist zu erwarten, dass in naher Zukunft Verbindungen für die klinische Erprobung zur Verfügung stehen.

1.3.1 Der CD4 Rezeptor

CD4 (Abbildung 13) ist ein humanes Glycoprotein, das auf verschiedenen Zellen des Immunsystems zu finden ist (T-Helferzellen, Macrophagen, Monocyten, inflammatorischen T-Zellen und Thymocyten).⁴⁵ Der natürliche Bindungspartner des CD4 sind die MHC Klasse II-Proteine.

CD4 ist ein Transmembranprotein, bestehend aus einem kleinen intracellulären Rest, einer Transmembrandomäne und vier extracellulären, immunglobulinartigen Domänen (D1-D4), von denen drei durch Disulfidbrücken zusammen gehalten werden. CD4 hat zwei *N*-Typ Glycosylierungsstellen in den Domänen D3 und D4.



Abbildung 13: Schema des humanen Proteins CD4. Die schwarzen Kästchen zeigen die beiden *N*-Typ-Glycosylierungsstellen an (CYT = cytosolische Domäne, TM = Transmembran-Domäne, EC = extracelluläre Domäne).

Inzwischen sind lösliche Varianten des CD4 (sCD4) kommerziell verfügbar. Sie bestehen nur aus den extracellulären *loops* (D1 und D2 bzw. D1-D4), behalten aber biologische Aktivität. Die Hoffnung, sCD4 in der Behandlung der HIV-Infektion einsetzen zu können, hat sich nicht bestätigt, da sCD4 eine viel zu kurze Serumhalbwertszeit hat (1h)⁴⁶ und nicht gut durch Membranen geschleust werden kann.

1.3.2 Die Bindung vom GP120 an das CD4

Nachdem jahrelang nur durch Mutationsstudien die für diese Wechselwirkung wichtigen Bereiche identifiziert werden konnten, steht seit 1998 die Röntgenstrukturanalyse von Kwong *et al.* zur Verfügung,⁴⁷ bei der ein gekürztes, partiell deglycosyliertes GP120 mit der D1 und D2-Domäne des CD4 und einem GP120-Antikörper cokristallisiert werden konnte.



Abbildung 14: Stereodarstellung der aus der Röntgenstrukturanalyse von Kwong *et al.* identifizierten CD4-bindenden Peptide des GP120 (farbig) und ihre Wechselwirkung zum CD4 (grau).

Wülfken untersuchte die Grenzfläche CD4/GP120 und identifizierte diejenigen Aminosäuren des GP120, die in einem besonders engen Kontakt zum CD4 stehen und daher wahrscheinlich für die Bindung verantwortlich sind (Abbildung 14).⁴⁸ Abbildung 15 zeigt die Aminsäureabfolge des GP120. Die blasser dargestellten Bereiche wurden in dem GP120-Konstrukt für die Röntgenstruktur herausgeschnitten. Rot hervorgehoben sind diejenigen Peptide, die in der Röntgenstrukturanalyse besonders nahe am CD4 stehen. Gelb unterlegt sind die Peptide NMWQKV und TPL, die ohne Lageänderung über ein Glycin verbrückt werden können und so das Peptidkonstrukt NMWQKVGTPL <u>2</u> ergeben. Dies zeigt eine 6 mM Dissoziationskonstante zum CD4 und inhibiert in einem Virusinhibitions-Assay⁴⁹ *in vitro* die Infektion von Zellen mit HIV.



Abbildung 15: Die Aminosäureabfolge von GP120. Blasser dargestellte Bereiche sind für die Röntgenstrukturanalyse entfernt worden, die rot hervorgehobenen Peptide zeigen im Kristall einen besonders engen Kontakt zum CD4.

Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Untersuchungen (vergleiche 2.3.2) des Peptids NMWQKVGTPL <u>2</u> zeigten eine Beteiligung der hervorgehobenen Gruppen (Abbildung 16) bei der Bindung zum CD4.



Abbildung 16 : Bindungsepitop des Peptids NMWQKVGTPL <u>2</u> an CD4 bestimmt mit STD-NMR (TOCSY bzw. HSQC).

1.4 Vergleich der CD4-GP120- und der CD4-MHC Klasse II-Protein-Wechselwirkung

Der natürliche Bindungspartner von CD4 sind die MHC Klasse II-Proteine. Diese sind für die Aktivierung der zellulären Immunantwort zuständig. Wie die Röntgenstrukturanalyse eines Komplexes aus einem humanen CD4 und einem murinen MHC Klasse II-Protein zeigt, wird dieselbe Bindungsregion des CD4 wie bei der Bindung an GP120 verwendet, wobei vor allem dem Phe₄₃ des CD4 eine entscheidende Bedeutung zukommt.⁵⁰ GP120 hat jedoch eine größere Kontaktfläche zum CD4 als die MHC Klasse II-Proteine.⁵¹ Dies führt dazu, dass GP120 stärker als MHC Klasse II-Proteine gebunden werden, was ein Grund dafür ist, warum HIV immunsupprimierend wirkt. Wenn Substanzen gefunden werden können, die an Bereiche des CD4 binden, die nur vom GP120, aber nicht von den MHC Klasse II-Proteine nerkannt werden, eröffnet sich die Möglichkeit, selektive Inhibitoren der CD4/GP120-Wechselwirkung zu entwickeln.

2 Methoden

In diesem Kapitel wird eine kurze Einführung in die in dieser Arbeit verwendeten Methoden gegeben.

2.1 Molecular Modelling

Man versteht unter molecular modelling die Darstellung, Berechnung und Bearbeitung von dreidimensionalen Molekülstrukturen mit Hilfe von Computerprogrammen.² Durch den Einsatz leistungsfähiger Computer ist es inzwischen möglich geworden, auch sehr komplexe Systeme wie Protein-Protein-Wechselwirkungen zu modellieren. Dabei kann man auch dynamische Untersuchungen durchführen, und ist bei Fragestellungen nicht auf die statischen Daten der späteren nur Röntgenstrukturanalyse angewiesen. Mit Hilfe der auf einem Kraftfeld basierenden MD-Rechenverfahren und Minimierungen kommt man von kristallographischen Daten oder im Rechner generierten neuen Strukturen zu den in einem (lokalen) energetischen Minimum befindlichen Konformationen der Moleküle und dem dynamischen Verhalten der Verbindungen. Es ist bei allen weiteren Schritten des molecular modellings essentiell, mit einer minimierten, und daher plausiblen Startkonformation zu beginnen, um vernünftige Ergebnisse zu bekommen.

Wenn in der Röntgenstrukturanalyse oder einer NMR-bestimmten Struktur eines Proteins die Bindungsregion eines Liganden identifiziert werden konnte, so kann man mit einem Docking weitere Moleküle in diese Bindungsregion einpassen. Dabei werden die Liganden möglichst flexibel gehalten, um ihre Konformation zu optimieren. Eine *scoring* Funktion findet die für die Wechselwirkungen günstigsten Konformationen heraus, mit denen dann weitergearbeitet werden kann. Das in dieser Arbeit verwendete Programm Flexidock arbeitet dabei mit einem genetischen Algorithmus, der für Energieminimierungen besonders geeignet ist. Er basiert auf den Regeln der biologischen Evolution und begünstigt in einem iterativen Verfahren die Generierung von Strukturen mit besonders guten Wechselwirkungen. Vom Programm werden die van der Waals-, elektrostatischen und Torsionsenergien des Tripos-Kraftfeldes berücksichtigt. Um einen denkbaren *induced fit* des Liganden an den Rezeptor berücksichtigen zu können, gibt es die Möglichkeit, auch Teile des Rezeptors beweglich zu halten.

Bei einem *de novo* Design geht man von einer aufgeklärten oder putativen Bindungsregion eines Proteins aus, ohne jedoch einen bekannten Liganden vorliegen zu haben. Durch Analyse der Bindungsregion können die lipophilen Regionen, mögliche Wasserstoffbrückenbindungsdonoren bzw. –akzeptoren etc. herausgefunden werden. Daraufhin werden komplementäre Strukturen (z.B. eine Carboxylfunktion in der Nähe einer Arg- oder Lys-Seitenkette) aus einer Datenbank an diese *hot spots* angepasst und anschließend miteinander verbunden. Leider ist das Verständnis der Protein-Ligand-Wechselwirkungen noch nicht so gut, dass allgemeingültige, in mathematische Formeln umsetzbare Regeln formuliert und damit diese Wechselwirkungen im Computer perfekt simuliert werden konnten. Bei tieferen Bindungstaschen kommt man mit dieser Methode zu brauchbaren Ergebnissen, während großflächige Bindungsareale auf der Oberfläche (wie bei der CD4-GP120-Wechselwirkung) meist nicht richtig bewertet werden.

2.2 Charakterisierung und Konformationsanalyse von Peptiden

Bei komplizierten Molekülen hoher Molmasse reichen 1D-NMR Spektren nicht mehr aus, um ihre Struktur aufzuklären. Sehr hilfreich sind hingegen 2D-Spektren.⁵² Im TOCSY findet man alle Protonen eines Spinsystems in einer Spur. So kann man z.B. Oligoamiden wie den Peptiden die einzelnen Aminosäuren einfach bei unterscheiden. Besonders gut gelingt dies im NH-Bereich des Spektrums, da hier die Protonen besonders gut dispergiert sind. NOESY- bzw. ROESY-Spektren, deren Kreuzsignale auf Grund dipolarer Kopplung durch den Raum zu Stande kommen, ermöglichen einem die Ermittlung der Reihenfolge der Spinsysteme, da hier eine Kopplung über die Amidbindung hinweg möglich ist (Kontakt $NH_{ASX}-H\alpha_{ASX-1}$). Zusätzlich genutzt können diese Spektren werden, Sekundärstrukturen nachzuweisen, wenn weiter entfernte Protonen ein Kreuzsignal ergeben. Diese Daten können mit molecular modelling zu einem dreidimensionalen Modell umgesetzt werden. Teilweise überlappen die Signale verschiedener Protonen sehr stark, hier können HSQC- oder HMBC-Spektren weiterhelfen, da man hier Protonen den an sie gebundenen Kohlenstoffen zuordnen kann. Letztere unterscheiden sich in ihrer chemischen Verschiebung stärker. ¹H-¹H-COSY-Spektren bzw. TOCSY-Spektren mit kurzer Mischzeit können in Ringsystemen und Ketten für die Zuordnung der genauen Abfolge der Atome genutzt werden. Die Konformation des *backbones* kann auch über die Analyse der ³J-Kopplungskonstanten zwischen NH- und Hα-Protonen genauer bestimmt werden.

Massenspektren von Verbindungen mit hoher Molmasse sind mit den klassischen Methoden häufig nicht zu bekommen. Die *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) und die *electron spray ionization – mass spectrometry* (ESI-MS) haben hier Abhilfe geschaffen.⁵³ Durch ihre besonderen Ionisierungsmethoden werden hier vor allem die Molekülpeaks und nicht nur Bruchstücke der zu untersuchenden Verbindungen nachgewiesen. Mit MALDI-TOF-MS können auch aus Gemischen und Lösungen (z.B. HPLC-Fraktionen) schnell gute Spektren gewonnen werden.

2.3 Bindungsstudien

Zur Bestimmung von Bindungskonstanten und Bindungsepitopen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Methoden verwendet.

2.3.1 Surface Plasmon Resonance (SPR)

Die SPR verwendet ein heterogenes Messsystem.⁵⁴ Im vorliegenden Fall wurde das CD4 auf einer carboxymethylierten Dextranmatrix, die auf einer dünnen Goldfolie aufgebracht war (CM5-Chip von Biacore), kovalent verankert und der jeweilige Ligand in gelöstem Zustand über diese Oberfläche geleitet. Bei einem Bindungsereignis kommt es zu einer Massenzunahme an der Oberfläche und damit zu einem veränderten Brechungsindex. Dieser wirkt direkt auf die Plasmonen der Goldschicht, was durch die Änderung des Totalreflexionswinkels eingestrahlten Lichtes detektiert werden kann. Mit Hilfe der einzelnen Messkurven (siehe Abbildung 17) können Assoziations- und Dissoziationskonstanten sowie kinetische Daten gewonnen werden.



Abbildung 17 : Typische Messkurve eines SPR Experiments.

Bei einem angenommen *one-site binding* Modell verhalten sich die im SPR gemessenen *response units* (RU) im *steady state* proportional zur Konzentration, gemäß der Gleichung 1. Trägt man die Gleichgewichts-RU-Werte gegen die Konzentration auf, so erhält man durch eine Regressionsanalyse eine Funktion, deren Wert bei $RU_{max}/2$ der Dissoziationskonstante K_D entspricht.

$$RU = \frac{RU_{\max} * conc.}{K_D + conc.}$$

Gleichung 1 : *one-site binding* Modell

Die Methode ist schnell und sehr empfindlich. 1 RU entspricht in etwa 1 pg gebundenem Material. Da das Basislinienrauschen bei dem verwendeten Biacore 3000 kleiner als 0.1 RU ist, kann die Bindung von wenigen 100 fg Material detektiert werden.
2.3.2 Die Saturation Transfer Difference (STD)-NMR Spektroskopie

Die STD-NMR-Spektroskopie ist eine leistungsfähige Methode, um biomolekulare Interaktionen zwischen Proteinen und Liganden zu untersuchen.^{55, 56} Mit dem STD-NMR-Verfahren können Substanzbibliotheken gescreent, Dissoziationskonstanten bestimmt und Bindungsepitope des Liganden genau charakterisiert werden.^{57, 58} Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 18 zu sehen.



Abbildung 18: Prinzip der *saturation transfer difference* NMR Spektroskopie. Die selektive Sättigung des Proteins wird auf einen Liganden übertragen, der in Lösung detektiert werden kann.

Bei der Messung wird das Protein selektiv gesättigt. Dies ist möglich, da Proteine durch Linienverbreiterung Resonanzen in Bereichen besitzt, in denen kleine Moleküle keine aufweisen. Diese Sättigung wird auf Liganden des Proteins während der Bindung übertragen, und sie wird in Lösung nach der Dissoziation beibehalten. Dadurch werden die Signale des Liganden im NMR-Spektrum verringert. Ein Differenzspektrum aus diesem *on-resonance* Spektrum und einem *off-resonance* Spektrum (ohne Sättigung des Proteins) enthält nun die Signale des Liganden. Nichtbinder erscheinen nicht im Spektrum, und die Signale des Proteins können z.B. durch ein Spinlockfeld herausgefiltert werden. Da Molekülgruppen von Liganden, die in engem räumlichen Kontakt zum Protein stehen, effektiver gesättigt werden als andere, spiegelt die Intensität des STD-Signals die räumliche Nähe der verschiedenen Molekülgruppen zum Protein wieder. Dies kann man zur Bestimmung des Bindungsepitops nutzen. Der Intensitätsvergleich des Integrals eines individuellen Protons im STD Spektrum mit dem im herkömmlichen Spektrum wird im Allgemeinen durch die rel. STD% angegeben (Gleichung 2)

$$rel. STD\% = \frac{Integral (STD - Spektrum)}{Integral (Referenzspektrum)} * \frac{2 * Scanzahl (Referenzspektrum)}{Scanzahl (STD - Spektrum)}$$

Gleichung 2: Definition der rel. STD %.

Der STD-Amplifikationsfaktor ergibt sich aus dem Produkt der rel. STD % eines Protons mit dem Ligandüberschuss in der Probe. Eine Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors gegenüber der Konzentration folgt ebenfalls in guter Näherung der Gleichung des *one-site binding* Modells. Eine Regressionsanalyse vergleichbar der aus Gleichung 1 ergibt auch hier die Dissoziationskonstanten. Inzwischen ist eine Anpassung der Daten an eine variierte Gleichung vorgeschlagen worden, die die für die STD-NMR-Spektroskopie wichtige Relaxationszeit des betrachteten Protons und die Sättigungszeit berücksichtigt.

Die STD-NMR-Spektroskopie lässt sich mit allen bekannten Pulsprogrammen kombinieren, und man kann mit ihr Bindungen in einem großen K_D-Wertebereich untersuchen (pM-mM). Wichtiger als die Dissoziationskonstante für die Anwendung des STD-NMR-Verfahrens ist jedoch die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion. Bei einer zu schnellen Dissoziation kann nicht genügend Sättigung auf den Liganden übertragen werden, so dass Spektren mit einem sehr schlechten Signal/Rausch-Verhältnis entstehen. Bleibt der Ligand zu lange am Protein gebunden, dann sind zu wenig gesättigte Liganden in Lösung vorhanden, die detektiert werden können. Dies führt zum selben Problem. Es gibt also Protein-Ligand-Systeme, die auf Grund ihrer Kinetik nicht mit STD-NMR untersucht werden können.

Die STD-NMR-Methode ist inzwischen erfolgreich auf Festphasensysteme,⁵⁹ Transmembranproteine, die in Liposomen eingebettet waren,⁶⁰ und sogar auf ganze Zellen übertragen worden.⁶¹

3 Aufgabenstellung

Jan Wülfken entwickelte während seiner Doktorarbeit das vom Hüllprotein GP120 des HIV abgeleitete Peptid NMWQKVGTPL <u>2</u> (siehe Abbildung 19). Dieses bindet an den humanen CD4 Rezeptor.



Abbildung 19: Die peptidische Leitstruktur NMWQKVGTPL 2.

Trotz seiner geringen Bindungskonstante von $K_D = 6$ mM zeigt es schon eine antivirale Aktivität in einem Virus-Neutralisations-Assay gegenüber dem HIV.⁴⁸

Ausgehend von diesem Peptid und dem mit STD-NMR bestimmten Bindungsepitop sollen zunächst mit Hilfe von molecular modelling peptidomimetische Strukturen entworfen und anschließend synthetisiert werden, die günstigere pharmakologische Eigenschaften als das Leitpeptid aufweisen, inbesondere eine bessere Bindungskonstante, eine höhere Proteolysestabilität sowie ein geringeres Molekulargewicht.

Die synthetisierten Verbindungen sollen mit Hilfe von MALDI-TOF-Spektrometrie und NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Die Bindung an CD4 soll mit SPR und STD-NMR verifiziert und quantifiziert werden. Weiterhin soll die proteolytische Stabilität untersucht werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Molecular Dynamics Rechnung der Röntgenstruktur

Um das Bindungsepitop des CD4 zum Peptidkonstrukt NMWQKVGTPL 2 genau beschreiben zu können, wurde zunächst die Röntgenstruktur von CD4 im Komplex mit GP120 und einem GP120-Antikörper analysiert. Dazu wurden die Rohdaten der Röntgenstruktur von Kwong et al. (PDB-Code 1gc1) mit SYBYL bearbeitet.⁴⁷ Zunächst wurden die Wasserstoffe ergänzt, die in der Röntgenstrukturanalyse von Proteinen nicht aufgelöst werden. Die daraus erhaltene Struktur war energetisch sehr ungünstig, da die zugefügten Wasserstoffatome teilweise miteinander oder mit anderen Teilen des Moleküls überlappten. Um dieses Problem zu beheben, wurde eine Energieminimierung (1000 Schritte) durchgeführt. Darauffolgend wurden der Antikörper, alle Zucker und Wassermoleküle und alle Aminosäuren des GP120 bis auf N₄₂₅MWQKV₄₃₀ und T₁₂₃PL₁₂₅ entfernt. Im Anschluss wurden die beiden Peptide mit einem neu eingefügten Glycin verbunden und minimiert. Die Aminosäuren NMWQK und PL wurden dabei fixiert, um das Peptid in der Bindungsregion zu halten. Anschließend wurde in einer Wasserbox eine Moleküldynamik-Simulation von 100 ps berechnet und die energetisch günstigste Konformation zur Bestimmung des Bindungsepitops auf dem CD4 benutzt. Dieses wird durch die Peptide Q₄₀GSF₄₃ und $R_{59}SLWDQG_{65}$ sowie das S_{23} gebildet (vergleiche Abbildung 20). Besonders hervorzuheben sind dabei folgende Wechselwirkungen von Aminosäuren der Leitstruktur:

- Tryptophan mit Ser₄₂ und Phe₄₃

- die Aminogruppe des Lysins mit der Carboxylatgruppe des Asp₆₃
- die hydrophobe Interaktion zwischen Threonin und Leucin mit Ser₆₀ und Leu₆₁.

- die Valin-Seitenkette wird eingebettet durch Trp₆₂ ("Boden"), Ser₄₂ und Phe₄₃, Arg₅₉ und Ser₆₀, Asp₆₃ sowie Ser₂₃ ("Seitenwände").



Abbildung 20: Stereodarstellung von CD4 (blau) mit dem Peptidbindungsepitop (orange) und dem Peptid NMWQKVGTPL (weiß)

4.2 in silico Alanin-Scan

Um zu verifizieren, dass das Programm Flexidock geeignet ist, die Bindung von Liganden an CD4 korrekt vorherzusagen, wurde ein in silico Alanin-Scan der Leitstruktur NMWQKVGTPL durchgeführt. Zuerst wurde über mehrere 100 000 Generationen die Leitstruktur gedockt, bis sich keine Änderung der Wechselwirkungsenergie mehr erreichen ließ. Daraufhin wurde jede Aminosäure des Peptids einmal durch Alanin ersetzt und ebenso das lokale Energieminimum gesucht. Dazu wurden nicht mehr als 100 000 Generationen gebraucht. Die Aminosäuren des CD4, die an der Wechselwirkung beteiligt sind (s.o.), wurden dabei beweglich gehalten, um Veränderungen in der Ligandstruktur besser molekular erkennen zu können, also einen induced fit zu modellieren. Da vom Programm polare Interaktionen viel stärker gewichtet werden als unpolare, wurden die Aminosäuren in zwei Gruppen eingeteilt, die getrennt betrachtet wurden (siehe Tabellen 1 und 2).

Aminosäure	ΔE [kcal/mol]
Lys -> Ala	58.2
Gln -> Ala	19.2
Asn -> Ala	14.8

Aminosäuren mit polaren Interaktionen:

Tabelle 1: ΔE nach der Ersetzung der polare Interaktionen eingehenden Aminosäuren durch Alanin im Docking.

Die Ersetzung von Lysin hat einen drei mal größeren Einfluss auf die berechnete Bindungsenergie als die Ersetzung von Glutamin oder Asparagin; dies stimmt mit dem STD *epitope mapping* überein und unterstreicht die Bedeutung der basischen Aminosäure Lys, die einen direkten Kontakt zum Asp₆₃ des CD4 eingehen kann, für die Bindung zum CD4. Weder Glutamin noch Asparagin zeigen im Modelling einen direkten Kontakt zum CD4 (vergleiche Abbildung 20).

Aminosäuren mit unpolaren Interaktionen:

Aminosäure	∆E [kcal/mol]
Gly -> Ala	8.1
Leu -> Ala	7.4
Trp -> Ala	7.2
Val -> Ala	6.1
Thr -> Ala	5.7
Pro -> Ala	-0.5
Met -> Ala	-5.2

Tabelle 2: ΔE nach dem Austausch der unpolare Interaktionen eingehenden Aminosäuren durch Alanin im Docking.

In diese Gruppe wurden neben den 'natürlichen' Mitgliedern Leu, Trp, Val, Pro und Met auch Gly und Thr aufgenommen. Gly gehört von sich aus zu keiner der beiden Gruppen, und zeigt weder im *epitope mapping* (vergleiche Abbildung 16) noch in den gemodellten Strukturen (vergleiche Abbildung 21) einen direkten Kontakt zum CD4. Dennoch erscheint eine Ersetzung durch Ala ungünstig. Da Glycin eine konformativ sehr flexible Aminosäure ist, kann sich die günstige Energie daraus ergeben, dass Glycin den anderen Aminosäuren eine ideale Wechselwirkung mit der CD4-Oberfläche erlaubt.

Threonin ist eine polare Aminosäure, hat jedoch durch die Methylgruppe auch die Möglichkeit für unpolare Interaktionen. Auf der CD4-Oberfläche findet sich keine polare Gruppe als Bindungspartner, so dass davon auszugehen ist, dass die Wechselwirkung mit dem CD4 in diesem Fall eher von hydrophober Natur ist. Dies wird durch das STD-NMR *epitope mapping* gestützt, das eine Wechselwirkung der Threonin-Hγ-Protonen, aber nicht des Hβ-Protons zeigt.

Die Ersetzung der STD-aktiven Aminosäuren Leucin, Tryptophan, Valin und Threonin führt zu einer geringeren berechneten Bindungsenergie, während die Ersetzung der nicht-STD-aktiven Aminosäure Methionin energetisch vorteilhaft ist. Diese zeigt auch im Modelling keinen direkten Kontakt zum CD4. Kaum eine Änderung tritt bei der Ersetzung von Prolin durch Alanin auf, wobei anzumerken ist, dass hier die STD-aktiven β-Protonen erhalten bleiben. Das Docking kann leider nicht erklären, warum das Prolin oder das Tryptophan einen deutlichen Beitrag zur Bindung leisten sollen.



Abbildung 21: Stereodarstellung des gedockten Peptids NMWQKVGTPL (ball + stick) an CD4 (grün).

Da das STD*-epitope mapping* und das Docking vergleichbare Aussagen geben, ist diese Form des Modellings geeignet, die Bindung von peptidischen Liganden an CD4 quantitativ zu beschreiben, sowie die Art der Wechselwirkung vorherzusagen.

4.3 Design der Liganden

Die Entwicklung neuer Liganden sollte Verbindungen ergeben, die bessere pharmakologische Eigenschaften als die Leitstruktur haben. Also sollten die Liganden folgende Eigenschaften haben:

Eigenschaft	Zu erreichen durch
1. Niedrigerer K _D	Entfernung der Gruppen, die ungünstige
	Wechselwirkungen hervorrufen.
	Veränderung der Gruppen, die günstige
	Interaktionen zeigen, um deren Eigenschaften zu
	verstärken.
	Einführung neuer Gruppen, die bisher nicht genutzte
	Bindungsareale auf dem CD4 erschließen.
	Günstige Konformationen stabilisieren.
2. Höhere Proteolysestabilität	Ersetzung der peptidischen Bindung.
	Verwendung von Aminosäuren mit unnatürlichen
	Seitenketten.
3. Geringere Molmasse	Kleinere Moleküle entwerfen.
4. Günstigerer clogP	Hydrophile Teile entfernen.

Tabelle 3: Ziele der Drug Design Phase und wie man sie erreichen kann.

Zunächst wurde das achirale retro-Peptoid von <u>2</u> *in silico* erzeugt und das Docking mit dem des Peptids verglichen, wobei das Peptoid energetisch deutlich ungünstiger war. Daher wurde auf eine weitere Untersuchung dieser Strukturen verzichtet.

Beim rationalen Design der Liganden auf Peptidbasis wurde nun folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurden alle Aminosäuren der Leitstruktur entfernt, die weder im STD *epitope mapping* noch im Alanin-Scan einen Beitrag zur Bindung erkennen ließen (also Asparagin, Methionin, Glutamin). Während die Kern-Region KVGTP der verbleibenden Aminosäuren einen Kontakt zum CD4 zeigt (vor allem Lysin mit der Bindung zum Asp₆₃ und Valin in der hydrophoben Tasche, die von

Trp₆₂ (Boden), Ser₄₂, Phe₄₃, Arg₅₉, Ser₆₀, Asp₆₃ sowie Ser₂₃ (Seitenwände) gebildet wird), zeigen Tryptophan und Leucin keine so genau zu erklärenden Wechselwirkungen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass hier eher ungerichtete Wechselwirkungen vom CD4 mit dem aromatischen System des Tryptophans bzw. mit dem hydrophoben Rest des Leucins auftreten. Darum sollte man hier genauso günstige Wechselwirkungen erzielen können, wenn man diese Reste konservativ ersetzt (d.h. das Indolsystem des Tryptophans durch andere Aromaten und den Isobutylrest des Leucins durch andere hydrophobe Reste), so lange man durch einen geeigneten Linker eine günstige Anordnung dieser Reste erreichen kann. Dies wird durch das Docking bestätigt: ein Austausch des Tryptophans durch verschiedene Aromaten und des Leucins durch hydrophobe Reste führt nicht zu einem Verlust der Bindungsenergie. Aus diesen Überlegungen resultierte das in Abbildung 22 gezeigte Templat.



Abbildung 22: vorläufiges Design der Liganden mit dem Kernpeptid KVGTP und zwei austauschbaren endständigen Gruppen.

Im Docking wurden nun zuerst nur die Kernregion untersucht, dann diese um Aromaten bzw. hydrophobe Reste erweitert und zum Schluss die gesamten Strukturen analysiert.

Docking der Kernregion:

Es konnte eine Bindungsaffinität zum CD4 festgestellt werden, jedoch deutlich geringer als bei dem Leitpeptid $\underline{2}$ (siehe Tabelle 4). Dies war durchaus zu erwarten, da weniger Wechselwirkungen stattfinden.

Der Austausch der Aminosäure Lysin durch Arginin zeigte eine bessere Wechselwirkung des Lysins auf, da es anscheinend eine stabilere Wasserstoffbrückenbindung mit Glu₆₃ eingehen kann als das etwas längere Arginin. Dies steht nicht im Einklang mit den Ergebnissen von Wülfken und Möller, die durchweg positive Effekte durch diese Ersetzung in SPR Untersuchungen nachweisen konnten.^{48, 62}

Die Ersetzung des nicht an der Wechselwirkung zum CD4 beteiligten Glycins durch Histidin und Glutaminsäure sollte zeigen, dass nicht nur hydrophobe Seitenketten (wie beim Alanin), sondern auch basische und saure Seitenketten an dieser Position ungünstig sind. Richtig ist dabei, dass der Austausch durch Histidin eine deutliche Verringerung der Bindungsenergie zur Folge hat. Die Ersetzung des Glycins durch Glutamat hingegen wird von Flexidock energetisch günstig eingeschätzt. Dies mag auf einer potentiellen Wasserstoffbrückenbindung zum Ser₆₀ beruhen. Diese Wasserstoffbrückenbindung scheint jedoch auf Grund des Abstandes oder Winkels nicht besonders stabil zu sein, da sie nur in wenigen Strukturen auftaucht.

Peptid	Bindungsenergie [kcal/mol]
NMWQKVGTPL	-322
KVGTP	-258
RVGTP	-245
KVHTP	-248
KVETP	-309

Tabelle 4: Von Flexidock berechnete Bindungsenergien gedockter Variationen des Kernpeptids.

Der Austausch G->E wurde in einer ganzen Reihe von Verbindungen *in silico* durchgeführt. Der durchschnittliche Energiegewinn bei der Ersetzung von Glycin durch Glutamat beträgt dabei 27 kcal/mol.

Docking der kurzen Peptide mit einem Aromaten:

Um eine breite Auswahl von Aromaten zu untersuchen, wurde in der *Available Chemicals Database* (ACD) eine Suche nach anellierten Systemen, bei denen zumindest ein Ring aromatisch sein sollte, durchgeführt, und eine Auswahl (sieheAbbildung 23) dieser Verbindungen *in silico* über einen Linker an das Kernpeptid geknüpft. Anschließend wurden diese Verbindungen gedockt (50 000-100 000 Generationen, bis das lokale Energieminimum erreicht wurde).



Aromaten

Abbildung 23 : Aromaten, die über einen Linker an das Kernpeptid KVGTP geknüpft und gedockt wurden.

Während sich Naphthylsysteme und die ihnen verwandten Cumarin- und Chinolinderivate als günstig erweisen, binden Derivate des Isochinolins, Purins, Benzodiazols, Biphenyls und Benzothiazols deutlich schlechter, teilweise binden sie nur dann, wenn mehr als das Kernpeptid vorhanden ist (Tabelle 5). Einen weiteren Einfluss auf die Bindungsenergien hat die Art des Linkers und die Position der Substituenten am Aromaten. Grundsätzlich gesehen steigert die Anwesenheit eines richtig verknüpften Aromaten die Bindungsenergie der Liganden zum CD4, wobei noch immer eine geringere Energie als die des Peptids NMWQKVGTPL berechnet wird.



Tabelle 5: Untersuchung verschiedener Aromaten mit Flexidock.

Als Linker wurden Ketten von 2-5 Kohlenstoff- und Heteroatomen verwendet, die über eine amidische Bindung oder als Amin über die α-Aminogruppe des Lysins mit dem restlichen Peptid verknüpft waren (siehe Tabelle 6). Bei den dreiatomigen Linkern kamen besonders niedrige Energien für den Oxyacetyl-Linker heraus. Während der kürzere Linker schon von Flexidock energetisch ungünstig beurteilt wurde, schienen die längeren Linker aufgrund ihrer zu hohen Flexibilität 39

Verbindung	Bindungsenergie [kcal/mol]
K V G T P-COOH	-274
K V G T P-cooh	-264
К V G Т Р-соон	-261
K V G T P-cooh	-259
	(Verlust der
K V G T P-COOH	Bindung)
C C C K V G T P-coo	-292
K V G T P-C	-290

ungeeigneter als vom Programm vorhergesagt (vorrausichtlich haben diese Substanzen schlechtere Bindungskinetiken).

Tabelle 6: Untersuchung verschiedener Linker zum Aromaten mit Flexidock. Der Linker ist jeweils an die α -Aminogruppe des Lysins geknüpft.

kurze Peptide + Carbamate:

Bei der *in silico* Verknüpfung des Kernpeptids KVGTP mit einem hydrophoben Rest wurden folgende Verknüpfungsarten ausprobiert: (Thio)Carbamat, (Thio)Harnstoff, Sulfonamid sowie β -Peptid (vergleiche Abbildung 7). Auf diese Weise sollte ein nichtpeptidischer Baustein in das Zielmolekül integriert werden. Als hydrophobe Reste wurden zunächst *t*Bu, Cyclohexyl sowie ein Ethylacetatderivat getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Einführung des hydrophoben Restes an dieser Stelle eine deutliche Steigerung der Bindungsenergie zur Folge hat (siehe Tabelle 7). Besonders günstig erschienen die Carbamate. Sie sind im Gegensatz zu den β -Peptiden starr und leichter synthetisch zugänglich als Sulfonamide und auch die Harnstoffderivate. Die Carbamate haben auch keine bekannten toxischen Eigenschaften, die Thioderivate dagegen häufig besitzen. Die berechneten Bindungsenergien dieser Konstrukte waren mit Ausnahme des β -Peptids, das keine Bindung zeigte, deutlich günstiger als die der Leitstruktur.

Verbindung	Bindungsenergie [kcal/mol]
NMWQKVGTPL	-322
$H_2 - K V G T - N - O H - CH_3 - CH$	-357
$M_2 - K V G T \rightarrow 0 $	-352
$NH_2 - K V G T - N - O H O CH_3$	-346
$H_2 - K V G T - N - O H - CH_3 - CH$	-348
$H_2 - K V G T - N + H + CH_3 CH_3 CH_3$	-355
$NH_2 - K V G T - N + H + H + CH_3 CH_3 CH_3$	-358
H_2 K V G T H_2 H_2 H_3 $H_$	(Verlust der Bindung)
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	-351

Tabelle 7: Untersuchung unterschiedlicher Linker vom Kernpeptid KVGTP zum hydrophobenRest mit Flexidock.

Liganden:

Beim Docking der vollständigen Liganden zeigt sich ein synergistischer Effekt von Aromaten und Carbamaten; sie binden deutlich besser als das Peptid NMWQKVGTPL. Die entworfenen Liganden zeigen im Docking eine günstigere Wechselwirkung als das Originalpeptid und erfüllen vorraussichtlich viele Anforderungen, die an pharmakologisch geeignetere Substanzen gestellt werden. Geprüft werden kann dies allerdings nur durch Synthese und Analyse dieser Substanzen. Zur Synthese wurden zwei Verbindungen ausgewählt (Liganden <u>I</u> und <u>II</u>, Abbildung 24). Als Aromat-Linker-System wurde (2'-Naphthyloxy)essigsäure verwendet, da es sich im Modelling als günstig erwies und kommerziell verfügbar war. Beim Carbamatrest unterscheiden sich die Liganden <u>I</u> und <u>II</u>. Obwohl der *t*Bu-Rest im Docking die günstigsten Wechselwirkungen zeigte (vergleiche Tabelle 7), wurde von der Synthese Abstand genommen, da Schwierigkeiten mit seiner Hydrolyseempfindlichkeit bei der sauren Abspaltung anderer Schutzgruppen befürchtet wurden. Statt dessen wurden der Cyclohexylrest (<u>I</u>) und das Ethylacetatderivat (<u>II</u>) dargestellt. Das Docking (Abbildungen 25 und 26

) zeigt eine sehr gute Passform der Liganden. Besonders schön zu sehen ist die Wechselwirkung Lysin-Asp₆₃, die Ausnutzung der hydrophoben Tasche durch das Valin und die Interaktion der hydrophoben Bereiche des N- und C-Terminus mit der Oberfläche. Die berechneten Bindungsenergien von –376 kcal/mol (Ligand <u>I</u>) und -377 kcal/mol (Ligand <u>II</u>) sind deutlich niedriger als von der Leistruktur <u>2</u> (-322 kcal/mol). In Tabelle 14, S. 86, wird die berechnete Bindungsenergie aller synthetisierten Liganden gezeigt.



Abbildung 24 : Liganden <u>I</u> und <u>II</u>



Abbildung 25: Stereobild von Ligand <u>I</u> (ball + stick) gedockt an CD4 (als grüne Oberfläche). Der Ligand schmiegt sich deutlich besser an die Oberfläche an als das Peptid NMWQKVGTPL <u>2</u> (siehe Abbildung 21).



Abbildung 26: Stereobild von Ligand <u>II</u> (ball + stick) gedockt an CD4 (als grüne Oberfläche). Der Bindungsmodus gleicht dem von Ligand <u>I</u>.

4.4 Synthese der Liganden <u>I</u> und <u>II</u>

1. Überprüfung der Carbamatkupplung

Für die Synthese von Carbamaten gibt es eine Reihe von Möglichkeiten, die Alkoholyse von den kommerziell in einer großen Vielfalt verfügbaren Isocyanaten ist jedoch die einfachste Lösung. Diese Reaktion kann durch die Verwendung von Lewis-aciden Metallhalogeniden katalysiert werden.⁶³ Um eine geeignete Methode herauszufinden, wurde Boc-L-Prolinol <u>3</u> nach der Vorschrift von Duggan *et al.* in DMF mit *tert*-Butylisocyanat unter Zusatz von CuCl zur Reaktion gebracht (Abbildung 27).⁶⁴ Die Aufarbeitung verlief problemlos, und die Ausbeute von 80% war zufriedenstellend. Daher wurde diese Methode in der Arbeit für alle Carbamatsynthesen benutzt.



Abbildung 27: Carbamatsynthese durch die Cu(I)-katalysierte Reaktion eines primären Alkohols mit einem Isocyanat und unerwünschte Nebenreaktion bei Isocyanatüberschuss.

2. Synthese der Liganden

Um die Synthese möglichst komfortabel zu gestalten, wurde sie zweistufig geplant. Zunächst sollten die Amidbindungen (peptidischer Teil und Aromat) als Festphasensynthese geknüpft werden und nach Abspaltung vom Harz die Carbamatkupplung in Lösung stattfinden. Dazu war es notwendig, eine orthogonale Schutzgruppenstrategie zu verwenden, die die Abspaltung des freien Alkohols vom Harz zulässt, aber die Seitenkettenschutzgruppen von Threonin und Lysin erhält.

Daher wurde zunächst als Test versucht, *N*-Boc-L-Prolinol <u>3</u> manuell an ein chlormethyliertes Polystyrol-Harz (Merrifield-Harz) zu kuppeln, und dann nach Abspaltung der Boc-Gruppe und Verknüpfung mit zwei weiteren Aminosäuren nach Fmoc-Strategie, das entstandene Peptid durch Hydrogenolyse vom Harz abzuspalten (Abbildung 28).⁶⁵ Dabei sollten die Seitenkettenschutzgruppen erhalten bleiben. Die Anknüpfung an das Harz und die Kupplung weiterer Aminosäuren verlief erfolgreich, wenn auch mit mäßigen Ausbeuten (28% nach der ersten Aminosäure, bestimmt über den Fmoc-Wert). Alle Abspaltversuche auf diesem Wege waren jedoch nicht erfolgreich.



Abbildung 28: Erste Syntheseversuche zur Darstellung der entworfenen Liganden. <u>3</u> wird über die Hydroxyfunktion an ein Merrifield-Harz gebunden. Nach Abspaltung der Boc-Gruppe findet eine Fmoc-Peptidsynthese statt und das Produkt sollte hydrogenolytisch vom Harz abgespalten werden. Versuche zu dieser Synthese blieben erfolglos.

Der erfolgreiche Synthesezugang zu den Liganden startet mit dem über die Hydroxylfunktion an ein 2'-Chlorotritylharz gebundenen Aminoalkohol L-Prolinol

(vergleiche Abbildung 29). An diesen wurden die Fmoc-geschützten Aminosäuren in DMF unter dem Zusatz von TBTU/DIPEA als Aktivator geknüpft und Fmoc mit 20 % Piperidin in DMF abgespalten. Die (2'Naphthyloxy)essigsäure kann unter denselben Bedingungen an der Festphase an das Peptidomimetikum geknüpft werden. Die entstehende Amidbindung ist unter den weiteren Synthesebedingungen stabil, sollte aber nicht von Proteasen erkannt werden. Wird das Harz nun mit 1 % TFA in Dichlormethan behandelt, so wird das Peptidomimetikum vom Harz abgespalten, wobei alle Seitenkettenschutzgruppen erhalten bleiben. Die Analyse mittels MALDI-TOF-MS zeigte, dass das Hauptprodukt eine Verbindung war, die 96 g/mol schwerer war als erwartet. Es wurde angenommen, dass der primäre Alkohol hierbei als TFA-Ester vorliegt, der durch Schütteln mit Natriumcarbonat-Lösung und Ionentauscher Amberlyst A-21 hydrolysiert werden konnte. Anschließend kann man den primären Alkohol der Prolinoleinheit selektiv mit einem Isocyanat Kupfer(I)-katalysiert zu einem Carbamat umsetzen. Dabei kann nur im 1:1-Verhältnis gearbeitet werden, da sonst die Gefahr von Nebenreaktionen zunimmt (vergleiche Abbildung 27).

Beim Extrahieren in einem H₂O/EE-System kam es bei den ersten Aufarbeitungen zu störenden Niederschlägen von Kupfersalzen. Eine deutliche Verbesserung konnte durch den Zusatz von NH₄HCO₃ zur wässrigen Phase erreicht werden. Das Kupfer wird dann als Kupfer-Amin-Komplex abgetrennt, was durch die Blaufärbung deutlich erkennbar ist. Auch der Wechsel zu Dichlormethan als organische Phase erleichterte die Aufarbeitung. Die saure Schutzgruppenabspaltung in 95 % TFA zersetzt das Carbamat nicht, da keine aktivierte C-O-Bindung im Carbamat (wie z.B. bei der Boc-Schutzgruppe) vorliegt. Das Peptidomimetikum kann per RP-HPLC gereinigt werden.



Abbildung 29: Synthese der Liganden I und II

Die Synthese wurde mehrere Male durchgeführt, wobei die Bedingungen optimiert wurden. Die erste, manuelle Synthese gab die Möglichkeit, mit Hilfe der Fmoc-Werte bei der Schutzgruppenabspaltung den Kupplungserfolg zu überprüfen. Dabei wurde festgestellt, dass vor allem die Kupplungen an das Prolinol und das Valin in extrem schlechten Ausbeuten abliefen (jeweils 40 %). Eine zufriedenstellende Ausbeute konnte erreicht werden, wenn dreimal für 120 min frisches Reagenz zum Ansatz gegeben wurde. Dies ergab nach der Kupplung der vier Aminosäuren eine % (gemäß Fmoc-Wert). Synthesen auf dem Gesamtausbeute von 65-70 Durchflusssynthesizer waren nicht möglich, da das Harz eine zu hohe Belegung hat und dadurch die Harzmenge für die Säulen zu gering war. Eine deutliche Arbeitserleichterung konnte durch Verwendung des automatischen die Pipettierroboters ACT 496 Ω erreicht werden, wobei die Ausbeuten denen der Handkupplung entsprachen. Die Abspaltung ergab eine Rohausbeute von 30-35 %. Diese konnte auch durch wiederholtes Abspalten nicht gesteigert werden; das heißt, die Verknüpfung mit den Arenoxycarbonsäuren verläuft nur mit etwa 50 % Ausbeute. Dies konnte nicht verbessert werden. Alle freien Zwischenprodukte und die Produkte konnten per MALDI-TOF-Spektrometrie nachgewiesen werden, wobei sich eine CCA-Matrix in EtOH/H₂O als besonders günstig erwies. Die Aufreinigung erfolgte erst nach der letzten Schutzgruppenabspaltung per HPLC an einer präparativen C18-RP Säule.

Ausbeute insgesamt (nach HPLC-Reinigung):

Ligand <u>I</u>: 5 % (14 % bezogen auf das Rohprodukt nach der Abspaltung vom Harz) Ligand <u>II</u>: 6 % (17 % bezogen auf das Rohprodukt nach der Abspaltung vom Harz)

4.5 Struktur- und Konformationsanalyse der beiden Liganden

Während im MALDI-TOF-Spektrum und im HPLC-Chromatogramm nur eine Substanz nachgewiesen werden konnte, so zeigten sich im NH-Bereich der 2D-NMR-Spektren jeweils zwei Spuren pro Aminosäure (siehe Abbildung 30). Besonders



große Unterschiede in der chemischen Verschiebung war für die *N*H- und H α -Protonen zu entdecken.

Abbildung 30: NH-Bereich des TOCSY Spektrums von Ligand <u>I</u> (500 MHz, 290 K, pH 2). Für jedes *backbone-N*H sind zwei Spuren zu sehen, die bei 320 K im Verhältnis von ca. 2.3:1 sind.

Dies beruht wahrscheinlich auf einem Konformerengleichgewicht zwischen den beiden Threonin-Prolinol-Amidbindungs-Rotameren (*trans* : *cis*, vergleiche Abbildung 31), das für Ligand <u>I</u> bei 320 K etwa 2.3:1 zueinander beträgt (Bestimmung über die H γ -Protonen des Valins im 1D-¹H-presat-Spektrum (700 MHz). Leider lässt sich das Verhältnis bei anderen Temperaturen nicht genau bestimmen, da die Signale im 1D-¹H-Spektrum überlappen; die einzig gut aufgespaltenen Signale, die NH-Protonen, können nicht gut integriert werden.



Abbildung 31: Die Rotamere der *trans* und *cis* Threonin-Prolinol Amidbindung stehen bei den Liganden in einem thermodynamischen Gleichgewicht. Das Verhältnis beträgt für Ligand <u>I</u> bei 320 K etwa 2.3:1.

Modelling und allgemeine Erfahrung sprechen dafür, dass die stabilere der beiden Formen die *trans*-Form ist und diese auch besser an CD4 bindet. Dafür spricht auch der geringe Unterschied der chemischen Verschiebungen von C β und C γ des Prolinols von nur ca. 2-3 ppm. Bei Prolinen liegt die chemische Verschiebung der beiden Kohlenstoffe bei einer *cis*-Amidbindung deutlich weiter auseinander (ca. 9 ppm), während bei *trans*-Amidbindungen ein Unterschied von 4 ppm normal ist.⁶⁶

4.6 Biacore-Ergebnisse

Die beiden Liganden wurden auf einem Biacore-3000 vermessen. Es wurde ein CM5-Chip verwendet, der von Heiko Möller und Jan Wülfken mit 6200 RU CD4 (= 138 fmol) belegt wurde. Um die Aktivität des CD4 zu überprüfen, wurde eine 250 nM Lösung von GP120 über den Chip geleitet (5 μ L/min Flussrate, Kontaktzeit 660 s) und die Kurve extrapoliert. Dies ergab eine Aktivität von 10 % des immobilisierten CD4 (entsprechend 11 fmol aktives CD4).

Die Liganden selbst wurden in HBS-EP-Puffer, pH 7.4 gelöst und folgende Konzentrationen wurden jeweils doppelt, angefangen bei der kleinsten, vermessen.

Ligand <u>I</u>: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250, 500, 1000 µM

Ligand II: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 20, 30, 50, 125, 250, 500 und 1000 µM

Die Proben wurden mit einer Flussrate von 15 μ L/min und einer Kontaktzeit von 120 s über den Chip geleitet, was zumindest bei den geringeren Konzentrationen zum *steady state* führte. Vor der Injektion einer Ligandlösung wurde eine Pufferinjektion unter denselben Bedingungen durchgeführt, die theoretisch keinen beobachtbaren Biacore-Effekt haben sollte. Dies war jedoch nicht der Fall: Pufferinjektionen führten zu einem Signal, das in den meisten Fällen schwach negativ war. Dies ist nicht eindeutig zu erklären; evtl. führt ein längeres Stehen des Puffers an der Luft durch Aufnahme von Gasen aus der Luft zu einer veränderten Dichte, die dann detektiert wird. Um diesen Effekt bei den Ligandproben herauszurechnen, wurden die Puffer-Werte vor der Probeninjektion und vor der nächsten Konzentration gemittelt und den Messwerten subtrahiert. Der Chip wurde entsprechend der Vorschrift von Jan Wülfken mit zwei Pulsen 100 mM H₃PO₄ für je 32 s regeneriert. Diese Regeneration scheint nicht optimal zu sein (schwache baseline *drift*), funktioniert jedoch im Rahmen der Genauigkeit gut genug. Ähnlich wie bei den Untersuchungen von Jan Wülfken und Heiko Möller mit diesem System kommt es nicht zu einer Sättigung des Chips; nur die ersten Punkte verhalten sich wie in einem one-site binding Modell, ab einer Konzentration von ca. 30 µM hingegen steigt die Kurve steil an, was auf unspezifische Bindung an das CD4 zurückzuführen ist. Wenn jedoch nur die ersten Punkte zur Auswertung herangezogen werden, so ergeben sich für den Liganden <u>I</u> ein K_D von 39 μ M und für den Liganden <u>II</u> von 20 μ M. Die χ^2 - und R²-Werte zeigen die Güte des Fits an (wobei χ^2 im Idealfall 0, R² hingegen 1 ist). Im Fall von Ligand <u>I</u> betragen $\chi^2 = 0.0421$ und R² = 0.9985, bei Ligand **II** ist $\chi^2 = 0.04687$ und R² = 0.98416. Es liegt also ein nahezu idealer Fit vor.



Abbildung 32: Bestimmung von K_D des Liganden <u>I</u> mittels SPR. Ein Fit an die Funktion ergibt einen K_D = 39 μ M.



Abbildung 33: Bestimmung des K_D-Wertes des Liganden <u>II</u> mittels SPR. Ein Fit an die Funktion ergibt $K_D = 20 \ \mu$ M.

Kinetische Daten konnten für die beiden Verbindungen aus den Biacore-Kurven leider nicht bestimmt werden, da die Kurven dazu nicht gut genug waren (siehe Abbildung 34). Abgeschätzt ergeben sich k_{on} -Werte von ca. 4*10³-3*10⁴ M⁻¹s⁻¹ und k_{off} -Werte von etwa 0.1-0.2 s⁻¹.



Abbildung 34 : SPR-Kurve des Liganden <u>I</u> bei einer Konzentration 12 μ M.

Die beiden Liganden wurden auch von der Firma Biacore auf einem Biacore S51 mit dem gleichen Messprotokoll vermessen, wobei dem Probenpuffer 5% DMSO zugesetzt wurde. Für Ligand **I** wurde ein $K_D = 10 \,\mu$ M und für Ligand **II** der $K_D = 6 \,\mu$ M bestimmt. Leider waren die RU_{max}-Werte bei dieser Untersuchung sehr gering, da nur wenig aktives CD4 nach der Immobilisierung erhalten wurde. Die Reihenfolge der Liganden bleibt jedoch erhalten und der K_D-Bereich ist dem am Biacore 3000 bestimmten sehr ähnlich. Allgemein wurde bei dieser Untersuchung festgestellt, dass die Peptidomimetika weniger unspezifische Wechselwirkungen zum CD4 eingehen als die untersuchten CD4 bindenden Peptide von Wülfken und Möller.

4.7 STD-Ergebnisse

Für die STD-Titrationsexperimente wurden zwei NMR Proben mit 8.8 μ M sCD4 in einem PBS Puffer in D₂O angesetzt. Eine der beiden Proben enthielt keinen Liganden, die andere die höchste zu vermessende Konzentration des jeweiligen Liganden. Die einzelnen Konzentrationen wurden durch Pipettieren eingestellt und die genaue Konzentration durch Vergleich mit dem als internen Standard zugesetzten DSS bestimmt.

4.7.1 Titration Ligand I

Die Titrationsreihe des Liganden I wurde am Bruker DRX 500 Spektrometer vermessen. Die Datenpunkte können nach einem one-site binding Modell gefittet werden (siehe Abbildung 35), wenn die Daten für die höchste Konzentration (156 µM) nicht beachtet werden. Hier wurden bei allen betrachteten Protonen ein deutlich höherer Wert als erwartet gemessen. Bei dieser Konzentration trat wahrscheinlich entweder ein Messfehler auf, oder aber unspezifische Assoziation an das CD4 findet statt. Wenn auf diese Daten verzichtet wird, so können für die beobachtbaren Protonen individuelle KD-Werte zwischen 18 µM (Val-Hy) und 119 µM $(Pro-H\beta\gamma/$ Val-Hβ) bestimmt werden. Die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Das Auftreten unterschiedlicher KD-Werte für einzelne Protonen einer Verbindung kann verschieden begründet werden. Zum Einen zeigen diejenigen Protonen, die nahe am Protein stehen, einen deutlicheren STD Effekt als diejenigen, die von ihm abgewandt sind. Dieses zum epitope mapping verwendete Phänomen führt bei der Berechnung der K_D-Werte zu Unterschieden zwischen einzelnen Protonen. Bei denjenigen Protonen, bei denen es auf Grund von sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen zu Signalüberlappung kommt, kommt es zu Fehlern, wenn auf diese Protonen durch ihre unterschiedliche Stellung zum Protein unterschiedlich gut Sättigung übertragen wird. Der K_D-Wert wird dann aus dem Mittelwert eines gut und eines schlecht erkennbaren Protons berechnet. Dies ist wahrscheinlich bei Naph-H4/5/8 sowie Pro-Hβγ / Val-Hβ der Fall. Der K_D wird am genauesten durch die Protonen bestimmt, die am nächsten am CD4 stehen. Wir erhalten somit einen mittleren KD von 31 µM (unter Berücksichtigung der Protonen Val-Hy, Cyclohexyl-H3 und Naphthyl-H6/7), was dem per SPR bestimmten Wert (39 µM) im Rahmen der Messgenauigkeit entspricht.



Abbildung 35: Gezeigt sind die STD-Titrationskurven von Protonen aus verschiedenen Bereichen des Liganden <u>I</u> (vergleiche Tabelle 8)

	Alle Punkte	Ohne letzten Punkt
Proton	$K_D[\mu M]$	K _D [μM]
Naphthyl-H4/5/8	n.b.	(211)
Naphthyl-H6/7	120	45
Naphthyl-H3	n.b.	88
Naphthyl-H1	n.b.	109
Pro-Hβγ / / Val-Hβ	270	119
Thr-Hγ	95	66
Cyclohexyl-H3	56	29
Val-Hy	68	18

Tabelle 8: Die aus der STD-Titration bestimmten K_D -Werte einzelner Protonen von Ligand <u>I</u> (n.b. = nicht bestimmbar).

4.7.2 Titration Ligand II

Bei der Titration von Ligand **II** am Bruker Avance 700 Spektrometer konnte ein größerer Konzentrationsbereich vermessen werden. Auch hier passen die Datenpunkte sehr gut zum Fit des *one-site binding* Modells (siehe Abbildung 33). Die für die einzelnen Protonen bestimmten K_D-Werte sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Sie betragen für die aliphatischen Protonen zwischen 37 μ M (für die Thr-H γ -Protonen) und 104 μ M (für die Protonen Pro-H $\beta\gamma$ / Val-H β , wobei hier ähnliche Probleme bei der Bestimmung von K_D wie bei Ligand <u>I</u> auftreten). Die aromatischen Protonen zeigen alle K_D -Werte über 100 μ M. Zusammenfassend liegt der per STD NMR bestimmte K_D von Ligand <u>II</u> auch dann höher als der per SPR bestimmte, wenn man nur die aliphatischen Protonen Thr-H γ , Ester-CH₃, und Val-H γ betrachtet (44 μ M im Gegensatz zu 20 μ M). Hier ergeben die beiden Methoden also nicht so gut übereinstimmende Werte wie bei Ligand <u>I</u>. Darüberhinaus liegt der bestimmte K_D -Wert auch höher als der von Ligand <u>I</u>, was eine Umkehr der Reihenfolge bedeutet, die eigentlich nicht beim Wechsel des Untersuchungssystems stattfinden sollte.



Abbildung 36: Bestimmung der K_D-Werte einzelner Protonen von Ligand <u>II</u> mit einer STD-NMR-Titration. Vier repräsentative Protonen sind ausgewählt (vollständige Daten, sieheTabelle 9).

Proton	K _D [μ M]
Naphthyl-H4/5/8	140
Naphthyl-H6/7	160
Naphthyl-H3	176
Naphthyl-H1	113
Pro-Hβγ // Val-Hβ	104
Thr-Hγ	37
Ester-CH ₃	49
Val-Hy	45

Tabelle 9: Übersicht über die mit STD-NMR-Titration bestimmten K_D-Werte individueller Protonen von Ligand <u>II</u>.

4.7.3 Epitope Mapping

Die Informationen für das *epitope mapping* wurden aus den 1D-¹H-STD-Spektren gewonnen. Beide Liganden zeigen STD-aktive Gruppen in den gleichen Bereichen des Moleküls (Abbildung 37). Besonders wichtig für die Bindung scheinen die aromatischen Protonen H6/7, die Valin-H γ -Protonen sowie ein hydrophober Teil des Carbamats zu sein. Dies stimmt mit dem *epitope mapping* des CD4-Binders <u>2</u> überein; die Peptidomimetika haben also mit großer Wahrscheinlichkeit denselben Bindungsmodus wie das Peptid.



Abbildung 37: *Epitope mapping* des Peptids NMWQKVGTPL und der Liganden <u>I</u> und <u>II</u> per STD-NMR. In allen Verbindungen stehen die vergleichbaren Bereiche in engem Kontakt zum CD4, es liegt ein analoger Bindungsmodus der Leitstruktur und der Peptidomimetika vor.

4.8 Proteolysestabilität

Da es kein Standard-Verfahren zum Testen der Proteolysestabilität von Peptiden gibt, wurde in Anlehnung an die Methode von Osapay *et al.* die 1 mM Lösungen der Peptidomimetika in 100 mM Tris-Puffer, pH = 7.5, bei 37 °C mit dem Enzymgemisch Pronase aus *Streptomyces griseus* verdaut.⁶⁷ Dieses Enzymgemisch aus verschiedenen Endo- und Exoproteasen ist in geeigneter Konzentration fähig, Peptide und Proteine zu den einzelnen Aminosäuren zu zerlegen. Zunächst wurde das Referenzpeptid <u>2</u> mit verschiedenen Pronasekonzentrationen verdaut, um geeignete Testbedingungen zu erzielen. Als gut geeignet erwies sich eine Endkonzentration von 8 mg Pronase/L. Dem Verdauansatz wurden nach 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten Proben entnommen, diese mit 1 M Essigsäure gemischt, um den Verdau zu beenden, und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die frisch aufgetauten Lösungen wurden dann über eine RP-HPLC getrennt und die einzelnen Peaks per MALDI-TOF-MS charakterisiert.



Abbildung 38: Vergleich des proteolytischen Verdaus der Referenzpeptids <u>2</u> und der Liganden <u>I</u> und <u>II</u> mit Pronase. Die Halbwertszeiten der beiden Peptidomimetika sind deutlich länger (ca. 4-5 x) als die des Peptids.

Die beiden getesteten Peptidomimetika haben deutlich höhere Halbwertszeiten (27.3 min bzw. 23 min) als das Referenzpeptid (6 min). Besonders interessant ist die Betrachtung der durch den Verdau gebildeten Bruchstücke (siehe Abbildungen 39 und 42). Dabei wird deutlich, dass die Carbamat-Bindung unter den gewählten Bedingungen offensichtlich gar nicht angegriffen wird. Im MALDI konnten kaum Bruchstücke gefunden werden, die sich aus einer Bindungsspaltung der β -NOA-Lys-Amidbindung ergeben, doch beweist dies aufgrund der Ionisierungstechnik nicht eindeutig eine höhere Stabilität der Bindung. Mit den gewählten Bedingungen lassen sich die Bruchstücke auf der HPLC nicht voneinander trennen, so dass die einzelnen Moleküle nicht quantifiziert werden können (siehe das Beispiel von Ligand <u>I</u> in den Abbildungen 40 und 41).



Abbildung 39: Ligand <u>I</u> und die nach dem Pronase-Verdau per MALDI-TOF-MS nachgewiesenen Haupt-Bruchstücke.


Abbildung 40: HPLC-Lauf von Ligand <u>I</u> mit vorher inaktivierter Pronase.



Abbildung 41: HPLC-Lauf von Ligand <u>I</u> nach 10 minütigem Verdau. Die Bruchstücke lassen sich nicht voneinander trennen, so dass sich keine Aussage über die bevorzugte Spaltungsstelle treffen lässt.



Abbildung 42: Ligand <u>II</u> und die nach dem Pronase-Verdau per MALDI-TOF-MS nachgewiesenen Haupt-Bruchstücke.

4.9 Design der Bibliothek

Die Liganden <u>I</u> und <u>II</u> zeigen den Erfolg der gewählten Strategie, basierend auf dem Templat in Abbildung 22. Nun wurde mit Hilfe einer kleinen Bibliothek versucht, die Bindungsaffinitäten weiter zu verbessern bzw. die Proteolysestabilität weiter zu erhöhen. Dies sollte auch dazu beitragen, die Vorhersagegenauigkeit des Flexidock-Dockings besser einschätzen zu können. Dazu wurde untersucht, welche Aromaten und hydrophoben Reste die günstigsten Wechselwirkungen geben, und ob quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gefunden werden können.

Hydrophobe Reste:

Es wurden vom sterisch einfachsten Cyclopropylrest bis zum anspruchsvollen Adamantylrest vier neue hydrophobe Reste in die Peptidomimetika eingebaut und miteinander verglichen. Statt des Cyclopropylisocyanats wurde das Cyclopropylisothiocyanat verwendet, da nur dieses kommerziell verfügbar war (Liganden <u>III-VI</u>).



Ligand III



Ligand <u>IV</u>



Ligand VI

Abbildung 43: Die Liganden <u>III-VI</u> unterscheiden sich vom Liganden <u>I</u> im hydrophoben Rest

Austausch einzelner Aminosäuren:

Im Docking gelang es, die Aminosäuren Lysin, Valin, Glycin und das Prolinol durch Gruppen zu ersetzen (Citrullin, Cyclohexylglycin, Glutaminsäure bzw. Alaninol), die Wechselwirkungen mit dem CD4 eingehen können und daher näher untersucht werden sollten. Beim Threonin war dies nicht möglich (Liganden <u>VII-XI</u>).







Ligand <u>XI</u>

Abbildung 44: Bei den Liganden <u>VII-XI</u> wurde jeweils eine Untereinheit der Kernregion ausgestauscht.

Aromaten:

Nachdem schon beim Design der Liganden günstige aromatische Systeme herausgefunden wurden, erschien nun besonders interessant, inwiefern eine Unterscheidung zwischen 1'- und 2'-sustituierten Systemen gefunden werden konnte. Zusätzlich ist der Vergleich der reinen Kohlenwassertoffsysteme mit den heteroaromatischen Chinolin- und Cumarinderivaten von Interesse (Liganden <u>XII-XIV</u>).



Abbildung 45: Die Liganden XII-XIV unterscheiden sich im aromatischen Rest von Ligand I

Dipeptidomimetika:

Das Glycin als Verbindungsstück zwischen den beiden ursprünglichen Peptiden NMWQKV und TPL ist ein nahe liegender Kandidat zur Ersetzung durch andere Gruppen, da es keinen direkten Kontakt zum CD4 zeigt. Vor allem Dipeptidomimetika, die Val-Gly oder Gly-Thr ersetzen, sind interessant, wobei letztere synthetisch nicht so einfach zur Verfügung stehen. Val-Gly kann hingegen durch eine Reihe anderer Verbindungen nachempfunden werden, unter anderem durch die Statine sowie vinyloge Peptide und Sulfonamide (siehe Abbildung 46).



Abbildung 46: Ersetzung des Dipeptids Val-Gly durch Dipeptidomimetika. Alle gezeigten Dipeptidomimetika sind um ein Atom verkürzt, zeigen aber im Docking noch immer eine energetische günstigere Wechselwirkung mit CD4 als <u>2</u> und sollten deutlich Protease stabiler sein.

Die Wahl fiel auf die Statine Statin <u>5</u> und ACHPA <u>6</u>, da sie kommerziell verfügbar waren. Sie waren im Docking nicht so gut wie die Liganden <u>I</u> und <u>II</u>, aber deutlich besser als das Peptid <u>2</u> (Liganden <u>XV-XVI</u>).



Abbildung 47: In den Liganden XV und XVI ersetzen 5 bzw. 6 das Val-Gly-Dipeptid.

4.10 Synthese der Aromaten

Die Aryloxyessigsäuren (8'-Chinolyloxy)essigsäure $\underline{8}$, (1'-Naphthyloxy)essigsäure $\underline{9}$ und 6-Carboxymethoxy-4-methylcumarin $\underline{10}$ wurden aus den entsprechenden Phenolen durch basische Veretherung mit Bromessigsäure dargestellt. Dabei erwies sich die Methode nach Rasshofer *et al.*⁶⁸ (siehe Abbildung 48) als deutlich effektiver als die klassische Variante der Umsetzung der Phenole in Aceton unter Zusatz von Kaliumcarbonat.⁶⁹ Da nur das Kaliumsalz von $\underline{8}$ durch Fällung abgetrennt werden konnte, wurde die Aufarbeitung bei den beiden anderen Aryloxyessigsäuren verändert. Die Ausbeuten waren sehr unterschiedlich; während $\underline{9}$ in 46.5 % Ausbeute erhalten wurde, ergab der Synthese von $\underline{8}$ nur 25 %, die von $\underline{10}$ nur 18.7 % Ausbeute. Die Reinheit der Produkte war jedoch sehr gut. Da genügend Substanz für alle Synthesen erhalten wurde, wurden die Reaktionen nicht optimiert.



Abbildung 48: Darstellung der Arenoxycarbonsäuren nach Rasshofer *et al.* am Beispiel von (8'-Chinolyloxy)essigsäure <u>8</u>.

4.11 Synthese der Bibliothek

Das Syntheseschema gleicht dem der ersten beiden Peptidomimetika (siehe Abbildung 29). Der Festphasenteil wurde als Parallelsynthese am ACT 496 Ω System durchgeführt. Es wurde jeweils ein 90 μ M-Ansatz eingesetzt und die Kupplung der Aminosäuren und der Arenoxycarbonsäuren 3x120 Minuten bei Verwendung eines vierfachen Überschusses Carbonsäure und eines jeweils fünffachen Überschusses DIPEA und TBTU durchgeführt. Nach Abspaltung von der festen Phase wurden zwischen 14 und 33 % Rohausbeute erhalten. Die Kupplung zum Carbamat verlief in Ausbeuten zwischen 62 und 97 %. Nach dem Abspalten der Schutzgruppen wurden die einzelnen Peptidomimetika per RP-HPLC gereinigt und Gesamtausbeuten von 1-8 % über alle Stufen inklusive Reinigung erhalten.

Bei drei Verbindungen lief die Carbamatkupplung nur zum Teil ab, so dass als Nebenprodukt relativ große Mengen der Prolinol-OH-freien Liganden <u>Ib</u>, <u>VIIb</u> und <u>Xb</u> entstanden. Diese wurden ebenfalls im Biacore untersucht.

4.12 Biacore-Ergebnisse der Bibliothek

Die Biacore-Studien der Bibliothek wurden nach demselben Messprotokoll durchgeführt wie bei den ersten Liganden. Allerdings wurde zunächst ein CM5-Chip neu belegt. Durch eine verkürzte Aktivierungszeit konnte bei einer geringeren Belegung erreicht werden, dass 50% des gekoppelten sCD4 aktiv blieben (Bestimmt durch die Extrapolation der Messkurve von GP120, entspricht 53 fmol aktivem CD4). Es wurden jeweils Konzentrationen von 4, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 50, 100, 500 und 1000 μ M vermessen. Dabei wurden Doppelbestimmungen der einzelnen Messpunkte vorgenommen und mit der kleinsten Konzentration begonnen. Bei der Untersuchung der Bibliothek mit SPR traten dieselben Probleme auf wie bei den Messungen der beiden ersten Liganden, d.h.

1. Injektionen von Pufferlösung führten zu negativen RU-Werten.

2. Bei hohen Ligandkonzentrationen steigen die RU-Werte immer weiter an, sogar deutlich über den theoretisch höchsten RU-Wert für ein *one-site binding* Modell (vergleiche Abbildung 49).

Zur Auswertung der Datenpunkte wurden daher zu den Messwerten eine Pufferkorrektur addiert (gemittelt aus dem RU-Wert der Pufferinjektion vor der Probe und der Pufferinjektion vor der nächsten Probe) und nur der Konzentrationsbereich berücksichtigt, dessen Werte zu einem *one-site binding* Modell passen (i.A. bis 30 μ M, in wenigen Fällen wurden mehr oder weniger Datenpunkte berücksichtigt). Die Datenpunkte und der Fit sind in Abbildung 50 dargestellt, während Abbildung 51 einen Fit über alle Datenpunkte zeigt. Dies ist nur bei drei Verbindungen möglich. Für diese Verbindungen sind Fehler bei der Bestimmung des K_D-Werts nicht auszuschließen. Nur für die Verbindung <u>Xb</u> konnte keine Bindungsaktivität nachgewiesen werden.



Abbildung 49: Hier wird am Beispiel von Ligand <u>III</u> gezeigt, dass die Datenpunkte der höheren Konzentrationen nicht mehr durch das *one-site binding* Modell erklärt werden können, sondern auf unspezifischen oder nicht bekannten Wechselwirkungen beruhen. Das wird vor allem daran deutlich, dass der RU_{maxtheor}. ca. = 40 ist.







Abbildung 50: Biacore-Daten mit dem nach einem *one-site binding* Modell gefitteten Graphen. Die Graphen zeigen den analysierten Bereich der jeweiligen Verbindungen



Abbildung 51: Biacore-Daten mit dem nach einem *one-site binding* Modell gefitteten Graphen über alle Datenpunkte. Hier kann nicht so gut wie bei den anderen Verbindungen gefittet werden, so dass die Ergebnisse aus dem unteren Datenbereich fehlerbehaftet sein können.

Wenn man die Datenpunkte für hohe Ligandkonzentrationen nicht mit in die Analyse einfließen lässt, so zeigen fast alle Verbindungen eine hervorragende Übereinstimmung mit dem *one-site binding* Modell. Die berechneten K_D-Werte liegen zwischen 6 μ M (Ligand <u>IV</u>) und 146 μ M (Ligand <u>X</u>) (siehe Tabelle 10).

Verbindung	$K_D [\mu M]$	Fehler	χ ²	Fit bis Konz. [µM]
Ligand <u>I</u>	39	4.6	0	32
Ligand <u>Ib</u>	26	10.1	2.5	100
Ligand <u>II</u>	20	4.3	0	14
Ligand <u>III</u>	27	12.4	1.8	50
Ligand <u>IV</u>	5.9	1.9	3.5	50
Ligand <u>V</u>	16	4.2	3.1	30
Ligand <u>VI</u>	13	1.8	1.1	20
Ligand <u>VII</u>	10	3.9	2.3	30
Ligand <u>VIIb</u>	103	50.3	1.5	500
Ligand <u>VIII</u>	30	7	2.7	30
Ligand <u>IX</u>	26	5	6.3	100
Ligand <u>X</u>	146	94	12	50
Ligand <u>XI</u>	31	5.5	3.5	50
Ligand <u>XII</u>	16	4	1.1	30
Ligand <u>XIII</u>	26	4	3.4	100
Ligand <u>XIV</u>	55	19	2.1	30
Ligand <u>XV</u>	66	21.3	1.8	30
Ligand <u>XVI</u>	118	28.8	4.4	30

Tabelle 10: K_D-Werte aus der Regressionsanalyse der Biacore-Daten nach dem *one-site binding* Modell.

Der K_D-Wert von Ligand <u>IV</u> (6 μ M) ist um drei Zehnerpotenzen besser als der des Ausgangspeptids <u>2</u> (6 mM).

4.13 Weitere STD-NMR Untersuchungen

4.13.1 Ligand <u>IV</u>

Die STD-Spektren wurden bei 290 K am 700 MHz-Spektrometer aufgenommen. Die ermittelten Datenpunkte passen sehr gut zu einem *one-site binding* Modell. Sie liegen zwischen 16 μ M (für Lys-H ϵ) und 165 μ M (für Naph-H4/5/8), mit einem ungefähr gemittelten Wert von 75 μ M. Dies stimmt nicht sehr genau mit dem im SPR bestimmten K_D-Wert von 6 μ M überein.



Abbildung 52: Bestimmung der K_D-Werte individueller Protonen von Ligand <u>IV</u> mit einer STD-Titration. Vier repräsentative Protonen sind dargestellt (vollständigen Daten siehe Tabelle 11). Die K_D-Werte reichen von 16 μ M (Lys-H ϵ) bis 165 μ M (Naph-H4/5/8).

Proton	K _D -Wert [µM]
Naph-H4/5/8	165
Naph-H6/7	136
Naph-H1/3	126
Lys-Hε	16
Pro-Hβγ/Val-Hβ	48
Cyc-H3	123
Thr-Hγ	88
Val-Hy	86

Tabelle 11: K_D-Werte individueller Protonen von Ligand <u>IV</u>, bestimmt über die Angleichung der Datenpunkte einer STD-Titrationsreihe an das *one-site binding* Modell

4.13.2 Ligand VII

Die STD-Spektren wurden bei 290 K am 700 MHz Spektrometer aufgenommen. Es konnte wegen Problemen bei der Probenvorbereitung nur ein relativ geringer Konzentrationsbereich vermessen werden. Die Datenpunkte stammen alle aus dem kritischen Bereich der Steigung und passen sehr gut zu einem *one-site binding* Modell (Abbildung 53).



Abbildung 53: Bestimmung der K_D-Werte individueller Protonen von Ligand <u>VII</u> mit einer STD-Titration. Vier repräsentative Protonen sind dargestellt (vollständigen Daten siehe Tabelle 12). Die K_D-Werte reichen von 8.9 μ M (Thr-H γ) bis 46.6 μ M (Val-H β).

Die ermittelten K_D-Werte für die betrachteten Protonen sind in Tabelle 12 zusammengestellt. Die K_D-Werte reichen von 9 μ M (für die Thr-H γ -Protonen) bis 47 μ M (für die Val-H β -Protonen). Im Mittel wird ein K_D-Wert von 24.5 μ M bestimmt. Dies sind kleinere Werte als für die Liganden <u>I</u> und <u>II</u>, was mit den Ergebnissen der SPR-Untersuchungen zusammenpasst, wo ein K_D-Wert von 10.3 μ M für Ligand <u>VII</u> bestimmt wurde.

Proton	K _D -Wert [µM]
Naph-H4/5/8	12
Naph-H6/7	30
Naph-H1/3	16
Val-Hβ	47
Cyclohexyl-H4	35
Cyclohexyl-H3	23
Thr-Hγ	9
Val-Hγ	25

Tabelle 12: K_D-Werte individueller Protonen, bestimmt über die Angleichung der Datenpunkte einer STD-Titrationsreihe an das *one-site binding* Modell.

4.14 Design und Synthese einer zweiten Bibliothek

In einer zweiten Bibliothek sollte zunächst verifiziert werden, dass die optimale Linkerlänge zwischen Kernregion und Aromat tatsächlich drei Atome beträgt (Liganden <u>XVII</u> und <u>XVIII</u>, Abbildung 54). Anhand weiterer fünf Verbindungen sollte versucht werden, die Bindungsaffinität weiter zu steigern, indem die als günstig erkannten Teile der Liganden verknüpft werden. Dazu wurden die Liganden <u>XIX-XXIII</u> synthetisiert. Als Aktivator wurde diesmal TCTU verwendet, was zu Ausbeuten zwischen 2 und 6 % führte. Dies gleicht den Ausbeuten bei der Verwendung von TBTU.



Ligand <u>XX</u>



Ligand XXIII

Abbildung 54: Die Liganden XVII-XXIII, die als zweite Bibliothek synthetisiert wurden.

4.14.1 SPR Ergebnisse

Die Untersuchungen wurden nach dem etablierten Messschema vorgenommen. Es musste ein neuer CM5-Chip mit CD4 belegt werden, wobei eine geringere Aktivität bei höherer Belegung als beim zweiten Chip erreicht wurde (ca. 20 % aktives CD4, entsprechend 44 fmol). Bei den Messungen führten Pufferinjektionen wiederum zu Antworten, die den gemessenen RUs der Verbindungen abgezogen wurden. Bei den höheren Konzentrationen kam es meistens zu den schon früher beobachteten unspezifischen Antworten. Bis auf Ligand <u>XVIII</u> zeigen alle Verbindungen einen guten Fit nach dem *one-site binding* Modell (Abbildung 55). Die Verbindungen zeigen alle eine Bindung an CD4, nur konnten durch die Verknüpfung bisher günstiger Bausteine keine Verbesserung der Dissoziationskonstanten (vollständige Daten siehe Tabelle 13) erreicht werden.





Abbildung 55: *Steady State* SPR-Daten für die Verbindungen Ligand <u>XVII-XXIII</u>, gefittet nach dem *one-site binding* Modell.

Verbindung	$K_D [\mu M]$	Fehler	χ^2	Fit bis Konz.
Ligand XVII	105	33	8.3	100
Ligand XVIII	53	102.2	7.4	25
Ligand XIX	26	8.2	3.2	100
Ligand XX	13	3	14	500
Ligand <u>XXI</u>	20	15.2	9.3	50
Ligand XXII	62	29.7	12	50
Ligand XXIII	80	34.8	3.4	100

Tabelle 13: Nach dem *one-site binding* Modell berechnete K_D -Werte und Fehlerangaben für dieVerbindungen Ligand <u>XVII-XXIII</u>.

4.15 Vergleich Modelling/Biacore

Da das Design mit Hilfe des Dockings sehr erfolgreich war, sollte auch eine genauere quantitative Beziehung zwischen der berechneten Bindungsenergie im Docking und dem per SPR bestimmten Dissoziationskonstanten (siehe Tabelle 14) untersucht werden.

Verbindung	K _D -Wert	Bindungsenergie	
_	SPR	(Flexidock)	
	[µM]	[kcal/mol]	
Ligand <u>I</u>	39	-376	
Ligand <u>II</u>	20	-377	
Ligand <u>III</u>	27	-379	
Ligand <u>IV</u>	5.9	-388	
Ligand <u>V</u>	16	-379	
Ligand <u>VI</u>	13	-384	
Ligand <u>VII</u>	10	-372	
Ligand <u>VIII</u>	30	-400	
Ligand <u>IX</u>	26	-387	
Ligand <u>X</u>	146	-378	
Ligand <u>XI</u>	31	-344	
Ligand <u>XII</u>	16	-379	
Ligand <u>XIII</u>	26	-382	
Ligand XIV	55	-370	
Ligand <u>XV</u>	66	-373	
Ligand XVI	118	-353	
Ligand XVII	105	-376	
Ligand XVIII	53	-374	
Ligand XIX	26	-385	
Ligand XX	13	-375	
Ligand XXI	20	-381	
Ligand XXII	62	-382	
Ligand XXIII	80	-382	

Tabelle 14: Übersicht über die mit Flexidock berechneten Bindungsenergien und die mit SPR bestimmten K_D-Werte der einzelnen Liganden.

Eine Auftragung dieser beiden Parameter gegeneinander zeigt keine eindeutige Beziehung auf, obwohl ein Trend zu einer Korrelation zu erkennen ist (Abbildung 56).



Abbildung 56: Vergleich der Ergebnisse der mit SPR bestimmten K_D-Werte und den im Docking bestimmten Wechselwirkungsenergien. Gestrichelt eingezeichnet ist ein exponentieller Fit. Ein Zusammenhang ist nur sehr grob zu sehen. Die Fehlerbalken geben den *fitting* Fehler der aus den SPR-Experimenten bestimmten Daten an.

Probleme bei einer solchen Analyse resultieren vor allem aus der Ungenauigkeit der Daten. Die SPR-Daten haben zwei Fehlerquellen: Messfehler (Genauigkeiten des Geräts und der Handhabung) sowie die Varianz im Fit an das *one-site binding* Modell. Die berechneten Energien des Dockings beruhen auf einer Reihe von Vereinfachungen beim Erstellen des Systems, der Parametrisierung, der Eignung des Kraftfeldes sowie der Auslassung des Solvenz.

Bei den nicht so gut bindenden Liganden liegt die berechnete Bindungsenergie am oberen Ende des Bereichs der Liganden. Doch auch diese Liganden binden sowohl im Modelling als auch in der SPR-Untersuchung besser als die Leitstruktur <u>2</u>. Für einen genauen Zusammenhang zwischen den Energien im Modelling und den SPR-Daten wäre eine höhere Genauigkeit der Daten unverzichtbar.

4.16 Structure Activity Relationships (SAR)

Durch die vorliegenden Daten aus Docking, SPR und STD-NMR lassen sich einige Rückschlüsse auf eine Abhängigkeit von Struktur und Bindungseigenschaften ziehen. Wirklich quantitative Abhängigkeiten konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Der aromatische Rest scheint besonders günstig Wechselwirkungen eingehen zu können, wenn er 2'-substituiert ist oder mindestens ein Heteroatom enthält. Die Linkerlänge hat ihr Optimum bei drei Atomen; kürzere Linker bzw. Verbindungen, bei denen das *backbone* verkürzt wurde, sind deutlich ungünstiger. Längere Linker hingegen sind möglich, auf Grund der größeren Freiheitsgrade aber nicht so fest bindend wie die 3-Atom-Linker. Die Verkürzung des *backbones* schlägt sich auch in der schlechteren Bindungsenergie der Statine nieder. Der Cyclohexylrest zum Besetzen der hydrophoben Tasche, die normalerweise von Valin eingenommen wird, hat sich weder bei ACHPA noch beim Cyclohexylglycin bewährt. Dies steht nicht im Einklang mit den Ergebnissen von Heiko Möller, der diese Ersetzung positiv bewertete.

Es konnte kein genauer Zusammenhang zwischen dem K_D-Wert und der Molmasse bzw. dem Volumen des Isocyanatrestes festgestellt werden. Allgemein scheinen jedoch tertiäre Isocyanate die besten Bindungen einzugehen (*t*Butyl und Adamantyl sind besser als Cyclohexyl oder Cyclopentyl).

Obwohl in den NMR-Untersuchungen bei der Ersetzung des Prolinols durch Alaninol keine Rotamerengemische nachgewiesen werden konnten, und somit bei der gleichen Konzentration mehr bindungsfähige Teilchen der Ala-Variante vorhanden sind, zeigen diese Verbindungen zwar gute, aber nicht eindeutig bessere Interaktionen mit dem CD4 als die Prolinol enthaltenden Strukturen.

Es konnte auch kein Zusammenhang zwischen der Lipophilie der Liganden (die grob proportional zur Acetonitrilkonzentration sein sollte, die für die Elution von der C18-Säule gebraucht wird) und dem bestimmten K_D-Wert oder der berechneten Energie nachgewiesen werden. Dies kann so gedeutet werden, dass vorwiegend spezifische Wechselwirkungen stattfinden.

4.17 Modelling der Glycostrukturen

Struktur des nativen GP120



Abbildung 57: Struktur des nativen GP120 mit allen N-Typ Glycosylierungsstellen und den für die CD4-Bindung wichtigen Bereichen. In unmittelbarer räumlicher Nähe zum carboxyterminalen Ende der Leitstruktur NMWQKVGTPL <u>2</u> sitzt eine N-Typ Glycosylierungsstelle, deren Bedeutung für die Bindung bisher nicht untersucht wurde.

In direkter räumlicher Nähe zum peptidischen Bindungsepitop des GP120 befindet sich eine Komplex-Typ *N*-Glycosylierungsstelle. Welchen Einfluss diese Glycosylierung auf die CD4-GP120-Wechselwirkung hat, ist bisher nicht bekannt. Die Analyse der Röntgenstruktur zeigt, dass kein direkter Kontakt vom Kohlenhydrat zum CD4 stattfindet. Dennoch könnte die Glycosylierung einen Beitrag zur Bindung vom GP120 oder der Peptidomimetika zum CD4 leisten, z.B. durch Veränderung der Bindungskinetik oder auch der Bioverfügbarkeit. Der Kohlenhydratanteil unterschiedlicher, glycosylierter Glyco-Liganden kann dieselbe räumliche Stellung einnehmen wie die natürlichen Saccharidstrukturen (Modelling siehe Abbildung 58, Strukturen siehe Abbildung 59).



Abbildung 58: NMWQKV und TPLC(S-S)CN-GlcNAc (gelb) und die unnatürlich glycosylierten Peptidomimetika Glyco-Ligand <u>B</u> (magenta) und <u>C</u> an CD4 (cyan). Die Kohlenhydratreste nehmen dieselbe räumliche Struktur ein und haben einen potenziellen Einfluss auf die Bindung zum CD4.



Abbildung 59: Vergleich der Strukturen des GP120-Ausschnitts aus der Röntgenstruktur und den für das Modelling verwendeten Glyco-Liganden <u>A-C</u>. Gezeigt sind die mit GlcNAc ersetzten Verbindungen, theoretisch untersucht wurden auch die chitobiosylierten Strukturen (Glyco-Liganden <u>[c]A-[c]C</u>

Ein Docking dieser Strukturen an CD4 zeigt, dass die Kohlenhydrate auch hier keinen direkten Kontakt zum CD4 eingehen, trotzdem zeigen sowohl die GlcNAcersetzten als auch die chitobiosylierten Glyco-Liganden bessere Energien als die unglycosylierten Liganden (Glyco-Ligand **[u]A**, Ligand **I** und Glyco-Ligand **[u]C**) (siehe Tabelle 15). Bei den GlcNAc-Derivaten treten zwei interne Wasserstoffbrückenbindung auf; eine zwischen der 3-OH-Funktion des Zuckers und dem NH der Carbamatbindung, die andere zwischen der 4- und der 6-OH-Funktion des Zuckers (siehe Abbildung 60). Diese führen zu einer bevorzugten Konformation der Peptidomimetika und so zu guten Bindungsenergien. Den nichtglycoslyierten Verbindungen fehlen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen.



Abbildung 60: Der Glyco-Ligand <u>C</u> (nach Atomtyp eingefärbt) wird durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen (in magenta dargestellt, zwischen der 3-OH-Funktion des GlcNAc und der NH-Funktion des Carbamats sowie zwischen den 4- und 6-OH-Funktionen des GlcNAcs) bei der Bindung zum CD4 (türkis) in seiner Struktur stabilisiert.

Verbindung	Bindungsenergie		
	(laut Flexidock)		
	[kcal/mol]		
NMWQKVGTPL	- 322		
Glyco-Ligand [u] <u>A</u>	- 351		
Glyco-Ligand <u>A</u>	- 355		
Glyco-Ligand [c] <u>A</u>	- 351		
Ligand <u>I</u>	- 376		
Glyco-Ligand <u>B</u>	- 391		
Glyco-Ligand [c]B	- 394		
Glyco-Ligand [u]C	- 371		
Glyco-Ligand <u>C</u>	- 377		
Glyco-Ligand [c]C	- 379		

Tabelle 15: Vergleich der mit Flexidock bestimmten Bindungsenergien der glycosylierten und nichtglycosylierten Verbindungen.

4.18 Syntheseversuche

4.18.1 Substituierte Hydroxyprolinole

Die Synthese des mehrfach substituierten Hydroxyprolinols startet zweckmäßig mit dem billigen Edukt *trans*-4-Hydroxy-L-prolin **1**, dass schon die richtige Stereochemie aufweist. Die Syntheseplanung (siehe Abbildung 61) sah zunächst vor, die Aminofunktion des Hydroxyprolinols zu schützen und anschließend die Säurefunktion zum primären Alkohol zu reduzieren. Diese muss nun selektiv geschützt werden, bevor die sekundäre Alkoholfunktion verethert werden kann. Danach wird die *O*-Schutzgruppe abgespalten, das primäre OH zu einem Carbamat umgesetzt und der 1-Aminozucker an die freie Carboxylfunktion gekuppelt. Dessen freie OH-Funktionen werden acetyliert und die *N*-Schutzgruppe abgespalten. Die Boc-Schutzgruppe kann sauer hydrolysiert werden, während sich für die Tosyl-Schutzgruppe eine reduktive Spaltung mit Magnesium in Methanol anbietet. Das dies bei einem sekundären Amin funktioniert, konnte durch die N-Entschützung des Ts-Hyp-OTrt nachgewiesen werden (siehe S. 180). Der Zuckerbaustein wird dann an das durch Festphasensynthese zugängliche Peptid gekuppelt. Zum Schluss werden die Schutzgruppe entfernt.

Die ersten beiden Schritte laufen problemlos in sehr guten Ausbeuten ab. Als Aminoschutzgruppe wurden dabei sowohl Tosyl als auch Boc verwendet. Die Schützung der primären Alkoholfunktion und die Veretherung verursachten jedoch Schwierigkeiten. Um die primäre OH-Funktion zu tritylieren (<u>15</u> und <u>17</u>), wurden verschiedene Vorschriften versucht, die letztlich alle nicht zu befriedigenden Ergebnissen führten. Zunächst wurden 1.1 eq. Trt-Cl in DMF unter Zusatz von 0.1 eq DMAP und 1.1 eq. N(Et)₃ eingesetzt. Als weitere Lösungsmittel wurden Acetonitril und Pyridin verwendet, jedoch eignete sich Acetonitril gar nicht, und auch die Umsetzung in Pyridin verlief noch schlechter. Als weitere Variante wurde Tritylpyridinium Tetrafluoroborat als Tritylierungsreagenzien eingesetzt. Dies sah bei der Reaktionsverfolgung per DC vernünftig aus, doch die Abtrennung des als Nebenprodukt entstehenden Tritylalkohols und der HBF₄ gelang nur unter Ausbeuteverlust. Auch die Schützung mit 4-Methoxytrityl, die in der Literatur für das Enantiomer beschrieben ist, konnte nicht umgesetzt werden. Als Alternativen zu den Tritylschutzgruppen wurden zudem die Silylschutzgruppen TBDMS und TIPS eingesetzt. Während das TBDMS-Derivat nicht dargestellt werden konnte, wurde die TIPS-Verbindung <u>18</u> wiederum nur in schlechten Ausbeuten erhalten.

Die relativ geringen Mengen der Trityl-geschützten Verbindung sollten nun mit Bromessigsäure verethert werden. Diese Umsetzung konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, weder mit NaH in THF noch mit dem DMSO-Anion in DMSO als Basen.



Abbildung 61: Syntheseplanung auf dem Weg zu Glyco-Ligand <u>B</u>. Da <u>20</u> auf diesem Weg nicht zugänglich war, wurde die Synthese ohne Erfolg abgebrochen.

Die Schützung der primären Alkoholfunktion bereitete Probleme, da vermutlich die relativ voluminöse *N*-Schutzgruppe den Zugang zur primären OH-Funktion beeinträchtigte. Daher wurde versucht, auf diese Schutzgruppe zu verzichten, um <u>20</u>

direkt aus <u>13</u> oder <u>14</u> darzustellen. Wenn mit einer sehr starken Base beide Hydroxylfunktionen deprotoniert werden können, dann sollte die sekundäre Hydroxylfunktion nucleophiler sein als die primäre. Man erwartet zumindest ein Gemisch aus drei verschiedenen Verbindungen; die jeweils einfach an der primären bzw. sekundären OH-Funktion veretherten Hydroxyprolinole und das doppelt substituierte Produkt. Bei der Reaktionsverfolgung erscheinen wie erwartet im DC auch drei Spots mit höherer Polarität als die Ausgangsverbindung, doch nach der chromatographischen Reinigung konnte das gewünschte Produkte nicht erhalten werden.

4.18.2 Versuch der Synthese von Glyco-Ligand <u>C</u>

Da die Synthese der Carboxymethoxy substituierten Prolinole nicht gelang, wurde versucht, das im Modelling etwas schlechter bindende Glutamolderivat zu synthetisieren (siehe Abbildung 62). Ausgehend vom Fmoc-Glu(*t*Bu)tamol, wird zunächst die freie OH-Funktion zum Carbamat umgesetzt. Anschließend wird die Carboxylfunktion entschützt und der Zucker eingeführt. Die freien OH-Funktionen des GlcNAcs werden mit Ac₂O acetyliert und die Aminofunktion entschützt. Nun sollte in einer Blocksynthese die Vorstufe **29** dargestellt werden. Die Synthese wurde bis zu diesem Schritt ohne Aufreinigung der Zwischenprodukte durchgeführt, alle Zwischenprodukte und der Verbrauch der Edukte jedoch per MALDI-TOF-MS nachgewiesen. Da die Block-Kupplung in DMF als Lösungsmittel nicht gelang, wurden *N*-Methylpyrrolidon und DMSO als Alternativen ausprobiert. Auch in diesen Lösungsmitteln konnte keine Reaktion beobachtet werden.



Abbildung 62: Synthese des Glycopeptidomimetikums Glyco-Ligand C

Da die Blocksynthese nicht funktioniert, wäre eine Festphasensynthese anzudenken. Dazu würde nach der Kupplung des Zuckers über eine der OH-Funktionen des Kohlenhydrats an ein Harz gekoppelt (z.B. 2'-Chloro-Tritylharz) und die anderen OH-Funktionen acetyliert. Dann kann eine Peptidsynthese durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Ausgehend von dem CD4-bindenden Dekapeptid NMWQKVGTPL <u>2</u> wurden in dieser Arbeit peptidomimetische Strukturen entworfen, synthetisiert und analysiert, die deutlich bessere pharmakologische Eigenschaften als die Leitstruktur besitzen. Die dargestellten Peptidomimetika weisen bessere Dissoziationskonstanten, höhere Proteolysestabilität sowie ein geringeres Molekulargewicht auf.

Zunächst wurde überprüft, ob das Programm Flexidock in der Lage ist, die Bindung von Peptiden und Peptidomimetika an CD4 korrekt vorherzusagen. Dazu wurde ein *in silico* Alanin-Scan durchgeführt, bei dem jede Aminosäure des NMWQKVGTPL **2** nacheinander durch Alanin ersetzt und die neue Bindungsenergie bestimmt wurde. Die Aussagen über an der Bindung beteiligte Aminosäuren und unbeteiligte Aminosäuren deckten sich dabei mit den Ergebnissen eines STD-NMR *epitope mappings*. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Templat entworfen, in dem nichtbindende Strukturen entfernt, die bindenden Teile des Peptids erhalten oder konservativ ersetzt, sowie peptidomimetische Ersetzungen eingeführt wurden. Die Peptidomimetika haben mit MG = ~ 800 g/mol eine deutlich geringere Molmasse als das Leitpeptid (1200 g/mol) und sie zeigen im Modelling eine deutlich bessere Bindung zum CD4.

Der erfolgreiche Synthesezugang zu diesen Verbindungen lief zum Teil an der festen Phase, zum Teil in Lösung ab. Zunächst wurde an einen Aminoalkohol, der an ein 2'-Chlorotritylharz gebunden war, mit einer Fmoc-Peptidsynthese eine Reihe von Amidbindungen geknüpft. Anschließend wurde von der festen Phase abgespalten, wobei die Seitenkettenschutzgruppen erhalten blieben. Die primäre Hydroxylfunktion konnte dann selektiv unter Kupfer(I)-Katalyse mit Isocyanaten Anschließend wurden Carbamat umgesetzt werden. die restlichen zum Schutzgruppen abgespalten und das Produkt per RP-HPLC gereinigt. Die zwei ersten synthetisierten Liganden I und II zeigten mit KD-Werten von 40 und 20 µM (SPR) bzw. von ca. 31 und 45 μ M mit STD-NMR im Gegensatz zu einem K_D = 6 mM der Leitstruktur eine deutlich bessere Bindung zum CD4 als das ursprüngliche
Peptid. Sie haben eine 4-5 mal höhere Proteolysestabilität in einem Pronaseverdau. Das STD-NMR *epitope mapping* zeigte zudem, dass die Peptidomimetika einen vergleichbaren Bindungsmodus zum CD4 wie das Dekapeptid besitzen.

Die Synthesestrategie erlaubt den einfachen Zugang zu weiteren Verbindungen. Um Substanzen mit noch besserer Bindungsaffinität zu erhalten sowie Struktur-Aktivititäts-Beziehungen zu finden, wurden 16 Peptidomimetika mit Ersetzungen einzelner Bausteine parallel synthetisiert. Sie wurden mit MALDI-TOF und 2D-NMR-Experimenten vollständig charakterisiert und mit SPR auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Dabei wurden Verbindungen mit KD-Werten von 6 bis 146 µM gefunden. Die beste Verbindung (Ligand IV) bindet also 1000 mal besser als die Leitstruktur. In einer weiteren Parallelsynthese wurden fünf Peptidomimetika hergestellt, die vorher als günstig identifizierte Bausteine miteinander verknüpfen sollte. Es wurden Verbindungen mit K_D-Werten von 11 bis 120 µM erhalten (SPR). Die Verknüpfung günstiger Bausteine führte also nicht zu einer weiteren Verbesserung der Dissoziationskonstanten.

Die Peptidomimetika mit einer Prolinoleinheit zeigen ein Gleichgewicht zwischen den *cis-* und *trans-*Konformeren an der Threonin-Prolinol-Amidbindung. Modelling und analytische Daten zeigen, dass die *trans-*Konformation stabiler ist und auch besser an CD4 bindet. Eine Stabilisierung dieser *trans-*Konformation wäre ein wichtiger Schritt in der weiteren Entwicklung dieser Substanzklasse.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der von Flexidock berechneten Bindungsenergie und den im SPR bestimmten Dissoziationskonstanten konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl ein Trend erkennbar ist.

Die Bedeutung einer im GP120 dem bindenden Dekapeptid räumlich benachbarten Glycosylierungsstelle wurde in dieser Arbeit mit *molecular modelling* näher untersucht, da die Synthese der Glycopeptidmimetika erfolglos blieb. Obwohl der Kohlenhydratrest keinen direkten Kontakt zum CD4 eingehen kann, zeigen alle Peptide und Peptidomimetika, die an einer vergleichbaren Stelle eine Glycosylierung aufweisen, einen besseren Kontakt als die nichtglycosylierten Vergleichssubstanzen. Die glycosylierten Substanzen haben intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, die anscheinend die bindende Konformation energetisch bevorzugen.

6 Summary

Starting with the CD4 binding peptide NMWQKVGTPL **2**, peptidomimetic structures have been designed, synthesized and analyzed. All have better pharmacological properties than the lead. In detail, these compounds have better dissociation constants, a higher proteolytic stability and a lower molecular weight.

First of all, it was tested if the program Flexidock can be used to calculate the binding energies of peptides and peptidomimetics binding to CD4. Therefore, an in silico alanine scan was conducted, replacing each amino acid of NMWQKVGTPL <u>2</u> subsequentially with alanine and calculating the binding energies. The results of this matched with the findings of a STD epitope mapping.

These data resulted in the design of a template for the peptidomimetics. All non binding subunits were removed, while keeping or replacing conservatively the binding parts and introducing peptidomimetic replacements. With a MW = ~800 g/mol, the peptidomimetics have a lower molecular weight than the lead (MW =~1200 g/mol) and they show a lower calculated binding energy.

The synthesis of the compounds is partially a solid phase and partially a solution phase synthesis. It starts with an amino alcohol bound to a 2'chloro trityl resin, to which several subunits are coupled, using a Fmoc protocol to form the amide bonds. Afterwards, mild acid treatment results in cleavage from the resin, retaining all side chain protecting groups. The primary hydroxyl function is reacted with an isocyanate to give a carbamate. At last, the side chain protecting groups were removed and the product is purified on a RP-HPLC.

The two synthesized compounds \underline{I} and \underline{II} showed K_D-values of 40 and 20 μ M (SPR) and 31 and 45 μ M (STD), respectively, much stronger binding to CD4 than the lead (K_D = 6 mM). They have a 4-5 times longer half-life in a proteolytic pronase digestion assay. The STD epitope mapping shows a similar binding mode of the peptidomimetics and the lead.

The design concept allowed an easy access to similar compounds. To improve on the binding affinity and to get structure acitivity relationship information, 16

peptidomimetics with single substitutions have been synthesized in parallel. The compounds were fully characterized with MALDI-TOF-MS and 2D-NMR experiments. SPR analysis shows K_D -values of 6 to 146 μ M for these compounds, the best (Ligand <u>IV</u>) having a 1000 fold lower dissociation constant than the lead. Furthermore, 5 compounds combining the best subunits have been synthesized in parallel. They have K_D -values of 11-120 μ M, not showing a further increase in binding affinity.

The peptidomimetics containing a prolinol subunit show a equilibrium between two conformers, differing at the threonine prolinol amide bond (*cis* and *trans* conformations). Modeling and analytical data show the trans form to be more stable and to bind better to CD4. The stabilization of the *trans* form will be an important task for the further development of these substances.

A direct correlation between the binding energies calculated by Flexidock and the dissociation constants determined by SPR could not be found. However, the general trend of a correlation can be seen.

The importance of a glycosylation site in GP120, directly neighbouring the binding decapeptide was clearified with molecular modelling, since the synthesis of the glycopeptidomimetics could not be finished. While the saccharide is not showing any direct contact to CD4, all glycosylated peptides and peptidomimetics show a better calculated binding energy than the corresponding nonglycosylated compounds. This is due to the structure stabilizing effect of the saccharide, mediated via hydrogen bonds.

7 Experimenteller Teil

7.1 Geräte und Methoden:

- NMR

Die NMR Spektren wurden auf Bruker AMX400, DRX 500 bzw. Avance 700 (mit Cryo-Probenkopf) Spektrometern aufgenommen. Mit der Software XWINNMR (Version 3.1, Fa. Bruker) wurden die Spektren auf Silicon Graphics Workstations (O2, Octane bzw. Octane2) prozessiert, die Basislinien korrigiert, integriert, kalibriert und ausgewertet.

- SPR

Die SPR Messungen wurden im AK Prof. Peters in Lübeck an einem Biacore 3000 durchgeführt. Zusätzlich wurden zwei Liganden an einem Biacore S51 vermessen. An beiden Geräten wurde ein CM5-Chip der Firma Biacore verwendet und als Probenpuffer der HBS-EP-Puffer der Firma Biacore verwendet.

- MALDI-TOF-MS

MALDI-Spektren wurden an einem Bruker Biflex III (Bruker Daltronics) im Reflektions-Modus aufgenommen.

- LC-ESI Messungen und analytische HPLC

Für LC-ESI-Messungen und analytische HPLC-Läufe wurden die jeweiligen Proben über das Agilent HPLC Series 1100 System der Firma Agilent, Waldbronn, mit einer CC 250/2 mm NUCLEOSIL 100-5 µM C18-Säule, Volumen 900 µL, der Firma Macherey und Nagel, Düren, gegeben. Für die Massenspektren wurde das HP59987A API-Electrospray LC/MS Interface von Hewlett-Packard, Böblingen, als Ionenquelle verwendet, während die Spektren selbst am HP5989B MS Engine Massenspektrometer von Hewlett-Packard, Böblingen, aufgenommen wurden.

- Präparative HPLC

Alle präparativen HPLC-Reinigungen wurden mit dem BioCad Sprint Perfusions Chromatography System der Firma PerSeptive Biosystems, Wiesbaden, durchgeführt. Als Säule diente eine ET 250/4 mm NUCLEOSIL 100-5 μ M C18-Säule, Volumen 3.142 mL der Firma Macherey und Nagel, Düren, Artikel-Nr. 720014. Als Laufmittel wurden 5% MeCN/H₂O + 0.1 % TFA (A) und 95% MeCN/H₂O + 0.1 % TFA (B) verwendet.

- Modelling

Alle Modelling und Docking Experimente wurden mit dem Programmpaket Sybyl 6.8 und 6.9 (Tripos) auf Octane bzw. Octane2 Workstations von Silicon Graphics durchgeführt

- Zentrifugen

Nicht proteinhaltige Proben wurden bei Raumtemperatur in einer Centrifuge 5415C von Eppendorf, Hamburg, zentrifugiert; proteinhaltige Proben bei 6 °C in einer Laborzentrifuge 2K15 der Firma Sigma, Deisenhofen.

- Automatisierte Synthesen

Für die Festphasensynthese wurde im Allgemeinen das automatische Pipettiersystem ACT 496 Ω der Firma Advanced Chemtech, Giessen, verwendet. Eine Synthese wurde an dem Durchflusssynthesizer Pioneer Peptide Synthesis System der Firma PerSeptive Biosystems, Wiesbaden, durchgeführt.

- Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase wurde ein mit Fluoreszenzmarker durchsetztes Kieselgel 60 auf einer Aluminiumfolie verwendet. Die Spots wurden sichtbar gemacht durch UV-Licht, Iodkammer oder Tauchbäder und anschließendem Anwärmen. Das Schwefelsäure-Tauchbad bestand aus 10 % H₂SO₄ in EtOH, das Kaliumpermanganat-Tauchbad aus 5% KMnO₄ in 5% H₂SO₄, das Anisaldehyd-Tauchbad aus EtOH:AcOH:H₂SO₄:Anisaldehyd 100:1:3:4

7.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen.

Lancaster

Bortrifluorid-Diethyletherat Komplex, *tert.*-Butylisocyanat Cyclohexylisocyanat, Cyclopropylisothiocyanat, Di-*tert.*-butyloxydicarbonat, Ethyl-(2-isocyanato)acetate, *trans-*4-Hydroxy-L-prolin Iodethanol, Kupfer(I)-chlorid, (2'-Naphthyl)-3thiopropionsäure, Natriumborhydrid, Natriumhydrid (60% in Paraffin), 4-Toluensulfonylchlorid Triisopropylsilan, Triisopropylsilylchlorid

-ACT

Chlormethyliertes Polystyrolharz (Merrifield-Harz), Prolinol-2'-chlorotritylharz, Alaninol-2'-chlorotritylharz, H-Thr(But)-2'-chlorotritylharz, alle Aminosäurederivate

-Sigma

6-Hydroxy-4-methylcumarin, Boc-L-prolin

-Fluka

Amberlyst A21, Calciumchlorid, Diethylether, Dimethylsulfoxid, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, trans-4-Hydroxy-L-prolinmethylester Hydrochlorid, Iodessigsäure, Methanol, N-Acetyl-D-glucosamin, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, 4-Pentensäure, Pyridin, TBTU, Tetrahydrofuran, Tritylchlorid

-Merck

Ammoniumhydrogencarbonat, Anisaldehyd, Acetanhydrid, Bromessigsäure, Dichlormethan, Diiospropylethylamin, 4-(*N*,*N*-Dimethylamino)pyridin, DSS, 8-Hydroxychinolin, Kaliumchlorid, Kaliumhydroxid, Essigsäureethylester, Kaliumpermanganat, Kieselgel G60, 18-Krone-6, Magnesium sulfat-Hydrat, 1Naphthol, (2'-Naphthyloxy)essigsäure, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Natriumiodid, Palladium-Kohle, Phenol, 2-Propanol,Salzsäure 37%, Schwefelsäure 95-97%, *tert*-Butyldimethylsilylchlorid, Triethylamin, Trifluoressigsäure, Zitronensäure

-Iris Biotech TCTU

-BIE Chloroform, Toluol

-HAL Petrolether

-Proligo N,N-Dimethylformamid

-Baker Acetonitril

-Aldrich

1-Adamantylisocyanat, Glycolaldehyd Dimer, Hydroxyaceton Dimer, Kalium-*tert*butylat, (2'-Naphthyl)essigsäure ,Tritylpyridinium Tetrafluoroborat

- PE Biosystems Piperidin 20 % Lösung in DMF

- BFB Ethanol - Biacore Acetatpuffer, Ethanolamin, HBS-EP Puffer, N-Hydroxysuccinimid

- Deutero GmbH DCl-Lösung, DCl, D₂O, MeOH-d4

- Linde Stickstoff, Wasserstoff

7.3 SPR-Experimente

Sämtliche SPR Experimente wurden an einem Biacore 3000 Gerät mit CM5-Chips durchgeführt. Für die Immobilisierung des sCD4 wurde die handelsübliche Lösung von 1 mg/mL (ca. 2.2 μ M) in einem Acetatpuffer, pH 4.5, verdünnt, so dass eine Konzentration von 50 mg/L (0.9 μ M) resultierte und über die mit NHS und EDC aktivierte carboxymethylierte Dextranmatrix gegeben. Die Referenzzelle wurde direkt nach der Aktivierung, die anderen Zellen nach der Belegung mit CD4 für 900 s mit Ethanolamin gecappt (alles bei einer Flussrate von 5 μ L/min). Die Aktivität des immobilisierten CD4 wurde durch die Vermessung mit GP120 verifiziert. Dieses wurde in einer Konzentration von 250 nM (Flussrate 15 μ L/min, Assoziationszeit: 11 min) über den Chip gegeben, und die Bindungskurve mit dem Programm BiaEvaluation analysiert. Die Daten für die Belegung der Chips sind zur besseren Übersicht in den Tabellen 16-18 zusammengefasst:

Flusszelle	Aktivierungszeit	Belegungszeit	Belegung	% Aktivität	Aktives
					CD4 (Imol)
Fc1	1200 s	-(Referenz)	-	-	-
Fc2	1200 s	480 s	6200 RU	10 %	11 fmol
Fc3	1200 s	480 s	6000 RU	8 %	9 fmol
Fc4	1200 s	120 s	1500 RU	8 %	2 fmol

Tabelle 16: Belegung des 1. CM5 Chips mit CD4 (durchgeführt von J. Wülfken und H. Möller). Zur Auswertung wurden später die Kurven der Fc2 verwendet.

Flusszelle	Aktivierungszeit	Belegungszeit	Belegung	% Aktivität	Aktives
	_				CD4 (fmol)
Fc1	900 s	-(Referenz)	-	-	-
Fc2	900 s	480 s	5330 RU	50 %	48 fmol
Fc3	720 s	480 s	5800 RU	50 %	53 fmol
Fc4	480 s	480 s	5790 RU	50 %	53 fmol

Tabelle 17: Belegung des 2. CM5 Chips mit CD4. Zur Auswertung wurden später die Kurven der Fc3 verwendet.

Flusszelle	Aktivierungszeit	Belegungszeit	Belegung	% Aktivität	Aktives
					CD4 (fmol)
Fc1	900 s	-(Referenz)	-	-	-
Fc2	900 s	480 s	11800 RU	20 %	43 fmol
Fc3	720 s	480 s	12200 RU	20 %	44 fmol
Fc4	480 s	480 s	10150 RU	20 %	37 fmol

Tabelle 18: Belegung des 3. CM5 Chips mit CD4. Zur Auswertung wurden später die Kurven der Fc3 verwendet.

Ein Messzyklus wurde folgendermaßen duchgeführt: Zunächst wurden 30 µL extra KINJECT, abgefüllter Puffer injiziert (Befehl Assoziationszeit: 120 s, Dissoziationszeit: 60 s), anschließend eine Minute gewartet, dann 30 µL Probenlösung wie der Puffer injiziert und nach einer weiteren Warteminute zwei Pulse (je 32 s, Befehl QUICKINJECT) 100 mM Phosphorsäure zur Regeneration über den Chip gegeben. Die Messreihen der einzelnen Peptidomimetika wurde beginnend mit der kleinsten Konzentration in Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurden jeweils folgende Konzentrationen vermessen: 2 µM, 4 µM, 6 µM, 8 µM, 10 µM, 12 µM, 15 μM, 20 μM, 25 μM, 30 μM, 50 μM, 100 μM, 500 μM und 1 mM.

7.4 STD-Titrationsexperimente

Ansetzen der Proben:

200 µg CD4 (4.4 nmol) in 200 µL PBS-Puffer wurden durch Verdünnen und Membranzentrifugation in einen deuterierten PBS-Puffer umgepuffert, so dass 250-300 µL Lösung erhalten wurden (genau bestimmt durch Abwiegen). Der D₂O-STD-Titrationspuffer enthält 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, 3 mM KCl und 6 mM NaN₃ und wurde auf pH = 7-7.5 (unkorrigiert) eingestellt. Die Lösung wurde in zwei Hälften geteilt und jeweils 5 μ L 1 mM DSS-Lösung in D₂O zugesetzt. Anschließend wurden die Lösungen auf 250 μ L mit PBS-Puffer aufgefüllt, der in einem Fall zusätzlich den zu vermessenden Liganden in erwünschter Konzentration enthielt. So wurden zwei NMR-Proben mit der gleichen Menge Protein und Standard erhalten, einmal ohne Ligand, und einmal mit der höchsten zu vermessenden Konzentration. Diese wurden in Shigemi-Röhrchen überführt, vermessen und dann wurde durch Kreuztitration die nächsten zu vermessenden Ligandkonzentrationen erreicht.

Messung der Proben

Durch Vermessung der Liganden im Titrationspuffer ohne CD4 wurden die *on resonance* Einstrahlpunkte ermittelt (der Einstrahlpunkt wurde so gewählt, dass evtl. auftretende Artefakte <<1 rel. STD % blieben. Sie waren bei Ligand <u>I</u> –0.25 ppm (500 MHz Spektrometer), bei Ligand <u>II</u> –1 ppm und bei den Liganden <u>IV</u> und <u>X</u> -1.5 ppm (alle 700 MHz Spektrometer). Die Anzahl der scans des Referenzspektrums und des STD Spektrums wurden dem Spektrometer und der Konzentration angepasst (bis zu 37 k scans für die niedrigste Konzentration des Liganden <u>I</u> am 500 MHz Spektrometer für das STD-Spektrum). Der *off resonance* Einstrahlpunkt wurde auf +40 ppm (500 MHz) bzw. +28.6 ppm (700 MHz) gesetzt.

Auswertung

Die 1D ¹H-NMR-Spektren wurden mit einer spektralen Weite von 12.0223 ppm (500 MHz) bzw. 10.0021 ppm (700 MHz) und 32 k Datenpunkten aufgenommen und vor der Fourier-Transformation auf 64k mit Nullen aufgefüllt. Durch Multiplikation des FID mit einer Exponentialfunktion (Linienverbreiterung um 5 Hz) wurde eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses erreicht und anschließend die Phase korrigiert. Mit einem Spinlock-Puls (Länge 30 ms (500 MHz) bzw. 15 ms (700 MHz), Abschwächung 20 dB (500 MHz) bzw. 12 dB (700 MHz)) als T1*p*-Filter wurde die Unterdrückung der Proteinresonanzen erreicht. Die Phasenzyklen der STD-NMR-Experimente wurden so gewählt, dass die Subtraktion zur Bildung der

Differenzspektren jeweils alternierend nach jedem Scan erfolgte. Dadurch werden Subtraktionsartefakte aufgrund von Temperatur- oder Magnetfeldinhomogenitäten minimiert. Die *on-* und *off resonance* Frequenz der Vorsättigung wechselt nach jedem Scan. Die STD-Experimente wurden mit WATERGATE Wasserunterdrückung aufgenommen. Um den prozentualen STD-Effekt bzw. den STD-Amplifikations-Faktor zu bestimmen, wurde bei jedem Ligandüberschuss ein Referenzexperiment unter identischen Konditionen aufgenommen, d.h. mit derselben Repetitionsdauer und einem Spinlock-Puls gleicher Länge. Die zu vergleichenden NMR-Experimente wurden mit den gleichen Parametereinstellungen prozessiert. Die Integrale wurden über den Dual-Display Modus in XWINNMR miteinander verglichen. Zur genauen Bestimmung der Konzentration des Liganden wurde das Signal des 20 µM DSS im ¹H-Presat integriert und mit den Protonen der Aromaten verglichen. Die Messungen wurden bei 285 K durchgeführt.

7.5 Synthesen

7.5.1 AAV 1: Festphasensynthese

Der Festphasenteil der Synthese wird zweckmässig in einem Parallelsynthesesystem automatisiert durchgeführt. Die manuelle Synthese erfolgt analog in einer Glassäule mit Frittenboden. Das mit einem Aminoalkohol belegte 2'-Chlorotritylharz wird zunächst in DMF gequollen. Anschließend wird die Amidbindung in einer 3x120 Minuten Dreifachkupplung geknüpft, wobei ein vierfacher Überschuss an Carbonsäure (0.5 M Lösung in DMF) und je ein fünffacher Überschuss Aktivator (TBTU oder TCTU, 0.5 M) und DIPEA (1 M) zugesetzt wird und nach jedem Kupplungsschritt das Harz mit 5x1 mL DMF gewaschen wird. Das Cappen der nicht umgesetzten Aminofunktionen erfolgt mit 1 mL einer 10 Vol % Lösung von Ac₂O in DMF für zweimal zehn Minuten. Anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe durch Schütteln mit 20 % Piperidin in DMF abgetrennt und das Harz erneut gewaschen. Danach folgt die Kupplung der nächsten Aminosäure. Nach Kupplung der Arenoxycarbonsäure wird das Harz mehrere Male mit DMF und anschließend mit 2-Propanol, DCM und wieder 2-Propanol (je 1 mL) gewaschen und im Stickstoffstrom für 15 Minuten getrocknet. Das Harz wird zum Überführen in einer Mischung aus DMF und DCM 1:1 aufgeschlämmt und kann dann mit einer 1 mL Eppendorfpippette pipettiert werden.

7.5.2 AAV 2: Abspaltung vom 2'-Chlorotritylharz

Das Harz wird in einer Lösung bestehend aus 1880 µL Dichlormethan, 20 µL TFA und 100 µL TIPS für eine Stunde in einer Fritte geschüttelt, abgesaugt und das Harz mit der gleichen Lösung gewaschen. Die Lösung wird daraufhin dreimal mit einer Natriumacetatlösung geschüttelt, die wäßrigen Lösungen zweimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen eine Stunde mit einer großen Spatelspitze Anionentauscher Amberlyst A-21 geschüttelt. Es wird abfiltriert, der Anionentauscher mit Dichlormethan gewaschen und die Lösung über MgSO₄ getrocknet. Anschließend wird das Dichlormethan am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird per MALDI charakterisiert.

7.5.3 AAV 3: Knüpfung der Carbamatbindung

In einem kleinem Rundkolben werden folgende Lösungen gemischt:

1 eq einer frische (!) Lösung/Suspension von CuCl in DMF (3mg / 75 µL)

1 eq Peptid (laut Ansatzgröße) in DMF

1 eq Isocyanat

und eine Stunde geschüttelt. (Grünfärbung) Anschließend wird mit Dichlormethan verdünnt und mit 5% iger NH₄HCO₃-Lösung 3x ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird per MALDI charakterisiert

7.5.4 AAV 4: Schutzgruppenabspaltung

In einem 10 mL Rundkolben werden das Peptidomimetikum mit einer Lösung aus 1.9 mL TFA, 100 μ L TIPS und 40 μ L Wasser versetzt und das Gemisch für eine Stunde geschüttelt. Anschließend werden die Lösungsmittel an einer Ölpumpe entfernt, 3 mL Wasser zugegeben und lyophylisiert.

7.5.5 AAV 5: Reinigung der Peptidomimetika per HPLC

Für die HPLC werden die Laufmittel C (95 % H₂O, 5% Actonitril, 0.1 % TFA) und D (95 % Acetonitril, 5 % H₂O, 0.1 % TFA) verwendet. Die Peptide werden in 1 mL einer 20 % Lösung von D in C suspendiert und für 15 min ultrabeschallt. Anschließend wird die Lösung durch einen Zentrifugenfilter zentrifugiert und auf die Säule gegeben. Gradientenverlauf: Start bei 20 % D (wird für 1 CV beibehalten), Gradient auf 50 % D (innerhalb von 1 CV), weiter auf 75 % D (innerhalb von 3 CV), auf 100 % D (innerhalb von 0.5 CV), was noch 1.5 CV beibehalten wird. Die Peptidomimetika eluieren i.A. bei 50-65 % D.

7.5.6 Darstellung und Charakterisierung der Peptidomimetika

7.5.6.1 <u>Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-{(2S, 3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester (Ligand I):</u>



MG $(C_{41}H_{61}N_7O_9) = 795.98 \text{ g/mol}$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (verwendet als)	Einwaage/Verbrauch
β-NOA(0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	506 mg / 2.16 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle: Chemikalienverbrauch bei der Synthese von Ligand I.

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 923 und 955 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol in 25.3 mg (34%) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 827 (M+H⁺), 849 (M+Na⁺), 865 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 952 (M+H⁺), 974 (M+Na⁺), 990 (M+K⁺). Rohausbeute: 17.1 mg (67.5 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>I</u> wurde bei 59.6 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 3 mg (3.8 µmol, 5 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 796 (M+H+), 818 (M+Na+), 834 (M+K+).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 290 K, pH = 2, H_2O/D_2O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.88 ppm und Aceton-CH₃ = 30.1 ppm.

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	sonstige
β-NOA					H1: 7.264, H3: 7.311, H4: 7.916, H5:
-					7.904, H6: 7.462, H7: 7.549, H8:
					7.849, O-CH ₂ : 4.86
Lys	8.521	4.466	1.772	1.165	Ηδ: 1.492, Ηε: 2.613,
					NH-Z: 7.45
Val	8.297	4.068	1.997	0.888	
Gly	8.607	3.96			
Thr	8.041	4.539	4.028	1.132	
Prolinol		4.247	2.029/1.902	1.984/1.886	Ηδ/ δ': 3.745/3.596, Η1: 3.966
Cyclohexyl	6.841				H1: 3.28, H2/2': 1.781/1.692, H3/3':
					1.54/1.115, H4:1.25

Tabelle 19: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>I</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΟΑ				C1: 107.158, C3: 118.437, C4: 127.608, C5: 127.706, C6:
-				124.616, C7: 126.97, C8: 126.921
Lys	52.983	32.421	21.841	Cδ: 26.19, Cε: 39.155
Val	59.866	29.912	18.154	
Gly	42.289			
Thr	57.449	67.241	21.798	
Prolinol	64.086	23.764	26.608	Cδ: 48.189, C1: 64.127
Cyclohexyl				C1: 50.074, C2/6: 30.372, C3/5: 24.81, C6: 24.559

Tabelle 20: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>I</u> (bestimmt aus dem HSQC). Daten für die Carbonyl-Kohlenstoffe und andere quartäre Kohlenstoffe können nicht angegeben werden, da nur HSQC-Spektren aufgenommen und ausgewertet wurden.

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	sonstige
β-ΝΟΑ					n.b.
Lys	8.561	4.466	1.747	1.153	Ηδ: 1.492, Ηε: 2.608,
					NH-Z: 7.45
Val	8.187	4.125	2.027	0.879	
Gly	8.522	3.986			
Thr	7.938	5.055	4.091	1.163	
Prolinol		4.333	2.029/1.902	1.984/1.886	Ηδ/ δ': 3.745/3.596, Η1: 3.966
Cyclohexyl	6.499				H1: 3.219, H2/2': 1.759/1.651,
					H3/3': 1.534/1.093, H4:1.23

Tabelle 21: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>I</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten keine Werte bestimmt werden.

7.5.6.2 <u>((S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-Amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-</u> acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-butyrylamino)-acetylamino]-3hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethoxycarbonylamino)-acetic acid ethyl ester (Ligand II):



MG ($C_{39}H_{57}N_7O_{11}$) = 799.93 g/mol

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage/Verbrauch
β-NOA / (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in	506 mg / 2.16 mL
DMF)	
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in	368 mg / 2.16 mL
DMF)	
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 22: Chemikalienverbrauch bei der Festphasenynthese eines Teils von Ligand II.

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 923 und 955 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol in 25.6 mg (36 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 827 (M+H⁺), 849 (M+Na⁺), 865 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Ethyl-(2-Isocyanato)acetat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 956 (M+H⁺), 978 (M+Na⁺), 994 (M+K⁺). Rohausbeute: 19 mg (62 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>II</u> wurde bei 66.5 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 4.5 mg (5.6 μ mol, 6 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 800 (M+H+), 822 (M+Na+), 838 (M+K+).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 290K, pH = 2, H₂O/D₂O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.88 ppm und Lys-Ce = 38.567.

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	sonstige
β-ΝΟΑ					H1: 7.264, H3: 7.304, H4:
					7.915, H5: 7.905, H6: 7.46, H7:
					7.543, H8: 7.848, O-CH ₂ : 4.854
Lys	8.523	4.454	1.746	1.149	Ηδ: 1.482, Ηε: 2.605,
					NH-Z: 7.409
Val	8.284	4.082	1.997	0.889	
Gly	8.594	3.966			
Thr	8.039	4.547	4.047	1.158	
Prolinol		4.263	2.034/1.91	2.004/1.917	Ηδ/δ': 3.761/3.645, Η1/1':
					4.371/4.065
Ethoxycarbonylmethyl	7.343				N-CH ₂ : 3.862, O-CH ₂ : 4.177,
					CH ₃ : 1.232

Tabelle 23: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>II</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-NOA				C1: 106.579, C3: 117.979, C4: 127.28, C5: 127.203, C6:
-				124.163, C7: 126.478, C8: 126.443, O-CH ₂ : 66.162
Lys	52.54	29.823	26.664	Cδ: 26.571, Cε: 38.567
Val	59.368	29.356	17.463	
Gly	41.82			
Thr	56.931	64.1	17.956	
Prolinol	56.065	23.913	26.651	Cδ: 48.296, C1: 64.552
Cyclohexyl				N-CH ₂ : 41.949, O-CH ₂ : 62.031, CH ₃ : 12.767

Tabelle 24: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>II</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	sonstige
β-NOA					
Lys	8.549	4.439	1.741	1.142	Ηδ: 1.489, Ηε: 2.595, NH-Ζ: 7.409
Val	8.203	4.099	1.991	0.866	
Gly	8.506	3.982			
Thr	7.941	5.018	4.064	1.164	
Prolinol					
Cyclohexyl	7.035				N-CH ₂ : 3.862

Tabelle 25: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>II</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten keine Werte bestimmt werden.

7.5.6.3 <u>Cyclopropyl-thiocarbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester (Ligand III):</u>

$$H_2$$

 H_2
 H_3
 H_3

MG ($C_{38}H_{55}N_7O_8S$) = 769.97 g/mol

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	506 mg / 2.16 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 26: Einwaagen bei der Synthese von Ligand III

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 923 und 955 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol.

MALDI-TOF-MS: m/z = 827 (M+H⁺), 849 (M+Na⁺), 865 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclopentylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 938 (M+H⁺), 960 (M+Na⁺), 976 (M+K⁺).

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>III</u> wurde bei % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 0.1 mg (0.1 μ mol, <0.3 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 782 (M+H⁺), 804 (M+Na⁺), 820 (M+K⁺).

Die Synthese dieser Verbindung läuft auf Grund der geringeren Aktivität des Thiocarbamats in nur sehr geringen Ausbeuten ab. Die Verbindung wurde mit SPR auf Bindungsaktivität zum CD4 untersucht, jedoch aufgrund der geringen Menge nicht NMR-spektroskopisch charakterisiert.

7.5.6.4 <u>tert-Butyl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-</u> <u>butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester</u> (Ligand IV):



 $MG(C_{39}H_{59}N_7O_9) = 769.95 \text{ g/mol}$

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch	
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL	
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in	506 mg / 2.16 mL	
DMF)		
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL	
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL	
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in	368 mg / 2.16 mL	
DMF)	-	
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL	
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL	
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL	
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL	

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Tabelle 27: Einwaagen bei der Synthese von Ligand <u>IV</u>.

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 923 und 955 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des sters erhält man den primären Alkohol in 26.2 mg (35 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 827 (M+H⁺), 849 (M+Na⁺), 865 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit *tert.*-Butylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 926 (M+H⁺), 958 (M+Na⁺), 974 (M+K⁺). Rohausbeute: 21.4 mg (73 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand **IV** wurde bei 59.4 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 0.7 mg (0.9 μ mol, 1 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 770 (M+H+), 792 (M+Na+), 808 (M+K+).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 295K, pH = 2, H_2O/D_2O 9:1, kalibriert auf HDO = 4.725 ppm und MeOH = 48.372 ppm

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-NOA					H1: 7.178, H3: 7.219, H4: 7.829, H5:
-					7.816, H6: 7.366, H7: 7.453, H8:
					7.758, O-CH ₂ : 4.776
Lys	8.404	4.368	1.695/1.604	1.053	Ηδ: 1.390, Ηε: 2.515, ΝΗ-Ζ: 7.304
Val	8.145	3.988	1.909	0.778	
Gly	8.456	3.878			
Thr	7.921	4.453	3.958	1.066	
Prolinol		4.148	1.906/1.795	1.952/1.818	Hd/d': 3.648/3.508, H1/1':
					4.196/4.177
tButyl	(8.013)				<i>t</i> Bu: 1.155

Tabelle 28: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>IV</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-NOA				C1 : 106.91, C3 : 117.512, C4 : 126.854, C5 : 126.682, C6 :
-				124.39, C7 : 126.739, C8 : 126.682, O-CH ₂ : ?
Lys	52.959	29.484	21.516	Cd : 25.807, Ce : 39.012
Val	59.051	29.561	18.006	
Gly	41.938			
Thr	56.724	66.923	17.783	
Prolinol	56.108	26.197	23.522	Cd: 47.277, C1: 62.542
tButyl				<i>t</i> Bu: 27.255

Tabelle 29: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>IV</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΟΑ					
Lys	8.438	4.355	1.701/1.604	1.053	Ηδ: 1.390, Ηε: 2.515, <i>N</i> H-Z : 7.304
Val	8.059	4.043	1.916	0.778	
Gly	8.456	3.915			
Thr	7.797	4.942	3.988	1.059	
Prolinol					
tBu	1.098				

Tabelle 30: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>IV</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten keine Werte bestimmt werden.

7.5.6.5 <u>Cyclopentyl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-</u> <u>butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester</u> <u>(Ligand V):</u>



MG (C₄₀H₅₉N₇O₉) =781.96 g/mol

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	506 mg / 2.16 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 31: Einwaagen bei der Synthese von Ligand V

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 923 und 955 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des sters erhält man den primären Alkohol in 24.1 mg (32 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 827 (M+H⁺), 849 (M+Na⁺), 865 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclopentylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 938 (M+H⁺), 960 (M+Na⁺), 976 (M+K⁺). Rohausbeute: 17.8 mg (65 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand \underline{V} wurde bei 63.4 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 0.7 mg (0.9 µmol, 1 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 782 (M+H⁺), 804 (M+Na⁺), 820 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 290K, MeOH-d4,

kalibriert auf CD₂H-OD = 3.34 ppm und 47.84 ppm

Spinsystem	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-NOA				H1: 7.281, H3: 7.310, H4: 7.836, H5:
				7.831, H6: 7.390, H7: 7.475, H8:
				7.797, O-CH ₂ : 4.758
Lys	4.616	1.886/1.766	1.356	Ηδ: 1.601, Ηε: 2.797,
Val	4.117	2.066	1.011/0.996	
Gly	4.069/3.833			
Thr	4.565	4.076	1.201	
Prolinol	4.266	Ca. 2.01	2.088/1.961	Ηδ/δ': 3.819/3.638, Η1/1':
				4.361/4.015
Cyclopentyl				H1: 3.872, H2/2': 1.911/1.464,
				H3/3': 1.607/1.360

Tabelle 32: ¹H-NMR-Verschiebungen von Ligand \underline{V} (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-NOA				C1: 107.056, C3: 118.280, C4: 126.869, C5: 126.869, C6:
				123.915, C7: 126.233, C8: 126.788, O-CH ₂ : 66.847
Lys	52.357	31.388	21.980	Cδ: 23.271, Cε: 39.105
Val	59.930	30.266	17.992	
Gly	41.944			
Thr	57.436	67.029		
Prolinol	56.522	26.720	30.167	Cδ: ca. 50, C1: 63.384
Cyclopentyl				C1: 52.571, C2/5: 32.284, C3/4: 26.710

Tabelle 33: ¹³C-NMR-Verschiebungen von Ligand <u>V</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Im Lösungsmittel Methanol konnten keine Hinweise auf eine *cis/trans*-Rotamerisierung gefunden werden.

7.5.6.6 <u>Adamantan-1-yl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-</u> <u>butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester</u> <u>(Ligand VI):</u>



MG $(C_{45}H_{65}N_7O_9) = 848.06 \text{ g/mol}$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	506 mg / 2.16 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 34: Einwaagen bei der Synthese von Ligand <u>VI</u>

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 923 und 955 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des sters erhält man den primären Alkohol in 24.2 mg (33 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 827 (M+H⁺), 849 (M+Na⁺), 865 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Adamantylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden: MALDI-TOF-MS, $m/z = 1004 (M+H^+)$, 1026 (M+Na⁺), 1042 (M+K⁺). Rohausbeute: 24.1 mg (82 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>VI</u> wurde bei 58.4 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 2 mg (2.4 μ mol, 3 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 848 (M+H+), 870 (M+Na+), 886 (M+K+).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 300 K, pH = 2, H_2O/D_2O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.72 ppm und Lys-Cε = 39.685 ppm.

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-NOA					H1: 7.234, H3: 7.271, H4: 7.881, H5:
					7.870, H6: 7.425, H7: 7.51, H8: 7.807,
					O-CH ₂ : 4.823
Lys	8.407	4.421	1.762/1.653	1.120	Ηδ: 1.447, Ηε: 2.592,
					NH-Z: 7.355
Val	8.169	4.039	1.956	0.842	
Gly	8.492	3.936			
Thr	7.926	4.511	4.015	1.12	
Prolinol		4.383	2.005/1.865	1.949/1.842	Ηδ/ δ': 3.694/3.546, H1/1': 4.250
Adamantyl					H2/2': 1.799/1.742, H3: 2.675,
					H4/4': 1.599/1.572

Tabelle 35: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>VI</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΟΑ				C1: 107.701, C3: 118.840, C4: 128.139, C5: 127.897, C6:
				124.991, C7: 127.558, C8: 127.461
Lys	53.436	30.702	22.316	Cδ: 26.717, Cε: 39.698
Val	60.350	29.497	18.332	
Gly	42.883			
Thr	57.803	67.749	19.027	
Prolinol	57.075	24.262	26.949	Cδ: 48.463, C1: 63.928
Adamantyl				C2: 41.31, C3: 35.195, C4: 36.076

Tabelle 36: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>VI</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	sonstige
β-NOA					
Lys	8.444	4.408	1.75/1.647	1.12	Hδ: 1.465, Hε: 2.604, NH-Ζ: 7.409
Val	8.048	4.100	1.962	0.817	
Gly	8.353	3.978			
Thr	7.840	5.002	4.045	1.126	
Prolinol					
Cyclohexyl					

Tabelle 37: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>VI</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten keine Werte bestimmt werden.

7.5.6.7 <u>Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-</u> <u>butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester</u> <u>(Ligand VII):</u>



 $\mathsf{MG}\;(\mathsf{C}_{39}\mathsf{H}_{59}\mathsf{N}_7\mathsf{O}_9)=769.44$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 180 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Alaninol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 38: Einwaagen bei der Synthese von Ligand <u>VII</u>

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 896 und 918 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol.

MALDI-TOF-MS: m/z = 800 (M+H⁺), 822 (M+Na⁺), 838 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 925 (M+H⁺), 947 (M+Na⁺), 963 (M+K⁺).

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>VII</u> wurde bei 59.4% Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 4.9 mg (6.4 µmol, 7% über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 769 (M+H⁺), 791 (M+Na⁺), 807 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 700 MHz, T = 285K, pH = 2, H₂O/D₂O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.7 ppm und MeOH = 48.711 ppm.

Es konnte, wie bei allen betrachteten Peptidomimetika mit einer Alaninol-Einheit, keine *cis/trans* Rotamerisierung beobachtet werden.

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΟΑ					H1: 7.298, H3: 7.341, H4: 7.936, H5:
-					7.92, H6: 7.484, H7: 7.566, H8:
					7.865, O-CH ₂ : 4.865
Lys	8.443	4.536	1.86/1.76	1.231	Ηδ: 1.578, Ηε: 2.701,
					NH-Z: 7.588
Val	8.31	4.131	2.06	0.949	
Gly	8.645	4.084/3.966			
Thr	7.968	4.272	4.178	1.207	
Alaninol	8.316	4.201	1.201		H1/1': 4.078/3.972
Cyclohexyl	6.873				H1: 3.337, H2/2': 1.825/1.178,
_					H3/3': 1.602, H4/4': 1.713/1.3

Tabelle 39: ¹H-NMR-Verschiebungen von Ligand <u>VII</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Сα	Сβ	Сү	Sonstige
β-NOA				C1: 107.633, C3: 118.727, C4: 128.103, C5: 128.057, C6:
-				124.993, C7: 127.268, C8: 127.361, O-CH ₂ : 67.155
Lys	53.206	31.14	22.652	Cδ: 26.879, Cε: 39.554
Val	60.369	30.394	18.305	
Gly	42.762			
Thr	60.091	67.716	16.121	
Alaninol	45.488	16.121		C1: 67.162
Cyclohexyl				C1: 50.433, C2/6: 33.004, C3/5: 25.355, C4: 24.855

Tabelle 40: ¹³C-NMR-Verschiebungen von Ligand <u>VII</u> (bestimmt aus dem HSQC).

7.5.6.8 4-((S)-2-{(S)-6-Amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-

hexanoylamino}-3-methyl-butyrylamino)-4-[(15,2R)-1-((S)-2-

cyclohexylcarbamoyloxymethyl-pyrrolidine-1-carbonyl)-2-hydroxy-

propylcarbamoyl]-butyric acid (Ligand VIII):



MG ($C_{44}H_{65}N_7O_{11}$) = 868.05 g/mol

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
α-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Glu(tBu)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	477 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Tabelle 41: Einwaagen bei der Synthese von Ligand VIII

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 1051 und 1073 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol in 18.2 mg (23 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 955 (M+H⁺), 977 (M+Na⁺), 993 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = $1080 (M+H^+)$, $1102 (M+Na^+)$, $1118 (M+K^+)$. Rohausbeute: 17 mg (78 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>VIII</u> wurde bei 59.4 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 0.8 mg (0.9 μ mol, 1 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 868 (M+H⁺), 890 (M+Na⁺), 906 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 285 K, pH = 2, H_2O/D_2O 9:1, kalibriert auf HDO = 4.700, Lys-H ϵ : 39.433 ppm

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-NOA					H1: 7.019, H3: 7.074, H4: 7.686, H5:
-					7.673, H6: 7.223, H7: 7.310, H8:
					7.618, O-CH ₂ : 4.610
Lys	8.314	4.194	1.542/1.459	0.871	Ηδ: 1.227, Ηε: 2.325,
					NH-Z: 7.188
Val	8.067	3.826	1.720	0.616	
Glu	8.374	4.206	1.844/1.702	2.189	
Thr	8.081	4.295	3.826	0.966	
Prolinol		4.033	1.830/1.710	1.847/1.713	Ηδ/δ': 3.529/3.403,
					H1/1': 4.166/3.744
Cyclohexyl	6.615				H1: 3.120, H2/2': 1.581/0.959,
					H3/3': 1.356, H4/4': 1.466/1.078

Tabelle 42: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>VIII</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Сα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΟΑ				C1: 107.248, C3: 118.508, C4: 127.5, C5: 127.5, C6:
				124.803, C7: 126.997, C8: 127.228, O-CH ₂ : 67.696
Lys	53.300	30.536	22.131	Сб: 26.548, Нє: 39.433
Val	59.869	30.291	18.082	
Glu	53.191	26.855	30.107	
Thr	57.772	67.486	19.002	
Prolinol	56.723	26.794	24.278	Cδ: 48.554, C1: 64.285
Cyclohexyl				C1: 49.195, C2/6: 32.745, C3/5: 25.505, C4: 24.953

Tabelle 43: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>VIII</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Es konnten nur für das Valin (NH: 8.031, H α : 3.838, H β : 30.291, H γ : 18.082) ein doppelter Signalsatz gefunden werden, was auch bei Ligand <u>VIII</u> auf ein *cis-trans*-Gleichgewicht schließen lässt.

7.5.6.9 <u>Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-((2S,3R)-2-{2-[((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-butyryl)-</u> methyl-amino]-acetylamino}-3-hydroxy-butyryl)-pyrrolidin-2-ylmethyl ester (Ligand IX):



MG (C₄₂H₆₃N₇O₉) = 810.01 g/mol

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Sar-OH (0.5 M Lösung in DMF)	336 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 44: Einwaagen bei der Synthese von Ligand <u>IX</u>

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 936 und 958 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol in 17.2 mg (23 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 840 (M+H⁺), 862 (M+Na⁺), 878 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 965 (M+H⁺), 987 (M+Na⁺), 1003 (M+K⁺). Rohausbeute: 15 mg (76 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>IX</u> wurde bei 62.3 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 0.7 mg (0.9 μ mol, 1 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 809 (M+H+), 831 (M+Na+), 847 (M+K+).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 300 K, pH = 2, H₂O/D₂O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.725 ppm und Naph-C1 = 107.725 ppm

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΟΑ					H1: 7.23, H3: 7.275, H4: 7.886, H5:
-					7.868, H6: 7.408, H7: 7.488, H8:
					7.813, O-CH ₂ : 4.812
Lys	8.424	4.406	1.741/1.644	1.113	Ηδ: 1.455, Ηε: 2.599,
					NH-Z: 7.340
Val	8.110	4.371	1.985	0.834	
Sar		3.709			N-CH ₃ : 3.139
Thr	8.004	4.497	4.009	1.141	
Prolinol		4.263	2.034/1.91	2.004/1.917	Ηδ/δ': 3.761/3.645, Η1/1':
					4.371/4.065
Cyclohexyl	6.745				H1: 3.255, H2/6, H3/5: , H4:

Tabelle 45: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>IX</u> (Bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Сα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΟΑ				C1: 107.725, C3: 118.924, C4: 128.16, C5: 128.16, C6:
-				125.080, C7: 127.522, C8 : 127.415, CH ₂ : 66.947
Lys	53.561	30.769	22.529	Cδ: 26.606, Cε: 39.627
Val	55.58	30.537	18.813	
Sar	48637			N-CH ₃ : ca. 37.8
Thr	57.903	67.727	19.007	
Prolinol	67.955	27.139	24.331	Cδ: 55.864, C1: 55.631
Cyclohexyl				C1: ca. 38, C2/6: 32.947, C3/5: 24.96, C6: 22.6

Tabelle 46: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>IX</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΟΑ					
Lys	8.358	4.512	1.728/1.639	1.167	Hδ: 1.460. Hε: 2.620, NH-Z: 7.346
Val	8.031	4.557	1.989	0.842/0.779	
Sar					
Thr	7.841	5.003	4.047	1.129	
Prolinol					
Cyclohexyl					

Tabelle 47: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>IX</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten keine Werte bestimmt werden.

```
7.5.6.10 <u>Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-
(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-2-cyclohexyl-
acetylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester
(Ligand X):</u>
```



MG $(C_{44}H_{65}N_7O_9) = 835.48 \text{ g/mol}$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-Chg-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 48: Einwaagen bei der Synthese von Ligand X

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 962 und 984 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol.

MALDI-TOF-MS: m/z = 866 (M+H⁺), 888 (M+Na⁺), 904 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 991 (M+H⁺), 1013 (M+Na⁺), 1027 (M+K⁺).

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand \underline{X} wurde bei 64% Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 2.5 mg (3.0 µmol, 3.3 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 835 (M+H+), 857 (M+Na+), 873 (M+K+).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 290K, pH = 2, H_2O/D_2O 9:1, kalibriert auf HDO = 4.7 ppm und Lys-H ϵ = 39.468 ppm

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΟΑ					H1: 7.077, H3: 7.137, H4: 7.752, H5:
-					7.743, H6: 7.298, H7: 7.383, H8:
					7.682, O-CH ₂ : 4.678
Lys	8.371	4.287	1.629/1.543	1.014	Ηδ: 1.1.348, Ηε: 2.481,
					NH-Z: 7.277
Chg	8.088	3.925	1.486	Siehe rechts	$H\gamma/\delta/\delta'/\epsilon/\epsilon'$:
					1.446/1.405/0.968/0.818/0.738
Gly	8.425	3.798			
Thr	7.856	4.367	3.873	0.991	
Prolinol		4.095	1.835/1.727	1.884/1.758	Ηδ/ δ': 3.586/3.441,
					H1/1': 4.176/3.798
Cyclohexyl	6.687				H1: 3.125, H2/2': 1.635/0.991,
					H3/3': 1.405/0.991, H4/4':
					1.514/1.106

Tabelle 49: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>X</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΟΑ				C1: 107.421, C3: 118.712, C4: 128.013, C5: 128.054,
				C6: 125.0074, C7: 127.282,
				C8: 127.363, O-CH ₂ : n.b.
Lys	56.881	30.657	22.298	Cδ: 26.618, Cε: 39.496
Chg	59.574	39.536	Siehe rechts	Cγ/δ/ε: 25.587/28.777/29.337
Gly	42.603			
Thr	57.904	67.764	18.899	
Prolinol	56.934	26.938	24.178	Сб: 48.529, С1: 64.424
Cyclohexyl				C1: 50.469, C2/6: 32.697, C3/5: 25.698,
				C4: 24.898

Tabelle 50: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand \underline{X} (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΟΑ					
Lys	8.412	4.275	1.635/1.56	1.02	Ηδ : 1.353, Ηε : 2.498
Chg	7.98	3.959	1.48		
Gly	8.324	3.827			
Thr	7.772	4.891	3.919	1.014	
Prolinol					H1/1': 3.921/3.811
Cyclohexyl	6.343				H1: 3.085, H2/2': 1.642/0.962,
					H3/3': 1.394/0.962, H4/4':
					1.514/1.106

Tabelle 51: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>X</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten nur zum Teil Werte bestimmt werden.

Spinsystem	Сα	Сβ	Сү	Sonstige
ChinOA				
Lys				
Val	59.69	30.76	18.692	
Gly	41.232			
Thr		67.9798	18.925	
Prolinol				
Cyclohexyl				C1: 49.181

Tabelle 52: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>X</u> (bestimmt aus dem HSQC).

7.5.6.11 <u>Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-3-hydroxy-2-[2-((S)-3-methyl-2-{(S)-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-5-ureido-pentanoylamino}-butyrylamino}-acetylamino]-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester (Ligand XI):</u>



MG $(C_{41}H_{60}N_8O_{10}) = 824.98 \text{ g/mol}$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.
Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Cit-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 53: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XI

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 851 und 873 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol in 19.4 mg (28 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 755 (M+H⁺), 777 (M+Na⁺), 793 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 880 (M+H⁺), 902 (M+Na⁺), 918 (M+K⁺). Rohausbeute: 13.1 mg (59 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XI</u> wurde bei 64.8 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 1.4 mg (1.7 μ mol, 2 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 825 (M+H+), 847 (M+Na+), 863 (M+K+).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 295 K, pH = 2, H_2O/D_2O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.725 ppm und MeOH = 49.4 ppm. Die Probe war so gering konzentriert, dass nicht alle Signale aufgelöst wurden

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-NOA					H1: 7.18, H3: 7.214, H4: 7.819, H5:
-					7.802, H6: 7.356, H7: 7.445, H8:
					7.746, O-CH ₂ : 4.781
Cit	8.395	4.368	1.693/1.602	1.252	Ηδ: 1.252
Val	8.182	3.986	1.913	0.786	
Gly	8.424	3.856			
Thr	7.911	4.433	3.927	1.045	
Prolinol		4.152	1.954/1.795		Ηδ/ δ': 3.400
Cyclohexyl	6.698				H1: 3.175, H4/4': 1.584/1.182

Tabelle 54: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XI</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΟΑ				C1: 107.708, C3: 118.537, C4: 128.231, C5: 128.001, C6:
				124.896, C7: 127.368, C8: 127.311
Cit	53.54	28.461	25.717	Cδ: 39.526
Val	60.369			
Gly	42.673			
Thr	58.112	67.851		
Prolinol	57.044	24.26		
Cyclohexyl				C4: 24.709

Tabelle 55: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand XI (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΟΑ					
Cit	8.425	4.361	1.693/1.608	1.252	Ηδ: 2.846
Val	8.08			0.786	
Gly	8.331	3.889			
Thr	7.799	4.944	3.979	1.071	
Prolinol					
Cyclohexyl	6.378				H1: 3.148

Tabelle 56: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>XI</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten keine Werte bestimmt werden.

7.5.6.12 <u>Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(quinolin-8-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-butyrylamino)-</u> acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester (Ligand **XII**):



MG $(C_{40}H_{60}N_8O_9) = 796.97 \text{ g/mol}$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
ChinOA (gesättigte Lösung in DMF)	219 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 57: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XII

Die (8'-Chinolyloxy)essigsäure löste sich in DMF extrem schlecht, so dass hier wahrscheinlich nicht die Konzentration von 0.5 M erreicht wurde. Dies erklärt die schlechte Ausbeute bei der Festphasensynthese.

Anschließend wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 924 und 946 zu finden waren. Dies entspricht den $(M+H^+)$ - und $(M+Na^+)$ -Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol in 10.4 mg (14 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 828 (M+H⁺), 850 (M+Na⁺), 866(M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 953 (M+H⁺), 975 (M+Na⁺), 991 (M+K⁺). Rohausbeute: 10.3 mg (86 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XII</u> wurde bei 54.9 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 3 mg (3.8 μ mol, 4 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 797 (M+H⁺), 819 (M+Na⁺), 835 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 290K, pH = 2, H_2O/D_2O 9:1,

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
ChinOA					H2: 8.963, H3: 7.936, H4: 8.902, H5:
					7.701, H6: 7.741, H7: 7.353, O-CH ₂ :
					4.903
Lys	8.704	4.308	1.663	1.25	Ηδ: 1.508, Ηε: 2.792,
					NH-Z: 7.401
Val	8.331	3.946	1.882	0.753	
Gly	8.491	3.817			
Thr	7.919	4.391	3.882	0.986	
Prolinol		4.075	1.879/1.754	1.837/1.709	Ηδ/δ': 3.434,
					H1/1': 4.13/3.765
Cyclohexyl	6.673				H1: 3.088, H2/2': 1.586/0.953,
					H3/3': 1.379/0.93, H4/4':
					1.502/1.076

kalibriert auf HDO = 4.7 ppm und MeOH = 49.2 ppm.

Tabelle 58: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XII</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Сα	Сβ	Сү	Sonstige
ChinOA				C2: 147.401, C3: 122.714, C4: 143.644, C5: 126.001, C6:
				121.841, C7: 114.328, O-CH ₂ : 67.696
Lys	53.91	30.634	22.323	Cδ: 26.621, Cε: 39.676
Val	60.12	30.443	17.93	
Gly	42.589			
Thr	57.779	67.619	18.857	
Prolinol	56.919	24.138	26.813	Cδ: 48.274, C1: 64.295
Cyclohexyl				C1: 50.375, C2/6: 32.672, C3/5: 25.061, C4: 24.681

Tabelle 59: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XII</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
ChinOA					
Lys					
Val	8.19	4.011	1.863	0.741	
Gly	8.491	3.869			
Thr	7.783	4.869	3.908	0.992	
Prolinol					
Cyclohexyl	6.616				H1: 3.121, H2/2': 1.476/1.063,
					H3/3': 1.34/0.953, H4/4': 1.618

Tabelle 60: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>XII</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten nicht für alle Atome Werte bestimmt werden. Sie werden in etwa denen des *trans*-Rotamers entsprechen.

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
ChinOA				
Lys				
Val	59.69	30.76	18.692	
Gly	41.232			
Thr		67.9798	18.925	
Prolinol				
Cyclohexyl				C1: 49.181, C2/6:

Tabelle 61: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>XII</u> (soweit bestimmbar aus dem HSQC).

7.5.6.13 Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(4-

<u>methyl-2-oxo-2H-chromen-6-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-</u> butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethylester (Ligand XIII):



MG $(C_{41}H_{61}N_7O_{11}) = 827.98 \text{ g/mol}$

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
CumOA (0.5 M Lösung in DMF)	253 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Tabelle 62: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XIII

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 955 und 977 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol in 25.5 mg (32 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 859 (M+H⁺), 881 (M+Na⁺), 897 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 984 (M+H⁺), 1006 (M+Na⁺), 1022 (M+K⁺). Rohausbeute: 18.2 mg (62 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XIII</u> wurde bei 57.9 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 0.8 mg (1.0 μ mol, 1 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 828 (M+H⁺), 850 (M+Na⁺), 866 (M+K⁺). Diese Verbindung wurde nicht NMR-spektroskopisch charakterisiert.

7.5.6.14 <u>Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-1-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-</u> <u>butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester</u> <u>(Ligand XIV):</u>



MG $(C_{41}H_{61}N_7O_9) = 795.98 \text{ g/mol}$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
α-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	366 mg / 2.16 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	321 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 63: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XIV

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 923 und 955 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol in 18.8 mg (25 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 827 (M+H⁺), 849 (M+Na⁺), 865 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 952 (M+H⁺), 974 (M+Na⁺), 980 (M+K⁺). Rohausbeute: 21 mg (97 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XIV</u> wurde bei 61.4 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 1.8 mg (2.3 μ mol, 3 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 796 (M+H+), 818 (M+Na+), 834 (M+K+).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 295K, pH = 2, H₂O/D₂O 9:1,

kalibriert auf Lys-H α = 4.384 ppm und Lys-C ϵ = 39.691 ppm.

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
a-NOA					H2: 6.817, H3: 7.369, H4: 7.516,
					H5: 7.844, H6: 7.523, H7: 7.513,
					H8: 8.237, O-CH ₂ : 4.835
Lys	8.302	4.384	1.715/1.619	1.141	Ηδ: 1.470, Ηε: 2.742,
					NH-Z: 7.395
Val	8.221	4.006	1.950	0.840	
Gly	8.504	3.908/3.805			
Thr	7.899	4.416	3.903	0.997	
Prolinol		4.141	1.885/1.783	1.936/1.793	Ηδ/ δ': 3.429,
					H1/1': 4.005
Cyclohexyl	6.683				H1: 3.188, H2/2': 1.687/1.057,
					H3/3': 1.583/1.175, H4/4':
					1.460/1.057

Tabelle 64: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XIV</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Сα	Сβ	Сү	Sonstige
ChinOA				C2: 106.245, C3: 126.450, C4: 121.991, C5: 128.029, C6:
				127.432, C7: 126.437, C8: 121.760
Lys	53.475	30.850	22.207	Cδ: 26.601, Cε: 39.691
Val	60.407	30.293	18.595	
Gly	42.667			
Thr	57.979	67.769	?	
Prolinol	56.843	27.01	24.097	Cδ: 48.584, C1: 65.05
Cyclohexyl				C1: 50.398, C2/6: 32.822, C3/5: 24.882, C4: 25.324

Tabelle 65: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XIV</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
ChinOA					
Lys	8.341	4.378	1.721/1.613	1.129	Hd : 1.476, He : 2.736, NH-Z : 7.379
Val	8.113	4.064	1.969	0.826	
Gly	8.423	3.911			
Thr	7.798	4.938	3.968	1.045	
Prolinol					
Cyclohexyl	6.388				H1: 3.138, H2/2': 1.684/1.008,
					H3/3': 1.556/1.149, H4/4': 1.435

Tabelle 66: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>XIV</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten keine Werte bestimmt werden.

7.5.6.15 <u>Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-[(2S,3R)-2-((3S,4S)-4-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-hydroxy-6-methyl-heptanoylamino)-3-hydroxy-butyryl]-pyrrolidin-2-ylmethyl ester (Ligand **XV**):</u>



MG $(C_{42}H_{64}N_6O_9) = 797.01 \text{ g/mol}$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
α-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-Statin-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 67: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XV

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 924 und 946 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol in 14.2 mg (19 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 828 (M+H⁺), 850 (M+Na⁺), 866 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 953 (M+H⁺), 975 (M+Na⁺), 991 (M+K⁺). Rohausbeute: 12.7 mg (77.5 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XV</u> wurde bei 65.3 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 5.2 mg (6.5 μ mol, 8 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 797 (M+H+), 819 (M+Na+), 835 (M+K+).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 290K, MeOH-d4,

kalibriert auf MeOH = 3.33 und 48.2 ppm.

In Methanol bei diesem pH-Wert konnte kein *cis/trans-*Gleichgewicht nachgewiesen werden

Spinsystem	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-NOA				H1: 7.284, H3: 7.307, H4: 7.827, H5:
-				7.846, H6: 7.388, H7: 7.475, H8:
				7.806, O-CH ₂ : 4.772
Lys	4.535	1.911/1.76	1.331	Ηδ: 1.621, Ηε: 2.761
Statin				H2: 2.556, H3: 5.097, H4: 4.211, H5:
				1.384, H6: 1.712, H7/7': 0.971/0.907
Thr	4.618	4.07	1.212	
Prolinol	4.159	2.064/1.928	1.969/1.611	Ηδ/ δ': 4.219,
				H1/1′: 3.638
Cyclohexyl				H1: 3.347, H2/2': 1.876/1.19, H3/3':
				1.641/1.183, H4/4': 1.754/1.329

Tabelle 68: ¹H-NMR-Verschiebungen von Ligand <u>XV</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Сα	Сβ	Сү	Sonstige
β-NOA				C1: 107.157 C3: 118.394, C4: 127.458, C5: 128.751, C6:
-				124.146, C7: 126.649, C8: 126.966, O-CH ₂ : 67.108
Lys	52.852	31.764	22.929	Cδ: 25.586, Cε: 39.388
Statin				C2: 37.974, C3: 72.896, C4: 50.087, C5: 22.972, C6:
				39.678, C7/7': 22.701/13.441
Thr	56.995	67.657		
Prolinol	59.676	24.126	27.234	Cδ: 50.11, C1: 61.991
Cyclohexyl				C1: 50.457, C2/6: 33.187, C3/5: 25.655, C4: 25.106

Tabelle 69: ¹³C-NMR-Verschiebungen von Ligand <u>XV</u> (bestimmt aus dem HSQC).

7.5.6.16 Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-[(2S,3R)-2-((3S,4S)-4-{(S)-6-amino-2-[2-

(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-5-cyclohexyl-3-hydroxypentanoylamino)-3-hydroxy-butyryl]-pyrrolidin-2-ylmethyl ester (Ligand

<u>XVI)</u>



MG $(C_{45}H_{68}N_6O_9) = 836.50 \text{ g/mol}$

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	218 mg / 2.16 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	446 mg / 2.16 mL
Fmoc-ACHPA-OH (0.5 M Lösung in DMF)	490 mg / 2.16 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	368 mg / 2.16 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	2.17 g / 13.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	872 μg / 6.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 90 µmol gebundenes L-Prolinol.

Tabelle 70: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XVI

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 963 und 985 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol in 19.6 mg (25 %) Rohausbeute.

MALDI-TOF-MS: m/z = 867 (M+H⁺), 889 (M+Na⁺), 905 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 992 (M+H⁺), 1014 (M+Na⁺), 1030 (M+K⁺). Rohausbeute: 17.4 mg (78 %)

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XVI</u> wurde bei 62 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 1.6 mg (1.9 μ mol, 2 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 836 (M+H+), 858 (M+Na+), 874 (M+K+).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 300 K, pH = 2, H_2O/D_2O 9:1, kalibriert auf HDO =4.71 ppm und Naphthyl-C1 = 107.617 ppm.

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-NOA					H1: 7.22, H3: 7.265, H4: 7.876, H5:
-					7.853, H6: 7.411, H7: 7.406, H8:
					7.817, O-CH ₂ : 4.802
Lys	8.347	4.323	1.712/1.658	1.136	Ηδ: 1.463, Ηε: 2.602,
					NH-Z: 7.367
ACHPA	7.731				H2: 2.454, H3: 4.928, H4: 3.99,
					H5/5': 1.197/1.086, H6: 1.06,
					H7a/7a'/7b/7b':
					1.443/0.641/1.392/0.779, H8/8':
					1.396/0.981, H9/9': 1.4/1.086
Thr	8.026	4.512	4.044	1.13	
Prolinol		4.075	1.975/1.864	1.918/1.84	Ηδ/ δ': 3.647/3.56,
					H1/1': 3.907/3.435
Cyclohexyl	6.677				H1: 3.207, H2/2': 1.7/1.071, H3/3':
					1.48/1.071, H4/4': 1.599/1.19

Tabelle 71: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XVI</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΟΑ				C1: 107.617, C3: 118.741, C4: 128.146, C5: 128.156, C6:
				125.213, C7: 125.112, C8: 127.488, O-CH ₂ : 66.789
Lys	53.777	30.924	22.718	Cδ: 26.681, Cε: 39.619
ACHPA				C1: 38.865, C2: 73.331, C3: 50.644, C4: 37.592, C5:
				34.095, C6/6': 32.043/33.908, C7: 26.355, C8: 26.075
Thr	57.317	67.645	19.174	
Prolinol	59.695	24.024	26.914	Cδ: 48.613, C1: 55.634
Cyclohexyl				C1: 50.72, C2/6: 32.816, C3/5: 25.282, C4: 24.909

Tabelle 72: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XVI</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Bei Ligand 16 konnte nur für die Protonen des Threonins eigene chemische Verschiebungen festgestellt werden (*N*H: 7.942, H α : 4.779, H β : 3.973, H γ : 1.113 ppm), die auch hier auf ein *cis/trans*-Gleichgewicht schließen lassen. Bei allen anderen untersuchten Kernen fallen die ¹H- und ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen zusammen.

7.5.6.17 <u>Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-[(2S,3R)-2-(2-{(S)-2-[(S)-6-amino-2-(2-naphthalen-2-yl-acetylamino)-hexanoylamino]-3-methyl-butyrylamino}-acetylamino)-3-hydroxy-butyryl]-pyrrolidin-2-ylmethyl ester (Ligand **XVII**):</u>



Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 56 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 50 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NA (0.5 M Lösung in DMF)	112 mg / 1.2 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	281 mg / 1.2 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	204 mg / 1.2 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	178 mg / 1.2 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	205 mg / 1.2 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	484 mg / 7.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	1.2 g / 3.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 73: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XVII

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 907 und 929 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol.

MALDI-TOF-MS: m/z = 811 (M+H⁺), 833 (M+Na⁺), 849 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 936 (M+H⁺), 958 (M+Na⁺), 974 (M+K⁺).

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XVII</u> wurde bei 60.9 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 1.3 mg (1.7 μ mol, 3.3 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 779 (M+H⁺), 801 (M+Na⁺), 817 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 700 MHz, T = 285 K, pH = 2, H₂O/D₂O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.7 und Lys-H ϵ = 38.820 ppm.

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Нβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-NA					H1: 7.569, H3: 7.200, H4: 7.688, H5:
-					7.308, H6: 7.684, H7: 7.274, H8:
					7.656, -CH ₂ : 3.58
Lys	8.353	4.129	1.578/1.513	1.151	Ηδ: 1.394, Ηε: 2.658,
					NH-Z: 7.309
Val	8.007	3.844	1.762	0.636	
Gly	8.382	3.718			
Thr	7.822	4.284	3.775	0.900	
Prolinol		4.028	1.77/1.667	1.829/1.686	Ηδ/ δ': 3.524/3.376,
					H1/1': 4.116/3.741
Cyclohexyl	6.645				H1: 3.04, H2/2': 1.536/0.901, H3/3':
					1.441/1.028, H4/4': 1.441/1.315

Tabelle 74: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XVII</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΑ				C1: 126.948, C3: 126.099, C4: ca. 127, C5: 125.642, C6:
				ca. 127, C7: ca. 125, C8: ca. 127, -CH ₂ : 41.229
Lys	52.886	29.516	21.397	Cδ: 24.836, Cε: 38.819
Val	57.784	29.516	17.799	
Gly	41.269			
Thr	56.455	66.981	17.831	
Prolinol	55.85	25.95	22.957	Cδ: 47.137, C1: 53.472
Cyclohexyl				C1: 49.436, C2/6: 31.776, C3/5: 23.785, C4: 24.332

Tabelle 75: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XVII</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΑ					
Lys	8.418	4.127	1.605/1.529	1.164	Hd : 1.403
Val	7.858	3.894	1.781	0.63	
Gly	8.282	3.756			
Thr	7.713	4.857	3.85	0.932	
Prolinol	XXX				XXX
Cyclohexyl	6.237				H1: 2.941, H2/2': 1.532/0.869,
					H3/3': 1.361/0.984, H4/4': 1.532

Tabelle 76: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>XVII</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten keine Werte bestimmt werden.

7.5.6.18 Cyclohexyl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[3-

(naphthalen-2-ylsulfanyl)-propionylamino]-hexanoylamino}-3-methylbutyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester (Ligand XVIII):



MG ($C_{42}H_{63}N_7O_8S$) = 826.08 g/mol

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 56 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 50 µmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NTP (0.5 M Lösung in DMF)	139mg / 1.2 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	281 mg / 1.2 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	204 mg / 1.2 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	178 mg / 1.2 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	205 mg / 1.2 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	484 mg / 7.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	1.2 g / 3.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 77: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XVIII

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 953 und 975 zu finden waren. Dies entspricht demn (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol.

MALDI-TOF-MS: m/z = 857 (M+H⁺), 879 (M+Na⁺), 896 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclohexylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 982 (M+H⁺), 1004 (M+Na⁺), 1020 (M+K⁺).

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XVIII</u> wurde bei 63.9 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 2.3 mg (2.8 µmol, 5.6 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 826 (M+H⁺), 848 (M+Na⁺), 864 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 700 MHz, T = 285 K, pH = 2, H_2O/D_2O 9:1,

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΤΡ					H1: 7.649, H3: 7.265, H4: 7.635, H5:
					7.616, H6: 7.290, H7: 7.328, H8:
					7.669, S-CH ₂ : 3.075, CH ₂ : 2.420
Lys	8.084	3.868	1.423	1.001	Ηδ: 1.276, Ηε: 2.655,
					NH-Z: 7.303
Val	7.989	3.804	1.787	0.708/0.692	
Gly	8.348	3.746/3.67			
Thr	7.822	4.263	3.765	0.867	
Prolinol		3.964	1.712/1.615	1.778/1.639	Ηδ/δ': 3.458/3.329,
					H1/1': 4.056/3.685
Cyclohexyl	6.625				H1: 3.017, H2/2': 1.527/0.895,
					H3/3': 1.43/1.297, H4/4': 1.015

Tabelle 78: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XVIII</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Сα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΤΡ				C1: 126.479, C3: 126.749, C4: 128.054, C5: 126.542,
				C6: 125.587, C7: 126.717, C8: 127.720, S-CH ₂ : 27.3.
				CH ₂ : 34.263
Lys	52.943	26.661	21.419	Cδ: 25.937, Cε: 38.848
Val	59.247	29.349	17.882/16.691	
Gly	41.228			
Thr	56.568	67.022	17.917	
Prolinol	55.993	26.042	22.61	Сб: 47.217, С1: 63.397
Cyclohexyl				C1: 49.476, C2/6: 31.926, C3/5: 29.474, C4: 23.696

Tabelle 79: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XVIII</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΤΡ					
Lys	8.123	3.861	1.442	1.027	Hd : 1.289, He : 2.648, NH-Z : 7.303
Val	7.890	3.868	1.825	0.708	
Gly	8.290	3.74			
Thr	7.675	4.819	3.797	0.887	
Prolinol	XXX				XXX
Cyclohexyl	6.255				H1: 2.963 H2/2': 1.430/1.003, H3/3':
					1.538/0.847, H4/4': 1.291

Tabelle 80: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>XVIII</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten keine Werte bestimmt werden.

7.5.6.19 <u>tert-Butyl-carbamic acid (S)-1-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(quinolin-8-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyryl}-pyrrolidin-2-ylmethyl ester (Ligand **XIX**):</u>



MG (C₃₈H₅₈N₈O₉) = 770.93 g/mol

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
ChinOA (gesättigte Lösung in DMF)	122 mg / 1.2 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	281 mg / 1.2 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	204 mg / 1.2 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	178 mg / 1.2 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	205 mg / 1.2 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	484 mg / 7.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	1.2 g / 3.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 56 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 55 µmol gebundenes L-Prolinol.

Tabelle 81: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XIX

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 924 und 946 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol.

MALDI-TOF-MS: m/z = 828 (M+H⁺), 850 (M+Na⁺), 866 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit *tert*.Butylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 927 (M+H⁺), 949 (M+Na⁺), 965 (M+K⁺).

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XIX</u> wurde bei 53.9 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 1.4 mg (1.8 μ mol, 3.6 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 771 (M+H⁺), 793 (M+Na⁺), 809 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 700 MHz, T = 285 K, pH = 2, H₂O/D₂O 9:1, kalibriert auf HDO = 4.7 ppm und Lys-H ϵ = 38.943 ppm.

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
ChinOA					H2: 8.891, H3: 7.866, H4: 8.830, H5:
					7.680, H6: 7.631, H7: 7.294, O-CH ₂ :
					4.843
Lys	8.683	4.234	1.619/1.570	1.186	Ηδ: 1.431, Ηε: 2.721,
					NH-Z: 7.345
Val	8.294	3.883	1.861	0.684	
Gly	8.465	3.743			
Thr	7.896	4.314	3.831	0.909	
Prolinol		3.996	1.749/1.645	1.805/1.667	Ηδ/ δ': 3:51273:373,
					H1/1': 4.03173:647
tert.Butyl	n.b.				tBu: 0.987

Tabelle 82: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XIX</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
ChinOA				C2: 146.694, C3: 121.543, C4: 143.514, C5: 121.013, C6:
				129.259, C7: 114.063, O-CH ₂ : 66.560
Lys	52.949	29.535	21.32	Cδ: 25.905, Cε: 38.943
Val	58.776	29.583	17.739	
Gly	41.296			
Thr	56.436	67.038	17.834	
Prolinol	56.054	26.001	22.514	Cδ: 47.218, C1: 62.501
tert.Butyl				<i>t</i> .Bu: 27.386

Tabelle 83: ¹³C-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XIX</u> (bestimmt aus dem HSQC).

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
ChinOA					
Lys					
Val	8.204	3.921	1.823	0.697	
Gly		3.786			
Thr	7.749	4.829	3.857	0.915	
Prolinol	XXX				XXX
tert.Butyl					<i>t</i> Bu: 27.29

Tabelle 84: ¹H-NMR-Verschiebungen des *cis*-Rotamers von Ligand <u>XIX</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Für die ¹³C-NMR chemischen Verschiebungen des *cis*-Rotamers konnten keine Werte bestimmt werden.

7.5.6.20 <u>tert-Butyl-carbamic acid (S)-2-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(quinolin-8-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-butyrylamino}-acetylamino]-3-hydroxy-butyrylamino}-propyl ester (Ligand **XX**):</u>

 $\begin{array}{c} & \mathsf{N}\mathsf{H}_2 \\ & \mathsf{N} \\ & \mathsf{O} \\ & \mathsf{N} \\ & \mathsf{O} \\ & \mathsf{H}_3 \\ & \mathsf{C} \\ & \mathsf{C}\mathsf{H}_3 \\ & \mathsf{H}_3 \\ & \mathsf{C} \\ & \mathsf{C}\mathsf{H}_3 \\ & \mathsf{H}_3 \\ & \mathsf{C} \\ & \mathsf{H}_3 \\ & \mathsf{H}_3 \\ & \mathsf{C} \\ & \mathsf{H}_3 \\ & \mathsf{H}_3 \\ & \mathsf{C} \\ & \mathsf{H}_3 \\ & \mathsf{H}_$

MG $(C_{36}H_{56}N_8O_9) = 744.90 \text{ g/mol}$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 100 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 50 µmol gebundenes L-Alaninol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
ChinOA (ges. Lösung in DMF)	122 mg / 1.2 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	281 mg / 1.2 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	204 mg / 1.2 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	178 mg / 1.2 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	205 mg / 1.2 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	484 mg / 7.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	1.2 g / 3.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 85: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XX

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 898 und 920 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol.

MALDI-TOF-MS: m/z = 802 (M+H⁺), 824 (M+Na⁺), 840 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit *tert.*-Butylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden: MALDI-TOF-MS, $m/z = 1024 (M+H^+)$, 1046 (M+Na⁺), 1062 (M+K⁺).

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand \underline{XX} wurde bei 52.5 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden

nach der Gefriertrocknung 1.3 mg (1.7 μ mol, 3.5 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 745 (M+H⁺), 767 (M+Na⁺), 783 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 700 MHz, T = 285 K, pH = 2, H₂O/D₂O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.7 ppm und Lys-H ϵ = 38.978 ppm.

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
ChinOA					H2: 8.896, H3: 7.865, H4: 8.865, H5: 7.680, H6: 7.634, H7: 7.289, O-CH ₂ : 4.855
Lys	8.679	4.240	1.601	1.182	Hδ: 1.420, Hε: 2.728, NH-Z: 7.340
Val	8.270	3.901	1.817	0.685	
Gly	8.456	3.763			
Thr	7.865	3.963	3.882	0.928	
Alaninol	7.961	3.886	0.898		H1/1': 3.758/3.602
tert.Butyl	8.066				<i>t</i> Bu: 0.997

Tabelle 86: 1H-NMR-Verschiebungen	von Ligand	<u>XX</u> (bestimmt	aus ¹ H,	TOCSY,	ROESY,	COSY,
HSQC).						

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
ChinOA				C2: 146.766, C3: 121.091, C4: 143.270, C5: 120.862, C6:
				129.172, C7: 113.125, O-CH ₂ : 66.853
Lys	53.003	29.602	21.459	Cδ: 26.049, Cε: 38.978
Val	59.005	29.602	17.955	
Gly	41.646			
Thr	59.005	44.509??	18.251	
Alaninol	67.038	14.649		C1: 65.93
tert.Butyl				<i>t</i> Bu: 27.48

Tabelle 87: ¹³C-NMR-Verschiebungen von Ligand <u>XX</u> (bestimmt aus dem HSQC).

7.5.6.21 <u>Cyclopentyl-carbamic acid (S)-2-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyrylamino}-propyl ester (Ligand XXI):</u>



MG $(C_{38}H_{57}N_7O_9) = 755.92 \text{ g/mol}$

Nach A	AAV 1	wurde	der	Festphasenteil	der	Synthese	durchgeführt.	Ansatzgröße
100 mg	2'-Chl	orotrity	lharz	, entsprechend	50 µ	mol gebur	ndenes L-Alanii	nol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	122 mg / 1.2 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	281 mg / 1.2 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	204 mg / 1.2 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	178 mg / 1.2 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	205 mg / 1.2 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	484 mg / 7.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	1.2 g / 3.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 88: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XXI

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 897 und 919 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol.

MALDI-TOF-MS: m/z = 801 (M+H⁺), 823 (M+Na⁺), 839 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Cyclopentylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 912 (M+H⁺), 934 (M+Na⁺), 950 (M+K⁺).

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XXI</u> wurde bei 58.3 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 1.9 mg (2.5 μ mol, 5.0 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 756 (M+H⁺), 778 (M+Na⁺), 794 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 700 MHz, T = 285 K, pH = 2, H₂O/D₂O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.7 ppm und Lys-H ϵ = 38.679 ppm

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-NOA					H1: 7.010, H3: 7.059, H4: 7.672, H5:
-					7.657, H6: 7.215, H7: 7.303, H8:
					7.599, O-CH ₂ : 4.638
Lys	8.329	4.230	1.570/1.493	0.909	Ηδ: 1.256, Ηε: 2.345,
					NH-Z: 7.174
Val	8.068	3.865	1.788	0.685	
Gly	8.405	3.768			
Thr	7.809	3.980	3.909	0.948	
Alaninol	7.921	3.944	0.935		H1/1': 3.839/3.704
Cyclopentyl	6.612				H1: 3.082, H2/2': 1.571/0.938,
					H3/3': 1.441/1.061

Tabelle 89: ¹H-NMR-Verschiebungen von Ligand <u>XXI</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Сα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΟΑ				C1: 106.644, C3: 117.551, C4: 129.345, C5: 126.878, C6:
				123.325, C7: 126.73, C8: 126.73, O-CH ₂ : 65.895
Lys	52.300	29.605	21.486	Cδ: 25.641, Cε: 38.679
Val	59.153	29.318	17.856	
Gly	41.992			
Thr	58.986	66.898	18.238	
Alaninol	44.388	14.418		C1: 65.839
Cyclopentyl				C1: 49.514, C2/5: 31.85, C3/4: 23.778

Tabelle 90: ¹³C-NMR-Verschiebungen von Ligand XXI (bestimmt aus dem HSQC).

7.5.6.22 <u>Adamantan-1-yl-carbamic acid (S)-2-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-</u> <u>butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyrylamino}-propyl ester</u> (Ligand XXII):



MG $(C_{43}H_{63}N_7O_9) = 821.47 \text{ g/mol}$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 56 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 50 μmol gebundenes L-Alaninol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	122 mg / 1.2 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	281 mg / 1.2 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	204 mg / 1.2 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	178 mg / 1.2 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	205 mg / 1.2 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	484 mg / 7.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	1.2 g / 3.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

 Tabelle 91: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XXII

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 897 und 919 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol.

MALDI-TOF-MS: m/z = 801 (M+H⁺), 823 (M+Na⁺), 839 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit Adamantylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden : MALDI-TOF-MS, m/z = 978 (M+H⁺), 1000 (M+Na⁺), 1016 (M+K⁺).

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XXII</u> wurde bei 61.8 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 2 mg (2.4 μ mol, 4.9 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 822 (M+H⁺), 844 (M+Na⁺), 860 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 285 K, pH = 2, H₂O/D₂O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.700 ppm und Lys-H ϵ = 39.442 ppm

Spinsystem	NH	Ηα/α′	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΟΑ					H1: 7.04, H3: 7.092, H4: 7.698, H5:
-					7.690, H6: 7.241, H7: 7.329, H8:
					7.632, O-CH ₂ : 4.625
Lys	8,340	4245	1.557/1.48	0.913	Ηδ: 1.251, Ηε: 2.347,
					NH-Z: 7.209
Val	8.093	3.863	1.799	0.678	
Gly	8.4330	3.774			
Thr	7.828	3.990	3.914	0.952	
Alaninol	7.910	3.939	0.958		H1/1': 3.793/3.634
Adamantyl	6.828				H2/2':1.672/1.607, H3: 1.82, H4/4':
					1.431

Tabelle 92: ¹H-NMR-Verschiebungen des *trans*-Rotamers von Ligand <u>XXII</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-NOA				C1: 107.093, C3: 118.770, C4: 127.839, C5: 127.820, C6:
-				124.891, C7: 127.499, C8: 127.215
Lys	53.250	30.392	16.028	Cδ: 26.634, Cε: 39.442
Val	60.262	29.358	18.462	
Gly	42.765			
Thr	59.940	67.531	16.26	
Alaninol	45.274	16	66.566	
Adamantyl				C2: 41.300, C3: 29.592, C4: 35.965

Tabelle 93: ¹³C-NMR-Verschiebungen von Ligand <u>XXII</u> (bestimmt aus dem HSQC).

7.5.6.23 <u>tert-Butyl-carbamic acid (S)-2-{(2S,3R)-2-[2-((S)-2-{(S)-6-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-</u> <u>butyrylamino)-acetylamino]-3-hydroxy-butyrylamino}-propyl ester</u> (Ligand XXIII):



MG $(C_{37}H_{57}N_{7}O_{9}) = 743.91 \text{ g/mol}$

Nach AAV 1 wurde der Festphasenteil der Synthese durchgeführt. Ansatzgröße : 56 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 50 μmol gebundenes L-Prolinol.

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	122 mg / 1.2 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	281 mg / 1.2 mL
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	204 mg / 1.2 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	178 mg / 1.2 mL
Fmoc-Thr(But)-OH (0.5 M Lösung in DMF)	205 mg / 1.2 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	484 mg / 7.5 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	1.2 g / 3.75 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	10 mL
Piperidin (20 % in DMF)	10 mL

Tabelle 94: Einwaagen bei der Synthese von Ligand XXIII

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, wobei im MALDI Hauptpeaks bei m/z = 897 und 919 zu finden waren. Dies entspricht den (M+H⁺)- und (M+Na⁺)- Werten des TFA-Ester der gewünschten Zwischenverbindung. Nach Spaltung des Esters erhält man den primären Alkohol.

MALDI-TOF-MS: m/z = 801 (M+H⁺), 823 (M+Na⁺), 839 (M+K⁺).

Nach AAV 3 wurde die Carbamatbindung durch Reaktion mit *tert.*-Butylisocyanat geknüpft. Charakterisierung des geschützten Liganden: MALDI-TOF-MS, m/z = 900 (M+H⁺), 922 (M+Na⁺), 938 (M+K⁺).

Nach AAV 4 wurden die Schutzgruppen abgespalten und dann nach AAV 5 per HPLC gereinigt. Ligand <u>XXIII</u> wurde bei 57.4 % Lösungsmittel D eluiert. Es wurden nach der Gefriertrocknung 1.9 mg (2.6 µmol, 5.1 % über alle Stufen) weißer Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: 794 (M+H⁺), 816 (M+Na⁺), 832 (M+K⁺).

NMR-Untersuchungen: 500 MHz, T = 285 K, pH = 2, H₂O/D₂O 9:1,

kalibriert auf HDO = 4.700 ppm und Lys-H ϵ = 39.412 pm

Spinsystem	NH	Ηα/α'	Ηβ/β′	Ηγ/γ′	Sonstige
β-ΝΟΑ					H1: 7.023, H3: 7.076, H4: 7.692, H5:
					7.673, H6: 7.232, H7: 7.320, H8:
					7.620, O-CH ₂ : 4.613
Lys	8.338	4.236	1.527/1.457	1.218	Ηδ: 1.218, Ηε: 2.315,
					NH-Z: 7.206
Val	8.079	3.856	1.759	0.655	
Gly	8.412	3.750			
Thr	7.828	3.982	3.898	0.922	
Alaninol	7.926	3.919	0.901		H1/1′: 3.771/3.624
tertButyl	6.915				<i>t</i> Bu: 1.009

Tabelle 95: ¹H-NMR-Verschiebungen von Ligand <u>XXIII</u> (bestimmt aus ¹H, TOCSY, ROESY, COSY, HSQC).

Spinsystem	Cα	Сβ	Сү	Sonstige
β-ΝΟΑ				C1: 107.161, C3: 118.654, C4: 128, C5: 128, C6: 124.855,
				С7: 127.415, Н8: 127.131
Lys	53.297	30.748	22.180	Сб: 26.633, Сє: 39.412
Val	60.160	30.312	18.114	
Gly	42.720			
Thr	59.823	67.530	19.131	
Alaninol	45.027	15.936		C1: 67.024
tertButyl				tBu: 29.279

Tabelle 96: ¹³C-NMR-Verschiebungen von Ligand <u>XXIII</u> (bestimmt aus dem HSQC).

7.5.7 Darstellung weiterer Verbindungen

7.5.7.1 Darstellung von (S)-2-tert-Butylcarbamoyloxymethyl-pyrrolidine-1-

carboxylic acid tert-butyl ester 4 64



102.5 mg (509 μ mol) N-Boc-L-prolinol wurden in 5 mL DMF gelöst und mit 50 mg (505 μ mol) CuCl und 57 μ L *tert*-Butylisocyanat versetzt 45 min gerührt. Anschließend wurde mit 20 mL Diethylether verdünnt, mit Wasser und NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurden 120.3 mg Produkt erhalten, dies entspricht einer Ausbeute von 80%.

Charakterisierung: weißer Feststoff.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ = 4.5443 (m, 1H, CH), 4.0-3.8 (m, 2H, CH₂OH), 3.2636 (m, 2H, H_{5ab}), 1.92-1.68 (m, 4H, H_{3ab+4ab}), 1.3957 (s, 9H, OtBu), 1.2457 (s, 9H, NtBu) ppm.





2 g (13.8 mmol) 8-Hydroxychinolin wurden in 27.6 mL Ethanol bis zum Rückfluss erhitzt. Dann wurde eine Lösung von 1.68 g (29.9 mmol) KOH in 11.2 mL Ethanol zugegeben und anschließend eine Lösung von 1.92 g (14.2 mmol) Bromessigsäure in 7 mL Ethanol innerhalb von zwei Stunden zugetropft. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gekühlt und noch zwölf Stunden gerührt, wobei langsam weiße Kristalle ausfielen. Das Produkt wurde abgenutscht und anschließend mit 5 mL 10 % iger HCl übergossen und 30 min gerührt. Zunächst ging alles in Lösung, doch nach kurzer Zeit fiel ein leicht gelblicher Feststoff aus, der abgenutscht und an der Ölpumpe getrocknet wurde. Es wurden 690.6 (3.4)mmol) mg (8-Chinolyloxy)essigsäure erhalten, dies entspricht einer Ausbeute von 24.6 % (Lit: 59 %).

Charakterisierung:

Hellgelber Feststoff, Smp = 168 °C (Lit.: 168 °C).

¹H (400 MHz, MeOH-D₄): δ = 9.2735 (m, 1H, H7), 9.2411 (m, 1H, H5), 8.2083 (m, 1H, H6), 8.02-7.92 (m, 2H, H5+H6), 7.7342 (m, 1H, H7) ppm.

Kalibriert wurde auf MeOH = 3.35 ppm

MS: 203 (3), 158 (100), 145 (8), 129 (55), 102 (15), 89 (10).





1.99 g (13.8 mmol) 1-Naphthol wurden in 27.6 mL Ethanol bis zum Rückfluss erhitzt. Dann wurde eine Lösung von 1.68 g (29.9 mmol) KOH in 11.2 mL Ethanol zugegeben und anschließend eine Lösung von 1.92 g (14.2 mmol) Bromessigsäure in 7 mL Ethanol innerhalb von zwei Stunden zugetropft. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gekühlt und noch zwölf Stunden gerührt. Anschließend wurde fast das gesamte Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung 3x ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurde mit konz. HCl angesäuert und 3x mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält 1.3 g (6.4 mmol) (1'-Naphthyloxy)essigsäure, dies entspricht 46.5 % (Lit.: 59 %)

Charakterisierung:

Weißer Feststoff, Smp: 194-196 °C (Lit: 193-195 °C)

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-D4): δ = 8.39-8.34 (m, 1H, H8), 7.87-7.815 (m, 1H, H5), 7.55-7.47 (m, 3H, H4/6/7), 7.425-7.365 (m, 1H, H3), 6.89-6.85 (m, 1H, H2), 4.8906 (s, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, MeOH-D4/CDCl₃ 2:1): δ = ca. 175 (CO₂H), ca. 155 (C1), 134.905 (C9(4-5)), 127.709 (C5), 126.929 (C6), 125.845 (C3), 125.717 (C7), 122.376 (C8), 121.759 (C4), 105.393 (C2), 65.884 (CH₂) ppm.

MS (70 eV): 202 (95), 143 (100), 127 (15), 115 (58), 77 (12), 40 (18).



7.5.7.4 Synthese von 6-Carboxmethoxy-4-methylcumarin 10⁶⁸

2.43 g (13.8 mmol) 6-Hydroxy-4-methylcumarin wurden in 27.6 mL Ethanol bis zum Rückfluss erhitzt. Dann wurde eine Lösung von 1.68 g (29.9 mmol) KOH in 11.2 mL Ethanol zugegeben und anschließend eine Lösung von 1.92 g (14.2 mmol) Bromessigsäure in 7 mL Ethanol innerhalb von zwei Stunden zugetropft. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gekühlt und noch zwölf Stunden gerührt. Anschließend wurde fast das gesamte Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit 5% iger NaHCO₃-Lösung 3x ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit konz. HCl angesäuert und 3x mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält 0.5 g (2.1 mmol) 6-Carboxmethoxy-4-methylcumarin, dies entspricht einer Ausbeute von 18.7 % (Lit: 59 %)

Charakterisierung:

Weißer Feststoff, Smp = 104-106 °C

¹H-NMR (400 MHz, MeOH): δ = 7.38-7.26 (m, 3H, H5/7/8), 6.3861 (d, ⁴J_{H3-CH3} = 1.02 Hz, 1H, H3), 4.80 (s, 2H, CH₂), 2.5091 (d, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, MeOH-D4): δ = 121.313 (C5), 119.263 (C7), 116.193 (C8), 110.803 (C3), 19.062 (CH₃) ppm.

MS (70 eV): 234 (100), 175 (50), 147 (69), 91 (18).

7.5.7.5 Darstellung von N-(Toluensulfonyl)-trans-4-hydroxy-L-prolin 11⁷⁰



Zu einer Lösung von 2 g (15.3 mmol) *trans*-4-Hydroxy-L-prolin in 15 mL Wasser wurden bei 0 °C 3.4 g (32 mmol) Na₂CO₃ gegeben und 15 min gerührt, wobei sich nicht alles löste. Dann wurden zu der Mischung in drei Portionen (im Abstand von 20 min) 3.49 g (18.3 mmol) 4-Toluensulfonylchlorid hinzugegeben, dann das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 48 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit konz. HCl (ca. 3 mL) auf pH 2 eingestellt, wobei zunächst alles in Lösung ging, bei saurem pH jedoch das weiße Produkt ausfiel. Dieses wurde abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurden 3.68 g (12.9 mmol) 1-(Toluensulfonyl)-*trans*-4-hydroxy-L-prolin erhalten, dies entspricht einer Ausbeute von 84.3 % (63-96 %, Lit: = 99 %).

Charakterisierung:

Weißes Pulver, Smp: 149-150 °C (Lit: 149-151 °C).

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d4) δ = 7.8187 (d, 2H, H2'), 7.4539 (d, 2H, H3'), 4.3993 (mc, 1H, H4), 4.2963 (t, ³J_{H2-H3ab} = 7.88 Hz, 1H, H2), 3.6373 (dd, ²J_{H5a-H5b} = 10.94 Hz, 1H, H5a), 3.3250 (mc, 1H, H5b), 2.4950 (s, 3H, 4'-CH₃), 2.14 (mc, 2H, H3ab) ppm. ¹³C-NMR (400 MHz, MeOH-d4) δ = 131.069 (C2'6'), 129.354 (C3'5'), 70.915 (Cg), 61.572 (Ca), 57.947 (C1), ca. 50 (C δ , zusammen mit MeOH) 40.707 (C β), 21.891 (CH₃) ppm.

MS: 240 (100), 155 (40), 91 (50), 68 (12).





1.31 g (10 mmol) *trans*-4-Hydroxy-L-prolin wurden in 24 mL THF:H₂O 2:1 gelöst und mit 4 mL 10 %iger NaOH versetzt. Zu diesem Gemisch wurden 2.97 g (13.6 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat in 12 mL THF:H₂O 2:1 gegeben und für 24h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das THF am Rotationsverdampfer entfernt, 3x mit Ethylacetat ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Extrakte mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es verblieben 1.65 g farbloser, halbflüssiger Rückstand. Dies entspricht einer Ausbeute von 71.3 % (Lit: 99 %)

Charakterisierung

Nach langem Trocknen (>72 h) kann man einen glasartigen, farblosen Feststoff erhalten, der einen Smp. von ca. 130 °C besitzt (Literatur: braunes Öl!).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ = 4.244-4.17 (m, 1H, H γ (*cis* + *trans*)), 4.09-4.02 (m, 1H, H α (*cis* + *trans*)), 3.299-3.15 (m, 2H, H $\delta\delta$ ' (*cis* + *trans*), 2.112-2.025 (m, 1H, H β , (*cis* + *trans*)), 1.861-1.761 (m, 1H, H β ' (*cis* + *trans*)), 1.16 (s, 2.6 H, *t*Bu-*cis*), 1.1175 (s, 6.4 H, *t*Bu-*trans*) ppm.

Kalibriert auf HDO = 4.7 ppm

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O) d = 69.473 (C γ), 58.8006 (C α), 54.3525 (C δ), 38.490 (C β), 27.828 (*t*Bu) ppm. Die quartären Kohlenstoffe wurden nicht aufgelöst.

MS (70 eV): 231 (1), 187 (6), 186 (10), 158 (10), 130 (100), 86 (67), 68 (38), 57 (78), 41 (38).





940 mg (24.8 mmol) NaBH₄ wurden in einem 250-mL-Dreihalskolben mit Thermometer und Tropftrichter mit 32.6 mL abs. THF versetzt und auf 10 °C gekühlt. Unter gutem Rühren wurden unter Stickstoff 4.075 mL (32.27 mmol) BF3·Et2O langsam zugetropft. Anschließend wurden 3.5g (12.3 mmol) 1-(4-Toluensulfonyl)-trans-4-hydroxy-L-prolin, aufgeschlämmt in 1.63 mL abs. THF, langsam zugegeben. Nach kurzer Induktionszeit sprang eine heftige Reaktion mit Schaumbildung und Temperatursteigerung auf 18 °C an, die sich aber schnell wieder beruhigte. Nach beendeter Zugabe wurde die Kühlung entfernt und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden zum Quenchen zunächst 10 mL MeOH und anschließend 15 mL 10 %ige HCl zugegeben. Dabei löste sich ein Teil des Niederschlags. Anschließend wurde das Thermometer durch einen Rückflußkühler ersetzt und auf dem Wasserbad für drei Stunden auf 60 °C erwärmt. Danach wurde die Mischung in einen 250-mL-Rundkolben überführt, mit ca. 4 mL 50 %iger NaOH auf pH 7 eingestellt und dann das MeOH und das THF am Rotationsverdampfer entfernt. Dabei fiel das Produkt aus und konnte durch filtrieren und waschen mit Wasser isoliert werden. Nach Trocknung an der Ölpumpe wurden 3.28 g (12.1 mmol) Produkt erhalten, dies entspricht einer Ausbeute von 98.3 % (Lit: 85 %).

Charakterisierung:

Weißer Feststoff, Smp: 133 °C (Lit: 133 °C)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.777$ (mc, 2H, Ts-H2'6'), 7.434 (mc, 2H, Ts-H3'5'), 4.344 (mc, 1H, H-4), 3.8-3.69 (m, 3H, CH₂OH + H-2), 3.5675 (dd, ³H_{H5a-H4} = 10.4 Hz, ²H_{H5a-H5b} = 4.7 Hz, 1H, H5a), 3.185 (mc, ³H_{H5b-H4} = 11.0 Hz, ⁴J_{H5b-H3} = 1,3 Hz, 1H, H5b), 2.471 (s, 3H, Ts-CH₃), 2.11-2.04 (mc, 1H, H3a), 1.76-1.685 (mc, 1H, H3b). ¹³C-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 145.51$ (Ts-C1'), 135.89 (Ts-C4'), 131.06 (Ts-C3'5'), 129.44 (Ts-C2'6'), 70.37 (C4), 66.19 (CH₂OH), 62.03 (C2), 58.39 (C5), 38.47 (C3), 21.89 (Ts-CH₃).

MS (70 MeV): 271 (1), 240 (100), 155 (63), 91 (50), 68 (20), 41 (10).



266 mg (10.1 mmol) NaBH₄ wurden in 13.25 mL abs. THF vorgelegt und bei 5 °C unter Stickstoffatmosphäre und bei gutem Rühren 1.66 mL (13.2 mmol) BF₃·Et₂O langsam zugetropft. Anschließend wurden 1.16 g (5 mmol) 1-(Butyloxycarbonyl)*trans*-4-hydroxy-L-prolin, gelöst in 660 μ L abs. THF (Ultraschall), langsam zugetropft. Nach kurzer Induktionszeit sprang eine heftige Reaktion mit Schaumbildung und Temperatursteigerung an. Die Tropfgeschwindigkeit wurde so gewählt, dass die Temperatur 10 °C nicht überschritt. Nach beendeter Zugabe wurde die Kühlung entfernt und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden zum Quenchen zunächst 4 mL MeOH und anschließend 4 mL 10 %ige HCl
zugegeben. Der pH-Wert wurde dann zügig mit 50 %iger NaOH auf 2-3 korrigiert und das Gemisch auf dem Wasserbad für eine Stunden auf 60 °C erwärmt. Die Mischung wurde mit 50 %iger NaOH auf pH 7 eingestellt und dann die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der sich bildende Niederschlag lässt sich nicht filtrieren, daher wurde dreimal mit Et₂O ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen, über MgSO4 getrocknet und der Ether am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum erhält man 781 mg eines weißen Sirups (Lit: farbloses Öl), dies entspricht 75 % Ausbeute (Literaur: 81 %). Die Reaktion lässt sich problemlos in größerem Maßstab durchführen.

Charakterisierung:

Farbloser Sirup.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ = 4.067-3.979 (m, 1H, H γ (*cis* + *trans*)), 3.67-3.548 (m, 1H, H α (*cis* + *trans*)), 3.426-3.349 (m, 1H, H1 (*cis* + *trans*)), 3.286-3.212 (m, 1H, H1' (*cis* + *trans*)), 3.158-3.085 (m, 1H, H δ (*cis* + *trans*)), 3.083-2.948 (m, 1H, H δ ' (*cis* + *trans*), 1.842-1.602 (m, 2H, H $\beta\beta$ ' (*cis* + *trans*)), 1.149 (s, 4H, *t*Bu-*cis*), 1.139 (s, 5H,*t*Bu-*trans*) ppm.

Kalibriert auf HDO = 4.7 ppm ¹³C-NMR (500 MHz, D₂O, aus dem HSQC) δ = 69.3 (Cγ) , 62.8 (C1), 57.8 (Cα), 55.18 (Cδ), 36.574(Cβ), 27.79 (CH₃) ppm. MS (70 MeV): 186 (32), 144 (21), 130 (81), 86 (92), 57 (100), 47 (32).

Bei einem grösserem Ansatz (10 g BocHyp = 43 mmol) wurde der pH-Wert vor dem Erwärmen auf 60 °C nicht genau kontrolliert und ca. 3 Stunden erwärmt. Dies führte nur zu einer Ausbeute von 40%.





Variante 1:72 3 g (11.1 mmol) (2S, 4R)-2-(Hydroxymethyl)-4-hydroxy-1-(4-toluensulfonyl)-pyrrolidin wurden zusammen mit 3.39 g (12.2 mmol) Tritylchlorid, 2.75 mL Triethylamin und 67 mg (550 µmol) N,N-Dimethyl-4-aminopyridin in DMF unter Stickstoffatmosphäre über Nacht gerührt. Die milchige Mischung wurde daraufhin in Eiswasser gegeben und 3x mit Dichlormethan extrahiert (langsame Phasentrennung). Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Ammoniumsulfatlösung und Wasser gewaschen, über MgSO4 getrocknet und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und an der Ölpumpe entfernt. Es wurden 5.90 g Rohprodukt erhalten. Das Produkt wurde per MALDI nachgewiesen. Es wurde versucht, das Produkt säulenchromatographisch zu reinigen. In EE:PE 4:1 ist eine Reinigung nicht möglich, trotz unterschiedlichem Laufverhalten im DC. Der Zusatz von Toluol zum Laufmittel verbessert die Aufreinigung nicht. Auch in CHCl₃/MeOH/NEt₃ 100:1:0.1 als Laufmittelgemisch führt nur zu einer kleinen Menge gereinigtem Material (200 mg = 3.5 %), ansonsten wurden hauptsächlich das Edukt und Tritlyalkohol erhalten. Die Ausbeute konnte durch Verwendung von Pyridin als Lösungsmittel nicht verbessert werden.

Variante 2: 100 mg (368.6 µmol) (2S, 4R)-2-(Hydroxymethyl)-4-hydroxy-1-(4toluensulfonyl)-pyrrolidin wurden mit 165.9 mg (405.5 µmol) Tritylpyridiniumtetrafluoroborat in 4 mL Acetonitril (HPLC grade) unter Stickstoff für 24 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Diethylether Rückstand 3x mit extrahiert, filtriert und erneut am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Es wurden 111.5 mg Rohprodukt erhalten (58.9 %). Diese Reaktion konnte nicht erfolgreich im größeren Maßstab durchgeführt werden.

Charakterisierung:

hellbrauner Schaum,

¹H-NMR (500 MHz): δ (CDCl₃) = 7.706 (mc, 2H, Ts-H2'6'), 7.4746 (mc, 6H, Trt-H3'5'), 7.3947-7.2652 (m, 11H, Trt-H2'4'6' + Ts-H3'5'), 4.4154 (mc, 1H, H-4), 3.881 (mc, 1H, H2), 3.621 (dd, ³J_{H5a-H4} = 11.9 Hz, ²J_{H5a-H5b} = 4.3 Hz, 1H, H5a), 3.441 (mc, 1H, CH₂OH-a), 3.347 (dd, ³J_{H5b-H4} = 9.5 Hz, 1H, H5b), 3.333 (mc, 1H, CH₂OH-b), 2.464 (s, 3H, Ts-CH₃), 2.072 (mc, 1H, H3a), 1.943 (mc, 1H, H3b), (1.332 (mc, 1.5H, OH). ¹³C-NMR (500 MHz, als HSQC)): δ (CDCl₃) =129-127 (Trt-C23456 + Ts-C2356), 70.879

¹³C-NMR (500 MHz, als HSQC)): δ (CDCl₃) =129-127 (Trt-C23456 + Ts-C2356), 70.879 (C4), 67.02 (CH₂OH), 58.879 (C2), 57.522 (C5), 39.106 (C3), 22.241 (Ts-CH₃).

MALDI-TOF-MS: 514 (M+H⁺), 536 (M+Na⁺), 552 (M+K⁺).

7.5.7.10 Darstellung von (2S,4R)-4-Hydroxy-2-triisopropylsilanyloxymethyl-





2.00 g (9.21 mmol) (2*S*, 4*R*)-1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-(hydroxy-methyl)-4hydroxypyrrolidin, 2.4 mL (11.20 mmol) TIPS-Cl und 1.57 g (23.06 mmol) Imidazol wurden in 4 mL DMF in einem trockenen 50 mL Stickstoffkolben unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Die Reaktionslösung wurde 21 h gerührt. Anschließend wurden 10 mL Wasser zu der Mischung gegeben und dreimal mit je 6 mL Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der verbliebene Rest wurde mit Kieselgel säulenchromatographisch (Petrolether/Isopropanol 15:1) gereinigt. Das Produkt konnte als hochviskose, farblose Flüssigkeit erhalten werden.

Ausbeute: 1.2 g (3.2 mmol) farblose, hochviskose Flüssigkeit entsprechend 35 % der Theorie.

Charakterisierung:

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 4.535 (mc, 1H, H γ), 4.053 (mc, 1H, H α), 3.815 (mc, 2H, H1/1'), 3.502 (mc, 2H, H δ/δ'), 2.315 (mc, 1H, H β), 2.066 (mc, 1H, H β'), 1.500 (s, 9H, *t*Bu), 1.097 (mc, 21H, *i*Pro) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz, bestimmt aus dem HSQC): δ = 70.589 (C γ), 65.003 (C1), 58.073 (C α), 55.9 (C δ), 37.901 (C β), 29.418 (*t*Bu), 18.556 (CH *i*Pro), 12.66 (CH₃ *i*Pro) ppm.

7.5.7.11 Darstellung von 1-Amino--2-acetamido-1,2-didesoxy-β-D-glucopyranose 22





2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose $C_8H_{15}NO_6$ MG = 221.21 g/mol β -1-Amino-2-acetamido-1,2-didesoxy-D-glucopyranose $C_8H_{16}N_2O_5$ MG = 220.23 g/mol 2 g (9 mmol) 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose wurden in 20 mL gesättigter NH₄HCO₃-Lösung bei 47 °C über 48 h gerührt (kleiner Bodensatz NH₄HCO₃!). Anschließend wurde die Lösung bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet (zwischendurch in kaltem H₂O auflösen). Es wurden 1.43 g 1-Amino-2-acetamido-1,2-didesoxy- β -D-glucopyranose erhalten, dies entspricht einer Ausbeute von 71.9 % (Lit: $\frac{73}{100}$ %).

Charakterisierung:

Weißer Feststoff, Smp: 151 °C (Lit: 151 °C)

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ =4.357 (d, ³J_{H1-H2} = 9.16 Hz, 1H, H1), 4.13-3.55 (m, 6H, H_{2,3,4,5,6ab}), 2.2471 (s, 3H, CH₃).

MS: 205(5), 179 (7), 149 (12), 137 (26), 123 (20), 107 (36), 97 (48), 81 (62), 69 (100), 56 (69), 44 (62).

7.5.7.12 <u>Darstellung von (2S,3R)-3-tert-Butoxy-2-[2-((S)-2-{(S)-6-tert-butoxycarbonyl-amino-2-[2-(naphthalen-2-yloxy)-acetylamino]-hexanoylamino}-3-methyl-butyrylamino)-acetylamino]-butyric acid **23**</u>



Nach AAV 1 wurde die Synthese an der festen Phase durchgeführt. Ansatzgröße : 56 mg 2'-Chlorotritylharz, entsprechend 50 µmol gebundenes L-Threonin(OtBu).

Substanz (eingesetzt als)	Einwaage / Verbrauch
β-NOA (0.5 M Lösung in DMF)	122 mg / 1.2 mL
Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.5 M Lösung in	281 mg / 1.2 mL
DMF)	
Fmoc-Val-OH (0.5 M Lösung in DMF)	204 mg / 1.2 mL
Fmoc-Gly-OH (0.5 M Lösung in DMF)	178 mg / 1.2 mL
TBTU (0.5 M Lösung in DMF)	387 mg / 6 mL
DIPEA (1 M Lösung in DMF)	0.96 g / 3 mL
Ac ₂ O (10 % in DMF)	8 mL
Piperidin (20 % in DMF)	8 mL

Tabelle 97: Einwaagen bei der Synthese von 23

Nun wurde nach AAV 2 vom Harz abgespalten, das Produkt lyophylisiert (Rohprodukt: 25 mg) und nach AAV 5 per HPLC gereinigt (Start mit 30% Acetonitril). Es wurden 10 mg Produkt erhalten (24 %).

Charakterisierung:

MALDI-TOF-MS: 744 (M+H+), 766 (M+Na+), 782 (M+K+) m/z.



carbonylamino)-pentanoic acid tert-butyl ester 25



500 (1.2)(S)-4-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5mg mmol) hydroxypentansäure-tert-butylester wurden in einem 10-mL-Rundkolben in 2.5 mL DMF gelöst, und anschließend wurden 120 mg (1.2 mmol) Kupfer(I)-chlorid sowie 160 µL (1.2 mmol) 98 % Cyclohexylisocyanat hinzugegeben. Die Anfangs leicht gelbliche Lösung wurde bei Raumtemperatur geschüttelt und verfärbte sich nach kurzer Zeit tiefgrün. Nach 20 h schütteln konnte im MALDI-TOF noch immer Edukt detektiert werden, so dass weitere 15 mg CuCl und 20 µL Cyclohexylisocyanat zugegeben wurden. Nach weiteren 2 h schütteln wurde die Reaktion abgebrochen, in dem mit DCM verdünnt wurde und die Lösung dreimal mit 5 %iger NH4HCO3-Lösung gewaschen wurde. Die organsiche Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Probe wurde ohne weitere Aufarbeitung für die weiteren Umsetzungen verwendet.

Charakterisierung: MALDI-TOF-MS: 537 (M+H+), 559 (M+Na+), 575 (M+K+) m/z.





Ca. 1 g rohes <u>25</u> wurden mit einem Gemisch aus 1.9 mL TFA, 100 μ L TIPS und 40 μ L Wasser versetzt und bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 1.5 h schütteln konnte im MALDI-TOF kein Edukt mehr nachgewiesen werden. Die Reaktionslösung wurde mit DCM verdünnt und mit Wasser gewaschen. Dabei trübte sich die organische Phase. Daher wurde die wässrige Phase noch zweimal mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit MgSO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und die restlicher TFA durch Codestillation mit Toluol am Rotationsverdampfer entfernt. Charakterisierung: MALDI-TOF-MS: 481 (M+H⁺), 503 (M+Na⁺), 519 (M+K⁺) m/z.

<u>26</u> wurde ohne Aufarbeitung weiter verwendet. Ausbeute: nicht genau bestimmt.

7.5.7.15 <u>Darstellung von Acetic acid (2R, 3S, 4R, 5R, 6R)-3,4-diacetoxy-5-acetylamino-</u> <u>6-[(S)-5-cyclohexylcarbamoyl-oxy-4-(9H-fluoren-9-ylmethoxy-</u>

carbonylamino)-pentanoylamino]tetrahydropyran-2-ylmethylester 27



278 mg (1.26 mmol) β-1-Amino-2-acetamido-1,2-didesoy-D-glucopyranose wurden in 10 mL DMF unter Stickstoff gelöst und im Eis/Kochsalzbad auf –15 °C gekühlt. Anschließend wurde ein Gemisch aus dem Rohprodukt von 1-Cyclohexylcarbamat-2-Fmoc-L-glutamol, 488 mg TBTU und 260 µL DIPEA in 3 mL DMF, das 10 Minuten vorher gemischt wurde, dazugegeben. MALDI-TOF-MS aus der Reaktionslösung, die 1:200 in MeOH verdünnt wurde, zeigten nach 20 h eine vollständige Umsetzung. Anschließend wurde das DMF im Ölpumpenvakuum verdampft. Charakterisierung: MALDI-TOF-MS: 683 (M+H⁺), 705 (M+Na⁺), 719 (M+K⁺) m/z. Nun wurden unter Stickstoff 10 mL Ac₂O/Pyridin (Verhältnis 2:3) zugegeben und der Kolben 5 Tage im Kühlschrank belassen. Dabei färbte sich die Lösung intensiv lila. Anschließend wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Charakterisierung: MALDI-TOF-MS: 809 (M+H⁺), 831 (M+Na⁺), 847 (M+K⁺) m/z. 7.5.7.16 Darstellung von Acetic acid (2R,3S,4R,5R,6R)-3,4-diacetoxy-5-acetylamino-6-

[(S)-5-cyclohexylcarbamoyl-oxypentanoylamino]-tetrahydro-pyran-2-



Das Rohprodukt <u>27</u> wurde in 5 mL 20 % Piperidin in DMF gelöst und 2 h gerührt. Anschließend wurden die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Charakterisierung: MALDI-TOF-MS: 587 (M+H⁺), 609 (M+Na⁺), 625 (M+K⁺) m/z.

7.5.7.17 Versuch der Darstellung des geschützten Glyco-Liganden C (29)



5 mg <u>28</u> wurden in 200 μL DMF unter Stickstoff gelöst und anschließend eine Mischung aus 1 mg <u>23</u>, 1 mg TBTU und 0.7 μL DIPEA in 200 μL DMF, die 10 min 179 vorinkubiert worden waren, hinzugegeben. Da per MALDI keine Umsetzung beobachtet werden konnte, wurde derselbe Ansatz mit DMSO bzw. NMP als Lösungsmittel wiederholt, ohne Bildung des erwünschten Produkts.

7.5.7.18 <u>Synthese von (3*R*, 5*S*)-5-Trityloxymethyl-pyrrolidin-3-ol **30** (Allgemeine Detosylierungsvorschrift)</u>



30 mg (2*S*, 4*R*)-2-(Hydroxymethyl)-4-hydroxy-1-(4-toluensulfonyl)-pyrrolidin (5.8 µmol) wurden in einen 10-ml-Rundkolben eingewogen, mit N₂ gespült und mit 700 µL abs. Methanol versetzt. Anschließend wurden unter Stickstoff eine Spatelspitze frisches Magnesiumpulver (ca. 45 mg = 1,85 mmol) hinzugegeben und der Kolben 2 Stunden im Ultraschallbad beschallt. Danach wurde der Ansatz mit Dichlormethan verdünnt und vorsichtig Wasser hinzugegeben. Der gebildete Niederschlag wurde mit wenig 10 % HCl in Lösung gebracht, das Dichlormethan abgetrennt und die wässrige Phase vier mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Der Rückstand ist reines 2*S*, 4*R*)-4-Hydroxy-2-triphenylmethoxymethyl-pyrrolidin.

Ausbeute: Es wurden 20 mg (55.6 µmol) Produkt erhalten, dies entspricht 95.9 %

(Lit: 80-100 %)

Charakterisierung :

Weißer Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.50-7.23 (m, 15H, Trt), 4.4154 (m, 1H, H4), 3.7035 (m, 1H, H2), 3.2-2.9 (m, 4H, H5ab + CH₂O), 1.9349 (m, 1H, H3a), 1.6845 (m, 1H, H3b) ppm.

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃, aus dem HSQC): δ = 129 (Aromaten), 72.812 (C4), 66.25 (CH₂O), 57.031 (C2), 55.156 (C5), 38.907 (C3).

7.6 Proteolytischer Verdau der Peptidomimetika mit Pronase aus Streptomyces griseus

100 μ L einer Lösung von Pronase aus *Streptomyces griseus* in 0.1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7-7.5 (3.6 mg in 9 mL Puffer, 1:50 mit Puffer verdünnt) werden mit 100 μ L 200 μ M Peptidomimetikalösung in H₂O gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten werden Proben von 20 μ L entnommen und in 40 μ L 1 M Essigsäure pipettiert, was die Reaktion stoppt. Die Proben werden gevortext, zentrifugiert und in N₂ tiefgefroren. Die aufgetauten Proben werden per ESI-MS untersucht. Detektion auf der HPLC: 280 nm (Aromaten)

8 Literatur

1. G. Thomas, *Medicinal Chemistry - An Introduction*, 1. Edition, John Wiley & Sons, Ltd. Chichester **2000**, 539.

2. H. J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin - Oxford **1996**, 599.

3. P. Nuhn, Naturstoffchemie, 3. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart - Leipzig 1997, 766.

4. J. Gante, Peptidmimetica - massgeschneiderte Enzyminhibitoren, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780-1802.

5. H. Lis, N. Sharon, Protein glycosylation. Structural and functional aspects, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1-27.

6. D. H. Live, R. A. Kumar, X. Beebe, S. J. Danishefsky, Conformational influences of glycosylation of a peptide: a possible model for the effect of glycosylation on the rate of protein folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 12759-61.

7. N. Sharon, H. Lis, Kohlenhydrate und Zellerkennung, Spekt. Wiss. 1993, 66-74.

8. N. Sharon, Kohlenhydrate, Spekt. Wiss. 1981, 71-85.

9. A. Giannis, T. Kolter, Peptidmimetica fuer Rezeptorliganden - Entdeckung, Entwicklung und medizinische Perspektiven, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303-1326.

 G. M. Figliozzi, R. Goldsmith, S. C. Ng, S. C. Banville, R. N. Zuckermann, Synthesis of N-substituted glycine peptoid libraries, *Methods Enzymol.* **1996**, 267, 437-47.

11. R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent, W. H. Moos, Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-substituted glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646-10647.

12. T. A. Tran, R. H. Mattern, M. Afargan, O. Amitay, O. Ziv, B. A. Morgan, J. E. Taylor, D. Hoyer, M. Goodman, Design, synthesis, and biological activities of potent and selective somatostatin analogues incorporating novel peptoid residues, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2679-85.

13. C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephans, S. P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, An Unnatural Biopolymer, *Science* **1993**, *261*, 1303-1305.

14. S. J. Paikoff, T. E. Wilson, C. Y. Cho, P. G. Schultz, The Solid Phase Synthesis of N-Alkylcarbamate Oligomers, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5653-5656.

15. C. Y. Cho, R. S. Youngquist, S. J. Paikoff, M. H. Beresini, A. R. Hebert, L. T. Berleau, C. W. Liu, D. E. Wemmer, T. Keough, P. G. Schultz, Synthesis and Screening of Linear abd Cyclic Oligocarbamate Libraries. Discovery of High Affinity Ligands for GPIIb/IIIa, J. Am. Chem. Soc. **1998**, 120, 7706-7718.

16. G. Guichard, V. Semetey, M. Rodriguez, J. P. Briand, Solid phase synthesis of oligoureas using O-succinimidyl-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)ethyl-carbamate derivatives as activated monomers, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1553-1557.

17. J. van Ameijde, R. M. J. Liskamp, Peptidomimetic building blocks for the synthesis of sulfonamide peptoids, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1103-1106.

18. C. Gennari, B. Salom, D. Potenza, A. Williams, Synthese von Sulfonamid-Pseudopeptiden: neue chirale synthetische Oligomere, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2181-2183.

19. J. M. Kim, Y. Bi, S. J. Paikoff, P. G. Schultz, The Solid Phase Synthesis of Oligoureas, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5305-5308.

20. M. E. Wilson, J. S. Nowick, An Efficient Synthesis of N,N'-Linked Oligoureas, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6613-6616.

21. J. C. Smith, J. L. Liras, S. E. Schneider, E. V. Anslyn, Solid and Solution Phase Organic Synthesis of Oligomeric Thioureas, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8811-8818.

22. K. Burgess, J. Ibarzo, D. S. Linthicum, D. H. Russell, H. Shin, A. Shitangkoon, R. Totani, A. J. Zhang, Solid Phase Synthesis of Oligoureas, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1556-1564.

23. A. Cheguillaume, F. Lehardy, K. Bouget, M. Baudy-Floc'h, P. Le Grel, Submonomer Solution Synthesis of Hydrazinopeptoids, a New Class of Pseudopeptides, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2924-2927.

24. S. Hanessian, G. McNaughton-Smith, H. G. Lombart, W. D. Lubell, Design and Synthesis of Conformationally Constrained Amino Acids as versatile Scaffolds and Peptide Mimetics, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *53*, 12789-12854.

25. D. J. Kempf, Design of symmetry-based, peptidomimetic inhibitors of human immunodeficiency virus protease, *Methods Enzymol.* **1994**, 241, 334-54.

26. P. W. Berman, W. Huang, L. Riddle, A. M. Gray, T. Wrin, J. Vennari, A. Johnson, M. Klaussen, H. Prashad, C. Kohne, C. deWit, T. J. Gregory, Development of bivalent (B/E) vaccines able to neutralize CCR5- dependent viruses from the United States and Thailand, *Virology* **1999**, *265*, 1-9.

27. J. Cohen, AIDS vaccine shows promise after years of frustration, *Science* **2001**, 291, 1686-8.

28. C. A. Heiman, D. Baltimore, HIV Vaccines: Where are we going?, *Nature Med. Vacc. Supp.* **1998**.

29. N. L. Letvin, Progress in the development of an HIV-1 vaccine, *Science* **1998**, 280, 1875-80.

30. P. Poignard, E. O. Saphire, P. W. Parren, D. R. Burton, gp120: Biological aspects of structural features, *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 253-74.

31. C. D. Rizzuto, R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, J. Sodroski, A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding, *Science* **1998**, *280*, 1949-53.

32. J. Cohen, Investigators detail HIV's fatal handshake, Science 1996, 274, 502.

33. S. Vella, L. Palmisano, Antiretroviral therapy: state of the HAART, *Antiviral Res.* **2000**, *45*, 1-7.

34. R. F. Rando, N. Nguyen-Ba, Development of novel nucleoside analogues for use against drug resistant strains of HIV-1, *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 465-476.

35. S. Ren, E. J. Lien, Development of HIV protease inhibitors: a survey, *Prog. Drug Res.* **1998**, *51*, 1-31.

36. J. D. Tyndall, R. C. Reid, D. P. Tyssen, D. K. Jardine, B. Todd, M. Passmore, D. R. March, L. K. Pattenden, D. A. Bergman, D. Alewood, S. H. Hu, P. F. Alewood, C. J. Birch, J. L. Martin, D. P. Fairlie, Synthesis, stability, antiviral activity, and protease-

bound structures of substrate-mimicking constrained macrocyclic inhibitors of HIV-1 protease, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3495-504.

37. J. H. Condra, M. D. Miller, D. J. Hazuda, E. A. Emini, Potential New therapies for the Treatment of HIV-1 Infection, *Ann. Rev. Med.* 2002, *53*, 541-555.
38.

39. W. S. Blair, P. F. Lin, N. A. Meanwell, O. B. Wallace, HIV-1 entry - an expanding portal for drug discovery, *Drug Discov. Today.* **2000**, *5*, 183-194.

40. S. Ramurthy, M. S. Lee, H. Nakanishi, R. Shen, M. Kahn, Peptidomimetic antagonists designed to inhibit the binding of CD4 to HIV GP120, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1007-13.

41. M. J. Root, M. S. Kay, P. S. Kim, Protein design of an HIV-1 entry inhibitor, *Science* **2001**, *291*, 884-8.

42. S. Chen, R. A. Chrusciel, H. Nakanishi, A. Raktabutr, M. E. Johnson, A. Sato, D. B. Weiner, J. Hoxie, H. U. Saragovi, M. I. Greene, M. Kahn, Design and Synthesis of a CD4 beta-turn mimetic that inhibits human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 binding and infection of human lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 5872-5876.

43. H. Tamamura, A. Otaka, T. Murakami, T. Ishihara, T. Ibuka, M. Waki, A. Matsumoto, N. Yamamoto, N. Fujii, Interaction of an anti-HIV peptide, T22, with gp120 and CD4, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 555-9.

44. T. E. Ramsdale, P. R. Andrews, E. C. Nice, Verification of the interaction between peptide T and CD4 using surface plasmon resonance, *FEBS Lett.* **1993**, *333*, 217-22.

45. L. R. Brady, A. N. Barclay, The structure of CD4, *Curr. Top. Microbio. Immun.* **1996**, 205, 1-18.

46. J. O. Kahn, J. D. Allan, T. L. Hodges, L. D. Kaplan, C. J. Arri, H. F. Fitch, A. E. Izu, J. Mordenti, J. E. Sherwin, J. E. Groopman, The safety and pharmacokinetics of recombinant soluble CD4 (rCD4) in subjects with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex., *Ann. Intern. Med.* **1990**, *112*, 254-261.

47. P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody, *Nature* **1998**, *393*, 648-59.

48. J. Wülfken, Doktorarbeit, Entwicklung CD4 bindender Peptide als Inhibitoren der HIV-Infektion, Institute for Organic Chemistry, University of Hamburg, Hamburg **2001**, 168.

49. J. R. Mascola, Neutralization of HIV-1 Infection of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) in HIV Protocols (Eds. N. L. Michael, J. H. Kim), 17, Humana Press Totowa **1998**, 309-321.

50. J. H. Wang, R. Meijers, Y. Xiong, J. H. Liu, T. Sakihama, R. Zhang, A. Joachimiak, E. L. Reinherz, Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 10799-804.

51. D. G. Myszka, R. W. Sweet, P. Hensley, M. Brigham-Burke, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, R. Wyatt, J. Sodroski, M. L. Doyle, Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 9026-31.

52. H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 3. Auflage, Wiley-VCH Weinheim, New York **1999**.

53. M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Massenspektren in Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie 5. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart, New York **1995**, 219-311.

54. U. Jönsson, L. Fägerstam, B. Ivarsson, K. Lundh, S. Löfas, B. Persson, H. Roos, L. Rönnberg, S. Sjölander, E. Stenberg, R. Stahlberg, C. Urbaniczky, H. Östlin, M. Malmqvist, *BioTechniques* **1991**, *11*, 620-627.

55. B. Meyer, T. Peters, NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864-890.

56. M. Mayer, Doktorarbeit, STD-NMR Spektroskopie: Eine neue Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Hamburg **2001**, 151.

57. B. Meyer, J. Klein, M. Mayer, R. Meinecke, H. Möller, A. Neffe, O. Schuster, J. Wülfken, Y. Ding, O. Knaie, J. Labbe, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, B. Wagner, B. Ernst, Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy to Identify Ligand Epitopes and Binding Specificities in Leucocyte Trafficking - The Role of Fucosyltransferases

and Selectines (Eds. A. Hamann, A. Schottelius, K. Asadullah), 44, 1, Springer Berlin **2004**, 149-168.

58. M. Mayer, B. Meyer, Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108-6117.

59. J. Klein, R. Meinecke, M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5336-5337. 60. R. Meinecke, B. Meyer, Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin alphaIIbbeta3., *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3059-3065.

61. R. Meinecke, Doktorarbeit, STD NMR Spektroskopie zur Untersuchung der Bindungsspezifität des integralen Membranproteins alphaIIb-beta3 auf Liposomen und intakten Thrombozyten, Institut für Oragnische Chemie, Universität Hamburg, Hamburg **2003**, 134.

62. H. Möller, Doktorarbeit, NMR-gestütztes Design neuer anti-HIV-Wirkstoffe, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Hamburg **2003**, 171.

63. G. Hazzard, S. A. Lammimam, N. L. Poon, D. P. N. Satchell, R. S. Satchell, The Kinetics of the Addition of Ethanolto p-Chlorophenyl Isocyanate in Diethyl Ether Solution in the Presence of Covalent Metal Halides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1985**, 1029-1033.

64. M. E. Duggan, J. S. Imagire, Copper (I) Chloride Catalyzed Addition of Alcohols to Alkyl Isocyanates. A Mild and Expedient Method for Alkyl Carbamate Formation, *Synthesis* **1989**, 131-132.

65. J. M. Schlatter, R. H. Mazur, Hydrogenation in solid phase synthesis. I. Removal of product from the resin, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *33*, 2851-2852.

66. M. Schubert, D. Labudde, H. Oschkinat, P. Schmieder, A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on 13C chemical shift statistics., *J. Biomol. NMR.* **2002**, *24*, 149-154.

67. G. Osapay, L. Prokai, H. S. Kim, K. F. Medzihradszky, D. H. Coy, G. Liapakis, T. Reisine, G. Melacini, Q. Zhu, S. H. Wang, R. H. Mattern, M. Goodman, Lanthionine-somatostatin analogs: synthesis, characterization, biological activity, and enzymatic stability studies, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2241-51.

68. W. Rasshofer, W. M. Muller, F. Vogtle, Chem. Ber. 1979, 112, 2095-2119.

69. L. Claisen, O. Eisleb, Justus Liebigs Annalen der Chemie 1913, 401, 21-119.

70. T. F. Braish, D. E. Fox, Synthesis of (S,S)- and (R,R)-2-Alkyl-2,5diazabicyclo[2.2.1]heptanes, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1684-1687.

71. M. M. Bowers-Nemia, M. M. Joullie, A short improved synthesis of N-substituted 5-Aza-2-oxa-3-oxo-bicyclo[2.2.1]heptanes, *Heterocycles* **1983**, 20, 817-828.

72. S. K. Chaudhary, O. Hernandez, A Simplified Procedure for the Preparation of Triphenylmethylethers, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *2*, 95-98.

73. S. Meyer, Doktorarbeit, Synthese und Konformationsanalyse von V3-Glycopeptiden des GP120 aus dem HIV, Department for Organic Chemistry, University of Hamburg, Hamburg **1999**.

9 Toxikologische Daten

Stoff	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
(2'-Naphthyl)-3-	Xi	36/37/38	26-36
thiopropionsäure			
(2'-Naphthyl)essigsäure	-	36/37/38	26-36
(2'-Naphthyloxy)-	Xn	22	-
essigsäure			
1-Adamantylisocyanat	Xn	20/21/22-	26-27-
		36/37/38	36/37/39
1-Naphthol	Xn	21/22-37/38-41	22-26-37/39
2,2-Dimethyl-2-sila-5-	-	-	-
sulfonsäure-Natriumsalz			
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	7-16-24/25-26
4-(N,N-Dimethylamino)-	Т	24/25-36/38	22-36/37-45
pyridin			
4-Toluensulfonylchlorid	С	34-37	26-28-
			36/37/39-45
6-Hydroxy-4-	Xi	36/37/38	26-36
methylcumarin			
8-Hydroxychinolin	Xn	20/22	24/25
Acetanhydrid	С	10-20/22-34	26-36/37/39-
			45
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Ammoniumhydrogen-	Xn	22	
carbonat			
Anisaldehyd	-	-	-
Boc-L-Prolin	-	-	-
Bortrifluorid-			26-36/37/39-
Diethyletherat	T, F, C	10-15-22-23-34-48	43-45

Bromessigsäure	T, C, N	23/24/25-35-50	26-36/37/39-
			45-61
Caliumchorid	Xi	36	26
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Chlorotriphenylmethan	С	34	26-36/37/39-
			45
		10-23-22-	23-26-
Cyclohexylisocyanat	T, Xi	36/37/38-42	36/37/39-45
			26-36/37/39-
Cyclopropylisothiocyanat	Т, С	10-23/25-34	45
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-
			36/37
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Diisopropylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-
			36/37/39-45-
			61
Dimethylsulfoxid	Xi	36/37/38	23.3-26-36
Dinatriumhydrogen-	Xi	36/37/38	26-36
phosphat-Dihydrat			
Di-tert			26-28-
butyloxydicarbonat	T, Xi	26-36/38-43	36/37/39-45
Essigsäureethylester	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
Ethanol	F	11	7-16
Ethanolamin	Xn	20-36/37/38	-
Ethyl-(2-isocyanato)acetat	Xn	20/22-36/37/38-	23-26-
		42	36/37/39-45
Iodessigsäure	Т, С	25-35	22-36/37/39-
			45
Kaliumchlorid	-	-	-
Kaliumhydroxid	С	22-35	26-36/37/39-

Kaliumpermanganat O, Kalium- <i>tert.</i> -butylat - Kieselgel G 60 -	9, Xn, N	8-22-53/53 11-14-35	60-61 16-26-45-7/9-
Kieselgel G 60 -		11-14-35	16-26-45-7/9-
Kieselgel G 60 -			
Kieselgel G 60 -			36/37/39-43
ruesenger e oo		-	-
Kupfer-(I)-chlorid Xr	n	22	22
Magnesiumsulfat -		-	-
Methanol F,	, T	11-23/24/25-	7-16-36/37-45
		39/23/24/25	
<i>N,N-</i> Dimethylformamid T		61-E20/21-36	53-45
N-Acetyl-D-glucosamin -		-	-
Natriumazid T+	+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriumborhydrid F,	, T, C	15-25-34	26-36/37/39-
			43-45
Natriumchlorid -		-	-
Natriumdihydrogen		-	-
phosphat-Dihydrat			
Natriumhydrid (60% in F		15	7/8-24/25-43
Paraffin)			
Natriumhydrogen		-	-
carbonat			
Natriumhydroxid C		35	26-37/39-45
Natriumiodid -		-	-
N-Hydroxysuccinimid -		-	-
Palladiumacetat Xi	i	41	22-26-39
Petrolether F,	, Xn, N	11-38-48/20-	16-23.2-24-33-
		51/53-62-65-67	36/37-61-62
Phenol T		24/25-34	28.6-45
Piperidin 20 % in DMF F,	, T	11-23/24-34	16-26-27-45
Pyridin F,	, Xn	11-20/21/22	26-28

Salzsäure 37%	С	34-37	26-36/37/39-
			45
Schwefelsäure 95-97%	С	35	26-30-45
TBTU	Xi	36/37/38	26-36
TCTU	-	-	-
tertButyldimethyl-	С	34	26-36/37/39-
silylchlorid			45
		11-26-22-	16-23-26-28-
tertButylisocyanat	Xn, F	36/37/38-42	36/37/39-45
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33
Toluol	F, Xn	11-20	16-25-29-33
Trans-4-Hydroxy-L-	-	-	-
prolin			
Trans-4-Hydroxy-L-	-	-	-
prolinmethylester-			
Hydrochorid			
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-
			36/37/39-45
Trifluoressigsäure	С	20-35-52/53	9-26-27-28.1-
			45-61
Triisopropylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36
Triisopropylsilylchlorid	С	34-37	26-36/37/39-
			45
Tritylpyridinium-	-	36/37/38	26-36
tetrafluoroborat			
Zitronensäure	Xi	36-26	-

10 Danksagung

Ich danke

- meinem Mann Matthias, für Liebe, Beistand, Rücksichtnahme, Aufmunterung, den Tritt zum rechten Zeitpunkt,...und einfach dafür, dass es Dich gibt!

- meinen Eltern Heide und Hans-Georg Neffe, deren ideelle und finanzielle Unterstützung Studium und Promotion erst ermöglicht haben, und die mich in der letzten Zeit als Dauergast beherbergt haben, obwohl sie wie alle Eltern sicher froh waren, als die Kinder endlich aus dem Haus waren.

- den Drs. Heiko Möller und Robert Meinecke für eine schöne Zeit im Bastellabor sowie Hilfsbereitschaft und Sachverstand in allen Lebenslagen, ganz besonders für die Einführung beim NMR.

- weiterhin allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des AK Meyer für die Zeit mit Euch in Wissenschaft und Freizeit. Ihr seid klasse! Insbesondere möchte ich hier Birgit Claasen (Du bist nun mal ein Schatz!) sowie Ilona Müller hervorheben, die mich bei einer Reihe von Synthesen unterstützt hat. Und dann gehör(t)en dazu (mit speziellen Beiträgen): Atilla Coksezen (NMR & Korrekturen), Boris Kröplien (Computer & Korrekturen), Britta Hünnefeld, Christian Flügge, Dr. Christian Seeberger (Computer), Dennis Wilhelm (der das Thema fortführt), Erika Paul (MALDI), Dr. Florian Ende (HPLC & viel Spaß!), Jan-Christoph Westermann (Computer, Modelling & Korrekturen), Dr. Jan Wülfken (der die Grundlagen für diese Arbeit geschaffen hat), Dr. Jörg Dojahn (Synthese), Jutta Tost (Synthese & Spaß), Kolja Klein, Marco Axmann (Korrekturen & Basteleien), Mirko Lindner, Dr. Moriz Mayer (der das STD-NMR Verfahren entwickelte), Dr. Olaf Nagel, Dr. Oliver Schuster (Modelling), Dr. Sabine Schröter (Spaß), Dr. Sonja Meyer (Synthese), So-Young Shin (NMR & HPLC), Thomas Kühnemund und Winrich Scherres. - meinen Praktikanten, besonders meinem Schwerpunkt-Praktikanten Matthias Bilang, der sich weit über das zu erwartende Maß hinaus eingesetzt hat.

- dem AK Thomas Peters (Lübeck), der mich für die Biacore-Messungen so nett aufgenommen hat, besonders Thies Köhli, Dr. Christian Plath, Dr. Hanne Peters, Dr. Thomas Weimar und Prof. Dr. Thomas Peters.

Dr. Johanna Kölln (AK Bredehorst), Susanne Sölter, Sven Possner (AK Francke),
 Matthias Wulf, Sven Gerber (AK Vill) und allen weiteren Mitgliedern des
 Fachbereichs, die mir mit Gesprächen, Chemikalien, Gelen und vielem mehr
 weitergeholfen haben.

- den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 464, f
ür die nette Zusammenarbeit und den Blick
über den Tellerrand hinaus.

11 Lebenslauf

Geboren am 2. August 1973 in Hamburg, verpartnert.

11.1 Ausbildung

Seit 01.00	Dissertation in der Gruppe von Prof. Dr. B. Meyer am
	Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg,
	Titel: Design, Synthese und Analyse CD4-bindender
	Peptidomimetika.
	Mitglied des Graduiertenkollegs 464: "Glycokonjugate:
	Synthese, Analyse, Struktur und Funktion"
10.98-10.99	Zivildienst im Institut für Laboratoriumsmedizin,
	Mikrobiologie und Transfusionsmedizin am
	Marienkrankenhaus Hamburg gGmbH.
10.95-09.98	Haupstudium der Chemie an der Universität Hamburg
	Abschluss: Diplom (Note 1.3, 'sehr gut')
	Diplomarbeit im AK B Meyer: Untersuchungen zur
	Isolierung eines hochmannosidischen Oligosaccharids.
10.93-09.95	Grundstudium der Chemie an der Universität Hamburg
	Abschluss: Vordiplom (Note 1.0, 'sehr gut')
06.93	Abitur am Gymnasium Buckhorn, Hamburg,
	Durchschnitt 1.3

Anstellungen	
09.01-09.03	Assistent für das OC-Grundpraktikum, Universität
	Hamburg
seit 01.00	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Universität Hamburg
11.99	Mitarbeiter im ILMT des Marienkrankenhaus Hamburg
	gGmbH
04.98-07.98	Assistent im Kurs ,Organische Chemie für Mediziner'
04.97-07.97	Tutor im Kurs , Anorganische Chemie für Biologen'

11.2 Veröffentlichungen:

Schriftliches:	Meyer, B., Klein, J., Mayer, M., Meinecke, R., Möller, H.,
	Neffe, A., Schuster, O., Wülfken, J., Ding, Y., Knaie, O.,
	Labbe, J., Palcic, M.M., Hindsgaul, O., Wagner, B., Ernst,
	B., Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy for
	Identifying Ligand Epitopes and Binding Specificities,
	Chapter 9 in Lecuocyte Trafficking - The Role of
	Fucosyltransferases and Selectins, Ernst Schering Research
	Foundation, Workshop 44, Hamann, K. Asadullah, A.
	Schottelius (Editors), Springer-Verlag Berlin Heidelberg
	2004, 149-167.
	Neffe, A.T., Meyer, B., A New Peptidomimetic HIV Entry
	Inhibitor Directed Against the CD4 Binding Site for the
	Viral GP120, Angew. Chem. Int. Ed., angenommen.
Posterpräsentationen:	Meyer, S., Neffe, A.T., Tost, J., Muller, H., Schreiber, M.,
	Meyer, B., Synthesis and Structural Characterization of N-
	Type Glycopeptides Related to the V3-Loop of HIV
	GP120, 20th International Carbohydrate Symposium,
	Hamburg, August 2000.

Neffe, A.T., Moller, H.M., Wulfken, J., Schreiber, M., Meyer, B., Design and Synthesis of Peptidomimetic Ligands of the GP120/CD4-Interaction, 4th Australian Peptide Conference, Lindeman Island, Australia, Oktober 2001.

Neffe, A.T., Meyer, B., Design and Synthesis of Peptidomimetic Ligands of the GP120/CD4-Interaction, Schering Chemistry Workshop, Berlin, Juni 2002

Gruppe B. Meyer, Synthese and Bindungseigenschaften komplexer Glycopeptide des HIV GP120, Evaluierung des SFB 470, Hamburg, Januar 2003.

Neffe, A.T., Meyer, B., Characterization of a Novel Class of CD4 Binding Peptidomimetics – Potential HIV Entry Inhibitors, 25th Discussion Meeting of the Magnetic Resonance Spectroscopy Division of the German Chemical Society, Leipzig, Oktober 2003

Vorträge: Neffe, A.T., Meyer, B., Design und Synthese CD4 bindender Peptidomimetika, Evaluierung des Graduiertenkollegs 464, Hamburg, Juni 2001

> Neffe, A.T., Drug Design auf dem Weg zu HIV Entry Inhibitoren, Seminar der Bioinformatik, Charité Berlin, Juni 2003.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.