



NMR-gestütztes Design neuer anti-HIV-Wirkstoffe

Synthese, Struktur und Bindung von Peptidmimetika
als Inhibitoren der GP120/CD4 Interaktion

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Heiko Möller

aus Wedel



Universität Hamburg

2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans Paulsen

Tag der letzten Prüfung: 1.4.2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis November 2002 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. C. Meier, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die Überlassung des Themas, für die wertvolle und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und für insgesamt fast fünf sehr anregende Jahre in seiner Gruppe.

...In another experiment, I laid out a lot of glass microscope slides, and got the ants to walk on them, back and forth, to some sugar I put on the windowsill. Then, by replacing an old slide with a new one, or by rearranging the slides, I could demonstrate that the ants had no sense of geometry: they couldn't figure out where something was. If they went to the sugar one way, and there was a shorter way back, they would never figure out the short way.

It was also pretty clear from rearranging the glass slides that the ants left some sort of trail. So then came a lot of easy experiments to find out how long it takes a trail to dry up, whether it can be easily wiped off, and so on. I also found out the trail wasn't directional. If I'd pick up an ant on a piece of paper, turn him around and around, and then put him back onto the trail, he wouldn't know that he was going the wrong way until he met another ant. (Later, in Brazil, I noticed some leaf-cutting ants and tried the same experiment on them. They could tell, within a few steps, whether they were going toward the food or away from it – presumably from the trail, which might be a series of smells in a pattern: A, B, space. A, B, space, and so on.)...

aus „Surely You're Joking, Mr. Feynman!“
Adventures of a Curious Character
von Richard P. Feynman
W. W. Norton & Company, 1985

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 HIV und AIDS	1
1.1.1 Die HIV-Infektion	2
1.1.2 Die Bekämpfung der HIV-Infektion	7
1.2 Molekularer Mechanismus des HIV-Entry	10
1.2.1 Beteiligte Proteine	10
1.2.2 Die Wechselwirkung von GP120 mit CD4 und dem Co-Rezeptor . . .	13
1.2.3 Die Membranfusion	16
1.2.4 HIV-Entry-Inhibitoren	17
1.3 Die peptidische Leitstruktur NMWQKVGTP	20
2 Methoden	25
2.1 <i>Saturation Transfer Difference</i> NMR Spektroskopie	25
2.2 <i>Molecular Modelling</i>	30
2.2.1 <i>Receptor-based Drug Design</i>	30
2.3 Festphasenpeptidsynthese	33
2.4 <i>Surface Plasmon Resonance</i>	35
3 Problemstellung	41

4	Ergebnisse und Diskussion	43
4.1	Rationales Ligandendesign	43
4.1.1	Auswahl unnatürlicher Aminosäuren	43
4.1.2	Variation der Leitstruktur	45
4.1.3	Bindungsstudien mit dem Programm Flexidock	54
4.2	Festphasensynthesen	56
4.3	Synthese einfach modifizierter Liganden	57
4.3.1	Bindungsstudien mittels SPR	58
4.3.2	STD-NMR-Experimente	64
4.4	Synthese mehrfach modifizierter Liganden	69
4.4.1	Bindungsstudien mittels SPR	71
4.4.2	STD-NMR-Experimente	75
4.5	Das Bindungsepitop von Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH ₂	77
4.5.1	<i>Group Epitope Mapping</i> mittels STD-TOCSY	77
4.5.2	1D-STD-Aufbauraten	81
4.5.3	Vergleich mit der Leitstruktur und dem Bindungsmodell	86
4.6	Untersuchung der Proteolysestabilität	87
4.7	Ausblick	89
5	Zusammenfassung	91
6	Summary	95
7	Experimenteller Teil	99
7.1	Chemikalien	99
7.2	Geräte	101
7.3	<i>Molecular Modelling</i>	104
7.4	Festphasensynthese	104
7.5	SPR-Experimente	141
7.6	STD-NMR-Experimente	143
7.7	Untersuchung der Proteolysestabilität	146

Toxikologie und Handhabung der Chemikalien	147
Flexidock-Parameter	149
Advanced Chemtech MOS 496 Omega - Syntheseprotokolle	151
STD-NMR-Pulsprogramme	159
Literaturverzeichnis	165

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
ADME	<i>adsorption, distribution, metabolism, excretion</i>
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
ARV	<i>AIDS-associated retroviruses</i>
AS	Aminosäure
AZT	3'-Azido-3'-desoxythymidin (Zidovudin)
CCA	α -Cyano-4-hydroxymizsäure
CCR5	CC-Chemokinrezeptor, Co-Rezeptor bei der HIV-Infektion
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
cLogP	10er-Logarithmus des berechneten Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor, Co-Rezeptor bei der HIV-Infektion
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Natrium 2,2-Dimethyl-2-silapentyl-5-sulfonat
EA	Ethanolamin
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Endo-H	Endoglycosidase H
Fc _n	Flußzelle n mit n = 1, 2, 3 oder 4
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GP120	Glycoprotein 120
GP120-core	Glycoprotein 120, mit verkürzter Proteinkette
GP41	Glycoprotein 41
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>

HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)- -N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBS-EP	<i>HEPES buffered saline</i> + EDTA + Polysorbat 20
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HTLV	<i>human T-lymphotropic virus</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
k_{on}	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
K_A	Gleichgewichtskonstante der Assoziation
k_{off}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
K_D	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
LAV	<i>lymphadenopathy-associated virus</i>
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight</i>
MeCN	Acetonitril
MES	2-(N-Morpholin)-ethansulfonat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MS	Massenspektrometrie
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
NaOAc	Natriumacetat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NNRTI	nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
NRTI	nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren
PAL	<i>peptide amide linker</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
ppm	<i>parts per million</i>
PS	<i>polystyrene support</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROESY	<i>rotating frame nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Reverse Transkriptase
RU	<i>resonance unit</i>
SAR	<i>structure-activity relationship</i>
sCD4	<i>soluble CD4</i> , enthält nur die extrazellulären Domänen D1-D4
S/N	<i>signal / noise</i>

SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
STD	<i>saturation transfer difference</i>
tBoc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- -N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
TMS	Tetramethylsilan
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPPI	<i>time proportional phase increment</i>
trNOE	<i>transferred</i> NOE
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
UN	<i>United Nations</i>
vdW	van der Waals
WATERGATE	<i>water suppression by gradient tailored excitation</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

natürliche Aminosäuren

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

unnatürliche Aminosäuren

1Acpc	1-Aminocyclopentancarbonsäure
2Ahx	2-Aminohexansäure (auch: Nle, Norleucin)
Aib	Aminoisobutansäure
Bpa	4-Benzoylphenylalanin
Cha	Cyclohexylalanin
Chg	Cyclohexylglycin
dAla	D-Alanin
Hfa	Homophenylalanin (auch: Hfe)
Hse	Homoserin
Msu	Methioninsulfon (auch: Met(O ₂))
2Nal	2-Naphtylalanin
Omy	O-Methyltyrosin (auch: Tyr(Me))
Paf	4-Aminophenylalanin
Pcf	4-Carboxyphenylalanin
Pff	4-Fluorphenylalanin
Pnf	4-Nitrophenylalanin
Thi	Thienylalanin
Tle	<i>tert</i> -Leucin

Einleitung 1

1.1 HIV und AIDS

Wie der Bericht der Vereinten Nationen anlässlich der UN AIDS Konferenz in Barcelona im Jahre 2002 zeigt, ist die durch das Humane Immunschwäche Virus (HIV) verursachte Krankheit zu einem weltweiten Problem geworden, das nicht nur die Gesundheit von Millionen Menschen bedroht, sondern auch soziale und ökonomische Strukturen zusammenbrechen lässt.¹

Im Jahr 2001, 20 Jahre nach Ausbruch der Krankheit, gab es schätzungsweise 40 Millionen HIV-Infizierte; 5 Millionen haben sich neu angesteckt, während 3 Millionen Menschen an den Folgen von AIDS starben. Insgesamt hat AIDS bis heute 25 Millionen Opfer gefordert. Abbildung 1.1 zeigt die globale Ausbreitung der Immunschwächekrankheit. Am stärksten betroffen sind das südliche Afrika und Süd-Ost-Asien. Der Anteil von HIV-Infizierten an der Gesamtbevölkerung liegt dort z. T. im zweistelligen Prozentbereich. In manchen Regionen tragen mehr als 50% der schwangeren Frauen das Virus.

Da HIV vorwiegend durch Sexualkontakt übertragen wird, sind bevorzugt relativ junge Menschen betroffen, die gleichzeitig die berufstätige Bevölkerung darstellen. Dies führt zu einer drastischen Abnahme der Produktivität und zum Zusammenbruch sozialer Sicherungssysteme.

In den Industriestaaten ist nach den erfolgreichen „Safer Sex“ Kampagnen der 90er Jahre ein zunehmend risikobereites Sexualverhalten zu beobachten, einhergehend mit wachsenden Infektionszahlen.² Dies hat z. T. seinen Grund im Rückgang präventiver Maßnahmen. Wahrscheinlich spielt auch die trügerische Hoffnung eine Rolle, mit der modernen Kombinationstherapie sei AIDS heilbar geworden.

Die unbestreitbaren Erfolge dieser unter dem Acronym HAART (*highly active anti-retroviral therapy*) bekannten Therapie können jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass



Abbildung 1.1: Globale Schätzungen der Ausbreitung von HIV / AIDS Ende 2001.¹

AIDS weiterhin eine tödliche Krankheit ist, deren Verlauf zur Zeit nur mehr oder weniger gut gebremst werden kann und zu deren Verhinderung immer noch kein Impfstoff zur Verfügung steht. Die Suche nach neuen Wirkstoffen und Therapieansätzen muss daher fortgesetzt werden, nicht zuletzt um den Menschen in den Entwicklungsländern eine Perspektive zu geben, für die HAART zu teuer und vermutlich zu kompliziert ist.

1.1.1 Die HIV-Infektion

Das HI-Virus

Die Entdeckung des HIV teilen sich zwei Forschungsgruppen, die von Luc Montagnier, Pasteur Institut, Paris und die von Robert Gallo, Universität von Maryland, Baltimore. Obwohl die französische Gruppe schon 1983 die Entdeckung des LAV (*lymphadenopathy associated virus*) publiziert hatte,³ wurde Gallo für das 1984 von ihm gefundene HTLV-III (*Human T-lymphotrophic Virus*) als Entdecker des AIDS-Erregers gefeiert.⁴ Erst 1986 wurde offiziell die

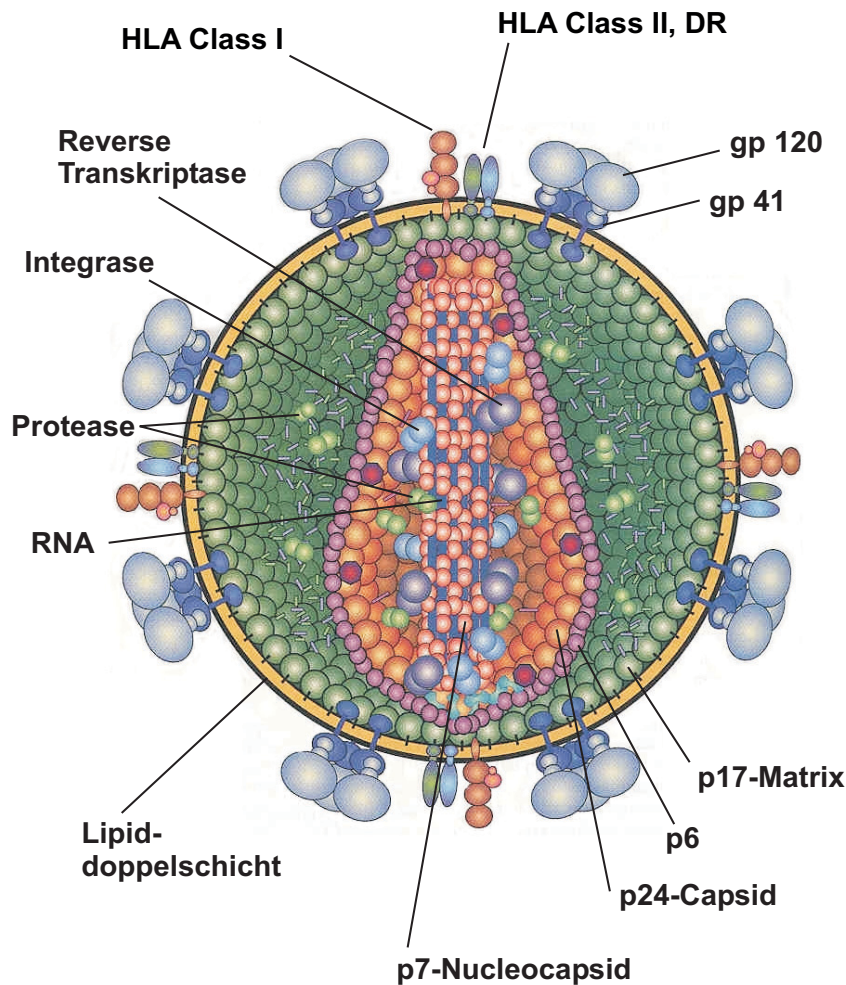


Abbildung 1.2:
Schematische
Darstellung des
HIV.⁵

Identität beider Viren bestätigt und der Streit beigelegt. Der Erreger bekam die Bezeichnung HIV (*human immunodeficiency virus*).

Die Infektion mit HIV führt durch Befall und Zerstörung von Schlüsselzellen des Immunsystems zur Krankheit AIDS, einer erworbenen Immunschwäche. HIV enthält sein Erbgut in Form von einzelsträngiger RNA, die in der infizierten Zelle mit Hilfe der viralen Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben wird, und gehört somit zu den Retroviren. Abbildung 1.2 zeigt schematisch den Aufbau des Viruspartikels (Virions).

Die RNA-Stränge, die das Erbgut von HIV bilden, liegen als Ribonukleoproteinkomplex stabilisiert mit etwa 2000 Einheiten des P7 Nucleocapsidproteins vor. Das Capsid, ein kegelförmiges Gebilde im Zentrum des Virus, ist aus ca. 2000 Kopien des Proteins P24 aufgebaut und enthält zusätzlich zum Erbgut noch drei virale Enzyme, die Reverse Transkriptase, die

Integrase und die Protease. Nach außen ist das Capsid von wiederum etwa 2000 Exemplaren des Matrixproteins P17 umgeben, welches seinerseits von einer Lipiddoppelschicht umhüllt wird.⁶

Die Lipiddoppelschicht stammt von der Wirtszelle und enthält daher diverse wirtseigene Strukturen wie MHC-Proteine, Zelladhäsionsproteine und Glycolipide. Weiterhin enthält diese Membran ca. 72 Trimere eines Komplexes des Transmembranglycoproteins GP41 und des Glycoroteins GP120, die vom Virusgenom kodiert werden. Diese werden für die Infektion neuer humaner Wirtszellen benötigt.⁷

HIV Virionen haben eine Halbwertszeit von weniger als 6 h im Blut. Infizierte, aktivierte CD4⁺-Lymphozyten produzieren mindestens 99 % an zirkulierendem Virus. Diese Zellen besitzen eine Halbwertszeit von 1.6 Tagen. Mindestens 10¹⁰ Virionen werden täglich produziert; ca. 140 Virusgenerationen werden pro Jahr durchlaufen.⁸

Wirtszellen des HIV

HIV benötigt für die Infektion zwei Rezeptoren auf den Zielzellen, den CD4-Rezeptor und ein Protein aus der Familie der Chemokinrezeptoren (siehe 1.2.1 und 1.2.1).⁹⁻¹² CD4 befindet sich auf reifenden Thymozyten, auf reifen, MHC II-abhängigen T-Lymphozyten und auf Zellen der Makrophagen / Monozyten-Linie.¹³ Außerdem wird das Protein noch von bestimmten Zellen des Nervensystems exprimiert, die, einmal infiziert, das schlafende Reservoir des HIV darstellen.

Aus der Vielzahl von Chemokinrezeptoren sind für die HIV-Infektion *in vivo* vorwiegend die CCR5- und CXCR4-Rezeptoren von Bedeutung. Während CCR5 vorwiegend von Makrophagen exprimiert wird, befindet sich CXCR4 auf T-Zellen. Die Spezifität der HI-Viren für einen der beiden Co-Rezeptoren bestimmt, welche Zellen befallen werden.¹⁴

Infektionsmechanismus

Die Hauptübertragungswege der HIV-Infektion sind ungeschützte Sexualkontakte sowie bei Drogenabhängigen Injektionsnadeln, die gemeinsam benutzt werden. Außerdem spielt die

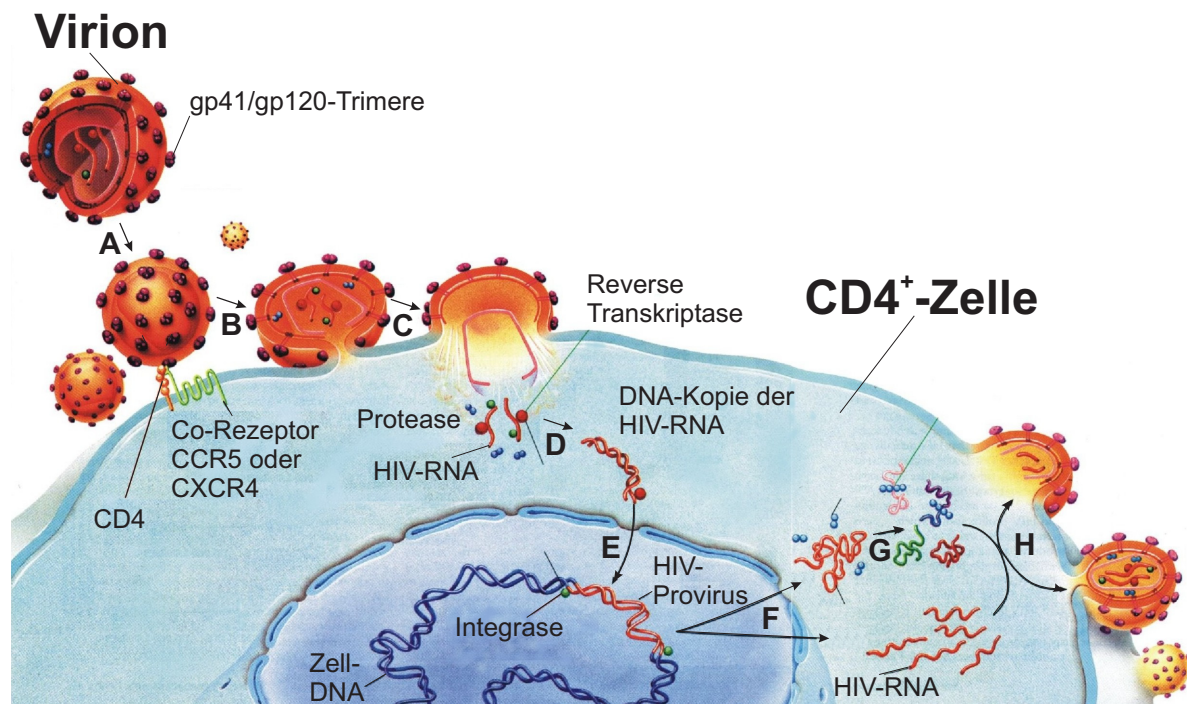


Abbildung 1.3: Infektionszyklus des HIV. A) Andocken des Virions an die Wirtszelle unter Beteiligung des CD4- und eines Chemokin-Rezeptors (CCR5 oder CXCR4). B) Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran. C) Einbringen der viralen RNA, der Reversen Transkriptase und der Protease in die Zelle. D) Transkription der Virus-RNA in doppelsträngige DNA durch die Reverse Transkriptase. E) Insertion der DNA in das Genom der Zelle durch die Integrase. F) Expression des Provirus: Es werden virale RNA und Virusproteine gebildet. G) Die Protease spaltet ein exprimiertes Virusprotein. H) Aus den Virusproteinen und den RNA-Kopien entstehen neue Virionen, die sich von der Membran abschnüren. Modifiziert nach Bartlett, 1998.¹⁵

Übertragung durch kontaminierte Blutprodukte und von der Mutter aufs Kind während der Geburt eine Rolle.

Ist das Virus in die Blutbahn gelangt, findet es seine Zielzellen mit Hilfe seines Hüllglycoproteins GP120 (siehe 1.2.1). Abbildung 1.3 zeigt den Entwicklungszyklus des HIV vom Andocken an die Wirtszelle bis zur Abschnürung neuer Viren aus seiner Membran. Die Wechselwirkungen der viralen Hüllproteine mit den Rezeptoren der Wirtszelle, die detailliert in Kapitel 1.2 ab Seite 10 dargestellt werden, führen zur Verschmelzung der Membranen und zur Insertion des Capsids. Aus diesem werden nun das Erbgut in Form von einzelsträngiger RNA und die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease freigesetzt. Die Reverse

Transkriptase schreibt die RNA in komplementäre DNA um, die durch Enzyme der Wirtszelle zu doppelsträngiger DNA ergänzt wird. Diese gelangt in den Zellkern und wird durch die virale Integrase in das Wirtszellgenom eingebaut. Transkription zu mRNA und Translation in neue virale Proteine erfolgt nun mit Hilfe der wirtszelleigenen Proteinsynthesemaschinerie.

Als Alternative zur Produktion neuer Viren kann das HIV-Genom auch in eine Ruhephase fallen, in der das Virus mehrere Jahre ohne Replikation überdauern kann und in der es weder vom Immunsystem noch von Chemotherapeutika aufspürbar ist.

Bei der Translation des HIV-Genoms entstehen zunächst Vorläuferproteine, die durch die viruseigene Protease zu funktionellen Proteinen gespalten werden müssen. Diese fertigen Proteine lagern sich im Folgenden mit neuer viraler RNA zusammen, umhüllen sich mit der Lipiddoppelschicht der Wirtszelle, in die die viralen Hüllproteine schon integriert sind, und knospen als reife Virionen von ihrer Wirtszelle ab. Über kurz oder lang führt die Virusproduktion zum Absterben der Wirtszelle, so dass diese ihre Aufgaben im Immunsystem nicht mehr wahrnehmen kann.

Krankheitsverlauf

Während der ersten zwei bis sechs Wochen nach der Infektion mit HIV kommt es häufiger zu grippeähnlichen Symptomen, die jedoch meist erst rückblickend mit HIV in Verbindung gebracht werden. Dabei steigt der Virus-Titer stark an, während die Anzahl CD4-positiver ($CD4^+$)-Zellen im peripheren Blut stark zurückgeht.

$CD4^+$ -Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der menschlichen Immunabwehr. Sie binden an Antigen-präsentierende Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphocyten), die Proteinfragmente von feindlichen Organismen mit Hilfe ihrer Klasse-II-MHC-Proteine darbieten, und aktivieren die Immunantwort gegen diese Antigene. Dies geschieht durch Ausschüttung von Cytokinen, die Immunzellen zur Teilung anregen, sie zum Ort der Infektion locken und sie zur Produktion von Antikörpern stimulieren.¹⁶ Fehlen $CD4^+$ -Zellen, bleibt die entsprechende Immunreaktion aus und normalerweise harmlose Keime wie z. B. Hautpilze oder Rhinoviren können lebensbedrohliche Infektionen hervorrufen.

Nach der akuten Phase geht die Krankheit in eine asymptomatische Phase über, die im Mittel zehn Jahre andauert. Während dieser Zeit sind direkt keine Viruspartikel im Blutstrom nachweisbar; die Infektion lässt sich aber anhand der HIV RNA Kopien feststellen, deren Anzahl pro mL Plasma zwischen 10^3 und 10^6 liegt.¹⁷

Die ständige Präsenz von Virus-RNA ist ein Beleg dafür, dass auch in der asymptomatischen Phase eine permanente Replikation stattfindet. Dabei besteht eine sehr dynamische Interaktion zwischen der Infektion von $CD4^+$ -Zellen durch freie Viren, Entfernung der Viren und infizierter Zellen durch das Immunsystem, Produktion neuer $CD4^+$ -Zellen und der Produktion von HI-Viren durch infizierte Zellen. Dieser Prozess läuft weitgehend unabhängig in verschiedenen Kompartimenten des Wirts wie Lymphknoten, zentralem Nervensystem und Keimdrüsen ab.^{18,19}

Die Anzahl an $CD4^+$ -Zellen nimmt stetig weiter ab. Nach einem Zeitraum von zwei bis 15 Jahren, wenn weniger als 400 $CD4^+$ -Zellen pro μL Blut gezählt werden, beginnt die symptomatische Phase mit opportunistischen Infektionen. Sinkt die $CD4^+$ -Zellen-Zahl unter 200 pro μL , spricht man von AIDS. Unbehandelt sterben innerhalb von 15 Jahren nach der Infektion ca. zwei Drittel der Erkrankten an den Folgen der Immunschwäche.²⁰

1.1.2 Die Bekämpfung der HIV-Infektion

Aktuelle Therapie

Die heute verfügbare hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) führt sehr schnell zu einem drastischen Abfall des Plasma-HIV-RNA-Levels. Dies ist dem Verschwinden infizierter, aktivierter $CD4^+$ -Lymphozyten und der Verhinderung der Neuinfektion zuzuschreiben.^{8,21} Gelingt es nicht, den HIV-RNA-Level unter 50 Kopien pro mL Plasma zu senken, besteht ein hohes Risiko, dass resistente Viren entstehen. Patienten, bei denen der HIV-RNA-Level dauerhaft unter 50 Kopien pro mL Plasma gesenkt wurde, können mehrere Jahre symptomfrei leben. Auch bei sehr effektiv behandelten Patienten wird jedoch eine kontinuierliche Evolution der persistierenden Viruspopulation beobachtet.²²

Unter HAART normalisiert sich das Erscheinungsbild des Immunsystems. Die Zahl an CD4⁺-Lymphozyten erhöht sich; es kommt zu einer Rückverteilung von Lymphozyten aus den Lymphknoten in den Blutstrom und oftmals werden opportunistische Infektionen bewältigt. Die daraus resultierende Senkung der Behandlungskosten und die Erhöhung der Lebenserwartung ist allerdings mit starken Nebenwirkungen der Virostatika und, je nach Krankheitsstadium, einem anspruchsvollen Therapieschema verbunden, so dass viele Infizierte HAART aufgeben.

Prinzipiell ist jeder Virusbestandteil, der zur effektiven Replikation beiträgt, ein therapeutischer Angriffspunkt. Im Fall von HIV waren die Reverse Transkriptase (RT) und die virale Protease die ersten *targets*.²³ Nucleosidischen Inhibitoren der Reversen Transkriptase fehlt die 3'-OH Gruppe. Sie wirken daher als Terminatoren der DNA-Polymerisation, indem sie die Bildung der kettenverlängernden 3'-5'-Phosphodiesterbindung verhindern. Seit 1996 sind auch nicht-nucleosidische RT-Inhibitoren im Einsatz, die allosterisch die DNA-Polymerisation unterbinden.

Protease-Inhibitoren leiten sich von Peptidsequenzen der viralen Vorläuferproteine ab, die durch die Protease zu funktionellen Proteinen prozessiert werden. Als Peptidmimetika weisen sie dort nicht spaltbare Strukturen auf, wo die Präproteine zerschnitten werden. Die Protease-Inhibitoren sind Beispiele für therapeutisch eingesetzte Verbindungen, die gegen die von Lipinski aufgestellte *rule of five* verstoßen. Nach dieser Regel steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Wirkstoff eine schlechte orale Bioverfügbarkeit besitzt, wenn er mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donatoren, zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren, ein Molekulargewicht von mehr als 500 g/mol oder einen cLogP-Wert größer als fünf aufweist, wobei cLogP der 10er-Logarithmus des berechneten Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ist.²⁴ Bei Protease-Inhibitoren, die Molekulargewichte um 600 g/mol und eine große Ähnlichkeit zur Peptidstruktur besitzen, stellten daher lange Zeit Löslichkeit und orale Bioverfügbarkeit Probleme bei der Wirkstoffentwicklung dar.

Im Jahr 2002 ist mit T20 (Handelsname *Fuzeon*, Trimeris, Inc.) der erste Vertreter einer weiteren Klasse von Anti-HIV-Wirkstoffen für die Therapie zugelassen worden.^{25,26} T20 ver-

hindert das Verschmelzen von Virus- und Wirtszellmembran und gehört damit zu den HIV-Entry-Inhibitoren (siehe Abschnitt 1.2).

Angesichts der Kosten von etwa 20000 Euro pro Infiziertem und Jahr und der hohen Anforderungen hinsichtlich Therapietreue ist es fraglich, ob HAART in den Entwicklungsländern Erfolg haben wird. In Industriestaaten stellt sich das Problem von Resistenzentwicklungen bzw. von Patienten, die HAART entweder nicht vertragen oder bei denen keine ausreichende Virenreduktion erreicht wird. Bei einer Produktion von 10^{10} Virionen pro Tag und einer Mutationsrate von 10^{-5} Nucleotiden pro Replikationszyklus enthält jedes neue Genom von 9200 Basen im Mittel eine Mutation.^{8,27,28} Daher sollten pro Tag alle denkbaren Einzelmutationen und viele Doppelmutationen auftreten. Liegt eine unvollständige Unterdrückung des Virus bei gleichzeitigem Anpassungsdruck durch die Therapie vor, können sich schnell resistente Erreger manifestieren. Ein besonderes Problem stellen dabei latent infizierte Zellen in pharmakologisch schlecht zugänglichen Kompartimenten wie dem zentralen Nervensystem und dem Genitaltrakt dar.^{21,29}

Neue Strategien zur Bekämpfung der HIV-Infektion

Um die unter 1.1.2 genannten Probleme zu umgehen, ist es sinnvoll, die Kombinationsbehandlung von HIV-Infizierten um weitere Wirkstoffe zu ergänzen. *Targets* sind die Rezeptoren, die am Andockprozess beteiligt sind (siehe 1.2.4), der *uncoating*-Prozess, die RNase H Aktivität der Reversen Transkriptase, Zinkfingerproteine, die bei der Packung der viralen RNA mitwirken, zelluläre Faktoren, die für die Fortsetzung des Zellzyklus benötigt werden, der Import der viralen cDNA in den Zellkern, der *virion infectivity factor* und die virale Integrase.³⁰

Eine starke Immunantwort im Frühstadium der Infektion korreliert mit einem langsameren Krankheitsverlauf. Diese Beobachtung ist ein wichtiges Argument für die Entwicklung von HIV-Impfstoffen und die Forschung an der therapeutischen Vakzinierung, d. h. der Immunisierung nach erfolgter Infektion mit dem Virus. Ein Ansatz ist die strategische Behandlungsunterbrechung (STI), bei der durch Aussetzen von HAART auftretende HIV-Antigene das Immunsystem des Infizierten verstärkt gegen das Virus lenken sollen.³¹ Die Erfolgsaussichten dieses Konzepts sind allerdings umstritten. Zur therapeutischen Vakzinierung werden

außerdem nicht-infektiöse Agenzien untersucht. Die Entwicklung eines konventionellen, d. h. präventiven Impfstoffs gegen das HIV ist besonders für Entwicklungsländer interessant, da Vakzinierung am ehesten Flächendeckend anwendbar ist. Leider zeichnet sich auch nach über 15 Jahren Forschung auf diesem Gebiet auf Grund der extremen Variabilität des Erregers noch kein Erfolg ab.²¹ Im Februar 2003 sind die Ergebnisse einer weltweiten Studie zur Impfung gegen AIDS veröffentlicht worden, die den verwendeten Impfstoff als weitgehend unwirksam ausweisen.³²

1.2 Molekularer Mechanismus des HIV-Entry

1.2.1 Beteiligte Proteine

Die viralen Proteine GP120 und GP41

Nach einer vermutlich unspezifischen Anheftung von HIV an seine Wirtszelle (siehe Abschnitt 1.2.4) findet die erste spezifische Interaktion zwischen dem viralen Glycoprotein GP120 und dem humanen CD4-Rezeptor statt.

GP120 liegt auf dem Virion in Form von Trimeren von Heterodimeren aus GP120 und dem membranständigen GP41 vor.⁷ Beide Glycoproteine gehen aus dem selben Vorläuferprotein hervor, sind jedoch im funktionellen Virus nicht mehr kovalent verbunden. GP120 besitzt eine Masse von 120 kDa, von der etwa 50 % auf den Kohlenhydratanteil entfällt. Eine schematische Darstellung bietet Abb. 1.4. Durch Sequenzvergleiche wurden fünf relativ konstante Regionen (C1-C5) und fünf hypervariable Bereiche (V1-V5) identifiziert. Die konstanten Regionen bilden diskontinuierliche Strukturen, die in erster Linie an Interaktionen mit GP41 und mit den Rezeptoren auf den humanen Wirtszellen beteiligt sind. Die ersten vier variablen Regionen bilden exponierte Loops, wobei die dritte hypervariable Schleife (V3-Loop) maßgeblich an der GP120-Co-Rezeptor-Wechselwirkung beteiligt ist. Die genaue Funktion der weiteren Loops ist noch unklar. GP120 besitzt keine Ähnlichkeit mit Oberflächenproteinen anderer Retroviren.³³

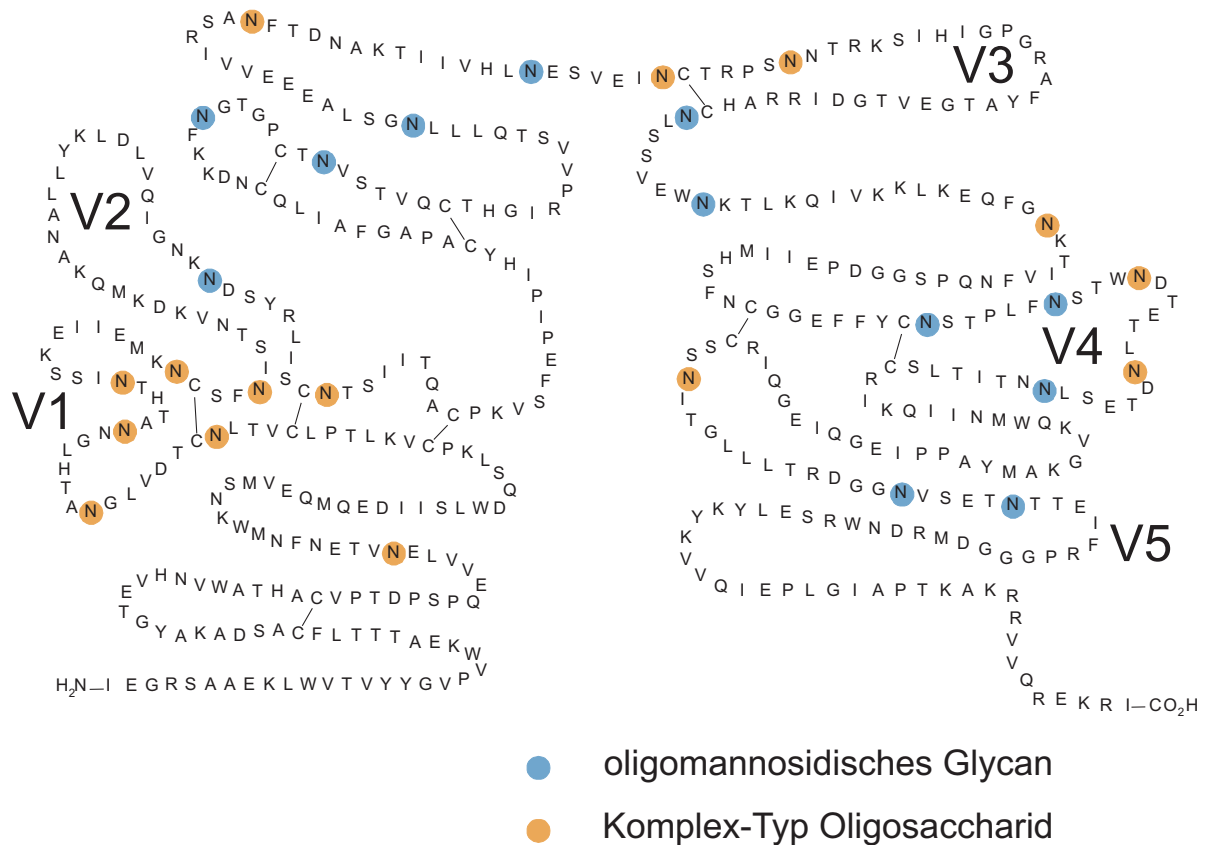


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des GP120.

Große Teile der Oberfläche von GP120 sind von Kohlenhydraten bedeckt, die von der Glycosylierungsmaschinerie der Wirtszelle angebracht werden. Die wirtseigenen Glycane und die hohe Variabilität der Aminosäuresequenz verhindert eine erfolgreiche Bekämpfung durch das menschliche Immunsystem.⁷ Strukturelle Details der Interaktion von GP120 mit den humanen Rezeptoren sind in Abschnitt 1.2.2 beschrieben.

Der CD4-Rezeptor

Der primäre Rezeptor für HIV auf der menschlichen Immunzelle ist das CD4-Protein.^{9,10} Es handelt sich um ein integrales Membranglycoprotein mit einer Masse von 55 kDa.³⁴ Die Expression von CD4 auf Zellen des Immunsystems ist ein wichtiges Entwicklungsmerkmal, wie die Zugehörigkeit zu den „CD“- (*cluster of differentiation*)-Proteinen nahelegt.³⁵ CD4 erfüllt seine natürliche Aufgabe als Co-Rezeptor des T-Zellrezeptors und bindet an nicht-polymorphe

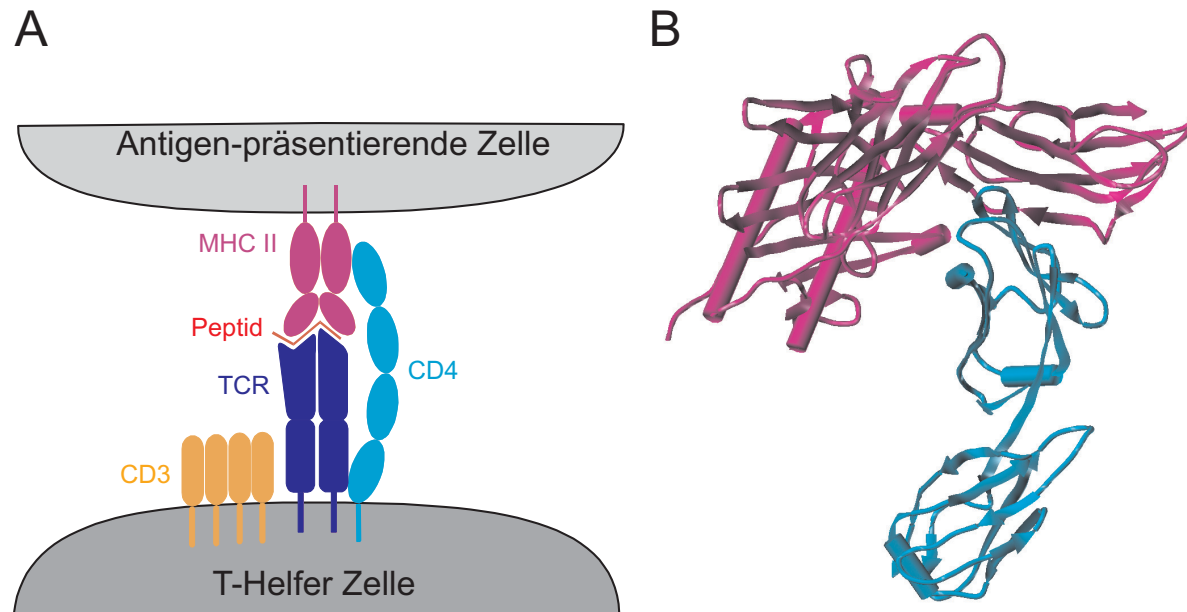


Abbildung 1.5: A) Schematische Darstellung der natürlichen Funktion des CD4-Rezeptors (Modifiziert nach Janeway, 2001).¹⁶ CD4 verstärkt die Avidität der Bindung zwischen APCs und T-Helfer Zellen. Nur bei gleichzeitiger Interaktion von CD4 mit dem Klasse II-MHC-Protein führt die Erkennung eines präsentierten Peptids durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) zur Aktivierung der Immunreaktion. B) Wechselwirkung des Klasse II-MHC-Proteins (magenta) mit dem CD4-Rezeptor (cyan, nur D1- und D2-Domäne) nach der Röntgenstrukturanalyse von Wang et. al..³⁶ α -Helices sind als Zylinder, β -Faltblätter als flache Bänder dargestellt. Das Klasse II-MHC-Protein bindet an die gleiche Region von CD4 wie das HIV-Hüllprotein GP120.

Regionen des Klasse II-MHC-Proteins, das sich auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) befindet (siehe Abb. 1.5). Es erhöht die Avidität zwischen Thymozyten und APCs und trägt über die Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinase $p56^{lck}$ zur Stimulation der Immunantwort bei.¹³

Der 371 Aminosäuren umfassende, extrazelluläre Teil von CD4 gliedert sich in vier Domänen (D1-D4), die eine immunglobulinartige Faltung besitzen und insgesamt ein stäbchenförmiges Protein bilden. Der CDR-2 (*complementarity determining region*) -verwandte Teil der D1-Domäne ist essentiell sowohl für die Bindung an das Klasse II-MHC-Protein als auch für die Wechselwirkung mit HIV-GP120, wie auch durch Vergleich der Röntgenstrukturanalysen der Komplexe von CD4 mit einem Klasse II-MHC-Protein³⁶ bzw. mit GP120 und dem Antikörper 17b³³ (siehe Abschnitt 1.2.2, Abb. 1.6) deutlich wird.

Die Co-Rezeptoren

Als Co-Rezeptor der HIV-Infektion dienen Sieben-Helix-Transmembranproteine aus der Familie der Chemokinrezeptoren.^{11,12} Ihre natürliche Funktion besteht darin, Leukozyten zu Entzündungsschauplätzen zu führen, indem sie Chemotaxis in Richtung auf am Ort der Entzündung ausgeschüttete Chemokine bewirken.¹⁴ Für die HIV-Infektion sind *in vivo* nur die Proteine CCR5 und CXCR4 von Bedeutung, die von Makrophagen bzw. T-Helfer-Zellen exprimiert werden. *In vitro* können auch andere Vertreter dieser Proteinklasse als Co-Rezeptor dienen.³⁷ Der Co-Rezeptor bestimmt den Tropismus des Virus. In der asymptomatischen Phase der HIV-Infektion werden vorwiegend sogenannte R5-trope Viren isoliert, die CCR5 als Co-Rezeptor verwenden und Makrophagen befallen (daher auch die Bezeichnung M-trop). Mit dem Ausbruch der Krankheit AIDS wechselt der vorherrschende Tropismus nach X4, d. h. zur Benutzung von CXCR4 als Co-Rezeptor, so dass vermehrt T-Helferzellen angegriffen werden (auch T-trop genannt).^{38–40} Dieser Tropismuswechsel ist eng mit der Glycosylierung des V3-Loop verbunden. In der Frühphase der Infektion bei noch intaktem Immunsystem dominieren die R5-tropen Virenstämme, die stärker glycosylierte V3-Loops besitzen und vom Immunsystem schlecht neutralisiert werden. Sie sind jedoch weniger virulent als die X4-tropen Stämme aus dem HIV-Endstadium, die weniger N-Glycane tragen und sich vermutlich erst bei einem stark vorgeschädigten Immunsystem durchsetzen können.⁴¹ Unreife Thymozyten tragen sowohl CCR5 als auch CXCR4 und werden daher von beiden Virustypen attackiert. Weiterhin existieren sogenannte Dual-trope Virenstämme, die beide Co-Rezeptoren zum Andocken nutzen können.

1.2.2 Die Wechselwirkung von GP120 mit CD4 und dem Co-Rezeptor

Die erste spezifische Wechselwirkung zwischen HIV und der humanen Wirtszelle findet zwischen GP120 und CD4 statt. In SPR-Experimenten bilden beide Proteine einen 1:1-Komplex. Für vollständige, glycosylierte GP120 aus verschiedenen Expressionssystemen wurden Dissoziationskonstanten von $K_D = 1 - 35 \text{ nM}$ für die Bindung an CD4 bestimmt.^{42–45}

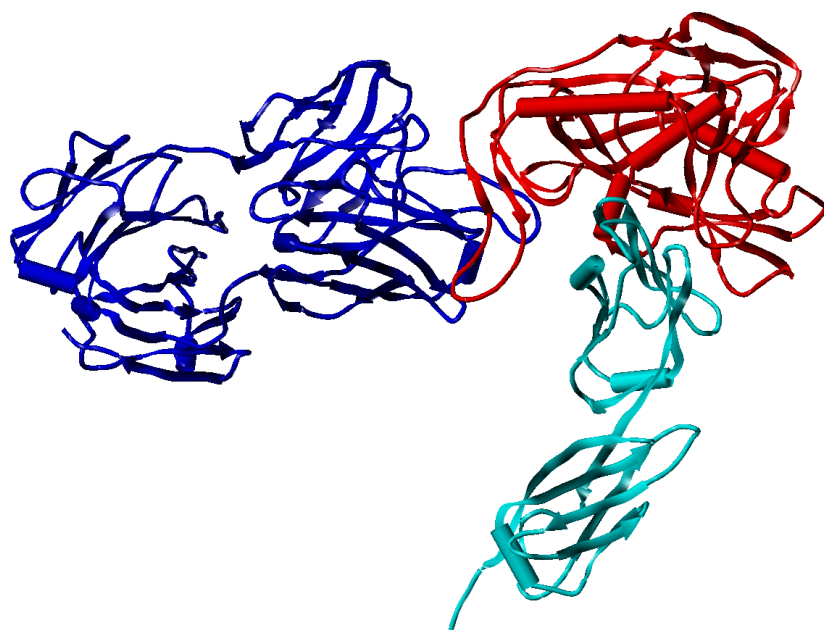


Abbildung 1.6: Röntgenstrukturanalyse eines ternären Komplexes aus CD4 (cyan, nur Domänen D1 und D2), GP120-core (rot) und dem Antikörper 17b (blau, F_{ab}-Fragment).³³

1998 gelang es Kwong et. al., ein Konstrukt von GP120 mit dem D1-D2-Fragment von CD4 und dem F_{ab}-Fragment des CD4-induzierten Antikörpers 17b cozukristallisieren (siehe Abb. 1.6).³³ In diesem Konstrukt waren N- und C-Terminus um 52 bzw. 19 Aminosäuren verkürzt und die variablen Loops V1 / V2 und V3 durch kurze, flexible Gly-Ala-Gly-Brücken ersetzt worden. Außerdem waren die N-Glycane enzymatisch mit *Endo-H* bis auf den ersten GlcNAc-Rest entfernt worden.

Trotz dieser radikalen Manipulationen behält das sogenannte GP120-*core* seine Affinität zu CD4 ($K_D = 190$ nM) und zu relevanten Antikörpern. Weiterhin zeigt es eine sehr ähnliche Bindungskinetik bezüglich CD4.⁴⁵ Da der aus der Röntgenstruktur hervorgehende Bindungsmodus außerdem konsistent mit den Ergebnissen vieler Mutationsstudien sowohl auf Seiten von GP120 als auch auf Seiten von CD4 ist, wird davon ausgegangen, dass die Interaktion von CD4 mit dem GP120-*core* bzw. mit nativem GP120 weitgehend identisch abläuft.

Die CDR-2-verwandte Region der CD4-D1-Domäne bindet in einer Vertiefung vom GP120, die sich an der Kontaktfläche des sogenannten *bridging sheet* mit der inneren und äußeren Domäne befindet. Diese Wechselwirkung bedeckt mit $742 \text{ \AA}^2$ des CD4 und $802 \text{ \AA}^2$ des GP120 sehr große Flächen beider Proteine. Direkte interatomare Kontakte ($d \leq 3 \text{ \AA}$) bestehen zwischen 22 Aminosäureresten des CD4 und 26 Resten des GP120, die sich in sechs Peptidab-

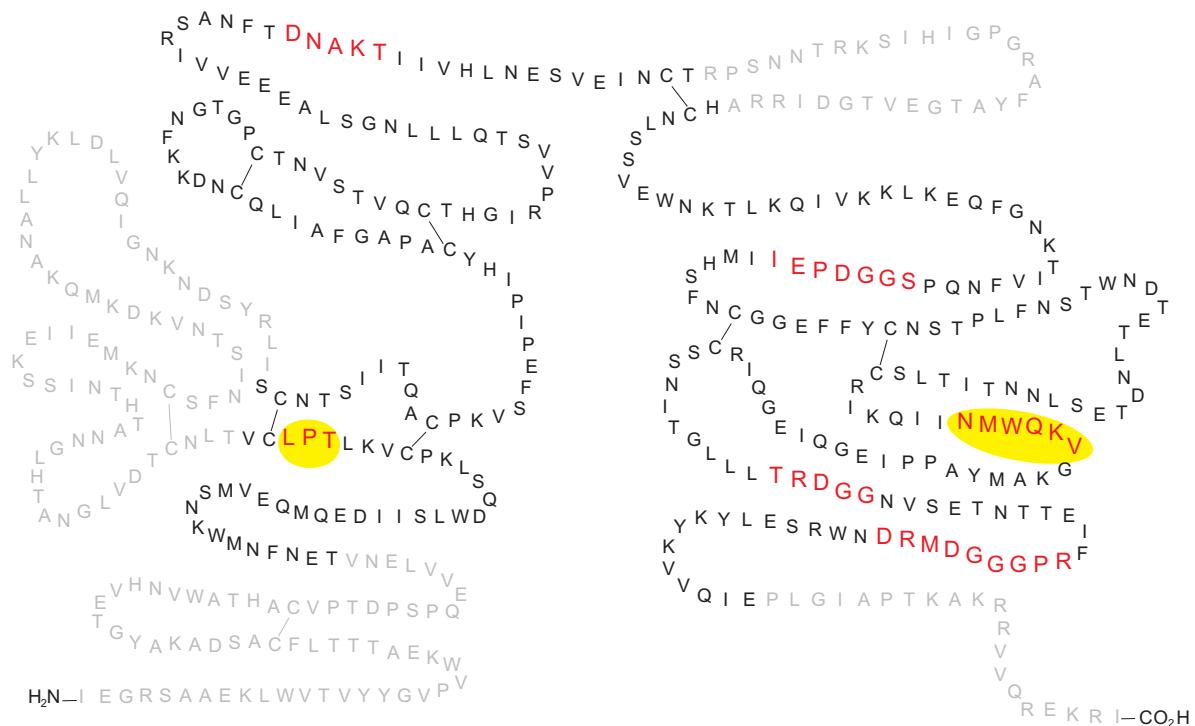


Abbildung 1.7: Peptidsequenzen des GP120-core, die in der Röntgenstrukturanalyse direkten Kontakt zu CD4 haben (rot).³³ In grau sind Bereiche des GP120 dargestellt, die für die Kristallisation molekularbiologisch entfernt wurden. Die sechs Peptidsegmente TPL, DNAKT, SGGDPEI, NMWQKV, TRDGG und RPPGGDMRD sind diskontinuierlich über den GP120-core verteilt. TPL und NMWQKV liegen jedoch in der 3D-Struktur so dicht beieinander, dass sie mit Hilfe eines einzigen Glycin-Restes verbrückt werden können. Das resultierende Peptid NMWQKV-G-TPL bindet an CD4 und dient in dieser Arbeit als Leitstruktur für die Entwicklung von verbesserten CD4-Liganden.

schnitten diskontinuierlich über die Sequenz von GP120 verteilen (siehe Abb. 1.7). Etwa die Hälfte der Kontakte des GP120 gehen vom Peptidrückgrat aus – ein Grund für die Stabilität der CD4-GP120-Interaktion angesichts der Beteiligung variabler Regionen.³³

Die Bindung des CD4-Rezeptors führt über Konformationsänderungen des GP120 zur Ausbildung der Co-Rezeptorbindungsstelle. Das Virus wird auf der Zelle fixiert und die Co-Rezeptorbindungsstelle des GP120 zur Wirtszellmembran orientiert.^{45,46} Die folgende Wechselwirkung mit dem Co-Rezeptor bringt das Virus nah an die Wirtszellmembran heran und bereitet die Fusion vor. Die Interaktion mit den Co-Rezeptoren findet über den V3-Loop und einige hochkonservierte Reste von GP120 statt. Nachdem die Co-Rezeptor-

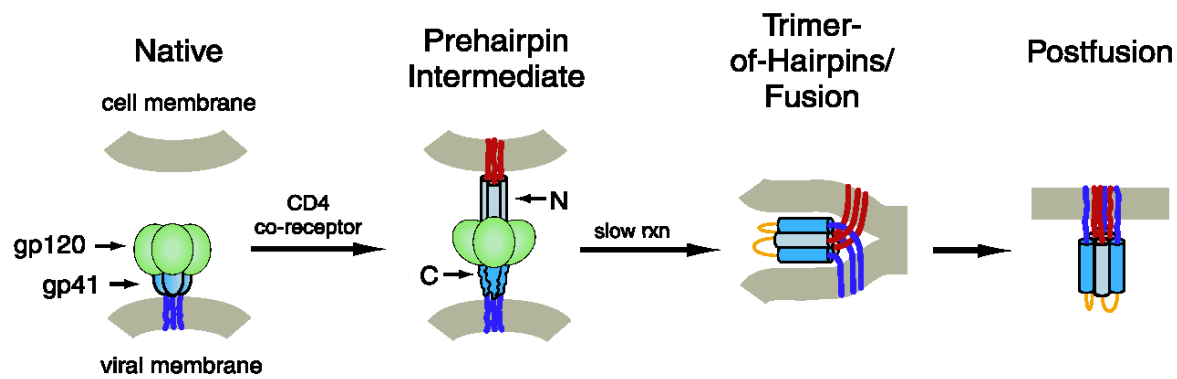


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Membranfusion nach Chan et. al..⁴⁹ Die Interaktion von GP120 mit den Rezeptoren auf der humanen Zelle führen zur Insertion des Fusionspeptids von GP41 in die Wirtszellmembran. Durch eine Konformationsänderung im GP41 werden die Membranen aneinandergezogen und verschmelzen schließlich. Der erste zugelassene HIV-Entry-Inhibitor *Fuzeon* (T20) inhibiert die Ausbildung des *trimer-of-hairpins*, so dass die Membranfusion unterbunden wird.

Bindungskonformation durch CD4 fixiert wurde, ist die Verbindung aus GP120 und GP41 metastabil und zur Membranfusion prädisponiert.^{47–50}

1.2.3 Die Membranfusion

Der finale Schritt des *HIV-Entry* ist die Fusion von Virus- und Wirtszellmembran, die durch das virale GP41 vermittelt wird. Nachdem GP120 an CD4 und den Co-Rezeptor gebunden hat, kommt es zu einer Umfaltung des trimer vorliegenden GP120-GP41-Komplexes, die zur Insertion der N-terminalen Fusionspeptide von GP41 in die Membran der Zielzelle führt. In diesem Stadium löst sich GP120 aus dem Komplex und es kommt zur Ausbildung einer *trimer-of-hairpins*-Struktur aus den C- und N-Peptid Regionen von GP41 – Bereichen, die den membranständigen Peptiden direkt benachbart sind. Dadurch werden die Membranen von Virus und Zelle aneinander gezogen und verschmelzen schließlich (siehe Abb. 1.8).^{49,51}

1.2.4 HIV-Entry-Inhibitoren

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt retroviraler Infektionen ist oft die erste Anheftung des Virions an die Wirtszelloberfläche, die noch vor der spezifischen Wechselwirkung von Virusproteinen mit Wirtszellrezeptoren stattfindet. Diese erste Assoziation wird vermutlich durch positiv geladene Bereiche der Virusglycoproteine und negativ geladene Heparansulfat-Proteoglycane der Zielzellen vermittelt.³⁰

Prinzipiell könnten auch diese Virus-Zell-Interaktionen durch polyionische Substanzen blockiert werden. Es ist allerdings bekannt, dass z. B. polyanionische Verbindungen, die aus Kationentauscherharzen ausbluten, *in vitro* vielfach biologische Aktivität vortäuschen, die allerdings nicht spezifisch ist und *in vivo* nicht reproduziert werden kann. Außerdem bergen derartige Substanzen eine Reihe weiterer Probleme wie synthetische Zugänglichkeit, Bioverfügbarkeit und Toxizität. Es ist daher fragwürdig, ob die niederaffine Virus-Zell-Assoziation über polyionische Wechselwirkungen ein realistisches *target* in der HIV-Bekämpfung sein wird.

Die GP120-CD4-Interaktion ist ein attraktives Ziel für die Wirkstoffentwicklung. Sie könnte einerseits durch Verbindungen blockiert werden, die sich an die CD4-Bindungsstelle von GP120 heften; andererseits könnten auch Moleküle eingesetzt werden, die die GP120-Bindungsstelle auf dem CD4-Rezeptor besetzen. Beide Strategien besitzen Vor- und Nachteile: Normalerweise wird versucht, Proteine des Pathogens anzugreifen, da so im Idealfall nur der Erreger geschädigt wird und Nebenwirkungen auf Seiten des Wirtsorganismus weitgehend vermieden werden können. Die Entwicklung eines niedermolekularen GP120-Inhibitors wird jedoch durch mehrere Faktoren erschwert: Die GP120/CD4-Interaktion findet zum großen Teil über *back-bone*-Kontakte statt und ist dadurch relativ tolerant gegenüber Mutationen, die wahrscheinlich schnell zur Resistenz gegen einen niedermolekularen Wirkstoff führen würden. Außerdem bewirkt die Bindung des CD4-Rezeptors an GP120 eine Umfaltung des viralen Proteins, die zur Ausbildung der Co-Rezeptor-Bindungsstelle führt. Ein GP120-bindendes Molekül, das in dieser Hinsicht wie der natürliche Rezeptor CD4 wirkt, könnte die Infektion Chemokinrezeptor-tragender Wirtszellen sogar erleichtern und wäre als Wirkstoff ungeeignet.

Ein Beispiel für einen GP120-Inhibitor ist die lösliche Form des CD4-Rezeptors (sCD4) selbst, der *in vitro* sehr effizient labor-adaptierte Virusstämme neutralisiert.^{52,53} In klinischen Studien war sCD4 jedoch wahrscheinlich auf Grund von zu schlechter Bioverfügbarkeit und mangelnder Potenz gegen Primärisolate nicht erfolgreich.^{54,55} Weiter fortgeschritten ist die Firma Progenics, die mit einem CD4-IgG-Fusionsprotein (PRO 542) Plasmalevel von HIV in einer Phase I Studie reduzieren konnte.^{56,57} Es bleibt abzuwarten, ob in diesem Fall die typischen Probleme von Proteinwirkstoffen umgangen werden können. Weiterhin ist es gelungen, mit kleineren Protein- und Peptidkonstrukten das GP120-Bindungsmotiv von CD4 nachzuahmen.^{58,59} Die Affinitäten dieser etwa 3 kDa großen Moleküle liegen im μM Bereich. Es ist fraglich, ob sie sich soweit verkleinern lassen, dass sie als Wirkstoffe attraktiv werden.

Der große Vorteil eines Inhibitors, der an den humanen CD4-Rezeptor bindet, ist, dass dieses Protein sich nicht verändert wie das unter hohem Evolutionsdruck stehende Virus. Um Resistenz zu entwickeln, müsste HIV wahrscheinlich CD4-unabhängig werden und gleichzeitig seine hohe Effizienz als Virus beibehalten. Sowohl von HIV-1 als auch von HIV-2 wurden schon CD4-unabhängige Varianten erzeugt.^{60–62} Ob diese *in vitro* kultivierten Virusstämme gegen das menschliche Immunsystem bestehen können, ist jedoch unklar.

Grundsätzlich birgt die Blockierung eines humanen Proteins ein größeres Nebenwirkungsrisiko als der relativ selektive Angriff auf Bestandteile eines Pathogens. Wie ein Vergleich der Röntgenstrukturen von CD4 im Komplex mit GP120 bzw. mit murinem Klasse II-MHC-Protein in Abb 1.9 zeigt, bindet HIV-GP120 in erstaunlich ähnlicher Weise an den CD4-Rezeptor wie das Klasse II-MHC-Protein, dessen Bindung für die natürliche Funktion des Immunsystems von großer Bedeutung ist (siehe auch Abschnitte 1.2.1 und 1.2.2). Es ist daher zu erwarten, dass ein erfolgreicher Inhibitor der GP120-CD4-Interaktion auch die Bindung des Klasse II-MHC-Protein verhindern würde. Dies könnte Nebenwirkungen wie Immunsuppression zur Folge haben. Ob die Vorteile einer weitgehend mutationsunabhängigen Virusbekämpfung die Nachteile der Nebenwirkungen überwiegen, kann jedoch gerade bei einer so schweren Krankheit wie AIDS erst nach eingehenden Studien entschieden werden.

Es existieren bereits Inhibitoren der GP120-CD4-Interaktion in Form von CD4-bindenden Antikörpern. Die Antikörper Leu3A oder OKT4A sind in dieser Hinsicht sehr wirksam,

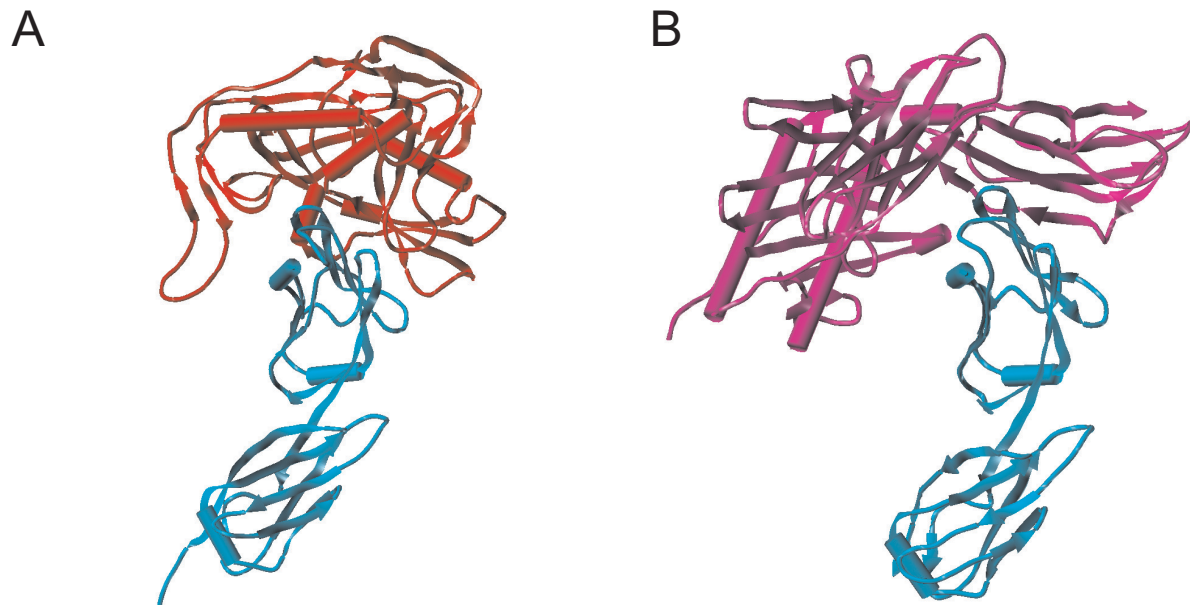


Abbildung 1.9: Vergleich der Interaktion von CD4 mit GP120 und mit einem Klasse II-MHC-Protein. A) Röntgenstrukturanalyse eines ternären Komplexes aus CD4 (cyan), GP120-core (rot) und dem Fab des Antikörpers 17b.³³ Der Antikörper ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. B) Wechselwirkung des murinen Klasse II-MHC-Proteins (magenta) mit dem CD4-Rezeptor (cyan, nur D1- und D2-Domäne) nach der Röntgenstrukturanalyse von Wang et. al..³⁶ α -Helices sind als Zylinder, β -Faltblätter als flache Bänder dargestellt. Das Klasse II-MHC-Protein bindet an die gleiche Region von CD4 wie das HIV-Hüllprotein GP120.

führen aber zu einem Rückgang der CD4⁺-Zellen. Ein anderer Antikörper namens 5A8 besitzt diesen Nachteil nicht. Ob es jedoch durch die CD4-Bindung zu immunsuppressiven Effekten kommt, ist bisher nicht bekannt.⁶³

Auch die sekundäre Wechselwirkung von GP120 mit Chemokinrezeptoren auf der Wirtszelle ist ein Ansatzpunkt für die Wirkstoffentwicklung. Die natürlichen Liganden dieser Rezeptoren wie MIP-1 α , Rantes, SDF-1 α etc. zeigen antivirale Aktivität,^{64,65} sind aber therapeutisch nicht einsetzbar, da sie zu Fieber und Schockreaktionen führen. Neben nicht-agonistisch wirkenden Antikörpern existieren auch niedermolekulare Inhibitoren der Co-Rezeptoren. Dabei handelt es sich z. T. um polyionische Verbindungen (AMD3100,⁶⁶ T22,⁶⁷ ALX40-4C⁶⁸); es wird aber auch von typischen Wirkstoffmolekülen berichtet (TAK-779,⁶⁹ Sch-C³⁰).

Auch der finale Schritt des HIV-Entry, die Fusion von Virus- und Zellmembran, kann durch Peptide oder Proteinkonstrukte verhindert werden, die an die C- oder die N-Peptid Region des

GP41 binden und so deren gegenseitige Assoziation zur *trimer-of-hairpins*-Struktur blockieren (siehe 1.2.3).⁵¹ Mit dem Peptid T20 (Handelsname *Fuzeon*, Trimeris, Inc.) ist im Jahr 2002 der erste HIV-Entry-Inhibitor zugelassen worden, der nach diesem Prinzip wirkt.^{25,26}

Die extrazelluläre Domäne von GP41 besitzt weiterhin eine hydrophobe Tasche, die möglicherweise zur Bindung von typischen Wirkstoffmolekülen geeignet ist.^{70,71} Es wurden bereits Fusionsinhibitoren auf der Basis von D-Peptiden gefunden, die in diese Tasche hineinpassen und Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich besitzen.^{72,73}

1.3 Die peptidische Leitstruktur NMWQKVGTPPL als HIV-Entry-Inhibitor

In Rahmen seiner Doktorarbeit fiel J. Wülfken auf, dass die in der Primärsequenz von GP120 weit auseinanderliegenden Sequenzen T¹²³PL¹²⁵ und N⁴²⁵MWQKV⁴³⁰ nach der Röntgenstrukturanalyse räumlich dicht zusammenliegen. Die Carboxylgruppe von Val⁴³⁰ lässt sich mit der Aminofunktion von Thr¹²³ durch Einbau eines Glycinrestes verbrücken, ohne die Orientierung beider Segmente signifikant zu ändern. Das entstehende Decapeptid NMWQKV-G-TPL bindet laut Oberflächenplasmonenresonanz- und *saturation transfer difference* (STD) NMR-Experimenten mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 6 \text{ mM}$ an den CD4-Rezeptor. Außerdem ist das Peptid in der Lage, *in vitro* die Infektion von peripheren mononucleären Blutzellen durch das HIV zu inhibieren, wobei die Dosisabhängigkeit dieses inhibitorischen Effekts mit der vorher genannten Affinität zu CD4 übereinstimmt.⁷⁴ Das Decapeptid NMWQKVGTPPL diene in dieser Arbeit als Leitstruktur, auf dessen Grundlage verbesserte Liganden des CD4-Rezeptors entwickelt werden sollten.

Mit Hilfe von STD-NMR Experimenten wurde außerdem das Bindungsepitop des Decapeptids bezüglich CD4 bestimmt. Das Ergebnis ist in den Abb. 1.10 und 1.11 dargestellt. Gruppen, die starken Kontakt zum Protein haben, zeigen große STD-Effekte. Im Fall von NMWQKVGTPPL sind das insbesondere das Indolsystem von Trp3, die α - und ε -Protonen von Lys5, sämtliche Protonen von Val6, die β - und γ -Protonen von Thr8, die β -Protonen von Pro9 und die Methylgruppen von Leu10.

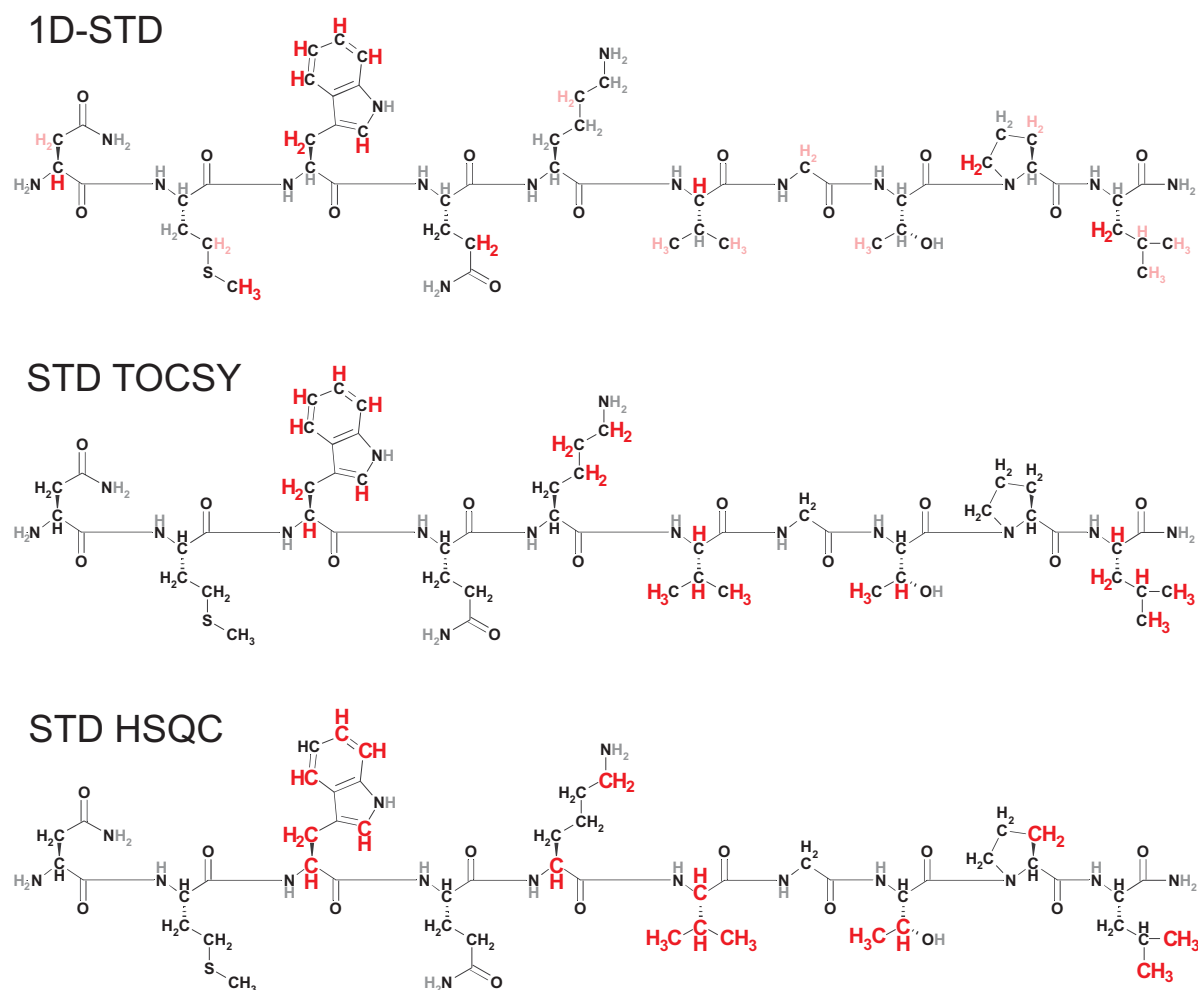


Abbildung 1.10: STD-NMR-*epitope mapping* des Decapeptids NMWQKVGTP^L. Oben: 1D-STD Experiment; mitte: STD-TOCSY; unten: STD-HSQC. Rot hervorgehoben: Signale von Protonen mit starkem STD-Effekt; grau: Protonen, deren Signale nicht sichtbar oder durch Überlagerung nicht auswertbar waren. Bei den 1D-STD-Ergebnissen sind zusätzlich in rosa Protonen markiert, die STD-Effekte mittlerer Intensität zeigen.

Das per STD-NMR bestimmte Bindungsepitop des Decapeptids stimmt weitgehend mit dem in Abb. 1.11 gezeigten Bindungsmodus überein, der sich mit Hilfe von *Docking*-Studien aus der Röntgenstrukturanalyse des CD4-GP120-Komplexes ableiten lässt.^{33,74} Dort liegt die Seitenkette von Val430_{GP120} (Val6_P entsprechend) in einer hydrophoben Mulde von CD4, die durch einen Teil des Ringes von Trp62_{CD4} und die β -Atome von Arg59_{CD4} gebildet wird. Ähnliche Verhältnisse findet man für Leu125_{GP120} (Leu10_P), dessen Seitenkette mit einer hydrophoben Fläche des CD4-Rezeptors wechselwirkt, an der die Gruppen Leu61- β , - γ und

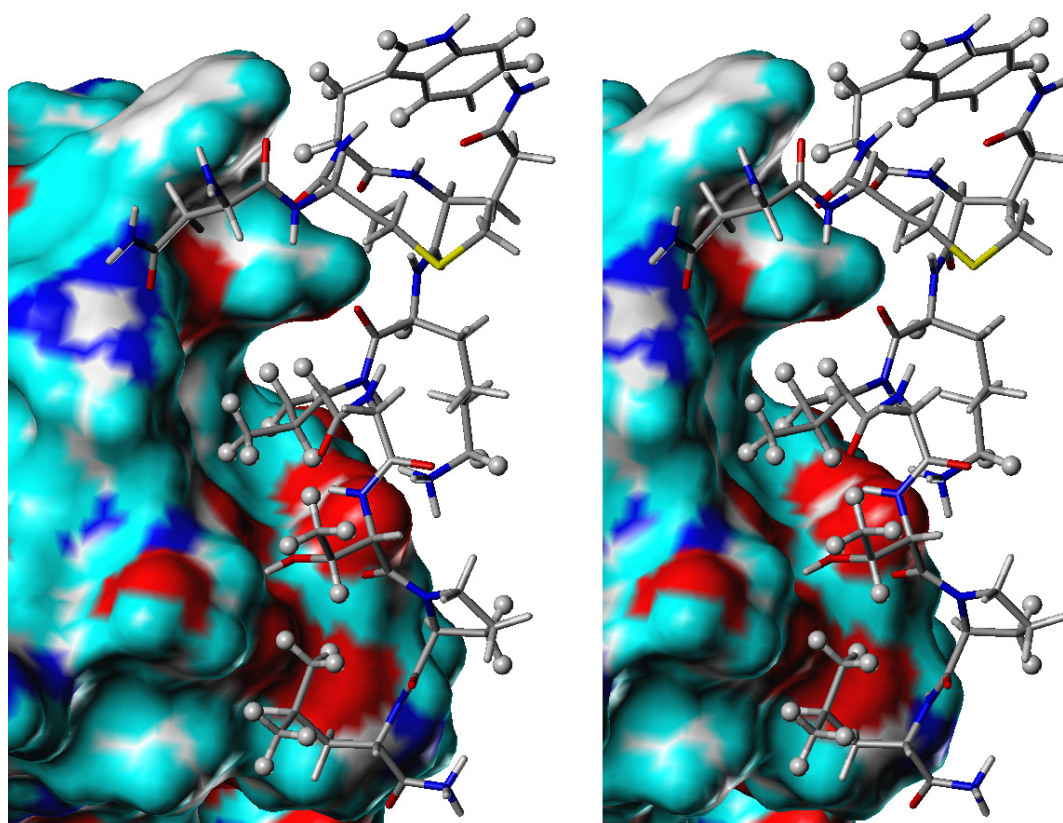


Abbildung 1.11: Möglicher Bindungsmodus des Peptids NMWQKVGTP im Komplex mit dem CD4-Rezeptor. Dargestellt ist das Ergebnis einer Flexidock-Simulation, in der der Ligand, ausgehend von der Position des zugrundeliegenden Tri- bzw. Hexapeptids in der Röntgenstruktur³³ an den Rezeptor gedockt wurde. Protonen, die einen starken STD-Effekt zeigen, sind als Kugeln hervorgehoben.

δ , Gln64- γ sowie Ser60- β beteiligt sind. Die Seitenkette von Lys429_{GP120} (Lys5_P) weist in der Kristallstruktur vom CD4-Rezeptor weg. Die STD-Effekte in den Bindungsstudien mit dem Decapeptid belegen jedoch starke Kontakte zum Rezeptor. Insbesondere die STD-Signale der Lys5- α - und - ϵ -Protonen, die im STD-HSQC-Spektrum hervortreten, werden plausibel, wenn sich die Lys5-Seitenkette zum CD4-Protein hin orientiert, damit die ϵ -Ammonium-Gruppe mit der Carboxylat-Gruppe von Asp63_{CD4} wechselwirken kann.

Der vorgeschlagene Bindungsmodus erklärt weiterhin gut die STD-Effekte der Trp3_P- α - und β -Protonen, da sich die entsprechenden Gruppen von Trp427_{GP120} in der Kristallstruktur in der Nähe des Phenylrings von Phe43_{CD4} befinden. π - π -Wechselwirkungen der beiden Ringsysteme sind in der gezeigten Bindungskonformation jedoch nicht möglich, so dass die

sehr starken STD-Effekte auf den Indol-Protonen von Trp3_P nicht einfach erklärbar sind. Gleiches gilt für die relativ intensiven STD-Signale der Asn1- α , Met2- ϵ und Gln4- γ -Protonen, die im 1D-STD-Spektrum beobachtet werden. Insgesamt liegt wahrscheinlich im N-terminalen Segment ein anderer Bindungsmodus vor.

2.1 *Saturation Transfer Difference* NMR Spektroskopie

Vor kurzem wurde mit der *saturation transfer difference* NMR Spektroskopie (STD-NMR) eine Methode entwickelt, die es erlaubt, niedermolekulare Liganden hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität zu makromolekularen Rezeptoren zu untersuchen.^{75–79} Im Gegensatz zu Verfahren wie ELISA, RIA und FACScan, die nur Aussagen über die Bindungsaffinität liefern, und Methoden wie *surface plasmon resonance* (SPR, Biacore, siehe 2.4) oder Fluoreszenz-korrelationsspektroskopie (FCS), mit denen man zusätzlich noch die Bindungskinetik untersuchen kann, eröffnet STD-NMR Einblicke in molekulare Details der Ligand-Protein-Wechselwirkung.

Das STD-NMR Experiment ist schematisch in Abb. 2.1 dargestellt. Es besteht aus zwei Teilspektren, einem sogenannten *on* und einem *off resonance* Spektrum, deren Differenz das STD-NMR-Spektrum ergibt. Im *on resonance* Teil werden Resonanzen eines Makromoleküls selektiv gesättigt, d.h. durch Einstrahlung einer passenden Frequenz kommt es zu einer Gleichverteilung der entsprechenden α - und β -Spins. Betrachtete man das *on resonance* Spektrum allein und gehörten die beeinflussten Resonanzen nicht zu einem Makromolekül, wären nur die gesättigten Signale im Spektrum ausgelöscht. Da jedoch in Proteinen ab einer Größe von ca. 10 kDa der Prozess der Spindiffusion sehr effektiv ist, d. h. Magnetisierung sich sehr schnell – innerhalb weniger 100 ms – über das gesamte Molekül verteilt, kann man durch selektive Sättigung einzelner Resonanzen sämtliche Signale eines Proteins im NMR-Spektrum auslöschen.

Durch intermolekularen Sättigungstransfer werden auch Resonanzen von Molekülen beeinflusst, die mit dem Rezeptor wechselwirken und zwar, gemäß der r^{-6} -Abhängigkeit der Kreuzrelaxationsrate, desto stärker, je enger die zugehörigen Protonen mit dem Protein in

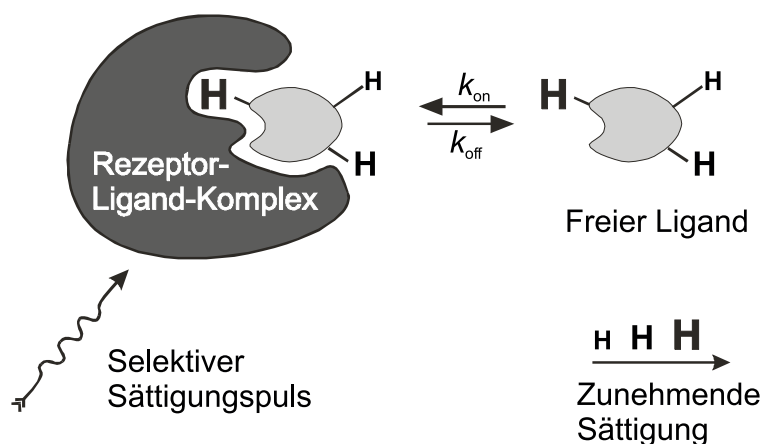


Abbildung 2.1: Bestimmung des Bindungssepitops mit Hilfe von *Saturation Transfer Difference* NMR Spektroskopie: Ein Ligand bindet reversibel an ein Protein. Im gebundenen Zustand haben einige Molekülbereiche starken Kontakt zum Rezeptor, während andere weit von der Proteinoberfläche entfernt sind. Je enger der Kontakt zum Protein ist, desto mehr Sättigung wird übertragen und desto intensiver sind die resultierenden Signale im STD-NMR Spektrum.

Kontakt treten. Im zweiten als *off resonance* Spektrum bezeichneten Teil des STD-NMR-Experiments liegt der Einstrahlungspunkt z. B. bei 40 ppm, so dass keine Proteinsignale getroffen werden. Das *off resonance* Spektrum entspricht also einem normalen NMR-Spektrum, wobei die Einstrahlung nötig ist, um Temperaturschwankungen durch die absorbierte Energiemenge zu kompensieren, die sonst zu Subtraktionsartefakten führen würden.

Während die Resonanzen nicht bindender Moleküle im *on* und *off resonance* Spektrum gleich sind und im Idealfall bei der Differenzbildung zu Null subtrahiert werden, treten die Ligandsignale hervor und zwar desto stärker, je mehr Sättigung sie unter *on resonance* Bedingungen erhalten haben, d. h. je enger ihr Kontakt zum Rezeptor ist. Die selektive Sättigung von Proteinresonanzen ist i. A. kein Problem, da einerseits in geordneten Bereichen Anisotropieeffekte auftreten, die zu extremen chemischen Verschiebungen führen. Außerdem kommt es ab einer Größe von etwa 10 kDa zu Linienverbreiterungen, so dass Signalausläufer über das normale spektrale Fenster von 0 - 12 ppm hinausgehen. Bei einem Einstrahlungspunkt von -1 ppm (-500 Hz bei einem 500 MHz-Spektrometer) und bei Anwendung von selektiven Pulsen wie z. B. Gauss-Anregung ist eine direkte Sättigung von kleinen Molekülen mit scharfen Resonanzen unmöglich.

Mit STD-NMR lassen sich bindungsaktive Substanzen aus komplexen Mischungen identifizieren. Es ist dem prinzipiell ähnlichen trNOE-*Screening*-Verfahren überlegen, da das Protein-Ligand-Verhältnis einen weniger kritischen Einfluß hat und die Methode mit einer Vielzahl von NMR-Pulssequenzen kombiniert werden kann.

Die Intensität des STD-Effekts, der für ein bestimmtes Proton beobachtet wird, hängt von mehreren Parametern ab. Einige lassen sich durch die Aufnahmebedingungen bzw. die Probenzusammensetzung beeinflussen, während andere sich aus der Kinetik und Thermodynamik der Ligand-Protein-Interaktion und aus den Relaxationszeiten der beteiligten Protonen ergeben.^{80,81} Gleichung 2.1 beschreibt die Veränderung der Konzentration an noch nicht gesättigtem Ligand $c_{L_{unsat}}$ mit der Sättigungszeit t_{sat} in einem rekursiven Ansatz.⁸²

$$c_{L_{unsat}}(t+1) = c_{L_{unsat}}(t) - \frac{c_{L_{unsat}}(t) c_{EL}}{c_{L_{tot}}} \text{Sat} + [c_{L_{tot}} - c_{L_{unsat}}(t)] (1 - \text{Rel}) \quad (2.1)$$

mit der Randbedingung

$$c_{L_{unsat}}(0) = c_{L_{tot}}$$

und den Abkürzungen

$$c_{EL} = \frac{1}{2} \left[K_D + c_{L_{tot}} + c_{E_{tot}} - \sqrt{K_D^2 + 2K_D c_{L_{tot}} + 2K_D c_{E_{tot}} + c_{L_{tot}}^2 - 2c_{E_{tot}} c_{L_{tot}} + c_{E_{tot}}^2} \right]$$

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

$$\text{Sat} = 1 - e^{-\frac{R_{sat} t \ln 2}{k_{off}}}$$

$$\text{Rel} = e^{-\frac{R_1 \ln 2}{k_{off}}}$$

$c_{L_{unsat}}(t+1)$, Konzentration an ungesättigten Liganden zur inkrementierten Sättigungszeit $t+1$; $c_{L_{unsat}}(t)$, entsprechend zur Zeit t ; c_{EL} , Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes; $c_{L_{tot}}$, Gesamtkonzentration an Ligand; $c_{E_{tot}}$, Gesamtkonzentration an Protein; K_D , Dissoziationskonstante; k_{off} , Dissoziationsrate; k_{on} , Assoziationsrate; R_{sat} , Sättigungsrate; R_1 , longitudinale Relaxationsrate

In diesem Ansatz wird der Aufbau der Sättigung rechnerisch in Zeitintervalle unterteilt, die der mittleren Aufenthaltsdauer des Liganden in der Bindungstasche entsprechen ($\ln 2/k_{off}$). Die Menge sättigbarer Liganden ergibt sich als c_{EL} und hängt somit von K_D und den Konzentrationen an Ligand und Protein ab. Direkt vor der Sättigung des Proteins bei $t_{sat} = 0$ liegen alle Ligandmoleküle ungesättigt vor. Mit Beginn der Einstrahlung auf das Protein wird Sättigung auf Liganden übertragen, die sich in der Bindungstasche des Proteins befinden. Die Sättigung strebt mit der Zeitkonstante $1/R_{sat}$ ihrem Maximalwert zu, wobei dies desto schneller stattfindet, je stärker die dipolare Kopplung zwischen Protein- und Ligand-Proton ist.

Nach Ablauf eines Zeitintervalls verlassen die gesättigten Liganden die Bindungstasche. Diese wird dann wieder mit Ligandmolekülen besetzt. Gleichung 2.1 berücksichtigt dabei durch den Faktor $\frac{c_{L_{unsat}}(t)}{c_{L_{tot}}}$, dass zum Zeitpunkt des Sättigungsprozesses schon Ligandmoleküle gesättigt oder partiell gesättigt vorliegen und nicht mehr so effizient am Sättigungstransfer teilnehmen können wie ungesättigte Liganden. Durch Erhöhung des Überschusses an Ligand gegenüber dem Protein kann man die Wahrscheinlichkeit senken, dass ein Ligandmolekül während einer Sättigungsphase mehrfach in die Bindungstasche gelangt, und erreicht so die maximale Empfindlichkeit des STD-NMR-Experiments.

Einmal gesättigte Ligandmoleküle streben wieder ihrer Gleichgewichtsmagnetisierung zu, wenn sie nicht mehr an das Protein gebunden vorliegen. Dieser Prozess verläuft schneller bei einer großen Relaxationsrate R_1 (d. h. kurzem T_1). Eine rekursive Analyse von Gl. 2.1 führt zu Gl. 2.2, die die Abhängigkeit des STD-Effekts von den kinetischen Größen der Bindungsreaktion und den NMR-Relaxationsparametern beschreibt.

$$c_{L_{sat}} = c_{L_{tot}} \left[1 - \frac{-\left[\frac{-c_{EL} \text{ Sat} + c_{L_{tot}} \text{ Rel}}{c_{L_{tot}}}\right]^{\frac{t_{sat} k_{off}}{\ln 2}} c_{EL} \text{ Sat} + c_{L_{tot}} (\text{Rel} - 1)}{-c_{EL} \text{ Sat} + c_{L_{tot}} (\text{Rel} - 1)} \right] \quad (2.2)$$

Definitionen wie bei Gl. 2.1; $c_{L_{sat}}$, Konzentration an gesättigtem Liganden; t_{sat} , Sättigungszeit

Durch Anpassung dieser Gleichung an die STD-Amplifikationsfaktoren, die bei verschiedenen Ligandkonzentrationen gemessen werden, lässt sich die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildungsreaktion gewinnen. Dies ist schon durch die Komplexität der Gleichung re-

lativ aufwändig. Außerdem müssen Annahmen zu Parametern getroffen werden, die nicht ohne weiteres bestimmt werden können (Relaxationsraten, kinetische Konstanten). In dieser Arbeit wurden Dissoziationskonstanten daher näherungsweise ermittelt, indem die Gleichung eines *one site binding* Modells (Gl. 2.3) an die Messpunkte angepasst wurde.

$$\text{STD-Amplifikation}(c) = \frac{\text{STD-Amplifikation}_{\text{max}} \cdot c}{K_D + c} \quad (2.3)$$

Im Gegensatz zu Bindungsassays, in denen direkt die Belegung von Bindungsstellen gemessen wird, z. B. *surface plasmon resonance* (SPR) (siehe Abschnitt 2.4) oder ELISA, steigt beim STD-Experiment der STD-Amplifikationsfaktor durch den Effekt des *turn over* jedoch auch bei praktisch vollständiger Rezeptorbelegung noch weiter an, wenn man den Überschuss an Ligand erhöht. Das spätere Erreichen eines Plateaus führt bei dieser Näherung folglich zu Dissoziationskonstanten, die gegenüber den wahren Werten zu hoch liegen.

Die T_1 -Relaxationszeiten der betrachteten Protonen beeinflussen nicht nur die Abhängigkeit des STD-Amplifikationsfaktors vom Überschuss des Liganden, sondern auch die Intensität des STD-Effekts für verschiedene Protonen.⁸¹ Ein Proton mit einer langen T_1 -Zeit kann mehr Sättigung akkumulieren, als eines, das sehr schnell relaxiert. Dieser Effekt nimmt mit steigender Sättigungszeit zu, so dass ein *epitope mapping* anhand von STD-Spektren mit langer Sättigungszeit unter ungünstigen Umständen, d. h. sehr unterschiedlichen T_1 -Zeiten der betrachteten Protonen, nicht die wahren Abstände der Ligandprotonen zur Bindungstasche widerspiegelt. Je kürzer die Sättigungszeit, desto weniger fallen die Unterschiede in den T_1 -Zeiten ins Gewicht.

Ein zuverlässigeres Maß für die Nähe eines Ligandprotons zur Bindungstasche des Rezeptors ist daher eine zur NOE-Aufbaurate analoge STD-Aufbaurate. Hierzu werden mehrere STD-NMR Spektren mit verschiedenen Sättigungszeiten t_{sat} aufgenommen und die erreichten STD-Effekte gegen t_{sat} aufgetragen. Die initiale Steigung dieser Kurven, also die extrapolierte Sättigungsrate bei $t_{\text{sat}} = 0$ ist frei vom Beitrag der Relaxationsrate und damit das beste Maß für die Nähe des entsprechenden Ligandprotons zum Protein. Der Erfolg dieses Ansatzes hängt jedoch entscheidend davon ab, ob man Spektren ausreichender Qualität bei kurzen Sättigungszeiten erhält, bei denen naturgemäß nur kleine STD-Effekte erreicht werden.

Unterschiede in der Sättigung von Ligandprotonen, die sich in gleichem Abstand von der Proteinoberfläche befinden, können sich außerdem dadurch ergeben, dass die entsprechenden Bereiche des Proteins verschieden stark durch Spindiffusion mit dem übrigen Protein verbunden sind. Befinden sich in einem Teil der Bindungstasche weniger oder isolierte Proteinprotonen, erhalten Ligandprotonen, die mit ihnen interagieren, weniger Sättigung, als solche, die mit Bereichen hoher Protonendichte des Proteins wechselwirken.

2.2 Molecular Modelling

Computer sind zu einem unverzichtbaren Werkzeug bei der Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe geworden. Mit ihrer Hilfe lassen sich heute dreidimensionale Strukturen von Molekülen in hoher Qualität darstellen und ihre physikochemische Eigenschaften berechnen (siehe Tab. 2.1).

Bei der Analyse von Proteinen und ihren Komplexen werden hauptsächlich kraftfeldbasierte Verfahren eingesetzt; die deutlich rechenaufwändigeren quantenmechanischen (*ab initio*) Verfahren sind zur Berechnung ganzer Proteine in einem akzeptablen Zeitrahmen noch nicht in der Lage. Sie werden z. T. jedoch zu hybriden Verfahren kombiniert, in denen z. B. nur die Bindungstasche eines Enzyms *ab initio* berechnet wird, während das restliche Protein auf Grundlage eines Kraftfelds modelliert wird.⁸⁴ Bei den Kraftfeld-Methoden werden Moleküle wie ein klassisch-mechanisches Modell behandelt, in dem Bindungslängen und -winkel sowie elektrostatische und van der Waals Wechselwirkungen durch empirisch bestimmte Potentiale beschrieben werden.

2.2.1 Receptor-based Drug Design

Ist die 3D-Struktur eines Proteins bereits aufgeklärt, wird das Wirkstoffdesign naturgemäß von diesem detaillierten Bild ausgehen. Am Anfang steht eine genaue Inspektion der Bindungstasche: Wo befinden sich saure oder basische Gruppen? Wo können hydrophobe Molekülteile wechselwirken?

Tabelle 2.1: *Molecular Modelling* in der pharmazeutischen Forschung.⁸³

Interaktive Computergrafik	Darstellung von 3D-Strukturen
Modellierung kleiner Moleküle	3D Strukturzeugung (CONCORD, CORINA) Molekülmechanik - Kraftfelder Moleküldynamik Quantenmechanische Verfahren Konformationsanalyse Berechnung physikochemischer Eigenschaften
Molekülvergleich	Überlagerung von Molekülen nach ihrer Ähnlichkeit Volumenvergleich 3D-QSAR (z. B. CoMFA-Methode)
Modellierung von Proteinen	Sequenzvergleiche von Proteinen Protein-Homologiemodellierung Simulation der Proteinfaltung
Modellierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	Berechnung von Bindungskonstanten <i>Docking</i> von Liganden
Liganden-Design	Suche in 3D-Datenbanken Struktur-basiertes Ligandendesign <i>De Novo</i> -Design

Auch diese Arbeit wird durch Computerprogramme unterstützt, deren erster Vertreter das Programm Grid ist.⁸⁵ Es tastet die Oberfläche des Zielproteins mit sogenannten Sonden ab. Für jeden Punkt eines engmaschigen Netzes im Bereich der Bindungstasche wird die Wechselwirkungsenergie für positiv und negativ geladene sowie für neutrale Gruppen berechnet. Daraus ergeben sich Anordnungen für funktionellen Gruppen eines idealen Ligand-Moleküls.

Basierend auf diesen Informationen werden Liganden entworfen und auf Rezeptoraffinität und biologische Aktivität getestet. Mit einer erneuten Strukturanalyse des Protein-Ligand-

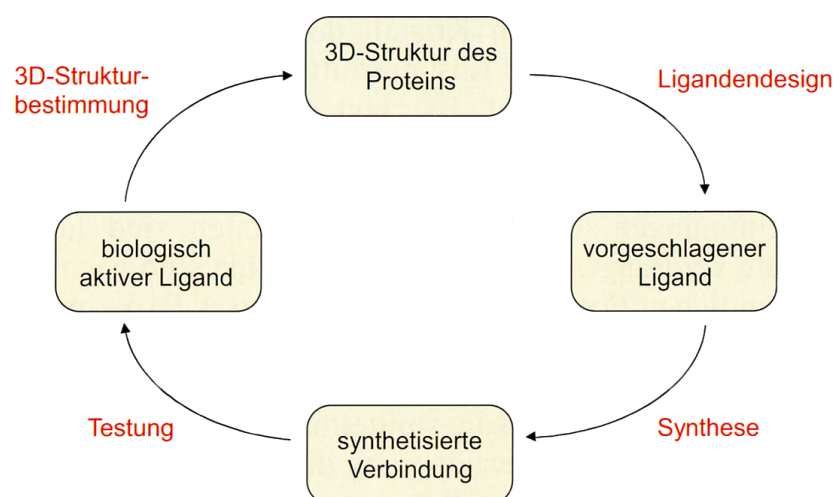


Abbildung 2.2: Iterativer Prozess des strukturbasierten Wirkstoffdesigns.⁸³

Komplexes beginnt ein weiterer Zyklus im iterativen Prozess der Wirkstoffentwicklung, der in Abb. 2.2 zusammengefasst ist.

Ein Teilschritt des *receptor-based design* ist das Einpassen von Liganden in die Bindungstasche eines Proteins. Hierbei können einerseits Strukturdatenbanken kleiner Moleküle durchsucht werden, um bekannte Verbindungen als neue Liganden des *targets* zu identifizieren. Zusätzlich können auch Vorschläge für den Bindungsmodus eines bekannten Liganden entwickelt werden, für den noch keine 3D-Struktur im Komplex mit dem Protein vorliegt.

Ein Vertreter der *Docking*-Programme ist das Programm Dock, das zuerst nur nach sterischer Komplementarität suchte, in aktuellen Versionen aber die Bewertung eines Liganden nach einem Kraftfeld vornimmt.⁸⁶ In dieser Arbeit wurde das Flexidock-Modul des Sybyl Softwarepakets verwendet.⁸⁷ Die Bewertung der Liganden erfolgt mit Hilfe des Tripos Kraftfelds.⁸⁸ Dabei können sowohl der Ligand als auch das Protein flexible Bindungen besitzen. Zur Suche des optimalen Bindungsmodus wird ein genetischer Algorithmus eingesetzt. Die Eigenschaften einer Bindungskonformation, d. h. Torsionswinkel und Position in der Bindungstasche, sind als sogenannte Gene gespeichert, die statistisch mutieren und rekombinieren können. Die erfolgreichsten Strukturen, d. h. diejenigen mit der niedrigsten Bindungsenergie, haben die besten Chancen sich fortzupflanzen und dominieren schließlich die „Population“ an Bindungsmodi. Genetische Algorithmen haben sich als erfolgreich erwiesen, Energieminima in Systemen mit sehr vielen Freiheitsgraden zu finden.⁸⁹

2.3 Festphasenpeptidsynthese

Neben gentechnischen Methoden und enzymatischen Synthesen ist die von R. B. Merrifield entwickelte Peptidsynthese an festen Trägern heute ein Standardverfahren.⁹⁰ Dadurch, dass wenige immer gleiche Reaktionsschritte zur Bildung einer Peptidbindung wiederholt werden müssen, ist die Verknüpfung von Aminosäuren zur Automatisierung prädestiniert. Es müssen allerdings einige Vorkehrungen getroffen werden, um selektiv nur das gewünschte Produkt zu erhalten. Abbildung 2.3 zeigt schematisch den Ablauf der Festphasensynthese.

In einem gängigen Verfahren wird die C-terminale Aminosäure mit ihrer Carboxylgruppe an einen Linker geknüpft, der selbst an ein hochmolekulares Harz gebunden ist. Als Schutzgruppe der Aminofunktion wird die Fmoc-Gruppe verwendet, die sich unter basischen Bedingungen entfernen lässt. Die nächste Aminosäure wird über einen Baustein eingeführt, der N-terminal wiederum Fmoc trägt und C-terminal eine freie Carboxylfunktion besitzt. Während die Peptidkette am polymeren Träger verlängert wird, liegen die funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten geschützt vor, damit keine Verzweigungen entstehen können.

Mit Hilfe eines Aktivators kann die Peptidbindung unter milden Bedingungen geschlossen werden. Während früher häufig Carbodiimide zur Aktivierung eingesetzt wurden, verwendet man heutzutage meistens Hydroxybenzotriazol-derivate wie TBTU (O-(7-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat) oder HATU (O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat). Nicht abreagierte Aminogruppen werden anschließend durch Acetylierung blockiert, damit keine Produkte mit Deletionsstellen entstehen können, die die nachträgliche Reinigung extrem erschweren würden. Nach erneuter Entschützung der terminalen Aminogruppen kann der nächste Syntheszyklus beginnen.

Sind alle Aminosäuren gekuppelt worden, spaltet man das Produkt vom Harz ab. Der eingesetzte Linker bestimmt hierbei, ob C-terminal eine Säure- oder eine Carboxamidfunktion entsteht. Durch die Abspaltungsbedingungen kann man außerdem steuern, ob die Seitenkettenschutzgruppen entfernt werden oder auf dem Peptid verbleiben.

In dieser Arbeit kamen Aminosäurebausteine mit Trityl-, Pbf-, tBu- und Boc-Schutzgruppen zum Einsatz, die sich mit Hilfe einer Mischung aus 5 % Wasser und 95 % Trifluoressigsäure entfernen lassen. Der hier verwendete PAL-Linker führt dabei gleichzeitig zum C-terminalen

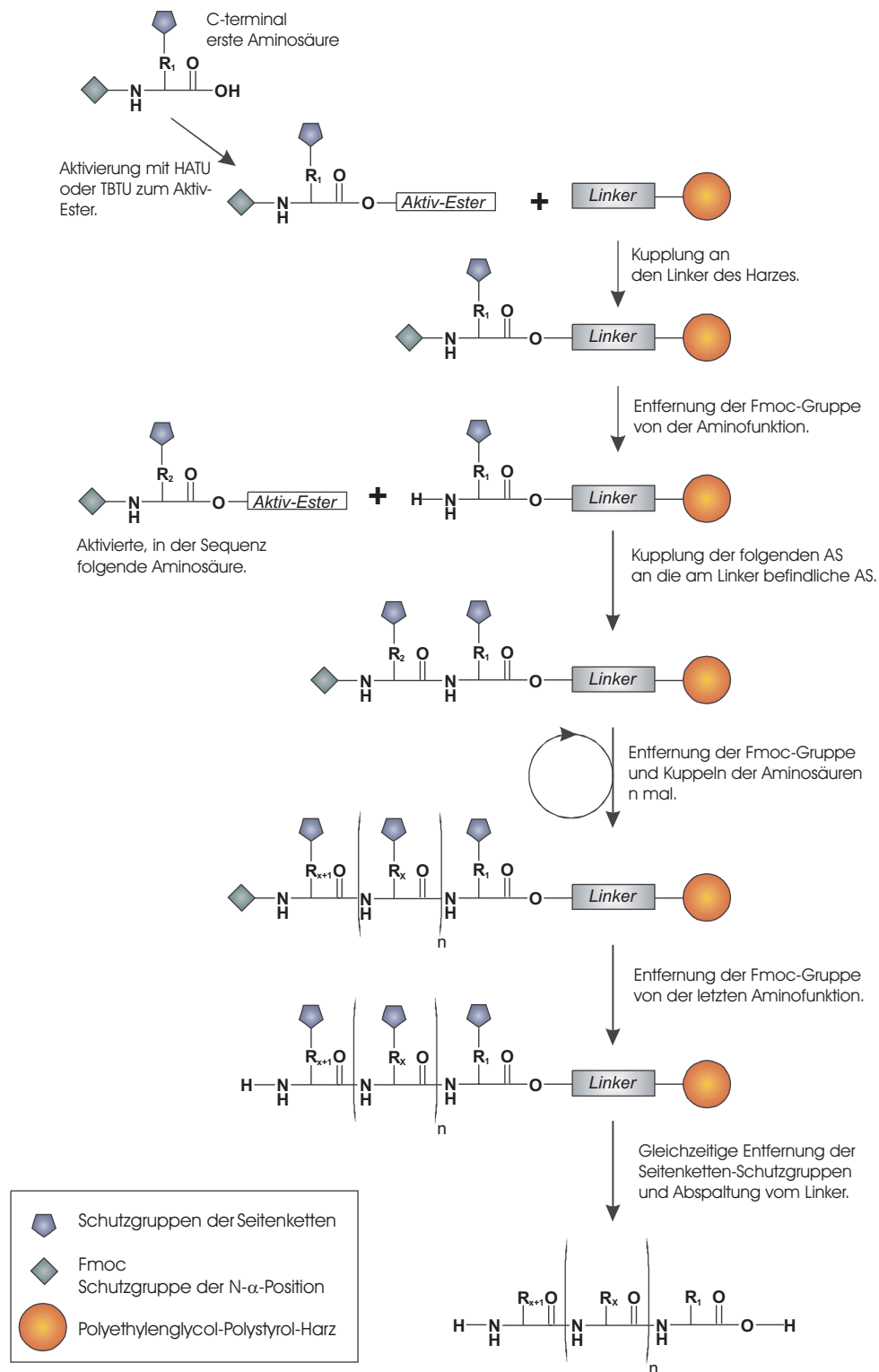


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield.⁹⁰

Carboxamid. Die Reinigung der so erhaltenen Peptide erfolgt üblicherweise per *reversed phase* Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC).

2.4 Surface Plasmon Resonance

Mit Hilfe eines erst 1990 kommerziell eingeführten Messverfahrens, das das Oberflächenplasmonenresonanz-Phänomen ausnutzt, kann man biomolekulare Wechselwirkungen in Echtzeit verfolgen.

Die physikalischen Grundlagen des Verfahrens wurden schon 1959 beschrieben und beruhen auf der Interaktion von totalreflektiertem Licht mit Oberflächenplasmonen eines reflektierenden Metallfilms.⁹¹ Totalreflektiertes Licht erzeugt ein sogenanntes evaneszierendes Feld jenseits der reflektierenden Schicht. Durch Wechselwirkung mit einem Metallfilm wird dieses Feld verstärkt und kann unter bestimmten Bedingungen mit den Oberflächenplasmonen des Metallfilms in Resonanz treten. Dies geschieht bei einem Reflexionswinkel, der vom Brechungsindex jenseits der Reflexionsebene abhängt, und führt zu einer Intensitätsverringering des reflektierten Lichts. Der Winkel, bei dem Resonanz eintritt, wird im Biacore-Instrument mit einer Genauigkeit von 0.0001° gemessen. Dies entspricht einer Änderung des Brechungsindex von $1 \cdot 10^{-6}$. Der Messaufbau, der im Biacore-Instrument verwendet wird, ist in Abb. 2.4 dargestellt.

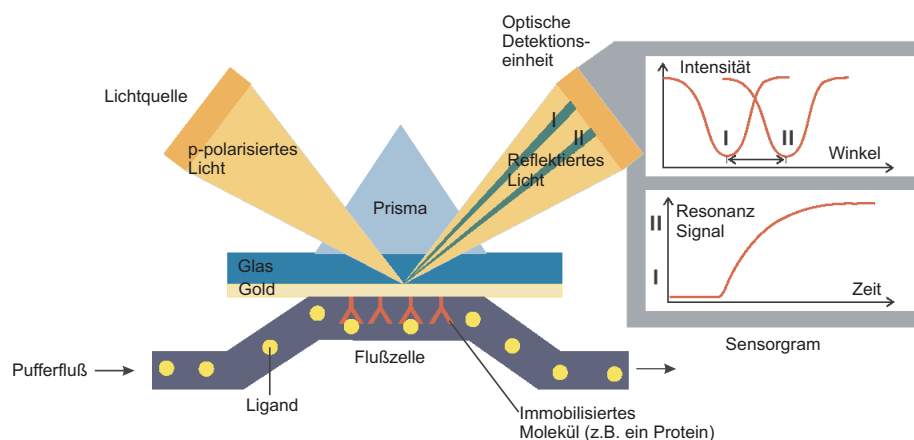


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Surface Plasmon Resonance Experiments.

Im Biacore-Gerät liegt ein Bindungspartner auf der Chipoberfläche immobilisiert vor, während der andere Bindungspartner durch ein Mikrofluidiksystem an ihm vorbeigeleitet wird. Der immobilisierte Bindungspartner kann dabei sowohl der makromolekulare Rezeptor (z.B. das Protein) als auch ein niedermolekularer Bindungspartner sein. Durch die Interaktion der Bindungspartner erhöht sich die Konzentration der mobilen Verbindung in der Nähe der Goldschicht und führt dort zu einer Änderung des Refraktionsindex, die mit dem evaneszierenden Feld abgetastet wird.

Bei biologischen Makromolekülen wie Proteinen, DNA, Lipiden oder Zuckern ist die Änderung des Brechungsindex praktisch proportional zur Massenzunahme auf dem Sensorchip.⁹² Daher kann SPR zur Messung von Massendifferenzen benutzt werden. Bei dem in dieser Arbeit benutzten Biacore 3000 Gerät entspricht eine Zunahme des SPR-Signals um 1 RU (*resonance unit*) einer Massenzunahme von 1 pg auf der Sensorchipoberfläche in einer der vier Flusszellen. Dabei liegt das Basislinienrauschen unterhalb von 0.1 RU. Es handelt sich also um ein hochempfindliches Verfahren. Ein weiterer Vorteil ist, dass der mobile Ligand keiner weiteren Markierung z. B. durch einen Fluoreszenzfarbstoff oder durch radioaktive Isotope bedarf.

Der hier verwendete CM5-Sensorchip ist mit einer 100 nm dicken, carboxymethylierten Dextranschicht beschichtet, an die ein Bindungspartner normalerweise über eine Amin-Kupplung fixiert wird. Dabei werden die Carboxyl-Funktionen der Dextran-Schicht mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid und N-Hydroxysuccinimid (EDC / NHS) in Aktivester überführt und das Protein (oder ein anderes Molekül mit freier Amino-Funktion) kovalent über eine Amidbindung gebunden. Anschließend werden alle nicht belegten, aber aktivierten Carboxylfunktionen mit einem Überschuß Ethanolamin (EA) umgesetzt und so inaktiviert. Für die Belegung einer Oberfläche werden nur einige μg Protein benötigt.

Ein Chip hat vier gleiche Zellen (Fc1 bis Fc4), von denen eine normalerweise nicht oder mit einem nicht aktiven Protein belegt wird und als Referenzzelle dient. Dies ist aufgrund der hohen Empfindlichkeit zum einen nötig, um die spezifische Wechselwirkung der beiden Bindungspartner von der nicht-spezifischen Wechselwirkung der Liganden mit der Chip-Oberfläche zu unterscheiden. Zum anderen dient es zur Unterscheidung von durch *bulk*-

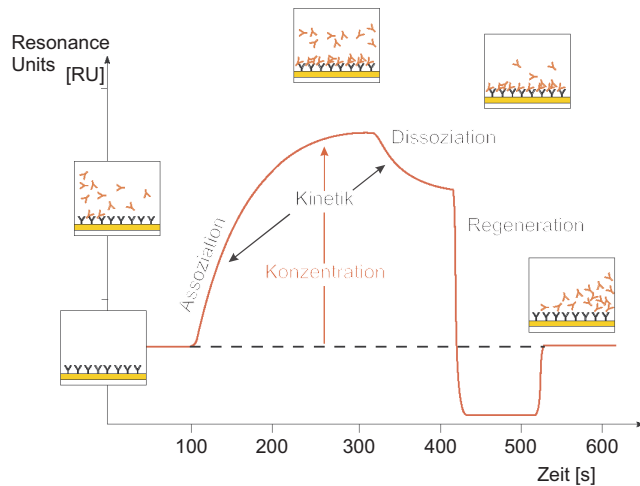


Abbildung 2.5: Beispielhafter Verlauf eines SPR-Experiments. Aus der Form der Assoziations- und Dissoziationskurve lassen sich die kinetischen Konstanten der Bindungsreaktion bestimmen; aus der Höhe des Gleichgewichts-SPR-Signals bei verschiedenen Konzentrationen erhält man die Dissoziationskonstante K_D .

Effekte hervorgerufenen Änderungen im Brechungsindex während der Injektionen. Als *bulk*-Effekt werden Differenzen im Brechungsindex zwischen dem Laufpuffer und der Injektionslösung bezeichnet. Der Brechungsindex variiert sehr stark in Abhängigkeit von der Konzentration an gelösten Molekülen (Biomoleküle, Salze, Puffersubstanzen usw.). Daher wird bei der Auswertung das Signal der Referenzzelle von dem Signal der mit dem Protein belegten Messzelle abgezogen.

In Abbildung 2.5 ist der Verlauf eines typischen SPR-Experiments in Form des Sensorgramms dargestellt. Am Anfang (0 - 100 s) fließt der Laufpuffer kontinuierlich über den Chip. In den kleinen Ausschnitten ist das immobilisierte Molekül als schwarzes Y dargestellt. Es folgt die Assoziationsphase, in der der Ligand zugegeben wird. Es findet eine Wechselwirkung mit den immobilisierten Molekülen statt und das Resonanzsignal nimmt zu, da sich der Brechungsindex nahe der Goldschicht durch Massezunahme ändert. Die Steigung des Signals wird nach einiger Zeit geringer, da die Bindungsstellen auf der Chipoberfläche kontinuierlich mit Ligand belegt werden; das System erreicht ein Gleichgewicht.

In der folgenden Dissoziationsphase wird reiner Puffer am Sensorchip vorbeigepumpt, und der gebundene Ligand löst sich von seinem Rezeptor. Durch den Verlust an gebundenem Ligand verringert sich der Brechungsindex und das Resonanzsignal erniedrigt sich.

Im einfachsten kinetischen Modell ist die Assoziationsrate proportional zur Konzentration des mobilen Liganden und zur Anzahl freier Bindungsstellen:

$$\frac{dRU}{dt} = k_{on} \cdot c_{Ligand} \cdot c_{Rezeptor} \quad (2.4)$$

Der Rezeptor-Ligand-Komplex zerfällt wieder in einer Reaktion erster Ordnung:

$$-\frac{dRU}{dt} = k_{off} \cdot c_{\text{Rezeptor-Ligand-Komplex}} \quad (2.5)$$

Für das Geschwindigkeitsgesetz der Dissoziation ergibt sich:

$$RU(t) = RU_{\text{Gleichgewicht}}(c_{\text{Ligand}}) \cdot e^{-k_{off}t} \quad (2.6)$$

Die Assoziation wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$RU(t) = RU_{\text{Gleichgewicht}}(c_{\text{Ligand}}) \cdot [1 - e^{-k_{obs}t}] \quad (2.7)$$

wobei sich k_{obs} – die scheinbare Geschwindigkeitskonstante der Assoziation – aus k_{on} , k_{off} und der Konzentration des mobilen Liganden c_{Ligand} zusammensetzt:

$$k_{on} = \frac{k_{obs} - k_{off}}{c_{\text{Ligand}}} \quad (2.8)$$

Aus dem Abfall des SPR-Signals nach dem Umschalten auf Laufpuffer lässt sich mit Gleichung 2.6 also direkt k_{off} ermitteln. Kennt man k_{off} und die Konzentration des mobilen Liganden, ergibt sich durch Anpassen der Assoziationskurve an Gleichung 2.7 und Benutzung von Gleichung 2.8 die Geschwindigkeitskonstante k_{on} . Durch Division erhält man die Gleichgewichtskonstante der Dissoziationsreaktion:

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (2.9)$$

Sehr schnelle Bindungsreaktionen ($k_{on} > 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} > 10 \text{ s}^{-1}$) sind jedoch über diesen kinetischen Weg nicht mehr auswertbar, da die Datenrate des Biacore 3000 Gerät maximal 10 Hz beträgt. Insbesondere bei hoher Belegung des Sensorchips und bei niedrigen Flussraten kann die Assoziation außerdem durch die Diffusion des mobilen Liganden begrenzt sein. Ob dieses auch als Massentransportlimitierung bezeichnete Phänomen eine Rolle spielt, lässt sich durch Messung der Kinetiken bei verschiedenen Flussraten herausfinden. Auch die beobachtete Dissoziationsrate kann durch sogenanntes *rebinding* fehlerbehaftet sein.

In solchen Fällen lässt sich die thermodynamische Dissoziationskonstante über Konzentrationsreihen bestimmen. Hier wird für verschiedene Ligandkonzentrationen die Gleichgewichtsbelegung der immobilisierten Bindungsstellen ($RU_{\text{Gleichgewicht}}$) bestimmt und gegen die

Konzentration an gelöstem Liganden (c_{Ligand}) aufgetragen. Liegt der Standardfall einer 1:1-Bindungsreaktion vor, lassen sich diese Daten an die Gleichung

$$RU_{\text{Gleichgewicht}}(c_{\text{Ligand}}) = \frac{RU_{\text{max}} \cdot c}{K_D + c} \quad (2.10)$$

anpassen, die die Dissoziationskonstante K_D und den RU-Wert für vollständige Belegung der Bindungsstellen (RU_{max}) enthält.

Problemstellung 3

In dieser Arbeit sollten aus einer Leitstruktur durch rationales Wirkstoffdesign Peptidmimetika entwickelt werden, die potentiell als HIV-Entry-Inhibitoren einsetzbar sind. Der erste Schritt der HIV-Infektion ist die Wechselwirkung des viralen Glycoproteins GP120 mit dem humanen Glycoprotein CD4, welches auf T-Zellen vorkommt. Es war im Arbeitskreis gezeigt worden, dass ein Decapeptid der Sequenz NMWQKVGTPPL diese Interaktion blockieren kann aber nur über eine schwache Bindung mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 6 \text{ mM}$ verfügt.⁷⁴

Um dieses Wirkprinzip therapeutisch zu nutzen, müssen Verbindungen mit deutlich verbesserter Affinität gefunden werden. Außerdem werden peptidische Wirkstoffe im Körper häufig schnell proteolytisch zersetzt, so dass es schwierig ist, wirksame Konzentrationen aufrechtzuerhalten.

In dieser Arbeit sollten beide Probleme adressiert werden, indem unnatürliche Aminosäuren in die Leitstruktur eingeführt werden, die die Affinität zum CD4-Rezeptor erhöhen und möglichst gleichzeitig Stabilität gegen Proteasen mit sich bringen. Das Projekt für die rationale Wirkstoffentwicklung gliedert sich in folgende Abschnitte:

- Durch Kombination der Information, die aus dem *saturation transfer difference* (STD-NMR) *epitope mapping* der Leitstruktur gewonnen worden war, mit Daten aus der Röntgenstruktur eines ternären Komplexes aus CD4, GP120 und einem Antikörper³³ sollten als erstes Teilziel modifizierte Liganden entwickelt werden, die in *Molecular Modelling*- und *Docking*-Simulationen eine höhere Affinität zu CD4 haben.
- Variationen der Leitstruktur mit verbesserter Bindungsenergie im *Docking* sollten dann als Bibliothek von Peptidmimetika mit jeweils einer Modifikationsstelle synthetisiert werden.

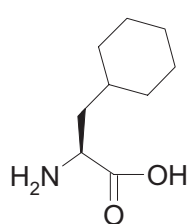
- Die Untersuchung der Bindungsaffinität der an einzelnen Positionen veränderten Peptidmimetika mit *surface plasmon resonance* (SPR) und STD-NMR sollten zu einer Validierung der durch *Molecular Modelling*-Studien vorgeschlagenen Modifikationen führen.
- Erfolgreiche Modifikationen sollten kombiniert werden, um eine weitere Affinitätserhöhung zu erreichen. Die mehrfach modifizierten CD4-Liganden sollten dann ebenfalls mit SPR und STD-NMR charakterisiert werden.

4.1 Rationales Ligandendesign

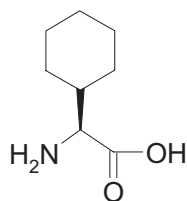
4.1.1 Auswahl unnatürlicher Aminosäuren

Durch die große Popularität, die die kombinatorische Chemie in den letzten Jahren erreicht hat, stehen unnatürliche Aminosäuren in großer Vielzahl kommerziell zur Verfügung. Bausteine, die in dieser Arbeit schließlich auch synthetisch eingesetzt wurden, sind im Folgenden nach ihren Hauptmerkmalen geordnet aufgeführt.

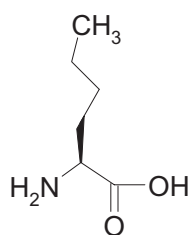
- Aliphatische Aminosäuren, die große hydrophobe Flächen präsentieren:



Cyclohexylalanin
(Cha)

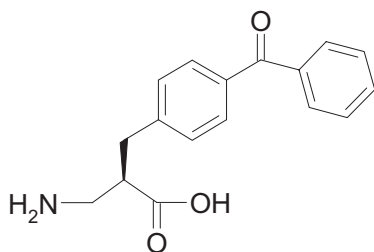


Cyclohexylglycin
(Chg)

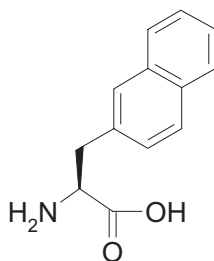


2-Aminohexansäure
(Ahx)

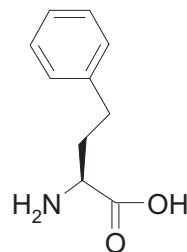
- Aromatische Aminosäuren mit erweiterten Ringsystemen:



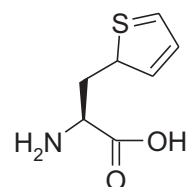
p-Benzoylphenylalanin
(Bpa)



2-Naphtylalanin
(2Nal)

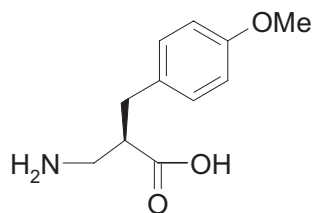


Homophenylalanin
(Hfa)

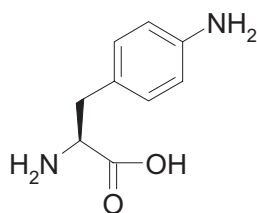


2-Thienylalanin
(Thi)

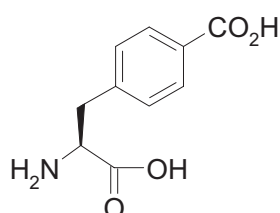
- Aromatische Aminosäuren, die zusätzlich als Wasserstoffbrücken-Akzeptoren oder Donatoren fungieren können:



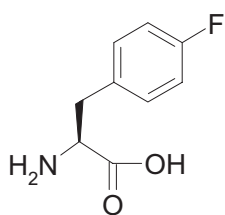
O-Methyltyrosin
(Omy)



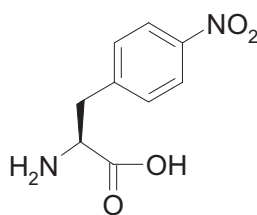
p-Aminophenylalanin
(Paf)



p-Carboxyphenylalanin
(Pcf)

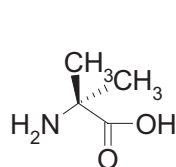


p-Fluorophenylalanin
(Pff)

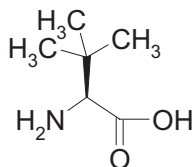


p-Nitrophenylalanin
(Pnf)

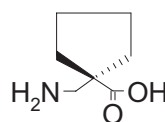
- Aminosäuren, die die konformationelle Flexibilität des Peptidmimetikums einschränken:



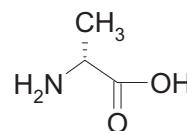
Aminoisobutansäure
(Aib)



tert-Leucin
(Tle)

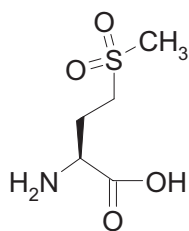


1-Aminocyclopentyl-
carbonsäure
(1Acpc)

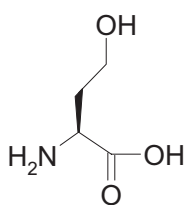


D-Alanin
(dAla)

- Aliphatische Aminosäuren, die polare Gruppen in variablem Abstand präsentieren:



Methioninsulfon
(Msn)



Homoserin
(Hse)

Die Auswahl der Aminosäurebausteine orientierte sich an den *modelling*-Studien, die in den nächsten beiden Abschnitten beschrieben sind.

4.1.2 Variation der Leitstruktur

Die Entwicklung neuer CD4-Liganden ging vom STD-NMR *epitope mapping* aus, das mit der Leitstruktur NMWQKVGTP-L-NH₂ durchgeführt worden war.⁷⁴ Als Arbeitshypothese diente ein Bindungsmodell, das aus der Röntgenstrukturanalyse eines Komplexes aus GP120, CD4 und einem Antikörper³³ hervorgegangen war und in großen Teilen mit den STD-NMR-Daten übereinstimmt. (siehe Abschnitt 1.3 und Abb. 1.11).

Basierend auf diesem Bindungsmodell wurden nun Aminosäuren der Leitstruktur durch unnatürliche Aminosäuren ersetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass rotierbare Einfachbindungen nah an der energetisch günstigen *staggered* Konformation gehalten wurden. Atomüberlappungen mit dem restlichen Peptid wurden durch Anpassung der Seitenketten-Torsionswinkel (χ_{1-n}) verhindert. Zur Anpassung an die Proteinoberfläche wurde zusätzlich die Lage des Peptidmimetikums relativ zum Rezeptor optimiert.

Die Methylgruppen der Aminosäure Val6 von NMWQKVGTP-L-NH₂ zeigen starke STD-Effekte und liegen im Bindungsmodell in einer ausgedehnten hydrophoben Tasche. Es sollte möglich sein, diesen Bereich des Rezeptors besser abzudecken, indem man Val6 durch Bausteine mit größeren aliphatischen oder aromatischen Seitenketten ersetzt. Dazu bieten sich einige Möglichkeiten an, die in den Abb. 4.1-4.5 veranschaulicht sind.

- Die Substitution von Val6 durch tert-Leucin (Tle) entspricht der Einführung einer dritten Methylgruppe anstelle des β -Protons (Abb. 4.1).

Neben der Präsentation einer größeren hydrophoben Oberfläche kann diese sterisch sehr anspruchsvolle Aminosäure außerdem die Konformation des Peptidrückgrats verändern bzw. dessen Flexibilität einschränken. Eine Stabilisation der Bindungskonformation wäre entropisch günstig und würde sowohl die Affinität des Peptidmimetikums zum Rezeptor erhöhen als auch die Assoziationsreaktion beschleunigen.

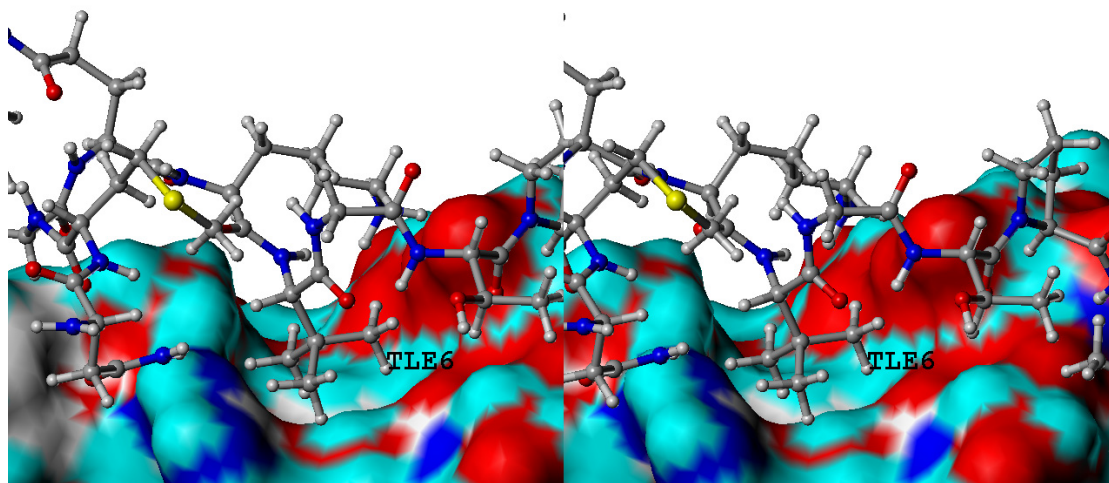


Abbildung 4.1: Substitution von Val6 durch tert-Leucin. Hier und in den folgenden Abbildungen sind jeweils die Ergebnisse der Flexidock-Simulationen gezeigt, die in Abschnitt 4.1.3 beschrieben werden. Aminosäuren von CD4, die die Bindungsfläche zu den Liganden bilden, waren in diesen Simulationen flexibel, so dass die Oberfläche des Rezeptors sich von Bild zu Bild geringfügig ändert.

- Auch die Einführung der zyklischen Aminosäure 1-Aminocyclopentylcarbonsäure (1Acpc) anstelle von Val6 ist sterisch möglich, sollte allerdings einen noch stärkeren Einfluss auf die Flexibilität des Peptid-*backbone* haben (Abb. 4.2).

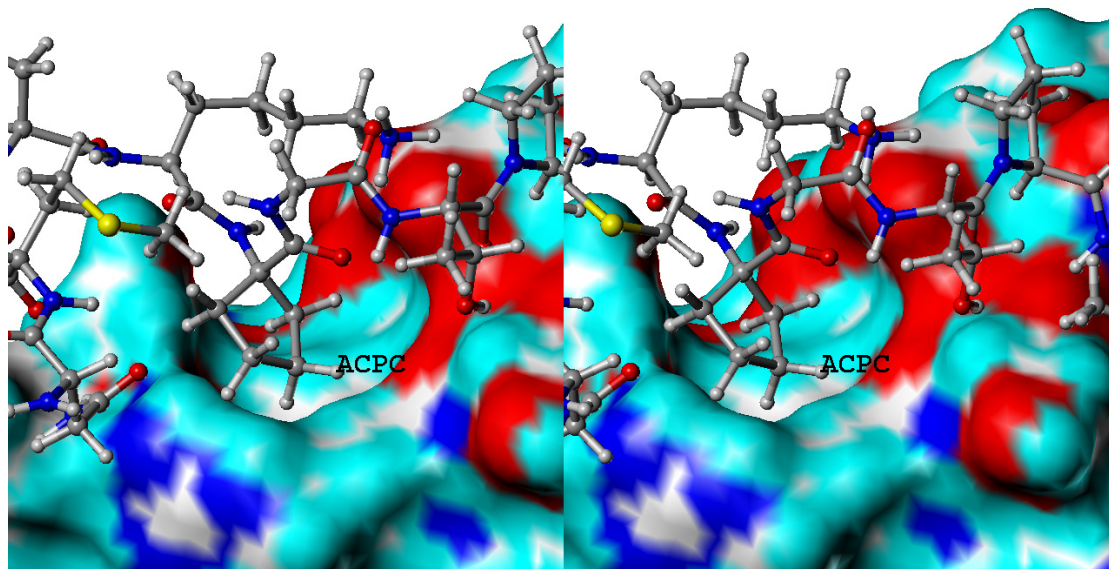


Abbildung 4.2: Substitution von Val6 durch 1-Aminocyclopentylcarbonsäure.

- Die lineare Seitenkette von L-2-Aminohexansäure (Ahx) lässt sich problemlos in die hydrophobe Tasche von CD4 einpassen (Abb. 4.3). Entropisch ist eine große Flexibilität allerdings ungünstig und kann sich negativ auf die Affinität auswirken.

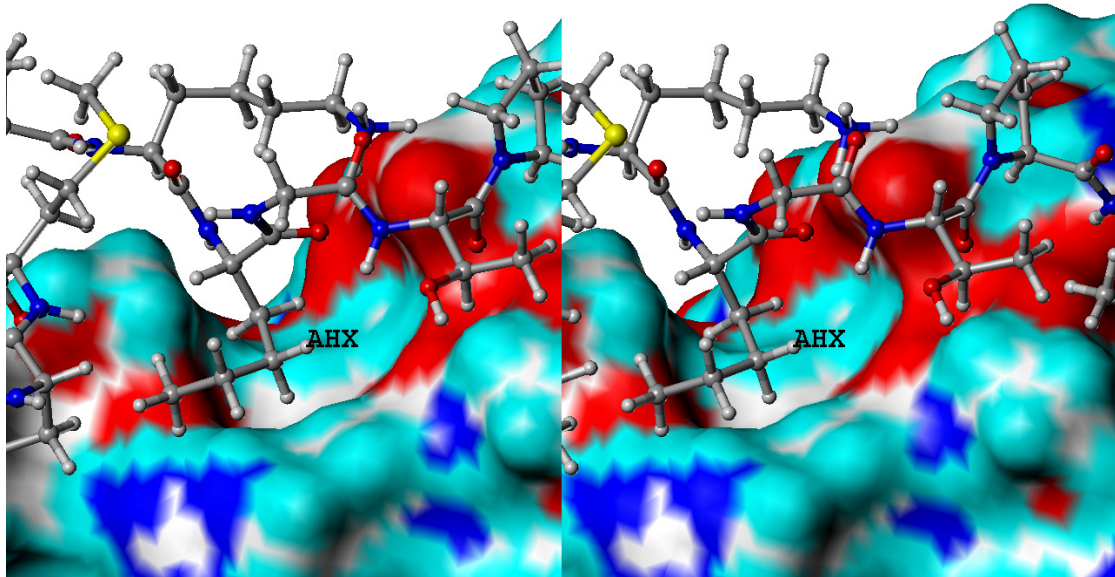


Abbildung 4.3: Substitution von Val6 durch L-2-Aminohexansäure.

- Um die im Vergleich zu Valin deutlich größere Aminosäure Cyclohexylalanin (Cha) in die Leitstruktur einzubauen, muss das gesamte Peptid geringfügig um seine Längsachse gedreht und quer dazu verschoben werden (Abb. 4.4). Die vormals von Val6 besetzte Furche wird nun fast vollständig von Cha ausgefüllt.
- Die Aminosäure Cyclohexylglycin (Chg) muss im Vergleich zu Cha in die entgegengesetzte Richtung weisen, um Überlappungen mit dem Protein zu vermeiden. Außerdem ist eine leichte Rotation des Peptids um dessen Längsachse und eine Verschiebung in Richtung C-Terminus erforderlich (Abb. 4.5).
- Aromatische Aminosäuren bieten sich an der Position von Val6 eher nicht an. Ringsysteme, die mit einer β -CH₂-Gruppe verknüpft sind, würden mit dem Rand des Ringsystems auf die Proteinoberfläche wiesen oder eine relativ starke Rotation des Peptids erfordern.

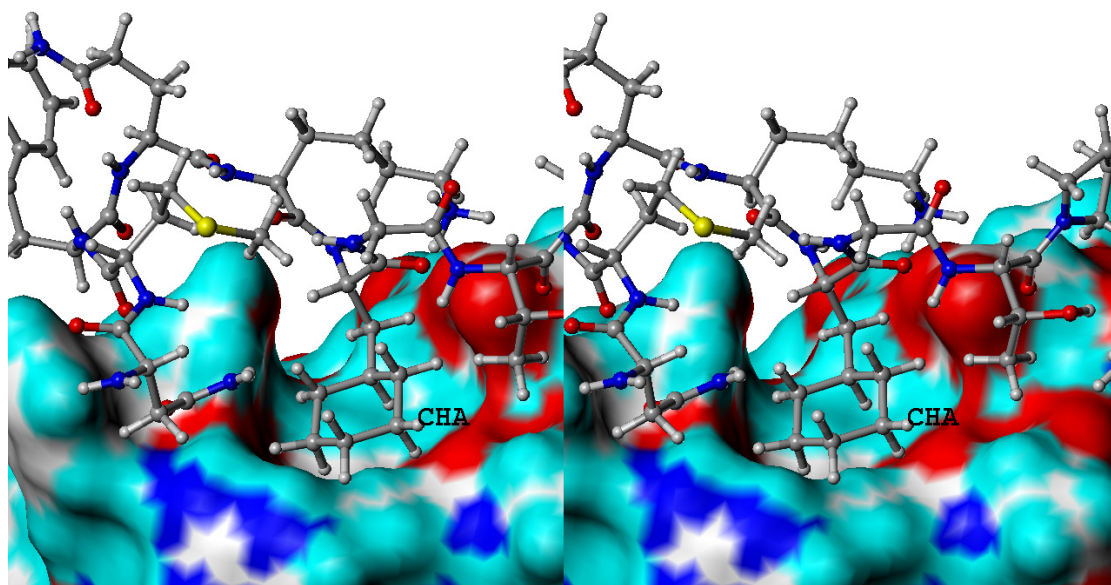


Abbildung 4.4: Substitution von Val6 durch Cyclohexylalanin.

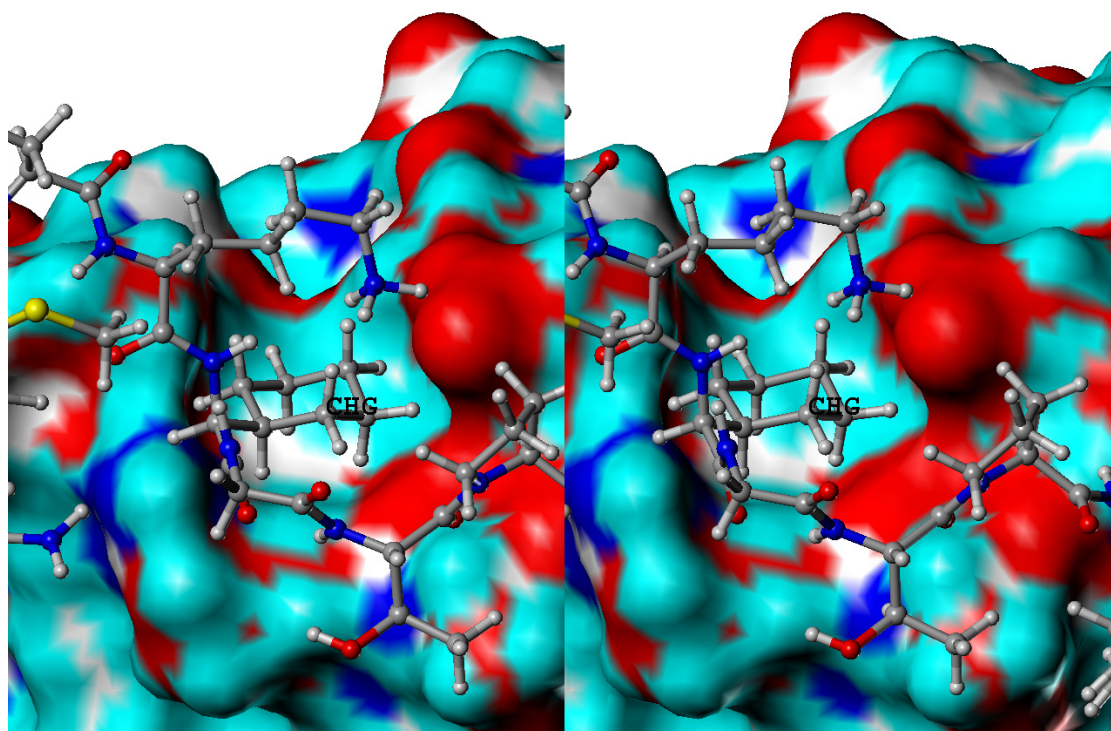


Abbildung 4.5: Substitution von Val6 durch Cyclohexylglycin.

Das flexible Homophenylalanin trägt seinen Phenylring in zu großer Entfernung vom *backbone*, als dass er die hydrophobe Furche optimal ausfüllen könnte.

Auch die Methylgruppen von Leu10 in der Leitstruktur zeigen starke STD-Effekte und befinden sich in der Nähe einer hydrophoben Fläche des CD4-Rezeptors. Da es sich nicht wie beim Bindungsbereich von Val6 um eine Furche handelt, ist es hier deutlich einfacher, Bausteine einzuführen, die größere hydrophobe Segmente präsentieren und sich auf der Oberfläche von CD4 platzieren lassen. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 4.6 die Substitution von Leu10 durch Cha dargestellt.

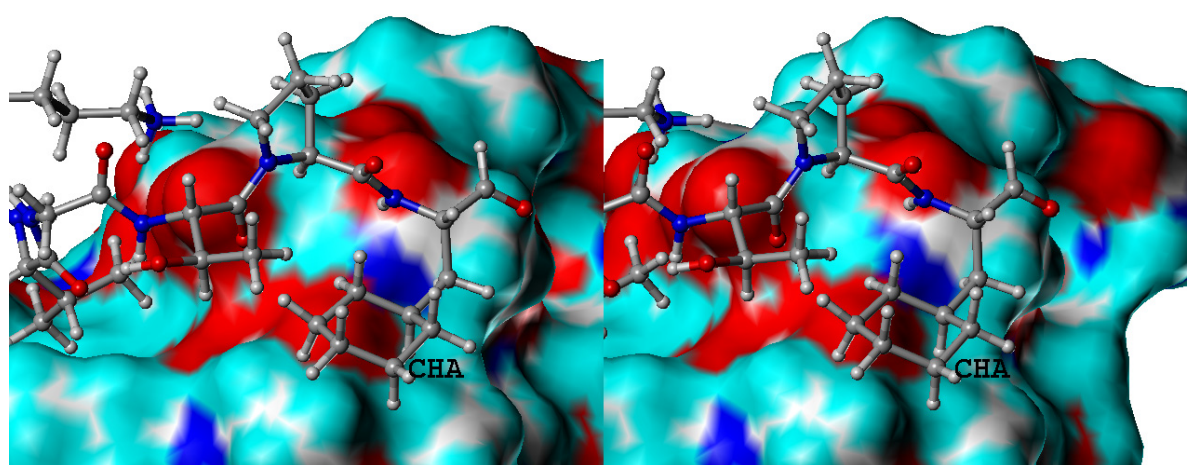


Abbildung 4.6: Substitution von Leu10 durch Cyclohexylalanin.

Die gesamte Aminosäure Trp3 der Leitstruktur steht laut STD-NMR *epitope mapping* in engem Kontakt mit dem CD4-Rezeptor. An dieser Position wurde daher eine ganze Reihe unnatürlicher, aromatischer Aminosäuren eingeführt. Da das Bindungsmodell die Wechselwirkungen der Ringprotonen von Trp3 mit CD4 jedoch nicht erklärt - der aromatische Ring weist von der CD4-Oberfläche weg, nur die Trp3- α - und β -Protonen haben Kontakt zu Phe43_{CD4} - sind für diese Substitutionen keine Molekülbilder gezeigt.

Wie schon aus Mutationsstudien hervorgeht und schließlich durch die Röntgenstruktur des CD4-GP120-17b-Komplexes verständlich wird, hat die Aminosäure Phe43_{CD4} für die Bindung von CD4 an GP120 eine zentrale Bedeutung.³³ Ihr Phenylring ragt tief in die Bindungstasche von GP120 hinein; wird Phe43 nach Val mutiert, sinkt die Dissoziationskonstante um

den Faktor 200.⁹³ Ein Peptidmimetikum, das gerade in dieser Region des CD4-Rezeptors bindet, sollte gute Chancen als Inhibitor der CD4-GP120-Interaktion haben.

Angesichts des Bindungsmodells für den CD4-NMWQKVGTP-L-Komplex erscheint es möglich, durch N-terminale Verlängerung der Leitstruktur um eine große und flexible aromatische Aminosäure das Phe43 des CD4 von beiden Seiten zu komplexieren. Beispielhaft ist in den Abb. 4.7 und 4.8 gezeigt, wie die Aminosäuren Homophenylalanin bzw. para-Benzoylphenylalanin an der Position -1 der Leitstruktur mit Phe43 wechselwirken könnten.

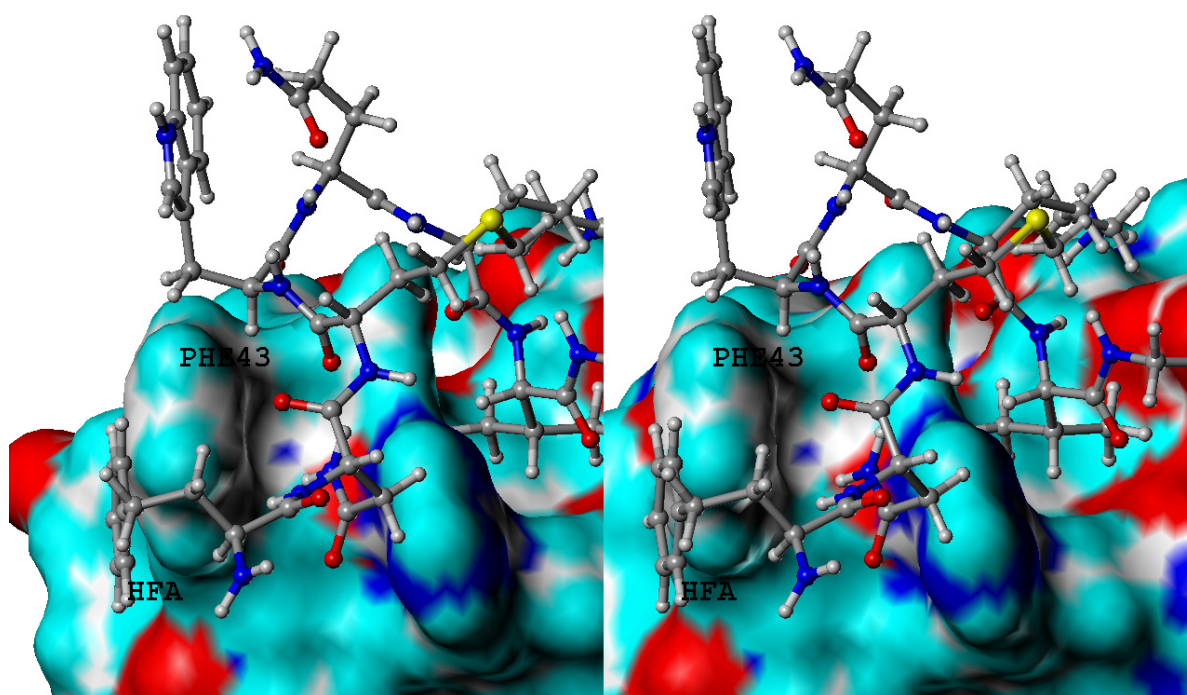


Abbildung 4.7: N-terminale Verlängerung der Leitstruktur um Homophenylalanin.

Die Methylgruppe von Thr8 zeigt einen leichten STD-Effekt, möglicherweise durch Wechselwirkung mit der hydrophoben Fläche, die von den α - und β -Protonen von Ser60_{CD4} gebildet wird. An dieser Position wurden mit Methioninsulfon (Msn) und Homoserin (Hse) zwei Aminosäuren eingebaut, die weiterhin als Wasserstoffbrückenakzeptoren fungieren können, aber andere hydrophobe Flächen präsentieren. Zur Veranschaulichung zeigt Abb. 4.9 ein Bindungsmodell mit Msn anstelle von Thr8.

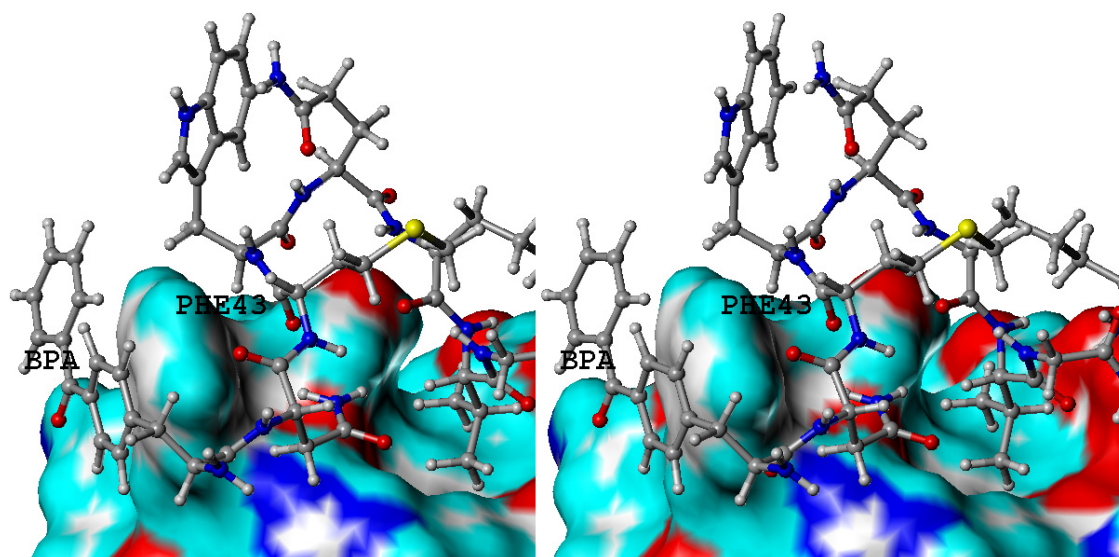


Abbildung 4.8: N-terminale Verlängerung der Leitstruktur um para-Benzoylphenylalanin.

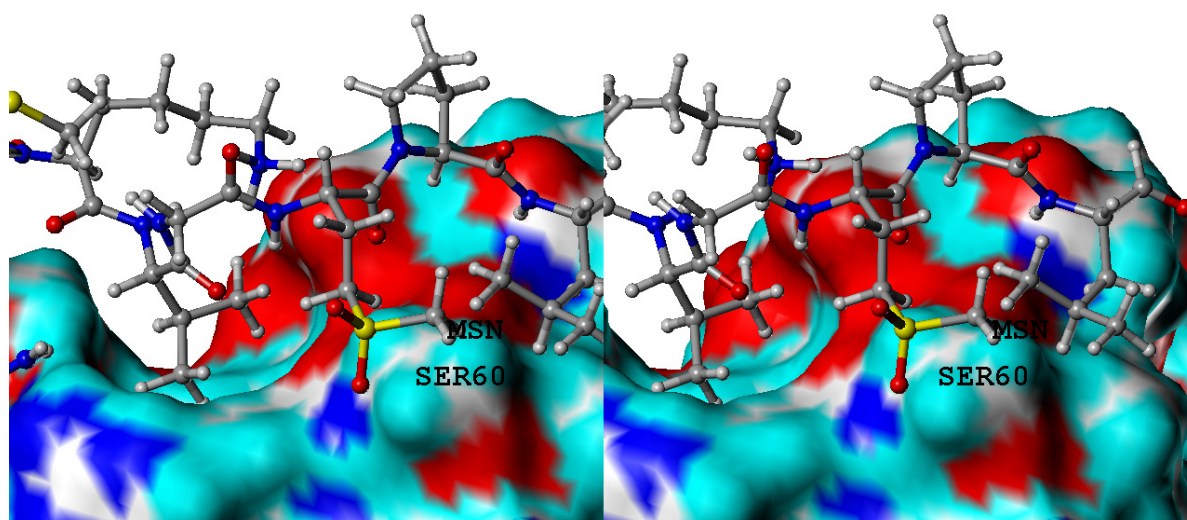


Abbildung 4.9: Einbau von Methioninsulfon anstelle von Thr8.

Alle bisher vorgestellten Variationen der Leitstruktur sind als konservativ zu bezeichnen, da die eingeführten Aminosäuren große Ähnlichkeiten zu ersetzten Resten aufweisen. In erster Linie wurden Substitutionen gesucht, die eine im „Original“ vorhandene Eigenschaft in anderer Form präsentieren.

An der Position von Gly7 wurden dagegen relativ drastische Substitutionen ausprobiert. Gly7 wurde durch D-Alanin oder Aminoisobutansäure (und schon in J. Wülfkens Dissertation⁷⁴ durch L-Alanin) ersetzt, drei Aminosäuren, die die Flexibilität des resultierenden Peptidmimetikums einschränken. Sollte die Bindungskonformation durch diese Rigidisierung stabilisiert werden, wäre dies entropisch günstig und würde sowohl die Affinität erhöhen als auch die Assoziationsrate beschleunigen. Alle drei Substitutionen lassen sich *in silico* ohne größere sterische Hemmnisse durchführen. Als Beispiel ist die Ersetzung von Gly7 durch Aib gezeigt (Abb 4.10).

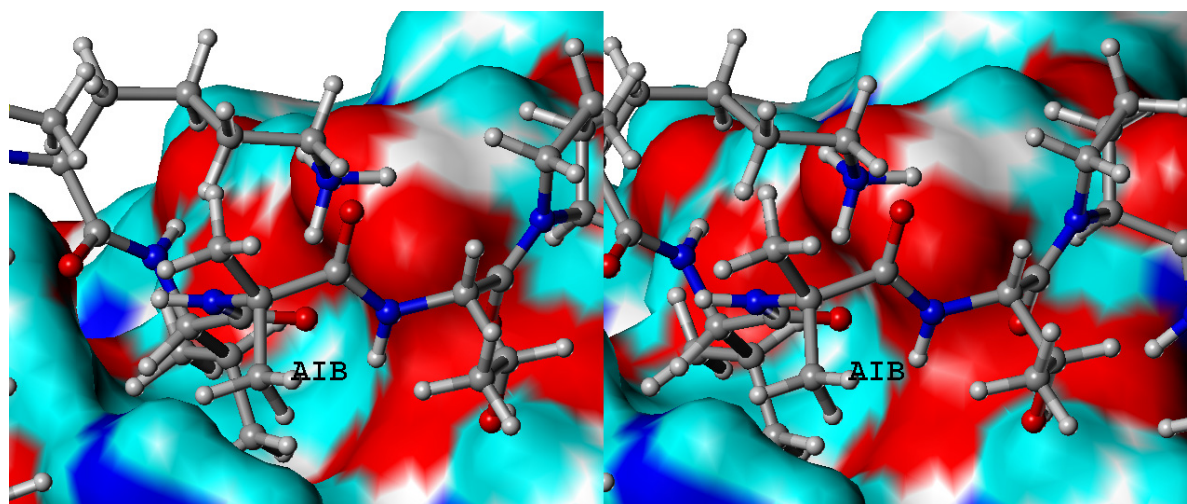


Abbildung 4.10: Einbau von Aminoisobutansäure anstelle von Gly7.

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Ergebnisse des manuellen *Docking*. Vor Berechnung der Energien wurden alle Liganden über 100 Schritte energieminiert, um eine Entspannung der Strukturen in der Bindungstasche zu ermöglichen. Einige Parameter des Tripos Kraftfelds (Wasserstoff van der Waals Radius, Wasserstoff van der Waals ϵ und van der Waals *cut-off*) wurden modifiziert, um einen Vergleich mit den Energien zu ermöglichen, die mit dem Programm Flexidock in Abschnitt 4.1.3 berechnet wurden. Insgesamt zeigt die Mehrzahl der monosubstituierten Peptidmimetika verbesserte Bindungsenergien verglichen mit der Leitstruktur, wobei zum Teil sehr deutliche Steigerungen auftreten (maximale Verbesserung: 9.3 kcal/mol), während die Bindungsenergien der schlechteren Liganden sehr nah am Wert des Ausgangspeptids liegen (maximale Verschlechterung: 2.4 kcal/mol). Den stärksten Effekt hat

die N-terminale Verlängerung um eine aromatische Aminosäure. Bis auf die Verbindung Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂ zeigen alle Undeca-peptide deutliche Verbesserungen der Bindungsenergie um 6.4 bis 9.3 kcal/mol. Die Aminosäure Homophenylalanin muss offenbar eine zu ungünstige Konformation annehmen, um mit dem dem Protein wechselwirken zu können, wie an der Energie des freien Peptids zu erkennen ist, das mit 31.1 kcal/mol den schlechtesten Wert aller betrachteten Liganden besitzt.

Tabelle 4.1: Energien der manuell an den CD4-Rezeptor angepassten Peptidmimetika mit einer Modifikationsstelle. Vor der Berechnung der Energien wurden alle Liganden in der Bindungstasche des CD4 über 100 Schritte energieminiert, wobei die Konformation des Rezeptors fixiert blieb. Die Dielektrizitätskonstante betrug $\epsilon = 10$. Um einen Vergleich mit den Ergebnissen der Flexidock-Bindungsstudien (Abschnitt 4.1.3, Tab. 4.2) zu ermöglichen, wurden einige Parameter des Tripos Kraftfeldes gegenüber den Standardwerten modifiziert: Wasserstoff van der Waals Radius: 1 Å statt 1.5 Å, Wasserstoff van der Waals ϵ : 0.03 statt 0.042, van der Waals *cut-off*: 16 Å statt 8 Å.

	Bindungsenergie [kcal/mol]	E _{gesamt} [kcal/mol]	E _{CD4} [kcal/mol]	E _{Ligand} [kcal/mol]
Bpa -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-30.889	-30.239	-20.658	21.308
Pcf -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-30.497	-30.529	-20.658	20.626
Pnf -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-29.864	-31.152	-20.658	19.370
Omy -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-29.616	-31.400	-20.658	18.874
2Nal -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-29.494	-33.317	-20.658	16.835
Paf -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-28.969	-31.508	-20.658	18.119
Pff -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-28.935	-31.176	-20.658	18.417
Thi -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-27.971	-27.151	-20.658	21.478
NMWQKVG- Ms n-PL-NH ₂	-23.010	-16.793	-20.658	26.875
NMWQK- Tle -GTPL-NH ₂	-22.423	-14.210	-20.658	28.871
Hfa -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-22.262	-11.839	-20.658	31.081
NMWQKVG- Hse -PL-NH ₂	-22.248	-13.070	-20.658	29.836
NMWQKV- Aib -TPL-NH ₂	-22.202	-21.683	-20.658	21.177
NMWQKV- dAla -TPL-NH ₂	-21.658	-17.398	-20.658	24.918
NMWQKVGTP-L-NH₂ (Referenz)	-21.564	-11.449	-20.658	30.773
NMWQK- Ahx -GTPL-NH ₂	-21.313	-12.657	-20.658	29.314
NMWQKVGTP- Ahx -NH ₂	-21.286	-9.184	-20.658	32.760
NMWQK- Cha -GTPL-NH ₂	-21.258	-18.238	-20.658	23.678
NMWQKVGTP- Chg -NH ₂	-21.084	-12.944	-20.658	28.798
NMWQKVGTP- Cha -NH ₂	-21.078	-12.259	-20.658	29.477
NMWQKVGTP- Tle -NH ₂	-20.676	-21.805	-20.658	19.529
NMWQK- 1Acpc -GTPL-NH ₂	-20.063	-12.639	-20.658	28.082
NMWQK- Chg -GTPL-NH ₂	-19.174	-12.059	-20.658	27.773

4.1.3 Bindungsstudien mit dem Programm Flexidock

Die im vorigen Abschnitt manuell getesteten Variationen der Leitstruktur wurden anschließend mit dem Flexidock-Modul der Sybyl-Software untersucht. Der von Hand in die Bindungstasche eingepasste Ligand wurde kurz (100 Schritte) energieminiert und dann über 100000 Generationen *gedockt*, was etwa 3h Rechenzeit pro Ligand erforderte. Während des *Docking* waren alle Bindungen des Liganden als drehbar zugelassen. Rezeptorseitig waren nur solche Aminosäuren flexibel, die unmittelbar die Bindungsregion bilden, d. h. Ser23, Gln25, Gln40, Ser42, Phe43, Arg59, Ser60, Leu61, Asp63 und Gln64.

In den *Docking*-Studien zeigte sich, dass die manuell positionierten Liganden einer energetisch günstigen Orientierung schon sehr nah kommen. Flexidock ändert Torsionswinkel nur noch geringfügig; kein Ligand verlässt die Bindungstasche. Es sind also keine Modifikationen eingeführt worden, die zu größeren Zwängen hinsichtlich der Konformation der Liganden oder des Platzangebots in der Bindungsregion führen. In den Tabellen 4.2 und 4.3 sind die Ergebnisse der *Docking*-Studien zusammengefasst, die einen Vergleich der eingeführten Variationen anhand der Bindungsenergien zulassen. Das *Docking* wurde mit zwei verschiedenen Dielektrizitätskonstanten ($\varepsilon = 10$ und $\varepsilon = 80$) durchgeführt, so dass Aussagen darüber möglich sind, wie die Bindungsenergie auf polare und hydrophobe Wechselwirkungen verteilt ist. Die Gewichtung polarer gegenüber unpolarer Interaktionen ist naturgemäß ein Problem des *Docking*, da meistens der Einfluss der Solvatisierung mit Wasser außer Acht gelassen wird, so dass polare Wechselwirkungen leicht überbewertet und Desolvatationseffekte auf hydrophoben Flächen unterschätzt werden.

Bei $\varepsilon = 10$ zeigen 14 der 25 untersuchten Peptidmimetika, bei $\varepsilon = 80$ sogar 24 von 25 Liganden eine verbesserte Bindungsenergie verglichen mit der Leitstruktur NMWQKVGTPPL. Unabhängig von der eingestellten Dielektrizitätskonstante zeigen die N-terminal verlängerten Peptidmimetika die besten Bindungsenergien. Die ist hauptsächlich auf die vergrößerte Kontaktfläche zum Protein zurückzuführen. Die Unterschiede innerhalb der Undeca-peptidmimetika ergeben sich einerseits aus den Größen der Aromaten – 2-Naphtylalanin bzw. Benzoylphenylalanin liegen an der Spitze – und andererseits durch die Gewichtung elektrostatischer Wechselwirkungen. Bei Homophenylalanin ist die relativ gute Bindungsenergie offenbar mit

Tabelle 4.2: Energien von monosubstituierten Peptidmimetika, die mit Flexidock an den CD4-Rezeptor gedockt wurden. Es wurden 100000 Flexidock-Generationen pro Ligand berechnet, wobei die Dielektrizitätskonstante $\varepsilon = 10$ betrug.

	Bindungsenergie [kcal/mol]	E_{gesamt} [kcal/mol]	E_{CD4} [kcal/mol]	E_{Ligand} [kcal/mol]
2Nal -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-38.58	-60.21	-32.88	11.26
Omy -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-38.27	-57.10	-32.60	13.77
Bpa -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-38.06	-54.95	-29.82	12.94
Pnf -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-37.20	-57.65	-33.43	12.98
Pff -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-36.76	-54.74	-31.95	13.97
Paf -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-36.37	-56.17	-32.08	12.28
Pcf -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-35.78	-51.62	-31.72	15.89
Thi -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-35.37	-53.78	-33.08	14.68
Hfa -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-33.94	-41.29	-30.36	23.01
NMWQK- Cha -GTPL-NH ₂	-33.28	-47.69	-33.09	18.68
NMWQKVGTP- Tle -NH ₂	-33.25	-48.57	-32.01	16.69
NMWQKV- Aib -TPL-NH ₂	-31.51	-46.47	-31.64	16.67
NMWQKVGTP- Chg -NH ₂	-31.00	-47.31	-37.08	20.76
NMWQKVGTP-L-NH₂ (Referenz)	-30.67	-41.22	-33.49	22.95
NMWQKV- dAla -TPL-NH ₂	-30.56	-42.16	-31.36	19.77
NMWQKVG- Hse -PL-NH ₂	-30.32	-43.86	-33.49	19.95
NMWQKVGTP- Ahx -NH ₂	-30.21	-44.43	-35.08	20.86
NMWQK- Chg -GTPL-NH ₂	-30.00	-45.47	-33.35	17.88
NMWQKVGTP- Cha -NH ₂	-29.57	-42.16	-33.66	21.07
NMWQKVG- Msu -PL-NH ₂	-29.52	-46.89	-35.28	17.91
NMWQK- Tle -GTPL-NH ₂	-29.51	-43.77	-34.51	20.25
NMWQK- IAcp -GTPL-NH ₂	-29.25	-36.71	-30.82	23.36
NMWQK- Ahx -GTPL-NH ₂	-26.51	-36.21	-33.15	23.45

einer ungünstigen Konformation des Liganden verbunden. Das so modifizierte Undecapeptid zeigt in beiden Flexidock-Durchgängen die geringste Bindungsenergie der N-terminal verlängerten Liganden.

Bei den Decapeptiden erweisen sich Substitutionen von Val6 durch Cyclohexylalanin, von Gly7 durch Aminoisobutansäure und von Leu10 durch tert-Leucin als günstig. Die Substitution von Val6 durch 2-Aminohexansäure bildet in beiden *Docking*-Durchgängen das Schlusslicht. Da die Flexidock-Studien die manuell entworfenen Variationen unterstützen und keine Substitution identifiziert werden konnte, die mit großer Wahrscheinlichkeit deutlich schlechter als die Leitstruktur an den CD4-Rezeptor binden würde, sind alle *gedockten* Peptidmimetika auch synthetisiert worden.

Tabelle 4.3: Energien von monosubstituierten Peptidmimetika, die mit Flexidock an den CD4-Rezeptor gedockt wurden. Es wurden 100000 Flexidock-Generationen pro Ligand berechnet, wobei die Dielektrizitätskonstante $\varepsilon = 80$ betrug.

	Bindungsenergie [kcal/mol]	E _{gesamt} [kcal/mol]	E _{CD4} [kcal/mol]	E _{Ligand} [kcal/mol]
Bpa -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-37.14	-28.32	-3.36	12.18
Paf -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-35.55	-30.52	-7.23	12.27
Thi -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-34.76	-27.48	-6.76	14.03
2Nal -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-33.71	-29.03	-6.96	11.65
Pnf -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-33.69	-23.99	-4.19	13.89
Pff -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-33.27	-24.42	-3.63	12.49
Pcf -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-33.10	-21.37	-3.02	14.74
Omy -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-32.83	-25.46	-4.42	11.79
NMWQK- Cha -GTPL-NH ₂	-31.82	-15.00	-8.85	25.67
Hfa -NMWQKVGTP-L-NH ₂	-30.99	-14.07	-4.06	20.98
NMWQKV- Aib -TPL-NH ₂	-29.69	-26.05	-8.58	12.23
NMWQKVGTP- Tle -NH ₂	-29.41	-20.20	-6.30	15.50
NMWQKVG- Msn -PL-NH ₂	-28.62	-16.10	-4.76	17.27
NMWQKVG- Hse -PL-NH ₂	-27.67	-14.43	-4.40	17.64
NMWQK- Chg -GTPL-NH ₂	-26.82	-12.93	-2.50	16.40
NMWQK- Tle -GTPL-NH ₂	-26.77	-13.22	-4.60	18.15
NMWQKVGTP- Ahx -NH ₂	-26.76	-17.43	-6.58	15.91
NMWQKVGTP- Cha -NH ₂	-26.64	-14.67	-6.65	18.62
NMWQK- 1Acpc -GTPL-NH ₂	-26.64	-13.70	-6.28	19.22
NMWQKV- dAla -TPL-NH ₂	-26.59	-19.13	-6.21	13.68
NMWQKVGTP- Chg -NH ₂	-25.52	-16.46	-5.20	14.26
NMWQKVGTP-L-NH₂ (Referenz)	-24.18	-12.20	-6.08	18.06
NMWQK- Ahx -GTPL-NH ₂	-23.42	-8.28	-6.42	21.56

4.2 Festphasensynthesen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Festphasen-Peptidsynthesen an einem Parallelsyntheseroboter MOS 496 Ω der Firma Advanced Chemtech durchgeführt. Bei diesem Gerät erfolgen in einem Teflon-Block im *Batch*-Verfahren bis zu 96 Parallel-Synthesen. Es können auch sehr kleine Ansätze von 10 μ mol mit dem Gerät durchgeführt werden. Da dieses System in der Lage ist, sehr kleine Volumina genau zu pipettieren, und das Totvolumen klein ist, können konzentrierte Lösungen zum Anknüpfen der Aminosäure benutzt werden. Üblicherweise reicht ein 2.5facher Überschuss an Aminosäure aus. Gerade für Untersuchungen, bei denen mehrere ähnliche Peptide benötigt werden, bietet sich die Synthese mit diesem Gerät an.

Im Laufe dieser Arbeit wurden in drei separaten Ansätzen 53 Peptide, bestehend aus je zehn bzw. elf Aminosäuren, in 10 μ mol-Ansätzen synthetisiert und für SPR- und NMR-Studien eingesetzt. Nach der Aufreinigung über RP-HPLC lag die Durchschnittsausbeute der reinen Peptide bei 30 %. Dabei reichten die Ausbeuten von 5 bis 97 %. Dieses Ergebnis kann als befriedigend angesehen werden. Es ist bekannt, dass bei der Festphasen-Peptidsynthese Probleme bei bestimmten Sequenzen auftreten können. Diese problematischen Sequenzen sind aber nur sehr schwer vorhersehbar. Insbesondere bei Sequenzen mit mehr als sechs Aminosäuren können sich Sekundärstrukturen ausbilden, die zu deutlichen Verlusten bei der Synthese führen können. Von allen Peptiden war jedoch für die folgenden Untersuchungen ausreichend Substanz aufgereinigt worden, so dass eine Optimierung der Synthesen nicht von Interesse war.

4.3 Synthese einfach modifizierter Liganden

Es war in Rahmen dieser Doktorarbeit weder durchführbar noch erwünscht, alle potentiell sinnvollen Variationen in allen denkbaren Kombinationen ($10 \cdot 10 \cdot 5 \cdot 3 \cdot 3 \cdot 4 = 18000$ Peptide) synthetisch herzustellen. In Anlehnung an die *positional scanning* Strategie, kann der synthetische Aufwand jedoch drastisch gesenkt werden, indem zuerst Peptidmimetika hergestellt werden, die jeweils nur an einer Position variiert sind. Diese Verbindungen können dann getestet werden, damit anschließend nur noch erfolgreiche Variationsstellen kombiniert werden müssen.⁹⁴

Insgesamt wurden 31 monosubstituierte Peptidmimetika mittels Parallelsynthese hergestellt, deren Daten in Tab. 4.4 zusammengestellt sind. Alle Substanzen wurden HPL-chromatographisch über eine RP18-Phase gereinigt und ihre Identität durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt. Die Ausbeute an reinen Peptidmimetika betrug 8 - 75%. Stellvertretend wurden vier Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert. Diese Peptidmimetika zeigen ausschließlich sequentielle NOEs sowie Kontakte innerhalb der betreffenden Aminosäure. Dies deutet auf weitgehend gestreckte Konformationen hin, die mit dem Bindungsmodell aus der Röntgenstruktur vereinbar sind.

Tabelle 4.4: Übersicht über Peptidmimetika mit einer Modifikationsstelle. ^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen der Peptide Bpa-NMWQKVGTP-L-NH₂, Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂, NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ und NMWQKVGTP-Cha-NH₂ sind in Abschnitt 7.4 zusammengestellt.

Peptid / Peptidmimetikum	Molmasse [g/mol]	MALDI-TOF [M+H] ⁺	Reinausbeute [mg]	[%]
2Nal -NMWQKVGTP-L-NH ₂	1369.66	1370	5.60	40.9
Bpa -NMWQKVGTP-L-NH ₂	1423.71	1423	10.61	74.5
Hfa -NMWQKVGTP-L-NH ₂	1333.63	1334	5.30	39.7
Omy -NMWQKVGTP-L-NH ₂	1349.63	1350	5.90	43.7
pAF -NMWQKVGTP-L-NH ₂	1334.62	1335	6.30	47.2
pCF -NMWQKVGTP-L-NH ₂	1363.61	1364	5.80	42.5
pFF -NMWQKVGTP-L-NH ₂	1337.59	1338	1.00	7.5
pNF -NMWQKVGTP-L-NH ₂	1364.60	1365	5.00	36.6
Thi -NMWQKVGTP-L-NH ₂	1325.63	1326	7.70	58.1
NM- 2Nal -QKVGTP-L-NH ₂	1183.45	1183	5.90	49.9
NM- Bpa -QKVGTP-L-NH ₂	1237.50	1238	3.50	28.3
NM- Hfa -QKVGTP-L-NH ₂	1147.42	1148	1.00	8.7
NM- Omy -QKVGTP-L-NH ₂	1163.41	1164	1.40	12.0
NM- pAF -QKVGTP-L-NH ₂	1148.40	1149	5.10	44.4
NM- pCF -QKVGTP-L-NH ₂	1177.40	1177	2.80	23.8
NM- pFF -QKVGTP-L-NH ₂	1151.38	1152	1.50	13.0
NM- pNF -QKVGTP-L-NH ₂	1178.39	1179	3.10	26.3
NM- Thi -QKVGTP-L-NH ₂	1139.41	1139	2.70	23.7
NMWQK- 1Acpc -GTPL-NH ₂	1184.44	1184	2.30	19.4
NMWQK- 2Ahx -GTPL-NH ₂	1186.45	1187	4.29	36.2
NMWQK- Cha -GTPL-NH ₂	1226.52	1227	1.90	15.5
NMWQK- Chg -GTPL-NH ₂	1212.49	1213	2.99	24.7
NMWQK- Tle -GTPL-NH ₂	1186.45	1186	2.60	21.9
NMWQKV- Aib -TPL-NH ₂	1200.48	1201	3.60	30.0
NMWQKV- dAla -TPL-NH ₂	1186.45	1187	2.80	23.6
NMWQKVG- Hse -PL-NH ₂	1172.43	1172	2.70	23.0
NMWQKVG- Msn -PL-NH ₂	1234.52	1235	3.71	30.0
NMWQKVGTP 2Ahx -NH ₂	1172.43	1173	3.40	29.0
NMWQKVGTP- Cha -NH ₂	1212.49	1212	3.30	27.2
NMWQKVGTP- Chg -NH ₂	1198.46	1198	3.20	26.7
NMWQKVGTP- Tle -NH ₂	1172.43	1173	2.70	23.0

4.3.1 Bindungsstudien mittels SPR

Die an einzelnen Positionen variierten Peptidmimetika wurden mittels SPR auf ihre Bindung an den CD4-Rezeptor untersucht. Es wurde ein lösliches, in CHO-Zellen exprimiertes CD4-Konstrukt verwendet, das nur die extrazellulären Domänen D1-D4 umfasste und im Rahmen des *AIDS Reagent Program* vom NIH zur Verfügung gestellt wurde. Von diesem Protein wurden 4825 RU (4.825 ng, 107.2 fmol) auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Die Aktivität

des Chips wurde mit GP120 getestet, das von der Firma Australbio bezogen worden war. Dabei zeigte die Bindungsreaktion zwischen löslichem GP120 und immobilisiertem CD4-Rezeptor die typische, sehr langsame Kinetik und eine durch Division von *off* und *on rate* berechnete Dissoziationskonstante von ca. 150 nM. Dieser etwas zu hoch liegende Wert (Literaturdaten: $K_D \approx 1 - 35 \text{ nM}$),⁴²⁻⁴⁵ ist auf *rebinding* zurückzuführen, da eine sehr hohe Belegung mit CD4 gewählt worden war, um hohe Empfindlichkeit bei den Messungen mit den Peptidmimetika zu gewährleisten. Aus den Kontrollexperimenten mit GP120 ging hervor, dass etwa 8 % des immobilisierten CD4-Rezeptors bindungsaktiv auf dem Sensorchip vorlagen. Eine Restaktivität von knapp 10 % des CD4-Proteins wurde auch bei SPR-Messungen beobachtet, die bei der Firma Biacore durchgeführt wurden, wobei hier CD4 der Firma Progenics (Expressionssystem: CHO-Zellen) immobilisiert und GP120 vom *National Institute of Biological Standards and Control* (Expressionssystem: Baculovirus) verwendet wurde. (siehe Abschnitte 4.4.1, 7.1 und 7.5)

Als Referenz zu den neuen Liganden diente die Leitstruktur NMWQKVGTP_L-NH₂, die bei 1 mM Konzentration ein SPR-Signal von 18 RU zeigte. Sofern es die Löslichkeit erlaubte, wurden die monovariierten Peptidmimetika in der gleichen Konzentration eingesetzt. Die Verbindungen Thi-NMWQKVGTP_L-NH₂ und 2Nal-NMWQKVGTP_L-NH₂ konnten nur in 125 μM Konzentration vermessen werden. Abbildung 4.11 und Tabelle 4.5 zeigen die Ergebnisse der SPR-Experimente. Viele der neuen Peptidmimetika (13/31) zeigen verglichen mit der Leitstruktur eine verstärkte Bindung im SPR-Experiment. Die Bindung einiger Substanzen (9/31) bewegt sich auf gleichem Niveau wie bei der Leitstruktur, während insgesamt wenige Peptidmimetika (9/31) ein schwächeres SPR-Signal aufweisen.

Besonders starken Effekt auf die CD4-Bindung im SPR-Experiment hat die Substitution von Val6 oder Leu10 durch große aliphatische Aminosäuren wie Cyclohexylalanin (Cha) und die N-terminale Verlängerung der Leitstruktur um eine aromatische Aminosäure. Der Austausch von Val6 durch Cha bewirkt eine Erhöhung des SPR-Signals um den Faktor neun. Cha anstelle von Leu10 verdreifacht die Bindung. Von den aromatischen Aminosäuren an Position -1 sind Benzoylphenylalanin (Bpa) und Homophenylalanin (Hfa) hervorzuheben. Bpa bewirkt eine 13fach stärkere Bindung, Hfa erhöht das SPR-Signal verglichen mit der

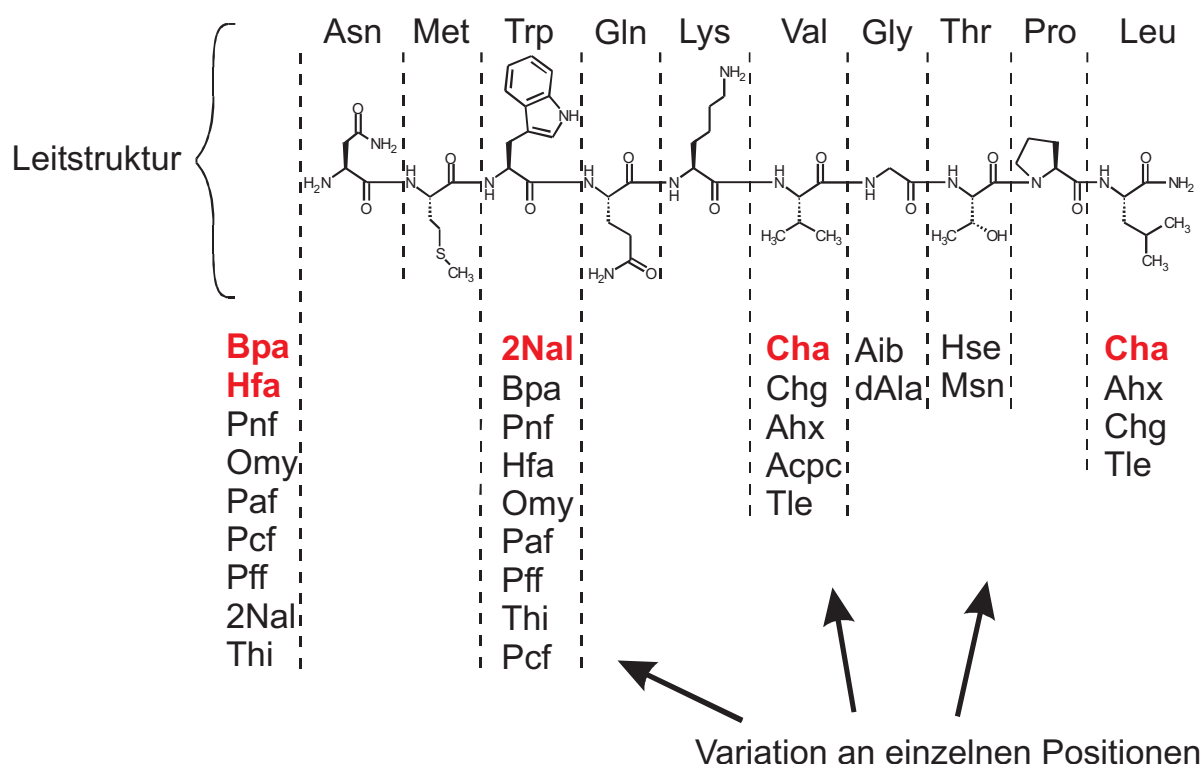


Abbildung 4.11: Überblick über die Bibliothek von Peptidmimetika mit einer Variationsstelle. In rot hervorgehoben sind Aminosäuren, deren Einbau an der entsprechenden Position im SPR-Experiment einen besonders starken Effekt auf die CD4-Bindung hat.

Leitstruktur um mehr als das 5fache. Diese Ergebnisse weisen in dieselbe Richtung wie die Flexidock-Simulationen (Abschnitt 4.1.3), in denen die N-terminal verlängerten Peptidmimetika die günstigsten Bindungsenergien aufwiesen. Auch die Einführung von Cha anstelle von Val6 hatte dort die Bindungsenergie deutlich verbessert.

Wie Abb. 4.12 exemplarisch für die Peptidmimetika Bpa-NMWQKVGTP-L-NH₂ und NMWQK-Cha-GTP-L-NH₂ zeigt, ist die Wechselwirkung der monosubstituierten Peptide nicht sättigbar, d. h. Verdünnungsreihen zeigten einen weitgehend linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Bindung im SPR-Experiment. Daher konnten keine Affinitätskonstanten bestimmt werden. Dies ist vermutlich durch unspezifische Wechselwirkungen der Verbindungen mit dem immobilisierten CD4-Protein oder der Sensorchipoberfläche zu erklären. Ein Grund dafür könnte darin bestehen, dass bei dem verwendeten Immobilisierungsprotokoll etwa 92% der Proteinaktivität, gemessen an der Bindungsfähigkeit für HIV-GP120,

Tabelle 4.5: Ergebnisse der SPR-Bindungsstudien monosubstituierter Peptidmimetika. (n. m. - nicht messbar)

Peptid / Peptidmimetikum										c [mM]	SPR-Signal [RU]
N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	-	P - L	1	18 (Referenz)
										0.1	2
Bpa	- N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	239
	N - M -	W	- Q - K -	Cha	-	G	-	T	- P - L	1	158
Hfa	- N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	98
Pnf	- N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	70
Omy	- N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	61
	N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - Cha	1	51
	N - M -	2Nal	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	42
Paf	- N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	41
	N - M -	Bpa	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	32
	N - M -	W	- Q - K -	Chg	-	G	-	T	- P - L	1	30
	N - M -	W	- Q - K -	2Ahx	-	G	-	T	- P - L	1	27
	N - M -	W	- Q - K -	V	-	Aib	-	T	- P - L	1	19
Pff	- N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	18
	N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	Hse	- P - L	1	15
	N - M -	W	- Q - K -	Tle	-	G	-	T	- P - L	1	15
	N - M -	W	- Q - K -	1Acpc	-	G	-	T	- P - L	1	15
Pcf	- N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	13
	N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - 2Ahx	1	13
	N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	Msn	- P - L	1	11
	N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - Tle	1	10
	N - M -	Pnf	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	8
	N - M -	W	- Q - K -	V	-	dAla	-	T	- P - L	1	7
	N - M -	Omy	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	4
	N - M -	Hfa	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	4
	N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - Chg	1	0
	N - M -	Paf	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	0
	N - M -	Pff	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	0
	N - M -	Thi	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	0
	N - M -	Pcf	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	-10
2Nal	- N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	n. m.
										0.125	3.5
Thi	- N - M -	W	- Q - K -	V	-	G	-	T	- P - L	1	n. m.
										0.125	6.4

verloren gehen, das inaktivierte Protein jedoch weiterhin für unspezifischen Wechselwirkungen zur Verfügung steht. Eine weitere Quelle für Artefakte im SPR-Experiment können die Carboxylatgruppen der Dextranmatrix sein, die unspezifisch elektrostatische Wechselwirkungen eingehen und so zu hohen oder zu niedrigen SPR-Signalen auf der Referenzzelle führen können. Da die eingeführten Aminosäuren mit deutlichem Effekt im SPR-Experiment jedoch

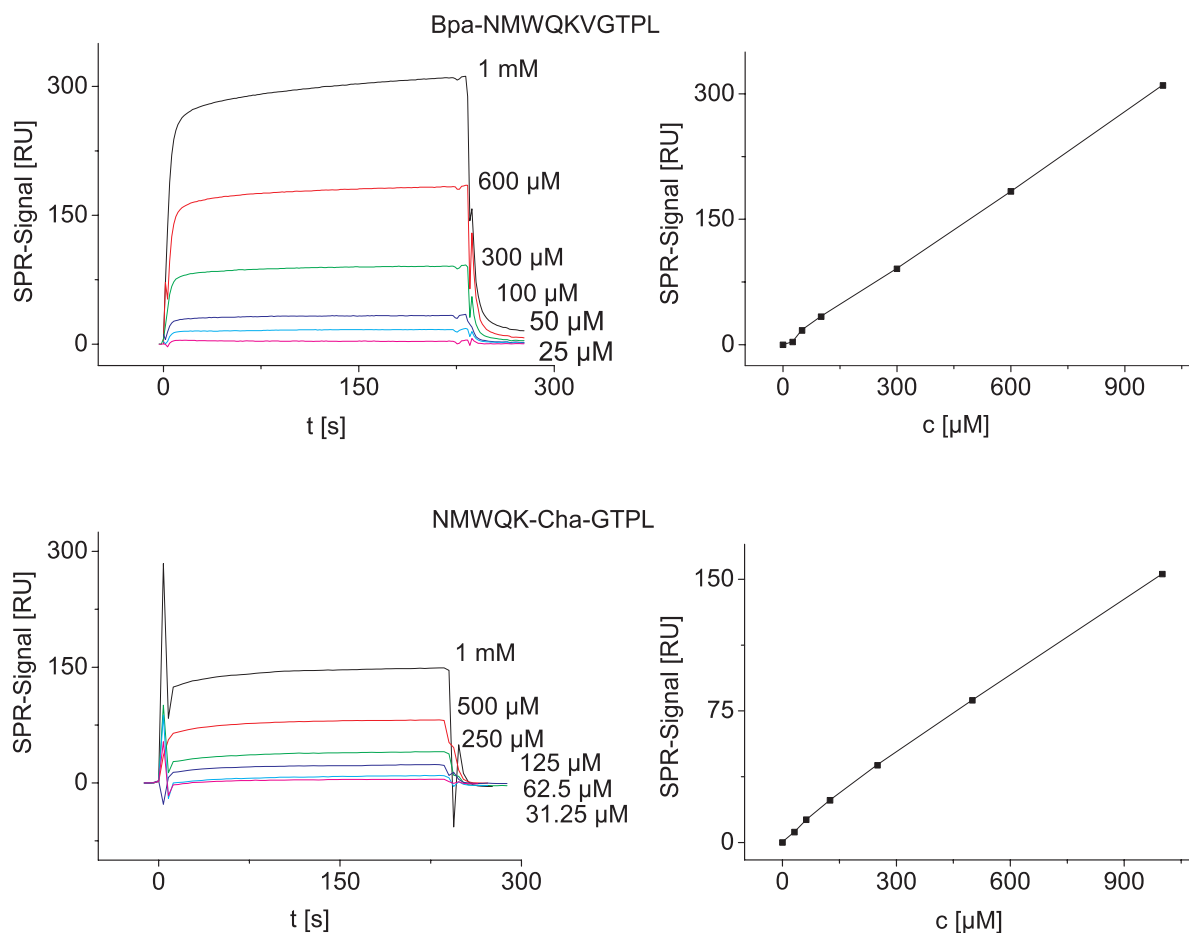


Abbildung 4.12: SPR-Verdünnungsreihen der Peptidmimetika Bpa-NMWQKVGTP-NH₂ und NMWQK-Cha-GTTP-NH₂. Die Gleichgewichts-SPR-Signale sind proportional zu Konzentration des mobilen Liganden. Es wird keine Sättigung beobachtet. Dies ist ein Kennzeichen für unspezifische Bindung.

hydrophober Natur sind, spielen elektrostatische Interaktionen wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle.

Alle monosubstituierten Peptidmimetika weisen Bindungskinetiken auf, die an der Grenze dessen liegen, was noch mit einem Biacore 3000 aufgelöst werden kann. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen – hohe Belegung, um hohe Empfindlichkeit zu erreichen; niedrige Flussrate, um wenig Substanz zu verbrauchen – folgt die Assoziation der Liganden nicht einem einfachen kinetischen Modell und ist wahrscheinlich massentransportlimitiert. Die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{on} konnte daher nicht ermittelt werden.

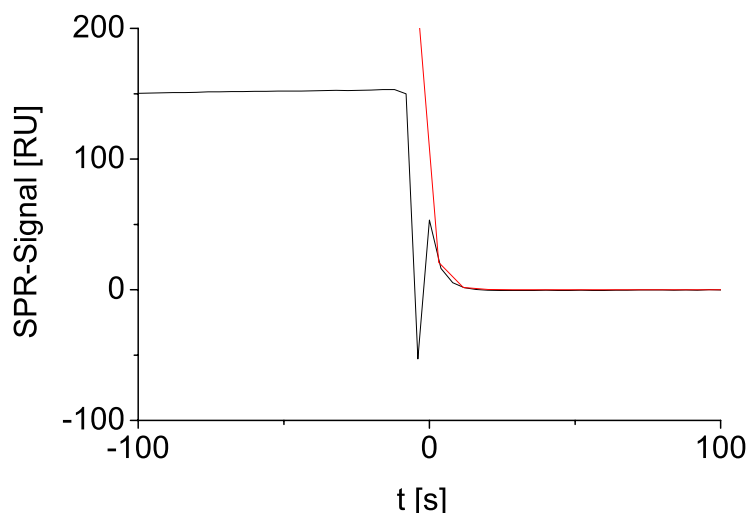


Abbildung 4.13: Dissoziation des Peptidmimetikums NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ vom Sensorchip. Belegung mit CD4: 4825 RU, $c_{\text{Peptid}} = 1 \text{ mM}$. Die Anpassung der Dissoziationskurve an ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung ergibt eine *off rate* von 0.29 s^{-1} .

Die Dissoziationkurven lassen sich recht gut mit einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung beschreiben, wie Abb. 4.13 für das Peptidmimetikum NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ beispielhaft illustriert. Die k_{off} -Werte aller monosubstituierten Peptidmimetika liegen um 0.3 s^{-1} . Durch *rebinding*-Effekte auf der hochbelegten Chipoberfläche kann die wahre Dissoziationsrate allerdings höher sein. Eine Berechnung der Gleichgewichtskonstanten aus den kinetischen Konstanten war ohne Kenntniss der Assoziationsrate nicht möglich.

Aus den SPR-Signalen bei Ligandkonzentrationen von 1 mM eine Rangfolge der Peptidmimetika aufzustellen ist aus zwei Gründen problematisch. Einerseits ist der unspezifische Anteil der Bindung nicht zu ermitteln. Zum anderen dürfen bei der verwendeten Konzentration noch nicht alle Bindungsstellen des Proteins besetzt sein, damit Unterschiede in der Affinität sich noch in unterschiedlicher Proteinbelegung und damit in Intensitätsunterschieden des SPR-Signals niederschlagen können.

Da die Ergebnisse der SPR-Experimente mit den monosubstituierten Peptidmimetika durch die *Docking*-Studien gestützt werden, bildeten sie trotz der eben genannten Probleme die Grundlage für die Synthese einer weiteren Serie von Peptidmimetika, die in Abschnitt 4.4 beschrieben ist.

4.3.2 STD-NMR-Experimente

Einige ausgewählte Peptidmimetika mit einer Variationsstelle wurden mit der STD-NMR Methode untersucht. Dabei sollten einerseits Affinitätskonstanten bestimmt und außerdem Informationen zum Bindungsepitop gesammelt werden. Für die Bestimmung von K_D müssen STD-NMR Spektren bei verschiedenen Ligandkonzentrationen aufgenommen werden. Im Vergleich zu NMR-Titrationsreihen z. B. mit Sacchariden, die aus hochkonzentrierten Stammlösungen zudosiert werden können, musste hier aufgrund der geringen Löslichkeit (je nach Verbindung zwischen 100 μM und einigen mM) ein anderer Weg gewählt werden.

Zuerst wurde die Ligandkonzentration einer NMR-Probe von Messung zu Messung erhöht, indem weiterer Feststoff in der Probenlösung aufgelöst wurde. Um die sehr geringen Mengen an Ligand zuverlässig zu dosieren, wurden definierte Volumina einer z. B. 1 mM Stammlösung lyophilisiert. Welche Konzentration in der Probe schließlich erreicht wurde, konnte unabhängig mit Hilfe von 2,2-Dimethyl-2-silapentyl-5-sulfonat (DSS) als internem Standard der NMR-Messungen bestimmt werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass der CD4-Rezeptor die wiederholte Auflösung von Liganden nicht unbeschadet übersteht. Möglicherweise kommt es an der Grenzfläche zum Feststoff zu lokalen Extrema des pH-Werts oder der Ligandkonzentration, die zur Ausfällung des Proteins führen.

Als erfolgreich erwies sich schließlich eine Vorgehensweise, bei der pro Titrationsreihe zwei NMR-Proben angesetzt werden, von denen zu Anfang eine die gewünschte maximale Ligandkonzentration und die andere keinen Ligand enthält. Durch „Austausch“ definierter Volumina zwischen den beiden Proben wird sukzessive Ligand aus der hoch- in die niedrigkonzentrierte Probe überführt, wobei das Probenvolumen konstant bleibt. Durch die Größe des „getauschten“ Volumens kann man wählen, wie dicht die Titrationspunkte beieinander liegen. Die tatsächlich vorhandene Ligandkonzentration wurde wiederum mit Hilfe von DSS als internem Standard bestimmt.

CD4-ausfällende Konzentrationsspitzen wurden verhindert, indem die Liganden zuerst in einer kleinen Menge des NMR-Probenpuffers (PBS in D_2O) vorgelöst wurden. Erst danach wurde die CD4-Rezeptor-haltige Lösung zugefügt. Dieses Vorgehen hat den weiteren Vorteil,

dass gesättigte Lösungen des Liganden vermieden werden, die durch die Existenz von Aggregaten oder Mizellen zu Artefakten im STD-NMR Experiment führen können.

Um maximale Empfindlichkeit zu erreichen, wurden die STD-NMR Spektren in Shigemi-NMR-Röhrchen durchgeführt, bei denen sich das gesamte Probenvolumen innerhalb der Empfängerspule des Probenkopfes befindet. Magnetfeldinhomogenitäten, die an den Grenzschichten ober- und unterhalb des Probenvolumens entstehen, werden durch Spezialglas minimiert. Für die NMR-Titrationsen wurde mit $100\text{ }\mu\text{g}$ (2.2 nmol , $8.8\text{ }\mu\text{M}$ in $250\text{ }\mu\text{L}$) CD4-Rezeptor pro Probe gearbeitet. Wie bei den SPR-Experimenten handelt es sich um CD4 aus CHO-Zellen, das hier jedoch in größerer Menge von der Firma Progenics Pharmaceuticals bezogen wurde.

Die Auswertung der STD-Titrationsreihen verlief analog zu den SPR-Verdünnungsreihen. Hier ist die Anpassung der Gleichung für ein *one-site binding* Modell an die STD-Amplifikationsfaktoren bei der jeweiligen Konzentration jedoch eine Näherung. Im Vergleich zum SPR-Verfahren streben die STD-Amplifikationsfaktoren langsamer einem Maximalwert zu, da durch den Austausch zwischen gebundenem und freiem Zustand auch bei vollständiger Belegung aller Bindungsstellen des Rezeptors mehr Sättigung übertragen wird, wenn der Ligandüberschuss weiter erhöht wird. Der exakte Kurvenverlauf hängt von der Kinetik der Austauschreaktion, der Zeitkonstante für die Sättigung und den T_1 -Relaxationszeiten der betrachteten Protonen ab (siehe Abschnitt 2.1). Diese Parameter waren nicht bekannt, so dass auf das einfachere Modell zurückgegriffen wurde.

Die Abb. 4.14 bis 4.16 zeigen die Ergebnisse der STD-NMR-Titrationsreihen der Peptidmimetika NMWQKVGTP-Cha-NH₂, Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂ und Bpa-NMWQKVGTP-L-NH₂, die aufgrund von Schwierigkeiten bei der Beschaffung des CD4-Rezeptors erst gegen Ende dieser Arbeit durchgeführt werden konnten. Im Gegensatz zu den SPR-Bindungsstudien war es mit Hilfe von STD-NMR möglich, Affinitätskonstanten der monosubstituierten Peptidmimetika zum CD4-Protein zu bestimmen. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass in diesen Untersuchungen homogen in Lösung gearbeitet wird und dadurch ein Großteil des Proteins bindungsaktiv vorliegt, während bei der Immobilisierung des CD4-Rezeptors auf dem Biacore-Sensorchip nur 8 % der Aktivität erhalten bleiben. Außerdem gibt es im STD-NMR

Experiment natürlich keine carboxymethylierte Dextranmatrix, die unspezifische Wechselwirkungen eingehen kann.

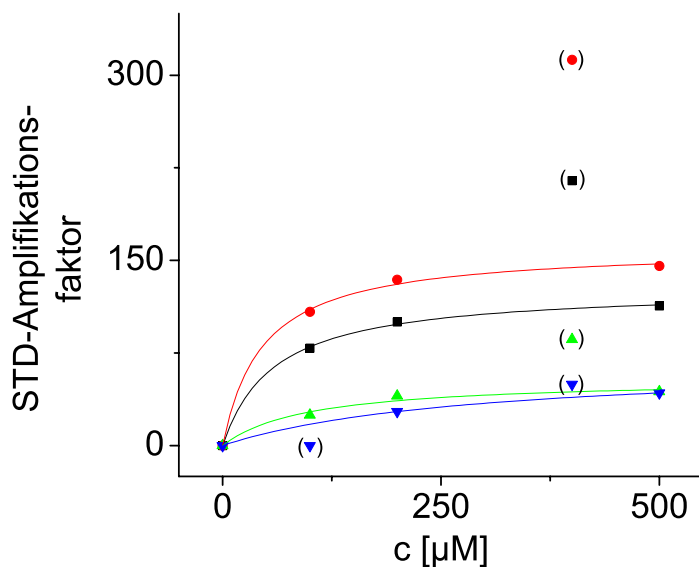


Abbildung 4.14: STD-Titration von NMWQKVGTP-Cha-NH₂. Trp3-H^{ζ2} (schwarz), $K_D = 59 \mu\text{M}$, Trp3-H^{η2} (rot), $K_D = 46 \mu\text{M}$, Lys5- + Cha10-H^β (grün), $K_D = 99 \mu\text{M}$, Thr8-H^γ (blau), $K_D = 289 \mu\text{M}$. (die eingeklammerten Messwerte wurden nicht berücksichtigt).

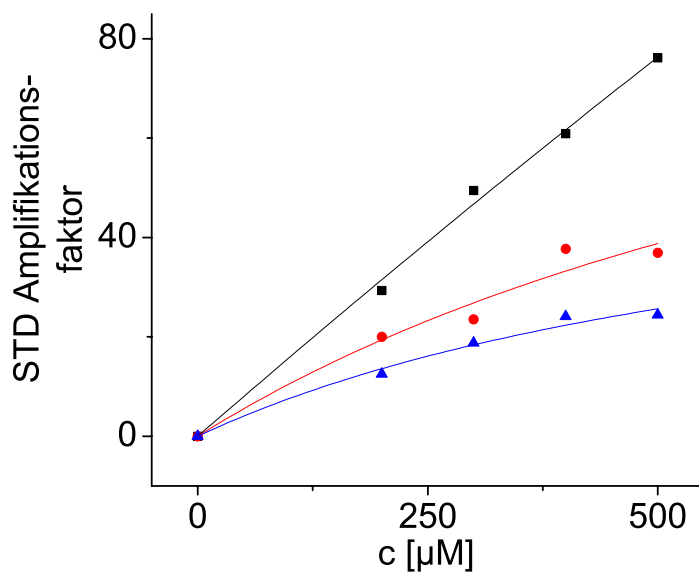


Abbildung 4.15: STD-Titration von Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂. Trp3-H^{ζ2} (schwarz), $K_D = 9 \text{ mM}$, Hfa⁻¹-H^{3/5,4,2/6} + Trp3-H^{δ1} (rot), $K_D = 1 \text{ mM}$, Val6-H^{γ1/2} + Leu10-H^{δ1/2} (blau), $K_D = 0.7 \text{ mM}$.

Alle getesteten monosubstituierten Peptidmimetika zeigen relativ schwache STD-Effekte. Dies ist aufgrund der langsamen Dissoziationsrate von $k_{off} \approx 0.3 \text{ s}^{-1}$, die aus den SPR-Kurven abgeschätzt werden konnte (siehe Seite 63), auch nicht anders zu erwarten. Für die

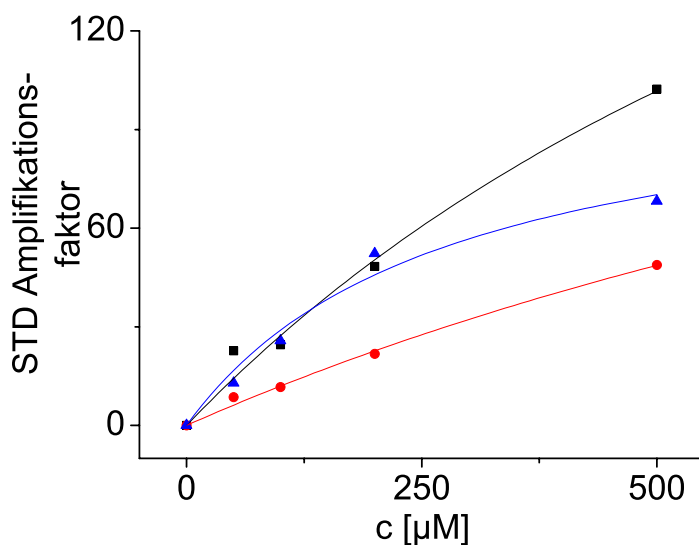


Abbildung 4.16: STD-Titration von Bpa-NMWQKVGTP-L-NH₂. Trp3-H ϵ^3 + Bpa⁻¹-H^{2'/6'} (schwarz), $K_D = 1.1$ mM, Val6-H $\gamma^{1/2}$ + Leu10-H $\delta^{1/2}$ (rot), $K_D = 1.6$ mM, Gln4- + Pro9-H γ (blau), $K_D = 280$ μ M.

Bestimmung der Dissoziationskonstante konnten daher nur intensive Signale verwendet werden. Hier boten sich Resonanzen der Aromaten oder Methylgruppen an.

Verglichen mit der Leitstruktur NMWQKVGTP-L-NH₂ ($K_D = 6$ mM) zeigen alle untersuchten Verbindungen durch den Einbau der jeweiligen unnatürlichen Aminosäure eine verbesserte Affinität zu CD4. Für das Peptidmimetikum NMWQKVGTP-Cha-NH₂ (Abb. 4.14) erhält man durch Anpassen der Messwerte an die Gleichung eines *one-site binding* Modells Dissoziationskonstanten von 46 bis 289 μ M für K_D . Dies entspricht einer bis zu 130fachen Verbesserung der Affinität zum CD4-Rezeptor. Die Messwerte, die bei einer Konzentration des Liganden von 400 μ M erhalten wurden, liegen durch einen ungeklärten systematischen Fehler zu hoch und blieben unberücksichtigt.

Bei den Verbindungen Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂ (Abb. 4.15) und Bpa-NMWQKVGTP-L-NH₂ (4.16) wurden höhere Werte für K_D , d. h. niedrigere Affinitäten beobachtet. Das N-terminal um Homophenylalanin verlängerte Peptidmimetikum liefert Dissoziationskonstanten von 0.7 bis 9 mM, bei dem Liganden mit Benzoylphenylalanin an Position -1 wurden Werte von 280 μ M bis 1.6 mM erhalten. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Liganden und der Empfindlichkeit des CD4-Rezeptors war es nicht möglich, Affinitätsplots bis in den Bereich millimolarer Konzentrationen aufzunehmen.

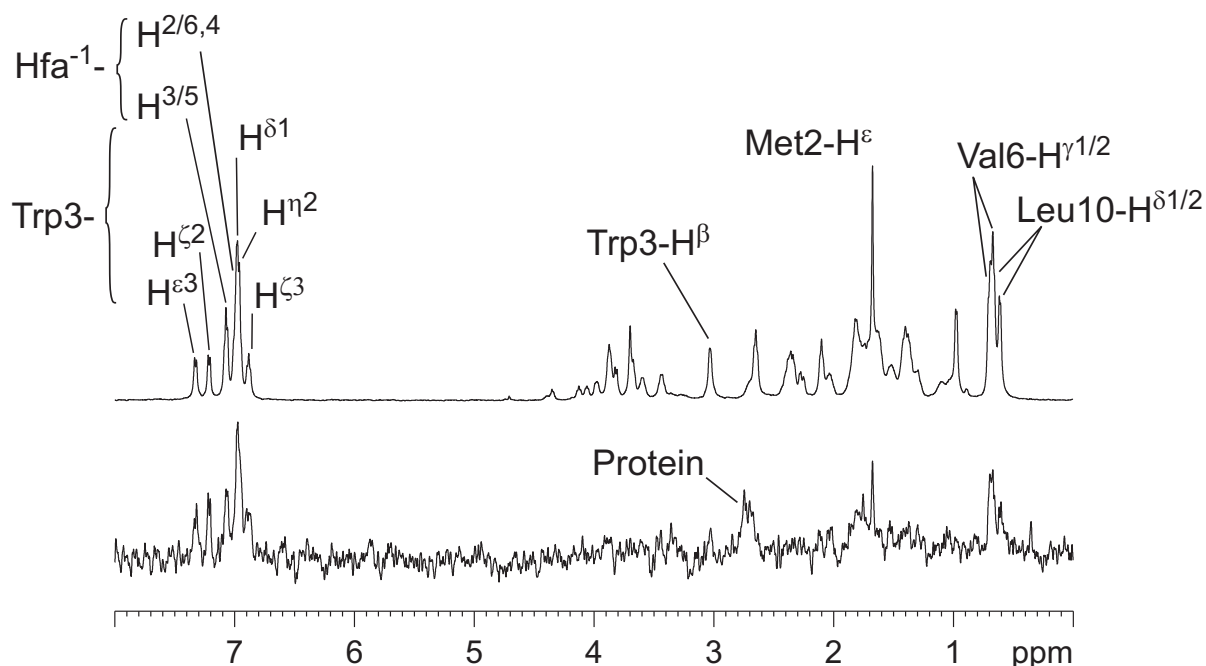


Abbildung 4.17: 1D-STD-NMR Spektrum von Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂. $c_{\text{Ligand}} = 500 \mu\text{M}$, $c_{\text{CD}_4} = 8.8 \mu\text{M}$. Messzeit: 12 h an einem 500 MHz Spektrometer.

Aus den STD-NMR-Titrationsreihen können Aussagen über die an der Bindung beteiligten Aminosäuren getroffen werden. Ein detailliertes *epitope mapping*, wie es in Abschnitt 4.5 für den Liganden Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ durchgeführt wurde, war aufgrund von Einschränkungen hinsichtlich Proteinmenge und Messzeit nicht möglich. Abbildung 4.17 zeigt das 1D-STD-NMR-Spektrum der Verbindung Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂ bei der höchsten Ligandkonzentration von 500 μM . Die stärksten STD-Signale stammen von den aromatischen Protonen und von den Methylgruppen der Aminosäuren Val6 und Leu10. Schwächere STD-Effekte werden für β -Protonen von Trp3 und die Methylprotonen von Met2 beobachtet. Im Bereich der α -Protonen und bei chemischen Verschiebungen zwischen 1 und 2 ppm liegen offenbar weitere Signale mit schwachem STD-Effekt, deren Intensität jedoch auf komplexe Multipletts verteilt ist und die aufgrund der Signalüberlagerung im 1D-Spektrum nicht zuzuordnen sind.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die anderen beiden Liganden. Im Fall von NMWQKVGTP-Cha-NH₂ treten wiederum die Signale von Trp3 und der Methylgruppe

von Val6 stark hervor. Zusätzlich liegt ein starker STD-Effekt auf dem Signal, in dem sich die Resonanzen der Cha10- und Lys5- β -Protonen überlagern. Bei der Verbindung Bpa-NMWQKVGTP-L-NH₂ ist die Differenzierung zwischen Signalen mit starkem oder schwachem STD-Effekt weniger ausgeprägt. Während wiederum die aromatischen Protonen die intensivsten STD-Signale besitzen, finden sich im aliphatischen Spektralbereich bei praktisch allen Resonanzen STD-Effekte, die etwa 50 % der Intensität der Ringprotonen von Bpa⁻¹ und Trp3 erreichen.

Die 1D-STD-NMR-Bindungsstudien zeigen, dass die neu eingeführten Aminosäuren Kontakte zum CD4-Rezeptor besitzen und dass die untersuchten Peptidmimetika mit einer Variationsstelle eine höhere Affinität zum CD4-Rezeptor haben als die Leitstruktur. Dabei bewirkt die Mutation Leu10 $\rightarrow$ Cha10 eine Verbesserung um das 130fache, während durch die N-terminale Verlängerung um Homophenylalanin bzw. Benzoylphenylalanin nur eine geringe Verbesserung von 9 bzw. 21fach erreicht wird.

4.4 Synthese mehrfach modifizierter Liganden

Diejenigen Aminosäuren, deren Einbau in die Leitstruktur die Bindung an immobilisiertes CD4 deutlich verstärkt hat, wurden so kombiniert, dass 22 Peptidmimetika mit zwei bis fünf Variationsstellen resultierten. Die Daten der synthetisierten Verbindungen sind in Tab. 4.6 zusammengestellt.

Zur N-terminalen Verlängerung wurden Benzoylphenylalanin (Bpa) und Homophenylalanin (Hfa) eingesetzt. Anstelle von Trp3 wurde alternativ 2-Naphtylalanin (2Nal) eingebaut. Außerdem wurde die Substitution von Lys5 durch Arginin berücksichtigt, die sich schon in der Dissertation von J. Wülfken als günstig erwiesen hatte.⁷⁴ An den Positionen 6 und 10 wurde Val bzw. Leu durch Cyclohexylalanin (Cha) ersetzt.

Diese Verbindungen wurden wiederum mit Hilfe eines automatischen Parallelsynthesizers hergestellt. Um möglichst schnell Peptidmimetika für weitere SPR-Experimente zu erhalten, wurde die zeitaufwändige HPLC-Trennung zunächst umgangen, indem die Rohprodukte nach der Abspaltung vom Festphasensyntheseharz durch Extraktion mit kaltem *tert*-

Tabelle 4.6: Übersicht über Peptidmimetika mit mehreren Modifikationsstellen. ^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen sind in Abschnitt 7.4 zusammenstellt. (* Keine Reinausbeute, da das Produkt bei der Reinigung verloren ging)

Peptid / Peptidmimetikum	Molmasse [g/mol]	MALDI-TOF [M+H] ⁺	Reinausbeute [mg]	[%]
Bpa-NM-2Nal-QK-Cha-GTP-Cha-NH₂	1528.89	1529	2.28	14.9
Bpa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTP-Cha-NH₂	1556.91	1557	1.56	10.0
Bpa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTPL-NH₂	1516.84	1517	4.55	30.0
Bpa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂	1517.87	1518	2.35	15.5
Bpa-NMWQK-Cha-GTPL-NH₂	1477.81	1478	2.31	15.6
Bpa-NMWQKVGTP-Cha-NH₂	1463.78	1464	7.80	53.3
Bpa-NMWQ-R-Cha-GTP-Cha-NH₂	1545.88	1546	1.79	11.6
Bpa-NMWQ-R-Cha-GTPL-NH₂	1505.82	1506	2.21	14.7
Bpa-NMWQ-R-VGTP-Cha-NH₂	1491.79	1492	5.10	34.2
Bpa-NMWQ-R-VGTPL-NH₂	1451.73	1451	7.20	49.6
Hfa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTP-Cha	1466.83	1467	8.70	59.3
Hfa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTPL-NH₂	1426.76	1427	1.60	11.2
Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂	1427.79	1428	2.90	20.3
Hfa-NMWQK-Cha-GTPL	1387.72	1388	13.51	97.3
Hfa-NMWQKVGTP-Cha-NH₂	1373.70	1373	1.31	9.5
Hfa-NMWQ-R-Cha-GTP-Cha-NH₂	1455.80	1456	10.00	68.7
Hfa-NMWQ-R-Cha-GTPL-NH₂	1415.74	1416	1.46	10.3
Hfa-NMWQ-R-VGTP-Cha-NH₂	1401.71	1402	3.00	21.4
NMWQK-Cha-GTP-Cha	1266.58	1266	3.72	29.4
NMWQ-R-Cha-GTP-Cha	1294.60	1295	6.80	52.5
NMWQ-R-Cha-GTPL-NH₂	1254.53	1254	0.65	5.2
NMWQ-R-VGTP-Cha-NH₂	1240.50	1240	-*	-*

Butylmethylether (MTBE) von Schutzgruppen und Linkerresten befreit wurden. Die Identität der Verbindungen wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt. Die Reinheit der Peptidmimetika wurde per LC-ESI-Massenspektrometrie abgeschätzt. Bei 20 von 22 Produkten nahmen die Produktpeaks in den Chromatogrammen der LC-ESI-Messungen 20-40 % der gesamten UV-Absorption ein, während die Nebenprodukte selten über 5 % gelangten. Dabei ist zu beachten, dass die Nebenprodukte (partiell geschützte Peptide, etc.) zum großen Teil aromatische Systeme beinhalten und deshalb starke Signale ergeben, auch wenn ihr Anteil am Rohproduktgemisch i.A. gering ist. Als weitere Nebenprodukte sind natürlich die Abbruchpeptide nicht zu vergessen, die normalerweise nur schwer abzutrennen sind. Für die geplanten SPR-Experimente ist ein geringer Anteil an Abbruchpeptiden eher unkritisch, da sie mit großer Wahrscheinlichkeit schlechter an CD4 bänden und somit das Ergebnis nur etwas

verschlechtern würden. Zwei Peptidmimetika zeigten Verunreinigungen, die bis zu 30 % der UV-Absorption ausmachten. Diese Verbindungen wurden zusätzlich zur MTBE-Extraktion mittels RP-HPLC gereinigt. Die übrigen mehrfachsubstituierten Peptidmimetika wurden ohne weitere Reinigung in den SPR-Messungen verwendet (siehe 4.4.1).

Vor den NMR-Bindungsstudien (siehe 4.4.2) wurden alle mehrfachsubstituierten Peptidmimetika über eine RP18-Phase chromatographiert, wobei die Ausbeuten nach HPLC-Reinigung zwischen 5 und 97 % lagen. Alle Verbindungen wurden mittels 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die Reinheit betrug durchweg über 90 %. Als Verunreinigungen traten nur noch Abbruchpeptide auf. Auch die mehrfachsubstituierten Verbindungen besitzen weitgehend gestreckte Konformationen, die sich durch einen Mangel an *long range* NOEs auszeichnen.

4.4.1 Bindungsstudien mittels SPR

Die Kombination der erfolgreichen Variationsstellen führte zu einigen Liganden, die nochmals deutlich verbesserte Bindungswerte im SPR-Experiment verglichen mit den monosubstituierten Verbindungen aufwiesen. Dabei konnten die SPR-Bindungsstudien nur mit maximalen Ligandkonzentrationen von 100 μM durchgeführt werden, da bei höheren Konzentrationen z. T. starke Wechselwirkungen mit der Referenzzelle auftraten. Dies ist möglicherweise auf nicht vollständig gelöste Liganden oder Mizellenbildung zurückzuführen. Als Vergleichssubstanzen zu den mehrfachsubstituierten Peptidmimetika dienen also die Leitstruktur NMWQKVGTPH-NH₂ (2.0 RU bei 100 μM) und die monosubstituierte Verbindung Bpa-NMWQKVGTPH-NH₂ (23.9 RU bei 100 μM). Tabelle 4.7 fasst die Ergebnisse der SPR-Bindungsstudien zusammen.

Wie bei den monosubstituierten Peptidmimetika (Abschnitt 4.3.1) folgt die Assoziation der Verbindungen mit mehreren Variationsstellen an den Sensorchip unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht einer einfachen Kinetik. Nur die Dissoziationsrate konnte aus den SPR-Kurven abgeschätzt werden. Sie liegt für die mehrfachsubstituierten Peptidmimetika mit $k_{\text{off}} \approx 0.03 \text{ s}^{-1}$ etwa bei einem Zehntel der *off rate* der Leitstruktur und der einfach substituierten Verbindungen. Eine Verringerung der Dissoziationsrate bei gleichbleibender *on rate* würde die gewünschte Erhöhung der Affinität bewirken.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der SPR-Bindungsstudien mehrfach substituierter Peptidmimetika. Alle Verbindungen wurden 100 μ M eingesetzt.

Peptid / Peptidmimetikum	SPR-Signal [RU]
N - M - W - Q - K - V - G - T - P - L	2.0 (Referenz)
Hfa - N - M - W - Q - K - Cha - G - T - P - Cha	147.9
Bpa - N - M - W - Q - K - Cha - G - T - P - L	134.2
Hfa - N - M - 2Nal - Q - R - Cha - G - T - P - Cha	99.1
Bpa - N - M - W - Q - R - V - G - T - P - L	64.7
Bpa - N - M - W - Q - K - V - G - T - P - Cha	54.7
Hfa - N - M - W - Q - K - Cha - G - T - P - L	47.9
Hfa - N - M - W - Q - R - Cha - G - T - P - Cha	47.4
N - M - W - Q - R - Cha - G - T - P - Cha	37.4
Bpa - N - M - W - Q - R - V - G - T - P - Cha	34.1
N - M - W - Q - K - Cha - G - T - P - Cha	29.8
Hfa - N - M - W - Q - R - Cha - G - T - P - L	28.4
Hfa - N - M - W - Q - R - V - G - T - P - Cha	26.5
Bpa - N - M - W - Q - R - Cha - G - T - P - L	25.2
Hfa - N - M - W - Q - K - V - G - T - P - Cha	21.5
N - M - W - Q - R - Cha - G - T - P - L	20.3
Bpa - N - M - W - Q - K - Cha - G - T - P - Cha	19.8
N - M - W - Q - R - V - G - T - P - Cha	19.5
Hfa - N - M - 2Nal - Q - R - Cha - G - T - P - L	14.0
Bpa - N - M - 2Nal - Q - K - Cha - G - T - P - Cha	7.8
Bpa - N - M - W - Q - R - Cha - G - T - P - Cha	7.6
Bpa - N - M - 2Nal - Q - R - Cha - G - T - P - L	7.2
Bpa - N - M - 2Nal - Q - R - Cha - G - T - P - Cha	4.1

Als besonders günstig hat sich die in der Verbindung Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ vorliegende Kombination von Variationsstellen erwiesen. Dieses Peptidmimetikum zeigt bei einer Konzentration von 100 μ M ein etwa 6fach stärkeres SPR-Signal als die beste monosubstituierte Verbindung; gegenüber der Leitstruktur ist die Bindung sogar 74fach stärker. Eine deutlich verbesserte Bindung zeigen weiterhin die Peptidmimetika Bpa-NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ und Hfa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTP-Cha-NH₂, die 67 bzw. 50fach stärkere SPR-Signale aufweisen. Die Ergebnisse der Biacore-Untersuchungen belegen allerdings auch, dass die Kombination von im Einzelfall günstigen Variationen nicht zwangsläufig zu einem Liganden mit deutlich verbesserter Bindungsstärke führt. Das fünffach modifizierte Peptidmimetikum Bpa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTP-Cha-NH₂ zeigt in einer Konzentration von 100 μ M nur ein SPR-Signal von 4.1 RU und bindet damit etwa 6fach schwächer als der beste Vertreter der ersten Verbindungsserie (Bpa-NMWQKVGTP-L-NH₂) und gerade einmal doppelt so

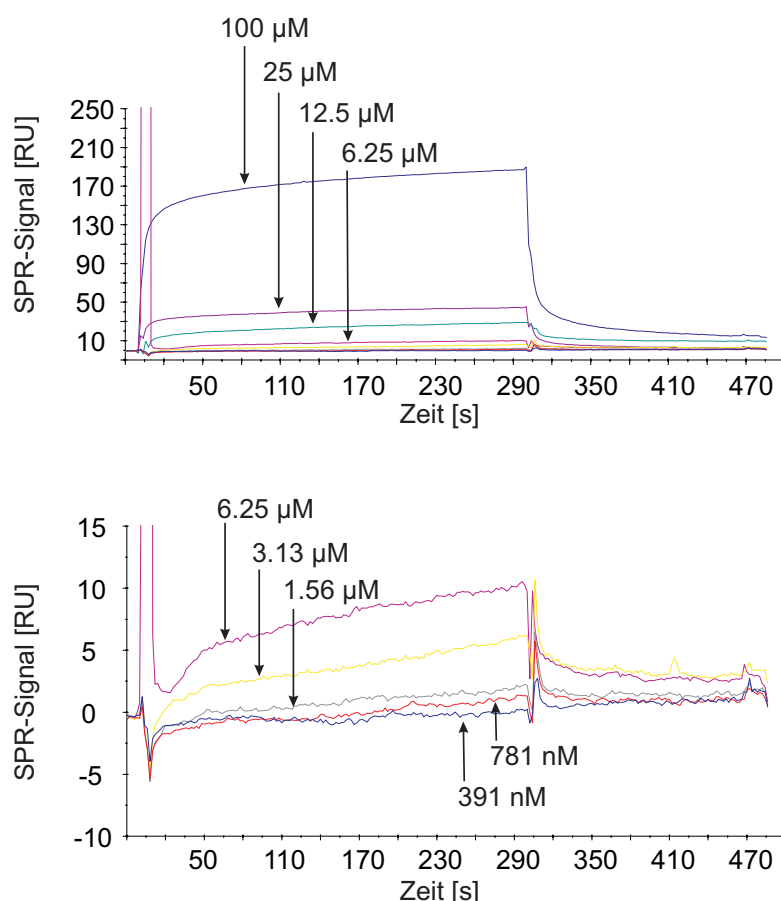


Abbildung 4.18: SPR-Kurven von Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂. Im oberen Teil sind alle Kurven einer Verdünnungsreihe gezeigt, in der Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ in den Konzentrationen 100 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,13 µM, 1,56 µM, 781 nM und 391 nM vermessen wurde. In der unteren Grafik sind die vier niedrigsten Konzentrationen vergrößert dargestellt.

stark wie die Leitstruktur. Beiträge von räumlich getrennten Molekülbereichen zur Bindung an den Rezeptor verhalten sich also nicht einfach additiv. Durch die Wechselwirkung eines Molekülfragments mit dem Protein kann die Interaktion eines anderen Bereichs verhindert werden. In der untersuchten Bibliothek sind Verbindungen mit zwei bis drei Bindungsstellen am erfolgreichsten, während die Mehrheit der vier- und fünffach substituierten Peptidmimetika vergleichsweise geringe Verbesserungen gegenüber der Leitstruktur darstellt.

Auch bei den mehrfachsubstituierten Peptidmimetika ist die spezifische Bindung an den immobilisierten CD4-Rezeptor durch unspezifische Wechselwirkungen überlagert. Bei den am Biacore 3000 durchgeführten Untersuchungen zeigte sich bei fast allen Verbindungen ein linearer Zusammenhang zwischen Ligandkonzentration und SPR-Signal. Nur bei der Substanz Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ ist bei Konzentrationen unterhalb von 12,5 µM eine sättigbare Bindung zu erkennen (siehe Abb. 4.18 und 4.19).

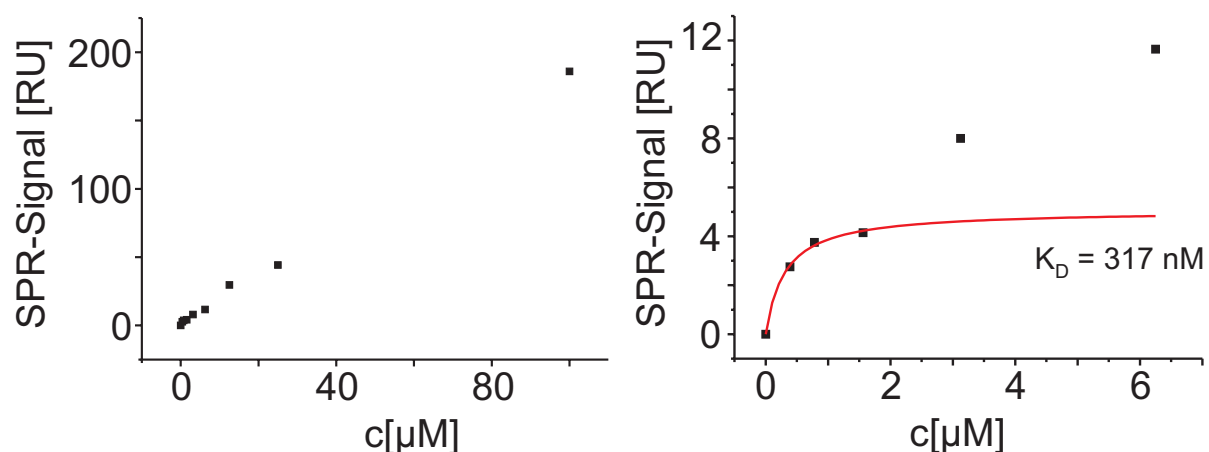


Abbildung 4.19: Bestimmung der Dissoziationskonstante aus SPR-Kurven von Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂. Links: gesamter Konzentrationsbereich, rechts: Messergebnisse bei $c_{\text{Ligand}} \leq 6.25 \mu\text{M}$. Aus den Messwerten bei den drei niedrigsten Konzentrationen (1.56 μM , 781 nM und 391 nM) ergibt sich eine Dissoziationskonstante von $317 \pm 56 \text{ nM}$. Bei Konzentrationen oberhalb von 6.25 μM steigt das maximale SPR-Signal praktisch linear mit der Konzentration an gelöstem Peptidmimetikum. Dies ist ein Zeichen für unspezifische Wechselwirkungen des niedermolekularen Liganden mit dem immobilisierten Protein oder der Sensorchipoberfläche.

Aus den SPR-Signalen bei diesen niedrigen Konzentrationen konnten Affinitätskonstanten bestimmt werden, wie in Abb. 4.19 dargestellt ist. Verwendet man nur die Werte der niedrigsten drei Konzentrationen, ergibt sich ein K_D von ca. 300 nM. Dies entspricht einer Verbesserung der Affinitätskonstante um den Faktor 20000 verglichen mit der Leitstruktur NMWQKVGTP-L-NH₂ ($K_D = 6 \text{ mM}$).

Eine Auswahl der mehrfachsubstituierten Peptidmimetika wurde zusätzlich bei der Firma Biacore an einem Biacore S51 Gerät untersucht. Für das Peptidmimetikum Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ bestätigte sich mit $K_D = 700 \text{ nM}$ eine Dissoziationskonstante im hohen nM-Bereich. Zusätzlich konnte auch für die Verbindung Bpa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ eine Affinitätskonstante von $K_D = 41 \mu\text{M}$ aus den SPR-Signalen einer Verdünnungsreihe bestimmt werden.

Schon dadurch, dass bei nur zwei der 22 mehrfach substituierten Peptidmimetika Affinitätskonstanten bestimmt werden konnten, wird deutlich, dass das verwendete SPR-Messprotokoll sehr anfällig für Artefakte durch unspezifische Wechselwirkung ist. Nimmt man an, dass die bestimmten Affinitätskonstanten der beiden zuletzt besprochenen Verbindungen richtig sind,

würde man für das Peptidmimetikum Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ bei einer Konzentration von 100 μ M eine praktisch vollständige Belegung seiner Bindungsstelle auf dem Rezeptor erwarten, während Bpa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ das CD4-Protein nur zu etwa 70 % sättigen sollte. Die 7.5fach stärkere Bindung von Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ an den CD4-belegten Sensorchip verglichen mit Bpa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ (147.9 RU gegenüber 19.8 RU, siehe Tab. 4.7) wird also größtenteils durch unspezifische Interaktionen verursacht. Angesichts dessen ist die Aufstellung einer Rangfolge der Peptidmimetika nur anhand ihrer SPR-Signale bei 100 μ M, wie in Tabelle 4.7 gezeigt, problematisch.

4.4.2 STD-NMR-Experimente

Das STD-NMR-Experiment erwies sich auch bei den mehrfachsubstituierten Peptidmimetika als robuster in Bezug auf Artefakte durch unspezifische Interaktionen. Die Bestimmung der Affinitätskonstanten wurde, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, mit 100 μ g CD4 pro NMR-Probe durchgeführt. Für alle drei Verbindungen mit zwei bzw. drei Variationsstellen, die mittels STD-NMR Spektroskopie untersucht wurden, konnten Dissoziationskonstanten ermittelt werden, wie die Abb. 4.20 bis 4.22 zeigen.

Insgesamt ist die Qualität der STD-NMR Spektren noch etwas schlechter als im Fall der monosubstituierten Peptidmimetika. Dies steht im Einklang mit der aus den SPR-Kurven bestimmten *off rate* von $k_{off} \approx 0.03 \text{ s}^{-1}$, die nochmals 10fach geringer ist als bei den Verbindungen mit nur einer Variationsstelle (Abschnitt 4.4.1).

Auch die STD-NMR Daten belegen, dass die Einführung der unnatürlichen Aminosäuren die Affinität der Peptidmimetika verglichen mit der Leitstruktur verbessert. Die drastischen Effekte, die in den SPR-Experimenten beobachtet wurden, bestätigen sich allerdings nicht. Für die Verbindung Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂, den „Spitzenreiter“ der SPR-Studien, ergeben sich Werte von $K_D = 90$ bis $320 \mu\text{M}$, je nachdem, welches Signal ausgewertet wird (Abb. 4.20). Dies entspricht einer 20 bis 70fachen Verbesserung der Affinität.

Die STD-NMR Daten von Hfa-NMWQKVGTP-Cha-NH₂ (Abb. 4.21) führen je nach Signal zu Dissoziationskonstanten von ca. 200, 340 und $590 \mu\text{M}$. Bei der Verbindung Hfa-NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ (Abb. 4.22) werden für K_D Werte von ca. 200 bzw. $570 \mu\text{M}$ er-

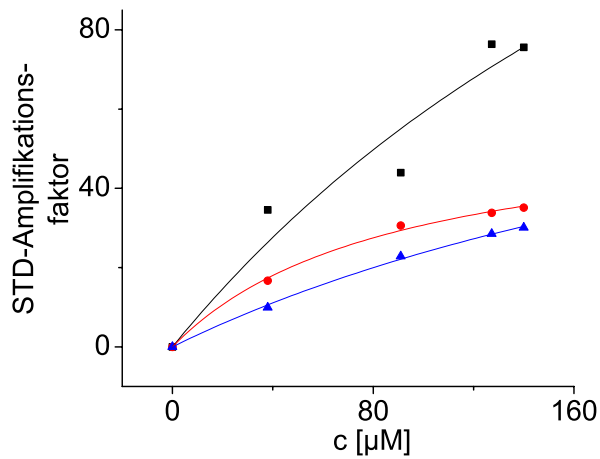


Abbildung 4.20: STD-Titration von Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂. Trp3-H^{ζ2} (schwarz), $K_D = 319 \mu\text{M}$, Hfa⁻¹-H^{2/6} + Trp3-H^{η2} (rot), $K_D = 89 \mu\text{M}$, Lys5- + Cha10-H^β (blau), $K_D = 323 \mu\text{M}$.

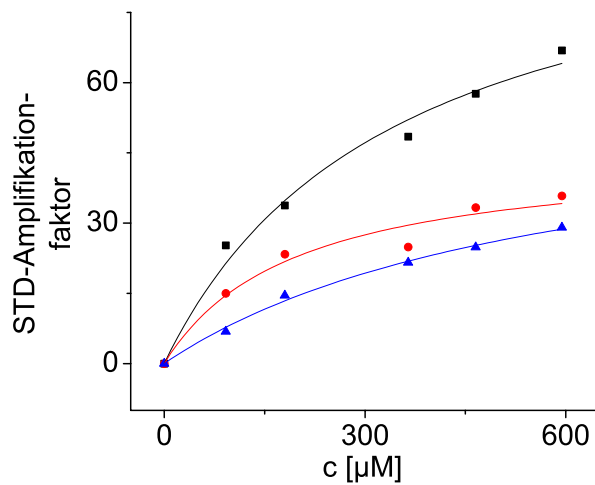


Abbildung 4.21: STD-Titration von Hfa-NMWQKVGTP-Cha-NH₂. Trp3-H^{ζ2} (schwarz), $K_D = 344 \mu\text{M}$, Hfa⁻¹-H^{2/6} + Trp3-H^{η2} (rot), $K_D = 196 \mu\text{M}$, Val6-H^{γ1/2} (blau), $K_D = 589 \mu\text{M}$.

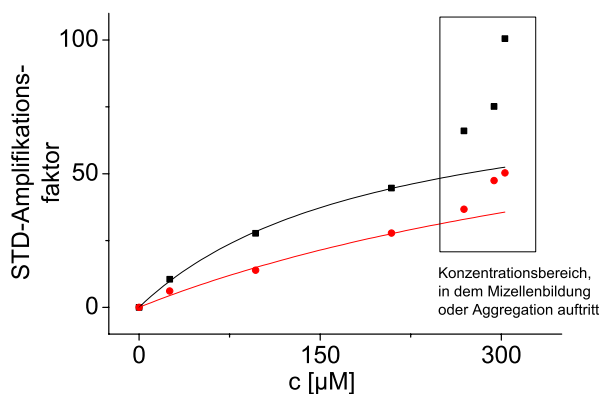


Abbildung 4.22: STD-Titration von Hfa-NMWQK-Cha-GTPL-NH₂. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden nur die niedrigsten drei Titrationspunkte verwendet. Trp3-H^{ζ2} (schwarz), $K_D = 201 \mu\text{M}$, Lys5- + Cha6-H^β (rot), $K_D = 567 \mu\text{M}$.

halten. Im letzteren Fall tritt auch im STD-NMR Experiment das Problem auf, dass bei Ligandkonzentration oberhalb von 250 μM keine Sättigung erhalten wird, sondern die STD-Amplifikationsfaktoren stark ansteigen. Dies könnte durch Aggregation oder Mizellenbildung verursacht werden. Die Dissoziationskonstanten mussten hier folglich aus den Titrationspunkten bis 200 μM errechnet werden.

Verglichen mit den monosubstituierten Peptidmimetika schlägt sich die Kombination der im SPR-Experiment erfolgreichen Variationsstellen nicht in einer deutlichen Verbesserung der aus STD-NMR Daten bestimmten Affinität wieder. Die Verbindungen Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂, Hfa-NMWQKVGTP-Cha-NH₂ und Hfa-NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ liegen mit ihren Dissoziationskonstanten im Bereich von einigen 100 μM eher etwas schlechter als das Peptidmimetikum NMWQKVGTP-Cha-NH₂ mit $K_D \leq 100 \mu\text{M}$. Die Substitution des C-terminalen Leucins der Leitstruktur durch Cyclohexylalanin hat offenbar den größten Effekt auf die Affinität der Peptidmimetika zum CD4-Rezeptor. Im Zusammenhang mit den SPR-Bindungsstudien kann man schließen, dass die weiteren Substitutionen zwar zu einer verlangsamen Dissoziation vom Protein führen, diese aber vermutlich durch eine entsprechend geringere *on rate* kompensiert und keine Affinitätssteigerung erzielt wird.

4.5 Bestimmung des Bindungsepitops von Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ mittels STD-NMR-Spektroskopie

4.5.1 *Group Epitope Mapping* mittels STD-TOCSY

Trotz der relativ ungünstigen Dissoziationskinetik der mehrfachsubstituierten Peptidmimetika ist es gelungen, von der Verbindung Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ das Epitop zu bestimmen, das an der Wechselwirkung mit dem CD4-Rezeptor beteiligt ist. Um möglichst intensive STD-Effekte zu erzielen, wurde die Proteinkonzentration der NMR-Probe im Vergleich zu den Titrationsreihen auf 31 μM vervierfacht. Das Peptidmimetikum konnte aus Gründen der Löslichkeit nur 130 μM also in einem vierfachen Überschuss eingesetzt werden. Trotz die-

ses geringen Überschusses ist keine Linienverbreiterung der Ligandresonanzen verglichen mit einer proteinfreien NMR-Probe zu erkennen - ein weiteres Indiz für eine sehr langsame Bindungskinetik, die schon bei den SPR-Experimenten aufgefallen war. Dennoch konnte in zwei Tagen Messzeit an einem mit Cryoprobekopf ausgestatteten 700 MHz NMR-Spektrometer ein STD-TOCSY Spektrum aufgenommen, das in den Abb. 4.23, 4.24 und 4.25 zusammen mit dem entsprechenden Referenzspektrum gezeigt ist.

Wie beim STD-NMR *epitope mapping*, das mit der Leitstruktur NMWQKVGTP-L-NH₂ im Rahmen der Dissertation von J. Wülfken durchgeführt wurde,⁷⁴ stammen auch hier die stärksten Signale von aromatischen Protonen. Neben den Ringprotonen von Trp3 treten in ungefähr gleicher Intensität Resonanzen der Phenylprotonen des N-terminalen Homophenylalanins hervor. Die Diagonal- und Kreuzsignale von Trp3 gehören auch im aliphatischen Bereich zu den Resonanzen mit starkem STD-Effekt. Die Kreuzsignale der Hfa⁻¹- α -, β - und γ -Protonen besitzen hier nur mittlere Intensität. Starke STD-Effekte zeigen weiterhin die Thr8- α - und β - sowie die Met2- β -, γ - und ϵ -Protonen.

Trotz relativ starker Signalüberlagerung im Bereich der β - und Ringprotonen der beiden Cyclohexylalanine gelingt es, eine Aussage über die Beiträge von Cha6 verglichen mit Cha10 zu treffen. Starke STD-Effekte finden sich dort, wo sich die Signale der meisten Ringprotonen beider Cha-Seitenketten überlagern (Abb. 4.24). Es ist also eher wahrscheinlich, dass beide Cyclohexylringe Kontakt zum CD4-Rezeptor haben. In der Spur der β -Protonen von Cha6 bei 1.698 ppm sind im STD-Spektrum weder Kreuzsignale zu den Ringprotonen noch zum α -Proton zu erkennen. Im Gegensatz dazu findet man in der β -Spur von Cha10 bei 1.595 ppm sowohl den *cross peak* zum α -Proton (Abb. 4.25) als auch Intensität bei den Ringprotonen. Es ist daher wahrscheinlich, dass Cha10 zusätzlich zu den Ringprotonen auch über seine α - und β -Protonen mit CD4 interagiert. Sehr dicht neben dem Signal von Cha10-H $^{\beta}$ liegen bei 1.589 ppm allerdings auch Signale der Ringprotonen selbst, so dass eine zweifelsfreie Unterscheidung der Beiträge beider Cyclohexylringe nicht möglich ist.

Von mittlerer Intensität sind weiterhin die Signale Lys5-H $^{\epsilon}$, Lys5-H $^{\epsilon}$ /H $^{\delta}$ und Lys5-H $^{\delta}$ /H $^{\gamma_{1/2}}$ sowie Met2-H $^{\alpha}$ /H $^{\beta}$ und Gln4-H $^{\alpha}$ /H $^{\beta}$. Die Aminosäure Asn1 zeigt nur einen schwachen STD-Effekt auf den Kreuzsignalen zwischen H $^{\alpha}$ und H $^{\beta_1}$ bzw. H $^{\beta_2}$, während das einzige, sehr

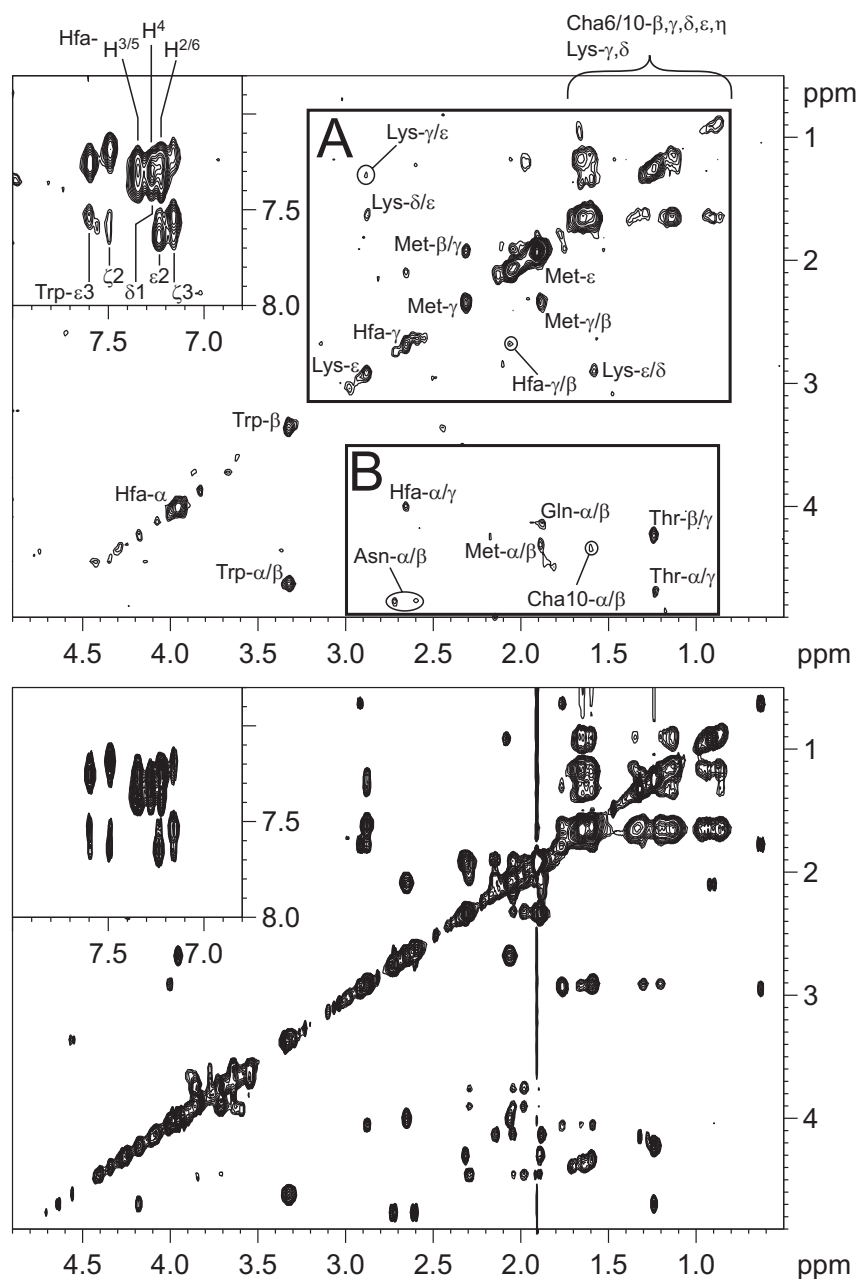


Abbildung 4.23: STD-TOCSY Spektrum von Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ (obere Bildhälfte) und Referenz-TOCSY Spektrum (unten). Im Ausschnitt in der linken oberen Ecke sind jeweils die Signale der aromatischen Protonen gezeigt. Die mit **A** und **B** gekennzeichneten Bereiche sind in den Abb. 4.24 und 4.25 vergrößert dargestellt. Die NMR-Probe war 31 μM an CD4 und 130 μM an Ligand in 290 μL deuteriertem PBS, pH = 7. Gemessen bei 285 K an einem 700 MHz Spektrometer, ausgestattet mit einem Cryoprobekopf.

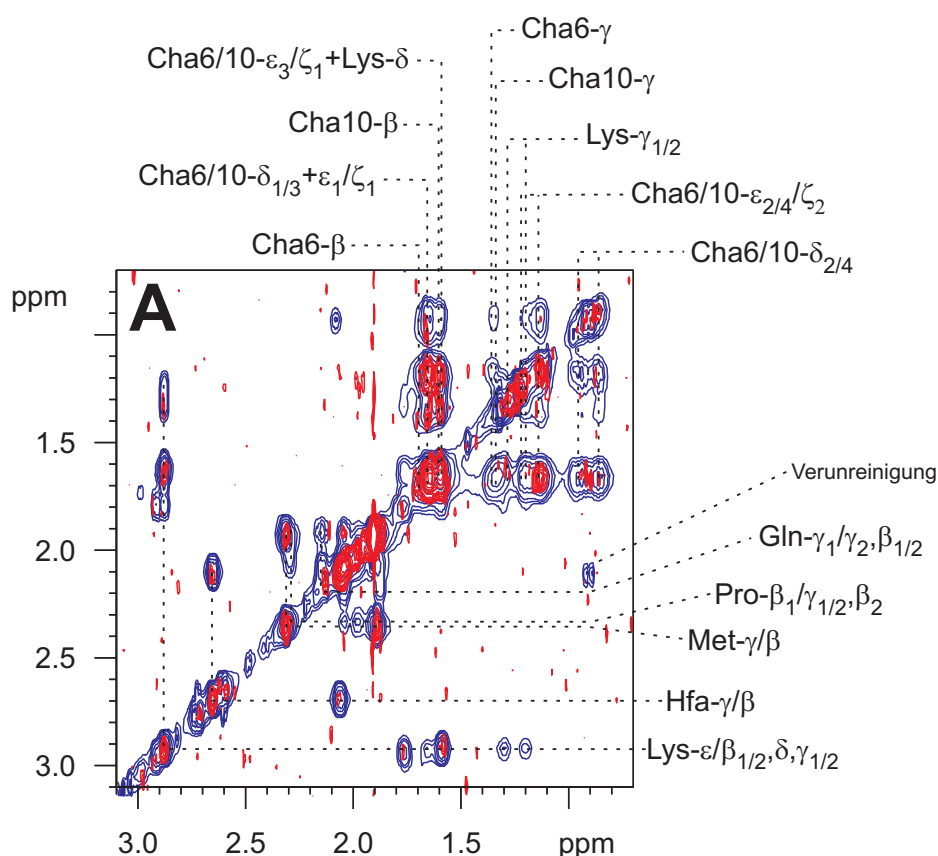


Abbildung 4.24: Vergrößerung des Ausschnitts A aus Abb. 4.23. Diagonal- und Kreuzsignale zwischen 3.1 und 0.7 ppm als Superposition von STD-TOCSY (rot) und Referenzspektrum (blau) des Peptidmimetikums Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂. Signale, die von Gruppen mit Proteinkontakt stammen, sind sowohl im STD- als auch im Referenzspektrum zu erkennen. Bereiche des Liganden, die nicht mit dem Rezeptor interagieren, zeigen keine Signale im STD-Spektrum. STD-Effekte sind bei folgenden Kreuzsignalen erkennbar: Hfa⁻¹-H^γ/H^β, Met2-H^γ/H^β, Lys5-H^ε/H^{β₁} und -H^ε/H^δ. Im stark überlagerten Bereich zwischen 1.7 und 0.8 ppm treten außerdem STD-Signale der Cha6/10-β- und -Ringprotonen sowie der Lys5-δ- und -γ-Protonen hervor. Geringe oder keine STD-Effekte finden sich bei Signalen von Pro9-H^{β₁/₂} und -H^{γ₁/₂} sowie für das Kreuzsignal Gln4-H^{γ₁}/H^{β₁/₂}.

schwache STD-Signal von Pro9 beim *cross peak* H^α/H^{β₂} zu erkennen ist. Bei 3.959 bzw. 3.951 ppm überlagern sich die Signale der α-Protonen von Hfa⁻¹ und Gly7. Dieses Diagonalsignal tritt auch im STD-TOCSY stark hervor und besitzt etwa die gleiche Breite wie im Referenzspektrum. Demnach hat auch Gly7 Kontakt zum Protein. Das Gesamtbild, das sich

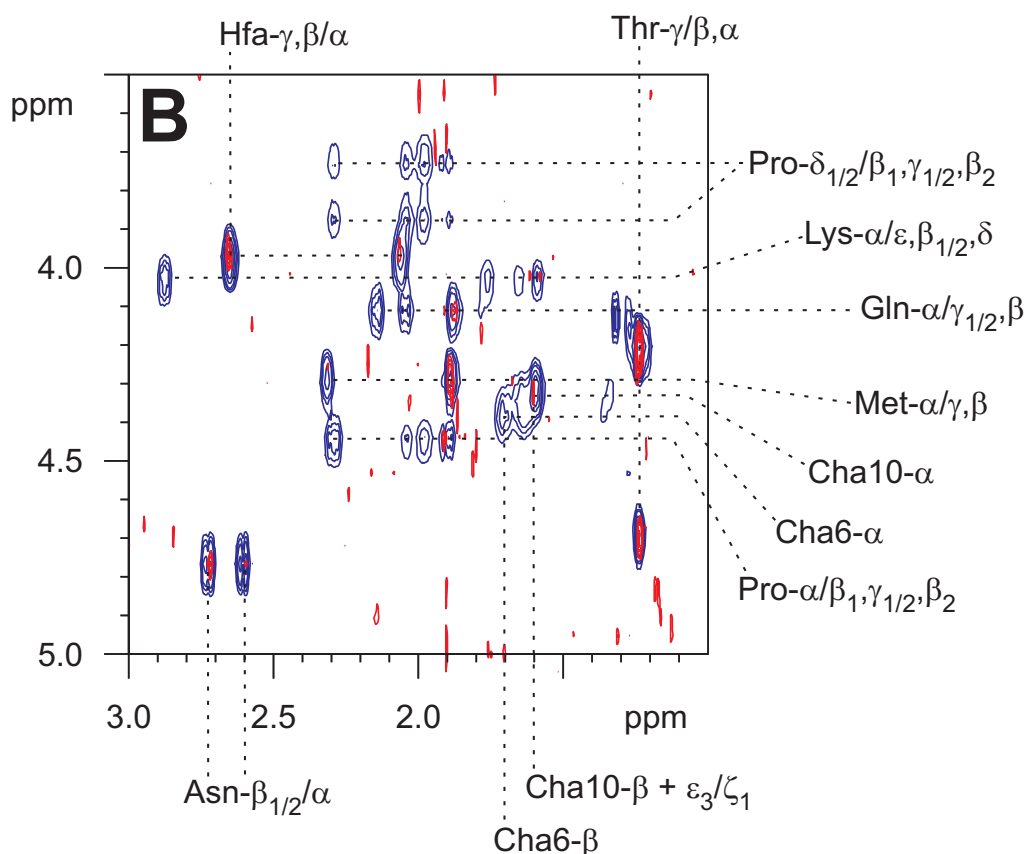


Abbildung 4.25: Vergrößerung des Ausschnitts B aus Abb. 4.23. Kreuzsignale zwischen 3.5-5.0 ppm in F1 und 3.0-1.0 ppm in F2 als Superposition von STD-TOCSY (rot) und Referenzspektrum (blau) des Peptidmimetikums Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂. Signale, die von Gruppen mit Proteinkontakt stammen, sind sowohl im STD- als auch im Referenzspektrum zu erkennen. Bereiche des Liganden, die nicht mit dem Rezeptor interagieren, zeigen keine Signale im STD-Spektrum. STD-Effekte sind bei folgenden Kreuzsignalen erkennbar: Hfa⁻¹-H^γ/H^α und -H^β/H^α, Asn1-H^β_{1/2}/H^α, Met2-H^α/H^β, Gln4-H^α/H^β, Thr8-H^γ/H^α und -H^γ/H^β, Pro9-H^α/H^β₂ und Cha10-H^α/H^{β/ε}_{3/ζ}₁. Geringe oder keine STD-Effekte finden sich bei: Gln4-H^α/H^γ_{1/2}, Lys5-H^α/H^{ε/β}_{1/2/δ}, Cha6-H^α/H^β, Pro9-H^δ_{1/2}/H^β_{1/γ}_{1/2/β}₂ und -H^α/H^β_{1/γ}_{1/2}.

aus dem STD-TOCSY *epitope mapping* und den im Folgenden beschriebenen 1D-STD-NMR Untersuchungen ergibt, wird am Ende des Abschnitts beschrieben und diskutiert.

4.5.2 1D-STD-Aufbauten

Um möglichst intensive Signale zu erhalten, wurde das soeben besprochene STD-TOCSY-Spektrum mit einer Sättigungszeit von 2 s aufgenommen. In den CORCEMA-Simulationen

von Jayalakshmi et. al.⁸¹ zeigt sich allerdings, dass bei zunehmender Sättigungszeit die T_1 -Relaxationszeiten der Ligandprotonen für die Höhe der erzielten STD-Effekte an Bedeutung gewinnen. Isolierte Ligandprotonen mit relativ langer T_1 -Relaxationszeit verlieren ihre Sättigung langsamer, als Protonen, die eng in ein Relaxationsnetzwerk eingebunden sind. Die isolierten Protonen können bei langen Sättigungszeiten also mehr Sättigung akkumulieren und zeigen als Folge davon unter Umständen intensivere STD-Effekte als Protonen, die zwar engeren Kontakt zum Protein haben, ihre Sättigung aber schneller durch Relaxation verlieren.

Ein zuverlässigeres Maß für die Nähe eines Ligandprotons zur Bindungstasche des Rezeptors ist daher eine zur NOE-Aufbaurate analoge STD-Aufbaurate. Hierzu werden mehrere STD-NMR Spektren mit verschiedenen Sättigungszeiten t_{sat} aufgenommen und die erreichten STD-Effekte gegen t_{sat} aufgetragen. Die initiale Steigung dieser Kurven, also die extrapolierte Sättigungsrate bei $t_{sat} = 0$ ist frei vom Beitrag der Relaxationsrate und damit das beste Maß für die Nähe des entsprechenden Ligandprotons zum Protein. Der Erfolg dieses Ansatzes hängt jedoch entscheidend davon ab, ob man Spektren ausreichender Qualität bei kurzen Sättigungszeiten erhält, bei denen naturgemäß nur kleine STD-Effekte erreicht werden.

Die Abb. 4.26 und 4.27 zeigen eine solche STD-Aufbaurate des Peptidmimetikums Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂. Solche Messreihen können sehr zeitaufwändig sein - allein das Spektrum mit der kürzesten Sättigungszeit von $t_{sat} = 250$ ms nahm 23 h Messzeit in Anspruch. Der Proteinintergrund wurde weitgehend mittels *Spin Lock* unterdrückt. Bei einigen flexiblen Bereichen mit Signalen bei 3 ppm und um 0.8 ppm war die Unterdrückung allerdings nicht sehr effektiv, so dass in den STD-Spektren dort breite Proteinresonanzen hervortreten.

Aufgrund des wesentlich günstigeren Signal/Rausch-Verhältnisses in den 1D-STD-Spektren verglichen mit dem 2D-STD-TOCSY Experiment kann man die Signale besser quantifizieren. Durch die Überlagerung vieler Resonanzen können jedoch häufig nur gemittelte STD-Effekte der entsprechenden Gruppen angegeben werden.

Aromatische Protonen

Auch aus der 1D-STD-Aufbaureihe geht hervor, dass die aromatischen Gruppen von Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ maßgeblich an der CD4-Bindung beteiligt sind. Bei $t_{sat} = 2$ s

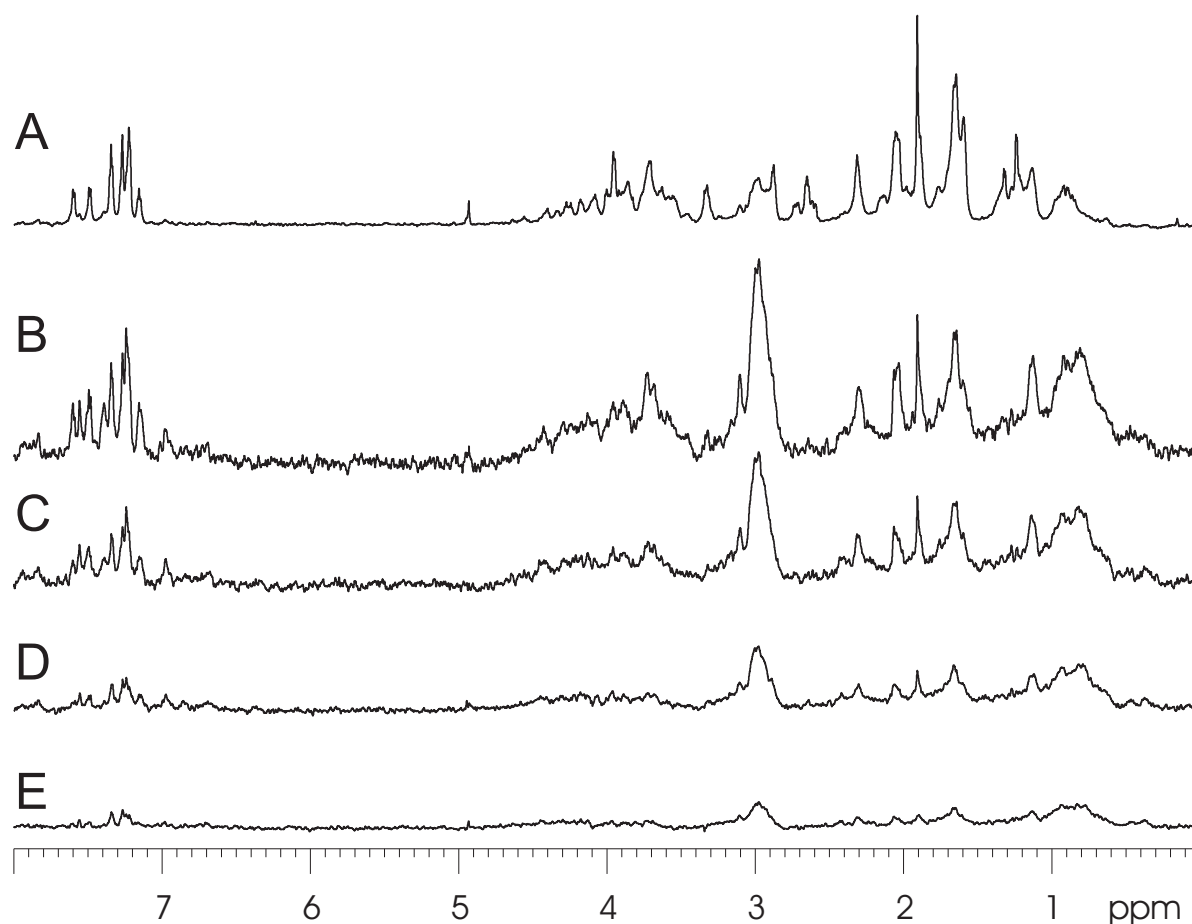


Abbildung 4.26: Sättigungstransfer in Abhängigkeit der Sättigungszeit für Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂. A) Referenzspektrum, B) $t_{sat} = 2$ s, C) $t_{sat} = 1$ s, D) $t_{sat} = 0.5$ s, E) $t_{sat} = 0.25$ s. In allen Spektren wurden Proteinresonanzen mittels *Spin Lock* unterdrückt. Bei sehr flexiblen Bereichen des Proteins gelingt dies nicht vollständig, so dass deren Signale im STD-Spektrum deutlich hervortreten (hier bei 3 ppm und um 0.8 ppm).

zeigen die Signale von Trp3 durchweg stärkere STD-Effekte als die von Hfa⁻¹. Betrachtet man jedoch die STD-Effekte bei $t_{sat} = 0.5$ und 0.25 s, ist der Unterschied zwischen Trp3 und Hfa⁻¹ nur noch marginal. Das Trp3-H^{ε3}-Proton erhält bei $t_{sat} \leq 0.5$ s am wenigsten Sättigung unter den aromatischen Signalen und schließt erst ab $t_{sat} \geq 1$ s zu den anderen Trp3-Ringprotonen auf. Hier liegt wahrscheinlich ein *relay*-Effekt vor, d. h. die Sättigung wird erst zeitverzögert z. B. über das Trp3-H^{ζ3}-Proton übertragen.

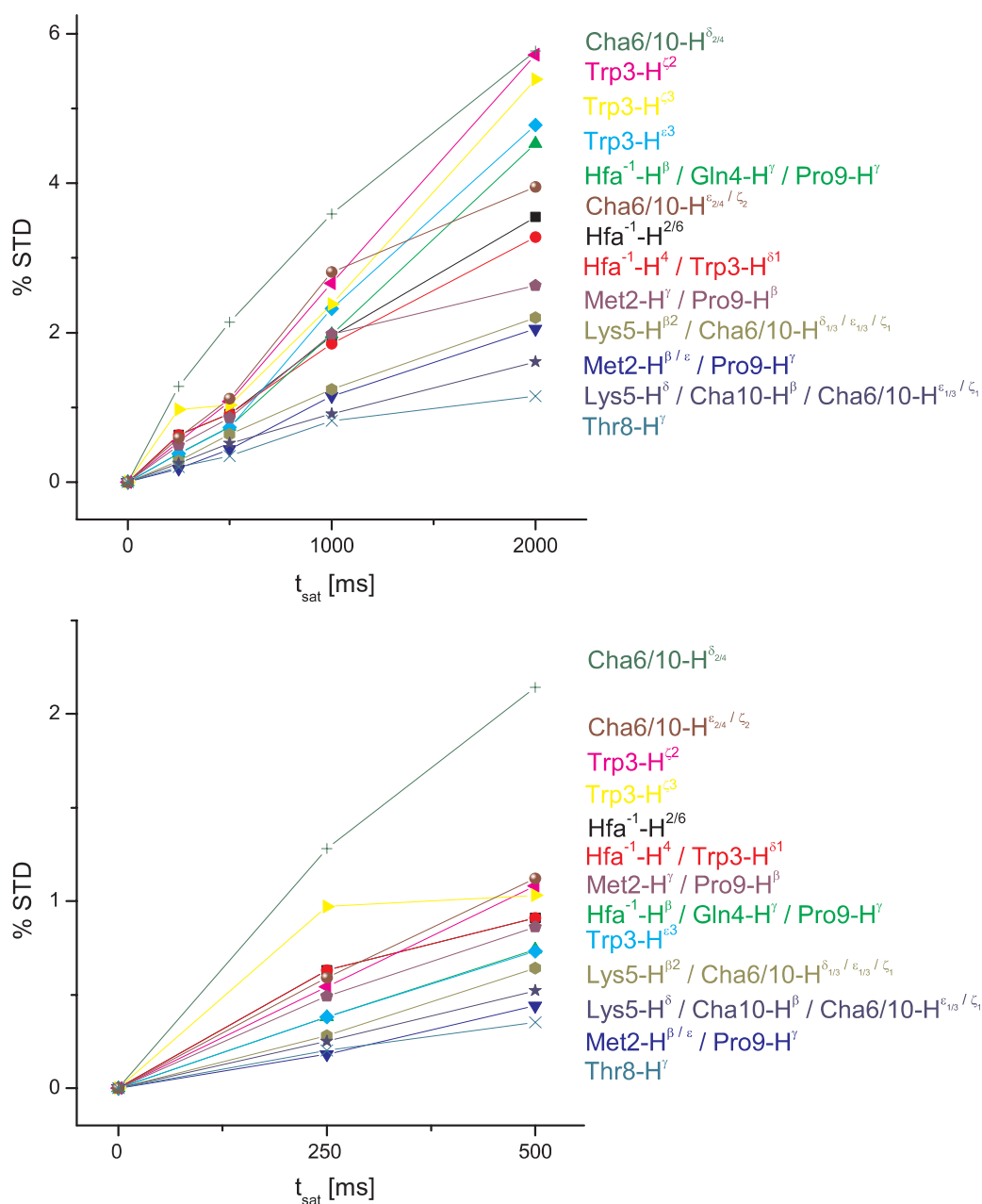


Abbildung 4.27: STD-Aufbaukurven des Peptidmimetikums Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂. Im oberen Teil sind alle Messpunkte gezeigt. Im unteren Diagramm ist der Bereich von 0-500 ms gespreizt dargestellt. Die Intensität der STD-Signale nimmt weitgehend linear mit der Sättigungszeit zu. Größere Abweichungen von diesem Verhalten zeigen sich nur beim Trp3- ϵ^3 -Proton, das erst bei $t_{sat} > 500$ ms starke STD-Effekte aufweist, und bei Resonanzen einiger Cha-Ringprotonen (Cha6/10-H ^{$\epsilon_{2/4}$} / ζ_2), die bei $t_{sat} > 500$ ms gegenüber den aromatischen Protonen zurückfallen.

Cyclohexylalanin-6 und -10

Den stärksten Proteinkontakt haben nach der 1D-STD-Aufbaureihe die $\delta_{2/4}$ -Protonen beider Cyclohexylalanin-Reste, die um 0.9 ppm liegen. Bei kurzen Sättigungszeiten ($t_{sat} \leq 0.5$ s) liegt das Signal der Cha6/10-H $\epsilon_{2/4}/\zeta_2$ -Protonen bei 1.14 ppm an zweiter Stelle hinter den $\delta_{2/4}$ -Protonen. Ab $t_{sat} \geq 1$ s fällt es hinter mehrere aromatische Protonen zurück. Die β -Protonen von Cha6 zeigen keinen STD-Effekt in den 1D-Spektren. Bei Cha10 ist das Signal der β -Protonen mit Resonanzen der Ringprotonen sowie dem Lys5-H δ -Signal überlagert. In Summe besitzt diese Signalgruppe einen schwachen STD-Effekt.

Nur die Cha6/10-H $\epsilon_{2/4}/\zeta_2$ -Protonen und das Trp3-H ϵ_3 -Proton zeigen deutliche Unterschiede in ihren STD-Effekten, wenn man Experimente mit langer und kurzer Sättigungszeit vergleicht. Bei den übrigen Protonen baut sich der STD-Effekt weitgehend linear mit t_{sat} auf. Offenbar sind die Unterschiede in den T₁-Relaxationzeiten gering, so dass die STD-Spektren mit einer Sättigungszeit von 2 s gut zur Charakterisierung des Bindungsepitops verwendet werden können.

STD-Effekte der übrigen Aminosäuren

Bei 2.3 ppm überlagern sich die Signale der Met2-H γ -Protonen mit dem eines Pro9-H β -Protons. Der recht starke STD-Effekt ist im 1D-Spektrum nicht sicher einer Aminosäure zuzuordnen. Im STD-TOCSY findet man jedoch ein starkes Kreuzsignal zwischen den Met2-H γ - und -H β -Protonen sowie ein etwas schwächeres Kreuzsignal zwischen Met2-H α - und -H β , während entsprechende *cross peaks* zwischen den Pro8-Protonen fehlen. Die Met2-Methylgruppe zeigt verglichen mit den γ -Protonen deutlich weniger STD-Effekt. Methionin-2 interagiert demnach hauptsächlich über seine H α -, -H β - und -H γ -Protonen mit CD4, während Pro9 wahrscheinlich nur schwachen Kontakt zum Rezeptor hat.

Erstaunlich ist, dass die Thr8-Methylgruppe bei 1.237 ppm in den 1D-STD-Spektren nur relativ schwach auftritt, während im STD-TOCSY intensive Kreuzsignale von Thr8-H α /H γ und -H β /H γ zu erkennen sind. Wahrscheinlich findet die Interaktion hauptsächlich über die α - und β -Protonen statt, deren Signale im 1D-STD-Spektrum nicht auswertbar sind. Lysin-5

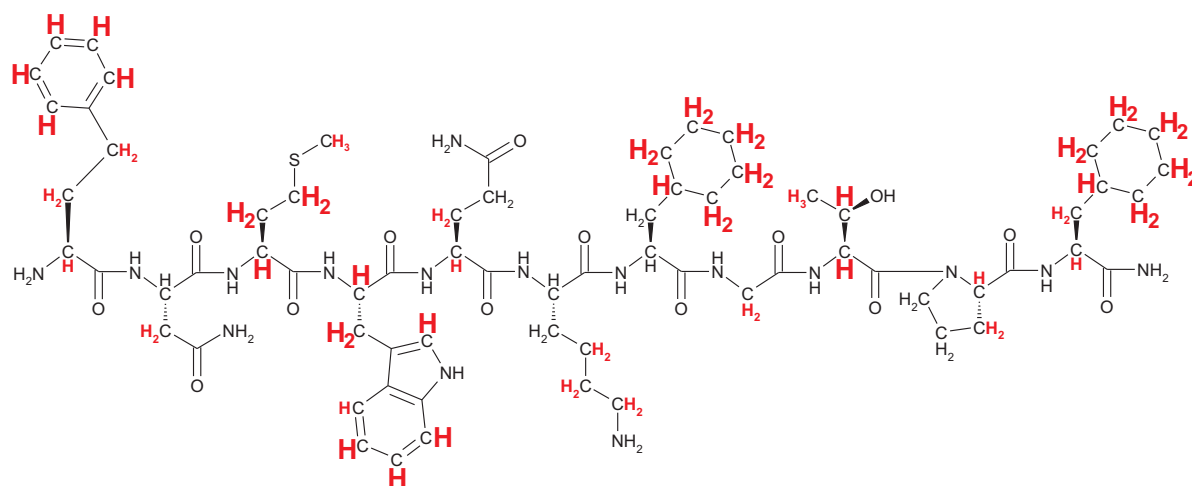


Abbildung 4.28: CD4-Bindungsepitop des Peptidmimetikums Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂. Rot hervorgehoben sind Protonen, die in den STD-Spektren hervortreten. Starke STD-Effekte im 1D- und im 2D-STD-TOCSY-Spektrum sind zusätzlich vergrößert dargestellt. (vgl. Text)

und Gln4 zeigen STD-Effekte mittlerer Intensität, während Asn2 nur schwachen Kontakt zum CD4-Rezeptor hat. Die Ergebnisse des *epitope mapping* sind in Abb. 4.28 zusammengefasst.

4.5.3 Vergleich mit der Leitstruktur und dem Bindungsmodell

Beim Vergleich der Bindungsepitope der Leitstruktur (siehe Abb. 1.10, Seite 21) und des Peptidmimetikums Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ fallen große Gemeinsamkeiten auf, die auch das Bindungsmodell weitgehend bestätigen, das eine Grundlage des rationalen Ligandendesigns bildete. Bei beiden CD4-Liganden ist Trp3 stark an der CD4-Bindung beteiligt. Die hydrophoben Aminosäuren an Position 6 und 10 (Val6 und Leu10 bzw. Cha6 und Cha10) zeigen starke STD-Signale. Weiterhin bestehen in beiden Verbindungen starke Kontakte zwischen Thr8 und dem CD4-Rezeptor, wobei in der Leitstruktur zusätzlich zum β -Proton die Methylgruppe beteiligt ist, während beim Peptidmimetikum eher die α - und β -Protonen von Bedeutung sind. Asparagin-1 und Prolin-9 haben jeweils nur schwachen Kontakt zum Protein.

Dass Cha6 hauptsächlich mit seinem Cyclohexylring Kontakt zum CD4 hat, während bei Cha10 zusätzlich die α - und β -Protonen beteiligt sind, passt gut zu den Strukturen aus dem *Docking* (Abb. 4.4 und 4.6, Seiten 48 und 49), da dort die ε - und ζ -Protonen von Cha6 zur

Proteinoberfläche weisen, während der Cyclohexylring von Cha10 relativ flach auf der Oberfläche des CD4 liegt, so dass auch die β -Protonen mit dem Protein wechselwirken. Im Unterschied zur Leitstruktur zeigt Lys5 von Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ nur STD-Effekte mittlerer Intensität. Weiterhin findet man bei Met2 und Gln4 im Peptidmimetikum starke bzw. mittelstarke STD-Effekte, während diese Aminosäuren im Peptid eher geringen Kontakt zum Protein haben.

Die STD-NMR-Experimente belegen starke Kontakte des zusätzlich N-terminal eingeführten Homophenylalanins. Möglicherweise findet dessen Wechselwirkung mit dem hervorstechenden Phenylring von Phe43_{CD4} aber deutlich anders statt, als die Lage des Segments Asn425-Met426-Trp427_{GP120} in der Röntgenstrukturanalyse vermuten lässt, so dass sowohl die neuen Kontakte von Met2 und Hfa⁻¹ als auch die schon in der Leitstruktur nur schwer erklärbaren STD-Effekte der Ringprotonen von Trp3 verständlich werden. Welche Experimente zur Klärung der aufgeworfenen Fragen beitragen können, wird im Ausblick (Abschnitt 4.7) zusammenfassend behandelt.

4.6 Untersuchung der Proteolysestabilität

Peptidische Wirkstoffe sind oft gekennzeichnet durch eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, da sie im Magen-Darm-Trakt schnell durch Verdauungsenzyme angegriffen und weiterhin meistens schlecht resorbiert werden. Auch im Blutkreislauf zirkulieren Proteasen, die nach der Resorption bzw. bei subcutaner oder intravenöser Verabreichung eines peptidischen Pharmakons aktiv werden und es erschweren, über längere Zeit therapeutisch wirksame Konzentrationen aufrechtzuerhalten.

In dieser Arbeit sollte die Einführung unnatürlicher Aminosäuren in die Leitstruktur NMWQKVGTP-L-NH₂ daher nicht nur dessen Affinität zum CD4-Rezeptor erhöhen, sondern möglichst gleichzeitig die Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau verbessern. Die Abbildung 4.29 zeigt das Ergebnis eines sehr einfachen Tests auf Proteolysestabilität.

Das Peptidmimetikum Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ und die Leitstruktur NMWQKVGTP-L-NH₂ wurden mit Pronase, einem Gemisch diverser Endo- und Exo-

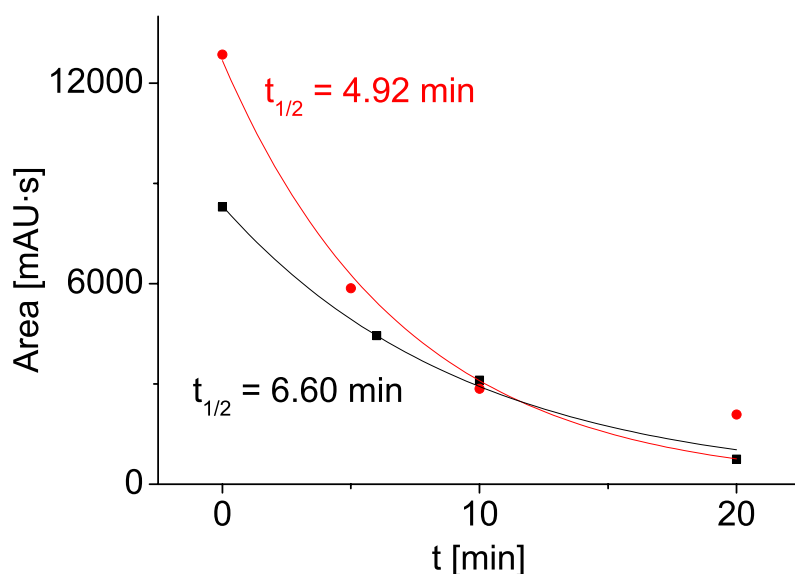


Abbildung 4.29: Stabilität des Peptidmimetikums Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ (■) gegen Pronase im Vergleich zur Leitstruktur NMWQKVGTPPL-NH₂ (●). Aufgetragen sind die Flächen im HPL-Chromatogramm gegen die Inkubationszeit. $c_{\text{Pronase}} = 8 \text{ mgL}^{-1}$, $c_{0,\text{Substrat}} = 500 \text{ } \mu\text{M}$.

peptidasen aus *Streptomyces griseus*, inkubiert und ihr Abbau mit Hilfe von HPLC-MS verfolgt ($c_{\text{Peptid}} = 0.5 \text{ mM}$, $c_{\text{Pronase}} = 8 \text{ mgL}^{-1}$, 100 mM Tris-Puffer, $\text{pH} = 7.5$, 37°C).

Tatsächlich wird das dreifach substituierte Peptidmimetikum etwas langsamer zersetzt als die Referenzverbindung. Nimmt man eine Reaktion pseudo-erster Ordnung an, ergibt die Anpassung der Messdaten an die Gleichung $y = a \cdot e^{-bt}$ für die Verbindung Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 6.60 \text{ min}$, die um 34 % über der Halbwertszeit des Peptids NMWQKVGTPPL-NH₂ mit $t_{1/2} = 4.92 \text{ min}$ liegt.

Als erstes Spaltprodukt findet man bei der Leitstruktur ein Peptid der Masse 928 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), d. h. das Oktapeptid WQKVGTPPL-NH₂. Im Fall des Peptidmimetikum taucht im Massenspektrogramm als erstes ein Signal bei $m/z = 1022$ auf, das der Verbindung WQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ zugeordnet werden kann. Bei beiden Peptiden wird von Pronase also zuerst zwischen Met2 und Trp3 gespalten. Hier liegt die wesentliche Erklärung dafür, dass sich Peptid und Peptidmimetikum nicht deutlich in ihrer Stabilität unterscheiden. Es ist eher unwahrscheinlich, dass eingeführte unnatürliche Gruppen, die neun (Hfa⁻¹) bzw. 14 (Cha6) Bindungen entfernt liegen, die Spaltung an dieser Stelle verhindern können. Eine Modifikation des Peptid-backbone, die zwischen Met2 und Trp3 eine Hydrolyse unmöglich macht, könnte wahrscheinlich die Stabilität der neuen CD4-Liganden signifikant erhöhen.

4.7 Ausblick

In dieser Arbeit wurden neue Liganden des CD4-Rezeptors gefunden, die im NMR-Experiment eine bis zu 130fach, im SPR-Experiment sogar eine bis zu 20000fach verbesserte Affinität verglichen mit der Leitstruktur besitzen. In biologischen Tests sollte nun getestet werden, ob sich diese Affinitätssteigerung auch in einer verstärkten Inhibition des HIV-Entry niederschlägt.

Zeigen die Virusinhibitionstests, dass die Entwicklung in die richtige Richtung weist, sollte der Bindungsmodus der Liganden präziser aufgeklärt werden, um als neuer Ausgangspunkt für die weitere Optimierung zu dienen.

Zu diesem Zweck stehen wiederum NMR-spektroskopische Verfahren zur Verfügung. Unter günstigen kinetischen Bedingungen lässt sich die bioaktive Konformation eines Liganden mit Hilfe von trNOE-Experimenten bestimmen.⁹⁵ Ob die in dieser Arbeit untersuchten Peptidmimetika, die schon im STD-NMR-Experiment nur relativ schwache Signale hervorbrachten, für derartige Experimente geeignet sind, bleibt jedoch fraglich.

Eine interessante Fortsetzung dieses Projekts liegt in NMR-Experimenten, die die Veränderungen des Proteins durch die Bindung des Liganden untersuchen und unter der Bezeichnung *SAR by NMR* bekannt sind.⁹⁶ Zur Detektion von Bindung wird dabei die Verschiebung von Kreuzsignalen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum betrachtet. Liegt zusätzlich noch eine komplette Resonanzzuordnung des Rezeptors vor, können die Aminosäuren identifiziert werden, die proteinseitig an der Bindung beteiligt sind. Damit ist diese Technik eine perfekte Ergänzung zum STD-NMR-Verfahren, da die Annahmen zum Bindungsmodus aus Sicht des Rezeptors verifiziert werden können. Die Protein-NMR-basierten Verfahren erfordern allerdings Isotopenmarkierung mit ^{15}N und ^{13}C . Zusätzlich dazu liegt bisher keine Resonanzzuordnung eines CD4-Konstrukts vor.

Da Kristallisationsbedingungen für den CD4-Rezeptor publiziert sind,^{97–99} könnten über sogenannte *soaking* Experimente Cokristalle des Rezeptors mit seinen Liganden zugänglich sein, deren Struktur röntgenkristallographisch aufgeklärt werden könnte.

Um die neuen Liganden als Wirkstoffe einsetzen zu können, müsste nicht nur ihre Affinität weiter gesteigert werden, sondern auch die Stabilität gegenüber Proteasen verbessert werden.

Hier bieten sich Modifikationen des Peptid-*back bone* an, wie sie zur Zeit im Arbeitskreis untersucht werden.

Zusammenfassung 5

Der erste Schritt der HIV-Infektion ist die Wechselwirkung des viralen Glycoproteins GP120 mit dem humanen Glycoprotein CD4, welches auf T-Zellen vorkommt. Ziel der Arbeiten war es, Substanzen zu entwickeln, die diese Interaktion blockieren. Es war im Arbeitskreis gezeigt worden, dass ein Decapeptid der Sequenz NMWQKVGTP_L die Interaktion des humanen CD4-Rezeptors mit dem HIV-Oberflächenglycoprotein GP120 blockieren kann aber nur eine Dissoziationskonstante von 6 mM besitzt.

Basierend auf diesen Daten wurden hier zuerst aufgrund von *Molecular Modelling*- und *Docking*-Simulationen Vorschläge für modifizierte Liganden entwickelt, die eine höhere Affinität zu CD4 haben sollten. Dazu wurde einerseits versucht, hydrophobe Flächen auf dem CD4-Rezeptor besser abzudecken sowie zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen einzuführen. Gleichzeitig sollte durch Einsatz unnatürlicher Aminosäuren die Stabilität gegen Proteolyse erhöht werden, die häufig ein Problem für die therapeutische Anwendung peptidischer Wirkstoffe darstellt.

Basierend auf den *Docking*-Studien wurden dann 31 neue Peptide bzw. Peptidmimetika an einem automatischen Parallelsynthese-Roboter hergestellt, die an einzelnen Positionen relativ zur Leitstruktur verändert waren. Die Ausbeuten an HPLC-gereinigten Deca- bzw. Undecapeptiden lagen zwischen 8 und 75 %. Die Identität der Substanzen wurde mittels MALDI-TOF- oder LC-ESI-Massenspektrometrie überprüft. Zusätzlich wurden die Strukturen von ausgewählten Verbindungen mittels 1D- und 2D-NMR-Spektren bestimmt.

Die Mehrzahl dieser Substanzen zeigte verstärkte Bindung im *Surface Plasmon Resonance* (SPR) Experiment, in dem der CD4-Rezeptor auf dem Sensorchip immobilisiert worden war. Besonders erfolgreich war die Substitution von Val6 bzw. Leu10 durch Cyclohexylalanin (Cha) sowie die N-terminale Verlängerung der Leitstruktur um große, aromatische Aminosäuren wie Homophenylalanin (Hfa). Im STD-NMR Experiment, bei dem beide Bindungspartner

in Lösung vorliegen, konnte die Bindung der Peptidmimetika an das CD4 bestätigt werden. Aus den STD-NMR Untersuchungen ergab sich die Affinität von Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂ zu $K_D \approx 1$ mM und von NMWQKVGTP-Cha-NH₂ zu $K_D \approx 100$ μ M. Diese Bindungskonstanten stellen Verbesserungen um den Faktor 6 bzw. 60 verglichen mit der Leitstruktur dar. Mittels SPR war eine K_D -Bestimmung der monosubstituierten Peptidmimetika nicht möglich, da die spezifische Bindung durch unspezifische Effekte überdeckt wurde.

Die Modifikationen an einzelnen Aminosäurepositionen, die eine verbesserte Bindung bewirkt hatten, wurden dann zu 22 neuen Peptidmimetika kombiniert, bei denen zwei bis fünf Aminosäuren ausgetauscht waren. Als erfolgreichste Mehrfachsubstitution wurde das Peptidmimetikum Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ erhalten, das im SPR-Assay eine Dissoziationskonstante von 317 nM aufweist und damit ca. 20000fach stärker an CD4 bindet als die Decapeptid-Leitstruktur. Im Gegensatz dazu lieferte eine Titrationsreihe zur Affinitätsbestimmung mittels STD-NMR-Spektroskopie K_D -Werte von etwa 250 μ M. Der Grund für die Diskrepanz der Bindungskonstanten konnte nicht abschliessend geklärt werden. Ein Problem der SPR-Bindungsstudien war jedoch, dass bei der Immobilisation des CD4-Rezeptors etwa 92 % der Proteinaktivität verloren ging und bei Ligandkonzentrationen oberhalb von 12.5 μ M unspezifische Wechselwirkungen mit dem Sensorchip auftraten. Ein weiterer Grund für die verschiedenen Affinitäten könnte auch darin liegen, dass eine heterogener (SPR) mit einem homogenen (STD) Bindungsassay verglichen wird. In dieser Hinsicht kommt das SPR-Experiment der natürlichen Situation näher, da CD4 ein Membranprotein ist.

Von dem Peptidmimetikum Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ konnte aus einem 2D-STD-TOCSY-Spektrum und aus einer 1D-STD-Aufbaureihe das Epitop bestimmt werden, das an der CD4-Bindung beteiligt ist. Die stärksten STD-Effekte und damit die wichtigsten Interaktionen mit dem CD4-Rezeptor wurden bei der Aminosäure Trp3, die schon in der Leitstruktur starke Effekte zeigte, sowie bei den neu eingeführten Aminosäuren Hfa⁻¹, Cha6 und Cha10 beobachtet. Diese Beobachtungen stimmen gut mit dem Bindungsmodell überein, das sich aus dem STD-epitope mapping der Leitstruktur und der Röntgenstruktur eines ternären Komplexes von CD4, GP120 und einem monoklonalen Antikörper ableitet.

Um zu testen, ob der Einbau von Aminosäuren mit unnatürlichen Seitenketten die Stabilität gegen Proteolyse erhöht, wurde untersucht, wie schnell die Verbindung Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ im Vergleich zur Leitstruktur durch den als Pronase bezeichneten „Enzymcocktail“ zersetzt wird. Das Peptidmimetikum besitzt gegenüber der Referenzverbindung eine um 34 % erhöhte Halbwertszeit. Diese relativ geringe Änderung der Stabilität ist mit der primären Spaltstelle zu erklären, die zwischen Met2 und Trp3 und somit weit entfernt von den eingeführten Modifikationen liegt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch den systematischen Einsatz von NMR-Spektroskopie, *Molecular Modelling* und SPR-Experimenten Liganden für den humanen CD4-Rezeptor entwickelt werden konnten, die eine signifikant verbesserte Affinität verglichen mit der Leitstruktur aufweisen und potentiell als HIV-Entry-Inhibitoren anwendbar sind.

Summary 6

The initial step of the HIV infection is the interaction of the viral glycoprotein GP120 with the human CD4 receptor which is expressed by T-lymphocytes. This thesis aimed at developing compounds that block this interaction. Previous work in our research group demonstrated that a decapeptide with the sequence NMWQKVGTP-L-NH₂ can inhibit the interaction of the human CD4 receptor with the HIV envelope glycoprotein GP120 but with a high dissociation constant of $K_D = 6 \text{ mM}$.

Based on the lead structure, molecular modelling and docking simulations lead to structures of modified ligands that should have higher affinities for the CD4 receptor. The modified ligands had more hydrophobic interactions with CD4 and/or showed improved electrostatic attractions. By incorporating non-natural amino acids higher stability against proteolysis should be achievable.

31 peptide mimetics with modifications at single positions compared to the lead structure were synthesized with the aid of an automated parallel synthesis robot. The yields of HPLC-purified deca- and undecapeptides were between 8 and 75 %. All compounds were identified by MALDI-TOF or LC-ESI mass spectrometry. Representatively, four peptide mimetics were fully characterized by 1D and 2D NMR spectroscopy.

The majority of these monosubstituted peptide mimetics showed increased binding towards CD4 in surface plasmon resonance (SPR) experiments on a Biacore 3000 instrument using immobilized CD4. Most successful were mutations of Val6 or Leu10 to Cyclohexylalanine and the N-terminal elongation of the lead structure by large aromatic amino acids like homophenylalanine (Hfa). STD NMR experiments in which both the receptor and the ligand are in solution confirmed the binding of the new ligands to the CD4 receptor. STD NMR titration series resulted in dissociation constants of $K_D \approx 1 \text{ mM}$ for the undecapeptide Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂ and of $K_D \approx 100 \mu\text{M}$ for NMWQKVGTP-Cha-NH₂. This corresponds to

improved binding by 6- and 60-fold, respectively, when compared to the decapeptide lead. Affinity constants of the monosubstituted peptide mimetics could not be determined by SPR as specific binding was buried by non-specific effects.

Modifications at single positions that had caused significantly improved CD4-binding were subsequently combined to yield 22 novel peptide mimetics carrying from two to five variations each. The most successful combination was found in the triple substituted peptide mimetic Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ that has a K_D of 317 nM determined by SPR, corresponding to a 20000-fold increased affinity towards CD4. In contrast, the dissociation constant as determined by STD NMR was approximately 250 μ M. This discrepancy could be due to the high degree of non-native CD4 of 92 % that is present in the SPR binding studies. In addition to that, the difference between heterogeneous and homogeneous assay could also be responsible for the deviation in binding constant. In this respect, the SPR experiment resembles the native conditions more closely as the CD4 receptor is an integral membrane protein.

The epitope involved in CD4-binding could be determined by a 2D STD TOCSY spectrum and a 1D STD build-up series. As in the lead structure, the amino acid Trp3 showed strong STD effects and thus has tight contacts to the receptor. In addition to that, the newly incorporated non-natural amino acids Hfa⁻¹, Cha6 and Cha10 have STD signals of about the same intensity as Trp3 indicating important interactions with CD4. These findings are in good agreement with the binding model derived from STD data of the decapeptide lead in conjunction with an X-ray crystal structure of a ternary complex of CD4, GP120 and a monoclonal antibody.

To investigate the influence of the non-natural modifications on the stability against proteolysis the digestion of Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ by pronase, a mixture of endo- and exopeptidases, was followed by LC-ESI mass spectrometry and was compared to the stability of the lead structure. The half-life of the triple substituted peptide mimetic is increased by only 34 %. This comparatively small improvement of stability can be explained by the primary cleavage site that lies between Met2 and Trp3 which is at a remote location relative to the non-natural amino acids.

In this thesis it was shown that by systematic application of NMR spectroscopy, molecular modelling and SPR experiments ligands for the human CD4 receptor could be developed that have a significantly improved affinity compared to the lead structure and that are potential HIV-entry inhibitors.

7.1 Chemikalien

Reagenzien zur Peptidsynthese und allgemeine Chemikalien

Hersteller / Lieferant	Chemikalien
Advanced Chemtech (Giessen)	Fmoc-L-1Acpc-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Bpa-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Hfa-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-2Nal-OH, Fmoc-L-Phe(4-F)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Tle-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz
Bachem GmbH (Weil am Rhein)	Fmoc-L-p-Amino-Phe(Boc)-OH, Fmoc-L-Chg-OH, Fmoc-L-p-Carboxy-Phe(OtBu)-OH,
Biacore AB (Uppsala)	NHS, EDC, EA, HBS-EP
Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden), (jetzt Merck Biosciences GmbH)	Fmoc-L-2Ahx-OH, Fmoc-L-Aib-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-L-Cha-OH, Fmoc-L-Hse(Trt)-OH, Fmoc-L-Msn-OH, Fmoc-L-Omy-OH, Fmoc-L-Thi-OH, Fmoc-L-Pnf-OH, TBTU
Deutero (Kastelann)	Deuteriumoxid, 99.9 %
J.T. Baker (Deventer)	Acetonitril (Ultra Gradient HPLC Grade)
Lancaster, (Mühlheim an der Ruhr)	Triisopropylsilan 99 %

Merck (Darmstadt)	Aceton, Ammoniak, Methanol, Dichlormethan, 2-Propanol, <i>tert</i> -Butylmethylether, Diethylether, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Trifluoressigsäure, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat
Applied Biosystems (Darmstadt)	Piperidin/DMF (1:5), DIPEA
Proligo, (Hamburg)	DMF

Proteine

Recombinant human soluble CD4 (CHO). Benutzt für SPR-Bindungsstudien am Biacore 3000. 1 mg (1 mg/mL) in 10 mM Histidin und 50 mM Mannitol mit 0.1 mg Polysorbate 80. Reinheit > 95 %. Aminosäure 1-369 vom natürlichen CD4 (45 kDa). Expressions System: CHO-Zellen. NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Rockville USA. Catalog Number: 1813, <http://www.aidsreagent.org/>, Gelagert bei -80 °C.

Recombinant human soluble CD4 (Baculovirus). Benutzt für SPR-Bindungsstudien am Biacore S51 in Freiburg. 50 µg (0.5 mg/mL) in PBS. Reinheit > 95 %. Expressions System: Baculovirus. National Institute for Biological Standards and Control, Katalog-Nr. ARP608/609, <http://www.nibsc.ac.uk/catalog/aids-reagent>, Gelagert bei -80 °C.

Recombinant human soluble CD4 (CHO). Benutzt für STD-NMR-Bindungsstudien. 1 mg in Aliquoten zu 100 µg (1 mg/mL) in 1 mL MES-Puffer, pH = 6, 350 mM NaCl. Reinheit > 95 %. Aminosäure 1-370 vom natürlichen CD4 (45 kDa). Expressions System: CHO-Zellen. Progenics Pharmaceuticals, Tarrytown, New York, USA. Katalog-Nr.: PRO 1008-1, Lot 48.

HIV-1 envelope GP120 antigen (recombinant). 100 µg (0.8 mg/mL, 6.7 µM) in 2X PBS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH = 7.4. Glu-39 bis Arg-517 (120 kDa) von HIV-1 (SF2 Isolat). Reinheit größer 95 %. HI1A-600-5 Australbio, San Ramon, USA <http://www.australbio.com> gelagert bei -20 °C.

Recombinant HIV-1 IIIB GP120. 50 µg (1 mg/mL) in PBS, 120 kDa. Reinheit > 95 %. Expressions System: Baculovirus. National Institute for Biological Standards and Control,

Katalog-Nr. EVA607, <http://www.nibsc.ac.uk/catalog/aids-reagent>, Gelagert bei -80 °C.

Pronase aus *streptomyces griseus*. Bezogen als lyophilisiertes Pulver von Boehringer Mannheim (jetzt Roche, Basel), Bestell-Nr. 164 21.

Puffer

PBS-Puffer. 800 mg NaCl, 20 mg KCl, 144 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 20 mg KH_2PO_4 , 50 mg NaN_3 auf 100 mL mit $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 9:1 oder D_2O aufgefüllt. pH = 7.4.

HBS-EP-Puffer. 0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % Polysorbat P20. Sterilfiltriert, entgast. Bezogen von Biacore, Freiburg.

7.2 Geräte

Automatisierte Peptidsynthese

Advanced Chemtech MOS 496 Ω . Alle Peptide wurden an einem Syntheseroboter MOS 496 Ω der Firma Advanced ChemTech mit Fmoc-geschützten Aminosäuren durchgeführt. Es wurde ein Reaktionsblock mit 96 Kammern verwendet. Auch die Abspaltung der Peptide vom Syntheseharz wurde automatisiert mit Hilfe des Abspaltblocks durchgeführt.

Chromatographie

BioCAD Sprint Perfusion Chromatography System. Die Aufreinigung der Peptide erfolgte an einer BioCAD Sprint HPLC-Anlage der Firma PerSeptive Biosystems, Wiesbaden. Dabei wurden Säulen mit unterschiedlichen Materialien und Dimensionen verwendet.

HPLC-Säulen. ET 250/4 mm Nucleosil 100-5 μm C18, Volumen: 3.142 mL, Macherey und Nagel, Düren, Art.-Nr. 720014. *Protein & Peptide* C18, Volumen: 19.635 mL, Vydac, (MZ-Analysentechnik GmbH, Mainz), Art.-Nr. 218TP510.

Fraktionssammler. Gilson FC205 „Fraction Collector“, Gilson, Middleton, WI, USA.

MALDI-TOF Massenspektrometrie

Bruker Biflex III. Die Aufnahme der Maldi-TOF-Spektren erfolgte an einem Biflex III Spektrometer der Firma Bruker Daltonics, Bremen im Reflexions Modus.

LC-ESI-Messungen

HP5989B MS Engine. Die *electro spray* Massenspektren mit HPLC-Kopplung wurden an einem HP5989B MS Engine Massenspektrometer der Firma Hewlett Packard, Böblingen aufgenommen.

HP59987A API-Elektrospray LC/MS Interface. Als Ionenquelle diente ein HP59987A API-Elektrospray LC/MS Interface der Firma Hewlett Packard, Böblingen.

Agilent HPLC Series 1100. Zur Flüssigchromatographie wurde ein HPLC-System der Serie 1100 von der Firma Agilent, Waldbronn eingesetzt.

HPLC-Säule. CC 250/2 mm NUCLEOSIL 100-5 μm C18, Volumen 900 μL , Macherey und Nagel, Düren.

NMR-Spektrometer

NMR-Spektren wurden an Bruker DRX500 und Avance700-Spektrometern aufgenommen.

DRX 500 Spektrometer. Der Magnet besitzt eine magnetische Induktion von 11.67 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 499.87 MHz für Protonen. Das Spektrometer ist mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen ausgestattet.

Avance 700 Spektrometer. Der Magnet besitzt eine magnetische Induktion von 16.35 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 700.13 MHz für Protonen. Das Spektrometer ist wahlweise mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Cryo-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen oder mit einem analogen TXI-Probenkopf ohne Cryo-Technologie ausgestattet.

Software. Die Auswertung, Prozessierung, Phasenkorrektur, Basislinienkorrektur und Kali-

brierung der Spektren erfolgte mit der Software XWINNMR (Version 2.5) und Aurelia (Version 2.5.9) der Firma Bruker auf Silicon-Graphics Workstations (O2, Octane).

SPR-Experimente

Biacore 3000. Die SPR-Experimente wurden mit einem Biacore 3000 Gerät der Firma Biacore, Uppsala, Schweden, an der Universität zu Lübeck durchgeführt. Es wurden CM-5-Sensorchips eingesetzt.

Biacore S51. Einige Substanzen wurden zusätzlich bei der Firma Biacore in Freiburg untersucht. Zum Einsatz kam ein Biacore S51 Gerät. Das Messprotokoll orientierte sich an den Untersuchungen, die mit dem Biacore 3000 Gerät durchgeführt worden waren. Es wurden ebenfalls Sensorchips vom Typ CM-5 verwendet.

Software. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen BIAevaluation (Version 3.0.2) und Biacore Control Software (Version 3.0).

Zentrifugation

Eppendorf Centrifuge 5415C. Alle nicht proteinhaltigen Proben wurden auf einer Eppendorf 5415C Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Sigma Laborzentrifuge 2K15. Proteinhaltige Proben wurden bei 6 °C in einer Kühlzentrifuge 2K15 der Firma SIGMA zentrifugiert bzw. ultrafiltriert.

Ultrafiltrationsmembranen

Centricon 10. Zentrifugen-Filter, Ausschlussgrenze: 10 kDa, Volumen: 2 mL, Amicon Inc., Beverly, MA, USA. Katalog-Nr. 4205. Vor der Benutzung wurde die Membran zehnmal mit 2 mL H₂O (120 min, 5000 g) gewaschen.

Millipore Ultrafree. Zentrifugen-Filter, Ausschlussgrenze: 10 kDa, Volumen: 4 mL, Millipore GmbH, Schwalbach. Katalog-Nr. UFV4BGC25. Vor der Benutzung wurde die Membran zweimal mit 4 mL H₂O (10 min, 5500 g) gewaschen.

7.3 Molecular Modelling

In silico Studien der CD4-GP120-Interaktion wurden mit dem Sybyl-Softwarepaket (Version 6.5 - 6.8) auf Silicon Graphics Octane Workstations (R10000 und R12000-Prozessoren) durchgeführt. Das Bindungsmodell der Leitstruktur wurde aus den Röntgenstrukturdaten des CD4-GP120-17b-Komplexes (PDB-Code: 1GC1³³) entwickelt. Einzelne Aminosäuren der Leitstruktur wurden modifiziert und manuell auf die CD4-Oberfläche ausgerichtet. Die manuell vorpositionierten Liganden wurden anschließend mit Hilfe des Flexidock-Moduls in Sybyl an den Rezeptor gedockt.⁸⁷ Mit dem genetischen Algorithmus von Flexidock wurden üblicherweise 10000 - 100000 Generationen von Bindungskonformationen berechnet. Dabei waren alle Bindungen des Liganden rotierbar. Vom Rezeptor waren nur Aminosäuren flexibel, die direkt die Bindungsstelle bilden, d. h. Ser23, Gln25, Gln40, Ser42, Phe43, Arg59, Ser60, Leu61, Asp63 und Gln64. Die Dielektrizitätskonstante ϵ wurde auf den Wert 10 oder 80 gesetzt. Ladungen wurden nach Gasteiger-Marsili berechnet.¹⁰⁰ Für die Bindungsenergie wurden die van der Waals Energie, das elektrostatische Potential und das Torsionspotential des Tripos Kraftfelds berücksichtigt.^{88, 101} In Abweichung von den Standardwerten des Tripos Kraftfeldes benutzt das Flexidock-Modul einen Wasserstoff van der Waals Radius von 1 Å statt von 1.5 Å, ein Wasserstoff van der Waals ϵ von 0.03 statt 0.042 und einen van der Waals *cut-off* von 16 Å statt 8 Å. Ein kompletter Flexidock-Parameter-Satz ist im Anhang aufgeführt.

7.4 Festphasensynthese

Parallelsynthesen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden an dem Syntheseroboter MOS 496 Ω der Firma Advanced Chemtech in drei Ansätzen zu 9, 22 und 22 Peptiden parallel synthetisiert. Im ersten Ansatz wurden 11er, im zweiten und dritten Ansatz 10er und 11er-Peptide hergestellt. Im Anhang ab Seite 151 ist ein komplettes Syntheseprotokoll aufgeführt. Die einzelnen Operationen sind im Folgenden für eine Reaktionskammer dargestellt:

In jede Reaktionskammer (Volumen: 4 mL) wurden 20 mg Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz eingewogen. Bei einer Belegung von 0.5 mmol/g entspricht dies einer Ansatzgröße von 10 μ mol. Zum Quellen wurde das Harz 1 min in 2 mL DMF geschüttelt. Nach Entleeren wurden 2 mL MeOH hinzugefügt, um ein Schrumpfen des Harzes zu bewirken. Nach einminütigem Schütteln und Entleeren wurde noch zweimal mit je 2 mL DMF gewaschen. Diese Operationen (DMF, MeOH, 2·DMF) werden im Weiteren als Waschsequenz bezeichnet.

Es folgte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Harz bzw. in späteren Zyklen von der terminalen Aminosäure. Dazu wurde 1 mL einer Mischung aus Piperidin und DMF (1:4) zum Harz pipettiert und 5 min geschüttelt. Nach Entleeren wurde nochmals 1 mL Abspatlösung zugefügt und 10 min geschüttelt.

Durch eine Waschsequenz wurden Reste der Abspatlösung entfernt. Vor der Aminosäurekupplung wurde einmal mit 2 mL trockenem DMF gewaschen. Alle Lösungen, die bei der Kupplung zum Einsatz kamen, wurden ebenfalls in trockenem DMF angesetzt. Zur Anknüpfung einer Aminosäure wurden zuerst 300 μ L DMF zum Harz pipettiert. Dann wurden 100 μ L einer 0.25 M Lösung einer Fmoc- und gegebenenfalls seitenkettengeschützten Aminosäure in DMF hinzugefügt. Dies ergab einen 2.5fachen Überschuss an Aminosäurebaustein gegenüber den freien Aminogruppen am Harz. Die in dieser Arbeit verwendeten Bausteine sind auf Seite 99 tabellarisch aufgeführt. Welcher Baustein zugefügt wurde, hing von der Peptidsequenz ab, die in der jeweiligen Reaktionskammer erzeugt werden sollte. Als nächstes wurden 60 μ L einer 1 M Lösung von DIPEA in DMF hinzugefügt (6facher Überschuss bezogen auf freie Aminogruppen). Von einer 0.5 M Lösung von TBTU in DMF wurden ebenfalls 60 μ L hinzupipettiert (3facher Überschuss). Diese Reaktionsmischung wurde 60 min geschüttelt. Nach einmaligem Spülen mit 1.5 mL trockenem DMF wurde der gleiche Baustein nochmals über 90 min gekuppelt.

Im nächsten Schritt wurden die nicht abreagierten Aminofunktionen durch Zugabe von 1 mL Acetanhydrid in DMF (1:10) und zehnminütiges Schütteln blockiert. Anschließend wurde eine Waschsequenz durchgeführt.

Die weiteren Aminosäurekupplungen begannen nun jeweils mit dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe (s. o.). Nach der letzten Aminosäure wurde nochmals die Fmoc-Gruppe entfernt, jedoch nicht acetyliert. Es entstanden Peptide mit freiem N-Terminus.

Abspaltung

Vor der Abspaltung der Produkte vom Harz musste dieses getrocknet werden. Dazu wurde zweimal alternierend mit 2 mL MeOH und 2 mL CH₂Cl₂ gewaschen und anschließend im Stickstoffstrom über 2 h getrocknet.

Zum Auffangen der Abspaltprodukte wurde der Abspaltblock eingesetzt (Volumen der Auffanggefäße: 4.5 mL). Dann wurden 80 µL TIPS und 2 mL 5% Wasser enthaltende TFA zupipettiert und 3 h geschüttelt. Nach Entleeren in die Reaktionsgefäße wurden erneut 40 µL TIPS und 1 mL TFA/H₂O zugegeben und 3 h geschüttelt. Nach Entleeren wurde noch zweimal mit 0.5 mL TFA/H₂O nachgespült. Die Lösungen wurden an der Ölpumpe zur Trockne eingeeengt, mit Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Reinigung

Alle monosubstituierten Peptidmimetika wurden mittels HPLC gereinigt. Je nach Löslichkeit wurden 1 - 20 mg des jeweiligen trocknen Rohproduktes in 1 mL Wasser / Acetonitril / Trifluoressigsäure (90:10:0.1) gelöst und unlösliche Verunreinigungen über einen 0.2 µm Zentrifugationsfilter (Costar Spin-X, Corning Inc, Corning, NY, USA) abgetrennt. Die Aufreinigung der Peptide erfolgte an der BioCAD Sprint HPLC-Anlage über die Vydac-C18-Säule (siehe oben). Alle Peptide zeigten ein sehr ähnliches Elutionsverhalten. Es wurde folgender Gradient zwischen Eluent C (H₂O/MeCN/TFA 95:5:0.1) und Eluent D (H₂O/MeCN/TFA 5:95:0.1) verwendet: 1 CV 10 % D, 3 CV 10-50 % D, 1 CV 50-100 % D. Alle Peptide eluierten zwischen 40 und 50 % D. Die Fraktionen wurden mit dem angeschlossenen Fraktionssammler mit Peak-Erkennung in Glas-Reagenzgläser gesammelt. Die mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierten Fraktionen des Zielpeptids wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Für die Biacore-Experimente wurden die mehrfach substituierten Peptidmimetika durch Ausschütteln der Rohprodukte mit *tert*-Butylmethylether (MTBE) gereinigt, so dass bei den meisten Peptiden auf die zeitaufwändige HPLC-Reinigung verzichtet werden konnte. Dazu wurden die Rohprodukte mit je 4 mL kaltem *tert*-Butylmethylether versetzt, 10 min unter Ultraschall rotiert und über Nacht bei -18 °C stengelassen. Am folgenden Tag wurde bei ca. -10 °C bei 5000 rpm zentrifugiert und die organische Phase vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde nochmals mit ca. 2 mL *tert*-Butylmethylether geschüttelt und anschließend wieder zentrifugiert.¹⁰² Bei den Peptidmimetika NMWQR-Cha-GTPL und Hfa-NMWQKVGTP-Cha war die MTBE-Extraktion zur Reinigung nicht ausreichend. Sie wurden daher wie oben beschrieben vor den SPR-Experimenten per HPLC gereinigt. Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung wurden auch alle übrigen, mehrfachsubstituierten Peptidmimetika mittels HPLC gereinigt.

Lagerung

Alle Peptide wurde lyophilisiert bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Charakterisierung

MALDI-TOF-MS. Die Peptide wurden in einer 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)-, oder α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CCA)-Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ L vermessen.

LC-ESI-MS. Um die Reinheiten der mehrfachsubstituierten Peptidmimetika nach dem Ausschütteln mit MTBE zu bestimmen, wurden die extrahierten Rohprodukte zu 1 mg/mL gelöst und davon 100 μ L eingespritzt. Es wurde derselbe Elutionsgradient wie bei der Reinigung der monosubstituierten Peptidmimetika verwendet.

NMR. Soweit nicht anders erwähnt wurden die NMR-Spektren der Peptidmimetika in H₂O/D₂O (9:1) bei einem pH-Wert von 2 - 2.5 (angesäuert mit TFA) bei 280 oder 300 K aufgenommen. Die Zuordnung der ¹H-chemischen Verschiebungen erfolgte mit Hilfe von 1D-¹H- (Pulsprogramme zg, zgpr, p3919gp) sowie 2D-TOCSY- (mlevgp19), ROESY-

(roesygpgh19) und COSY- (cosydfgpph19) Experimenten, während die ^{13}C -chemischen Verschiebungen aus HSQC- (invietgssi bzw. inviedetgs) Spektren ermittelt wurden. Die Unterdrückung des Lösungsmittelsignals wurde mittels Vorsättigung oder WATERGATE erreicht. Die 2D-Spektren wurden üblicherweise mit 512 Inkrementen in F1 aufgenommen. Bei einer Spektrenweite von 12 ppm wurden 8 bis 40 Scans mit 4k Datenpunkten pro Inkrement aufsummiert. Alle Spektren wurden mittels TPPI- (*time proportional phase increment*) oder Echo-Antiecho-Verfahren phasensensitiv aufgenommen. Der Phasenfehler der Spektren wurde korrigiert und anschließend eine Basislinienkorrektur mit einem Polynom fünften Grades durchgeführt. Als *Window*-Funktionen wurden in beiden Dimensionen typischerweise verschobene Quadrat-Sinusfunktionen eingesetzt. Die Nomenklatur der natürlichen Aminosäuren folgt der IUPAC-Empfehlung zur Präsentation von NMR-spektroskopischen Daten von Proteinen.¹⁰³ Für unnatürliche Aminosäuren wurden die Bezeichnungen aus Abb. 7.1 verwendet. Diastereotope Substituenten wurden nicht stereospezifisch zugeordnet.

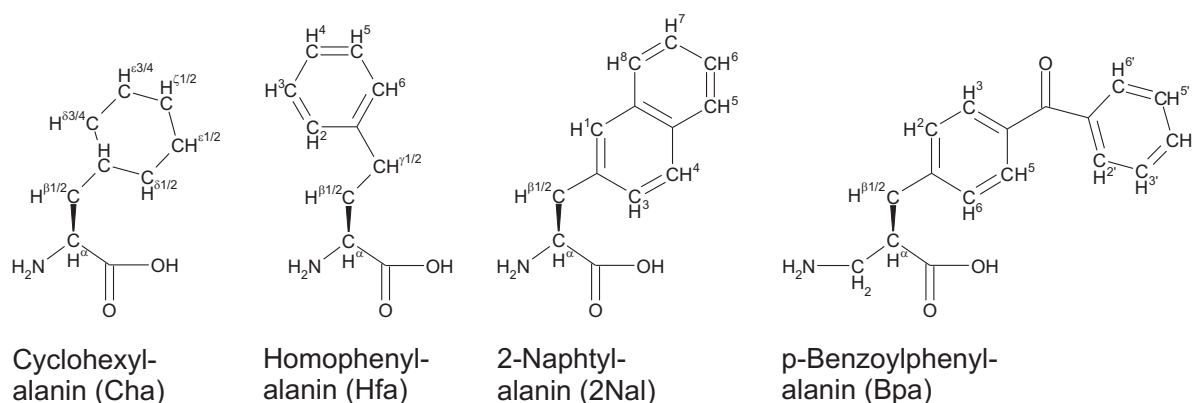


Abbildung 7.1: Benennung von Protonen unnatürlicher Aminosäuren. Die Nomenklatur der Kohlenstoffatome erfolgte analog.

Darstellung der Peptide und Peptidmimetika

Im Folgenden sind die Daten aller Verbindungen zusammengestellt, die in dieser Arbeit synthetisiert wurden. Alle Verbindungen wurden wie in Abschnitt 7.4 beschrieben synthetisiert, gereinigt und charakterisiert. Grundsätzlich sind Reinausbeuten nach HPL-

Chromatographie angegeben. Alle mehrfachsubstituierten Peptidmimetika wurden mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert. Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen Bpa-NMWQKVGTP-L-NH₂, Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂, NMWQK-Cha-GTP-L-NH₂ und NMWQKVGTP-Cha-NH₂ NMR-spektroskopisch untersucht.

2Nal-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1369.66 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1370, berechnet [M]: 1368.70
Theoretische Ausbeute:	13.7 mg
Ausbeute:	40.9 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Bpa-Asn-Met-2Nal-Gln-Lys-Cha-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse:	1528.89
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1529, berechnet [M]: 1527.79 g/mol
Theoretische Ausbeute:	15.29 mg
Ausbeute:	14.9 %
Kommentar:	Verbindung aggregiert in reinem Wasser. NMR-spektroskopische Charakterisierung daher in Wasser/Methanol (2:1).

Tabelle 7.1: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NM-2Nal-QK-Cha-GTP-Cha-NH₂ in 400 μL H₂O/D₂O (9:1) + 200 μL Methanol-d₄, 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.189	3.196/3.108	-	H ^{2/6} 7.243, H ^{3/5} 7.595, H ^{2'/6'} 7.434, H ^{3'/5'} 7.641, H ^{4'} 7.582
Asn1	8.444	4.563	2.558/2.507	-	H ^{δ1/2} 7.435/6.883
Met2	8.386	3.990	1.569	1.987	H ^ε 1.583
2Nal3	8.006	4.539	3.260/3.066	-	H ¹ 7.591, H ³ 7.274, H ⁴ 7.729, H ⁵ 7.748, H ⁶ 7.387, H ⁷ 7.405, H ⁸ 7.707
Gln4	7.797	4.121	1.886	2.156	H ^{ε1/2} 7.388/6.704
Lys5	7.964	4.075	1.677/1.566	1.246	H ^{δ1/2} 1.522, H ^{ε1/2} 2.826 H ^ζ 7.512
Cha6	7.910	4.239	1.520	1.210	H ^{δ1/2/3/4} 1.537/1.512/0.807/0.732, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.515/1.455/1.062/0.993
Gly7	8.192	3.821	-	-	-
Thr8	7.736	4.526	4.052	1.102	-
Pro9	-	4.288	2.140/1.775	1.889/1.817	H ^{δ1/2} 3.706/3.587
Cha10	7.960	4.182	1.459	1.210	H ^{δ1/2/3/4} 1.537/1.512/0.807/0.732, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.515/1.455/1.062/0.993 CONH ₂ 7.325/6.891

Tabelle 7.2: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NM-2Nal-QK-Cha-GTP-Cha-NH₂ in 400 μL H₂O/D₂O (9:1) + 200 μL Methanol-d₄, 300 K, pH=2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.583/14.370 ppm.

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	54.475	37.575	-	C ^{2/6} 130.066, C ^{3/5} 130.618, C ^{2'/6'} 129.223, C ^{3'/5'} 131.155, C ^{4'} 134.082
Asn1	55.880	37.407	-	-
Met2	54.377	30.563	29.520	C $^{\epsilon}$ 14.370
2Nal3	50.435	36.988	-	C ¹ 128.257, C ³ 127.567, C ⁴ 128.257, C ⁵ 128.257, C ⁶ 126.801, C ⁷ 126.801, C ⁸ 128.257
Gln4	54.442	27.636	31.842	-
Lys5	54.409	30.866	22.7915	C $^{\delta}$ 27.299, C $^{\epsilon}$ 40.173
Cha6	52.504	39.352	34.399	C $^{\delta 1/2}$ 33.894/32.210, C $^{\epsilon 1/2}/\text{C}^{\zeta}$ 26.593
Gly7	43.190	-	-	-
Thr8	57.563	67.845	19.157	-
Pro9	61.242	29.957	25.345	C $^{\delta}$ 49.045
Cha10	52.077	39.352	34.399	C $^{\delta 1/2}$ 33.894/32.210, C $^{\epsilon 1/2}/\text{C}^{\zeta}$ 26.593

Bpa-Asn-Met-2Nal-Gln-Arg-Cha-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse: 1556.91 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1557, berechnet [M]: 1555.80
Theoretische Ausbeute: 15.57 mg
Ausbeute: 10.0 %

Tabelle 7.3: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH=2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.216	3.263/3.124	-	H ^{2/6} 7.272, H ^{3/5} 7.645, H ^{2'/6'} 7.466, H ^{3'/5'} 7.691, H ^{4'} 7.620
Asn1	8.424	4.565	2.459	-	H $^{\delta 1/2}$ 7.411/6.865
Met2	8.371	4.027	1.645	2.076	H $^{\epsilon}$ 1.694
2Nal3	8.004	4.579	3.236/3.090	-	H ¹ 7.606, H ³ 7.295, H ⁴ 7.782, H ⁵ 7.801, H ⁶ 7.430, H ⁷ 7.450, H ⁸ 7.766
Gln4	7.911	4.135	1.920/1.833	2.139	H $^{\epsilon 1/2}$ 7.369/6.731
Arg5	8.064	4.000	1.666/1.564	1.427	H $^{\delta 1/2}$ 3.022, H $^{\epsilon}$ 7.069
Cha6	8.036	4.276	1.538	1.218	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.552/1.536/0.840/0.763, H $^{\epsilon 1/2/3/4}/\text{H}^{\zeta 1/2}$ 1.549/1.486/1.064/1.015
Gly7	8.272	3.860	-	-	-
Thr8	7.876	4.514	4.060	1.130	-
Pro9	-	4.310	2.185/1.810	1.940/1.870	H $^{\delta 1/2}$ 3.741/3.606
Cha10	8.135	4.195	1.505	1.218	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.552/1.536/0.840/0.763, H $^{\epsilon 1/2/3/4}/\text{H}^{\zeta 1/2}$ 1.549/1.486/1.064/1.015 CONH ₂ 7.410/6.961

Tabelle 7.4: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.694/14.370 ppm.

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	54.621	37.575	-	C ^{2/6} 130.023, C ^{3/5} 131.538, C ^{2'/6'} 129.238, C ^{3'/5'} 130.970, C ^{4'} 134.542
Asn1	57.986	37.318	-	-
Met2	54.302	30.578	29.734	C $^{\epsilon}$ 14.370
2Nal3	50.583	36.750	-	C ¹ 128.372, C ³ 127.858, C ⁴ 129.130, C ⁵ 128.561, C ⁶ 126.721, C ⁷ 127.316, C ⁸ 128.561
Gln4	54.232	27.604	31.970	-
Arg5	54.125	28.490	25.115	C $^{\delta}$ 41.511
Cha6	52.602	39.286	34.409	C $^{\delta 1/2}$ 33.981/32.441, C $^{\epsilon 1/2}/C^{\zeta}$ 26.622
Gly7	43.5645	-	-	-
Thr8	57.986	67.869	19.263	-
Pro9	61.316	30.009	25.495	C $^{\delta}$ 49.297
Cha10	52.354	39.286	34.409	C $^{\delta 1/2}$ 33.981/32.44, C $^{\epsilon 1/2}/C^{\zeta}$ 26.622

Bpa-Asn-Met-2Nal-Gln-Arg-Cha-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1516.84 g/mol
 MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1517, berechnet [M]: 1515.77
 Theoretische Ausbeute: 15.17 mg
 Ausbeute: 30.0 %
 Kommentar: Verbindung aggregiert in reinem Wasser. NMR-spektroskopische Charakterisierung daher in Wasser/Methanol (3:1).

Tabelle 7.5: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTPL-NH₂ in 600 μL H₂O/D₂O (9:1) + 200 μL Methanol-d₄, 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.158	3.184/3.070	-	H ^{2/6} 7.217, H ^{3/5} 7.572, H ^{2'/6'} 7.404, H ^{3'/5'} 7.616, H ^{4'} 7.554
Asn1	8.394	4.519	2.497/2.457	-	H $^{\delta 1/2}$ 7.402/6.852
Met2	8.358	3.962	1.558	1.969	H $^{\epsilon}$ 1.576
2Nal3	7.965	4.495	3.210/3.031	-	H ¹ 7.566, H ³ 7.243, H ⁴ 7.708, H ⁵ 7.727, H ⁶ 7.353, H ⁷ 7.374, H ⁸ 7.691
Gln4	7.797	4.088	1.873/1.826	2.113	H $^{\epsilon 1/2}$ 7.355/6.687
Arg5	7.970	4.016	1.639/1.535	1.397	H $^{\delta 1/2}$ 2.981, H $^{\epsilon}$ 7.074
Cha6	7.934	4.226	1.487	1.169	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.496/1.468/0.791/0.713, H $^{\epsilon 1/2/3/4}/H^{\zeta 1/2}$ 1.481/1.406/0.956
Gly7	8.162	3.801	-	-	-
Thr8	7.770	4.473	4.008	1.075	-
Pro9	-	4.253	2.123/1.755	1.878/1.812	H $^{\delta 1/2}$ 3.679/3.552
Leu10	8.027	4.111	1.477/1.416	1.494	H $^{\delta 1/2}$ 0.766/0.719, CONH ₂ 7.350/6.898

Tabelle 7.6: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTPL-NH₂ in 600 μL H₂O/D₂O (9:1) + 200 μL Methanol-d₄, 300 K, pH=2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.576/14.370 ppm.

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	54.831	37.762	-	C ^{2/6} 130.511, C ^{3/5} 131.705, C ^{2'/6'} 129.579, C ^{3'/5'} 131.084, C ^{4'} 134.594
Asn1	50.705	37.323	-	-
Met2	54.564	30.595	29.612	C $^{\epsilon}$ 14.370
2Nal3	56.054	37.048	-	C ¹ 128.529, C ³ 128.123, C ⁴ 129.030, C ⁵ 128.147, C ⁶ 127.263, C ⁷ 127.263, C ⁸ 128.147
Gln4	54.525	27.765	32.039	-
Arg5	54.372	28.736	25.266	C $^{\delta}$ 41.442
Cha6	52.615	39.246	34.321	C $^{\delta 1/2}$ 34.067/32.256, C $^{\epsilon 1/2}/C^{\zeta}$ 26.570
Gly7	43.200	-	-	-
Thr8	58.002	68.051	19.399	-
Pro9	61.555	30.047	25.520	C $^{\delta}$ 49.131
Leu10	53.188	40.876	25.666	C $^{\delta 1/2}$ 23.021/21.536

Bpa-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Cha-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse: 1517.87 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1518, berechnet [M]: 1516.79
Theoretische Ausbeute: 15.18 mg
Ausbeute: 15.5 %

Tabelle 7.7: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH=2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.252	3.290/3.162	-	H ^{2/6} 7.309, H ^{3/5} 7.682, H ^{2'/6'} 7.506, H ^{3'/5'} 7.727, H ^{4'} 7.650
Asn1	8.452	4.608	2.485/2.440	-	H $^{\delta 1/2}$ 6.868, 7.439
Met2	8.384	4.056	1.741/1.686	2.147	H $^{\epsilon}$ 1.821
Trp3	7.762	4.555	3.243/3.173	-	H $^{\delta 1}$ 7.178, H $^{\epsilon 1}$ 10.086, H $^{\epsilon 3}$ 7.519, H $^{\zeta 2}$ 7.414, H $^{\zeta 3}$ 7.078, H $^{\eta 2}$ 7.161
Gln4	7.736	4.103	1.895/1.791	2.118/2.009	H $^{\epsilon 1/2}$ 6.740/7.360
Lys5	7.997	4.109	1.724/1.609	1.291	H $^{\delta 1/2}$ 1.586, H $^{\epsilon 1/2}$ 2.885, H $^{\zeta}$ 7.462
Cha6	8.025	4.302	1.569	1.252	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.578/1.552/0.870/0.792, H $^{\epsilon 1/2/3/4}/H^{\zeta 1/2}$ 1.576-1.503/1.147-1.043
Gly7	8.269	3.890	-	-	-
Thr8	7.866	4.562	4.096	1.156	-
Pro9	-	4.331	2.206/1.842	1.968/1.901	H $^{\delta 1/2}$ 3.765/3.635
Cha10	8.116	4.229	1.532	1.252	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.578/1.552/0.870/0.792, H $^{\epsilon 1/2/3/4}/H^{\zeta 1/2}$ 1.576-1.503/1.147-1.043, CONH ₂ 7.451/6.981

Tabelle 7.8: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.821/14.370 ppm.

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	54.382	37.243	-	C ^{2/6} 129.938, C ^{3/5} 131.138, C ^{2'/6'} 129.071, C ^{3'/5'} 130.704, C ^{4'} 134.137
Asn1	50.316	36.963	-	-
Met2	53.984	29.993	29.270	C $^{\epsilon}$ 14.370
Trp3	55.115	26.699	-	C $^{\delta 1}$ 125.004, C $^{\epsilon 3}$ 118.638, C $^{\zeta 2}$ 112.438, C $^{\zeta 3}$ 119.871, C $^{\eta 2}$ 122.538
Gln4	53.954	27.353	31.595	-
Lys5	54.229	30.496	22.483	C $^{\delta}$ 26.656, C $^{\epsilon}$ 39.871
Cha6	52.303	38.885	33.983	C $^{\delta 1/2}$ 33.638/31.972, C $^{\epsilon 1/2}$ /C $^{\zeta}$ 26.254
Gly7	42.988	-	-	-
Thr8	57.439	67.650	19.027	-
Pro9	61.108	29.679	25.122	C $^{\delta}$ 48.804
Cha10	51.997	38.885	33.983	C $^{\delta 1/2}$ 33.638/31.972, C $^{\epsilon 1/2}$ /C $^{\zeta}$ 26.254

Bpa-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Cha-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1477.81 g/mol
 MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1478, berechnet [M]: 1476.76
 Theoretische Ausbeute: 14.78 mg
 Ausbeute: 15.6 %

Tabelle 7.9: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.247	3.297/3.162	-	H ^{2/6} 7.309, H ^{3/5} 7.684, H ^{2'/6'} 7.508, H ^{3'/5'} 7.731, H ^{4'} 7.658
Asn1	8.447	4.603	2.479/2.428	-	H $^{\delta 1/2}$ 6.867, 7.436
Met2	8.379	4.064	1.746/1.681	2.157	H $^{\epsilon}$ 1.822
Trp3	7.769	4.564	3.242/3.169	-	H $^{\delta 1}$ 7.172, H $^{\epsilon 3}$ 7.521, H $^{\zeta 2}$ 7.412, H $^{\zeta 3}$ 7.080, H $^{\eta 2}$ 7.163
Gln4	7.731	4.114	1.890/1.779	2.116/1.999	H $^{\epsilon 1/2}$ 6.740, 7.362
Lys5	8.015	4.120	1.722/1.611	1.295	H $^{\delta 1/2}$ 1.586, H $^{\epsilon 1/2}$ 2.893, H $^{\zeta}$ 7.460
Cha6	8.051	4.328	1.563	1.232	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.578/1.547/0.875/0.799, H $^{\epsilon 1/2/3/4}$ /H $^{\zeta 1/2}$ 1.578/1.050
Gly7	8.267	3.896	-	-	-
Thr8	7.903	4.564	4.103	1.178	-
Pro9	-	4.328	2.212/1.837	1.964/1.901	H $^{\delta 1/2}$ 3.766/3.630
Leu10	8.171	4.199	1.586/1.514	1.592	H $^{\delta 1/2}$ 0.854/0.806, CONH ₂ 7.451/6.981

Tabelle 7.10: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.822/14.370 ppm.

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	54.371	37.439	-	C ^{2/6} 129.885, C ^{3/5} 131.258, C ^{2'/6'} 129.170, C ^{3'/5'} 130.795, C ^{4'} 134.256
Asn1	50.203	37.038	-	-
Met2	54.056	30.220	29.374	C $^{\epsilon}$ 14.370
Trp3	55.022	26.766	-	C $^{\delta 1}$ 125.095, C $^{\epsilon 3}$ 118.676, C $^{\zeta 2}$ 112.589, C $^{\zeta 3}$ 119.912, C $^{\eta 2}$ 122.575
Gln4	54.056	27.225	31.489	-
Lys5	54.056	30.537	22.432	C $^{\delta}$ 26.731, C $^{\epsilon}$ 39.967
Cha6	52.234	39.030	33.956	C $^{\delta 1/2}$ 33.568/31.841, C $^{\epsilon 1/2}$ /C $^{\zeta}$ 26.273
Gly7	42.815	-	-	-
Thr8	57.419	67.542	19.084	-
Pro9	61.132	29.797	25.181	C $^{\delta}$ 48.914
Leu10	52.900	40.229	25.004	C $^{\delta 1/2}$ 22.679/21.198

Bpa-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse: 1463.78 g/mol
 MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1464, berechnet [M]: 1462.74
 Theoretische Ausbeute: 14.64 mg
 Ausbeute: 53.3 %

Tabelle 7.11: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NMWQKVGTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.246	3.291/3.157	-	H ^{2/6} 7.311, H ^{3/5} 7.690, H ^{2'/6'} 7.505, H ^{3'/5'} 7.735, H ^{4'} 7.655
Asn1	8.454	4.582	2.470/2.427	-	H $^{\delta 1/2}$ 6.851, 7.434
Met2	8.348	4.079	1.750/1.670	2.168	H $^{\epsilon}$ 1.837
Trp3	7.796	4.573	3.228/3.151	-	H $^{\delta 1}$ 7.160, H $^{\epsilon 1}$ 10.071, H $^{\epsilon 3}$ 7.506, H $^{\zeta 2}$ 7.412, H $^{\zeta 3}$ 7.077, H $^{\eta 2}$ 7.162
Gln4	7.755	4.131	1.882/1.751	2.112/2.009	H $^{\epsilon 1/2}$ 6.730, 7.349
Lys5	8.080	4.147	1.720/1.604	1.298	H $^{\delta 1/2}$ 1.580, H $^{\epsilon 1/2}$ 2.896
Val6	8.029	4.033	2.003	0.879/0.865	
Gly7	8.435	3.914	-	-	-
Thr8	7.932	4.557	4.096	1.166	-
Pro9	-	4.329	2.207/1.856	1.961/1.907	H $^{\delta 1/2}$ 3.767/3.639
Cha10	8.151	4.250	1.543	1.263	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.599/1.584/0.899/0.806 H $^{\epsilon 1/2/3/4}$ /H $^{\zeta 1/2}$ 1.590/1.531/1.132/1.065 CONH ₂ 7.430/6.978

Tabelle 7.12: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NMWQKVGTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.837/14.370 ppm.

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	54.475	37.367	-	C ^{2/6} 129.869, C ^{3/5} 131.341, C ^{2'/6'} 129.306, C ^{3'/5'} 130.908, C ^{4'} 134.199
Asn1	50.344	36.993	-	-
Met2	53.756	30.196	29.429	C $^{\epsilon}$ 14.370
Trp3	54.894	26.755	-	C $^{\delta 1}$ 125.018, C $^{\epsilon 3}$ 118.695, C $^{\zeta 2}$ 112.545, C $^{\zeta 3}$ 119.864, C $^{\eta 2}$ 122.636
Gln4	53.876	27.463	31.529	-
Lys5	53.876	30.829	22.530	C $^{\delta}$ 26.496, C $^{\epsilon}$ 39.870
Val6	60.222	30.829	18.563	
Gly7	42.897	-	-	-
Thr8	57.438	67.615	19.163	-
Pro9	61.000	29.796	25.096	C $^{\delta}$ 48.837
Cha10	52.110	38.895	34.195	C $^{\delta 1/2}$ 33.595/32.129, C $^{\epsilon 1/2}$ /C $^{\zeta}$ 26.196

Bpa-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1423.71 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1423, berechnet [M]: 1422.71
Theoretische Ausbeute: 14.24 mg
Ausbeute: 74.5 %

Tabelle 7.13: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NMWQKVGTP-L-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.245	3.292/3.147	-	H ^{2/6} 7.318, H ^{3/5} 7.689, H ^{2'/6'} 7.504, H ^{3'/5'} 7.733, H ^{4'} 7.662
Asn1	8.448	4.590	2.450	-	H $^{\delta 1/2}$ 7.433/6.850
Met2	8.347	4.074	1.733/1.667	2.163	H $^{\epsilon}$ 1.832
Trp3	7.798	4.585	3.227/3.149	-	H $^{\delta 1}$ 7.160, H $^{\epsilon 1}$ 10.073, H $^{\epsilon 3}$ 7.523, H $^{\zeta 2}$ 7.412, H $^{\zeta 3}$ 7.080, H $^{\eta 2}$ 7.170
Gln4	7.751	4.137	1.891/1.756	2.120/2.024	H $^{\epsilon 1/2}$ 7.349/6.732
Lys5	8.089	4.149	1.723/1.630	1.311	H $^{\delta 1/2}$ 1.598, H $^{\epsilon 1/2}$ 2.904, H $^{\zeta}$ 7.455
Val6	8.036	4.045	1.995	0.876/0.863	
Gly7	8.425	3.911	-	-	-
Thr8	7.952	4.556	4.085	1.171	-
Pro9	-	4.329	2.226/1.851	1.964/1.909	H $^{\delta 1/2}$ 3.767/3.634
Leu10	8.197	4.196	1.594/1.511	1.603	H $^{\delta 1/2}$ 0.861/0.811 CONH ₂ 7.459/6.986

Tabelle 7.14: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NMWQKVGTP-L-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH=2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.832/14.370 ppm. (n. b. - nicht beobachtet)

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	54.206	37.093	-	C ^{2/6} 129.449, C ^{3/5} 131.185, C ^{2'/6'} 131.303, C ^{3'/5'} 131.185, C ^{4'} 133.869
Asn1	n. b.	36.971	-	-
Met2	53.632	30.379	29.192	C $^{\epsilon}$ 14.370
Trp3	n. b.	26.829	-	C $^{\delta 1}$ 124.689, C $^{\epsilon 3}$ 118.228, C $^{\zeta 2}$ 112.350, C $^{\zeta 3}$ 119.734, C $^{\eta 2}$ 122.503
Gln4	53.632	27.408	31.321	-
Lys5	53.755	30.453	22.535	C $^{\delta}$ 26.890, C $^{\epsilon}$ 39.858
Val6	59.895	30.383	18.470	
Gly7	42.505	-	-	-
Thr8	n. b.	67.661	18.961	-
Pro9	60.727	29.753	24.917	C $^{\delta}$ 48.778
Leu10	52.935	40.019	24.812	C $^{\delta 1/2}$ 22.605/20.993

Bpa-Asn-Met-Trp-Gln-Arg-Cha-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse: 1545.88 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1546, berechnet [M]: 1544.80
Theoretische Ausbeute: 15.46 mg
Ausbeute: 11.6 %

Tabelle 7.15: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NMWQ-R-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH=2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.248	3.286/3.155	-	H ^{2/6} 7.297, H ^{3/5} 7.667, H ^{2'/6'} 7.486, H ^{3'/5'} 7.709, H ^{4'} 7.636
Asn1	8.452	4.609	2.494/2.447	-	H $^{\delta 1/2}$ 6.869, 7.436
Met2	8.414	4.027	1.715	2.135	H $^{\epsilon}$ 1.795
Trp3	7.739	4.526	3.244/3.174	-	H $^{\delta 1}$ 7.179, H $^{\epsilon 1}$ 10.081, H $^{\epsilon 3}$ 7.500, H $^{\zeta 2}$ 7.401, H $^{\zeta 3}$ 7.060, H $^{\eta 2}$ 7.144
Gln4	7.729	4.104	1.906/1.797	2.117/2.005	H $^{\epsilon 1/2}$ 6.869, 7.436
Arg5	7.950	4.122	1.727/1.635	1.476	H $^{\delta 1/2}$ 3.055, H $^{\epsilon}$ 7.089
Cha6	7.994	4.306	1.571	1.234	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.574/1.540/0.872/0.781, H $^{\epsilon 1/2/3/4}$ /H $^{\zeta 1/2}$ 1.543-1.491/1.102-1.015
Gly7	8.222	3.897	-	-	-
Thr8	7.849	4.567	4.104	1.162	-
Pro9	-	4.326	2.205/1.834	1.960/1.892	H $^{\delta 1/2}$ 3.755/3.629
Cha10	8.096	4.229	1.524	1.234	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.574/1.540/0.872/0.781, H $^{\epsilon 1/2/3/4}$ /H $^{\zeta 1/2}$ 1.543-1.491/1.102-1.015 CONH ₂ 7.399/ 6.958

Tabelle 7.16: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NMWQ-R-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH=2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.795/14.370 ppm. (n. b. - nicht beobachtet)

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	54.484	37.321	-	C ^{2/6} 130.038, C ^{3/5} 131.096, C ^{2'/6'} 129.076, C ^{3'/5'} 130.775, C ^{4'} 134.110
Asn1	n. b.	36.949	-	-
Met2	54.224	29.971	29.359	C $^{\epsilon}$ 14.370
Trp3	n. b.	26.838	-	C $^{\delta 1}$ 125.105, C $^{\epsilon 3}$ 118.593, C $^{\zeta 2}$ 112.534, C $^{\zeta 3}$ 119.940, C $^{\eta 2}$ 122.537
Gln4	54.113	27.170	31.668	-
Arg5	53.890	28.176	24.839	C $^{\delta}$ 41.063
Cha6	52.329	38.866	34.099	C $^{\delta 1/2}$ 33.613/31.944, C $^{\epsilon 1/2}/\text{C}^{\zeta}$ 26.297
Gly7	43.004	-	-	-
Thr8	n. b.	67.637	19.132	-
Pro9	61.162	29.787	25.107	C $^{\delta}$ 48.837
Cha10	52.069	38.866	34.099	C $^{\delta 1/2}$ 33.613/31.944, C $^{\epsilon 1/2}/\text{C}^{\zeta}$ 26.297

Bpa-Asn-Met-Trp-Gln-Arg-Cha-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1505.82 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1506, berechnet [M]: 1504.76
Theoretische Ausbeute: 15.06 mg
Ausbeute: 14.7 %

Tabelle 7.17: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NMWQ-R-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH=2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.244	3.296/3.149	-	H ^{2/6} 7.297, H ^{3/5} 7.670, H ^{2'/6'} 7.490, H ^{3'/5'} 7.709, H ^{4'} 7.638
Asn1	8.443	4.595	2.479/2.428	-	H $^{\delta 1/2}$ 6.872, 7.434
Met2	8.404	4.037	1.738/1.695	2.153	H $^{\epsilon}$ 1.815
Trp3	7.755	4.537	3.231/3.178	-	H $^{\delta 1}$ 7.169, H $^{\epsilon 1}$ 10.081, H $^{\epsilon 3}$ 7.512, H $^{\zeta 2}$ 7.395, H $^{\zeta 3}$ 7.063, H $^{\eta 2}$ 7.148
Gln4	7.719	4.106	1.896/1.779	2.110/1.996	H $^{\epsilon 1/2}$ 6.739, 7.353
Arg5	7.985	4.112	1.722/1.634	1.474	H $^{\delta 1/2}$ 3.062, H $^{\epsilon}$ 7.081
Cha6	8.041	4.318	1.561	1.227	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.556/1.528/0.873/0.785, H $^{\epsilon 1/2/3/4}/\text{H}^{\zeta 1/2}$ 1.563-1.492/1.054/1.019
Gly7	8.241	3.886	-	-	-
Thr8	7.895	4.548	4.086	1.164	-
Pro9	-	4.329	2.211/1.835	1.961/1.891	H $^{\delta 1/2}$ 3.759/3.626
Leu10	8.166	4.192	1.563/1.507	1.583	H $^{\delta 1/2}$ 0.845/0.803, CONH ₂ 7.433/6.974

Tabelle 7.18: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NMWQ-R-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.815/14.370 ppm.

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	54.390	37.263	-	C ^{2/6} 129.938, C ^{3/5} 131.288, C ^{2'/6'} 129.083, C ^{3'/5'} 130.761, C ^{4'} 134.085
Asn1	50.267	36.948	-	-
Met2	54.135	29.974	29.303	C $^{\epsilon}$ 14.370
Trp3	55.208	26.719	-	C $^{\delta 1}$ 125.002, C $^{\epsilon 3}$ 118.638, C $^{\zeta 2}$ 112.497, C $^{\zeta 3}$ 119.869, C $^{\eta 2}$ 122.534
Gln4	54.107	27.290	31.584	-
Arg5	53.825	28.230	24.775	C $^{\delta}$ 41.152
Cha6	52.215	38.830	33.993	C $^{\delta 1/2}$ 33.664/31.886, C $^{\epsilon 1/2}/C^{\zeta}$ 26.250
Gly7	42.973	-	-	-
Thr8	57.552	67.604	19.072	-
Pro9	61.082	29.739	25.144	C $^{\delta}$ 48.824
Leu10	52.808	40.238	24.875	C $^{\delta 1/2}$ 22.661/21.085, C $^{\epsilon 1/2}/C^{\zeta}$ 26.250

Bpa-Asn-Met-Trp-Gln-Arg-Val-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse: 1491.79 g/mol
 MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1492, berechnet [M]: 1490.75
 Theoretische Ausbeute: 14.92 mg
 Ausbeute: 34.2 %

Tabelle 7.19: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NMWQ-R-VGTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.247	3.296/3.156	-	H ^{2/6} 7.307, H ^{3/5} 7.686, H ^{2'/6'} 7.502, H ^{3'/5'} 7.732, H ^{4'} 7.655
Asn1	8.447	4.957	2.468/2.432	-	H $^{\delta 1/2}$ 6.860, 7.432
Met2	8.372	4.073	1.722/1.659	2.171	H $^{\epsilon}$ 1.839
Trp3	7.793	4.582	3.224/3.156	-	H $^{\delta 1}$ 7.171, H $^{\epsilon 1}$ 10.075, H $^{\epsilon 3}$ 7.520, H $^{\zeta 2}$ 7.412, H $^{\zeta 3}$ 7.077, H $^{\eta 2}$ 7.158
Gln4	7.757	4.147	1.887/1.750	2.116/2.000	H $^{\epsilon 1/2}$ 6.736, 7.346
Arg5	8.058	4.160	1.720/1.618	1.476	H $^{\delta 1/2}$ 3.072
Val6	8.049	4.042	2.000	0.880/0.867	-
Gly7	8.441	3.915	-	-	-
Thr8	7.938	4.562	4.102	1.167	-
Pro9	-	4.332	2.207/1.853	1.967/1.907	H $^{\delta 1/2}$ 3.764/3.638
Cha10	8.155	4.236	1.527	1.254	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.587/1.571/0.850/0.765 H $^{\epsilon 1/2/3/4}/H^{\zeta 1/2}$ 1.585/1.524/1.094/1.038 CONH ₂ 7.432/6.979

Tabelle 7.20: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NMWQ-R-VGTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.839/14.370 ppm. (n. b. - nicht beobachtet)

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	54.421	37.269	-	C ^{2/6} 129.904, C ^{3/5} 131.330, C ^{2'/6'} 129.062, C ^{3'/5'} 130.674s, C ^{4'} 134.159
Asn1	n. b.	36.874	-	-
Met2	53.688	29.999	29.425	C $^{\epsilon}$ 14.370
Trp3	54.988	26.829	-	C $^{\delta 1}$ 125.000, C $^{\epsilon 3}$ 118.631, C $^{\zeta 2}$ 112.474, C $^{\zeta 3}$ 119.947, C $^{\eta 2}$ 122.537
Gln4	53.588	27.359	31.425	-
Arg5	53.555	28.295	24.746	C $^{\delta}$ 41.108
Val6	60.254	30.651	18.679	-
Gly7	42.830	-	-	-
Thr8	57.254	67.753	19.034	-
Pro9	60.945	29.554	25.068	C $^{\delta}$ 48.786
Cha10	52.021	38.879	33.878	C $^{\delta 1/2}$ 33.572/31.974, C $^{\epsilon 1/2}$ /C $^{\zeta}$ 26.198

Bpa-Asn-Met-Trp-Gln-Arg-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1451.73 g/mol
 MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1451, berechnet [M]: 1450.72
 Theoretische Ausbeute: 14.52 mg
 Ausbeute: 49.6 %

Tabelle 7.21: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Bpa-NMWQ-R-VGTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Bpa ⁻¹	-	4.247	3.294/3.156	-	H ^{2/6} 7.307, H ^{3/5} 7.687, H ^{2'/6'} 7.502, H ^{3'/5'} 7.730, H ^{4'} 7.654
Asn1	8.446	4.592	2.472/2.421	-	H $^{\delta 1/2}$ 6.859, 7.433
Met2	8.367	4.062	1.750/1.684	2.166	H $^{\epsilon}$ 1.835
Trp3	7.791	4.575	3.228/3.152	-	H $^{\delta 1}$ 7.164, H $^{\epsilon 1}$ 10.073, H $^{\epsilon 3}$ 7.519, H $^{\zeta 2}$ 7.410, H $^{\zeta 3}$ 7.076, H $^{\eta 2}$ 7.157
Gln4	7.753	4.143	1.886/1.745	2.105/2.002	H $^{\epsilon 1/2}$ 6.735, 7.347
Arg5	8.065	4.154	1.718/1.616	1.478	H $^{\delta 1/2}$ 3.071, H $^{\epsilon}$ 7.075
Val6	8.058	4.051	1.999	0.871	-
Gly7	8.427	3.912	-	-	-
Thr8	7.959	4.552	4.085	1.169	-
Pro9	-	4.330	2.213/1.833	1.967/1.903	H $^{\delta 1/2}$ 3.768/3.641
Leu10	8.200	4.195	1.579	1.506	H $^{\delta 1/2}$ 0.861/0.812, CONH ₂ 6.988, 7460

Tabelle 7.22: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Bpa-NMWQ-R-VGTPL- NH_2 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.835/14.370 ppm.

	C^α	C^β	C^γ	Sonstige
Bpa $^{-1}$	54.427	37.278	-	$\text{C}^{2/6}$ 129.969, $\text{C}^{3/5}$ 131.399, $\text{C}^{2' / 6'}$ 129.233, $\text{C}^{3' / 5'}$ 130.879, $\text{C}^{4'}$ 134.257
Asn1	50.239	36.970	-	-
Met2	53.880	30.057	29.383	C^ϵ 14.370
Trp3	54.893	26.838	-	$\text{C}^{\delta 1}$ 125.119, $\text{C}^{\epsilon 3}$ 118.666, $\text{C}^{\zeta 2}$ 112.516, $\text{C}^{\zeta 3}$ 119.922, $\text{C}^{\eta 2}$ 122.564
Gln4	53.688	27.398	31.439	-
Arg5	53.688	28.497	24.845	C^δ 26.890
Val6	60.178	30.659	18.783	-
Gly7	42.768	-	-	-
Thr8	57.549	67.600	19.066	-
Pro9	61.082	29.702	25.164	C^δ 48.867
Leu10	52.839	40.196	24.845	$\text{C}^{\delta 1/2}$ 22.647/21.122

Hfa-Asn-Met-2Nal-Gln-Arg-Cha-Gly-Thr-Pro-Cha

molare Masse: 1466.83 g/mol
 MALDI-TOF (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1467, berechnet $[\text{M}]$: 1465.79
 Theoretische Ausbeute: 14.67 mg
 Ausbeute: 59.3 %

Tabelle 7.23: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Hfa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTP-Cha- NH_2 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H^α	H^β	H^γ	Sonstige
Hfa $^{-1}$	-	4.026	2.078	2.594	$\text{H}^{2/6}$ 7.171, $\text{H}^{3/5}$ 7.296, H^4 7.222
Asn1	8.746	4.645	2.626/2.579	-	$\text{H}^{\delta 1/2}$ 6.930/7.458
Met2	8.481	4.238	1.779	2.243	H^ϵ 1.776
2Nal3	8.129	4.602	3.282/3.173	-	H^1 7.656, H^3 7.342, H^4 7.827, H^5 7.853, H^6 7.473, H^7 7.485, H^8 7.812
Gln4	8.022	4.142	1.899	2.184	$\text{H}^{\epsilon 1/2}$ 7.412/6.755
Arg5	7.994	3.933	1.683/1.570	1.438/1.369	$\text{H}^{\delta 1/2}$ 3.018, H^ϵ 7.091
Cha6	7.973	4.303	1.586	1.257	$\text{H}^{\delta 1/2/3/4}$ 1.587/1.565/0.880/0.794, $\text{H}^{\epsilon 1/2/3/4}/\text{H}^{\zeta 1/2}$ 1.522/1.125/1.059
Gly7	8.233	3.885	-	-	-
Thr8	7.871	4.554	4.099	1.174	-
Pro9	-	4.353	2.217/1.835	1.969/1.909	$\text{H}^{\delta 1/2}$ 3.773/3.645
Cha10	8.145	4.228	1.532	1.257	$\text{H}^{\delta 1/2/3/4}$ 1.587/1.565/0.880/0.794, $\text{H}^{\epsilon 1/2/3/4}/\text{H}^{\zeta 1/2}$ 1.522/1.125/1.059 CONH $_2$ 7.421/6.974

Tabelle 7.24: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Hfa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH=2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.776/14.370 ppm.

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Hfa ⁻¹	53.444	33.442	30.631	C ^{2/6} 129.233, C ^{3/5} 128.910, C ⁴ 129.366
Asn1	50.779	36.689	-	-
Met2	54.218	30.155	29.551	C $^{\epsilon}$ 14.370
2Nal3	55.995	36.946	-	C ¹ 128.144, C ³ 127.748, C ⁴ 128.124, C ⁵ 128.337, C ^{6/7} 126.990, C ⁸ 128.136
Gln4	54.132	27.371	31.899	-
Arg5	54.275	28.344	24.822	C $^{\delta}$ 41.209
Cha6	52.326	38.910	34.113	C $^{\delta 1/2}$ 33.811/32.033, C $^{\epsilon 1/2}$ /C $^{\zeta}$ 26.398
Gly7	43.037	-	-	-
Thr8	57.542	67.745	19.119	-
Pro9	61.153	29.752	25.358	C $^{\delta}$ 48.839
Cha10	52.097	38.910	34.113	C $^{\delta 1/2}$ 33.811/32.033, C $^{\epsilon 1/2}$ /C $^{\zeta}$ 26.398

Hfa-Asn-Met-2Nal-Gln-Arg-Cha-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1426.76 g/mol
 MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1427, berechnet [M]: 1425.76
 Theoretische Ausbeute: 14.27 mg
 Ausbeute: 11.2 %

Tabelle 7.25: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Hfa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH=2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Hfa ⁻¹	-	4.021	2.079	2.662/2.575	H ^{2/6} 7.169, H ^{3/5} 7.293, H ⁴ 7.221
Asn1	8.744	4.646	2.623/2.570	-	H $^{\delta 1/2}$ 7.448/6.925
Met2	8.474	4.246	1.783	2.246	H $^{\epsilon}$ 1.778
2Nal3	8.134	4.613	3.276/3.169	-	H ¹ 7.652, H ³ 7.340, H ⁴ 7.825, H ⁵ 7.852, H ⁶ 7.469, H ⁷ 7.499, H ⁸ 7.808
Gln4	8.017	4.149	1.931/1.876	2.180	H $^{\epsilon 1/2}$ 7.409/6.754
Arg5	8.000	3.943	1.675/1.571	1.440/1.361	H $^{\delta 1/2}$ 3.027, H $^{\epsilon}$ 7.062
Cha6	7.987	4.317	1.573	1.239	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.574/1.564/0.894/0.803, H $^{\epsilon 1/2/3/4}$ /H $^{\zeta 1/2}$ 1.598-1.518/1.099-1.029
Gly7	8.228	3.891	-	-	-
Thr8	7.896	4.549	4.091	1.176	-
Pro9	-	4.341	2.220/1.834	1.965/1.897	H $^{\delta 1/2}$ 3.773/3.632
Leu10	8.187	4.201	1.574/1.506	1.578	H $^{\delta 1/2}$ 0.851/0.804, CONH ₂ 7.448/6.977

Tabelle 7.26: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Hfa-NM-2Nal-Q-R-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.778/14.370 ppm. (n. b. - nicht beobachtet)

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Hfa ⁻¹	53.467	33.490	30.596	C ^{2/6} 129.310, C ^{3/5} 128.806, C ⁴ 129.366
Asn1	50.637	36.649	-	-
Met2	54.102	30.214	29.516	C ^{ϵ} 14.370
2Nal3	n. b.	37.046	-	C ¹ 128.142, C ³ 127.815, C ⁴ 128.133, C ⁵ 128.413, C ⁶ 126.872, C ⁷ 126.872, C ⁸ 128.133
Gln4	54.073	27.378	31.744	-
Arg5	54.159	28.368	24.858	C ^{δ} 41.235
Cha6	52.341	38.978	34.014	C ^{$\delta^{1/2}$} 33.712/31.934, C ^{$\epsilon^{1/2}$} /C ^{ζ} 26.299
Gly7	43.038	-	-	-
Thr8	57.595	67.585	19.087	-
Pro9	61.147	29.853	25.150	C ^{δ} 48.913
Leu10	52.860	40.353	24.745	C ^{$\delta^{1/2}$} 22.643/21.167

Hfa-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Cha-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse: 1427.79 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1428, berechnet [M]: 1426.78
Theoretische Ausbeute: 14.28 mg
Ausbeute: 20.3 %

Tabelle 7.27: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Hfa ⁻¹	-	4.027	2.073	2.629/2.562	H ^{2/6} 7.164, H ^{3/5} 7.295, H ⁴ 7.224
Asn1	8.751	4.652	2.628/2.539	-	H ^{$\delta^{1/2}$} 6.930/7.479
Met2	8.501	4.208	1.821	2.276	H ^{ϵ} 1.853
Trp3	7.841	4.510	3.266/3.221	-	H ^{δ^1} 7.197, H ^{ϵ^1} 10.071, H ^{ϵ^3} 7.534, H ^{ζ^2} 7.428, H ^{ζ^3} 7.095, H ^{η^2} 7.175
Gln4	7.817	4.065	1.836	2.104/2.000	H ^{$\epsilon^{1/2}$} 7.397/6.737
Lys5	7.898	4.009	1.711	1.219	H ^{$\delta^{1/2}$} 1.562, H ^{$\epsilon^{1/2}$} 2.837, H ^{ζ} 7.440
Cha6	7.946	4.297	1.586	1.257	H ^{$\delta^{1/2/3/4}$} 1.587/1.565/0.884/0.804, H ^{$\epsilon^{1/2/3/4}$} /H ^{$\zeta^{1/2}$} 1.587/1.127/1.062
Gly7	8.211	3.896	-	-	-
Thr8	7.872	4.563	4.114	1.172	-
Pro9	-	4.341	2.216/1.849	1.967/1.923	H ^{$\delta^{1/2}$} 3.776 /3.644
Cha10	8.131	4.228	1.535	1.283	H ^{$\delta^{1/2/3/4}$} 1.583/1.556/0.885/0.812, H ^{$\epsilon^{1/2/3/4}$} /H ^{$\zeta^{1/2}$} 1.583-1.516/1.075/1.038, CONH ₂ 7.447, 7.416

Tabelle 7.28: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ in D₂O/PBS, 280 K, pH = 7, kalibriert auf das Methylsignal von DSS bei 0 ppm.

	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	3.959	2.060	2.649	H ^{2/6} 7.221, H ^{3/5} 7.345, H ⁴ 7.274
Asn1	4.705	2.724/2.603	-	-
Met2	4.246	1.891	2.313	H ^ε 1.907
Trp3	4.561	3.323	-	H ^{δ1} 7.270, H ^{ε3} 7.595, H ^{ζ2} 7.490, H ^{ζ3} 7.157, H ^{η2} 7.234
Gln4	4.084	1.884	2.141/2.043	-
Lys5	4.005	1.760/1.655	1.294/1.197	H ^{δ1/2} 1.589, H ^{ε1/2} 2.876
Cha6	4.339	1.698	1.360	H ^{δ1/2/3/4} , 1.655/1.639/0.951/0.864, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.655/1.589/1.219/1.141
Gly7	3.951	-	-	-
Thr8	4.639	4.181	1.237	-
Pro9	4.408	2.292/1.898	2.044/1.974	H ^{δ1/2} 3.848/3.710
Cha10	4.273	1.595	1.338	H ^{δ1/2/3/4} , 1.655/1.639/0.951/0.864, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.655/1.589/1.219/1.141

Tabelle 7.29: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.853/14.370 ppm. (n. b. - nicht beobachtet)

	C ^α	C ^β	C ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	53.427	33.328	30.621	C ^{2/6} 129.033, C ^{3/5} 129.148, C ⁴ 127.069
Asn1	n. b.	36.565	-	-
Met2	54.330	30.037	29.346	C ^ε 14.370
Trp3	55.626	26.581	-	C ^{δ1} 124.991, C ^{ε3} 118.581, C ^{ζ2} 112.489, C ^{ζ3} 119.938, C ^{η2} 122.392
Gln4	54.330	27.240	31.664	-
Lys5	54.566	30.531	22.535	C ^δ 26.582, C ^ε 39.844
Cha6	52.366	38.889	33.986	C ^{δ1/2} 33.591/31.946, C ^{ε1/2} /C ^ζ 26.220
Gly7	43.014	-	-	-
Thr8	57.550	67.644	19.047	-
Pro9	61.007	29.708	25.200	C ^δ 48.764
Cha10	52.013	38.889	33.986	C ^{δ1/2} 33.591/31.946, C ^{ε1/2} /C ^ζ 26.220

Hfa-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Cha-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1387.72 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1388, berechnet [M]: 1386.75
Theoretische Ausbeute:	13.88 mg
Ausbeute:	97.3 %

Tabelle 7.30: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Hfa-NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	-	4.023	2.076	2.594	H ^{2/6} 7.168, H ^{3/5} 7.295, H ⁴ 7.224
Asn1	8.752	4.666	2.619/2.536	-	H ^{δ1/2} 7.474/6.931
Met2	8.497	4.226	1.822	2.281	H ^ε 1.858
Trp3	7.855	4.528	3.267/3.219	-	H ^{δ1} 7.198, H ^{ε1} 10.101, H ^{ε3} 7.537, H ^{ζ2} 7.430, H ^{ζ3} 7.093, H ^{η2} 7.174
Gln4	7.815	4.062	1.852/1.807	2.105/1.999	H ^{ε1/2} 7.394/6.755
Lys5	7.916	4.024	1.703	1.233	H ^{δ1/2} 1.545/1.568, H ^{ε1/2} 2.840, H ^ζ 7.444
Cha6	7.974	4.308	1.587	1.257	H ^{δ1/2/3/4} 1.583/1.556/0.885/0.812, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.583-1.516/1.075/1.038
Gly7	8.217	3.894	-	-	-
Thr8	7.899	4.558	4.104	1.178	-
Pro9	-	4.342	2.224/1.840	1.973/1.879	H ^{δ1/2} 3.783/3.645
Leu10	8.178	4.193	1.576/1.510	1.539	H ^{δ1/2} 0.856/0.807, CONH ₂ 7.447, 6.981

Tabelle 7.31: ¹³C-NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Hfa-NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.858/14.370 ppm.

	C ^α	C ^β	C ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	53.384	33.336	30.629	C ^{2/6} 129.205, C ^{3/5} 128.766, C ⁴ 127.135
Asn1	50.595	36.583	-	-
Met2	54.326	29.914	29.378	C ^ε 14.370
Trp3	55.622	26.608	-	C ^{δ1} 125.047, C ^{ε3} 118.576, C ^{ζ2} 112.521, C ^{ζ3} 119.960, C ^{η2} 122.556
Gln4	54.248	27.298	31.659	-
Lys5	54.444	30.518	22.535	C ^δ 41.172, C ^ε 39.794
Cha6	52.362	38.937	33.906	C ^{δ1/2} 33.638/31.826, C ^{ε1/2} /C ^ζ 26.325
Gly7	42.976	-	-	-
Thr8	57.547	67.640	18.980	-
Pro9	61.160	29.680	25.185	C ^δ 48.906
Leu10	52.873	40.178	24.849	C ^{δ1/2} 22.669/21.093

Hfa-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse: 1373.70 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1373, berechnet [M]: 1372.73
Theoretische Ausbeute: 13.74 mg
Ausbeute: 9.5 %

Tabelle 7.32: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Hfa-NMWQKVGTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	-	4.009	2.089	2.627/2.561	H ^{2/6} 7.179, H ^{3/5} 7.294, H ⁴ 7.220
Asn1	8.749	4.639	2.564/2.506	-	H ^{δ1/2} 7.461, 6.894
Met2	8.472	4.280	1.844/1.787	2.317	H ^ε 1.882
Trp3	7.922	4.579	3.251/3.204	-	H ^{δ1} 7.195, H ^{ε1} 10.085, H ^{ε3} 7.540, H ^{ζ2} 7.426, H ^{ζ3} 7.091, H ^{η2} 7.173
Gln4	7.800	4.124	1.867/1.753	2.091/1.974	H ^{ε1/2} 7.363/6.738
Lys5	8.019	4.118	1.713/1.614	1.274	H ^{δ1/2} 1.571, H ^{ε1/2} 2.885, H ^ζ 7.445
Val6	7.999	4.053	2.024	0.898/0.883	
Gly7	8.421	3.921	-	-	-
Thr8	7.939	4.585	4.106	1.180	-
Pro9	-	4.340	2.218/1.840	1.967/1.912	H ^{δ1/2} 3.779/3.650
Cha10	8.163	4.244	1.548	1.278	H ^{δ1/2/3/4} 1.613/1.591/0.893/0.811, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.544/1.146/1.083, CONH ₂ 6.981/7.437

Tabelle 7.33: ¹³C-NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Hfa-NMWQKVGTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.882/14.370 ppm.

	C ^α	C ^β	C ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	53.388	33.238	30.556	C ^{2/6} 128.949, C ^{3/5} 128.914, C ⁴ 127.208
Asn1	50.771	36.619	-	-
Met2	53.900	30.096	29.423	C ^ε 14.370
Trp3	55.152	26.788	-	C ^{δ1} 125.154, C ^{ε3} 118.664, C ^{ζ2} 112.551, C ^{ζ3} 119.932, C ^{η2} 122.578
Gln4	53.929	27.532	31.539	-
Lys5	53.929	30.770	22.339	C ^δ 26.718, C ^ε 39.920
Val6	60.329	30.641	18.332	-
Gly7	42.826	-	-	-
Thr8	57.598	67.697	19.293	-
Pro9	61.097	29.712	25.096	C ^δ 48.781
Cha10	52.108	38.912	34.135	C ^{δ1/2} 33.655/32.020, C ^{ε1/2} /C ^ζ 26.282

Hfa-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1333.63 g/mol
 MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1334, berechnet [M]: 1332.70
 Theoretische Ausbeute: 13.34 mg
 Ausbeute: 39.7 %

Tabelle 7.34: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	-	3.977	2.059	2.594/2.533	H ^{2/6} 7.159, H ^{3/5} 7.269, H ⁴ 7.196
Asn1	8.734	4.594	2.534/2.479	-	H ^{δ1/2} 7.445/6.877
Met2	8.466	4.257	1.843/1.764	2.285	H ^ε 1.857
Trp3	7.907	4.545	3.220/3.181	-	H ^{δ1} 7.162, H ^{ε1} 10.070, H ^{ε3} 7.516, H ^{ζ2} 7.400, H ^{ζ3} 7.068, H ^{η2} 7.147
Gln4	7.777	4.091	1.842/1.726	2.057/1.948	H ^{ε1/2} 7.350/6.721
Lys5	8.015	4.091	1.691/1.589	1.289/1.218	H ^{δ1/2} 1.547, H ^{ε1/2} 2.852, H ^ζ 7.424
Val6	7.999	4.024	1.999	0.869/0.855	
Gly7	8.400	3.895	-	-	-
Thr8	7.946	4.533	4.067	1.153	-
Pro9	-	4.310	2.200/1.820	1.954/1.884	H ^{δ1/2} 3.759/3.619
Leu10	8.200	4.177	1.570/1.493	1.576	H ^{δ1/2} 0.842/0.792 CONH ₂ 7.449/6.964

Tabelle 7.35: ¹³C-NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.857/14.370 ppm.

	C ^α	C ^β	C ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	53.620	33.716	30.785	C ^{2/6} 129.232, C ^{3/5} 129.697, C ⁴ 127.462
Asn1	51.066	36.668	-	-
Met2	54.175	30.139	29.645	C ^ε 1.857
Trp3	55.445	27.231	-	C ^{δ1} 125.382, C ^{ε3} 118.956, C ^{ζ2} 112.810, C ^{ζ3} 120.229, C ^{η2} 122.806
Gln4	54.175	27.866	31.944	-
Lys5	54.175	30.824	22.666	C ^δ 27.244, C ^ε 40.183
Val6	60.527	30.908	18.776	
Gly7	43.202	-	-	-
Thr8	57.886	67.782	19.487	-
Pro9	61.363	30.189	25.475	C ^δ 49.047
Leu10	53.066	40.698	24.957	C ^{δ1/2} 22.003/21.582

Hfa-Asn-Met-Trp-Gln-Arg-Cha-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse: 1455.80 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1456, berechnet [M]: 1454.79
Theoretische Ausbeute: 14.56 mg
Ausbeute: 68.7 %

Tabelle 7.36: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Hfa-NMWQ-R-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH=2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	-	4.042	2.073	2.622/2.583	H ^{2/6} 7.155, H ^{3/5} 7.292, H ⁴ 7.228
Asn1	8.765	4.676	2.649/2.552	-	H ^{δ1/2} 7.482/6.952
Met2	8.530	4.196	1.831	2.278	H ^ε 1.856
Trp3	7.820	4.507	3.274/3.232	-	H ^{δ1} 7.212, H ^{ε1} 10.115, H ^{ε3} 7.537, H ^{ζ2} 7.432, H ^{ζ3} 7.099, H ^{η2} 7.178
Gln4	7.823	4.065	1.868/1.830	2.105/2.008	H ^{ε1/2} 7.406/6.766
Arg5	7.865	3.986	1.703/1.605	1.444/1.351	H ^{δ1/2} 3.025, H ^ε 7.061
Cha6	7.929	4.310	1.600	1.274	H ^{δ1/2/3/4} 1.591/1.566/0.890/0.806, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.591/1.523/1.154/1.074
Gly7	8.183	3.905	-	-	-
Thr8	7.863	4.579	4.111	1.177	-
Pro9	-	4.348	2.222/1.848	1.984/1.921	H ^{δ1/2} 3.784/3.651
Cha10	8.138	4.229	1.538	1.274	H ^{δ1/2/3/4} 1.591/1.566/0.890/0.806, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.591/1.523/1.154/1.074 CONH ₂ 7.417/6.973

Tabelle 7.37: ¹³C-NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Hfa-NMWQ-R-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH=2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.856/14.370 ppm. (n. b. - nicht beobachtet)

	C ^α	C ^β	C ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	53.388	33.410	30.760	C ^{2/6} 128.786, C ^{3/5} 129.356, C ⁴ 127.228
Asn1	n. b.	36.688	-	-
Met2	54.521	29.921	29.418	C ^ε 14.370
Trp3	56.055	26.503	-	C ^{δ1} 125.062, C ^{ε3} 118.639, C ^{ζ2} 112.597, C ^{ζ3} 120.007, C ^{η2} 122.667
Gln4	54.288	27.238	31.699	-
Arg5	54.288	28.278	24.923	C ^δ 41.172
Cha6	52.488	38.911	34.047	C ^{δ1/2} 33.712/31.968, C ^{ε1/2} /C ^ζ 26.332
Gly7	42.997	-	-	-
Thr8	57.155	67.721	19.019	-
Pro9	61.021	29.687	25.192	C ^δ 48.849
Cha10	52.121	38.911	34.047	C ^{δ1/2} 33.712/31.968, C ^{ε1/2} /C ^ζ 26.332

Hfa-Asn-Met-Trp-Gln-Arg-Cha-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1415.74 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1416, berechnet [M]: 1414.75
Theoretische Ausbeute: 14.16 mg
Ausbeute: 10.3 %

Tabelle 7.38: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Hfa-NMWQ-R-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	-	4.041	2.073	2.613/2.578	H ^{2/6} 7.158, H ^{3/5} 7.294, H ⁴ 7.225
Asn1	8.764	4.677	2.639/2.546	-	H ^{δ1/2} 7.480/6.952
Met2	8.524	4.207	1.834	2.283	H ^ε 1.860
Trp3	7.831	4.518	3.271/3.230	-	H ^{δ1} 7.214, H ^{ε1} 10.112, H ^{ε3} 7.538, H ^{ζ2} 7.432, H ^{ζ3} 7.099, H ^{η2} 7.178
Gln4	7.821	4.073	1.868/1.825	2.112/2.006	H ^{ε1/2} 7.404/6.765
Arg5	7.879	4.004	1.707/1.610	1.453/1.363	H ^{δ1/2} 3.032, H ^ε 7.061
Cha6	7.952	4.315	1.614/1.583	1.279	H ^{δ1/2/3/4} 1.595/1.562/0.911/0.812, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.595/1.527/1.079
Gly7	8.185	3.902	-	-	-
Thr8	7.894	4.569	4.112	1.185	-
Pro9	-	4.347	2.228/1.850	1.982/1.916	H ^{δ1/2} 3.785/3.647
Leu10	8.178	4.207	1.583/1.518	1.605	H ^{δ1/2} 0.858/0.811, CONH ₂ 7.447/6.980

Tabelle 7.39: ¹³C-NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Hfa-NMWQ-R-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.860/14.370 ppm. (n. b. - nicht beobachtet)

	C ^α	C ^β	C ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	53.332	33.355	30.691	C ^{2/6} 128.768, C ^{3/5} 129.249, C ⁴ 127.069
Asn1	n. b.	36.528	-	-
Met2	54.477	29.916	29.331	C ^ε 14.370
Trp3	55.683	26.554	-	C ^{δ1} 125.081, C ^{ε3} 118.605, C ^{ζ2} 112.514, C ^{ζ3} 119.984, C ^{η2} 122.580
Gln4	54.296	27.165	31.739	-
Arg5	54.327	28.300	24.860	C ^δ 41.001
Cha6	52.277	38.858	33.906	C ^{δ1/2} 33.562/31.842, C ^{ε1/2} /C ^ζ 26.201
Gly7	42.956	-	-	-
Thr8	57.432	67.531	19.048	-
Pro9	61.170	29.641	25.170	C ^δ 48.866
Leu10	52.819	40.268	24.860	C ^{δ1/2} 22.590/21.111

Hfa-Asn-Met-Trp-Gln-Arg-Val-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse: 1401.71 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1402, berechnet [M]: 1400.74
Theoretische Ausbeute: 14.02 mg
Ausbeute: 21.4 %

Tabelle 7.40: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen in ppm. Hfa-NMWQ-R-VGTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	-	4.012	2.078	2.620/2.557	H ^{2/6} 7.168, H ^{3/5} 7.291, H ⁴ 7.217
Asn1	8.756	4.658	2.566/2.500	-	H ^{δ1/2} 7.456/6.905
Met2	8.501	4.265	1.849/1.800	2.316	H ^ε 1.879
Trp3	7.899	4.564	3.250/3.208	-	H ^{δ1} 7.193, H ^{ε1} 10.092, H ^{ε3} 7.534, H ^{ζ2} 7.423, H ^{ζ3} 7.0897.093, H ^{η2} 7.169
Gln4	7.797	4.122	1.874/1.760	2.082/1.956	H ^{ε1/2} 7.363/6.743
Arg5	7.968	4.110	1.716/1.611	1.481/1.400	H ^{δ1/2} 3.051, H ^ε 7.056
Val6	7.999	4.054	2.030	0.897/0.881	
Gly7	8.409	3.929	-	-	-
Thr8	7.939	4.571	4.110	1.177	-
Pro9	-	4.340	2.216/1.840	1.972/1.915	H ^{δ1/2} 3.773/3.646
Cha10	8.163	4.247	1.544	1.267	H ^{δ1/2/3/4} 1.603/1.584/0.893/0.813, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.599/1.146/1.079 CONH ₂ 7.434, 6.980

Tabelle 7.41: ¹³C-NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. Hfa-NMWQ-R-VGTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.879/14.370 ppm.

	C ^α	C ^β	C ^γ	Sonstige
Hfa ⁻¹	53.386	33.330	30.667	C ^{2/6} 129.361, C ^{3/5} 128.903, C ⁴ 127.268
Asn1	50.744	36.655	-	-
Met2	54.109	30.050	29.509	C ^ε 14.370
Trp3	55.360	26.837	-	C ^{δ1} 125.208, C ^{ε3} 118.670, C ^{ζ2} 112.589, C ^{ζ3} 120.043, C ^{η2} 122.626
Gln4	53.803	27.407	31.642	-
Arg5	54.053	28.617	24.828	C ^δ 41.216
Val6	60.394	30.655	18.522	
Gly7	42.922	-	-	-
Thr8	57.613	67.736	19.128	-
Pro9	61.173	29.827	25.210	C ^δ 48.945
Cha10	52.162	38.966	34.222	C ^{δ1/2} 33.680/32.056, C ^{ε1/2} /C ^ζ 26.292

Asn-Met-2Nal-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1183.45 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1183, berechnet [M]: 1182.62
Theoretische Ausbeute: 11.83 mg
Ausbeute: 49.9 %
Kommentar: Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Bpa-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1237.50 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1238, berechnet [M]: 1236.63
Theoretische Ausbeute: 12.38 mg
Ausbeute: 28.3 %
Kommentar: Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Hfa-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1147.42 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1148, berechnet [M]: 1146.62
Theoretische Ausbeute: 11.47 mg
Ausbeute: 8.7 %
Kommentar: Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Omy-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1163.41 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1164, berechnet [M]: 1162.62
Theoretische Ausbeute: 11.63 mg
Ausbeute: 12.0 %
Kommentar: Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Paf-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1148.40 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1149, berechnet [M]: 1147.62
Theoretische Ausbeute: 11.48 mg
Ausbeute: 44.4 %
Kommentar: Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Pcf-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1177.40 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1177, berechnet [M]: 1176.60
Theoretische Ausbeute:	11.77 mg
Ausbeute:	23.8 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Pff-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1151.38 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1152, berechnet [M]: 1150.60
Theoretische Ausbeute:	11.51 mg
Ausbeute:	13.0 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Pnf-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1178.39 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1179, berechnet [M]: 1177.59
Theoretische Ausbeute:	11.78 mg
Ausbeute:	26.3 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Thi-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1139.41 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1139, berechnet [M]: 1138.56
Theoretische Ausbeute:	11.39 mg
Ausbeute:	23.7 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-1Acpc-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1184.44 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1184, berechnet [M]: 1183.62
Theoretische Ausbeute:	11.86 mg
Ausbeute:	19.4 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-2Ahx-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1186.45 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1187, berechnet [M]: 1185.63
Theoretische Ausbeute:	11.86 mg
Ausbeute:	36.2 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Cha-Gly-Thr-Pro-Cha

molare Masse:	1266.58 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1266, berechnet [M]: 1265.70
Theoretische Ausbeute:	12.67 mg
Ausbeute:	29.4 %

Tabelle 7.42: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen in ppm. NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Asn1	-	4.238	2.808	-	H ^{δ1/2} 6.942/7.557
Met2	8.642	4.361	1.844	2.303	H ^ε 1.948
Trp3	8.069	4.591	3.258/3.188	-	H ^{δ1} 7.205, H ^{ε1} 10.092, H ^{ε3} 7.549, H ^{ζ2} 7.437, H ^{ζ3} 7.094, H ^{η2} 7.182
Gln4	7.968	4.143	1.917/1.807	2.128	H ^{ε1/2} 7.395/6.755
Lys5	8.072	4.131	1.741/1.649	1.335	H ^{δ1/2} 1.620, H ^{ε1/2} 2.917, H ^ζ 7.461
Cha6	8.125	4.320	1.587	1.268	H ^{δ1/2/3/4} 1.602/1.586/0.901/0.819, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.605-1.535/1.157/1.056
Gly7	8.332	3.896	-	-	-
Thr8	7.911	4.573	4.108	1.173	-
Pro9	-	4.346	2.224/1.847	1.977/1.921	H ^{δ1/2} 3.782/3.652
Cha10	8.151	4.243	1.553	1.268	H ^{δ1/2/3/4} 1.602/1.586/0.901/0.819, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.605-1.535/1.157/1.056 CONH ₂ 7.439/6.981

Tabelle 7.43: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.948/14.370 ppm.

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Asn1	50.284	35.374	-	-
Met2	53.753	30.292	29.133	C $^{\epsilon}$ 14.370
Trp3	55.164	26.952	-	C $^{\delta 1}$ 124.911, C $^{\epsilon 3}$ 118.489, C $^{\zeta 2}$ 112.358, C $^{\zeta 3}$ 119.651, C $^{\eta 2}$ 122.362
Gln4	53.833	27.411	31.352	-
Lys5	53.833	30.524	22.410	C $^{\delta}$ 26.625, C $^{\epsilon}$ 39.770
Cha6	52.220	38.737	34.001	C $^{\delta 1/2}$ 33.538/31.882, C $^{\epsilon 1/2}$ /C $^{\zeta}$ 26.210
Gly7	42.799	-	-	-
Thr8	57.423	67.628	18.999	-
Pro9	61.054	29.630	25.059	C $^{\delta}$ 48.746
Cha10	52.018	38.737	34.001	C $^{\delta 1/2}$ 33.538/31.882, C $^{\epsilon 1/2}$ /C $^{\zeta}$ 26.210

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Cha-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1226.52 g/mol
 MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1227, berechnet [M]: 1225.66
 Theoretische Ausbeute: 12.27 mg
 Ausbeute: 15.5 %

Tabelle 7.44: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Asn1	-	4.209	2.783	-	H $^{\delta 1/2}$ 7.543/6.927
Met2	8.630	4.341	1.823	2.279	H $^{\epsilon}$ 1.924
Trp3	8.064	4.563	3.230/3.165	-	H $^{\delta 1}$ 7.184, H $^{\epsilon 1}$ 10.037, H $^{\epsilon 3}$ 7.526, H $^{\zeta 2}$ 7.413, H $^{\zeta 3}$ 7.070, H $^{\eta 2}$ 7.157
Gln4	7.941	4.112	1.886/1.779	2.136/2.067	H $^{\epsilon 1/2}$ 7.382/6.741
Lys5	8.072	4.101	1.710/1.629	1.304	H $^{\delta 1/2}$ 1.595, H $^{\epsilon 1/2}$ 2.902, H $^{\zeta}$ 7.444
Cha6	8.191	4.175	1.560	1.231	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.567/1.560/0.883/0.815, H $^{\epsilon 1/2/3/4}$ /H $^{\zeta 1/2}$ 1.576/1.510/1.078/1.049
Gly7	8.320	3.872	-	-	-
Thr8	7.920	4.523	4.072	1.149	-
Pro9	-	4.316	2.206/1.823	1.954/1.891	H $^{\delta 1/2}$ 3.765/3.620
Leu10	8.130	4.301	1.563/1.494	1.586	H $^{\delta 1/2}$ 0.844/0.794, CONH ₂ 7.451/6.977

Tabelle 7.45: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. NMWQK-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.924/14.370 ppm. (n. b. - nicht beobachtet)

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Asn1	50.090	35.344	-	-
Met2	53.536	30.125	29.148	C $^{\epsilon}$ 14.370
Trp3	n. b.	27.008	-	C $^{\delta 1}$ 124.814, C $^{\epsilon 3}$ 118.519, C $^{\zeta 2}$ 112.246, C $^{\zeta 3}$ 119.689, C $^{\eta 2}$ 122.274
Gln4	53.792	27.365	31.295	-
Lys5	53.908	30.365	22.338	C $^{\delta}$ 26.798, C $^{\epsilon}$ 39.656
Cha6	52.698	38.888	33.867	C $^{\delta 1/2}$ 33.404/31.819, C $^{\epsilon 1/2}$ /C $^{\zeta}$ 26.137
Gly7	42.716	-	-	-
Thr8	57.563.	67.774	18.837	-
Pro9	60.912	29.616	25.028	C $^{\delta}$ 48.676
Leu10	52.116	40.077	24.717	C $^{\delta 1/2}$ 22.668/21.116

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Chg-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1212.49 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1213, berechnet [M]: 1211.65
Theoretische Ausbeute: 12.12 mg
Ausbeute: 24.7 %
Kommentar: Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Tle-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1186.45 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1186, berechnet [M]: 1185.63
Theoretische Ausbeute: 11.86 mg
Ausbeute: 21.9 %
Kommentar: Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Aib-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1200.48 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1201, berechnet [M]: 1199.65
Theoretische Ausbeute: 12.00 mg
Ausbeute: 30.0 %
Kommentar: Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-dAla-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1186.45 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1187, berechnet [M]: 1185.63
Theoretische Ausbeute:	11.86 mg
Ausbeute:	23.6 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Hse-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1172.43 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1172, berechnet [M]: 1171.62
Theoretische Ausbeute:	11.72 mg
Ausbeute:	23.0 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Msn-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1234.52 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1235, berechnet [M]: 1233.60
Theoretische Ausbeute:	12.35 mg
Ausbeute:	30.0 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-2Ahx-NH₂

molare Masse:	1172.43 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1173, berechnet [M]: 1171.62
Theoretische Ausbeute:	11.72 mg
Ausbeute:	29.0 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Cha-NH₂

molare Masse: 1212.49 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1212, berechnet [M]: 1211.65
Theoretische Ausbeute: 12.12 mg
Ausbeute: 27.2 %

Tabelle 7.46: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen in ppm. NMWQKVGTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Asn1	-	4.229	2.789	-	H ^{δ1/2} 7.545/6.926
Met2	8.610	4.358	1.865/1.808	2.303	H ^ε 1.951
Trp3	8.098	4.600	3.246/3.176	-	H ^{δ1} 7.201, H ^{ε1} 10.078, H ^{ε3} 7.550, H ^{ζ2} 7.434, H ^{ζ3} 7.092, H ^{η2} 7.179
Gln4	7.938	4.155	1.904/1.755	2.121	H ^{ε1/2} 7.374/6.746
Lys5	8.132	4.149	1.725/1.638	1.325	H ^{δ1/2} 1.613, H ^{ε1/2} 2.907, H ^ζ 7.454
Val6	8.081	4.031	1.985	0.894/0.881	
Gly7	8.459	3.913	-	-	-
Thr8	7.955	4.554	4.083	1.161	-
Pro9	-	4.339	2.219/1.840	1.986/1.919	H ^{δ1/2} 3.779/3.648
Cha10	8.167	4.240	1.560	1.283	H ^{δ1/2/3/4} 1.616/1.603/0.918/0.890, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.620/1.112, CONH ₂ 7.441/6.979

Tabelle 7.47: ¹³C-NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. NMWQKVGTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.951/14.370 ppm.

	C ^α	C ^β	C ^γ	Sonstige
Asn1	50.317	35.475	-	-
Met2	53.614	27.299	29.373	C ^ε 14.370
Trp3	54.882	27.162	-	C ^{δ1} 124.754, C ^{ε3} 118.599, C ^{ζ2} 112.445, C ^{ζ3} 119.774, C ^{η2} 122.428
Gln4	53.614	27.262	31.335	-
Lys5	53.614	30.743	22.281	C ^δ 26.744, C ^ε 39.805
Val6	60.099	30.483	18.299	
Gly7	42.680	-	-	-
Thr8	57.382	67.599	19.032	-
Pro9	61.077	29.780	25.003	C ^δ 48.638
Cha10	51.983	38.730	24.056	C ^{δ1/2} 33.368/32.126, C ^{ε1/2} /C ^ζ 25.966

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Chg-NH₂

molare Masse:	1198.46 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1198, berechnet [M]: 1197.63
Theoretische Ausbeute:	11.98 mg
Ausbeute:	26.7 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Tle-NH₂

molare Masse:	1172.43 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1173, berechnet [M]: 1171.62
Theoretische Ausbeute:	11.72 mg
Ausbeute:	23.0 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Asn-Met-Trp-Gln-Arg-Cha-Gly-Thr-Pro-Cha

molare Masse:	1294.60 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1295, berechnet [M]: 1293.70
Theoretische Ausbeute:	12.95 mg
Ausbeute:	52.5 %

Tabelle 7.48: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen in ppm. NMWQ-R-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H ^α	H ^β	H ^γ	Sonstige
Asn1	-	4.238	2.814	-	H ^{δ1/2} 7.562/6.945
Met2	8.651	4.370	1.867/1.830	2.310	H ^ε 1.948
Trp3	8.079	4.599	3.256/3.186	-	H ^{δ1} 7.207, H ^{ε1} 10.095, H ^{ε3} 7.544, H ^{ζ2} 7.435, H ^{ζ3} 7.090, H ^{η2} 7.178
Gln4	7.981	4.159	1.918/1.814	2.158/2.104	H ^{ε1/2} 6.757, 7.394
Arg5	8.090	4.141	1.731/1.669	1.540/1.508	H ^{δ1/2} 3.126
Cha6	8.154	4.324	1.572	1.247	H ^{δ1/2/3/4} 1.603/1.582/0.890/0.811, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.603/1.086
Gly7	8.329	3.902	-	-	-
Thr8	7.914	4.570	4.114	1.180	-
Pro9	-	4.342	2.220/1.848	1.978/1.920	H ^{δ1/2} 3.787/3.650
Cha10	8.156	4.241	1.572	1.247	H ^{δ1/2/3/4} 1.603/1.582/0.890/0.811, H ^{ε1/2/3/4} /H ^{ζ1/2} 1.603/1.086 CONH ₂ 7.442/6.984

Tabelle 7.49: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. NMWQ-R-Cha-GTP-Cha-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.948/14.370 ppm.

	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	Sonstige
Asn1	50.197	35.437	-	-
Met2	53.730	30.339	29.185	C $^{\varepsilon}$ 14.370
Trp3	55.220	26.979	-	C $^{\delta 1}$ 124.948, C $^{\varepsilon 3}$ 118.574, C $^{\zeta 2}$ 112.336, C $^{\zeta 3}$ 119.681, C $^{\eta 2}$ 122.331
Gln4	53.730	27.293	31.365	-
Arg5	53.730	28.191	24.761	C $^{\delta}$ 41.076
Cha6	52.156	38.738	33.961	C $^{\delta 1/2}$ 33.512/31.910, C $^{\varepsilon 1/2}/\text{C}^{\zeta}$ 26.139
Gly7	42.774	-	-	-
Thr8	57.428	67.584	18.927	-
Pro9	60.988	29.634	24.953	C $^{\delta}$ 48.752
Cha10	52.018	38.738	33.961	C $^{\delta 1/2}$ 33.512/31.910, C $^{\varepsilon 1/2}/\text{C}^{\zeta}$ 26.139

Asn-Met-Trp-Gln-Arg-Cha-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse: 1254.53 g/mol
MALDI-TOF (m/z): [M+H]⁺ 1254, berechnet [M]: 1253.67
Theoretische Ausbeute: 12.55 mg
Ausbeute: 5.2 %

Tabelle 7.50: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen in ppm. NMWQ-R-Cha-GTPL-NH₂ in H₂O/D₂O (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf HDO bei 4.7 ppm.

	NH	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	Sonstige
Asn1	-	4.240	2.811	-	H $^{\delta 1/2}$ 7.561/6.945
Met2	8.649	4.363	1.843	2.304	H $^{\varepsilon}$ 1.951
Trp3	8.082	4.581	3.256/3.185	-	H $^{\delta 1}$ 7.205, H $^{\varepsilon 1}$ 10.082, H $^{\varepsilon 3}$ 7.545, H $^{\zeta 2}$ 7.434, H $^{\zeta 3}$ 7.091, H $^{\eta 2}$ 7.177
Gln4	7.975	4.145	1.916/1.808	2.157/2.106	H $^{\varepsilon 1/2}$ 6.759, 7.396
Arg5	8.098	4.139	1.744/1.658	1.524	H $^{\delta 1/2}$ 3.112, H $^{\varepsilon}$ 7.118
Cha6	8.163	4.337	1.584	1.239	H $^{\delta 1/2/3/4}$ 1.595/1.578/0.905/0.828 H $^{\varepsilon 1/2/3/4}/\text{H}^{\zeta 1/2}$ 1.536/1.068
Gly7	8.320	3.889	-	-	-
Thr8	7.932	4.555	4.094	1.176	-
Pro9	-	4.348	2.230/1.843	1.985/1.917	H $^{\delta 1/2}$ 3.788/3.648
Leu10	8.197	4.203	1.577/1.525	1.601	H $^{\delta 1/2}$ 0.868/0.818 CONH ₂ 7.467/6.991

Tabelle 7.51: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen aus HSQC-Spektren in ppm. NMWQ-R-Cha-GTPL- NH_2 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), 300 K, pH = 2, kalibriert auf das Methylsignal von Met2 bei 1.951/14.370 ppm.

	C^α	C^β	C^γ	Sonstige
Asn1	50.129	35.490	-	-
Met2	53.755	30.155	29.244	C^ϵ 14.370
Trp3	55.181	26.971	-	$\text{C}^{\delta 1}$ 125.095, $\text{C}^{\epsilon 3}$ 118.644, $\text{C}^{\zeta 2}$ 112.362, $\text{C}^{\zeta 3}$ 119.758, $\text{C}^{\eta 2}$ 122.193
Gln4	53.693	27.320	31.371	-
Arg5	53.693	28.029	24.653	C^δ 41.057
Cha6	52.206	38.695	33.936	$\text{C}^{\delta 1/2}$ 33.565/31.776, $\text{C}^{\epsilon 1/2}/\text{C}^\zeta$ 26.274
Gly7	42.738	-	-	-
Thr8	57.506	67.424	18.847	-
Pro9	61.039	29.582	25.092	C^δ 48.866
Leu10	52.825	40.113	24.620	$\text{C}^{\delta 1/2}$ 22.561/21.109

Asn-Met-Trp-Gln-Arg-Val-Gly-Thr-Pro-Cha- NH_2

molare Masse:	1240.50 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 1240, berechnet [M]: 1239.65
Theoretische Ausbeute:	12.41 mg
Ausbeute:	-
Kommentar:	Keine Reinausbeute und NMR-spektroskopische Charakterisierung, da die Verbindung bei der HPL-chromatographischen Reinigung verloren ging.

Omy-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu- NH_2

molare Masse:	1349.63 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 1350, berechnet [M]: 1348.70
Theoretische Ausbeute:	13.50 mg
Ausbeute:	43.7 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Paf-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu- NH_2

molare Masse:	1334.62 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 1335, berechnet [M]: 1333.70
Theoretische Ausbeute:	13.35 mg
Ausbeute:	47.2 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Pcf-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1363.61 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1364, berechnet [M]: 1362.68
Theoretische Ausbeute:	13.64 mg
Ausbeute:	42.5 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Pff-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1337.59 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1338, berechnet [M]: 1336.68
Theoretische Ausbeute:	13.38 mg
Ausbeute:	7.5 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Pnf-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1364.60 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1365, berechnet [M]: 1363.67
Theoretische Ausbeute:	13.65 mg
Ausbeute:	36.6 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Thi-Asn-Met-Trp-Gln-Lys-Val-Gly-Thr-Pro-Leu-NH₂

molare Masse:	1325.63 g/mol
MALDI-TOF (m/z):	[M+H] ⁺ 1326, berechnet [M]: 1324.64
Theoretische Ausbeute:	13.26 mg
Ausbeute:	58.1 %
Kommentar:	Von den monosubstituierten Peptidmimetika wurden nur die Verbindungen NMR-spektroskopisch charakterisiert, die später in den STD-NMR-Bindungsstudien eingesetzt wurden.

7.5 SPR-Experimente

Bindung von Peptidmimetika an den immobilisierten

CD4-Rezeptor (Biacore 3000)

Für die Biacore-Studien wurde ein neuer CM5-Sensorchip über 1200 s mit einer Mischung aus 1 M NHS und 1 M EDC aktiviert.

Das CD4, das in einem Histidin-Puffer vorlag (siehe Abschnitt 7.1, CD4 aus CHO-Zellen, NIH), wurde vor der Aminkupplung nach PBS umgepuffert, um zu verhindern, dass das Histidin mit den aktivierten Carboxylgruppen des Sensorchips reagiert.

2 μ L dieser Proteinlösung (2 μ g CD4) wurden mit 150 μ L Acetatpuffer (pH 4.5) verdünnt und mit Hilfe des *Quick Inject*-Befehls (QI) bei einer Flussrate von 5 μ L/min in verschiedenen Portionen über die jeweiligen Flusszellen Fc1 - Fc4 geleitet. Es wurden folgende Belegungen erzielt:

Fc1	keine Belegung, Referenzzelle	
Fc2	QI 40 μ L CD4 (CHO) (2 μ g/152 μ L)	4825 RU
Fc2	QI 20 μ L CD4 (CHO) (2 μ g/152 μ L)	876 RU
Fc2	QI 30 μ L CD4 (CHO) (2 μ g/152 μ L)	2633 RU

Nach der Belegung mit CD4 wurden nicht umgesetzte aktivierte Carboxylgruppen über 1200 s mit 1 M Ethanolamin deaktiviert.

Die biologische Aktivität des immobilisierten Rezeptors wurde in regelmäßigen Abständen durch Injektion des natürlichen Liganden GP120 (Australbio, siehe Abschnitt 7.1) geprüft. Wie in J. Wülfkens Dissertation beschrieben ist, führt das verwendete Immobilisierungsprotokoll zu einer Restaktivität von 8 %.⁷⁴ In allen Experimenten mit immobilisiertem CD4-Rezeptor wurde mit zwei Injektionen von 10 μ L 100 mM H_3PO_4 bei 35 mL/min Flussrate regeneriert.

Von den meisten der monosubstituierten Peptidmimetika konnten 50 mM Stammlösungen in H_2O angesetzt werden. Diese wurden dann zu 1 mM in HBS-EP verdünnt. Weitere Kon-

zentrationen wurden entweder direkt aus den Stammlösungen oder durch Weiterverdünnung von niedriger konzentrierten Proben hergestellt.

Einige der mono- und alle der mehrfachsubstituierten Peptidmimetika konnten nicht hochkonzentriert vorgelöst werden. Sie wurden daher als Feststoff direkt zu 1 mM bzw. 100 μ M in HBS-EP gelöst.

Von den Verdünnungen der Peptidmimetika wurden jeweils 20 μ L mittels Kinject (KI) (Dissoziationszeit 270 s) eingespritzt. Zwischen jeder Ligandinjektion wurde regeneriert und eine Kontrollinjektion mit reinem HBS-EP-Puffer durchgeführt.

Zur Ermittlung des korrekten SPR-Signals wurde ein *double referencing* durchgeführt, d. h. zuerst wurde das SPR-Signal der unbelegten Referenzzelle von dem einer CD4-belegten Zelle abgezogen. Von diesem Wert wurde zusätzlich das Differenzsignal abgezogen, das sich ergab, wenn reiner Puffer injiziert wurde. Es wurde der Mittelwert von zwei Pufferinjektionen verwendet, die direkt vor bzw. nach der entsprechenden Peptidinjektion durchgeführt worden waren.

Bindung von Peptidmimetika an den immobilisierten CD4-Rezeptor (Biacore S51)

Mit ausgewählten mehrfachsubstituierten Peptidmimetika wurden zum vorigen Abschnitt analoge Messungen an einem Biacore S51 Gerät bei der Firma Biacore in Freiburg durchgeführt. Der Sensorchip war hier mit 4020 RU an CD4 (CHO, Progenics, siehe Abschnitt 7.1) belegt.

Bei der Kontrollinjektion von GP120 (NIBSC, siehe Abschnitt 7.1) zeigte sich in einem Vorversuch eine starke Wechselwirkung des Proteins mit der Referenzzelle. Dies konnte auf einem neuen Sensorchip durch sogenanntes „*blanking*“, d. h. Aktivieren und Deaktivieren der Referenzzelle mit EDC/NHS und EA vor der eigentlichen Immobilisierung unterbunden werden. Nach dieser Maßnahme wurde ein typisches Verhalten der CD4-GP120-Interaktion beobachtet. Auch hier gingen auf dem Weg der Amin-Kupplung über 90 % an CD4-Aktivität verloren.

Alle Peptidmimetika wurden zu 10 mM in DMSO gelöst. Konzentrationsreihen wurden durch sukzessives Verdünnen mit Laufpuffer (HBS-EP) erhalten. Alle Proben wurden bei

15 mL/min Flussrate mit dem Kinject-Befehl eingespritzt. Die durch die Verwendung von DMSO notwendige Lösungsmittelkorrektur wurde anhand einer Verdünnungsreihe mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen durchgeführt.

7.6 STD-NMR-Experimente

STD-NMR-Experimente wurden bei möglichst niedriger Temperatur aufgenommen, um die Stabilität des Proteins nicht zu gefährden. Bei Verwendung der standardgemäßen TXI-Probenköpfe wurden 280 K eingestellt. Am 700 MHz-Cryo-Probenkopf wurde bei 285 K gemessen. STD-NMR-Pulsprogramme sind im Anhang ab Seite 159 aufgeführt.

Probenvorbereitung

Um maximale Sensitivität zu erreichen wurden alle STD-Experimente in Shigemi-NMR-Röhrchen vom Typ BMS-008TB, Shigemi, Inc., Allison Park, PA, USA durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 250-300 μL .

Für die Titrationsreihen wurden jeweils 200 μg CD4 (4.4 nmol, Progenics, siehe 7.1) mittels Ultrafiltration aus protoniertem PBS in deuterierten PBS umgepuffert (Verdünnungsfaktor für H_2O mindestens 10^5)

Da sich die z. T. schlecht löslichen Liganden nicht gut zu einer NMR-Probe zudosieren lassen, wurde folgende Verfahrensweise gewählt, um STD-Titrationsreihen zu erhalten:

- Das umgepufferte CD4 wird auf zwei Proben zu je ca. 100 μL aufgeteilt.
- Der Ligand wird im Differenzvolumen zu 250 μL (d. h. in ca. 150 μL) in deuteriertem PBS gelöst, so dass sich nach Vereinigung mit einer CD4-Portion die gewünschte maximal zu vermessende Ligandkonzentration ergibt.
- Der pH-Wert wird geprüft und wenn nötig auf 7.0 - 7.5 eingestellt.
- Ligandlösung und eine Hälfte der CD4-Lösung werden gemischt und in ein Shigemi NMR-Röhrchen überführt.

- Die zweite Hälfte der CD4-Lösung wird mit deuteriertem PBS auf 250 μL aufgefüllt und in ein zweites Shigemi NMR-Röhrchen überführt.
- Nachdem beide Proben vermessen wurden, entnimmt man mit zwei Pipetten aus beiden NMR-Proben jeweils ein bestimmtes Volumen und fügt es anschließend der jeweils anderen Probe zu und mischt mit Hilfe des Shigemi-Glaszylinders.

Das Probenvolumen bleibt bei diesem Vorgehen konstant, und es wird sukzessive Ligand aus der hoch- in die niedrigkonzentrierte Probe überführt. Durch die entnommenen Volumina kann man wählen, wie dicht die Titrationspunkte beieinander liegen. Die tatsächlich vorhandene Ligandkonzentration wurde durch Integration von Ligandsignalen im Vergleich zu einem internen Standards bestimmt. Als Vergleichssignal diente das Singulett der neun Methylprotonen von Natrium 2,2-Dimethyl-2-silapentyl-5-sulfonat (DSS).

Für die 1D-STD-Aufbaureate und das STD-TOCSY-Spektrum mit der Verbindung Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha wurden 400 μg (8.9 nmol) in 200 μL deuteriertes PBS umgepuffert. Diese Lösung wurde zu einer Suspension von 428 μg (300 nmol) Peptidmimetikum in 100 μL deuteriertem PBS gegeben. Zur genauen Dosierung des Liganden wurde wiederum eine entsprechende Volumen einer Stammlösung lyophilisiert.

Die erhaltene Protein-Ligand-Lösung wurde intensiv geschüttelt und mit Ultraschall behandelt. Ein Vergleich der Signalintensitäten mit dem Methylsignal des 20 μM zugesetzten Standard DSS ergab jedoch, dass Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha nur 130 μM und nicht 1 mM wie geplant in Lösung gegangen war. Das Ligand-Protein-Verhältnis betrug demnach 4.4 : 1.

1D ^1H -STD-NMR-Spektren

1D ^1H -NMR-Spektren wurden mit einer spektralen Weite von 12.0223 ppm und 32 k Datenpunkten aufgenommen und vor der Fourier-Transformation auf 64k mit Nullen aufgefüllt. Zur Apodisierung wurde das FID mit einer Exponentialfunktion multipliziert (Linienverbreiterung um 0.3-5 Hz) und anschließend die Phase korrigiert. Die Unterdrückung der Proteinresonanzen wurde über einen $T1\rho$ -Filter, bestehend aus einem Spinlock-Puls mit einer Länge von 30 ms, bei einer Abschwächung von 15 dB erreicht (Spinlock-Feldstärke 4.45 kHz).

Da es sich bei den STD-NMR-Experimenten um Differenzmessungen handelt, wurden die Phasenzyklen so gewählt, dass bei den 1D NMR-Experimenten die Subtraktion jeweils alternierend nach jedem Scan erfolgte. Dadurch werden Subtraktionsartefakte aufgrund von Temperatur- oder Magnetfeldinhomogenitäten minimiert. Die *on*- und *off resonance* Frequenz der Vorsättigung wechselt nach jedem Scan. Die STD-Experimente wurden mit WATERGATE Wasserunterdrückung aufgenommen. Die Einstrahlposition für die Vorsättigung des Proteins (*on resonance*) lag bei -500 Hz (Spektrometerfrequenz 500 MHz, -1 ppm) bzw. -525 Hz (Spektrometerfrequenz 700 MHz, -0.75 ppm). Die *off resonance* Frequenz betrug 20000 Hz (40 bzw. 28.6 ppm).

Um sicherzugehen, dass unter diesen Bedingungen keine STD-Artefakte aufgrund von direkter Sättigung des Liganden, Aggregationseffekten o. ä. auftreten, wurden Proben vermessen, die die Liganden in der höchsten geplanten Konzentration jedoch kein CD4 enthielten.

Um den prozentualen STD-Effekt bzw. den STD-Amplifikations-Faktor zu bestimmen, wurde bei jedem Ligandüberschuß ein Referenzexperiment unter identischen Konditionen aufgenommen, d.h. mit derselben Repetitionsdauer und einem Spinlock-Puls gleicher Länge. Die zu vergleichenden NMR-Experimente wurden mit den gleichen Parametereinstellungen prozessiert. Die STD-Intensitäten wurden über den Dual-Display Modus in XWINNMR miteinander verglichen.

2D STD-TOCSY-Spektren

Beim 2D STD-TOCSY-Experiment wurden die jeweiligen *on* und *off resonance* F1-Inkmente in zwei getrennten Datensätzen gespeichert. Verwendet wurde das Pulsprogramm std19mlev2f. Die Mischzeit betrug 151 ms. Es wurden 4k Datenpunkte bei 256 Inkrementen und 128 Scans je Inkrement aufgenommen. Die Differenzbildung erfolgte erst nach der Akquisition durch Subtraktion der prozessierten Daten mit Hilfe des add2d-Befehls von XWINNMR. Als *window*-Funktionen diente in der F1-Dimension eine um 90° verschobene Quadrat-Sinusfunktion, während in der F2-Dimension mit einer Exponential-Funktion multipliziert wurde, die eine Linienverbreiterung von 5 Hz bewirkte.

7.7 Untersuchung der Proteolysestabilität

3.92 mg Pronase aus (siehe Abschnitt 7.1) wurden in 9.8 mL Tris-Puffer ($c_{\text{Tris}} = 100 \text{ mM}$) gelöst und 1:50 verdünnt. Von dieser 8 mgL^{-1} Pronase enthaltenden Lösung wurden jeweils $60 \mu\text{L}$ zum gleichen Volumen einer 1 mM Lösung des Peptidmimetikums Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha bzw. des Referenzpeptids NMWQKVGTPPL in reinem Wasser gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 5 bzw. 6, 10 und 20 min 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 HPLC-ESI-MS vermessen. Mithilfe der Massenpeaks bei 1173 m/z (Referenzpeptid, $[\text{M}]^+$) bzw. 1428 (Peptidmimetikum, $[\text{M}]^+$) wurde der entsprechende Substratpeak im UV-Chromatogramm bei 280 nm identifiziert, dessen Abnahme gegen die Inkubationszeit aufgetragen wurde.

Toxikologie und Handhabung der Chemikalien

Substanzname	Gefahren- symbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Aceton	F	11	9-16-23.2-33
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
O-(Azabenzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetramethyluronium- hexafluorophosphat (HATU)	Xi	36/37/38	26-36
O-(Benzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetramethyluronium- tetrafluoroborat (TBTU)	Xi	36/37/38	26-36
<i>tert</i> -Butylmethylether	F	11-66	16-23.2-29-33
CDCl ₃	Xn	20/22- 38-40-48	36/37
Chloroform	Xn	22-38-40- 48/20/22	36/37
α -Cyano-4-hydroxymizsäure	Xn	20/21/22- 36/37/38	26-36
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37 24/25
2,5-Dihydroxybenzoesäure			
N,N-Diisopropylethylamin	F, C	11-22-34- 52/53	16-26-36/37/39- 45-61
N,N-Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Piperidin	F, T	11-23/24-34	16-26-27-45
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	(2-)7-16-24/25-26
Salzsäure	C	34-37	26-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Triisopropylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36

Flexidock-Parameter

h_vdw_radius	1.0
h_vdw_epsilon	0.030
grid_bounds	x -10.0 10.0
grid_bounds	y -10.0 10.0
grid_bounds	z -10.0 10.0
max_saved	20
diel_const	80.0
hb_factor	0.7
dist_cutoff	16.0
e_thresh	20.0
grid_resolution	0.35
extra_dist	1.5
site_radius	1.0
site_score	100.0
proximity_mult	2.0
proximity_fract	0.1
dist_dep_diel	yes
use_charges	yes
use_tors	yes
use_constr	no
use_backbone	no
use_nonrot	no
use_grid_vdw	no
use_site_points	no
restart_run	no
bounds	Torsional 0.0 360.0
bounds	Rotation 0.0 360.0
bounds	TransX -4.0 4.0
bounds	TransY -4.0 4.0
bounds	TransZ -4.0 4.0
initial_bounds	Torsional 0.0 360.0
initial_bounds	Rotation 0.0 360.0
initial_bounds	TransX -2.0 2.0
initial_bounds	TransY -2.0 2.0
initial_bounds	TransZ -2.0 2.0
mut_window	Torsional 60.0
mut_window	Rotation 60.0
mut_window	TransX 0.5
mut_window	TransY 0.5
mut_window	TransZ 0.5
large_mut_window	Torsional 360.0
large_mut_window	Rotation 360.0
large_mut_window	TransX 2.0
large_mut_window	TransY 2.0
large_mut_window	TransZ 2.0
conv_thresh	Torsional 5.0
conv_thresh	Rotation 5.0
conv_thresh	TransX 0.1
conv_thresh	TransY 0.1
conv_thresh	TransZ 0.1
chrom_rms	Torsional 60.0
chrom_rms	Rotation 60.0
chrom_rms	TransX 0.1
chrom_rms	TransY 0.1
chrom_rms	TransZ 0.1
initial_chrom_rms	Torsional 60.0
initial_chrom_rms	Rotation 60.0

initial_chrom_rms	TransX 0.5
initial_chrom_rms	TransY 0.5
initial_chrom_rms	TransZ 0.5
gene_mut_thresh	Torsional 30.0
gene_mut_thresh	Rotation 30.0
gene_mut_thresh	TransX 0.3
gene_mut_thresh	TransY 0.3
gene_mut_thresh	TransZ 0.3
Xover_method	GA_XOVER_TP
scaling_method	GA_SCALE_RANK
parent_method	GA_PARENT_ROUL
gen_method	GA_GEN_STEADY_STATE
island_method	GA_ISLAND_EXCHANGE
steady_state_method	GA_STEADY_STATE_REPLACE
rot_trans	GA_RT_ALLOW
num_islands	1
pop_size	500
num_elite	1
num_random	3
gen_number	0
exchange_int	0
num_exchange	5
print_interval	200
arch_interval	0
ss_Xover_chance	0.4 0.2
ss_mut_chance	0.4
Xover_chance	0.8
mut_chance	0.15
avg_Xover_chance	0.0
full_mut_chance	0.1
large_mut_chance	0.0
swap_mut_chance	0.25
tourney_chance	0.75
max_score	1e7
max_initial_score	0.0
box_sel_limit	0.4
crit_gene	0.95
crit_score	0.5
dupl_score_window	20.0
rank_increment	19000.0
rank_multiple	6.0
dynamic_mut_delta	0.02
max_dynamic_mut_delta	1.0
use_all_bonds	no
use_no_bonds	no
duplicate_check	yes
use_initial_geom	yes
print_settings	no
check_initial	no
exceed window	no
avg_use_trans	no
dynamic_mut	no
gen_limit	100000

Advanced Chemtech

MOS 496 Omega -

Syntheseprotokolle

Die hier aufgeführten Syntheseprotokolle wurden verwendet, um in Zusammenarbeit mit J. Wülfken 31 Decapeptide bzw. -peptidmimetika herzustellen, von denen 22 in der vorliegenden Arbeit weiterbearbeitet wurden. Die Synthesen der weiteren Peptidmimetika wurden analog durchgeführt.

Hauptprogramm

```
1 REM ** This is the data for cycle 1. **
2 <Set Active>
3 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
4 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
5 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
6 REM doppelkupplung 60 90
7 REM DMF2 sollte frisch aus dem Kanister kommen
8
9 Dispense System Fluid DMF2 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
10 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
11 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
12
13 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
14 Dispense Sequence 2JWHM1.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
15 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
16 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
17 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
18 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
19
20 Dispense System Fluid DMF2 1500ul to Reaktionsblock[18-48]
21 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
22 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
23
24 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
25 Dispense Sequence 2JWHM1.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
26 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
27 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
28 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)
29
30 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
31 Goto ChemFile 23cap.cht, line 1
32 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
33 REM ** This is the data for cycle 2. **
34 <Set Active>
35 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
36 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
37 REM doppelkupplung 60 90
38 REM DMF2 sollte frisch aus dem Kanister kommen
39
40 Dispense System Fluid DMF2 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
```

```
41 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
42 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
43
44 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
45 Dispense Sequence 2JWHM2.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
46 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
47 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
48 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
49 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
50
51 Dispense System Fluid DMF2 1500ul to Reaktionsblock[18-48]
52 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
53 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
54
55 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
56 Dispense Sequence 2JWHM2.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
57 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
58 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
59 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)
60
61 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
62 Goto ChemFile 23cap.cht, line 1
63 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
64 REM ** This is the data for cycle 3. **
65 <Set Active>
66 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
67 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
68 REM doppelkupplung 60 90
69 REM DMF2 sollte frisch aus dem Kanister kommen
70
71 Dispense System Fluid DMF2 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
72 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
73 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
74
75 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
76 Dispense Sequence 2JWHM3.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
77 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
78 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
79 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
80 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
81
82 Dispense System Fluid DMF2 1500ul to Reaktionsblock[18-48]
83 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
84 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
85
86 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
87 Dispense Sequence 2JWHM3.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
88 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
89 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
90 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)
91
92 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
93 Goto ChemFile 23cap.cht, line 1
94 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
95 REM ** This is the data for cycle 4. **
96 <Set Active>
97 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
98 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
99 REM doppelkupplung 60 90
100 REM DMF2 sollte frisch aus dem Kanister kommen
101
102 Dispense System Fluid DMF2 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
103 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
104 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
105
106 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
```

```
107 Dispense Sequence 2JWHM4.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
108 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
109 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
110 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
111 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
112
113 Dispense System Fluid DMF2 1500ul to Reaktionsblock[18-48]
114 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
115 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
116
117 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
118 Dispense Sequence 2JWHM4.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
119 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
120 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
121 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)
122
123 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
124 Goto ChemFile 23cap.cht, line 1
125 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
126 REM ** This is the data for cycle 5. **
127 <Set Active>
128 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
129 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
130 REM doppelkupplung 60 90
131 REM DMF2 sollte frisch aus dem Kanister kommen
132
133 Dispense System Fluid DMF2 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
134 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
135 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
136
137 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
138 Dispense Sequence 2JWHM5.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
139 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
140 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
141 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
142 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
143
144 Dispense System Fluid DMF2 1500ul to Reaktionsblock[18-48]
145 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
146 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
147
148 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
149 Dispense Sequence 2JWHM5.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
150 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
151 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
152 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)
153
154 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
155 Goto ChemFile 23cap.cht, line 1
156 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
157 REM ** This is the data for cycle 6. **
158 <Set Active>
159 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
160 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
161 REM doppelkupplung 60 90
162 REM DMF2 sollte frisch aus dem Kanister kommen
163
164 Dispense System Fluid DMF2 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
165 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
166 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
167
168 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
169 Dispense Sequence 2JWHM6.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
170 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
171 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
172 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
```

```
173 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
174
175 Dispense System Fluid DMF2 1500ul to Reaktionsblock[18-48]
176 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
177 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
178
179 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
180 Dispense Sequence 2JWHM6.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
181 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
182 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
183 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)
184
185 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
186 Goto ChemFile 23cap.cht, line 1
187 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
188 REM ** This is the data for cycle 7. **
189 <Set Active>
190 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
191 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
192 REM doppelkupplung 60 90
193 REM DMF2 sollte frisch aus dem Kanister kommen
194
195 Dispense System Fluid DMF2 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
196 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
197 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
198
199 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
200 Dispense Sequence 2JWHM7.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
201 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
202 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
203 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
204 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
205
206 Dispense System Fluid DMF2 1500ul to Reaktionsblock[18-48]
207 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
208 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
209
210 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
211 Dispense Sequence 2JWHM7.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
212 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
213 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
214 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)
215
216 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
217 Goto ChemFile 23cap.cht, line 1
218 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
219 REM ** This is the data for cycle 8. **
220 <Set Active>
221 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
222 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
223 REM doppelkupplung 60 90
224 REM DMF2 sollte frisch aus dem Kanister kommen
225
226 Dispense System Fluid DMF2 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
227 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
228 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
229
230 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
231 Dispense Sequence 2JWHM8.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
232 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
233 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
234 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
235 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
236
237 Dispense System Fluid DMF2 1500ul to Reaktionsblock[18-48]
238 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
```

```
239 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
240
241 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
242 Dispense Sequence 2JWHM8.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
243 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
244 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
245 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)
246
247 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
248 Goto ChemFile 23cap.cht, line 1
249 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
250 REM ** This is the data for cycle 9. **
251 <Set Active>
252 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
253 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
254 REM doppelkupplung 60 90
255 REM DMF2 sollte frisch aus dem Kanister kommen
256
257 Dispense System Fluid DMF2 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
258 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
259 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
260
261 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
262 Dispense Sequence 2JWHM9.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
263 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
264 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
265 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
266 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
267
268 Dispense System Fluid DMF2 1500ul to Reaktionsblock[18-48]
269 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
270 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
271
272 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
273 Dispense Sequence 2JWHM9.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
274 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
275 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
276 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)
277
278 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
279 Goto ChemFile 23cap.cht, line 1
280 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
281 REM ** This is the data for cycle 10. **
282 <Set Active>
283 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
284 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
285 REM doppelkupplung 60 90
286 REM DMF2 sollte frisch aus dem Kanister kommen
287
288 Dispense System Fluid DMF2 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
289 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
290 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
291
292 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
293 Dispense Sequence 2JWHM10.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
294 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
295 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
296 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
297 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
298
299 Dispense System Fluid DMF2 1500ul to Reaktionsblock[18-48]
300 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
301 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
302
303 Dispense System Fluid DMF2 300ul to Reaktionsblock[18-48]
304 Dispense Sequence 2JWHM10.dsp with 100ul to Reaktionsblock rack using DMF1
```

```
305 Transfer 60ul from DIPEA_1M[1] (DIPEA_1M) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
306 Transfer 60ul from Aminosaeuren[36] (TBTU) to Reaktionsblock[18-48] using DMF2
307 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)
308
309 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
310 Goto ChemFile 23cap.cht, line 1
311 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
312 Goto ChemFile 23depro.cht, line 1
313 Goto ChemFile 23wasch.cht, line 1
314 Goto ChemFile 23postw.cht, line 1
```

Fmoc-Schutzgruppe Entfernen

```
1 REM Fmoc-Abspaltung
2
3 Transfer 1000ul from PipDMF20[1] (PIP/DMF_1:4) to Reaktionsblock[18-48] using DMF1
4 Mix for 5.00 minutes at 600 rpm(s)
5 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
6
7 Transfer 1000ul from PipDMF20[2] (PIP/DMF_1:4) to Reaktionsblock[18-48] using DMF1
8 Mix for 10.00 minutes at 600 rpm(s)
9 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
10
11 Return
```

Waschen

```
1 REM waschen mit DMF und MeOH
2
3 Dispense System Fluid DMF13* 2000ul to Reaktionsblock[18-48]
4 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
5 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
6
7 Dispense System Fluid MeOH4 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
8 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
9 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
10
11 Dispense System Fluid DMF13* 2000ul to Reaktionsblock[18-48]
12 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
13 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
14
15 Repeat from step 11, 1 times
16
17 Return
```

Capping

```
1 REM Capping
2
3 Transfer 1000ul from Ac2O[1] (Ac2O) to Reaktionsblock[18-48] using DMF1
4 Mix for 10.00 minutes at 600 rpm(s)
5 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
6
7 Return
```

Waschen und Trocknen

```
1 REM Postwash
2
3 Dispense System Fluid MeOH4 2.00ml to Reaktionsblock[18-48]
4 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
5 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
6
7 Transfer 2.00ml from CH2Cl2[1] (CH2Cl2) to Reaktionsblock[18-48] using MeOH4
8 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
9 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)
10
11 Repeat from step 3, 1 times
12 Empty Reaktionsblock for 2.0000 hour(s)
13
14 Return
```

Abspaltung

```
1 REM Abspaltung
2
3 Empty Abspaltblock for 5.0000 hour(s)
4 Transfer 80ul from Aminosaeuren[36] (TIPS) to Abspaltblock[18-48] using MeOH4
5 Transfer 2.00ml from Abspaltlösung[1] (TFA) to Abspaltblock[18-48] using MeOH4
6 Mix for 3.00 hours at 600 rpm(s)
7 Empty Abspaltblock for 5.000 minute(s)
8
9 Transfer 40ul from Aminosaeuren[36] (TIPS) to Abspaltblock[18-48] using MeOH4
10 Transfer 1.00ml from Abspaltlösung[1] (TFA) to Abspaltblock[18-48] using MeOH4
11 Mix for 3.00 hours at 600 rpm(s)
12 Empty Abspaltblock for 5.000 minute(s)
13
14 Transfer 500ul from Abspaltlösung[1] (TFA) to Abspaltblock[18-48] using MeOH4
15 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
16 Empty Abspaltblock for 5.000 minute(s)
17 Repeat from step 14, 1 times
18 Empty Abspaltblock for 1.0000 hour(s)
```

Aminosäuresequenzen

```
18 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Chg-RESIN
19 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Cha-RESIN
20 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-2-Ahx-RESIN
21 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-t-Leu-RESIN
22 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-MO2-Pro-Leu-RESIN
23 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Hse-Pro-Leu-RESIN
24 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Ala-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
25 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-D-Ala-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
26 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Aib-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
27 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Pro-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
28 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Cha-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
29 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Chg-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
30 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -2-Ahx-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
31 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Ile-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
32 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -t-Leu-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
33 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Acp-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
34 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Arg(Pbf) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
35 Asn(Trt) -Met-Trp(Boc) -Ser(But) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
36 Asn(Trt) -Met-Tyr(But) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
37 Asn(Trt) -Met-Bpa-Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
38 Asn(Trt) -Met-pNF-Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
```

- 39 Asn(Trt) -Met-pCF-Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
- 40 Asn(Trt) -Met-pAF-Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
- 41 Asn(Trt) -Met-OMY-Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
- 42 Asn(Trt) -Met-Hfa-Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
- 43 Asn(Trt) -Met-pFF-Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
- 44 Asn(Trt) -Met-2Nal-Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
- 45 Asn(Trt) -Met-Thi-Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
- 46 Asn(Trt) -Ser(But) -Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) -Pro-Leu-RESIN
- 47 Glu(OBut) -Met-Trp(Boc) -Gln(Trt) -Lys(Boc) -Val-Gly-Thr(But) - Pro-Leu-RESIN
- 48 Leu-Pro-Thr(But) -Gly-Val-Lys(Boc) -Gln(Trt) -Trp(Boc) -Met-Asn(Trt) -RESIN

STD-NMR-Pulsprogramme

1D-STD-Spektrum mit WATERGATE-Lösungsmittelunterdrückung

```
;std19sp
;M. Mayer; B. Meyer, Department of Chemistry
;University of Hamburg, Germany
;email: bernd_meyer@sgil.chemie.uni-hamburg.de
;avance-version
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
;frequency alternates after every scan, defined by fqllist
;water suppression by watergate, use p3919gp to optimize parameters
;define 1H on channel f2 in edasp
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
```

```
1 ze
2 20u pl1:f1
   d7 fq1:f2
3 pl1:sp1:f2
   d11
   lo to 3 times l7
   p1 ph1
   50u UNBLKGRAD
   p16:gp1
   d16 pl18:f1
   p28*0.231 ph3
   d19*2
   p28*0.692 ph3
   d19*2
   p28*1.462 ph3
   d19*2
   p28*1.462 ph4
   d19*2
   p28*0.692 ph4
   d19*2
   p0*0.231 ph4
   46u
   p16:gp2
   d16
   4u BLKGRAD
   go=2 ph31
   wr #0
exit

ph1=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 0 2 2
```

```
;*****Power Level*****
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate 12dB)
```

```

;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse
;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand
;
;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
;          use for fine adjustment
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;
;*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if necessary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;      d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;      d19 should be around 150-220 usec.
;
;
;presaturation = (p11 + d11) * 17 (presaturation should be around 2 sec)
;
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
;      0 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ)
;      on frequency list f1.
;NS = 16*n
;DS = 16
;use gradient ratio      gp1      :      gp2
;                        20        :      20

```

1D-STD-Spektrum mit WATERGATE und *Spin Lock*

```

;std19slsp
;M. Mayer; B. Meyer, Department of Chemistry
;University of Hamburg, Germany
;email: bernd_meyer@sgil.chemie.uni-hamburg.de
;avance-version
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
;frequency alternates after every scan, defined by fqllist
;spin lock for protein suppression
;water suppression by watergate, use p3919gp to optimize parameters
;define 1H on channel f2 in edasp

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

1 ze
2 20u p11:f1
  d7 fq1:f2
3 p11:sp1:f2
  d11
  lo to 3 times 17
  p1 ph1
  20u p110:f1
  p10 ph2
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 p118:f1
  p28*0.231 ph3
  d19*2
  p28*0.692 ph3
  d19*2
  p28*1.462 ph3

```

```

d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p0*0.231 ph4
46u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
wr #0
exit

ph1=0 2
ph2=1 3
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 0 2 2

;*****Power Level*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate 12dB)
;p110 : f1 channel - power level for spin lock pulse (10-15 dB)
;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse
;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand
;
;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
;      use for fine adjustment
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;p10 : f1 channel - spin lock pulse for protein suppr. (10-30 ms, depending on the protein)
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;
;*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if necessary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;      d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;      d19 should be around 150-220 usec.
;
;
;presaturation = (p11 + d11) * 17 (presaturation should be around 2 sec)
;
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
;      0 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(XXX HZ)
;      on frequency list f1.
;NS = 16*n
;DS = 16
;use gradient ratio      gp1      :      gp2
;                        20        20

```

2D-STD-TOCSY-Spektrum mit WATERGATE

```

;std19mlev2f
;O. Schuster, M. Mayer, B. Meyer, Department of Chemistry
;University of Hamburg, Germany
;email: bernd_meyer@sgil.chemie.uni-hamburg.de
;avance-version

```

```

;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence
;for mixing
;using two power levels for excitation and spinlock
;writing two files with dslist, subtraction of processed data only
;presat with shaped pulse defined by frequency list f1
;phase sensitive using TPPI
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

"p5=p6*.667"
"p7=p6*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=3u"

1 ze
  3u fql:f2
2 d11
3 d7 pl1:f1
4 pl1:sp1:f2
  d14
  lo to 4 times l7
  pl ph1
  d0
  d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
5 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
  lo to 5 times l1
  (p17 ph26)
50u UNBLKGRAD
p16:gpl
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*1.462 ph5
d19*2
p28*0.692 ph5

```

```

d19*2
p0*0.231 ph5
46u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d9 wr #1 if #1 zd fq1:f2
goto 7
6 d11
7 d7 p11:f1
8 p11:sp1:f2
d14
lo to 8 times l7
p1 ph1
d0
d12 p110:f1
(p17 ph26)
9 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p5 ph23)
lo to 9 times l1
(p17 ph26)
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 p118:f1
p28*0.231 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*1.462 ph5
d19*2
p28*0.692 ph5
d19*2
p0*0.231 ph5
46u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=6 ph31
d9 wr #2 if #2 id0 ip1 zd fq1:f2
lo to 3 times tdl
exit

ph1=0 2
ph4=0 0 1 1 2 2 3 3
ph5=2 2 3 3 0 0 1 1
ph22=3
ph23=0

```

```

ph24=1
ph25=2
ph26=0
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0

;*****Power Level*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p118 : f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;sp1 : f2 - channel shaped pulse power level 50 -60 dB
;
;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p5 : f1 channel - 60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1msec]
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;p11: shaped pulse [50 msec]
;
;*****Delays*****
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec ]
;d9 : delay for relaxation between frequency switch [min 30 msec]
;d7 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec ]
;d12: delay for power switching [20 usec ]
;d13: short delay [3 usec ]
;d14: delay between presat pulses [1 msec ]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [ 200 u ]
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;L1: loop for MLEV cycle: ((p6*64) + p5) * l1) + (p17*2) = mixing time
;l7: loop counter, (d14 + p11) * l7 = presaturation time
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
; 0 499.87000 on resonance (xxxHZ) off resonance (20000HZ)
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 20 : 20

```

Literaturverzeichnis

- [1] UNAIDS. Report on the global HIV/AIDS epidemic. (2002).
- [2] UNAIDS. AIDS Epidemic Update December 2002. (2002).
- [3] F. Barre-Sinoussi, J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**:868–71, (1983).
- [4] R. C. Gallo, S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, **224**:500–3, (1984).
- [5] L. E. Henderson and L. O. Arthur. Defeating AIDS: What will it take? *Scientific American*, **279**:61, (1998).
- [6] B. G. Turner and M. F. Summers. Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.*, **285**:1–32, (1999).
- [7] R. Wyatt, P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson, and J. G. Sodroski. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*, **393**:705–11, (1998).
- [8] A. S. Perelson, A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard, and D. D. Ho. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, **271**:1582–6, (1996).
- [9] D. Klatzmann, E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, **312**:767–8, (1984).
- [10] P. J. Maddon, A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*, **47**:333–48, (1986).

- [11] Y. Feng, C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, **272**:872–7, (1996).
- [12] G. Alkhatib, C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, **272**:1955–8, (1996).
- [13] K. Bowers, C. Pitcher, and M. Marsh. CD4: a co-receptor in the immune response and HIV infection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**:871–5, (1997).
- [14] R. Horuk. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol. Today*, **20**:89–94, (1999).
- [15] J. G. Bartlett and R. D. Moore. Improving HIV therapy. *Sci. Am.*, **279**:84–7, 89, (1998).
- [16] Jr. Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Current Biology. Garland, London, 5th edition, 2001.
- [17] D. V. Havlir and D. D. Richman. Viral dynamics of HIV: implications for drug development and therapeutic strategies. *Ann. Intern. Med.*, **124**:984–94, (1996).
- [18] S. Haggerty and M. Stevenson. Predominance of distinct viral genotypes in brain and lymph node compartments of HIV-1-infected individuals. *Viral. Immunol.*, **4**:123–31, (1991).
- [19] T. Zhu, N. Wang, A. Carr, D. S. Nam, R. Moor-Jankowski, D. A. Cooper, and D. D. Ho. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J. Virol.*, **70**:3098–107, (1996).
- [20] Robert Koch Institut Berlin. Merkblatt für Ärzte, Die HIV-Infektion (AIDS), <http://www.rki.de/GESUND/MBL/MBL.HTM?HIV.HTM&1>, 2000.
- [21] D. D. Richman. HIV chemotherapy. *Nature*, **410**:995–1001, (2001).
- [22] H. F. Günthard, S. D. Frost, A. J. Leigh-Brown, C. C. Ignacio, K. Kee, A. S. Perelson, C. A. Spina, D. V. Havlir, M. Hezareh, D. J. Looney, D. D. Richman, and J. K. Wong. Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy. *J. Virol.*, **73**:9404–12, (1999).
- [23] J. K. Rockstroh. Antiretroviral therapy of HIV-infections. *Pharm. Unserer Zeit*, **29**:284–96, (2000).
- [24] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Paul J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **23**:3–25, (1997).

- [25] J. M. Kilby, S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag. 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).
- [26] Trimeris Inc. Information on *Fuzeon*, <http://www.trimeris.com/pipeline/t-20.html>, 2002.
- [27] L. M. Mansky and H. M. Temin. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.*, **69**:5087–94, (1995).
- [28] S. Modrow and D. Falke. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 1st edition, 1997.
- [29] R. F. Siliciano. Latency and reservoirs for HIV-1. *Aids*, **13**:S49–58, (1999).
- [30] J. P. Moore and M. Stevenson. New targets for inhibitors of HIV-1 replication. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **1**:40–9, (2000).
- [31] F. Lori, M. G. Lewis, J. Xu, G. Varga, Jr. Zinn, D. E., C. Crabbs, W. Wagner, J. Greenhouse, P. Silvera, J. Yalley-Ogunro, C. Tinelli, and J. Lisiewicz. Control of SIV rebound through structured treatment interruptions during early infection. *Science*, **290**:1591–3, (2000).
- [32] VaxGen Inc. Brisbane CA. Presseerklärung zur Phase III Studie des Impfstoffs AIDSVAX, <http://www.vaxgen.com/pressroom/index.html>, 2003.
- [33] P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, **393**:648–59, (1998).
- [34] R. L. Brady and A. N. Barclay. The structure of CD4. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **205**:1–18, (1996).
- [35] A. Bernhard, L. Boumsell, J. Dausset, C. Milstein, and S. F. Schlossman. *Leucocyte Typing*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1984.
- [36] J. H. Wang, R. Meijers, Y. Xiong, J. H. Liu, T. Sakihama, R. Zhang, A. Joachimiak, and E. L. Reinherz. Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:10799–804, (2001).
- [37] D. S. Dimitrov, X. Xiao, D. J. Chabot, and C. C. Broder. HIV coreceptors. *J. Membr. Biol.*, **166**:75–90, (1998).
- [38] C. Cheng-Mayer, D. Seto, M. Tateno, and J. A. Levy. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science*, **240**:80–2, (1988).

- [39] G. Scarlatti, E. Tresoldi, A. Bjorndal, R. Fredriksson, C. Colognesi, H. K. Deng, M. S. Malnati, A. Plebani, A. G. Siccardi, D. R. Littman, E. M. Fenyo, and P. Lusso. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat. Med.*, **3**:1259–65, (1997).
- [40] P. M. Murphy, M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim, and C. A. Power. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, **52**:145–76, (2000).
- [41] S. Polzer. *Bedeutung von N-Glycanen im V3-Bereich des HIV-1 Hüllproteins gp120 für die Korezeptor-nutzung und Neutralisierbarkeit von HIV-1*. Ph.d, Universität Hamburg, 2002.
- [42] L. A. Lasky, G. Nakamura, D. H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, and D. J. Capon. 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).
- [43] S. M. Schnittman, H. C. Lane, J. Roth, A. Burrows, T. M. Folks, J. H. Kehrl, S. Koenig, P. Berman, and A. S. Fauci. Characterization of GP120 binding to CD4 and an assay that measures ability of sera to inhibit this binding. *J. Immunol.*, **141**:4181–6, (1988).
- [44] P. B. Fischer, M. Collin, G. B. Karlsson, W. James, T. D. Butters, S. J. Davis, S. Gordon, R. A. Dwek, and F. M. Platt. The alpha-glucosidase inhibitor N-butyldeoxynojirimycin inhibits human immunodeficiency virus entry at the level of post-CD4 binding. *J. Virol.*, **69**:5791–7, (1995).
- [45] D. G. Myszka, R. W. Sweet, P. Hensley, M. Brigham-Burke, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, R. Wyatt, J. Sodroski, and M. L. Doyle. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:9026–31, (2000).
- [46] R. Wyatt and J. Sodroski. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, **280**:1884–8, (1998).
- [47] J. P. Moore, J. A. McKeating, R. A. Weiss, and Q. J. Sattentau. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science*, **250**:1139–42, (1990).
- [48] T. K. Hart, R. Kirsh, H. Ellens, R. W. Sweet, D. M. Lambert, Jr. Petteway, S. R., J. Leary, and P. J. Bugelski. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:2189–93, (1991).
- [49] D. C. Chan and P. S. Kim. HIV entry and its inhibition. *Cell*, **93**:681–4, (1998).
- [50] R. A. Furuta, C. T. Wild, Y. Weng, and C. D. Weiss. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.*, **5**:276–9, (1998).
- [51] M. J. Root, M. S. Kay, and P. S. Kim. Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science*, **291**:884–8, (2001).

- [52] D. H. Smith, R. A. Byrn, S. A. Marsters, T. Gregory, J. E. Groopman, and D. J. Capon. Blocking of HIV-1 infectivity by a soluble, secreted form of the CD4 antigen. *Science*, **238**:1704–7, (1987).
- [53] A. Trauneker, W. Luke, and K. Karjalainen. Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1. *Nature*, **331**:84–6, (1988).
- [54] J. O. Kahn, J. D. Allan, T. L. Hodges, L. D. Kaplan, C. J. Arri, H. F. Fitch, A. E. Izu, J. Mordenti, J. E. Sherwin, J. E. Groopman, and et al. The safety and pharmacokinetics of recombinant soluble CD4 (rCD4) in subjects with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS- related complex. A phase 1 study. *Ann. Intern. Med.*, **112**:254–61, (1990).
- [55] E. S. Daar, X. L. Li, T. Moudgil, and D. D. Ho. High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:6574–8, (1990).
- [56] G. P. Allaway, K. L. Davis-Bruno, G. A. Beaudry, E. B. Garcia, E. L. Wong, A. M. Ryder, K. W. Hasel, M. C. Gauduin, R. A. Koup, J. S. McDougal, and et al. Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **11**:533–9, (1995).
- [57] J. M. Jacobson, I. Lowy, C. V. Fletcher, T. J. O'Neill, D. N. Tran, T. J. Ketas, A. Trkola, M. E. Klotman, P. J. Maddon, W. C. Olson, and R. J. Israel. Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV- infected adults. *J. Infect. Dis.*, **182**:326–9, (2000).
- [58] C. Li, C. S. Dowd, W. Zhang, and I. M. Chaiken. Phage randomization in a charybdotoxin scaffold leads to CD4-mimetic recognition motifs that bind HIV-1 envelope through non-aromatic sequences. *J. Pept. Res.*, **57**:507–18, (2001).
- [59] C. Vita, E. Drakopoulou, J. Vizzavona, S. Rochette, L. Martin, A. Menez, C. Roumestand, Y. S. Yang, L. Ylisastigui, A. Benjouad, and J. C. Gluckman. Rational engineering of a miniprotein that reproduces the core of the CD4 site interacting with HIV-1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:13091–6, (1999).
- [60] P. Kolchinsky, T. Mirzabekov, M. Farzan, E. Kiprilov, M. Cayabyab, L. J. Mooney, H. Choe, and J. Sodroski. Adaptation of a CCR5-using, primary human immunodeficiency virus type 1 isolate for CD4-independent replication. *J. Virol.*, **73**:8120–6, (1999).
- [61] T. L. Hoffman, C. C. LaBranche, W. Zhang, G. Canziani, J. Robinson, I. Chaiken, J. A. Hoxie, and R. W. Doms. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:6359–64, (1999).

- [62] M. J. Endres, P. R. Clapham, M. Marsh, M. Ahuja, J. D. Turner, A. McKnight, J. F. Thomas, B. Stoeckenau-Haggarty, S. Choe, P. J. Vance, T. N. Wells, C. A. Power, S. S. Sutterwala, R. W. Doms, N. R. Landau, and J. A. Hoxie. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell*, **87**:745–56, (1996).
- [63] K. A. Reimann, W. Lin, S. Bixler, B. Browning, B. N. Ehrenfels, J. Lucci, K. Miatkowski, D. Olson, T. H. Parish, M. D. Rosa, F. B. Oleson, Y. M. Hsu, E. A. Padlan, N. L. Letvin, and L. C. Burkly. A humanized form of a CD4-specific monoclonal antibody exhibits decreased antigenicity and prolonged plasma half-life in rhesus monkeys while retaining its unique biological and antiviral properties. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **13**:933–43, (1997).
- [64] F. Cocchi, A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, and P. Lusso. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV- suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, **270**:1811–5, (1995).
- [65] C. C. Bleul, M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, and T. A. Springer. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, **382**:829–33, (1996).
- [66] D. Schols, S. Struyf, J. Van Damme, J. A. Este, G. Henson, and E. De Clercq. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J. Exp. Med.*, **186**:1383–8, (1997).
- [67] T. Murakami, T. Y. Zhang, Y. Koyanagi, Y. Tanaka, J. Kim, Y. Suzuki, S. Minoguchi, H. Tamamura, M. Waki, A. Matsumoto, N. Fujii, H. Shida, J. A. Hoxie, S. C. Peiper, and N. Yamamoto. Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.*, **73**:7489–96, (1999).
- [68] B. J. Doranz, K. Grovit-Ferbas, M. P. Sharron, S. H. Mao, M. B. Goetz, E. S. Daar, R. W. Doms, and W. A. O'Brien. A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J. Exp. Med.*, **186**:1395–400, (1997).
- [69] M. Baba, O. Nishimura, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, Y. Iizawa, M. Shiraishi, Y. Aramaki, K. Okonogi, Y. Ogawa, K. Meguro, and M. Fujino. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:5698–703, (1999).
- [70] W. Weissenhorn, A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. Atomic structure of the ecto-domain from HIV-1 gp41. *Nature*, **387**:426–30, (1997).
- [71] D. C. Chan, D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, **89**:263–73, (1997).
- [72] M. Ferrer, T. M. Kapoor, T. Strassmaier, W. Weissenhorn, J. J. Skehel, D. Oprian, S. L. Schreiber, D. C. Wiley, and S. C. Harrison. Selection of gp41-mediated HIV-1 cell entry inhibitors from biased combinatorial libraries of non-natural binding elements. *Nat. Struct. Biol.*, **6**:953–60, (1999).

- [73] D. M. Eckert, V. N. Malashkevich, L. H. Hong, P. A. Carr, and P. S. Kim. Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell*, **99**:103–15, (1999).
- [74] J. Wülfken. *Entwicklung CD4-bindender Peptide als Inhibitoren der HIV-Infektion*. Ph.d., Universität Hamburg, 2001.
- [75] M. Mayer and B. Meyer. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**:1784–1788, (1999).
- [76] J. Klein, R. Meinecke, M. Mayer, and B. Meyer. Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**:5336–5337, (1999).
- [77] M. Mayer and B. Meyer. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**:6108–6117, (2001).
- [78] R. Meinecke and B. Meyer. Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin α Ibb3. *J. Med. Chem.*, **44**:3059–65, (2001).
- [79] H. Möller, N. Serttas, H. Paulsen, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, and B. Meyer. NMR-based determination of the binding epitope and conformational analysis of MUC-1 glycopeptides and peptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3. *Eur. J. Biochem.*, **269**:1444–55, (2002).
- [80] B. Meyer and T. Peters. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**:864–90, (2003).
- [81] V. Jayalakshmi and N.R. Krishna. Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCE-MA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J. Magn. Reson.*, **155**:106–118, (2002).
- [82] B. Meyer. Dependence of the STD effect on kinetic constants of the binding reaction and on NMR relaxation parameters. *unveröffentlichte Ergebnisse*, (2003).
- [83] H.-J. Böhm, G. Klebe, and H. Kubinyi. *Wirkstoffdesign. Der Weg zum Arzneimittel*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996.
- [84] J. Gao and D. G. Truhlar. Quantum mechanical methods for enzyme kinetics. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **53**:467–505, (2002).
- [85] P. J. Goodford. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.*, **28**:849–57, (1985).
- [86] I. D. Kuntz, J. M. Blaney, S. J. Oatley, R. Langridge, and T. E. Ferrin. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.*, **161**:269–88, (1982).

- [87] Sybyl, Receptor-based Design, Flexidock, Tripos Inc., St. Louis, MO, USA, 1999.
- [88] Sybyl, Force Field, Tripos Inc., St. Louis, MO, USA, 1999.
- [89] R. Judson, editor. *Genetic Algorithms and Their Use in Chemistry*, volume 10 of *Reviews in Computational Chemistry*. Wiley-VCH, New York, 1997.
- [90] R. B. Merrifield. Peptide synthesis on a solid polymer. *Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **21**:412, (1962).
- [91] T. Turbadar. Complete absorption of light by thin metal films. *Proc. Phy. Soc.*, **73**:40–44, (1959).
- [92] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, and C. Urbaniczky. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Colloid and Interface Science.*, **143**:513–526, (1991).
- [93] H. Wu, D. G. Myszka, S. W. Tendian, C. G. Brouillette, R. W. Sweet, I. M. Chaiken, and W. A. Hendrickson. Kinetic and structural analysis of mutant CD4 receptors that are defective in HIV gp120 binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:15030–5, (1996).
- [94] C. Pinilla, J. R. Appel, P. Blanc, and R. A. Houghten. Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. *Biotechniques*, **13**:901–5, (1992).
- [95] F. Ni. Recent developments in transferred NOE methods. *Prog. NMR Spectrosc.*, **26**:517–606, (1994).
- [96] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, and S. W. Fesik. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science*, **274**:1531–4, (1996).
- [97] T. P. Garrett, J. Wang, Y. Yan, J. Liu, and S. C. Harrison. Refinement and analysis of the structure of the first two domains of human CD4. *J. Mol. Biol.*, **234**:763–78, (1993).
- [98] S. E. Ryu, A. Truneh, R. W. Sweet, and W. A. Hendrickson. Structures of an HIV and MHC binding fragment from human CD4 as refined in two crystal lattices. *Structure*, **2**:59–74, (1994).
- [99] H. Wu, P. D. Kwong, and W. A. Hendrickson. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature*, **387**:527–30, (1997).
- [100] J. Gasteiger and M. Marsili. Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity - A Rapid Access to Atomic Charges. *Tetrahedron*, **36**:3219–3228, (1980).
- [101] M. Clark, R.D. Cramer, and N. Van Opdenbosch. Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Force Field. *J. Comp. Chem.*, **10**:982–1012, (1989).
- [102] N. A. Sole and G. Barany. Optimization of solid-phase synthesis of [Ala8]-dynorphin A1-3. *J. Org. Chem.*, **57**:5399–5403, (1992).

- [103] J. L. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. W. Hilbers, R. Kaptein, B. D. Sykes, P. E. Wright, and K. Wuthrich. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the Standardization of Data Bases of Protein and Nucleic Acid Structures Determined by NMR Spectroscopy. *J. Biomol. NMR*, **12**:1–23, (1998).

Lebenslauf

geboren am 8. Juli 1972 in Wedel / Holstein

Ausbildung

- | | |
|-----------------|---|
| 1979 - 1983 | Grundschule Iserbarg, Hamburg |
| 1983 - 1992 | Gymnasium Rissen, Hamburg, Abitur: Juni 1992 |
| 1990 - 1993 | Parallelausbildung zum Chemisch-Technischen-Assistenten am Gymnasium Altona und an der Gewerbeschule G13 in Bergedorf |
| 2.1993 - 3.1994 | Zivildienst |
| 1994 - 1996 | Grundstudium der Chemie an der Universität Hamburg, Vordiplom: April 1996 |
| 1996 - 1998 | Hauptstudium der Chemie an der Universität Hamburg, Diplom: Juni 1998 |
| 2. - 5.1997 | Erasmussemester an der University of Newcastle-upon-Tyne |
| 8.1998 - 3.1999 | Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, betreut durch Prof. Dr. B. Meyer. Thema: <i>Bindungsstudien am monoklonalen Antikörper SM3 mit MUC1-Peptiden und Glycopeptiden.</i> |
| 4.1999 - 3.2003 | Dissertation bei Prof. Dr. B. Meyer. Thema: <i>NMR-gestütztes Design neuer anti HIV-Wirkstoffe: Synthese, Struktur und Bindung von Peptidmimetika als Inhibitoren der GP120/CD4 Interaktion.</i> |

Stipendien

4. - 9.1999 Vollmitglied im Graduiertenkolleg 464 - *Glycoconjugate: Darstellung, Analyse, Struktur und Funktion*, danach assoziiertes Mitglied
- 10.1999 - 9.2001 Doktorandenstipendium des Fonds der Chemischen Industrie

Veröffentlichungen

Artikel in Fachzeitschriften

H. Möller, N. Serttas, H. Paulsen, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou und B. Meyer, NMR-based determination of the binding epitope and conformational analysis of MUC-1 glycopeptides and peptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3, *Eur. J. Biochem.* 2002, **269**, 1444-1455.

H. Möller, J. Wülfken, A. Neffe und B. Meyer, STD-NMR-based design of novel HIV-entry inhibitors, *in Vorbereitung*

C. Deschermeier, H. Möller, M. Mayer, B. Meyer and G. W. Mayr, Refinement of active site mapping for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase by a novel combination of site directed mutagenesis and saturation transfer difference (STD) NMR studies, *in Vorbereitung*

Vorträge

H. Möller, N. Öztürk, H. Paulsen, J. Taylor-Papadimitriou, M. Mayer und B. Meyer, Epitope mapping and conformational analysis of MUC1 peptides and glycopeptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3, *6th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins*, Cambridge, UK, 2000

Heiko Möller, J. Wülfken, B. Schulte, A. Coksezen und B. Meyer, Optimierung von Entry-Inhibitoren zur Verhinderung der HIV-Infektion, *2nd Symposium on Interdisciplinary Nanoscience*, Hamburg, 2001

- Posterpräsentationen H. Möller, N. Öztürk, H. Paulsen, J. Taylor-Papadimitriou, M. Mayer und B. Meyer, Epitope mapping and conformational analysis of MUC1 peptides and glycopeptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3, *Jahrestagung der Fachgruppe magnetische Resonanz der GDCh*, Würzburg, 1999
- H. Möller, N. Öztürk, H. Paulsen, J. Taylor-Papadimitriou, M. Mayer und B. Meyer, Epitope mapping and conformational analysis of MUC1 peptides and glycopeptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3, *6th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins*, Cambridge, UK, 2000
- J. Dojahn, H. Möller, C. Diotel, N. Serttas, H. Paulsen, J. Tayler-Papadimitriou und B. Meyer, 3D-Structure of MUC1 glycopeptides and their binding mode with the monoclonal antibody SM3 by NMR, *20th International Carbohydrate Symposium ICS2000*, Hamburg, 2000
- C. Deschermeier, M. Mayer, H. Möller and G.W. Mayr, B. Meyer, Inositol phosphate binding to inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase: investigation by mutagenesis studies and saturation transfer difference NMR spectroscopy, *20th International Carbohydrate Symposium ICS2000*, Hamburg, 2000
- H. Möller, J. Wülfken, B. Schulte, A Coksezen und B. Meyer, Optimization of CD4-binding peptide mimetics as HIV-entry inhibitors, *2nd International Symposium on Conformational Control of Biomolecular Function of the VW Foundation*, Lübeck, 2001

Anstellungsverhältnisse

- 1996 - 1998 Lehrtätigkeit am Institut für Anorganische Chemie im Rahmen von Tutorien in allgemeiner Chemie für Nebenfachstudenten
- 1998 - 1999 Lehrtätigkeit am Institut für Organische Chemie im Rahmen des Grundpraktikums in organischer Chemie für Medizin- und Zahnmedizin-Studenten
- 10.2001 - 12.2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie

Industriekooperation

11.2000 - 11.2001 Kooperation mit der Bayer AG im Rahmen des Projekts *Screening von Substanzbibliotheken und Detektion niedermolekularer Liganden mit STD-NMR*

11. - 12.2002 STD-NMR-Projekt mit der Lilly Forschung GmbH

Mein Dank gilt

- Meiner Lebensgefährtin Claudia für acht wunderbare Jahre, für große Geduld im Umgang mit meiner Sturheit und für tatkräftige Hilfe beim Fertigstellen dieser Arbeit.
- Werner, Karin und Gisela für liebevolle Unterstützung und Vertrauen.
- Prof. Dr. Hans Paulsen für die Erstellung des Zweitgutachtens und für freundschaftliche Unterstützung seit meiner Diplomarbeit.
- Jan Wülfken für seine hervorragende Dissertation, auf der meine Arbeit aufbauen konnte.
- Moriz Mayer für die geniale Idee mit dem STD-Verfahren.
- Robert Meinecke für Rat und Tat in allen technischen Fragen.
- Frau Dr. Hanne Peters, Dr. Thomas Weimar und Thies Köhli für Tipps, Tricks und Seelsorge am Biacore 3000 in Lübeck.
- Dem gesamten AK Meyer.
- Meinen Schwerpunktpraktikanten Atila Coksezen und Britta Hünnefeld.
- Bernd Lepenies, Anja Rumpelcker und Arnd-Lüder Gaulke, die bei der NMR-Auswertung mitgearbeitet haben.
- Dr. Patrick Ziegel Müller, Dipl. Biol. Wolf Wenthe und Dipl. Chem. Christina Ehlers für die Produktion einiger Chargen des CD4-Rezeptors. Dr. Edzard Spillner und der ganzen Hamburger Biochemie für viele Gele und Rat in Proteinfragen.
- Axel Neffe und Jan Westermann fürs Korrekturlesen.
- Heiko Hünnefeld und Jan Westermann für Hilfe bei Formatierungen.
- So-Young Shin für herrliche Massagen.

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, den 19. März 2003

Heiko Möller