

Design, Synthese und Analyse
CD4 bindender Peptide,
Glycopeptide und deren Mimetika
als HIV-*Entry*-Inhibitoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Dennis Wilhelm
aus Hamburg

Hamburg, 2009

meinen Eltern

Es gibt kein großes Genie ohne einen Schuß Verrücktheit.

- Aristoteles - griechischer Philosoph, 384 – 322 v. Chr.

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an, interessant zu werden, wo sie aufhört.

- Justus von Liebig - deutscher Chemiker, 1803 - 1873

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2004 bis Juni 2009 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. B. Meyer, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. B. Meyer danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die stets wertvolle und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

Tag der Disputation: 16.10.2009

1	EINLEITUNG	1
1.1	ARZNEIMITTELFORSCHUNG	1
1.2	PEPTIDE UND PEPTIDOMIMETIKA	2
1.3	DESIGN VON NICHT-PEPTIDISCHEN MIMETIKA	2
1.3.1	<i>Sekundärstruktur Mimetika</i>	2
1.3.2	<i>Tertiärstruktur-Mimetika</i>	6
1.4	DAS HUMANE IMMUNSCHWÄCHE VIRUS (HIV)	8
1.4.1	<i>AIDS und das HI-Virus</i>	8
1.4.2	<i>HIV-Lebenszyklus</i>	9
1.5	THERAPIEANSÄTZE ZUR BEKÄMPFUNG VON HIV	12
1.5.1	<i>Entry-Inhibitoren</i>	12
1.6	VERGLEICH DER CD4/MHC-II- UND DER CD4/GP120-WECHSELWIRKUNG	14
1.7	CD4-BINDENDE PEPTIDE UND PEPTIDOMIMETIKA	15
2	METHODEN	19
2.1	KONFORMATIONSANALYSE VON PEPTIDEN	19
2.2	OBERFLÄCHENPLASMONENRESONANZ	21
3	PROBLEMSTELLUNG	25
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	27
4.1	SYNTHESE UND ANALYSE NEUARTIGER CD4-BINDENDER PEPTIDOMIMETIKA	27
4.1.1	<i>Analyse Statin-modifizierter Peptidomimetika</i>	28
4.1.2	<i>Docking-Studien backbone-modifizierter Peptidomimetika</i>	35
4.1.3	<i>Syntheseoptimierung Dipeptid-mimetischer Bausteine</i>	39
4.1.4	<i>Synthese von L-Cyclohexylalanin-derivatisierten Dipeptidmimetika</i>	51
4.1.5	<i>Lineare Synthese der entwickelten Peptidomimetika 16 und 17</i>	54
4.1.6	<i>Analyse und Optimierung der Festphasenpeptidsynthese</i>	59
4.1.7	<i>Analyse und Optimierung der Carbamat-Synthese</i>	64
4.1.8	<i>Konvergente Synthese der entwickelten Peptidomimetika</i>	67
4.1.9	<i>SPR-Untersuchungen der neu entwickelten Peptidomimetika</i>	73
4.1.10	<i>Untersuchung zur Proteolysestabilität</i>	78
4.2	EINFLUSS DER GLYCOSYLIERUNG DES ASN ²⁰¹ AUF DIE BINDUNGS-AFFINITÄT VON PEPTIDEN	81
4.2.1	<i>Synthese der Peptide und Glycopeptide</i>	84
4.2.2	<i>SPR-Untersuchungen der Peptide und Glycopeptide 81 - 86</i>	91
4.2.3	<i>Konformationsanalyse des zyklischen Glycopeptids 86</i>	96
4.2.4	<i>Strukturgenerierung mit dem Programm DYANA</i>	98
4.2.5	<i>Constrained Moleküldynamiksimulation</i>	102
4.3	ENTWICKLUNG, SYNTHESE UND ANALYSE NEUARTIGER GLYCOPEPTIDOMIMETIKA	106
4.3.1	<i>Synthese neuartiger, unnatürlicher Monosaccharid-Aminosäuren</i>	108
4.3.2	<i>SPR-Untersuchungen der Monosaccharidpeptidomimetika</i>	120

4.3.3	<i>Synthese neuartiger Monosaccharid-mimetischer Aminosäuren</i>	125
4.3.4	<i>Synthese neuartiger, unnatürlicher Disaccharid-Aminosäuren</i>	126
4.3.5	<i>SPR-Untersuchungen der Disaccharidpeptidomimetika</i>	130
5	ZUSAMMENFASSUNG	132
6	SUMMARY	136
7	EXPERIMENTELLER TEIL	139
7.1	GERÄTE	139
7.2	CHEMIKALIEN	140
7.3	SPR-EXPERIMENTE	141
7.4	SYNTHESEN	141
7.4.1	<i>Allgemeine Arbeitsvorschriften</i>	143
7.4.2	<i>Verbindungen aus Abschnitt 4.1</i>	146
7.4.3	<i>Verbindungen aus Abschnitt 4.2</i>	184
7.4.4	<i>Verbindungen aus Abschnitt 4.3</i>	192
7.5	UNTERSUCHUNG DER PROTEOLYSESTABILITÄT	233
7.6	KONFORMATIONSANALYSE	233
7.6.1	<i>NOESY-Spektren und Berechnung der NOE-Kontakte</i>	233
7.6.2	<i>Berechnung der ϕ-Winkel</i>	233
7.6.3	<i>DG-Rechnungen</i>	234
7.6.4	<i>Constrained MD-Simulation</i>	235
8	TOXIKOLOGISCHE DATEN	237
9	LITERATUR	240
10	DANKSAGUNG	256
11	CURRICULUM VITAE	259

Abkürzungsverzeichnis

1D-, 2D-, 3D-	ein-, zwei-, dreidimensional
AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
AIDS	<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
Äq	Äquivalent
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyl-dicarbonat
BSA	Bovines Serumalbumin
CCA	α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
CCR _n	C-Typ-Chemokinrezeptor <i>n</i>
CXCR _n	CX-Typ-Chemokinrezeptor <i>n</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDI	1, 1'-Carbonyldiimidazol
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CV	<i>Column Volume</i>
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DHB	2, 5-Dihydroxybenzoesäure
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	<i>N, N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DME	1, 2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid
EE	Ethylacetat
EI	<i>Electron Ionisation</i>
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i>

EtOH	Ethanol
Et ₃ N	Triethylamin
Et ₂ O	Diethylether
FAB	<i>Fast Atom Bombartment</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-ONSu	9-Fluorenylmethyl- <i>N</i> -succinimidyl-carbonat
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GP	Glycoprotein
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HATU	2-(1 <i>H</i> -7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphate
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
KHMDS	Kalium-1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazan
LAH	Lithiumaluminiumhydrid
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MW	Molgewicht [g* mol^{-1}]
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOA	Naphtyloxyessigsäure
NOE	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAL	Peptidamid-Linker
PE	Petrolether 50-70
PEG	Polyethylenglycol
Pg	<i>Protecting Group</i>

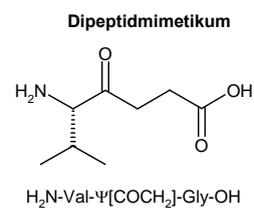
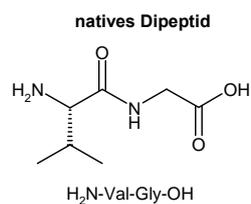
Pip	Piperidin
ROESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
RP	<i>Reversed Phase</i>
R _f	Retentionsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
R _t	Retentionszeit
RT	Reverse Transkriptase
RU	<i>response unit</i>
SAR	<i>structure activity relationship</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
STD	Sättigungstransfer Differenz
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
TOF	<i>Time Of Flight</i>
WATERGATE	<i>water suppression by gradient taylorred excitation</i>
v/v	Volumen per Volumen
Zers.	Zersetzung

Aminosäuren

<i>Aminosäure</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Code</i>	<i>Schutzgruppe</i>
Alanin	Ala	A	
Arginin	Arg	R	Pbf
Asparagin	Asn	N	Trt
Asparaginsäure	Asp	D	<i>t</i> Bu
Cystein	Cys	C	Trt
Glutamin	Gln	Q	Trt
Glutaminsäure	Glu	E	<i>t</i> Bu
Glycin	Gly	G	
Histidin	His	H	Trt
Isoleucin	Ile	I	
Leucin	Leu	L	
Lysin	Lys	K	Boc
Methionin	Met	M	
Phenylalanin	Phe	F	
Prolin	Pro	P	
Serin	Ser	S	<i>t</i> Bu
Threonin	Thr	T	<i>t</i> Bu
Tryptophan	Trp	W	Boc
Tyrosin	Tyr	Y	<i>t</i> Bu
Valin	Val	V	

Dipeptidmimetika

Die Nomenklatur der Pseudopeptide in dieser Arbeit basiert auf dem Suffix Ψ , gefolgt von der Substitution in eckigen Klammern, z. B.:



1 Einleitung

1.1 Arzneimittelforschung

Schon die Alchimisten haben ein Elixier, das sogenannte *Arcanum* gesucht, das jede Krankheit zu heilen vermag. Heute wissen wir, dass dies eine Illusion bleiben musste. Die Therapie mit Arzneimitteln ist mit dem stetig zunehmenden Kenntnisstand der verschiedenen Krankheitsursachen extrem komplex geworden.

Dennoch sind die Erfolge der Arzneimittelforschung beeindruckend. Dank Hygiene, Impfungen, Chemotherapeutika, Antibiotika und anderen Medikamenten sind Seuchen und Infektionskrankheiten heute, zumindest in den industrialisierten Ländern, stark zurückgedrängt worden. Im Besonderen schien durch die Entdeckung der Antibiotika ein entscheidender Schritt in der Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten und Seuchen gelungen zu sein.¹ Unter anderem wurden die Entdeckungen des Penicillins durch Fleming, Chain und Florey 1945 und die des gegen Tuberkulose wirksamen Streptomycins durch Waksman 1952 mit Nobelpreisen für Physiologie und Medizin gewürdigt.²

Bei vielen bakteriellen Infektionskrankheiten, z. B. der Tuberkulose sind aber durch die stark zunehmende Zahl therapieresistenter Krankheitserreger neue Probleme entstanden.³ Vor Kurzem entdeckte, meist durch Viren verursachte Krankheiten, wie das *Acquired Immuno Deficiency Syndrome* (AIDS), erweitern diese Reihe altbekannter Krankheitserreger mit hohen Resistenzen gegenüber bekannten Wirkstoffen. Dies führt dazu, dass bestimmte Erregerstämme nur noch mit neu entwickelten, hochspezifischen Arzneistoffen zu therapieren sind.

Neben den angesprochenen Resistenzen sind es auch die heutigen Anforderungen der Zulassungsbehörden, die Arzneistoffe mit hoher Spezifität und geringeren Nebenwirkungen notwendig machen. Stellten früher vor allem pharmakologisch wirksame Naturstoffe aus biologischen Systemen den Hauptteil der Wirkstoffe, so sind in den letzten Jahren synthetische Peptidomimetika immer mehr in den Fokus der Forschung und Entwicklung von Wirkstoffen gelangt. In dem Prozess der Entwicklung solcher hochspezifischer Wirkstoffe sind neben Chemikern, Biologen und Medizinern auch Physiker und Informatiker involviert, so dass sich die Arzneimittelforschung zu einem komplexen und interdisziplinärer Forschungszweig entwickelt hat, in den deutschlandweit im Jahre 2006 um die 4.3 Milliarden Euro investiert worden sind.⁴

1.2 Peptide und Peptidomimetika

Peptide und Proteine sind für die Kontrolle einer Vielzahl von biologischen Prozessen zuständig. Um die komplexen Mechanismen und Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu untersuchen ist es ein möglicher Ansatz, die Proteine in kleinere Einheiten zu unterteilen und die Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion dieser Einheiten zu untersuchen. Diese Einteilung kann die Identifizierung der aktiven Zentren bzw. des Epitops eines nativen Proteins erleichtern. Auf Basis dieser Resultate können niedermolekulare, peptidische Verbindungen abgeleitet werden, die in der Lage sind das aktive Zentrum bzw. das Epitop zu mimikrieren, womit sie für Studien molekularer Erkennungsprozesse herangezogen werden können⁵⁻⁹ Die hohe konformationelle Flexibilität von Peptiden in Lösung erschweren jedoch oftmals die Bestimmung der bioaktiven bzw. der Rezeptor-gebundenen Struktur.¹⁰ Um u. A. dieser hohen Flexibilität entgegenzuwirken stellen Peptidomimetika ein wertvolles Instrument dar, um die biologisch aktiven Peptide aus dem aktiven Zentrum bzw. Epitop und somit die Protein/Protein Wechselwirkung zu mimikrieren.¹¹⁻¹³

1.3 Design von nicht-peptidischen Mimetika

Im Verlauf der 90iger Jahre des letzten Jahrhunderts wurden vermehrt Anstrengungen unternommen, mittels rationalen Designs biologisch aktive Analoga zu entwickeln.¹⁴ Die intensiven Weiterentwicklungen in den Bereichen der Biochemie, Spektroskopie und Computerchemie haben in den letzten Jahren dazu beigetragen, ein leistungsfähigeres und zuverlässigeres rationales Design zu entwickeln.¹⁵⁻¹⁷ So werden die pharmakophoren Gruppen, die sich aus einer Leitstruktur ergeben, durch einen geeigneten Linker in den benötigten räumlichen Abstand zueinander angeordnet, so dass eine optimale Wechselwirkung zum *Target* möglich ist. Durch diese Vorstrukturierung der pharmakophoren Gruppen entfällt der entropische Verlust der Bindungsenergie, der auftritt, wenn das entsprechende native Peptid aus einer Vielzahl von Konformeren in das bindende übergeht.¹⁸

1.3.1 Sekundärstruktur Mimetika

Ein Ansatz in der Entwicklung von Peptidomimetika ist das Mimikrieren von nativen Sekundärstrukturelementen der Proteine. Im Besonderen sind die drei Strukturelemente α -Helix, β -Faltblatt und *Turns* hervorzuheben. Das Design solcher Peptidomimetika, erfordert meist die Analyse komplexer Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den Proteinen.

Die exponierte Lage von *Turns* an der Oberfläche von Proteinen und die zusätzliche Anwesenheit von bestimmten Aminosäureresten innerhalb dieser *Turns* haben zu der Hypothese geführt, dass *Turns* bei einer Vielzahl von Erkennungsprozessen eine dominante Rolle spielen. Die Entwicklung spezifischer *Turn*-Mimetika ist somit ein vielversprechender Ansatz zur Verifizierung dieser These.¹⁹

Hirschmann *et al.* gelang so die Entwicklung und Synthese des ersten nicht-peptidischen Analogons des Rezeptor erkennenden β -*Turns* des Somatostatins (Abbildung 1, **3**).^{20;21} Das native, cyclische Hormonpeptid inhibiert die Wirkung einer Vielzahl von Hormonen, welche das Zellwachstum (z. B. GH, ACTH) regulieren. Zusätzlich inhibiert es die Produktion von Insulin oder Renin durch Wechselwirkung mit unterschiedlichen G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR).

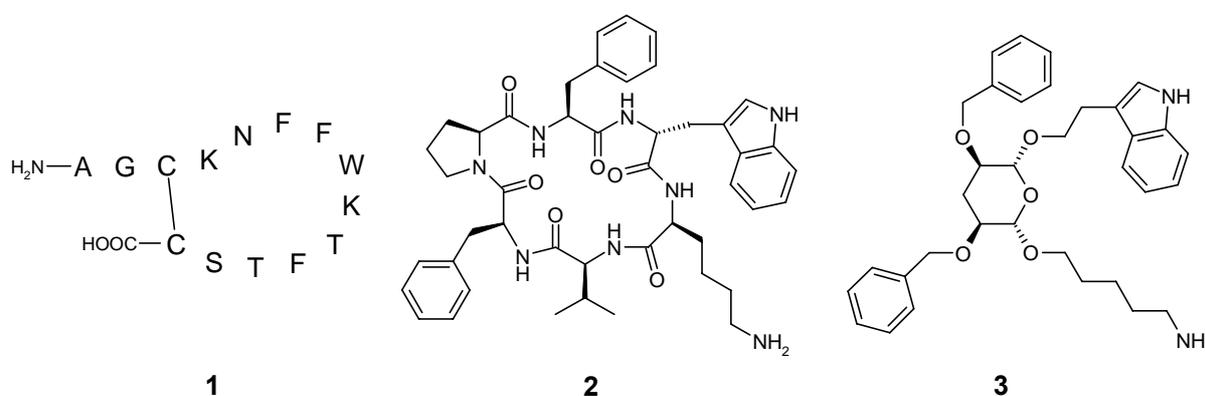


Abbildung 1: Somatostatin, ein cyclisches 14er Peptidhormon (**1**); ein cyclisches Peptid, das den β -*Turn* des Somatostatin mimikriert (**2**); ein von β -D-Glucose synthetisiertes Nicht-Peptid-Mimetikum des β -*Turns* (**3**).

Sowohl das peptidische Analogon **2** als auch das nicht-peptidische Analogon **3** sind in der Lage, als Agonisten des Somatostatins an einem Endokrin-Rezeptor zu fungieren. Dieser ist für die Freisetzung von GH verantwortlich. Der IC_{50} -Wert des Mimetikums **3** konnte dabei in einem Funktionsassay mit $3 \mu\text{M}$ bestimmt werden.²¹

Basierend auf NMR-spektroskopischen Untersuchungen sowie durch Verwendung von cyclischen Peptidanaloga konnte festgestellt werden, dass β -*Turns* die ubiquitäre, bioaktiven Konformationen innerhalb von Peptidhormonen und Neuropeptiden als Liganden für GPCRs sind.²²⁻²⁶ Das erfolgreiche Design eines β -*Turn*-Peptidomimetikums ist jedoch durch die relativ hohe konformationelle Vielfalt der *Turns*²⁷ (unterschieden wird in acht Hauptklassen) und die einhergehende Spezifität eines jeden β -*Turns* recht komplex. Durch die Notwendigkeit einer exakten räumlichen Anordnung der pharmakophoren Gruppen ist die Synthese eines solchen Peptidomimetikums in der Regel alles andere als trivial. Chen *et al.* synthetisierten Anfang der 1990iger Jahre ein β -*Turn*-Mimetikum aus der CDR2-Region des

humanen CD4-Proteins als potentiellen HIV-Entry-Inhibitor (siehe Abschnitt 1.5.1).⁵ Die für die Bindung zum Virus höchst relevanten Aminosäuren 40-45 des CD4-Proteins liegen an der Oberfläche des Proteins^{28;29} und bilden einen β -Turn, der zwei β -Faltblattstrukturen miteinander verbindet. Die Geometrie des synthetisierten Mimetikums (Abbildung 2) wurde mittels NOESY-Analyse in Lösung gegenüber eines idealisierten Typ II' β -Turns untersucht, wobei eine annehmbare Übereinstimmung der entsprechenden *backbone*-Regionen aufgezeigt werden konnte.³⁰

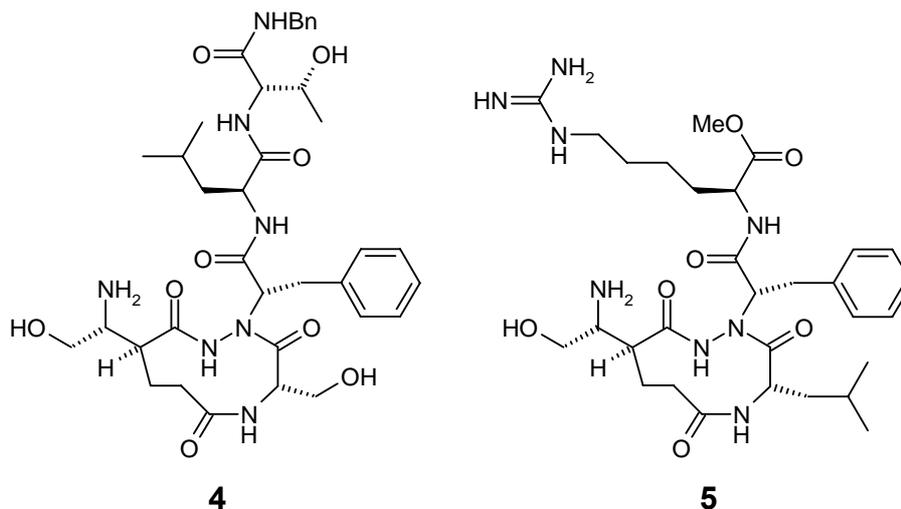


Abbildung 2: Peptidomimetika des β -Turns der CDR2 Domäne des CD4 Proteins. Mimetikum **4** inhibiert die Bindung zwischen CD4+-Zellen und HIV-1 (IIIB) GP120 in mikromolarer Konzentration. Mimetikum **5** wurde entwickelt, um neben den für die Bindung zum GP120 essentiellen Aminosäuren Gln⁴⁰ bzw. Phe⁴³ zusätzlich das relevante Arg⁵⁹ durch ein entsprechendes Homoarginin zu mimikrieren.

Die Verwendung größerer Makrozyklen innerhalb eines solchen *Turn*-Mimitikums ist jedoch durch deren hohe Flexibilität problematisch. Die *backbone*-Konformation dieser Zyklen hängt in Lösung stark von den entsprechenden intramolekularen Seitenketten-Interaktionen ab. Um diese hohe Flexibilität und den damit einhergehenden Entropieverlust beim Übergang vom freien zum gebundenen Zustand zu minimieren, ist es vonnöten ein rigides Grundgerüst zu integrieren, welches idealerweise sowohl die Bioverfügbarkeit/Bindungsaffinität erhöht wie auch die pharmakophoren Gruppen in der gewünschten geometrischen Anordnung zulässt.

In diesem Zusammenhang sind im Besonderen bicyclische Ringsysteme des Aza- bzw. Diazabicyclo[X.Y.0]alkantyps zu nennen, die durch die Vielzahl an unterschiedlichen Grundgerüsten eine Reihe von unterschiedlichen Peptidkonformationen mimikrieren.^{31; 32} In solchen Mimetika können die unterschiedlichen Diederwinkel ω , φ und ψ sowie der erste Seitenkettenkonformationswinkel χ_1 (siehe Abbildung 11, Abschnitt 2.1) konformationell fixiert werden. Unterschiedliche Verbindungen, die eine Vielfalt von Peptidgeometrien

nachahmen und sich von den Verbindungen **6** und **7** (Abbildung 3) ableiten, wurden unter anderem in Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und als Modulatoren pharmazeutisch relevanter Rezeptorfunktionen eingesetzt.

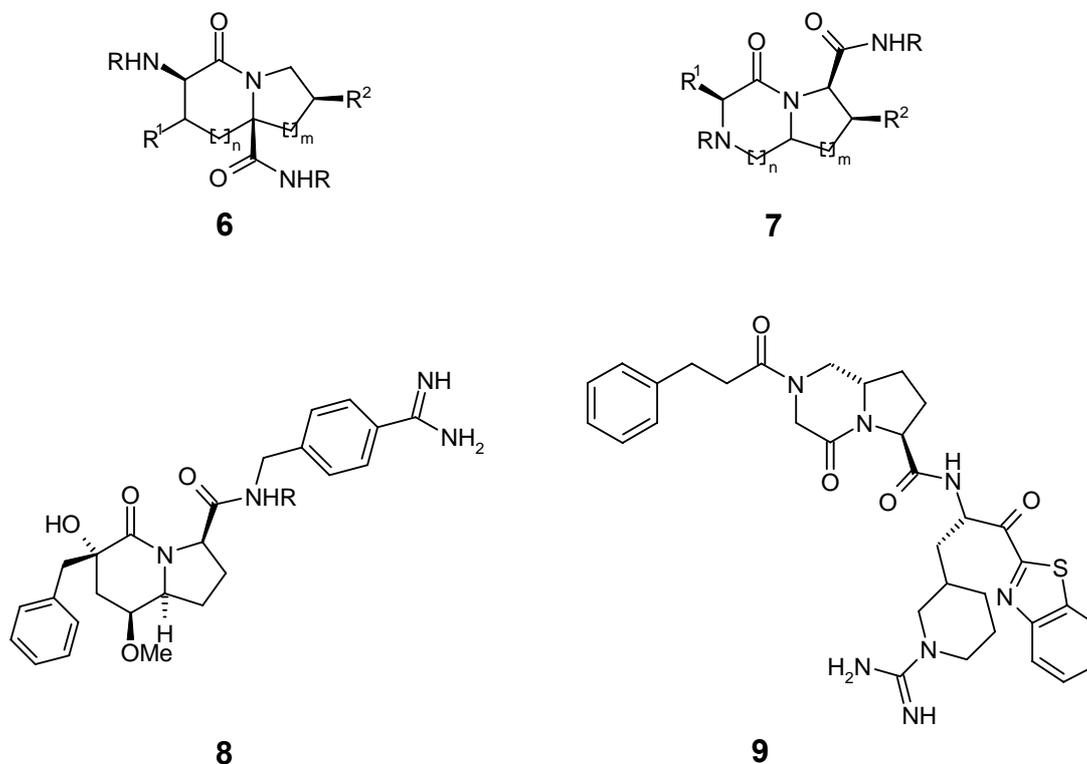


Abbildung 3: Dipeptidmimetika **6** und **7** stellen den Grundkörper der Aza- bzw. Diazabicyclo[X.Y.0]alkantypen dar. Das Mimetikum **8** stellt einen potenten α -Thrombin-Inhibitor dar, der α -Thrombin mit $K_i = 1.5 \text{ nM}$ inhibiert. Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte festgestellt werden, dass der Inhibitor starke Wechselwirkungen mit der P2-Bindungsseite durch die Ausbildung einer α -helicale Struktur eingeht.³³ Mimetikum **9** bildet hingegen eine β -Strand-Struktur aus und bindet ebenfalls an α -Thrombin, jedoch an die P1-Bindungsseite mit einem IC^{50} -Wert von 5 nM .³⁴

Die in Abbildung 3 dargestellten α -Thrombin-Inhibitoren **8** und **9** sind Beispiele für die Vielfalt dieser Bicyclen dar. Die stärkste Wechselwirkung der beiden Mimetika ist eine ausgebildete Salzbrücke zwischen der Amidino-Gruppe bzw. der Guanidinium-Gruppe der Mimetika zum Asp¹⁸⁹, welches in einer zentralen Position in der Bindungstasche des α -Thrombins lokalisiert ist. Sie unterscheiden sich allerdings durch ihre dreidimensionale Anordnung innerhalb der Bindungskavität. Mimetikum **8** bildet eine α -helicale Struktur aus und ist dadurch in der Lage, mit der hydrophoben Bindungsseite P2 der Bindungstasche Wechselwirkungen einzugehen³³, wohingegen das Mimetikum **9** durch die Ausbildung eines β -Strands Wechselwirkungen mit der Bindungsseite P1 eingeht.³⁴

Durch die stereoselektive Synthese solcher Bicyclen ist es möglich, bestimmte Sekundärstrukturmerkmale von potentiellen Inhibitoren zu mimikrieren und deren Einfluss auf die Bindungseigenschaften gezielt zu untersuchen.³⁵

1.3.2 Tertiärstruktur-Mimetika

Neben den bereits erwähnten Sekundärstrukturmerkmalen sind funktionale Epitope ebenfalls durch die dreidimensionale Struktur der Proteine definiert. Diese Epitope sind meist diskontinuierlicher Natur, womit die beteiligten Aminosäuren in der Primärstruktur nicht in direkter Nachbarschaft zueinander stehen müssen, sondern ggf. auf weit voneinander entfernten Teilen des Proteins lokalisiert sein können. Dieses Konzept wurde unter anderem durch Deletionsexperimente am Wachstum-Hormon-Rezeptor mit seinen Liganden bestätigt.³⁶ Um das funktionale Epitop des Proteins zu mimikrieren, muss auch hier ein geeignetes molekulares Grundgerüst gefunden werden, das die essentiellen funktionellen Gruppen in der entsprechenden Geometrie fixiert. Bei der Entwicklung solcher Tertiärstruktur-Mimetika muss sowohl das entsprechende Grundgerüst in der Lage sein die C_{α} -Position als auch den Vektor zwischen C_{α} und C_{β} der funktionellen Gruppen des Epitops exakt zu positionieren. Durch diesen Umstand ist der Transfer eines Konzeptes aus der Entwicklung eines bestimmten Tertiärstruktur-Mimetikums auf Entwicklung eines neuen Mimetikums, welches ein anderes Protein als *Target* besitzt, schwierig. Nichtsdestotrotz wird die Entwicklung solcher Mimetika durch *in silico*-Verfahren und *screening*- bzw. *SAR by NMR*^{37;38} möglich. Folgend der Strategie des Ableitens eines Epitops auf ein niedermolekulares Molekül, gelang es Gadek *et al.*, einen Inhibitor der Wechselwirkung des Lymphociten-assoziierten Antigens 1 (LFA-1) mit dem Interzellulären Adehäsions Molekül 1 (ICAM-1 oder CD54) zu entwickeln.³⁹ Hierbei wurde zunächst die räumliche Anordnung der für die Bindung relevanten Aminosäuren E³⁴, K³⁹, M⁶⁴, Y⁶⁶ und Q⁷³ untersucht. Darauffolgend wurden die durch *SAR* erhaltenen Daten eines optimierten cyclischen Peptids (**10**, Abbildung 4) dazu verwendet, um eine niedermolekulare Leitstruktur zu entwickeln (**11**). Anschließend wurde in einer kleinen *screening*-Bibliothek ein sehr potenter Inhibitor entdeckt (**12**).

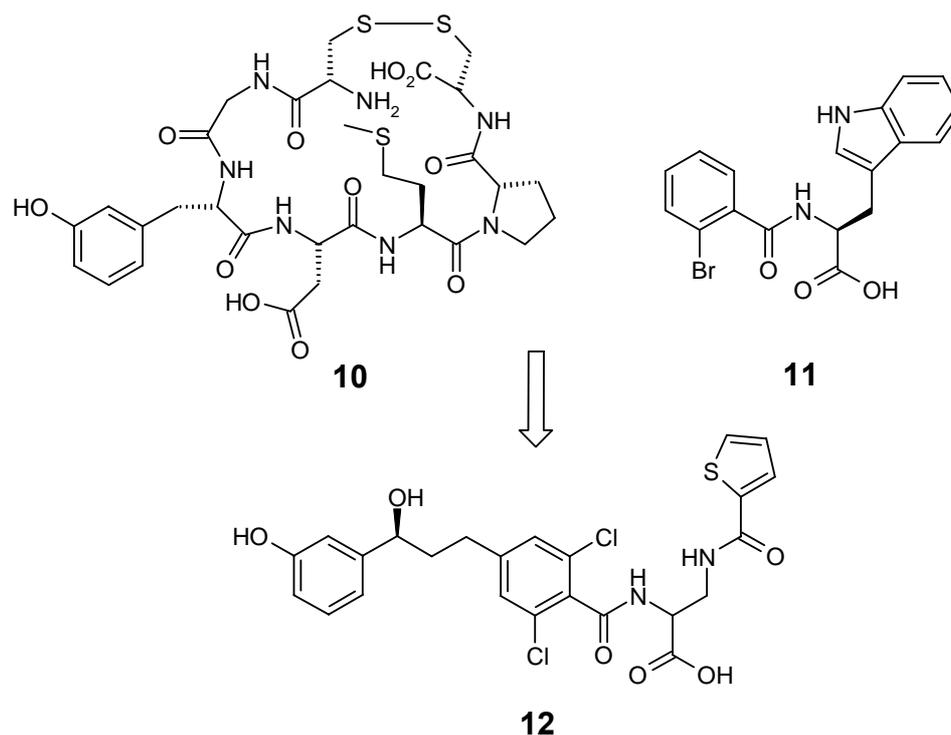


Abbildung 4: Ein der Bindungstasche des ICAM-1 nachempfundenes und optimiertes zyklisches Peptid **10** inhibiert die Bindung zum LFA-1 mit einem IC_{50} -Wert von 1.6 μ M. Aus SAR-Studien am zyklischen Peptid ging der niedermolekulare Inhibitor **11** ($IC_{50} = 1.4 \mu$ M) hervor. Nach *screening* einer kleinen auf Ligand **11** basierenden Bibliothek wurde ein stark inhibierender Ligand **12** erhalten ($IC_{50} = 3$ nM).

Durch den Vergleich der Röntgenkristallstrukturanalysen des ICAM-1⁴⁰ mit Analysen des ICAM-1 mit dem entwickelten Liganden **12** konnte gezeigt werden, dass sowohl das Dichlorphenyl als auch das Thiophen sowie die Carboxylfunktion des Inhibitors mit den funktionellen Gruppen des Y⁶⁶, M⁶⁴ und E³⁴, in Deckung gebracht werden können. Ebenso findet sich die Position des *m*-Phenols ideal zwischen Q⁷³ und N⁶⁸ wieder.³⁹ Das aus diesem Entwicklungsprozess hervorgegangene Tertiärstruktur-Mimetikum **12** bindet in einem *Mixed Lymphocyte Reaction* (MLR) Assay mit einem IC_{50} -Wert von 3 nM um den Faktor sieben stärker als ein F_{ab}-Fragment eines entsprechenden Antikörpers und um den Faktor 20 stärker als Cyclosporin A (ein zyklisches 11er Peptid, welches als zugelassener Arzneistoff an ICAM-1 bindet).

Durch die Weiterentwicklung von Methoden wie *in silico* Rechnungen, fokussierter kombinatorischer Chemie, sowie *SAR by NMR*, STD-NMR und Techniken in der Röntgenkristallstrukturaufklärung wird die Entwicklung von vielversprechenden Tertiärstruktur-Mimetika beschleunigt und rückt immer mehr in den Fokus der Inhibitorenentwicklung.⁴¹

1.4 Das humane Immunschwäche Virus (HIV)

1.4.1 AIDS und das HI-Virus

Mit der Veröffentlichung der Beobachtung einer ungewöhnlichen Form der Lungenentzündung bei fünf homosexuellen Männern durch das „*U.S. Centre for Disease Control and Prevention*“ im Juni 1981 begann die Dokumentation einer der verheerensten Epidemien der Menschheitsgeschichte.⁴² Die medizinische Fachwelt diagnostizierte im Zusammenhang mit diesen Fällen ein bis dato nicht bekanntes Syndrom, das das Immunsystem des Befallenen stark schwächt. Dieses Syndrom ist heute als *Acquired Immuno Deficiency Syndrome* (AIDS) bekannt. Als Verursacher dieses Syndroms wurde 1983 das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) von zwei Arbeitsgruppen identifiziert.^{43;44} Das Privileg der Entdeckung des Virus wurde in den 1980er Jahren stark diskutiert, jedoch gab Gallo Mitte der 1990er zu, dass Barre-Sinoussi und Montagnier die ursprünglichen Entdecker des Virus seien, wofür sie im Jahre 2008 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurden.^{45; 46} Der Verlauf der HIV-Infektion weist in der Regel zunächst eine über mehrere Jahre klinisch unauffällige Phase auf. In dieser Zeit wird das Immunsystem des Infizierten kontinuierlich geschwächt, bis dieser im Endstadium (AIDS) opportunistischen Krankheiten erliegt.



Abbildung 5: Globale Schätzung der HIV-Infizierten bis Ende des Jahres 2008⁴⁷

Weltweit sind im Jahre 2008 nach Abschätzungen der UNAIDS und WHO, 2.5 Millionen Menschen mit HIV neu infiziert worden, womit die Gesamtanzahl an Infizierten weltweit auf 33.2 Millionen angestiegen ist (Abbildung 5). Vergleicht man diese Zahl mit denen aus dem Jahre 2001, so ist dies ein Anstieg von 14.5%, wobei im Verhältnis zur gesamten Welt der

prozentuale Anstieg der Infizierten in den asiatischen Regionen mit bis zu 300% im Vergleich zu 2001 am auffälligsten ausfällt.⁴⁸

Das HI-Virus unterteilt sich in zwei Arten, die sich wiederum in eine Vielzahl von Subtypen unterscheiden lassen. Während der Virus-Typ 1 global vorkommt, beschränkt sich das Typ 2-Virus nur auf den westlichen Teil Afrikas und zeichnet sich, neben dem geringeren pathogenen Potential, auch durch eine geringere Verbreitungsgeschwindigkeit aus und spielt eher eine untergeordnete Rolle.^{49; 50} Beide HIV-Arten haben sich im Laufe der Zeit in verschiedene Subtypen-Gruppen differenziert. Im Falle des HIV-1 unterscheidet man diese aufgrund von Sequenzanalysen in die Subtyp-Gruppen M (*main*), O (*outlier*) und die N (*non-M, non-O*), wobei mit 99% aller HIV-Infektionen die Subtypen (Subtypen A bis K) der M-Gruppe am verbreitetsten sind. Besonders erwähnenswert ist, dass die Erbinformationen des HI-Virus selbst innerhalb eines Subtyps um 10% voneinander divergieren können. Ebenfalls wird beobachtet, dass einige Subtypen vornehmlich in bestimmten geografischen Regionen vorkommen. So ist der Subtyp B dominierend in Europa, Nord-, Mittel- und Südamerika sowie in Australien, der Subtyp C in Äthiopien, Indien und Süd-Afrika. In Zentralafrika dagegen koexistieren verschiedene Subtypen. Aufgrund genetischer Vergleiche mit HIV-2 wird vermutet, dass das HIV vom SIV stammt und vor etwa 50 Jahren in Zentralafrika vom Affen auf den Menschen übergegangen ist.⁵¹

1.4.2 HIV-Lebenszyklus

Das HIV infiziert hauptsächlich Zellen wie Makrophagen oder T-Helferzellen.⁵² Diese Immunzellen haben gemein, dass sie an ihrer Oberfläche den *Cluster of Differentiation 4* exprimieren (CD4⁺-Zellen), der vom Virus erkannt wird und für den *Virus-Entry* von großer Bedeutung ist. Bei dem CD4 handelt es sich um ein glycosyliertes Transmembranprotein mit einer Molmasse von 55 kDa. Neben der intrazellulären und transmembranen Domäne verfügt das CD4 über vier extrazelluläre Domänen, die immunglobulinartig (D1-D4) aufgebaut sind. Drei dieser Domänen sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die native Funktion des CD4 ist die Identifizierung einer bestimmten Zellabstammungslinie oder eines Entwicklungszustandes einer Zelle. Dabei fungiert das Transmembranprotein als Corezeptor des T-Zell-Rezeptors, indem es die T-Zellen zu den peptidpräsentierenden MHC-II-Komplexen der Zielzellen dirigiert und somit für die Immunantwort des menschlichen Körpers eine wichtige Rolle spielt.

Der erste Schritt in der Infektion der Wirtszelle durch das HIV besteht in einer Wechselwirkung des humanen CD4-Proteins mit dem viralen GP120-Protein.^{53; 54} Bei dem viralen Protein GP120 handelt es sich um ein Glycoprotein, welches an der Oberfläche des

Virus lokalisiert ist. Es liegt dort trimer vor und ist an das, ebenfalls trimer vorliegende Transmembranprotein GP41 nicht-kovalent gebunden.⁵⁵ Es besitzt eine Molmasse von 120 kDa und weist einen hohen Glycosylierungsgrad auf, so dass 50% seines Molgewichts auf die Kohlenhydrateinheiten zurückzuführen sind.^{56;57}

Durch die primäre Wechselwirkung dieser beiden Proteine findet vermutlich eine Konformationsänderung im GP120 statt, womit die Präsentation eines weiteren Epitops (*V3-Loop*)⁵⁸ einhergeht, welche den nächsten Schritt in der Infektion der Wirtszelle einleitet. Das freigelegte Epitop des *V3-Loops* tritt nun in Kontakt mit einem weiteren Rezeptor an der Oberfläche der Wirtszelle. Bei diesem Corezeptor kann es sich um zwei unterschiedliche 7-Helix-Transmembranrezeptoren handeln, die der Gruppe der Chemokin-Rezeptoren angehören.⁵⁹⁻⁶¹ Im Falle der Makrophagen handelt es sich um den CCR5- und bei T-Helferzellen um den CXCR4-Rezeptor.^{62;63} Durch diese Wechselwirkung mit dem Corezeptor kommt es zu einer Destabilisierung des GP41-/GP120-Komplexes^{60;64} und einer Veränderung der Tertiärstruktur innerhalb des GP41. Die darauffolgende Ausbildung des sogenannten *Trimer of Hairpins*, deren Mechanismus bis dato noch nicht aufgeklärt werden konnte, initiiert die Membranverschmelzung zwischen Virus und Wirtszelle.^{65; 66} Im Folgenden werden das Erbgut des Virus und viruseigene Proteine in die Wirtszelle entlassen.⁶⁷

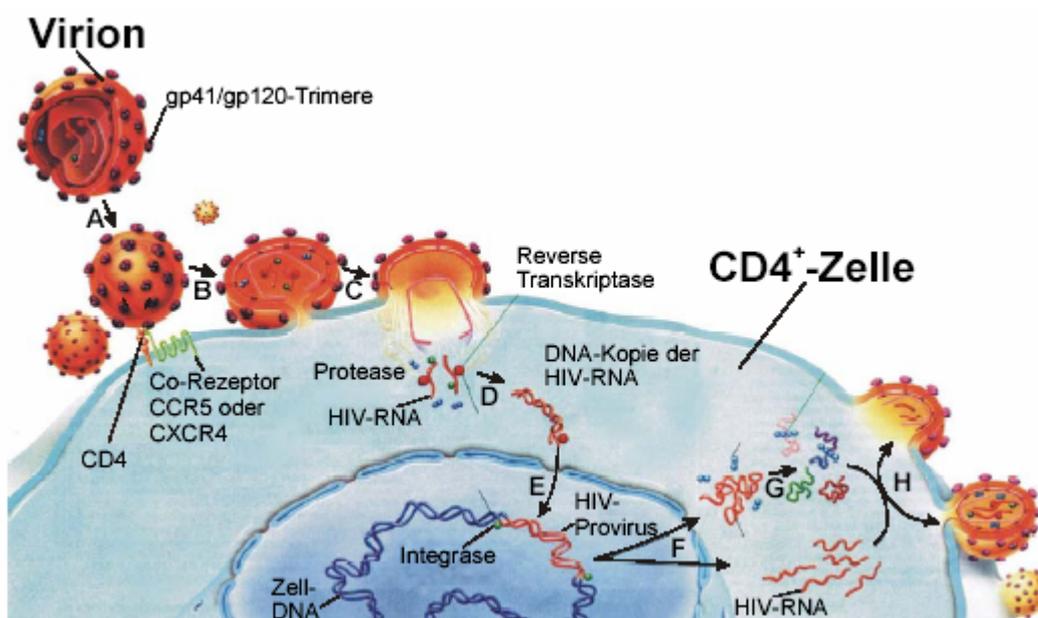


Abbildung 6: HIV-Infektionszyklus. A: Molekulare Erkennung der Wirtszelle; B+C: Membranfusion und Freisetzung der Virusproteine und RNA; D: Reverse Transkriptase der ssRNA in DNA; E: Integration der neu erzeugten DNA in das Genom der Wirtszelle; F: Produktion der HIV-Proteine und -RNA; G: *Assembly*; H: Knospung neuer Virionen.

Die Reverse Transkriptase schreibt die ssRNA des Virus in die cDNA um und die viruseigene Integrase fügt diese anschließend in die zelleigene DNA ein. Anschließend werden durch die Zelle neue Virusproteine exprimiert und mithilfe der viruseigenen Protease zurechtgeschnitten. Danach finden sich alle Bestandteile zu einem neuen Virion zusammen (*Assembly*), so dass neue Viruspartikel aus der Wirtszellemembran abgeschnürt werden können.

Die durch HIV infizierten CD4⁺-Lymphozyten haben eine sehr geringe Lebensdauer von knapp mehr als einen Tag,⁶⁸ für das Virus im Plasma beträgt sie sogar weniger als sechs Stunden.⁶⁹ Im Verlauf der ersten Wochen nach der Infektion vermehren sich die Viren rasch, wobei es bei einigen Patienten zu grippeähnlichen Symptomen kommen kann. Während dieser Periode steigt die Anzahl der Virus-Partikel im Blut stark an, während der Titer an CD4⁺-Lymphozyten stark abfällt. Im weiteren Verlauf baut das Immunsystem eine starke Abwehr gegen die Partikel auf, wodurch die Anzahl der CD4⁺-Lymphozyten fast wieder auf normale Werte zurückgeht. Diese Phase der Infektion kann zwischen zwei bis 15 Jahre in Anspruch nehmen.⁷⁰

Es wurde herausgefunden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Art der Corezeptoren und dem Verlauf der Erkrankung gibt. Dabei scheint eine Veränderung im Glycosylierungsmuster und in der Sequenz des *V3-Loops* einen entscheidenden Beitrag im Bezug auf den Tropismus des Virus zu liefern.⁷¹ Zunächst ist CCR5 der Angriffspunkt (von M-tropen Virusstämmen), später aber greifen T-trope Stämme die T-Zellen mittels CXCR4 an; erst dann kommt es zu einem raschen Fortschreiten der Erkrankung. Offensichtlich sind die M-tropen Stämme weniger infektiös, als die T-tropen Stämme.⁷² Die M-tropen Stämme werden jedoch durch das Immunsystem langsamer abgebaut als die T-tropen Stämme, die zu Beginn der Infektion rasch neutralisiert werden. Bricht das Immunsystem im späten Stadium der Infektion zusammen, so vermehren sich die T-tropen Stämme schneller. In diesem späten Stadium verringert sich der CD4⁺-Lymphozyten-Titer von normalen Werten zwischen 600 bis 1200 Zellen pro μL auf unter 200 pro μL Blut – dieses Stadium der Infektion, sowie das Auftreten opportunistischer Infektionen wird AIDS genannt.

1.5 Therapieansätze zur Bekämpfung von HIV

Der fast völlige Zusammenbruch des Immunsystems, der mit dem Ausbruch von AIDS im Zusammenhang steht, kann heutzutage mittels geeigneter Medikamentierung deutlich hinausgezögert werden.⁷³ Im Jahre 1987 wurde Azidothymidin (AZT) von der Food and Drug Administration (FDA) als erstes Anti-HIV-Medikament zugelassen.⁷⁴ AZT ist ein Vertreter der sogenannten Nukleosid-analogen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI), die neben den Nicht-Nukleosid-analogen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI) und den Protease-Inhibitoren (PI) das Gros der durch die FDA zugelassenen Medikamente darstellen.⁷⁵⁻⁷⁷ In der Regel werden diese Präparate in einer Kombinationstherapie verwendet, die als Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) bezeichnet wird. Eine vollständige Genesung von der Infektion durch diese Therapie ist jedoch nicht gewährleistet und die Präparate müssen von den betroffenen Personen über mehrere Jahre nach einem genauen Zeitplan eingenommen werden. Neben der konsequenten Weiterentwicklung bestehender, gegen die in der Wirtszelle freigesetzten Virus-Proteine wirkende Inhibitoren in Bezug auf Nebenwirkungen⁷⁸ und Virusresistenzen⁷⁹, bietet der HIV-Infektionsmechanismus weitere Ansatzpunkte zur Inhibition des Virus.⁸⁰

1.5.1 Entry-Inhibitoren

Verbindungen, die das Anheften des Virus an die Wirtszelle oder die Membranverschmelzung inhibieren (Abbildung 6: A-C) ordnet man der Klasse der HIV-Entry-Inhibitoren zu.^{58;81-83} Ausschlaggebend für die Entwicklung dieser neuen Wirkstoffklasse war die Entdeckung der Tatsache, dass etwa zehn Prozent der Männer kaukasischen Typs in den Vereinigten Staaten von Amerika ein defektes Gen besitzen, was zur Folge hat, dass der CCR5-Rezeptor nur unvollständig exprimiert wird ($\Delta 32$ -Deletion).⁸⁴ Die homozygoten Träger dieser Allele können nicht mit dem HI-Virus infiziert werden und haben durch das Fehlen des Rezeptors keine weiteren Einschränkungen in ihrer Gesundheit.

Je nachdem, welchen Teilschritt des *Entries* eine Verbindung inhibieren soll, unterteilt man die *Entry*-Inhibitoren in weitere Untergruppen. Verbindungen, die die Wechselwirkung zwischen dem viralen Protein GP120 und dem Primärrezeptor CD4 unterbinden, werden als *Attachment*-Inhibitoren bezeichnet. Verbindungen, die mit dem Corezeptoren interagieren, werden allgemein der Klasse der Corezeptorantagonisten zugeordnet.⁸⁵ Wird hingegen die Verschmelzung zwischen Virus und Wirtszelle als *Target* gewählt, spricht man von einem Fusionsinhibitor.

Der erste zugelassene Fusionsinhibitor ist FUZEONTM (Enfuvirtide, T20). Dieser ist als einziger Vertreter dieser Klasse fester Bestandteil der HAAR-Therapie.^{86; 87} Hierbei handelt es sich um ein 36er Peptid aus dem C-Terminus der Sequenz des GP41, welches die Ausbildung des *Trimer of Hairpins* und damit die Membranverschmelzung blockiert. Ein sehr vielversprechender Ansatz wird von Münch *et al.* verfolgt. Hierbei wurde aus dem humanen Blutserum ein *Virus-Inhibitory Peptide* (VIRIP), welches aus dem C-Terminus des α 1-Trypsins stammt, isoliert.⁸⁸ Dieses 20er Peptid ist in der Lage, selektiv an das vom GP41 präsentierte Fusionspeptid zu binden und somit den Kontakt zwischen Virus und der Wirtszelle zu inhibieren. Ebenfalls konnte in Untersuchungen festgestellt werden, dass VIRIP gegenüber Virusstämmen aktiv wirkt, die sich bis dato durch Resistenzen gegenüber antiviral aktiven Medikamenten ausgezeichnet haben.⁸⁹ Momentan befinden sich von VIRIP abgeleitete Derivate in den ersten klinischen Studien.

Neben der Inhibition des GP41-Proteins besteht die Möglichkeit die Corezeptoren zu inhibieren. Hierbei können entweder der CCR5- oder der CXCR4-Rezeptor blockiert werden, um so den *Entry* des Virus zu inhibieren. Die antagonistische Inhibition des CXCR4-Rezeptors ist nicht unbedenklich. So ergaben Studien mit CXCR4-*Knockout*-Mäusen tödliche Entwicklungsstörungen der Föten.⁹⁰ Dennoch gibt es eine Reihe von nicht toxischen Inhibitoren. Der auf zwei Cyclamringen basierende Inhibitor AMD3100 repräsentiert hierbei einen der potentesten und selektiv wirksamsten Vertreter dieser Klasse. In den klinischen Studien eins und zwei unterband er die Virusreplikation bei X4-infizierten Probanden schon in niedrigen nanomolaren Konzentrationen.⁹¹⁻⁹³ In weiteren Untersuchungen wird mittels Derivatisierung von AMD3100 versucht, diese inhibitorische Eigenschaft auch auf C5-trope Virusstämme zu übernehmen.⁹⁴ Um die genannte Problematik zu umgehen, bietet sich die selektive Blockierung des Corezeptors CCR5 an. Diese scheint aufgrund der Beobachtungen der Δ 32-Deletion weniger risikobehaftet zu sein. So stehen unterschiedliche Antikörper, die spezifisch an den Rezeptor binden, zur Verfügung. PRO-140 ist ein monoklonaler anti-CCR5 Antikörper, der den HIV-*Entry* inhibiert, ohne die native Funktion des CCR5 zu beeinflussen.⁹⁵ Ein weiterer Inhibitor ist das TAK-779, welcher als CCR5-Antagonist in einer Bindungstasche bindet, die von den transmembranen Domänen des CCR5 ausgebildet werden. Durch die Bindung wird eine konformationelle Änderung des Rezeptors induziert, die dazu führt, dass das GP120-Protein nicht mehr mit dem Rezeptor wechselwirken kann.⁹⁶ Neben diesem niedermolekularen Inhibitor befinden sich zwei Weitere in unterschiedlichen Abschnitten der klinischen Phasen. Hierbei handelt es sich um SCH-351125⁹⁷, einem Dipiperidinderivat mit hoher Bioverfügbarkeit und einem von RANTES abgeleiteten

Inhibitor, der in der Lage ist um den Faktor 50 stärker an CCR5 Rezeptor zu binden als das bis dahin vielversprechenste RANTES-Analogon.⁹⁸

Auf dem Gebiet der *Attachment*-Inhibitoren haben sich in den letzten Jahren als Grundlagen hauptsächlich Proteine und Peptide hervorgetan.^{99; 100} Mittels *High Throughput Screening* (HTS) Methoden konnten jedoch auch kleinere Moleküle identifiziert werden, die die primäre Wechselwirkung des Virus mit der Wirtszelle inhibieren. Bei Verbindungen wie dem BMS-378806¹⁰¹ bzw. BMS-488043¹⁰² handelt es sich um Heteroaromat-substituierte Piparizin-Derivate, die an eine essentielle Bindungsstelle der Wechselwirkung an der Oberfläche des GP120 binden, welche als Phe⁴³-*cavity* bekannt ist.^{103;104} Durch diese Bindung wird die Wechselwirkung zwischen CD4- und GP120-Protein fast vollständig unterdrückt.¹⁰⁵ Es kommt allerdings als Folge der Bindung an das virale Protein zu einer konformationellen Umstrukturierung innerhalb des GP120, wodurch die Ausbildung einer Bindung zum sekundären Rezeptor (CCR5 bzw. CXCR4) beschleunigt wird und das Virus dadurch in der Lage ist, CD4⁻Zellen zu infizieren.^{106; 107} Diese Problematik herrscht sowohl bei allen bis dato untersuchten als auch potentiellen Inhibitoren vor, so dass dieser Ansatz, die Bindung eines Inhibitors an das virale GP120, überdacht werden muss. Um diese Konformationsänderung zu umgehen, wäre es ein vielversprechender Ansatz, anstatt eines GP120 bindenden Inhibitors, einen CD4 bindenden Inhibitor zu entwickeln. Bei der Durchführung dieses Ansatzes bedarf es jedoch zunächst der Betrachtung der nativen Funktion des CD4-Proteins, die durch die Wechselwirkung des potentiellen *Attachment*-Inhibitors möglichst nicht beeinträchtigt werden sollte.

1.6 Vergleich der CD4/MHC-II- und der CD4/GP120-Wechselwirkung

Die nativen Bindungspartner des CD4-Proteins sind die *Major Histocompatibility Complex*- (MHC) Klasse II Proteine. Diese Proteine sind auf der Oberfläche sogenannter professioneller Antigenpräsentierender Zellen (APZ) lokalisiert. Die natürliche Funktion der MHC-II-Proteine beruht auf der Präsentation von endozytotisch oder phagozytotisch verdauten Antigenen. Diese Antigen-MHC-II-Komplexe werden selektiv von CD4-Proteinen erkannt und leiten somit die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen entsprechender Antigenpezifität ein.¹⁰⁸ Aus unterschiedlichen Röntgenstrukturanalysen konnte festgestellt werden, dass das GP120 die gleichen Bindungsregionen auf der Oberfläche des CD4-Proteins abgreift, wie der MHC-II-Komplex.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Jedoch ist die Kontaktfläche zwischen dem MHC-II- und dem CD4-Protein geringer, als diejenige zwischen dem GP120 und CD4.¹¹² Dies hat zur Folge, dass die Bindung des GP120 an das CD4 stärker ist, als die

Bindung der MHC-II-Proteine und eine Erklärung für die immunsupprimierende Wirkung des HIV. Durch intensive Studien konnte festgestellt werden, dass dem Phe⁴³ des CD4-Proteins eine zentrale Rolle in der Wechselwirkung zwischen dem GP120 und CD4 zuzukommen scheint.^{110; 113} Moleküle die selektiv an Teile des konservierten GP120-Epitops des CD4-Proteins binden, könnte die primäre Wechselwirkung des Virus mit seiner Wirtszelle zu inhibieren, ohne die native Funktion des CD4-Proteins zu beeinträchtigen. Dieser Ansatz birgt zusätzlich den Vorteil, dass mit der Inhibition des humanen CD4-Proteins die hohe Mutationsrate des Virus an Bedeutung verlieren sollte.

1.7 CD4-bindende Peptide und Peptidomimetika

Durch die Publikation einer Röntgenstrukturanalyse von Kwong *et al.* aus dem Jahre 1998 standen erstmals Daten über relevante Bindungsregionen zwischen dem GP120 und dem CD4 zur Verfügung.¹¹⁰ In dieser Röntgenstruktur war es gelungen, ein stark verkürztes, deglycosyliertes GP120 mit den D1- und D2-Domänen des CD4 und einem F_{ab}-Fragment eines GP120-spezifischen Antikörpers zu kokristallisieren.

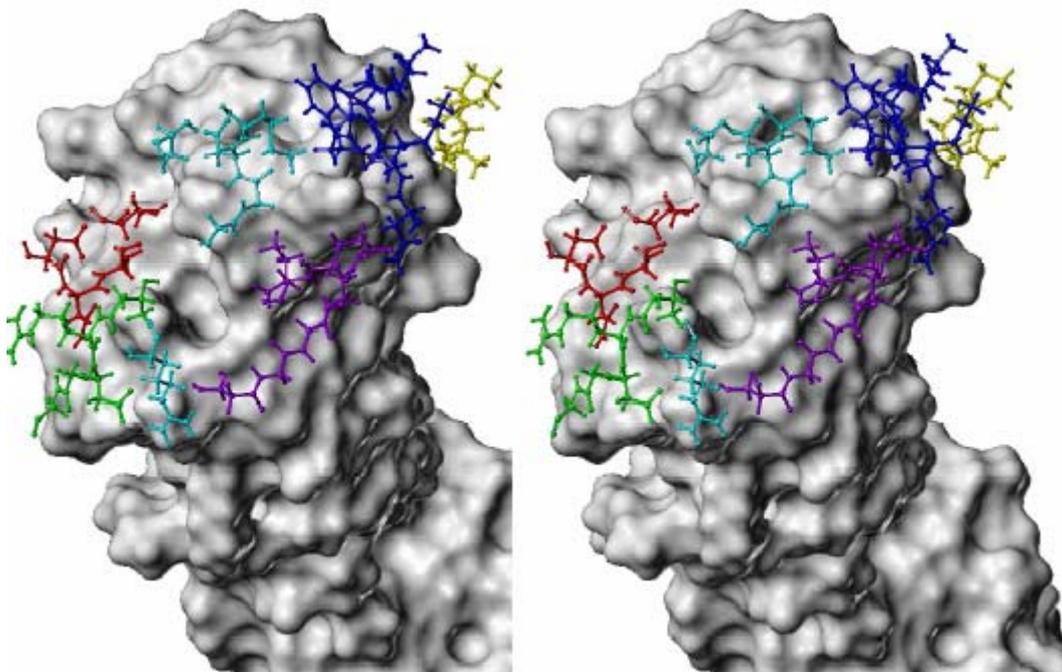


Abbildung 7: Stereodarstellung der aus der Röntgenstrukturanalyse von Kwong *et al.* identifizierten CD4-bindenden Peptide des GP120 (farbig) und ihrer Wechselwirkung zum CD4 (grau).¹¹⁴

Jan Wülfken konnte in seinen Arbeiten aufgrund dieser Röntgenstrukturanalyse diejenigen Aminosäuren des GP120 identifizieren, die in einem engen Kontakt zum CD4 stehen und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit einen relevanten Anteil zur Bindungsaffinität beitragen.¹¹⁴ In Abbildung 8 ist die Aminosäureabfolge des GP120 dargestellt. Hierbei sind

die hellgrau unterlegten Aminosäuren in der Röntgenstrukturanalyse von Kwong *et al.* herausgeschnitten worden. Die in rot dargestellten Aminosäuren stellen diejenigen Aminosäuren dar, die in einem engen Kontakt zum CD4 stehen. Die zusätzlich gelb unterlegten Aminosäuren $^{123}\text{TPL}^{125}$ und $^{425}\text{NMWQK}^{430}$ stellen einen sehr interessanten Teil des diskontinuierlichen Epitops des GP120 dar. Wülfken fand heraus, dass diese Peptidfragmente ohne eine Lageänderung mittels eines Glycinlinkers verbunden werden können. Dieses so erhaltene Dekapeptid $^{425}\text{NMWQKV}^{430}\text{-G-}^{123}\text{TPL}^{125}$ ergab in SPR-Bindungsstudien eine Dissoziationskonstante von 6 mM gegenüber dem CD4 und inhibierte in einem Virus-Neutralisations-Assay *in vitro* die Infektion der Zellen mit HIV.

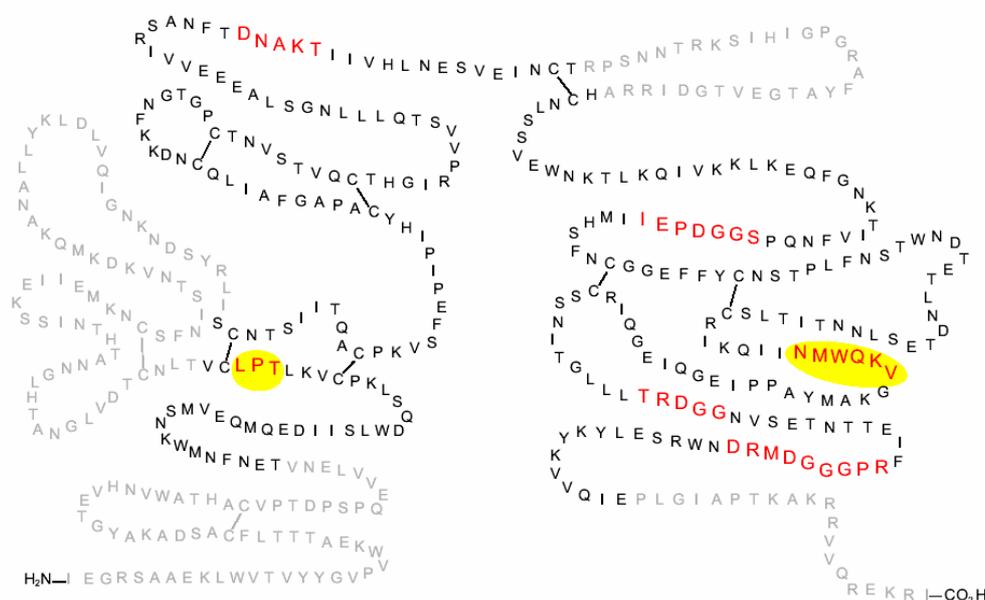


Abbildung 8: AS-Sequenz des GP120; blass dargestellt sind die Teile des Proteins, die in dem Konstrukt der Röntgenstrukturanalyse nicht vorhanden waren; rot dargestellt sind die Bereiche, die im Kristall in einem sehr engen Kontakt zum CD4 stehen; gelb umkreist sind zusätzlich die Teile des diskontinuierlichen Epitops, welches die Grundlage für das Dekapeptid $^{425}\text{NMWQKV}^{430}\text{-G-}^{123}\text{TPL}^{125}$ von J. Wülfken darstellt.

Zusätzlich gelang es Wülfken durch das von M. Mayer und B. Meyer entwickelte *Saturation Transfer Difference* (STD)-NMR-Verfahren¹¹⁵, das Bindungsepitop des Hybridpeptids auf atomarem Niveau aufzuklären. In Abbildung 9 sind die Protonen, die in einem engen Kontakt zum Protein stehen, rot markiert. Die zu diesen Protonen gehörenden funktionellen Gruppen zeichnen sich verantwortlich für die Bindung zum CD4-Protein.

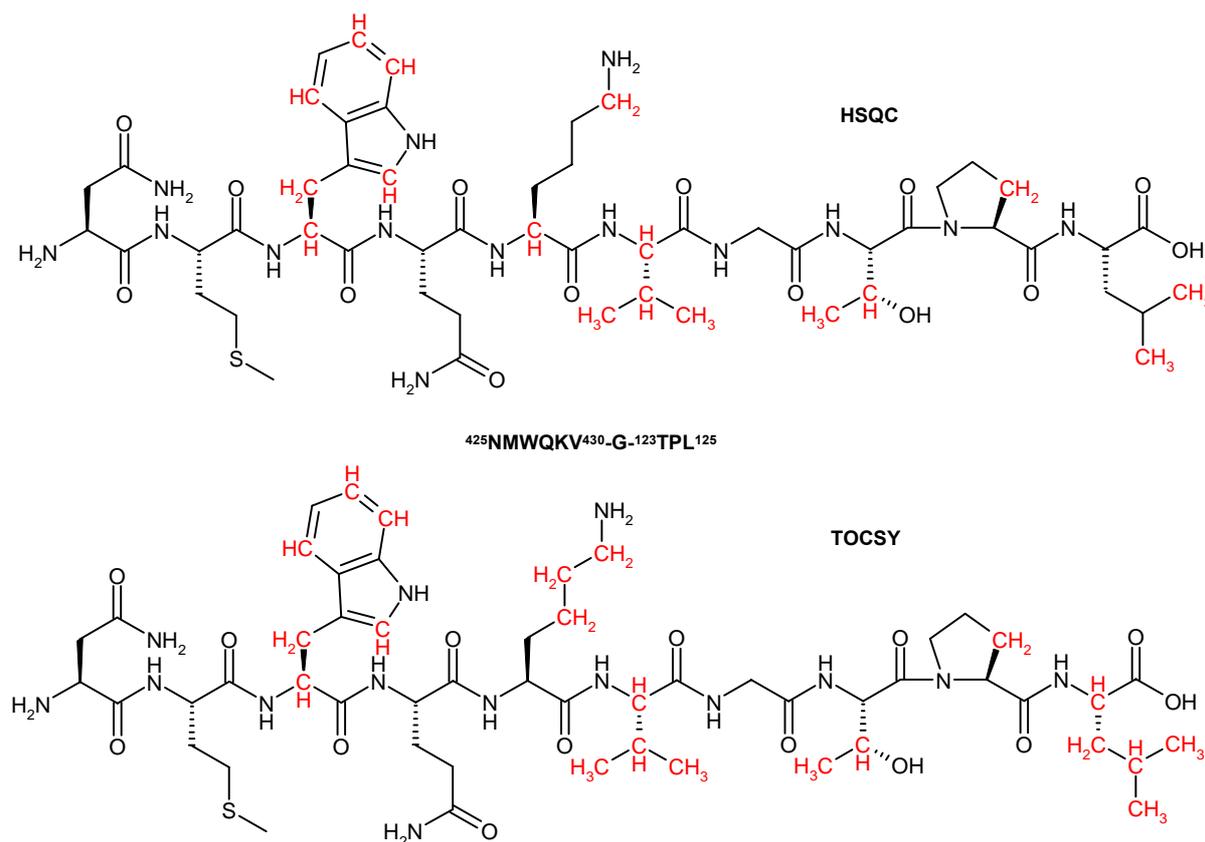


Abbildung 9: Bindungsepitop des Peptids ⁴²⁵NMWQKV⁴³⁰-G-¹²³TPL¹²⁵ an CD4 bestimmt mit STD-NMR (HSQC (oben) bzw. TOCSY (unten)).¹¹⁴

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass nicht alle Aminosäuren des Hybridpeptids in einem engen Kontakt zum CD4-Protein stehen und somit zur Bindungsaffinität des Peptids beitragen. Von besonderem Interesse bei den Ergebnissen ist die Tatsache, dass die Protonen des Trp⁴²⁷ in den STD-Messungen die größten relativen STD-Intensitäten aufwiesen. Die große Relevanz des Tryptophans an der Bindung gegenüber dem CD4-Protein wurde in zahlreichen Mutationsstudien untersucht¹¹⁶⁻¹²⁰ und konnte mit der Arbeit von Wülfken für das Peptid bestätigt werden.

Ausgehend von diesem Hybridpeptid und den Ergebnissen der STD-NMR-Untersuchungen führten Neffe *et al.* Docking-Studien durch, in denen nur Aminosäuren berücksichtigt wurden, die STD-aktive Seitenkettengruppen besitzen. Hierbei wurde die peptidische Kernstruktur ⁴²⁹KV⁴³⁰-G-¹²³TP¹²⁴ beibehalten und die Aminosäuren Tryptophan und Leucin durch aromatische bzw. hydrophobe Reste mimikriert und variiert (Grundgerüst: Abbildung 10).¹²¹

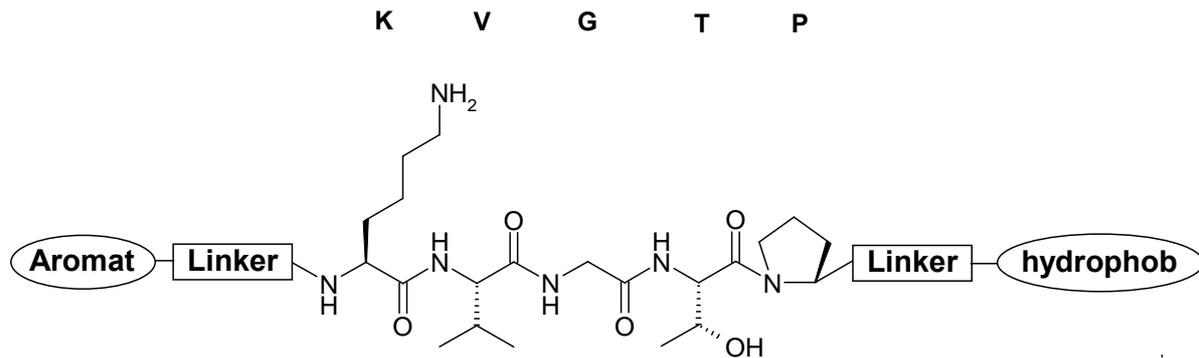


Abbildung 10: Allgemeine Struktur der Peptidomimetika mit dem Kernpeptid KVGTP und zwei nicht peptidischen endständigen Gruppen.

Die berechneten Bindungsenergien aus den Ligand-*Docking*-Studien der so erhaltenen neuen Peptidomimetika waren durchgehend niedriger als die des Dekapeptids $^{425}\text{NMWQKV}^{430}\text{-G-}^{123}\text{TPL}^{125, 122}$. Diejenigen Peptidomimetika mit der geringsten berechneten Bindungsenergie wurden anschließend synthetisiert und ihr Bindungsverhalten gegenüber dem CD4-Protein mittels *Surface Plasmon Resonance* (SPR)- und STD-NMR untersucht. Die Dissoziationskonstanten dieser Liganden gegenüber dem CD4-Protein konnten mit bis zu $6\ \mu\text{M}$ bestimmt werden und liegen somit um bis zu dem Faktor 1000 niedriger als beim ursprünglichen Hybridpeptid von Wülfken. Ebenfalls erwiesen sich diese Liganden in Proteolysestudien gegenüber Pronase um den Faktor drei bis vier stabiler als das ursprüngliche Leitpeptid $^{425}\text{NMWQKV}^{430}\text{-G-}^{123}\text{TPL}^{125, 123;124}$. Um die Proteolysestabilität und somit auch die Bioverfügbarkeit weiterhin zu steigern, wurden von Neffe weitere Liganden entwickelt, die anstatt des Dipeptids Valin-Glycin kommerziell erhältliche Statine enthielten. Die Analyse der darauffolgenden Ligand-*Docking*-Rechnungen ergab jedoch, dass sich durch diese Modifikation, die mit einer Verkürzung des peptidischen *backbones* einhergeht, die Bindungsenergien verschlechterten.¹²²

Eine Modifikation des *backbones* zur Erhöhung der Proteolysestabilität unter Erhalt der *backbone*-Länge wäre somit sehr erstrebenswert. Ebenfalls wäre eine weitere Bindungsaffinitätssteigerung wünschenswert, da die Bindungsaffinität des GP120-Proteins zum CD4-Protein mit $10\ \text{nM}$ um einen Faktor 100 niedriger angesiedelt ist, als die der Liganden von Neffe. Um dies zu erreichen, müssten neuartige Liganden entwickelt werden, die weitere Wechselwirkungen mit dem CD4-Protein eingehen können. Das ursprüngliche, relevante Bindungs epitop der Peptidomimetika sollte jedoch bei dieser Erweiterung intakt bleiben, da sich dieses als äußerst relevant herausgestellt hatte.

2 Methoden

2.1 Konformationsanalyse von Peptiden

Peptide dienen in der Arzneimittelforschung in vielen Fällen als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Durch ihre Vielzahl an frei drehbaren Bindungen besitzen sie jedoch eine hohe konformationelle Vielfalt. Von großem Interesse im Hinblick auf eine Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung eines Moleküls ist seine dreidimensionale, häufig energetisch günstigste Gestalt. Hauptsächlich werden zwei Verfahren zur Bestimmung der dreidimensionalen Strukturen von Liganden und Proteinen verwendet: die Kristallstrukturanalytik und die hochauflösende NMR-Spektroskopie. Im Folgenden wird auf die NMR-spektroskopische Analyse eingegangen.

Die Analyse von NMR-Daten liefert Informationen über Bindungswinkel und intramolekulare sowie intermolekulare Abstände. Werden Peptide betrachtet, so lässt sich die Konformation des Peptidrückgrats durch die Winkel ϕ , ψ und ω beschreiben. Die Winkel χ_n hingegen beschreiben die räumliche Orientierung der Seitenkette.¹²⁵

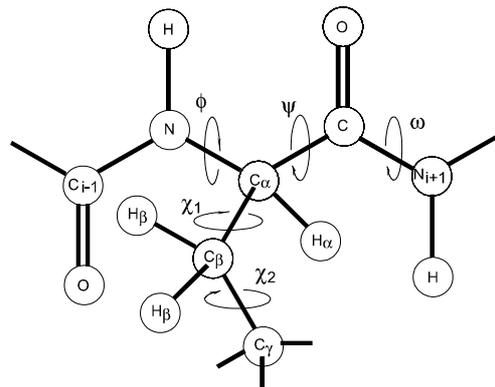


Abbildung 11: Peptidrückgrat und die zugehörigen Diederwinkel.

Die Diederwinkel zwischen zwei betrachteten Protonen lassen sich durch die Analyse der skalaren 3J -Kopplungskonstanten aus dem NMR-Spektrum bestimmen. Der Zusammenhang zwischen der Kopplungskonstante und dem Diederwinkel wird durch die Karplus-Gleichung wiedergegeben:¹²⁶

$$^3J = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C$$

Gleichung 1

Innerhalb dieser Gleichung gibt θ den Diederwinkel an. A, B und C sind hierbei die Karpluskoeffizienten, welche empirische Konstanten repräsentieren. Diese Koeffizienten wurden durch quantenmechanische Rechnungen und empirische Parametrisierung für

bestimmte molekulare Systeme erhalten. Für Peptide lautet die parametrisierte Karplus-Gleichung:¹²⁵

$${}^3J_{\text{HNH}\alpha}(\phi) = 6.7 \cos^2(\phi - 60^\circ) - 1.3 \cos(\phi - 60^\circ) + 1.5$$

Gleichung 2

Löst man diese Gleichung nach dem Winkel θ auf, so erhält man:

$$\phi = 60^\circ \pm \arccos \left[\frac{1.3}{13.4} \pm \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4} \right)^2 - \left(\frac{1.5 - J}{6.7} \right)} \right]$$

Gleichung 3

Aus dieser Formel geht hervor, dass die Lösung der Karplus-Gleichung nicht eindeutig ist – es können sich bis zu vier Möglichkeiten für den Diederwinkel ergeben. Diese Tatsache muss bei der Analyse der 3J -Kopplungskonstanten berücksichtigt werden. Allerdings gelten für die Winkel ϕ und ψ bestimmte Einschränkungen. Diese konnten von Ramachandran anhand sogenannter *hard sphere* Modelle gezeigt werden.¹²⁷ Die sich daraus ergebenden Winkel für ϕ und ψ werden im Ramachandranplot dargestellt (siehe Abbildung 12).

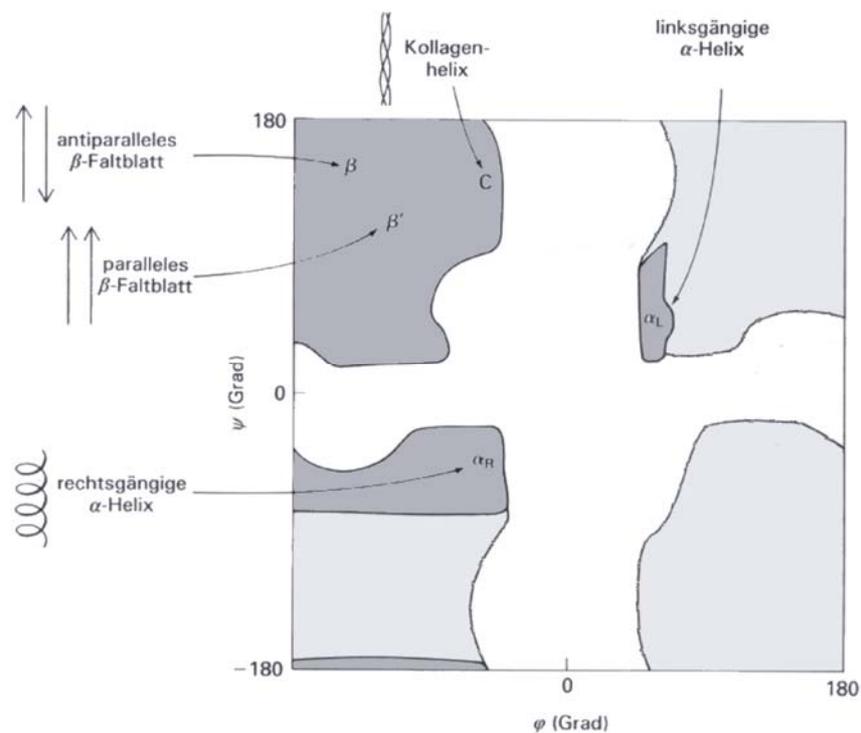


Abbildung 12: Ramachandranplot mit den erlaubten Winkelwerten für ϕ und ψ .

Eine weitere Kopplung, neben den skalaren Kopplungen, ist die dipolare Kopplung. Diese Kopplung wirkt unabhängig von Bindungselektronen durch den Raum. Anhand des Nuklear-Overhauser-Effekts (NOE) lassen sich innerhalb eines Moleküls interatomare

Abstände bestimmen. Wird die Resonanz eines Protons durch das Einstrahlen eines selektiven Pulses gestört, befindet sich das beobachtete System nicht mehr in seinem thermodynamischen Gleichgewicht. Es ist nun bestrebt, unter Nutzung aller Relaxationswege wieder in das Gleichgewicht zurückzukehren. Für das Auftreten des NOEs sind hierbei dipolare Nullquanten- und Zweiquantenübergänge verantwortlich, deren Wahrscheinlichkeiten direkt von den Abständen der beteiligten Kerne abhängen.

Die NMR-Analysen erlauben zwar so die Bestimmung einer 3D-Struktur, die räumliche Darstellung des Moleküls entspricht jedoch immer dem zeitlichen Mittel aller vorhandenen Konformationen.

Um die aus den NMR-Experimenten erhaltenen Informationen in Raumkoordinaten der Atome zu überführen, wurden sogenannte *distance geometry* (DG) Algorithmen entwickelt¹²⁸, in die die NMR-Daten als Beschränkungen (*constraints*) einfließen. Das in dieser Arbeit verwendete Programm DYANA¹²⁹ berechnet aus Distanz- und Winkelbeschränkungen Konformationen, die den Anforderungen eines *Empirical Conformational Energy Program for Peptides* ECEPP-Kraftfeldes genügen.¹³⁰ Durch mehrere aufeinanderfolgende Rechenzyklen werden die zunächst zufällig generierten Strukturen durch Variationen der Diederwinkel an die vorgegebenen Abstands- und Winkelbedingungen angepasst. Zielfunktionen, die umso kleinere Werte annehmen je besser die entsprechenden Vorgaben erfüllt werden, dienen als ein Maß der Güte für die generierte 3D-Struktur. Von Nachteil ist jedoch, dass energetische Aspekte in DG-Rechnungen nicht in Betracht gezogen werden.

Um dem entgegenzuwirken, werden nach einer DG-Rechnung häufig Moleküldynamiksimulationen (MD) mit den generierten Strukturmodellen durchgeführt. Diese Rechnungen berücksichtigen den energetischen Aspekt und liefern energetisch günstigste und den *constraints* genügende 3D-Strukturen.

2.2 Oberflächenplasmonenresonanz

Die Oberflächenplasmonenresonanz ist ein physikalisches Phänomen, deren Anwendung es ermöglicht, biomolekulare Interaktionen zu untersuchen. Oberflächenplasmonenresonanz ermöglicht z. B. die zeitnahe Messung von Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptoren und die Bestimmung von Bindungsaffinitäten.

Die physikalische Grundlage dieses optischen Messsystems ist hierbei das Gesetz der Totalreflexion. Das Gesetz besagt, dass bei einem Übergang vom optisch dichteren ins dünnere Medium ($n_2 > n_1$) der Einfallswinkel einen bestimmten Grenzwert (α_G) nicht

überschreiten kann ($\sin \alpha_G = n_1/n_2$). Bei allen Einfallswinkeln $\alpha > \alpha_G$ tritt Totalreflexion auf und die gesamte Lichtenergie wird gemäß dem Reflexionsgesetz in das optisch dichtere Medium reflektiert. Obwohl bei diesem Vorgang kein Nettoenergieverlust zu verzeichnen ist, entsteht im optisch dünneren Medium ein sogenanntes evaneszierendes Feld. Befindet sich nun auf der Oberfläche des optisch dichteren Mediums eine dünne Schicht eines leitenden Materials, so kann das evaneszierende Feld unter bestimmten Totalreflexionswinkel mit den Elektronen der Leiterschicht in Resonanz treten und es kommt zur Anregung von Oberflächenplasmonen.¹³¹ Durch diese Resonanz wird eine deutliche Verstärkung des evaneszierenden Feldes erreicht, die als *Surface Plasmon Resonance* (SPR) bekannt ist.¹³²⁻¹³⁴ Einhergehend mit diesem Resonanzphänomen, kommt es zu einer Reduktion der Intensität des reflektierten Lichts in Form eines Dunkelfeldes. Dieser Intensitätsverlust ist nur dann beobachtbar, wenn der Wellenvektor des einfallenden Lichts und der Oberflächenplasmonen sowohl im Betrag als auch in ihrer Richtung gleich sind. Dabei ist der Wellenvektor des Oberflächenplasmons zum einen abhängig vom Brechungsindex der dünnen leitenden Schicht und zum anderen von dem des optisch dünneren Mediums.

Unter Ausnutzung dieses Phänomens gelang es der Firma Biacore (Uppsala, Schweden; BIA: *Biomolecular Interaction Analysis*) zu Beginn der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts ein Sensorchipssystem auf dem Markt zu etablieren, welches in der Lage ist, Interaktionen von biospezifischen Oberflächen mit in Lösung befindlichen Komponenten in Echtzeit zu untersuchen.¹³⁵ In diesen Messsystemen dienen Glasträger, deren Oberfläche mit einer dünnen Goldschicht beschichtet ist, als optisch dichteres Medium. Das optisch dünnere Medium wird durch eine Flusszelle repräsentiert, die oberhalb des Glasträgers lokalisiert ist. Ein Bindungspartner wird dabei chemisch auf der Chipoberfläche immobilisiert, wohingegen der in Lösung befindliche Bindungspartner über den Chip geleitet wird. Mit einem Wechselwirkungsereignis in der Nähe der Oberfläche des Chips geht eine Erhöhung des Brechungsindex des optisch dünneren Mediums einher. Dies hat eine Änderung des Winkels der Totalreflexion zur Folge, bei der das SPR-Phänomen auftritt. Die Verschiebung des Intensitätsminimums der Totalreflexion ist somit ein für die Messungen zugrunde liegender Parameter zur Verfolgung von Bindungsereignissen auf der Oberfläche des Chips. Als Signal wird die Veränderung des SPR-Winkels in *Response Units* (RU) angegeben. Da die Injektion der gelösten Komponente an sich zu einer Veränderung des Brechungsindex und damit zu einer Veränderung des RU-Wertes führt, wird neben der eigentlichen Messzelle eine Referenzzelle vermessen, auf der sich kein Immobilisat befindet. Aus der Differenzbildung

der RU-Werte beider Zellen erhält man abschließend die eigentliche Messkurve als Sensorgramm (Abbildung 13).

Die Immobilisierung der Moleküle auf der Oberfläche des Chips kann auf unterschiedliche Weise erfolgen.¹³⁶ Eine der etabliertesten Methoden ist die kovalente Fixierung des Bindungspartners auf der Oberfläche. Hierfür wird auf der Goldoberfläche eine Dextranmatrix aufgebracht, die terminal eine Carboxylfunktion trägt, über die Moleküle mit freier Aminofunktion als Amide kovalent gebunden werden können. Mittels dieser Methode ist man in der Lage, nicht nur Peptide oder Proteine, sondern auch Viren¹³⁷, Bakterien¹³⁸ oder Zellen¹³⁹ auf der Oberfläche zu immobilisieren. Ein idealisiertes Sensorgramm ist in Abbildung 13 dargestellt. Zu Beginn einer Messung wird die in Lösung gebrachte Komponente durch die Flusszelle geleitet. Kommt es zu einer Assoziation dieser Komponente mit dem an der Oberfläche immobilisierten Spezies steigt der RU-Wert an. Wird im Anschluss an die Injektion mit Puffer gespült kommt es zu einer Dissoziation der Moleküle von der Oberfläche des Chips und der RU-Wert sinkt ab. Oftmals gelingt jedoch die Wiederherstellung der Ausgangsbedingungen nur nach der Injektion einer geeigneten Regenerationlösungen.

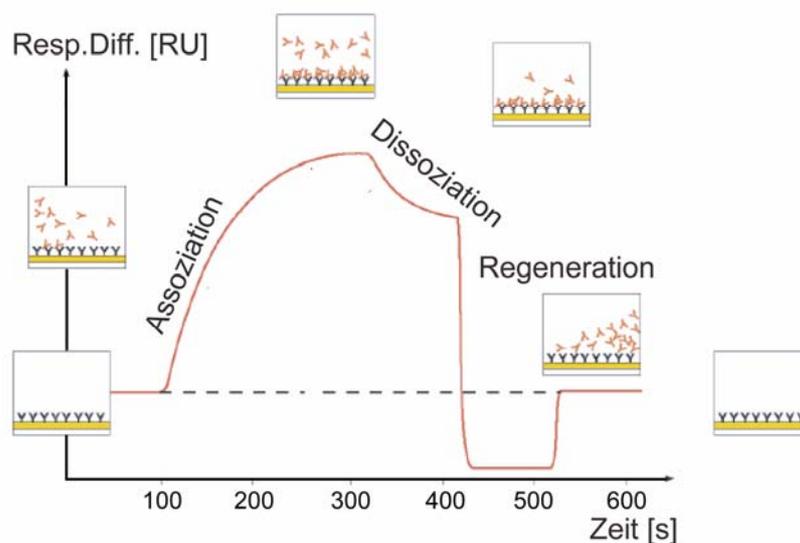


Abbildung 13: Idealisiertes Sensorgramm einer SPR-Messung. Die Analyse des Verlaufs der Assoziation und Dissoziation mit der Zeit erlaubt die Bestimmung von kinetischen Daten (k_a , k_d). Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Gleichgewichtswerte ergibt sich die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D .

Die Analyse eines Sensorgramms ermöglicht die Bestimmung sowohl kinetischer als auch thermodynamischer Daten des Bindungsereignisses. So lassen sich durch Anpassung an die Langmuir-Gleichung die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_a) und die der Dissoziation (k_d) ermitteln. Der erreichte Gleichgewichtszustand ermöglicht den quantitativen

Vergleich der Bindungseigenschaften zwischen unterschiedlichen Bindungspartnern. Durch das Auftragen der erlangten Sättigungswerte gegen die jeweilige Konzentration der gelösten Komponente gelangt man, unter der Annahme des *one-site binding* Modells (Gleichung 4), durch das Anfitzen der sich ergebenden Kurve, zur thermodynamischen Dissoziationskonstanten K_D :

$$RU = \frac{RU_{\max} \cdot [L]}{K_D + [L]}$$

Gleichung 4

Bei der angegebenen Gleichung handelt es sich bei $[L]$ um die Konzentration der gelösten Komponente und bei RU_{\max} um den theoretischen Sättigungswert bei unendlich hoher Ligandenkonzentration.

Als Echtzeitmethode lassen sich kinetische Daten aus den Messreihen ableiten. Die neuesten Geräte können konstante Temperaturen gewährleisten, so dass durch die Bestimmung von K_D -Werten in Abhängigkeit von der Temperatur thermodynamische Daten über Enthalpie und Entropie zugänglich sind. Nichtsdestotrotz können diffusionsbedingte Massentransportlimitierungen¹⁴⁰ oder Rückbindungsereignisse¹⁴¹ zu Komplikationen der Auswertung führen.

3 Problemstellung

Der primäre Kontakt des HI-Virus mit humanen Wirtszellen wird durch die Wechselwirkung zwischen dem viralen Oberflächenprotein GP120 und dem humanen Rezeptor CD4 vermittelt. Als Folge dieses Kontaktes kommt es zu konformativen Änderungen innerhalb des viralen GP120-Proteins, welches eine weitere Wechselwirkung dieses Proteins mit humanen Corezeptoren und dann die Fusion des HI-Virus mit seiner Wirtszelle ermöglicht. Die Entwicklung von Inhibitoren dieser primären Wechselwirkung könnte ein vielversprechender Weg in der HIV-Therapie sein.

Basierend auf einem Virus neutralisierenden Dekapeptid¹¹⁴ konnten mittels STD-NMR- und *in silico*-Methoden CD4-bindende Peptidomimetika entwickelt und synthetisiert werden.¹²² Die mittels STD-NMR und SPR bestimmten Dissoziationskonstanten vom CD4-Protein für das beste Peptidomimetikum war 6 μM .¹²¹ Mittels proteolytischem Verdau konnte gezeigt werden, dass diese Peptidomimetika eine drei- bis vierfache höhere proteolytische Stabilität gegenüber Pronase besitzen als das Dekapeptid. Zur weiteren Steigerung der proteolytische Stabilität konnten ich in meiner Diplomarbeit dipeptid-mimetische Bausteine entwickeln, die zu *backbone*-modifizierten Peptidomimetika führten (Abbildung 14).¹⁴²

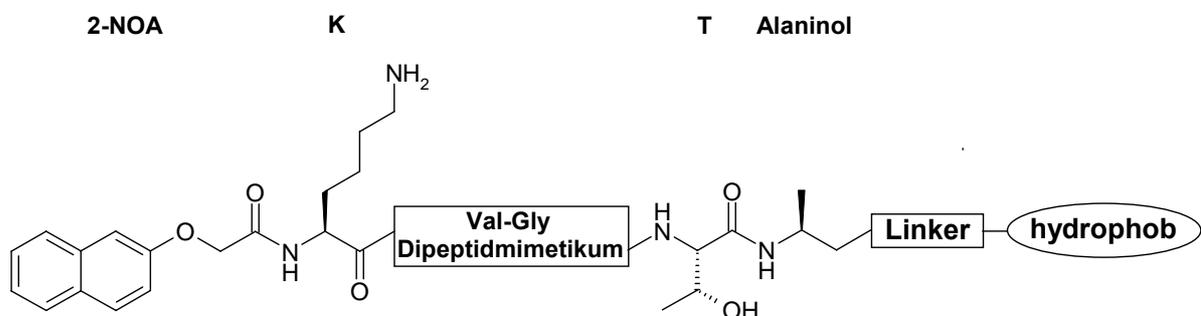


Abbildung 14: Struktur des Peptidomimetikum-Templats mit zentralem Valin-Glycin-Dipeptidmimetikum und variablem hydrophoben Rest.

Im Rahmen dieser Arbeit war es das Ziel, zunächst die oben erwähnten unterschiedlich *backbone*-modifizierten Peptidomimetika (Abbildung 14) in *Docking*-Studien mit bereits *in silico* gedockten, Statin-modifizierten, CD4-bindenden Peptidomimetika¹²² zu analysieren. Im Anschluss an diese *in silico*-Analyse war eingeplant, die *backbone*-modifizierten Peptidomimetika des obigen Typs darzustellen. Darauf folgend soll eine Optimierung der Synthesesequenz durchgeführt werden und die Bindungsaffinität mittels SPR-Bindungsstudien ermittelt werden. Ebenfalls soll der Einfluss der unterschiedlichen dipeptid-

mimetischen Modifikationen auf die proteolytische Stabilität gegenüber Pronase untersucht werden. Weiterhin war es Ziel, auf Basis der Struktur des GP120-Proteins neue peptidomimetische Verbindungen mittels NMR-spektroskopischen- und *in silico*-Methoden zu entwickeln, deren Bindungseigenschaften besser sind als die der Peptidomimetika des abgebildeten Typs (Abbildung 14).

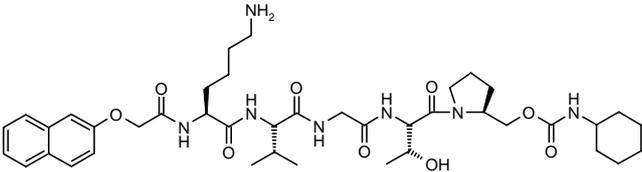
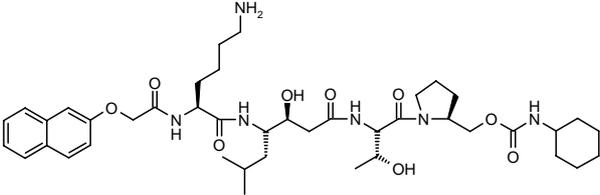
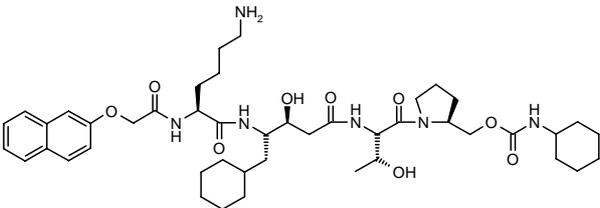
Die synthetisierten Verbindungen sollten mit Hilfe von MALDI-TOF-Spektrometrie und NMR-Spektroskopie charakterisiert, sowie ihre Bindungsaffinität gegenüber dem CD4-Protein mit SPR quantifiziert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese und Analyse neuartiger CD4-bindender Peptidomimetika

A. Neffe untersuchte *backbone* modifizierte Peptidomimetika mittels *in silico* Docking-Methoden und SPR-Experimenten. Die *backbone*-Modifikationen bestanden darin, dass das zentrale Dipeptid Valin-Glycin des Liganden **13** durch unterschiedliche Statin-Derivate substituiert wurde (Ligand **14** und **15**; Tabelle 1). Diese Substitutionen resultierten jedoch in höheren kalkulierten Bindungsenergien und in höheren K_D -Werten der Liganden **14** und **15** gegenüber dem CD4-Protein im Verhältnis zu dem ungekürzten Liganden **13**.¹²²

Tabelle 1: Von Neffe untersuchte Verbindungen: Ligand **13** dient als Referenz-Ligand, da er die gleichen aromatischen bzw. hydrophoben Gruppen beinhaltet, wie verwendeten Statin-Liganden **14** und **15**. In den Verbindung **14** und **15** wurde das Dipeptid Valin-Glycin durch unterschiedliche Statine substituiert, wodurch die *backbone* Länge der Mimetika um eine Bindung verkürzt wird. Zusätzlich zu der *backbone* Verkürzung wurde die Seitenkette des Valins im Falle des Liganden **14** durch einen *iso*-Butyl- und bei Ligand **15** durch einen Methylencyclohexyl-Rest substituiert.

Nr.	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	K_D [μ M]
	- 376	40
	- 371	66
	- 355	118

Die hier ausgewählten Liganden **13-15** tragen als N-terminale, aromatische Gruppe ein 2-Naphthol-Derivat und als C-terminale, hydrophobe Gruppe einen Cyclohexytring. Ebenfalls unterschieden sie sich nicht in der Länge des Linkers vom Kernfragment des Mimetikums zu den entsprechenden funktionellen Gruppen. Unter diesen Bedingungen sind die Unterschiede der berechneten Bindungsenergie respektive Dissoziationskonstanten nur auf die Modifikation des Valin-Glycin-Dipeptids zurückzuführen. Für die unvorteilhaften Beiträge zur berechneten Bindungsenergie bzw. Dissoziationskonstante können sowohl das um ein Kohlenstoffatom verkürzte *backbone* der Liganden **14** und **15**, die Hydroxylfunktion am neu eingeführten asymmetrischen Kohlenstoffatom, die Methylen-Gruppe sowie die sterisch unterschiedlich anspruchsvollen Seitenkettengruppen der Statine verantwortlich sein.

Um den Einfluss der entsprechenden einzelnen Modifikationen zu untersuchen, wurden zunächst die aus dem *Docking* erhaltenen Ligand-Protein-Strukturen der Liganden **14** und **15** mit der des Liganden **13** verglichen.

4.1.1 Analyse Statin-modifizierter Peptidomimetika

Um die Wechselwirkungen der gedockten Liganden **13-15** miteinander zu vergleichen, wurden zunächst die Wechselwirkungen des Liganden **13** charakterisiert. Wie in Abbildung 15 deutlich zu erkennen ist, kommt es zur Ausbildung einer Salzbrücke zwischen der Ammonium-Gruppe der Seitenkette des Lysins von **13** und der Carboxylat-Gruppe des Asp⁶³ des CD4-Proteins. Ebenfalls ist die Seitenkette des Valins sehr genau in eine hydrophobe Kavität des CD4-Proteins eingebettet und kann dort hauptsächlich mit den hydrophoben Seitenketten des Arg⁵⁹ und Trp⁶² wechselwirken. Der 2-Naphthol-Rest des Liganden **13** interagiert ebenfalls über hydrophobe Wechselwirkungen mit der β -Methylen-Gruppe des Ser⁴² und der α -Methylen-Gruppe des Gly⁴¹. Wechselwirkungen mit dem in der Literatur als essentiell angesehenen Phe⁴³ des CD4-Proteins (siehe Abschnitt 1.6) sind nicht möglich. Der Cyclohexytring des Liganden liegt in einem engen Kontakt zu den Seitenketten von Leu⁶¹ und Gln⁶⁴ des CD4-Proteins. Sowohl die Wechselwirkung zwischen diesen Struktureinheiten, als auch die der Methylgruppe des Threonins des Liganden **13** mit der Methylengruppe des Ser⁶⁰ des CD4-Proteins sind hydrophober Natur. Durch Substitutions- respektive Deletionsexperimente *in silico* durch A. Neffe konnten sowohl der aromatische, als auch der hydrophobe Rest als bedeutend für die Bindung des Liganden an das Protein identifiziert werden, wohingegen die Substitution der Valin-Seitenkette durch eine größere hydrophobe Gruppe noch nicht quantifiziert wurde.¹²²

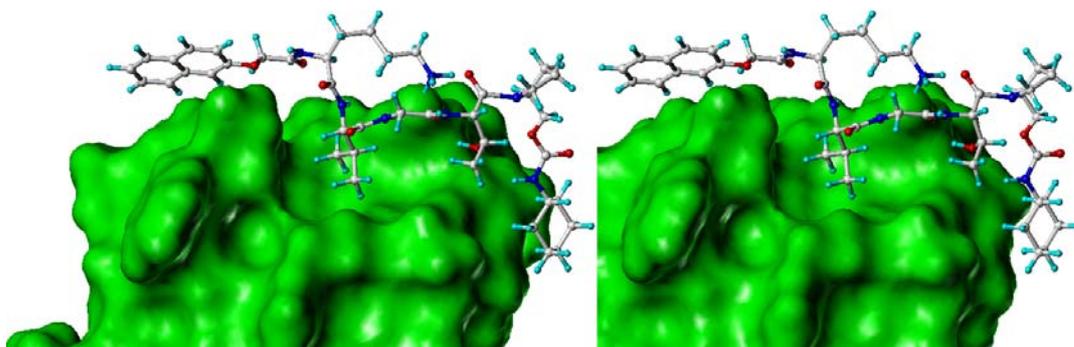


Abbildung 15: *crossed stereo view* des gedockten Liganden **13** (*ball + sticks*) an das CD4-Protein (dargestellt als grüne Oberfläche). Deutlich zu erkennen ist die Wechselwirkung der Ammonium-Gruppe des Lysins mit der Carboxylat-Gruppe des Asp⁶³. Die Seitenkette des Valins liegt in einer hydrophoben Bindungstasche des CD4, die unter anderem unterhalb vom Trp⁶² und seitlich vom Arg⁵⁹ begrenzt wird. Ebenfalls gut zu erkennen, sind die Termini des Liganden, die beide großflächig hydrophobe Wechselwirkungen zum Protein ausbilden.

Die Präferenz des Liganden, in einer bestimmten Konformation während der Bindung mit dem CD4-Protein vorzuliegen, ist nicht nur durch die Wechselwirkungen der Seitenketten des Liganden mit dem Protein bestimmt. Es kommt normalerweise zusätzlich zu Wechselwirkungen des *backbones* mit dem Protein, die die Konformation des gebundenen Liganden stabilisieren und somit die Position der pharmakophoren Gruppen begünstigen. Aufgrund der Komplexität des CD4-Proteins wird in dieser Betrachtung davon abgesehen die intramolekularen Wechselwirkungen des Proteins zu berücksichtigen. Anstatt dessen werden nur die intramolekularen Wechselwirkungen des *backbones* des Liganden untersucht, um die Unterschiede in den berechneten Bindungsenergien der Ligand **13-15** zu analysieren.

Die Wechselwirkungen, die vom peptidischen *backbone* ausgebildet wird, gehen hauptsächlich von den Peptidbindungen und weniger von der α -Methin-Gruppe aus. Die typischen Abstände der Wasserstoffbrückenbindungen liegen bei 2.4 – 3.1 Å und werden in der Regel eher intermolekular ausgebildet.¹ In diesem Model werden jedoch auch die relevanten intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen analysiert, um die unterschiedlichen Bindungsenergien der *Docking*-Experimente zu interpretieren. Es konnten sechs relevante Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Liganden **13** identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um drei unterschiedliche Netzwerke von möglichen Wasserstoffbrückenbindungen. Diese sind in Abbildung 16 dargestellt. Der Wasserstoff der Amidbindung zwischen Lysin und der 2-Naphthoxyessigsäure ist theoretisch in der Lage eine Wasserstoffbrückenbindung sowohl zum Carbonyl-Sauerstoff der Peptidbindung zwischen Lysin und Valin auszubilden, als auch zum Ether-Sauerstoff. Die jeweiligen Schweratome befinden sich in einem Abstand von 2.42 bzw. 2.79 Å zueinander. Eine zentrale

Rolle scheint dem Carbonyl-Sauerstoff der Amidbindung zwischen Glycin und Threonin zuzukommen. Dieser fungiert sowohl als Akzeptor für ein Proton der Ammoniumgruppe des Lysins, als auch für den Wasserstoff der Hydroxylgruppe in der Seitenkette des Threonins. Hierbei befinden sich die Schweratome 2.47 \AA und 2.67 \AA voneinander entfernt. Letzterer Wasserstoff bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbamatsauerstoff auszubilden, die jedoch aufgrund des Abstandes von 3.01 \AA schwächer ist. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung ergibt sich zwischen dem Carbonylsauerstoff der Peptidbindung von Threonin und Prolin und einem weiteren Wasserstoff der Ammonium-Gruppe des Lysins (Abstand: 2.56 \AA). Dieses Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen sorgt dafür, dass die entsprechenden pharmakophoren Gruppen des Liganden eine für die Bindung zum Protein günstige Konformation einnehmen. Interessanterweise ist die Peptidbindung zwischen Valin und Glycin weder an inter- noch intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt.

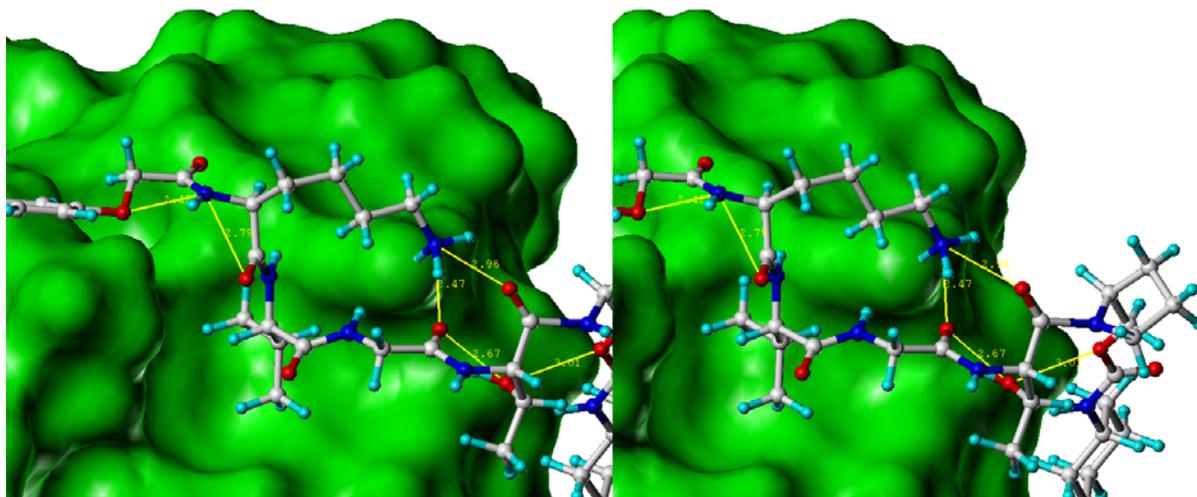


Abbildung 16: *crossed stereo view* des gedockten Liganden **13** (*ball + sticks*) an das CD4-Protein (dargestellt als grüne Oberfläche). In Gelb sind die Abstände zwischen den Schweratomen der potentiellen Wasserstoffbrückenbindung dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass durch diese internen Netzwerke, die pharmakophoren Gruppen des Liganden für die Wechselwirkung mit dem Protein fixiert werden und diese, einen Beitrag zur guten errechneten Bindungsenergie leistet.

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der *Docking*-Studien für die Liganden **14** und **15** nach den gleichen Gesichtspunkten hin untersucht. Bei der Betrachtung der Positionen der pharmakophoren Gruppen des Liganden **14** zeigen sich Unterschiede in Bezug auf die gedockte Struktur des Liganden **13**. Die Lage des Liganden **14** auf der Proteinoberfläche ist im Gegensatz zu der von Ligand **13** verschoben. Der Ethersauerstoff liegt nun näher an der Hydroxylfunktion des Ser⁴² (Abstand: 2.61 \AA), so dass eine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet wird. Durch diese Verschiebung rückt der Naphthylrest näher an die Proteinoberfläche. Insbesondere der Abstand zum Phe⁴³ verringert sich von 7.8 \AA auf 6.7 \AA , wodurch eine Verstärkung der Wechselwirkung zu erwarten ist. Die Ammoniumgruppe des

Lysins des Liganden befindet sich nun relativ zur Carboxylatfunktion des Asp⁶³ des CD4-Proteins nicht mehr oberhalb sondern leicht nach links unten verschoben, wodurch sich der Abstand des Stickstoffatoms zum Carboxylatkohlenstoff um $\sim 0.2 \text{ \AA}$ verringert und sich verstärkte elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen ergeben können.

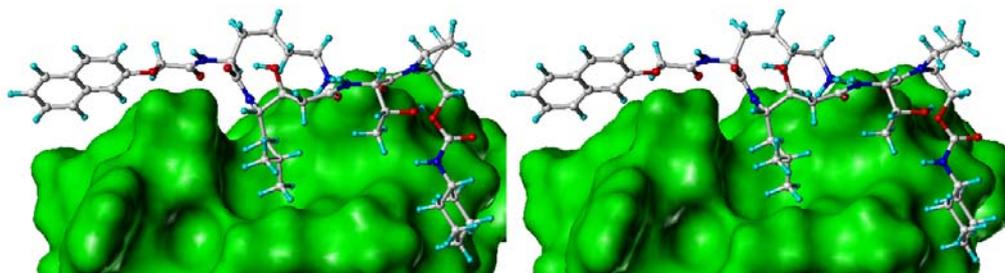


Abbildung 17: *crossed stereo view* des gedockten Liganden **14** (*ball + sticks*) an das CD4-Protein (dargestellt als grüne Oberfläche). Es ist erkennbar, dass die relative Lage des Liganden **14** auf der Proteinoberfläche im Vergleich zu dem Liganden **13** verschoben ist. Ebenfalls zu erkennen ist die, aus der hydrophoben Bindungstasche, herausgedrehte *iso*-Butylseitenkette des Statins, die nur noch mit einer Methylgruppe mit dem Arg⁵⁹ Wechselwirkungen einzugehen scheint. Der Cyclohexylring des C-Terminus ist ebenfalls in seiner Position verschoben und ist nicht mehr in der Lage hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Leu⁶¹ des Proteins einzugehen.

Weitaus größere Unterschiede in der Struktur des Liganden **14** lassen sich bei der neu eingeführten Statin-Einheit finden. Die, im Gegensatz zur *iso*-Propylgruppe des Valins, räumlich anspruchsvollere *iso*-Butylgruppe des Statins, passt sich nicht mehr exakt in die hydrophobe Tasche des CD4-Proteins ein. Durch die neu eingeführte β -Methyleinheit in der Seitenkette dreht sich diese aus der Tasche heraus, wodurch sowohl die Methingruppe, als auch die Methylgruppen der Seitenkette nicht mehr in der Lage sind hydrophobe Wechselwirkungen zum Trp⁶² auszubilden. Weiterhin zeigt sich, dass eine Methylgruppe des Statins in einem engen Abstand zu der β - und γ -Gruppe des Arg⁵⁹ steht, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen möglich sind, die jedoch wegen der Flexibilität der nun freien Seitenkette wahrscheinlich schwächer sind. Der Cyclohexylring des C-Terminus hat sich in seiner relativen Lage zur Proteinoberfläche im Vergleich zu Ligand **13** ebenfalls stark verschoben. Im Gegensatz zum Cyclohexylring im Ligand **13**, der eng an den Seitenketten des Leu⁶¹ und Gln⁶⁴ liegt, steht der Ring im Liganden **14** in einem engen Kontakt mit den β -Methyleinheit des Ser⁶⁰, wodurch die Möglichkeit des Liganden hydrophobe Wechselwirkungen zum Protein auszubilden verringert ist.

Das Muster der potentiellen, intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen des Liganden **14** hat sich ebenfalls im Verhältnis zum Liganden **13** verändert. Durch die Verkürzung des

Rückgrates des Liganden und die zusätzlich eingeführte Hydroxylgruppe ergibt sich ein verändertes Muster von Wasserstoffbrückenbindungen. Auffällig ist, dass der Wasserstoff der Hydroxylgruppe des Statins mit dem Carbonylsauerstoff des Lysins eine Wasserstoffbrückenbindung auszubilden scheint. Die potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen naphthylischem Sauerstoff, amidischen Wasserstoff und Lysin-Carbonylsauerstoff sind weiterhin möglich. Der Abstand des amidischen Protons und Ethersauerstoff ist um ~ 0.2 Å angestiegen, wodurch eine schwächere Bindung zu vermuten ist.

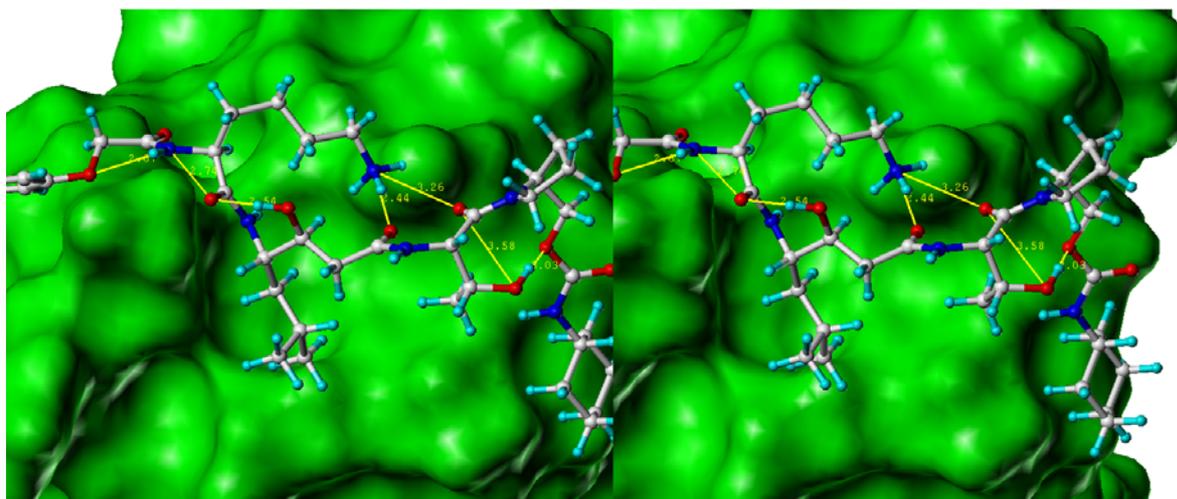


Abbildung 18: *crossed stereo view* des gedockten Liganden **14** (*ball + sticks*) an das CD4-Protein (dargestellt als grüne Oberfläche). In Gelb sind die Abstände zwischen den Schweratomen der potentiellen Wasserstoffbrückenbindung dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Abstände der Ammoniumgruppe des Lysins und der Hydroxylgruppe zum Carbonyl-Sauerstoff des Threonins im Vergleich zum Liganden **13** erhöht sind und somit keine Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können. Die Hydroxylgruppe des Statins geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonyl-Sauerstoff des Lysins ein.

Der Abstand zwischen dem Carbonylsauerstoff des Statins und dem Stickstoff der Ammoniumgruppe ist im Vergleich zum Liganden **13** nahezu konstant geblieben, jedoch hat sich der Abstand zwischen dem Carbonylsauerstoff der Peptidbindung Threonin-Prolin und der Ammoniumgruppe des Lysins um 0.3 Å vergrößert. Ebenfalls ist die Hydroxylgruppe des Threonins aufgrund des Abstandes nicht mehr in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen zum Carbonylsauerstoff der Amidbindung (Statin-Threonin; Abstand > 5.0 Å) und zum Carbonylsauerstoff der Peptidbindung (Threonin-Prolin; Abstand: 3.58 Å) auszubilden. Nur die Wasserstoffbrückenbindung zum Carbamat-Sauerstoff ist noch vorhanden. Der Abstand der beiden Schweratome in diesem Fall von 3.03 Å zu 3.01 Å nahezu nicht verändert.

Die Veränderung im Muster der Wasserstoffbrückenbindungen ist eindeutig auf die Substitution des Valin-Glycin-Dipeptids durch das *iso*-Butyl-Statins zurückzuführen. Wie in

Abbildung 19 (linkes Bild) zu erkennen ist, liegt das *backbone* der Glycin des Liganden **13** in einer Furche der Proteinoberfläche, die von Asp⁶³ und Ser⁶⁰ gebildet wird.

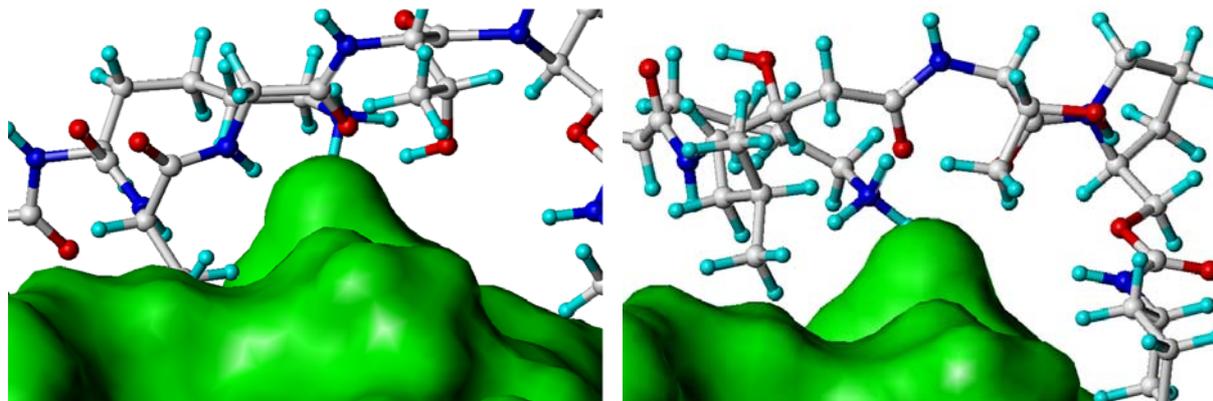


Abbildung 19: Links: Die Valin-Seitenkette des Liganden **13** (*ball + sticks*) ist tief in die hydrophobe Bindungstasche des CD4-Proteins (grüne Oberfläche) eingepasst. Das Glycin fungiert als Linker, der entlang einer vom Asp⁶³ und Ser⁶⁰ gebildeten Furche verläuft. Die Seitenkette des Threonins des Liganden **13** ist auf der rechten Seite der Furche lokalisiert. **Rechts:** Die *Iso*-Butylseitenkette des Statins des Liganden **14** (*ball + sticks*) ist aus der Bindungstasche herausgedreht. Das verkürzte *backbone* zwischen Threonin und *Iso*-Butylgruppe sorgt dafür, dass die Furche in der Proteinoberfläche (grüne Oberfläche) nicht mehr vollständig überbrückt werden kann, wodurch aus sterischen Gründen die Seitenkette des Threonins weiter von der Proteinoberfläche entfernt angeordnet ist.

Die pharmakophoren Gruppen des Valins und Threonins können sich im Falle des Liganden **13** aufgrund der exakten Spacerlänge gut an die Proteinoberfläche anpassen. Die Valin-Seitenkette liegt tief in die hydrophobe Kavität und die Hydroxylgruppe der Seitenkette des Threonins dient als Wasserstoffbrückendonator, wohingegen die Methylgruppe des Threonins zusätzliche schwache hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Ser⁶⁰ eingehen kann. Durch die verkürzte Spacerlänge des Liganden **14** (Abbildung 19; Rechts) liegt die Seitenkette des Threonins innerhalb der Furche des Proteins. Um sterischen Hinderungen entgegenzuwirken, rückt das gesamte Threonin von der Proteinoberfläche ab und bildet dadurch schwächere Wechselwirkungen mit dem Protein. Die Konformation der Seitenkette wird durch die genannte Wasserstoffbrückenbindung zwischen Hydroxylgruppe und Carbamatsauerstoff stabilisiert. Ebenfalls wird durch diese Bindung die Methylgruppe in Richtung des Proteins fixiert und kann dort weiterhin mit der β -Methyleneinheit des Ser⁶⁰ wechselwirken. Das Abrücken des gesamten *backbones* des Liganden **14** wird zusätzlich durch den erhöhten sterischen Anspruch der *iso*-Butylseitenkette des Statins forciert. Dies bedeutet, dass sich die beiden Effekte der Substitution der Seitenkette und des *backbones* negativ auf die berechnete Bindungsenergie des Liganden **14** auswirken. Diese negativen Effekte werden allerdings zum Teil durch die Neuorientierung des 2-Naphtol- und des Cyclohexylrestes kompensiert, so

dass die gesamte berechnete Bindungsenergie des Liganden **14** nur wenig schlechter als die des Liganden **13** ist.

Die Analyse des *Docking*-Experiments des Liganden **15** bestätigt die Annahme, dass die Substitution der Valin-Seitenkette durch einen sterisch anspruchsvolleren Rest zu einer Verringerung der potentiellen Wechselwirkungen des Liganden mit der hydrophoben Bindungstasche des CD4-Proteins führt. In Abbildung 20 ist deutlich zu erkennen, dass der Cyclohexylmethylrest des Statins komplett aus der Bindungstasche herausgedreht ist. Aufgrund der fast gänzlich fehlenden Interaktion der Seitenkette des Statins und der für Ligand **14** diskutierten unvorteilhaften Positionierung der Threoninseitenkette, ist der Cyclohexylring des Carbamates ebenfalls nicht mehr in der Lage, mit den Aminosäuren Gln⁶⁴, Leu⁶¹ oder Ser⁶⁰ Wechselwirkungen einzugehen. Es kommt somit zu einem fast vollständigen Zusammenbruch der Bindungsbeiträge des Statins, Threonins und Carbamatrestes des Liganden **15** mit dem CD4-Protein. Allerdings ist der berechnete Bindungsenergie des gedockten Liganden **15** mit -355 kcal/mol immer noch besser, als die berechnete Bindungsenergie solcher Liganden, bei denen der komplette Carbamatrest entfernt wurde.¹²² Dies impliziert, dass diese drei Reste dennoch einen kleinen Anteil zu der berechneten Bindungsenergie beitragen.

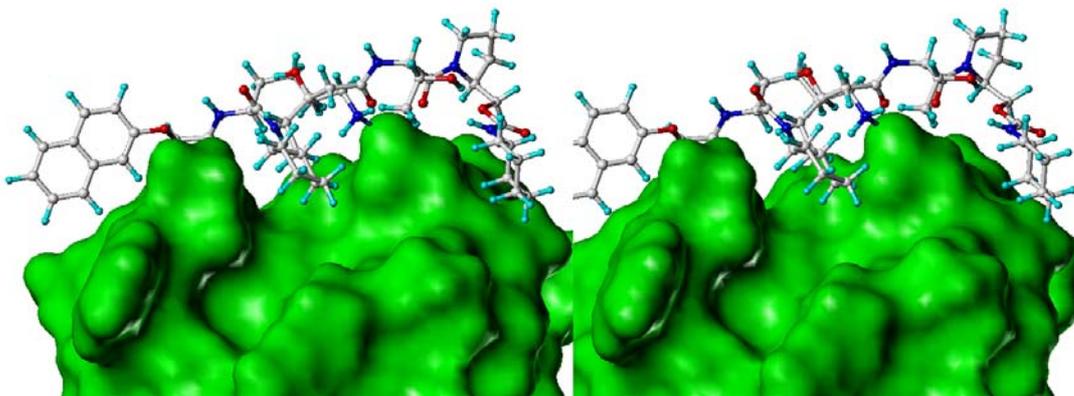


Abbildung 20: *crossed stereo view* des gedockten Liganden **15** (*ball + sticks*) an das CD4-Protein (dargestellt als grüne Oberfläche). Die Seitenkette des Statins ist weit aus der hydrophoben Bindungstasche des CD4-Proteins herausgedreht. Das Threonin, sowie das Prolin und der Carbamatrest sind von der Proteinoberfläche abgewendet, wodurch die Wechselwirkung der pharmakophoren Gruppen dieser Reste stark verringert ist. Einzig die Ammoniumgruppe des Lysins sowie der 2-Naphtyloxyessigsäurerest befinden sich in ähnlichen relativen Positionen gegenüber der Proteinoberfläche wie bei den gedockten Liganden **13** und **14**.

Der Hauptanteil der Wechselwirkungen und somit der berechneten Bindungsenergie des Liganden **15** entfallen auf die, in ihrer relativen Position zur Proteinoberfläche, kaum verschobenen Lysinseitenkette und den 2-Naphtyloxyessigsäurerest. Letzterer hat sich im

Verhältnis zur gedockten Struktur **14** um weitere 0.2 Å an das Phe⁴³ angenähert. Dies lässt sich auf die erhöhte Flexibilität des Liganden, aufgrund der nicht mehr in der hydrophoben Kavität des CD4-Proteins fixierten Statinseitenkette zurückführen.

Zusammenfassend betrachtet, haben die Kombination der peptidomimetischen Substitutionen der Liganden **14** und **15** einen negativen Einfluss auf die berechneten Bindungsenergie in den durchgeführten *Docking*-Experimenten mit dem CD4-Protein. Die berechnete Bindungsenergie des Liganden **14** ist geringfügig schlechter als die des Referenz-Liganden **13**. Dies lässt sich auf sowohl auf die leicht herausgedrehte Seitenkette des Statins (stabilisiert durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen) als auch das verkürzte *backbone* des Liganden zurückführen, wodurch die Threoninseitenkette in einer sterisch ungünstigen Position fixiert wird. Beim *docking* des Liganden **15** dreht sich die Statinseitenkette komplett aus der hydrophoben Bindungstasche heraus, wodurch die Flexibilität des Liganden zunimmt und die Threoninseitenkette weiter von der Proteinoberfläche entfernt liegt. Diese hat zur Folge, dass der gesamte Carbamatrest ebenfalls einen größeren Abstand zum Protein einnimmt und der Beitrag dieses essentiellen Restes verringert wird.

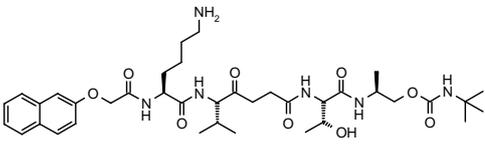
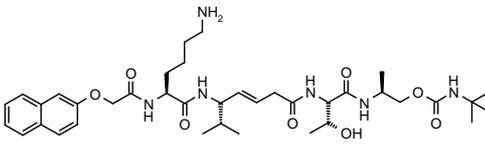
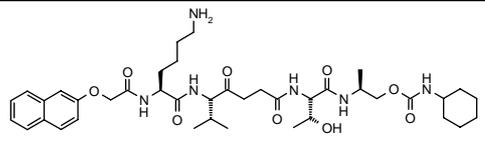
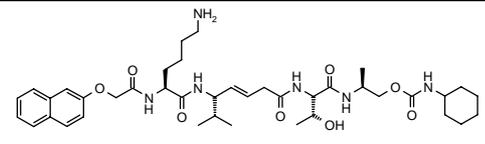
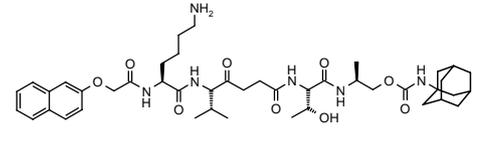
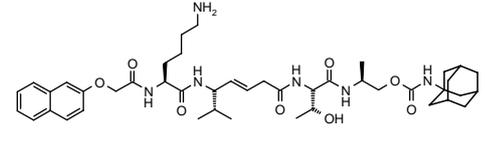
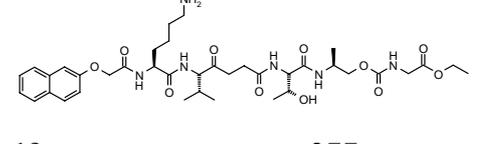
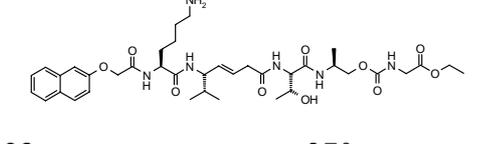
Um den negativen Einfluss dieser Modifikationen zu umgehen, wurden im Folgenden nicht *backbone* verkürzte, modifizierte Peptidomimetika mit dem CD4-Protein gedockt.

4.1.2 *Docking*-Studien *backbone*-modifizierter Peptidomimetika

Basierend auf den Ergebnissen der Analyse der Liganden **13-15** wurden zwei unterschiedliche Klassen von *backbone* modifizierten Peptidomimetika entwickelt, die in ihrer *backbone*-Länge dem ursprünglichen Liganden entsprechen. Diese wurden anschließend an das CD4-Protein gedockt. Bei diesen neuen mimetischen Modifikationen handelt es sich bei beiden Klassen um Carbapeptide, wobei die Amidgruppe des in der zentralen Position befindlichen Dipeptids Valin-Glycin durch eine Ketomethylen-Gruppe **16-19** oder eine *E*-Alkenyl-Gruppe **20-23** (Tabelle 2) ersetzt wurde. In vorausgegangenen Pronase-Verdaustudien des Liganden **13** konnte nachgewiesen werden, dass diese zentrale Peptidbindung des Liganden diejenige ist, die am leichtesten durch Proteasen hydrolysiert wird.¹²³ Ebenfalls wurde das Prolinol des Liganden **13** gegen Alaninol substituiert. Diese Substitution konnte insofern ohne weitere Bedenken durchgeführt werden, da das mittels STD-NMR-Spektroskopie ermittelte Bindungsepitop des Liganden **13** nur STD-Effekte auf den β-Protonen des Prolinols ergab. Zusätzlich neigen Prolin und seine Derivate zu einer

ausgeprägten *cis-/trans*-Isomerie ihrer Peptidbindung. Diese Isomerie konnte NMR-spektroskopisch für Ligand **13** nachgewiesen werden. Für die durchgeführten *Docking*-Experimente spielt diese Isomerie eine untergeordnete Rolle, ist jedoch bei der Durchführung von Bindungsstudien von Interesse, da nur ein Konformer für die Bindung an das CD4-Protein verantwortlich ist.

Tabelle 2: In *Docking*-Experimenten verwendete Liganden, die Modifikationen an der zentralen Peptidbindung Val-Gly enthalten. Die Liganden **16-19** beinhalten als neu eingeführte *backbone*-Modifikation die Carbapetideinheit H₂N-ValΨ[COCH₂]-Gly-OH; Liganden **20-23** hingegen beinhalten H₂N-ValΨ[CHCH]-Gly-OH. Innerhalb der jeweiligen Klasse wurden unterschiedliche Carbamatreste verwendet, um den etwaigen Einfluss verschiedener hydrophober Reste abschätzen zu können.

Nr.	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	Nr.	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]
	16 - 391		20 - 385
	17 - 379		21 - 371
	18 - 390		22 - 385
	19 - 377		23 - 370

Um die in Tabelle 2 dargestellten berechneten Bindungsenergien zu erhalten, wurden zunächst die gedockten Protein-Ligandstrukturen von A. Neffe verwendet und jeweils die entsprechende Peptidbindung zwischen Valin und Glycin modifiziert. Der erhaltene neue Ligand wurde über 100 Iterationsschritte energieminiert und anschließend mit der Funktion *FlexiDock* des Software Sybyl 8.0 an das CD4-Protein über 5000 Generationen gedockt. Alle Strukturen der acht unterschiedlichen Liganden lagen nach der *Docking*-Prozedur in einer ähnlichen Position auf der Oberfläche des Proteins wie die von A. Neffe gedockten Liganden.

Der Abstand der jeweiligen Liganden zur Oberfläche des Proteins ist jedoch verringert, wodurch sich die niedrigeren Beträge der berechneten Bindungsenergien gegenüber den Ausgangsliganden zum Teil erklären lassen. Die Liganden **16-19** weisen jeweils eine 6-8 kcal/mol niedrigere berechnete Bindungsenergie auf als die entsprechenden Ausgangsliganden, deren Peptidbindung zwischen Valin und Glycin nicht mimikriert wurde. Bei den Liganden **20-23** ist die Differenz mit 1-3 kcal/mol nicht so ausgeprägt.

In Abschnitt 4.1.1 konnte gezeigt werden, dass die Peptidbindung zwischen Valin und Glycin in dem Liganden **13** weder Wasserstoffbrückendonor- respektive -akzeptorfunktionen übernimmt, so dass der Unterschied der berechneten Bindungsenergien zwischen den zwei neuen Ligandklassen wahrscheinlich nicht auf die An- bzw. Abwesenheit der Carbonylfunktion zurückzuführen ist. Um den Unterschied in den berechneten Bindungsenergien zwischen beiden Ligandklassen zu erklären, wurden zusätzlich Konformationsänderungen von Aminosäuren innerhalb des Proteins berücksichtigt. Hierfür wurden die entsprechenden Ligand-Protein-Strukturen der gedockten Liganden **17** und **21** miteinander verglichen, indem die Aminosäuren der einzelnen Proteinstrukturen räumlich übereinandergelegt wurden. Interessanterweise stellte sich heraus, dass sich nur sechs Aminosäuren in ihrer räumlichen Anordnung marginal voneinander unterscheiden. Hierbei handelt es sich um Lys²², Ser⁴², Phe⁴³, Arg⁵⁹, Leu⁶¹ und Asp⁶³. In Abbildung 21 sind die übereinander gelegten Protein-Ligand-Strukturen der *docking*-Experimente des Liganden **17** (blaugrün), **21** (orange) und zusätzlich des Referenzliganden (grau) gezeigt.

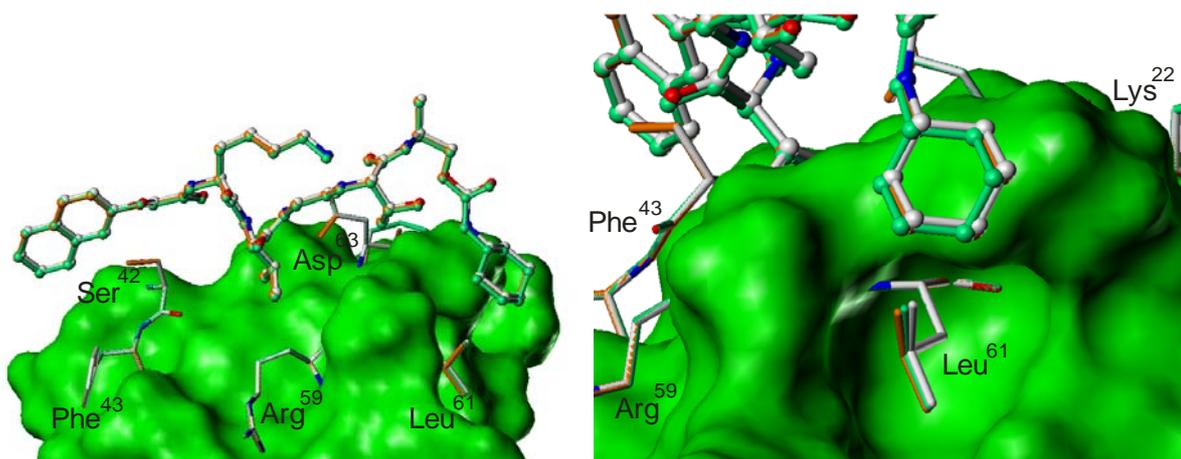


Abbildung 21: Links: die gedockten Strukturen (ohne Wasserstoffatome) der Liganden (*ball + sticks*) der **17** (blaugrün), **21** (orange) und des Referenzliganden (grau). Die konstanten Regionen des CD4-Proteins sind als grüne Oberfläche dargestellt. Die in den einzelnen Proteinstrukturen unterschiedlichen Aminosäuren sind in den Liganden entsprechenden Farben dargestellt (*capped sticks*). Rechts: Ligand-Protein-Strukturen um 90° gedreht. Frontale Ansicht auf die Cyclohexylringe der Liganden sowie auf die Aminosäure Leu⁶¹, die in den unterschiedlichen Strukturen des Proteins die größten Unterschiede in der Seitenkette aufweist.

Der deutlichste Unterschied in den Proteinstrukturen findet sich in der Seitenkette des Leu⁶¹, insbesondere die γ/γ' -Methylgruppen sind in ihrer Position leicht voneinander verschoben. In der Analyse des gedockten Liganden **13** wurde die hydrophobe Wechselwirkung bzw. die räumliche Nähe des Cyclohexylrestes zum Leu⁶¹ für einen wesentlichen Teil der Bindungsenergie verantwortlich gemacht. Aus diesem Grund wird der Abstand der γ -Methylgruppe des Leucins zum Kohlenstoff in 3-Position des Cyclohexylrings als qualitative Erklärung für die unterschiedlichen stark ausgeprägten Bindungsenergien herangezogen. Hierbei differiert der Abstand von 3.04 Å (Ligand **17**), über 3.06 Å (Referenzligand) zu 3.12 Å (Ligand **21**). Dies korreliert mit den erhaltenen Bindungsenergien, die mit -379 kcal/mol (Ligand **17**), -372 kcal/mol (Referenzligand) und -371 kcal/mol (Ligand **21**) bestimmt wurden.

Zusammenfassend kann aus diesen *docking*-Experimenten gefolgert werden, dass beide *backbone*-Modifikationen des Valin-Glycin-Dipeptids nicht zu einem starken Abfall in der berechneten Bindungsenergie führen. Die Liganden **20-23** ergaben in den Experimenten fast gleiche Bindungsenergiwerte wie die Referenzliganden. Im Falle der Liganden **16-19** ist die Bindungsenergie sogar 6-8 kcal/mol günstiger als den entsprechenden Referenzliganden. Die *docking*-Experimente der Liganden **20-23** ergaben, dass hauptsächlich der Cyclohexylrest bzw. die Seitenkette des Leu⁶¹ des Proteins in ihrer räumlichen Lage zu den der Liganden **16-19** verschoben waren und somit für die Unterschiede in den Bindungsenergien verantwortlich gemacht wurden. Doch aufgrund des geringeren Abstandes beider Ligandklassen zur Proteinoberfläche, ist davon auszugehen, dass beide Klassen zu Verbesserungen in der Bindungsaffinität zum CD4-Protein führen können.

4.1.3 Syntheseoptimierung Dipeptid-mimetischer Bausteine

Die Darstellung der Dipeptidmimetika **24** und **25** konnten in voran gegangenen Arbeiten erfolgreich etabliert werden.¹⁴² Die anschließende Synthesestrategie sah vor, dass die Bausteine in einer Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung der Fmoc-Strategie in ein Seitenketten-geschütztes Peptidomimetikum integriert werden sollten.

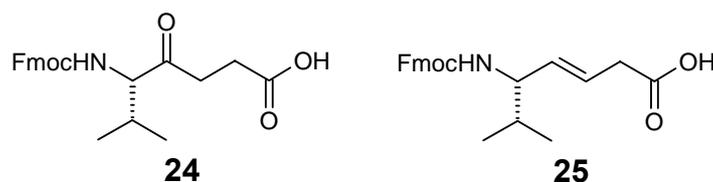


Abbildung 22: Die Fmoc-geschützten Dipeptidmimetika **24** und **25**, die mittels SPPS in die entsprechenden Liganden integriert werden sollten. Die Synthese wurde in vorangegangenen Arbeiten erstmals erfolgreich durchgeführt.¹⁴²

Die Synthese dieser beiden Dipeptidmimetika ging von der Verwendung der Boc-geschützten Aminosäure L-Valin **26** aus. Beide Syntheserouten starten vom Hydroxamsäurederivat des Valins (Weinreb-Amid) **27**.^{vor.143} Um **24** zu erhalten, wurde ausgehend von **27** unter Erhalt der Carbonylfunktion eine Grignardreaktion analog zu einer Literaturvorschrift, mit einer Ausbeute von 50% durchgeführt (Verbindung **28**).¹⁴⁴ Die neu eingeführte terminale Doppelbindung wurde anschließend mittels Natrium(meta)periodat und $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ zu dem **24** entsprechenden Boc-geschützten Dipeptidmimetikum **29** umgesetzt.^{144;145} In einem abschließenden Syntheseschritt wurde eine Umschützung des Dipeptidmimetikums durchgeführt und das Produkt **24** erhalten. Hierbei handelte es sich zunächst um eine salzsaure Abspaltung der Boc-Schutzgruppe, gefolgt von einer *in situ* Schützung der Aminofunktion im basischen Milieu mit Fmoc-ONSu. Die Gesamtausbeute über diese beiden Syntheseschritte ist 30%. Da es sich letztlich bei diesen beiden Reaktionen um Standardverfahren handelt, ist die Gesamtausbeute bei diesen Reaktionen in ihrer Durchführung optimierbar.

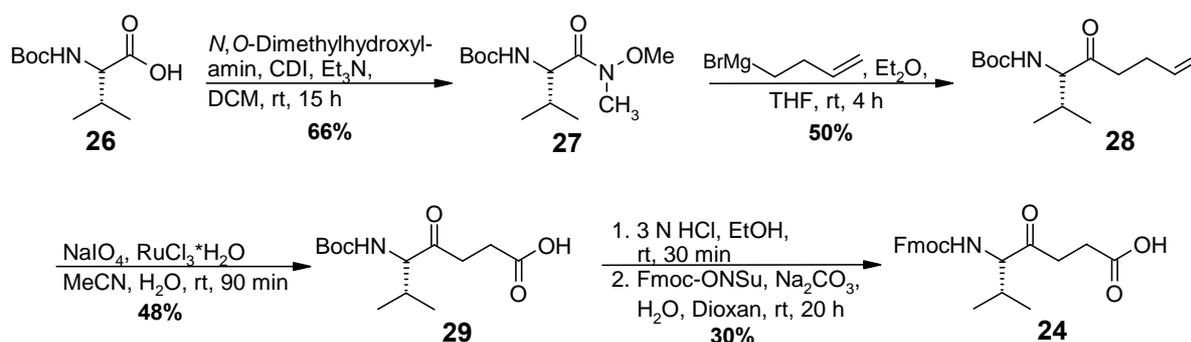


Abbildung 23: Etablierte Syntheseroute für das Dipeptidmimetikum **24** mit nicht optimierten Ausbeuten.¹⁴²

Die zentrale Verbindung der Synthese für das Dipeptidmimetikum **25** ist der Boc-geschützte Aldehyd des Valins (**32**). Dieser Aldehyd muss ohne säulenchromatographische Aufreinigung des Reaktionsprodukts zugänglich sein, da das in α -Position zum Aldehyd befindliche Stereozentrum schon unter den leicht sauren Bedingungen einer Kieselgel-Säulenchromatographie eine Racemisierung von bis zu vier Prozent aufweisen kann.¹⁴⁶ Aus diesem Grund wurden zwei unterschiedliche Varianten der Darstellung des Aldehyds durchgeführt. Eine Variante sah die Reduktion des Weinrebamids **27** mittels Lithiumaluminiumhydrids (LAH) vor, wobei diese Reaktion mit 59% nicht in überzeugenden Ausbeuten verlief. Dies lässt sich durch die erschwerte Handhabbarkeit des LAH erklären, da dies auch bei Lagerung unter Stickstoffatmosphäre teils inaktiviert wird, wodurch eine genaue Dosierung des Reduktionsmittels erschwert ist. Ebenfalls ist durch die hohe Reaktivität und die damit einhergehende geringe Selektivität des Reagenzes die Durchführung des Syntheseanspruchsvoll, so dass eine weitere Variante zum Erhalt des gewünschten Aldehyds in Betracht gezogen und durchgeführt wurde. Hierbei wurde von dem kommerziell erhältlichen L-Valinol **30** ausgegangen, welches in darauffolgenden Reaktionsschritten zunächst Boc-geschützt und anschließend nach Swern zum Aldehyd oxidiert wurde. Die Ausbeuten waren über die zwei Schritte mit 65% zufriedenstellend, jedoch ist L-Valinol **30** als Edukt sehr teuer, so dass auch hier eine alternative Darstellungsweise in Betracht gezogen werden sollte.

Ausgehend von dem nun zugänglichen Aldehyd **32** wurde im Anschluss eine Wittig-Reaktion analog zu einer literaturbekannten Vorschrift durchgeführt.¹⁴⁷ Das Boc-geschützte Alken **33** wurde darauffolgend in einer gekreuzten Metathese mit Methylbut-3-enoat unter Verwendung von fünf mol% Grubbs *2nd Generation* Katalysator selektiv das *E*-Konformer **34** umgesetzt und mit einer Ausbeute von 77% erhalten. Die darauffolgenden Entschützungs Schritte sowie die anschließende Umsetzung mit Fmoc-ONSu verliefen mit einer Gesamtausbeute von 19%.

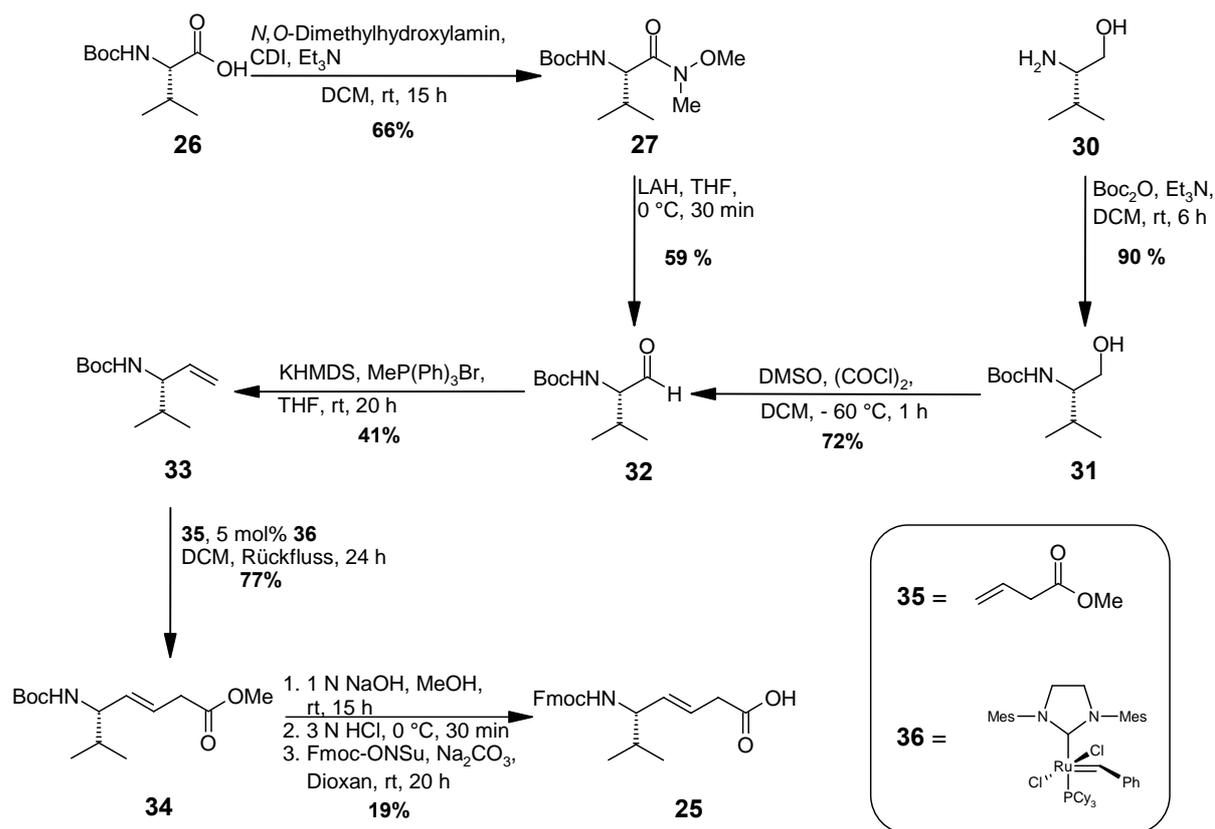


Abbildung 24: Zwei Varianten zur Darstellungen des Dipeptidmimetikums **25**. Zentrale Reaktion war die Synthese des Aldehyd **32**. Dieser wurde in einer Variante über das Weinrebamid **27** mittels LAH-Reduktion mit moderaten Ausbeuten dargestellt. Eine weitere Variante ging von dem kommerziell erhältlichen, L-Valinol **30** aus, welcher nach Boc-Schätzung zum entsprechenden Aldehyd nach Swern oxidiert wurde.

Die Dipeptidmimetika **24** und **25** konnten auf diesen Syntheserouten über vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 5% (**24**) bzw. über fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 4% (**25**) dargestellt werden. Diese geringen in der vorangegangenen Diplomarbeit erhaltenen Gesamtausbeuten bedurften einer Optimierung der einzelnen Syntheseschritte.

Um das Weinrebamid **27** darzustellen, muss die Carboxylfunktion der *N*-geschützten Aminosäure **26** zunächst säurefrei mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert werden. Die *in situ* Darstellung des Carbonsäureimidazolid verläuft rasch und ist unter Verwendung von getrocknetem DCM quantitativ. Das *N*, *O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid wurde hingegen zu einer Suspension mit einem Äquivalent Triethylamin vermischt und anschließend zur Reaktionslösung hinzugegeben. Die Zugabe von Triethylamin ist vonnöten, damit das *N*, *O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid in einer Säure-Base-Reaktion zunächst in das freie Amin überführt wurde, welches dann nukleophil am Carboxylkohlenstoff des Carbonsäureimidazolid angreifen kann. Verläuft diese Reaktion nicht vollständig, so ist das *N*, *O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid nicht in der Lage zum gewünschten Weinrebamid

27 zu reagieren, da es in DCM nicht löslich ist. Um eine vollständige Säure-Base-Reaktion zu gewährleisten, wird das *N, O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid mit DCM versetzt und anschließend Triethylamin zugegeben, bis sämtliches Hydrochlorid in Lösung gegangen ist und somit ein nahezu quantitativer Reaktionsverlauf gewährleistet ist. Diese Lösung wurde dann bei 0 °C mit der vorgelegten Boc-Aminosäure **26** versetzt, bei Raumtemperatur gerührt und anschließend aufgearbeitet. Durch diese Modifikation der Reaktionsbedingungen gelang es die Ausbeuten dieser Reaktion von 66% auf 96% zu steigern.

Für die Umsetzung des Weinrebamids **27** mit 1-Butenylmagnesiumbromid zum Keton **28** bedurfte es zunächst der Darstellung des Grignard-Reagenzes. Der Methode von Kaiser *et al.* folgend, wurde das Grignard-Reagenz in einem fünffachen Überschuss gegenüber dem Weinrebamid **27** eingesetzt.¹⁴⁴ Jedoch wurde die Aufarbeitung insofern modifiziert, dass anstatt der für die Hydrolyse vorgesehenen 5%igen NH₄Cl-Lösung, eine 10%ige Lösung und anstatt Et₂O zum Extrahieren Ethylacetat verwendet wurde. Diese Modifikation wurde vorgenommen, da Kaiser *et al.* anstatt einer auf L-Valin basierenden Synthese, L-Norleucin verwendet haben. Da diese Aminosäure aufgrund der längeren Alkylseitenkette hydrophober ist als das in dieser Synthese verwendete L-Valin, wurde zur Extraktion aus der wässrigen Phase sowohl die Ionenstärke der wässrigen Phase erhöht, als auch die Polarität der organischen Phase. Damit gelang es das Produkt vollständiger aus der wässrigen Phase zu extrahieren und die Ausbeute des Ketons **28** von 50% auf 87% zu steigern.

Die anschließende Umsetzung des Ketons **28** zur Carbonsäure **29** ist eine Oxidation einer terminalen Doppelbindung unter Lemieux-von-Rudloff-Bedingungen. In der ursprünglichen Synthese wurde das Natrium(meta)periodat bei 0 °C als Suspension in Wasser zu dem Keton **28** in Acetonitril zugefügt. Es wurde anschließend versucht, Natrium(meta)periodat gelöst in Wasser zuzugeben, um so die Ausbeute der Reaktion zu erhöhen. Die Löslichkeit von Natrium(meta)periodat ist mit 91 g/L bei 20 °C angegeben. Da die Reaktionsbedingungen einen fünffachen Überschuss an Natrium(meta)periodat gegenüber dem eingesetzten Keton **28** verlangen, ist die eingesetzte wässrige Periodat-Lösung nahezu gesättigt. Um den Lösungsvorgang zu beschleunigen wurde das Periodat zunächst suspensiert, anschließend mit Ultraschall behandelt und leicht erwärmt. Das gelöste Periodat wurde dann zu der 0 °C kalten Reaktionslösung zugetropft und mit RuCl₃*H₂O versetzt. Die Aufarbeitung der Reaktion erfolgte wie in den vorangegangenen Synthesen. Aufgrund der Modifikation bei der Zugabe von Natrium(meta)periodat gelang es, die Ausbeute des Boc-geschützten Dipeptidmimetikums **29** von 48% auf 95% zu steigern.

Die anschließende Entschützung der Aminofunktion des Dipeptidmimetikums **29** und darauffolgende Fmoc-Schützung zum fertigen Baustein **24** verlief in den vorangegangenen Synthesen ebenfalls unbefriedigend. Eine Analyse der Entschützung, mit anschließender Aufreinigung der (5*S*)-Amino-6-methyl-4-oxo-heptansäure **37** mittels *RP*-HPLC ergab eine Ausbeute von 87%. Der hohe Verlust in der Ausbeute muss also bei dem Umsatz der freien δ -Aminosäure mit dem Fmoc-ONSu zu finden sein. Die Reaktion wurde anschließend mit der gereinigten Aminosäure durchgeführt. Nach Aufarbeitung und Reinigung des Rohproduktes mittels Flash-Säulenchromatographie konnte das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von 64% isoliert werden, was einer Zunahme der Gesamtausbeute von 25% im Gegensatz zu der Ausbeute bei der „one pot“-Variante (ohne Aufreinigung der Aminosäure **37**) entspricht.

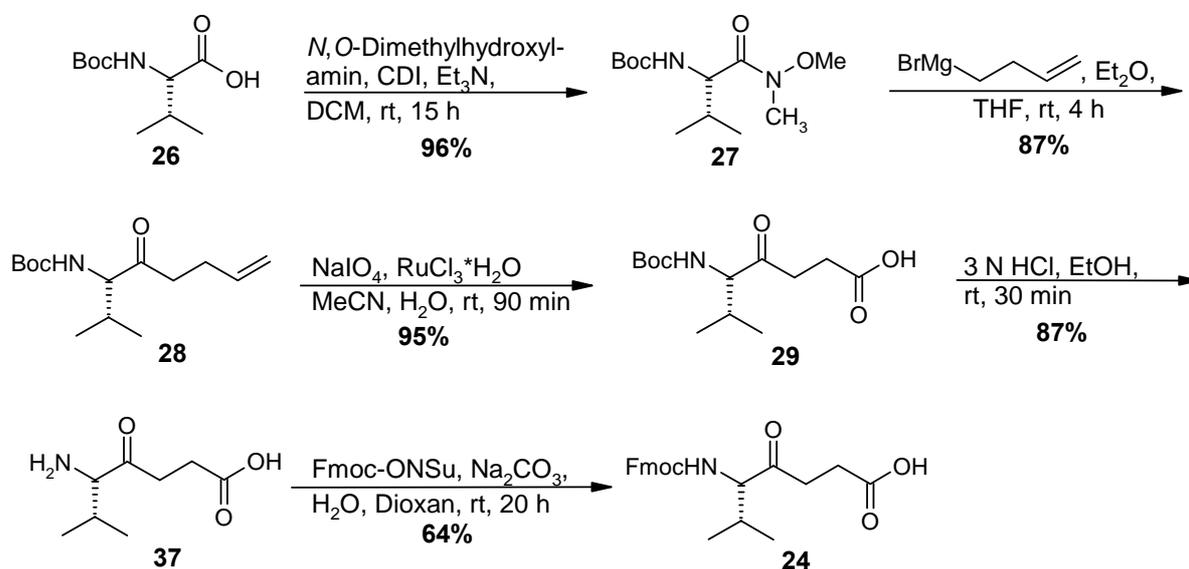


Abbildung 25: Syntheseroute für das Fmoc-geschützte Dipeptidmimetikum **24**. Das Schema zeigt die optimierten Ausbeuten aller Syntheseschritte. Insbesondere wichtig ist die isolierte Zwischenstufe **37**, die die Verbesserung der Ausbeute zu Verbindung **24** ermöglichte; die Gesamtausbeute des Bausteins **24** konnte von ursprünglichen 5% auf 44% gesteigert werden.

Der erste Schritt zu einer optimierten Synthese des Dipeptidmimetikums **25** bestand darin eine alternative Methode zur Darstellung des Boc-Valinals **32** zu etablieren. Neben den bereits beschriebenen Varianten über die Oxidation aus dem entsprechenden Alkohol **31** bzw. der Reduktion aus dem Weinrebamid **27** mittels LAH ist die Reduktion eines Esters zum entsprechenden Aldehyd eine Alternative. Hierbei ist die Reduktion eines Methylesters eine der am häufigsten verwendeten Methoden, da diese synthetisch vielfältig und leicht zugänglich sind. Prinzipiell sind für die Synthese des Boc-Valinmethyl ester **40** zwei unterschiedliche Syntheserouten, ausgehend von L-Valin **38** möglich (Abbildung 26).

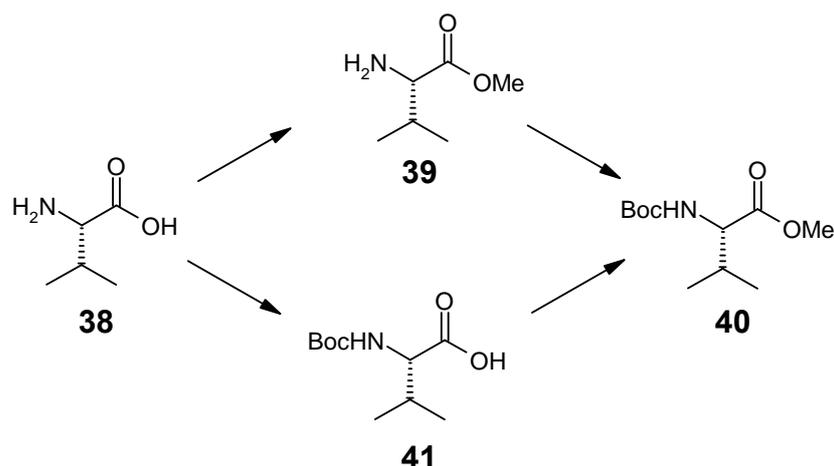


Abbildung 26: Prinzipielle Syntheserouten des Boc-Valinmethyl ester **40**. Hierbei kann, ausgehend vom kommerziell erhältlichen L-Valin **38**, zunächst die Esterfunktion in das Molekül eingebracht werden (**39**) und anschließend die Aminofunktion Boc-geschützt werden. Eine weitere Variante ist möglich, wenn das Molekül zunächst *N*-terminal Boc geschützt (**41**) und anschließend verestert wird.

Das Überführen der aminofreien Verbindungen **38** bzw. **39** in die entsprechend Boc-geschützten Verbindungen **41** respektive **40** verläuft für beide Syntheserouten unter den gleichen Bedingungen. In beiden Fällen würde die *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe mittels Boc_2O als Reagenz unter wässrigen, basischen Bedingungen eingeführt werden.¹⁴⁸⁻¹⁵¹ Um abzuwägen welche der beiden Syntheserouten letztlich zu wählen ist, bedarf es einer Betrachtung der jeweiligen Reaktionsbedingungen. Die nachträgliche Einführung der Esterfunktion ist in der Literatur bekannt, jedoch mit Problemen behaftet. So sind die gängigen Reagenzien zur Veresterung von Boc-geschützten Aminosäuren Diazomethan^{152;153} oder Methyljodid.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Beide Varianten verlaufen unter zufriedenstellenden Ausbeuten, sind jedoch in ihrer Anwendung limitiert. So ist gerade die Handhabung in größeren Maßstäben problematisch, da Diazomethan explosionsfähig und genau wie Methyljodid krebserregend ist. Ebenfalls besteht bei der Verwendung von Methyljodid die Möglichkeit, dass neben der gewünschten Veresterung, eine *N*-Methylierung auftritt.^{157;158} Eine alternative Methode der nachträglichen Veresterung wurde von Chen *et al.* untersucht.¹⁵⁹ Hierbei wurde eine Veresterung einer Boc-geschützten Aminosäure in MeOH unter Verwendung von Trimethylsilylchlorid versucht. Die bei dieser Methode *in situ* dargestellte Salzsäure dient letztlich als Katalysator für die Veresterung. Unter den gewählten Bedingungen konnte jedoch stets neben dem gewünschten Produkt die Boc-entschützte Aminosäure isoliert werden.

Die Darstellung des Methyl ester **39** aus der freien Aminosäure **38** mit anschließender Schützung der Aminofunktion mit Boc_2O erschien somit eine elegantere Route zu sein. Um eine Racemisierung des asymmetrischen Zentrums zu vermeiden, wurde von der Darstellung des Methyl ester über ein entsprechendes Säurechlorid abgesehen und eine Variante gewählt,

die ebenfalls eine *in situ* Freisetzung von Salzsäure vorsieht.¹⁴⁸ In der durchgeführten Synthese wird zu der in Methanol gelösten Aminosäure Thionylchlorid bei -10 °C langsam zutropft. Das Thionylchlorid reagiert dabei mit dem Methanol u. A. zu Schwefeldioxid und Salzsäure. Letztere katalysiert schließlich die Umsetzung zum Ester **39**. Nach vollendeter Zugabe des Thionylchlorids wird die Reaktionslösung für weitere zwei Stunden unter Rückfluss gerührt. Das gewünschte Produkt wird anschließend als Hydrochlorid aus der Lösung mittels Diethylether ausgefällt. Die Reaktion verlief nach dieser durchgeführten Variante mit 93% sehr zufriedenstellend. Das darauffolgende Schützen der Aminofunktion verlief mit einer Ausbeute von 85% ebenfalls zufriedenstellend.

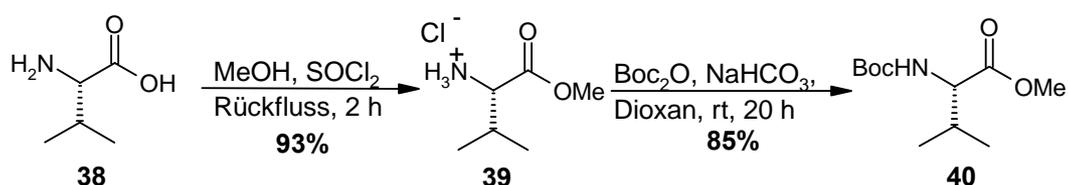


Abbildung 27: Die durchgeführten Synthesen zur Darstellung des Boc-Valinmethylesters **40** aus dem kommerziell erhältlichen L-Valin **38**. Die Gesamtausbeute über die zwei Reaktionschritte beträgt 79%. Es konnte somit, auf kostengünstige Weise in großen Mengen, ein *Precursor* für das Boc-Valinal **32** dargestellt werden.

Zur anschließenden Reduktion des erhaltenen Boc-Valinmethylesters **40** zum Boc-Valinal **32** wurde Diisobutylaluminiumhydrid (DIBALH) verwendet. Das Reagenz ist in der Lage Ester bis zum Alkohol zu reduzieren. Um jedoch eine chemoselektive Reduktion des Esters **40** zum Aldehyd **32** durchzuführen, bedarf es neben einer thermodynamischen Kontrolle der Reaktion auch die Verwendung von unpolaren Lösungsmitteln. Die Begründung hierfür ist, dass nach der vermutlich einstufigen Addition der H-Al-Bindung des Reduktionsmittels an die C=O-Bindung des Esters ein Tetraeder-Intermediat entsteht. Dieses Intermediat zerfällt bei tiefen Temperaturen unterhalb von -65 °C in unpolaren Lösungsmittel nicht. Erst bei der wässrigen Aufarbeitung zerfällt das Intermediat proteolytisch über das Halbacetal in den entsprechenden Aldehyd. Würde dieses Intermediat noch während der Anwesenheit des Reduktionsmittels zum Aldehyd zerfallen, so würde das Reduktionsmittel die elektrophile aldehydische C=O-Bindung zum Alkohol reduzieren. Dieser Zerfall wird sowohl höhere Temperatur als auch durch polare Lösungsmittel katalysiert. Aus diesen genannten Gründen wird die Reaktion bei -78 °C in DCM durchgeführt.¹⁶⁰

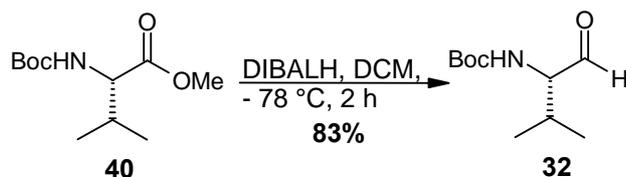


Abbildung 28: Reduktion des Methylesters **40** zum Aldehyd **32** unter Verwendung von DIBALH.

Zur wässrigen Hydrolyse der Reaktionslösung wurde gesättigte NH_4Cl -Lösung verwendet. Das dabei entstehende Aluminiumhydroxid konnte ohne weitere Probleme abfiltriert und das im Filtrat vorhandene Produkt isoliert werden. Die Reaktion verlief mit einer Ausbeute von 83% sehr zufriedenstellend. Ausgehend von L-Valin **38** konnte auf diesem Weg der für die Synthese des Dipeptidmimetikums **25** wichtige Precursor **32** mit einer Gesamtausbeute von 66% erfolgreich dargestellt werden.

Die darauffolgende Umsetzung des Aldehyds **32** in das terminale Alken **33** wurde mittels Wittig Reaktion unter Verwendung von Triphenylmethylphosphoniumbromid durchgeführt. Die Reaktion wurde analog für L-Phenylalaninal von Humphries *et al.* durchgeführt.¹⁴⁷ In diesem Zusammenhang wurde die Aufarbeitung des Rohproduktes abweichend von der Literatur modifiziert. Das im Rohprodukt enthaltene Triphenylphosphoniumoxid wurde vor der säulen-chromatographischen Reinigung durch die Zugabe von Petrolether (50-70)/Diethylether (6:1 v/v) und anschließendem Behandeln des sirupösen Rohprodukts im Ultraschallbad ausgefällt. Das Triphenylphosphoniumoxid wurde mehrfach gewaschen, das Filtrat eingengt und säulenchromatographisch gereinigt. In vorangegangenen Synthesen wurde das Triphenylphosphoniumoxid nicht vorher ausgefällt, sondern zusammen mit dem gesamten Rohprodukt als Sirup auf die Kieselgelsäule gegeben. Durch das Löslichkeitsverhalten des Phosphoniumoxids im verwendeten Lösungsmittelgemisch kontaminierte dieses die gesammelten Fraktionen, wodurch es die Ausbeute des isolierten Produktes herabsetzte. Selbst durch zuvor mehrfach durchgeführte säulenchromatographische Reinigungsschritte konnte ohne die Fällung des Phosphoniumoxids im Ultraschallbad keine höhere Ausbeute als 41% erzielt werden. Nach dieser neuen Aufarbeitungsmethode konnte das Produkt **33** mit hervorragenden 71% isoliert werden.

Die Umsetzung des terminalen Alkens **33** zum Boc-geschützten Dipeptidmimetikum **34** erfolgte mittels einer Kreuzmetathese unter Verwendung eines Grubbs 2^{nd} -Generation Katalysators (**36**, Abbildung 29).

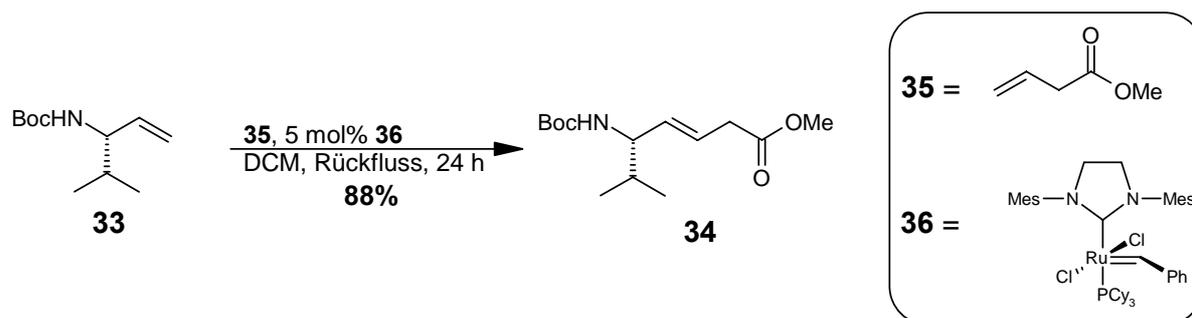


Abbildung 29: Durchgeführte Kreuzmetathese des Alkens **33** mit dem Methylbut-3-enoat **35** unter Verwendung eines Grubbs 2nd Generation Katalysators (**36**). Es wurden drei Äquivalente des Alkens **33** eingesetzt, von denen nach Aufarbeitung bis zu 1.5 Äquivalente reisoliert werden konnten. Als Produkt konnte das thermodynamisch stabilere *E*-Konformer **34** erfolgreich isoliert werden.

Das für die Synthese verwendete Methylbut-3-enoat **35** und der Katalysator **36** sind kommerziell erhältlich. Vasbinder *et al.* berichteten, dass die Olefine **33** und **35** in einem Verhältnis von 3:1 (**33/35**) eingesetzt werden sollten, wobei das entsprechende Olefin **33** nach der säulenchromatographischen Aufreinigung mit bis zu einem Äquivalent wiedergewonnen werden kann.¹⁶¹ In den in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen wurden bis zu 1.5 Äquivalente des Eduktes **33** reisoliert. Um die gewählten Verhältnisse der Olefine und die erhöhte Rückgewinnung des Eduktes **33** erklären zu können, bedarf es der Einstufung der verwendeten Olefine in die Olefin-Typen I-IV nach Chatterjee *et al.*¹⁶² Diese Klassifizierung der Olefine basiert sowohl auf der relativen Fähigkeit im Vergleich zu anderen Olefinen zu homodimerisieren, sowie auf der Reaktivität des entstandenen Homodimers mit einem weiteren Olefin eine sekundäre Metathese-Reaktion einzugehen. So sind Typ-I-Olefine in der Lage schnelle Homodimerisierungen durchzuführen. Diese Homodimere reagieren ebenso schnell in einer Kreuzmetathese mit anderen Olefinen, wie ihre Monomereinheiten. Typ-II-Olefine homodimerisieren hingegen langsamer und ihre entsprechenden Dimere sind im Gegensatz zu den Typ-I-Olefinen nicht zu einer Kreuzmetathese mit weiteren Olefinen befähigt. Typ-III-Olefine sind nicht mehr in der Lage Dimere zu bilden, jedoch können in diese mit Typ-I- respektive Typ-II-Olefinen Kreuzmetathesen eingehen. Die im Bezug auf Kreuzmetathesen unreaktivste Klasse, die Typ-IV-Olefine reagieren nicht mehr im Sinne einer Metathesereaktion mit anderen Olefinen. Ihre Anwesenheit bei einer Metathese verhindert jedoch nicht die Reaktion anderer Olefine miteinander. Olefine, die sich außerhalb dieser vier Typen klassifizieren lassen, desaktivieren letztlich den Katalysator. Wird eine Kreuzmetathese mit Olefinen gleichen Typs durchgeführt, so kommt es zu einer statistischen

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches, deren exakte Verteilung durch die Stöchiometrie der eingesetzten Monomere teils beeinflussbar ist (Abbildung 30).

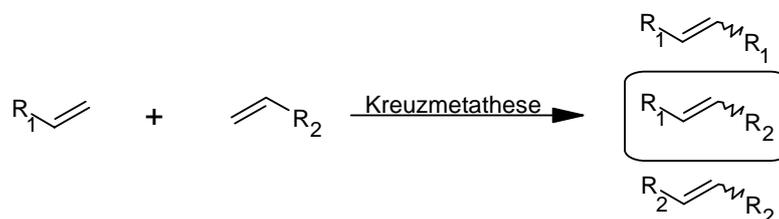


Abbildung 30: Prinzipieller Verlauf einer Kreuzmetathese mit Olefinen gleichen Typs. Nach der Einstufung von Chatterjee *et al.* können dies Olefine des Typs I-III sein. Das Ergebnis einer solchen Kreuzmetathese ist statistischer Natur und kann nur durch die Änderung der Stöchiometrieverhältnisse der einzelnen Monomere beeinflusst werden.

Die eingesetzten Monomere werden in diesem Falle während der Reaktion vollends verbraucht, so dass es nicht möglich ist, Monomere zu reisolieren. Wird hingegen davon ausgegangen, dass Olefine unterschiedlicher Reaktivität bzw. unterschiedlichen Typs miteinander reagieren (Typ I mit Typ II bzw. III), so ist der Verlauf der Kreuzmetathese ein anderer (Abbildung 31). In einem ersten Metatheseschritt kommt sowohl zur Bildung eines Homodimers des reaktiven Typs I als auch zur Ausbildung des gewünschten Kreuzproduktes. Die Homodimerisierung des im Verhältnis zum Typ I unreaktiveren Olefins findet nicht statt. Das bei diesem Reaktionsschritt entstehende Ethen tritt aus der Reaktionslösung aus, womit die Rückreaktion dieser ersten Metatheseprodukte zu den entsprechenden geminalen Olefinen verhindert wird. Das Homodimer des Typ I-Olefins ist aufgrund seiner Reaktivität in der Lage mit einem weiteren Olefin anderen Typs eine sekundäre Metathesereaktion einzugehen. Hierbei entsteht wiederum das gewünschte Heterodimer und das Olefin Typ I. Das bei der Reaktion entstehende Heterodimer ist im Gegensatz zum Homodimer des Typs I weniger reaktiv und geht keine sekundären Metathesereaktionen ein.

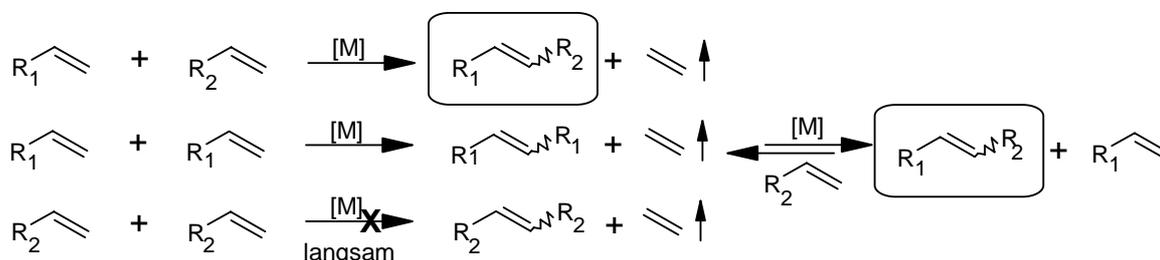


Abbildung 31: Prinzipieller Mechanismus der Metathese zweier Olefine unterschiedlichen Typs. In einer Primärmetathese reagiert das reaktive Olefin (Typ I; R₁) sowohl mit sich selbst zum entsprechenden Homodimer, als auch mit dem Typ II-Olefin (R₂) zum gewünschten Kreuzprodukt. Die Homodimerisierung des unreaktiveren Olefins findet nur langsam bzw. gar nicht statt. Das bei der Reaktion freiwerdende Ethen tritt aus der Reaktionslösung aus und verhindert eine Rückreaktion. Das reaktive Homodimer reagiert in einer sekundären Metathesereaktion mit dem Olefin Typ II zum Heterodimer, wobei das Olefin Typ I wieder frei wird; das Heterodimer ist aufgrund seiner niedrigeren Reaktivität nicht in der Lage eine sekundäre Metathesereaktion einzugehen.

Dieser Mechanismus erklärt sowohl die Wiedergewinnung von bis zu 1.5 Äquivalenten des Alkens **33** als auch die geringe Anzahl an Nebenprodukten bei der durchgeführten Metathese zum Boc-geschützten Dipeptidmimetikum **34**. Um zu beweisen, dass es sich bei den eingesetzten Olefinen um Olefine unterschiedlichen Typs und somit unterschiedlicher Reaktivität handelt, wurden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Olefine aufgenommen und die chemische Verschiebung der Methin-Protonen der $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung miteinander verglichen. Da olefinischen Protonen im negativen Bereich des Anisotropiekegels einer $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung lokalisiert sind, hängt ihre chemische Verschiebung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum direkt mit der Elektronendichte der $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung zusammen. Je größer die Elektronendichte der nicht polarisierten $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung desto stärker ist der Charakter des Anisotropieeffektes ausgeprägt. Somit sind Methin-Protonen von elektronenreichen unpolaren $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindungen mehr ins Tieffeld verschoben, als diejenigen Methin-Protonen, die sich an einer elektronenärmeren $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung befinden. In Abbildung 32 ist der Bereich der chemischen Verschiebung der olefinischen Protonen der Edukte **33** und **35** und des Metathese-Produktes **34** dargestellt.

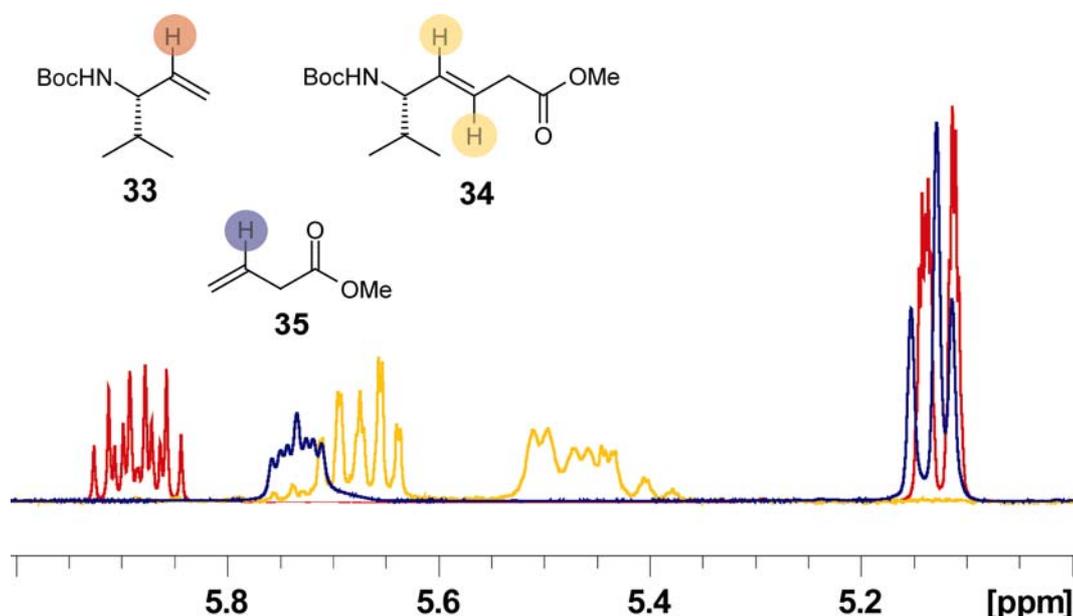


Abbildung 32: Dargestellt sind die chemischen Verschiebungen der olefinischen Protonen der jeweiligen Edukte **33** (rot) und **35** (blau) der Metathese, sowie des Produktes **34** (gelb) im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Deutlich zu erkennen ist das tieffeldverschobene Methin-Proton des Eduktes **33** im Gegensatz zu dem des Alkens **35**. Aufgrund der Verschiebung lassen sich Rückschlüsse auf die Elektronendichte der $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung und somit auf die Reaktivität des Olefins im Bezug auf eine Metathesereaktion schließen. So ist die $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung des Alkens **33** am elektronreichsten und reagiert wie ein Olefin Typ I; die $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung des Alkens **35** hingegen ist elektronenärmer, wodurch es wie ein Olefin Typ II zu reagieren scheint, womit die experimentellen Ergebnisse mit dem theoretischen Mechanismus dieser Metathesereaktion erfolgreich in Einklang gebracht werden können. Das heterodimere Produkt **34** zeigt eine starke Hochfeldverschiebung, wodurch es unter gegebenen Synthesebedingungen aufgrund seiner elektronenarmen $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung nicht in der Lage ist weitere Kreuzmetathesen mit den Edukten einzugehen.

Es ist zu erkennen, dass das Methin-Proton des Olefins **33** am weitesten zu tiefem Feld verschoben (Multipllett $\delta = 5.94 - 5.83$ ppm) ist und somit an der elektronenreichsten C=C-Doppelbindung in diesem System gebunden ist. Weiter hochfeldverschoben befindet sich das Methin-Proton des Eduktes **35** (Multipllett $\delta = 5.77 - 5.69$ ppm). Dies zeigt, dass es sich um zwei unterschiedlich elektronenreiche und somit für die Metathese unterschiedlich reaktive Olefine handelt. In dieser Synthese ist das Alken **33** somit als ein Typ I-Olefin und Alken **35** als ein Typ II- oder Typ III-Olefin zu charakterisieren. Erkennbar ist aus der Abbildung 32 ebenfalls, dass die olefinischen Protonen des Produktes **34** am weitesten hochfeldverschoben sind (Multipllett $\delta = 5.73 - 5.62$; $\delta = 5.53 - 5.36$ ppm), wodurch dieses Heterodimer nicht mehr in der Lage zu sein scheint, während der Reaktion mit vorhandenen Monomeren eine Kreuzmetathese einzugehen.

Die aus der Synthese des Dipeptidmimetikums **24** gewonnen Erkenntnisse im Zusammenhang mit der Umschätzung des Boc-geschützten **34** zum Fmoc-geschützten Baustein **25** wurden in dieser Syntheseroute ebenfalls verwendet. Hierfür wurde zunächst der Methylester hydrolysiert und anschließend die Boc-Schutzgruppe im sauren Milieu entfernt. Die entschützte δ -Aminosäure **42** wurde anschließend mittels *RP*-HPLC aufgereinigt und anschließend mit Fmoc-ONSu zum gewünschten Produkt **25** umgesetzt.

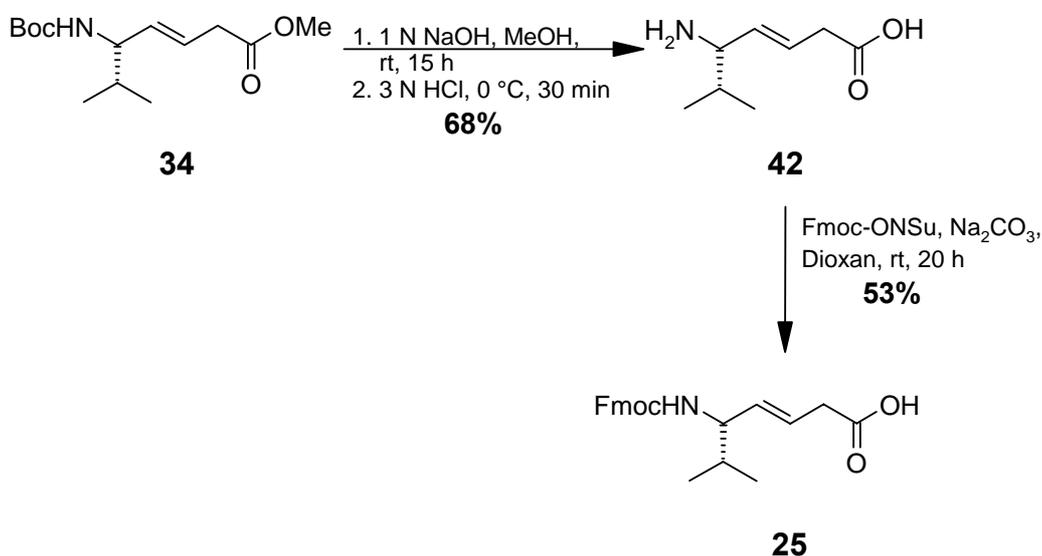


Abbildung 33: Durchgeführte Variante der Ent- und Umschätzung des Boc-geschützten Methylesters **34** in die Fmoc-geschützte Säure **25**. Hierbei wurde die δ -Aminosäure als Zwischenprodukt **42** nach der Entschätzung mittels *RP*-HPLC aufgereinigt und anschließend mit Fmoc-ONSu an der freien Aminofunktion Fmoc geschützt. Durch diesen Zwischenschritt konnte die Ausbeute der Synthese deutlich erhöht werden.

Auch in diesem Fall konnte eine Steigerung der Ausbeute der Umschätzung zum Fmoc-geschützten Mimetikum **25** erzielt werden. So wurde das Mimetikum **25** ausgehend

von **34** mit einer Ausbeute von 36% erhalten werden. Dies entspricht einer Steigerung der Ausbeute um 15% im Verhältnis zu der vorangegangenen Synthesevariante.

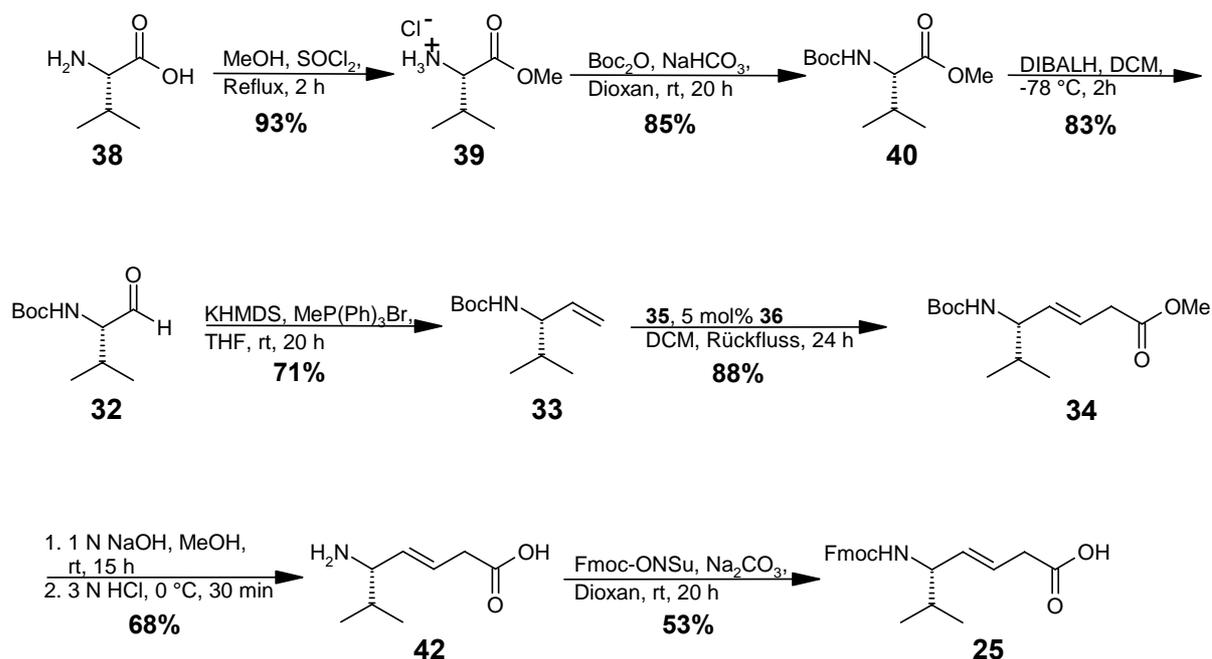


Abbildung 34: Syntheseroute für das Fmoc-geschützte Dipeptidmimetikum **25**. Das Schema zeigt die optimierte Synthese. Aldehyd **32** wurde durch die Reduktion des Methylesters **40** erhalten. Die δ -Aminosäure **42** wurde als Zwischenstufe der Umschüttung der Verbindung **34** zu **25** die δ -Aminosäure **42** aufgereinigt, wodurch eine weitere Steigerung der Gesamtausbeute erzielt werden konnte; die Gesamtausbeute des Bausteins **25** konnte von ursprünglichen 4% auf 15% gesteigert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Gesamtausbeuten der Synthesen der Fmoc-geschützten Dipeptidmimetika **24** und **25** mittels der durchgeführten Modifikationen deutlich erhöhen ließen. So ist das Mimetikum **24** über eine fünfstufige Syntheseroute, ausgehend von Boc-geschützten L-Valin mit einer Gesamtausbeute von 44% erfolgreich zugänglich ist. Das Mimetikum **25** ist über eine siebenstufige Synthese mit einer Gesamtausbeute von 15%, bezogen auf L-Valin **38** synthetisiert worden.

4.1.4 Synthese von L-Cyclohexylalanin-derivatisierten Dipeptidmimetika

Die optimierte Darstellung der Fmoc-geschützten Dipeptidmimetika **24** und **25** und die aus dem Abschnitt 4.1.1 gewonnen Erkenntnisse über den Einfluss der Verkürzung der *backbone*-Länge der Liganden **13-15** in Kombination mit der Einführung eines sterisch anspruchsvolleren, hydrophoben Restes an Stelle der L-Valin-Seitenkette führte zur Darstellung der Dipeptidmimetika **47** und **55**. In beiden Fällen ist die Aminosäure L-Valin durch die unnatürliche Aminosäure L-Cyclohexylalanin ersetzt worden. Diese Substitution wurde durchgeführt, da diese in den Arbeiten von H. Möller an Mimetika des Dekapeptids

$^{425}\text{NMWQKV}^{430}\text{-G-}^{123}\text{TPL}^{125}$ als positiv eingeschätzt werden konnte.¹⁶³ Die Dipeptidmimetika **47** und **55** wurden in Analogie zu den Synthesen der Dipeptidmimetika **24** und **25** dargestellt. Die Synthese des Dipeptidmimetikums **47** ist in Abbildung 35 schematisch dargestellt.

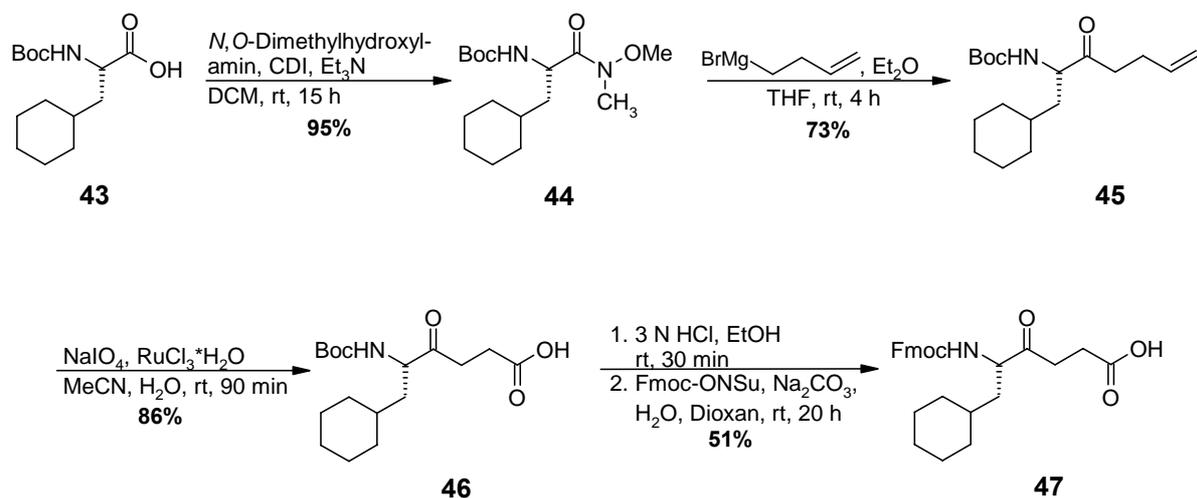


Abbildung 35: Durchgeführte Synthesen des L-Cyclohexylalanin-Derivats **47**. Es stellt das erste Ketomethylen-Dipeptid-Mimetikum dar, welches auf Basis von Cha und Gly synthetisiert wurde.

Die Umsetzung des Boc-geschützten L-Cyclohexylalanin **43** in das Weinreb-Amid **44** konnte erfolgreich mit einer Ausbeute von 95% durchgeführt werden. Dies entspricht der Ausbeute für das entsprechende L-Valin-Derivat **27**. Die anschließende Reaktion des Weinreb-Amids mit dem *in situ* dargestellten 1-Butenmagnesiumbromid verlief ebenfalls in guten Ausbeuten von 73%. Folgend dem Syntheschema wurde daraufhin die terminale Doppelbindung mittels Natrium(meta)periodat in Anwesenheit des *in situ* gebildeten RuO₄ zur Säure **46** umgesetzt. Die Reaktion verlief mit 86% Ausbeute. Die Umschützung zum Fmoc-geschützten Dipeptidmimetikum **47** wurde im Gegensatz zu der Darstellung von **24** nicht nach der Entschützung gereinigt, sondern lediglich durch Extraktion vorgereinigt. Nach Reinigung konnte der Fmoc-geschützte Baustein **47** mit 51% isoliert werden.

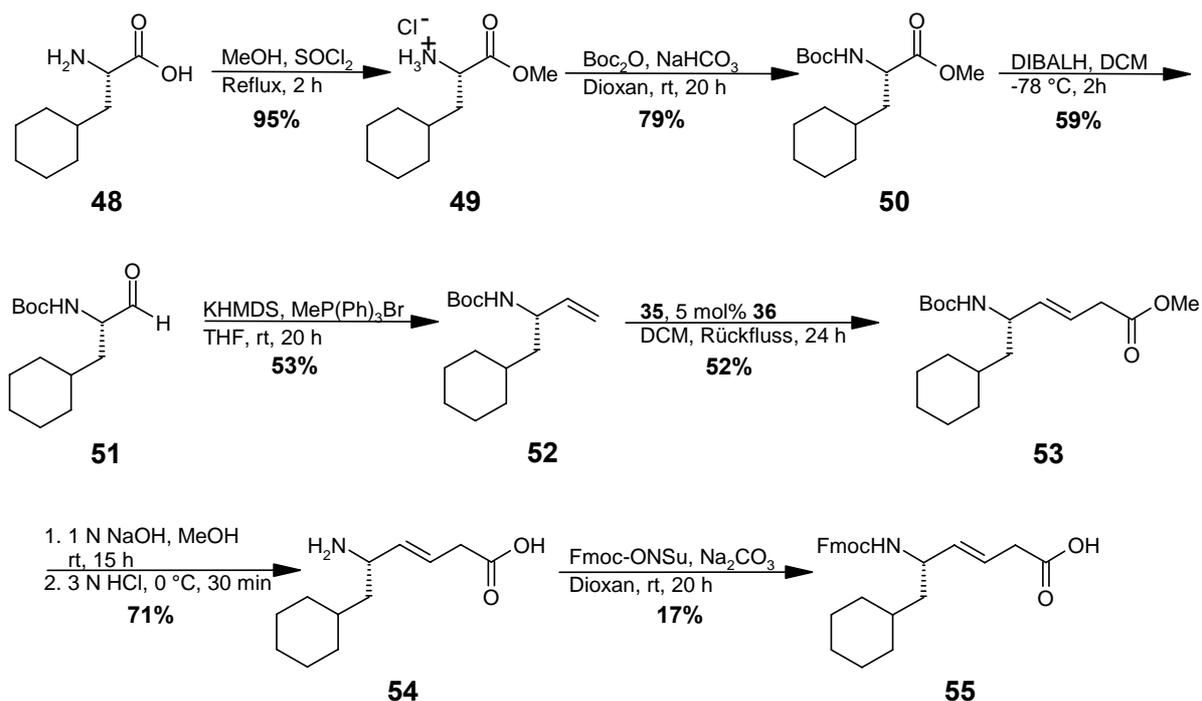


Abbildung 36: Durchgeführte Synthesen des L-Cyclohexylalanin-Derivats **55**. Es stellt das erste *E*-Ethylen-Dipeptid-Mimetikum dar, welches auf Basis von Cha und Gly synthetisiert wurde.

Die Darstellung des Dipeptid-Mimetikums **55** (Abbildung 36) ging von dem freien L-Cyclohexylalanin **48** aus. Die Überführung in den Boc-geschützten Methylester **50** über das Hydrochlorid **49** konnte mit der L-Valin-Derivat-Synthese analogen Ausbeuten von 95%, respektive 79%, dargestellt werden. Die folgenden drei Reaktionschritte verliefen jedoch unter stärkeren Einbußen in den Ausbeuten. Dies wurde auf die geringere Löslichkeit der L-Cyclohexylalanin-Derivate im Vergleich zu den L-Valin-Derivaten zurückgeführt. In diesem Zusammenhang mussten die Verbindungen **50-52** im Verhältnis zu den Verbindungen **40**, **32** und **33** in mehr Lösungsmittel gelöst werden, so dass durch die Verdünnung eine schlechtere Umsetzung zu den jeweiligen Produkten auftrat. Die Verbindungen **51**, **52** und **53** konnten mit Ausbeuten von 59%, 53% bzw. 52% dargestellt werden. Nach der Entschützung zur freien Aminosäure **54** konnten Ausbeuten ähnlich denen bei der Darstellung von **25** erzielt werden. Die abschließende Fmoc-Schützung zum Dipeptidmimetikum **55** hingegen verlief mit einer geringen Ausbeute von 17%.

Die dargestellten Fmoc-geschützten Dipeptidmimetika **47** und **55** wurden für weitere Studien im Rahmen der Diplomarbeit von H. Behnken verwendet.¹⁶⁴

4.1.5 Lineare Synthese der entwickelten Peptidomimetika 16 und 17

Die dargestellten Fmoc-geschützten Dipeptidmimetika **24** und **25** und wurde zur Darstellung der in Abschnitt 4.1.2 *in silico* entwickelten und gedockten Liganden **16-23** auf eine von A. Neffe entwickelte Synthesestrategie zurückgegriffen. Diese Strategie sieht die Verwendung eines mit L-Alaninol belegten 2-Chlortritylharzes vor (**59**). An dieses L-Alaninol werden sukzessive nach der Fmoc-Strategie die Dipeptidmimetika **24** bzw. **25** gekuppelt, darauffolgend Fmoc-Lys(Boc)-OH und abschließend 2-Naphthyloxyessigsäure **58**. Die Fragmente (**60** bzw. **61**) werden unter mild sauren Bedingungen vom Harz abgespalten. Die sauren Bedingungen werden bei diesem Schritt so gewählt, dass das Ligand-Fragment vom Harz abgespalten wird, jedoch die säurelabile Boc- bzw. *t*-Bu-Schutzgruppe intakt bleibt (**62** bzw. **63**). Dies wird in dieser Synthesestrategie durch die Verwendung eines Gemisches aus DCM/TIPS/TFA (*v/v* 19:1:0.2) realisiert. Die Seitenkettengeschützten Alkohole **62** und **63** werden anschließend zur Verknüpfung der hydrophoben Reste mit einem entsprechenden Isocyanat unter der Verwendung eines Äquivalents Kupfer(I)chlorids zu den seitenkettengeschützten Liganden umgesetzt. In einem abschließenden Schritt werden die Seitenkettenschutzgruppen unter stark sauren Bedingungen abgespalten und so die gewünschten Liganden **16-23** erhalten (Abbildung 38).

Die für die Synthese benötigte 2-Naphthyloxyessigsäure **58** wurde zunächst durch Umsetzen von 2-Naphthol **56** mit Bromessigsäure **57** synthetisiert nach Rasshofer *et al.* synthetisiert.¹⁶⁵

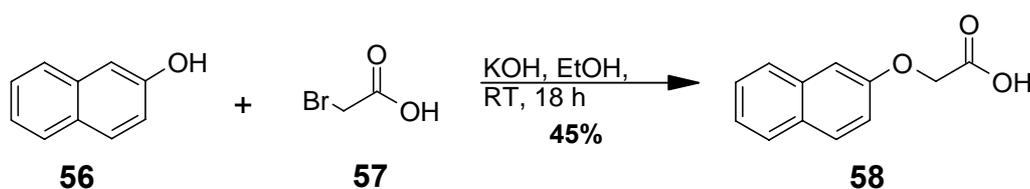


Abbildung 37: Durchgeführte Synthese zur Darstellung der 2-Naphthyloxyessigsäure **45** aus 2-Naphthol **43** und Bromessigsäure **44** mittels einer Williamson'schen Ethersynthese nach Rasshofer *et al.*¹⁶⁵

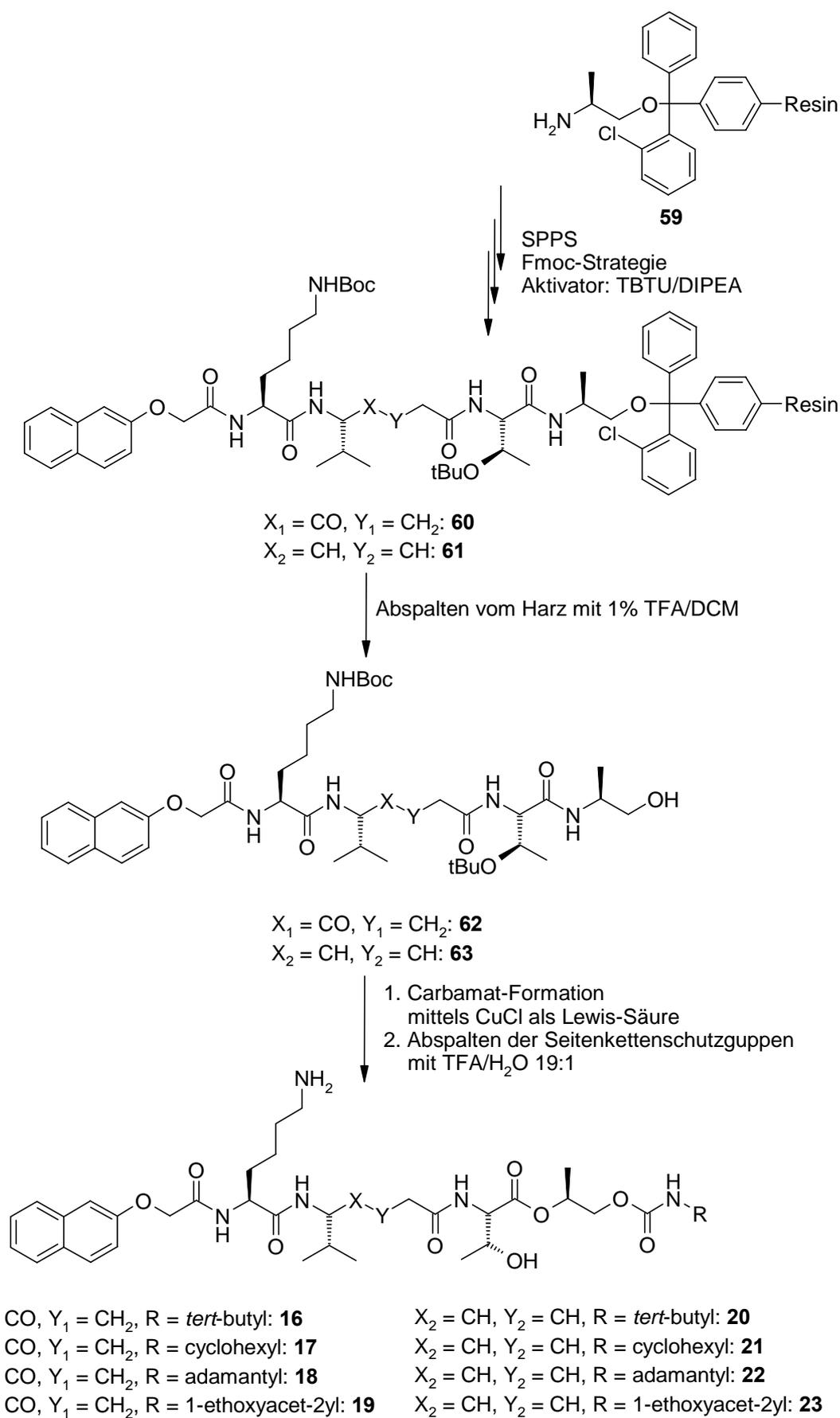


Abbildung 38: Ursprüngliche Synthesestrategie für die Liganden **16-23**. Vorgesehen war die Carbamat-Formation am komplett geschützten Peptidomimetikum und anschließende Entschützung des Liganden.

Zunächst wurde die Synthese der Liganden **16** und **17** durchgeführt. Für die Synthese der Liganden wurde ein 40 μmol -Ansatz gewählt, wobei im Anschluss an jede Kupplungsreaktion ein *capping*-Schritt mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMF}$ (v/v 1:9) durchgeführt wurde, bevor anschließend die Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin/DMF (v/v 1:4) abgespalten wurde. Das bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe entstehende Methylenfluoren eignet sich zur quantitativen UV-photometrische Untersuchung.¹⁶⁶ Für die Synthesen der Liganden **16** bzw. **17** wurden zunächst unterschiedliche Strategien bei der SPPS verfolgt. Die Kupplungsreaktionen der Aminosäuren wurden im Falle des Liganden **16** jeweils einfach über einen längeren Zeitraum durchgeführt, wohingegen die Aminosäurekupplungen bei der Synthese des Liganden **17** jeweils dreifach, jedoch über einen jeweils kürzeren Zeitraum durchgeführt wurden. Diese unterschiedliche Durchführung sollte eine Analyse des Einflusses der Reaktionszeit bzw. der Aktivität des *in situ* gebildeten Aktivesters der Aminosäure auf die Ausbeute der Kupplungsreaktion ermöglichen. In Tabelle 3 sind die jeweiligen Kupplungszeiten der einzelnen Aminosäuren und die entsprechenden photometrisch ermittelten Ausbeutebestimmungen des Methylenfluoren-Wertes angegeben.

Tabelle 3: Darstellung der einzelnen Aminosäurekupplungen für die Liganden **16** und **17**. Die Kupplungszeiten für die Synthese des Liganden **16** wurden lang gewählt, jedoch jede Aminosäure einzeln gekuppelt. Bei der Synthese des Liganden **17** wurde eine kürzere Kupplungszeit gewählt, jedoch nach 60 Minuten jeweils frisch angesetzte Aminosäureaktivesterlösung eingesetzt.

Ligand 16			Ligand 17		
Aminosäure	Kupplungszeit	Ausbeute	Aminosäure	Kupplungszeit	Ausbeute
L-Threonin	8 h 30 min	41%	L-Threonin	60 min	----
----	----	----	L-Threonin	60 min	----
----	----	----	L-Threonin	60 min	58%
Mimetikum 24	12 h 30 min	166%	Mimetikum 24	60 min	----
----	----	----	Mimetikum 24	60 min	108%
L-Lysin	8 h 00 min	91%	L-Lysin	60 min	----
----	----	----	L-Lysin	60 min	----
----	----	----	L-Lysin	60 min	89%

Für die jeweiligen Kupplungsreaktionen wurden die Fmoc-geschützten Aminosäuren L-Threonin und L-Lysin sowie die 2-Napthyloxyessigsäure in einem vierfachen Überschuss relativ zur freien Aminofunktionen am Harz eingesetzt. Das Mimetikum **24** wurde in beiden Synthesen in einem zweieinhalbfachen Überschuss eingesetzt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach der photometrischen Bestimmung des Methylenfluorens kaum ein Unterschied

zwischen den Ausbeuten der einzelnen Syntheseansätze besteht. Die Kupplungsausbeuten der jeweils ersten Aminosäure an das L-Alaninol fallen bei beiden Ansätzen mit 41% bzw. 58% ungenügend aus. Hingegen sind die Bestimmungen der Methylenfluoren-Werte nach der Kupplung des Dipeptidmimetikums **24** mit jeweils über 100% insofern zufriedenstellend, dass die Kupplung des Bausteins **24** nach dem Standardverfahren erfolgreich verlaufen, jedoch offenbaren sie die Nachteile der photometrischen Bestimmung des Fmoc-Wertes. Die Ergebnisse der Bestimmung sind durch ihre Durchführung mit einem relativ großen Fehler von 30% behaftet, so dass die Ausbeuten mit über 100% zu erklären sind. Es lassen sich aber halbquantitative Aussagen über die Ausbeuten der Kupplungsreaktionen treffen. So scheint die erste Kupplungsreaktion des L-Threonins an Alaninol schlechter zu verlaufen, als die darauffolgenden Kupplungen des Dipeptidmimetikums **24** und des L-Lysins. Die Bestimmung der Ausbeute der Kupplung der 2-NOA ist mit der Fmoc-Methode nicht möglich, so dass in diesem Rahmen keine Aussagen über den Erfolg der Kupplungen getroffen werden können.

Nach vollendeter letzter Kupplung wurde das Harz mit DCM gewaschen, getrocknet und das geschützte Mimetikum **62** anschließend mittels DCM/TIPS/TFA (*v/v* 19:1:0.2) vom Harz abgespalten. Unter diesen Bedingungen kommt es nicht nur zu einer Abspaltung des Mimetikums vom Harz sondern auch zu einer Veresterung der freien Hydroxylgruppe des Mimetikums **62** mit der Trifluoressigsäure. Trifluoressigsäure lassen sich durch 5%ige Natriumcarbonat-Lösung und Verwendung eines Amberlyt A-21-Ionenauschers hydrolysieren, wodurch der freie Alkohol **62** erhalten werden kann. Die so erhaltenen Rohprodukte (60 mg für Ligand **16** und 25 mg für Ligand **17**) wurden ohne weitere Aufreinigung jeweils in DMF gelöst und mit einem Äquivalent Kupfer(I)chlorid und dem entsprechenden Isocyanat versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich die Lösung von einer leicht gelblichen Lösung in eine dunkelgrüne Lösung verfärbte. Nach der Reaktion wurde das vorhandene Kupfer durch Waschen mit einer 5%igen NH_4HCO_3 -Lösung aus der Reaktionslösung entfernt. Die Analyse des Rohproduktes mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie ergab, dass sowohl die Natrium- bzw. Kaliumpeaks der entsprechenden geschützten Liganden **16** und **17** vorlagen (922 *m/z* $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 938 *m/z* $[\text{M}+\text{K}]^+$ bzw. 948 *m/z* $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 964 *m/z* $[\text{M}+\text{K}]^+$), jedoch auch nicht umgesetztes Edukt in beiden Fällen im Rohproduktgemisch zu finden war (801 *m/z* $[\text{M}+\text{H}]^+$, 823 *m/z* $[\text{M}+\text{Na}]^+$). Eine Quantifizierung der Reaktionsausbeute wurde in diesem Zusammenhang an dieser Position nicht durchgeführt. Das aus dieser Carbamat-Bildungsreaktion hervorgegangene Rohprodukt wurde anschließend mit einem Gemisch aus TFA/TIPS/ H_2O (*v/v* 19:1:0.2) zum Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen versetzt und das

so erhaltene Rohprodukt mittels *RP*-HPLC aufgereinigt. Es konnten hierbei für den Liganden **16** 3.7 mg (5.0 μmol) und 4.8 mg (6.2 μmol) für den Liganden **17** isoliert werden. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 13% respektive 16% der Liganden **16** und **17** bezogen auf die eingesetzte Menge an Harz.

Die Liganden **16** und **17** wurden anschließend mittels ^1H -NMR-Spektroskopie charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden die Liganden in einem Gemisch aus $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (v/v 9:1, pH 3) gelöst und Spektren an einem Bruker 700 MHz mit Cryo-Probenkopf bei 300 K aufgenommen. Zur Unterdrückung des Wassersignals wurden Pulsprogramme mit einer WATERGATE-Pulssequenz verwendet. In Abbildung 39 ist ein Bereich des ^1H , ^1H -TOCSY-Spektrums dargestellt.

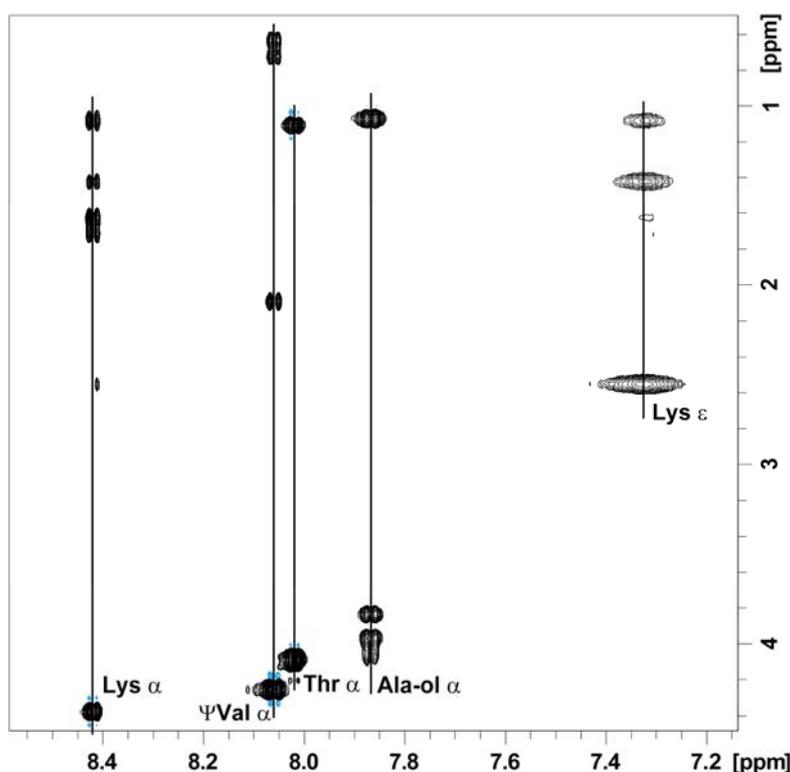


Abbildung 39: Ausschnitt des NH-Bereichs des ^1H , ^1H -TOCSY-Spektrums des Liganden **17** ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3.0, 300 K, 700 MHz).

Es ist deutlich zu erkennen, dass für jede Aminosäure nur eine NH-Spur vorhanden ist. Dies bedeutet, dass die *cis*-/*trans*-Isomerie bei den Liganden, die L-Prolinol an Stelle von L-Alaninol besaßen, nicht auftritt. Dies ist in Hinblick auf die SPR-Untersuchungen von Bedeutung, da für die Bindung an das CD4-Protein nur das *trans*-Konformer zur Verfügung steht und dadurch der K_D -Wert des *trans*-Konformers bestimmt werden kann und nicht der eines *cis*-/*trans*-Gemisches.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Synthesen der Liganden **16** und **17** erfolgreich verliefen und es durch die Substitution des L-Prolinols durch L-Alaninol nicht mehr zu der Ausbildung eines *cis*-/*trans*-Isomerengemisches kommt. Die Gesamtausbeuten der Synthese der Liganden **16** und **17** waren jedoch mit 13% bzw. 16% nicht zufriedenstellend, so dass vor der Synthese der Liganden **18-23** eine Analyse und Optimierung der einzelnen Syntheseschritte zur Darstellung der Liganden erfolgte.

4.1.6 Analyse und Optimierung der Festphasenpeptidsynthese

Eine quantitative Analyse der Ausbeuten der einzelnen Kupplungsschritte der Aminosäuren im Rahmen der in Abschnitt 4.1.5 durchgeführten Synthesen war nach der Fmoc-Methode nicht möglich. In diesem Zusammenhang war es notwendig eine andere Methodik zur quantitativen Erfassung der Ausbeuten der Festphasenpeptidsynthese zu etablieren. Zu diesem Zweck wurde die Kupplung des Fmoc-L-Threonin(^tBu)-OH an das am 2-Chloro-Tritylharz gekoppelte L-Alaninol als Modellsystem für die Festphasensynthese verwendet. Es wurden hierfür sechs unterschiedliche Ansätze durchgeführt. In allen Ansätzen wurde das zu kuppelnde L-Threonin in einem vierfachen, TBTU als Aktivator und DIPEA als Base jeweils in einem fünffachen Überschuss relativ zum L-Alaninol (10 μ mol) eingesetzt. Die Ansätze wurden jeweils über 1, 2, 3, 6, 12 und 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Um Kondensation von Wasser im Verlauf der Reaktionszeit zu verhindern, wurden die Reaktionen unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Nach vollendeter Reaktionszeit wurde das Reaktionslösungsgemisch abgesogen und das sich am Harz befindliche Kupplungsprodukt mittels DCM/TIPS/TFA (v/v 19:1:0.2) vom Harz abgespalten (**64**).

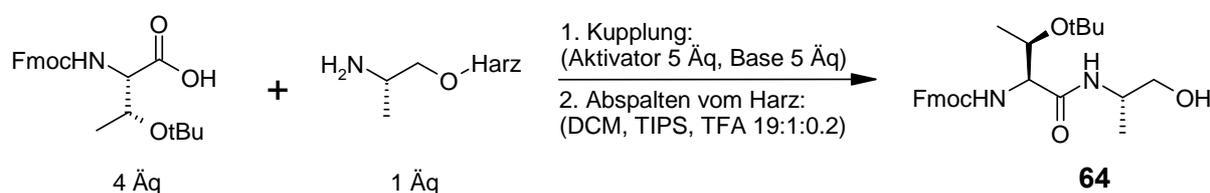


Abbildung 40: Reaktionsschema der durchgeführten Peptidkupplung und Abspaltung des geschützten Produktes **64** vom Harz. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend zur quantitativen Bestimmung der Ausbeute der Kupplungsreaktion mittels *RP*-HPLC aufgereinigt

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels *RP*-HPLC aufgereinigt, die Produkt enthaltenden Fraktionen gesammelt und nach Gefriertrocknung ausgewogen, so dass eine quantitative Bestimmung der Ausbeute des Kupplungsschrittes möglich ist.

Die Ausbeuteberechnungen der Auswaagen der ersten Kupplung und die durch die Fmoc-Methode erhaltenen Werte befanden sich in der gleichen Größenordnung (41% durch die Fmoc-Bestimmung bzw. 24-40% durch die Auswaage). Es wurde zusätzlich festgestellt, dass die Ausbeuten der Reaktion bis zu einer Reaktionszeit von drei Stunden ansteigen, jedoch bei einer Verlängerung der Reaktionszeit wieder abfallen. Es scheinen hierbei nicht geklärte Nebenreaktionen vorzukommen, die das Produkt im Verlauf einer verlängerten Reaktionszeit zersetzen und somit die Ausbeute verringern. Die in diesen Versuchen ermittelte maximale Ausbeute von 40% ist jedoch im Rahmen der Standardpeptidverknüpfung sehr gering. Aus diesem Grund wurde der Einfluss eines alternativen Aktivators auf die Kupplungsausbeute untersucht.

Als alternativer Aktivator wurde das Azabenzotriazol-Derivat HATU verwendet. Die Aza-Derivate¹⁶⁷ haben sich im Gegensatz zu ihren entsprechenden Benzotriazol-Derivaten¹⁶⁸ als effizienter herausgestellt. Als Ergebnis der HATU-Versuchsreihe ist festzuhalten, dass die Ausbeuten der Kupplung durch die Verwendung von HATU als Aktivator im Verhältnis zur TBTU-Versuchsreihe gestiegen sind. Ebenfalls ist ein gleicher Zusammenhang zwischen Reaktionszeit und Reaktionsausbeute zu erkennen wie bei der TBTU-Reihe. Jedoch ist die maximale Ausbeute mit 77% nach drei Stunden Reaktionszeit zu gering.

Im Anschluss durchgeführte Analysen der *RP*-HPLC-Läufe der einzelnen Reaktionen ergab neben dem Produktpeak ($R_t = 29$ Minuten) ein Nebenprodukt, welches nach 15 Minuten von der C_{18} -Säule eluierte. Eine MALDI-TOF-MS-Analyse dieser Fraktion ergab, dass es sich um den TFA-Ester **65** des entsprechenden Produktes mit der Masse von 551 g/mol handelt (Abbildung 41).

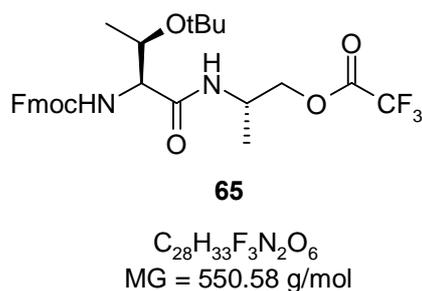


Abbildung 41: Der TFA-Ester **65** des Kupplungsproduktes. Unter den gewählten Bedingungen der Abspaltung des Produktes vom Harz entsteht dieser Ester, der in die Betrachtungen der Ausbeuten der vorangegangenen Kupplungsreaktion mit einbezogen werden kann. Dieser TFA-Ester **65** könnte mittels 5%iger Natriumcarbonat-Lösung hydrolysiert werden, um den freien Alkohol für weitere Synthesen zugänglich zu machen.

Dieser Ester kann bei der Ausbeute der Kupplungsreaktion mit in Betracht gezogen werden, da die Veresterung letztlich nur durch die Abspaltbedingungen generiert wird und auch als Kupplungsprodukt gewertet werden kann. Um nachträglich die TFA-Ester **65** aller

Reaktionsansätze der HATU-Reihe, sowie die der TBTU-Reihe quantitativ in die Kupplungsausbeuten einfließen zu lassen, um die reale Gesamtausbeute zu bestimmen, wurden die Flächen der TFA-Ester-Peaks eines jeden Reaktionsansatzes integriert. Diese Integrale wurden in das Verhältnis zum Integral des TFA-Ester-Peaks bei dem HATU-Referenzexperiment gesetzt, um somit Rückschlüsse auf die jeweiligen Stoffmengen der TFA-Ester eines jeden TBTU- bzw. HATU-Experiments zu schließen. Das Ergebnis der realen Kupplungsausbeuten ist in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Bestimmte Gesamtausbeuten der TBTU- bzw. HATU-Experimente mit In Bezugnahme des bei der Abspaltung entstehenden TFA-Esters **65**. Der bei den vorangegangenen Experimenten beobachtete Trend, dass die maximale Gesamtausbeute bei einer Reaktionszeit von drei Stunden erzielt wurde, ist ebenfalls zu beobachten. Die prozentuale Ausbeute entspricht den allgemeinen Kupplungsausbeuten für Peptidsynthesen. Die um bis zu 30% niedrigere Gesamtausbeute der TBTU-Experimente ist durch die geringere Reaktivität des Aktivators bei der sterisch anspruchsvolleren Kupplung zu erklären.

Aktivator TBTU			
Reaktionszeit [h]	64 [μmol]	65 [μmol]	Gesamtausbeute [%]
1	2.42	4.55	69.7
2	3.31	4.72	80.3
3	3.96	4.91	88.7
6	3.52	4.55	80.7
12	3.08	4.55	76.3
24	2.42	3.64	60.6

Aktivator HATU			
Reaktionszeit [h]	64 [μmol]	65 [μmol]	Gesamtausbeute [%]
1	3.45	6.36	98.1
2	6.17	3.65	98.2
3	7.71	2.23	99.4
6	6.39	3.25	96.4
12	4.41	4.91	93.2
24	4.19	5.19	93.8

Die in der Tabelle 4 gezeigten Gesamtausbeuten der Kupplungsreaktionen verifizieren den vorher beobachteten Trend, dass die Ausbeuten der TBTU-Versuchsreihe wesentlich niedriger sind, als bei der Versuchsreihe mit dem potenteren Aktivator HATU. Ebenfalls sind die maximalen Ausbeuten bei beiden Versuchsreihen bei einer Reaktionszeit von drei Stunden

erzielt worden, wohingegen sich längere Kupplungszeiten negativ auf Gesamtausbeuten auswirkten. Erkennbar ist auch, dass die Ausbeuten der TBTU-Reihe mit bis zu 28% wesentlich stärker variieren, als die der HATU-Reihe, deren Varianz nur knapp 6% beträgt. Die nahezu quantitativen Ausbeuten der HATU-Reihen sind sehr zufriedenstellend, jedoch ist eine Reaktionszeit von bis zu drei Stunden für eine Kupplungsreaktion und die Verwendung des kostenintensiven HATU-Aktivators von Nachteil, so dass eine alternative Möglichkeit der Kupplung in Betracht gezogen wurde.

Die Verwendung einer mikrowellenunterstützten Synthese zur Beschleunigung der Reaktion bot sich als eine Alternative zur konventionellen Festphasenpeptidsynthese an. Hierbei basiert die Beschleunigung der Reaktion auf einer effizienten Erwärmung der Reaktionspartner durch die Absorption von Mikrowellenstrahlung. Durch die Bestrahlung einer Probe mit Mikrowellen richten sich die in der Probe befindlichen Ionen oder Dipole nach dem angelegten elektrischen Feld aus. Ist das angelegte Feld oszillierender Natur, so versuchen sich die Dipole innerhalb der Probe dem alternierenden elektrischen Feld anzupassen. Durch diesen Vorgang kommt es zu einem Verlust an Energie in Form von Wärme durch molekulare Reibung oder dielektrischen Abfall. Ist ein Dipol in der Probe jedoch nicht in der Lage, sich dem angelegten alternierenden Feld anzupassen oder ist zu schnell, so kommt zu keiner Erwärmung der Probe. Der für diese Arbeit zur Verfügung stehende Mikrowellen-Reaktor arbeitet mit einer Frequenz von 2.45 GHz, die sich genau in der Mitte dieser beiden dargestellten Extreme befindet. Molekulare Dipole sind somit zwar in der Lage sich dem alternierenden Feld anzupassen, folgen aber dem Feld nicht präzise, sondern leicht versetzt.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

Im Bereich der Festphasenpeptidsynthese werden Mikrowellenreaktoren bereits erfolgreich verwendet. Dabei können sie die Reaktionszeit der Synthese verringern und die Ausbeute erhöhen.¹⁷²⁻¹⁷⁴

Im Rahmen der Optimierung der Kupplungsreaktion wurden zwei unterschiedliche Ansätze mit Mikrowellenunterstützung durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde TBTU, im zweiten Ansatz HATU als Aktivator verwendet. Die Ansatzgröße wurde wie in den vorangegangenen Versuchsreihen mit 10 μmol an L-Alaninol gewählt (Überschüsse der Aminosäure, Aktivatoren und Base waren ebenfalls gleich). Die einzelnen Ansätze wurden direkt nach dem Zusammengeben der Lösung im Reaktor für zehn Minuten und einer Leistung von 50 Watt bestrahlt. Dabei wurde die Zieltemperatur der Reaktionslösung auf 60 °C eingestellt. Nach

vollendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung abgesogen, das Produkt vom Harz abgespalten und mittels RP-HPLC aufgereinigt. Die Ergebnisse dieser beiden Versuche sind in Abbildung 42 im Verhältnis zu den Gesamtausbeuten der besten TBTU-/HATU-Experimente bei Raumtemperatur dargestellt.

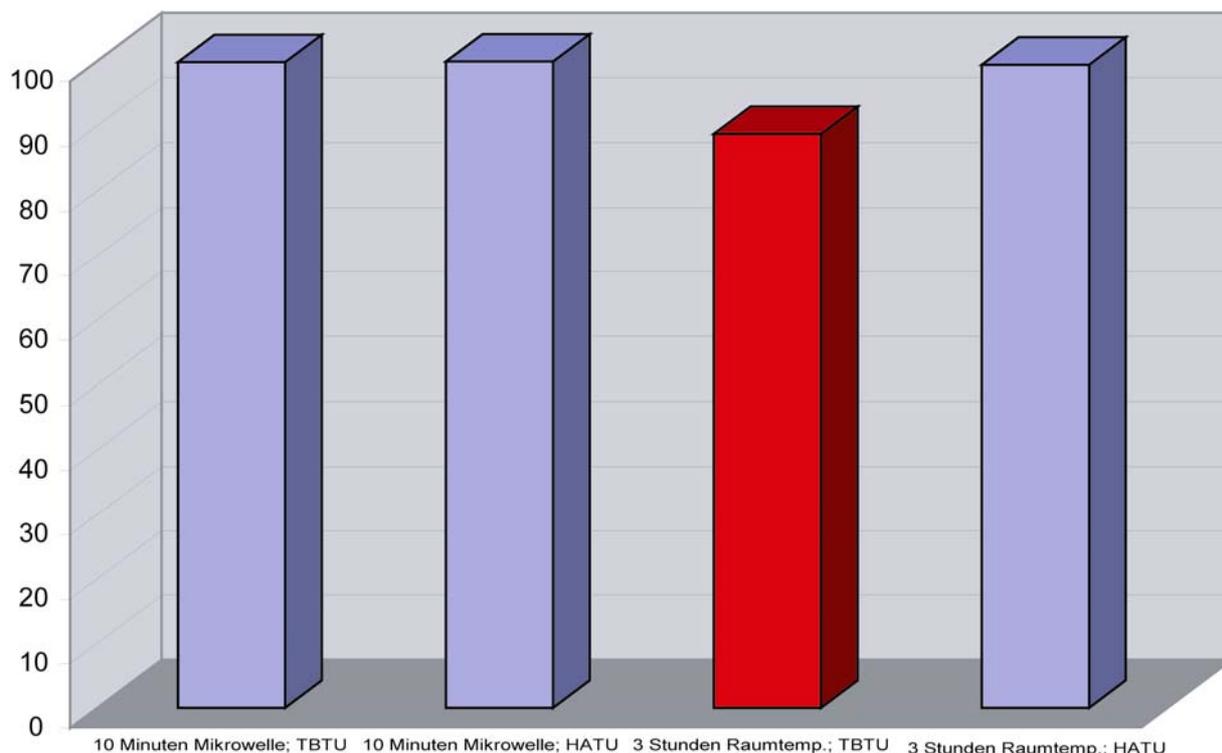


Abbildung 42: Dargestellt sind die maximalen Kupplungsausbeuten einer jeden Versuchsreihe. Die in den Mikrowellenexperimenten (Leistung: 50 Watt; T = 60 °C) ermittelten Gesamtausbeuten sind nach zehn Minuten mit 99.8% bzw. 99.9% als quantitativer Umsatz zu bewerten (Balken 1 und 2). Mit 99.4% nach drei Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur ist das Kupplungsexperiment mit dem HATU-Aktivator ebenfalls nahezu quantitativ (Balken 4). In dem entsprechenden Drei-Stunden-TBTU-Experiment hingegen konnte nur eine Gesamtausbeute von 88.7% ermittelt werden (rot; Balken 3), womit diese Ausbeute für eine sequenzielle Peptidsynthese viel zu gering ist.

Es zeigt sich deutlich, dass der Einsatz von Mikrowellenenergie die Geschwindigkeit der Reaktion beschleunigt. So ist in beiden Experimenten eine nahezu quantitative Umsetzung zum Kupplungsprodukt nach zehn Minuten erreicht. Ähnliche Ausbeuten werden bei dem Experiment mit HATU bei Raumtemperatur nach drei Stunden erreicht, wohingegen die Gesamtausbeute des äquivalenten TBTU-Experiments bei Raumtemperatur mit ~ 89% um 10% niedriger liegt.

Zusammenfassend lässt sich über die Optimierung der Reaktionen an der Festphase sagen, dass die zuvor mittels der Fmoc-Methode ermittelten Ausbeuten der Realität entsprachen. Der ermittelte Wert der ersten Kupplungsreaktion des L-Threonins an das L-Alanin lag jedoch

um bis zu 35% niedriger als bei der real ermittelten Ausbeute, die nach der Reinigung mittels *RP*-HPLC ermittelt wurde. Die Verwendung des potenteren Aza-Derivates HATU als Aktivator in der Kupplungsreaktion führte zu einer Verbesserung der Reaktionsausbeute bei allen durchgeführten Kupplungsexperimenten um über 30% gegenüber den durchgeführten TBTU-Experimenten. Ebenfalls ließ sich feststellen, dass sich eine verlängerte Reaktionszeit über drei Stunden hinaus negativ auf die Gesamtausbeute der Kupplungsreaktion auswirkten und somit zu vermeiden ist. Die Reaktionszeit konnte einhergehend mit einer Verbesserung zu nahezu quantitativen Ausbeuten durch die Verwendung von Mikrowellenenergie auf zehn Minuten verkürzt werden. In den Mikrowellen-Experimenten stellte sich heraus, dass die Ausbeuten der Kupplungen nicht von der Wahl der Aktivatoren TBTU bzw. HATU abhängen und somit dem kostengünstigeren TBTU der Vorzug gegenüber dem HATU gegeben werden sollte.

4.1.7 Analyse und Optimierung der Carbamat-Synthese

Eine Analyse der in Abschnitt 4.1.6 beschriebenen Syntheseschritte zur Darstellung der Liganden **16** und **17** offenbarte, dass die Carbamat-Bildungsreaktion im Anschluss der Abspaltung der geschützten Peptidomimetika **62** bzw. **63** nicht quantitativ verlief. Dies konnte anhand einer MADLI-TOF-MS-Analyse gezeigt werden. Da das Ergebnis diese Analyse nicht quantitativ ist, bedurfte es eines alternativen Systems zur quantitativen Erfassung der Ausbeuten der Umsetzung eines Alkohols mit den entsprechenden *Isocyanaten*. Als Modellsystem wurde die Reaktion zwischen Fmoc-L-Alaninol **67** und Cyclohexylisocyanat **68** gewählt. Für die Synthese des Fmoc-L-Alaninol **67** wurde auf Arbeiten von Boeijen *et al.* zurückgegriffen, die die entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäuren mittels Reduktion eines gemischten Acylcarbonats durch Natriumborhydrid dargestellt haben.¹⁷⁵ Hierbei handelt es sich um eine Variante der von Martinez *et al.* entwickelten Synthese.¹⁷⁶ Diese Variante basiert auf der Umsetzung einer Amino-geschützten Säure mit *Isobutylchloroformiat* zum Acylcarbonat in 1,2-Dimethoxyethan. Die bei der Reaktion entstehende Salzsäure wird durch die Base *N*-Methylmorpholin neutralisiert. Bei der darauffolgenden Zugabe von wässrigem Natriumborhydrid wird dieses gemischte Acylcarbonat chemoselektiv zum entsprechenden Alkohol reduziert. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl die Verwendung von Ethylchloroformiat in methanolischer Lösung zu Nebenprodukten bei der Reduktion geführt hatte.¹⁷⁷ Die Verwendung von weiteren Reduktionsmitteln, wie LAH, BH₃*THF oder DIBALH führten entweder zur Entschützung der Aminogruppe oder zu einer Racemisierung des Produktes.¹⁷⁸

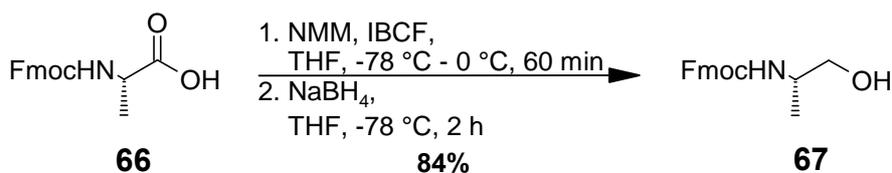


Abbildung 43: Durchgeführte Reduktion der Fmoc-geschützten Aminosäure **66** zum entsprechenden Alkohol **67** über ein intermediär gebildetes Acylcarbonat und anschließender chemoselektiver Reduktion zum Alkohol nach Boeijen *et al.*¹⁷⁵

Das bei der Hydrolyse der Reaktionslösung ausfallende Produkt wurde abfiltriert und nach Trocknung mit einer Ausbeute von 84% erhalten.

Die anschließende Untersuchung zur Darstellung des N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[adamantylaminocarbonyl]-L-alaninol **69** wurde zunächst unter den Bedingungen durchgeführt, die bei denen der Synthese der Liganden **16** und **17** entsprachen. Hierfür wurden die einzelnen Komponenten äquimolar nach Duggan *et al.* in DMF bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt.¹⁷⁹

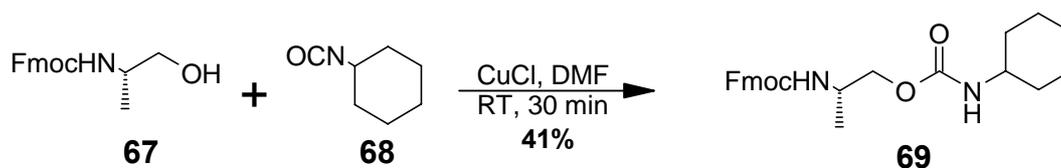


Abbildung 44: Für die Untersuchung der Carbamat-Bildungsreaktion gewähltes Modellsystem. Die Reaktion basiert auf einer Vorschrift von Duggan *et al.* und verwendet Kupfer(I)chlorid als Lewis-Säure zur Aktivierung der Isocyanat-Gruppe. Mit einer Ausbeute von 41% ist die Reaktion noch zu optimieren.

Nach 30 Minuten wurde mittels Analyse durch Dünnschichtchromatographie kein weiterer Umsatz zum Produkt beobachtet. Die Reaktionslösung, welche eine hellgrüne Farbe angenommen hatte, wurde mit 5%iger NH_4HCO_3 -Lösung versetzt und die wässrige Phase mehrfach mit Diethylether extrahiert. Die Ausbeute des gereinigten Produktes wurde mit 41% bestimmt. Diese geringe Ausbeute lässt sich teils dadurch erklären, dass Alkyl-Isocyanate im Verhältnis zu Aryl-Isocyanaten weniger reaktiv sind.¹⁸⁰ Eine weitere Möglichkeit der Erklärung könnte in den verwendeten Reagenzien begründet sein. Isocyanate sind leicht hydrolysierbar und könnten bei einer Lagerung durch einkondensiertes Wasser zersetzt worden sein. Diese Vermutung konnte jedoch durch eine IR-spektroskopischen Analyse der verwendeten Isocyanat-Chargen nicht bestätigt werden. In allen Fällen konnte die starke -N=C=O -Valenzschwingung, aber keine O-H -Valenzschwingung identifiziert werden.

In alternativen Syntheseverarianten wurde sowohl der Alkohol **67** in einem Überschuss von drei Äquivalenten gegenüber dem Isocyanat **68** eingesetzt, sowie ein weiteres Äquivalent Kupfer(I)chlorid zugefügt. Dies führte allerdings zu keiner Verbesserung der Ausbeute des

Produktes **69**. Die Verwendung von Mikrowellenenergie in Kombination mit einer erhöhten Reaktionstemperatur ging ebenfalls nicht mit einer signifikanten Verbesserung der Reaktionsausbeute einher. Die Varianten der Synthese des Produktes **69** sind in Tabelle 5 abgebildet.

Tabelle 5: Varianten zur Optimierung der Synthese von **69**. Es zeigt sich deutlich, dass die Ausbeute der Reaktion weder durch die Zugabe weiterer Äquivalente des Alkohols noch durch Zugabe von Kupfer(I)chlorid gesteigert werden konnte. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur in Kombination mit Mikrowellenenergie führte ebenfalls zu keiner signifikanten Erhöhung der Ausbeuten (Reaktionen sind mit * gekennzeichnet).

Äquivalent 67	Äquivalent 68	Äquivalent CuCl	Temp. [°C]	Ausbeute [%]
1	1	1	r.t.	41
3	1	1	r.t.	38
1	1	2	r.t.	40
1	1	1	50*	44
1	1	1	80*	47

Da die Ausbeuten des Produktes **69** bei diesen Varianten nicht wesentlich zu steigern waren, wurde eine alternative Aktivierung des *Isocyanats* **68** bzw. des Alkohols **67** in Betracht gezogen. Da die Synthese der Liganden diesen Schritt unter Berücksichtigung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen (**62** bzw. **63**; Abbildung 38) vorsah, wurde davon Abstand genommen, die Reaktion durch Brønstedt-Säuren zu katalysieren. Die Überführung des Alkohols in das entsprechende Alkoholat erschien ebenfalls inakzeptabel, da die Peptidbindung unter diesen Bedingungen hydrolysiert werden könnte. Eine schwach basische Aktivierung mit 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) hingegen erschien geeignet.^{181;182}

Tabelle 6: Varianten zur Optimierung der Darstellung der Carbamatfunktion mit DMAP. Es konnte in keiner der durchgeführten Varianten das Produkt **69** isoliert werden. Das DMAP spaltet in allen Reaktionen als Base die Fmoc-Schutzgruppe ab. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur in Kombination mit Mikrowellenenergie führte ebenfalls zu keiner signifikanten Erhöhung der Ausbeuten (Reaktionen sind mit * gekennzeichnet).

Äquivalent 67	Äquivalent 68	DMAP	Temp. [°C]	Lösungsmittel	Ausbeute [%]
1	1	1	r.t.	DCM	---
1	1	0.1	r.t.	DCM	---
1	1	1	100	DMF	---
1	1	1	50*	DMF	---
1	1	0.1	50*	DMF	---

Keine der in Tabelle 6 dargestellten Varianten führte zum gewünschten Produkt **69**. In den Varianten 1, 3 und 4, in denen DMAP äquimolar eingesetzt wurde, wurde anstatt des Produktes **69** die Fmoc-Schutzgruppe quantitativ abgespalten. Wohingegen die Varianten 2 und 5, in denen DMAP in 0.1 Äquivalenten eingesetzt wurde, keine Umsetzung der Edukte **67** und **68** festzustellen war. Eine Variation in der Hinsicht, dass die Schutzgruppe der Aminofunktion vom basenlabilen Fmoc zum säurelabilen und damit unter diesen Bedingungen stabilen Boc, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

4.1.8 Konvergente Synthese der entwickelten Peptidomimetika

Da die Ausbeuten der Carbamat-Bildungsreaktion im Rahmen der durchgeführten Variationen nicht verbessert werden konnte und somit als derjenige Syntheseschritt in der Synthese der Liganden **16-23** mit den größten Ausbeuteverlusten angesehen werden konnte, bedurfte es einer komplett neuen Synthesestrategie zur Darstellung der Liganden **16-23**, um ein Erhöhung der Gesamtausbeute zu erzielen.

Diese neue Strategie sah vor, dass anstelle der Festphasensynthese der Mimetika **62** und **63** und anschließender Carbamat-Bildungsreaktion, die Darstellung des Carbamates nicht zum Schluss der Synthese der Liganden durchzuführen, sondern in einem konvergenten Syntheseansatz die Carbamate **69-72** zu synthetisieren, die Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen und die freien Amine **73-76** an die Mimetika **77-78** in einer Peptidkupplungsreaktion zu verbinden. Anschließend sollten die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten und die Mimetika **16-23** mittels RP-HPLC gereinigt werden. Hierfür sollten die Mimetika **77** und **78** von einem an einem 2-Chlorotriethylharz gebundenen Fmoc-L-Thr(^tBu)-OH (**79**) synthetisiert werden.

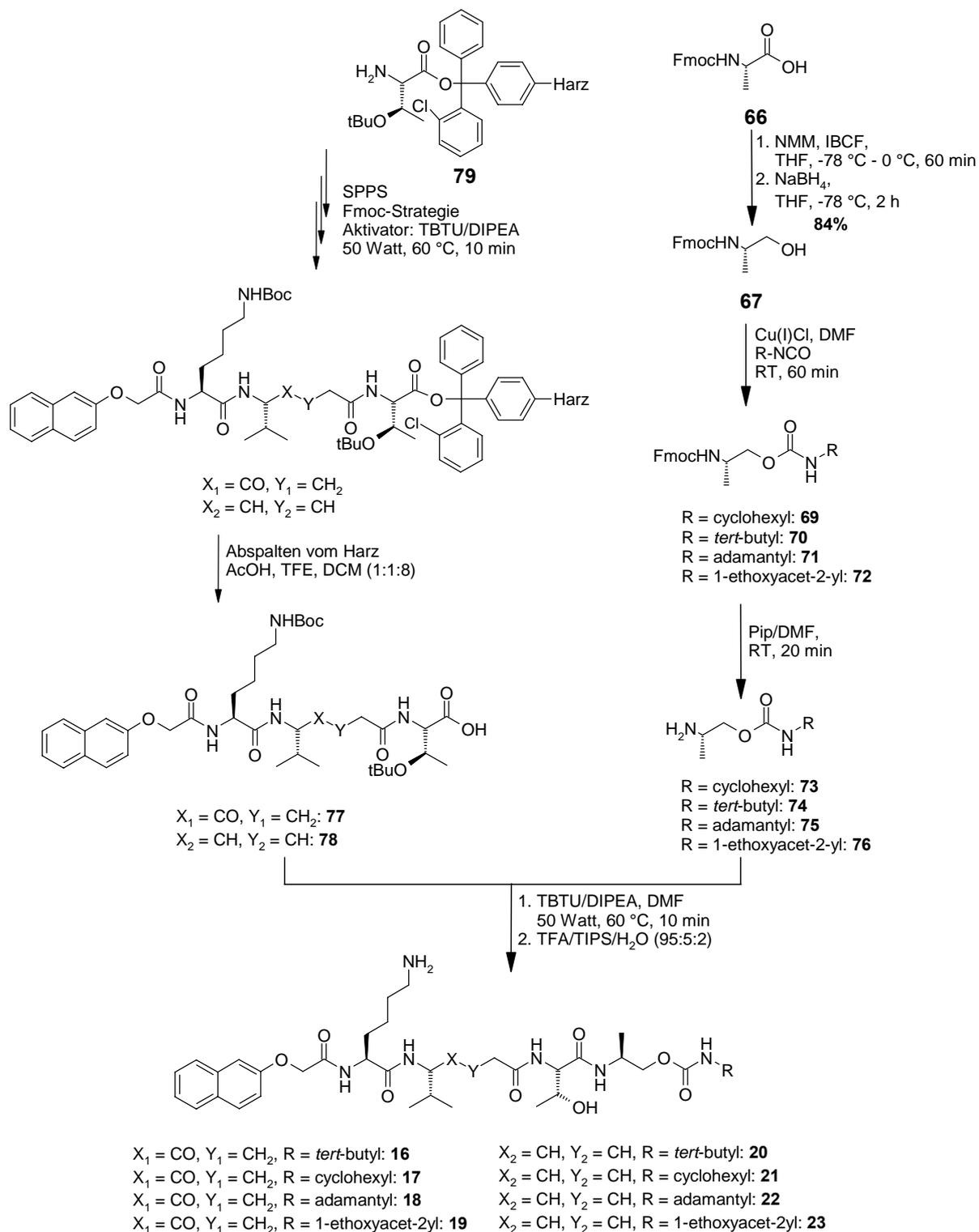


Abbildung 45: Neuer konvergenter Syntheseansatz zur Darstellung der Liganden **16-23**. Die Synthese sieht eine Carbamat-Synthese (rechter Syntheseweig) und eine Festphasensynthese (linker Syntheseweig) vor. Dadurch sind die Reaktionen mit geringen Ausbeuten von denen, die hervorragende Ausbeuten erzielen, getrennt.

Zunächst wurde die Synthese der vier Amino-Carbamatbausteine **73-76** durchgeführt. Hierbei wurde zunächst nach Boeijen *et al.* zum entsprechenden Alkohol **67** reduziert.¹⁷⁵ Dabei wurden die Syntheseäquivalente der Reagenzien und Reaktanden äquimolar gewählt.

Die Reaktionen wurden jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und das Rohprodukt der jeweiligen Reaktionsansätze nach destillativem Entfernen des DMFs in DCM aufgenommen. Durch anschließendes Waschen der organischen Phase mit 5%iger NH_4HCO_3 Lösung wurden die Kupferrückstände erfolgreich entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt. Hierbei konnten neben dem Kupplungsprodukt auch der nicht umgesetzte Alkohol **67** reisoliert werden, wodurch die Synthese in ihrer Molekülökonomie verbessert wurde. Die Ausbeute der einzelnen Fmoc-geschützten Carbamate **69-72** ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7: Synthesen zur Darstellung der Fmoc-geschützten Carbamate **69-72**. Bei der Reinigung der Rohprodukte konnte das nicht umgesetzte Edukt **67** bis zu 0.2 Äquivalente isoliert werden und stand so für erneute Synthesen zur Verfügung.

Fmoc-Carbamat	Ausbeute [%]	Alkohol 67 [Äq]	Ausbeute basierend auf zurück gewonnenen 67 [%]
69	41	0.21	51
70	51	0.20	64
71	68	0.19	83
72	56	0.13	65

Die anschließende Entschützung der Aminofunktion wurde unter den Standardbedingungen mit Piperidin/DMF (v/v 1:4) bei Raumtemperatur über 20 Minuten durchgeführt. Das DMF wurde darauffolgend im Vakuum destillativ entfernt und die freien Amine **73-76** säulenchromatographisch gereinigt. Die Ausbeuten der isolierten Amine waren mit 91-96% sehr gut.

Die Synthese der geschützten Peptidomimetika **77** und **78** wurde nach der optimierten Methode aus Abschnitt 4.1.6 mit TBTU als Aktivator und unter Verwendung von Mikrowellenenergie durchgeführt. Hierfür wurde nach jedem Kupplungsschritt das Harz aus dem Reaktorgefäß in eine Glasfritte überführt und dort anschließend ein Capping-Schritt mit Ac_2O /DMF durchgeführt. Darauffolgend wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und das Harz anschließend wieder in das Reaktorgefäß überführt, um dort die nächste Kupplungsreaktion durchzuführen. Die Kupplung der ersten beiden Aminosäuren (Dipeptidmimetischer Baustein bzw. L-Lysin) verlief unter den gewählten Standardbedingungen problemlos. Hierbei wurde der Aktivator TBTU 1.0 M in DMF gelöst und mit der entsprechenden Menge an DIPEA versetzt. Diese Lösung wurde zu einer 0.5 M-Lösung der Aminosäure in DMF zugetropft und anschließend auf das Harz gegeben. Im Falle der 2-Naphthyloxyessigsäure hingegen bildete sich während der Reaktionszeit im

Mikrowellenreaktor ein farbloser Feststoff, der durch Waschen des Harzes mit großen Mengen DMF wieder entfernt werden konnte. Um die Ausbildung des Feststoffes zu verhindern, wurde die 2-NOA in größeren Volumina DMF gelöst, als die anderen Aminosäuren. Die Konzentration der 2-NOA-Lösung wurde auf 0.25 M verringert, die Aktivatorkonzentration jedoch konstant gehalten. Mit dieser Modifikation kam es zu keiner Feststoffbildung während der Kupplungsreaktion. Nach der letzten Kupplungsreaktion wurde das Harz erneut in eine Fritte überführt und mehrfach mit DCM und *i*-PrOH gewaschen. Um im nächsten Schritt das geschützte Mimetikum vom Harz abzuspalten wurde eine Mischung aus AcOH/TFE/DCM (*v/v* 1:1:8) verwendet.¹⁸³ Nach der Reaktionszeit von 15 Minuten wurde die Abspaltung mit dem 15fachen Volumen an Hexan verdünnt. Das Hexan ist von Nöten, um die in der Abspaltung enthaltene Essigsäure während des Einengens der Lösung nicht aufzukonzentrieren sondern azeotrop zu entfernen. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels *RP*-HPLC gereinigt.

Zunächst wurde ein 100 μ mol-Ansatz des Rohproduktes des Mimetikums **77** aufgereinigt. Das Produkt eluierte nach einer Retentionszeit von 19.98 Minuten von der C₁₈-Säule und ergab nach anschließender Trocknung 26 mg, welches einer Ausbeute von 35% entspricht. Durch eine Analyse des HPLC-Laufes konnten jedoch zwei weitere Fraktionen identifiziert werden. In der Fraktionen, die nach 12.10 bzw. 13.76 Minuten eluierten konnten die Mimetika **79** bzw. **80** identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um Mimetika, bei denen entweder die Boc-Schutzgruppe des L-Lysins oder die *t*-Butyl-Schutzgruppe des L-Threonins abgespalten worden ist.

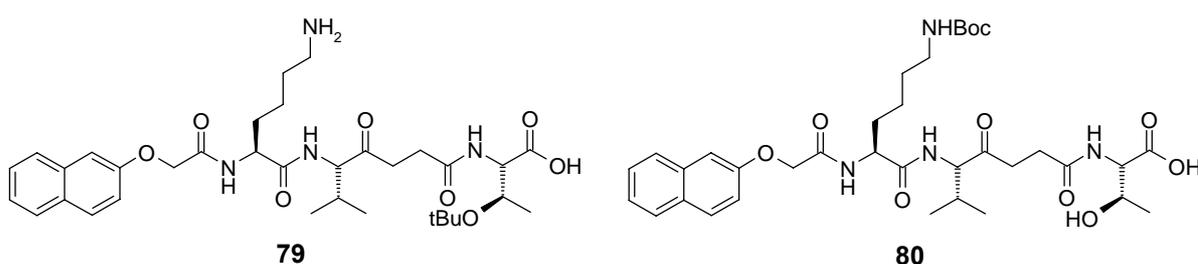


Abbildung 46: Semigeschützte Mimetika, die während der Abspaltung des Mimetikums **77** vom Harz durch das Aufkonzentrieren der in der Abspaltung enthaltenen AcOH entstanden. Sowohl **79** als auch **80** konnten in dem nach dem Abspalten durchgeführten Reinigungsschritt mittels *RP*-HPLC isoliert werden. Insbesondere **79** ist durch die freie Aminofunktion in der Seitenkette des L-Lysins als Edukt für die Kupplungsreaktion mit den Amino-Carbamaten **73-76** ungeeignet, da es zu Nebenreaktionen mit der aktivierten Carboxylfunktion kommen kann.

Die nicht vollständige azeotrope Destillation der Essigsäure mittels Hexan wird für die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen verantwortlich sein. Diese semigeschützten Mimetika lassen sich bei weiteren Umsetzungen unter den Bedingungen einer

TBTU-aktivierten Peptidkupplung nicht mehr chemoselektiv koppeln. Die Verknüpfung der Bausteine **79** bzw. **80** mit den Amino-Carbamaten **73-76** sieht im ersten Schritt die Aktivierung der Carboxylfunktion der semigeschützten Mimetika vor. Würde dies nun durchgeführt werden, so wäre die aktivierte Carboxylfunktion in der Lage mit der freien Aminogruppe des L-Lysins unter Bildung einer Art Dimers zu reagieren. Die Nukleophilie der frei vorliegenden Hydroxylgruppe würde höchst wahrscheinlich unter diesen Bedingungen nicht ausreichen, um an dieser Position eine Veresterung einzugehen.

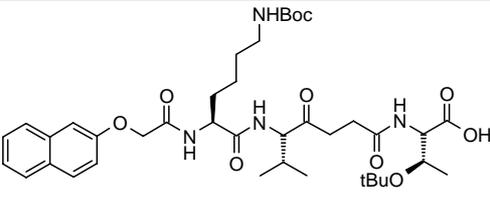
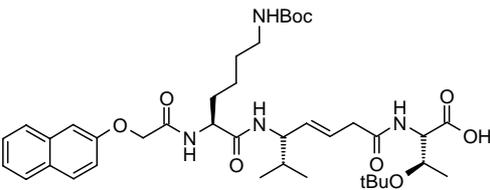
Eine nachträgliche Schützung der Aminogruppe des L-Lysins mittels Boc_2O würde auch das semigeschützte Mimetikum **79** für eine weitere Synthese zu den gewünschten Mimetika **16-19** zugänglich machen. Das Schützen der Aminofunktion nach einer Methode von Saioh *et al.* mit Boc_2O mit Et_3N als Base führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt **77**, so dass alternative Abspaltbedingungen des Mimetikums vom Harz erforderlich sind, um eine höhere Ausbeute zu erzielen.

Eine alternative Abspaltmethode von geschützten Peptiden von 2-Chlortritylharzen wurde von Bollhagen *et al.* publiziert.¹⁸⁴ In dieser Variante wird 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisoopropanol (HFIP) in trockenem DCM (*v/v* 3:7) als Abspatlösung verwendet. HFIP besitzt einen pKs-Wert von 9.3 und ist somit schwach sauer. Dies reicht aus, um das Peptid innerhalb von drei Minuten unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abzuspalten. Die Ausbildung eines HFIP-Esters durch die Reaktion des C-Terminus mit dem HFIP ist nicht zu beobachten, da die Elektrophilie des Carboxylkohlenstoffs des C-Terminus geringer ist als die des Carboxylkohlenstoffs der Triflouressigsäure, mit der bei der Abspaltung des Mimetikums **62** bzw. **63** vom Harz eine Veresterung stattfindet.

In einem erneuten 100 μmol -Ansatz zur Synthese des Mimetikums **77** wurde die alternative Abspaltmethode verwendet nach Bollhagen *et al.* verwendet. Die Kupplungs-, Capping- bzw. Abspaltbedingungen wurden nicht verändert. Im Anschluss an das Waschen des Harzes nach der letzten Kupplungsreaktion wurde das Mimetikum **77** mit HFIP/DCM (*v/v* 3:7) über fünf Minuten vom Harz abgespalten. Das Harz verfärbte sich nach der Zugabe der Abspatlösung augenblicklich tiefviolett, was durch die Ausbildung des bei der Abspaltung entstehenden Trityl-Kations zu erklären ist. Nachdem das Harz im Anschluss mehrfach mit DCM gewaschen wurde, wurde das Lösungsmittel der Abspatlösung destillativ entfernt. Hierbei wird das niedrig siedende HFIP (Sdp.: 59 °C) mit dem DCM gleichzeitig entfernt, so dass es zu keiner Aufkonzentrierung des HFIPs und somit zu einer etwaigen Abspaltung des Seitenkettenschutzgruppen kommt. Die darauffolgende Reinigung des Rohprodukts erfolgte

mittels *RP*-HPLC, wobei die Peaks der semientschützten Mimetika **79** und **80** im Chromatogramm nicht vorhanden waren. Es konnten insgesamt 66 mg des Mimetikums **77** isoliert werden. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 89%. Die Ausbeute konnte somit durch die neuartige Abspaltmethode erfolgreich verbessert werden. Die Synthese für das Mimetikum **78** wurde analog durchgeführt, wobei nach der Aufreinigung 62 mg des Produktes isoliert werden konnten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 85%.

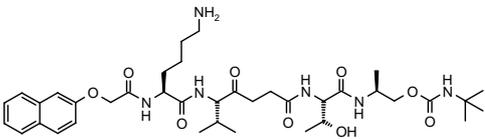
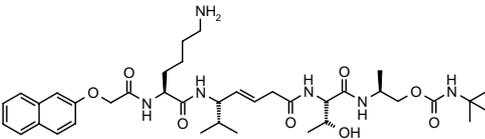
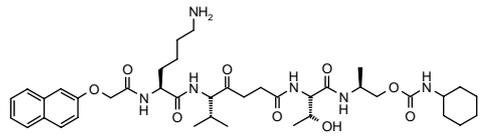
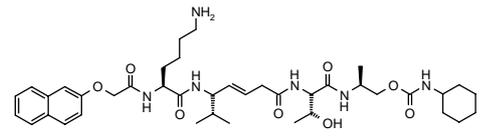
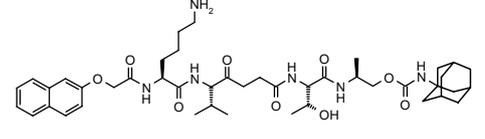
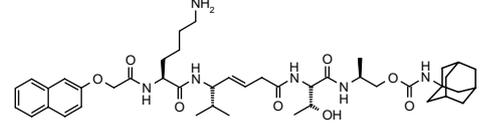
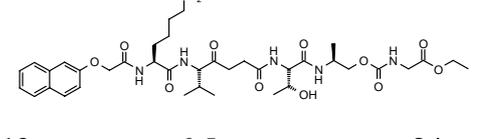
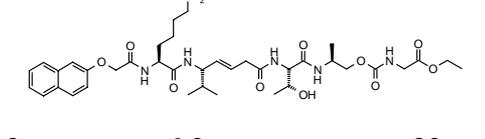
Tabelle 8: Ausbeuten der Mimetika **77** und **78** nach der Abspaltung vom 2-Chlortritylharz mit HFIP/DCM (3:7) und anschließender Aufreinigung mittels *RP*-HPLC.

Nr.	Mimetikum	Ausbeute
77		89%
78		85%

Die Synthesen zur Darstellung der Amino-Carbamate **69-72** und der Mimetika **77** bzw. **78** ermöglichen im folgenden Schritt die konvergente Synthese der Bausteine zu den zunächst geschützten Liganden **16-23**, die als Rohprodukt mittels TFA/TIPS/H₂O (*v/v* 95:5:2) entschützt und anschließend durch *RP*-HPLC gereinigt werden. Zu diesem Zwecke werden die Mimetika **77** bzw. **78** in einem 1.2fachen Überschuss gegenüber den jeweiligen Amino-Carbamaten **69-72** eingesetzt. Der Aktivator TBTU bzw. die Base DIPEA wurden in einem zweifachen Überschuss verwendet.

Jeder Reaktionsansatz wurde für zehn Minuten im Mikrowellenreaktor bei einer Leistung von 50 Watt und einer Temperatur von 60 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend destillativ entfernt und das Rohprodukt in TFA/TIPS/H₂O aufgenommen und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachdem die Abspatlösung destillativ entfernt wurde, wurde das Rohprodukt der jeweiligen Liganden mehrfach mit Toluol kdestilliert und anschließend in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet. Das auf diesem Wege präparierte Rohprodukt wurde abschließend mittels *RP*-HPLC gereinigt. Die jeweilig isolierten Mengen der Liganden und die entsprechende Ausbeute eines jeden Ansatzes sind in der Tabelle 9 zusammengefasst. Es gelang eine erhebliche Steigerung der gesamten Ausbeute der Liganden.

Tabelle 9: Durchgeführte, mikrowellenunterstützte Synthesen der Liganden **16-23**. Es wurden jeweils 10 μmol Ansätze durchgeführt. Die Ausbeuten der Liganden sind gut, bis sehr gut.

Nr.	Auswaage [mg]	Ausbeute [%]	Nr.	Auswaage [mg]	Ausbeute [%]		
	16	6.8	92		20	6.3	86
	17	7.0	91		21	6.2	82
	18	6.2	76		22	6.7	84
	19	6.5	84		23	6.2	82

Die Ausbeuten der Liganden in allen Kupplungsreaktionen waren gut, bis sehr gut. Es gelang somit eine erhebliche Steigerung der gesamten Ausbeute der Liganden.

4.1.9 SPR-Untersuchungen der neu entwickelten Peptidomimetika

Die Liganden **16-23** wurden anschließend an einem BIAcore T100-Gerät auf ihre Bindungsaffinität gegenüber dem CD4-Protein hin untersucht. Zunächst musste das CD4-Protein, welches in einem L-Histidin enthaltenen Puffer bezogen wurde, in HBS-EP-Puffer, pH = 7.4, umgepuffert werden. Das enthaltene L-Histidin kann bei der Belegung des Chips Komplikationen hervorrufen, da es durch seine freie Aminofunktion ebenfalls in der Lage ist auf der zuvor aktivierten Chipoberfläche zu binden und somit die Immobilisierung des Proteins verhindert. Im Anschluss an diese Prozedur konnte ein CM5-Chip mit CD4-Protein mit insgesamt 9640 RU belegt werden. Dies entspricht einer Belegung von 230 fmol Protein auf der Chipoberfläche. Zur Kontrolle der Aktivität des auf der Oberfläche immobilisierten Proteins wurde eine 250 nM Lösung aus GP120 über den Chip geleitet (Flussrate: 15 $\mu\text{L}/\text{min}$; Kontaktzeit: 600 Sekunden) und die erhaltene Kurve

ausgewertet. Daraus ergab sich eine Aktivität von 8% des an der Oberfläche immobilisierten CD4-Proteins von 19 fmol. Die Liganden wurden jeweils in HBS-EP-Puffer, pH = 7.4, gelöst und in Konzentrationen von jeweils 2 bis 1000 μM mit einer Kontaktzeit von 120 Sekunden bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ über den Chip geleitet. Vor jeder Messreihe wurde eine Pufferinjektion vorgenommen und die erhaltenen RU-Antworten der Pufferkurve von den jeweiligen Ligand-Konzentrationskurven abgezogen, um spezifisch die RU-Antworten des jeweiligen Liganden mit CD4-Protein zu erhalten. Ein typischer Konzentrationsreihen-Messverlauf ist in Abbildung 47 am Beispiel des Liganden **16** dargestellt.

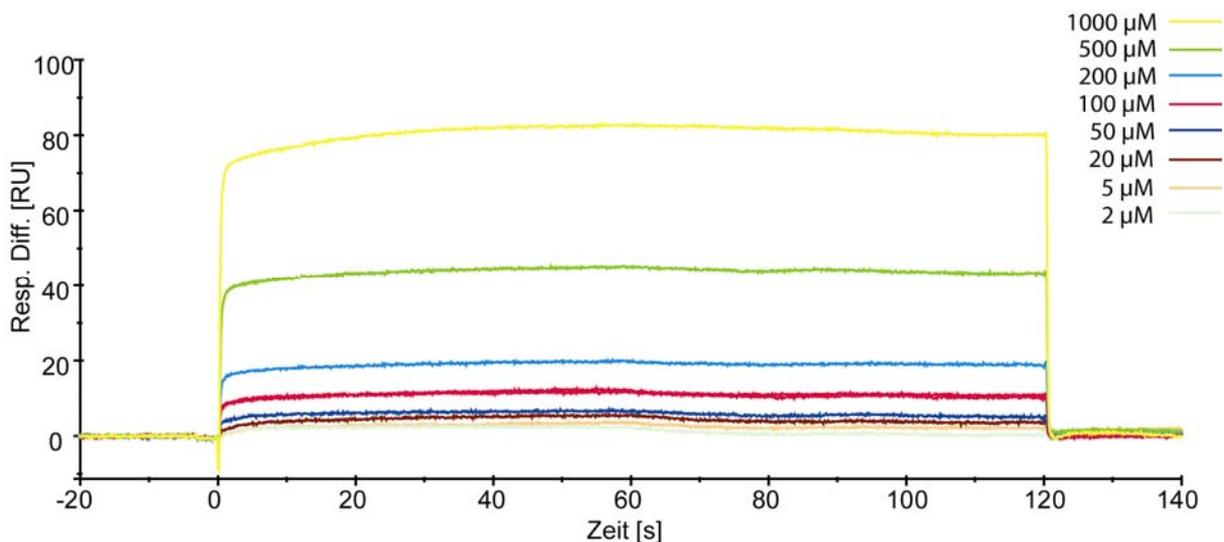


Abbildung 47: Sensorgramme der Vermessung des Liganden **16** gegenüber dem immobilisierten CD4-Protein. Zu erkennen ist die schnelle *on-* und *off-rate*. Zusätzlich zu erkennen ist, dass es zu Schwankungen in den RU_{max} -Werten kommt.

Sehr gut zu erkennen ist eine schnelle Einstellung des Gleichgewichtszustandes (*steady state*) etwa 55-60 Sekunden nach Beginn der Injektion. Nach Ende der Injektion regeneriert das System in sehr viel kürzerer Zeit. Die Vermessungen der Liganden **16-23** zeigten jedoch eine Schwankung, so dass eine genaue Bestimmung der Gleichgewichtswerte erschwert wurde. Aus diesem Grund wurden die SPR-Antworten 60 Sekunden nach Injektionsbeginn bestimmt. Aus der Auftragung der jeweiligen RU_{max} -Werte gegen die entsprechende Konzentration der Liganden kann der K_D -Wert der jeweiligen Interaktion des jeweiligen Liganden mit dem CD4-Protein nach dem *one-site-binding*-Modell berechnet werden.

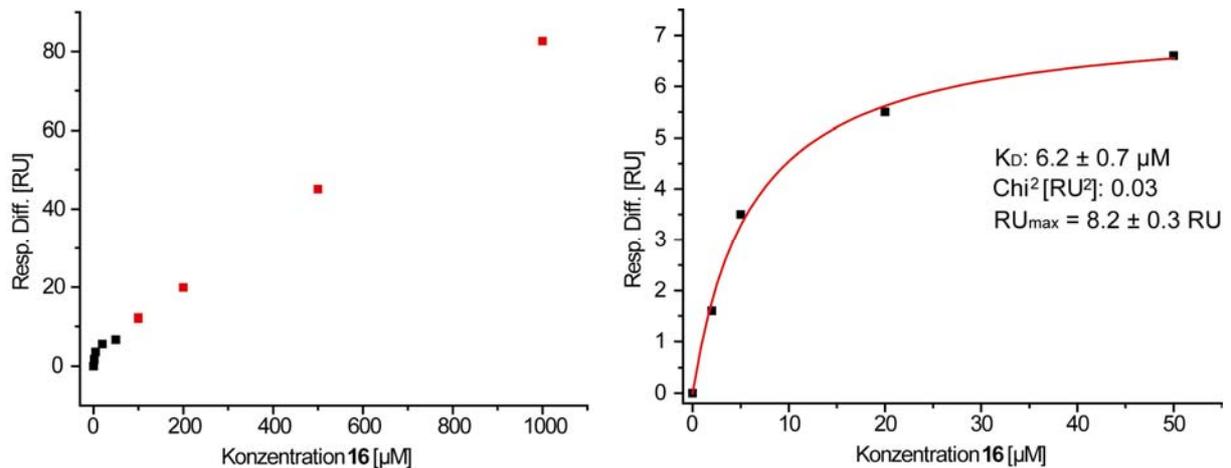
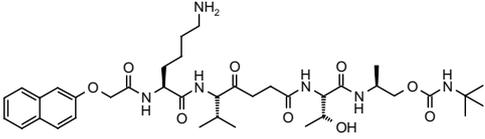
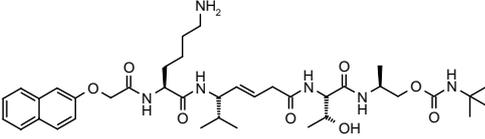
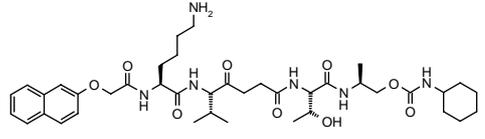
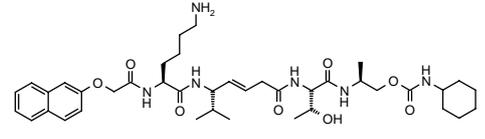
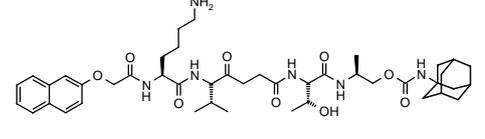
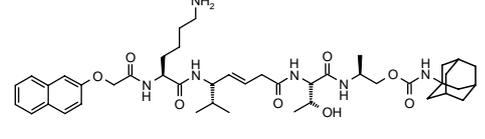
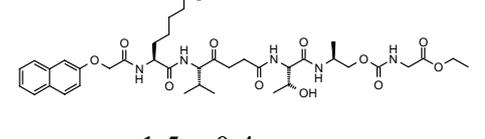
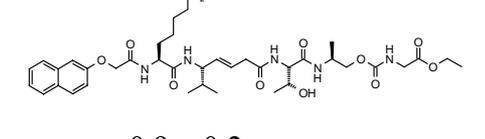


Abbildung 48: SPR-Affinitätsanalyse des Liganden **16** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. **Links:** Auftragung der RU-Antworten aller Messpunkte; rot dargestellt sind diejenigen RU-Antworten, die nicht nach dem *one-site-binding*-Modell angefitet werden können. **Rechts:** Messpunkte, die nach dem *one-site-binding*-Modell angefitet werden konnten.

Aus der Abbildung 48 ist exemplarisch für Ligand **16** deutlich zu erkennen, dass die SPR-Antworten ab einer Konzentration von 100 μM einen linearen Verlauf annehmen. Dies kann auf unspezifische Wechselwirkungen des Liganden mit der Chipoberfläche bzw. Protein zurückzuführen sein. Daher wurden sie in der Berechnung des K_D -Wertes nicht mit einbezogen. Diese Vermutung lässt sich zusätzlich dadurch bekräftigen, dass die erhaltenen RU-Antworten ab der Konzentration von 100 μM über dem errechneten RU_{max} -Wert dieses Liganden (15 RU) liegen und somit mit dem *one-site-binding*-Modell nicht in Einklang zu bringen sind.

Eine kinetische Analyse der Messkurven konnte mittels der Evaluationssoftware der Firma BIAcore nicht erfolgreich durchgeführt werden. Dies liegt darin begründet, dass sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation der Liganden so schnell erfolgten, dass der mathematische Fit der Kurven nicht mit der im Programm implementierten Funktion möglich war. Die Beobachtungen der ausgeprägt schnellen Assoziation bzw. Dissoziation konnte bereits bei den von Neffe synthetisierten Liganden gemacht werden.¹²² Qualitativ lässt sich jedoch sagen, dass die Kinetik der Bindung der synthetisierten Liganden **16-23** sehr schnell ist, sich aber nicht quantitativ bestimmen ließ. Diese schnelle Kinetik könnte sich dadurch erklären lassen, dass die Konformation der Liganden in Lösung schon der Konformation im gebundenen Zustand entspricht bzw. sehr ähnlich ist, so dass eine schnelle Assoziation bzw. Dissoziation des jeweiligen Liganden möglich ist.

Tabelle 10: Mittels SPR untersuchte Liganden **16-23**. Alle Liganden zeigen eine höhere Bindungsaffinität zum CD4-Protein, als die nicht *backbone* modifizierten Analoga von Neffe.¹²¹ Ein Trend bezüglich der verwendeten Carbamatreste und der ermittelten K_D -Werte lässt sich nicht eindeutig nachweisen, jedoch binden die Ethoxy-1-yl-Carbamate (**19** und **23**) mit K_D 8.2 bzw. 7.1 μM am geringsten.

Nr.	RU_{max} (RU_{max} theor.)	K_D [μM]	Nr.	RU_{max} (RU_{max} theor.)	K_D [μM]
16	 8.2 ± 0.3 (14.1)	6.2 ± 0.7	20	 0.92 ± 0.01 (13.8)	1.5 ± 0.1
17	 2.2 ± 0.2 (14.6)	3.6 ± 0.9	21	 0.81 ± 0.02 (14.3)	3.6 ± 0.3
18	 3.1 ± 0.3 (15.6)	2.2 ± 0.5	22	 1.1 ± 0.2 (15.3)	2.7 ± 0.7
19	 1.5 ± 0.4 (14.7)	8.2 ± 1.0	23	 0.9 ± 0.2 (14.4)	7.1 ± 0.8

Wie aus der Tabelle 10 zu entnehmen ist, sind die thermodynamischen Bindungskonstanten der Liganden **16-23** allesamt in einem gleichen Größenordnungsbereich. Hierbei konnte mit $1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ die niedrigste thermodynamische Bindungskonstante beim Liganden **20** und die höchste thermodynamische Bindungskonstante beim Liganden **19** mit $8.2 \pm 1.0 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Es lässt sich jedoch keine exakte Aussage darüber treffen, inwiefern sich die Substitution im *backbone*-Bereich der Liganden, entweder durch die Verwendung des $\text{H}_2\text{N-Val-}\Psi[\text{COCH}_2]\text{-Gly-OH}$ (Liganden **16-19**) oder durch $\text{H}_2\text{N-Val-}\Psi[\text{CHCH}]\text{-Gly-OH}$ (Liganden **20-23**), sich positiv oder negativ auf die thermodynamischen Bindungskonstanten auswirkt. Die thermodynamischen Bindungskonstanten der Liganden **19** und **23** sind in

beiden Substitutionsfällen am höchsten. Dies könnte dadurch begründet sein, dass durch die Verwendung des 1-Ethoxyacet-2-yl-Restes die Liganden **19** und **23** nicht mehr in der Lage sind eine stärkere hydrophobe Wechselwirkung zum Leu⁶¹ des CD4-Proteins einzugehen, wodurch die Bindung geschwächt sein könnte. Diese Vermutung, dass die Wechselwirkung des hydrophoben Restes des jeweiligen Liganden mit dem Leu⁶¹ des CD4-Proteins von essentieller Bedeutung für die Bindung des Liganden ist, lässt sich bestätigen, wenn die K_D -Werte der Cyclohexyl-Derivate **17** und **21** mit denen der Adamantyl-Derivate **18** und **22** verglichen werden. Hierbei lässt sich erkennen, dass die Adamantyl-Liganden stärker binden, als die entsprechenden Cyclohexyl-Derivate. Die thermodynamische Bindungskonstante des Liganden **16** stimmt mit dieser Theorie überein, da die *tert*-Butyl-Gruppe einen geringeren Raumanpruch und somit eine geringere hydrophobe Oberfläche besitzt, als eine Cyclohexylgruppe. Der mit $1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ bestimmte K_D -Wert des Liganden **20** lässt sich hingegen mit dieser Theorie nicht erklären. Eine Begründung für das Abweichen des K_D -Wertes könnte sich dadurch erklären lassen, dass die generellen RU-Antworten während der Messreihen von Ligand zu Ligand abnahmen und somit die exakte Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit bei der Bestimmung der K_D -Werte innerhalb der Messreihe nicht mehr gegeben ist. Letztendlich ist der Fit der Messpunkte der Konzentrationen $2 \mu\text{M}$ bis $20 \mu\text{M}$ für den Liganden **20** durch die Software Origin 7.5G mit einem $\text{Chi}^2 = 0.00013$ und einem $R^2 = 0.99909$ sehr gut.

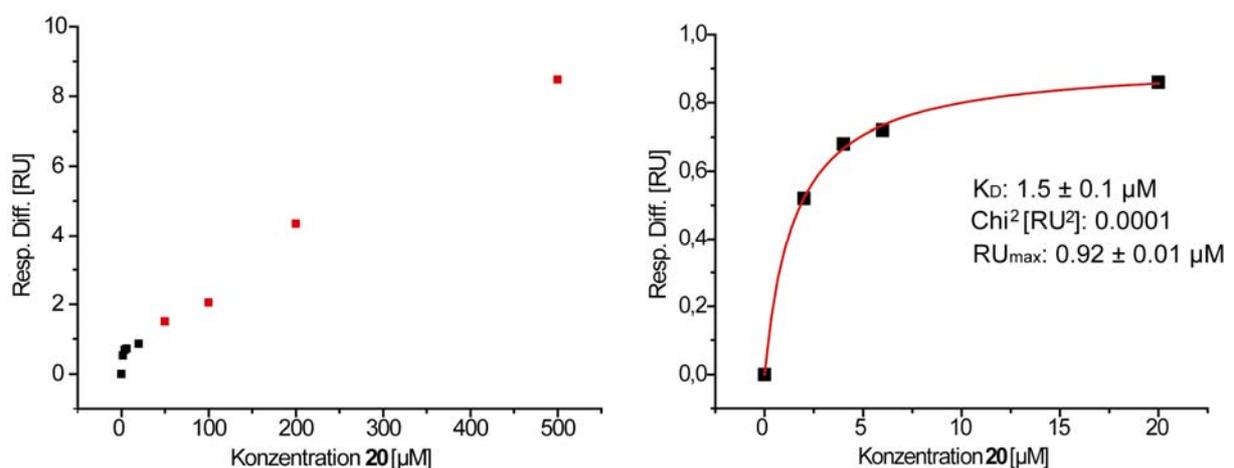


Abbildung 49: SPR-Affinitätsanalyse des Liganden **20** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. **Links:** Auftragung der RU-Antworten aller Messpunkte; rot dargestellt sind diejenigen RU-Antworten, die nicht nach dem *one-site-binding*-Modell angefitet werden können. **Rechts:** Messpunkte, die nach dem *one-site-binding*-Modell angefitet werden konnten.

Die Abnahme in den RU-Antworten liegt wahrscheinlich in der Verwendung von 150 mM Phosphorsäure zur Regeneration der Chip-Oberfläche nach vollendeter Dissoziationszeit begründet. Diese Regeneration wurde in Analogie zu dem von A. Neffe durchgeführten

Biacore-Protokoll durchgeführt.¹²² Es scheint jedoch in diesem Zusammenhang zu einem Verlust der Aktivität des CD4-Proteins zu kommen, wodurch im Laufe der unterschiedlichen Messungen die RU-Antworten im Gesamten stetig abnahmen. Das Kontrollexperiment zur Bestätigung dieser Annahme, wurde zu diesem Zeitpunkt nicht durchgeführt, anstatt dessen wurde bei darauffolgenden Messungen am Biacore mit neuen Chips auf ein Regenerationspuls mit Phosphorsäure verzichtet.

4.1.10 Untersuchung zur Proteolysestabilität

Da es kein Standard-Verfahren zum Testen der Proteolysestabilität von Peptiden gibt, wurde in Anlehnung an die Methode von Osapay *et al.* eine 1 mM Lösung der Peptidomimetika **18** und **22** in 100 mM Tris-Puffer, pH 7.5, bei 37 °C mit dem Enzymgemisch Pronase aus *Streptomyces griseus* verdaut.¹⁸⁵ Diese beiden Liganden wurden verwendet, da sie aus den SPR-Studien als vielversprechendste Verbindungen im Bezug auf die Bindungsaffinität hervorgegangen sind. Das Pronase-Enzymgemisch aus verschiedenen Endo- und Exoproteasen ist in geeigneter Konzentration fähig, Peptide und Proteine zu den einzelnen Aminosäuren zu zerlegen. Zunächst wurde die Aktivität der Pronase getestet. Hierfür wurden jeweils drei unterschiedlich konzentrierte BSA-Lösungen mit jeweils der Stock-Lösung an Pronase (8 mg/L in Tris-Puffer) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Reaktion mit der Zugabe von 1 M Essigsäure abgebrochen und anschließend auf ein Gel aufgetragen und eine SDS-PAGE durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 50 zu sehen.

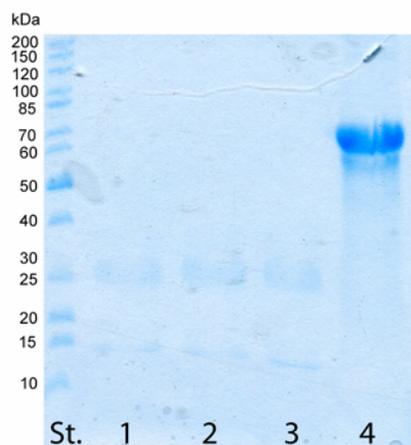


Abbildung 50: SDS-PAGE (Coomassie-Blau gefärbt) des Aktivitätstests der Pronase. **St.:** Fermentas unstained Marker; **1:** Pronase-Stock-Lsg. + 1 mg/mL BSA; **2:** Pronase-Stock-Lsg. + 0.5 mg/mL BSA; **3:** Pronase-Stock-Lsg. + 0.1 mg/mL BSA; **4:** 1 mg/mL BSA.

Die Analyse der SDS-PAGE ergab, dass das BSA vollständig verdaut wurde. Dies war deutlich in dem Fehlen der Bande bei 70 kDa in allen drei Ansätzen zu erkennen. Anstatt der

ursprünglichen Bande waren nur Banden bei 25 kDa bzw. 15 kDa zu erkennen, die von den Verdauprodukten des BSA her rühren. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Pronase aktiv ist und mit der Konzentration von 8 mg/L verwendet werden konnte.

Dem Verdauanatz wurden nach 5, 10, 20, 30, 180 und 600 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 Flächen unter den Peaks anschließend integriert und per MALDI-TOF-MS charakterisiert.

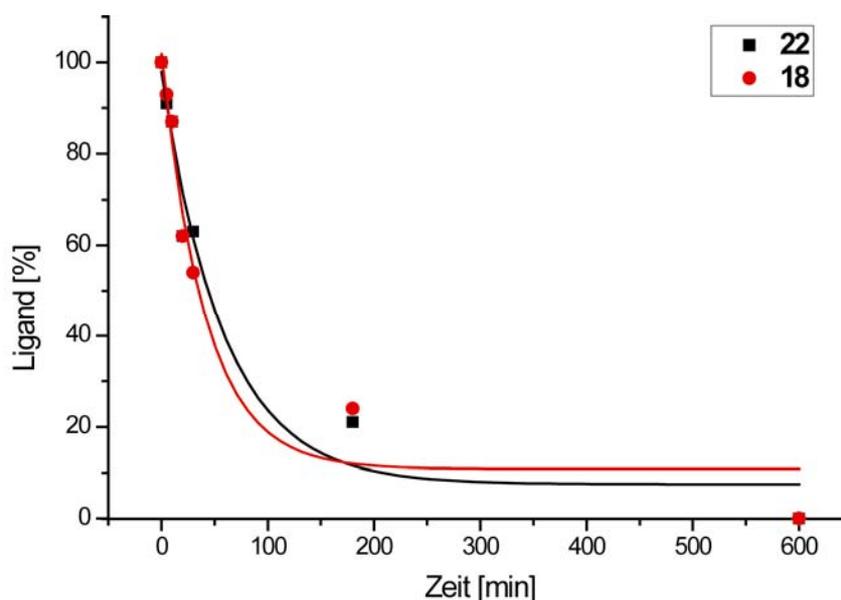


Abbildung 51: Verlauf der Abnahme der prozentualen Mengen der Liganden **18** und **22** bei dem proteolytischen Verdau durch Pronase. Die Liganden haben eine erheblich erhöhte Halbwertszeit (41 Minuten für Ligand **18**; 58 Minuten für Ligand **22**) im Gegensatz zu den von Neffe untersuchten Liganden.¹²³

Die beiden untersuchten Liganden haben eine sehr hohe Halbwertszeit von 41 ± 11 Minuten (Ligand **18**) bzw. 58 ± 18 Minuten (Ligand **22**). Ihre Halbwertszeiten sind bis zum Faktor zwei höher als die der Verbindungen, die von Neffe *et al.* untersucht worden sind.¹²³ Diese Peptidomimetika besaßen eine Halbwertszeit von ungefähr 25 Minuten. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten der beiden Liganden sind höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Fit nach erster Ordnung nicht optimal ist. Mit der HPLC-Methode ließen sich die bei dem Verdau entstehenden Abbauprodukte nicht voneinander trennen, so dass keine Integration und damit Quantifizierung der Abbauprodukte möglich war. Somit konnten die Stabilitäten der in den Liganden **18** und **22** vorhandenen Amid- bzw. Peptidbindungen nur qualitativ mittels MALDI-TOF-MS-Analyse beurteilt werden. Die Analyse der Zusammensetzungen der Abbauprodukt-Peaks ergab, dass die Carbamatbindung offensichtlich unter den experimentellen Bedingungen nicht gespalten wurde.

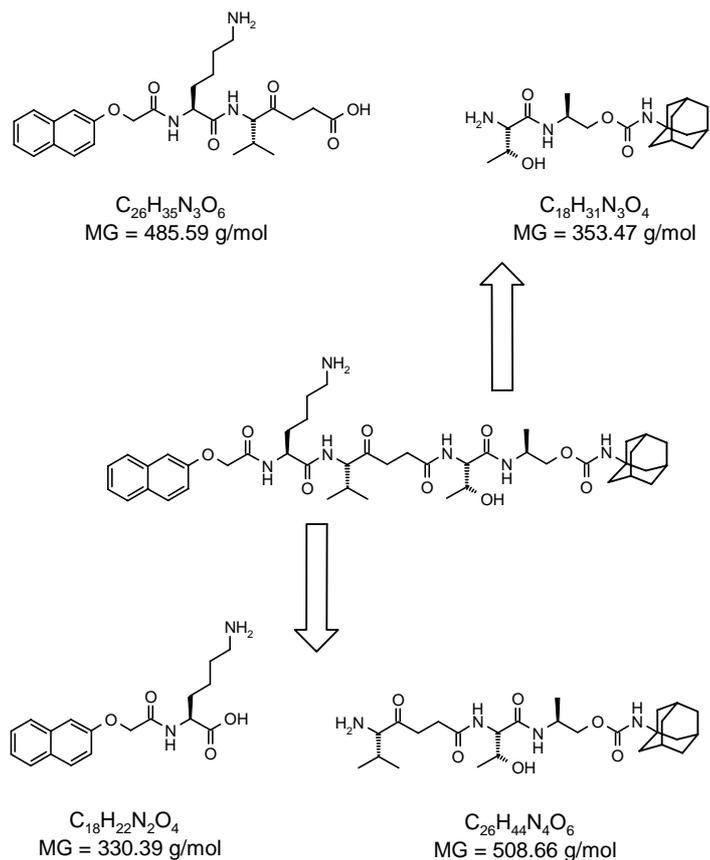


Abbildung 52: Exemplarisch für Ligand **18** dargestellte, im MALDI-TOF-MS nachgewiesene Fragmente des proteolytischen Verdaus des Liganden **18** durch Pronase. Kleinere Fragmente konnte aufgrund der Matrix-Peaks im MALDI-TOF-Spektrum nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Ionisierungsmethode konnte ebenfalls keine Quantifizierung der Fragmente und einhergehende Aussagen über die Stabilität der einzelnen Amid- bzw. Peptidbindung getroffen werden.

Die erhebliche Steigerung der Halbwertszeit der Liganden **18** und **22** im Bezug auf die von A. Neffe¹²³ untersuchten Liganden ist somit auf die vorgenommene Mimikrierung der Peptidbindung zwischen L-Valin und Glycin zurückzuführen.

4.2 Einfluss der Glycosylierung des Asn²⁰¹ auf die Bindungsaffinität von Peptiden

Die in Abschnitt 4.1 diskutierten Ergebnisse zur Darstellung und Analyse der Liganden **16-23** stellen eine vielversprechende Ausgangslage für das Design neuartiger CD4-bindender Liganden dar.

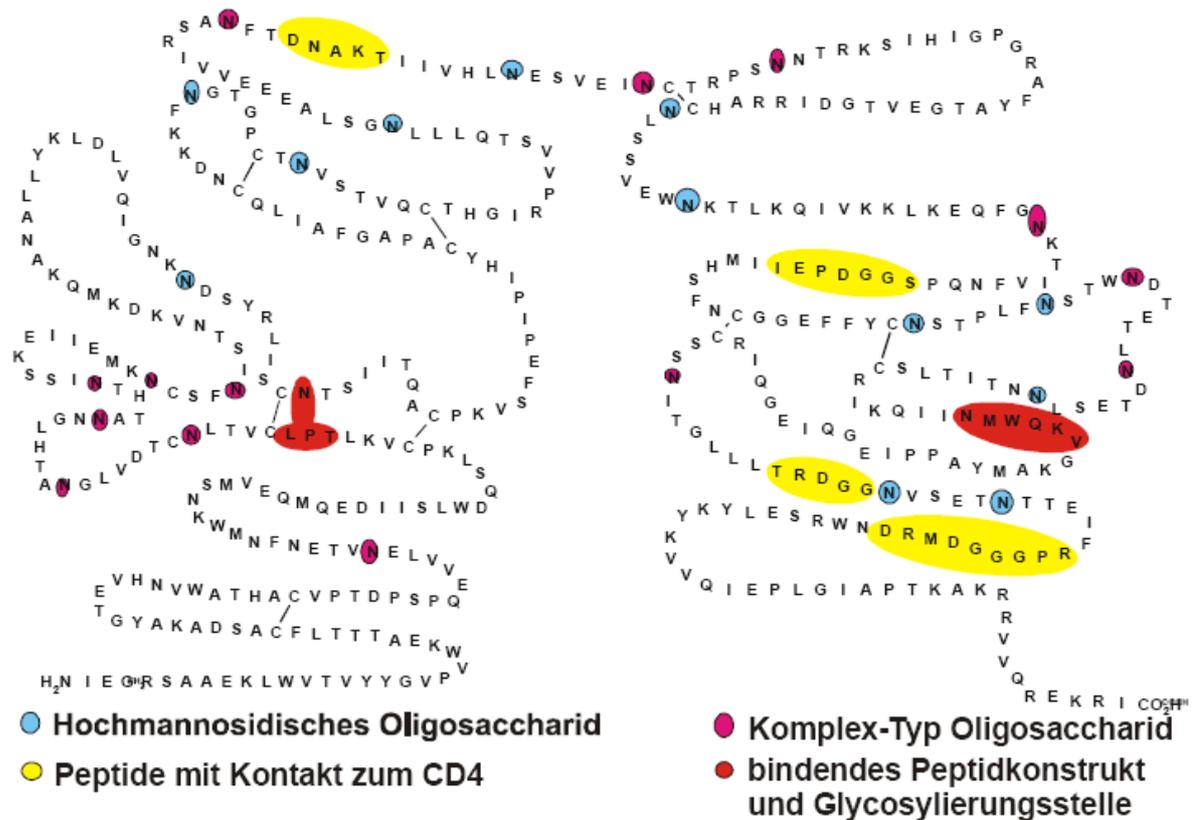


Abbildung 53: AS-Sequenz des nativen GP120 mit allen N-Typ Glycosylierungsstellen und den für die CD4-Bindung wichtigen Bereichen. In unmittelbarer räumlicher Nähe zum C-terminalen Ende des Dekapeptids ⁴²⁵NMWQKV⁴³⁰-G-¹²³TPL¹²⁵ befindet sich eine N-Glycosylierungsstelle am Asn²⁰¹, deren Einfluss im Rahmen eines peptidomimetischen Ansatzes unbekannt ist.

In Abbildung 53 ist die Struktur des nativen GP120-Proteins aufgezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass das an das Teilepitop ¹²³TPL¹²⁵ direkt eine Disulfidbrücke zwischen dem Cys¹²⁶ und dem Cys²⁰⁰ folgt. Diese Disulfidbrücke flankiert die hypervariablen *Loops* V1 und V2. Direkt in Nachbarschaft zum Cys²⁰⁰ befindet sich eine N-Glycosylierungsstelle an dem Asn²⁰¹. Das Asparagin trägt in seiner nativen Struktur ein Oligosaccharid vom Komplex-Typ.¹⁸⁶ Durch dieses Tertiärstrukturelement der Disulfidbrücke liegt das bekannte Teilepitop ¹²³TPL¹²⁵ in einem sehr geringen Abstand zu der Glycosylierungsstelle am Asn²⁰¹. Durch Mutationsstudien an SI- und HI-Viren konnte unter Anderem gezeigt werden, dass

durch das Entfernen des Komplex-Typ-Oligosaccharid am Asn²⁰¹, die Affinität des GP120-Proteins gegenüber dem CD4-Protein fast völlig zum Erliegen kommt.¹⁸⁷ Stattdessen scheint es durch eine Konformationsänderung des GP120-Proteins zu einer erhöhten Affinität zum Korezeptor CCR5 zu kommen, die den Primärkontakt zum CD4-Protein unnötig macht.¹⁸⁸ Eine weitere Mutationsstudie von Wolk *et al.* konnte mittels unterschiedlicher deglycosylierter Virusvarianten nachweisen, dass durch die Deglycosylierung des Asn²⁰¹ die Infektiosität der Viren gegenüber CXCR4-Zellen fast gänzlich zum Erliegen kommt.¹⁸⁹ Der Einfluss der Glycosylierung des Asn²⁰¹ des GP120-Proteins gegenüber der Bindung zum CD4-Protein scheint somit sehr groß zu sein, wodurch sich eine Kombination der Glycosylierungsstelle und dem bekannten CD4-Epitop anbietet, um eine neue Klasse von CD4-bindenden Liganden zu generieren.

Zunächst wurde eine kleine Bibliothek von sechs unterschiedlichen Peptiden entworfen (Abbildung 54), um die unterschiedlichen Einflüsse der Glycosylierung, der Tertiärstruktur und der Primärstruktur um die Glycosylierungsstelle des Asn²⁰¹ zu untersuchen.

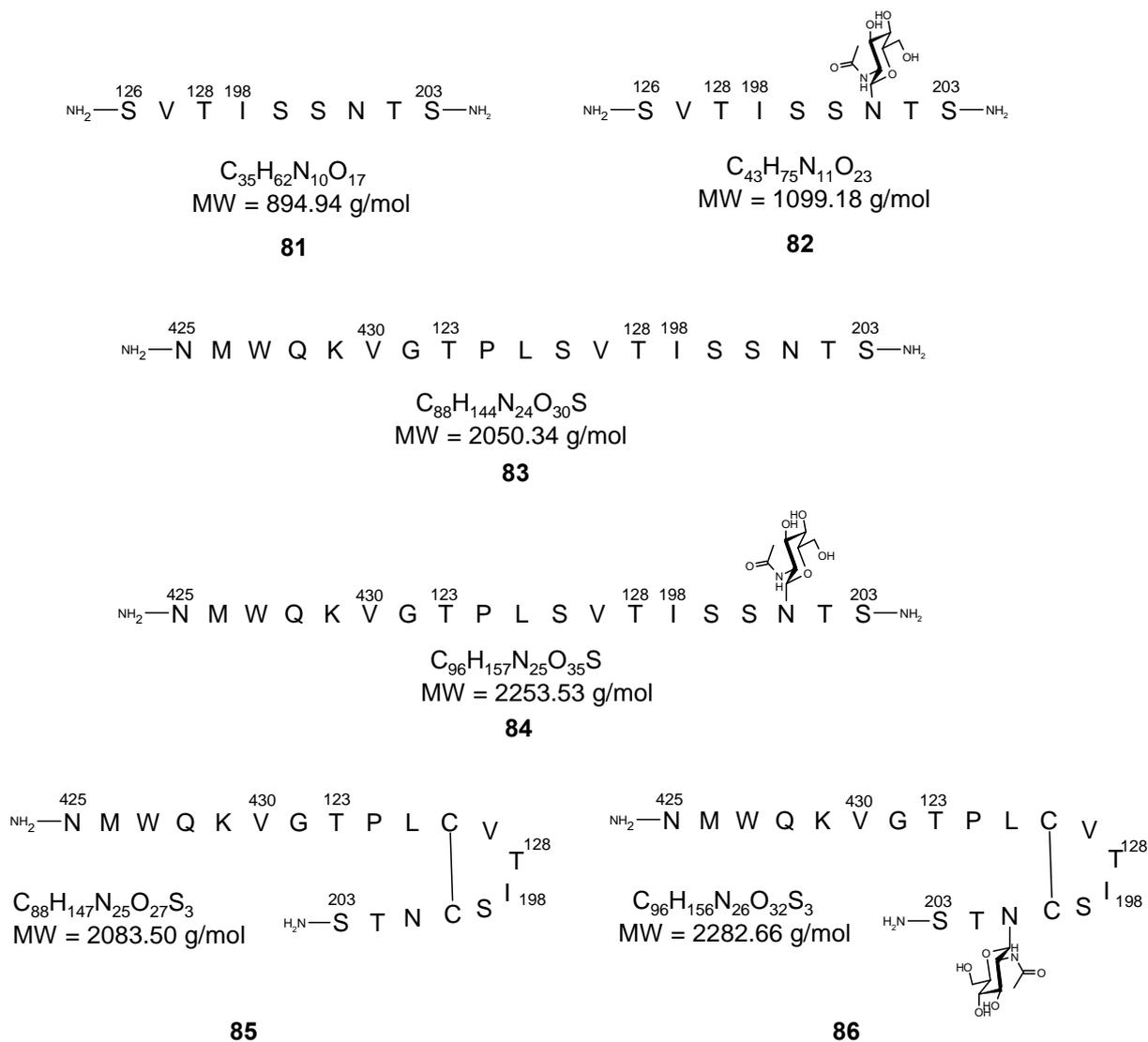


Abbildung 54: Peptide zur Untersuchung des Einflusses der Glycosylierung des Asn²⁰¹. Hierbei handelt es sich um drei Glycopeptide (**82**, **84**, **86**) und die entsprechenden nicht glycosylierten Peptide (**81**, **83**, **85**). Durch die unterschiedlichen Peptidlängen bzw. zyklisierten Varianten der Peptide kann zusätzlich der Einfluss der dreidimensionalen Struktur der Peptide untersucht werden.

Zur Repräsentation des *N*-Glycans wurde als Kohlenhydrateinheit die 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose verwendet. 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose stellt bei *N*-Glycanen das erste Kohlenhydrat dar, welches β -*N*-glycosidisch mit Asparagin verknüpft ist. Ebenfalls ist die Synthese des GlcNAc-Asparagin-Bausteins im Verhältnis zu den Oligosaccharid-Asparagin-Bausteinen erheblich vereinfacht und für die grundsätzliche Untersuchung des Einflusses der Glycosylierung bei kürzeren Peptiden vollends geeignet.¹⁹⁰

4.2.1 Synthese der Peptide und Glycopeptide

4.2.1.1 Synthese der linearen Peptide **81** und **82**

Die Peptide **81** und **82** wurde manuell mittels Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung der Fmoc-Strategie synthetisiert. Als Festphase diente ein mit Polyethylenglycol copolymerisiertes Polystyrolharz. Dieses Harz trägt einen 5-(4-Aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)valeriansäure-Linker (PAL), der an der Aminofunktion Fmoc-geschützt ist.

Bevor die Festphasenpeptidsynthese der Glycopeptide durchgeführt werden konnte, musste zunächst der Fmoc-Asn(GlcNAc(Ac)₃)-OH **90** synthetisiert werden. Dieser Baustein wurde nach einer literaturbekannten Vorschrift aus dem Anomerengemisch der GlcNAc (**87**) dargestellt.^{191,192} Hierfür wurde **87** zunächst am anomeren Zentrum zum β-2-Acetamido-1,2-dideoxy-D-glucosamin **88** umgesetzt, anschließend mit der Seitenketten-entschützt Asparaginsäure unter Aktivesterbedingungen gekuppelt und abschließend die *t*-Butylschutzgruppe der α-Säurefunktion entfernt.

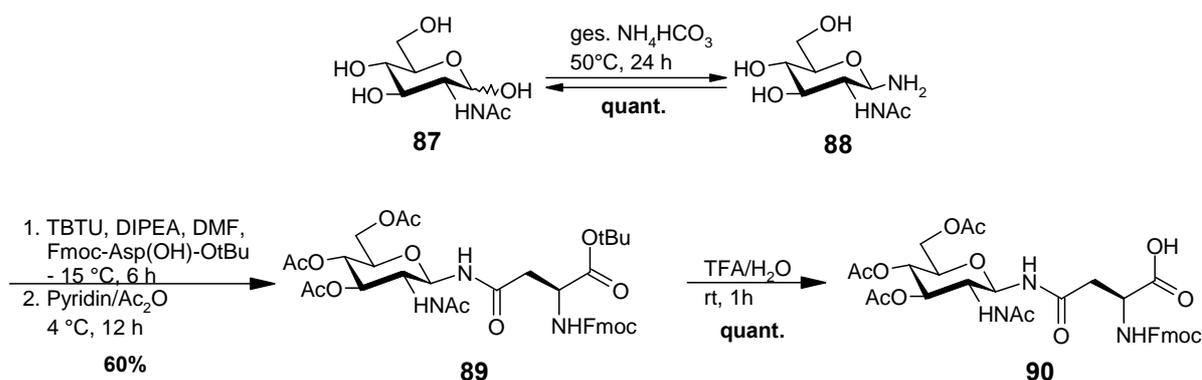


Abbildung 55: Synthese zur Darstellung des Fmoc-Asn(GlcNAc(Ac)₃)-OH als Modellverbindung einer *N*-Typ-Kohlenhydrateinheit zur Darstellung der Glycopeptide **82**, **84** und **86**.

Für die Synthese der Peptide **81** und **82** wurde eine Einfach-Kupplung gemäß AAV1 durchgeführt, wobei in diesen beiden Synthesen vom Capping abgesehen wurde. Der Glycosylbaustein **90** für das Glycopeptid **82** wurde nicht in einem vierfachen Überschuss gegenüber der freien Aminofunktion eingesetzt, sondern in einem doppelten Überschuss, um einen geringeren Substanzverbrauch zu erreichen. Die Bestimmung des Fmoc-Wertes ergab für das Peptid **81** eine Reaktionsausbeute von 45% und für das Glycopeptid **82** eine Reaktionsausbeute von 35% bezogen auf den gewählten 50 μmol Reaktionsansatz. Diese Ausbeuten sind für die neun durchgeführten Aminosäure-Kupplungen sehr gering und weisen auf eine generelle Problematik in der Synthese (Diskussion siehe Abschnitt 4.2.1.2) hin. Das Peptid **81** wurde anschließend nach AAV5 unter sauren Bedingungen vom Harz abgespalten, wohingegen die Glucosamineinheit des Glycopeptids **82**, gemäß AAV4 mittels

Hydrazin-Hydrat/MeOH deacetyliert und anschließend vom Harz abgespalten wurde. Die Reinigung der Peptide erfolgte mittels *RP*-HPLC. Durch eine anschließende NMR-spektroskopische Untersuchung wurde festgestellt, dass die isolierten Fraktionen beider Peptide nicht rein waren. Es stellte sich heraus, dass diese Fraktionen mit Abbruchpeptiden bzw. Deletionspeptiden verunreinigt waren, die auch durch die Wahl unterschiedlicher Reinigungsprotokolle mittels *RP*-HPLC nicht getrennt werden konnten. Dies lag vermutlich darin begründet, dass die Polarität der nicht gecappten Abbruchpeptide bzw. Deletionspeptide und der jeweiligen Produktpeptide sehr ähnlich sind, so dass eine Trennung über eine C_{18} -Säule nicht möglich war. Um diese Probleme bei der Reinigung der Peptide **83-86** zu minimieren, wurde für die Synthese dieser Peptide ein Capping-Schritt integriert. Da die folgenden SPR-Experimente als eine Art *Screening* durchgeführt werden sollten, wurde davon abgesehen, die Peptide **81** und **82** nach dem Capping-Protokoll erneut zu synthetisieren. Zur exakten Charakterisierung der Peptide **81** und **82** aus den Peptidgemischen wurden 2D-NMR-Experimente durchgeführt. Der Nachweis der einzelnen Spinsysteme der Aminosäuren und die Zuordnung der chemischen Verschiebungen erfolgte mittels eines TOCSY-Spektrums. Dort konnten in der *NH*-Region acht *NH*-Spuren der amidischen Protonen im Bereich von 8.114 bis 8.507 ppm den entsprechenden Aminosäuren für das Peptid **81** und im Bereich von 8.068 bis 8.503 ppm für das Glycopeptid **82** zugeordnet werden. Die Identifikation der *N*-terminalen L-Serine gelang anhand der $CH\alpha$ -Spur bei 4.133 (**81**) bzw. 3.926 ppm (**82**). Die Sequenzierung der Peptide erfolgte durch Analyse der sequenziellen NOE-Signale benachbarter Aminosäuren in einem NOESY-Spektrum. Die Bestimmungen der jeweiligen $^3J_{NH,H\alpha}$ -Kopplungskonstante wurden anhand des jeweiligen *WATERGATE*- 1H -Spektrums durchgeführt.

4.2.1.2 Synthese der linearen Peptide 83 und 84

Zunächst wurde versucht, das lineare Peptid **83** und das lineare Glycopeptid **84** an dem Pioneer Peptide Synthesizer der Firma *Perseptive* nach dem *continuous flow*-Verfahren darzustellen. Für die Synthese wurde ebenfalls ein PAL-PEG-Harz eingesetzt. Bei allen Kupplungsschritten wurde eine Dreifachkupplung (30, 60, 90 min) bei einem vierfachen Aminosäureüberschuss in Bezug auf die freien Aminofunktionen durchgeführt, um eine möglichst hohe Kupplungsausbeute zu gewährleisten. Da der Synthesizer über die Möglichkeit verfügt, während der Synthese ein *Fmoc-monitoring* durchzuführen, ist man in der Lage, halbquantitativ die einzelnen Kupplungsreaktionen während der Synthese zu verfolgen. Es zeigte sich ein deutlicher Einbruch in den *Fmoc*-Werten nach der Kupplung des

Fmoc-L-Prolins an die wachsende Peptidkette. Die Kupplungen des darauffolgenden Fmoc-L-Threonins zeigten einen fast vollständigen Einbruch in der Detektion des Fmoc-Wertes. Die manuelle Bestimmung des letzten Fmoc-Wertes ergab, die Reaktionsausbeute bei der Synthese des linearen Peptids **83** 2% und die des linearen Glycopeptids **84** <1% extrem gering ausfielen. Nach erfolgter Abspaltung bzw. Deacetylierung und folgender Abspaltung und Reinigung mittels *RP*-HPLC konnte keines der gewünschten Peptide erfolgreich isoliert werden. Eine Erklärung für die Einbrüche in den Kupplungsausbeuten könnten ausgeprägte Aggregationen der wachsenden Peptidkette mit der Harz-Matrix, sowie die Ausbildung einer Sekundärstruktur des wachsenden Peptids sein. Diese Effekte können ab der fünften gekuppelten Aminosäure bei geeigneter Peptidsequenz auftreten, wodurch die Kupplung der nächsten Aminosäuren erschwert, wenn nicht sogar vollends unterdrückt wird. Diese Effekte treten besonders verstärkt bei Peptidsequenzen auf, die viele Alanine, Valine, Leucine bzw. Isoleucine enthalten.¹⁹³⁻¹⁹⁵ Die Sequenz der Aminosäuren nach der fünften Aminosäure bis zum L-Proline (mit dem detektierten Einbruch in den Fmoc-Werten) ist in beiden Peptiden ITVSLP. Somit könnte dies sowohl eine Erklärung für den Einbruch der Fmoc-Werte bei der Synthese der Peptide **83** und **84** sein, als auch ein Grund für die schlechten Ausbeuten bei den Peptiden **81** und **82** aus Abschnitt 4.2.1.1. Bacsá *et al.* berichteten über eine Mikrowellen-unterstützte Methode zur Synthese von Peptiden, die ab der fünften gekuppelten Aminosäure Aminosäuren enthalten, die zur Aggregation neigen.¹⁹⁶

In diesem Zusammenhang wurde die Synthese des linearen Peptids **83** und des linearen Glycopeptids **84** mittels eines Mikrowellen-unterstützten Peptidsynthesizers *Liberty* der Firma CEM durchgeführt. Während der Synthese wurden die jeweiligen Aminosäuren einfach in einem vierfachen Überschuss in Bezug auf die freie Aminosäure-Funktion gekuppelt. Der Baustein **90** wurde im Falle des Glycopeptids **84** in einem zweifachen Überschuss eingesetzt. Das Standard-Syntheseprotokoll des Synthesizers sieht vor, dass die entsprechend aktivierten Aminosäuren jeweils für fünf Minuten bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C mit einer Mikrowellenleistung von 25 Watt an die freie Aminofunktion gekuppelt werden. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt bei einer Leistung von 35 Watt, ebenfalls bei 80 °C über drei Minuten. Der Cap-Schritt mit Ac₂O/DMF erfolgt bei 60 °C über zwei Minuten bei einer Leistung von 40 Watt. Nach beendeter Synthese wurde das Harz in eine Fritte überführt und durch Abspalten der terminalen Fmoc-Schutzgruppe der Fmoc-Wert bestimmt. Die Reaktionsausbeute betrug demnach für das Peptid **83** 68% und für das Glycopeptid **84** 50%. Im Anschluss an die Abspaltprozedur (s. o.) konnten beide Peptide nach der Aufreinigung mittels *RP*-HPLC erfolgreich isoliert werden. Im Falle des Peptids **83**

konnten 12 mg (5.8 μmol) und im Falle des Glycopeptids **84** 8 mg (4 μmol) isoliert werden, was einer Ausbeute von 12% bzw. 8% bezogen auf den eingesetzten 50 μmol -Ansatz entspricht. Die Differenz der Fmoc-Ausbeute und der isolierten Ausbeute sind nicht zufriedenstellend zu erklären. Jedoch könnte eine Erklärung für die hohe Diskrepanz die Vorsäule sein, die vor die präparative C_{18} -Säule der *RP*-HPLC geschaltet ist, um Verunreinigungen des Rohproduktes (hauptsächlich hydrophobe Verunreinigungen) zu entfernen. Nichtsdestotrotz reichen die Substanzmengen aus, um SPR-Experimente durchzuführen. In diesem Zusammenhang wurde nicht weiter an einer Optimierung der Trennmethodik im Rahmen dieser Arbeit gearbeitet.

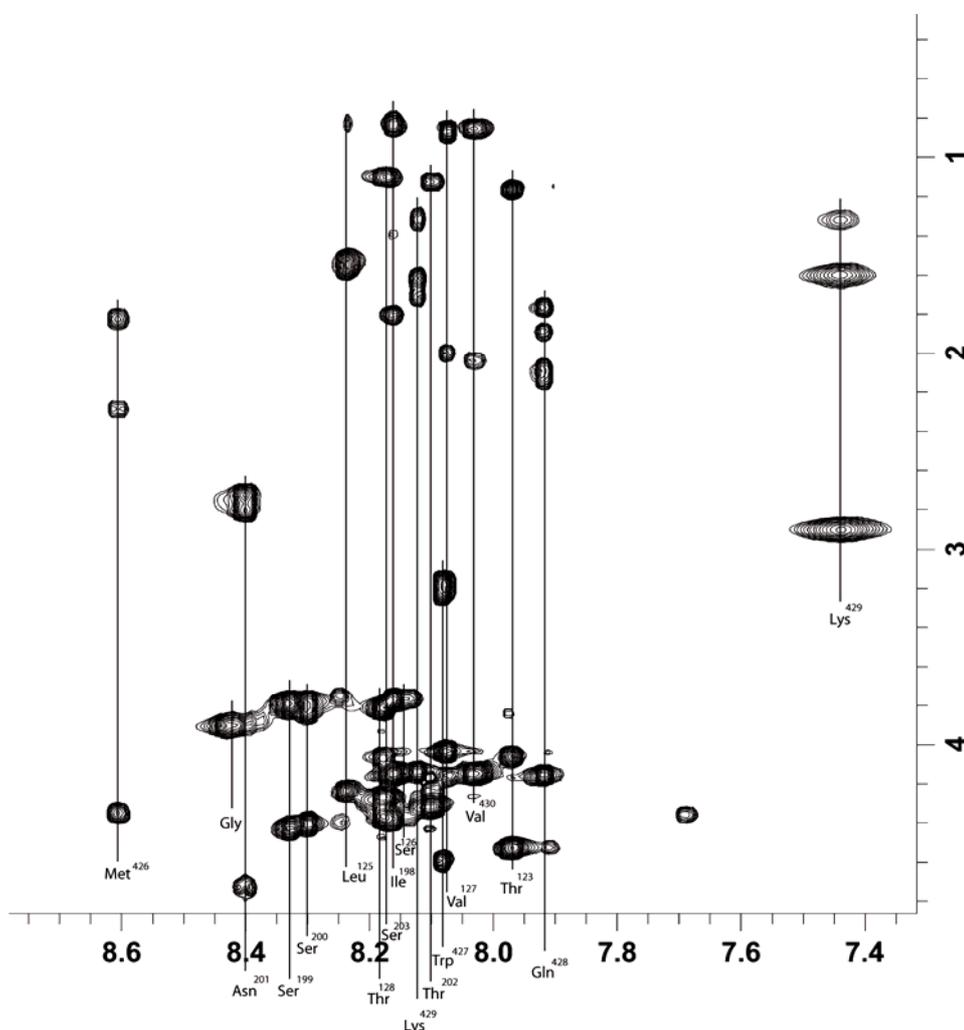


Abbildung 56: Ausschnitt aus dem *NH*-Bereich des H,H -TOCSY-Spektrums des linearen Peptids **83**. Die Aufnahme erfolgte bei 300 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) und $\text{pH} = 3.5$. Die in diesem Bereich teilweise fehlenden Kreuzsignale der Seitenkettenprotonen von Leu^{125} und Ile^{198} konnten aus den Seitenkettenspuren der entsprechenden Aminosäuren eindeutig identifiziert werden.

Zur exakten Charakterisierung der Peptide **83** und **84** wurden 2D-NMR-Experimente durchgeführt. Der Nachweis der einzelnen Spinsysteme der Aminosäuren und die Zuordnung

der chemischen Verschiebungen erfolgten mittels eines TOCSY-Spektrums. Dort konnten in der NH-Region acht NH-Spuren der amidischen Protonen im Bereich von 7.918 bis 8.603 ppm den entsprechenden Aminosäuren für das Peptid **83** und im Bereich von 7.916 bis 8.606 ppm für das Glycopeptid **84** zugeordnet werden. Die Identifikation der in den Sequenzen vorhandenen L-Proline bzw. der N-terminalen L-Asparagine gelang anhand der CH α -Spur bei 4.328/4.221 (**83**) bzw. 4.328/4.223 ppm (**84**). Die Sequenzierung des Peptids erfolgte durch Analyse der sequenziellen NOE-Signale benachbarter Aminosäuren in einem NOESY-Spektrum. Die Bestimmungen der jeweiligen $^3J_{\text{NH,H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten geschahen anhand des jeweiligen *WATERGATE*- ^1H -Spektrums.

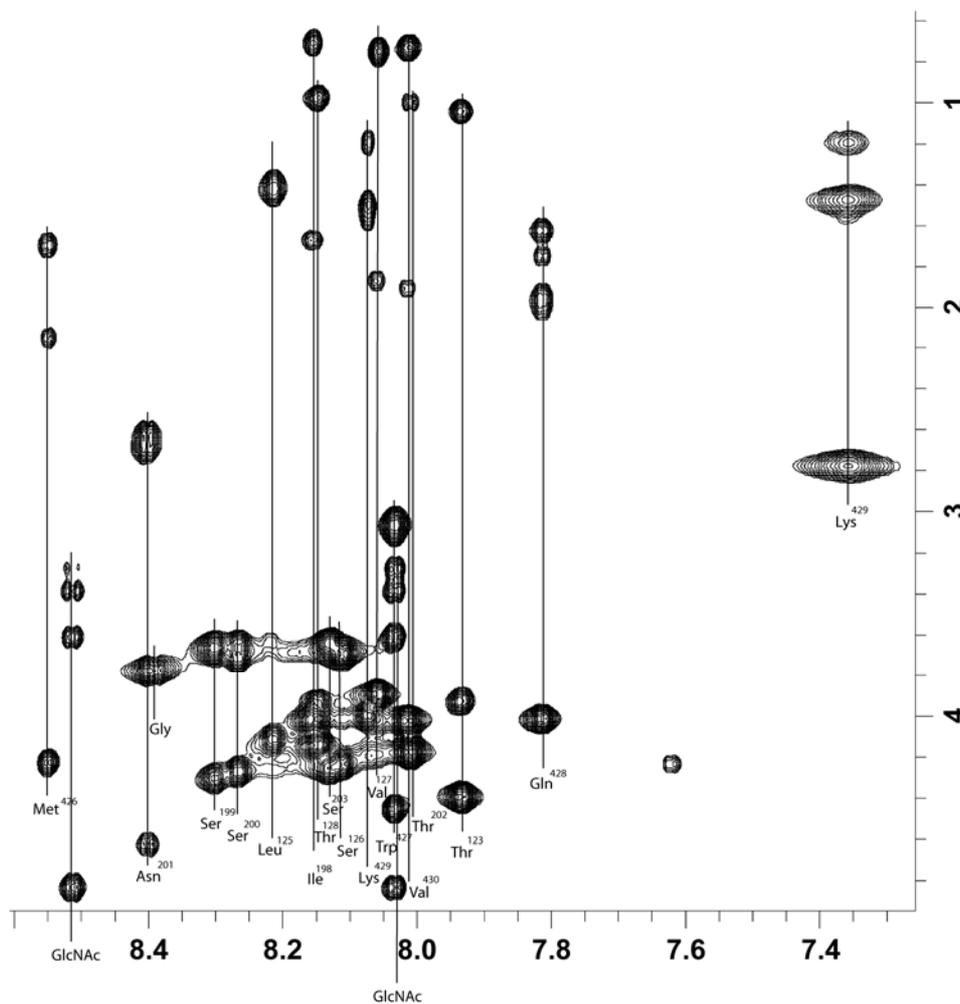


Abbildung 57: Ausschnitt aus dem NH-Bereich des H,H-TOCSY-Spektrums des linearen Glycopeptids **84**. Die Aufnahme erfolgte bei 300 K in H $_2$ O/D $_2$ O (9:1) und pH = 3.5. Die in diesem Bereich teilweise fehlenden Kreuzsignale der Seitenkettenprotonen von Leu 125 und Ile 198 konnten aus den Seitenkettenspuren der entsprechenden Aminosäuren eindeutig identifiziert werden.

4.2.1.3 Synthese der zyklischen Peptide **85** und **86**

Das zyklisierte Peptid **85** wurde in einem 50 μmol Ansatz unter Mikrowellenunterstützung mittels des Peptidsynthesizers *Discovery* dargestellt. Hierbei wurden die gleichen Kupplungsbedingungen gewählt wie bei dem linearen, nicht glycosylierten Peptid **83**. Das glycosylierte, zyklische Peptid **86** hingegen wurde, ebenfalls in einem 50 μmol Ansatz, erneut versucht am Pioneer Peptide Synthesizer darzustellen. Für die Synthese wurde eine Dreifachkupplung der jeweiligen Aminosäuren verwendet, wohingegen der Glycobaustein **90** einfach in einem zweieinhalbfachen Überschuss gekuppelt wurde. Eine Analyse des Fmoc-monitoring während der Synthese des Glycopeptids ergab ebenfalls einen Einbruch in den Fmoc-Werten ab der Kupplung des L-Prolins, die jedoch nicht so stark ausgeprägt waren, wie bei der Synthese des äquivalenten Glycopeptids **84**. Im Anschluss der Synthese wurden beide Harz jeweils in eine Stickstofffritte überführt und dort die terminale Fmoc-Gruppe abgespalten und der Fmoc-Wert zur Bestimmung der Rohausbeute der Synthese der jeweiligen Peptide gemessen. Im Falle des nicht glycosylierten Peptids **85** ergab die Bestimmung eine Rohausbeute von 65% und für das Glycopeptid **86** eine Rohausbeute von 43%. Somit scheint die Kombination der Verwendung des Glycobausteins **90** und der Substitution der L-Serine durch L-Cysteine innerhalb der Peptidsequenz einen positiven Effekt auf Ausbeute zu haben.

Nachdem die Glucosamineinheit des Peptids **86** mittels Hydrazin-Hydrat/MeOH über sechs Stunden deacetyliert wurde, wurden beide Peptide nacheinander mit der gleichen Prozedur zyklisiert. Die Peptide wurden unter gleichzeitiger Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen von der Festphase abgespalten und unter Sauerstoffausschluss in eine entgaste und mit Stickstoff gesättigte 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung überführt. Durch die Einwirkung von Luftsauerstoff wurden die freien Thiolgruppen der Cysteine an Position 126 und 200 innerhalb der Sequenz unter Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke oxidiert. Das stark salzhaltige Produkt wurde ultrafiltriert (regenerierte Zellulose, *cut off* 1000 Da) und der Rückstand gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels RP-HPLC an einer C₁₈-Säule. Es wurden 8.0 mg (3.8 μmol) des Produktes **85** und 5.4 mg (2.6 μmol) des Produktes **86** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 7.6% bzw. 5.2% bezogen auf den gewählten Reaktionsansatz von 50 μmol . Die theoretische Zyklisierungsausbeute bezogen auf das eingesetzte Rohprodukt betrug in beiden Fällen 12% nach Reinigung mittels RP-HPLC.

Bei der Aufnahme und der anschließenden Auswertung der 2D-NMR-Spektren traten jedoch im Falle des Peptids **85** Probleme auf. Trotz der ausreichenden Substanzmenge ergaben sich keine zufriedenstellenden Spektren. Dieser Effekt wurde auch bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen an zyklischen, nicht glycosylierten V3-Peptiden beobachtet.^{197; 198} In den vorliegenden Spektren für das Peptid **85** konnte die Identifikation jedoch eindeutig durchgeführt werden.

Bei der Aufnahme der 2D-NMR-Spektren für das zyklische Glycopeptid **86** traten die oben genannten Probleme des Peptids **85** nicht auf (Abbildung 64). Es konnten Spektren mit zufriedenstellendem Signal/Rausch-Verhältnis erhalten werden.

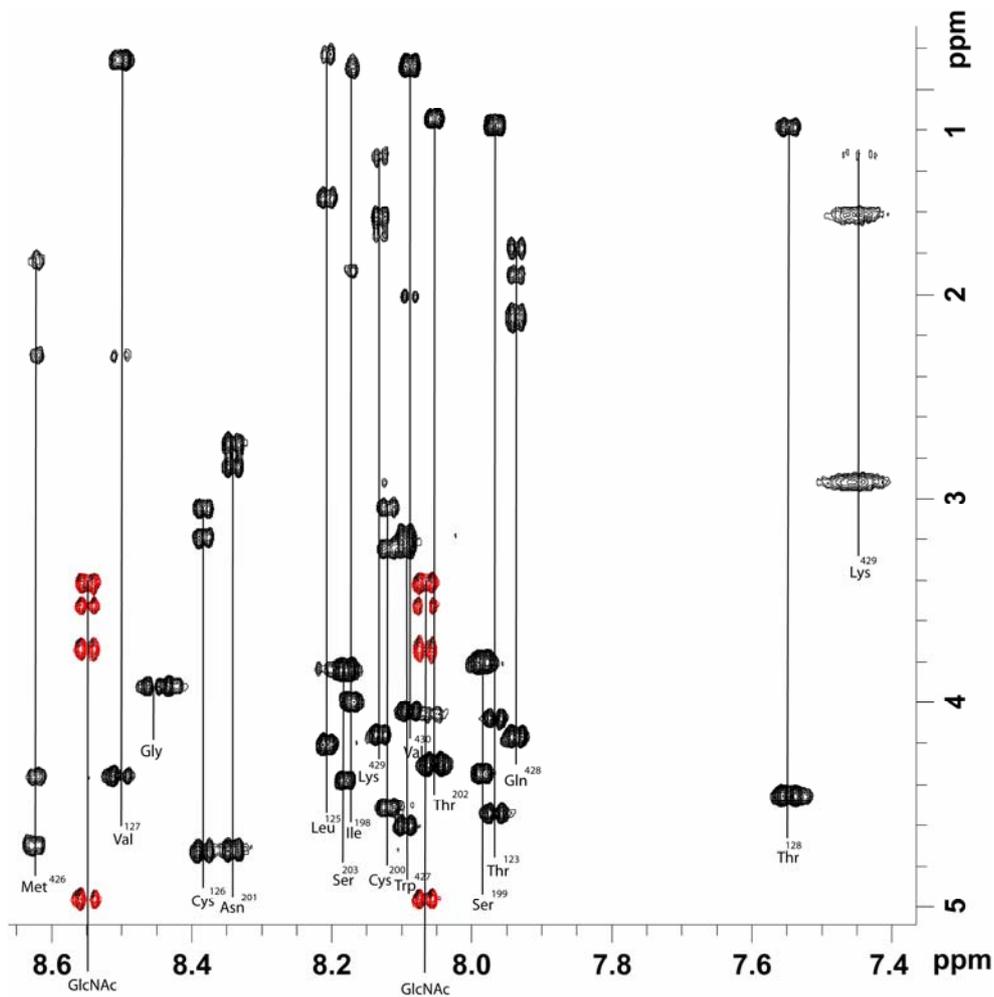


Abbildung 58: Ausschnitt aus dem *NH*-Bereich des ^1H , ^1H -TOCSY-Spektrums des zyklischen Glycopeptids **86**. Die Aufnahme erfolgte bei 300 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) und $\text{pH} = 3.5$. Die in diesem Bereich teilweise fehlenden Kreuzsignale der Seitenkettenprotonen von Leu¹²⁵ und Ile¹⁹⁸ konnten aus den Seitenkettenspuren der entsprechenden Aminosäuren eindeutig identifiziert werden.

4.2.2 SPR-Untersuchungen der Peptide und Glycopeptide 81 - 86

Im Anschluss der erfolgreich durchgeführten Synthesen der Peptide **81-86** wurden SPR-Experimente zur Untersuchung des Einflusses der Glycosylierung am Asp²⁰¹ der Primärstruktur und der Tertiärstruktur durchgeführt.

Zunächst wurden die Peptide **81** und **82** untersucht. Hierbei wurde der gleiche CM5-Chip verwendet wie bereits bei den Untersuchungen aus Abschnitt 4.1.9. Die Peptide wurden in unterschiedlichen Konzentrationen von 100 μ M-50 mM für das Peptid **81** und von 750 μ M-180 mM für das Glycopeptid **82** mit einer Flussrate von 30 μ L/min über den Chip geleitet. Die Injektionszeit betrug bei diesen SPR-Experimenten 150 s. Da es sich um Stoffgemische (siehe Abschnitt 4.2.1.1) handelte, musste der exakte Anteil des Produktpeptids im Stoffgemisch durch Integration der Amidsignale im ¹H-NMR-Spektrum bestimmt werden. Dadurch konnte die Konzentration des zu untersuchenden Analyten bestimmt werden.

Auffallend bei den SPR-Experimenten dieser Peptide war, dass ab einer Konzentration von 10 mM sowohl beim Peptid **81** als auch beim Glycopeptid **82** die Messkurven negativ wurden. Die RU-Antworten der unterschiedlichen Konzentrationen sind in Abbildung 59 für beide Peptide dargestellt.

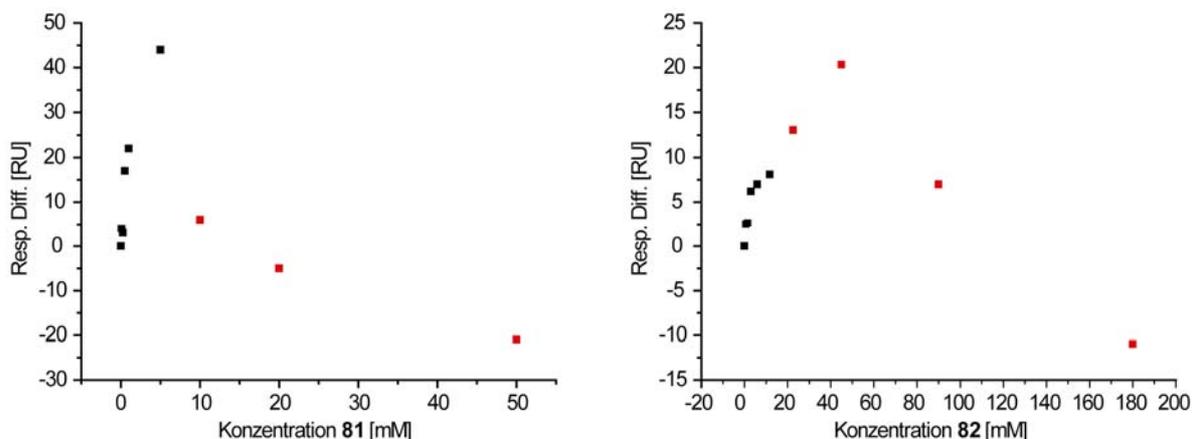


Abbildung 59: SPR-Affinitätsanalyse der Peptide **81** und **82** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. **Links:** Auftragung der RU-Antworten aller Messpunkte des Peptids **81**; rot dargestellt sind diejenigen RU-Antworten, die trotz erhöhter Konzentration zu niedrigeren RU-Antworten führen. **Rechts:** Auftragung der RU-Antworten aller Messpunkte des Peptids **82**; rot dargestellt sind diejenigen RU-Antworten, die weder dem *one-site-binding*-Modell entsprechen und trotz erhöhter Konzentration zu niedrigeren RU-Antworten führen.

Dieser Abfall in den RU-Antworten ist vielleicht durch das Löslichkeitsverhalten der beiden Peptide begründet. Übersteigt die Konzentration der peptidischen Lösung von **81** und **82** 10 mM, so wurden die Lösungen milchig, was auf die Ausbildung einer kolloidalen Lösung (mit Veränderung im Brechungsindex der Lösung) hinweist. Dies erklärt den beobachteten

Abfall, da letztlich die aufgenommenen Messkurven auf der Detektion der Änderung der Brechungsindex an der Grenzschicht basieren, kann dies eine Erklärung sein.

Auffallend ist ebenfalls bei der Konzentrationsreihe des Peptids **81**, dass die RU-Antworten höher liegen als der theoretische RU_{\max} -Wert. Bei 8%iger Aktivität des CD4-Proteins auf der Chip-Oberfläche (siehe Abschnitt 4.1.9) ist der RU_{\max} -Wert für Peptid **81** mit 17 RU weit niedriger als die bestimmten RU-Werte. Diese erreichen schon bei einer Konzentration von 500 μM den theoretischen Maximalwert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die erhaltenen RU-Antworten jenseits dieser Konzentration auf unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und dem auf der Oberfläche immobilisierten CD4-Protein zurückzuführen sind. Ein Fit der ersten drei Konzentrationspunkte zur Bestimmung des K_D -Wertes nach dem *one-site-binding*-Modell wurde nicht durchgeführt und die gesamte Wechselwirkung des Peptids **81** mit dem CD4-Protein weiter ausgewertet.

Der K_D -Wert konnte für das Glycopeptid **82** für die ersten fünf Messpunkte, dem *one-site-binding*-Modell folgend, bestimmt werden. Dieser ergab eine Dissoziationskonstante von 2.71 ± 0.91 mM (Zusammenfassung der K_D -Werte siehe Tabelle 11). Der theoretische RU_{\max} -Wert für das Glycopeptid **82** wurde mit 20 RU bestimmt. Der experimentelle RU_{\max} -Wert wurde mit 10 RU ermittelt. Dieser liegt somit um die Hälfte niedriger als erwartet. Die Messpunkte der 22 μM - respektive 44 μM -Konzentration wurden jedoch nicht mit in die Bestimmung des K_D -Wertes einbezogen, da die RU-Antwort dieser beiden Punkte nicht mehr mit dem *one-site-binding*-Modell in Einklang gebracht werden konnten.

Die SPR-Experimente für die Peptide **83** und **84** wurden auf einem von H. Behnken verwendeten CM5-Chip durchgeführt. Es wurde ein mit 15400 RU belegter CM5-Chip verwendet. 15400 RU entsprechen 341 fmol CD4-Protein, welches auf der Matrixoberfläche des Chips immobilisiert ist. Ein Aktivitätstest mit GP120-Protein ergab hierbei eine Aktivität von 20% des immobilisierten CD4-Proteins. Die SPR-Experimente und die Bestimmung des K_D -Wertes für das nicht glycosylierte Peptid **83** wurden von H. Behnken im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt. Es konnte hierbei erfolgreich ein K_D -Wert von 468 ± 234 μM bestimmt werden.¹⁶⁴

Für die Konzentrationsreihe zur Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstante der Bindung des Glycopeptid **84** und dem CD4-Protein wurden unterschiedliche Konzentrationen von 1.5-200 μM verwendet. Nach anschließender Analyse des Fits nach dem *one-site-binding*-Modell konnte ein K_D -Wert von 433 ± 248 μM bestimmt werden. Dieser liegt somit in der gleichen Größenordnung wie der des nicht glycosylierten

Peptids **83**. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die primäre Wechselwirkung beider Peptide mit dem CD4-Protein auf dem bekannten Dekapeptid $^{425}\text{NMWQKV}^{430}\text{-G-}^{123}\text{TPL}^{125}$ beruht und der neu eingeführte Peptidteil eher sekundär an der Proteinoberfläche bindet, dies jedoch zu einer Verbesserung der Bindungsaffinität um den Faktor zehn gegenüber dem Dekapeptid führt.

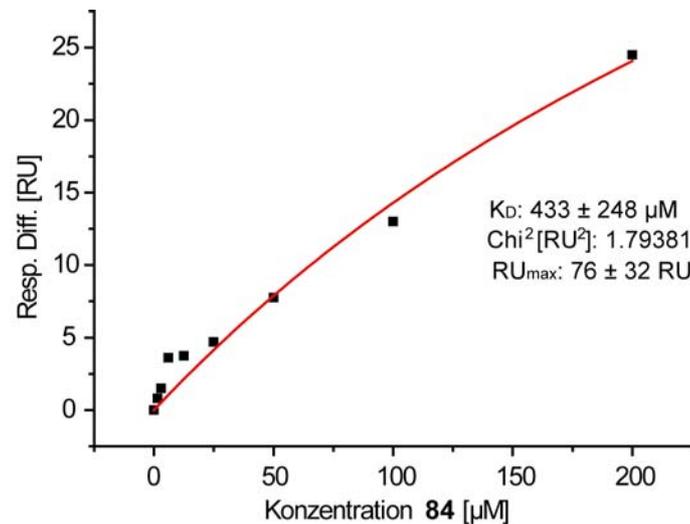


Abbildung 60: SPR-Affinitätsanalyse des Peptids **84** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. Auftragung der RU-Antworten aller Messpunkte; gefittet die nach dem *one-site-binding*-Modell. Obwohl ein linearer Verlauf der letzten drei Datenpunkte erkennbar ist, wurden diese im Fit der Kurve berücksichtigt, da das Fitten der ersten fünf Datenpunkte einen RU_{max} -Wert von 9.4 ± 1.7 RU ergab und somit um den Faktor 15 niedriger als der theoretische RU_{max} -Wert liegt. Der bestimmte K_D -Wert aller Datenpunkte liegt mit 433 ± 248 µM in der gleichen Größenordnung, wie der des nicht glycosylierten Peptids **83**. Jedoch ist die Affinität des Peptids gegenüber dem CD4-Protein um den Faktor zehn höher, als die des Dekapeptids NMWQKV-G-TPL.

Die SPR-Experimente für das zyklische, nicht glycosylierte Peptid **85** wurden ebenfalls mit dem CM5-Chip von H. Behnken durchgeführt. Hierbei wurde das Peptid **85** in Konzentrationen von 325 nM bis 50 µM über den Chip geleitet. Bemerkenswert war bei dieser Messreihe, dass die Messkurven einen negativen Verlauf besaßen, die normalen SPR-Bindungskurven entsprachen, nur an der x-Achse (Zeitskala) gespiegelt schienen. Da sich die negativen RU-Antworten konzentrationsabhängig änderten und das Detektionsverfahren auf der Brechungsindexänderung an der Grenzoberfläche basiert (welche durchaus auch zu negativen Kurven führen kann), ist es zulässig, anstelle der absoluten Werte der RU-Antworten, die Beträge der Werte zu verwenden. Die erhaltenen Messpunkte konnten anschließend nach dem *one-site-binding*-Modell angefittet und so ein K_D -Wert bestimmt werden. Dieser Wert lag mit 91 ± 0.16 µM um den Faktor vier niedriger, als bei den Peptiden **83** und **84**. In der folgenden Abbildung 61 ist der Verlauf der RU-Antworten für die unterschiedlichen Konzentrationen der SPR-Experimente für das Peptid **85** dargestellt.

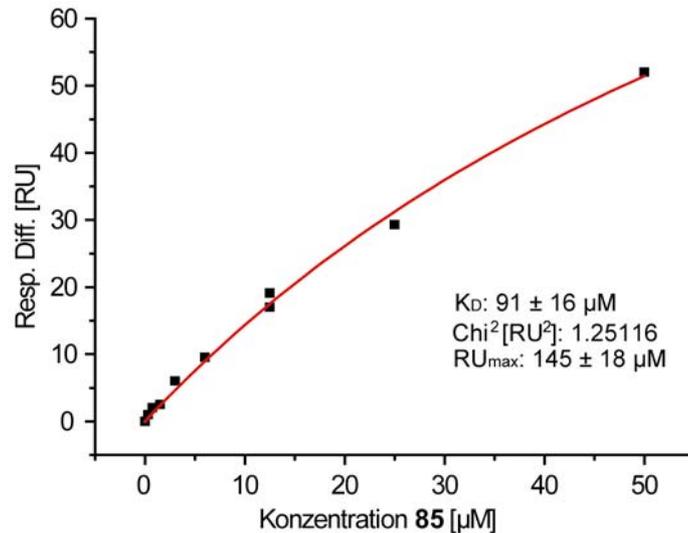


Abbildung 61: SPR-Affinitätsanalyse des Peptids **85** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. Auftragung der RU-Antworten aller Messpunkte; gefittet die nach dem *one-site-binding*-Modell. Der bestimmte K_D -Wert liegt mit $91 \pm 16 \mu\text{M}$ um den Faktor vier niedriger, als das entsprechende lineare Peptid **83**. Die erhöhte Affinität kann nur durch das Strukturelement der Disulfidbrücke erklärt werden.

Die SPR-Experimente des zyklischen, glycosylierten Peptids **86** wurden wiederum auf dem CM5-Chip der vorangegangenen Experimente durchgeführt. In diesem Fall wurden Konzentrationen von 50 nM – 10 µM verwendet. Der Fit der RU-Antworten gemäß dem *one-site-binding*-Modell ergab die in Abbildung 62 dargestellte Kurve.

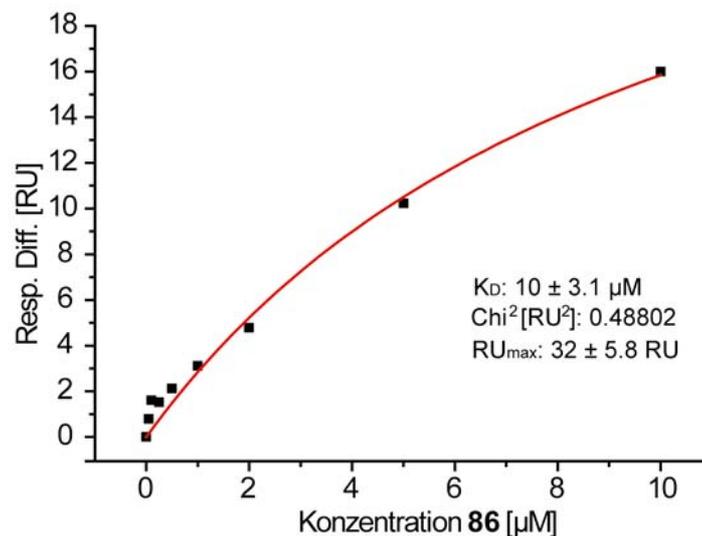


Abbildung 62: SPR-Affinitätsanalyse des Peptids **86** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. Auftragung der RU-Antworten aller Messpunkte; gefittet die nach dem *one-site-binding*-Modell. Der bestimmte K_D -Wert liegt mit $10 \pm 3.1 \mu\text{M}$ um den Faktor neun niedriger, als das entsprechende nicht glycosylierte Peptid **85**. Die erhöhte Affinität kann nur durch die Glycosylierung des Asn²⁰¹ erklärt werden. Die durch die Disulfidbrücke in der nativen räumlichen Orientierung zum Epitop des NMWQKV-G-TPL fixiert ist.

Der K_D -Wert konnte mir $10 \pm 3.1 \mu\text{M}$ bestimmt werden und liegt somit um den Faktor neun niedriger als der des nicht glycosylierten Peptids **85**. Ähnlich wie in dem Fall des Peptids **85**,

sind die verwendeten Konzentrationen unterhalb des ermittelten K_D -Wertes, jedoch ist der errechnete RU_{\max} -Wert mit 32 RU in der gleichen Größenordnung zu sehen, wie der theoretische RU_{\max} -Wert von 43 RU.

Die mittels SPR-Experimenten erhaltenen K_D -Werte der Peptide **81-86** sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenfassung der ermittelten K_D -Werte der Peptide **81-86**. Es zeigt sich deutlich, dass die Peptidsequenz um das Asn^{201} keine hohe Bindungsaffinität gegenüber dem CD4-Protein besitzt. Die Kombination dieser Sequenz mit dem bekannten Epitop $^{425}NMWQKV^{430}$ -G- $^{123}TPL^{125}$ hingegen führt zu einer Erhöhung in der Affinität. Die Einführung der Disulfidbrücke führt zusätzlich zu einer starken Erhöhung in der Affinität, da es die räumliche Struktur der nativen GP120-Sequenz mimikriert und die GlcNAc-Einheit so in ihrer nativen Position fixiert wird. * von H. Behnken durchgeführtes SPR-Experiment.¹⁶⁴

Nr.	Peptid-Typ	K_D [μ M]	Nr.	Glycopeptid-Typ	K_D [μ M]
81	Linear kurz	unspezifisch	82	Linear kurz	2710 ± 910
83	Linear lang	$468 \pm 234^*$	84	Linear lang	433 ± 248
85	Zyklisch	91 ± 16	86	Zyklisch	10 ± 3.1

Eine Analyse der K_D -Werte zeigt, dass die Peptidsequenz um die Glycosylierungsstelle des Asn^{201} (Peptid **81**) keinen entscheidenden Beitrag zur Bindungsaffinität. Ist hingegen dieselbe Sequenz mit einem GlcNAc glycosyliert, so ist das Glycopeptid **82** in der Lage, schwache Wechselwirkungen zum CD4-Protein einzugehen. Kombiniert man nun diese Peptide mit dem bereits bekannten Motiv $^{425}NMWQKV^{430}$ -G- $^{123}TPL^{125}$ des GP120, so scheint der Hauptteil der Wechselwirkung zum CD4-Protein vom Dekapeptid auszugehen, wobei die zusätzlich neu eingeführten C-terminalen Peptideile zu einer Intensivierung der Bindung führen, so dass beide Peptide (**83** und **84**) um etwa den Faktor zehn stärker binden.

Führt man zusätzlich zu der Verlängerung der Peptidsequenz ein Tertiärstruktur-Element in Form einer Disulfidbrücke ein, so verstärkt sich die Bindung des jeweiligen Peptids noch einmal. Das zyklische Peptid **85** bindet um einen Faktor vier stärker an das CD4-Protein als die beiden linearen Peptide **83** und **84**. Somit resultiert aus der Zyklisierung des Peptids eine bessere definierte 3D-Struktur, die zu einer Verstärkung der Bindung zum CD4-Protein führt. Glycosyliert man nun das Asn^{201} , so wird die Bindungsaffinität noch einmal um den Faktor neun gesteigert. Dies belegt eindeutig, dass die die räumliche Orientierung der GlcNAc-Einheit durch die Tertiärstruktur des Peptids von großer Bedeutung für die Bindung zum CD4-Protein ist.

4.2.3 Konformationsanalyse des zyklischen Glycopeptids **86**

Die aus dem Abschnitt 4.2.2 gewonnenen Erkenntnisse legen nahe, dass die Glycosylierung des Asn²⁰¹ in Kombination mit einer dreidimensionalen Struktur durch die Zyklisierung einen sehr starken Effekt auf die Bindungseigenschaften gegenüber dem CD4-Protein haben. Aus diesem Grund wurde versucht, die offensichtlich relevante Kohlenhydrat-Einheit mit dem Grundgerüst der Liganden **16-23** zu verbinden.

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Analyse des 2D-NOESY-Spektrums des Glycopeptids **86** vorgenommen. In dieser Analyse wurden alle NOE-Kreuzsignale berücksichtigt, die bei einer Mischzeit von 300 ms und 300 K zu identifizieren waren. Neben den sequenziellen Kontakten zur Aufklärung der Primärstruktur wurden vor allem *long-range*-NOE-Kreuzsignale untersucht, die Aufschluss über die 3D-Strukturen des Glycopeptids **86** geben.

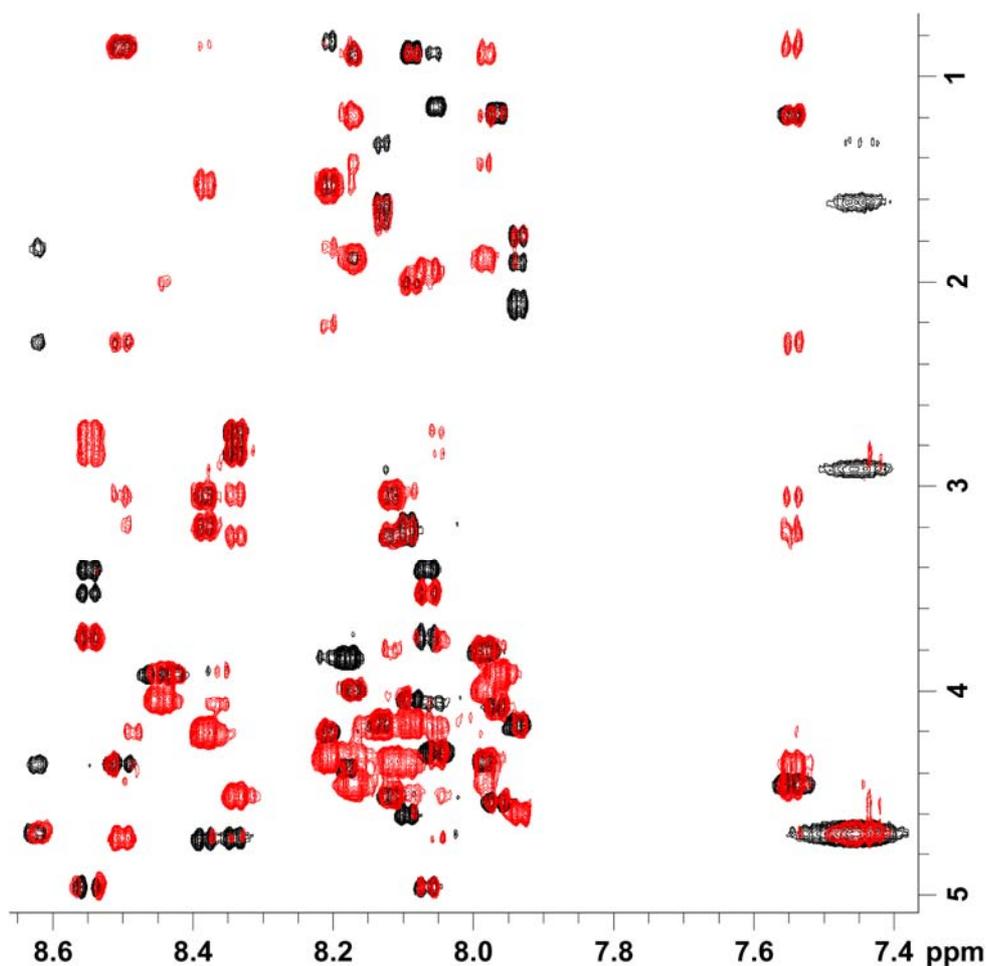


Abbildung 63: Ausschnitte der *NH*-Bereiche der *NH*-Bereiche des H, H-TOCSY-Spektrums (schwarz) und des H, H-NOESY-Spektrums (rot) des zyklischen Glycopeptids **86**. (H₂O/D₂O 9:1, pH 3.0, 300 K, 700 MHz).

Durch die Disulfidbrücke des Glycopeptids ist die Flexibilität des Moleküls im Bereich der *Loop* stark eingeschränkt, so dass zwischen den einzelnen Protonen der Aminosäuren der

Loop eine Vielzahl von NOE-Kreuzsignalen zu erwarten sein dürften, wohingegen im flexiblen Teil des Peptids weniger NOE-Kreuzsignale auftreten sollten. Üblicherweise werden exakte Protonenabstände aus NOE-Aufbaureihen durch den Vergleich mit einem Referenzabstand ermittelt. In dieser Arbeit wurden jedoch nur die Abstände aus einem 2D-NOE-Spektrum ermittelt und in drei unterschiedliche Kategorien (stark, mittel und schwach) unterteilt. Das Ergebnis der NOE-Analyse ist in Tabelle 12 wiedergegeben.

Tabelle 12: Protonenabstände des Glycopeptids **86**. Die Intensität der Kreuzsignale wurde in stark (1.8 – 2.5 Å), mittel (2.5 – 3.5 Å) und schwach (3.5 – 5.0 Å) eingeteilt. Die Nomenklatur „123 Thr HN 203 Ser HN“ bezeichnet den Protonenabstand zwischen den NH-Protonen von Thr¹²³ und Ser²⁰³; Q = NMR-Pseudoatom. Cyss = Disulfid-verbrücktes Cystein; GlcNAc HN (a) = NH-Gruppe am anomeren Zentrum; GlcNAc HN = NH-Gruppe der N-Acetylgruppe.

	Kreuzsignal	Abstände [Å]		Kreuzsignal	Abstände [Å]
1	427 Trp HE3 427 Trp QB	2.5 – 3.5	18	127 Val HN 126 Cyss QB	2.5 – 3.5
2	427 Trp HE3 127 Val HG11	2.5 – 3.5	19	128 Thr HN 126 Cyss QB	2.5 – 3.5
3	429 Lys HN Gly HN	3.5 – 5.0	20	128 Thr HN 127 Val HN	1.8 – 2.5
4	430 Val HN Gly HN	1.8 – 2.5	21	128 Thr HN 127 Val HB	2.5 – 3.5
5	Gly QA 123 Thr HN	1.8 – 2.5	22	198 Ile HA 199 Ser HN	1.8 – 2.5
6	Gly HN 430 Val HB	3.5 – 5.0	23	199 Ser HN 198 Ile HB	1.8 – 2.5
7	123 Thr HN Gly HN	2.5 – 3.5	24	199 Ser HN 198 Ile QG1	2.5 – 3.5
8	123 Thr HN 203 Ser HN	2.5 – 3.5	25	199 Ser HN 198 Ile QG1	2.5 – 3.5
9	124 Pro QD 123 Thr HA	3.5 – 5.0	26	200 Cyss HN 199 Ser QB	2.5 – 3.5
10	124 Pro QD 123 Thr HB	1.8 – 2.5	27	200 Cyss HN 201 Asn HN	3.5 – 5.0
11	125 Leu HN 124 Pro QB	2.5 – 3.5	28	200 Cyss QB 126 Cyss QB	1.8 – 2.5
12	125 Leu HN 124 Pro QD	2.5 – 3.5	29	201 Asn HN 199 Cyss HN	2.5 – 3.5
13	125 Leu HN 126 Cyss HN	1.8 – 2.5	30	202 Thr HN 201 Asn HN	3.5 – 5.0
14	126 Cyss HN 125 Leu QB	2.5 – 3.5	31	202 Thr HN 201 Asn QB	2.5 – 3.5
15	126 Cyss HN 127 Val HN	3.5 – 5.0	32	GlcNAc HN (a) 201 Asn QB	1.8 – 2.5
16	126 Cyss QB 429 Lys QE	3.5 – 5.0	33	GlcNAc HN 201 Asn QB	1.8 – 2.5
17	126 Cyss QB 200 Cyss QB	1.8 – 2.5	34	GlcNAc HN 124 Pro QG	1.8 – 2.5

Von großem Interesse sind die NOE-Kreuzsignale der GlcNAc-Einheit mit den Protonen der Seitenketten des Peptids. Die NOE-Kontakte der amidischen Protonen der anomeren NH-Gruppe bzw. NHAc-Gruppe zu den β -Protonen des Asn²⁰¹ belegen die korrekte Verknüpfung des Kohlenhydrats an die entsprechende Aminosäure. Der starke NOE-Kontakt des Protons der NHAc-Gruppe zu einem Proton an der γ -Position des Pro¹²⁴ (Abbildung 64) eröffnet hierbei einen möglichen Ansatz zur Weiterentwicklung der Liganden **16-23**.

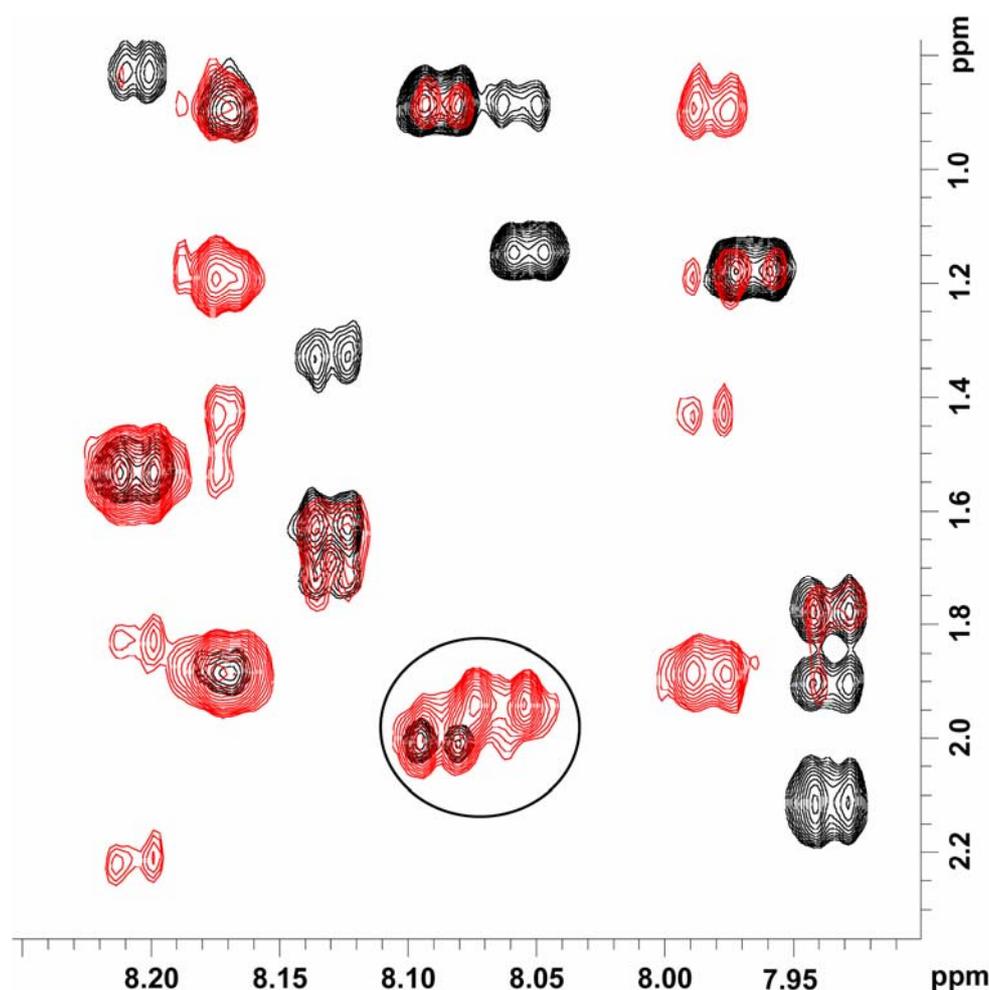


Abbildung 64: Ausschnitte der *NH*-Bereiche des H, H-TOCSY-Spektrums (schwarz) und des H, H-NOESY-Spektrums (rot) des zyklischen Glycopeptids **86**. ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3.0, 300 K, 700 MHz). Eingekreist ist der NOE-Kontakt des amidischen Protons der NHAc-Gruppe (Spur bei 8.065 ppm) zum g-Proton des Pro¹²⁴ (bei 2.208 ppm; rot).

Dieser NOE-Kontakt ist daher von Bedeutung, da das Pro¹²⁴ zu dem bekannten Epitop des Dekapeptids ⁴²⁵NMWQKV⁴³⁰-G-¹²³TPL¹²⁵ gehört und eine räumliche Nähe des Kohlenhydrats zu eben dieser Aminosäure eine Kombination der Ligandenstruktur (**16-23**) mit dem Kohlenhydrat ermöglichen könnte. Zur weiteren Interpretation des 2D-NOESY-Spektrums des Glycopeptids **86** wurde eine *distance geometry* Analyse durchgeführt.

4.2.4 Strukturgenerierung mit dem Programm DYANA

Aus den interatomaren Distanzen und ϕ -Winkeln wurden mit Hilfe des Programms DYANA für das Glycopeptid **86** Strukturen generiert.¹²⁹ Zur Berechnung der ϕ -Winkel wurden zunächst aus den 1D-¹H-*Watergate*-Spektren der beiden Peptide die ³ $J_{\text{NH},\text{H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten bestimmt. Durch Einsetzen der Kopplungskonstanten in Gleichung 3 ergeben sich direkt die ϕ -Winkel bezogen auf die Kohlenstoffkette. Allerdings ist die Karplus-Gleichung nicht immer eindeutig, so dass sich in einigen Fällen mehrere

Möglichkeiten für die entsprechenden Winkel ergeben. Durch den Vergleich der errechneten Winkel mit dem Ramachandran Plot (Abbildung 12), in dem die möglichen ϕ - und ψ -Winkel für eine Peptidkette graphisch dargestellt sind, lassen sich die wahrscheinlichen Winkel bestimmen. In Tabelle 13 sind die Kopplungskonstanten und die zugehörigen Winkel für das Glycopeptid **86** zusammengestellt, wobei diejenigen, die sich im Ramachandran Plot im erlaubten Bereich befinden, grau unterlegt sind. Hellgrau sind diejenigen Winkel, die in der unüblichen, linksgängigen Helix vorgefunden werden. Für alle ϕ -Winkel des Peptidrückgrats sind demnach zwei Winkelwerte möglich. Im Folgenden werden die größeren Winkelbeträge (-150 bis -170°) als Winkelbereich A und die kleineren Beträge (-70 bis -90°) als Bereich B bezeichnet.

Glycin nimmt eine Sonderrolle ein, da es zwei α -Protonen besitzt. Es ist für die α -Protonen jeweils ein Triplet zu beobachten. Die Kopplungskonstanten für die $^3J_{\text{NH,H}\alpha}$ - bzw. der $^3J_{\text{NH,H}\alpha}$ -Kopplung sind demnach sehr ähnlich. Dies ist nur in einer Konformation möglich, in der der Diederwinkel entlang der Kohlenstoffkette ca. ± 180 beträgt.

Tabelle 13: $^3J_{\text{NH,H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten und die sich daraus ergebenden Winkelmöglichkeiten für das Glycopeptid **86**. Die Winkel, die in Übereinstimmung mit dem Ramachandran Plot stehen, sind grau unterlegt. Hellgrau sind die Winkel hervorgehoben, die im Ramachandran Plot im Bereich der unüblichen linksgängigen α -Helix liegen.

Peptid	$^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ [Hz]	ϕ [°] ¹	Bereich A		Bereich B	
			ϕ [°] ²	ϕ [°] ³	ϕ [°] ⁴	
Asn ⁴²⁵	---	---	---	---	---	
Met ⁴²⁶	5.79	85.44	-164.84	34.56	-75.16	
Trp ⁴²⁷	7.39		-152.26		-87.74	
Gln ⁴²⁸	7.22		-153.69		-86.31	
Lys ⁴²⁹	6.64	71.97	-158.35	48.03	-81.65	
Val ⁴³⁰	7.99		-146.88		-93.12	
Gly	5.95	83.40	-163.64	36.60	-76.36	
Thr ¹²³	8.17		-145.12		-94.88	
Pro ¹²⁴	---	---	---	---	---	
Leu ¹²⁵	6.27	78.85	-161.21	41.15	-78.79	
Cys ¹²⁶	7.30		-153.02		-86.98	
Val ¹²⁷	8.23		-144.51		-95.49	
Thr ¹²⁸	7.93		-147.45		-92.55	
Ile ¹⁹⁸	4.76	96.75	-172.61	23.25	-67.39	
Ser ¹⁹⁹	6.82	66.60	-156.93	53.40	-83.07	
Cys ²⁰⁰	7.60		-150.45		-89.55	
Asn ²⁰¹	7.38		-152.35		-87.65	
Thr ²⁰²	8.18		-145.02		-94.98	
Ser ²⁰³	6.26	79.01	-161.29	40.99	-78.71	
GlcNAc	8.64		-139.97		-100.03	
NHAc	9.36		-127.93		-112.07	

$$\begin{aligned}
 &^1 \phi = 60^\circ + \arccos \left[\frac{1.3}{13.4} + \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^2 - \left(\frac{1.5-J}{6.7}\right)} \right]; &^2 \phi = 60^\circ + \arccos \left[\frac{1.3}{13.4} - \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^2 - \left(\frac{1.5-J}{6.7}\right)} \right]; \\
 &^3 \phi = 60^\circ - \arccos \left[\frac{1.3}{13.4} + \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^2 - \left(\frac{1.5-J}{6.7}\right)} \right]; &^4 \phi = 60^\circ - \arccos \left[\frac{1.3}{13.4} - \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^2 - \left(\frac{1.5-J}{6.7}\right)} \right]
 \end{aligned}$$

Die Strukturen des Glycopeptids wurden dabei ohne die Saccharid-Einheit gerechnet, da in DYANA der Zucker nicht implementiert sind. Die Abstände dienten dabei als sogenannte *distance constraints* und wurden für die Berechnung jeweils als Bereich von $\pm 5\%$ bezogen auf die ermittelte Distanz angegeben. Zusätzlich wurde ein *constraint* für die Disulfidbrücke eingepflegt, der durch das Programm DYANA auf 2.0-2.1 Å festgelegt ist. Die ϕ -Winkel konnten nicht eindeutig zugeordnet, eine Kombination der zwei möglichen Werte für alle 17 ϕ -Winkel, würde aber 2^{17} Rechnungen erfordern. Daher wurde zunächst eine Rechnung durchgeführt, die nur die *distance constraints* berücksichtigt. DYANA berechnete 500 Strukturen, die anhand der Zielfunktion bewertet wurden. Je kleiner der Wert der Zielfunktion ist, umso besser sind die vorgegebenen *constraints* erfüllt.

Für den sich anschließenden REDAC-Zyklus (*redundant dihedral angle constraints*), wurden die besten 100 Konformere ausgewählt und die Strukturen wurden über einen Algorithmus iterativ an die Distanzbeschränkungen angepasst. Es wurden drei REDAC-Zyklen durchgeführt, die jeweils 150, 400 und 800 Iterationsschritte enthielten. In Abbildung 65 sind die sich ergebenden Strukturen nach dem Rang der Zielfunktionswerte dargestellt.

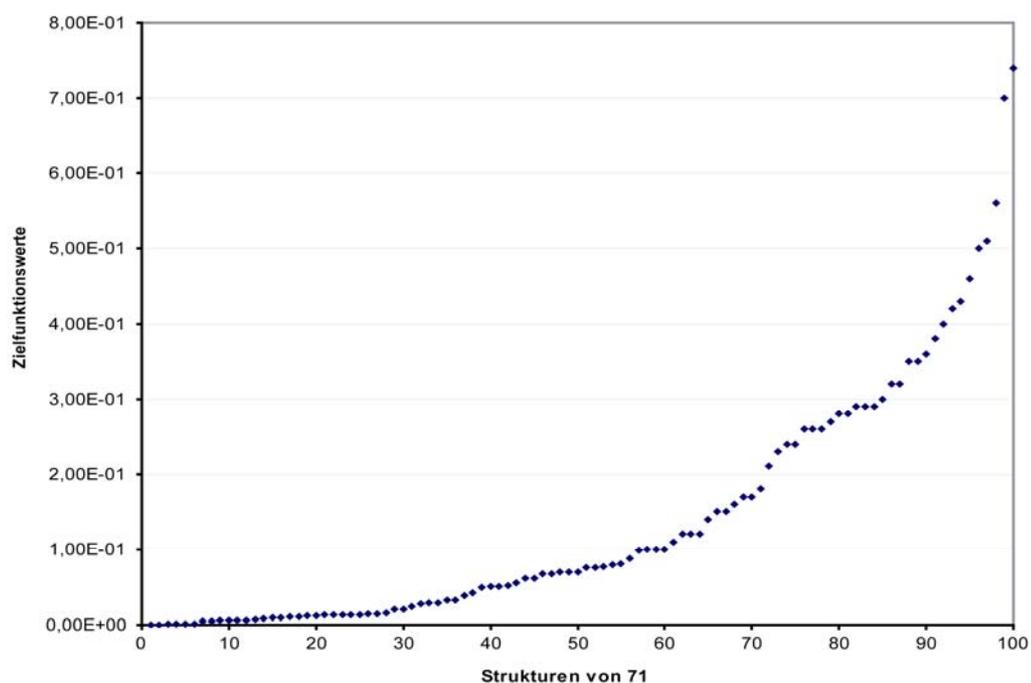


Abbildung 65: Zielfunktionswerte der 100 Strukturen des ersten REDAC-Zyklus für das Glycopeptid **86**. Die Strukturen beinhalten nur die *distance constraints*, so dass die Werte der Zielfunktionen einen sehr niedrigen Wert einnehmen können.

In einem darauffolgenden Schritt wurden zehn Strukturen mit den niedrigsten Zielfunktionswerten in das Programm SYBYL 7.2 geladen und auf ihre Torsionswinkel zwischen NH- und H α -Proton hin analysiert. Die Werte der Winkel wurden mit den Werten aus der Analyse der Kopplungskonstanten verglichen und die übereinstimmenden Winkeldaten (Tabelle 13) verwendet, um eine zweite DYANA Rechnung unter der zusätzlichen Berücksichtigung der *redundant dihedral angle constraints* durchzuführen. Für das Glycin wurde stets ein ϕ -Winkel von -163° verwendet. Die Winkelbeschränkungen wurden dabei als Intervall von $\pm 15^\circ$ festgelegt. Da für das N-terminale Ser²⁰³ keine Kopplungskonstante bestimmt werden konnte, wurde hier die Winkeleinschränkung als Intervall von 0° bis -180° entsprechend der im Ramachandran Plot vorzufindenden Häufigkeit für die ϕ -Winkel angegeben. Wiederum wurden 500 Strukturen generiert, von denen die 100 besten durch drei REDAC-Zyklen weiter berechnet wurden.

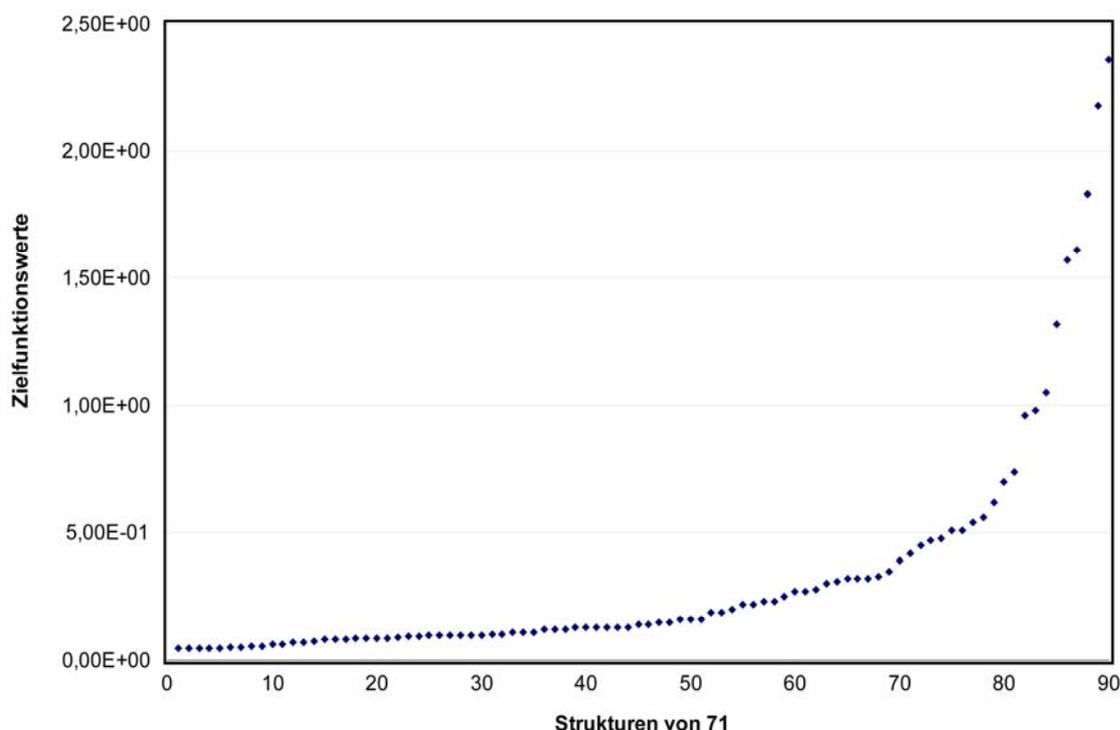


Abbildung 66: Zielfunktionswerte der 90 besten Strukturen des zweiten REDAC-Zyklus für das Glycopeptid **86**. Die Strukturen beinhalten neben *distance constraints* auch *redundant dihedral angle constraints*. Dennoch zeigen die Werte der Zielfunktionen bis etwa zur Struktur 40 niedrige Werte an, so dass die *constraints* scheinbar gut erfüllt werden.

Es stellte sich heraus, dass innerhalb dieser Strukturen keine Verletzung der ϕ -Winkelvorgaben auftraten, jedoch die Abstandsbeschränkung von H α -Gly zum HN-Thr¹²³ in allen Strukturen verletzt wurde. Dies könnte auf einen nicht korrekt zugewiesenen NOE-Kontakt zurückzuführen sein. Die aus diesen Rechnungen erhaltenen zehn besten Strukturen wurden auf ihre Vereinbarkeit mit den nicht berücksichtigten

Kohlenhydrat-Peptid-NOE-*constraints* im Programm SYBYL bewertet. Die ersten neun Strukturen mit den niedrigsten Zielfunktionswerten stellten sich als nicht brauchbar heraus, da sie einerseits die vorgegebenen *constraints* erfüllen, jedoch auf der anderen Seite nicht die Möglichkeit besaßen, die GlcNAc-Einheit mit dem Asp²⁰¹ in der Art und Weise zu verknüpfen, dass diese den *constraints*-Vorgaben aus dem NOE-Spektrum genügen würde. In diesen Fällen hätten die aus den *distance geometry* (DG) Rechnungen hervorgegangenen ersten neun Strukturen grundsätzlich mittels SYBYL neu angeordnet werden müssen, wodurch es zu Verletzungen der eingegebenen *distance* bzw. *redundant dihedral angle constraints* hätte kommen können. Die Struktur mit dem zehnten besten Zielfunktionswert entsprach dieser Voraussetzung. Diese Struktur diente nun als Ausgangsstruktur für die folgende Moleküldynamikrechnung

4.2.5 Constrained Moleküldynamiksimulation

Die in Abschnitt 4.2.4 ausgewählte Struktur musste zunächst modifiziert werden. Zunächst wurden die fehlenden Wasserstoffatome hinzugefügt und die Bindungen zwischen den beiden Schwefelatomen der Disulfidbrücke bzw. zwischen dem Schwefel mit dem entsprechenden β -Kohlenstoffatom generiert. Anschließend wurde die Struktur über 100 Iterationsschritte unter Verwendung einer Dielektrizitätskonstante von 20 energieminiert und drauffolgend die Saccharid-Einheit mit Asn²⁰¹ unter Berücksichtigung der Torsionswinkel zwischen dem NH-Proton und dem anomeren Proton bzw. dem NH-Proton und dem H-2-Proton verknüpft. Die bestehenden Atomtypen wurden überprüft und korrigiert. Weiterhin wurde der C-Terminus als Amid, der N-Terminus als NH₃⁺-Gruppe und die Aminogruppe der Seitenkette des Lys⁴²⁹ ebenfalls als NH₃⁺-Gruppe dargestellt. Anschließend wurden die Ladungen mit Hilfe der Methode, die von Gassteiger und Marsili beschrieben wurde, zugewiesen. Die *distance range* und *torsion constraints* wurden wie auch in den DG-Rechnungen verwendet, wobei sie um diejenigen, die das Kohlenhydrat betreffen erweitert wurden. Das Strafpotential für die Abstandseinschränkung wurde auf 20 kcal/mol*Å², das Potential für die Winkelbeschränkung wurde auf 0.05 kcal/mol[°]² gesetzt. Die Struktur wurde anschließend im Vakuum über 1000 Iterationsschritte energieminiert und anschließend solvatisiert. Hieraus resultierte eine Wasserbox mit 1887 Wassermolekülen und einem Volumen von 44674 Å³. Nach einer darauffolgenden Energieminimierung der gesamten Wasserbox über 1000 Iterationsschritte wurde zunächst eine Simulation mit einer Dauer von 20 ps zur Relaxation der Wasserbox durchgeführt. Die aus dieser Simulation erhaltenen Endstrukturen zeigten keine großen

konformativen Abweichungen von den ursprünglichen Strukturen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Solvatation zu keiner starken Abweichung innerhalb der Konformation des Glycopeptids **86** geführt hat. Aus diesem Grund wurde die Endstruktur dieser MD-Simulation als Startstruktur für eine weitere Simulation verwendet, deren Zeitraum mit 300 ps bemessen wurde. Es zeigte sich, dass nach bereits 20 ps die potentielle Energie des Systems stabil blieb und sich im weiteren Verlauf nur noch geringfügig änderte.

Die aus dieser Simulation resultierende Endstruktur wurde im Folgenden mit der energieminierten Struktur vor dem Anknüpfen der GlcNAc-Einheit verglichen, um einen qualitativen Eindruck von der konformativen Veränderung durch die MD-Simulation im Verhältnis zu der rein durch DG-Rechnungen (und somit auf den NMR-Daten basierenden Struktur) erhalten Struktur zu bekommen (Abbildung 67).

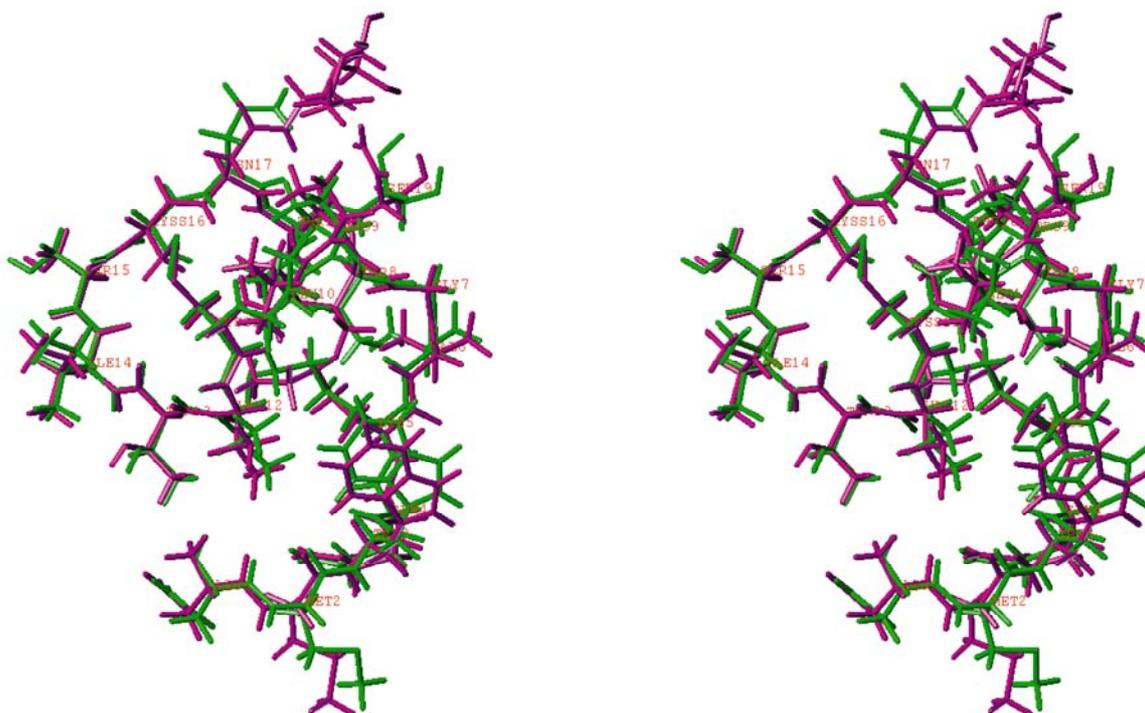


Abbildung 67: *crossed stereo view*. Grün: Struktur, die als Ausgangsverbindung aus der Strukturberechnung des Programm DYANA hervorging. Magenta: Die nach den Verknüpfung der Disulfidbrücke, der Modifikation des C-Terminus, der Amino-Gruppe des Lysins⁴²⁹, der Verknüpfung der GlcNAc-Einheit an das Asn²⁰¹, sowie der Energieminimierung und anschließender MD-Simulation hervorgegangene Struktur. Deutlich zu erkennen ist, dass die beiden Strukturen nur im Bereich des C- und N-Terminus, sowie im Bereich der Glycosylierungsstelle voneinander abweichen.

Es zeigen sich in weiten Teilen der Strukturen große Übereinstimmungen. So ist das gesamte *backbone* im Kernbereich der beiden Strukturen des Peptids (Gln⁴²⁸ bis Cys²⁰⁰) nahezu in Deckung zu bringen. Das *backbone* im Bereich des N- bzw. des C-Terminus weichen jedoch stark von der Ausgangsstruktur ab. Dies liegt darin begründet, dass diese

Bereiche nur durch *redundant dihedral angle constraints* vordefiniert worden waren, so dass die Strukturen in diesen Bereichen, die aus der DG-Rechnung hervorgingen sicherlich den *constraints*-Vorgaben genügten, jedoch nicht in der energetisch günstigsten Konformation vorlagen. Die Konformation im Bereich der Seitenketten weist hingegen eine teils starke Abweichung von der Startstruktur auf. So ist der Indolring des Trp⁴²⁷ in seiner relativen Position zur Startstruktur um bis zu 1.31 Å verdreht, wodurch sich der Abstand zu den Protonen der γ -Methylgruppe des Val¹²⁷ von 2.54 Å auf 3.04 Å erhöht. Jedoch liegt auch der neue Abstand der beiden Protonen zueinander in den durch den *constraint* definierten Grenzen von 2.5-3.5 Å.

Starke Abweichungen in den beiden Strukturen finden sich in dem Bereich des Asn²⁰¹. Dies lässt sich durch die neu eingeführte GlcNAc-Einheit und die damit verbundenen neuen *constraint* erklären. Der Abstand des amidischen Protons der NHAc-Gruppe und der γ -Protonen des Pro¹²⁴ wurden mit einem *distance constraint* von 1.8-2.5 Å festgelegt, wodurch die Seitenkette des Asn²⁰¹ stark von seiner ursprünglichen Position verdreht werden musste, um diesen *constraint* zu erfüllen. Diese konformative Änderung der Seitenkette zieht ebenfalls eine Konformationsänderung der C-terminalen Aminosäuren Thr²⁰² und Ser²⁰³ mit sich, da diese durch die eingegebenen *torsion constraints* in ihrer Konformation eingeschränkt sind.

Eine zusätzliche Begründung für die ausgeprägte konformative Änderung innerhalb der beiden Strukturen ist die Ausbildung eines weit verzweigten Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen der GlcNAc-Einheit und den C-terminalen Aminosäure, sowie mit dem C-Terminus an sich. In Abbildung 68 sind die von dem Programm SYBYL deklarierten potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen der glycosylierten Struktur und der Startstruktur dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass insbesondere der Ringsauerstoff der GlcNAc-Einheit und der Sauerstoff der 6-OH-Gruppe in einem Geflecht aus Wasserstoffbrückenbindungen im Speziellen mit der Amid-Gruppe des C-Terminus, involviert sind.

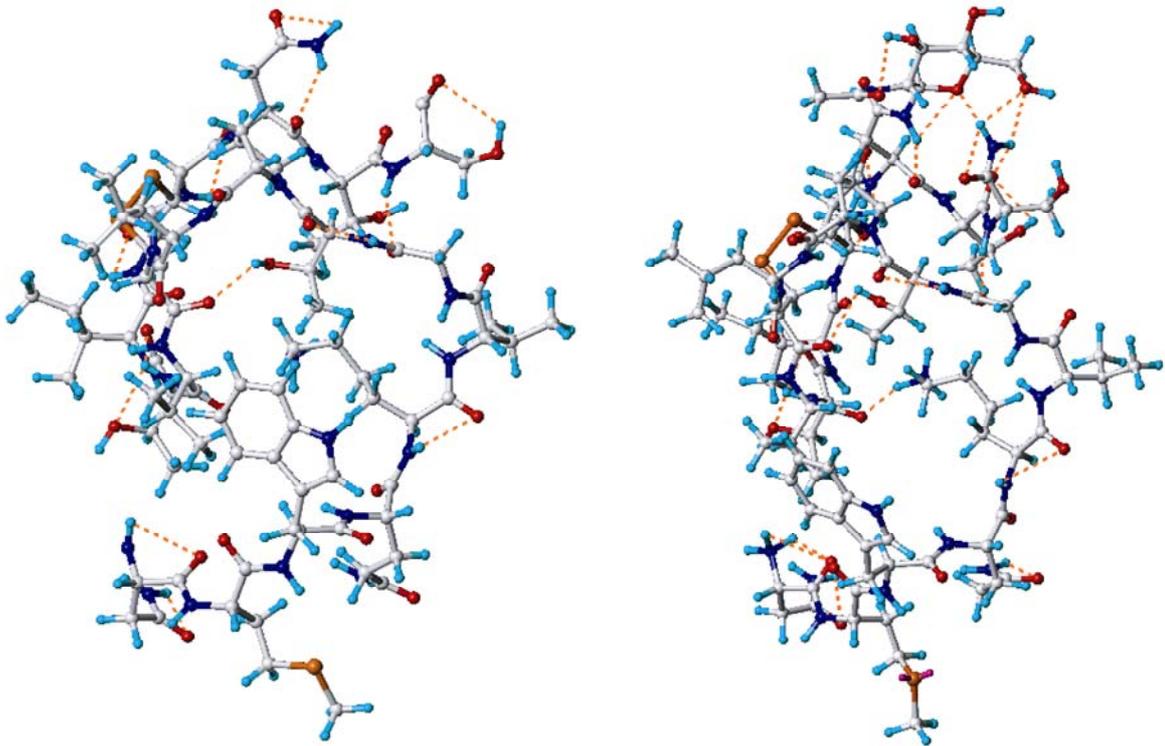


Abbildung 68: Darstellung der von dem Programm SYBYL deklarierten, potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen. **Links:** Struktur aus der DG-Rechnung des Programms DYANA. **Rechts:** Die nach der MD-Simulation erhaltene Struktur des zyklischen Glycopeptids **86**. Deutlich zu erkennen ist, dass neben den bei der DYANA-Struktur bereits vorhandenen potentiellen Wasserstoffbrückebindungen die GlcNAc-Einheit der MD-Simulation in ein ausgeprägtes Wasserstoffbrückenbindungssystem integriert ist und somit die Struktur stabilisiert wird.

Eine Analyse der gesamten, über die Moleküle verteilten, potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen der jeweiligen Strukturen ergab, dass sie sich im Muster nur in den in Abbildung 68 aufgezeigten Bindungen unterscheiden und sonst konserviert sind. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um Wasserstoffbrückenbindungen zwischen peptidischen NH-Protonen und dem Sauerstoff der Carbonylgruppe bzw. der Hydroxylgruppe (im Falle von Ser bzw. Thr) der gleichen Aminosäure. Hervorzuheben sind nur zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen Aminosäuren innerhalb der Strukturen ausgebildet werden. Hierbei handelt es sich um die Bindung zwischen der Ammoniumgruppe der Lys⁴²⁹-Seitenkette und dem Carbonyl-Sauerstoff der Peptidbindung des Val¹²⁷ bzw. um die zwischen dem Proton der Seitenkettenhydroxylgruppe des Thr¹²³ und dem Carbonyl-Sauerstoff der Peptidbindung des Cys¹²⁶. Diesen Bindungen kommt vermutlich eine den Peptiden strukturgebende Rolle zu, so dass diese sich über den Verlauf der Modifikationen, Minimierungen und nachfolgenden MD-Simulationen hinweg nicht verändert haben.

Die Endstruktur der MD-Simulation des Glycopeptids **86** kann als grundlegende räumliche Struktur genutzt werden, um das bekannte Bindungsepitop der Liganden **16-23** mit der Kohlenhydrat-Einheit zu verbinden.

4.3 Entwicklung, Synthese und Analyse neuartiger Glycopeptidomimetika

Die aus der MD-Simulation hervorgegangene Struktur für das Glycopeptid **86** konnte nun genutzt werden, um den Abstand zwischen dem Pro¹²⁶ des Dekapeptids und der GlcNAc-Einheit zu bestimmen. Aus diesem Abstand wurde eine geeignete Linkerlänge für das Anknüpfen einer GlcNAc-Einheit an die Grundstruktur der Liganden **16-23** bestimmt. In Abbildung 69 ist der Ausschnitt des Glycopeptids **86** mit Pro¹²⁴ und GlcNAc gezeigt.

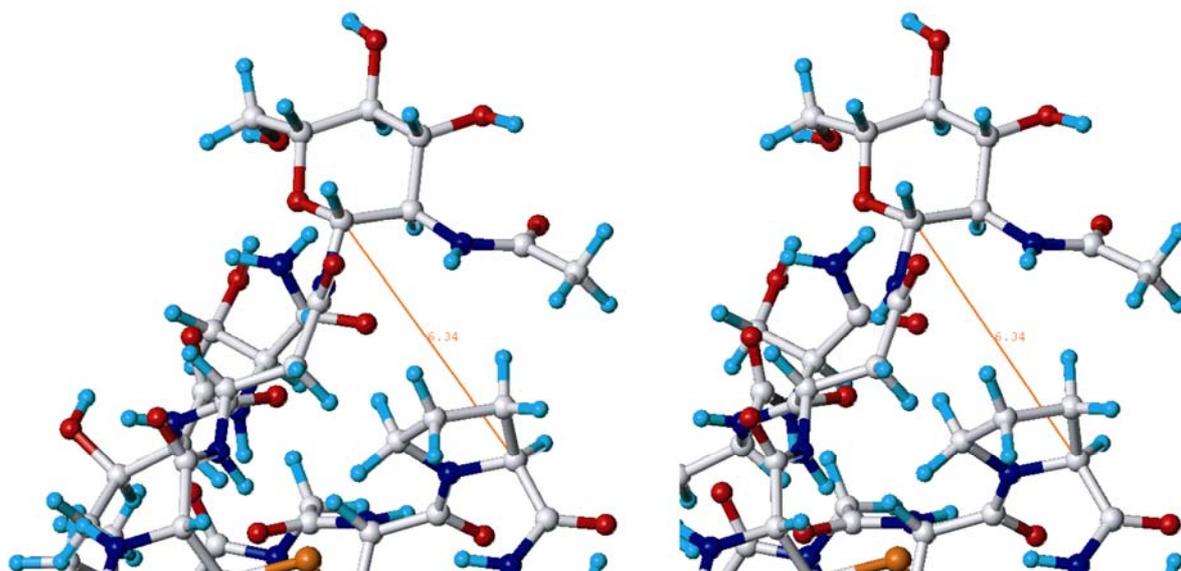


Abbildung 69: *crossed stereo view* eines Ausschnittes der aus der MD-Simulation hervorgegangenen Struktur des Glycopeptids **86**. In orange ist der Abstand zwischen dem α -Kohlenstoff des Pro¹²⁴ und dem anomeren Kohlenstoff des GlcNAc aufgezeichnet. Er beträgt in dieser Struktur 6.34 Å.

Da in den Ligandenstrukturen das L-Prolin durch ein L-Alanin-Derivat substituiert wurde, wurde die Bestimmung des Abstandes zwischen dem *backbone* des Peptides und GlcNAc-Einheit bestimmt. Für die MD-Simulationsstruktur des Glycopeptides **86** konnte ein Abstand von 6.34 Å zwischen dem α -Kohlenstoffatom des Pro¹²⁴ und dem anomeren Kohlenstoffatom der GlcNAc-Einheit bestimmt werden. Ausgehend von der oben genannten Substitution des L-Prolins wurde das L-Alaninol der Liganden als potentieller Ausgangspunkt für den Linker zum Kohlenhydrat gewählt. Im Allgemeinen wurde eine Linkerstruktur gewählt, die keine zusätzliche (oder nur geringe) Wechselwirkungen zum CD4-Protein auszubilden. Die Kohlenhydrat-Einheit sollte, wie im natürlichen Glycopeptid, über eine Amid-Bindung an den Linker verknüpft sein, um die native Struktur zu mimikrieren. Unter diesen Voraussetzungen konnte davon ausgegangen werden, dass Veränderungen der

Bindungskonstanten im Verhältnis zu den Liganden **16-23** vorwiegend auf die Einführung der Kohlenhydrat-Einheit zu Stande kommt.

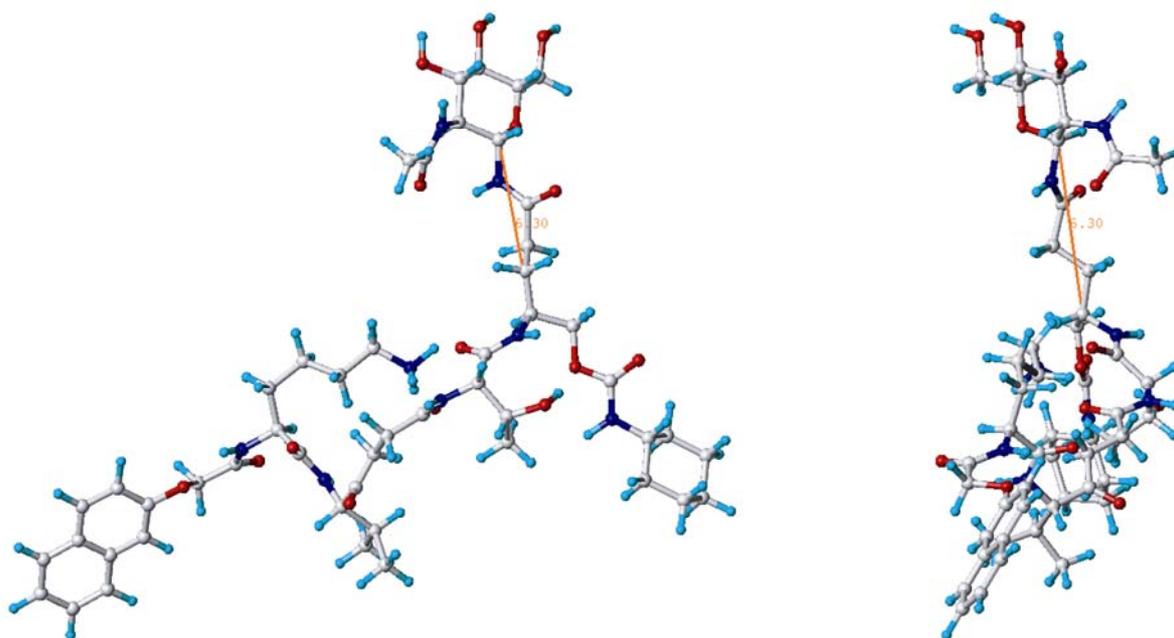
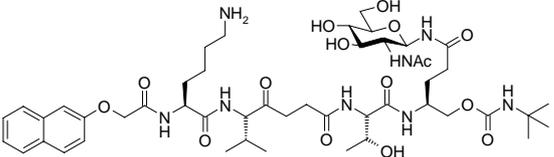
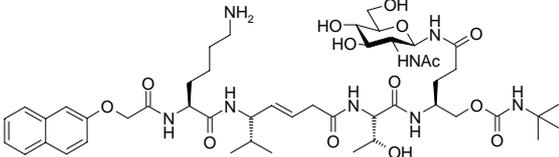
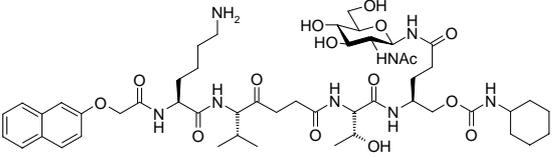
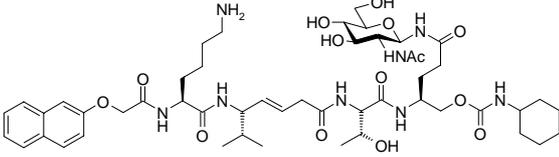
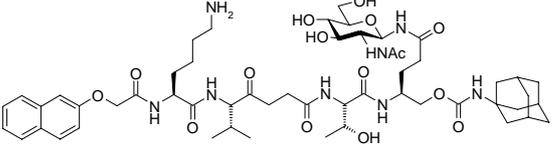
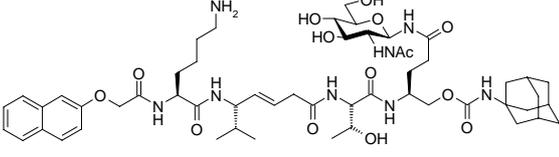
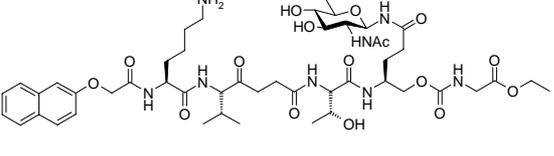
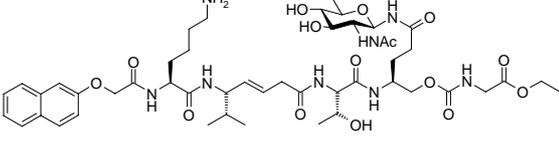


Abbildung 70: Orthogonale Darstellung des energieminierten, neuen Glycopeptidomimetikums **92**. Innerhalb dieses Liganden wird das bekannte Bindungssepitop der Liganden **16-23** mit der für die Bindung zum CD4-Protein relevanten GlcNAc-Einheit verbunden. Der Abstand des Liganden-*backbones* (α -Kohlenstoffs des L-Glutaminols) zum anomeren Kohlenstoff des GlcNAc beträgt 6.30 Å und hat damit denselben Abstand wie im Glycopeptid **86**. Diese Struktur mimikriert somit ideal die Struktur des Glycopeptids **86**.

Für die Berechnung des geeigneten Abstandes zwischen Ligand-*backbone* und anomeren Kohlenstoff des GlcNAc wurde die gedockte Struktur des Liganden **17** verwendet. Die für den Linker vorgenommenen Überlegungen konnten am Besten durch die Verwendung eines L-Glutaminol-Derivats realisiert werden (vgl. Abbildung 70). Diese Seitenkette erfüllt die Voraussetzung nahezu ideal. Die Torsionswinkel der amidischen NH-Protonen zum anomeren Proton, respektive zum H-2-Proton, wurden analog zu denen im Glycopeptid **86** gewählt. Im Abschluss wurde die neu erhaltene Struktur **92** über 100 Schritte energieminiert und der Abstand der Kohlenstoffe zueinander gemessen. Der in Abbildung 70 gezeigte Abstand zwischen dem α -Kohlenstoffatom und dem anomeren Kohlenstoff konnte mit 6.30 Å bestimmt werden und entspricht dem Abstand, der im Glycopeptid **86** mit NMR-Spektroskopie und *Modeling* bestimmt werden konnte. Durch Substitution des L-Alaninols durch ein L-Glutaminol kann eine Strategie zur Darstellung dieser neuen Glycopeptidomimetika, analog der Synthese der Liganden **16-23** durchgeführt werden. Ziel war es acht Liganden mit Kohlenhydraten herzustellen. Die daraus resultierenden Liganden sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Aus den MD-Simulation hervorgegangene Liganden. Die Liganden **91-94** beinhalten als *backbone*-Modifikation die Carbapeptideinheit $\text{H}_2\text{N-Val}\Psi[\text{COCH}_2]\text{-Gly-OH}$; Liganden **95-98** hingegen beinhalten $\text{H}_2\text{N-Val}\Psi[\text{CHCH}]\text{-Gly-OH}$. Innerhalb der jeweiligen Klasse wurden unterschiedliche Carbamatreste verwendet, um den etwaigen Einfluss verschiedener hydrophober Reste abschätzen zu können.

Nr.	Nr.
 91	 95
 92	 96
 93	 97
 94	 98

4.3.1 Synthese neuartiger, unnatürlicher Monosaccharid-Aminosäuren

In Analogie zu der Darstellung der Liganden **16-23** wurde für die Synthese der Liganden **91-98** ein konvergenter Ansatz gewählt. Zu diesem Zweck wurde die Synthese der geschützten Peptidomimetika **77** und **78** (Abschnitt 4.1.7) unverändert durchgeführt. Die Synthese der unterschiedlichen glycosylierten L-Glutamol-Carbamate **99-102** sollte ebenfalls in Analogie zu der Synthese der entsprechenden L-Alaninol-Bausteine **73-76** erfolgen. Die für die Synthese dieser Bausteine erforderliche Glycosylierungsreaktion sollte unter denselben Bedingungen durchgeführt werden, wie bei der Darstellung des Fmoc-geschützten Asparagin-Bausteins **79** für die Synthese der Glycopeptide **82**, **84** und **86**. Das vorgesehene Syntheschema ist in Abbildung 71 dargestellt.

Für die Synthese der Bausteine **99-102** wurde von der kommerziell erhältlichen Fmoc-Glu(^tBu)-OH **103** ausgegangen. Diese geschützte Aminosäure ist mit konvergenten Schutzgruppen an der primären Aminofunktion und der Seitenketten-Carboxylfunktion versehen, so dass eine selektive Entschützung, respektive Umsetzung der einzelnen funktionalen Gruppen, möglich ist.

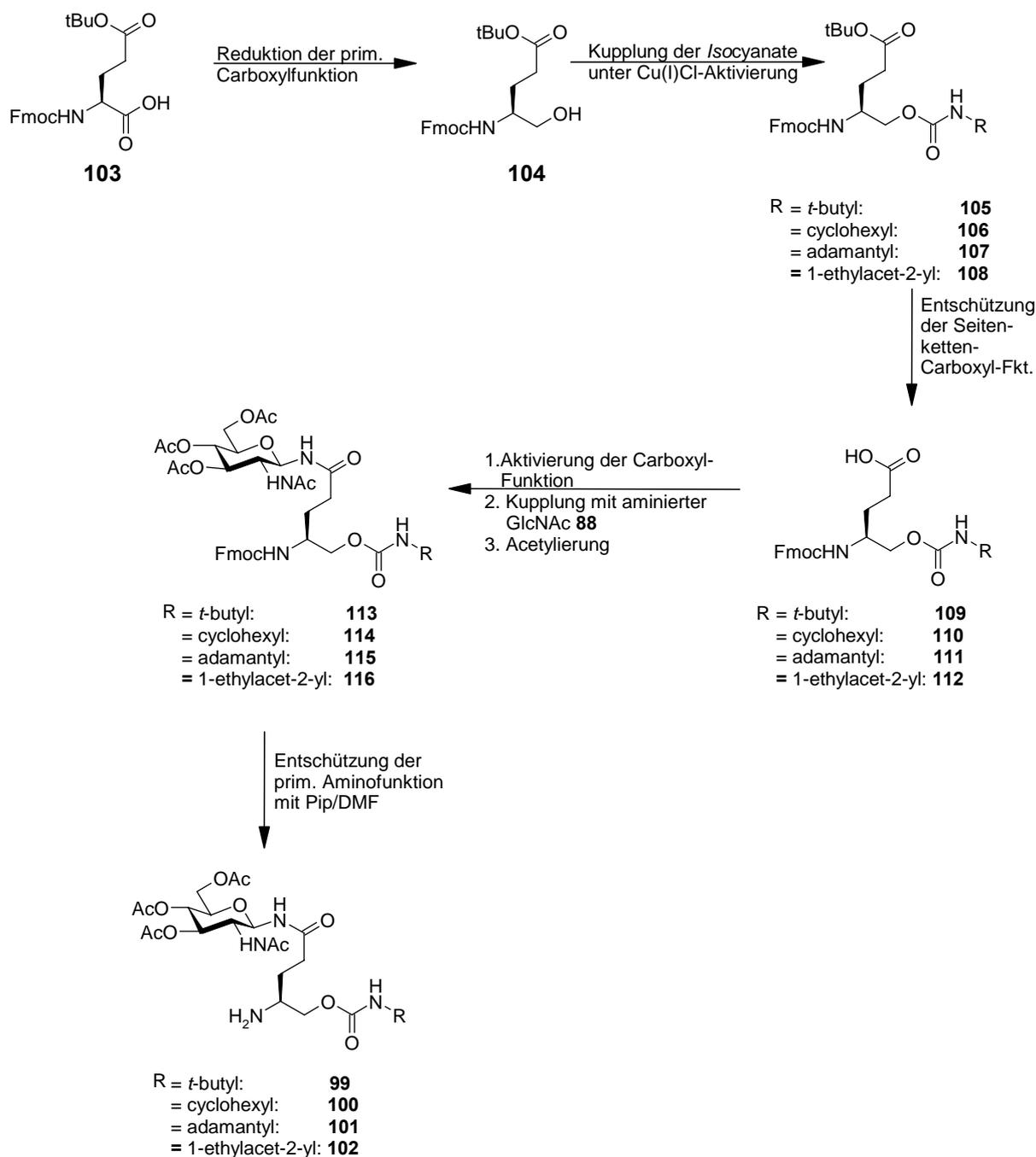


Abbildung 71: Syntheseplanung für die Darstellung der glycosylierten Carbamatbausteine **99-102** zur konvergenten Synthese der Glycopeptidomimetika **91-98**. Die Darstellung sollte in Analogie zu der Darstellung der L-Alanin-Derivate **73-76** erfolgen. Die Glycosylierungsreaktion sollte wie bei der Darstellung des GlcNAc-Bausteins **90** durchgeführt werden.

Die Reduktion der primären Carboxylfunktion wurde unter Verwendung von IBCF und NaBH₄ direkt nach einer Vorschrift von Boeijen *et al.* durchgeführt.¹⁷⁵ In der Vorschrift stand beschrieben, dass nach der erfolgten Zugabe von Wasser zur abschließenden Hydrolyse das Produkt als farbloser Feststoff ausfallen sollte, der anschließend abfiltriert werden konnte. Dies war bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Darstellungen nicht der Fall. Aus diesem Grund wurde ein alternatives Aufarbeitungsprotokoll durchgeführt. Zunächst wurde die Reaktionslösung mit größeren Mengen Wasser als vorgeschrieben hydrolysiert und die wässrige Phase anschließend mehrfach mit Chloroform extrahiert. Hierbei war eine nur sehr langsame Phasentrennung zu beobachten. Nach dem darauffolgenden Trocknen und anschließenden der säulen-chromatographischen Reinigung des Rohproduktes konnte der gewünschte Alkohol mit einer Ausbeute von 82% erfolgreich isoliert werden. Um zu untersuchen, ob diese alternative Aufarbeitungsmethode die Stereochemie am ehemaligen α -Kohlenstoffatom beeinflusst hat, wurde ein Drehwert der Verbindung gemessen, der mit -23.1° ($c = 1.5$, MeOH; gemessen bei 25°C und $\lambda = 589\text{ nm}$) dem in der Literatur bekannten Drehwert entspricht.¹⁹⁹ Im Anschluss erfolgte unter Verwendung von Kupfer(I)chlorid die Kupplung mit dem *tert*-Butylisocyanat zum gewünschten Produkt **105**.

Im Verlauf der säulenchromatographischen Reinigung des Rohproduktes konnte das Produkt **105** mit einer Ausbeute von 30% isoliert werden. Dies entspricht den Ausbeuten, die beim L-Alaninol erhalten wurden. Hier gelang es jedoch nicht, unumgesetztes L-Glutamol wiederzugewinnen.

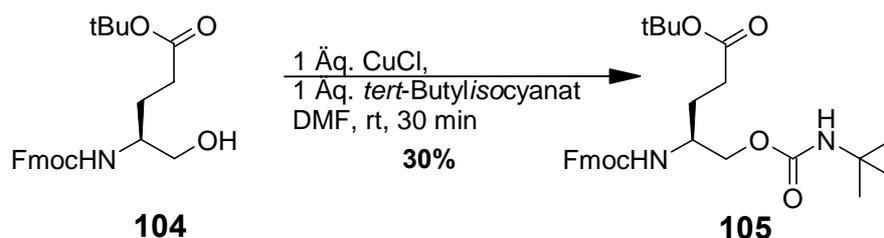


Abbildung 72: Darstellung des L-Glutamol-Derivates **105** unter Verwendung von Kupfer(I)chlorid. Nach vollendeter Reaktion war es im Gegensatz zu den Synthesen der Carbamate **73-76** nicht möglich, um umgesetztes Edukt **104** zurückzugewinnen.

Die dünnschichtchromatographische Analyse der Reaktionslösung ergab neben dem Produkt-Spot ($R_f = 0.33$, (PE/EE 7:3)) mehrere UV-aktive, nicht voneinander trennbare Spots mit R_f -Werten zwischen 0.5-0.6. Ein Edukt-Spot konnte nicht identifiziert werden. Eine Optimierung der Bedingungen gelang jedoch nicht.

Spino *et al.* berichteten vor kurzem über einen neuen Katalysator für die Umsetzung von sterisch gehinderten und empfindlichen *Isocyanaten* mit Alkoholen.²⁰⁰ Abweichend von der Vorschrift wurde das toxische Benzol gegen Toluol als Lösungsmittel ausgetauscht. Hier konnte nach einer Stunde Reaktionszeit lediglich Edukt nachgewiesen werden. Auffällig war bei der Reaktion die Bildung eines transparenten, gelartigen Feststoffs in der Reaktionsmischung zehn Minuten nach Beginn der Reaktion, was auf Bildung von Titanhydroxid schließen ließ. Wasser schien also den Katalysator zu inaktivieren. Feuchtigkeit wurde bei beiden Reaktionen nicht ausgeschlossen, da Spino *et al.* für ihre Reaktionen kein Schutzgas oder absolutierte Lösungsmittel verwendet haben. Der Grund lag in dem verwendeten Lösungsmittel: Toluol löst 5% Wasser, Benzol nur 0.8 %. Bei einer 0.02 M Lösung des Katalysators in technischem Toluol bedeutete dies einen zehnfachen Überschuss an Wasser, was das Nichtgelingen der Reaktion erklärte.

Da die von Spino *et al.* beschriebenen Reaktionen an anderen Systemen stattfanden, wurde nach einer besseren Möglichkeit gesucht, den Reaktionsverlauf zu verfolgen, um gegebenenfalls die Bedingungen, insbesondere Reaktionszeit und -temperatur, anpassen zu können. Eine *online*-Reaktionsverfolgung per ¹H-NMR-Spektroskopie erschien passend. Dabei wurde zunächst ein Spektrum des gelösten Alkohols aufgenommen, ein weiteres nach Zugabe des *Isocyanats* und das dritte nach der Zugabe des Katalysators. Zwischen dem Zeitpunkt der Zugabe und Messung des Reaktionsgemischs lagen zwei bis drei Minuten, die zum Homogenisieren des Magnetfeldes benötigt wurden.

Anschließend wurde über eine Stunde alle fünf Minuten ein ¹H-Spektrum aufgenommen. Der erste Versuch mit Fmoc-L-Alaninol, das weniger aliphatische Signale gibt als L-Glutamol, Benzol-*d*⁶, Cyclohexylisocyanat und Tetra-*tert*-butoxytitan(IV), lieferte keine verwertbaren Ergebnisse, wofür es verschiedene Gründe gab: Zunächst löste sich das polarere Alaninol nicht vollständig in Benzol, dann bereitete die Zuordnung der Cyclohexylsignale, die sich während der Reaktion am stärksten verändern sollten, Schwierigkeiten. Folglich wurde für den zweiten Versuch das besser lösliche L-Glutamol **104** sowie *tert*-Butylisocyanat, welches im ¹H-NMR-Spektrum ein intensives Singulett liefert, gewählt. Die Reaktionsverfolgung wurde analog dem ersten Versuch durchgeführt, wobei nach 60 Minuten Reaktionszeit weitere 0.9 Äquivalente des Katalysators hinzugegeben wurden, um zu sehen, ob stöchiometrische Mengen an Tetra-*tert*-Butoxytitan(IV) einen Fortschritt der Reaktion bewirken.

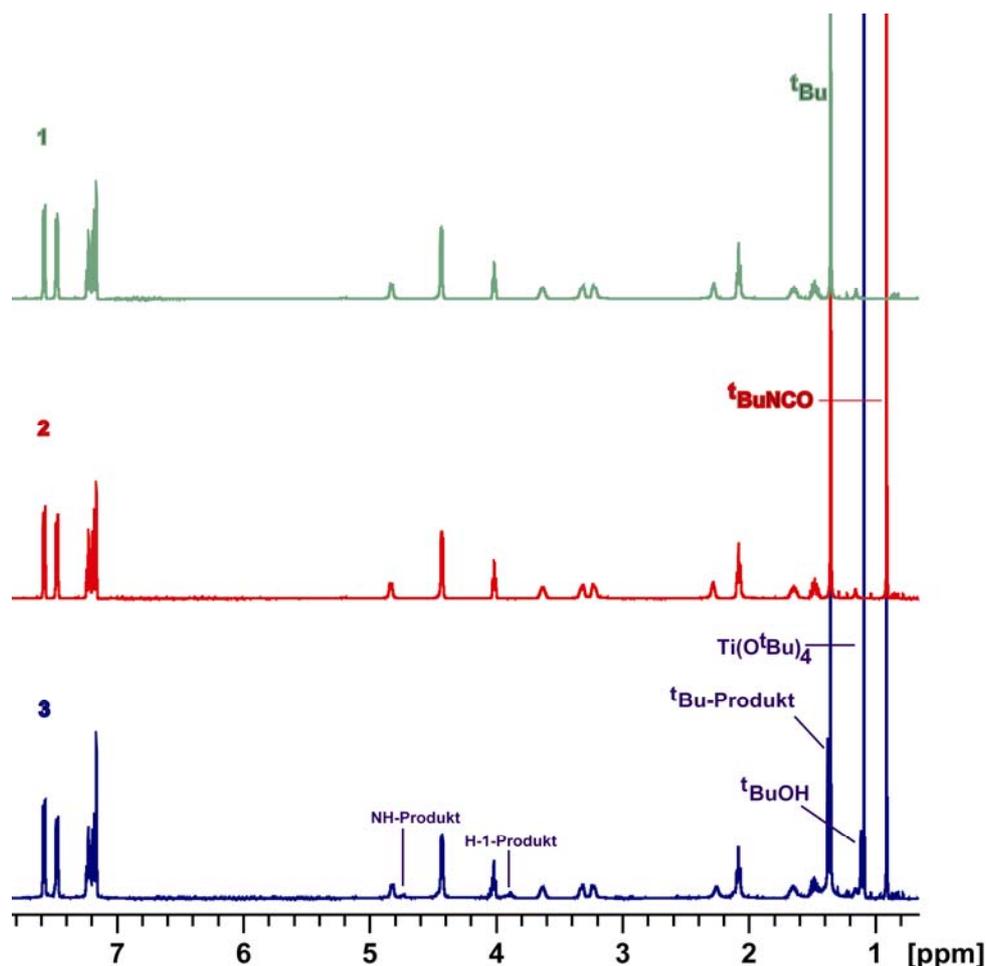


Abbildung 73: ^1H -NMR-Spektren der Reaktionsverfolgung von L-Glutamol **104** mit *tert*-Butylisocyanat unter Katalyse von Tetra-*tert*-butoxytitan(IV) in Benzol. **Oben** (grün): Zuordnung der Signale vom L-Glutamol **104**, **Mitte** (rot): Nach Zugabe von *tert*-Butylisocyanat ist das zu erwartende zweite *tert*-Butylsignal erkennbar, alle anderen Signale verändern sich nicht. **Unten** (blau): Nach der Zugabe des Katalysators sind die ersten Signalveränderungen erkennbar, am deutlichsten an den intensiven *tert*-Butylsignalen

Abbildung 73 zeigt in grün das zugeordnete ^1H -Spektrum des Edukts **104**, in rot das Spektrum des Reaktionsgemischs nach Zugabe des *Isocyanats*. Wie erwartet lagen die Signale der Reaktanden unverändert nebeneinander vor, es fand also in Abwesenheit des Katalysators keine Reaktion statt. In blau ist das Spektrum der Reaktionsmischung zwei Minuten nach Zugabe des Katalysators gezeigt. Neue Signale, gut zu erkennen an den intensiven Singulets der *tert*-Butylgruppen, sind sichtbar. Um den Reaktionsfortschritt zunächst qualitativ beurteilen zu können, wurden die Fmoc-*NH*-Signale von Edukt und Produkt herangezogen. Sie liegen von den anderen Signalen gut separiert vor. Die chemische Verschiebung ändert sich vom L-Glutaminol **89** (4.83 ppm) zum Carbamat **90** (4.71 ppm) signifikant, sodass sich die Veränderung beider Signale über die Reaktionszeit bequem beobachten lässt. Die Fmoc-*NH*-Signale ausgewählter Spektren sind in Abbildung 74 gezeigt.

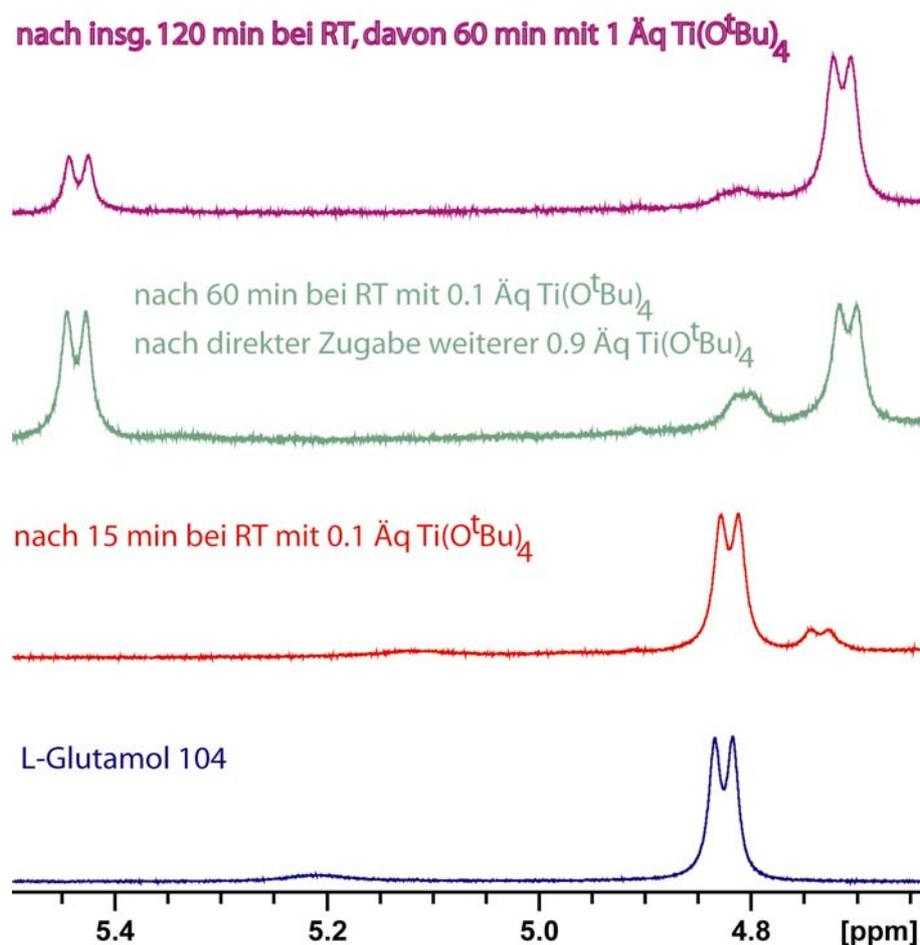


Abbildung 74: Fmoc-NH-Signale der Reaktionsmischung nach 15 Minuten Reaktionszeit (rot), 60 Minuten Reaktionszeit und direkt nach der Zugabe von weiteren 0.9 Äq. Katalysator (grün), nach 60 Minuten Reaktion mit 0.1 Äq. Katalysator und weiteren 60 Minuten mit 1.0 Äq. Katalysator (violett). Das auftretende Dublett bei $\delta = 5.45$ ppm konnte nicht mehr nachgewiesen werden, nachdem die Temperatur der Probe auf 320 K erhöht wurde, somit wurde davon ausgegangen, dass es sich um Rotamere Fmoc-NH-Signale handelt, die in der Betrachtung der Reaktionsverfolgung jedoch nicht mit in Betracht gezogen wurden.

Es wurde bei der Betrachtung der Fmoc-NH-Signale folgendes beobachtet: Das Produktsignal ist unmittelbar nach Zugabe des Katalysators zu detektieren, sein Integral nimmt aber nur 15 Minuten (Edukt/Produkt 4:1). Dies lässt darauf schließen, dass die Reaktion nach 15 Minuten abgeschlossen ist und 0.1 Äq. Katalysator nicht ausreichen, um 1.0 Äq. L-Glutamol **104** umzusetzen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden nach 60 Minuten weitere 0.9 Äq. Katalysator hinzugegeben, sodass insgesamt eine stöchiometrische Menge an Tetra-*tert*-butoxytitan vorlagen. Im unmittelbar nach der Zugabe aufgenommenen Spektrum ist ein deutlicher Zuwachs des Produktsignals zu sehen. Das Verhältnis von Edukt zu Produkt beträgt laut Integral etwa 1:3. Die Entwicklung des Produkt/Edukt-Verhältnisses mit der Zeit ist in Abbildung 75 gezeigt.

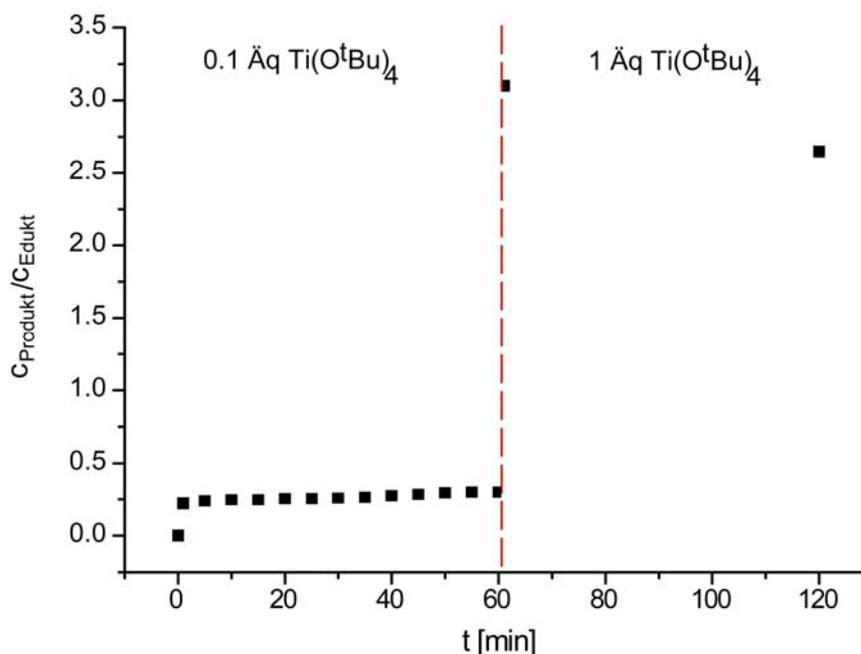


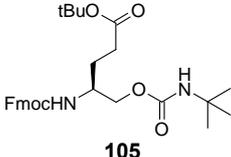
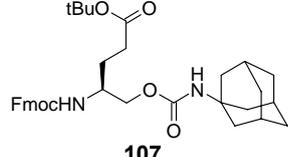
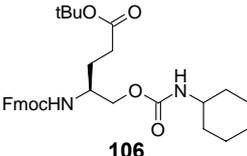
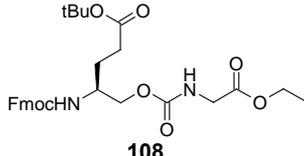
Abbildung 75: Entwicklung des Verhältnisses Produkt/Edukt mit der Reaktionszeit. Das Verhältnis wurde über die Integrale der Fmoc-NH-Signale bestimmt. Die gestrichelte rote Linie markiert die Zugabe von weiteren 0.9 Äq. des Katalysators.

Die Reaktionsmischung aus der NMR-Reaktionsverfolgung wurde aufgearbeitet und säulenchromatographisch getrennt. Neben wenig Edukt **104** und dem gewünschten Carbamat **105** konnte noch eine weitere, unbekannte Substanz mit $R_f = 0.63$ (PE/EE 2:1 v/v) isoliert werden. Die Ausbeute konnte aufgrund der geringen Menge nicht quantifiziert werden.

Die Reaktion wurde anschließend erfolgreich zur Synthese der entsprechenden Cyclohexyl- und Adamantylcarbamate durchgeführt, wobei absolutes Toluol als Lösungsmittel verwendet wurde und gemäß der Ergebnisse aus der NMR-Reaktionsverfolgung stöchiometrische Mengen an Tetra-*tert*-butoxytitan(IV).

Die aus dieser Analyse erhaltenen Daten wurden anschließend auf die Synthese der Carbamate **105-108** übertragen. Hierfür wurden unter Stickstoffatmosphäre das L-Glutaminol **104** mit einem Äquivalent des Katalysators und einem Äquivalent des entsprechenden Isocyanats umgesetzt. Bei Aufarbeitung der Reaktionslösung wurde abweichend von der Vorschrift von Spion *et al.* mit einem großen Volumen an Ammoniumchlorid-Lösung gearbeitet und das dadurch entstehende Titanhydroxid abfiltriert und mehrfach mit DCM gewaschen. Die isolierten Ausbeuten der jeweiligen Reaktionen zur Darstellung der Carbamate **105-108** sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Isolierte Reaktionsausbeuten der L-Glutamol-Derivate **105-108**. Die Reaktionen wurden unter Verwendung des Katalysators $\text{Ti}(\text{O}^t\text{Bu})_4$ durchgeführt.

L-Glutamol-Derivat	Ausbeute [%]	L-Glutamol-Derivat	Ausbeute [%]
 <p>105</p>	60	 <p>107</p>	64
 <p>106</p>	65	 <p>108</p>	67

Die Ausbeuten sind bei allen Reaktionen mit 60-67% akzeptabel. Insgesamt konnten mit diesem Protokoll die Ausbeuten verdoppelt werden.

Im Anschluss an die Darstellungen der Carbamate **105-108** wurde der *tert*-Butylester der Seitenketten-Carboxylfunktion unter Verwendung von TFA/ H_2O (*v/v* 19:1) hydrolysiert. Nach 30 minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die TFA durch mehrfaches koevaporieren mit Toluol und Methanol entfernt. Nach anschließender säulenchromatographischer Reinigung konnten die entsprechenden freien Carbonsäuren **109-112** mit Ausbeuten von 89-99% isoliert werden.

Die anschließende Glycosylierungsreaktion mit dem aminierten β -GlcNAc-Baustein **88** wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt wie die Darstellung des Asparagin-Bausteins **89**. Das Kohlenhydrat wurde in DMF gelöst und die Lösung auf $-15\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Anschließend wurde die entsprechende, mit TBTU/DIPEA aktivierte Carbonsäure **109-112** zugetropft und für weitere sechs Stunden bei $-15\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Hierbei sind die niedrigen Temperaturen notwendig, um eine chemoselektive Umsetzung der Säure mit der Aminofunktion des Kohlenhydrats zu gewährleisten.^{192;198} Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit Ac_2O /Pyridin (*v/v* 3:2) versetzt, um das Kupplungsprodukt *in situ* über Nacht zu acetylieren. Eine dünnschichtchromatographische Analyse der Reaktionslösung zeigte neben dem entsprechenden Produkt-Spot eine Vielzahl von Nebenprodukten, die die Reinigung des Rohproduktes erschwerten. Die zunächst durchgeführte säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes führte zu keinem Erfolg. Es wurden unterschiedlichste Verhältnisse an CHCl_3 /MeOH sowohl isokratisch, als auch als Gradient

verwendet. Hierbei eluierten die jeweiligen Produkte stets zusammen mit Nebenprodukten, deren Identität mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden konnte.

Da die Reinigung alleine über die säulenchromatographische Trennung nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde in Analogie zu der Kupplungsreaktion zum geschützten Asparagin-Baustein **89** das Rohprodukt der einzelnen Bausteine **94-97** aus Ethanol umkristallisiert. Hierdurch wurde die Anzahl der Nebenprodukt-Peaks stark verringert, wodurch eine anschließende Trennung der glycosylierten Bausteine **113-116** durch Säulenchromatographie möglich wurde. Die Ausbeuten der Kupplungsreaktion waren jedoch mit 14-30% nicht zufriedenstellend. Die geringen Ausbeuten können nur durch das Aufarbeitungsprotokoll erklärt werden, da die Kupplungs- bzw. Acetylierungsbedingungen denen entsprechen, die auch für die Darstellung des Asparagin-Bausteins **89** verwendet werden. Die Problematik scheint bei der Umkristallisation zu liegen, da die entsprechenden acetylierten Kupplungsprodukte auch sehr gut in Ethanol löslich waren und dies dadurch (auch unter mehrmaligem Umkristallisieren) zu hohen Verlusten in den Ausbeuten führte. Die Wahl eines alternativen Lösungsmittels zum Umkristallisieren wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen. Stattdessen wurde eine alternative Darstellungsmethode versucht zu etablieren.

Meinjohanns *et al.* berichteten von der Synthese von *N*-Glycopeptiden, wobei für die Verknüpfung des aminierten Kohlenhydrats an die L-Asparaginsäure nicht das TBTU/DIPEA-Protokoll verwendet wurde.¹⁹⁰ In diesen Arbeiten wurde der Aktivester nicht *in situ* gebildet, sondern in einem vorgeschalteten Syntheseschritt ein isolierbarer Aktivester dargestellt. Hierbei handelt es sich um den 3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-Aktivester (ODhbt-Ester).²⁰¹ Zur Darstellung dieses Aktivesters wurde Verbindung **111** in abs. THF gelöst und bei -20 °C zunächst mit DCC und anschließend mit Dhbt-OH umgesetzt (Abbildung 76). Nach erfolgter säulenchromatographischer Reinigung konnte der ODhbt-Ester **118** der Verbindung **111** erfolgreich isoliert. Die Ausbeute der Synthese war mit 45% durchschnittlich, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter optimiert. Die darauffolgende Umsetzung des ODhbt-Esters **117** mit dem aminierten Glucosamin **88** wurde analog zu den von Meinjohanns *et al.* publizierten Bedingungen in DMSO als Lösungsmittel durchgeführt. Bei der anschließenden Reinigung des Rohproduktes mittels *RP*-HPLC konnte jedoch kein Produkt **115a** isoliert werden. Eine mögliche Erklärung für die erfolglose Darstellung der Verbindung **115a** über den ODhbt-Ester **117** könnte im Ester an sich begründet liegen. Die Analyse des ¹H-NMR-Spektrums ergab, dass neben den Signalen, die eindeutig dem Ester **117** zuzuordnen waren, zwei weitere Signale bei 12.92 bzw. 12.04 ppm

auftraten. Die Identität dieser beiden Singulets konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. In diesem Bereich kommen normalerweise NH-Protonen von Heteroaromaten bzw. Protonen von OH- oder NH-Gruppen, die Wasserstoffbrückenbindungen zu Carbonylsauerstoffen ausbilden. Jedoch konnte keine solche Verbindung durch Massenspektrometrie bzw. ^{13}C -NMR-Spektroskopie identifiziert werden. Aufgrund des Fehlschlagens dieser Syntheseroute wurden die geringen Ausbeuten aus den Kupplungsreaktionen mit TBTU/DIPEA akzeptiert.

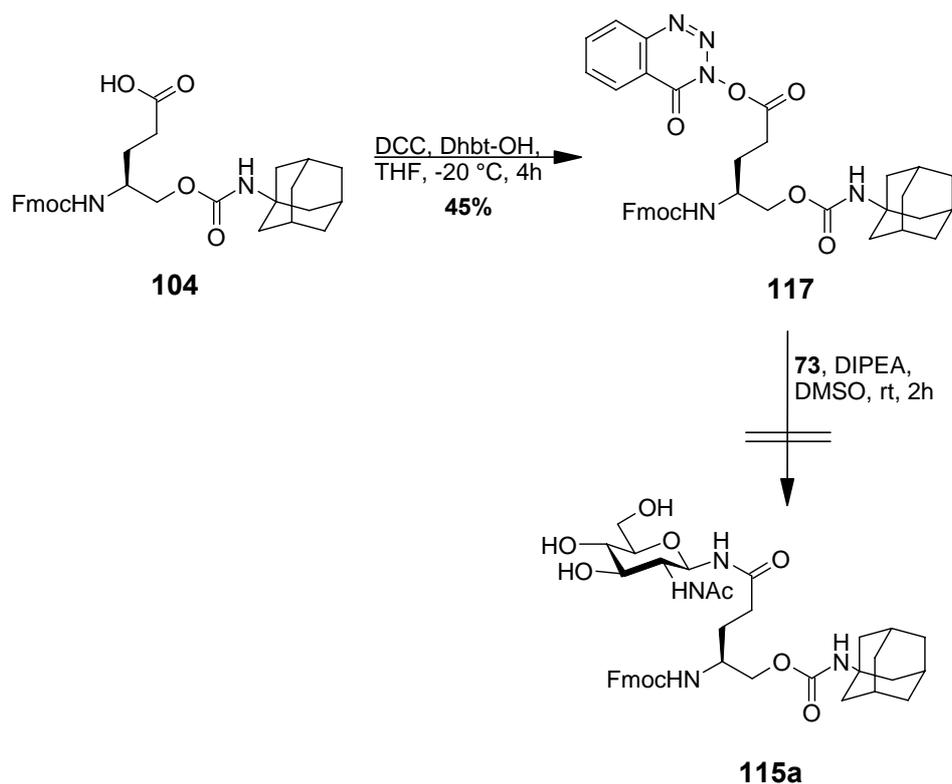


Abbildung 76: Versuch der Darstellung des glycosylierten Bausteins **115a** mittels des isolierbaren Aktivesters **117**. Der gewünschte Dhbt-Aktivester ließ sich in zufriedenstellenden Ausbeuten darstellen, wobei die Reaktion mit dem aminierten GlcNAc **88** mit DIPEA in DMSO fehlschlug. Dies wurde durch nicht identifizierte Salze erklärt, deren Signale im ^1H -NMR-Spektrum von **117** beobachtet werden konnten.

Die Fmoc-geschützten, glycosylierten Bausteine **113-116** wurden im nächsten Schritt der Syntheseroute mit Piperidin/DMF (1:4 v/v) versetzt, um die Fmoc-Gruppe zu entfernen. Die Ausbeuten der jeweiligen Entschützung verliefen mit 53-68% adäquat. Die gesamte Syntheseroute zur Darstellung der Bausteine **99-102** ist in Abbildung 77 dargestellt.

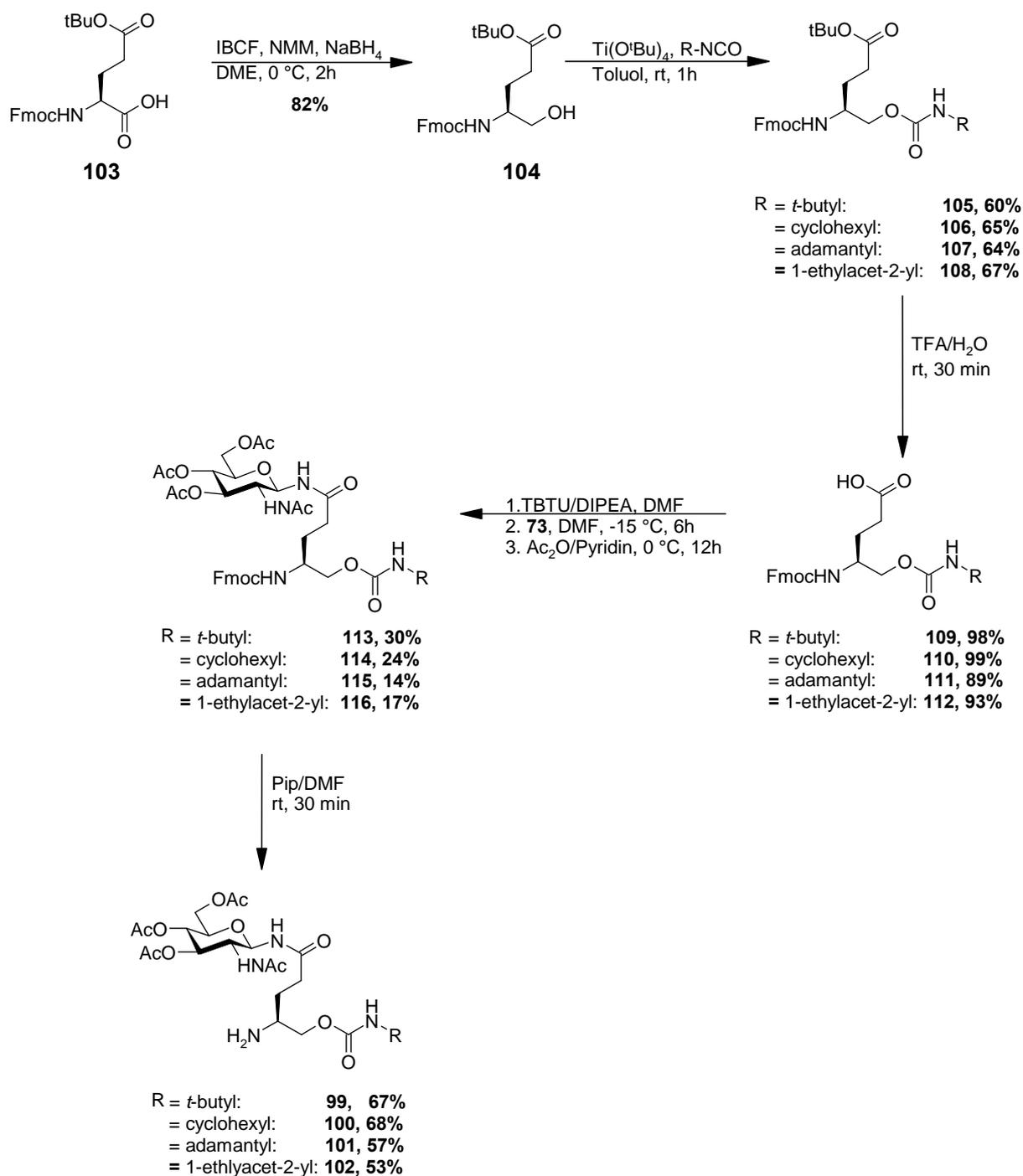


Abbildung 77: Erfolgreich durchgeführte Synthesen zur Darstellung der glycosylierten Bausteine **99-102** und zur Darstellung der Glycopeptidomimetika **91-98**.

Die glycosylierten Bausteine **99-102** wurden anschließend mit den Seitenketten-geschützten Peptidomimetika **77** und **78** umgesetzt. Hierbei wurde das gleiche Mikrowellen-unterstützte Syntheseprotokoll verwendet wie bei der Darstellung der nicht glycosylierten Liganden **16-23**. Das Syntheschema und die Ausbeuten der einzelnen Synthesen der Liganden **91-98** sind in Abbildung 78 zusammengefasst.

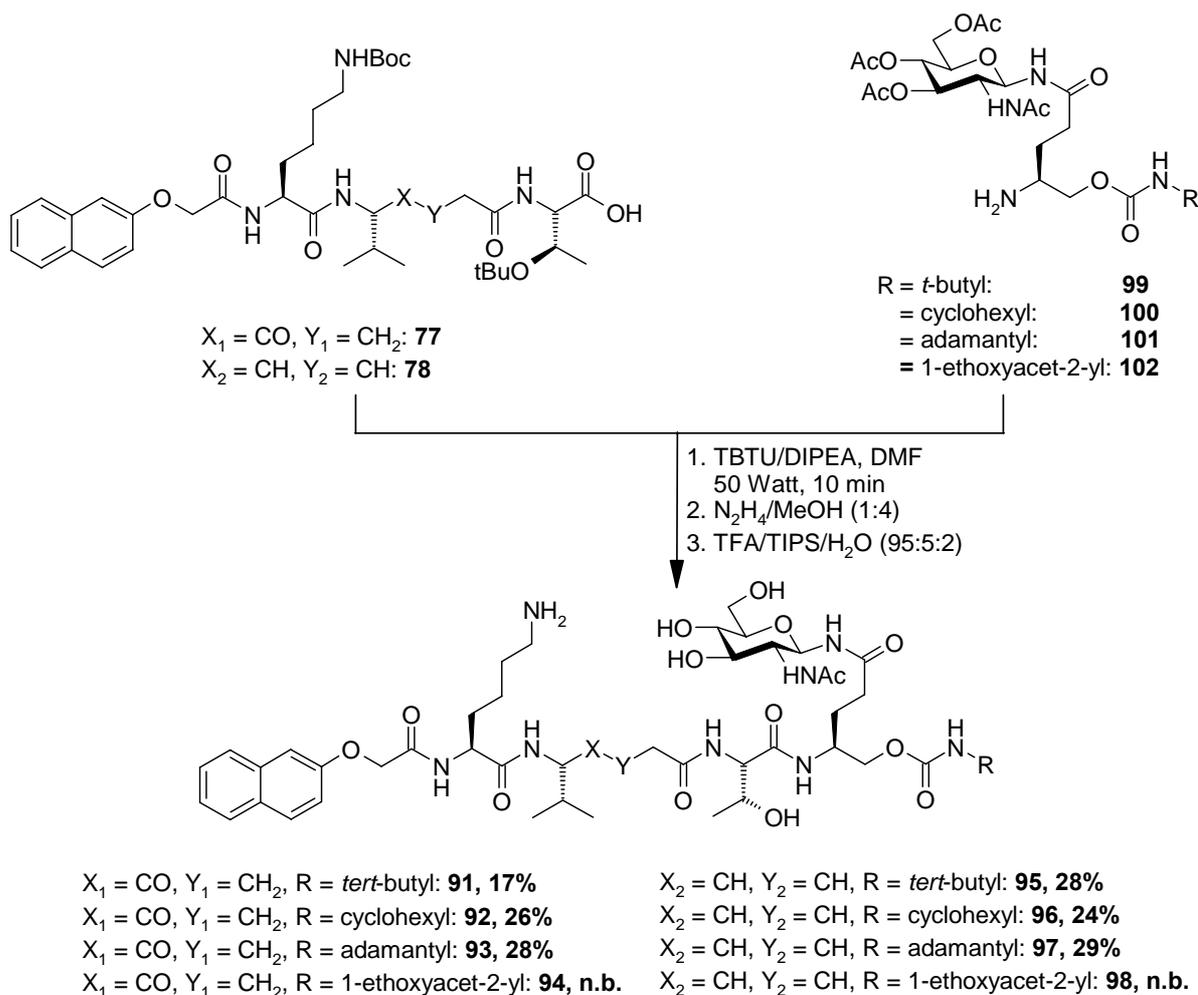


Abbildung 78: Durchgeführte konvergente Synthese der Glycopeptidomimetika **76-78** und **80-82**. Die Synthese des Liganden **79** und **83** konnte unter den gewählten Bedingungen nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Die Ausbeuten der Kupplungsreaktionen waren mit 17-29% (Abbildung 78) weit unter den entsprechenden Ausbeuten der Kupplungsreaktionen für die Liganden **16-23**. Da die drei Reaktionen (Kupplung, Deacetylierung und Entschützung) jeweils hintereinander durchgeführt wurden, ohne die Produkte zwischendurch zu reinigen, konnte die Reaktion nicht identifiziert werden, die zu den Ausbeuteverlusten führt.

Problematisch stellte sich insbesondere die Synthese der beiden 1-Ethoxyacet-2-yl-Liganden **94** und **98** dar. Von diesen beiden Liganden wurde zunächst das *E*-Ethylen-Derivat **98** synthetisiert. Die MALDI-TOF-MS-Analyse der Reaktionslösung der Kupplungsreaktion ergab eindeutig einen *Peak* bei $m/z = 1363$, was dem $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Peak des Kupplungsproduktes entspricht. Nach Deacetylierung und Entschützung der Seitenketten wurde das Rohprodukt mittels *RP*-HPLC gereinigt. Es konnte kein Produkt isoliert werden. Eine MALDI TOF MS Analyse der gesammelten Fraktionen des *RP*-HPLC-Laufes ergab, dass die Fraktion, die nach $R_t = 23.32$ min eluierte, eine Masse von 1003 g/mol aufwies. Dies

entspricht der Masse des entsprechenden Methylesters des Liganden **98**. Der Grund für das Auftreten des Methylesters **118** ist in der Deacetylierungsreaktion zu finden, wobei es zu einer Umesterung des terminalen Ethylesters mit dem Lösungsmittel Methanol kommt. Dies ist in der Abbildung 79 skizziert.

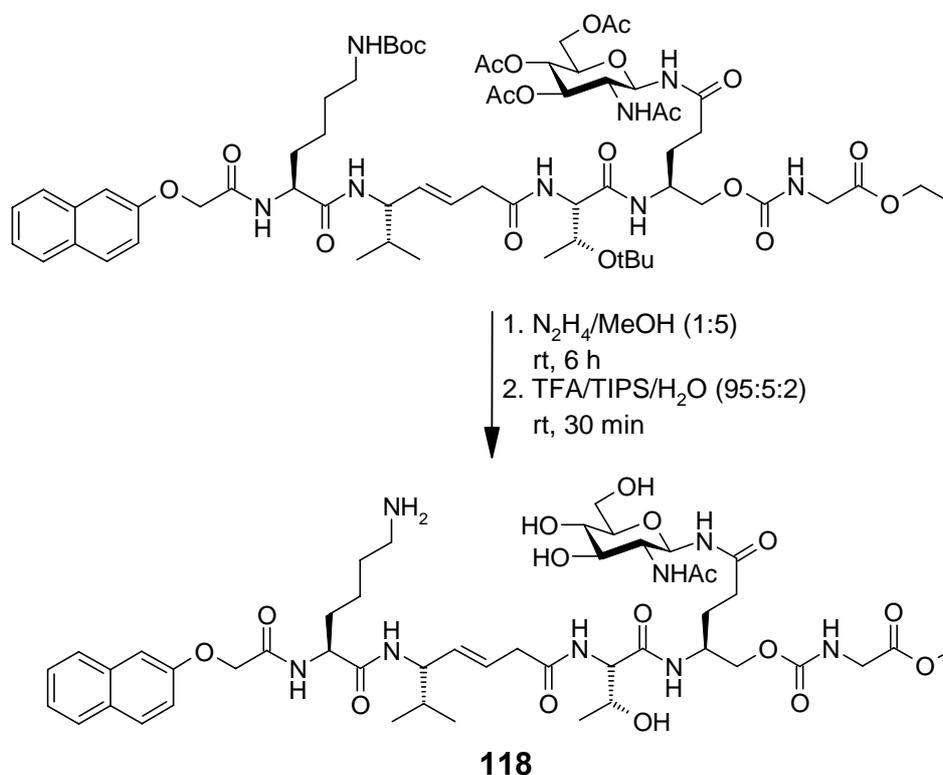


Abbildung 79: Durch die Reaktion mit N_2H_4 in MeOH sowohl deacetylierter, als auch C-terminal umgeesterter Ligand **118**. Nach erfolgreicher Reinigung mittels *RP*-HPLC konnten 3.4 mg des Glycopeptidomimetikums **118** isoliert werden. Dieser wurde für die Verifizierung des wichtigen Einflusses des hydrophoben C-Terminus in SPR-Experimenten als Negativ-Kontrolle verwendet.

Da der hydrophobe Rest der Carbamate wichtig für die Bindung an das CD4-Protein ist.. Nichtsdestotrotz wurde der Methylester **118** für die darauffolgenden Biacore-Experimente verwendet, um den bereits genannten Einfluss des hydrophoben Restes auch für dieses glycosylierte Derivat zu verifizieren.

4.3.2 SPR-Untersuchungen der Monosaccharidpeptidomimetika

Die in Abschnitt 4.3.2 erfolgreich dargestellten Liganden **91-93**, **95-97** und der Ligand **118** wurden anschließend auf ihre Bindungsaffinität zum CD4-Protein mittels SPR untersucht. Hierbei wurde, bis auf die Untersuchungen mit dem Liganden **118**, der bereits etablierte CM5-Chip aus Abschnitt 4.1.9 verwendet. Die Experimente mit dem Liganden **118** wurden mit CM5-Chip von H. Behnken durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2.2). Die entsprechenden Liganden wurden mit 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ bei einer Injektionszeit 120 s über den CM5-Chip geleitet.

In Abbildung 80 ist die Auftragung der RU-Antworten der Messreihe für den Liganden **91** gegen die Konzentration aufgetragen.

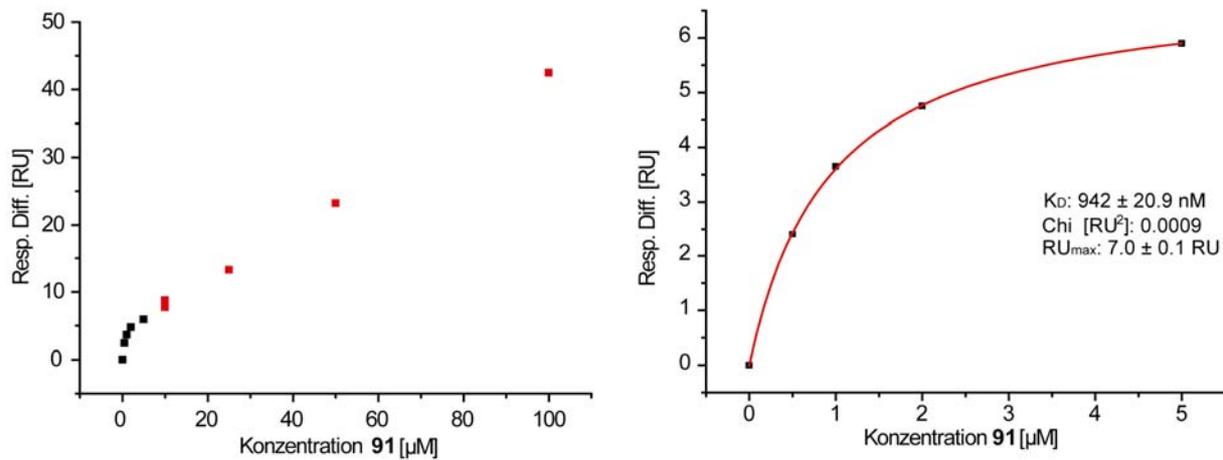
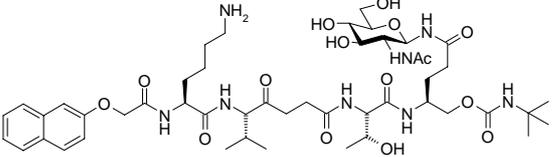
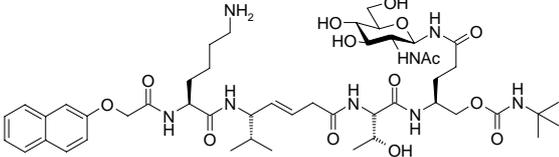
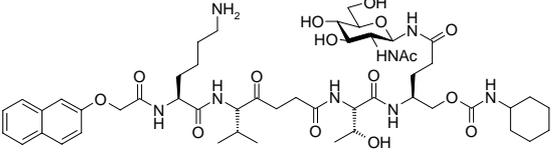
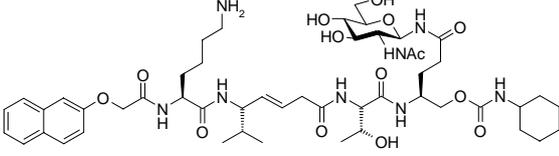
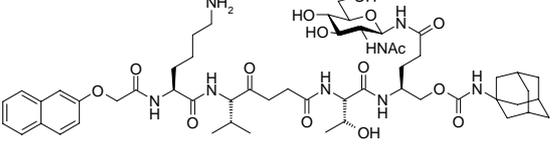
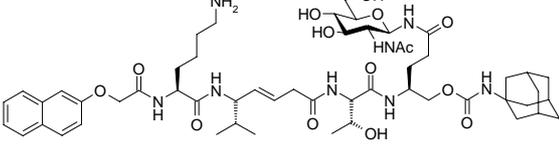


Abbildung 80: SPR-Affinitätsanalyse des Liganden **91** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. **Links:** Auftragung der RU-Antworten aller Messpunkte; rot dargestellt sind diejenigen RU-Antworten, die nicht nach dem *one-site-binding*-Modell angefitet werden können. **Rechts:** Messpunkte, die nach dem *one-site-binding*-Modell angefitet werden konnten.

Es wurden für diesen Liganden Konzentrationen im Bereich von 500 nM – 100 µM vermessen. Es zeigt sich deutlich, dass ab einer Konzentration von 10 µM ein linearer Anstieg der RU-Antworten gegenüber der Konzentration auftritt, so dass diese Konzentrationspunkte nicht mehr nach dem *one-site-binding*-Modell auszuwerten sind. Die RU-Antworten sind somit auf unspezifische Wechselwirkungen des Liganden **91** mit der Chipoberfläche zurückzuführen und werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Nach dem Fit der Konzentrationen unterhalb von 10 µM konnte eine Dissoziationskonstante von $942 \pm 21 \text{ nM}$ erhalten werden. Somit zeigt sich deutlich, dass das Einführen der Glucosamin-Einheit einen positiven Effekt bezüglich der Bindungsaffinität des Liganden gegenüber dem CD4-Protein hat. Der K_D -Wert des Liganden **91** ist durch diese Modifikation um den Faktor 6.5 niedriger als bei dem entsprechenden nicht glycosylierten Liganden **16** ($6.2 \pm 0.2 \text{ µM}$). Dies bestätigt erfolgreich die *Modeling*-Resultate nach den SPR-Experimenten der Peptide **81-86** aus Abschnitt 4.2.2.

Die K_D -Werte für die Liganden **91-93** und **95-97** sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Zusammenfassung der K_D -Werte der Monosaccharid-Peptidomimetika **91-93** und **95-97**. Es zeigt sich deutlich, dass mit steigendem Volumen des hydrophoben Restes, die Bindungsaffinität gegenüber dem CD4-Protein zunimmt.

Nr.	K_D [nM]	Nr.	K_D [nM]
 91	942 ± 21	 95	780 ± 207
 92	504 ± 305	 96	630 ± 285
 93	203 ± 82	 97	376 ± 186

Die K_D -Werte aller Liganden liegen im nanomolaren Bereich und binden somit um den Faktor 6.5 bis 8 niedriger als ihre entsprechenden nicht glycosylierten Liganden. Somit geht die Einführung der GlcNAc-Einheit mit einer Verbesserung der Bindungsaffinität der Liganden einher. Ebenfalls scheint dem Einfluss des hydrophoben Carbamat-Restes eine stärkere Bedeutung zuzukommen, als bei den nicht glycosylierten Liganden. Analog zu den Ergebnissen bei den unglycosylierten Liganden **16-23** ist ein Einfluss der unterschiedlichen dipeptidmimetischen Modifikationen im Rückgrat der Liganden auf die Bindungsaffinität nicht auszumachen.

Die Abbildung 81 zeigt die Auswertung der Messreihe für den Liganden **95**. Bei diesem Liganden wurden Konzentrationen von 250 nM bis 25 μ M vermessen.

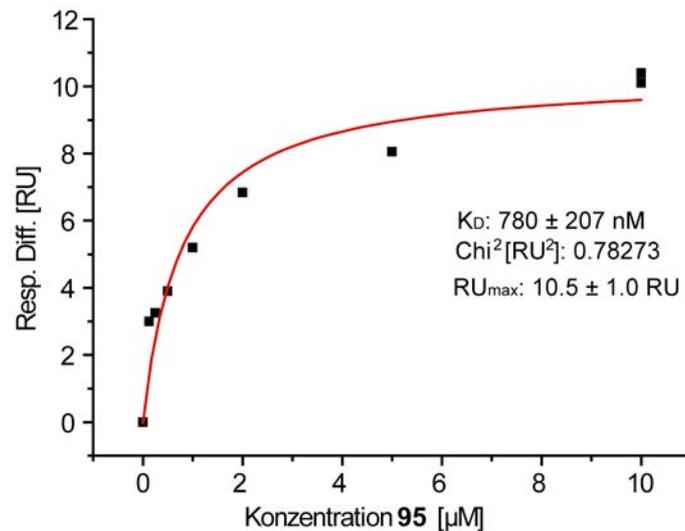


Abbildung 81: SPR-Affinitätsanalyse des Liganden **95** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. Auftragung der RU-Antworten der Messpunkte und Fit nach dem *one-site-binding*-Modell.

Konzentrationen oberhalb von 10 µM führten zu einem linearen Anstieg der RU-Antworten. Daher wurden diese Messpunkte nicht berücksichtigt. Die aus dem Fit der ersten sieben Messpunkte erhaltenen RU_{max} -Antwort von 10 RU ist ebenfalls mit dem theoretischen RU_{max} von 19 RU vereinbar.

Wie aus Tabelle 16 zu entnehmen ist, sind die K_D -Werte für die Adamantyl-Liganden **93** und **97** die niedrigsten. In Analogie zu den Auswertungsprotokollen der Liganden **91-92** und **95-96** wurden ebenfalls nur diejenigen Messpunkte zur Auswertung nach dem *one-site-binding*-Modell herangezogen, die unterhalb einer Konzentration von 10 µM lagen.

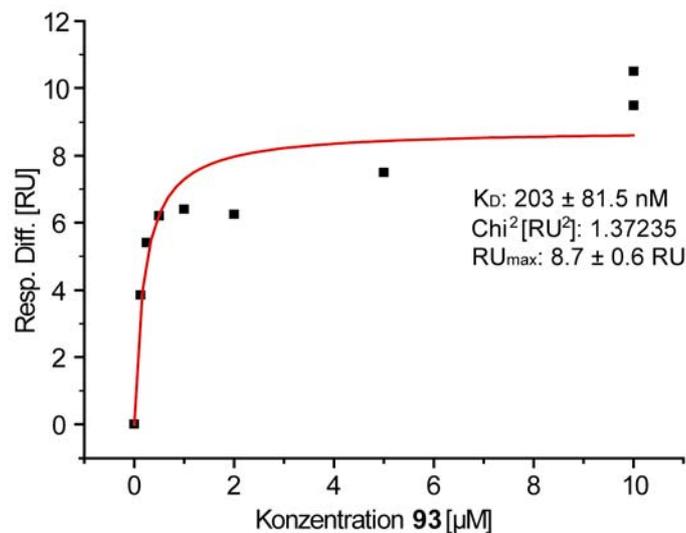


Abbildung 82: SPR-Affinitätsanalyse des Liganden **93** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. Auftragung der RU-Antworten der Messpunkte und Fit nach dem *one-site-binding*-Modell.

Der Fit zeigt einen relativ großen χ^2 -Wert, von 1.37 RU^2 . Diese Abweichung und damit die Qualität des Fits ist beim Einbeziehen des Messpunktes bei einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ jedoch noch größer, weshalb davon abgesehen wurde.

Die SPR-Untersuchung des Methylesters **118** wurde unter Verwendung des von H. Behnken benutzten CM5-Chips durchgeführt. Da dieser Ligand zur Überprüfung der Relevanz des hydrophoben Restes im Bezug auf die Bindungsaffinität des Liganden sein sollte, wurde eine Konzentrationsreihe von 90 nM bis $100 \mu\text{M}$ vermessen. Abbildung 83 zeigt die entsprechende Auftragung und den dazugehörigen Fit nach dem *one-site-binding*-Modell.

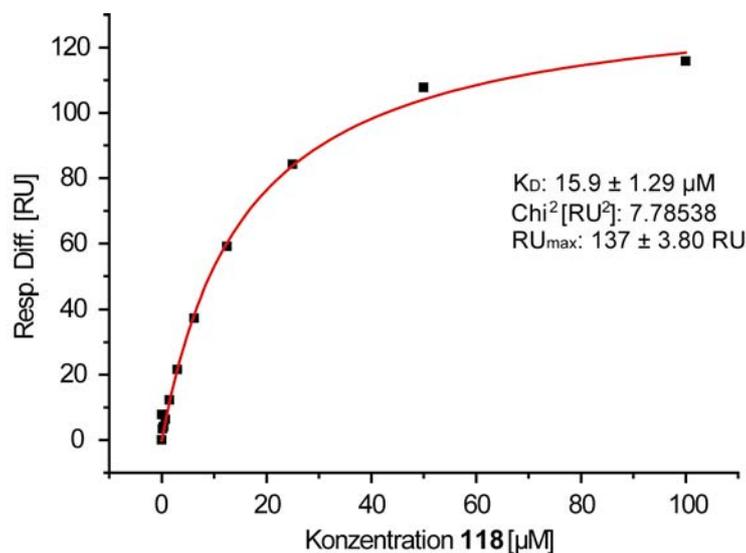


Abbildung 83: SPR-Affinitätsanalyse des Monosaccharid-Peptidomimetikums **118** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. Auftragung der RU-Antworten aller Messpunkte; gefittet die nach dem *one-site-binding*-Modell. Der bestimmte K_D -Wert liegt mit $15.9 \pm 1.29 \mu\text{M}$ sehr viel höher, als bei den Liganden **91-93** bzw. **95-97**, was auf dem Fehlen der hydrophoben Wechselwirkungen des C-terminalen Restes beruht.

Zunächst ist deutlich zu erkennen, dass im Gegensatz zu den SPR-Experimenten der Liganden **91-93** und **95-97** keine Sättigung bei niedrigen Konzentrationen auftritt, sondern erst bei Konzentrationen ab $100 \mu\text{M}$. Die aus dem Fit erhaltene Dissoziationskonstante von $15.9 \pm 1.29 \mu\text{M}$ ist fast 80fach höher, als bei dem am stärksten bindenden Liganden **97**. Dieser Einbruch in der Bindungsaffinität ist auf das Fehlen der hydrophoben Wechselwirkung zurückzuführen. Jedoch ist die Bindungsaffinität des Liganden **118** nur um den Faktor zwei geringer als bei den nicht glycosylierten Liganden **19** und **23**, was darauf hindeutet, dass der Einbruch der Bindungsaffinität durch die geringere essentielle hydrophobe Wechselwirkung durch die neu eingeführte Kohlenhydrat-Einheit teils kompensiert wird. Dies zeigt ebenfalls den positiven Einfluss der GlcNAc-Einheit auf die Bindungsaffinität der Liganden. Im Weiteren wurden Versuche durchgeführt, um Aussagen über die Art der positiven Wechselwirkung des Kohlenhydrats zu treffen und genauer zu charakterisieren.

4.3.3 Synthese neuartiger Monosaccharid-mimetischer Aminosäuren

Um den Art der Wechselwirkung des Kohlenhydrats mit dem CD4-Protein charakterisieren zu können, wurde ein hydrophobes GlcNAc-Mimetikum **123** entwickelt, da Kohlenhydrate nicht nur in der Lage sind über Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Protein zu interagieren, sondern ebenfalls über hydrophobe Wechselwirkungen, ausgehend von der Acetatgruppe bzw. dem Pyran- oder Furanring.²⁰²

Zur Darstellung des 4-Acetamido-3-nitrobenzylalkohol **120** wurde von der kommerziell erhältlichen 4-Acetamido-3-nitrobenzoesäure **119** ausgegangen. Folgend der Synthesevorschrift von Safonov *et al.* wurde die Carboxylfunktion unter Verwendung von $\text{BF}_3 \cdot \text{THF}$ reduziert.²⁰³ Hierbei konnte der gewünschte Benzylalkohol mit einer Ausbeute von 26% isoliert werden. Die geringen Ausbeuten der Reaktion wurden auch von Safonov *et al.* beobachtet, wobei eine dünnschichtchromatographische Analyse des Rohproduktes eine Vielzahl von unterschiedlichen Verbindungen ergab deren Identität jedoch nicht geklärt werden konnte. In der darauffolgenden Reduktion der Nitrogruppe wurde eine Vorschrift von Neres *et al.* verwendet und modifiziert.²⁰⁴ Als Katalysator wurde 10% Pd/C verwendet. Der nötige Wasserstoff wurde *in situ* durch Verwendung von Hydrazin-Hydrat dargestellt. Die in der Vorschrift vorgenommene gleichzeitige Hydrolyse eines Esters wurde nicht vorgenommen. Der gewünschte 4-Acetamido-3-aminobenzylalkohol **121** konnte mit einer Ausbeute von 58% isoliert werden. Sowohl die zwei durchgeführten Reaktionen, sowie die zwei noch folgenden Reaktionen zur Darstellung des fertigen GlcNAc-Mimetikum-Bausteins **123** sind in Abbildung 84 dargestellt.

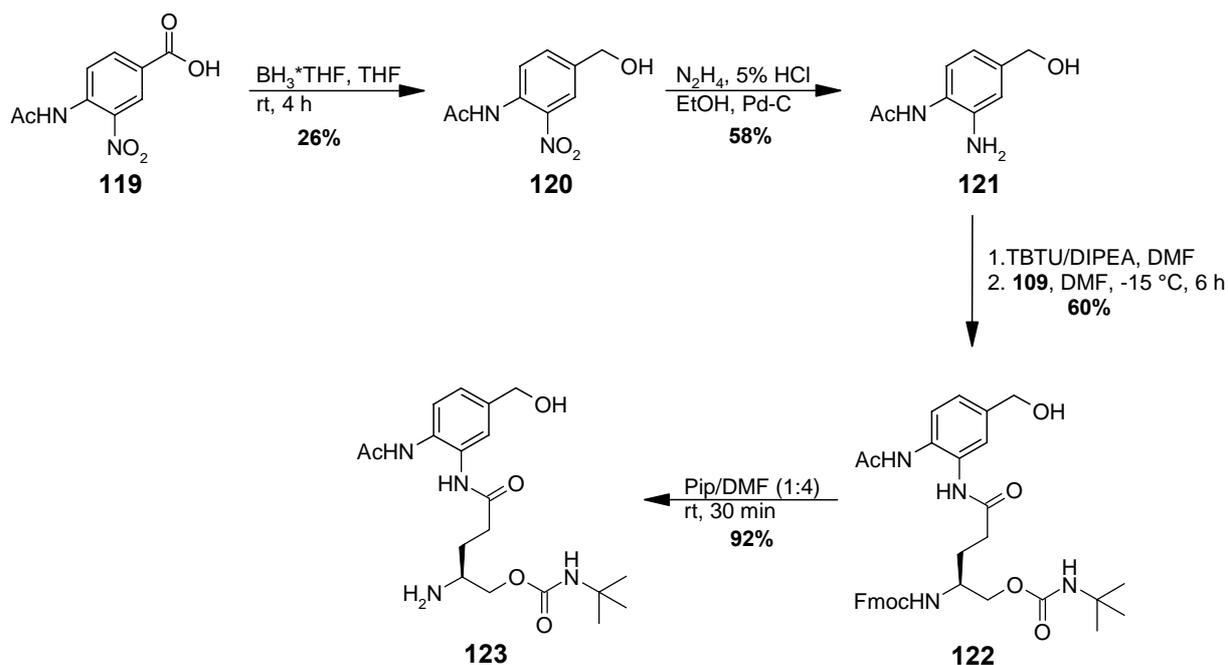


Abbildung 84: Synthesen zur Darstellung des GlcNAc-Mimetikums **123**, des Bausteins **99** zur Untersuchung des hydrophoben Charakters der Wechselwirkung der GlcNAc-Einheit.

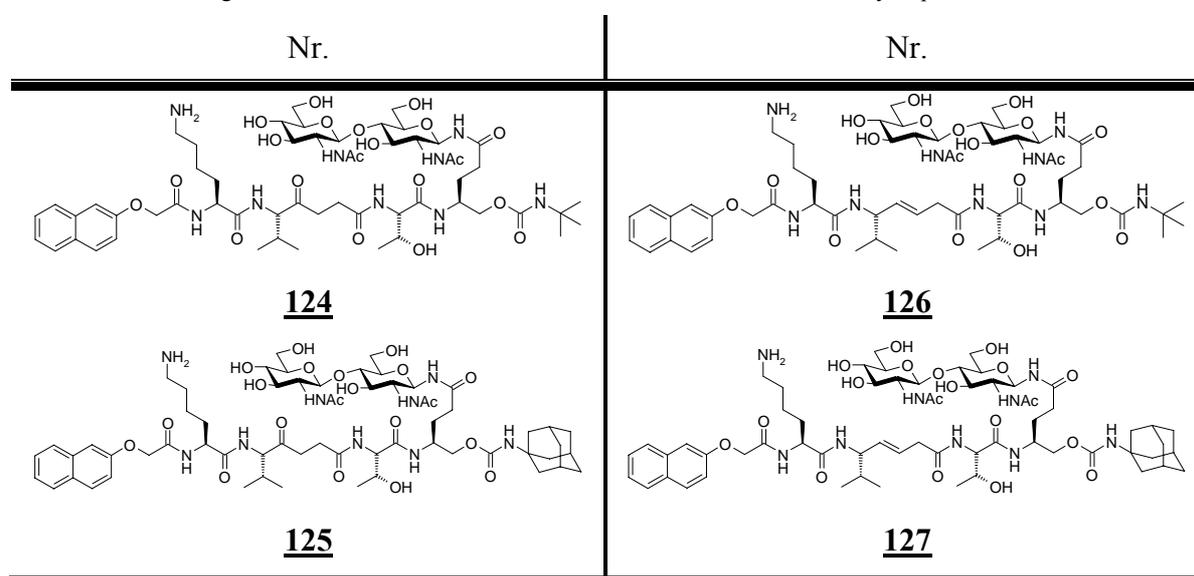
Die im Anschluss an die Synthese des 4-Acetamido-3-aminobenzylalkohols **121** erfolgende Kupplung an die freie Säure **94** wurde unter den TBTU/DIPEA-Standardbedingungen durchgeführt. In diesem Fall wurde im Gegensatz zu den GlcNAc-Derivaten darauf verzichtet, die benzyliche Hydroxylgruppe zu acetylieren. Das Kupplungsprodukt **122** konnte erfolgreich mit einer Ausbeute von 60% isoliert werden. Der darauffolgende Entschützungsprozess verlief mit einer Ausbeute von 92% sehr gut. Die anschließende Kupplungsreaktion des Bausteins **123** mit einem der geschützten Peptidomimetika (**77** oder **78**) konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Eine Verfolgung der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie ergab eine Umsetzung der Edukte, wobei das Rohprodukt nicht erfolgreich aufgereinigt werden konnte. Aus diesem Grund wurden die Versuche zur Identifikation der Art der Wechselwirkung der Kohlenhydrat-Einheit nicht weiter untersucht. Der positive Einfluss der GlcNAc-Einheit auf die Bindungsaffinität der Liganden **76-78** bzw. **80-82** wurde jedoch durch SPR eindeutig nachgewiesen, weswegen weitere Untersuchungen durchgeführt wurden, um die Affinität der Liganden zu erhöhen.

4.3.4 Synthese neuartiger, unnatürlicher Disaccharid-Aminosäuren

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Affinität der Liganden besteht in der Einführung einer erweiterten Kohlenhydratstruktur, da die Ergebnisse der SPR-Untersuchungen der Liganden **91-93** bzw. **95-97** eindeutig den positiven Einfluss des β -GlcNAc-Restes auf die

Bindungsaffinität an das CD4-Protein zeigten. Das β -GlcNAc repräsentiert hierbei das erste Kohlenhydrat, welches an Asn²⁰¹ im GP120-Protein gebunden ist. Da es sich an dieser Glycosylierungsstelle um ein *N*-Glycan des Komplex-Typs handelt, wurden im Folgenden Liganden entwickelt (Tabelle 17), die anstatt des Monosaccharids das Disaccharid Chitobiose beinhalten. Chitobiose stellt in den *N*-Glycanen das natürliche Disaccharid dar, welches an das Asparagin gebunden ist. Somit stellt Chitobiose ein geeignetes Disaccharid dar, um den Einfluss einer erweiterten Kohlenhydrat-Struktur auf die Bindungsaffinität der Liganden gegenüber dem CD4-Protein zu untersuchen.

Tabelle 17: Chitobiosyl-Peptidomimetika **124-127**. Die Mimetika sollen sowohl den Einfluss einer weiteren GlcNAc-Einheit auf die Bindungsaffinität zum CD4-Protein simulieren, als auch den Einfluss des hydrophoben C-Terminus.



Die Synthese dieser Liganden sollte ebenfalls über die bereits etablierte konvergente Strategie erfolgen. Für die Darstellung der Chitobiosyl-Bausteine **114** und **115** (Abbildung 86) wurde von dem Chitobioseoctaacetat **109** ausgegangen, welches freundlicherweise von I. Grüneberg zur Verfügung gestellt worden war.

In einem ersten Schritt wurden die Acetat-Schutzgruppen der Chitobiose unter Verwendung 5%iger Natriummethanolat-Lösung abgespalten. Die Ausbeuten dieses Schrittes verliefen nahezu quantitativ und das Rohprodukt des α/β -Anomerengemisches der Chitobiose **110** wurde anschließend in Analogie zum GlcNAc nach Likhoshevstov *et al.* selektiv zum β -Anomer der aminierten Chitobiose **111** umgesetzt. Die Ausbeute in diesem Schritt verlief mit 89% sehr zufriedenstellend.

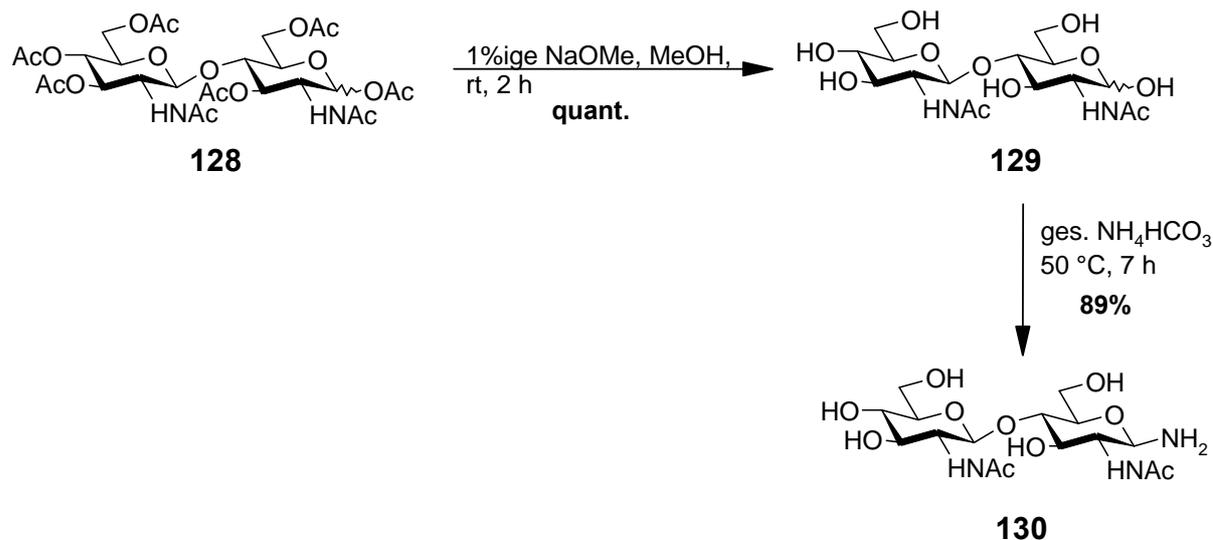


Abbildung 85: Durchgeführte Synthese zur Darstellung von 2-Acetamido-2-desoxy-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosylamin **130**.¹⁹⁸

Die anschließende Umsetzung der aminierten Chitobiose **130** mit den freien Säuren **109** und **111** erfolgte nach den bereits etablierten Synthesevorschriften. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte ebenfalls zunächst über eine Umkristallisation aus Ethanol mit anschließender säulenchromatographischer Reinigung. Die Ausbeuten der Kupplungsprodukte **131** bzw. **132** waren mit 23% und 3% sehr niedrig. Während der säulenchromatographischen Reinigung des Kupplungsproduktes **132** konnte ein Nebenprodukt mittels MALDI-TOF-MS-Analyse identifiziert, jedoch nicht erfolgreich gereinigt werden. Hierbei handelte es sich um das Tetra-*O*-Acetylprodukt. Es ist bekannt, dass die 3-OH-Gruppe aus sterischen Gründen schwer zu acetylieren ist. Aus synthetischen Überlegungen heraus könnte auch das Tetra-*O*-Acetylprodukt aus dem genannten Grund für die weiteren Synthesen verwendet werden, da dieses Nebenprodukt jedoch nicht erfolgreich gereinigt werden konnte, wurde von der Weiterverwendung abgesehen. Die abschließende Entschützung der Amino-Gruppe mittels Pip/DMF verlief im Falle der Verbindung **133** mit 76% zufriedenstellend, wohingegen bei der Entschützung des Adamantyl-Derivates **134** nur eine Ausbeute von 19% erzielt werden konnte. Eine hinreichende Begründung für die schlechte Ausbeute konnte nicht gefunden werden.

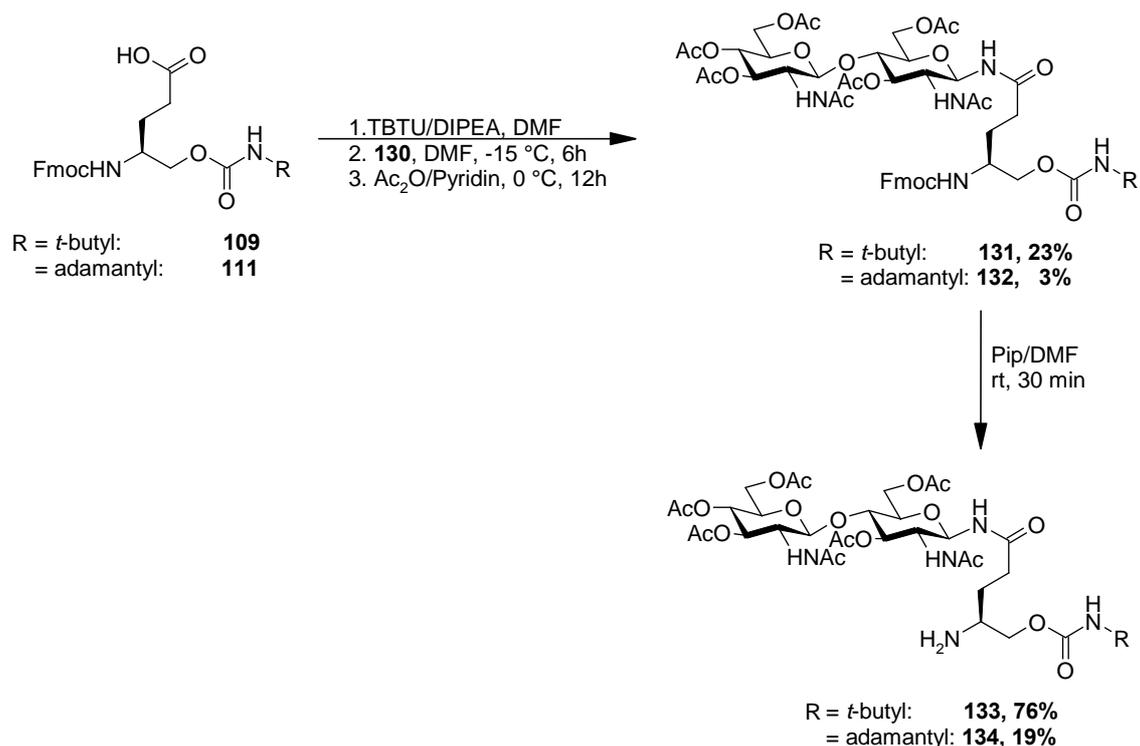


Abbildung 86: Erfolgreich durchgeführte Synthesen zur Darstellung der chitobiosylierten Bausteine **133** und **134** zur Darstellung der Glycopeptidomimetika **124-127**. Die Ausbeuten waren für das *t*-Butyl-Derivat zufriedenstellend, jedoch für das entsprechende Adamantyl-Derivat schlecht.

Die Chitobiosyl-Bausteine **133** und **134** wurden im Anschluss mit den geschützten Peptidomimetika **77** und **78** umgesetzt, deacetyliert und die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen entfernt. Da von der Verbindung **134** nur sehr wenig erhalten wurde, sind nur 1 µmol-Ansätze zur Synthese der Liganden **126** und **127** durchgeführt worden. Die erhaltenen Rohprodukte wurden mittels *RP*-HPLC gereinigt.

Tabelle 18: Durchgeführte, Mikrowellen-unterstützte Synthesen der Liganden **124-127**. Es wurden jeweils 10 µmol- (*t*-Butyl-Derivate) und 1 µmol-Ansätze (Adamantyl-Derivate) durchgeführt.

Nr.	Ausbeute [%]	Nr.	Ausbeute [%]
	2.5		13
	5.5		8.2

Die Ausbeuten der jeweiligen Kupplungs- und Entschützungsreaktionen waren durchgängig niedrig. Eine mögliche Erklärung dieser Ausbeuten könnten die neu synthetisierten Chargen der geschützten Peptidomimetika **77** und **78** sein, die in diesem Falle nicht mittels *RP*-HPLC gereinigt wurden, sondern als Rohprodukte verwendet wurden. Die erhaltenen Substanzmengen der Liganden **124-127** sollten jedoch ausreichen, um SPR-Experimente durchzuführen.

4.3.5 SPR-Untersuchungen der Disaccharidpeptidomimetika

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Liganden **124-127** mittels SPR-Experimenten auf seine Bindungsaffinität zum CD4-Protein hin erfolgreich untersucht. Es wurde hierbei der CM5-Chip von H. Behnken verwendet. Bei dem SPR-Experiment wurden Konzentrationen von 90 nM bis 100 μ M über eine Injektionszeit von 240 s über den Chip geleitet. Die SPR-Experimente für die Liganden **124**, **125** und **127** konnten nicht ausgewertet werden, da die Messkurven aller Konzentrationen keinen Anstieg in den RU-Antworten ergaben. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls nach mehrmaligem Durchführen der Experimente erzielt und konnte nicht erklärt werden. Die SPR-Experimente des Liganden **126** jedoch verliefen erfolgreich. Das entsprechende Ergebnis der Auftragung der RU-Antworten gegen die entsprechenden Konzentrationen ist in Abbildung 87 abgebildet.

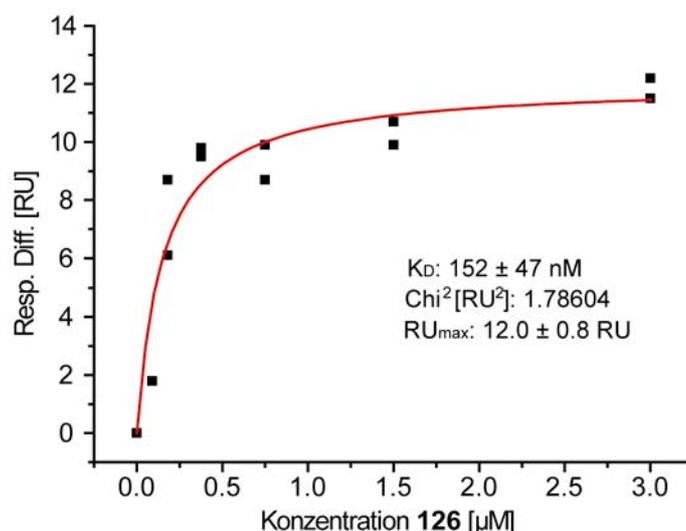


Abbildung 87: SPR-Affinitätsanalyse des Liganden **126** bezüglich des immobilisierten CD4-Proteins. Der geringe $R_{U_{max}}$ -Wert ist in diesem Zusammenhang nicht eindeutig zu erklären. Die RU-Antworten ab Konzentrationen von 6 μ M nehmen aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen einen linearen Verlauf. Die Messpunkte wurden nach dem *one-site-binding*-Modell angefitet.

Die RU-Antworten steigen aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen ab einer vermessenen Konzentration von 6 μ M steigen linear an. Aus diesem Grund wurden nur die

Konzentrationen unterhalb von 6 μM für die Bestimmung des K_D -Wertes verwendet. Das Ergebnis nach dem Anfitten der Messpunkte ergab eine Dissoziationskonstante von 152 ± 47 nM. Dies würde im Verhältnis zum entsprechenden Monosaccharid-Liganden **95** (780 ± 207 nM) eine Steigerung in der Bindungsaffinität um den Faktor fünf bedeuten, was nur durch das Einführen der zweiten GlcNAc-Einheit in Form der Chitobiose zu erklären ist. Dieses belegt die Bedeutung der Kohlenhydratstruktur am Asn²⁰¹ im nativen GP120-Protein auf die Bindungsaffinität. Durch die erfolgreiche Darstellung und SPR-Untersuchung dieses Liganden konnte die Bindungsaffinität der bekannten Peptidomimetika¹²¹ als potentielle *Entry*-Inhibitoren von $K_D \sim 6 \mu\text{M}$ auf ~ 150 nM gesteigert werden. Dies entspricht einer 40fachen Steigerung in der Bindungsaffinität gegenüber dem CD4-Protein.

5 Zusammenfassung

Die primäre Wechselwirkung des HI-Virus mit humanen Wirtszellen bietet einen vielversprechenden Ansatz zur Entwicklung von HIV-Entry-Inhibitoren. Die an dieser Wechselwirkung beteiligten Proteine sind das virale GP120-Protein und das humane CD4-Protein. Die Blockade des konservierten Epitops im CD4-Protein, das vom viralen GP120-Protein benutzt wird, um an die humane Zelle anzudocken, hat den Vorteil, dass diese Inhibitoren nicht leicht durch Mutation innerhalb der GP120-Sequenz umgangen werden kann. Auf der Grundlage eines von J. Wülfken entwickelten Dekapeptids¹¹⁴ mit Virus neutralisierenden Eigenschaften konnte A. Neffe Peptidomimetika mit verbesserten pharmakophoren Eigenschaften entwickeln. Die mittels SPR-Experimenten bestimmten Dissoziationskonstanten dieser Peptidomimetika betragen bis zu $K_D = 6 \mu\text{M}$. Ebenfalls wurde die proteolytische Halbwertszeit gegenüber dem Peptid vervierfacht.¹²²

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden in dieser Arbeit neue Typen von *backbone*-modifizierten Peptidomimetika und Glycopeptidomimetika entwickelt. Diese weisen deutlich verbesserte Bindungseigenschaften gegenüber dem CD4-Protein auf. Ebenfalls ist die proteolytische Stabilität der neuen Peptidomimetika gegenüber dem sehr aktiven Proteasemisch Pronase nochmals mehr als verdoppelt worden.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit, wurde mittels des Programms Sybyl eine Analyse der von A. Neffe gedockten und synthetisierten Statin-modifizierten Peptidomimetika **13-15** durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse zeigte, dass es durch die Verkürzung *backbones* der Mimetika zu sterischen Abstoßungen zwischen der Methylgruppe des L-Threonins und der Proteinoberfläche kommt. Zusätzlich kommt es als Folge dessen zu einem größeren Abstand des hydrophoben Carbamat-Restes zur Proteinoberfläche, wodurch die als bedeutend eingestufte hydrophobe Wechselwirkung des Restes mit dem Leu⁶¹ des CD4-Proteins abgeschwächt wird. Die gleichzeitig vorgenommene Vergrößerung der hydrophoben Seitenkette des Statins, die anstelle der L-Valinseitenkette in eine hydrophobe Kavität des CD4-Proteins zeigt, konnte in diesem Zusammenhang keine positiven Effekte auf die berechnete Bindungsenergie der Liganden **13-15** ausüben. Resultierend aus diesen Ergebnissen wurden *backbone*-modifizierte Peptidomimetika **16-23** mittels des Programms FlexiDock an das CD4-Protein gedockt. Hierbei enthielten diese Peptidomimetika zwei unterschiedliche Modifikationen der Peptidbindung zwischen L-Valin und Glycin. Bei den Modifikationen handelte es sich um Ketomethylen-Mimetika (**16-19**) und E-Ethylen-Mimetika (**20-23**). Durch den Erhalt der ursprünglichen *backbone*-Länge **16-23** der

Liganden waren die aus dem *Docking* erhaltenen Bindungsenergien um bis zu 35 kcal/mol niedriger, als bei den entsprechenden Statin-modifizierten Liganden.

Die für die Synthese der Liganden notwendigen Fmoc-geschützten Dipeptidmimetika **24** und **25** konnten, ausgehend von bereits von mir etablierten Synthesewegen, erfolgreich dargestellt werden. Durch diverse Modifikationen in den Synthesen, sind die Mimetika **24** und **25** mit Gesamtausbeuten von 44% respektive 15% zugänglich. Analog zu dieser optimierten Syntheseroute wurden die L-Cyclohexylalanin-Dipeptidmimetika **47** und **55** dargestellt, die in weiteren Studien für die Synthese von neuen CD4-bindenden Peptidomimetika verwendet werden konnten.¹⁶⁴ Die dargestellten Verbindungen **24** und **25** wurden verwendet, um zunächst die Liganden **16** und **17** in einer linearen Synthesesequenz darzustellen. Die niedrigen Ausbeuten in der Umsetzung von den *Isocyanaten* mit dem Alkohol **62** wurden durch ein neuartiges Synthesekonzept wesentlich verbessert. Durch Mikrowellen-unterstützte Synthese geschützter Peptidomimetika **77** und **78** sowie die Synthese der Amino-Carbamate **73-76** konnten anschließend in einer ebenfalls Mikrowellen-unterstützten Synthese konvergent zusammengeführt werden, wodurch die Liganden **16-23** in sehr zufriedenstellenden Ausbeuten erfolgreich dargestellt werden konnten.

In den anschließenden SPR-Experimenten konnten für alle acht neuartigen Peptidomimetika Bindungskurven erhalten und daraus Dissoziationskonstanten bestimmt werden. Die K_D -Werte wurden zu 1 bis 6 μM bestimmt. Sie besitzen somit im direkten Vergleich mit denen von A. Neffe untersuchten Liganden einen um den Faktor zehn bis zwanzig niedrigere Dissoziationskonstante. Ebenfalls konnten in Verdaustudien die Halbwertszeiten der Stabilität der Liganden **18** und **22** mit 41 Minuten bzw. 58 Minuten bestimmt werden. Sie sind somit um den Faktor zwei stabiler gegenüber Pronase als bisherige Peptidomimetika.

Ausgehend von Studien an kompletten HI-Viren, in denen der Einfluss der Glycosylierung am Asn²⁰¹ auf die Infektiosität nachgewiesen wurde, sind sechs unterschiedliche Peptide und Glycopeptide **81-86** erfolgreich mittels Mikrowellen-unterstützter Festphasenpeptidsynthese dargestellt worden. Hierbei wurde erstmals der Einfluss der Glycosylierung auf die Bindungsaffinität gegenüber dem CD4-Protein untersucht. Es konnte mittels SPR-Experimenten erfolgreich nachgewiesen werden, dass die linearen Peptide **81** und **82** keine starke Bindung zum CD4-Protein eingehen, wohingegen die Verknüpfung der Peptide **81** beziehungsweise **82** mit dem bekannten Dekapeptid wesentlich zu einer Verbesserung der Bindungsaffinität führt. Die K_D -Werte für die linearen Peptide **83** und **84** konnten mit $\sim 430 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Dies ist im Vergleich zum Dekapeptid eine Verbesserung um

den Faktor fünfzehn. Durch die erfolgreichen SPR-Experimente mit den zyklischen Peptiden **85** und **86** konnte jedoch zusätzlich eindeutig aufgezeigt werden, dass durch die Zyklisierung, einhergehend mit einer vermutlich daraus resultierenden räumlichen Faltung der Peptide, die Bindungseigenschaft zum CD4-Protein noch einmal erheblich gesteigert werden konnte. Es konnte ein K_D -Wert für das zyklische, nicht glycosylierte Peptid **85** von 91 μM bestimmt werden und für das zyklische Glycopeptid **86** ein K_D -Wert von 10 μM . Das zyklische Glycopeptid **86** bindet fast 1000 Mal stärker an das CD4-Protein, als das ursprüngliche Peptid $^{425}\text{NMWQKV}^{430}\text{-G-}^{123}\text{TPL}^{125}$ ($K_D = 6 \text{ mM}$).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Strukturbestimmung des Glycopeptids **86** basierend auf $^1\text{H-NMR}$ - und NOE-spektroskopischen Daten durchgeführt. Es gelang erfolgreich durch anschließende *constrained*-Moleküldynamiksimulation die dreidimensionale Struktur des Glycopeptids **86** in Lösung zu erhalten. Zusätzlich gelang es, den Abstand zwischen dem im Epitop vorhandenen L-Prolin- α -Kohlenstoff und dem anomeren Kohlenstoff des essentiellen Glucosamins am Asn^{201} mit 6.34 Å zu bestimmen.

Im Anschluss wurde es erfolgreich die Struktur der Peptidomimetika **16-23** mit einem Glucosamin über ein Glutaminsäure-Derivat mit einem Abstand von 6.30 Å zu kombiniert. Dies führte zu einer neuen Klasse von Monosaccharidpeptidomimetika (**91-98**). Die Synthese der Liganden **91-93** und **95-97** konnte erfolgreich in Analogie zu der der Liganden **16-23** konvergent durchgeführt werden. Anschließende SPR-Experimente mit den neuen Glycopeptid-mimetischen Liganden ergaben K_D -Werte von ~ 203 bis 940 nM, wobei die Bindungsaffinität mit steigendem sterischen Anspruch des hydrophoben Carbamat-Restes besser wird. Diese vermutlich entscheidende Wechselwirkung des hydrophoben Carbamat-Restes mit der CD4-Oberfläche wurde in einem SPR-Experiment mit dem Monosaccharidpeptidomimetikum **118** bestätigt. Durch das Fehlen einer Methyleinheit konnte nur ein K_D -Wert von 15.9 μM bestimmt werden, was einem Einbruch in der Bindungsaffinität um den Faktor acht gegenüber dem Monosaccharidpeptidomimetikum **93** entspricht.

Da der Einfluss der Monosaccharid-Glycosylierung auf die Affinität der Liganden **91-93** und **95-97** sehr groß zu sein schien, wurden weitere Disaccharidpeptidomimetika **124-127** entwickelt. Diese konnten erfolgreich, analog zu der hier entwickelten Syntheseroute dargestellt werden. SPR-Untersuchungen mit dem Liganden **126** ergaben einen K_D -Wert von 152 nM, was einer Steigerung um den Faktor fünf in der Bindungsaffinität gegenüber dem Monosaccharidpeptidomimetikum **95** entspricht.

Durch Kombination von NMR-spektroskopischen Analysen, *in silico* Rechnungen, SPR-Untersuchungen sowie organisch, synthetischen Arbeitsmethodiken konnten nun

Glycopeptidomimetika als potentielle *Entry*-Inhibitoren erhalten werden, deren Bindungsaffinitäten gegenüber dem CD4-Protein im Verlaufe dieser Arbeit von $K_D \sim 6 \mu\text{M}$ auf $\sim 150 \text{ nM}$ gesteigert werden konnten.

6 Summary

The primary interaction between the HI-virus and its human host cell provides a promising approach for the development of HIV-entry-inhibitors. The proteins who are involved in these interactions are the viral gp120- and the human CD4-protein. The Inhibiting of the conserved gp120 binding site on the surface of the CD4 protein eliminates probably resistance due to mutations within gp120. Based on a virus neutralizing decapeptide developed by J. Wülfken¹¹⁴ A. Neffe designed CD4 binding peptidomimetics with improved pharmacophoric properties. SPR experiments provided dissociations constants of these peptidomimetics down to $K_D = 6 \mu\text{M}$. Relative to the peptide the proteolytic half life was increased four fold.¹²²

Based on these results new types of backbone modified peptidomimetics and glycopeptidomimetics were developed during this thesis. These ligands display a much higher affinity towards the CD4 protein. Furthermore, the proteolytic stability against the highly active protease mixture Pronase of these new peptidomimetics was improved more than two fold.

At the beginning of this thesis *in silico* analysis of statine modified peptidomimetics **13-15** docked and synthesized by A. Neffe, was carried out using the program Sybyl. It could be shown that the shorter backbone of these ligands led to a repulsion of the methyl group of L-Threonine and the protein surface. In addition, a much greater distance of the hydrophobic urethane residue to protein surface is obtained, which weakened the important hydrophobic interactions of the residue with Leu⁶¹ of the CD4-protein. The simultaneous enlargement of the hydrophobic side chain of the statine that mimics the L-valine side chain in the hydrophobic cavity of the CD4-protein did not lead to an improvement of the calculated binding energies of ligands **13-15**. Based on these results backbone modified peptidomimetics **16-23** were docked to CD4 using the program Flexidock. Two different modifications of the peptide bond between L-Valine and Glycine were introduced as ketomethylene that gave peptidomimetics **16-19** and as *E*-ethylene derivatives that gave peptidomimetics **20-23**. Because the original backbone length was preserved the calculated binding energies resulting from docking experiments were up to 35 kcal/mol lower than the corresponding statine containing ligands.

Starting from a synthetic strategy established earlier by me Fmoc protected dipeptide mimetics **24** and **25** could be successfully obtained. Several modifications in the synthetic routes yielded mimetics **24** and **25** with overall yields of 44% and 15%, respectively.

Analogous to this optimized synthetic route cyclohexylalanine dipeptide mimetics **47** and **55** could be obtained and used for further studies in order to synthesize new CD4 binding peptidomimetics.¹⁶⁴ Compounds **24** and **25** were used to synthesize ligands **16** and **17** via a linear synthetic sequence. A new convergent synthetic strategy was developed employing the microwave assisted synthesis of the protected peptidomimetics **77**, **78** and the amino urethane building blocks **73-76**. These different building blocks were finally merged together so that final ligands **16-23** could be obtained in very satisfactory yields.

SPR experiments gave binding curves for all eight ligands from which K_D values were calculated. The K_D values were determined in a range from 1-6 μM . In comparison to the ligands investigated by A. Neffe these new ligands have a ten to twenty fold lower dissociation constant.

Several studies with complete HI viruses showed the influence of the glycosylation at the Asn²⁰¹ on infectivity. Therefore, six peptides and glycopeptides were synthesized via microwave assisted solid phase peptide synthesis (**81-86**). Using these peptides the influence of glycosylation could be assessed for the first time. SPR experiments showed that linear peptides **81** and **82** did not have a high affinity to CD4 whereas the combination of **81** or **82** with decapeptide ⁴²⁵NMWQKV⁴³⁰-G-¹²³TPL¹²⁵ led to an improvement in binding affinity. The K_D values for peptide **83** and **84** could be determined to $K_D \sim 430 \mu\text{M}$. This is an improvement by 15 fold compared to the decapeptide. SPR experiments with the cyclic peptides **85** and **86** unambiguously showed that the cyclization led to even stronger binding affinity to CD4. The K_D value of the cyclic, non glycosylated peptide **85** could be determined to $K_D 91 \mu\text{M}$ that of the cyclic, glycosylated peptide **86** to $10 \mu\text{M}$. The cyclic glycopeptide **86** has an almost one thousand fold stronger binding affinity to CD4 compared to the original decapeptide ($K_D 6 \mu\text{M}$).

Based on these results a structure of the cyclic glycopeptide **86** derived from ¹H-NMR- and NOE-spectroscopic data was determined. Constrained molecular dynamic simulation gave the three dimensional structure of glycopeptide **86** in solution. From this model the distance between the α -carbon of L-Proline and the anomeric carbon of the essential glucosamine linked to Asn²⁰¹ was derived to be 6.34 Å.

Peptidomimetics **16-23** were linked with an L-glutamic acid derivative to a glucosamine with a distance of 6.30 Å. This linkage led to a new class of monosaccharide-peptidomimetics (**91-98**). The synthesis of ligands **91-93** respectively **95-97** could be successfully accomplished in analogy to the convergent synthesis of the ligands **16-23**. Following SPR experiments of these ligands gave $K_D \sim 203-940 \text{ nM}$. The important interaction between

the hydrophobic urethane residue and the CD4 surface was confirmed via an additional SPR experiment with truncated monosaccharide-peptidomimetic **118**. The absence of a methylene group in the hydrophobic residue resulted in decreased K_D value. Thus, the binding affinity is about eight fold lower than that of monosaccharide-peptidomimetic **93**.

Because of the influence of glycosylation by a monosaccharide to the binding affinity of ligands **91-93** and **95-97** new disaccharide-peptidomimetics (**124-127**) were developed. These ligands could be synthesized successfully via the already established synthetic route. SPR investigations of ligand **126** resulted in $K_D = 152$ nM, an eight fold higher value compared to monosaccharide peptidomimetic **95**.

By combination of NMR spectroscopic data, *in silico* calculations, SPR investigations as well as organic synthesis during this thesis new glycopeptidomimetics are available, whose binding affinity against CD4 could be increased from $K_D = 6$ μ M to ~ 150 nM.

7 Experimenteller Teil

7.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Gerätetyp</i>	<i>Hersteller</i>
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4,	Christ
HPLC	Biocad 700E Perfusion	BioCAD
	Merck/Hitachi LaChrom L-7000-Serie	VWR International
MALDI-TOF-MS Hamburg	Biflex III	Bruker Daltonics
Mikrowellen-Reaktor	<i>Mono-mode System Discover</i>	CEM
Mikrowellen-Synthesizer	<i>Liberty</i>	CEM
NMR 500 MHz	DRX500, $\nu_L(^1\text{H}) = 499.87$ MHz), inverser 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf	Bruker Biospin
NMR 700 MHz	Avance 700, (16.35 Tesla, $\nu_L(^1\text{H}) = 700.13$ MHz), inverser 5 mm Tripelresonanz- <i>cryoprobe</i>	Bruker Biospin
NMR-Probenröhrchen	3 mm <i>match</i>	Hilgenberg
NMR-Probenröhrchen	5 mm Typ502, Typ507-HP7	Norell
Reinstwasseranlage	SG Ultra Clear UV 18.2 M Ω	SGwater
Rotationsverdampfer	Laborata 4000-efficient	Heidolph/Cinnaminson
RP-Säule (analytisch)	EC250/4 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
RP-Säule (präparativ)	VP250/21 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
Sensorchip	CM5	Biacore
SpeedVac	Savant SC110	Thermo Electron
Software (allgemein)	Origin Pro 7.5, Adobe Illustrator 10	OriginLab Adobe
Software (MS)	Xmass 4.1, flexControl 3.0	Bruker Daltonics
Software (NMR)	Topspin 1.3, Topspin 2.1	Bruker Biospin
Software (SPR)	BIA-Eval 3.0	Biacore
Spin-Tubes	SpinX tubes (0.22 μm Celluloseacetat)	CoStar
SPR	Biacore T100	Biacore
Ultrafiltrationszelle	Amico 8050 (400 mL)	Millipore Inc
Ultrafiltrationsmembran	YM3 1000 Da, 3000 Da	Millipore Inc
Ultraschallbad	Sonorex Super, RK512H	Bandelin
UV/VIS Spektrometer	UV/Vis Spektrometer	Shimadzu
Zentrifugen	5084, 5417C, 5417R, Megafuge1.0R	Eppendorf, Heraeus

7.2 Chemikalien

<i>Hersteller</i>	<i>Chemikalie</i>
Acros Organics	Acetonitril (Ultra Gradient HPLC-Grade), Tetra- <i>n</i> -butoxytitan, Tetra- <i>tert</i> -butoxytitan, Trifluoroethanol, Triisopropylsilan (TIPS)
Iris Biotech	Acetanhydrid, L-Alaninol-2'-chlorotritylharz, Diisopropylethylamin (DIPEA), Fmoc-Aminosäuren, Piperidin 25 % (v/v) in DMF, HATU
Biacore	EDC-Lsg; NHS-Lsg; 10 mM Acetat-Puffer pH 4.0, 4.5 oder 5.0; 1.0 M Ethanolamin-HCl pH 8.5; BIAAdsorb1 (0.5 % (w/v) SDS); BIAAdsorb2 (50 mM Glycin pH 9.5); BIADisinfectant solution; PDEA
Deutero	Benzol- <i>d</i> ⁶ , CDCl ₃ , Deuteriumoxid 99.9%, DMSO- <i>d</i> ⁶ , MeOH- <i>d</i> ⁴
Fluka	2-Acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranose, Boc-L-Valin, 4-Brom-1-buten, Calciumchlorid, Dichlormethan, Diethylether, 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin, Dimethoxyethan, Dimethylsulfoxid, Dioxan, Essigsäureethylester, Ethanol, Lithiumaluminiumhydrid, Methanol, Natrium(meta)periodat, Ruthenium(III)-chlorid-Hydrat, TBTU, Tetrahydrofuran, Toluol, L-Valin
Iris Biotech und Novabiochem	Aminosäuren, Fmoc- und Seitenketten-geschützt (siehe Abkürzungsverzeichnis für Schutzgruppen)
Lancaster	Adamantylisocyanat, Bromessigsäure, <i>tert</i> -Butylisocyanat, Di- <i>tert</i> -butyloxycarbonat, Cyclohexylisocyanat, Ethyl-2-isocyanatoacetat
Linde	Stickstoff, Wasserstoff
Merck KGaA	Ammoniumhydrogencarbonat, Bromessigsäure, 1,1'-Carbonyldiimidazol, Chloroform, Dichlormethan, Dicyclohexylcarbodiimid, <i>N,O</i> -Dimethylhydroxylamin, Essigsäure, 9-Fluorenylmethyl-succinimidylcarbonat, Hydrazin-Hydrat, Iod, Kaliumhydroxid, Kaliumpermanganat, KHMDS, Kieselgel G60, Kupfer(I)-chlorid, Magnesium-Späne, Magnesiumsulfat-Hydrat, Methyltriphenylphosphoniumbromid, 2-Naphthol, Natrium, Natriumborhydrid, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Petrolether 50-70, Phosphorsäure, 2-Propanol, Salzsäure 37 %, Schwefelsäure 95-97 %, Thionylchlorid, Triethylamin, Trifluoressigsäure
Proligo	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
Sigma-Aldrich	Diisobutylaluminiumhydrid, 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), Cyano-4-hydroxymethylsäure (CCA), Grubbs-Katalysator 2 nd Generation, Sinapinsäure (SA)

7.3 SPR-Experimente

Sämtliche SPR-Experimente wurden an einem BIAcore T100-Gerät durchgeführt. Zunächst wurde das CD4-Protein in HBS-EP, pH = 7.4, umgepuffert. Bei der Umpufferung wurden *centricon tubes* mit einer Membrangröße von 10 kDa verwendet. Die Membran wurde zehnmal mit 2 mL ddH₂O gewaschen, mit 1.9 mL HBS-EP befüllt und 100 µL der 1 mg/mL Proteinlösung hinzugefügt. Diese wurde anschließend bei 4 °C und 4000 rpm mit einem Verdünnungsfaktor von mindestens 10⁵ umgepuffert. Im Anschluss an diese Prozedur konnte ein CM5-Chips mit CD4-Protein mit insgesamt 9640 RU (230 fmol) belegt. Zur Kontrolle der Aktivität des auf der Oberfläche immobilisierten Proteins wurde eine 250 nM Lösung aus GP120 über den Chip geleitet (Flussrate: 15 µL/min; Kontaktzeit: 600 Sekunden) und die Bindungskurve mit dem Programm BiaEvaluation analysiert. Daraus ergab sich eine Aktivität von 8% des an der Oberfläche immobilisierten CD4-Proteins entsprechend 19 fmol. Die Liganden wurden jeweils in HBS-EP-Puffer, pH = 7.4, gelöst und in unterschiedlichen Konzentrationen mit einer Kontaktzeit von 120-240 Sekunden bei einer Flussrate von 30 µL/min über den Chip geleitet.

7.4 Synthesen

Alle Reaktionen wurden, falls nicht anders vermerkt, mit Stickstoff als Schutzgas und in trockenen Lösungsmitteln durchgeführt. Als trockene Lösungsmittel wurden die vom Hersteller Fluka käuflich erhältlichen Lösungsmittel verwendet. Die Flash-säulenchromatographische Aufreinigung wurde mit einem Stufengradienten durchgeführt. Es wurde die Startzusammensetzung der mobilen Phase angegeben. Der Anteil der polaren Komponente der mobilen Phase wurde nach einem Säulenvolumen verdoppelt, bis die angegebene Endzusammensetzung der mobilen Phase erreicht wurde.

Im Experimentellen Teil dieser Arbeit werden ausschließlich die Darstellungen neu synthetisierte Verbindungen detailliert beschrieben. Verbindungen, deren Darstellung nicht von der literaturbekannten Synthese abweichen, werden nicht berücksichtigt.

Nomenklatur der Verbindungen

Alle Verbindungen wurden mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie analysiert. Alle Namen der Verbindungen im Experimentellen Teil wurden unter Verwendung der IUPAC Nomenklatur bestimmt. Derivaten, die von L-Alaninol bzw. L-Glutamol abgeleitet werden können, werden aus übersichtstechnischen Gründen weiterhin beibehalten.

Nomenklatur für NMR-Spektroskopie

Die NMR-Auswertung der Fmoc-Schutzgruppe bezieht sich in ihrer Nomenklatur auf die Benennung der Protonen und Kohlenstoffe Fluorens nach einem aromatischen ABCD-Spinsystems (Abbildung 88). Die Multiplizitäten bei der Zuordnung der Kohlenstoffsignale entspricht ihrem Protonierungsgrad (*s*: Methinkohlenstoff; *d*: Methylene Kohlenstoff; *t*: Methylkohlenstoff; *g*: quartärer Kohlenstoff).

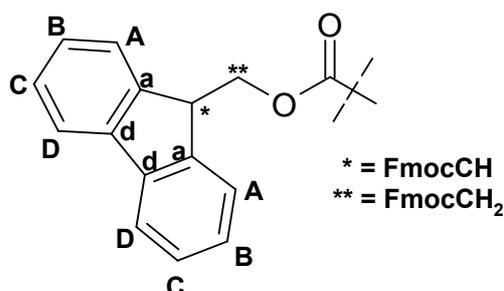


Abbildung 88: Verwendete Nomenklatur der Protonen bzw. Kohlenstoffatome für die NMR-Spektroskopie.

Die Nomenklatur für die Bezeichnungen der Protonen- bzw. Kohlenstoffatome für die Auswertung mittels NMR-Spektroskopie folgt für L-Alaninol-, L-Glutamol- bzw. L-Glutaminol Derivate folgendem Schema:

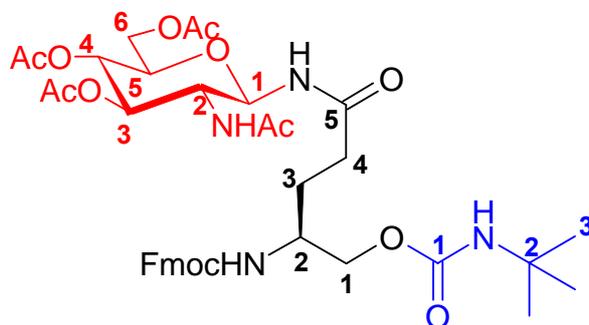


Abbildung 89: Verwendete Nomenklatur der Protonen bzw. Kohlenstoffatome für die NMR-Spektroskopie am Beispiel der Verbindung **113**. Schwarz: Protonen und Kohlenstoffe, die dem L-Glutaminol zugeordnet werden. Blau: Protonen und Kohlenstoffe, die den *Isocyanaten* zugeordnet werden (werden hinter der Bezeichnung des Signals zusätzlich mit **carb.** bezeichnet). Rot: Protonen und Kohlenstoffe, die dem Kohlenhydraten zugeordnet werden (werden hinter der Bezeichnung des Signals zusätzlich mit **GlcNAc 1** bzw. **GlcNAc 2** bezeichnet).

7.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

7.4.1.1 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese (AAV1)

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese erfolgte an dem Mikrowellen-unterstützten Syntheserobotersystem *Discovery* der Firma *CEM* unter Verwendung eines Polystyrol-PAL-PEG-Harzes, welches eine Belegung von 0.21 μmol Bindungsstellen pro 1 mg Harz aufwies. Das Harz wurde vor der ersten Kupplung durch das abwechselnde Versetzen des Harzes mit 2-Propanol und DMF für mindestens 12 Stunden gequellt. Für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen wurde das Harz für 30 Sekunden mit einer Lösung von 20% (v/v) Piperidin in DMF versetzt und die Lösung bei 75 °C mit einer Leistung von 35 Watt bestrahlt. Die Kupplung der Aminosäuren erfolgte unter Einsatz eines vierfachen Überschusses der Aminosäure (0.2 M in DMF) und eines fünffachen Überschusses an DIPEA (0.5 M in DMF) und TBTU (0.5 M in DMF). Die Kupplungslösung wurde nach erfolgtem Einspritzen für 300 Sekunden bei 75 °C mit einer Leistung von 25 Watt bestrahlt. Das Blockieren nicht umgesetzter Bindungsstellen erfolgte durch Versetzen des Harzes mit einer Lösung von 10% (v/v) Essigsäureanhydrid in DMF für 30 Sekunden bei 65 °C und einer Leistung von 40 Watt. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe der gekuppelten Aminosäure wurde bei einer Reaktionszeit von 180 Sekunden bei einer Temperatur von 75 °C und einer Leistung von 35 Watt erwirkt. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten Waschschrte mit DMF, mit denen alle Nebenprodukte und Reste der Reagenzien entfernt wurden. Die Fmoc-Gruppe der letzten gekuppelten Aminosäure wurde manuell abgespalten, um eine vorläufige Ausbeute der Synthese bestimmen zu können (AAV3).

7.4.1.2 Kupplung der geschützten Peptidomimetika 64 und 65 mit Amino-Carbamaten (AAV2)

Das entsprechend Seitenketten-geschützte Peptidomimetikum (1.2 Äq.) wurde in DMF gelöst (75 μL DMF/1 μmol) und mit einer Lösung aus TBTU/DIPEA (1.5 Äq.) in DMF (40 μL /1 μmol TBTU/DIPEA) versetzt. Diese Lösung wurde anschließend zu einer Lösung des entsprechenden Amino-Carbamats in DMF (50 μL / μmol) zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 600 Sekunden bei 60 °C mit einer Leistung von 50 Watt bestrahlt. Darauffolgend wurde das Lösungsmittel der Reaktionslösung destillativ entfernt und im Falle der Glycopeptidomimetika nach AAV4 *O*-deacetyliert und im Falle aller Peptidomimetika anschließend nach AAV5 entschützt und entsprechend gereinigt.

7.4.1.3 Manuelle Abspaltung der Fmoc-Gruppe (AAV3)

Für die Bestimmung der Rohausbeute der Peptidsynthese wurde die Fmoc-Gruppe der letzten gekuppelten Aminosäure manuell abgespalten. Hierzu wurde das gesamte Harz mit 2000 μL Piperidin/DMF (20% (v/v)) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung in einem lichtgeschützten Kolben überführt und das Harz viermal mit je 2000 μL DMF gewaschen und die Waschlösung mit der Reaktionslösung vereint. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die photometrische Quantifizierung des abgespaltenen Methylenfluorens. Hierzu wurden 200 μL der Reaktionslösung mit DMF auf 2000 μL verdünnt und die so erhaltene Lösung bei einer Wellenlänge $\lambda = 301 \text{ nm}$ vermessen. Die Stoffmenge des abgespaltenen Methylenfluorens errechnet sich nach.

$$n_{\text{Fmoc}} = (OD * V + \varepsilon^{-1} + d^{-1}) * F$$

Berechnung der Stoffmenge des abgespaltenen Methylenfluorens (n_{Fmoc}). Mit OD: gemessene Absorption, V: Volumen der Reaktionslösung (20 mL), ε : Molarer Extinktionskoeffizient ($7.95 * 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d: Schichtdicke der Küvette (1 cm) und F: Verdünnungsfaktor (16).²⁰⁵

Die prozentuale Ausbeute berechnet sich aus dem Quotienten der Menge an abgespaltenem Methylenfluoren und der Anzahl der Bindungsstellen des eingewogenen Harzes in Prozent.

7.4.1.4 O-Deacetylierung der Glycopeptide und Glycopeptidomimetika (AAV4)

Das am Harz befindliche Glycopeptid bzw. Glycopeptidomimetikum wurde in 3 mL Hydrazin-Hydrat/MeOH (1:5 v/v) versetzt und für 5 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung im Vakuum destillativ entfernt. Im Falle der Glycopeptidomimetika wurde der Feststoff jeweils ein Mal mit Toluol und Methanol codestilliert und darauffolgend im Vakuum getrocknet.

7.4.1.5 Abspaltung der Peptide von der Festphase (AAV5)

Vor dem Abspalten der Peptide vom Harz wurde dieses gründlich mit Dichlormethan gewaschen um letzte Spuren an DMF zu entfernen und danach im Stickstoffstrom getrocknet.

Die Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgte durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit einer Lösung aus TFA/TIPS/ H_2O (v/v 95/3/2) und anschließendem Schütteln der Reaktionslösung für 90 Minuten. Die Reaktionslösung wurde darauffolgend in einen Kolben überführt, das Harz viermal mit 2 mL TFA gewaschen und die vereinigten Lösungen im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der verbliebene Rückstand wurde zum Entfernen letzter TFA-Spuren einmal mit Dichlormethan coevaporiert und im Anschluss mit 'Butyl-

Methylether versetzt. Die erhaltene Suspension wurde für fünf Minuten im Ultraschall homogenisiert und im Anschluss bei 3300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

7.4.1.6 Reinigung der Peptide und Peptidomimetika über RP-HPLC (AAV6)

Die Reinigung der Peptide erfolgte über eine präparative RP-HPLC-Säule (Pyramid C₁₈ reversed phase) mit einer Flussrate von 20 mL/min. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten eines Laufmittelgemisches aus Laufmittel (Wasser/Acetonitril 95/5 mit 0.1% (v/v) TFA) und Laufmittel (Acetonitril/Wasser 95/5 mit 0.1% (v/v) TFA), die Detektion erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 215$ nm und $\lambda = 280$ nm.

Für die HPLC-Injektion wurde das gefriergetrocknete Rohprodukt eingewogen und in 1 mL des Laufmittels gelöst. Die erhaltene Lösung wurde eine Minute bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand durch einen Zentrifugationsfilter (0.22 μ m) bei 3300 g zentrifugiert.

Reinigung Dipeptid-mimetischer Bausteine

Für die RP-HPLC werden die Laufmittel (95 % H₂O, 5 % Acetonitril, 0.1 % TFA) und (95 % Acetonitril, 5 % H₂O, 0.1 % TFA) verwendet. Die dipeptid-mimetischen Bausteine wurden in 1 mL des Laufmittels gelöst. Eluent C / Eluent D 80/20 (1 CV) → 70/30 (2.5 CV) → 0/100 (1 CV) → 0/100 (1 CV) → 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL/min).

Reinigung der Peptidomimetika

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels RP-HPLC an einer präparativen RPC₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 80/20 (1 CV) → 50/50 (1 CV) → 25/75 (3 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1.5 CV) → 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL).

Reinigung der Glycopeptidomimetika 105-108

Die Vorreinigung des Rohproduktes erfolgte mittels RP-HPLC an einer präparativen RPC₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 80/20 (1 CV) → 50/50 (1 CV) → 25/75 (3 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1.5 CV) → 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL). Die produkthaltigen Fraktionen wurden anschließend gefriergetrocknet und wiederum mittels RP-HPLC an einer präparativen RPC₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 100/00 (1 CV) → 60/40 (7 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1.5 CV) → 100/00 (1 CV), Flussrate 20 mL) gereinigt.

7.4.1.7 Charakterisierung der Peptide/Mimetika mit NMR (AAV7)

Alle Peptide/Mimetika wurden NMR-spektroskopisch charakterisiert. Hierzu wurden die jeweiligen Peptide/Mimetika in H₂O/D₂O (9:1, pH 3.0) gelöst und auf einem 500 MHz oder einem 700 MHz Spektrometer bei einer Temperatur von 300 K vermessen. Das Wassersignal wurde mit einer WATERGATE-Pulssequenz unterdrückt. Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme eines TOCSY-Spektrums, die Peptidsequenz wurde durch die Auswertung der NOE-Kontakte der jeweiligen Aminosäuren unter Zuhilfenahme eines NOESY-Spektrums verifiziert.

7.4.2 Verbindungen aus Abschnitt 4.1

7.4.2.1 Darstellung von (6*S*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-6-amino-7-methyl-5-oxo-oct-1-en **28**

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁴⁴ wurden zur Darstellung von (6*S*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-6-amino-7-methyl-5-oxo-oct-1-en (**28**) 648 mg (27.1 mmol) Mg-Späne in 6 mL abs. Et₂O vorgelegt und eine kleine Spatelspitze Iod zugegeben. Anschließend wurden 2.8 mL (3.7 g; 27 mmol) 4-Brom-1-buten in 42 mL abs. Et₂O zugetropft und die Lösung eine Stunde unter Rückfluss gerührt. Darauffolgend wurde diese Lösung zu einer –78 °C kalten Lösung aus 1.17 g (4.51 mmol) **27** gelöst in 100 mL abs. Et₂O wurden zugetropft. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere drei Stunden gerührt. Danach erfolgte die Zugabe von 300 mL EE und 150 mL 10 %iger NH₄Cl-Lösung. Die wässrige Phase wurde dreimal mit jeweils 100 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit jeweils 100 mL Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Das Rohprodukt (1.27 g) wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 3:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 1.00 g (3.92 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 87 %.

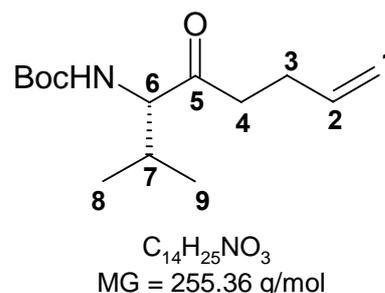
Charakterisierung

Farbloses, viskoses Öl

Drehwert: $[\alpha]_{546} = +39^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

R_f-Wert (PE/EE 3:1) = 0.44

FAB-MS: $m/z = 256.4$ [M+H]⁺, 288.2 [M+Na]⁺, 294.9 [M+K]⁺



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.87\text{-}5.72$ (*m*, 1H, **H-2**); 5.12 (*br*, 1H, NH) 5.04 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-1,H-2}} = 1.5$ Hz, $^2J_{\text{H-1,H-1}'} = 15.3$ Hz, **H-1**); 4.98 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-1}',\text{H-2}} = 1.5$ Hz, $^2J_{\text{H-1}',\text{H-9}} = 10.2$ Hz, **H-1'**); 4.27 (*br*, 1H, **H-6**); 2.63-2.55 (*m*, 2H, **H-3**); 2.39-2.30 (*m*, 2H, **H-4**); 2.18-2.09 (*m*, 1H, **H-7**); 1.62 (*s*, 9H, Boc-Me); 1.00 (*d*, $^3J_{\text{H-8,H-7}} = 6.9$ Hz, **H-8**); 0.78 (*d*, $^3J_{\text{H-9,H-7}} = 6.9$ Hz, **H-9**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 208.86$ (*s*, **C-5**); 155.99 (*s*, Boc-Carbonyl); 137.23 (*d*, **C-2**); 115.93 (*t*, **C-1**); 79.55 (*s*, Boc-quart.); 64.41 (*d*, **C-6**); 34.86 (*d*, **C-7**); 32.25 (*t*, **C-4**); 29.06 (*q*, Boc-Me); 27.84 (*t*, **C-3**); 20.59 (*q*, **C-8**); 16.91 (*q*, **C-9**) ppm.

7.4.2.2 Darstellung von (5*S*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-5-amino-6-methyl-3-oxoheptansäure **29**

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁴⁴ wurde zur Darstellung von (5*S*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-5-amino-6-methyl-3-oxoheptansäure (**29**) 1.00 g (3.92 mmol) **28** in 68 mL MeCN gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 5.87 g (27.4 mmol) Natrium(meta)periodat gelöst in 68 mL Wasser und 72 mg (0.35 mmol) $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ zugeben. Die Lösung wurde 105 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden jeweils 70 mL Wasser und Et_2O zugegeben. Die wässrige Phase wurde zweimal mit jeweils 70 mL Et_2O und einmal mit 70 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 70 mL Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 3:1 - 1:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 536 mg (1.96 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 50%.

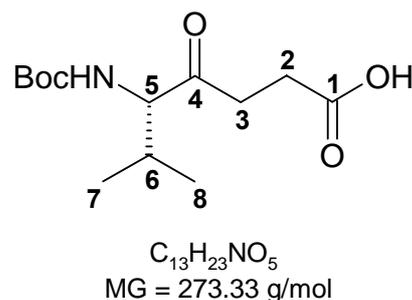
Charakterisierung

Hellbrauner Feststoff; Smp.: 105 – 108 °C

Drehwert: $[\alpha]_{546} = +28^\circ$ (*c* = 1, CHCl_3)

R_f -Wert ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5:1) = 0.55

FAB-MS: $m/z = 274.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 296.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.08$ (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH,H-5}} = 11.2$ Hz, **NH**); 4.28 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-5,NH}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H-5,H-6}} = 3.8$ Hz, **H-5**); 3.37 (*br*, 1H, CO_2H); 2.94-2.82 (*m*, 1H, **H-2**); 2.80-2.57 (*m*, 3H, **H-3**, **H-2'**); 2.27-2.16 (*m*, 1H, **H-6**); 1.44 (*s*, 9H, **Boc-Me**); 1.01 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-7,H-6}} = 6.3$ Hz, **H-7**); 0.80 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-8,H-6}} = 6.3$ Hz, **H-8**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 209.13$ (*s*, **C-4**); 176.18 (*s*, **C-1**); 154.68 (*s*, **Boc-Carbonyl**); 78.63 (*s*, **Boc-quart.**); 64.14 (*d*, **C-5**); 36.00 (*t*, **C-2**); 35.35 (*d*, **C-6**); 29.06 (*q*, **Boc-Me**); 28.19 (*t*, **C-3**); 20.82 (*q*, **C-7**); 17.35 (*q*, **C-8**) ppm.

7.4.2.3 Darstellung von (5S)-5-Amino-6-methyl-4-oxo-heptansäure **37**

536 mg (1.96 mmol) **29** wurden in 10 mL EtOH gelöst (180 $\mu\text{mol}/1$ mL), mit 750 μL 3 N Salzsäure versetzt (1 $\mu\text{mol}/0.5$ μL) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

Das Rohprodukt wurde nach AAV6 per HPLC gereinigt. Es konnten 287 mg (1.66 mmol) isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 85 %.

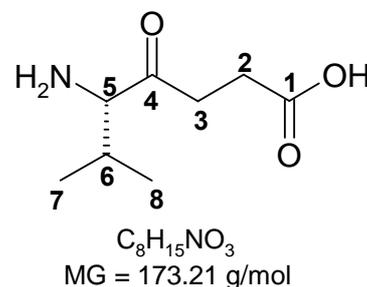
Charakterisierung

Farbloses, viskoses Öl

R_t -Wert: 5.05 min

Drehwert: $[\alpha]_{546} = +25^\circ$ ($c = 0.67$, MeOH)

ESI-MS: 174 (82) $[\text{M}+\text{H}]^+$; 129 (100); 102 (63)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH-d^4): $\delta = 4.19$ (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-5,H-6}} = 7.1$ Hz, **H-5**); 3.03-2.94 (*m*, 1H, **H-2**); 2.88-2.80 (*m*, 1H, **H-2'**); 2.73-2.66 (*m*, 2H, **H-3**); 2.61-2.57 (*m*, 1H, **H-6**); 1.18 (*d*, $^3J_{\text{H-7,H-6}} = 7.1$ Hz, **H-7**); 0.98 (*d*; $^3J_{\text{H-8,H-6}} = 7.1$ Hz, **H-8**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOH-d^4): $\delta = 203.79$ (*s*, **C-4**); 175.25 (*s*, **C-1**); 64.32 (*d*, **C-5**); 35.01 (*t*, **C-2**); 28.67 (*d*, **C-6**); 27.32 (*t*, **C-3**); 18.28 (*q*, **C-7**); 15.24 (*q*, **C-8**) ppm.

7.4.2.4 Darstellung von (5S)-N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-5-amino-6-methyl-3-oxo-heptansäure 24

287 mg (1.66 mmol) **37** wurden in 2.3 mL 10 %iger Na₂CO₃-Lösung gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde die Lösung zunächst mit 2.3 mL Dioxan versetzt; darauffolgend wurden langsam 562 mg (1.66 mmol) Fmoc-ONSu gelöst in 4.3 mL Dioxan zugetropft. Es wurde eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt und anschließend weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde mit 3 N Salzsäure angesäuert (pH = 1.5). Anschließend wurden jeweils 40 mL Wasser und Et₂O zugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit jeweils 40 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Das erhaltene Rohprodukt (900 mg) wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 95:5 – 8:2) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 347 mg (878 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 53%.

Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Smp.: 56 °C

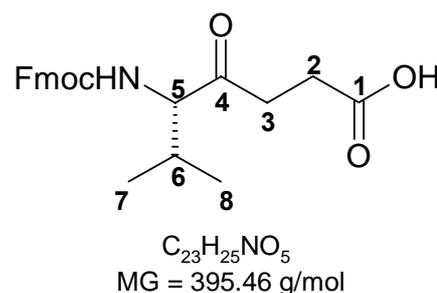
Drehwert: $[\alpha]_{546} = +37^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

R_F-Wert (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.11

MALDI-TOF-MS: m/z = 396 [M+H]⁺; 418 [M+Na]⁺; 435 [M+K]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.86-7.79 (m, 2H, Fmoc **H_A**, **H_{A'}**); 7.73-7.67 (m, 2H, Fmoc **H_D**, **H_{D'}**); 7.45-7.37 (m, 2H, Fmoc **H_B**, **H_{B'}**); 7.36-7.30 (m, 2H, Fmoc **H_C**, **H_{C'}**); 5.08 (d, 1H, ³J_{NH,H-5} = 7.2 Hz, **NH**); 4.52-4.39 (m, 2H, Fmoc-CH₂); 4.25 (t, 1H, ³J_{Fmoc-CH,Fmoc-CH₂} = 6.6 Hz, Fmoc-CH); 4.08 (dd, 1H, ³J_{H-5,H-6} = 5.8 Hz, ³J_{H-5,NH} = 7.2 Hz, **H-5**); 2.79-2.71 (m, 2H, **H-2**); 2.56-2.51 (m, 2H, **H-3**); 2.30-2.18 (m, 1H, **H-6**); 0.97 (d, 3H, ³J_{H-7,H-6} = 6.6 Hz, **H-7**); 0.87 (d, 3H, ³J_{H-8,H-6} = 6.6 Hz, **H-8**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 209.00 (s, **C-4**); 175.26 (s, **C-1**); 158.00 (s, Fmoc-Carbonyl); 144.08 (s, Fmoc **C_a**); 141.26 (s, Fmoc **C_d**); 129.97 (d, Fmoc **C_B**); 127.30 (d, Fmoc **C_C**); 124.87 (d, Fmoc **C_A**); 119.70 (d, Fmoc **C_D**); 66.46 (d, **C-5**); 65.86 (t, Fmoc-CH₂); 47.92 (d, Fmoc-CH); 34.66 (t, **C-2**); 29.77 (d, **C-6**); 28.61 (t, **C-3**); 20.16 (q, **C-7**); 16.60 (q, **C-8**) ppm.



7.4.2.5 Darstellung von (3*S*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-amino-4-methyl-pent-1-en **33**

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁴⁷ wurden zur Darstellung von (3*S*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-amino-4-methyl-pent-1-en **33** 10.60 g (29.61 mmol) Methyltriphenylphosphoniumbromid wurden in 60 mL abs. THF gelöst und die Lösung anschließend auf 0 °C gekühlt. Darauffolgend wurden 5.98 g (30.0 mmol) gelöst in 60 mL abs. THF zugetropft und die Lösung auf -78 °C gekühlt. Zu dieser Reaktionslösung wurden 2.97 g (14.8 mmol) **32** gelöst in 60 mL abs. THF zugetropft und die Lösung weitere zwei Stunden bei -78 °C und anschließend 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Reaktionslösung mit 400 mL EE/H₂O (1:1) versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EE extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/Et₂O; 6:1) gereinigt. Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum konnten 2.09 g (10.5 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 71 %.

Charakterisierung

Farbloses Öl

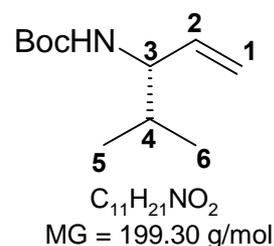
Drehwert: $[\alpha]_{546} + 35.3^\circ$ ($c = 1$, CHCl₃)

R_F-Wert (PE/Et₂O 6:1) = 0.23

FAB-MS: $m/z = 200.5$ [M+H]⁺, 222.8 [M+Na]⁺, 238.7 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.71$ - 5.67 (*m*, 1H, **H-2**); 5.13 - 5.01 (*m*, 2H, **H-1**); 4.47 (*br*, 1H, NH); 3.90 (*br*, 1H, **H-3**); 1.77 - 1.68 (*m*, 1H, **H-4**); 1.39 (*s*, 9H, Boc-Me); 0.85 (*d*, ³*J*_{H-5,H-4} = 6.9 Hz, **H-5**); 0.83 (*d*, ³*J*_{H-6,H-4} = 6.9 Hz, **H-6**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 155.79$ (*s*, Carbonyl-C); 138.01 (*d*, **C-2**); 117.32 (*t*, **C-1**); 79.39 (*s*, Boc-quart.); 57.88 (*d*, **C-3**); 33.02 (*d*, **C-4**); 29.51 (*q*, Boc-Me); 19.15 (*q*, **C-5**); 18.95 (*q*, **C-6**) ppm.



7.4.2.6 Darstellung von (5S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-5-amino-6-methyl-hept-3E-ensäuremethylester **34**

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁶¹ wurden 2.00 g (10.1 mmol) **33** und 358 μ L (335 mg, 3.35 mmol) Methyl-3-butenolat zu 799 mg (2.95 mmol) **34** umgesetzt. Das entspricht einer Ausbeute von 88% bezogen auf Methyl-3-butenolat.

Charakterisierung

Farbloses Öl

Drehwert: $[\alpha]_{546} = +38^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

R_f -Wert (PE/EE 7:3) = 0.48

FAB-MS: $m/z = 272.5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 295.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 310.7 $[\text{M}+\text{K}]^+$

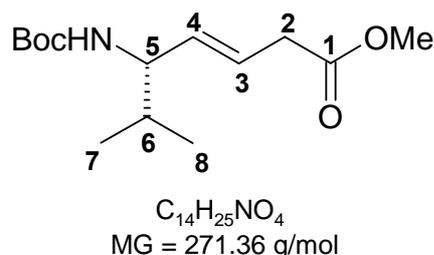
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.89\text{-}5.79$ (m , 1H, **H-4**); 5.65 (dd , 1H, $^3J_{\text{H-3,H-4}} = 15.3$ Hz, $^3J_{\text{H-3,H-5}} = 5.6$ Hz, **H-3**); 4.67 (br , 1H, **NH**); 4.15 (br , 1H, **H-5**); 3.85 (q , 3H, Ester-Me); 3.25 (d , 2H, $^3J_{\text{H-2,H-3}} = 5.6$ Hz, **H-2**); 1.99-1.86 (m , 1H, **H-6**); 1.45 (s , 9H, Boc-Me); 1.06 (d , $^3J_{\text{H-7,H-6}} = 6.9$ Hz, **H-7**); 1.04 (d , $^3J_{\text{H-8,H-6}} = 6.9$ Hz, **H-8**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 174.75$ (s , **C-1**); 157.30 (s , Boc-Carbonyl); 133.75 (d , **C-3**); 123.20 (d , **C-4**); 79.62 (s , Boc-quart.); 58.13 (d , **C-5**); 52.27 (q , Ester-Me); 37.95 (t , **C-2**); 32.69 (d , **C-6**); 28.63 (q , Boc-Me); 19.08 (q , **C-7**); 18.51 (q , **C-8**) ppm.

7.4.2.7 Darstellung von (5S)-5-Amino-6-methyl-hept-3E-ensäure **42**

913 mg (3.36 mmol) **34** wurden in 16 mL MeOH gelöst, mit 6.53 mL 1M NaOH-Lösung versetzt und anschließend 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde daraufhin mit konz. *ortho*-Phosphorsäure auf den pH-Wert 1.5 angesäuert und die wässrige Phase dreimal mit jeweils 75 mL Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 8.4 mL EtOH aufgenommen und die Lösung anschließend auf 0 °C gekühlt. Daraufhin wurde die Reaktionslösung mit 1.3 mL 3N HCl-Lösung versetzt und weitere 45 Minuten bei 0 °C gerührt. Im Folgenden wurde das Lösungsmittel bei 60 °C im Vakuum destillativ entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 10 mL MeCN/ H_2O (1:4) aufgenommen und anschließend gefriergetrocknet. Das Rohprodukt



wurde anschließend nach AAV6 mittels *RP*-HPLC gereinigt. Es wurden 359 mg (2.28 mmol) isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 68%.

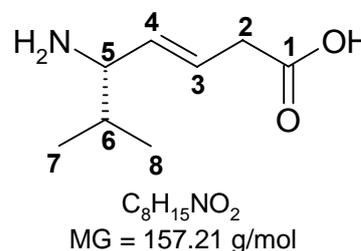
Charakterisierung

Farbloses Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = +32^\circ$ ($c = 1$, MeOH)

R_t -Wert = 5.12 min

FAB-MS: $m/z = 158.1$ $[M+H]^+$, 180.1 $[M+Na]^+$



1H -NMR (500 MHz, MeOD- d^4): $\delta = 5.89$ - 5.79 (m , 1H, **H-4**); 5.65 (dd , 1H, $^3J_{H-3,H-4} = 15.3$ Hz, $^3J_{H-3,H-2} = 5.6$ Hz, **H-3**); 4.15 (br , 1H, **H-5**); 3.25 (d , 2H, $^3J_{H-2,H-3} = 5.6$ Hz, **H-2**); 1.99 - 1.86 (m , 1H, **H-6**); 1.06 (d , $^3J_{H-7,H-6} = 6.9$ Hz, **H-7**); 1.04 (d , $^3J_{H-8,H-6} = 6.9$ Hz, **H-8**) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD- d^4): $\delta = 173.88$ (s , **C-1**); 131.00 (d , **C-3**); 127.54 (d , **C-4**); 59.21 (d , **C-5**); 37.30 (t , **C-2**); 31.66 (d , **C-6**); 17.74 (q , **C-7**); 17.62 (q , **C-8**) ppm.

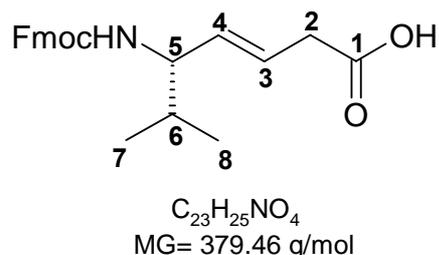
7.4.2.8 Darstellung von (5S)-N-(Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-4-amino-5-methyl-pent-3E-ensäure 25

217 mg (1.38 mmol) 42 wurden in 3.5 mL eines Gemisches aus 10%iger Na_2CO_3 -Lösung und 1,4-Dioxan (v/v 1:1) gelöst und auf $0^\circ C$ gekühlt. Anschließend wurden 467 mg (1.38 mmol) Fmoc-ONSu gelöst in 3.57 mL 1,4-Dioxan zugetropft und eine weitere Stunde bei $0^\circ C$ gerührt. Daraufhin wurde für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Lösung anschließend mittels 3N HCl-Lösung auf $pH = 1$ angesäuert und mit 33 mL H_2O versetzt. Die wässrige Phase wurde viermal mit 30 mL Et_2O extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: $CHCl_3/MeOH$; 19:1) gereinigt. Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum und anschließender Gefriertrocknung konnten 290 mg (756 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 55%.

Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Smp.: 142 °C

Drehwert: $[\alpha]_{546} = +34^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3) R_f -Wert ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$; 19:1) = 0.31MALDI-TOF-MS: $m/z = 380.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; 402.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOH-}d^4$): $\delta = 7.86\text{-}7.79$ (*m*, 2H, Fmoc H_A , H_A'); $7.74\text{-}7.66$ (*m*, 2H, Fmoc H_D , H_D'); $7.45\text{-}7.37$ (*m*, 2H, Fmoc H_B , H_B'); $7.36\text{-}7.31$ (*m*, 2H, Fmoc H_C , H_C'); $5.85\text{-}5.77$ (*m*, 1H, H-4); 5.49 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-3,H-2}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{H-3,H-4}} = 15.8$ Hz, H-3); $4.43\text{-}4.31$ (*m*, 2H, Fmoc- CH_2); 4.24 (*t*, 1H, $^3J_{\text{Fmoc-CH,Fmoc-CH}_2} = 6.9$ Hz, Fmoc- CH); 3.90 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-5,H-6}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{H-5,H-4}} = 6.6$ Hz, H-5); 2.95 (*d*, 2H, $^3J_{\text{H-2,H-3}} = 6.3$ Hz, H-2); $1.82\text{-}1.74$ (*m*, 1H, H-6); 1.08 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-7,H-6}} = 6.9$ Hz H-7); 1.01 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-8,H-6}} = 6.8$ Hz, H-8) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{MeOD-}d^4$): $\delta = 175.43$ (*s*, C-1); 157.30 (*s*, Fmoc-**Carbonyl**); 144.12 (*s*, Fmoc C_a); 141.32 (*s*, Fmoc C_d); 133.88 (*d*, C-4); 129.95 (*d*, Fmoc C_b); 127.24 (*d*, Fmoc C_c); 124.2 (*d*, Fmoc C_A); 123.55 (*d*, C-3); 119.70 (*d*, Fmoc C_D); 66.46 (*d*, C-5); 65.86 (*t*, Fmoc- CH_2); 47.92 (*d*, Fmoc- CH); 37.95 (*t*, C-2); 29.77 (*d*, C-6); 20.16 (*q*, C-7); 16.60 (*q*, C-8) ppm.

7.4.2.9 Darstellung von (2S)-N-Methyl-2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-propylhydroxamsäuremethylester 44

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁴³ wurden zur Darstellung von (2S)-N-Methyl-2-tert-(butoxycarbonylamino)-3-cyclohexyl-propylhydroxam-säuremethylester (44) zu einer Lösung aus 570 mg (2.11 mmol) 43 in 5.5 mL DCM bei 0 °C 454 mg (2.79 mmol) CDI zugegeben und weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Dieser Lösung wurde eine Suspension aus 2.72 g (2.79 mmol) N, O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid und 391 μL (283 mg; 2.79 mmol) Et_3N zugegeben und eine Stunde bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 24 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde jeweils dreimal mit 15 mL 1 N Salzsäure, ges. Na_2CO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 629 mg (2.01 mmol) des Produktes erhalten werden. Das entspricht einer Ausbeute von 95 %.

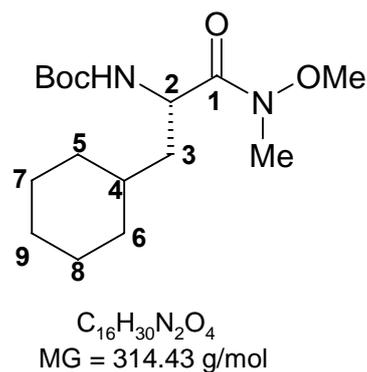
Charakterisierung

gelbliches, viskoses Öl

Drehwert: $[\alpha]_{546} + 148.4^\circ$ ($c = 1$, DCM)

R_f -Wert (PE/EE 1:1) = 0.51

FAB-MS: $m/z = 327.1$ $[M+Na]^+$; 353.5 $[M+K]^+$.



1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.12$ (*br*, 1H, NH); 4.49 (*br*, 1H, **H-2**); 3.69 (*s*, 3H, O-Me); 3.12 (*s*, 3H, N-Me); 1.82 (*dd*, 1H, $^2J_{H-3,H-3'} = 13.2$ Hz, $^3J_{H-3,H-2} = 11.6$ Hz, **H-3**); 1.75-1.55 (*m*, 5H, **H-5**, **H-6**, **H-7**, **H-8**, **H-9**); 1.52 (*dd*, 1H, $^2J_{H-3',H-3} = 8.9$ Hz, $^3J_{H-3',H-2} = 5.4$ Hz, H-3'); 1.44 (*s*, 9H, Boc-Me); 1.38-1.30 (*m*, 1H, **H-4**); 1.28-1.02 (*m*, 3H, **H-7'**, **H-8'**, **H-9'**); 1.00-0.82 (*m*, 2H, **H-5'**, **H-6'**) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 168.62$ (*s*, **C-1**); 156.15 (*s*, Boc-Carbonyl); 79.65 (*s*, Boc-quart.); 61.86 (*q*, O-Me); 52.29 (*d*, **C-2**); 32.18 (*q*, N-Me); 40.00 (*t*, **C-3**); 34.05 (*d*, **C-4**); 33.32 (*t*, **C-5**); 32.12 (*t*, **C-6**); 28.20 (*q*, Boc-Me); 26.32 (*t*, **C-7**); 26.10 (*t*, **C-8**); 26.10 (*t*, **C-9**) ppm.

7.4.2.10 Darstellung von (6S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-6-amino-7-cyclohexyl-5-oxo-hept-1-en **45**

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁴³ wurden zur Darstellung von (6S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-6-amino-7-cyclohexyl-5-oxo-hept-1-en (**45**) 648 mg (27.1 mmol) Mg-Späne in 6 mL abs. Et_2O vorgelegt und eine kleine Spatelspitze Iod zugegeben. Anschließend wurden 2.8 mL (3.7 g; 27 mmol) 4-Brom-1-buten in 42 mL abs. Et_2O zugetropft und die Lösung eine Stunde unter Rückfluss gerührt. Darauffolgend wurde diese Lösung zu einer $-78^\circ C$ kalten Lösung aus 1.17 g (4.51 mmol) **44** gelöst in 100 mL abs. Et_2O wurden zugetropft. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere drei Stunden gerührt. Danach erfolgte die Zugabe von 300 mL EE und 150 mL 10 %iger NH_4Cl -Lösung. Die wässrige Phase wurde dreimal mit jeweils 100 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit jeweils 100 mL Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

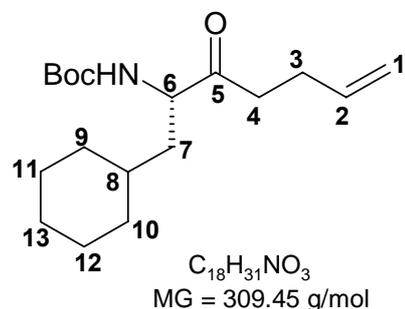
Das erhaltene Rohprodukt (1.27 g) wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 3:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 1.00 g (3.92 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 87 %.

Charakterisierung

Farbloses, viskoses Öl

R_f -Wert (PE/EE 3:1) = 0.44

FAB-MS: $m/z = 310.8 [M+H]^+$; $332.7 [M+Na]^+$.



1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.87$ - 5.72 (*m*, 1H, **H-2**); 5.12 (*br*, 1H, NH) 5.04 (*dd*, 1H, $^3J_{H-1,H-2} = 1.5$ Hz, $^2J_{H-1,H-1'} = 15.3$ Hz, **H-1**); 4.98 (*dd*, 1H, $^3J_{H-1',H-2} = 1.7$ Hz, $^2J_{H-1',H-1} = 10.8$ Hz, **H-13'**); 4.23 (*br*, 1H, **H-6**); 2.65 - 2.57 (*m*, 2H, **H-3**); 2.37 - 2.28 (*m*, 2H, **H-4**); 3.06 1.82 - 1.75 (*m*, 1H, **H-9**); 1.72 - 1.63 (*m*, 4H, **H-10**, **H-11**, **H-12**, **H-13**); 1.62 (*s*, 9H, Boc- CH_3); 1.36 - 1.28 (*m*, 3H, **H-7**, **H-8**); 1.27 - 1.10 (*m*, 3H, **H-11'**, **H-12'**, **H-13'**); 0.99 - 0.81 (*m*, 2H, **H-9'**, **H-10'**) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 168.62$ (*s*, **C-5**); 155.99 (*s*, Boc-Carbonyl); 137.23 (*d*, **C-2**); 115.93 (*t*, **C-1**); 79.55 (*s*, Boc-quart.); 53.01 (*d*, **C-6**); 40.52 (*t*, **C-7**); 34.01 (*d*, **C-8**); 33.25 (*t*, **C-9**); 32.22 (*t*, **C-10**); 32.20 (*t*, **C-4**); 29.12 (*q*, Boc- CH_3); 27.85 (*t*, **C-3**); 26.35 (*t*, **C-11**); 26.21 (*t*, **C-12**); 26.01 (*t*, **C-13**) ppm.

7.4.2.11 Darstellung von (5S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-4-amino-6-cyclohexyl-3-oxo-hexansäure **46**

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁴⁴ wurden für die Darstellung von (5S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-4-amino-6-cyclohexyl-3-oxo-hexansäure (**46**) 1.00 g (3.92 mmol) **45** in 68 mL MeCN gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 5.87 g (27.4 mmol) Natriummetaperiodat gelöst in 68 mL Wasser und 72 mg (0.35 mmol) $RuCl_3 \cdot H_2O$ zugeben. Die Lösung wurde 105 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden jeweils 70 mL Wasser und Et_2O zugegeben. Die wässrige Phase wurde zweimal mit jeweils 70 mL Et_2O und einmal mit 70 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 70 mL Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

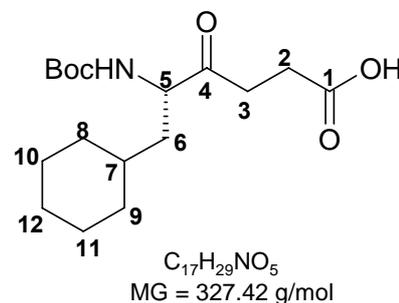
Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 3:1 - 1:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 536 mg (1.96 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 50%.

Charakterisierung

Hellbrauner Feststoff;

R_f -Wert (CHCl₃/MeOH 5:1) = 0.55

FAB-MS: m/z = 650.5 [M+Na]⁺; 666.7 [M+K]⁺.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.15 (*d*, 1H, ³ $J_{\text{NH,H-5}}$ = 8.7 Hz, NH); 4.42 (*dd*, 1H, ³ $J_{\text{H-5,NH}}$ = 8.5 Hz, ³ $J_{\text{H-5,H-6}}$ = 4.5 Hz, **H-5**); 2.90-2.81 (*m*, 2H, **H-2**); 2.75-2.50 (*m*, 2H, **H-3**); 3.06 1.84-1.77 (*m*, 1H, **H-8**); 1.73-1.60 (*m*, 4H, **H-9**, **H-10**, **H-11**, **H-12**); 1.45 (*s*, 9H, Boc-CH₃); 1.36-1.25 (*m*, 3H, **H-6**, **H-7**); 1.23-1.15 (*m*, 3H, **H-10'**, **H-11'**, **H-12'**); 1.01-0.85 (*m*, 2H, **H-8'**, **H-9'**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 210.55 (*s*, **C-1**); 175.99 (*s*, **C-4**); 154.85 (*s*, Boc-Carbonyl); 78.65 (*s*, Boc-quart.); 64.01 (*d*, **C-5**); 40.52 (*t*, **C-6**); 36.05 (*t*, **C-2**); 34.15 (*d*, **C-7**); 33.33 (*t*, **C-8**); 32.55 (*t*, **C-9**); 32.01 (*t*, **C-3**); 29.06 (*q*, Boc-CH₃); 27.85 (*t*, **C-2**); 26.35 (*t*, **C-10**); 26.21 (*t*, **C-11**); 26.01 (*t*, **C-12**) ppm.

7.4.2.12 Darstellung von (5S)-N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-4-amino-6-cyclohexyl-3-oxo-hexansäure 47

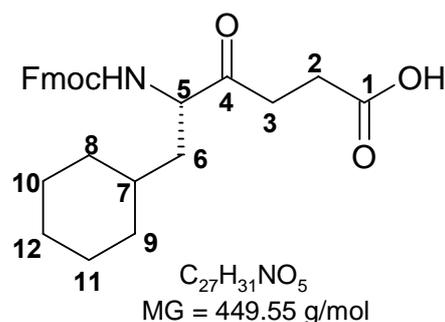
287 mg (1.66 mmol) 46 wurden in 2.3 mL 10 %iger Na₂CO₃-Lösung gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde die Lösung zunächst mit 2.3 mL Dioxan versetzt; darauffolgend wurden langsam 562 mg (1.66 mmol) Fmoc-ONSu gelöst in 4.3 mL Dioxan zugetropft. Es wurde eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt und anschließend weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde mit 3 N Salzsäure angesäuert (pH = 1.5). Anschließend wurden jeweils 40 mL Wasser und Et₂O zugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit jeweils 40 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Das erhaltene Rohprodukt (900 mg) wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 95:5 – 8:2) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 347 mg (878 μ mol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 53 %.

Charakterisierung

Farblosler Feststoff

Smp.: 56 °C

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.11MALDI-TOF-MS: m/z = 450.1 [M+H]⁺; 472.1 [M+Na]⁺; 488.2 [M+K]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.88-7.81 (*m*, 2H, Fmoc **H_A**, **H_{A'}**); 7.71-7.65 (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_{D'}**); 7.45-7.38 (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_{B'}**); 7.37-7.31 (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_{C'}**); 5.22 (*br*, 1H, NH); 4.50-4.41 (*m*, 2H, Fmoc-CH₂); 4.28 (*t*, 1H, ³J_{Fmoc-CH, Fmoc-CH₂} = 6.6 Hz, Fmoc-CH); 4.13 (*dd*, 1H, ³J_{H-5, NH} = 5.8 Hz, ³J_{H-5, H-6} = 7.2 Hz, **H-5**); 2.79-2.71 (*m*, 2H, **H-3**); 2.56-2.51 (*m*, 2H, **H-2**); 1.87-1.80 (*m*, 1H, **H-3**); 1.79-1.58 (*m*, 5H, **H-8**, **H-9**, **H-10**, **H-11**, **H-12**); 1.57-1.50 (*m*, 1H, **H-6**); 1.45 (*s*, 9H, Boc-CH₃); 1.39-1.32 (*m*, 1H, **H-7**); 1.28-1.07 (*m*, 3H, **H-10'**, **H-11'**, **H-12'**); 1.05-0.85 (*m*, 2H, **H-8'**, **H-9'**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 209.00 (*s*, **C-1**); 175.26 (*s*, **C-2**); 158.00 (*s*, Boc-Carbonyl); 144.08 (*s*, Fmoc C_a); 141.26 (*s*, Fmoc C_d); 129.97 (*d*, Fmoc C_B); 127.30 (*d*, Fmoc C_C); 124.87 (*d*, Fmoc C_A); 119.70 (*d*, Fmoc C_D); 66.46 (*d*, **C-5**); 65.86 (*t*, Fmoc-CH₂); 47.92 (*d*, Fmoc-CH); 34.66 (*t*, **C-10**); 32.01 (*t*, **C-3**); 29.77 (*d*, **C-6**); 28.61 (*t*, **C-2**); 27.75 (*t*, **C-9**); 26.21 (*t*, **C-11**); 26.01 (*t*, **C-12**); 20.16 (*q*, **C-7**); 16.60 (*q*, **C-8**) ppm.

7.4.2.13 Darstellung von L-Cyclohexylalaninmethylester-Hydrochlorid 49

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁴⁸ wurden für die Darstellung von L-Cyclohexylalaninmethylester-Hydrochlorid (49) 3.01 g (17.6 mmol) 48 in 40 mL MeOH suspendiert und auf -10 °C gekühlt und zur gekühlten Suspension 1.56 mL (21.4 mmol, δ = 1.631 g/mL) Thionylchlorid über 10 Minuten zugetropft, wobei die Lösung klar wurde. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das MeOH am Rotationsverdampfer destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH aufgenommen und mit Diethylether wieder gefällt und abschließend filtriert und so ein farblosler Feststoff erhalten. Der gefällte Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet. Es konnten 3.10 g (14.0 mmol) isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 80 %.

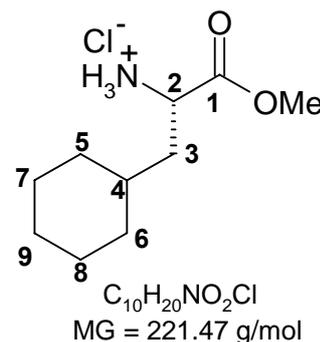
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Smp.: 151 °C

Drehwert: $[\alpha]_{546} = +109.7^\circ$ (c = 1, DCM)

FAB-MS m/z = 186.2 [M+H]⁺



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.84 (s, 3H, NH₃⁺); 4.10 (t, 1H, ³J_{H-2,H-3} = 4.8 Hz, **H-2**); 3.81 (s, 3H, Ester-CH₃); 1.95 (dd, 1H, ²J_{H-3,H-3'} = 14.4 Hz, ³J_{H-3,H-2} = 7.3 Hz, 1H, **H-3**); 1.86 (dd, 1H, ²J_{H-3,H-3'} = 14.4 Hz, ³J_{H-3,H-2} = 7.3 Hz, 1H, **H-3'**); 1.83-1.74 (m, 2H, **H-7**, **H-8**), 1.73-1.58 (m, 4H, **H-4**, **H-7'**, **H-8'**, **H-9**), 1.38-1.25 (m, 2H, **H-5**, **H-6**), 1.21-1.07 (m, 1H, **H-9'**), 0.99-0.87 (m, 2H, **H-5'**, **H-6'**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.04 (s, C-1); 53.36 (q, Ester-CH₃); 51.09 (d, C-2); 38.09 (t, C-3); 33.31 (d, C-4), 32.90 (t, C-6), 32.48 (t, C-5), 26.24 (t, C-7), 25.88 (t, C-8), 25.68 (t, C-9) ppm.

7.4.2.14 Darstellung von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-cyclohexylalaninmethylester **50**

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁴⁸ wurden für die Darstellung von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-cyclohexylalaninmethylester (**50**) 3.05 g (13.7 mmol) **49** in 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung vorgelegt. Dabei wurde die Lösung schaumig und es war eine Gasentwicklung zu beobachten. Zur vorgelegten Lösung wurden 3.10 g (14.2 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat gelöst in 13.5 mL trockenem 1,4-Dioxan langsam zugetropft. Die Lösung wurde 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 100 mL DCM zur Reaktionslösung gegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase zweimal mit 100 mL und einmal mit 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wurde das DCM im Vakuum destillativ entfernt und ein gelbes Öl erhalten. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/Et₂O; 4:1) gereinigt. Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum konnten 3.50 g (12.3 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 89%.

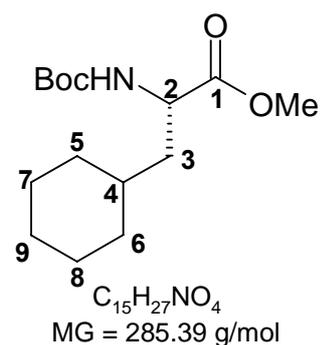
Charakterisierung

Farbloses Öl

Drehwert: $[\alpha]_{546} = +118.5^\circ$ ($c = 1$, DCM)

R_f -Wert (PE/Et₂O 4:1) = 0.28

FAB-MS $m/z = 286.2$ $[M+H]^+$, 308.2 $[M+Na]^+$



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.87$ (*d*, 1H, $^3J_{H-1,H-2} = 7.6$ Hz, NH); 4.33 (*dd*, 1H, $^3J_{H-2,H-3} = 13.2$ Hz, $^3J_{H-2,H-3} = 8.1$ Hz, **H-2**); 3.72 (*s*, 3H, Ester-Me); 1.80 (*dd*, 1H, $^2J_{H-3,H-3'} = 13.19$ Hz, $^3J_{H-3,H-2} = 12.6$ Hz, **H-3**); 1.74 - 1.57 (*m*, 5H, **H-5**, **H-6**, **H-7**, **H-8**, **H-9**); 1.53 (*dd*, 1H, $^2J_{H-3',H-3} = 9.3$ Hz, $^3J_{H-3',H-2} = 5.5$ Hz, H-3'); 1.44 (*s*, 9H, Boc-Me); 1.38 - 1.30 (*m*, 1H, **H-4**); 1.28 - 1.07 (*m*, 3H, **H-7'**, **H-8'**, **H-9'**); 0.99 - 0.83 (*m*, 2H, **H-5'**, **H-6'**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): $\delta = 208.86$ (*s*, **C-1**); 155.99 (*s*, Boc-Carbonyl); 67.07 (*s*, **quart. Boc**); 52.09 (*q*, Ester-CH₃); 51.44 (*d*, **C-2**); 40.40 (*t*, **C-3**); 34.05 (*d*, **C-4**); 33.54 (*t*, **C-5**); 32.49 (*t*, **C-6**); 28.29 (*q*, Boc-CH₃); 26.37 (*t*, **C-7**); 26.19 (*t*, **C-8**); 26.01 (*t*, **C-9**) ppm.

7.4.2.15 Darstellung von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-cyclohexylalaninal **51**

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁶⁰ wurden für die Darstellung von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-cyclohexylalaninal (**51**) 3.45 g (12.1 mmol) **51** in 35 mL DCM gelöst und die Lösung auf -85°C gekühlt und zur gekühlten Lösung 16.2 mL (3.46 g; 24.4 mmol) DIBALH (1.5 molare Lösung in Toluol) langsam zugetropft und die Temperatur unterhalb von -70°C gehalten. Während der Zugabe war eine Gasentwicklung zu beobachten und die gelbe Lösung entfärbte sich. Die Reaktionslösung wurde nach beendeter Zugabe zwei Stunden bei -80°C gerührt. Dabei trübte sich die Reaktionslösung. Anschließend wurde die Reaktionslösung zuerst mit 3 mL -78°C kaltem MeOH und danach mit 30 mL 0°C kalter, gesättigter NH₄Cl-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur weitergerührt wobei ein Feststoff ausfiel. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wurde das DCM im Vakuum destillativ entfernt und ein hellgelbes Öl erhalten. Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum konnten 2.97 g (10.9 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 91 %.

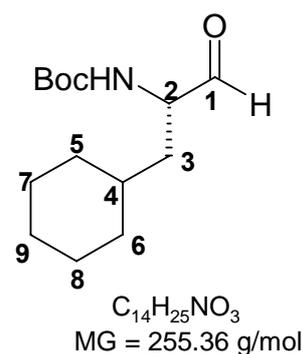
Charakterisierung

Hellgelbes Öl

Drehwert: $[\alpha]_{546} = +120.3^\circ$ ($c = 1$, DCM)

R_f -Wert (PE/EE 1:1) = 0.62

FAB-MS $m/z = 256.2$ $[M+H]^+$



1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 9.58$ (*s*, 1H, CHO); 4.92 (*br*, 1H, NH); 4.27 (*t*, 1H, $^3J_{H-2,H-3} = 4.0$ Hz, H-2); 1.94-1.76 (*m*, 1H, H-3); 1.74-1.57 (*m*, 5H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9); 1.53-1.35 (*m*, 10H, Boc-Me, H-4); 1.28-1.07 (*m*, 4H, H-3', H-7', H-8', H-9'); 0.99 - 0.83 (*m*, 2H, H-5', H-6').

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 200.50$ (*s*, C-1); 163.14 (*s*, Boc-Carbonyl); 66.95 (*s*, quart. Boc); 51.36 (*d*, C-2); 36.73 (*t*, C-3); 33.80 (*d*, C-4); 33.14 (*t*, C-5); 32.60 (*t*, C-6); 28.26 (*q*, Boc- CH_3); 26.29 (*t*, C-7); 26.16 (*t*, C-8); 26.02 (*t*, C-9) ppm.

7.4.2.16 Darstellung von (3S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-3-amino-4-cyclohexyl-but-1-en 52

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹⁴⁷ wurden für die Darstellung von (3S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-3-amino-4-cyclohexyl-but-1-en (52) 7.74 g (21.6 mmol) Methyltriphosponiumbromid in 44 mL trockenem THF suspendiert, auf 0 °C gekühlt und es wurden hierzu 44 mL einer 0.5 molaren Kaliumbis(trimethylsilyl)amid-Lösung in trockenem THF zugetropft. Die nun gelbe Reaktionslösung wurde auf -78 °C gekühlt und zur tief gekühlten Lösung wurden 2.74 g (10.7 mmol) 51 gelöst in 44 mL trockenem THF langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde zwei Stunden bei tiefen Temperaturen gerührt, danach das Kühlbad entfernt und 16 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Zur orangefarbenen Reaktionslösung wurden 200 mL eines Gemisches aus dest. Wasser und Ethylacetat (1:1) zugegeben. Während der Zugabe wurde die orangefarbene Reaktionslösung erst orange-grau und schließlich grün. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase fünfmal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über Natriumsulfat getrocknet. Dabei wurde die grüne Lösung gelb. Abschließend wurde das Ethylacetat am Rotationsverdampfer destillativ entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung

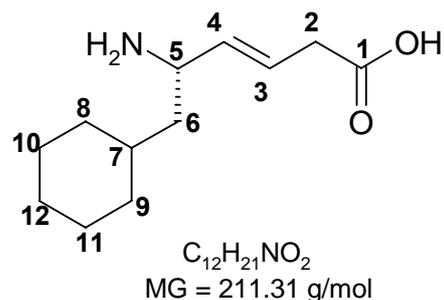
Charakterisierung

Farbloses Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} + 150.1^\circ$ ($c = 1$, DCM)

R_t -Wert = 6.25 min

FAB-MS: $m/z = 212.1$ $[M+H]^+$; 234.1 $[M+Na]^+$.



1H -NMR (400 MHz, MeOD- d^4): $\delta = 5.72$ - 5.61 (m , 1H, **H-4**); 5.50 - 5.35 (m , 2H, **H-3**); 4.25 - 4.08 (m , 1H, **H-5**); 3.03 (d , 1H, $^3J_{H-2,H-3} = 7.0$ Hz, **H-2**); 1.80 - 1.73 (m , 1H, **H-8**); 1.70 - 1.59 (m , 4H, **H-9**, **H-10**, **H-11**, **H-12**); 1.34 - 1.25 (m , 3H, **H-6**, **H-7**); 1.23 - 1.10 (m , 3H, **H-10'**, **H-11'**, **H-12'**); 1.02 - 0.88 (m , 2H, **H-8'**, **H-9'**).

^{13}C -NMR (101 MHz, MeOD- d^4): $\delta = 135.41$ (d , **C-4**); 121.52 (t , **C-3**); 52.38 (d , **C-5**); 43.25 (t , **C-6**); 37.52 (t , **C-2**); 34.20 (d , **C-7**); 33.48 (t , **C-8**); 33.08 (t , **C-9**); 26.50 (t , **C-10**); 26.30 (t , **C-11**); 26.20 (t , **C-12**) ppm.

7.4.2.19 Darstellung von (5S)-N-(Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-5-amino-6-cyclohexyl-hex-3E-ensäure 55

490 mg (2.32 mmol) 54 wurden in 3 mL 10%iger Na_2CO_3 -Lösung gelöst wobei die Lösung leicht trübe wurde. Zu der auf $0^\circ C$ gekühlten Reaktionslösung wurden 3 mL 1,4-Dioxan gegeben. Anschließend wurden 784 mg (2.32 mmol) FmocONSu gelöst in 6 mL 1,4-Dioxan zur nun hellbraunen, kalten Reaktionslösung zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden, erst bei $0^\circ C$ und danach bei Raumtemperatur, gerührt. Mit 3N HCl wurde der pH-Wert auf 1 eingestellt wobei eine leichte Trübung zu beobachten war. Es wurden 55 mL dest. Wasser zur Reaktionslösung gegeben wobei ein farbloser Niederschlag entstand. Dann wurden 55 mL Diethylether zur Reaktionslösung gegeben und alles zusammen 10 Minuten gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit 50 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet. Der Diethylether wurde im Vakuum destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: $CHCl_3/MeOH$ 100:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 170 mg (392 μ mol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 17%.

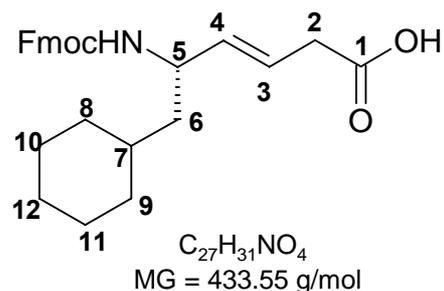
Charakterisierung

Farbloses Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} + 157.4^\circ$ ($c = 1$, DCM)

R_f -Wert (CHCl₃/MeOH 100:1) = 0.63

FAB-MS: $m/z = 456.2$ [M+Na]⁺; 672.1 [M+K]⁺.



¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*⁴): $\delta = 7.86$ - 7.79 (*m*, 2H, Fmoc **H_A**, **H_{A'}**); 7.74 - 7.66 (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_{D'}**); 7.45 - 7.37 (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_{B'}**); 7.36 - 7.31 (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_{C'}**); 5.75 - 5.60 (*m*, 1H, **H-4**); 5.54 - 5.41 (*m*, 2H, **H-3**); 4.42 - 4.29 (*m*, 2H, Fmoc-CH₂); 4.24 (*t*, 1H, ³ $J_{\text{Fmoc-CH, Fmoc-CH}_2} = 7.0$ Hz, Fmoc-CH); 4.21 - 4.08 (*m*, 1H, **H-5**); 3.09 (*d*, 1H, ³ $J_{\text{H-2, H-3}} = 6.9$ Hz, **H-2**); 1.84 - 1.77 (*m*, 1H, **H-8**); 1.77 - 1.64 (*m*, 4H, **H-9**, **H-10**, **H-11**, **H-12**); 1.36 - 1.28 (*m*, 3H, **H-6**, **H-7**); 1.27 - 1.10 (*m*, 3H, **H-10'**, **H-11'**, **H-12'**); 0.99 - 0.81 (*m*, 2H, **H-8'**, **H-9'**).

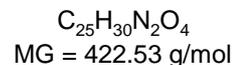
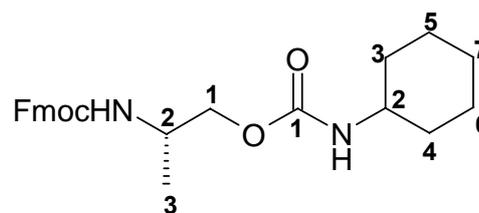
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): $\delta = 202.31$ (*s*, **C-1**); 165.12 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 134.75 (*d*, **C-4**); 122.64 (*t*, **C-3**); 52.39 (*d*, **C-5**); 43.25 (*t*, **C-6**); 37.55 (*t*, **C-2**); 34.20 (*d*, **C-4**); 33.52 (*t*, **C-8**); 33.08 (*t*, **C-9**); 26.53 (*t*, **C-10**); 26.25 (*t*, **C-11**); 26.22 (*t*, **C-12**) ppm.

7.4.2.20 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[cyclohexylaminocarbonyl]-L-alaninol **69**

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹²¹ wurden zur Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[cyclohexylaminocarbonyl]-L-alaninol (**69**) 300 mg (1.01 mmol) **67** in 10 mL DMF gelöst und mit einer Suspension aus 99.1 mg (1.01 mmol) Kupfer(I)-chlorid in 5 mL DMF versetzt. Anschließend wurden 129 μ L (127 mg, 1.01 mmol) Cyclohexylisocyanat zugetropft und die Lösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand in 30 mL DCM aufgenommen und die Lösung dreimal mit je 20 mL 5%iger NH₄HCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 1:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 355 mg (838 μ mol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 83%.

Charakterisierung



Gelblicher Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -10^\circ$ ($c = 0.8$, CHCl_3)

R_f -Wert (PE/EE 1:1) = 0.48

FAB-MS: $m/z = 423.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 445.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 461.9 $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.82\text{-}7.74$ (m , 2H, Fmoc H_A , H_A'); $7.65\text{-}7.57$ (m , 2H, Fmoc H_D , H_D'); $7.45\text{-}7.37$ (m , 2H, Fmoc H_B , H_B'); $7.36\text{-}7.28$ (m , 2H, Fmoc H_C , H_C'); 5.03 (d , 1H, $^3J_{\text{NH,H-2}} = 6.2$ Hz, NH); 4.64 (br , 1H, NH carb.); 4.39 (d , 2H, $^3J_{\text{FmocCH}_2, \text{FmocCH}} = 6.2$ Hz, Fmoc- CH_2); 4.22 (t , 1H, $^3J_{\text{FmocCH}, \text{FmocCH}_2} = 6.8$ Hz, Fmoc-CH); 4.09 (br , 1H, H-1); $4.05\text{-}3.91$ (m , 2H, H-2, H-1'); $3.55\text{-}3.39$ (m , 1H, H-2 carb.); $2.01\text{-}1.82$ (m , 2H, H-3 carb., H-4 carb.); $1.78\text{-}1.53$ (m , 4H, H-5 carb., H-6 carb., H-7 carb.); $1.41\text{-}1.24$ (m , 2H, H-5' carb., H-6' carb.); (m , 5H, H-4 carb., H-7' carb., H-8' carb.) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.06$ (s , C-1 carb.); 155.85 (s , Fmoc-Carbonyl); 143.83 (s , C_a); 141.12 (s , C_d); 127.47 (d , C_B); 126.83 (d , C_C); 124.86 (d , C_D); 119.78 (s , C_A); 66.97 (t , Fmoc- CH_2); 66.69 (t , C-1); 47.26 (d , Fmoc-CH); 46.72 (d , C-2); 45.55 (t , C-2 carb.); 33.19 (t , C-3 carb.); 25.23 (t , C-7 carb.); 24.83 (t , C-5 carb.); ppm.

Aufgrund der C2-Symmetrie des Cyclohexylringes sind die ^{13}C -Signale der Kohlenstoffatome C-4 carb. und C-6 carb. nicht von denen der Kohlenstoffe C-3 carb. und C-5 carb. Zu unterscheiden.

7.4.2.21 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[tert-butyl-aminocarbonyl]-L-alaninol 70

Analog zu einer literaturbekannte Vorschrift¹²¹ wurde für die Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[tert-butyl-aminocarbonyl]-L-alaninol (70) 1.00 g (3.17 mmol) 67 in 25 mL DMF gelöst und mit einer Suspension aus Kupfer(I)-chlorid in 7.5 mL DMF versetzt. Anschließend wurden 362 μL (482 mg, 3.17 mmol) *tert*-Butylisocyanat zugetropft und die Lösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand in 50 mL DCM aufgenommen und die

Lösung dreimal mit je 30 mL 5%iger NH_4HCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 1:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 1.08 g (2.60 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 62%.

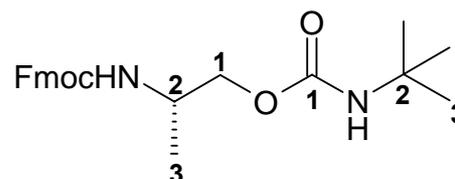
Charakterisierung

Gelblicher Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -5^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

R_f -Wert (PE/EE 1:1) = 0.45

FAB-MS: $m/z = 397.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 419.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 435.7 $[\text{M}+\text{K}]^+$



$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$
MG = 396.49 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.79\text{-}7.72$ (*m*, 2H, Fmoc **H_A**, **H_{A'}**); $7.62\text{-}7.56$ (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_{D'}**); $7.42\text{-}7.36$ (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_{B'}**); $7.34\text{-}7.27$ (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_{C'}**); 5.18 (*br*, 1H, **NH**); 4.81 (*s*, 1H, **NH carb.**); 4.38 (*d*, 2H, $^3J_{\text{FmocCH}_2, \text{FmocCH}} = 6.2$ Hz, Fmoc-**CH₂**); 4.21 (*t*, 1H, $^3J_{\text{FmocCH}, \text{FmocCH}_2} = 6.9$ Hz, Fmoc-**CH**); $4.10\text{-}4.02$ (*m*, 1H, **H-1**); $4.02\text{-}3.88$ (*m*, 2H, **H-2**, **H-1'**); 1.31 (*s*, 9H, **H-3 carb.**); 1.18 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-3}, \text{H-2}} = 6.2$ Hz, **H-3**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.06$ (*s*, **C-1 carb.**); 171.00 (*s*, Fmoc-**Carbonyl**); 143.85 (*s*, **C_a**); 141.15 (*s*, **C_d**); 127.55 (*d*, **C_B**); 126.83 (*d*, **C_C**); 124.85 (*d*, **C_D**); 119.83 (*s*, **C_A**); 66.44 (*t*, Fmoc-**CH₂**); 66.33 (*t*, **C-1**); 50.19 (*s*, **C-2 carb.**); 47.31 (*d*, Fmoc-**CH**); 46.70 (*d*, **C-2**); 29.20 (*q*, **C-3 carb.**); 17.91 (*q*, **C-3**) ppm.

7.4.2.22 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[adamantylaminocarbonyl]-L-alaninol **71**

Analog zu einer literaturbekannten Vorschrift¹²¹ wurden zur Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[adamantylaminocarbonyl]-L-alaninol (**71**) 674 mg (2.14 mmol) **67** in 20 mL DMF gelöst und mit einer Suspension aus 207 mg (2.14 mmol) Kupfer(I)-chlorid in 5 mL DMF versetzt. Anschließend wurden 378 mg (2.14 mmol) Adamantylisocyanat gelöst in 5 mL DMF zugetropft und die Lösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand in 50 mL DCM

aufgenommen und die Lösung dreimal mit je 25 mL 5%iger NH_4HCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 1:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 793 mg (1.67 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 78%.

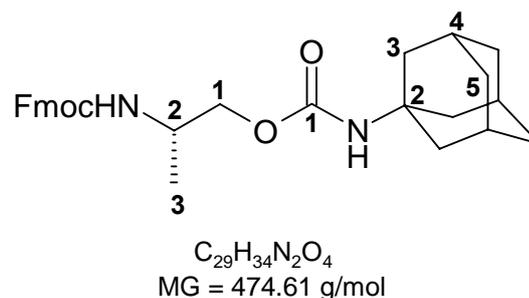
Charakterisierung

Gelblicher Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -14^\circ$ ($c = 1.1$, CHCl_3)

R_f -Wert (PE/EE 1:1) = 0.68

FAB-MS: $m/z = 475.9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 497.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.78\text{-}7.72$ (*m*, 2H, Fmoc \mathbf{H}_A , \mathbf{H}_A'); $7.61\text{-}7.55$ (*m*, 2H, Fmoc \mathbf{H}_D , \mathbf{H}_D'); $7.42\text{-}7.35$ (*m*, 2H, Fmoc \mathbf{H}_B , \mathbf{H}_B'); $7.33\text{-}7.26$ (*m*, 2H, Fmoc \mathbf{H}_C , \mathbf{H}_C'); 5.00 (*br*, 1H, NH); 4.57 (*br*, 1H, NH carb.); 4.37 (*d*, 1H, $^3J_{\text{FmocCH}_2, \text{FmocCH}} = 6.1$ Hz, Fmoc- CH_2); 4.20 (*t*, 1H, $^3J_{\text{FmocCH}, \text{FmocCH}_2} = 5.7$ Hz, Fmoc-CH); 4.03 (*br*, 1H, $\mathbf{H-1}$); $3.99\text{-}3.88$ (*m*, 2H, $\mathbf{H-2}$, $\mathbf{H-1}'$); 2.05 (*br*, 3H, $\mathbf{H-4}$ carb.); 1.90 (*br*, 6H, $\mathbf{H-3}$ carb.); 1.64 (*br*, 6H, $\mathbf{H-5}$ carb.); 1.17 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-3}, \text{H-2}} = 4.5$ Hz, $\mathbf{H-3}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.40$ (*s*, $\mathbf{C-1}$ carb.); 168.48 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 143.91 (*s*, \mathbf{C}_a); 141.22 (*s*, \mathbf{C}_d); 127.57 (*d*, \mathbf{C}_B); 126.96 (*d*, \mathbf{C}_C); 124.92 (*d*, \mathbf{C}_D); 119.87 (*s*, \mathbf{C}_A); 66.60 (*t*, Fmoc- CH_2); 66.52 (*t*, $\mathbf{C-1}$); 49.48 (*s*, $\mathbf{C-2}$ carb.); 47.25 (*d*, Fmoc-CH); 46.83 (*d*, $\mathbf{C-2}$); 41.82 (*t*, $\mathbf{C-4}$ carb.); 36.26 (*t*, $\mathbf{C-5}$ carb.); 29.43 (*d*, $\mathbf{C-3}$ carb.); 17.58 (*q*, $\mathbf{C-3}$) ppm.

7.4.2.23 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[ethoxycarbonylmethylaminocarbonyl]-L-alaninol 72

Analog zu einer literaturbekannte Vorschrift¹²¹ wurden zur Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[Ethoxycarbonylmethylamino-carbonyl]-L-alaninol (72) 243 mg (818 μmol) 67 in 5 mL DMF gelöst und mit einer Suspension aus 80.8 mg (818 μmol) Kupfer(I)-chlorid in 3 mL DMF versetzt. Anschließend wurden 91.6 μL (105 mg, 818 μmol) Ethyl-2-isocyanatoacetat zugetropft und die Lösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur

gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand in 25 mL DCM aufgenommen und die Lösung dreimal mit je 15 mL 5%iger NH_4HCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 1:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 150 mg (352 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 43%.

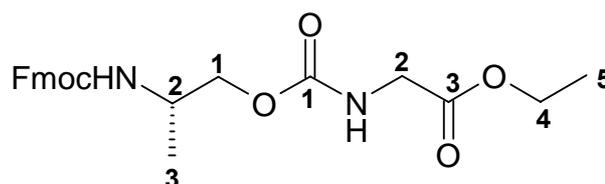
Charakterisierung

Gelblicher Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -8^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

R_f -Wert (PE/EE 1:1) = 0.32

FAB-MS: $m/z = 449.2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 465.1 $[\text{M}+\text{K}]^+$



$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$
MG = 426.47 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.81\text{-}7.73$ (*m*, 2H, Fmoc \mathbf{H}_A , \mathbf{H}_A'); $7.65\text{-}7.56$ (*m*, 2H, Fmoc \mathbf{H}_D , \mathbf{H}_D'); $7.45\text{-}7.37$ (*m*, 2H, Fmoc \mathbf{H}_B , \mathbf{H}_B'); $7.36\text{-}7.28$ (*m*, 2H, Fmoc \mathbf{H}_C , \mathbf{H}_C'); 5.25 (*br*, 1H, NH); 4.97 (*br*, 1H, NH carb.); $4.49\text{-}4.31$ (*m*, 2H, Fmoc- CH_2); $4.27\text{-}4.16$ (*m*, 3H, Fmoc-CH, $\mathbf{H-4}$ carb.); $4.16\text{-}4.05$ (*m*, 2H, $\mathbf{H-1}$); $4.05\text{-}3.98$ (*m*, 1H, $\mathbf{H-2}$); 3.95 (*d*, 2H, $^3J_{\text{H-2 carb.}, \text{NH carb.}} = 5.5$ Hz, $\mathbf{H-2}$ carb.); 1.36 (*q*, 3H, $^3J_{\text{H-4 carb.}, \text{H-5 carb.}} = 7.0$ Hz, $\mathbf{H-5}$ carb.); 1.20 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-3}, \text{H-2}} = 6.0$ Hz, $\mathbf{H-3}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.06$ (*s*, $\mathbf{C-3}$ carb.); 170.98 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 169.80 (*s*, $\mathbf{C-1}$ carb.); 143.89 (*s*, \mathbf{C}_a); 141.26 (*s*, \mathbf{C}_d); 127.44 (*d*, \mathbf{C}_B); 126.90 (*d*, \mathbf{C}_C); 124.85 (*d*, \mathbf{C}_D); 119.74 (*s*, \mathbf{C}_A); 67.80 (*t*, $\mathbf{C-1}$); 66.37 (*t*, Fmoc- CH_2); 61.65 (*t*, $\mathbf{C-4}$ carb.); 47.38 (*d*, Fmoc-CH); 46.33 (*d*, $\mathbf{C-2}$); 42.68 (*t*, $\mathbf{C-2}$ carb.); 17.83 (*q*, $\mathbf{C-3}$); 14.73 (*q*, $\mathbf{C-5}$ carb.) ppm.

7.4.2.24 Darstellung von O1-[Cyclohexylaminocarbonyl]-L-alaninol 73

355 mg (838 μmol) 69 wurden in 2 mL Piperidin/DMF (1:4) gelöst und für zwei Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10:1) gereinigt. Nach Gefriertrocknung konnten 161 mg (805 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 96%.

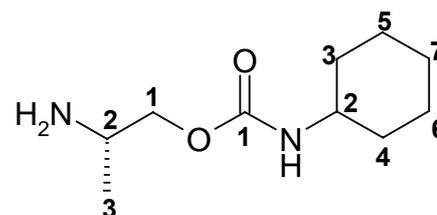
Charakterisierung

Farblosor Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -11^\circ$ ($c = 1.2$, MeOH)

R_f -Wert (CHCl₃/MeOH 10:1) = 0.05

FAB-MS: $m/z = 201.4$ [M+H]⁺, 223.4 [M+Na]⁺, 239.8 [M+K]⁺



C₁₀H₂₀N₂O₂
MG = 200.28 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*⁴): $\delta = 3.94$ (*dd*, 1H, $^2J_{\text{H-1,H-1}'} = 10.6$ Hz, $^3J_{\text{H-1,H-2}} = 4.8$ Hz, **H-1**); 3.94 (*dd*, 1H, $^2J_{\text{H-1},\text{H-1}'} = 10.6$ Hz, $^3J_{\text{H-1,H-2}} = 7.2$ Hz, **H-1'**); 3.41-3.32 (*m*, 1H, **H-2 carb.**); 3.16-3.03 (*m*, 1H, **H-2**); 1.92-1.82 (*m*, 2H, **H-3 carb.**, **H-4 carb.**); 1.79-1.71 (*m*, 2H, **H-5 carb.**, **H-6 carb.**); 1.66-1.58 (*m*, 2H, **H-7 carb.**); 1.39-1.29 (*m*, 2H, **H-5'** carb., **H-6'** carb.), 1.25-1.13 (*m*, 2H, **H-3'** carb., **H-4'** carb.); 1.09 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-3,H-2}} = 6.7$ Hz, **H-3**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD-*d*⁴): $\delta = 156.46$ (*s*, **C-1 carb.**); 69.48 (*t*, **C-1**); 49.75 (*d*, **C-2**); 45.62 (*t*, **C-2 carb.**); 32.69 (*t*, **C-3 carb.**); 24.97 (*t*, **C-5 carb.**); 24.75 (*t*, **C-7 carb.**); 17.31 (*q*, **C-3**) ppm.

Aufgrund der C₂-Symmetrie des Cyclohexylringes sind die ¹³C-Signale der Kohlenstoffatome C-4 carb. und C-6 carb. nicht von denen der Kohlenstoffe C-3 carb. und C-5 carb. Zu unterscheiden.

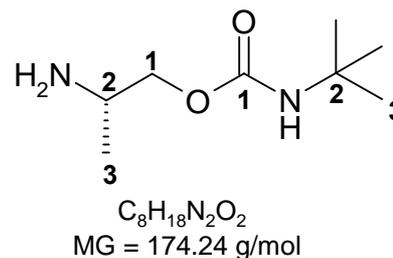
7.4.2.25 Darstellung von O1-[tert-Butylaminocarbonyl]-L-alaninol 74

65.3 mg (164 μmol) 70 wurden in 2 mL Piperidin/DMF (1:4) gelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Nach Gefriertrocknung konnten 27.1 mg (156 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 95%.

Charakterisierung

Farblosler Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -6^\circ$ ($c = 1$, MeOH) R_f -Wert (CHCl₃/MeOH 5:1) = 0.21FAB-MS: $m/z = 175.4$ [M+H]⁺, 197.7 [M+Na]⁺

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*⁴): $\delta = 3.92$ (*dd*, 1H, $^2J_{H-1,H-1'} = 10.7$ Hz, $^3J_{H-1,H-2} = 4.6$ Hz, **H-1**); 3.74 (*dd*, $^2J_{H-1',H-1} = 10.7$ Hz, $^3J_{H-1',H-2} = 4.2$ Hz, **H-1'**); 3.17-3.06 (*m*, 1H, **H-2**); 1.30 (*s*, 9H, *tert*-**Bu carb.**); 1.10 (*d*, 3H, $^3J_{H-3,H-2} = 6.5$ Hz, **H-3**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD-*d*⁴): $\delta = 155.51$ (*s*, **C-1 carb.**); 68.67 (*t*, **C-1**); 49.32 (*s*, **C-2 carb.**); 45.70 (*d*, **C-2**); 27.54 (*q*, **C-3 carb.**); 17.19 (*q*, **C-3**) ppm.

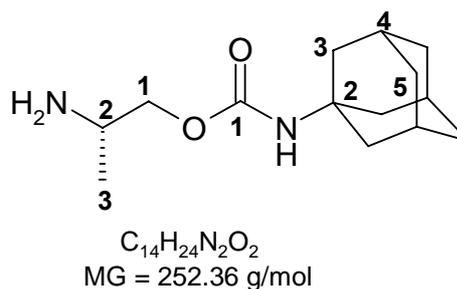
7.4.2.26 Darstellung von O1-[Adamantylaminocarbonyl]-L-alanin 75

793 mg (1.67 mmol) **71** wurden in 5 mL Piperidin/DMF (1:4) gelöst und für zwei Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 10:1) gereinigt. Nach Gefriertrocknung konnten 383 mg (1.52 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 91%.

Charakterisierung

Farblosler Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -8^\circ$ ($c = 1$, MeOH) R_f -Wert (CHCl₃/MeOH 10:1) = 0.02FAB-MS: $m/z = 253.4$ [M+H]⁺, 285.2 [M+Na]⁺, 291.9 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*⁴): $\delta = 3.84$ (*dd*, 1H, $^2J_{H-1,H-1'} = 10.9$ Hz, $^3J_{H-1,H-2} = 6.8$ Hz, **H-1**); 3.66 (*dd*, 1H, $^2J_{H-1',H-1} = 10.9$ Hz, $^3J_{H-1',H-2} = 6.9$ Hz, **H-1'**); 3.08-3.01 (*m*, 1H, **H-2**); 1.92 (*br*, 3H, **H-4 carb.**); 1.87 (*br*, 6H, **H-3 carb.**); 1.92 (*br*, 6H, **H-5 carb.**); 1.03 (*d*, 3H, $^3J_{H-3,H-2} = 6.6$ Hz, **H-3**) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{MeOD-}d^4$): $\delta = 156.20$ (*s*, **C-1 carb.**); 69.68 (*t*, **C-1**); 49.92 (*s*, **C-2 carb.**); 49.22 (*t*, **C-2**); 42.04 (*t*, **C-4 carb.**); 37.37 (*t*, **C-5 carb.**); 30.58 (*d*, **C-3 carb.**); 17.90 (*q*, **C-3**) ppm.

7.4.2.27 Darstellung von O1-[Ethoxycarbonylmethylaminocarbonyl]-L-alaninol **76**

150 mg (352 μmol) **72** wurden in 2 mL Piperidin/DMF (1:4) gelöst und für zwei Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10:1) gereinigt. Nach Gefriertrocknung konnten 66.1 mg (324 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 92%.

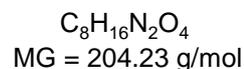
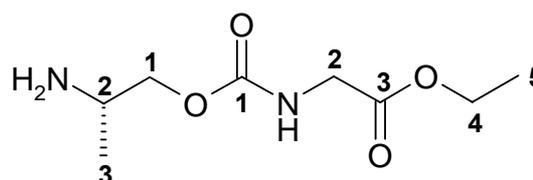
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -9^\circ$ ($c = 1$, MeOH)

R_f -Wert ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10:1) = 0.10

FAB-MS: $m/z = 205.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 227.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 243.2 $[\text{M}+\text{K}]^+$



^1H -NMR (500 MHz, $\text{MeOD-}d^4$): $\delta = 4.16$ -4.05 (*m*, 2H, **H-1**); 4.05-3.98 (*m*, 1H, **H-2**); 3.95 (*s*, 2H, **H-2 carb.**); 3.84 (*q*, 2H, $^3J_{\text{H-4 carb, H-5 carb}} = 6.0$ Hz, **H-4 carb.**); 1.35 (*t*, 3H, $^3J_{\text{H-5 carb, H-4 carb}} = 6.4$ Hz, **H-5 carb.**); 1.20 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-3, H-2}} = 6.0$ Hz, **H-3**) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{MeOD-}d^4$): $\delta = 171.06$ (*s*, **C-1 carb.**); 169.80 (*s*, **C-3 carb.**); 67.80 (*t*, **C-1**); 61.65 (*t*, **C-4 carb.**); 46.33 (*d*, **C-2**); 42.68 (*t*, **C-2 carb.**); 17.83 (*q*, **C-3**); 14.73 (*q*, **C-5 carb.**) ppm.

7.4.2.28 **Darstellung von N_{α} -(2-Naphthyloxyacetyl)- N_{ϵ} -(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinyll-[(5S)-5-amino-6-methyl-4-oxo-heptanoyl]-O-(tert-butyl)-L-threonin 77**

1.07 g H-L-Thr(*t*Bu)-2-chlorotrityl-Harz mit einer Belegung von 600 $\mu\text{mol/g}$ wurden als feste Phase eingesetzt. Dies entsprach 642 μmol an freien Bindungsstellen auf dem Harz. Das Harz wurde in 5 mL DMF in einer Stickstofffritte für sechs Stunden gequollen. Nach Beenden des Quellvorgangs wurde das DMF entfernt. Anschließend wurde der Dipeptid-mimetische Baustein Fmoc-ValΨ[COCH₂]Gly-OH (1 eq, 251 mg, 642 μmol) gemäß AAV1 an die ersten Aminosäure über sechs Stunden gekuppelt. Die Bestimmung des Fmoc-Wertes ergaben 497 μmol ; dies entsprach einer Ausbeute von 78% für den ersten Kupplungsschritt. Die folgenden Bausteine, Fmoc-Lys(Boc)-OH und 2-NOA wurden in einem vierfachen Überschuss (1.21 g, 2.57 mmol bzw. 520 mg, 2.57 mmol) eingesetzt und gemäß AAV1 für jeweils sechs Stunden gekuppelt. Die Bestimmung des Fmoc-Wertes nach der Kupplung des Lysin-Bausteins ergaben 472 μmol an Methylenfluoren; dies entspricht einer Ausbeute von 95% für den zweiten Kupplungsschritt. Nach vollzogener Kupplung von 2-NOA, wurde das Harz mit jeweils mit 10 mL *i*-PrOH und DCM gewaschen und anschließend getrocknet. Die darauffolgende Abspaltung des Seitenketten-geschützten Peptidomimetikums vom Harz erfolgte unter Verwendung von 5 mL HFIP/DCM (1:4) über zehn Minuten bei Raumtemperatur. Das Harz wurde anschließend mit 20 mL DCM gewaschen und das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum destillativ entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde anschließend in 10 mL H₂O/MeCN (4:1) aufgenommen und gefriergetrocknet.

Die Reinigung des erhaltenen Rohproduktes erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer präparativen *RPC*₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 80/20 (1 CV) → 50/50 (1 CV) → 25/75 (3 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1.5 CV) → 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL).

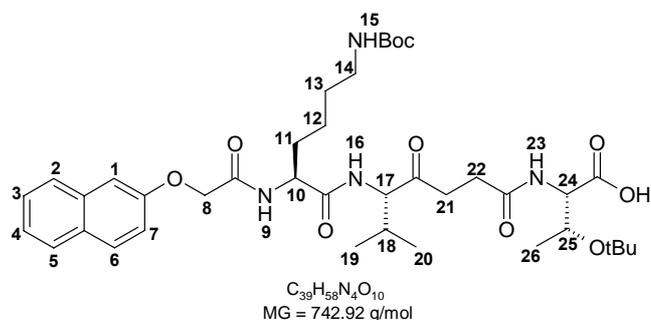
Nach anschließender Gefriertrocknung konnten 424 mg (571 μmol) isoliert werden. Das entspricht einer Gesamtausbeute von 89%.

Charakterisierung

Farbloser Feststoff

R_t -Wert = 15.02 min

MALDI-TOF-MS: $m/z = 744.1 [M+H]^+$; $766.2 [M+Na]^+$; $781.9 [M+K]^+$



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 8.15$ (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-16,H-17}} = 7.9$ Hz, **H-16**); 8.14 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-9,H-10}} = 7.7$ Hz, **H-9**); 7.87-7.84 (*m*, 1H, **H-6**); 7.86-7.83 (*m*, 1H, **H-5**); 7.78-7.75 (*m*, 1H, **H-2**); 7.71 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-23,H-24}} = 9.1$ Hz, **H-23**); 7.49-7.44 (*m*, 1H, **H-3**); 7.38-7.34 (*m*, 1H, **H-4**); 7.29-7.26 (*m*, 1H, **H-1**); 7.26-7.23 (*m*, 1H, **H-7**); 6.75 (*t*, 1H, $^3J_{\text{H-15,H-14}} = 5.5$ Hz, **H-15**); 4.69 (*d*, 1H, $^2J_{\text{H-8,H-8}'} = 14.6$ Hz, **H-8**), 4.64 (*d*, 1H, $^2J_{\text{H-8},\text{H-8}'} = 14.6$ Hz, **H-8'**); 4.49-4.43 (*m*, 1H, **H-10**); 4.28 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-24,H-25}} = 2.9$ Hz, $^3J_{\text{H-24,H-23}} = 9.1$ Hz, **H-24**); 4.21 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-17,H-18}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H-17,H-16}} = 8.1$ Hz, **H-17**); 4.09-4.04 (*m*, 1H, **H-25**); 2.89-2.79 (*m*, 2H, **H-14**); 2.71-2.64 (*m*, 2H, **H-22**); 2.41-2.37 (*m*, 2H, **H-21**); 2.17-2.08 (*m*, 1H, **H-17**); 1.73-1.65 (*m*, 1H, **H-11**); 1.64-1.55 (*m*, 1H, **H-11'**); 1.36 (*s*, 9H, Boc-Me); 1.35-1.17 (*m*, 4H, **H-12**, **H-13**); 1.11 (*s*, 9H, **tBu-Me**); 1.04 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-26,H-25}} = 6.3$ Hz, **H-26**); 0.81 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-20,H-18}} = 7.0$ Hz, **H-20**); 0.77 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-19,H-18}} = 6.5$ Hz, **H-19**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 130.3$ (*d*, **C-6**); 128.3 (*d*, **C-5**); 127.4 (*d*, **C-2**); 127.1 (*d*, **C-3**); 124.6 (*d*, **C-4**); 119.1 (*d*, **C-1**); 107.9 (*d*, **C-7**); 70.0 (*d*, **C-25**); 67.6 (*t*, **C-8**); 63.6 (*d*, **C-17**); 58.1 (*d*, **C-24**); 52.8 (*d*, **C-10**); 40.4 (*t*, **C-14**); 35.8 (*t*, **C-22**); 32.7 (*t*, **C-11**); 30.2 (*t*, **C-12**); 29.4 (*d*, **C-25**); 29.3 (*t*, **C-21**); 29.2 (*q*, **tBu-Me**); 29.1 (*q*, Boc-Me); 23.3 (*t*, **C-13**); 21.1 (*q*, **C-26**); 20.3 (*q*, **C-20**); 18.5 (*q*, **C-19**) ppm.

Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnis im ^{13}C - bzw. HMBC-Spektrum konnten die quartären Carbonylkohlenstoffatome und das Kohlenstoffatom an Position zwei des Naphthylrings nicht zugeordnet werden.

7.4.2.29 Darstellung von N_{α} -(2-Naphthyloxyacetyl)- N_{ϵ} -(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinyll-[(5S)-5-amino-6-methyl-hept-3E-enoyl]-O-(tert-butyl)-L-threonin **78**

454 mg H-L-Thr(*t*Bu)-2-chlorotrityl-Harz mit einer Belegung von 660 $\mu\text{mol/g}$ wurden als feste Phase eingesetzt. Dies entsprach 300 μmol an freien Bindungsstellen auf dem Harz. Das Harz wurde in 3 mL DMF in einer Stickstoffritze für sechs Stunden gequollen. Nach Beenden des Quellvorgangs wurde das DMF entfernt. Anschließend wurde der Dipeptid-mimetische Baustein Fmoc-Val Ψ [CHCH]Gly-OH (4 eq, 455 mg, 1.21 mmol) gemäß AAV1 gelöst in 2.4 mL DMF (0.5 M) an die erste Aminosäure über sechs Stunden gekuppelt. Die Bestimmung des Fmoc-Wertes ergaben 273 μmol ; dies entsprach einer Ausbeute von 91% für den ersten Kupplungsschritt. Die folgenden Bausteine, Fmoc-Lys(Boc)-OH und 2-NOA wurden in einem vierfachen Überschuss (551 mg, 1.20 mmol bzw. 242 mg, 1.21 mmol)

eingesetzt und gemäß AAV1 unter Schlenkbedingungen für jeweils sechs Stunden gekuppelt. Die Bestimmung des Fmoc-Wertes nach der Kupplung des Lysin-Bausteins ergaben 261 μmol an Methylenfluoren; dies entspricht einer Ausbeute von 96% für den zweiten Kupplungsschritt. Nach vollzogener Kupplung von 2-NOA, wurde das Harz mit jeweils mit 10 mL *i*-PrOH und DCM gewaschen und anschließend getrocknet. Die darauffolgende Abspaltung des Seitenketten-geschützten Peptidomimetikums vom Harz erfolgte unter Verwendung von 5 mL HFIP/DCM (1:4) über zehn Minuten bei Raumtemperatur. Das Harz wurde anschließend mit 20 mL DCM gewaschen und das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum destillativ entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde anschließend in 10 mL $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (4:1) aufgenommen und gefriergetrocknet.

Die Reinigung des erhaltenen Rohproduktes erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer präparativen RPC_{18} -Säule (Eluent C / Eluent D 80/20 (1 CV) \rightarrow 50/50 (1 CV) \rightarrow 25/75 (3 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1.5 CV) \rightarrow 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL).

Nach anschließender Gefriertrocknung konnten 187 mg (255 μmol) isoliert werden. Das entspricht einer Gesamtausbeute von 85%.

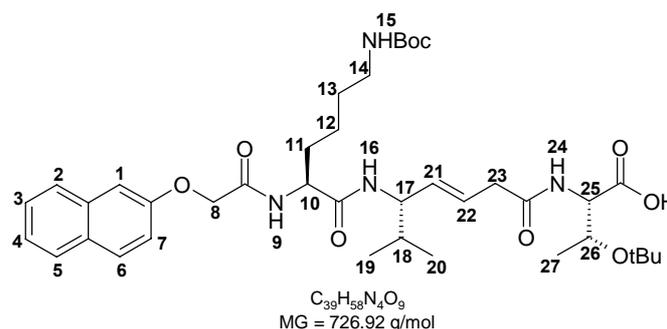
Charakterisierung

Farbloses Feststoff

R_t -Wert = 16.04 min

MALDI-TOF-MS: $m/z = 728.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$;

750.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 746.1 $[\text{M}+\text{K}]^+$



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 8.08$ (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-9,H-10}} = 8.6$ Hz, **H-9**); 7.96 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-16,H-17}} = 8.9$ Hz, **H-16**); 7.87-7.82 (*m*, 2H, **H-6**, **H-5**); 7.79-7.75 (*m*, 1H, **H-2**); 7.541 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-24,H-25}} = 9.6$ Hz, **H-24**); 7.48-7.43 (*m*, 1H, **H-3**); 7.38-7.34 (*m*, 1H, **H-4**); 7.31-7.26 (*m*, 1H, **H-1**); 7.26-7.22 (*m*, 1H, **H-7**); 6.74-6.69 (*m*, 1H, **H-15**); 5.61-5.53 (*m*, 1H, **H-21**); 5.52-5.44 (*m*, 1H, **H-22**); 4.68 (*d*, 1H, $^2J_{\text{H-8,H-8'}} = 14.8$ Hz, **H-8**), 4.65 (*d*, 1H, $^2J_{\text{H-8'},\text{H-8}} = 14.8$ Hz, **H-8'**); 4.40-4.33 (*m*, 1H, **H-10**); 4.27 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-25,H-24}} = 8.6$ Hz, $^3J_{\text{H-25,H-26}} = 8.6$ Hz, **H-25**); 4.12-3.99 (*m*, 2H, H-17, **H-26**); 3.06-3.00 (*m*, 2H, **H-23**); 2.88-2.78 (*m*, 2H, **H-14**); 1.70-1.61 (*m*, 2H, **H-18**, **H-11a**); 1.60-1.54 (*m*, 1H, **H-11b**); 1.36 (*s*, 9H, Boc-Me); 1.35-1.17 (*m*, 4H, **H-12**, **H-13**); 1.10 (*s*, 9H, ^tBu-Me); 1.04 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-27,H-26}} = 6.4$ Hz, **H-27**); 0.80 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-19,H-18}} = 7.0$ Hz, **H-19**); 0.78 (*d*, 3H, $^3J_{\text{H-20,H-18}} = 6.9$ Hz, **H-20**) ppm.

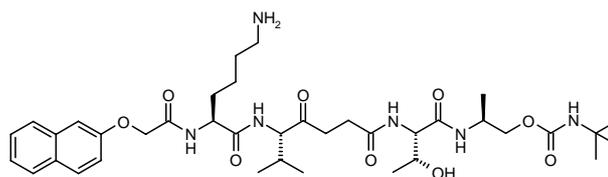
^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 132.14$ (*d*, **C-22**); 129.51 (*d*, **C-6**); 128.02 (*d*, **C-5**); 127.08 (*d*, **C-2**); 126.69 (*d*, **C-3**); 125.23 (*d*, **C-21**); 123.96 (*d*, **C-4**); 118.80 (*d*, **C-1**); 107.48 (*d*, **C-7**); 67.41 (*d*, **C-26**); 66.89 (*t*, **C-8**); 57.71 (*d*, **C-25**); 56.31 (*d*, **C-17**); 52.61 (*d*, **C-10**); 40.69 (*t*, **C-14**); 39.92 (*t*, **C-23**); 32.61 (*t*, **C-11**); 32.54 (*d*, **C-18**); 31.92 (*t*, **C-12**); 29.42 (*q*, **C-27**); 27.91 (*q*, $^t\text{Bu-Me}$); 27.88 (*q*, Boc-Me); 23.88 (*t*, **C-13**); 21.07 (*q*, **C-27**); 20.91 (*q*, **C-20**); 19.07 (*q*, **C-19**) ppm.

Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnis im ^{13}C - bzw. HMBC-Spektrum konnten die quartären Carbonylkohlenstoffatome und das Kohlenstoffatom an Position zwei des Naphthylrings nicht zugeordnet werden.

7.4.2.30 Darstellung von *N*₂-[*N*_α-(2-naphthoxyacetyl)-*L*-lysiny]-[(5*S*)-5-amino-6-methyl-4-oxo-heptanoyl]-*L*-threonyl-*O*1-[*tert*-butylamino-carbonyl]-*L*-alaninol 16

Nach AAV2 wurden 8.9 mg (12 μmol) **77** mit 1.7 mg (10 μmol) **74** umgesetzt. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 6.8 mg (9.2 μmol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 92% bezogen auf **74**.

Charakterisierung



C₃₇H₅₇N₇O₉
MG= 743.91 g/mol

Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 11.39 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 744.1 [M+H]⁺; 766.2 [M+Na]⁺; 781.9 [M+K]⁺

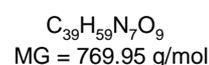
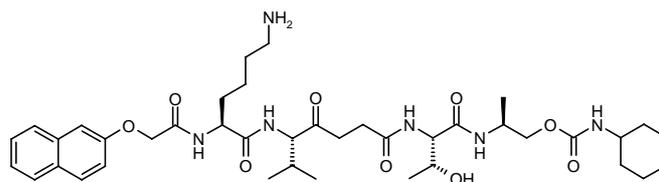
¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.068 NH	7.095 α	7.612 β	7.685 β'	7.396 γ/β''	7.268 δ	7.677 ε	4.655 z-NH ₂
Lysin	8.368	4.223	1.572	1.475	0.907	1.270	2.370	7.210
Threonin	7.975	3.975	3.881		0.972			
Alaninol	7.830	3.959	0.928	3.797	3.797			
	NH	α	β	γ	γ'	CH ₂	CH ₂	
Val-Ψ[COCH ₂]-Gly Carbamat	8.045 NH	4.161 <i>t</i> -Bu	1.994	0.532	0.503	2.629	2.337	
	n.b.	1.002						

7.4.2.31 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-4-oxo-heptanoyl]-L-threonyl-O1-[cyclohexylamino-carbonyl]-L-alaninol 17

Nach AAV2 wurden 8.8 mg (12 μ mol) **77** mit 2.0 mg (10 μ mol) **73** umgesetzt. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 7.0 mg (9.1 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 91% bezogen auf **73**.

Charakterisierung



Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 12.38 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 771.1 [M+H]⁺; 793.8 [M+Na]⁺; 809.9 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.081	7.198	7.845	7.855	7.378	7.605	7.474	4.599
	NH	α	β	β'	γ/β''	δ	ϵ	z-NH ₂
Lysin	8.418	4.374	1.701	1.620	1.075	1.412	2.555	7.320
Threonin	8.015	4.074	3.969		1.104			
Alaninol	7.864	4.050	1.068	3.961	3.829			
	NH	α	β	γ	γ'	CH ₂	CH ₂	
Val- Ψ [COCH ₂]-Gly	8.059	4.241	2.098	0.722	0.641	2.775	2.436	
Carbamat	NH	H1	H2/H6	H3/5	H4			
	n.b.	3.209	1.667	1.418	1.087			

7.4.2.32 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-4-oxo-heptanoyl]-L-threonyl-O1-[adamantylamino-carbonyl]-L-alaninol 18

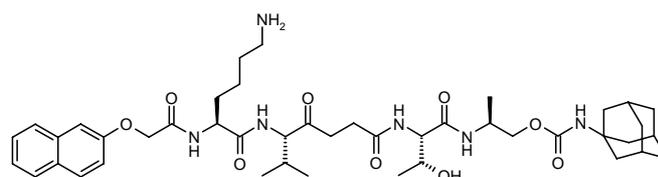
Nach AAV2 wurden 8.9 mg (12 μ mol) 77 mit 2.5 mg (10 μ mol) 75 umgesetzt. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 6.2 mg (7.6 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 76% bezogen 75.

Charakterisierung

Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 12.84 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 823.1 [M+H]⁺; 845.2 [M+Na]⁺; 861.4 [M+K]⁺



C₄₃H₆₃N₇O₉
MG = 822.02 g/mol

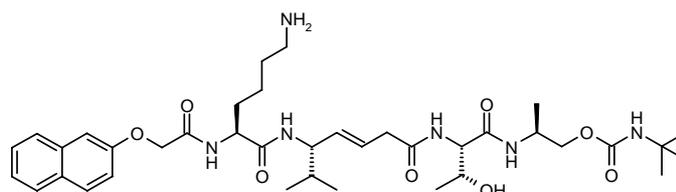
¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.197	7.245	7.685	7.842	7.396	7.478	7.838	4.654
	NH	α	β	β'	γ/β''	δ	ϵ	z -NH ₂
Lysin	8.409	4.381	1.721	1.628	1.087	1.426	2.550	7.326
Threonin	7.975	3.975	3.875		1.092			
Alaninol	8.029	4.057	1.089	3.878	3.878			
	NH	α	β	γ	γ'	CH ₂	CH ₂	
Val- Ψ [COCH ₂]-Gly Carbamat	8.051	4.264	2.085	0.713	0.628	2.793	2.475	
	NH	CH	CH ₂	CH ₂				
	n.b.	1.880	1.703	1.550				

7.4.2.34 Darstellung von *N*2-[*N* α -(2-naphthoxyacetyl)-*L*-lysiny]-[(5*S*)-5-amino-6-methyl-hept-3*E*-enoyl]-*L*-threonyl]-*O*1-[*tert*-butylamino-carbonyl]-*L*-alaninol 20

Nach AAV2 wurden 8.6 mg (12 μ mol) **78** mit 2.0 mg (10 μ mol) **74** umgesetzt. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 6.3 mg (8.6 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 86% bezogen **74**.

Charakterisierung



Farbloser Feststoff

R_t -Wert = 11.22 min

$C_{37}H_{57}N_7O_8$
MG = 727.91 g/mol

MALDI-TOF-MS: m/z = 728.1 $[M+H]^+$; 751.2 $[M+Na]^+$; 766.9 $[M+K]^+$

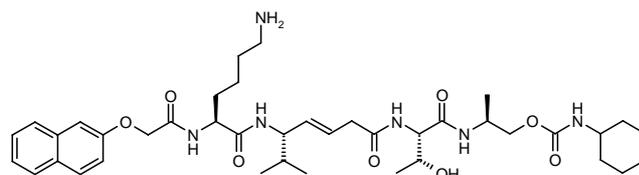
1H -NMR (500 MHz, H_2O/D_2O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.080 NH	7.233 α	7.685 β	7.808 β'	7.305 γ/β''	7.604 δ	7.685 ϵ	4.621 z-NH ₂
Lysin	8.326	4.140	1.532		0.931	1.270	2.372	7.201
Threonin	7.996	3.820	3.746		0.913			
Alaninol	7.788	3.901	0.940	3.778	3.778			
	NH	α	β	γ	CH	CH	CH ₂	
Val- Ψ [CHCH]-Gly Carbamat	7.793 NH	3.820 <i>t</i> -Bu	1.390	0.547	5.323	5.323	2.771	
	6.707	1.125						

7.4.2.35 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-hept-3E-enoyl]-L-threonyl]-O1-[cyclohexylamino-carbonyl]-L-alaninol 21

Nach AAV2 wurden 8.6 mg (12 μ mol) **78** mit 2.0 mg (10 μ mol) **73** umgesetzt. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 6.2 mg (8.2 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 82% bezogen **73**.

Charakterisierung



Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 12.85 min

C₃₉H₅₉N₇O₈
MG = 753.95 g/mol

MALDI-TOF-MS: m/z = 754.9 [M+H]⁺; 776.9 [M+Na]⁺; 772.9 [M+K]⁺

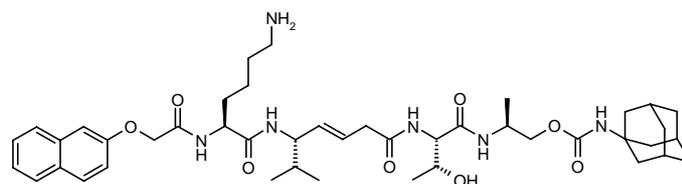
¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.081 NH	7.233 α	7.685 β	7.800 β'	7.315 γ/β''	7.605 δ	7.685 ϵ	4.558 z-NH ₂
Lysin	8.388	4.303	1.737	1.662	0.987	1.462	2.577	7.333
Threonin	7.975	3.975	3.875		1.092			
Alaninol	8.029	4.057	1.089	3.878	3.878			
	NH	α	β	γ	CH	CH	CH ₂	
Val- Ψ [CHCH]-Gly Carbamat	7.802 NH	3.947 H1	1.532 H2/H6	0.692 H3/5	5.503 H4	5.503	2.962	
	6.707	3.264	1.742	1.628	1.125			

7.4.2.36 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-hept-3E-enoyl]-L-threonyl]-O1-[adamantylamino-carbonyl]-L-alaninol 22

Nach AAV2 wurden 8.7 mg (12 μ mol) **78** mit 2.5 mg (10 μ mol) **75** umgesetzt. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 6.7 mg (8.4 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 84% bezogen auf **75**.

Charakterisierung



Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 11.49 min

C₄₃H₆₃N₇O₈
MG = 806.02 g/mol

MALDI-TOF-MS: m/z = 807.1 [M+H]⁺; 829.2 [M+Na]⁺; 845.9 [M+K]⁺

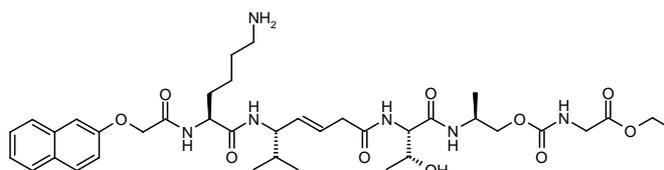
¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.078	7.235	7.678	7.801	7.315	7.599	7.625	4.652
	NH	α	β	β'	γ/β''	δ	ϵ	z -NH ₂
Lysin	8.332	4.142	1.533	1.453	0.932	1.275	2.371	7.202
Threonin	7.985	3.820	3.746		0.919			
Alaninol	7.795	3.905	0.955	3.801	3.801			
	NH	α	β	γ	CH	CH	CH ₂	
Val- Ψ [CHCH]-Gly	7.795	3.822	1.385	0.595	5.299	5.299	2.775	
Carbamat	NH	CH	CH ₂	CH ₂				
	n.b.	1.880	1.703	1.550				

7.4.2.37 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-hept-3E-enoyl]-L-threonyl]-O1-[ethoxycarbonyl-methylamino-carbonyl]-L-alaninol 23

Nach AAV2 wurden 8.5 mg (12 μ mol) **78** mit 2.1 mg (10 μ mol) **76** umgesetzt. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 6.2 mg (8.2 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 82% bezogen auf **76**.

Charakterisierung



Farbloses Feststoff

R_t-Wert = 11.20 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 758.1 [M+H]⁺; 780.5 [M+Na]⁺; 796.9 [M+K]⁺

C₃₇H₅₅N₇O₁₀
MG = 757.89 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.080	7.233	7.672	7.800	7.315	7.605	7.685	4.553
	NH	α	β	β'	γ/β''	δ	ϵ	z -NH ₂
Lysin	8.321	4.132	1.522		0.931	1.270	2.372	7.213
Threonin	7.996	3.978	3.746		0.913			
Alaninol	7.788	3.901	0.940	3.778	3.778			
	NH	α	β	γ	CH	CH	CH ₂	
Val- Ψ [CHCH]-Gly	7.793	3.820	1.390	0.547	5.323	5.323	2.771	
Carbamat	NH	Ac-CH ₂	CH ₂	CH ₃				
	7.080	3.650	1.832	1.211				

7.4.3 Verbindungen aus Abschnitt 4.2

7.4.3.1 Darstellung des linearen Peptids **81**

Die Synthese des Peptids **81** erfolgte in einem 50 μmol -Ansatz und wurde manuell nach AAV1 dargestellt, wobei bei dieser Synthese kein *Capping* durchgeführt wurde. Nach erfolgter Synthese wurde die terminale Fmoc-Gruppe des Peptids gemäß AAV2 abgespalten und anschließend, entsprechend AAV5 vom Harz abgespalten und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels RP-HPLC an einer präparativen RPC_{18} -Säule (Eluent C / Eluent D 100/00 (1 CV) \rightarrow 40/60 (7 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1.5 CV) \rightarrow 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL/min), wobei es jedoch nicht gelang das Peptid **66** vollständig zu isolieren, so dass keine Ausbeute angegeben werden konnte. Die Reinheit der Probe wurde mittels Integration von Amid-Protonensignalen mit 65% bestimmt.

Charakterisierung

Sequenz: SVTISSNTS

Molmasse: 894.5 g/mol

Farblosers Feststoff

R_t -Wert = 9.26 min

MALDI-TOF-MS: $m/z = 895.9 [M+H]^+$; $818.8 [M+Na]^+$; $834.9 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (300 K, 700 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 pH = 3.5):

AS	NH ($^3J_{\text{NH,H}\alpha}$)	α	β	β'	γ	δ	ϵ	andere Protonen
Ser ¹²⁶	---	4.133	3.871	---	---	---	---	
Val ¹²⁷	8.507 (7.7)	4.212	2.027	---	0.878	---	---	
Thr ¹²⁸	8.331 (7.6)	4.296	4.097	---	1.114	---	---	
Ile ¹⁹⁸	8.284 (7.7)	4.047	1.801	---	1.406	0.785	---	γ' : 1.119
Ser ¹⁹⁹	8.381 (6.8)	4.445	3.786	---	---	---	---	
Ser ²⁰⁰	8.333 (6.8)	4.411	3.804	---	---	---	---	
Asn ²⁰¹	8.429 (6.8)	4.739	2.808	2.729	---	---	---	CONH ₂ : 7.495/7.087
Thr ²⁰²	8.114 (7.7)	4.326	4.294	---	1.132	---	---	
Ser ²⁰³	8.190 (7.4)	4.364	3.817	---	---	---	---	CONH ₂ : 7.519/6.836

7.4.3.2 Darstellung des glycosylierten Peptids **82**

Die Synthese des Peptids **82** erfolgte in einem 50 μ mol-Ansatz und wurde manuell nach AAV1 dargestellt, wobei bei dieser Synthese kein *Capping* durchgeführt wurde. Nach erfolgter Synthese wurde die terminalen Fmoc-Gruppe des Peptids gemäß AAV2 abgespalten und anschließend, entsprechend AVV4 zunächst *O*-deacetyliert und abschließend nach AAV5 vom Harz abgespalten und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels RP-HPLC an einer präparativen RPC₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 100/00 (0.5 CV) \rightarrow 90/10 (0.5 CV) \rightarrow 80/20 (5 CV) \rightarrow 0/100 (0.75 CV) \rightarrow 0/100 (1.5 CV) \rightarrow 100/00 (0.5 CV), Flussrate 20 mL/min), wobei es jedoch nicht gelang das Peptid **67** vollständig zu isolieren, so dass keine Ausbeute angegeben werden konnte. Die Reinheit der Probe wurde mittels Integration von Amid-Protonensignalen mit 60% bestimmt.

Charakterisierung

Sequenz: SVTISSN(GlcNAc)TS

Molmasse: 1099.5 g/mol

Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 13.96 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 1100.2 [M+H]⁺; 1122.8 [M+Na]⁺; 1138.7 [M+K]⁺

¹H-NMR (300 K, 700 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3.5):

AS	NH (³ J _{NH,Hα})	α	β	β'	γ	δ	ϵ	andere Protonen
Ser ¹²⁶	---	3.926	3.864	---	---	---	---	
Val ¹²⁷	8.503 (7.8)	4.209	2.022	---	0.875	---	---	
Thr ¹²⁸	8.327 (7.5)	4.292	4.044	---	1.105	---	---	
Ile ¹⁹⁸	8.282 (7.6)	4.150	1.795	---	1.385	0.835	---	γ' : 1.114
Ser ¹⁹⁹	8.375 (7.1)	4.446	3.836	---	---	---	---	
Ser ²⁰⁰	8.319 (7.0)	4.294	3.764	---	---	---	---	
Asn ²⁰¹	8.474 (7.3)	4.207	2.826	2.736	---	---	---	
Thr ²⁰²	8.068 (8.1)	4.304	4.245	---	1.129	---	---	
Ser ²⁰³	8.178 (7.3)	4.300	3.753					CONH ₂ : 7.092/7.518
GlcNAc	NH	NH(Ac)	1	2	3	4	5	6a/6b
	8.557 (9.1)	8.082 (9.8) 1.929	4.960	3.797	3.666	3.734	3.429	3.412/3.552

7.4.3.3 Darstellung des linearen Peptids **83**

Die Synthese des Peptids **83** erfolgte in einem 50 μmol -Ansatz und wurde manuell nach AAV1 dargestellt, wobei bei dieser Synthese kein *Capping* durchgeführt wurde. Nach erfolgter Synthese wurde die terminale Fmoc-Gruppe des Peptids gemäß AAV2 abgespalten und anschließend, entsprechend AAV5 vom Harz abgespalten und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels *RP*-HPLC gereinigt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer präparativen RPC_{18} -Säule (Eluent C / Eluent D 100/00 (1 CV) \rightarrow 40/60 (7 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1.5 CV) \rightarrow 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL/min). Es konnten 9.5 mg (4.6 μmol) isoliert werden. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 9.2%.

Charakterisierung

Sequenz: NMWQKVGTPLSVTISSNTS

Molmasse: 2050.4 g/mol

Farbloser Feststoff

R_t -Wert = 17.25 min

MALDI-TOF-MS: $m/z = 2051.5 [M+H]^+$; $2073.2 [M+Na]^+$; $2089.7 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (300 K, 700 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 pH = 3.5):

AS	NH ($^3J_{\text{NH,H}\alpha}$)	α	β	β'	γ	δ	ϵ	andere Protonen
Asn ⁴²⁵	---	4.221	2.789	---	---	---	---	CONH ₂ : 6.914/7.531
Met ⁴²⁶	8.607 (6.6)	4.348	2.290	---	1.826	---	---	CH ₃ : 1.936
Trp ⁴²⁷	8.083 (7.4)	4.563	3.193	---	---	---	---	H2: 7.159 H4: 7.532 H5: 7.075 H6: 7.149 H7: 7.421
Gln ⁴²⁸	7.918 (7.3)	4.158	1.759	1.889	2.104	---	---	CONH ₂ : 6.839/7.511
Lys ⁴²⁹	8.122 (6.9)	4.156	1.707	---	1.313	1.612	2.901	NH ₂ : 7.437
Val ⁴³⁰	8.074 (7.7)	4.025	1.998	---	0.867	---	---	
Gly	8.429 (6.5)	3.903	---	---	---	---	---	
Thr ¹²³	7.971 (7.8)	4.528	4.067	---	1.167	---	---	
Pro ¹²⁴	---	4.329	1.944	1.849	2.209	3.777	---	δ' : 3.614
Leu ¹²⁵	8.238 (6.7)	4.236	1.658	---	1.539	0.855	---	

AS	NH ($^3J_{\text{NH,H}\alpha}$)	α	β	β'	γ	δ	ϵ	andere Protonen
Ser ¹²⁶	8.159 (7.6)	4.389	3.768	---	---	---	---	
Val ¹²⁷	8.032 (7.8)	4.149	2.032	---	0.855	---	---	
Thr ¹²⁸	8.181 (7.3)	4.269	4.151	---	1.109	---	---	
Ile ¹⁹⁸	8.167 (7.0)	4.145	1.809	---	1.541	0.847	---	γ' : 1.416 γ'' : 1.117
Ser ¹⁹⁹	8.331 (6.8)	4.424	3.797	---	---	---	---	
Ser ²⁰⁰	8.297 (7.1)	4.407	3.804	---	---	---	---	
Asn ²⁰¹	8.399 (7.4)	4.734	2.796	2.725	---	---	---	
Thr ²⁰²	8.099 (8.0)	4.314	4.224	---	1.124	---	---	
Ser ²⁰³	8.179 (6.2)	4.317	3.816	---	---	---	---	CONH ₂ : 6.732/7.359

7.4.3.4 Darstellung des glycosylierten, linearen Peptids **84**

Die Synthese des Peptids **84** erfolgte in einem 50 μmol -Ansatz und wurde manuell nach AAV1 dargestellt, wobei bei dieser Synthese kein *Capping* durchgeführt wurde. Nach erfolgter Synthese wurde die terminalen Fmoc-Gruppe des Peptids gemäß AAV2 abgespalten und anschließend, entsprechend AVV4 zunächst *O*-deacetyliert und abschließend nach AAV5 vom Harz abgespalten und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels RP-HPLC an einer präparativen RPC₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 100/00 (1 CV) \rightarrow 40/60 (7 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1.5 CV) \rightarrow 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL/min). Es konnten 9.7 mg (4.3 μmol) isoliert werden. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 8.6%.

Charakterisierung

Sequenz: NMWQKVGTPLSVTISSN(GlcNAc)TS

Molmasse: 2253.2 g/mol

Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 18.97 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 2254.5 [M+H]⁺; 2276.8 [M+Na]⁺

¹H-NMR (300 K, 700 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3.5):

AS	NH ($^3J_{\text{NH,H}\alpha}$)	α	β	β'	γ	δ	ϵ	andere Protonen
Asn ⁴²⁵	---	4.223	2.774	---	---	---	---	CONH ₂ : 6.913/7.532
Met ⁴²⁶	8.606 (7.1)	4.344	2.277	---	1.824	---	---	CH ₃ : 1.935
Trp ⁴²⁷	8.087 (7.1)	4.579	3.198	---	---	---	---	H2: 7.176 H4: 7.532 H5: 7.081 H6: 7.172 H7: 7.415
Gln ⁴²⁸	7.917 (8.1)	4.154	1.768	1.893	2.105	---	---	CONH ₂ : n.b.
Lys ⁴²⁹	8.126 (7.1)	4.167	1.718	---	1.312	1.599	2.905	NH ₂ : 7.442
Val ⁴³⁰	8.081 (9.0)	4.035	1.999	---	0.881	---	---	
Gly	8.427 (6.6)	3.898	---	---	---	---	---	
Thr ¹²³	7.973 (7.1)	4.511	4.067	---	1.168	---	---	
Pro ¹²⁴	---	4.328	1.929	1.836	2.208	3.785	---	δ' : 3.619
Leu ¹²⁵	8.237 (6.6)	4.237	2.213	1.822	1.559	0.825	---	
Ser	8.177 (7.2)	4.325	3.813	---	---	---	---	
Val ¹²⁷	8.428 (6.8)	3.898	1.993	---	0.875	---	---	
Thr ¹²⁸	8.151 (8.4)	4.151	4.023	---	1.109	---	---	
Ile ¹⁹⁸	8.171 (8.6)	4.154	1.805	---	1.537	0.837	---	γ' : 1.118 γ'' : 1.548
Ser ¹⁹⁹	8.331 (6.6)	4.442	3.792	---	---	---	---	
Ser	8.299 (7.1)	4.404	3.804	---	---	---	---	
Asn ²⁰¹	8.462 (8.1)	4.735	2.826	2.739	---	---	---	
Thr ²⁰²	8.064 (8.3)	4.323	4.260	---	1.118	---	---	
Ser ²⁰³	8.166 (7.0)	4.375	3.772	---	---	---	---	CONH ₂ : 6.791/7.361
GlcNAc	NH	NH(Ac)	1	2	3	4	5	6a/6b
	8.554 (9.1)	8.080 (1.927)	4.952	3.723	3.519	3.613	3.407	3.517/3.395

7.4.3.5 Darstellung des zyklischen Peptids **85**

In einem 50 μmol -Ansatz wurde die Synthese des zyklischen Peptids **85** mittels einer automatischen Festphasenpeptidsynthese gemäß AAV1 durchgeführt.

Die terminalen Fmoc-Gruppe wurde nach AAV5 abgespalten und das Harz anschließend in eine Stickstoffritze überführt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Peptid **85** wurde nun unter Schlenkbedingungen mit 5 mL Argon entgaster Abspaltungslösung aus TFA/TIPS/H₂O

(95:5:2) vom Harz abgespalten. Das abgespaltene, vollständig entschützte Peptid **85** wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde unter Schlenkbedingungen in 2.5 L, mit Helium entgaster, 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat aufgenommen. Anschließend wurde diese Lösung mittels Ultraschall 60 Minuten homogenisiert. Anschließend wurde mittels einer Gasfritte Luftsauerstoff zur Zyklisierung des Glycopeptids in die Lösung eingeleitet und diese für 48 Stunden gerührt.

Diese Lösung wurde darauffolgend unter Verwendung einer Ultrafiltrationszelle und eines Filters mit einem *cut-off* von 1000 Da gemäß ultrafiltriert und die eingengte Lösung anschließend gefriergetrocknet.

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer präparativen *RPC*₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 100/00 (1 CV) → 40/60 (7 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1.5 CV) → 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL). Es konnten 8.0 mg (3.8 µmol) isoliert werden. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 7.6%.

Charakterisierung

Sequenz: NMWQKVGTPLCVTISCNTS

Molmasse: 2082.5 g/mol

Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 16.73 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 2083.2 [M+H]⁺; 2105.5 [M+Na]⁺

¹H-NMR (300 K, 700 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3.5):

AS	NH (³ J _{NH,Hα})	α	β	β'	γ	δ	ε	andere Protonen
Asn ⁴²⁵	---	4.223	2.787	---	---	---	---	CONH ₂ : 6.822/7.482
Met ⁴²⁶	8.607 (6.4)	4.353	2.297	---	1.821	---	---	CH ₃ : 1.936
Trp ⁴²⁷	8.083 (6.7)	4.597	3.234	---	---	---	---	H2: 7.161 H4: 7.532 H5: 7.062 H6: 7.152 H7: 7.464
Gln ⁴²⁸	7.921 (7.1)	4.167	1.920	1.768	2.114	---	---	CONH ₂ : 7.077/7.464
Lys ⁴²⁹	8.118 (7.2)	4.142	1.702	---	1.326	1.617	2.913	NH ₂ : 7.443
Val ⁴³⁰	8.079 (7.8)	4.029	2.009	---	0.839	---	---	
Gly	8.439 (7.3)	3.903	---	---	---	---	---	

AS	NH ($^3J_{\text{NH,H}\alpha}$)	α	β	β'	γ	δ	ϵ	andere Protonen
Thr ¹²³	7.952 (7.6)	4.524	4.064	---	1.181	---	---	
Pro ¹²⁴	---	4.321	1.934	1.817	2.202	3.743	---	δ' : 3.613
Leu ¹²⁵	8.192 (6.0)	4.194	n.b.	n.b.	1.522	0.818	---	
Cys ¹²⁶	8.360 (6.9)	4.203	3.198	3.034	---	---	---	
Val ¹²⁷	8.496 (6.8)	3.881	1.966	---	0.839	---	---	
Thr ¹²⁸	7.532 (8.4)	4.456	3.998	---	1.176	---	---	
Ile ¹⁹⁸	8.162 (7.6)	4.142	1.716	---	n.b.	0.853	---	γ' : 1.328 γ'' : 1.603
Ser ¹⁹⁹	7.991 (6.5)	4.340	3.801	---	---	---	---	
Cys ²⁰⁰	8.095 (7.3)	4.512	3.228	3.052	---	---	---	
Asn ²⁰¹	8.361 (7.3)	4.727	2.810	2.743	---	---	---	
Thr ²⁰²	8.091 (7.1)	4.334	4.258	---	1.136	---	---	
Ser ²⁰³	8.200 (7.3)	4.375	3.813	---	---	---	---	CONH ₂ : 7.359/6.734

7.4.3.6 Darstellung des glycosylierten, zyklischen Peptids **86**

In einem 50 μmol -Ansatz wurde die Synthese des zyklischen Glycopeptids **86** mittels einer Kombination der automatischen Festphasenpeptidsynthese gemäß AAV1 und der manuellen Kupplung der ersten vier zu kuppelnden Aminosäuren durchgeführt.

Die ersten Aminosäuren, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH und Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, wurden dreimal jeweils für 180 Minuten in einem vierfachen Überschuss an das Harz unter Schlenkbedingungen gekuppelt. Der darauffolgende *N*-Glycosylbaustein **90** wurde, ebenfalls unter Schlenkbedingungen, einmal mit einem Überschuss von 1.5 Äquivalenten über 48 Stunden gekuppelt. Anschließend wurde die Aminosäure Fmoc-Cys(Trt)-OH wiederum unter Schlenkbedingungen dreimal in einem vierfachen Überschuss für jeweils 180 Minuten an das Harz gekuppelt. Nach der Überführung des Harzes in den Peptid-Synthesizer *Liberty* wurde der noch ausbleibende Teil der Peptidsequenz nach AAV1 synthetisiert. Die terminale Fmoc-Gruppe wurde nach AAV5 abgespalten und das Harz wurde anschließend erneut in eine Stickstofffritte überführt und gemäß AAV4 *O*-deacetyliert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Peptid **86** wurde nun unter Schlenkbedingungen mit 5 mL Argon entgaster Abspaltlösung aus TFA/TIPS/H₂O (95:5:2) vom Harz abgespalten. Das abgespaltene, vollständig entschützte Peptid **86** wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde unter Schlenkbedingungen in 2.5 L, mit Helium entgaster, 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat aufgenommen. Anschließend wurde diese Lösung mittels

Ultraschall 60 Minuten homogenisiert. Anschließend wurde mittels einer Gasfritte Luftsauerstoff zur Zyklisierung des Glycopeptids in die Lösung eingeleitet und diese für 48 Stunden gerührt.

Diese Lösung wurde darauffolgend unter Verwendung einer Ultrafiltrationszelle und eines Filters mit einem *cut-off* von 1000 Da gemäß ultrafiltriert und die eingeeengte Lösung anschließend gefriergetrocknet.

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer präparativen *RP*-C₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 80/20 (0.25 CV) → 77/23 (9 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1.5 CV) → 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL/min). Die produkthaltigen Fraktionen wurden anschließend gefriergetrocknet. Es konnten 5.4 mg (2.6 μmol) isoliert werden. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 5.2%.

Charakterisierung

Sequenz: NMWQKVGTPLCVTISCN(GlcNAc)TS

Molmasse: 2282.3 g/mol

Farbloses Feststoff

R_t-Wert = 37.096 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 2283.8 [M+H]⁺; 2306.1 [M+Na]⁺

¹H-NMR (300 K, 700 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3.5):

AS	NH (³ J _{NH,Hα})	α	β	β'	γ	δ	ε	andere Protonen
Asn ⁴²⁵	---	4.696	2.743	---	---	---	---	CONH ₂ : 8.064/8.548
Met ⁴²⁶	8.621 (5.8)	4.355	2.291	---	1.826	---	---	CH ₃ : 1.949
Trp ⁴²⁷	8.096(7.4)	4.602	3.209	---	---	---	---	H2: 7.177 H4: 7.550 H5: 7.028 H6: 7.173 H7: 7.437
Gln ⁴²⁸	7.935(7.2)	4.164	1.771	1.891	2.109	---	---	CONH ₂ : 6.695/7.284
Lys ⁴²⁹	8.129(6.6)	4.149	1.691	---	1.313	1.612	2.912	
Val ⁴³⁰	8.087(8.0)	4.043	2.006	---	0.881	---	---	
Gly	8.441(5.9)	3.916	---	---	---	---	---	
Thr ¹²³	7.967(8.2)	4.544	4.065		1.174	---	---	
Pro ¹²⁴	---	4.337	1.924	1.826	2.208	3.777	---	δ': 3.625

AS	NH ($^3J_{\text{NH,H}\alpha}$)	α	β	β'	γ	δ	ϵ	andere Protonen
Leu ¹²⁵	8.206(6.2)	4.202	2.218		1.529	0.812	---	
Cys ¹²⁶	8.381(7.3)	4.207	3.189	3.055	---	---	---	
Val ¹²⁷	8.501(8.2)	4.357	2.291	---	0.846	---	---	
Thr ¹²⁸	7.545(7.9)	4.449	4.448	---	1.181	---	---	
Ile ¹⁹⁸	8.171(4.8)	3.948	1.883	---	1.492	0.882	---	γ' : 1.187
Ser ¹⁹⁹	7.984(6.8)	4.336	3.801	---	---	---	---	
Cys ²⁰⁰	8.117(7.6)	4.515	3.238	3.039	---	---	---	
Asn ²⁰¹	8.339(7.3)	4.196	2.833	2.725	---	---	---	
Thr ²⁰²	8.052(8.2)	4.297	4.297	---	1.152	---	---	
Ser ²⁰³	8.178(6.3)	4.373	3.832	---	---	---	---	CONH ₂ : 6.741/7.374
GlcNAc	NH	NH(Ac)	1	2	3	4	5	6a/6b
	8.548(8.6)	8.065(9.4) (1.938)	4.962	3.797	3.521	3.678	3.402	3.297/3.305

7.4.4 Verbindungen aus Abschnitt 4.3

7.4.4.1 Darstellung von *N*2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-*O*1-[*tert*-butyl-aminocarbonyl]-*O*5-[*tert*-butyl]-*L*-glutamol **105**

Abweichend von einer literaturbekannten Vorschrift²⁰⁰ wurden zur Darstellung von *N*2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-*O*1-[*tert*-butylaminocarbonyl]-*O*5-[*tert*-butyl]-*L*-glutamol (**105**) 455 μL (606 mg; 4.49 mmol) *tert*-Butylisocyanat wurden 18 mL abs. Toluol gelöst und 1.73 mL (1.53 g; 4.49 mmol) $\text{Ti}(\text{O}^t\text{Bu})_4$ zugetropft. Anschließend wurden 1.93 g (4.43 mmol) **104** gelöst in 4 mL abs. Toluol zugegeben und die Reaktionslösung eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Darauffolgend wurde die Lösung mit 15 mL ges. NH_4Cl Lsg. versetzt. Der entstandene Feststoff wurde abgetrennt und wässrige Phase zweimal mit jeweils 25 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 7:3) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 1.37 g (2.69 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 60%.

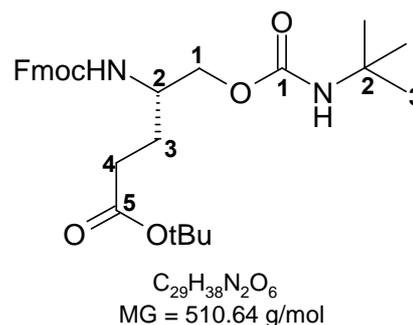
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -31.1$ ($c = 1$, CHCl_3)

R_f -Wert (PE/EE 7:3) = 0.33

FAB-MS: $m/z = 511.9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; 533.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.80\text{-}7.73$ (m , 2H, Fmoc H_A , H_A'); $7.62\text{-}7.56$ (m , 2H, Fmoc H_D , H_D'); $7.44\text{-}7.37$ (m , 2H, Fmoc H_B , H_B'), $7.36\text{-}7.28$ (m , 2H, Fmoc H_C , H_C'), 5.00 (d , 1H, $^3J_{\text{NH,H-1}} = 8.8$ Hz, NH); 4.67 (s , 1H, NH carb.); 4.39 (d , 2H, $^3J_{\text{Fmoc-CH}_2, \text{Fmoc-CH}} = 7.4$ Hz, Fmoc- CH_2); 4.21 (t , 1H, $^3J_{\text{Fmoc-CH}, \text{Fmoc-CH}_2} = 7.4$ Hz, Fmoc-CH); $4.15\text{-}4.05$ (m , 1H, H-1); $4.04\text{-}3.96$ (m , 1H, $\text{H-1}'$); $3.93\text{-}3.81$ (m , 1H, H-2); $2.29\text{-}2.24$ (m , 2H, H-4); $1.88\text{-}1.78$ (m , 1H, H-3); $1.78\text{-}1.70$ (m , 1H, $\text{H-3}'$); 1.44 (s , 9H, Ester- CH_3); 1.30 (s , 9H, H-3 carb.) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.45$ (s , C-5); 171.03 (s , C-1 carb.); 170.94 (s , Fmoc-Carbonyl); 143.82 (s , C_a); 141.22 (s , C_d); 127.52 (d , C_B); 126.99 (d , C_C); 124.83 (d , C_D); 119.84 (s , C_A); 80.42 (s , quart. Ester); 66.49 (t , Fmoc- CH_2); 65.53 (t , C-1); 50.73 (d , C-2); 50.28 (s , C-2 carb.); 47.37 (d , Fmoc-CH); 32.36 (t , C-4); 28.03 (q , Ester- CH_3); 26.92 (t , C-3); 12.49 (q , C-3 carb.) ppm.

7.4.4.2 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[cyclohexyl-aminocarbonyl]-O5-[tert-butyl]-L-glutamol 106

Abweichend von einer literaturbekannten Vorschrift²⁰⁰ zur Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[cyclohexylaminocarbonyl]-O5-[tert-butyl]-L-glutamol (106) wurden 298 μL (292 mg; 2.33 mmol) Cyclohexylisocyanat 10 mL abs. Toluol gelöst und 896 μL (793 mg; 2.23 mmol) $\text{Ti}(\text{O}^t\text{Bu})_4$ zugetropft. Anschließend wurden 1.00 g (2.33 mmol) 104 gelöst in 5 mL abs. Toluol zugegeben und die Reaktionslösung eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Darauffolgend wurde die Lösung mit 20 mL ges. NH_4Cl -Lsg. versetzt. Der entstandene Feststoff wurde abgetrennt und wässrige Phase zweimal mit jeweils 25 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 7:3) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 555 mg (1.00 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 43%.

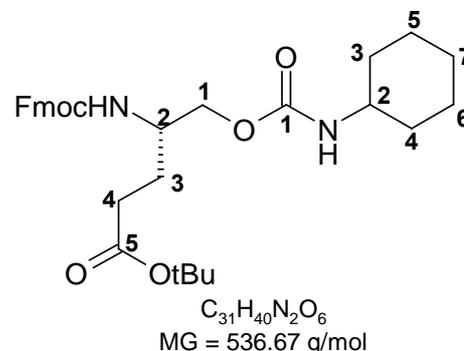
Charakterisierung

Farbloses Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -37^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

R_f -Wert (PE/EE 7:1) = 0.61

MALDI-TOF-MS: $m/z = 537.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 559.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.80\text{-}7.73$ (*m*, 2H, Fmoc **H_A**, **H_A'**); $7.62\text{-}7.56$ (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_D'**); $7.44\text{-}7.37$ (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_B'**); $7.36\text{-}7.28$ (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_C'**); 5.00 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH,H-2}} = 8.5$ Hz, **NH**); 4.60 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH carb,H-2 carb}} = 6.5$ Hz, **NH carb.**); 4.39 (*d*, 2H, $^3J_{\text{FmocCH}_2,\text{FmocCH}} = 6.5$ Hz, Fmoc-**CH₂**); 4.21 (*t*, 1H, $^3J_{\text{FmocCH},\text{FmocCH}_2} = 6.5$ Hz, Fmoc-**CH**); $4.16\text{-}4.07$ (*m*, 1H, **H-1**); $4.07\text{-}3.99$ (*m*, 1H, **H-1'**); $3.97\text{-}3.82$ (*m*, 1H, **H-2**); 3.46 (*br*, **H-2 br.**); $2.39\text{-}2.24$ (*m*, 2H, **H-4**); $1.98\text{-}1.62$ (*m*, 1H, **H-3**); $1.62\text{-}1.52$ (*m*, 1H, **H-3'**); 1.44 (*s*, 9H, Ester-**CH₃**); $1.39\text{-}1.21$ (*m*, 4H, **H-3 carb.**, **H-4 carb.**); $1.20\text{-}1.03$ (*m*, 6H, **H-5 carb.**, **H-6 carb.**, **H-7 carb.**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.42$ (*s*, **C-5**); 171.15 (*s*, **C-1 carb.**); 155.59 (*s*, Fmoc-**Carbonyl**); 143.82 (*s*, **C_a**); 141.26 (*s*, **C_d**); 127.44 (*d*, **C_B**); 127.00 (*d*, **C_C**); 124.94 (*d*, **C_D**); 119.81 (*s*, **C_A**); 80.47 (*s*, quart. **Ester**); 66.46 (*t*, Fmoc-**CH₂**); 66.18 (*t*, **C-1**); 50.69 (*d*, **C-2**); 50.64 (*d*, **C-4**); 49.93 (*t*, **C-2 carb.**); 47.24 (*d*, Fmoc-**CH**); 32.36 (*t*, **C-4**); 31.96 (*d*, **C-3 carb.**); 28.10 (*q*, Ester-**CH₃**); 27.19 (*t*, **C-3**); 26.89 (*d*, **C-5 carb.**); 24.75 (*d*, **C-7 carb.**) ppm.

Aufgrund der C2-Symmetrie des Cyclohexylringes sind die ^{13}C -Signale der Kohlenstoffatome C-4 carb. und C-6 carb. nicht von denen der Kohlenstoffe C-3 carb. und C-5 carb. Zu unterscheiden.

7.4.4.3 Darstellung von *N*2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-*O*1-[adamantylaminocarbonyl]-*O*5-[tert-butyl]-*L*-glutamol **107**

Abweichend von einer literaturbekannten Vorschrift²⁰⁰ wurden zur Darstellung von *N*2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-*O*1-[adamantylaminocarbonyl]-*O*5-[tert-butyl]-*L*-glutamol (**107**) 795 mg (4.49 mmol) Adamantylisocyanat 18 mL abs. Toluol gelöst und 1.73 mL (1.53 g; 4.49 mmol) Ti(O^tBu)₄ zugetropft. Anschließend wurden 1.93 g (4.43 mmol) **104** gelöst in 4 mL abs. Toluol zugegeben und die Reaktionslösung eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Darauffolgend wurde die Lösung mit 15 mL ges. NH₄Cl-Lsg. versetzt. Der entstandene Feststoff wurde abgetrennt und wässrige Phase zweimal mit jeweils 25 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 7:3) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 1.41 g (2.39 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 53%.

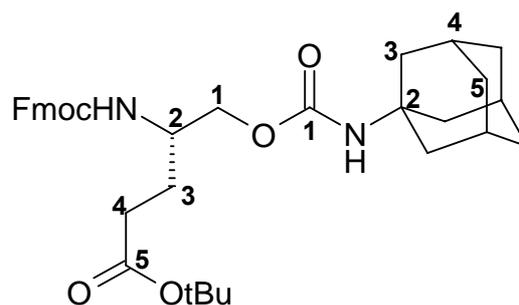
Charakterisierung

Farbloses Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -23.5^\circ$ ($c = 1.2$; CHCl₃)

R_f-Wert (PE/EE 7:3) = 0.22

FAB-MS: $m/z = 589.9$ [M+H]⁺; 611.1 [M+Na]⁺; 627.9 [M+K]⁺ $C_{35}H_{44}N_2O_6$
MG = 588.75 g/mol



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.81$ - 7.73 (*m*, 2H, Fmoc **H_A**, **H_{A'}**); 7.63 - 7.56 (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_{D'}**); 7.44 - 7.36 (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_{B'}**), 7.36 - 7.28 (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_{C'}**), 5.00 (*d*, 1H, ³*J*_{NH,H-1} = 8.5 Hz, NH); 4.57 (*s*, 1H, NH carb.); 4.39 (*d*, 2H, ³*J*_{Fmoc-CH₂,Fmoc-CH} = 7.3 Hz, Fmoc-CH₂); 4.20 (*t*, 1H, ³*J*_{FmocCH,FmocCH₂} = 6.9 Hz, Fmoc-CH); 4.09 - 4.03 (*m*, 1H, **H-1**); 4.02 - 3.94 (*m*, 1H, **H-1'**); 3.93 - 3.81 (*m*, 1H, **H-2**); 2.39 - 2.23 (*m*, 2H, **H-4**); 2.06 (*s*, 3H, **H-4 carb.**); 1.91 (*s*, 6H, **H-3 carb.**); 1.86 - 1.72 (*m*, 2H, **H-3**); 1.65 (*s*, 6H, **H-5 carb.**); 1.44 (*s*, 9H, Ester-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.49$ (*s*, **C-5**); 171.07 (*s*, **C-1 carb.**); 155.59 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 143.87 (*s*, **C_a**); 141.28 (*s*, **C_d**); 127.43 (*d*, **C_B**); 126.98 (*d*, **C_C**); 124.86 (*d*, **C_D**); 119.80 (*s*, **C_A**); 80.43 (*s*, quart. Ester); 66.55 (*t*, Fmoc-CH₂); 65.39 (*t*, **C-1**); 50.81 (*s*,

C-2 carb.); 50.73 (*d*, **C-2**); 47.39 (*d*, Fmoc-CH); 41.59 (*t*, **C-3 carb.**); 36.26 (*t*, **C-5 carb.**) 29.33 (*d*, **C-4 carb.**); 28.11 (*q*, Ester-CH₃); 27.04 (*t*, **C-3**) ppm.

7.4.4.4 Darstellung von *N*2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-*O*1-[ethoxy-carbonylmethylaminocarbonyl]-*O*5-[*tert*-butyl]-*L*-glutamol **108**

Abweichend von einer literaturbekannten Vorschrift²⁰⁰ wurden zur Darstellung von *N*2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-*O*1-[ethoxy-carbonylmethylaminocarbonyl]-*O*5-[*tert*-butyl]-*L*-glutamol (**108**) 273 μ L (314 mg; 2.43 mmol) Ethyl-2-*isoc*yanoacetat 150 mL abs. Toluol gelöst. Anschließend wurde 1.00 g (2.43 mmol) **104** gelöst in 5 mL abs. Toluol zugegeben und 939 μ L (827 mg; 2.43 mmol) Ti(O^{*t*}Bu)₄ zugetropft. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Darauffolgend wurde die Lösung mit 150 mL ges. NH₄Cl-Lsg. versetzt. Der entstandene Feststoff wurde abgetrennt und wässrige Phase zweimal mit jeweils 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 3:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 882 mg (1.63 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 67%.

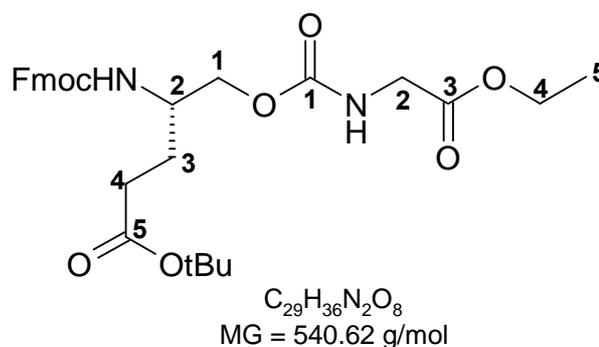
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -29.7$ ($c = 1.1$; CHCl₃)

R_f-Wert (PE/EE 1:1) = 0.41

FAB-MS: $m/z = 563.3$ [M+Na]⁺; 579.9 [M+K]⁺



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.79$ -7.74 (*m*, 2H, Fmoc **H_A**, **H_A'**); 7.62-7.56 (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_D'**); 7.43-7.37 (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_B'**); 7.34-7.29 (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_C'**); 5.23 (*t*, 1H, ³*J*_{NH carb,H-2 carb} = 4.9 Hz, NH **carb.**); 5.01 (*d*, 1H, ³*J*_{NH,H-2} = 8.5 Hz, NH); 4.42 (*dd*, 1H, ³*J*_{FmocCH₂,FmocCH} = 7.6 Hz, ²*J*_{FmocCH₂,FmocCH₂} = 10.2 Hz, Fmoc-CH₂); 4.36 (*dd*, 1H, ³*J*_{FmocCH₂,FmocCH} = 7.0 Hz, ²*J*_{FmocCH₂,FmocCH₂} = 10.3 Hz, Fmoc-CH₂); 4.24-4.16 (*m*, 4H, Fmoc-CH, **H-1**, **H-4 carb.**); 4.16-4.08 (*m*, 1H, **H-1'**); 3.97-3.86 (*m*, 3H, **H-2**, **H-2 carb.**); 2.38-2.25 (*m*, 2H, **H-4**); 1.88-1.80 (*m*, 1H, **H-3**); 1.80-1.72 (*m*, 1H, **H-3'**); 1.44 (*s*, 9H, Ester-CH₃); 1.27 (*t*, 3H, ³*J*_{H-5 carb,H-4 carb} = 7.3 Hz, **H-5 carb.**) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.39$ (*s*, C-5); 169.70 (*s*, C-1 carb.); 169.69 (*s*, C-3 carb.); 167.77 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 143.73 (*s*, C_a); 141.14 (*s*, C_d); 127.47 (*d*, C_B); 126.93 (*d*, C_C); 124.91 (*d*, C_D); 119.76 (*s*, C_A); 80.52 (*s*, quart. Ester); 66.51 (*t*, Fmoc-CH₂); 66.47 (*t*, C-2 carb.); 66.29 (*t*, C-1); 61.66 (*t*, C-4 carb.); 50.46 (*d*, C-2); 47.29 (*d*, Fmoc-CH); 42.68 (*t*, C-2 carb.); 33.04 (*t*, C-4); 27.96 (*q*, Ester-CH₃); 26.21 (*t*, C-3); 14.65 (*q*, C-5 carb.) ppm.

7.4.4.5 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[tert-butyl-aminocarbonyl]-L-glutamol 109

1.37 g (2.69 mmol) **105** wurden in 5 mL TFA/H₂O gelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das verbleibende Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe wurde der erhaltene Rückstand in Wasser aufgenommen und mittels 3 N HCl auf pH = 2 angesäuert und anschließend bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet.

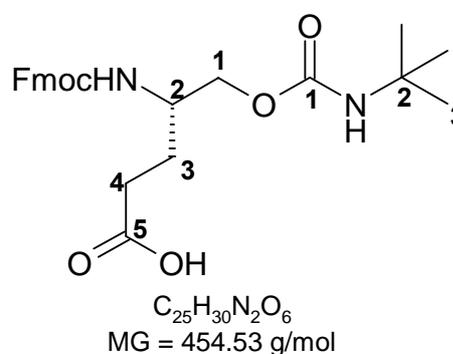
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -18.5^\circ$ (*c* = 1, MeOH)

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.09

FAB-MS: *m/z* = 455.9 [M+H]⁺; 477.1 [M+Na]⁺



^1H -NMR (500 MHz, MeOD-*d*⁴): $\delta = 7.73$ -7.68 (*m*, 2H, Fmoc H_A, H_{A'}); 7.59-7.54 (*m*, 2H, Fmoc H_B, H_{B'}); 7.32-7.29 (*m*, 2H, Fmoc H_B, H_{B'}), 7.25-7.19 (*m*, 2H, Fmoc H_C, H_{C'}), 4.28 (*d*, 2H, $^3J_{\text{Fmoc-CH}_2, \text{Fmoc-CH}} = 7.1$ Hz, Fmoc-CH₂); 4.13 (*t*, 1H, $^3J_{\text{Fmoc-CH}, \text{Fmoc-CH}_2} = 7.2$ Hz, Fmoc-CH); 3.89-3.80 (*m*, 2H, H-1); 3.74-3.64 (*m*, 1H, H-2); 2.28-2.20 (*m*, 2H, H-4); 1.88-1.78 (*m*, 1H, H-3); 1.78-1.70 (*m*, 1H, H-4'); 1.30 (*s*, 9H, H-3 carb.) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD-*d*⁴): $\delta = 173.35$ (*s*, C-5); 171.00 (*s*, C-1 carb.); 170.99 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 143.72 (*s*, C_a); 141.22 (*s*, C_d); 127.41 (*d*, C_B); 126.91 (*d*, C_C); 124.92 (*d*, C_D); 119.71 (*s*, C_A); 66.66 (*t*, Fmoc-CH₂); 65.32 (*t*, C-3); 50.75 (*q*, C-10); 50.57 (*d*, C-2);

50.28 (*s*, **C-2 carb.**); 47.20 (*d*, Fmoc-CH); 4166.49 (*t*, Fmoc-CH₂); 65.53 (*t*, **C-1**); 50.73 (*d*, **C-2**); 50.28 (*s*, **C-2 carb.**); 47.37 (*d*, Fmoc-CH); 32.36 (*t*, **C-4**); 28.03 (*q*, Ester-CH₃); 26.92 (*t*, **C-3**); 12.49 (*q*, **C-3 carb.**) ppm.

7.4.4.6 Darstellung von *N*2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-*O*1-[cyclohexyl-aminocarbonyl]-*L*-glutamol **110**

550 mg (983 μmol) **106** wurden in 5 mL TFA/H₂O (19:1 *v/v*) gelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das der verbleibende Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Es konnten 316 mg (659 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 67%.

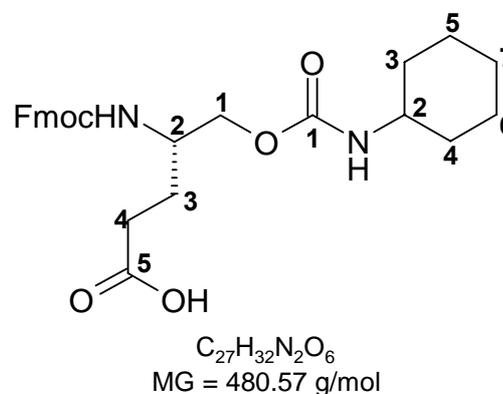
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -34^\circ$ (*c* = 1, CHCl₃)

*R*_F-Wert (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.33

FAB-MS: *m/z* = 503.9 [M+Na]⁺; 519.9 [M+K]



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.80-7.73 (*m*, 2H, Fmoc **H_A**, **H_A'**); 7.62-7.56 (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_D'**); 7.44-7.37 (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_B'**), 7.36-7.28 (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_C'**), 5.00 (*d*, 1H, ³*J*_{NH,H-2} = 8.5 Hz, **NH**); 4.60 (*d*, 1H, ³*J*_{NH carb,H-2 carb} = 6.5 Hz, **NH carb.**); 4.39 (*d*, 2H, ³*J*_{FmocCH₂,FmocCH} = 6.5 Hz, Fmoc-**CH₂**); 4.21 (*t*, 1H, ³*J*_{FmocCH,FmocCH₂} = 6.5 Hz, Fmoc-**CH**); 4.16-4.07 (*m*, 1H, **H-1**); 4.07-3.99 (*m*, 1H, **H-1'**); 3.97-3.82 (*m*, 1H, **H-2**); 3.46 (*br*, **H-2 carb.**); 2.39-2.24 (*m*, 2H, **H-4**); 1.98-1.62 (*m*, 1H, **H-3**); 1.62-1.52 (*m*, 1H, **H-3'**); 1.39-1.21 (*m*, 4H, **H-3 carb.**, **H-4 carb.**); 1.20-1.03 (*m*, 6H, **H-5 carb.**, **H-6 carb.**, **H-7 carb.**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 177.75 (*s*, **C-5**); 171.15 (*s*, **C-1 carb.**); 155.59 (*s*, Fmoc-**Carbonyl**); 143.82 (*s*, **C_a**); 141.26 (*s*, **C_d**); 127.74 (*d*, **C_B**); 127.04 (*d*, **C_C**); 124.88 (*d*, **C_D**); 119.81 (*s*, **C_A**); 66.68 (*t*, Fmoc-CH₂); 66.15 (*t*, **C-1**); 50.69 (*d*, **C-2**); 50.65 (*d*, **C-4**); 49.90 (*t*, **C-2 carb.**); 47.22 (*d*, Fmoc-CH); 32.34 (*t*, **C-3 carb.**); 27.12 (*t*, **C-3**); 26.91 (*d*, **C-5 carb.**); 24.72 (*d*, **C-7 carb.**) ppm.

Aufgrund der C₂-Symmetrie des Cyclohexylringes sind die ¹³C-Signale der Kohlenstoffatome C-4 carb. und C-6 carb. nicht von denen der Kohlenstoffe C-3 carb. und C-5 carb. Zu unterscheiden.

7.4.4.7 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[adamantyl-aminocarbonyl]-L-glutamol 111

1.41 g (2.39 mmol) 107 wurden in 5 mL TFA/H₂O (19:1) gelöst und für 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 1.26 g (2.36 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 99%.

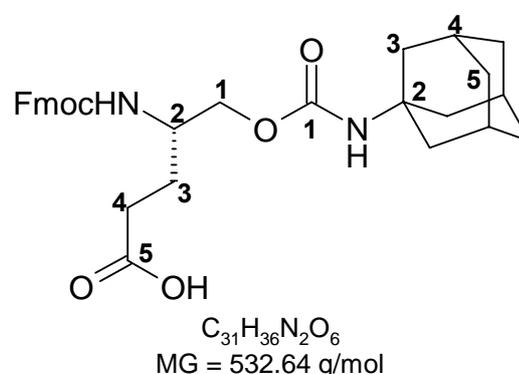
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -23.7^\circ$ (c = 1.2; CHCl₃)

(CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.15

FAB-MS: m/z = 533.5 [M+H]⁺; 655.1 [M+Na]⁺



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.81-7.73 (m, 2H, Fmoc **H_A**, **H_A'**); 7.63-7.56 (m, 2H, Fmoc **H_D**, **H_D'**); 7.44-7.36 (m, 2H, Fmoc **H_B**, **H_B'**); 7.36-7.28 (m, 2H, Fmoc **H_C**, **H_C'**); 4.99 (d, 1H, ³J_{NH,H-1} = 9.0 Hz, **NH**); 4.59 (s, 1H, **NH carb.**); 4.43-4.37 (m, 2H, Fmoc-**CH₂**); 4.21 (t, 1H, ³J_{FmocCH,FmocCH₂} = 6.8 Hz, Fmoc-**CH**); 4.13-4.03 (m, 1H, **H-1**); 4.02-3.95 (m, 1H, **H-1'**); 3.94-3.83 (m, 1H, **H-2**); 2.49-2.32 (m, 2H, **H-4**); 2.06 (s, 3H, **H-4**); 1.96-1.86 (m, 7H, **H-3**, **H-3 carb.**); 1.85-1.72 (m, 1H, **H-3'**); 1.65 (s, 6H, **H-5 carb.**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.59 (s, **C-5**); 171.07 (s, **C-1 carb.**); 155.59 (s, Fmoc-**Carbonyl**); 143.72 (s, **C_a**); 141.22 (s, **C_d**); 127.41 (d, **C_B**); 126.91 (d, **C_C**); 124.92 (d, **C_D**); 119.71 (s, **C_A**); 66.66 (t, Fmoc-**CH₂**); 65.32 (t, **C-1**); 50.75 (q, **C-2 carb.**); 50.57 (d, **C-2**); 47.20 (d, Fmoc-**CH**); 41.51 (t, **C-3 carb.**); 36.15 (t, **C-5 carb.**); 30.15 (t, **C-4**); 29.25 (d, **C-4 carb.**); 27.05 (t, **C-3**) ppm.

7.4.4.8 Darstellung von *N*2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-*O*1-[ethoxycarbonylmethylaminocarbonyl]-*L*-glutamol 112

882 mg (1.63 mmol) **108** wurden in 3 mL TFA/H₂O (19:1) gelöst und eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 730 mg (1.51 mmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 93%.

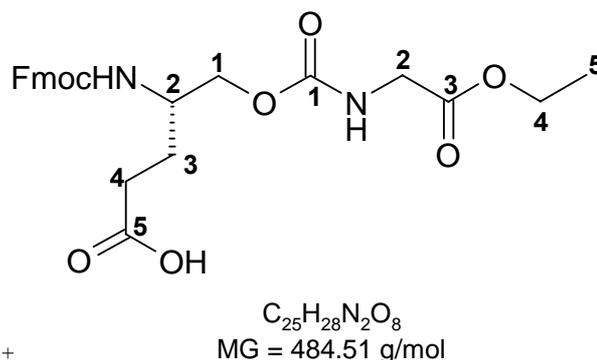
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{546} = -31.8^\circ$ ($c = 1$; CHCl₃)

R_f -Wert (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.12

FAB-MS: $m/z = 507.3$ [M+Na]⁺; 523.9 [M+K]⁺



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.77$ - 7.71 (*m*, 2H, Fmoc **H_A**, **H_A'**); 7.61 - 7.52 (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_D'**); 7.41 - 7.34 (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_B'**); 7.33 - 7.27 (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_C'**); 5.49 (*t*, 1H, ³ $J_{NH\ carb,H-2\ carb} = 5.5$ Hz, NH **carb.**); 5.22 (*d*, 1H, ³ $J_{NH,H-2} = 9.0$ Hz, NH); 4.39 (*d*, 1H, ³ $J_{FmocCH_2,FmocCH} = 6.2$ Hz, Fmoc-CH₂); 4.23 - 4.05 (*m*, 5H, Fmoc-CH, **H-1**, **H-4 carb.**); 3.99 - 3.87 (*m*, 3H, **H-2**, **H-2 carb.**); 2.41 (*dd*, 2H, ³ $J_{H-4,H-3} = 7.2$ Hz, ³ $J_{H-4,H-3'} = 7.2$ Hz, **H-4**); 1.92 - 1.82 (*m*, 1H, **H-3**); 1.82 - 1.71 (*m*, 1H, **H-3'**); 1.25 (*t*, 3H, ³ $J_{H-5\ carb,H-4\ carb} = 7.4$ Hz, **H-5**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.29$ (*s*, **C-5**); 169.74 (*s*, **C-1 carb.**); 169.69 (*s*, **C-3 carb.**); 167.71 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 143.74 (*s*, **C_a**); 141.15 (*s*, **C_d**); 127.49 (*d*, **C_B**); 126.92 (*d*, **C_C**); 124.91 (*d*, **C_D**); 119.75 (*s*, **C_A**); 66.51 (*t*, Fmoc-CH₂); 66.48 (*t*, **C-2 carb.**); 66.30 (*t*, **C-1**); 61.65 (*t*, **C-4 carb.**); 50.43 (*d*, **C-2**); 47.26 (*d*, Fmoc-CH); 42.68 (*t*, **C-2 carb.**); 33.05 (*t*, **C-4**); 26.22 (*t*, **C-3**); 14.67 (*q*, **C-5 carb.**) ppm.

7.4.4.9 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-N5-[3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy-β-D-glucopyranosyl]-O1-[tert-butyl-aminocarbonyl]-L-glutaminol 113

112 mg (380 μmol) TBTU wurden in 500 μL DMF gelöst und mit 57 μL (43 mg; 380 μmol) DIPEA versetzt. Zu dieser Lösung wurden anschließend 120 mg (260 μmol) **109** zugegeben. Diese Lösung wurde zu einer – 10 °C kalten Lösung aus 63.5 mg (290 μmol) **88** in 2 mL DMF zugetropft und für drei Stunden bei – 10 °C gerührt. Darauffolgend wurde zu dieser Reaktionslösung 5 mL eines Gemisches aus Pyridin/Ac₂O (3:2) zugegeben und für weitere 15 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt aus EtOH umkristallisiert und abschließend mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 35 mg (45 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 17%.

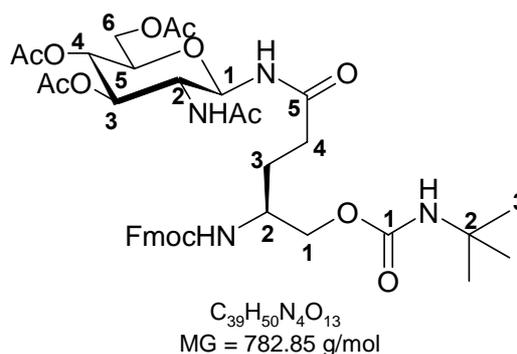
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -34.2^\circ$ (c = 1.4; CHCl₃)

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.34

FAB-MS: $m/z = 784.1$ [M+H]⁺; 806.1 [M+Na]⁺; 822.2 [M+K]⁺



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*⁶): δ = 8.45 (*d*, 1H, ³J_{NH(N5),H-1 GlcNAc} = 9.2 Hz, NH (N5)); 7.93-7.86 (*m*, 3H, Fmoc H_A, H_A', NHAc GlcNAc); 7.72-7.66 (*m*, 2H, Fmoc H_D, H_D'); 7.44-7.38 (*m*, 2H, Fmoc H_B, H_B'), 7.36-7.29 (*m*, 2H, Fmoc H_C, H_C'), 7.20 (*d*, 1H, ³J_{NH,H-1} = 8.1 Hz, NH); 6.79 (*s*, 1H, NH carb.); 5.16 (*dd*, 1H, ³J_{H-1 GlcNAc,H-2 GlcNAc} = 9.5 Hz, ³J_{H-1 GlcNAc,NH(N5)} = 9.5 Hz, H-1 GlcNAc); 5.10 (*dd*, 1H, ³J_{H-3 GlcNAc,H-2 GlcNAc} = 9.8 Hz, ³J_{H-3 GlcNAc,H-4 GlcNAc} = 9.8 Hz, H-3 GlcNAc); 4.81 (*dd*, 1H, ³J_{H-4 GlcNAc,H-3 GlcNAc} = 9.8 Hz, ³J_{H-4 GlcNAc,H-5 GlcNAc} = 9.8 Hz, H-4 GlcNAc); 4.34-4.19 (*m*, 3H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂); 4.17 (*dd*, ³J_{H-6a GlcNAc,H-5 GlcNAc} = 4.3 Hz, ²J_{H-6a GlcNAc,H-6b GlcNAc} = 12.7 Hz, H-6a GlcNAc); 3.95 (*dd*, ³J_{H-6b GlcNAc,H-5 GlcNAc} = 3.7 Hz, ³J_{H-6b GlcNAc,H-6a GlcNAc} = 12.1 Hz, H-6b GlcNAc); 3.90-3.78 (*m*, 4H, H-1, H-2 GlcNAc, H-5 GlcNAc); 3.59 (*br*, 1H, H-2); 2.17-2.03 (*m*, 2H, H-4); 1.99 (*s*, 3H, OAc); 1.96 (*s*, 3H, OAc); 1.90 (*s*, 3H, OAc); 1.74 (*s*, 3H, HNAc); 1.72-1.63 (*m*, 1H, H-3); 1.57-1.46 (*m*, 1H, H-3'); 1.19 (*s*, 9H, H-3 carb.) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 177.75$ (*s*, C-5); 172.45 (*s*, C-1 carb.); 171.03 (*s*, Carbonyl-HNac); 170.94 (*s*, Carbonyl-OAc); 169.79 (*s*, Carbonyl-OAc); 169.58 (*s*, Carbonyl-OAc); 155.59 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 143.75 (*s*, C_a); 141.30 (*s*, C_d); 128.37 (*s*, C_B); 127.77 (*s*, C_C); 125.82 (*d*, C_D); 120.84 (*d*, C_A); 78.78 (*d*, C-1 GlcNAc); 74.16 (*d*, C-3 GlcNAc); 72.97 (*d*, C-5 GlcNAc); 69.21 (*d*, C-4 GlcNAc); 66.07 (*t*, Fmoc-CH₂); 65.36 (*t*, C-1); 62.58 (*t*, C-6 GlcNAc); 52.89 (*d*, C-2 GlcNAc); 50.79 (*d*, C-2); 47.51 (*d*, Fmoc-CH); 32.74 (*t*, C-4); 29.47 (*q*, C-2 carb.); 27.89 (*t*, C-3); 23.40 (*q*, HNac); 21.45 (*q*, OAc); 21.31 (*q*, OAc); 21.13 (*q*, OAc) ppm.

7.4.4.10 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-N5-[3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[cyclohexyl-aminocarbonyl]-L-glutaminol 114

13 mg (41 μmol) TBTU wurden in 300 μL DMF gelöst und mit 6.8 μL (5.3 mg; 41 μmol) DIPEA versetzt. Zu dieser Lösung wurden anschließend 15 mg (31 μmol) 110 zugegeben. Diese Lösung wurde zu einer $-10\text{ }^\circ\text{C}$ kalten Lösung aus 8.0 mg (35 μmol) 88 in 500 μL DMF zugetropft und für drei Stunden bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Darauffolgend wurde zu dieser Reaktionslösung 5 mL eines Gemisches aus Pyridin/Ac₂O (3:2) zugegeben und für weitere 15 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt aus EtOH umkristallisiert und abschließend mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 13 mg (16 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 52%.

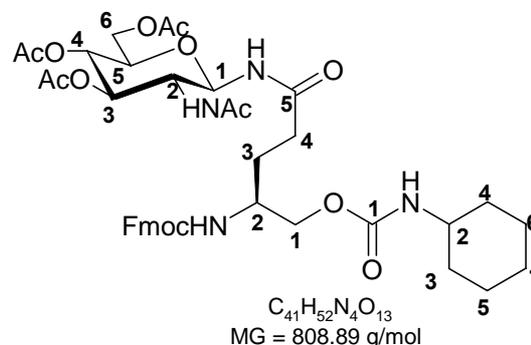
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -12.3^\circ$ ($c = 0.3$; DMSO)

R_F-Wert (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.15

MALDI-TOF-MS: $m/z = 810.1$ [M+H]⁺, 832.1 [M+Na]⁺



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 8.46$ (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH (N5),H-1 GlcNAc}} = 9.3$ Hz, **NH (N5)**); 7.94-7.84 (*m*, 3H, **NHAc GlcNAc**, **Fmoc H_A**, **H_{A'}**); 7.72-7.65 (*m*, 2H, **Fmoc H_D**, **H_{D'}**); 7.45-7.38 (*m*, 2H, **Fmoc H_B**, **H_{B'}**); 7.37-7.28 (*m*, 2H, **Fmoc H_C**, **H_{C'}**); 7.22 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH carb,H-2 carb}} = 7.9$ Hz, **NH carb.**); 6.99 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH,H-2}} = 8.6$ Hz, **NH**); 5.15 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc,H-2 GlcNAc}} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc,H-4 GlcNAc}} = 9.7$ Hz, **H-3 GlcNAc**); 5.99 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc,NH (N5)}} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc,H-2 GlcNAc}} = 9.7$ Hz, **H-1 GlcNAc**); 4.80 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc,H-3 GlcNAc}} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc,H-5 GlcNAc}} = 9.7$ Hz, **H-4 GlcNAc**); 4.32-4.13 (*m*, 4H, **Fmoc-CH₂**, **Fmoc-CH**, **H-6a GlcNAc**); 3.95 (*dd*, $^3J_{\text{H-6b GlcNAc,H-5 GlcNAc}} = 2.2$ Hz, $^2J_{\text{H-6b GlcNAc,H-6a GlcNAc}} = 10.1$ Hz, **H-6b GlcNAc**); 3.90-3.77 (*m*, 4H, **H-1**, **H-2 GlcNAc**, **H-5 GlcNAc**); 3.66-3.52 (*m*, 1H, **H-2 carb.**); 3.26-3.17 (*m*, 1H, **H-2**); 2.20-2.05 (*m*, 2H, **H-4**); 1.98 (*s*, 3H, **OAc**); 1.96 (*s*, 3H, **OAc**); 1.90 (*s*, 3H, **OAc**); 1.74 (*s*, 3H, **HNAc**); 1.76-1.59 (*m*, 5H, **H-3**, **H-3 carb.**, **H-4 carb.**); 1.57-1.47 (*m*, 2H, **H-3'**, **H-5 carb.**); 1.25-0.95 (*m*, 5H, **H-5'** carb., **H-6 carb.**, **H-7 carb.**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 172.32$ (*s*, **C-5**); 170.62 (*s*, **C-1 carb.**); 169.96 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 169.45 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.45 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.41 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.25 (*s*, **Fmoc-Carbonyl**); 143.79 (*s*, **C_a**); 140.69 (*s*, **C_d**); 127.76 (*s*, **C_B**); 127.02 (*s*, **C_C**); 125.14 (*d*, **C_D**); 120.06 (*d*, **C_A**); 77.99 (*d*, **C-1 GlcNAc**); 73.33 (*d*, **C-3 GlcNAc**); 72.24 (*d*, **C-5 GlcNAc**); 68.49 (*d*, **C-4 GlcNAc**); 65.35 (*t*, **C-1**); 64.91 (*t*, **Fmoc-CH₂**); 61.90 (*t*, **C-6 GlcNAc**); 52.14 (*d*, **C-2 GlcNAc**); 50.00 (*d*, **C-2**); 50.00 (*d*, **C-2 carb.**); 46.76 (*d*, **Fmoc-CH**); 32.60 (*t*, **C-4**); 28.98 (*t*, **C-3**); 24.97 (*t*, **C-5 carb.**); 24.75 (*t*, **C-7 carb.**); 22.53 (*q*, **HNAc**); 20.46 (*q*, **OAc**); 20.35 (*q*, **OAc**); 20.32 (*q*, **OAc**) ppm.

Aufgrund der C2-Symmetrie des Cyclohexylringes sind die ^{13}C -Signale der Kohlenstoffatome C-4 carb. und C-6 carb. nicht von denen der Kohlenstoffe C-3 carb. und C-5 carb. zu unterscheiden.

7.4.4.11 Darstellung von **N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-N5-[3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[admantyl-aminocarbonyl]-L-glutaminol 115**

481 mg (150 μmol) TBTU wurden in 500 μL DMF gelöst und mit 25 μL (19 mg; 150 μmol) DIPEA versetzt. Zu dieser Lösung wurden anschließend 53.0 mg (100 μmol) **111** zugegeben. Diese Lösung wurde zu einer -10 °C kalten Lösung aus 26.4 mg (120 μmol) **88** in 2 mL DMF zugetropft und für drei Stunden bei -10 °C gerührt. Darauf folgend wurde zu dieser Reaktionslösung 5 mL eines Gemisches aus Pyridin/ Ac_2O (3:2) zugegeben und für

weitere 15 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt aus EtOH umkristallisiert und abschließend mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 12 mg (14 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 14%.

Charakterisierung

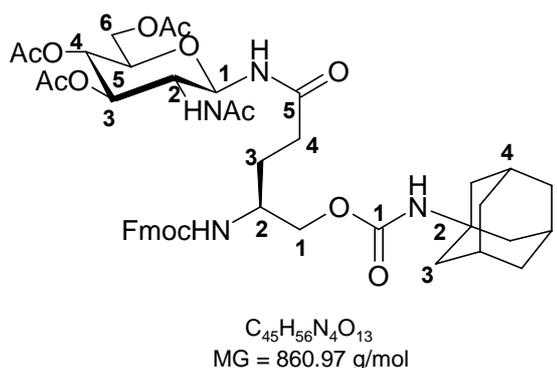
Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -34.2^\circ$ ($c = 1.4$; CHCl₃)

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.39

FAB-MS: $m/z = 861.9$ [M+H]⁺; 883.8

[M+Na]⁺; 899.9 [M+K]⁺



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*⁶): $\delta = 8.45$ (*d*, 1H, ³J_{NH(N5),H-1 GlcNAc} = 9.2 Hz, NH (**N5**)); 7.93-7.86 (*m*, 3H, Fmoc **H_A**, **H_{A'}**, NHAc **GlcNAc**); 7.72-7.66 (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_{D'}**); 7.44-7.38 (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_{B'}**), 7.36-7.29 (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_{C'}**), 7.20 (*d*, 1H, ³J_{NH,H-2} = 8.1 Hz, NH); 6.79 (*s*, 1H, NH **carb.**); 5.16 (*dd*, 1H, ³J_{H-1 GlcNAc,NH(N5)} = 9.5 Hz, ³J_{H-1 GlcNAc,H-2 GlcNAc} = 9.5 Hz, **H-1 GlcNAc**); 5.10 (*dd*, 1H, ³J_{H-3 GlcNAc,H-2 GlcNAc} = 9.8 Hz, ³J_{H-3 GlcNAc,H-4 GlcNAc} = 9.8 Hz, **H-3 GlcNAc**); 4.81 (*dd*, 1H, ³J_{H-4 GlcNAc,H-3 GlcNAc} = 9.8 Hz, ³J_{H-4 GlcNAc,H-5 GlcNAc} = 9.8 Hz, **H-4 GlcNAc**); 4.34-4.19 (*m*, 3H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂); 4.17 (*dd*, ³J_{H-6a GlcNAc,H-5 GlcNAc} = 4.3 Hz, ²J_{H-6a GlcNAc,H-6b GlcNAc} = 12.7 Hz, **H-6a GlcNAc**); 3.95 (*dd*, ³J_{H-6b GlcNAc,H-5 GlcNAc} = 3.7 Hz, ³J_{H-6b GlcNAc,H-6a GlcNAc} = 12.1 Hz, **H-6b GlcNAc**); 3.90-3.78 (*m*, 4H, **H-1**, **H-2 GlcNAc**, **H-5 GlcNAc**); 3.59 (*br*, 1H, **H-2**); 2.29-2.13 (*m*, 2H, **H-4**); 2.02 (*s*, 3H, OAc); 2.00 (*s*, 3H, OAc); 1.98 (*br*, 3H, **H-4 carb.**); 1.95 (*s*, 3H, OAc); 1.94 (*s*, 3H, OAc); 1.90 (*s*, 3H, OAc); 1.83 (*br*, 6H, **H-3 carb.**); 1.75 (*s*, 3H, HNac); 1.71 (*s*, 3H, HNac); 1.72-1.61 (*m*, 1H, **H-3**); 1.57-1.44 (*m*, 7H, **H-3'**, **H-5 carb.**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*⁶): $\delta = 176.88$ (*s*, **C-5**); 172.01 (*s*, **C-1**); 172.44 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 171.03 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 170.93 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.89 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.56 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 143.75 (*s*, **C_a**); 141.30 (*s*, **C_d**); 128.37 (*s*, **C_B**); 127.87 (*s*, **C_C**); 125.87 (*d*, **C_D**); 120.84 (*d*, **C_A**); 78.78 (*d*, **C-1 GlcNAc**); 74.16 (*d*, **C-3 GlcNAc**); 72.97 (*d*, **C-5 GlcNAc**); 69.21 (*d*, **C-4 GlcNAc**); 66.07 (*t*, Fmoc-CH₂); 65.36 (*t*, **C-1**); 62.58 (*t*, **C-6**

GlcNAc); 52.89 (*d*, **C-2 GlcNAc**); 50.85 (*q*, **C-2 carb.**); 50.76 (*d*, **C-2**); 47.51 (*d*, Fmoc-CH); 41.73 (*t*, **C-4 carb.**); 36.22 (*t*, **C-3 carb.**); 32.74 (*t*, **C-4**); 29.15 (*d*, **C-4 carb.**); 27.89 (*t*, **C-3**); 23.40 (*q*, **HNAc**); 21.45 (*q*, **OAc**); 21.31 (*q*, **OAc**); 21.13 (*q*, **OAc**) ppm.

7.4.4.12 Darstellung von **N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-N5-[3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy-β-D-glucopyranosyl]-O1-[ethoxycarbonylmethylaminocarbonyl]-L-glutaminol 116**

112 mg (380 μmol) TBTU wurden in 500 μL DMF gelöst und mit 57 μL (43 mg; 380 μmol) DIPEA versetzt. Zu dieser Lösung wurden anschließend 120 mg (260 μmol) **112** zugegeben. Diese Lösung wurde zu einer – 10 °C kalten Lösung aus 63.5 mg (290 mmol) **88** in 2 mL DMF zugetropft und für drei Stunden bei – 10 °C gerührt. Darauffolgend wurde zu dieser Reaktionslösung 5 mL eines Gemisches aus Pyridin/Ac₂O (3:2) zugegeben und für weitere 15 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt aus EtOH umkristallisiert und abschließend mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 35 mg (45 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 17%.

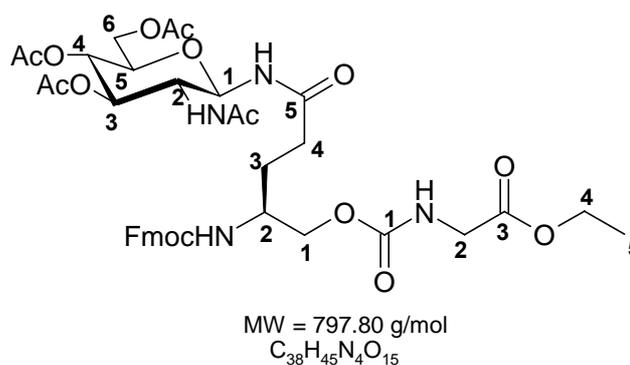
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -35.4^\circ$ (*c* = 1; DMSO)

R_F-Wert (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.29

FAB-MS: *m/z* = 798.5 [M+H]⁺; 820.1 [M+Na]⁺; 836.5 [M+K]⁺



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*⁶): δ = 8.47 (*d*, 1H, ³J_{NH(N5),H-1 GlcNAc} = 9.5 Hz, NH (**N5**)); 7.96-7.85 (*m*, 3H, NHAc **GlcNAc**, Fmoc **H_A**, **H_{A'}**); 7.74-7.66 (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_{D'}**); 7.52 (*t*, 1H, ³J_{NH carb,H-2 carb} = 6.3 Hz, NH **carb.**); 7.45-7.38 (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_{B'}**), 7.37-7.31 (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_{C'}**), 7.27 (*d*, 1H, ³J_{NH,H-2} = 8.5 Hz, NH); 5.17 (*dd*, 1H, ³J_{H-3 GlcNAc,H-2 GlcNAc} = 9.9 Hz, ³J_{H-3 GlcNAc,H-4 GlcNAc} = 9.9 Hz, **H-3 GlcNAc**); 5.10 (*dd*, 1H, ³J_{H-1 GlcNAc,NH(N5)} = 9.5 Hz,

$^3J_{\text{H-1 GlcNAc,H-2 GlcNAc}} = 9.5$ Hz, **H-1 GlcNAc**); 4.81 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc,H-3 GlcNAc}} = 9.5$ Hz, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc,H-5 GlcNAc}} = 9.5$ Hz, **H-4 GlcNAc**); 4.29 (*d*, 2H, $^3J_{\text{Fmoc-CH}_2,\text{Fmoc-CH}} = 6.7$ Hz, Fmoc-CH₂); 4.23 (*t*, 2H, $^3J_{\text{Fmoc-CH},\text{Fmoc-CH}_2} = 6.8$ Hz, Fmoc-CH); 4.17 (*dd*, $^3J_{\text{H-6a GlcNAc,H-5 GlcNAc}} = 4.3$ Hz, $^2J_{\text{H-6a GlcNAc,H-6b GlcNAc}} = 12.7$ Hz, **H-6a GlcNAc**); 4.08 (*q*, 2H, $^3J_{\text{H-4 carb,H-3 carb}} = 7.4$ Hz, **H-4 carb.**); 3.95 (*dd*, $^3J_{\text{H-6b GlcNAc,H-5 GlcNAc}} = 2.1$ Hz, $^2J_{\text{H-6b GlcNAc,H-6a GlcNAc}} = 12.0$ Hz, **H-6b GlcNAc**); 3.93-3.78 (*m*, 4H, **H-1, H-2 GlcNAc, H-5 GlcNAc**); 3.71 (*d*, $^3J_{\text{H-2 carb,NH carb}} = 6.3$ Hz, **H-2 carb.**); 3.66-3.55 (*m*, 1H, **H-2**); 2.19-2.06 (*m*, 2H, **H-4**); 1.99 (*s*, 3H, OAc); 1.97 (*s*, 3H, OAc); 1.91 (*s*, 3H, OAc); 1.74 (*s*, 3H, HNAc); 1.73-1.65 (*m*, 1H, **H-3**); 1.59-1.48 (*m*, 1H, **H-3'**); 1.18 (*t*, 3H, $^3J_{\text{H-5 carb,H-4 carb}} = 7.1$ Hz, **H-5 carb.**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-*d*⁶): $\delta = 172.45$ (*s, s*, **C-5**); 171.03 (*s*, **C-1 carb.**); 170.94 (*s*, **C-3 carb.**); 169.75 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 169.79 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.75 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.58 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 168.79 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 167.77 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 143.79 (*s*, **C_a**); 141.21 (*s*, **C_d**); 128.46 (*s*, **C_B**); 127.73 (*s*, **C_C**); 126.04 (*d*, **C_D**); 120.87 (*d*, **C_A**); 78.76 (*d*, **C-1 GlcNAc**); 74.14 (*d*, **C-3 GlcNAc**); 73.03 (*d*, **C-5 GlcNAc**); 69.32 (*d*, **C-4 GlcNAc**); 66.41 (*t*, **C-1**); 66.22 (*t*, Fmoc-CH₂); 62.66 (*t*, **C-6 GlcNAc**); 61.24 (*t*, **C-4 carb.**); 52.96 (*d*, **C-2 GlcNAc**); 50.76 (*d*, **C-2**); 47.53 (*d*, Fmoc-CH); 43.13 (*t*, **C-2 carb.**); 32.65 (*t*, **C-4**); 27.72 (*t*, **C-3**); 23.40 (*q*, HNAc); 21.45 (*q*, OAc); 21.31 (*q*, OAc); 21.13 (*q*, OAc); 15.01 (*q*, **C-5 carb.**) ppm.

7.4.4.13 **Darstellung von N5-[3,4,6-Tri-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[tert-butyl-aminocarbonyl]-L-glutaminol 99**

19 mg (24 μmol) **113** wurden in 2 mL Pip/DMF (1:4) gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 4:1) gereinigt. Der Rückstand wurde in Wasser/MeCN aufgenommen und gefriergetrocknet. Es konnten 10 mg (18 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 75%.

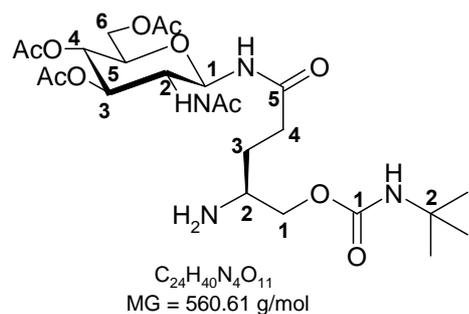
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -31.7^\circ$ ($c = 1.2$; CHCl_3)

R_f -Wert ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4:1) = 0.26

FAB-MS: $m/z = 561.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; 584.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 599.8 $[\text{M}+\text{K}]^+$



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 8.57$ (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH (N5), H-1 GlcNAc}} = 9.3$ Hz, **NH (N5)**); 7.95 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NHAc GlcNAc,H-2 GlcNAc}} = 9.3$ Hz, **NHAc GlcNAc**); 7.92 (*br*, 2H, NH_2); 6.81 (*s*, 1H, **NH carb.**); 5.16 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc,NH (N5)}} = 9.5$ Hz, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc,H-2 GlcNAc}} = 9.5$ Hz, **H-1 GlcNAc**); 5.12 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc,H-2 GlcNAc}} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc,H-4 GlcNAc}} = 9.9$ Hz, **H-3 GlcNAc**); 4.82 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc,H-3 GlcNAc}} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc,H-5 GlcNAc}} = 9.7$ Hz, **H-4 GlcNAc**); 4.18 (*dd*, $^3J_{\text{H-6a GlcNAc,H-5 GlcNAc}} = 4.4$ Hz, $^2J_{\text{H-6a GlcNAc,H-6b GlcNAc}} = 12.5$ Hz, **H-6a GlcNAc**); 4.05 (*dd*, $^3J_{\text{H-1,H-2}} = 3.9$ Hz, $^2J_{\text{H-1,H-1'}}$ = 11.4 Hz, **H-1**); 3.99-3.87 (*m*, 3H, **H-1'**, **H-2 GlcNAc**, **H-4 GlcNAc**); 3.84 (*ddd*, $^3J_{\text{H-5 GlcNAc,H-4 GlcNAc}} = 6.2$ Hz, $^3J_{\text{H-5 GlcNAc,H-6a GlcNAc}} = 4.0$ Hz, $^3J_{\text{H-5,H-6b GlcNAc}} = 4.1$ Hz, **H-5 GlcNAc**); 3.29 (*br*, 1H, **H-2**); 2.32-2.02 (*m*, 2H, **H-4**); 2.01 (*s*, 3H, **OAc**); 1.98 (*s*, 3H, **OAc**); 1.92 (*s*, 3H, **OAc**); 1.82-1.71 (*m*, 2H, **H-3**); 1.76 (*s*, 3H, **HNAc**); 1.24 (*s*, 9H, **H-3 carb.**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO): $\delta = 172.25$ (*s*, **C-5**); 169.72 (*s*, **C-1 carb.**); 170.35 (*s*, **Carbonyl-HNAc**); 169.81 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.79 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.58 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 78.24 (*d*, **C-1 GlcNAc**); 73.68 (*d*, **C-3 GlcNAc**); 72.49 (*d*, **C-5 GlcNAc**); 69.01 (*d*, **C-4 GlcNAc**); 62.46 (*t*, **C-1**); 62.25 (*t*, **C-6 GlcNAc**); 52.56 (*d*, **C-2 GlcNAc**); 50.12 (*d*, **C-2**); 49.81 (*s*, **C-2 carb.**); 31.49 (*t*, **C-4**); 29.48 (*q*, **C-3 carb.**); 23.26 (*t*, **C-3**); 23.21 (*q*, **HNAc**); 21.45 (*q*, **OAc**); 21.31 (*q*, **OAc**); 21.13 (*q*, **OAc**) ppm.

7.4.4.14 Darstellung von **N5-[3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[cyclohexylaminocarbonyl]-L-glutaminol 100**

19 mg (24 μmol) **114** wurden in 2 mL Pip/DMF (1:4) gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4:1) gereinigt. Der Rückstand wurde in Wasser/MeCN aufgenommen

und gefriergetrocknet. Es konnten 10 mg (18 μ mol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 75%.

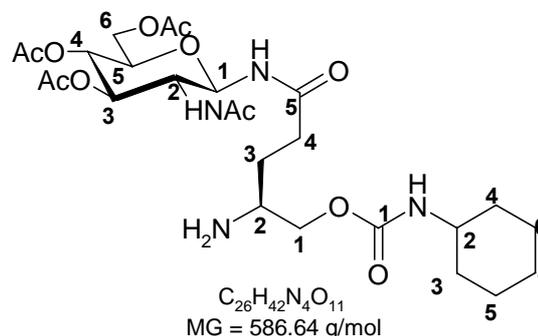
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -15.8^\circ$ ($c = 0.4$; CHCl_3)

R_f -Wert ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4:1) = 0.26

MALDI-TOF-MS: $m/z = 588.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 609.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 8.56$ (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH}(\text{N5}),\text{H-1 GlcNAc}} = 9.3$ Hz, **NH (N5)**); 7.94 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NHAc GlcNAc,H-2 GlcNAc}} = 9.2$ Hz, **NHAc GlcNAc**); 7.89 (*br*, 2H, **NH₂**); 6.81 (*br*, 1H, **NH carb.**); 5.16 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc,NH (N5)}} = 9.4$ Hz, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc,H-2 GlcNAc}} = 9.4$ Hz, **H-1 GlcNAc**); 5.11 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc,H-2 GlcNAc}} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc,H-4 GlcNAc}} = 9.9$ Hz, **H-3 GlcNAc**); 4.81 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc,H-3 GlcNAc}} = 9.8$ Hz, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc,H-5 GlcNAc}} = 9.8$ Hz, **H-4 GlcNAc**); 4.16 (*dd*, $^3J_{\text{H-6a GlcNAc,H-5 GlcNAc}} = 4.4$ Hz, $^2J_{\text{H-6a GlcNAc,H-6b GlcNAc}} = 12.5$ Hz, **H-6^a GlcNAc**); 4.07 (*dd*, $^3J_{\text{H-1,H-2}} = 3.7$ Hz, $^2J_{\text{H-1,H-1'}}$ = 10.8 Hz, **H-1**); 3.98-3.86 (*m*, 3H, **H-1'**, **H-2 GlcNAc**, **H-3 GlcNAc**); 3.86 (*ddd*, $^3J_{\text{H-5 GlcNAc,H-4 GlcNAc}} = 6.2$ Hz, $^3J_{\text{H-5 GlcNAc,H-6a GlcNAc}} = 4.0$ Hz, $^3J_{\text{H-5 GlcNAc,H-6b GlcNAc}} = 4.1$ Hz, **H-5 GlcNAc**); 3.23 (*br*, 1H, **H-2**); 2.21-2.02 (*m*, 2H, **H-4**); 1.97 (*s*, 3H, **OAc**); 1.96 (*s*, 3H, **OAc**); 1.92 (*s*, 3H, **OAc**); 1.71 (*s*, 3H, **HNAc**); 1.76-1.55 (*m*, 5H, **H-3 carb.**, **H-4 carb.**, **H-3 carb.**); 1.58-1.49 (*m*, 2H, **H-3'**, **H-5 carb.**); 1.24-0.98 (*m*, 5H, **H-5' carb.**, **H-6 carb.**, **H-7 carb.**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 172.25$ (*s*, **C-5**); 169.72 (*s*, **C-1 carb.**); 170.35 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 169.81 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.79 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.58 (*s*, **Fmoc-Carbonyl**); 78.24 (*d*, **C-1 GlcNAc**); 73.68 (*d*, **C-3 GlcNAc**); 72.49 (*d*, **C-5 GlcNAc**); 69.01 (*d*, **C-4 GlcNAc**); 62.46 (*t*, **C-1**); 62.25 (*t*, **C-6 GlcNAc**); 52.56 (*d*, **C-2 GlcNAc**); 50.12 (*d*, **C-2**); 43.08 (*t*, **C-2 carb.**); 32.60 (*t*, **C-4**); 29.01 (*t*, **C-3**); 26.07 (*t*, **C-3**); 25.18 (*t*, **C-5**); 24.60 (*t*, **C-7**); 22.53 (*q*, **HNAc**); 20.47 (*q*, **OAc**); 20.41 (*q*, **OAc**); 20.31 (*q*, **OAc**) ppm.

Aufgrund der C2-Symmetrie des Cyclohexylringes sind die ^{13}C -Signale der Kohlenstoffatome C-4 carb. und C-6 carb. nicht von denen der Kohlenstoffe C-3 carb. und C-5 carb. Zu unterscheiden.

7.4.4.15 Darstellung von N5-[3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[admantyl-aminocarbonyl]-L-glutaminol 101

19 mg (24 μ mol) 115 wurden in 2 mL Pip/DMF (1:4) gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 4:1) gereinigt. Der Rückstand wurde in Wasser/MeCN aufgenommen und gefriergetrocknet. Es konnten 10 mg (18 μ mol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 75%.

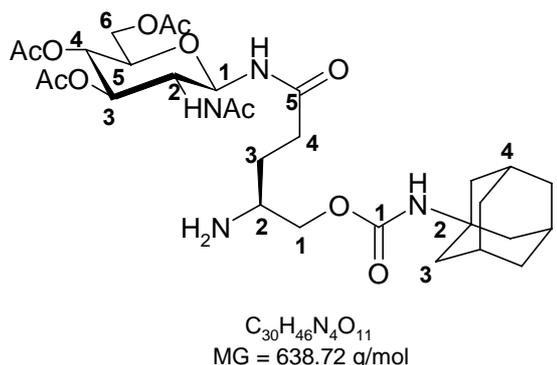
Charakterisierung

Farbloses Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -35.7^\circ$ ($c = 1.1$; DMSO)

R_f -Wert (CHCl₃/MeOH 4:1) = 0.26

FAB-MS: $m/z = 639.8$ $[M+H]^+$; 662.1 $[M+Na]^+$; 678.2 $[M+K]^+$



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*⁶): $\delta = 8.56$ (*d*, 1H, ³ $J_{NH(N5),H-1\text{ GlcNAc}} = 9.3$ Hz, NH (N5)); 7.94 (*d*, 1H, ³ $J_{NHAc\text{ GlcNAc},H-2\text{ GlcNAc}} = 9.2$ Hz, NHAc GlcNAc); 7.89 (*br*, 2H, NH₂); 6.81 (*s*, 1H, NH carb.); 5.16 (*dd*, 1H, ³ $J_{H-1\text{ GlcNAc},NH(N5)} = 9.4$ Hz, ³ $J_{H-1\text{ GlcNAc},H-2\text{ GlcNAc}} = 9.4$ Hz, H-1 GlcNAc); 5.11 (*dd*, 1H, ³ $J_{H-3\text{ GlcNAc},H-2\text{ GlcNAc}} = 9.9$ Hz, ³ $J_{H-3\text{ GlcNAc},H-4\text{ GlcNAc}} = 9.9$ Hz, H-3 GlcNAc); 4.81 (*dd*, 1H, ³ $J_{H-4\text{ GlcNAc},H-3\text{ GlcNAc}} = 9.8$ Hz, ³ $J_{H-4\text{ GlcNAc},H-5\text{ GlcNAc}} = 9.8$ Hz, H-4 GlcNAc); 4.16 (*dd*, ³ $J_{H-6a\text{ GlcNAc},H-5\text{ GlcNAc}} = 4.4$ Hz, ² $J_{H-6a\text{ GlcNAc},H-6b\text{ GlcNAc}} = 12.5$ Hz, H-6a GlcNAc); 4.07 (*dd*, ³ $J_{H-1,H-2} = 3.7$ Hz, ² $J_{H-1,H-1'} = 10.8$ Hz, H-1); 3.98-3.86 (*m*, 3H, H-1', H-2 GlcNAc, H-3 GlcNAc); 3.86 (*ddd*, ³ $J_{H-5\text{ GlcNAc},H-4\text{ GlcNAc}} = 6.2$ Hz, ³ $J_{H-5\text{ GlcNAc},H-6a\text{ GlcNAc}} = 4.0$ Hz, ³ $J_{H-5\text{ GlcNAc},H-6b\text{ GlcNAc}} = 4.1$ Hz, H-5 GlcNAc); 3.23 (*br*, 1H, H-2); 2.21-2.02 (*m*, 2H, H-4); 2.00 (*s*, 3H, OAc); 2.00 (*s*, 3H, OAc); 1.98 (*s*, 3H, H-4 carb.); 1.95 (*s*, 3H, OAc); 1.94 (*s*, 3H, OAc); 1.90 (*s*, 3H, OAc); 1.83 (*s*, 6H, H-3 carb.); 1.75 (*s*, 3H, HNAc); 1.73 (*s*, 3H, HNAc); 1.71-1.60 (*m*, 1H, H-3); 1.54-1.44 (*m*, 7H, H-3', H-5 carb.) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*⁶): $\delta = 172.25$ (*s*, C-5); 169.72 (*s*, C-1 carb.); 170.35 (*s*, Carbonyl-HNAc); 169.81 (*s*, Carbonyl-OAc); 169.79 (*s*, Carbonyl-OAc); 169.58 (*s*, Carbonyl-OAc); 78.24 (*d*, C-1 GlcNAc); 73.68 (*d*, C-3 GlcNAc); 72.49 (*d*, C-5 GlcNAc); 69.01 (*d*, C-4 GlcNAc); 62.46 (*t*, C-1); 62.25 (*t*, C-6 GlcNAc); 52.56 (*d*, C-2 GlcNAc); 50.12

(*d*, C-2); 43.08 (*s*, C-2 carb.); 41.66 (*t*, C-4 carb.); 36.23 (*t*, C-3 carb.); 32.75 (*t*, C-4); 29.11 (*d*, C-5 carb.); 27.88 (*t*, C-3); 23.41 (*q*, HNAc); 21.44 (*q*, OAc); 21.33 (*q*, OAc); 21.15 (*q*, OAc) ppm.

7.4.4.16 Darstellung von N5-[3,4,6-Tri-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[ethoxycarbonylmethylaminocarbonyl]-L-glutaminol **102**

25 mg (32 μ mol) **116** wurden in 2 mL Pip/DMF (1:4) gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 4:1) gereinigt. Der Rückstand wurde in Wasser/MeCN aufgenommen und gefriergetrocknet. Es konnten 10 mg (17 μ mol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 53%.

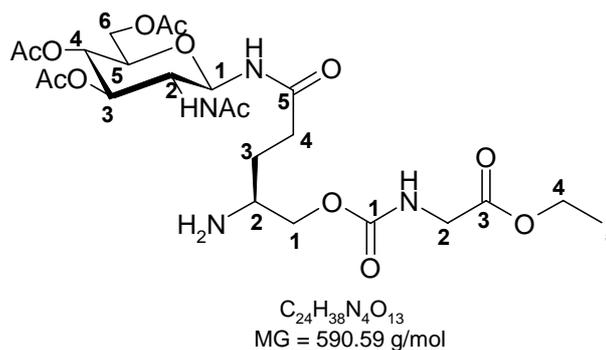
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -29.1^\circ$ ($c = 0.7$; CHCl₃)

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH 4:1) = 0.26

FAB-MS: $m/z = 591.8$ [M+H]⁺; 613.5 [M+Na]⁺; 629.7 [M+K]⁺



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*⁶): $\delta = 8.42$ (*d*, 1H, ³J_{NH(N5),H-1 GlcNAc} = 9.5 Hz, NH (N5)); 7.80 (*br*, 2H, NH₂); 7.54 (*t*, 1H, ³J_{NH carb,H-2 carb} = 6.3 Hz, NH carb.); 5.19 (*dd*, 1H, ³J_{H-3 GlcNAc,H-2 GlcNAc} = 9.9 Hz, ³J_{H-3 GlcNAc,H-4 GlcNAc} = 9.9 Hz, H-3 GlcNAc); 5.12 (*dd*, 1H, ³J_{H-1 GlcNAc,NH(N5)} = 9.5 Hz, ³J_{H-1 GlcNAc,H-2 GlcNAc} = 9.5 Hz, H-1 GlcNAc); 4.79 (*dd*, 1H, ³J_{H-4 GlcNAc,H-3 GlcNAc} = 9.5 Hz, ³J_{H-4 GlcNAc,H-3 GlcNAc} = 9.5 Hz, H-4 GlcNAc); 4.15 (*dd*, ³J_{H-6a GlcNAc,H-5 GlcNAc} = 4.3 Hz, ²J_{H-6a GlcNAc,H-6b GlcNAc} = 12.7 Hz, H-6a GlcNAc); 4.10 (*q*, 2H, ³J_{H-4 carb,H-5 carb} = 7.3 Hz, H-4 carb.); 3.96 (*dd*, ³J_{H-6b GlcNAc,H-5 GlcNAc} = 2.1 Hz, ²J_{H-6b GlcNAc,H-6a GlcNAc} = 12.0 Hz, H-6b GlcNAc); 3.92-3.79 (*m*, 4H, H-1, H-2 GlcNAc, H-5 GlcNAc); 3.70 (*d*, ³J_{H-2 carb,NH carb} = 6.3 Hz, H-2 carb.); 3.65-3.54 (*m*, 1H, H-2); 2.18-2.05 (*m*, 2H, H-4); 1.98 (*s*, 3H, OAc); 1.95 (*s*, 3H, OAc); 1.90 (*s*, 3H, OAc); 1.74 (*s*, 3H, HNAc); 1.72-1.65 (*m*, 1H, H-3); 1.58-1.48 (*m*, 1H, H-3'); 1.14 (*t*, 3H, ³J_{H-5 carb,H-4 carb} = 7.1 Hz, H-5 carb.) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d^6): δ = 172.25 (*s*, C-5); 170.35 (*s*, C-1 carb.); 169.81 (*s*, C3 carb.); 169.79 (*s*, Carbonyl-NHAc); 169.72 (*s*, Carbonyl-OAc); 169.58 (*s*, Carbonyl-OAc); 169.20 (*s*, Carbonyl-OAc); 78.24 (*d*, C-1 GlcNAc); 73.68 (*d*, C-3 GlcNAc); 72.49 (*d*, C-5 GlcNAc); 69.01 (*d*, C-4 GlcNAc); 62.46 (*t*, C-1); 62.25 (*t*, C-6 GlcNAc); 61.32 (*t*, C-4 carb.); 52.56 (*d*, C-2 GlcNAc); 50.12 (*d*, C-2); 43.08 (*t*, C-2 carb.); 32.60 (*t*, C-4); 29.01 (*t*, C-3); 23.45 (*q*, HNAc); 21.44 (*q*, OAc); 21.31 (*q*, OAc); 21.08 (*q*, OAc); 15.05 (*q*, C-5 carb.) ppm.

7.4.4.17 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[adamantyl-aminocarbonyl]-O5-(4-oxo-4H-benzo[1,2,3]-triazin-3-yl)-L-glutamol **117**

Abweichend von einer literaturbekannten Vorschrift²⁰¹ wurden zur Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-O1-[adamantyl-aminocarbonyl]-O5-(4-oxo-4H-benzo[1,2,3]-triazin-3-yl)-L-glutamol (**117**) 202 mg (379 μmol) **111** in 5 mL abs. THF gelöst und die Lösung auf -20 °C gekühlt. Anschließend wurden 78.4 mg (379 μmol) DCC zugegeben und für 30 Minuten bei -20 °C gerührt. Darauffolgend wurden 61.8 mg (379 μmol) Dhbt-OH zugegeben und die Lösung für weitere vier Stunden bei -20 °C gerührt. Der entstandene Feststoff wurde anschließend abfiltriert und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

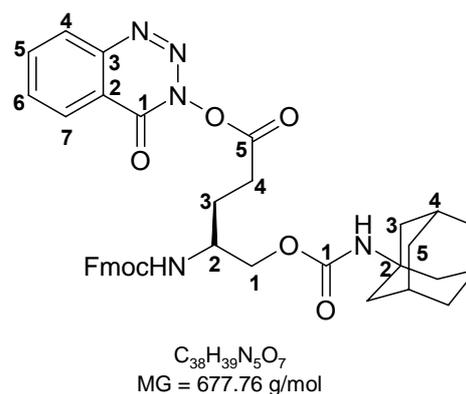
Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: PE/EE 1:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 117 mg (172 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 45%.

Charakterisierung

dunkelbrauner Sirup

R_f -Wert (PE/EE 1:1) = 0.38

FAB-MS: m/z = 701.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 716.9 $[\text{M}+\text{K}]^+$



^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d^6): δ = 8.31-8.26 (*m*, 1H, H-7 Dhbt.); 8.24-8.19 (*m*, 1H, H-4 Dhbt.); 8.12-8.04 (*m*, 1H, H-5 Dhbt.); 7.96-7.86 (*m*, 3H, H-6 Dhbt, Fmoc H_A, H_{A'}); 7.74-7.66 (*m*, 2H, Fmoc H_D, H_{D'}); 7.46-7.37 (*m*, 2H, Fmoc H_B, H_{B'}); 7.36-7.28 (*m*, 2H, Fmoc H_C, H_{C'}); 7.21 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH,H-1}}$ = 8.3 Hz, NH); 6.72 (*s*, 1H, NH carb.); 4.38-4.18 (*m*, 3H, H-1, Fmoc-CH); 3.28 (*d*, 2H, $^3J_{\text{Fmoc-CH,Fmoc-CH}_2}$ = 5.8 Hz, Fmoc-CH₂); 3.63 (*br*, 1H, H-2);

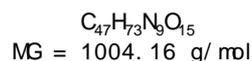
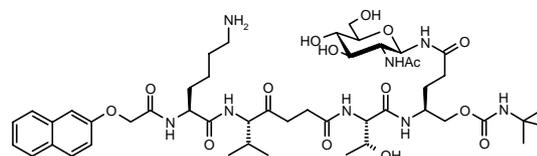
2.29-2.13 (*m*, 2H, **H-4**); 1.97 (*s*, 3H, **H-4 carb.**); 1.83 (*s*, 6H, **H-3 carb.**); 1.83-1.69 (*m*, 1H, **H-3**); 1.62-1.48 (*m*, 7H, **H-3'**, **H-5 carb.**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*⁶): δ = 176.23 (*s*, **C-1 Dhbt.**); 173.59 (*s*, **C-5**); 171.07 (*s*, **C-1 carb.**); 158.88 (*s*, **C-3 Dhbt.**); 155.55 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 152.00 (*s*, **C-2 Dhbt.**); 144.59 (*s*, **C_a**); 140.99 (*s*, **C_b**); 135.44 (*d*, **C-5 Dhbt.**); 132.71 (*d*, **C-6 Dhbt.**); 128.34 (*d*, **C-4 Dhbt.**); 127.95 (*d*, **C_B**); 127.36 (*d*, **C_C**); 125.24 (*d*, **C_D**); 124.79 (*d*, **C-7 Dhbt.**); 120.60 (*d*, **C_A**); 65.74 (*t*, **C-1**); 64.67 (*t*, Fmoc-CH₂); 49.62 (*d*, **C-2**); 47.22 (*d*, Fmoc-CH); 41.73 (*t*, **C-3 carb.**); 36.22 (*t*, **C-5 carb.**); 30.52 (*d*, **C-4**); 29.15 (*d*, **C-4 carb.**); 26.98 (*d*, **C-3**) ppm.

7.4.4.18 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthyloxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-4-oxo-heptanoyl]-L-threonyl]-N5-[2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[tert-butylaminocarbonyl]-L-glutaminol **91**

Nach AAV2 wurden 8.9 mg (12 μ mol) **77** mit 5.6 mg (10 μ mol) **99** umgesetzt. Im darauffolgenden Schritt wurde das Kupplungsprodukt nach AAV4 O-deacetyliert. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 1.7 mg (1.6 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 17% bezogen auf **99**.

Charakterisierung



Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 22.25 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 1005.1 [M+H]⁺; 1027.1 [M+Na]⁺

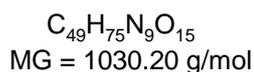
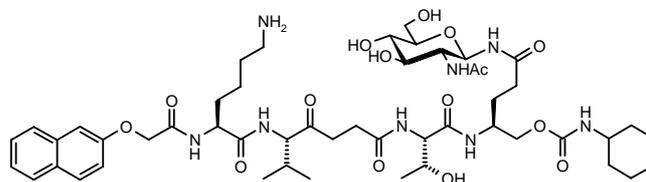
¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.242	7.196	7.787	7.839	7.396	7.479	7.769	4.565
Lysin	NH	α	β	β'	γ	δ	ϵ	z-NH
Threonin	8.389	4.282	1.682	1.617	1.087	1.419	2.983	7.321
Glutaminol	7.840	4.108	4.013		1.097			
	8.023	3.838	1.602	3.926	2.185			
	NH	α	β	γ	CH ₂	CH ₂		
Val- Ψ[COCH]- Gly Carbamat	7.787	4.278	2.180	0.706	0.705	2.789		
	NH	t-Bu						
GlcNAc	n. b.	1.179						
	NH	NH(Ac)	1	2	3	4	5	6a/6b
1	8.422	8.116/1.896	4.953	3.804	3.726	3.498	3.579	3.661/3.448

7.4.4.19 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-4-oxo-heptanoyl]-L-threonyl]-N5-[2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[cyclohexylaminocarbonyl]-L-glutaminol **92**

Nach AAV2 wurden 8.9 mg (12 μ mol) **77** mit 5.8 mg (10 μ mol) **100** umgesetzt. Im darauffolgenden Schritt wurde das Kupplungsprodukt nach AAV4 O-deacetyliert. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 2.6 mg (2.6 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 26% bezogen auf **100**.

Charakterisierung



Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 22.19 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 1031.2 [M+H]⁺; 1054.1 [M+Na]⁺; 1069.1 [M+K]⁺

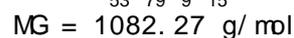
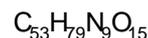
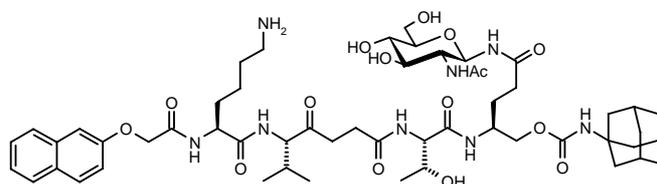
¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.135	7.205	7.689	7.779	7.356	7.455	7.706	n.b.
	NH	α	β	β'	γ	δ	ϵ	z-NH
Lysin	8.502	4.278	1.706	1.652	1.096	1.526	2.547	7.321
Threonin	8.057	4.218	4.013		0.745			
Glutaminol	8.023	3.838	1.602	3.926	2.185			
	NH	α	β	γ	γ'	CH ₂	CH ₂	
Val- Ψ [COCH ₂]- Gly Carbamat	8.059	4.278	2.180	0.705	0.705	2.789	2.485	
	NH	H1	H2/H6	H2/H5	H3			
GlcNAc	n.b.	3.209	1.658	1.405	1.056			
	NH	NH(Ac)	1	2	3	4	5	6a/6b
	8.422	8.098/1.885	4.969	3.795	3.698	3.528	3.528	3.698/3.398

7.4.4.20 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-4-oxo-heptanoyl]-L-threonyl]-N5-[2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[adamantylaminocarbonyl]-L-glutaminol **93**

Nach AAV2 wurden 8.6 mg (12 μ mol) **77** mit 6.3 mg (10 μ mol) **101** umgesetzt. Im darauffolgenden Schritt wurde das Kupplungsprodukt nach AAV4 O-deacetyliert. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 3.0 mg (2.8 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 28% bezogen **86**.

Charakterisierung



Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 22.84 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 1083.5 [M+H]⁺; 1106.4 [M+Na]⁺; 1126.1 [M+K]⁺

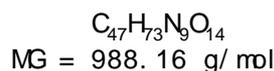
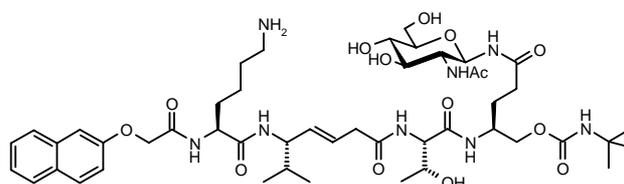
¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.057	7.175	7.788	7.799	7.396	7.479	7.769	4.552
Lysin	NH	α	β	β'	γ	δ	ϵ	z-NH
Threonin	8.374	4.358	1.696	1.616	1.056	1.396	2.537	7.333
Glutamol	7.896	4.158	4.158		1.076			
	7.954	3.918	1.676	3.818	2.197			
	NH	α	β	γ	γ'	CH ₂	CH ₂	
Val- Ψ [COCH ₂]-Gly	8.094	4.309	1.896	0.795	0.795	2.641	2.775	
Carbamat	NH	CH	CH ₂	CH ₂				
GlcNAc	n.b.	1.712	1.564	1.832				
	NH	NH(Ac)	1	2	3	4	5	6a/6b
1	8.432	8.089/1.875	4.959	3.832	3.753	3.398	3.518	3.698/3.396

7.4.4.21 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthyloxyacetyl)-L-lysiny]-[5S]-5-amino-6-methyl-hept-3E-enoyl]-L-threonyl]-N5-[2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[tert-butylaminocarbonyl]-L-glutaminol 95

Nach AAV2 wurden 8.6 mg (12 μ mol) 78 mit 5.6 mg (10 μ mol) 99 umgesetzt. Im darauffolgenden Schritt wurde das Kupplungsprodukt nach AAV4 O-deacetyliert. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 2.7 mg (2.8 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 28% bezogen auf 99.

Charakterisierung



Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 22.72 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 989.2 [M+H]⁺; 1011.4 [M+Na]⁺; 1027.1 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.242	7.196	7.787	7.839	7.396	7.479	7.769	3.275
	NH	α	β	β'	γ	δ	ϵ	z-NH
Lysin	8.389	4.282	1.682	1.617	1.087	1.419	2.983	7.321
Threonin	7.840	4.108	4.013		1.097			
	NH	α	β	γ	CH ₂	CH ₂		
Val-								
Ψ [COCH]-	7.787	4.311	1.912	0.826	0.824	2.640		
Gly								
Glutaminol	8.023	3.838	1.602	3.926	2.185			
Carbamat	NH	t-Bu						
GlcNAc	n.b.	1.179						
	NH	NH(Ac)	1	2	3	4	5	6a/6b
1	8.422	8.116/1.896	4.953	3.804	3.726	3.498	3.579	3.661/3.448

7.4.4.22 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[5S)-5-amino-6-methyl-hept-3E-enoyl]-L-threonyl]-N5-[2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[cyclohexylaminocarbonyl]-L-glutaminol **96**

Nach AAV2 wurden 8.6 mg (12 μ mol) **78** mit 5.8 mg (12 μ mol) **100** umgesetzt. Im darauffolgenden Schritt wurde das Kupplungsprodukt nach AAV4 O-deacetyliert. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 2.4 mg (2.4 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 24% bezogen auf **100**.

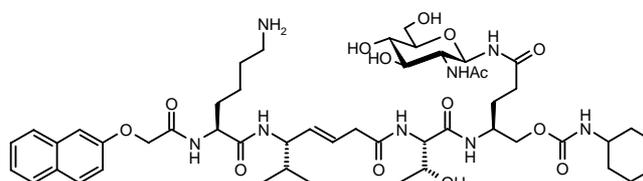
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 22.67 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 1015.5

[M+H]⁺; 1037.1 [M+Na]⁺; 1053.1 [M+K]⁺



C₄₉H₇₅N₉O₁₄
MG = 1014.20 g/mol

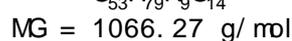
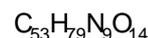
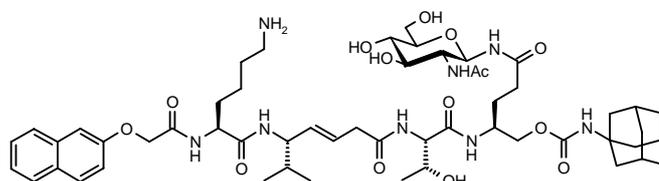
¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.242	7.196	7.787	7.839	7.396	7.479	7.769	4.358
	NH	α	β	β'	γ	δ	ϵ	z-NH
Lysin	8.384	4.288	1.636	1.636	1.096	1.426	2.567	7.328
Threonin	7.784	3.908	3.908		0.635			
Glutamol	7.999	3.918	1.656	3.897	2.207			
	NH	α	β	γ	CH	CH	CH ₂	
Val- Ψ [CHCH]-Gly	7.855	4.125	2.101	1.088	5.458	5.365	2.957	
Carbamat	NH	H1	H2/H6	H2/H5	H3			
GlcNAc	n.b.	3.200	1.658	1.400	1.099			
	NH	NH(Ac)	1	2	3	4	5	6a/6b
1	8.452	8.112/1.886	4.969	3.804	3.708	3.388	3.538	3.698/3.398

7.4.4.23 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthyloxyacetyl)-L-lysiny]-[5S)-5-amino-6-methyl-hept-3E-enoyl]-L-threonyl]-N5-[2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[adamantylaminocarbonyl]-L-glutaminol **97**

Nach AAV2 wurden 8.6 mg (12 μ mol) **78** mit 6.3 mg (10 μ mol) **101** umgesetzt. Im darauffolgenden Schritt wurde das Kupplungsprodukt nach AAV4 O-deacetyliert. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 3.1 mg (2.9 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 29% bezogen auf **101**.

Charakterisierung



Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 22.96min

MALDI-TOF-MS: m/z = 1067.3 [M+H]⁺; 1089.5 [M+Na]⁺; 1105.2 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.242	7.196	7.787	7.839	7.396	7.479	7.769	n.b.
	NH	α	β	β'	γ	δ	ϵ	z-NH
Lysin	8.389	4.282	1.682	1.617	1.087	1.419	2.983	7.321
Threonin	7.840	4.108	4.013		1.097			
Glutaminol	8.023	3.838	1.602	3.926	2.185			
	NH	α	β	γ	CH	CH	CH ₂	
Val- Ψ [CHCH]-Gly	7.834	4.098	2.024	1.086	5.459	5.399	2.962	
Carbamat	NH	CH	CH ₂	CH ₂				
GlcNAc	n.b.	1.715	1.565	1.831				
	NH	NH(Ac)	1	2	3	4	5	6a/6b
1	8.422	8.116/1.896	4.953	3.804	3.726	3.498	3.579	3.661/3.448

7.4.4.24 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[5S)-5-amino-6-methyl-hept-3E-enoyl]-L-threonyl]-N5-[2-acetamido-1,2-dideoxy- β -D-glucopyranosyl]-O1-[methoxycarbonylmehtylamino-carbonyl]-L-glutaminol 118

Nach AAV2 wurden 8.6 mg (12 μ mol) **78** mit 6.0 mg (10 μ mol) **102** umgesetzt. Im darauffolgenden Schritt wurde das Kupplungsprodukt nach AAV4 O-deacetyliert. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten.

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels RP-HPLC an einer präparativen RPC₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 80/20 (0.25 CV) \rightarrow 77/23 (9 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1.5 CV) \rightarrow 80/20 (1 CV), Flussrate 20 mL). Die produkthaltigen Fraktionen wurden anschließend gefriergetrocknet. Es konnten 3.6 mg (3.5 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 35% bezogen auf **102**.

Charakterisierung

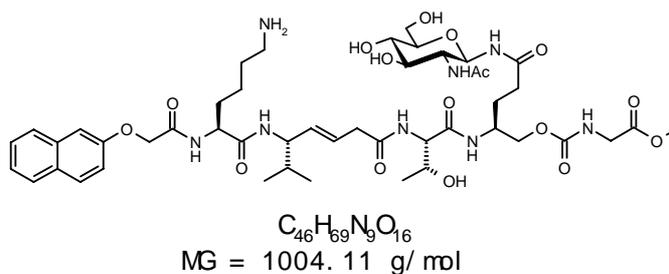
Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 27.51 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 1005.1

[M+H]⁺; 1027.1 [M+Na]⁺; 1043.2 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):



2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.080 NH	7.131 α	7.741 β	7.725 β'	7.279 γ	7.365 δ	7.669 ϵ	3.275 z-NH
Lysin	8.389	4.170	1.601	1.575	0.961	1.307	2.414	7.321
Threonin	7.840	4.025	3.922		1.097			
Glutaminol	8.023 NH	3.859 α	1.566 β	3.958 γ	2.096 CH			
Val- Ψ [CHCH]- Gly Carbamat	7.894 NH	3.806 Acetyl CH ₂	1.401 CH ₃	0.556	5.383	5.339	2.828	
GlcNAc	n.b. NH	4.001 NH(Ac)	3.661 1	2	3	4	5	6a/6b
1	8.422	8.116/1.792	4.875	3.606	3.419	3.288	3.557	3.661/3.318

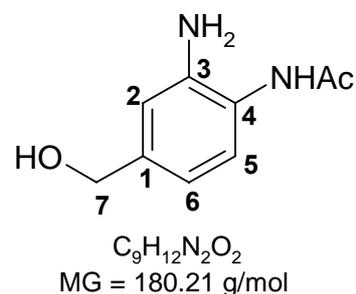
7.4.4.25 **Darstellung von 4-Acetamido-3-aminobenzylalkohol 121**

110 mg Pd/C (10%) wurden in 256 μ L 5%ige Salzsäure suspendiert. Anschließend wurde eine Suspension aus 241 mg (1.15 mmol) 120 in 7 mL EtOH hinzugegeben. Darauf folgend wurde eine Lösung aus 161 μ L Hydrazinhydrat in 330 μ L EtOH zugetropft, der Kolben verschlossen und Reaktionslösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 20 mL EE/EtOH (1:1) hinzugefügt, der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 120 mg (666 μ mol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 58%.

Charakterisierung

hellgelber Feststoff; Smp.:

FAB-MS: $m/z = 181.2 [M+H]^+$



1H -NMR (500 MHz, DMSO- d^6): $\delta = 9.09$ (*s*, 1H, NHAc); 7.09-7.06 (*m*, 1H, **H-5**); 6.73-6.66 (*m*, 1H, **H-2**); 6.52-6.45 (*m*, 1H, **H-6**); 4.34 (*s*, 2H, **H-7**); 2.02 (*s*, 3H, HNAc) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d^6): $\delta = 168.52$ (Carbonyl-NHAc); 141.53 (*s*, C-3); 140.42 (*s*, C-1); 125.25 (*d*, C-5); 122.74 (*s*, C-4); 114.98 (*d*, C-6); 114.38 (*d*, C-2); 63.27 (*t*, C-7); 24.05 (*q*, HNAc) ppm.

7.4.4.26 **Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-N5-[2-acetamido-5-hydroxymethylphenyl]-O1-[tert-butylaminocarbonyl]-L-glutaminol 122**

Es wurden 88.0 mg (275 μ mol) 121 in 400 μ L DMF gelöst und mit 47.0 μ L (34.3 mg; 275 μ mol) DIPEA versetzt. Anschließend wurde die Lösung zu 100 mg (220 μ mol) 94 gelöst in 500 μ L DMF zugetropft und die Reaktionslösung für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: $CHCl_3/MeOH$ 20:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 68.1 mg (110 μ mol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 60%.

Charakterisierung

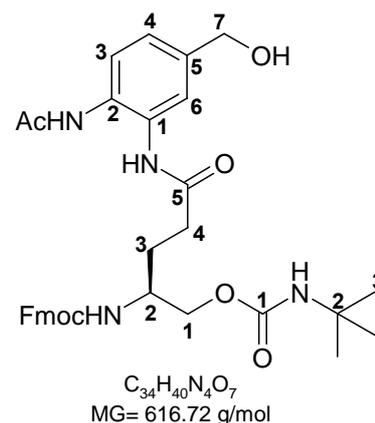
hellgelber Feststoff;

Smp.: 147 °C zersetzt

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH 5:1) = 0.48

Drehwert: [α]₅₈₉ = - 0.1° (c = 0.15, DMSO)

FAB-MS: m/z = 639 [M+Na]⁺; 655 [M+K]⁺.



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*⁶): δ = 9.28 (*s*, 1H, NH (**N5**)); 9.24 (*s*, 1H, NHAc **arom.**); 7.94-7.85 (*m*, 2H, Fmoc **H_A**, **H_A'**); 7.76-7.67 (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_D'**); 7.52-7.46 (*m*, 2H, **H-3 arom.**, **H-6 arom.**); 7.46-7.38 (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_B'**); 7.38-7.28 (*m*, 3H, Fmoc **H_C**, **H_C'**, NH); 7.09-7.01 (*m*, 1H, **H-4 arom.**); 6.86 (*s*, 1H, NH **carb.**); 5.19 (*dd*, 1H, ³J_{OH,H-7 arom} = 5.4 Hz, -OH); 4.44 (*d*, 2H, ³J_{H-7 arom,OH} = 2.8 Hz, **H-7 arom.**); 4.31 (*d*, 2H, ³J_{FmocCH₂,FmocCH} = 6.1 Hz, Fmoc-CH₂); 4.23 (*d*, 1H, ³J_{FmocCH,FmocCH₂} = 6.1 Hz, Fmoc-CH); 3.95-3.81 (*m*, 2H, **H-1**); 3.69 (*br*, 1H, **H-2**); 2.42-2.30 (*m*, 2H, **H-4**); 2.05 (*s*, 3H, HNAc) 1.90-1.77 (*m*, 1H, **H-3**); 1.71-1.58 (*m*, 1H, **H-3'**), 1.20 (*s*, 9H, **H-3 carb.**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*⁶): δ = 171.35 (*s*, **C-5**); 168.98 (*s*, **C-1 carb.**); 168.92 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 156.44 (*s*, Fmoc-**Carbonyl**); 144.29 (*s*, **C_a**); 141.29 (*s*, **C_b**); 139.52 (*s*, **C-5 arom.**); 130.57 (*s*, **C-2 arom.**); 129.26 (*s*, **C-1 arom.**); 128.02 (*s*, **C_B**); 127.49 (*s*, **C_C**); 125.66 (*d*, **C_D**); 124.74 (*d*, **C-6 arom.**); 123.23 (*d*, **C-3 arom.**); 123.23 (*d*, **C-4 arom.**); 120.49 (*d*, **C_A**); 65.92 (*t*, Fmoc-CH₂); 65.11 (*t*, **C-1**); 62.82 (*t*, **C-7 arom.**); 50.41 (*d*, **C-2**); 49.81 (*s*, **C-2 carb.**); 47.23 (*d*, Fmoc-CH); 32.89 (*t*, **C-4**); 29.19 (*q*, **C-3 carb.**); 27.54 (*t*, **C-3**); 24.23 (*q*, HNAc) ppm.

7.4.4.27 Darstellung von N5-[2-acetamido-5-hydroxymethylphenyl]-O1-[tert-butylaminocarbonyl]-L-glutaminol 123

Es wurden 68.1 mg (110 μmol) 122 in 2 mL Pip/DMF (1:4 v/v) gelöst und für 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 40.0 mg (101 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 92%.

Charakterisierung

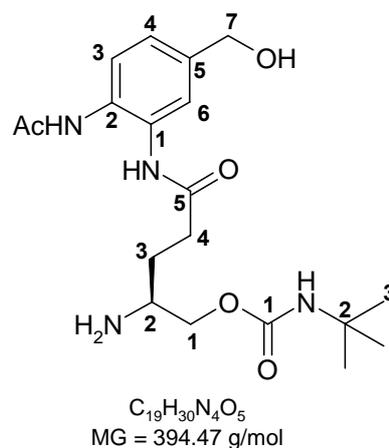
farbloser Feststoff;

Smp.: 115 °C zersetzt

R_f -Wert ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4:1) = 0.08

Drehwert: $[\alpha]_{589} = 6.55^\circ$ (c = 0.31, MeOH)

FAB-MS: = 417.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 433.4 $[\text{M}+\text{K}]^+$.



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{MeOD-}d^4$): $\delta = 7.60\text{-}7.55$ (m, 1H, **H-6 arom.**); $7.54\text{-}7.45$ (m, 1H, **H-3 arom.**); $7.27\text{-}7.20$ (m, 1H, **H-4 arom.**); 4.62 (s, 2H, **H-7 arom.**); 4.31 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-1},\text{H-1}'} = 10.8$ Hz, $^3J_{\text{H-1},\text{H-2}} = 4.3$ Hz, **H-1**); 4.31 (dd, 1H, $^2J_{\text{H-1}',\text{H-1}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H-1}',\text{H-2}} = 6.4$ Hz, **H-1'**); $3.13\text{-}3.04$ (m, 1H, **H-2**); $2.65\text{-}2.51$ (m, 2H, **H-4**); 2.20 (s, 3H, **HNAc**); $1.99\text{-}1.88$ (m, 1H, **H-3**); $1.85\text{-}1.74$ (m, 1H, **H-3'**); 1.33 (s, 9H, **H-3 carb.**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{MeOD-}d^4$): $\delta = 172.50$ (s, **C-5**); 170.92 (s, **C-1 carb.**); 168.98 (s, **Carbonyl-NHAc arom.**); 137.65 (s, **C-5 arom.**); 128.82 (s, **C-2 arom.**); 127.82 (s, **C-1 arom.**); 123.53 (d, **C-6 arom.**); 122.41 (d, **C-3 arom.**); 121.87 (d, **C-4 arom.**); 66.58 (t, **C-1**); 61.56 (t, **C-7 arom.**); 48.28 (d, **C-2**); 47.87 (s, **C-2 carb.**); 30.56 (t, **C-4**); 27.07 (t, **C-3**); 26.26 (q, **C-3 carb.**); 20.43 (q, **HNAc**) ppm.

7.4.4.28 Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-N5-[(3,6-di-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy-4-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]-O1-[tert-butyl-aminocarbonyl]-L-glutaminol 131

112 mg (380 μ mol) TBTU wurden in 500 μ L DMF gelöst und mit 57 μ L (43 mg; 380 μ mol) DIPEA versetzt. Zu dieser Lösung wurden anschließend 120 mg (260 μ mol) **109** zugegeben. Diese Lösung wurde zu einer -10 °C kalten Lösung aus 122 mg (290 μ mol) **130** in 2 mL DMF zugetropft und für drei Stunden bei -10 °C gerührt. Darauffolgend wurde zu dieser Reaktionslösung 5 mL eines Gemisches aus Pyridin/Ac₂O (3:2) zugegeben und für weitere 15 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt aus EtOH umkristallisiert und abschließend mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 35 mg (45 μ mol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 23%.

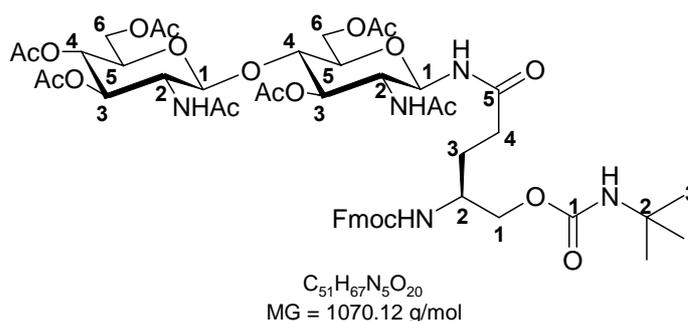
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -20.0^\circ$ ($c = 1.5$; CHCl₃)

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.16

MALDI-TOF-MS: $m/z = 1071.3$ [M+H]⁺, 1094.5 [M+Na]⁺



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*⁶): $\delta = 8.37$ (*d*, 1H, ³*J*_{NH(N5),H-1 GlcNAc 1} = 9.3 Hz, NH (N5)); 7.97 (*d*, 1H, ³*J*_{NHAc GlcNAc 2,H-2 GlcNAc 2} = 8.8 Hz, NHAc GlcNAc 2); 7.91-7.86 (*m*, 2H, Fmoc H_A, H_{A'}); 7.83 (*d*, 1H, ³*J*_{NHAc GlcNAc 1,H-2 GlcNAc 1} = 9.2 Hz, NHAc GlcNAc1); 7.72-7.66 (*m*, 2H, Fmoc H_B, H_D); 7.45-7.38 (*m*, 2H, Fmoc H_B, H_{B'}), 7.36-7.28 (*m*, 2H, Fmoc H_C, H_{C'}), 7.20 (*d*, 1H, ³*J*_{NH,H-2} = 8.8 Hz, NH); 6.81 (*s*, 1H, NH carb.); 5.13 (*dd*, 1H, ³*J*_{H-3 GlcNAc 2,H-2 GlcNAc 2} = 9.8 Hz, ³*J*_{H-3 GlcNAc 2,H-4 GlcNAc 2} = 9.8 Hz, H-3 GlcNAc 2); 5.05 (*dd*, 1H, ³*J*_{H-1 GlcNAc 1,NH(N5)} = 9.6 Hz, ³*J*_{H-1 GlcNAc 1,H-2 GlcNAc} = 9.6 Hz, H-1 GlcNAc 1); 4.96 (*dd*, 1H, ³*J*_{H-3 GlcNAc 1,H-2 GlcNAc 1} = 9.6 Hz, ³*J*_{H-3 GlcNAc 1,H-4 GlcNAc 1} = 9.6 Hz, H-3 GlcNAc 1); 4.81 (*dd*, 1H, ³*J*_{H-4 GlcNAc 2,H-3 GlcNAc 2} = 9.6 Hz, ³*J*_{H-4 GlcNAc 2,H-5 GlcNAc 2} = 9.6 Hz, H-4 GlcNAc 2); 4.67 (*d*, 1H, ³*J*_{H-1 GlcNAc 2,H-2 GlcNAc 2} = 8.3 Hz, H-1 GlcNAc); 4.34-4.17 (*m*, 5H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂, H-6a GlcNAc 1, H-6a GlcNAc 2); 3.96 (*dd*, ³*J*_{H-6b GlcNAc 1,H-5 GlcNAc 1} = 5.6 Hz, ²*J*_{H-6b GlcNAc 1,H-6a GlcNAc 1} = 12.2 Hz,

H-6b GlcNAc 1); 3.90 (*dd*, $^3J_{\text{H-6b GlcNAc 2, H-5 GlcNAc 2}} = 2.3$ Hz, $^2J_{\text{H-6b GlcNAc 2, H-6a GlcNAc 2}} = 10.3$ Hz, **H-6b GlcNAc 2**); 3.84-3.73 (*m*, 4H, **H-5 GlcNAc 2**, **H-2 GlcNAc 1**, **H-1**); 3.68 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc 1, H-3 GlcNAc 1}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc 1, H-5 GlcNAc 1}} = 9.6$ Hz, **H-4 GlcNAc 1**); 3.62-3.48 (*m*, 3H, **H-2**, **H-5 GlcNAc 1**, **H-2 GlcNAc 2**); 2.13-1.98 (*m*, 2H, **H-4**); 2.03 (*s*, 3H, OAc); 2.01 (*s*, 3H, OAc); 1.95 (*s*, 3H, OAc); 1.94 (*s*, 3H, OAc); 1.90 (*s*, 3H, OAc); 1.75 (*s*, 3H, HNac); 1.71 (*s*, 3H, HNac); 1.72-1.61 (*m*, 1H, **H-3**); 1.57-1.44 (*m*, 1H, **H-3'**); 1.19 (*s*, 9H, **H-3 carb.**) ppm.

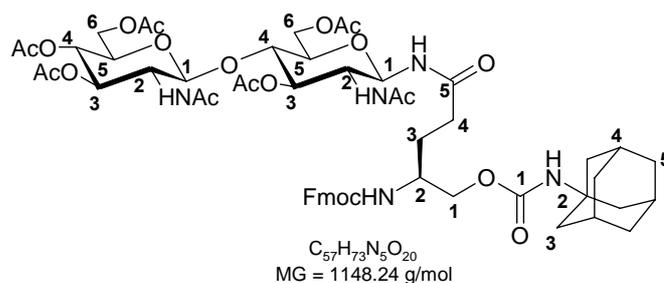
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-*d*⁶): $\delta =$ 170.55 (*s*, **C-5**); 170.45 (*s*, **C-1 carb.**); 169.92 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 169.76 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 169.72 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.65 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.60 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.52 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.41 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.25 (*s*, **Fmoc-Carbonyl**); 144.08 (*s*, **C_a**); 140.73 (*s*, **C_d**); 127.92 (*d*, **C_B**); 127.26 (*d*, **C_C**); 125.47 (*d*, **C_D**); 120.33 (*s*, **C_A**); 100.64 (*d*, **C-1 GlcNAc 2**); 78.52 (*d*, **C-1 GlcNAc 1**); 74.62 (*d*, **C-3 GlcNAc 1**); 73.84 (*d*, **C-3 GlcNAc 2**); 73.82 (*d*, **C-5 GlcNAc 1**); 70.76 (*d*, **C-5 GlcNAc 2**); 68.77 (*d*, **C-4 GlcNAc 2**); 65.89 (*t*, **Fmoc-CH₂**); 64.46 (*t*, **C-1**); 63.02 (*t*, **C-6 GlcNAc 1**); 61.78 (*t*, **C-6 GlcNAc 2**); 53.44 (*d*, **C-2 GlcNAc 2**); 53.09 (*d*, **C-2 GlcNAc 1**); 50.56 (*d*, **C-2**); 49.73 (*s*, **C-2 carb.**); 47.46 (*d*, **Fmoc-CH**); 32.21 (*t*, **C-4**); 28.89 (*q*, **C-3 carb.**); 27.16 (*t*, **C-3**); 23.07 (*q*, **HNac**); 22.98 (*q*, **HNac**); 21.23 (*q*, **OAc**); 20.86 (*q*, **OAc**); 20.83 (*q*, **OAc**); 20.77 (*q*, **OAc**); 20.57 (*q*, **OAc**) ppm.

7.4.4.29 **Darstellung von N2-[Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-N5-[(3,6-di-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy-4-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]-O1-[adamantyl-aminocarbonyl]-L-glutaminol 132**

638 mg (2.17 mmol) TBTU wurden in 500 μL DMF gelöst und mit 325 μL (245 mg; 2.17 mmol) DIPEA versetzt. Zu dieser Lösung wurden anschließend 684 mg (1.48 μmol) **111** zugegeben. Diese Lösung wurde zu einer -10 °C kalten Lösung aus 703 mg (1.67 mmol) **130** in 2 mL DMF zugetropft und für drei Stunden bei -10 °C gerührt. Darauf folgend wurde zu dieser Reaktionslösung 5 mL eines Gemisches aus Pyridin/Ac₂O (3:2) zugegeben und für weitere 15 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt aus EtOH umkristallisiert und abschließend mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Nach Trocknung an der Ölpumpe konnten 51 mg (45 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 3%.

Charakterisierung

Farbloses Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -20.5^\circ$ ($c = 1.5$; CHCl_3) R_f -Wert ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) = 0.16MALDI-TOF-MS: $m/z = 1149.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1170.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1187.5 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 8.35$ (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH}(\text{N}5),\text{H-1}}$ GlcNAc 1 = 9.2 Hz, NH (N5)); 7.95 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NHAc GlcNAc 2,H-2}}$ GlcNAc 2 = 8.9 Hz, NHAc GlcNAc 2); 7.95-7.85 (*m*, 2H, Fmoc **H_A**, **H_{A'}**); 7.81 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NHAc GlcNAc 1,H-2}}$ GlcNAc 1 = 9.2 Hz, NHAc GlcNAc 1); 7.74-7.68 (*m*, 2H, Fmoc **H_D**, **H_{D'}**); 7.47-7.40 (*m*, 2H, Fmoc **H_B**, **H_{B'}**), 7.37-7.28 (*m*, 2H, Fmoc **H_C**, **H_{C'}**), 7.21 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH,H-2}}$ = 8.8 Hz, NH); 6.83 (*s*, 1H, NH carb.); 5.15 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc 2,H-2}}$ GlcNAc 2 = 9.7 Hz, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc 2,H-4}}$ GlcNAc 2 = 9.7 Hz, **H-3 GlcNAc 2**); 5.07 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc 1,NH}(\text{N}5)}$ = 9.5 Hz, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc 1,H-2}}$ GlcNAc 1 = 9.5 Hz, **H-1 GlcNAc 1**); 4.95 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc 1,H-2}}$ GlcNAc 1 = 9.6 Hz, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc 1,H-4}}$ GlcNAc 1 = 9.6 Hz, **H-3 GlcNAc 1**); 4.81 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc 2,H-3}}$ GlcNAc 2 = 9.6 Hz, $^3J_{\text{H-4,H-5}}$ = 9.6 Hz, **H-5 GlcNAc 2**); 4.67 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-15,H-17}}$ = 8.3 Hz, **H-15**); 4.32-4.15 (*m*, 5H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂, **H-14a**, **H-21a**); 3.90 (*dd*, $^3J_{\text{H-6b GlcNAc 1,H-5}}$ GlcNAc 1 = 5.6 Hz, $^2J_{\text{H-6b GlcNAc 1,H-6a}}$ GlcNAc 1 = 12.2 Hz, **H-6b GlcNAc 1**); 3.88 (*dd*, $^3J_{\text{H-6b GlcNAc 2,H-5}}$ GlcNAc 2 = 2.3 Hz, $^2J_{\text{H-6b GlcNAc 2,H-6a}}$ GlcNAc 2 = 10.3 Hz, **H-6b GlcNAc 2**); 3.84-3.73 (*m*, 4H, **H-5 GlcNAc 2**, **H-2 GlcNAc 1**, **H-1**); 3.70 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc 1,H-3}}$ GlcNAc 1 = 9.6 Hz, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc 1,H-5}}$ GlcNAc 1 = 9.6 Hz, **H-4 GlcNAc 1**); 3.61-3.49 (*m*, 3H, **H-2**, **H-5 GlcNAc 1**, **H-2 GlcNAc 1**); 2.15-1.99 (*m*, 2H, **H-2**); 2.02 (*s*, 3H, OAc); 2.00 (*s*, 3H, OAc); 1.98 (*s*, 3H, **H-4 carb.**); 1.95 (*s*, 3H, OAc); 1.94 (*s*, 3H, OAc); 1.90 (*s*, 3H, OAc); 1.83 (*s*, 6H, **H-3 carb.**); 1.75 (*s*, 3H, HNAc); 1.71 (*s*, 3H, HNAc); 1.72-1.61 (*m*, 1H, **H-3**); 1.57-1.44 (*m*, 7H, **H-3'**, **H-5 carb.**) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 170.49$ (*s*, **C-5**); 170.44 (*s*, **C-1 carb.**); 169.99 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 169.79 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 169.72 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.65 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.60 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.52 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.41 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.25 (*s*, Fmoc-Carbonyl); 144.14 (*s*, **C_a**); 140.80 (*s*, **C_d**); 127.98 (*d*, **C_B**); 127.35 (*d*, **C_C**); 125.52 (*d*, **C_D**); 120.49 (*s*, **C_A**); 100.88 (*d*, **C-1 GlcNAc 2**); 78.42 (*d*, **C-1 GlcNAc 1**); 74.72 (*d*, **C-3 GlcNAc 1**); 73.88 (*d*, **C-3 GlcNAc 2**); 73.73 (*d*, **C-5 GlcNAc 1**);

70.75 (*d*, C-5 GlcNAc 2); 68.71 (*d*, C-4 GlcNAc 2); 65.82 (*t*, Fmoc-CH₂); 64.41 (*t*, C-1); 63.10 (*t*, C-6 GlcNAc 1); 61.71 (*t*, C-6 GlcNAc 2); 53.48 (*d*, C-2 GlcNAc 2); 53.00 (*d*, C-2 GlcNAc 1); 50.49 (*d*, C-2); 47.40 (*d*, Fmoc-CH); 41.69 (*t*, C-4 carb.); 36.09 (*t*, C-3 carb.) 32.22 (*t*, C-4); 29.20 (*d*, C-5 carb.); 27.20 (*t*, C-3); 23.15 (*q*, HNAc); 23.01 (*q*, HNAc); 21.15 (*q*, OAc); 20.79 (*q*, OAc); 20.77 (*q*, OAc); 20.73 (*q*, OAc); 20.57 (*q*, OAc) ppm.

7.4.4.30 Darstellung von N5-[(3,6-Di-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy-4-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]-O1-[tert-butyl-aminocarbonyl]-L-glutaminol **133**

63 mg (59 μmol) **131** wurden in 2 mL Pip/DMF (1:4) gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 4:1) gereinigt. Der Rückstand wurde in Wasser/MeCN aufgenommen und gefriergetrocknet. Es konnten 38 mg (45 μmol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 76%.

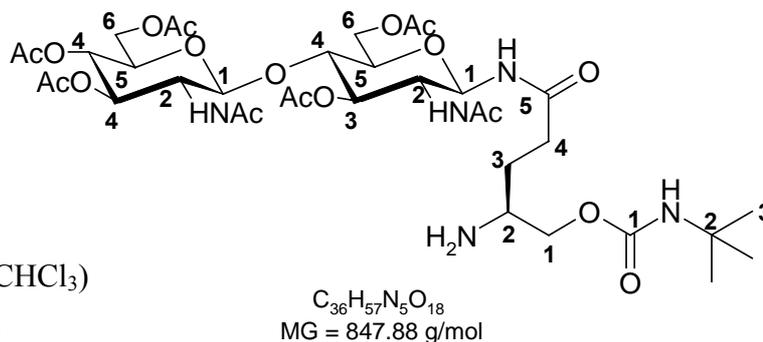
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -12.8^\circ$ ($c = 1.5$; CHCl₃)

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.15

MALDI-TOF-MS: $m/z = 849.1$ [M+H]⁺, 871.1 [M+Na]⁺



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*⁶): $\delta = 8.39$ (*d*, 1H, ³J_{NH(N5),H-1 GlcNAc 1} = 9.3 Hz, NH (**N5**)); 7.96 (*d*, 1H, ³J_{NHAc GlcNAc 2,H-2 GlcNAc 2} = 9.0 Hz, NHAc **GlcNAc 2**); 7.84 (*d*, 1H, ³J_{NHAc GlcNAc 1,H-2 GlcNAc 1} = 9.6 Hz, NHAc **GlcNAc 1**); 6.77 (*s*, 1H, NH carb.); 5.13 (*dd*, 1H, ³J_{H-3 GlcNAc 2,H-2 GlcNAc 2} = 9.9 Hz, ³J_{H-3 GlcNAc 2,H-4 GlcNAc 2} = 9.9 Hz, **H-3 GlcNAc 2**); 5.05 (*dd*, 1H, ³J_{H-1 GlcNAc 1,NH(N5)} = 9.9 Hz, ³J_{H-1 GlcNAc 1,H-2 GlcNAc 1} = 9.9 Hz, **H-1 GlcNAc 1**); 4.96 (*dd*, 1H, ³J_{H-3 GlcNAc 1,H-2 GlcNAc 1} = 9.6 Hz, ³J_{H-3 GlcNAc 1,H-4 GlcNAc 1} = 9.6 Hz, **H-3 GlcNAc 1**); 4.81 (*dd*, 1H, ³J_{H-4 GlcNAc 2,H-3 GlcNAc 2} = 9.6 Hz, ³J_{H-4 GlcNAc 2,H-5 GlcNAc 2} = 9.6 Hz, **H-4 GlcNAc 2**); 4.67 (*d*, 1H, ³J_{H-1 GlcNAc 2,H-2 GlcNAc 2} = 8.3 Hz, **H-1 GlcNAc 2**); 4.34-4.23 (*m*, 2H, **H-6a GlcNAc 1**, **H-6a GlcNAc 2**); 3.97 (*dd*, ³J_{H-6b GlcNAc 1,H-5 GlcNAc 1} = 5.8 Hz, ²J_{H-6b GlcNAc 1,H-6a GlcNAc 1} = 11.8 Hz, **H-6b GlcNAc 1**); 3.90 (*dd*, ³J_{H-6b GlcNAc 2,H-5 GlcNAc 2} = 1.6 Hz, ²J_{H-6b GlcNAc 2,H-6a GlcNAc 2} =

12.5 Hz, **H-6b GlcNAc 2**); 3.85-3.75 (*m*, 4H, **H-5 GlcNAc 2, H-2 GlcNAc 1, H-1**); 3.75-3.65 (*m*, 2H, **H-2, H-4 GlcNAc 1**); 3.59-3.49 (*m*, 2H, **H-5 GlcNAc 1, H-2 GlcNAc 2**); 3.29 (*s*, 2H, **NH₂**); 2.26-2.12 (*m*, 2H, **H-4**); 2.04 (*s*, 3H, **OAc**); 2.01 (*s*, 3H, **OAc**); 1.95 (*s*, 3H, **OAc**); 1.94 (*s*, 3H, **OAc**); 1.90 (*s*, 3H, **OAc**); 1.75 (*s*, 3H, **HNAc**); 1.71 (*s*, 3H, **HNAc**); 1.67-1.56 (*m*, 1H, **H-3**); 1.49-1.35 (*m*, 1H, **H-3'**); 1.21 (*s*, 9H, **H-3 carb.**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*⁶): δ = 171.03 (*s*, **C-5**); 170.85 (*s*, **C-1 carb.**); 170.26 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 170.23 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 170.12 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 170.07 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 170.04 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.72 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.65 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 100.43 (*d*, **C-1 GlcNAc 2**); 78.35 (*d*, **C-1 GlcNAc 1**); 74.14 (*d*, **C-3 GlcNAc 1**); 73.93 (*d*, **C-3 GlcNAc 2**); 73.83 (*d*, **C-5 GlcNAc 1**); 70.44 (*d*, **C-5 GlcNAc 2**); 69.03 (*d*, **C-4 GlcNAc 1**); 68.76 (*d*, **C-4 GlcNAc 2**); 64.46 (*t*, **C-1**); 63.43 (*t*, **C-6 GlcNAc 1**); 62.04 (*t*, **C-6 GlcNAc 2**); 53.44 (*d*, **C-2 GlcNAc 2**); 53.38 (*d*, **C-2 GlcNAc 1**); 50.56 (*d*, **C-2**); 49.69 (*s*, **C-2 carb.**); 32.51 (*t*, **C-4**); 28.82 (*q*, **C-3 carb.**); 29.74 (*t*, **C-3**); 23.84 (*q*, **HNAc**); 22.99 (*q*, **HNAc**); 21.17 (*q*, **OAc**); 20.85 (*q*, **OAc**); 20.79 (*q*, **OAc**); 20.77 (*q*, **OAc**); 20.68 (*q*, **OAc**) ppm.

7.4.4.31 Darstellung von **N5-[(3,6-Di-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy-4-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]-O1-[adamantyl-aminocarbonyl]-L-glutaminol **134****

51 mg (45 μ mol) **132** wurden in 2 mL Pip/DMF (1:4) gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie (Eluent: CHCl₃/MeOH 4:1) gereinigt. Der Rückstand wurde in Wasser/MeCN aufgenommen und gefriergetrocknet. Es konnten 7.9 mg (8.6 μ mol) des Produktes isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 76%.

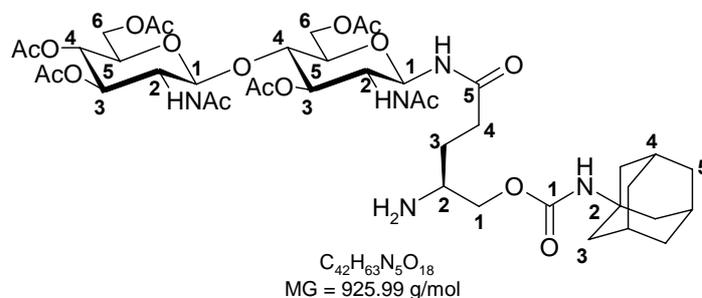
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

Drehwert: $[\alpha]_{589} = -22.6^\circ$ (*c* = 0.9; CHCl₃)

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.05

MALDI-TOF-MS: *m/z* = 927.1 [M+H]⁺, 949.5 [M+Na]⁺, 975.1 [M+K]⁺



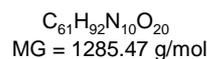
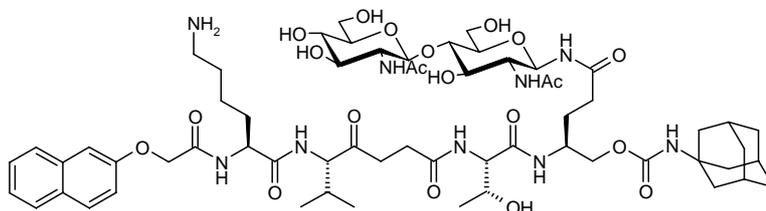
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 8.38$ (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH (N5),H-1 GlcNAc 1}} = 9.3$ Hz, **NH (N5)**); 7.95 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NHAc GlcNAc 2,H-2 GlcNAc 2}} = 9.0$ Hz, **NHAc GlcNAc 2**); 7.82 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NHAc GlcNAc 1,H-2 GlcNAc 1}} = 9.6$ Hz, **NHAc GlcNAc 1**); 6.74 (*s*, 1H, **NH carb.**); 5.11 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc 2,H-2 GlcNAc 2}} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc 2,H-4 GlcNAc 2}} = 9.9$ Hz, **H-3 GlcNAc 2**); 5.01 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc 1,NH (N5)}} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc 1,H-2 GlcNAc 1}} = 9.9$ Hz, **H-1 GlcNAc 1**); 4.93 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc 1,H-2}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H-3 GlcNAc 1,H-3 GlcNAc 1}} = 9.6$ Hz, **H-3 GlcNAc 1**); 4.80 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc 2,H-3 GlcNAc 2}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H-4 GlcNAc 2,H-5 GlcNAc 2}} = 9.6$ Hz, **H-4 GlcNAc 2**); 4.65 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-1 GlcNAc 2,H-2 GlcNAc 2}} = 8.3$ Hz, **H-1 GlcNAc 2**); 4.32-4.21 (*m*, 2H, **H-6a GlcNAc 1, H-6a GlcNAc 2**); 3.98 (*dd*, $^3J_{\text{H-6b GlcNAc 1,H-5 GlcNAc 1}} = 5.8$ Hz, $^2J_{\text{H-6b GlcNAc 1,H-6a GlcNAc 1}} = 11.8$ Hz, **H-6b GlcNAc 1**); 3.89 (*dd*, $^3J_{\text{H-6b GlcNAc 2,H-5 GlcNAc 2}} = 1.6$ Hz, $^2J_{\text{H-6b GlcNAc 2,H-6a GlcNAc 2}} = 12.5$ Hz, **H-21b**); 3.86-3.76 (*m*, 4H, **H-5 GlcNAc 2, H-2 GlcNAc 1, H-1**); 3.73-3.63 (*m*, 2H, **H-2, H-4 GlcNAc 1**); 3.55-3.45 (*m*, 2H, **H-5 GlcNAc 1, H-2 GlcNAc 2**); 3.28 (*s*, 2H, **NH₂**); 2.27-2.14 (*m*, 2H, **H-4**); 2.04 (*s*, 3H, **OAc**); 1.98 (*s*, 3H, **H-4 carb.**); 1.96 (*s*, 3H, **OAc**); 1.94 (*s*, 3H, **OAc**); 1.90 (*s*, 3H, **OAc**); 1.84 (*s*, 6H, **H-3 carb.**); 1.76 (*s*, 3H, **HNAc**); 1.73 (*s*, 3H, **HNAc**); 1.72-1.61 (*m*, 1H, **H-3**); 1.57-1.45 (*m*, 7H, **H-3', H-5 carb.**) ppm..

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d^6$): $\delta = 171.03$ (*s*, **C-5**); 170.85 (*s*, **C-1 carb.**); 170.26 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 170.23 (*s*, **Carbonyl-NHAc**); 170.12 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 170.07 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 170.04 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.60 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 169.52 (*s*, **Carbonyl-OAc**); 100.43 (*d*, **C-1 GlcNAc 2**); 78.35 (*d*, **C-1 GlcNAc 1**); 74.14 (*d*, **C-3 GlcNAc 1**); 73.93 (*d*, **C-3 GlcNAc 2**); 73.83 (*d*, **C-5 GlcNAc 1**); 70.44 (*d*, **C-5 GlcNAc 2**); 69.03 (*d*, **C-4 GlcNAc 1**); 68.76 (*d*, **C-4 GlcNAc 2**); 64.46 (*t*, **C-1**); 63.43 (*t*, **C-6 GlcNAc 1**); 62.04 (*t*, **C-6 GlcNAc 2**); 53.44 (*d*, **C-2 GlcNAc 2**); 53.38 (*d*, **C-2 GlcNAc 1**); 50.56 (*d*, **C-2**); 41.65 (*t*, **C-4 carb.**); 36.09 (*t*, **C-3 carb.**); 32.51 (*t*, **C-4**); 29.74 (*t*, **C-3**); 29.20 (*d*, **C-5 carb.**); 23.84 (*q*, **HNAc**); 22.99 (*q*, **HNAc**); 21.17 (*q*, **OAc**); 20.85 (*q*, **OAc**); 20.79 (*q*, **OAc**); 20.77 (*q*, **OAc**); 20.68 (*q*, **OAc**) ppm.

7.4.4.33 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-4-oxo-heptanoyl]-L-threonyl]-N5-[(3,6-Di-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy-4-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)-O1-[adamantylaminocarbonyl]-L-glutaminol 125

Nach AAV2 wurden 0.8 mg (1.2 μ mol) 77 mit 0.9 mg (1.0 μ mol) 134 umgesetzt. Im darauffolgenden Schritt wurde das Kupplungsprodukt nach AAV4 O-deacetyliert. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 43 μ g (55 nmol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 5.5% bezogen auf 134.

Charakterisierung



Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 25.87 min

MALDI-TOF-MS: (M = 1285 g/mol)m/z = 1286.1 [M+H]⁺; 1309.1 [M+Na]⁺; 1325.2 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.201 NH	7.197 α	7.777 β	7.853 β'	7.402 γ	7.379 δ	7.701 ϵ	n.b. z-NH
Lysin	8.370	4.272	1.680	1.689	0.997	1.410	2.975	7.322
Threonin	7.842	4.105	4.075		1.113			
Glutaminol	8.025 NH	4.023 α	1.615 β	3.956 γ	2.156 γ'			
Val- Ψ [CHCH]- Gly Carbamat	8.048 N	4.309 CH	1.852 CH ₂	0.788 CH ₂	0.788	2.638	2.799	
GlcNAc	n.b. NH	1.780 NH(Ac)	1.560 1	1.799 2	3	4	5	6a/6b
1	8.421	8.152/1.901	4.951	3.801	3.725	3.495	3.571	3.691/3.445
2		8.270/1.970	4.475	3.740	3.649	3.370	3.468	3.509/3.391

7.4.4.34 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-hept-3E-ensäure]-L-threonyl]-N5-[(3,6-Di-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy-4-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucofuranosyl)- β -D-glucofuranosyl)-O1-[tert-butylaminocarbonyl]-L-glutaminol 126

Nach AAV2 wurden 7.4 mg (10 μ mol) **78** mit 10 mg (12 μ mol) **133** umgesetzt. Im darauffolgenden Schritt wurde das Kupplungsprodukt nach AAV4 O-deacetyliert. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 1.6 mg (1.3 μ mol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 13% bezogen auf **78**.

Charakterisierung

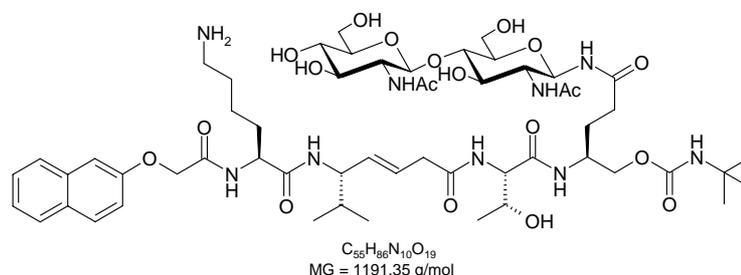
Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 24.47 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 1191.1 [M+H]⁺; 1213.2 [M+Na]⁺; 1229.1 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):

2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.242 NH	7.196 α	7.787 β	7.839 β'	7.396 γ	7.479 δ	7.769 ϵ	n. b. z-NH
Lysin	8.389	4.282	1.682	1.617	1.087	1.419	2.983	7.321
Threonin	7.840	4.108	4.013		1.097			
Glutaminol	8.023 NH	3.838 α	1.602 β	3.926 γ	2.185 CH			CH ₂
Val- Ψ[CHCH]- Gly Carbamat	7.787 N	3.925 t-Bu	1.761	0.672	5.493	5.477	2.956	
GlcNAc	n.b. NH	1.179 NH(Ac)	1	2	3	4	5	6a/6b
1	8.422	8.116/1.896	4.953	3.804	3.726	3.498	3.579	3.661/3.448
2		8.273/1.976	4.461	3.732	3.652	3.365	3.471	3.561/3.365



7.4.4.35 Darstellung von N2-[N α -(2-naphthoxyacetyl)-L-lysiny]-[(5S)-5-amino-6-methyl-hept-3E-ensäure]-L-threonyl]-N5-[(3,6-Di-O-acetyl-2-acetamido-1,2-dideoxy-4-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucofuranosyl)- β -D-glucofuranosyl)-O1-[adamantylaminocarbonyl]-L-glutaminol 127

Nach AAV2 wurden 0.8 mg (1 μ mol) **78** mit 1.0 mg (1.1 μ mol) **133** umgesetzt. Im darauffolgenden Schritt wurde das Kupplungsprodukt nach AAV4 O-deacetyliert. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV5 abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV6 gereinigt. Es konnten 0.1 mg (82 nmol) des Produktes isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 8.2% bezogen auf **78**.

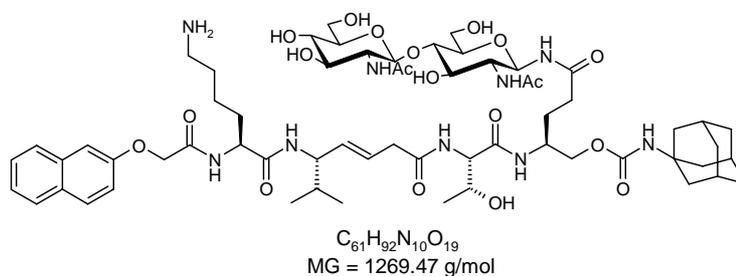
Charakterisierung

Farbloser Feststoff

R_t-Wert = 26.54 min

MALDI-TOF-MS: m/z = 1270.1 [M+H]⁺; 1282.1 [M+Na]⁺; 1308.2 [M+K]⁺

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O 9:1 pH = 3):



2-NOA	1	3	4	5	6	7	8	CH ₂
AS	7.057 NH	7.120 α	7.720 β	7.735 β'	7.385 γ	7.458 δ	7.699 ϵ	4.499 z-NH
Lysin	8.402	4.302	1.679	1.615	1.088	1.410	2.978	7.320
Threonin	7.888	4.115	4.012		1.095			
Glutaminol	8.023 NH	3.835 α	1.612 β	3.902 γ	2.165 CH			
Val- Ψ [CHCH]- Gly Carbamat	7.803 N	4.002 CH	1.754 CH ₂	0.672 CH ₂	5.433	5.457	2.980	
GlcNAc	n.b. NH	1.782 NH(Ac)	1.558 1	1.801 2	3	4	5	6a/6b
1	8.453	8.125/1.850	4.952	3.814	3.701	3.499	3.575	3.660/3.444
2		8.270/1.992	4.450	3.721	3.675	3.364	3.469	3.575/3.359

7.5 Untersuchung der Proteolysestabilität

4 mg Pronase (siehe Abschnitt Proteine und Puffer) wurden in 10 mL Tris-Puffer ($c_{\text{Tromethanol}} = 100 \text{ mM}$) gelöst und 1:50 verdünnt. Von dieser 8 mgL^{-1} Pronase enthaltene Lösung wurden jeweils jeweils $100 \mu\text{L}$ zum gleichen Volumen einer 1 mM Lösung des Peptidomimetikums **18**, **22** bzw. des Referenzpeptids NMWQKVGTPPL in ddH_2O gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 5, 10, 20, 30 und 180 Minuten wurden $20 \mu\text{L}$ Lösung entnommen und in $40 \mu\text{L}$ 1 M Essigsäure pipettiert um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Diese Lösung wurde eingefroren oder sofort mittels RP-HPLC aufgetrennt. Mithilfe von MALDI-TOF-MS wurden die entsprechenden Substratpeaks im UV-Chromatogramm bei 280 nm identifiziert und die Fläche unterhalb der Peaks mittels der Auswertesoftware der BioCAD 700 Sprint integriert. Die Abnahme des Integrals wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

7.6 Konformationsanalyse

7.6.1 NOESY-Spektren und Berechnung der NOE-Kontakte

Das ^1H , ^1H -NOESY-Spektrum des Glycopeptids **86** wurde mit dem Pulsprogramm *noesygpph19* aufgenommen. Das 2D, ^1H -NOESY-Spektrum wurde 300 ms bei 285 K am 700 MHz -Spektrometer mit inversem 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Cryo-Technologie aufgenommen. Die Konzentration des Glycopeptids betrug 36 mM . Der pH-Wert der Probe betrug 3.5 . Zur Analyse des ^1H , ^1H -NOESY-Spektrums wurde das Programm TOPSPIN 1.3 verwendet. Hierbei wurden die nicht sequenziellen NOE-Kreuzsignale ihrer Intensität nach in drei Kategorien eingeteilt. Der Abstand zwischen zwei Protonen, deren Intensität des NOE-Kreuzsignals als stark eingestuft wurde, wurde mit einer Distanzspanne von 1.8 \AA bis 2.5 \AA angegeben. Der Abstand der Protonen mittlerer und niedriger Kreuzsignalintensität wurde mit 2.5 \AA bis 3.5 \AA bzw. mit 3.5 \AA bis 5.0 \AA festgelegt. Es ergaben sich 31 interatomare Distanzen für das Glycopeptid **86** (Tabelle: Kapitel 4.2.4).

7.6.2 Berechnung der ϕ -Winkel

Für die Berechnung der ϕ -Winkel für das Glycopeptid **86** wurde ein ^1H -Spektrum mit einer *Watergate*-Sequenz zur Wasserunterdrückung über eine spektrale Breite von 10 ppm aufgenommen. Aus diesem Spektrum wurden die $^3J_{\text{NH},\text{H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten ermittelt. Konnte aufgrund von Signalüberlagerungen die Kopplungskonstante nicht ermittelt werden, wurden diese unter Verwendung eines ^1H - ^1H -TOCSY-Spektrums bestimmt. Zu diesem Zweck wurde der Abstand zwischen den Intensitätsmaxima der Dubletts der $\text{H}\alpha$ -Protonen

gemessen und dadurch die Kopplungskonstante bestimmt. Da die N-terminale Aminogruppe von Asn⁴²⁵ bedingt durch schnellen H/D-Austausch im Spektrum kein Signal aufwies, konnte für diese Aminosäure kein ϕ -Winkel bestimmt werden. Dies gilt auch für das Pro¹²⁴, da dies als Iminosäure bei einer Verknüpfung im Peptid kein NH-Proton besitzt. Unter Zuhilfenahme des Programms Excel wurden aus den Kopplungskonstanten über die Gleichung der Tabelle 13 Winkel berechnet, wobei sich für eine Kopplungskonstante bis zu vier unterschiedliche Winkel ergaben (Tabelle 13). Der Vergleich der erhaltenen Winkel mit dem Ramachandran-Plot ergab für jeden Winkel zwei mögliche Werte.

7.6.3 DG-Rechnungen

Die aus dem 2D,¹H-NOESY-Spektrum berechneten *distance range constraints* wurden dem Programm DYANA in Form von unteren und oberen Limits vorgegeben. Für Protonenpaare, zwischen denen keine NOE-Kontakte nachgewiesen wurden, wurden keine negativen *constraints* gesetzt, d.h. auch für diese Protonenpaare waren Abstände unterhalb von 5.0 Å erlaubt. Methylenprotonen wurden nicht stereospezifisch zugeordnet, weswegen die Abstände wie auch für Methylprotonen- und nicht dispergierte Methylenprotonen zu NMR-Pseudoprotonen definiert wurden. Da eine Nomenklatur für Kohlenhydratprotonen im Programm DYANA nicht implementiert ist, wurden die Glycopeptidstrukturen ohne die Saccharid-Einheit gerechnet. Ebenfalls wurde ein zusätzlicher *constraint* für die Disulfidbrücke eingepflegt, der durch das Programm DYANA auf 2.0-2.1 Å festgelegt ist.

Es wurden zunächst 500 Strukturen unter Berücksichtigung der *distance range constraints* berechnet und die anschließend die 100 besten Strukturen unter Verwendung der REDAC-Strategie erneut berechnet. Hierfür wurden drei REDAC-Zyklen durchgeführt, welche jeweils 150, 400 und 800 Schritte beinhalteten. Die zehn aus diesen Zyklen erhaltenen Strukturen wurden mittels dem Programm SYBYL auf ihre Torsionswinkel zwischen NH- und H α -Proton analysiert. Die erhaltenen Werte der Winkel wurden mit den Werten aus der Analyse der Kopplungskonstanten verglichen und die übereinstimmenden Winkeldaten (Tabelle 13) verwendet, um eine zweite DYANA Rechnung unter der zusätzlichen Berücksichtigung der *redundant dihedral angle constraints* durchzuführen. Wiederum wurden 500 Strukturen generiert, von denen die 100 besten durch drei REDAC-Zyklen weiter berechnet wurden. Die aus diesen Rechnungen erhaltenen zehn besten Strukturen wurden auf ihre Vereinbarkeit mit den nicht berücksichtigten Kohlenhydrat-Peptid-NOE-*constraints* im Programm SYBYL bewertet.

7.6.4 *Constrained* MD-Simulation

Alle Moleküldynamik-Berechnungen wurden auf einer Octane-Workstation der Firma Silicon Graphics mit dem Programm SYBYL 7.2 von Tripos durchgeführt. Die aus der DYANA-Berechnung hervorgegangene Struktur diente als Startstruktur für eine MD-Simulation.

Zuvor wurden die fehlenden Wasserstoffatome hinzugefügt und die Bindungen zwischen den beiden Schwefelatomen der Disulfidbrücke bzw. zwischen dem Schwefel mit dem entsprechenden β -Kohlenstoffatom generiert. Anschließend wurde Struktur über 200 Iterationsschritte unter Verwendung einer Dielektrizitätskonstante von 20 energieminiert und drauffolgend die Saccarid-Einheit mit Asn²⁰¹ unter Berücksichtigung der Torsionswinkel zwischen dem NH-Proton und dem anomeren Proton bzw. dem NH-Proton und dem H-2-Proton verknüpft. Die bestehenden Atomtypen wurden überprüft und korrigiert. Weiterhin wurde der C-Terminus als Amid, der N-Terminus als NH₃⁺-Gruppe und die Aminogruppe der der Seitenkette des Lys⁴²⁹ ebenfalls als NH₃⁺-Gruppe dargestellt. Anschließend wurden die Ladungen mit Hilfe der Methode, die von Gasteiger und Marsili beschrieben wurde, zugewiesen.^{206,207} Diese Struktur wurde wiederum in 250 Iterationsschritten energieminiert. Anschließend wurde das Glycopeptid in Wasser mit dem Silverware-Algorithmus solvatisiert. Dabei wurde sichergestellt, dass die Wassermoleküle Ladungen trugen. Das gesamte System wurde jeweils in 1000 Iterationsschritten energieminiert. Vor der eigentlichen *constrained* MD-Simulation wurde zur Relaxation der Wasserbox kurze *constrained* MD-Rechnungen (20 ps bei 300 K) vorgeschaltet. Die Endstruktur fungierten dann ihrerseits als Startstrukturen einer weiteren MD-Simulation über einen Zeitraum von 300 ps bei 300 K. Das Integrationsintervall wurde auf 1 fs gesetzt, und alle 100 fs wurden die charakteristischen Daten der Simulation aufgezeichnet (Druck, Temperatur, Dichte, Volumen, potentielle, kinetische und Gesamtenergie des Systems sowie Atomabstände und Torsionswinkel des Peptids).

Die Berechnungen erfolgten unter Berücksichtigung der gleichen *distance* und *angle constraints*, die schon für die DYANA-Berechnungen verwendet wurden. Die Abstände wurden dabei wie gewohnt als Bereich angegeben. Für die *torsion constraints* wurden Gleichgewichtswinkel eingesetzt. Das Strafpotential für die Abstandsbeschränkungen wurde auf 20 kcal/molÅ² gesetzt, das der Winkelbeschränkungen betrug 0.05 oder 0.1 kcal/mol[°]². Die Anfangsgeschwindigkeiten waren nach Boltzmann gewichtet. Die Parameter der Simulation sind in Tabelle 19 zusammengestellt. Abschließend wurden die Endstrukturen in 1000 Iterationsschritten im Vakuum energieminiert.

Tabelle 19: Startwerte der Molekulardynamik-Simulationen und Energien der jeweils Energie-minimierten Endstrukturen.

Parameter	MD des Glycopeptids
Druck [atm]	27705
Temperatur [K]	292
Dichte [g/ml]	1.35
Volumen [\AA^3]	44674
Anzahl der Wassermoleküle	1887
potentielle Energie [kcal/mol]	-2678
kinetische Energie [kcal/mol]	5190
Gesamtenergie [kcal/mol]	2512
Energie der minimierten Startstruktur [kcal/mol]	112
Energie der minimierten Endstruktur [kcal/mol]	97

8 Toxikologische Daten

Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranose	-	-	26-36
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Adamantylisocyanat	Xn	20/21/22-36/37/38	26-37/38/39
2-Aminoethanol	Xn	20-36/37/38	-
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	22	-
Ammoniumchlorid	Xn	22-36	(2-)22
Benzol	F, T	45-46-11-36/38-45/23/24/25-65	53-45
4-Brom-1-buten	F, Xn	11-36/37-42/43	16-23.2-24-37
Bromessigsäure	T, C, N	23/24/25-35-50	26-36/37/39-45-61
<i>tert.</i> -Butylisocyanat	Xn, F	11-26-22-36/37/38-42	16-23-26-28-36/37/39-45
Calciumchlorid	Xi	36	22-24
1,1'-Carbonyldiimidazol	Xi	36/37/38	-
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Cyclohexylisocyanat	T+, N	10-26-/36/37/38-42-50	16-23-26-28A-36/37/39-45-47
Deuteriumoxid	-	-	-
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Dicyclohexylcarbodiimid	T	22-24-41-43	(1/2)24-26-37/39-45
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	2-9-16-29-33
3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin	Xi	36/37/38	26-36
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Xn	22-36/37/38	26-36
Di- <i>isobutyl</i> aluminiumhydrid	C; F, Xn	11-14/15-17-20-35	7/8-16-26-36/37/39-45-61
<i>N,N'</i> -Di- <i>iso</i> -propylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-61
1,2-Dimethoxyethan	F, T	60-61-11-19-E20	53-16-24/25-37-45
<i>N,N'</i> -Dimethylformamid	T	61-20/21-36	53-45
<i>N,O</i> -Dimethylhydroxylamin	Xi	36/37/38	-
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
1,4-Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46
Di- <i>tert</i> -butyloxydicarbonat	T, Xi	26-36/38-43	26-28-36/37/39-45
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-45
Essigsäureethylester	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
Ethanol	F	11	7-16

Ethyl-2-isocyanatoacetat	Xn	20/22-36/37/38-42	23-26-36/37/39-45
9-Flourenylmethyl-succinimidylcarbonat	-	-	-
Fmoc-Aminosäuren	-	-	22-24/25
Grubbs-Katalysator 2 nd Generation	A	-	-
HATU	Xi	36/37/38	26-36
1',1',1',3',3',3'-Hexafluoroisopropanol	Xn	22-36/37/38	26-27-/36/37/39-45
Hydrazinhydrat	T, N	45-10-23/24/25-34-43-50/53	53-45-60-61
Iod	Xn, N	20/21-50	(2-)23-25-61
Kalium-1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazan	C	14-34	26-36/37/39-43-45
Kaliumpermanganat	O, Xn, N	8-22-53/53	60-61
Kieselgel G 60	-	-	-
Kupfer-(I)-chlorid	Xn	22	22
Magnesium	F	11-15	7/8-43.6
Magnesiumsulfat	-	-	-
Methanol (MeOH)	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Methyltriphenylphosphonium-bromid	Xn	20/21/22	36/37
Natrium	F, C	14/15-34	(1/2)5*-8-43-45
Natriumborhydrid	T, C, F	15-25-364	22-26/36/37/39-43-45
Natriumcarbonat	Xi	36	(2-)20-26
Natriumchlorid	-	-	-
Natriumdodecylsulfat	Xn	22-36/38	26-36
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Natrium(meta)periodat	O, Xi	8-36/37/38	17-26-36
Natriummethanolat	C, T	11-23/24/25-34-39	7-16-36/37/39-45
Natriumsulfat	-	-	-
(2-Naphthyloxy)-essigsäure	Xn	22	-
2-Naphthol	Xn	21/22-37/38-41	22-26-37/39
Petrolether 50-70	F, Xn, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	16-23.2-24-33-36/37-61-62
Phosphorsäure	C	34	(1/2)26-45
Piperidin	F,T	11-23/24-34	16-26-27-45
Pronase	-	-	-
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	(2-)7-16-24/25-26
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1

Ruthenium(III)-chlorid-Hydrat	-	24/25	-
Salzsäure 37%	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure 95-97%	C	35	26-30-45
TBTU	Xi	36/37/38	26-36
Tetra- <i>n</i> -butoxytitan	Xi	36/37/38	24/25
Tetra- <i>tert</i> -butoxytitan	Xi	36/37/38	26-37/38
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	(2-)16-29-33
Thionylchlorid	C	14-20/22-29-35	(1/2)26-36/37/39-45
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63-65-67	36/37-46-62
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
2',2',2'-Trifluoroethanol	Xn	10-20/21/22-38-41-48/20	26-36
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Tri- <i>iso</i> -propylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36
Trypton	-	-	-
Valin	Xn	20/21/22-40	22-36

9 Literatur

1. H. J. Böhm, G. Klebe, and H. Kubinyi. *Wirkstoffdesign*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin - Oxford, 10. (1996).
2. S. Waksman. Streptomycin: background, isolation, properties, and utilization. *Nobel Lectures*, 1-19. (1952).
3. Kaplan, S. L. Review of antibiotic resistance, antibiotic treatment and prevention of pneumococcal pneumonia. *Paediatr Respir Rev* **5**, 153-8 (2004).
4. Verband forschender Arzneimittelhersteller e. V. *Jahresbericht 2007 - Arzneimittelforschung in Deutschland*.
5. Chen, S., Skoumbourdis, A. P., Guo, P., Bednarz, M. S., Kocy, O. R., Sundeen, J. E. and Vite, G. D. Design and synthesis of a CD4 β -turn mimetic that inhibits human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 binding and infection of human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5872-6. (1992).
6. Kamerzell, T. J. and Middaugh, C. R. The complex inter-relationships between protein flexibility and stability. *J Pharm Sci* **97**, 3494-517. (2008).
7. Park, S., Johnson, M.E., and Fung, L.W. NMR analysis of secondary structure and dynamics of a recombinant peptide from the N-terminal region of human erythroid alpha-spectrin. *FEBS Lett* **485**, 81-6. (2000).
8. Eker, F., Griebenow, K., Cao, X., Nafie, L.A., and Schweitzer-Stenner, R. Preferred peptide backbone conformations in the unfolded state revealed by the structure analysis of alanine-based (AXA) tripeptides in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10054-9. (2004).
9. Andersen, N. H., Cao, B., and Chen, C. Peptide/protein structure analysis using the chemical shift index method: upfield alpha-CH values reveal dynamic helices and alpha L sites. *Biochem Biophys Res Commun* **184**, 1008-14. (1992).
10. Hruby, V. J., al-Obeidi, F., and Kazmierski, W. Emerging approaches in the molecular design of receptor-selective peptide ligands: conformational, topographical and dynamic considerations. *Biochem J* **268**, 249-62. (1990).
11. Giannis, A. and Kolter, T. Peptidomimetics for receptor ligands-discovery, development, and medical perspectives. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**(9), 1244-1267. (1993).
12. Gante, J. Peptidomimetics - tailored enzyme inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**(17), 1699-1720. (1994).
13. Hruby, V. J., Li, G., Haskell-Luevano, C., and Shenderovich, M. Design of peptides, proteins, and peptidomimetics in chi space. *Biopolymers* **43**, 219-66. (1997).
14. Damewood, J. R. Jr. Peptide mimetic-design with the aid of computational chemistry. *Reviews in Computational Chemistry* **9**, 1-80. (1996).
15. Nakai, S. and Alizadeh-Pasdar, N. Rational designing of bioactive peptides. *Nutr. Sci. Tech.* **4**, 565-582. (2006).

16. El Tayar, N., Karajiannis, H., and van de Waterbeemd, H. Structure-lipophilicity relationship of peptides and peptidomimetics. *Amino Acids* **8**(2), 125-139. (1995).
17. Douek, D. C., Kwong, P. D., and Nabel, G. J. The rational design of an AIDS vaccine. *Cell* **124**, 677-81. (2006).
18. Bursavich, M. G. and Rich, D. H. Designing non-peptide peptidomimetics in the 21st century: inhibitors targeting conformational ensembles. *J Med Chem* **45**, 541-58. (2002).
19. Rose, G. D., Gierasch, L. M., and Smith, J. A. Turns in peptides and proteins. *Adv Protein Chem* **37**, 1-109. (1985).
20. Hirschmann, R., Nicolaou, K. C., Pietranico, S., Salvino, J., and Leahy, E. M. Nonpeptidic peptidomimetics with a beta-D-glucose scaffolding. A partial somatostatin agonist bearing a close structural relationship to a potent, selective substance P antagonist. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9217-9218. (1992).
21. Hirschmann, R., Nicolaou, K. C., Pietranico, S., Leahy, E. M., and Salvino, J. De novo design and synthesis of somatostatin non-peptide peptidomimetics utilizing β -D-glucose as a novel scaffolding. **115**, 12550-12568. (1993).
22. Johannesson, P., Lindeberg, G., Tong, W., Gogoll, A., Karlen, A. and Hallberg, A. Bicyclic tripeptide mimetics with reverse turn inducing properties. *J Med Chem* **42**, 601-8. (1999).
23. Blomberg, D., Hedenstroem, M., Kreye, P., Sethson, I., Brickmann, K., and Kihlberg, J. Synthesis and Conformational Studies of a β -Turn Mimetic Incorporated in Leu-enkephalin. *J. Org. Chem.* **69**(10), 3500-3508. (2004).
24. Eguchi, M. and Kahn, M. Design, synthesis, and application of peptide secondary structure mimetics. *Mini Rev Med Chem* **2**, 447-62. (2002).
25. Kim, H. O., Nakanishi, H., Lee, M. S., and Kahn, M. Design and synthesis of novel conformationally restricted peptide secondary structure mimetics. *Org Lett* **2**, 301-2 (2000).
26. Kahn, M., Wilke, S., Chen, B., Fujita, K., Lee, Y. H. and Johnson, M. E. The design and synthesis of mimetics of peptide β -turns. *J Mol Recognit* **1**, 75-9. (1988).
27. Wilmot, C. M. and Thornton, J.M. Analysis and prediction of the different types of beta-turn in proteins. *J Mol Biol* **203**, 221-32. (1988).
28. Landau, N. R., Warton, M., and Littman, D. R. The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* **334**, 159-62. (1988).
29. Ashkenazi, A., Presta, L. G., Marsters, S. A., Camerato, T. R., Rosenthal, K. A., Fendly, B. M. and Capon, D. J. Mapping the CD4 binding site for human immunodeficiency virus by alanine-scanning mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7150-4. (1990).
31. Cluzeau, J. and Lubell, W. D. Design, synthesis, and application of azabicyclo[X.Y.0]alkanone amino acids as constrained dipeptide surrogates and peptide mimics. *Biopolymers* **80**, 98-150. (2005).

32. Halab, L., Gosselin, F., and Lubell, W. D. Design, synthesis, and conformational analysis of azacycloalkane amino acids as conformationally constrained probes for mimicry of peptide secondary structures. *Biopolymers* **55**, 101-22. (2000).
33. Hanessian, S., Balaux, E., Musil, D., Olsson, L. L., and Nilsson, I. Exploring the chiral space within the active site of alpha-thrombin with a constrained mimic of D-Phe-Pro-Arg-design, synthesis, inhibitory activity, and X-ray structure of an enzyme-inhibitor complex. *Bioorg Med Chem Lett* **10**, 243-7. (2000).
34. Plummer, J. S., Berryman, K. A., Cai, C., Cody, W. L., DiMaio, J., Doherty, A. M., Eaton, S., Edmunds, J. J., Holland, D. R., Lafleur, D., Levesque, S., Narasimhan, L. S., Rubin, J. R., Rapundalo, S. T., Siddiqui, M. A., Susser, A., St-Denis, Y. and Winocour, P. Potent and selective bicyclic lactam inhibitors of thrombin: Part 3: P1' modifications. *Bioorg Med Chem Lett* **9**, 835-40. (1999).
35. Maison, W. and Prenzel, A. H. G. P. Stereoselective Synthesis of Aza- and Diazabicyclo[X.Y.0]alkane Dipeptide Mimetics. *Synthesis* (7), 1031-1048. (2005).
36. Clackson, T. and Wells, J. A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **267**, 383-6. (1995).
37. Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531-4. (1996).
38. Erlanson, D.A., Braisted, A. C., Raphael, D. R., Randal, M., Stroud, R. M., Gordon, E. M. and Wells, J. A. Site-directed ligand discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9367-72. (2000).
39. Gadek, T. R., Burdick, D. J., McDowell, R. S., Stanley, M. S., Marsters, J. C. Jr., Paris, K. J., Oare, D. A., Reynolds, M. E., Ladner, C., Zioncheck, K. A., Lee, W. P., Gribling, P., Dennis, M. S., Skelton, N. J., Tumas, D. B., Clark, K. R., Keating, S. M., Beresini, M. H., Tilley, J. W., Presta, L. G. and Bodary, S. C. Generation of an LFA-1 antagonist by the transfer of the ICAM-1 immunoregulatory epitope to a small molecule. *Science* **295**, 1086-9. (2002).
40. Bella, J., Kolatkar, P. R., Marlor, C.W., Greve, J. M., and Rossmann, M. G. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4140-5. (1998).
41. Toogood, P. L. Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. *J Med Chem* **45**, 1543-58. (2002).
42. Centers for Disease Control and Prevention . *Morbid. Mortal. Wkly. Rep.* **30**, 250-252. 81.
43. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871. (1983).
44. Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., and Popovic,

- M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-867. (1983).
45. Barré-Sinoussi, F. HIV: a Discovery Opening the Road to Novel Scientific Achievements and Global Health Improvement. *Noble Lectures*. (2008).
46. Montagnier, L. 25 Years of Research on AIDS - Lessons and Prospects for Cure and Vaccine. *Noble Lectures*. (2008).
47. UNAIDS. AIDS Epidemic Update 2007. (2007).
48. UNAIDS. AIDS Epidemic Update 2008. (2008).
49. Wainberg, M. A. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *AIDS* **18**, 63-8. (2004).
50. Azevedo-Pereira, J. M., Santos-Costa, Q., and Moniz-Pereira, J. HIV-2 infection and chemokine receptors usage - clues to reduced virulence of HIV-2. *Curr HIV Res* **3**, 3-16. (2005).
51. Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J. F., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M. and Hahn, B. H. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* **313**, 523-6. (2006).
52. Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. and Weiss, R. A. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-7. (1984-1985).
53. Nara, P. L., Garrity, R. R., and Goudsmit, J. Neutralization of HIV-1: a paradox of humoral proportions. *FASEB J* **5**, 2437-55. (1991).
54. Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C. and Montagnier, L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-8. (1984-1985).
55. Wyatt, R. and Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-8. (1998).
56. Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N. and Gregory, T. J. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **265**, 10373-82. (1990).
57. Zhu, X., Borchers, C., Bienstock, R. J., and Tomer, K. B. Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry* **39**, 11194-204. (2000).
58. Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y. M., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. and Sodroski, J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**, 1949-53. (1998).

59. Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A. and Sodroski, J. G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705-11. (1998).
60. Wu, L., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A. A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. and Sodroski, J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-83. (1996).
61. Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. and Sodroski, J. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-48. (1996).
62. Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. and Berger, E. A. CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-8. (1996).
63. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. and Paxton, W. A. HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-73. (1996).
64. Trkola, A., Kuhmann, S. E., Strizki, J. M., Maxwell, E., Ketas, T., Morgan, T., Pugach, P., Xu, S., Wojcik, L., Tagat, J., Palani, A., Shapiro, S., Clader, J. W., McCombie, S., Reyes, G. R., Baroudy, B. M. and Moore, J. P. HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 395-400. (2002).
65. Freed, E. O., Myers, D. J., and Risser, R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4650-4. (1990).
66. Weiss, C.D. HIV-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition. *AIDS Rev* **5**, 214-21. (2003).
67. Cohen, J. Investigators detail HIV's fatal handshake. *Science* **274**, 502. (1996).
68. Markowitz, M., Louie, M., Hurley, A., Sun, E., Di Mascio, M., Perelson, A. S. and Ho, D. D. A novel antiviral intervention results in more accurate assessment of human immunodeficiency virus type 1 replication dynamics and T-cell decay in vivo. *J Virol* **77**, 5037-8. (2003).
69. Ramratnam, B., Bonhoeffer, S., Binley, J., Hurley, A., Zhang, L., Mittler, J. E., Markowitz, M., Moore, J. P., Perelson, A. S. and Ho, D. D. Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *Lancet* **354**, 1782-5. (1999).
70. Nowak, A. Die Zerstörung des Immunsystems durch HIV. *Spektrum der Wissenschaft* **3**. (1997).
71. Ho, S. H., Tasca, S., Shek, L., Li, A., Gettie, A., Blanchard, J., Boden, D. and Cheng-Mayer, C. Coreceptor switch in R5-tropic simian/human immunodeficiency virus-infected macaques.

- J Virol* **81**, 8621-33 (2007).
72. Polzer, S., Dittmar, M. T., Schmitz, H., Meyer, B., Muller, H., Krausslich, H. G. and Schreiber, M. Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology* **11**, 11-9. (2001).
 73. Dewhurst, S. and Whetter, L. Pathogenesis and treatment of HIV-1 infection: recent developments. *Front Biosci* **2**, 147-59. (1997).
 74. Kolata, G. FDA approves AZT. *Science* **235**, 1570. (1987).
 75. Castro, H. C., Loureiro, N. I., Pujol-Luz, M., Souza, A. M., Albuquerque, M. G., Santos, D. O., Cabral, L. M., Frugulhetti, I. C. and Rodrigues, C. R. HIV-1 reverse transcriptase: a therapeutical target in the spotlight. *Curr Med Chem* **13**, 313-24. (2006).
 76. O'Brien, W. A. 3rd. Saquinavir/Ritonavir: its evolution and current treatment role. *AIDS Read* **16**, 38-44; discussion 43 (2006).
 77. Martins, S., Ramos, M.J., and Fernandes, P.A. The current status of the NNRTI family of antiretrovirals used in the HAART regime against HIV infection. *Curr Med Chem* **15**, 1083-95. (2008).
 78. Sabin, C. A., Smith, C. J., Youle, M., Lampe, F. C., Bell, D. R., Puradiredja, D., Lipman, M. C., Bhagani, S., Phillips, A. N. and Johnson, M. A. Deaths in the era of HAART: contribution of late presentation, treatment exposure, resistance and abnormal laboratory markers. *AIDS* **20**, 67-71. (2006).
 79. Shafer, R. W. and Schapiro, J.M. HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. *AIDS Rev* **10**, 67-84. (2008).
 80. Rusconi, S., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., and Supuran, C.T. New advances in HIV entry inhibitors development. *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**, 339-55. (2004).
 81. Sterjovski, J., Churchill, M. J., Wesselingh, S. L., and Gorry, P. R. HIV-1 entry inhibitors: classes, applications and factors affecting potency. *Curr HIV Res* **4**, 387-400. (2006).
 82. Rusconi, S., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., and Supuran, C. T. An update in the development of HIV entry inhibitors. *Curr Top Med Chem* **7**, 1273-89. (2007).
 83. Redshaw, S. and Westby, M. Fusion/entry inhibitors as therapies for HIV. *Expert Opin Emerg Drugs* **6**, 209-24. (2001).
 84. Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G. and Parmentier, M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-5. (1996).
 85. Tsibris, A. M. and Kuritzkes, D. R. Chemokine antagonists as therapeutics: focus on HIV-1. *Annu Rev Med* **58**, 445-59. (2007).
 86. Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., DiMassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge,

- L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M. R., Nowak, M. A., Shaw, G. M. and Saag, M. S. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**, 1302-7. (1998).
87. Poveda, E., Briz, V., and Soriano, V. Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection. *AIDS Rev* **7**, 139-47. (2005).
88. Kirchhoff, F., Munch, J., Standker, L., Forssmann, W. G., and Adermann, K. Virus-inhibiting peptide (VIRIP) which inhibits a circulating virus in humans, isolation thereof, and therapeutic and diagnostic use thereof. *PCT Int. Appl.* 6 pp. (2001).
89. Munch, J., Standker, L., Adermann, K., Schulz, A., Schindler, M., Chinnadurai, R., Pohlmann, S., Chaipan, C., Biet, T., Peters, T., Meyer, B., Wilhelm, D., Lu, H., Jing, W., Jiang, S., Forssmann, W. G. and Kirchhoff, F. Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide. *Cell* **129**, 263-75. (2007).
90. Zou, Y. R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**, 595-9. (1998).
91. De Clercq, E. Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. *Mini Rev Med Chem* **5**, 805-24. (2005).
92. Donzella, G.A., Schols, D., Lin, S. W., Este, J. A., Nagashima, K. A., Maddon, P. J., Allaway, G. P., Sakmar, T. P., Henson, G., De Clercq, E. and Moore, J. P. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* **4**, 72-7. (1998).
93. Hatse, S., Princen, K., Bridger, G., De Clercq, E., and Schols, D. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett* **527**, 255-62. (2002).
94. Fransen, S., Bridger, G., Whitcomb, J. M., Toma, J., Stawiski, E., Parkin, N., Petropoulos, C. J. and Huang, W. Suppression of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 by the CXCR4 antagonist AMD3100 is associated with efficiency of CXCR4 use and baseline virus composition. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2608-15. (2008).
95. Trkola, A., Ketas, T. J., Nagashima, K. A., Zhao, L., Cilliers, T., Morris, L., Moore, J. P., Maddon, P. J. and Olson, W. C. Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J Virol* **75**, 579-88. (2001).
96. Baba, M., Nishimura, O., Kanzaki, N., Okamoto, M., Sawada, H., Iizawa, Y., Shiraishi, M., Aramaki, Y., Okonogi, K., Ogawa, Y., Meguro, K. and Fujino, M. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5698-703. (1999).
97. Palani, A., Shapiro, S., Clader, J. W., Greenlee, W. J., Cox, K., Strizki, J., Endres, M. and Baroudy, B. M. Discovery of 4-[(Z)-(4-bromophenyl)-(ethoxyimino)methyl]-1'-[(2,4-dimethyl-3-pyridinyl)carbonyl]-4'-methyl-1,4'-bipiperidine N-oxide (SCH 351125): an

- orally bioavailable human CCR5 antagonist for the treatment of HIV infection. *J Med Chem* **44**, 3339-42. (2001).
98. Hartley, O., Gaertner, H., Wilken, J., Thompson, D., Fish, R., Ramos, A., Pastore, C., Dufour, B., Cerini, F., Melotti, A., Heveker, N., Picard, L., Alizon, M., Mosier, D., Kent, S. and Offord, R. Medicinal chemistry applied to a synthetic protein: development of highly potent HIV entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16460-5. (2004).
99. Vermeire, K. and Schols, D. Anti-HIV agents targeting the interaction of gp120 with the cellular CD4 receptor. *Expert Opin Investig Drugs* **14**, 1199-212. (2005).
100. Strizki, J. Targeting HIV attachment and entry for therapy. *Adv Pharmacol* **56**, 93-120 (2008).
101. Wang, T., Zhang, Z., Wallace, O. B., Deshpande, M., Fang, H., Yang, Z., Zadjura, L. M., Tweedie, D. L., Huang, S., Zhao, F., Ranadive, S., Robinson, B. S., Gong, Y. F., Ricarrdi, K., Spicer, T. P., Deminie, C., Rose, R., Wang, H. G., Blair, W. S., Shi, P. Y., Lin, P. F., Colonno, R. J. and Meanwell, N. A. Discovery of 4-benzoyl-1-[(4-methoxy-1H-pyrrolo[2,3- β]pyridin-3-yl)oxoacetyl]-2- (R)-methylpiperazine (BMS-378806): a novel HIV-1 attachment inhibitor that interferes with CD4-gp120 interactions. *J Med Chem* **46**, 4236-9. (2003).
102. Lin, P. F., Blair, W., Wang, T., Spicer, T., Guo, Q., Zhou, N., Gong, Y. F., Wang, H. G., Rose, R., Yamanaka, G., Robinson, B., Li, C. B., Fridell, R., Deminie, C., Demers, G., Yang, Z., Zadjura, L., Meanwell, N. and Colonno, R. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11013-8. (2003).
103. Kong, R., Tan, J. J., Ma, X.H., Chen, W. Z., and Wang, C. X. Prediction of the binding mode between BMS-378806 and HIV-1 gp120 by docking and molecular dynamics simulation. *Biochim Biophys Acta* **1764**, 766-72. (2006).
104. Madani, N., Schon, A., Princiotta, A. M., Lalonde, J. M., Courter, J. R., Soeta, T., Ng, D., Wang, L., Brower, E. T., Xiang, S. H., Do Kwon, Y., Huang, C. C., Wyatt, R., Kwong, P. D., Freire, E., Smith, A. B. 3rd and Sodroski, J. Small-molecule CD4 mimics interact with a highly conserved pocket on HIV-1 gp120. *Structure* **16**, 1689-701. (2008).
105. Yang, Z., Zadjura, L., D'Arienzo, C., Marino, A., Santone, K., Klunk, L., Greene, D., Lin, P. F., Colonno, R., Wang, T., Meanwell, N. and Hansel, S. Preclinical pharmacokinetics of a novel HIV-1 attachment inhibitor BMS-378806 and prediction of its human pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos* **26**, 387-402. (2005).
106. Schon, A., Madani, N., Klein, J. C., Hubicki, A., Ng, D., Yang, X., Smith, A. B. 3rd, Sodroski, J. and Freire, E. Thermodynamics of binding of a low-molecular-weight CD4 mimetic to HIV-1 gp120. *Biochemistry* **45**, 10973-80. (2006).
107. Si, Z., Madani, N., Cox, J. M., Chroma, J. J., Klein, J. C., Schon, A., Phan, N., Wang, L., Biorn, A. C., Cocklin, S., Chaiken, I., Freire, E., Smith, A. B. 3rd and Sodroski, J. G. Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral

- envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5036-41. (2004).
108. Richard J. Epstein. Human molecular biology. 204-208. (2003).
 109. Kwong, P. D., Wyatt, R., Majeed, S., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure Fold Des* **8**, 1329-39. (2000).
 110. Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648-59. (1998).
 111. Huang, C. C., Tang, M., Zhang, M. Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R. L., Dimitrov, D. S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I. A., Wyatt, R. and Kwong, P. D. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **310**, 1025-8. (2005).
 112. Myszka, D. G., Sweet, R. W., Hensley, P., Brigham-Burke, M., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., Wyatt, R., Sodroski, J. and Doyle, M. L. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9026-31. (2000).
 113. Xie, H., Ng, D., Savinov, S. N., Dey, B., Kwong, P. D., Wyatt, R., Smith, A. B. 3rd and Hendrickson, W. A. Structure-activity relationships in the binding of chemically derivatized CD4 to gp120 from human immunodeficiency virus. *J Med Chem* **50**, 4898-908. (2007).
 114. Wülfken, J. Entwicklung CD4 bindender Peptide als Inhibitoren der HIV-Infektion. Doktorarbeit, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Hamburg, 168. (2001).
 115. Mayer, M. and Meyer, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **38**, 1784-1788. (1999).
 116. Pollard, S. R., Rosa, M. D., Rosa, J. J. and Wiley, D. C. Truncated variants of gp120 bind CD4 with high affinity and suggest a minimum CD4 binding region. *EMBO J* **11**, 585-91. (1992).
 117. Syu, W. J., Huang, J.H., Essex, M., and Lee, T.H. The N-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 contains potential binding sites for CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3695-9. (1990).
 118. Olshevsky, U., Helseth, E., Furman, C., Li, J., Haseltine, W. and Sodroski, J. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J Virol* **64**, 5701-7. (1990).
 119. Lasky, L. A., Nakamura, G., Smith, D. H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T. and Capon, D. J. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**, 975-85. (1987).
 120. Dowbenko, D., Nakamura, G., Fennie, C., Shimasaki, C., Riddle, L., Harris, R., Gregory, T. and Lasky, L. Epitope mapping of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 with monoclonal antibodies. *J Virol* **62**, 4703-11. (1988).

121. Neffe, A. T. and Meyer, B. A peptidomimetic HIV-entry inhibitor directed against the CD4 binding site of the viral glycoprotein gp120. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 2937-40. (2004).
122. Neffe, A. T., Bilanz, M., Gruneberg, I., and Meyer, B. Rational optimization of the binding affinity of CD4 targeting peptidomimetics with potential anti HIV activity. *J Med Chem* **50**, 3482-8. (2007).
123. Neffe, A. T., Bilanz, M., and Meyer, B. Synthesis and optimization of peptidomimetics as HIV entry inhibitors against the receptor protein CD4 using STD NMR and ligand docking. *Org Biomol Chem* **4**, 3259-67. (2006).
124. Neffe, A. T. Design, Synthese und Analyse CD4-bindender Peptidomimetika. Doktorarbeit, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Hamburg , 198. (2004).
125. Wüthrich, K. NMR of proteins and nucleic acids. Wiley-Interscience, New York. (1986).
126. Karplus, M. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J Chem Phys* **30**, 11-15. (1959).
127. Ramachandran, G. N. and Sasisekharan, V. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem* **23**, 283-438. (1968).
128. Havel, T. and Wüthrich, K. A distance geometry program for determining the structures of small proteins and other macromolecules from nuclear magnetic resonance measurements of intramolecular proton-proton proximities in solution. *Bull Math Biol* **46**, 673-698. (1984).
129. Guntert, P., Mumenthaler, C., and Wuthrich, K. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J Mol Biol* **273**, 283-98. (1997).
130. Benedetti, E., Morelli, G., Nemethy, G., and Scheraga, H.A. Statistical and energetic analysis of side-chain conformations in oligopeptides. *Int J Pept Protein Res* **22**, 1-15. (1983).
131. Turbadar, T. Complete Absorbtion of Light by Thin Metal Films. *Proc Phys Soc* **73**, 40. (1959).
132. Kretschmann, E. and Raether, H. Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons excited by light. *Z Naturf* **230**, 2135. (1968).
133. Otto, A. Eine neue Methode der Anregung nichtstrahlender Oberflächenplasmonenschwingungen. *Phys Stat Sol* **26**, 99-101. (1968).
134. Otto, A. Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection. *Zeitschrift für Physik* **216**, 398-400. (1968).
135. Jonsson, U., Fagerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H., and Ronnberg, I. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **11**, 620-7. (1991).
136. Pattnaik, P. Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. *Appl Biochem Biotechnol* **126**, 79-92. (2005).
137. Xing, L., Tjarnlund, K., Lindqvist, B., Kaplan, G. G., Feigelstock, D., Cheng, R. H. and Casasnovas, J. M. Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *EMBO*

- J* **19**, 1207-16. (2000).
138. Holmes, S. D., May, K., Johansson, V., Markey, F., and Critchley, I. A. A. Studies on the interaction of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis* with fibronectin using surface plasmon resonance. *J Micro Methods* **28**, 77-84. 97.
 139. Quinn, J. G., O'Neill, S., Doyle, A., McAtamney, C., Diamond, D., MacCraith, B. D. and O'Kennedy, R. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal Biochem* **281**, 135-43. (2000).
 140. Myszka, D. G., Morton, T.A., Doyle, M.L., and Chaiken, I.M. Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. *Biophys Chem* **64**, 127-37. (1997).
 141. Nieba, L., Krebber, A., and Pluckthun, A. Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* **234**, 155-65 (1996).
 142. Wilhelm, D. Synthese neuer Dipeptid-mimetischer Bausteine für Inhibitoren der CD4/GP120 Wechselwirkung. Universität Hamburg, Hamburg. (2004).
 143. Skiles, J. W., Miao, C., Sorcek, R., Jacober, S., Mui, P. W., Chow, G., Weldon, S. M., Possanza, G., Skoog, M., and Keirns, J. Inhibition of human leukocyte elastase by N-substituted peptides containing α,α -difluorostatone residues at P1. *J. Med.chem.* **35**, 4795-808. (1992).
 144. Kaiser, M., Siciliano, C., Assfalg-Machleidt, I., Groll, M., Milbradt, A. G., and Moroder, L. Synthesis of a TMC-95A Ketomethylene Analogue by Cyclization via Intramolecular Suzuki Coupling. *Org. Lett.* **5**, 3435-3437. (2003).
 145. Loidl, G. Dissertation, Universität München, München. (1999).
 146. Takita, T., Umezawa, Y., Saito, S., Morishima, H., Naganawa, H., Umezawa, H., Tsuchiya, T., Miyake, T., and Kageyama, S. Total synthesis of bleomycin A2. *Tetrahedron Lett* **23**, 521-524. (1982).
 147. Humphries, M. E., Murphy, J., Phillips, A. J., and Abell, A. D. Synthesis of Functionalized Piperidinones. *J. Org. Chem.* **68**, 2432-2436. (2003).
 148. Alexander, K., Cook, S., Gibson, C.L., and Kennedy, A.R. Highly effective and recyclable chiral auxiliaries: a study of the synthesis and use of three 4-isopropyl-5,5-diaryloxazolidin-2-ones. *J Chem Soc, Perkin Trans I* 1538-1549. (2001).
 149. Jakopin, Z., Roskar, D., and Dolenc, M.S. Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles as peptidomimetic building blocks. *Tetrahedron Lett* **48**, 1465-1468. (2007).
 150. Adrio, J., Cuevas, C., Manzanares, I., and Joullie, M.M. Synthesis and Biological Evaluation of Tamandarin B Analogues. *Organic Lett* **8**, 511-514. (2006).
 151. Belov, V. N. , Mueller, M., Ignatenko, O., Hallier, E., and de Meijere, A. Facile access to isotopically labelled valylleucyl anilides as biomarkers for the quantification of hemoglobin

- adducts to toxic electrophiles. *European Journal of Organic Chemistry* 5094-5099. (2005).
152. Qabar, M. N., Urban, J., and Kahn, M. A facile solution and solid phase synthesis of phosphotyrosine mimetic image-4-[diethylphosphono(difluoromethyl)]-phenylalanine (F2Pmp(EtO)₂) derivatives. *Tetrahedron* **53**, 11171-11178. (1997).
153. Kim, S. W., Hong, C.Y., Lee, K., Lee, E.J., and Koh, J.S. Solid phase synthesis of benzylamine-derived sulfonamide library. *Bioorg Med Chem Lett* **8**, 735-738. (1998).
154. Paruszewski, R., Jaworski, P., Winiecka, I., Tautt, J., and Dudkiewicz, J. New renin inhibitors with hydrophilic C-terminus. *Pharmazie* **54**, 102-6. (1999).
155. Almquist, R. G., Chao, W.-R., Judd, A. K., Mitoma, C., Rossi, D. J., Panasevich, R. E. and Mattews, R. J. Synthesis and biological activity of ketomethylene-containing nonapeptide analogs of snake venom angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Med Chem* **31**, 561-567. (1988).
156. Deng, J., Hamada, Y., Shioiri, T.M.S., and Fusetani, N. Synthesis of Cyclotheonamide B and Its Derivatives. *Angew Chem Int Ed Engl* **33**, 1729-1731. (1994).
157. Xue, C. B. and DeGrado, W.F. Novel Synthesis of N-methyl-arginine and N-methyl-ornithine derivatives. *Tetrahedr Lett* **36**, 55-58. (1995).
158. Boger, D. L. and Yohannes, D. Studies on the total synthesis of bouvardin and deoxybouvardin: cyclic hexapeptide cyclization studies and preparation of key partial structures. *J Org Chem* **53**, 487-499. (1988).
159. Chen, B.-C., Skoumbourdis, A. P., Guo, P., Bednarz, M. S., Kocy, O. R., Sundeen, J. E. and Vite, G. D. A Facile Method for the Transformation of N-(tert-Butoxycarbonyl) α -Amino Acids to N-Unprotected α -Amino Methyl Esters. *J Org Chem* **64**, 9294-9296. (1999).
160. Dondoni, A., Perrone, D., and Merino, P. Chelation- and Non-chelation-Controlled Addition of 2-(Trimethylsilyl)thiazole to α -Amino Aldehyds: Stereoselective Synthesis of β -Amino- α -hydroxy Aldehyde Intermediate for the Preparation of the Human Immunodeficiency Virus Prtoteinase Inhibitor Ro 31-8959. *J Org Chem* **60**, 8074-8080. (1995).
161. Vasbinder, M. M. and Miller, S. J. Synthesis of the Pro-Gly Dipeptide Alkene Isostere Using Olefin Cross-Metathesis. *J. Org. Chem.* 67(17), 6240-6242. 2002.
162. Chatterjee, A.K., Choi, T.-L., Sanders, D.P., and Grubbs, R.H. A General Model for Selectivity in Olefin Metathesis. *Journal of American Chemical Society* **125**, 11360-11370 (2003).
163. Moeller, H. NMR-gestütztes Design neuer anti-HIV-Wirkstoffe. 2003. Hamburg, Hamburg.
164. Behnken, H. Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen zur Optimierung von Entry-Inhibitoren des HIV-1. 2009. Hamburg, Universität Hamburg.
165. Rasshofer, W., Mueller, W. M., and Voegtle, F. Ligand structure and complexation. XL. Noncyclic crown ether type esters and their metal ion complexes. *Chem. Ber.* **112**, 2095-119. (1979).

166. Carpino, L.A. and Han, G.Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonylamino-protecting group. *J. Or Chem.* **37**, 3404-9 (1972).
167. Carpino, L. A., Imazumi, H., El-Faham, A., Ferrer, F. J., Zhang, C., Lee, Y., Foxman, B. M., Henklein, P., Hanay, C., Muegge, C., Wenschuh, H., Klose, J., Beyermann, M. and Bienert, M. The Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salt. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 441-445. (2002).
168. König, W. and Geiger, R. A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additive]. *Chem Ber* **103**, 788-98 (1970).
169. Baghurst, D. R. and Mingos, D.M.P. Tilden Lecture. Applications of microwave dielectric heating effects to synthetic problems in chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **20**, 1-47. (1991).
170. Gabriel, C., Gabriel, S., Grant, E.H., Halstead, B.S.J., and Mingos, D.M.P. Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chem. Soc. Rev.* **27**, 213-223 (1998).
171. Stuerge, D. and Delmotte. Microwaves in organic synthesis. In Loupy, A. (ed.) Wiley-VCH, Weinheim (2002).
172. Santagada, V., Frecentese, F., Perissutti, E., Fiorino, F., Severino, B. and Caliendo, G. Microwave assisted synthesis: a new technology in drug discovery. *Mini Rev Med Chem* **9**, 340-58. (2009).
173. Katritzky, A. R., Khashab, N. M., Yoshioka, M., Haase, D. N., Wilson, K. R., Johnson, J. V., Chung, A. and Haskell-Luevano, C. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis utilizing N-Fmoc-protected (α -aminoacyl)benzotriazoles. *Chem Biol Drug Des* **70**, 465-8. (2007).
174. Kappe, C.O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 6250-84. (2004).
175. Boeijen, A., van Ameijde, J., and Liskamp, R.M. Solid-phase synthesis of oligopeptide mimetics employing the Fmoc protection strategy. *J Org Chem* **66**, 8454-62. (2001).
176. Rodriguez, M., Llinares, M., Doulut, S., Heitz, A., and Martinez, J. A Facile Synthesis of Chiral N-Protected β -Amino Alcohols. *Tetrahedr Lett* **32**, 923-926. (1991).
177. Kokotos, G. A Convenient One-Pot Conversion of N-Protected Amino Acids and Peptides into Alcohols. *Synthesis* **35**, 299-301. (1990).
178. Stanfield, C F., Parker, J E., and Kanellis, P. Synthesis of Protected Amino Alcohols: A Comparative Study. *J Org Chem* **46**, 4799-4800. (1981).
179. Duggan, M. E. and Imagire, J. S. Copper(I) Chloride Catalyzed Addition of Alcohols to Alkyl Isocyanates. A Mild and Expedient Method for Alkyl Carbamate Formation. *Synthesis* **20**, 131-132. (1989).
180. Trost, B. M. and Sudhaker, A. R. Cis Hydroxyamination Equivalent. Application to the Synthesis of (-)-acosamine. *J Am Chem Soc* **109**, 3792-3794. (1987).

181. Kauch, M., Snieckus, V., and Hoppe, D. Substitution of hydroxybiaryls via directed ortho-lithiation of N-silylated O-aryl N-isopropylcarbamates. *J Org Chem* **70**, 7149-58. (2005).
182. Gillespie, R. J., Cliffe, I. A., Dawson, C. E., Dourish, C. T., Gaur, S., Jordan, A. M., Knight, A. R., Lerpiniere, J., Misra, A., Pratt, R. M., Roffey, J., Stratton, G. C., Upton, R., Weiss, S. M. and Williamson, D. S. Antagonists of the human adenosine A2A receptor. Part 3: Design and synthesis of pyrazolo[3,4- δ]pyrimidines, pyrrolo[2,3- δ]pyrimidines and 6-arylpurines. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 2924-9. (2008).
183. Barlos, K., Gatos, D., Kapolos, S., Poulos, C., Schafer, W. and Yao, W. Q. Application of 2-chlorotrityl resin in solid phase synthesis of (Leu15)-gastrin I and unsulfated cholecystokinin octapeptide. Selective O-deprotection of tyrosine. *Int J Pept Protein Res* **38**, 555-61. (1991).
184. Bollhagen, R., Schmiedberger, M., Kleomenis, B., and Grell, E. A New Reagent for the Cleavage of fully protected peptides synthesised on 2-Chlorotrityl Chloride Resin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 2559-2560. 94.
185. Osapay, G., Prokai, L., Kim, H. S., Medzihradzky, K. F., Coy, D. H., Liapakis, G., Reisine, T., Melacini, G., Zhu, Q., Wang, S. H., Mattern, R. H. and Goodman, M. Lanthionine-somatostatin analogs: synthesis, characterization, biological activity, and enzymatic stability studies. *J Med Chem* **40**, 2241-51. (1997).
186. Pinter, A. and Honnen, W. J. A sensitive radioimmunoprecipitation assay for human immunodeficiency virus (HIV). *J Immunol Methods* **112**, 235-41. (1988).
187. Kolchinsky, P., Kiprilov, E., Bartley, P., Rubinstein, R., and Sodroski, J. Loss of a single N-linked glycan allows CD4-independent human immunodeficiency virus type 1 infection by altering the position of the gp120 V1/V2 variable loops. *J Virol* **75**, 3435-43. (2001).
188. Van Rompay, K. K., Greenier, J. L., Cole, K. S., Earl, P., Moss, B., Steckbeck, J. D., Pahar, B., Rourke, T., Montelaro, R. C., Canfield, D. R., Tarara, R. P., Miller, C., McChesney, M. B. and Marthas, M. L. Immunization of newborn rhesus macaques with simian immunodeficiency virus (SIV) vaccines prolongs survival after oral challenge with virulent SIVmac251. *J Virol* **77**, 179-90. (2003).
189. Wolk, T. and Schreiber, M. N-Glycans in the gp120 V1/V2 domain of the HIV-1 strain NL4-3 are indispensable for viral infectivity and resistance against antibody neutralization. *Med Microbiol Immunol* **195**, 165-72. (2006).
190. Meinjohanns, E., Meldal, M., Paulsen, H., Dwek, R.A., and Bock, K. Novel sequential solid-phase synthesis of N-linked glycopeptides from natural sources. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* 549-560. (1998).
191. Likhosherstov, L. M., Piskarev, V.E., Derevitskaia, V.A., and Kochetkov, N.K. Synthesis of N-glycoproteins with a native type of carbohydrate-peptide bond. *Bioorg Khim* **16** , 124-6. (1990).
192. Meyer, S. Synthese und Konformationsanalyse von V3-Glycopeptiden des gp120 aus dem

- HIV. Hamburg, Universität Hamburg, (1999).
193. Hyde, C., Johnson, T., Owen, D., Quibell, M., and Sheppard, R.C. Some 'difficult sequences' made easy. A study of interchain association in solid-phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res* **43**, 431-40. (1994).
 194. Dettin, M., Pegoraro, S., Rovero, P., Bicciato, S., Bagnò, A. and Di Bello, C. SPPS of difficult sequences. A comparison of chemical conditions, synthetic strategies and on-line monitoring. *J Pept Res* **49**, 103-11. (1997).
 195. McNamara, J. F., Lombardo, H., Pillai, S. K., Jensen, I., Albericio, F. and Kates, S. A. An efficient solid-phase strategy for the construction of chemokines. *J Pept Sci* **6**, 512-8. (2000).
 196. Bacsa, B., Horvati, K., Bosze, S., Andreae, F., and Kappe, C.O. Solid-Phase Synthesis of Difficult Peptide Sequences at Elevated Temperatures: A Critical Comparison of Microwave and Conventional Heating Technologies. *J. Org. Chem.* **73**, 7532-7542. (2008).
 197. Flüge, C. Einfluss der Glycosylierung auf Struktur und Bindungsverhalten der dritten variablen Loop des HIV-1 Glycoproteins GP120. Universität Hamburg, Hamburg. (2007).
 198. Tost, J. Synthese von N-Typ-Glycopetiden aus dem V3-Bereich des HIV-1 Glycoproteins GP120 und Untersuchung ihrer CCR5 Korezeptorspezifität. Universität Hamburg, Hamburg. (2005).
 199. Fehrentz, J.-A., Califanol, J.-C., Amblard, M., Loffet, A., and Martinez, J. Synthesis of Chiral N-Protected β -Amino Alcohols by the Use of UNCAs. *Tetrahedr Lett* **35**, 569-571. (1994).
 200. El Kaim, L., Grimaud, L., Lee, A., Perroux, Y., and Tirla, C. First carbamates conversion to amides by simple alkyl group transfer from trialkylalanes. *Org Lett* **6**, 381-3. (2004).
 201. Spino, C., Joly, M.A., Godbout, C., and Arbour, M. Ti-catalyzed reactions of hindered isocyanates with alcohols. *J Org Chem* **70**, 6118-21. (2005).
 202. Cameron, L. R., Holder, J. L., Meldal, M., and Sheppard, R. C. Peptide synthesis. Part 13. Feedback control in solid phase synthesis. Use of fluorenylmethoxycarbonyl amino acid 3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl esters in a fully automated system. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **17**, 2895-2901. (1988).
 203. Lis, H. and Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem Rev* **98**, 637-674. (1998).
 204. Safonov, I.G., Heerding, D. A., Keenan, R. M., Price, A. T., Erickson-Miller, C. L., Hopson, C. B., Levin, J. L., Lord, K. A. and Tapley, P. M. New benzimidazoles as thrombopoietin receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 1212-6. (2006).
 205. Neres, J., Bonnet, P., Edwards, P. N., Kotian, P. L., Buschiazzi, A., Alzari, P. M., Bryce, R. A. and Douglas, K. T. Benzoic acid and pyridine derivatives as inhibitors of Trypanosoma cruzi trans-sialidase. *Bioorg Med Chem* **15**, 2106-19. (2007).
 206. Rehders, D. Aufklärung der Interaktion zwischen dem humanen Prionenprotein und dem peptidischen Aggregationsinhibitor NMHRYPNQ. Hamburg, Universität Hamburg (2009).

207. Gasteiger, J. and Marsili M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity: a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **36**, 3219-22. (1980).
208. Gasteiger, J. and Marsili M. Prediction of proton magnetic resonance shifts: the dependence on hydrogen charges obtained by iterative partial equalization of orbital electronegativity. *Organ Magn Reson* **15**, 353-60. (1981).

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einer Vielzahl von Personen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern, Horst und Anette, meinem Bruder André, sowie meiner gesamten Familie, für deren langjährige, bedingungslose Unterstützung und das Vertrauen in mich. Ich liebe Euch!

Meinen Freunden Mark, Marc, Kai und Karsten für die jahrelange Freundschaft, die durch Dick und Dünn hält und keine Grenzen kennt. Danke!

Meinen Freunden Tobias und Christian, mit denen mich mehr verbindet als nur unser gemeinsamer Dialekt!

Jan Wülfken und Axel Neffe für ihre hervorragenden Arbeiten, die diese Doktorarbeit erst ermöglichten.

Meinen unzähligen Praktikanten, speziell Dr. Nicolas Gisch (meinem Ersten), meinem Schwerpunktpraktikanten Moritz Waldmann, sowie Jessica Franke und Miriam Kötzler (meinen Letzten) ohne deren unermüdlichen Einsatz die Arbeit im Labor sicher nicht so viel Spaß gemacht hätte und für so manche Säule.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich Dirk Rehders, Katharina Wallach, Martin Hollinger und Moritz Waldmann danken.

Allen Mitarbeitern des AK Meyer, die mir während der gesamten Arbeitszeit immer mit einem offenen Ohr und viel Geduld zur Seite standen, im Besonderen:

Dirk Rehders für die Unmengen an fachlichen und persönlichen Gespräche und so manchen Geist der Friesen, der uns durchdrang und zu neuen Ideen inspirierte.

Moritz Waldmann für die Tatsache, dass er mit einer Neugier an Dinge rangeht, die ich lange nicht mehr erlebt habe und für die gute Stimmung, die so manche Wände zum Einstürzen bringen kann.

Katharina Wallach für die vielen Gespräche, die ich nicht missen möchte. Außerdem dafür, dass ohne die organisatorische Hand so manche Dinge im AK im Chaos versinken würden.

Robin Job dafür, dass ich mit ihm seit elf Jahren diese Institution besuchen darf und er einfach ein liebenswerter Mensch ist, wenn die Sache mit der Soße nicht wäre.

Anna-Winona Struck dafür, dass sie meine Lieblingstutanden war und ist. Genauso dafür, dass ich kaum einen Menschen kenne, der sich so um andere Menschen sorgt.

Kathrin Althof für die gemeinsame verrückte Zeit in der Höhle des Wahnsinns, dem Labor 11. Es war und ist immer ein Spaß gewesen mit und neben Dir zu arbeiten.

Katrin Schäfer möchte ich danken, dass Sie die Synthese-Fahne der Arbeitsgruppe hochhält, sowie für die Diskussionen über die eine oder andere Synthese-Problematik.

Beatrice Jürs für das viele Lachen beim Lesen und dafür, dass Sie ein wenig musikalische Frische in den AK gebracht hat. P.S. Zucker sind gar nicht so schlimm.

Ilona Grüneberg für die Unmengen an Synthesen, Säulen, MS- und NMR-Spektren, die Sie in meinem Namen zu verantworten hatte. Für den kleinen Schluck Spülwasser und für ein immer offenes Ohr.

Kolja Klein dafür, dass ich selten einen Menschen erlebt habe, der eine solche Ruhe ausstrahlt. Danke für das Einführen des „Goofy“-Effekts und für die ach so vielen Gespräche in der Bahn und bei der Ampel.

Dr. Thomas Hackl für ein unglaublich analytisch arbeitendes Gehirn. Dafür, dass er immer ein offenes Ohr für einen Synthetiker hat, auch ab von den fachspezifischen Problemen.

Henning Behnken dafür, dass er in den AK gekommen ist und mit auf dem Thema gearbeitet hat. Für die fachlichen und auch persönlicheren Gespräche.

Allen anderen Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppe B. Meyer für die Gerätebetreuung, das Fachwissen oder die angenehme Arbeitsatmosphäre: Alexander Buschke, Karsten Winkel, Miriam Kötzler, Meike Fellenberg, Karolina Elzholz, Lars Fischer, Christian Flügge, Atillâ Coksezen, Birgit Claasen, Jan-Christoph Westermann, Marco Axmann, Mirko Lindner, Thomas Kühnemund, Martin Hollinger, Britta Hünnefeld, Boris Kröplien, Karolina Poc, Vera Leitmann, Svenja Scheid, Jutta Tost.

Bei allen Professoren, Doktoranden und Mitarbeitern des Departments Chemie möchte ich mich für Ihre tatkräftige Unterstützung bedanken.

Last but not least Alexander Prenzel und Michael Stolzenburg für die so vielen Skatrunden, die vielen schönen Gespräche und *Tastings* in der Uni, in Hamburg und in Kopenhagen.

11 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name Dennis Wilhelm
Geburtstag/-ort 23.10.1977, Hamburg
Familienstand ledig

AUSBILDUNG

- Seit 10/2004 **Doktorarbeit**
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bernd Meyer, Department für Chemie,
Universität Hamburg
Titel: *“Design, Synthese und Analyse CD4 bindender Peptide,
Glycopeptide und deren Mimetika als HIV-Entry-Inhibitoren”*
Voraussichtlicher Abschluss Oktober 2009
- 10/2003 – 07/2004 **Diplomarbeit**
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bernd Meyer, Department für Chemie,
Universität Hamburg
Titel: *“Synthese neuer Dipeptid-mimetischer Bausteine für die
Synthese von Inhibitoren der CD4/gp120 Wechselwirkung”* (Note:
Sehr gut)
- 01/2001 – 09/2003 **Hauptstudium der Chemie**
Schwerpunktfach: Anorganische Chemie
Wahlpflichtfach: Biochemie,
Abschluss mit mündlicher Prüfung,
Diplom (Note: Sehr gut)
- 10/1998 – 01/2001 **Grundstudium der Chemie**
Abschluss mit mündlicher Prüfung,
Vordiplom (Note: Gut)
- 09/1997 – 06/1998 **Grundwehrdienst**
Panzergrenadierbataillon 6./72
- 08/1988 – 07/1997 **Gymnasium**
Gymnasium Farmsen, Abschluss: Abitur (Note: 2.1)

ANSTELLUNGSVERHÄLTNISSE

- 10/2008 – 02/2009 **Lehrbeauftragter für Studenten der Medizin**
Institut für organische Chemie, Universität Hamburg
- 03/2007 **Patent Recherché Projekt**
IP-Bewertungs AG, Hamburg
- 02/2006 - 08/2007 **Lehrbeauftragter für Studenten der Chemie**
Institut für organische Chemie, Universität Hamburg
- Seit 05/2005 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Institut für organische Chemie, Universität Hamburg
Betreuung von studentischen Forschungsprojekten
- 10/2004 – 04/2005 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
SFB 470: Glycostrukturen und Biosysteme, Universität Hamburg
Betreuung und Wartung unterschiedlicher HPLC-Systeme und eines
MALDI-TOF-MS-Systems
- 11/2003 – 12/2003 **Studentische Hilfskraft**
NMR basierte Untersuchung von Peptid-Fragmenten
Alepharma oHG, Hamburg
- 04/2001 – 10/2003 **Studentische Hilfskraft**
Laborassistent, Planung von Arbeitsgruppen-Seminaren
Institut für anorganische Chemie, Universität Hamburg
- 10/1998 – 04/2000 **Tutorium**
Betreuung von Studienanfängern
Department der Chemie, Universität Hamburg

Artikel in Fachzeitschriften

Munch, J.; Standker, L.; Adermann, K.; Schulz, A.; Schindler, M.; Chinnadurai, R.; Pohlmann, S.; Chaipan, C.; Biet, T.; Peters, T.; Meyer, B.; Wilhelm, D.; Lu, H.; Jing, W.; Jiang, S.; Forssmann, W.-G.; Kirchhoff, F. (2007), *CELL*, 129, 263-275.

Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide

Wilhelm, D.; Neffe, A.T., Meyer, B.

HIV entry inhibitors: Improved protease stability and enhanced CD4 binding affinity by use of new dipeptide mimetics.

In Bearbeitung

Poster

Axmann, M.; Claasen, B.; Dohjan, J.; Hollinger, M.; Hünnefeld, B.; Kühnemund, T.; Lindner, M.; Scherres, W.; Tost, J.; Wallach, K.; Wilhelm, D. (2006); Begutachtung des SFB 470 „Glycostrukturen und Biomoleküle“, Hamburg, 03-05.02.2006.

Die Rolle der Glycosilierung bei der Erkennung von HIV Epitopen durch die Chemokin Rezeptoren CCR5 und CXCR4 und durch den CD4 Rezeptor.

Vorträge

Wilhelm, D., 4th german-polish workshop (2006), Hamburg, 7th-9th July.
Synthesis and analysis of new CD4 binding peptidomimetics.

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen, als die von mir genannten Quellen verwendet habe. Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in veränderter Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Hamburg, den 14.09.2009

Dennis Wilhelm