

Kombinatorische Synthese und
Untersuchung von V3-Peptid-
und Glycopeptidbibliotheken
als potentielle HIV Impfstoffe

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jörg Dojahn
aus Rendsburg

2002



Universität Hamburg

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1998 bis November 2002 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. C. Meier, durchgeführt.

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

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen

Tag der letzten Prüfung: 14.02.2003

für Ewald

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Aids.....	10
1.2	Der Erreger	10
1.3	Infektionsmechanismus	12
1.4	Glycoproteine	14
1.5	Das virale Glycoprotein GP120.....	17
1.6	Behandlung der HIV-Infektion.....	20
2	Methoden	22
2.1	Synthese von Peptiden und N-Typ Glycopeptiden.....	22
2.2	Kombinatorische Chemie	28
2.3	Analytik	31
2.3.1	Massenspektrometrie	31
2.3.2	NMR	32
2.4	Surface Plasmon Resonance (SPR)	34
2.4.1	Das SPR-Phänomen und dessen Anwendung	34
2.4.2	SPR mit Zellen.....	37
2.4.3	HI5- und Parentalzellen	38
3	Aufgabenstellung	39
4	Ergebnisse und Diskussion	40
4.1	Gendatenbankrecherche.....	40
4.2	Darstellung des N ^γ -Chitobiosyl-Asparagin-Bausteins 12.....	44
4.3	Synthese von Peptiden und Glycopeptiden als Einzelsubstanzen	44
4.3.1	Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen V3-Peptids 1	46
4.3.2	Synthese des offenkettigen V3-Glycopeptids 2.....	49
4.3.3	Versuch der Zyklisierung des orthogonal StBu-cysteingeschützten nicht glycosylierten V3-Peptids 1	51
4.3.4	Versuch der Zyklisierung des orthogonal tBu-cysteingeschützten Modellpeptids C(tBu)KSGYGFTNAGMQWC(tBu)K 13	53
4.3.5	Synthese der nicht glycosylierten zyklischen V3-Loop 3	53
4.3.6	Synthese der glycosylierten zyklischen V3-Loop 4	55
4.4	NMR-spektroskopische Untersuchungen zu konformativen Differenzen unterschiedlicher V3-Peptide und -Glycopeptide.....	58
4.4.1	Vergleich des offenkettigen V3-Peptids 1 mit dem offenkettigen V3-Glycopeptid 2.....	58
4.4.2	Vergleich des zyklisierten V3-Peptids 3 mit dem zyklisierten V3-Glycopeptid 4.....	60

4.4.3	Vergleich des offenkettigen V3-Glycopeptids 2 mit dem zyklisierten V3-Glycopeptid 4.....	61
4.4.4	Vergleich einer glycosylierten zyklischen V3-Loop (EB1) ¹⁶⁰ mit dem zyklisierten V3-Glycopeptid 4.....	63
4.4.5	Fazit aus den durchgeführten Vergleichen	65
4.5	SPR-Experimente der Peptide und Glycopeptide 1 – 4.....	65
4.5.1	Zellkultur und Zellpräparation von Parental- bzw. HI5-Zellen.....	65
4.5.2	SPR-Bindungsstudien mit Zellen	66
4.6	Synthese von (Glyco)Peptidbibliotheken	70
4.6.1	Untersuchungen zur Bibliothekssynthese nach dem <i>Premix</i> -Verfahren	70
4.6.2	Synthese der nicht glycosylierten zyklischen V3-Bibliothek 5.....	76
4.6.3	Synthese der glycosylierten zyklischen V3-Bibliothek 6.....	79
4.7	SPR-Experimente der Bibliotheken 5 und 6.....	82
4.8	Ausblick.....	84
5	Zusammenfassung	86
6	Summary	89
7	Experimenteller Teil	92
7.1	Allgemeines	92
7.1.1	Präparative HPLC.....	92
7.1.2	MALDI-TOF-MS	92
7.1.3	ESI-LC/MS.....	92
7.1.4	NMR	93
7.1.5	SPR	93
7.1.6	Weitere chromatographische Methoden	93
7.1.7	Verschiedenes	94
7.2	Verwendete Chemikalien	95
7.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Festphasensynthese.....	96
7.3.1	Peptid- und Glycopeptidsynthese	96
7.3.2	Entschützung und Abspaltung des Peptids oder Glycopeptids vom Harz.....	97
7.3.3	Aufarbeitung der (Glyco)Peptide nach der Abspaltung	98
7.4	Synthese von Einzelverbindungen.....	99
7.4.1	Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen V3-Peptids C(StBu)TRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC(StBu) 1	99
7.4.2	Synthese des offenkettigen V3-Glycopeptids C(StBu)TRPNN (β-D-GlcNAc-β-(1-4)-D-GlcNAc)NTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQ AHC(StBu) 2.....	103
7.4.3	Versuch der Zyklisierung des orthogonal StBu-cysteingeschützten V3-Peptids 1.....	106

7.4.4	Versuch zur Zyklisierung des orthogonal tBu-cysteingeschützten Modellpeptids C(tBu)KSGYGFTNAGMQWC(tBu)K 13	106
7.4.5	Synthese der nicht glycosylierten zyklisierten <i>V3-Loop</i> CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC 3.....	107
7.4.6	Synthese der glycosylierten zyklisierten <i>V3-Loop</i> CTRPNN (β -D-GlcNAc- β -(1-4)D-GlcNAc)NTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQ AHC 4	110
7.4.7	Synthese des Peptids IGPGR 14.....	113
7.5	Synthese von Bibliotheken	113
7.5.1	Untersuchungen zur Bibliothekssynthese nach dem <i>Premix</i> -Verfahren	113
7.5.2	Synthese der nicht glycosylierten zyklischen <i>V3</i> -Bibliothek CTRPNNNTRKSI(H,R,P,N)IGPG(R,Q,G)AFY(A,T)TG(D,E)IIGDIRQA HC 5	119
7.5.3	Synthese der glycosylierten zyklischen <i>V3</i> -Bibliothek CTRPNN(β -D-GlcNAc- β -(1-4)-D-GlcNAc)NTRKSI(H,R,P,N)HIGPG(R, Q,G)AFY(A,T)TG(D,E)IIGDIRQAHC 6	121
7.6	SPR-Experimente	124
7.6.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften zu SPR-Messungen	125
7.6.2	SPR-Messungen.....	126
8	Sicherheitshinweise	127
9	Literatur.....	128

Abkürzungen

Aminosäuren

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

Weitere Abkürzungen

1D, 2D	ein-, zweidimensional
AB	<i>antibody</i>
abs	absolutiert
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AS	Aminosäure
AU	Absorptionseinheit
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CCA	α -Cyano-4-hydroxymimtsäure
Chi	Chitobiose
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CV	<i>column volume</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	1,3-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin

DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
E.COSY	<i>exclusive correlation spectroscopy</i>
EA	Ethanolamin
EC	<i>extracellular</i>
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>elektrospray ionisation</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fcn	Flußzelle n mit n = 1, 2, 3 oder 4
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT	Fourier-Transformation
Fuc	Fucose
ges	gesättigt
GHOST	<i>green fluorescent human osteosarcoma</i>
GlcNAc	N-Acetyl-2-amino-2-desoxy-D-glucose
GP	Glycoprotein
GP120	Glycoprotein 120
GP41	Glycoprotein 41
HAART	highly active antiretroviral therapy
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOS	<i>human osteosarcoma</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
Hmb	2-Hydroxy-4-methoxybenzyl
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
HTLV	<i>human T-lymphotrope virus</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
k_a	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
K_A	Gleichgewichtskonstante der Assoziation
k_d	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
K_D	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
M	Molar, mol/L
m/z	Masse/Ladung
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight</i>
Man	Mannose
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

MS	Massenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i>
NaOAc	Natriumacetat
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
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
O _t Bu	<i>tert</i> -Butylester
PAL	<i>peptide amide linker</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>personal computer</i>
PEG	Polyethylenglycol
PND	<i>principal neutralizing domain</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PS	<i>polystyrene support</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
RU	<i>resonance unit</i>
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
ssRNA	<i>single strand RNA</i>
S _t Bu	<i>tert</i> -Butylthio
T	Temperatur
tBoc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TCR	<i>T-cell-receptor</i>
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i>
TIPS	Triisopropylsilan
TM	transmembran
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPPI	<i>time proportional phase increment</i>
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
UHTS	<i>ultra high throughput screening</i>
WATERGATE	<i>water suppression by gradient tailored excitation</i>
WHO	<i>world health organization</i>

1 Einleitung

1.1 Aids

Mit dem Auftreten erster Todesfälle 1981, die im Zusammenhang mit dem vollständigen Zusammenbruch des Immunsystems standen, diagnostizierte man eine neue Krankheit, die heute als erworbene Immunschwäche (AIDS, *acquired immune deficiency syndrome*) bekannt ist. Vom vereinzelt Auftreten in der homosexuellen Szene zu Anfang hat diese Krankheit heute das Ausmaß einer Pandemie mit weltweit 40 Millionen infizierten Menschen erreicht¹. Davon entfallen allein 70% auf den Teil Afrikas südlich der Sahara. Ein wesentlicher Grund für diese Verhältnisse ist zum einen die Ignorierung der Krankheit durch offizielle Stellen und die damit verbundene mangelnde Aufklärung. Zum anderen ist die hohe Sterberate in diesen Ländern bedingt durch deren finanzielle Notlage, die es unmöglich macht, die hohen Kosten für Therapie und Pflege aufzubringen.

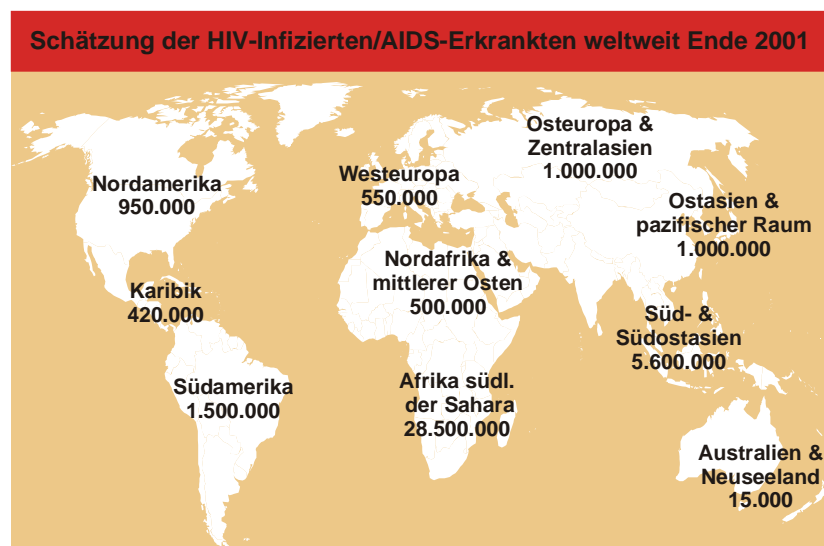


Abbildung 1: Zahl der an AIDS erkrankten bzw. mit HIV infizierten Menschen weltweit (Stand 12/2001)¹.

1.2 Der Erreger

1983 entdeckten Robert Gallo² und Luc Montagnier³ den Erreger für die bis dahin relativ unerforschte Krankheit AIDS. Das dafür verantwortliche HIV (*human immunodeficiency virus*) gehört zu der Familie der Lentiviren, d.h. es besitzt eine ungewöhnlich lange Inkubationszeit von mehreren Jahren. Der überwiegende Teil der HIV-Infektionen ist auf das HIV-1 zurückzuführen. Darüber hinaus gibt es auch das HIV-2, dessen Genom sich zu 40% von dem des HIV-1 unterscheidet. HIV-1 unterteilt sich in die M (*major*)- und

O (*outlier*)-Gruppe. Letztere enthält allerdings nur einige Varianten, die auf bestimmte Regionen Afrikas beschränkt sind.⁴⁻⁶ Die M-Gruppe hingegen ist für das Auftreten von AIDS als Pandemie verantwortlich. Sie läßt sich durch den Vergleich ihrer Genome in neun weitere Subtypen (A-I) unterteilen.⁷⁻¹¹ Bemerkenswert ist das regional vermehrte Auftreten bestimmter Subtypen. Die Subtypen A, C, D und G findet man hauptsächlich in Afrika.¹⁰⁻¹⁴ Der Typ B¹⁵⁻¹⁷ kommt im wesentlichen in Amerika und Europa, E¹⁸⁻²⁰ in Asien und F^{8,9,21} in Brasilien und Rumänien vor.

Die Erbinformation dieses Retrovirus liegt in Form von ssRNA vor. Diese wird durch die viruseigene Reverse Transkriptase in DNA transkribiert. Durch die etwa zehnmal höhere Ungenauigkeit gegenüber vergleichbaren Enzymen entsteht eine ungewöhnlich hohe Mutationsrate, die die Entwicklung eines potenten Impfstoffes oder Medikamentes erschwert. Das Virus ist in mehrere Kompartimente unterteilt. Die äußere Hülle des HIV besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in der sich ca. 72 Trimere des transmembranen Glycoproteins GP41 befinden.²² Jedes GP41 ist nicht kovalent mit einem weiteren Glycoprotein GP120 verbunden.²³ Sie stammen beide aus dem Vorläuferprotein GP160 und werden durch proteolytische Spaltung einer viruseigenen Protease gebildet.^{24,25} Darüber hinaus befinden sich mehrere zelluläre Proteine der Wirtszelle, sogenannte HLA's, in der Virusmembran. Die darunter liegende Schicht besteht aus ca. 2000 Proteinmolekülen P17. Der kegelförmige Kern des Viruspartikels ist aus ungefähr 2000 Molekülen des P24-Capsid Proteins aufgebaut und enthält außer zwei Kopien ssRNA, die durch P7 Nucleocapsid-Proteine stabilisiert werden, zusätzlich die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease.²⁶

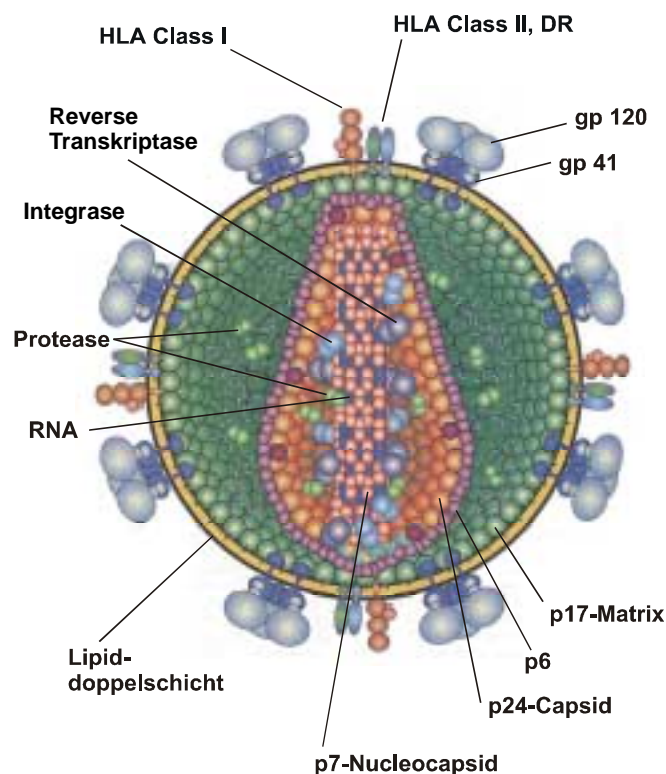
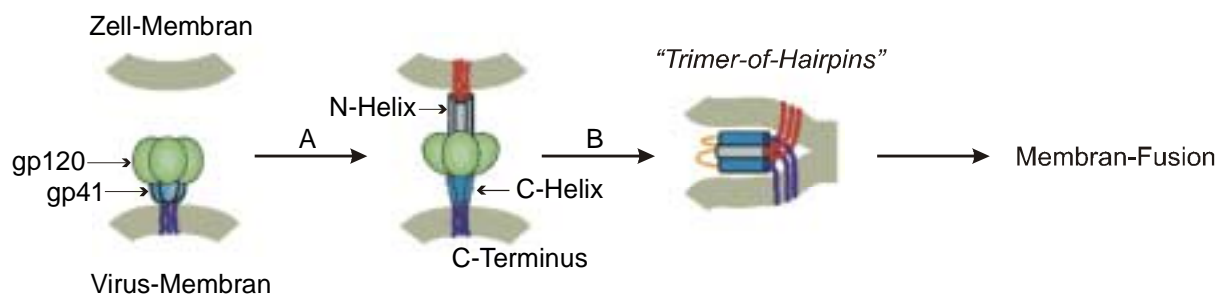


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Virions von HIV-1. Durchmesser: ~ 100 nm.

1.3 Infektionsmechanismus

Das HI-Virus infiziert Lymphozyten. Diese unterteilen sich in zwei Klassen, die B-Zellen und die T-Zellen. Die T-Zellen lassen sich weiter unterteilen in T_H1 -Zellen, T_H2 -Zellen („T-Helferzellen“) und T_C -Zellen (cytotoxischen T-Zellen). Die T_H -Zellen tragen jeweils CD4-Rezeptoren auf ihren Oberflächen, die T_C -Zellen den CD8-Rezeptor. CD4 ist ein stabförmiges 55 kDa Glycoprotein, welches sich aus vier immunglobulinartigen Domänen (D1-D4) zusammensetzt. CD8 ist ein Heterodimer bestehend aus α - und β -Ketten mit immunglobulin-artigen Domänen. CD4 und CD8 haben nur entfernt ähnliche Strukturen, aber eine sehr ähnliche Funktion. T_H1 -Zellen sind für die Aktivierung von infizierten Makrophagen, T_H2 -Zellen für die Aktivierung von B-Zellen verantwortlich.

Der erste Schritt der HIV-Infektion ist die Wechselwirkung zwischen dem CD4 einer Lymphozytenzelle und einem diskontinuierlichen Epitop (siehe 1.5) im GP120 auf der Virusoberfläche.^{27,28} Danach kommt es zu einer Konformationsänderung im GP120, die eine Exposition der V3-Bindungsepitope (siehe 1.5) zur Folge hat und die Bindung an einen Chemokin-Rezeptor ermöglicht.²⁹⁻³⁴ Die Art des Chemokin-Rezeptors hängt vom Typ der infizierten Zelle ab. T-Zellen besitzen CXCR4-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, Makrophagen CCR5-Rezeptoren. Aufgrund dieser Bindungen kommt es zu einer Destabilisierung des GP120-CD4-Komplexes mit der Konsequenz einer Konformationsänderung des gp41, so daß ein hydrophobes "Fusionspeptid" präsentiert wird (siehe Abbildung 3). Dieses Fusionspeptid am N-Terminus des gp41 kann dann in die Zielzellmembran insertieren und es erfolgt die Fusion von Virus- und Zellmembran.³⁵⁻³⁷ Jedes der drei gp41 besitzt zwei helikale Bereiche (N-Helix und C-Helix). Drei N-Helices bilden eine *Coiled-Coil*-Struktur, um die sich die drei C-Helices antiparallel gruppieren und ein Bündel bilden. Diese *Trimer-of-Hairpins* bringt die Membranen zusammen und führt so zur Membranfusion.



- A: Bindung an CD4 und Corezeptor mit Konformationsänderung von gp41.
Das hydrophobe Fusionspeptid (rot) wird freigelegt und insertiert in die Zielmembran.
- B: Gp120 wird abgegeben und es bildet sich ein "Trimer-of-Hairpins".

Abbildung 3: Postulierter Mechanismus der Membranfusion.

Nach der Membranfusion gelangen die Virusproteine und die RNA-Kopien in das Zellinnere. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wird aus der Virus-RNA eine doppelsträngige

DNA-Kopie erstellt. Diese wird dann durch die Integrase in die Zell-DNA inseriert. Die Expression der eingefügten Virus-DNA führt zur Produktion aller zur Erzeugung von neuen Virionen benötigten Bestandteile. Diese schnüren sich aus der Zellmembran ab und können neue Zellen infizieren. Der Virus besitzt also eine Membran, die aus der Zielzelle entstanden ist und daher werden einige Zellproteine (HLA's) auf der Oberfläche präsentiert. Dies erschwert die Erkennung durch das Immunsystem des infizierten Menschen. Der gesamte Vorgang von der Infektion bis zur Erzeugung neuer Virionen ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

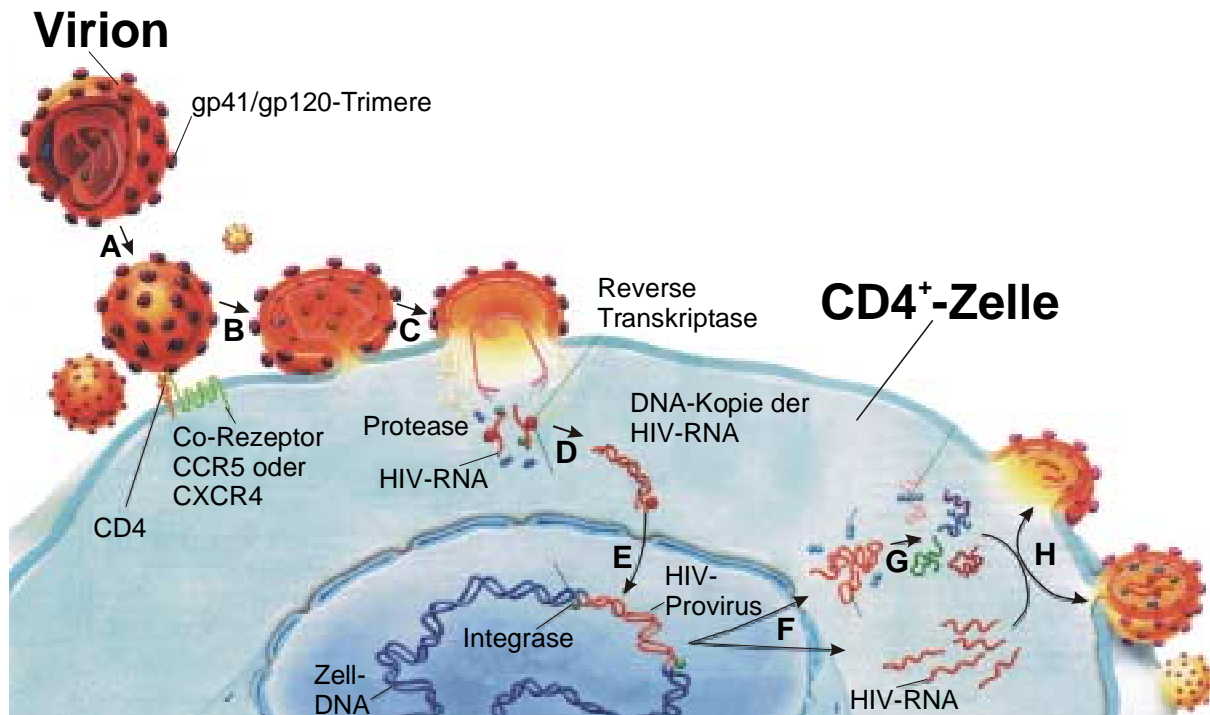


Abbildung 4: Lebenszyklus des HIV. A: Anlagerung des Virions an die CD4⁺-Zelle unter Beteiligung von CD4 und einem Chemokin-Rezeptor (CCR5 oder CXCR4). B: Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran. C: Einbringen der Virus-ssRNA-Kopien, der Reversen Transkriptase und der Protease in die Zelle. D: Transkription der Virus-RNA in doppelsträngige DNA durch die Reverse Transkriptase. E: Insertion der DNA in das Genom der Zelle durch die Integrase. F: Das Provirus wird exprimiert. Es werden virale ssRNA und Virusproteine gebildet. G: Die Protease spaltet ein exprimiertes Virusprotein. H: Aus den Virusproteinen und den ssRNA Kopien entstehen neue Virionen, die sich von der Membran abschnüren.³⁸

Es gibt einige wenige HIV-1, HIV-2 und SIV Isolate, die in der Lage sind, ohne eine vorherige CD4-GP120-Wechselwirkung an Chemokin-Rezeptoren zu binden. Der Mechanismus ist zur Zeit noch weitgehend ungeklärt. Es wird aber vermutet, daß Mutationen³⁹ und ein partieller Verlust an Glycosylierungsstellen^{40,41} innerhalb des GP120 zu einer besseren Präsentation des Chemokin-Rezeptor-Bindungssepitops und damit einer höheren Bindungsaffinität führen, was eine Notwendigkeit des CD4-Proteins überflüssig erscheinen läßt.

Wenn ein HIV CD4⁺-Zellen infiziert, so führt dies zu einer Zerstörung derselben, mit einer Halbwertszeit von weniger als zwei Tagen.⁴²⁻⁴⁴ Aufgrund des Absinkens des CD4-T-Zellen-Titers wird das Immunsystem zunehmend geschwächt und es kommt vermehrt zu opportunistischen Infektionen.

In den ersten Wochen nach einer Infektion steigt der Virus-Titer stark an, die Zahl der CD4-T-Zellen nimmt entsprechend ab. Während dieser Zeit kann es zu grippeähnlichen Symptomen kommen. Nach dieser Zeit bekommt das Immunsystem die Infektion zunächst unter Kontrolle. Es folgt eine Zeit ohne äußere Anzeichen, die auf eine Infektion durch HIV hindeutet, obwohl auch hier eine ständige Interaktion zwischen Infektion, Produktion von Viren und deren Bekämpfung durch das Immunsystem stattfindet. Diese Phase kann einen Zeitraum von 2 bis 15 Jahren in Anspruch nehmen. Sinkt die Zahl der CD4-T-Zellen von einem normalen Wert zwischen 600 bis 1200 Zellen pro μL auf unter 200 pro μL Blut, so spricht man von AIDS. Unbehandelt versterben innerhalb von 15 Jahren etwa zwei Drittel der Patienten an den Folgen ihrer HIV-Infektion.⁴⁵

Die Übertragung findet sowohl durch Sexualkontakt, als auch direkt über die Blut oder Blutprodukte, durch z.B. infektiöse Blutkonserven oder -derivate statt. Weiterhin besteht das Risiko der Infektion prä-, peri- oder postnatal von der infizierten Mutter auf ihr Kind.

1.4 Glycoproteine

Glycoproteine sind bei höheren Zellen eine sehr weit verbreitete Naturstoffklasse. Der Zuckeranteil ist bei ihnen mit dem Proteinanteil kovalent verknüpft. Grundsätzlich kann zwischen zwei Arten von Glycoproteinen unterschieden werden. Bei dem N-Typ ist der Kohlenhydratrest über den Amidstickstoff der Asparaginseitenkette N-glycosidisch gebunden. Bei dem Großteil der O-Typ-Glycoproteine findet die Verknüpfung des Zuckeranteils über das Sauerstoffatom einer Serin- oder Threoninseitenkette statt. Sie treten wesentlich häufiger auf als der N-Typ.⁴⁶

Die N-Typ-Glycoproteine sind modular aufgebaut. Ausgehend von einem einheitlichen Pentasaccharidgrundgerüst, das als *core*-Struktur⁴⁷ bezeichnet wird, befinden sich an deren Ende je nach Organismus und biologischer Funktion weitere Oligosaccharide. In dieser *core*-Struktur sind, wie in Abbildung 5 zu sehen, zwei N-Acetylglucosamine β -glycosidisch miteinander verknüpft. Diese sind wiederum mit einer Mannose β -glycosidisch verbunden, an der sich zwei weitere α -glycosidisch verknüpfte Mannoseeinheiten befinden.

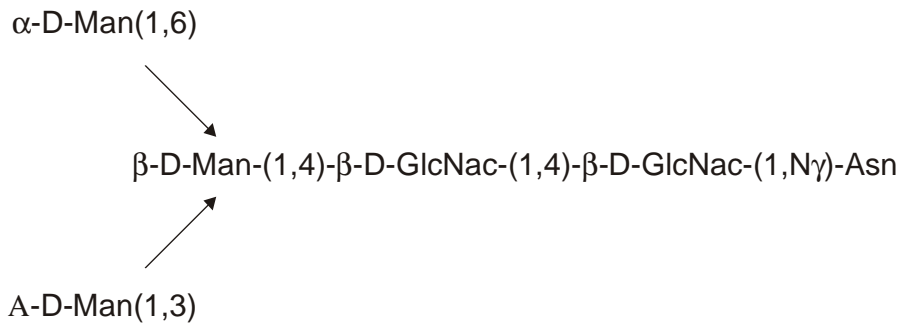


Abbildung 5: Core Struktur eines N-glycosidisch verknüpften Saccharids.

Das weitere Glycosylierungsmuster unterscheidet zwischen drei Haupttypen. Der High-Mannose-Typ, welcher nur in höheren Organismen zu finden ist, enthält mindestens zwei weitere α -glycosidisch gebundene Mannosen. Der Komplex-Typ besitzt je nach Verzweigungsgrad zwei bis sechs Antennen aus (Sialyl-)(Fucosyl-)-Lactosaminresten. Die dritte, als Hybrid-Typ bezeichnete Art, enthält die Strukturmerkmale beider vorangegangener Typen.⁴⁷

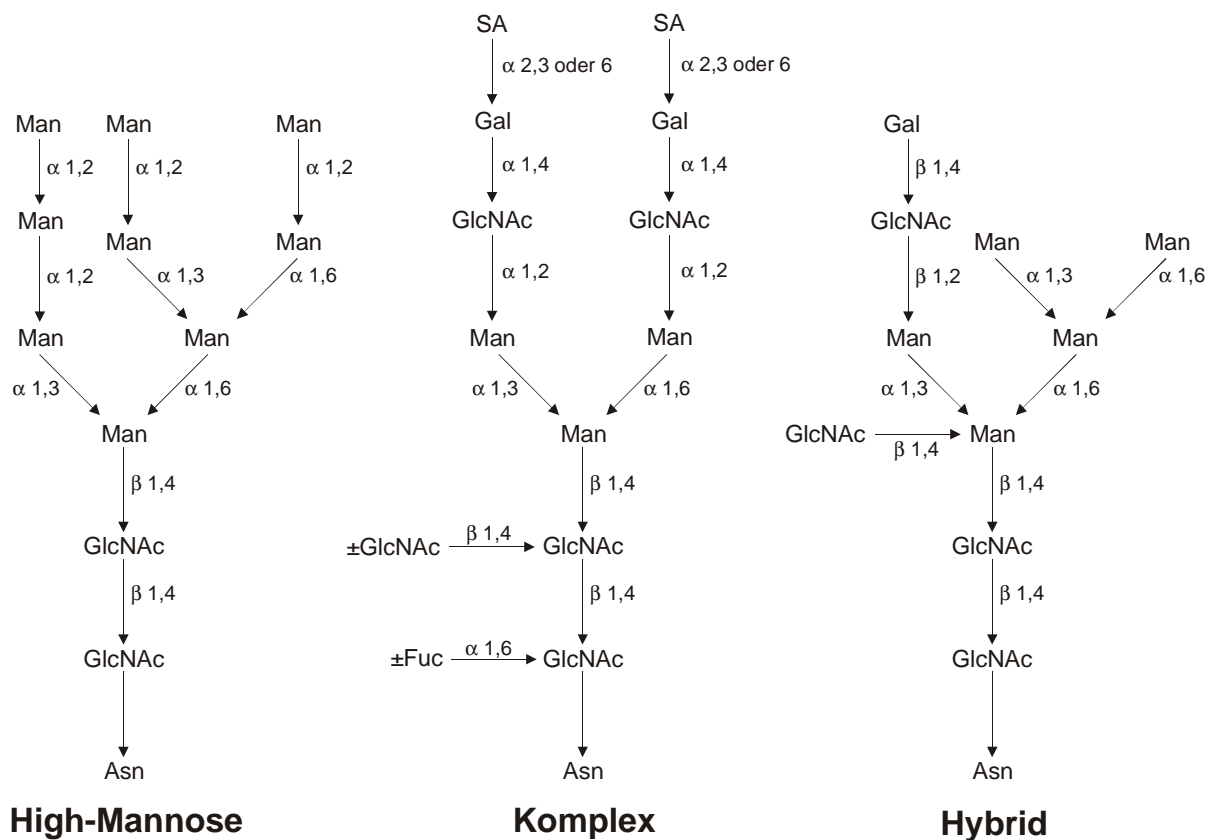


Abbildung 6: Haupttypen der Oligosaccharidstrukturen bei N-Typ Glycoproteinen.

Die Biosynthese der Glycoproteine beginnt im rauhen endoplasmatischen Retikulum durch Übertragung eines an Dolicholphosphat gebundenen Tetradasaccharids auf einen Asparaginrest im ribosomal hergestellten Protein. Damit ein Asparagin glycosyliert werden kann, muß es Teil der Sequenz NXT/S sein, wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann.

Das heißt jedoch nicht, daß alle diese Sequenzen glycosyliert sind. Die entstandenen Vorstufen werden in Vesikeln zur *cis*-Seite des Golgi-Apparates transportiert. In den verschiedenen Kompartimenten des Golgi-Apparates werden durch zahlreiche Enzyme, wie Glycosyltransferasen und Glycosidasen Modifikationen (Prozessierung) vorgenommen, d.h. eine große Vielfalt an unterschiedlichen Glykanen erzeugt. Unvollständige Glycosylierungen und ein Mangel an absoluter Spezifität der Enzyme beim Prozessieren sind im wesentlichen für diese Mikroheterogenität verantwortlich. Daneben spielt auch die dreidimensionale Struktur des Proteinanteils eine Rolle. Die so entstandenen Oligosaccharidseitenketten dienen auch als Erkennungsmerkmale für die abschließende Sortierung in der *trans*-Zisterne des Golgi-Apparates, bevor sie, wiederum in Vesikeln, zu ihren Zielorten transportiert werden.⁴⁸

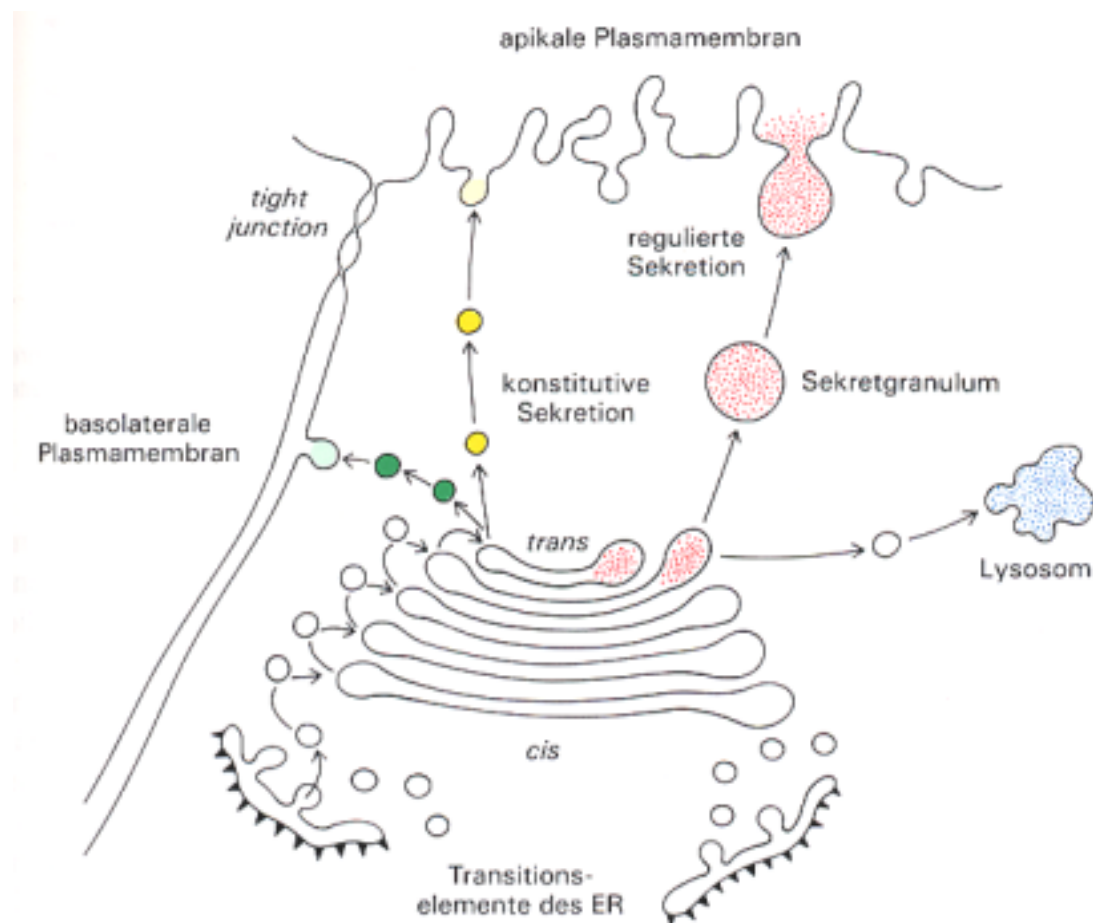


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Glycoproteinbiosynthese.

Während die funktionelle Bedeutung der reinen Kohlenhydrate als Gerüst- und Speicherstoffe sowie die der Proteine als Strukturbildner oder Träger spezifischer Funktionen (z.B. Enzyme) weitgehend aufgeklärt sind, ist die spezielle Funktion der Glycoproteine noch ungeklärt. Verglichen mit anderen Informationsträgern wie Nukleinsäuren oder Proteinen, ist die Menge an Informationen pro Gewichtseinheit bei Kohlenhydraten sehr viel größer. Dieses Potential an struktureller Diversität kommt durch die vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten der

unterschiedlichen Monosaccharide zustande. Diese macht sie zu den effizientesten Informationsträgern und läßt vermuten, daß ihnen eine vielfältige Bedeutung zukommt. Gesichert ist u.a. ihr großer Einfluß bei zellulären Erkennungsprozessen.^{49,50}

Die Theorie, daß Zellen über komplementäre Saccharidstrukturen miteinander wechselwirken, wurde zwar schon lange diskutiert, setzte sich aber erst mit Entdeckung der Glycokalix langsam durch.⁵⁰ Zahlreiche Experimente belegen diese These. Adhärenz wachsende Zellen, die durch Einwirkung von Enzymen voneinander getrennt wurden, bilden schon nach kurzer Zeit wieder Aggregate.⁵⁰ Auch ist es Zellen mit Hilfe ihrer Kohlenhydratstrukturen möglich, andere Zellen der eigenen Spezies zu erkennen, wie der Versuch einer Befruchtung von Eizellen mit Spermien derselben und fremder Spezies gezeigt hat.⁵⁰

Die Differenzierung aber auch die Erkrankung von Zellen geht häufig einher mit einer charakteristischen Änderung des Glycosylierungsmusters auf der Zelloberfläche. Bestimmte Tumorzellen verlieren oft einen Großteil ihrer Oligosaccharidstrukturen, was zur Folge hat, daß die Zellen sich aus dem Verband lösen und so Metastasen ausbilden können.⁵¹ Neben der Zellwachstumskontrolle spielen sie auch bei Wechselwirkung mit bioaktiven Molekülen in Regulationskaskaden und Prozessen der Signaltransduktion eine wichtige Rolle.⁵²⁻⁵⁴

Das Immunsystem arbeitet auf der Grundlage der Erkennung von körperfremden Oberflächenstrukturen, wie sie häufig durch Glycoproteine dargestellt werden. Werden spezifische strukturelle Toleranzgrenzen der körpereigenen Strukturen überschritten, so setzt eine Immunabwehr ein.

Kohlenhydrate haben ein hohes Wasserbindungsvermögen. Mucine, deren Zuckeranteil 50 bis 85% der Molmasse ausmacht, können auf diese Weise schleimartige Schutzfilme ausbilden, die die darunterliegenden Zellen vor pathogenen Einflüssen, wie z.B. Keimen oder niedrigen pH-Werten im Verdauungstrakt schützen.⁵⁵

1.5 Das virale Glycoprotein GP120

GP120 und GP41 werden durch eine viruseigene Protease aus dem Vorläuferprotein GP160 gebildet.^{56,57} Das GP120 Glycoprotein ist nicht kovalent an das membranständige Protein GP41 gebunden.⁵⁸ Dieses Heterodimer liegt als Trimer auf der Virusoberfläche vor. Die Molmasse des GP120 beträgt 120 kDa, wovon auf den Kohlenhydratanteil ca. 50% entfallen.⁵⁹ Das GP120 besteht aus fünf hypervariablen *Loops* (V1-V5), die über fünf relativ konservierte Bereiche (C1-C5) miteinander verbunden sind und enthält neun Disulfidbrücken. Darüber hinaus weist es ca. 24 N-Typ Glycosylierungsstellen auf, von denen 13 auf den komplexen und 11 auf den mannosereichen Typ entfallen.⁶⁰ Die hypervariablen Bereiche weisen neben einer replikationsbedingten Varianz in der Aminosäuresequenz auch Deletionen

und Insertionen auf. Dies führt zu Differenzen von bis zu 25% in der Sequenz der verschiedenen HIV-Stämme.

Anhand von Röntgenstrukturdaten^{61,62} wurde festgestellt, daß die für die Bindung an den CD4-Rezeptor verantwortlichen Aminosäuren ein diskontinuierliches Epitop aus verschiedenen Bereichen des Glycoproteins bilden.⁶³

Kürzlich wurde belegt, daß die dritte variable Region des GP120 die Bindung an den CCR5 Corezeptor, der zur Gruppe der Chemokin-Rezeptoren gehört, bewirkt.^{64,65} Die *V3-Loop* enthält in den meisten Fällen 35 Aminosäuren, die durch zwei disulfidbrückenbildende Cysteinreste an N- und C-Terminus abgeschlossen wird. Darüber hinaus gibt es Sequenzen mit Deletionsstellen, aber auch solche mit Insertionen. Sie machen aber nur einen kleinen Teil der Gesamtpopulation aus. Die große Zahl an unterschiedlichen Sequenzen ist durch die relativ hohe Fehlerquote der reversen Transkriptase und der dadurch hohen Mutationsrate bedingt. Bemerkenswert ist jedoch eine kurze hochkonservierte Sequenz innerhalb der *V3-Loop*, die je nach HIV-Subtyp nur etwas variiert.¹¹

HIV-1 Subtyp	Sequenz der PND
A	G P G Q A F
B	G P G R A F
C	G P G Q T F
D	G P G Q A L
E	G P G Q V F

Tabelle 1: Variation der prinzipiell neutralisierenden Domäne je nach HIV-1 Subtyp. Angegeben ist jeweils die am häufigsten vertretene Sequenz.

Sie wird als prinzipiell neutralisierende Domäne (PND) bezeichnet, da die gegen diese Region gebildeten Antikörper in der Lage sind, entsprechende HIV-Stämme zu neutralisieren. Allerdings vermögen sie nicht langfristig vor einer Infektion zu schützen. Trotzdem wird diesem Epitop eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung mit humanen Zellen zugeschrieben, da es maßgeblich an der Bindung an einen der Chemokin-Rezeptoren beteiligt ist.⁶⁶ Inwieweit die flankierenden Aminosäuren hier eine Rolle spielen, ist noch nicht eindeutig geklärt. Antikörper, die gegen Bereiche gebildet wurden, die nicht zur PND-Region gehören, sind nicht in der Lage einen HIV-Stamm zu neutralisieren. Das läßt vermuten, daß sie bei der Bindung an den Corezeptor keine Rolle spielen. NMR-Studien zeigen allerdings eine Wechselwirkung der zur PND benachbarten Aminosäuren mit einem anti-(PND)-Antikörper⁶⁷.

Ein zweiter hochkonservierter Bereich innerhalb der *V3-Loop* befindet sich in der Nähe des N-Terminus, der eine potentielle Glycosylierungsstelle beinhaltet und mit einem Oligosaccharid des komplexen Typs besetzt ist. Die Bedeutung dieses Bereichs für Rezeptorbindung ist ebenfalls noch nicht geklärt.

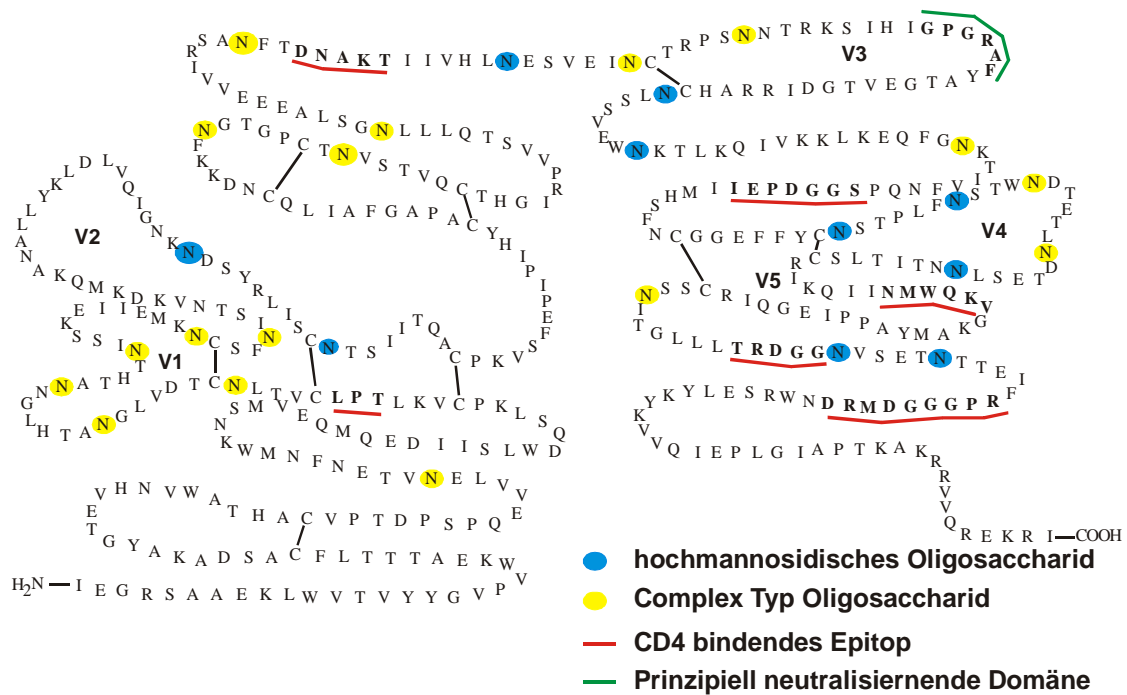


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines GP120 mit potentiellen Glycosylierungsstellen, den hypervariablen *Loops* V1 bis V5, den CD4-Bindungsstellen sowie der prinzipiell neutralisierenden Domäne V3.

Die Aufgabe des Kohlenhydratanteils im GP120 ist immer noch weitgehend umstritten. Während einige Arbeiten die Auffassung vertreten, daß eine Glycosylierung unbedingt erforderlich ist für eine Infektion, schreiben andere ihr nur eine Bedeutung bei der Proteinfaltung zu.⁶⁸ Grundsätzlich läßt sich aber festhalten, daß die Glycosylierungen für den Erhalt und die Ausbildung der Funktion des Proteins notwendig sind. Dies zeigt die Expression in einem nicht glycosylierenden System, welche zu einem Protein führt, das nicht an CD4 bindet.⁶⁹ Andere Arbeiten versuchen diesen Befund wiederum einzuschränken und beschreiben, daß die meisten der N-Typ Glycosylierungen für die virale Infektiosität entbehrlich sind, weil einzelne Mutationen an einem Teil der Glycosylierungsstellen nur einen geringen inhibitorischen Effekt auf die virale Infektiosität besitzen.⁷⁰ Neuere Erkenntnisse haben jedoch gezeigt, daß bei einer Behandlung von humanen, mit HIV-1 infizierten T-Lymphozyten mit Desoxynojirimycin, einem α -Glucosidase I-II Inhibitor, die Vermehrung des Virus behindert wird.⁷¹ Die Bindung zum CD4 findet zwar zunächst statt, aber es erfolgt keine anschließende Membranfusion. Das legt den Schluß einer Interaktion der Oligosaccharide bei der Bindung an den Corezeptor nahe. Darüber hinaus führt die Abspaltung der Neuraminsäuren zu einer reduzierten Produktion an Antikörpern. Bei der Inkubation mit mannosespezifischen Lektinen wird die Infektion von CD4⁺-T-Zellen vollständig verhindert.⁷²

Während die Mehrzahl der Glycosylierungen entbehrlich oder nur einen geringen Einfluß auf Infektiosität haben soll,⁷³ ist der Kohlenhydratanteil in CD4-⁷⁴ oder corezeptorbindenden⁷⁵ Regionen essentiell für eine Bindung. Das Fehlen von drei Glycosylierungen in

CD4-bindenden Regionen führt zu einer verminderten Bindungsstärke.⁷⁴ Ebenso sorgt eine Entfernung der Glycosylierung innerhalb der *V3-Loop* für eine veränderte Infektiosität und beeinflusst auch den Wechsel des Corezeptors.⁷⁶⁻⁷⁸ Vergleicht man die Neutralisationsrate durch anti-V3 und anti-CD4-bindende Antikörper, so ist ein drastischer Anstieg zu verzeichnen, wenn die entsprechenden Glycosylierungen fehlen.^{75,79,80} Dies spricht im Fall einer Glycosylierung für eine Maskierung der Peptidepitope durch den Saccharidteil.

Wie diese Auflistung verschiedener, teils widersprüchlicher Arbeiten zur Aufklärung der Funktion des Kohlenhydrateil im GP120 verdeutlicht, ist noch viel Forschungsarbeit insbesondere im Bereich der Strukturaufklärung und der Bindungsstudien zu leisten. Dafür ist die Synthese von Peptiden und Glycopeptiden, als Einzelverbindungen oder Substanzbibliotheken, unerlässlich.

1.6 Behandlung der HIV-Infektion

Die heute übliche Behandlungsform von HIV-Infektionen ist die antiretrovirale Therapie (HAART, *highly active antiretroviral therapy*). Alle hier eingesetzten Medikamente richten sich gegen die Replikation des Virus, indem sie die Enzyme Reverse Transkriptase und Protease hemmen. Zur Zeit stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung (siehe Tabelle 2), die sich in drei Gruppen einteilen lassen: Die Nukleosid- bzw. Nukleotid-analogen-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI), die Nicht-Nukleosid- bzw. Nicht-Nukleotid-analogen-Reverse-Transkriptase-Hemmer (NNRTI) und die Protease Inhibitoren (PI).⁸¹

Nukleosid analoge Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)	Nicht Nukleosid analoge Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)	Protease-Inhibitoren (PI)
Retrovir (AZT)	Viramune (Nevirapin)	Invirase, Fortovase (Saquinavir)
Videx (ddl)	Efavirenz (Stocrin)	Crixivan (Indinavir)
Hivid (ddC)		Norvir (Ritonavir)
Epivir (3TC)		Viracept (Nelfinavir)
Zerit (d4T)		
Ziagen (Abacavir)		

Tabelle 2: Zur Zeit in der HAART eingesetzte Medikamente (Stand 06/2002).⁸²

Um einer Resistenz des HIV gegen eines dieser Medikamente zuvor zu kommen, werden sie in einer Kombinationstherapie eingesetzt. Mit Hilfe der *HAART* ist jedoch keine Heilung nach einer HIV-Infektion möglich, da durch sie lediglich der Titer an CD4⁺-Zellen zu- und die Zahl der freien Viren im Blut abnimmt. Für den Patienten bedeutet dies eine lebenslange medikamentöse Behandlung mit teilweise starken Nebenwirkungen.

Eine Impfung wäre im Gegensatz zur *HAART* die bessere Alternative, um die zunehmende Ausbreitung von AIDS zu stoppen, da sie eine Infektion grundsätzlich verhindern könnte. Bei den ersten Impfstoff-Strategien wurden genetisch veränderte, nicht pathogene, lebende Viren

einsetzt. Die Infektion von Affen mit einem SI-Virus, in einer nicht pathogenen Form, schützte sie zunächst vor einer Infektion mit dem entsprechenden Wild-Typ des Virus.⁸³ Andere Untersuchungen zeigten jedoch, daß nicht pathogene Stämme durch Mutationen in der Lage waren, ihr pathogenes Potential wieder zu erlangen.⁸⁴ Aufgrund dieser sicherheitsrelevanten Fragestellungen solcher Impfungen und deren Fähigkeit lediglich isolatspezifisch zu immunisieren, stellte man die Bemühungen in dieser Richtung relativ schnell ein.

Der nächste Schritt war die Verwendung von monomerem GP120 oder seiner Peptide als Impfstoff. Relevant für die Verhinderung einer Infektion ist hier die Produktion von neutralisierenden Antikörpern. Sie sind in der Lage im Blut befindliche freie Viren zu neutralisieren, d.h. unschädlich zu machen. Zu den Proteinen, die neutralisierende Antikörper hervorrufen, gehören die CD4 bindende Region und die *V3-Loop* des GP120, das Transmembranprotein GP41 und das Capsidprotein.⁸⁵ Diese Versuche zeigten zunächst aber nur bedingten Schutz vor einer HIV-Infektion. Zwar ist der Impfstoff nicht pathogen, aber die produzierten Antikörper waren nur in der Lage den spezifischen HIV-Stamm, nicht aber ein HIV-1-Isolat zu neutralisieren.^{86,87} Der Nachteil der hohen Spezifität und damit verbundenen geringen oder nicht vorhandenen Kreuzreaktivität von gebildeten Antikörpern, die auf der Immunisierung mit Proteinen oder Peptiden eines HIV-Stammes beruhen, könnte durch eine Impfung mit einem Cocktail an Proteinen/Peptiden verschiedener Subtypen umgangen werden.⁸⁸ Verschiedene Studien bestätigen die Vermutung, daß eine hohe Diversität an Antigenen eine breitere Immunantwort erzeugt.^{88,89}

In einer anderen Strategie wird der Einsatz von vektor- oder plasmidbasierten DNA-Vakzinen untersucht. Dazu werden zunächst die proteinkodierenden Gene des HIV in ein ungefährliches Virus oder ein Bakterium inseriert. Die anschließende Infektion mit diesem rekombinanten Organismus führt zu einer Immunantwort gegen diesen Organismus und die Produkte der inserierten Gene. Experimente mit dieser Impfstoffklasse zeigten eine virusspezifische zelluläre und humorale Immunreaktion bei Affen.^{90,91} In vitro Tests haben auch gezeigt, daß die Blutseren von geimpften Probanden eine Immunantwort bei der Infektion mit verschiedenen HIV-1 Subtypen hervorzurufen vermögen.⁹²

Die zur Zeit am meisten erfolgversprechende Methode ist ein Kombinationsimpfung von einem DNA-Vakzin mit einem Protein/Peptid-*Booster*. Es konnte gezeigt werden, daß eine solche Impfung Affen vor einer Infektion mit verschiedenen SIV-Isolaten schützt,⁹³ bzw. die Seren von geimpften Menschen in der Lage waren, HIV-subtypübergreifende Neutralisationsaktivität der erzeugten Antikörper zu zeigen.

Zur Zeit befinden sich mehrere der oben beschriebenen Impfstoff-Typen in verschiedenen klinischen Phasen.⁹⁴ Die Ergebnisse lassen einen Impfstoff zwar möglich erscheinen, einen umfassenden Schutz vor einer HIV-Infektion kann jedoch nicht geboten werden. Es besteht in dieser Richtung noch ein enormer Forschungsbedarf, der strukturelevante Fragen aber auch solche der erforderlichen Diversität eines Impfstoffes beinhaltet.

2 Methoden

2.1 Synthese von Peptiden und N-Typ Glycopeptiden

Bei der Peptidsynthese unterscheidet man grundsätzlich zwischen drei verschiedenen Methoden. Neben enzymatischen Methoden und gentechnischen Synthesen in Expressionssystemen hat vor allem die rein chemische Synthese an einer festen Phase einen hohen Stellenwert bei der Herstellung von Peptiden und Glycopeptiden. Begründet wurde diese durch die Entwicklung von R. B. Merrifield,⁹⁵ der aufgrund seiner Leistungen in diesem Bereich 1984 den Nobelpreis erhalten hat. Während die Festphasensynthese vor allem im Labormaßstab ihre Anwendung findet, trifft man die chemische Synthese in Lösung eher im industriellen Maßstab an.

Bei der Festphasensynthese erfolgt der Aufbau des Peptids entgegen der natürlichen Syntheserichtung vom C- zum N-Terminus. Man hat es mit sich wiederholenden Synthesezyklen zu tun, die in drei Einzelschritten erfolgen und jeweils durch Waschstritte unterbrochen werden. In Abbildung 9 sind die einzelnen Schritte der Festphasensynthese schematisch dargestellt. Der erste Schritt besteht aus der Entschützung des N-Terminus am Harz. Darauf folgt die Kupplung einer aktivierten Aminosäure in Form eines Aktivesters und anschließende Blockierung aller nicht umgesetzten Aminogruppen, durch Acetylierung. Ein entscheidender Vorteil gegenüber der Synthese in Lösung ist die Möglichkeit des Einsatzes hoher Überschüsse, da aufgrund der Fixierung des wachsenden Peptids nicht reagierte Komponenten problemlos durch Waschen entfernt werden können.

Damit die an das Harz zu knüpfenden Aminosäuren nur mit der α -Aminogruppe des N-Terminus reagieren, müssen sie ihrerseits N-terminal und seitenkettengeschützt eingesetzt werden. Die Schutzgruppen für die α -Aminofunktion und für eventuell vorhandene funktionelle Gruppen in der Seitenkette müssen orthogonal zueinander sein, da letztere über die gesamte Synthese stabil geschützt bleiben müssen, während der Schutz des N-Terminus nur temporär erforderlich ist. Aus einer Reihe von Schutzgruppen hat sich im Laufe der Zeit die basenlabile Fmoc-Gruppe⁹⁶ für den Schutz der α -Aminogruppe etabliert. Als Seitenkettenschutz dienen Trt-, Pbf-, tBu-, Boc- und StBu-Gruppen (siehe Abbildung 10), die sich bis auf die StBu-Gruppe problemlos mit wasserhaltiger TFA unter Zusatz von Triisopropylsilan⁹⁷ als *scavenger* entfernen lassen. Das Triisopropylsilan fungiert als Hydridionendonator und sorgt durch Reaktion mit den während der Abspaltung gebildeten Carbokationen dafür, daß diese nicht wieder mit dem Peptid reagieren können. Die StBu-Schutzgruppe läßt sich durch Reduktion, z.B. mit DTT, selektiv entfernen (s.u.).

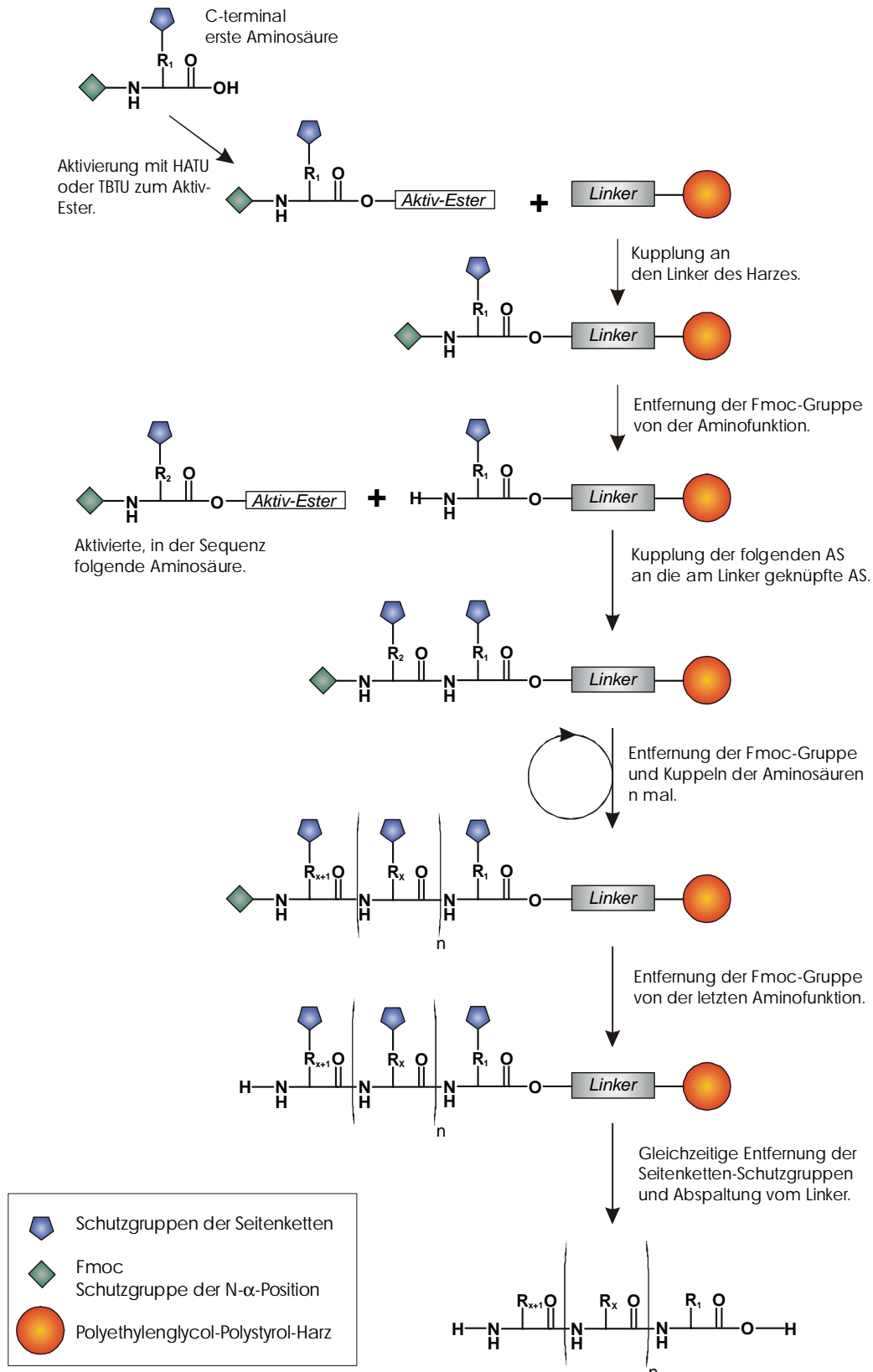


Abbildung 9: Allgemeines Schema der Peptid-Festphasensynthese.

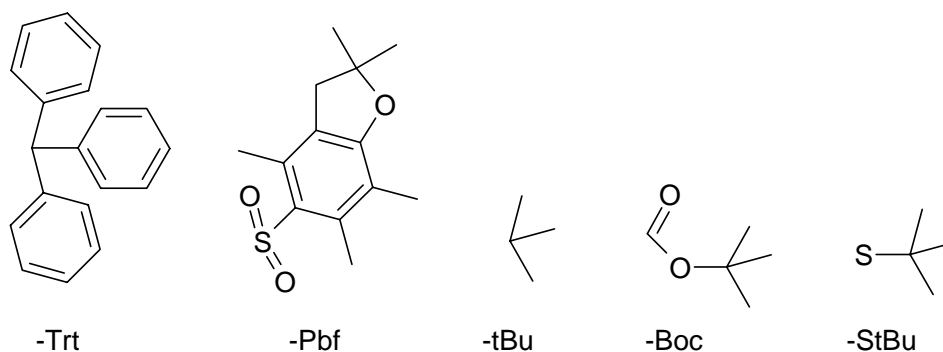


Abbildung 10: In dieser Arbeit eingesetzte Seitenkettenschutzgruppen.

Das Harz besitzt auf seiner Oberfläche sogenannte *Linker*, an die die erste Aminosäure geknüpft wird. Je nach Art des Linkers entstehen entweder Peptide mit Carboxamid oder freier Carboxylgruppe am C-Terminus. Weiterhin entscheiden die Abspaltbedingungen des Linkers und damit des Peptids, ob der Schutz der Funktionalitäten in den Seitenketten erhalten bleibt oder mit entfernt wird.

Es gibt eine Reihe von Reagenzien für die Aktivierung der α -Carboxylfunktion, die für die Knüpfung der Peptidbindung erforderlich ist. Aufgrund der geringeren Racemisierungsgefahr⁹⁸ und hoher Kupplungseffizienz haben sich als Aktivatoren TBTU⁹⁹ und HATU¹⁰⁰ (siehe Abbildung 11) durchgesetzt. Der vorgeschlagene Mechanismus der Aktivierung einer Säurefunktion durch HATU ist in Abbildung 12 zu sehen.

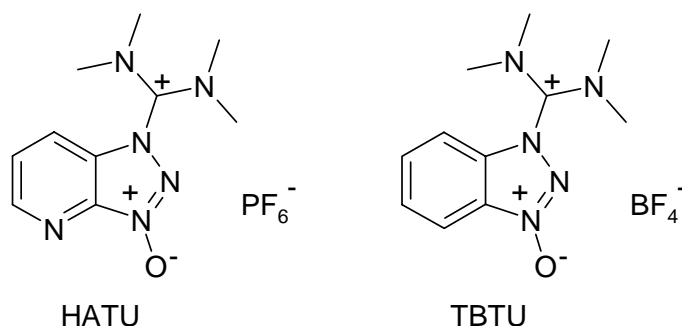


Abbildung 11: Die Aktivatoren HATU und TBTU.

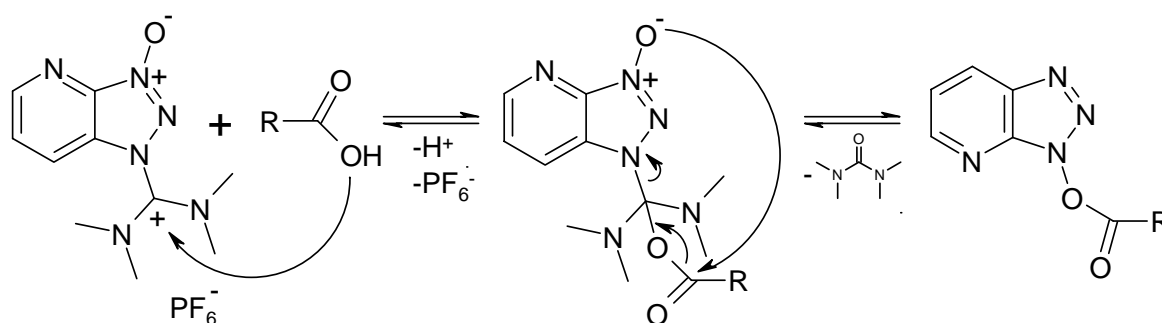


Abbildung 12: Vorgeschlagener Mechanismus der Aktivierung einer Säurefunktion durch HATU.

Bei der Synthese von N-Typ Glycopeptiden unterscheidet man genau wie auch bei der reinen Peptidsynthese zwischen chemischen oder enzymatischen Methoden sowie gentechnischen Verfahren in Expressionssystemen. Enzymatische Methoden haben den Nachteil, daß die Ausbeuten relativ gering sind und der finanzielle Aufwand häufig sehr hoch ist. Die Expression in gentechnisch veränderten Zellen ist auch problematisch, da die Art der posttranslationalen Glycosylierung vom Expressionssystem abhängt und somit nicht mit der natürlichen Glycosylierung übereinstimmen muß.¹⁰¹ Die klassische organische Synthese stellt daher den wichtigsten Weg dar. Dabei wird grundsätzlich zwischen dem Verfahren der konvergenten Synthese^{102,103} und dem der Bausteinsynthese^{104,105} unterschieden.

Bei der konvergenten Synthese werden die zu glycosylierenden Asparagine als orthogonal mit Allylgruppen geschützte Aspartate in der Peptidsynthese eingesetzt. Die Glycosylierung erfolgt erst nach abgeschlossener Synthese des Peptids, wobei der Zucker als Glycosylamin selektiv an das zuvor entschützte Aspartat geknüpft wird.^{102,103} Der Vorteil dieser Methode ist eindeutig der späte Einsatz des Saccharids, das in der Regel nur in kleinen Mengen zur Verfügung steht. Sollte das Peptid allerdings schon Sekundärstrukturmerkmale ausbilden, die den Zugang des Zuckers zum Aspartat erschweren, so kann dies zu Aubeuteverlusten führen. Ein weiterer Nachteil, der zwar bei beiden Verfahren auftritt, aber bei der konvergenten Synthese drastischere Auswirkungen hat, ist die während der Kupplung auftretende Nebenreaktion der Aspartimidbildung. Hierbei bildet sich zwischen der aktivierten Säurefunktion am Aspartatrest und der in der Sequenz benachbarten Aminosäure ein fünfgliedriger Succinimidring, der thermodynamisch sehr stabil ist.¹⁰⁶ Um diese Ringbildung zu vermeiden werden N^α-HMB-N^α-Fmoc-geschützte Aminosäurederivate bei der Synthese eingesetzt. Diese Derivate sind jedoch kommerziell nur zum Teil zugänglich und deren Synthese verläuft oft nur mit unbefriedigenden Ausbeuten.^{107,108}

Bei der Bausteinmethode werden zuvor synthetisierte glycosylierte Asparagine als sogenannte Bausteine in der normalen Festphasensynthese bzw. Blocksynthese eingesetzt.^{104,105} Vorteil dieser Methode ist die selektive Darstellung von mehrfach und verschieden glycosylierten Peptiden ohne aufwendigen Einsatz von Schutzgruppen. Nachteil ist allerdings der nicht vermeidbare Aubeuteverlust, der im wesentlichen durch nicht quantitative Umsätze bei den nachfolgenden Aminosäurekupplungen hervorgerufen wird. Beim Einsatz der Blocksynthese läßt sich dieser Nachteil zwar umgehen, aber die unter Umständen schlechte Löslichkeit der zu verknüpfenden geschützten Peptidfragmente kann hier zum Problem werden.

Bei der Synthese der glycosylierten Aminosäurebausteine hat sich im Laufe der Zeit der Einsatz von, bis auf die γ -Carboxylgruppe, vollständig geschütztem Aspartat etabliert. Dies wird nach vorheriger Aktivierung mit z.B. TBTU in einer glycosidischen Bindung mit dem Zucker verknüpft. Die Saccharide werden nach vorangegangener Aminierung¹⁰⁹ des anomeren C-Atoms als hydroxylgruppenungeschützte Derivate eingesetzt. Wird der Zucker dann anschließend in seinen OH-Gruppen durch Acetylierung geschützt, kann im

Syntheseverlauf weiterhin unter Verwendung von Aktivierungsreagenzien gearbeitet werden, nachdem die *tBu*-geschützte α -Carboxylfunktion entschützt wurde.

Für die Bildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten.¹¹⁰ Man unterscheidet prinzipiell zwischen den Verfahren der Zyklisierung am Harz und denen in Lösung. Je nach Wahl der Thiol-Schutzgruppen gibt es darüber hinaus die Möglichkeit der simultanen und sukzessiven Entschützung der Cysteine und ihrer Verknüpfung über eine Disulfidbrücke (siehe Abbildung 13). Hierzu stehen wiederum verschiedene Oxidantien zur Verfügung.

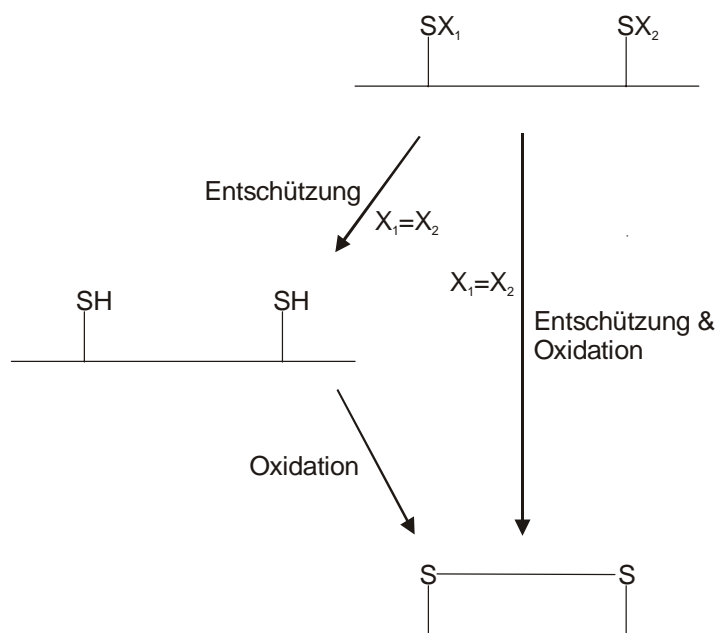


Abbildung 13: Synthesestrategien zur Bildung einer Disulfidbrücke.

Die Verfahren der simultanen Umsetzung wie z.B. nach der Silylchlorid-Sulfoxid-Methode¹¹¹ bieten den Vorteil der Einsparung eines Reaktionsschritts und einer kurzen Reaktionsdauer. Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus¹¹² ist in Abbildung 14 gezeigt. Da diese Methode jedoch in relativ konzentrierter Lösung abläuft, kann die Tendenz zur Bildung intermolekularer Disulfidbrücken bei ungünstiger Sekundärstruktur oder wachsender Peptidlänge zunehmen.

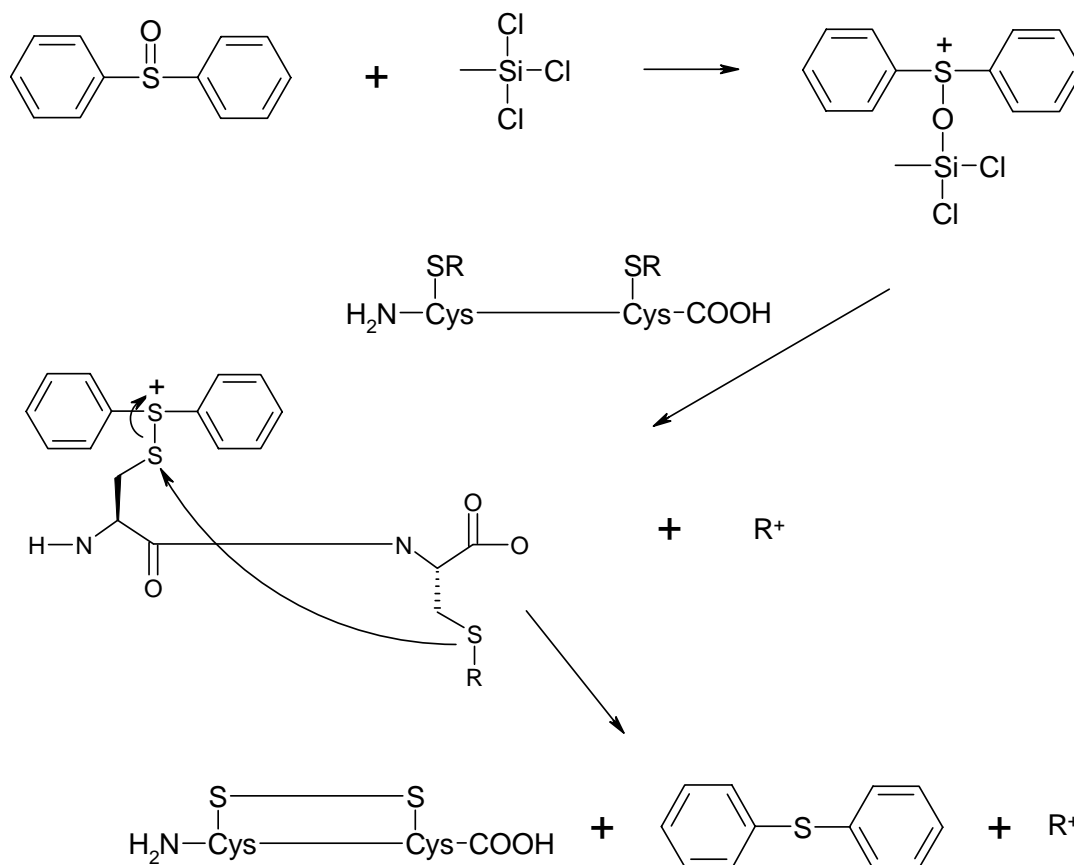


Abbildung 14: Vorgeschlagener Mechanismus zur Disulfidbrückenbildung nach der Silylchlorid-Sulfoxid-Methode.

Dieses Problem kann bei den schrittweise ablaufenden Strategien umgangen werden, wenn die einzelnen Peptide einen genügend großen Abstand voneinander haben. Bei der Zyklisierung am Harz sorgt eine niedrige Belegung desselben dafür. Diese Methode ist jedoch nur auf kurze Peptide beschränkt, da bei langen Peptiden die Neigung zur Polymerisation nicht durch Herabsetzung der Harzbelegung in einem vertretbaren Rahmen kompensiert werden kann. Hier bietet sich die Zyklisierung in Lösung an. Durch eine hohe Verdünnung der Peptide wird gewährleistet, daß sich nur intramolekulare SS-Brücken bilden. Bei der Wahl der Entschützungs- und Oxidationsbedingungen muß darauf geachtet werden, daß außer den Thiol-Gruppen alle anderen Funktionalitäten intakt bleiben und die Reagenzien relativ einfach nach beendeter Reaktion zu entfernen sind. Als Oxidationsmittel bietet sich Luftsauerstoff an, da es sich hier um ein sehr mildes Oxidans handelt und zudem keinerlei Rückstände hinterlassen werden.¹¹³ Zur Beschleunigung der Oxidation und als Lösungsvermittler von schlecht löslichen Peptiden kann der Lösung etwas DMSO zugesetzt werden.¹¹⁴

Setzt man bei der Peptidsynthese ein S-(Trt)-geschütztes Cysteinderivat ein, so wird die SH-Gruppe unter Abspaltbedingungen mit wäßriger TFA ebenfalls freigesetzt und das Peptid kann nach Entfernen der Abspaltlösung zyklisiert werden. Vorteil dieser Methode ist eine schnelle Entschützung des gesamten Peptids. Ein Nachteil besteht in der Gefahr der

Polymerisation während der Abspaltung, so daß die Reaktion unter Schutzgas erfolgen muß. Bei der anschließenden Zyklisierung können Abbruchpeptide, die nur ein Cystein enthalten, dimerisieren und so zu zusätzlichen Aufreinigungsproblemen führen. Dieses Problem kann vermieden werden, wenn an den Cysteinen orthogonale Schutzgruppen, wie z.B. die StBu-Gruppe eingesetzt werden. So besteht die Möglichkeit, das vom Harz abgespaltene Peptid ohne die Gefahr einer Polymerisation aufzureinigen, selektiv mit DTT^{115,116} zu entschützen (siehe Abbildung 15) und anschließend zu zyklisieren. Ein weiterer Vorteil dieser Schutzgruppenstrategie ist der Erhalt von zwei Peptiden in einer Synthese, der linearen oder der zyklischen Form, je nachdem ob man die Cysteine entschützt und das Peptid zyklisiert oder die Cysteine in der geschützten Form beläßt.

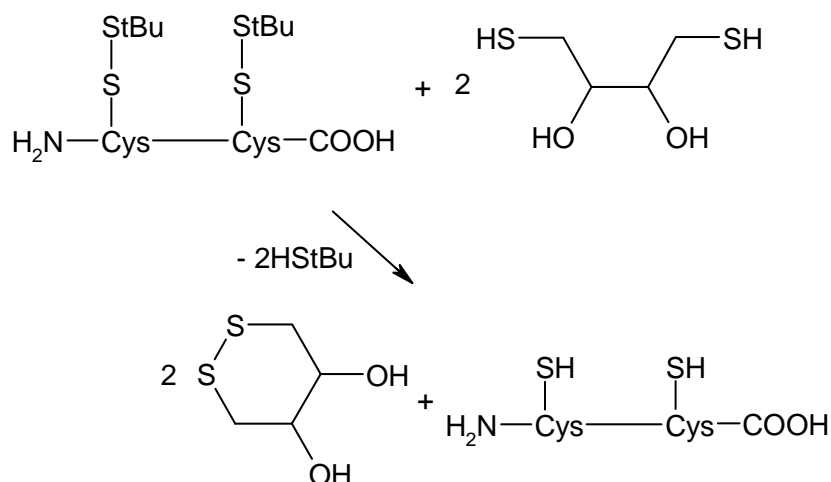


Abbildung 15: Entschützung der Cysteine durch Reduktion mit DTT.

2.2 Kombinatorische Chemie

Bis Anfang der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurden chemische Verbindungen in der Pharmaforschung im wesentlichen in Einzelsynthesen hergestellt und auf ihre Verwendbarkeit hin getestet. Große Pharmakonzerne waren so in der Lage, 10000 bis 20000 Verbindungen pro Jahr zu testen. Mit dem Aufkommen moderner *Screening*-Methoden und der zunehmenden Automatisierung konnten in immer kürzerer Zeit immer mehr Substanzen auf ihre Eignung als Kandidat in der Medikamentenentwicklung getestet werden. Heute ist es möglich, 100000 Verbindungen an einem Tag in einem sogenannten UHTS-*Screening* zu überprüfen. Zeitgleich etablierte sich die kombinatorische Chemie in diesem Sektor, die es ermöglichte, eine Flut von Verbindungen in kürzester Zeit zu liefern. Sie wird vor allem eingesetzt, um neue chemische Strukturen zu finden, die mit einem biologischen Zielmolekül interagieren. Aber auch bei der Herstellung von

Substanzbibliotheken, die eine systematische Variation eines Moleküls darstellen, wird die kombinatorische Chemie genutzt.

In der Peptidchemie hat sich die kombinatorische Chemie zuerst durchgesetzt, da hier durch die Festphasensynthese und immer wiederkehrende Zyklen eine Automatisierung am einfachsten war. Wenn hier von Substanzbibliotheken gesprochen wird, sind Peptide gleicher Kettenlänge mit definierten Aminosäurepositionen (O Positionen) und Permutationsstellen, die unterschiedliche Aminosäurederivate enthalten können (X Positionen), gemeint.^{117,118} Um kombinatorische Peptidsynthese zu betreiben, kann entweder der Weg der gentechnischen Strategie über die Einschleusung von Phagen,¹¹⁹⁻¹²² Plasmiden¹²³ oder Polysomen¹²⁴ in Expressionsysteme besritten oder diese Bibliotheken mit Hilfe von rein chemischer Festphasensynthese dargestellt werden. Der gentechnologische Ansatz hat den Nachteil, daß er auf reine Peptidbibliotheken beschränkt ist. Der Einsatz nicht natürlicher Aminosäuren oder ein natives Glycosylierungsmuster ist bei diesen Methoden in der Regel nicht möglich. Die Herstellung von Bibliotheken durch Festphasensynthese kann auf prinzipiell drei Wegen erfolgen. Der einfachste Ansatz besteht aus der Parallelsynthese von Einzelpeptiden. Diese Strategie gehört streng genommen nicht zu den kombinatorischen Verfahren, ist aber sehr verbreitet. Nachteil dieser Methode ist die Beschränkung auf eine relativ kleine Anzahl von Einzelverbindungen, die durch die Zahl der Reaktionsgefäße des Syntheseroboters beschränkt ist. Bei den anderen Verfahren unterscheidet man zwischen der *Premix*¹²⁵⁻¹²⁸ und *Split and Combine*¹²⁹⁻¹³³ Strategie.

Nach dem *Premix*-Verfahren werden Substanzbibliotheken hergestellt, indem an den Permutationsstellen nicht mit einer einzelnen Aminosäure in der laufenden Peptidsynthese gekuppelt wird, sondern mit einem Gemisch aus verschiedenen Aminosäuren. Nach Fertigstellung wird die Bibliothek vom Harz abgespalten und man erhält ein Gemisch von Peptiden in einer Lösung. Die Möglichkeit mit einem vergleichsweise geringen Aufwand in kurzer Zeit und selbst mit einer relativ geringen Menge an Harz große Bibliotheken zu erstellen, ist ein klarer Vorteil gegenüber anderen Methoden. Die Aufreinigung einer solchen Bibliothek kann gerade bei einer größeren Zahl von Komponenten und langen Peptiden Probleme bereiten. Dieser Nachteil läßt sich aber durch möglichst effiziente Kupplungsbedingungen bzw. durch die Anwendung von multidimensionaler Chromatographie bei der Aufreinigung minimieren. Eine nachträgliche Separierung der Einzelkomponenten ist bei dieser Methode aus oben genannten Gründen oft nicht mehr möglich, deshalb findet sie hauptsächlich dort Anwendung, wo ein *Screening* von Einzelsubstanzen nicht erforderlich ist. Ein Beispiel hierfür ist der Herstellung von synthetischen Immunogenen für einen multivalenten Impfstoff. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die unterschiedliche Kupplungskinetik der Aminosäuren bei der Knüpfung der Peptidbindung. Dies führt zu unterschiedlichen prozentualen Anteilen der Einzelkomponenten in der Bibliothek und kann nachfolgende Biotests verfälschen. Durch die Veränderung der Aminosäureüberschüsse oder

der quantitativen Zusammensetzung des zu kuppelnden Gemisches kann jedoch das durch die Kinetik auftretende Problem der Ungleichverteilung kompensiert werden.^{125,128,134-139}

Die *Split and Combine* Methode wurde zuerst von Furka et al.¹³¹ beschrieben. Der wesentliche Unterschied ist die Erweiterung eines Kupplungszyklus um zwei Schritte. Vor dem eigentlichen Kupplungsschritt wird das Harz in mehrere gleich große Portionen aufgeteilt. Die Anzahl der Portionen ist dabei gleich der Anzahl der unterschiedlichen Aminosäuren, die an diese Position geknüpft werden sollen. An jede Harzportion wird demnach eine andere Aminosäure gekuppelt. Anschließend werden alle Portionen zusammengegeben und vermischt, um dann vor dem nächsten Kupplungsschritt wieder neu portioniert zu werden. Nach beendeter Synthese befindet sich dann auf jeder Harzkugel nur eine bestimmte Verbindung. Das Verfahren ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt.

Vorteile dieser Methode sind zum einen die Gleichverteilung aller Komponenten in der Bibliothek und zum anderen die Möglichkeit, jede Verbindung in der Bibliothek einzeln zu testen und sofort zu identifizieren, wenn mit markierten Harzkugeln gearbeitet wird. Ansonsten werden die Harzkugeln mit den gewünschten Peptiden isoliert und z.B. durch Edman Abbau sequenziert. Nachteilig ist jedoch neben dem hohen Zeitaufwand gegenüber dem *Premix*-Verfahren der hohe Verbrauch an Harz, Aminosäuren und Reagenzien, was dieses Verfahren sehr kostspielig werden läßt. Im Vergleich zur *Premix*-Methode wird hier die fünfzehnfache Menge an Harz benötigt, um eine vergleichbare Heterogenität in einer Bibliothek zu erreichen.¹⁴⁰ Damit die Mengen an Harz im Labormaßstab noch vernünftig handhabbar bleiben, werden mit dieser Methode eher kleine, wenig komplexe Bibliotheken erstellt.

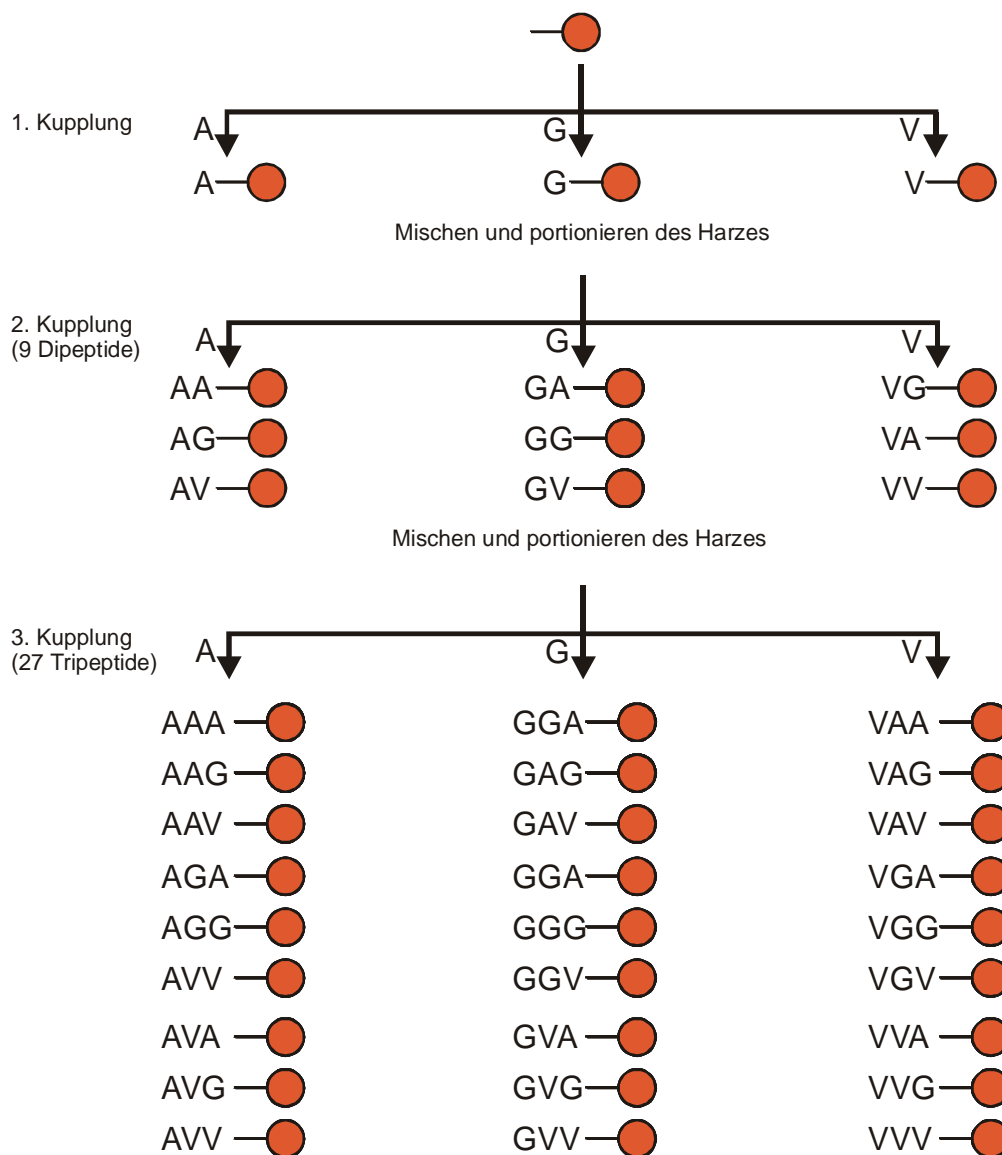


Abbildung 16: Schematische Darstellung der *Split and Combine*-Strategie zur Bibliothekssynthese.

2.3 Analytik

2.3.1 Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight*) und die ESI (*Elektrospray*) Massenspektrometrie ermöglichen durch ihre sanfte Ionisation die Bestimmung des Molekulargewichts von Biomolekülen. Ein Vorteil dieser Methoden ist Schnelligkeit und hohe Empfindlichkeit (im femtomolaren Bereich). Das macht sie ideal für die Analytik von wertvollen, nur in kleinen Mengen zur Verfügung stehenden Substanzen.

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie eignet sich ganz besonders zur Untersuchung von hochmolekularen Verbindungen, die aufgrund ihrer Molmasse nur schwer in die Gasphase zu

überführen sind, ohne dabei zu fragmentieren. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine gepulste Ionisierungsart. Die zu untersuchende Substanz wird zusammen mit einer geeigneten Matrix (z.B. DHB oder CCA) kokristallisiert. Durch lokale Erhitzung mit einem Laser werden Matrixmoleküle schlagartig verdampft und die Probenmoleküle mitgerissen.¹⁴¹ Bei der Desorption der Matrixmoleküle werden diese zusätzlich durch Photoionisation angeregt und es findet ein Protonentransfer auf neutrale Matrixmoleküle statt. Ein weiterer Ladungstransfer auf die Probenmoleküle sorgt dann für die Ionisation derselben. Die Geschwindigkeit der ionisierten Moleküle im nachfolgenden TOF-Analysator ist umgekehrt proportional zu ihrer Masse, so daß anhand ihrer Flugzeit das Masse-Ladungsverhältnis errechnet werden kann.

Mit der Elektrospray Massenspektrometrie ist es möglich, neben sehr großen Biomolekülen wie Proteinen auch niedermolekulare Moleküle (Untergrenze $m/z \approx 100$) zu analysieren. Es handelt sich um ein homogenes Ionisationsverfahren, bei dem die Probe aus einer Lösung in einem elektrischen Feld versprüht wird.¹⁴² Das elektrische Feld liegt zwischen der Kapillarspitze, aus der die Lösung austritt und der am MS-Eingang lokalisierten Gegenelektrode an. Die bei Atmosphärendruck gebildeten Ionen werden durch die angelegte Spannung in Richtung des Analysators im Hochvakuum beschleunigt. Dabei verdampfen die Lösungsmittelmoleküle in den Nebeltröpfchen, die Ladungsdichte nimmt zu und es kommt zu Coulomb-Explosionen der Tropfen. Dieser Prozeß wiederholt sich mehrmals hintereinander, bis die Probenmoleküle vollständig desolvatisiert sind und durch eine geeignete Ionenoptik in den Analysatorteil des Spektrometers gelangen. Die Bestimmung ihres Masse-Ladungsverhältnisses geschieht hier in der Regel über einen Quadrupol. Es gibt allerdings auch die Kombination mit einem TOF-Analysator. Beim ESI-MS treten neben den einfach geladenen auch mehrfach geladene Molekülonen auf. So ist es möglich auch mit Massenanalysatoren, die nur einen begrenzten Masse-Ladungsbereich detektieren können, hochmolekulare Verbindungen zu vermessen. Vorteil dieser Methode gegenüber dem MALDI-TOF-Verfahren ist die mögliche Kopplung mit einer HPLC, so daß auch Substanzgemische nach vorheriger Trennung zeitgleich vermessen werden können. Außerdem ist beim ESI-MS, im Gegensatz zum MALDI-TOF-MS, eine Quantifizierung von Einzelkomponenten in einer zu untersuchenden Probe möglich, da von einer homogenen Lösung als Analyt ausgegangen wird und nicht von einem heterogenen Kristall.

2.3.2 NMR

Bei der Charakterisierung von Peptiden und Glycopeptiden hat sich die NMR-Spektroskopie als ein Standardverfahren etabliert. Um die chemischen Verschiebungen und Integrale der Resonanzen sowie die Kopplung in deren Feinstrukturen zu ermitteln, reichen eindimensionale Experimente nicht mehr aus, da aufgrund der Signalüberlagerungen die Auswertbarkeit der Spektren an ihre Grenzen stößt. Dieses Problem wird durch Aufnahme zweidimensionaler NMR-Spektren umgangen. Mit den nachfolgend erläuterten

2D-Experimenten ist es möglich, die einzelnen Spinsysteme zu identifizieren sowie skalare und dipolare Kopplungen zu ermitteln.

Das TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*)-Experiment ermöglicht es, die chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäure- und Zuckerkomponenten eines Glycopeptids im Spektrum zu bestimmen. Dies erfolgt vorzugsweise bei einem in Wasser aufgenommenen Spektrum durch Analyse der NH-Spuren, da diese am besten dispergiert und von anderen Signalen separiert sind. Im TOCSY-Experiment erfolgt eine totale Korrelation innerhalb eines Spinsystems aufgrund eines angelegten Spinlockfeldes.¹⁴³ Dabei hängt es von der Spinlockzeit im Experiment und den Kopplungskonstanten des Spinsystems ab, wie weit dieser Magnetisierungstransfer geht. Bei $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungen, die kleiner als zwei Hertz sind, erfolgt kein Transfer mehr.

Das NOESY (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*)-Experiment dient zur Sequenzbestimmung eines Peptids, sowie bei Glycopeptiden zur Zuordnung von Sacchariden zu den daran gebundenen Aminosäuren. Darüber hinaus können aber auch durch das Auftreten von NOE-Kontakten, von in der Sequenz weit voneinander entfernten Aminosäuren, bzw. durch die Analyse der NH-NH-Kontakte Aussagen über die Sekundärstruktur des Peptids gemacht werden. $\text{NH}_i\text{-NH}_{i+1}$ und $\text{NH}_i\text{-NH}_{i+2}$ deuten auf α -helicale Bereiche hin, wo hingegen in β -Strängen nur $\text{NH}_i\text{-NH}_{i+1}$ -Kontakte auftreten. Allgemein lassen sich interatomare Abstände bestimmen, die zwischen 1.8 und 5.0 Å liegen.

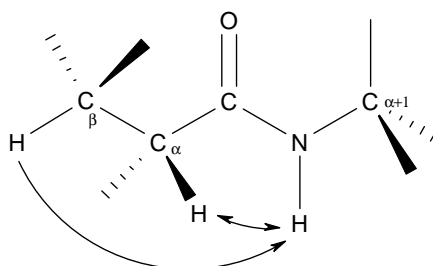


Abbildung 17: Sequentielle NOE-Kontakte zwischen benachbarten Aminosäuren.

Das NOESY-Experiment basiert auf der dipolaren Kopplung von Spins direkt durch den Raum.¹⁴⁴ Durch sie wird das Relaxationsverhalten räumlich benachbarter Kerne beeinflusst. Die Magnetisierung eines Spins führt zu einer vom Gleichgewicht abweichenden Magnetisierung eines benachbarten Spins. Dieses Phänomen wird als *Nuclear-Overhauser-Enhancement* (NOE) bezeichnet.¹⁴⁵ Die Intensität eines NOESY-Kreuzsignals ist unter anderem abhängig vom räumlichen Abstand der Kopplungspartner zueinander. Da es sich beim NOE um ein reines Relaxationsphänomen handelt, ist es unerheblich, ob die Spins zusätzlich über eine skalare Kopplung miteinander in Verbindung stehen.

Da die skalaren Kopplungskonstanten der Spinsysteme anhand eines 1D-NMR-Experiments nur bei kleinen Molekülen bestimmbar sind, werden diese bei größeren Molekülen mit Hilfe des COSY (*Corrolated Spectroscopy*)-Experiments¹⁴⁶ ermittelt. Bei starken Signal-

überlagerungen und einer gleichzeitigen starken Aufspaltung des Signals ist es nicht immer möglich, eine genaue Zuordnung zu machen. In diesem Fall ist die Aufnahme eines E.COSY- oder DQF-COSY Spektrums ratsam, da es hier zu einer Vereinfachung der Multiplettstruktur kommt. Im Falle einer starken Kopplung ist jedoch mit einem Verschwinden der Kreuzsignale unter der Diagonalen zu rechnen. Darüber hinaus kann mit Hilfe des COSY-Experiments eine eindeutige Zuordnung von Zuckerprotonen oder peptidischen Protonen der Aminosäureseitenkette durchgeführt werden.

2.4 Surface Plasmon Resonance (SPR)

Bei der Erforschung neuer Wirkstoffe kommt der Untersuchung von Interaktionen zwischen Proteinen mit anderen Molekülen eine zentrale Rolle zu. Neben klassischen Bindungsassays wie ELISA oder FACS, die markierte Bindungspartner (Enzym- oder Fluoreszenzlabel) benötigen, gibt es seit etwa zehn Jahren eine Methode, mit der es möglich ist, ein Bindungsereignis von ungelabelten Substanzen in Echtzeit zu messen. Die bei dieser optischen Methode eingesetzte SPR-Technik wurde 1959 erstmals von Turbador¹⁴⁷ beschrieben und wesentlich durch Otto^{148,149} bzw. Kretschmann und Raether¹⁵⁰ weiterentwickelt. Bei einem SPR-Experiment sorgt die durch ein Bindungsereignis hervorgerufene Massenzunahme für eine Veränderung des Brechungsindex in der Analytenlösung. Das Meßprinzip beruht auf der Detektion dieser Änderung. Vorteilhaft bei diesem Verfahren ist neben der oben erwähnten fehlenden Notwendigkeit einer Veränderung der Moleküleigenschaften durch *labeling*, der sehr geringe Verbrauch an häufig schwer zugänglichem biologischen Material und die Möglichkeit, unter nahezu physiologischen Bedingungen zu arbeiten. Bei den Geräten der Firma BIACORE ist man nicht nur auf die Messung der Interaktionen zwischen Molekülen beschränkt. Auch größere Systeme, wie Bakterien¹⁵¹, Viren¹⁵² und Zellen¹⁵³ konnten erfolgreich untersucht werden.

2.4.1 Das SPR-Phänomen und dessen Anwendung

Das SPR-Phänomen läßt sich folgendermaßen beschreiben. Trifft ein linear polarisierter Lichtstrahl unter Totalreflektion auf eine Grenzfläche von hohem zu niedrigem Brechungsindex auf, so tritt eine evaneszierende Welle in das Medium mit niedrigerem Brechungsindex und nimmt in der Intensität exponentiell ab. Die Eindringtiefe entspricht etwa der Wellenlänge des verwendeten Lichtes. Ist die Grenzfläche mit einem leitenden, aber nicht magnetischen Material (z.B. Gold) beschichtet, so wechselwirkt die evaneszierende Welle mit den Oberflächenplasmonen dieser Schicht und es entsteht eine verstärkte evaneszierende Welle. Das Auftreten dieser Wechselwirkung ist von einem bestimmten Winkel der evaneszierenden Welle und dieser wiederum vom Brechungsindex des Mediums, in das die Welle eindringt, abhängig. Eine auftretende Resonanz wird als eine

Intensitätsabschwächung des Lichtes bei einem bestimmten Winkel detektiert (siehe Abbildung 18 oben rechts). Die Änderung des Brechungsindex um $1 \cdot 10^{-3}$ erzeugt eine Verschiebung um 0.1° im Resonanzwinkel. Die gemessene Veränderung im Winkel wird als Resonanz-Unit (RU) bezeichnet. Stenberg *et al.*¹⁵⁴ haben gezeigt, daß für Proteine Änderungen im Brechungsindex proportional zur Zunahme an Masse sind. Dies kann auch auf andere Moleküle übertragen werden. 1000 RU entsprechen einer Änderung um 0.1° oder 1 ng. Bei einem BIACORE Gerät wird, wie in Abbildung 18 zu sehen, ein Bindungspartner auf einem Chip immobilisiert, während der andere an ihm vorbeiströmt. Die beiden Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes werden durch die in der Meßzelle strömende Lösung des mobilen Bindungspartners und durch eine Glasschicht im Chip dargestellt. Kommt es zum Bindungsereignis, so erhöht sich die lokale Konzentration des mobilen Liganden in der Nähe der Chipoberfläche, welches eine Änderung des Brechungsindex und damit des Meßsignals zur Folge hat.

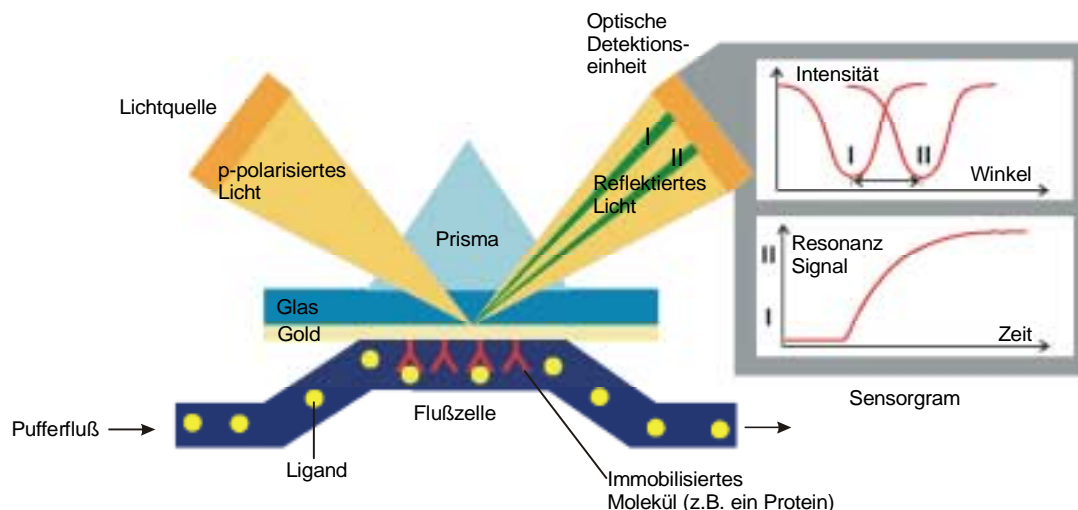


Abbildung 18: Schematische Darstellung des BIACORE-SPR-Systems¹⁵⁵.

Für unterschiedliche Anwendungen gibt es unterschiedliche Chips und entsprechend adaptierte Immobilisierungsarten. Die gebräuchlichste Immobilisierung erfolgt über eine Aminkupplung auf einem Chip, bestehend aus einer Glas- und Goldschicht, an die eine carboxymethylierte Dextranschicht gebunden ist. Bedingung ist jedoch, daß der zu immobilisierende Ligand eine Amin-Funktion besitzt. Zunächst werden, wie in Abbildung 19 oben zu sehen, die Carboxyl-Funktionen der Dextran-Schicht durch Zugabe von NHS und EDC in Aktivester überführt und anschließend der Ligand kovalent über eine Amidbindung gebunden. Danach werden alle nicht belegten, aber aktivierten Carboxylfunktionen mit einem Überschuß an Ethanolamin umgesetzt und so inaktiviert (siehe Abbildung 19 unten).

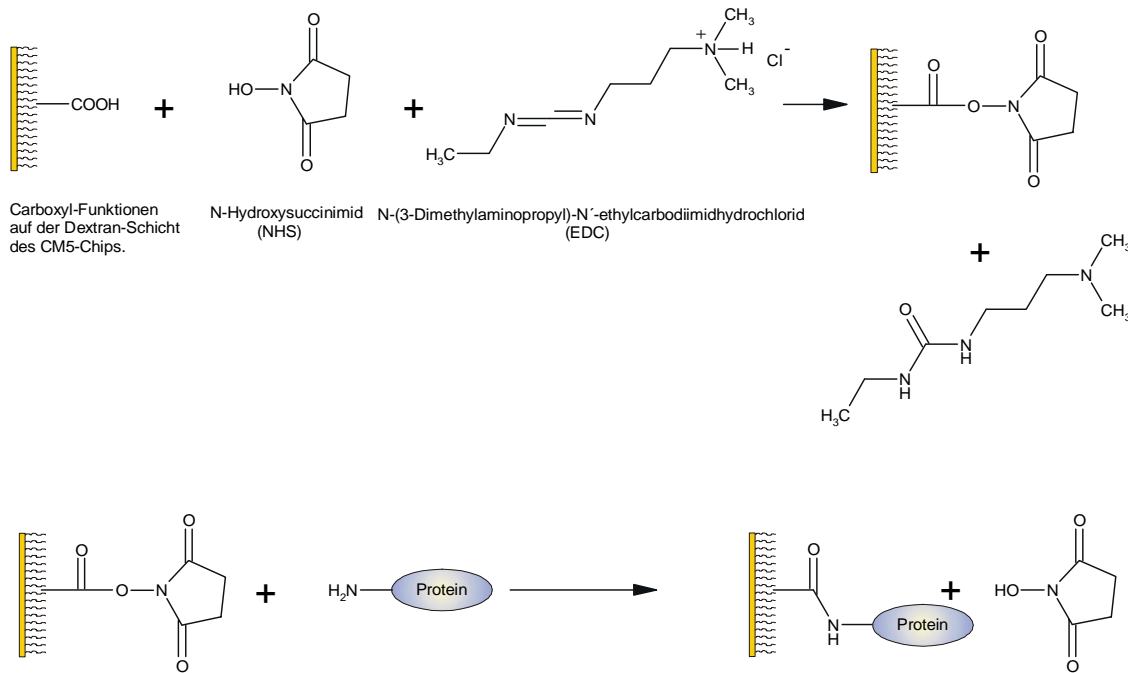


Abbildung 19: Amin-Kupplung zur Immobilisierung eines Liganden auf der Chipoberfläche.

In Abbildung 20 ist der idealisierte Verlauf eines SPR-Experiments in Form eines Sensorgramms dargestellt. Es lässt sich in mehrere Phasen unterteilen. Zu Anfang der Messung fließt lediglich Laufpuffer über die Chipoberfläche. Es folgt die Assoziationsphase, in der der mobile Ligand über die Chipoberfläche strömt und mit den matrixgebundenen Molekülen wechselwirkt. Sichtbar wird diese Wechselwirkung durch die Zunahme des Resonanzsignals. Sind alle Bindungsstellen belegt, so stellt sich zwischen Assoziation und Dissoziation ein Gleichgewicht ein, und die Steigung der Resonanzkurve nimmt auf den Wert Null ab. Die Steigung und Dauer bis zum Erreichen dieses Plateaus hängt von der Konzentration des Liganden und der Kinetik des untersuchten Systems ab. Nach Erreichen des Gleichgewichts wird die Zufuhr von Liganden gestoppt und es wird wieder Laufpuffer durch die Meßzelle geleitet. Die Zahl der gebundenen Liganden verringert sich in dieser Dissoziationsphase zunehmend, und das Resonanzsignal erniedrigt sich. An die Dissoziationsphase schließt sich häufig noch eine Regeneration der Chipoberfläche an, die dafür sorgt, daß alle Komplexe aus immobilisierten und mobilen Liganden nach erfolgter Messung schnell zerstört werden und die Oberfläche für ein neues Experiment in ihrer ursprünglichen Form zur Verfügung steht.

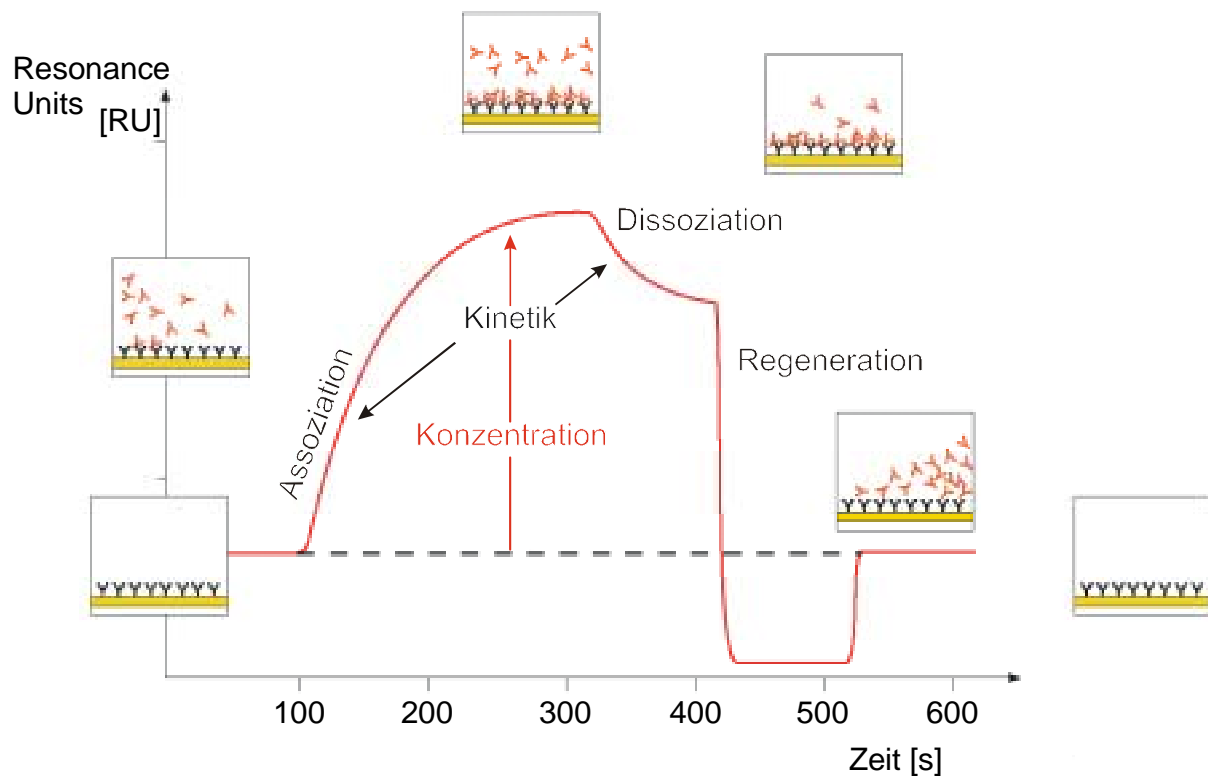


Abbildung 20: Darstellung eines idealisierten Sensorgramms¹⁵⁵.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_a) und Dissoziation (k_d) können direkt aus deren Kurvenformen erhalten werden, wenn die Austauschprozesse nicht zu schnell erfolgen. Mit Hilfe dieser beiden kinetischen Daten läßt sich die thermodynamische Gleichgewichtskonstante (K_D) nach der Formel

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

bestimmen.¹⁵⁶ Im Fall einer sehr schnellen Kinetik läßt sich die Dissoziationskonstante und damit auch die Gleichgewichtskonstante nur über eine Konzentrationsreihe bestimmen.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹

Damit K_D berechnet werden kann, ist es also notwendig, die Konzentration an mobilem Liganden zu kennen. Bei Untersuchungen der Wechselwirkungen von z.B. (Glyco)Peptiden mit membranständigen Rezeptoren auf Zellen entspricht diese der Anzahl der Rezeptoren auf der Oberfläche. Die Rezeptoranzahl variiert aber von Zelle zu Zelle und kann daher nur abgeschätzt werden.

2.4.2 SPR mit Zellen

Bei einer SPR-Messung mit Molekülen ist die Anzahl der detektierten RUs ein Maß für die Zahl der entstandenen Komplexe. Das ist bei Messungen mit Zellen nicht der Fall, da eine einzelne Zelle über mehrere Rezeptoren an mehrere immobilisierten Liganden bindet. Die Massenzunahme steigt hier also nicht linear mit der Zahl der gebildeten Komplexe an. Außerdem bedingt die äußere Gestalt der Zelle, daß viele Rezeptoren nicht die Möglichkeit

haben in die Nähe der Bindungspartner zu gelangen, da sie sich auf der von der Chipoberfläche abgewandten Seite der Zelloberfläche befinden. Man kann daher den K_D -Wert allenfalls abschätzen. Um dennoch einen guten von einem schlechten Bindungspartner unterscheiden zu können, werden Zellkonzentrationsreihen verschiedener Liganden relativ zueinander ins Verhältnis gesetzt (in Abbildung 21 beispielhaft dargestellt). Der am besten bindende Ligand weist demnach unter Voraussetzung einer gleichen Immobilisationsrate die Konzentrationsreihe mit den höchsten RU-Werten auf.

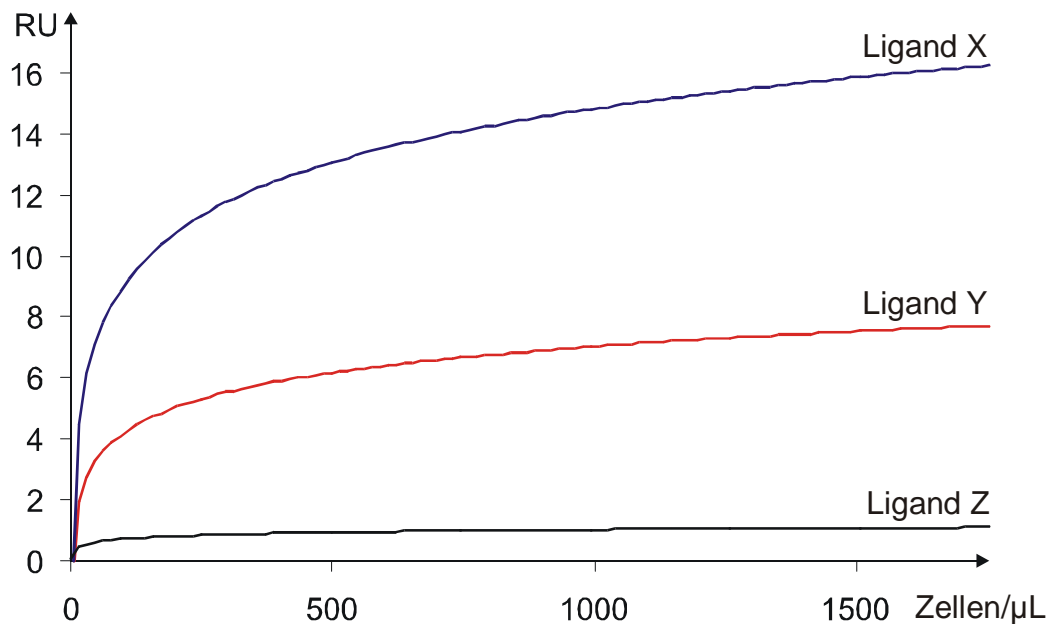


Abbildung 21: Vergleich der Bindungsaffinitäten verschiedener Liganden anhand von Konzentrationsreihen mit Zellen.

Um festzustellen, ob eine detektierte Bindung spezifisch oder unspezifisch erfolgt, wird eine Negativkontrolle mit Zellen der gleichen Zelllinie durchgeführt, die jedoch nicht die Rezeptoren besitzen, die für eine spezifische Interaktion nötig sind.

2.4.3 HI5- und Parentalzellen

Um Interaktionen von GP120 oder V3-Peptiden bzw. -glycopeptiden mit dem CCR5-Corezeptor studieren zu können, gibt es die Möglichkeit, sogenannte GHOST-HI5-Zellen einzusetzen, die diesen Corezeptor überexprimieren. Die Zahl der auf der Zelloberfläche befindlichen CCR5-Corezeptoren liegt bei ca. 10^4 bis 10^5 Kopien pro Zelle. Diese Zelllinie basiert auf einer humanen Osteosarkoma-Zelllinie (HOS). Als Negativkontrolle dienen GHOST-Parentalzellen. Sie sind mit den HI-5-Zellen identisch, exprimieren allerdings kein CCR5 auf ihrer Zelloberfläche.

3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, potentielle Kandidaten für einen möglichst effektiven Impfstoff gegen eine HIV-Infektion zu erhalten. Es ist bekannt, daß die *V3-Loop* des GP120 durch neutralisierende Antikörper erkannt wird und somit vom Immunsystem unschädlich gemacht werden kann. Das Epitop, das von diesen Antikörper erkannt wird, ist also wahrscheinlich auch beim Mechanismus der HIV-Infektion bedeutend. Um hier einen genaueren Einblick zu gewinnen, ist es wichtig, die konformationellen Einflüsse einer Glycosylierung, Disulfidbrückenbildung auch in Abhängigkeit der Sequenz näher zu erforschen und die Unterschiede im Bindungsverhalten zu studieren. Die Bereitstellung der (Glyco)Peptide für derartige Untersuchungen durch eine rein chemische Synthese bietet einen erfolgversprechenden Weg, da der Zugang aus natürlichen Ressourcen oder durch gentechnologische Methoden schwierig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher, ausgehend von einer zuvor ermittelten Konsensussequenz, offenkettige und zyklische V3-Peptide bzw. -Glycopeptide mit Hilfe der Festphasensynthese dargestellt werden. Anstelle des natürlichen Zuckers soll bei der Glycopeptidsynthese Chitobiose als Modellverbindung in Form des Fmoc-geschützten Chitobiosyl-Asparagin-Bausteins eingesetzt werden. Diese Verbindungen sollen anschließend NMR-spektroskopisch bzw. durch SPR-Studien mit CCR5 überexprimierenden Zellen untersucht werden. Durch den Vergleich der Ergebnisse untereinander und mit zuvor durchgeführten Untersuchungen einer EB1-Patientensequenz⁶⁴ sollen Aussagen über die strukturellen Veränderungen und Einflüsse auf die Bindungsaffinität gemacht werden, die Glycosylierung, Disulfidbrückenbildung und Mutationen nach sich ziehen.

Ein weiteres Kriterium für einen wirkungsvollen HIV-Impfstoff ist es, die Voraussetzungen für eine möglichst umfassende Immunantwort zu schaffen. Aufgrund der hohen Variabilität der *V3-Loop* ist es nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich, mit einem einzelnen Antikörper eine Vielzahl von HIV-Stämmen zu neutralisieren. Versuche mit gepoolten Patientenseren, die viele unterschiedliche anti-V3-Antikörper enthalten, zeigen häufig eine sehr viel breitere Immunantwort. Deshalb soll in dieser Arbeit zunächst die Sequenzvariabilität der *V3-Loop* ermittelt werden, um daraus mögliche Permutationsstellen abzuleiten. Zusammen mit den bisher gewonnenen Informationen sollen dann entsprechende (Glyco)Peptidbibliotheken entwickelt und dargestellt werden, die diese Varianz in hohem Maße widerspiegeln. Dazu soll die Synthesestrategie des kombinatorischen *Premix*-Ansatzes zunächst optimiert werden, um die Erkenntnisse bei der anschließenden Synthese der (Glyco)Peptidbibliotheken zu nutzen. Darüber hinaus sollen auch die V3-Bibliotheken mittels SPR untersucht und deren Bindungsaffinitäten mit denen der entsprechenden Einzelverbindungen verglichen werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Gendatenbankrecherche

Ziel der *Genbank*-Recherche war es, eine subtypübergreifende V3-Konsensussequenz zu ermitteln aber auch die Variabilität innerhalb der *V3-Loop* des GP120 zu bestimmen, um Hinweise zur Schaffung eines effizienten subtypübergreifenden Impfstoffes zu erhalten. Da die Suche alle HIV-1 Subtypen erfassen sollte, wurden lediglich die Stichworte „HIV-1“ und „GP120“ verwendet. Die Recherche ergab einen Datensatz bestehend aus 31936 Sequenzen. Unvollständige GP120-Sequenzen, die nicht die *V3-Loop* enthielten, mußten vor der weiteren Analyse aus der Datenbank eliminiert werden, da sie sonst die statistische Auswertung verfälschen. Es wurden nur *V3-Loops* mit 35 Aminosäuren berücksichtigt, die mit Cystein beginnen und enden. Weitere V3-Sequenzen enthalten Deletionsstellen oder Insertionsstellen, wobei insbesondere die um zwei Aminosäuren verlängerte *V3-Loop* einen weiteren wichtigen Typ darstellt, der jedoch zumindest in der Datenbank wesentlich weniger vertreten ist als der Haupttyp mit 35 Aminosäuren. Das Ergebnis ist ein Datensatz mit 17974 Sequenzen. Die Auswertung der Variabilität an jeder der 35 Positionen der *V3-Loop* ist in Abbildung 22 zu sehen.

Bemerkenswert sind die starken Unterschiede der Permutationsgrade an den einzelnen Positionen. Die Aminosäurepositionen des GPG-Motivs der prinzipiell neutralisierenden Domäne (PND) sind sehr hoch konserviert. Bis auf wenige Ausnahmen zeigen die fünf N-terminal und acht C-terminal benachbarten Positionen jedoch eine sehr hohe Varianz. Die Diversität innerhalb der sonst sehr konservierten PND ist zum Teil durch die Berücksichtigung verschiedener Subtypen in der Datenbankanalyse zu erklären. Die Sequenzen der PND unterscheiden sich normalerweise zwar je nach Subtyp, sind innerhalb einer Klasse aber hoch konserviert (siehe 1.5). *Anglister*⁶⁷ zeigte anhand einer NMR basierten Konformationsanalyse eines anti(PND)-Antikörper-V3-Peptid-Komplexes, daß die zur PND benachbarten Aminosäuren ebenso vom Antikörper erkannt werden, wie die zentrale GPG-Sequenz. Die hohe Mutationsrate der flankierenden Bereiche des GPG-Motivs ist also wahrscheinlich mitverantwortlich dafür, daß die meisten monoklonalen Antikörper gegen die PND nicht kreuzreaktiv, d.h. nicht in der Lage sind, Viren unterschiedlicher Isolate zu neutralisieren, und es dem Virus so ermöglichen einer Immunreaktion auszuweichen. Experimente zeigten bei einer Impfung mit einem Gemisch an V3-Peptiden bzw. GP120-Proteinen eine breitere Immunantwort, als bei einer Immunisierung mit Einzelpeptiden.^{38,39}

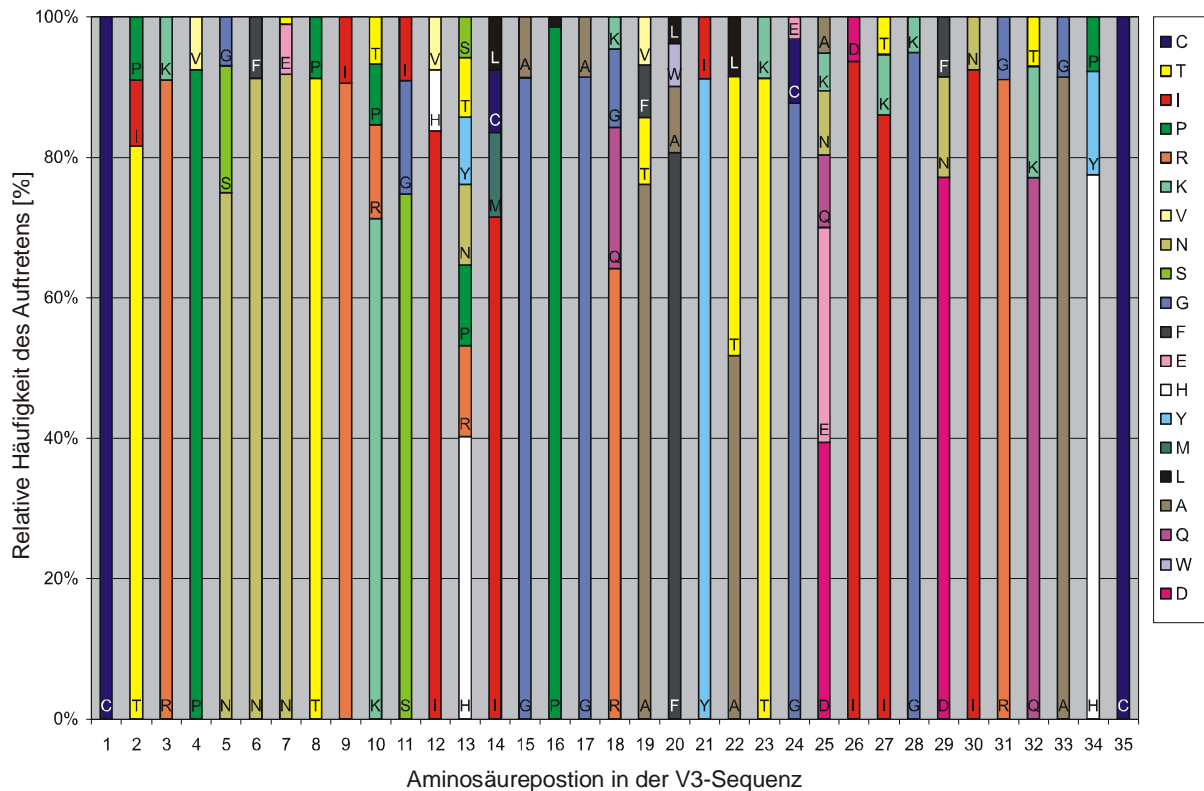


Abbildung 22: Varianz an den Positionen des Haupttyps der V3-Loop mit 35 Aminosäuren. Sie wird dargestellt durch Angabe der relativen Häufigkeit [%] des Auftretens der Aminosäuren für jede der 35 Positionen. Die unterschiedlichen Aminosäuren sind durch verschiedene Farben gekennzeichnet. Ausgewertet wurde ein Datensatz von 17974 V3-Loop Sequenzen aus Genbank.

N-Glycosylierungen im GP120 können immer an der Sequenz NXT auftreten, wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann. Die Analyse ergibt eine zu 87% hoch konservierte Glycosylierungsstelle am Asn6. Daneben existiert noch eine weitere potentielle Glycosylierungsstelle am Asn5, die aber nur zu einem Prozent populiert ist und somit vernachlässigt werden kann.

Die zielgerichtete Entwicklung und Synthese von V3-Peptidbibliotheken, welche alle wesentlichen Elemente beinhalten, die wichtig für die Ausbildung des optimalen Bindungs epitops sind und darüber hinaus die Variabilität innerhalb der V3-Loop widerspiegelt, scheint also sinnvoll.

Ausgehend von der ermittelten Diversität der V3-Loop werden die Konsensussequenz und eine Peptidbibliothek, die die Hauptvarianzen repräsentieren, abgeleitet (siehe Abbildung 23). S. Meyer^{64,160} konnte an einer EB-1 Patientensequenz zeigen, daß sowohl eine Glycosylierung als auch eine Zyklisierung eine Änderung in der Konformation zur Folge hatten und sich positiv auf die Bindungseigenschaften zum CCR5-Chemokin-Rezeptor auswirken. Am Beispiel der hier abgeleiteten Konsensussequenz, die sich an den Positionen 5 (N ↔ S) und 25 (D ↔ E) von der EB1-Sequenz unterscheidet, soll im Folgenden untersucht werden, inwieweit sich diese Beobachtungen auch bei einer V3-Loop mit etwas anderer Sequenz (s.o.) bestätigen lassen. Dazu werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit offenkettige und zyklisierte

Peptide bzw. Glycopeptide synthetisiert (siehe Abbildung 24), die die hier abgeleitete Konsensussequenz beinhalten. Diese Verbindungen werden dann auf strukturelle Unterschiede mit Hilfe von NMR-Studien analysiert, wie sie durch Zyklisierung, Glycosylierung und Sequenzunterschiede (durch Vergleich mit einer EB-1 Patientensequenz¹⁶⁰) hervorgerufen werden. Ebenso sollen diese Einflüsse auf die Bindungseigenschaften zum Chemokin-Rezeptor mittels SPR untersucht und mit denen der EB-1 Verbindungen verglichen werden.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C		
											R						Q				T		E													
											P						G																			
											N																									

Abbildung 23: Ergebnis des Bibliotheksdesigns ausgehend vom Variationsgrad an den Positionen 1 bis 35 der V3-Loop anhand einer Genbank Datenbankrecherche. Damit eine Position als Permutationsstelle definiert wird, müssen bestimmte Kriterien erfüllt sein (siehe unten). Dies führt zu insgesamt vier Permutationen in der Bibliothek. Die darin enthaltenen Aminosäuren sind an der entsprechenden Position senkrecht untereinander dargestellt. Die gelb unterlegte Sequenz stellt die Konsensussequenz der Datenbankrecherche dar.

Da nicht bekannt ist, wie viele verschiedene Sequenzen für einen ausreichenden Impfschutz notwendig sind, scheint es zunächst sinnvoll, nur die am stärksten permutierten Positionen zu berücksichtigen. Weiterhin sollten in eine Permutation nur solche Aminosäuren einbezogen werden, die nennenswert an der Gesamtpopulation der jeweiligen Position beteiligt sind. Damit eine Position als Permutationsstelle definiert wird, müssen folgende willkürlich festgesetzte Kriterien erfüllt sein: Die an einer Position am häufigsten vorkommende Aminosäure darf nur mit maximal 67% an der Gesamtpopulation beteiligt sein und es werden nur die Aminosäuren berücksichtigt, die mindestens 10% der jeweiligen Population ausmachen. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 zu sehen. Mit Hilfe der so ermittelten Permutationsstellen sollen dann die in Abbildung 24 dargestellten V3-Bibliotheken synthetisiert und auf ihre Bindungsaffinitäten hin untersucht werden.

Bei allen Verbindungen wurden die C-Termini amidiert, um den Gegebenheiten innerhalb des nativen Proteins besser zu entsprechen. Die N-Termini sind frei und nicht acetyliert.

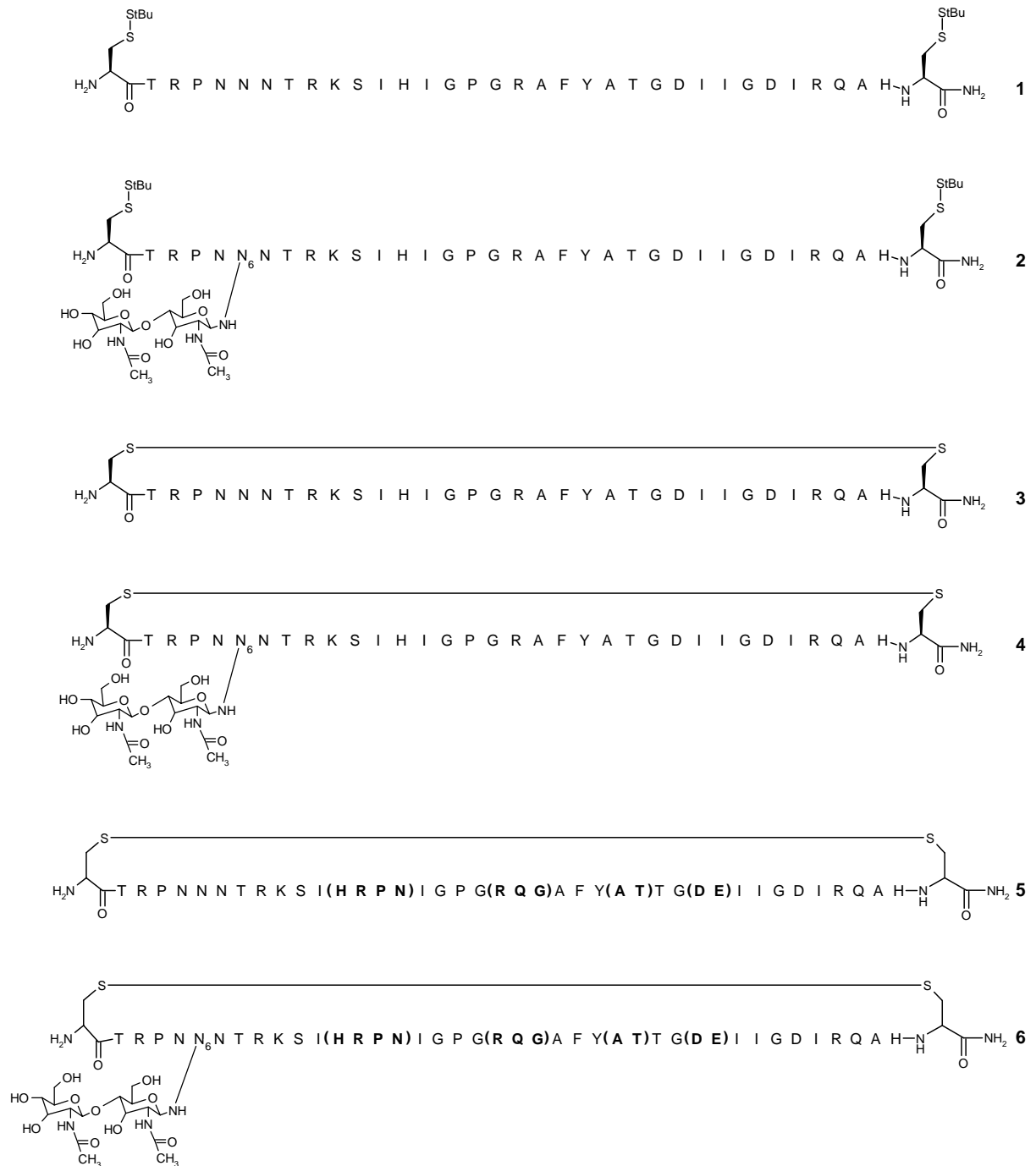


Abbildung 24: Übersicht der darzustellenden Konsensusverbindungen und Bibliotheken. Die Konsensussequenz wird in Form eines offenkettigen und disulfidverbrückten Peptids (**1** und **2**) bzw. an Asn6 mit Chitobiose glycosyliertes Peptids (**3** und **4**) synthetisiert. Die abgeleitete Bibliothek wird als zyklische Peptid- bzw. analog der Konsensussequenz glycosylierte Peptidbibliothek (**5** und **6**) synthetisiert. Die bei den Bibliotheken **5** und **6** fett und in Klammern angegebenen Aminosäuren, stellen eine Permutationsstelle dar. Die Bibliotheken enthalten also jeweils 48 Peptide respektive Glycopeptide. Bei allen Peptiden wurden die C-Termini amidiert, um den Gegebenheiten innerhalb des nativen Proteins besser zu entsprechen. Die N-Termini sind frei und nicht acetyliert.

4.2 Darstellung des N^γ-Chitobiosyl-Asparagin-Bausteins 12

Da die Glycopeptidsynthesen in dieser Arbeit nach der Bausteinmethode erfolgten, wurde zuvor der hierfür benötigte N^γ-Chitobiosyl-Asparagin-Baustein **12** nach dem in Abbildung 25 gezeigten Schema synthetisiert. Die hierfür benötigte Vorschrift stammt von S. Meyer¹⁶⁰ und J. Tost,¹⁶¹.

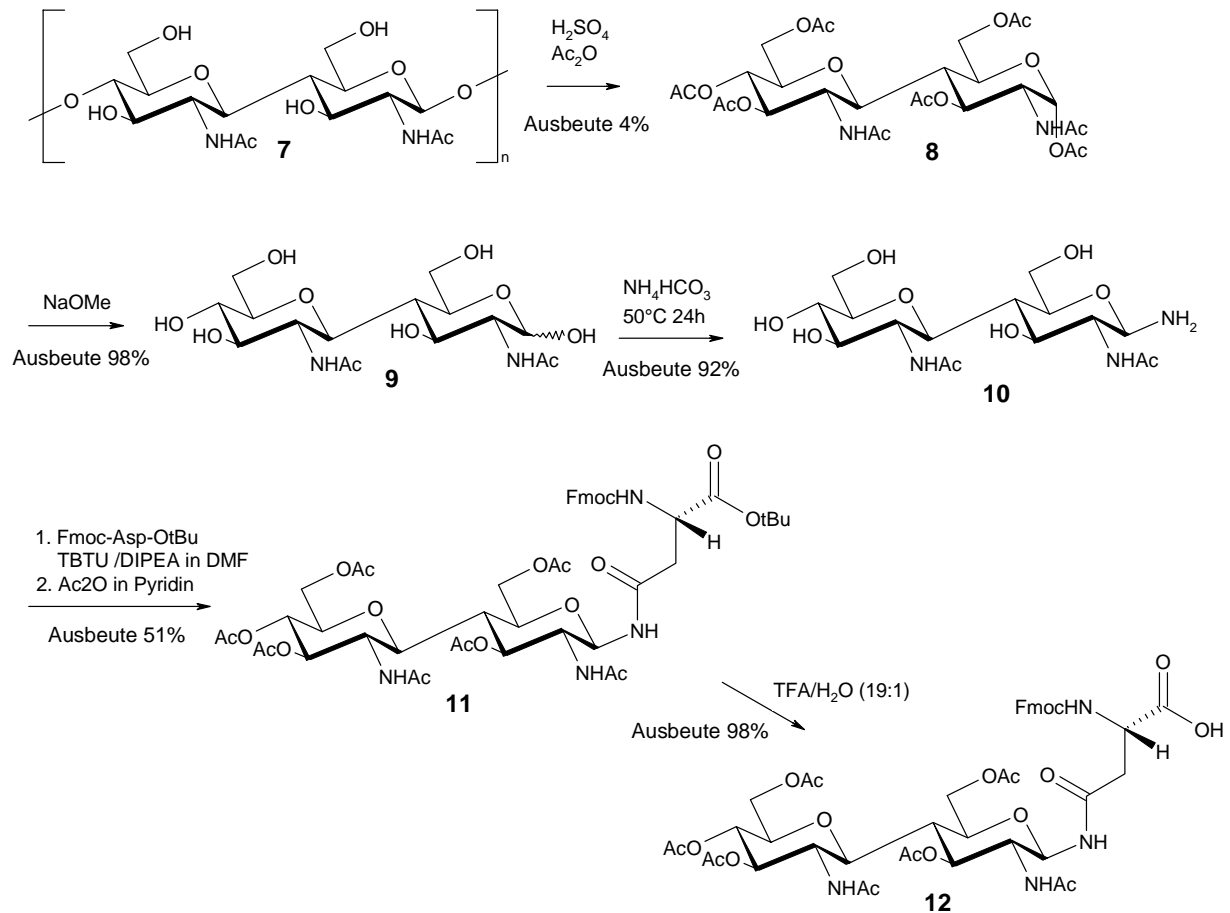


Abbildung 25: Synthese des N^γ-Chitobiosyl-Asparagin-Baustein 12.

4.3 Synthese von Peptiden und Glycopeptiden als Einzelsubstanzen

Die Synthese der hier beschriebenen Peptide und Glycopeptide erfolgten vollautomatisch im *continuous flow* Verfahren an einem Pioneer Peptide Synthesizer der Firma Perseptive. Lediglich schwierig zu kuppelnde Aminosäuren wurden bei längerer Reaktionszeit und unter Ar-Schutzgasatmosphäre manuell in die laufende Peptid- bzw. Glycopeptidsynthese eingeführt. Als Lösungsmittel diente an diesen Positionen NMP statt DMF, da NMP in der Lage ist, eine im Peptid vorhandene Sekundärstruktur zu strecken, so daß der N-Terminus für eine Kupplung besser zugänglich ist.¹⁷¹

Als Festphase wurde ein mit Polyethylenglycol copolymerisiertes Polystyrolharz verwendet, welches mit einer Fmoc- geschützten 5-(4-Aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeriansäure (PAL) als Linker ausgestattet ist.

Die Abspaltung, der am Harz synthetisierten Peptide und Glycopeptide, erfolgte bei allen synthetisierten Verbindungen durch Schütteln des Harzes in einem Gemisch bestehend aus TFA:TIPS:H₂O 95:5:2 (v:v:v). Auf die in der Peptidchemie allgemein üblichen Zusätze von weiteren *scavengern* wie 1,2-Ethandithiol oder Thioanisol wurde verzichtet, weil es, wie in anderen Arbeiten beschrieben¹⁶⁰, unter den stark sauren Abspaltbedingungen zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen kann, die letztlich zum Verlust des Zuckers oder seiner stereochemischen Eindeutigkeit führen könnten. Darüber hinaus wurden, abgesehen von Fmoc-L-Cys-(*StBu*)-OH, ausschließlich solche Aminosäurederivate eingesetzt, deren Seitenkettenschutzgruppen eine vollständige Abspaltung auch ohne weitere *scavenger* zulassen.

Bevor das abgespaltene Rohproduktgemisch per RP-HPLC aufgetrennt wurde, wurde das Abspaltgemisch vorgereinigt. Dazu wurde das bis zur Trockne eingeengte Abspaltgemisch in Wasser suspendiert, im Ultraschallbad behandelt und anschließend der unlösliche Rückstand abzentrifugiert. Das aufgearbeitete Rohproduktgemisch ließ sich im Anschluß gut in Wasser aufnehmen und gefriertrocknen, was sein Lösungsverhalten zur späteren Aufreinigung an RP-HPLC in Wasser/Acetonitril merklich verbesserte.

Um eine möglichst hohe Kupplungsausbeute zu erhalten, wurde bei allen Kupplungsschritten eine Dreifachkupplung, bei einem jeweils vierfachen Aminosäureüberschuß in Bezug auf die freien Aminofunktionen eingesetzt. Ausgenommen waren Kupplungen von Chitobiosylasparaginbausteinen. Auf deren Kupplungsbedingungen wird später eingegangen. Als Aktivatoren wurden bei der vollautomatischen Synthese TBTU, bei der manuellen Durchführung von sterisch anspruchsvollen Kupplungen HATU verwendet. Der Aktivator wurde jeweils zusammen mit der Base DIPEA im fünffachen Überschuß eingesetzt. Auch hier gelten andere Kupplungsbedingungen für die Verknüpfung von Chitobiosylasparaginbausteinen.

Da Kupplungsreaktionen in der Regel nicht quantitativ verlaufen, wurden nicht umgesetzte Aminogruppen nach einem Kupplungszyklus mit einer 10%igen Lösung von Acetanhydrid in DMF acetyliert. Ohne diesen *Capping*-Schritt bekäme man nach beendeter Synthese eine größere Anzahl von Nebenprodukten mit Deletionsstellen, was eine Aufreinigung erheblich erschweren würde.

Für den Einbau des wertvollen Chitobiosylasparagin-Bausteins sind hohe Kupplungsausbeuten bei möglichst geringen Überschüssen von großer Wichtigkeit. Das reaktivere HATU kann allerdings nicht als Aktivator verwendet werden, da die Nebenreaktion der intramolekularen Succinimidbildung nach der Aktivierung des Bausteins mit HATU an Bedeutung gewinnt (siehe Abbildung 26). Wird aber TBTU unter Feuchtigkeitsausschluß eingesetzt, so läßt sich eine Kupplungsausbeute von bis zu 78%¹⁶⁰ erzielen. Es wurden

Zweifachkupplungen durchgeführt, bei denen der Baustein äquimolar bezüglich der freien Aminofunktionen eingesetzt wurde. Es hat sich gezeigt, daß das Ausbeute-Optimum erreicht werden kann, wenn das Verhältnis von Baustein/Aktivator/Base 4:5:5 (v:v:v) beträgt.¹⁶¹ Dies entspricht einem 1.2fachen Überschuß an TBTU und DIPEA. Der gelöste Chitobiosylasparagin-Baustein wurde dabei getrennt von TBTU und DIPEA ohne Voraktivierungszeit auf das Harz gegeben, um die oben genannte Aspartimidbildung zu verhindern.

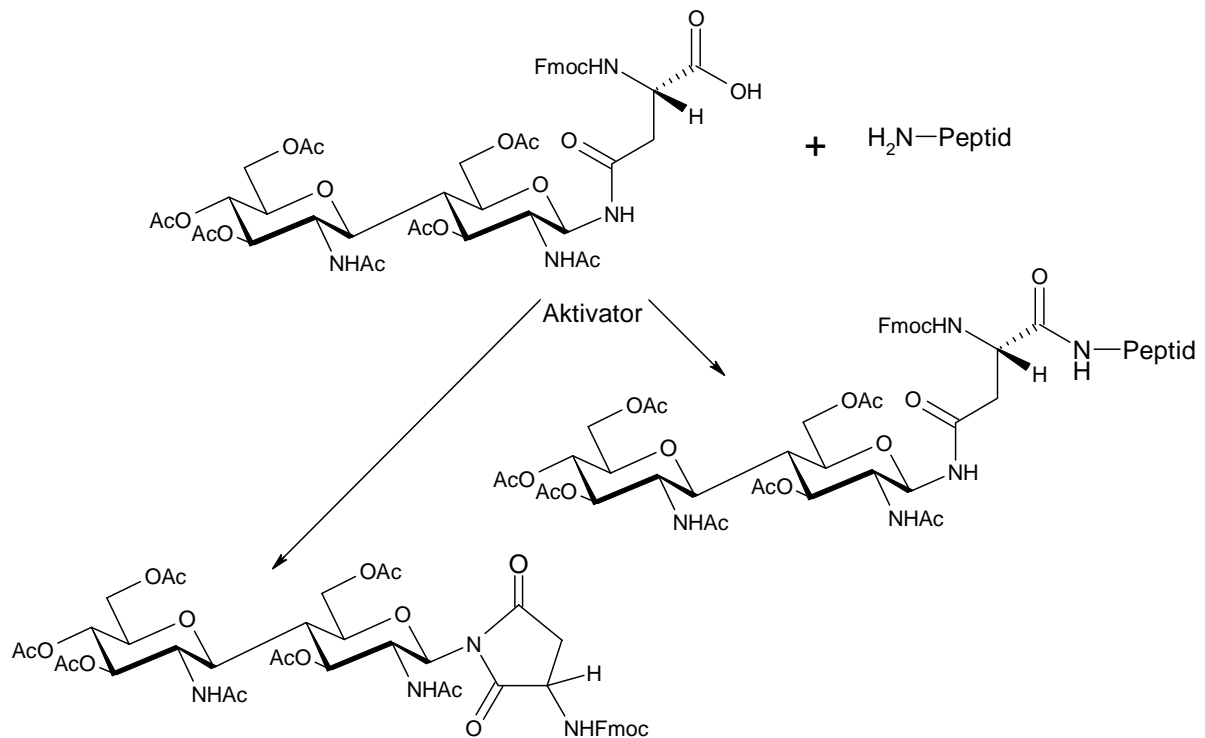


Abbildung 26: Intramolekulare Succinimidbildung als Nebenreaktion bei der Bausteinverknüpfung.

Die O-Deacetylierung des am *Peptidbackbone* verknüpften Zuckers wird vor der Abspaltung des Peptides vom Harz durchgeführt. Dazu läßt man eine Lösung aus Hydrazinhydrat in absolutem Methanol im Verhältnis 1:5 für sechs Stunden einwirken.

4.3.1 Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen V3-Peptids 1

Durch die Synthese des unglycosylierten offenkettigen Peptids **1** (siehe Abbildung 24) sollten schwierige Kupplungsschritte identifiziert werden, um später bei der Glycopeptidsynthese optimale Ausbeuten zu erreichen. Darüber hinaus dient es als Vergleichssubstanz hinsichtlich der Bindungsaffinitäten und konformativer Änderungen.

Das 35er Peptid wurde in einem ersten Ansatz komplett in einer vollautomatischen Synthese mit Dreifachkupplungen am Peptidsynthesizer hergestellt. Nach Aufreinigung mittels HPLC ergab sich eine Ausbeute von 1.5%. Die Analyse des automatischen Fmoc-Monitoring zeigte, daß die Kupplungen von Tyrosin-21 bis Arginin-18 nur mit schlechten Ausbeuten

durchführbar waren. Die Aufnahme eines MALDI-TOF Spektrums der Rohprodukts bestätigte dieses Ergebnis. Es konnten folgende Abbruchpeptide als Hauptnebenprodukte identifiziert werden:

$[M+H^+] = 1979.96$; *AcHN-AFYATGDIIGDIRQAHC(StBu)-CONH2*

$[M+H^+] = 1908.67$; *AcHN-FYATGDIIGDIRQAHC(StBu)-CONH2*

$[M+H^+] = 1761.72$; *AcHN-YATGDIIGDIRQAHC(StBu)-CONH2*

$[M+H^+] = 1598.90$; *AcHN-ATGDIIGDIRQAHC(StBu)-CONH2*

Der Grund für den Einbruch der Ausbeuten an diesen Positionen könnte in der Ausbildung einer für die Kupplung ungünstigen Sekundärstruktur liegen, so daß der N-Terminus sterisch abgeschirmt wird. Aufgrund der schlechten Ausbeute wurde die Synthese wiederholt. Die vier schwierig zu verknüpfenden Aminosäuren wurden manuell in einer Dreifachkupplung mit je 120 Minuten Dauer in Gegenwart von NMP als Lösungsmittel gekuppelt. Die photometrische Bestimmung der Ausbeute nach jedem einzelnen Kupplungsschritt durch Messung der UV-Absorption des in der Abspaltung enthaltenen Methylenfluorens ergab nahezu quantitative Ausbeuten in diesen vier Kupplungsschritten. Die Verknüpfung der anderen Aminosäuren erfolgte wie oben beschrieben am Peptidsynthesizer. Nach Aufreinigung mittels HPLC ergab sich eine Ausbeute von 4.5%. Dies entspricht nur einer Durchschnittsausbeute von 91% pro Aminosäureposition. Es ist zu vermuten, daß es noch weitere Synthesepositionen im Peptid mit unbefriedigenden Kupplungsausbeuten gibt. Darüber hinaus entstehen bei der Aufreinigung durch HPLC zusätzliche Ausbeuteverluste, die ebenfalls für diese relativ geringe Ausbeute verantwortlich sind.

Die Produkte beider Synthesen (MW = 4029.74 g/mol) konnten im MALDI-TOF-Spektrum durch einen Peak bei $m/z = 4030.49$ $[M+H^+]$ identifiziert werden. Zur genauen Charakterisierung wurden 2D-NMR-Experimente aufgenommen. Im TOCSY-Spektrum konnten die Spinsysteme aller Aminosäuren identifiziert werden. Durch Auswertung der NH-Region konnten 32 NH-Spuren, im Bereich von 7.865 bis 8.537 ppm, den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden (siehe Abbildung 27). Die zwei Prolinspuren bei 4.392 und 4.362 ppm, sowie die des N-terminalen Cysteins bei 4.456 ppm wurden anhand ihrer C_{α} -Spur zugeordnet. Die Sequenzierung des Peptids gelang durch Analyse der Nachbarschafts-NOE's in einem NOESY-Spektrum. Die Bestimmung der $^3J_{NH\alpha}$ -Kopplungskonstanten gelang unter Zuhilfenahme eines DQF-COSY-Spektrums. Die 1H -NMR-chemischen Verschiebungen und die $^3J_{NH\alpha}$ -Kopplungskonstanten sind in Tabelle 19 (siehe 7.4.1) angegeben. Dieser Syntheseprozess wurde für die folgenden Synthesen von V3-(Glyco)Peptiden als Standardverfahren übernommen.

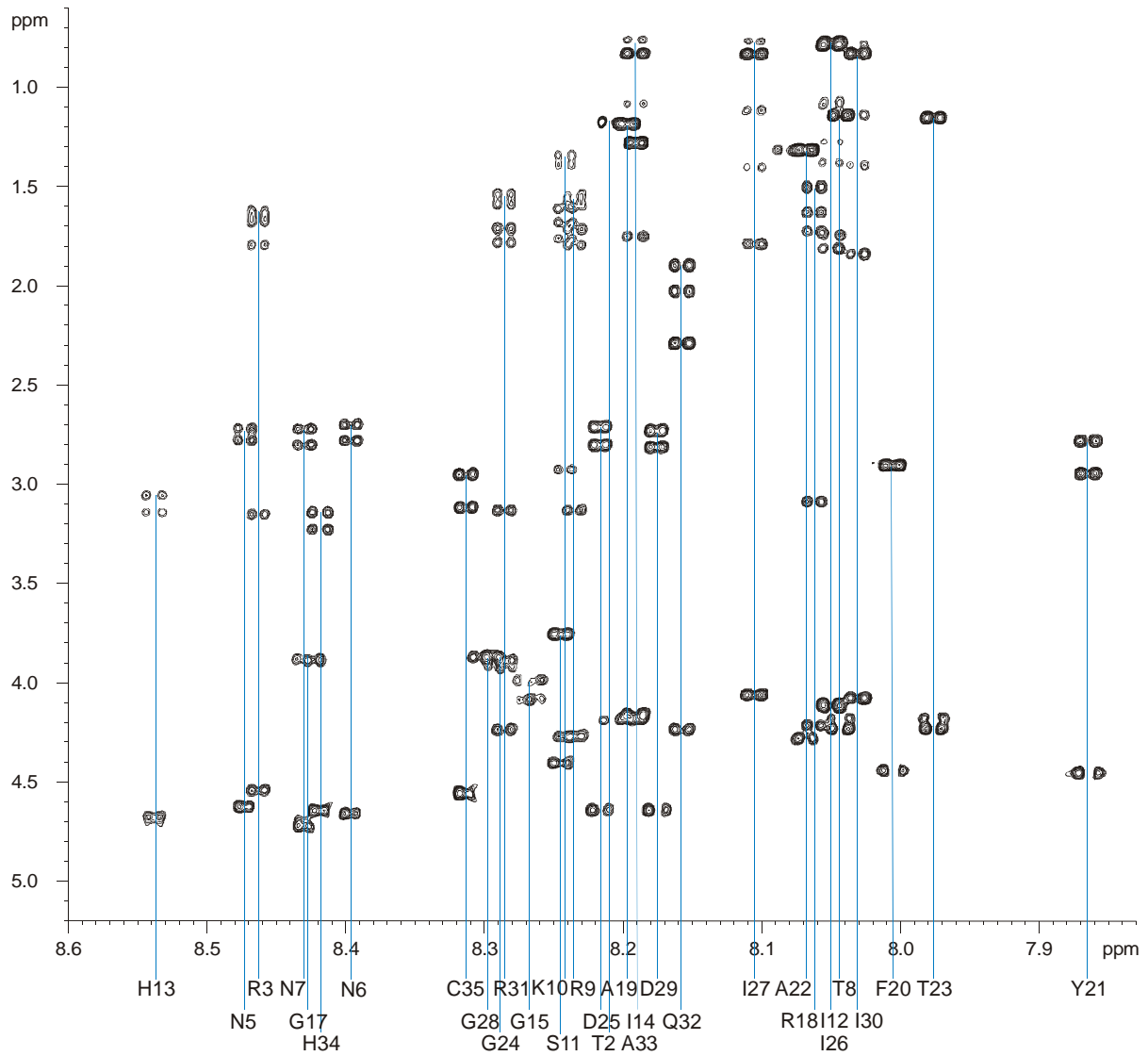
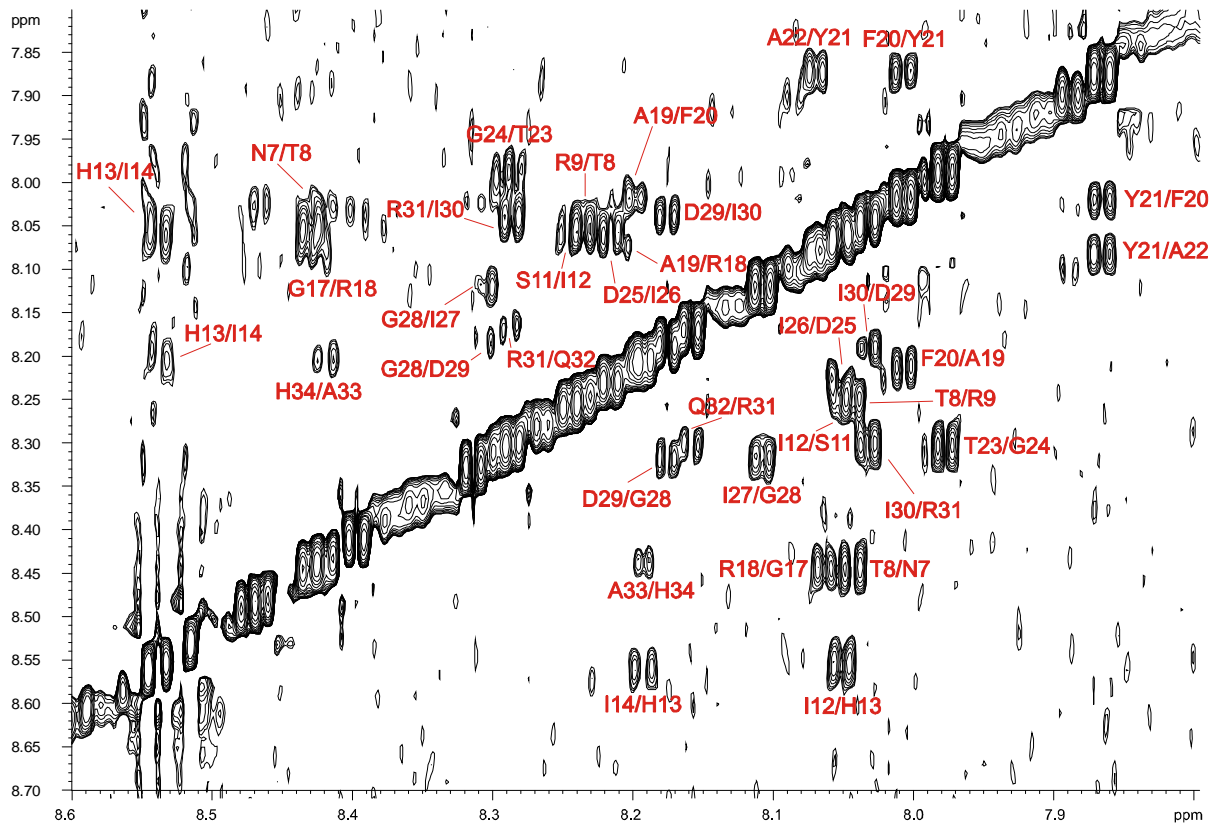


Abbildung 27: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums von **1**. Zu sehen sind 32 von 35 Aminosäurespuren. Die Kreuzsignale des N-terminalen Cysteins sowie der beiden Proline 4 und 16 sind hier nicht zu sehen, da sie keine amidischen Protonen besitzen. Die Zuordnung ihrer Spinsysteme gelang durch Auswertung ihrer C_{α} -Spuren.

Die Untersuchung der strukturelevanten NOE-Kontakte ergab, wie in Abbildung 28 zu sehen, nur sequenzielle NOE-Kontakte zwischen den amidischen Protonen. Dies deutet auf eine relativ gestreckte Struktur hin. Eine Ausnahme bildet der N-terminale Bereich. Hier treten überhaupt keine NH-NH-NOE-Kontakte auf. Der Grund könnte eine erhöhte Flexibilität dieser Region sein. Die beobachteten NOE-Kontakte sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Abbildung 28: NH-NH-Bereich des NOESY-Spektrums von Verbindung 1.

Aminosäure	NH-NH-NOE-Kontakt	Aminosäure	NH-NH-NOE-Kontakt	Aminosäure	NH-NH-NOE-Kontakt
Asn7	Thr8	Ala19	Arg18; Phe20	Gly28	Ile27; Asp29
Thr8	Asn7; Arg9	Phe20	Ala19; Tyr21	Asp29	Gly28; Ile30
Arg9	Thr8	Tyr21	Phe20; Ala22	Ile30	Asp29; Arg31
Ser11	Ile12	Ala22	Tyr21	Arg31	Ile30; Gln32
Ile12	Ser11; His13	Thr23	Gly24	Gln32	Arg31
His13	Ile12; Ile14	Gly24	Thr23	Ala33	His34
Ile14	His13	Asp25	Ile26	His34	Ala33
Gly17	Arg18	Ile26	Asp25		
Arg18	Gly17	Ile27	Gly28		

Tabelle 3: Strukturrelevante NOE-Kontakte von 1.

4.3.2 Synthese des offenkettigen V3-Glycopeptids 2

Die Anknüpfung der ersten 29 Aminosäuren des 35er Glycopeptids 2 (siehe Abbildung 24) wurde nach dem unter 4.3.1 (zweiter Synthesansatz) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die anschließende Verknüpfung des Chitobiosylasparagin-Bausteins 12 erfolgte manuell. Die Kupplung der nachfolgenden Aminosäuren fand in einer vollautomatischen Synthese am Peptidsynthesizer statt. Die Ausbeute nach Aufreinigung mittels HPLC betrug 3%. Das Glycopeptid (MW = 4436.13 g/mol) konnte durch Aufnahme eines MALDI-TOF-Spektrums, daß den Hauptpeak bei $m/z = 4437.33 [M+H^+]$ aufwies, identifiziert werden.

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung erfolgte wie unter 4.3.1 beschrieben. Wie in Abbildung 29 zu sehen, überstreichen die NH-Spuren einen Bereich von 7.865 bis 8.564 ppm.

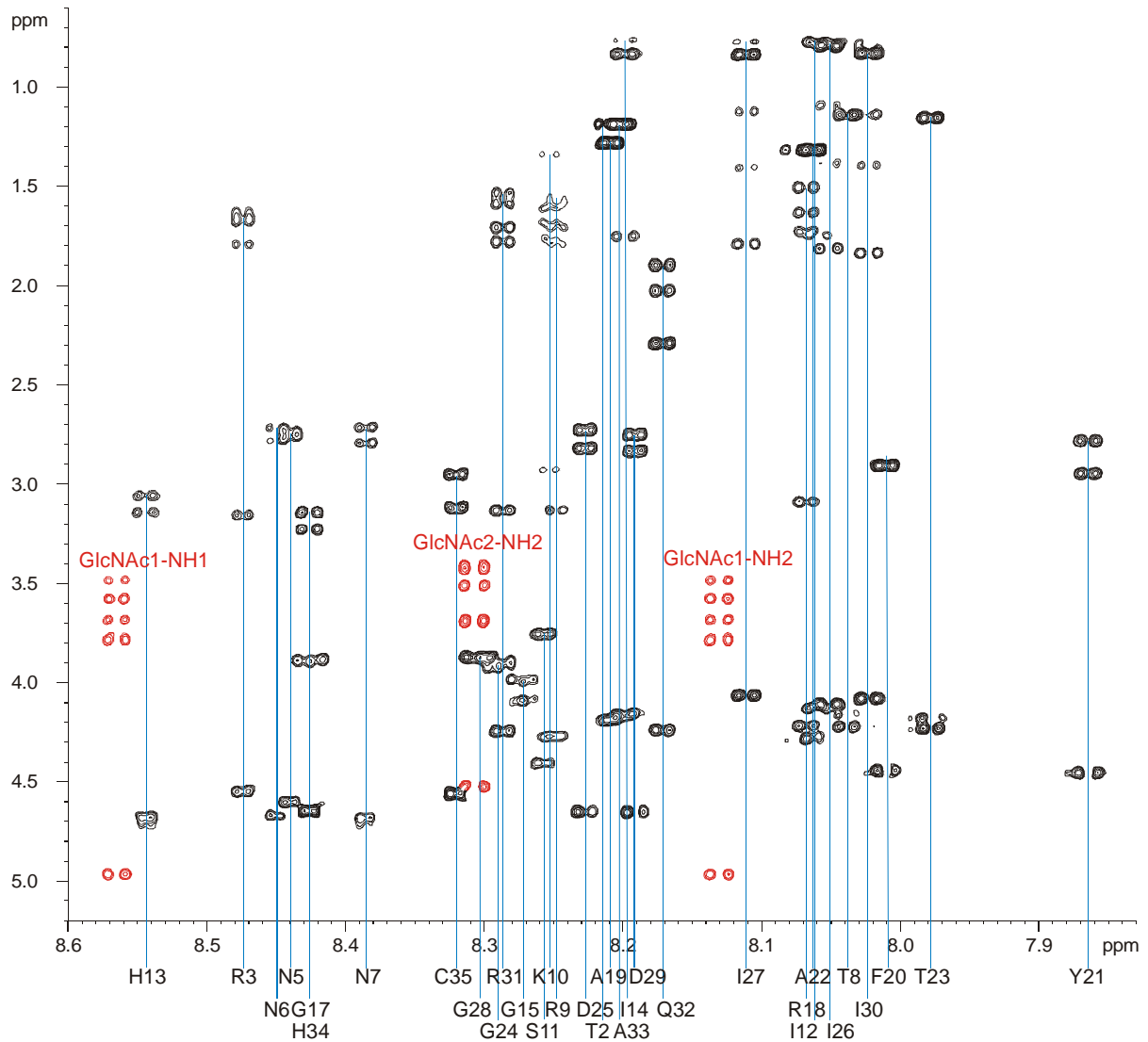


Abbildung 29: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums von 2. Die schwarz eingefärbten Signale stammen von Aminosäuren, die roten von Zuckern. Zu sehen sind 32 von 35 Aminosäurespuren und 3 Saccharidspuren. Die Kreuzsignale des N-terminalen Cysteins sowie der beiden Proline 4 und 16 sind hier nicht zu sehen, da sie keine amidischen Protonen besitzen. Die Zuordnung ihrer Spinsysteme gelang durch Auswertung ihrer C_{α} -Spuren.

Die C_{α} -Spuren der zwei Proline und des Cystein-1 liegen bei 4.390, 4.365 und 4.458 ppm. Für das direkt am Peptid gebundene N-Acetylglucosamin sind zwei NH-Spuren zu beobachten, die von der N-Acetylgruppe (8.130 ppm) und der N-glycosidischen Bindung (8.564 ppm) herrühren. Eine dritte NH-Spur (8.307 ppm) stammt von dem zweiten N-Acetylglucosamin der Chitobiose. Die Zuordnung der Zuckerprotonen gelang durch Analyse der dipolaren Kopplungen im DQF-COSY-Spektrum. Die $^1\text{H-NMR}$ -chemischen Verschiebungen und die $^3J_{\text{NH}/\alpha}$ -Kopplungskonstanten sind in Tabelle 21 (siehe 7.4.2) angegeben.

Die hier beobachteten NH-NH-NOE-Kontakte (siehe Tabelle 4) der Peptidkette decken sich weitestgehend mit denen des offenkettigen Peptids **1**. Lediglich ein zusätzlicher NOE-Kontakt zwischen Asn6 und Ans7 ist aufgetreten. Da sich beide Verbindungen nur durch eine Glycosylierung an der Seitenkette von Asn6 unterscheiden, muß der Zucker hier eine maßgebliche Rolle spielen.

Aminosäure	NH-NH-NOE-Kontakt	Aminosäure	NH-NH-NOE-Kontakt	Aminosäure	NH-NH-NOE-Kontakt
Asn6	Asn7	Arg18	Gly17	Ile27	Gly28
Asn7	Asn6; Thr8	Ala19	Phe20	Gly28	Ile27
Thr8	Asn7; Arg9	Phe20	Ala19; Tyr21	Asp29	Gly28; Ile30
Arg9	Thr8	Tyr21	Phe20; Ala22	Ile30	Asp29; Arg31
Ser11	Ile12	Ala22	Tyr21	Arg31	Ile30
Ile12	Ser11; His13	Thr23	Gly24	Gln32	Arg31
His13	Ile12; Ile14	Gly24	Thr23	Ala33	His34
Ile14	His13	Asp25	Ile26	His34	Ala33
Gly17	Arg18	Ile26	Asp25		

Tabelle 4: Strukturelevante NOE-Kontakte von **2**.

4.3.3 Versuch der Zyklisierung des orthogonal *StBu*-cystein-geschützten nicht glycosylierten V3-Peptids **1**

Die unter 4.3.1 und 4.3.2 beschriebenen Synthesen wurden unter Verwendung von orthogonal seitenkettengeschützten Cysteinen durchgeführt. Dieser Schutz erlaubt es, das entstandene Rohprodukt vor dem Entschützen der Thiolgruppen und dem Knüpfen einer Disulfidbrücke, aufzureinigen. Darüber hinaus hat diese Schutzgruppenstrategie den Vorteil, daß mit jeweils einer Synthese sowohl das lineare, als auch das zyklisierte Peptid bzw. Glycopeptid erhalten werden kann (siehe 2.1).

Die selektive Abspaltung der orthogonalen *StBu*-Schutzgruppen wird mit Hilfe von Thiolen als reduzierende Agentien durchgeführt. In der Literatur ist der Einsatz verschiedener Thiole, wie z.B. Mercaptoethanol, Ethanedithiol oder Dithiothreitol (DTT) beschrieben.¹¹⁰ DTT erscheint aber aufgrund der guten Löslichkeit in wäßrigen Medien und der weniger starken Geruchsbelästigung im Vergleich zu anderen Thiolen am geeignetsten.¹¹⁶ Die Abspaltung der *StBu*-Gruppen und die anschließende Knüpfung der Disulfidbrücke wurde in drei verschiedenen Ansätzen durchgeführt, um die optimalen Reaktionsbedingungen zu ermitteln. Dabei wurden der Überschuß an DTT und die Reaktionszeit bei der Entschützung und Zyklisierung variiert. Der erste Syntheserversuch zur Reduktion der geschützten Thiole erfolgte wie in der Literatur beschrieben mit 20 Äquivalenten DTT und einer Reaktionszeit von 6 Stunden.¹⁶² Das Fortschreiten der Entschützung ist, wie in Abbildung 30 zu sehen, massenspektrometrisch verfolgt worden.

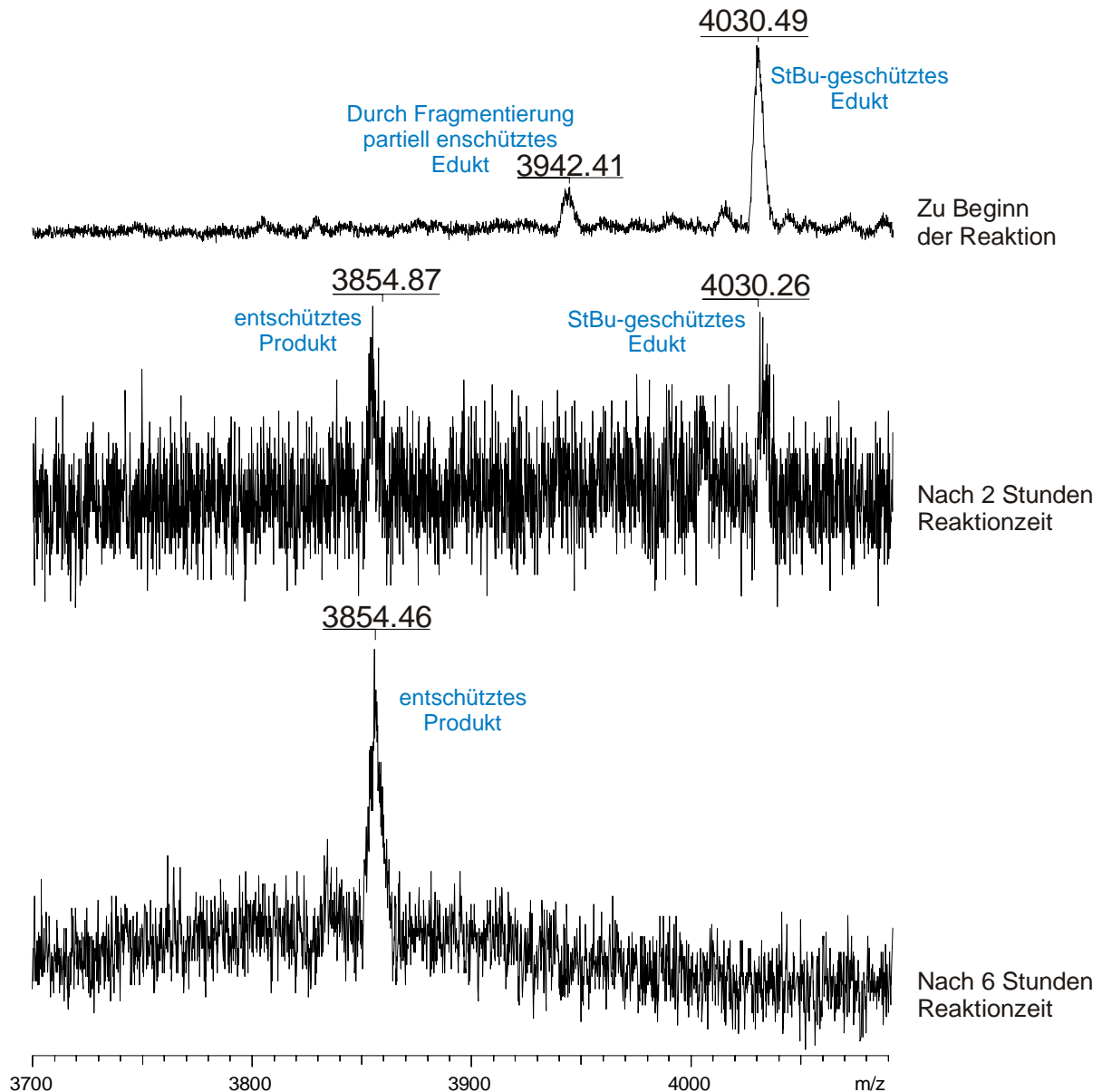


Abbildung 30: Massenspektrometrische Verfolgung der Entschützungsreaktion der Cystein-Thiole mit DTT von **1.** Es wurden vor dem Start der Reaktion, nach zwei und nach sechs Stunden eine Probe aus dem Reaktionsgemisch entnommen und nach vorheriger Entsalzung mit Hilfe von C_{18} -Pipettenspitzen massenspektrometrisch via MALDI-TOF vermessen.

Anschließend wurde die Peptidlösung mit einer Ammoniumhydrogencarbonatlösung auf $20\mu\text{M}$ verdünnt. Die Knüpfung der Disulfidbrücke erfolgte dann durch Luftoxidation über drei Tage. Nach Entsalzung und Aufkonzentration durch Ultrafiltration konnte jedoch weder das Edukt noch das gewünschte zyklisierte Peptid per MALDI-TOF detektiert werden. Der gefriergetrocknete Rückstand erwies sich, ganz im Gegensatz zum Edukt, als extrem wasserunlöslich. Das läßt darauf schließen, daß es während der Ultrafiltration zu einer Polymerisation durch intermolekulare Disulfidbrückenbildung gekommen sein könnte. Da DTT in einem hohen Überschuß eingesetzt wurde, sorgt es während der Oxidationsreaktion wahrscheinlich dafür, daß die bereits gebildeten Disulfidbrücken wieder gespalten werden. In der anschließenden Ultrafiltration wird das DTT aus der Lösung entfernt, so daß es zu

keinerlei Reduktion der Disulfidbrücken mehr kommen konnte. Da die Peptidlösung aber jetzt stark aufkonzentriert ist, steigt die Neigung zur intermolekularen Disulfidbrückenbildung stark an, welches letztendlich zu Polymeren führt.

In den folgenden beiden Experimenten sollte die Rückreaktion unterbunden werden, indem der Überschuß an DTT reduziert und die Reaktionsdauer verlängert wurde. Zusätzlich wurde der Fortschritt der Zyklisierungsreaktion durch den Nachweis von freien Thiolgruppen mit Hilfe des *Ellmann*-Tests^{163,164} verfolgt und erst abgebrochen, nachdem der Test keine freien Thiole mehr nachwies. Die Entschützung verlief auch bei diesen beiden Experimenten erfolgreich (massenspektrometrische Reaktionsverfolgung), aber auch hier bestand das gefriergetrocknete Produkt nach der Zyklisierung aus einem schwer wasserlöslichen Granulat. Im MALDI-TOF-Spektrum konnte weder das Edukt noch das Produkt nachgewiesen werden. Es kam aller Wahrscheinlichkeit nach wieder zu einer Polymerisationsreaktion. Dies ist zunächst einmal verwunderlich, weil mit dem während der Oxidationsreaktion durchgeführten *Ellman*-Test kein unumgesetztes DTT mehr nachgewiesen und so von einer Beendigung der Reaktion ausgegangen werden konnte. Das entstandene unlösliche Produkt legt aber den Schluß nahe, daß sich trotz des negativen *Ellman*-Tests noch geringe Mengen nicht umgesetztes DTT in der Reaktionslösung befanden, die ausreichten um im weiteren Verlauf der Aufarbeitung zu Polymerisationsreaktionen zu führen (s.o.). Der Test scheint also für die Verfolgung dieser Reaktion zu unempfindlich zu sein.

Auf weitere Versuche wurde verzichtet. Die beiden synthetisierten Verbindungen **1** und **2** dienen als lineare Referenzsubstanzen zu den entsprechenden zyklischen Verbindungen **3** und **4**, auf deren Synthese noch eingegangen wird.

4.3.4 Versuch der Zyklisierung des orthogonal tBu-cysteingeschützten Modellpeptids C(tBu)KSGYGFTNAGMQWC(tBu)K 13

Da die unter 4.3.3 angewandte Methode nicht zum gewünschten Erfolg führte, soll unter Verwendung von orthogonal *tBu*-geschützten Cysteinen die Entschützung und Zyklisierung nach der Silylchlorid-Sulfoxid-Methode untersucht werden.¹¹¹ Dazu wurde das Peptid C(tBu)KSGYGFTNAGMQWC(tBu)K **13** freundlicherweise von Herrn Dr. Jan Wülfken zur Verfügung gestellt.⁶³ Nach erfolgter Umsetzung nach einer modifizierten Methode¹¹⁰ von Kiso¹⁶⁵ bzw. Fujii¹⁶⁶ konnte weder das entstandene Produkt noch das Edukt im MALDI-TOF-Spektrum identifiziert werden. Da das entstandene Produkt ein unlösliches Granulat bildete, kam es wahrscheinlich, bedingt durch das geringe Lösungsmittelvolumen und die damit verbundene hohe Peptidkonzentration, zu einer Polymerisation.

4.3.5 Synthese der nicht glycosylierten zyklischen V3-Loop 3

Die Synthese erfolgte nach der unter 4.3.1 (zweiter Syntheseansatz) beschriebenen Methode. Bei dieser Synthese wurden Trityl-geschützte Cysteine eingesetzt, die zusammen mit allen

anderen Aminosäuren, bei der Abspaltung des Peptids vom Harz, entschützt wurden. Die anschließende Zyklisierung mit Luftsauerstoff, Ultrafiltration und Aufreinigung mittels HPLC ergab eine Ausbeute von 2%.

Das Produkt (MW = 3851.38 g/mol) konnte massenspektrometrisch bei $m/z = 3852.12$ ($M+H^+$) im MALDI-TOF-Spektrum nachgewiesen werden.

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung erfolgte wie unter 4.3.1 beschrieben. 32 NH-Spuren in einem Bereich von 7.865 bis 8.483 ppm konnten den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden (siehe Abbildung 31). Die Identifikation der zwei Proline und des N-terminalen Cysteins erfolgte durch Auswertung der C_α -Spuren bei 4.356, 4.381 und 4.454 ppm. Die ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen und die $^3J_{\text{NH}/\alpha}$ -Kopplungskonstanten sind in Tabelle 24 (siehe 7.4.5) angegeben.

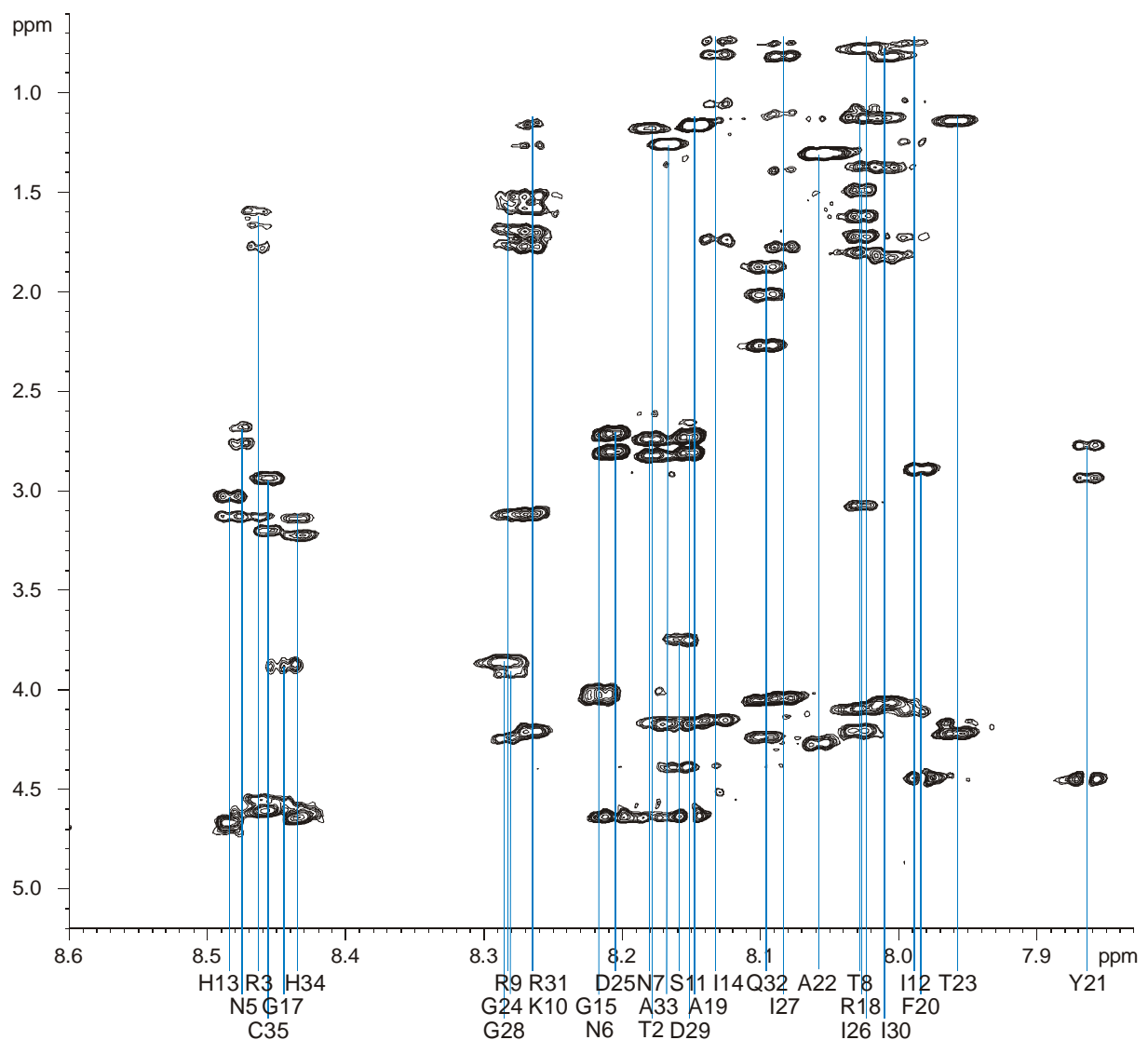


Abbildung 31: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums von **3**. Zu sehen sind 32 von 35 Aminosäurespuren. Die Kreuzsignale des N-terminalen Cysteins sowie der beiden Proline 4 und 16 sind hier nicht zu sehen, da sie keine amidischen Protonen besitzen. Die Zuordnung ihrer Spinsysteme gelang durch Auswertung ihrer C_α -Spuren.

Wie in Tabelle 5 zu sehen, konnten neben zahlreichen strukturelevanten, sequentiellen NOE-Kontakten zwischen den amidischen Protonen auch ein *long-range* NOE-Kontakte zwischen Cys35- β' und Cys1- β' beobachtet werden. Zusätzlich tritt ein NOE-Kontakt von Gly15-NH zu Arg18-NH auf. Die hier auftretenden *mid-* und *long-range* NOE-Kontakte sind auf die mit der Disulfidbrücke verbundene *Loop*-Bildung zurückzuführen, in der sich die oben erwähnten Aminosäuren räumlich sehr nahe kommen. Aufgrund der beobachteten NOE-Kontakte ist davon auszugehen, daß die zyklisierte *V3-Loop 5* in einer wesentlich anderen Konformation vorliegt als die offenkettigen Verbindungen.

Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt
Asn7	Thr8	Phe20	Ala19; Tyr21	Asp29	Gly28; Ile30
Ser11	Ile12	Tyr21	Phe20; Ala22	Ile30	Asp29; Arg31
Ile12	Ser11; His13	Ala22	Tyr21	Arg31	Ile30; Gln32
His13	Ile12; Ile14	Thr23	Gly24	Gln32	Arg31
Ile14	His13	Gly24	Thr23	Ala33	His34
Gly15	Arg18	Asp25	Ile26	His34	Ala33
Gly17	Arg18	Ile26	Asp25		
Arg18	G15; Gly17	Ile27	Gly28		
Ala19	Phe20	Gly28	Ile27		
andere strukturelevante NOE-Kontakte					
Cys35 β'	Cys1 β'				

Tabelle 5: Strukturelevante NOE-Kontakte von 3. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um NH-NH-Kontakte.

4.3.6 Synthese der glycosylierten zyklischen *V3-Loop 4*

Die Anknüpfung der ersten 29 Aminosäuren des 35er Glycopeptids **4** (siehe Abbildung 24) wurde nach dem unter 4.3.1 (zweiter Syntheseansatz) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die anschließende Verknüpfung des Chitobiosylasparagin-Bausteins erfolgte manuell. Die Kupplung der nachfolgenden Aminosäuren fand in einer vollautomatischen Synthese am Peptidsynthesizer statt. Die Bildung der Disulfidbrücke wurde wie unter 4.3.5 beschrieben durchgeführt. Nach Aufreinigung durch HPLC betrug die Ausbeute 3%.

Die Identität des Glycopeptids (MW = 4257.77 g/mol) wurde zunächst durch die Aufnahme eines MALDI-TOF-Spektrums mit einem Peak bei $m/z = 4258.77$ ($M+H^+$), bestätigt.

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung erfolgte wie unter 4.3.1 beschrieben. Der NH-Bereich des TOCSY-Spektrums wies 35 Spuren auf, die sich zwischen 7.865 und 8.543 ppm befanden. 32 Spuren konnten den im Glycopeptid enthaltenen Aminosäuren zugewiesen werden (siehe Abbildung 32). Die verbliebenen drei NH-Spuren stammen von den Zuckerprotonen. Der mit dem Peptid verknüpfte N-Acetylglucosaminrest war durch zwei NH-Spuren bei 8.543 und 8.120 ppm zu identifizieren. Die NH-Spur des zweiten Zuckerrests liegt bei 8.289 ppm. Die Identifikation der Spinsysteme der zwei Proline und des N-terminalen Cysteins erfolgte durch Auswertung der C_{α} -Spuren bei 4.345, 4.380 und 4.454 ppm.

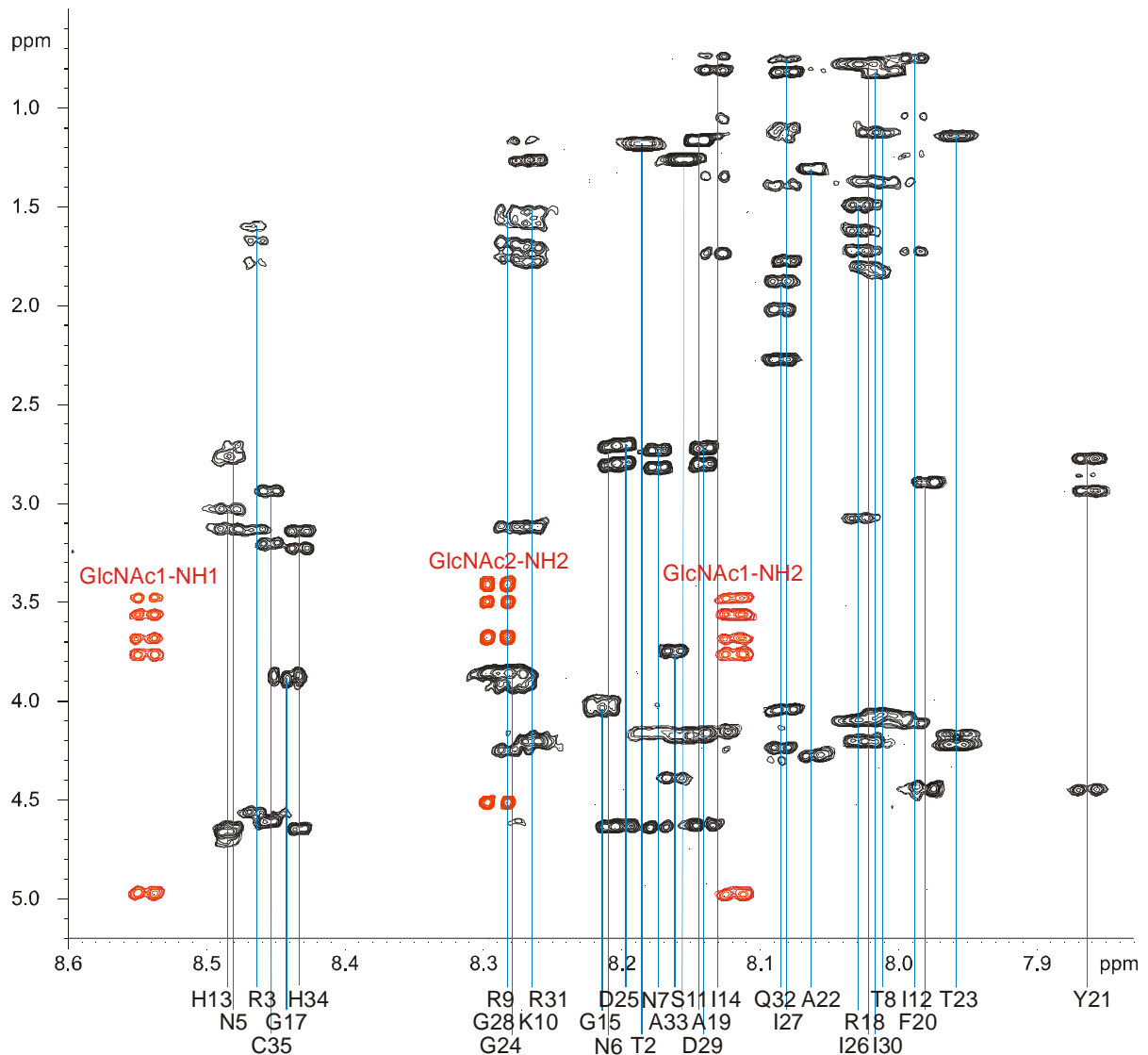


Abbildung 32: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums von **4**. Die schwarz eingefärbten Signale stammen von Aminosäuren, die roten von Zuckern. Zu sehen sind 32 von 35 Aminosäurespuren und 3 Saccharidspuren. Die Kreuzsignale des N-terminalen Cysteins sowie der beiden Proline 4 und 16 sind hier nicht zu sehen, da sie keine amidischen Protonen besitzen. Die Zuordnung ihrer Spinsysteme gelang durch Auswertung ihrer C_{α} -Spuren.

Die ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen und die $^3J_{\text{NH}/\alpha}$ -Kopplungskonstanten sind in Tabelle 26 (siehe 7.4.6) angegeben.

Für das zyklisierte Glycopeptid **4** konnten neben zahlreichen sequentiellen NOE-Kontakten (siehe Abbildung 33 und Tabelle 6) auch zwei *mid-range* NOE-Kontakte zwischen GlcNAc1-NH1 und Asn5- β/β' sowie Gly15-NH und Arg18-NH ausgewertet werden. Weitere zwei strukturelevante *long-range* Kontakte traten zwischen, Asn5-NH und Ile30-NH sowie zwischen Cys35- β' und Cys1- β' auf.

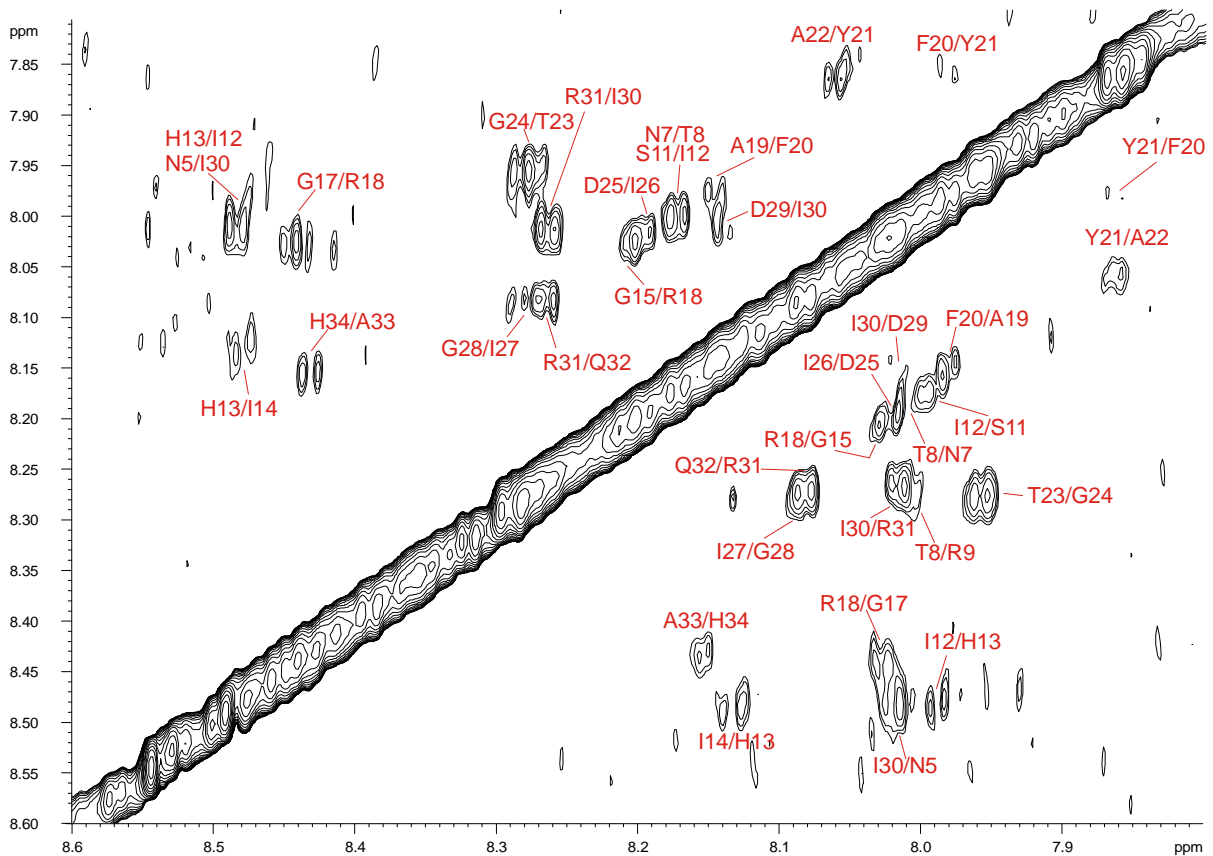


Abbildung 33: NH-NH-Bereich des NOESY-Spektrums von Verbindung **4**.

Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt
Asn5	Ile30	Arg18	Gly15; Gly17	Ile27	Gly28
Asn7	Thr8	Ala19	Phe20	Gly28	Ile27
Thr8	Asn7	Phe20	Ala19; Tyr21	Asp29	Gly28; Ile30
Ser11	Ile12	Tyr21	Phe20; Ala22	Ile30	Asn5; Asp29; Arg31
Ile12	Ser11; His13	Ala22	Tyr21	Arg31	Ile30; Gln32
His13	Ile12; Ile14	Thr23	Gly24	Gln32	Arg31
Ile14	His13	Gly24	Thr23	Ala33	His34
Gly15	Arg18	Asp25	Ile26	His34	Ala33
Gly17	Arg18	Ile26	Asp25		
andere strukturelevante NOE-Kontakte					
Cys35 β'	Cys1 β'				
GlcNAc1-NH1	Asn5 β,β'				

Tabelle 6: Strukturelevante NOE-Kontakte von **4**. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um NH-NH-Kontakte.

Wie schon bei der nicht glycosylierten *V3-Loop* zu beobachten war, unterscheidet sich auch die glycosylierte Form in ihrer Konformation deutlich von der entsprechenden offenkettigen Verbindung. Diese ist an den hier auftretenden *mid* und *long-range* NOE-Kontakten festzumachen. Bemerkenswert ist der NOE-Kontakt zwischen Asn5-NH und Ile30-NH. Er tritt bei dem hier untersuchten Glycopeptid **4** auf, jedoch nicht beim unglycosylierten zyklischen Peptid **3**. Der Chitobiosylrest hat hier also einen wesentlichen Einfluß - direkt oder

indirekt - auf die räumliche Annäherung der beiden Aminosäuren und damit auch auf die Konformation in diesem Bereich des Peptidrückgrats.

4.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen zu konformativen Differenzen unterschiedlicher V3-Peptide und -Glycopeptide

Durch Vergleiche der TOCSY-Spektren der synthetisierten Verbindungen **1**, **2**, **3** und **4** und einer zyklischen glycosylierten *V3-Loop* der EB1-Patientensequenz¹⁶⁰ können Hinweise auf strukturelle Unterschiede, hervorgerufen durch Glycosylierung, Ringschluß durch eine Disulfidbrücke und Permutationen, erhalten werden. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden alle Spektren in H₂O/D₂O (9:1) bei 300K aufgenommen. Der pH-Wert aller Proben betrug 3.

4.4.1 Vergleich des offenkettigen V3-Peptids 1 mit dem offenkettigen V3-Glycopeptid 2

In Abbildung 34 sind die NH-Bereiche der TOCSY-Spektren des linearen Peptids **1** und des linearen Glycopeptids **2** übereinander gelegt. Der Vergleich der chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen liefert Hinweise auf glycosylierungsbedingte Unterschiede in der dreidimensionalen Struktur (siehe Tabelle 7). Die deutlichste Änderungen weist erwartungsgemäß Asn6 ($\Delta\delta = -0.054$ ppm) im Bereich der Glycosylierungsstelle auf. Die beiden benachbarten Aminosäuren zeigen zwar kleinere aber dennoch signifikante Änderungen von 0.032 ppm für Asn5 und 0.046 ppm für Asn7. Darüber hinaus sind noch kleinere Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Aminosäuren Arg3, Arg9, Lys10, Ser12 und Ile14 im N-terminalen Bereich und Asp25, Asp29, Gln32 und Ala33 im C-terminalen Bereich, mit Beträgen zwischen 0.011 ppm und 0.019 ppm festzustellen.

Die Veränderungen der chemischen Verschiebungen im N-terminalen Bereich lassen sich auf die Nähe zur Glycosylierungsstelle zurückführen. Die Ursache der Unterschiede bei den anderen sechs Aminosäuren können nur dann beim Chitobiosylrest zu suchen sein, wenn eine direkt oder indirekt durch ihn bedingte Konformationsänderung der Peptidkette in dem Bereich der oben erwähnten Aminosäuren stattfände oder direkt *trans-loop*-Kontakte vorhanden wären. Die Peptidkette müßte also eine *loop*-artige Struktur aufgrund der Glycosylierung ausbilden. Dies ist jedoch nach einer NMR-Konformationsanalyse der offenkettigen *V3-Loop*¹⁶⁰ relativ unwahrscheinlich. Zusätzlich wurden auch keinerlei *long-range* NOE-Kontakte im NOESY-Spektrum des Glycopeptids **2** gefunden. Die Unterschiede in diesem Bereich bleiben somit ungeklärt.

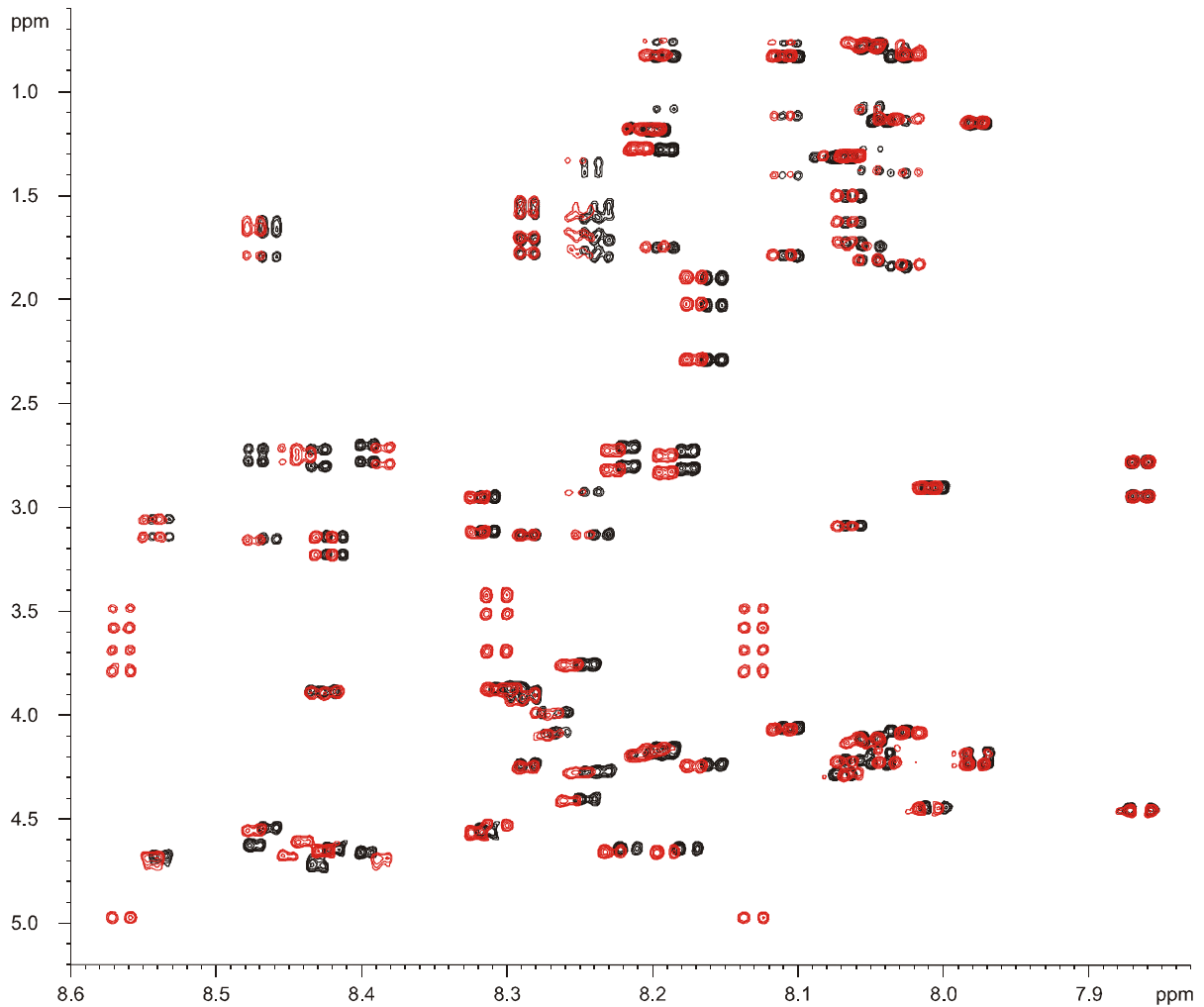


Abbildung 34: Ausschnitte aus den TOCSY-Spektren des linearen Peptids 1 (schwarz) und des linearen Glycopeptids 2 (rot).

Aminosäure	$\Delta\delta$ [ppm]	Aminosäure	$\Delta\delta$ [ppm]	Aminosäure	$\Delta\delta$ [ppm]
Thr2	-0.005	Ile14	-0.008	Ile26	-0.001
Arg3	-0.011	Gly15	-0.004	Ile27	-0.006
Asn5	0.032	Gly17	0.002	Gly28	-0.005
Asn6	-0.054	Arg18	-0.006	Asp29	-0.017
Asn7	0.046	Ala19	-0.005	Ile30	0.009
Thr8	0.007	Phe20	-0.005	Arg31	-0.002
Arg9	-0.012	Tyr21	0.000	Gln32	-0.013
Lys10	-0.011	Ala22	0.004	Ala33	-0.019
Ser11	-0.012	Thr23	-0.002	His34	-0.008
Ile12	-0.014	Gly24	-0.001	Cys35	-0.007
His13	-0.007	Asp25	-0.011		

Tabelle 7: Unterschiede in der chemischen Verschiebung der amidischen Protonen zwischen linearem Peptid 1 und linearem Glycopeptid 2.

4.4.2 Vergleich des zyklisierten V3-Peptids 3 mit dem zyklisierten V3-Glycopeptid 4

Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, sind die Unterschiede in der chemischen Verschiebung zwischen dem zyklischen Peptid 3 und dem zyklischen Glycopeptid 4 geringer, als bei den offenkettigen Verbindungen 1 und 2. Lediglich die Aminosäuren Thr2, Asn6, Asn7, Thr8, Lys10, Asp25, Asp29, Gln32 und Ala33 zeigen kleine Änderungen der Beträge in der chemischen Verschiebung zwischen 0.007 ppm und 0.017 ppm (siehe Tabelle 8).

Aminosäure	$\Delta\delta$ [ppm]	Aminosäure	$\Delta\delta$ [ppm]	Aminosäure	$\Delta\delta$ [ppm]
Thr2	-0.007	Ile14	0.001	Ile26	0.001
Arg3	0.000	Gly15	0.003	Ile27	0.002
Asn5	-0.005	Gly17	0.002	Gly28	0.004
Asn6	0.007	Arg18	-0.002	Asp29	0.011
Asn7	0.007	Ala19	0.003	Ile30	-0.006
Thr8	0.017	Phe20	0.003	Arg31	0.000
Arg9	0.001	Tyr21	0.000	Gln32	0.011
Lys10	-0.008	Ala22	-0.005	Ala33	0.012
Ser11	-0.003	Thr23	0.000	His34	0.002
Ile12	0.000	Gly24	0.002	Cys35	0.003
His13	-0.001	Asp25	0.008		

Tabelle 8: Unterschiede in der chemischen Verschiebung der amidischen Protonen zwischen zyklischem Peptid 3 und zyklischem Glycopeptid 4.

Die Aminosäuren nahe der Glycosylierungsstelle weisen mit Ausnahme von Thr8 kleinere Differenzen auf als die weiter entfernten. Unterschiede in der chemischen Verschiebung treten bei diesem Vergleich, von wenigen Ausnahmen abgesehen, bei den gleichen Aminosäuren auf, wie sie schon beim vorangegangenen Vergleich der offenkettigen Verbindungen 1 und 2 beobachtet werden konnten (siehe 4.4.1). Wie oben bereits erwähnt, sind die Beträge hier jedoch kleiner. Durch den Ringschluß mittels einer Disulfidbrücke scheint das Peptidrückgrat weitgehend in seiner dreidimensionalen Struktur festgelegt zu sein, so daß in diesem Fall der konformative Einfluß des Zuckers wahrscheinlich keinen großen Effekt mehr hat. Das erklärt die sehr viel kleineren Unterschiede von 3 und 4 in der chemischen Verschiebung, verglichen mit den linearen Verbindungen 1 und 2.

Eine analoge Untersuchung einer zyklisierten V3-Loop¹⁶⁰, jedoch mit anderer Sequenz im Bereich der Glycosylierungsstelle (N5 ↔ S5) zeigt eine sehr viel größere Änderung in der chemischen Verschiebung von 0.069 ppm für S5 im Vergleich zu N5 mit -0.005 ppm. Dieses kann durch die verschiedenen Aminosäuren an der Position 5 aber ebenso durch einen verschieden großen Einfluß des Zuckers bedingt sein. Je nach Aminosäure hat der Zucker wahrscheinlich eine etwas andere Vorzugsrichtung im Bezug auf das Peptidrückgrat, was wiederum eine unterschiedlich starke Änderung in der chemischen Verschiebung der betroffenen Aminosäuren bewirken kann.

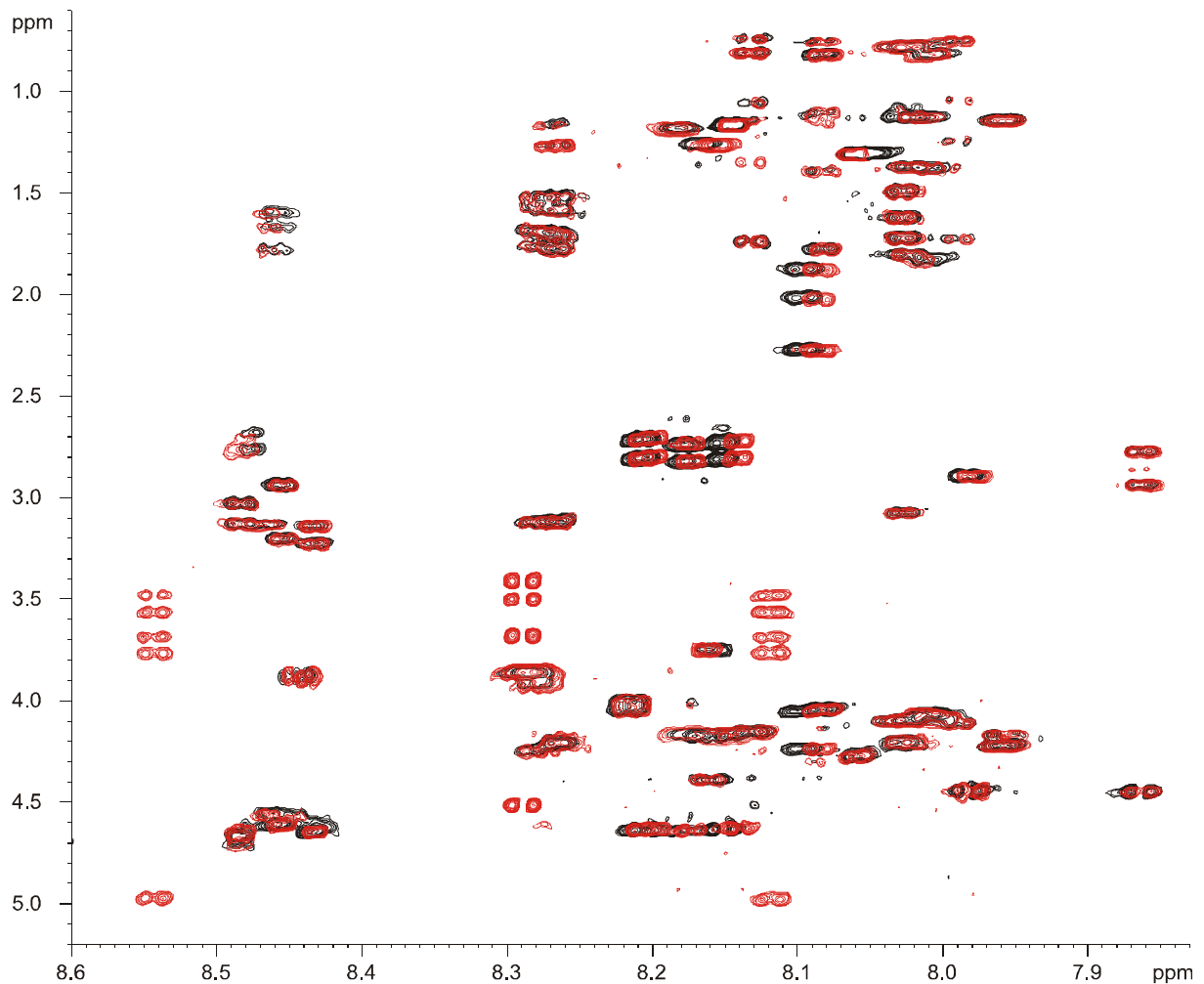


Abbildung 35: Auschnitte aus den TOCSY-Spektren des zyklischen Peptids 3 (schwarz) und des zyklischen Glycopeptids 4 (rot).

4.4.3 Vergleich des offenkettigen V3-Glycopeptids 2 mit dem zyklisierten V3-Glycopeptid 4

Anhand der TOCSY-Spektren der Verbindungen 2 und 4 sind Unterschiede in den chemischen Verschiebungen nahezu aller Amidprotonen festzustellen ($\Delta\delta = 0.001$ ppm bis 0.240 ppm) und mehr als 77% der Aminosäuren weisen Differenzen von mindestens 0.020 ppm auf (siehe Tabelle 9). Es ist somit möglich, daß sich die dreidimensionalen Strukturen beider Verbindungen unterscheiden.

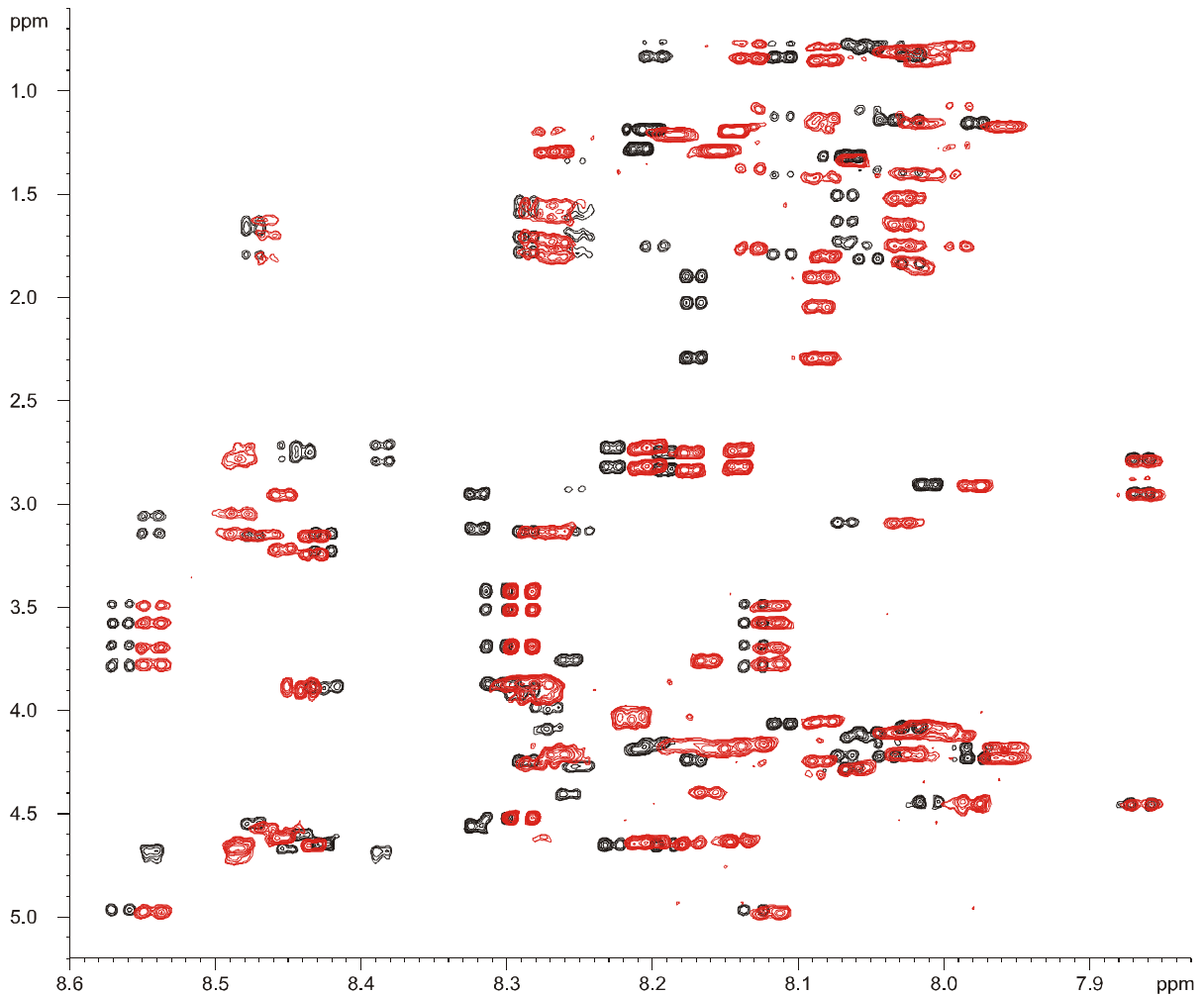


Abbildung 36: Ausschnitte aus den TOCSY-Spektren des linearen Glycopeptids 2 (schwarz) und des zyklischen Glycopeptids 4 (rot).

Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen sind hier sehr viel größer, als bei den vorherigen Vergleichen zwischen nicht glycosyliertem und glycosyliertem Peptid (siehe 4.4.1. und 4.4.2) Die Zyklisierung der Glycopeptide durch eine Disulfidbrücke hat also einen sehr viel größeren Einfluß auf die Konformation, als die Einführung eines Chitobiosylrestes. Die größten Differenzen weisen hier die Aminosäuren Asn6 und Asn7 im Bereich der Glycosylierung auf, mit Änderungen von 0.240 ppm bzw. 0.212 ppm. Es ist daher anzunehmen, daß die Knüpfung der Disulfidbrücke zwischen den terminalen Cysteinen auch eine stärkere Wechselwirkung des Zuckerrestes mit Asn6 bzw. Asn7 und damit verbunden, eine Beeinflussung von deren Konformation, induziert.

Der Vergleich der TOCSY-Spektren in Bezug auf die Lage der amidischen Protonen von den Zuckerresten zeigt ebenso eine deutliche Verschiebung, deren Ursache eine konformative Änderung aufgrund der oben erwähnten Zyklisierung ist. Darüber hinaus zeigt auch Cys35 eine deutliche Veränderung in der chemischen Verschiebung von -0.133 ppm, die ebenfalls ihre Ursache in der Zyklisierung findet.

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	GlcNAc-NH	$\Delta\delta$ [ppm]
Thr2	0.030	Ile14	0.067	Ile26	0.029	GlcNAc1-NH1	0.022
Arg3	0.010	Gly15	0.058	Ile27	0.030	GlcNAc1-NH2	0.012
Asn5	-0.041	Gly17	-0.017	Gly28	0.021	GlcNAc2-NH2	0.018
Asn6	0.240	Arg18	0.039	Asp29	0.051		
Asn7	0.212	Ala19	0.057	Ile30	0.005		
Thr8	0.027	Phe20	0.029	Arg31	0.022		
Arg9	-0.034	Tyr21	0.000	Gln32	0.087		
Lys10	-0.020	Ala22	0.001	Ala33	0.053		
Ser11	0.095	Thr23	0.020	His34	-0.007		
Ile12	0.075	Gly24	0.011	Cys35	-0.133		
His13	0.059	Asp25	0.030				

Tabelle 9: Unterschiede in der chemischen Verschiebung der amidischen Protonen zwischen linearem Glycopeptid 2 und zyklischem Glycopeptid 4.

4.4.4 Vergleich einer glycosylierten zyklischen V3-Loop (EB1)¹⁶⁰ mit dem zyklisierten V3-Glycopeptid 4

Die übereinandergelegten TOCSY-Spektren des zyklischen Glycopeptids 4 und einer zyklischen glycosylierten V3-Loop der EB1-Patientensequenz¹⁶⁰ (siehe Abbildung 37), die sich an den Positionen 5 (N ↔ S) und 25 (D ↔ E) unterscheiden, weisen deutliche Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der amidischen Aminosäureprotonen auf. Die Beträge der Differenzen liegen in einem Bereich von 0.001 ppm für Arg31 und 0.259 ppm für Asn6 (siehe Tabelle 10). 22 der 30 verglichenen Aminosäure-NH-Spuren weisen sogar einen Unterschied von mindestens 0.010 ppm auf. Wie zu erwarten war, sind die Unterschiede in den zu den Positionen 5 und 25 benachbarten Aminosäuren am größten. Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, daß die elektronische Umgebung aufgrund unterschiedlicher Aminosäuren eine andere ist. Darüber hinaus können unterschiedliche Aminosäuren an den Positionen 5 und 25 auch voneinander abweichende Konformationen der benachbarten Aminosäuren induzieren. Dies führt letztendlich auch zu Unterschieden in der chemischen Verschiebung. Die Veränderung in der chemischen Verschiebung der benachbarten Aminosäuren Arg3 und Asn6 beträgt 0.182 ppm bzw. -0.259 ppm. Ebenso verhält es sich beim Ile26 mit einer Änderung von -0.129 ppm. Obwohl auch Gly24 direkt zu einer der Permutationsstellen benachbart ist, zeigt es im Vergleich zu den anderen drei Aminosäuren nur einen relativ geringen Unterschied von -0.008 ppm.

Aufgrund der relativ großen Differenzen in den chemischen Verschiebungen vieler Aminosäuren ist es möglich, daß der Austausch von Asparagin gegen Serin an der Position 5 und Asparaginsäure gegen Glutaminsäure an der Position 25 einen Einfluß auf die dreidimensionale Struktur der Glycopeptide hat.

Erwähnenswert ist an dieser Stelle auch der Einfluß der Permutation nahe der Glycosylierung und vice versa. Die NH-Spuren des Chitobiosylrestes sind um bis zu 0.023 ppm verschoben, wobei die amidischen Protonen der N-Acetylgruppen größere Differenzen aufweisen, als die

der N-glycosidischen Bindung zur Asparaginseitenkette (siehe Tabelle 10). Dies ist auf die oben bereits genannten Gründe des Aminosäureaustausches, aber auch auf konformationelle Unterschiede zurückzuführen.

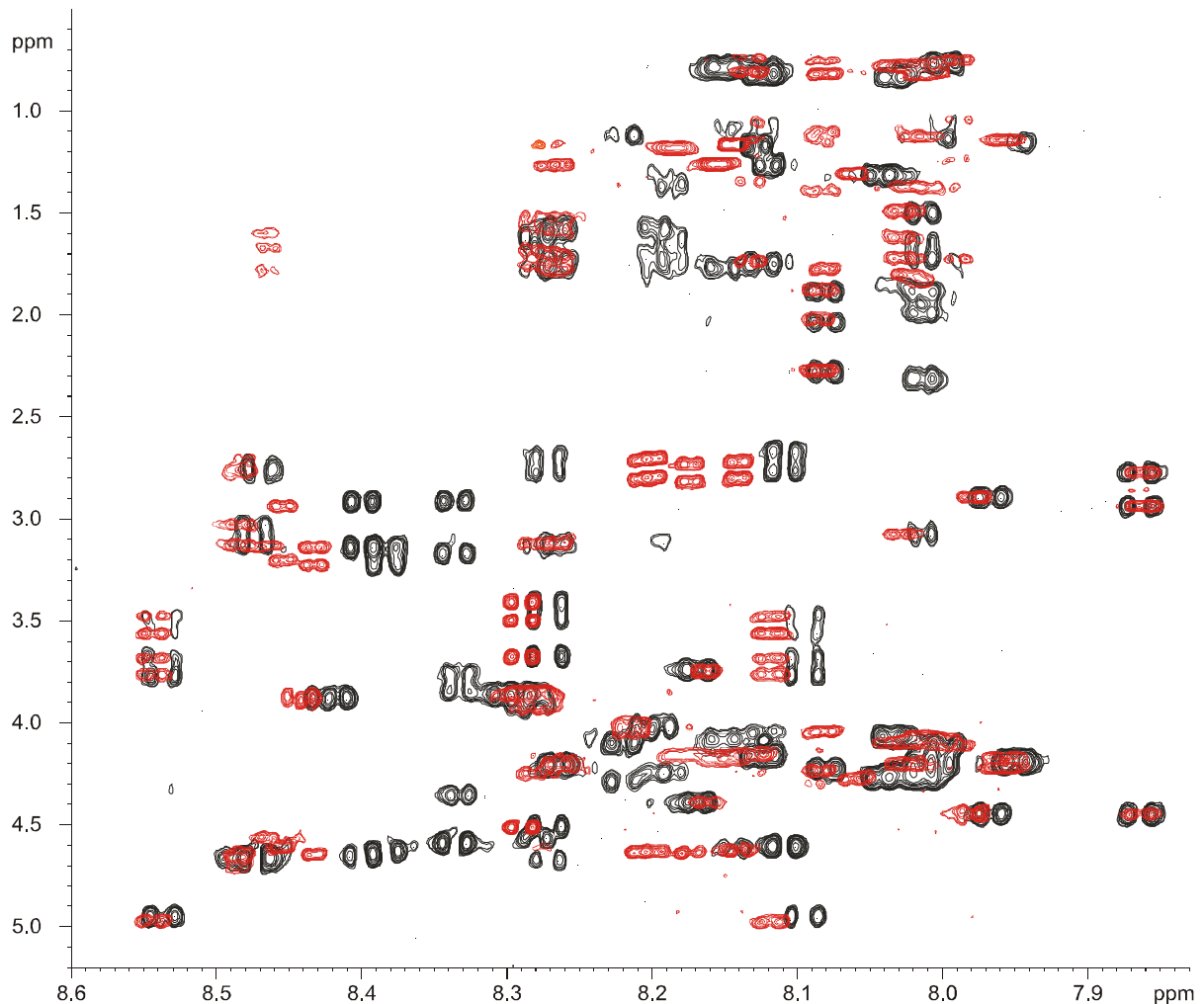


Abbildung 37: Unterschiede in der chemischen Verschiebung der amidischen Protonen zwischen zyklischer *V3-Loop* aus der Patientensequenz EB1¹⁶⁰ und zyklischem Glycopeptid **4**.

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	GlcNAc-NH	$\Delta\delta$ [ppm]
Thr2	-0.035	Ile14	0.007	Ile26	-0.129	GlcNAc1-NH1	0.008
Arg3	0.182	Gly15	0.015	Ile27	-0.043	GlcNAc1-NH2	0.023
Asn6	-0.259	Gly17	0.021	Gly28	-0.015	GlcNAc2-NH2	0.017
Asn7	-0.099	Arg18	0.014	Asp29	0.032		
Thr8	0.010	Ala19	0.016	Ile30	-0.018		
Arg9	0.083	Phe20	0.014	Arg31	0.001		
Lys10	0.088	Tyr21	0.000	Gln32	0.004		
Ser11	-0.007	Ala22	0.019	Ala33	0.036		
Ile12	-0.009	Thr23	0.008	His34	0.050		
His13	0.011	Gly24	-0.008	Cys35	0.119		

Tabelle 10: Unterschiede in der chemischen Verschiebung der amidischen Protonen zwischen dem zyklischem Glycopeptid **4** und der zyklischen *V3-Loop* aus der Patientensequenz EB1.¹⁶⁰

4.4.5 Fazit aus den durchgeführten Vergleichen

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine Glycosylierung, wie schon bei analogen Untersuchungen anderer Glycopeptide aus der V3-Region^{160,161} beobachtet, die Konformation der Aminosäuren in diesem Bereich beeinflusst. Dieser Einfluß ist bei den offenkettigen V3-Verbindungen **1** und **2** aber sehr viel größer als bei den zyklisierten **3** und **4**. Dies ist hauptsächlich auf die Erhöhung der Rigidität aufgrund der Disulfidbrücke zurückzuführen. Darüber hinaus kann eine Variation in der Aminosäuresequenz ebenso die Rigidität des Peptidrückgrats und damit auch die Stärke des konformationellen Einflusses des Zuckers verändern.

Die Einflußnahme einer Glycosylierung auf die Gesamtstruktur des Peptidrückgrats ist jedoch in der Stärke und in der Ausdehnung kleiner als die durch eine Zyklisierung hervorgerufenen Veränderungen. Die dreidimensionalen Strukturen der offenkettigen (Glyco)Peptide **1** und **2** unterscheidet sich stark von der der zyklisierten **3** und **4**. Dieses wird durch die beobachteten strukturelevanten NOE-Kontakte bestätigt. Bei den offenkettigen Verbindungen **1** und **2** treten lediglich sequentielle NH-NH-Kontakte auf. Die disulfidverbrückten Verbindungen **3** und **4** zeigen dagegen noch zusätzliche *mid-* und *long range* NOE-Kontakte. Zuvor von *S. Meyer*¹⁶⁰ durchgeführte Konformationsanalysen von V3-Glycopeptiden bestätigen diese Ergebnisse.

Darüber hinaus scheint eine gezielte Permutation an den Positionen 5 (N ↔ S) und 25 (D ↔ E) der *V3-Loop* einen entscheidenden Einfluß auf die gesamte dreidimensionale Struktur zu haben, wie die teilweise sehr großen Differenzen der chemischen Verschiebungen in den TOCSY-Spektren des zyklischen Glycopeptids **4** und des entsprechenden Glycopeptids einer EB1-Patientensequenz¹⁶⁰ zeigen.

4.5 SPR-Experimente der Peptide und Glycopeptide 1 – 4

4.5.1 Zellkultur und Zellpräparation von Parental- bzw. HI5-Zellen

Die Zellkulturen, bestehend aus Osteosarkoma HI5- bzw. Parentalzellen wurden bei 37°C in Wachstumsmedium kultiviert und anschließend zu 1 mL-Aliquots mit je $3 \cdot 10^6$ Zellen in DMSO-haltigem Einfriermedium eingefroren. Direkt vor der SPR-Messung wurden die Zellen aufgetaut und deren Vitalitätsrate durch Auszählung, der mit Trypanblau angefärbten Zellen, bestimmt. Sie lag bei den verwendeten Aliquots zwischen 90 und 95%. Auf Basis der Zellanzahlbestimmungen wurden Konzentrationen der Zellkulturen von 56, 225, 450, 900 und 1800 Zellen pro μL präpariert, mit denen die Messungen erfolgten.

4.5.2 SPR-Bindungsstudien mit Zellen

Mit Hilfe der SPR-Studien sollen die Bindungsaffinitäten der synthetisierten Einzelverbindungen **1**, **2**, **3** und **4** zu CCR5-überexprimierenden vitalen Osteosarcomazellen (HI5-Zellen) bestimmt werden, um sie anschließend miteinander zu vergleichen. Als Negativkontrolle diente ein Fibrinogenpeptid, welches nachweislich nicht mit den HI5-Zellen in Wechselwirkung tritt.^{64,65} Als eine weitere Negativkontrolle wurden Parentalzellen verwendet.

Für die folgenden BIACORE-Studien wurden die oben erwähnten Peptide bzw. Glycopeptide in der Dextranmatrix von F1-Chips immobilisiert. Die erste Flußzelle wurde nicht belegt, da sie als Referenzzelle dient. Für die nachfolgenden Messungen wird die Differenz zwischen Flußzelle 1 und einer belegten Flußzelle ausgewertet. Die Flußzellen 2 bis 4 wurden nach Aktivierung mit der jeweiligen (Glyco)Peptid- bzw. Proteinlösung belegt und anschließend aktivierte aber nicht belegte Bindungsstellen in der Dextranmatrix *gecappt*. Die Belegungsdaten für die einzelnen Verbindungen sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Immobilisierte Verbindung	immobilisierte Menge [RU; fmoI]
1	246; 61
2	237; 53
3	196; 51
4	248; 58
Fibrinogen	14625; 43

Tabelle 11: Belegung der Flußzellen nach der Immobilisierung mit den Verbindungen 1, 2, 3, 4 und Fibrinogen.

Es wurden HI5- und Parentalzellen in Konzentrationen von 56 bis 1800 Zellen pro μL an den immobilisierten Verbindungen gemessen. In diesen Experimenten zeigten HI5-Zellen eine eindeutige Bindung an die auf dem Chip immobilisierten Verbindungen. Lediglich Fibrinogen wies keinerlei Bindungsaffinität zu den CCR5 exprimierenden Zellen auf (siehe Abbildung 40). In Abbildung 38 sind die Sensorgramme des zyklisierten Konsensusglycopeptids **4** bei verschiedenen HI5-Zellkonzentrationen exemplarisch für alle anderen Verbindungen dargestellt. Wurden hingegen verschieden konzentrierte Lösungen von Parentalzellen über die immobilisierten Verbindungen geleitet, so ist in keinem Fall ein Anstieg im Sensorgramm, sprich eine Bindung, zu beobachten. Abbildung 39 zeigt exemplarisch für alle untersuchten Peptide und Glycopeptide die Sensorgramme von **4** bei Konzentrationen von 56, 225, 450, 900 und 1800 Parentalzellen pro μL . Das beweist, daß die zuvor beobachteten Bindungsereignisse zwischen den Verbindungen **1** bis **4** und den CCR5 exprimierenden HI5-Zellen spezifisch sind.

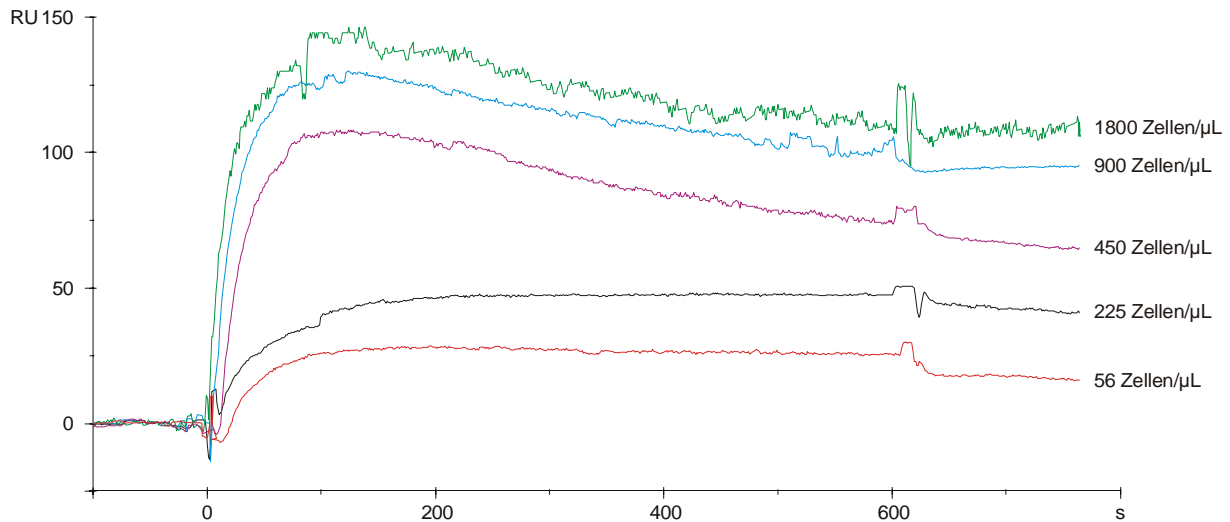


Abbildung 38: Differenzsensorgramme von HI5-Zellen unterschiedlicher Konzentrationen (56, 225, 450, 900, 1800 Zellen pro μL) bei immobilisiertem Glycopeptid 4.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen von *S. Meyer*⁶⁴ und *J. Tost*⁶⁵, die zuvor SPR-Studien von V3-Peptiden und Glycopeptiden mit HI5- und Parentalzellen durchgeführt haben. Die von ihnen beobachtete direkte Beteiligung der *V3-Loop*, bei der Wechselwirkung zwischen GP120 und den Zellrezeptoren kann auch hier an einer *V3-Loop* anderer Sequenz bestätigt werden. Davon abweichend wird vermutet, daß andere Bereiche des GP120 bei der Bindung an den Corezeptor eine Rolle spielen.¹⁶⁷ Dies kann zwar nicht ausgeschlossen werden, die Ergebnisse der durchgeführten SPR-Studien zeigen jedoch nachweislich eine direkte Interaktion des CCR5-Rezeptors mit der *V3-Loop* des GP120.

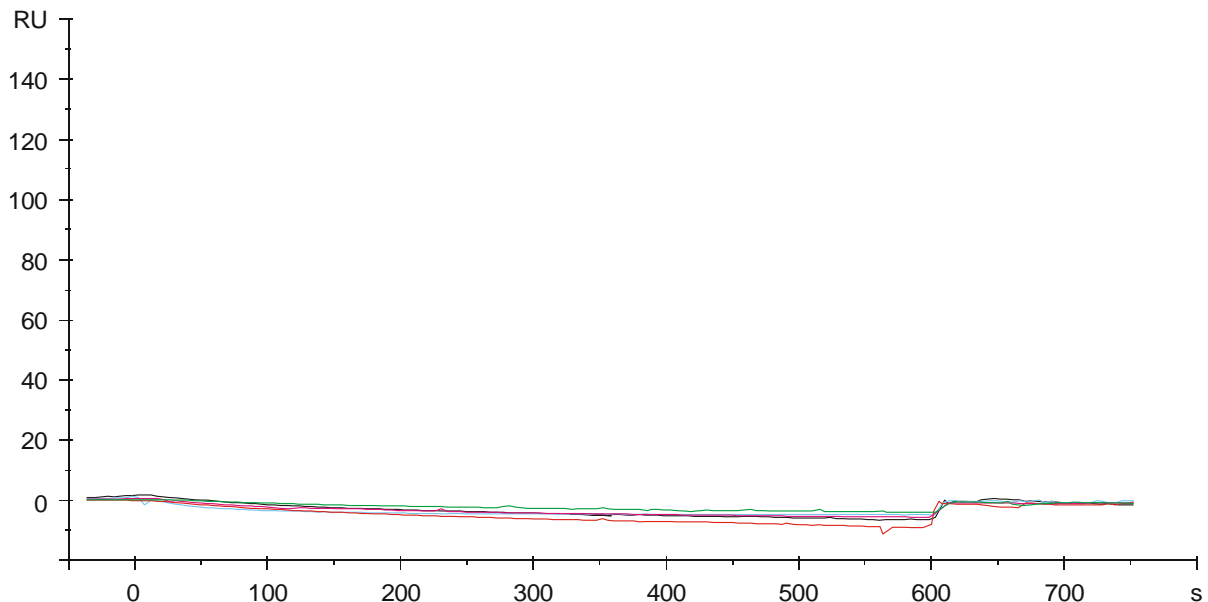


Abbildung 39: Übereinander gelegte Differenzsensorgramme von Parentalzellen unterschiedlicher Konzentrationen (56, 225, 450, 900, 1800 Zellen/μL) bei immobilisiertem Glycopeptid 4. Diese Negativkontrolle zeigt, daß keine Wechselwirkung mit nicht CCR5 exprimierenden Zellen stattfindet.

Abbildung 40 zeigt die Auswertung der Konzentrationsreihen für die Verbindungen **1**, **2**, **3**, **4** und Fibrinogen nach einem *steady-state-affinity*-Ansatz.

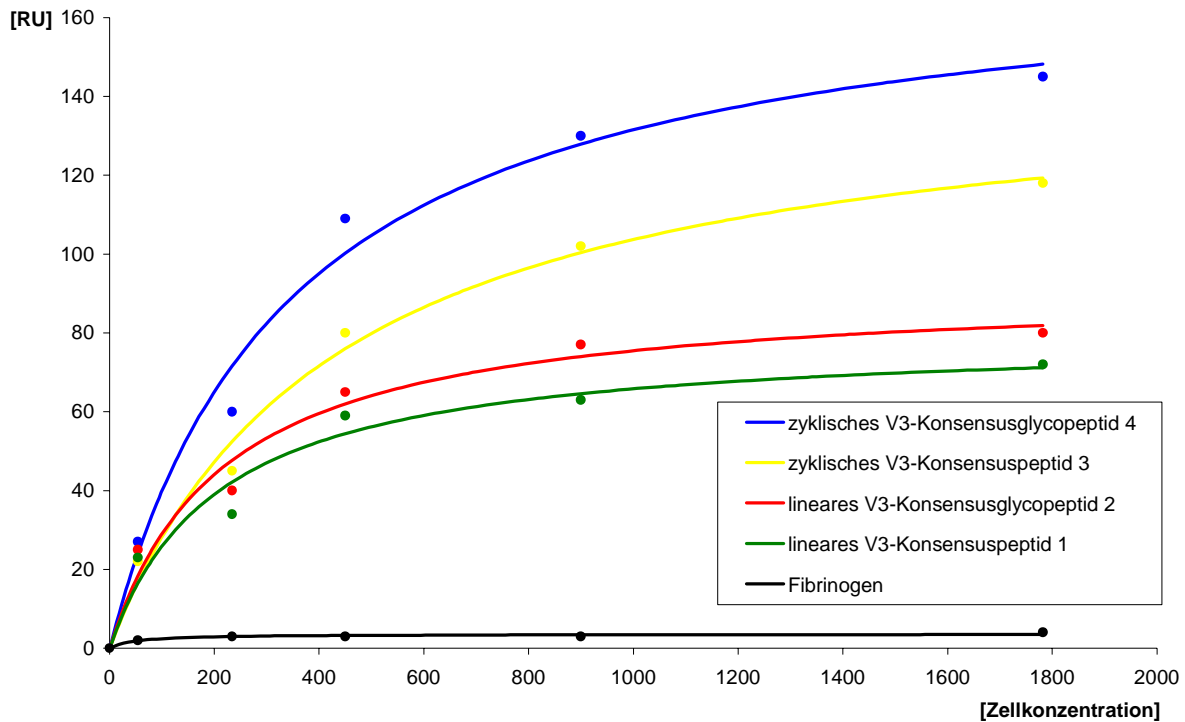


Abbildung 40: Vergleich der Bindungsaffinitäten der synthetisierten Verbindungen **1**, **2**, **3**, **4** und Fibrinogen (Negativkontrolle) zu CCR5 exprimierenden Osteosarkomazellen (HI5-Zellen) in einem *steady-state-affinity*-Ansatz. Dargestellt ist die jeweilige RU-Antwort gegen die Konzentrationen von 56, 225, 450, 900 und 1800 Zellen pro µL.

Dazu werden die ermittelten RU-Werte gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen und *gefittet*. Charakteristisch für alle Kurven ist die stark abfallende Steigung bei zunehmender Zellkonzentration, was auf eine Sättigung der Bindung hindeutet.

Ein Vergleich der Bindungsaffinitäten der untersuchten Verbindungen zeigt, daß das zyklisierte Glycopeptid **4** die stärkste, das offenkettige Peptid **1** hingegen die schlechteste Bindung aufweist. Dafür sind zwei Einflüsse verantwortlich. Zum einen ist dies die *Loop*-Bildung durch die Disulfidbrücke zwischen den terminalen Cysteinen und zum anderen die Glycosylierung. Wie in Tabelle 12 zu sehen, zeigt das offenkettige V3-Glycopeptid **2** gegenüber dem offenkettigen V3-Peptid **1** eine um den Faktor 1.1 stärkere Bindung, während die Affinität zum CCR5-Corezeptor beim zyklisierten V3-Peptid **3** 1.6 fach höher als beim linearen V3-Peptid **1** ist. Eine Zyklisierung bei gleichzeitiger Glycosylierung bewirkt sogar eine um Faktor 2.1 höhere Bindungsstärke, wie die Gegenüberstellung der Bindungsaffinitäten von **4** und **1** zeigt.

Daraus läßt sich folgendes ableiten: Die Zyklisierung hat einen größeren Einfluß auf die Bindungsstärke als die Glycosylierung. Bei einer Kombination beider Faktoren wird die beste Bindung erhalten. Außerdem sind eindeutige synergetische Effekte, beim gleichzeitigen

Auftreten einer Zyklisierung und Glycosylierung, im Hinblick auf die Stärke der Bindung zum CCR5 zu beobachten, da hier die Bindungsaffinität deutlich höher ist, als sich aus der Kombination beider Faktoren schließen läßt.

Verbindung	RU bei 1800 Zellen/ μ L	Δ RU zu Peptid 1 bei 1800 Zellen/ μ L	Erhöhung der Bindungsstärke gegenüber Peptid 1 [Faktor]
1	72		
2	82	10	1.1
3	118	46	1.6
4	148	76	2.1

Tabelle 12: Vergleich der Bindungsaffinitäten der Verbindungen 2, 3 und 4 zu der von 1. Verglichen wurden die gefitteten Werte bei einer Zellkonzentration von 1800 Zellen pro μ L im Bereich der Sättigung der Bindung zum CCR5-Corezeptor.

Frühere SPR-Untersuchungen⁶⁴ von V3-(Glyco)Peptiden mit geringfügig anderer Sequenz (Position 5 (S \leftrightarrow N) und 25 (E \leftrightarrow D)) zeigen 20-40% niedrigere RU-Antworten, verglichen mit den hier untersuchten Verbindungen. Die Abstufung der (Glyco)Peptide nach steigender Bindungsaffinität ist aber bei beiden Analysen identisch und bestätigt somit den Trend in der zuvor durchgeführten Studie. Bemerkenswert ist jedoch, daß bei diesen Untersuchungen eine Zyklisierung eine noch stärkere Auswirkung auf die Affinität zu CCR5-exprimierenden Zellen hatte, verglichen mit den oben erhaltenen Ergebnissen (siehe Tabelle 12). Das entsprechende zyklisierte V3-Peptid wies eine um den Faktor 2.3 stärkere Bindung auf, als das offenkettige unglycosylierte Peptid. Die Bindung des zyklisierten Glycopeptids war sogar 2.8 mal so stark.

Für diese Differenzen in der absoluten Bindungsaffinität der beiden SPR-Studien gibt es mehrere Gründe. Die bei den früheren SPR-Untersuchungen verwendeten Verbindungen waren N-terminal acetyliert. Dies ist bei den hier untersuchten Verbindungen nicht der Fall. Diese Tatsache bewirkt ein unterschiedliches Konjugationsverhalten der (Glyco)peptide mit der Chipoberfläche. Die N-terminal acetylierten Verbindungen sind nur in Lage, über Aminogruppen in einer Peptidseitenkette an die Chipoberfläche zu kuppeln. Dabei kann es im schlimmsten Fall zu einer Zerstörung des Bindungsseptops kommen, wenn die entsprechende Seitenkette normalerweise an der Bindung beteiligt ist. Die nicht N-terminal acetylierten Verbindungen können zusätzlich auch über den N-Terminus immobilisiert werden, so daß die Gefahr einer Inaktivierung aus oben genannten Gründen geringer ist. Betrachtet man die Gesamtheit aller auf der Chipoberfläche immobilisierten (Glyco)peptide, so ist der Anteil der inaktiven (Glyco)peptide bei einer N-terminalen Acetylierung also höher als bei einem freien N-Terminus. Das Ergebnis sind dann Bindungskurven mit kleineren RU-Werten, da die tatsächliche Belegung mit bindungsaktiven (Glyco)peptiden bei acetylierten Substanzen geringer ist.

Andererseits können die unterschiedlichen Bindungsstärken auch dadurch zustande kommen, weil sich die Verbindungen an den Positionen 5 (S \leftrightarrow N) und 25 (E \leftrightarrow D) unterscheiden. Eine

Permutation an diesen Stellen könnte also einen Einfluß auf die absolute Bindungsaffinität und damit auf die 3D-Struktur des Bindungsepitops haben. Diese Hypothese wird durch die hier durchgeführten NMR-Untersuchungen (siehe 4.4.4) untermauert. Die dort beobachteten Unterschiede der chemischen Verschiebungen in den TOCSY-Spektren weisen ebenfalls auf Unterschiede in der Konformation bzw. im Bindungsepitop der beiden Glycopeptide hin. Darüber hinaus können diese Permutationen auch dafür verantwortlich sein, daß eine Zyklisierung sich unterschiedlich stark auf eine Steigerung der Bindungsstärke auswirkt. Veränderungen der Peptidsequenz an diesen Positionen können somit direkt oder indirekt zu einem modifizierten Bindungsepitop führen mit den für eine Bindung an den CCR5-Corezeptor beschriebenen Folgen. Wie stark sich der eine oder andere Effekt auf diese Ergebnisse ausgewirkt hat, läßt sich aber nicht mit Bestimmtheit sagen.

Vergleiche der zyklisierten Glycopeptide mit den zyklisierten Peptiden haben gezeigt, daß die anteilige Erhöhung der Bindungsstärke durch den Zucker zusammen mit den oben genannten Synergieeffekten sowohl hier, als auch in den vorangegangenen Untersuchungen⁶⁴ in etwa gleich groß ist. Die Summe der Verstärkung der Bindung zum CCR5-Corezeptor durch eine Glycosylierung und Synergieeffekte ist demnach also unabhängig von der V3-Peptidsequenz.

4.6 Synthese von (Glyco)Peptidbibliotheken

4.6.1 Untersuchungen zur Bibliothekssynthese nach dem *Premix-*Verfahren

4.6.1.1 Optimierung der Aminosäureüberschüsse

Da die verschiedenen Aminosäuren auch unterschiedliche Kupplungskinetiken bei der Peptidsynthese haben, sollte ein Kompromiß gefunden werden, in welchem der eingesetzte Über- bzw. Unterschuß eines Aminosäuregemisches bei einer Kupplung eine möglichst homogene Verteilung der Komponenten in einer Bibliothek, bei hoher Kupplungsausbeute liefert. Dazu wurde zunächst das Peptid IGPR **14** in einer vollautomatischen Synthese am Peptidsynthesizer hergestellt. Die Ausbeute, bestimmt durch photometrische Quantifizierung des abgespaltenen N-terminalen Methylenfluorens, betrug 100%. Das Peptid wurde am Harz belassen, um in einem letzten Kupplungsschritt ein Gemisch aus fünf (P, T, N, H, R) bzw. zwölf (G, A, S, P, T, D, Q, H, F, R, Y, W) verschiedenen Aminosäuren an den N-Terminus von **14** zu knüpfen. Die Kupplung dieser Gemische erfolgte sowohl in automatischen, als auch in manuellen Synthesen.

Vollautomatische Synthesen

In einer ersten Variante wurde die Bibliothek **15** mit den darin enthaltenen Peptiden **15.1** bis **15.5** (siehe Abbildung 41) in einer vollautomatischen Synthese in einer Dreifachkupplung mit

vier Äquivalenten Aminosäuregemisch pro Kupplungsschritt hergestellt, wobei die Verhältnisse der einzelnen Aminosäuren mit einem empirisch bestimmten Korrekturwert¹⁶⁸ versehen sind. Die Ausbeute, ermittelt durch die photometrische Quantifizierung des abgespaltenen Metylenfluorens, betrug 90%. Die Auswertung der Ionenchromatogramme des ESI-LC/MS-Spektrums ergab prozentuale Anteile der einzelnen Peptide in der Bibliothek zwischen 9 und 37% (siehe Abbildung 42). Die Identität der einzelnen Peptide in der Bibliothek konnte im ESI-Spektrum nachgewiesen werden. Die genauen Masse-Ladungsverhältnisse der entsprechenden Signale sind in Tabelle 30 (siehe 7.5.1.1) angegeben.

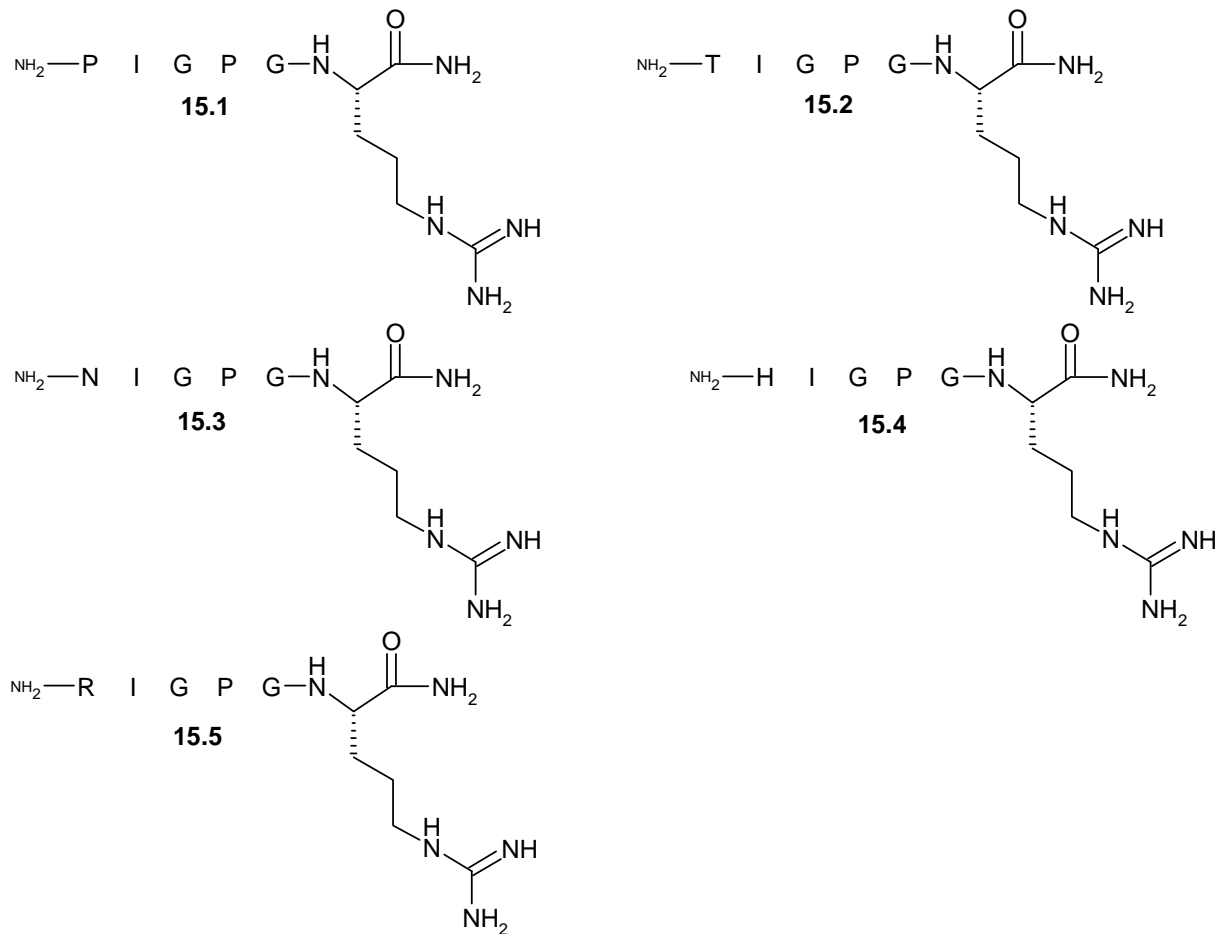


Abbildung 41: In der Bibliothek 15 enthaltene Peptide 15.1 bis 15.5.

In einer zweiten vollautomatischen Peptidsynthese wurde die Kupplung mit einem Äquivalent Aminosäuregemisch (alle Aminosäuren zu gleichen Anteilen) in einer Dreifachkupplung durchgeführt. Die Ausbeute betrug bei dieser Synthese von **15** nur 32%, die Anteile der Komponenten lagen aber homogen zwischen 18 und 23% (siehe Abbildung 42). Die Charakterisierung der Produkte erfolgte mittels eines ESI-MS-Spektrums (siehe Tabelle 30, 7.5.1.1).

Aus den Ergebnissen dieser beiden Experimente kann gefolgert werden, daß eine vollautomatische Synthese keine befriedigenden Ergebnisse liefert. Beim Einsatz eines

vierfachen Überschusses an Aminosäuregemisch sind zwar zufriedenstellende Ausbeuten zu erreichen, aber das Verhältnis des Peptids mit dem geringsten Anteil zu dem mit dem höchsten Anteil innerhalb der Bibliothek liegt bei ungefähr 1:3 und ist damit unbefriedigend. Die unterschiedliche Kupplungskinetik hat, trotz des Einsatzes aminosäurespezifischer Korrekturen, hier einen zu hohen Einfluß auf die spätere quantitative Zusammensetzung der Bibliothek.

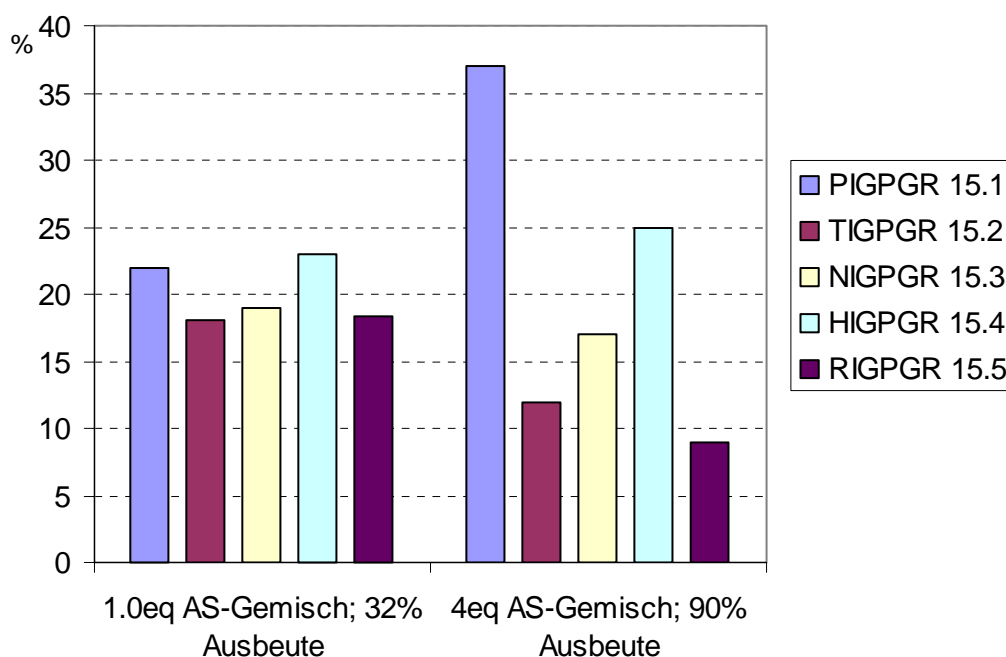


Abbildung 42: Prozentuale Verteilung der Komponenten in der Bibliothek 15 nach automatischer Synthese der Permutationsstelle mit unterschiedlichen Überschüssen an Aminosäuregemisch.

Setzt man nur ein Äquivalent Aminosäuregemisch ein, wird eine relativ homogene Zusammensetzung in der Bibliothek erreicht. Die Effizienz der Kupplung ist mit einer Ausbeute von 32% allerdings sehr niedrig. Diese geringe Ausbeute ist durch die Bauart des Synthesizers bedingt. Der Peptidsynthesizer besitzt aufgrund der *continuous flow*-Technik ein relativ hohes Totvolumen. Die Folge ist ein zu stark verdünntes Kupplungsgemisch, um die Aminosäuren mit hoher Ausbeute an das wachsende Peptid knüpfen zu können. Die Synthese der Permutationsstelle mit konzentrierteren Lösungen läßt sich also nur in einem manuellen *batch*-Verfahren durchführen.

Manuelle Synthesen

In der dritten Variante der Synthese von **15** wurde das Harz mit dem daran befindlichen Peptid **14** in vier gleiche Portionen geteilt, die im Folgenden getrennt weiterverarbeitet wurden. Die Kupplung des Aminosäuregemisches (P, T, N, H, R) in unterschiedlichen Unter- bzw. Überschüssen erfolgte nach einem für die manuelle Peptidsynthese standardisierten Verfahren in Dreifachkupplungen mit Reaktionszeiten von je 24 Stunden. Die Ausbeuten

wurden durch Messung des in der Abspaltungslösung enthaltenen Methylenfluorens bestimmt und lagen zwischen 84 und 97%. Die quantitative Zusammensetzung konnte durch Analyse der Ionenchromatogramme des ESI-LC/MS-Spektrums bestimmt werden. Sie liegt in einen Bereich von 18 bis 23% pro Komponente beim Einsatz von 0.8 Äquivalenten Unterschluß und 14 bis 26% bei 1.4 Äquivalenten Aminosäureüberschuß. Die genauen Ausbeuten und Zusammensetzungen der vier Ansätze sind in Abbildung 43 zu sehen. Die Identität der Produkte wurden mittels ESI-MS nachgewiesen (siehe Tabelle 30, 7.5.1.1).

Den besten Kompromiß zwischen einer akzeptablen Ausbeute und einer homogenen Bibliothekszusammensetzung erhält man bei Verwendung von einem Äquivalent Aminosäuregemisch in einer Dreifachkupplung.

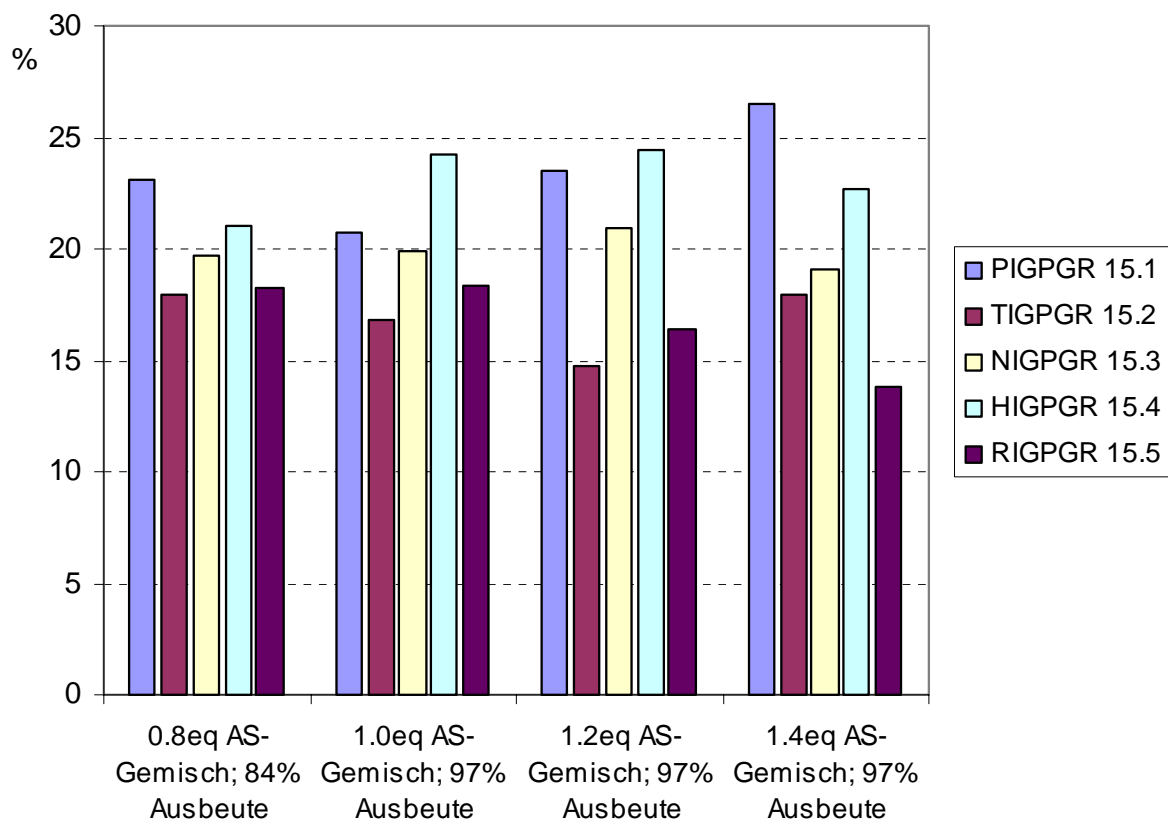


Abbildung 43: Prozentuale Verteilung der Komponenten in der Bibliothek 15 nach manueller Kupplung der Permutationsstelle mit unterschiedlichen Unter- bzw. Überschüssen an Aminosäuregemisch.

Die Synthese der Bibliothek **16** mit den darin enthaltenen Peptiden **16.1** bis **16.12** (siehe Abbildung 44) erfolgte nach dem unter Variante 3 erwähnten Verfahren ausgehend von **14** durch Kupplung von einem Äquivalent des Aminosäuregemisches (G, A, S, P, T, D, Q, H, F, R, Y, W).

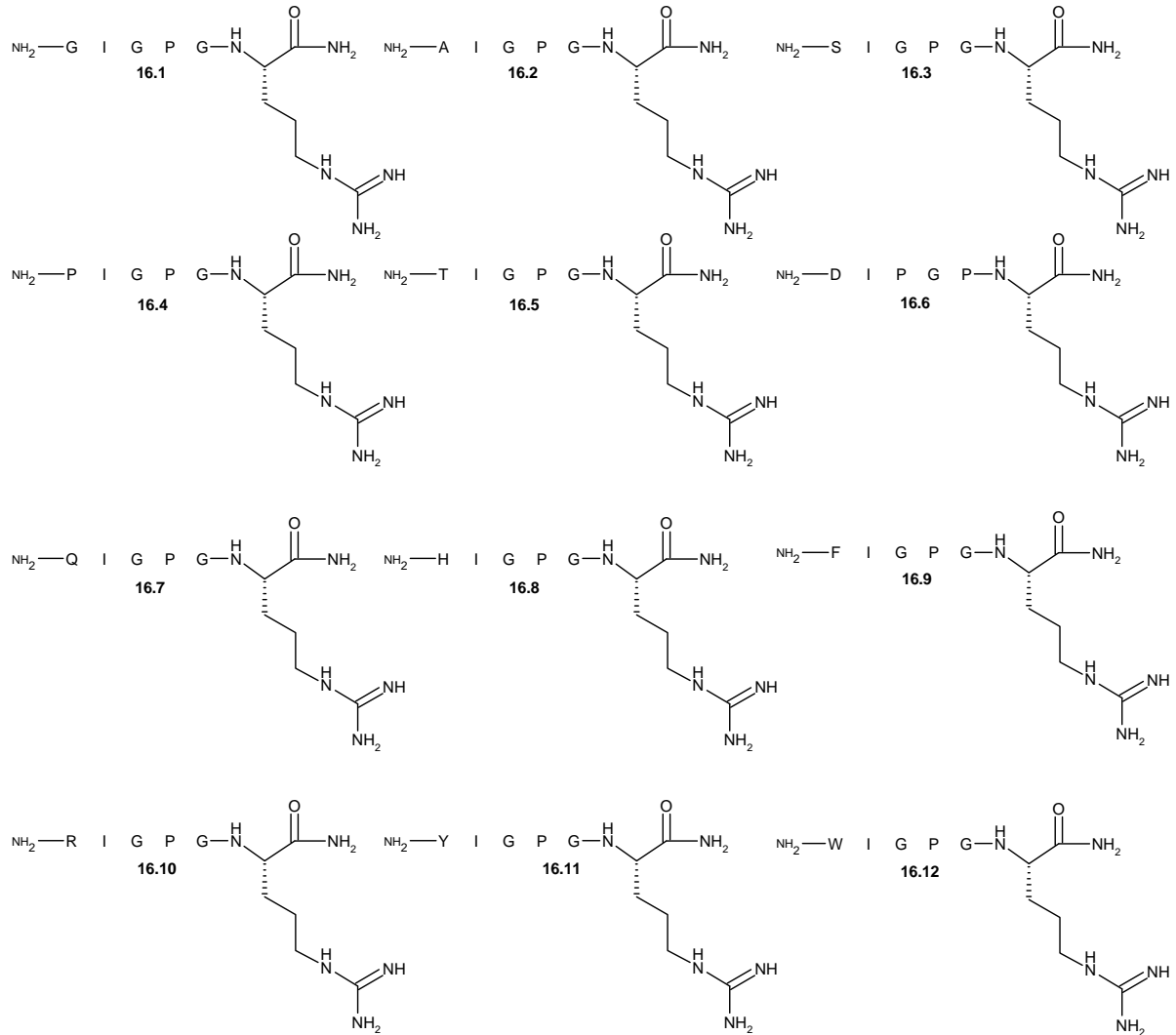


Abbildung 44: In der Bibliothek 16 enthaltene Peptide 16.1 bis 16.12.

Wie in Abbildung 45 zu sehen, ist die Ausbeute im Verhältnis zur prozentualen Zusammensetzung innerhalb der Bibliothek bei diesen Reaktionsparametern auch hier ein guter Kompromiß. Die Identifizierung der Einzelkomponenten der Bibliothek gelang durch Aufnahme eines ESI-Spektrums (siehe Tabelle 37, 7.5.1.1).

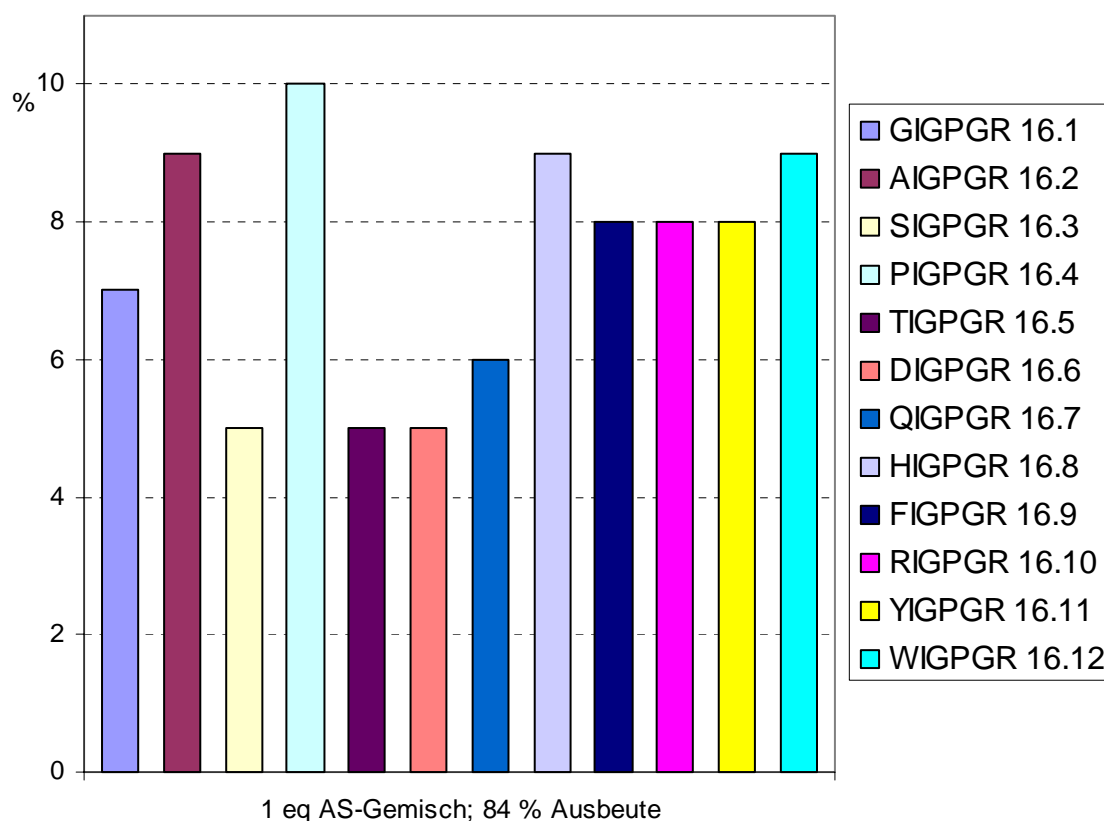


Abbildung 45: Prozentuale Verteilung der Komponenten in der Bibliothek **16** nach manueller Kupplung der Permutationsstelle mit einem Äquivalent Aminosäuregemisch.

4.6.1.2 Optimierung der Kupplungszeiten

Es sollte, ausgehend von optimierten Aminosäureüberschüssen, bestimmt werden, in wie weit die Reaktionszeiten verringert werden können, ohne die Kupplungsausbeuten zu verschlechtern. Dazu wurde das Harz mit dem daran befindlichen Peptid **14** in drei gleiche Portionen geteilt, die im Folgenden getrennt weiterverarbeitet wurden. Zur Darstellung von **15** erfolgte die Kupplung von einem Äquivalent Aminosäuregemisch (P, T, N, H, R) nach einem für die manuelle Peptidsynthese standardisierten Verfahren in einer Dreifachkupplung mit Reaktionszeiten von 3, 12 und 24 Stunden für die unterschiedlichen Reaktionsansätze. Wie die quantitative Analyse der Ionenchromatogramme des ESI-Spektrums in Abbildung 46 zeigt, kann die Reaktionszeit bedenkenlos auf drei Stunden herabgesetzt werden. Die Identität der Produkte innerhalb der Bibliotheken konnten per ESI-MS nachgewiesen werden (siehe Tabelle 30, 7.5.1.1).

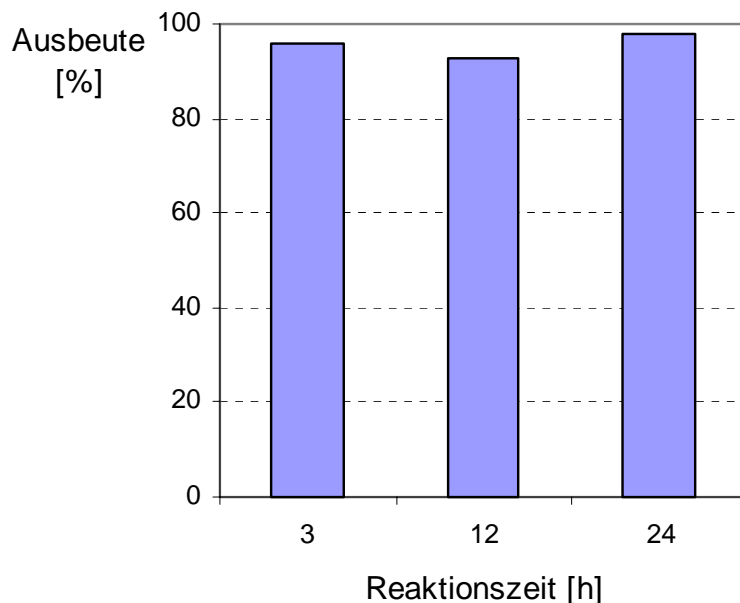


Abbildung 46: Kupplungsausbeuten bei der Darstellung von 15 bei Verwendung von einem Äquivalent Aminosäuregemisch und unterschiedlichen Reaktionszeiten.

4.6.2 Synthese der nicht glycosylierten zyklischen V3-Bibliothek 5

Bei der Synthese der Bibliothek 5 (siehe Abbildung 47) flossen alle bisherigen Erkenntnisse aus den Einzelsynthesen und den Experimenten zum *Premix*-Verfahren ein. Sie enthält 48 verschiedene V3-Sequenzen aus dem GP120, die anhand einer Datenbankanalyse ermittelt wurden (siehe 4.1). Die Synthese konnte wie im experimentellen Teil unter 7.5.2 durchgeführt werden. Die photometrische Bestimmung des Methylenfluorengehalts der Abspaltung von der zuletzt gekuppelten Aminosäure ergab eine Ausbeute von 72%. Alle Komponenten der Bibliothek konnten durch die Aufnahme eines MALDI-TOF-Spektrums (siehe Abbildung 48) charakterisiert werden. Die $(M+H^+)$ -Peaks der entsprechenden Peptide liegen in einem Bereich von $m/z = 3710.52$ bis 3913.17 . Die genauen Masse-Ladungsverhältnisse der Signale sind Tabelle 13 zu entnehmen.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	Peptid Kürzel
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.1
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.2
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.3
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.4
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.5
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.6
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.7
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.8
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.9
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.10
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.11
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.12
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.13
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.14
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.15
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.16
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.17
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.18
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	p	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.19
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.20
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.21
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.22
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.23
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.24
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.25
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.26
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.27
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.28
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	p	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.29
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.30
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.31
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.32
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.33
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.34
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.35
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.36
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.37
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.38
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.39
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.40
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.41
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.42
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.43
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.44
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.45
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.46
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.47
C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	5.48

Abbildung 47: In der Bibliothek 5 enthaltene disulfidverbrückte V3-Peptide 5.1 bis 5.48. Die rot eingefärbten Spalten stellen die Permutationsstellen dar. Am rechten Rand ist ein Kürzel für jedes Peptid angegeben, mit denen sie im weiteren Verlauf bezeichnet werden. Die N-Termini enthalten eine freie Aminogruppe, die C-Termini eine Carboxamidgruppe.

Da es sich bei den untersuchten Peptiden um relativ ähnliche Verbindungen handelt, geben die Intensitäten der *Peaks* im MALDI-TOF-Spektrum näherungsweise über die relativen Anteile der einzelnen Peptide in der Bibliothek Auskunft. Die Peptide 5.1 bis 5.32 sind relativ homogen in der Bibliothek verteilt. Ab Peptid 5.33 nimmt die Intensität der *Peaks* im Massenspektrum etwas ab. Dies kann zum einen an schlechteren Kupplungsabbeuten

aufgrund schlechterer Kupplungskinetiken liegen. Zum anderen kann es aber auch sein, daß die lokale Konzentration dieser Peptide im Kristall etwas geringer ist. Ebenso ist es möglich, daß ihr Ionisierungsverhalten etwas schlechter ist, verglichen mit den übrigen Verbindungen in der Bibliothek und damit einen geringeren Anteil vortäuscht. Zusammenfassend kann aber gesagt werden, daß sich diese Methode gut eignet um Peptidbibliotheken herzustellen, in der die Anteile der einzelnen Komponenten relativ homogen verteilt sind.

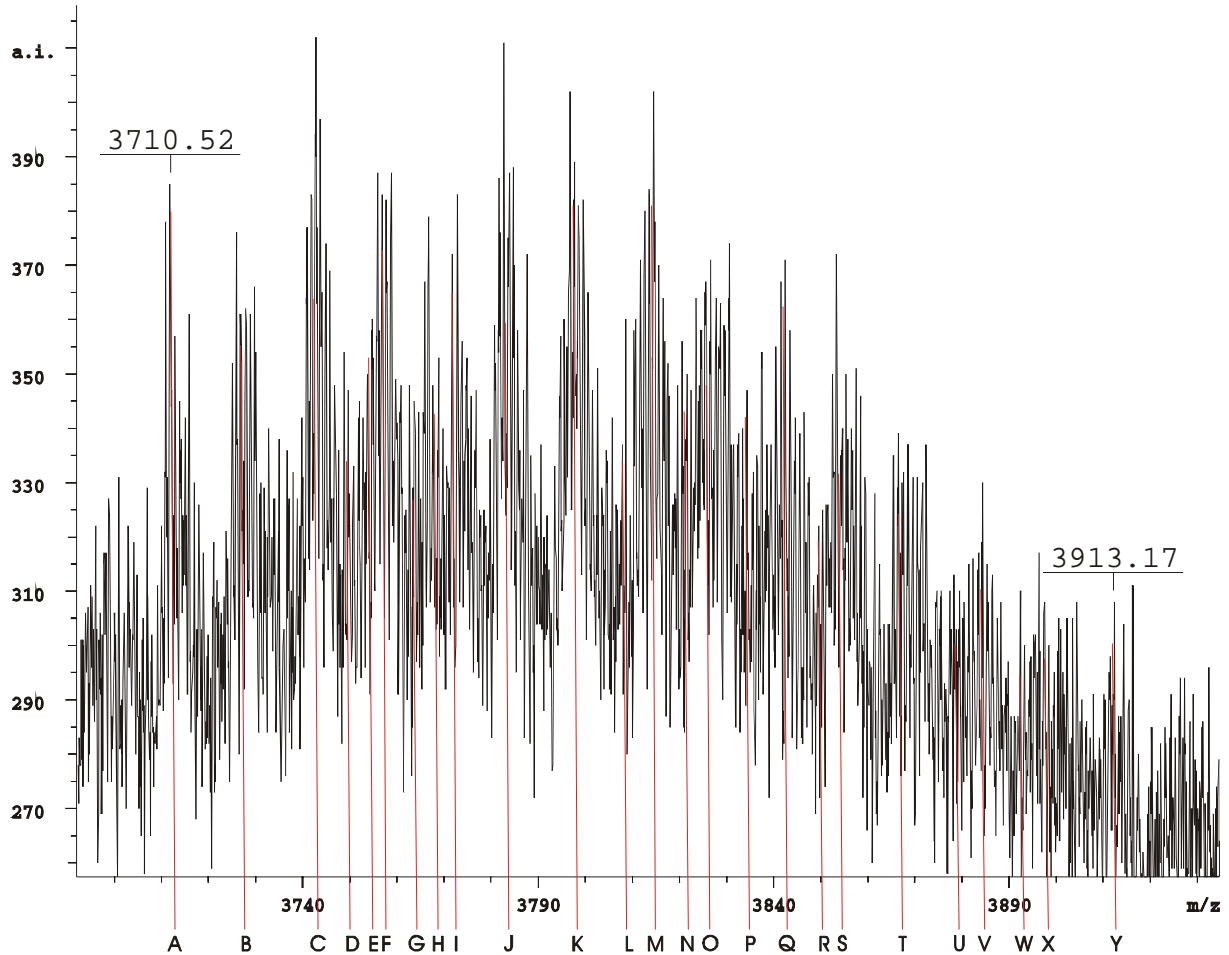


Abbildung 48: MALDI-TOF-Spektrum der nicht glycosylierten zyklischen V3-Bibliothek 5. Isobare oder nahezu isobare Peptide sind zur besseren Übersichtlichkeit unter einem Buchstabenindex von A bis Y zusammengefaßt und in Tabelle 13 angegeben.

Index	Peptid	Molmasse	m/z [M+H ⁺]	Index	Peptid	Molmasse	m/z [M+H ⁺]
A	5.1	3709.83	3710.52	O	5.24	3822.93	3824.05
B	5.2	3723.85	3724.64		5.25	3824.90	3826.01
	5.3	3726.82	3726.53		5.26	3825.90	3826.78
C	5.4	3739.84	3740.92		5.27	3827.87	3828.86
	5.5	3740.84	3741.80	P	5.28	3834.89	3835.91
D	5.6	3749.84	3750.99	Q	5.29	3838.92	3839.91
E	5.7	3753.86	3754.76		5.30*	3839.92	3840.99
F	5.8	3756.83	3757.82		5.31*	3839.92	3840.99
G	5.9	3763.85	3764.88		5.32	3841.89	3842.75
H	5.10	3768.88	3769.49	R	5.33	3848.92	3849.94
I	5.11	3770.85	3771.81	S	5.34	3850.89	3851.83
J	5.12	3779.85	3780.84		5.35	3852.94	3854.07
	5.13	3780.87	3781.95		5.36	3853.93	3855.01
	5.14	3782.90	3783.81		5.37	3855.91	3856.79
K	5.15	3793.86	3794.79	T	5.38	3862.93	3863.96
	5.16	3794.88	3796.01		5.39	3864.90	3865.84
	5.17	3797.86	3798.85		5.40	3867.96	3868.99
	5.18	3798.89	3799.61		5.41*	3869.93	3870.12
L	5.19	3808.91	3809.83		5.42*	3869.93	3870.12
M	5.20	3810.88	3812.03	U	5.43	3878.93	3879.92
	5.21	3811.87	3812.91	V	5.44	3881.98	3883.05
	5.22	3812.91	3813.99		5.45	3883.94	3884.91
N	5.23	3820.88	3821.53	W	5.46	3892.94	3893.97
				X	5.47	3897.97	3898.96
				Y	5.48	3911.99	3913.17

* isobare Peptide vertauschbar

Tabelle 13: Molmassen und die experimentell ermittelten Masse-Ladungsverhältnisse aller in der Bibliothek 5 enthaltenen Peptide 5.1 bis 5.48. Isobare oder nahezu isobare Peptide sind der Übersichtlichkeit halber zu Gruppen zusammengefasst, die mit den Buchstaben A bis Y gekennzeichnet sind.

4.6.3 Synthese der glycosylierten zyklischen V3-Bibliothek 6

Auch hier konnten die bisherigen Erkenntnisse aus den Synthesen von Einzelverbindungen und den Optimierungen zur *Premix*-Methode erfolgreich genutzt werden. Die Bibliothek **6** (siehe Abbildung 49) enthält 48 verschiedene V3-Sequenzen aus dem GP120, die anhand einer Datenbankanalyse ermittelt wurden (siehe 4.1). Die Synthese konnte wie im experimentellen Teil unter 7.5.3 beschrieben, mit einer Ausbeute von 43% (Bestimmung des Methylenfluorengehalts), durchgeführt werden. Die mit der Synthese der V3-Peptidbibliothek **5** verglichene schlechtere Ausbeute, ist mit nicht quantitativen Umsätzen bei der Anknüpfung des Chitobiosylasparagin-Bausteins in der laufenden Synthese zu erklären. Die massenspektrometrische Identifizierung aller Glycopeptide der Bibliothek gelang durch Auswertung der (M+H⁺)-Peaks in einem Bereich von 4117.45 bis 4319.23 (siehe Abbildung 50). Die genauen Masse-Ladungsverhältnisse der Signale sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	Peptid Kürzel
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.1
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.2
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.3
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.4
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.5
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.6
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.7
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.8
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.9
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.10
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.11
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.12
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.13
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	G	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.14
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.15
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.16
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.17
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.18
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	p	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.19
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.20
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.21
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	G	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.22
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.23
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.24
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.25
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.26
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.27
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.28
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	p	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.29
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.30
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.31
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.32
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.33
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.34
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.35
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.36
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.37
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.38
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.39
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.40
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.41
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.42
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.43
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.44
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.45
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.46
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.47
C	T	R	P	N	N(Chi)	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	6.48

Abbildung 49: In der Bibliothek 6 enthaltene disulfidverbrückte V3-Glycopeptide 6.1 bis 6.48. Die rot eingefärbten Spalten stellen die Permutationsstellen dar. Am rechten Rand ist ein Kürzel für jedes Glycopeptid angegeben, mit denen sie im weiteren Verlauf bezeichnet werden. Die N-Termini enthalten eine freie Aminogruppe, die C-Termini eine Carboxamidgruppe.

Die relativen Anteile der einzelnen Glycopeptide in der Bibliothek **6** ähneln der von Bibliothek **5**. Sie ist bis **6.37** relativ homogen, danach nehmen die Intensitäten im MALDI-TOF-Spektrum jedoch aus oben genannten Gründen etwas ab. Aber auch hier kann gesagt werden, daß die verwendete Synthesestrategie zur Erzeugung der Glycopeptidbibliothek **6** mit relativ homogener Komponentenzusammensetzung erfolgreich war.

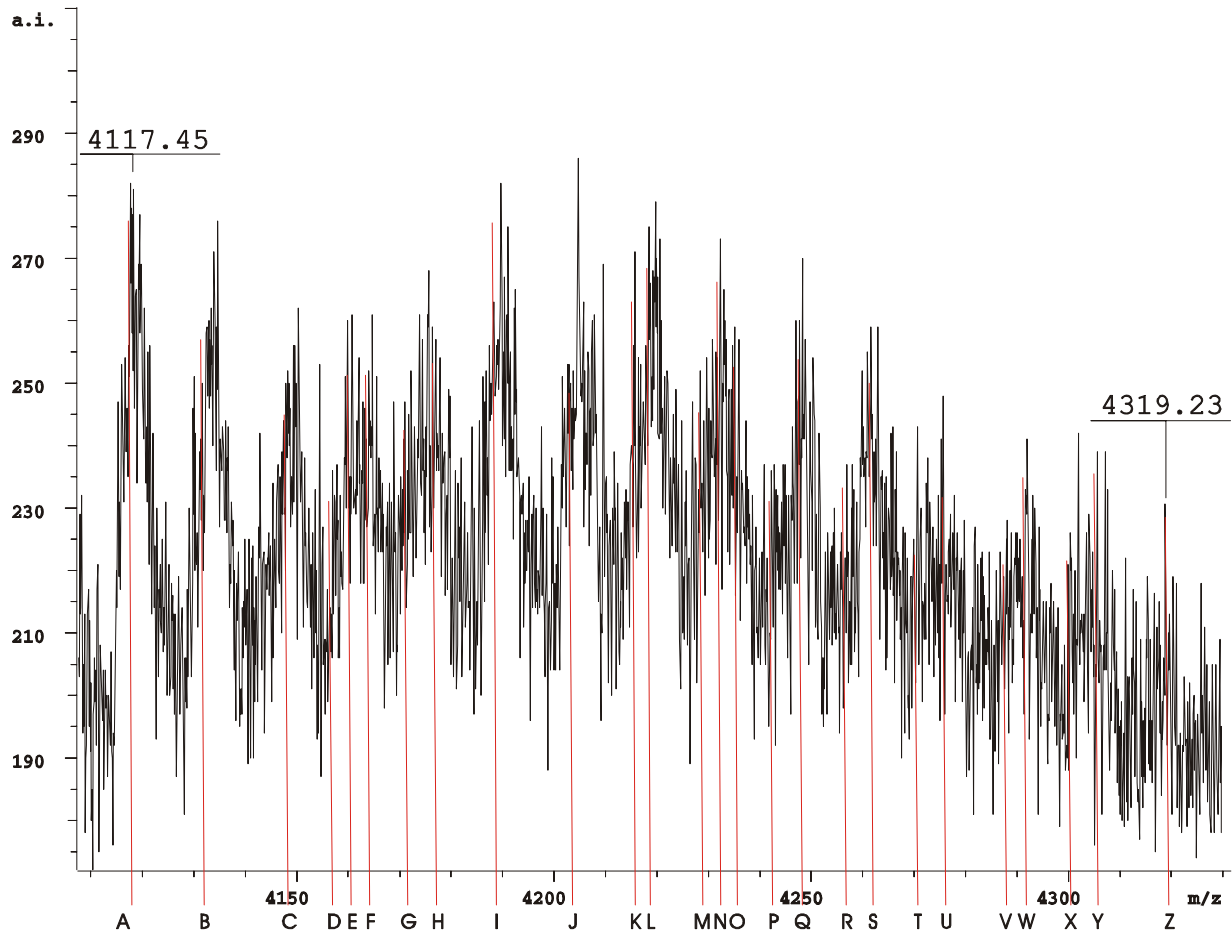


Abbildung 50: MALDI-TOF-Spektrum der glycosylierten zyklischen V3-Bibliothek **6**. Isobare oder nahezu isobare Glycopeptide sind zur besseren Übersichtlichkeit unter einem Buchstabenindex von A bis Z zusammengefaßt und in Tabelle 14 angegeben.

Index	Glyco-peptid	Molmasse	m/z [M+H+]	Index	Glyco-peptid	Molmasse	m/z [M+H+]
A	6.1	4115.97	4117.45	N	6.25	4231.03	4232.04
B	6.2	4129.98	4130.01		6.26	4232.04	4233.06
	6.3	4132.96	4133.87	O	6.27	4234.01	4234.98
C	6.4	4145.98	4146.91	P	6.28	4241.03	4241.93
	6.5	4146.97	4147.83	Q	6.29	4245.06	4246.11
D	6.6	4155.98	4157.02		6.30*	4246.05	4247.06
E	6.7	4159.99	4161.04		6.31*	4246.06	4247.14
F	6.8	4162.97	4163.93		6.32	4248.02	4249.20
G	6.9	4169.99	4170.98	R	6.33	4255.06	4256.01
H	6.10	4175.02	4176.10		6.34	4257.03	4257.99
	6.11	4176.98	4177.79	S	6.35	4259.07	4260.09
I	6.12	4185.99	4186.95		6.36	4260.07	4261.06
	6.13	4187.01	4187.97		6.37	4262.05	4263.01
	6.14	4189.03	4190.12	T	6.38	4269.07	4269.00
J	6.15	4200.00	4201.17		6.39	4271.04	4272.12
	6.16	4201.02	4202.08	U	6.40	4274.10	4275.18
	6.17	4204.00	4205.13		6.41*	4276.06	4277.20
	6.18	4205.03	4205.98		6.42*	4276.07	4277.20
K	6.19	4215.05	4214.95	V	6.43	4285.07	4285.93
L	6.20	4217.02	4218.16		6.44	4288.11	4289.23
	6.21	4218.01	4218.96	W	6.45	4290.08	4291.01
	6.22	4219.04	4220.04	X	6.46	4299.08	4300.07
M	6.23	4227.02	4228.10	Y	6.47	4304.11	4305.23
	6.24	4229.06	4230.17	Z	6.48	4318.12	4319.23

* isobare Glycopeptide vertauschbar

Tabelle 14: Molmassen und die experimentell ermittelten Masse-Ladungsverhältnisse aller in der Bibliothek 6 enthaltenen Glycopeptide 6.1 bis 6.48. Isobare oder nahezu isobare Glycopeptide sind der Übersichtlichkeit halber zu Gruppen zusammengefaßt, die mit den Buchstaben A bis Z gekennzeichnet sind.

4.7 SPR-Experimente der Bibliotheken 5 und 6

Die Zellkultur und -präparation von Parental- bzw. HI5-Zellen erfolgte hier wie unter 4.5.1 beschrieben. Mit Hilfe der SPR-Studien sollen die Bindungsaffinitäten der synthetisierten Bibliotheken 5 und 6 zu CCR5-überexprimierenden vitalen Osteosarcomazellen (HI5-Zellen) bestimmt werden, um sie miteinander aber auch mit den entsprechenden Konsensusverbindungen 3 und 4 zu vergleichen. Als Negativkontrollen wurden auch hier Fibrinogen^{64,65} und Parentalzellen verwendet.

Die Immobilisierung der Bibliotheken erfolgte nach dem gleichen Verfahren, welches auch schon bei der Immobilisierung der Konsensuspeptide angewendet wurde (siehe 4.5.2). Die Belegungsdaten für die einzelnen Verbindungen sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Immobilisierte Verbindung	immobilisierte Menge [RU; fmol]
5	263; ~69
6	272; ~64
Fibrinogen	14625; 43

Tabelle 15: Belegung der Flußzellen nach der Immobilisierung mit den Verbindungen 5, 6 und Fibrinogen. Für die Berechnung der Belegung der Bibliotheken 5 und 6 wurde eine mittlere Molmasse verwendet, daher stimmen die Werte hier nur näherungsweise.

Es wurden HI5- und Parentalzellen in Konzentrationen von 56 bis 1800 Zellen pro μL an den immobilisierten Verbindungen vermessen. In diesen Experimenten zeigten auch hier die HI5-Zellen eine eindeutige Bindung an die auf dem Chip immobilisierten Verbindungen (siehe Abbildung 51). Wie schon bei den vorangegangenen SPR-Experimenten beobachtet, wies Fibrinogen auch bei diesen Studien keinerlei Bindungsaffinität zu den CCR5 exprimierenden Zellen auf (siehe Abbildung 51).

Verschieden konzentrierte Lösungen von Parentalzellen zeigten bei den Bibliotheken 5 und 6 wie auch bei den zuvor untersuchten Konsensusverbindungen keine Bindung. Das beweist, daß die hier beobachteten Bindungsereignisse zwischen den Bibliotheken 5 bzw. 6 und den CCR5 exprimierenden HI5-Zellen ebenso spezifisch sind, wie die unter 4.5.2 beobachteten Bindungsereignisse.

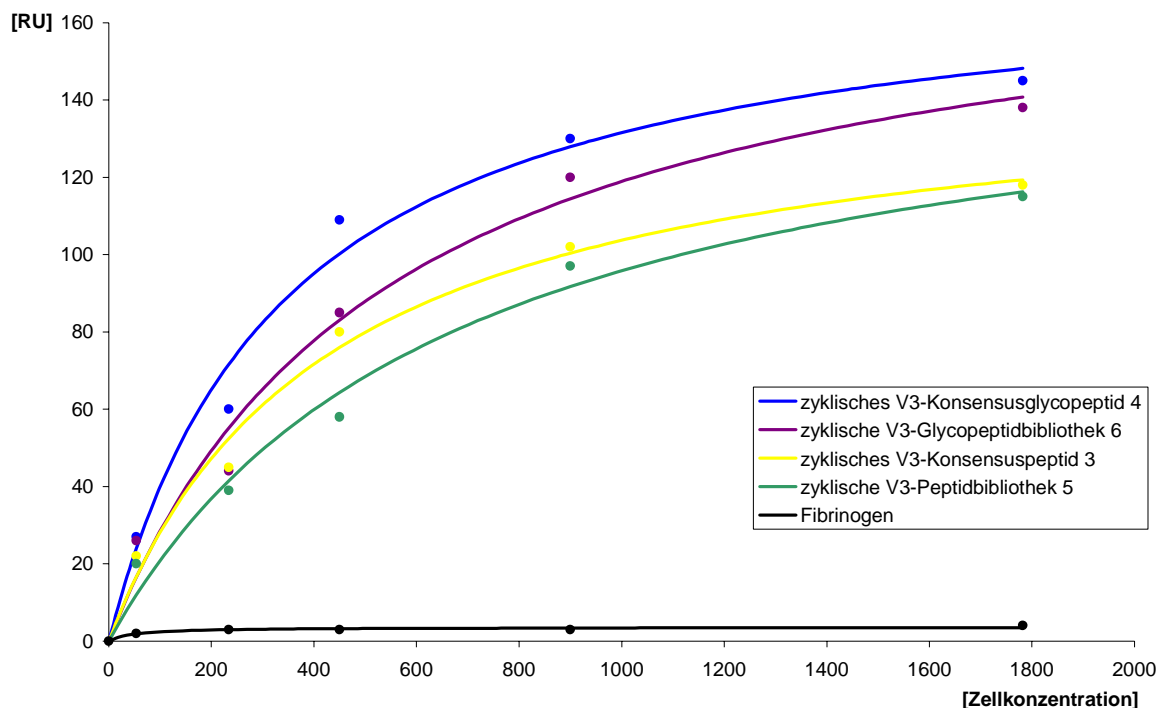


Abbildung 51: Vergleich der Bindungsaffinitäten der synthetisierten Verbindungen 3, 4, 5, 6 und Fibrinogen (Negativkontrolle) zu CCR5 exprimierenden Osteosarkomazellen (HI5-Zellen) in einem *steady-state-affinity*-Ansatz. Dargestellt ist die jeweilige RU-Antwort gegen die Konzentrationen von 56, 225, 450, 900 und 1800 Zellen pro μL .

Zusätzlich sind die Konzentrationsreihen der entsprechenden Konsensusverbindungen **3** und **4** als Vergleich angegeben. Bei diesen Experimenten zeigte die glycosylierte Bibliothek **6** verglichen mit der unglycosylierten Bibliothek **5** eine stärkere Bindungsaffinität zu den HI5-Zellen. Dies deckt sich sehr gut mit den Ergebnissen der unter 4.5.2 beschriebenen SPR-Experimente der entsprechenden Konsensussequenzen **3** und **4**. Vergleicht man die Stärke der Bindung zum CCR5-Corezeptor von der Bibliothek **5** mit der des Konsensuspeptides **3** sowie die der glycosylierten Bibliothek **6** mit der des Konsensusglycopeptides **4**, so sind nur geringfügige Unterschiede zu erkennen (siehe Abbildung 51). Bei den glycosylierten Verbindungen, wie auch bei den unglycosylierten sind die Affinitäten der Konsensussequenzen um 5% bzw. 2% höher, als die der jeweiligen Bibliotheken.

Aufgrund dieser minimalen Unterschiede ist zu vermuten, daß der CCR5-Corezeptor keine besondere Sequenzspezifität in Bezug auf die Permutationsstellen besitzt. Das bedeutet wiederum, daß alle Bibliothekskomponenten in etwa gleich gut binden. Die etwas niedrigeren Bindungsaffinitäten der Bibliotheken **5** und **6**, verglichen mit den Einzelverbindungen **3** und **4**, können damit begründet werden, daß die Bibliotheken wahrscheinlich noch zu einem geringen Teil Abbruchpeptide enthalten, die keine oder nur eine schwache Bindung zeigen.

Es könnte allerdings auch so sein, daß die einzelnen Bibliothekskomponenten sehr unterschiedliche Bindungsaffinitäten aufweisen, die je nach Sequenz gleichstark, stärker bzw. schwächer ausfallen, als die der jeweiligen Konsensussequenz. Die Tatsache, daß die mittlere Bindungsstärke der Bibliothek **5** bzw. **6** der des entsprechenden zyklisierten Peptids **3** bzw. Glycopeptids **4** ähnelt, ist bei diesem Erklärungsmodell eher zufällig.

Es kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, welche der genannten Ursachen für diese Ergebnisse verantwortlich ist oder ob es eine Kombination aus mehreren Faktoren ist. Die oben erwähnte fehlende Sequenzspezifität des Corezeptors ist jedoch relativ wahrscheinlich, da sonst, beim Auftreten von „Nichtbindern“, je nach Permutationsstelle eine um 25% bis 50% verringerte Bindungsaffinität zu beobachten wäre. Andererseits ist es relativ unwahrscheinlich, daß die mittleren Bindungsaffinitäten der Bibliotheken ungefähr denen der korrespondierenden Einzelverbindungen entsprechen, wenn man von einer sequenz-abhängigen Bindungsaffinität ausgeht.

4.8 Ausblick

Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen und Untersuchungen gelang es V3-Bibliotheken herzustellen, die alle wichtigen Elemente besitzen, welche für die Ausbildung des optimalen Bindungs epitops nötig sind und gleichzeitig die Variabilität innerhalb der V3-Loop widerspiegeln. Der nächste logische Schritt wäre eine Antikörperproduktion mit Hilfe der synthetischen V3-Konsensusverbindungen und V3-Bibliotheken. Biotests mit diesen

Antikörpern, bei denen das Neutralisationsverhalten untersucht und verglichen wird, könnten dann darüber Auskunft geben, ob die Immunisierung mit V3-Bibliotheken statt mit entsprechenden Einzelverbindungen tatsächlich einen ausreichenden Impfschutz bieten kann.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, auf der *V3-Loop* des viralen Glycoproteins GP120 basierende potentielle Kandidaten für einen erfolgversprechenden HIV-Impfstoff herzustellen, die die wesentlichen Elemente wie Glycosylierung und/oder Zyklisierung enthalten und gleichzeitig auch die Diversität der *V3-Region* widerspiegeln.

Vorangegangene Arbeiten mit der EB1-V3-Patientensequenz⁶⁴ deuteten auf einen hohen Einfluß einer Glycosylierung bzw. Zyklisierung auf die Stärke der Bindung an den CCR5-Corezeptor hin. Die Größe dieses Einflusses wurde hier in Abhängigkeit von der Sequenz weiter untersucht. Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer *Genbank*-Datenbankanalyse (17974 Sequenzen) folgende Konsensussequenz über alle Subtypen ermittelt:

CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC

Diese Sequenz wurde als offenkettiges **1** und disulfidverbrücktes Peptid **2**, sowie als offenkettiges **3** und disulfidverbrücktes Glycopeptid **4** in einer Kombination aus automatischer und manueller Festphasensynthese hergestellt. Die Einführung des Zuckers erfolgte in der laufenden Glycopeptidsynthese unter Verwendung des zuvor hergestellten N γ -Chitobiosyl-Asparagin-Bausteins **12**. Bei den offenkettigen Verbindungen kamen orthogonal *St*Bu-geschützte Cysteine zum Einsatz, deren Seitenkettenschutz bei der Abspaltung vom Harz nicht entfernt wurde. Für die Darstellung der zyklischen Verbindungen gelang zwar die Entschützung der Cysteine durch Reduktion mit DTT, bei der nachfolgenden Zyklisierung mit Luftsauerstoff in hochverdünnter Lösung konnte aber das gewünschte Zyklopeptid nicht erhalten werden. Der Versuch der simultanen Entschützung und Zyklisierung des Modellpeptids **13** mit orthogonal *t*Bu-geschützten Cysteinen nach der Silylchlorid-Sulfoxid-Methode¹¹¹ mißlang ebenfalls. Deshalb wurden die zyklischen Verbindungen **3** und **4** unter Verwendung von nicht orthogonal *Trt*-geschützten Cysteinen synthetisiert und nach der Abspaltung vom Harz in einer Stickstoffatmosphäre, durch Zyklisierung an Luftsauerstoff in hochverdünnter Lösung fertiggestellt. Alle hergestellten Verbindungen konnten durch MALDI-TOF-MS und/oder 1D/2D-NMR-Experimente charakterisiert werden.

Bei den anschließenden NMR-Spektroskopischen Untersuchungen, ergaben die Vergleiche der TOCSY-Spektren der Verbindungen **1/2**, **3/4** und **2/4** eindeutig differierende chemische Verschiebungen der amidischen Protonen des Peptidrückgrats. Dies weist auf strukturelle Unterschiede im Peptidrückgrat hin, hervorgerufen durch eine Glycosylierung bzw. Zyklisierung. Bemerkenswert ist der größere Einfluß des Zuckerrestes auf eine Konformationsänderung bei den offenkettigen Verbindungen, verglichen mit den zyklisierten. Die Auswirkungen einer Glycosylierung auf die dreidimensionale Struktur sind jedoch wesentlich kleiner als die, welche durch eine Zyklisierung hervorgerufen werden. Letztere erstrecken sich zudem über das gesamte Peptidrückgrat. Ein analoger Vergleich von der zyklischen glycosylierten *V3-Loop* **4** mit der oben erwähnten *V3-Loop* der

EB1-Patientensequenz¹⁶⁰, weist ebenfalls auf eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Glycopeptids hin. Eine Permutation an den Positionen 5 und 25 scheint demnach also strukturelevant zu sein.

Die in den NOESY-Spektren beobachteten strukturelevanten NOE-Kontakte bestätigen ebenfalls den konformativen Einfluß durch eine Zyklisierung. Während bei den offenkettigen Verbindungen **1** und **2** nur sequentielle NOE-Kontakte auftraten, so waren bei den zyklischen *V3-Loops* **3** und **4** mehrere strukturelevante *mid-* und *long-range* NOE-Kontakte zu beobachten. Sie belegen, daß die zyklisierten Verbindungen eine andere Konformation ausbilden als die offenkettigen, hervorgerufen durch die Disulfidbrücke und die Glycosylierung. Diese Ergebnisse bestätigen vorangegangene NMR-Untersuchungen von *S. Meyer*¹⁶⁰ und *J. Tost*¹⁶¹.

Mit Hilfe von SPR-Studien der Verbindungen **1** bis **4** mit CCR5-überexprimierenden HI5-Zellen konnte gezeigt werden, daß alle Verbindungen eine spezifische Bindung mit dem CCR5-Corezeptor eingehen und bestätigen somit vorangegangene Untersuchungen von *S. Meyer*⁶⁴ mit EB1-V3-(Glyco)Peptiden. Vergleicht man die hier ermittelten Bindungsaffinitäten der einzelnen Verbindungen miteinander, so zeigte das offenkettige V3-Peptid **1** die schwächste und das zyklisierte V3-Glycopeptid **4** die stärkste Wechselwirkung. Glycosylierung bzw. Zyklisierung wirken sich somit auch hier positiv auf die Bindungsstärke aus, wobei letztere einen größeren Einfluß auf die Ausbildung des optimalen Bindungssepitops hat. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß bei einem glycosylierten und gleichzeitig zyklisierten Peptid zusätzliche Synergieeffekte auftreten, da hier die Bindungsaffinität deutlich höher lag, als sich aus der Summe beider Einflüsse ergeben würde. Die entsprechenden SPR-Studien von *S. Meyer*⁶⁴ mit den oben erwähnten EB1-V3-(Glyco)Peptiden zeigen um 20-40% niedrigere RU-Antworten, als die hier untersuchten Verbindungen. Der Grund dafür ist wahrscheinlich in Unterschieden in der Konjugation an der Chipoberfläche aufgrund einer N-terminalen Acetylierung der EB1-Verbindungen zu suchen. Andererseits könnte die Steigerung der Bindungsaffinität auch aufgrund von Sequenzunterschieden zustande kommen. Variationen in der Peptidsequenz - hier geschehen an den Positionen 5 und 25 - könnten also auch direkt oder indirekt zu einem modifizierten Bindungssepitop führen, mit den für eine Bindung beschriebenen Folgen.

Die V3-loop stellt eine hochgradig variable Region innerhalb des GP120 dar. Die Repräsentation dieser Variabilität innerhalb eines HIV-Impfstoffes ist wahrscheinlich essentiell für seine Wirksamkeit. Mit Hilfe der bereits erwähnten *Genbank*-Datenbankrecherche konnte ebenfalls die Variabilität innerhalb der Sequenz der *V3-Loop* ermittelt werden. Bemerkenswert sind die unterschiedlich starken Permutationsgrade, gerade im Bereich der PND-Region. Das GPG-Motiv dieser Domäne ist sehr konserviert. Die fünf N-terminal und acht C-terminal benachbarten Positionen weisen jedoch bis auf wenige Ausnahmen eine hohe Varianz auf. Um eine mögliche Bibliothek abzuleiten, wurden vier Permutationsstellen ermittelt, an denen die Varianz am größten ist. Sie beinhalten zwei bis

vier Aminosäuren pro Permutation und ergeben so eine Zahl von 48 Verbindungen pro Bibliothek.

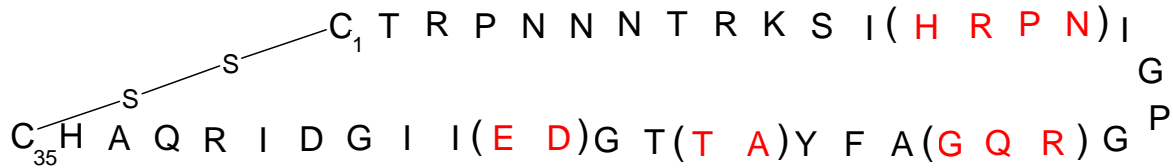


Abbildung 52: Ergebnis des Bibliotheksdesigns ausgehend vom Variationsgrad an den Positionen 1 bis 35 der V3-Loop anhand einer *Genbank* Datenbankrecherche. Die innerhalb der Klammern rot abgebildeten Aminosäuren gehören jeweils einer Permutationsstelle an.

Die Bibliothekssynthesen wurden in einem kombinatorischen *Premix*-Ansatz durchgeführt. Nach mehreren Untersuchungen und Optimierungen am Beispiel der Modellbibliotheken (P,T,N,H,R)IGPGR **15** und (G,A,S,P,T,D,Q,H,F,R,Y,W)IGPGR **16** gelang es, eine gute Gleichverteilung der Komponenten innerhalb einer Bibliothek bei gleichzeitig hohen Ausbeuten (84% bis 97%) zu erreichen. Für die Synthese der Permutationsstellen hat sich gezeigt, daß eine Kombination von einer Dreifachkupplung in manueller *batch*-Synthese unter Verwendung von einem Äquivalent Aminosäuregemisch und 1.2 Äquivalenten HATU bei einer Kupplungszeit von je drei Stunden das beste Ergebnis lieferte. Mit Hilfe der optimierten Bedingungen aus den Einzel- und Modellbibliothekssynthesen konnten die aus der Datenbankanalyse abgeleiteten V3-Sequenzen (siehe Abbildung 52) als Peptid- bzw. Glycopeptidbibliothek **5** und **6** hergestellt werden. Die Identitäten der darin enthaltenen Verbindungen wurden massenspektrometrisch nachgewiesen.

Die mit den Bibliotheken **5** und **6** durchgeführten SPR-Studien zeigten ebenfalls eine spezifische Bindung zum CCR5-Corezeptor in etwa der gleichen Größenordnung, wie die entsprechenden Konsensusverbindungen. Die nur geringfügigen Unterschiede zwischen der mittleren Bindungsaffinität der Bibliothek **5** verglichen mit der Bindungsstärke des Konsensuspeptids **3** sowie zwischen **6** und **4** deuten darauf hin, daß der CCR5-Corezeptor wahrscheinlich keine ausgeprägte Sequenzspezifität an den Permutationsstellen besitzt und das deshalb alle Komponenten innerhalb einer Bibliothek wahrscheinlich ähnlich stark binden.

6 Summary

Glycopeptides and peptides have been synthesized and analyzed as candidates for an broad anti HIV vaccine. The constructs described are based on the V3 loop of the viral envelope protein GP120. These compounds include the important elements like glycosylation and/or disulfide cyclization and also reflect to some extent the diversity of the V3 region.

Previous studies with the EB1 patient sequence⁶⁴ had indicated a big influence of glycosylation as well as cyclization on binding strength towards the CCR5 coreceptor. The influence of the amino acid sequence has been studied here more deeply. Also, a consensus sequence of all HIV strains known and its main variants were selected to assure a broad coverage. The following consensus sequence was extracted from a Genbank search resulting in 17974 V3 sequences that differed from the EB1 sequence at positions 5 (N ↔ S) and 25 (D ↔ E): CTRPNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC.

This sequence was synthesized as an open chain **1** peptide with the cysteines preserved but capped as t-butylthio derivatives and as disulfide cyclized peptide **2**. The corresponding glycopeptides, where the carbohydrate is represented as chitobiosyl moiety, have also been synthesized as open chain **3** and cyclized glycopeptide **4** using a combination of automatic and manual solid phase synthesis. The insertion of the sugar moiety during the peptide synthesis was carried out by using N γ -chitobiosyl asparagine building block **12**. Formation of the cyclic compounds started with the deprotection of the StBu protected cysteines by reduction with DTT. However, cyclization using air oxygen in highly diluted solution failed and only polymeric products were obtained. Another attempt to deprotect and cyclize a model peptide **13** using orthogonal *t*Bu protected cysteines via the silylchloride sulfoxide pathway¹¹¹ was not successful either. Therefore, Trt protected cysteines were used for the synthesis of **3** and **4**. The formation of the disulfide bridge led to the wanted product, when conducting the cleavage in a nitrogen atmosphere and the cyclization by air oxidation in a highly diluted solution. All synthesized compounds were characterized using MALDI-TOF-MS and/or 1D/2D NMR experiments.

Comparisons of TOCSY Spectra of the compounds **1/2**, **3/4** and **2/4** showed significant alterations of the NH chemical shift of the backbone. This indicates changes of the 3D structure of the peptide backbone, caused by glycosylation and cyclization. The stronger sterical influence of a sugar residue is more pronounced in the linear peptide compared to the cyclic structures. However, cyclization affects the peptide conformation much more than glycosylation and it influences the overall structure. A similar comparison of the V3 loop **4** and the corresponding EB1 V3 loop¹⁶⁰ mentioned above also indicates an alteration of the conformation. A permutation at the positions 5 and 25 might be important for the formation of a certain 3D structure.

Data from NOESY spectra confirm the influence of cyclization on the peptide backbone conformation. In contrast to the linear compounds **1** and **2** which only showed sequential

NOE contacts, the cyclic compounds **3** and **4** additionally showed several mid- and long-range NOE contacts. This indicates different conformations for the linear and the cyclic compounds because of cyclization and glycosylation. This is in good agreement with previous NMR studies from *S. Meyer*¹⁶⁰ and *J. Tost*.¹⁶¹

In SPR analysis compounds **1** to **4** showed a specific binding towards CCR5 overexpressing HI5 cells. This is in good agreement with the data obtained by *S. Meyer*⁶⁴, who had carried out SPR studies with EB1 V3 (glyco)peptides containing sequential alterations at the positions 5 (S ↔ N) and 25 (E ↔ D), compared to the consensus sequence determined in this work. The linear V3 peptide **1** showed the weakest and the cyclic glycopeptide **4** the strongest binding. Cyclization as well as glycosylation both enhances the binding affinity, but the effect of cyclization on the formation of an optimal binding epitope is considerably higher. Additionally, there is a synergetic effect, which enhances the binding strength, if a cyclic peptide also includes a glycosylation site.

Equivalent SPR studies by *S. Meyer*⁶⁴ mentioned above showed 20 to 40% weaker SPR response than the compounds studied here. This is probably a result of differences in conjugation to the chip surface, because of N-terminal acetylation of the EB1 (glyco)peptides. On the other hand an increased binding affinity could be a result of variations in the peptide sequence, incorporated here at positions 5 and 25. This could lead directly or indirectly to a change in the binding epitope with consequences for binding affinity.

The V3 loop is a highly variable region within the GP120. The representation of this variability in a HIV vaccine is probably important for its efficiency. Based on a Genbank data analysis mentioned above, it was possible to determine the sequence variability of the V3 loop. Remarkable are the different levels of permutation within this loop, especially in the PND region. The GPG motif of this domain is very conserved but five amino acids on C terminal and eight on the N terminal side show a drastically increased variability. For the library design, four sites with the highest level of permutation were identified and selected to design a library. They include two to four different amino acids per site. The result is a 48 compound library.

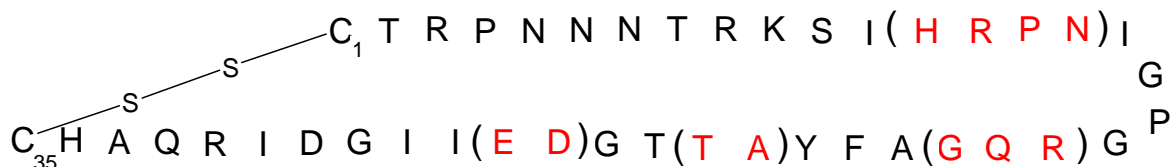


Figure 53: Library based on the highest diversity sites in the V3 loop. The red amino acids in brackets represent the permutations at the given positions.

The library synthesis was carried out by a combinatorial premix synthesis strategy. After several optimizations of the coupling conditions with the model libraries (P,T,N,H,R)IGPGR **15** and (G,A,S,P,T,D,Q,H,F,R,Y,W)IGPGR **16**, it was possible to obtain a nearly equal representation of all library compounds in good overall yields between 84% and 97%. The

best result for the synthesis of a permutation site was obtained in a manual batch synthesis with 3 coupling cycles each utilizing one equivalent of the amino acid mixture and 1.2 equivalents of HATU. The coupling times could be reduced to 3 hours per cycle without lowering the yields. Using these optimized conditions libraries of the V3 peptide **5** and the glycopeptide **6** (Figure 53) were synthesized successfully. The presence and approximate quantity of all components in the library could be validated by MALDI-TOF-MS.

The SPR studies of libraries **5** and **6** showed specific binding towards the CCR5 coreceptor at almost the same magnitude as the corresponding consensus sequences **3** and **4**. No significant differences of the average binding affinity of the peptide library **5** and the consensus peptide **3** nor of the glycopeptide library **6** and the peptide library **4** were found. This indicates that the CCR5 coreceptor does not show a distinct sequence specificity at the permutation sites. Therefore, an almost equal binding affinity is likely for all compounds within the libraries.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Präparative HPLC

Alle im Folgenden beschriebenen präparativen Aufreinigungen von Rohproduktgemischen über HPLC wurden an RP-, bzw. RP-analogen Phasen an einer *Biocad Sprint*-HPLC-Anlage der Firma *Perseptive* durchgeführt. Als Fraktionsammler wurde ein *Gilson FC205 „Fraction Collector“* eingesetzt. Als stationäre Phasen wurden eine *VP 250/21mm NUCLEOSIL 100-7µm C₁₈*-Säule (Flussrate 20 mL/min) der Firma *Machery & Nagel* eingesetzt. Als RP-analoge Phase diente eine semipräparative *218TP510*-Säule (1.0 x 25 cm, 5µm) der Firma *Vydac* (Flussrate 5 mL/min). Als mobile Phasen wurden unterschiedliche Gradientenprogramme zwischen Eluent A (95% H₂O/5% MeCN) und Eluent B (95% MeCN/5% H₂O), bzw. Eluent C (95% H₂O/5% MeCN/0.1% TFA) und Eluent D (95% MeCN/5% H₂O/0.1% TFA) ausgeführt. Die Laufmittel sind filtriert, im Ultraschallbad vorentgast und von HPLC *grade*. Das verwendete Wasser wurde über eine *USF Purelab Plus* gereinigt und in reinster Qualität eingesetzt. Die Proben wurden in 1 mL des Eluentengemisches gelöst, welches dem Gradienten bei der Injektion entspricht. Ungelöste Rückstände wurden durch Filtration mit *Costar SpinX tubes* (2.2µm Celluloseacetat) vor der Injektion abgetrennt. Das Acetonitril der gesammelten Fraktionen wurde zunächst am Rotationsverdampfer abdestilliert und die Proben anschließend gefriergetrocknet.

7.1.2 MALDI-TOF-MS

Die Aufnahme der Maldi-TOF-Spektren erfolgte an einem *Biflex III* Spektrometer der Firma *Bruker* im *reflector mode*. Die Proben wurden in einer 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)-, oder α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CCA)-Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/µl vermessen.

7.1.3 ESI-LC/MS

Einige in dieser Arbeit synthetisierte Substanzbibliotheken wurden an einem *HP5989B MS Engine* Massenspektrometer mit *HP59987A API-Elektrospray LC/MS Interface* der Firma *Hewlett Packard*, welches mit einer *Agilent HPLC Series 1100* gekoppelt war, charakterisiert und relativ zueinander quantifiziert. Als stationäre RP-Phase wurden eine *CC 250/2mm NUCLEOSIL 100-5µm C₁₈*-Säule (Flussrate 50 µL/min) der Firma *Machery & Nagel* eingesetzt. Zur Trennung wurden mit verschiedenen mobilen Phasen unterschiedliche Gradienten eingestellt, welche auch bei der präparativen HPLC zum Einsatz kamen.

7.1.4 NMR

Die eindimensionalen ^1H -Spektren wurden an einem *Bruker AMX400*-Spektrometer bei 300K aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der NMR-Spektren sind in Einheiten der δ -Skala angegeben, als interner Standard diente hierbei, wie bei Messungen in organischen Lösungsmitteln allgemein üblich, Tetramethylsilan ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00$ ppm). Die Kopplungskonstanten J sind, wenn nicht anders angegeben ^3J -Kopplungen und in Hertz angegeben. Die Indizes kennzeichnen die jeweils miteinander koppelnden Wasserstoffatome. Alle höherdimensionalen Protonen-NMR-Spektren wurden an einem *DRX500* bzw. *DRX700* Spektrometer der Firma *Bruker* bei 300K in einem *TXI ^1H - ^{13}C / ^{15}N -D*-Probenkopf für 5 mm NMR-Röhrchen aufgenommen. Die Peptid- und Glycopeptid-Proben wurden in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 bei einem pH-Wert von 3-4 (TFA) vermessen. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte auf das NH-Signal von Tyrosin-21 bei 7.865 ppm. Die so aufgenommenen Daten wurden an einer *Silicon Graphics Workstation (O₂, Octane)* unter Zuhilfenahme der Software *Xwinnmr 2.0* und *Aurelia 2.5.9* von *Bruker* prozessiert und ausgewertet. Die einzelnen Spinsysteme wurden in TOCSY-Experimenten zugeordnet. Die Sequenzbestimmung gelang mit Hilfe der NOESY-Experimente. Die Zuordnung der Zuckerprotonen sowie die Bestimmung der NH- H_α Kopplungskonstanten erfolgte in DQF COSY Experimenten.

7.1.5 SPR

Die SPR-Experimente wurden mit einem *BIACORE 3000* Gerät mit *F1-Chips* durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen *BIAevaluation Vers. 3.0.2* und *BIACORE Control Vers. 3.0*.

7.1.6 Weitere chromatographische Methoden

Alle dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen wurden an Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie (*Merck, GF₂₅₄*) durchgeführt. Die Detektion erfolgte in Abhängigkeit der Reaktionspartner durch UV-Absorption und/oder Eintauchen in eine ethanolisch/wäßrige Lösung von Schwefelsäure (10%ig) und anschließender Wärmebehandlung mit einem Heißluftfön.

Säulenchromatographische Aufreinigungen von Rohprodukten an Kieselgel wurden in präparativem Maßstab an einer Mitteldruckanlage der Firma *Büchi* (10 bar) an Kieselgel 60, Korngröße 40 μm – 63 μm der Firma *Merck* durchgeführt. Es wurden ausschließlich destillierte Laufmittel verwendet.

7.1.7 Verschiedenes

Die photometrischen Untersuchungen wurden an einem *UV-160A* – Photometer der Firma *Shimadzu* vorgenommen.

Alle Ultrafiltrationen wurden mit einer 400 mL (*Modell 8400*) bzw 50 mL (*Modell 8050*) Rührzelle und einer Membran mit 1000 MWCO der Firma *Millipore* durchgeführt.

Alle Gefriertrocknungen erfolgten an einer Lyophylle *Alpha 1-2* bzw. *Alpha 1-4* der Firma *Christ* durchgeführt.

Die Zellkonzentrationen wurden in einer Neubauer Zählkammer (0.1 mm Tiefe/0.0025 mm²) und einem *Diavert* Mikroskop der Firma *Leitz* bestimmt.

Alle angegebenen Lösungsmittel sind, wenn nicht anders angegeben, von destillierter Qualität.

Alle Lösungsmittelverhältnisse sind volumetrisch.

7.2 Verwendete Chemikalien

Hersteller	Chemikalien
Advanced ChemTech	Fmoc-L-Alanin-OH, Fmoc-L-Arginin-(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asparagin-(Trt)-OH, Fmoc-L-Aspartat-(OtBu)-OH, Fmoc-L-Glutamat-(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cystein-(Trt)-OH, Fmoc-L-Glutamin-(Trt)-OH, Fmoc-L-Glycin-OH, Fmoc-L-Histidin-(Trt)-OH, Fmoc-L-Isoleucin-OH, Fmoc-L-Lysin-(Boc)-OH, Fmoc-L-Phenylalanin-OH, Fmoc-L-Prolin-OH, Fmoc-L-Serin-(tBu)-OH, Fmoc-L-Threonin-(tBu)-OH, Fmoc-L-Tryptophan-(Boc)-OH, Fmoc-L-Tyrosin-(tBu)-OH
Applied Biosystems	DIPEA, Piperidin/DMF (1:4), HATU, Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz
BIACORE AB	NHS, EDC, EA, HBS-EP, sonstige Chemikalien Biacore
Biochrom	FKS
Calbiochem-Novabiochem	Fmoc-L-Cystein-(StBu)-OH, Fmoc-L-Cystein-(tBu)-OH, TBTU
Deutero	Deuteriumoxid, 99.9%, DMSO-d ₆ (99.8%), CDCl ₃ (99.8%)
Gibco	Zellkulturmedium RPMI 1640, Trypsin
J.T. Baker	Acetonitril (Ultra Gradient HPLC Grade)
Lancaster	TIPS 99%
Merck	Acetanhydrid, Aceton, Ammoniumhydrogencarbonat, Chloroform, α -Cyano-4-hydroxizimzsäure, Dichlormethan, Diethylether, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Dinatriumhydrogenphosphat, Diphenylsulfoxid, Dithiothreitol, Ethanol, Hydraziniumhydroxid, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Methanol, N-Methylpyrrolidon, Natrium, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, 2-Propanol, Pyridin, Schwefelsäure 96%, Toluol, Trichlormethylsilan, Trifluoressigsäure,
Proligo	DMF
Sigma-Aldrich	Chitin, Dimethylsulfoxid, Neomycin, Penicillin, Puromycin, Streptomycin

Tabelle 16: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

7.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Festphasensynthese

7.3.1 Peptid- und Glycopeptidsynthese

7.3.1.1 Manuelle Peptid- und Glycopeptidsynthese

Falls nicht anders angegeben, wird die manuelle Peptid-, bzw. Glycopeptidsynthese nach dem folgenden Verfahren durchgeführt.

Eine äquivalente Menge PAL-PEG-PS-Harz wird in eine Glasfritte (Porengröße 3) eingewogen und anschließend zum Quellen für 20 Minuten mit DMF bedeckt. Nach Entfernen des DMF mit Stickstoff, wird zweimal für 10 Minuten mit Piperidin/DMF-Lösung (1:4) bedeckt und nachfolgend mit DMF gewaschen. Die Menge der abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen wird durch Messung der UV-Absorption des in der Abspaltungslösung enthaltenen Methylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) ermittelt. Im Anschluß wird solange mit DMF gewaschen, bis die Waschlösung neutral ist.

Die seitenkettengeschützte Aminosäure wird als N-terminal Fmoc-geschütztes Derivat, wenn nicht anders angegeben, im 4fachen Überschuß eingewogen. Zusammen mit dem 5fachen Überschuß an TBTU oder HATU und ebenfalls 5 Äquivalenten DIPEA wird sie in genau der Menge absoluten DMF bzw. NMP gelöst, die nötig ist, um das Harz zu bedecken. Nach einer Aktivierungszeit von 5 Minuten wird das Gemisch zu dem Harz gegeben und für einen angegebenen Zeitraum geschüttelt. Bei einer Mehrfachkupplung wird die Reaktion mit einer frischen Reaktionslösung wiederholt. Nach Entfernen und gründlichen Waschen mit DMF werden nichtumgesetzte Aminogruppen mit 10% Acetanhydrid in DMF für 15 Minuten acetyliert. Nach Entfernen der Acetylierungslösung und ausgiebigen Waschen des Harzes mit DMF wird der beschriebene Zyklus für eine bestimmte Anzahl an Positionen im Peptid wiederholt, oder das Harz zur automatischen Synthese in den Peptidsynthesizer überführt. Um das (Glyco)Peptid lagerungsbeständig zu machen, wird die endständige Fmoc-Schutzgruppe erst vor der Weiterverarbeitung abgespalten. Nur wenn angegeben, wird die α -Aminogruppe des N-Terminus nach fertiggestellter Synthese des (Glyco)Peptid mit Acetanhydrid/DMF (1:10) acetyliert. Das Harz wird nach der Synthese erst gründlich mit 2-Propanol, dann mit Dichlormethan und anschließend nochmals mit 2-Propanol gewaschen, die Waschlösungen entfernt und das Harz in einem Stickstoffstrom getrocknet.

7.3.1.2 Automatisierte Peptid und Glycopeptidsynthese

Die automatisierte Peptidsynthese erfolgte an einem *Pioneer Peptide Synthesis System* der Firma *Perseptive Biosystems*.

Eine der Ansatzgröße und Harzbelegung entsprechende Menge PAL-PEG-PS-Harz wird in eine Stempelsäule mit Frittenböden eingewogen. Die Aminosäuren werden im 4-fachen Überschuß vom C- zum N-Terminus an das Harz geknüpft. Als Aktivatoren dienen HATU

bzw. TBTU in Gegenwart von DIPEA in jeweils 5 fachen Überschuß, bezogen auf das Harz. Die Blockierung nicht umgesetzter Aminogruppen erfolgt durch einen 5 minütigen kontinuierlichen Fluß von Acetanhydrid/DMF (1:10). Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mit Piperidin/DMF (1:4) über 10 Minuten. Die endständige Fmoc-Schutzgruppe wird zunächst am Harz belassen. Nach dessen Überführung in eine Glasfritte wird zur Bestimmung der Rohausbeute unter Messung der UV-Absorption diese Fmoc-Schutzgruppe manuell abgespalten. Anschließend wird, nur wenn angegeben, der N-Terminus des (Glyco)Peptids mit Acetanhydrid/DMF (1:10) blockiert. Das Harz wird nach der Synthese erst gründlich mit 2-Propanol, dann mit Dichlormethan und anschließend nochmal mit 2-Propanol gewaschen, die Waschlösungen entfernt und das Harz in einem Stickstoffstrom getrocknet.

7.3.1.3 Manuelle Kupplung des Fmoc-Asn-(β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc)-COOH-Bausteins 12

Das PAL-PEG-PS-Harz mit dem daran gebundenen, bis vor die Glycosylierungsstelle synthetisierten Peptid wird in eine Glasfritte (Porengröße 3) gegeben und anschließend zum Quellen für 20 Minuten mit DMF bedeckt. Nach Entfernen des DMF mit Stickstoff, wird das Harz zweimal für 10 Minuten mit Piperidin/DMF-Lösung (1:4) bedeckt und nachfolgend mit DMF gewaschen. Die Menge der abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen wird durch Messung der UV-Absorption des in der Abspaltungslösung enthaltenen Methyleneblaus bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) ermittelt. Im Anschluß wird solange mit DMF gewaschen, bis die Waschlösung neutral ist.

Der Fmoc-Asn-(β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc)-COOH-Baustein wird äquimolar eingewogen, in absolutem DMF gelöst und auf das Harz gegeben. Je 1.2 Äquivalente an TBTU und DIPEA werden in genau der Menge absoluten DMF gelöst, die nötig ist, damit das Harz gerade bedeckt wird. Das Gemisch wird auf dem Harz für 24 Stunden geschüttelt. Anschließend wird mit absolutem DMF gewaschen und die Kupplung mit einer frischen Reaktionslösung wiederholt. Nach Entfernen der Lösung und gründlichen Waschen mit DMF werden nicht umgesetzte Aminogruppen mit 10% Acetanhydrid in DMF für 15 Minuten acetyliert. Nach Entfernen der Acetylierungslösung und ausgiebigen Waschen des Harzes mit DMF wird die Ausbeute durch Messung der UV-Absorption nach oben beschriebenen Verfahren bestimmt.

7.3.2 Entschützung und Abspaltung des Peptids oder Glycopeptids vom Harz

Wenn nicht anders beschrieben, wird die Seitenkettenentschützung und Abspaltung des fertigen Peptids vom Harz nach folgenden Standardverfahren durchgeführt.

7.3.2.1 Entschützung und Abspaltung von Peptiden vom Harz

Das im Stickstoffstrom getrocknete Harz wird zweimal in Folge mit einer Lösung, bestehend aus TFA, TIPS und Wasser im Verhältnis 95:5:2, bedeckt und für je 90 Minuten geschüttelt. Die Lösung wird im Ölpumpenvakuum abgesaugt. Die vereinten Lösungen werden anschließend im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen, im Ultraschallbad suspendiert und lyophilisiert.

Beim Ansetzen der Abspatlösung wird stets darauf geachtet, daß minimal 2 Äquivalente Triisopropylsilan (pro mol Schutzgruppe am Harz) eingesetzt werden¹⁶⁹ und das Gesamtvolumen 25 mL pro Gramm Harz beträgt.¹⁷⁰ Dies Verfahren wird als Standardverfahren übernommen.

7.3.2.2 Entschützung und Abspaltung von Glycopeptiden vom Harz

Das im Stickstoffstrom getrocknete Harz wird gründlich mit absoluten Methanol gewaschen und anschließend mit einem Gemisch aus Hydrazinhydrat und absoluten Methanol (1:5) für 6 Stunden geschüttelt um die OH-Schutzgruppen des Zuckers zu entfernen. Darauf hin wird sorgfältig mit absolutem Methanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz erfolgt nach der oben beschriebenen Prozedur.

7.3.2.3 Entschützung und Abspaltung von Cystein-(Trt)-haltigen (Glyco)Peptiden vom Harz und Bildung einer Disulfidgruppe

Die Vorgehensweise der Entschützung und Abspaltung erfolgt analog den oben beschriebenen Verfahren mit dem Unterschied, daß sämtliche Lösungen vorher frisch entgast werden. Die Reaktion und das sich anschließende Absaugen der Abspatlösung wird dann in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Das erhaltene Rohprodukt wird noch unter Stickstoff in einer einstündig entgasten 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung (50 mL pro 1 µmol Harzäquivalent) unter zu Hilfenahme von Ultraschall gelöst. Die Lösung wird nun für 72 Stunden bei offenem Reaktionsgefäß stark gerührt, so daß sie mit Luftsauerstoff durchsetzt wird. Durch Ultrafiltration (MWCO 1000 D) wird die Lösung auf ca. 50 mL eingengt, viermal mit Wasser auf 350 mL verdünnt und dann wieder auf 50 mL eingengt. Diese Lösung wird bis zur Gewichtskontanz lyophilisiert und der weiteren Aufreinigung unterzogen.

7.3.3 Aufarbeitung der (Glyco)Peptide nach der Abspaltung

Das getrocknete Rohprodukt der (Glyco)Peptidsynthese nach der Abspaltung vom Harz wird in Wasser/Acetonitril/TFA 95:5:0.1 (200 µL pro µmol Harzäquivalent) aufgenommen und für 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und ungelöste Rückstände abzentrifugiert. Der Rückstand wird nochmals gelöst, suspendiert und zentrifugiert. Die erhaltenen Lösungen werden, wenn nicht anders angegeben, vereint, lyophilisiert und durch HPLC an einer C₁₈-Phase bzw. C₁₈-analogen Phase aufgereinigt.

7.4 Synthese von Einzelverbindungen

7.4.1 Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen V3-Peptids C(StBu)TRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC(StBu) 1

1. Synthese

Es wird die unter 4.1 erwähnte nicht glycosylierte Konsensussequenz nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.2 synthetisiert. Die Ansatzgröße beträgt 50 μmol , als Aktivator dient TBTU. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 120 Minuten durchgeführt. Die Entschützung, Abspaltung und Aufreinigung erfolgt nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.1 und 7.3.3.

Synthese- position	Aminosäure	Einwaage pro Kuppl. [mg]	Synthese- position	Aminosäure	Einwaage pro Kuppl. [mg]
	Harz	278	18	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130
1	Fmoc-Cys-(StBu)-OH	86	19	Fmoc-Gly-OH	59
2	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	20	Fmoc-Pro-OH	67
3	Fmoc-Ala-OH	62	21	Fmoc-Gly-OH	59
4	Fmoc-Gln-(Trt)-OH	122	22	Fmoc-Ile-OH	71
5	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	23	Fmoc-His-(Trt)-OH	124
6	Fmoc-Ile-OH	71	24	Fmoc-Ile-OH	71
7	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	25	Fmoc-Ser-(tBu)-OH	77
8	Fmoc-Gly-OH	59	26	Fmoc-Lys-Boc)-OH	94
9	Fmoc-Ile-OH	71	27	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130
10	Fmoc-Ile-OH	71	28	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79
11	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	29	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119
12	Fmoc-Gly-OH	59	30	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119
13	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	31	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119
14	Fmoc-Ala-OH	62	32	Fmoc-Pro-OH	67
15	Fmoc-Tyr-(tBu)-OH	92	33	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130
16	Fmoc-Phe-OH	77	34	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79
17	Fmoc-Ala-OH	62	35	Fmoc-Cys-(StBu)-OH	86

Tabelle 17: Einwaagen zur automatischen Synthese von 1.

Das Rohprodukt wird in einem ersten Aufreinigungsschritt über HPLC an einer RP C₁₈ Säule aufgereinigt (Eluent C/Eluent D 90/10 → 90/10 (1 CV) → 50/50 (6 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1 CV) → 90/10 (1 CV), R_t = 23.56 min, Flußrate 20 mL/min). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wird das vorgereinigte Produkt nochmals durch HPLC an einer RP C₁₈ (Eluent C/Eluent D 90/10 → 90/10 (1 CV) → 70/30 (0.2 CV) → 68/32 (2 CV) → 0/100 (0.6 CV) → 0/100 (1 CV) → 90/10 (1 CV), R_t = 10.30 min, Flußrate 5 mL/min) analogen Säule aufgereinigt. Die Produkte werden durch MALDI-TOF-MS und NMR identifiziert.

Ausbeute:

3.3 mg (0.81 μmol) an **1** entsprechend 2% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung:

¹H-NMR Daten: Tabelle 19

MALDI-TOF (m/z) = 4030.29 (M+H⁺)

C₁₇₁H₂₇₉N₅₇O₄₈S₄ (4029.74 g/mol)

2. Synthese

Die Synthese der unter 4.1 erwähnten nicht glycosylierten Konsensussequenz erfolgt an den Synthesepositionen 1 (Cystein-35) bis 14 (Alanin-22) und 19 (Glycin-20) bis 35 (Cystein-1) automatisch am Syntheseroboter nach allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.2. Die Ansatzgröße beträgt 50 µmol, als Aktivator dient TBTU. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 120 Minuten durchgeführt.

Wegen schlechter Kupplungsausbeuten der Aminosäuren Tyrosin-21 bis Arginin-18 wird die Peptidsynthese an den Syntheseposition 15 (Tyrosin-21) bis 18 (Arginin-18) manuell, nach der allgemeinen Vorschrift 7.3.1.1 unter Schutzgas, NMP¹⁷¹ als Lösungsmittel und HATU als Aktivator durchgeführt. Auch hier erfolgt eine Dreifachkupplung von je 120 Minuten. Die Einwaagen des Harzes und sämtlicher Aminosäuren pro Kupplung sind in Tabelle 18 angegeben. Die Entschützung, Abspaltung und Aufreinigung erfolgt nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.1 und 7.3.3.

Syntheseposition	Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]	Kupplungsart
	Harz	278	
1	Fmoc-Cys-(StBu)-OH	86	automatisch
2	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	automatisch
3	Fmoc-Ala-OH	62	automatisch
4	Fmoc-Gln-(Trt)-OH	122	automatisch
5	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
6	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
7	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	automatisch
8	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
9	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
10	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
11	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	automatisch
12	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
13	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
14	Fmoc-Ala-OH	62	automatisch
15	Fmoc-Tyr-(tBu)-OH	92	manuell
16	Fmoc-Phe-OH	77	manuell
17	Fmoc-Ala-OH	62	manuell
18	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	manuell
19	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
20	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
21	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
22	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
23	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	automatisch
24	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
25	Fmoc-Ser-(tBu)-OH	77	automatisch
26	Fmoc-Lys-Boc)-OH	94	automatisch
27	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
28	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
29	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
30	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
31	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
32	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
33	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
34	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
35	Fmoc-Cys-(StBu)-OH	86	automatisch

Tabelle 18: Einwaagen des Harzes und der Aminosäuren pro Kupplung zur Synthese von 1.

Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgt nach dem gleichen Verfahren, wie bei der ersten Synthese von **1**.

Ausbeute:

8.66 mg (2.15 μmol) an **1** entsprechend 5% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung:

chemische Verschiebung [ppm] und $^3J_{(NH/H\alpha)}$ in Hz									
Pos	Aminosäure	NH	α	α' o. β	β'	γ	γ'	δ	andere
1	Cys1		4.456	2.786	2.954				tBu: 1.267
2	Thr2	8.210 (7.9)	4.194			1.185			
3	Arg3	8.463 (6.9)	4.547	1.801		1.672	1.672	3.152	ϵ : 7.135
4	Pro4		4.362	1.850	1.973	2.249		3.591	δ' : 3.779
5	Asn5	8.472 (7.6)	4.623	2.718	2.786				
6	Asn6	8.396 (7.7)	4.662	2.776	2.698				
7	Asn7	8.431 (6.9)	4.720	2.807	2.728				
8	Thr8	8.045 (7.5)	4.233			1.146			
9	Arg9	8.236 (9.4)	4.274	1.606	1.801	1.546	1.722	3.131	ϵ : 7.099
10	Lys10	8.242 (9.3)	4.273	1.684	1.762	1.341	1.391	1.615	ϵ : 2.924; NH ₂ : 7.455
11	Ser11	8.245 (6.8)	4.410	3.756					
12	Ile12*	8.050 (8.3)	4.115	1.752		1.092	1.385	0.788	γ'' : 0.788
13	His13	8.537 (8.6)	4.681	3.060	3.139				H2: 7.192; H4: 8.519 γ'' : 0.833
14	Ile14	8.190 (8.3)	4.164	1.755		1.089	1.382	0.764	γ'' : 0.833
15	Gly15	8.268 (5.3)	4.086	3.989					
16	Pro16		4.392	1.923	1.954	2.203		3.591	δ' : 3.760
17	Gly17	8.428 (5.1)	3.881						
18	Arg18	8.062 (6.8)	4.218	1.634	1.731	1.507	1.507	3.092	ϵ : 7.072
19	Ala19	8.197 (9.4)	4.194	1.185					
20	Phe20	8.005 (6.8)	4.437	2.904					ϵ/ζ : 7.057
21	Tyr21	7.865 (7.8)	4.458	2.786	2.943				ϵ : 7.012
22	Ala22	8.068 (6.2)	4.282	1.321					
23	Thr23	7.976 (6.9)	4.233	4.174		1.155			
24	Gly24	8.289 (6.4)	3.901						
25	Asp25	8.216 (7.7)	4.649	2.718	2.806				
26	Ile26*	8.050 (8.3)	4.115	1.819		1.092	1.283	0.786	0.786
27	Ile27	8.105 (6.8)	4.066	1.793		1.117	1.411	0.774	0.834
28	Gly28	8.298 (6.0)	3.871						
29	Asp29	8.175 (7.6)	4.642	2.738	2.816				
30	Ile30	8.031 (7.1)	4.076	1.839		1.147	1.392	0.835	0.835
31	Arg31	8.285 (6.8)	4.235	1.596	1.780	1.545	1.713	3.134	ϵ : 7.176
32	Gln32	8.159 (6.9)	4.232	2.289		1.898		2.035	
33	Ala33	8.190 (8.3)	4.164	1.283					
34	His34	8.418 (7.8)	4.642	3.226	3.138				H1: 7.241; H2: 8.549
35	Cys35	8.314 (7.6)	4.554	2.953	3.119				tBu: 1.267
	CONH ₂	6.803; 7.457							

* Signale vertauschbar

Tabelle 19: $^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebungen und $^3J_{(NH/H\alpha)}$ -Kopplungskonstanten in Klammern von **1**.MALDI-TOF (m/z) = 4030.49 (M+H⁺)C₁₇₁H₂₇₉N₅₇O₄₈S₄ (4029.74 g/mol)

7.4.2 Synthese des offenkettigen V3-Glycopeptids C(StBu)TRPNN (β -D-GlcNAc- β -(1-4)-D-GlcNAc)NTRKSIHIGPGRAF $\underline{\underline{YATGDIIGDI}}$ RQAHC(StBu) 2

Die Synthese der unter 4.1 erwähnten glycosylierten Konsensussequenz erfolgt an den Synthesepositionen 1 (Cystein-35) bis 14 (Alanin-22), 19 (Glycin-20) bis 29 (Asparagin-7) und 31 (Asparagin-6) bis 35 (Cystein-1) automatisch am Syntheseroboter nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.2. Die Ansatzgröße beträgt 50 μ mol, als Aktivator dient TBTU. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 120 Minuten durchgeführt.

Wegen schlechter Kupplungsausbeuten der Aminosäuren Tyrosin-21 bis Arginin-18 wird die Peptidsynthese an den Syntheseposition 15 (Tyrosin-21) bis 18 (Arginin-18) manuell, nach der allgemeinen Vorschrift 7.3.1.1 unter Schutzgas, NMP¹⁷¹ als Lösungsmittel und HATU als Aktivator durchgeführt. Auch hier erfolgt eine Dreifachkupplung von je 120 Minuten.

Die Kupplung des Fmoc-Asn-(β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc)-COOH-Bausteins **12** an der Syntheseposition 30 erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift 7.3.1.3. Die einzuwiegende Menge pro Kupplung bezieht sich auf die photometrisch bestimmte Ausbeute nach der vorhergehenden Fmoc-Abspaltung (25 μ mol).

Die Einwaagen des Harzes und sämtlicher Aminosäurederivate pro Kupplung sind in Tabelle 20 angegeben. Die Entschützung, Abspaltung und Aufreinigung erfolgt nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.1 und 7.3.3.

Die Entschützung, Abspaltung und die Aufreinigung erfolgt nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.2 und 7.3.3. Das Rohprodukt wird in einem ersten Aufreinigungsschritt über HPLC an einer RP C₁₈ Säule aufgereinigt (Eluent C/Eluent D 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 50/50 (6 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), R_t = 25.14 min, Flußrate 20 mL/min). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wird das vorgereinigte Produkt nochmals durch HPLC an einer RP C₁₈ analogen Säule aufgereinigt (Eluent C/Eluent D 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 80/20 (0.1 CV) \rightarrow 71/29 (4 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), R_t = 9.55 min, Flußrate 5 mL/min). Die Produkte werden durch MALDI-TOF-MS und NMR identifiziert.

Syntheseposition	Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]	Kupplungsart
	Harz	278	automatisch
1	Fmoc-Cys-(StBu)-OH	86	automatisch
2	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	automatisch
3	Fmoc-Ala-OH	62	automatisch
4	Fmoc-Gln-(Trt)-OH	122	automatisch
5	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
6	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
7	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	automatisch
8	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
9	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
10	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
11	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	automatisch
12	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
13	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
14	Fmoc-Ala-OH	62	automatisch
15	Fmoc-Tyr-(tBu)-OH	92	manuell
16	Fmoc-Phe-OH	77	manuell
17	Fmoc-Ala-OH	62	manuell
18	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	manuell
19	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
20	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
21	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
22	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
23	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	automatisch
24	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
25	Fmoc-Ser-(tBu)-OH	77	automatisch
26	Fmoc-Lys-Boc)-OH	94	automatisch
27	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
28	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
29	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
30	Fmoc-Asn-(β -D-GlcNAc- (1-4)- β -D-GlcNAc)-OH	24	manuell
31	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
32	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
33	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
34	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
35	Fmoc-Cys-(StBu)-OH	86	automatisch

Tabelle 20: Einwaagen des Harzes und der Aminosäurederivate pro Kupplung zur Synthese von **2**.

Ausbeute:

7.82 mg (1.76 μ mol) an **2** entsprechend 3% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung:

chemische Verschiebung [ppm] und $^3J_{(NH/H\alpha)}$ in Hz										
Pos.	Aminosäure	NH	α	α' o. β	β'	γ	γ'	δ	andere	
1	Cys1		4.458	2.786	2.952				tBu: 1.267	
2	Thr2	8.215 (6.8)	4.173			1.283				
3	Arg3	8.474 (7.6)	4.554	1.800		1.673	1.673	3.158	ϵ : 7.151	
4	Pro4		4.365	1.853	1.970	2.250		3.588	δ' : 3.774	
5	Asn5	8.440 (7.7)	4.603	2.767	2.737					
6	Asn6	8.450 (7.1)	4.671	2.717	2.786					
7	Asn7	8.385 (7.7)	4.682	2.795	2.719					
8	Thr8	8.038 (6.9)	4.222	4.163		1.146				
9	Arg9	8.248 (9.6)	4.271	1.586	1.799	1.586	1.713	3.138	ϵ : 7.099	
10	Lys10	8.253 (9.3)	4.281	1.684	1.772	1.342	1.402	1.615	ϵ : 2.933; NH: 7.453	
11	Ser11	8.257 (6.9)	4.410	3.764						
12	Ile12	8.064 (5.2)	4.143	1.752		1.078	1.280	0.786	$\gamma\gamma''$: 0.786	
13	His13	8.544 (7.7)	4.681	3.061	3.149				H2: 7.191; H4: 8.521	
14	Ile14	8.198 (5.2)	4.163	1.762		1.088	1.391	0.775	γ'' : 0.845	
15	Gly15	8.272 (6.0)	4.086	3.989						
16	Pro16		4.390	1.933		2.196		3.588	δ' : 3.774	
17	Gly17	8.426 (5.1)	3.890							
18	Arg18	8.068 (6.9)	4.222	1.634	1.732	1.507	1.507	3.089	ϵ : 7.071	
19	Ala19	8.202 (6.0)	4.173	1.195						
20	Phe20	8.010 (6.8)	4.368	2.913					ϵ/ζ : 7.060	
21	Tyr21	7.865 (7.8)	4.457	2.768	2.952				ϵ : 7.015	
22	Ala22	8.064 (6.1)	4.272	1.323	1.323					
23	Thr23	7.978 (6.9)	4.233	4.183		1.165				
24	Gly24	8.290 (5.1)	3.900							
25	Asp25	8.227 (7.7)	4.652	2.739	2.825					
26	Ile26	8.051 (5.8)	4.115	1.745		1.082	1.385	0.788	γ'' : 0.788	
27	Ile27	8.111 (6.9)	4.066	1.802		1.128	1.411	0.775	γ'' : 0.845	
28	Gly28	8.303 (6.0)	3.870							
29	Asp29	8.192 (6.9)	4.652	2.757	2.835					
30	Ile30	8.022 (6.0)	4.086	1.839		1.146		0.833	γ'' : 0.833	
31	Arg31	8.287 (6.8)	4.242	1.595	1.780	1.537	1.713	3.138	ϵ : 7.152	
32	Gln32	8.172 (7.0)	4.242	2.299		1.898		2.035		
33	Ala33	8.209 (5.9)	4.193	1.283						
34	His34	8.426 (7.6)	4.652	3.226	3.147				H2: 7.245; H4: 8.550 tBu: 1.267	
35	Cys35	8.321 (7.6)	4.564	2.953	3.119					
	CONH ₂	6.807; 7.457								
Zucker:										
		NH 1	NH 2	1	2	3	4	5	6a / 6b	Ac
	GlcNAc1	8.566 (10.3)	8.131 (10.1)	4.964	3.784	3.676	3.571	3.482	3.581 / 3.581	1.941
	GlcNAc2		8.307 (10.3)	4.525	3.690	3.869	3.434	3.701	3.506 / 3.506	1.995

Tabelle 21: $^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebungen und $^3J_{(NH/H\alpha)}$ -Kopplungskonstanten in Klammern von 2.MALDI-TOF (m/z) = 4437.33 (M+H⁺)C₁₈₇H₃₀₅N₅₉O₅₈S₄ (4436.13 g/mol)

7.4.3 Versuch der Zyklisierung des orthogonal StBu-cysteingeschützten V3-Peptids 1

Es werden 1.1 mg (0.26 μmol) **1** in 8 mL 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung gelöst, mit Dithiothreitol im Überschuß versetzt und in einer Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entschützung der Cysteine (Reaktionsverfolgung durch MALDI-TOF) wird mit 150 mL 0.1M Ammoniumhydrogencarbonatlösung verdünnt. Unter starkem Rühren bei offenem Reaktionsgefäß und Begasen der Lösung mit Luft wird diese mit Sauerstoff versetzt. Durch Ultrafiltration (MWCO 1000 D) wird die Lösung auf ca. 10 mL eingengt, viermal mit Wasser auf 50 mL verdünnt und wieder auf 10 mL eingengt. Diese Lösung wird bis zur Gewichtskontanz lyophilisiert.

Die Überschüsse an DTT und die Reaktionszeiten sind in Tabelle 22 angegeben.

	1. Ansatz	2. Ansatz	3. Ansatz
Überschuß an DTT [Äquivalente]	20 (0.78mg)	10 (0.39mg)	5 (0.20mg)
Reaktionszeit für die Entschützung [h]	6	7	42
Reaktionszeit für die Zyklisierung [Tage]	3	5	7

Tabelle 22: Überschüsse an DTT und Reaktionszeiten

Ausbeute:

Das gewünschte Produkt ist in keinem der Ansätze entstanden.

Charakterisierung:

MALDI-TOF des offenkettigen entschützten Peptids (m/z) = 3854.46 ($M+H^+$)

Das entstandene zyklisierte Produkt konnte in keinem Lösungsmittel gelöst werden.

MALDI-TOF: In einer Schichtpräparation der Suspension konnte kein Produkt mit der entsprechenden Masse/Ladung identifiziert werden.

$C_{163}H_{263}N_{57}O_{48}S_2$ (3853.39 g/mol)

7.4.4 Versuch zur Zyklisierung des orthogonal tBu-cysteingeschützten Modellpeptids C(tBu)KSGYGFTNAGMQWC(tBu)K 13

3 mg (1.58 μmol) des Peptids C(tBu)KSGYGFTNAGMQWC(tBu)K **13** (zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Wülfken)⁶³ werden in 3.6 mL TFA gelöst. Dazu wird ein Gemisch aus 28 μL (237 μmol) Trichlormethylsilan und 3.19 mg (16 μmol) Diphenylsulfoxid und für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 300 eq Ammoniumfluorid abgebrochen, das Rohprodukt in 50 mL Diethylether ausgefällt, der Ether abdekantiert und das Produkt im Vakuum getrocknet.

Ausbeute:

Das gewünschte Produkt ist nicht entstanden.

Charakterisierung:

Das entstandene Produkt konnte in keinem Lösungsmittel gelöst werden.

MALDI-TOF: In einer Schichtpräparation der Suspension konnte kein Produkt mit der entsprechenden Masse/Ladung identifiziert werden.

$C_{85}H_{130}N_{22}O_{21}S_3$ (1892.31 g/mol)

7.4.5 Synthese der nicht glycosylierten zyklisierten V3-Loop CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC 3

Die Synthese der unter 4.1 erwähnten nicht glycosylierten Konsensussequenz erfolgt an den Synthesepositionen 1 (Cystein-35) bis 14 (Alanin-22) und 19 (Glycin-20) bis 35 (Cystein-1) automatisch am Syntheseroboter nach allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.2. Die Ansatzgröße beträgt 50 μ mol, als Aktivator dient TBTU. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 120 Minuten durchgeführt.

Wegen schlechter Kupplungsausbeuten der Aminosäuren Tyrosin-21 bis Arginin-18 wird die Peptidsynthese an den Syntheseposition 15 (Tyrosin-21) bis 18 (Arginin-18) manuell, nach der allgemeinen Vorschrift 7.3.1.1 unter Schutzgas, NMP¹⁷¹ als Lösungsmittel und HATU als Aktivator durchgeführt. Auch hier erfolgt eine Dreifachkupplung von je 120 Minuten. Die Einwaagen des Harzes und sämtlicher Aminosäuren pro Kupplung sind in Tabelle 23 angegeben.

Die Entschützung, Abspaltung, Bildung der Disulfidbrücke durch Luftoxidation und die Aufreinigung erfolgt nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.3 und 7.3.3. Das Rohprodukt wird in einem ersten Aufreinigungsschritt über HPLC an einer RP C₁₈ Säule aufgereinigt (Eluent C/Eluent D 90/10 → 90/10 (0.8 CV) → 50/50 (5 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1 CV) → 90/10 (1 CV), R_t = 22.59 min, Flußrate 20 mL/min). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wird das vorgereinigte Produkt nochmals durch HPLC an einer RP C₁₈ (Eluent C/Eluent D 90/10 → 90/10 (1 CV) → 80/20 (0.1 CV) → 71/29 (4 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1 CV) → 90/10 (1 CV), R_t = 15.43 min, Flußrate 5 mL/min) analogen Säule aufgereinigt. Die Produkte werden durch MALDI-TOF-MS und NMR identifiziert.

Syntheseposition	Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]	Kupplungsart
	Harz	278	
1	Fmoc-Cys-(Trt)-OH	117	automatisch
2	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	automatisch
3	Fmoc-Ala-OH	62	automatisch
4	Fmoc-Gln-(Trt)-OH	122	automatisch
5	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
6	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
7	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	automatisch
8	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
9	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
10	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
11	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	automatisch
12	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
13	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
14	Fmoc-Ala-OH	62	automatisch
15	Fmoc-Tyr-(tBu)-OH	92	manuell
16	Fmoc-Phe-OH	77	manuell
17	Fmoc-Ala-OH	62	manuell
18	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	manuell
19	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
20	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
21	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
22	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
23	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	automatisch
24	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
25	Fmoc-Ser-(tBu)-OH	77	automatisch
26	Fmoc-Lys-Boc)-OH	94	automatisch
27	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
28	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
29	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
30	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
31	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
32	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
33	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
34	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
35	Fmoc-Cys-(Trt)-OH	117	automatisch

Tabelle 23: Einwaagen des Harzes und der Aminosäuren pro Kupplung zur Synthese von 3.

Ausbeute:

3.81 mg (0.99 μmol) an 3 entsprechend 2% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung:

chemische Verschiebung [ppm] und $^3J_{(NH/H\alpha)}$ in Hz										
Pos.	Aminosäure	NH	α	α'	β	β'	γ	γ'	δ	andere
1	Cys1		4.454	2.931	2.775					
2	Thr2	8.178 (7.1)	4.174		1.182					
3	Arg3	8.464 (7.8)	4.559	1.596	1.790	1.674	1.674	3.133	ϵ : 7.127	
4	Pro4		4.356	1.889	1.947	2.209		3.578	δ' : 3.706	
5	Asn5	8.476 (8.1)	4.673	2.763	2.690					
6	Asn6	8.217 (6.2)	4.633	2.707	2.796					
7	Asn7	8.180 (8.0)	4.650	2.747	2.826					
8	Thr8	8.028 (7.9)	4.204			1.139				
9	Arg9	8.283 (6.7)	4.242	1.586	1.770	1.527	1.692	3.131	ϵ : 7.124	
10	Lys10	8.265 (5.4)	4.212	1.705	1.784	1.276	1.160	1.588	ϵ : 3.134; NH ₂ : 7.444	
11	Ser11	8.159 (7.7)	4.388	3.754						
12	Ile12	7.989 (7.5)	4.113	1.736		1.058	1.221	0.757	γ'' : 0.757	
13	His13	8.484 (7.4)	4.672	3.129	3.031				H2: 7.168; H4: 8.500	
14	Ile14	8.132 (7.0)	4.154	1.743		1.063	1.343	0.744	γ'' : 0.816	
15	Gly15	8.217 (7.1)	4.026							
16	Pro16		4.381	1.900	1.952	2.190		3.578	δ' : 3.736	
17	Gly17	8.445 (6.0)	3.873							
18	Arg18	8.027 (8.5)	4.206	1.627	1.726	1.490		3.083	ϵ : 7.073	
19	Ala19	8.148 (7.6)	4.173	1.165						
20	Phe20	7.984 (7.4)	4.450	2.902					ϵ/ζ : 7.043	
21	Tyr21	7.865 (8.4)	4.454	2.779	2.942				ϵ : 6.997	
22	Ala22	8.058 (9.2)	4.261	1.311						
23	Thr23	7.958 (8.59)	4.222	4.164		1.145				
24	Gly24	8.281 (6.7)	3.861	3.919						
25	Asp25	8.205 (6.3)	4.649	2.718	2.806					
26	Ile26	8.023 (6.4)	4.095	1.814		1.122	1.385	0.788	γ'' : 0.788	
27	Ile27	8.083 (6.1)	4.047	1.784		1.110	1.316	0.760	γ'' : 0.827	
28	Gly28	8.286 (6.0)	3.861							
29	Asp29	8.152 (7.4)	4.642	2.745	2.823					
30	Ile30	8.011 (6.2)	4.066	1.833		1.122	1.397	0.827	γ'' : 0.872	
31	Arg31	8.265 (6.6)	4.212	1.588	1.784	1.527	1.705	3.119	ϵ : 7.178	
32	Gln32	8.096 (7.1)	4.241	2.280		1.881		2.022		
33	Ala33	8.168 (7.1)	4.174	1.263						
34	His34	8.435 (7.6)	4.644	3.229	3.140				H2: 7.232; H4: 8.551	
35	Cys35	8.457 (7.8)	4.619	3.202	2.946					

Tabelle 24: $^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebungen und $^3J_{(NH/H\alpha)}$ -Kopplungskonstanten in Klammern von **3**.MALDI-TOF (m/z) = 3852.12 (M+H⁺)C₁₆₃H₂₆₁N₅₇O₄₈S₂ (3851.38 g/mol)

7.4.6 Synthese der glycosylierten zyklisierten *V3-Loop* CTRPNN (β -D-GlcNAc- β -(1-4)D-GlcNAc)NTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIR QAHC 4

Die Synthese der unter 4.1 erwähnten glycosylierten Konsensussequenz erfolgt an den Synthesepositionen 1 (Cystein-35) bis 14 (Alanin-22), 19 (Glycin-20) bis 29 (Asparagin-7) und 31 (Asparagin-6) bis 35 (Cystein-1) automatisch am Syntheseroboter nach allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.2. Die Ansatzgröße beträgt 50 μ mol, als Aktivator dient TBTU. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 120 Minuten durchgeführt.

Wegen schlechter Kupplungsausbeuten der Aminosäuren Tyrosin-21 bis Arginin-18 wird die Peptidsynthese an den Syntheseposition 15 (Tyrosin-21) bis 18 (Arginin-18) manuell, nach der allgemeinen Vorschrift 7.3.1.1 unter Schutzgas, NMP¹⁷¹ als Lösungsmittel und HATU als Aktivator durchgeführt. Auch hier erfolgt eine Dreifachkupplung von je 120 Minuten.

Die Kupplung des Fmoc-Asn-(β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc)-COOH-Bausteins **12** an der Syntheseposition 30 erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift 7.3.1.3. Die einzuwiegende Menge pro Kupplung bezieht sich auf die photometrisch bestimmte Ausbeute nach der vorhergehenden Fmoc-Abspaltung (25 μ mol). Die Einwaagen des Harzes und sämtlicher Aminosäurederivate pro Kupplung sind in Tabelle 25 angegeben.

Die Entschützung, Abspaltung, Bildung der Disulfidbrücke durch Luftoxidation und die Aufreinigung erfolgt nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.3 und 7.3.3.

Das Rohprodukt wird in einem ersten Aufreinigungsschritt über HPLC an einer RP C₁₈ Säule aufgereinigt (Eluent C/Eluent D 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 50/50 (5 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), R_t = 20.53 min, Flußrate 20 mL/min). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wird das vorgereinigte Produkt nochmals durch HPLC an einer RP C₁₈ analogen Säule aufgereinigt (Eluent C/Eluent D 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 80/20 (0.1 CV) \rightarrow 71/29 (4 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), R_t = 14.60 min, Flußrate 5 mL/min). Die Produkte werden durch MALDI-TOF-MS und NMR identifiziert.

Syntheseposition	Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]	Kupplungsart
	Harz	278	automatisch
1	Fmoc-Cys-(Trt)-OH	117	automatisch
2	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	automatisch
3	Fmoc-Ala-OH	62	automatisch
4	Fmoc-Gln-(Trt)-OH	122	automatisch
5	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
6	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
7	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	automatisch
8	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
9	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
10	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
11	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	automatisch
12	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
13	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
14	Fmoc-Ala-OH	62	automatisch
15	Fmoc-Tyr-(tBu)-OH	92	manuell
16	Fmoc-Phe-OH	77	manuell
17	Fmoc-Ala-OH	62	manuell
18	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	manuell
19	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
20	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
21	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
22	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
23	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	automatisch
24	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
25	Fmoc-Ser-(tBu)-OH	77	automatisch
26	Fmoc-Lys-Boc)-OH	94	automatisch
27	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
28	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
29	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
30	Fmoc-Asn-(β -D-GlcNAc- (1-4)- β -D-GlcNAc)-OH	24	manuell
31	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
32	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
33	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
34	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
35	Fmoc-Cys-(Trt)-OH	117	automatisch

Tabelle 25: Einwaagen des Harzes und der Aminosäurederivate pro Kupplung zur Synthese von 4.

Ausbeute:

5.7 mg (1.34 μ mol) an 4 entsprechend 3% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung:

chemische Verschiebung [ppm] und $^3J_{(NH/H\alpha)}$ in Hz										
Pos.	Aminosäure	NH	α	α' o. β	β'	γ	γ'	δ	andere	
1	Cys1		4.454	2.935	2.777					
2	Thr2	8.185 (6.7)	4.061		1.079					
3	Arg3	8.464 (7.4)	4.564	1.595	1.780	1.683	1.683	3.137	ϵ : 7.188	
4	Pro4		4.345	1.897	1.947	2.202		3.578	δ' : 3.734	
5	Asn5	8.481 (8.5)	4.640	2.771	2.711					
6	Asn6	8.210 (6.6)	4.633	2.707	2.796					
7	Asn7	8.173 (8.2)	4.642	2.737	2.825					
8	Thr8	8.011 (8.5)	4.203			1.125				
9	Arg9	8.282 (6.6)	4.251	1.575	1.761	1.516	1.683	3.118	ϵ : 7.097	
10	Lys10	8.273 (5.1)	4.251	1.699	1.780	1.180	1.279	1.596	ϵ : 3.118; NH_2 : 7.444	
11	Ser11	8.162 (7.6)	4.390	3.746						
12	Ile12	7.989 (8.3)	4.127	1.736		1.046	1.234	0.759	γ'' : 0.759	
13	His13	8.485 (7.7)	4.664	3.140	3.041				H2: 7.171; H4: 8.509	
14	Ile14	8.131 (7.7)	4.153	1.742		1.061	1.351	0.744	γ'' : 0.813	
15	Gly15	8.214 (7.8)	4.033							
16	Pro16		4.380	1.900	1.945	2.195		3.580	δ' : 3.745	
17	Gly17	8.443 (6.0)	3.874							
18	Arg18	8.029 (8.5)	4.202	1.634	1.721	1.497		3.079	ϵ : 7.070	
19	Ala19	8.145 (6.8)	4.164	1.165						
20	Phe20	7.981 (7.5)	4.446	2.893					ϵ/ζ : 7.036	
21	Tyr21	7.865 (9.5)	4.452	2.776	2.943				ϵ : 6.987	
22	Ala22	8.063 (9.4)	4.261	1.310						
23	Thr23	7.958 (8.4)	4.222	4.163		1.145				
24	Gly24	8.279 (5.8)	3.861	3.989						
25	Asp25	8.197 (6.2)	4.649	2.719	2.811					
26	Ile26	8.022 (7.1)	4.095	1.810		1.125	1.488	0.783	γ'' : 0.783	
27	Ile27	8.081 (6.8)	4.047	1.782		1.107	1.392	0.754	γ'' : 0.823	
28	Gly28	8.282 (6.0)	3.850							
29	Asp29	8.141 (6.9)	4.632	2.727	2.805					
30	Ile30	8.017 (6.8)	4.066	1.839		1.125	1.488	0.832	γ'' : 0.832	
31	Arg31	8.265 (6.1)	4.201	1.596	1.780	1.526	1.714	3.118	ϵ : 7.069	
32	Gln32	8.085 (7.7)	4.231	2.279		1.878		2.025		
33	Ala33	8.156 (7.8)	4.174	1.262						
34	His34	8.433 (7.5)	4.651	3.226	3.147				H2: 7.239; H4: 8.552	
35	Cys35 CONH ₂	8.454 (8.8) 6.798; 7.436	4.613	3.205	2.943					
Zucker:										
		NH 1	NH 2	1	2	3	4	5	6a / 6b	Ac
	GlcNAc1	8.544	8.119	4.974	3.766	3.685	3.568	3.480	3.689 / 3.689	1.927
	GlcNAc2		8.289	4.515	3.675	3.500	3.411	3.687	3.504 / 3.504	1.985

Tabelle 26: 1H -NMR-chemische Verschiebungen und $^3J_{(NH/H\alpha)}$ -Kopplungskonstanten in Klammern von **4**.MALDI-TOF (m/z) = 4258.77 (M+H⁺)C₁₇₉H₂₈₇N₅₉O₅₈S₂ (4257.77 g/mol)

7.4.7 Synthese des Peptids IGPCR 14

Es wird in vier Ansätzen das Peptid IGPCR nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.2 synthetisiert. Die Ansatzgröße beträgt 50 μmol , als Aktivator dient TBTU. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von 30, 60 und 90 Minuten durchgeführt. Das synthetisierte Produkt wird am Harz belassen, da es als Ausgangsmaterial zur Untersuchung der Kupplungskinetik bei der Bibliothekssynthese dient. Zur Charakterisierung des Peptids mittels MALDI-TOF-MS wird eine kleine Harzprobe für 15 Minuten in 2 mL Abspaltcocktail (siehe 7.3.2.1) geschüttelt. Die MALDI-TOF Probenpräparation erfolgt direkt aus der Abspatlösung.

Syntheseposition	Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]
	Harz	278
1	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130
2	Fmoc-Gly-OH	59
3	Fmoc-Pro-OH	67
4	Fmoc-Gly-OH	59
5	Fmoc-Ile-OH	71

Tabelle 27: Einwaagen des Harzes und der Aminosäuren pro Kupplung zur automatischen Synthese von 14.

Ausbeute:

Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens:

50 μmol an **14** entsprechend 100% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung:

MALDI-TOF (m/z) = 498.45 ($M+H^+$)

$C_{21}H_{39}N_9O_5$ (497.31 g/mol)

7.5 Synthese von Bibliotheken

7.5.1 Untersuchungen zur Bibliothekssynthese nach dem *Premix-*Verfahren

7.5.1.1 Optimierung der Aminosäureüberschüsse

Die Untersuchungen zur Kupplungskinetik wurden am Beispiel der Peptidbibliotheken (H, R, P, N, T)IGPCR **15** (siehe Abbildung 41) und (G, A, S, P, T, D, Q, H, F, R, Y, W)IGPCR **16** (siehe Abbildung 44) durchgeführt. Dazu wird für alle Synthesevarianten von

dem Peptid IGPGR **14** ausgegangen. Die eingesetzten Aminosäureäquivalente sind auf die jeweilige Ansatzgröße bezogen.

Variante 1: Automatische Synthese der Bibliothek (H, R, P, N, T)IGPGR 15 mit vier Äquivalenten Aminosäuregemisch.

Ausgehend vom Harz mit dem daran gebundenen Peptid **14** wird die Bibliothek **15** durch Kupplung des in Tabelle 28 angegebenen Aminosäuregemisches nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.2 synthetisiert. Der eingesetzte Aminosäureüberschuß ist ebenfalls in Tabelle 28 angegeben. Die Ansatzgröße beträgt 50 µmol, als Aktivator dient HATU. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 240 Minuten durchgeführt. Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird dieser acetyliert. Die Entschützung, Abspaltung und die Aufreinigung erfolgt nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.1 und 7.3.3.

Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]
Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	26
Fmoc-His-(Trt)-OH	24.8
Fmoc-Pro-OH	13.4
Fmoc-Asn-(Trt)-OH	23.8
Fmoc-Thr-(tBu)-OH	15.8

Tabelle 28: Einwaagen der Aminosäuren zur automatischen Synthese von 15 nach Variante 1.

Das Rohprodukt wird zwecks qualitativer und quantitativer Charakterisierung durch analytische HPLC an einer RP C₁₈ Säule aufgetrennt und online mittels ESI-MS analysiert (Eluent C/Eluent D 100/0 → 100/0 (1CV) → 50/50 (6 CV) → 0/100 (1 CV) → 0/100 (1 CV) → 100/0 (1 CV), R_t siehe Tabelle 30, Flußrate 250 µL/min).

Ausbeute:

Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens:

45 µmol an **15** entsprechend 90% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Sequenz	Anteil [%]
PIGPGR 15.1	37
TIGPGR 15.2	12
NIGPGR 15.3	17
HIGPGR 15.4	25
RIGPGR 15.5	9

Tabelle 29: Relativer Anteil der Einzelkomponenten innerhalb der Bibliothek 15. Die Quantifizierung erfolgte durch ESI-LC/MS.

Charakterisierung:

Sequenz	Summenformel	Molmasse	ESI-MS [m / z]	R _t [min]
PIGPGR 15.1	C ₂₈ H ₄₈ N ₁₀ O ₇	636.37	637.5 (M+H ⁺)	21.76
TIGPGR 15.2	C ₂₇ H ₄₇ N ₉ O ₉	641.35	641.5 (M+H ⁺)	19.52
NIGPGR 15.3	C ₂₇ H ₄₇ N ₁₁ O ₈	653.36	654.5 (M+H ⁺)	19.02
HIGPGR 15.4	C ₂₉ H ₄₈ N ₁₂ O ₇	676.38	677.5 (M+H ⁺) 339.2 (M+2H ⁺)	19.14
RIGPGR 15.5	C ₂₉ H ₅₃ N ₁₃ O ₇	695.42	696.1 (M+H ⁺) 348.8 (M+2H ⁺)	19.32

Tabelle 30: Charakterisierung von **15** durch ESI-MS**Variante 2: Automatische Synthese der Bibliothek (H, R, P, N, T)IGPGR 15 mit einem Äquivalent Aminosäuregemisch.**

Wie unter Variante 1 beschrieben, aber mit nur einem Äquivalent Aminosäuregemisch und 1.2 Äquivalenten HATU bzw. DIPEA.

Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]
Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	6.5
Fmoc-His-(Trt)-OH	6.2
Fmoc-Pro-OH	3.4
Fmoc-Asn-(Trt)-OH	6.0
Fmoc-Thr-(tBu)-OH	4.0

Tabelle 31: Einwaagen der Aminosäuren zur automatischen Synthese von **15** nach Variante 2.Ausbeute:

Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens:

16 µmol an **15** entsprechend 32% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Sequenz	Anteil [%]
PIGPGR 15.1	22
TIGPGR 15.2	18
NIGPGR 15.3	19
HIGPGR 15.4	23
RIGPGR 15.5	18

Tabelle 32: Relativer Anteil der Einzelkomponenten innerhalb der Bibliothek **15**. Die Quantifizierung erfolgte durch ESI-LC/MS.Charakterisierung:

Siehe Variante 1

Variante 3: Manuelle Synthese der Bibliothek (H, R, P, N, T)IGPGR 15 mit 0.8 (A), 1.0 (B), 1.2 (C) und 1.4 (D) Äquivalenten Aminosäuregemisch.

Ausgehend vom Harz mit dem daran gebundenen Peptid **14** wird die Bibliothek **15** in vier Reaktionsansätzen zu je 12 μmol durch Kupplung des angegebenen Aminosäuregemisches nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.1 synthetisiert. Die Unter- bzw. Überschüsse an eingesetzten Aminosäuregemischen, HATU und DIPEA sind in Tabelle 33 angegeben. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 24 Stunden durchgeführt. Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird dieser acetyliert. Die Entschützung, Abspaltung und die Aufreinigung erfolgt nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.1 und 7.3.3.

Aminosäure	Einwaage [mg] 0.8 eq.	Einwaage [mg] 1.eq.	Einwaage [mg] 1.2 eq.	Einwaage [mg] 1.4 eq.
Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	1.2	1.6	1.9	2.2
Fmoc-His-(Trt)-OH	1.2	1.5	1.8	2.1
Fmoc-Pro-OH	0.7	0.8	1.0	1.1
Fmoc-Asn-(Trt)-OH	1.2	1.4	1.7	2.0
Fmoc-Thr-(tBu)-OH	0.8	1.0	1.2	1.3
HATU 1.2 eq.*	4.4	5.5	6.6	7.7
DIPEA 1.2 eq.*	2.0 μL	2.4 μL	2.9 μL	3.4 μL

* bezogen auf den eingesetzten Aminosäureüber- bzw unterschuß

Tabelle 33: Einwaagen der Aminosäuren pro Kupplung zur manuellen Synthese von 15 nach Variante 3.

Die qualitative und quantitative Charakterisierung durch analytische HPLC-ESI-MS wurde wie unter Variante 1 beschrieben, durchgeführt.

Ausbeute:

Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens

Ansatz A: 10 μmol an **15** entsprechend 84% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Ansatz B, C, D: 11,6 μmol an **15** entsprechend 97% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Sequenz	Anteil Ansatz C [%]	Anteil Ansatz B [%]	Anteil Ansatz C [%]	Anteil Ansatz D [%]
PIGPGR 15.1	23	20	21	19
TIGPGR 15.2	18	24	24	23
NIGPGR 15.3	20	18	16	14
HIGPGR 15.4	21	21	24	26
RIGPGR 15.5	18	17	15	18

Tabelle 34: Relativer Anteil der Einzelkomponenten innerhalb der Bibliothek 15. Die Quantifizierung erfolgte durch ESI-LC/MS.

Charakterisierung:

Siehe Variante 1

Synthese der Bibliothek (G, A, S, P, T, D, Q, H, F, R, Y, W)IGPGR 16 mit einem Äquivalent Aminosäuregemisch.

Das in Tabelle 35 angegebene äquimolar eingesetzte Aminosäuregemisch wird nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.1 an das am Harz befindliche Peptid **14** gekuppelt. Die Ansatzgröße beträgt 50 μmol , HATU und DIPEA werden in einem 1.2 fachen Überschuß verwendet. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 24 Stunden durchgeführt. Die Entschützung, Abspaltung und die Aufreinigung erfolgt nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.1 und 7.3.3. Das Rohprodukt wird zwecks qualitativer und quantitativer Charakterisierung durch analytische HPLC an einer RP C₁₈ Säule aufgetrennt und online mittels ESI-MS analysiert (Eluent C/Eluent D 100/0 \rightarrow 100/0 (1CV) \rightarrow 50/50 (6 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 100/0 (1 CV), R_t siehe Tabelle 37, Flußrate 250 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]
Fmoc-Trp-(Boc)-OH	2.5
Fmoc-His-(Trt)-OH	2.6
Fmoc-Ala-OH	1.3
Fmoc-Gln-(Trt)-OH	2.5
Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	2.7
Fmoc-Ser-(tBu)-OH	1.6
Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	1.7
Fmoc-Gly-OH	1.2
Fmoc-Pro-OH	1.4
Fmoc-Phe-OH	1.6
Fmoc-Thr-(tBu)-OH	1.6
Fmoc-Tyr-(tBu)-OH	1.9

Tabelle 35: Einwaagen der Aminosäuren zur manuellen Synthese von 16.

Ausbeute:

Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens:

42 μmol an **16** entsprechend 84% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Sequenz	Anteil [%]	Sequenz	Anteil [%]
GIGPGR 16.1	7	QIGPGR 16.7	6
AIGPGR 16.2	9	HIGPGR 16.8	9
SIGPGR 16.3	5	FIGPGR 16.9	8
PIGPGR 16.4	10	RIGPGR 16.10	8
TIGPGR 16.5	5	YIGPGR 16.11	8
DIGPGR 16.6	5	WIGPGR 16.12	9

Tabelle 36: Relativer Anteil der Einzelkomponenten innerhalb der Bibliothek 16. Die Quantifizierung erfolgte durch ESI-LC/MS.

Charakterisierung:

Sequenz	Summenformel	Molmasse	ESI-MS [m / z]	R _t [min]
GIGPGR 16.1	C ₂₃ H ₄₂ N ₁₀ O ₆	554.33	555.5 (M+H ⁺)	18.21
AIGPGR 16.2	C ₂₄ H ₄₄ N ₁₀ O ₆	568.34	569.5 (M+H ⁺)	17.95
SIGPGR 16.3	C ₂₄ H ₄₄ N ₁₀ O ₇	584.34	585.4 (M+H ⁺)	17.92
PIGPGR 16.4	C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₆	594.36	595.5 (M+H ⁺); 298.9 (M+2H ⁺)	18.98
TIGPGR 16.5	C ₂₅ H ₄₆ N ₁₀ O ₇	598.36	599.5 (M+H ⁺)	18.26
DIGPGR 16.6	C ₂₅ H ₄₄ N ₁₀ O ₈	612.33	613.4 (M+H ⁺)	18.05
QIGPGR 16.7	C ₂₆ H ₄₇ N ₁₁ O ₇	625.37	626.4 (M+H ⁺)	18.32
HIGPGR 16.8	C ₂₇ H ₄₆ N ₁₂ O ₆	634.37	635.3 (M+H ⁺); 318.3 (M+2H ⁺)	18.34
FIGPGR 16.9	C ₃₀ H ₄₈ N ₁₀ O ₆	644.38	645.6 (M+H ⁺)	22.33
RIGPGR 16.10	C ₂₇ H ₅₁ N ₁₃ O ₆	653.41	654.4 (M+H ⁺); 327.9 (M+2H ⁺)	18.51
YIGPGR 16.11	C ₃₀ H ₄₈ N ₁₀ O ₇	660.37	661.5 (M+H ⁺)	20.5
WIGPGR 16.12	C ₃₂ H ₄₉ N ₁₁ O ₆	683.82	684.5 (M+H ⁺)	24.01

Tabelle 37: Charakterisierung von 16 durch ESI-MS**7.5.1.2 Optimierung der Kupplungszeiten****Manuelle Synthese der Bibliothek (H, R, P, N, T)IGPGR 15**

Ausgehend vom Harz mit dem daran gebundenen Peptid **14** wird die Bibliothek **15** in drei Reaktionsansätzen zu je 16 µmol durch Kupplung des in Tabelle 38 angegebenen äquimolar eingesetzten Aminosäuregemisches nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.1 synthetisiert. Die Ansatzgröße beträgt 50 µmol, HATU und DIPEA werden in einem 1.2 fachen Überschuß verwendet. Die Synthese wird in den drei Ansätzen in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 3, 12 bzw. 24 Stunden durchgeführt. Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird die Aminogruppe des N-Terminus acetyliert. Die Entschützung, Abspaltung und die Aufreinigung erfolgte nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.1 und 7.3.3.

Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]
Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	2.1
Fmoc-His-(Trt)-OH	2.0
Fmoc-Pro-OH	1.1
Fmoc-Asn-(Trt)-OH	1.9
Fmoc-Thr-(tBu)-OH	1.3

Tabelle 38: Einwaagen der Aminosäuren zur manuellen Synthese von 15.

Das Rohprodukt wird zwecks qualitativer und quantitativer Charakterisierung durch analytische HPLC an einer RP C₁₈ Säule aufgetrennt und online mittels ESI-MS analysiert (Eluent C/Eluent D 100/0 → 100/0 (1 CV) → 50/50 (6 CV) → 0/100 (1 CV) → 0/100 (1 CV) → 100/0 (1 CV), R_t siehe 7.5.1.1, Tabelle 30, Flußrate 250 µL/min).

Ausbeute:

Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens:

3 Stunden Kupplungszeit: 15.4 μmol an **15** entsprechend 96% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

12 Stunden Kupplungszeit: 14.9 μmol an **15** entsprechend 93% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

24 Stunden Kupplungszeit: 15.7 μmol an **15** entsprechend 98% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung:

Siehe 7.5.1.1, Variante 1.

7.5.2 Synthese der nicht glycosylierten zyklischen V3-Bibliothek CTRPNNTRKSI(H,R,P,N)IGPG(R,Q,G)AFY(A,T)TG(D,E)IIGDIRQ AHC 5

Die Synthese der in Abbildung 47 gezeigten nicht glycosylierten zyklischen *V3-Loop* Bibliothek erfolgt an den Synthesepositionen 1 (Cystein-35) bis 10 (Isoleucin-26), 12 (Glycin-24) bis 13 (Threonin-23), 19 (Glycin-17) bis 22 (Isoleucin-14) und 24 (Isoleucin-12) bis 35 (Cystein-1) automatisch am Syntheseroboter nach allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.2. Die Ansatzgröße beträgt 50 μmol , als Aktivator dient TBTU. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 120 Minuten durchgeführt.

Wegen schlechter Kupplungsausbeuten der Aminosäuren Tyrosin-21 bis Alanin-19 wird die Peptidsynthese an den Syntheseposition 15 (Tyrosin-21) bis 17 (Alanin-19) manuell, nach der allgemeinen Vorschrift 7.3.1.1 unter Schutzgas, NMP¹⁷¹ als Lösungsmittel und HATU als Aktivator durchgeführt. Auch hier erfolgt eine Dreifachkupplung von je 120 Minuten.

Die Einwaagen des Harzes und der Aminosäuren pro Kupplung für alle Synthesepositionen außer denen der Permutationsstellen sind in Tabelle 39 angegeben.

Die Synthese der Permutationsstellen (Syntheseposition 11, 14, 18 und 23) wird nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.1 unter Schutzgas, absolutem DMF als Lösungsmittel durchgeführt. Es werden 1 Äquivalent Aminosäuregemisch und 1.2 Äquivalenten HATU (bezogen auf das eingesetzte Aminosäuregemisch) als Aktivator eingesetzt. Die Reaktionszeit pro Zyklus der Dreifachkupplung beträgt drei Stunden. Die Einwaagen der Aminosäuren pro Kupplung sind in Tabelle 40 angegeben. Sie werden vor der Reaktion miteinander vereinigt.

Die Entschützung, Abspaltung, Bildung der Disulfidbrücke durch Luftoxidation und die Aufreinigung erfolgt nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften 7.3.2.3 und 7.3.3, ohne jedoch chromatographisch aufgereinigt zu werden.

Syntheseposition	Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]	Kupplungsart
	Harz	278	
1	Fmoc-Cys-(Trt)-OH	117	automatisch
2	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	automatisch
3	Fmoc-Ala-OH	62	automatisch
4	Fmoc-Gln-(Trt)-OH	122	automatisch
5	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
6	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
7	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	automatisch
8	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
9	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
10	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
11	1. Permutationsstelle siehe Tabelle 40		
12	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
13	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
14	2. Permutationsstelle siehe Tabelle 40		
15	Fmoc-Tyr-(tBu)-OH	92	manuell
16	Fmoc-Phe-OH	77	manuell
17	Fmoc-Ala-OH	62	manuell
18	3. Permutationsstelle siehe Tabelle 40		
19	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
20	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
21	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
22	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
23	4. Permutationsstelle siehe Tabelle 40		
24	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
25	Fmoc-Ser-(tBu)-OH	77	automatisch
26	Fmoc-Lys-Boc)-OH	94	automatisch
27	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
28	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
29	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
30	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
31	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
32	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
33	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
34	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
35	Fmoc-Cys-(Trt)-OH	117	automatisch

Tabelle 39: Einwaagen des Harzes und der Aminosäuren aller Synthesepositionen mit Ausnahme der Permutationsstellen zur Synthese von 5.

	Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]
1. Permutation; Synthesepos. 11	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	10.3
	Fmoc-Glu-(OtBu)-OH	10.6
2. Permutation; Synthesepos. 14	Fmoc-Ala-OH	7.8
	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	9.9
3. Permutation; Synthesepos. 18	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	10.8
	Fmoc-Gln-(Trt)-OH	10.2
	Fmoc-Gly-OH	4.9
4. Permutation; Synthesepos. 23	Fmoc-His-(Trt)-OH	7.8
	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	8.1
	Fmoc-Pro-OH	4.2
	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	7.4

Tabelle 40: Einwaagen zur manuellen Synthese von 5 an den Permutationsstellen.

Ausbeute:

Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens:

36 μmol an **5** entsprechend 72% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung:

Alle in der Bibliothek **5** theoretisch vorkommende Peptide konnten im MALDI-TOF Spektrum durch ihr $[\text{M}+\text{H}^+]$ -Signal identifiziert werden (siehe Tabelle 41).

Summenformel:	Peptid:	Molmasse [g / mol]	m / z [M+H ⁺]	Summenformel:	Peptid:	Molmasse [g / mol]	m / z [M+H ⁺]
C ₁₅₈ H ₂₅₂ N ₅₂ O ₄₈ S ₂	5.1	3709.83	3710.52	C ₁₆₃ H ₂₆₁ N ₅₃ O ₅₀ S ₂	5.25	3824.90	3826.01
C ₁₅₉ H ₂₅₄ N ₅₂ O ₄₈ S ₂	5.2	3723.85	3724.64	C ₁₆₁ H ₂₆₀ N ₅₆ O ₄₉ S ₂	5.26	3825.90	3826.78
C ₁₅₇ H ₂₅₁ N ₅₁ O ₄₉ S ₂	5.3	3726.82	3726.53	C ₁₆₁ H ₂₅₈ N ₅₄ O ₅₁ S ₂	5.27	3827.87	3828.86
C ₁₅₉ H ₂₅₄ N ₅₂ O ₄₉ S ₂	5.4	3739.84	3740.92	C ₁₆₃ H ₂₅₉ N ₅₅ O ₄₉ S ₂	5.28	3834.89	3835.91
C ₁₅₈ H ₂₅₃ N ₅₃ O ₄₉ S ₂	5.5	3740.84	3741.80	C ₁₆₃ H ₂₆₃ N ₅₅ O ₄₉ S ₂	5.29	3838.92	3839.91
C ₁₅₉ H ₂₅₂ N ₅₄ O ₄₈ S ₂	5.6	3749.84	3750.99	C ₁₆₂ H ₂₆₂ N ₅₆ O ₄₉ S ₂	5.30	3839.92	3840.99
C ₁₆₀ H ₂₅₆ N ₅₂ O ₄₉ S ₂	5.7	3753.86	3754.76	C ₁₆₂ H ₂₆₂ N ₅₆ O ₄₉ S ₂	5.31	3839.92	3840.99
C ₁₅₈ H ₂₅₃ N ₅₃ O ₅₀ S ₂	5.8	3756.83	3757.82	C ₁₆₂ H ₂₆₀ N ₅₄ O ₅₁ S ₂	5.32	3841.89	3842.75
C ₁₆₀ H ₂₅₄ N ₅₄ O ₄₈ S ₂	5.9	3763.85	3764.88	C ₁₆₃ H ₂₆₁ N ₅₇ O ₄₈ S ₂	5.33	3848.92	3849.94
C ₁₅₉ H ₂₅₇ N ₅₅ O ₄₈ S ₂	5.10	3768.88	3769.49	C ₁₆₃ H ₂₅₉ N ₅₅ O ₅₀ S ₂	5.34	3850.89	3851.83
C ₁₅₉ H ₂₅₅ N ₅₃ O ₅₀ S ₂	5.11	3770.85	3771.81	C ₁₆₄ H ₂₆₅ N ₅₅ O ₄₉ S ₂	5.35	3852.94	3854.07
C ₁₆₀ H ₂₅₄ N ₅₄ O ₄₉ S ₂	5.12	3779.85	3780.84	C ₁₆₃ H ₂₆₄ N ₅₆ O ₄₉ S ₂	5.36	3853.93	3855.01
C ₁₆₁ H ₂₅₇ N ₅₃ O ₄₉ S ₂	5.13	3780.87	3781.85	C ₁₆₂ H ₂₆₂ N ₅₆ O ₅₀ S ₂	5.37	3855.91	3856.79
C ₁₆₀ H ₂₅₉ N ₅₅ O ₄₈ S ₂	5.14	3782.90	3783.81	C ₁₆₄ H ₂₆₃ N ₅₇ O ₄₈ S ₂	5.38	3862.93	3863.96
C ₁₆₁ H ₂₅₆ N ₅₄ O ₄₉ S ₂	5.15	3793.86	3794.79	C ₁₆₄ H ₂₆₁ N ₅₅ O ₅₀ S ₂	5.39	3864.90	3865.84
C ₁₆₂ H ₂₅₉ N ₅₃ O ₄₉ S ₂	5.16	3794.88	3796.01	C ₁₆₃ H ₂₆₆ N ₅₈ O ₄₈ S ₂	5.40	3867.96	3868.99
C ₁₅₈ H ₂₅₂ N ₅₂ O ₄₈ S ₂	5.17	3797.86	3798.85	C ₁₆₃ H ₂₆₄ N ₅₆ O ₅₀ S ₂	5.41	3869.93	3870.12
C ₁₅₈ H ₂₅₂ N ₅₂ O ₄₈ S ₂	5.18	3798.89	3799.61	C ₁₆₃ H ₂₆₄ N ₅₆ O ₅₀ S ₂	5.42	3869.93	3870.12
C ₁₆₂ H ₂₆₁ N ₅₅ O ₄₈ S ₂	5.19	3808.91	3809.83	C ₁₆₄ H ₂₆₃ N ₅₇ O ₄₉ S ₂	5.43	3878.93	3879.92
C ₁₆₂ H ₂₅₉ N ₅₃ O ₅₀ S ₂	5.20	3810.88	3812.03	C ₁₆₄ H ₂₆₆ N ₅₈ O ₄₈ S ₂	5.44	3881.98	3883.05
C ₁₆₁ H ₂₅₈ N ₅₄ O ₅₀ S ₂	5.21	3811.87	3812.91	C ₁₆₄ H ₂₆₆ N ₅₆ O ₅₀ S ₂	5.45	3883.94	3884.91
C ₁₆₁ H ₂₆₁ N ₅₅ O ₄₉ S ₂	5.22	3812.91	3813.99	C ₁₆₅ H ₂₆₅ N ₅₇ O ₄₉ S ₂	5.46	3892.94	3893.97
C ₁₆₂ H ₂₅₇ N ₅₅ O ₄₉ S ₂	5.23	3820.88	3821.53	C ₁₆₄ H ₂₆₈ N ₅₈ O ₄₉ S ₂	5.47	3897.97	3898.96
C ₁₆₃ H ₂₆₃ N ₅₅ O ₄₈ S ₂	5.24	3822.93	3824.05	C ₁₆₅ H ₂₇₀ N ₅₈ O ₄₉ S ₂	5.48	3911.99	3913.17

Tabelle 41: Summenformeln, Molmassen und dazugehörige Signale im MALDI-TOF Spektrum aller in der Bibliothek **5** vorkommenden Peptide. Die Sequenzen zu dem Ziffernkodex der einzelnen Peptide sind in Abbildung 47 angegeben.

7.5.3 Synthese der glycosylierten zyklischen V3-Bibliothek

CTRPNN(β -D-GlcNAc- β -(1-4)-D-GlcNAc)NTRKSI(H,R,P,N)HIGPG (R,Q,G)AFY(A,T)TG(D,E)IIGDIRQAHC **6**

Die Synthese der in Abbildung 49 angegebenen glycosylierten zyklische *V3-Loop* Bibliothek erfolgt an den Synthesepositionen 1 (Cystein-35) bis 10 (Isoleucin-26), 12 (Glycin-24) bis 13 (Threonin-23), 19 (Glycin-17) bis 22 (Isoleucin-14) und 24 (Isoleucin-12) bis 29 (Asparagin-7) und 31 (Asparagin-5) bis 35 (Cystein-1) automatisch am Syntheseroboter nach

allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.2. Die Ansatzgröße beträgt 50 μmol , als Aktivator dient TBTU. Die Synthese wird in einer Dreifachkupplung mit Kupplungszeiten von je 120 Minuten durchgeführt.

Wegen schlechter Kupplungsausbeuten der Aminosäuren Tyrosin-21 bis Alanin-19 wird die Peptidsynthese an den Syntheseposition 15 (Tyrosin-21) bis 17 (Alanin-19) manuell, nach der allgemeinen Vorschrift 7.3.1.1 unter Schutzgas, NMP¹⁷¹ als Lösungsmittel und HATU als Aktivator durchgeführt. Auch hier erfolgt eine Dreifachkupplung von je 120 Minuten.

Die Kupplung des Fmoc-Asn-(β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc)-COOH-Bausteins **12** an der Syntheseposition 30 erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift 7.3.1.3. Die einzuwiegende Menge pro Kupplung bezieht sich auf die photometrisch bestimmte Ausbeute nach der vorhergehenden Fmoc-Abspaltung (39 μmol).

Die Einwaagen des Harzes und der Aminosäurederivate pro Kupplung für alle Synthesepositionen außer denen der Permutationsstellen sind in Tabelle 42 angegeben.

Die Synthese der Permutationsstellen (Syntheseposition 11, 14, 18 und 23) wird nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 7.3.1.1 unter Schutzgas, absolutem DMF als Lösungsmittel durchgeführt. Es werden 1 Äquivalent Aminosäuregemisch und 1.2 Äquivalenten HATU (bezogen auf das eingesetzte Aminosäuregemisch) als Aktivator eingesetzt. Die Reaktionszeit pro Zyklus der Dreifachkupplung beträgt drei Stunden. Die Einwaagen der Aminosäuren pro Kupplung sind in Tabelle 43 angegeben. Sie werden vor der Reaktion miteinander vereinigt.

Syntheseposition	Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]	Kupplungsart
	Harz	278	automatisch
1	Fmoc-Cys-(Trt)-OH	117	automatisch
2	Fmoc-His-(Trt)-OH	124	automatisch
3	Fmoc-Ala-OH	62	automatisch
4	Fmoc-Gln-(Trt)-OH	122	automatisch
5	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
6	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
7	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	82	automatisch
8	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
9	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
10	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
11	1. Permutationsstelle siehe Tabelle 43		
12	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
13	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
14	2. Permutationsstelle siehe Tabelle 43		
15	Fmoc-Tyr-(tBu)-OH	92	manuell
16	Fmoc-Phe-OH	77	manuell
17	Fmoc-Ala-OH	62	manuell
18	3. Permutationsstelle siehe Tabelle 43		
19	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
20	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
21	Fmoc-Gly-OH	59	automatisch
22	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
23	4. Permutationsstelle siehe Tabelle 43		
24	Fmoc-Ile-OH	71	automatisch
25	Fmoc-Ser-(tBu)-OH	77	automatisch
26	Fmoc-Lys-Boc)-OH	94	automatisch
27	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
28	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
29	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
30	Fmoc-Asn-(β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc)-OH	39	manuell
31	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	119	automatisch
32	Fmoc-Pro-OH	67	automatisch
33	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	130	automatisch
34	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	79	automatisch
35	Fmoc-Cys-(Trt)-OH	117	automatisch

Tabelle 42: Einwaagen des Harzes und der Aminosäurederivate aller Synthesepositionen mit Ausnahme der Permutationsstellen zur Synthese von 6.

	Aminosäure	Einwaage pro Kupplung [mg]
1. Permutation; Synthesepos. 11	Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	10.3
	Fmoc-Glu-(OtBu)-OH	10.6
2. Permutation; Synthesepos. 14	Fmoc-Ala-OH	7.8
	Fmoc-Thr-(tBu)-OH	9.9
3. Permutation; Synthesepos. 18	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	10.8
	Fmoc-Gln-(Trt)-OH	10.2
	Fmoc-Gly-OH	4.9
4. Permutation; Synthesepos. 23	Fmoc-His-(Trt)-OH	7.8
	Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	8.1
	Fmoc-Pro-OH	4.2
	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	7.4

Tabelle 43: Einwaagen zur manuellen Synthese von 6 an den Permutationsstellen.

Ausbeute:

Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens:

21 μmol an **6** entsprechend 43% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung:

Alle in der Bibliothek **6** theoretisch vorkommende Glycopeptide konnten im MALDI-TOF Spektrum durch ihr $[\text{M}+\text{H}^+]$ -Signal identifiziert werden (siehe Tabelle 44).

Summenformel:	Peptid:	Molmasse [g / mol]	m / z [M+H ⁺]	Summenformel:	Peptid:	Molmasse [g / mol]	m / z [M+H ⁺]
C ₁₇₄ H ₂₇₈ N ₅₄ O ₅₈ S ₂	6.1	4115.97	4117.45	C ₁₇₉ H ₂₈₇ N ₅₅ O ₆₀ S ₂	6.25	4231.03	4232.04
C ₁₇₅ H ₂₈₀ N ₅₄ O ₅₈ S ₂	6.2	4129.98	4130.01	C ₁₇₇ H ₂₈₆ N ₅₆ O ₄₉ S ₂	6.26	4232.04	4233.06
C ₁₇₃ H ₂₇₇ N ₅₃ O ₅₉ S ₂	6.3	4132.96	4133.87	C ₁₇₇ H ₂₈₄ N ₅₆ O ₆₁ S ₂	6.27	4234.01	4234.98
C ₁₇₅ H ₂₈₀ N ₅₄ O ₅₉ S ₂	6.4	4145.98	4146.91	C ₁₇₉ H ₂₈₅ N ₅₇ O ₅₉ S ₂	6.28	4241.03	4241.93
C ₁₇₄ H ₂₇₉ N ₅₅ O ₅₉ S ₂	6.5	4146.97	4147.83	C ₁₇₉ H ₂₈₉ N ₅₇ O ₅₉ S ₂	6.29	4245.06	4246.11
C ₁₇₅ H ₂₇₈ N ₅₆ O ₅₈ S ₂	6.6	4155.98	4157.02	C ₁₇₈ H ₂₈₈ N ₅₈ O ₅₉ S ₂	6.30	4246.05	4247.06
C ₁₇₆ H ₂₈₂ N ₅₄ O ₅₉ S ₂	6.7	4159.99	4161.04	C ₁₇₈ H ₂₈₈ N ₅₈ O ₅₉ S ₂	6.31	4246.06	4247.14
C ₁₇₄ H ₂₇₉ N ₅₅ O ₆₀ S ₂	6.8	4162.97	4163.93	C ₁₇₈ H ₂₈₆ N ₅₆ O ₆₁ S ₂	6.32	4248.02	4249.20
C ₁₇₆ H ₂₈₀ N ₅₆ O ₅₈ S ₂	6.9	4169.99	4170.98	C ₁₇₉ H ₂₈₇ N ₅₉ O ₅₈ S ₂	6.33	4255.06	4256.01
C ₁₇₅ H ₂₈₃ N ₅₇ O ₅₈ S ₂	6.10	4175.02	4176.10	C ₁₇₉ H ₂₈₅ N ₅₇ O ₆₀ S ₂	6.34	4257.03	4257.99
C ₁₇₅ H ₂₈₁ N ₅₅ O ₆₀ S ₂	6.11	4176.98	4177.79	C ₁₈₀ H ₂₉₁ N ₅₇ O ₅₉ S ₂	6.35	4259.07	4260.09
C ₁₇₆ H ₂₈₀ N ₅₆ O ₅₉ S ₂	6.12	4185.99	4186.95	C ₁₇₉ H ₂₉₀ N ₅₈ O ₅₉ S ₂	6.36	4260.07	4261.06
C ₁₇₇ H ₂₈₃ N ₅₅ O ₅₉ S ₂	6.13	4187.01	4187.97	C ₁₇₈ H ₂₈₈ N ₅₈ O ₆₀ S ₂	6.37	4262.05	4263.01
C ₁₇₆ H ₂₈₅ N ₅₇ O ₅₈ S ₂	6.14	4189.03	4190.12	C ₁₈₀ H ₂₈₉ N ₅₉ O ₅₈ S ₂	6.38	4269.07	4269.00
C ₁₇₇ H ₂₈₂ N ₅₆ O ₅₉ S ₂	6.15	4200.00	4201.17	C ₁₈₀ H ₂₈₇ N ₅₇ O ₆₀ S ₂	6.39	4271.04	4272.12
C ₁₇₈ H ₂₈₅ N ₅₅ O ₅₉ S ₂	6.16	4201.02	4202.08	C ₁₇₉ H ₂₉₂ N ₆₀ O ₅₈ S ₂	6.40	4274.10	4275.18
C ₁₇₄ H ₂₇₈ N ₅₄ O ₅₈ S ₂	6.17	4204.00	4205.13	C ₁₇₉ H ₂₉₀ N ₅₈ O ₆₀ S ₂	6.41	4276.06	4277.20
C ₁₇₄ H ₂₇₈ N ₅₄ O ₅₈ S ₂	6.18	4205.03	4205.98	C ₁₇₉ H ₂₉₀ N ₅₈ O ₆₀ S ₂	6.42	4276.07	4277.20
C ₁₇₆ H ₂₈₇ N ₅₇ O ₅₈ S ₂	6.19	4215.05	4215.95	C ₁₈₀ H ₂₈₉ N ₅₉ O ₅₉ S ₂	6.43	4285.07	4285.93
C ₁₇₈ H ₂₈₅ N ₅₅ O ₆₀ S ₂	6.20	4217.02	4218.16	C ₁₈₀ H ₂₉₄ N ₆₀ O ₅₈ S ₂	6.44	4288.11	4289.23
C ₁₇₇ H ₂₈₄ N ₅₆ O ₆₀ S ₂	6.21	4218.01	4218.96	C ₁₈₀ H ₂₉₂ N ₅₈ O ₆₀ S ₂	6.45	4290.08	4291.01
C ₁₇₇ H ₂₈₇ N ₅₇ O ₅₉ S ₂	6.22	4219.04	4220.04	C ₁₈₁ H ₂₉₁ N ₅₉ O ₅₉ S ₂	6.46	4299.08	4300.97
C ₁₇₈ H ₂₈₃ N ₅₇ O ₅₉ S ₂	6.23	4227.02	4228.10	C ₁₈₀ H ₂₉₄ N ₆₀ O ₅₉ S ₂	6.47	4304.11	4305.23
C ₁₇₉ H ₂₈₉ N ₅₇ O ₅₈ S ₂	6.24	4229.06	4230.17	C ₁₈₁ H ₂₉₆ N ₆₀ O ₅₉ S ₂	6.48	4318.12	4319.23

Tabelle 44: Summenformeln, Molmassen und dazugehörige Signale im MALDI-TOF Spektrum aller in der Bibliothek **6 vorkommenden Glycopeptide. Die Sequenzen zu dem Ziffernkodex der einzelnen Glycopeptide sind in Abbildung 49 angegeben.**

7.6 SPR-Experimente

Der Zellrasen, bestehend aus Osteosarkoma HI5- bzw. Parentalzellen, einer 185 cm² Zellkulturschale wird zweimal pro Woche abgeerntet. Dazu werden zunächst die adhären

wachsenden Zellen durch Inkubation bei 37°C mit 8 mL Trypsin-EDTA-Lösung (0.5g/L Trypsin und 0.2g/L EDTA in einer modifizierten Puck's Salzlösung A ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) von der Oberfläche abgelöst. Dieser Vorgang wird nach fünf Minuten durch Zugabe von 10 mL Kulturmedium (94% RPMI 1640, 5% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) gestoppt. Die Zellen werden für fünf Minuten zentrifugiert (1000rpm/174G), in 10 mL frischem Kulturmedium suspendiert und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. 3·10⁶ Zellen pro Milliliter werden in einer neuen Kulturschale mit 25 mL Kulturmedium ausgesät und bis zur nächsten Ernte bei 37°C kultiviert. Alle vier Wochen werden die Parentalzellen mit Neomycin (50 µg/mL Kulturmedium) und die HI5 Zellen mit Puromycin (1 µg/mL Kulturmedium) selektiert. Die restliche Zellsuspension wird für fünf Minuten zentrifugiert und das *Pellet* in soviel Einfriermedium (70% RPMI 1640, 10% DMSO, 20% FKS) suspendiert, bis eine Konzentration von 3·10⁶ Zellen pro Milliliter erreicht wird. Anschließend werden daraus 1 mL Aliquots erstellt und diese bei -80°C eingefroren.

Die Zellen eines Aliquots werden abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und zur Regeneration für 5 Minuten mit 1 mL Kulturmedium bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird abzentrifugiert, dreimal mit 1 mL PBS-Puffer (150mM, pH 7.4) gewaschen und in 1 mL entgastem PBS-Puffer aufgenommen. Die Zahl der vitalen Zellen in einer 10 µL Probe wird durch Zugabe von 10 µL Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Sie lag zwischen 90% und 95%, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Anschließend wird eine Konzentrationsreihe von 56, 225, 450, 900 und 1800 Zellen pro µL erstellt.

7.6.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zu SPR-Messungen

Sowohl Immobilisierung als auch die eigentlichen Messungen erfolgen bei 20°C. Als Laufpuffer dient entgaster PBS-Puffer (150 mM, pH 7.4).

Es werden Stammlösungen der (Glyco)Peptide mit einer Konzentration von 50 µg/mL in Acetatpuffer (10 mM, pH 4.5) hergestellt. Die Belegung der einzelnen Flußzellen erfolgt sukzessiv, d.h. jede Zelle wird einzeln aktiviert und im Anschluß das (Glyco)Peptid an die aktivierte Dextranschicht gebunden. Die Aktivierung wird für 20 Minuten bei einer Flußrate von 5 µL pro Minute mit einer frisch hergestellten Lösung aus NHS und EDC, im Verhältnis 1:1 (v:v), durchgeführt. Die nachfolgende Immobilisierung erfolgt bei einer Flußrate von 2 µL pro Minute über einen Zeitraum von ein bis drei Minuten mit oben erwähnten Stammlösungen. Abschließend werden in allen Flußzellen nicht umgesetzte aktivierte Hydroxygruppen der Dextranschicht bei einer Flußrate von 5 µL pro Minute für 30 Minuten mit Ethanolamin *gecappt*. Flußzelle 1 dient als Referenzzelle, wird also nur aktiviert und *gecappt*.

Für die Messungen werden Verdünnungsreihen von 56 bis 1800 HI5 Zellen pro µL in PBS-Puffer (150mM, pH 7.4) hergestellt. Die frisch suspendierten Lösungen werden bei einer Flußrate von 2 µL pro Minute über zehn Minuten injiziert. Die sich anschließende

Dissoziationszeit beträgt zwei Minuten. Die Regeneration der Chipoberfläche nach der Messung erfolgt bei 35 μL pro Minute Flußrate durch fünfzehn Sekunden lange Pulse mit einer 1.7 mM SDS Lösung in PBS-Puffer (150mM, pH 7.4).

7.6.2 SPR-Messungen

Die Immobilisierungen der Chips und SPR-Messungen wurden nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften, wie unter 7.6.1 beschrieben, durchgeführt.

Immobilisierte Verbindung	Immobilisierungzeit [s]	immobilisierte Menge [RU; fmol]	HI5-Zelllösungen [Zellzahl/ μL]	Parental-Zelllösungen [Zellzahl/ μL]
1	60	246; 61	56; 225; 450; 900; 1800	56; 225; 450; 900; 1800
2	60	237; 53	56; 225; 450; 900; 1800	56; 225; 450; 900; 1800
3	180	196; 51	56; 225; 450; 900; 1800	56; 225; 450; 900; 1800
4	180	248; 58	56; 225; 450; 900; 1800	56; 225; 450; 900; 1800
5	180	263; ~69	56; 225; 450; 900; 1800	56; 225; 450; 900; 1800
6	180	272; ~64	56; 225; 450; 900; 1800	56; 225; 450; 900; 1800
Fibrinogen	1200	14625; 43	56; 225; 450; 900; 1800	

Tabelle 45: Experimentparameter der SPR-Messungen.

8 Sicherheitshinweise

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
α -Cyano-4-hydroxymethylsäure	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	22	
CDCl ₃	Xn	20/22-38-40-48	36/37
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
2,5-Dihydroxybenzoesäure			24/25
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	(2-)9-16-29-33
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Ethanol	F	11	7-16
Hydrazin	T, N	45-E23/24/25-34-43-50/53	53-26-36/37/39-45-60-61
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
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
Natrium	F, C	14/15-34	5.3-8-43.7-45
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriummethanolat	C, F	11-14-34-36/37/38	26-36
Natronlauge	C	35	26-37/39-45
N-Methylpyrrolidon	Xi	36/38	41
O-(Azabenzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetramethyl- uroniumhexafluorophosphat	Xi	36/37/38	26-36
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'- tetramethyluronium- tetrafluoroborat			
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	(2-)7-16-24/25-26
Piperidin	F, T	11-23/24-34	16-26-27-45
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Schwefelsäure	C	35	26-30-45
Trichlormethylsilan	F, Xi	11-14-36/37/38	26-39
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Triisopropylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36

Tabelle 46: Sicherheitshinweise

9 Literatur

- ¹ UNAIDS Report on the global HIV/AIDS epidemic July 2002, <http://www.unaids.org/barcelona/presskit/report.html>.
- ² 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, G. White, P. Foster, P.D. Markham, *Science* (1984), 224, 500-503.
- ³ F. Barré-Sinoussi, J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier, *Science* (1983), 220, 868-871.
- ⁴ L.G. Gürtler, P.H. Hauser, J. Eberle, A. von Brunn, S. Knapp, L. Zekeng, J.M. Tsague, L. Kaptue, *J. Virol.* (1994) 68, 1581–1585.
- ⁵ I. Loussert-Ajaka, M.L. Chaix, B. Korber, F. Letourneur, E. Gomas, E., Allen, T.D. Ly, F. Brun-Vézinet, F. Simon, S. Saragosti, *J. Virol.* (1995), 69, 5640–5649.
- ⁶ M. Vanden Haeseveld, J.L. Decourt, R.J. de Luys, B. Vanderborght, G. van der Groen, H. van Heuverswijn, E. Saman, *J. Virol.* (1994), 68, 1586–1596.
- ⁷ L.G. Kostrikis, E. Bagdades, Y. Cao, L. Zhang, D. Dimitriou, D.D. Ho, *J. Virol.* (1995), 69, 6122–6130.
- ⁸ J. Louwagie, E.L. Delwart, J.I. Mullins, F.E. McCutchan, G. Eddy, D.S. Burke, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (1994), 10, 561–567.
- ⁹ M.G. Morgado, E.C. Sabino, E.G. Shpaer, V. Bongertz, L. Brigido, M.D.C. Guimaraes, E.A. Castilho, B. Galvao-Castro, J.I. Mullins, R.M. Hendry, A. Mayer, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (1994), 10, 569–576.
- ¹⁰ G. Myers, B. Korber, S. Wain-Hobson, R.F. Smith, G.N. Pavlakis, *Human Retroviruses and AIDS* (1994), Los Alamos, NM: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.Mex.
- ¹¹ G. Myers, B. Korber, S. Wain-Hobson, R.F. Smith, G.N. Pavlakis, *Human Retroviruses and AIDS* 1992, Los Alamos, NM: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.Mex.
- ¹² W. Janssens, L. Heyndrickx, K. Fransen, J. Motte, M. Peeters, J.N. Nkengasong, P.M. Ndumbe, E. Delaporte, J.L. Perret, C. Atende, P. Piot, G. van der Groen, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (1994), 10, 877–879.
- ¹³ E.E. Murphy, B. Korber, M.C. Georges-Courbot, B. You, A. Pinter, D. Cook, M.P. Kieny, A. Georges, C. Mathiot, F. Barre-Sinoussi, M. Girard, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (1993), 9, 997–1006.
- ¹⁴ J.N. Nkengasong, W. Janssens, L. Heyndrickx, K. Fransen, P.M. Ndumbe, J. Motte, A. Leonaers, M. Ngolle, J. Ayuk, P. Piot, G. van der Groen, *AIDS* (1994), 8, 1405–1412.
- ¹⁵ C.L. Kuiken, G. Zwart, E. Baan, R.A. Coutinho, J.A.R. van den Hoek, J. Goudsmit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993), 90, 9061–9065.

- ¹⁶ G.J. LaRosa, J.P. Davide, K. Weinhold, J.A. Waterbury, A.T. Profy, J.A. Lewis, A.J. Langlois, G.R. Dreesman, R.N. Boswell, P. Shadduck, L.H. Holley, M. Karplus, D.P. Bolognesi, T.J. Matthews, E.A. Emini, S. Putney, *Science* (1990), 249, 932–935
- ¹⁷ G. Zwart, T.F.W. Wolf, R. Bookelman, S. Hartman, M. Bakker, C.A.B. Boucher, C. Kuiken, J. Goudsmit, *AIDS* (1993), 7, 467–474.
- ¹⁸ C. Kunanusont, H.M. Foy, J.K. Kreiss, S. Rersk-Ngarm, P. Phanuphak, S. Raktham, C.P. Pau, N. Young, *Lancet* (1995), 345:1078–1083.
- ¹⁹ F.E. McCutchan, P.A. Hegerich, T.P. Brennan, P. Phanuphak, P. Singharaj, A. Jugudee, P.W. Berman, A.M. Gray, A.K. Fowler, D.S. Burke, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (1992), 8, 1887–1895.
- ²⁰ A. Pfütznner, U. Dietrich, U. von Eichel, H. von Briesen, H.D. Brede, J.K. Maniar, H. Rübsamen-Waigmann, *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* (1992), 5, 972–977.
- ²¹ C.I. Bandea, A. Ramos, D. Pieniazek, R. Pascu, A. Tanuri, G. Schochetman, M.A. Rayfield, *Emerg. Infect. Dis.* (1995), 1, 91–93.
- ²² R. Wyatt, J. Sodroski, *Science* (1998), 280, 1884–1888.
- ²³ E. Helseth, U. Olshevsky, C. Furmann, J. Sodroski, *J. Virol.* (1991), 65, 2119–2123.
- ²⁴ J.M. McCune, L.B. Rabin, M.B. Feinberg, M. Libermann, J.C. Kosek, G.R. Reyes, I.L. Weissmann, *Cell* (1988), 53, 55–67.
- ²⁵ A. Franzusoff, A.M. Volpe, D. Josse, S. Pichuanes, J.R. Wolf, *J. Biol. Chem.* (1995), 270, 3154–3159.
- ²⁶ B.G. Turner, F.M. Summers, *J. Mol. Biol.* (1999), 285, 1–32.
- ²⁷ A.G. Dalgleish, P.C. Beverley, P.R. Clapham, D.H. Crawford, M.F. Greaves, R.A. Weiss, *Nature* (1984), 312, 763–767.
- ²⁸ D. Klatzmann, E. Champagne, S. Chemaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J.C. Gluckman, L. Montagnier, *Nature* (1984), 312, 767–768.
- ²⁹ H. Choe, M. Farzan, N. Sun, Y., Sullivan, B. Rollins, P.D. Ponath, L. Wu, C.R. Mackay, G. LaRosa, G., Newman, N. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, *Cell* (1996), 85, 1135–1148.
- ³⁰ P.D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R.W. Sweet, J. Sodroski, W.A. Hendrickson, *Nature* (1998), 393, 648–659.
- ³¹ C.D. Rizzuto, R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P.D. Kwong, W.A. Hendrickson, J.A. Sodroski, *Science* (1998), 280, 1949–1953.
- ³² Q.J. Sattentau, J.P. Moore, F. Vignaux, F. Traincard, P. Poignard, *J. Virol.* (1993), 67, 7383–7393.
- ³³ L. Wu, N.P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, J. Sodroski, *Nature* (1996), 384, 179–183.
- ³⁴ R. Wyatt, P.D. Kwong, E. Desjardins, R.W. Sweet, J. Robinson, W.A. Hendrickson, J.G. Sodroski, *Nature* (1998), 393, 705–711.
- ³⁵ J.P. Moore, J.A. McKeating, R.A. Weiss, Q.J. Sattentau, *Science* (1990), 250, 1139–1142.
- ³⁶ W.R. Gallaher, *Cell* (1987), 50, 327–328.

- ³⁷ T.K. Hart, R. Kirsh, H. Ellens, R.W. Sweet, D.M. Lambert, S.R. Petteway, J. Leary, P.J. Bugelski, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (1991), 88, 2189-2193.
- ³⁸ J.G. Bartlett, R.D. Moore, *Sci. Am.* (1998), 279, 84-87, 89.
- ³⁹ M.J. Endres, P. R. Clapham, M. Marsh, M. Ahuja, J. Davis Turner, A. McKnight, J.F. Thomas, B. Stoebenau-Haggarty, S. Choe, P.J. Vance, T.N.C. Wells, C.A. Power, S.S. Sutterwala, R.W. Doms, N.R. Landau, J.A. Hoxie., *Cell* (1996), 87, 745–756.
- ⁴⁰ C.C. Labranche, T.L. Hoffman, J. Romano, B.S. Haggarty, T.G. Edwards, T.J. Matthews, R.W. Doms, J.A. Hoxie, *J. Virol.* (1999), 17, 10310–10319.
- ⁴¹ J.C. Bandres, Q.F. Wang, J. O’Leary, F. Baleaux, A. Amara, J.A. Hoxie, S. Zolla-Pazner, M.K. Gorny, *J. Virol.* (1998), 72, 2500–2504.
- ⁴² D.D. Ho, A.U. Neumann, A.S. Perelson, W. Chen, J.M. Leonard, M. Markowitz, *Nature* (1995), 373, 123-126.
- ⁴³ A.S. Perelson, A.U. Neumann, M. Markowitz, J.M. Leonard, D.D. Ho, *Science* (1996), 271, 1582-1586.
- ⁴⁴ X. Wei, S.K. Ghosh, M.E. Taylor, V.A. Johnson, E.A. Emini, P. Deutsch, J.D. Lifson, S. Bonhoeffer, M.A. Nowak, B.H. Hahn, *Nature* (1995), 373, 117-122.
- ⁴⁵ Informationen des Robert-Koch-Institutes, www.rki.de/GESUND/MBL/HIV.HTM
- ⁴⁶ H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* (1993), 218, 1-27.
- ⁴⁷ D. Voet, J.G. Voet, *Biochemie*, VCH Weinheim (1992).
- ⁴⁸ L. Stryer, *Biochemie*, 4.Auflage, Spektrum Akad. Verlag Heidelberg/Berlin/Oxford (1990).
- ⁴⁹ A. Gottschalk (Hrsg.), *Glycoproteins*, Vol. 1 & 2, Elsevier Amsterdam (1972).
- ⁵⁰ N. Sharon, H. Lis, *Spektrum d. Wiss.* (1993), 3, 66-74.
- ⁵¹ L. Devine, I.F.C. McKenzie, *BioAssays* (1992), 14, 619-625.
- ⁵² I. Christiansen-Brams, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin I.* (1993), 1461-1471.
- ⁵³ S. Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.* (1992), 61, 307-330.
- ⁵⁴ T.W. Rademacher, R.B. Parekh, R.A. Dwek, *Ann. Rev. Biochem.* (1988), 57, 785-838.
- ⁵⁵ S.K. Young, J. Gum Jr, I. Brockhausen, *Glycoconjugate J.* (1996), 13, 693-707.
- ⁵⁶ J.M. McCune, L.B. Rabin, M.B. Feinberg, M. Lieberman, J.C. Kosek, G.R. Reyes, I.L. Weissman, *Cell* (1988), 53, 55-67.
- ⁵⁷ A. Franzusoff, A.M. Volpe, D. Josse, S. Pichuanes, J.R. Wolf, *J. Biol. Chem.* (1995), 270, 3154-3159.
- ⁵⁸ E. Helseth, U. Olshevsky, C. Furman, J. Sodroski, *J. Virol.* (1991), 65, 2119-2123.
- ⁵⁹ C.K. Leonard, M.W. Spellman, L. Riddle, R.J. Harris, J.N. Thomas, T.J. Gregory, *J. Biol. Chem.* (1990), 265, 10373-10382.
- ⁶⁰ J.P. Moore, Q.J. Sattentau, R. Wyatt, J. Sodroski, *J. Virol.* (1994), 68, 469-484.
- ⁶¹ P.D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R.W. Sweet, J. Sodroski, W.A. Hendrickson, *Nature* (1998), 393, 648-659.
- ⁶² E.A. Berger, *Nature Struct. Biol.* (1998), 5, 671-674.
- ⁶³ J. Wülfken, Dissertation Universität Hamburg (2001).

- ⁶⁴ S. Meyer, persönliche Mitteilungen.
- ⁶⁵ J. Tost, persönliche Mitteilungen.
- ⁶⁶ M.J. Papandreou, E. Fenouillet, *Virology* (1998), 241, 163-167.
- ⁶⁷ V. Tugarinov A. Zvi, R. Levy, Y. Hayek, S. Matsushita, J. Anglister, *Structure* (2000), 8, 385-395.
- ⁶⁸ E. Fenouillet, J.C. Gluckma, I.M. Jones, *Trends Biochem. Sci.* (1994), 19, 65-70.
- ⁶⁹ R.A. Gryters, J.J. Neefjes, M. Tersmette, R.E.V. De Goede, G. Huismann, F. Miedema, H.L. Ploegh, *Nature* (1987), 330, 74-77.
- ⁷⁰ Y. Li, L. Luo, N. Rasool, C.Y. Kang, *J. Virol.* (1993), 67, 584-588.
- ⁷¹ M.J. Papandreou R. Barbouche R. Guieu M.P. Kiény E. Fenouillet, *Mol. Pharmacol.* (2002), 61, 186-93.
- ⁷² E. Fenouillet, *J. Exp. Med.* (1989), 169, 807-822.
- ⁷³ W.R. Lee, X.F. Yu, W.J. Syu, M. Essex, T.H. Lee, *J. Virol.* (1992), 66, 1799-1803.
- ⁷⁴ L. Dirk, D. Lindemann, C. Manzoni, D. Moritz, J. Mous, *Virus Res.* (1990), 18, 9-20.
- ⁷⁵ A. Blomstedt, B. Losman, M. Biller, B. Svennerholm, S. Olofson, *Abstracts of the XIV International Symposium on Glycoconjugates* (1997), 140.
- ⁷⁶ S. Polzer M.T. Dittmar H. Schmitz B. Meyer H. Müller H.G. Krausslich M. Schreiber, *Glycobiology* (2001), 11, 11-9.
- ⁷⁷ Y. Li, M.A. Rey-Cuille, S.L. Hu, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (2001), 17, 1473-9.
- ⁷⁸ G. Pollakis, S. Kang, A. Kliphuis, M.I. Chalaby, J. Goudsmit, W.A. Paxton, *J. Biol. Chem.* (2001), 276, 13433-41.
- ⁷⁹ K. Schönning, B. Jansson, S. Olofson, J.E. Stig Hansen, *Virology* (1996) 218, 134-140.
- ⁸⁰ A. Ly, L. Stamatatos, *J. Virol.* (2000), 74, 6769-76.
- ⁸¹ J.H. Condra, M.D. Miller, D.J. Hazuda, E.A. Emini, *Annu. Rev. Med.* (2002), 53, 541-55.
- ⁸² AIDSNET: www.aidsnet.ch/infothek/d/glossar_12.htm.
- ⁸³ M.D. Daniel, F. Kirchhoff, S.C. Czajak, P.K. Sehgal, R.C. Desrosiers, *Science* (1992), 258, 1938-41.
- ⁸⁴ A.M. Whatmore, N. Cook, G.A. Hall, S. Sharpe, E.W. Rud, M.P. Cranage, *J. Virol.* (1995), 69, 5117-23.
- ⁸⁵ P.E. Stephens, G. Clements, G.T. Yarranton, *Nature* (1990), 343, 219.
- ⁸⁶ J.R. Mascola, S.W. Snyder, O.S. Belay, R.B. Belshe, D.H. Schwarz, M.L. Clements, R. Dolin, B.S. Graham, G.J. Gorse, M.C. Keefer, M.J. McElrath, M.C. Walker, K.F. Wagner, J.G. McNeil, F.E. McCutchan, D.S. Burke, *J. Infect. Dis.* (1996), 173, 340-48.
- ⁸⁷ N.L. Letvin, D.H. Barouch, D.C. Montefiori, *Annu. Rev. Immunol.* (2002), 20, 73-99.
- ⁸⁸ J. Estaquier, C. Boutillon, B. Georges, J.C. Ameisen, A. Tartar, C. Auriault, *J. Pept. Sci.* (1996), 2, 165-175.
- ⁸⁹ M.W. Cho, Y.B. Kim, M.K. Lee, K. Gupta, W. Ross, R. Plishka, A. Buckler-White, T. Igarashi, T. Theodore, R. Byrum, C. Kemp, D.C. Montefiori, M.A. Martin, *J. Virol.* (2001), 75, 645-53.

- ⁹⁰ S.-L. Hu, P.N. Fultz, H.M. McClure, J.W. Eichberg, E.K. Thomas, J. Zarling, M.C. Singhal, S.G. Kosowski, R.B. Swenson, D.C. Anderson, G. Todaro, *Nature* (1987), 328, 721-23.
- ⁹¹ L. Shen, Z.W. Chen, M.D. Miller, V. Stallard, G.P. Mazzara, D.L. Panicali, N.L. Letvin, *Science* (1991), 252, 440-43.
- ⁹² G. Ferrari, W. Humphrey, M.J. McElrath, J.-L. Excler, A.-M. Duliege, M.L. Clements, L.C. Corey, D.P. Bolognesi, K.J. Weinhold, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1997), 94, 1396-1401.
- ⁹³ S.-L. Hus, K. Abrams, G.N. Barber, P. Moran, J.M. Zarling, A.J. Langlois, L. Kuller, W.R. Morton, *Science* (1992), 255, 456-59.
- ⁹⁴ B.S. Graham, 2001, NIH Vaccine Research Center Clinical Studies, www.vrc.nih.gov/VRC/clinstudies.htm.
- ⁹⁵ R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* (1963), 85, 2149-2154.
- ⁹⁶ L.A. Carpino, G.Y. Han, *J. Org. Chem.* (1972), 37, 3404-3409.
- ⁹⁷ D.A. Pearson, M. Blanchette, M.L. Baker, C.A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* (1989), 30, 2739-2742.
- ⁹⁸ L.A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Letters* (1994), 35, 2279-2282.
- ⁹⁹ G.E. Reid, R.J. Simpson, *Anal. Biochem.* (1992), 200, 301-309.
- ¹⁰⁰ L.A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* (1993), 115, 4397-4398.
- ¹⁰¹ R.A. Dwek, *Biochem. Soc. Trans.* (1995), 23, 1-25.
- ¹⁰² D. Vetter, D. Tumeltyl, S.K. Singh, M.A. Gallop, *Angew. Chem.*, (1995), 107, 94-97.
- ¹⁰³ S.T. Cohen-Anisfeld, P.T. Lansbury jr., *J. Am. Chem. Soc.* (1993), 115, 10531-10537.
- ¹⁰⁴ I. Christiansen-Brams, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin I* (1993), 1461-1471.
- ¹⁰⁵ Z. Guo, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Tetrahedron. Lett.* (1997), 38, 27, 4799-4802.
- ¹⁰⁶ S.T. Anisfield, P.T. Lansbury, *J. Org. Chem.* (1990), 55, 5560-5562.
- ¹⁰⁷ F. Ende, Dissertation Universität Hamburg (2001).
- ¹⁰⁸ B. Claasen, Diplomarbeit Universität Hamburg (2001).
- ¹⁰⁹ L.M. Likkosherstov, O.S. Novikova, V.A. Derevitskaja, N.K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* (1986) 146, C1-C5.
- ¹¹⁰ I. Annis, B. Hargittai, G. Barany, *Meth. Enzym.* (1997), 289, 198-220.
- ¹¹¹ K. Akaji, T. Tatsumi, M. Yoshida, T. Kimura, Y. Fujiwara, Y. Kiso, *J. Am Chem. Soc.* (1992), 114, 4137-4143.
- ¹¹² K. Akaji, K. Fujino, T. Tatsumi, Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.* (1992), 33, 1073-1076.
- ¹¹³ C. Kellenberger, H. Hietter, B. Luu, *Pept. Res.* (1995), 8, 321-327.
- ¹¹⁴ M.C. Munsen, G. Barany, *J. Am. Chem. Soc.* (1993), 115, 10203-10210.
- ¹¹⁵ R. Eritja, J.P. Ziehler-Martin, P.A. Walker, T.D. Lee, K. Ledesse, F. Albericio, B.E. Kaplan, *Tetrahedron* (1987), 43, 2675-2680.
- ¹¹⁶ W.W. Cleland, *Biochemistry* (1964), 3, 480-482.
- ¹¹⁷ G. Jung, A.G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* (1992), 104, 375-391
- ¹¹⁸ R.A. Houghten, *TIG* (1993), 9, 235

- ¹¹⁹ S.E. Cwirla, E.A. Peters, R.W. Barrett, W.J. Dower, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990), 87,6378-6382.
- ¹²⁰ J.J. Devlin, L.C. Panganiban, P.E. Devlin, *Science* (1990), 249,404-406.
- ¹²¹ J.K. Scott, G.P. Smith, *Science* (1990), 249, 386-390.
- ¹²² F. Felici, A. Castagnoli, R. Musacchio, G. Capelli, G. Cesarei, *J. Mol. Biol.* (1991), 222, 301-310.
- ¹²³ M.G. Cull, J.F. Miller, P.J. Schatz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992), 89, 1865-1869.
- ¹²⁴ K. Kawasaki, International Patent Application WO 91/05058, 1991.
- ¹²⁵ F.S. Tjoeng, S. Towery, J.W. Bullock, D.E. Whipple, K.F. Fok, M.H. Williams, M.E. Zupc, S.P. Adams, *Int. J. Pept. Prot. Res.* (1990), 35, 141-146.
- ¹²⁶ C. Pinilla, J.R. Appel, P. Blanc, R.A. Houghten, *Biotechniques* (1992), 13, 901-905.
- ¹²⁷ C.T. Dooley, R.A. Houghten, *Life Sci.* (1993), 52, 1509-1517.
- ¹²⁸ J.M. Ostresh, J.H. Winkle, V.T. Hamashin, R.A. Houghten, *Biopolymers.* (1994), 34, 1681-1689.
- ¹²⁹ R.A. Houghten, C. Pinilla, S.E. Blondelle, J.R. Appel, C.T. Dooley, J.H. Cuervo, *Nature* (1991), 354, 84-86.
- ¹³⁰ R.A. Houghten, J.R. Appel, S.E. Blondelle, J.H. Cuervo, C.T. Dooley, C. Pinilla, *Pept. Res.* (1992), 6, 351-358.
- ¹³¹ A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Prot. Res.* (1991), 37, 487-493.
- ¹³² F. Sebestyen, G. Dibo, A. Kovacs, A. Furka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1993), 3, 413-418.
- ¹³³ K.S. Lam, S.E. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby, W.M. Kazmierski, R.J. Knapp, *Nature* (1991), 354, 82-84.
- ¹³⁴ A. Kramer, R. Volkmer-Engert, R. Malin, U. Reineke, J. Schneider-Mergner, *Pept. Res.* (1993), 6, 314-318.
- ¹³⁵ J. Eichler, R.A. Houghten, *Biochemistry* (1993), 32, 11035-11041.
- ¹³⁶ K.-H. Wiesmüller, A.G. Becksickinger, H.-G. Ihlenfeld, H.A. Wieland, K. Udaka, P. Walden, G. Jung, „Experimental limits of the peptide library concept“ in *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, Proc. 13th Am. Pept. Symp. (Eds.: R.S. Hodges, J.A. Smith), Escom, Leiden, The Netherlands, 1994, 35, 141-146.
- ¹³⁷ A. Quesnel, A. Casrouge, P.Kourilsky, J.P. Abastado, Y. Trudelle, *Pept. Res.* (1995), 8, 47-51.
- ¹³⁸ H. Gras-Masse, J.-C. Ameisen, C. Boutillon, F. Rouaix, M. Bossus, B. Deprez, J.-L. Neyrinck, A. Capron, A. Tartar, *Pept. Res.* (1992), 5, 211-216.
- ¹³⁹ G.G. Flynn, J. Pohl, M.T. Flocco, J.E. Rothman, *Nature* (1991), 353, 321-325.
- ¹⁴⁰ G. Jung, *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, 1. Auflage, Weinheim/New York/Basel/Cambridge/Tokyo, VCH, 1996.
- ¹⁴¹ R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Mass. Spectrom. Rev.* (1998), 17, 337-366.
- ¹⁴² F. Lottspeich, H. Zorbas (Herausgeber), *Bioanalytik*, Spektrum Akad. Verlag Heidelberg (1998).

- ¹⁴³ L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* (1983), 53, 521-528.
- ¹⁴⁴ J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Soc.* (1979), 71, 4546-4553.
- ¹⁴⁵ H. Kessler, J. H. Gehrke, C. Griesinger, *Angw. Chem.* (1988), 100, 507-554.
- ¹⁴⁶ M. Eberstadt, G. Gemmecker, D. F. Mierke, H. Kessler, *Angew. Chem.* (1995), 107, 1813-1838.
- ¹⁴⁷ T. Turbadar, *Proc. Phy. Soc.* (1959), 73, 40-44.
- ¹⁴⁸ A. Otto, *Z. Phys.* (1968), 216, 398-410.
- ¹⁴⁹ A. Otto, *Phys. Stat. Solidi.* (1968), 26, 99-101.
- ¹⁵⁰ E. Kretschmann, H. Rather, *Z. Naturf.* (1968), 230, 2135-2136.
- ¹⁵¹ S.D. Holmes, K. May, V. Johansson, F. Markey, I.A. Critchley, *J. Micro. Methods* (1997), 28, 77-84.
- ¹⁵² L. Xing, K. Tjarnlund, B. Lindqvist, G.G. Kaplan, D. Feigelstock, R.H. Cheng, J.M. Casanovas, *Embo. J.* (2000), 19, 1207-1216.
- ¹⁵³ J.G. Quinn, S. O'Neill, A. Doyle, C. McAtamney, D. Diamond, B.D. MacCraith, R. O'Kennedy, *Anal. Biochem.* (2000), 281, 135-143.
- ¹⁵⁴ E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, *Colloid and Interface Science* (1991), 143, 513-526.
- ¹⁵⁵ Informationen der Firma Biacore, <http://www.biacore.com>.
- ¹⁵⁶ R. Karlson, R. Stahlberg, *Anal. Biochem.* (1995), 228, 274-80.
- ¹⁵⁷ T. Weimar, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2000), 39, 1219-1221.
- ¹⁵⁸ K. Nagata, H. Handa, Real-time analysis of biomolecular interactions: Applications of Biacore. *Springer Verlag, Berlin* (2000).
- ¹⁵⁹ R.L. Rich, D.G. Myszka, *Curr. Opin. Biotechnol.* (2000), 11, 54-61.
- ¹⁶⁰ S. Meyer, Dissertation, Universität Hamburg 1999.
- ¹⁶¹ J. Tost, Diplomarbeit, Universität Hamburg 1999.
- ¹⁶² W.W. Cleland, *Biochemistry* (1964), 3, 480-482.
- ¹⁶³ G.L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* (1959), 82, 70-77.
- ¹⁶⁴ G.L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* (1958), 74, 443-450.
- ¹⁶⁵ K. Akaji, T. Tatsumi, M. Yoshida, T. Kimura, Y. Fujiwara, Y. Kiso, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1991), 1, 167-168.
- ¹⁶⁶ T. Koide, A. Otaka, H. Suzuki, N. Fujii, *Syn. Lett.* (1991), 5, 345-346.
- ¹⁶⁷ L. Wu, G. LaRosa, N. Kassam, C.J. Gordon, H. Heath, N. Ruffing, H. Chen, J. Humblias, M. Samson, M. Parmentier, J.P. Moore, C.R.J. Mackay, *Exp Med* (1997), 186(8):1373-81.
- ¹⁶⁸ L.W. Herman, G. Tarr, S.A. Kates, *Mol. Div.* (1996), 2, 147-155.
- ¹⁶⁹ D.A. Pearson, M. Blanchette, M.L. Baker, C.A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* (1989), 2739-2742.
- ¹⁷⁰ N.A. Sole, G. Barany, *J. Org. Chem.* (1992), 57, 5399-5403.
- ¹⁷¹ M. R. Nilsson, L.L. Nguuyen, D.P. Raleigh, *Anal. Biochem.* (2001), 288, 76-82.

Danksagung

Ich danke meiner Freundin Claudia Pritschow und meinen Eltern.

Sowie:

Marco Axmann, Birgit Claasen, Atillâ Çoksezen, Florian Ende, Christian Flügge, Britta Hünnefeld, Jens Klein, Kolja Klein, Thies Köhli, Helge Kränz, Martina Krasova, Boris Kröplin, Thomas Kühnemund, Moriz Mayer, Robert Meinecke, Sonja Meyer, Heiko Möller, Jan Münster, Iona Müller, Nicolai Nagorny, Axel Neffe, Erika Paul, Oliver Schuster, Christian Seeberger, So-Young Shin, Jutta Tost, Thomas Weimar, Jan-C. Westermann, Andreas Witte, Jan Wülken, Patrick Ziegel Müller ...

Lebenslauf

Persönliche Angaben: Name: Jörg Dojahn
Geburtsort: Rendsburg,
Geburtstag: 23.10.1967

Schulausbildung:
8/1974 – 7/1978 Grundschule El Paso/Texas/USA und Heide
8/1978 – 5/1989 Gymnasium Heide Ost, Abitur

Wehrdienst:
6/1989 – 5/1991 Ausbildung zum Offizier der Reserve

Studium/Promotion:
4/1992 – 3/1998 Studium der Chemie an der Universität Hamburg
10/1994 Vordiplom
3/1998 Diplom

Diplomarbeit bei Prof. Dr. Meyer am Institut für Organische Chemie; Universität Hamburg:

Titel: *Konformationsanalyse eines synthetischen pentaglycosylierten Peptids aus der extrazellulären Domäne des menschlichen Mucins MUC1*

Seit 4/1998 Promotion bei Prof. Dr. Meyer am Institut für Organische Chemie; Universität Hamburg:

Titel: *Kombinatorische Synthese und Untersuchung von V3-Peptid- und Glycopeptidbibliotheken als potentielle HIV Impfstoffe*

Anstellungsverhältnisse:
4/1998 – 9/1998 Universität Hamburg, Lehrtätigkeit im organisch-chemischen Praktikum für Medizinstudenten
1/1999 – 12/2001 Universität Hamburg, wissenschaftlicher Mitarbeiter
3/2001 – 6/2002 Universität Hamburg, wissenschaftlicher Mitarbeiter

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.