

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**Parallele und kombinatorische Methoden zur Synthese cyclischer
Urokinaserezeptorantagonisten an fester Phase und in Lösung**

Niko Schmiedeberg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller
3. apl. Prof. Dr. L. Moroder

Die Dissertation wurde am 14.11.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 24.01.2002 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1997 bis November 2001 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Meinem Betreuer Prof. Dr. H. Kessler danke ich für die interessante Aufgabenstellung sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Über die Bereitstellung optimaler materieller Arbeitsbedingungen hinaus ist es vor allem die außergewöhnliche wissenschaftliche Freiheit, die ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft und das große Interesse an den bearbeiteten Themen die für das exzellente Arbeitsklima verantwortlich sind und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein weiterer Dank gilt:

- meiner Familie, ohne deren ständige Unterstützung die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre,
- meinem Laborkollegen Dirk Gottschling für gegenseitige Hilfe, Aufmunterung und sehr viel Spaß während der vielen schwäbisch-hessischen Kabarett-Einlagen,
- Dr. Rainer Haeßner, Dr. Markus (Mopi) Born, Alexander Dehner und Monika Goede für schnelle Hilfe im Kampf gegen die Tücken der Computerwelt,
- Ulrich (Uli) Hersel, Martin Sukopp und Thorsten (Bobby) Arndt für das gewissenhafte Korrekturlesen des Manuskriptes,
- Dr. Markus Bürgle, Dr. Christian Rölz, Vincent Truffault und Martin Sukopp für die sehr gute Zusammenarbeit auf dem Urokinaseprojekt,
- der Klinischen Forschergruppe mit Prof. Dr. Manfred Schmitt, PD Dr. Viktor Magdolen und Elke Guthaus, sowie PD Dr. Olaf Wilhelm und Dr. Markus Bürgle von der Wilex AG für die erfolgreiche Zusammenarbeit auf dem Urokinaseprojekt,
- Dr. Christian Mang, Dr. Martin Kantlehner, Dr. Daniel Weicherding, Gábor Sulyok, Ulrich Hersel, Bobby Arndt und Armin Modlinger für erbauliche Stunden außerhalb des Labors,

- Dr. Christian Mang, Dirk Gottschling, Dr. Martin Kantlehner, Dr. Markus Bürgle, Dr. Christoph Riemer, Ulrich Hersel und Gábor Sulyok für den ständigen wissenschaftlichen Austausch und die stete Diskussionsbereitschaft,
- Markus Urzinger und Burghard Cordes für die schnelle Anfertigung der Massenspektren und Maria Kranawetter für die zuverlässigen Substanzreinigungen durch präparative HPLC,
- meinen Praktikanten Björn Reinhard, Bernhard Bauer, Alexander Wörndle und Nicole Amann für die selbständige und gewissenhafte Arbeit,
- Albert Schröder und Mona Wolff für die Durchführung zahlreicher Synthesen und

Miriam für ihre Geduld, ihren Optimismus und dafür, dass sie mir immer wieder die Augen für die wirklich wichtigen Dinge des Lebens geöffnet hat.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Das uPA/uPAR-System in der Tumorthherapie	4
2.1 Molekulare Physiologie der Krebsentstehung und -ausbreitung	4
2.1.1 Die Proteolyse in Tumorwachstum und -metastasierung	6
2.1.2 Die Aktivierungskaskade der perizellulären Proteolyse	7
2.2 Das Urokinase-Urokinaserezeptorsystem	9
2.2.1 Die molekulare Struktur von uPA	9
2.2.2 Der uPA-Rezeptor	11
2.2.3 Bindung von uPA an uPAR	14
2.2.4 Die natürlichen uPA-Inhibitoren PAI-1 und -2	16
2.2.5 Weitere Liganden für uPAR	18
2.2.5.1 Direkter Einfluss von uPAR auf die Zelladhäsion	18
2.2.5.2 Indirekter Einfluss von uPAR auf die Zelladhäsion und Signaltransduktion durch Wechselwirkung mit Integrinen	20
2.2.5.2.1 Integrinvermittelte Zelladhäsion und Signaltransduktion	20
2.2.5.2.2 Weitere Komponenten im ‚uPAR-Integrin-Signalosom‘	22
2.2.6 Das uPA/uPAR-System bei der Tumorprognose	24
2.2.7 Inhibition des uPA/uPAR-Systems als Ansatz für die Tumorthherapie	26
2.2.8 Testsysteme für uPAR-Antagonisten	30
3 Entwicklung von Inhibitoren für die uPA/uPAR-Wechselwirkung	33
3.1 Vorarbeiten und Aufgabenstellung	33
3.2 Allgemeine Aspekte der Peptidsynthese	37
3.3 Modifikationen von <i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29}]-uPA ₂₁₋₃₀ (5)	43
3.3.1 Ala- <i>scan</i> von 5	43
3.3.2 D- <i>scan</i> von 5	48
3.3.3 NMR-Struktur von <i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ (16)	54
3.3.4 Weitere Modifikationen an der verbrückenden Einheit von 16 .	59
3.3.4.1 Lineare Derivate	59
3.3.5 Penicillamin als rigidisierendes Element?!	60

3.3.6	Der <i>N</i> - und <i>C</i> -Terminus von 16	65
3.3.7	Seitenkettenmodifikationen von 16	71
3.4	Proteolytische Stabilitäten, Toxizitäten und <i>ex vivo</i> Untersuchungen	73
3.4.1	Proteolytische Stabilitäten	73
3.4.2	Zelltoxizität	74
3.4.3	Angiogeneseinhibition <i>ex vivo</i>	75
3.4.4	Das Problem der Artenbarriere für <i>in vivo</i> Modelle	77
4	Entwicklung einer Methode zum kombinatorischen spatial screening mittels Ringschlussolefinmetathese (RCM) in uPA-Epitopen an fester Phase	78
4.1	Allgemeine Aspekte zur Entwicklung von Inhibitoren für die uPA/uPAR-Wechselwirkung	78
4.2	Die Olefinmetathese in der bioorganischen Chemie	82
4.2.1	Grundlagen der Ringschlussolefinmetathese (RCM)	82
4.2.2	Ringschluss-Metathesereaktionen peptidischer Verbindungen	88
4.2.3	Racemische und enantioselektive Zugänge zu olefinischen Aminosäuren	89
4.2.3.1	Racemische Aminosäuresynthesen	90
4.2.3.2	Enantioselektive Synthesen monoalkylierter Aminosäuren	91
4.2.3.3	Versuch der enantioselektiven Synthese <i>C</i> ^α -disubstituierter Derivate	97
4.3	Die RCM in homodetischen uPA-Peptiden an fester Phase	98
4.3.1	Versuche zur RCM in olefinischen Peptiden an fester Phase	98
4.3.2	Verwendung von Pseudoproline ermöglicht die RCM in olefinischen uPA-Epitopen an fester Phase	101
4.3.3	Kombinatorische Festphasensynthese RCM-cyclisierter uPA-Epitope	105
5	Synthese schwieriger Sequenzen	115
5.1	Spezielle Aspekte der Peptidsynthese	115
5.2	Reversible Schutzgruppen des Rückgrats von Peptiden	119
5.2.1	Die <i>N</i> -2-Hydroxy-4-methoxybenzyl-Schutzgruppe	120
5.2.2	Die Mutter'schen Pseudoproline	122
5.3	Funktion und Struktur des transmembranen Proteins EmrE	123
5.4	Synthese der Transmembrandomäne EmrE ₁₋₂₉	125
5.4.1	Vorarbeiten	125
5.4.2	Fragmentkondensationen unmodifizierter Peptide	127

5.4.3	Synthese von <i>N</i> -Hmb- und Pseudoprolinderivaten zur reversiblen Schützung des Peptid-Rückgrates	129
5.4.4	Synthese Rückgrat-geschützter Peptide	130
5.4.4.1	Pseudoproline	130
5.4.4.2	<i>N</i> -Hmb-Derivate	130
6	Zusammenfassung	134
7	Experimenteller Teil	137
7.1	Allgemeine Arbeitstechniken	137
7.2	Liste der synthetisierten Verbindungen	138
7.2.1	Bausteine, Auxiliare, <i>N</i> -geschützte Aminosäuren	138
7.2.2	Lineare und disulfidcyclische uPA-Peptide	139
7.2.3	Pen-Modifikationen	140
7.2.4	<i>C</i> -/ <i>N</i> -terminale und Cys-Modifikationen	141
7.2.5	Metathesecyclen	142
7.2.6	EmrE-Peptide	143
7.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften	143
7.4	Synthesen der Bausteine	151
8	Literatur	171

Abkürzungen

1D, 2D	eindimensional, zweidimensional
Å	Ångström, 10^{-10} m
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Aba	α -Aminobuttersäure
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
Abs.	Absorption
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
ADME	<i>absorption, distribution, metabolism, excretion</i>
Alg	Allylglycin, 2-Amino-4-pentensäure
Aib	α -Aminoisobuttersäure
Alloc	Allyloxycarbonyl
Ape	2-Amino-1-phenylethanol
ATF	aminoterminales Fragment
All	Allyl
<i>b</i>	breit
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bhAlg	Bishomoallylglycin, 2-Amino-6-heptensäure
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bu	<i>n</i> -Butyl
BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
CCK	Cholecystokinin
Cha	Cyclohexylalanin
CD	<i>cluster domain</i>
CHO	<i>chinese hamster ovarian</i>

Abkürzungen

COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
Dab	2,4-Diaminobuttersäure
Dap	2,3-Diaminopropionsäure
d	Dublett oder <i>days</i>
dd	Doppeldublett
δ	chemische Verschiebung
dest.	destilliert
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	Dicyclohexylamin
DCM	Dichlormethan
DHP	Dihydropyran
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMDTC	Dimethyldithiocarbamat
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol, <i>Cleland</i> Reagenz
EC	<i>end-capped</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDCI	<i>N</i> -Ethyl- <i>N,N'</i> -(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDT	1,2-Ethandithiol
EE	Essigsäureethylester
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EmrE	<i>E. coli multidrug resistance protein E</i>
eq.	Äquivalente
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI	<i>electro spray ionization</i>
Et	Ethyl

EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-ONSu	(<i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyloxy)- <i>N</i> -succinimid
g	Gramm
ges.	gesättigt
GFD	<i>growthfactor-like Domaine</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GH	<i>growth hormone</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
G-Protein	GTP bindendes Protein
GRB	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
h	Stunde
hAlg	Homoallylglycin, 2-Amino-5-hexensäure
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> ,-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
Hci	Homocitrullin
Hcy	Homocystein
HFIP	Hexafluorisopropanol
HGF	Hepatocytenwachstumsfaktor
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
Hmb	2-Hydroxy-4-methoxybenzyl
HMBA-AM	4-Hydroxymethylbenzoesäureaminomethylamid
HMDS	Hexamethyldisilazan
HMW	<i>high molecular weight</i>
HOAc	Essigsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOObt	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin

Abkürzungen

HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
HV	Hochvakuum (Ölpumpenvakuum)
Hz	Hertz
IC	<i>inhibitory capacity</i>
Ig	Immunglobulin
JAK	Januskinase
K	Kelvin
kat.	katalytisch
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
L	Liter
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i>
LHMDS	Lithium-bis(trimethylsilyl)amid
LMW	<i>low molecular weight</i>
J	skalare Kopplungskonstante
m	Multipllett
M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper
Mac	<i>macrophage glycoprotein</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD	Moleküldynamik
Me	Methyl
MeIm	<i>N</i> -Methylimidazol
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min.	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter

MMA	<i>N</i> -Methylmercaptoacetamid
mmol	Millimol
MMP	Metallomatrixproteinase
MR	Makroglobulinrezeptor
MS	Massenspektrometrie
MSNT	1-(Mesityl-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol
muPAR	muriner uPAR
MW	Molgewicht
μmol	Mikromol
N	normal
Nal	Naphtylalanin
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrid, <i>Leuchs</i> Anhydrid
NHC	<i>N</i> -heterocyclische Carbenliganden
Nle	Norleucin, 2-Aminohexansäure
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
Orn	Ornithin
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
PCI	Protein C Inhibitor
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillamin, 3,3-Dimethylcystein
Pfp	Pentafluorphenol
Ph	Phenyl
Phg	Phenylglycin
PI	Phosphatidyl-Inositol
PI-PLC	PI-spezifische Phospholipase C

Abkürzungen

pm	Picometer
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
PN-1	Protease-Nexin-1
ppm	<i>parts per million</i>
pro-uPA	proteolytisch inaktives Proenzym des Urokinasetyp Plasminogenaktivators
PS	Polystyrol
q	Quartett
QSAR	<i>quantitative structure activity relationship</i>
r, <i>rac</i>	racemisch
RCM	<i>ring-closing metathesis</i>
rMD	<i>restraint molecular dynamics</i>
fMD	<i>free molecular dynamics</i>
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
RP	<i>reversed phase</i>
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Serpin	Serinprotease-Inhibitor
<i>shc</i>	<i>src-homology (domain) C</i>
SPE	<i>solid-phase extraction</i>
SPPS	Festphasen-Peptidsynthese
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
<i>src</i>	<i>sarcoma</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
suPAR	löslicher uPAR
t	Triplett
<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -Butyl
TBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> ,-tetramethyluronium-hexafluoroborat
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz

TEA	Triethylamin
Tes	2-Thioessigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	1,1,1-Trifluorethanol
TFFH	Tetramethylfluoroformamidinium-hexafluorophosphat
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
TG	TentaGel
TGF	<i>transforming growth factor</i>
THF	Tetrahydrofuran
Thi	Thienylalanin
Thia	Thiazolylalanin
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TIPS	Triisopropylsilan
TISH	Trisylhydrazid
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
Tms	2-Thiomilchsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TMSCI	Trimethylchlorsilan
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
Tps	3-Thiopropionsäure
Trt, Trityl	Triphenylmethyl
Trisyl	2,4,6-Triisopropylsulfonyl
uPA	Urokinasetyp Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinasetyp Plasminogenaktivator-Rezeptor
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
verd.	verdünnt
VN	Vitronectin
Xaa	beliebige Aminosäure

Abkürzungen

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von *Chemical Abstracts* (Chemical Abstracts, 'Index Guide', 77, 210.) und der *IUPAC-IUB*-Kommission empfohlenen Richtlinien (Eur. J. Biochem. **1984**, 138, 9-37).

Fachausdrücke, die aus dem Englischen übernommen wurden, sind *kursiv* geschrieben.

1 Einleitung

Schreiber et al. haben kürzlich die ‚Identifizierung kleiner Molekül-Partner für jedes Genprodukt‘ als wichtiges Ziel der bioorganischen Chemie benannt.^[1] Auch wenn diese Erkenntnis nicht gerade als neu zu bezeichnen ist, beschreibt sie doch die in Zeiten von (humanen) Genomprojekten und *DNA-Microarraytechniken*^[2] immer dringender werdende Notwendigkeit, in möglichst kurzer Zeit Verbindungen zu entwickeln, die, wenn sie auch nicht als Wirkstoffe selbst verwendet werden können, zumindest die Wechselwirkung verschiedener Genprodukte untereinander beeinflussen können, um so einen tieferen Einblick in das Regelwerk der Zelle zu gewähren. Mittels dieser Moleküle sollte es dann möglich sein, die häufig aus der Molekularbiologie resultierenden sehr komplexen und häufig spekulativen Beziehungen zu verifi- oder falsifizieren, um die weitere Entwicklungsarbeit auf die entsprechenden Schlüsselstellen der (krankhaft veränderten) Zelle zu konzentrieren.

Nach der erfolgreichen Etablierung der Kombinatorik und der automatisierten Parallelsynthese^[3] zur Bereitstellung einer großen Zahl von potentiell biologisch aktiven Substanzen für die pharmazeutische Industrie entwickeln sich die entsprechenden *screening*-Verfahren zunehmend in Richtung eines nicht zu vernachlässigenden Kosten- und Zeitfaktors. Während die kombinatorische Chemie unbestritten einen enormen Beitrag zur Identifizierung einer großen Zahl neuer Wirkstoffe geliefert hat, ist das Problem der Inhibition von Protein-Protein- oder Protein-Nukleinsäure Wechselwirkungen nach wie vor kaum gelöst: Während die Wirkstoffe der meisten neu entwickelten Medikamente als kleine organische Moleküle überwiegend die reaktiven Zentren biologisch bedeutsamer Enzyme hemmen, gibt es nur wenige Beispiele für analoge Erfolge auf dem Gebiet der Protein- oder Rezeptor-Antagonisten.^[4-7]

Die ursächliche Schwierigkeit bei der Entwicklung von Inhibitoren für die Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in den räumlich relativ weit ausgedehnten Epitopen auf den Proteinoberflächen, den sogenannten *hotspots*. Nur in einigen Fällen kann die Interaktion eines Proteins mit seinem Rezeptor einer relativ kurzen, kontinuierlichen Peptidsequenz zugeordnet werden.

Im Fall der Serinprotease urokinaseartiger Plasminogen Aktivator (uPA) erfolgt die Bindung des Enzyms an den zugehörigen zellmembrangebundenen Rezeptor (uPAR) mittels eines nur dreizehn Aminosäuren kleinen, flexiblen *loops* im *N*-terminalen Bereich des Proteins.^[8,9] Zahlreiche Arbeiten auf diesem Gebiet konnten zeigen, dass einerseits das Auftreten hoher Konzentrationen von uPA, uPAR und den natürlichen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 eine schlechte Prognose bei einigen malignen Erkrankungen signalisieren und andererseits die Inhibierung dieser Wechselwirkung eine Verlangsamung von Tumorwachstum und Metastasierungstendenz zur Folge haben, weshalb diese Faktoren als neue *targets* in der Tumorthherapie bezeichnet werden.^[10-13]

Der erste Schritt zur Entwicklung eines solchen Inhibitors für die uPA/uPAR-Wechselwirkung besteht in der Ermittlung der biologischen Minimalsequenz und der nachfolgenden Substitution und konformationellen Veränderung einzelner Aminosäureseitenketten. Im nächsten Schritt versucht man durch Deletion der nicht für die biologische Wirkung essentiellen Aminosäuren und durch räumliche Fixierung der biologisch aktiven Konformation zu kleineren und möglichst aktiven Leitstrukturen zu gelangen, die dann einer strukturellen Charakterisierung mittels Kernresonanzspektroskopie zugänglich sind und somit ein rationales Design von Wirkstoffen ermöglichen sollten.

Da die Fixierung der Seitenketten in den cyclischen Verbindungen häufig zu biologisch inaktiven räumlichen Anordnungen führt (*mismatched case*), ist es in diesem Zusammenhang selbstverständlich, dass angesichts der vielen erforderlichen Synthesen cyclischer Peptide eine Methode wünschenswert ist, die in wenigen Reaktionsschritten möglichst viele strukturell unterschiedliche Verbindungen erzeugt.

Basierend auf der Dissertationen von *M. Bürgle* sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, durch Variation der funktionellen Gruppen in der peptidischen Leitstruktur $cyclo[21,29][Cys^{21,29}]$ -uPA₂₁₋₃₀ und durch die Entwicklung und Anwendung effizienter Synthesemethoden neue Inhibitoren für die Wechselwirkung von uPA und uPAR zu finden und im Hinblick auf biologische Aktivität und proteolytische Stabilität zu optimieren.^[14] Die Untersuchung der pharmakophoren Relevanz und der räumlichen Anordnung der in den neuen Leitstrukturen enthaltenen

Aminosäuren bzw. Peptidomimetika sollte damit einen entscheidenden Schritt auf dem Weg zur Entwicklung eines neuen Tumormedikaments beitragen.

In einem unabhängigen Teilprojekt sollte das Phänomen der Resistenzentwicklung aufgrund von *multidrug*-Transportproteinen untersucht werden. Zahlreiche Zellen bzw. Mikroorganismen entwickeln bei langfristiger Behandlung mit Antibiotika bzw. Chemotherapeutika Resistenzen, die sich bei entsprechendem evolutionärem Druck schnell ausbreiten. Ein Teil dieser Resistenzen wird durch die Expression von Membranproteinen verursacht, die selektiv bestimmte Therapeutika aus der Zelle heraus transportieren und somit eine therapeutische Wirkung abschwächen oder verhindern.^[15-17]

Die Entwicklung von Substanzen, die diesen Transportmechanismus unterbinden, ist entscheidend von der Kenntnis der Struktur und des Transportmechanismus dieser Porenmoleküle abhängig. Ein geeignetes Modellprotein ist das transmembrane EmrE-Protein aus *Escherichia coli*, das aufgrund seiner ungewöhnlich geringen Größe einer strukturellen Charakterisierung mittels NMR zugänglich zu sein scheint.^[17,18] Um Einsicht in die Struktur und Wirkungsweise dieses Transporters zu erhalten, sollte die erste der transmembranen Domänen dieses Moleküls synthetisiert werden, wobei die besondere synthetische Herausforderung in der Überwindung der, im Zusammenhang mit der Festphasenpeptidsynthese transmembraner (und damit sehr hydrophober) Peptide auftretenden Aggregationsphänomene liegt.

2 Das uPA/uPAR-System in der Tumorthherapie

2.1 Molekulare Physiologie der Krebsentstehung und -ausbreitung

Die etwa 30 Billionen Zellen eines gesunden menschlichen Körpers leben in einer komplexen Gemeinschaft, die auf wechselseitigen Abhängigkeiten und geteilter Herrschaft beruht. Die Aufforderung zur Teilung erhält die Zelle normalerweise von den benachbarten Zellen. Diese gegenseitige Kontrolle gewährleistet, dass jedes Gewebe eine ihm angemessene Ausdehnung und Architektur beibehält.^[19]

Krebszellen dagegen besitzen zwei Eigenschaften,^[20,21] die die Tücke dieses Krankheitsbildes ausmachen:

- Sie durchbrechen die Kontrollen und beachten die Regulation des Zellwachstums nicht mehr (gutartige oder benigne Tumore) und darüber hinaus
- können sie die Fähigkeit erlangen, den normalen Aufenthaltsort zu verlassen, in benachbartes Gewebe einzudringen und in weit entfernten Regionen des Körpers neue Ansiedlungen zu bilden (maligne Tumore).

Im Gegensatz zu benignen Tumoren, die meist chirurgisch entfernt werden und damit potenziell vollständig curativ behandelt werden können, werden Tumoren aus bösartigen Zellen im Verlauf ihrer Entwicklung immer aggressiver und führen durch Ausbildung von nicht mehr behandelbaren Tochtermetastasen zu einer irreversiblen Schädigung von lebenswichtigen Organen und Gewebe und schließlich zum Tode.

Als Ursachen für die unkontrollierte Teilung (Unsterblichkeit!) sind mittlerweile eine große Zahl von Mutationen sowohl im stimulatorischen als auch im inhibitorischen Zellteilungssignalsystem identifiziert worden, wie z.B. das p53-Protein und sein Gegenspieler MDM2.^[20]

Maligne Tumoren können darüber hinaus die extrazelluläre Matrix (EZM) ihres Gewebes verlassen und nach Durchdringung von Basalmembranen in benachbarte Gewebestrukturen eindringen (siehe Abbildung 1).^[22]

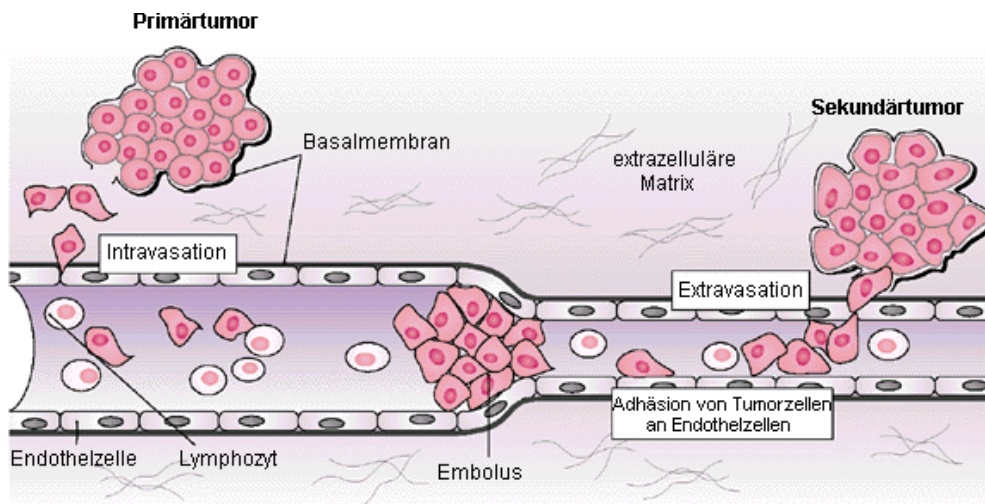


Abbildung 1: Stadien der Metastasierung eines malignen Tumors. Die Tochterzellen müssen dabei mehrere Male die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran durchdringen.

Die Basalmembran ist eine im Lichtmikroskop sichtbare, dicht gepackte Schicht, die hauptsächlich aus einem Geflecht des Faserproteins Kollagen IV besteht (siehe Abbildung 2). Auf der Oberfläche finden sich zahlreiche heparansulfathaltige Proteoglycane und die Glycoproteine Entactin und Laminin. Das Stroma besteht aus einem engen Netzwerk aus Proteinen (z.B. Elastin, Fibrin und verschiedenen Kollagentypen), Glycoproteinen (z.B. Fibronectin), Glycosaminoglykanen (z.B. Hyaluronsäure) und Proteoglykanen wie Heparin und Heparinsulfat.^[23,24]

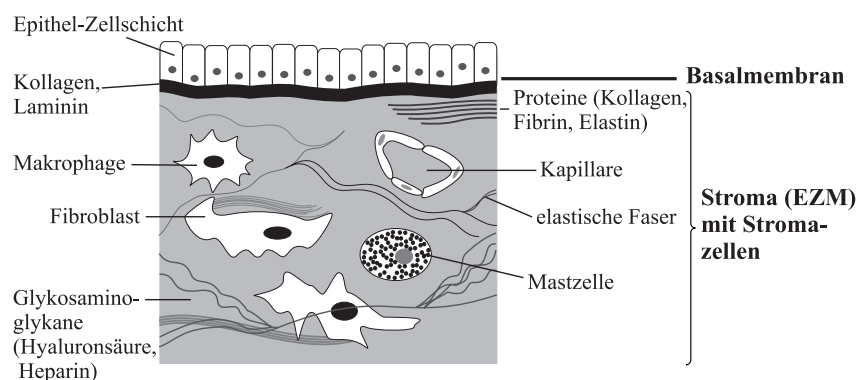


Abbildung 2: Aufbau der Extrazellulären Matrix (EZM) mit der Basalmembran und darunter liegende Stroma.

Die Bindung der Zellen an die EZM erfolgt über Rezeptoren der Integrin-Superfamilie an adhäsive Proteine wie Laminin oder Fibronectin.^[25] Die zahlreichen hygroskopischen Makromoleküle bilden eine kompakte Gelmatrix, in die die Zellen des Stromas eingelagert sind, wie z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen.

2.1.1 Die Proteolyse in Tumorwachstum und -metastasierung

Sowohl für den invasiven Prozess als auch für die Migration maligner Zellen ist der proteolytische Abbau von Teilen der Basalmembranen und EZM erforderlich. Normale Zellen regeln die Aktivität der zum Abbau der EZM befähigten Proteasen im Rahmen verschiedener physiologischer Wachstums- und Modifikationsprozesse wie z.B. während der Embryogenese, der Morphogenese und der Wundheilung sehr genau.^[26] Im Gegensatz dazu sezernieren maligne Tumorzellen verstärkt diese Proteasen -in Form inaktiver Vorstufen als Proenzyme oder Zymogene- die dann im weiteren Verlauf durch (Auto-)Proteolyse in die aktiven Formen überführt werden und so zu einer lokalen Anhäufung proteolytischer Aktivität im Kontaktbereich zur EZM führen.^[27,28] Aufgrund der verschiedenen aktiven Zentren können diese Proteasen in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Die extrazelluläre Matrix abbauende Enzyme und ihr aktives Zentrum.^[29]

<i>Proteasefamilie</i>	<i>Aktives Zentrum</i>	<i>Beispiele</i>
Serinproteasen	Serin	Plasmin, uPA, tPA ^[24]
Matrixmetallo- Proteinasen (MMP's)	Zink	Kollagenasen, Metalloelastasen, Stromelysine, Gelatinasen ^[30]
Cysteinproteasen	Cystein	Kathepsine B, H und L ^[31]
Aspartatproteasen	Asparaginsäure	Kathepsin D ^[32]

Obwohl es eine große Zahl von Proteinen gibt, die in der Lage sind, Elemente des Gewebestromas spalten zu können, scheinen vor allem die Metalloproteinasen (MMP's)^[33,34] und die Serinproteasen des Plasminsystems für die o.g. Prozesse von Bedeutung zu sein scheint.^[11,13,35]

2.1.2 Die Aktivierungskaskade der perizellulären Proteolyse

Die Serinprotease urokinaseartiger Plasminogen Aktivator (uPA) spielt bei der Aktivierung verschiedener EZM-abbauender Enzyme eine entscheidende Rolle, wie in Abbildung 3 gezeigt wird.^[36]

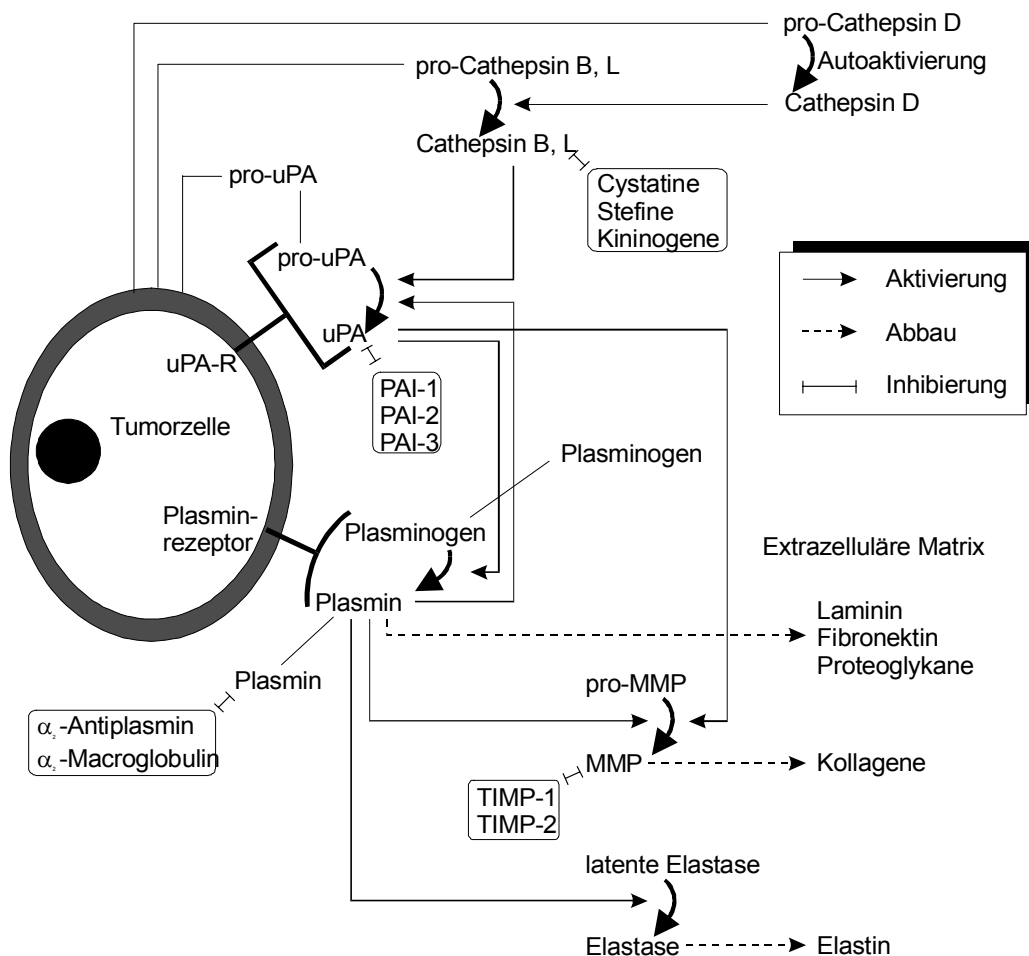


Abbildung 3: Die Aktivierungskaskade der perizellulären Proteolyse initiiert durch das zelloberflächengebundene uPA/uPAR-System.

Startpunkt der proteolytischen Kaskade ist die Aktivierung des Plasminogens, ein inaktiver Vorläufer des Plasmins, durch Spaltung der Amidbindung zwischen Arg⁵⁶⁰ und Val⁵⁶¹ durch uPA. Das entstehende Plasmin hat im Gegensatz zum uPA ein sehr breites Aktivitätsspektrum, spaltet fast alle wichtigen Komponenten der EZM (Fibrin, Fibronectin, Laminin) und aktiviert weitere matrixabbauende Proteasen wie MMP's und Elastase. Plasmin kommt im Gegensatz zu vielen anderen Proteasen neben der löslichen auch in rezeptorgebundener Form vor. Der zugehörige Rezeptor weist zwar eine relative geringe Affinität zum Plasmin auf, kommt dafür aber in großer Kopienzahl auf der Zelloberfläche vor. Das rezeptorgebundene Plasmin kann allerdings nicht wie die lösliche Form durch den natürlichen Inhibitor α_2 -Antiplasmin inhibiert werden, wodurch eine Fokussierung der proteolytischen Aktivität auf die Zelloberfläche erfolgt.^[37] Da rezeptorgebundenes Plasminogen außerdem von rezeptor-gebundenem uPA aktiviert werden kann, steht der Zelle ein Instrumentarium zur Verfügung, dass die proteolytische Aktivität selektiv auf der Zelloberfläche fokussiert, da der natürliche Inhibitor an dieser Stelle der Regelwerks wirkungslos ist. Darüber hinaus ist pro-uPA wiederum ein Substrat von Plasmin und anderen Serin- und Cysteinproteasen wie Kallikrein und Trypsin, bzw. Kathepsin B, D und L und führt somit durch eine Art positiver Rückkopplung zu einer Potenzierung der proteolytischen Aktivität auf der Zelloberfläche.

Durch die Anbindung von uPA und Plasmin an die zugehörigen Rezeptoren wird somit eine Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit erreicht, die um ein bis zwei Größenordnungen über den in Lösung beobachteten Geschwindigkeiten liegt^[38] und zwar sowohl bei der uPA-Aktivierung durch Plasmin als auch bei umgekehrten Aktivierung von Plasminogen durch uPA.

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, wurden für einige der anderen an der Proteolyse der EZM beteiligten Proteasen, ebenfalls einige natürliche Inhibitoren identifiziert, die entweder ubiquitär vorkommen oder wie die Proteasen selbst von Tumor- bzw. Stromazellen ausgeschieden werden. Zu diesen zählen neben dem bereits erwähnten α_2 -Antiplasmin noch das α_2 -Makroglobulin für Plasmin, Cystatine, Steffine und Kininogene für die Cysteinproteasen und TIMP-1 und -2 für die Matrix-Metalloproteinasen, auf deren Funktion hier aber nicht näher eingegangen werden soll.

Der urokinaseartige Plasminogenaktivator besitzt über seine proteolytische Aktivität innerhalb der Plasminogenaktivierungskaskade hinaus noch eine weitere Eigenschaft, die das Zellverhalten beeinflusst. Wie am Hepatozytenwachstumsfaktor HGF und makrophagenstimulierenden Protein MSP gezeigt wurde, kann uPA auch eine Reihe weiterer Wachstumsfaktoren aktivieren und dadurch die Proliferationsrate steigern. Dies konnte durch Zugabe von (enzymatisch aktivem!) uPA und nachfolgender Stimulation der Proliferation von epidermalen Tumorzellen gezeigt werden.^[39-41]

2.2 Das Urokinase-Urokinaserezeptorsystem

2.2.1 Die molekulare Struktur von uPA

Der urokinaseartige Plasminogen Aktivator wird in Form des 52 kDa schweren Proenzym pro-uPA von einer Vielzahl maligner und normaler Zellen als einkettiges und enzymatisch inaktives Protein exprimiert^[42]. Die räumliche Struktur des 411 Aminosäuren langen Proteins wird durch 12 Disulfidbrücken bestimmt und verfügt mit Asn³⁰² über eine Glycosylierungsstelle.

Das Proenzym lässt sich gemäß der Analyse des Proteins sowie seines zugehörigen Gens, in die drei in Abbildung 4 dargestellten Domänen unterteilen:

- Die N-terminale wachstumsfaktorähnliche Domäne GFD (*growth factor-like domain*) bestehend aus den Aminosäuren uPA₁₋₄₄ beinhaltet die Bindungsstelle für den uPA-Rezeptor und ist Teil des aminoterminalen Fragments uPA₁₋₁₃₅.^[43] Wie der Name schon andeutet, bestehen signifikante Sequenzhomologien zum epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) und zum transformierenden Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*, TGF- α).^[44,45] Trotz dieser Ähnlichkeit ist die Bindung des uPA-Rezeptors auf die GFD der Urokinase beschränkt, andere homologe Domänen zeigen keine Affinität zu uPAR.^[23] Darüber hinaus ist die Wechselwirkung GFD / uPAR artspezifisch, d.h. es ist keine Wechselwirkung zwischen uPA und uPAR verschiedener

Spezies zu beobachten.^[46] Die NMR-Struktur des Aminoterminalen Fragments (ATF: uPA₁₋₁₃₅) wurde von *Hansen et al.* bestimmt.^[47]

- Der Bereich uPA₄₅₋₁₃₅ wird als *kringle*-Domäne bezeichnet, ein hoch konserviertes Strukturmotiv, dass in einer Reihe an der Hämostase und der Fibrinolyse beteiligten Proteinen auftritt.^[48] Im Gegensatz zu den *kringle*-Domänen von tPA und Plasminogen besitzt die *kringle*-Domäne der Urokinase allerdings keine Fibrin-Bindungsaffinität, sondern bindet an das polyanionische Heparin.^[49]
- Die C-terminale Region uPA₁₃₆₋₄₁₁ bildet die enzymatisch aktive Region des Proteins mit den Resten His²⁰⁴, Asp²⁵⁵ und Ser³⁵⁶ als bekanntem Strukturmotiv einer Serin-Protease mit der katalytischen Triade^[50] und wurde im Komplex mit mehreren Inhibitoren röntgenkristallographisch charakterisiert.^[51,52]

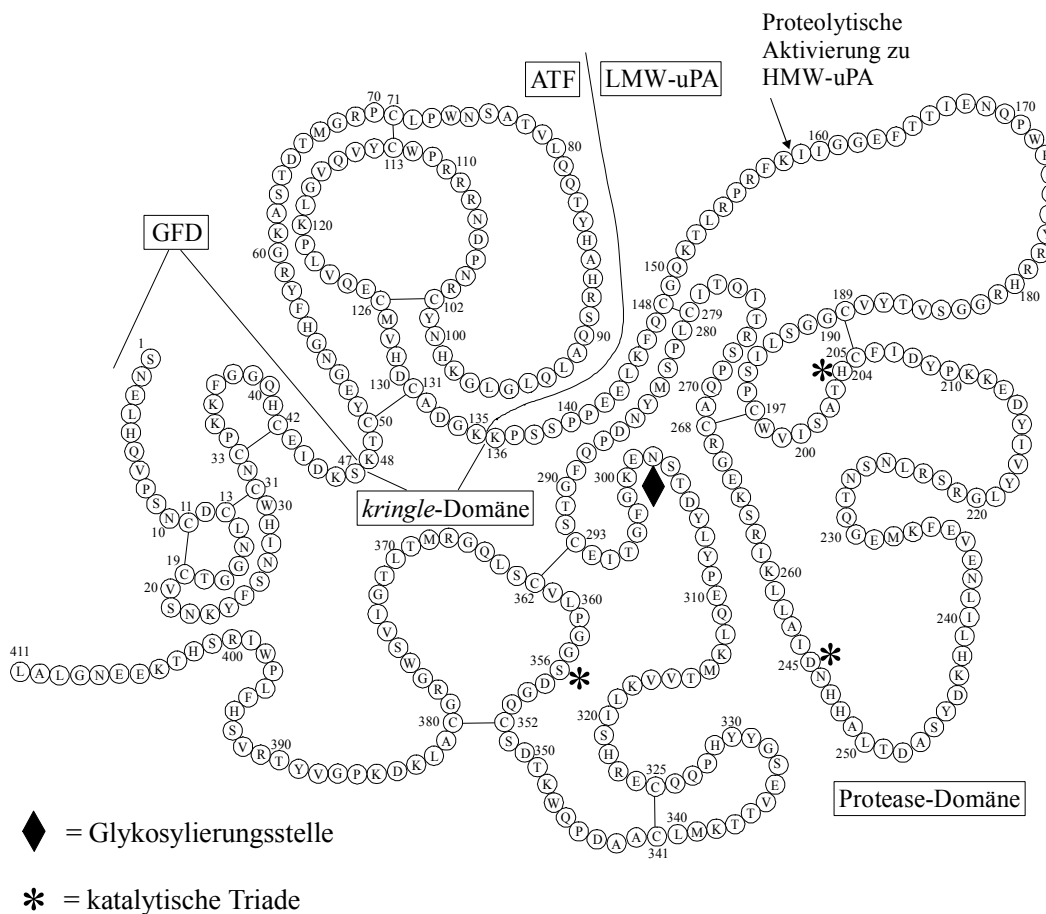


Abbildung 4: Primärstruktur und Domänenverteilung der Urokinase.

Das inaktive, einkettige pro-uPA wird durch proteolytische Spaltung der Peptidbindung zwischen Lys¹⁵⁸ und Ile¹⁵⁹ zum zweikettigen, enzymatisch aktiven HMW-uPA gespalten, dessen A- und (uPA₁₋₁₅₈) B-Kette (uPA₁₅₉₋₄₁₁) durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁴⁸ und Cys²⁷⁹ verknüpft ist. Durch die mit der Spaltung verbundene Konformationsänderung wird das enzymatisch aktive Zentrum exponiert, wodurch die aktive Form des uPA generiert wird. Diese proteolytische Spaltung kann durch Plasmin, Kallikrein, Kathepsin B/L, den Nerven-Wachstumsfaktor- γ oder Thrombin erfolgen, wodurch die Aktivierung eine positive Rückkopplung erfährt.^[53-56] Der so entstandene HMW-uPA kann durch limitierte Proteolyse zu ATF (uPA₁₋₁₃₅) und LMW-uPA (uPA₁₃₆₋₄₁₁) hydrolysiert werden, wobei beide Fragmente vollständige biologische Aktivität (Bindung an uPAR, bzw. proteolytische Aktivität) zeigen.^[57]

2.2.2 Der uPA-Rezeptor

Der Urokinaserezeptor uPAR (CD87) wurde erstmals 1985 auf differenzierten U-937 Leukämiezellen von *Vassilli et al.* entdeckt. Nachfolgend wurde dessen Existenz auf einer großen Zahl von malignen und nicht-malignen Zelltypen belegt.^[58,59] 1988 wurde uPAR von *Nielsen et al.* aus U-937 isoliert und von *Behrendt et al.* und *Ploug et al.* charakterisiert.^[60-63] Der Rezeptor bindet aktiven uPA, pro-uPA und die N-terminalen uPA-Domänen ATF und GFD mit hoher Affinität ($IC_{50} = 5-20$ nM je nach Domäne und Testmethode).^[64-66]

Der Urokinase-Rezeptor wird als ein 335 Aminosäuren enthaltendes Polypeptid sezerniert, das eine N-terminale Signalsequenz enthält und C-terminal einen 15-20 Aminosäuren langen hydrophoben Abschnitt besitzt, der über einen hydrophilen 5-10 Aminosäuren enthaltenden Spacer mit dem Protein verknüpft ist. Während des posttranslationalen *processing* wird zunächst im ER die Signalsequenz abgespalten und anschließend durch eine Transamidase der hydrophobe Teil abgespalten, während gleichzeitig der neu gebildete C-Terminus mit einer Glycolipidstruktur, dem GPI-Anker verbunden wird, wodurch der biologisch aktive Rezeptor entsteht (siehe Abbildung 5).^[62,67]

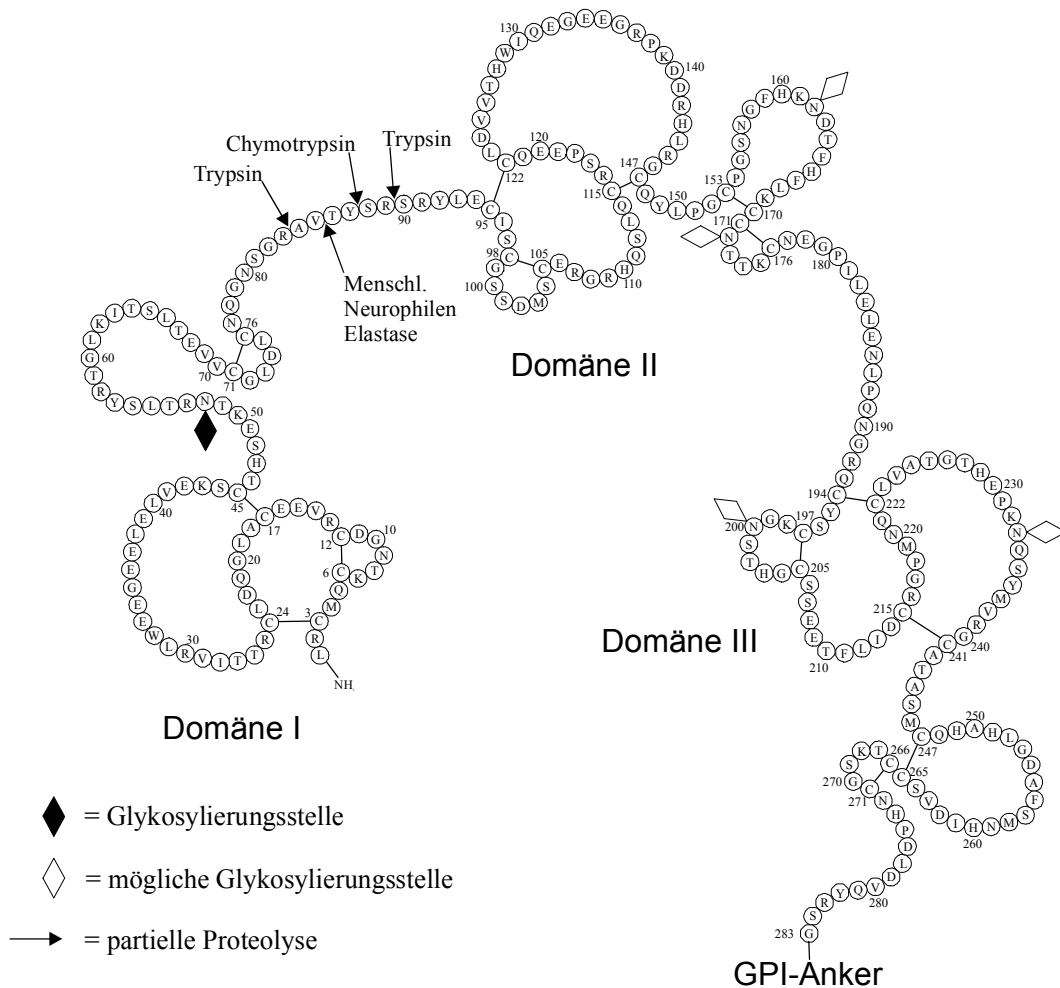


Abbildung 5: Sequenz und Domänenverteilung des prozessierten uPAR.

Der GPI-Anker besteht aus einer *core*-Struktur, die Ethanolamin, eine variable Sequenz aus verschiedenen Mannosen, *N*-Acetylglucosamin, Phosphatidylinositol und Diacylglycerol enthält (siehe Abbildung 6). Die Verknüpfung des GPI-Ankers erfolgt bevorzugt über Gly²⁸³, in geringerem Maß aber auch an Ala²⁸⁴ oder Ser²⁸². Eine Ablösung des Rezeptors von seiner Zellmembranverankerung kann durch Spaltung mittels der phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) erreicht werden.^[68,69] Die dadurch erhaltene lösliche Form des Rezeptors (suPAR) bindet ebenfalls an uPA und kommt in verschiedenen Varianten in konditioniertem Medium verschiedener Zelllinien und in den Körperflüssigkeiten von Krebspatienten vor. Für die Entstehung der verschiedenen Formen löslichen uPARs werden *differential splicing*,^[70-72] unspezifische Proteolyse und die oben beschriebene PI-PLC verantwortlich gemacht.

Der Proteinanteil des Rezeptors ist in Abhängigkeit von der exprimierenden Zelllinie zu ca. 30% glycosyliert, wobei ein Molekulargewicht von 45-55 kDa erreicht wird.^[73] Im Protein sind fünf potenzielle Glycosylierungsstellen vorhanden (siehe Abbildung 5), die genaue Art und Verteilung ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt; als gesichert gilt aber, dass Asn⁵² und mindestens ein weiteres Asn in der Kette glycosyliert vorliegen.^[73-75] Die Glycosylierung ist sowohl für den intrazellulären Transport als auch für die korrekte Faltung des Rezeptorproteins von großer Bedeutung und beeinflusst je nach Art und Ausmaß zusätzlich in einer Art Feinabstimmung die Affinität von uPAR zu uPA.^[76] So wird z.B. in einer Mutationsstudie nach Substitution von Asn⁵² gegen Gln⁵² ein deutlicher Verlust der Bindungsaffinität zu uPA beobachtet und nach vollständiger enzymatischer Deglycosylierung wird ein 35 kDa schweres Protein erhalten, das keinerlei Affinität mehr zu uPA aufweist.^[76]

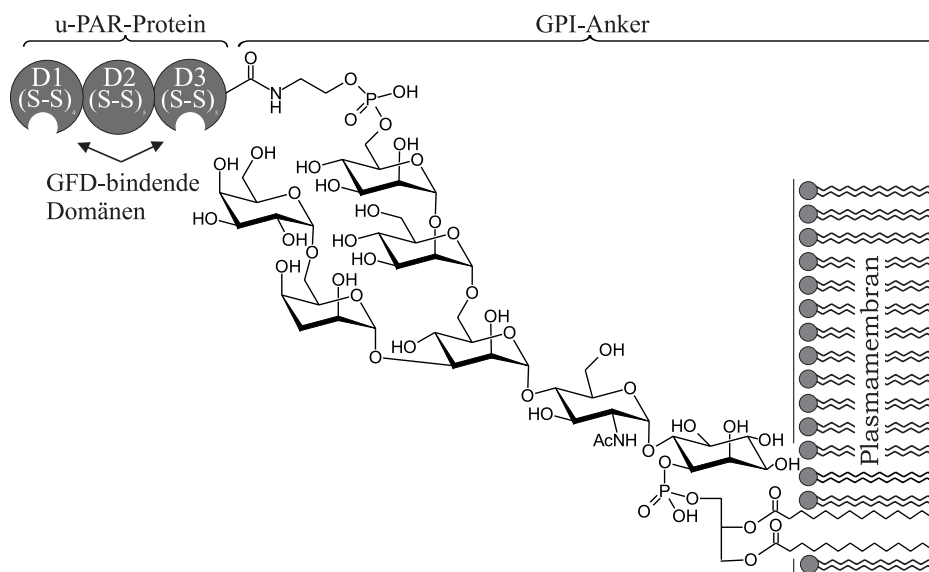


Abbildung 6: Molekulare Struktur des uPAR-GPI-Ankers.

Eine weiteres Charakteristikum des uPA-Rezeptors ist der hohe Cysteingehalt von ca. 10% im Proteinanteil. Reduktion der Disulfidbrücken führt wie im Fall der enzymatischen Deglycosylierung zu einem vollständigen Verlust der uPA-Bindungsaffinität.^[77] Aufgrund des charakteristischen Cysteinemusters der insgesamt 28 Cystein-Reste lässt sich der Rezeptor in drei strukturell homologe Domänen von

jeweils ca. 90 Aminosäureresten einteilen, die einzelnen Domänen zeigen untereinander aber keine Übereinstimmung (weniger als 20% Sequenzidentität) in der Primärstruktur.^[60,78] Ein Sequenzvergleich zwischen menschlichem, murinem und bovinem uPAR zeigt allerdings, dass die einzelnen Domänen zwischen verschiedenen Spezies sehr stark konserviert sind^[79] (mehr als 60% Sequenzidentität). Diese Bindungsdomänentheorie wird durch die Beobachtung gestützt, dass Chymotrypsin und andere Proteasen beim partiellen Verdau den Rezeptor bevorzugt an den Stellen in der Sequenz spalten, die die Domänen miteinander verbinden.^[60,80,81]

Das postulierte Domänenmuster zeigt darüber hinaus Ähnlichkeiten mit dem der Ly-6-Superfamilie^[82] zu denen auch die in Schlangengiften enthaltenen α -Neurotoxine,^[83,84] die glycolipidverankerten Eindomänen- (z.B. CD59,^[85] E48^[86] und Ly-6^[87]) und Zweidomänen-Membranproteine (z.B. Robo-1)^[88] gehören. Die mutmaßliche Ly-6 / uPAR-Domänenfamilie ist durch ein zentrales dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt charakterisiert, dessen Schleifenregionen eine Drei-Finger-Struktur ausbilden.^[89-91]

2.2.3 Bindung von uPA an uPAR

In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Domäne 1 des uPAR hauptsächlich für die Bindung von uPA verantwortlich ist. So zeigt einzig die isolierte Domäne 1 eine, allerdings hundertfach schwächere, Bindung an uPA (verglichen mit dem vollständigen Rezeptor).^[60] In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten verschiedene *Ala-scan* Mutanten in Domäne 1 einen kompletten Verlust der Bindungsaktivität. Punktmutationen zu Alanin an Arg⁵³, Leu⁵⁵, Tyr⁵⁷ und Leu⁶⁶ aber auch im Bereich uPA₂₋₁₀ bewirken einen starken Abfall der Bindungsaffinität zu uPA.^[92] Weiterhin wird Tyr⁵⁷ im Gegensatz zu den Resten Tyr^{87,92,149,195,236} in Nitrierungsexperimenten mit Tetranitromethan nur dann nicht modifiziert, wenn uPA gebunden ist. Im letzteren Fall wird analog bei uPA die Nitrierung von Tyr²⁴ verhindert, eine Beobachtung, die mit den Ergebnissen der *Ala-scans* für die uPAR-Antagonisten vom Typ uPA₁₉₋₃₁ und uPA₂₁₋₃₀ im Einklang steht.^[93]

Mit Hilfe von *crosslinking*- und Mutagenese-Experimenten konnten allerdings noch weitere Bindungsstellen identifiziert werden, die für die volle Bindungsaktivität des Rezeptors essentiell sind. So konnten *Ploug et al.* mittels *photoaffinity-crosslinking* zeigen, dass neben den bereits erwähnten Aminosäureresten Arg⁵³ und Leu⁶⁶ auch His²⁵¹ (Domäne 3) an der Ligand-Bindung beteiligt ist.^[94] In der Offenlegungsschrift eines Patentes aus dieser Arbeitsgruppe werden weitere Reste benannt, die für die Bindung von uPAR an synthetische Antagonisten verantwortlich gemacht werden.^[95] So zeigt sich, dass die Seitenketten von His²⁴⁹, Asp²⁵⁴ und Phe²⁵⁶ den mit Abstand größten Teil zur Bindungsenthalpie beitragen. Diese Ergebnisse sind für die Etablierung eines Mausmodells zum Zwecke von *in vivo* Tests synthetischer uPAR-Antagonisten von großer Bedeutung. Sequenzvergleiche mit uPAR anderer Spezies zeigen nämlich, dass der artspezifische Unterschied zwischen z.B. humanem und murinem uPAR einzig in der Mutation von eben diesem His²⁴⁹ (humaner uPAR) zu dem der Sequenz entsprechenden Gly²⁷² in Mäusen besteht. Da diese Position in allen anderen Spezies nicht konserviert ist, besteht theoretisch die Möglichkeit, durch Mutation Xaa-His an der entsprechenden Stelle einen transgenen Organismus zu klonieren, dessen Bindung an den natürlichen uPA unverändert bleiben sollte, aber durch humanspezifische Antagonisten verdrängt werden kann.

Darüber hinaus identifizierten *Mazar et al.* kürzlich ein nona-Epitop in Domäne 2, das ebenfalls für die Bindung von uPAR an uPA essentiell zu sein scheint.^[96] Neben den Hinweisen auf eine direkte Bindungsbeteiligung mehrerer diskontinuierlicher Epitope an der uPA-Bindung kommt natürlich auch ein möglicher struktureller Einfluss von Glycosyl- und Aminosäureresten auf die Bindungsaffinität in Frage. Untersuchungen in dieser Richtung sind allerdings sehr schwierig, da der hohe Glycosylierungsgrad des Rezeptors leider keine strukturellen Untersuchungen mittels NMR zulässt und ein Homologie-Modell für die Bindungsregion des uPA-Rezeptors auf der Basis des mittels Kristallstruktur charakterisierten κ -Bungarotoxins (Untergruppe der α -Neurotoxine) zu keinem verwertbaren Ergebnis führt.^[97]

Neben uPA bindet uPAR auch Vitronectin^[98,99] in subnanomolaren Konzentrationen, wobei die Affinität durch Bindung von pro-uPA, uPA, ATF und den uPA-PAI-1-Komplex gesteigert, umgekehrt aber durch PAI-1 alleine inhibiert wird (siehe folgendes Kapitel). Weiterhin bindet uPAR an β_2 -Integrine und scheint auch mit β_1 -

und β_3 -Integrinen zu assoziieren, worauf im Kapitel Integrine und Signaltransduktion genauer eingegangen wird.

2.2.4 Die natürlichen uPA-Inhibitoren PAI-1 und -2

Wie bereits im Kapitel über die Aktivierungskaskade der perizellulären Proteolyse erwähnt, spielt die Bindung von uPA an uPAR eine wichtige Rolle für das Ausmaß der proteolytischen Aktivierung von Plasminogen und die Fokussierung der proteolytischen Aktivität auf die Zelloberfläche. Die Aktivierung von Plasminogen durch uPA wird physiologisch durch die Inhibitoren PAI-1, PAI-2, Protease-Nexin-1 (PN-1) und Protein C Inhibitor (PCI) kontrolliert.^[10,100,101] Diese weisen untereinander starke Sequenzhomologien auf und gehören zur Familie der Serpine (Serinprotease-Inhibitoren), wobei PAI-1 und -2 eine deutlich erhöhte Inhibition von uPA im Vergleich zu PN-1 und PCI aufweisen. PAI-1 und PAI-2 binden sowohl an freien als auch rezeptorgebundenen uPA.^[102,103]

Bei PAI-1 handelt es sich um ein einkettiges Glycoprotein mit einer Masse von etwa 50 kDa, das in seiner biologisch aktiven Form von Endothelzellen, Blutplättchen und verschiedenen Tumorzellen sezerniert wird.^[104] Dieses ist metastabil und geht spontan in eine latente, inaktive Konformation über,^[105] *in vivo* wird die biologisch aktive Form allerdings durch Bindung an Vitronectin stabilisiert, bzw. die latente Form in die aktive überführt.^[106,107] Umgekehrt beeinflusst die Bindung von PAI-1 an Matrix- oder Plasma-Vitronectin aber nicht dessen Adhäsionseigenschaften.^[108]

Aktives PAI-1 inhibiert uPA (in geringerem Maß auch tPA, LMW-uPA, HMW-uPA, und Plasmin) indem es über einen dem Substrat entsprechenden (*bait* Sequenz), etwa 20 Aminosäuren langen Abschnitt (*RCL-loop*) einen 1:1 Komplex mit uPA bildet (siehe Abbildung 7).

Dabei wird der Peptidstrang gespalten und der *C*-Terminus als Ester auf das Serin der katalytischen Triade übertragen,^[110] während sich der entstandene freie *N*-terminale Strang als Teil eines β -Faltblattes im Protein umorientiert und so zusammen mit

anderen konformationellen Änderungen (*flexible-joints* Regionen an den Enden der Helices D und E) den Protease-Inhibitor Komplex stabilisiert.^[111]

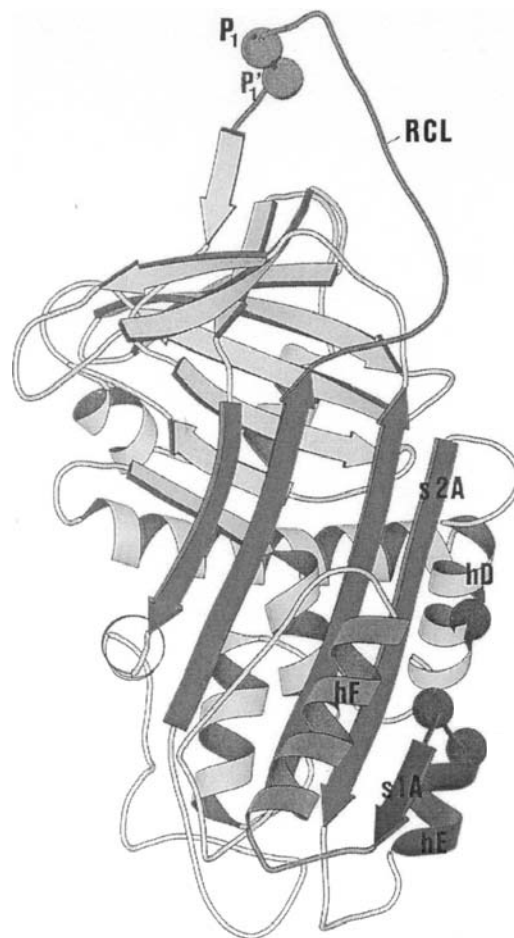


Abbildung 7: Modell der dreidimensionalen Struktur des aktiven PAI-1 von Aegeerts et al.^[109] P1 und P'1 markieren die Spaltstellen durch uPA. Der freiwerdende RCL-loop lagert sich als vierter Strang an die Region von β -Strang s2 an, während die Regionen um Helix D (hD) und Helix E (hE) weitere Umorientierung erfahren. An der Bindung von Vitronectin sind Helix E (hE), Helix F (hF) und β -Strang 1A beteiligt.

Dieser Komplex bindet im Gegensatz zu PAI-1 nicht an Vitronectin. Die dreidimensionale Struktur des uPA-PAI-1-Komplexes wurde bis heute nicht gelöst, allerdings scheint eine Kristallstruktur von latentem PAI-1 den postulierten Reaktionsmechanismus zu stützen, da im Fall des inaktiven Inhibitors der reaktive RCL-loop im Inneren des Moleküls verborgen ist.^[111-114]

PAI-2 kommt in Form eines 47 kDa schweren intrazellulären Proteins und als glykosyliertes, extrazelluläres, 60 kDa schweres Glycoprotein vor, das von Phagozyten und in Tumorzellen produziert wird.^[115,116] PAI-2 zeichnet sich gegenüber PAI-1 durch eine deutlich größere Stabilität aus und bindet ebenfalls überwiegend uPA in Form eines 1:1 Inhibitor-Protease-Komplexes.^[117] PN-1 dagegen ist ein unspezifischer Proteaseinhibitor, der uPA, Plasmin, Thrombin und Trypsin inhibiert, wobei die Proteasespezifität über extrazelluläre Matrixkomponenten wie Kollagene reguliert wird.^[118]

Im Anschluss an die Bildung der ternären Komplexe aus uPA/uPAR/PAI-1, uPA/uPAR/PAI-2 oder uPA/uPAR/PN-1 erfolgt die Anlagerung z.B. an den α_2 -Makroglobulin-Rezeptor (α_2 -MR)^[119] oder das epithelische Glycoprotein gp330.^[120,121] Diese gehören zu einer Familie sogenannter *low-density lipoprotein receptors* (LDLR) von denen in Säugetieren sechs Mitglieder bekannt sind und die allgemein an der Internalisierung von Lipoproteinen und anderer Proteinase/Inhibitor-Komplexe beteiligt sind. Sowohl uPA als auch uPAR besitzen Bindungsstellen für beide Rezeptoren.^[122] Diese Komplexbildung aus z.B. uPA/uPAR/PAI-1/ α_2 -MR und sieben bis acht weiteren Einheiten der Endocytoserezeptoren LDLR, VLDLR, apoER2, LR8B, α_2 -MR und gp330 führt zur Internalisierung des supramolekularen Komplexes und anschließendem Abbau im Cytoplasma, wobei die freien Rezeptoren nach der Exocytose wieder auf der Oberfläche präsentiert werden.

2.2.5 Weitere Liganden für uPAR

2.2.5.1 Direkter Einfluss von uPAR auf die Zelladhäsion

Neben dem bereits erwähnten uPA und den oben beschriebenen Endocytoserezeptoren der LDLR-Familie existieren noch weitere Proteinliganden für uPAR, nämlich das Matrixprotein Vitronectin (VN), Kininogen und einige α -Ketten bestimmter Integrine.^[123] Diese Liganden sind multifunktionelle Faktoren mit überlappenden

Aktivitäten in der perizellulären Proteolyse, Zellwanderung, Wundheilung und bei Entzündungen.

Wie bereits im Kapitel 2.1 erwähnt, sind die Fähigkeit zur Durchdringung der EZM und der späteren Anheftung an Zelloberflächen fundamentale Eigenschaften maligner und anderer migrierender Zellen. Bis vor kurzem waren diese Gebiete der Protease- und Integrininhibition zwar intensiv bearbeitete, aber noch voneinander getrennte Bereiche in der Krebsforschung. Die Entdeckung, dass die proteolytische Aktivität von Zellen entweder auf die fokalen Adhäsionspunkte oder auf den Apex der betreffenden Zellen konzentriert ist,^[124] scheint eine Erklärung darin zu finden, dass der uPA-Rezeptor eine hohe Bindungsaffinität im unteren nanomolaren Bereich zu dem im Gefäß-Endothelgewebe vorkommenden Vitronectin aufweist.^[125-128] Gleichzeitig stellt ein Ausschnitt aus diesem Protein, die Arg-Gly-Asp- (RGD) Sequenz, aber auch das Bindungsepitop für eine Gruppe der Integrine (siehe nächstes Kapitel) dar, die als oberflächengebundene Transmembranproteine für die Zelladhäsion und Signaltransduktion verantwortlich sind.^[98,129] Die Bindung des uPAR an Vitronectin ist nicht von der allgemeinen Zellerkennungssequenz RGD abhängig, benötigt keine bivalenten Kationen zur Komplexstabilisierung, zeigt keine Homologien zu uPA und erfolgt auch nicht an der bereits beschriebenen uPA-Bindungsstelle. Über die VN-Bindungsstelle von uPAR gibt es wie im Fall der uPA/uPAR Wechselwirkung widersprüchliche Befunde: sowohl die Domänen I und II alleine,^[125,130] als auch die Domänen II und III zusammen werden für die Bindung an Vitronectin verantwortlich gemacht.^[127] Da Vitronectin an den fokalen Adhäsionspunkten in hoher Konzentration nachgewiesen werden kann,^[131] erfolgt die Konzentration der proteolytischen Aktivität vermutlich über eben diese Bindung von uPAR an Vitronectin.^[132,133] Diese Bindung kann durch die Zugabe von uPA, bzw. einer uPAR-bindenden Domäne wie ATF noch gesteigert werden, was durch eine Konformationsänderung des uPAR und einer nachfolgend veränderten Affinität für Vitronectin erklärt wird.^[134] Umgekehrt kann aktiver PAI-1 diese Wechselwirkung inhibieren, da PAI-1 wie uPAR mit hoher Affinität an die Somatomedin B Domäne von Vitronectin bindet, welche auch in unmittelbarer Nähe der α_v -Integrin-Bindungsstelle liegt.^[99,135] Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass PAI-1 *in vivo* als Angiogeneseinhibitor agiert.^[136] Diese Konkurrenzsituation um VN führt zu folgendem Bild.^[137]

- In Fällen, in denen ein Überschuss von uPA im Vergleich zu PAI-1 vorliegt, wird die Bindung des uPA/uPAR-Komplexes an VN stark erhöht. Gleichzeitig führt aber die durch uPA erhöhte proteolytische Plasminaktivität wieder zu einer verstärkten Ablösung des uPA-Rezeptors von VN.
- Liegt dagegen PAI-1 im Überschuss vor, so kommt es aufgrund der Konkurrenz von uPAR und PAI-1 um VN zu einer Ablösung des uPA-Rezeptors von VN und damit zu einer stark eingeschränkten uPAR/VN-vermittelten Adhäsion.

Diese Daten stehen im Einklang mit dem Postulat, dass PAI-1 eine anti-adhäsive Rolle im interzellulären Geschehen spielt (siehe uPA/uPAR bei der Tumorprognose).

Im Gegensatz zu der Integrin-vermittelten Adhäsion (direkte Verbindung von Rezeptor und Cytoskelett!) ist aufgrund des GPI-Ankers diese Form der Zellbindung via uPAR/VN allerdings nicht resistent gegen mechanische Beanspruchung.^[138] Die Beobachtung, dass die multimere Form von VN ein bevorzugter Ligand für uPAR ist, stützt aber die Hypothese, dass durch das Clustering von Ligand (VN) und Rezeptor (uPAR, uPA/uPAR) die Zelladhäsion zumindest zeitweise gewährleistet ist.^[125]

2.2.5.2 Indirekter Einfluss von uPAR auf die Zelladhäsion und Signaltransduktion durch Wechselwirkung mit Integrinen

2.2.5.2.1 Integrinvermittelte Zelladhäsion und Signaltransduktion

Die Assoziation von Integrinen mit Corezeptoren oder anderen Membranproteinen erlaubt die Regulation von Ligandenbindung bzw. Signalkaskaden und kontrolliert die Integrin-Internalisierung. Neben den Integrin-assoziierten Membranproteinen (z.B. CD47 und CD98)^[139] konnten auch einige GPI-verankerte Membranproteine wie uPAR, CD14 und CD59 als Bindungspartner für Integrine in verschiedenen Zelltypen identifiziert werden.^[140] Diese Funktion der Integrine als Adaptermoleküle für GPI-verankerte Oberflächenproteine ermöglicht letzteren trotz fehlender

Transmembrandomäne eine Teilnahme an der Signalweiterleitung ins Innere der Zelle und wurde schon seit geraumer Zeit postuliert.^[141]

Bei der Familie der Integrine handelt es sich um transmembrane Oberflächenproteine, die an der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, der Regulierung von entzündlichen Prozessen, der Immunabwehr und der Tumorprogression (z.B. Neoangiogenese) teilnehmen. Die Integrine gehen erst nach einer Aktivierung durch Bindung eines Liganden oder ein zelluläres Signal in einen aktivierten Zustand über, der sie in Lage versetzt, an der Adhäsion teilzunehmen.^[142] Zahlreiche Beobachtungen, dass uPAR mit verschiedenen Integrin-Typen interagiert (bisher eindeutig nachgewiesen: $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$)^[142-150] und umgekehrt die Inhibition oder proteolytische Ablösung von uPAR an der Oberfläche zu einem Funktionsverlust der betreffenden Integrine führt, deuten auf eine weitere indirekte Funktionalität des uPAR im Zusammenhang mit der Zelladhäsion und Signaltransduktion hin (siehe Abbildung 8).

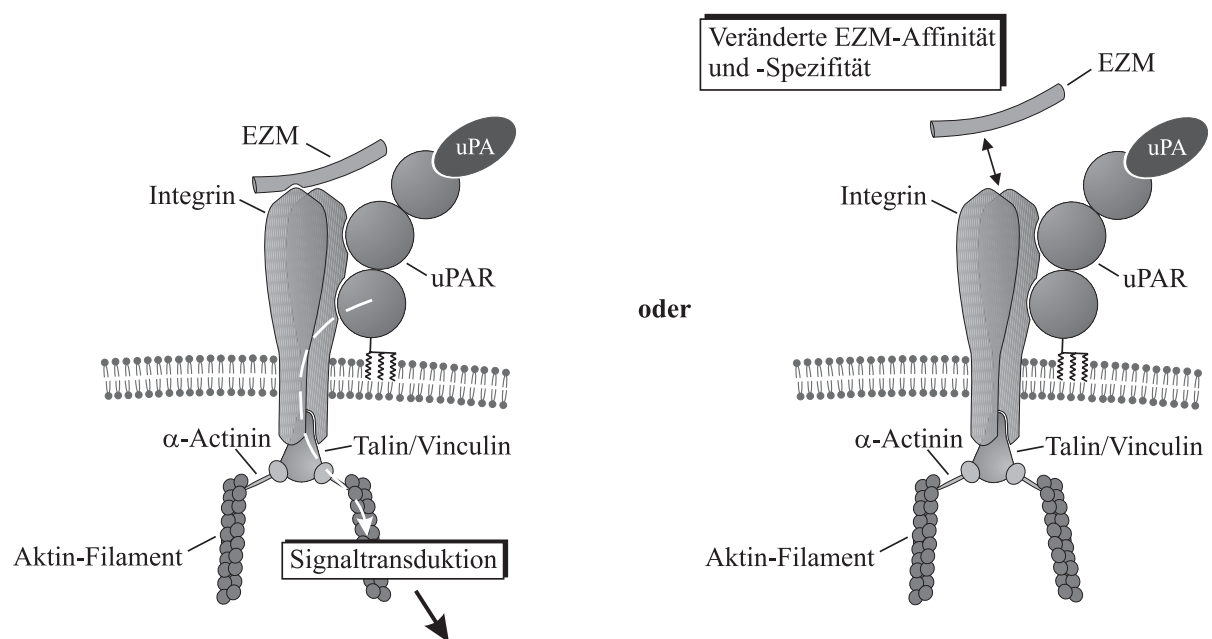


Abbildung 8: Mögliche Effekte durch Bindung von uPAR an Integrine. Als Folge der Komplexbildung von uPAR mit Integrinen kann durch Konformationsänderung entweder eine Signaltransduktion in das Zellinnere erfolgen oder aber die Affinität und/oder Spezifität für die EZM verändert werden.

Die Integrin-uPAR-Wechselwirkungen erlauben dem GPI-gebundenen uPAR trotz seiner fehlenden Transmembrandomäne eine Teilnahme an der Regulation von Adhäsion, Migration und Signaltransduktion in bestimmten Zellen. Eine Beeinflussung der Ligandaffinität von Integrinen konnten z.B. *Chapman et al.* an embryonalen 293-Nierenzellen nachweisen.^[127,151] Durch die Induktion einer Überexpression von uPAR wird die Zelladhäsion an Fibronectin unterdrückt, während gleichzeitig eine verstärkte Affinität für Vitronectin auftritt. Nachfolgende proteolytische Entfernung des uPAR von der Zelloberfläche mittels der bereits beschriebenen phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C führt wieder zu einer Adhäsion an Fibronectin.

Darüber hinaus konnten kürzlich *Chapman et al.* mittels *phage display* das Peptidfragment M25 identifizieren,^[147] das

- homolog zu einem Abschnitt des β_2 -Integrins Mac-1 ist,
- an uPAR bindet,
- die Ligandenbindung von Mac-1 nicht beeinflusst, trotzdem die Adhäsion von Leukocyten an Fibrinogen und Vitronectin im mikromolaren Bereich inhibiert,
- die Assoziation von uPAR und β_1 -Integrinen inhibiert
- und die β_1 -Integrin-abhängige Migration von humanen, glatten Muskelzellen auf Fibronectin und Collagen inhibiert.

Diese Beobachtungen belegen eindeutig eine direkte Wechselwirkung von uPAR mit verschiedenen Integrintypen und eröffnen darüber hinaus einen weiteren Weg, die Wechselwirkung von uPAR und Integrinen genauer zu untersuchen, bzw. zu modulieren.

2.2.5.2.2 Weitere Komponenten im ‚uPAR-Integrin-Signalosom‘

Neben der im vorherigen Kapitel beschriebenen Art der Signalinduktion existieren weitere Wege der Integrin-vermittelten Signalinduktion. Seit längerem ist bekannt,

dass Leukozyten im Gegensatz zu den adherierenden Epithelzellen keine Cholesterolbindenden Proteine wie Caveolin exprimieren und dadurch bedingt deutliche Unterschiede im Assoziationsverhalten von uPAR an Integrine in diesen Zellen zeigen.^[152] Hohe Expressionsraten von Caveolin und aktivierten Integrinen führen in metastatischen Tumorzellen und Makrophagen zu gesteigerter Zellwanderung, während niedrige Raten von Caveolin zu einer direkten uPAR/VN-vermittelten Zelladhäsion führen bzw. zu einer uPAR-vermittelten β_2 -Integrinaktivierung.^[153,154] Die Caveolin-Oligomerisierung kann die lokale Konzentration von Src-Verwandten und Tyrosin Kinasen beeinflussen und auf diesem Weg dynamisch deren Aktivität regulieren. Durch zelluläre Aktivierung oder durch Bindung von uPAR- bzw. Integrinliganden bestimmen also voneinander unabhängige, funktionale Komplexe über das Migrationsverhalten der Zellen. Entsprechend führt die Unterbrechung der Wechselwirkungen im uPAR- β_1 -Integrin-Caveolin-Komplex durch spezifische Inhibition zu einer veränderten Assoziation mit den Src-Kinasen und daraus resultierend zu einer Veränderung des Ligand-induzierten Signals. Kürzlich konnten *Chapman et al.* zeigen, dass uPAR einen molekularen Adapter für Integrine und die Cholesterol-bindenden Proteine wie z.B. Caveolin darstellt^[152,155] (siehe Abbildung 9). Neben der im Fall von uPAR, Integrinen und Caveolin eindeutig nachgewiesenen Wechselwirkung gibt es zahlreiche weitere Hinweise auf an diesem *clustering* beteiligte Proteine. Dabei konnten durch Coimmunopräzipitation z.B. neben den bereits erwähnten nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen der Src-Familie auch mehrere G-Proteine und das Transmembranglycoprotein gp130 identifiziert werden, das wiederum als Adapter für weitere GPI-verankerte Proteine wie Rezeptoren für die Janus Kinase (JAK) und die Familie der Signaltransduktoren und -aktivatoren der Transkription (STAT) fungiert. Dies führt zur Aktivierung des gleichnamigen JAK/STAT-Signalwegs, wobei einige Faktoren auch direkt an uPAR binden.^[123] Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass alle Proteine entweder lipidverankert oder zumindest lipidassoziiert sind,^[156] was eine direkte Beteiligung an der Bildung der sogenannten *lipid rafts* (in Detergentien unlösliche Membran-Protein-Komplexe von ca. 70-300 nm Durchmesser, die ca. 15 Proteine enthalten und diesen eine räumliche Nähe über einen Zeitraum von 7-9 Sekunden ermöglichen) nahelegt. Dieser Befund wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass Membranlipide eine

Rolle bei der Modulation der integrinvermittelten Signalweiterleitung spielen.^[157] Die räumliche Nähe der o. g. Proteine untereinander löst dann weitere Signalkaskaden, wie z.B. die direkte JAK/STAT-Phosphorylierung aus (s. o.), bzw. moduliert, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, die Funktion der Integrine und deren Signalweiterleitung in das Zellinnere (siehe Abbildung 9).

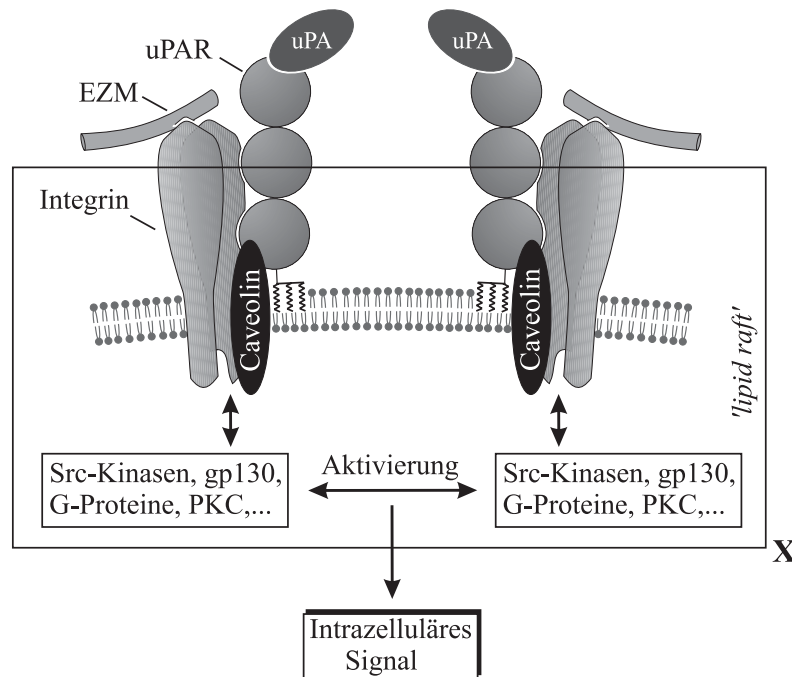


Abbildung 9: Signaltransduktion in lipid rafts durch das clustering von Integrinen, uPA, uPAR, Caveolin und anderen membranassoziierten Proteinen. Die räumliche Nähe der gezeigten Proteine löst weitverzweigte Signalkaskaden in der Zelle aus, wobei die direkte Beteiligung des Caveolins als Adaptermolekül eindeutig belegt werden konnte. Die Rolle der übrigen Proteine in diesem ‚uPAR-Signalosom‘ ist nach wie vor nicht detailliert geklärt.

2.2.6 Das uPA/uPAR-System bei der Tumorprognose

Im Rahmen einer Tumorthherapie kommt der Risikoabschätzung einer Neuerkrankung nach einer chirurgischen Entfernung eines Karzinoms große Bedeutung zu. Auf ihrer

Grundlage findet die Entscheidung für eine weitere Nachbehandlung statt (Chemotherapie oder Bestrahlung) und dient so zur Minimierung der Belastung für den Patienten bei größtmöglichem therapeutischen Erfolg. Um das Risiko einer Fehleinschätzung und den damit verbundenen negativen Folgen für den Patienten zu minimieren, bedarf es eines möglichst zuverlässigen Testsystems mit dessen Hilfe die Rezidivwahrscheinlichkeit möglichst genau und einfach zu ermitteln ist.

Nach der Entdeckung des Enzyms uPA durch *White et al.* 1966^[158] stieg das Interesse an diesem Enzymsystem 1976 stark an, nachdem *Åstedt et al.* beobachteten, dass uPA von Zellen des menschlichen Ovarialkarzinoms stark überexprimiert wird.^[159]

Genauere Untersuchungen haben ergeben, dass nach der operativen Entfernung von verschiedenen Tumorarten hohe Werte von uPA mit einer geringen Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert sind, was aufgrund der bereits ausführlich geschilderten Bedeutung des proteolytischen Systems uPA/uPAR durchaus verständlich ist.^[13] Eine ähnliche prognostische Aussagekraft findet sich überraschenderweise auch für den natürlichen Urokinaseinhibitor PAI-1, wobei dieser zusammen mit uPA (s.u.) den größten prognostischen Wert aufweist.^[160]

Diese letzte, auf den ersten Blick widersprüchliche Entdeckung wird durch folgende mögliche Theorien erklärt:^[23]

- Hohe Konzentrationen von PAI-1 führt durch Bindung an uPA zu Internalisierung des PAI-1/uPA/uPAR-Komplexes, was gleichzeitig zu einer gesteigerten Zellproliferation führt.
- Die Inhibition der proteolytischen Aktivität durch PAI-1 ermöglicht der Zelle eine bessere Anheftung an die EZM.
- Wie bereits im Abschnitt über den Einfluss von uPAR auf die Zelladhäsion geschildert, führt die Konkurrenz zwischen uPAR und PAI-1 um Vitronectin zu einer verringerten uPAR/VN-vermittelten Zelladhäsion.

In einer aktuellen Studie von *Foekens et al.* konnte in einer Gruppe von 2780 Brustkrebspatientinnen der prognostische Wert von uPA und PAI-1 eindrucksvoll belegt werden.^[161] Durch Entwicklung eines grundlegenden Modells, das Informationen wie Alter, menopausalen Status, Tumorgröße(n) und -grad,

Lymphknotenstatus, unterstützende Therapie, Steroidhormon-Rezeptorstatus und andere Faktoren berücksichtigt, konnten uPA, PAI-1 und PAI-2 (,inverse' Prognose im Vergleich zu uPA und PAI-1!)^[162,163] als voneinander unabhängige Marker für die individuelle Überlebens- und Rezidivwahrscheinlichkeit etabliert werden, während uPAR im Gegensatz zu anderen Studien^[164,165] so gut wie keine Beiträge zur Voraussage liefert.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Bemühungen der letzten Jahre, neue Marker für die Prognose der rezidivfreien, bzw. Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit soliden Tumoren zu identifizieren erfolgreich durchgeführt werden konnte und die entsprechenden FACS-, ELISA- und immunohistochemischen Testsysteme schon in naher Zukunft zum Standardarsenal bei der Entwicklung individueller Tumorthérapien gehören werden.

2.2.7 Inhibition des uPA/uPAR-Systems als Ansatz für die Tumorthherapie

Aus den bisher beschriebenen Zusammenhängen ergeben sich neben der Anwendung der an dem uPA/uPAR/PAI-1-System beteiligten Proteine als prognostische Marker mehrere mögliche Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapeutika für die Krebstherapie. Dazu gehören folgende, in Abbildung 10 dargestellte Strategien:

- Selektive Inhibierung des enzymatischen Zentrums der Serinprotease uPA.
- Einsatz von uPA- bzw. uPAR-Antagonisten, die die Bindung von uPA an uPAR verhindern.
- Unterdrückung der Expression der an dem proteolytischen System beteiligten Proteine durch *antisense*-Strategie bzw. individuelle Gentherapie zur Eliminierung der an der Expression der proteolytischen Faktoren beteiligten Gene.

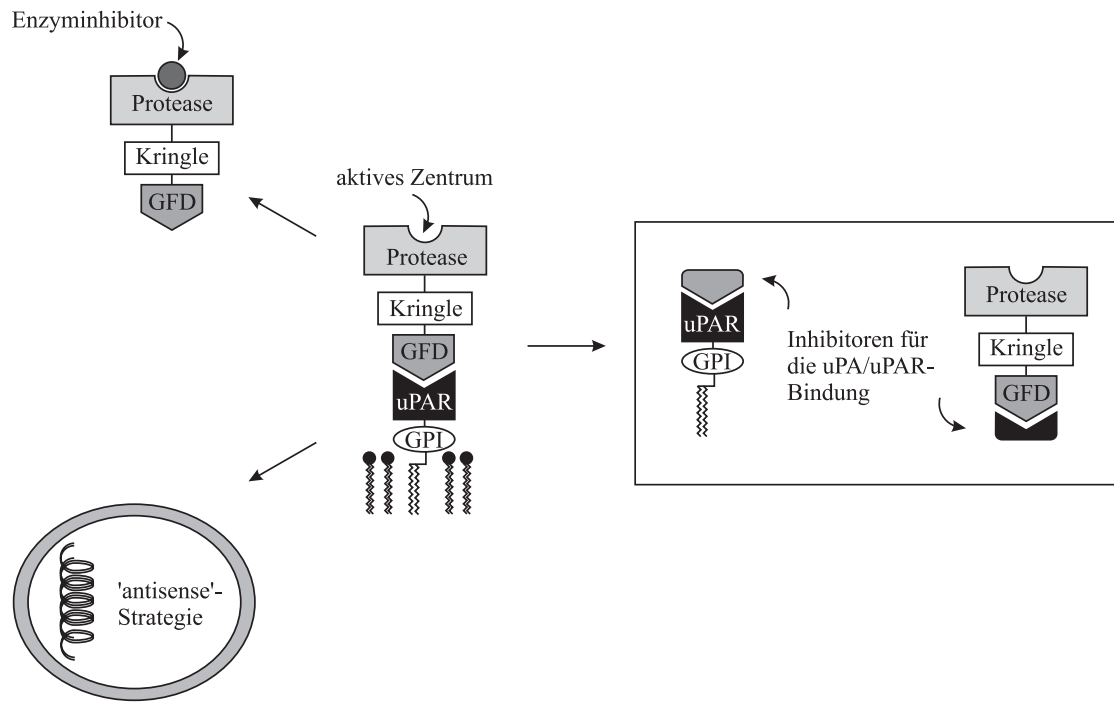


Abbildung 10: Grundsätzliche Strategien für die Entwicklung von Therapeutika im uPA/uPAR-System.

Zahlreiche zellbiologische Studien zeigen, dass dem zellassoziierten Plasminogenaktivator-System in der tumorassoziierten Proteolyse eine besondere Bedeutung zukommt. So hängt z.B. die Fähigkeit humaner Kolonkarzinomzellen eine Matrigelmatrix zu durchwandern vom Sättigungsgrad der Oberflächen-uPAR mit uPA ab^[166] und umgekehrt führt die Blockierung des uPAR mit enzymatisch inaktivem uPA zu einer Reduktion des invasiven Potentials.^[167,168] Neben vielen weiteren *in vitro*-Studien konnte ein *proof-of-principle* auch in einigen Tiermodellen erbracht werden. So kann z.B. durch Gabe von Antikörpern gegen uPA die Bildung von Lungenmetastasen in Hühnerembryos fast vollständig verhindert werden und verschiedene Ansätze der Translationsinhibition führen ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der Metastasierung in Mäusen.^[169-172]

Von den in Abbildung 10 dargestellten Möglichkeiten sind alle mit mehr oder weniger großen Nachteilen verbunden. So ist die Nukleotid-basierende Methodik noch nicht ausgereift, insbesondere der Transport zum Wirkort bzw. potenzielle immunologische Komplikationen stellen nach wie vor gravierende Probleme dar. Die Inhibition des katalytischen Zentrums scheint zwar der schnellste Weg zu einem oral bioverfügbaren

Wirkstoff zu sein, allerdings ist die Frage der *target*-Spezifität von sehr großer Bedeutung. Da eine große Zahl von Serinproteasen essentielle Aufgaben im Körper übernehmen (z.B. Blutgerinnung und andere Aktivierungskaskaden), kann die ungewollte Blockierung des enzymatischen Zentrums einer anderen Serinprotease dramatische Auswirkungen auf den Organismus haben. Anlass zur Hoffnung geben allerdings detaillierte Einsichten in den Bindungsmodus von zahlreichen Substrat- und Inhibitormolekülen, was mittlerweile zu relativ selektiven, nichtpeptidischen Inhibitoren geführt hat oder ausgehend von neuen Substratpeptidsequenzen zu selektiven peptidomimetischen Inhibitoren führte (siehe Abbildung 11).^[173-175] Die beiden von *Moroder et al.* identifizierten Inhibitoren **1** und **WX-293T** zeigen eine mehr als 600fach stärkere Bindung an uPA als gegenüber den Serinproteasen Plasmin, Thrombin, Faktor Xa (Gerinnungskaskade) und tPA,^[52] während **2** zwar schon biologische Aktivitäten im unteren nanomolaren Bereich aufweist, aber mit einem Faktor von 100 eine relativ schlechten Selektivität gegenüber Plasmin aufweist.^[176]

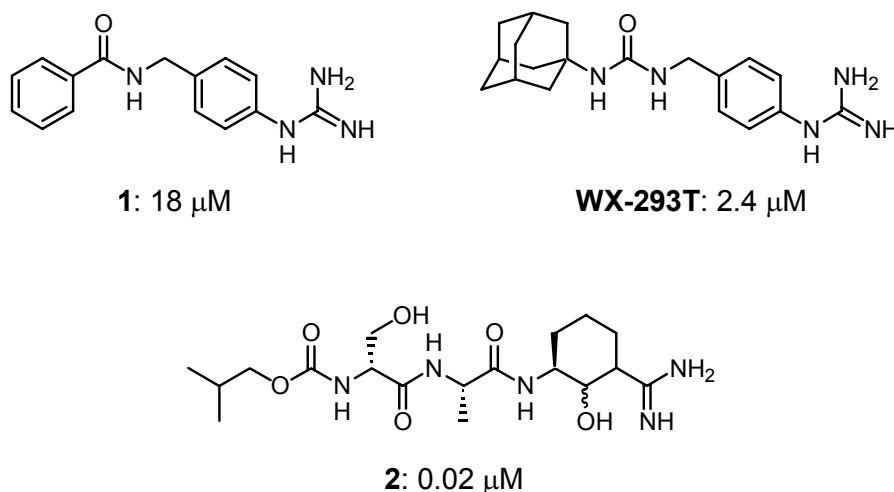


Abbildung 11: Niedermolekulare Proteaseinhibitoren für uPA.

Zu der zweiten erwähnten Strategie zur Inhibition des uPA/uPAR-System gehören neben den nachfolgend beschriebenen uPA/uPAR-Antagonisten (siehe Abbildung 12) auch solche Verbindungen, die weitere an dem uPA/uPAR-'Signalosom' beteiligte Proteine und deren Wechselwirkungen inhibieren. So wurden z.B. Peptide

identifiziert, die die Wechselwirkung von uPAR und Integrinen^[147] oder die Bindung von PAI-1 an uPA inhibieren.^[177,178]

Der vielleicht aussichtsreichste Ansatz zur Inhibition der uPA/uPAR-Wechselwirkung basiert auf der Sequenz der Wachstumsfaktordomäne (GFD) von uPA, auch wenn inzwischen von der Firma *Ångstrom Pharmaceuticals* eine nicht-GFD Peptidsequenz **Å6** gefunden wurde, die die Bindung von uPA an uPAR im nanomolaren Bereich inhibiert (Abbildung 12).^[179] So konnten *Rosenberg et al.* mittels *phage display* die 'Klon20' Peptidsequenz identifizieren,^[180] die von *Ploug et al.* zu dem in Abbildung 12 dargestellten **AE68** und weiteren optimierten Verbindungen weiterentwickelt werden konnte und mit hoher Affinität im unteren nanomolaren Bereich spezifisch an humanen uPAR binden (Abbildung 12).^[94,95] Unabhängig davon wurde in unserem Arbeitskreis das Bindungsepitop von ATF von *M. Koppitz* auf den Bereich um uPA₁₉₋₃₁ eingeschränkt und von *M. Bürgele* zu den 13meren **3** und **4** und dem 10mer Peptid *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ **5** weiterentwickelt, die ebenfalls im unteren nanomolaren Bereich an uPAR binden, bzw. die uPA/uPAR-Wechselwirkung inhibieren (Abbildung 12).^[9,14,181,182]

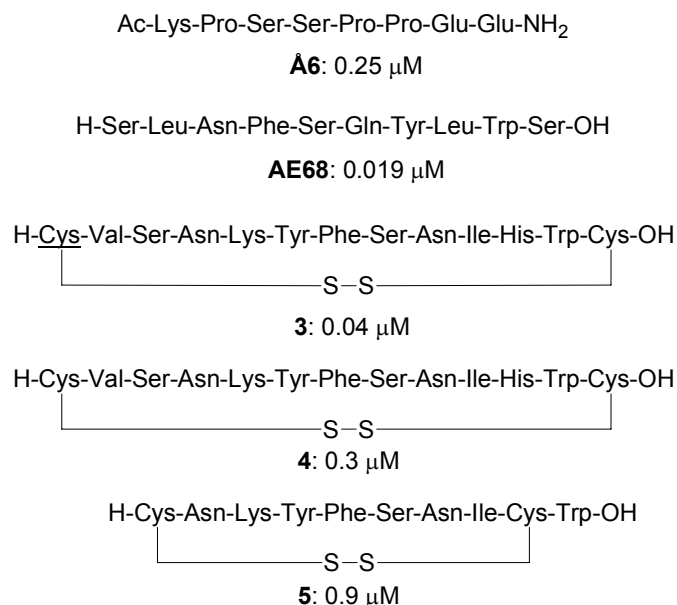


Abbildung 12: Inhibitoren für die uPA/uPAR-Wechselwirkung.

Beide Ansätze sollten sehr gute Möglichkeiten für die Entwicklung kleinerer und höher affiner uPAR-Antagonisten mit erhöhter proteolytischer Stabilität bieten. Sie sind Thema des Kapitels Entwicklung von Inhibitoren für die uPA/uPAR-Wechselwirkung.

2.2.8 Testsysteme für uPAR-Antagonisten

Für die Identifizierung von uPAR-Liganden ist die Bereitstellung eines ausreichend empfindlichen und einfach handhabbaren Testsystems unverzichtbar. Neben den Mikrotiter-Festphasen-Immunoassays, die im Wesentlichen auf dem Prinzip der ELISA-Tests beruhen, finden in letzter Zeit besonders zwei Systeme vermehrte Anwendung:

- Laser FACS Scan Analyse:^[77]

Bei dieser Methode wird die Bindung eines synthetischen Liganden in Konkurrenz zu einem natürlichen, markierten Liganden gemessen. Dazu werden humane U937 Leukämiezellen 72 h mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) stimuliert, wobei die uPAR-Dichte auf der Oberfläche der Zellen ca. 800000 uPAR / Zelle beträgt. Anschließend werden die Zellen mit FITC-modifizierten (Fluoreszeinisothiocyanat-Konjugat) pro-uPA und dem jeweiligen synthetischen Liganden inkubiert. Die resultierende Zellsuspension wird dann durch eine Düse gepresst, wobei sich kleine Tröpfchen bilden, die jeweils nur eine Zelle enthalten. Dieses durchfliegt dann einen *Laser*-Strahl, welcher in Abhängigkeit von der FITC-Dichte auf der Oberfläche der Zelle eine Ladung generiert. Diese Ladung lenkt dann die Flugbahn der Zelle in dem folgendem elektrischen Feld ab. Je mehr FITC-Label durch den natürlichen Liganden auf der Zelloberfläche vorhanden ist (schwacher bis inaktiver Konkurrenzligand), desto mehr Ladung wird auf der Oberfläche generiert und desto stärker wird die Flugbahn der Zelle abgelenkt. Durch Messreihen bei verschiedenen Konzentrationen und molaren Verhältnissen ist somit die Bestimmung des pharmazeutisch relevanten IC_{50} -Wertes möglich.

- Oberflächen Plasmonen Resonanz (SPR):^[183-185]

Die Oberflächen Plasmonen Resonanz ermöglicht die Detektion von Wechselwirkungen zwischen zwei und mehr Biomolekülen in Echtzeit ohne den Einsatz chemisch modifizierter Verbindungen. Grundlage der Plasmonenresonanz ist die Veränderung des refraktiven Index an der Grenzfläche zwischen Metallen und Flüssigkeiten, die auf der Veränderung der Oberflächenschwingungen beruht. Dabei kommt ein Chip zum Einsatz, der auf der Oberfläche mit dem entsprechenden Rezeptormolekül und dessen Rückseite mit einem dünnen Goldfilm beschichtet ist. Die rezeptorbeschichtete Vorderseite steht mit einer Durchflusszelle in Kontakt, während die Rückseite durch ein Prisma mit polarisiertem Licht bestrahlt wird (siehe Abbildung 13).

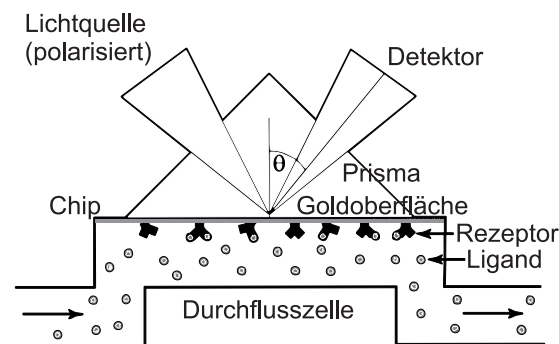


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines Plasmonen Resonanz Experiments.

Die während der Bindung oder Ablösung des entsprechenden Liganden von dem Rezeptor auf der Vorderseite ausgelöste Veränderung des refraktiven Indexes (Intensitäts- und Wellenlängenveränderungen) wird nach Totalreflexion an der Goldoberfläche mittels eines Detektors analysiert und ergibt ein zeitaufgelöstes Resonanzsignal (siehe Abbildung 14).

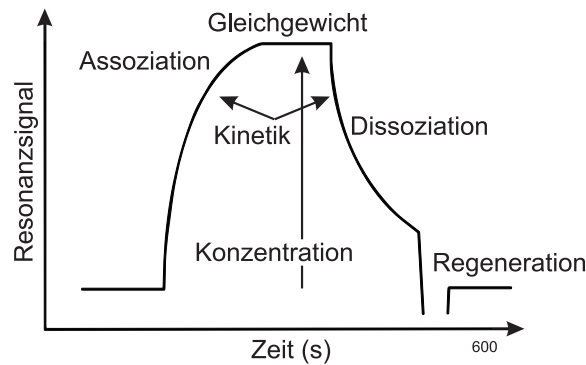


Abbildung 14: Darstellung eines 'Sensorgramms' mit den zu bestimmenden Messgrößen

Aus den resultierenden Assoziations- und Dissoziationskinetiken kann dann u.a. der IC_{50} -Wert bestimmt werden. Die größten Vorteile der Methode sind die rasche Regenerierbarkeit des Chips innerhalb weniger Minuten, die kurze Gesamtzeit für den Messzyklus, der für jeden Liganden typischerweise nur ca. 10 Minuten dauert und der große Empfindlichkeitsbereich, der im Bereich von 10^{-6} - 10^{-12} M liegt (neuere Entwicklungen im Bereich der Langreichweiten Plasmonen Resonanz erlauben sogar eine Steigerung der Sensitivität um den Faktor sieben^[186] und neue Assays scheinen auch die Optimierung von ADME-Parametern zu ermöglichen^[187,188]).

Der entsprechende Teil der Bindungsdomäne besteht aus einem charakteristischen faltblattartigen Teil im Bereich Cys¹⁹-Ser²¹ bzw. His²⁹-Cys³¹ gefolgt von einem ω -loop im Bereich Asn²²-Ile²⁸, wobei sich die beiden C ^{α} der Cysteinreste trotz ihrer Bindung zu anderen Cysteinen außerhalb des Epitops (Cys¹¹ bzw. Cys¹³) so nahe kommen (6.1 Å), dass der Abstand ungefähr einer Disulfidbrücke mit 5.2 Å entspricht. Diese geringe Verkürzung des Abstandes scheint für die biologische Aktivität nicht von großer Bedeutung zu sein, allerdings weisen im Gegensatz dazu auch die aktivsten, von *C. Riemer* synthetisierten Lanthioninpeptide eine um den Faktor >10 erniedrigte Aktivität auf, was darauf hindeutet, dass ein gewisser Mindestabstand zwischen beiden β -Strängen nicht unterschritten werden kann, ohne einen deutlichen Aktivitätsverlust zu beobachten.^[182,191]

Aus dem systematischen Austausch aller Seitenketten in *cyclo*[19,31]-uPA₁₉₋₃₁ **4** durch Alanin und die entsprechenden D-Aminosäuren konnten die für die biologische Aktivität bedeutsamen Seitenketten und Hinweise auf deren Einfluss auf die Konformation der Verbindung erhalten werden (siehe Abbildung 16).

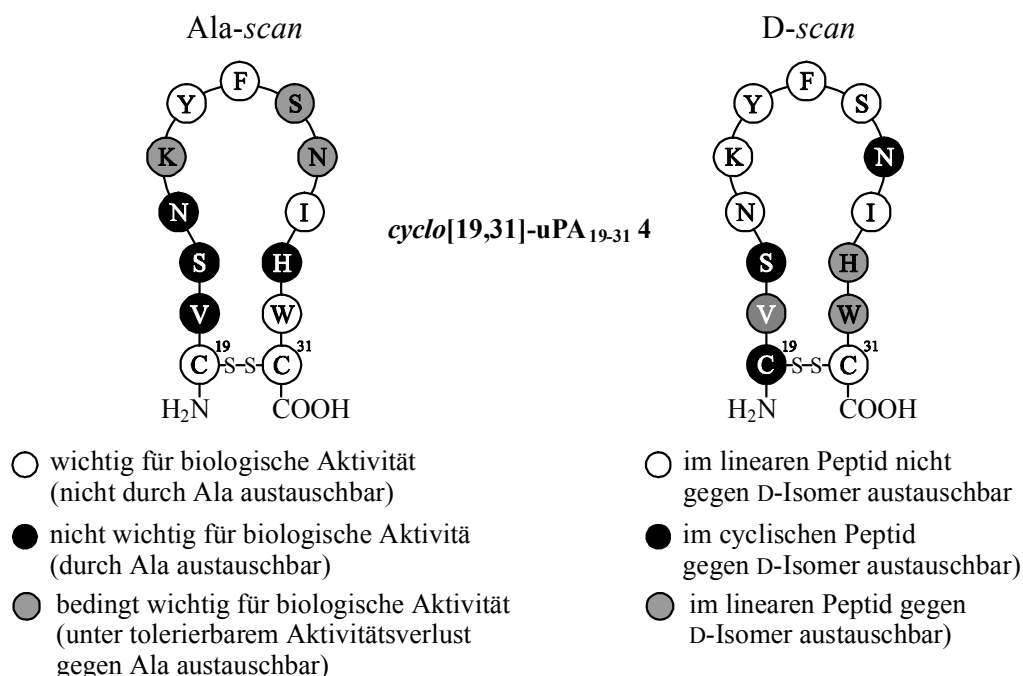


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Ala- und D-scans der Leitsequenz *cyclo*[19,31]-uPA₁₉₋₃₁ **4**.

Dabei erwies sich der Ersatz von Cys¹⁹ gegen D-Cys¹⁹ als sehr wichtig für die biologische Aktivität des resultierenden Peptids *cyclo*[19,31][D-Cys¹⁹]-uPA₁₉₋₃₁ **3** mit einer um den Faktor 7 gesteigerten Affinität zum uPAR im Vergleich zu *cyclo*[19,31]-uPA₁₉₋₃₁ **4**. Trotz dieser bereits relativ hohen Bindungsaktivität des cyclisierten Peptids und der im D-*scan* gefundenen starken Einflüsse der Stereochemie im ω -loop auf die biologische Aktivität - dies deutet bereits auf eine vorhandene Ausbildung von Sekundärstrukturen hin - ist das Peptid noch zu flexibel für eine Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie,^[192] sodass ein strukturbasierendes, rationales Design noch nicht durchgeführt werden konnte.

Ausgehend von den Erkenntnissen aus dem Ala- und D-*scan* des Peptids *cyclo*[19,31]-uPA₁₉₋₃₁ **4** wurde die Position der Disulfidbrücke von *M. Bürgle* schrittweise verschoben und dabei nicht-essentielle Aminosäurereste deletiert. Diese Strategie führte durch Ersatz der Seitenketten Ser²¹/His²⁹ durch eine Disulfidbrücke und Deletion der Reste Cys¹⁹, Val²⁰ und Cys³¹ zur Auffindung des Peptids *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ **5** mit einem IC₅₀-Wert von 1 μ M im FACS-Test (siehe Abbildung 17).^[14]

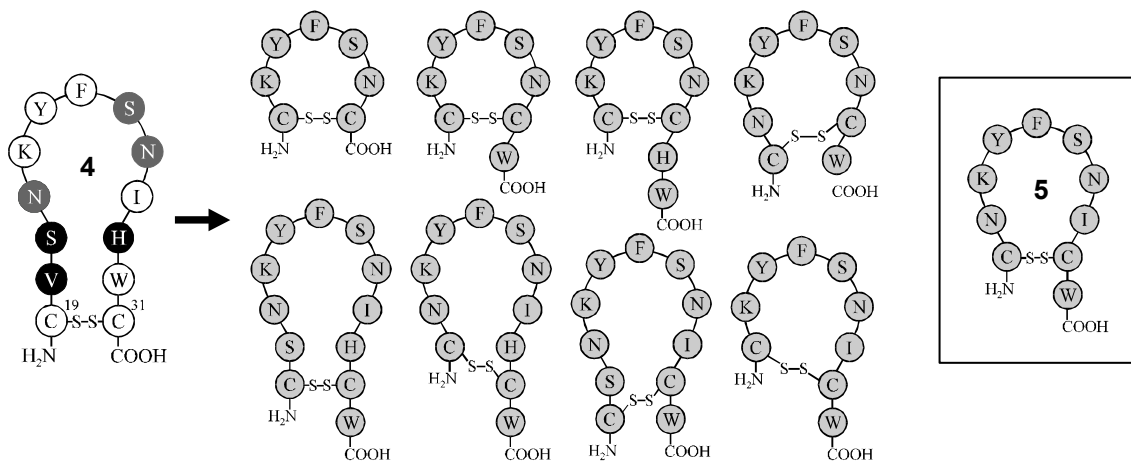


Abbildung 17: Schrittweise verkürzte Peptidvarianten von *cyclo*[19,31]-uPA₁₉₋₃₁, die zur Identifizierung der Leitstruktur **5** geführt haben. Die im Ala-*scan* von **4** substituierbaren Seitenketten sind dunkel gekennzeichnet. Einzig die hervorgehobene Leitstruktur hat sich in FACS-Analysen als aktiv herausgestellt.

Ausgehend von diesem Kenntnisstand ergeben sich folgende Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollten:

- Welchen Einfluss haben Art und Orientierung der Seitenketten in **5** auf die biologische Aktivität?
- Lässt sich die Leitstruktur durch die Verwendung nichtproteinogener Aminosäuren in Hinblick auf biologische Aktivität und/oder proteolytische Stabilität optimieren?
- Ist eine weitere Verkürzung von **5** in Bezug auf Ringgröße und/oder Aminosäurereste möglich?
- Welchen Einfluss hat die Konfiguration und die Rigidität der Disulfidbrücke in **5** auf die Aktivität der Leitstruktur?
- Ist es möglich, eine NMR-Struktur von einem der uPAR-Antagonisten zu erhalten, um ein rationales Design von uPAR-Antagonisten zu ermöglichen?
- Kann man die Leitstruktursuche über einen kombinatorischen Ansatz beschleunigen?

Entsprechend dieser Fragestellungen bestehen einzelne Teile der Aufgabe in den Synthesen der folgenden modifizierten, von *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) abgeleiteten Verbindungen:

- Ala- und D-scan von **5** und nachfolgende Synthese der entsprechenden Ala- und D-Mehrfachsubstitutionen an den Positionen, die eine Alanin- oder D-Aminosäuresubstitution tolerieren.
- Substitution der Cystin-Disulfidbrücke in **5** durch alle möglichen Kombinationen von D-/L-Pen und/oder D-/L-Cys.
- Modifikationen/Deletionen der N- und C-Termini in **5**.
- Synthese weiterer verkürzter Analoga auf Basis der Erkenntnisse der vorhergehenden Untersuchungen.
- Entwicklung einer Strategie zur kombinatorischen Synthese kleinerer Ringe.

Die Synthesen und daraus resultierenden Erkenntnisse bezüglich der Bedeutung einzelner funktioneller Gruppen in **5** für die uPAR-Bindung, entsprechend der ersten vier aufgeführten Vorhaben, sind Thema des folgenden Kapitels. Die Entwicklung einer Strategie zur Anwendung kombinatorischer Methoden zur effizienten Synthese von Ringgrößenbibliotheken werden in einem separaten Kapitel besprochen.

3.2 Allgemeine Aspekte der Peptidsynthese

Die Bedeutung von Peptiden für die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Biopolymeren wurde bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts erkannt. Entsprechend früh wurden dann auch von *Fischer* und *Curtius* die Grundlagen für eine chemische Synthese von Peptiden in Lösung erarbeitet.^[193,194] Erst durch die Einführung urethanischer Schutzgruppen durch *Bergmann* konnte das Problem der Racemisierung überwunden werden und führte zum Durchbruch in der Peptidsynthese.^[195] Für die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptide wird die von *Merrifield* entwickelte Strategie der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) verwendet.^[196,197] Bei dieser Technik wird die Peptidkette sequenziell an einem festen Träger aufgebaut, indem eine mit einer temporären Schutzgruppe für die Aminogruppe und einer permanenten Schutzgruppe für die Seitenkette geschützte Aminosäure an eine *N*-terminal entschützte, festphasengebundene Aminosäure gekuppelt wird. Die Vorteile dieser Methode bestehen im Wesentlichen darin, dass

- durch hohe Reagenzienüberschüsse die Kupplungsreaktion zu einer fast quantitativen Umsetzung vervollständigt werden kann (Vorraussetzung für gute Ausbeuten bei Peptiden mit mehr als drei Resten!) und
- die Nebenprodukte und Reagenzien von dem jeweiligen geträgerten Zielmolekül durch einfache Filtration zu entfernen sind.

Dabei kommt die von *Carpino et al.* entwickelte orthogonale Fmoc/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie zum Einsatz, wie sie in Abbildung 18 dargestellt ist.^[198-200] Die

Verankerung der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure am Harz (Schritt 1) kann je nach Zielmolekül statt über den Trityllinker^[201] auch über ein Linkermolekül mit orthogonaler Sensitivität erfolgen.

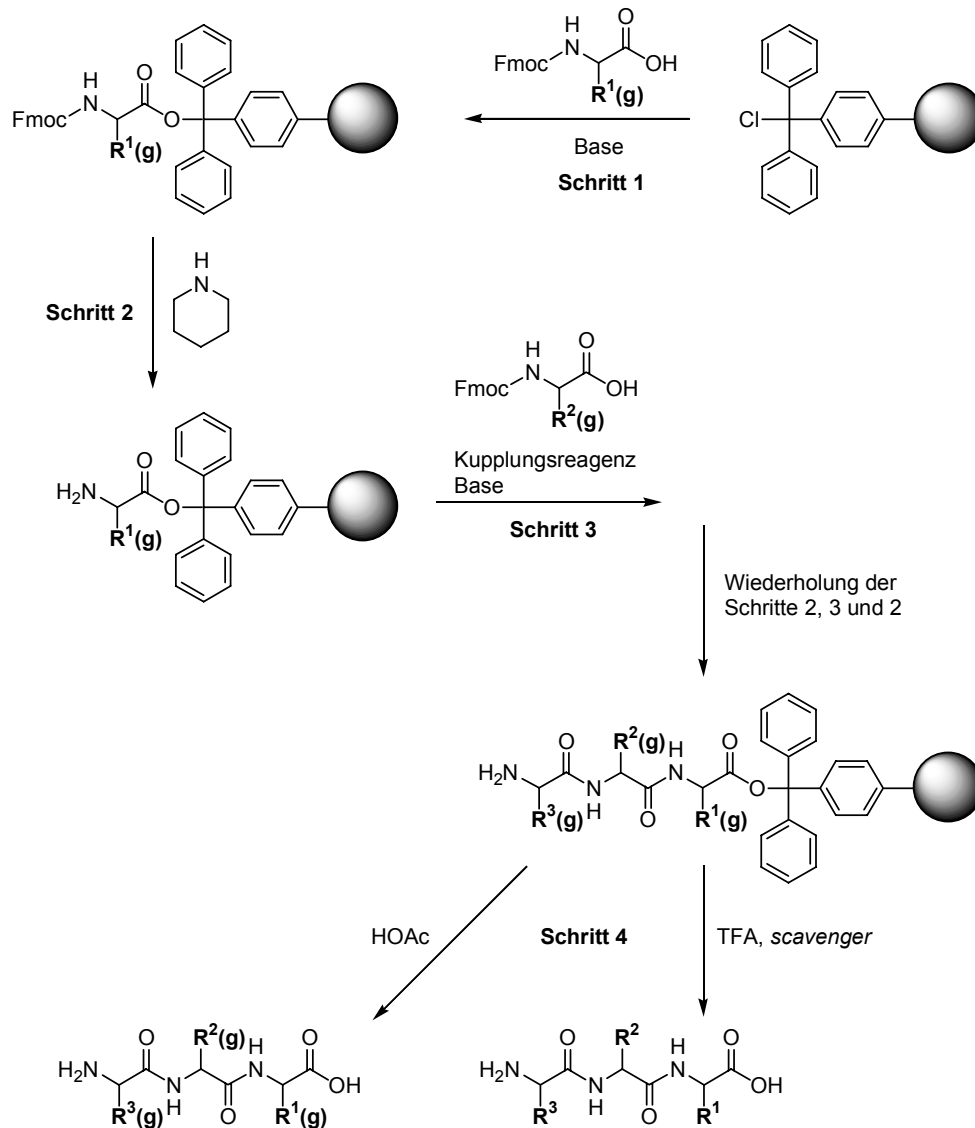


Abbildung 18: Darstellung der Synthesestrategie von Peptiden an fester Phase nach Merrifield und Carpino. Die Abspaltung des Peptids vom festen Träger in Schritt 4 erfolgt entweder unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen (g), unter essigsauren Bedingungen oder durch simultane Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mittels TFA.

Dabei haben sich neben dem bereits erwähnten Trityllinker u. a. die in Abbildung 19 dargestellten Linker in der chemischen Festphasensynthese als besonders verlässlich für die Synthese modifizierter Peptide herausgestellt.^[202]

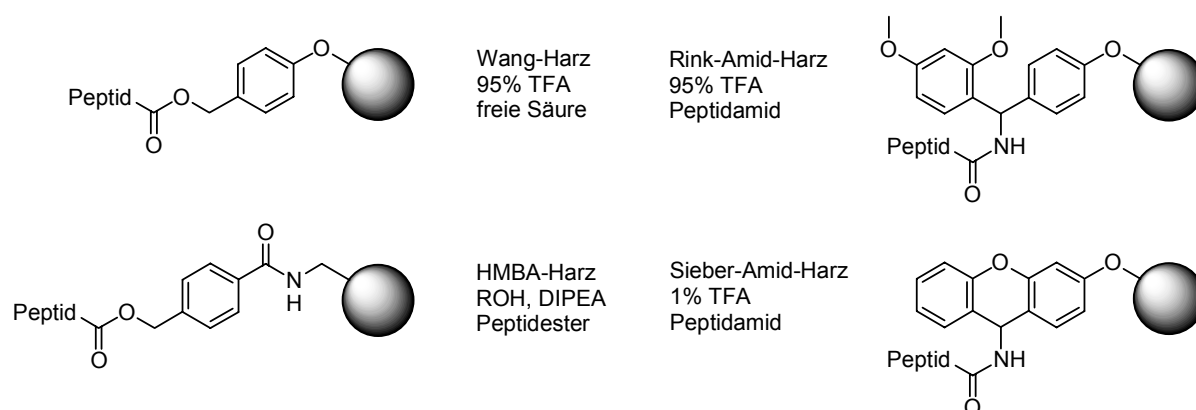


Abbildung 19: Ausgewählte Linker, die sich in der Festphasensynthese von Peptidderivaten bewährt haben und im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Entsprechend der aufgeführten Abspaltbedingungen und Seitenkettenschutzgruppen werden entweder freie oder geschützte Peptidderivate erhalten.

Die Aktivierung der zu kuppelnden Fmoc- und seitenkettengeschützten Aminosäure erfolgt entweder in einem getrennten Reaktionsgefäß vor der eigentlichen Kupplungsreaktion (Abbildung 20) oder *in situ* durch die in Abbildung 21 dargestellten Kupplungsreagenzien.^[203-205]

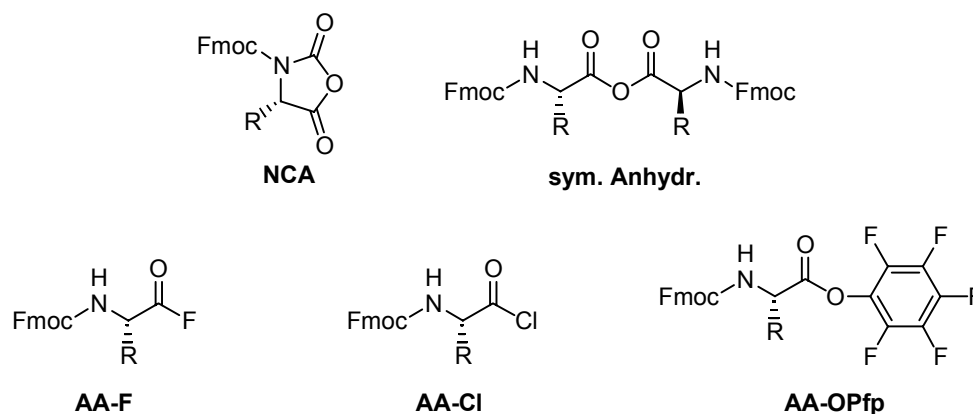


Abbildung 20: Voraktivierte Aminosäurederivate.

Von den voraktivierten Aminosäurederivaten sind die *N*-Carboxyanhydride (NCA, Leuch's Anhydride) und die Pentafluorphenolester (AA-OPfp) kommerziell erhältlich. Die symmetrischen Anhydride und die Säurehalogenide müssen dagegen in einem vorgeschalteten Reaktionsschritt synthetisiert werden, was im Fall der Aminosäurefluoride aufwendig ist, da das Produkt vor der Verwendung durch Kristallisation oder Chromatographie gereinigt werden muss.^[206,207] Die Kupplungsreaktionen betreffend weisen die symmetrischen Anhydride und die Aminosäurehalogenide die größte Reaktivität auf. Die Aminosäureanhydride und -chloride haben sich aufgrund ihrer hohen Reaktionsgeschwindigkeit besonders in Acylierungsreaktionen sekundärer Amine bewährt,^[208] während die Aminosäurefluoride ganz besonders für sterisch gehinderte Kupplungen, wie z.B. zwischen α -disubstituierten Aminosäuren (z.B. Aib) geeignet sind.^[209-211] Die Verwendung der Aminosäurepentafluorphenolester stellt eine attraktive Strategie für Kupplungen von schwach aktivierten Aminosäuren an Verbindungen mit mehreren ungeschützten, schwach nukleophilen Funktionalitäten dar, wodurch die temporäre Verwendung von Schutzgruppen überflüssig wird (siehe auch Kapitel 5.2.2). Neben der Verwendung voraktivierter Derivate in der Peptidsynthese haben insbesondere die *in situ* Reagenzien (Abbildung 21) eine große Verbreitung gefunden, nicht zuletzt auch wegen ihrer Anwendbarkeit in der automatisierten Synthese.

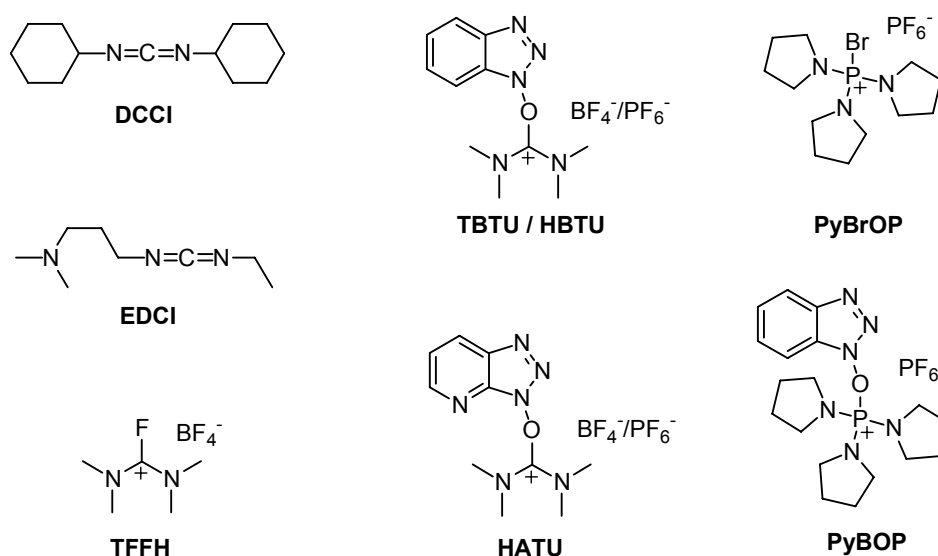


Abbildung 21: Kupplungsreagenzien für die *in situ* Aktivierung von Aminosäuren.

Alle in Abbildung 21 gezeigten Reagenzien erzeugen im ersten Schritt der Aktivierung eine Acyluronium- oder -phosphonium-Spezies, die dann durch die Abgangsgruppe Fluorid, Chlorid (nicht dargestellt), Bromid, HOBt oder HOAt substituiert wird (nicht wenn Carbodiimide alleine eingesetzt werden!), bzw. zum Anhydrid dimerisiert.

Die intermediär erzeugten OAt-Aktivester zeigen dabei eine ähnliche Kupplungseffizienz an sekundäre Amine und in sterisch gehinderte Kupplungen wie die Aminosäurefluoride, weshalb HATU trotz seines sehr hohen Preises mittlerweile zum Standardreagenz in der Synthese von peptidischen Naturstoffen geworden ist.^[203,204]

Die in den ersten Reaktionsschritten der Aktivierung gebildeten Acyl-Onium-Verbindungen racemisieren leicht, sodass diese durch den Zusatz von Additiven (siehe Abbildung 22) in die entsprechenden, stabileren Aktivester überführt werden müssen, bzw. das Reaktionsgleichgewicht zu diesen verschoben werden muss. Gleichzeitig müssen sterisch gehinderte bzw. sehr schwache Basen wie Collidin eingesetzt werden um unerwünschte Racemisierungen zu vermeiden.^[212-215]

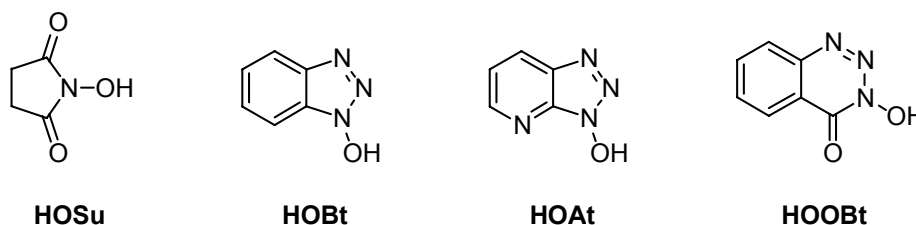


Abbildung 22: Gebräuchliche Additive für die Kupplung von *in situ* aktivierten Aminosäurederivaten. Die Effizienz in der Unterdrückung der Racemisierung nimmt von links nach rechts zu.

In Festphasenreaktionen hängt die Reaktionsgeschwindigkeit neben der eigentlichen Reaktivität der an der Reaktion beteiligten Molekülen auch besonders davon ab, in welchem Ausmaß die reaktiven Gruppen der beteiligten Reaktionspartner miteinander in Kontakt kommen können. Da der Transport in das Innere der *beads* durch Diffusion erfolgt, kommt es darauf an,

- die Reaktion in einer möglichst hoch konzentrierten Lösung durchzuführen (Konzentrationen mindestens >0.1 M!)
- die Reaktionssuspension ständig zu durchmischen. Eigene Erfahrungen zeigten, dass bei fehlender Mischung eine einfache Kupplungsreaktion zwischen zwei Aminosäuren an fester Phase nach zwei Stunden erst 50% Umsatz gezeigt hat, während bei Durchmischung bereits nach 30 Minuten vollständiger Umsatz beobachtet wurde!

Als permanente Seitenkettenschutzgruppen für die Fmoc-Aminosäuren kommen folgende Schutzgruppen zum Einsatz, die allesamt TFA-labil sind:

Aminosäure	Schutzgruppe
Serin, Threonin	<i>t</i> Butyl-Ether (<i>t</i> Bu)
Aspartat, Glutamat	<i>t</i> Bu-Ester (<i>Ot</i> Bu)
Cystein, Asparagin, Glutamin, Histidin	Triphenylmethyl- (Trt)
Lysin, Tryptophan	<i>t</i> Butyloxycarbonyl- (Boc)
Arginin	<i>N</i> ^α -(2,2,4,6,7)-Pentamethyl- dihydrobenzofuran-5-sulfonyl- (Pbf)

Die bei der sauren Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen entstehenden Carbokationen müssen mittels geeigneter *scavenger* abgefangen werden, um die irreversible Alkylierung nucleophiler Aminosäureseitenketten zu unterdrücken. Als Abspaltnischung kommen dabei Mischungen aus TFA und unterschiedlichen Anteilen an *scavengern* wie Wasser, Thioanisol, Ethandithiol oder Phenol zum Einsatz.^[216] Mittlerweile hat sich TIPS (zusammen mit Wasser) in TFA als Abspaltnischung der Wahl etabliert, da es geruchlos ist und Carbokationen sehr effektiv abfängt^[217].

3.3 Modifikationen von *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀

3.3.1 Ala-scan von *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀

Um die funktionelle Bedeutung der Seitenketten für die biologische Aktivität von *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ **5** zu ermitteln, wurde jede Aminosäure der Sequenz gegen Alanin ersetzt. Auch wenn die funktionellen Gruppen der Seitenketten einen mitunter deutlichen Einfluss auf die Ausbildung von Sekundärstrukturen haben können, lassen die Ergebnisse des Ala-scans doch Rückschlüsse auf die Bedeutung der jeweiligen Funktionalitäten für die Bindung an uPAR zu.

Die Synthese der entsprechenden Peptide erfolgte wie in den Kapiteln 3.2 und 7.3 beschrieben in automatisierter Parallelsynthese mittels Fmoc/*t*Bu-Strategie an fester Phase auf einem mit 1% Divinylbenzol quervernetztem tritylfunktionalisierten Polystyrolharz und dem TBTU/HOBt-System in NMP zur Aminosäureaktivierung. Die TFA-vermittelte Abspaltung des Peptids von der festen Phase unter simultan erfolgender Seitenkettenentschützung macht die anschließende Oxidation der Cysteinreste nach der von *Tam et al.* entwickelten Methode mittels DMSO besonders attraktiv.^[218-220] Diese weist gegenüber den Oxidationsmethoden mittels Sauerstoff,^[221,222] Iod,^[223] Thalliumsalzen^[224] oder K₃Fe(CN)₆^[225] mehrere Vorteile auf:^[226,227]

- hohe Reaktionsgeschwindigkeit unter pH-neutralen oder schwach basischen Bedingungen^[228]
- Oxidation *N*-terminaler Cysteinreste (im Gegensatz zu Iod!)
- keine Nebenreaktionen mit den im Peptid vorhandenen Seitenketten von Tyr und Trp^[219,226,229]
- Toleranz gegenüber sauren Reaktionsbedingungen^[219,220]
- sehr gutes Lösungsmittel für Peptide

Durch die Verwendung des besonders milden Oxidations- und Lösungsmittels DMSO lässt sich die Reaktion im Gegensatz zu vielen anderen publizierten Beispielen^[219,220]

von der Abspaltung bis zur Reinigung mittels HPLC als wirkliche Eintopfreaktion führen, wobei bis zur endgültigen Reinigung der Zielverbindung durch HPLC einzig Konzentrations- und Filtrationsschritte durchzuführen sind, was zu einer sehr effizienten Synthese- und Aufarbeitungsstrategie führt (siehe Abbildung 23).

Bemerkenswert ist, dass bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Peptidsynthesen keine Nebenreaktionen während der sauren Entschützung beobachtet wurden. Entsprechend entfällt bei der Verwendung von TIPS als *scavenger* während der Seitenkettenabspaltung die langwierige Optimierung der Abspatlösung, im Gegensatz zu den früher häufig in der Literatur beschriebenen Synthesen.^[216]

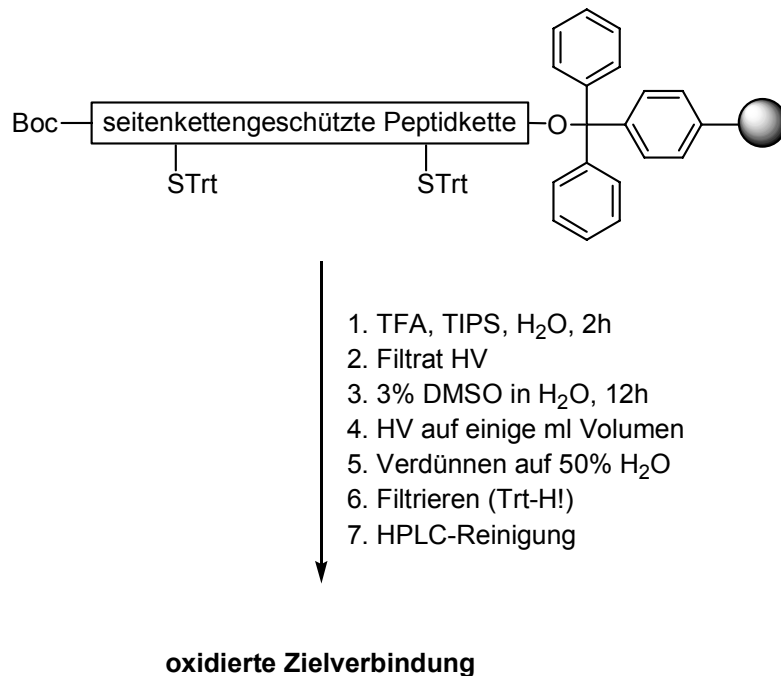


Abbildung 23: Eintopfverfahren zur Abspaltung, Entschützung, Oxidation und anschließenden Reinigung der Cystinpeptide.

Um eine Reduktion der Indolseitenkette des Tryptophans^[217] durch Silane zu verhindern muss diese allerdings *N*-Boc-geschützt eingesetzt werden, wobei das während der stark sauren Abspaltung gebildete, sehr stabile *N*-Carboxy-Indol während der anschließenden Oxidation in leicht saurem (s.u.) Medium zerstört wird.^[230]

Die Oxidation der Cysteinseitenketten erfolgt bereits mit einer nur 3%igen Lösung von DMSO in Wasser bei pH = 2 (Reste von TFA aus der Entschützungreaktion) mit

ausreichender Geschwindigkeit, wodurch die Zeiten für die anschließende Entfernung des Lösungsmittels im HV wesentlich verkürzt werden. Um intermolekulare Oxidationen und damit Oligomerisierungen zu vermeiden wird die Reaktion bei einer Peptidkonzentration von $c = 10^{-3}$ - 10^{-5} M durchgeführt.

Die in Schritt 5 und 6 in Abbildung 23 durchgeführte Verdünnung und Filtration der aus dem Konzentrationsprozess resultierenden DMSO-Peptidlösung dient dabei der Entfernung des aus den Seitenkettenschutzgruppen stammenden Triphenylmethans, das bei konventioneller Vorgehensweise während des Fällens des entschützten Peptids in der Etherphase gelöst bleibt und in größeren Mengen sowohl zur Kontamination von Massenspektrometern als auch zur Ausfällung des Triphenylmethans in HPLC-Anlagen führen kann!

Durch die oben beschriebene Synthesestrategie konnten die entsprechenden Alanin-substituierten Peptide von *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) mit Reinheiten >95% erhalten werden und wurden mittels der bereits beschriebenen Laser FACS Scan Analyse auf ihre biologische Aktivität getestet. In Abbildung 24 sind die aus den dosisabhängigen uPA/uPAR-Aktivitätstests resultierenden IC₅₀-Werte als auf die Leitstruktur **5** normierte Rezeptorbindungsaktivitäten dargestellt.

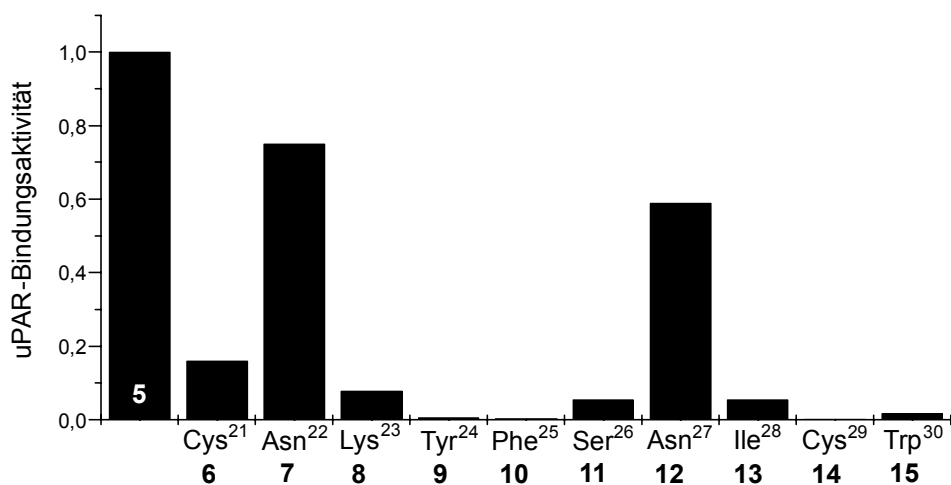


Abbildung 24: Auf die Leitstruktur **5** normierte biologische Aktivitäten der Alanin-Mutanten von *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ **6-15** (ermittelt in FACS-Analyse).

Bei der Interpretation der Aktivitäten der Alaninmutanten sind mehrere Aspekte zu berücksichtigen, die im Folgenden kurz skizziert werden sollen.

Wie bereits eingangs erwähnt, erhält die Substitution einer Seitenkette durch die Methylgruppe des Alanins in Peptiden zwar den konformationellen Einfluss der Aminosäure auf die Peptidkette in unmittelbarer Nachbarschaft ('Naheffekt'), trotzdem können strukturinduzierenden Eigenschaften verloren gehen. Dies ist immer dann der Fall, wenn die Seitenkette der betreffenden Aminosäure entweder Wasserstoffbrücken zu anderen Seitenketten bzw. dem Peptidrückgrat ausbildet (z.B. Ser, Thr oder Asn),^[231-234] oder wenn die Seitenkette an der Bildung eines hydrophoben *clusters* mit anderen Seitenketten beteiligt ist ('Ferneffekt').^[235,236]

Noch extremer ist das Bild, wenn zwei Seitenketten für die Cyclisierung des betreffenden Peptids verwendet werden. Diese Einschränkung der konformationellen Freiheitsgrade kann, wie im vorliegenden Fall, zu einem dramatischen Anstieg der biologischen Aktivität (oder Selektivität!) führen, wenn die biologisch aktive Konformation stabilisiert oder deren Bildung begünstigt wird. Im Fall seitenkettencyclisierter Peptide führt die Substitution verbrückender Seitenketten zu linearen Peptiden und wieder zu einer Zunahme der konformationellen Freiheit und damit zu einem starken Verlust der Aktivität. Dies gilt allerdings nur dann, wenn die verbrückenden Seitenketten nicht auch an der Rezeptorbindung selbst beteiligt sind, bzw. nicht die Ausbildung von Strukturen der o. g. Art im Peptid induzieren. Im vorliegenden Fall des *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) wäre also durch die Substitution der Cysteine in den Positionen 21 und 29 durch Alanin ein etwa gleich großer Abfall der biologischen Aktivität der beiden Verbindungen zu erwarten. Der deutliche Unterschied der Aktivitäten der beiden Mutanten (Ala²¹ **6** und Ala²⁹ **14**) kann mehrere mögliche Ursachen haben:

- Die Substitution des *N*-terminalen Cysteins²¹ durch Alanin²¹ (**6**) ermöglicht dem für die biologische Aktivität bedeutsamen Aminoterminus (siehe Kapitel 3.3.6) im linearen Peptid eine bessere Ausrichtung im Raum, wodurch ein Teil des aus der Linearisierung resultierenden Aktivitätsverlustes wieder ausgeglichen wird.

- Die Substitution von Cystein²⁹ durch Alanin²⁹ (**14**) führt im Fall der ebenfalls für die biologische Aktivität wichtigen, benachbarten Trp³⁰-Seitenkette (siehe Kapitel 3.3.3) zu einem inversen Szenario wie oben geschildert.
- Der C-terminale Teil der hydrophoben Disulfidbrücke kann an der Rezeptorbindung beteiligt sein, was aber durch die Ergebnisse der His²⁹-Ala²⁹-Substitution im Fall des linearen uPA₁₄₋₃₂ fraglich erscheint. Allerdings besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass die Cystinbrücke eine zusätzliche Bindungstasche besetzt, die im Fall des linearen Peptids unbesetzt bleibt.

Die Seitenketten von Asn²² und Asn²⁷ scheinen dagegen nicht an der Rezeptorbindung beteiligt zu sein, da sie ohne wesentlichen Aktivitätsverlust einzeln gegen Alanin (**7**, **12**) ausgetauscht werden können. Die doppelten Substitutionen Ala^{22,27} (**16**) und Alg^{22,27} (**17**, hydrophobe Seitenketten) führen hingegen zu einem fast vollständigen Bindungsverlust, was auf eine in der Summe nicht zu vernachlässigende Destabilisierung der Struktur hinweist (siehe Kapitel 3.3.3). Gleiches gilt im Wesentlichen auch für die Seitenkette von Lys²³ (**8**), wobei die Aktivitätsdaten in diesem Fall aufgrund der schlechten Löslichkeiten und der damit unbekanntem Peptidkonzentration nicht besonders zuverlässig sind (siehe auch Kapitel 3.3.7).

Die verbleibenden Seitenketten von Tyr²⁴, Phe²⁵, Ser²⁶, Ile²⁸ und Trp³⁰ sind im *Ala-scan* (**9**, **10**, **11**, **13** und **15**) von *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) nicht austauschbar, ohne einen starken Verlust der Bindungsaktivität zu uPAR. Nur auf diesen Daten basierend kann keine Aussage gemacht werden, welcher Effekt für diese Beobachtung verantwortlich ist. Allerdings zeigen zumindest Phe²⁵, Ile²⁸ und Trp³⁰ und eingeschränkt auch Tyr²⁴ und Ser²⁶ in **5** eine Sequenzhomologie zu den von *Rosenberg et al.* mittels *phage display* gefundenen 'Klon20-' und analogen Peptiden bzw. dem von *Danø et al.* weiterentwickelten 'AE68-Peptid' die bereits in Kapitel 2.2.7 erwähnt wurden.^[94,95,180] Die entsprechenden Konsensussequenzen und der Vergleich mit der Sequenz des Peptids *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) erlauben es aber, das Verständnis der Funktion der einzelnen Seitenketten weiter zu präzisieren (siehe Abbildung 25).

Klon	Sequenz	Aktivität [μ M]
20	AEPMPHSLN FSQYLW YT	0.01
26	AEHTYSSLWDT YSPLAW	0.34
54	AELDLWMR HYPLSFS NR	0.38
16	AESSL WTRYAW PSMPSY	0.40
12	AEWHPGLS FGSYLW SKT	0.40
18	AEPALLN WSFFFN PGLH	1.00
9	AE WSFY NL HL PEPQTIF	1.00
26	AEHTYSSL WDTYS PLAW	0.34
54	AELDL WMRHY PLSFSNR	0.38
16	AESS LWTRY AWPSMPSY	0.40

Abbildung 25: Überlagerte Sequenzen der aktivsten phage display Peptide von Rosenberg et al. mit den markierten Konsensusmotiven FSXXXW und LWXXAr.

Aus dem Vergleich der verschiedenen phage display Sequenzen ergibt sich, dass die beiden getrennten Motive FSXXXW und LWXXAr zu dem Motiv (Leu)-Ar-(Ser/Thr)-X-Ar/R-X-(Trp) als gemeinsame Bindungssequenz für uPAR überlagert werden kann, wobei prinzipiell die fehlende aromatische Seitenkette des Trp im Fall der Klone 26, 54 und 16 auch durch Rückfaltung eines weiter C-terminal gelegenen Restes ausgeglichen werden könnte (Reste in Klammern: bedingt variabel, fett gedruckte Reste: essentiell). Übertragen auf die Leitstruktur und die Seitenketten von Tyr²⁴, Phe²⁵, Ser²⁶, Ile²⁸ und Trp³⁰ in **5** würde dies bedeuten, dass einzig die Seitenketten von Phe²⁵, Ile²⁸ und Trp³⁰ für die eigentliche Rezeptorbindung verantwortlich sind und die Seitenketten von Tyr²⁴ und Ser²⁶ eher einen strukturellen Einfluss haben. Identische Interpretationen legen auch Ala-scan Untersuchungen von Danø et al. in dem verkürzten Klon20-Peptid AE68 für die entsprechenden Positionen nahe.^[94] Um weiteren Einblick in die Funktion der einzelnen Seitenketten zu erhalten, wurden, wie im nächsten Kapitel beschrieben, die Stereozentren aller Seitenketten invertiert.

3.3.2 D-scan von *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀

Die Inversion des Stereozentrums am α -Kohlenstoff der Peptidkette kann starke Auswirkungen auf die biologische Aktivität der entsprechenden Verbindung haben.

Diese Modifikation gibt Auskunft über die Ausbildung von Sekundärstrukturen und den stereochemischen Erfordernissen für Seitenketten in der biologisch aktiven Konformation. Im betrachteten Fall wird entweder

- die Seitenkette bei sonst gleicher Konformation des Peptids in eine andere räumliche Orientierung gebracht,
- die Konformation der Amidkette durch die Induktion eines β -turn Motivs geändert^[237]
- oder ein bestehendes β -turn Motiv zusätzlich stabilisiert.

Die Induktion oder Stabilisierung von *turn*-Motiven^[238-240] erklärt sich daraus, dass die stereochemische Orientierung der Seitenketten in der zweiten ($i+1$) und dritten Position ($i+2$) des *turns* die Konformation beeinflusst. Liegen beide Aminosäuren in der L/L-Konfiguration vor ist ein β I *turn* bevorzugt, liegen die Aminosäuren als D/L- oder L/D-Paar vor, so findet man bevorzugt β II bzw. β II' *turns*, die alle eine sehr ähnliche räumliche Orientierung der Seitenketten aufweisen (siehe Abbildung 26).

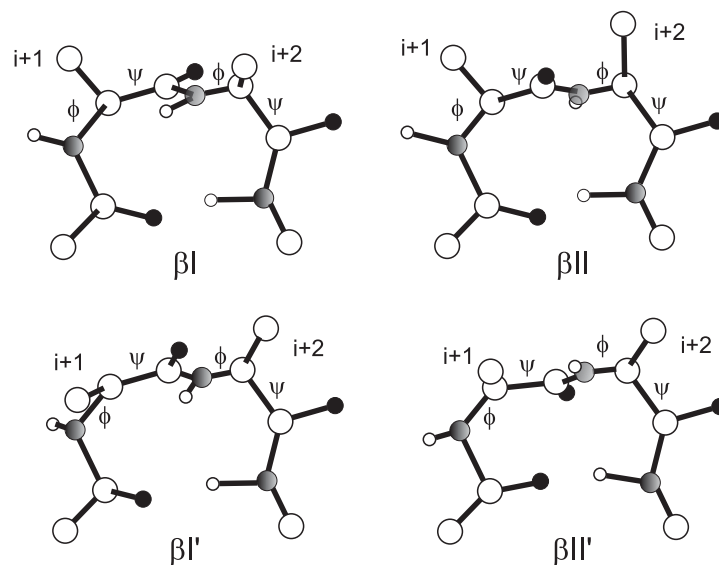


Abbildung 26: Verschiedene Typen von β -Schleifen bestehend aus L-Aminosäuren mit annähernd identischer Orientierung der Seitenketten. Die einzelnen *turns* unterscheiden sich in den Ψ - und Φ -Winkeln, bzw. werden durch diese definiert.

Diese strukturinduzierenden Eigenschaften von D-Aminosäuren in Peptiden konnten im Fall des *Veber-Hirschmann*-Peptids^[241] und zahlreichen anderen cyclischen, in unserem Arbeitskreis synthetisierten Peptiden eindrucksvoll belegt werden.^[234,242,243]

Entsprechend den in Kapitel 3.3.1 und 7.3 beschriebenen Methoden wurden alle Peptide synthetisiert, die an der jeweiligen Position in der Leitstruktur *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) eine entsprechende D-Aminosäure enthalten. Die aus den dosisabhängigen FACS-Versuchen resultierenden IC₅₀-Werte sind als auf die aktivste Verbindung *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**) normierte biologische Aktivitäten in Abbildung 27 dargestellt.

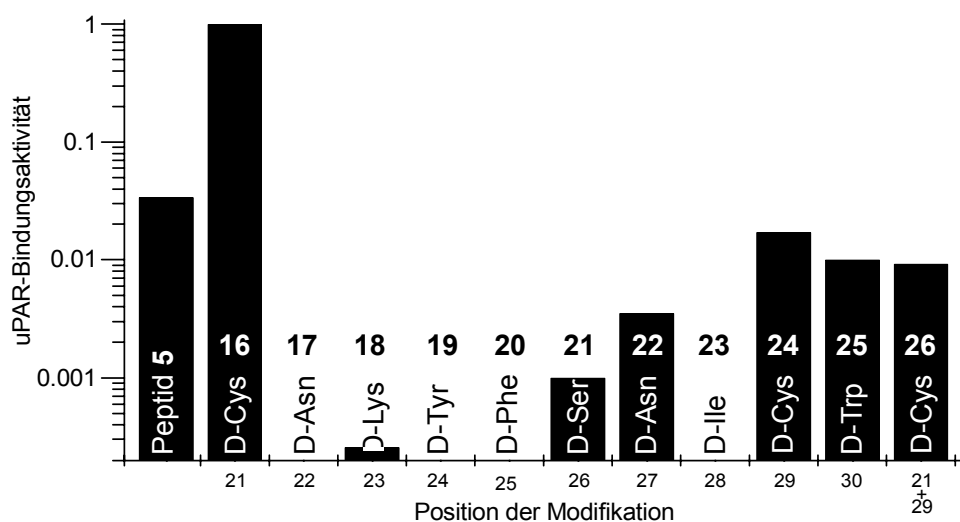


Abbildung 27: Biologische Aktivitäten der auf die aktivste Verbindung **16** genormten D-substituierten *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀-Peptide **16-26**.

Wie aus Abbildung 27 ersichtlich führt die Inversion der stereochemischen Orientierung der Seitenketten in *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) in allen Positionen, die an der Ausbildung des ω -loops beteiligt sind zu einem fast vollständigen Verlust der Bindungsaktivität an uPAR (**17-23**). Einzig die Inversion der Stereochemie der Reste Ser²⁶ (**21**) und Asn²⁷ (**22**), die nach den Betrachtungen zur Sequenzhomologie mit den *phage display* Peptiden in Kapitel 3.3.1 eher strukturellen Einfluss auf die Bindungskapazität an uPAR haben, zeigen eine um den Faktor 10-20 verminderte Restaktivität im Vergleich zur Leitstruktur **5**. Alle übrigen Modifikationen innerhalb des *loops* führen scheinbar zu einer falschen Orientierung der Seitenketten und/oder

zur Induktion einer biologisch inaktiven Gesamtgeometrie der Verbindungen (siehe auch Kapitel 3.3.3). Im Fall der verbrückenden Cys²¹/Cys²⁹ (**16**, **24**, **26**) bzw. des exocyclischen Trp³⁰ (**25**) führt die Inversion des Stereozentrums dagegen zum fast vollständigen Erhalt bzw. im Fall von *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**) mit einem IC₅₀ = 40 nM zu einer drastischen Steigerung der biologischen Aktivität um den Faktor 25 und somit zu einem der aktivsten bisher beschriebenen uPAR-Antagonisten (siehe Abbildung 28). Die Peptide, die alle Kombinationen aus D- und/oder L-konfigurierten Aminosäuren Cys²¹, Asn²⁷, Cys²⁹ und Trp³⁰ enthalten (, erwiesen sich in FACS-Analysen im Vergleich zu **16** als deutlich weniger aktiv (IC₅₀>1μM).

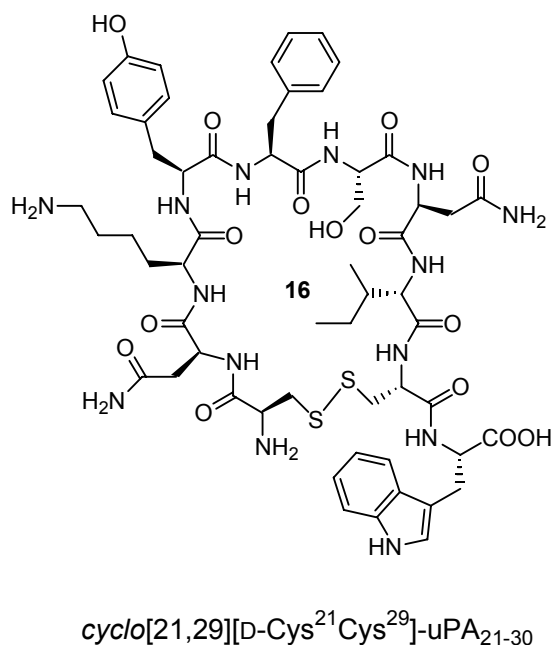


Abbildung 28: Molekulare Struktur von *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**). Der IC₅₀-Wert der quantifizierten Verbindung beträgt laut FACS-Analyse 40 nM.

Diese Beobachtung kann durch die folgenden Überlegungen rationalisiert werden. Bei der Seitenkettencyclisierung von Peptiden spielt die Stereochemie der verbrückenden Aminosäureseitenkette eine besondere Rolle, da durch diese Fixierung im N-terminal verbleibenden Teil des Peptids (hier die Aminogruppe) eine gravierende Umorientierung erfolgt. Ersetzt man die entsprechende Aminosäure nun durch eine D-Aminosäure, so ist es prinzipiell möglich, dass der für die biologische Aktivität

bedeutsame *N*-Terminus (siehe Kapitel 3.3.6) wieder in eine für die Bindung erforderliche Position gelangt, oder sogar in einer geeigneteren Position fixiert wird, was wie im vorliegenden Fall zu einer drastischen Steigerung des Bindungsvermögens an uPAR führt (siehe auch die Betrachtungen zur biologischen Aktivität der Ala²¹ und Ala²⁹ Substitution in **6** und **14** in Kapitel 3.3.1). Dieses Prinzip sollte auch entsprechend für den *C*-Terminus gelten, allerdings erlaubt die exocyclische Position von Trp³⁰ eine beinahe freie Drehbarkeit um die entsprechenden Einfachbindungen, ohne dass die Carboxylgruppe durch eine weiterführende Peptidkette fixiert ist. Somit sollte sowohl die Indolseitenkette als auch der (für die biologische Aktivität nicht bedeutsame, siehe Kapitel 3.3.6) *C*-Terminus unabhängig von der Konfiguration der Seitenkette in Cys²⁹ zumindest ungefähr eine für die Bindung erforderliche Konformation einnehmen können. Dieses gilt jedoch (analog zum *N*-Terminus) nicht gleichzeitig für die Amidgruppe zwischen Cys²⁹ und Trp³⁰. Wie aus den Aktivitäten erkennbar, beeinflussen weder die Substitution durch D-Cys²⁹ (**24**) noch die durch D-Trp³⁰ (**26**) die Aktivitäten wesentlich, was die vorhergehenden Überlegungen zu bestätigen scheint.

Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Konfiguration der *N*-terminal verbrückenden Seitenkette und biologischer Aktivität wurde bereits in den Untersuchungen von *M. Bürgele* an *cyclo*[19,31]-uPA₁₉₋₃₁ (**4**) und *cyclo*[19,31][D-Cys¹⁹]-uPA₁₉₋₃₁ (**3**) gefunden.

Im Fall des kleineren und damit konformationell stärker eingeschränkten *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) ist die Differenz der Aktivitäten von D-Isomer **16** und L-Isomer **5** entsprechend größer als im Fall von der jeweiligen D- (**3**) und L-Cys¹⁹ (**4**) Modifikationen von uPA₁₉₋₃₁ (siehe Abbildung 29).

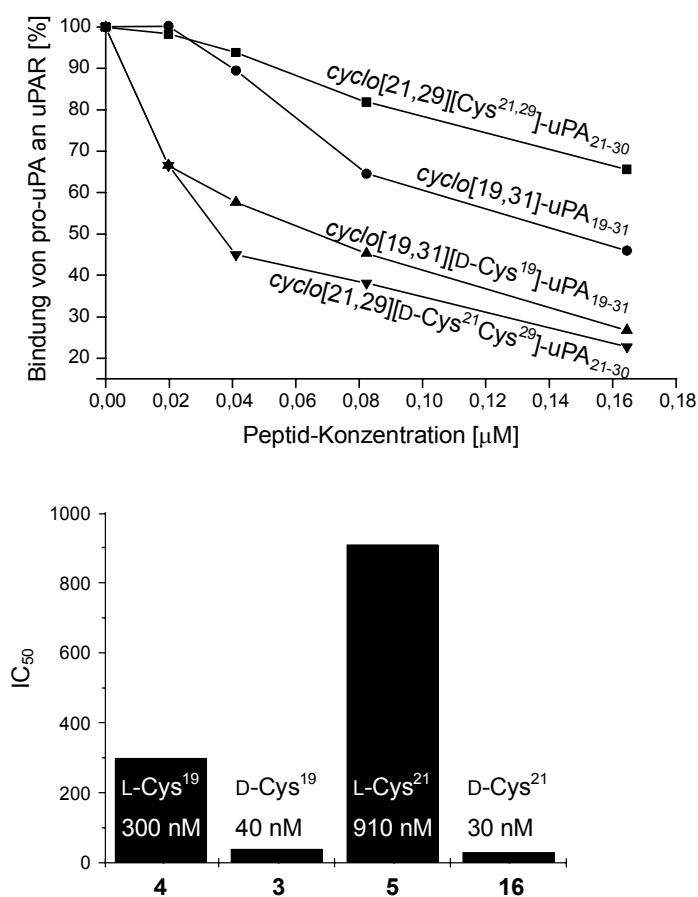


Abbildung 29: Dosisabhängige Inhibierung der uPA-uPAR-Wechselwirkung durch die quantifizierten Peptide 4, 3, 5 und 16 in FACS-Analysen (oben) und Vergleich der resultierenden IC₅₀-Werte (unten).

Alle möglichen Kombinationen doppelter, dreifacher und vierfacher D-Aminosäuresubstitutionen in den tolerierenden Positionen Cys²¹, Asn²⁷, Cys²⁹ und Trp³⁰ in **5** (führt zu Peptiden **26-35**) resultieren in einem Abfall der uPAR-Bindungsaktivitäten um mehr als eine Größenordnung. Diese Beobachtung wird ebenso im Fall der Doppel- und Dreifachsubstitutionen durch D-Aminosäuren in den Positionen Cys¹⁹, Ser²¹, Asn²⁷ und Cys³¹ in **4** (führt zu den Peptiden **36-41**) gemacht. Die offensichtlich kleinere Zahl von Freiheitsgraden in *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**) bei gleichzeitig erhöhter biologischer Aktivität legte die Vermutung nahe, dass die Bestimmung einer Lösungsstruktur in Wasser mittels NMR (im Gegensatz zu *cyclo*[19,31][D-Cys¹⁹]-uPA₁₉₋₃₁ **3**) möglich sein könnte (siehe nächstes Kapitel).

3.3.3 NMR-Struktur von *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**)

Die Bestimmung der Lösungsstruktur von *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**) gelang in unserer Arbeitsgruppe durch NMR-Messungen bei einer Peptidkonzentration von 12.2 mM in Wasser bei 280 K auf einem Bruker DMX 600 Spektrometer durch *V. Truffault*. Die anschließende Generierung einer auf Abstand-*restraints* und Kopplungskonstanten basierenden Struktur und deren anschließende Verfeinerung durch moleküldynamische Untersuchung wurden von *Dr. C. Rölz* durchgeführt (Abbildung 30).^[244]

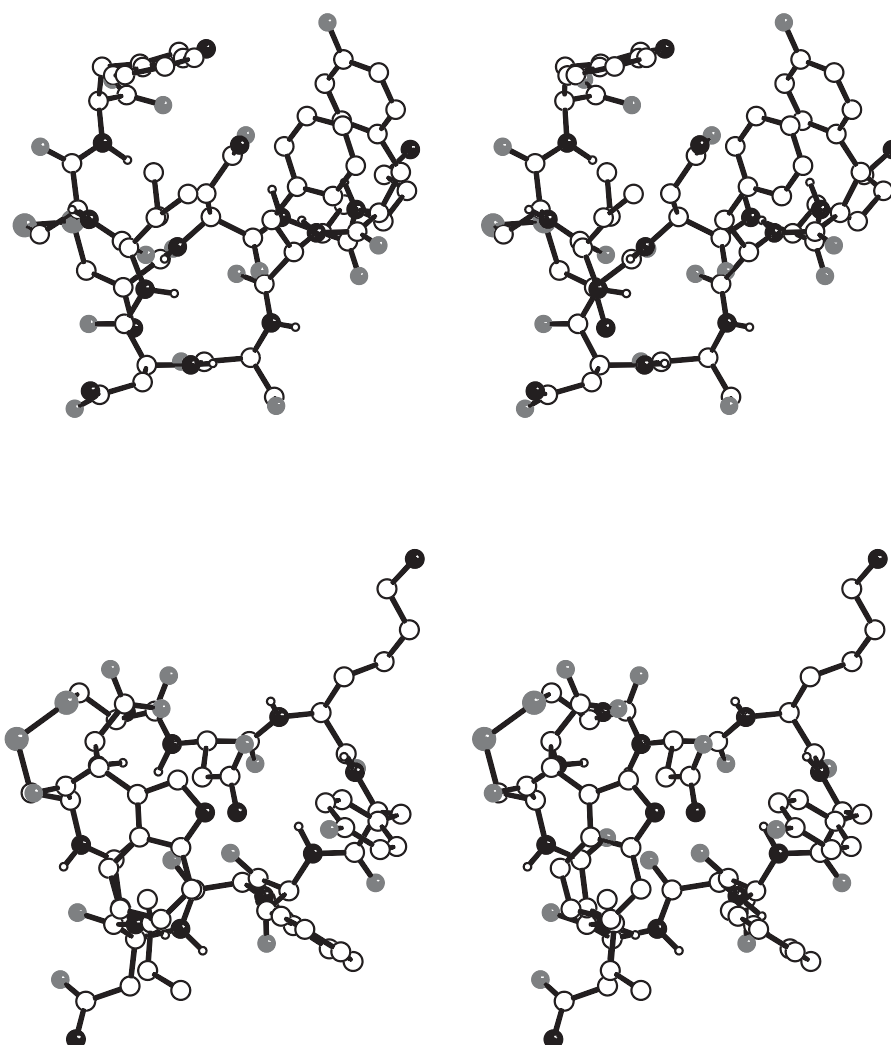


Abbildung 30: Stereodarstellung der Lösungsstruktur von *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**) (unten: 90° gedreht). Darstellung der Atome als Kugeln: C (weiß, groß), H (weiß, klein), N (schwarz), O (grau), S (grau, groß).

Um Verwechslungen zu vermeiden, werden in diesem Kapitel die Aminosäuren in *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**) von 1 (*N*-Terminus) bis 10 (*C*-Terminus) nummeriert, die Aminosäuren des ATF mit den der Sequenz im Protein entsprechenden Zahlen 21-30. Auffallendste Bestandteile der dreidimensionalen Struktur von **16** sind ein hydrophober *cluster* auf einer Seite des Peptidringes und zwei *turn*-Strukturen um die Reste Lys³, Tyr⁴ und Ser⁶, Asn⁷. Der *cluster* besteht aus den Seitenketten der Aminosäuren Lys³, Tyr⁴, Phe⁵, Ile⁸ und Trp¹⁰, wobei sich die Seitenkette von Ile⁸ im Zentrum dieses *clusters* befindet und von den aromatischen Seitenketten von Phe⁵ und Trp¹⁰ von der wässrigen Umgebung abgeschirmt wird. Diese Beschreibung befindet sich in Übereinstimmung mit den deutlichen Hochfeld-*shifts* der chemischen Verschiebungen der Methylgruppen in Ile⁸, die sich demnach über den Ebenen der Phenyl- bzw. Indolringe von Phe⁵ und Trp¹⁰ befinden müssen. Ähnliches gilt für die β , γ und δ -Methylengruppen der Lys³ Seitenkette, die ebenfalls eine Verschiebung Richtung höherem Feld erfahren. Die dargestellte Struktur ist allerdings nicht so starr, wie die Abbildung vermitteln mag. So haben *restraint molecular dynamics* (rMD)-Rechnungen ergeben, dass Ile⁸ eine bemerkenswerte Flexibilität um die C ^{α} -C ^{β} -Bindung aufweist und weiterhin zeigen zwei verschiedene ³J(H ^{α} H ^{β})-Werte für Tyr⁴, dass dessen Seitenkette auch in Rotameren vorliegt (g⁻, t), die eine Wechselwirkung mit den Methylengruppen von Lys³ erlauben. Diese enge Nachbarschaft der Seitenketten von Lys³ und Tyr⁴ entspricht auch einem Strukturelement, das in der NMR-Struktur des ATF gefunden wird.^[47,190] In den entsprechenden rMD-Rechnungen ist allerdings nur das Rotamer populiert, das an der Bildung des hydrophoben *clusters* mit Phe⁵ beteiligt ist (g⁺). Gleiches gilt für die Seitenkette von Trp¹⁰, deren Kopplungskonstanten ebenfalls die Population verschiedener Rotamere andeuten, während diese in den entsprechenden Simulationen nicht auftreten. Die entsprechende Rotation würde die Indolseitenkette von Trp¹⁰ in eine Position bringen, die der Position von Trp³⁰ im ATF entsprechen würde.

Über diesen hydrophoben *cluster* hinaus werden in der NMR-Struktur, wie bereits eingangs erwähnt auch reguläre Sekundärstrukturen beobachtet. Die β I-Schleife^[238,245] um die Aminosäuren Lys³ und Tyr⁴ weist zwar eine kaum populierte (i,i+3)-Wasserstoffbrücke auf,^[246] wird aber durch eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen

der Seitenkette von Asn² (O^{δ1}) und dem Amidproton von Tyr⁴ stabilisiert, wodurch ein sogenannter *Asx turn*^[247] gebildet wird. Die Carbonylfunktion Asn²O^{δ1} bildet weiterhin eine Wasserstoffbrücke zu Phe⁵H^N aus, wodurch sich letztere von Asn²CO weg orientiert und somit die bereits erwähnte Schwächung der (i,i+3)-Wasserstoffbrücke erklärt.

Eine zweite βI *turn*-Struktur ist um Ser⁶ und Asn⁷ erkennbar, wobei diese durch die entsprechende (i,i+3)-Wasserstoffbrücke zwischen Phe⁵CO und Ile⁸H^N stabilisiert wird. Eine weitere Seitenkettenwasserstoffbrücke zwischen Ser⁶O^γ und Asn⁷H^N trägt ebenfalls zur Stabilisierung bei. Neben diesen Strukturelementen tritt durch Rotation um die Phe⁵-Ser⁶-Amidbindung eine schwach populierte γ-Schleife auf, die durch die Seitenketten-Rückgrat-Wasserstoffbrücke zwischen Phe⁵CO und Ser⁶H^γ stabilisiert wird und nach geringer Änderung zu der ebenfalls populierte βII'-Schleife um Ser⁶ und Asn⁷ führt. Die beschriebene Flexibilität der Struktur in der Region Phe⁵-Ser⁶-Asn⁷ wird ebenfalls in dem Ensemble der 15 NMR-Strukturen von ATF gefunden.

Die Peptidstruktur mit zwei aufeinanderfolgenden *turn*-Motiven wird darüber hinaus durch eine stark frequentierte Wasserstoffbrücke zwischen Asn²H^N und Ile⁸CO stabilisiert. Die oben beschriebenen Struktureigenschaften lassen sich verwenden, um die Befunde aus Alanin- und D-Aminosäure-*scan* zu erklären.

Der starke Bindungsabfall bei Substitution der Seitenketten durch Alanin kann demnach im Fall der nicht direkt für die Bindung erforderlichen Seitenketten von Lys³ und Tyr⁴ in **8** und **9** (laut Sequenzvergleich mit den *phage display* Peptiden) durch eine Schwächung des hydrophoben *clusters* und einer damit verbundenen Destabilisierung der Struktur erklärt werden. Dafür sprechen auch die Befunde aus den FACS Analysen der möglichen Modifikationen an Lys³ und Tyr⁴ in **16** (siehe Kapitel 3.3.7). Die Substitution der Seitenketten von Asn² und Asn⁷ durch eine Methylgruppe (**7** und **12**) offenbart dagegen kaum Auswirkungen auf die biologische Aktivität; einerseits scheint die stabilisierende Wirkung der Seitenketten-Rückgrat-Wasserstoffbrücken Asn²O^{δ1}-Tyr⁴H^N und Asn²O^{δ1}-Phe⁵H^N für die Strukturbildung nicht besonders ausgeprägt zu sein und andererseits ist die Seitenkette von Asn⁷ in keiner erkennbaren Form an einer Stabilisierung der Struktur beteiligt. Unerklärlich bleibt allerdings, weshalb die Doppelmutation von Asn³/Asn⁷ gegen Ala³/Ala⁷ in einem fast

vollständigen Bindungsverlust resultiert. Der aus der Substitution Ser⁶-Ala⁶ (**11**) resultierende Bindungsabfall um den Faktor 10 kann durch den Verlust der beiden Wasserstoffbrücken Ser⁶O^γ-Asn⁷H^N und Ser⁶H^γ-Phe⁵CO erklärt werden, die in einer strukturell dynamischen Region liegen und somit einen deutlichen Einfluss auf die biologische Aktivität haben sollten.

Im Gegensatz zur Substitution der Seitenketten durch Methylgruppen lässt sich der Einfluss einer geänderten Stereochemie an C^α auf die biologische Aktivität nicht ohne weiteres erklären, da sich in dem flexiblen *ω-loop* kaum vorhersagen lässt, ob sich im Fall der für die Bindung essentiellen Seitenketten (Phe⁵, und Ile⁸) einzig deren Orientierung bei gleichbleibender Konformation des Rückgrates geändert hat (und damit nicht mehr für die Bindung zur Verfügung steht), oder die Struktur des gesamten Moleküls nachhaltig geändert wurde. Gleiches gilt für die an der Bildung des hydrophoben *clusters* beteiligten Seitenketten von Lys³ und Tyr⁴. Für die Inversion der Seitenkette von Asn² ergibt sich aus dem Vergleich mit den Werten aus dem *Ala-scan*, dass eine Veränderung der Rückgrat-Konformation wahrscheinlich erscheint (vollständiger Bindungsverlust für **17** im Vergleich zu **7**). Im Fall von Ser⁶ und Asn⁷ ergeben die Substitution durch Ala⁶ (**11**), D-Ser⁶ (**21**) und D-Asn⁷ (**22**) einen etwa gleich großen Bindungsverlust um den Faktor ~10, was eine gewisse Toleranz gegenüber strukturellen Veränderungen in diesem Bereich des Moleküls widerspiegelt, ein Befund, der durch die Ergebnisse der MD-Simulationen gestützt wird. Die Auswirkungen der Konfigurationen im Fall von Cys²¹, Cys²⁹ und Trp³⁰ wurden bereits in Kapitel 3.3.2 ausführlich diskutiert.

Durch die Ähnlichkeiten in der Bedeutung der einzelnen Seitenketten für die Rezeptorbindung in ATF und **16** erscheint eine ähnliche räumliche Anordnung der entsprechenden Seitenketten sehr wahrscheinlich. Eine Überlagerung der Lösungsstruktur von **16** mit der gemittelten NMR-Struktur von ATF ergibt dabei für die Seitenketten der Reste Tyr⁴, Phe⁵ und Ile⁸ tatsächlich eine beinahe identische Orientierung im Raum (siehe Abbildung 31).

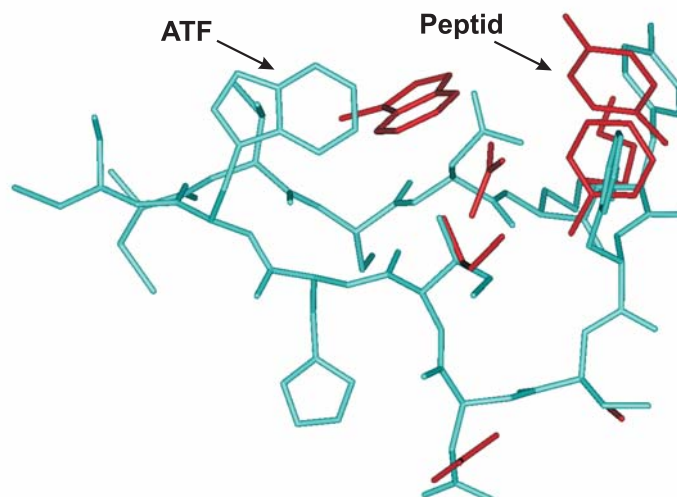


Abbildung 31: Überlagerung der biologisch bedeutsamen Seitenketten in der gemittelten NMR-Struktur von ATF mit denen in cyclo[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**) (Tyr⁴, Phe⁵ und Ile⁸, der Übersichtlichkeit wegen nur Seitenketten dargestellt) resultiert in einem RMSD von nur 0.6 Å für den Bereich Ile⁸ bis Tyr⁴. Das exocyclische Trp¹⁰ ist wegen der mangelnden Aussagekraft der Daten für die Überlagerung nicht berücksichtigt.

Die Trp-Reste liegen im ATF und **16** allerdings bei erster Betrachtung nicht in den exakt gleichen Positionen vor, allerdings ermöglicht es die freie Drehbarkeit, wie in den Betrachtungen zur NMR-Struktur von **16** bereits beschrieben, nahezu jede beliebige Position im Raum anzunehmen (und somit auch, aus dem hydrophoben cluster der Lösungskonformation auszuscheren und eine dem ATF vergleichbare Position bei der Rezeptorbindung anzunehmen). Für die Überlagerung der Seitenkettenvektoren der für die biologische Aktivität besonders wichtigen Aminosäurereste wurden die Werte für Trp nicht berücksichtigt, da der Indolring in besonderem Maß an der Bildung des hydrophoben clusters teilnimmt, dieses Strukturelement aber für Trp³⁰ in ATF nicht in diesem Ausmaß auftritt. Die entsprechende Überlagerung der biologisch bedeutsamen Seitenketten von Tyr⁴, Phe⁵ und Ile⁸ in **16** resultiert in einem RMSD von nur 0.6 Å (Abbildung 31)!

Aus den beschriebenen strukturellen Beobachtungen lassen sich folgende Voraussetzungen für die Entwicklung hochaffiner uPAR-Antagonisten formulieren:

- Eine Minimalsequenz von 10 Aminosäuren (siehe auch Kapitel 3.3.6)
- Die Orientierung der Seitenketten von Phe⁵, Ile⁸ und Trp¹⁰ auf einer Ringseite.
- Das Auftreten zweier, aufeinander folgender β -turn-Motive um Lys³/Tyr⁴ und Ser⁶/Asn⁷.
- Ein (formaler) Abstand von vier Aminosäuren zwischen Phe⁵ und Trp¹⁰ (eine zusätzliche Methylengruppe im Rückgrat führt auch im *Danø*-Peptid AE68 zu einem kompletten Bindungsverlust).

Weitergehende Versuche, die Konformation von **16** durch Variation der verbrückenden Einheit zu optimieren und die Modifikationen von *N*- und *C*-Termini sind Themen der folgenden Kapitel.

3.3.4 Weitere Modifikationen an der verbrückenden Einheit von *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ und ihre Auswirkungen auf die Rezeptorbindung.

3.3.4.1 Lineare Derivate

Aus den bereits in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Beobachtungen im *Ala-scan* von **5** lassen sich keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Bedeutung der Disulfidbrücke für die biologische Aktivität ziehen (Rigidisierung *versus* Bindung). Auch die von *C. Riemer* durchgeführten Modifikationen mittels Lanthionin legen nahe, dass die Verbrückung im Bereich 21/30 der uPAR-Antagonisten hauptsächlich für die optimale Anordnung der funktionellen Gruppen in dem betrachteten Bereich und die Rigidisierung der Verbindung benötigt wird. Um eine mögliche (partielle) Beteiligung der Disulfidbrücke an der Rezeptorbindung zu untersuchen (was im Falle einer aktiven Verbindung auch die Möglichkeit zur Entfernung der unter physiologischen Bedingungen instabilen Cystinbrücke eröffnen würde), wurde das Konzept des isosteren Ersatzes auf hydrophobe, z. T. Schwefel enthaltende Seitenketten erweitert und die entsprechenden linearen Varianten **42-45** von *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) synthetisiert (siehe Abbildung 32).

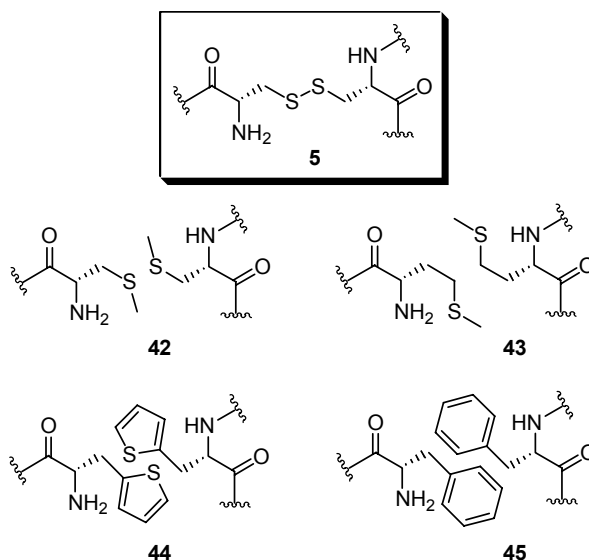


Abbildung 32: Lineare Modifikationen zum versuchsweisen Ersatz der Cystinbrücke in der Leitstruktur $\text{cyclo}[21,29][\text{Cys}^{21,29}]\text{-uPA}_{21-30}$ **5** (Ersatz beider Cysteine durch Cys(Me) zu **42**, Met zu **43**, Thi zu **44** und Phe zu **45**).

Der Ersatz der Disulfidbrücke durch je zwei Aromaten basiert auf dem Postulat, dass durch Aromatenstapelung eine Einschränkung des konformationellen Raumes in Peptiden erfolgen kann. Diese Annahme wurde im Fall des bereits erwähnten *Veber-Hirschmann*-Peptids postuliert, in dem ein Ersatz zweier, im Cyclus gegenüberliegender Phe-Seitenketten durch eine Cystinbrücke möglich war (ein Beleg für diese Theorie konnte allerdings bis heute nicht erbracht werden).^[241,248,249] Weitere Versuche, die konformationelle bzw. die biologische Stabilität der Cystinbrücke durch Modifikation der Seitenketten zu verbessern werden nachfolgend beschrieben.

3.3.5 Penicillamin als rigidisierendes Element?!

Der β -dimethylsubstituierte, cysteinanalogue Baustein Penicillamin (Pen, **46**) wurde in Form seines aus dem Penicillin G gewonnenen D-Isomers schon seit geraumer Zeit in der Medizin als *scavanger* bei Schwermetallvergiftungen eingesetzt, wobei der Einsatz

als Notfallmedikament die enormen Herstellungskosten für das enantiomerenreine Produkt aus Penicillin (das L-Isomer ist toxisch) rechtfertigte (siehe Abbildung 33).

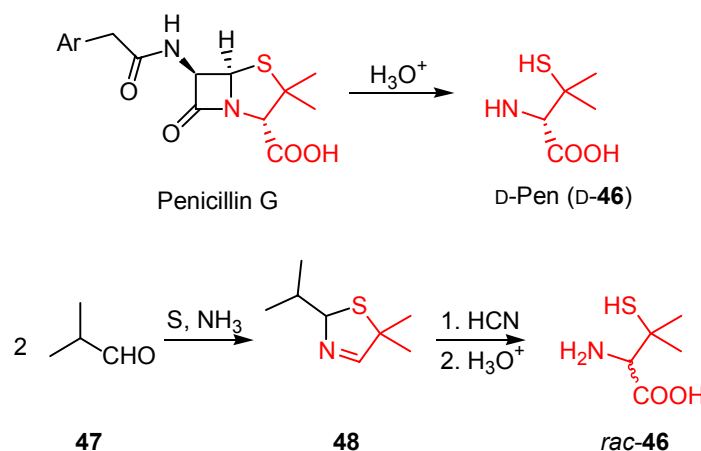


Abbildung 33: Enantioselektive und racemische Synthesen von Penicillamin (46). Die Hydrolyse von Penicillin G zu D-46 (scavenger bei Schwermetallvergiftungen, L-46 ist toxisch) ist heute weitgehend durch die Synthese von rac-46 und anschließende Racematspaltung ersetzt worden.

Mit der Verwendung als Baustein in der Peptidsynthese sind zahlreiche Verfahren zur racemischen Synthese und der nachfolgenden Racematspaltung entwickelt worden, sodass heute beide Fmoc-geschützten Enantiomere kommerziell erhältlich sind (siehe Abbildung 33).

Steigerungen von biologischer Aktivität und Selektivität gegenüber verschiedenen Rezeptorsubtypen in Penicillamin-cyclisierten Peptiden gegenüber ihren cysteinsubstituierten Analogen sind häufig in der Literatur beschrieben^[250-252] und im Falle der von den Enkephalinen abgeleiteten Peptide und ihrer Opioid-Rezeptoren eingehend untersucht worden.^[253-258] Ob die beschriebenen Effekte aber auf eine weitere Rigidisierung der Disulfidbrücke und damit auf Stabilisierung der biologisch aktiven Konformation zurückzuführen ist, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden, da sich alle strukturellen Untersuchungen auf die jeweils aktivsten gefundenen Verbindungen konzentrieren und nicht auf einen Vergleich der Konformationen zwischen Pen- und Cys-substituierten Peptiden.

Die genauere Betrachtungen aller Bindung in unmittelbarer Nachbarschaft der Disulfidbrücke offenbart allerdings, dass die sterische Überfrachtung in der C^β -Position nicht zwangsläufig zu einer stärkeren Einschränkung auf eine Vorzugskonformation führen muss (siehe auch Abbildung 34).

Prinzipiell werden zwar die Rotationsbarrieren bei der Einführung sterischer Hinderungen größer, die energetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Rotameren können aber auch kleiner werden. Eine Abschätzung, welcher Effekt für die Konformation überwiegt ist ohne entsprechende Daten nicht möglich.

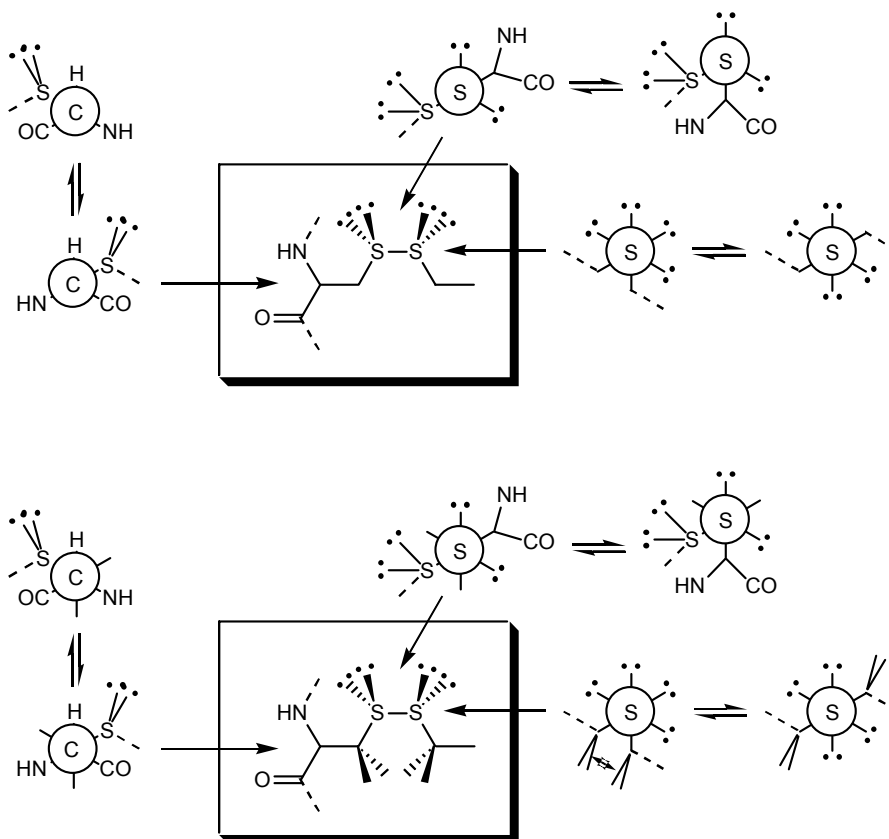


Abbildung 34: Vergleich der Newman-Projektionen der an den Cystin- (Kasten oben) und Pen/Pen-Brücken (Kasten unten) beteiligten Bindungen. Zumindest im Fall der S-S-Bindung der Pen/Pen-Brücke (unten, rechts) ist eine Destabilisierung der Vorzugskonformation gegenüber der Cystinbrücke offensichtlich.

Auch die auf gesteigerten Aktivitäten und besseren Selektivitäten basierende Argumentationen einiger Autoren bezüglich der Rigidität peptidischer Cyclen kann

ohne genaue Kenntnis der Strukturen verschieden substituierter Verbindungen in Lösung und am Rezeptor keine Antwort auf die Frage nach der Stabilisierung einer Struktur geben. Einzig *Veber et al.* haben zumindest die NMR-Lösungsstrukturen zweier disulfidcyclischer RGD-Peptide verglichen und konnten eine geringfügige Abnahme der Flexibilität des Rückgrates beim Ersatz von Cys durch Pen zeigen (bei ebenfalls ähnlicher biologischer Aktivität),^[259] während die Erklärungen für die teilweise drastischen Änderungen der biologischen Eigenschaften anderer Moleküle überwiegend auf Mutmaßungen beruhen.

So können im Falle einer durch die Einführung von Pen gesteigerten biologischen Aktivität/Selektivität mehrere Erklärungen möglich sein:

- Die biologisch aktive Konformation wird durch die Substitution stabilisiert (unabhängig davon, ob diese auch der Lösungsstruktur entspricht oder letztere destabilisiert wird).
- Eine *mismatched*-Vorzugskonformation wird durch die Substitution destabilisiert, wodurch eine biologisch aktive Konformation (oder eine, die den Übergang in eine solche besser ermöglicht) stärker populiert wird.
- Die zusätzlichen β -Methylgruppen füllen eine (sonst nicht besetzte) Bindungstasche nahe der Disulfidbrücke (besser) aus.

Für eine verminderte Aktivität nach Substitution durch Pen ergeben sich analog die inversen Erklärungen.

Im Fall der Leitstruktur *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**) wurden alle Verbindungen synthetisiert, die an den Cyclisierungspunkten alle Kombinationen von D-/L-Pen und/oder Cys enthalten (siehe Tabelle 2) und auf ihre biologische Aktivität untersucht.

Die Synthesen der geschützten Peptide an fester Phase und anschließende Entschützung verlaufen auch im Fall der doppelt β -substituierten Pen Derivate problemlos an fester Phase nach den in Kapitel 3.3.1 und 7.3 beschriebenen Methoden. Die oxidativen Cyclisierungen mittels DMSO in Wasser bedürfen allerdings der HPLC-Kontrolle, da je nach sterischer Hinderung die Reaktionen zwischen 12 h

(Cys/Cys, **5**, **16**, **24**, **26**) und drei Tagen (Pen/Pen, **49-52**) dauern (Cys/Pen-Verbindungen **53-60** benötigen entsprechend 1-2 d zur vollständigen Umsetzung).

Tabelle 2: Liste aller synthetisierten D-/L-Pen und/oder Cys Modifikationen in *cyclo[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀* **16**.

Modifikation Position ^{21/29}	Verbindung	Modifikation Position ^{21/29}	Verbindung
Cys/Cys	5	Cys/Pen	53
D-Cys/Cys	16	D-Cys/Pen	54
Cys/D-Cys	24	Cys/D-Pen	55
D-Cys/D-Cys	26	D-Cys/D-Pen	56
Pen/Pen	49	Pen/Cys	57
Pen/D-Pen	50	D-Pen/Cys	58
D-Pen/Pen	51	Pen/D-Cys	59
D-Pen/D-Pen	52	D-Pen/D-Cys	60

Die anschließenden FACS-Analysen offenbarten durchweg geringere biologische Aktivitäten der Pen-Derivate im Vergleich zu den Cys-Derivaten, allerdings folgten die Verbindungen dem in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Prinzip, dass die Kombination D-Xaa²¹-L-Xaa²⁹ die größte antagonistische Wirkung für uPAR hat (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: IC₅₀-Werte der aktivsten Cys/Pen-Modifikationen in *cyclo[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀* (**16**).

Modifikation Position ^{21/29}	Verbindung	IC ₅₀ [μM]
D-Cys/Cys	16	0.04
D-Pen/Pen	51	0.12
D-Cys/Pen	54	0.19

Während die Aktivitäten der Pen-Modifikationen **51** und **54** nur moderate Änderungen der Bindungsaktivitäten um den Faktor 3-5 aufweisen, hat die Einführung des Pen-Restes in der Kombination D-Pen/Cys (**58**) dramatische Auswirkungen auf die biologische Aktivität. So ergibt sich für **58** mit einem $IC_{50} = 3 \mu\text{M}$ ein Bindungsabfall um den Faktor 100.

3.3.6 Der N- und C-Terminus von *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**)

Die Untersuchung möglicher Modifikationen von N- und C-Termini in Peptiden bildet neben der Optimierung von biologischer Aktivität (falls die terminalen Funktionalitäten essentiell für diese sind) und proteolytischer Stabilität (Exopeptidasen) die Voraussetzung für einfach einzuführende Modifikationen mit Farbstoffen, Linkern, Dendrimeren und/oder weiteren Wirk- und Markierungsstoffen. Im Sinne einer Optimierung von biologischer Aktivität und proteolytischer Stabilität kommen als Modifikationen zwei Positionen in Frage:

- Seitenketten terminaler Aminosäuren (Art und stereochemische Orientierung)
- Amino- und/oder Carboxylgruppe

Auf erstere wurde im Fall des verbrückenden Cys²¹ in **16** bereits in den Kapiteln 3.3.1, 3.3.2, 3.3.4.1 und 3.3.5 und im Fall von Trp³⁰ teilweise in 3.3.2 eingegangen.

Der Ersatz der Seitenkette von Trp³⁰ durch eine Reihe kommerziell erhältlicher, proteinogener (Phe **61**, Tyr **63** und His **66**) und nicht-natürlicher Aminosäuren (Thi **62**, 2-Nal **64** und Thia **65**; siehe Abbildung 35) erfolgte nach den in den Kapiteln 3.2, 3.3.1, und 7.3 beschriebenen Methoden mittels automatisierter Festphasensynthese.

Von den nichtproteinogenen Modifikationen mit Thi (**62**), Nal (**64**) und Thia (**66**) zeigte nur **52** eine der Leitstruktur **16** vergleichbare Aktivität von $0.22 \mu\text{M}$ während mit Ausnahme von **51** ($0.18 \mu\text{M}$) und **53** ($0.60 \mu\text{M}$) alle anderen Modifikationen deutlich schlechtere Bindungseigenschaften ($IC_{50} > 1 \mu\text{M}$) an uPAR aufwiesen.

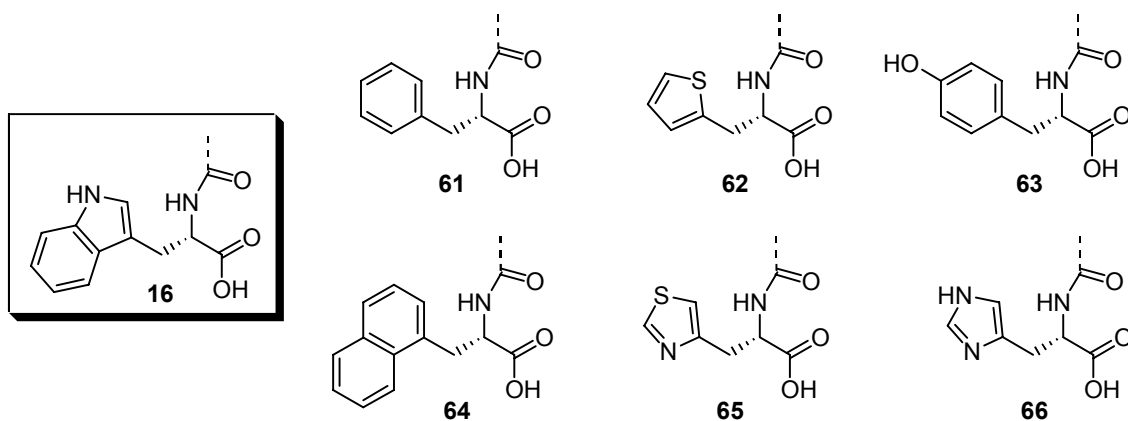


Abbildung 35: C-Terminale Modifikationen der Seitenkette von Trp³⁰ in **16** zu den Peptiden **61-63** mit IC_{50} -Werten von 180, 220, 600 nM, und **64-66** mit Aktivitäten $>1\mu M$.

Bei den Abwandlungen der N- und C-Termini handelt es sich um die in Abbildung 36 dargestellten acetylierten, deletierten, amidierten und reduzierten Verbindungen **67-76**.

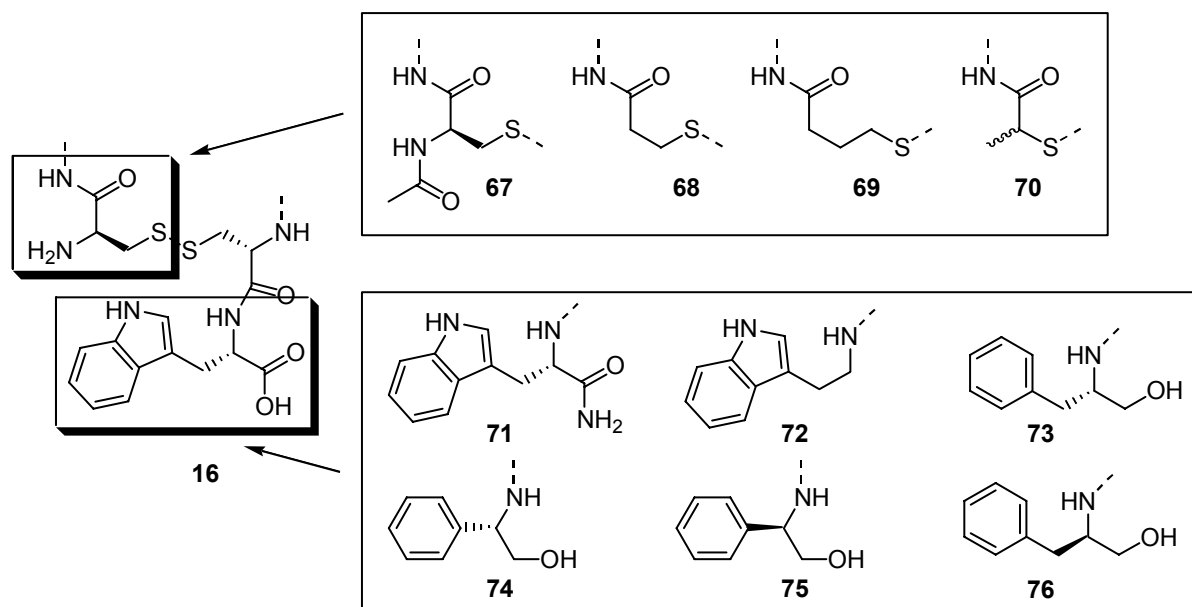


Abbildung 36: Modifikationen an N- und C-Termini von cyclo[21,29][D-Cys²¹ Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ **16**

Die Synthese der *N*-terminal modifizierten Verbindungen erfolgte mittels den in Kapiteln 3.3.1 und 7.3 beschriebenen Methoden entweder durch *capping* der seitenkettengeschützten Peptide H-CNKYFSNICW-TCP mit Ac₂O / DIPEA / NMP zu **67** oder durch Kupplung der *S*-Trityl-geschützten 2-Mercaptoessigsäure (**77**), 3-Mercaptopropionsäure (**78**) oder *rac*-Mercaptomilchsäure (**79**) an seitenkettengeschütztes H-CNKYFSNICW-TCP, anschließender Abspaltung und oxidativer Cyclisierung mittels 3% DMSO in Wasser zu **58-60**.

In den FACS-Analysen erwiesen sich alle Verbindungen **67-70** als inaktiv, was auf den ersten Blick unverständlich erscheint, da die freie Aminogruppe in Position 21 im Protein und den daraus abgeleiteten uPA₁₉₋₃₁ Peptiden **3** und **4** ebenfalls acyliert vorliegt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen liefert die Struktur des ATF. In allen Spezies ist in Position 29 eine positive Ladung entweder als His oder Arg in der Seitenkette konserviert. Da diese unterhalb der Cyclusebene liegt, wäre es möglich, dass der *N*-Terminus diese, durch die Cysteinsubstitution verlorene Ladung, zu ersetzen vermag (siehe auch Kapitel 3.3.3). Diese Theorie würde auch erklären, weshalb das am *N*-Terminus um eine exocyclische Aminosäure verlängerte, von *M. Sukopp* synthetisierte Peptid *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₀₋₃₀ (**80**) die volle biologische Aktivität aufweist, die *N*-acetylierte Form **81** aber erneut einen dramatischen Bindungsabfall aufweist.^[260] Im Fall des ebenfalls aktiven [Ala²⁹]-uPA₁₉₋₃₁ (**82**) (von *M. Bürgle* als lineare Verbindung synthetisiert und getestet!)^[14] müsste dann allerdings die Aminogruppe von Cys¹⁹ entsprechend zurückgefaltet sein, um die fehlende Ladung zu ersetzen. Die Bedeutung der *N*-terminalen Aminogruppe für die biologische Aktivität stimmt auch mit den Ergebnissen aus Ala- und D-Aminosäure-*scan* von **5** überein und scheint die dort angestellten Überlegungen zu bestätigen (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). Erwähnenswert scheint an dieser Stelle auch der Vergleich mit dem von *Danø et al.* entwickelten 10mer Peptid **AE68**, für das die Minimalsequenz *N*-terminal ebenfalls in dieser Region endet (entsprechend uPA₂₂₋₃₁), das ebenfalls keine positiv geladene Seitenketten enthält und deren terminale Seitenketten für die biologische Aktivität unwichtig sind.^[94] Im Hinblick auf die proteolytische Stabilität ist die mangelnde Substituierbarkeit jedoch kein Problem. Einerseits handelt es sich bei *N*-terminalen Cysteinen um eine von sieben Aminosäuren, die Peptide und Proteine in Eukaryonten vor dem Abbau bewahren

(Met, Ser, Ala, Thr, Val, Gly und Cys)^[261] und andererseits ist durch die D-Konfiguration gewährleistet, dass kein Abbau durch Exopeptidasen erfolgen kann. Im Gegensatz zu der Aminogruppe von Cys²¹ ist die C-terminale Carboxylfunktion von Trp³⁰ in **16** ohne Bindungsverlust substituierbar. Die synthetischen Zugänge zu den in Abbildung 36 dargestellten Modifikationen **71-76** werden nachfolgend beschrieben.

Die Synthese des Peptides mit der Modifikation Trp³⁰-NH₂ (**71**) am C-Terminus in **5** erfolgte über das kommerziell erhältliche Sieber-Amidharz nach dem in Abbildung 37 dargestellten, allgemeinen Schema.

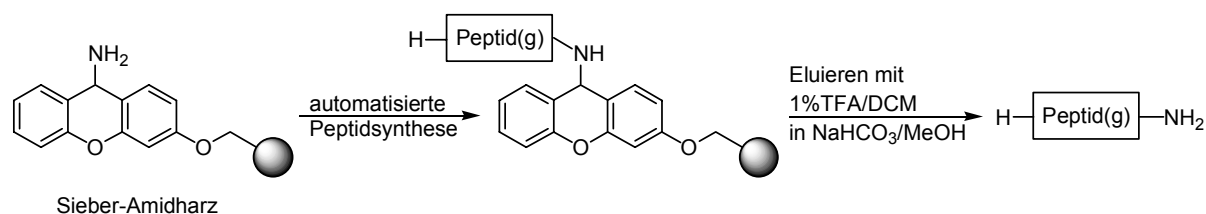


Abbildung 37: Synthese C-terminaler, geschützter (g) Peptidamide mittels Sieber-Amidharz durch automatisierte Festphasensynthese und anschließender 'flow'-Elution zur schnellen Neutralisierung.

Die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-Trp(Boc)-OH und die Synthese des geschützten Peptids erfolgt unter den allgemeinen, in den Kapiteln 3.2, 3.3.1 und 7.3 beschriebenen Bedingungen. Anschließend wurde in einem Zweistufenprozess erst das geschützte Peptid vom Harz abgespalten und dann separat die Seitenkettenentschützung zu **71** durchgeführt. Die entsprechende Einstufensynthese entschützter Peptidamide (simultane Abspaltung vom Harz und Seitenkettenentschützung) mittels Rink-Amidharz hat nach eigenen Erfahrungen häufig zu verunreinigten Verbindungen infolge labiler Linkersysteme geführt und wurde aus diesem Grund nicht mehr angewendet.

Für die Synthese der C-terminalen Aminoalkoholpeptide **73-76** unter Verwendung der auf Phenylalanin und Phenylglycin basierenden L- und D-Fmoc-Phe-ol (L- und D-**83**) und L- und D-Fmoc-Phg-ol (L- und D-**84**) muss die Festphasensynthese geringfügig abgeändert werden. Zur Verankerung der C-terminalen Fmoc-Aminoalkohole stehen

zwei verschiedene Linkersysteme zur Verfügung, das bekannte TCP-Harz^[262] und ein von *Ellman et al.* eingeführtes Dihydropyran(DHP)-Polystyrolharz.^[263] Der Unterschied der beiden Linker besteht hauptsächlich in der Toleranz sterischer gehinderter Seitenketten (Abbildung 38).

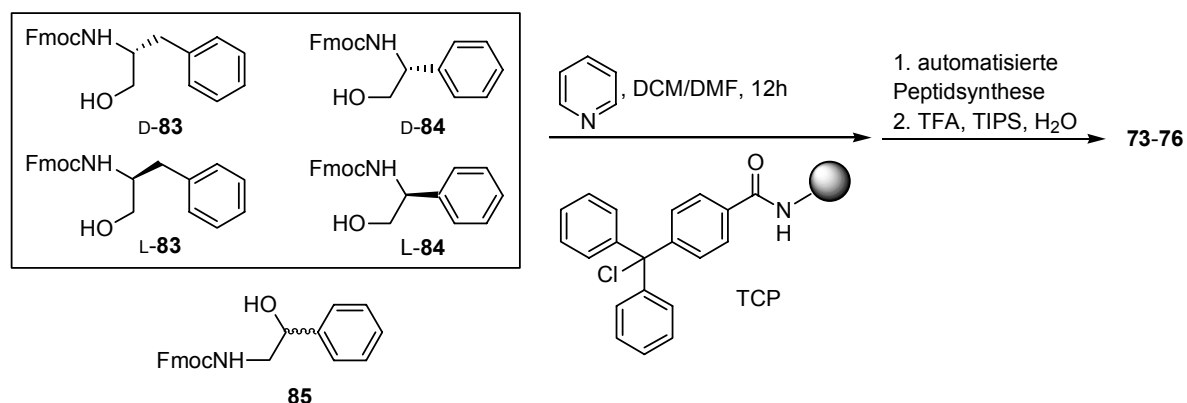


Abbildung 38: Belegung von TCP-Harz mit Fmoc-Aminoalkoholen **83** und **84** und anschließende automatisierter Peptidsynthese zu **73-76**. Der α -verzweigte Fmoc-Aminoalkohol **85** konnte nicht an den Trityllinker gekuppelt werden.

Während die Verankerung β -verzweigter Aminoalkohole **83** und **84** an TCP Harz in 12 h in Anwesenheit von Pyridin gelingt, erwies es sich als unmöglich, den Aminoalkohol **85** an TCP zu verankern. Die C-terminalen Aminoalkoholpeptide **73-76** wurden in FACS-Analysen auf ihre uPAR-antagonistische Wirkung untersucht, zeigten aber alle keinen Effekt. Möglicherweise spielte hier die sehr schlechte Löslichkeit der Verbindungen oder aber im Fall der Aminoalkohole **84** der 'falsche' Abstand des Aromaten zur Peptidkette eine entscheidende Rolle. Aufgrund der nachfolgend geschilderten Ergebnisse für die Deletion der Carboxylgruppe bleiben aber Zweifel an der Verlässlichkeit dieser Messreihe.

In einer letzten Modifikation wurde die Trp³⁰-Carboxylgruppe in **16** ganz entfernt und die Auswirkung dieser Modifikation auf die biologische Aktivität untersucht. Da in diesem Fall keine funktionelle Gruppe für die Bindung an die feste Phase zur Verfügung steht, musste die Synthese als Fragmentkondensation wie in Abbildung 39 gezeigt durchgeführt werden.

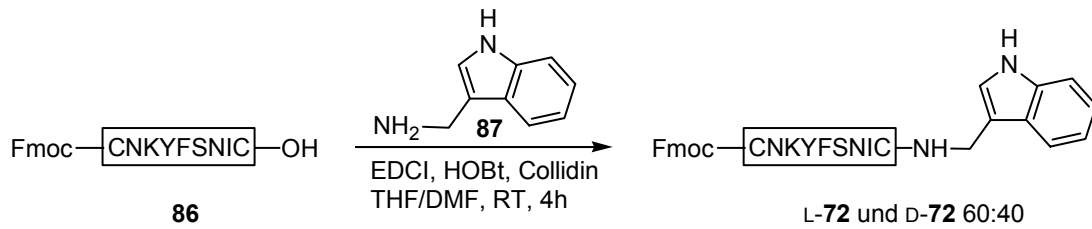


Abbildung 39: *Synthese der carboxydeletierten Variante 72 von cyclo[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ 16 durch Lösungssynthese. Die Racemisierung des Cys²¹ lieferte nach der Entschützung und Trennung durch HPLC die beiden potenziell biologisch aktiven Enantiomeren L-72 und D-72 im Verhältnis 60:40.*

Bei der Synthese wurde durch Verwendung des Systems von EDCI/HOBt die Racemisierung an dem schon unter Peptidsynthesebedingungen racemisierungsgefährdeten Cys(Trt) provoziert, um neben der Variation des C-Terminus gleichzeitig den Einfluss der Stereochemie an dem verbrückenden Cys²⁹ auf die exocyclische Indolfunktion untersuchen zu können (siehe auch Kapitel 3.3.2). Wie die FACS-Analyse von L-72 und D-72 ergab, ist die Carboxylgruppe nicht an der Rezeptorbindung beteiligt (Abbildung 40).

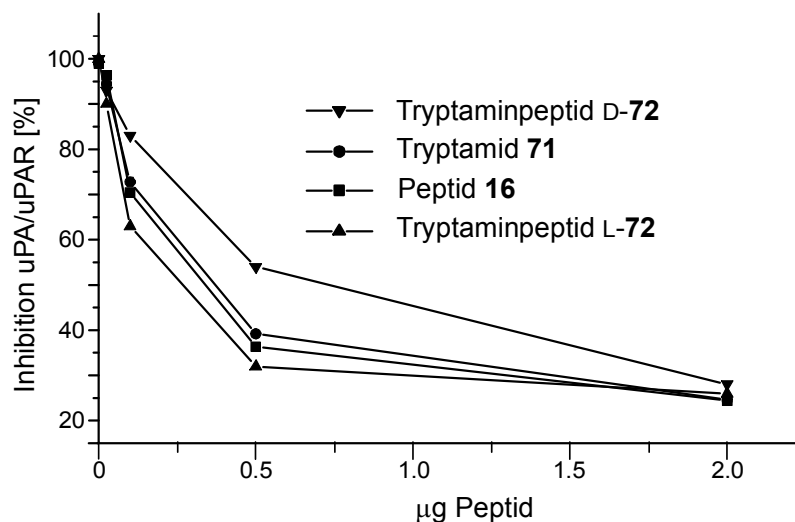


Abbildung 40: *Dosisabhängige FACS-Analyse der C-terminalen Modifikationen 71, L-72, und D-72 im Vergleich zu 16.*

Analog zu den Ergebnissen für die D-Aminosäurevarianten ist auch in diesem Fall das L-Cys²⁹ Enantiomer **5** geringfügig aktiver als die D-Verbindung **24**, was eine Beteiligung an einer konformationellen Stabilisierung der Trp-Seitenkette in **16** ausschließt.

Die Toleranz der C-terminalen Carboxylgruppe öffnet einen einfachen Zugang zu den eingangs erwähnten Modifikation mittels Festphasensynthese. Weitere Seitenkettenmodifikationen der übrigen Reste sind Thema des folgenden Kapitels.

3.3.7 Seitenkettenmodifikationen von *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀

Der Ersatz von Aminosäureresten durch nichtproteinogene Seitenketten stellt neben der Cyclisierung einen der wichtigsten Ansätze zur Entwicklung proteasestabiler peptidischer Wirkstoffe dar. Entsprechend wurden von *M. Bürge* (Wilex AG) eine Reihe modifizierter Abwandlungen von **16** synthetisiert (**88-106**) und mittels FACS-Analyse auf uPAR-Bindung untersucht (siehe Abbildung 41).

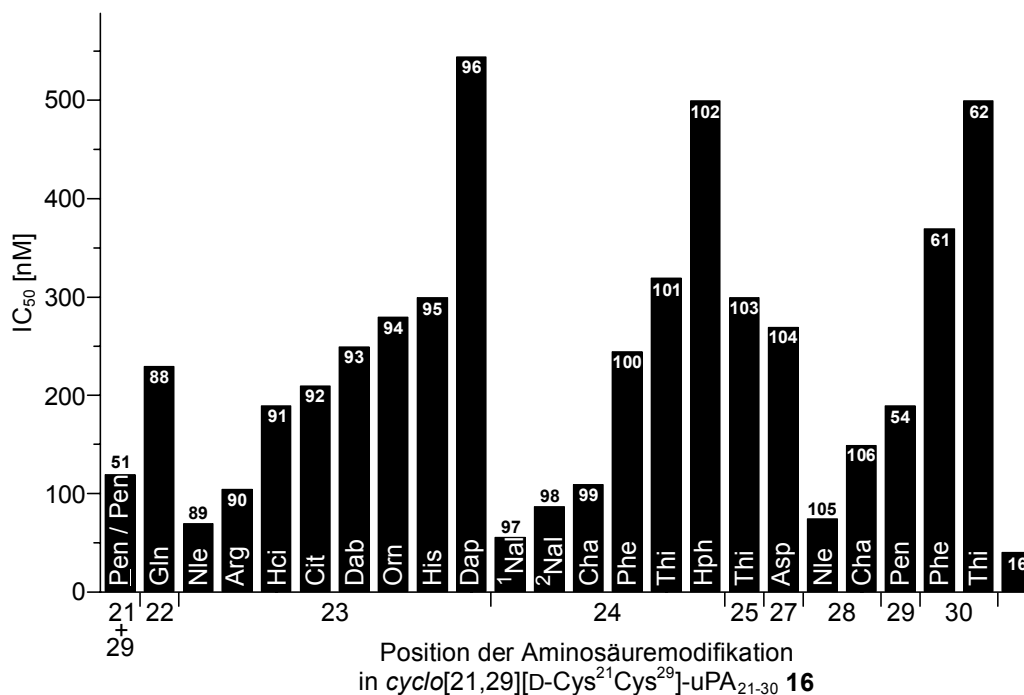


Abbildung 41: Übersicht der aktivsten Seitenkettenmodifikationen (IC_{50} in FACS) in *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ **16** bis 500 nM.

Wie bereits in Kapitel 3.3.6 beschrieben hat die Art der Seitenketten starke Auswirkungen auf die proteolytische Stabilität einer peptidischen Verbindung. Insbesondere die Positionen 23 und 24 sind gleich mehrfach bedeutsam für die Stabilität. Erstens handelt es sich bei der Kombination einer geladenen Aminosäureseitenkette neben einer aromatischen oder sperrigen Seitenkette um zwei Motive, die bevorzugte Erkennungssequenz zahlreicher Endopeptidasen sind. Zweitens ist die Lysin-Seitenkette der wichtigste Bindungspunkt für die Ubiquitin-Markierung^[264,265] zum Abbau von Proteinen und Peptiden in Eukaryonten (allerdings handelt es sich dabei um einen cytosolischen Vorgang und ist hier wahrscheinlich nicht von Bedeutung).

Wie aus Abbildung 41 ersichtlich sind die Seitenketten von Lys²³ und Tyr²⁴ gut durch andere nichtproteinogene Aminosäuren substituierbar. Im Fall von Lys²³ ist die positive Ladung für die biologische Aktivität nicht erforderlich, sondern nur abhängig von der Länge der hydrophoben Seitenkette (**89-96**). Die größte Aktivität zeigt dabei die Modifikation durch die unverzweigte Kohlenwasserstoffkette des Norleucins in **89**. Auch im Fall von Tyr²⁴ ist die Seitenkette unter Erhalt der biologischen Aktivität gut durch andere aromatische (**97, 98**) und aliphatische (**99**), nichtproteinogene Seitenketten ersetzbar. Diese Beobachtung scheint auch die Hypothese in den Kapiteln 3.3.1 und 3.3.3 zu bestätigen, dass die Seitenketten von Lys²³ und Tyr²⁴ eher an der hydrophoben Stabilisierung der Peptidstruktur als an der eigentlichen Rezeptorbindung beteiligt sind. Ebenfalls erwähnenswert ist die gute Substituierbarkeit von Ile²⁸ durch Nle (**105**) und Cha (**106**), was bezüglich der Entwicklung neuer Cyclisierungsstrategien von Bedeutung ist.

Neben der Ermittlung der biologischen Aktivität in FACS-Analysen ist die Untersuchung der beschriebenen Verbindungen bezüglich proteolytischer Stabilität, Toxizität und Inhibition der Angiogenese bzw. des Tumorwachstums (*proof-of-principle*) in biologischen Systemen von großer Bedeutung für die Entwicklung eines Wirkstoffes und ist Thema des folgenden Abschnitts.

3.4 Proteolytische Stabilitäten, Toxizitäten und *ex vivo* Untersuchungen an *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**) und -Derivaten

3.4.1 Proteolytische Stabilitäten

In den von M. Bürgle (Wilex AG) durchgeführten Untersuchungen zum proteolytischen Abbau wurden die Stabilitäten von *cyclo*[19,31]-uPA₁₆₋₃₂ **107**, mit denen von **16** und den entsprechenden Lys²³-Modifikationen (Nle **89**, Orn **94**, Dab **93** und Dap **96**) in Vollblut, Serum, uPA und Plasmin verglichen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Stabilitäten ausgewählter Verbindungen gegenüber Vollblut, Plasma, uPA und Plasmin.

Verbindung	Enzymsystem	Stabilität % / [h]
<i>cyclo</i> [19,31]-uPA ₁₆₋₃₂ 107		20/0.25; -/1
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ 16	Vollblut	100/24
Lys ²³ -Modifikationen 89 , 93 , 94 und 96		100/24
<i>cyclo</i> [19,31]-uPA ₁₆₋₃₂ 107		20/0.25; -/1
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ 16	Serum	100/24
Lys ²³ -Modifikationen 89 , 93 , 94 und 96		100/24
<i>cyclo</i> [19,31]-uPA ₁₆₋₃₂ 107		n.d.
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ 16	uPA	100/24
Lys ²³ -Modifikationen 89 , 93 , 94 und 96		100/24
<i>cyclo</i> [19,31]-uPA ₁₆₋₃₂ 107		-/1
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ 16	Plasmin	-/1
Lys ²³ -Modifikationen 89 , 93 , 94 und 96		100/24

Auffallend ist die bereits im Fall von **16** bestehende Resistenz gegen proteolytischen Abbau in Vollblut und Serum im Vergleich zu dem größeren cyclischen Peptid *cyclo*[19,31]-uPA₁₆₋₃₂ **107**, dass bereits nach 15 min. zu 80% abgebaut ist. Besondere

Bedeutung kommt der Stabilität gegenüber uPA und Plasmin zu, die dem biologischen Mechanismus der Metastasierung zufolge in erhöhter Konzentration auf der Zelloberfläche vorliegen. Entsprechend wichtig ist die Beobachtung, dass zwar beide uPA₂₁₋₃₀-Peptide stabil gegenüber uPA sind, aber erst nach Modifikation an Lys²³ (**89**, **93**, **94** und **96**) resistent gegen den Abbau durch Plasmin werden.

3.4.2 Zelltoxizität

Die Untersuchung der Zelltoxizität ist Voraussetzung für die Entwicklung von Wirkstoffen und wurde bei der Wilex AG durchgeführt (siehe Abbildung 42).

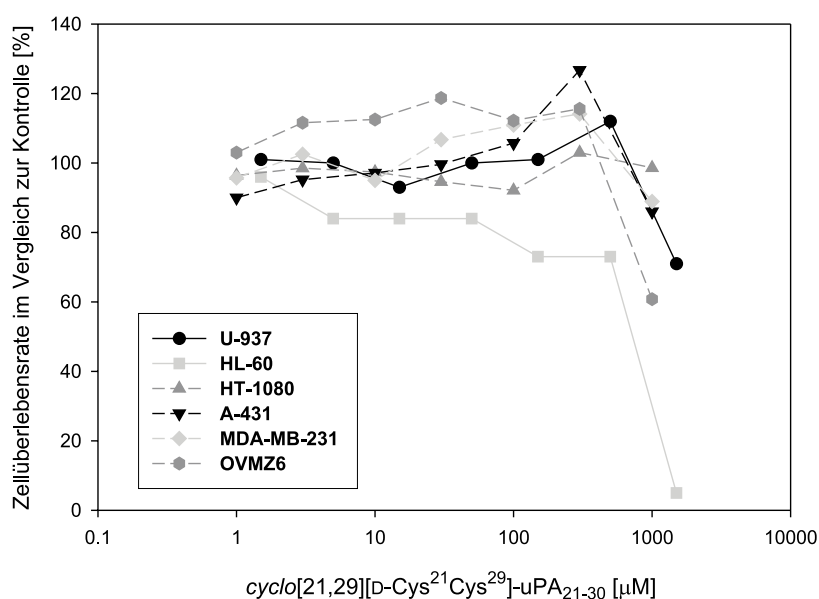


Abbildung 42: Dosisabhängige Zellüberlebensraten verschiedener Tumorzelllinien für cyclo[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**).

Bei diesem Test wurde der Einfluss von **16** auf die Überlebensfähigkeit verschiedener Zelllinien in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration untersucht.

Wie aus Abbildung 42 ersichtlich zeigt einzig HL-60 (humane, akute promyelozytische Leukämie) bei Konzentrationen oberhalb von 1 mM einen Effekt in der dosisabhängigen Zellüberlebensrate, weshalb **16** als nicht toxisch eingestuft werden

kann (die toxische Konzentration für HL-60 entspricht immerhin einer Lösung 1.3 g 16 / mL!).

3.4.3 Angiogeneseinhibition *ex vivo*

Die bereits in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Auswirkungen der Bindung von uPA an uPAR leitet eine Aktivierungskaskade ein, die zur Aktivierung von Plasminogen und diversen MMP's führt. Die folgende Freisetzung bzw. Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF-2 oder TGF β führt zu einer beschleunigten Tumorzellinvasion und tumorassoziierten Angiogenese.^[140,179,266]

Zur Untersuchung des antiangiogenetischen Potenzials der in den vorherigen Kapiteln beschriebenen uPAR-Antagonisten kamen zwei Methoden zum Einsatz. In ersten Experimenten wurde im Auftrag der Wilex AG der Einfluss der beiden uPAR-Antagonisten **16** und **89** auf die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen in humanen mikrovascularen Endothelzellen (hMVEG, in Fibrinmatrices) untersucht (Abbildung 43).^[267-269]

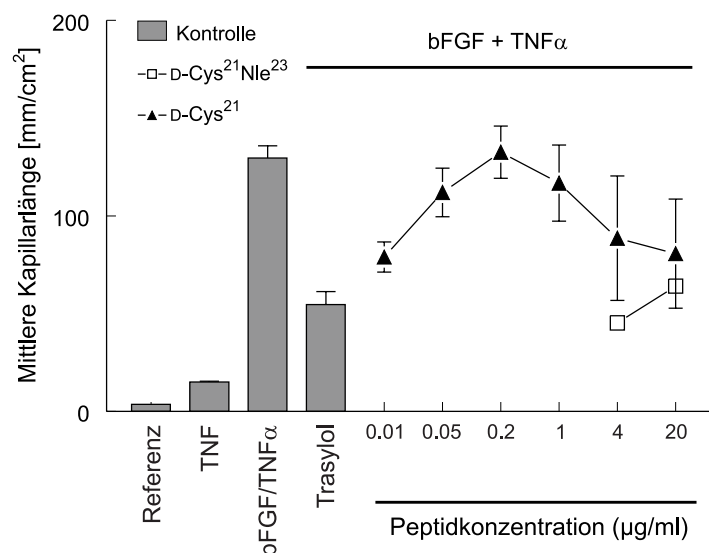


Abbildung 43: Dosisabhängiger Effekt von Peptiden **16** (Dreiecke) und **89** (Quadrate) auf die bFGF/TNF α -induzierte *in vitro* Angiogenese von hMVE-Zellen nach drei Tagen.

Beide untersuchten Verbindungen zeigten eine deutliche Inhibition der Kapillarstrukturbildung, wobei **16** mit bis zu 44% im Vergleich zu **89** mit bis zu 74% Inhibition ein etwas schlechteres Verhalten zeigte. Bei keiner der eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen wurde Cytotoxizität gegenüber den hMVE-Zellen beobachtet.

Bei der zweiten verwendeten Methode zur Untersuchung der *in vitro* Angiogeneseinhibition durch die Verbindungen **16** und **89** handelte es sich um den *rat aortic assay*, bei dem die Wirkung auf das Angiogeneseverhalten von in Matrigel eingebetteten Rattenaorten detektiert wird.^[270-273]

Wie in Abbildung 44 zu sehen ist, inhibiert **16** die Bildung von Kapillaren bei einer Konzentration von 10 µg / mL.

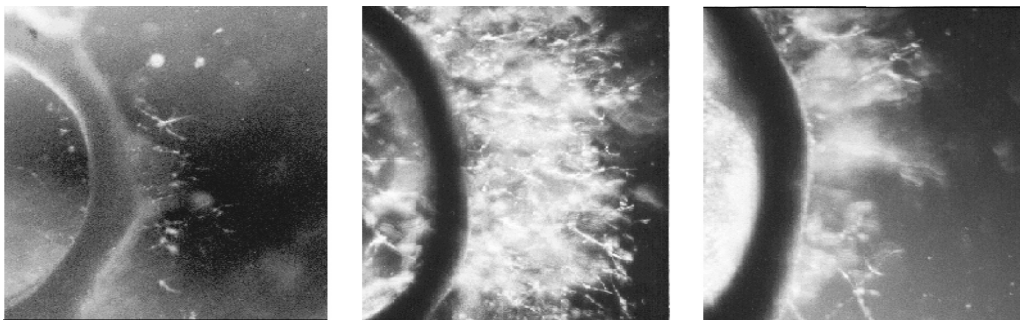


Abbildung 44: Inhibition der Angiogenese im *rat aortic assay* nach 5 Tagen (links: Aprotinin als Positivkontrolle, Mitte: inaktives Kontrollpeptid Hph²⁵Cys²⁹-uPA₂₁₋₃₀ **108**, rechts: **16**.)

Während erwartungsgemäß Aprotinin als Positivkontrolle und das Kontrollpeptid *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Hph²⁵Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ **108** (keine uPAR-antagonistische Aktivität in FACS-Analysen) die Angiogenese inhibierten bzw. nicht beeinflussten, zeigte überraschend die Nle²³-Variante **89** keine detektierbare inhibitorische Aktivität. Diese Beobachtung könnte die Folge einer Artenspezifität sein, da in allen Spezies die Position 23 eine positive Ladung in der Seitenkette trägt. Während im humanen uPAR die Ladung für die Bindung keine Bedeutung hat, ist es möglich, dass eine positiv geladene Gruppe für die Liganderkennung beim Rattenrezeptor essentiell ist. Die Auswirkungen der Artenspezifität auf mögliche *in vivo* Untersuchungen sind Thema des folgenden Kapitels.

3.4.4 Das Problem der Artenbarriere für *in vivo* Modelle

Die Artenbarriere stellt ein grundlegendes Problem bei der Etablierung eines verlässlichen *in vivo assays* dar und konnte vorerst nur durch die Verwendung eines Gewebexenografts (Einbringung humaner Krebszelllinien in das Peritoneum von immundefizienten Nacktmäusen) und die intraperitoneale Injektion der Wirkstoffe umgangen werden.^[14,179,269] Da in diesem Fall allerdings das Tumorgewebe humanes uPA und uPAR exprimiert und die stromalen Zellen (Fibroblasten und Makrophagen) murines werden die Testergebnisse deutlich verfälscht, da beide Systeme zum Tumorwachstum beitragen.^[269]

Ein vielversprechender Ansatz zur Etablierung eines 'echten' *in vivo* Modells wurde kürzlich von *Danø et al.* in einem Patent offengelegt, in dem nach Sequenzvergleichen zwischen humanem und murinem uPAR eine einzige Seitenkette im huPAR (His²⁴⁹) die Speziesspezifität vermittelt.^[95] Da die entsprechende Stelle in anderen Spezies nicht konserviert ist, schlagen die Autoren vor, durch *gene targeting* Gly²⁷² in muPAR durch His²⁷² zu ersetzen.^[274] In diesem Mausstamm sollte dann die Bindung von muPA an muPAR unbeeinflusst bleiben, aber diese Wechselwirkung durch huPA oder humanspezifische Antagonisten inhibierbar sein. Eine Überprüfung dieses Konzeptes im Mausmodell wird allerdings aufgrund der aufwendigen molekularbiologischen Verfahren erst in einigen Jahren zu erwarten sein.

4 Entwicklung einer Methode zum kombinatorischen *spatial screening* mittels Ringschlussolefinmetathese (RCM) in uPA-Epitopen an fester Phase

4.1 Allgemeine Aspekte zur Entwicklung von Inhibitoren für die uPA/uPAR-Wechselwirkung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Entwicklung kleiner organischer (leicht zugänglicher) und oral bioverfügbarer Wirkstoffe letztlich das Ziel jeder (kommerziellen) Pharmaforschung. Nach wie vor konkurrieren aber die jeweiligen Befürworter der zwei grundsätzlichen Lösungsansätze (rationales Design *versus* kombinatorische Chemie) um die Meinungsführerschaft in der pharmazeutischen Forschung. Gegenwärtig setzt sich langsam die Erkenntnis durch, dass weder die eine noch die andere Methode den einzigen, erfolgversprechenden Weg repräsentieren kann, solange nützliche Informationen oder Methoden auf dem Weg zum Arzneimittel ignoriert werden.

Dem auf dem *modelling* basierenden Ansatz stehen im Optimalfall bekannte, möglichst rigide Ligand- (kleine Moleküle bis hin zu Proteinen) und Rezeptorstrukturen im gebundenen Zustand zur Verfügung, anhand derer dann kleine organische Moleküle in die entsprechenden Bindungstaschen eingepasst werden können.^[275,276] Da es sich aber bei pharmazeutisch interessanten *targets* oft um sehr große, glycosylierte und/oder transmembrane Rezeptoren mit häufig ausgedehnten Epitopen handelt, stehen entsprechende Lösungsstrukturen selten zur Verfügung. Kristallstrukturen können diesen Strukturen aber aufgrund ihrer hohen Wassergehalte als *quasi*-Lösung sehr nahe kommen und stellen deshalb eine häufig verwendete Alternative dar. Besonders im Fall ausgedehnter Epitope in Protein bietet das *modelling* aufgrund der großen Flexibilität der Liganden kaum Ansatzpunkte zur Entwicklung einer Leitstruktur.

In der kombinatorischen Chemie wird der klassische Syntheseweg einer Verbindung dahingehend abgewandelt, dass in jedem verknüpfenden Syntheseschritt nicht mehr nur ein Baustein eingesetzt wird, sondern viele verschiedene Bausteine entweder als

Substanzgemische verwendet werden, oder durch Parallelsynthese aller möglicher Kombinationen im Laufe der Synthese eine sehr große Zahl von Verbindungen erhalten wird (Abbildung 45).^[3]

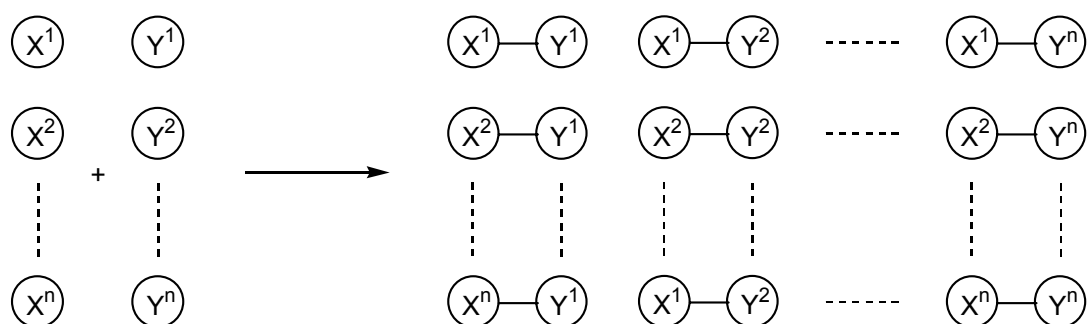


Abbildung 45: Prinzip der kombinatorischen Synthese. Die Kombination von jeweils 10 Bausteinen X und Y resultiert bereits in 100 verschiedenen Produkten.

Die Kupplungsreaktion kann dabei als Reaktion von Gemischen oder einzelnen Verbindungen in getrennten Gefäßen erfolgen. Die letztere Methode hat den Vorteil, dass Verbindung unterschiedlicher Reaktivität in getrennten Ansätzen zu vollständigen Umsatz bringen lassen. Dieses ist die Voraussetzung, um alle theoretisch zu erwartenden Produkte in möglichst äquimolaren Verhältnissen zu erhalten. Entsprechend wurde das Potenzial der kombinatorischen Chemie auch zuerst von Peptidchemikern entdeckt und dann aufgrund der schlechten Wirkstoffeigenschaften von Peptiden auf die Festphasensynthese kleiner organischer Moleküle übertragen. Die Einschränkung der einsetzbaren Synthesemethoden zusammen mit der Zahl von allein 10^{200} theoretisch denkbaren organischen Verbindungen mit einem pharmazeutisch relevanten Molgewicht <750 führt zu dem Problem der Realisierung einer möglichst *diversen* Substanzmischung (möglichst viele Pharmakophore in allen räumlichen Positionen) um eine hohe Trefferwahrscheinlichkeit zu erreichen. Für den Fall des wahllosen *high throughput screenings* (HTS) bestehender Bibliotheken kleiner organischer Moleküle auf Inhibition von Protein-Protein-Wechselwirkungen sind aber kaum Erfolge dokumentiert, da die synthetischen Liganden vermutlich zu flexibel sind bzw. an einen zu kleinen Bereich des Proteins binden.^[4,5,7]

Aus diesem Grund versucht man, Informationen über die Bindungseigenschaften bereits identifizierter Liganden in die Planung der Bibliotheken mit einfließen zu lassen (*focused* oder *biased libraries*). Bei der Übertragung von Informationen über einen relativ großen peptidischen Wirkstoff auf die Synthesestrategie für eine nichtpeptidischen Verbindungsbibliothek treten allerdings zwei Probleme auf:

- große Flexibilität der peptidischen Verbindung und dadurch wenige Informationen über die räumliche Anordnung der für die Bindung essentiellen Seitenketten im *gebundenen Zustand* (siehe oben)
- kaum Informationen über eine Beteiligung des Rückgrates an der Bindung zum Rezeptor, da entsprechende Modifikationen auch zu Veränderungen der (Lösungs-)Struktur führen können.

Der erfolgversprechendste Ansatz scheint daher zu sein, in bestehenden Proteinepitopen, in sich wiederholenden Optimierungscyclen die biologischen Aktivität durch Cyclisierung oder die Induktion von Sekundärstrukturen zu steigern und durch schrittweise Deletionen der exocyclischen Reste das Minimalepitop einzukreisen, bis ab einer gewissen Größe bzw. Rigidität ein peptidomimetischer Ersatz der Aminosäuren oder ein rationales Design nichtpeptidischer Verbindungen möglich wird.

Der Cyclisierung über Seitenketten kommt dabei besondere Bedeutung zu, da sie eine Rigidisierung des Moleküls ermöglicht, dabei aber die funktionellen Gruppen im Molekül (außer den Cyclisierungspunkten) unverändert lässt. Diese Strategie hat schon im Fall des in Kapitel 3.1 beschriebenen *cyclo*[19,31]-uPA₁₉₋₃₁ (**4**) durch schrittweise Verschiebung der Disulfidbrücke und Deletion der exocyclischen Reste zur Auffindung des kleineren *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) geführt, von dem nach Analyse und Optimierung der Seitenketten zu **16** eine NMR-Struktur erhalten werden konnte. Von den Methoden zur Seitenkettencyclisierungen sind die zur Bildung von Disulfiden^[218,219,277-279] (Cys, Hcy, Pen) und Amidgruppen^[249,280-287] (Dap, Dab, Orn, Lys, Asp, Glu, Asu) am weitesten verbreitet, da die entsprechenden Aminosäurebausteine kommerziell erhältlich sind und die Verknüpfungsreaktionen bei geeigneter konformationeller Beweglichkeit der Verbindung quantitativ verlaufen können.

Nachteilig ist, dass die selektive Verknüpfungsreaktion den Einsatz einer orthogonalen Schutzgruppe erforderlich macht und darüber hinaus die resultierenden Bindungen unter physiologischen Bedingungen unter Umständen nicht stabil sind, bzw. die verbrückende Aminosäure immer noch eine proteinogene ist (Anfälligkeit für Spaltung des Rückgrates durch Proteasen).

Weiterhin wurden auch zahlreiche Verknüpfungsreaktionen für Makrocyclisierungen eingesetzt, die in physiologisch stabilen Brücken resultieren (überwiegend zur Synthese und Stabilisierung von *turn*-Mimetika) (Abbildung 46).^[288-295]

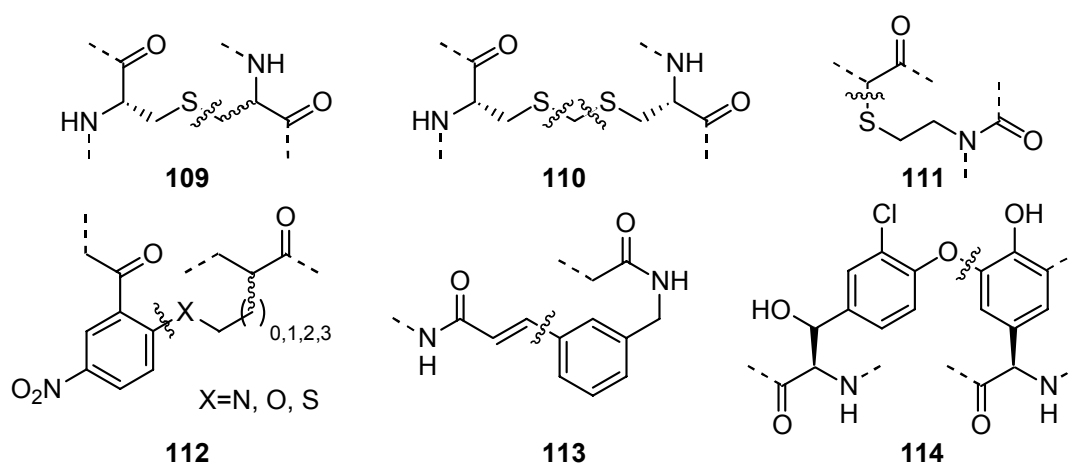


Abbildung 46: Ausgewählte Beispiele zur Makrocyclisierung von peptidischen Verbindungen durch nukleophile Substitutionen und C-C-Verknüpfungen zu **109-114**.

Aufgrund der Untersuchungen zur Substituierbarkeit der Seitenketten in **16** erscheint eine Verknüpfung von Kohlenwasserstoffseitenketten (tolerierte Seitenketten mit nur gering veränderten Aktivitäten: Asn²²-Ala **7**, Lys²³-Nle **89**, Asn²⁷-Ala **12** und Ile²⁸-Nle **105**, siehe Kapitel 3.3.1 und 3.3.7) die naheliegendste Cyclisierungsstrategie mit der geringsten Störung der peptidischen Struktur zu sein (die NMR-Struktur offenbart ebenfalls eine enge Nachbarschaft der Seitenketten von Asn²² und Ile²⁸, siehe Kapitel 3.3.3). Aufgrund der Entwicklung chemisch definierter Katalysatoren, ist in den letzten Jahren die katalytische Olefinmetathese zu großer Bedeutung gelangt. Deren Einsatz in der bioorganischen Chemie und die Entwicklung einer Methode zu deren kombinatorischen Anwendung in der Wirkstoffsuche wird in den folgenden Kapiteln eingehend beschrieben.

4.2 Die Olefinmetathese in der bioorganischen Chemie

4.2.1 Grundlagen der Ringschlussolefinmetathese (RCM)

Die heterogen katalysierte Olefinmetathese ist eine seit langem bekannte Methode, die vor allem in der Produktion von Erzeugnissen für die Petro- und Polymerchemie eine wichtige Rolle spielt (Abbildung 47).^[296]

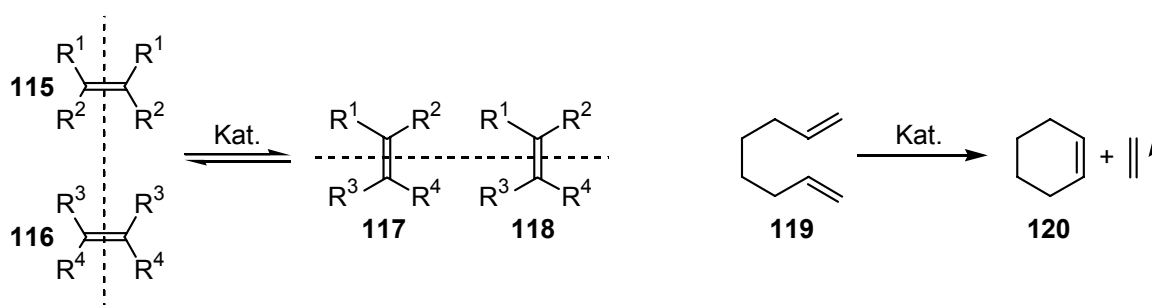


Abbildung 47: Prinzip der Olefinmetathese. Die Produktverteilung erfolgt bei unsymmetrischen oder Olefingemischen **115/116** statistisch zu **117/118** (und E/Z-Isomere!). Steigerungen der Ausbeuten in cyclischen Verbindungen (**119**) sind durch Entfernung eines Reaktionspartner (Ethen) aus dem Reaktionsgleichgewicht möglich.

Als Katalysatoren werden Übergangsmetallverbindungen verwendet, z.B. MoO₃, WCl₆/SnMe₄, Re₂O₇. Der allgemein anerkannte Reaktionsmechanismus der Metathesereaktion (*Chauvin-Mechanismus*, Abbildung 48)^[297] besteht in der formalen Abfolge von Cycloadditions- und -reversionsschritten, während dieser Metallcarben- und Metallacyclobutan-Zwischenstufen (**121-124**) durchlaufen werden, die alle reversibel sind, weshalb die Cyclisierung von terminalen Olefinen **120** zu **125** in besonders guten Ausbeuten verläuft (Entfernung des Reaktionsproduktes Ethen aus dem Gleichgewicht).

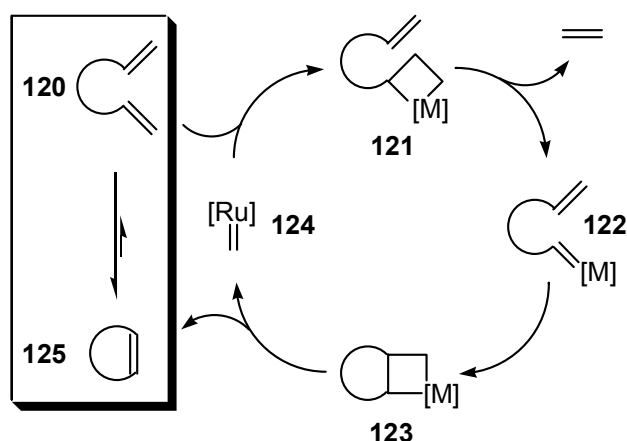


Abbildung 48: Chauvin-Mechanismus der Ringschlussolefinmetathese.

Einen Durchbruch in der organische Synthese erlebte die homogen katalysierte Olefinmetathese^[296,298-301] mit der Einführung chemisch definierter, hochaktiver und kommerziell verfügbarer Katalysatoren **126** von *Grubbs et al.*, dessen Initiation des katalytischen Cyclus in Abbildung 49 gezeigt ist.^[302,303]

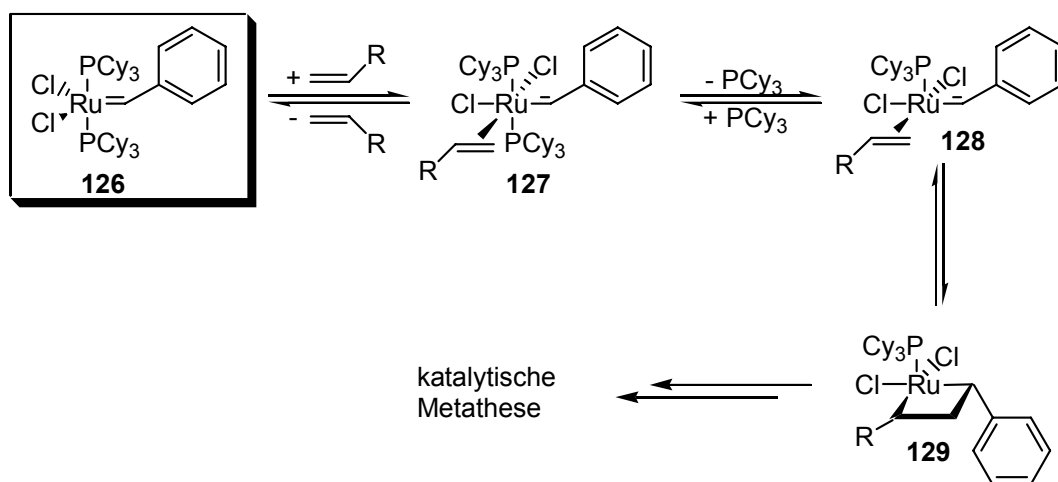


Abbildung 49: Initiation des katalytischen Cyclus von Alkylidenruthenium-katalysatoren mit Tricyclohexylphosphinliganden **126**. Die Dissoziation eines Phosphinliganden von **127** zu **128** ist essentiell für hohe Reaktivitäten.

Die Rutheniumcarbene zeichnen sich im Gegensatz zu den hochaktiven, von *Schrock et al.* bereits 1988 eingeführten Katalysatoren auf Molybdänbasis **130**^[304,305] durch eine wesentlich größere Stabilität gegenüber Wasser und Sauerstoff aus, zeigen aber

noch eine ausreichende Reaktionsgeschwindigkeit mit sterisch nicht gehinderten Olefinen (gleiches gilt auch für die zeitgleich von *Hoveyda et al.* entwickelten, zurückgewinnbaren Katalysatoren **131** und **132**,^[306] siehe Abbildung 50). Die Dissoziation eines Phosphinliganden ist dabei essentiell für die Einleitung des katalytischen Zyklus (siehe oben), entsprechend führten erste Variationen in Richtung der Optimierung der Phosphinliganden mittels doppelter Substitution durch die fest bindenden *N*-heterocyclischen Carbenliganden (NHC) anfangs zwar zu Katalysatoren, die eine große Toleranz gegenüber sterischen Hinderungen an Olefinen aufwiesen, aber nur sehr geringe Reaktionsgeschwindigkeiten aufwiesen. Schließlich führte die stürmische Entwicklung von gemischt NHC/Phosphin-substituierten Verbindungen in den letzten zwei Jahren zu - auch bei sterisch gehinderten Olefinen! - hochaktiven Katalysatoren **133**,^[307-310] die aufgrund der sehr fest bindenden Liganden zur Immobilisierung in **134** verwendet werden konnten (Abbildung 50).^[311-314] Neuerdings wurden durch die Einführung chiraler NHC-Liganden auch asymmetrischen RCM-Reaktionen verwirklicht.^[315]

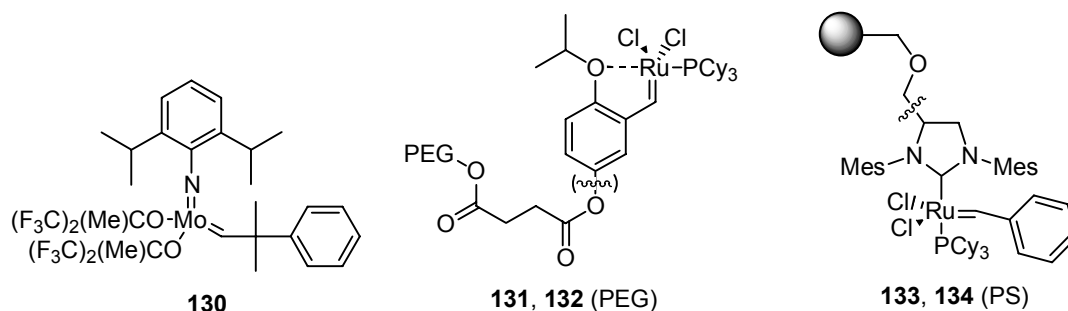


Abbildung 50: Metathesekatalysatoren **130**, **131** und **133** und immobilisierte (PEG und Polystyrolharz, **132** und **134**) Modifikationen.

Die Katalysatoren auf Rutheniumbasis zeigen eine sehr große Toleranz gegenüber zahlreichen funktionellen Gruppen, sind darüber hinaus bemerkenswert stabil gegen Wasser und Sauerstoff (aber meist weniger aktiv als **130**) und ermöglichen Makrocyclisierungen in guten Ausbeuten. Entsprechend zahlreich sind in den letzten Jahren die Beispiele für den Einsatz der Ringschlussmetathese doppelt terminal

olefinischer Verbindungen in der Synthese von Naturstoffen (zwei exemplarische Beispiele **135** und **136** sind in Abbildung 51 dargestellt).^[316,317]

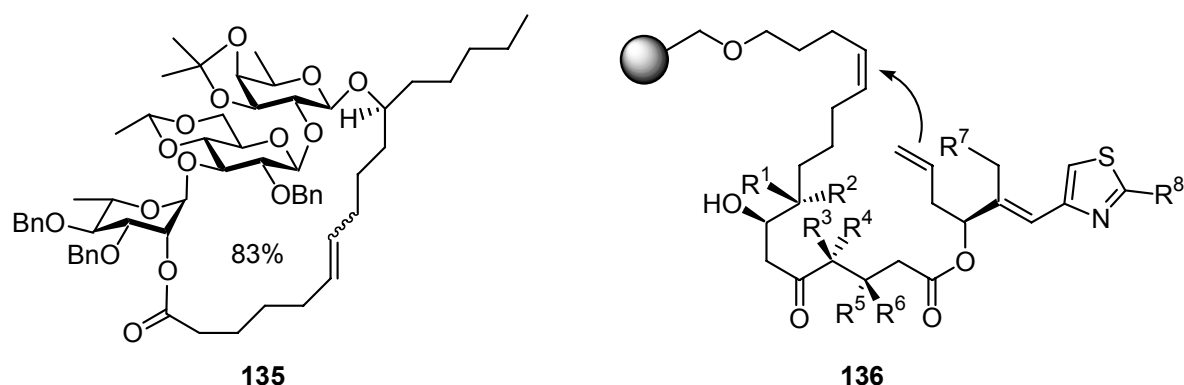


Abbildung 51: Naturstoffe, die mittels RCM in Lösung (**135**) und an fester Phase (**136**) unter simultaner Abspaltung der Zielverbindung erhalten werden.

Die Bildung der Doppelbindung in den Zielmolekülen (Strategie der gleichzeitigen Abspaltung vom Träger möglich!)^[202,318-320] erfolgt dabei als *cis/trans*-Gemisch, deren Verteilung in Makrocyclen bis heute weder beeinflussbar noch vorhersagbar ist. Dies macht entweder eine anschließende Reduktion erforderlich oder es muss eine Trennung der Isomere versucht werden. In den Fällen, in denen nur ein Olefin-Isomer das gewünschte Produkt ist, bietet die von *Fürstner et al.* eingehend untersuchte und angewendete Alkinmetathese und anschließende partielle Reduktion einen Ausweg.^[321]

Neben der Synthese makrocyclischer Naturstoffe wurde die RCM auch häufig in der Synthese von Peptidomimetika eingesetzt. Dabei werden entweder die cyclischen Bausteine getrennt synthetisiert und eingebaut, oder aber nach Einbau der olefinischen Seitenketten in peptidische Strukturen cyclisiert (Abbildung 52).^[319,322-327]

Entsprechende Anwendungen im kombinatorischen Bereich sind trotz der guten Umsatzraten bis 90% kaum beschrieben. Einzig die Arbeiten von *Piscopio et al.* (**139**) und *Verdine et al.* (**143**) haben die RCM-Reaktion auf eine Verwendung in der kombinatorischen Synthese kleiner Cyclen untersucht und zur Generierung von Bibliotheken verwendet (andere Arten von Bibliotheken wurden u. a. von *Boger* und

Nicolaou *et al.* beschrieben und verwendeten die Kreuzmetathese von monoolefinisch modifizierten Substanzen zur Dimerisierung).^[328-330]

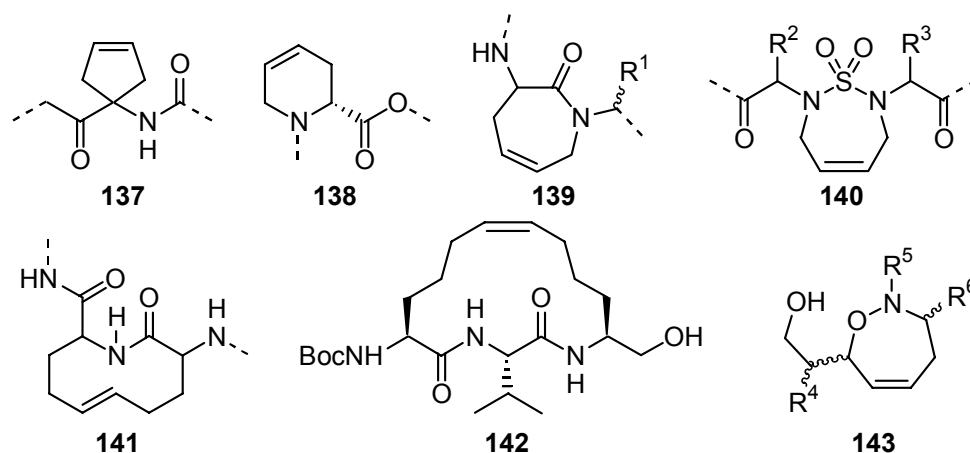


Abbildung 52: Zusammenstellung einiger ausgewählter RCM-cyclisierter Peptidomimetika.

Während kleine Cyclen von 5-9 Atomen häufig in guten Ausbeuten erhalten werden können, stellt die Makrocyclisierung allgemein hohe Ansprüche an eine Reaktionsoptimierung im Hinblick auf eine kombinatorische *split-pool*-Synthese. So führen langsame Reaktionsgeschwindigkeiten aufgrund sterischer oder konformationeller Hinderungen unabhängig von der Cyclisierungsmethode zur Bildung zahlreicher Nebenprodukte und machen die Reaktion unbrauchbar für einen Einsatz in der kombinatorischen Synthese. Ein neuer, sehr eleganter Ansatz von *Schreiber et al.* bezüglich der Vorhersage von Cyclisierungstendenzen beruht auf der vinylogenen Übertragen von Cyclohexangerüsten auf größere *scaffolds* durch Insertion von (starren!) Amid- und Olefingruppen. Diese Strategie ermöglichte es, im Voraus potenzielle Cyclen zu benennen, die in RCM mit hohen Ausbeuten reagieren und somit die kombinatorische Festphasensynthese von sehr diversen Bibliotheken ermöglicht.^[331]

Naheliegende Bausteine für die Einführung olefinischer Seitenketten in Moleküle sind *N*-Alkenyle, Olefinester und Aminosäuren mit olefinischen Seitenketten. In zahlreichen Beispielen hat sich jedoch herausgestellt, dass die Nachbarschaft der ungesättigten Seitenkette in Abhängigkeit vom Abstand zu einer Carbonylgruppe die Metathesereaktion verhindern kann. So haben *Fürstner et al.* als erste postuliert, dass

die enge Nachbarschaft zwischen Katalysator-koordiniertem Olefin und einer Carbonyl- oder Ethergruppe (vergleiche auch *Hoveyda*-Katalysator **131!**) in der Bildung einer katalytisch inaktiven, weil zu stabilen Spezies resultiert (Abbildung 53).

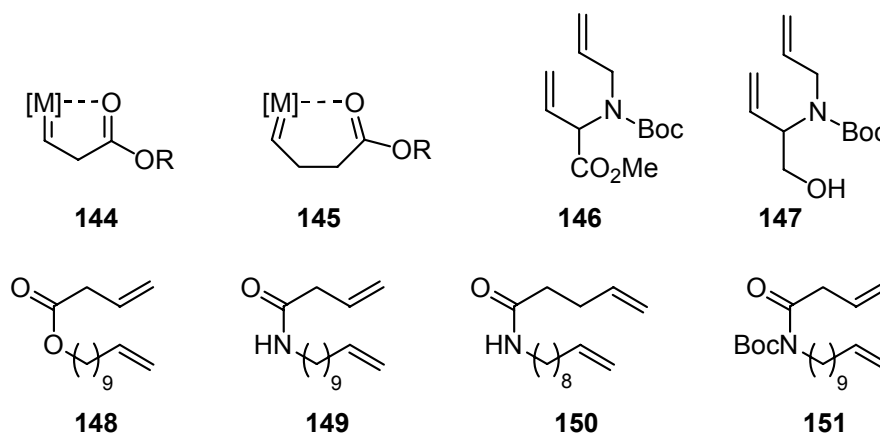


Abbildung 53: In RCM-Reaktionen gering inaktive olefinische Verbindungen (außer **147**). Einzelne Methyleneinsertionen zwischen dem Carbonylkohlenstoff und der Doppelbindung in **148-151** stellen die Reaktivitäten wieder her!

Eine mögliche Strategie, die RCM mit Vinylderivaten trotzdem zu ermöglichen besteht in der Zugabe von $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$, das die Carbonylgruppen im Zielmolekül durch Koordination absättigt.^[332] Weiterhin wurden auch die aciden Wasserstoffatome an C^α für die schlechte Reaktivität der Vinylglycinderivate verantwortlich gemacht.^[333] So reagiert z.B. das Vinylglycinolderivat **147** in guten Ausbeuten zum entsprechenden RCM-Cyclus, während die Carbonylverbindung **146** keine Reaktivität zeigt (allerdings zeigt auch die entsprechende *N,O*-cyclischen Verbindung keine Reaktion, weshalb diese Erklärung fragwürdig erscheint).^[334] Darüber hinaus wurde von *Weiler et al.* gefunden, dass der Abstand der Doppelbindung von dem Sauerstoffatom einer Ester- oder Amidgruppe großen Einfluss auf die RCM-Reaktivität des Eduktes hat. So zeigen die Verbindungen **148-151** sehr geringe Umsätze in RCM-Reaktion, während die Insertion einer Methylengruppe (bei gleicher Ringgröße) in guten Ausbeuten reagieren. Ferner scheint die Änderung der elektronischen Eigenschaften der Carbonylgruppe durch Substitution der Amidgruppe einen Einfluss auf die Reaktivität

der Verbindungen zu haben, wobei konformationelle Effekte nicht auszuschliessen sind.^[335]

Nach den oben aufgeführten Zusammenhängen kommen also für die Synthese RCM-cyclischer Peptide nur solche olefinischen Aminosäuren in Frage, die Seitenkettenlängen von mindestens drei Atomen aufweisen. Der bisherige Einsatz dieser Strategie in peptidischen Verbindungen ist im folgenden Kapitel beschrieben.

4.2.2 Ringschluss-Metathesereaktionen peptidischer Verbindungen

Während das Potenzial der RCM in Peptiden bereits sehr früh nach der Einführung definierter Metathese-Katalysatoren von *Grubbs et al.* erkannt und in ersten Modellverbindungen umgesetzt wurde, beschränkt sich der Einsatz der Methode bis zum heutigen Tag auf einige wenige Beispiele, die im Wesentlichen die Stabilisierung vorgeformter Sekundärstrukturen zum Inhalt haben (Abbildung 54). Neben den gezeigten β -turns **152** und **153**^[333,336-338] und γ -turns^[339] wurden in Peptiden auch β -barrels^[340-342] und α -Helices^[343,344] durch RCM ungesättigter Seitenketten stabilisiert.

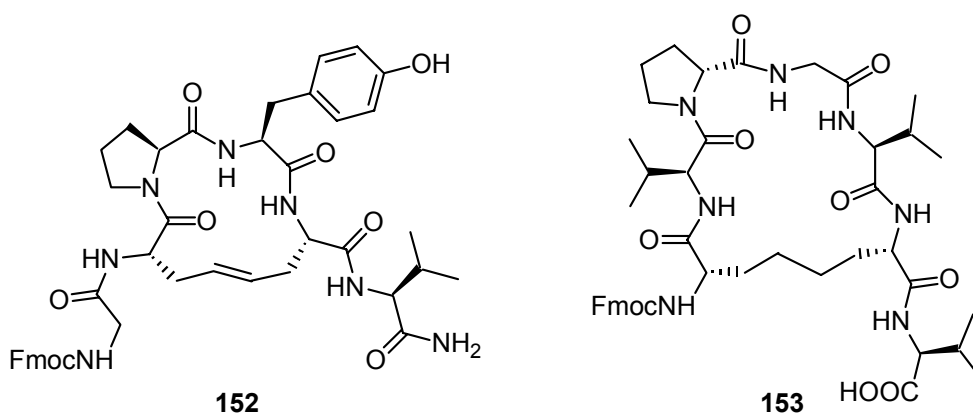


Abbildung 54: Stabilisierung von β -turns durch RCM in Peptiden zu **152** und **153** an fester Phase.

Im Gegensatz dazu existieren nur wenige Beispiele für RCM in Peptiden durch Verknüpfung an solchen Stellen, die nicht explizit durch Vororientierung der

Peptidkette stabilisiert sind. Zu dieser Gruppe gehören die *N*-olefinierten Verbindung aus der Arbeitsgruppe von *Liskamp et al.*,^[345-347] RCM-cyclische HIV-Proteaseinhibitoren von *Fujii et al.*^[348,349] und einige Peptidcyclen von *Kazmaier et al.*^[350,351]

Die Synthesen der olefinischen Aminosäuren, die die Anwendung der RCM-Strategie in Peptiden ermöglichen, sind im folgenden Kapitel beschrieben.

4.2.3 Racemische und enantioselektive Zugänge zu olefinischen Aminosäuren

Bei den geplanten, für die RCM-Reaktion zu verwendende Aminosäurederivaten mit ungesättigten Seitenketten kommen aufgrund der zu erwartenden Reaktivität Seitenketten mit drei bis fünf Kohlenstoffatomen in Betracht (siehe vorheriges Kapitel). Entsprechend den Überlegungen aus Kapitel 3.3.2 kommt der Stereochemie der verbrückenden Aminosäuren eine besondere Bedeutung zu und könnte bei falscher Konfiguration zu einem so großen Aktivitätsverlust führen, dass eine schwach aktive Substanz in den entsprechenden Tests übersehen wird. Aus diesem Grund sollten die Verbrückungsstellen alle möglichen Kombinationen von Konfigurationen enthalten. Die einfachste Methode dieses Konzept zu realisieren ist, die entsprechenden Aminosäuren als Racemate in die Peptidkette einzuführen, da auf diese Weise -zumindest theoretisch- gleichzeitig alle vier Produkte gebildet werden können (ohne die *cis/trans*-Isomere). Daneben ist die Synthese und der Einsatz von Racematen für die verbrückenden olefinischen Aminosäuren wesentlich effizienter, da nur eine Synthese (statt vier getrennter Synthesen für alle D- und L-Aminosäurekombinationen) durchgeführt werden muss und diese durch den Einsatz racemischer Bausteine deutlich kostengünstiger ist. Um eine möglicherweise aktive Substanz zu isolieren ist aber auch eine enantioselektive Methode zur Resynthese der einzelnen diastereomerenreinen Verbindungen notwendig. Diese Resynthese muss über den Einbau von enantiomerenreinen Aminosäuren erfolgen, um eine Identifizierung der Verbindung zu ermöglichen.

Der Zugang zu Aminosäuren mit terminal olefinischen Seitenketten ist aufgrund der chemischen Inertheit der Doppelbindung unproblematisch und ohne weitere Schutzgruppentechnik durch Addition der entsprechenden olefinischen Bromverbindungen an Nucleophile zu erreichen. Die Synthesen nach *Strecker* oder *Erlenmeyer* sind aufgrund der harschen Bedingungen während der Hydrolyse, bzw. Reduktion der alkylierten Verbindungen nicht zu empfehlen, stattdessen bietet sich die Route über Acetamidomalonester an. Für die analogen enantioselektiven Synthesen wurde eine Methode aus der Arbeitsgruppe von *Myers* evaluiert.

4.2.3.1 Racemische Aminosäuresynthesen

Racemisches Allylglycin (Aminopentensäure, rAlg) ist kommerziell erhältlich und musste nur entsprechend dem letzten Schritt in Abbildung 55 zu Fmoc-rAlg-OH (*rac*-**154**) geschützt werden.

Die racemische Synthese von *rac*-*N*-Fmoc-2-amino-5-hexensäure (Fmoc-rhAlg-OH, **160**) erfolgte über die Alkylierung der kommerziell erhältlichen Acetamidomalonsäurediethylester **155** durch Deprotonierung mittels NaH und der anschließenden Alkylierung mit 4-Brom-1-buten **156**, wie in Abbildung 55 dargestellt.

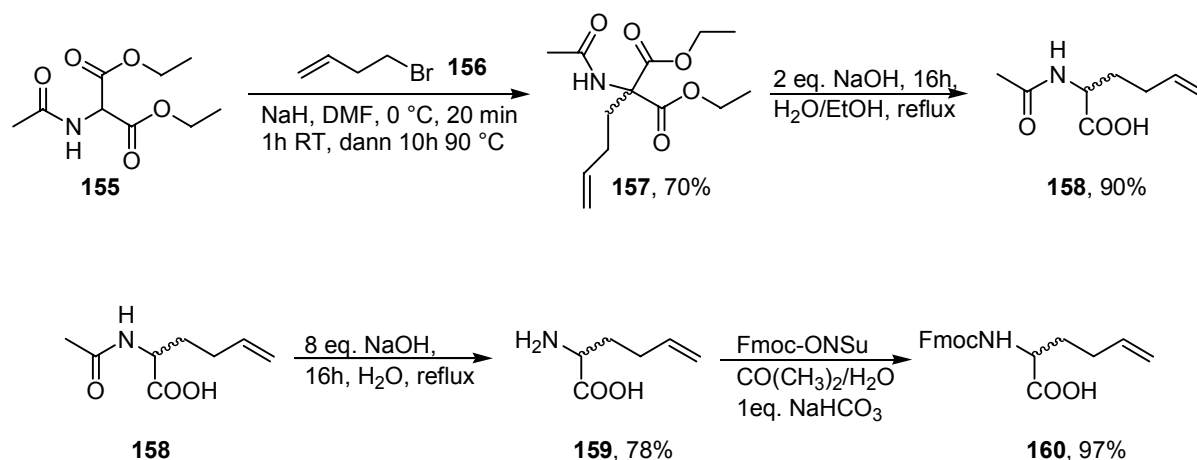


Abbildung 55: Synthese von *racemischer Fmoc-Aminohexensäure 160* ausgehend von *Acetamidomalonsäurediethylester 155* und *4-Brom-1-buten 156*.

Die Reaktionssequenz bietet den Vorteil, dass außer **157** (chromatographische Reinigung an Kieselgel) alle anderen Reaktionsprodukte **158-160** durch Kristallisation zu reinigen sind.

Die entsprechenden Reaktionen, die zur *rac*-*N*-Fmoc-2-Amino-6-heptensäure (Fmoc-rbhAlg-OH, **165**) führt sind in Abbildung 56 dargestellt.

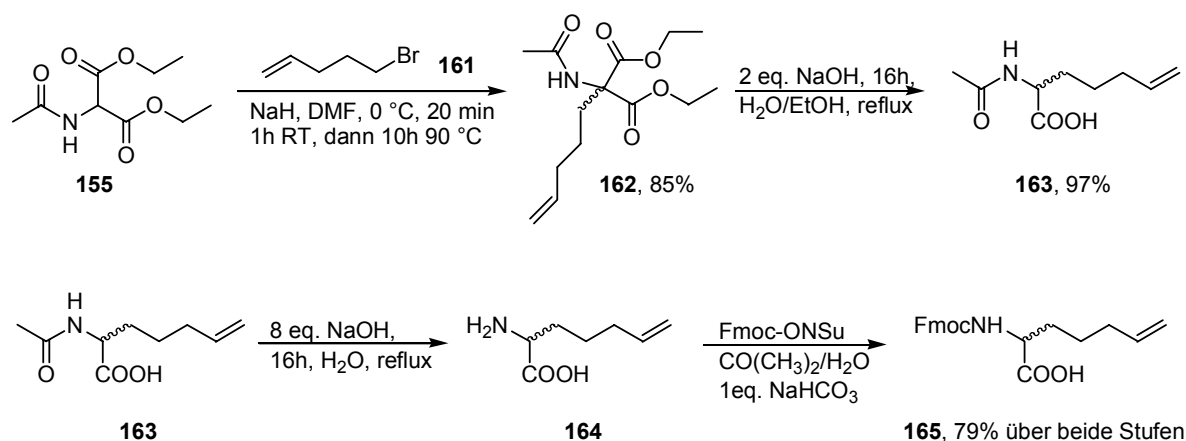


Abbildung 56: Synthese von racemischer Fmoc-Aminoheptensäure **165** ausgehend von Acetamidomalonsäurediethylester **155** und 5-Brom-1-penten **161**.

In Analogie zur Synthese von Fmoc-Aminohexensäure **160** bedarf es auch hier nur einer einzigen chromatographischen Reinigung nach der Reaktion von **155** zu **162**, während alle anderen Reaktionsprodukte **163-165** durch Kristallisation zu reinigen sind, was die Synthese sehr effizient gestaltet.

4.2.3.2 Enantioselektive Synthesen monoalkylierter Aminosäuren

Während die Entscheidung für einen Syntheseweg für die racemischen olefinischen Aminosäuren leicht zu fällen ist, kommen für die asymmetrische Variante wesentlich mehr Methoden in Frage. Zu den verbreitetsten gehören die Strategien nach Evans (**166**) (enantioselektive Aminierung),^[352] Oppolzer's Sultamglycinate **167**,^[353,354] Belokon's Reagenz **168**,^[355,356] Seebach's chirale *N,O*-Glycinacetale **169**,^[357]

Schöllkopf's Bislactimether **170**^[358] und enantioselektive Reduktionen der Erlenmeyer-Azlactone **171**^[359-361] (siehe Abbildung 57). Darüber hinaus werden noch die enzymatischen Racematspaltungen mittels Amidasen oder Acylasen^[362] und chirale Varianten von Phasentransferkatalysen häufig eingesetzt.

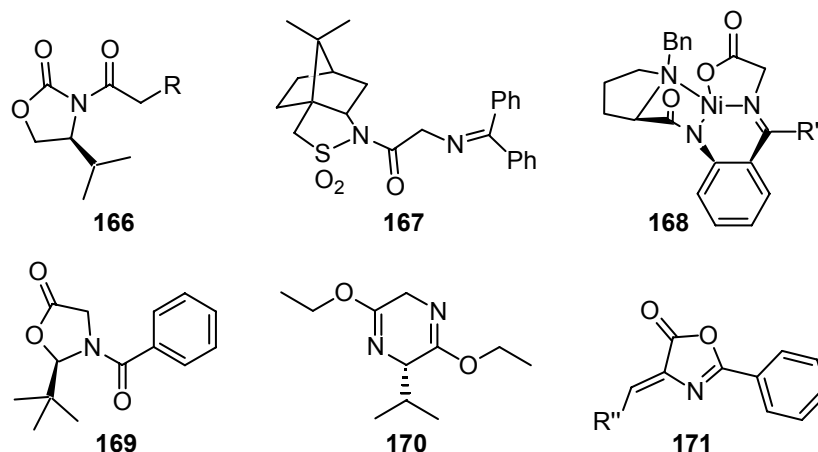


Abbildung 57: Häufig eingesetzte chirale Edukte **166-171** zur enantioselektiven Synthese von α -Aminosäuren.

Alle Methoden sind mit gewissen Nachteilen hinsichtlich stereochemischer Induktion, Herstellung bzw. hohen Kosten der chiralen Auxiliare, Optimierung von Racematspaltungen, Abspaltung der chiralen Auxiliare o.ä. verbunden.

Eine sehr attraktive Alternative schien die kürzlich von *Myers et al.* publizierte Methode zu sein, die (R,R)- und (S,S)-Pseudoephedrine (**172**) als chirale Auxiliare verwendet.^[363-367] Diese Naturstoffe sind in großen Mengen kommerziell verfügbar (allerdings überwachungspflichtig durch das BfArM) und mit einem Preis von ca. DM 3,-/g ausgesprochen preiswert. Der größte Vorteil für den Einsatz als chirales Auxiliar ist aber die Tatsache, dass viele C $^{\alpha}$ -substituierte Analoge der Pseudoephedringlycinate **174** sehr gut als Hydrate kristallisierbar sind, was prinzipiell die Reinigung der Produkte entscheidend vereinfachen und beschleunigen sollte. Die publizierte Synthese von **174** nach der in Abbildung 58 dargestellten Route sollte eigentlich zu einer kostengünstigen Synthese ausgehend von dem billigen Glycinmethylesterhydrochlorid (**173***HCl) und Lithium-*t*Butylat führen. Bei dieser Strategie erfolgt kein Einsatz trockenen Lithiumchlorids, die Reaktionen werden bei

Raumtemperatur durchgeführt, die Reaktionszeiten sind sehr kurz und die Verwendung des polymerisierbaren, freien Glycinmethylesters (**173**) wird vermieden.

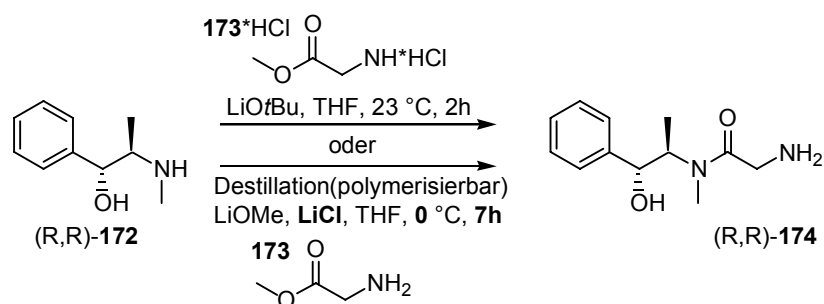


Abbildung 58: Vereinfachte Synthese von Ephedringlycinaten (*R,R*)-**174** nach Myers.

Der Versuch die Synthese nachzuvollziehen führte allerdings auch zur Bildung größerer Mengen der entsprechenden Oligomere **175** und anderer nicht identifizierter Nebenprodukte (Abbildung 59).

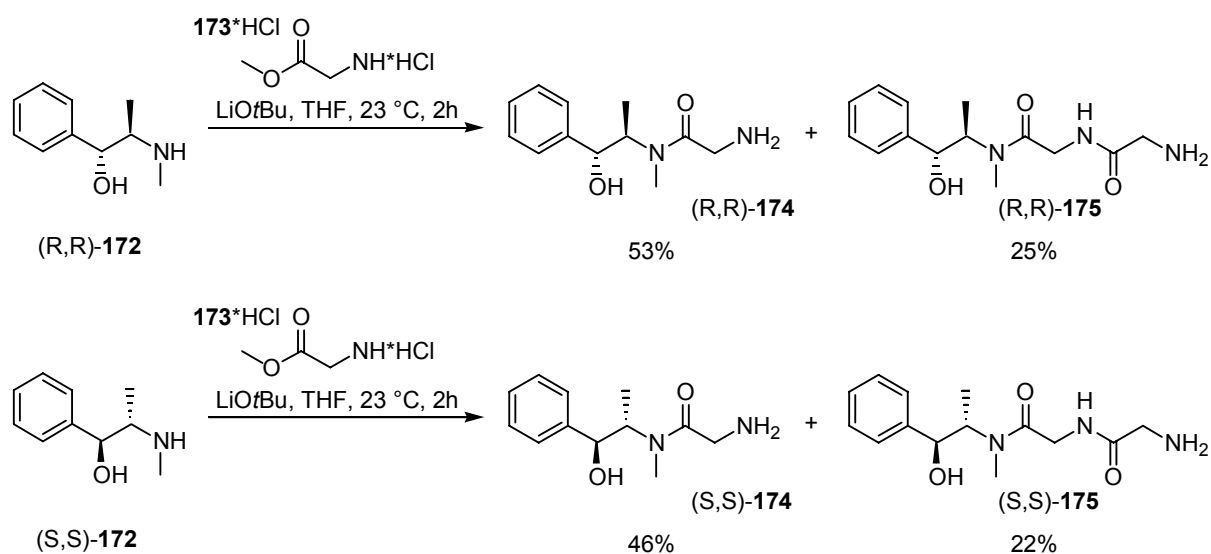


Abbildung 59: Acylierung von (*R,R*)- und (*S,S*)-**172** durch Glycinmethylesterhydrochlorid **173*HCl** und LiOtBu als Base führt zur Bildung der Oligomeren (*R,R*)- und (*S,S*)-**175** (HPLC-MS Analyse).

Der entsprechende Ansatz mit (*S,S*)-**172** führte zum gleichen Ergebnis. Da sich beide Pseudoephedringlycinat auch durch Kristallisation nicht von den Nebenprodukten

abtrennen ließen (Ansatzgrößen um 50 g sind im Labormaßstab auch nicht effizient durch Chromatographie zu reinigen), wurden die entsprechenden Auxiliare (R,R)- und (S,S)-**172** durch basische Hydrolyse der Reaktionsprodukte wieder abgespalten und konnte auf diese Weise zu 89% bzw. 83% zurückgewonnen werden (siehe dazu auch die Auxiliarabspaltung in Abbildung 62).

In einem erneuten Ansatz wurde der Syntheseweg nach der früher publizierten Methode der Kupplung von Boc-Gly-OH mittels Pivaloylchlorid und Et₃N an (R,R)- und (S,S)-**172** angewendet (Abbildung 60).^[363,364]

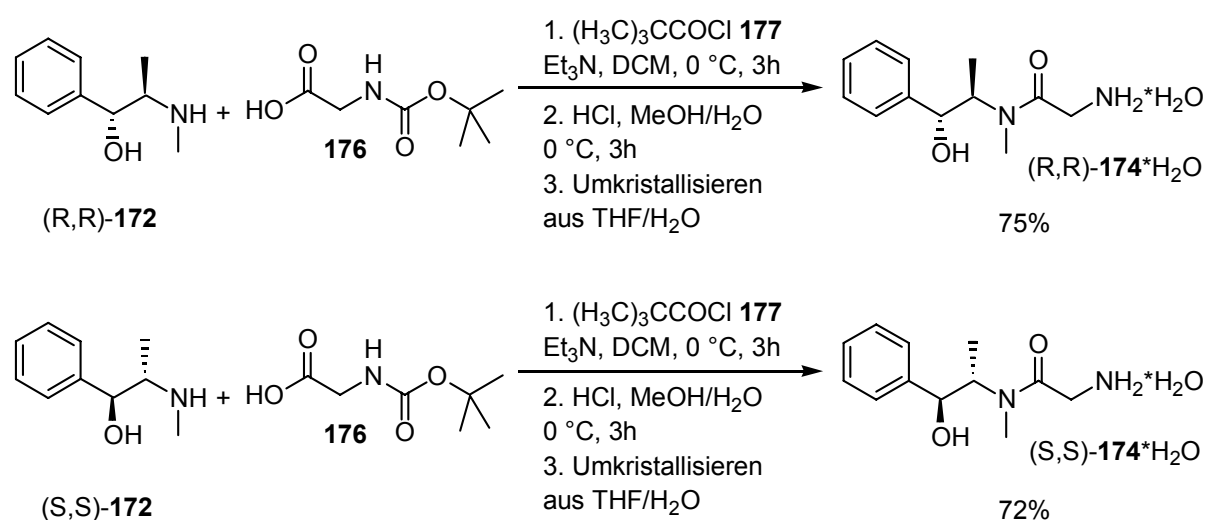


Abbildung 60: Synthese von (R,R)- und (S,S)-**174***H₂O durch Kupplung von Boc-Gly-OH **176** an (R,R)- und (S,S)-**172** mittels Pivaloylchlorid **177** und TEA, Boc-Entschützung und Kristallisation aus wässrigem THF.

Die Ausbeuten der reinen Verbindungen (R,R)- und (S,S)-**174***H₂O liegen hier deutlich oberhalb der in Abbildung 59 beschriebenen Methode, obwohl die Kristallisation nicht optimiert ist, d.h. die Mutterlauge enthielt noch größere Mengen Produkt. Ferner tritt hier nicht die Bildung der durch Kristallisation schlecht abtrennbaren Oligomeren **175** auf.

Die Alkylierung von (R,R)- und (S,S)-**174***H₂O wurde anschließend ebenfalls nach einer von *Myers et al.* publizierten Methode durchgeführt.^[367] Um die hohen Enantiomerenüberschüsse bei der Alkylierung zu erreichen, ist der Einsatz von mindestens 2 eq. LiCl nötig (Vorkoordinierung der sonst linearen Enolatspezies) und

der Einsatz von LDA als gängiger Base macht deren genaue Dosierung unabdingbar (Basenüberschüsse führen zur Bildung zahlreicher Nebenprodukte, wie Oligomeren **175** und freiem **172** durch basische Spaltung). Da sich die Handhabung von wasserfreiem LiCl in absoluten Lösungsmitteln und die Quantifizierung von LDA als unpraktisch erwiesen haben, wurde die in Abbildung 61 dargestellte modifizierte Variante zur Alkylierung verwendet.

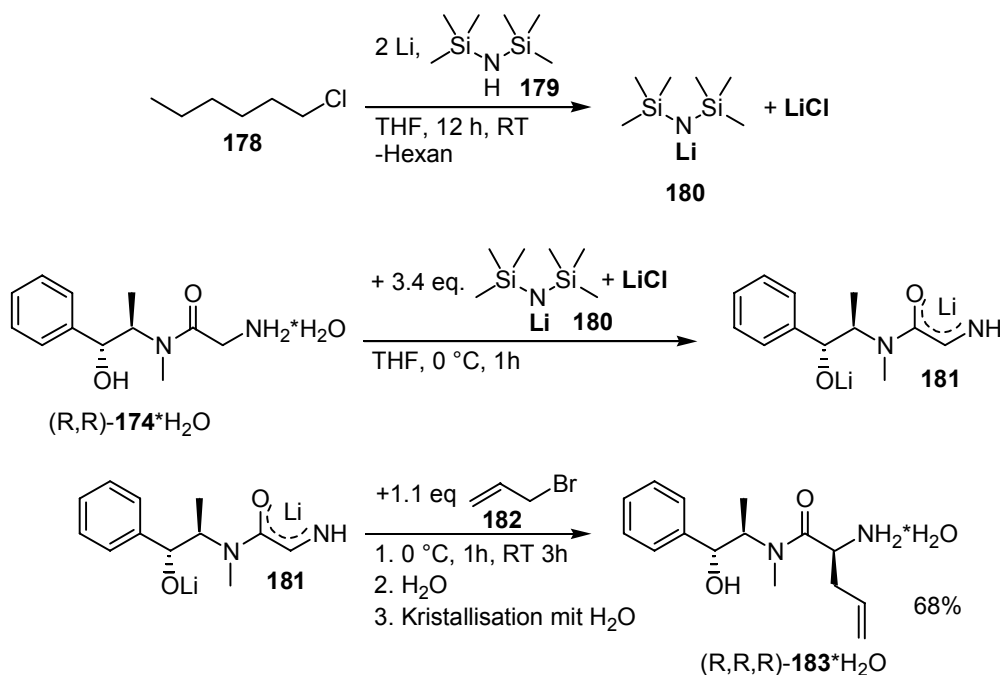


Abbildung 61: Eintopfreaktion zur Deprotonierung der (R,R)- und (S,S)-**174***H₂O (hier nur die R,R-Form gezeigt, die S,S-Form resultiert in dem spiegelbildlichen Diastereomer) mittels *in situ* erzeugtem LHMDS **180** und anschließende Alkylierung mit Allylbromid **182** zu (R,R,R)-**183***H₂O nach Myers et al. (68% (R,R,R)-**183** nach Kristallisation und 44% (S,S,S)-**183***H₂O nach Flashchromatographie und Kristallisation).

Aus der *in situ*-Generierung des LHMDS (**180**) im später für die Alkylierung eingesetzten Lösungsmittel und der Tolerierung von Basenüberschüssen während der Alkylierung resultiert auch ein geringerer Anspruch an die Qualität des verwendeten absoluten THF. Die vorherige Dehydratisierung der Hydrate (R,R)- und (S,S)-**174***H₂O entfällt somit ebenfalls.

Während das (R,R,R)-**183***H₂O nach Hydrolyse des Reaktionsansatzes und basischer Aufreinigung spontan aus dem Rohprodukt kristallisierte und aus wässrigem Toluol umkristallisiert werden konnte (68% Ausbeute, nicht optimiert), wurde im Fall des (S,S,S)-**183***H₂O eine vorherige chromatographische Reinigung an Kieselgel nötig. Anschließendes Umkristallisieren aus wässrigem Toluol ergab eine (nicht optimierte) Ausbeute von 44% (S,S,S)-**183***H₂O.

Die Freisetzung der Aminosäure erfolgte durch basische Hydrolyse mit 2 eq. NaOH von (R,R,R)-**183***H₂O in Wasser bei 90 °C. Anschließende Schützung mit Fmoc-Cl aus der Reaktionslösung zu Fmoc-D-Alg-OH (**D-154**) und Kristallisation ergab 78% Ausbeute über beide Stufen (Abbildung 62).

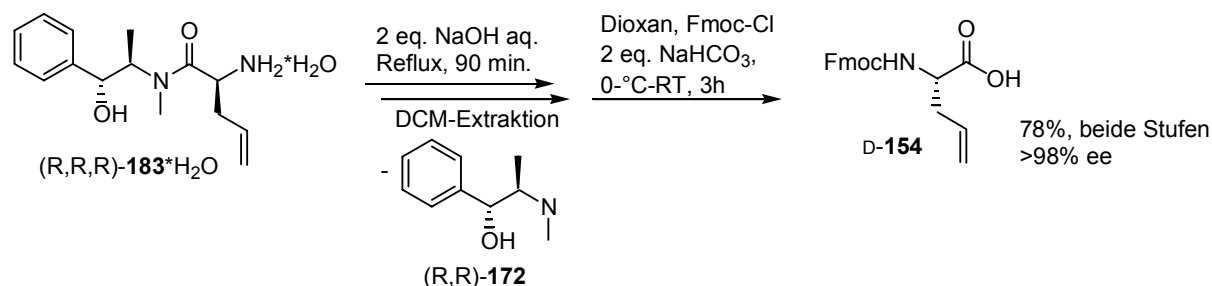


Abbildung 62: Abspaltung des Auxiliars (R,R)-**172** von (R,R,R)-**183***H₂O und anschließende Fmoc-Schützung zu Fmoc-D-Alg-OH (**D-154**).

Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses in **D-154** erfolgte durch Kupplung an H-His(Trt)-Trp(Boc)-TCP. Vorherige umfangreiche Untersuchungen hatten das Peptidgemisch Fmoc-*rac*-Alg-L-His(Trt)-L-Trp(Boc)-OH als einziges identifiziert, bei dem die beiden L- und D-Enantiomeren in HPLC-Untersuchungen basisliniengetrennte Signale aufweisen und somit eine Bestimmung der ee's ermöglichen. Die Integration der Signale lieferte einen ee>98%, bzw. das L-Alg-Diastereomer war nicht detektierbar.

Die Pseudophepdringlycinate (R,R)- und (S,S)-**174***H₂O erweisen sich somit als überaus effiziente Bausteine zur Synthese enantiomerenreiner olefinischer Aminosäuren und sollten entsprechend geeignet sein, im Fall aktiver RCM-cyclischer

Verbindungen die Synthese der enantiomerenreinen Bausteine zur Identifikation der aktiven Peptide zu ermöglichen.

4.2.3.3 Versuch der enantioselektiven Synthese C^α-disubstituierter Aminosäuren

Wie bereits in den Kapiteln 3.3.2 und 4.2.3 diskutiert, hat die Konfiguration an C^α der verbrückenden Aminosäure einen starken Effekt auf die Orientierung der exocyclischen Reste. Einen stark strukturinduzierenden Effekt in Peptiden zeigen auch C^α-disubstituierte Aminosäuren, weshalb der Einsatz solcher Verbindung in Betracht gezogen wurde.^[368-371] Voraussetzung für den Einsatz dieser Bausteine sollte aber auch hier der einfache und schnelle Zugang zu den entsprechenden enantiomerenreinen Verbindungen sein, um im Fall einer biologisch aktiven Verbindung in den Gemischen diese identifizieren zu können. Während effektive enantioselektive Synthesen der monosubstituierten Aminosäuren schon seit langem bekannt sind und inzwischen sehr ausgereift sind, sind die entsprechenden Synthesen auf dem Gebiet der C^α-disubstituierten Aminosäuren noch mit zahlreichen Nachteilen behaftet. Die vielversprechendsten Ansätze sind sicherlich die in den Arbeitskreisen von *Seebach* und *Mutter* intensiv bearbeiteten Oxazolidinone und enzymatische Racematspaltungen mittels Amidasen, Acylasen und Lipasen.^[370,372-374] In einer Abwandlung der Oxazolidinonsynthesen wurden von *Davies et al.* Ferrocencarbaldehyde (**184**) als dirigierende Gruppe vorgestellt und die entsprechenden Synthesen zu (**187**) beschrieben (Abbildung 63).^[375-377]

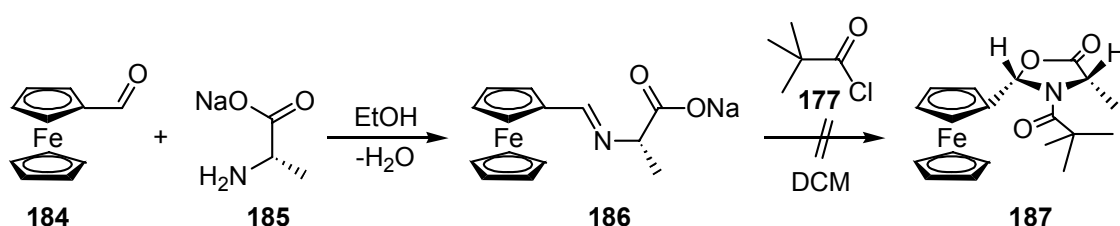


Abbildung 63: Versuch der Synthese des Ferrocenoxazolidinons **187** nach Davies.

Die entscheidenden Vorteile dieser Syntheseroute sind die sehr guten publizierten Ausbeuten (98%) und de's (>98%) für die Bildung, Alkylierung und die milde Spaltung von **187** zu der entsprechenden doppelt substituierten Aminosäure und dem Ferrocencarbaldehyd **184** durch Ionentauscher.

Leider gelang die Synthese des Ferrocenoxazolidinons **187** trotz mehrfacher Versuche unter Variation der Reaktionsbedingungen nicht! Auch sind seit der Publikation der Methode von der Gruppe von *S. G. Davies* keine anderen Synthesen veröffentlicht worden, in denen eine erfolgreiche Synthese beschrieben ist (in der Arbeitsgruppe von *V. Hruby* konnte nach Optimierung des Lösungsmittels immerhin eine Ausbeute von maximal 15% des Ferrocenoxazolidinons erreicht werden; persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurde auf weitere Versuche, C^α-methylierte olefinische Aminosäuren zu synthetisieren, verzichtet.

4.3 Die RCM in homodetischen uPA-Peptiden an fester Phase

4.3.1 Versuche zur RCM in olefinischen Peptiden an fester Phase

In ersten Voruntersuchungen sollte das Konzept und die Durchführbarkeit der RCM in uPA-Peptiden an fester Phase überprüft werden (siehe Abbildung 64).

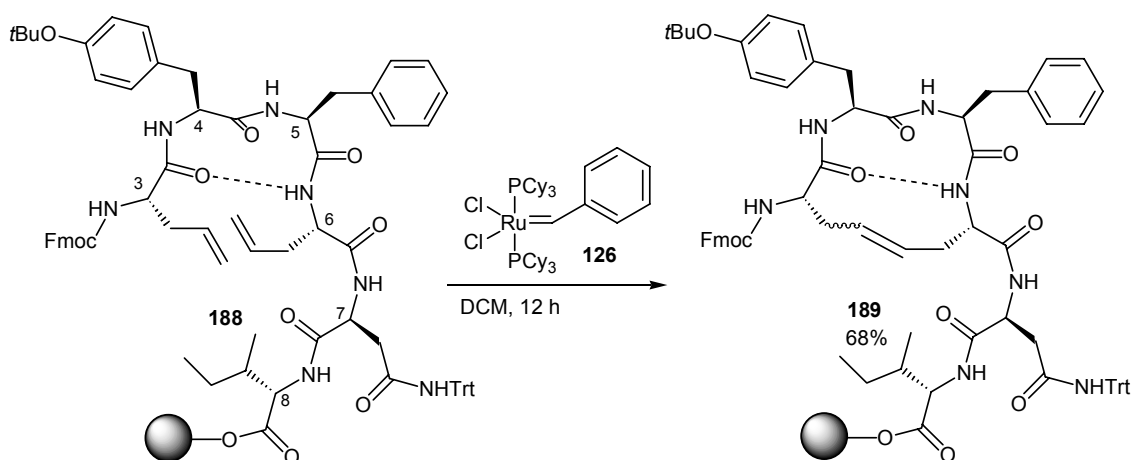


Abbildung 64: Synthese des RCM-cyclischen Peptids **189** an fester Phase.

Da die Toleranz des *Grubbs*-Katalysators insbesondere gegenüber den heterocyclischen Seitenketten von His(Trt) und Trp(Boc) nicht bekannt war, bestanden erste Modellcyclen aus den jeweiligen C-terminal verkürzten Verbindungen. Auch wurde die Beobachtung von *Grubbs et al.*, dass im Fall der RCM von β -turns ausschließlich die L-konfigurierten Allylglycine zum gewünschten Produkt führen^[333,336] in die Planung mit einbezogen (Abbildung 64).

Anders als im Fall der *Grubbs*-Verbindung **152** beschrieben, führte die RCM-Reaktion von **188** zur Bildung eines Produktgemisches aus *cis*- und *trans*-Verbindung (**189**, 60:40). Bei der Reaktion des entsprechenden racemischen Peptidylharzes **190** bilden sich ebenfalls nur zwei Verbindungen, wobei aber auf eine Untersuchung, ob es sich um das gleiche *cis/trans*-Gemisch wie in **189** handelte, verzichtet wurde. Im Folgenden wurden noch zahlreiche Modellverbindungen synthetisiert und den RCM-Bedingungen unterworfen (einige der Verbindungen sind in Abbildung 65 dargestellt).

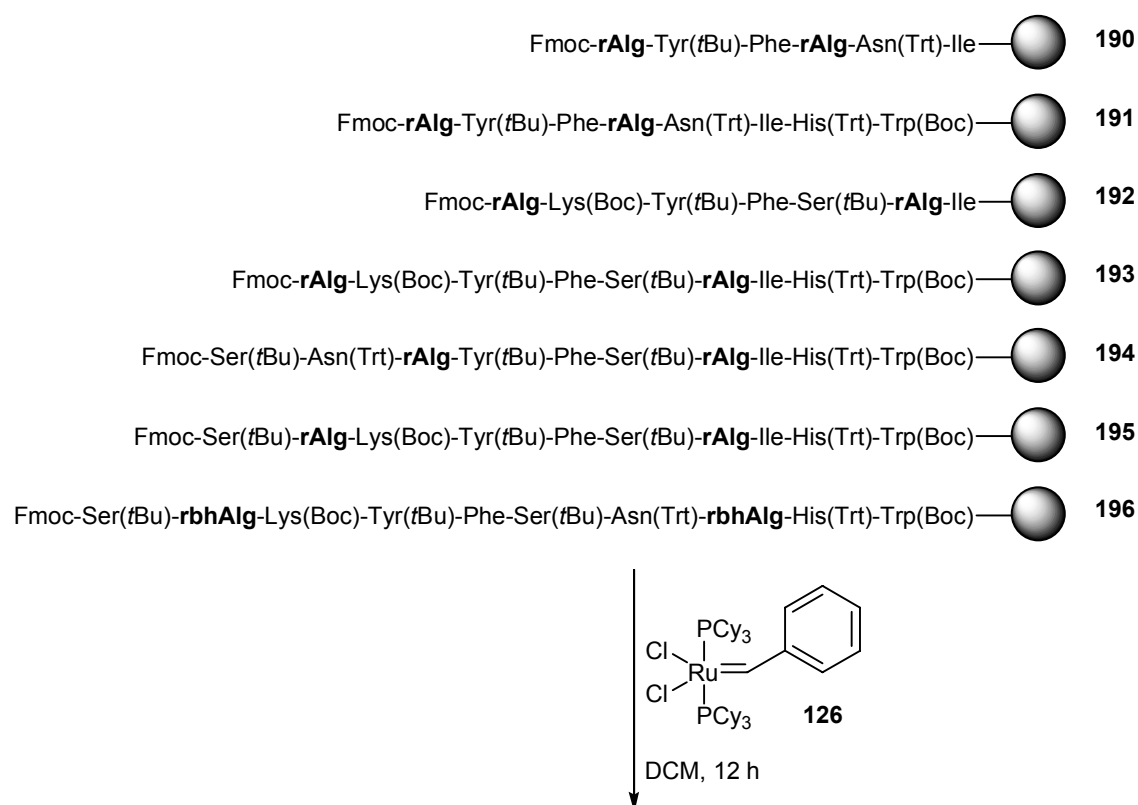


Abbildung 65: Modellcyclen, die RCM-Bedingungen unterworfen wurden. Einzig **190** und **191** bildeten RCM-Produkte.

Von allen untersuchten Verbindungen zeigten einzig die vom β -turn abgeleiteten Peptidylharze **190** und **191** die Bildung RCM-cyclischer Verbindungen, bei allen anderen konnten nur die Edukte detektiert werden. Darüber hinaus zeigte die Verbindungen **191** noch eine zunehmende Tendenz, polymere Nebenprodukte zu bilden: Während **188** bei RT noch glatt zu den entsprechenden RCM-cyclischen Verbindung reagiert, zeigt **191** bereits bei RT die deutliche Bildung polymeren Materials und bei 40 °C überwiegt die Polymerisation gegenüber der Cyclisierung. Diese Beobachtung beruht wahrscheinlich auf der zunehmenden Beweglichkeit der längeren Peptidketten bei höherer Temperatur, was eine intermolekulare Reaktion solcher Seitenketten ermöglicht, die aufgrund ihrer Konfiguration keine intramolekularen RCM-Reaktionen eingehen können. Da die Tendenz zur Polymerisation in **191** temperaturabhängig ist, die RCM in allen größeren Modellcyclen **192-196** überhaupt nicht beobachtet werden konnte und die Verwendung unterbelegter bzw. PEG-modifizierter Harze keinen Einfluss auf die Tendenz zur Cyclisierung hatte, lag es nahe zu vermuten, dass es sich im Fall der nicht erfolgenden RCM in den olefinischen Peptiden **192-196** um intramolekulare Aggregationseffekte handelte, die eine Annäherung der terminalen Olefinseitenketten verhinderten.

Für eine solche Erklärung spricht auch die Analyse der wenigen publizierten Beispiele erfolgreicher RCM-Cyclisierung in Peptiden mit ungesättigten Seitenketten. Auffällig ist, dass alle diese Verbindungen entweder weniger als vier Aminosäuren im Cyclus enthalten (Aggregationen treten in Peptiden erst ab Ketten von fünf Aminosäuren auf) oder im Fall größerer Peptide Prolin oder *N*-Alkyl-Aminosäurereste enthalten (größere Flexibilität der Amidbindung, weshalb diese Bausteine 'strukturbrechende' Eigenschaften haben).^[337,344,345,348,349,378] Entsprechend der grundsätzlichen Überlegungen zur Entwicklung von uPAR-Antagonisten in Kapitel 4.1 stellt der Einbau solcher *N*-substituierter Bausteine aber möglicherweise eine zu große Veränderung für die Struktur der bestehenden peptidischen Antagonisten dar und kommt deshalb nicht in Betracht. Eine mögliche Strategie bestand aber in der Einführung reversibler Schutzgruppen des Peptid-Rückgrates, wie sie im folgenden Kapitel beschrieben werden.

4.3.2 Verwendung von Pseudoprolinen ermöglicht die RCM in olefinischen uPA-Epitopen an fester Phase

Unvollständige Kupplungen und Entschützungen im Zusammenhang mit der Aggregation seitenkettengeschützter Peptide an fester Phase sind zwar für eine große Zahl von Sequenzen beschrieben, allerdings gibt es nur wenig prinzipielle Lösungsstrategien. Eine davon besteht in der temporären *N*-Substitution des Rückgrates zu den cyclischen oder linearen Bausteinen **197** und **198**. Diese in Abbildung 66 dargestellten Schutzgruppen führen in einer großen Zahl von Sequenzen nachweislich zur Störung von Sekundärstrukturen und damit verbunden zur Überwindung sogenannter schwieriger Sequenzen (eine ausführliche Diskussion zu Synthese und Einsatz der gezeigten Derivate in der Peptidsynthese folgt in Kapitel 5).

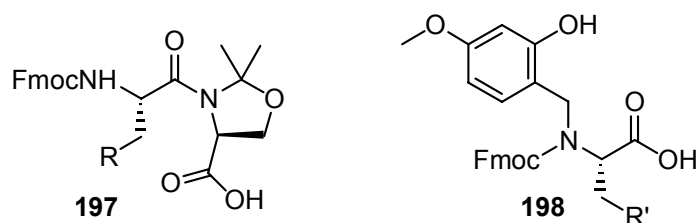


Abbildung 66: Pseudoprolin- (**197**) und *N*-Hmb-Derivate (**198**) zur Einführung reversibler Schutzgruppen der Amidgruppen in Peptiden

Im Fall der Pseudoproline (**197**) konnte von *Mutter et al.* gezeigt werden, dass die Amidbindung im Gegensatz zu normalen sekundären Amiden in der *cis*-Konfiguration vorliegt, was die besondere Eignung dieser Derivate als Aggregationsinhibitoren erklärt. Als Position für die Einführung einer reversiblen Schutzgruppe eignet sich einzig die Position Ser²⁶, da nur an dieser Stelle eine solche Seitenkettencyclisierung möglich ist. Das entsprechende Fmoc-geschützte Pseudoprolindipeptid Fmoc-Phe-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (**199**) ist (mittlerweile) kommerziell erhältlich und racemisierungsfrei unter Standardbedingungen in die Peptidkette einzubauen (zur Synthese von **199** siehe Kapitel 5.4.3). Die modifizierten Modellpeptidylharze **200**, **202-204** reagierten unter RCM-Bedingungen, wobei die *C*-terminal verkürzte

Verbindung **200** bereits bei RT vollständigen Umsatz zeigt, während alle anderen, um drei Aminosäuren längeren Peptidylharze erst bei 40 °C in DCM nach 12 h einen vollständigen Umsatz aufweisen (siehe Abbildung 67).

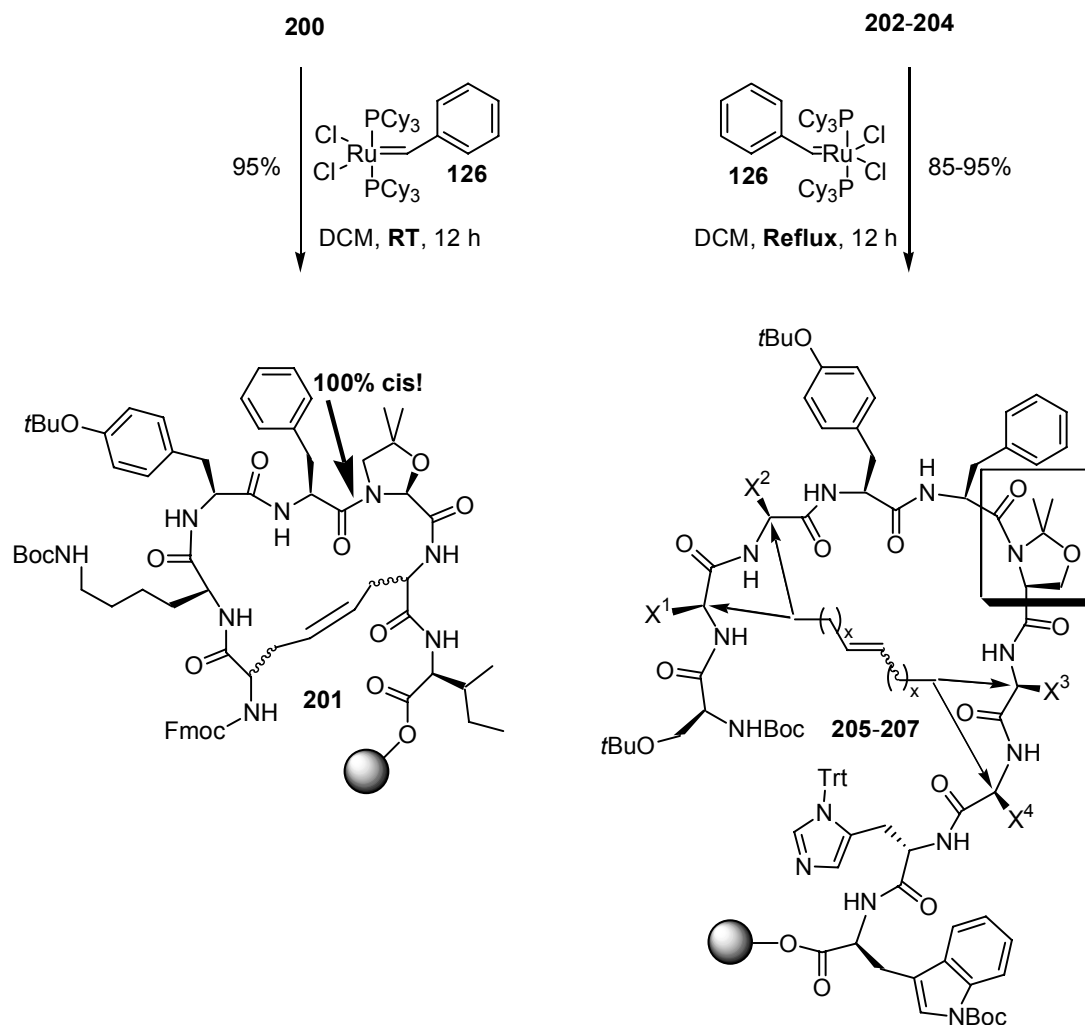


Abbildung 67: Produkte erfolgreicher RCM-Reaktionen in Modellpeptidylharzen, die ein Pseudoprolinderivat des Serins²⁶ enthalten (induziert 100% cis-Amidbindungen!). Das C-terminal verkürzte **200** zeigte bereits bei RT vollständigen Umsatz, während **202-204** erst bei 40 °C hohe Umsatzraten aufwies (X¹-X⁴ sind entweder die Seitenketten der natürlichen Aminosäuren oder die olefinischen, verbrückenden Einheiten, Brückenpositionen sind Asn²²/Asn²⁷ **202** und Lys²³/Asn²⁷ **203** mit x = 1 und Asn²²/Ile²⁸ **204** mit x = 3).

Die Beobachtung, dass die nicht Rückgrat-modifizierte Peptidharze **193-196** mit den C-terminalen Aminosäuren His(Trt) und Trp(Boc) trotz nicht erfolgreicher RCM-Reaktion nach seitenkettengeschützter Abspaltung vom Harz eine Veränderung der RP-HPLC Retentionszeiten aufweisen, deutete auf die Bildung eines Komplexes aus Peptid und RCM-Katalysator **126**, bzw. seinen Abbauprodukten hin. Entsprechende Coinjektionen von reinem Peptid und von mit *Grubbs*-Katalysator verunreinigtem Peptid zeigten in der RP-HPLC ein gemeinsames Signal mit gemittelter Retentionszeit. Auch die Einführung der Pseudoproline änderte nichts an diesem Verhalten und sogar durch präparative RP-HPLC RCM-cyclisierter Peptide konnte keine Reinigung erzielt werden (Isolierung von violett bis braun gefärbten, seitenkettengeschützten Peptiden).

Der naheliegende Ansatz, die komplexierenden, geschützten Peptide durch festphasengebundenen *scavenger* zu verdrängen sollte durch den Einsatz von Thiolpolystyrolharzen **207** realisiert werden (Abbildung 68).

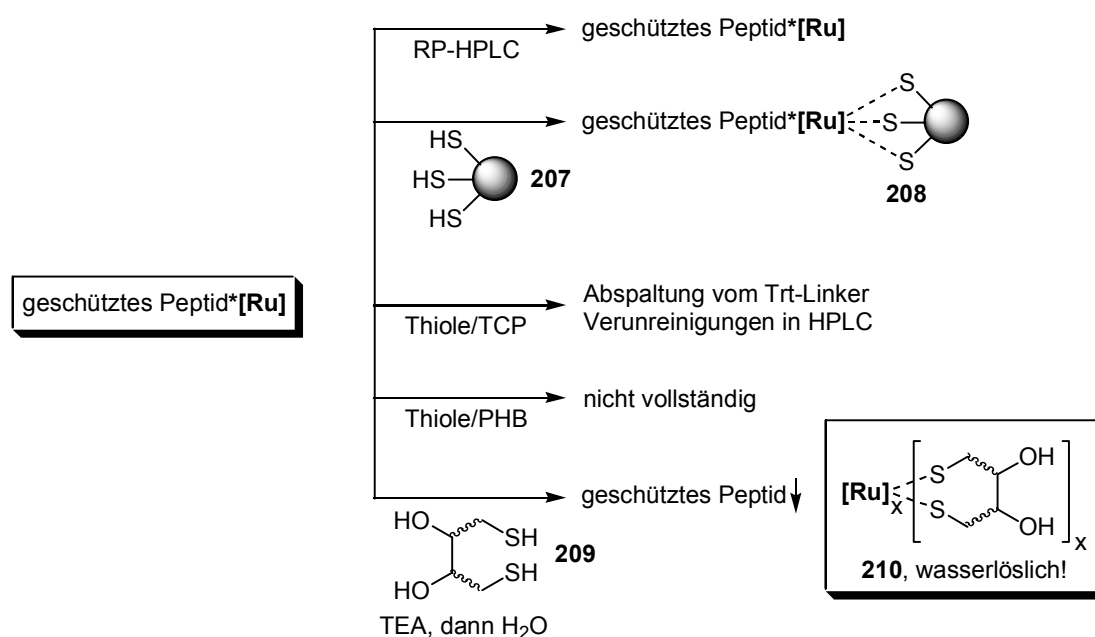


Abbildung 68: *Evaluerte Strategien zur Entfernung der Rutheniumverunreinigungen aus den RCM-cyclisierten Peptiden.*

Die Behandlung der Ruthenium-kontaminierten Harze mit thiol-funktionalisiertem TentaGel führte laut RP-HPLC Analyse der verbleibenden Lösung allerdings zu etwa

75% Bindung der Peptide an das Harz, vermutlich durch die doppelte Komplexierung des Metalls durch die Peptide als auch durch die Thiofunktionen (**208**). Die umgekehrte Strategie, die Metallverbindungen aus dem Harz zu waschen ist am Trityllinker mit Thiolverbindungen wie Ethandithiol (EDT) oder Dimethyldithiocarbamat (DMDTC)^[379] wegen der Linkerinstabilität nicht möglich. EDT oder DMDTC als Komplexierungsreagenz für die präparative RP-HPLC Reinigung zu verwenden ist wegen der zahlreichen Signale von Verunreinigungen der Reagenzien in der UV-Spur und der Geruchsbelästigung ebenfalls nicht durchführbar. Auch die Bindung von RCM-Peptiden über *p*-Hydroxymethoxybenzyl(HMB)-Linker und der anschließende Versuch, die Rutheniumverunreinigungen aus den RCM-Peptidylharzen auszuwaschen schlugen fehl. Schließlich führte die Strategie der Komplexierung der Katalysatorreste mittels Dithiothreitol (*Clelands* Reagenz, DTT, **209**) in Triethylamin (TEA) und Acetonitril (ACN) und die anschließende Fällung des geschützten Peptids in Wasser zur Abtrennung der gebildeten wasserlöslichen Rutheniumkomplexe **210** (Abbildung 68). Eine ähnliche Methode wurde auch kürzlich von *Grubbs et al.* realisiert, die ein wasserlösliches Phosphinderivat zur Reinigung RCM-cyclischer Verbindungen eingesetzt haben.^[380]

Da die gebildeten RCM-Verbindungen in **205-207** in Form von Gemischen aus den vier L-/L-, D-/L-, L-/D- und D-/D-Brückenkonfigurationen mit zusätzlich unterschiedlichen Verhältnissen *cis/trans*-Doppelbindung (maximal acht Verbindungen) und gegebenenfalls noch vorhandenen Edukten bestehen, ist eine Aussage über die Bildung aller theoretisch zu erwartenden Verbindung nur schwer zu treffen. Zu diesem Zweck sollten die in den RCM-Reaktionen gebildeten Doppelbindungen reduziert werden, was die Analytik erheblich vereinfachen sollte. Entsprechende Versuche mittels Wasserstoff und Palladium/Aktivkohle als Katalysator in Dimethylacetamid (DMAc) als Lösungsmittel zeigten, dass die Doppelbindungen nur sehr langsam hydriert werden und gleichzeitig eine weitere Reduktion stattfindet, vermutlich am Indolring des Tryptophans. Aus diesem Grund wurde die Sequenz im C-terminalen Bereich dahingehend abgeändert, dass His²⁹ gegen Ala (siehe Kapitel 3.1) und Trp³⁰ gegen Phe (siehe Kapitel 3.3.6) ausgetauscht wurden, um einerseits die Möglichkeit der Reduktion einer Seitenkette auszuschließen und andererseits die Tendenz zur Komplexierung von Rutheniumverbindungen zu

minimieren (eine Verschiebung der Retentionszeiten als Indikator für die Bildung eines Peptid/Rutheniumkomplexes wurde nur im Fall der Peptide **205-207** erhalten, die C-terminal um His²⁹ und Trp³⁰ verlängert waren!).

Da die racemisches Allylglycin (*rac*-**154**) enthaltenden Mischungen **205** und **206** noch bis zu 15% Edukte enthielten, konnte in der racemischen Synthese keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob der Anteil dieser Edukte gleichmäßig auf alle Diastereomeren verteilt ist oder manche Diastereomeren deutlich geringere Reaktivitäten zeigten als andere.

Die aus diesen Modellversuchen resultierenden Erkenntnisse wurden in der Planung einer kombinatorischen Synthesestrategie für RCM-Bibliotheken umgesetzt und sind im folgenden Kapitel beschrieben.

4.3.3 Kombinatorische Festphasensynthese RCM-cyclisierter uPA-Epitope

Für einen kombinatorischen Ansatz ist die Optimierung der RCM-Reaktion zu möglichst vollständigem Umsatz unabdingbar, weshalb nach den Erkenntnissen aus dem vorherigen Kapitel der gleichzeitige Einsatz aller racemischer Olefinbausteine mit allen Seitenkettenlängen in Mischungen vorerst nicht sinnvoll erschien. Auch existierten noch keine Erkenntnisse darüber, ob es mit einigen Kombinationen von Verbrückungspositionen aufgrund ungeeigneter Konformationen nicht doch zu einem Einbruch der Umsatzraten kommen könnte. Im Folgenden musste also ein sinnvoller Kompromiss zwischen den folgenden Extremen gefunden werden:

- Effiziente Synthese der Zielverbindungen (möglichst viele Verbindung in möglichst wenigen Ansätzen, bzw. Mischungen).
- Minimierung des Risikos, im Fall unvollständiger Reaktionen größere Bibliotheken hinsichtlich der RCM-Reaktivität einzeln untersuchen zu müssen.

Entsprechend wurden in einem ersten Schritt nur solche Peptidylharze getrennt synthetisiert, die jeweils die olefinischen Seitenketten von racemischem

Homoallylglycin (*rac*-**160**) oder Bishomoallylglycin (*rac*-**165**) enthielten, da in dem analogen Modellpeptid (**207**) keine Edukte detektiert werden konnten (Abbildung 69).

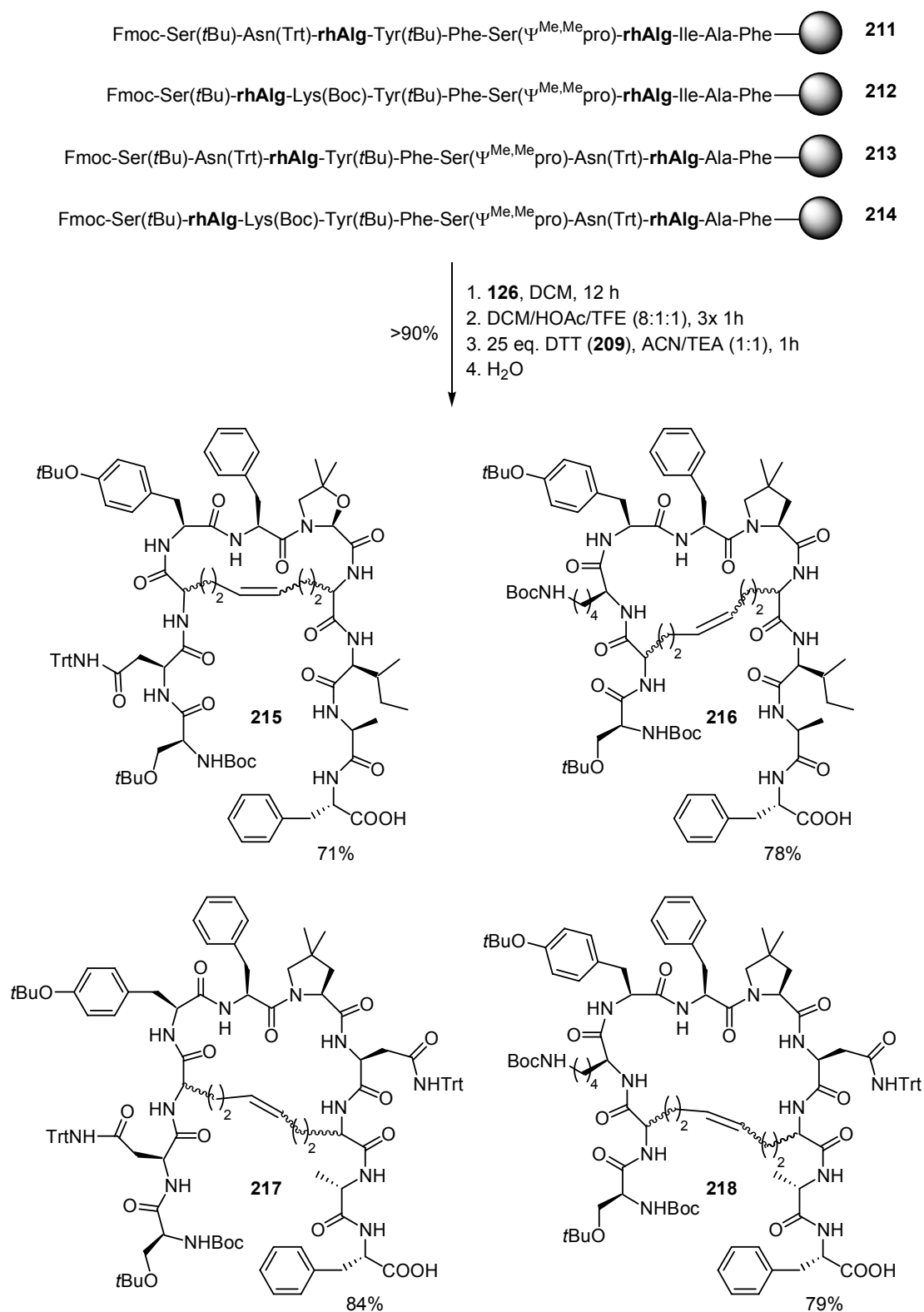


Abbildung 69: RCM-Reaktionen mit Peptidylharzen **211-214**, Abspaltung und Fällung zu den Bibliotheken **215-218**.

Die entsprechenden auf Homoallylglycin (*rac*-**160**) basierenden Peptidylharze **211-214** wurden nach den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Methoden synthetisiert und durch Massenspektroskopie charakterisiert. Bei den Harzen handelte es sich in allen folgenden Synthesen um unterbelegte TCP-Harze, die mit Mischungen aus Boc- und Fmoc-geschützten (3:1) Aminosäuren belegt worden sind und in Fmoc-Belegdichten von 0.15-0.2 mmol/g resultierten. Diese Strategie wurde gewählt, um eventuell auftretende Kreuzmetathesereaktionen im Fall disfavorisierter RCM-Cyclisierungen zu minimieren (siehe auch Kapitel 4.3.1).^[330]

Die RCM-Reaktion zeigte innerhalb von 12 h in DCM hohe Umsätze mit über 90%. Bei der folgenden Abspaltung der geschützten RCM-Peptidbibliotheken **215-218** mussten die Abspaltzeiten verlängert werden, um gute Ausbeuten zu erhalten. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich die Bildung von Rutheniumsalzen und anderer Abbauprodukte, die die Diffusion der Zielverbindungen aus dem *bead* heraus zu verlangsamen scheinen. Die resultierenden, tiefbraunen Lösungen wurden einrotiert und die geschützten Peptidbibliotheken **215-218** nach der oben beschriebenen Methode mittels 25 eq. DTT (**209**) in TEA/ACN (1:1) und nach Fällung in Wasser und Zentrifugation in guten Ausbeuten erhalten (siehe Abbildung 69). In den HPLC-MS Analysen waren zwischen drei und sieben der verschiedenen gesuchten Verbindungen der entsprechenden Masse in unterschiedlichen Intensitäten erkennbar (Abbildung 70).

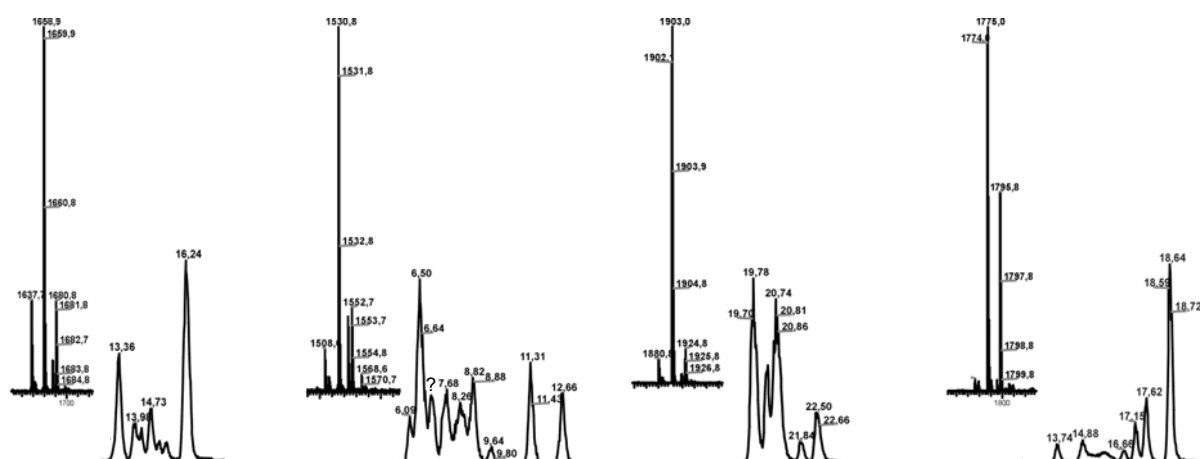


Abbildung 70: Produktverteilungen (jedes Signal entspricht jeweils der Masse der Zielverbindung) und massenspektroskopische Charakterisierung der RCM-cyclisierten Peptidbibliotheken **215-218** (von links nach rechts).

Die Retentionszeitunterschiede zwischen den Diastereomeren betragen zwischen einer und sechs Minuten, bei einer Gradientenlaufzeit von nur 15 Minuten!

Diese extremen Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften der erzeugten RCM-cyclischen Peptide (stark unterschiedliche hydrophobe Wechselwirkungen mit der C₁₈-Phase der RP-Kieselgele) sind eine Bestätigung für die Voraussage, dass die Konfiguration der verbrückenden C^α der Aminosäuren einen sehr großen Einfluss auf die räumliche Ausrichtung der Seitenketten im cyclischen Peptid hat und man durch die gezeigten Variationen von Cyclisierungsstelle, Brückenlänge und Konfiguration zu räumlicher Diversität gelangen kann.

Leider lassen die Intensitäten der Signale keine Aussage darüber zu, ob alle möglichen Kombinationen gebildet wurden. Es ist möglich, dass im Fall einer konformationell gehinderten RCM-Reaktion die Kreuzmetathese überwiegt und die so gebildeten polymeren Produkte aufgrund ihrer Hydrophobizität nicht mehr detektiert werden können. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde versucht, die Bibliotheken **215-218** mit H₂ und Pd/C in DMAc (mit DMF vergleichbares Lösungsmittel für Peptide) zu reduzieren, wodurch sich die Chromatogramme zu den vier zu erwartenden Signalen vereinfachen sollten. Dabei zeigte sich, dass die Reaktivität der Doppelbindung viel geringer ist, als für ein disubstituiertes Olefin zu erwarten wäre.^[323,338] Die langen Reaktionszeiten von drei Tagen bei 1 bar H₂-Partialdruck (auch höhere Drücke vermögen die Reaktion nicht zu beschleunigen) sind vermutlich durch eine schlechte Exposition der Doppelbindung zur Katalysatoroberfläche bedingt. Der Versuch, die hydrophobe Kohlenwasserstoffbrücke durch Verwendung des unpolaren Dioxans als Lösungsmittel besser für eine Reduktion zugänglich zu machen, resultierte in einer noch wesentlich geringeren Reaktionsgeschwindigkeit für einzelne Diastereomere.

Nach der Reduktion der Bibliotheken **215-218** zu **219-222** vereinfachten sich die HPLC-Diagramme zu vier bzw. drei Signalen (in **220** und **222** laufen zwei Diastereomere isochron mit etwa doppeltem Integral) mit Retentionszeitunterschieden von zwei bis fünf Minuten. Die Diagramme belegen die Bildung aller zu erwartenden RCM-Cyclen!

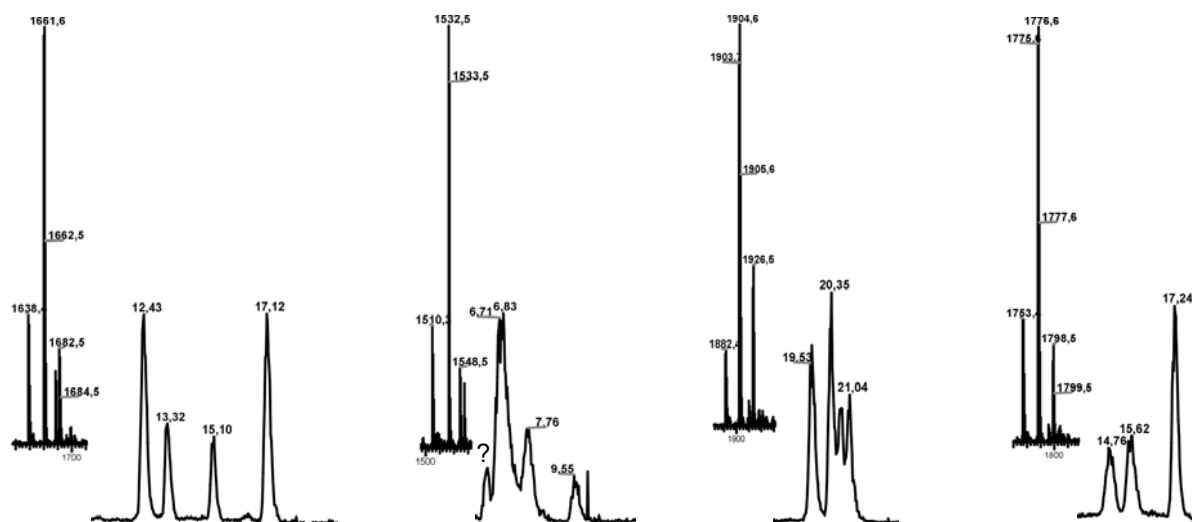


Abbildung 71: Produktverteilungen (jedes Signal entspricht jeweils der Masse der Zielverbindung) und massenspektroskopische Charakterisierung der RCM-cyclisierten Peptidbibliotheken **219-222** nach Reduktion mit H_2 , Pd/C.

In der sich anschließenden Seitenkettenentschützung erwies sich die $Ser^{26}(\Psi^{Me,Me}pro)$ -Schutzgruppe als problematisch. In der massenspektroskopischen Analyse tritt ein Nebenprodukt mit der Massendifferenz von +40 auf. Diese Differenz kann einer unvollständigen Entschützung der Pseudoprolinschutzgruppe entsprechen, was aber in der Synthese schwieriger Peptidsequenzen nie beobachtet wurde (siehe Kapitel 5.4.4). Die Freisetzung zu den vollständig seitenkettenentschützten Verbindungen (**223-226**) gelang dann aber durch den Zusatz von 5% Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) zur TFA-Abspaltungslösung.^[381]

Die Fällung von **223-226** in Et_2O blieb unvollständig, bzw. erfolgte gar nicht. Erst die Zugabe von (max. 40%, sonst Bildung einer Emulsion!) Hexan ermöglichte die Fällung, um die TFA und besonders TFMSA vor einer präparativen RP-HPLC abzutrennen. Nach RP-HPLC-Reinigung wurden die in Abbildung 72 dargestellten Bibliotheken **223-226** erhalten.

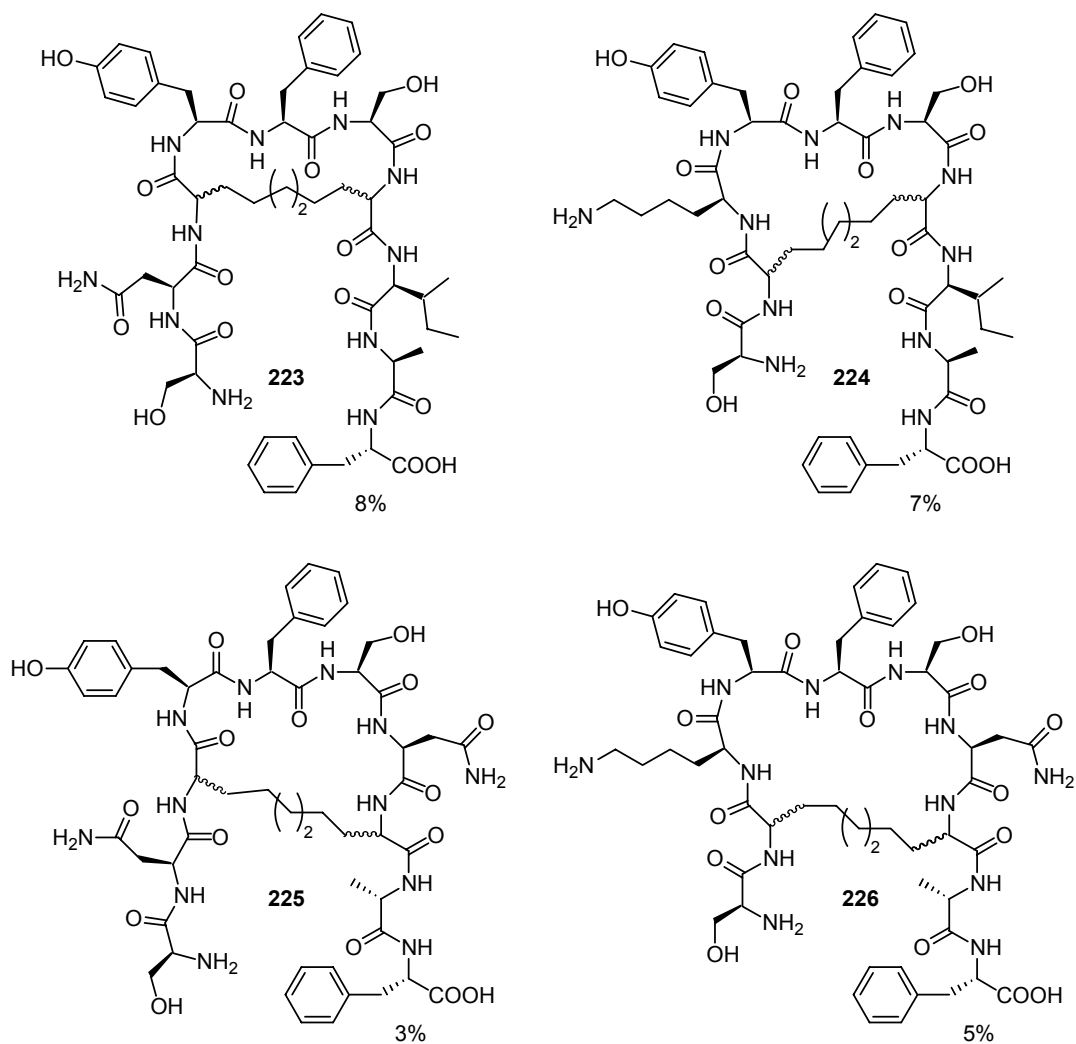


Abbildung 72: Auf der Basis von racemischen Homoallylglycin (*rac*-160) synthetisierte RCM-Bibliotheken 223-226 (16 Verbindungen in vier getrennten Ansätzen). Die geringen Ausbeuten nach Entschützung, Fällung und RP-HPLC sind auf die unvollständige Etherfällung nach der Seitenkettenentschützung zurückzuführen.

In Analogie zu den oben beschriebenen Bibliotheken wurden die entsprechenden Peptidylharze 227-230 mit racemischem Bishomoallylglycin (*rac*-165) als olefinischem Baustein synthetisiert und in hohen Umsätzen zu den RCM-cyclischen Bibliotheken umgesetzt (keine Edukte gemäß RP-HPLC-ESI)(Abbildung 73).

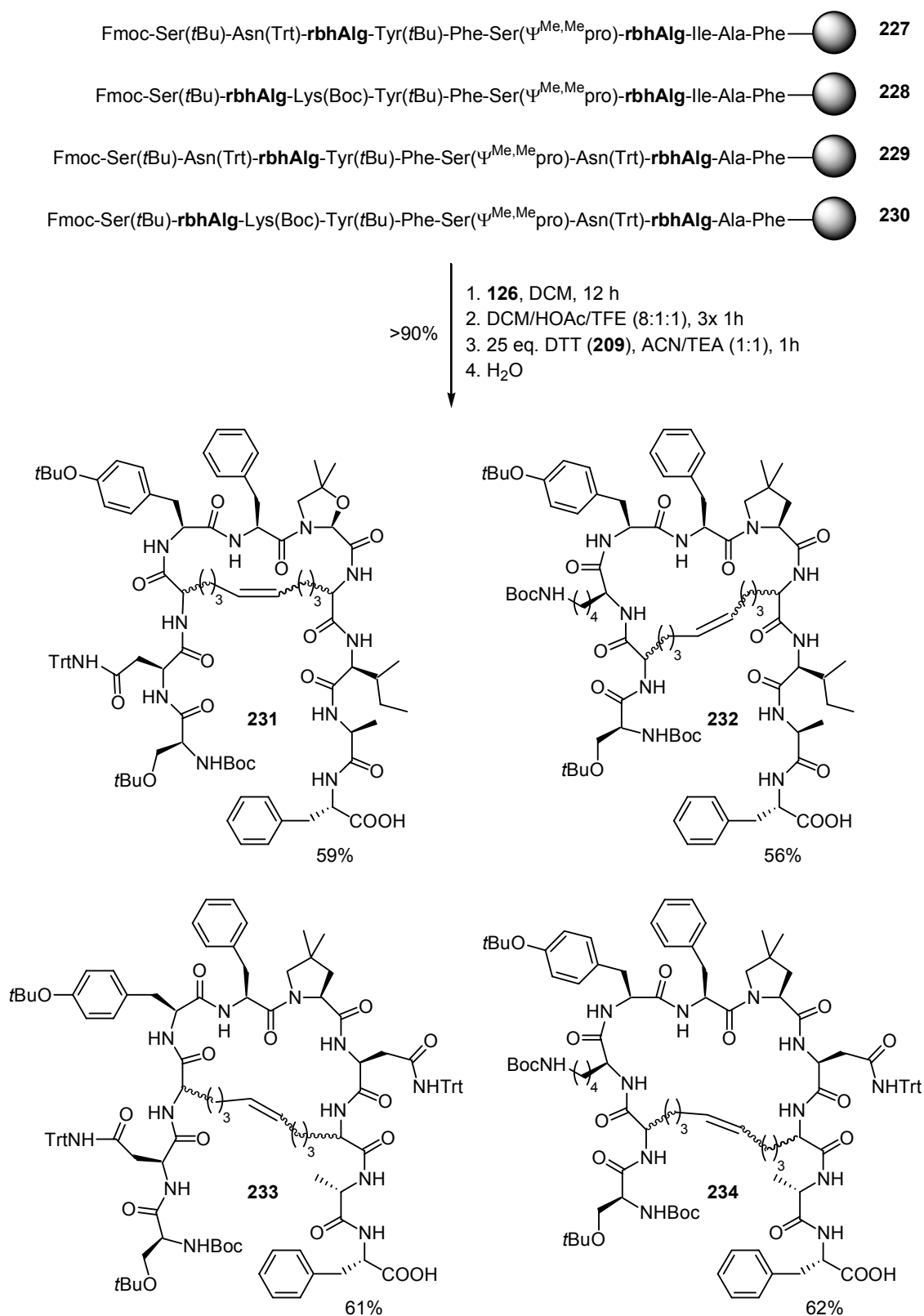


Abbildung 73: RCM-Reaktionen mit Peptidylharzen **227-230**, nachfolgende Abspaltung vom Harz und DTT-Fällung führt zu den geschützten RCM-cyclisierten Peptidbibliotheken **231-234** (bestehend aus je acht theoretisch zu erwartenden Produkten).

Die Ausbeuten nach Harzabspaltung, Komplexierung der Rutheniumreste mit der DTT-Prozedur und Fällung in Wasser ergab in diesem Fall allerdings schlechtere Ausbeuten im Bereich von nur 56-62%, ohne dass eine Erklärung für diese Beobachtung gegeben werden kann (Abbildung 73).

Wie bereits für die Verbindungen in **215-218** diskutiert, zeigten die geschützten cyclischen Peptidbibliotheken deutliche Retentionszeitunterschiede der einzelnen Diastereomere in der HPLC-Analyse, allerdings fielen diese aufgrund der verlängerten Brückeneinheit weniger stark aus und lagen zwischen einer und dreieinhalb Minuten. Auch in den stärker getrennten Mischungen ließen die auf unterschiedlichen *cis/trans*-Verhältnissen basierenden Produktverteilungen erneut keine Aussage über die vollständige Bildung aller acht zu erwartender Reaktionsprodukte zu, weshalb erneut alle Doppelbindung in **231-234** reduziert werden sollten.

In dem System H₂, Pd/C in DMAc verlief die Reduktion aber so extrem langsam, dass eine homogene Reduktion durch *in situ* erzeugtes Diimin H₂N₂ (**236**) (Abbildung 74) versucht werden sollte.^[344,382,383]

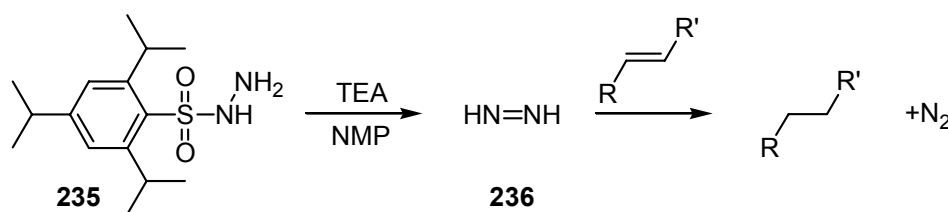


Abbildung 74: *In situ* Generierung von Diimin (**236**) aus Triisopropylbenzolsulfon-säurehydrazid (**235**) und TEA führt zur Reduktion von Olefinen.

Die Reduktion der ungesättigten Bibliotheken **231-234** führte dann unter Verwendung von 60 eq. **235** (!) und 1.6 eq. TEA bei 50 °C in NMP innerhalb von drei Tagen zu den reduzierten, seitenkettengeschützten Bibliotheken **235-238**, die in Analogie zu **219-222** vereinfachte HPLC-Diagramme mit nur vier, bzw. drei Produkten aufwiesen. Anschließende Seitenkettenentschützung mittels 5% TFMSA in TFA führte nach Fällung in Et₂O/40% Hexan und RP-HPLC zu den in Abbildung 75 dargestellten RCM-cyclischen Peptidbibliotheken **239-242** mit insgesamt 16 RCM-cyclischen Verbindungen.

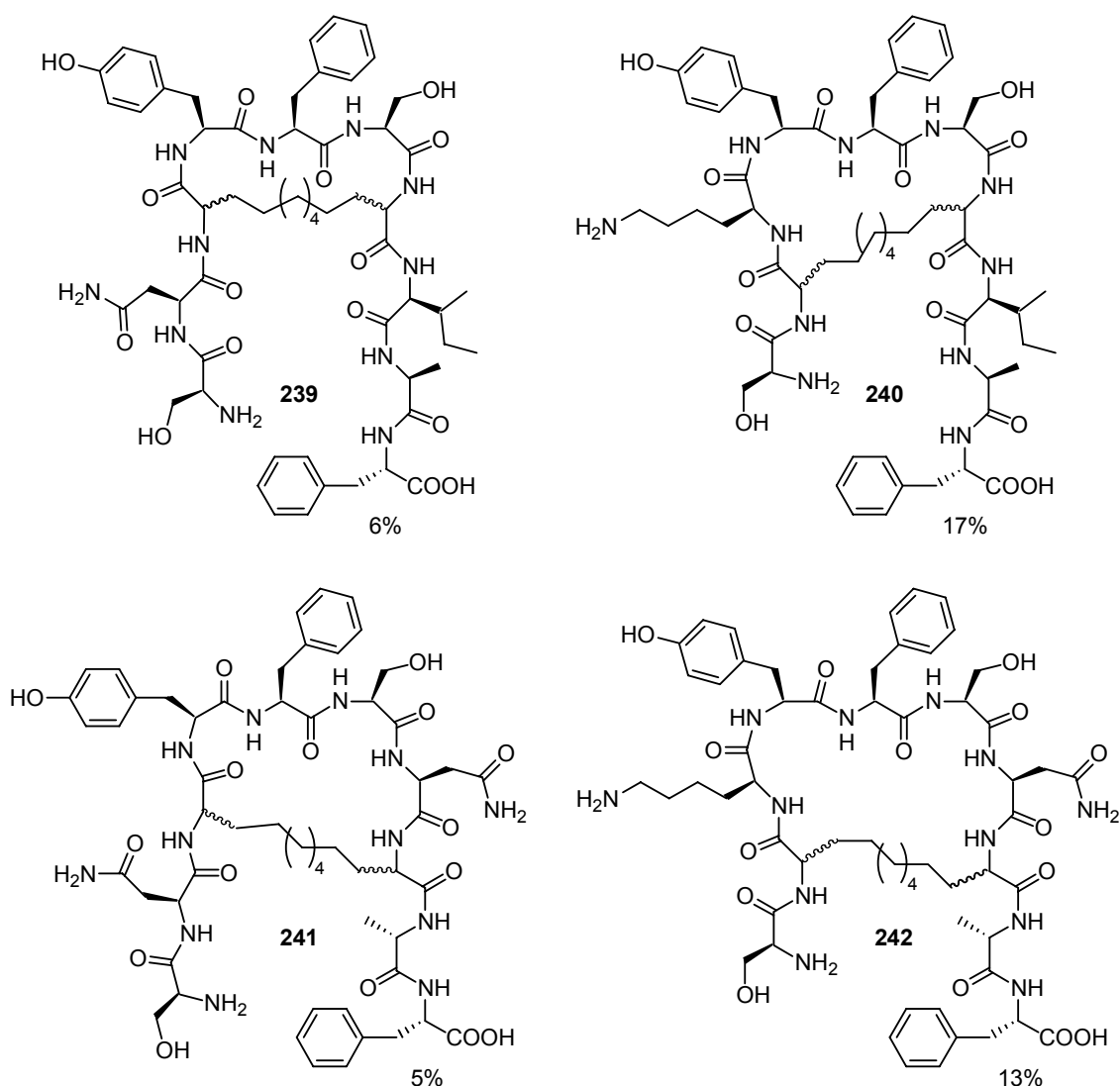


Abbildung 75: Auf der Basis von racemischem Bishomoallylglycin (*rac*-165) synthetisierte, reduzierte und seitenkettenentschützte RCM-Bibliotheken **239-242** (16 Verbindungen in vier getrennten Ansätzen). Die geringen Ausbeuten nach Entschützung, Fällung und RP-HPLC sind wie im Fall der Peptidbibliotheken **223-226** auf die unvollständige Etherfällung nach der Seitenkettenentschützung zurückzuführen.

In einem getrennten Ansatz wurden alle Kombinationen der enantiomerenreines Allylglycin (D- und L-154) enthaltenden olefinischen Peptidylharze synthetisiert (nur Positionen Asn²²/Ile²⁸ **243-246** und Lys²³/Ile²⁸ **247-250**) und RCM-Bedingungen unterworfen.

RP-HPLC Untersuchungen der Produkte **251-254** (Asn²²/Ile²⁸) und **255-258** (Lys²³/Ile²⁸) zeigten, dass in Abhängigkeit der Konfiguration der Olefinbrücken in einigen Fällen bis zu 30% lineares Edukt vorlagen. Da in dem Auftreten unvollständiger Reaktionen aber keine Regelmäßigkeit zu erkennen war, konnte dieses Verhalten nicht eindeutig einer eventuellen konformationellen Spannung oder einer Komplexierung der aktiven Rutheniumspezies durch den Carbonylsauerstoff des Rückgrates (siehe Abbildung 53) zugeschrieben werden. Es ist allerdings fraglich, ob der Unterschied von nur zwei Methylengruppen bei sonst identischem Molekül in einigen Fällen für die schlechten Ausbeuten der RCM-Reaktion in solchen großen Ringmolekülen verantwortlich sein kann.

Weiterhin waren die theoretisch zu erwartenden *cis/trans*-Isomere nur in einigen Fällen getrennt in HPLC-Analysen zu detektieren (bzw. nicht vorhanden?) und es gelang auch nicht, die resultierenden Doppelbindungen zu reduzieren, um zu einer definierten Substanz zu gelangen die dann zumindest in diastereomerenreiner Form über eine Parallelsynthese zugänglich wäre.

Diese Beobachtungen ließen Allylglycin (**154**) als Baustein für kombinatorische Synthesen von RCM-cyclischen Peptiden ungeeignet erscheinen und entsprechend wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Die Untersuchung der Peptidbibliotheken **223-226** und **239-242** auf antagonistische Aktivität gegenüber uPAR wurde mittels FACS-scan Analyse durchgeführt, wobei sich alle Verbindungen als inaktiv erwiesen. Diese enttäuschende Tatsache ist offensichtlich entweder dadurch bedingt, dass die für die biologische Aktivität bedeutsamen exocyclischen Gruppen trotz der Verwendung racemischer Aminosäurebausteine durch die Cyclisierung in eine Position gebracht werden, in der sie nicht mehr für eine Rezeptorbindung zur Verfügung stehen oder aber die Cyclisierung die Struktur so nachhaltig verändert, dass durch die Fixierung der Seitenketten in einer ungeeigneten räumlichen Anordnung keine Bindung mehr erfolgen kann.

5 Synthese schwieriger Sequenzen

5.1 Spezielle Aspekte der Peptidsynthese

Seit der Entwicklung des Konzepts zur Festphasensynthese von Oligonukleotiden und Peptiden vor fast vierzig Jahren durch *Letsinger* und *Merrifield*,^[384,385] ist die Optimierung von Kupplungsreagenzien, Lösungsmitteln und Schutzgruppen so weit fortgeschritten, dass die Synthese kurzer Oligopeptide in guten Ausbeuten und hervorragenden Reinheiten heute keine Herausforderung mehr in der bioorganischen Chemie darstellt (siehe auch Kapitel 3.2). Auch die Synthesen kurzer Peptidsequenzen mit *N*-Alkylresten oder sterisch gehinderten Seitenketten (α - oder β -verzweigt) stellen nur noch geringe Anforderungen an die Optimierung der Verfahren.^[203,204]

Ein vollkommen anderes Phänomen unvollständiger oder gänzlich ausbleibender temporärer Schutzgruppenabspaltungen oder Kupplungen über mehrere Aminosäurereste hinweg beobachtet man im Fall der sogenannten '*difficult sequences*'.^[386-389] Diese sind gekennzeichnet durch:

- sehr starke Sequenzabhängigkeit
- spontanes Schrumpfen des Harzvolumens
- unvollständige oder ausbleibende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe
- unvollständige oder ausbleibende Acylierung des *N*-Terminus

Diese Schwierigkeiten in der Synthese treten frühestens ab der 5. Aminosäure einer Sequenz auf und werden ab der 15. Aminosäure statistisch wieder seltener.^[390]

Ursache dieses Verhaltens ist die Bildung von faltblattartigen Sekundärstrukturen, die entweder durch Rückfaltung der Peptidkette oder durch intermolekulare Wechselwirkung mit benachbarten Peptidketten oder dem polymeren Träger selbst erfolgen können, die unvollständige Solvatisierung des Peptidylharzes zur Folge haben und so den Zugang zu den freien Aminotermini verhindern.

Dieses führt dann weiterhin zu einem stark verminderten Quellvolumen des Peptidylharzes mit schlechter Reagenzpermeabilität. Darüber hinaus ist die Erkennung

einer aggregierenden Sequenz ohne HPLC-Kontrolle schwierig, da die Ninhydrintests, die auf Vollständigkeit der Kupplung detektieren falsch positive Ergebnisse anzeigen. Grosse Anstrengungen sind unternommen worden, die oben beschriebenen synthetischen Probleme im Zusammenhang mit bestimmten Aminosäuresequenzen zu überwinden. Die bisherigen *state-of-the-art* Strategien, die zumindest das Risiko der Aggregation mindern können und routinemäßig angewendet werden sollten, sind im Folgenden zusammengestellt:

- Möglichst geringer Vernetzungsgrad der eingesetzten Polystyrolharze ($\leq 1\%$ Divinylbenzol) und niedrige Beladungsdichte der Harze (≤ 0.25 mmol/g).^[391]
- Einsatz polarer, aprotischer Lösungsmittel wie DMF, NMP oder DMSO (Oxidationsmittel!), auch Zusatz von THF oder DCM.^[392]
- Verwendung neuer Harze mit polaren Baugruppen, wie Polyamidharze oder PEG-funktionalisierte Harze.^[201,393-396]
- Durchführung von Doppelkupplungen.

Von den vielen weiteren beschriebenen Strategien zur Überwindung einzelner schwieriger Sequenzen sind der Einsatz von Boc- statt Fmoc-Strategie, die Kupplung bei höheren Reaktionstemperaturen^[397] und der Zusatz chaotroper Salze wie NaClO₄, LiCl oder KSCN noch am universellsten anwendbar.^[398] Die Verringerung des Anteils der Nebenprodukte ist allerdings häufig nur gering und stellt sich erst nach mehreren Optimierungscyclen ein, die für jede einzelne Fmoc-Abspaltung und folgende Kupplung erneut wiederholt werden müssen, bis die aggregierende Region überwunden ist! Ob dagegen der Einsatz von Ultraschall^[399,400] oder solubilisierender Präsequenzen^[401-403] sich zu allgemein anwendbaren Lösungsstrategien entwickeln werden, bleibt noch abzuwarten.

Über den Einfluss der Seitenkettenschutzgruppen auf das Aggregationsverhalten gibt es ebenso unterschiedliche Befunde wie über die aus empirischen Untersuchungen abgeleiteten Versuche, das Auftreten schwieriger Sequenzen vorherzusagen.^[388,404-407] In jedem Fall bedarf die Synthese schwieriger Sequenzen durch *batch*-Strategie einer umfassenden Optimierung der einzelnen Reaktionsschritte, wobei nicht vorhergesagt

werden kann, ob die Synthese überhaupt erfolgreich durchgeführt werden kann oder ein Strategiewechsel bei der Synthese erforderlich ist. Wegen des großen Aufwands, der mit den erforderlichen Vorabsynthesen und nachfolgendem *upscaling* der Ansätze verbunden ist, sind Strategien entwickelt worden, die schneller zum gewünschten Produkt führen und beim Auftreten einer unüberwindlichen Abspaltungs- oder Kupplungsreaktion innerhalb der Sequenz alternative Routen ermöglichen.

Diese wesentlich elegantere Strategie zur Synthese großer Peptide bis hin zu Proteinen ist die konvergente Peptidsynthese, deren Prinzip in Abbildung 76 dargestellt ist.^[408,409]

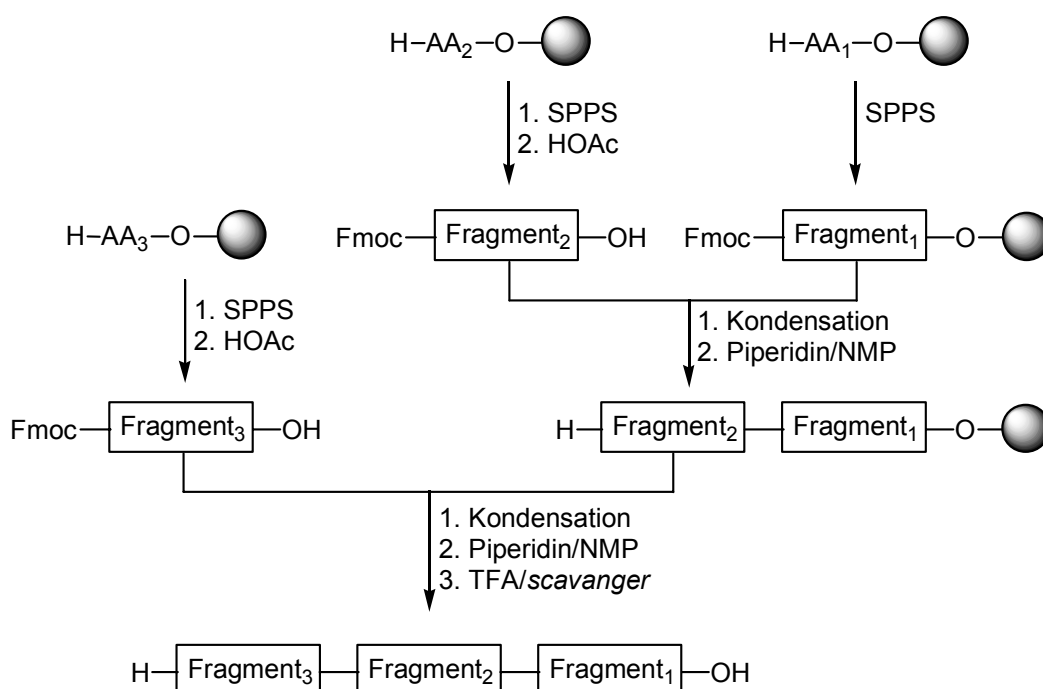


Abbildung 76: Prinzip der konvergenten Peptidsynthese nach Fmoc/tBu-Strategie auf TCP-Harz.^[409]

Die Synthese der geschützten Fragmente kann auch nach Boc-Strategie erfolgen, wobei die Verankerung auf dem polymeren Träger über einen orthogonalen Linker erfolgen muss (z. B. den in letzter Zeit entwickelte Fmoc-Linker).^[410,411] Auch muss die Kondensation der geschützten Fragmente nicht in der gezeigten Reihenfolge geschehen^[412] und auch nicht zwangsläufig an fester Phase, sofern man den C-Terminus orthogonal schützt.^[411,413,414] Die Kombination aus Festphasensynthese

geschützter Fragmente nach Boc-Strategie mit der Phenacylgruppe (Pac) als C-terminaler Schutzgruppe und Kondensation in dem Lösungsmittelsystem TFE, HFIP oder Phenol in CHCl_3 (25%/75%, v/v)^[415,416] hat zur Synthese des mit 238 Aminosäuren bisher größten bekannten synthetischen Proteins GFP (*green fluorescent protein*) durch *Sakakibara et al.* geführt.^[417] Die Übertragung eines analogen Lösungsmittelsystems auf die Kondensation an fester Phase ist ebenfalls beschrieben,^[418] allerdings ist diese Strategie nicht mit dem TCP-Harz kompatibel (Abspaltung!) und die Verwendung stärker säureresistenter Linker ist aufgrund der drastisch verlängerten Abspaltzeiten für die Reaktionskontrolle bei der Syntheseentwicklung unvorteilhaft.

Durch die Synthese der geschützten Peptidfragmente ist deren Reinigung vor der Fragmentkondensation möglich, wodurch die Zahl der Nebenprodukte (hauptsächlich Deletionsmutanten) gering bleibt und entsprechende Trennprobleme bei der finalen HPLC-Reinigung des Zielmoleküls umgangen werden. Die konvergente Synthesestrategie sollte es im Prinzip ermöglichen, einen Abschnitt schwieriger Kupplungen in einer Sequenz zu 'überspringen', indem kurz vor Beginn der unvollständigen Reaktionen ein Fragment gekuppelt wird. Durch den Einfluss der dann vorgelagerten schwierigen Sequenz kann es aber erneut zu unvollständigen Reaktionen in dem eigentlich problemlosen neuen Fragmentbereich kommen, wodurch der Vorteil der Strategie wieder verloren geht.

Die Festlegung der Schnittstellen für die Fragmentkondensation erfolgt nach folgenden Gesichtspunkten, die allerdings selten gleichzeitig realisierbar sind:

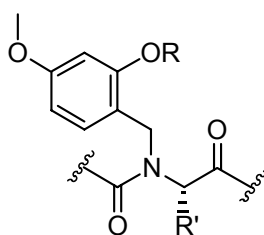
- Fragmente mit weniger als 12 Aminosäuren (Löslichkeit).
- C- und N-terminal möglichst keine sterisch gehinderten Aminosäuren (β -Verzweigung in Val, Ile und Thr) die die ohnehin schon geringe Reaktionsgeschwindigkeit weiter verlangsamen würde.
- N-terminal keine sekundären Amine wie Pro (langsame Acylierung) und kein Glu (Bildung der Pyroglutaminsäure).
- C-terminal möglichst Gly oder Pro (keine Racemisierung), aber keinesfalls His(Trt), Cys(Trt), Phe, Tyr(tBu), Trp(Boc), Asp(OtBu), Asn(Trt) oder

Gln(Trt), da diese während der Aktivierung in Fragmentkupplungen, in der genannten Reihenfolge, sehr stark zur Racemisierung neigen.

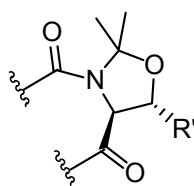
Aufgrund der möglichen beschriebenen Schwierigkeiten in der Festphasensynthese sehr großer Peptide/Proteine sind im letzten Jahrzehnt auch Methoden entwickelt worden, die auf der chemoselektiven Kupplung freier (d.h. ungeschützter) Peptidfragmente in wässrigem Medium beruhen. Eine Beschreibung aller Methoden würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, weshalb hier auf die sehr guten, aktuellen Übersichtsartikel zu diesem Thema verwiesen wird.^[205,419]

5.2 Reversible Schutzgruppen des Rückgrats von Peptiden

Eine Methode, die das ursächliche Problem der oben beschriebenen, schwierigen Sequenzen zu beseitigen versucht, ist die reversible Substitution des Peptidrückgrats, wodurch einerseits die Bildung einer an der Strukturbildung beteiligten Wasserstoffbrücke verhindert wird und außerdem die Bildung einer *cis*-Amidbindung ermöglicht bzw. induziert wird, was die Stabilität der Sekundärstruktur nachhaltig stört.



259: R = H
260: R = Fmoc
R' = Xaa Seitenkette



261: R'' = H
262: R'' = Me

Abbildung 77: Strukturen der Derivate zum reversiblen Schutz des Peptidrückgrats durch 2-Hydroxy-4-methoxybenzylreste (Hmb, **259** und **260**) und von Ser und Thr abgeleitete Pseudoproline (**261**) und (**262**).

Bei den beiden vorgeschlagenen reversiblen Schutzgruppen handelt es sich um die von Sheppard *et al.* eingeführten^[420,421] substituierten *N*-Benzylgruppen (**259**, **260**) und die aus Seitenketten-Rückgrat-Cyclisierung resultierenden Pseudoproline (**261**, **262**) von Mutter *et al.*^[422,423] (Abbildung 77).

5.2.1 Die *N*-2-Hydroxy-4-methoxybenzyl-Schutzgruppe

Die Einführung der Hmb-Schutzgruppe erfolgt entweder als *N,O*-bis- (**260**) oder *N*-mono-Fmoc-*N*-Hmb-Aminosäuren (**259**). Ursprünglich wurde angenommen, dass die stark nukleophile, phenolische Hydroxygruppe der Hmb-Gruppe in **259** während der Kupplung zu Substitutionen am aktivierten *C*-Terminus führen würde (intra- oder intermolekular) und deshalb ebenfalls temporär geschützt werden müsste.^[424] Diese Substitution erfolgt tatsächlich, aber überwiegend unter intramolekularer Cyclisierung, wobei das gebildete Intermediat **264** eine gerade ausreichende Acylierungstendenz gegenüber dem *N*-Terminus von nicht- β -verzweigten Aminosäuren im Peptidylharz **265** zeigt.^[425,426] Nach Fmoc-Abspaltung von **266** erfolgt die Kupplung der folgenden aktivierten Fmoc-Aminosäure erst an die phenolische Hydroxygruppe zu **267** und nach *N,O*-Acytransfer entsteht das Peptidylharz **268** (Abbildung 78).^[427]

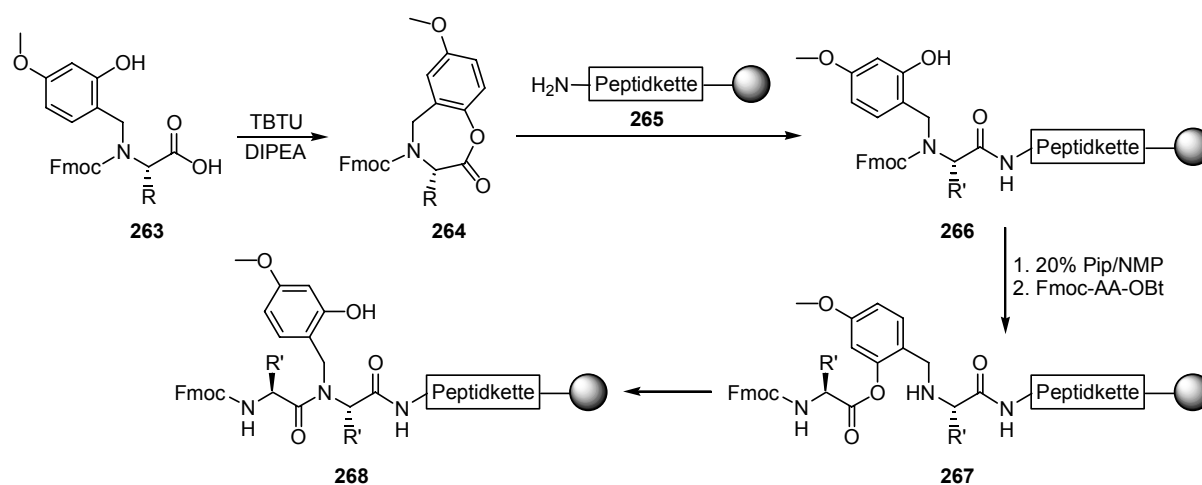


Abbildung 78: Aktivierung und Kupplung von *N*-Fmoc-*N*-Hmb-Aminosäuren **263** zu den *N*-Hmb-geschützten Peptidylharzen **268**.

Die Acylierung der sekundären (*N*-Hmb-)Aminogruppe ist ebenfalls vom sterischen Anspruch der Aminosäureseitenkette abhängig.^[425] Während Kupplungen zwischen sterisch wenig gehinderten Resten wie Gly und Ala (eine der beiden Aminosäuren jeweils als *N*-Hmb-geschützter *N*-Terminus des Peptidylharzes) noch unter Standardbedingungen mittels Aktivierung durch das System TBTU/HOBt/DIPEA zu vollständigem Umsatz gebracht werden können, erfordern vollständige Kupplungen von Fmoc-Val-OH an H-Val(*N*-Hmb)-Peptidylharze den Einsatz von Aminosäurefluoriden und Temperaturen von 60 °C über einen Zeitraum von 12 h für die Kupplungsreaktion! Die Abspaltung der *N*-Hmb-Schutzgruppe erfolgt bei der sauren Abspaltung der Aminosäureseitenkettenschutzgruppen mit 90% TFA, allerdings nur, wenn die Phenolfunktion des Hmb nicht acyliert ist (siehe nachfolgende Betrachtungen zur Strukturinduktion).

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es wenige Untersuchungen, die den strukturellen Einfluss der *N*-Hmb-Schutzgruppe belegen konnten. Ein Vergleich der aggregierenden β -Amyloid₁₋₄₀-Sequenz mit der entsprechenden Penta(*O*-Acetyl-Hmb)^{20,25,29,33,37}-Verbindung (erhalten durch *capping* der Phenolfunktionen mit Ac₂O und anschließende Seitenkettenentschützung mit TFA) zeigte eine Destabilisierung der helikalen Eigenschaften in TFE durch die *N*-Hmb-Modifikation. In wässrigem Medium zeigt die *N*-Hmb-modifizierte Verbindung zwar eine verstärkte Tendenz zur Faltblattbildung aber im Gegensatz zur natürlichen Verbindung keine Aggregation.^[428] Für den strukturellen Einfluss wird ein *long range* Effekt postuliert, sodass eine *N*-Hmb-Modifikation nur alle sechs Aminosäurereste notwendig sein sollte, um die Aggregation wirkungsvoll zu inhibieren. Allerdings sind Ausnahmen von dieser Regel beschrieben worden.^[429]

Abgesehen von diesen Widersprüchlichkeiten haben zahlreiche Beispiele in den letzten Jahren den Nutzen dieses Konzepts in der Synthese schwieriger Sequenzen belegt, wobei die Entwicklung neuer, leichter in die wachsende Peptidkette einbaubarer Benzylderivate die Anwendungsbreite in den nächsten Jahren sicher noch vergrößern werden.^[425-427,429-435]

5.2.2 Die Mutter'schen Pseudoproline

Im Gegensatz zu den im vorigen Kapitel beschriebenen Hmb-Derivaten handelt es sich bei den von *Mutter et al.* entwickelten Pseudoprolinen um Seitenketten-Rückgrat-cyclisierte Derivate von Ser **261** und Thr **262** in Abbildung 77 (auch solche des Cysteins, dessen Derivate hier aber nicht besprochen werden sollen).^[422] Die Pseudoproline werden aufgrund der sehr schlechten Tendenz zur Acylierung in Form der Fmoc-Xaa-Ser/Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-OH Dipeptide in die wachsende Peptidkette eingeführt, was neben der allgemeinen Beschränkung auf Serin und Threonin einen der Hauptnachteile dieser Methode bedingt, da in einer separaten Synthese immer erst der entsprechende Baustein von 40 theoretisch möglichen hergestellt werden muss.^[423] Entsprechend den Betrachtungen zur konvergenten Peptidsynthese verläuft die Kupplung der Pseudoprolindipeptide an das Peptidylharz erwartungsgemäß ohne Racemisierung und mittels der im Kapitel 3.2 beschriebenen Kupplungsreagenzien quantitativ. Die Spaltung der Pseudoprolinschutzgruppe erfolgt unter den Bedingungen für die Seitenkettenentschützung des Zielpeptids mit 90 % TFA innerhalb einer Stunde. Neben dem *tuning* der Säurelabilität hat die symmetrische Substitution mit den beiden Methylgruppen in Pseudoprolinen (**261**, **262**) den Vorteil, dass die Verbindungen achiral sind (im Gegensatz zu den Thiazolidin-Derivaten aus Cystein und substituierten Benzaldehyden). Die im Hinblick auf die Sekundärstruktur wichtigste Eigenschaft ist allerdings, dass in diesen Dipeptiden die Amidbindung zwischen Pseudoprolin und *N*-terminal nachfolgender Aminosäure zu 100 % in die *cis*-Konfiguration gezwungen wird, wie durch NMR-spektroskopische Untersuchungen an Modellpeptiden belegt werden konnte.^[436]

Der Einfluss auf die Inhibition der Aggregation sollte wie im Fall der *N*-Hmb-Derivate mindestens über einen Abstand von sechs Aminosäuren reichen und wurde von *Mutter et al.* für einige schwierige Sequenzen demonstriert. Dabei ist besonders der Einfluss der Modifikation auf die Löslichkeit der vollständig geschützten Fragmente bemerkenswert.^[381] In einem unabhängigen Vergleich von *Ede et al.* haben sich die Pseudoproline gegenüber der *N*-Hmb-Schutzgruppe in der Synthese einiger

schwieriger Sequenzen in Bezug auf die Reinheit der synthetisierten Peptide als überlegen erwiesen.^[433]

5.3 Funktion und Struktur des transmembranen Proteins *E. coli* multidrug resistance E (EmrE)

Die Fortschritte in der Behandlung zahlreicher Krankheiten durch neu entwickelte Wirkstoffe hat viele Wissenschaftler zu dem vorschnellen Schluss verleitet, der Sieg über viele Krankheiten sei nur eine Frage der Zeit. So wurden die bakteriellen Erkrankungen seit der Entdeckung und Weiterentwicklung der Antibiotika als besiegt dargestellt.^[437] Ein erst später erkanntes Problem war die Entwicklung von Resistenzen, die Bakterien unempfindlich gegen bestimmte Antibiotika macht. Ein ähnliches Phänomen wurde später auch bei der Behandlung von Tumoren mittels Cytostatika beobachtet. Allgemein kommen für die Realisierung dieser Resistenzen mehrere Mechanismen in Betracht, von denen die ersten beiden relativ stoffspezifisch sind, die letzten beiden Mehrfachresistenzen vermitteln können, wie sie auch in der Tumorthherapie beobachtet werden:

- Expression von Enzymen, die toxische Substanzen abbauen
- Veränderung der Angriffspunkte der antibiotischen Verbindungen, bzw. Realisierung alternativer Stoffwechselwege
- Veränderung der Zellwand (Durchlässigkeit)
- aktiver Transport aus der Zelle

Für den letzten Punkt zeigen sich integrale Transmembranproteine verantwortlich, die durch aktiven Transport (Protonengradient, ATP-Hydrolyse) verschiedene Moleküle aus der Zelle entfernen können.

Ein für den Menschen besonders wichtiges *multidrug*-Transportprotein ist der *multidrug resistance transporter 1* (MDR1, P-Glycoprotein) und das assoziierte Protein MRP (ABC-Typ,^[438] von dem gemeinsamen Motiv: *ATP binding cassette*),^[439] da während der Chemotherapie durch Selektion der MDR1-überexprimierenden

Tumorzellen eine vollständige Resistenz gegen das Pharmakon entstehen kann.^[15,440,441] Eine entsprechende Gruppe von *multidrug resistance* Proteinen ist auch aus Bakterien und Pilzen bekannt und umfasst die *TEXANs*, die aus 400-500 Aminosäuren bestehen und Antibiotikaresistenzen vermitteln.^[16,442,443] Der Transport der Substanzen aus der Zelle wird durch einen Protonengradienten angetrieben. Gleiches gilt für eine Untergruppe, den MiniTEXANs, die durch elektroneutralen Antiport positiv geladene cytotoxische Verbindungen wie Ethidium, Tetracyclin und Reserpin aus der Zelle entfernt.^[444] Dazu gehört das *E. coli multidrug resistance E* Protein (EmrE), das aus 110 Aminosäuren aufgebaut ist und Resistenz gegenüber zahlreichen positiv geladenen cytotoxischen Verbindungen in *E. coli* vermittelt.^[17]

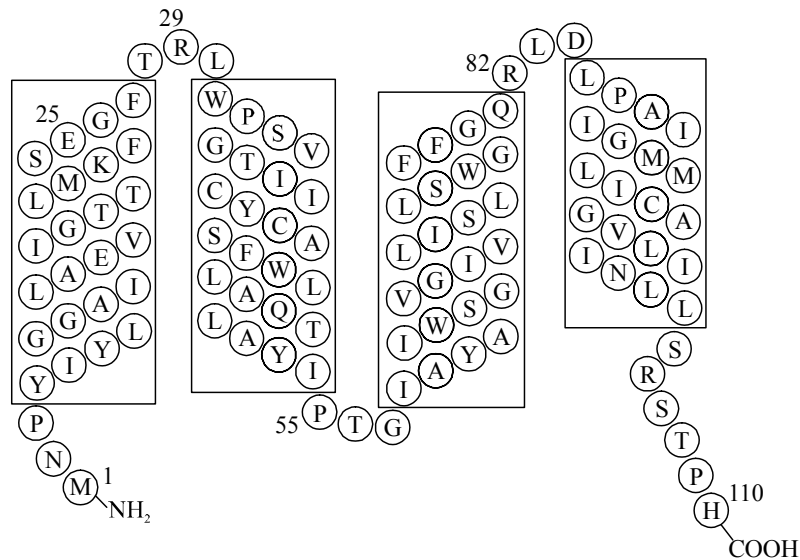


Abbildung 79: Postulierte Sekundärstruktur von EmrE. Unterschiede zwischen theoretischer Vorhersage und experimentellen Daten bestehen hinsichtlich der Länge der transmembranen Domäne1. Während das Hydrophathie-Profil den Bereich EmrE₄₋₂₁ als helikalen Abschnitt nahelegte, wurden in NMR-Untersuchungen in MeOH/TFE Hinweise auf eine helikale Struktur im Bereich von EmrE₄₋₂₇ gefunden.

Bemerkenswert ist die Löslichkeit des Proteins in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform/Methanol, was zur Isolierung des Proteins ausgenutzt wird. Darüber hinaus bleibt nach Rekonstitution des Proteins in Proteoliposomen die volle Aktivität erhalten.

Eine erste Analyse der Aminosäureseitenketten legte nahe, dass das Protein aus vier transmembranen Helices besteht (Xaa 4-21, 35-52, 58-79 und 85-106) der Sequenz gebildet werden und durch kurze *loop*-Regionen miteinander verbunden sind.^[17] FTIR-Messungen in CHCl₃/MeOH bzw. Dimyristoylphosphocholin ergaben für EmrE eine Helikalität von 78% bzw. 80%.^[445]

Eine Sekundärstrukturanalyse der NMR-Daten von EmrE in CHCl₃/MeOH/H₂O bestätigte zwar den helikalen Charakter des Proteins in Lösung, allerdings sind einige signifikante Unterschiede zur theoretisch vorhergesagten Struktur zu beobachten.^[18] So scheint die *N*-terminale Transmembrandomäne von Tyr⁴ bis Gly²⁶ zu reichen, wobei der Bereich von Lys²² bis Gly²⁶ amphiphilen Charakter hat und es aufgrund der geladenen Seitenketten unwahrscheinlich ist, dass dieser Teil der Helix innerhalb der Membran liegt. Stattdessen ist in der Lösungsstruktur zwischen den Aminosäuren Leu¹² und Glu¹⁴ ein NOE-Kontakt zu beobachten, der auf einen Knick in der Helix hindeutet. Dieser Knick könnte erklären, warum in FTIR-Messungen des Proteins ein gemittelter Helix-Neigungswinkel von 27° gegen die Membran beobachtet wurde.^[445] Um genauere Informationen bezüglich der Struktur der einzelnen Helices zu erhalten wurden eine der transmembranen Domänen EmrE₁₋₂₅ bereits von *M. Bürgle* synthetisiert und deren Helikalität mittels NMR-Spektroskopie (84% in CHCl₃/MeOH, 1:1) und CD-Messungen (72% in TFE, 45% in TFE/MeOH, 1:1) bestimmt.^[14] Von der strukturell interessanten Helix 1 wurde allerdings, basierend auf der ersten Strukturvorhersage nur der Abschnitt EmrE₁₋₂₅ synthetisiert, während für strukturelle Untersuchungen der gesamte Bereich von 1 bis 29 interessant wäre.

5.4 Synthese der Transmembrandomäne EmrE₁₋₂₉

5.4.1 Vorarbeiten

Aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung (hauptsächlich Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Tyr, Phe) gehören fast alle Transmembrandomänen zur Gruppe der schwierigen Sequenzen mit den bereits beschriebenen Auswirkungen auf die Festphasensynthese.

Dementsprechend gelang *M. Bürgle* die Synthese der transmembranen Domäne EmrE₁₋₂₅ (**274**) erst durch Anwendung der in Kapitel 5.1 beschriebenen Regeln für die Synthese hydrophober Sequenzen und konvergente Festphasenpeptidsynthese nach der in Abbildung 80 gezeigten Strategie.

Die Aggregationspotentiale für den Bereich EmrE₄₋₂₁ (auch die der einzelnen Fragmente und Zwischenprodukte) liegen ausnahmslos im kritischen Bereich, was sich bereits in der schlechten Reproduzierbarkeit der Fragmentkupplungen und der hohen Tendenz zur Gelbildung der Fragmentlösungen von **270** zeigt.^[14,446]

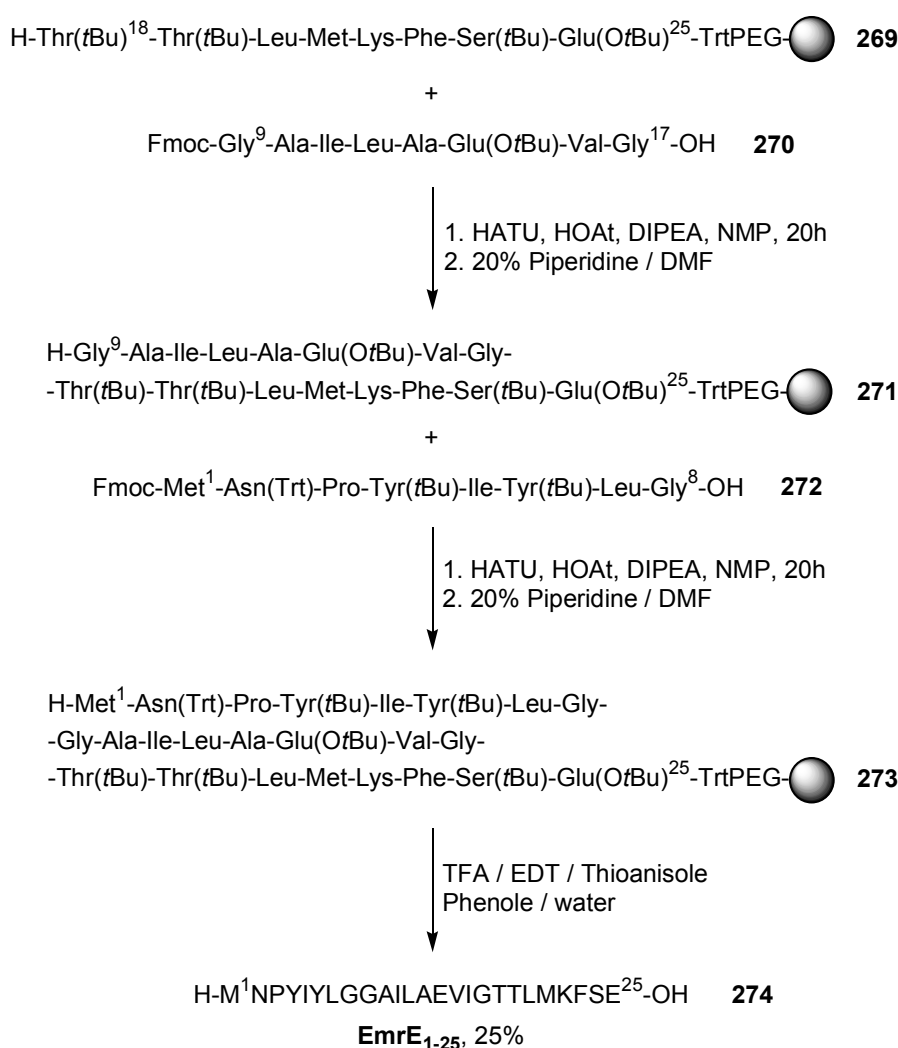


Abbildung 80: Festphasensynthese der transmembranen Domäne H-EmrE₁₋₂₅-OH (**274**) durch [9+(9+8)]-Fragmentkondensation an TentaGel Trt S Polystyrolharz durch *M. Bürgle*.

5.4.2 Fragmentkondensationen unmodifizierter, seitenkettengeschützter Peptide

In Analogie zur Synthesestrategie für H-EmrE₁₋₂₅-OH (**274**) durch *M. Bürgle* ergibt sich für eine potentiell erfolgversprechende Strategie für die Synthese von H-EmrE₁₋₂₉-NH₂ (**275**) das folgende, in Abbildung 81 dargestellte retrosynthetische Schema.

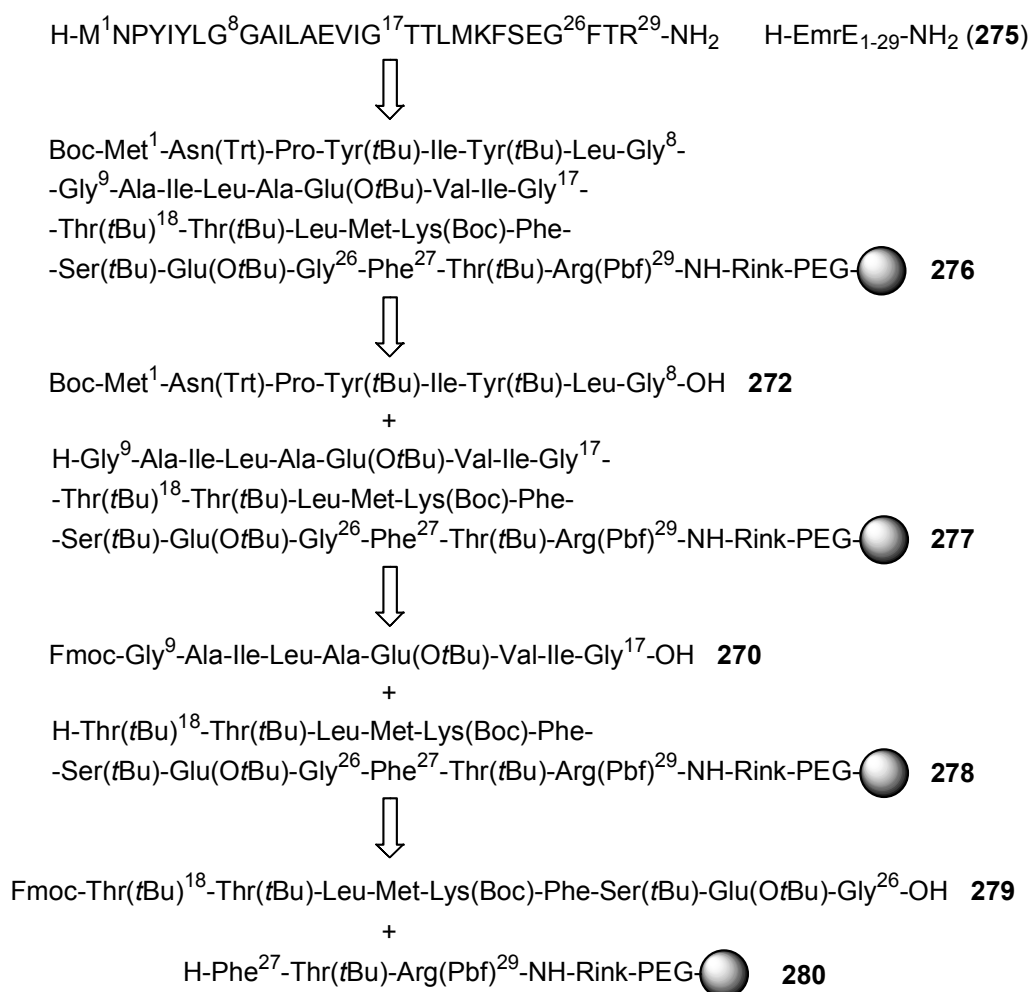


Abbildung 81: Retrosynthetische Analyse der Transmembrandomäne H-EmrE₁₋₂₉-NH₂.

Bei dem Versuch, die Synthesestrategie für die Domäne H-EmrE₁₋₂₅-OH (**274**) auf die Synthese des C-terminal verlängerten H-EmrE₁₋₂₉-NH₂ (**275**) zu übertragen, traten eine

Fülle unvollständiger Fmoc-Abspaltungen und Kupplungen auf, von denen die wichtigsten im Folgenden dargestellt werden:

- Sehr schlechte Löslichkeit und starke Tendenz zur Aggregation von Fmoc-Emr_{E18-26}-OH (**279**). Die Acylierung des Peptidylharzes **280** (erst TrtTG-PS wegen der kürzeren Abspaltzeiten und damit besseren Möglichkeit zur Verfolgung der Reaktion) mittels HATU/HOAt/Collidin gelingt zwar auch im Gel/Harz-Gemisch (**279/280**) quantitativ, allerdings nimmt die Abtrennung des resultierenden Peptidylharzes Fmoc-Emr_{E18-29}-TrtTG-PS (Fmoc-**278**) vom Fragment **279** wiederholtes Waschen mit verschiedenen Lösungsmitteln wie NMP, DMF und DMSO mehrere Tage in Anspruch!
- Gleiches gilt für die Kupplung von Fmoc-Emr_{E9-17}-OH **270** an das Peptidylharz **278**, wobei die Kupplungseffizienz nur noch ca. 20% beträgt und die anschließende Abspaltung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe von Fmoc-Emr_{E9-29}-TrtTG-PS (Fmoc-**277**) zu **277** nicht mehr möglich ist! Fmoc-**270** bildet im Gegensatz zu Fmoc-**279** auch kein Gel mehr, sondern eine hochviskose Suspension.
- Die Fmoc-Abspaltung von Fmoc-Emr_{E9-17}-TCP und -TentaGel Trt S gelingt ebenfalls nicht (nach der Synthese des Fragmentes **270** auf TCP-Harz beginnt **270** bereits in der Abspalllösung zu aggregieren)!
- Der Versuch der *batch*-Synthese von H-Emr_{E18-29}-SieberPS (**278**-Sieber) offenbart unvollständige Acylierungen beginnend mit Met²¹, die mit einem stark eingeschränkten Quellvolumen des Peptidylharzes einhergehen.

Scheinbar führt die Verlängerung der Sequenz Emr_{E1-25} um vier C-terminale Aminosäuren zum Auftreten von zwei, voneinander getrennten, schwierigen Sequenzen im Bereich Gly⁹ und Thr¹⁸, die auch durch konvergente Synthesestrategie nicht überwunden werden können.

Um die Synthese der transmembranen Domäne **275** dennoch zu realisieren, wurde die Synthese dahingehend abgeändert, dass erst die einzelnen schwierigen Sequenzen mittels reversibler Schützung des Peptid-Rückgrats überwunden werden sollten und

anschließend eine Kondensation der beiden geschützten Fragmente Boc-EmrE₁₋₁₇-OH und H-EmrE₁₈₋₂₉-NH₂ in Lösung unter *Sakakibara*-Bedingungen angestrebt wurde.

5.4.3 Synthese von *N*-Hmb- und Pseudoprolinderivaten zur reversiblen Schützung des Peptid-Rückgrates

Als Positionen für einen möglichen Einsatz von *N*-Hmb-Derivaten kommen nach den Betrachtungen in Kapitel 5.2.1 nur solche Positionen in Frage die an den entsprechenden Positionen sterisch wenig gehinderte Aminosäuren wie Gly oder Ala aufweisen, um eine hohe Kupplungseffizienz zu gewährleisten. Die Synthese der Fmoc-geschützten Derivate gelang nach der in Abbildung 82 dargestellten Methode, allerdings in deutlich schlechteren Ausbeuten als von den Autoren beschrieben, wobei nach der Fällung in **282** und **284** verbliebenes Wasser der Grund für die schlechten Reaktivitäten im letzten Reaktionsschritt zu sein scheint.

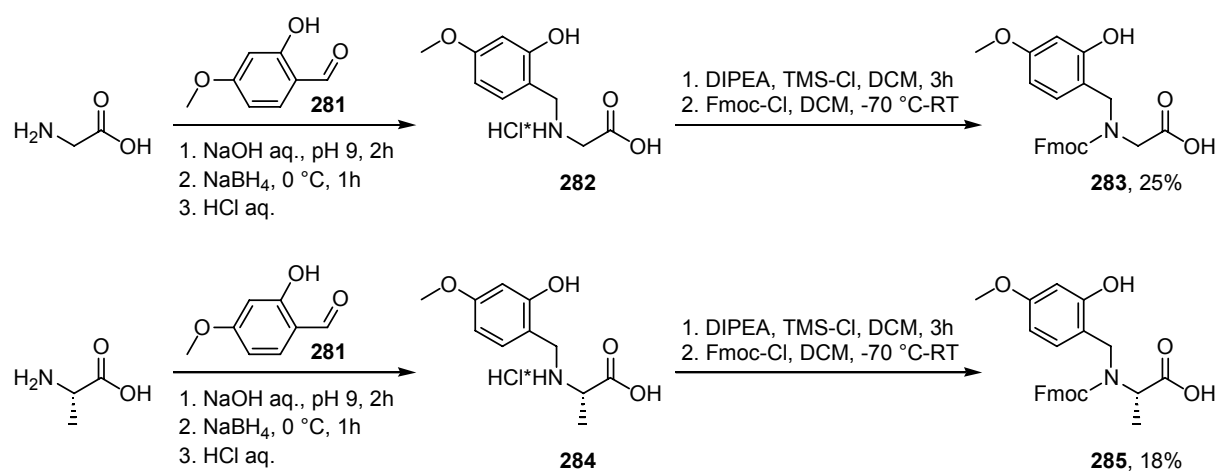


Abbildung 82: Synthese der *N*-Hmb-geschützten Fmoc-Derivate von Gly (**283**) und Ala (**285**) durch reduktive Aminierung nach Nicolas et al.^[426]

Als Positionen für die Einführung der Pseudoproline bieten sich in der Sequenz die zwei Positionen Thr¹⁹ und Ser²⁴ an, wobei erstere aufgrund der an dieser Stelle bereits bestehenden Kupplungsschwierigkeiten nicht optimal erschien. Die Synthese von Fmoc-Phe-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (**288**) gelang wie in Abbildung 83 dargestellt.

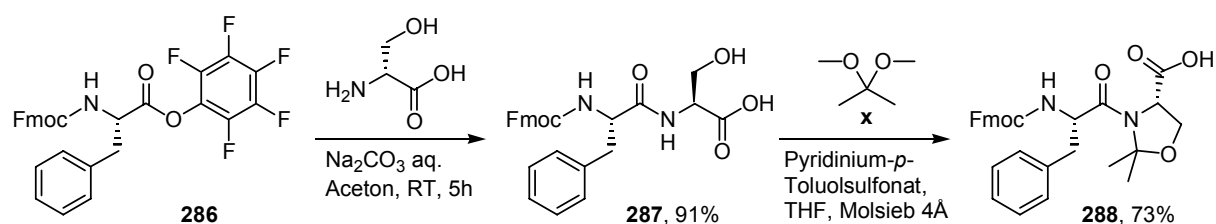


Abbildung 83: Synthese von Fmoc-Phe-Ser($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH (**288**) nach Mutter.^[381]

Die Synthese des entsprechenden Dipeptids Fmoc-Thr(*t*Bu)-Thr-OH gelang ebenfalls nach der beschriebenen Methode, allerdings erfolgte die Cyclisierung zum entsprechenden Pseudoprolin nicht, was wahrscheinlich auf sterische Wechselwirkungen zwischen den beiden β -Methylgruppen zurückzuführen ist.

5.4.4 Synthese backbone-geschützter Peptide

5.4.4.1 Pseudoprolin

Der Einbau des Fmoc-Phe-Ser($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH (**288**) an der entsprechenden Stelle gelang auf Sieber-Amidharz quantitativ mittels Einfachkupplung innerhalb von zwei Stunden (siehe Kapitel 3.2). Im weiteren Verlauf der Synthese traten im Gegensatz zum unmodifizierten Peptidylharz keine weiteren Kupplungsschwierigkeiten auf. Nach Elution vom Harz mittels 1% TFA in DCM und RP-HPLC-Reinigung wurde das seitenketten- und rückgratgeschützte Fragment H-EmrE₁₈₋₂₉-NH₂ (**293**, Abbildung 85) in 32% Ausbeute erhalten.

5.4.4.2 N-Hmb-Derivate

Ogleich in der Literatur zur Verhinderung von Racemisierungen in Fragmentkondensation beschrieben,^[447] ist der Einsatz von C-terminalen Gly(*N*-Hmb)-

Derivaten nicht möglich, da diese bei der Fmoc-Abspaltung der zweiten Aminosäure der Sequenz, trotz der sterischen Hinderung durch den Trityllinker, unter Abspaltung vom polymeren Träger cyclisierten. Darüber hinaus ist auch fraglich, ob im vorliegenden Fall der strukturelle Langreichweiteneffekt der *N*-Hmb-Schutzgruppe groß genug wäre, um die Schwierigkeiten bei der Fmoc-Entschützung und der anschließenden Kupplung an Gly⁹ zu beseitigen.

Die Synthese des *N*-Hmb-geschützten Peptidylharzes **291** gelang nach der in Abbildung 84 dargestellten Methode.

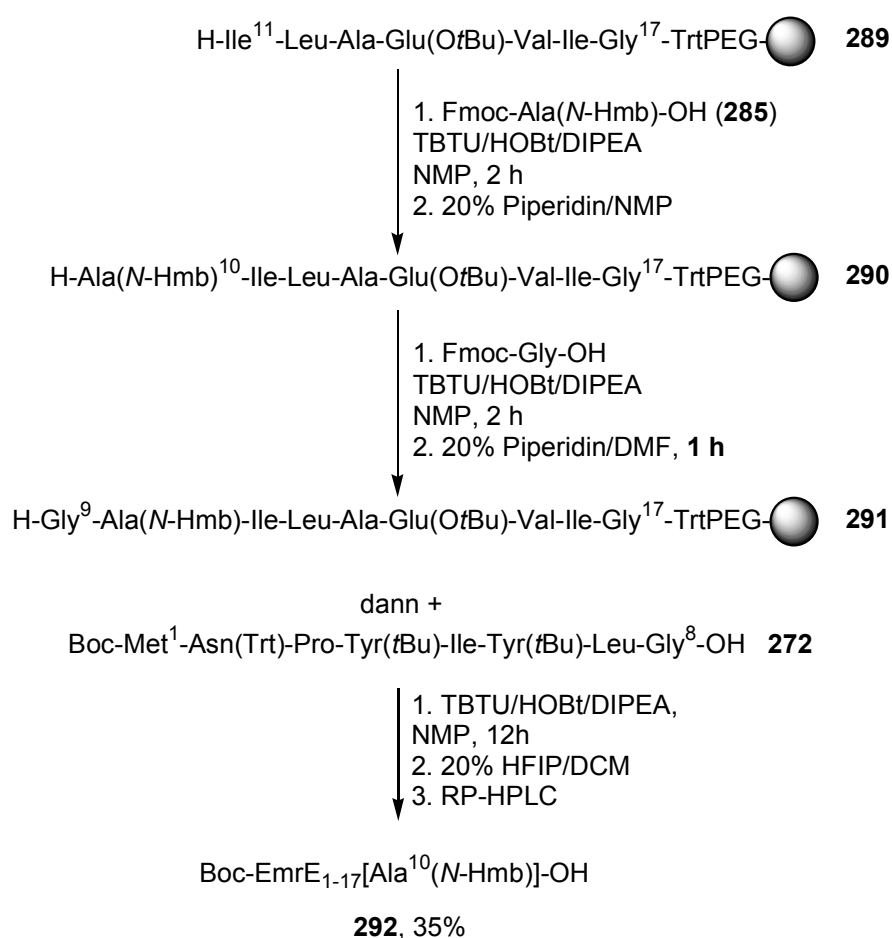


Abbildung 84: Synthese des seitenketten- und Ala¹⁰(*N*-Hmb)-geschützten Peptidfragments Boc-EmrE₁₋₁₇-OH (**292**).

Die Einführung des Fmoc-Ala(*N*-Hmb)-OH (**285**) und nachfolgende Fmoc-Abspaltung zu **290** erfolgte unter Standardbedingungen im TBTU-System (siehe Kapitel 3.2) quantitativ. Bei der Kupplung des folgenden Fmoc-Gly-OH wurde neben der Bildung

des Produktes auch eine weitere Acylierung an der phenolischen Hydroxylgruppe beobachtet (bei Kupplung im HATU/HOAt/Collidin-System trat diese Nebenreaktion nicht auf, allerdings war die Acylierung am terminalen Amin unvollständig!). Der resultierende Phenolester konnte durch verlängerte Behandlung mit 20% Piperidin in DMF innerhalb einer Stunde gespalten werden. In der nachfolgenden Fragmentkupplung von **291** mit **272** zu **292** wurde eine entsprechende doppelte Acylierung durch das geschützte Fragment **272** nicht beobachtet, allerdings wurde in der RP-HPLC-Analyse nach dem *upscaling* eine unvollständige Spaltung des H-Gly-Phenolesters der Ala¹⁰-N-Hmb-Schutzgruppe beobachtet. Dieses Nebenprodukt konnte allerdings in der präparativen RP-HPLC aufgrund ausreichender Retentionszeitunterschiede problemlos entfernt werden.

Die Fragmentkondensation zwischen dem seitenketten- und Ala(N-Hmb)¹⁰-geschützten Boc-EmrE₁₋₁₇-OH (**292**) und dem gleichfalls seitenketten- und Ser²⁴(Ψ^{Me,Me}pro)-geschützten (**288**) Fragment H-EmrE₁₈₋₂₉-NH₂ (**293**) unter *Sakakibara*-Bedingungen verläuft quantitativ, nach TFA-Entschützung der Seitenketten (das geschützte Produkt ist weder in ESI noch MALDI-TOF detektierbar!) konnte aber nur das doppelt oxidierten Produkt **294** identifiziert werden (siehe Abbildung 85)!

Auch der Versuch, die Oxidation durch Verwendung von Thiol-*scavangern* oder Argon-Atmosphäre während der Abspaltung zu unterdrücken schlugen fehl.

Die naheliegendste Methode, doch noch zum Zielmolekül zu gelangen, schien die Reduktion der Methionin-Sulfoxidgruppen mittels des von *Houghten et al.* eingeführten *N*-Methylmercaptoacetamids **295** zu sein.^[448] Dieses Reduktionsmittel hat in Modelluntersuchungen die größte Reaktivität gezeigt und ist gleichzeitig ein gutes Lösungsmittel für Peptide. Die entsprechende Reduktion lieferte innerhalb von vier Tagen in H₂O/MMA/HOAc (10:8:1) bei 40 °C laut MS das vollständig regenerierte Produkt **275**.

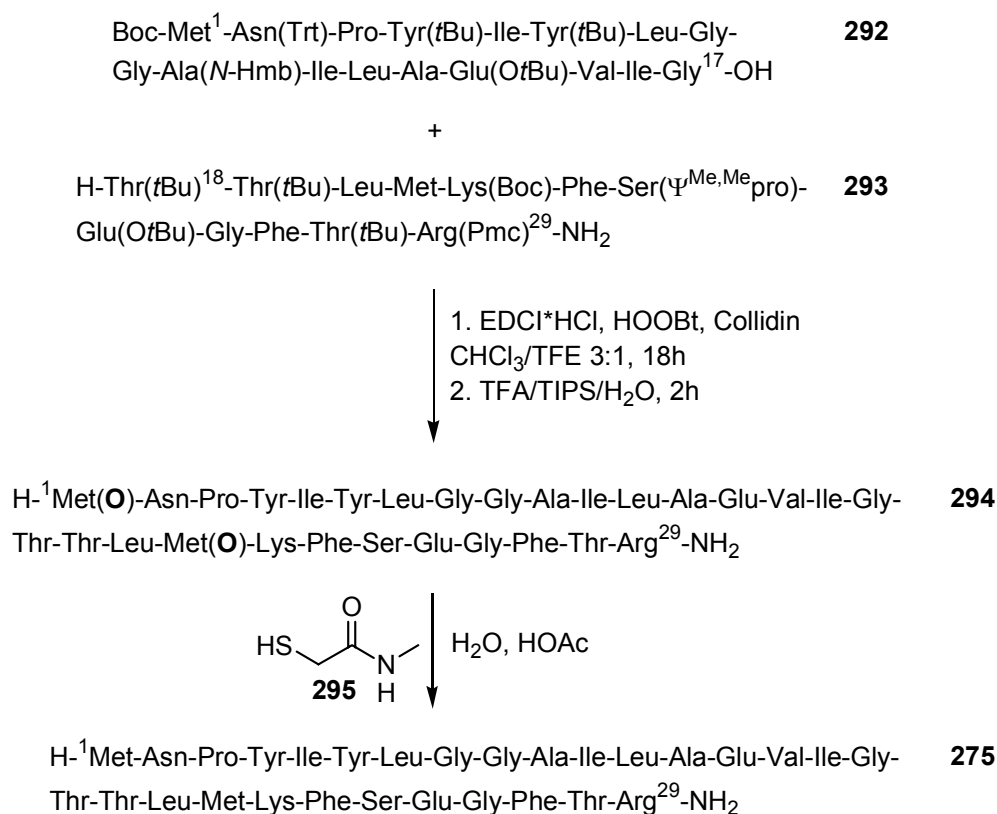


Abbildung 85: Synthese der Transmembrandomäne *H-EmrE*₁₋₂₉-NH₂ **275** durch Fragmentkondensation von **292** und **293** im Sakakibara-System.

Die Entfernung des öligen Reduktionsmittels stellte allerdings ein gravierendes Problem dar, da es sich weder im Hochvakuum entfernen, noch sich die Zielverbindung nach RP-SPE oder RP-HPLC in nennenswerten Mengen isolieren ließ. Eine Untersuchung der Löslichkeit des Rohproduktes (Lösung in MMA) in wässrigen Systemen aber auch mit zahlreichen organischen Lösungsmitteln und Mischungen daraus verliefen ohne Erfolg. Der amphiphile Charakter der Zielverbindung **275** erfordert offensichtlich eine umfangreiche Optimierung der Lösungs- und Laufmittelsysteme für eine Reinigung mittels chromatographischer Methoden, wobei die gängigen Lösungsmittel für schwer lösliche Peptide für diesen Zweck nicht geeignet sind.

6 Zusammenfassung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Projekte beschäftigen sich mit der Synthese, Optimierung und Leitstruktursuche neuer biologisch-medizinisch bedeutsamer, peptidischer Verbindungen, die ihren Wirkungsort an bzw. in der Zellmembran haben.

Eines der verfolgten Ziele ist die wirkungsvolle Inhibition der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen der Serinprotease urokinaseartiger Plasminogen Aktivator uPA mit ihrem Zelloberflächenrezeptor uPAR (CD87). Durch systematische Substitutionen und stereochemische Inversionen der Seitenketten in der von *M. Bürgle* entwickelten, von der uPA-Rezeptorbindungsdomäne ATF abgeleiteten Leitstruktur *cyclo*[21,29][Cys^{21,29}]-uPA₂₁₋₃₀ (**5**) und nachfolgende Untersuchungen der uPAR-Bindungsaffinität konnten einerseits Einblicke in die Anforderungen an einen hochaffinen uPAR-Antagonisten gewonnen werden und darüber hinaus eine Bibliothek von Verbindung synthetisiert werden, die als Startpunkt für weitere Optimierungen der biologischen Aktivität und enzymatischer Stabilität dienen können. Besondere Bedeutung kommt dabei der Tatsache zu, dass es gelungen ist, den mit einem IC₅₀ von etwa 30 nM aktivsten Liganden *cyclo*[21,29][D-Cys²¹Cys²⁹]-uPA₂₁₋₃₀ (**16**) durch Anwendung mehrdimensionaler NMR-Techniken und moleküldynamischer Rechnungen durch *V. Truffault* und *C. Rölz* einer strukturellen Charakterisierung zugänglich zu machen. Die detaillierte Untersuchung der Bedeutung der C- und N-Termini in **16** durch chemische Modifikationen und Deletionen eröffnet darüber hinaus einen effizienten Syntheseweg zu weiteren Modifikationen mittels spektroskopisch oder immunologisch detektierbaren Verbindungen durch die automatisierte Festphasenpeptidsynthese.

In Untersuchungen bezüglich proteolytischer Stabilität zeigte die Leitstruktur **16** eine beachtliche Resistenz gegenüber dem Abbau durch zahlreiche Proteasen wie Plasmin und uPA, was für einen Einsatz der Verbindung in biologischen Systemen von großer Bedeutung ist. Erste *in vivo* Untersuchungen belegen den zu erwartenden inhibitorischen Effekt auf die an Tumorwachstum und -ausbreitung beteiligte Angiogenese.

Um die für ein rationales *design* von Wirkstoffen wichtige Rigidisierung und Verkleinerung der mit zehn Aminosäuren noch recht großen Verbindung **16** zu beschleunigen, wurde eine Methode zur kombinatorischen Erzeugung von Ringgrößenbibliotheken mittels Ringschlussmetathese (RCM) an fester Phase entwickelt. Durch eingehende Analyse der an der Rezeptorbindung beteiligten Aminosäureseitenketten konnten mehrere potentiell für eine RCM-Reaktion geeignete Positionen in **16** identifiziert werden. Die bereits in kleineren peptidischen Verbindungen bekannte Reaktion erweist sich im untersuchten uPA₂₁₋₃₀-Epitop mit terminal olefinischen Seitenketten in fast allen Fällen trotz der Kompatibilität mit allen funktionelle Gruppen der Verbindungen als nicht durchführbar. Diese Beobachtung ist unabhängig von der gewählten Ringgröße, der Seitenkettenlänge, stereochemischen Orientierung und Position der Verknüpfungsposition.

Erst durch die Einführung des *Mutter*'schen Pseudoprolins als reversible Schutzgruppe des Peptidrückgrates und dadurch erhöhte Flexibilität bzw. Vororientierung der Peptidkette erfolgt die RCM-Reaktion mit nahezu quantitativen Umsätzen, so dass ein Einsatz in der kombinatorischen Synthese erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abbildung 86).

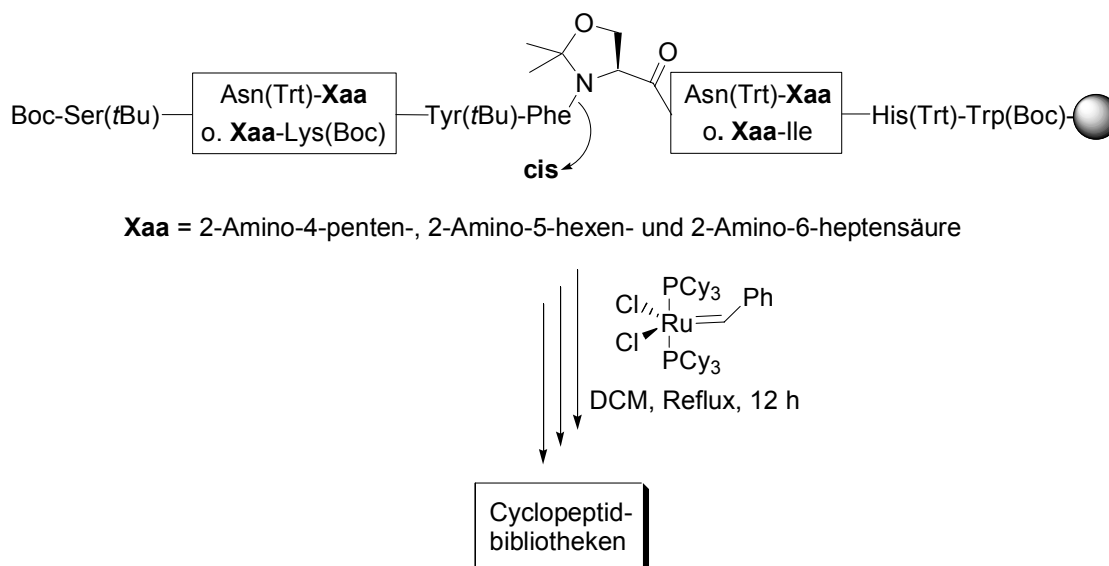


Abbildung 86: Die reversible Modifikation des Peptidrückgrates in Peptidylharzen mit terminal olefinischen Seitenketten ermöglicht RCM-Reaktionen zu Cyclopeptiden verschiedener Ringgrößen.

Durch die nachfolgend erforderliche Optimierung bzw. Entwicklung von Protokollen für die Reinigung, Reduktion der resultierenden Doppelbindung, Seitenkettenentschützung, und Isolierung der Produkte konnte schließlich die kombinatorische Synthese einer jeweils vier Verbindungen enthaltenden Ringgrößenbibliothek **223-226** und **239-242** in acht parallelen Ansätzen mit Cyclohexanringen von 19-27 Atomen verwirklicht werden.

In einem zweiten, unabhängigen Projekt wurde eine Synthesestrategie für eine transmembrane Domäne des *multidrug resistance* Proteins EmrE entwickelt. Dieses zur Familie der MiniTEXANs gehörende Transmembranprotein vermittelt Resistenz gegen mehrere, positiv geladene cytotoxische Verbindungen in *E. coli* durch elektroneutralen Antiport gegen einen Protonengradienten und scheint aufgrund seiner geringen Größe geeignet zu sein, um die strukturellen Grundlagen des Transportmechanismus untersuchen zu können.

Die Synthese einzelner transmembraner Domänen bereitete auch im vorliegenden Fall der Sequenz H-EmrE₁₋₂₉-NH₂ (**275**) aufgrund der hydrophoben Eigenschaften große Schwierigkeiten während der konventionellen Festphasensynthese. Die aus dem Auftreten zweier, voneinander getrennter Bereiche aggregierender Teilsequenzen resultierenden, sehr geringen Umsätze während Entschützung und Kupplungen an fester Phase konnten erst durch die Kombination mehrerer *state-of-the-art*-Methoden gesteigert werden. So gelang die Synthese des Teilfragmentes Boc-EmrE₁₋₁₇-OH (**292**) erst durch reversiblen Schutz des Peptidrückgrates durch *Sheppard's* N-Hmb-Gruppe und Fragmentkondensation an fester Phase und im Fall des Fragmentes H-EmrE₁₈₋₂₉-NH₂ (**293**) durch Einführung der *Mutter's*chen Pseudoproline und *batch*-Synthese an fester Phase. Die anschließende geschützte Abspaltung vom Harz, Kondensation unter *Sakakibara*-Bedingungen, Abspaltung der Schutzgruppen und Reduktion der Methionin-Seitenketten ermöglichte die Synthese des Zielmoleküls, allerdings nur in Mengen, die eine Analytik mittels Massenspektroskopie ermöglichten. Die Reinigung mittels herkömmlicher chromatographischer Methoden erwies sich aufgrund schlechter Löslichkeitseigenschaften als nicht effektiv und so bleibt die Isolierung der amphiphilen Domäne H-EmrE₁₋₂₉-NH₂ (**275**) vorerst ein ungelöstes Problem.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und falls erforderlich nach den gängigen Methoden absolutiert oder absolut von kommerziellen Anbietern bezogen.

Die für die Festphasensynthese verwendeten Harze wurden von *PepChem* (Tritylchlorid-Polystyrol-Harz), *Rapp Polymere* (Rink-Amid-, PHB-, Trityl- und Tritylthiol-TentaGel) und *NovaBiochem* (Sieber-Amid-PEG, Sieber-Amid- und Wang-Polystyrol-Harz) bezogen. Die verwendeten Aminosäurederivate stammen, soweit nicht selbst hergestellt, von den Firmen *NovaBiochem*, *Alexis*, *Merck*, *Bachem*, *Neosystem*, *Aldrich*, *Advanced Chemtech*, *Synthetech* und *MultiSynTech*. Reverse Phase Säulchen (500 mg, XL, C18-EC) wurden von der Firma Separtis erworben. Alle anderen eingesetzten Reagenzien stammen von den Firmen *Aldrich*, *Fluka*, *PerSeptive* und *Merck*.

Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrollen wurden auf Fertigplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F₂₅₆) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption bei 254 nm, durch Eintauchen in 5%ige Ninhydrinlösung in Ethanol oder Phosphormolybdänsäure und Cer(IV)sulfat in Schwefelsäure/Wasser und anschließender Wärmebehandlung.

Säulenchromatographische Trennungen wurden an Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm, *Merck*) bei 1-1.6 bar Druck durchgeführt.

RP-HPLC-Analytik und Präparationen wurden an Geräten der Firmen *Beckmann System Gold*, Hockdruckpumpen 110B, Controller 420, bzw. *Amersham Pharmacia Äckta Basic 10F* und *100F* durchgeführt.

Die eingesetzten Säulen der Firma *YMC* enthielten die Materialien ODS-A (C-18, 5 µm bei 250 x 4.6 mm und 10 µm bei 250 x 20 mm bzw. 250 x 30 mm). Als Eluenten kamen verschiedene lineare Gradienten aus Acetonitril (B) und Wasser (A), bzw. Isopropanol (B) und Acetonitril (A), jeweils mit 0.1 % TFA Zusatz zum Einsatz.

Präparationen wurden bei Flüssen von 6-8 mL durchgeführt. Analytische Retentionszeiten wurden bei einem Fluss von 1 mL/min. ermittelt.

ESI-Massenspektren sowie HPLC-MS-Analysen wurden auf einem Gerät der Firma *Finnigan*, LCQ-ESI Spektrometer (HPLC-System *Hewlett Packard* HP1100) durchgeführt.

Automatisierte Peptid Festphasensynthesen wurden auf einem Gerät der Firma *MultiSynTech* (SyRo II) durchgeführt.

Die NMR-Spektren wurden mit den Geräten AC250 und DMX600 der Firma *Bruker* aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden auf die Restprotonensignale des d_6 -DMSO bei 2.49 ppm, bzw. $CDCl_3$ bei 7.24 ppm (1H -Spektrum) und auf das ^{13}C -Signal des d_6 -DMSO bei 39.7 ppm bzw. $CDCl_3$ bei 77.0 ppm (^{13}C -Spektrum) geeicht.

7.2 Liste der synthetisierten Verbindungen

7.2.1 Bausteine, Auxiliare, *N*-geschützte Aminosäuren

2-Trt-Thioessigsäure (**77**)

2-Trt-Thiopropionsäure (**78**)

3-Trt-Thiopropionsäure (**79**)

(1R)-Fmoc-2-amino-2-phenylethanol (D-**84**)

(1S)-Fmoc-2-amino-2-phenylethanol (L-**84**)

(1R)-Fmoc-2-amino-3-phenyl-1-propanol (D-**83**)

(1S)-Fmoc-2-amino-3-phenyl-1-propanol (L-**83**)

rac-Fmoc-2-amino-1-phenylethanol (**85**)

H-Gly-(S,S)-Pseudoephedrin*H₂O (S,S-**174**)

H-Gly-(R,R)-Pseudoephedrin*H₂O (R,R-**174**)

H-(S)-Alg-(S,S)-Pseudoephedrin (S,S,S-**183**)

H-(R)-Alg-(R,R)-Pseudoephedrin (R,R,R-**183**)

Fmoc-D-Alg-OH (D-**154**)

- Fmoc-*rac*-Alg-OH (*rac*-**154**)
rac-Diethyl-2-acetamido-2-(but-3-enyl)-malonat (**157**)
rac-Diethyl-2-acetamido-2-(pent-4-enyl)-malonat (**162**)
rac-(*N*-Acetyl)-2-amino-5-hexensäure (**158**)
rac-(*N*-Acetyl)-2-amino-5-heptensäure (**163**)
rac-Fmoc-2-amino-5-hexensäure (**160**)
rac-Fmoc-2-amino-5-heptensäure (**165**)
Fmoc-(*N*-Hmb)-Gly-OH (**283**)
Fmoc-(*N*-Hmb)-Ala-OH (**285**)
Fmoc-Phe-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (**288**)

7.2.2 Lineare und disulfidcyclische uPA-Peptide

- | | | |
|---|------|---|
| <i>cyclo</i> [19,31][D-Ser ²¹ D-Asn ²⁷]-uPA ₁₉₋₃₁ | (36) | <i>H</i> -CVSNKYFSN <u>I</u> HW <u>C</u> -OH |
| <i>cyclo</i> [19,31][D-Cys ¹⁹ D-Ser ²¹]-uPA ₁₉₋₃₁ | (37) | <i>H</i> -C <u>V</u> SNKYFSN <u>I</u> HW <u>C</u> -OH |
| <i>cyclo</i> [19,31][D-Cys ¹⁹ D-Asn ²⁷]-uPA ₁₉₋₃₁ | (38) | <i>H</i> -C <u>V</u> SNKYFSN <u>I</u> HW <u>C</u> -OH |
| <i>cyclo</i> [19,31][D-Cys ¹⁹ D-Ser ²¹ D-Asn ²⁷]-uPA ₁₉₋₃₁ | (39) | <i>H</i> -C <u>V</u> SNKYFSN <u>I</u> HW <u>C</u> -OH |
| <i>cyclo</i> [19,31][D-Cys ¹⁹]-uPA ₁₉₋₃₁ | (3) | <i>H</i> -C <u>V</u> SNKYFSN <u>I</u> HW <u>C</u> -OH |
| <i>cyclo</i> [19,31][D-Cys ³¹]-uPA ₁₉₋₃₁ | (40) | <i>H</i> -CVSNKYFSN <u>I</u> HW <u>C</u> -OH |
| <i>cyclo</i> [19,31][D-Cys ¹⁹ D-Cys ³¹]-uPA ₁₉₋₃₁ | (41) | <i>H</i> -C <u>V</u> SNKYFSN <u>I</u> HW <u>C</u> -OH |
| <i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29}]-uPA ₂₁₋₃₀ | (5) | <i>H</i> -CNKYFSNICW-OH |
| [Ala ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ | (6) | <i>H</i> -ANKYFSNICW-OH |
| <i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ Ala ²² Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ | (7) | <i>H</i> -CAKYFSNICW-OH |
| <i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ Ala ²³ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ | (8) | <i>H</i> -CNAKYFSNICW-OH |
| <i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ Ala ²⁴ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ | (9) | <i>H</i> -CNKAFSNICW-OH |
| <i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ Ala ²⁵ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ | (10) | <i>H</i> -CNKYASNICW-OH |
| <i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ Ala ²⁶ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ | (11) | <i>H</i> -CNKYFANICW-OH |
| <i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ Ala ²⁷ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ | (12) | <i>H</i> -CNKYFSAICW-OH |
| <i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ Ala ²⁸ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ | (13) | <i>H</i> -CNKYFSNACW-OH |
| [Cys ²¹ Ala ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀ | (14) | <i>H</i> -CNKYFSNIAW-OH |

<i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ Cys ²⁹ Ala ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(15)	<i>H</i> -CNKYFSNICA-OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(16)	<i>H</i> - <u>C</u> NKYFSNICW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Asn ²²]-uPA ₂₁₋₃₀	(17)	<i>H</i> - <u>C</u> N <u>K</u> YFSNICW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Lys ²³]-uPA ₂₁₋₃₀	(18)	<i>H</i> -CN <u>K</u> YFSNICW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Tyr ²⁴]-uPA ₂₁₋₃₀	(19)	<i>H</i> -CNKY <u>F</u> SNICW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Phe ²⁵]-uPA ₂₁₋₃₀	(20)	<i>H</i> -CNKYF <u>S</u> NICW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Ser ²⁶]-uPA ₂₁₋₃₀	(21)	<i>H</i> -CNKYFS <u>N</u> ICW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Asn ²⁷]-uPA ₂₁₋₃₀	(22)	<i>H</i> -CNKYFSN <u>I</u> CW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Ile ²⁸]-uPA ₂₁₋₃₀	(23)	<i>H</i> -CNKYFSNIC <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ D-Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(24)	<i>H</i> -CNKYFSNIC <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Trp ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(25)	<i>H</i> -CNKYFSNIC <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ^{21,29}]-uPA ₂₁₋₃₀	(26)	<i>H</i> - <u>C</u> NKYFSNIC <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ D-Asn ²⁷ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(27)	<i>H</i> - <u>C</u> NKYFSN <u>I</u> CW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ Cys ²⁹ D-Trp ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(28)	<i>H</i> - <u>C</u> NKYFSNIC <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Asn ²⁷ D-Trp ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(29)	<i>H</i> -CNKYFSN <u>I</u> C <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ D-Cys ²⁹ D-Trp ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(30)	<i>H</i> -CNKYFSNIC <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ D-Asn ²⁷ D-Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(31)	<i>H</i> -CNKYFSN <u>I</u> C <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ^{21,29} D-Asn ²⁷]-uPA ₂₁₋₃₀	(32)	<i>H</i> - <u>C</u> NKYFSN <u>I</u> C <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ D-Asn ²⁷ Cys ²⁹ D-Trp ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(33)	<i>H</i> - <u>C</u> NKYFSN <u>I</u> C <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ^{21,29} D-Trp ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(34)	<i>H</i> - <u>C</u> NKYFSNIC <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ^{21,29} D-Asn ²⁷ D-Trp ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(35)	<i>H</i> - <u>C</u> NKYFSN <u>I</u> C <u>W</u> -OH

7.2.3 Pen-Modifikationen

<i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ Pen ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(53)	<i>H</i> -CNKYFSNIXW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ D-Pen ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(55)	<i>H</i> -CNKYFSN <u>I</u> XW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ Pen ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(54)	<i>H</i> - <u>C</u> NKYFSNIXW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ D-Pen ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(56)	<i>H</i> - <u>C</u> NKYFSN <u>I</u> XW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Pen ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(57)	<i>H</i> -XNKYFSNICW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Pen ²¹ D-Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(59)	<i>H</i> -XNKYFSN <u>I</u> CW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Pen ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(58)	<i>H</i> - <u>X</u> NKYFSNICW-OH

<i>cyclo</i> [21,29][D-Pen ²¹ D-Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(60)	<i>H-X</i> NKYFSNIC <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][Pen ²¹ Pen ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(49)	<i>H-X</i> NKYFSNIXW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Pen ²¹ D-Pen ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(50)	<i>H-X</i> NKYFSNIX <u>W</u> -OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Pen ²¹ Pen ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(51)	<i>H-X</i> NKYFSNIXW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Pen ²¹ D-Pen ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(52)	<i>H-X</i> NKYFSNIX <u>W</u> -OH

7.2.4 C-/N-terminale und Cys-Modifikationen

[Met ^{21,29}]-uPA ₂₁₋₃₀	(43)	<i>H-M</i> NKYFSNIMW-OH
[Cys(Me) ^{21,29}]-uPA ₂₁₋₃₀	(42)	<i>H-X</i> NKYFSNIXW-OH
[Phe ^{21,29}]-uPA ₂₁₋₃₀	(45)	<i>H-F</i> NKYFSNIFW-OH
[Thi ^{21,29}]-uPA ₂₁₋₃₀	(44)	<i>H-X</i> NKYFSNIXW-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(61)	<i>H-C</i> NKYFSNICF-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} Tyr ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(63)	<i>H-C</i> NKYFSNICY-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} His ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(66)	<i>H-C</i> NKYFSNICH-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} Thi ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(62)	<i>H-C</i> NKYFSNICX-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} Tia ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(65)	<i>H-C</i> NKYFSNICX-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} 2-Nal ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(64)	<i>H-C</i> NKYFSNICX-OH
<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys ²¹ Cys ²⁹ Trp-NH ₂ ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(71)	<i>H-C</i> NKYFSNICW-NH ₂
<i>cyclo</i> [21,29][Ac-D-Cys ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(67)	Ac- <i>C</i> NKYFSNICF-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Tes ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(68)	Tes-NKYFSNICF-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Tps ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(69)	Tps-CNKYFSNICF-OH
<i>cyclo</i> [21,29][<i>rac</i> -Tms ²¹ Cys ²⁹]-uPA ₂₁₋₃₀	(70)	<i>rac</i> Tms-CNKYFSNICF-OH
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} Phg-ol ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(74)	<i>H-C</i> NKYFSNICX-ol
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Phg-ol ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(75)	<i>H-C</i> NKYFSNIC <u>X</u> -ol
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} Phe-ol ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(73)	<i>H-C</i> NKYFSNICF-ol
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} D-Phe-ol ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(76)	<i>H-C</i> NKYFSNIC <u>F</u> -ol
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ^{21,29} (87) ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(L-72)	<i>H-C</i> NKYFSNICW
<i>cyclo</i> [21,29][Cys ²¹ D-Cys ²⁹ (87) ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀	(D-72)	<i>H-C</i> NKYFSNIC <u>W</u>

7.2.5 Metathesecyclen

<i>cyclo</i> [22,28][Alg ^{22,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [‡]	(251) <i>H</i> -SXXKYFSNXAF-OH
<i>cyclo</i> [22,28][Alg ²² D-Alg ²⁸ Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [‡]	(252) <i>H</i> -SXXKYFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [22,28][D-Alg ²² Alg ²⁸ Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [‡]	(253) <i>H</i> -S <u>X</u> KYFSNXAF-OH
<i>cyclo</i> [22,28][D-Alg ^{22,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [‡]	(254) <i>H</i> -S <u>X</u> KYFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [23,28][Alg ^{23,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [‡]	(255) <i>H</i> -SNXYFSNXAF-OH
<i>cyclo</i> [23,28][Alg ²³ D-Alg ²⁸ Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [‡]	(256) <i>H</i> -SNXYFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [23,28][D-Alg ²³ Alg ²⁸ Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [‡]	(257) <i>H</i> -SN <u>X</u> YFSNXAF-OH
<i>cyclo</i> [23,28][D-Alg ^{23,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [‡]	(258) <i>H</i> -SN <u>X</u> YFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [22,28][<i>rac</i> Alg ^{22,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ ^{‡*}	(218) <i>H</i> -S <u>X</u> KYFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [23,28][<i>rac</i> Alg ^{23,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ ^{‡*}	(217) <i>H</i> -SN <u>X</u> YFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [23,27][<i>rac</i> Alg ^{23,27} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ ^{‡*}	(215) <i>H</i> -SN <u>X</u> YFS <u>X</u> IAF-OH
<i>cyclo</i> [22,27][<i>rac</i> Alg ^{22,27} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ ^{‡*}	(216) <i>H</i> -S <u>X</u> KYFS <u>X</u> IAF-OH
<i>cyclo</i> [22,28][<i>rac</i> bhAlg ^{22,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ ^{‡*}	(234) <i>H</i> -S <u>X</u> KYFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [23,28][<i>rac</i> bhAlg ^{23,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ ^{‡*}	(233) <i>H</i> -SN <u>X</u> YFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [23,27][<i>rac</i> bhAlg ^{23,27} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ ^{‡*}	(231) <i>H</i> -SN <u>X</u> YFS <u>X</u> IAF-OH
<i>cyclo</i> [22,27][<i>rac</i> bhAlg ^{22,27} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ ^{‡*}	(232) <i>H</i> -S <u>X</u> KYFS <u>X</u> IAF-OH
<i>cyclo</i> [22,28][<i>rac</i> Alg ^{22,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [*]	(226) <i>H</i> -S <u>X</u> KYFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [23,28][<i>rac</i> Alg ^{23,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [*]	(225) <i>H</i> -SN <u>X</u> YFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [23,27][<i>rac</i> Alg ^{23,27} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [*]	(223) <i>H</i> -SN <u>X</u> YFS <u>X</u> IAF-OH
<i>cyclo</i> [22,27][<i>rac</i> Alg ^{22,27} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [*]	(224) <i>H</i> -S <u>X</u> KYFS <u>X</u> IAF-OH
<i>cyclo</i> [22,28][<i>rac</i> bhAlg ^{22,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [*]	(242) <i>H</i> -S <u>X</u> KYFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [23,28][<i>rac</i> bhAlg ^{23,28} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [*]	(241) <i>H</i> -SN <u>X</u> YFSN <u>X</u> AF-OH
<i>cyclo</i> [23,27][<i>rac</i> bhAlg ^{23,27} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [*]	(239) <i>H</i> -SN <u>X</u> YFS <u>X</u> IAF-OH
<i>cyclo</i> [22,27][<i>rac</i> bhAlg ^{22,27} Ala ²⁹ Phe ³⁰]-uPA ₂₁₋₃₀ [*]	(240) <i>H</i> -S <u>X</u> KYFS <u>X</u> IAF-OH

‡ = geschützte Seitenketten

* = reduzierte Doppelbindung

7.2.6 EmrE-Peptide

Boc-Met-Asn(Trt)-Pro-Tyr(*t*Bu)-Ile-Tyr(*t*Bu)-Leu-Gly-OH (Boc-272)

Fmoc-Gly-Ala-Ile-Leu-Glu(*Ot*Bu)-Val-Ile-Gly-OH (270)

H-Gly-Ala(*N*-Hmb)-Ile-Leu-Glu(*Ot*Bu)-Val-Ile-Gly-TrtTG-PS (291)

Fmoc-Thr(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Leu-Met-Lys(Boc)-Phe-Ser(*t*Bu)-Glu(*Ot*Bu)-Gly-OH (279)

H-Phe-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-SieberPS (280)

H-Thr(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Leu-Met-Lys(Boc)-Phe-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Glu(*Ot*Bu)-Gly-Phe-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-NH₂ (293)

Boc-Met-Asn(Trt)-Pro-Tyr(*t*Bu)-Ile-Tyr(*t*Bu)-Leu-Gly-Gly-Ala(*N*-Hmb)-Ile-Leu-Glu(*Ot*Bu)-Val-Ile-Gly-OH (292)

H-Met(O)-Asn-Pro-Tyr-Ile-Tyr-Leu-Gly-Gly-Ala-Ile-Leu-Glu-Val-Ile-Gly-Thr-Thr-Leu-Met(O)-Lys-Phe-Ser-Glu-Gly-Phe-Thr-Arg-NH₂ (294)

H-Met-Asn-Pro-Tyr-Ile-Tyr-Leu-Gly-Gly-Ala-Ile-Leu-Glu-Val-Ile-Gly-Thr-Thr-Leu-Met-Lys-Phe-Ser-Glu-Gly-Phe-Thr-Arg-NH₂ (295)

7.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAVI: Kupplung der ersten Aminosäure an TCP-Harz

1 g TCP-Harz (maximale Belegungsdichte ca. 1 mmol/g Harz) werden mit 1.2 eq. Aminosäurederivat und 153 μ l DIPEA in 10 mL trockenem DCM unter Schütteln gemischt. Nach fünf Minuten werden weitere 356 μ l DIPEA zugegeben und zwei Stunden geschüttelt. Nach Zugabe von 1 mL MeOH wird weitere 30 min geschüttelt, abfiltriert und nacheinander mit zweimal 10 mL DCM, dreimal 10 mL NMP und dreimal mit 20 mL MeOH (Ultraschall um Klumpen aufzulösen) gewaschen. Anschließend wird im HV getrocknet und der Belegungsgrad gravimetrisch nach folgender Formel bestimmt:

$$n = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 1000}{(MG_{\text{Xaa}} - 36.461) \cdot m_2}$$

n = Mol Aminosäure am Harz ^[449]

m_1 = Masse des unbelegten TCP-Harzes [g]

m_2 = Masse des belegten Harzes [g]

MG_{Xaa} = Molgewicht der Aminosäure [g / mol]

AAV2: Unterbelegung von TCP-Harz

Die Unterbelegung erfolgt analog *AAV1*, als Aminosäure wird allerdings eine Mischung aus 0.3 eq. Fmoc-Aminosäure und 1.2 eq. der entsprechenden Boc-geschützten Aminosäure eingesetzt. Die Bestimmung des Belegungsgrades erfolgt nach *AAV5*.

AAV3: Kupplung von Fmoc-Aminoalkoholen an TCP-Harz

250 mg TCP-Harz werden mit 3 eq. Fmoc-Aminoalkohol und 6 eq. Pyridin in 3 mL trockenem DCM/DMF (1:1, v/v) 12 h geschüttelt. Anschließend wird 1 mL MeOH zugegeben, erneut 1 h geschüttelt und wie in *AAV1* gewaschen.

AAV4: Kupplung der ersten Aminosäure an Wang- und HMBA-AM-Harz

500 mg Wang- oder HMBA-AM-Harz werden mit einer Lösung von 5 eq. AS, 5 eq. MSNT und 3.75 eq. MeIm in 10 mL trockenem DCM 1h geschüttelt. Nach Waschen (*AAV1*) wird die Belegungsdichte nach *AAV 4* bestimmt.

AAV5: Bestimmung des Belegungsgrades durch UV-Absorption des Fmoc-Piperidin-Komplexes

Etwa 3 mg trockenes belegtes Harz wird mit 3 mL einer frisch bereiteten Lösung von 20% Piperidin in DMF (v/v) versetzt und 5 min geschüttelt. Nach Filtration wird die Absorption bei 290 nm gemessen (Abspalllösung als Referenz). Der Belegungsgrad wird nach folgender Formel bestimmt:

$$n = \frac{\text{Abs}_{\text{Harz}} - \text{Abs}_{\text{Ref.}}}{1.65 \cdot m_{\text{Harz}}}$$

n = Mol Aminosäure am Harz ^[449]

Abs_{Harz} = Absorption der Abspalllösung mit beladenem Harz

$Abs_{Ref.}$ = Absorption der reinen Abspaltlösung

m = Masse des eingewogenen beladenen Harzes [mg]

AAV6: Festphasensynthese von Peptiden mit Fmoc/tBu-Schutzgruppenstrategie

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der harzgebundenen Aminosäure/des Peptids und die Kupplung einer weiteren Fmoc-Aminosäure erfolgt nach folgendem Schema:

	Operation	Reagenzien (10 mL/g Harz)	Zeit[<i>min</i>]	Anzahl
1	Quellung	NMP	30	1
2	Entschützen	20% Piperidin in NMP	5	1
3	Waschen	NMP	1	1
4	Entschützen	20% Piperidin in NMP	15	1
5	Waschen	NMP	1	5
6	Kuppeln	Fmoc-AS-OH/TBTU/HOBt/DIPEA oder Fmoc-AS-OH/HATU/HOAt/Collidin	60	1
7	Waschen	NMP	1	1
8	Kuppeln	Fmoc-AS-OH/TBTU/HOBt/DIPEA oder Fmoc-AS-OH/HATU/HOAt/Collidin	45	1
9	Waschen	NMP	1	3
10	Waschen	DCM	1	3
11	Trocknen	HV	ü.N.	

Die Schritte 10 und 11 erfolgen nur, wenn die Peptid-Festphasensynthese für mehrere Tage unterbrochen wird.

Je nach Kupplungseffizienz und Verfügbarkeit des Aminosäurederivats werden die Schritte 2-7 bzw. 2-9 für jede zu kuppelnde Aminosäure wiederholt. Die Kupplung der Fmoc-Aminosäure erfolgt entweder nach der TBTU- oder HATU-Methode:

Je 3 eq. geschützter Fmoc-Aminosäure, 3 eq. Kupplungsreagenz, 3 eq. Additiv und 8.4 eq. DIPEA (TBTU) bzw. 30 eq. Collidin (HATU!) werden in Konzentrationen größer 0.3 M in NMP gelöst, zu dem *N*-terminal entschützten Peptidyl-Harz gegeben, eine Stunde geschüttelt und bei Bedarf (HPLC-Kontrolle) nachgekuppelt.

Je nach Verwendungszweck wird für die letzte Aminosäure ein *N*-terminaler Boc-Schutz verwendet oder vor dem Abspalten vom Harz die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

AAV7: Automatisierte Festphasensynthese mit Fmoc/*t*Bu-Schutzgruppenkombination

Die Festphasensynthese erfolgte analog *AAV 6* auf dem multiplen Peptidsynthesizer SyRoII mittels TBTU/HOBt-Aktivierung und NMP als Lösungsmittel. Die Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien wurden so gewählt, dass in der resultierenden Reaktionslösung die Konzentration der Fmoc-Aminosäurederivate größer 0.2 M waren. DIPEA musste entsprechend mit DMF gemischt werden. Durchmischung in den Reaktoren erfolgte alle 10 Minuten für je 5 Sekunden.

AAV8: Abspaltung seitenkettengeschützter Peptide vom TCP-Harz

Die Abspaltung der geschützten Peptide vom TCP-Harz erfolgt nach folgendem Schema:

	Operation	Reagenzien (10 mL/g Harz)	Zeit[min]	Anzahl
1	Quellung	DCM	10	1
2	Abspalten	DCM / HFIP (4:1, v/v)	15	1
3	Abspalten	DCM / HFIP (4:1, v/v)	15	1
4	Abspalten	DCM / HFIP (4:1, v/v)	15	1

Bei Anwesenheit von His(Trt)-Resten im Peptid muss als Abspalllösung DCM/HOAc/TFE (8:1:1, v/v/v) verwendet werden (Abspaltzeiten von 15 min auf eine Stunde verlängern!), da der Tritylrest auf der Imidazolseitenkette des Histidins unter stärker sauren Bedingungen nicht stabil ist.

Die vereinigten Filtrate aus den Schritten 2-4 werden am Rotationsverdampfer unter mehrmaliger Zugabe von Toluol (vermeidet Aufkonzentrierung von HOAc und bildet ein Azeotrop) bis zur Trockne eingengt (Bad maximal 30 °C) und das zurückbleibende Peptid wird aus *t*BuOH oder Dioxan lyophilisiert.

AAV9: *Abspaltung seitenkettengeschützter Peptidamide von Sieber-Amid-Harz*

Die Abspaltung der geschützten Peptide vom Sieber-Amid-Harz erfolgt im *flow*-Verfahren mit 1% TFA in DCM. Dazu werden 250 mg Peptidylharz in DCM gequollen und anschließend mit 100 mL 1% TFA/DCM (v/v) bei einem Fluss von ca. 4-5 mL/min in eine Suspension von 2 g NaHCO₃ in 30 mL MeOH eluiert. Nach Zugabe von 80 mL Wasser wird das Methanol am Rotationsverdampfer abdestilliert (Badtemperatur maximal 30 °C), das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, mehrmals mit Wasser gewaschen, anschließend aus Dioxan lyophilisiert und bei Bedarf mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

AAV10: *Abspaltung seitenkettenentschützter Peptide vom TCP-Harz*

Die Abspaltung vollständig entschützter Peptide vom TCP-Harz erfolgt bei RT durch Schütteln mit einer Mischung von dreimal 15 min TFA/TIPS/H₂O (90:7:3, v/v/v). Die vereinigten Filtrate werden in einen 30fachen Überschuss Et₂O eingetropfelt, das Peptid abzentrifugiert, erneut mit Et₂O gewaschen, aus Wasser oder *t*BuOH lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Die resultierenden Peptide zeigten anschließend durchweg Reinheiten von >95% und Abweichungen von der theoretisch zu erwartenden Masse von maximal 0.5 Masseneinheiten in ESI-MS-Untersuchungen.

AAV11: *Abspaltung seitenkettenentschützter Peptide vom TCP-Harz mit anschließender Disulfidcyclisierung.*

Die Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgt nach *AAV10*. Die vereinigten Filtrate werden im HV getrocknet, der Rückstand mit Wasser (200 mL/100 mg Harz) im US-Bad suspendiert, mit DMSO (20%, v/v) versetzt und 12-36 h (HPLC-Kontrolle!) gerührt. Die Suspension wird bis auf ein Volumen von wenigen mL DMSO eingengt und mit etwa der gleichen Menge Wasser versetzt, das ausgefallene Triphenylmethan abfiltriert und die resultierende Lösung mittels RP-HPLC gereinigt. Für die Charakterisierung der Produkte gilt Identisches wie in *AAV10*.

AAV12: *Vollständige Seitenkettenentschützung von Trp bei Verwendung von Fmoc-Trp(Boc)-OH*

Zur Entfernung der *N*-Carboxygruppe des Trp wird das Peptid in Wasser gelöst, einige Tropfen HOAc zugegeben und über Nacht gerührt. Anschließend wird lyophilisiert und das verbleibende Peptid mittels HPLC gereinigt. Für die Charakterisierung der Produkte gilt Identisches wie in AAV10.

AAV13: *Acetylierung freier Aminogruppen an fester Phase (capping)*

Zur Acetylierung freier Aminogruppen werden 100 mg Harz zweimal 15 min mit 1 mL einer Lösung aus NMP/Ac₂O/DIPEA (93:5:2, v/v) geschüttelt und anschließend fünfmal mit NMP gewaschen.

AAV14: *Fmoc-Schützung freier Aminoalkohole oder -säuren*

- a) Zu einer etwa 0.5M Suspension bzw. Lösung der Aminosäure bzw. des Aminoalkohols in abs. DCM werden unter Rühren bei 0 °C 2.1 eq. TMS-Cl langsam zugetropft, das Eisbad entfernt, 3 eq. DIPEA zugetropft, 1.1 eq. Fmoc-Cl in einer Portion zugegeben und eine Stunde bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt, der Rückstand in Et₂O aufgenommen und zweimal mit 5%iger wässriger Na₂CO₃-Lösung ausgeschüttelt und die vereinigten wässrigen Phasen mit Et₂O ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wird mit 2N HCl auf pH=1 angesäuert, dreimal mit EE extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation oder durch Säulenchromatographie.
- b) Zu einer etwa 0.5M Suspension der Aminosäure und 1 eq. NaHCO₃ in einer Mischung aus Wasser/Aceton (1:1, v/v) wird bei RT 1 eq. Fmoc-ONSu in einer Portion zugegeben und 20 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung vorsichtig mit konz. HCl auf pH=1 angesäuert und das Aceton am Rotationsverdampfer abdestilliert. Die verbleibende wässrige Suspension wird zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen mit 0.1M HCl und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das

Lösungsmittel im HV entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend durch umkristallisieren oder Säulenchromatographie gereinigt.

AAV15: Fmoc-Abspaltung in Lösung

Das Peptid wird 1 h in einer Lösung von 20% Diethylamin in DMF (v/v) gerührt und das Lösungsmittel im HV entfernt. Der Rückstand wird in MeOH aufgenommen, mit Et₂O gefällt, abzentrifugiert, mit Et₂O gewaschen und aus Wasser, Dioxan oder *t*BuOH lyophilisiert.

AAV16: Tritylierung von Thioessigsäure und homologer Bausteine

Zu einer Lösung von 30 mmol des entsprechenden Bausteins in 25 mL HOAc werden bei RT 35 mmol Tritylalkohol und 6.5 mL BF₃-Et₂O (Eiskühlung!) gegeben und 3 h gerührt. Unter Eiskühlung werden dann 80 mL gesättigte NaOAc-Lösung und anschließend 160 mL Wasser zugegeben, 15 min bei RT und 15 min bei 0 °C gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit wässriger NaCl-Lösung, Et₂O und Petrolether gewaschen und im HV getrocknet.

AAV17: Fragmentkupplung zur C-terminalen Modifikation der uPA-Peptide

Zu etwa 0.01 mmol geschütztem Peptid in 400 mL THF/DMF (1:1, v/v) werden 1.2 eq. EDCI*HCL, 1.2 eq. HOBt, 3 eq. Amin und 10 eq. Collidin zugegeben und 48 h gerührt. Anschließend werden die Lösungsmittel im HV entfernt, zweimal mit Wasser gewaschen und aus *t*BuOH lyophilisiert. Das *N*-terminal geschützte Peptid wird 30 min mit 0.5 mL 20% DEA/NMP behandelt und mit 20 mL Wasser aufgefüllt. Die Suspension wird mehrmals zentrifugiert, der Niederschlag mit Wasser gewaschen, aus *t*BuOH lyophilisiert, nach *AAV 10* entschützt und mittels HPLC gereinigt.

AAV18: Metathese mit olefinsubstituierten Peptiden an fester Phase

Jeweils 5-100 mg Peptidylharz werden unter Argon in 3-5 mL trockenem DCM mit 2-6 eq. Grubbs Katalysator suspendiert und 12-14 h refluxiert. Anschließend wird das Harz abfiltriert, zweimal mit DCM und MeOH gewaschen und getrocknet.

AAV19: Reinigung der Metathesepeptide (Grubb's Katalysator und Ruthenium-Salze)

Im Anschluss an die Metathese-Reaktion erfolgt die Abspaltung des cyclisierten geschützten Produktes nach AAV8, wobei die Abspaltzeiten auf dreimal 1 h verlängert werden und aus Dioxan lyophilisiert wird. Etwa 0.05 mmol des resultierenden rot-braunen Peptids wird in 2 mL ACN/TEA (1:1, v/v) gelöst, 200 mg DTT zugegeben und einige Stunden stehen gelassen. Der resultierenden braune Niederschlag wird abzentrifugiert oder filtriert und der Überstand bzw. das Filtrat in 40 mL Wasser eingetroppt. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen, aus Dioxan lyophilisiert und bei Bedarf mittels HPLC gereinigt.

In den Fällen, in denen eine Fällung der geschützten Peptide in Wasser unterbleibt, wird mit HOAc angesäuert, worauf das Peptid ausfällt. Nach Zentrifugation wird mit Wasser/HOAc (50:1, v/v) gewaschen, erneut zentrifugiert und aus *t*BuOH lyophilisiert.

Je 5-15 mg des trockenen Peptids werden anschließend in 1 mL ACN/TEA (1:1, v/v) gelöst und mit 10-25 mg DTT versetzt, nach kurzem Schütteln auf 8 mL Wasser aufgefüllt, auf eine *Isolute SPE* Säule (10 mL XL, 500 mg RP-C18-EC Kieselgel) aufgetragen (Konditionierung mit zweimal 8 mL Wasser/ACN, 9:1, v/v) und innerhalb von 30 min. abgesaugt. Nach Waschen mit 8 mL der Aufzuehlösung und 8 mL Wasser/HOAc (9:1, v/v) wird mit dreimal 8 mL Toluol und dreimal 8 mL ACN/Wasser/TFA (9:1:0.1%, v/v/v) eluiert. Die vereinigten Filtrate werden am Rotationsverdampfer aufkonzentriert und anschließend zweimal aus *t*BuOH oder Dioxan lyophilisiert.

Werden die *N*-terminalen Reste His und Trp durch Ala und Phe ersetzt, kann nach der Fällung in Wasser die Reinigung mittels der *Isolute SPE* Säulchen durch eine HPLC Trennung ersetzt werden.

AAV20: Reduktion von Metathesepeptiden

- a) Jeweils ca. 10 mg geschütztes cyclisches Peptid wird in 6 mL DMAc und 1 mL HOAc gelöst und mit 25 mg Pd/C wassernass versetzt und unter einer Wasserstoffatmosphäre 48 h gerührt. Dann werden erneut 25 mg Pd/C zugegeben und erneut unter Wasserstoffatmosphäre 24-48 h (ESI-Kontrolle!)

gerührt. Anschließend wird mit MeOH auf 15 mL aufgefüllt, filtriert, die Lösungsmittel am HV-Rotationsverdampfer abdestilliert und dreimal aus Dioxan lyophilisiert.

- b) Jeweils ca. 10 mg des geschützten cyclischen Peptids werden in 500 μ l NMP gelöst, mit 40 eq. TISH und 1.6 eq. DIPEA versetzt und 48 h bei 50 °C geschüttelt. Anschließend werden erneut 40 eq. TISH und 1.6 eq. DIPEA zugegeben und weitere 24 h bei 50 °C geschüttelt (ESI-Kontrolle!). Das Lösungsmittel wird wie in AAV19 über SPE entfernt und die Reinigung erfolgt über RP-HPLC.

AAV21: *Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen im Fall pseudoprolingeschützter Metathesecyclen*

Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen im Fall pseudoprolingeschützter Metathesecyclen erfolgt bei RT durch zweistündiges Schütteln mit einer Mischung von TFA/TIPS/H₂O (90:7:3, v/v/v). Die Lösung wird in einen 30fachen Überschuss Et₂O eingetropft, das Peptid abzentrifugiert, erneut mit Et₂O gewaschen und aus Wasser oder *t*BuOH lyophilisiert. Anschließend wird erneut eine Stunde mit einer Mischung aus TFA/TFMSA/H₂O (90/5/5, v/v/v) abgespalten und durch Eintropfen in Et₂O ausgefällt, zentrifugiert, mit Et₂O gewaschen und lyophilisiert (ist die Fällung in Et₂O unvollständig, kann zur Vervollständigung der Fällung bis max. 40% Hexan zugegeben werden).

7.4 Synthesen der Bausteine

7.4.1 Synthese von 2-(Tritylsulfanyl)-essigsäure (77)

Die Synthese erfolgt nach *AAV16*. Ausgehend von 1.8 g (20.0 mmol) Thioessigsäure wurden 5.2 g (MW=298.4 g/mol, 17.3 mmol, 87%) der Titelverbindung als weißer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 7.37-7.21 (m, 15H, Trt-*H*), 2.83 (s, 2H, S- $\text{CH}_2\text{-CO}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 170.4, 144.1, 129.2, 128.4, 127.1, 66.4, 34.9.

7.4.2 Synthese von 2-(Tritylsulfanyl)-propionsäure (78)

Die Synthese erfolgt nach *AAVI6*. Ausgehend von 1.3 g (12.3 mmol) Thioessigsäure wurden 3.0 g (MW=312.4 g/mol, 9.7 mmol, 79%) der Titelverbindung als weißer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 7.38 (m, 15H, Trt-*H*), 2.73 (q, 1H, $^3\text{J}=7.2$ Hz, TrtS- $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CO}$), 0.85 (d, $^3\text{J}=7.2$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 174.1, 144.3, 129.4, 128.2, 127.0, 67.8, 42.7, 18.9.

7.4.3 Synthese von 3-(Tritylsulfanyl)-propionsäure (79)

Die Synthese erfolgt nach *AAVI6*. Ausgehend von 2.7 g (10.5 mmol) Thioessigsäure wurden 2.8 g (MW=312.4 g/mol, 9.0 mmol, 85%) der Titelverbindung als weißer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 7.36-7.20 (m, 14H, Trt-*H*), 2.28 (t, 2H, $^3\text{J}=6.0$ Hz, S- $\text{CH}_2\text{-}$), 2.16 (t, 2H, $^3\text{J}=6.5$ Hz, $\text{-CH}_2\text{-CO}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 172.9, 144,6, 129.3, 128.2, 126.9, 66.4, 33.1, 26.9.

7.4.4 Synthese von (1R)-(9H-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-2-phenylethanol (D-84)

Die Synthese erfolgt nach *AAVI4a* aus 5.0 g (36.4 mmol) (R)-2-Amino-2-phenylethanol. Nach Umkristallisieren aus EE/Hexan (4:1, v/v) erhält man 9.4 g (MW=359.4 g/mol; 26.2 mmol, 72%) der Titelverbindung als farblose Nadeln.

ESI-MS: $m/z = 382.3$ (45, $[m+Na]^+$), 741.0 (25, $[2m+Na]^+$).

1H -NMR (250 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 7.89-7.69 (m, 5H, Fmoc- und CONH), 7.43-7.22 (m, 9H, Fmoc- und Ar-H), 4.85 (t, 1H, $^3J = 5.8$ Hz, CH_2-OH), 4.58 (q, 1H, $^3J=8.0$ Hz, H^α), 4.29-4.20 (m, 3H, Fmoc-H), 3.54 (t, 2H, $^3J=6.0$ Hz, CH_2-OH).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 156.0, 144.1, 144.0, 141.6, 140.9, 128.3, 127.8, 127.2, 127.0, 125.4, 120.3, 65.6, 64.9, 57.6, 46.9.

7.4.5 Synthese von (1S)-(9H-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-2-phenylethanol (L-84)

Die Synthese erfolgt nach *AAVI4a* aus 1.0 g (8.8 mmol) (S)-2-Amino-2-phenylethanol. Nach Umkristallisieren aus EE/Hexan (4:1, v/v) erhält man 2.1 g (MW=359.4 g/mol; 5.8 mmol, 79%) der Titelverbindung als farblose Nadeln.

ESI-MS: $m/z = 382.3$ (32, $[m+Na]^+$), 740.0 (9, $[2m+Na]^+$).

1H -NMR (250 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 7.89-7.70 (m, 5H, Fmoc- und CONH), 7.42-7.20 (m, 9H, Fmoc- und Ar-H), 4.85 (bs, 1H, CH_2-OH), 4.58 (q, 1H, $^3J=8.3$ Hz, H^α), 4.29-4.20 (m, 3H, Fmoc-H), 3.54 (bs, 2H, CH_2-OH).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 156.0, 144.1, 144.0, 141.6, 140.9, 128.3, 127.8, 127.2, 127.0, 125.4, 120.3, 65.6, 64.9, 57.6, 46.9.

7.4.6 Synthese von (1R)-(9H-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-3-phenyl-1-propanol (D-83)

Die Synthese erfolgt nach *AAV14a* aus 1.0 g (6.6 mmol) (R)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol. Nach Umkristallisieren aus EE/Hexan (4:1, v/v) erhält man 2.2 g (MW=373.5 g/mol; 5.8 mmol, 88%) der Titelverbindung als farblose Nadeln.

ESI-MS: $m/z = 396.3$ (49, $[m+Na]^+$), 769.0 (22, $[2m+Na]^+$).

1H -NMR (250 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 7.89-7.15 (m, 14H, Fmoc-, Ar-H und NH), 5.15 (sbs, 1H, CH_2-OH), 4.24-4.10 (m, 3H, Fmoc-H), 3.71-3.51 (bs, 1H, H^α), 3.43-3.23 (m, 2H, CH_2-OH), 2.90-2.53 (m, 2H, Ar- CH_2).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 157.2, 155.9, 144.1, 142.8, 140.9, 139.8, 139.6, 137.6, 129.3, 129.1, 128.2, 127.8, 127.5, 127.2, 126.0, 125.4, 121.6, 120.2, 109.9, 65.4, 63.4, 63.2, 54.8, 54.5, 46.9, 37.0, 36.8.

7.4.7 Synthese von (1S)-(9H-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-3-phenyl-1-propanol (L-83)

Die Synthese erfolgt nach *AAV14a* aus 1 g (6.6 mmol) (S)-2-Amino-2-phenyl-1-propanol. Nach Umkristallisieren aus EE/Hexan (4:1, v/v) erhält man 1.9 g (MW=373.5 g/mol; 5.3 mmol, 79%) der Titelverbindung als farblose Nadeln.

ESI-MS: $m/z = 396.3$ (49, $[m+Na]^+$), 769.0 (22, $[2m+Na]^+$).

1H -NMR (250 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 7.88-7.61 (m, 5H, Fmoc- und NH), 7.43-7.16 (m, 9H, Fmoc- und Ar-H), 4.77 (t, 1H, $^3J = 5.5$ Hz, CH_2-OH), 4.24-4.11 (m, 3H, Fmoc-H), 3.71-3.53 (bs, 1H, H^α), 3.44-3.27 (m, 2H, CH_2-OH), 2.90-2.56 (m, 2H, Ar- CH_2).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 155.9, 144.1, 140.9, 139.5, 129.3, 128.2, 127.8, 127.2, 126.0, 125.4, 120.2, 65.4, 63.2, 54.8, 46.9, 36.8.

7.4.8 Synthese von *rac*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-1-phenylethanol (85)

Die Synthese erfolgt nach *AAVI4a* aus 6 g (43.7 mmol) *rac*-2-Amino-1-phenylethanol. Nach Umkristallisieren aus EE/Hexan (4:1, v/v) erhält man 11.9 g (MW=359.4 g/mol; 33.1 mmol, 76%) der Titelverbindung als farblose Nadeln.

ESI-MS: $m/z = 382.4$ (39, $[m+Na]^+$), 741.0 (12, $[2m+Na]^+$).

1H -NMR (250 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 7.89-7.18 (m, 15H, Fmoc-, Ar- und NH), 5.40 (d, 1H, $3J = 4.4$ Hz, ArCH-OH), 4.65-4.58 (m, 1H, H^α), 4.35-4.15 (m, 3H, Fmoc-H), 3.18-3.12 (m, 2H, NH-CH₂-CHAr).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 156.4, 144.1, 143.8, 140.9, 128.1, 127.8, 127.2, 126.2, 125.4, 120.3, 71.5, 65.5, 48.6, 46.9.

7.4.9 Synthese von *rac*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-4-pentensäure (*rac*-154)

Die Synthese erfolgt nach *AAVI4b* aus 1 g (8.7 mmol) *rac*-2-Amino-4-pentensäure. Nach Umkristallisation aus EE/Hexan (4:1, v/v) und Trocknung im HV erhält man 1.97 g (MG=337.4 g/mol; 5.8 mmol, 67%) der Titelverbindung als farblose Nadeln.

ESI-MS: $m/z = 337.9$ (4, $[m+H]^+$), 360.2 (10, $[m+Na]^+$), 376.1 (14, $[m+K]^+$), 697.1 (62, $[2m+Na]^+$), 713.1 (100, $[2m+K]^+$).

1H -NMR (250 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 7.92-7.29 (m, 10H, Fmoc- und NH), 5.87-5.70 (m, 1H, H₂C=CH-CH₂), 5.14-5.02 (m, 2H, H₂C=CH-CH₂), 4.30-4.18 (m, 3H, Fmoc), 4.07-3.98 (m, 1H, H^α), 2.54-2.30 (m, 2H, CH₂^β).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 173.4, 156.2, 144.0, 141.0, 134.5, 127.8, 127.3, 125.5, 120.5, 117.8, 65.8, 53.8, 46.8, 25.5.

7.4.10 Synthese von *rac*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-5-hexensäure (*rac*-160)

7.4.10.1 Synthese von *rac*-Diethyl-2-acetamido-2-(but-3-enyl)-malonat (**157**)

Zu einer Suspension von 2.1 g NaH (88 mmol) in 100 mL trockenem DMF werden bei 0 °C langsam 17.4 g Acetamidomalonsäurediethylester (**155**, 80 mmol) in trockenem DMF zugegeben. Das Eisbad wird entfernt und die Lösung wird weitere 20 min gerührt. Dann werden 11.9 g (8.9 mL, 88 mmol) 4-Brom-1-buten (**156**) langsam zugetropft und 4 h bei 90 °C gerührt. Nach Stehen über Nacht wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und das verbleibende orange Öl in EE aufgenommen, mit Wasser gewaschen, die wässrige Phase zweimal mit EE gewaschen, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das erhaltene gelbliche Öl wird durch Flash-Chromatographie mit Et₂O/Hexan (2:1, 1% HOAc, v/v/v) gereinigt und anschließend aus Et₂O/Hexan (1:2, v/v) umkristallisiert, wobei 15.2 g (MW=271.3 g/mol, 56.0 mmol, 70%) der Titelverbindung (**157**) als farblose Kristalle erhalten werden.

ESI-MS: $m/z = 230.1$ (58, [m-Ac+H]⁺), 294.2 (100 [m+Na]⁺).

¹H-NMR (250 MHz, D₆-DMSO): δ (ppm) = 8.25 (s, 1H, CO-NH), 5.83-5.67 (m, 1H, H₂C=CH-CH₂), 5.03-4.91 (m, 2H, H₂C=CH-CH₂), 4.12 (q, 4H, 3J = 7.0 Hz, OCH₂-CH₃), 2.19-2.08 (m, 2H, H₂C=CH-CH₂), 1.90-1.81 (m, 5H, H₃C-C=O und H₂C=CH-CH₂-CH₂), 1.34 (t, 6H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂-CH₃).

¹³C-NMR (62.9 MHz, D₆-DMSO): δ (ppm) = 169.2, 167.6, 137.6, 115.4, 65.9, 61.7, 32.0, 27.6, 22.3, 14.0.

7.4.10.2 Synthese von *rac*-(*N*-Acetyl)-2-amino-5-hexensäure (**158**)

Zu einer Lösung von 8.1 g (30 mmol) *rac*-Diethyl-2-acetamido-2-(but-3-enyl)-malonat (**157**) in 80 mL Wasser/EtOH (1:1, v/v) werden 1.3 g (32.0 mmol) NaOH gegeben und die Lösung unter Rühren 16 h auf 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen

wird das Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt und die resultierende wässrige Phase mit 80 mL EE gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 2M HCl auf pH=1 angesäuert und dreimal mit je 80 mL EE/DCM (4:1, v/v) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im HV entfernt, wobei 4.6 g (MW=171.2 g/mol, 26.9 mmol, 90%) der Titelverbindung (**158**) als weißer Feststoff erhalten werden.

¹H-NMR (250 MHz, D₆-DMSO): δ (ppm) = 8.09 (d, 1H, ³J = 7.8 Hz, CONH-CHR), 5.86-5.70 (m, 1H, H₂C=CH-R), 5.04-4.94 (m, 2H, H₂C=CH-R), 4.19-4.10 (m, 1H, H^α), 2.08-2.00 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 1.83-1.55 (m, 5H, H₃C-CONH und CH₂-CH₂-CH^α).

¹³C-NMR (62.9 MHz, D₆-DMSO): δ (ppm) = 173.9, 169.5, 137.7, 115.7, 51.5, 30.5, 29.7, 22.5.

7.4.10.3 Synthese von *rac*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-5-hexensäure (**160**)

Eine Lösung von 4.6 g (26.9 mmol) *rac*-(*N*-Acetyl)-2-amino-5-hexensäure (**158**) in 100 mL wässriger NaOH (9.0 g, 225 mmol) wird 20 h refluxiert. Nach dem Abkühlen werden 80 mL 4M HCl zugegeben, die Lösung zur Trockne aufkonzentriert, der Rückstand in Wasser gelöst und das Wasser erneut im HV entfernt. Der resultierende weiße Feststoff wird in Ethanol suspendiert, filtriert und der NaCl-Niederschlag zweimal mit Ethanol gewaschen. Zu den vereinigten Filtraten wird 9.1 g (10.8 mL, 157 mmol) Propenoxid gegeben und die Lösung 20 h bei RT gerührt und anschließend im HV konzentriert. Nach Zugabe von 100 mL CHCl₃ wird 20 min gerührt, die ausgefallene Titelverbindung abfiltriert, erneut mit CHCl₃ gewaschen und im HV getrocknet, wobei dabei 2.7 g (MW=129.2 g/mol, 20.9 mmol, 78%) freie 2-Amino-5-hexensäure als weißer Feststoff anfällt. Dieser wird nach AAV14b in 7.1 g (MW=351.4 g/mol, 20.2 mmol, 97%) der Fmoc geschützten Titelverbindung (**160**) überführt.

ESI-MS: $m/z = 374.2$ (3 $[m+Na]^+$), 725.0 (25 $[2m+Na]^+$), 741 (100 $[2m+K]^+$).

1H -NMR (250 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 7.89-7.29 (m, 10H, Fmoc- und NH), 5.87-5.71 (m, 1H, $H_2C=CH-CH_2$), 5.05-4.96 (m, 2H, $H_2C=CH-CH_2$), 4.31-4.19 (m, 3H, Fmoc), 4.00-3.91 (m, 1H, H^α), 2.09-1.94 (m, 2H, CH_2 -Alkyl), 1.86-1.64 (m, 2H, CH_2 -Alkyl).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 174.1, 156.3, 144.0, 140.0, 137.7, 127.8, 127.2, 125.5, 120.3, 115.7, 65.8, 53.3, 46.9, 30.1, 29.8.

7.4.11 Synthese von *rac*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-6-heptensäure (**165**)

7.4.11.1 Synthese von *rac*-Diethyl-2-acetamido-2-(pent-3-enyl)-malonat (**162**)

Die Synthese der Titelverbindung erfolgt analog der Darstellung von *rac*-Diethyl-2-acetamido-2-(but-3-enyl)-malonat (**157**) ausgehend von 39.0 g (179.5 mmol) Acetamidomalonsäurediethylester (**155**). Es werden 43.7 g (MW=285.3, 153.2 mmol, 85%) der Titelverbindung (**162**) als farblose Nadeln erhalten.

ESI-MS: $m/z = 286.0$ (68, $[m+H]^+$), 308.1 (49 $[m+Na]^+$).

1H -NMR (250 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 8.24 (s, 1H, $NHCO$), 5.81-5.64 (m, 1H, $H_2C=CH-CH_2$), 5.01-4.92 (m, 2H, $H_2C=CH-CH_2$), 4.12 (q, 4H, $^3J = 7.0$ Hz, $COOCH_2-CH_3$), 2.10-1.89 (m, 7H, $NHCOCH_3$ und Alkyl-*H*), 1.25-1.10 (m, 2H, Alkyl-*H*), 1.13 (t, 6H, $^3J = 7.1$ Hz, $COOCH_2-CH_3$).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 169.1, 167.8, 138.3, 115.3, 66.2, 61.6, 32.9, 32.3, 22.5, 22.3, 14.0.

7.4.11.2 Synthese von *rac*-(*N*-Acetyl)-2-amino-6-heptensäure (**163**)

Die Synthese der Titelverbindung erfolgt analog der Darstellung von *rac*-(*N*-Acetyl)-2-amino-5-heptensäure (**158**) ausgehend von 7.1 g (24.8 mmol) *rac*-Diethyl-2-acetamido-2-(pent-3-enyl)-malonat (**162**). Es werden 4.5 g (MW=185.2, 24.1 mmol, 97%) der Titelverbindung (**163**) als weißer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 8.07 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.1$ Hz, NHCO), 5.84-5.68 (m, 1H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5.03-4.91 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4.18-4.10 (m, 1H, H^α), 2.05-2.00 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Alkyl}$), 1.83 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-CO-NH-}$), 1.70-1.50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Alkyl}$), 1.43-1.34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Alkyl}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 172.2, 167.7, 136.7, 113.4, 50.1, 31.1, 28.9, 23.0, 20.7.

7.4.11.3 Synthese von *rac*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-6-heptensäure (**165**)

Die Synthese der Titelverbindung erfolgt analog der Darstellung von *rac*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-5-heptensäure (**160**) ausgehend von 7.6 g (41.2 mmol) *rac*-(*N*-Acetyl)-2-amino-5-heptensäure (**163**). Es werden 11.9 g (MW=365.4, 32.7 mmol, 79%) der Titelverbindung (**165**) als weißer Feststoff erhalten.

ESI-MS: $m/z = 366.0$ (7, $[\text{m}+\text{H}]^+$), 388.3 (9, $[\text{m}+\text{Na}]^+$), 753.3 (31, $[\text{2m}+\text{Na}]^+$), 769.3 (100, $[\text{2m}+\text{K}]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 7.89-7.22 (m, 10H, Fmoc- und NH), 5.86-5.69 (m, 1H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5.04-4.92 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4.29-4.18 (m, 3H, Fmoc), 3.98-3.89 (m, 1H, H^α), 2.05-1.97 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Alkyl}$), 1.75-1.524 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Alkyl}$), 1.47-1.38 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Alkyl}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 174.2, 156.4, 144.0, 141.0, 138.6, 127.9, 127.3, 125.5, 120.3, 115.3, 65.8, 53.9, 46.9, 32.9, 30.5, 25.0.

7.4.12 Synthese von (R,R)-Pseudoephedringlycinamidhydrat (R,R-174)

Zu einer Lösung von 15.0 g (90.0 mmol) *N*-Boc-Glycin (**176**) und 14.3 mL (100.0 mmol) TEA in 300 mL DCM werden bei 0 °C 10.6 mL (90.0 mmol) Pivaloylchlorid (**177**) zugetropft und nach 30 min erneut 14.3 mL (100.0 mmol) TEA zugegeben. Anschließend werden 14.2 g (90.0 mmol) (R,R)-Pseudoephedrin (R,R-**172**) portionsweise innerhalb einer Stunde zu der Reaktionslösung gegeben und 45 min bei 0 °C gerührt. Nach je zweimaligem Waschen der organischen Phase mit wässriger HCl (pH=2) und 10%iger Na₂CO₃-Lösung und Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei 34.8 g (110.0 mmol) eines gelben zähen Öls erhalten werden, das laut ESI-MS das Produkt enthält.

$m/z = 323.4$ (5, [m+H]⁺), 345.0 (100, [m+Na]⁺), 667.0 (10, [2 m+Na]⁺).

Von diesem Rohprodukt werden 5.13 g durch Flash-Chromatographie (250 g Kieselgel, EE/Hexan 1.5/3.5/1% HOAc, v/v/v) gereinigt und 4.57g eines farblosen zähen Öls erhalten. Dieses wird in 100 mL MeOH/H₂O (1:1, v/v) suspendiert und bei 0 °C 40 mL konz. HCl zugetropft. Nach drei Stunden Rührens bei 0 °C wird die klare Lösung vorsichtig mit etwa 70 mL 50%iger wässriger NaOH auf pH=14 gebracht, viermal mit je 50 mL DCM extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das erhaltene farblose Öl wird mit 1 mL (ca. 5 eq.) Wasser versetzt und aus 10 mL heißem THF umkristallisiert. Die farblosen Kristalle werden abfiltriert und im HV getrocknet, wobei 2.41 g (MW=240.3 g/mol, 10.0 mmol, 75% Ausbeute entsprechend der Ansatzgröße) der Titelsubstanz (R,R-**174**) erhalten werden.

ESI-MS: $m/z = 223.1$ (7, [m+H]⁺), 245.1 (16, [m+Na]⁺), 467.0 (12, [2m+Na]⁺), 483.0 (9, [2m+K]⁺).

¹H-NMR (250 MHz, D₆-DMSO): δ (ppm) = (2 Rotamere ca. 1:1) 7.38-7.22 (m, 5H, Ar-H), 4.64-4.45 und 3.83-3.71 (m, 1H, CH-CH₃), 4.58-4.45 (m, 1H, CHOH), 2.79 und 2.75 (s, 3H, N-CH₃), 0.87 und 0.80 (d, 3H, CH-CH₃).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 173.0, 172.8, 143.4, 128.0, 127.8, 127.1, 126.9, 73.6, 73.5, 56.2, 54.1, 42.9, 42.7, 28.6, 26.6, 15.1, 13.9.

7.4.13 Synthese von (S,S)-Pseudoephedringlycinamidhydrat (S,S-174)

Die Synthese der Titelverbindung erfolgt analog der Darstellung von (R,R)-Pseudoephedringlycinamidhydrat (R,R-174). Ausgehend von 14.2 g (90.0 mmol) (S,S)-Pseudoephedrin (S,S-172) wurden 10.8 g (44.9 mmol, 72% umgerechnet auf den Gesamtansatz) der Titelverbindung (S,S-174) erhalten.

ESI-MS: m/z = 223.1 (7, $[\text{m}+\text{H}]^+$), 245.1 (16, $[\text{m}+\text{Na}]^+$), 467.0 (12, $[\text{2m}+\text{Na}]^+$), 483.0 (9, $[\text{2m}+\text{K}]^+$).

^1H -NMR (250 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = (2 Rotamere ca. 1:1) 7.38-7.22 (m, 5H, Ar-H), 4.64-4.45 und 3.83-3.71 (m, 1H, CH-CH₃), 4.58-4.45 (m, 1H, CHOH), 2.79 und 2.75 (s, 3H, N-CH₃), 0.87 und 0.80 (d, 3H, CH-CH₃).

7.4.14 Synthese von (S,S)-Pseudoephedrin-(S)-allylglycinamid (S,S,S-183)

Zu einer Suspension von 2.0 g Li (283.0 mmol, 6.8 eq.) in 170 mL abs. THF und 32.5 mL (3.7 eq.) HMDS (179) werden bei RT 20.6 mL (3.6 eq.) 1-Chlorhexan (178) zugegeben (Eiskühlung) und 12 h gerührt. Zu der gelben Lösung werden 10 g (35.7 mmol, 1 eq.) (S,S)-Pseudoephedringlycinamidhydrat (S,S-174) in einer Portion zugegeben und 3 h gerührt. Zu der orangenen Suspension werden dann bei 0 °C tropfenweise 3.7 mL (43.7 mmol, 1.2 eq.) Allylbromid (182) zugegeben und eine Stunde bei 0 °C gerührt. Nach vorsichtiger Zugabe von 100 mL Wasser wird mit 6M wässriger HCl vorsichtig bis pH=1 angesäuert, wobei die Temperatur unter 10 °C gehalten wird. Nach Zugabe von 100 mL EE und Trennung der Phasen wird die organische Phase nacheinander mit 3M und 1M wässriger HCl gewaschen. Die wässrigen Phasen werden auf 0 °C gekühlt und mit 50%iger wässriger NaOH auf pH=14 gebracht, wobei die Zugaberate so gewählt wird, daß die Temperatur nicht

über 25 °C steigt. Die entstandene Emulsion wird viermal mit 100 mL DCM extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im HV entfernt, wobei 10.73 g eines zähen gelben Öls erhalten werden. Dieses wird durch Flash-Chromatographie (750 g Kieselgel, CHCl₃/MeOH/HOAc 90:9:1, v/v/v) gereinigt und nach Umkristallisation aus Toluol (Zugabe einiger mL Wasser und Impfkristall!), Filtration, Waschen mit Et₂O und Trocknung im HV werden 4.1 g (MW=262.4 g/mol, 14.3 mmol, 44%) der Titelverbindung (S,S,S-**183**) in Form weißer Nadeln erhalten.

ESI-MS: m/z = 263.0 (63 [m+H]⁺), 285.2 (26 [m+Na]⁺), 301.0 (3 [m+K]⁺).

¹H-NMR (250 MHz, D₆-DMSO): δ (ppm) = 7.36-7.22 (m, 5H, Ar), 5.87-5.67 (m, 1H), 5.11-4.97 (m, 2H), 4.63-4.62 (m, 2H), 4.15-3.99 (m, 1H), 3.65-3.56 (m, 2H), 2.86 (s, 3H), 2.79 (s, 3H), 2.45-2.01 (m, 3H), 0.90 (d, 3H, ³J = 6.6 Hz), 0.79 (d, 3H, ³J = 6.3 Hz).

¹³C-NMR (62.9 MHz, D₆-DMSO): δ (ppm) = 174.8, 174.7, 143.7, 143.6, 136.5, 135.5, 128.3, 128.1, 127.6, 127.4, 127.1, 127.1, 117.0, 116.6, 73.9, 73.6, 56.9, 50.7, 50.6, 39.0, 38.7, 29.5, 27.1, 15.6, 14.2.

7.4.15 Synthese von (R,R)-Pseudoephedrin-(R)-allylglycinamid

Die Synthese der Titelverbindung erfolgt analog der Synthese des (S,S)-Pseudoephedrin-(S)-allylglycinamids (S,S,S-**183**). Ausgehend von 10 g (35.7 mmol) (R,R)-Pseudoephedringlycinamidhydrat (R,R-**174**) werden nach zweimaligem Umkristallisieren (keine Flash-Chromatographie zur vorherigen Reinigung nötig!), Filtrieren und Waschen mit Et₂O 6.3 g (24.1 mmol, MW=262.4 g/mol, 68%) der Titelverbindung (R,R,R-**183**) als gelbliche Nadeln erhalten.

ESI-MS: m/z = 263.1 (20, [m+H]⁺), 285.1 (45, [m+Na]⁺).

¹H-NMR (250 MHz, D₆-DMSO): δ (ppm) = 7.35-7.22 (m, 5H, Ar), 5.86-5.69 (m, 1H), 5.091-4.97 (m, 2H), 4.62-4.52 (m, 2H), 4.05-3.99 (m, 1H), 3.64-3.55 (m, 2H), 2.86 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 2.43-2.00 (m, 3H), 0.93 (d, 3H, ³J = 6.6 Hz), 0.79 (d, 3H, ³J = 6.3 Hz).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 174.9, 174.7, 143.7, 143.6, 136.6, 135.5, 128.3, 128.1, 127.6, 127.4, 127.1, 117.0, 116.6, 73.9, 73.6, 56.9, 50.7, 50.6, 39.0, 38.7, 29.5, 27.1, 15.6, 14.2.

7.4.16 Synthese von (R)-(9H-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-amino-4-pentensäure (D-154)

Zu einer Lösung von 2 g (7.6 mmol) (R,R)-Pseudoephedrin-(R)-allylglycinamid (R,R,R-**183**) in 60 mL H_2O werden 7.7 mL (15.2 mmol, 2 eq.) 2M NaOH gegeben und 90 min refluxiert. Nach dem Abkühlen werden 100 mL Wasser zugegeben, zweimal mit 50 mL DCM extrahiert, die organischen Phasen mit Wasser extrahiert, die vereinten wässrigen Phasen erneut mit DCM gewaschen und die wässrige Phase bei 0 °C mit 200 mL Dioxan, 1.3 g NaHCO_3 (15.2 mmol) und 2.17 g (8.4 mmol) Fmoc-Cl versetzt, eine Stunde bei 0 °C und weitere zwei Stunden bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 100 mL $\text{Et}_2\text{O}/\text{EE}$ (1:1, v/v) extrahiert, die organische Phase mit 2%iger wässriger NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinten wässrigen Phasen werden mit 1M wässriger HCl auf pH=1 angesäuert und mit zweimal 100 mL EE extrahiert, die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und im HV zur Trockne konzentriert. Nach Umkristallisation aus EE/Hexan (1:2, v/v), Filtration, Waschen mit Hexan und Trocknung in HV erhält man 2.0 g (MW=337.4 g/mol, 5.9 mmol, 78%) der Titelverbindung (D-**154**) als weiße Nadeln.

^1H -NMR (250 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 7.92-7.29 (m, 10H, Fmoc- und NH), 5.87-5.70 (m, 1H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5.14-5.02 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4.30-4.18 (m, 3H, Fmoc), 4.07-3.98 (m, 1H, H^α), 2.54-2.30 (m, 2H, CH_2^β).

^{13}C -NMR (62.9 MHz, D_6 -DMSO): δ (ppm) = 173.4, 156.2, 144.0, 141.0, 134.5, 127.8, 127.3, 125.5, 120.5, 117.8, 65.8, 53.8, 46.8, 25.5.

7.4.16.1 Überprüfung der stereochemischen Identität von (R)-(9H-Fluoren-9-ylmethyl-oxycarbonyl)-2-amino-4-pentensäure (D-154)

Die Überprüfung der stereochemischen Identität der Titelverbindung D-154 erfolgt durch Kupplung nach *AAV6* an das harzgebundene Peptid H-L-His(Trt)-L-Trp(Boc)-OH, Abspaltung nach *AAV8* und HPLC Analyse des gebildeten Peptids. Die beiden zu erwartenden Diastereomere sind im Fall racemischer (9H-Fluoren-9-ylmethyloxy-carbonyl)-2-amino-4-pentensäure basisliniengetrennt! Die Analyse des Peptids Fmoc-D-Alg-L-His(Trt)-L-Trp(Boc)-OH ergibt für die Titelverbindung einen ee größer 99%.

ESI-MS: $m/z = 1003.4$ (14, $[m+H]^+$), 1025.5 (7, $[m+Na]^+$).

7.4.17 Synthese von N-(9H-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-N-(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-Glycin (283)

Eine Lösung von 855.6 mg (11.4 mmol) Glycin in 20 mL Wasser wird mit 2M wässriger NaOH auf pH=9 eingestellt, 1.7 g (11.4 mmol) 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (**281**) zugegeben, der pH auf 9-9.5 eingestellt und bei konstantem pH-Wert (nachregulieren!) zwei Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wird auf 0 °C gekühlt und innerhalb von 20 min 15 mL einer 0.76M wässrigen Lösung (11.4 mmol, 1 eq., stabilisiert mit einigen Tropfen 2 M wässriger NaOH) NaBH₄ zugegeben und eine Stunde gerührt. Anschließend wird mit 2 M wässriger HCl der pH auf 6 eingestellt, wobei eine Temperatur von 20 °C nicht überschritten wird. Die Suspension wird über Nacht bei 4 °C gelagert und der ausgefallene weiße Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im HV getrocknet, wobei 1.62 g (MW=211.2 g/mol, 7.7 mmol, 68%) des ungereinigten N-(2-Hydroxy-4-methoxy)-glycins (**282**) als weißer Feststoff erhalten werden.

ESI-MS: $m/z = 211.8$ (15, $[m+H]^+$), 444.8 (6, $[2m+Na]^+$), 675.3 (16, $[3m+K]^+$).

Zu einer Suspension von 1.62 g (7.7 mmol) *N*-(2-Hydroxy-4-methoxy)-glycin (**282**) in 30 mL abs. DCM werden 7.9 mL DIPEA (6 eq.) und 5.7 mL (9.5 eq.) TMS-Cl getropft und 3 h bei RT gerührt. Die Lösung wird auf $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, 8.5 mL (1eq.) einer 0.89 M Lösung von Fmoc-Cl in abs. DCM werden innerhalb von 10 min zugegeben, die orangene Lösung auf RT erwärmt und 35 mL 2M wässrige HCl zugegeben. Die organische Phase wird fünfmal mit 2M wässriger HCl gewaschen und das Lösungsmittel im HV entfernt, wobei ein oranges viskoses Öl erhalten wird. Dieses wird durch Flash-Chromatographie (100 g Kieselgel, Stufengradient Hexan/EE/HOAc 3:1:1%, v/v/v, dann EE/1% HOAc v/v) gereinigt und man erhält nach Trocknung im HV 832.8 mg (MW=433.5 g/mol, 1.9 mmol, 25%) der Titelverbindung (**283**) als orangenen Feststoff.

ESI-MS: $m/z = 434.2$ (9, $[m+H]^+$), 456.2 (29, $[m+Na]^+$), 905.1 (10, $[2m+K]^+$)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 7.88-7.28 (m, 8H, Fmoc-*H*), 6.95-6.19 (m, 3H, Ar-*H*), 4.43-4.18 (m, 3H, Fmoc-*H*), 4.30 (d, 2H, $^3J = 10.6$ Hz, Ar- CH_2 -), 3.83 (d, 2H, $^3J = 11.4$ Hz, H^α Gly), 3.65 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$).

7.4.18 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-*N*-(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-Alanin (**285**)

Die Synthese der Titelverbindung erfolgt analog der Darstellung von *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-*N*-(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-Glycin (**283**) ausgehend von 1.0 g (11.4 mmol) Alanin. Es werden 916.4 mg (MW=447.5 g/mol, 2.0 mmol, 18%) der Titelverbindung (**285**) als orangener Schaum erhalten.

ESI-MS: $m/z = 470.1$ (100, $[m+Na]^+$), 916.6 (57, $[2m+Na]^+$), 1364.1 (14, $[3m+Na]^+$)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 7.85-7.28 (m, 8H, Fmoc-*H*), 6.76-6.25 (m, 3H, Ar-*H*), 4.37-4.12 (m, 6H, Fmoc-, Benzyl- und Gly- H^α), 3.68 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 1.20 (d, 3H, $^3J = 7.1$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}$).

7.4.19 Synthese von Fmoc-Phe-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (**288**)

Zu einer Suspension von 5 g (9.0 mmol) Fmoc-Phenylalaninpentafluorphenolester (**286**) in 80 mL Aceton wird eine Lösung aus 2.8 g (27.0 mmol, 3eq.) Serin und 10 mL 10%iger wässriger Na_2CO_3 Lösung (w/v) getropft und 5h gerührt. Die Suspension wird unter Eiskühlung mit konz. wässriger HCl auf pH=1 angesäuert, am Rotationsverdampfer auf die Hälfte des Volumens eingengt und mit zweimal 100 mL EE extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Wasser und NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im HV entfernt. Der resultierende weiße Feststoff wird durch Flash-Chromatographie (400 g Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 mit 1% HOAc, v/v/v) gereinigt und man erhält nach Trocknung im HV 3.9 g (MW=474.5 g/mol, 8.2 mmol, 91%) Fmoc-Phe-Ser-OH (**287**) als weißen Feststoff.

ESI-MS: m/z = 474.9 (67, $[\text{m}+\text{H}]^+$), 497.1 (100, $[\text{m}+\text{Na}]^+$), 948.9 (64, $[\text{2m}+\text{H}]^+$), 970.8 (73, $[\text{2m}+\text{Na}]^+$), 986.9 (85, $[\text{2m}+\text{K}]^+$).

Zur Cyclisierung werden 5.3 g (11.2 mmol) Fmoc-Phe-Ser-OH (**287**) in 250 mL abs. THF mit 650.0 mg (2.6 mmol) Pyridinium-*p*-Toluolsulfonat und 10 mL (8.5 g, 81.6 mmol, 7.3 eq.) 2,2-Dimethoxypropan mit Molsieb(4Å)-*bypass* 10 h refluxiert. Nach dem Erkalten werden 550.0 μL (4 mmol) TEA zugegeben und zu Trockne eingedampft. Der gelbliche Feststoff wird in 150 mL EE aufgenommen, dreimal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im HV entfernt und der resultierende gelbe Schaum durch Flash-Chromatographie (400 g Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 mit 1% HOAc, v/v/v) gereinigt. Nach Trocknung im HV werden 4.2 g (MW=514.6 g/mol, 8.2 mmol, 73%) Fmoc-Phe-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (**288**) als weißer Schaum erhalten.

ESI-MS: m/z = 514.9 (14, $[\text{m}+\text{H}]^+$), 537.1 (100, $[\text{m}+\text{Na}]^+$), 1028.7 (6, $[\text{2m}+\text{H}]^+$), 1051.0 (49, $[\text{2m}+\text{Na}]^+$), 1067.1 (61, $[\text{2m}+\text{K}]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 7.89-7.17 (m, 14H, Fmoc-, Ar- und NHCO), 4.38-3.83 (m, 7H, Fmoc-, $H^\beta H^\alpha\text{Ser}$ und $H^\alpha\text{Phe}$), 3.01-2.80 (m, 2H, $H^\beta\text{Phe}$), 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.39 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) = 171.7, 168.6, 155.7, 144.0, 140.8, 137.3, 129.6, 128.3, 127.8, 127.2, 126.7, 125.6, 120.2, 95.6, 66.5, 66.0, 58.9, 55.0, 46.7, 37.0, 25.4, 23.1.

7.4.20 Synthese des geschützten EmrE₁₈₋₂₉-Fragments H-Thr(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Leu-Met- Lys(Boc)-Phe-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-Glu(*O**t*Bu)-Gly-Phe-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-NH₂ (293)

Ausgehend von 100 mg Sieber-Amidharz (Belegungsdichte 0.62 mmol/g Harz) wird das Peptid nach *AAV6* synthetisiert, wobei Doppelkupplungen durchgeführt werden. Das Pseudoprolindipeptid Fmoc-Phe-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH (**288**) wird mittels Einfachkupplung und verlängerter Reaktionszeit von zwei Stunden an das Peptid gekuppelt. Das *N*-terminale Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH wird mit je einer Einfachkupplung mit TBTU/HOBt/DIPEA und HATU/HOAt/Collidin an die Peptidkette angekuppelt, die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und das geschützte Peptid nach *AAV9* vom Harz abgespalten. Nach semipräparativer RP-HPLC und zweimaligem Lyophilisieren aus Dioxan werden 85.5 mg (MW=2047.7, 41.8 μmol , 32%) des geschützten Peptids **293** als weißes Pulver erhalten.

ESI-MS: m/z = 862.2 (82, $[\text{m-pmc-boc}+2\text{Na}]^{2+}$), 890.3 (64, $[\text{m-pmc}+2\text{H}]^{2+}$), 1046.5 (37, $[\text{m}+2\text{Na}]^{2+}$), 1948.3 (4, $[\text{m-boc}+\text{H}]^+$).

7.4.21 Synthese des geschützten EmrE₁₋₁₇-Fragments Boc-Met-Asn(Trt)-Pro-Tyr(*t*Bu)-Ile-Tyr(*t*Bu)-Leu-Gly-Gly-Ala(*N*-Hmb)-Ile-Leu-Ala-Glu(*O**t*Bu)-Val-Ile-Gly-OH (292)

Ausgehend von 600 mg TentaGel Trt S Harz (Belegungsdichte 0.20 mmol/g Harz) wird das Peptidylharz Fmoc-Gly-Ala(*N*-Hmb)-Ile-Leu-Ala-Glu(*O**t*Bu)-Val-Ile-Gly-

TrtTG (Fmoc-**291**) nach AAV6 synthetisiert und die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe zweimal eine Stunde mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP (v/v) gerührt und anschließend gewaschen. Dann wird nach AAV6 mit 1.2 eq. Boc-Met-Asn(Trt)-Pro-Tyr(*t*Bu)-Ile-Tyr(*t*Bu)-Leu-Gly-OH (**272**) mittels Aktivierung durch TBTU/HOBt/DIPEA in NMP (c=0.03M!) 15 h gekuppelt, gewaschen, dreimal 30 min mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP (v/v) gerührt und erneut gewaschen. Das Peptid (**292**) wird dreimal 15 min mit 20% HFIP/DCM (v/v) abgespalten, dreimal mit 25% TFE/CHCl₃ gewaschen und die Lösungsmittel im HV entfernt. Es werden 240 mg des rohen Peptids **292** als gelber Lack erhalten.

Das rohe Peptid **292** wird in DMSO gelöst, in Mengen von 10-20 mg pro Injektion mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt und zweimal aus Dioxan lyophilisiert. Es werden 101.4 mg (MG=2441.1, 41.5 μmol, 35%) des geschützten Peptids **292** als weißes Pulver erhalten.

ESI-MS: $m/z = 1221.5$ (27, [m+2H]²⁺), 1232.0 (28, [m+H+Na]²⁺), 1240.2 (100, [m+H+K]²⁺), 1243.2 (42, [m+2Na]²⁺), 1251.2 (36, [m+Na+K]²⁺).

MALDI-TOF: $m/z = 2462.1$ [448 a.i., [m+Na]⁺], 2478.0 (261 a.i., [m+K]⁺).

7.4.22 Synthese des geschützten EmrE₁₋₂₉-Fragments Boc-Met-Asn(Trt)-Pro-Tyr(*t*Bu)-Ile-Tyr(*t*Bu)-Leu-Gly-Gly-Ala(*N*-Hmb)-Ile-Leu-Ala-Glu(*O**t*Bu)-Val-Ile-Gly-Thr(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Leu-Met-Lys(Boc)-Phe-Ser(Ψ^{Me,Me}pro)-Glu(*O**t*Bu)-Gly-Phe-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-NH₂

Zu 10.0 mg Boc-Met-Asn(Trt)-Pro-Tyr(*t*Bu)-Ile-Tyr(*t*Bu)-Leu-Gly-Gly-Ala(*N*-Hmb)-Ile-Leu-Ala-Glu(*O**t*Bu)-Val-Ile-Gly-OH (**292**, 4.1 μmol) werden 100 μL einer Lösung von 6.69 mg HOObt (41 μmol, 10 eq.) in 1 mL CHCl₃/TFE (3:1, v/v) und 100 μL einer Lösung von 7.85 mg EDCI HCl (41 μmol, 10 eq.) in 1 mL CHCl₃/TFE (3:1, v/v) gegeben, kurz geschüttelt und die Lösung nach Zugabe von 110 mL Collidin (0.8 mmol, 20 eq.) zu 8.0 mg H-Thr(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Leu-Met-Lys(Boc)-Phe-Ser(Ψ^{Me,Me}pro)-Glu(*O**t*Bu)-Gly-Phe-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-NH₂ (**293**, 3.9 mmol,

0.95 eq.) gegeben und 18 h bei RT gerührt. Anschliessend werden die LM am HV abdestilliert und zweimal aus Dioxan lyophilisiert.

Eine analytische Untersuchung ist mittels massenspektroskopischer Methoden nicht möglich, da das geschützte Produkt weder in ESI noch MALDI-TOF zu ionisieren ist.

7.4.23 Synthese des teilentschützten EmrE₁₋₂₉-Fragments H-Met(O)-Asn-Pro-Tyr-Ile-Tyr-Leu-Gly-Gly-Ala-Ile-Leu-Ala-Glu-Val-Ile-Gly-Thr-Thr-Leu-Met(O)-Lys-Phe-Ser-Glu-Gly-Phe-Thr-Arg-NH₂ (294)

Das rohe Kupplungsprodukt wird mit 5 mL TFA/TIPS/Wasser (90:7:3, v/v/v) versetzt und 2 h gerührt. Anschliessend wird im HV getrocknet, zweimal aus Dioxan lyophilisiert und das Rohprodukt massenspektroskopisch untersucht.

ESI-MS: $m/z = 1075.6$ (100, $[m+3H]^{3+}$), 1612.5 (65, $[m+2H]^{2+}$).

MALDI-TOF: $m/z = 3223.0$ [1100 a.i., $[m+H]^+$], 3245.1 (220 a.i., $[m+Na]^+$).

7.4.24 Synthese des entschützten EmrE₁₋₂₉-Fragments H-Met-Asn-Pro-Tyr-Ile-Tyr-Leu-Gly-Gly-Ala-Ile-Leu-Ala-Glu-Val-Ile-Gly-Thr-Thr-Leu-Met-Lys-Phe-Ser-Glu-Gly-Phe-Thr-Arg-NH₂ (275)

Etwa 10% des rohen, H-EmrE₁₋₂₉[Met^{1,21}(O)]-NH₂-Fragments (**294**) aus der vorherigen Reaktion wird in 950 μ L Wasser/MMA/HOAc (10:8:1, v/v/v) gelöst und 3 d bei 40 °C geschüttelt. Anschliessend wurde erfolglos versucht, das Reduktionsmittel am HV-Rotationsverdampfer abzudestillieren. Das resultierende Öl wurde auf eine *Isolute SPE* Säule (10 mL XL, 500 mg RP-C18-EC Kieselgel) aufgetragen (Konditionierung mit einmal 10 mL Wasser/ACN, 9:1, v/v) und innerhalb von 30 min. abgesaugt. Nach waschen mit 2.5 mL Wasser/ACN (9:1, v/v) wird mit 5 mL ACN/Wasser/TFA (9:1, v/v) eluiert und im Eluat massenspektroskopisch das Produkt **275** nachgewiesen.

ESI-MS: $m/z = 1597.3$ (78, $[m+2H]^{2+}$), 1634.6 (100, $[m+2K]^{2+}$).

Der verbleibende Rest des Reaktionsproduktes wurde mit 500 μL DMSO und 1000 μL ACN verdünnt, filtriert und versucht, durch semipräparative RP-HPLC zu reinigen. Einzig eine Fraktion enthielt laut ESI-MS das gesuchte Produkt **275**, allerdings in nicht isolierbarer Menge.

8 Literatur

- [1] S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1127-1152.
- [2] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2865-2869.
- [3] F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 2288-2337.
- [4] R. M. Freidinger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 395-406.
- [5] J. C. Way, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 40-46.
- [6] Z. Guo, D. Zhou, P. G. Schultz, *Science* **2000**, 288, 2042-2045.
- [7] A. G. Cochran, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 85-94.
- [8] E. Appella, E. A. Robinson, S. J. Ullrich, M. P. Stoppelli, A. Corti, G. Cassani, F. Blasi, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 4437-4440.
- [9] M. Bürgle, M. Koppitz, C. Riemer, H. Kessler, B. König, U. H. Weidle, J. Kellermann, F. Lottspeich, H. Graeff, M. Schmitt, L. Goretzki, U. Reuning, O. G. Wilhelm, V. Magdolen, *Biol. Chem.* **1997**, 378, 231-237.
- [10] P. A. Andreasen, L. Kjøller, L. Cristensen, M. J. Duffy, *Int. J. Cancer* **1997**, 72, 1-22.
- [11] P. A. Andreasen, R. Egelund, H. H. Petersen, *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, 57, 25-40.
- [12] A. P. Mazar, *Anti-Cancer Drugs* **2001**, 12, 387-400.
- [13] M. Schmitt, O. G. Wilhelm, U. Reuning, A. Krüger, N. Harbeck, E. Lengyel, H. Graeff, B. Gänsbacher, H. Kessler, M. Bürgle, J. Stürzebecher, S. Sperl, V. Magdolen, *Fibrinol. Proteol.* **2000**, 14, 114-132.
- [14] M. Bürgle, *Dissertation* **1998**, TU München.
- [15] M. Raderer, W. Scheithauer, *Cancer* **1993**, 72, 3553-3563.
- [16] H. Nikaido, *Science* **1994**, 264, 382-388.
- [17] H. Yerushalmi, M. Lebendiker, S. Schuldiner, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 6856-6863.
- [18] M. Schwaiger, M. Lebendiker, H. Yerushalmi, M. Coles, A. Gröger, C. Schwarz, S. Schuldiner, H. Kessler, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 254, 610-619.
- [19] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie* **1992**, 1100-1193.

- [20] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [21] E. Ruoslahti, *Sci. Am.* **1996**, *275*, 72-77.
- [22] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Wiley-VCH, Weinheim* **1995**, 1489-1506.
- [23] O. G. Wilhelm, U. Reuning, F. Jänicke, M. Schmitt, H. Graeff, *Onkologie* **1994**, *17*, 358-366.
- [24] K. Danø, P. A. Andreasen, J. Grøndahl-Hansen, P. Kristensen, L. S. Nielsen, L. Skriver, *Adv. Cancer Res.* **1985**, *44*, 139-266.
- [25] E. Ruoslahti, *Adv. Cancer Res.* **1999**, *76*, 1-20.
- [26] J.-P. Belloq, M.-P. Chenard-Neu, N. Rouyer, C. Wolf, P. Chambon, P. Basset, *Prospects in Diagnosis and Treatment of Breast Cancer* **1994**, (Hrsg.: M. Schmitt, H. Graeff, G. Kindermann), 89-97.
- [27] D. R. Edwards, G. Murphy, *Nature* **1998**, *394*, 527-528.
- [28] M. Johnsen, L. R. Lund, J. Rømer, K. Almholte, K. Danø, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 667-671.
- [29] M. Schmitt, F. Jaenicke, H. Graeff, *Fibrinolysis* **1992**, *6*, 3-26.
- [30] W. G. Stetler-Stevenson, L. A. Liotta, D. E. Kleiner, Jr., *FASEB J.* **1993**, *7*, 1434-1441.
- [31] B. F. Sloane, *Sem. Cancer Biol.* **1990**, *1*, 137-152.
- [32] H. Rochefort, *Breast Cancer Res. Treat.* **1990**, *16*, 3-13.
- [33] J. E. Koblinski, M. Ahram, B. F. Sloane, *Clin. Chim. Acta* **2000**, *291*, 113-135.
- [34] N. Johansson, M. Ahonen, V. M. Kahari, *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 5-15.
- [35] K. Danø, J. Rømer, B. S. Nielsen, S. Bjørn, C. Pyke, J. Rygaard, L. R. Lund, *APMIS* **1999**, *107*, 120-127.
- [36] N. Chucholowski, M. Schmitt, L. Goretzki, E. Schueren, N. Moniwa, U. Weidle, M. Kramer, B. Wagner, F. Jaenicke, H. Graeff, *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, *20*, 208-216.
- [37] E. F. Plow, D. E. Freaney, L. A. Miles, *J. Cell Biol.* **1986**, *103*, 2411-2420.
- [38] V. Ellis, N. Behrendt, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12752-12758.
- [39] Y. Sato, R. Tsuboi, R. Lyons, H. Moses, D. B. Rifkin, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 757-763.
- [40] L. E. Odekon, F. Blasi, D. B. Rifkin, *J. Cell. Physiol.* **1994**, *158*, 398-407.

- [41] L. Naldini, E. Vigna, A. Bardelli, A. Follenzi, F. Galimi, P. M. Comoglio, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 603-611.
- [42] T. C. Wun, L. Ossowski, E. Reich, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7262-7268.
- [43] M. P. Stoppelli, A. Corti, A. Soffientini, G. Cassani, F. Blasi, R. K. Assoian, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 4939-4943.
- [44] W. A. Günzler, G. J. Steffens, F. Oetting, G. Buse, L. Flohe, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1982**, *363*, 133-141.
- [45] G. J. Steffens, W. A. Günzler, F. Oetting, E. Frankus, L. Flohe, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1982**, *363*, 1043-1058.
- [46] P. H. A. Quax, J. M. Grimbergen, M. Lansink, A. H. F. Bakker, M.-C. Blatter, D. Belin, V. W. M. Van Hinsbergh, J. H. Verheijen, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **1998**, *18*, 693-701.
- [47] A. P. Hansen, A. M. Petros, R. P. Meadows, D. G. Nettlesheim, A. P. Mazar, E. T. Olejniczak, R. X. Xu, T. M. Pederson, J. Henkin, S. W. Fesik, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4847-4864.
- [48] X. Li, R. A. G. Smith, C. M. Dobson, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9562-9571.
- [49] R. W. Stephens, A. M. Bokman, H. T. Myöhänen, T. Reisberg, H. Tapiovaara, N. Pedersen, J. Grøndahl-Hansen, M. Llinas, A. Vaheri, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7572-7579.
- [50] W. Strassburger, A. Wollmer, J. E. Pitts, I. D. Glover, I. J. Tickle, T. L. Blundell, G. J. Steffens, W. A. Guenzler, F. Oetting, L. Flohe, *FEBS Lett.* **1983**, *157*, 219-223.
- [51] G. Spraggon, C. Phillips, U. K. Nowak, C. P. Ponting, D. Saunders, C. M. Dobson, D. I. Stuart, E. Y. Jones, *Structure (London)* **1995**, *3*, 681-691.
- [52] S. Sperl, U. Jacob, N. A. De Prada, J. Stürzebecher, O. G. Wilhelm, W. Bode, V. Magdolen, R. Huber, L. Moroder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 5113-5118.
- [53] H. Kobayashi, M. Schmitt, L. Goretzki, N. Chucholowski, J. Calvete, M. Kramer, W. A. Gunzler, F. Jänicke, H. Graeff, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 5147-5152.
- [54] L. Goretzki, M. Schmitt, K. Mann, J. Calvete, N. Chucholowski, M. Kramer, W. A. Gunzler, F. Jänicke, H. Graeff, *FEBS Lett.* **1992**, *297*, 112-118.

- [55] B. B. Wolf, J. Vasudevan, J. Henkin, S. L. Gonias, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16327-16331.
- [56] E. Koivunen, M. L. Huhtala, U. H. Stenman, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 14095-14099.
- [57] M. Schmitt, L. Goretzki, F. Jaenicke, J. Calvete, M. Eulitz, H. Kobayashi, N. Chucholowski, H. Graeff, *Biomed. Biochim. Acta* **1991**, *50*, 731-741.
- [58] J. D. Vassalli, D. Baccino, D. Belin, *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 86-92.
- [59] J. D. Vassalli, *Fibrinolysis* **1994**, *8*, 172-181.
- [60] N. Behrendt, M. Ploug, L. Patthy, G. Houen, F. Blasi, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7842-7847.
- [61] N. Behrendt, E. Rønne, K. Danø, *Biol. Chem.* **1995**, *376*, 269-279.
- [62] M. Ploug, N. Behrendt, D. Lober, K. Danø, *Sem. Thromb. Hemost.* **1991**, *17*, 183-193.
- [63] N. Behrendt, R. W. Stephens, *Fibrinol. Proteol.* **1998**, *12*, 191-204.
- [64] M. V. Cubellis, M. L. Nolli, G. Cassani, F. Blasi, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15819-15822.
- [65] E. Appella, E. A. Robinson, S. J. Ullrich, M. P. Stoppelli, A. Corti, G. Cassani, F. Blasi, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4437-4440.
- [66] F. Blasi, N. Behrendt, M. V. Cubellis, V. Ellis, L. R. Lund, M. T. Masucci, L. B. Møller, D. P. Olson, N. Pedersen, M. Ploug, E. Rønne, K. Danø, *Cell Differ. Dev.* **1990**, *32*, 247-253.
- [67] L. B. Møller, M. Ploug, F. Blasi, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *208*, 493-500.
- [68] G. Brunner, C. N. Metz, H. Nguyen, J. Gabilove, S. R. Patel, M. A. Davitz, D. B. Rifkin, E. L. Wilson, *Blood* **1994**, *83*, 2115-2125.
- [69] O. G. Wilhelm, S. Wilhelm, G. M. Escott, V. Lutz, V. Magdolen, M. Schmitt, D. B. Rifkin, E. L. Wilson, H. Graeff, G. Brunner, *J. Cell. Physiol.* **1999**, *180*, 225-235.
- [70] P. Kristensen, J. Eriksen, F. Blasi, K. Danø, *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 1763-1771.
- [71] S. A. Rabbani, N. Rajwans, A. Achbarou, K. K. Murthy, D. Goltzman, *FEBS Lett.* **1994**, *338*, 69-74.
- [72] C. Pyke, J. Eriksen, H. Solberg, B. S. Nielsen, P. Kristensen, L. R. Lund, K. Danø, *FEBS Lett.* **1993**, *326*, 69-74.

- [73] N. Behrendt, E. Rønne, M. Ploug, T. Petri, D. Løber, L. S. Nielsen, W. D. Schleuning, F. Blasi, E. Appella, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6453-6460.
- [74] A. L. Roldan, M. V. Cubellis, M. T. Masucci, N. Behrendt, L. R. Lund, K. Danø, E. Appella, F. Blasi, *EMBO J.* **1990**, *9*, 467-474.
- [75] M. Ploug, H. Rahbek-Nielsen, P. F. Nielsen, P. Roepstorff, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13933-13943.
- [76] L. B. Møller, J. J. Pöllänen, E. Rønne, N. Pedersen, F. Blasi, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11152-11159.
- [77] N. Chucholowski, M. Schmitt, P. Rettenberger, E. Schueren, N. Moniwa, L. Goretzki, O. G. Wilhelm, U. Weidle, F. Jaenicke, H. Graeff, *Fibrinolysis* **1992**, *6*, 95-102.
- [78] J. R. Casey, J. G. Petranka, J. Kottra, D. E. Fleenor, W. F. Rosse, *Blood* **1994**, *84*, 1151-1156.
- [79] J. Kratzschmar, B. Haendler, S. Kojima, D. B. Rifkin, W. D. Schleuning, *Gene* **1993**, *125*, 177-183.
- [80] G. Høyer-Hansen, E. Rønne, H. Solberg, N. Behrendt, M. Ploug, L. R. Lund, V. Ellis, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18224-18229.
- [81] M. Ploug, M. Kjalke, E. Rønne, U. Weidle, G. Høyer-Hansen, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 17539-17546.
- [82] I. P. Witz, *J. Cell. Biochem.* **2000**, 61-66.
- [83] N. Ohkura, S. Inoue, K. Ikeda, K. Hayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 1212-1218.
- [84] M. Ploug, V. Ellis, *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 163-168.
- [85] C. M. Fletcher, R. A. Harrison, P. J. Lachmann, D. Neuhaus, *Structure (London)* **1994**, *2*, 185-199.
- [86] R. Eshel, A. Zanin, O. Sagi-Assif, T. Meshel, N. Smorodinsky, O. Dwir, R. Alon, R. Brakenhoff, G. van Dongen, I. P. Witz, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 12833-12840.
- [87] T. P. Gumley, I. F. McKenzie, M. S. Sandrin, *Immunol. Cell Biol.* **1995**, *73*, 277-296.

- [88] L. S. Noel, B. R. Champion, C. L. Holley, C. J. Simmons, D. C. Morris, J. A. Payne, J. M. Lean, T. J. Chambers, G. Zaman, L. E. Lanyon, L. J. Suva, L. R. Miller, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3878-3883.
- [89] B. Kieffer, P. C. Driscoll, I. D. Campbell, A. C. Willis, P. A. van der Merwe, S. J. Davis, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4471-4482.
- [90] J. C. Dewan, G. A. Grant, J. C. Sacchettini, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13147-13154.
- [91] R. E. Oswald, M. J. Sutcliffe, M. Bamberger, R. H. Loring, E. Braswell, C. M. Dobson, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4901-4909.
- [92] H. Gårdsvoll, K. Danø, M. Ploug, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37995-38003.
- [93] M. Ploug, H. Rahbek-Nielsen, V. Ellis, P. Roepstorff, K. Danø, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12524-12534.
- [94] M. Ploug, S. Østergaard, L. B. L. Hansen, A. Holm, K. Danø, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3612-3622.
- [95] M. Ploug, S. Østergaard, A. Holm, C. Holst-Hansen, R. W. Stephens, K. Danø, *PCT Int. Appl.* **2000**, *WO 00/01802*, 1-75.
- [96] K. Bdeir, A. Kuo, A. P. Mazar, B. S. Sachais, W. Xiao, S. Gawlak, S. Harris, A. A.-R. Higazi, D. B. Cines, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28532-28538.
- [97] C. Rölz, *persönliche Mitteilung* **2000**.
- [98] B. Felding-Habermann, D. A. Cheresh, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, *5*, 864-868.
- [99] K. T. Preissner, D. Seiffert, *Thromb. Res.* **1998**, *89*, 1-21.
- [100] E. D. Sprengers, C. Kluft, *Blood* **1987**, *69*, 381-387.
- [101] F. España, A. Estelles, P. J. Fernandez, J. Gilabert, J. Sanchez-Cuenca, J. H. Griffin, *Thromb. Haemost.* **1993**, *70*, 989-994.
- [102] R. W. Carrell, P. E. Stein, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1996**, *377*, 1-17.
- [103] A. Gils, P. J. Declerck, *Thromb. Haemost.* **1998**, *80*, 531-541.
- [104] L. A. Erickson, M. H. Ginsberg, D. J. Loskutoff, *J. Clin. Invest.* **1984**, *74*, 1465-1472.
- [105] C. M. Hekman, D. J. Loskutoff, *Biochemistry* **1988**, *27*, 2911-2918.
- [106] T. C. Wun, E. Reich, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3646-3653.

- [107] P. J. Declerck, M. De Mol, M. C. Alessi, S. Baudner, E. P. Paques, K. T. Preissner, G. Mueller-Berghaus, D. Collen, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 15454-15461.
- [108] E. M. Salonen, A. Vaheri, J. Pöllänen, R. Stephens, P. Andreasen, M. Mayer, K. Danø, J. Gailit, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6339-6343.
- [109] K. Aertgeerts, H. L. De Bondt, C. De Ranter, P. J. Declerck, *J. Struct. Biol.* **1994**, *113*, 239-245.
- [110] R. Egelund, K. W. Rodenburg, P. A. Andreasen, M. S. Rasmussen, R. E. Guldborg, T. E. Petersen, *Biochemistry* **1998**, *37*, 6375-6379.
- [111] R. Egelund, T. E. Petersen, P. A. Andreasen, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 673-685.
- [112] S. L. Schousboe, R. Egelund, T. Kirkegaard, K. T. Preissner, K. W. Rodenburg, P. A. Andreasen, *Thromb. Haemost.* **2000**, *83*, 742-751.
- [113] R. Egelund, S. L. Schousboe, L. Sottrup-Jensen, K. W. Rodenburg, P. A. Andreasen, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *248*, 775-785.
- [114] M. Fa, F. Bergstrom, P. Hagglof, M. Wilczynska, L. B. A. Johansson, T. Ny, *Structure (London)* **2000**, *8*, 397-405.
- [115] E. K. O. Kruithof, J. D. Vassalli, W. D. Schleuning, R. J. Mattaliano, F. Bachmann, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11207-11213.
- [116] C. Genton, E. K. O. Kruithof, W. D. Schleuning, *J. Cell Biol.* **1987**, *104*, 705-712.
- [117] P. A. Andreasen, B. Georg, L. R. Lund, A. Riccio, S. N. Stacey, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1990**, *68*, 1-19.
- [118] F. M. Donovan, P. J. Vaughan, D. D. Cunningham, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17199-17205.
- [119] F. Blasi, M. Conese, L. B. Møller, N. Pedersen, U. Cavallaro, M. V. Cubellis, F. Fazioli, L. Hernandez-Marrero, P. Limongi, et al., *Fibrinolysis* **1994**, *8*, 182-188.
- [120] K. W. Rodenburg, L. Kjølner, H. H. Petersen, P. A. Andreasen, *Biochem. J.* **1998**, *329*, 55-63.
- [121] S. Stefansson, S. Muhammad, X.-F. Cheng, F. D. Battey, D. K. Strickland, D. A. Lawrence, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 6358-6366.

- [122] A. Nykjær, L. Kjøller, R. L. Cohen, D. A. Lawrence, B. A. Garni-Wagner, R. F. Todd, III, A.-J. van Zonneveld, J. Gliemann, P. A. Andreasen, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25668-25676.
- [123] Y. Koshelnick, M. Ehart, H. Stockinger, B. R. Binder, *Thromb. Haemost.* **1999**, *82*, 305-311.
- [124] A. Estreicher, J. Muehlhauser, J. L. Carpentier, L. Orci, J. D. Vassalli, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 783-792.
- [125] S. M. Kanse, C. Kost, O. G. Wilhelm, P. A. Andreasen, K. T. Preissner, *Exp. Cell Res.* **1996**, *224*, 344-353.
- [126] J. Samanen, A. Jonak, D. Rieman, T.-L. Yue, *Curr. Pharm. Des.* **1997**, *3*, 545-584.
- [127] Y. Wei, D. A. Waltz, N. C. Rao, R. J. Drummond, S. Rosenberg, H. A. Chapman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32380-32388.
- [128] G. Deng, S. A. Curriden, S. Wang, S. Rosenberg, D. J. Loskutoff, *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 1563-1571.
- [129] M. A. Horton, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29*, 721-725.
- [130] G. Høyer-Hansen, N. Behrendt, M. Ploug, K. Danø, K. T. Preissner, *FEBS Lett.* **1997**, *420*, 79-85.
- [131] K. Burridge, K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, C. Turner, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1988**, *4*, 487-525.
- [132] R. G. Sitrin, R. F. Todd, III, H. R. Petty, T. G. Brock, S. B. Schollenberg, E. Albrecht, M. R. Gyetko, *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 1942-1951.
- [133] T. Chavakis, S. M. Kanse, B. Yutzy, H. R. Lijnen, K. T. Preissner, *Blood* **1998**, *91*, 2305-2312.
- [134] D. A. Waltz, H. A. Chapman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14746-14750.
- [135] S. Stefansson, D. A. Lawrence, *Nature* **1996**, *383*, 441-443.
- [136] S. Stefansson, E. Petitclerc, M. K. K. Wong, G. A. McMahon, P. C. Brooks, D. A. Lawrence, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8135-8141.
- [137] T. Chavakis, S. M. Kanse, F. Lupu, H.-P. Hammes, W. Müller-Esterl, R. A. Pixley, R. W. Colman, K. T. Preissner, *Blood* **2000**, *96*, 514-522.

- [138] O. Shliom, M. Huang, B. Sachais, A. Kuo, J. W. Weisel, C. Nagaswami, T. Nassar, K. Bdeir, E. Hiss, S. Gawlak, S. Harris, A. P. Mazar, A. A.-R. Higazi, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 24304-24312.
- [139] H. T. Maecker, S. C. Todd, S. Levy, *FASEB J.* **1997**, *11*, 428-442.
- [140] K. T. Preissner, S. M. Kanse, A. E. May, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 621-628.
- [141] N. Busso, S. K. Masur, D. Lazega, S. Waxman, L. Ossowski, *J. Cell Biol.* **1994**, *126*, 259-270.
- [142] H. A. Chapman, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 714-724.
- [143] W. Xue, I. Mizukami, R. F. Todd, III, H. R. Petty, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1682-1689.
- [144] W. Xue, A. L. Kindzelskii, R. F. Todd, III, H. R. Petty, *J. Immunol.* **1994**, *152*, 4630-4460.
- [145] J. A. Aguirre Ghiso, K. Kovalski, L. Ossowski, *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 89-103.
- [146] M. Yebra, G. C. N. Parry, S. Stroemblad, N. Mackman, S. Rosenberg, B. M. Mueller, D. A. Cheresh, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29393-29399.
- [147] D. I. Simon, Y. Wei, L. Zhang, N. K. Rao, H. Xu, Z. Chen, Q. Liu, S. Rosenberg, H. A. Chapman, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10228-10234.
- [148] H. R. Petty, R. F. Todd, III, *Immunol. Today* **1996**, *17*, 209-212.
- [149] J. Bohuslav, V. Horejsi, C. Hansmann, J. Stoeck, U. H. Weidle, O. Majdic, I. Bartke, W. Knapp, H. Stockinger, *J. Exp. Med.* **1995**, *181*, 1381-1390.
- [150] A. L. Kindzelskii, M. M. Eszes, R. F. Todd, III, H. R. Petty, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 1777-1784.
- [151] Y. Wei, M. Lukashev, D. I. Simon, S. C. Bodary, S. Rosenberg, M. V. Doyle, H. A. Chapman, *Science* **1996**, *273*, 1551-1555.
- [152] H. A. Chapman, Y. Wei, D. I. Simon, D. A. Waltz, *Thromb. Haemostasis* **1999**, *82*, 291-297.
- [153] A. E. May, S. M. Kanse, L. R. Lund, R. H. Gisler, B. A. Imhof, K. T. Preissner, *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 1029-1037.
- [154] A. E. May, F.-J. Neumann, A. Schomig, K. T. Preissner, *Blood* **2000**, *96*, 506-513.

- [155] Y. Wei, X. Yang, Q. Liu, J. A. Wilkins, H. A. Chapman, *J. Cell Biol.* **1999**, *144*, 1285-1294.
- [156] V. Horejsi, K. Drbal, M. Cebecauer, J. Cerny, T. Brdicka, P. Angelisova, H. Stockinger, *Immunol. Today* **1999**, *20*, 356-361.
- [157] G. Pande, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 569-574.
- [158] W. F. White, G. H. Barlow, M. M. Mozen, *Biochemistry* **1966**, *5*, 2160-2169.
- [159] B. Åstedt, L. Holmberg, *Nature* **1976**, *261*, 595-597.
- [160] C. Tecimer, D. L. Doering, L. J. Goldsmith, J. S. Meyer, G. Abdulhay, J. L. Wittliff, *Gynecol. Oncol.* **2001**, *80*, 48-55.
- [161] J. A. Foekens, H. A. Peters, M. P. Look, H. Portengen, M. Schmitt, M. D. Kramer, N. Brünner, F. Jänicke, M. E. M.-v. Gelder, S. C. Henzen-Logmans, W. L. J. v. Putten, J. G. M. Klijn, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 636-643.
- [162] M. P. Look, J. A. Foekens, *APMIS*, *107*, 150-159.
- [163] U. Reuning, V. Magdolen, O. G. Wilhelm, K. Fischer, V. Lutz, H. Graeff, M. Schmitt, *Int. J. Oncol.* **1998**, *13*, 893-906.
- [164] M. M. Heiss, H. Allgayer, K. U. Gruetzner, I. Funke, R. Babic, K.-W. Jauch, F. W. Schildberg, *Nature. Med.* **1995**, *1*, 1035-1039.
- [165] K. Danø, N. Behrendt, N. Brünner, V. Ellis, M. Ploug, C. Pyke, *Fibrinolysis* **1994**, *8*, 189-203.
- [166] W. Hollas, F. Blasi, D. Boyd, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 3690-3695.
- [167] R. L. Cohen, X. P. Xi, C. W. Crowley, B. K. Lucas, A. D. Levinson, M. A. Shuman, *Blood* **1991**, *78*, 479-487.
- [168] H. Kobayashi, H. Ohi, H. Shinohara, M. Sugimura, T. Fujii, T. Terao, M. Schmitt, L. Goretzki, N. Chucholowski, F. Jänicke, H. Graeff, *Br. J. Cancer* **1993**, *67*, 537-544.
- [169] Y. H. Kook, J. Adamski, A. Zelent, L. Ossowski, *EMBO J.* **1994**, *13*, 3983-3991.
- [170] G. Liu, M. A. Shuman, R. L. Cohen, *Int. J. Cancer* **1995**, *60*, 501-506.
- [171] O. G. Wilhelm, M. Schmitt, S. Höhl, R. Senekowitsch, H. Graeff, *Clin. Exp. Metastasis* **1995**, *13*, 296-302.

- [172] Y. Go, S. K. Chintala, S. Mohanam, Z. Gokaslan, B. Venkaiah, R. Bjerkvig, K. Oka, G. L. Nicolson, R. Sawaya, J. S. Rao, *Clin. Exp. Metastasis* **1997**, *15*, 440-446.
- [173] S.-H. Ke, G. S. Coombs, K. Tachias, D. R. Corey, E. L. Madison, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20456-20462.
- [174] M. Renatus, W. Bode, R. Huber, J. Stürzebecher, M. T. Stubbs, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5445-5456.
- [175] E. Verner, B. A. Katz, J. R. Spencer, D. Allen, J. Hataye, W. Hruzewicz, H. C. Hui, A. Kolesnikov, Y. Li, C. Luong, A. Martelli, K. Radika, R. Rai, M. She, W. Shrader, P. A. Sprengeler, S. Trapp, J. Wang, W. B. Young, R. L. Mackman, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2753-2771.
- [176] S. J. Tamura, M. I. Weinhouse, C. A. Roberts, E. A. Goldman, K. Masukawa, S. M. Anderson, C. R. Cohen, A. E. Bradbury, V. T. Bernardino, S. A. Dixon, M. G. Ma, T. G. Nolan, T. K. Brunck, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 983-987.
- [177] D. T. Eitzman, W. P. Fay, D. A. Lawrence, A. M. Francis-Chmura, J. D. Shore, S. T. Olson, D. Ginsburg, *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 2416-2420.
- [178] H. Gårdsvoll, A.-J. van Zonneveld, A. Holm, E. Eldering, M. van Meijer, K. Danø, H. Pannekoek, *FEBS Lett.* **1998**, *431*, 170-174.
- [179] Y. Guo, A. A. Higazi, A. Arakelian, B. S. Sachais, D. Cines, R. H. Goldfarb, T. R. Jones, H. Kwaan, A. P. Mazar, S. A. Rabbani, *FASEB J.* **2000**, *14*, 1400-1410.
- [180] R. J. Goodson, M. V. Doyle, S. E. Kaufman, S. Rosenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7129-7133.
- [181] M. Koppitz, *Dissertation* **1996**, *TU München*.
- [182] V. Magdolen, M. Bürgle, N. A. d. Prada, N. Schmiedeberg, C. Riemer, F. Schroeck, J. Kellermann, K. Degitz, O. G. Wilhelm, M. Schmitt, H. Kessler, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 1197-1205.
- [183] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, *Sens. Actuators, B* **1999**, *B54*, 3-15.
- [184] R. L. Rich, D. G. Myszka, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 54-61.
- [185] <http://www.biacore.com>, **2001**.

- [186] G. G. Nenninger, P. Tobiška, J. Homola, S. S. Yee, *Sens. Actuators, B* **2001**, *B74*, 145-151.
- [187] D. G. Myszka, R. L. Rich, *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, *3*, 310-317.
- [188] R. L. Rich, D. G. Myszka, *Biacore J.* **2001**, *1*, 8-11.
- [189] V. Magdolen, P. Rettenberger, M. Koppitz, L. Goretzki, H. Kessler, U. H. Weidle, B. König, H. Graeff, M. Schmitt, O. G. Wilhelm, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *237*, 743-751.
- [190] A. P. Hansen, A. M. Petros, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Biochemistry* **1994**, *33*, 15418-15424.
- [191] C. Riemer, *Dissertation* **1999**, TU München.
- [192] J. Boer, *persönliche Mitteilung* **1997**.
- [193] E. Fischer, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 2868-2877.
- [194] T. Curtius, *J. Prakt. Chem.* **1904**, *70*, 57-108.
- [195] M. Bergmann, *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 1192-1195.
- [196] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801-812.
- [197] G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *30*, 705-739.
- [198] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [199] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [200] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [201] E. Bayer, N. Clausen, C. Goldammer, B. Henkel, W. Rapp, L. Zhang, *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, ed. R. S. Hodges and J. A. Smith, ESCOM, Leiden **1994**, 40-43.
- [202] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.
- [203] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243-2266.
- [204] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [205] L. P. Miranda, P. F. Alewood, *Biopolymers (Peptide Science)* **2000**, *55*, 217-226.
- [206] L. A. Carpino, D. Sadat-Aalae, H. G. Chao, R. H. DeSelms, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651-9652.

- [207] J.-N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther, G. Sennyey, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1303-1306.
- [208] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 268-274.
- [209] Y. M. Angell, C. García-Echeverría, D. H. Rich, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5981-5984.
- [210] H. Wenschuh, M. Beyermann, R. Winter, M. Bienert, D. Ionescu, L. A. Carpino, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5483-5486.
- [211] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, P. Henklein, H. Wenschuh, M. Bienert, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 241-244.
- [212] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 2024-2033.
- [213] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 2034-2040.
- [214] Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4307-4312.
- [215] S. Nozaki, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1999**, 54, 162-167.
- [216] N. A. Solé, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 5399-5403.
- [217] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739-2742.
- [218] J. P. Tam, C. R. Wu, W. Liu, J. W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6657-6662.
- [219] J. C. Spetzler, M. Meldal, *Lett. Pept. Sci.* **1997**, 3, 327-332.
- [220] H. Tamamura, T. Ishihara, H. Oyake, M. Imai, A. Otaka, T. Ibuka, R. Arakaki, H. Nakashima, T. Murakami, M. Waki, A. Matsumoto, N. Yamamoto, N. Fujii, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3, 495-500.
- [221] J. A. Camarero, E. Giralt, D. Andreu, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1137-1140.
- [222] R. Volkmer-Engert, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, *J. Pept. Res.* **1998**, 51, 365-369.
- [223] B. Kamber, A. Hartmann, K. Eisler, B. Riniker, H. Rink, P. Sieber, W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **1980**, 63, 899-915.
- [224] N. Fujii, T. Watanabe, A. Otaka, K. Bessho, I. Yamamoto, T. Noda, H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 4769-4776.
- [225] S. N. McCurdy, *Pept. Res.* **1989**, 2, 147-152.

- [226] E. V. Kudryavtseva, M. V. Sidorova, M. V. Ovchinnikov, Z. D. Bespalova, V. N. Bushuev, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 52-58.
- [227] B. Hargittai, G. Barany, *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 468-479.
- [228] T. J. Wallace, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2018-2021.
- [229] P. Sieber, B. Kamber, B. Riniker, W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 2358-2363.
- [230] P. White, *Pept., Proc. Am. Pept. Symp., 12th* **1992**, 537-538.
- [231] L. G. Pease, C. H. Niu, G. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 184-191.
- [232] H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 512-523.
- [233] H. Matter, G. Gemmecker, H. Kessler, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1995**, *45*, 430-440.
- [234] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1374-1389.
- [235] H. Kessler, H. Matter, G. Gemmecker, H.-J. Diehl, C. Isernia, S. Mronka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1994**, *43*, 47-61.
- [236] M. S. Lim, E. R. Johnston, C. A. Kettner, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1831-1838.
- [237] R. Chandrasekaran, A. V. Lakshminarayanan, U. V. Pandya, G. N. Ramachandran, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 14-27.
- [238] J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167-339.
- [239] C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436.
- [240] G. Nemethy, M. P. Printz, *Macromolecules* **1972**, *5*, 755-758.
- [241] B. H. Arison, R. Hirschmann, D. F. Veber, *Bioorg. Chem.* **1978**, *7*, 447-451.
- [242] M. A. Dechantsreiter, E. Plancker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.
- [243] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, M. Semmrich, B. Holzmann, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2586-2592.
- [244] C. Rölz, *Dissertation* **2000**, TU München.
- [245] G. Mueller, M. Gurrath, M. Kurz, H. Kessler, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1993**, *15*, 235-251.
- [246] P. N. Lewis, F. A. Momany, H. A. Scheraga, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211-229.

- [247] D. C. Rees, M. Lewis, W. N. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* **1983**, *168*, 367-387.
- [248] R. Hirschmann, W. Yao, B. Arison, L. Maechler, A. Rosegay, P. A. Sprengeler, A. B. Smith, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5637-5640.
- [249] R. Hirschmann, W. Yao, B. Arison, L. Maechler, A. Rosegay, P. A. Sprengeler, A. B. Smith, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7179-7202.
- [250] V. J. Hruby, *Life Sci.* **1982**, *31*, 189-199.
- [251] S. Saha, D. J. J. Waugh, P. Zhao, P. W. Abel, D. D. Smith, *J. Pept. Res.* **1998**, *52*, 112-120.
- [252] D. D. Smith, S. Saha, D. J. J. Waugh, P. W. Abel, *Pept. Proc. Am. Pept. Symp., 15th* **1999**, 597-598.
- [253] H. I. Mosberg, P. W. Schiller, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, *23*, 462-466.
- [254] R. C. Haaseth, K. Sobczyk-Kojiro, F. Medzihradsky, C. B. Smith, H. I. Mosberg, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 139-146.
- [255] H. I. Mosberg, A. L. Lomize, C. Wang, H. Kroona, D. L. Heyl, K. Sobczyk-Kojiro, W. Ma, C. Mousigian, F. Porreca, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4371-4383.
- [256] A. L. Lomize, I. D. Pogozeva, H. I. Mosberg, *Biopolymers* **1996**, *38*, 221-234.
- [257] H. I. Mosberg, *Biopolymers* **1999**, *51*, 426-439.
- [258] I. J. McFadyen, J. C. Ho, H. I. Mosberg, J. R. Traynor, *J. Pept. Res.* **2000**, *55*, 255-261.
- [259] M. J. Bogusky, A. M. Naylor, M. E. Mertzman, S. M. Pitzenberger, R. F. Nutt, S. F. Brady, C. D. Colton, D. F. Veber, *Biopolymers* **1993**, *33*, 1287-1297.
- [260] M. Sukopp, *persönliche Mitteilung*, **2001**.
- [261] A. Bachmair, D. Finley, A. Varshavsky, *Science* **1986**, *234*, 179-186.
- [262] H. Wenschuh, M. Beyermann, H. Haber, J. K. Seydel, E. Krause, M. Bienert, L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 405-410.
- [263] L. A. Thompson, J. Ellman, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9333-9336.
- [264] A. Varshavsky, A. Bachmair, D. Finley, D. K. Gonda, I. Wunning, *Biotechnol. Ser.* **1989**, *13*, 109-143.
- [265] V. Chau, J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda, A. Varshavsky, *Science* **1989**, *243*, 1576-1583.
- [266] H. Y. Min, L. V. Doyle, C. R. Vitt, C. L. Zandonella, J. R. Stratton-Thomas, M. A. Shuman, S. Rosenberg, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2428-2433.

- [267] P. Koolwijk, M. G. M. van Erck, W. J. A. de Vree, M. A. Vermeer, H. A. Weich, R. Hanemaaijer, V. W. M. van Hinsbergh, *J. Cell Biol.* **1996**, *132*, 1177-1188.
- [268] M. E. Kroon, P. Koolwijk, H. v. Goor, U. H. Weidle, A. Collen, G. v. d. Pluijm, V. W. M. v. Hinsbergh, *Am. J. Path.* **1999**, *154*, 1731-1742.
- [269] R. J. Tressler, P. A. Pitot, J. R. Stratton, L. D. Forrest, S. Zhuo, R. J. Drummond, S. Fong, M. V. Doyle, H. Y. Min, S. Rosenberg, *APMIS* **1999**, *107*, 168-173.
- [270] R. F. Nicosia, J. A. Madri, *Am. J. Path.* **1987**, *128*, 78-90.
- [271] R. F. Nicosia, A. Ottinetti, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **1990**, *26*, 119-128.
- [272] R. F. Nicosia, A. Ottinetti, *Lab. Investig.* **1990**, *63*, 115-122.
- [273] K. M. Malinda, M. Nomizu, M. Chung, M. Delgado, Y. Kuratomi, Y. Yamada, H. K. Kleinman, M. L. Ponce, *FASEB J.* **1999**, *13*, 53-62.
- [274] M. Hanks, W. Wurst, L. Anson-Cartwright, A. B. Auerbach, A. L. Joyner, *Science* **1995**, *269*, 679-682.
- [275] M. Goodman, J. Zhang, *Chemtracts Org. Chem.* **1997**, *10*, 629-645.
- [276] A. S. Ripka, D. H. Rich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 441-452.
- [277] N. Nishino, H. Mihara, N. Izumi, T. Fujimoto, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1295-1298.
- [278] J. M. McDonnell, D. Fushman, S. M. Cahill, B. J. Sutton, D. Cowburn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5321-5328.
- [279] R. N. Gursoy, D. S. S. Jois, T. J. Siahaan, *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 422-431.
- [280] P. W. Schiller, T. M.-D. Nguyen, J. Miller, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, *25*, 171-177.
- [281] A. J. Pearson, K. Lee, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7153-7160.
- [282] W. Zhang, J. W. Taylor, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2173-2176.
- [283] L. Yu, Y. Lai, J. V. Wade, S. M. Coutts, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6633-6636.
- [284] L. Yang, G. Moriello, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8197-8200.
- [285] C. Blackburn, S. A. Kates, *Innov. Perspect., Int. Symp., 5th* **1999**, 129-134.
- [286] F. Albericio, A. Frieden, M. Del Fresno, M. Royo, J. Alsina, K. J. Jensen, S. A. Kates, G. Barany, *Innov. Perspect., Int. Symp., 5th* **1999**, 7-10.

- [287] V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4508-4512.
- [288] J. P. Mayer, J. Zhang, S. Groeger, C.-F. Liu, M. A. Jarosinski, *Journal of Peptide Research* **1998**, *51*, 432-436.
- [289] M. Ueki, T. Ikeo, K. Hokari, K. Nakamura, A. Saeki, H. Komatsu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 829-838.
- [290] A. J. Souers, A. A. Virgilio, A. Rosenquist, W. Fenuik, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1817-1825.
- [291] Y. Feng, M. Pattarawarapan, Z. Wang, K. Burgess, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 121-124.
- [292] C. Park, K. Burgess, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 257-266.
- [293] K. Akaji, K. Teruya, M. Akaji, S. Aimoto, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2293-2303.
- [294] A. J. Zhang, K. Burgess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 634-636.
- [295] A. M. Elder, D. H. Rich, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1443-1446.
- [296] R. Streck, *J. Mol. Catal.* **1992**, *76*, 359-372.
- [297] J.-L. Hérisson, Y. Chauvin, *Makromol. Chem.* **1970**, *141*, 161-176.
- [298] M. Schuster, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2037-2056.
- [299] R. H. Grubbs, S. Chang, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4413-4450.
- [300] A. J. Phillips, A. D. Abell, *Aldrichimica Acta* **1999**, *32*, 75-89.
- [301] A. Fürstner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3012-3043.
- [302] P. Schwab, M. B. France, J. W. Ziller, R. H. Grubbs, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, *34*, 2039-2041.
- [303] B. Mohr, D. M. Lynn, R. H. Grubbs, *Organometallics* **1996**, *15*, 4317-4325.
- [304] K. C. Wallace, A. H. Liu, J. C. Dewan, R. R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4964-4977.
- [305] R. R. Schrock, J. S. Murdzek, G. C. Bazan, J. Robbins, M. DiMare, M. O'Regan, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3875-3886.
- [306] J. S. Kingsbury, J. P. A. Harrity, P. J. B. Jr., A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 791-799.
- [307] T. Weskamp, W. C. Schattenmann, M. Spiegler, W. A. Herrmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2490-2493.
- [308] J. Huang, E. D. Stevens, S. P. Nolan, J. L. Petersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2674-2678.

- [309] M. Scholl, T. M. Trnka, J. P. Morgan, R. H. Grubbs, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2247-2250.
- [310] J. Wagner, L. M. M. Cabrejas, C. E. Grossmith, C. Papageorgiou, F. Senia, D. Wagner, J. France, S. P. Nolan, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 9255-9260.
- [311] M. Ahmed, A. G. M. Barrett, D. C. Braddock, S. M. Cramp, P. A. Procopiou, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8657-8662.
- [312] Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3896-3898.
- [313] S. C. Schürer, S. Gessler, N. Buschmann, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3898-3901.
- [314] S. Kobayashi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 338-345.
- [315] T. J. Seiders, D. W. Ward, R. H. Grubbs, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3225-3228.
- [316] K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, S. Ninkovic, F. Sarabia, Y. He, D. Vourloumis, Z. Yang, T. Li, P. Giannakakou, E. Hamel, *Nature* **1997**, *387*, 268-272.
- [317] A. Fürstner, T. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7814-7821.
- [318] M. Schuster, J. Pernerstorfer, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1979-1980.
- [319] A. D. Piscopio, J. F. Miller, K. Koch, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7143-7146.
- [320] A. D. Piscopio, J. F. Miller, K. Koch, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2667-2670.
- [321] A. Fürstner, O. Guth, A. Rumbo, G. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11108-11113.
- [322] F. P. J. T. Rutjes, H. E. Shoemaker, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 677-680.
- [323] A. S. Ripka, R. S. Bohacek, D. H. Rich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 357-360.
- [324] S. Kotha, N. Sreenivasachary, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 257-260.
- [325] B. E. Fink, P. R. Kym, J. A. Katzenellenbogen, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4334-4344.
- [326] J. M. Dougherty, D. A. Probst, R. E. Robinson, J. D. Moore, T. A. Klein, K. A. Snelgrove, P. R. Hanson, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9781-9790.
- [327] S. Kotha, N. Sreenivasachary, K. Mohanraja, S. Durani, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1421-1423.
- [328] D. L. Boger, W. Chai, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3955-3970.

- [329] K. C. Nicolaou, R. Hughes, S. Y. Cho, N. Winssinger, H. Labischinski, R. Endermann, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3824-3843.
- [330] Q. Tang, J. R. Wareing, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1399-1401.
- [331] D. Lee, J. K. Sello, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10648-10649.
- [332] A. Fürstner, K. Langemann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9130-9136.
- [333] S. J. Miller, H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9606-9614.
- [334] J.-M. Campagne, L. Ghosez, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6175-6178.
- [335] W. P. D. Goldring, A. S. Hodder, L. Weiler, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4955-4958.
- [336] S. J. Miller, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5855-5856.
- [337] E. R. Jarvo, G. T. Copeland, N. Papaioannou, J. P. J. Bonitatebus, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11638-11643.
- [338] B. Kaptein, Q. B. Broxterman, H. E. Schoemaker, F. P. J. T. Rutjes, J. J. N. Veerman, J. Kamphuis, C. Peggion, F. Formaggio, C. Toniolo, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6567-6577.
- [339] E. N. Prabhakaran, V. Rahesh, S. Dubey, J. Iqbal, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 339-342.
- [340] T. D. Clark, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12364-12365.
- [341] T. D. Clark, J. M. Buriak, K. Kobayashi, M. P. Isler, D. E. McRee, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8962.
- [342] T. D. Clark, K. Kobayashi, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 782-792.
- [343] H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3281-3284.
- [344] C. E. Schafmeister, J. Po, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5891-5892.
- [345] J. F. Reichwein, B. Wels, J. A. W. Kruijtzter, C. Versluis, R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 3684-3687.
- [346] J. F. Reichwein, C. Versluis, R. M. J. Liskamp, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6187-6195.
- [347] J. F. Reichwein, R. M. L. Liskamp, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2335-2344.
- [348] M. Hirohashi, H. Tamamura, A. Otaka, T. Ibuka, R. Arakaki, H. Nakashima, N. Fujii, *Peptides, Proceed. 25th Europ. Pept. Symp.* **1998**, 662-663.

- [349] N. Fujii, M. Hirohashi, S. Oischi, M. Akaji, A. Omagari, A. Otaka, T. Ibuka, *Pept. Science, Proceed. 36th Japan. Pept. Symp.* **1999**, 193-194.
- [350] U. Kazmaier, S. Maier, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1763-1766.
- [351] U. Kazmaier, S. Maier, F. Z. Zumpe, *Synlett* **2000**, *11*, 1523-1535.
- [352] D. A. Evans, J. Bartroli, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 807-810.
- [353] W. Oppolzer, R. Moretti, S. Thomi, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6009-6010.
- [354] W. Oppolzer, P. Lienard, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 2572-2582.
- [355] Y. N. Belokon, *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64*, 1917-1924.
- [356] Y. N. Belokon, V. I. Tararov, V. I. Maleev, T. F. Savel'eva, M. G. Ryzhov, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 4249-4252.
- [357] D. Seebach, A. Fadel, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 1243-1250.
- [358] U. Schoellkopf, W. Hartwig, U. Groth, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 922-923.
- [359] M. J. Burk, J. E. Feaster, W. A. Nugent, R. L. Harlow, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10125-10138.
- [360] S. D. Debenham, J. Cossrow, E. J. Toone, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9153-9163.
- [361] G. P. Aguado, A. Alvarez-Larena, O. Illa, A. G. Moglioni, R. M. Ortuno, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 25-28.
- [362] U. T. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 107-117.
- [363] A. G. Myers, B. H. Yang, H. Chen, J. L. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9361-9362.
- [364] A. G. Myers, T. Yoon, J. L. Gleason, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4555-4558.
- [365] A. G. Myers, J. L. Gleason, T. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8488-8489.
- [366] A. G. Myers, J. L. Gleason, T. Yoon, D. W. Kung, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 656-673.
- [367] A. G. Myers, P. Schnider, S. Kwon, D. W. Kung, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3322-3327.
- [368] I. L. Karle, P. Balaram, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6747-6756.
- [369] G. Valle, M. Crisma, C. Toniolo, S. Polinelli, W. H. J. Boesten, H. E. Schoemaker, E. M. Meijer, J. Kamphuis, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 521-527.

- [370] C. Peggion, R. Flammengo, E. Mossel, Q. B. Broxterman, B. Kaptein, J. Kamphuis, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3589-3601.
- [371] A. Dehner, E. Planker, G. Gemmecker, Q. B. Broxterman, W. Bisson, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6678-6686.
- [372] M. Gander-Coquoz, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 224-236.
- [373] E. Altmann, K. Nebel, M. Mutter, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 800-806.
- [374] C. Cativiela, M. D. Diaz-de-Villegas, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 3517-3599.
- [375] F. Alonso, S. G. Davies, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 353-356.
- [376] F. Alonso, S. G. Davies, A. S. Elend, J. L. Haggitt, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 257-264.
- [377] F. Alonso, S. G. Davies, C. A. P. Smethurst, *J. Organomet. Chem.* **1998**, *553*, 463-468.
- [378] A. Srinivasan, R. R. Wilhelm, M. A. Schmidt, in *26th European Peptide Symposium* (Eds.: J. Martinez, J.-A. Fehrentz), EDK, Paris, Montpellier, **2000**, pp. 163-164.
- [379] S. A. Kates, S. B. Daniels, N. A. Sole, G. Barany, F. Albericio, *Pept.: Chem., Struct. Biol., Proc. Am. Pept. Symp., 13th* **1994**, 113-115.
- [380] H. D. Maynard, R. H. Grubbs, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4137-4140.
- [381] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218-9227.
- [382] N. J. Cusack, C. B. Reese, A. C. Risius, B. Roozpeikar, *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2157-2162.
- [383] P. Lacombe, B. Castagner, Y. Gareau, R. Ruel, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6785-6786.
- [384] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045-3046.
- [385] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [386] A. Dryland, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1986**, 125-137.
- [387] M. Beyermann, M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3745-3748.

- [388] V. Krchnak, Z. Flegelova, J. Vagner, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 450-454.
- [389] J. P. Tam, Y.-A. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12058-12063.
- [390] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957-990.
- [391] J. H. Adams, R. M. Cook, D. Hudson, V. Jammalamadaka, M. H. Lyttle, M. F. Songster, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3706-3716.
- [392] L. P. Miranda, P. F. Alewood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1181-1186.
- [393] M. Zeppezauer, S. Rawer, R. Hoffmann, A. Schoenberger, W. Rapp, E. Bayer, *Pept. 1990, Proc. Eur. Pept. Symp., 21st* **1991**, 847-848.
- [394] L. Zhang, W. Rapp, E. Bayer, *Pept. 1990, Proc. Eur. Pept. Symp., 21st* **1991**, 196-197.
- [395] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080.
- [396] J. T. Varkey, V. N. R. Pillai, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 577-581.
- [397] L. M. Varanda, M. T. M. Miranda, *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 102-108.
- [398] A. Thaler, D. Seebach, F. Cardinaux, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 628-643.
- [399] J. Vagner, P. Kocna, V. Krchnak, *Pept. Res.* **1991**, *4*, 284-288.
- [400] A. M. Bray, L. M. Lagniton, R. M. Valerio, N. J. Maeji, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9079-9082.
- [401] D. R. Englebretsen, P. F. Alewood, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8431-8434.
- [402] B. D. Larsen, A. Holm, *J. Pept. Res.* **1998**, *52*, 470-476.
- [403] C. T. Choma, G. T. Robillard, D. R. Englebretsen, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2417-2420.
- [404] M. Narita, N. Ohkawa, S. Nagasawa, S. Isokawa, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, *24*, 129-134.
- [405] M. Narita, K. Ishikawa, J. Y. Chen, Y. Kim, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, *24*, 580-587.
- [406] R. C. d. L. Milton, S. C. F. Milton, P. A. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6039-6046.
- [407] A. Steinschneider, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 49-57.
- [408] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 11065-11133.
- [409] K. Barlos, D. Gatos, *Biopolymers* **1999**, *51*, 266-278.
- [410] F. Rabanal, E. Giralt, F. Albericio, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1449-1458.

- [411] Y. Nishiuchi, H. Nishio, T. Inui, J. Bódi, T. Kimura, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 84-93.
- [412] D. Gatos, P. Athanassopoulos, C. Tzavara, K. Barlos, *Pept. 1998, Proc. Eur. Pept. Symp., 25th* **1999**, 146-147.
- [413] B. Riniker, A. Flörsheimer, H. Fretz, P. Sieber, B. Kamber, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9307-9320.
- [414] P. Athanassopoulos, K. Barlos, D. Gatos, O. Hatzi, C. Tzavara, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5645-5648.
- [415] H. Kuroda, Y.-N. Chen, T. Kimura, S. Sakakibara, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 294-299.
- [416] N. Nishino, H. Mihara, Y. Makinose, T. Fujimoto, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7007-7010.
- [417] Y. Nishiuchi, H. Nishio, T. Inui, J. Bodi, F. I. Tsuji, T. Kimura, S. Sakakibara, *Pept. 1998, Proc. Eur. Pept. Symp., 25th* **1999**, 36-37.
- [418] S. C. F. Milton, R. C. d. L. Milton, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 193-196.
- [419] J. P. Tam, Q. Yu, Z. Miao, *Biopolymers (Peptide Science)* **1999**, *51*, 311-332.
- [420] T. Johnson, M. Quibell, D. Owen, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 369-372.
- [421] T. Johnson, M. Quibell, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 463-466.
- [422] T. Haack, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1589-1592.
- [423] T. Wöhr, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3847-3848.
- [424] T. Johnson, M. Quibell, R. C. Sheppard, *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 11-25.
- [425] W. Zeng, P.-O. Regamey, K. Rose, Y. Wang, E. Bayer, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 273-279.
- [426] E. Nicolas, M. Pujades, J. Bacardit, E. Girald, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2317-2320.
- [427] C. Hyde, T. Johnson, D. Owen, M. Quibell, R. C. Sheppard, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 431-440.
- [428] A. B. Clippingdale, M. Macris, J. D. Wade, C. J. Barrow, *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 665-672.
- [429] R. B. Simmonds, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *47*, 36-41.
- [430] M. Quibell, W. G. Turnell, T. Johnson, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1745-1750.

- [431] M. Quibell, L. C. Packman, T. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11656-11668.
- [432] E. Oliveira, A. Miranda, F. Albericio, D. Andreu, A. C. M. Paiva, C. R. Nakaie, M. Tominaga, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 300-307.
- [433] W. R. Sampson, H. Patsiouras, N. J. Ede, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 403-409.
- [434] J. Howe, M. Quibell, T. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3997-4001.
- [435] L. P. Miranda, W. D. F. Meutermans, M. L. Smythe, P. F. Alewood, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5460-5468.
- [436] P. Dumy, M. Keller, D. E. Ryan, B. Rohwedder, T. Wöhr, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 918-925.
- [437] J. Travis, *Science* **1994**, *264*, 360-362.
- [438] E. Schneider, *Chem. Unserer Zeit* **2000**, *34*, 90-98.
- [439] C. A. Doige, G. F. Ames, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *47*, 291-319.
- [440] S. M. Simon, M. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 3497-3504.
- [441] M. Kavallari, *Anti-Cancer Drugs* **1997**, *8*, 17-25.
- [442] N. Firth, K. P. Ridgway, M. E. Byrne, P. D. Fink, L. Johnson, I. T. Paulsen, R. A. Skurray, *Gene* **1993**, *136*, 13-25.
- [443] H. Nikaido, *FEBS Lett.* **1994**, *346*, 55-58.
- [444] M. Midgley, *Microbiol. Sci.* **1987**, *4*, 125-127.
- [445] I. T. Arkin, W. P. Russ, M. Lebediker, S. Schuldiner, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7233-7238.
- [446] M. Bürgle, *persönliche Mitteilung*.
- [447] J. Offer, T. Johnson, M. Quibell, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 9047-9050.
- [448] R. A. Houghten, C. H. Li, *Peptides, Proc. 5th Am. Pept. Symp.* **1977**, 458-460.
- [449] J. Wijnholds, R. Evers, M. R. v. Leusden, C. A. A. M. Mol, G. J. R. Zaman, U. Mayer, J. H. Beijnen, M. v. d. Valk, P. Krimpenfort, P. Borst, *Nature Med.* **1997**, *3*, 1275-1279.