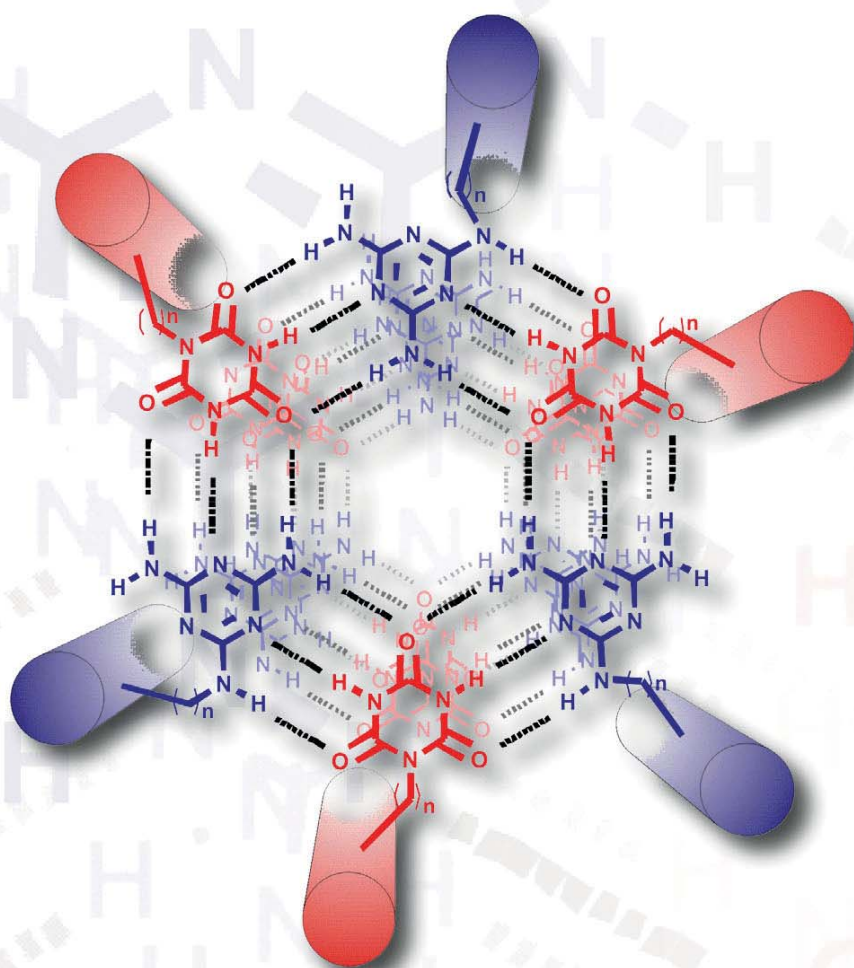


Selda Kabatas

Synthese Artifizierter Peptide zur Erzeugung von Supramolekularen Architekturen und zur Markierung von Biomolekülen



Cuvillier Verlag Göttingen

Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Synthese Artifizierter Peptide zur Erzeugung von Supramolekularen Architekturen und zur Markierung von Biomolekülen





SYNTHESE ARTIFIZIELLER PEPTIDE ZUR ERZEUGUNG VON SUPRAMOLEKULAREN ARCHITEKTUREN UND ZUR MARKIERUNG VON BIOMOLEKÜLEN

DISSERTATION

zur Erlangung
des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
"Doctor rerum naturalium"
der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm GAUSS -
Georg-August-University School of Science

vorgelegt von
Selda Kabatas
aus Göttingen

Göttingen 2015



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2016

Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2015

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2016

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2016

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9282-5

eISBN 978-3-7369-8282-6



Betreuungsausschluss

Prof. Dr. ULF DIEDERICHSEN (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen)

Prof. Dr. LUTZ ACKERMANN (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen)

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. ULF DIEDERICHSEN

(Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen)

Korreferent: Prof. Dr. LUTZ ACKERMANN

(Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen)

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. FRANC MEYER (Institut für Anorganische Chemie, Göttingen)

Prof. Dr. KONRAD KOSZINOWSKI (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen)

Prof. Dr. PHILIPP VANA (Institut für Physikalische Chemie, Göttingen)

Dr. INKE SIEWERT (Institut für Anorganische Chemie, Göttingen)

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2015



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2011 bis Juni 2015 am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. ULF DIEDERICHSEN angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. ULF DIEDERICHSEN, für die interessanten Themenstellungen, die gewährte wissenschaftliche Freiheit, die stetige Diskussionsbereitschaft sowie für die uneingeschränkte Unterstützung.



SYNTHESE ARTIFIZIELLER PEPTIDE ZUR ERZEUGUNG VON SUPRAMOLEKULAREN ARCHITEKTUREN UND ZUR MARKIERUNG VON BIOMOLEKÜLEN

We not only want to know *how* nature is (and *how* her transactions are carried through), but we also want to reach, if possible, a goal which may seem utopian and presumptuous, namely, to know why nature *is such and not otherwise*.

A. EINSTEIN

meiner Familie





Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits Bestandteile folgender Veröffentlichung:

I. C. Vreja, S. Kabatas, S. K. Saka, K. Kröhnert, C. Höschen, F. Opazo, U. Diederichsen, S. O. Rizzoli,
Secondary-Ion Mass Spectrometry of Genetically Encoded Targets,
Angew. Chem. Int. Ed. **2015**, 54, 5784–5788.
Angew. Chem. **2015**, 127, 5876–5880.





Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Janusmolekül-funktionalisierte β^3-Peptide zur Ausbildung höher geordneter Aggregate	5
2.1	β -Aminosäuren und ihre Peptide	6
2.2	Janusmoleküle als Erkennungseinheiten	11
2.3	Cyanursäure- und Triaminotriazin-funktionalisierte β^3 -Peptide	13
2.3.1	Synthese der β^3 -Aminosäuren	16
2.3.2	Synthese der β^3 -Peptide	29
2.3.3	Strukturelle Voranalysen und Aggregationsstudien	35
2.3.3.1	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	35
2.3.3.2	UV-Spektroskopie	40
2.3.3.3	Elektrospray-Ionisations (ESI)-Massenspektrometrie	42
2.3.3.4	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	48
2.3.3.5	Kristallisationsexperimente	53
2.3.4	Diskussion der Ergebnisse	56
3	Trifunktionale Cyclo-β^3-Peptide	57
3.1	Cyclopeptide zur templatvermittelten Organisation von Funktionalitäten	58
3.2	Nanoröhren aus cyclischen Peptiden	61
3.3	Synthese von Cyclo- β^3 -Tripeptiden	63
3.3.1	Herstellung auf fester Phase	64
3.3.2	Herstellung in Lösung	67
3.3.3	Diskussion der Ergebnisse	70
4	Biomolekülmarker für Sekundärionen-Massenspektrometrie	73
4.1	Sekundärionen-Massenspektrometrie als bildgebendes Verfahren	74
4.2	Verwendung von NanoSIMS in biologischen Studien	78
4.3	Selektive Marker für genetisch kodierte Biomoleküle	79
4.3.1	Entwicklung spezifischer ^{15}N -Triazin-Peptide zur Markierung	81
4.3.1.1	Synthese der Vorläuferbausteine	81



4.3.1.2	Synthese der ^{15}N -Triazin-funktionalisierten Peptide	84
4.3.1.3	Markierung von modifiziertem β -Pompilidotoxin	88
4.3.1.4	^{15}N -Markierung von genetisch kodierten SNARE-Proteinen	90
4.3.2	Entwicklung spezifischer Fluorpeptide zur Markierung	95
4.3.2.1	Synthese der Fluorpeptide	95
4.3.2.2	^{19}F -Markierung von genetisch kodierten SNARE-Proteinen	97
5	Markierung von Peptiden mit Sortase A-Erkennungsmotiv	101
5.1	Einführung von Fluorophoren in Biomoleküle	102
5.2	Sortase A-vermittelte Ligationen	105
5.3	Synthese markierter LPETGG-Peptide	106
6	Zusammenfassung	111
7	Summary	115
8	Experimenteller Teil	119
8.1	Allgemeines	119
8.1.1	Allgemeine Arbeitstechniken	119
8.1.2	Charakterisierung	121
8.1.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	123
8.2	Synthese von Janusmolekül-funktionalisierten β^3 -Peptiden	128
8.2.1	Vorschriften zur Synthese der β^3 -Aminosäuren	128
8.2.2	Vorschriften zur Synthese der β^3 -Peptide	169
8.3	Synthese von trifunktionalen Cyclo- β^3 -Peptiden	175
8.3.1	Vorschriften zur Synthese der β^3 -Aminosäuren	175
8.3.2	Vorschriften zur Synthese der Cyclo- β^3 -Peptide	186
8.4	Synthese von Biomolekülmarkern für Sekundärionen-Massenspektrometrie	194
8.4.1	Vorschriften zu ^{15}N -Biomolekülmarkern	194
8.4.2	Vorschriften zu ^{19}F -Biomolekülmarkern	211
8.5	Synthese von markierten Peptiden mit Sortase A-Erkennungsmotiv	215



9	Anhang	218
10	Abkürzungsverzeichnis	220
11	Literaturverzeichnis	226



1. Einleitung und Zielsetzung

Die vielseitigsten Makromoleküle in Lebewesen stellen ohne Zweifel die Proteine, abgeleitet vom griechischen *proteios* – der Erste, dar. Diese molekularen Maschinen verfügen über eine große und weitreichende Vielfalt an komplexen Funktionen, in denen die biologische Aktivität jedes Proteins durch seine dreidimensionale Struktur bestimmt wird.^[1] Sie werden zum Aufbau von biologischem Material genutzt, dienen als Speicher von Substanzen, werden zum Transport von Molekülen eingesetzt und fungieren in Form von Enzymen als Katalysatoren von chemischen Vorgängen. Weiterführend besitzen sie regulative Funktionen als Botenstoffe, den Hormonen, und üben eine Schutzfunktion als Antikörper zur Abwehr aus. Als Vermittler in Form von Membranproteinen, Rezeptoren sowie Ionenkanälen halten sie die Kommunikation von Zellkompartimenten aufrecht.^[1,2] Da sie in nahezu allen essentiellen Prozessen des Lebens involviert sind, können bereits geringfügige Veränderungen der Proteinstruktur zu einem Verlust der biologischen Aktivität führen und eine Vielzahl an Krankheiten sowie pathogen ablaufenden Prozessen auslösen. Eine große Anzahl an Therapeutika, die heutzutage eingesetzt werden, entfaltet ihre Wirkung durch die Interaktion mit Proteinen, Enzymen und Rezeptoren, die mit der jeweiligen Krankheit einhergehen.^[3] Basierend auf diesem Sachverhalt müssen gezielt effektive und hoch selektive Wirkstoffe entwickelt werden. Ohne die Kenntnisse über die exakten Abläufe in biologischen Systemen ist das Design von Wirkstoffen mit therapeutischer Aktivität undenkbar. Zur Beantwortung solch komplexer Fragestellungen werden in der Chemie und Biologie verschiedene Strategien verfolgt.

Eine chemische Herangehensweise zum Verständnis der biologischen Prozesse, in denen Proteine beteiligt sind, ist die Entwicklung von vereinfachten Modellsystemen. Proteinmimetika stellen hier eine gute Möglichkeit dar, Informationen über die Funktion natürlich vorkommender Proteine zu erhalten. Dabei spielt die Proteinstruktur eine wichtige Rolle, die Information der Aminosäuresequenz allein ist jedoch nicht ausreichend um Rückschlüsse auf die spezifische Funktion zu ziehen.^[4–6] Von besonderer Bedeutung ist das Verständnis der vorherrschenden intermolekularen nichtkovalenten Kräfte, die an der Faltung und Selbstorganisation beteiligt sind. Zum Verständnis sowie zur Steuerung dieser nichtkovalenten Kräfte und der infolgedessen entstehenden Überstrukturen wurden viele Modellsysteme konzipiert. Anfänglich wurden für das *de novo*-Design α -Aminosäuren und ihre Peptide in Anlehnung an natürliche Systeme verwendet. Allerdings weisen α -Peptide Defizite aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem enzymatischen Abbau *in vivo* und der inhärenten Flexibilität des Peptidrückgrats kurzer Sequenzen auf.^[7–9] Um diese Problematik für therapeutische Anwendungen zu umgehen, sind Foldamere eine vielversprechende Alternative. Foldamere, aus flexiblen synthetischen Kettenmolekülen aufgebaut, weisen durch nichtkovalente Wechselwirkungen eine stabile Sekundärstruktur in Lösung auf.^[10] Somit können sie sogar über die gleiche biologische Funktion ihrer natürlichen Leitstrukturen verfügen. Eine Unterklasse der Foldamere sind die β -Peptide, welche zu den wichtigsten Vertretern der bioinspirierten Foldamere gezählt werden.^[11] In der Natur sind sie meist in marinen Pflanzen und Mikroorganismen und vereinzelt im Metabolismus von Säugern zu finden.^[12] Sie besitzen eine höhere Resistenz gegenüber thermischen Einflüssen und dem enzymatischen Abbau *in vivo*. In wässrigen Systemen werden stabile Sekundärstrukturen für β -Peptide bereits ab einer Kettenlänge von sechs Aminosäuren beobachtet.^[11,12] Des Weiteren verfügen β -Peptide über ein sehr großes Repertoire an möglichen natürlichen und nichtnatürlichen Sekundärstruktur-

motiven.^[12] Eine der wichtigsten Sekundärstrukturen der β^3 -Peptide ist die 14-Helix.^[12,13] Die aus β^3 -Aminosäuren aufgebaute Helix besteht aus einem 14-gliedrigen Ring, der durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Durch die Funktionalisierung der Flanken einer 14-Helix mit Erkennungseinheiten in i und $i+3$ Abständen kommen die eingeführten Einheiten mit einem Stapelungsabstand von 5 Å übereinander zu liegen. So konnten komplementäre Nukleobasen-funktionalisierte β -Peptide durch WATSON-CRICK- und HOOGSTEEN-Basenpaarung stabile Helix-Dimere bilden.^[14–16] Prinzipiell können mit Hilfe von geeigneten Erkennungseinheiten an den β^3 -Peptiden mit 14-helikaler Struktur gezielt höhere Aggregate aufgebaut werden.^[17] In dem zweiten Kapitel wird beschrieben, wie komplementäre Janusmolekül¹-funktionalisierte β^3 -Aminosäuren hergestellt und anschließend in Peptide integriert werden. Dabei besitzen die Janusmoleküle Cyanursäure (CYA) und Triaminotriazin (TAT) zwei gleichwertige Bindungsseiten, d. h. Donor- und Akzeptorposition sind jeweils auf beiden Seiten vorhanden.^[18] Dies befähigt die Moleküle mit weiteren Donor-Akzeptor-Spezies zu interagieren. Die Bildung einer stabilen 14-Helix und die Erkennung zwischen CYA und TAT sollen zu einer molekularen Selbstorganisation der beiden Komponenten führen und eine Aggregation zu tubulären Strukturen ermöglichen (Abb. 1.1). Die angestrebten supramolekularen Aggregate hätten aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu porenbildenden Transmembranproteinen das Potential als künstliches System in Modellmembranen implementiert zu werden.

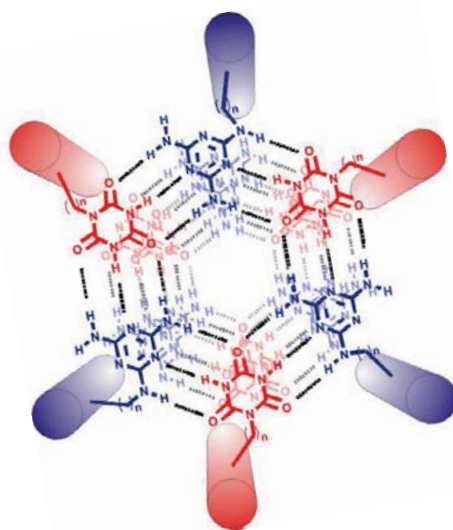


Abbildung 1.1: Molekulare Selbstorganisation von komplementären β^3 -Peptiden, erzeugt mittels Induktion durch die Janusmoleküle Cyanursäure (CYA) und Triaminotriazin (TAT), deren Erkennung durch Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt wird.

Neben dem Einsatz in Modellsystemen eignen sich β^3 -Peptide in cyclischer Form aufgrund ihrer rigiden Struktur als Träger für strukturelle und funktionelle Eigenschaften.^[19] Cyclo- β^3 -Tripeptide, die drei Verankerungspositionen aufweisen, können als zelluläre Transportmoleküle von Wirkstoffen fungieren. Des Weiteren kann ihre Tendenz zur Selbstaggregation ausgenutzt werden, da durch vertikale Stapelung mehrerer Cyclo- β^3 -Tripeptide Nanoröhren entstehen und zur Amplifikation der horizontal orientierten Funktionalitäten führen. Die erzeugten

¹ Inspiriert wurde die Bezeichnung Janusmolekül von der römischen Gottheit Janus, dargestellt durch einen Kopf mit zwei Gesichtern.^[257]

Nanoröhren mit neuartigen Eigenschaften könnten als künstliche Ionenkanäle in biologischen Studien eingesetzt werden oder in materialwissenschaftlichen Bereichen elektrochemische Anwendung finden.^[20] In einem weiteren Projekt wird der synthetische Zugang eines literaturbekannten trifunktionalen Cyclo- β^3 -Peptids^[19] von der Festphasen-Peptidsynthese in die Lösung übertragen, um größere Maßstäbe zur Herstellung zu realisieren (Kapitel 3). Die Generierung größerer Mengen mit reduzierten Materialkosten wäre ein großer Fortschritt, vor allem für pharmazeutische Hochdurchsatz-Screenings zur Identifizierung biologisch aktiver Verbindungen funktionalisierter Cyclo- β^3 -Peptide.

Die biologische Vorgehensweise zur Aufklärung von Struktur und Funktion zellulärer Proteine beinhaltet bildgebende Verfahren als Methode der Wahl. Vor allem durch die rasanten Fortschritte der Technik und die Entwicklung selektiver Fluorophore werden Lichtmikroskope weitverbreitet eingesetzt. Den Durchbruch brachte die STED (*stimulated emission depletion*)-Mikroskopie, wodurch die Auflösungsbegrenzung nach dem ABBE'schen Gesetz umgangen und durch das An- und Ausschalten von Fluoreszenzsignalen markierter Zielobjekte eine höhere Detailschärfe erzielt wird.^[21] Dabei ermöglichen die bildgebende Verfahren die Visualisierung und Lokalisierung zellulärer Proteine. Seit mehr als einer Dekade ist die bildgebende Massenspektrometrie (*mass spectrometry imaging*, MSI) stärker in den Fokus gerückt, da diese im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren neben der räumlichen Information auch die chemische Zusammensetzung der Probe wiedergibt.^[22] Die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) ermöglicht eine Auflösung, die den Bereichen von Lichtmikroskopen nahe kommt.^[23] Für den Kontrast werden in Lichtmikroskopen Fluorophore eingesetzt, während die MSI eine Isotopenmarkierung zur Differenzierung erfordert. In bisherigen biologischen Studien wurde die isotopische Markierung überwiegend durch metabolische Anreicherung erzielt.^[24] So werden durch das Füttern lebender Organismen oder Inkubation von Zellen mit isotonenangereicherten Verbindungen nach mehreren Zyklen der Proteinbiosynthese isotonenmarkierte zelluläre Proteine erhalten. Im Anschluss wird der Isotopengehalt visualisiert. Dies jedoch erschwert die Unterscheidung einzelner Proteine von der zellulären Gesamtheit. In diesem Zusammenhang wird in dem vierten Kapitel beschrieben, wie in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe RIZZOLI eine Strategie ausgearbeitet und in einer Teilaufgabe die Entwicklung von selektiven isotonenangereicherten Markern erzielt wird. Somit wird die Möglichkeit zur Differenzierung einzelner zellulärer Proteine unter Verwendung der Ionen-Mikrosonde NanoSIMS 50L von Cameca aufgezeigt und der Weg für metabolische und Protein-Turnover Studien geschaffen.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind eine beliebte Methode in zellbiologischen Studien. Mittlerweile gibt es eine Bandbreite an kommerziell erhältlichen Fluorophoren, die meistens über bestimmte chemische Reaktionsarten eingeführt werden können.^[25] Zur Visualisierung von Protein-Antikörper/Antigen-Konjugaten wird neben chemischer eine enzymatische Einführung der Fluorophore wegen der hohen Spezifität sowie Sensitivität bevorzugt. In Kapitel 5 wird beschrieben, wie die literaturbekannte Sortase A-Erkennungseinheit synthetisiert und mit Fluorophoren sowie einem Biotin verknüpft wird.^[26] Diese soll im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt werden. Sortase A ist ein bakterielles Enzym, dessen Struktur und Funktion bekannt ist und dessen natürliche Funktion als biotechnologisches Hilfsmittel zur Markierung und Ligation von Proteinen übertragen worden ist.^[27] Demzufolge sollen die markierten Erkennungseinheiten in einer Sortase A-vermittelten Reaktion mit Proteinen verknüpft werden, um immunocytochemische Experimente zu ermöglichen.



2. Janusmolekül-funktionalisierte β^3 -Peptide zur Ausbildung höher geordneter Aggregate

Die molekulare Selbstorganisation von Molekülen ist ein spontaner Assoziationsvorgang unter Gleichgewichtsbedingungen, aus der dreidimensionale Überstrukturen resultieren. Angetrieben durch intermolekulare nichtkovalente Kräfte oder koordinativer Wechselwirkungen werden in ubiquitären Prozessen des Lebens unter Bildung komplexer Strukturen verschiedene Biomoleküle involviert. Neben der Duplexbildung der DNA durch Nukleobasenpaarung, ist die Proteinfaltung ein repräsentatives Beispiel für molekular selbstorganisierende Systeme. Für das gezielte Design von höheren Strukturen muss der Vorgang vollständig verstanden werden und kontrollierbar sein. Durch den Einsatz peptidischer Aggregate definierter Geometrie kann eine Vielzahl an supramolekularer Strukturen, wie Käfigstrukturen oder Nanoröhren, erzeugt werden, um über das Verständnis hinaus weitere Anwendungsmöglichkeiten für biologische und materialwissenschaftliche Bereiche zu ermöglichen.

Inspiziert von den integralen Membranproteinen, den α -Helix-Bündel- und β -Fassproteinen, soll ein artifizielles porenbildendes Modellsystem mit molekular selbstorganisierenden Eigenschaften entworfen werden. Zum Aufbau komplexer Strukturen eignet sich das bioinspirierte Foldamer β^3 -Peptid aufgrund dessen 14-helikaler Vororganisation und gezielter Adressierung der Flanken für Erkennungseinheiten. Die Kontrolle über Geometrie, Stöchiometrie und Spezifität der Selbstassoziation kann mit Hilfe von Erkennungseinheiten gesteigert werden. Aus der molekularen Erkennung des Janusmolekülpaars Cyanursäure (CYA) und Triaminotriazin (TAT) mit komplementären Akzeptor/Donor-Positionen (ADA/DAD) können planare hexamere Strukturen realisiert werden, die sich durch die Verwendung eines präorganisierenden β^3 -Peptidrückgrats im dreidimensionalen Raum zu tubulären Strukturen ausrichten können. In diesem Kapitel werden die Eigenschaften der β^3 -Peptide wiedergegeben (Kapitel 2.1) und die Janusmoleküle als potentielle Erkennungseinheiten aufgezeigt (Kapitel 2.2). Des Weiteren werden Design und Synthese Janusmolekül-funktionalisierter β^3 -Peptide vorgestellt (Kapitel 2.3) und die Ergebnisse aus den Aggregationsstudien präsentiert (Kapitel 2.4).

2.1 β -Aminosäuren und ihre Peptide

Angelehnt an die natürlichen Vorbilder, den α -Peptiden, werden synthetisch erzeugte Oligomere mit charakteristischer Tendenz zur Faltung und Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturen in Lösung als Foldamere bezeichnet.^[10,28,29] Trotz abweichendem Aufbau verglichen mit natürlichen Strukturen, besitzen sie ein ähnliches Verhalten in Assoziation und Faltung, welche durch nichtkovalente Kräfte induziert werden. Darüber hinaus zeichnen sie sich durch ihre Fähigkeit aus, definierte Sekundärstrukturen bereits mit kürzeren Oligomeren auszubilden. Heutzutage ist eine Vielzahl von Foldameren bekannt, welche erfolgreich synthetisiert und überdies auf ihre Eigenschaften zur Faltung und Assoziation untersucht worden sind (Abb. 2.1).^[10,29,32,33] Dabei werden Foldamere in zwei Klassen eingeteilt, die bioinspirierten Foldamere und die abiotischen Foldamere. Nichtnatürliche Foldamere beinhalten typischerweise aromatische Ringe in ihrem Rückgrat.^[30,31] Im Gegensatz zu den natürlichen oder bioinspirierten Foldameren sind in den nichtnatürlichen Foldameren π - π -Stapel-Wechselwirkung und die geometrische Spezifität der Aromaten vorhanden, die zu einer spezifischen Ausbildung von räumlichen Strukturen führen.

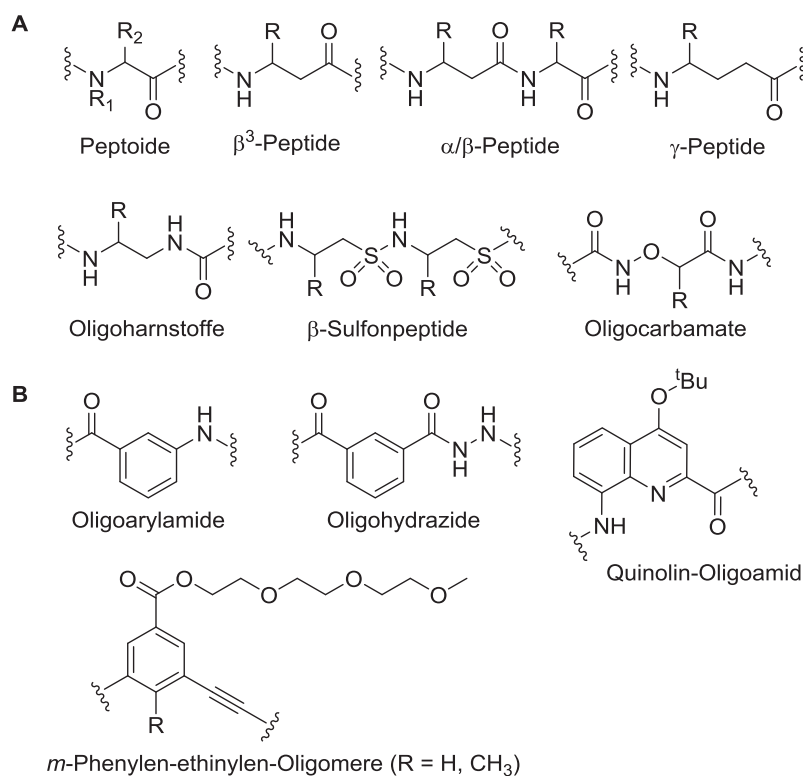


Abbildung 2.1: Beispiele für bioinspirierte Foldamere (**A**) und abiotische, nichtnatürliche Foldamere (**B**).^[10,29,32,33]

β -Peptide werden zu den bioinspirierten Foldameren gezählt, welche in der Natur bisher vereinzelt in hochaktiven Naturstoffen und insbesondere in marinen Lebewesen identifiziert worden sind.^[10,12] Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften, wie thermische und enzymatische Stabilität, bieten diese interessante Forschungsbereiche auch im Hinblick auf Wirkstoffentwicklung.^[34,35]

Im Gegensatz zu α -Aminosäuren werden in β -Aminosäuren durch die Verlängerung um eine Methyleneneinheit zwischen der Amino- und Carboxylgruppe, zusätzlich zwei weitere Positionen

für Substitutionen zur Verfügung gestellt (Abb. 2.2). Die Anzahl an möglichen Stereoisomeren steigt somit von zwei auf vier und verdeutlicht die große strukturelle Vielfalt der β -Aminosäuren.^[12]



Abbildung 2.2: Mit R markierte mögliche Substitutionsstellen für α -Aminosäuren und β -Aminosäuren.

Zur besseren Unterscheidung der Substitutionspositionen von β -Peptiden wurden Indizes eingeführt. Die Monosubstitution an C_β wird als β^3 -Aminosäure und die an C_α als β^2 -Aminosäure bezeichnet.^[12] Demzufolge wird eine Disubstitution an beiden C-Atomen als $\beta^{2,3}$ -Aminosäure benannt (Abb. 2.3).

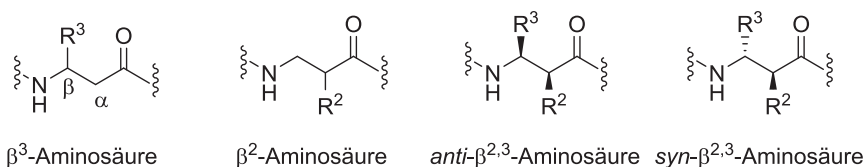


Abbildung 2.3: Substitutionsmuster in β -Aminosäuren.

Die Torsionswinkel ω , Φ , θ und φ in β -Aminosäuren werden nach der Konvention von BALARAM festgelegt (Abb. 2.4).^[36,37] Hierbei repräsentiert ω den Winkel der CO-N-Bindung, Φ den Winkel der CN- C_β (CN- C_α für α -Peptide), θ den Winkel der C_α - C_β und φ den Winkel der CO- C_α -Bindung. Dabei hat der Winkel θ einen hohen Einfluss auf die Ausbildung von Sekundärstrukturen der β -Peptide.^[36]



Abbildung 2.4: Torsionswinkel von α -Peptiden (**links**) und β -Peptiden (**rechts**) nach der Konvention von BALARAM in Anlehnung an die RAMACHANDRAN-Diagramme.^[36,37]

Des Weiteren hat das Substitutionsmuster einen starken Einfluss auf die Konformation. Die monosubstituierten β^2 - und β^3 -Aminosäuren sowie die *anti*-konfigurierten $\beta^{2,3}$ -Aminosäuren bevorzugen die *gauche* Konformation.^[36,38] Mit einem Diederwinkel θ von 60° werden hierbei helikale Strukturen präferiert. Im Gegensatz dazu neigen die *syn*-konfigurierten $\beta^{2,3}$ -Aminosäuren durch die *trans*-Konformation mit einem Winkel θ von 180° zur Ausbildung von β -Faltblatt-Motiven. Bei $\beta^{2,2}$ - und $\beta^{3,3}$ -Aminosäuren hingegen werden statt der helikalen oder *turn*-artigen Strukturen, wie sie in α -Aminosäuren vorkommen, *reverse turn* Konformationen stabilisiert. Die β -Aminosäuren mit einem Ringschluss über C_α - C_β begünstigen aufgrund der Starrheit der Bindung eine *gauche*-Konformation mit Präferenz zur Helix-Bildung. Dabei wird der Torsionswinkel durch die Ringgröße bestimmt.

Die Annahme, dass β -Peptide aufgrund des zusätzlichen C-Atoms und der dadurch „freidrehbaren“ C_α - C_β σ -Bindung eine geringe Neigung zur Bildung von übergeordneten Strukturen haben, erwies sich als nicht zutreffend.^[38,39] Bereits mit einer Sequenz von sechs β -Aminosäuren können in wässrigen Medien oder Methanol Sekundärstrukturen erhalten werden, wohingegen



15–20 α -Aminosäuren notwendig sind um stabile Sekundärstrukturen auszubilden. Durch Zuhilfenahme der Konformationsdiagramme wird deutlich, dass die C_{α} - C_{β} -Bindung eine große Energiebarriere aufweist. Die Folge ist die erschwerte Rotation um die sp^3 - sp^3 -hybridisierte σ -Bindung der β -Aminosäure im Vergleich zu gewöhnlichen sp^3 - sp^3 -hybridisierten Bindungen.

Das Vorhandensein einer stabilen Sekundärstruktur ist eine wichtige Voraussetzung zur Bildung von Tertiärstrukturen, die eine definierte Funktion bei der Protein-Substrat-Interaktion beinhalten.^[38] Dabei sind β -Peptide nicht nur in der Lage stabile Sekundärstrukturen zu bilden, sondern weisen neben natürlichen Sekundärstrukturen (Helices, parallele und antiparallele Faltblätter und *turn*-artige Strukturen) auch in der Natur selten anzutreffende Motive auf, wie tubuläre, bandartige Strukturen oder unnatürliche Helixkonformationen.^[9] Durch das Substitutionsmuster der β -Peptide wird in erster Linie die Sekundärstruktur induziert. Zur Differenzierung der Helixrichtung ist in der Literatur keine eindeutige Nomenklatur vorgegeben. Während SEEBACH anhand der Helixsymmetrie zwischen M und P (links- oder rechts-drehend) unterscheidet, beruht SUBIRANAS und APPLEQUISTS Konvention auf dem Drehsinn (R und L) der Helix.^[36] Eine weitere Möglichkeit zur Helix Nomenklatur beschreibt die Anzahl an Seitenketten pro Windung mit einem Index, der in der Nomenklatur von GELLMAN Verwendung findet.^[36] GELLMAN klassifiziert die verschiedenen Helices über den durch intramolekulare Wasserstoffbrücken gebildeten Ringschluß zwischen einem Akzeptor- und einem Donoratom, in diesem Fall zwischen dem Carbonylsauerstoff am Peptidrückgrat und dem Amidproton.² Folglich beinhalten die Nummern die Anzahl, der in dem Ring enthaltenen Atome, zur Differenzierung der Helix-Typen. Die bekanntesten und weitgehend untersuchten Helices sind die 14-, 12-, 10/12-, 10- und 8-Helices (Abb. 2.5). Im Vergleich dazu sind für α -Peptid-Helices nur drei Wasserstoffbrücken-bildende Strukturen bekannt (α -, 3_{10} - und π -Helix).^[40]

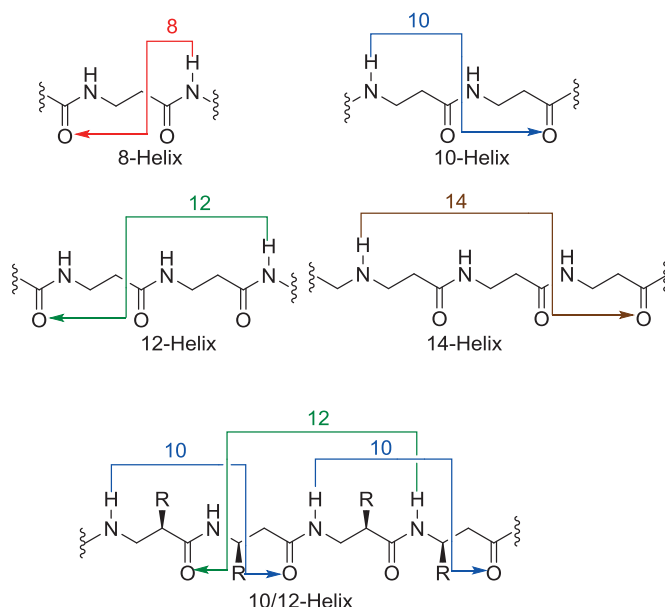


Abbildung 2.5: Darstellung der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und die daraus resultierenden Helixtypen. Die Anzahl der Atome innerhalb des gebildeten Ringes ist namensgebend für den Helixtyp.^[36]

² Im weiteren Verlauf wird die GELLMAN-Nomenklatur verwendet.

Die strukturelle Charakterisierung der einzelnen Helix-Typen erfolgt mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR)-Spektroskopie, der Röntgenkristallstrukturanalyse sowie der Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie.^[12] Die Kristallstrukturanalyse liefert genaue strukturelle Informationen. Allerdings ist diese Methode auf feste Phasen limitiert und die Bildung eines Einkristalls meist erschwert. Für strukturelle Aussagen in Lösung sind zweidimensionale NMR-Spektroskopie sowie CD-Spektroskopie unerlässlich. Durch die CD-Spektroskopie können zusätzliche Aussagen über Veränderungen in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur oder anderen Lösungsmitteln getroffen werden. Sie bietet oft eine gute Möglichkeit zur Abschätzung der α -Peptid-Konformationen an.^[32] Sind bereits Referenzen der unterschiedlichen Typen an helikaler Konformation vorhanden, wie im Fall der β^3 -Peptide, können Vergleiche zu neuartigen Oligomeren gezogen werden.

Die Stabilität der β -Peptid-Helix ist je nach Substitutionsmuster unterschiedlich. In Studien von SEEBACH konnte gezeigt werden, dass β^3 -Peptide (C_β -substituiert) eine höhere Stabilität in ihren Helices aufweisen als β^2 -Peptide (C_α -substituiert).^[12] In β^3 -Peptiden befinden sich die Substituenten neben der Aminofunktion des Rückgrats, wohingegen sich die Substituenten der β^2 -Peptide neben der Carbonylgruppe befinden. Die Nachbarschaft zur Carbonylfunktion führt aufgrund sterischer Hinderungen zu einer Schwächung der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung und infolgedessen tritt ein destabilisierender Effekt auf.

Für helikale β -Peptide ist die 14-Helix (Helix-Nomenklatur: 3_{14}) die am besten untersuchte Sekundärstruktur, deren Gesamtdipolmoment invers zu dem einer α -Helix ist (Abb. 2.6).^[12]

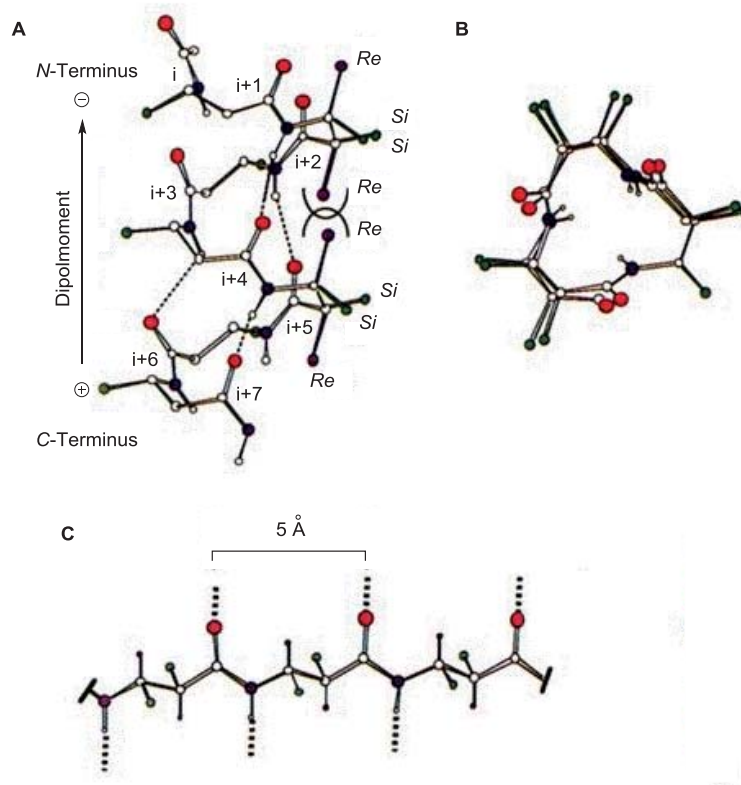


Abbildung 2.6: A Seitenprofil der linksgängigen 14-Helix (farblich hervorgehoben sind Stickstoffatome = blau, Sauerstoffatome = rot und Kohlenstoffatome = weiß).^[12] Axiale Substituenten (Re , violett) verhindern die Helixbildung. Laterale Substituenten (Si , grün) sind begünstigte Positionen für die Ausbildung der 14-Helix. B 14-Helikales β^3 -Peptid von oben betrachtet. Die Substituenten bilden drei Flanken. C: Gestreckte Konformation eines β -Peptids mit Seitenansicht.^[12]



Die Stabilisierung der 14-Helix erfolgt über einen 14-gliedrigen Ring der durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Amidproton an der Position i und dem Carbonylsauerstoffatom, das sich in $i+2$ Stellung am Rückgrat befindet, ausgebildet wird.^[12,39,41] Dabei sind pro Windung näherungsweise drei Aminosäuren vorhanden, deren Seitenketten mit einem Abstand von 5 Å an der Position i und $i+3$ übereinander zu liegen kommen. An jedem sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatom entlang des Rückgrats der Helix sind Positionen für laterale oder axiale Substituenten vorhanden. Die laterale Bindung ist näherungsweise senkrecht und die axiale parallel zur Helixachse ausgerichtet. Seitenkettenreste sind aufgrund sterischer Hinderungen nur in lateraler Position erlaubt, während in axialer Position ausschließlich Wasserstoffatome auftreten dürfen. Die linksgängige Helix (M) wird gebildet, wenn die Seitenketten an den Positionen C_α und/oder C_β der β -Aminosäuren sich in den *Si*-Sphären befinden. Folglich formen β^3 -Peptide, die aus natürlichen L-Aminosäuren aufgebaut sind, eine linksgängige 14-Helix. Dahingegen müssen für eine rechtsgängige Helix (P) die Wasserstoffatome in *Si*-Positionen und Seitenkettenreste in *Re*-Positionen angeordnet werden. Helices für disubstituierte β -Peptide in C_α - oder in C_β -Position wurden dementsprechend bisher nicht erhalten.

Die stabilisierenden Effekte von acyclischen β -Peptiden wurden bisher meist in organischen Lösungsmitteln nachgewiesen. In organischem Milieu herrschen oft sehr starke struktur-stabilisierende Effekte, aufgrund der Bevorzugung von intramolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen relativ zu wässrigen Systemen.^[38] Die Abnahme der Helix-Stabilität in wässrigen Medien wäre aus pharmakologischer Sicht von Nachteil in Bezug auf die Entwicklung von Arzneimitteln. Mit gezielter Wahl der Seitenkette kann jedoch die Rückgrat-Flexibilität minimiert und so eine hohe Population der helikalen Konformation in wässrigen Medien erzielt werden.^[8] GELLMAN zeigte, dass die cyclische Aminosäure *trans*-2-Aminocyclohexancarbonsäure (ACHC) (**1**) prädestiniert ist für die 14-Helix-Bildung (siehe Abb. 2.7). Durch einen Cyclohexanring wird die C_α - C_β -Bindung fixiert und die Rotation um diese Bindungsachse verhindert. Der Torsionswinkel θ beträgt in diesem Fall etwa 55 °.^[8,36,41,42] Somit wird die Helix unabhängig vom Lösungsmittel stabilisiert, das in moleküldynamischen Berechnungen bestätigt wird.^[42,43]

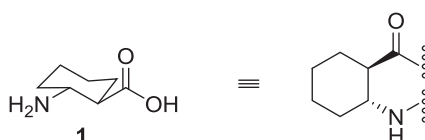


Abbildung 2.7: Die cyclische $\beta^{2,3}$ -Aminosäure ACHC (**1**). Die *trans*-Konfiguration bevorzugt eine *gauche*-Konformation und somit die Ausbildung einer stabilen 14-Helix.^[36]

Um eine verbesserte Löslichkeit im wässrigen Milieu zu erreichen, ist es notwendig, neben der Aminosäure ACHC (**5**) auch geladene β^3 -Aminosäuren in die Peptidsequenz einzubeziehen.^[44] GELLMAN, SEEBACH und DEGRADO konnten unabhängig voneinander zeigen, dass alternativ geladene β^3 -Peptide ebenfalls eine erhöhte helikale Population in wässrigem Medium aufweisen.^[45,46] Durch die positiven und negativen Ladungen an den Positionen i und $i+3$ werden Salzbindungen entlang dieser Flanken ausgebildet. Für jede dritte Aminosäure wurden β^3 -Aminosäuren mit einer unpolaren, aliphatischen Seitenkette verwendet, welche durch intramolekulare hydrophobe Wechselwirkung die Gesamtstruktur stabilisieren. Arbeiten von SCHEPARTZ haben gezeigt, dass nicht unbedingt zwei der drei Flanken mit geladenen Resten besetzt werden müssen. Es ist ausreichend wenn eine Flanke geladen ist und die anderen zwei Flanken für hydrophobe Interaktionen zur Verfügung stehen.^[47–49] Infolgedessen entsteht durch

die Wahl entgegengesetzt geladener Reste an beispielsweise jeder i -ten Position, bzw. an der Position i und $i+3$, mehr Freiraum bei der Sequenzwahl.

2.2 Janusmoleküle als Erkennungseinheiten

Die Präorganisation von interagierenden Gruppen in einem Netzwerk von nichtkovalenten Wechselwirkungen führt zu einer Erkennung mit hoher Selektivität sowie Systemen mit positiver Kooperativität.^[50] Die Verwendung von reversiblen Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, ermöglicht komplementären Molekülen die Ausbildung von supramolekularen Aggregaten.^[51] Das Anfangs von WHITESIDES vorgeschlagene einfache Modell sind die präorganisierten Derivate der Cyanursäure (CYA, **2**) und des Triaminotriazins (TAT, **3**) (Abb. 2.22).^[52] Weitere bekannte und potentielle Vertreter dieser Molekülklasse sind Barbitursäure (BAP, **4**) und Triaminopyrimidin (TAP, **5**) (Abb. 2.8). Die komplementären Moleküle besitzen jeweils zwei Bindungsseiten mit alternierenden Akzeptor- und Donorpositionen, um simultan über beide Seiten zu binden. Dabei geht jede Bindungsseite eines Moleküls drei Wasserstoffbrückenbindungen in einem Bindungswinkel von etwa 120° ein.^[50] Die CYA/TAT-Aggregate besitzen eine geringe Löslichkeit in Wasser (pH = 7) und zeigen erst über 350°C eine Zersetzung, welches auf eine hohe thermodynamische Stabilität hinweist.

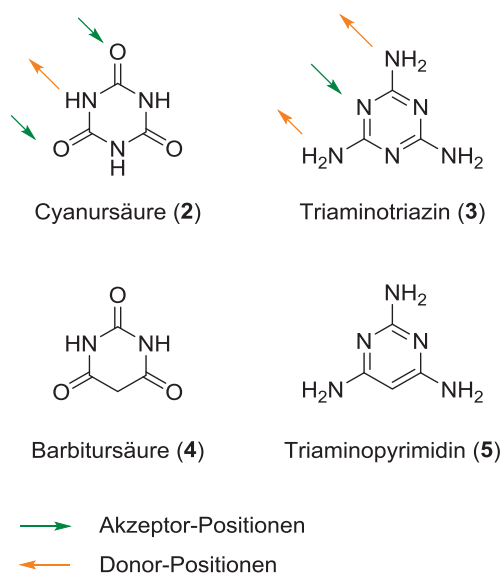


Abbildung 2.8: Cyanursäure (CYA, **2**) und Barbitursäure (BAP, **4**) sind komplementär zu Triaminotriazin (TAT, **3**) und Triaminopyrimidin (TAP, **5**). Die Erkennung für Wasserstoffbrückenbindungen wird durch die alternierenden Donor- und Akzeptorpositionen gegeben.

Die Überstrukturen sind abhängig von den Seitenketten des komplementären Molekülpaars. Die möglichen Motive sind das cyclische Hexamer (Rosette), das lineare Band und die Zickzackstruktur, welche unendlich fortgesetzt vorliegen (Abb. 2.9).^[53]

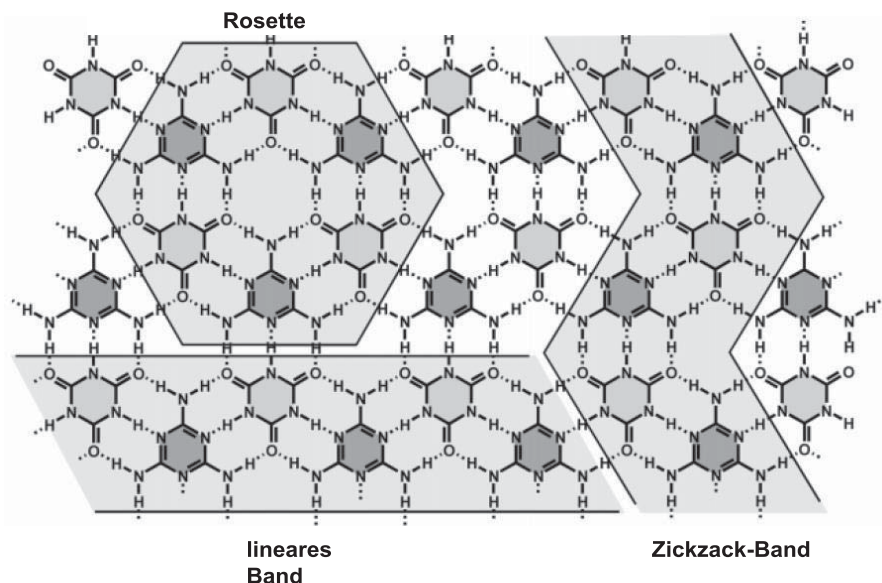


Abbildung 2.9: Vorhandene Struktur motive für die Triaminotriazin-Cyanursäure (TAT/CYA)-Aggregate.^[18,50]

Die Stapelung cyclischer Hexamere zu porenartigen Strukturen erfordert eine Minimierung des entropischen Aufwands der Selbstorganisation und eine Kontrolle über die Form der Nanostruktur.^[51,53] Um diese Bedingungen zu erfüllen, wurde von WHITESIDES das Konzept der kovalenten Präorganisation sowie das Konzept der peripheren Hinderung vorgeschlagen (Abb. 2.10 A, B). Bei Ersterem wird durch kovalente Knüpfung eine molekulare Erkennung zwischen den zu vernetzenden Systemen geschaffen und der entropische Aufwand minimiert (präorganisierendes Rückgrat der TAT-Einheit). Für das Letztere werden sperrige Gruppen an CYA substituiert und auf die zu aggregierende Fläche gebracht, um so das Band-Motiv oder Zickzack-Strukturen zu vermeiden und die Rosettenstruktur zu begünstigen.^[53–55]

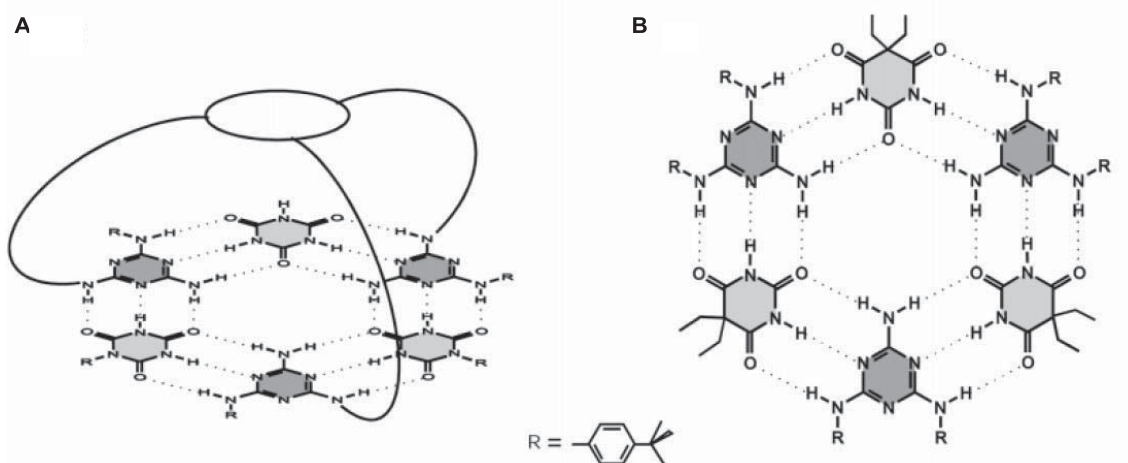


Abbildung 2.10: Das Konzept der kovalenten Präorganisation (A) sowie der peripheren Hinderung (B) zur Ausbildung der Rosettenstruktur.^[18,50]

2.3 Cyanursäure- und Triaminotriazin-funktionalisierte β^3 -Peptide

Biologische Systeme streben eine hohe Präzision an, in der Strukturen entweder geordnet oder ungeordnet vorliegen und inkorrekte strukturbildende Elemente wieder in das dynamische Gleichgewicht zurückgewiesen werden.^[53] So können Proteine in einer *random coil*-Struktur vorliegen oder aber durch Faltung eine biologisch aktive Form annehmen. Für die molekulare Selbstorganisation sind nichtkovalente Interaktionen wie Wasserstoffbrücken-bindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte, π - π - und elektrostatische Wechselwirkungen sowie Metallkoordination ausschlaggebend. Durch das Zusammenspiel dieser einzelnen Kräfte wird die ungünstige Entropie zur Anordnung überwunden und ein Aggregat im thermodynamischen Minimum erhalten.^[53] Hierfür sind präorganisierte Untereinheiten eine wichtige Voraussetzung, wie stabile Sekundärstrukturen. Weiterführend wird der Prozess durch eine reduzierte Anzahl an Biomolekültypen begünstigt, wodurch das System nur eine geringe Menge an Information verarbeiten muss. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die positive Kooperativität, in der das Zusammenschließen einzelner Komponenten die Affinität zum Anbringen weiterer steigert.^[53]

Die molekulare Selbstorganisation ist der Schlüsselschritt zur Generierung von supramolekularen Strukturen in der Natur, aber auch in künstlichen Systemen, die natürliche Strukturen nachahmen sollen. Die β^3 -Peptide besitzen die Fähigkeit, diese besondere Aufgabe zu bewerkstelligen. Ein β^3 -Peptid bildet bevorzugt eine 14-helikale Sekundärstruktur aus, welche durch den Einbau der artifiziellen Aminosäure (1*R*,2*R*)-*trans*-Aminocyclohexancarbonsäure (ACHC) zusätzlich Stabilität findet. Aus der molekularen Erkennung von Cyanursäure (CYA) und Triaminotriazin (TAT) resultieren cyclisch hexamere Strukturen, die sich durch die Verwendung des präorganisierenden β^3 -Peptid-Rückgrats im dreidimensionalen Raum gezielt ausrichten sollen. Dies soll durch die Positionierung der Erkennungseinheiten in Position *i* und *i*+3 erreicht werden, wodurch jede dritte Seitenkette eines β^3 -Peptides mit einem Abstand von 5 Å übereinander zu liegen kommt.

Die Hauptaufgabe dieser Arbeit bestand somit aus dem Aufbau eines supramolekularen Aggregats basierend auf Cyanursäure- und Triaminotriazin-funktionalisierten β^3 -Peptiden. Dies sollte in vier Etappen erzielt werden:

1. Generieren der CYA- und TAT-funktionalisierten β^3 -Aminosäuren durch kovalente Synthese.
2. Kovalente Polymerisation, d. h. Inkorporation der Monomerbausteine in Peptide definierter Primärsequenz unter Erhalt zweier komplementärer Peptidstränge.
3. Selbstorganisation der einzelnen β^3 -Peptide durch intramolekulare Wechselwirkung, in der durch Faltung eine stabile Sekundärstruktur ausgebildet wird.
4. Molekulare Selbstorganisation äquimolarer Mischungen der komplementären Peptide, induziert durch die Erkennungseinheiten CYA und TAT über intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen.

Bedingung an das gebildete Aggregat ist seine Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen (pH = 7.4), um als verlängerte Version in zukünftigen Applikationen als künstliches porenbildendes Protein in Modellmembranen integriert zu werden.

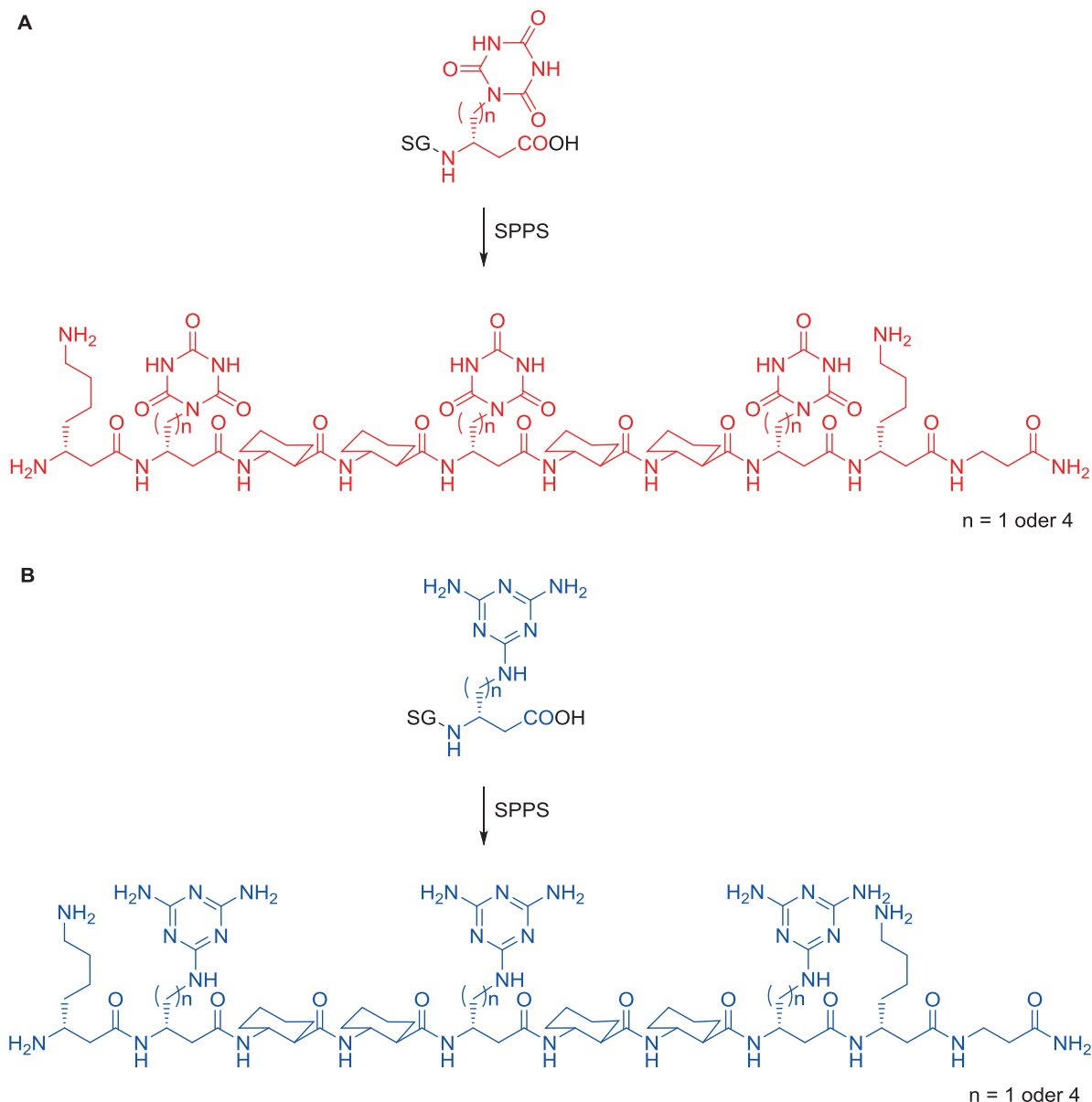


Abbildung 2.11: Inkorporation der zueinander komplementären Janusmolekül-funktionalisierten Monomerbausteine in die ausgewählte β^3 -Peptidsequenz (**A** und **B**), jeweils flankiert von zwei β^3 -Homolysinen zur Erhöhung der Löslichkeit. Die Inkorporation von (1*R*,2*R*)-*trans*-Aminocyclohexancarbonsäure (ACHC) steigert die Stabilität der rechtsgängigen 14-helikalen Sekundärstruktur. Dargestellt sind jeweils die Primärstrukturen, die in Lösung bevorzugt 14-Helices ausbilden. SG = Schutzgruppe, SPPS = *solid phase peptide synthesis*.

Somit ergaben sich folgende Teilaufgaben:

- Die Ansätze aus der dieser Arbeit vorangegangenen Dissertation^[17] sollten übertragen werden. Diese bestanden aus der Synthese einer *tert*-Butoxycarbonyl (Boc)-geschützten CYA-funktionalisierten β^3 -Aminosäure und ihr Einbau in die hier übernommene Peptidsequenz über Festphasen-Peptidsynthese nach Boc-Strategie.
- Synthese von 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-geschützten CYA- und TAT-funktionalisierten β^3 -Aminosäuren mit jeweils einer CH_2 -Einheit zwischen Heteroaromat und β^3 -Rückgrat sowie einer verlängerten Version (Kapitel 2.3.1) und deren

Inkorporation in Peptide über Festphasen-Peptidsynthese nach Fmoc-Strategie (Kapitel 2.3.2) (Abb. 2.11).

- Strukturelle Voranalysen der jeweiligen Peptide, um Aussagen über die Ausbildung der 14-Helix treffen zu können (Kapitel 2.3.3).
- Untersuchungen der äquimolaren Peptidmischungen auf ihr Aggregationsverhalten (Kapitel 2.3.3) (Abb. 2.12).

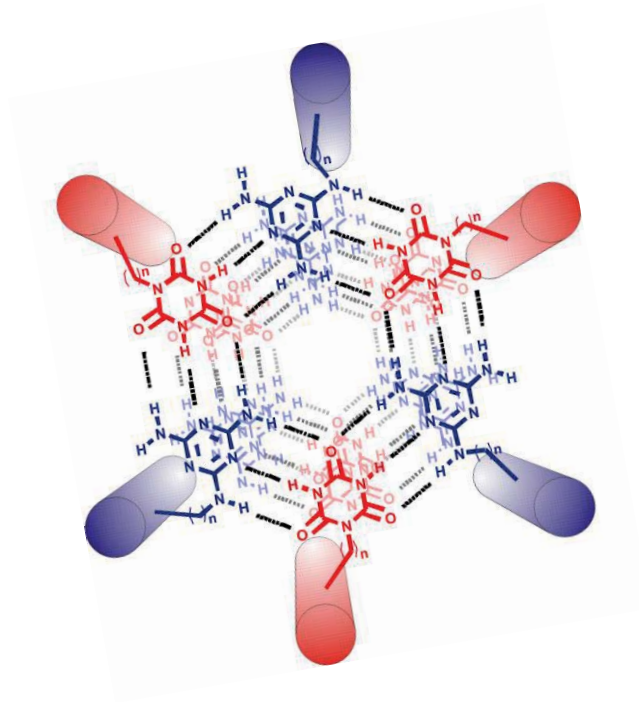


Abbildung 2.12: Molekulare Selbstorganisation einer äquimolaren Mischung der zueinander komplementären CYA- und TAT- β^3 -Peptide zu einer tubulären Struktur, induziert durch die Wasserstoffbrücken-vermittelte Erkennung der Janusmoleküle CYA und TAT.



2.3.1 Synthese der β^3 -Aminosäuren

Es gibt eine Vielzahl an Strategien zur Synthese von enantiomerenreinen β^3 -Aminosäuren ausgehend von unterschiedlichen Klassen an Ausgangsmaterialien.^[56,57] In den letzten Jahrzehnten konnten sich jedoch die effizienten Reaktionen durchsetzen, in denen das Ausgangsmaterial die chirale Information bereits beinhaltet und bei der Transformation zur β^3 -Aminosäure unangetastet bleibt. Zu den bekanntesten Beispielen zählen die ARNDT-EISTERT-Homologisierung und die KOLBE-Reaktion, die sich an enantiomerenreinen α -Aminosäuren bedienen. Erstere hat sich aufgrund des geringeren Aufwands sowie der Toleranz gegenüber basenlabilen Schutzgruppen wie Fmoc durchgesetzt (Abb. 2.13 A, B).^[57]

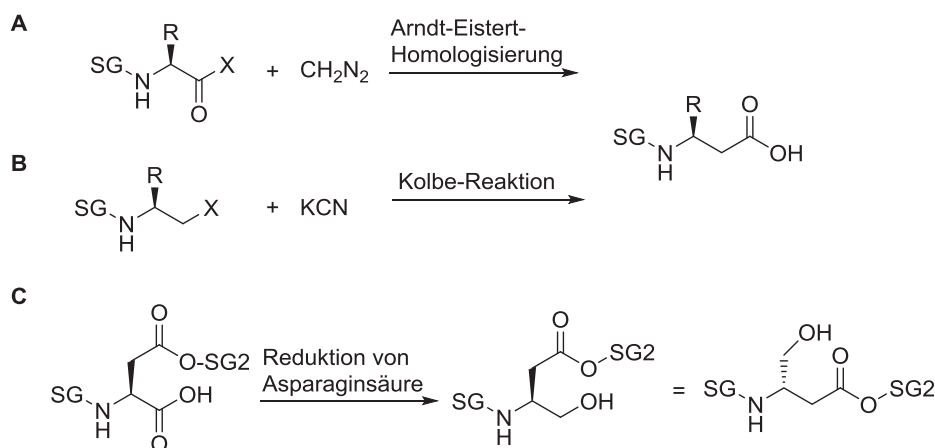


Abbildung 2.13: *Chiral pool*-Ansätze zur Darstellung enantiomerenreiner β^3 -Aminosäuren. Dabei sind die Abkürzungen wie folgt definiert: SG, SG2 = Schutzgruppen, R = Seitenkettenmodifikation und X = Abgangsgruppe. Die Synthese einer L- β^3 -Aminosäure kann über eine aktivierte L- α -Aminosäure erfolgen (A, ARNDT-EISTERT-Homologisierung) oder aus einer reduzierten L- α -Aminosäure gewonnen werden (B, KOLBE-Reaktion). Eine Alternative bietet die Reduktion von L- α -Asparaginsäure zu D- β^3 -Homoserin (C).^[58,59]

Einen alternativen *chiral pool*-Ansatz stellt die Reduktion der Asparaginsäure dar (Abb. 2.13 C).^[58,59] Diese beinhaltet bereits in ihrer Seitenkette die benötigte β^3 -Struktur und steht nach Reduktion der α -ständigen Carboxylgruppe zur Verfügung. Die Seitenkette des Folgeproduktes hat jedoch eine entgegengesetzte Orientierung als das Startmaterial. Um eine Topologie identisch zur gewünschten Aminosäure-Konfiguration (L oder D) zu erhalten, muss daher für die Reduktion die entgegengesetzt konfigurierte Asparaginsäure eingesetzt werden.^[60]

Die Generierung des D- β^3 -Rückgrats erfolgte im Rahmen dieser Arbeit entweder über ARNDT-EISTERT-Homologisierung ausgehend von D- α -Aminosäuren oder über L- α -Asparaginsäure-Reduktion zu D- β^3 -Homoserin. Nach vollständigem Aufbau der Monomerbausteine wurde eine Fmoc-Schützung vorgenommen, um eine Peptidknüpfung durch Festphasen-Peptidsynthese nach Fmoc-Protokoll zu ermöglichen (Kapitel 2.3.2).

Fmoc-D- β^3 -hLys(Boc)-OH (8)

Die Aminosäure Fmoc-D- β^3 -hLys(Boc)-OH (**8**) wurde ausgehend von ihrem α -Analogon Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (**2**) mittels ARNDT-EISTERT-Homologisierung generiert (Abb. 2.14).^[61] In einer zweistufigen Synthese wurde zuerst die Carboxylgruppe der Aminosäure **6** *in situ* aktiviert und

dabei in ein Carbonsäureanhydrid überführt. Durch die Zugabe von Diazomethan in Diethylether (Et_2O) entstand in einer nucleophilen Addition das α -Diazomethylketon **7**. Das verwendete Diazomethan³ in Diethylether wurde zuvor durch Destillation aus einem Reaktionsgemisch bestehend aus wässrigem KOH und Nitrosomethylharnstoff⁴ in Diethylether gewonnen.^[62] Anschließend fand eine Silber(I)-katalysierte WOLFF-Umlagerung in Gegenwart von Wasser statt, wodurch das gebildete Keten zu der gewünschten Carbonsäure **8** umgesetzt wurde. Die Aminosäure **8** wurde in der Peptidsynthese eingesetzt (Kapitel 2.3.2).

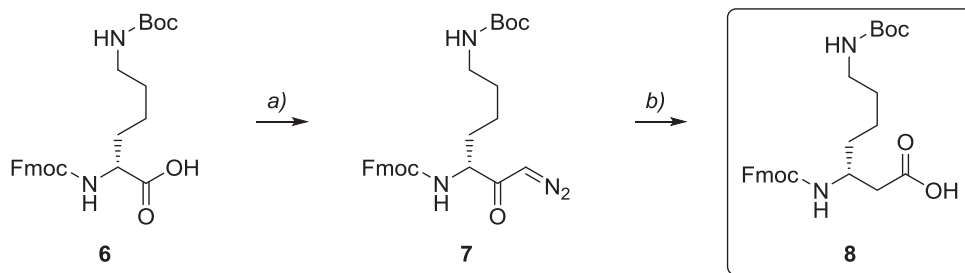


Abbildung 2.14: Synthese von Fmoc-D- β^3 -hLys-OH (**8**).^[61] a) (i) Triethylamin (NEt_3), $t\text{BuCOOCl}$, THF, $-21\text{ }^\circ\text{C}$, 45 min, (ii) CH_2N_2 , Et_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, RT, 6 h; quant. b) AgOBz , THF/ H_2O (9:1), Ultraschallbad, 4 h; 67%.

Fmoc-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACHC-OH (**9**)

Die artifizielle Aminosäure Fmoc-(1*R*,2*R*)-*trans*-Aminocyclohexancarbonsäure (**4**) wurde zur Verfügung gestellt⁵ und wurde ohne weitere Behandlung in der Peptidsynthese (Kapitel 2.3.2) verwendet (Abb. 2.15).

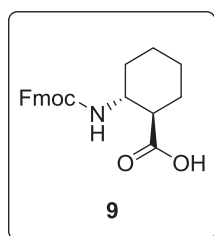


Abbildung 2.15: Fmoc-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACHC-OH (**9**).

Fmoc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**15**)

Die Syntheseroute für die Herstellung der Cyanursäure (CYA)-funktionalisierten Aminosäure Fmoc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**15**) wurde bis zu Boc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**14**) der Dissertation von SRIVASTAVA entnommen (Abb. 2.16).^[17] Ausgehend von Boc-L-Asp-OBn (**10**) wurde nach *in situ*-Aktivierung zum gemischten Anhydrid und Reduktion der α -Carboxylgruppe mittels Natriumborhydrid das Homoserin **11**^[17,59] erhalten. Anschließend erfolgte unter den milden

³ Diazomethan (0.6 – 0.7 M) in Diethylether^[62] wurde entweder selbst hergestellt oder von D. FRANK aus dem Arbeitskreis DIEDERICHSEN generiert.

⁴ Nitrosomethylharnstoff^[258] wurde von D. FRANK aus dem Arbeitskreis DIEDERICHSEN zur Verfügung gestellt.

⁵ Fmoc-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACHC-OH (**9**) wurde entweder von B. WORBS aus dem Arbeitskreis DIEDERICHSEN nach dem Syntheseprotokoll von GELLMANN^[259,260] hergestellt oder kommerziell erworben.



Bedingungen der APPEL-Reaktion durch die Verwendung von Tetrabrommethan und Triphenylphosphin die Umwandlung der Alkoholfunktion in das Bromid-Derivat **12**.^[17] Im nächsten Schritt wurde das Brom durch CYA (**2**) in Gegenwart der Base 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) nucleophil substituiert und das entstandene Boc-D- β^3 -hDap(CYA)-OBn (**13**) durch eine basische Esterhydrolyse in Boc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**14**) überführt.^[17] Zur Verwirklichung der Peptidsynthese nach Fmoc-Protokoll wurde das Amin in β -Position von Boc auf Fmoc umgeschützt. Hierfür wurde zuerst durch die Behandlung mit TFA (Trifluoressigsäure)/H₂O (95:5) die säurelabile Boc-Schutzgruppe über die Generierung der Abspaltprodukte Kohlenstoffdioxid und Isobuten entfernt. Im Anschluss erfolgte die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe an die freie Aminfunktion mittels Fmoc-OSu in wässrigem Dioxan und NaHCO₃ als Base unter Beibehaltung des pH-Wertes in einem Bereich von 8 – 9. Somit wurde nach einer mehrstufigen Synthese mit moderaten bis sehr guten Ausbeuten Fmoc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**15**) für die Peptidsynthese (Kapitel 2.3.2) bereitgestellt (Kapitel 2.3.2).

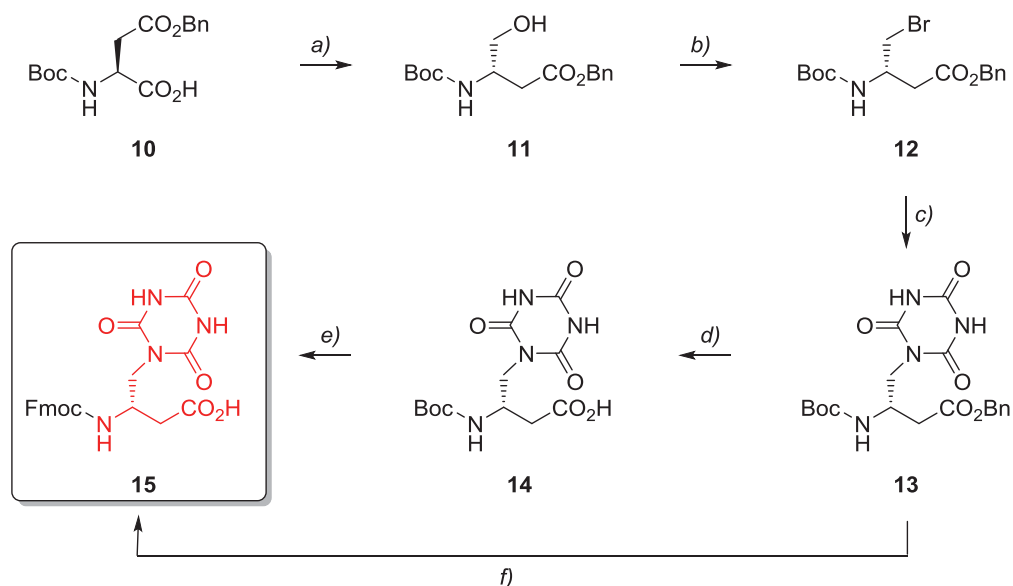


Abbildung 2.16: Synthese von Fmoc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**15**). a) (i) *N*-Ethylmorpholin (NEM), ^tBuCOOCl, THF, –10 °C, 10 min, (ii) NaBH₄, Methanol (MeOH), 0 °C, 30 min; 84%. b) PPh₃, CBr₄, CH₂Cl₂, –10 °C - 0 °C, 30 min, 2 h, RT; 67%. c) CYA (**2**), DBU, Dimethylformamid (DMF), 70 °C, 16 h; 52%. d) 1 M NaOH, Dioxan/H₂O (1:1), RT, über Nacht; 91%. e) (i) TFA/H₂O (95:5), 0 °C, 1 h, RT, 1 h, (ii) Fmoc-OSu, NaHCO₃, Dioxan/H₂O (1:1), 0 °C, 1 h, RT, über Nacht; 69%. f) (v) 1 M NaOH, Dioxan/H₂O (1:1), RT, über Nacht; 91%. (vi) TFA/H₂O (95:5), 0 °C, 1 h, RT, 1 h, (vii) Fmoc-OSu, NaHCO₃, Dioxan/H₂O (1:1), 0 °C, 1 h, RT, über Nacht; 76%.

Fmoc-D- β^3 -hLys(CYA)-OH (**16**)

Alternativ sollte eine modifizierte Version der CYA-funktionalisierten β^3 -Aminosäure (**16**) hergestellt werden, wobei der Abstand zwischen Peptidrückgrat und CYA verlängert werden sollte. Nach retrosynthetischen Überlegungen wurde hierzu eine Strategie ausgearbeitet, die in Abbildung 2.17 dargestellt ist.

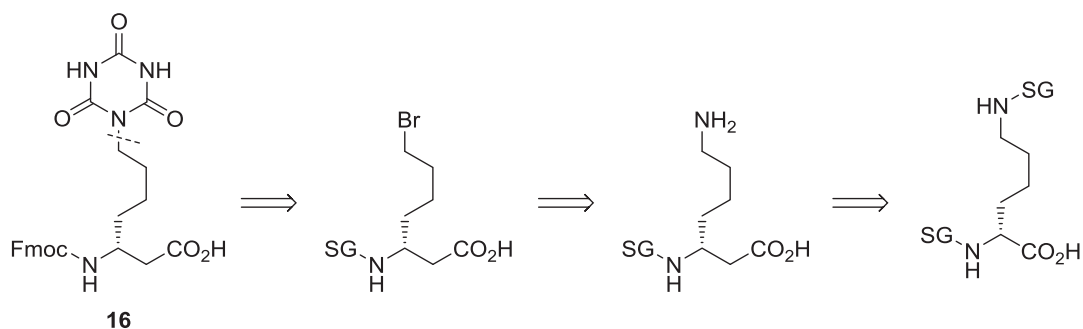


Abbildung 2.17: Retrosynthetische Analyse zur Herstellung von Fmoc-D- β^3 -hLys(CYA)-OH (**16**).

Die Synthese von Fmoc-D- β^3 -hLys(CYA)-OH (**16**) ging von Boc-D-Lys(Cbz)-OH (**17**) aus, welches zuerst in die β^3 -Aminosäure überführt wurde (Abb. 2.18). Die Verlängerung des Rückgrats um eine Methylen-Einheit wurde, wie zuvor für Verbindung **8** beschrieben, durch eine ARNDT-EISTERT-Homologisierung erreicht. Nach erfolgreicher Isolierung von Boc-D- β^3 -hLys(Cbz)-OH (**19**)^[14] wurde die Carboxybenzyl (Cbz)-Schutzgruppe durch Palladium/Aktivkohle-katalysierte Hydrogenolyse^[63] erfolgreich entfernt und Boc-D- β^3 -hLys-OH (**20**) erhalten. In einer Natriumpentacyanonitrosylferrat(II)-vermittelten Reaktion unter basischen Bedingungen^[64–66] führte eine Desaminierung über Diazotierung und darauffolgender Hydroxy-Substitution zur β^3 -Aminosäure **21**. Die moderate Ausbeute von 50% für das Hydroxy-substituierte Produkt **21** wurde aufgrund einer klassischen Konkurrenzreaktion zwischen Substitution und Eliminierung erhalten. Das Entstehen des Eliminierungsproduktes (23%) unter den benötigten Bedingungen (pH = 9.5, 65 °C) war unvermeidbar, weshalb die Reaktion mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt und nach vollständigem Umsatz des Startmaterials sofort beendet wurde. Als nächstes wurde in einer APPEL-Reaktion die Alkoholfunktion von Verbindung **21** in das Bromid-Derivat **22** umgewandelt und diese gegen Cyanursäure (**2**) zu Verbindung **23** substituiert, deren moderate Ausbeute mit der zuvor beschriebenen verkürzten Version **13** vergleichbar ist. Nach Umschützung der Aminogruppe von Boc auf Fmoc wurde Fmoc-D- β^3 -hLys(CYA)-OH (**16**) für die Peptidsynthese (Kapitel 2.3.2) erhalten.

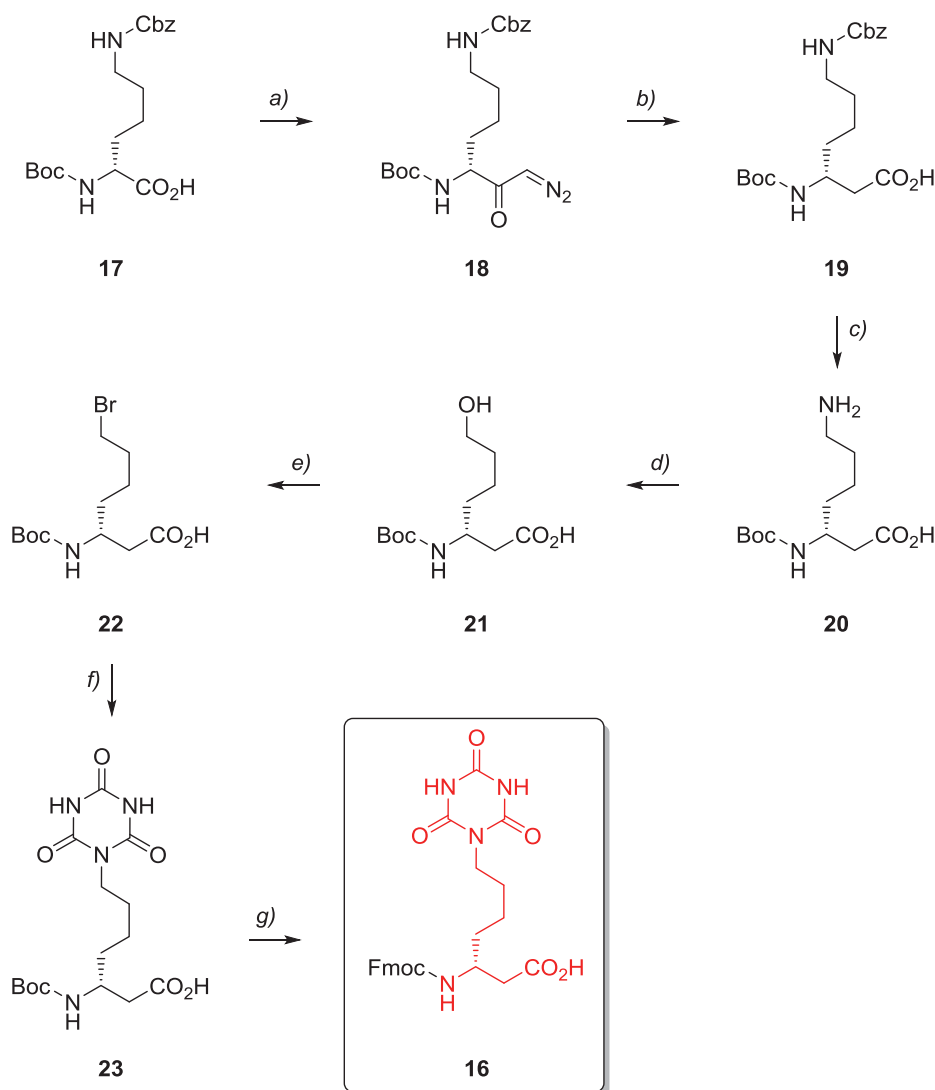


Abbildung 2.18: Synthese von Fmoc-D- β^3 -hLys(CYA)-OH (**16**). a) (i) NEt_3 , $i\text{BuCOOCl}$, THF, -21°C , 45 min, (ii) CH_2N_2 , Et_2O , 0°C , 30 min, RT, 5 h; quant. b) AgOBz , THF/ H_2O (9:1), Ultraschallbad, 3 h; 84%. c) Pd/C , H_2 , Ethanol (EtOH), RT, über Nacht; 98%. d) $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 M NaOH, H_2O , 65°C , 5 h; 50%. e) PPh_3 , CBr_4 , CH_2Cl_2 , -10°C - 0°C , 1 h, RT, über Nacht; 45%. f) CYA (**2**), DBU, DMF, 70°C , 2 d; 52%. g) (i) TFA/ H_2O (95:5), 0°C , 1 h, RT, 1 h, (ii) Fmoc-OSu, NaHCO_3 , Dioxan/ H_2O (1:1), 0°C , 1 h, RT, über Nacht; 90%.

Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**)

Triaminotriazin (TAT, **4**) und Triaminopyrimidin (TAP, **5**) stellen potentielle komplementäre Partner für CYA (**2**) dar. Die Funktionalisierung durch direkte C-C-Kupplung einer β^3 -Aminosäure mit TAP (**5**) an Position C5 des Heteroaromaten konnte in vorheriger Arbeit nicht erreicht werden.^[17] Die Cyclisierung zum gewünschten Produkt, einer Malonsäuredinitril-funktionalisierten β^3 -Aminosäure, unter Verwendung von Guanidiniumsalzen führte im besten Fall zu Ausbeuten von 20%. Als Alternative wurde die Verknüpfung des TATs (**4**) über dessen exocyc

liche Aminogruppe anvisiert. Die gewählten Strategien und Synthesen zur Funktionalisierung mit einer CH_2 -Einheit zwischen der β^3 -Aminosäure und TAT analog zu Fmoc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**15**) werden im Folgenden dargestellt.

Die erste Strategie geht aus der in Abbildung 2.19 dargestellten retrosynthetischen Überlegung hervor. Hierfür sollten zunächst das Aminosäurerückgrat und TAT-Derivat voneinander getrennt aufgebaut werden, um im Anschluss in einer nucleophilen Substitutionsreaktion oder über Iminbildung mit anschließender Reduktion verknüpft zu werden.

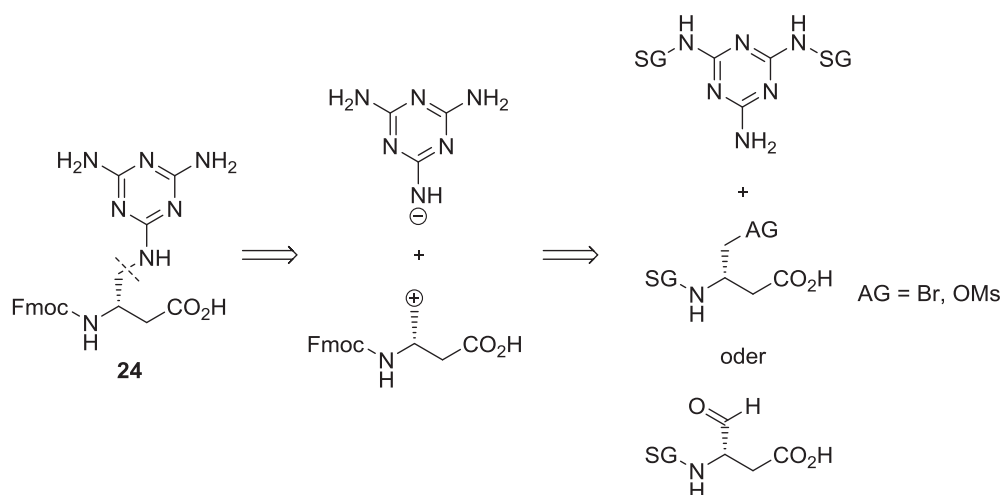


Abbildung 2.19: Retrosynthetische Analyse zur Herstellung von Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**).

Um in erster Linie die Löslichkeit des TAT (**3**) zu verbessern und mögliche Nebenreaktionen der exocyclischen Aminofunktionen während der Peptidsynthese zu vermeiden, sollten zunächst zwei der exocyclischen Aminogruppen geschützt werden. Am besten würden sich aromatische Carboxyl-Schutzgruppen eignen, deren Entschützung nach der Peptidsynthese simultan mit der sauren Abspaltung vom Trägermaterial erfolgen würde. Eine Cbz-Schützung konnte aufgrund der geringen Löslichkeit des TAT (**3**) und der geringen Reaktivität der exocyclischen Amine trotz Erhöhung der Temperatur sowie der Reaktionszeiten nicht beobachtet werden. Angewendet wurden Standardbedingungen zur Cbz-Schützung mit Benzylchlorformiat, Kaliumcarbonat in einem Dioxan/Wasser-Gemisch für einen Tag bei Raumtemperatur, sowie drastischere Bedingungen durch die Verwendung von Benzylchlorformiat, Natriumhydrid in DMF für einen Tag bei Raumtemperatur gefolgt vom Erhitzen auf 50 °C für zwei Stunden.

Statt vom unlöslichen TAT (**3**) auszugehen, wurde 2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin (Cyanurchlorid, **25**) als Ausgangsmaterial ausgewählt. Cyanurchlorid (**25**) besitzt eine sehr gute Löslichkeit in den meisten organischen Lösungsmitteln und erlaubt eine schrittweise Substitution in Abhängigkeit der Temperatur.^[67,68] Das erste Chloratom kann bereits unterhalb von 0 °C substituiert werden, gefolgt vom zweiten Chloratom bei ungefähr Raumtemperatur und dem dritten Chloratom bei höheren Temperaturen (über 80 °C). So konnten die ersten zwei Chlor-Positionen unter Zuhilfenahme von zwei verschiedenen Bedingungen^[69,70] erfolgreich gegen Benzylamine substituiert und das Derivat **26**^[69] erhalten werden (Abb. 2.20).

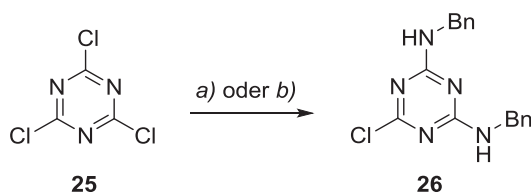


Abbildung 2.20: Synthese von N^2,N^4 -Dibenzyl-6-chlor-1,3,5-triazin-2,4-diamin (**26**)^[69]. a) Benzylamin, K_2CO_3 , 18-Krone-6, Toluol, RT, 2 d; quant. b) Benzylamin, THF, Mikrowellen-Aktivierung: 70 °C, 10 min, max. Leistung = 90 W; 92%.

Die dritte Substitution erforderte höhere Temperaturen. Die Ausbeuten von Reaktionen mit wässrigem oder dioxanhaltigem Ammoniak waren moderat, da sie im Fall von Dioxan als Lösungsmittel keinen vollständigen Umsatz oder im wässrigen Ammoniak hydrolysiertes Nebenprodukt lieferten. Aufgrund verringerter Löslichkeit des Aminoderivats **26** und des hydrolysierten Nebenproduktes war die Reinigung erschwert. Die Reaktion wurde in einem Druckgefäß in flüssigem Ammoniak wiederholt, wodurch das gewünschte Produkt **27**^[71] in quantitativer Ausbeute erhalten werden konnte (Abb. 2.21).

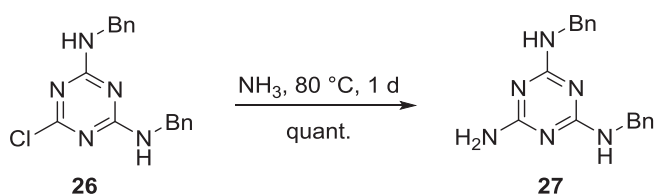


Abbildung 2.21: Synthese von N^2,N^4 -Dibenzyl-1,3,5-triazin-2,4,6-triamin (**27**)^[71].

Die Aldehyd-funktionalisierte D- β^3 -Aminosäure **30** konnte in zwei Stufen ausgehend von Boc-L-Asparaginsäure (**28**) durch Überführen in ein Weinrebamid **29** mit anschließender Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H)-Reduktion generiert werden (Abb. 2.22).

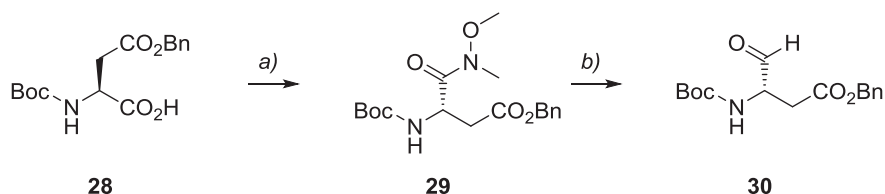


Abbildung 2.22: Synthese von Aldehyd-funktionalisierter D- β^3 -Aminosäure **30**. a) N,O -Dimethylhydroxylamin, NEM, 1 Propanphosphonsäurecycloanhydrid (PPA), DCM, -10 °C, 1.5 h, RT, 2 h; 84%. b) DIBAL-H, THF, -78 °C, 2 h; 46%.

Im Schlüsselschritt wurden der Aldehyd **30** und N^2,N^4 -Dibenzyl-1,3,5-triazin-2,4,6-triamin (**27**) in Chloroform und dem Trocknungsmittel Magnesiumsulfat umgesetzt, jedoch blieb die Iminbildung aufgrund der geringen Löslichkeit von Verbindung **27** aus. Aus diesen Erkenntnissen wurde die zweite retrosynthetische Überlegung mit umgekehrten nucleophilen und elektrophilen Synthons in Betracht gezogen (Abb. 2.23). Dabei sollte der bereits hergestellte Baustein **26** mit einer N -terminal geschützten D- β^3 -Homodiaminopropionsäure zur Reaktion gebracht werden.

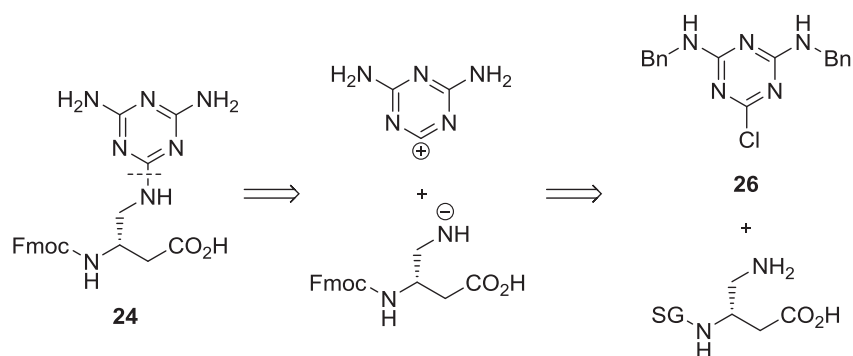


Abbildung 2.23: Zweite retrosynthetische Analyse zur Herstellung von Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**).

Die Aminosäure Boc-D- β^3 -hDap-OH (**32**) wurde ausgehend von dem bereits vorgestellten Brom-Derivat **12** in zwei zusätzlichen Stufen mit guten Ausbeuten hergestellt (Abb. 2.24). Hierfür wurde in einer Reaktion mit Natriumazid in DMF das Bromid zu einem Azid **31** substituiert, das durch eine Palladium/Aktivkohle-vermittelte Hydrogenolyse mit gleichzeitiger C-terminaler Entschützung in das Amin Boc-D- β^3 -hDap-OH (**32**) überführt wurde. Im Schlüsselschritt konnte das β^3 -Rückgrat mit *N*²,*N*⁴-Dibenzyl-6-chlor-1,3,5-triazin-2,4-diamin (**26**) zum gewünschten Produkt **33** verknüpft werden. Dazu wurden beide Reaktanden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und basenvermittelt unter Erhitzen zur Reaktion gebracht, wobei ein 1:1:1 sowie ein 1:2:2-Verhältnis an Aminosäure **32**/*N*²,*N*⁴-Dibenzyl-6-chlor-1,3,5-triazin-2,4-diamin (**26**)/K₂CO₃ getestet wurden, während das Letztere bessere Ergebnisse lieferte. Die Verfolgung der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie (DC) zeigte nach einem Tag neben nicht umgesetzter β^3 -Aminosäure die Bildung des Produktes sowie eines Nebenproduktes. Nach Verlängern der Reaktionszeit auf bis zu vier Tage wurden neben unvollständigem Umsatz eine Verringerung des Produktes und die vermehrte Entstehung des Nebenproduktes beobachtet. Bei dem Nebenprodukt handelte es sich um das 3-Triaminotriazin-2-(oxo-imidazolidin-1-yl)essigsäure (**34**), welches unter den drastischen Bedingungen durch den nucleophilen Angriff des γ -ständigen sekundären Amins am Carbonylkohlenstoff der Boc-Schutzgruppe mit gleichzeitiger Abspaltung von *tert*-Butanolat entstand. Anhand der NMR-spektroskopischen Daten konnte ermittelt werden, dass nach 18 h Reaktionszeit der Anteil des Nebenprodukts 10% betrug, nach vier Tagen sogar 80%. Daher wurde die Reaktion nach einem Tag beendet und das gewünschte Produkt **33** nach Reinigung mit einer Ausbeute von 41% isoliert.

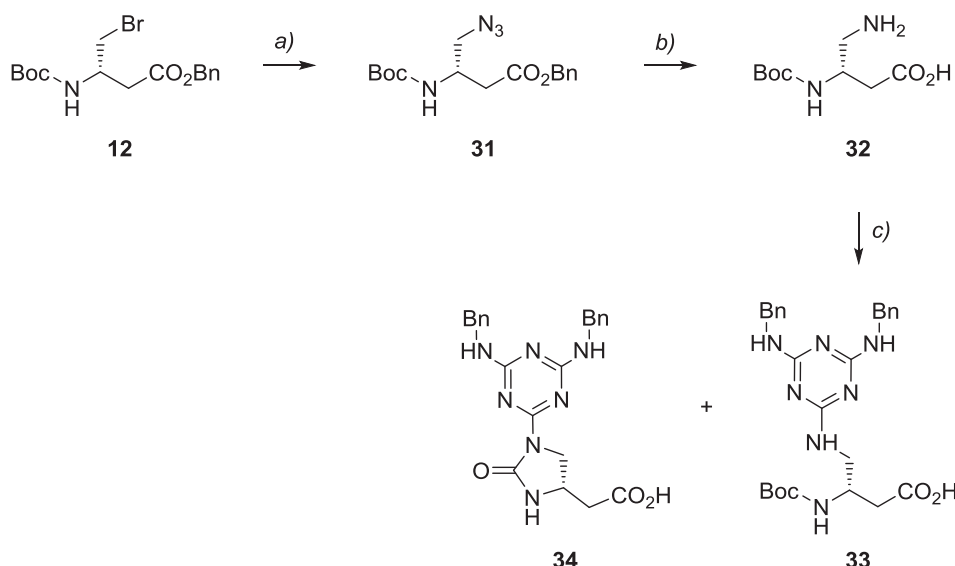
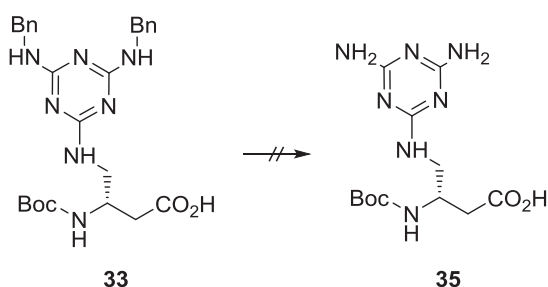


Abbildung 2.24: Synthese der dibenzylierten Triaminotriazin-funktionalisierten D- β^3 -Aminosäure **33**. a) NaN_3 , DMF, 50 °C, 5 h; 91%. b) H_2 , Pd/C, EtOH, RT, 1 atm, über Nacht; 89%. c) N^2,N^4 -Dibenzyl-6-chlor-1,3,5-triazin-2,4-diamin (**26**), K_2CO_3 , DMSO, 85 °C, 18 h; 41%.

Vor der Umschüttung der Verbindung **33** von Boc auf Fmoc wurde die Entschüttung der Benzyl-Schutzgruppen, welche nach Einbau in die Peptide und Abspaltung vom Trägermaterial stattfinden sollte, im Voraus getestet werden. Die Entschüttung verläuft bekanntlich unter drastischeren Bedingungen im Vergleich zu den aromatischen Carbamat-Schutzgruppen, deren Triebkraft im Allgemeinen die CO_2 -Freisetzung ist.^[72] Die Benzyl-Schutzgruppen konnten unter den genannten Bedingungen in Abb. 2.25 nicht entfernt werden. Die dibenzylierte Aminosäure **33** wies aufgrund ihres konjugierten π -Elektronensystems eine hohe Stabilität auf.



Getestete Bedingungen

H_2 , Pd/C, EtOH, RT, 1 atm, über Nacht

H_2 , Pd/C, MeOH/ CHCl_3 (3:1), RT, 80 bar, 1mL/min (H-Cube)

NH_4HCO_3 , Pd/C, MeOH, reflux, 3 h

$(\text{NH}_4)\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (98:2), RT, über Nacht

$(\text{NH}_4)\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (98:2), 50 °C, 18 h

Abbildung 2.25: Getestete Reaktionsbedingungen zur Benzyl-Entschüttung von Verbindung **33**.

Die gleiche Schlüsselreaktion wurde durch den Einsatz von kommerziell erhältlichem, ungeschütztem 6-Chlor-2,4-diamin-1,3,5-triazin mit der β^3 -Aminosäure **32** durchgeführt. Getestet wurden folgende Bedingungen: a) NaOH/H₂O, 85 °C, über Nacht, b) DMF, K₂CO₃, 75 °C, über Nacht, c) DMSO, 85 °C, über Nacht. Nur aus der Reaktion c) konnte aus massenspektrometrischen Analysen das Produkt und erneut gebildetes Oxo-imidazolidin (bis zu 40% aus NMR) bestätigt werden. Aufgrund der sehr geringen Ausbeute nach Isolierung wurden keine weiteren Versuche zur Optimierung unternommen.

Aus den zuvor beschriebenen Strategien zum Erhalt von Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**) konnten folgende Erkenntnisse für zukünftige Strategien abgeleitet werden: Eine Cbz-Schätzung exocyclischer Aminogruppen des TATs (**3**) mittels reaktivem Cbz-Cl konnte unter stark basischen Bedingungen sowie Hitzeeinwirkung nicht erreicht werden. Somit bedarf es keiner Schätzung der unreaktiven exocyclischen Aminogruppen des TATs während der Peptidknüpfung. Der Schlüsselschritt zur Synthese von Verbindung **33** funktionierte nur bedingt aufgrund der Bildung des Oxo-imidazolidins **34**. Um den nucleophilen Angriff des γ -ständigenamins zu vermeiden, bedarf es an β -N-Schutzgruppen, die nicht auf Carbamaten basieren.

Daraus resultierte die in Abbildung 2.26 dargestellte dritte Syntheseroute. Die optimierte mehrstufige Synthese startete von Boc-D-Asn-OH (**36**) mit einer HOFFMANN-Umlagerung durch die Verwendung von Diacetoxyiodbenzol (PIDA).^[73] Das entstandene Boc-D-Dap-OH (**37**) wurde im nächsten Schritt Fmoc-geschützt^[74] und nach Durchführung der ARNDT-EISTERT-Homologisierung wurde die β^3 -Aminosäure **40** erhalten. Da eine Carbamat-Schutzgruppe an $N\alpha$ -Position aufgrund der Bildung des 2-Oxo-imidazolidins im Schlüsselschritt vermieden werden sollte, wurde eine Umschätzung von Boc auf *p*-Methoxybenzyl (Pmb) vorgenommen. Dazu wurde die Boc-Schutzgruppe entfernt und anschließend die freie Aminofunktion mit Methoxybenzaldehyd umgesetzt. Das gebildete Imin in der Zwischenstufe wurde mit Natriumborhydrid reduziert und lieferte Pmb-D- β^3 -hDap(Fmoc)-OH (**41**). Danach erfolgte eine Fmoc-Entschätzung von Verbindung **41** nach einem E1cb-Mechanismus. Durch die Zugabe von Piperidin in Acetonitril wurde durch die Entstehung der Abspaltprodukte Kohlenstoffdioxid und Dibenzofulven-Piperidin-Addukt die Aminosäure Pmb-D- β^3 -hDap-OH (**42**) generiert. Pmb-D- β^3 -hDap-OH (**42**) wurde mit 2-Chlor-4,6-diamino-1,3,5-triazin in Gegenwart von K₂CO₃ in DMSO zur Reaktion gebracht. Im Schlüsselschritt wurde eine bessere Ausbeute von 72% (41% bei **33**) für Pmb-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**43**) erhalten. Interessant war allerdings die Isolierung eines geringfügig entstandenen Nebenproduktes, welches anhand einer NMR-Analyse als zweifach TAT-substituierte β^3 -Aminosäure identifiziert werden konnte. Im Gegensatz zu Carbamat-Schutzgruppen hat die Pmb-Schutzgruppe einen elektronenschiebenden Effekt auf das Amin in β -Position, wodurch es basischer und somit reaktiver ist. Deshalb wurde neben der gewünschten NH-Knüpfung in γ -Position eine Diaminotriazin-Funktionalisierung desamins in β -Position erhalten. Im weiteren Verlauf erfolgte die oxidative Pmb-Entschätzung von Verbindung **44** durch die Verwendung von Cer(IV)ammoniumnitrat (CAN) gefolgt von einer Fmoc-Schätzung. Die erfolgreich isolierte Aminosäure Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**) wurde in der Festphasen-Peptidsynthese verwendet (Kapitel 2.3.2).

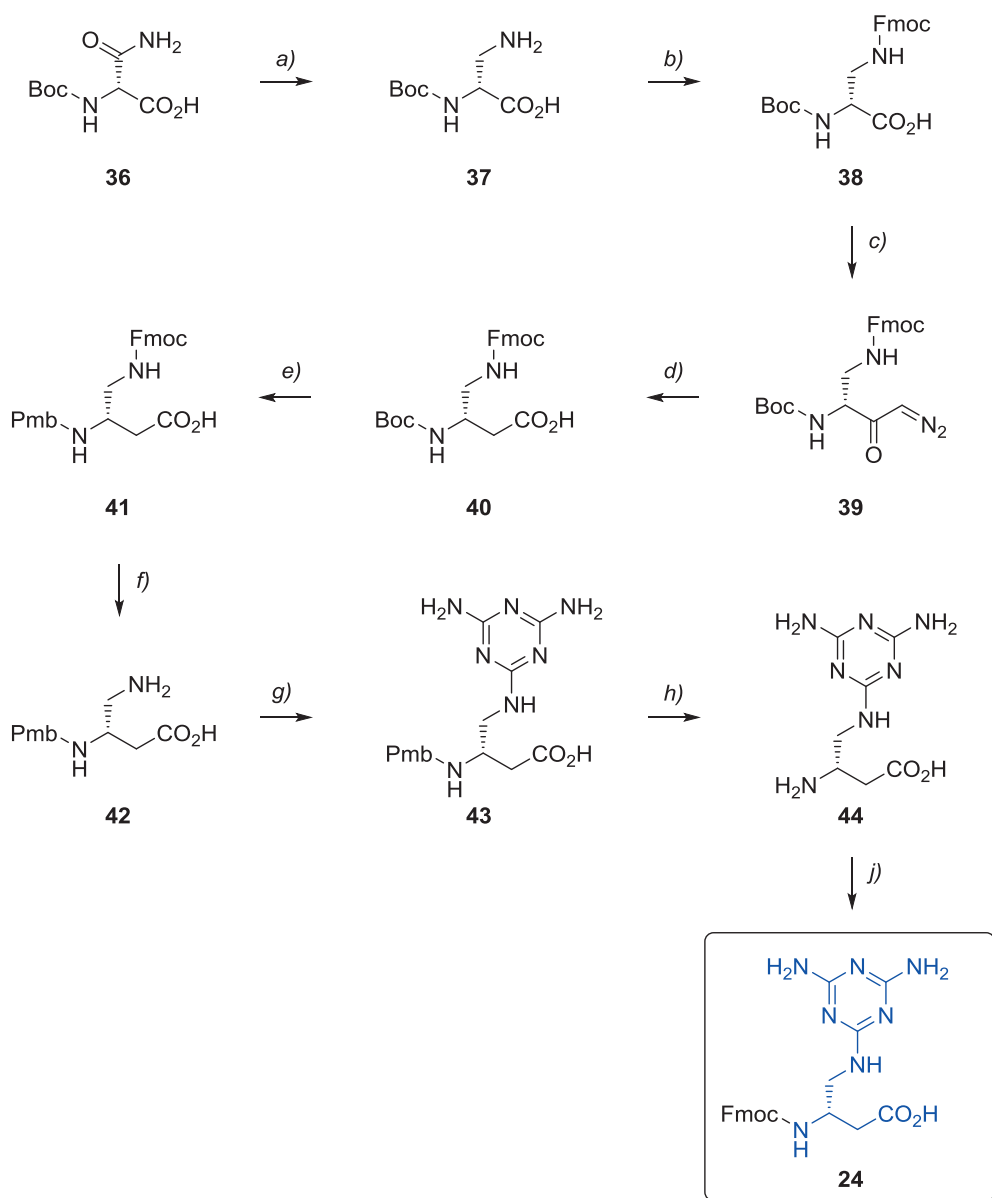


Abbildung 2.26: Synthese von Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**). *a*) PIDA, CH₃CN/Essigsäureethylester (EtOAc)/H₂O (2:2:1), 0 °C, 15 min, RT, 4 h; 83%. *b*) Fmoc-Cl, NaHCO₃, Dioxan, 0 °C, 1 h, RT, 1 h; quant. *c*) (i) NEt₃, ^tBuCOOCl, THF, -15 °C, 1 h, (ii) CH₂N₂, Et₂O, 0 °C, 30 min, RT, 5 h; 83%. *d*) AgOBn, THF/H₂O (9:1), Ultraschallbad, 4.5 h; 87%. *e*) (i) TFA/H₂O (98:2), 0 °C, 0.5 h, RT, 1 h. (ii) 4-Methoxybenzaldehyd, *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA), MeOH, RT, 1 h, (iii) NaBH₄, MeOH, 0 °C, 15 min, RT, über Nacht; 89% über drei Stufen. *f*) Piperidin, CH₃CN, RT, über Nacht; 83%. *g*) 2-Chlor-4,6-diamino-1,3,5-triazin, K₂CO₃, DMSO, 88 °C, 8 h; 72%. *h*) CAN, CH₃CN/H₂O (5:1), RT, über Nacht; 93%. *j*) Fmoc-OSu, NaHCO₃, Dioxan/H₂O (1:1), 0 °C, 1 h, RT, 2 h; quant.

Fmoc-D- β^3 -hDap(Alloc)-OH (**49**)

Alternativ wurde Fmoc-D- β^3 -hDap(Alloc)-OH (**49**) aufgebaut, welches als Rückgrat dienend in β^3 -Peptide (Kapitel 2.3.2) eingebaut werden sollte, um eine TAT-Funktionalisierung der verkürzten Version auf fester Phase zu ermöglichen (Abb. 2.27). Hierzu wurde zunächst eine HOFFMANN-Umlagerung durch Verwendung von Diacetoxyiodbenzol (PIDA) an Fmoc-D-Asn-OH (**45**)^[73] durchgeführt und Fmoc-D-Dap-OH (**46**) erhalten. Nach Allyloxycarbonyl (Alloc)-

Schützung des freien Amins **47** und Generierung der β^3 -Aminosäure mittels ARNDT-EISTERT-Homologisierung wurde die Aminosäure Fmoc-D- β^3 -hDap(Alloc)-OH (**49**) isoliert.

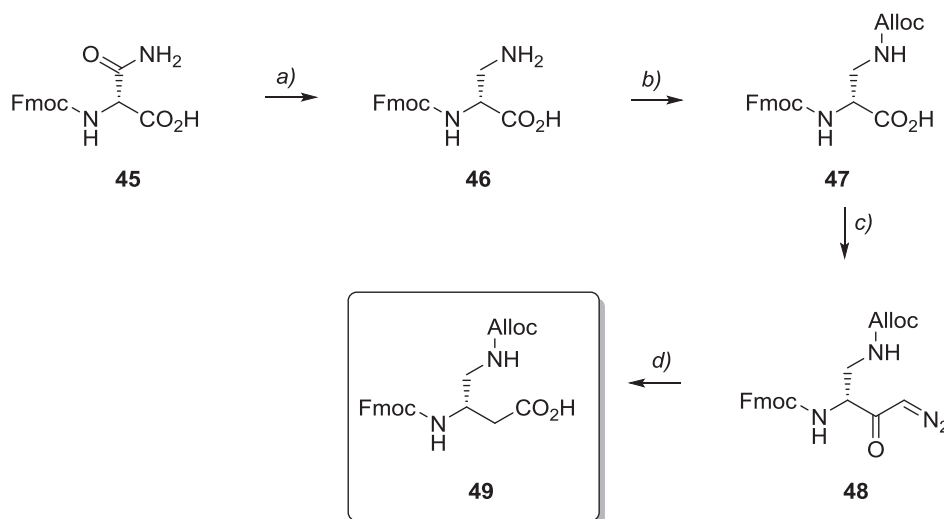


Abbildung 2.27: Synthese von Fmoc-D- β^3 -hDap(Alloc)-OH (**49**). *a)* PIDA, CH₃CN/EtOAc/H₂O (2:2:1), 0 °C, 15 min, RT, 6 h; 83%. *b)* Alloc-Cl, NaHCO₃, Dioxan/H₂O (1:1), 0 °C, 1 h, RT, 1 h; 61%. *c)* (i) NEt₃, ^tBuCOOCl, THF, -15 °C, 1 h, (ii) CH₂N₂, Et₂O, 0 °C, 30 min, RT, 5 h; 51%. *d)* AgOBn, THF/H₂O (9:1), Ultraschallbad, 4.5 h; 89%.

Fmoc-D- β^3 -hLys(TAT)-OH (**55**)

Analog zu den CYA-funktionalisierten β^3 -Aminosäuren **15** und **16**, welche eine unterschiedliche Anzahl an CH₂-Einheiten zwischen Rückgrat und Erkennungseinheit tragen, wurde auch für TAT eine verlängerte Version für die Peptidsynthese bereit gestellt (Abb. 2.28). Das α -L-Analogon des gewünschten D- β^3 -hLys(TAT)-OH ist bereits in der Literatur beschrieben^[75] und wurde nach gleicher Strategie synthetisiert. Zunächst wurde ausgehend von Boc-D-Lys(2-Cl-Cbz)-OH (**50**) eine ARNDT-EISTERT-Homologisierung durchgeführt, gefolgt von einer Palladium/Aktivkohle-katalysierten Hydrogenolyse zu Boc-D- β^3 -hLys-OH (**53**). Der Schlüsselschritt, die Verknüpfung des Rückgrats mit 2-Chlor-4,6-diaminotriazin, wurde identisch zur verkürzten Version durchgeführt und es wurden vergleichbare Ausbeuten erzielt. Nach Umschützung von Boc auf Fmoc wurde die gewünschte Aminosäure Fmoc-D- β^3 -hLys(TAT)-OH (**55**) erhalten und konnte in der SPPS eingesetzt werden (Kapitel 2.3.2).

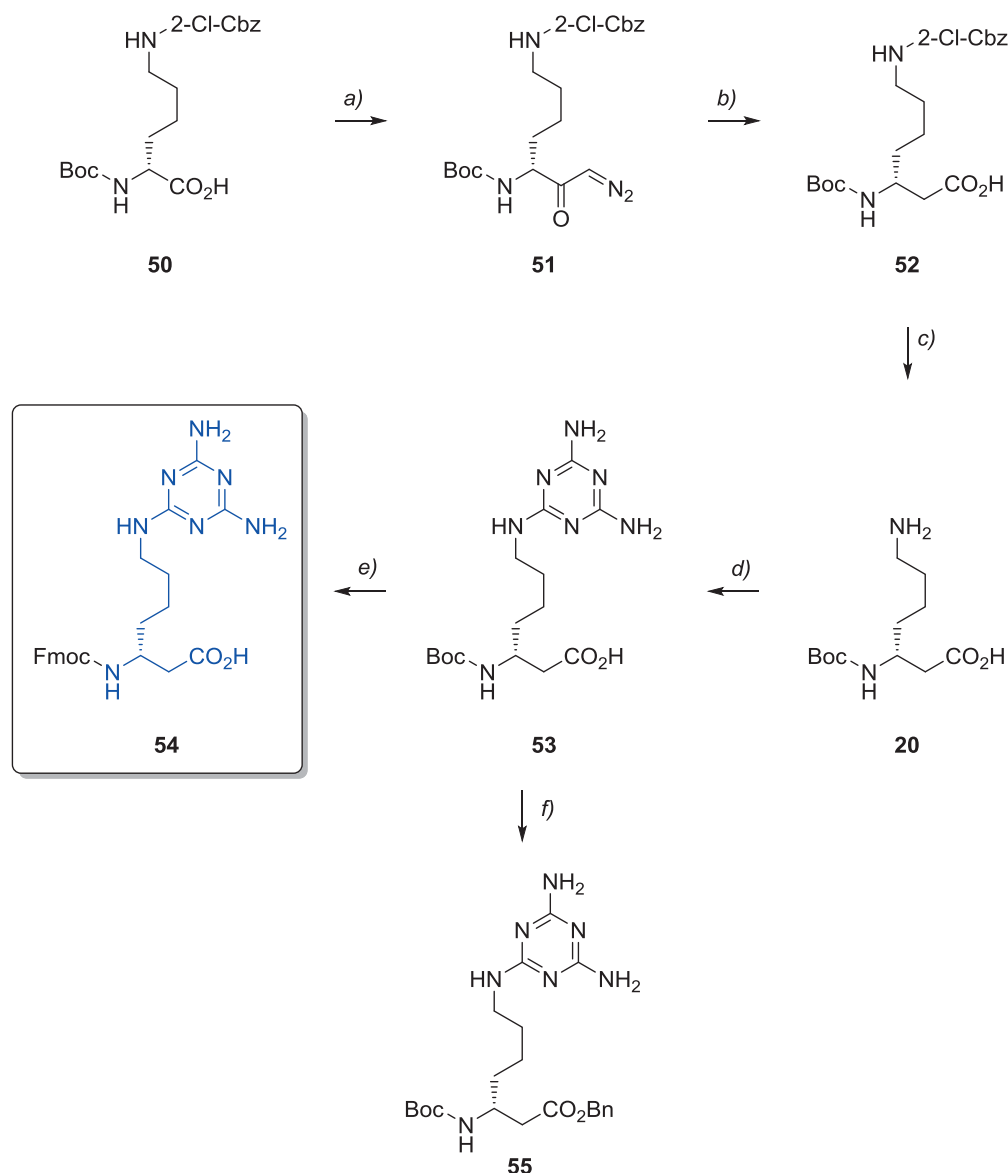


Abbildung 2.28: Synthese von Fmoc-D- β^3 -hLys(TAT)-OH (**54**). a) (i) NEt_3 , $t\text{BuCOOCl}$, THF, -15°C , 45 min, (ii) CH_2N_2 , Et_2O , 0°C , 30 min, RT, 6 h; 97%. b) AgOBn, THF/ H_2O (9:1), Ultraschallbad, 4.5 h; 85%. c) Pd/C, H_2 , EtOH, RT, über Nacht; quant. d) 6-Chlor-1,3,5-triazin-2,4-diamin, K_2CO_3 , DMSO, $84-98^\circ\text{C}$, über Nacht; 70%. e) (i) TFA/ H_2O (95:5), 0°C , 1 h, RT, 1 h, (ii) Fmoc-OSu, NaHCO_3 , Dioxan/ H_2O (1:1), 0°C , 1 h, RT, über Nacht; 64%. f) BnBr, NaHCO_3 , DMF, 0°C , 10 min, RT, über Nacht; 36%.

Das Aggregationsverhalten der Monomerbausteine in Abwesenheit eines peptidischen Rückgrats wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie (ESI-MS) untersucht (Kapitel 2.3.3.3). Hierzu wurden *N*- und *C*-terminal geschützte CYA- und TAT- β^3 -Aminosäuren verwendet, um Interaktionen des Rückgrats mit den Erkennungseinheiten auszuschließen. Das Zwischenprodukt Boc-D- β^3 -hDap(CYA)-OBn (**13**) konnte direkt verwendet werden. Die komplementäre Aminosäure Boc-D- β^3 -hLys(TAT)-OH (**53**) erforderte eine zusätzliche *C*-terminale Benzylschützung (Abb. 2.28, Reaktion f). Die Reaktion von Aminosäure **53** und Benzylbromid in Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat in DMF lieferte das Produkt Boc-D- β^3 -hLys(TAT)-OBn (**55**) in geringen Ausbeuten. Da die isolierte Menge für die Analysen ausreichend war, wurde die Synthese zur Optimierung nicht wiederholt.

2.3.2 Synthese der β^3 -Peptide

Die erste chemische Peptidsynthese in Lösung wurde von E. FISCHER im Jahre 1901 veröffentlicht und bestand lediglich aus der Kondensation zweier α -Aminosäuren.^[76] Nach der Entwicklung von Schutzgruppen und darüber hinaus der orthogonalen Schutzgruppenstrategie (Boc/Cbz) zur Maskierung der reaktiven Seitenketten der Aminosäuren während der Peptidsynthese, führte MERRIFIELD die Festphasen-Peptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) nach Boc-Protokoll ein.^[77,78] Die Boc-Strategie benötigt harsche Bedingungen bei der Entschützung und die Abspaltung vom Trägermaterial erfordert den Gebrauch von Fluorwasserstoff oder anderen aggressiven Alternativen. Erst mit der Einführung der Fmoc-Strategie konnte die SPPS sogar automatisiert stattfinden, da in diesem Fall milde Basen bereits zu einer Fmoc-Entschützung führen und Trägermaterialien mit milderem Abspaltbedingungen verwendet werden können.^[76] Beide Strategien basieren im Allgemeinen auf demselben Prinzip und finden nicht nur für die Generierung von α -Peptide Verwendung, sondern sind auch auf die Synthese von artifiziellen Peptiden übertragbar. Im Folgenden wird die Funktionsweise der SPPS zur Herstellung von Peptiden am eigenen Beispiel unter Verwendung von β -D-Aminosäuren kurz beschrieben (Abb. 2.29).

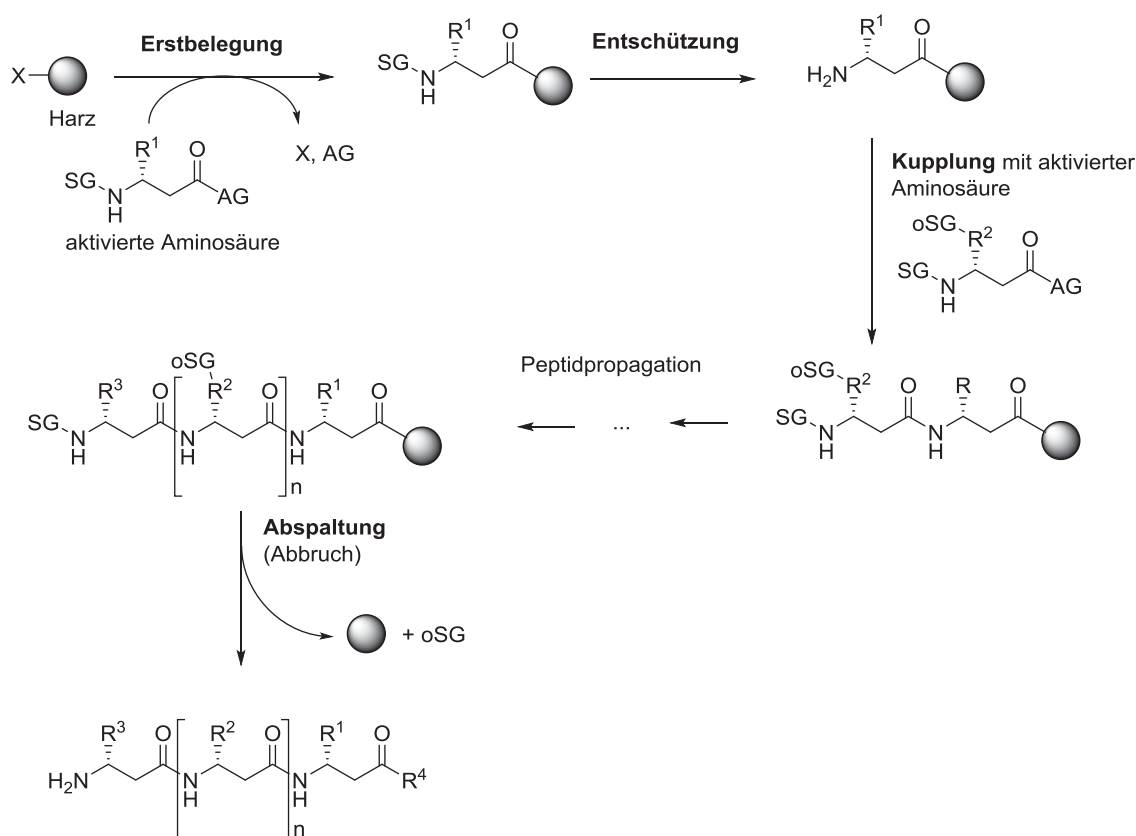


Abbildung 2.29: Schematische Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese am Beispiel der β -D-Aminosäuren mit orthogonaler Schutzgruppenstrategie. Die Peptidsynthese verläuft vom C- zum N-Terminus. Dabei sind die Abkürzungen wie folgt definiert: SG = Schutzgruppe (Boc oder Fmoc), oSG = orthogonale Schutzgruppe, R¹, R², R³ = Seitenkettenmodifikation, X, AG = Abgangsgruppe und R⁴ = OH oder NH₂ je nach eingesetztem Harz.

Zu Beginn erfolgt die Erstbelegung des Harzes, in der das feste Trägermaterial mit der ersten *N*-terminal geschützten Aminosäure verknüpft wird. Die Harze bestehen hauptsächlich aus quervernetztem Polystyrol (PS) sowie Polyethylenglycol (PEG)-haltigen Polymeren.^[76] Die Polymere besitzen auf ihrer Oberfläche reaktive Linkerregionen (Amine, Alkohole, Hydrazine, Oxime), die mit der ersten Aminosäure verbunden werden. Die Bestimmung der Belegungsdichte (mmol/g) zeigt den Grad der Erstbelegung an, welches für Boc über die Gewichtszunahme des Harzes und für Fmoc zusätzlich über die UV-Absorption des Abspaltproduktes Fmoc-Dibenzofulven erfolgen kann.^[79] Nach Acetylierung unbelegter Positionen wird im nächsten Schritt die *N*-terminale Schutzgruppe (Boc bzw. Fmoc) der bereits verknüpften Aminosäure abgespalten. Darauffolgend wird die nächste *N*-terminal geschützte Aminosäure in Lösung *C*-terminal aktiviert und unter Bildung einer Amidbindung an die erste Aminosäure gebunden. Als Aktivierungsreagenz für β^3 -Aminosäuren hat sich in unseren Laboratorien eine Kombination aus *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU)/7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt) durchgesetzt, welche im Vergleich zu den standardisierten Reagenzien wie *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU)/1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) eine höhere Reaktivität aufweist (Abb. 2.30).

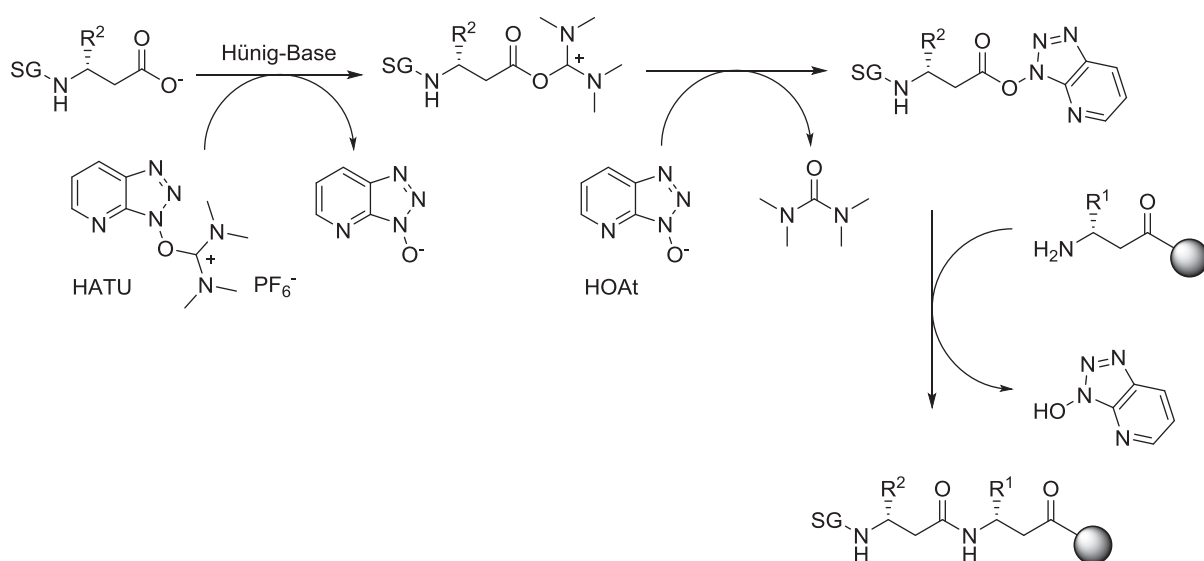


Abbildung 2.30: *C*-Terminale Aktivierung einer β^3 -Aminosäure mittels HATU/HOAt gefolgt von *N*-terminaler Peptid-Knüpfung.

Die Kupplung kann ein weiteres Mal wiederholt werden (Doppelkupplung), um noch nicht reagierte Stellen zu belegen. Eine anschließende Acetylierung nicht umgesetzter, freier Amingruppen kann nach jedem Schritt vorgenommen werden, um die Bildung von Nebenprodukten zu vermeiden. Die Schritte der Entschützung sowie Kupplung werden solange wiederholt, bis die gewünschte Peptidsequenz erreicht ist. Zwischen jedem dieser Schritte muss das Harz mehrmals gewaschen werden, um die Verunreinigungen zu entfernen. Abschließend erfolgen die Abspaltung vom Trägermaterial und die simultane Entfernung der Seitenketten-Schutzgruppen. Nach Vorbehandlung, welche Entfernen flüchtiger Bestandteile und Etherfällung beinhaltet, wird das Rohprodukt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) gereinigt und die Richtigkeit der Sequenz mit massenspektrometrischen Analysen (ESI-MS, HR-MS) überprüft.

Des Weiteren kann zwischen manueller (Kupplung erfolgt bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen), manuell Mikrowellen-unterstützter (Kupplung erfolgt durch Mikrowellen-Anregung) und automatisiert Mikrowellen-unterstützter Festphasen-Peptidsynthese unterschieden werden. Im Arbeitskreis DIEDERICHSEN hat sich die Boc-Strategie für die Synthese der Nucleobasen-funktionalisierten β^3 -Peptide etabliert, in der jeder Schritt manuell und bei Raumtemperatur durchgeführt wird.^[14–16] Eine Ausnahme bildet der Kupplungsschritt, in dem bei höheren Temperaturen (50 °C) bessere Ergebnisse erzielt werden. In gleicher Weise gelang SRIVASTAVA die erstmalige Synthese des β^3 -hDap(CYA)-Decapeptids **56** (Abb. 2.31).^[17] In dieser Arbeit erfolgte die Synthese nach Fmoc-Strategie, um die harschen Bedingungen zu umgehen und die Kupplungseffizienz zu steigern.

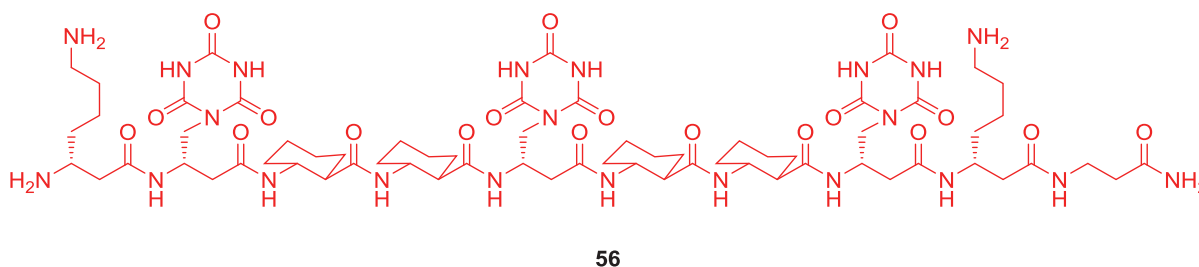


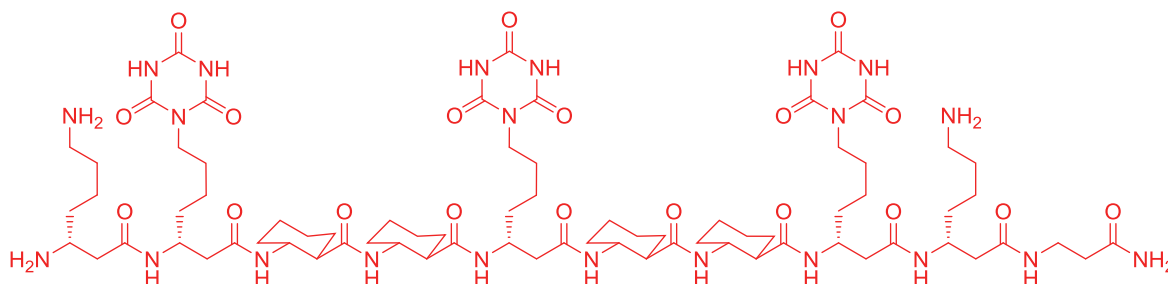
Abbildung 2.31: β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56**.^[17] Synthese durch SPPS nach Fmoc-Protokoll unter Verwendung der Monomerbausteine Fmoc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**15**), Fmoc-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACHC-OH (**9**) und Fmoc-D- β^3 -hLys-OH (**8**).

Eine direkte Übertragung der Kupplungsbedingungen (2 h bei 50 °C) von Boc auf Fmoc unter Verwendung eines sehr säurelabilen Trägermaterials (β -Ala vorbelegtes Sieberamid-Harz) lieferte zufriedenstellende Ergebnisse. Jedoch waren die Reaktionszeiten nach beiden Protokollen zu lang. Für ein Decapeptid mit Doppelkupplung und den Bedingungen von je zwei Stunden bei 50 °C wurde eine Gesamtdauer von 40 Stunden erhalten, zu der die Zeit für die Vorbereitung, die Entschützung sowie für die Waschschrte noch gezählt werden müssen. In Arbeiten von GELLMAN wurde zwischen Kupplungen bei Raumtemperatur, höheren Temperaturen sowie Mikrowellen-Anregung verglichen.^[80] Eine Übertragung seiner Mikrowellen-unterstützten Kupplungsbedingungen verkürzte die Kupplungszeit eines Decapeptids auf vier Stunden. Ebenso wurden die in der Literatur erwähnten Bedingungen für die Kupplung von Fmoc-ACHC-OH (**9**) übernommen, in der das chaotrope Salz Lithiumchlorid in *N*-Methylpyrrolidin-2-on (NMP) eingesetzt wurde.^[80] Chaotrope Salze werden bei der Peptidsynthese zur Unterbindung von Sequenzlängen-abhängigen Aggregationen auf dem Harz eingesetzt. Im Fall des β^3 -hDap(CYA)-Decapeptids **56** wurde aufgrund der Polarität sowie der Kürze der Sequenz weniger Aggregation auf dem Harz erwartet, aber aufgrund der Rigidität von ACHC das chaotrope Salz verwendet. Die Inkorporation vom jeweils zweiten ACHC war im Vergleich zum Ersten erschwert und dementsprechend die gewählte Kupplungszeit nicht ausreichend. Mit einer Erhöhung der Kupplungszeit von 10 auf 20 min Mikrowellen-Aktivierung konnte dieses Problem behoben werden. Das β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** wurde nach Abspaltung von der festen Phase unter milderen Bedingungen mit 10% TFA/*m*-Cresol (95:5, v/v) in Dichlormethan (DCM), Vorbehandlung und HPLC-Reinigung erfolgreich isoliert und durch massenspektrometrische Analysen bestätigt.



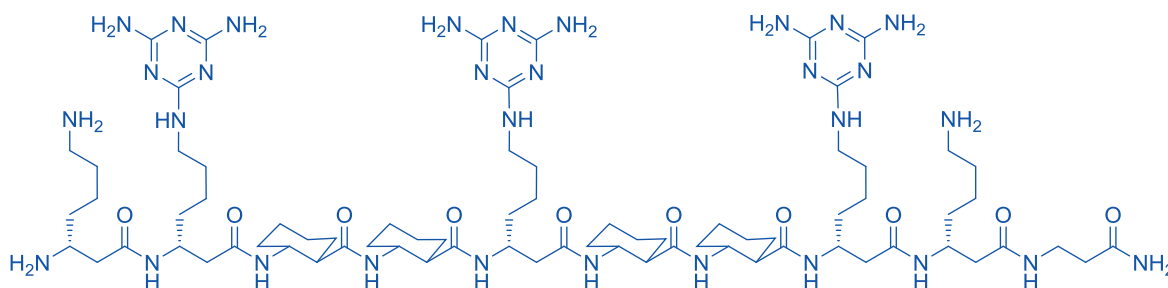
Weiterführend konnten das β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** und das β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** nach demselben Mikrowellen-unterstützten Fmoc-Protokoll erfolgreich synthetisiert und isoliert werden (Abb. 2.32).

A



57

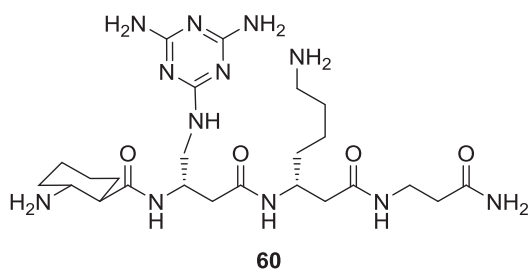
B



58

Abbildung 2.32: Die zueinander komplementären Peptide: β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** und β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58**. Synthese erfolgte durch SPPS unter Verwendung der folgenden Monomerbausteine: (A) Fmoc-D- β^3 -hLys(CYA)-OH (**16**), Fmoc-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACHC-OH (**9**) und Fmoc-D- β^3 -hLys-OH (**8**) und (B) Fmoc-D- β^3 -hLys(TAT)-OH (**54**), Fmoc-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACHC-OH (**9**) und Fmoc-D- β^3 -hLys-OH (**8**).

Nach demselben Prinzip wie zuvor beschrieben sollte das β^3 -hDap(TAT)-Decapeptid (**59**) hergestellt werden. Dazu wurden die Aminosäuren Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**), Fmoc-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACHC-OH (**9**) und Fmoc-D- β^3 -hLys-OH (**8**) eingesetzt. Beim Aktivieren von Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**) während der SPPS wurde eine geringe bis keine Löslichkeit des Bausteins in DMF sowie NMP beobachtet und infolgedessen eine Testabspaltung nach vier Aminosäuren gefolgt von massenspektrometrischen Analysen durchgeführt, in denen das Tetrapeptid **60** nicht bestätigt werden konnte (Abb. 2.33). Getestet wurden weitere Bedingungen, welche in Abbildung 2.5 dargestellt sind. Trotz Variation des Lösungsmittels unter Berücksichtigung der Quelleigenschaft des Harzes, die Verwendung reaktiverer Aktivester (Benzotriazol-1-yl-oxy-tripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat, PyBOP) oder dem Einsatz reaktiverer Radikalfänger während der Abspaltung vom Trägermaterial, konnte eine Inkorporation nur in geringem Umfang erzielt werden.



Kupplung

Reagenzien	Bedingungen	Ergebnis
AS 24 , HATU, HOAt, DIPEA, NMP	2 h, RT	negativ
	2 h, 60 °C	negativ
AS 24 , HATU, HOAt, DIPEA, NMP/DMSO	2 h, RT	positiv, in Spuren
	2 h, 60 °C	positiv, in Spuren
AS 24 , PyBOP, DIPEA, NMP/DMSO	2 h, 60 °C	negativ
AS 24 , HATU, HOAt, DIPEA, DMSO	12 min, 45 °C, 20 W	positiv, in Spuren

Abbildung 2.33: Getestete Bedingungen zur Synthese des Tetrapeptids **60**. Nach Abspaltung vom Trägermaterial erfolgten massenspektrometrische Analysen. AS = Aminosäure.

Da ein Einbau von Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**) über klassische SPPS nicht realisiert werden konnte, wurde eine alternative Strategie entwickelt. Das β^3 -peptidische Rückgrat sollte auf fester Phase aufgebaut und erst danach 6-Chlor-1,3,5-triazin-2,4-diamin an die gewünschten Seitenketten-Positionen angebracht werden (Abb. 2.6). Im ersten Schritt wurde das Tetrapeptid **61** ausgehend von einem β -Alanin vorbelegten Harz unter Verwendung der Monomerbausteine Fmoc-D- β^3 -hDap(Alloc)-OH (**49**), Fmoc-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACHC-OH (**9**) und Fmoc-D- β^3 -hLys(Boc)-OH (**8**) hergestellt und nach *N*-terminaler Fmoc-Entschützung acetyliert. Auf fester Phase erfolgte zunächst eine Palladium-katalysierte, reduktive Entschützung der Alloc-Schutzgruppe, um die NH₂-Position zur Funktionalisierung freizulegen (Abb. 2.34).

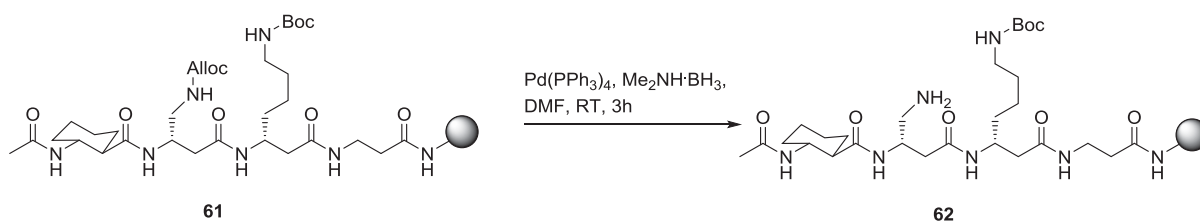


Abbildung 2.34: Alloc-Entschützung des Tetrapeptids **61** auf fester Phase.

Anschließend erfolgte der Schlüsselschritt durch die Zugabe von 6-Chlor-1,3,5-triazin-2,4-diamin und DIPEA (oder K₂CO₃) jeweils im Überschuss in DMSO. Dabei wurden Mikrowellen-Anregung mit einer maximalen Leistung von 20–50 W, höhere Temperaturen (80–85 °C) sowie eine Reaktionszeit von einer Stunde angewendet (Abb. 2.35). Nach Abspaltung von der festen Phase wurde das Rohprodukt mittels HPLC und Massenspektrometrie analysiert. Die Substitution fand unter den gewählten drastischen Bedingungen statt. Ein vollständiger Umsatz konnte allerdings nicht erzielt werden. Interessant waren die zwei zu gleichen Anteilen vorliegenden Fraktionen mit ähnlichen Retentionszeiten im HPLC-Chromatogramm, welche das



gewünschte Produkt **63** mitunter enthalten. Das Nebenprodukt konnte als 4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-ol-funktionalisiertes Tetrapeptid **64** identifiziert werden. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf drei Stunden bewirkte den Verbrauch beider Peptide (**63** und **64**) und die nicht erwartete Bildung des 6-Chlor-1,3,5-triazin-2,4-diamin-funktionalisierten Tetrapeptids **65** durch die nach anfänglicher Substitution vorhandenen Chlorid-Ionen. Die angewendeten drastischen Bedingungen führten zu Transformationen, welche nicht abzusehen waren. So wurde an dieser Stelle die β^3 -hDap(TAT)-funktionalisierte Version belassen. Der Fokus für weiterführende Studien hinsichtlich Aggregationseigenschaft wurde auf das bereits erfolgreich synthetisierte hLys(TAT)-funktionalisierte β^3 -Decapeptid **58** gelegt.

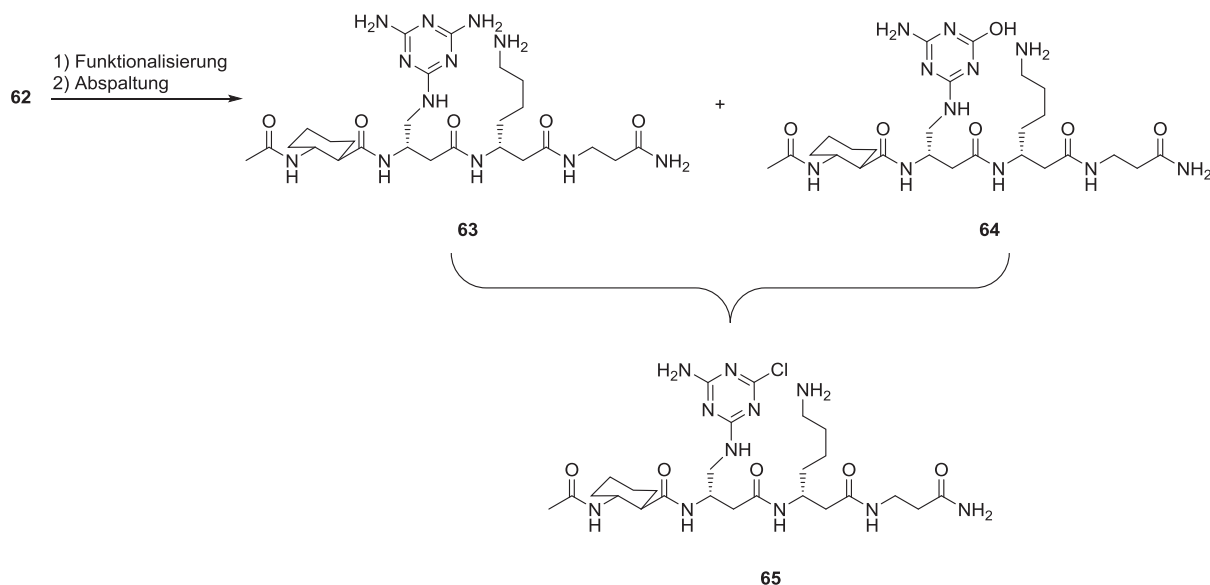


Abbildung 2.35: Funktionalisierung des Alloc-entschützten Tetrapeptids **62** auf fester Phase. Nach Abspaltung vom Trägermaterial erfolgten HPLC- und massenspektrometrische Analysen, die die Bildung von β^3 -hDap(TAT)-Tetrapeptid **63** (HPLC, analytisch, Gradient: 0 $\rightarrow$ 40% B in 30 min, t_R = 18.41 min) sowie die Hydroxy-substituiertes Nebenprodukt **64** (HPLC, analytisch, Gradient: 0 $\rightarrow$ 40% B in 30 min, t_R = 19.14 min) und Chlor-substituiertes Nebenprodukt **65** (HPLC, analytisch, Gradient: 0 $\rightarrow$ 40% B in 30 min, t_R = 22.41 min) bestätigten.

2.3.3 Strukturelle Voranalysen und Aggregationsstudien

Nach der Synthese der Monomerbausteine und deren Einbau in Peptide wurden zunächst die einzelnen Peptide β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56**, β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** sowie β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** analysiert und anschließend äquimolare Mischungen, wie sie in Abbildung 2.36 dargestellt sind, auf die Bildung von Aggregaten untersucht.

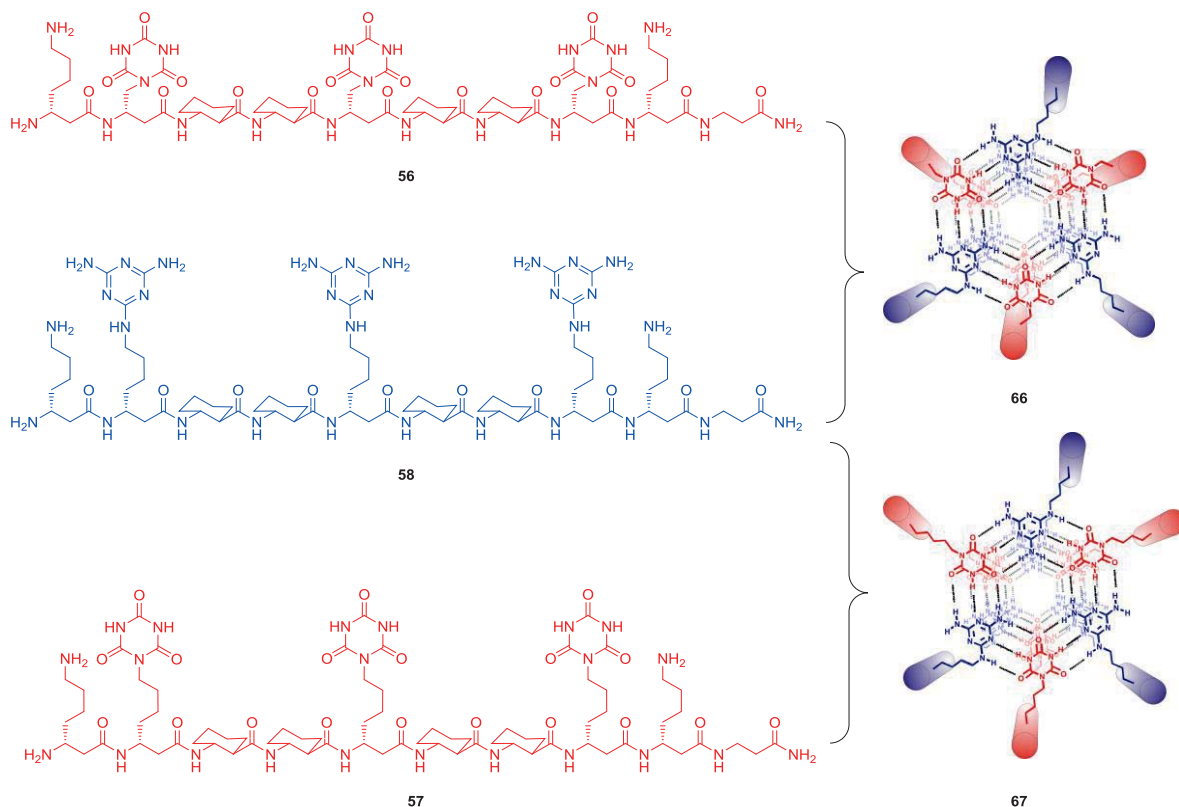


Abbildung 2.36: Für die Aggregationsstudien verwendeten äquimolaren Mischungen aus β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** sowie β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58**.

2.3.3.1 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie hat sich als Standardmethode zur Strukturaufklärung von natürlichen Peptiden und Proteinen bewährt, in der je nach vorhandener Sekundärstruktur wie Helices, β -Faltblätter und β -Schleifen charakteristische Verläufe zwischen 190 nm bis 300 nm erhalten werden.^[81,82] Optisch aktive, chirale Foldamere wurden in Anlehnung an natürliche Leitstrukturen entwickelt, wie die β -Peptide, und durch die erhaltenen Daten über die Jahrzehnte typische Verläufe aus den CD-Spektren ermittelt.^[12,14–16] Die rechtsgängige 14-Helix weist für gewöhnlich ein COTTON-Effekt mit einem Maximum bei 215 nm und ein Minimum unter 200 nm auf, welche durch die Variation des Lösungsmittels geringfügig verschoben sein können. Die Größenordnung der Elliptizität bei 215 nm wird durch die angesetzte Konzentration, die vorhandene Sequenz(-länge) und dem verwendeten Lösungsmittel

beeinflusst. Weiterführend können mit CD-Spektroskopie Aussagen über die Stabilität der Sekundärstrukturen vergleichbarer Sequenzen gemacht werden.

Die Peptide β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56**, β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** und β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** wurden jeweils in wässrigem Triethylammoniumacetat (TEAA)-Puffer (5 mM, pH = 7.3) mit einer Konzentration von 20 μ M angesetzt und die Temperatur von 0 °C beginnend nach jeder einzelnen Messung in 20er Schritten bis 80 °C erhöht. Die CD-Spektren der β^3 -Peptide zeigten das typische Minimum und Maximum einer rechtsgängigen 14-Helix (Abb. 2.37).⁶ Die Erhöhung der Temperatur führte zu einer geringfügigen Destabilisierung der Sekundärstruktur, welches an den reduzierten molaren Elliptizitäten aus den CD-Spektren hervorgeht.

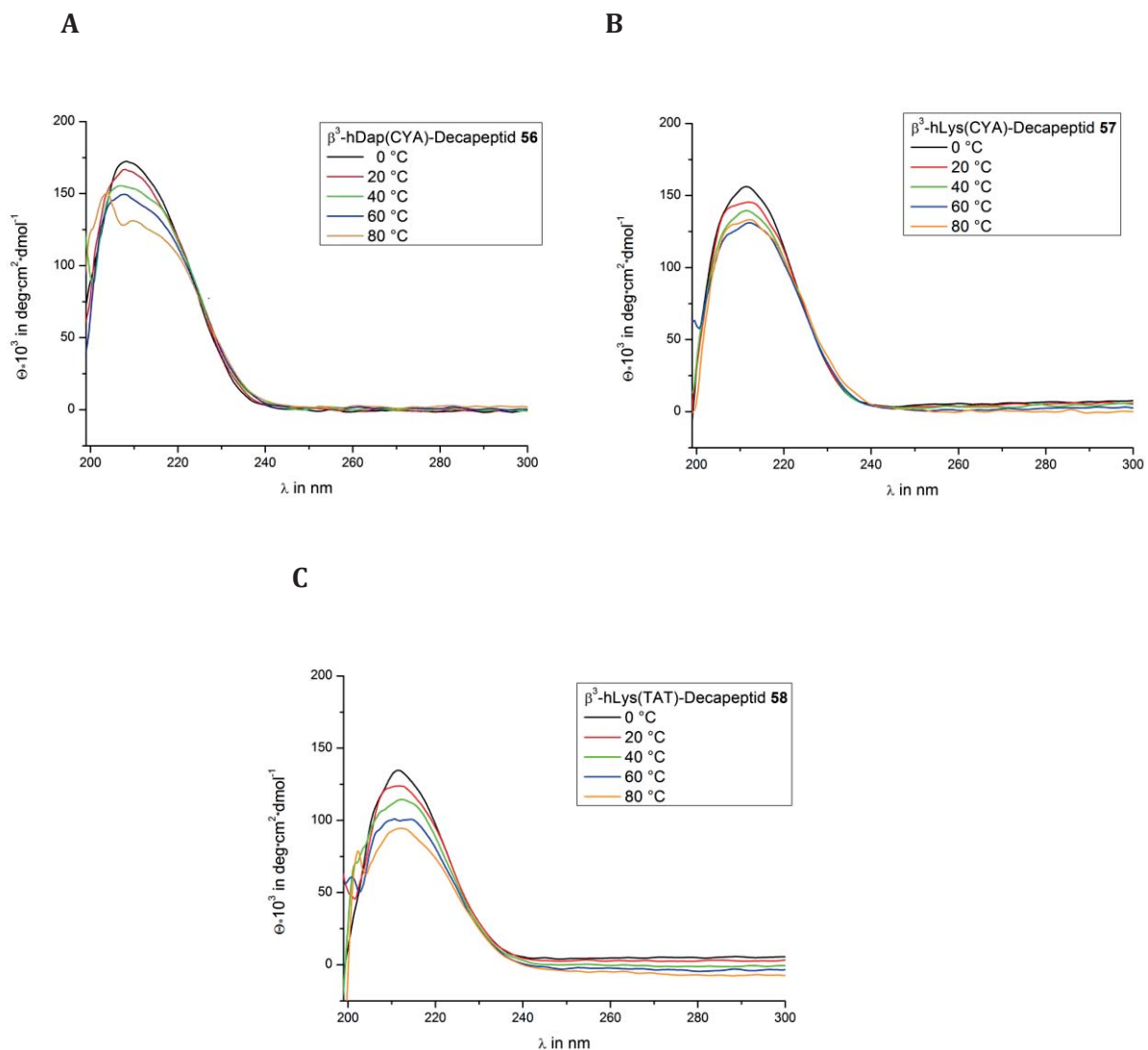


Abbildung 2.37: Temperaturabhängige CD-Spektren von **A** β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** (20 μ M in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum bei 208 nm), **B** β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** (20 μ M in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum bei 211 nm) und **C** β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μ M in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum bei 211 nm).

⁶ Die Minima wurden ebenso beobachtet und entsprachen in den meisten Fällen den Literaturwerten.^[12] Dennoch wurden diese nicht mitberücksichtigt, da unter 200 nm der verwendete Puffer einen größeren Einfluss auf die Messungen hatte.

Des Weiteren wurden temperaturabhängige CD-Spektren für die äquimolaren Mischungen **56** + **58** und **57** + **58** (20 μM in 5mM TEAA-Puffer, pH = 7.4, bei 20 °C) aufgenommen (Abb. 2.38). Hierzu wurden Peptidkonzentrationen von 50 μM in 5mM TEAA-Puffer angesetzt und nach einem Tag Inkubation bei 4 °C und Verdünnen der Probe auf 20 μM bei unterschiedlichen Temperaturen, beginnend mit 0 °C bis 80 °C gemessen. Das CD-Spektrum von der Mischung **56** + **58** zeigte im Vergleich zu den einzelnen Strängen sowie der äquimolaren Mischung aus **57** + **58** deutliche Abnahme der molaren Elliptizität.

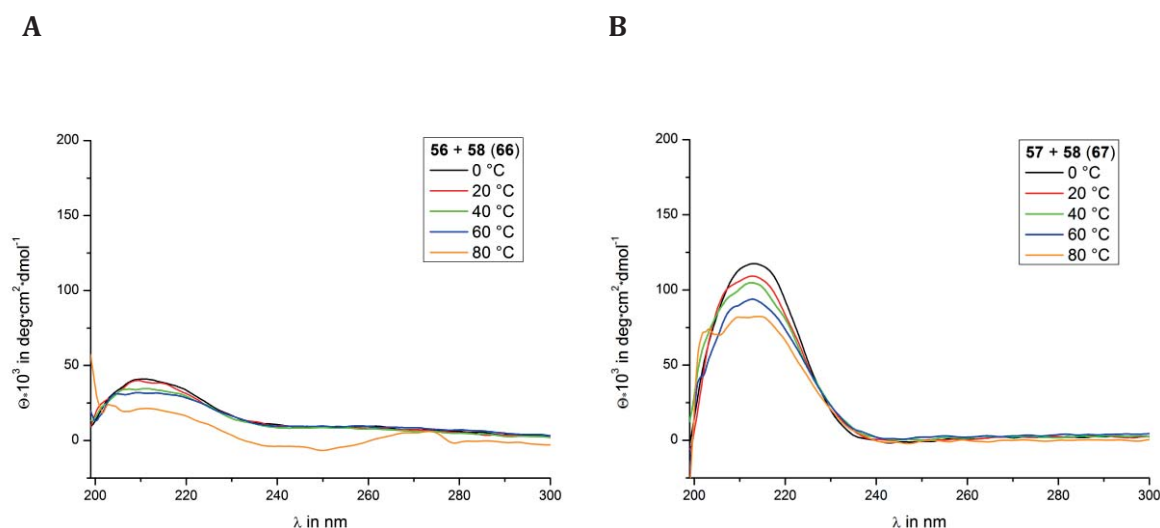


Abbildung 2.38: Temperaturabhängige CD-Spektren von **A** der äquimolaren Mischung von β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μM in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum bei 210 nm) und **B** der äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μM in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum bei 212 nm).

Um weitere Informationen zu erhalten, wurden die äquimolaren Mischungen nach 30 Minuten und nach einem Tag Inkubationszeit CD-spektroskopisch analysiert und mit den einzelnen CD-Spektren der einzelnen Peptidstränge verglichen (Abb. 2.39, 2.40). Dabei wurde zusätzlich das Lösungsmittel variiert, indem neben Triethylammoniumacetat eine Mischung aus Ammoniumacetat (AA) und Acetonitril in einem 1:1-Verhältnis verwendet wurde. Die Mischung **56** + **58** zeigte bei der Variation des Lösungsmittels eine Veränderung der molaren Elliptizitäten (Abb. 2.39). In Triethylammoniumacetat konnte im Vergleich zu den Einzelsträngen eine Abnahme der molaren Elliptizität festgestellt werden, während sich die Werte in Ammoniumacetat/Acetonitril in den Bereichen der Einzelstränge befanden. Ein zeitabhängiger Effekt bei **56** + **58** konnte nicht festgestellt werden. Weiterführend konnten für die äquimolare Mischung aus **57** + **58** keine zeitabhängigen Veränderungen registriert werden (Abb. 2.40). In Triethylammoniumacetat wurden im Gegensatz zu Ammoniumacetat/Acetonitril (1:1) keine Schwankungen festgestellt.

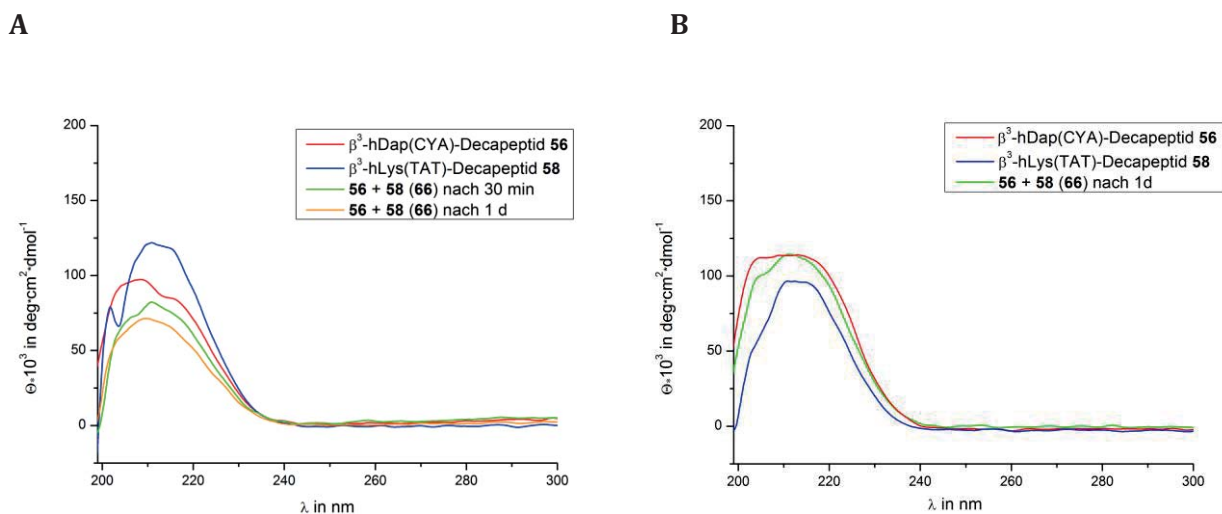


Abbildung 2.39: CD-Spektren von **A** der äquimolaren Mischung von β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μ M in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum bei 212 nm) und **B** der äquimolaren Mischung von β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μ M in 5 mM AA-Puffer (pH = 7.3)/CH₃CN, 1:1) (Maximum bei 212 nm). Temperatur während der Messungen betrug 20 °C.

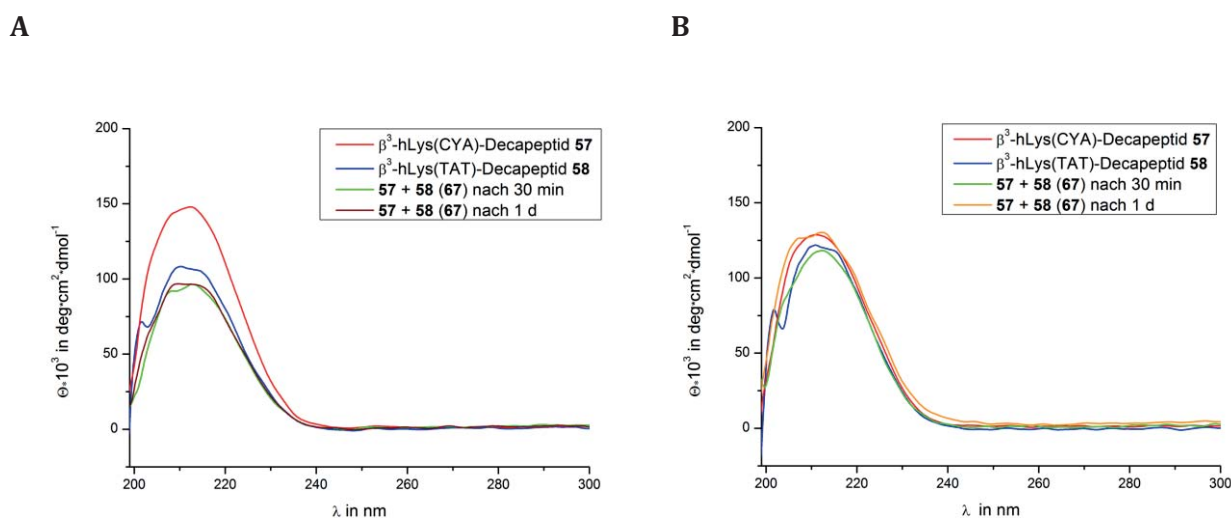
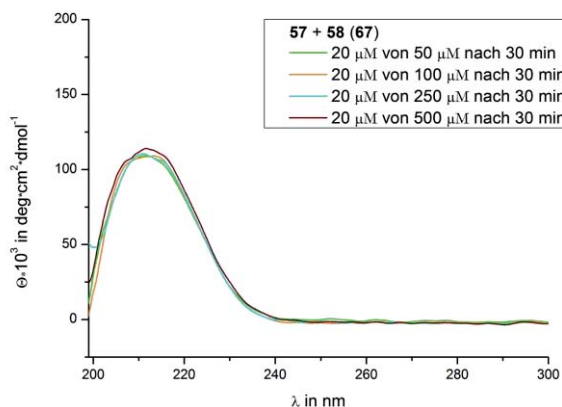


Abbildung 2.40: Zeitabhängige CD-Spektren von **A** der äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μ M in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum bei 210–212 nm) und **B** der äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μ M in 5 mM AA-Puffer (pH = 7.3)/CH₃CN, 1:1) (Maximum bei 211 nm). Temperatur während der Messung betrug 20 °C.

Des Weiteren wurden von der äquimolaren Mischung **57** + **58** zeit- und konzentrationsabhängige CD-Spektren aufgenommen (Abb. 2.41). Die Proben wurden nach 30 min und nach einem Tag Inkubationszeit bei 20 °C gemessen. Nach einem Tag wurde bei fast

gleichbleibenden molaren Elliptizitäten eine geringfügige Verschiebung des Maximums von 211 nm zu 206 nm festgestellt.

A



B

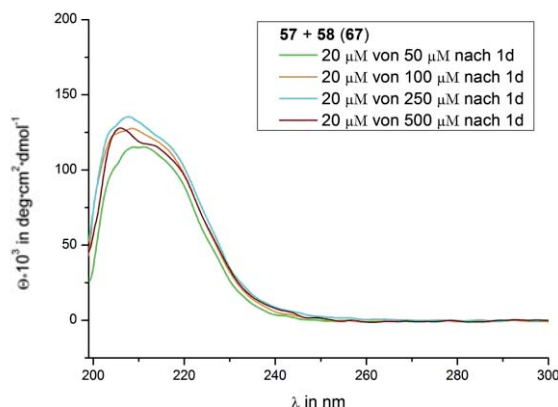


Abbildung 2.41: Konzentrations- und zeitabhängige CD-Spektren von **A** der äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μM in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) nach 30 min Inkubationszeit (Maximum 211 nm) und **B** der äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μM in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) nach 1 d Inkubationszeit (Maximum 211 $\rightarrow$ 206 nm). Temperatur während der Messungen betrug 20 $^{\circ}\text{C}$.

Es konnten CD-Spektren erhalten werden, die dem typischen Verlauf einer rechtsgängigen 14-Helix entsprechen. Eine temperaturabhängige Destabilisierung der Sekundärstruktur konnte ebenfalls bestätigt werden. Des Weiteren wurden unter Beibehaltung einer bestimmten Konzentration das Lösungsmittel sowie die Inkubationszeit variiert. Dabei änderten sich die Wellenlängen der Maxima nicht ausschlaggebend, während die molaren Elliptizitäten entweder unverändert (**57** + **58**) im Vergleich zu den Einzelsträngen oder teilweise reduziert (**56** + **58**) vorlagen. Bei einer gleichbleibenden molaren Elliptizität können folgende Aussagen getroffen werden: Es sind keine Aggregate entstanden, es handelt sich um lösliche Aggregate oder aber die Bildung der Aggregate unter den Bedingungen ist sehr gering. Des Weiteren können abnehmende Elliptizitäten bei gleichbleibender Konzentration auf unlösliche Aggregate hinweisen. Denn ein Ausfallen der Aggregate aus der Lösung würde die Peptidkonzentration reduzieren, wodurch eine verringerte molare Elliptizität resultieren würde. Die Verringerung der molaren Elliptizität von **56** + **57** gibt somit den ersten Hinweis auf die Bildung unlöslicher Aggregate.

2.3.3.2 UV-Spektroskopie

Analog zur CD-Spektroskopie wurde UV-Spektroskopie angewandt. Zunächst wurden UV-Spektren der Peptide β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56**, β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** sowie β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** in TEAA-Puffer bei 20 °C aufgenommen (Abb. 2.42). Dabei entspricht das Maximum bei 199–200 nm dem β^3 -Peptidrückgrat. Die Schulter bei 219 nm in den UV-Spektren von den CYA-funktionalisierten Peptiden **56** und **57** sind dem CYA zuzuordnen. Die Absorption von CYA ist vom pH-Wert abhängig. In neutraler Form wird keine bis eine sehr schwache Bande erhalten, während bei einem pH-Wert von 7.4 CYA aufgrund des ersten pKa-Wertes von 6.5 partiell einfach-ionisiert vorliegt.^[83,84] Das TAT-funktionalisierte Peptid **58** weist keine weiteren Maxima als die des β^3 -Peptidrückgrats auf. Der Heteroaromat TAT liegt mit einem pKa-Wert von 5.1 bei pH = 7.4 als neutrales Molekül vor. In dieser Form wird eine sehr schwache Bande bei 235 nm beschrieben, welche wegen eines symmetrie-verbotenen π -Elektronen-Übergangs zustande kommt.^[83,84]

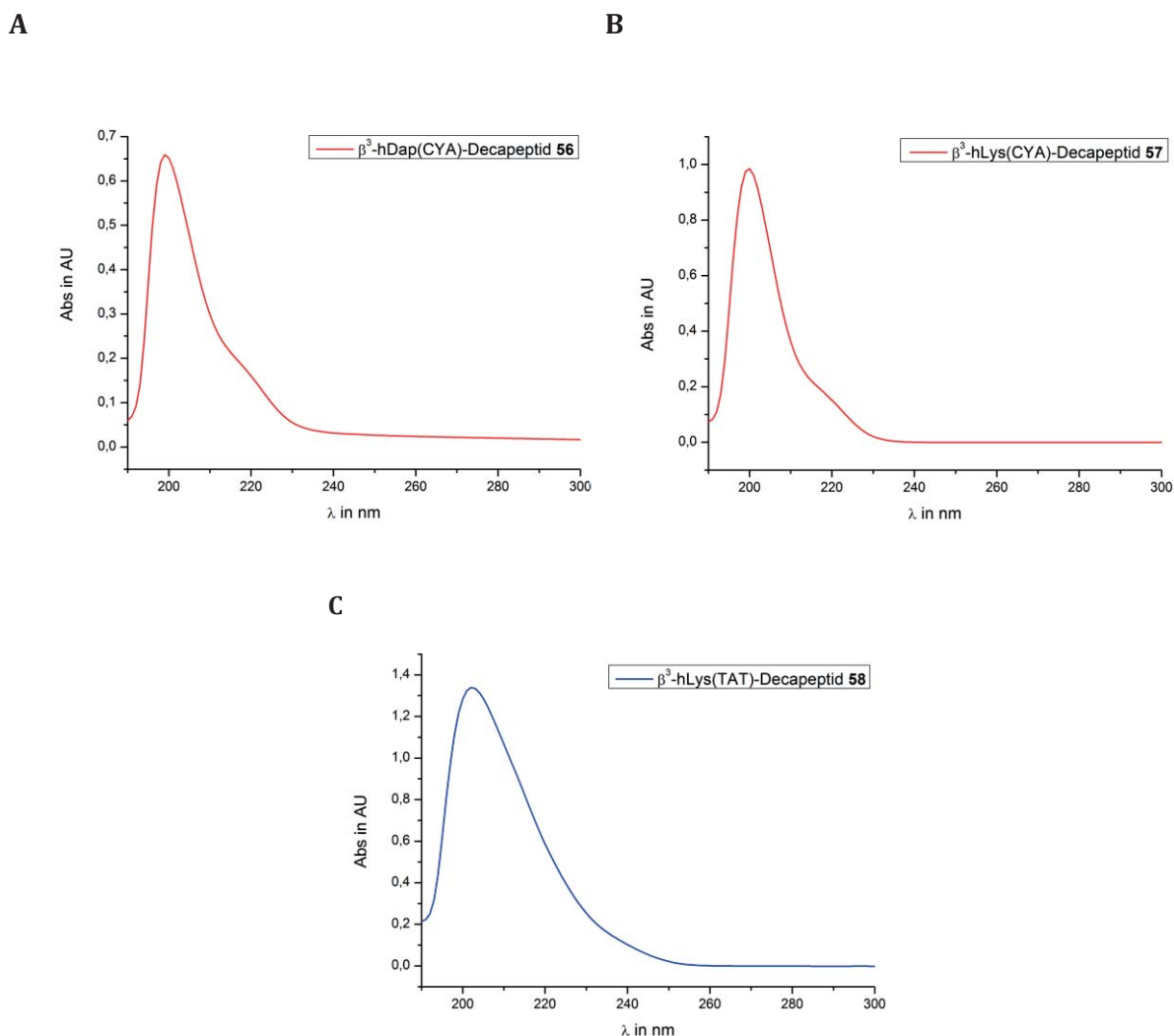


Abbildung 2.42: UV-Spektren von **A** β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** (20 μ M in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum bei 199 nm, Schulter bei 219 nm), **B** β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** (20 μ M in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum bei 200 nm, Schulter bei 219 nm) und **C** β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μ M in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum bei 202 nm).

Die äquimolaren Mischungen **56** + **58** und **57** + **58** wurden wie zuvor beschrieben (Kapitel 2.3.3.1), angesetzt. Es folgen UV-Spektren mit unterschiedlichen Lösungsmitteln (TEAA oder AA/ CH_3CN , 1:1) und zu unterschiedlichen Zeiten (nach 30 min und 1 d). Aus den Spektren konnten keine neuen Banden oder Wellenlängenverschiebungen beobachtet werden (Abb. 2.43, 2.44).

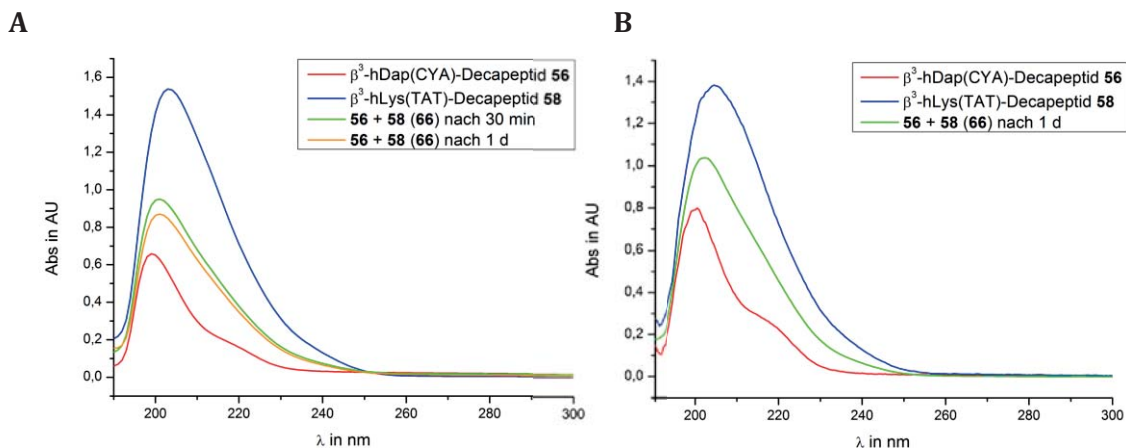


Abbildung 2.43: UV-Spektren von **A** der äquimolaren Mischung von β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μM in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum für **66** bei 201 nm) und **B** der äquimolaren Mischung von β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μM in 5 mM AA-Puffer (pH = 7.3)/ CH_3CN , 1:1) (Maximum für **66** bei 202 nm). Temperatur während der Messungen betrug 20 °C.

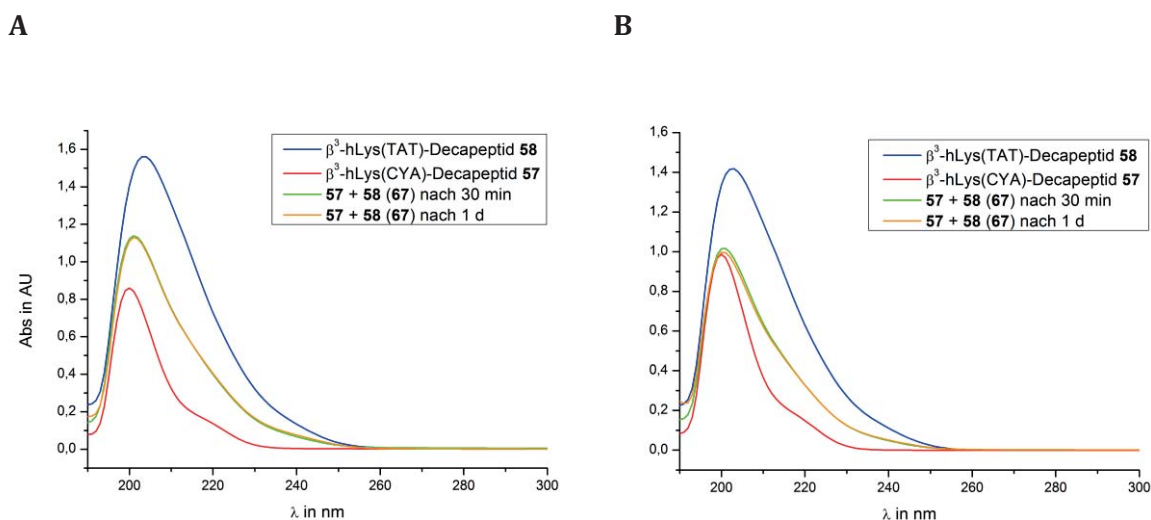


Abbildung 2.44: UV-Spektren von **A** der äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μM in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) (Maximum für **67** bei 201 nm) und **B** der äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μM in 5 mM AA-Puffer (pH = 7.3)/ CH_3CN , 1:1) (Maximum für **67** bei 201 nm). Temperatur während der Messungen betrug 20 °C.

Zusätzlich wurden konzentrations- und zeitabhängige UV-Spektroskopie für die äquimolare Mischung **57** + **58** durchgeführt (Abb. 2.45). Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von 50 μM –500 μM angesetzt und eine verdünnte Probe hieraus nach 30 min und nach einem Tag gemessen. Der einzige Unterschied zwischen den Messungen unterschiedlicher Zeiten, der festgestellt werden konnte, war nach einem Tag ein geringfügiger Anstieg um 240 nm mit steigender Konzentration.

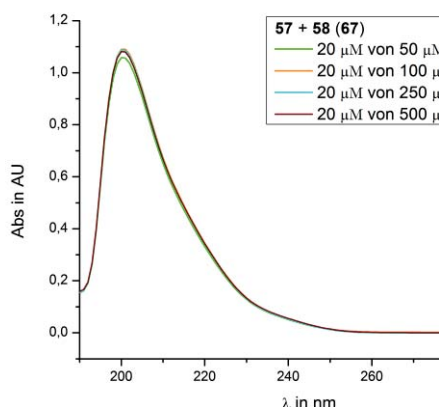
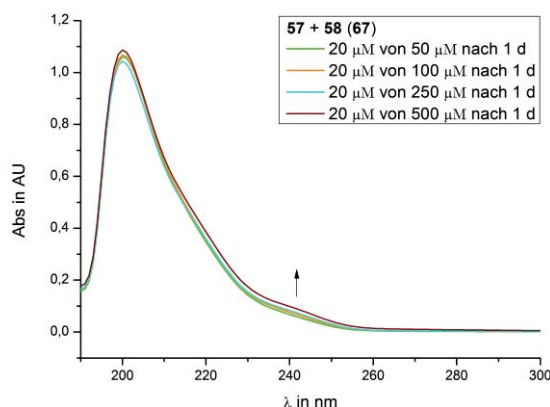
A**B**

Abbildung 2.45: Konzentrations- und zeitabhängige UV-Spektren von **A** der äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μM in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) nach 30 min Inkubationszeit (Maximum 201 nm) und **B** der äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (20 μM in 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.3) nach 1 d Inkubationszeit (Maximum 200 nm). Temperatur während der Messungen betrug 20 °C.

2.3.3.3 Elektrospray-Ionisations (ESI)-Massenspektrometrie

Die Bildung möglicher Aggregate sollte mit der Elektrospray-Ionisations (ESI)-Massenspektrometrie bestätigt werden, in dem die gelösten Proben in die Gasphase gebracht und die geladenen Spezies detektiert werden. Zunächst wurden die *N*- und *C*-terminal geschützten Monomerbausteine Boc- β^3 -hDap(CYA)-OBn **13** + Boc- β^3 -hLys(TAT)-OBn **55** analysiert, aus der die Notwendigkeit eines präorganisierenden β^3 -Rückgrats, um die Erkennungseinheiten in die hexamere Anordnung zu dirigieren, bestätigt werden sollte (Abb. 2.46).⁷ Dafür wurde eine äquimolare Mischung von **13** + **55** mit einer Konzentration von 5 mM in Ammoniumacetat/Acetonitril (1:1) angesetzt und ein Tag bei 4 °C inkubiert. Nach Ansetzen konnte innerhalb weniger Minuten die Bildung eines farblosen Niederschlages beobachtet werden. Vor der Messung wurde die Probe auf 20 μM verdünnt.

⁷ Die ESI-MS-Messungen zur Analyse der Monomerbausteine **13** und **55** wurden von Dr. H. FRAUENDORF durchgeführt.

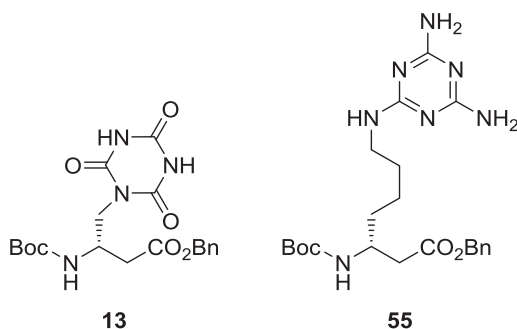


Abbildung 2.46: Für die Voranalysen verwendeten Monomerbausteine Boc- β^3 -hDap(CYA)-OBn **13** + Boc- β^3 -hLys(TAT)-OBn **55**.

Die ESI-MS-Messungen ergaben höhere Aggregate in Form von Homo- und Heterodimeren sowie Homo- und Heterotrimeren (Abb. 2.47, 2.48). Tetramere konnten ebenfalls bestätigt werden, allerdings war die Intensität unter 0.1% relativer Signalintensität. Eine Präferenz zu hexameren Überstrukturen konnte nicht ermittelt werden.

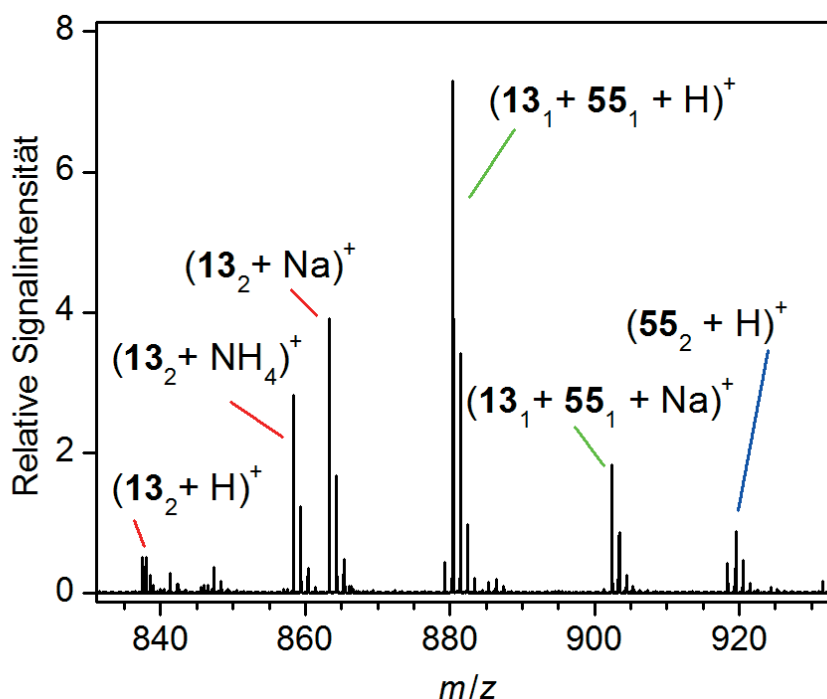


Abbildung 2.47: 1. Ausschnitt aus dem ESI-Massenspektrum im positiven Modus von einer äquimolaren Mischung aus Boc- β^3 -hDap(CYA)-OBn **13** und Boc- β^3 -hLys(TAT)-OBn **55** (5 mM in 5 mM NH_4OAc -Puffer/ CH_3CN , 1:1). Die Probe wurde ein Tag zuvor angesetzt und bei 4 °C inkubiert. Vor der Messung wurde die Probe auf 20 μM verdünnt.

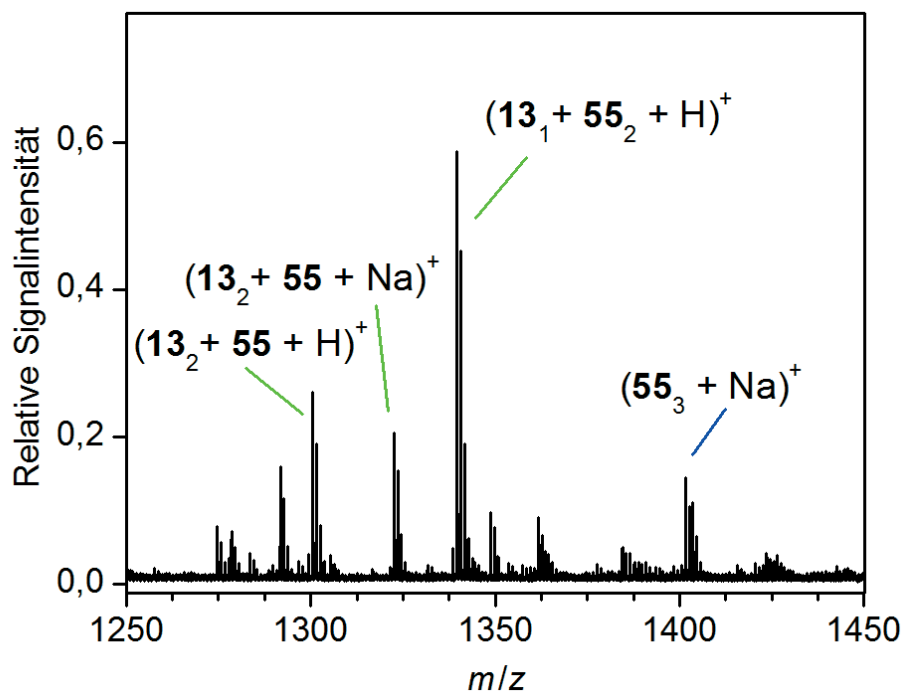


Abbildung 2.48: 2. Ausschnitt aus dem ESI-Massenspektrum im positiven Modus von einer äquimolaren Mischung aus Boc- β^3 -hDap(CYA)-OBn **13** und Boc- β^3 -hLys(TAT)-OBn **55** (5 mM in 5 mM NH_4OAc -Puffer/ CH_3CN , 1:1).

Bevor die äquimolaren Mischungen analysiert wurden, wurden die einzelnen Peptide β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** und β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** auf ein Selbstaggregationsverhalten hin untersucht.⁸ Es wurden Proben von **56** und **58** in 5 mM Ammoniumacetat/Acetonitril (1:1) angesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. In beiden Fällen wurden Dimere in geringen Anteilen gefunden, wobei die Tendenz zur Selbstaggregation von β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** anhand der Intensitäten im positiven und negativen Modus ausgeprägter war als für β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (Abb. 2.49, 2.50).

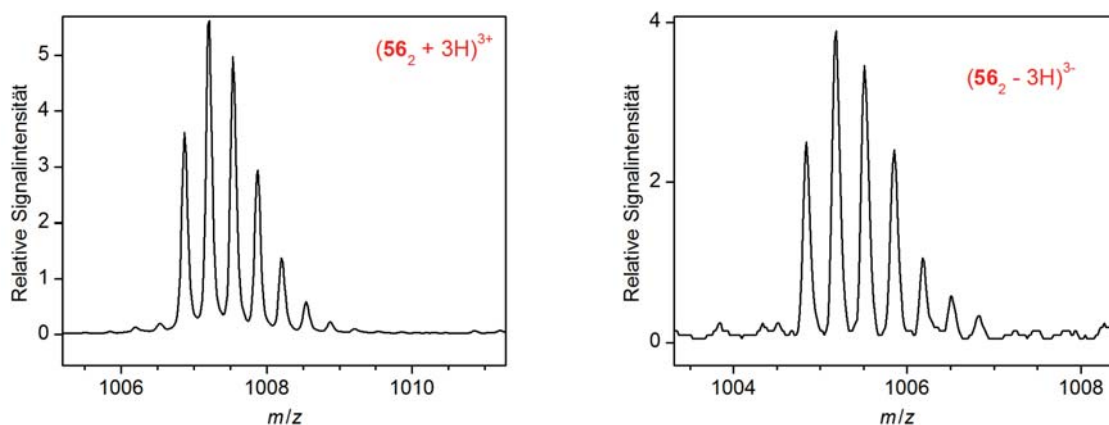


Abbildung 2.49: Isotopenmuster des Homodimers **56**₂ aus positivem (**links**) und negativem Modus (**rechts**). β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** (20 μM in 5 mM NH_4OAc -Puffer/ CH_3CN , 1:1). $(56_2 - 3\text{H})^{3-}$: berechnet: 1004.849, gefunden: 1004.846.

⁸ Die im Verlauf präsentierten ESI-Massenspektren der einzelnen Peptide sowie der äquimolaren Mischungen wurden von Prof. Dr. K. KOSZINOWSKI gemessen.

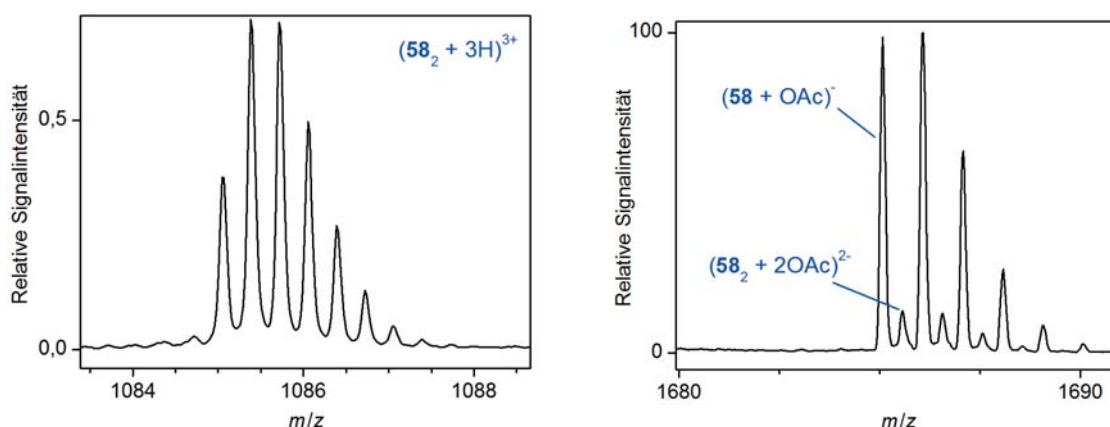


Abbildung 2.50: Isotopenmuster des Homodimers 58_2 aus positivem Modus (**links**) und negativem Modus (**rechts**). β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** ($20\ \mu\text{M}$ in $5\ \text{mM}\ \text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer/ CH_3CN , 1:1). $(58_2 + 3\text{H})^{3+}$: berechnet: 1085.055, gefunden: 1085.054.

Im Anschluss erfolgten die Messungen mit der äquimolaren Mischung aus β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** und β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58**. Die hexamere Überstruktur **66** konnte nicht bestätigt werden (Abb. 2.51). Die einzigen höheren Aggregate im positiven Modus waren Homodimere von **56** und Heterodimere aus **56** + **58** (Abb. 2.52).

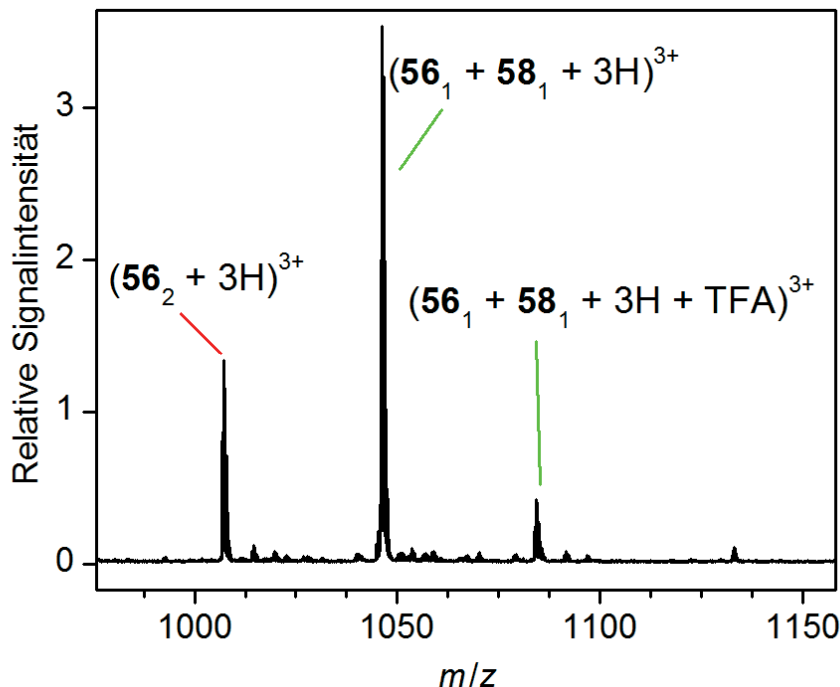


Abbildung 2.51: 2. Ausschnitt aus dem ESI-Massenspektrum im positiven Modus von einer äquimolaren Mischung aus β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** und β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** ($20\ \mu\text{M}$ in $5\ \text{mM}\ \text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer/ CH_3CN , 1:1).

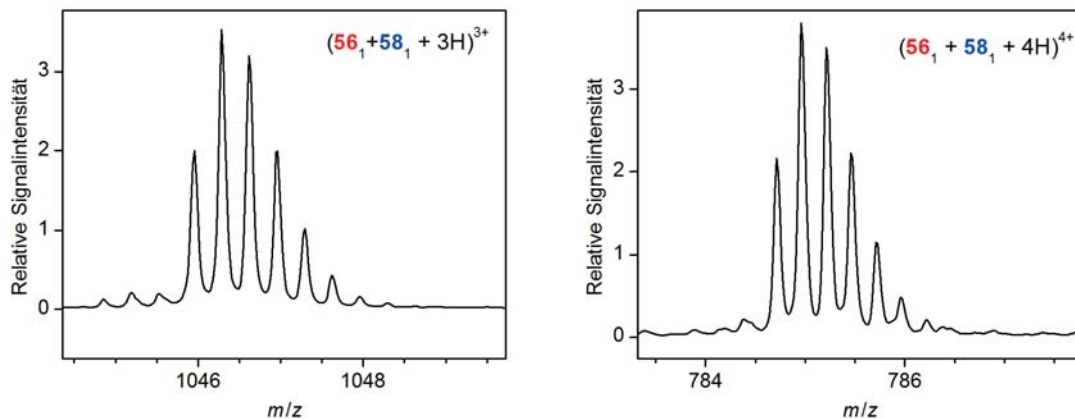


Abbildung 2.52: Isotopenmuster des Heterodimers $56 + 58$ aus positivem Modus. $(56 + 58 + 3H)^{3+}$: berechnet = 1045.959, gefunden = 1045.957, $(56 + 58 + 4H)^{4+}$: berechnet = 784.721, gefunden = 784.720.

Aus der äquimolaren Mischung $57+58$ konnte die angestrebte höher geordnete Überstruktur **67** eindeutig identifiziert werden. Im positiven Modus konnten die Signale dem der Monomere **57** und **58**, dem des Heterodimers $57+58$ und dem des Aggregats **66** ($57+58$) zugeordnet werden (Abb. 2.53, 2.54). Die Zwischenstufen Trimer, Tetramer und Pentamer wurden bei einer analysierten relativen Signalintensität über 0.5% nicht beobachtet.

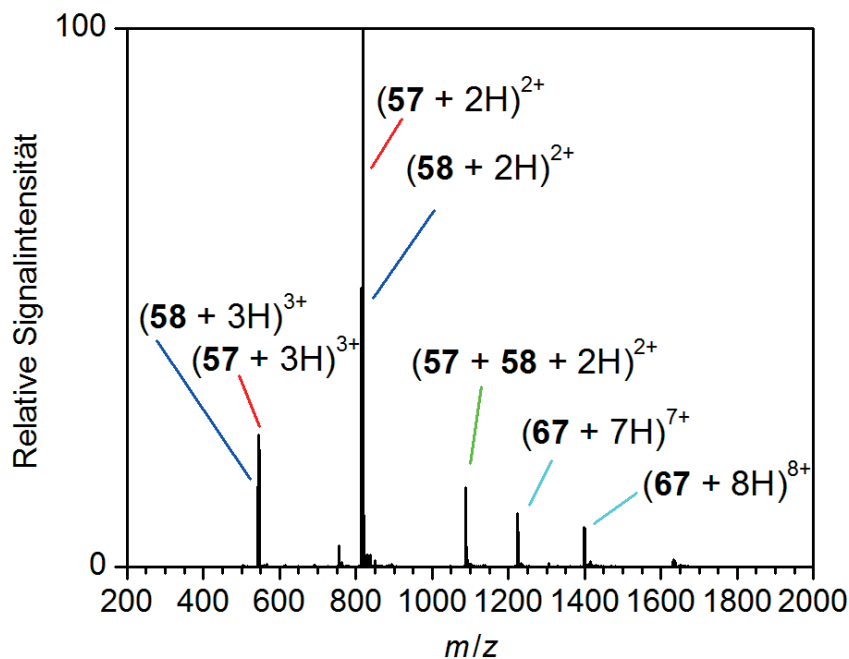


Abbildung 2.53: ESI-Massenspektrum im positiven Modus von einer äquimolaren Mischung aus β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** und β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** ($50 \mu\text{M}$ in $5 \text{ mM NH}_4\text{OAc-Puffer/CH}_3\text{CN}$, 1:1). Die Probe wurde nach einem Tag Inkubation bei 4°C für die Messung auf $20 \mu\text{M}$ verdünnt.

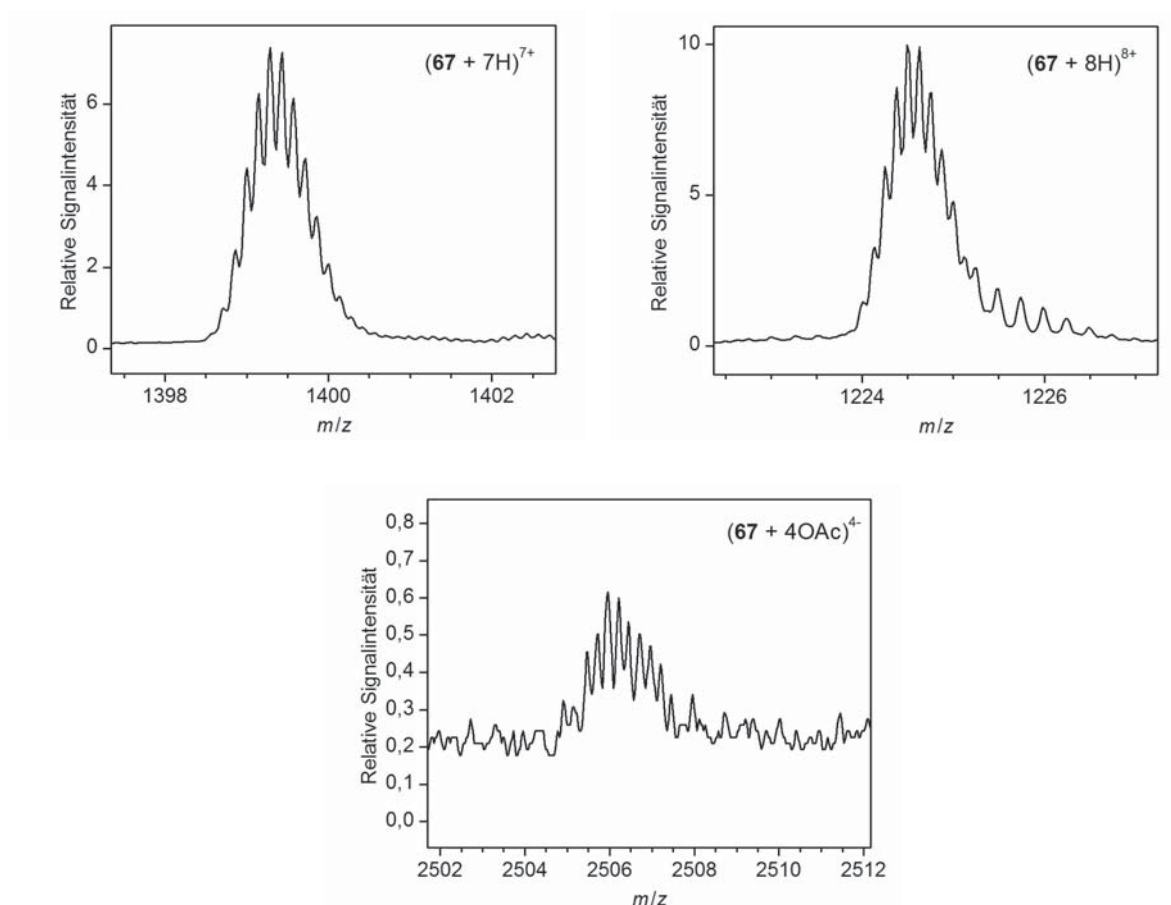


Abbildung 2.54: Isotopenmuster des Aggregats **67**, aus einer äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** und β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** ($50 \mu\text{M}$ in $5 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$ -Puffer/ CH_3CN , 1:1). Für die Messung wurde die Probe nach einem Tag Inkubation bei 4°C auf $20 \mu\text{M}$ verdünnt. **A** $(67 + 7H)^{7+}$ und **B** $(67 + 8H)^{8+}$ sind aus dem positiven Modus, während **C** $(67 + 4OAc)^{4-}$ aus dem negativen Modus stammt.



2.3.3.4 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Zur Bestimmung der Aggregatsgrößen wurden verschiedene Methoden in Betracht gezogen. Eine Möglichkeit zur Größenbestimmung bieten bildgebende Verfahren wie die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) und die Elektronenmikroskopie (EM). Letzteres lässt sich in zwei Typen unterteilen, der Rasterelektronenmikroskopie (*scanning electron microscope*, SEM) und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).^[85] Dabei werden die Messungen unter Vakuum durchgeführt und erfordern eine geeignete Präparation der Probe. Das Erzielen einer Detailschärfe ist abhängig vom Kontrast und vom Auflösungsvermögen. Auch wenn das theoretische Auflösungsvermögen in den benötigten Größenordnungen liegen mag, kann ein geringer Kontrast gegenüber dem Substrat bei der Analyse biologischer Materialien die Bildgebung erschweren. Darüber hinaus kann der Einsatz intensiver Elektronenstrahlen beim EM die biologische Probe schädigen.^[85] Im Vergleich bietet die dynamische Lichtstreuung (DLS) als nichtinvasive Methode mehrere Vorteile zur Bestimmung der Größenverteilung von Partikeln, die in einer Flüssigkeit dispergiert oder gelöst vorliegen in Bereichen von 1 bis 2000 nm.^[86–88] DLS toleriert mitunter wässrige Medien und beeinflusst das System nicht oder zumindest in einem geringen Umfang.^[85] Dabei wird die Probe mit einem fokussiertem Laser bestrahlt, wodurch ein Teil gestreut und dieser in einem definierten Winkel detektiert.^[86–88] Die Ablenkung des Lichtes geht von den Partikeln in der Lösung aus, die eine BROWN'sche Molekularbewegung durchführen. Dabei nimmt die gemessene Streuintensität mit dem Durchmesser der Partikel zu. Die konstruktiven und destruktiven Interferenzen des gestreuten Lichts werden summiert und ergeben eine detektierte Nettointensität, welche in einer Intensität-Zeit-Kurve aufgetragen werden. Aus der Analyse der Intensitätsfluktuationen ergibt sich die Geschwindigkeit der BROWN'schen Molekularbewegung, welche über den translationalen Diffusionskoeffizienten D definiert wird. Um Diffusionsgeschwindigkeiten zu ermitteln, wird eine Autokorrelationsfunktion berechnet, welches die Ähnlichkeit zweier Signale oder eines Signals unterschiedlicher Zeiten wiedergibt. Hieraus ergibt sich unter Einbeziehung der EINSTEIN-STOKES-Gleichung der hydrodynamische Radius d_h .⁹

$$d_h = \frac{k \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot D}$$

d_h = hydrodynamischer Durchmesser,

k = Boltzmann-Konstante,

T = absolute Temperatur,

η = Viskosität,

D = Diffusionskoeffizient.

Über die MIE-Theorie, welches die Maxima und Minima der erhaltenen Intensitäten in Abhängigkeit des Winkels einbezieht, wird unter Berücksichtigung des Brechungsindex und der Viskosität des Lösungsmittels bei gegebener Temperatur, die Intensitätsverteilung in prozentuale Anzahl- und Volumen-Anteilen umgerechnet.^[86–88] Bei der Umrechnung wird eine ideale monodisperse Größenverteilung angenommen, in der alle Partikel sphärisch sind sowie dieselbe Dichte aufweisen. Trotz dieser Annahmen erweist sich DLS auch für nichtsphärische

⁹ Hydrodynamischer Durchmesser bzw. Radius (d_h) ist definiert als die Größe einer harten Kugel, die eine identische Diffusion, wie die gemessenen Partikel aufweist. Dabei können Makromoleküle nichtsphärisch, dynamisch und solvatisiert sein. Demzufolge entspricht d_h einer Kugel, die denselben translationalen Diffusionskoeffizienten hat, wie ein solvatisiert vorliegendes Partikel.^[88]

Makromoleküle als eine nützliche Methode, um in Näherung Aussagen über Partikeldurchmesser zu machen, in der beispielsweise einzelne Proteine und Protein-Protein-Assoziate gegenüber gestellt werden.^[89–91]

Es wurden DLS-Messungen¹⁰ der einzelnen Peptide durchgeführt und im Anschluss die äquimolaren Mischungen im Vergleich zu diesen gesetzt. Die Intensitätsverteilung ergab sich über mehrere Messungen (15 Läufe je 200 s) und wurden anschließend durch Einbeziehen der Temperatur (20 °C), der Viskosität des Lösungsmittels ($\eta_{\text{H}_2\text{O}} = 1.0031 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) und des Brechungsindex für Proteine ($n_D^{20} = 1.450$) in die Anzahl-Durchmesser-Kurve überführt. Vor den Messungen wurden die Proben mit einer Konzentration von 125 μM in TEAA-Puffer (5 mM, pH = 7.4) angesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.¹¹

Die möglichen Größendurchmesser der einzelnen Peptide sowie der angestrebten tubulären Strukturen wurden rechnerisch in Näherung ermittelt. Hierfür wurden die Größenordnungen von β^3 -Peptiden mit 14-helikaler Struktur sowie von zweidimensional cyclisch hexameren Systemen basierend auf CYA_3TAT_3 aus Literaturwerten übertragen (Abb. 2.55).^[51,57,92] Zur Ermittlung der Größenordnung der Partikeldurchmesser wurde von einer zylindrischen Form ausgegangen und auf das Volumen sphärischer Strukturen übertragen. In grober Näherung wurde für die einzelnen β^3 -Peptide eine Größenordnung um 1.0 nm und für die Aggregate um 3.2 nm Durchmesser erwartet.

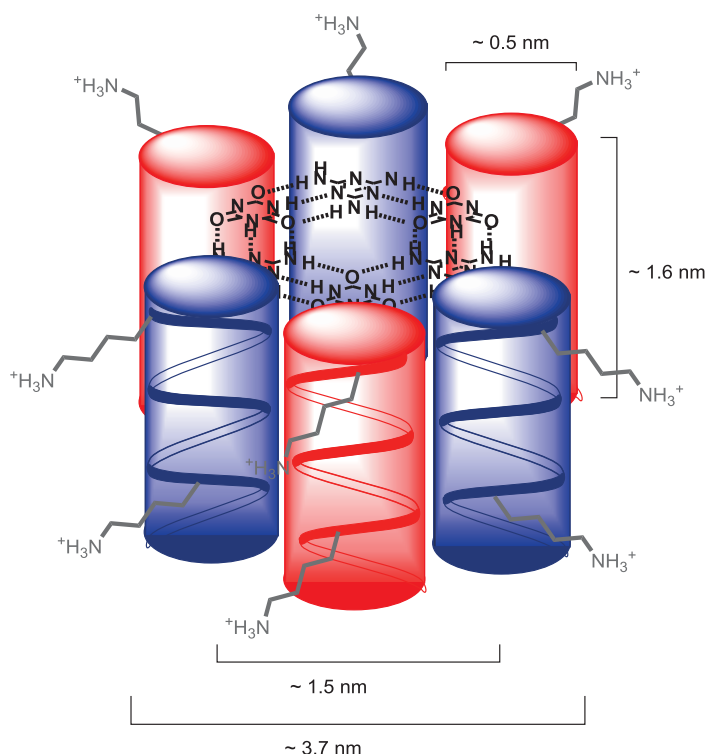


Abbildung 2.55: Die hexamer-tubuläre Struktur des Aggregats **67** aus den β^3 -Decapeptiden **57** und **58** als dicht gepackte Bündelstruktur mit den rechnerisch angenommenen Längenabmessungen.^[51,57,92]

¹⁰ Die DLS-Messungen wurden von D. HÜBNER aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. P. VANA an einem Zetasizer Nano S (*Malvern*) ausgestattet mit einem He-Ne-Laser (633 nm) bei einem Detektionswinkel von 173 ° durchgeführt.

¹¹ Die Probenlösungen wurden vor der Inkubation durch 0.2 μm Filter geleitet, um Staubpartikel zu entfernen und darauffolgend in PS-Küvetten überführt.



Für das β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** wurde ein hydrodynamischer Partikeldurchmesser von 0.61 nm erhalten (Abb. 2.56).

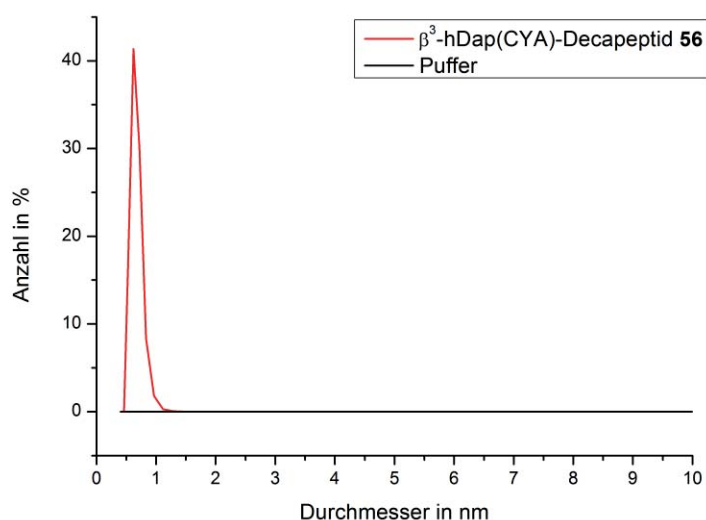


Abbildung 2.56: Größenverteilung von β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** (125 μ M, 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.4) bei 20 °C. Maximum liegt bei 0.61 nm (41%).

Die verlängerte Version, das β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57**, zeigte mit einem hydrodynamischen Partikeldurchmesser von 0.73 nm eine ähnliche Größenordnung (Abb. 2.57).

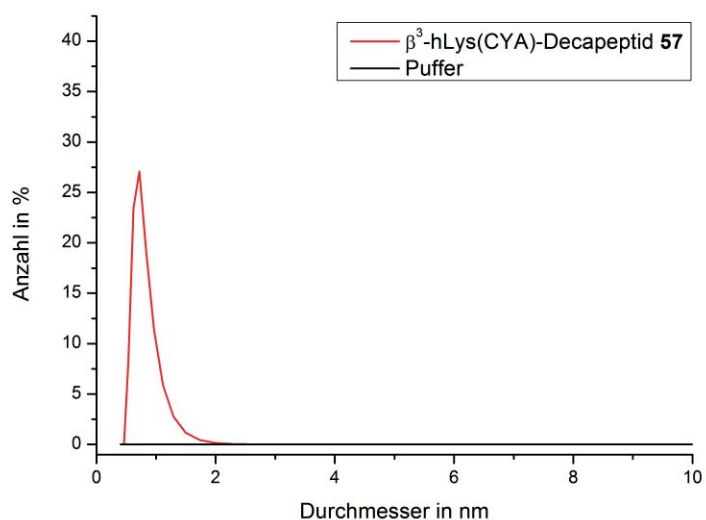


Abbildung 2.57: Größenverteilung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** (125 μ M, 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.4) bei 20 °C. Maximum liegt bei 0.73 nm (27%).

Das komplementäre β^3 -hLys(TAT)- β^3 -Decapeptid **58** passte mit einem hydrodynamischen Partikeldurchmesser von 0.62 nm in die Größenbereiche der CYA- β^3 -Decapeptide (Abb. 2.58).

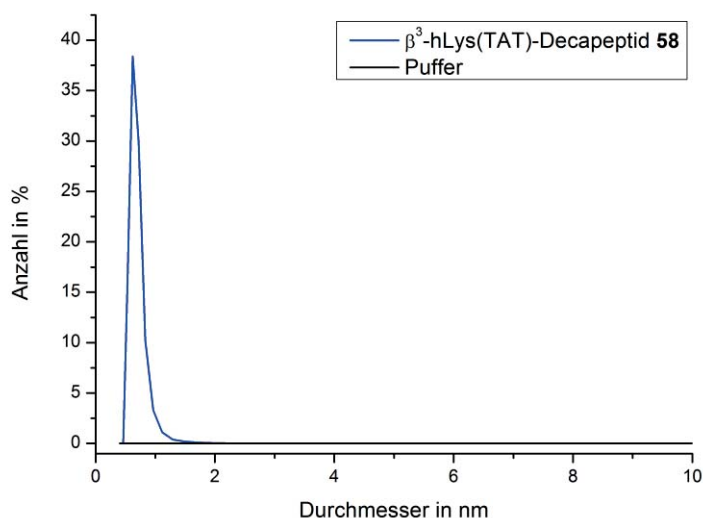


Abbildung 2.58: Größenverteilung von β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (125 μ M, 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.4) bei 20 °C. Maximum liegt bei 0.62 nm (38%).

Die äquimolare Mischung von β^3 -hDap(CYA)-Decapeptids **56** und β^3 -hLys(TAT)-Decapeptids **58** bildeten nach kurzer Zeit des Ansetzens einen sichtbaren farblosen Niederschlag, der sich am Boden der Küvette absetzte. In den DLS-Messungen konnten keine Einzelstränge mehr beobachtet werden. Jedoch wurden höhere hydrodynamische Durchmesser erhalten als erwartet, die wiederum von Messung zu Messung variierten (Abb. 2.59). Anhand der erhaltenen Messungen können keine genauen Größenangaben zu den entstandenen Aggregaten gemacht werden. In Arbeiten anderer Forschungsgruppen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Stapelung von zweidimensional hexamer-angeordneten CYA₃TAP₃-Derivaten kommt und infolgedessen unlösliche Fibrille bzw. Aggregate erzeugt werden.^[93,94] Die *N*- und *C*-terminalen, protoniert vorliegenden Lysine des hier vorgestellten Designs sollen eine Stapelung mehrerer Bündel anhand repulsiver Wechselwirkungen unterbinden. Eine mögliche Erklärung zur Aggregatsbildung könnte in der verringerten Symmetrie liegen. Die beiden Peptide β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** und β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** unterscheiden sich in den CH₂-Abständen zwischen Erkennungseinheit und β^3 -Peptidrückgrat. Während β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** nur eine CH₂-Einheit als Abstandshalter aufweist, besitzt β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** vier CH₂-Gruppen. Es könnte ein cyclisch hexameres Bündel entstanden sein, welches durch ein versetztes Stapeln weiterer Bündel den repulsiven Kräften umgangen und somit zu unlöslichen Aggregaten geführt haben könnte.

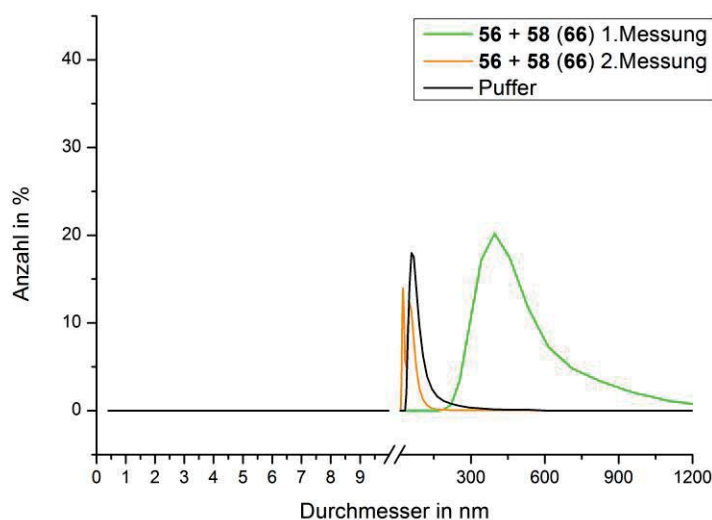


Abbildung 2.59: Größenverteilung der äquimolaren Mischung von β^3 -hDap(CYA)-Decapeptid **56** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (125 μ M, 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.4) bei 20 °C. Reproduzierbarkeit war aufgrund der Schwankungen nicht gegeben.

Weiterführend wurden die äquimolare Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** und β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** analysiert. Die DLS-Messungen zeigten einen vollständigen Verbrauch der einzelnen Peptide und ergaben eine breitere Verteilung an Durchmessern, dessen maximale Werte zwischen 2.71–3.12 nm lagen (Abb. 2.60). Die Reproduzierbarkeit war im Gegensatz zu der vorherigen äquimolaren Mischung gegeben. Die erhaltenen Größenordnungen passten zu den erwarteten Aggregatsgrößen. Die Verbreiterung könnte auf Zwischenstufen hinweisen, in der die β^3 -Decapeptide geordnet vorliegen, aber die finale Struktur noch nicht erreicht wurde.

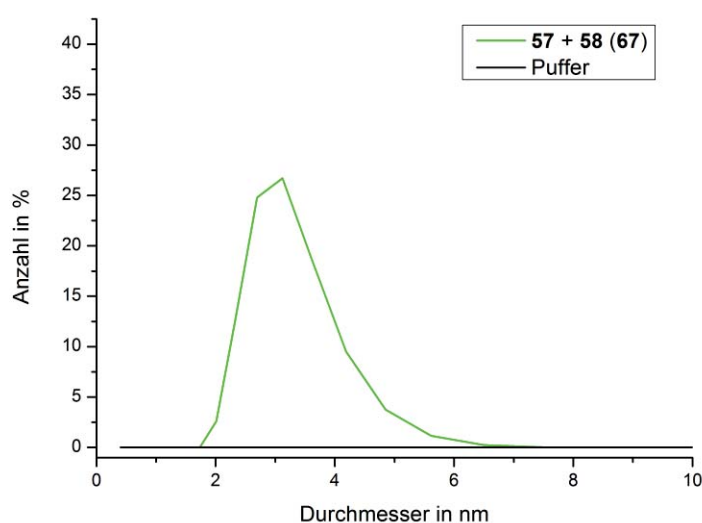


Abbildung 2.60: Größenverteilung der äquimolaren Mischung von β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** + β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58** (125 μ M, 5 mM TEAA-Puffer, pH = 7.4) bei 20 °C. Maximale Durchmesser liegen zwischen 2.71–3.12 nm (25–27%).

2.3.3.5 Kristallisationsexperimente

Eine Aussage über die strukturelle Anordnung des gebildeten Aggregates **67** aus der äquimolaren Mischung aus β^3 -hLys(CYA)-Decapeptid **57** und dem β^3 -hLys(TAT)-Decapeptid **58**, aus der vor allem die Orientierung der einzelnen β^3 -Peptide im hexameren Bündel hervorgeht, kann anhand der bisherigen Untersuchungen nicht getroffen werden. Ob die Peptide eine bestimmte Vorzugsrichtung (parallel bzw. antiparallel) aufweisen oder eine zufällige Anordnung annehmen, sollte durch Röntgenstrukturanalyse an einem Einkristall aufgeklärt werden. Allerdings gibt es nur vereinzelte Beispiele in der Literatur, die eine erfolgreiche Kristallisation von β^3 -Peptiden beschreiben.^[95,96] In Arbeiten von SEEBACH wird die geglückte Kristallisation eines beidseitig terminal geschützten hydrophoben L- β^3 -Tripeptids beschrieben, aus der die Tendenz einer linksgängigen 14-helikalen Sekundärstruktur abgeleitet und in Kombination mit 2D-NMR-Spektroskopie unter Verwendung einer verlängerten und entschützten Version in Form eines L- β^3 -Hexapeptids bestätigt wird.^[96] Des Weiteren führt die Wasserstoffbrücken-vermittelte, spontane Aggregation äquimolarer Mischungen aus CYA und TAT zu hydrophoberen Komplexen mit verringerter Löslichkeit in den meisten Solvenzien.^[92,97] Die vorwiegend pulverförmig ausfallenden Komplexe aus der Lösung erschweren aufgrund schneller Keimbildung und Kristallwachstum die Bildung eines Einkristalls. Erst durch die Verwendung der hydrothermalen Synthese konnte RAO Einkristalle des $(\text{CYA})_3(\text{TAT})_3$ -Komplexes erhalten und dessen netzwerkartige, periodisch hexamere Anordnung in einer Ebene sowie die Stapelung mehrerer Schichten übereinander mittels Röntgenbeugung bestätigen.^[92]

Die mutmaßlich erschwerten Bedingungen zur Kristallisation angesichts der sechs β^3 -Decapeptide und der damit verbundenen Flexibilität des Systems **67** sollte aufgrund der Pore, bestehend aus drei Lagen des $(\text{CYA})_3(\text{TAT})_3$ -Komplexes, abgeschwächt sein. Zusätzlich weisen die einzelnen Komponenten sehr gute Löslichkeit im wässrigen Medium auf, welcher aus den vorherigen Untersuchungen urteilend, auch nach Bildung des Aggregats **67** beibehalten wird. Folglich könnten die Erkennungseinheiten modifiziert mit den β^3 -Peptiden die Bildung eines Einkristalls begünstigen, welche andernfalls zur schnellen Keimbildung neigen.

Das Aggregat **67** kann mit einer Molekülmasse von 10 kDa als ein sehr kleines Protein betrachtet werden. Da Proteine und ähnliche Strukturen empfindlich auf ihre Umgebung reagieren und deren erfolgreiche Kristallisation mit langen Versuchsreihen verbunden ist, können *screening kits* kommerziell erworben werden, die eine große Anzahl an Präzipitationsmitteln beinhalten. Verwendet wurden Crystal Screen 2 von *Hampton Research* und Nuc-Pro 1–3 von *Jena Bioscience*. Die für Makromoleküle am häufigsten eingesetzte Hängetropfenmethode (*hanging drop*) wurde angewandt, in der eine Konzentrationsänderung durch Dampfdiffusion herbeigeführt wird (Abb. 2.61).^[98]

Insgesamt wurden 120 Bedingungen jeweils bei Raumtemperatur und 50 °C angesetzt.¹² Hierfür wurden die Reservoirs mit den unterschiedlichen Präzipitationsmitteln belegt. Die verwendeten Lösungen mit variierenden pH-Werten enthalten unterschiedliche Salzkonzentrationen und Puffer sowie Additive wie Polymere, mono- oder divalente Metallionen, organische Komponenten oder nichtflüchtige Alkohole. Anschließend wurde das Aggregat **67** (1 mM in milliQ-Wasser) und die entsprechende Reservoirlösung in einem Mischverhältnis von 1:1 als

¹² Die Kristallisationsexperimente wurden in Kooperation mit A. V. LÜBBEN aus dem Arbeitskreis von Prof. G. M. SHELDRICK und J. LÜBBEN aus dem Arbeitskreis von PD. Dr. habil. B. DITTRICH durchgeführt.



Tropfen auf einem Glasträger aufgebracht und das zugehörige Reservoir damit zugedeckt. Da im Allgemeinen das Präzipitationsmittel im Reservoir eine höhere Konzentration und einen niedrigeren Dampfdruck aufweist als im Tropfen, stehen Tropfen und Reservoir anfänglich nicht im Gleichgewicht zueinander. Um ein Gleichgewicht herzustellen, diffundiert Wasser aus dem Tropfen und führt zu einem sukzessiven Anstieg der Peptidkonzentration sowie die des Präzipitationsmittels im Tropfen. Die in dem Tropfen enthaltene Präparatkonzentration steigt an, wodurch eine Kristallbildung begünstigt wird.

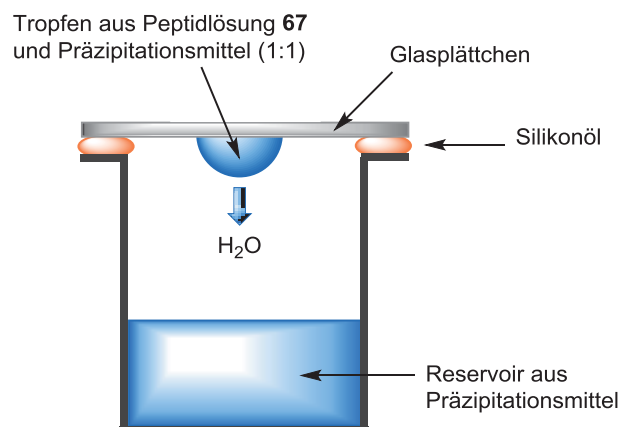


Abbildung 2.61: Hängetropfenmethode zur Kristallisation von Aggregat 67.

Aus den 240 Bedingungen konnten sieben Kristalle isoliert werden (Tab. 2.1). Es konnten jedoch keine zur Strukturaufklärung geeigneten Daten gesammelt werden.¹³ Mehrere Ursachen können vereinzelt oder akkumuliert zu diesem Resultat beigetragen haben. Im Gegensatz zu kleinen organischen Molekülen bestehen supramolekulare Aggregate wie diese aus einem Zusammenspiel intramolekularer und intermolekularer Wechselwirkungen, die zu einer molekularen Erkennung und Organisation führen. Zur detaillierten Veranschaulichung solcher höher geordneten Strukturen, deren Zusammenhalt durch nichtkovalente Bindungen zustande kommt, mag die Kristallstrukturanalyse eine der aussagekräftigsten Methoden sein. Dennoch ist eine Garantie zur Auflösung einer Struktur beginnend mit Kristallisationsexperimenten und Selektion der Kristalle gefolgt von Datensammlung sowie ihrer Interpretation nicht gegeben.

Tabelle 2.1 Isolierung von potentiellen Kristallen bei den angegebenen Präzipitationsmitteln.

Präzipitationsmittel
20 % v/v PEG 400, 50 mM Bis-Tris-propan ¹⁴ (pH = 6.8), 60 mM MgCl 1 M Imidazol (pH = 7.0)
0.2 M NaCl, 0.1 M NaOAc·H ₂ O (pH = 4.6), 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4- pentandiol
0.1 M CoCl ₂ ·6H ₂ O, 0.1 M NaOAc·3H ₂ O (pH = 4.6), 1.0 M 1,6-Hexandiol
0.5 M NaCl, 0.1 M Na ₃ Citrat·2H ₂ O (pH = 5.6), 2% v/v Polyethylenimin
1.6 M Na ₃ Citrat·2H ₂ O (pH = 6.5)
0.1 M HEPES ¹⁵ (pH = 7.5), 2 M Ammoniumformiat

¹³ Die Datensammlung wurde von PD Dr. habil. B. DITTRICH an der Swiss Light Source (SLS) in der Schweiz durchgeführt.

¹⁴ 1,3-Bis-(tris-(hydroxymethyl)-methylamino)-propan.

¹⁵ 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure.

Die einzelnen Schritte des hier beschriebenen Prozesses durchgehend, können folgende Bemerkungen gemacht werden: Für die Kristallisationsexperimente wurden eine begrenzte Anzahl an *screening kits* verwendet. Eine Bandbreite weiterer *screening kits* hätte getestet werden können. Die limitierenden Faktoren hierbei sind hauptsächlich die geringen Mengen beider Peptide, die nach erfolgreicher SPPS mit darauffolgender Reinigung zum Erhalt qualitativ reiner Substanzen noch zur Verfügung stehen sowie die Kosten und der Zeitaufwand. Des Weiteren ist die Qualität der entstandenen Kristalle ein wichtiges Kriterium hinsichtlich ihrer Beugungskraft.^[99] Die periodische Anordnung des Kristallgitters ist von entscheidender Bedeutung, welches bereits beim Wachstumsprozess entsteht. Eine externe Beeinflussung ist zudem begrenzt möglich. Einen zusätzlichen Effekt auf die Beugungskraft haben die vorhandenen Atomsorten des Aggregats **67**, welche nur aus leichteren Elementen (C, H, N, O) besteht. Leichtere Elemente führen im Vergleich zu schwereren Atomsorten zu einer verringerten Beugungskraft. Darüber hinaus ist die Stabilität höher geordneter Strukturen und somit der entstandenen Kristalle ein wichtiger Aspekt der mit berücksichtigt werden sollte.^[99] Das unter bestimmten Bedingungen erhaltene Aggregat **67** wird durch schwache intermolekulare Kräfte zusammengehalten. Somit ist es denkbar, dass es empfindlich auf seine Umgebung reagiert und nach Entfernen aus der Mutterlauge sowie Luftkontakt eine höhere Tendenz zur Zersetzung zeigt. Daraus folgt, dass neben der Kristallqualität auch die Vorbereitung der Kristalle sowie deren Transport vor der Datensammlung zu unbrauchbaren Kristallen geführt haben könnte. Ein letzter zu erwähnender Punkt ist das Kühlen der Probe auf 100 K vor Beginn der Datensammlung. Das Vorhandensein von Wassermolekülen im Kristall begünstigt beim Kühlen das Gefrieren dieser, wodurch Sprünge und Risse verursacht werden können. Somit bleibt die Frage offen, ob es sich bei den Kristallen um das gewünschte Aggregat **67**, dessen einzelne Komponenten oder lediglich um Salze aus den Präzipitationsmitteln handelte. Die Experimente mit den sieben Bedingungen wurden wiederholt und zusätzlich Kristallisationsexperimente mit Triethylammoniumacetat (pH = 7.0, 5 mM, 50 mM und 500 mM) als Präzipitationsmittel angesetzt, welches in den vorherigen Untersuchungen von Aggregat **67** verwendet wurde. Die Informationen zur erneuten Kristallbildung sowie ihrer Röntgenstrukturanalyse wurden noch nicht erhalten, so dass zu diesem Zeitpunkt keine Aussage über die exakte räumliche Anordnung des Aggregats **67** getroffen werden kann.



2.3.4 Diskussion der Ergebnisse

Es wurde ein künstliches System entworfen, welches durch molekulare Selbstorganisation eine höher geordnete Überstruktur ausbilden sollte. Den Antrieb sollten geeignete Untereinheiten mit positiver Kooperativität geben und somit die Assoziation erleichtern. Hierzu wurden β^3 -Peptide mit den Erkennungseinheiten CYA und TAT hergestellt, die eine 14-Helix ausbilden, wodurch die Erkennungseinheiten auf einer Seite übereinander zu liegen kommen. Dabei wurden zwei verschiedene CYA-funktionalisierte β^3 -Peptide **56** und **57** mit gleicher Abfolge hergestellt, die sich lediglich im Abstand des β^3 -Rückgrats und der Erkennungseinheit (eine CH_2 -Gruppe bzw. vier CH_2 -Gruppen) unterscheiden. Das TAT-funktionalisierte β^3 -Peptid **58** enthielt vier CH_2 -Einheiten ähnlich dem CYA-Peptid **57**. Die äquimolaren Mischungen **56+58** und **57+58** wurden in wässrigen Lösungen (pH-Wert 7–7.4) angesetzt und analysiert. Es wurden zwei komplett unterschiedliche Resultate erzielt. Aus den CD- und DLS-Messungen wurden Hinweise auf unlösliche Aggregate für die äquimolare Mischung **56+57** (**66**) erhalten, jedoch blieb eine Bestätigung mittels ESI-MS aus, in der aus der Gasphase nur Heterodimere und Spuren von Trimeren detektiert worden sind. DLS-Messungen wiederum zeigten einen vollständigen Verbrauch der Monomere **56** und **58**. Eine mögliche Erklärung zur Bildung unlöslicher Aggregate ist die verringerte Symmetrie bedingt durch die unterschiedlichen Seitenkettenabstände. Eine Stapelung von $(\text{CYA})_3(\text{TAT})_3$ -Derivaten wird für gewöhnlich begünstigt, jedoch sollten die C- und N-terminalen Lysine durch abstoßende Kräfte die Assoziation mehrerer Bündel unterbinden. Durch das versetzte Stapeln einzelner Aggregate, in denen sich β^3 -Peptide mit kürzeren Seitenkettenabständen mit β^3 -Peptiden längerer Abstände arrangieren und übereinander ordnen, könnten die repulsiven Kräfte umgangen und unlösliche Fibrille entstanden sein. Zum Nachweis von unlöslichen Aggregaten bedarf es weiterer Experimente, in der bildgebende Verfahren wie Elektronenmikroskopie oder AFM herangezogen werden können. Im Gegensatz zu **66** wurde die molekulare Selbstorganisation der äquimolaren Mischung aus **57+58** (**67**) in ESI-MS- und DLS-Messungen bestätigt. Die Massenspektren zeigten neben der gewünschten hexameren Topologie **67**, lediglich die Monomere und das Heterodimer **57+58**. Die zugehörigen Signale der Zwischenstufen Trimer, Tetramer und Pentamer wurden in den analysierten relativen Signalintensitäten über 0.5% nicht beobachtet. Dieses Ergebnis deutet zum einen auf die positive Kooperativität der Janusmolekül-funktionalisierten β^3 -Peptide und zum anderen auf die Stabilität des Aggregats **67**. Weiterführend zeigte die DLS-Messung einen vollständigen Verbrauch der Monomere und ergab eine verbreitete Größenordnung, welche in dem berechneten Durchmesserbereich des Aggregats **67** lag. Die Verbreiterung des hydrodynamischen Durchmessers kann ein Indiz für Zwischenstufen sein oder aber die Flexibilität der Seitenkette (vier CH_2 -Einheiten zwischen Rückgrat und Erkennungseinheit) hat zu der Verteilung beigetragen. Die CD- und UV-Spektren zeigten kaum Intensitätsverlust und könnten auf lösliche Aggregate hinweisen. Somit eignet sich das Aggregat **67** für zukünftige Untersuchungen.

3. Trifunktionale Cyclo- β^3 -Peptide

Die Entwicklung und Herstellung von aktiven artifiziellen Proteinmimetika, sei es für biomedizinische oder für materialwissenschaftliche Zwecke, setzt das Verständnis der dreidimensionalen Proteinstruktur voraus. Die durch die Beschaffenheit der Primärstruktur vorherrschenden Kräfte, wie hydrophobe, Wasserstoffbrücken-bildende, elektrostatische und van-der-Waals-Kräfte, führen zu konformationell definierten Sekundärstrukturen, die sich im dreidimensionalen Raum ausrichten. Aus der dreidimensionalen Struktur resultiert die biologische Aktivität des Proteins. Für das Design von neuartigen funktionalisierten Verbindungen ist es wichtig, die nichtkovalenten Kräfte, die den Antrieb zur Ausbildung von spezifischen Überstrukturen darstellen, zu kennen und gezielt einzusetzen. Zum Verständnis wurden viele Modellsysteme konzipiert und in diesem Zusammenhang in den letzten drei Jahrzehnten synthetische Bausteine mit definierter Form und Größe synthetisiert. Allerdings weisen die artifiziellen Aminosäuresequenzen meist keine stabilen Sekundärstrukturen, sondern ungeordnete Aggregate in Lösung auf. Ein Lösungsansatz für das als Faltungsproblem bekannte komplexe Phänomen wird durch das Konzept „Templat-assoziierte synthetische Proteine“ (TASP) gegeben. Durch die Verwendung eines Templates soll der Weg für neue Proteine, die den Anforderungen von Forschung und Industrie entsprechen, geebnet sein. Cyclische β^3 -Peptide, deren Seitenketten stufenweise modifizierbar sind und damit die Einführung diverser Funktionalitäten ermöglichen, eignen sich als richtungsweisende Template. Neben einer hohen Flexibilität zur Funktionalisierung offerieren Cyclopeptide aus ihrer Molekülerkennung heraus höhere Wasserstoffbrücken-vernetzte Aggregate. Eine tubuläre Stapelung dieser kann zur Amplifikation der Funktionalität führen und diese Eigenschaft für nanotechnologische Bereiche zur Erzeugung von Speichermedien oder Ionenkanäle von Nutzen sein.

Die Funktionalisierung von Cyclopeptiden, sei es für TASP oder zur Erzeugung von funktionellen Nanoröhren und ferner für pharmazeutische Bioaktivitätsstudien, kann während der Peptidsynthese oder nach Aufbau des Grundgerüsts erfolgen. Trotz zahlreich etablierter Strategien kann die N-zu-C-terminale Cyclisierung acyclischer Peptide eine synthetische Herausforderung darstellen und sich in geringen Ausbeuten widerspiegeln. Demzufolge wird in diesem Kapitel das Konzept TASP beschrieben und es werden cyclische Peptide als potentielle Träger von strukturellen und funktionellen Eigenschaften aufgezeigt (Kapitel 3.1). Die Generierung von Nanoröhren aus aggregierten Cyclopeptiden und deren potentielle Applikationen werden wiedergegeben (Kapitel 3.2). Des Weiteren wird gezeigt, wie die bekannte Synthese eines Cyclo- β^3 -Peptids von der festen Phase in die Lösung übertragen wurde (Kapitel 3.3.1). In einer Gegenüberstellung werden außerdem die Vor- und Nachteile der Synthese auf fester Phase und in Lösung diskutiert (Kapitel 3.3.2).



3.1 Cylopeptide zur templatvermittelten Organisation von Funktionalitäten

Im Allgemeinen werden zwei unterschiedliche Strategien zur Konstruktion künstlicher Proteine mit definierten Eigenschaften verfolgt: Protein Engineering und *de novo*-Design.^[100] Das Ertere beschäftigt sich mit der Struktur und Funktion in Abhängigkeit von der natürlichen Sequenz, die durch Punktmutationen verändert wird. Die Modifikationen können über standardisierte biotechnologische Methoden realisiert werden, wobei die Einführung mehrerer Moleküle unterschiedlicher Klassen mit den zur Auswahl stehenden Hilfsmitteln begrenzt sein kann. Im *de novo* Design wird eine dreidimensionale Konformation angestrebt, und aus monomeren Bausteinen nach chemischen Methoden aufgebaut, welches die Verknüpfung diverser Funktionalitäten ermöglicht.

Ausgehend von einem ungefalteten Zustand wird unter nativen Bedingungen die Ausbildung der dreidimensionalen Proteinstruktur durch die Überwindung der Konformationsentropie erreicht.^[100] Der initiiierende Vorgang zur Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur kann für die meisten künstlichen Systeme aufgrund des komplexen Faltungsvorgangs, in dem verschiedene Kräfte und Effekte zusammenwirken, erschwert sein. Die Ursachen hierbei sind häufig die hohe Flexibilität des peptidischen Systems und das Vorhandensein von geringen Kontakterflächen für den hydrophoben Effekt. Eine weiterführende Komplikation stellt das Fehlen von stabilisierenden weitreichenden Wechselwirkungen dar. Zur Kompensation wurden amphiphile Peptide nach dem Helix-Rad-Modell entworfen, die eine Tendenz zur Selbstassoziation und Komplexierung aufweisen.^[100,101] Dabei werden im Fall einer α -Helix hydrophobe Seitenketten auf eine Seite und hydrophile Seitenketten auf die andere Seite geordnet, so dass im wässrigen Medium die hydrophoben Bereiche der Helix intermolekulare Wechselwirkungen eingehen (Beispiel Abb. 3.1, Mitte).^[100,102] Trotz einer Primärsequenz amphiphilen Charakters kann die gewünschte konformationelle Anordnung gehindert sein.

Ein möglicher Ansatz zur Vereinfachung des Faltungsvorgangs sowie zur Assoziation dieser liefert das *de novo*-Design durch die lineare Synthese, in der die Primärsequenz vier α -Helixbereiche sowie Linkerregionen zwischen diesen enthält (Abb. 3.1 a).^[100,103] Allerdings kann die Herstellung von Peptidsequenzen mit 4 α -Helix-Domänen aufgrund ihrer Länge synthetische Schwierigkeiten verursachen.

Eine weitere Strategie zur Aufhebung des Faltungsproblems wurde von MUTTER mit dem Konzept der Templat-assoziierten synthetischen Proteine (TASP) eingeführt, welches die Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur durch die dirigierende Eigenschaft eines Templates erleichtern und die Komplexität des Systems reduzieren soll.^[100,104,105] Hierbei besitzen die templatgebundenen Peptide eine niedrigere Konformationsenergie als solche ohne einen Träger, wodurch eine Faltung gegenüber einer *random coil*-Struktur bevorzugt wird. Das Faltungsproblem wird über energetisch günstiger gewordene intermolekulare Wechselwirkungen umgangen und über stabile Sekundärstrukturen (α -Helices, β -Faltblätter, Schleifen) die Faltung induziert. Durch ein richtungsweisendes Templat kann eine Packungsordnung mit mehreren Sekundärstrukturen vorgegeben und es können Vernetzungen zu Tertiärstrukturen begünstigt werden (Beispiel Abb. 3.1, b).^[100,106–109]

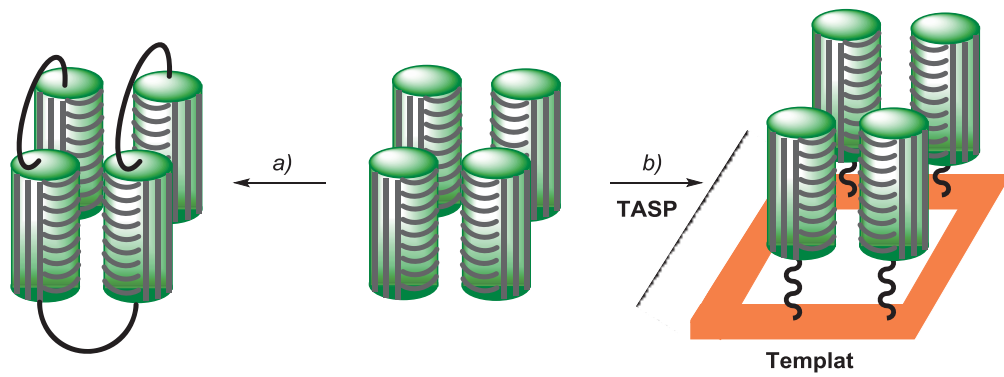


Abbildung 3.1: Strategien zur Erzeugung von artifiziellen 4 α -Helixbündel-Proteinen¹⁶ nach dem *de novo*-Design. Die Strategien werden zur Nachahmung von tetrameren Strukturen genutzt, die durch Selbstassoziation entstehen (**mitte**).^[100,101] a) Lineare Peptidketten werden synthetisiert, die Regionen für α -Helices und Schleifen (*loops*) enthalten, so dass in Lösung 4 α -Helixbündel-proteine gebildet werden.^[100,103] b) TASP-Konzept: ein Templat wird kovalent mit den einzelnen α -Helices verbunden. Die Helices sind mit gleicher Topologie angeordnet, wie sie in natürlichen Systemen zu finden sind.^[100, 106–108]

Nach dem TASP-Konzept können Ionenkanalbildner, biologisch aktive Peptide und Enzymmodelle erzeugt werden.^[100,105] Nicht nur Peptide können als Substituenten an das Templat geknüpft werden, sondern auch andere Biomoleküle und eine Kombination daraus wie DNA/RNA-Base(n), Glykoside oder Farbstoffe mit Fluoreszenzeigenschaften, isotopenmarkierte oder lipophile Moleküle zur verbesserten Membrangängigkeit. Die resultierenden Topologien mit funktionellen Eigenschaften eröffnen ein unbegrenztes Spektrum an Applikationen, wie die Untersuchung von Protein- bzw. Peptid-Substrat-Interaktionen in biologischen Studien, die Entwicklung bioaktiver Substanzen für pharmazeutische Zwecke oder die Erforschung neuartiger Produkte in Materialwissenschaften.

Als Template können beliebige Moleküle mit Verknüpfungsstellen räumlich geeigneter Anordnung verwendet werden, wobei cyclische Peptide bevorzugte Kandidaten darstellen. Die am meisten studierten Peptidkonformationen in diesem Zusammenhang sind die cyclischen Decapeptide (Abb. 3.2).^[110–113] Durch die Verwendung von zwei Glycinen und zwei Prolinen wird das Templat in eine antiparallele β -Faltblatt-Konformation dirigiert. Die Ringstruktur des Prolins vereinfacht neben der bevorzugten *trans*-Stellung eine *cis*-Anordnung, wodurch ein Richtungswechsel im Decapeptid induziert wird.^[111] Funktionalisiert mit vier gleichen Verknüpfungsstellen, wird eine tetravalente Modifikation des Decapeptids durch eine regioselektive Adressierung (*regioselective addressable functionalized template*, RAFT) ermöglicht.^[114]

¹⁶ 4 α -helikales Bündel ist ein häufig vorkommendes Motiv in biologisch aktiven Peptiden und Proteinen, dessen Aufgaben von Metall-Speicherung bis hin zu Zellstimulation reichen.^[102] Als Modellsysteme eignen sie sich durch ihre einfachere Struktur im Vergleich zu anderen Proteinstrukturen und werden zum Verständnis natürlicher Strukturen sowie zum Entwurf artifizieller Proteine benutzt.

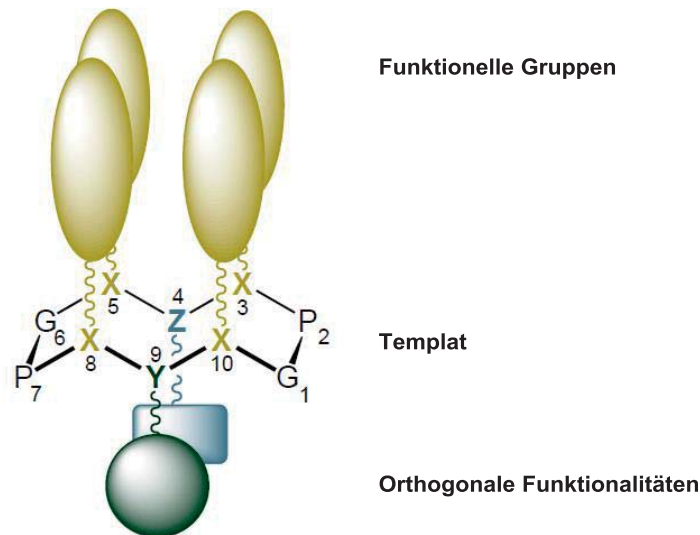


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines cyclischen Decapeptids mit funktionellen Gruppen und orthogonalen Funktionalitäten.^[110–113]

Darüber hinaus werden durch die Einführung von orthogonalen Seitengruppen chemoselektive Reaktionen zur Inkorporation von unterschiedlichen Strukturen und Funktionen realisiert (*chemoselective addressable template*, CAT) (Abb. 3.3).^[115–117]

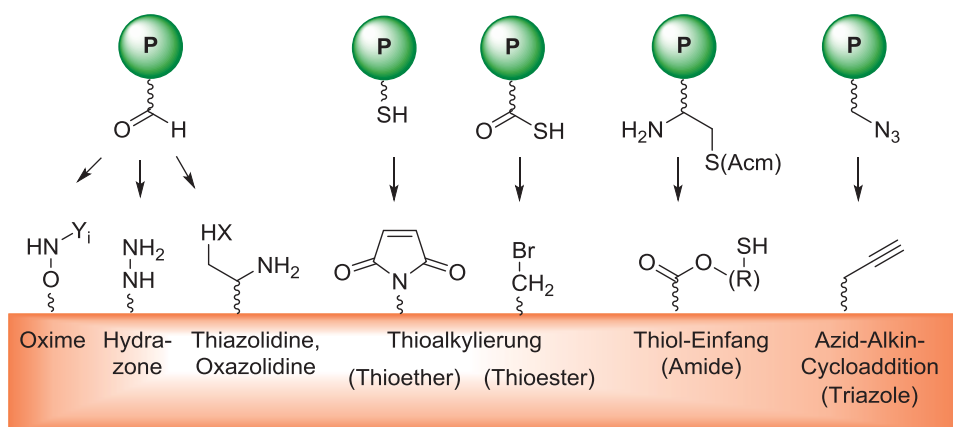


Abbildung 3.3: Chemoselektive Ligationsmethoden zur Verknüpfung von Zielmolekül und Templat.^[115,116]

Cyclo- β^3 -Peptide besitzen eine starre planare Struktur und bieten anhand ihrer drei definierten Seitenketten die Einführung von strukturellen und funktionellen Charakteristiken. Die hohe Neigung zur Stapelung mehrerer Cyclo- β^3 -Peptide durch intermolekulare Wechselwirkung ermöglicht eine Oligomerisierung und führt somit zu einer Verstärkung der eingeführten Modifikationen. In Arbeiten von DIEDERICHSEN wurde ein trivalentes Cyclo- β^3 -Peptid mit drei orthogonal geschützten Seitenketten synthetisiert, die eine schrittweise Funktionalisierung ermöglichen.^[19] So wurden ein zellpenetrierendes Peptid und ein Fluorophor an das Cyclo- β^3 -Peptid (**68**) angebracht und dadurch das Potential für zellbiologische Studien aufgezeigt (Abb. 3.4). Zum einen wird durch das zellpenetrierende Peptid Penetratin die Membrangängigkeit gesteigert und zum anderen durch den Fluorophor 5(6)-TAMRA eine biophysikalische Methode

zur zellulären Lokalisierung angeboten. Die dritte Position kann zum Einschleusen von bioaktiven Molekülen genutzt werden. Das Cyclo-β³-Peptid als zentraler Träger mit den erwähnten Funktionalitäten könnte in *in vivo*-Experimenten zur Evaluation der Wirksamkeit von induzierenden und inhibierenden Wirkstoffen verwendet werden.

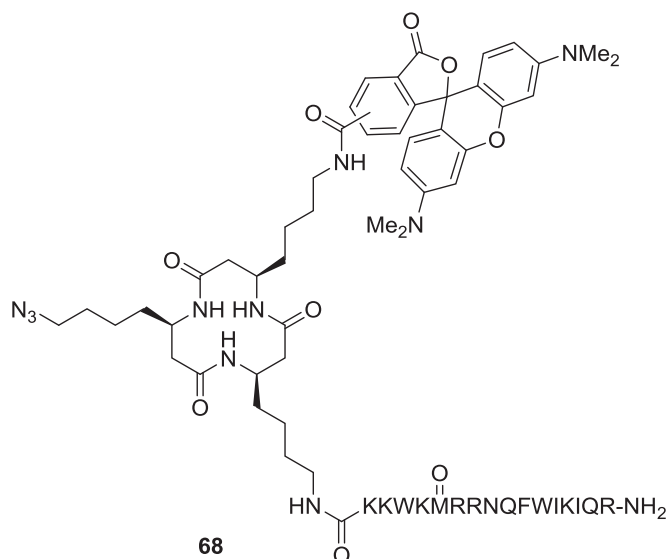


Abbildung 3.4: Cyclo-β³-Peptid **68** als zentraler Träger von Penetratin und 5(6)-TAMRA.^[19]

3.2 Nanoröhren aus cyclischen Peptiden

Neben richtungsweisenden Trägern zur Organisation von Funktionalitäten eignen sich cyclische Peptide als Modellsysteme für natürliche Ionenkanäle aufgrund ihrer Tendenz zur Selbstaggregation. Ionenkanäle sind porenförmige Transmembranproteine, die die Biomembranen durchspannen und das Durchqueren von geladenen Ionen ermöglichen.^[118] Für einen selektiven Transport werden an die künstlichen Systeme Anforderungen wie gute Eigenschaften zur Permeation, die Fähigkeit zur Öffnung und Schließung des Kanals sowie die Steuerung ihrer Aktivität durch Interaktionen mit speziellen Substanzen gestellt.^[119]

Organische Nanoröhren aus cyclischen Peptiden (*peptide nanotubes*, PNTs) wurden bereits in den 70er Jahren von HASSAL und DESANTIS vorhergesagt. Der Vorschlag wurde erstmalig von GHADIRI durch die Verwendung von D,L-alternierenden α-Aminosäuren am Beispiel des Cyclo[(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂] umgesetzt.^[120–123] Die Antriebskraft zur Bildung der porenförmigen Strukturen wird durch die energetisch begünstigte Wasserstoffbrückenbindung gegeben. Das achtegliedrige cyclische Peptid bildet aus zwei Gründen diese tubuläre Strukturen aus (Abb. 3.5, rechts). Zum einen ist der cyclische Ring planar, dadurch liegen alle Rückgratmodifikationen senkrecht zur Ringebene. Dies führt zu einer orthogonalen Stapelung unter Bildung von acht Wasserstoffbrückenbindungen. Zum anderen weisen die Seitenketten der Aminosäuren nach außen, so dass der Abstand zwischen zwei Cyclopeptiden ungefähr 4,8 Å beträgt.^[120,124] Der Innendurchmesser dieser Nanoröhren kann durch die Art und Anzahl der Aminosäuren kontrolliert werden: Während Cyclooctamere einen Innendurchmesser von 7 Å aufweisen, besitzen Cyclododecamere einen Innendurchmesser von 13 Å.^[124] Als Transportkanäle in Lipiddoppelschichten eingesetzt, ermöglichen Nanoröhren die Übertragung von hydrophilen Substanzen ohne spezifische Transportproteine zu benötigen. Für den Transport von Glucose

wird ein Innendurchmesser von mindestens 9 Å benötigt. Dies wird erreicht, indem ein zehngliedriges cyclisches Peptid alternierend aus Tryptophan und Leucin eingesetzt wird.^[125] Einzelkanalmessungen ergaben für K^+ - und Na^+ -Ionen eine Kanalaktivität, die den kanalbildenden nativen Proteinen ähnelt.^[124,125]

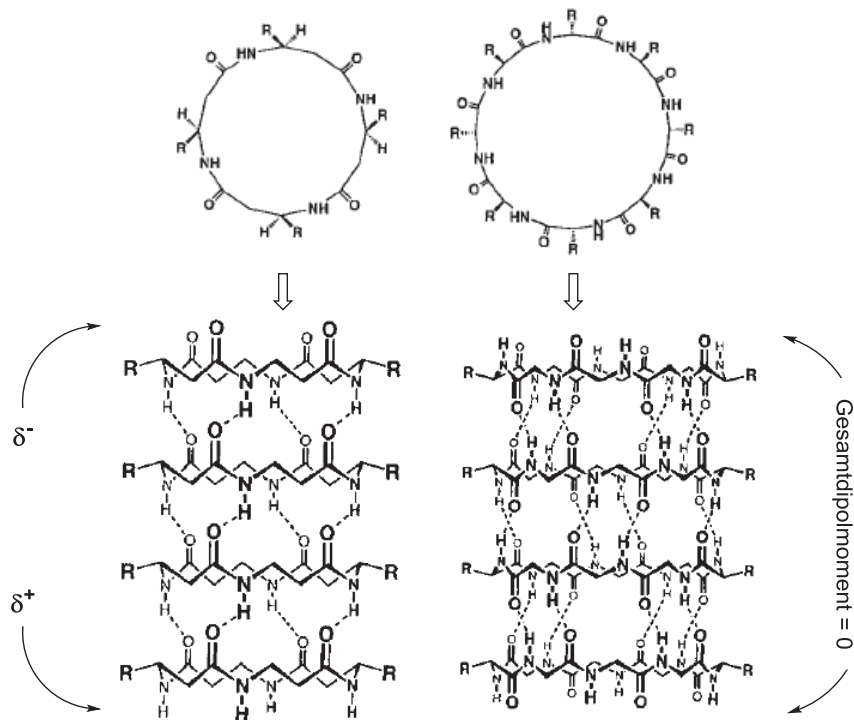


Abbildung 4.5: Gegenüberstellung von Nanoröhren aus D,L- α - und β^3 -Cyclopeptiden.^[126] **Links:** Ein Cyclo- β^3 -Tetrapeptid, in dem durch die entgegengesetzt orientierten NH- und CO-Funktionalitäten ein Makrodipolmoment analog zu α -Helices resultiert. **Rechts:** Im Vergleich sollte das Cyclo-D,L- α -Octapeptid kein Gesamtdipolmoment besitzen.^[120,126] Die Seitenketten der Aminosäuren zeigen in beiden Fällen senkrecht zur tubulären Struktur.

Cyclische β^3 -Peptide sind in der Lage, so wie ihre α -Analoge tubuläre Strukturen auszubilden. Dafür wurden in Untersuchungen von SEEBACH kurzkettige cyclische β^3 -Tetrapeptide bestehend aus β^3 -Homoalanin verwendet.^[127] Durch die Wahl von drei unterschiedlich konfigurierten cyclischen Tetrapeptiden können verschiedene Konformationen erhalten werden. Bedingt durch die Konfiguration der Reste richten sich die Carboxylgruppen und Amidprotonen definiert aus, wodurch sich die Erkennungspositionen für Wasserstoffbrückenbindungen für jedes Stereoisomer unterscheiden und die Stereoisomere infolgedessen unterschiedliche Aggregate aufweisen. In allen Konformeren befinden sich die Seitenketten in lateralen Positionen, um nicht nur eine 1,5-repulsive Wechselwirkung zwischen dem Carbonylsauerstoff und der Methylgruppe zu vermeiden, sondern auch repulsive Kräfte zwischen den Methylgruppen und den Wasserstoffbrückenbindungen zu verhindern. In einem homochiralen Tetrapeptid mit (all-S)-Konfiguration richten sich alle CO- sowie NH-Gruppen orthogonal zueinander und senkrecht zur Ringebene aus, so dass alle CO-Gruppen auf einer Ringseite und die NH-Gruppen auf der anderen Seite liegen. Dieses Grundgerüst wurde von GHADIRI auf β^3 -hTrp-haltige Sequenzen übertragen, um einen Ionenkanalbildner in C_4 -Symmetrie mit einem Porendurchmesser von 2.6–2.7 Å zu erhalten (Abb. 3.5, links).^[124,126] Einzelkanalmessungen zeigten ähnliche K^+ -Aktivität wie die D,L- α -Cyclopeptide unter denselben Bedingungen. Aufgrund des Makrodipolmoments analog

zu natürlichen Ionenkanalbildnern wird im Allgemeinen ein Kationen- und Anionentransport begünstigt.

Cyclische β^3 -Tripeptide bilden analog zu ihren Tetrameren rigide β^3 -PNTs mit einem Innendurchmesser von 1.3 Å und einem Stapelungsabstand von 4.8 Å aus. Die Neigung zur Selbstassoziation wurde mit Hilfe des MacroModel-Programmes als energetisches Minimum aufgezeigt.^[128,129] Die Arbeiten von Kimura zeigten, dass Cyclo- β^3 -Tripeptide gezielt in dem Bereich der Elektrochemie eingesetzt werden können. In diesem Zusammenhang wurden Cyclo- β^3 -Tripeptide an den Seitenketten mit Terpyridinen funktionalisiert, wodurch nicht nur Selbstaggregation stattfinden, sondern auch Metalle komplexiert werden.^[120] Die Terpyridine bilden eine planare Ebene und ordnen sich parallel übereinander an, wodurch das β^3 -PNT durch zusätzliche π - π -Wechselwirkung stabilisiert wird. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die gebildeten molekularen Aggregate auch in der Lage sind, Cu(II) zu binden. Diese Nanoröhren besitzen eine hohe elektrische Leitfähigkeit sowie ein starkes Dipolmoment und sind somit interessant für elektrochemische Anwendungen. Weiterführend wurden β^3 -PNTs aus β -Glycaminsäuren (*sugar amino acids*, SAAs) hergestellt, die Pyranose-Einheiten in ihrem Rückgrat aufweisen, welche in biologischen Studien als aktives Templat mit dem Kohlenhydrat-bindenden Protein Lectin interagieren können.^[130,131]

Neben der Verwendung als Modellsystem für porenbildende Transmembranproteine reichen die Applikationen der PNTs von artifiziellen Photosystemen, über Biosensoren und -materialien zu elektronischen Elementen sowie photoaktiven Materialien.^[123,131]

3.3 Synthese von Cyclo- β^3 -Tripeptiden

Die Stabilisierung von Cyclopeptiden über intramolekulare Wasserstoffbrücken führt zu tubulären Strukturen, deren Seitenketten der vereinfachten Einführung von strukturellen und funktionellen Eigenschaften dienen. Die ursprüngliche Intention zur Synthese von Cyclopeptiden lag im Rahmen dieser Arbeit in der Entwicklung von dimeren Nanoröhren. Die Synthese des Cyclo- β^3 -Tripeptids **69** unter Verwendung von drei orthogonal geschützten β^3 -Homolysinen wurde in unserem Arbeitskreis entwickelt und ermöglicht eine stufenweise Modifikation der Seitenketten (Abb. 3.6).^[19] Die Herstellung über Festphasen-Peptidsynthese sollte übertragen werden, um im Anschluss die Seitenketten mit Nucleobasen zu funktionalisieren. Die Einführung von Nucleobasen durch geeignete Funktionalisierung ist in der Literatur beschrieben und sollte analog angewandt werden.^[19,132] Die Kombination der Eigenschaften der Cyclopeptide zur Selbstaggregation und der Erkennungseinheiten zur Basenpaarung sollte eine Dimerisierung begünstigen und höher geordnete Aggregate ermöglichen.

Der ausschlaggebende, limitierende Faktor bei der Herstellung des Cyclo- β^3 -Tripeptids **69** sind jedoch die isolierten geringen Mengen, die weitere Funktionalisierungen über mehrere Stufen erschweren. Hieraus ergab sich die Hauptaufgabe, den Prozess zur Generierung des Cyclo- β^3 -Tripeptids **69** im Detail durchzugehen und einen verbesserten Zugang zu finden. Die Möglichkeit zur Herstellung von Cyclo- β^3 -Tripeptiden im Gramm-Maßstab wäre ein wichtiger Fortschritt, der über das anfängliche Vorhaben hinaus in der Arzneimittelforschung zur Identifikation hochaktiver Cyclopeptide durch Hochdurchsatz-Screening genutzt werden könnte.

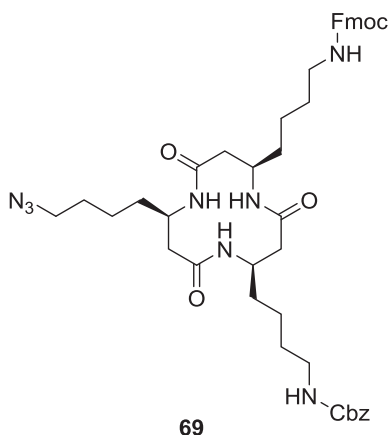


Abbildung 3.6: Struktur des Cyclo- β^3 -Tripeptids **69**: Anhand der orthogonalen Schutzgruppenstrategie ist das Templat mit mehreren Verknüpfungsstellen stufenweise funktionalisierbar. Durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindung und Stapelung der Ringe wird eine tubuläre Struktur generiert.^[19]

3.3.1 Herstellung auf fester Phase

Wie bereits im Kapitel 2 beschrieben unterscheiden sich β -Aminosäuren von α -Aminosäuren lediglich durch eine zusätzliche Methylengruppe. Die natürlichen α -Aminosäuren sind kommerziell in enantiomerenreiner Form erhältlich und werden daher häufig als Ausgangsmaterialien in β^3 -Aminosäure-Synthesen verwendet. Darauf aufbauend wurde die bekannteste Methode, die ARNDT-EISTERT-Homologisierung, entwickelt.^[96] Die effiziente Umsetzung zu enantiomerenreinen β^3 -Aminosäuren beginnt zunächst durch die Überführung der Säurefunktion des α -Analogons in ein Diazoketon. Im nächsten Schritt wird über die WOLFF-Umlagerung die β^3 -Aminosäure generiert.

Zum Erhalt der Monomerbausteine wurde die ARNDT-EISTERT-Homologisierung angewandt und drei orthogonal geschützte Aminosäuren im Gramm-Maßstab erfolgreich isoliert (Abb. 3.7).^[19]

Dabei konnten die Aminosäuren Boc-L- β^3 -hLys(Fmoc)-OH (**72**) und Boc-L- β^3 -hLys(Cbz)-OH (**76**) über ihre natürlichen α -Analoge hergestellt werden. Die Azidfunktion der Aminosäure Boc-L- β^3 -hLys(N₃)-OH (**79**) wurde ausgehend von Boc-L-Lys-OH (**76**) über eine Kupfer(II)-katalysierte Diazo-Transferreaktion eingeführt und Boc-L-Lys(N₃)-OH (**78**) erhalten (Abb. 3.7). Anschließend wurde Boc-L-Lys(N₃)-OH durch eine ARNDT-EISTERT-Homologisierung in die β^3 -Aminosäure **79** überführt.

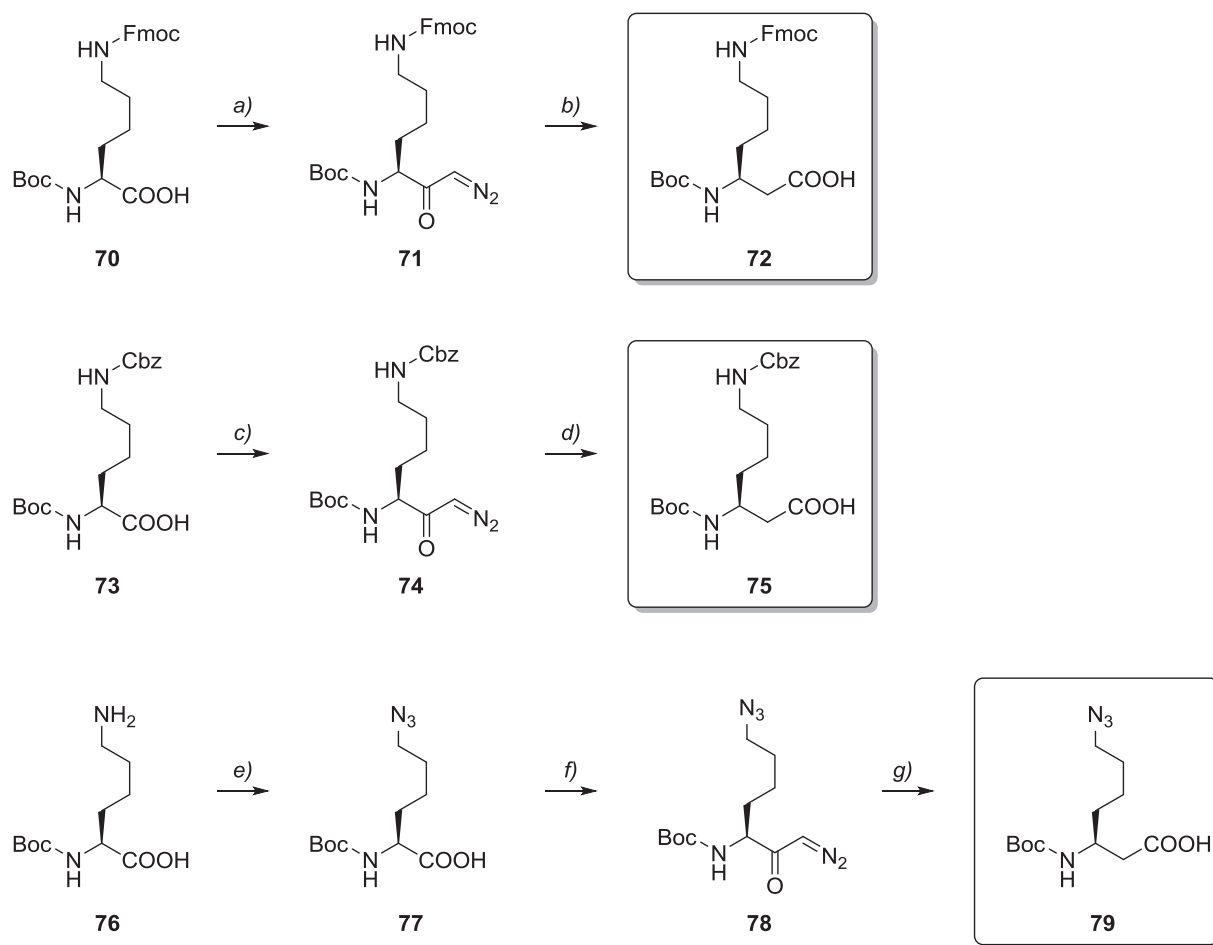


Abbildung 3.7: Die zur Synthese des Cyclo-β³-Tripeptids **69** hergestellten Aminosäuren. a) (i) NEt₃, ^tBuCOOCl, THF, -21 °C, 45 min, (ii) CH₂N₂, Et₂O, 0 °C, 30 min, RT, 5 h; 93%. b) AgOBz, THF/H₂O (9:1), Ultraschallbad, 2 h; 86%. c) (iii) NEt₃, ^tBuCOOCl, THF, -21 °C, 45 min, 90% (iv) CH₂N₂, Et₂O, 0 °C, 30 min, RT, 6 h; 64%. d) AgOBz, NEt₃, THF/H₂O (9:1), -15 °C, 30 min, RT, 21 h; 64%. e) 1H-Imidazol-1-sulfonylazid-hydrochlorid (**80**)¹⁷, K₂CO₃, CuSO₄·5H₂O, MeOH/H₂O (1:4), RT, 5 h; 98%. f) (vi) NEt₃, ^tBuCOOCl, THF, -21 °C, 45 min, (vii) CH₂N₂, Et₂O, 0 °C, 30 min, RT, 6 h. g) AgOBz, THF/H₂O (9:1), Ultraschallbad, 3 h; 65% (über zwei Stufen).^[19]

Unter Verwendung der orthogonalen Schutzgruppenstrategie werden Peptide chemisch entweder über die Festphasensynthese oder über die Synthese in Lösung hergestellt. Die Verlängerung der Peptidkette um eine Aminosäure beinhaltet im Wesentlichen die Zwischenschritte Aktivierung, Kupplung und Entschützung bis die gewünschte Sequenz erhalten wird. Zur Herstellung der Peptide, insbesondere für lineare Sequenzen, hat sich die Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) als bewährte Methode etabliert. Zur Synthese von Cyclopeptiden wurden in den letzten Jahrzehnten viele Strategien entwickelt, welche gewisse Vorzüge, aber zugleich bestimmte Limitationen aufweisen.^[133–137] Eine Möglichkeit zur *N*- zu *C*-terminalen Cyclisierung wurde von ROSENBAUM eingeführt, in der eine oxidationslabile Arylhydrazingruppe verbunden mit dem Trägermaterial verwendet wird. Bei der Oxidation wird das am Trägermaterial gebundene Arylhydrazin zu einem Aryldiazen überführt. Im Anschluss greift das *N*-terminale freie Amin nucleophil die aktivierte Carbonylgruppe in Nachbarschaft zum Aryldiazen an,

¹⁷ 1H-Imidazol-1-sulfonylazid-hydrochlorid (**80**) wurde zuvor nach der Vorschrift von GODDARD-BORGER hergestellt.^[192,193]

während Stickstoff freigesetzt und das Trägermaterial abgespalten wird. Die Synthese des Cyclo- β^3 -Tripeptids **69** erfolgte nach der Methode von ROSENBAUM an einem 4-Fmoc-Hydrazinobenzoyl-AM-NovaGel-Harz (Abb. 3.8).^[138] Hiermit konnte die Synthese des Cyclopeptids zunächst durch lineare Propagation nach Merrifield^[19,78] durchgeführt und die Cyclisierung nach Oxidation des Arylhydrazins eingeleitet werden. Anschließend konnte das Cyclo- β^3 -Tripeptid **69** ohne die Verwendung von kostspieliger und zeitaufwendiger HPLC-Reinigung mittels Säulenchromatographie gereinigt und rein isoliert werden.

Nach der literaturbekannten Vorschrift^[19], in der HBTU/HOBt und DIPEA in DMF als Aktivierungsreagenzien zur Kupplung der Aminosäuren eingesetzt wurden, konnte das Cyclo- β^3 -Tripeptids **69** mit einer Ausbeute von 13% erhalten werden. Der Austausch der Aktivierungsreagenzien gegen HATU/HOAt führte mit 26% (42 mg aus 200 μ mol-Ansatz) zu einem verbesserten Ergebnis. Dies lag an einer verbesserten Kupplungseffizienz, welche durch die Bestimmung der Belegungsdichte anhand der UV-Absorption des Fmoc-Dibenzofulven-Abspaltproduktes ermittelt wurde. Während Kupplungen mit HBTU/HOBt einen Belegungsgrad unterhalb von 50% erreichten, konnte für HATU/HOAt ein Wert über 80% erhalten werden. In beiden Fällen wurden die Aminosäuren aktiviert und mit dem Trägermaterial bei Raumtemperatur über Nacht zur Reaktion gebracht. Eine Kupplung bei höheren Temperaturen oder durch Mikrowellen-Anregung zur Steigerung der Aminosäurebelegung war aufgrund der Instabilität des Arylhydrazin-Linkers gegenüber Hitzeeinwirkung nicht möglich. Des Weiteren wurde eine frühzeitige Abspaltung des acyclischen Tripeptids nach der Oxidation des Arylhydrazin-Linkers in der Waschlösung beobachtet. Nach der Oxidation steht die aktivierte Carbonsäure nicht nur für das *N*-terminale Amin zur Cyclisierung bereit, sondern kann auch durch geringe Spuren von Wasser nucleophil angegriffen werden, so dass die acyclische Form erhalten wird.

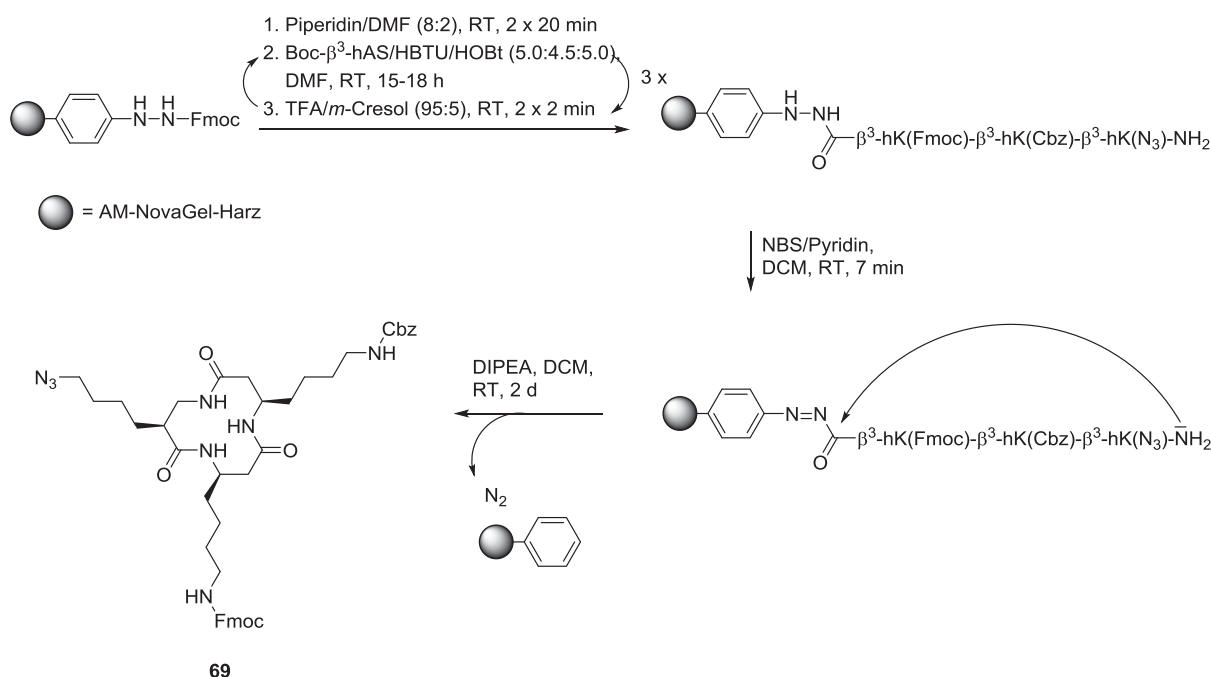


Abbildung 3.8: Synthese des Cyclo- β^3 -Tripeptids **69** auf fester Phase durch die Verwendung eines oxidationslabilen Arylhydrazin-Linkers.^[19]

Nach der Isolierung des Cyclo- β^3 -Tripeptids **69** ermöglichen die orthogonalen Schutzgruppen eine schrittweise Funktionalisierung der Seitenketten. Die N_3 -Funktionalität kann mit einem

Alkin-Derivat als Zielmolekül in einer Kupfer(I)-katalysierten HUISGEN-[3 + 2]-Cycloaddition zu stabilen Triazol-Konjugaten umgesetzt werden. Die Fmoc-Schutzgruppe kann unter milden basischen Bedingungen abgespalten und das freie Amin zur weiteren Funktionalisierung freigesetzt werden. Eine quantitative Cbz-Entschützung wird gewöhnlich mit Pd-katalysierter Hydrierung erreicht, welche hier allerdings zur Reduktion des Azids führen würde. Die Verwendung von TFA/*m*-Cresol/Thioanisol (3.5:1:1.1) führte lediglich zu einer partiellen Entschützung bei langen Reaktionszeiten wie z. B. sechs Stunden bei Raumtemperatur. Der Gebrauch von TFA/Trifluormethansulfonsäure (TFMSA)/*m*-Cresol (10:3:0.1) für zwei Stunden bei 0 °C bewirkte eine Degradation des Cyclo- β^3 -Tripeptids **69**. Es wurde festgestellt, dass die Synthese des Cyclo- β^3 -Tripeptids **69** über Festphasen-Peptidsynthese moderate Ausbeuten liefert und die Cbz-Entschützung nicht effektiv ist.

3.3.2 Herstellung in Lösung

Bereits in den 60er Jahren wurden von KELLY Arylhydrazine als potentielle Schutzgruppe vorgeschlagen.^[139] Das Potential als spurlosen Linker erkennend, wurden Trägermaterialien mit Arylhydrazin versehen.^[140] Nach Peptidsynthese gefolgt von oxidativer Abspaltung können so acyclische Peptide generiert werden. Darüber hinaus können nach der Oxidation je nach eingesetztem Nucleophil (H₂O, MeOH, usw.) unterschiedliche C-terminale Peptide erhalten werden. Die Weiterentwicklung führte zur cycloaktiven Abspaltung und infolgedessen zur Herstellung von Cyclopeptiden auf fester Phase.^[138] Die Entwicklung zurückverfolgend wurde das Arylhydrazin als potentielle C-terminale Schutzgruppe zur Synthese der Cyclo- β^3 -Tripeptide ausgewählt. Zur Auswahl standen Phenylhydrazin, 4-Nitrophenylhydrazin und 4-Methoxyphenylhydrazin. Das Letztere wurde verwendet, da die C-terminale Abspaltung durch den elektronenschiebenden Effekt der Methoxygruppe und infolgedessen die Freisetzung von Stickstoff begünstigt wird.

Zunächst wurde wegen der erschwerten Bedingungen der zuvor beschriebenen Cbz-Entschützung des Cyclo- β^3 -Tripeptids **79** (Kapitel 3.2.1) die Aminosäure Boc-L- β^3 -hLys(Cbz)-OH (**75**) gegen Boc-L- β^3 -hLys(Alloc)-OH (**83**) ausgetauscht (Abb. 3.9).

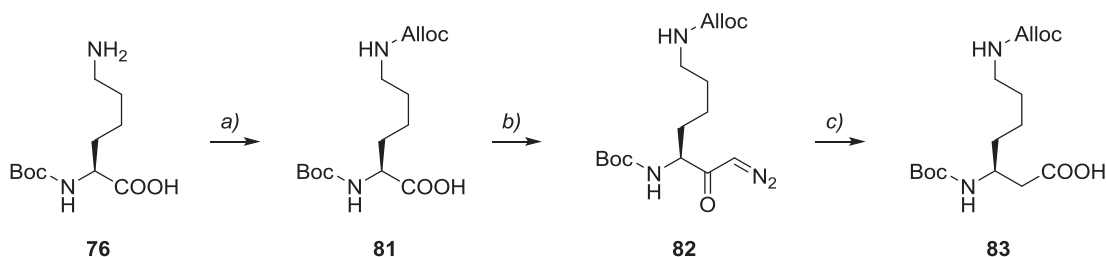


Abbildung 3.9: Synthese von Boc-L- β^3 -Lys(Alloc)-OH (**83**). a) Alloc-Cl, Na₂CO₃, THF/H₂O (1:1), 0 °C, 1 h; 75%. b) (i) NEt₃, ^tBuCOCl, THF, -21 °C, 45 min, (ii) CH₂N₂, Et₂O, 0 °C, 30 min, RT, 5 h. c) AgOBz, THF/H₂O (9:1), Ultraschallbad, 3 h; 72% (über zwei Stufen).

In Arbeiten von SMITH konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart einer Azidgruppe eine Alloc-Entschützung durch Pd(PPh₃)₄ und Dimedon mit hoher Effizienz durchgeführt werden kann.^[141] Des Weiteren sollte unter den gegebenen Bedingungen der Alloc-Entschützung die Fmoc-Schutzgruppe unangetastet bleiben. Als Ausgangsmaterial wurde Boc-L-Lys-OH (**76**) eingesetzt und nach Alloc-Schützung konnte die β^3 -Aminosäure **83** durch ARNDT-EISTERT-Homologisierung erhalten werden.

Anschließend erfolgte die Peptidsynthese in Lösung, in der aufwendige Zwischenreinigungen wie Extraktion oder Säulenchromatographie vermieden werden sollten, um eine zur SPPS relativ vergleichbar vereinfachte Durchführung zu gewähren. Die Temperatur im gesamten Prozess durfte 50 °C nicht überschreiten, um eine vorzeitige Abspaltung des Hydrazins nicht zu riskieren. Zu Anfang wurden 4-Methoxyphenylhydrazin (**84**, 1.0 Äq.), Boc-L-β³-hLys(Fmoc)-OH (**72**, 1.3 Äq.), HATU (1.3 Äq.) und DIPEA (3.3 Äq.) in DMF (10 mL/mmol) gelöst und bei 0 °C für 3 h gefolgt von Raumtemperatur über Nacht zur Reaktion gebracht (Abb. 3.10). Die Reinigung des entstandenen Produktes **85** bestand lediglich aus Einengen von DMF unter vermindertem Druck, gefolgt von Fällern aus Methanol/Wasser (1:1), wodurch sehr gute Ausbeuten erhalten werden konnten. Zur Kupplung der zweiten Aminosäure wurde zunächst eine Boc-Entschützung vorgenommen. Ein thiolhaltiger Radikalfänger musste eingesetzt werden, da der Einsatz von sauerstoffhaltigen oder stickstoffhaltigen Radikalfängern nicht ausreichte und es zur Spaltung des Hydrazins kam. Die Peptidsynthese war somit durch die Bildung eines C-terminalen Amids vorzeitig beendet. Demzufolge wurde 2-Propanthiol ausgesucht, welches einen sehr niedrigen Siedepunkt aufweist und nach Boc-Entschützung unter N₂-Strom zusammen mit TFA leicht entfernt werden konnte. Darauffolgend wurde die Verbindung **86** mit Toluol gefolgt von Ether coevaporiert, um Säure- und Radikalfängerspuren zu entfernen.

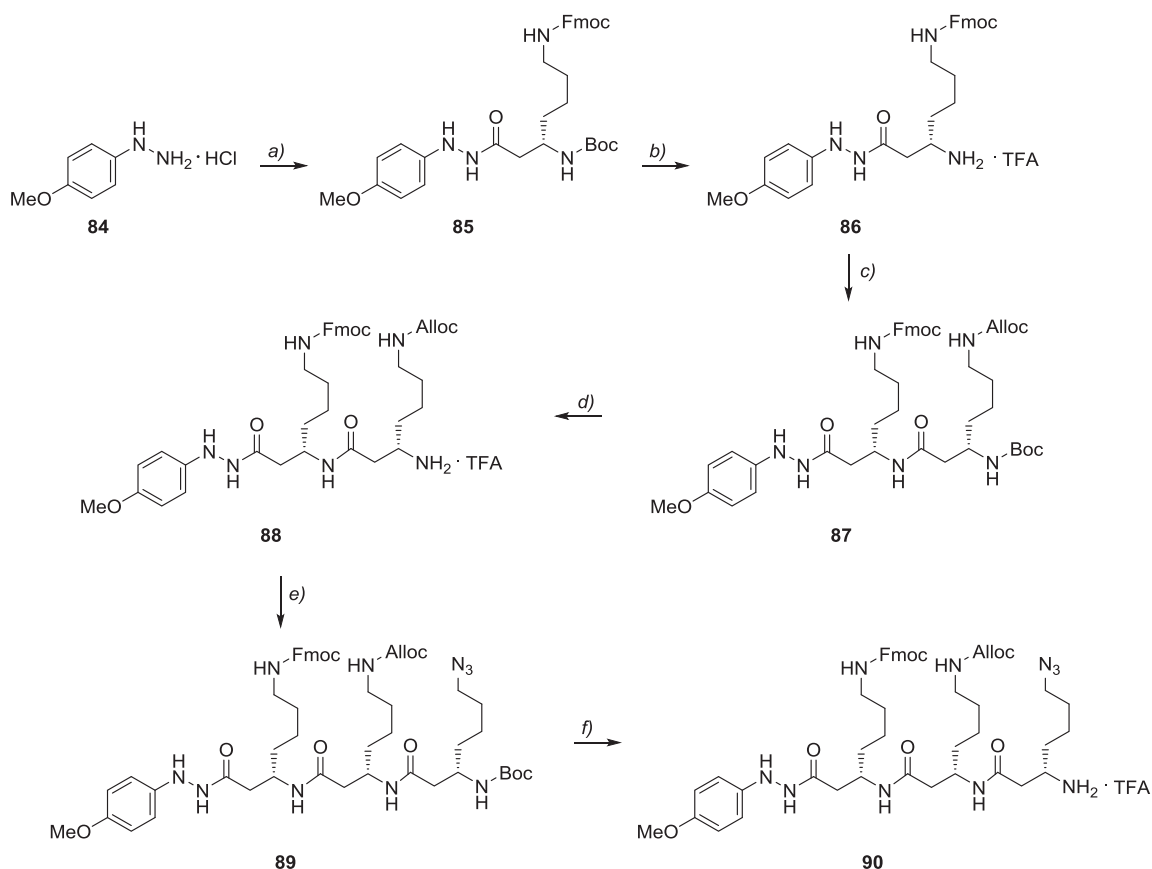


Abbildung 3.10: Synthese des acyclischen β³-Tripeptids **89** im Gramm-Maßstab. a) Boc-L-β³-hLys(Fmoc)-OH (**72**), HATU, DIPEA, DMF, 0 °C, 3 h, RT, über Nacht; quant. b) TFA, 2-Propanthiol, 0 °C, 1 h, RT, 1 h. c) Boc-L-β³-hLys(Alloc)-OH (**83**), HATU, DIPEA, DMF, 0 °C, 3 h, RT, über Nacht; 92% (über zwei Stufen). d) TFA, 2-Propanthiol, 0 °C, 1 h, RT, 1 h. e) Boc-L-β³-hLys(N₃)-OH (**79**), HATU, DIPEA, DMF, 0 °C, 3 h, RT, über Nacht; 95% (über zwei Stufen). f) TFA, 2-Propanthiol, 0 °C, 1 h, RT, 1 h.

Die Kupplung von Boc-L- β^3 -Lys(Alloc)-OH (**83**) und die Reinigung des Dipeptids **87** erfolgten analog zur ersten Aminosäure. Nach Boc-Entschützung wurde der Vorgang wiederholt und das acyclische β^3 -Tripeptid **89** erhalten. Die Ausbeuten jeder Aminosäure-Kupplung lagen über 90% und das erhaltene vollgeschützte acyclische β^3 -Tripeptid **89** konnte ohne jegliche Degradation über einen beobachteten Zeitraum von 15 Monaten bei $-21\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden. Nach Durchlaufen der Synthese wurden insgesamt 3.31 g des Tripeptids **89** isoliert.

Die finale Cyclisierung von Verbindung **89** wurde analog der Synthese auf fester Phase in einem Maßstab von 170 μmol durchgeführt, in der zunächst eine Boc-Entschützung mit TFA/2-Propanthiol (15:1) vorgenommen und die Verbindung **90** erhalten wurde (Abb. 3.10). Nach Entschützung wurde in Gegenwart von Kupfer(II)acetat, DIPEA und Sauerstoff die Cyclisierung in DMF bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ für 3 h eingeleitet und bei Raumtemperatur über Nacht fortgesetzt (Abb. 3.11, Route a). Trotz der Verwendung trockener Lösungsmittel, einer hohen Verdünnung und Molsieb als Trocknungsmittel konnten neben dem gewünschten Cyclo- β^3 -Tripeptid **91** hauptsächlich die acyclische Form sowie viele weitere Nebenprodukte beobachtet werden. Alternativ wurde *N*-Bromsuccinimid (NBS) und Pyridin in DMF zur Oxidation und Einleitung der Cyclisierung verwendet und erneut dasselbe Resultat erhalten.

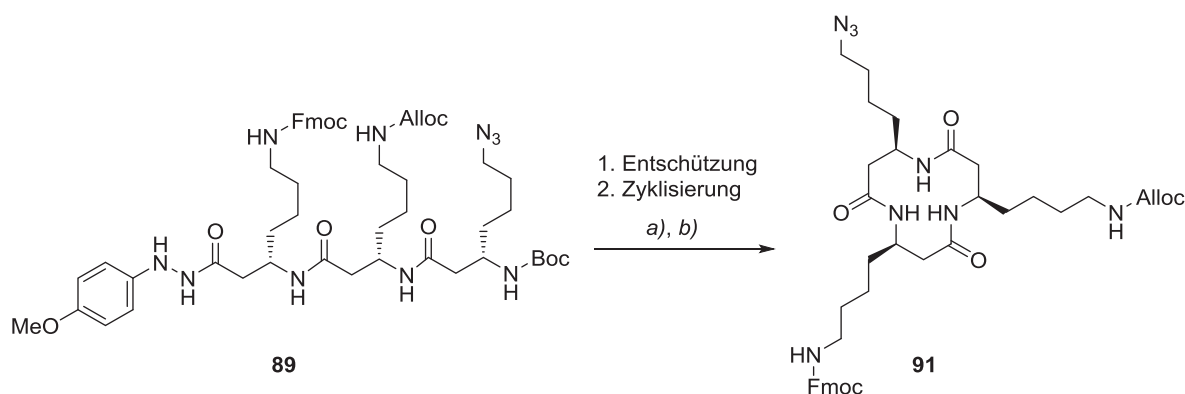


Abbildung 3.11: Synthese des Cyclo- β^3 -Tripeptids **91**. a) $\text{Cu}(\text{Ac})_2$, O_2 , DIPEA, DMF, Molekularsieb (3 Å), $0\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, RT, über Nacht. b) (i) $\text{Cu}(\text{II})\text{Cl}_2$, THF/ H_2O (1:0.05), RT, 2 h. (ii) TFA/ H_2O (95:5), $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, RT, 1 h. (iii) HATU, DIPEA, DMF, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, RT, über Nacht; 17% (über drei Stufen).

So wurde die Strategie der simultanen Cyclisierung und Abspaltung nicht weiter verfolgt. Alternativ wurde die C-terminale Entfernung von 4-Methoxyphenylhydrazin unter Generierung einer freien Carboxylgruppe vorgenommen (Abb. 3.11, Route b). Hierzu wurde das β^3 -Tripeptid **89** mit stöchiometrischen Mengen an Kupfer(II)chlorid in THF/Wasser (1:0.05) versetzt und nach zwei Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur eine vollständige C-terminale Entschützung erreicht. Dabei wurde zunächst durch Kupfer(II) die Oxidation des 4-Methoxyphenylhydrazins zum 4-Methoxyphenyldiazon erreicht, gefolgt vom nucleophilen Angriff des Wassers an dem aktivierten C-Terminus. Im Anschluss wurde die N-terminale Boc-Entschützung des β^3 -Tripeptids durchgeführt.

Die Cyclisierung von acyclischen Peptiden dieser Größenordnung in Lösung wurde von KIMURA beschrieben, dessen Bedingungen hier übertragen worden sind.^[142] Zur Cyclisierung wurde das C- und N-terminal entschützte β^3 -Tripeptid in einem Ansatz von 120 μmol mit HATU (10 Äq.) und DIPEA (14 Äq.) in DMF umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Extraktion mit DCM gefolgt von Fällungen aus Methanol, konnte das Cyclo- β^3 -Tripeptid **91** in einer Ausbeute von 17% isoliert werden.



3.3.3 Diskussion der Ergebnisse

Die Herstellung des Cyclo- β^3 -Tripeptides auf fester Phase (**69**, Kapitel 4.2.1) und in Lösung (**91**, Kapitel 4.2.2) lieferten jeweils Mengen im mg-Bereich. Die Herstellung von cyclischen Peptiden in größeren Maßstäben ist im Allgemeinen eine synthetische Herausforderung und demzufolge sind die erhaltenen Mengen zufriedenstellend (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Gegenüberstellung beider Strategien zur Herstellung von Cyclo- β^3 -Tripeptiden.

Festphasen-Peptidsynthese	Synthese in Lösung
+ geringerer Zeitaufwand – höhere Materialkosten – Kupplungseffizienz je Aminosäure $\leq 80\%$ – vorzeitige Peptidabspaltung nach Oxidation des Arylhydrazin-Linkers – geringe Ansatzgrößen, geringe Mengen an Cyclo-β^3-Tripeptid 69	– größerer Zeitaufwand + geringere Materialkosten + Kupplungseffizienz je Aminosäure $> 90\%$ + Gramm-Maßstab für acyclisches β^3-Tripeptid 89 + längere Lagerzeit des acyclischen β^3-Tripeptids 89, bei Bedarf benötigte Mengen zur Cyclisierung entnehmbar – Cyclisierung in hoher Verdünnung, geringe Mengen an Cyclo-β^3-Tripeptid 91

Die Festphasen-Peptidsynthese bietet durch die vereinfachte Handhabung und der simultanen Cyclisierung sowie Abspaltung vom Trägermaterial eine elegante Lösung. Somit konnte das Cyclo- β^3 -Tripeptid **69** in kürzerer Zeit synthetisiert werden. Die maximalen Ansatzgrößen auf fester Phase zur optimalen Handhabung und Durchführung sind unter den gegebenen Bedingungen gering und dadurch auch die isolierten Mengen. Die β^3 -Aminosäuren (5.0 Äq.) sowie Aktivierungsreagenzien (HATU/HOAt, 4.5 Äq./5.0 Äq.) wurden nach dem Standardprotokoll in einem großen Überschuss eingesetzt. Das Harz war nach Abspaltung nicht mehr regenerierbar, welche mit erhöhten Materialkosten verbunden sind. Nach der Oxidation des Arylhydrazin-Linkers wurde eine vorzeitige Abspaltung des acyclischen β^3 -Tripeptids durch die Präsenz von Wasserspuren beobachtet, welches zu den geringen Ausbeuten beitrug.

Die Synthese in Lösung unter Verwendung von 4-Methoxyphenylhydrazin als C-terminale Schutzgruppe ermöglichte die Kupplung der Aminosäuren mit sehr guten Ausbeuten. Des Weiteren konnten die Aminosäuren (1.3 Äq.) und das Aktivierungsreagenz (HATU, 1.3 Äq.) in geringerem Überschuss eingesetzt werden, wodurch die Materialkosten im Vergleich geringer ausfielen. Die Isolierung der Zwischenprodukte erfolgte lediglich durch Einengen von DMF und Fällern aus Methanol/Wasser (1:1), aber nach jedem Schritt musste eine Trocknungszeit mit einkalkuliert werden. Besonders hervorzuheben war die Isolierung des acyclischen β^3 -Tripeptids **89** im Gramm-Maßstab, welches ohne Bedenken über einen längeren Zeitraum

gelagert und erst bei Bedarf zum Cyclopeptid **91** umgesetzt werden kann. Dabei konnte die Cyclisierung vom *N*- zum *C*-Terminus erst nach einem zusätzlich eingeführten Schritt, der *C*-terminalen Entschützung erfolgen, welches innerhalb zwei Stunden durchgeführt werden konnte und lediglich eine Extraktion zur Isolierung erforderte. Die Cyclisierung musste unter hoher Verdünnung (0.001 mol/L) durchgeführt werden um intermolekulare Reaktionen zu vermeiden und lieferte in den ersten durchgeführten Experimenten vergleichbare Ausbeuten wie in der Festphasen-Peptidsynthese.



4. Biomolekülmarker für Sekundärionen-Massenspektrometrie

Zellbiologie beschäftigt sich mit der Struktur und Funktion von Zellen. Aus den Untersuchungen über die strukturellen Merkmale und den gemeinsamen Eigenschaften einzelner Zellen sowie ihren einzigartigen Funktionen resultieren komplexere Fragestellungen, welche die Zellbiologie in unterschiedliche Fachbereiche teilen. Dennoch sind bildgebende Verfahren fächerübergreifend ein wesentlicher Bestandteil biologischer Untersuchungen, vor allem seit der Etablierung von Mikroskopen und Kontrastfärbemitteln. Eines dieser Verfahren ist die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS), mit deren Hilfe im Allgemeinen die Isotopenverteilung von Materialien allen Ursprungs detektiert und visualisiert wird. Die enormen Fortschritte zur Verbesserung der Auflösung bringen diese Technik in Bereiche die sonst nur mit Elektronenmikroskopie und Lichtmikroskopie erreicht wurden. Die massenspektrometrische Visualisierung ist im Vergleich zu mikroskopischen Methoden einzigartig, da zugleich Informationen über die chemische Zusammensetzung der analysierten Substanzen geliefert werden. Diese Gegebenheit führt zu ihrer vermehrten Anwendung in biologischen Studien. Seitdem ist die Entwicklung von exogenen Biomolekülmarkern, um den Kontrast zu heben und somit zwischen Biomaterialien zu differenzieren, von großem Interesse. Dementsprechend werden in diesem Abschnitt die Sekundärionen-Massenspektrometrie und die Funktionsweise der aktuellsten Ionen-Mikrosonde Cameca NanoSIMS 50L kurz geschildert (Kapitel 4.1), der bisherige Stand zur Markierung von Biomolekülen wiedergegeben (Kapitel 4.2) und die Entwicklung selektiver Biomolekülmarker sowie deren Einsatz vorgestellt (Kapitel 4.3).



4.1 Sekundärionen-Massenspektrometrie als bildgebendes Verfahren

Massenspektrometrie stellt heutzutage eine der universellen Analysemethoden dar, in der die chemische Zusammensetzung unterschiedlicher Materialien durch die Ermittlung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) bestimmt werden kann. Ihr Einsatz erfordert im Allgemeinen die Generierung von Ionen, eine Massenseparation und deren Detektion. In der Theorie ist es möglich jede Spezies, die ionisiert und in die Gasphase gebracht werden kann, zu ermitteln. Durch die Kombination von chemischer und räumlicher Information entsteht die bildgebende Massenspektrometrie (*mass spectrometry imaging*, MSI).^[22,143,144] Anfänglich zur Visualisierung von anorganischen Oberflächen dienend, hat sich die MSI in kurzer Zeit zu einer bewährten Analysemethode von komplexen organischen Substanzen etablieren können. Zur rasanten Weiterentwicklung dieser Technik hat hauptsächlich die MALDI-TOF-basierte Bildgebung im Jahre 1997 von CAPRIOLI beigetragen, anhand der erstmalig Peptide und Proteine lokalisiert wurden.^[145] Die vermehrte Anwendung der sogenannten chemischen Mikroskopie in Biowissenschaften weist auf ihr enormes Potential hin und führt seitdem zu einem deutlichen Anstieg der Publikationsraten (Abb. 4.1).^[143]

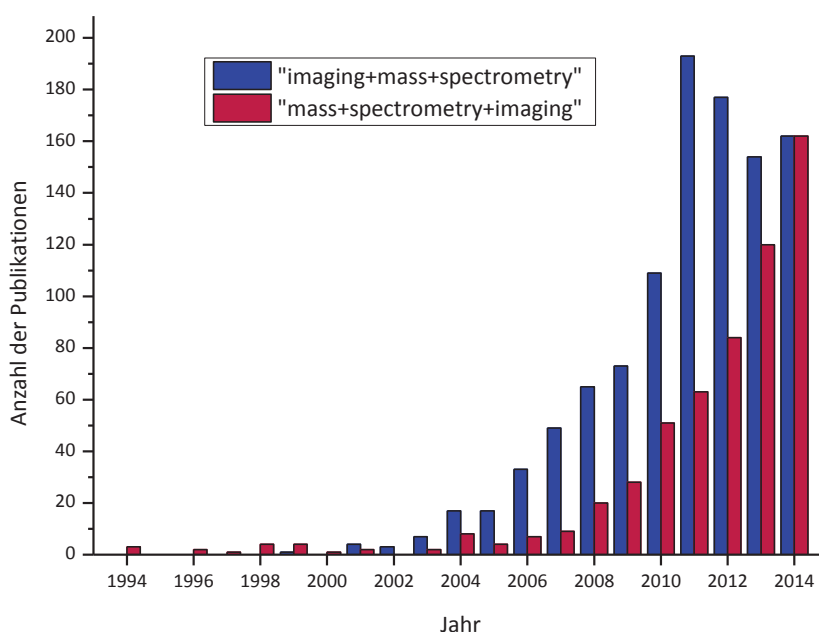


Abbildung 4.1: Die grafische Darstellung berücksichtigt die Anzahl der Publikationen pro Jahr im Zeitraum von 1994 bis 2014, welche mittels einer *ISI Web of Science* Suchanfrage (*topic; imaging+mass+spectrometry* und *mass+spectrometry+imaging*) ermittelt wurde (bezogene Quelle^[143] wurde erweitert und modifiziert). Der Begriff *imaging mass spectrometry* (IMC) wurde anfänglich häufiger benutzt, aber da es zur Verwechslung mit *ion mobilisation spectrometry* (IMS) kommen könnte, wird nun der Begriff *mass spectrometry imaging* (MSI) vermehrt verwendet.^[144]

Die Erzeugung von Ionen in der MSI basiert auf der Desorptions- und Ionisations-Technik, in der Ionen von einer festen Oberfläche abgelöst und nach Aufnahme in die Gasphase detektiert und visualisiert werden. Dabei wird aufgrund unterschiedlicher Ionisationsquellen zwischen drei Hauptgruppen differenziert: Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS), (Matrix-unterstützte) Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS) und Desorptions-Elektrospray-

Ionisation-Massenspektrometrie (DESI).^[143,144] Bei einer Gegenüberstellung dieser Methoden wird ersichtlich, dass die laterale Auflösung¹⁸ von SIMS als einzige in subzellularen Bereichen liegt (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Eine Gegenüberstellung der MSI-Methoden.^[144]

Abkürzung	Ionisationsquelle	Laterale Auflösung	Obere Massengrenze
SIMS	Fokussierter Strahl aus hoch-energetischen Primärionen	unter 1 µm	500 – 1000 Da
(MA)LDI-MS	Laserlicht; Energietransfer a) direkt oder über Oberfläche, b) durch Matrix (MALDI)	10 – 150 µm (50 µm häufig benutzt)	2 kDa (ohne Matrix)
DESI-MS	Extraktion mittels Elektrospray-Tröpfchen	100 – 500 µm (40 µm literaturbekannt)	30 – 60 kDa

SIMS wurde ursprünglich in den frühen 60er Jahren von CASTAING und SLODZIAN eingeführt.^[146] Durch die Verwendung eines elektrostatischen Sammelsystems wurde neben der chemischen Zusammensetzung auch die topologische Information der Probe erhalten, vergleichbar mit einer Linse in Lichtmikroskopen. Dabei wurde die räumlich aufgelöste Information durch den Beschuss einer Oberfläche mit einem energetischen Strahl, bestehend aus Primärionen, und der Freisetzung von Sekundärionen erhalten (Abb. 4.2). Diese Technik wurde lange Zeit für Oberflächenanalysen in der Materialwissenschaft und der Geochemie verwendet, wobei die geringe laterale Auflösung der limitierende Faktor zur Analyse von biologischen Substanzen war.^[147,148] Erst die Fokussierung des Strahls führte zu einer verbesserten lateralen Auflösung. Des Weiteren trug die Weiterentwicklung des Massenanalysators, mit unter anderem des doppelt fokussierenden magnetischen Sektorfeldes und des Quadropol-Massenspektrometers, zur Optimierung des Massenaufklärungsvermögens bei. Aufgrund der Detektion einer Ionenspezies und der destruktiven Natur von SIMS, konnte anfänglich nur eine Ionensorte pro Bild erfasst werden. Eine Korrelation mit weiteren Ionen wurde erst durch die Einführung der statischen SIMS von BENNINGHOVEN ermöglicht.^[149] In Abhängigkeit der eingesetzten Primärionenintensität (1–30 keV) gibt es neben der statischen SIMS die dynamische SIMS.^[22,23,147,148] Im Fall von statischer SIMS wird eine geringe Menge an Primärionen eingesetzt, wodurch die Wahrscheinlichkeit eine Stelle ein weiteres Mal zu treffen verringert ist. Dadurch wird die Analyse der obersten Atomschicht einer dünnen Probe ermöglicht. Dahingegen wird bei der dynamischen SIMS die Probe einem intensiveren Primärstrahl ausgesetzt. Es kommt zu einem kontinuierlichen Abbau von Atomschichten und dementsprechend eines bestimmten Volumens. Durch die Auftragung der detektierten Sekundärionenintensitäten in Abhängigkeit der gemessenen Zeit wird ein Tiefenprofil von einigen bis hundert Nanometern generiert.

¹⁸ Begriff aus der Optik: Die Auflösung bzw. der Abbildungsmaßstab wird in laterale und axiale aufgeteilt. Laterale Auflösung ist der kleinste Abstand zwischen zwei Punkten in x,y-Richtung und ist abhängig von dem Durchmesser des Ionisationsstrahls. Axiale Auflösung berücksichtigt die (Eindringungs)tiefe des Ionisationsstrahls und entspricht dem Längenverlauf der Ionisationsquelle in z-Richtung.^[22,144]

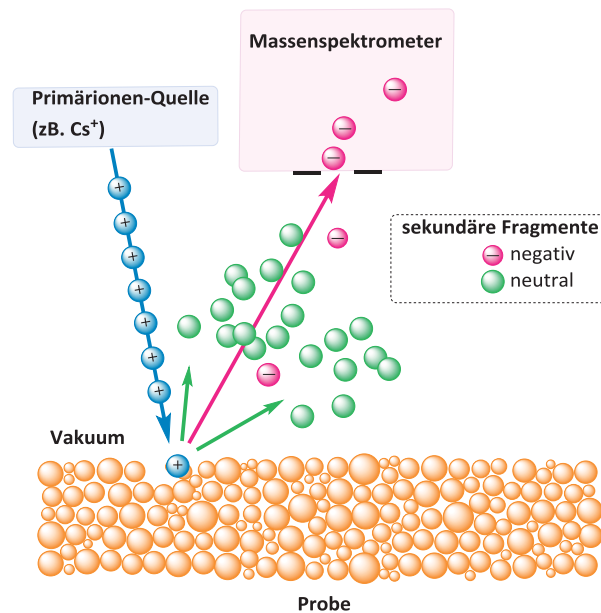


Abbildung 4.2: Grundlegende Funktionsweise der SIMS am Beispiel einer Cäsium-Primärionenquelle: Die positiv geladenen Primärionen schlagen auf die Oberfläche der zu analysierenden Substanz auf und lösen dadurch einzelne Fragmente. Die negativ geladenen Sekundärionen gelangen zum Massenspektrometer und werden detektiert.

Die hochauflösende Ionenmikrosonde *Cameca NanoSIMS 50L*, basierend auf dynamischer SIMS, eignet sich aufgrund ihrer optimierten Eigenschaften zur Analyse von biologischen Materialien (Abb. 4.3). Die allgemeine Funktionsweise und der experimentelle Aufbau werden im Folgenden kurz beschrieben. Die räumliche Information wird, analog der Rastersondenmikroskopie, über das Abtasten der Probenoberfläche mit einem Primärstrahl, Punkt für Punkt aufgenommen und abgespeichert.^[144] Hierzu wird eine Probe in festem Zustand in die Probenkammer eingeführt, welches unter Hochvakuum (10^{-10} mbar in der Kammer, 10^{-8} mbar im Detektorbereich) steht.^[147] Anschließend wird der Festkörper mit einem fokussierten hochenergetischen Primärionenstrahl in kontinuierlichem Modus entlang seiner Oberfläche bombardiert, was eine Stoßkaskade auslöst, in Folge der Teilchen aus der Oberfläche herausgeschlagen werden.^[22,23,147,150] Die erhaltenen Fragmente können eine Mischung aus neutralen Atomen und Molekülen sein, sowie einfach oder mehrfach geladene atomare oder molekulare Ionen beinhalten. Dabei können nur die geladenen Spezies, die Sekundärionen, weiterhin analysiert werden. Je nachdem ob positive oder negative Sekundärionen betrachtet werden sollen, wird im positiven oder im negativen Modus gearbeitet. Im positiven Modus führen Cs^+ -Ionen als Primärquelle zur Steigerung der Ausbeute an negativen Sekundärionen. Durch ein Duoplasmatron werden Sauerstoffionen (O_2^+ , O_2^- , O^-) generiert, wobei für den negativen Modus hauptsächlich O^- -Ionen zur Steigerung der Ausbeute an positiven Sekundärionen beitragen.

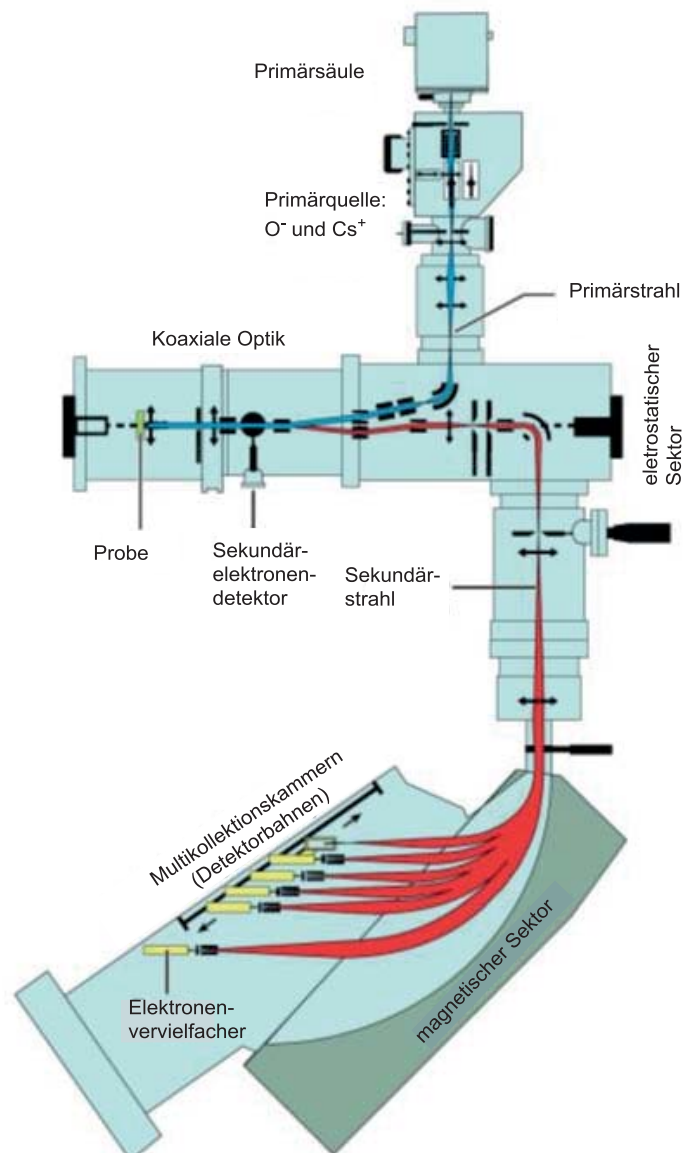


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Ionen-Mikrosonde *Cameca NanoSIMS*.^[23]

Eine Besonderheit stellt die koaxiale Linsenoptik dar, welche für Primär- und Sekundärstrahl kollinear verwendet wird.^[23,147] Insgesamt wird der Arbeitsabstand zur Probe verringert, was mehrere Vorzüge mit sich bringt. Zum einen wird der Durchmesser des Primärstrahls verringert und dadurch auch die erforderliche Probengröße. Zum anderen verkürzt sich der Extraktionsweg der erzeugten Sekundärionen und führt zur verbesserten Transmission. Dabei steht der Begriff Transmission für die Anzahl der detektierten aus den insgesamt produzierten Sekundärionen. Da die Strahlen in linearer Abhängigkeit die koaxiale Optik durchlaufen, kann mit Primär- und Sekundärionenstrahlen entgegengesetzter Ladung sowie vergleichbarer Energien gearbeitet werden.^[150] Nach der Ionenerzeugung erfolgt ihre Trennung nach ihrem m/z am Massenanalysator, der über einen elektrostatischen und einen magnetischen Sektor in Mattauch-Herzog-Geometrie verfügt.^[147] Nach Ionen-Separation erfolgt die Registrierung am Detektor, welcher die Intensitäten der ankommenden Ionen ermittelt. Das erzeugte elektrische Signal wird zur weiteren Auswertung digitalisiert.^[144]



Zusammenfassend wird mit *Cameca NanoSIMS 50L* eine hohe laterale Auflösung ($\sim 33\text{--}50\text{ nm}$ mit Cs^+ und 150 nm mit O^-), eine hohe Massenauflösung bei hoher Transmission (60% bei $M/\Delta M = 5000$)¹⁹ und eine hohe Empfindlichkeit (ppm sowie ppb für einige Elemente) ermöglicht.^[23,24,147] Insgesamt können bis zu sieben Ionenspezies gleichzeitig von demselben Mikrovolumen an Probe mit einer gesteigerten Sammeleffizienz detektiert und die räumliche Isotopenverteilung visualisiert werden.^[151]

4.2 Verwendung von NanoSIMS in biologischen Studien

Seit mehr als einer Dekade ermöglicht das hochauflösende *Cameca NanoSIMS 50/50L* die Abbildung einzelner Zellen durch die Detektion ihrer oberflächlichen Isotopen-Zusammensetzung. Dabei werden biologische Proben aufgrund ihres organischen Materials bevorzugt im positiven Modus (Cs^+) gemessen und negative Sekundärionen erhalten.^[23] Die negativen Sekundärionen werden in Form von atomaren Ionen ($^1\text{H}^-$, D^- , $^{12}\text{C}^-$, $^{13}\text{C}^-$, $^{16}\text{O}^-$, $^{18}\text{O}^-$, $^{19}\text{F}^-$, $^{31}\text{P}^-$, $^{32}\text{S}^-$) oder molekularen Ionen ($^{12}\text{CH}^-$, $^{13}\text{CH}^-$, $^{12}\text{CD}^-$, $^{12}\text{CH}_2^-$, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^{13}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$, $^{13}\text{C}^{15}\text{N}^-$) generiert, wobei eine quantitative Analyse von isobaren Interferenzen ($^{13}\text{C}^{14}\text{N}^- = 27.0069\text{ amu}$ and $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^- = 27.0007\text{ amu}$) gewährleistet wird.^[23,152]

Anfänglich wurde die natürliche Zusammensetzung biologischer Materialien wiedergegeben, die jedoch aufgrund des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses die Differenzierung zwischen Makromolekülen nicht erlaubt.^[152–154] Um den Kontrast zu erhöhen, wurden vermehrt stabile Isotope zur Anreicherung eingesetzt. Die Markierung mit stabilen Isotopen ist abhängig vom Probenursprung und kann auf unterschiedlichen Stufen erfolgen, welche in Organismus, Zelle und subzelluläre Komponenten wie genetisches Material, Membranen und Proteinen gestaffelt werden kann.^[155] Dabei kann die Markierung mit stabilen Isotopen auf drei Wegen erfolgen: metabolisch, enzymatisch und chemisch, wobei für die chemische Markierung zwischen kovalenter und nichtkovalenter Verknüpfung differenziert wird.^[155,156] Die am häufigsten eingesetzte Methode für NanoSIMS ist die metabolische Anreicherung mit stabilen Isotopen wie ^{15}N (natürliche Häufigkeit = 0.37%) und ^{13}C (1.12%). Es wird vorausgesetzt, dass der Austausch von natürlichem Stickstoff und Kohlenstoff gegen diese Isotope die Funktion der Biomoleküle nicht beeinträchtigt.^[157–159] Dafür werden lebende Organismen und Zellkulturen mit ^{15}N - und/oder ^{13}C -Aminosäuren versetzt, um durch die Erneuerungsmaschinerie der Systeme, auf der Stufe der Translation, mit aufgenommen zu werden.^[152,160–162] Alternativ werden Zellkulturen entsprechenden Salzen ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$), Nährmedien ($^{13}\text{C}_6\text{-D-Glucose}$, ^{13}C -angereicherte Cellulose), partiell halogensubstituierten ^{15}N - und ^{13}C -(Deoxy)ribonukleosiden oder gasförmigem $^{15}\text{N}_2$ ausgesetzt.^[24,163–166] In weiteren Applikationen wird der Schwerpunkt auf die zelluläre Organisation von ^{13}C - und ^{15}N -Fettsäuren oder ^{18}O -Cholesterol gelegt, deren Membraninkorporation Informationen über ihre Verteilung geben.^[167–170] Als Beispiele enzymatischer Markierung können die Methoden *element labelling* Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (EL-FISH) und Halogen-*in-situ*-Hybridisierung (HISH)-SIMS genannt werden.^[171,172] Hierzu werden Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierte Oligonukleotide eingesetzt und zunächst eine Hybridisierung mit ribosomaler RNA erreicht.^[173] Im nächsten Schritt erfolgt die Inkubation mit halogenhaltigen Tyramiden, welche durch das HRP aktiviert

¹⁹ Das Auflösungsvermögen (*resolving power*, $R = M/\Delta M$) gibt die Information über die Fähigkeit des Massenanalysators zwischen zwei Ionenspezies ähnlicher Massen zu differenzieren. Je höher R , desto besser das Auflösungsvermögen. Dabei ist ΔM die minimale Massendifferenz, die bei angegebenem R unterschieden wird.^[23]

werden. In unmittelbarer Nähe zum Enzym reagieren die aktivierten Tyramide mit Tyrosin- und Tryptophanresten der Proteine. Im Anschluss wird der zelluläre Halogengehalt (^{19}F) mit NanoSIMS detektiert und visualisiert, wobei der Nachteil dieser FISH-basierenden Methoden ihre Limitation zu spezifischen ribosomalen Regionen von bakteriellen Zellen ist. Die chemische Markierung basierend auf kovalenter Verknüpfung mit isotopischen Markern, ähnlich Fluorophore für Fluoreszenzmikroskopie, konnte noch nicht etabliert werden. Meist ist es ein positiver Zusatzeffekt bei der Kombination von NanoSIMS und Fluoreszenzmikroskopie, in der halogenhaltige Fluorophore eingesetzt werden. Die chemische Markierung aufgrund nichtkovalenter Interaktionen wird in Krebsstudien angewandt, in der die Affinität von Markern und Antitumor-Medikamenten hinsichtlich Diagnosemittel und Therapeutikum evaluiert werden. NanoSIMS eignet sich um Informationen über die Gewebe- und Zellaufnahme von halogenhaltigen Markern und ^{15}N -markierten Pt-Antitumor-Medikamenten zu erhalten.^[174–176] Aufgrund der Komplexität von biologischen Systemen wird eine Kombination von NanoSIMS mit anderen bildgebenden Verfahren empfohlen und bereits mehrfach umgesetzt.^[162,177,178] Dadurch werden zum einen zusätzliche strukturelle Informationen erhalten und zum anderen die Bereiche von Interesse vorselektiert, wobei Letzteres aufgrund des begrenzten Sichtfensters von NanoSIMS von Vorteil ist.

Abschließend wird festgestellt, dass die bisherigen Ansätze für NanoSIMS keine Differenzierung zwischen einzelnen Proteinen aus der zellulären Gesamtheit ermöglichen. Es bedarf einer vielseitig einsetzbaren Prozedur, sowie der Entwicklung von selektiven Biomolekülmarkern mit stabilen Isotopen, um in biologischen Zellstudien Aussagen über Proteinumsatz und Metabolismus treffen zu können.

4.3 Selektive Marker für genetisch kodierte Biomoleküle

Den aktuellen Stand der Wissenschaft berücksichtigend, ist die Differenzierung individueller Proteine in Zellen durch die Verwendung von MSI, speziell NanoSIMS, erschwert. Gäbe es die Möglichkeit einzelne Proteine zu markieren, könnten *protein turnover* und metabolische Studien durch NanoSIMS realisiert werden. Um dieses Problem zu lösen, wurde in Zusammenarbeit mit I.-C. VREJA, DR. F. OPAZO und DR. S. K. SAKA aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. S. O. RIZZOLI eine Strategie entwickelt, die es ermöglicht einzelne isotoopenmarkierte Proteine in Zellen zu visualisieren. Dabei wurden folgende Bedingungen gestellt:

1. Die Methode soll einen weitverbreiteten Einsatz erlauben, d. h. die Möglichkeit zur Markierung diverser Proteine unterschiedlicher Organismen soll gegeben sein.
2. Der Marker soll über eine bioorthogonale und chemoselektive Reaktion an das Zielmolekül angebracht werden ohne dessen essentielle Interaktionen zu stören oder dessen strukturelle Organisation zu beeinträchtigen.
3. Der Marker soll eine Anreicherung einer stabilen Isotopensorte (^{15}N , ^{19}F) beinhalten, die in biologischen Materialien eine geringe Häufigkeit aufweist und dadurch NanoSIMS-Bilder mit hohem Kontrast gewährleistet.
4. Darüber hinaus soll der Marker mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen werden, um eine direkte Korrelation von NanoSIMS und Fluoreszenzmikroskopie zu erlauben. Dadurch sollen zusätzliche strukturelle Informationen über die Zellen und ihre



Kompartimente erhalten sowie Bereiche für NanoSIMS-Messungen vorselektiert werden.

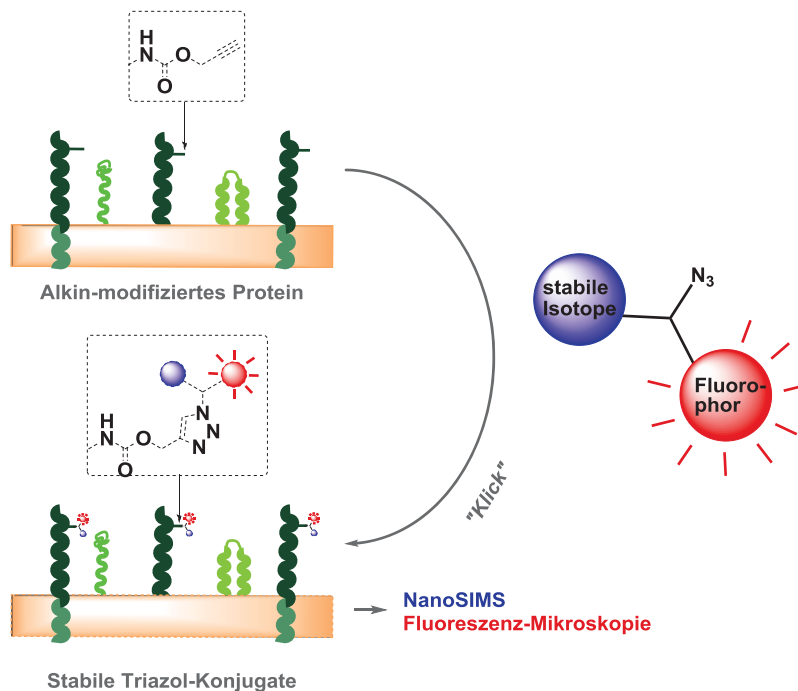


Abbildung 4.4: Das Konzept der spezifischen Markierung von Proteinen nach dem SPILL-Protokoll.

Aus den Bedingungen entstand die Strategie zur spezifischen Isotopen- und Fluoreszenzmarkierung von Proteinen (*specific protein isotopic and fluorescence labelling*, SPILL). SPILL basiert auf der ortsspezifischen Mutagenese (*site-specific mutagenesis*)^[179] über Expansion des genetischen Codes (*genetic code expansion*)^[180] gefolgt von posttranslationaler Modifikation durch chemoselektive Markierung (Abb. 4.4).

Im Allgemeinen werden über ortsspezifische Mutagenese definierte Positionen eines Proteins auf der Stufe der Transkription, durch die Manipulation des kodierenden Gens gegen andere natürliche Aminosäuren ausgetauscht.^[179] Mit der Einführung der Expansion des genetischen Codes können, im Unterschied zur ortsspezifischen Mutagenese, artifizielle Aminosäuren eingebaut werden.^[180–182] Unnatürliche Aminosäuren werden mit dieser Methode bereits in Bakterien und eukaryotischen Zellen sowie in Organismen (dem Wurm *C. elegans* und der Fruchtfliege *D. melanogaster*) erfolgreich implementiert.^[182,183] Im Zuge dessen werden Proteine mit modifizierten Aminosäuren wie Propargyl-L-lysin und L-Azidolysin, an Positionen, deren Manipulation keinen bis geringen Einfluss auf die Proteinstruktur aufweist, erhalten.^[184] Auf die Weise werden Farbstoffe für Fluoreszenz-Mikroskopie posttranslational mit der bioorthogonalen und chemoselektiven Kupfer(I)-katalysierten HUISGEN-Azid-Alkin-Cycloaddition angebracht.^[185–187] Die Methode SPILL soll auf gleiche Weise die Einführung von stabilen Isotopen erlauben.

Somit ergab sich für diese Arbeit als Teilaufgabe die Entwicklung einer trifunktionalen Probe für SPILL-basierte Ansätze (Abb. 4.5). Die Probe bestand aus einem Peptid, welches eine Azidfunktionalität an dessen Seitenkette beinhaltet, um alkintragende Zielmoleküle über Klickchemie zu verknüpfen. Des Weiteren wurden stabile Isotope (¹⁵N, ¹⁹F) N-terminal oder über eine Seitenkette eingebaut sowie ein Fluorophor über eine Thiol/Maleimid- oder Amin/N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester-Reaktion mit integriert. Nach Erproben ihrer Klickbarkeit an

einem beliebigen Peptid in organischer Lösung oder an fester Phase wurde die Probe der Arbeitsgruppe RIZZOLI übergeben, um nach zellulärer Inkorporation des Markers in genetisch kodierte Proteine über Konfokalmikroskopie und NanoSIMS analysiert zu werden. Die Vorgehensweise und die resultierenden Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

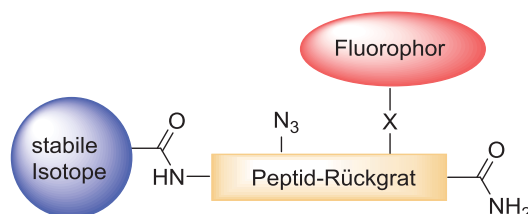


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung eines Peptids mit den gestellten Anforderungen in minimalistischem Design. Die Einführung des Fluorophors kann je nach Wahl über die Thiolgruppe eines Cysteins (Thiol/Maleimid-Reaktion) oder über die Aminogruppe eines Lysins (Amin/NHS-Ester-Reaktion) eingeführt werden.

4.3.1 Entwicklung spezifischer ¹⁵N-Triazin-Peptide zur Markierung

4.3.1.1 Synthese der Vorläuferbausteine

Zu Beginn wurden die einzelnen Bausteine für die Festphasen-Peptidsynthese hergestellt. Hierzu sollte ein ¹⁵N-isotopenreines Molekül aufgebaut werden. In der Natur kommt das stabile Isotop ¹⁵N mit einem geringen Anteil von 0.37% vor, weshalb dieses zu den häufig eingesetzten stabilen Isotopen in biologischen Studien zählt.^[155,157,159] In metabolischen Zellstudien werden meist kommerziell erhältliche ¹⁵N-Isotopen-reine L-Aminosäuren eingesetzt. Jedoch wäre eine Übertragung hier durch willkürliche Aneinanderreihung von L-Aminosäuren keine elegante Lösung. Zusätzlich enthalten die meisten essentiellen Aminosäuren lediglich ein bis zwei mögliche ¹⁵N-Isotope. Die Aminosäuren Arginin (4 × ¹⁵N) sowie Histidin (3 × ¹⁵N) mit den höchsten Anteilen wurden aufgrund ihres basischen Charakters und somit möglichen Interaktionen mit Zellkompartimenten ausgeschlossen. Ferner sind die für die Festphasen-Peptidsynthese benötigten N-terminal geschützten Aminosäuren mit hohen Kosten verbunden. Bei der Suche nach kleinen Molekülkandidaten fiel die Wahl auf Triaminotriazin (**3**), welches mit sechs Stickstoffatomen einen hohen Anteil an Stickstoff und somit an austauschbaren Positionen aufweist. Ein wichtiges Kriterium hierbei war der kommerzielle Erwerb der Vorläuferbausteine mit höchster Isotopenreinheit (≥98 Atom%). Das Endmolekül sollte ungeladen sein sowie keine Neigung zur Wasserstoffbrücken-Bildung aufweisen, um Interaktionen mit Zellkompartimenten in biochemischen und zellulären Experimenten zu vermeiden. Weiterführend sollte eine vereinfachte Verknüpfung mit dem Peptid ermöglicht werden, im idealen Fall direkt über die Festphasen-Peptidsynthese beim Aufbau des Peptides. Nach retrosynthetischen Überlegungen wurde eine Strategie zur Herstellung ausgearbeitet (Abb. 4.6). Vor Einsatz des ¹⁵N-Materials wurde jedoch mit den natürlichen Analoga gearbeitet bis ein optimierter Zugang realisiert werden konnte.

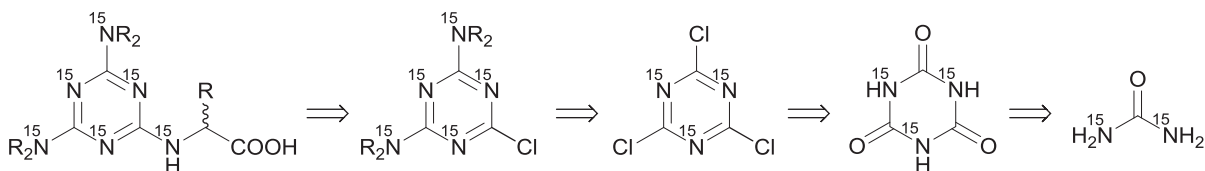


Abbildung 4.6: Retrosynthetische Überlegung zur Herstellung von $^{15}\text{N}_6$ -Triaminotriazin.

Triazine und ihre Derivate sind seit langem bekannt und ihr synthetischer Zugang ist in der Literatur auf zahlreichen Wegen dargestellt.^[188] Ausgehend von Harnstoff sollte die Trimerisierung zur Cyanursäure unter Abgabe von Ammoniak stattfinden. Allerdings sind die Bedingungen zur effektiven Herstellung drastischer Natur und erfordern hohe Temperaturen sowie die Durchführung der Reaktion in Druckgefäßen. Um die erschwerten Bedingungen zu umgehen, wurde von $^{15}\text{N}_3$ -Biuret (**92**) ausgegangen, welches ebenfalls kommerziell erwerblich ist und über die Kondensation von zwei ^{15}N -Harnstoff-Molekülen erhalten werden kann. Die Cyclisierung zur $^{15}\text{N}_3$ -Cyanursäure (**93**)^[189] konnte im Vergleich unter weniger drastischen Bedingungen ablaufen (Abb. 4.7).^[190]

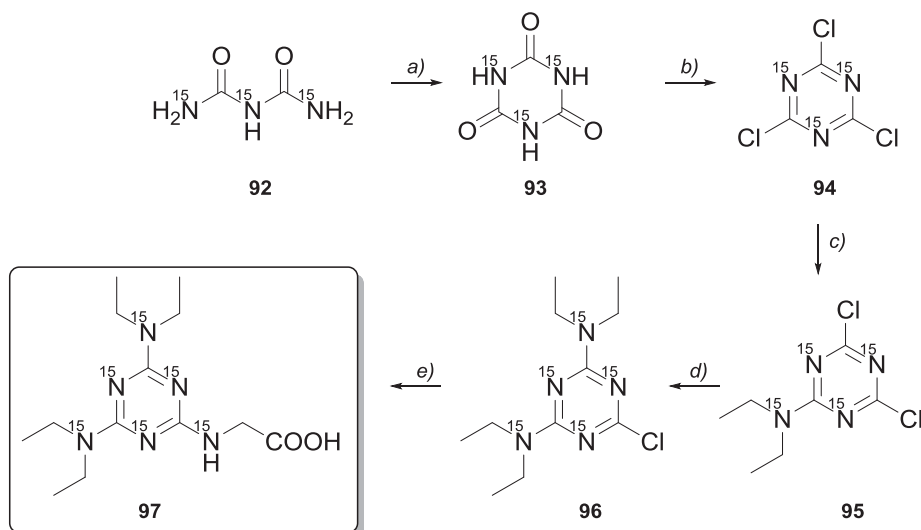


Abbildung 4.7: Synthese von $(^{15}\text{N}_2\text{-4,6-Bis(diethylamino)-}^{15}\text{N}_3\text{-1,3,5-triazin-2-yl)-}^{15}\text{N-glycin}$ ($^{15}\text{N}_6$ -TriazGly-OH, **97**). Reagenzien und Bedingungen: a) $(\text{EtO})_2\text{CO}$, NaOEt, EtOH, 16 h, unter Rückfluss; 84%. b) PCl_5 , POCl_3 , 11 h, unter Rückfluss. c) $\text{Et}_2\text{NH}\cdot\text{HCl}$, K_2CO_3 , 18-Krone-6, DCM, 1 h, 0 °C; 18% (über zwei Stufen). d) $\text{Et}_2\text{NH}\cdot\text{HCl}$, K_2CO_3 , 18-Krone-6, Toluol, 2 d, RT; 95%. e) ^{15}N -Glycin, K_2CO_3 , DMSO, 16 h, 88–94 °C; 65%.

So konnte in einer Reaktion von $^{15}\text{N}_3$ -Biuret (**92**) und Diethylcarbonat in Ethanol durch die Zugabe von Natriumethanolat, welches zuvor aus Natrium in trockenem Ethanol generiert wurde, durch Erhitzen unter Rückfluss über Nacht $^{15}\text{N}_3$ -Cyanursäure (**93**) in guter Ausbeute erhalten werden. Anschließend erfolgte die Transformation der $^{15}\text{N}_3$ -Cyanursäure (**93**) zum $^{15}\text{N}_3$ -Cyanurchlorid (**94**) in einer Reaktion mit Phosphorpentachlorid in Phosphoroxychlorid durch Erhitzen unter Rückfluss über Nacht. Aufgrund der Instabilität des Produktes **94** wurden die flüchtigen Bestandteile nach der Reaktion zügig entfernt und nach Neutralisieren und Extrahieren bei tieferen Temperaturen das $^{15}\text{N}_3$ -Cyanurchlorid (**94**) in organischer Lösung unter Annahme eines vollständigen Umsatzes weiter umgesetzt. $^{15}\text{N}_3$ -Cyanurchlorid (**94**) erlaubte nun die schrittweise, temperaturabhängige Substitution, in der zunächst das erste Chloratom bei

tieferen Temperaturen durch ^{15}N -Diethylamin-hydrochlorid in Gegenwart von Kaliumcarbonat sowie 18-Krone-6 in DCM ersetzt wurde. Die geringe Ausbeute (18%) von $^{15}\text{N}_4$ -4,6-Dichlor- N,N -diethyl-1,3,5-triazin-2-amin (**95**) konnte in den Tests ausgehend vom natürlichen Analogon von **93** ebenfalls nicht erhöht werden. Die Variation der Äquivalente, des Lösungsmittelvolumens sowie die Art der Aufarbeitung hatten keinen positiven Effekt auf die Ausbeute. Wenn im Vergleich kommerziell erworbenes Cyanurchlorid (**25**) eingesetzt wurde, wurde das Chloratom in sehr guten Ausbeuten gegen Diethylamin substituiert. Folglich verläuft die Stufe zur Herstellung der Verbindung **94** unter geringem Umsatz oder aber bei der benötigten Aufarbeitung wird die Verbindung **94** hydrolysiert. Weiterführend wurde $^{15}\text{N}_4$ -4,6-Dichlor- N,N -diethyl-1,3,5-triazin-2-amin (**94**) in einer weiteren Substitutionsreaktion mit ^{15}N -Diethylamin-hydrochlorid in Gegenwart von Kaliumcarbonat sowie 18-Krone-6 in Toluol bei Raumtemperatur zu $^{15}\text{N}_5$ -6-Chlor- N^2,N^2,N^4,N^4 -tetraethyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin (**96**) in sehr guten Ausbeuten umgesetzt. Im letzten Schritt führte die Substitutionsreaktion bei höheren Temperaturen mit ^{15}N -Glycin in Gegenwart von Kaliumcarbonat in DMSO zu ($^{15}\text{N}_2$ -4,6-Bis(diethylamino)- $^{15}\text{N}_3$ -1,3,5-triazin-2-yl)- ^{15}N -glycin ($^{15}\text{N}_6$ -TriazGly-OH, **97**). Hierbei konnte nicht reagiertes Edukt **96** bei der säulenchromatographischen Reinigung zurückgewonnen werden. Das erfolgreich isolierte isotopepure $^{15}\text{N}_6$ -TriazGly-OH (**97**) wurde in der Festphasen-Peptidsynthese verwendet (Kapitel 4.3.1.2).

Um die Anzahl der ^{15}N -Isotope im Peptid soweit wie möglich zu maximieren, wurde zusätzlich zu $^{15}\text{N}_6$ -TriazGly-OH (**97**) ^{15}N -Glycin (**98**) mit der Fmoc-Schutzgruppe versehen und Fmoc- ^{15}N -Glycin (**99**) erhalten (Abb. 4.8).^[191]

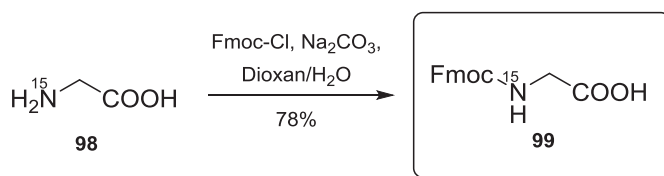


Abbildung 4.8: Synthese von ^{15}N -Fmoc-Gly-OH (**99**).^[191]

Die Azidfunktionalität wurde ausgehend vom Fmoc-L-Lys-OH (**100**) über eine Kupfer(II)-katalysierte Reaktion mit dem Diazotransfer-Reagenz 1*H*-Imidazol-1-sulfonylazid-hydrochlorid (**80**)²⁰ an die ϵ -Position der Seitenkette angebracht und dadurch Fmoc-L-Lys(N_3)-OH (**101**) generiert (Abb. 4.9).^[192,193]

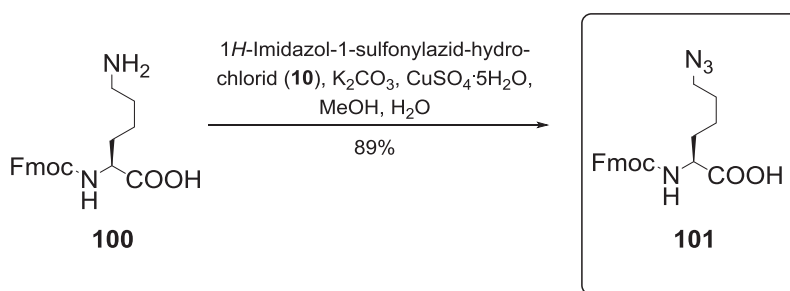


Abbildung 4.9: Synthese von Fmoc-L-Lys(N_3)-OH (**101**).^[192,193]

²⁰ 1*H*-Imidazol-1-sulfonylazid-hydrochlorid (**80**) wurde zuvor nach der Vorschrift von GODDARD-BORGER hergestellt.^[192,193]



4.3.1.2 Synthese der ^{15}N -Triazin-funktionalisierten Peptide

Nach erfolgreicher Synthese der Monomerbausteine wurden Triazin-funktionalisierte Peptide als potentielle Biomolekülmarker über manuelle Festphasen-Peptidsynthese nach Fmoc-Protokoll sowie unter Verwendung von Mikrowellen-Aktivierung hergestellt. Bevor das ^{15}N -Material eingesetzt wurde, wurden die natürliche Version von $^{15}\text{N}_6$ -TriazGly-OH (**97**), Fmoc-L-Lys(N_3)-OH (**101**), kommerziell erhältliche Fmoc-geschützte Aminosäuren und ein zuvor mit Fmoc-Gly vorbelegtes Sieberamid-Harz verwendet (Abb. 4.10). Da Fluorophore weitverbreitet in Form von thiolreaktiven Maleimiden oder in Form von aminreaktiven NHS-Estern angeboten werden, konnte entweder ein Cystein oder ein Lysin mit eingebaut werden. Die Aktivierung von Fmoc-L-Lys(N_3)-OH (**101**) sowie der anderen Standardamino-säuren erfolgte mit einer Kombination aus HBTU und HOBt sowie DIPEA in NMP. Die Carbonsäure-aktivierten Bausteine wurden unter Mikrowellen-Aktivierung (50 °C, 25 W, 10 min) gefolgt von einer Doppelkupplung verknüpft. Im Falle von Cystein-Kupplungen wurden mildere Bedingungen angewandt (40 °C, 20 W, 10 min), um unerwünschte Racemerisierung auszuschließen.^[194] Das natürliche Analogon von $^{15}\text{N}_6$ -TriazGly-OH (**97**) ließ sich ähnlich einer Aminosäure-Kupplung an *N*-terminaler Position über SPPS unter Verwendung von HATU/HOAt und DIPEA in NMP in das Peptid **102** integrieren. Weiterführend wurden durch die *N*-terminale Einführung von Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gefolgt durch das Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen auf dem Harz zwei Positionen zur TriazGly-Funktionalisierung bereitgestellt und die zweite Generation **103** erhalten.

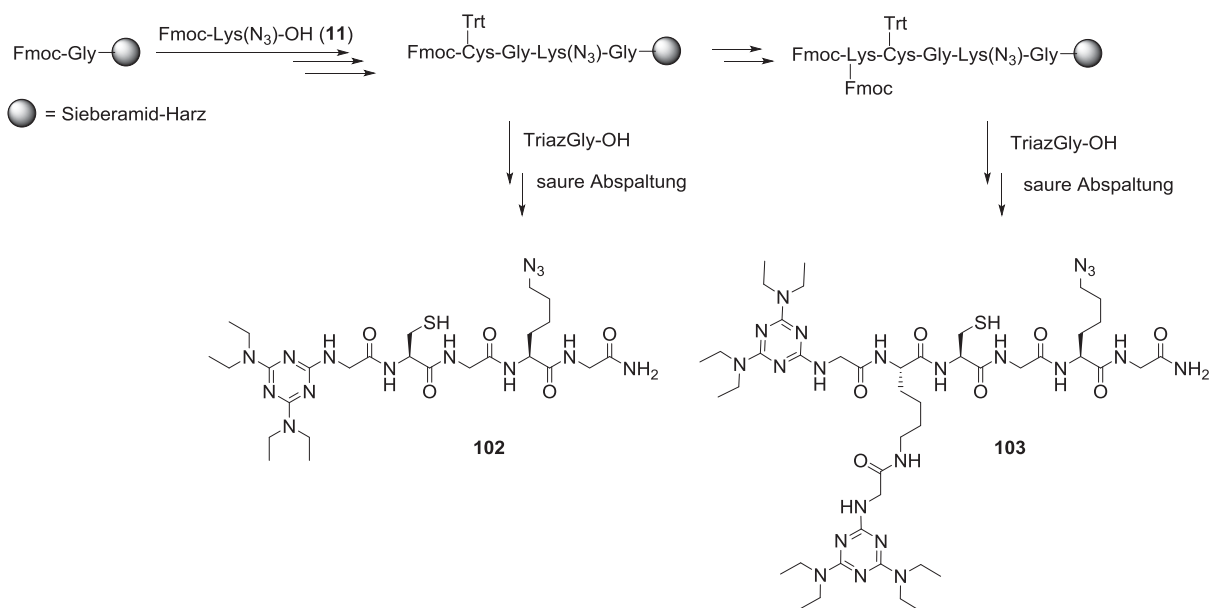


Abbildung 4.10: Synthese der ersten und zweiten Generation TriazGly-funktionalisierter Peptide.

Die Abspaltungen vom Trägermaterial erfolgten in säurehaltigen Lösungen, bestehend aus 10% Trifluoressigsäure (TFA)/ H_2O /1,2-Ethandithiol (EDT)/ Triisopropylsilan (TIS) (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v) in DCM. Für die Abspaltung vom Harz reichen geringe Mengen an Säure aus, dennoch wurde das Filtrat mit zusätzlicher TFA versetzt, um eine vollständige Entschützung der Seitenketten-Schutzgruppen zu gewährleisten. Nach Vorbehandlung der Peptide erfolgten HPLC- und massenspektrometrische Analysen. Es konnten für beide Peptide HPLC-Spektren erhalten werden, welche fast ausschließlich die Bildung der gewünschten Peptide aufzeigten. Die geringen und somit vernachlässigbaren Verunreinigungen der Rohprodukte konnten als ein weiteres verknüpftes TriazGly identifiziert werden (ESI-MS, HR-MS). Um die zweite Verknüpfungsstelle als reaktive α -N-Position des TriazGly zu verifizieren, wurde eine

Testreaktion durchgeführt (Abb. 4.11). Hierzu wurde TriazGly-OH an Gly-Sieberamid-Harz unter denselben Bedingungen gekuppelt und nach saurer Abspaltung analysiert. Die Bildung des zweifach substituierten Nebenproduktes **105** konnte auch hier nachgewiesen werden.

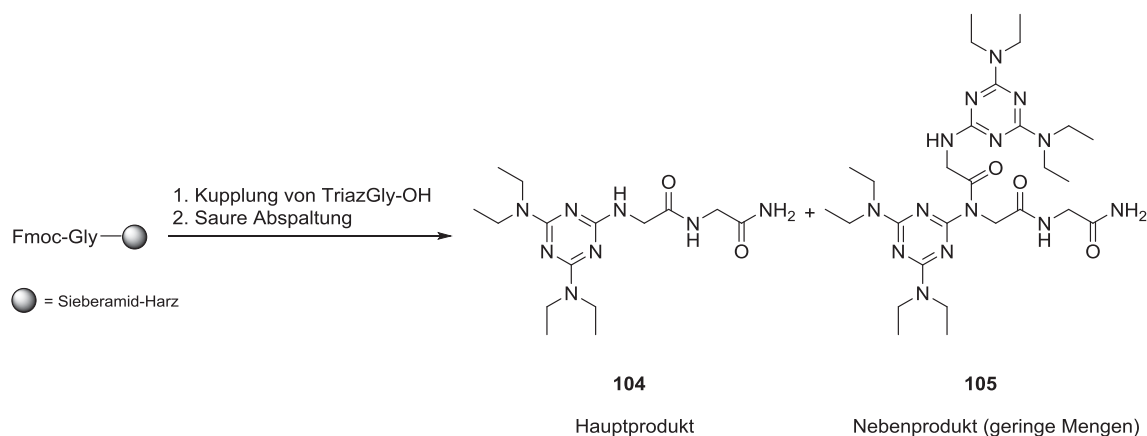


Abbildung 4.11: Geringe Bildung des Nebenproduktes **105** aufgrund der reaktiven α -N-Position von TriazGly-funktionalisiertem Produkt **104**.

Als potentieller Biomolekülmarker wurde das TriazGly₂-Pentapeptid **103** ausgewählt, welches mehr Stickstoffpositionen zum Austausch ($14 \times N$) aufweist und die ¹⁵N-Version **106** nach derselben Prozedur hergestellt. Dabei wurden ¹⁵N₆-TriazGly-OH (**97**), Fmoc-L-Lys(N₃)-OH (**101**), Fmoc-¹⁵N-Gly-OH (**99**) sowie Fmoc-Cys(Trt)-OH eingesetzt und das ¹⁵N-TriazGly₂-Pentapeptid **106** erhalten (Abb. 4.12).

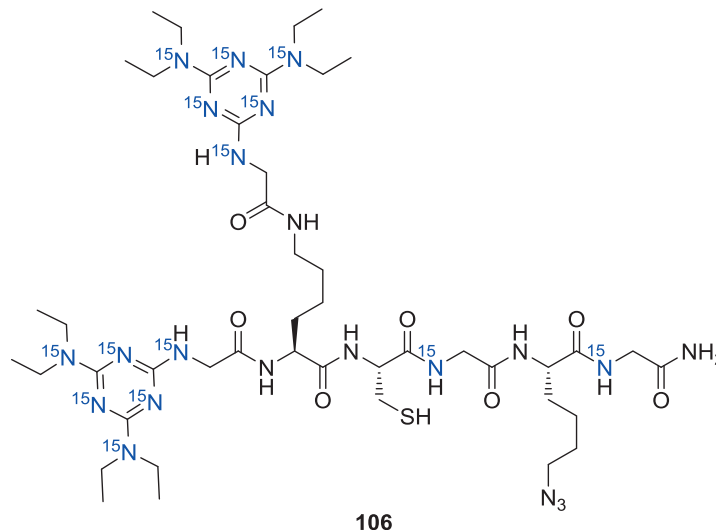


Abbildung 4.12: Das synthetisierte ¹⁵N-TriazGly₂-Pentapeptid **106**.

Da die zukünftige Markierung der Proteine in den Zellen unter physiologischen Bedingungen stattfinden soll, war die Löslichkeit des Biomolekülmarkers in phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS, pH = 7.4) ein ausschlaggebendes Kriterium zur Auswahl. Neben dem neutralen TriazGly₂-Pentapeptid **106** wurden zur Evaluation zwei weitere Peptide mit entgegengesetzten Ladungen hergestellt (Abb. 4.13). Das positiv geladene TriazGly₂-Octapeptid **107** wurde durch die Inkorporation von vier Lysinen erhalten, welche aufgrund der basischen Aminogruppen ($pK_a = 10.53$)^[195] unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen. Das negativ geladene TriazGly₂-Nonapeptid **108** enthält zwei Glutaminsäurereste



($pK_a = 4.25$)^[195] und zwei Asparaginsäurereste ($pK_a = 3.65$)^[195], dessen Seitenketten bei $pH = 7.4$ deprotonierte Carbonsäuren aufweisen.

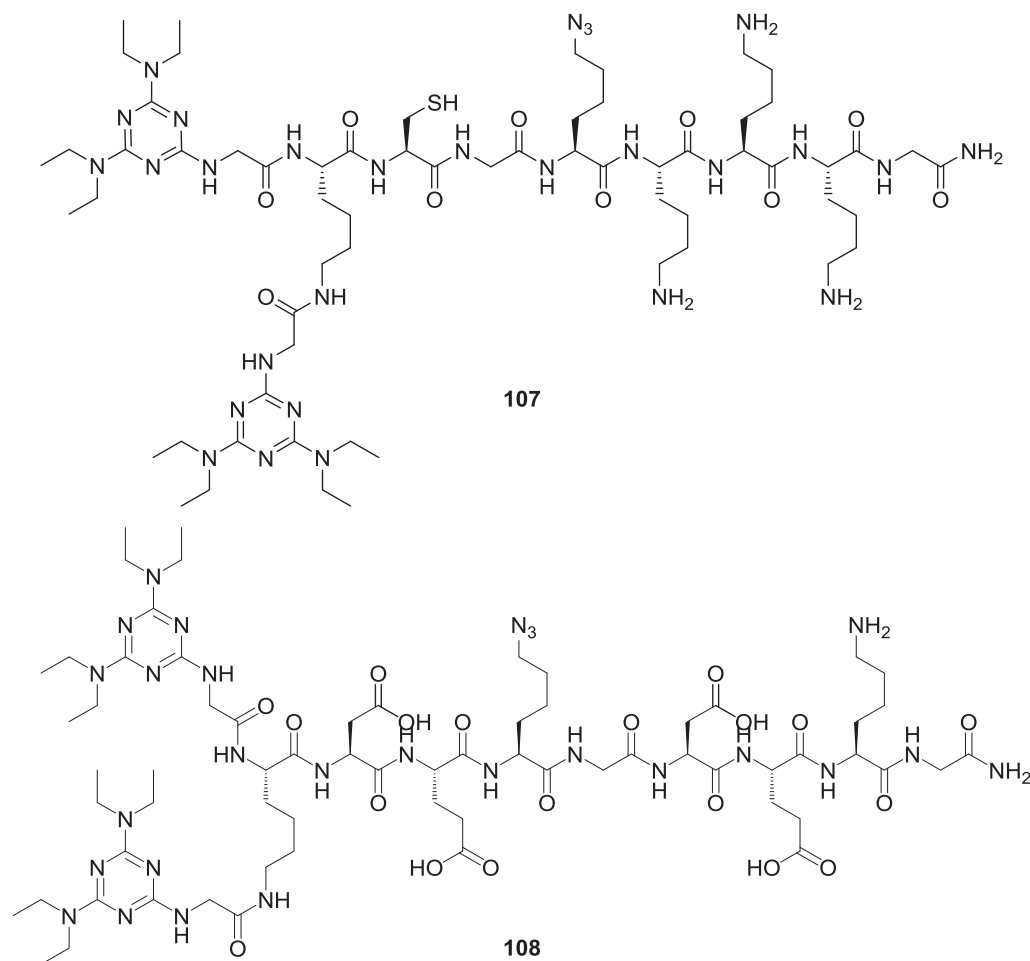


Abbildung 4.13: Das positiv geladene Octapeptid **107** und das negativ geladene Nonapeptid **108**.

Anschließend erfolgte die Fluorophor-Verknüpfung der hergestellten TriazGly₂-Peptide in Lösung. Das neutrale TriazGly₂-Pentapeptid **103**, seine ¹⁵N-Version **106** und das positiv geladene TriazGly₂-Octapeptid **107** verfügen über jeweils eine Thiofunktion und sollten mit einem Maleimid-funktionalisierten Fluorophor umgesetzt werden. Die Reaktion wurde bei physiologischem pH-Wert in entgastem Phosphatpuffer (20 mM, $pH = 7.3$, 10 mM NaCl) durchgeführt, so dass vorhandene Aminogruppen im Fall vom Octapeptid **107** ungeschützt eingesetzt werden konnten. Eine Reduktion von möglichen Disulfidbrücken zur Generierung von Thiolgruppen mit geeigneten Reduktionsmitteln wird vom Hersteller vor Fluorophor-Verknüpfung empfohlen. TCEP ist ein bekanntes Reduktionsmittel, welches im Gegensatz zu DDT irreversibel mit Disulfiden reagiert.^[196] Die Verwendung eines definierten TCEP-Überschusses hätte deshalb den Vorteil nicht aus der Lösung entfernt werden zu müssen und könnte auch in Gegenwart des Fluorophors im Falle einer Rückoxidation Disulfide brechen und Thiole regenerieren. Dennoch wurde der Einsatz von TCEP vermieden, da sonst die Azidfunktion an der Seitenkette der Peptide partiell mit reduziert worden wäre.^[197]

Das cysteininhaltige TriazGly₂-Pentapeptid **103** sowie seine ¹⁵N-Version **106** zeigten während der HPLC-Reinigung, nach Lyophilisieren und somit Entfernen der TFA-Spuren sowie nach Lagerung über Monate bei -21 °C nur eine geringe Tendenz zur Oxidation. Die geringe Neigung zur Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken ausnutzend, konnten die TriazGly₂-Pentapeptide **103** und

106 ohne weiteres in entgastem Puffer eingesetzt werden. Aufgrund schlechter Löslichkeit der neutralen Peptide musste DMF der Reaktionsmischung zugesetzt werden. Im Gegensatz dazu war das im Puffer lösliche TriazGly₂-Octapeptid **107** nach HPLC-Reinigung und Entfernen des TFA-haltigen Lösungsmittels oxidationslabil und musste somit nach Abspalten vom Trägermaterial und Vorbehandlung durch mehrmaliges Fällern mit Ether ohne weitere HPLC-Aufreinigung eingesetzt werden. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen während der sauren Abspaltung erfordern thiolhaltige Peptide schwerflüchtige Radikalfänger als Additive.^[198] Um diese beim TriazGly₂-Octapeptid **107** zu vermeiden, wurde das flüchtige 2-Propanthiol als Additiv verwendet, welches nach Etherfällung und Trocknen im Vakuum einfacher aus dem Pellet zu entfernen war.

Tabelle 4.2: Fluorophor-verknüpfte TriazGly₂-Peptide. a) TriazGly₂-Peptid **103**, Cy5-maleimid, DMF/PBS (pH = 7.3), unter Lichtausschluss, 2 h, RT, über Nacht, 4 °C; quant. b) TriazGly₂-Peptid **103** (oder ¹⁵N-TriazGly₂-Peptid **106**), Star635-Maleimid, DMF/PBS (pH = 7.3), unter Lichtausschluss, 2 h, RT, über Nacht, 4 °C; 42%. c) ¹⁵N-TriazGly₂-Peptid **106**, Alexa488-Maleimid, PBS (pH = 7.3), unter Lichtausschluss, 2 h, RT, über Nacht, 4 °C; 30%. d) TriazGly₂-Peptid **107**, Star635-Maleimid, PBS (pH = 7.3), unter Lichtausschluss, 2 h, RT, über Nacht, 4 °C; 24%. e) TriazGly₂-Peptid **108** (oder ¹⁵N-TriazGly₂-Peptid **109**), Star-NHS-Ester, DIPEA, DMF, unter Lichtausschluss, über Nacht, RT; 47%.

Fluorophor-verknüpfte Triazin-funktionalisierte Peptide

TriazGly-Lys(TriazGly)-Cys(Cy5)-Gly-Lys(N₃)-Gly-NH₂ (**110**)^a

TriazGly-Lys(TriazGly)-Cys(Star635)-Gly-Lys(N₃)-Gly-NH₂ (**111**)^b

¹⁵N₆-TriazGly-Lys(¹⁵N₆-TriazGly)-Cys(Alexa488)-¹⁵N-Gly-Lys(N₃)-¹⁵N-Gly-NH₂ (**112**)^c

TriazGly-Lys(TriazGly)-Cys(Star635)-Gly-Lys(N₃)-Lys-Lys-Lys-Gly-NH₂ (**113**)^d

TriazGly-Lys(TriazGly)-Asp-Glu-Lys(N₃)-Gly-Asp-Glu-Lys(Star635)-Gly-NH₂ (**114**)^e

¹⁵N₆-TriazGly-Lys(¹⁵N₆-TriazGly)-Asp-Glu-Lys(N₃)-¹⁵N-Gly-Asp-Glu-Lys(Star635)-¹⁵N-Gly-NH₂ (**115**)^e

Durch den Einsatz von den thiolreaktiven Fluorophoren Cy5-Maleimid, Star635-Maleimid und Alexa488-Maleimid wurden die in Tabelle 4.2 dargestellten Fluorophor-verknüpften TriazGly₂-Peptide erhalten. Das negativ geladene TriazGly₂-Nonapeptid **108** und seine ¹⁵N-Version **109** wurden mit einem aminreaktivem Star635-NHS-Ester in Gegenwart von DIPEA in trockenem DMF umgesetzt, sodass eine Fluorophor-Verknüpfung der TriazGly₂-Peptide erreicht wurde (Tabelle 4.2). Die Fluorophor-verknüpften TriazGly₂-Peptide standen nach HPLC-Aufreinigung zur Markierung von Biomolekülen bereit (Kapitel 4.3.1.3, 4.3.1.4).



4.3.1.3 Markierung von modifiziertem β -Pompilidotoxin

Die Anwendbarkeit der hergestellten azidtragenden TriazGly₂-Peptide sollte am Beispiel von Alexa488-¹⁵N-TriazGly₂-Pentapeptid (**112**) an einem Alkin-funktionalisierten Peptid in einer Kupfer(I)-katalysierten HUISGEN-Azid-Alkin-Cycloaddition gezeigt werden. Das β -Pompilidotoxin (β -PMTX) bestehend aus 13 Aminosäuren wurde als Zielmolekül ausgewählt, welches zuvor an einer beliebigen Stelle mit einem Alkin modifiziert werden sollte. PMTXe sind natürliche Neurotoxine aus den Wegwespen (*Pompilidae*), deren Wirkung auf der selektiven Inaktivierung der neuronalen Natrium-Kanäle beruht.^[199–204] Hochspezifische Ionenkanäle für Natrium bestehen aus porenbildenden Transmembranproteinen und spielen eine Rolle beim Austausch von Informationen zwischen zwei Nervenzellen bei der synaptischen Übertragung (Transmission). PMTXe lösen eine Änderung des Membranpotentials aus, indem die Kanalöffnungsaktivität durch die Verlangsamung der Inaktivierung des Na⁺-Stromes begünstigt wird. Es sind zwei Unterarten, das α - und das β -PMTX, bekannt, wobei das β -PMTX eine höhere Aktivität aufweist. PMTXe unterscheiden sich durch die Abwesenheit von Disulfidbrücken strukturell von anderen bekannten biologischen Neurotoxinen wie den Giften von Skorpionen und Seeanemonen sowie dem δ -Conotoxin aus Kegelschnecken.^[200,201] In diesen Fällen sind die Disulfidbrücken durch die Interaktion mit den porenbildenden Transmembranproteinen von essentieller Bedeutung, deren Reduktion zur Inhibition ihrer Affinität für Na⁺-Ionenkanäle führt. So ist ein detaillierter Mechanismus des PMTX mit den Ionenkanälen noch Bestand aktueller Forschung. Dabei ist die simple Struktur von PMTX vorteilhaft für die Einführung von Mutationen um Struktur-Aktivitätsbeziehung zu verstehen und einen genauen Mechanismus dieser abzuleiten. Erst mit dem Verständnis der genauen Abläufe könnte PMTX zur Charakterisierung von unterschiedliche Typen von Na⁺-Kanälen genutzt werden. Neben zahlreich beschriebenen Mutationen führt ein Alanin-Austausch im α -PMTX an Position 11 (ausgehend vom N- zum C-Terminus) zur Erhaltung der Aktivität.^[199] Analog dazu wurde die Position 11 ausgesucht und auf das β -PMTX übertragen. Dabei wurde die Position 11 gegen ein Propargyl-L-serin²¹ ausgetauscht, dessen Einbau über automatisierte SPPS nach Fmoc-Strategie erfolgte.

Bei den standardisierten Bedingungen der automatisierten SPPS (Kupplung bei 75 °C, 25 W, 300 s) wurde neben dem modifizierten β -Pompilidotoxin **116** in geringen Mengen auch das aus Asparaginsäure gebildete und unerwünschte Aspartimid-Peptid beobachtet. Zur Unterdrückung des Nebenproduktes wurde deswegen HOBt in die Lösung für die Schritte der Fmoc-Entschützung (20% Piperidin in NMP + 0.1 M HOBt) gegeben, welches dennoch unzureichend war.^[205,206] Die Trennung mittels HPLC wäre bei einer Differenz von nur 18 g/mol erschwert und Aspartimid an dieser Stelle ungünstig für Aktivitätsstudien. Im vorherigen Kapitel (Kapitel 4.3.1.2) wurde beschrieben, dass Asparaginsäuren in das negativ geladene TriazGly₂-Peptid **108** über manuelle Festphasen-Peptidsynthese nach Fmoc-Protokoll (50 °C, 25 W, 10 min) ohne die Bildung von Aspartimid eingebaut wurden. Die Aspartimid-Entstehung kann somit durch die Erniedrigung der Temperatur von 75 auf 50 °C vermieden werden. Die erneute automatisierte Herstellung lieferte das modifizierte β -Pompilidotoxin **116**²² ohne Aspartimid-Bildung. Eine Umsetzung des alkinmodifizierten β -PMTX **116** mit Alexa488-TriazGly₂-Pentapeptid **112**, Kupfer(I)-iodid und DIPEA in DMF führte nicht zur gewünschten Triazolbildung. Ein möglicher Störfaktor könnten die ungeschützten Seitenketten des alkinmodifizierten β -PMTX sein. So

²¹ Von Dr. H. RADZEY aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. U. DIEDERICHSEN zur Verfügung gestellt.

²² Die automatische Synthese bei niedrigeren Temperaturen wurde von Dr. H. RADZEY aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. U. DIEDERICHSEN durchgeführt.

wurde die Reaktion in Lösung auf die feste Phase übertragen und das auf dem Harz gebundene und vollständig Seitenketten-geschützte PMTX (**116**) eingesetzt. Die Durchführung der Klickreaktion auf dem Harz hat den Vorteil, dass nicht reagiertes Material sowie Reagenzien nach Reaktion durch mehrmaliges Waschen des Harzes entfernt werden können.^[207] Nach Abspaltung gefolgt von HPLC und massenspektrometrischen Analysen (ESI-MS, HR-MS) konnte das Produkt **117** bestätigt werden (Abb. 4.14). Durch die Markierung von spezifischen Toxinen mit dem hier vorgestellten Fluorophor-verknüpften TriazGly₂-Peptid könnte neben der Fluoreszenzmikroskopie auch NanoSIMS genutzt werden, um eine Lokalisation der Toxine im neuronalen Gewebe zu realisieren. Es wird darauf hingewiesen, dass aufgrund der destruktiven Art von NanoSIMS nur *post mortem* Analysen für *in vivo* Studien in Frage kämen.

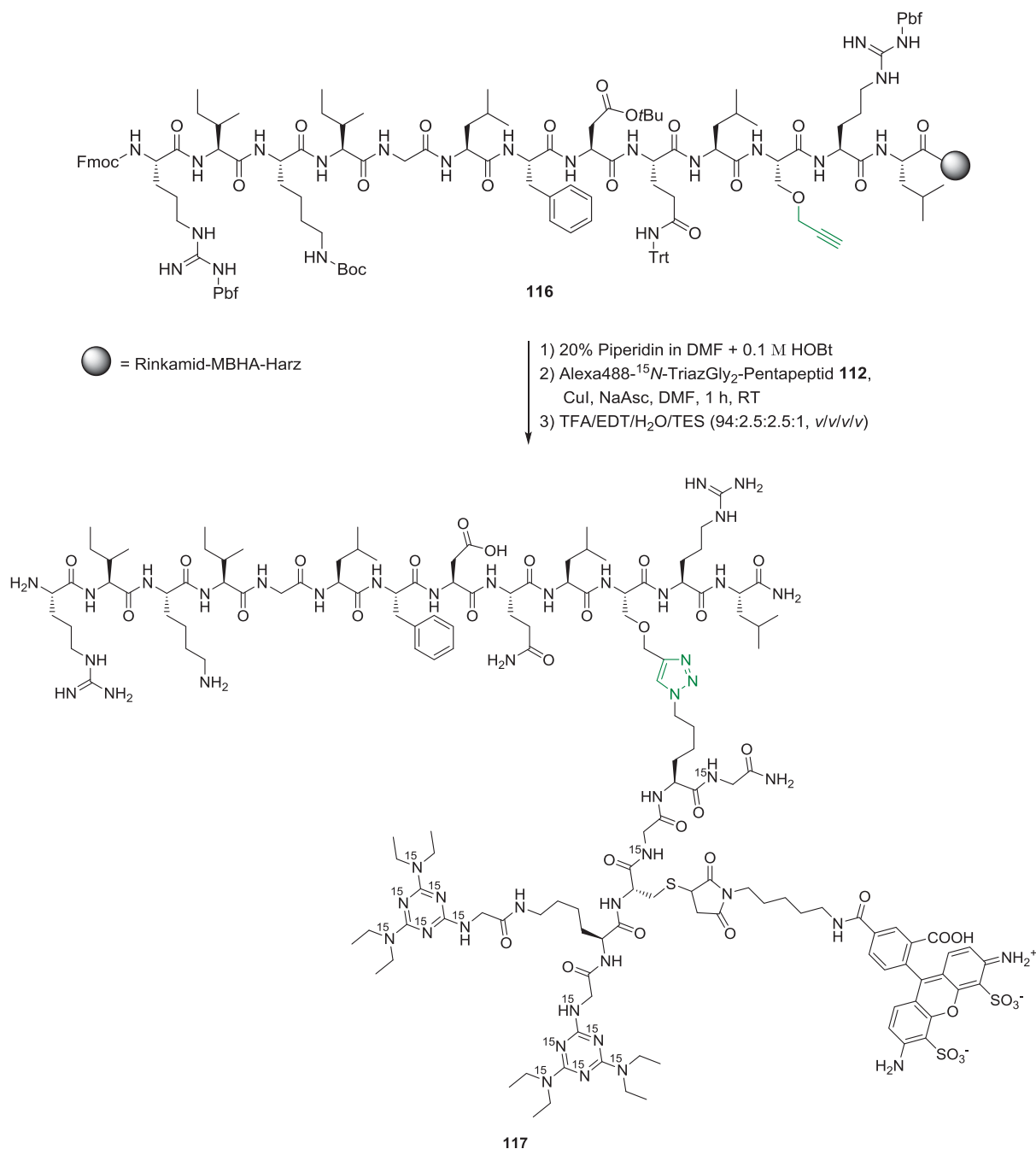


Abbildung 4.14 Markierung von alkinmodifiziertem β -Pompilidotoxin **116** mit Alexa488-¹⁵N-TriazGly₂-Pentapeptid **112** über eine Kupfer(I)-katalysierte HUISGEN-Azid-Alkin-Cycloaddition.



4.3.1.4 ¹⁵N-Markierung von genetisch kodierten SNARE-Proteinen

Die unterschiedlich geladenen Peptide, das neutrale Cy5- **110** und Star635-verknüpfte TriazGly₂-Pentapeptid **111**, das positiv geladene Star635-TriazGly₂-Octapeptid **113** sowie das negativ geladene Star635-TriazGly₂-Nonapeptid **114**, wurden auf ihre Spezifität hinsichtlich genetisch kodierter Proteine in Zellen getestet.²³ Hierfür wurden SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor)-Proteine, die zur Vermittlung der Membranfusion beitragen, ausgewählt.^[208] Im Allgemeinen werden in eukaryotischen Zellen durch die Fusion von synaptischen Vesikeln an einer postsynaptischen Lipidmembran Informationen durch die Ausschüttung von Neurotransmittern weitergegeben. Die Aufrechterhaltung der zellulären Kommunikation ist von essentieller Bedeutung für den Denkprozess höherer Lebewesen und Gegenstand intensiver Forschung. Zum Verständnis und Steuerung der Fusionsprozesse, in denen SNARE-Komplexe involviert sind, wurden Modifikationen vorgenommen sowie artifizielle Modellsysteme entworfen.^[209,210]

Zur Markierung wurden die SNARE-Proteine, speziell die Transmembranproteine Syntaxin 1 und 13 sowie das membranverankerte Protein SNAP-25 aus Zellkulturen höherer Organismen (Säugetierzellen, BHK (*baby hamster kidney*)-Zellkulturen, Hamsterfibroblasten) und jeweils in Gegenwart eines Vektors exprimiert. Dabei bestand der Vektor aus einem Plasmid, welches das modifizierte Gen zur Einführung des Amber-Stop-Codons (TAG) über ortsspezifische Mutagenese an einer definierten Position trug. Ursprünglich führt der Stop-Codon in biologischen Systemen zur Termination der Proteinexpression.^[179] Dementgegen ermöglicht die Expansion des genetischen Codes an diesen Positionen die gezielte Inkorporation von Propargyl-L-lysin (PRK).^[182] Hierzu wurden im Anschluss die transfizierten (TAG-tragenden) Proteine mit PRK sowie dem Originalsystem orthogonalen tRNA/aminoacyl-tRNA-Synthetase (tRNA/RS)-Paar inkubiert (hier vom Wildtyp *Methanosarcina Mazei* einem euryarchaeota Archaeon). Während das Paar des Originalsystems im Verlauf der Translation ausschließlich die natürlichen Aminosäuren integriert, erkennt das orthogonale Paar im Gastsystem den Amber-Stop-Codon als Insertionssignal für PRK. Nach mehreren Zyklen der Expression wurden PRK-modifizierte Proteine erhalten. Aufgrund der geringen Größe von PRK können sich die Proteine ohne bzw. mit geringen strukturellen Beeinträchtigungen entfalten. Erst nach intakter Organisation wurden die Proteine mit den SPILL-Markern in einer bioorthogonalen und chemoselektiven Kupfer(I)-katalysierten HUISGEN-Azid-Alkin-Cycloaddition^[185] versehen und nach Präparation analysiert.

Das neutrale Cy5- **110** und das Star635- verknüpfte TriazGly₂-Pentapeptid **111** zeigten in den Experimenten zur Markierung von genetisch kodierten Proteinen keine Spezifität. In Abbildung 4.15 wird es im Fall von SNAP-25 und Star635-TriazGly₂-Pentapeptid **111** demonstriert. Dabei präsentieren die oberen Bilder die Negativkontrolle, in denen die Zellen das natürliche und nicht alkinmodifizierte Protein enthalten. Die unteren Bilder entsprechen dem PRK-SNAP-25-GFP. Beide Zellkulturen wurden mit 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), einem bekannten Fluoreszenzfarbstoff, versetzt. Dadurch werden alle vorhandenen Zellen indifferent visualisiert. DAPI passiert bekanntlich die Zellmembran und weist eine hohe Affinität für den Zellkern, speziell der DNA auf.^[211] Weiterführend beinhalten alle PRK-modifizierten Proteine das grün fluoreszierende Protein (GFP)^[212], welches zur Differenzierung zwischen kodierten und natürlichen Proteinen während der Stufe der PRK-Inkorporation mit eingeführt wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionsmaxima von DAPI, GFP und Star635 konnten auf

²³ Die im Verlauf präsentierten Experimente wurden von I.-C. VREJA im Rahmen ihrer Doktorarbeit und K. KRÖHNERT vom Arbeitskreis Prof. Dr. S. O. RIZZOLI durchgeführt. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden von I.-C. VREJA angefertigt.

diese Weise systematisch die Gesamtheit der Zellen (DAPI, blau), das alkinmodifizierte SNAP-25 (GFP, grün) und das azidtragende Star635-TriazGly₂-Pentapeptid **111** (Star635, rot) visualisiert werden. Es wird aus der Abbildung 12 ersichtlich, dass Star635-TriazGly₂-Pentapeptid **111** unspezifisch an den Zellen haftet, anstatt mit dem PRK-SNAP-25 stabile Triazol-Konjugate zu bilden. Die Ursache lag hierbei an der geringen Löslichkeit des neutralen Markers in Phosphatpuffer. Nicht umgesetztes Material konnte durch Waschen mit wässrigen Puffern nicht entfernt werden. Somit wurde Star635-TriazGly₂-Pentapeptid **111** als potentieller SPILL-Marker ausgeschlossen.

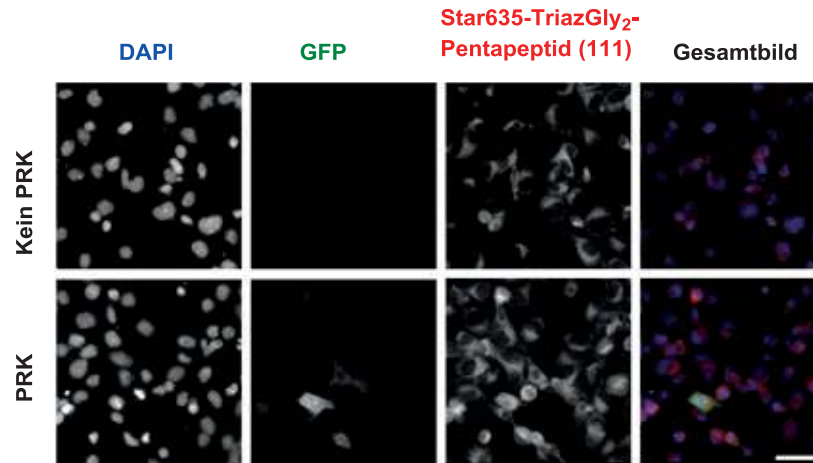


Abbildung 4.15: Ergebnisse aus den Experimenten mit alkinmodifiziertem SNAP-25-GFP und azidtragendem Star635-TriazGly₂-Pentapeptid **111** zeigen keine spezifische Markierung, da der Marker ohne Differenzierung sowohl an Zellen mit natürlichem SNAP-25 (**obere Reihe**) als auch an Zellen mit PRK-SNAP-25-GFP haftet (**untere Reihe**). Maßstabsbalken entspricht 40 µm.

Aus den Experimenten des positiv geladenen und in Phosphatpuffer sehr gut löslichen Star635-TriazGly₂-Octapeptids **113** mit PRK-SNAP-25-GFP resultierten ebenfalls Bilder mit unspezifischer Bindung (Abb. 4.16). Eine mögliche Erklärung wären elektrostatische Interaktionen ausgehend von den protonierten Lysinen des Star635-TriazGly₂-Octapeptids **113** mit diversen Zellkompartimenten sowie cytoplasmatische Polyanionen wie RNA. Folglich kann das Star635-TriazGly₂-Octapeptids **113** nicht als SPILL-Marker verwendet werden.

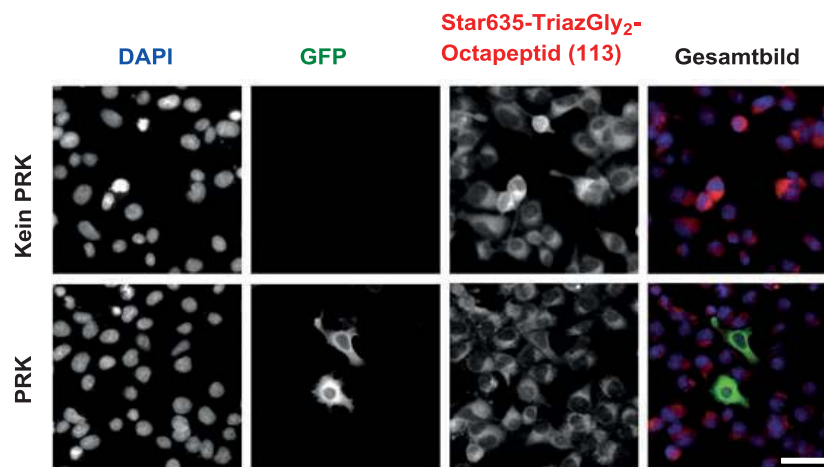


Abbildung 4.16: Das azidtragende Star635-TriazGly₂-Octapeptid **113** bindet unspezifisch an die Zellen. Eine Unterscheidung zwischen Zellen die SNAP-25 (**obere Reihe**) und PRK-SNAP-25-GFP (**untere Reihe**) ist nicht gegeben. Maßstabsbalken entspricht 40 µm.

Das negativ geladene Star635-TriazGly₂-Nonapeptid **114** wies eine hohe Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen auf. Die dabei resultierende spezifische Markierung von PRK-SNAP-25-GFP ist der Abbildung 4.17 zu entnehmen.

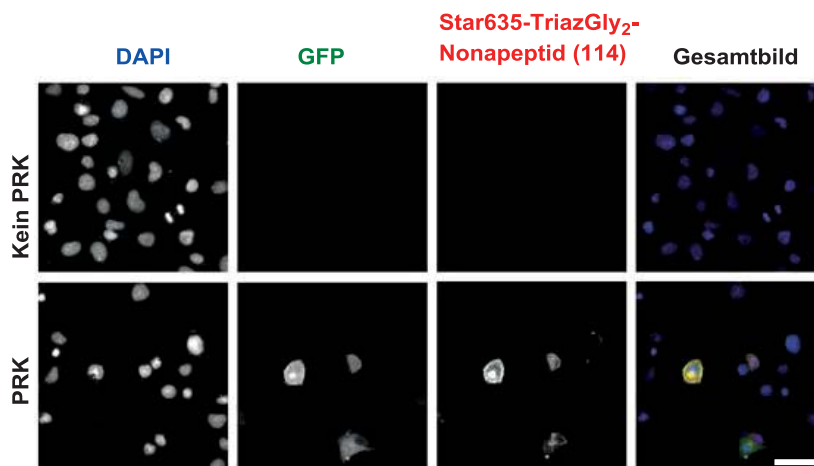


Abbildung 4.17: Selektive Markierung von alkinmodifiziertem SNAP-25-GFP mit azidtragendem Star635-TriazGly₂-Nonapeptid **114** über die Bildung von stabilen Triazol-Konjugaten (**untere Reihe**). Obere Reihe enthält die Negativkontrolle mit Zellen, welche das natürliche SNAP-25 beinhalten. Maßstabsbalken entspricht 40 μm .

Infolge dessen wurde die ^{15}N -Version **115** eingesetzt, welche im weiteren Verlauf der Arbeit als TriazNF1 bezeichnet wird (Abb. 4.18). Die Triazolbildung mit TriazNF1 konnte wie für das natürliche Analogon (**114**) bestätigt werden (Abb. 4.19). Der SPILL-Marker TriazNF1 besitzt annähernd äquivalente Proportionen an ^{15}N (14 $\times$)- und ^{14}N -Isotopen (16 $\times$), wodurch ein Isotopenverhältnis von 0.875 erhalten wird. Im Gegensatz dazu beträgt das natürliche $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnis 0.00367.

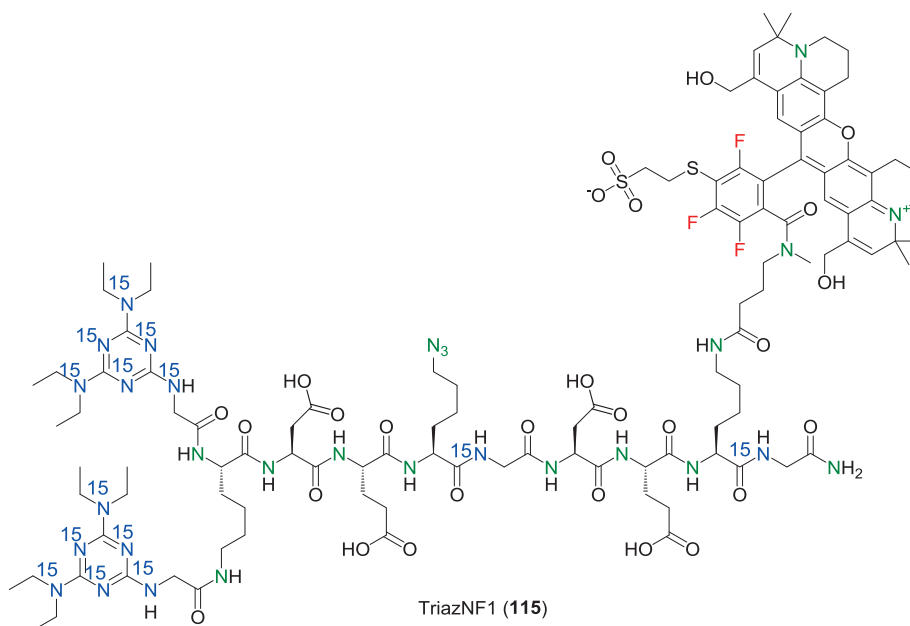


Abbildung 4.18: TriazNF1 (**115**) als chemoselektiver Biomolekülmarker für SPILL-basierte Ansätze.

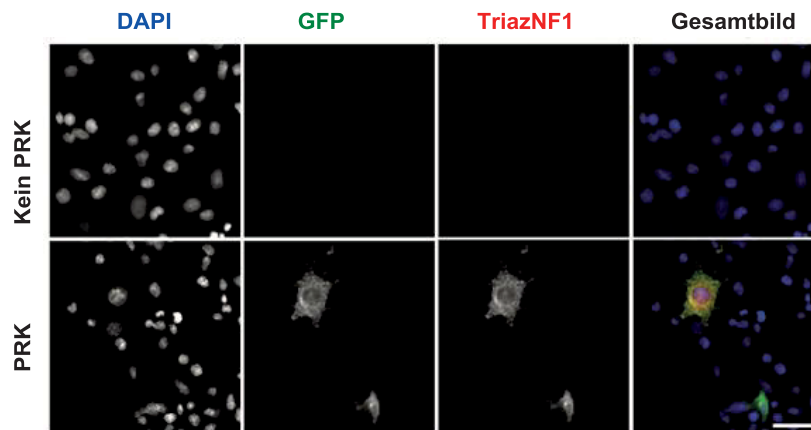


Abbildung 4.19: Selektive Markierung von alkinmodifiziertem SNAP-25-GFP mit TriazNF1 (**115**) über die Bildung von stabilen Triazol-Konjugaten (**untere Reihe**). Obere Reihe enthält die Negativkontrolle mit Zellen, welche das natürliche SNAP-25 beinhalten. Maßstabsbalken entspricht 40 μm .

Nachdem die Eignung von TriazNF1 (**115**) zur selektiven Markierung von auserwählten Proteinen mit konfokalmikroskopischen Analysen bestätigt wurde, sollte die entscheidende Etappe, die Visualisierung mit NanoSIMS erfolgen. Zur Strukturhaltung der SNARE-Proteine Syntaxin 1 und 13 sowie SNAP-25 nach PRK-Inkorporation wurden die Zellen mit Glutaraldehyd und Paraformaldehyd (PFA) chemisch fixiert. Nach Fixierung wurde die Markierung mit TriazNF1 (**115**) durchgeführt, gefolgt von DAPI-Färbung sowie geeigneter Präparation. Die Präparation ist zwingend erforderlich, da NanoSIMS-Messungen, ähnlich wie Elektronenmikroskopie, unter hohem Vakuum erfolgen.^[22] Die Präparation beginnt mit der Dehydratisierung, in der der Wassergehalt der Probe reduziert wird. Anschließend wird die Probe in ein Kunstharz eingebettet und nach Schneiden in 200 nm dicke Scheiben auf einem Silizium-Wafer angebracht. Nach konfokalmikroskopischen Aufnahmen erfolgten die NanoSIMS-Messungen²⁴. Die erhaltenen Bilder werden am Beispiel des Syntaxin 1 in Abbildung 3.20 wiedergegeben. Die TriazNF1-markierten Proteine weisen signifikant höhere Anteile an dem $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnis als nicht markierte Zellen auf (Abb. 4.20, C). Aufgrund des höheren Kontrastes bzw. des größeren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses konnten die einzelnen Proteine lokalisiert werden (Abb. 4.20, A), während Zellen ohne vormarkierte Proteine indifferent erscheinen (Abb. 4.20, B). Dazu wurden erst die einzelnen negativ geladenen Molekülspezies $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$ und $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ aus demselben Probenvolumen parallel detektiert und beide in Verhältnis gesetzt. Über das Isotopenverhältnis konnte die tatsächliche zelluläre Anreicherung an ^{15}N visualisiert werden. Weiterführend wurde eine direkte Korrelation von Konfokalmikroskopie und NanoSIMS in guter Übereinstimmung erhalten.

²⁴ Von I.-C. VREJA und Dr. S. K. SAKA aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. S. O. RIZZOLI und Dr.-Ing. CARMEN HÖSCHEN an einem NanoSIMS 50L Instrument gemessen.

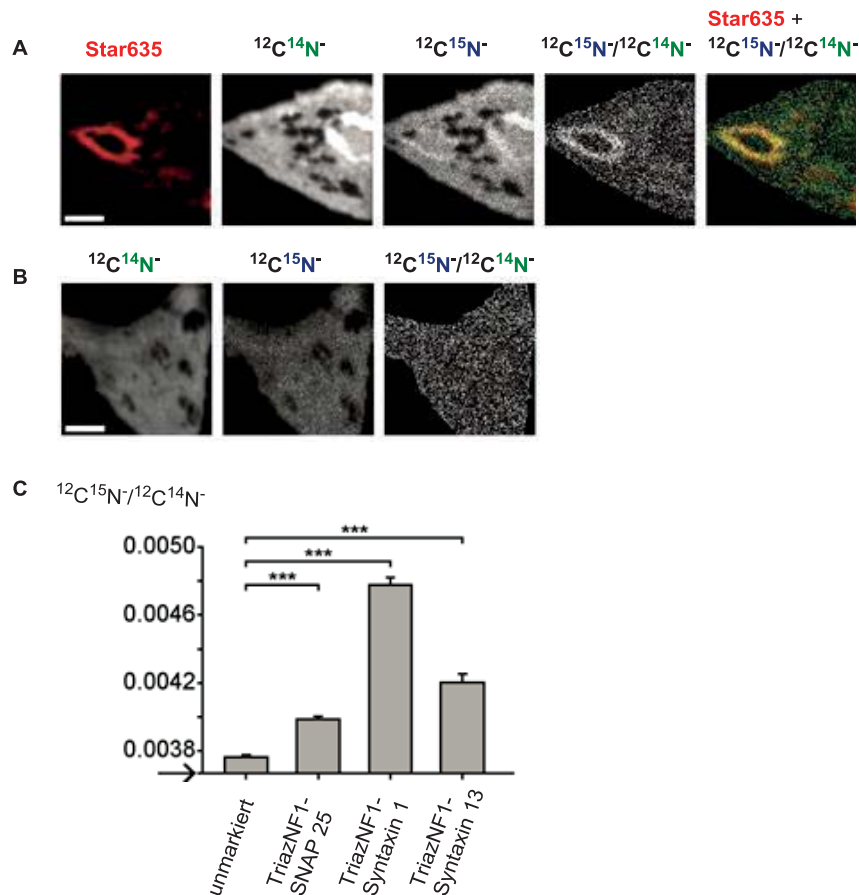


Abbildung 4.20: TriazNF1 (**115**) markiert genetisch kodierte Proteine spezifisch und ermöglicht die Lokalisierung dieser in den Zellen. **A** Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Star635-TriazNF1-Syntaxin 1 (**links**) gefolgt von NanoSIMS-Bildern für die $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ - und $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$ -Isotope und das $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-/^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ -Isotopenverhältnis sowie die Überlappung der beiden bildgebenden Verfahren (**rechts**). Maßstabsbalken entspricht 2 μm . **B** Zum Vergleich NanoSIMS-Bilder unmarkierter Zellen, die einen natürlichen $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnis (0.00367) aufweisen. Maßstabsbalken entspricht 2 μm . **C** Die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnisse sind signifikant höher in genetisch kodierten Proteinen aufgrund der Markierung mit TriazNF1 (**115**). Die graphische Darstellung erfolgte anhand der detektierten Ionenspezies in NanoSIMS. Die y-Achse startet bei dem Wert des natürlichen $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnisses.

Durch die SPILL-basierte Visualisierung einzelner Proteine in NanoSIMS wird die Möglichkeit zur Bestimmung von Proteinturnover-Raten und Durchführung metabolischer Studien gegeben. Dabei eignet sich das entwickelte TriazNF1 (**115**), basierend auf einem künstlichen $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnis, zur Markierung und Lokalisierung der Proteine. Eine entscheidende Bedingung an die Proteine ist, neben der Bekanntheit ihrer Primärsequenz, eine Flexibilität zur Inkorporation von PRK oder anderen unnatürlichen Aminosäuren. Zusätzlich sollte das biologische System die Einführung des SPILL-Markers über eine Kupfer(I)-katalysierte HUISGEN-Azid-Alkin-Cycloaddition tolerieren. Soll die Verwendung von Kupfer vermieden werden, kann alternativ eine kupferfreie Cycloaddition des TriazNF1 (**115**) mit einem Cyclooctin-modifizierten Biomolekül^[213] erfolgen. Weiterführend kann das peptidische Templat von TriazNF1 (**115**) genutzt werden, um andere bioorthogonale und chemoselektive Funktionalitäten einzuführen, den Bedürfnissen entsprechende Fluorophore anzubringen sowie weitere stabile Isotope unterzubringen.

4.3.2 Entwicklung spezifischer Fluorpeptide zur Markierung

Bei der Evaluation der entwickelten Triazin-Peptide stellte sich das negativ geladene TriazNF1 (**115**) als selektiver Marker heraus. Neben adäquaten Löslichkeitseigenschaften unter physiologischen Bedingungen, geht TriazNF1 (**115**) keine unspezifischen Interaktionen mit Zellkompartimenten ein. Diese Sachlage einbeziehend, soll das negativ geladene Peptid-Grundgerüst übertragen werden, um das Repertoire an weiteren stabilen Isotopen, speziell um ^{19}F zu erweitern. Dabei gehört ^{19}F mit einer natürlichen Häufigkeit von 100% zu den Reinelementen.^[214] Weiterführend wird die Verwendung von ^{19}F aufgrund der geringen Präsenz in biologischen Materialien unterstützt.^[171] Im Folgenden wird die Synthese des ^{19}F -Biomolekülmarkers (Kapitel 4.3.2.1) sowie dessen Anwendung zur Visualisierung einzelner Proteine in NanoSIMS (Kapitel 4.3.2.2) vorgestellt.

4.3.2.1 Synthese der Fluorpeptide

Aufgrund des natürlichen Vorkommens von ^{19}F , musste im Vergleich zum ^{15}N -Isotop, keine aufwendige Synthese zur Generierung von reichhaltigen ^{19}F -Verbindungen unternommen werden. Am Rande ist zu beachten, dass hoch fluorhaltige Kohlenstoffverbindungen eine Anomalie, die als Fluorphase bekannt ist, haben können.^[215] Diese Eigenschaft tritt speziell bei perfluorierten Formen auf und wirkt sich auf die Löslichkeit aus, die sowohl in organischen als auch in wässrigen Lösungsmitteln nicht mehr gegeben sein kann. Dieser Zustand wird bei der Dreiphasenextraktion genutzt, in der nach einer Synthese bei der Aufarbeitung, neben organischer und wässriger Phase, perfluorierte Lösungsmittel als dritte Phase vorliegen. Die abgetrennte perfluorige Phase toleriert Gase und fluorierte Verbindungen und schließt andere organische Substanzen sowie Salze aus. Bei der Übertragung des Peptid-Grundgerüsts von TriazNF1 (**115**) sollte deshalb lediglich die TriazGly-Einheit ausgetauscht werden. Um eine Synthese analog zu der ^{15}N -Version zu ermöglichen sowie ähnliche Eigenschaften der Probe bei der selektiven Markierung aufrechtzuhalten, wurde 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoesäure (**118**) ausgewählt (Abb. 4.21).

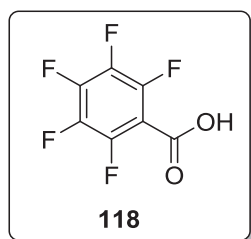


Abbildung 4.21: Die kommerziell erhältliche 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoesäure (**118**).

Die Herstellung der Fluorpeptide war analog zu der zuvor beschriebenen Synthese (Kapitel 4.3.1.2) und wurde über manuelle Mikrowellen-unterstützte Festphasen-Peptidsynthese nach Fmoc-Protokoll erreicht. Die *N*-terminale Verknüpfung von 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoesäure (**118**)^[216] erfolgte nach Carbonsäure-Aktivierung mit HATU/HOAt in Gegenwart von DIPEA in DMF und lieferte das Fluorpeptid **119** (Abb. 4.22, A). Alternativ wurde an dem *N*-Terminus Fmoc-L-Lys(Fmoc)-OH angebracht, um nach Fmoc-Entschützung zwei 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoe-Einheiten einzuführen und anschließend das nächste Fluorpeptid **120** zu erhalten (Abb. 4.22, A). Die hergestellten Peptide wurden im nächsten Schritt mit Star635-NHS-Ester in Anwesenheit von DIPEA in DMF über die Aminogruppe des Lysins verknüpft und verfügten über eine gute Löslichkeit im Phosphatpuffer (Abb. 4.22, B).

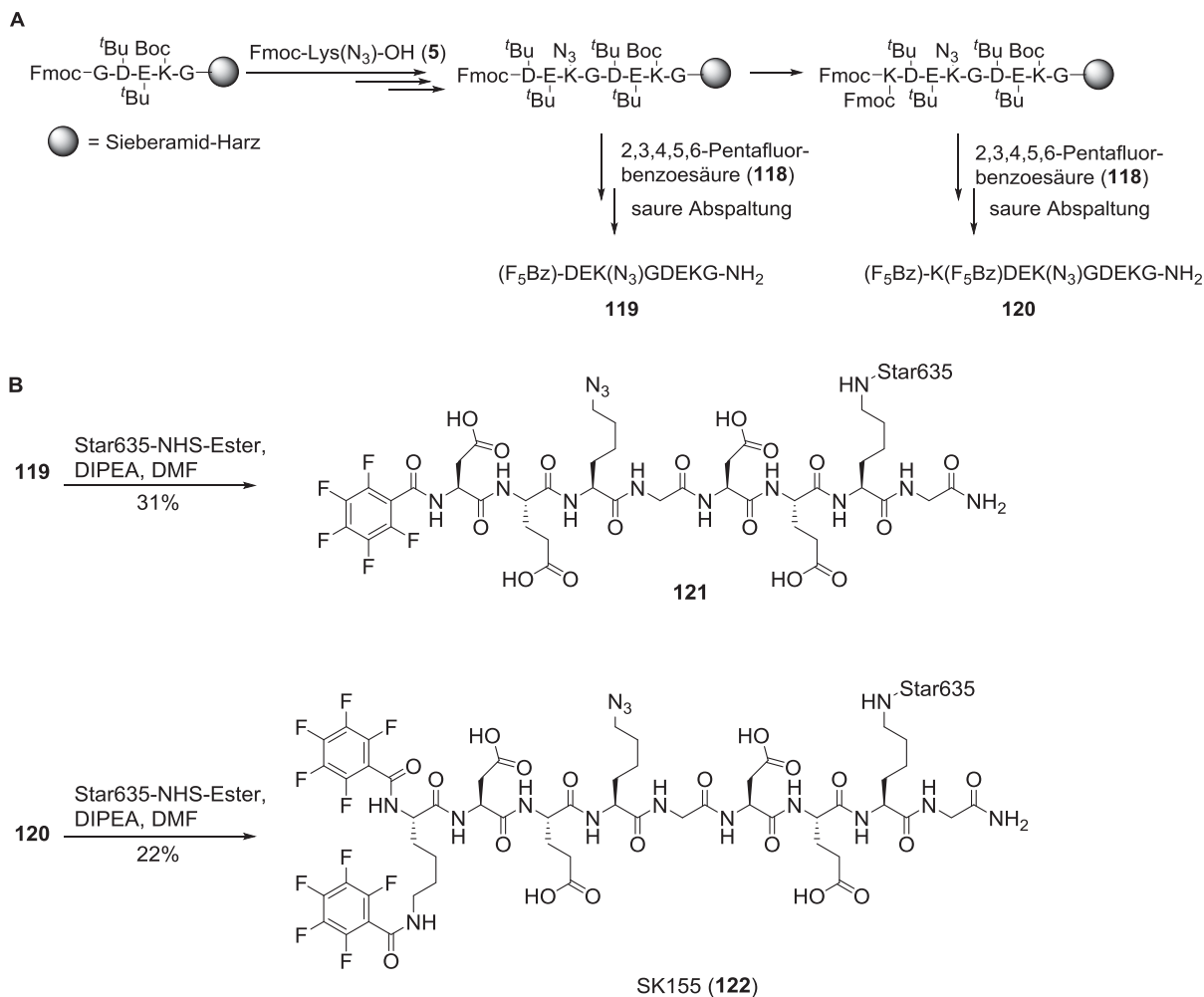


Abbildung 4.22: Synthese der ^{19}F -Biomolekülmarker. **A** Herstellung von F_5Bz -Octapeptid (**119**) und $(\text{F}_5\text{Bz})_2$ -Nonapeptid (**120**) über Festphasen-Peptidsynthese. **B** Star635-Verknüpfung in Lösung zur Isolierung von Star635- F_5Bz -Octapeptid (**121**) und Star635- $(\text{F}_5\text{Bz})_2$ -Nonapeptid (SK155) (**122**).

Durch das Vorhandensein von $3 \times ^{19}\text{F}$ -Atomen in Star635 besitzt das Star635- F_5Bz -Octapeptid **121** insgesamt $8 \times ^{19}\text{F}$ -Atome, während das Star635- $(\text{F}_5\text{Bz})_2$ -Nonapeptid **122** $13 \times ^{19}\text{F}$ -Atome aufweist. Da beide Peptide in wässrigen Systemen löslich sind, wurde das Star635- $(\text{F}_5\text{Bz})_2$ -Nonapeptid **122**, welches den höchsten Fluorgehalt beinhaltet, ausgewählt. Das Star635- F_5Bz -Octapeptid **121** wurde vorzeitig ausgeschlossen, denn gut aufgelöste NanoSIMS-Aufnahmen resultieren durch ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Demnach gewährleistet der Marker mit dem höheren Isotopengehalt eine höhere Anreicherung in den Biomolekülen und dadurch einen besseren Kontrast. Ferner werden bei biologischen Studien halogenhaltige Kontaminationen an der Oberfläche der Analyten beobachtet. In SIMS-Messungen stellen Kohlenstoff- und Fluor-Verunreinigungen der Silizium-Wafer-Oberfläche, auf die die Proben vor der Messung angebracht werden, ein bekanntes Problem dar.^[217] Der störende Einfluss soll durch die Verwendung des entwickelten Star635- $(\text{F}_5\text{Bz})_2$ -Nonapeptids **122** mit $13 \times ^{19}\text{F}$ -Atomen unterdrückt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird das Nonapeptid **122** als SK155 bezeichnet wird.

4.3.2.2 ^{19}F -Markierung von genetisch kodierten SNARE-Proteinen

Der synthetisierte Biomolekülmarker SK155 (**122**) wurde zur selektiven Markierung von genetisch kodierten SNARE-Proteinen eingesetzt (Abb. 4.23, **A**). Hierzu wurden die Proteine Syntaxin 1 und 13 sowie das SNAP-25 wie zuvor beschrieben (Kapitel 4.3.1.4) jeweils durch Expansion des genetischen Codes mit Propargyl-L-lysin (PRK) an definierter Position modifiziert.²⁵ Nach mehreren Zyklen der Proteinbiosynthese konnten neben unmodifizierten Zellen, Zellen mit dem jeweiligen PRK-SNARE-Protein erhalten werden. Nach chemischer Fixierung wurden die Zellen mit SK155 (**122**) in einer Kupfer(I)-katalysierten HUISGEN-Azid-Alkin-Cycloaddition umgesetzt und eine selektive Verknüpfung erzielt (Abb. 4.23, **B**).

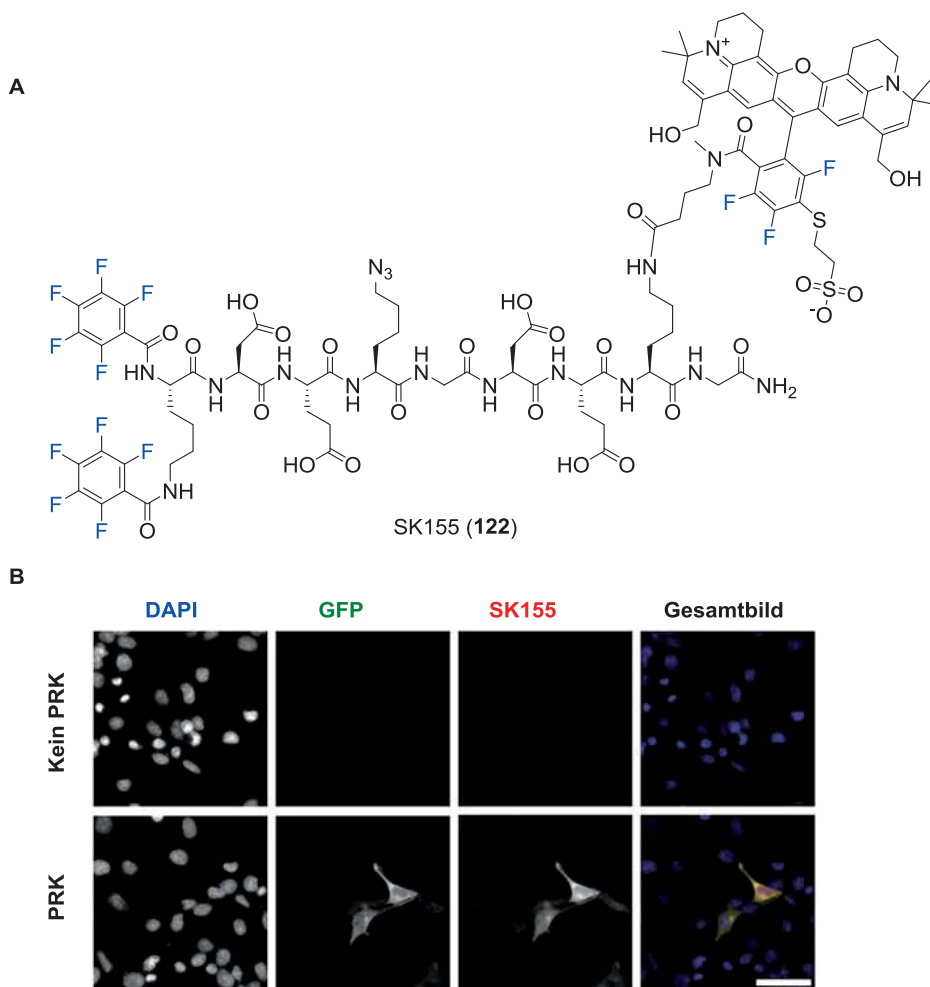


Abbildung 4.23: **A** SK155 (**122**) mit insgesamt $13 \times ^{19}\text{F}$ als Biomolekülmarker. **B** Die Negativkontrolle zeigt Zellen mit SNAP 25, welche kein Alkin tragen (**obere Reihe**). Ausschließlich Zellen mit alkinmodifiziertem SNAP 25-GFP und SK155 (**122**) bilden stabile Triazolkonjugate (**untere Reihe**). Dabei dient DAPI zur Darstellung der gesamten Zellen. GFP ist nur in alkinmodifiziertem SNAP-25 präsent und dient der Visualisierung sowie zur Gegenüberstellung und Evaluation der Markierung mit SK155 (**122**). Maßstabsbalken entspricht 40 μm .

²⁵ Die Markierungsexperimente wurden von I.-C. VREJA und K. KRÖHNERT vom Arbeitskreis Prof. Dr. S. O. RIZZOLI durchgeführt. Die Aufnahmen mit Konfokalmikroskopie wurden von I.-C. VREJA erstellt.

Im weiteren Verlauf erfolgten die NanoSIMS-Messungen²⁶ der Zellen mit SK155-markierten SNARE-Proteinen. Als repräsentatives Beispiel sind die Aufnahmen für SK155-Syntaxin 1 in Abbildung 4.24 (A) dargestellt. Zuvor wurden anhand des SK155-Fluoreszenzsignals (Star635) Aufnahmen mit Konfokalmikroskopie erstellt. Anschließend wurde die Oberfläche des ausgewählten Bereiches in NanoSIMS-Messungen abgetastet und durch die Detektion der $^{19}\text{F}^-$ -Ionen visualisiert. Die Überlagerung der Bilder aus den beiden Verfahren zeigt eine gute Deckung. Da in biologischen Materialien Fluor eine Seltenheit ist, wurde zur Ermittlung der ^{19}F -Anreicherung diese zunächst in unmarkierten Zellen mit $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ -Ionen in Relation gesetzt. Anschließend konnte die ^{19}F -Anreicherung von markierten SNAP 25, Syntaxin 1 und 13 durch den Vergleich der natürlichen und der angereicherten $^{19}\text{F}^-/^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ -Verhältnisse ermittelt werden (Abb. 4.24, B). Für alle drei SK155-modifizierten Proteine wurden signifikant höhere $^{19}\text{F}^-/^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ -Verhältnisse erzielt.

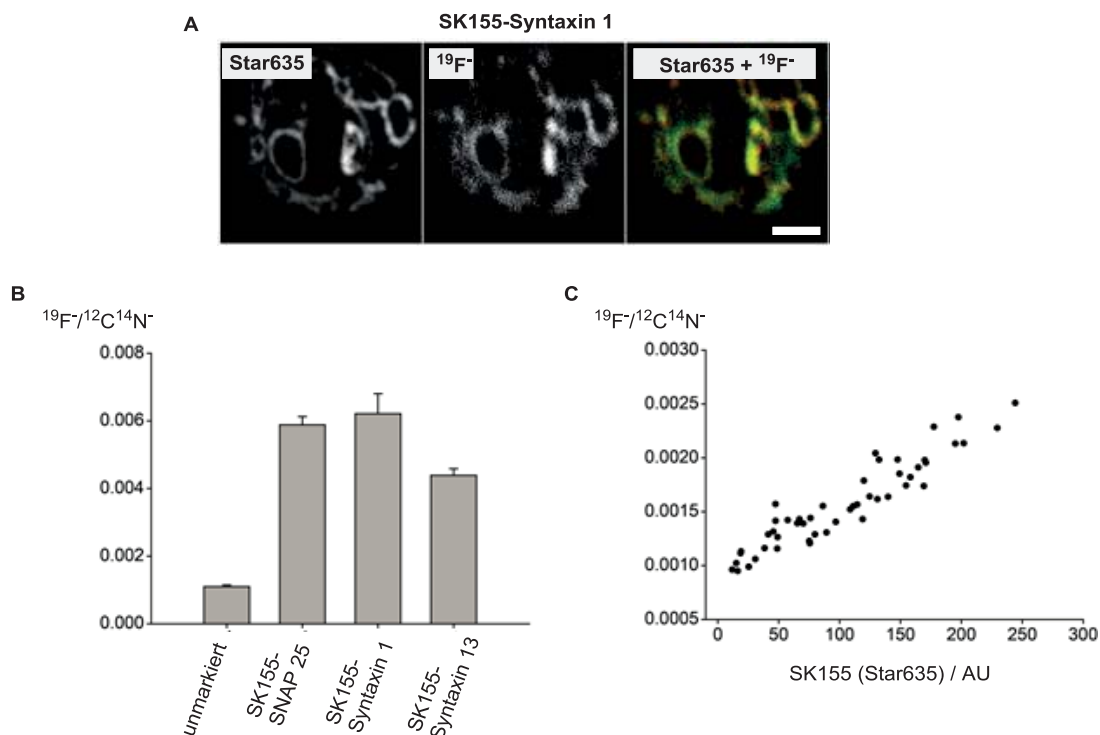


Abbildung 4.24: **A** Das Fluoreszenzbild von einer Zelle mit SK155-Syntaxin-1, ermöglicht durch den Fluoreszenzfarbstoff Star635 in SK155 (**links**). Das resultierende NanoSIMS-Bild durch die Detektion der $^{19}\text{F}^-$ Spezies (**mitte**). Direkte Korrelation durch Überlagerung der beiden bildgebenden Verfahren in guter Übereinstimmung (**rechts**). Maßstabsbalken entspricht 2 μm . **B** Graphische Darstellung des $^{19}\text{F}^-/^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ -Verhältnisses zwischen natürlichen und markierten Zellen anhand der Anzahl der detektierten Ionenspezies in NanoSIMS. Signifikant höhere ^{19}F -Anreicherungen sind im Falle der Zellen mit modifizierten SNARE-Proteinen gegeben. **C** Linearer Zusammenhang zwischen dem $^{19}\text{F}^-/^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ -Verhältnis und der Intensität des Fluoreszenzsignals von SK155 (Star635). Die aufgetragenen Werte sind aus den Datensätzen der gezeigten Bilder in **A**.

²⁶ Von I.-C. VREJA aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. S. O. RIZZOLI und Dr.-Ing. CARMEN HÖSCHEN an einem NanoSIMS 50L Instrument gemessen.

Mit insgesamt $13 \times {}^{19}\text{F}$ -Atomen in SK155 (**122**) konnte ein ausreichender Kontrast in NanoSIMS-Bildern erhalten werden. Denkbare oberflächliche Halogen-Kontaminationen, die durch die Präparation und den umgebenden Bedingungen verursacht werden können, hatten einen geringen Einfluss auf die resultierenden Bilder. Darüber hinaus ermöglicht NanoSIMS, im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie, die Generierung eines Tiefenprofils (Abb. 4.25). Der fokussierte Primärionenstrahl löst beim Abtasten einer definierten Oberfläche Ionen von wenigen Atomschichten heraus. Unter Berücksichtigung der Masse und der Energie der Primärionen sowie der Materialeigenschaften der Probe, kann im Schnitt eine gewisse Tiefe an Ionen herausgeschlagen werden. Somit wurden unter der Annahme, dass beim wiederholten Abtasten einer definierten Oberfläche, jedes Mal dieselbe Volumenmenge herausgelöst wird, mehrere Schichten der Zelle aufgenommen. Die einzelnen Schichten wurden akkumuliert und eine gute Übereinstimmung mit dem Fluoreszenzbild erhalten (Abb. 4.25).

Darüber hinaus wurde der Marker SK155 (**122**) in metabolisch ${}^{15}\text{N}$ -angereicherten Zellen verwendet, welche zusätzlich mit einem genetisch kodierten Protein versehen waren. Zur ${}^{15}\text{N}$ -Anreicherung wurde die Zellkultur mit ${}^{15}\text{N}$ -Leucin inkubiert. Nach mehreren Zyklen der Proteinbiosynthese konnte ${}^{15}\text{N}$ in die neueren Protein-Generationen integriert werden. Nach Markierung mit SK155 (**122**) konnte ${}^{19}\text{F}$ und ${}^{15}\text{N}$ parallel lokalisiert und weitere Informationen erhalten werden.

Durch die Erweiterung des Biomolekülmarkers um ${}^{19}\text{F}$, wird eine Alternative zu ${}^{15}\text{N}$ gegeben.

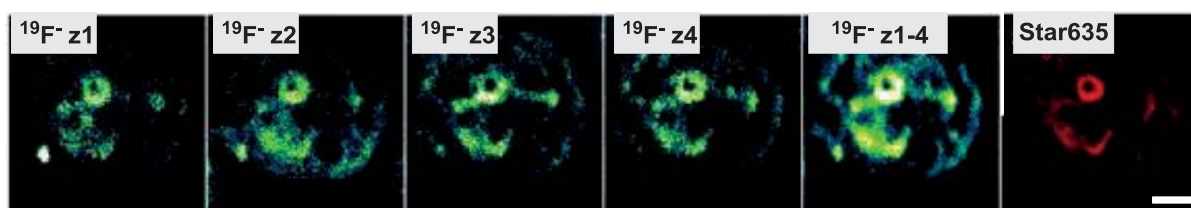


Abbildung 4.25: NanoSIMS-Aufnahmen unterschiedlicher Schichten z1 bis z4 einer Zelle mit **SK155**-Syntaxin 1 sowie die Überlagerung der Schichten z1-4. Zum Vergleich wird das Fluoreszenzsignal (Star635), aus dem Marker SK155 stammend, durch Konfokalmikroskopie gegenüber gestellt. Maßstabsbalken entspricht 2 μm .



5. Markierung von Peptiden mit Sortase A-Erkennungsmotiv

In Prozessen lebender Organismen übernehmen Proteine vielfältige Aufgaben, in denen spezifische nichtkovalente Bindungen, Komplexierungen sowie Protein-Biomolekül-Interaktionen von entscheidender Bedeutung sind. Die Informationen zur Proteinbiosynthese sind im genetischen Material hinterlegt, wobei Mutationen auf der Stufe der Transkription oder Translation pathogene Prozesse einleiten und zur Fehlfaltung von Proteinen führen können. Eine Fehlfaltung führt gewöhnlich zum Verlust der biologischen Aktivität und kann darüber hinaus die Bildung von Aggregaten begünstigen. Die Entstehung von unlöslichen Aggregaten wird bei neurodegenerativen Krankheiten beobachtet, dessen Ursprung entweder ein genetischer Defekt, die umgebenden Bedingungen oder eine Kombination aus beidem sein kann. In diesem Zusammenhang ist das Protein α -Synuclein, dessen Beteiligung im aggregierten Zustand bei der Parkinson-Krankheit diskutiert wird, Gegenstand aktueller Forschung. Zweige der Biologie nutzen zum Verständnis dieser komplexen Vorgänge biophysikalische Methoden, wie die Fluoreszenzmikroskopie, welche in erster Linie zur Lokalisierung der zellulären Proteine genutzt wird, um daraus Rückschlüsse auf deren Verteilung zu ziehen und molekulare Mechanismen abzuleiten. Die Visualisierung durch Fluoreszenzmikroskopie erfordert eine Markierung der Zielmoleküle mit Fluorophoren, welche als breites Sortiment kommerziell erhältlich sind. Ein wichtiger Aspekt ist die Art der Einführung, die auf unterschiedlichen Reaktionswegen erfolgen kann. In diesem Kapitel wird ein Überblick über die spezifischen Reaktionen zur Inkorporation von Fluoreszenzfarbstoffen gegeben (Kapitel 5.1), auf die Sortase A-vermittelte Ligation eingegangen (Kapitel 5.2) und die Synthese markierter Peptide mit Sortase A-Erkennungsmotiv präsentiert (Kapitel 5.3), welche in zukünftigen Experimenten zur Markierung von α -Synuclein-Immunkonjugaten verwendet werden sollen.



5.1 Einführung von Fluorophoren in Biomoleküle

Zur Ermöglichung von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, in denen komplexe biologische Fragestellungen, wie Protein-Protein-Interaktionen, adressiert werden, müssen Fluorophore an die Biomoleküle angebracht werden, um einen ausreichenden Kontrast zwischen diesen und der zellulären Gesamtheit zu erhalten. Eine große Anzahl an Fluorophoren mit hohen Quantenausbeuten im UV und sichtbaren Bereich wurden entwickelt, welche neben optimierten Eigenschaften, eine selektive und schnelle Umsetzung mit hohen Ausbeuten gewährleisten sollen.^[218,219] Um einen größtmöglichen Satz an Informationen aus dem bildgebenden Verfahren zu erhalten, ist es hilfreich die Reaktionsart zur Einführung der Fluorophore und ihre Anzahl pro Biomolekül zu kennen. Dabei kann die Art der Einführung auf genetischer, chemischer (kovalent, nichtkovalent) und enzymatischer Weise erfolgen, so dass eine Vielzahl an Strategien entwickelt wurden und ein hoher Bedarf an weiteren besteht, um leicht zugänglichere Ausgangsmaterialien, mildere Bedingungen und neben *in vitro* auch *in vivo* Studien zu ermöglichen.^[25] Ein wichtiges Kriterium hierbei ist, dass die strukturelle Organisation der Biomoleküle sowie ihre natürliche Funktion nicht beeinträchtigt werden darf.

Ein großes Repertoire bietet die chemische Markierung, in der Modifikationen auf unterschiedliche Reaktionsarten erfolgen können (Abb. 5.1).^[25] Fluorophore mit Amin-, Thiol- und Hydroxy-reaktiven Funktionalitäten erlauben eine einfache Umsetzung.^[25,220,221] Allerdings verlaufen diese Reaktionen nicht chemoselektiv, so dass ohne Differenzierung der Positionen, alle zugänglichen Amin-, Thiol- und Hydroxygruppen im Biomolekül angegriffen werden (Abb. 5.1, A–C). Demzufolge ist eine Quantifizierung der Anzahl an Fluorophoren nicht möglich und die Struktur und Funktion des Proteins gefährdet. Diese reaktiven Fluorophore eignen sich viel mehr für die Markierung von Vorläufermolekülen oder erst nach Fixierung der Zellen *in vitro*, wodurch ein momentaner Zustand festgehalten wird und die Einführung einen geringeren Einfluss auf die Biomoleküle haben kann.

Soll die Modifikation an einer bestimmten Position im Protein erfolgen, werden rekombinante Techniken eingesetzt, speziell die Expansion des genetischen Codes (Kapitel 3.3), in der eine unnatürliche Aminosäure ortsspezifisch eingeführt und durch die Kombination mit einem bioorthogonalen Fluorophor über eine chemoselektive Reaktion verknüpft wird.^[222] Dabei sind bekannte Beispiele für unnatürliche Aminosäuren jene mit Azidgruppen an den Seitenketten, welche mit einem alkintragenden Fluorophor über eine Kupfer(I)-katalysierte HUISGEN-Azid-Alkin-Cycloaddition verknüpft werden (Abb. 5.1, D).^[25,223–225] Der inverse Fall ist ebenfalls möglich. Die kupferfreie Variante wurde von BERTOZZI eingeführt, indem die Verknüpfung durch gespannte Cycloalkine über spannungsgetriebene Azid-Alkin-Cycloaddition (*strained-promoted azide-alkyne cycloaddition*, SPAAC) erreicht wird.^[25,213,226] Eingeführte Azidfunktionalitäten können darüber hinaus mit einem Phosphin-aktiviertem Fluorophor durch eine STAUDINGER-Ligation verbunden werden (Abb. 5.1, E).^[25,227,228] Des Weiteren wird durch die gezielte Inkorporation von gespannten Cycloalkanen oder -alkinen in Biomolekülen, zusammen mit einem Dienophil, wie *s*-Tetrazin-verknüpftes Fluorophor, die Markierung über eine inverse DIELS-ALDER-Reaktion realisiert (Abb. 5.1, F).^[25,229,230]

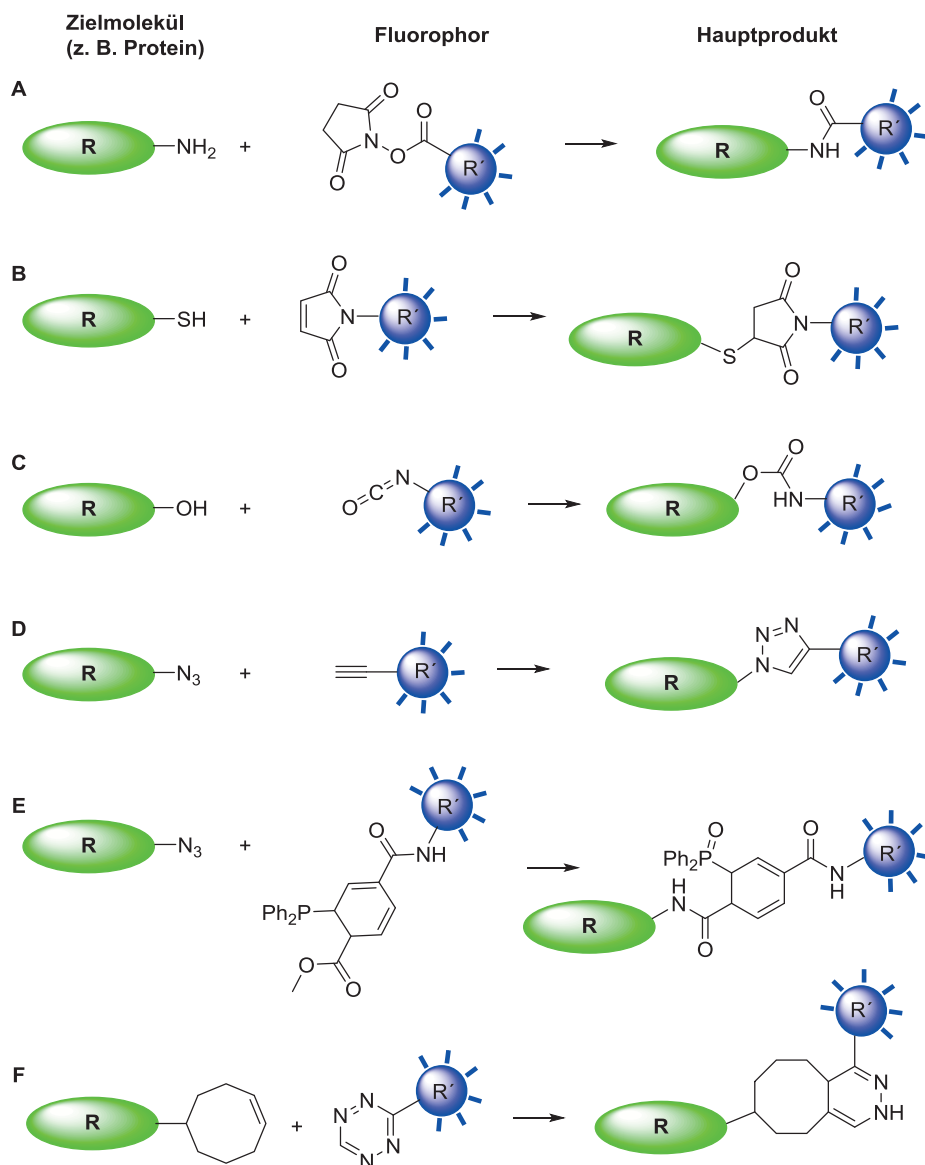


Abbildung 5.1: Chemische Reaktionen zur Markierung von Biomolekülen mit Fluorophoren.^[25] **A** Reaktiver Fluorophor-NHS-Ester reagiert selektiv mit Aminen.^[25,220] **B** Fluorophor-Maleimid reagiert selektiv mit Thiolgruppen.^[25,220] **C** Hydroxygruppen können mit Isocyanat-tragenden Fluorophoren umgesetzt werden.^[25,221] **D** Azidmodifiziertes Protein wird chemoselektiv mit alkintragendem Fluorophor durch eine Kupfer(I)-katalysierte HUISGEN-Azid-Alkin-Cycloaddition verbunden.^[25,223–225] **E** Alternativ kann das Azid mit Phosphin-tragendem Fluorophor in einer STAUDINGER-Reaktion ligiert werden.^[25,227,228] **F** Durch die Einführung von *trans*-Cyclooctin können *s*-Tetrazin-funktionalisierte Fluorophore über inverse DIELS-ALDER-Reaktion verknüpft werden.^[25,229,230] Die verwendeten Abkürzungen sind wie folgt definiert: R = Biomolekül (z. B. Protein) und R' = Fluorophor.



Enzymatische Methoden können genutzt werden, um sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Markierungen zu ermöglichen.^[27,231–233] Sie finden wegen ihrer Schnelligkeit, Effizienz und Selektivität breite Anwendung, vor allem in Immunassays, in denen Proteine durch Antikörper/Antigen-Bindungen immobilisiert werden sollen.^[25] Dabei werden im Vergleich zu anderen Methoden Fluorophore mit einer höheren Sensitivität, gleichbedeutend mit einem höheren Signal-zu-Rausch-Verhältnis, angebracht.^[25,234] Aufgrund ihrer Spezifität erlauben sie Modifikationen an definierten Positionen, welche zuvor mittels standardisierten molekularen Klontechniken mit Enzym-Erkennungseinheiten versehen werden.^[235] Sortase A ist neben einer Reihe anderer bekannter Enzyme, gut untersucht und findet Verwendung in diversen Markierungs- und Ligationsexperimenten.^[27] Dabei katalysiert das Enzym unter physiologischen Bedingungen die Verknüpfung von Biomolekülen mit anderen Substanzen, beispielsweise Fluorophoren, und stellt aufgrund der Generierung einer natürlichen Peptidbindung eine Alternative zur *native chemical ligation* (NCL) dar.^[27,236] Im weiteren Verlauf wird auf das Enzym Sortase A und ihre Funktion näher eingegangen (Kapitel 5.2).

5.2 Sortase A-vermittelte Ligationen

Sortasen sind membrangebundene Enzyme aus grampositiven Bakterien²⁷, welche als Transpeptidasen die kovalente Verankerung von spezifischen Proteinen mit der Zellwand ermöglichen.^[237] Die Zellwand der grampositiven Bakterien besteht aus Peptidoglycanen, einem sich wiederholenden Disaccharid aus *N*-Acetylmuraminsäure und *N*-Acetylglucosamin. Die für die Zellwandbiosynthese essentiellen Sortasen werden in vier Klassen aufgeteilt, Sortase A–D, wobei Sortase A eine größere Protein-Substrat-Erkennung aufweist.^[26] Sortase A aus dem *Staphylococcus aureus* ist als Modellsystem intensiv erforscht und die Sulfhydrylgruppe in Position 184 durch einen Alanin-Austausch als aktive Seitenkette identifiziert worden.^[231,238]

Die Transpeptidase-Reaktion verläuft in zwei Stufen, in der zunächst die Sulfhydrylgruppe der Sortase A ein C-terminales Protein mit dem Erkennungsmotiv Leucin-Prolin-Xaa-Threonin-Glycin zwischen Threonin und Glycin spaltet.^[26,238] Die Spaltung erfolgt durch den Angriff des Thiols an die Carbonylgruppe des Threonins unter Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediates. Hierbei ist wichtig, dass das C-terminale Glycin keine freie Carboxylgruppe besitzt während Xaa eine beliebige Aminosäure sein kann. Im zweiten Schritt beteiligt sich das membrangebundene *N*-terminal freie Pentaglycin-Lipid II, welches ein Vorläuferbaustein der Peptidoglycane darstellt. Dabei greift die freie *N*-terminale Aminofunktion nucleophil den Thioester des Acyl-Enzym-Intermediates an, infolge dessen Sortase A regeneriert und eine Amidbindung zwischen Protein und Lipidanker erzielt wird.

Die einfache Expression von Sortase A aus *E. coli*, die Durchführung der Transpeptidase-Reaktion unter physiologischen Bedingungen und die Generierung einer nativen Peptidbindung führte zu ihrer Übertragung und Verwendung als biotechnologisches Hilfsmittel.^[27] Über eine Sortase A-vermittelte Ligation werden *N*-terminal modifizierte Proteine selektiv mit einem LPXTG-Zielmolekül verknüpft (Abb. 5.2).^[26] Dabei können Zielmoleküle mit Festphasen-Peptidsynthese hergestellte Peptidfragmente sein, Fluorophore oder Isotope beinhalten sowie aus anderen Biomolekülen wie Lipiden, Nukleinsäuren sowie Kohlenhydraten aufgebaut sein. Die Umkehrung der Sortase A-reaktiven Enden ermöglicht Proteinen die C-terminale Verknüpfung.^[235] Ferner kann mit dieser Methode *N*-*N*- und *C*-*C*-terminale Ligation durchgeführt und chimäre Proteine erzeugt werden.

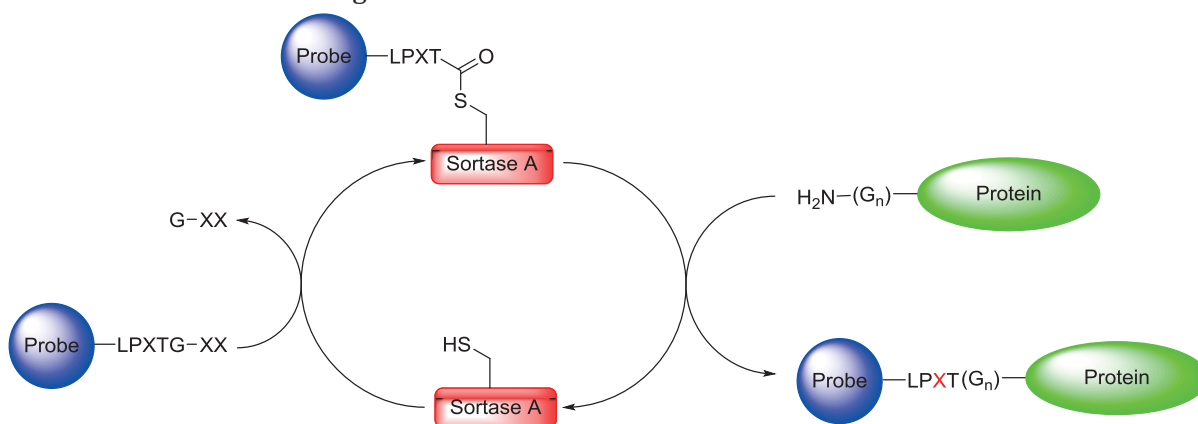


Abbildung 5.2: Selektive Markierung von *N*-terminal modifizierten Proteinen mit einer Sortase A-Erkennungseinheit-tragenden Probe.^[26] Dabei steht X für eine beliebige Aminosäure.

²⁷ Bakterien werden aufgrund ihrer Färbung nach GRAM^[261] in zwei Klassen unterteilt, grampositive und gramnegative. Dabei werden unter dem Lichtmikroskop unterschiedliche Färbungen in Abhängigkeit der bakteriellen Membrandicken beobachtet. Grampositive Bakterien besitzen eine mehrschichtige Mureinhülle, während gramnegative eine dünnere, einschichtige Mureinhülle aufweisen.

werden, indem die Carboxylgruppe des Biotins zuvor aktiviert und zum *N*-terminal entschützten Peptid (**123**) auf fester Phase zugesetzt wird. Da nach Abspaltung des Peptids vom Trägermaterial auch simultan alle Schutzgruppen entfernt werden, kam eine Verknüpfung in Lösung aufgrund von möglichen Nebenreaktionen nicht in Frage. Das *N*-terminal Fmoc-entschützte Peptid (**124**) wurde eingesetzt und durch manuelle Mikrowellen-Aktivierung unter milden Bedingungen ähnlich einer Cys-Kupplung (10 min, 40 °C, 20 W) mit dem aktivierten Biotin zur Reaktion gebracht (Abb. 5.4). Nach Aufreinigung mittels HPLC konnten 43% des Biotin-verknüpften Peptids **125** erhalten werden.

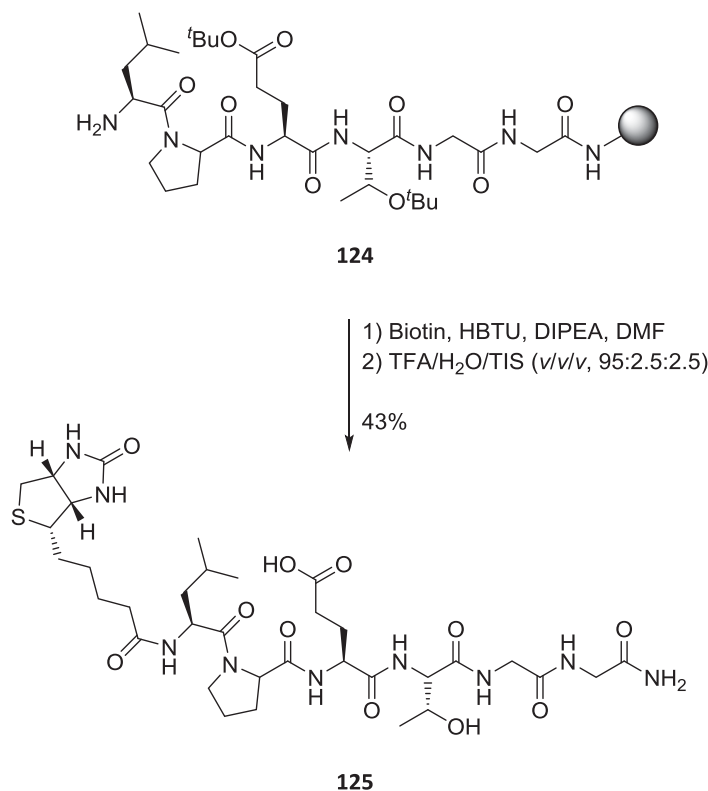


Abbildung 5.4: Synthese von Biotin-LPETGG-NH₂ (**125**)^[26] gefolgt von saurer Abspaltung vom Trägermaterial.

Zusätzlich wurde LPETGG-NH₂ (**123.1**) an *N*-terminaler Position mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen. Hierzu wurden zwei kommerziell erworbene aminreaktive Farbstoffe, Atto647N-NHS-Ester und Star635-NHS-Ester, zur Verfügung gestellt. Beide Farbstoffe besitzen ähnliche Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften jedoch mit strukturellen Unterschieden und Löslichkeitseigenschaften.^[243–245] Während das hydrophobere Atto647N aus einem Gemisch zweier Isomere mit identischen Eigenschaften besteht und nach Anbringen an das Zielmolekül eine positive Ladung trägt, ist das hydrophilere Star635 nach außen hin aufgrund der gleichzeitigen Anwesenheit von positiver und negativer Ladung neutral. Für die Verknüpfung des Peptids **123.1** mit den Farbstoffen wurde die Funktionalisierung auf fester Phase ausgewählt. Dazu wurde das *N*-terminal entschützte Peptid **124** gebunden an fester Phase in zweifachem Überschuss eingesetzt und in Gegenwart des jeweiligen Farbstoffes sowie DIPEA in DMF zur Reaktion gebracht (Abb. 5.5). Die Reaktion wurde unter Lichtausschluss bei



Raumtemperatur über Nacht durchgeführt. Nach sorgfältigem Waschen des Harzes, welches die jeweilige Farbe der Farbstoffe angenommen hatte, erfolgte die Abspaltung vom Trägermaterial durch die Zugabe von TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5, v/v/v) für 2 h bei Raumtemperatur.

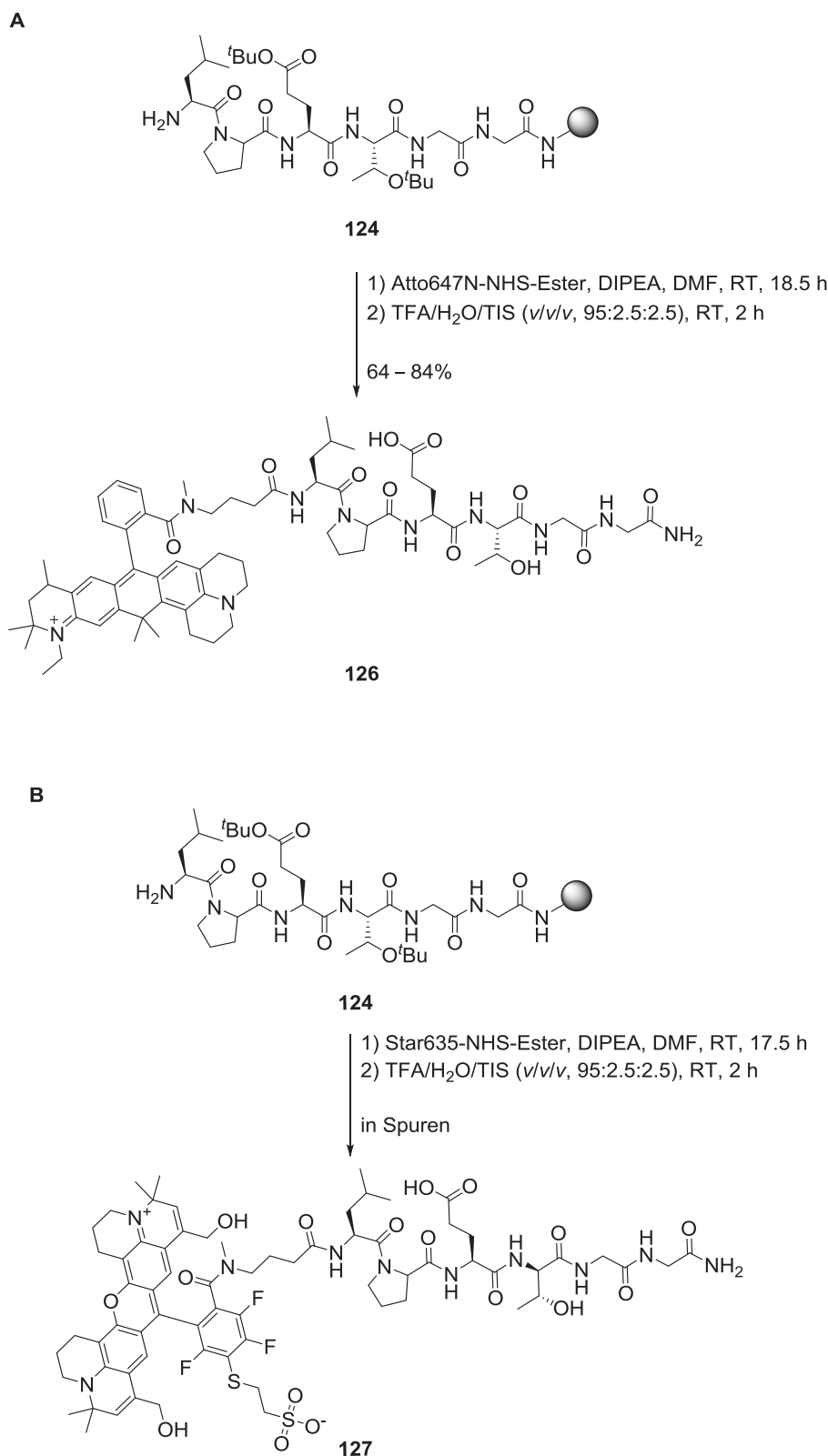


Abbildung 5.5: Synthese von Fluorophor-verknüpften LPETGG-NH₂. **A** Atto647N-LPETGG-NH₂ (**126**) und **B** Star635-LPETGG-NH₂ (**127**).

Nach Vorbehandlung erfolgten die Analysen mittels HPLC und Massenspektrometrie (ESI-MS, HR-MS). Die Produktbildung wurde für Atto647N-LPETGG-NH₂ (**126**) eindeutig bestätigt, während Star635-LPETGG-NH₂ (**127**) nur in Spuren erhalten wurde. Eine mögliche Ursache für die geringen Mengen an Star635-LPETGG-NH₂ (**127**) könnten die notwendigen harschen Abspaltbedingungen vom Trägermaterial sowie die Abwesenheit eines thiolbasierten Radikalfängers sein. Eventuell waren hier reaktivere, thiolhaltige Radikalfänger aufgrund der Präsenz von Schwefelatomen in Star635-NHS-Ester notwendig. Thiolhaltige Radikalfänger werden üblicherweise in der Abspaltlösung von thiolhaltigen Aminosäuren (Cystein und Methionin) verwendet.^[198] Die Reaktion wurde nicht erneut wiederholt, sondern der Fokus auf Atto647N-LPETGG-NH₂ (**126**) gelegt, welches erfolgreich synthetisiert und isoliert werden konnte. Bei der Herstellung von Atto647N-LPETGG-NH₂ (**126**) ist zu erwähnen, dass ein Heraufsetzen des Maßstabes auf ein vierfaches zu einer Erniedrigung der Ausbeute zur Folge hatte.

Die für die Erkennung in Sortase-A-vermittelten Reaktionen notwendigen Peptide LPETGG-NH₂ (**123.1**), Biotin-LPETGG-NH₂ (**125**) und Atto647N-LPETGG-NH₂ (**126**) wurden übergeben und sollten über ortsspezifische N-terminale Markierung von α -Synuclein unter Verwendung von *Staphylococcus aureus* Sortase A eingesetzt werden. Das Fluorophor-verknüpfte Atto647N-LPETGG-NH₂ (**126**) soll nach Ligation immunocytochemische Lokalisation von α -Synuclein mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen. Alternativ soll Biotin-LPETGG-NH₂ (**125**) zur Markierung des Proteins eingesetzt werden, um nach zellulärer Organisation die spezifische Affinität von Biotin zu Fluorophor-markiertem Streptavidin auszunutzen und das Fluoreszenzsignal^[246–248] zu verstärken.



6. Zusammenfassung

Durch molekulare Selbstorganisation werden in natürlichen Systemen aus einfachen Bausteinen komplexe Überstrukturen gebildet, denen je nach Biomolekülklasse unterschiedliche Funktionen aufgetragen werden.^[51,99] Zu diesen Makromolekülen gehören unter anderem die Proteine, die in ubiquitären Prozessen des Lebens vielfältige Aufgaben bewerkstelligen.^[1,2] Es ist von interdisziplinärem Interesse, die Vorgänge, in denen Proteine involviert sind, zu verstehen und zu steuern. Diesbezüglich wurde eine Vielzahl an Strategien ausgearbeitet und verfolgt.^[10,104,115] Der zentrale Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Erforschung und Entwicklung von peptidischen Strukturen und kann in zwei Teilbereiche eingeteilt werden. Zum einen wurden artifizielle Systeme generiert, um natürliche Proteine nachzuahmen und Strukturen mit neuartigen Eigenschaften zu erhalten. Zum anderen wurden durch die Synthese peptidischer Marker die Anforderungen für den Einsatz von bildgebenden Verfahren zur zellulären Lokalisierung von Proteinen erfüllt.

Demzufolge wurde im zweiten Kapitel ein künstliches porenbildendes Modellsystem vorgestellt, welches erstmalig aus der molekularen Selbstorganisation von Cyanursäure (CYA)- und Triaminotriazin (TAT)-funktionalisierten β^3 -Peptiden erhalten wurde. Hierzu wurden zunächst unterschiedliche Fmoc-geschützte CYA- und TAT-funktionalisierte β^3 -Aminosäuren hergestellt. Dabei wurde der Abstand zwischen β -Peptidrückgrat und den Erkennungseinheiten variiert, um den Einfluss des Abstandes bei der Generierung von Überstrukturen zu evaluieren (Abb. 6.1).

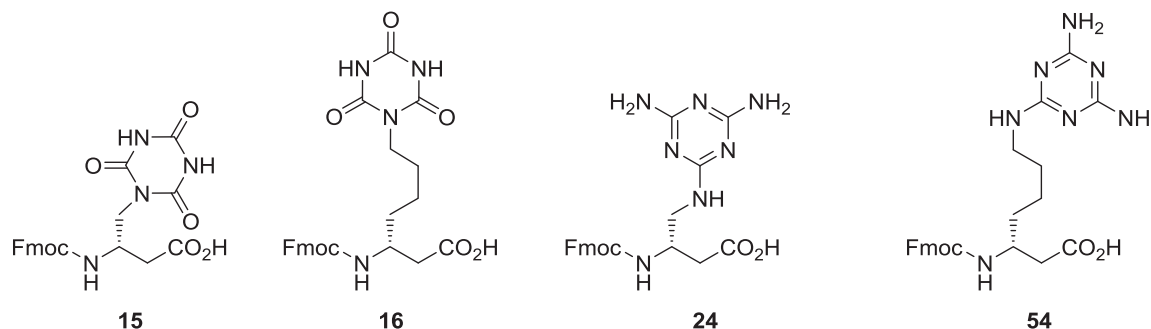


Abbildung 6.1: Synthetisierte Fmoc-geschützte CYA- und TAT-funktionalisierte β^3 -Aminosäuren.

Durch gezielte sequentielle Anordnung der β^3 -Aminosäuren sollte eine 14-helikale Sekundärstruktur erhalten werden, in der jede dritte Seitenkette funktionalisiert mit den Erkennungseinheiten CYA und TAT übereinander zu liegen kommt. So konnten die Verbindungen Fmoc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**15**), Fmoc-D- β^3 -hLys(CYA)-OH (**16**) und Fmoc-D- β^3 -hLys(TAT)-OH (**54**) über Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) nach Fmoc-Protokoll erfolgreich inkorporiert werden, während der Monomerbaustein Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**) aufgrund seiner geringen Löslichkeit unter den standardisierten Bedingungen der SPPS nicht eingebaut werden konnte (Abb. 6.2). Die Richtigkeit der Sequenzen wurde mit massenspektrometrischen Analysen bestätigt und eine hohe Reinheit durch die Reinigung mittels HPLC erzielt. Die einzelnen β^3 -Decapeptide **56**, **57** und **58** wurden in Voranalysen auf ihre 14-helikalen Organisationen in wässrigen Lösungen (pH = 7.4) mittels CD-Spektroskopie überprüft.

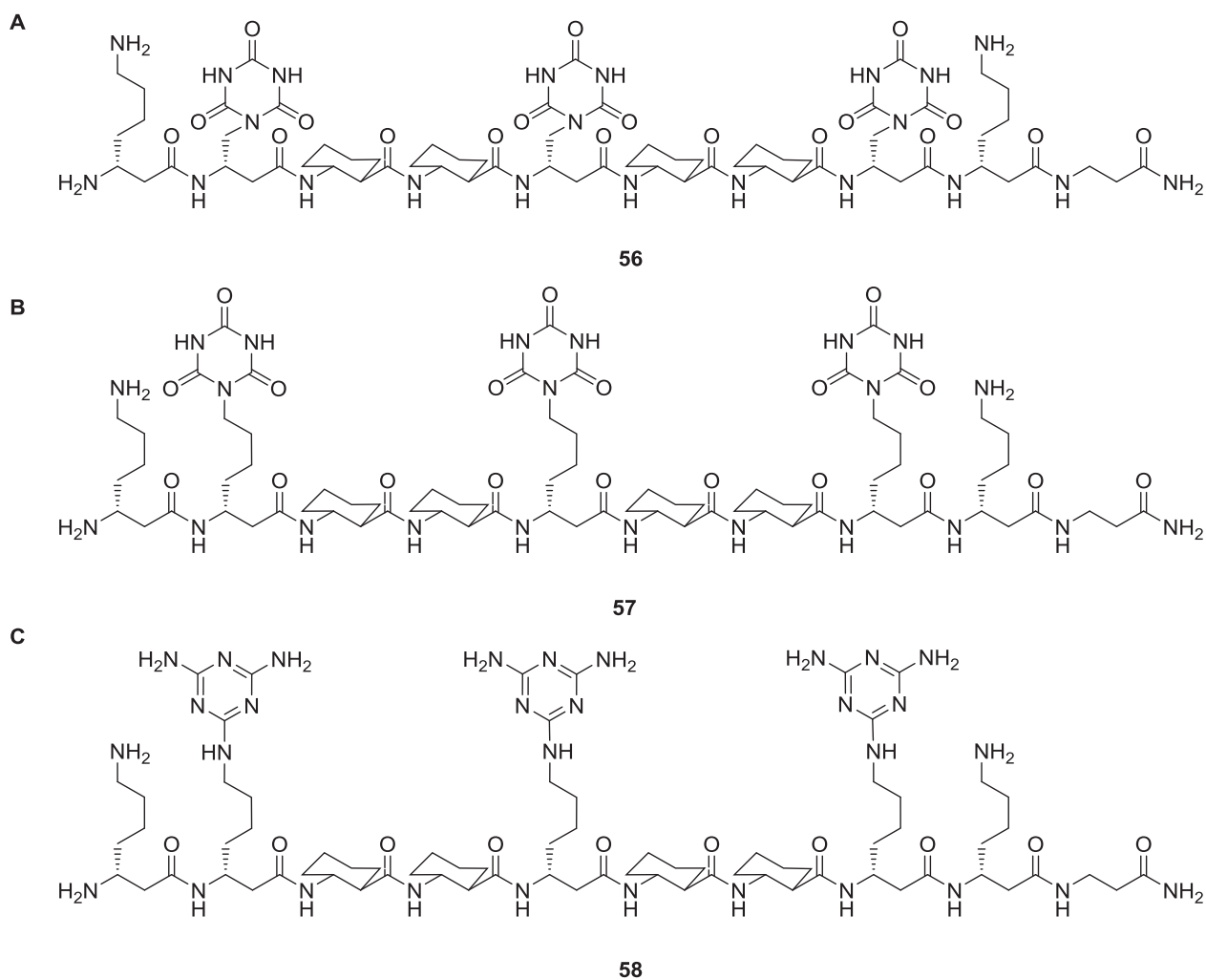


Abbildung 6.2: Synthetisierte CYA- und TAT- β^3 -Decapeptide, welche in Aggregationsstudien verwendet wurden.

Im Anschluss wurden diese in massenspektrometrischen Untersuchungen (ESI-MS) auf ein Selbstaggregationsverhalten hin untersucht und darauffolgend äquimolare Mischungen der Decapeptide **56** + **58** (**66**) sowie **57** + **58** (**67**) analysiert. Während aus der Mischung **56** + **58** die hexamere Topologie **66** nicht bestätigt werden konnte, wurde aus der Mischung **57** + **58** die Überstruktur **67** eindeutig identifiziert. Des Weiteren wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) für die einzelnen Peptide sowie für die äquimolaren Mischungen angewandt. Die DLS-Messungen ergaben für die einzelnen Peptide in wässrigen Lösungen (pH = 7.4) jeweils dieselben Größenordnungen der Partikeldurchmesser. Im Gegensatz zu der äquimolaren Mischung **56** + **58** konnten für **57** + **58** die erwarteten Größenordnungen der Partikeldurchmesser unter vollständigem Verbrauch der einzelnen Peptidstränge erhalten werden. Weiterführend wurden für beide Mischungen konzentrations- und zeitabhängige UV- und CD-Spektren sowie temperaturabhängige CD-Spektren aufgenommen, um primär Hinweise auf die Löslichkeit der Aggregate zu erhalten. Das Aggregat **67**, dessen molekulare Selbstorganisation mit Hilfe von ESI-MS und DLS-Experimenten bestätigt wurde, zeigte, in Relation zu den Einzelsträngen gesetzt, keine bis minimale Veränderungen in den UV- und CD-Spektren, was ein Indiz auf lösliche Aggregate sein kann. Somit eignet sich das beschriebene

supramolekulare Aggregat **67** für weitere Untersuchungen, in denen die Länge bei gleichbleibender Sequenzabfolge der einer Modellmembran angepasst wird. Dadurch soll dem Aggregat **67** die Möglichkeit zum Durchdringen der Membran gegeben werden und in biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen seine Fähigkeit als künstliches porenbildendes System überprüft werden.

In Kapitel 3 wurden Cyclo- β^3 -Tripeptide als geeignete Template für diverse strukturelle und funktionelle Eigenschaften aufgezeigt und ihre selbstaggregierende Neigung zu tubulären Strukturen für biologische und materialwissenschaftliche Anwendungen erwähnt.^[19,20] Die literaturbekannte Synthese des Cyclo- β^3 -Tripeptids (**69**) wurde von der festen Phase^[19] in die Lösung übertragen, um so, zur weiteren Funktionalisierung, größere Mengen als die Festphasen-Peptidsynthese im Labormaßstab ermöglicht, zu realisieren. Das Cyclopeptid wurde in beiden Fällen erst durch lineare Peptidpropagation in acyclischer Form hergestellt, wobei in Lösung 4-Methoxyphenylhydrazin als C-terminale Schutzgruppe verwendet wurde. Die finale N-zu-C-terminale Cyclisierung erfolgte für beide Strategien nach C-terminaler Aktivierung und lieferte vergleichbare Ausbeuten und isolierte Mengen. Die Herstellung in Lösung ermöglichte im Gegensatz zur festen Phase eine höhere Kupplungseffizienz und führte infolge verringerter Äquivalente der Reaktanden und Reagenzien zu minimierten Materialkosten. Dabei erforderte die Reinigung der Zwischenschritte keine aufwendigen chromatographischen Verfahren und bestand lediglich aus Fällungen aus der Lösung. Weiterführend konnten in Lösung Gramm-Maßstäbe der acyclischen Form realisiert werden, die gelagert und bei Bedarf zum Cyclopeptid umgesetzt werden können. Somit wurde ein alternativer Zugang zur Generierung von trifunktionalen Cyclo- β^3 -Peptiden aufgezeigt.

Des Weiteren wurde in Kapitel 4 die zunehmende Anwendung der bildgebenden Massenspektrometrie, speziell der Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS), für zellbiologische Studien beschrieben und die Notwendigkeit von selektiven Markern zur Differenzierung einzelner Proteine aus der zellulären Gesamtheit aufgezeigt. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe RIZZOLI wurde die Methode „spezifische Isotopen- und Fluoreszenzmarkierung von Proteinen“ (*specific protein isotopic and fluorescence labelling*, SPILL) eingeführt und es wurden im Rahmen dieser Arbeit peptidische Biomolekülmarker basierend auf unnatürlichen Anteilen an Isotopen (^{15}N und ^{19}F) entwickelt. Als ^{15}N -Biomolekülmarker wurde die neuartige Verbindung $^{15}\text{N}_6$ -TriazGly-OH (**97**) aus einfachen und isotopenreinen Ausgangsmaterialien aufgebaut, welche im Anschluss ähnlich einer Aminosäurekupplung während der SPPS in die Peptide integriert werden konnte (Abb. 6.3). Das negativ geladene und azidtragende Nonapeptid TriazNF1 (**115**) mit $14 \times ^{15}\text{N}$ -Isotopen zeigte in zellulären Experimenten eine hohe Spezifität für alkinmodifizierte SNARE-Proteine über die Bildung von Triazol-Konjugaten durch Kupfer(I)-katalysierte HUISGEN-Azid-Alkin-Cycloaddition. Die TriazNF1-markierten SNARE-Proteine konnten durch SIMS lokalisiert werden. Zur direkten Korrelation von SIMS und Fluoreszenzmikroskopie enthielt TriazNF1 (**115**) den Fluorophor Star635. Mit TriazNF1 (**115**) wurde die Möglichkeit zur selektiven isotopischen Markierung genetisch kodierter Proteine sowie ihre Lokalisierung durch SIMS gegeben. Weiterführend wurde das negativ geladene Grundgerüst von TriazNF1 übernommen und durch den Austausch von $^{15}\text{N}_6$ -TriazGly-Einheiten gegen 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoesäure eine ^{19}F ($13 \times$) angereicherte Version **122** erhalten. Analoge Markierung zellulärer genetisch kodierter SNARE-Proteine gefolgt von SIMS und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigten auch hier die selektive Einführung und führten zur Lokalisierung der zellulären Proteine. Somit konnte das

Repertoire von selektiven Biomolekülmarkern für SPILL-basierte Ansätze um ^{19}F -angereicherte Verbindungen erweitert werden.

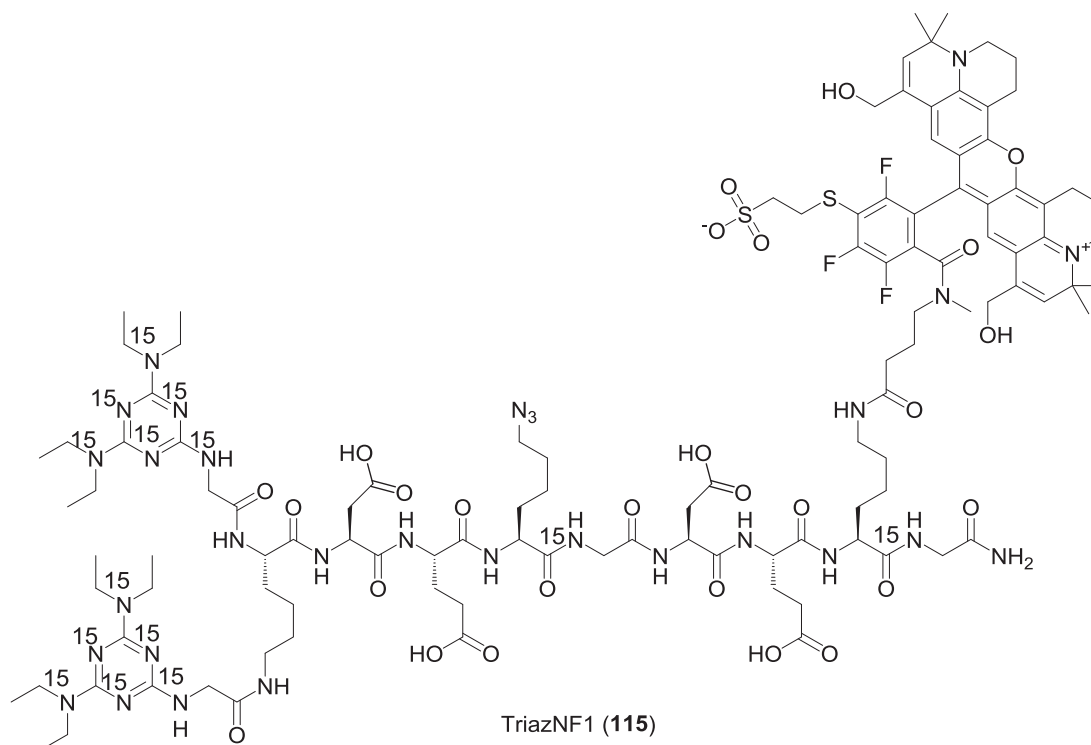


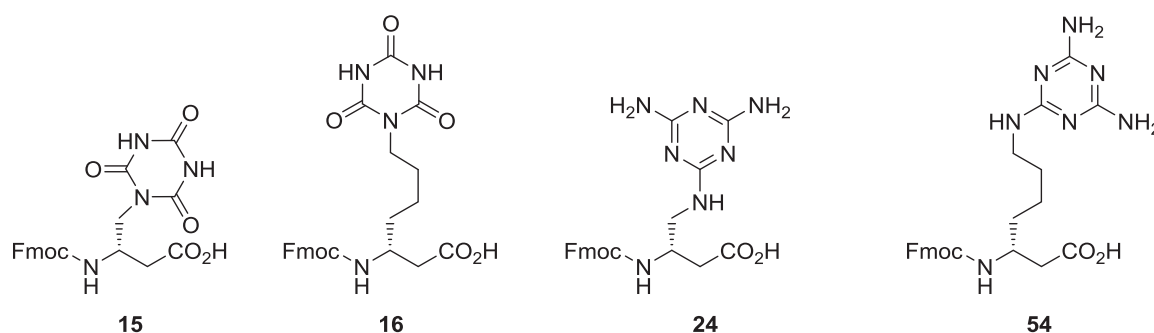
Abbildung 6.3: TriazNF1 (115) mit insgesamt $14 \times ^{15}\text{N}$ als chemoselektiver Biomolekülmarker für SPILL-basierte Ansätze.

Abschließend wurde in Kapitel 5 berichtet, wie die bekannte Sortase A-Erkennungseinheit mit der Sequenz LPETGG (**123**)^[26] hergestellt und mit dem Fluorophor Atto647N oder einem Biotin^[26] verknüpft wurde. Die so modifizierten Erkennungseinheiten wurden im Rahmen einer Kooperation der Arbeitsgruppe RIZZOLI übergeben. In einer Sortase A-vermittelten Reaktion soll das Protein α -Synuclein, gebunden an einen sekundären Antikörper, mit dem Fluorophor verknüpft werden, um α -Synuclein in immunocytochemischen Experimenten zu lokalisieren. Die Entstehung unlöslicher Fibrillen aus α -Synuclein wird im Zusammenhang von neurodegenerativen Krankheiten diskutiert.^[239,241] In zukünftigen Zellstudien soll gezielt die aggregierte Form von α -Synuclein visualisiert werden, um Informationen über ihr Aggregationsverhalten im Zusammenhang mit den getesteten Bedingungen zu erzielen.

7. Summary

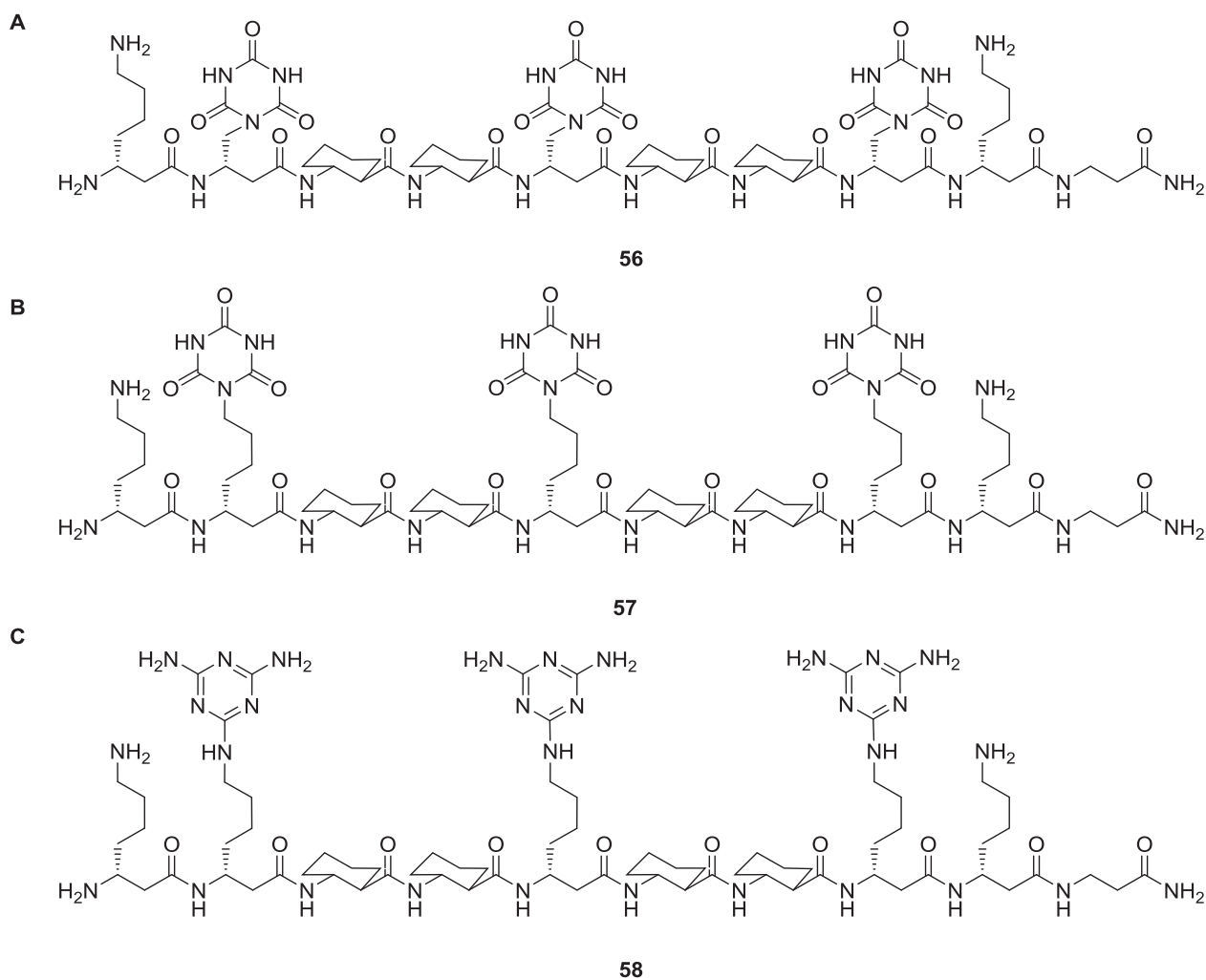
In natural systems complex supramolecular structures arise from simple building blocks through molecular self-organisation, which have different functions depending on the type of biomolecule.^[51,99] Proteins are such macromolecules, which are involved in essential processes of living systems by accomplishing diverse tasks.^[1,2] It is of interdisciplinary interest to understand and control processes involving proteins, therefore a large number of strategies are developed and followed.^[10,104,105] The main idea behind this work was the investigation and development of peptide structures and can be divided in two sub-areas. The first part includes the generation of artificial systems to mimic natural proteins and create special features. The second part concentrates in providing access to synthetic peptide labels fulfilling the requirements for the localisation of cellular proteins through imaging techniques.

According to this, in the second chapter an artificial pore-forming model system was presented for the first time from the molecular self-organisation of cyanuric acid (CYA)- und triaminotriazine (TAT)-functionalised β^3 -peptides. At the first instance, different Fmoc-protected CYA- and TAT-modified β^3 -amino acids were synthesized, which varied by the distance between β -peptide backbone and recognition unit in order to evaluate its influence in generating higher-ordered structures (scheme 6.1).



Scheme 6.1: Synthesized Fmoc-protected CYA- and TAT-functionalized β^3 -amino acids.

Through specific sequential arrangement of the β^3 -amino acids a 14-helical secondary structure should be obtained, in which every third side chain is directed on top of each other and functionalised with the recognition units either CYA or TAT. Therefore, the compounds Fmoc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**15**), Fmoc-D- β^3 -hLys(CYA)-OH (**16**) and Fmoc-D- β^3 -hLys(TAT)-OH (**54**) could be successfully implemented into peptides by solid phase peptide synthesis (SPPS) applying Fmoc protocol, while the building block Fmoc-D- β^3 -hDap(TAT)-OH (**24**) could not be introduced, due to its poor solubility under standard conditions of SPPS (scheme 6.2). The conformational accuracy of the peptides was confirmed by mass spectrometry and a high purity was gained by purification via HPLC. By using CD-spectroscopy the single β^3 -decapeptides **56**, **57** and **58** in aqueous solutions (pH = 7.4) were verified regarding their tendency for 14-helical preorganization.



Scheme 6.3: Synthesized CYA- and TAT- β^3 -decapeptides, which were employed in aggregation studies.

Thereafter, mass spectrometry (ESI-MS) was conducted to analyse a self-aggregation behaviour followed by equimolar mixtures of the decapeptides **56** + **58** (**66**) and **57** + **58** (**67**). The equimolar mixture **57** + **58** contained the mass of the expected assembly **67**, while from the mixture **56** + **58**, the mass of the hexameric topology **67** could not be determined. Furthermore, dynamic light scattering (DLS) was performed for the peptides and their mixtures. The DLS measurements showed for each peptide in aqueous solution (pH = 7.4) the same magnitude of particle size. In both mixing assays a complete consumption of the starting materials was displayed, but in contrast to **56** + **58**, only the mixture **57** + **58** showed promising results corresponding to the expected particle diameter range of the assembly **67**. Additionally, concentration- and time-dependent UV- and CD-spectra as well as temperature-dependent CD-spectra were recorded, primarily to get hints about the solubility of the assemblies. The aggregate **67**, whose assembling was confirmed by mass spectrometry (ESI-MS) and DLS, showed in relation to the single strands, hardly any changes in UV- and CD-spectra, which could give a clue regarding soluble aggregates. As a consequence, the described higher-ordered architecture **67** is suitable for further investigations, extending its length to fit in a model membrane while keeping the sequential arrangement. As a result, the extended version should

have the possibility for membrane permeation. This would open biochemical and biophysical studies, in which the ability as a pore-forming system could be examined.

In chapter 3 it was described that cyclo- β^3 -tripeptides are suited as templates of diverse structural and functional characteristics.^[19,20] Furthermore, they can be utilized in fields such as biology and material science, due to their self-aggregation tendency to nanotubes.^[19] Here, the synthesis of a literature-known cyclo- β^3 -tripeptide (**69**) was transformed from the solid phase to solution so as to enable higher amounts for further functionalization unlike SPPS. In both cases, the cyclopeptides were synthesized through linear polymerization, whereby in solution 4-methoxyphenylhydrazine as *C*-terminal protecting group was used. For both strategies the final *N*-to-*C*-terminal cyclisation was started after *C*-terminal activation and led to similar yields and amounts. The synthesis in solution offered in comparison to SPPS a higher coupling efficiency and minimized material costs, due to reduced equivalents of reactants and reagents. Furthermore, in solution a gramm-scale of the acyclic form could be achieved which can be stored and converted to the cyclic peptide on demand. The purification of intermediate stages did not require costly chromatographic methods and were realized by suspending in solution and filtration. As a consequence, an alternative approach for the generation of trifunctional cyclo- β^3 -peptides was presented.

In chapter 4 the increasing applications of mass spectrometry imaging in cell biology was described, especially of secondary ion mass spectrometry (SIMS) and the necessity of selective labels for differentiation of individual proteins from the rest of the cellular components was highlighted. In a cooperation with the RIZZOLI group the method „specific protein isotopic and fluorescence labelling“ (SPILL) was introduced and in this work a label based on unnatural amounts of isotopes (^{15}N und ^{19}F) was developed. A ^{15}N -label was synthesized containing the novel compound $^{15}\text{N}_6$ -TriazGly-OH (**97**), which was generated from simple and isotopic pure starting materials and could be implemented through SPPS similar to an amino acid coupling (scheme 6.3). The negatively charged and azide bearing nonapeptide TriazNF1 (**115**) with $14 \times ^{15}\text{N}$ -isotops showed in cellular experiments a high selectivity for alkyne-modified SNARE-proteins by stable triazole formation through copper(I)-catalysed HUISGEN-azide-alkyne-cycloaddition. The TriazNF1-labelled SNARE-proteins could be visualised by SIMS. For direct correlation of SIMS with fluorescence microscopy, TriazNF1 (**115**) consists of the fluorophore Star635. With TriazNF1 (**115**) the possibility for selective isotopic labelling of genetically encoded proteins and their localisation through SIMS is given. Furthermore, the negatively charged backbone of TriazNF1 was adopted and the $^{15}\text{N}_6$ -TriazGly-units were replaced by 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoic acid (**28**) to get the ^{19}F ($13 \times$) enriched version **122**. Similar cellular labelling and imaging experiments were performed and confirmed the specific introduction as well as localisation of proteins of interest. As a result, the scope of isotopic biomolecule labels for SPILL-based approaches was extended to a ^{19}F -enriched version.

Finally, in chapter 5 was reported, how a literature-known Sortase A-recognition motif with the sequence LPETGG (**123**)^[26] was synthesized followed by fluorophore (Atto647N) or biotin^[26] attachment. The modified recognition motifs were forwarded to the RIZZOLI group for further investigations. Hereafter, in a Sortase A-mediated reaction the protein α -Synuclein should be labelled with the sortase A-recognition motif, which is bound to a secondary antibody. This would allow the localization of α -Synuclein in immunocytochemical experiments by fluorescence microscopy. The formation of insoluble aggregates from α -Synuclein is discussed in neurodegenerative diseases.^[239,241] In near future, the aggregates delivered from α -Synuclein



would be targeted and should give information about aggregation tendency under given conditions.

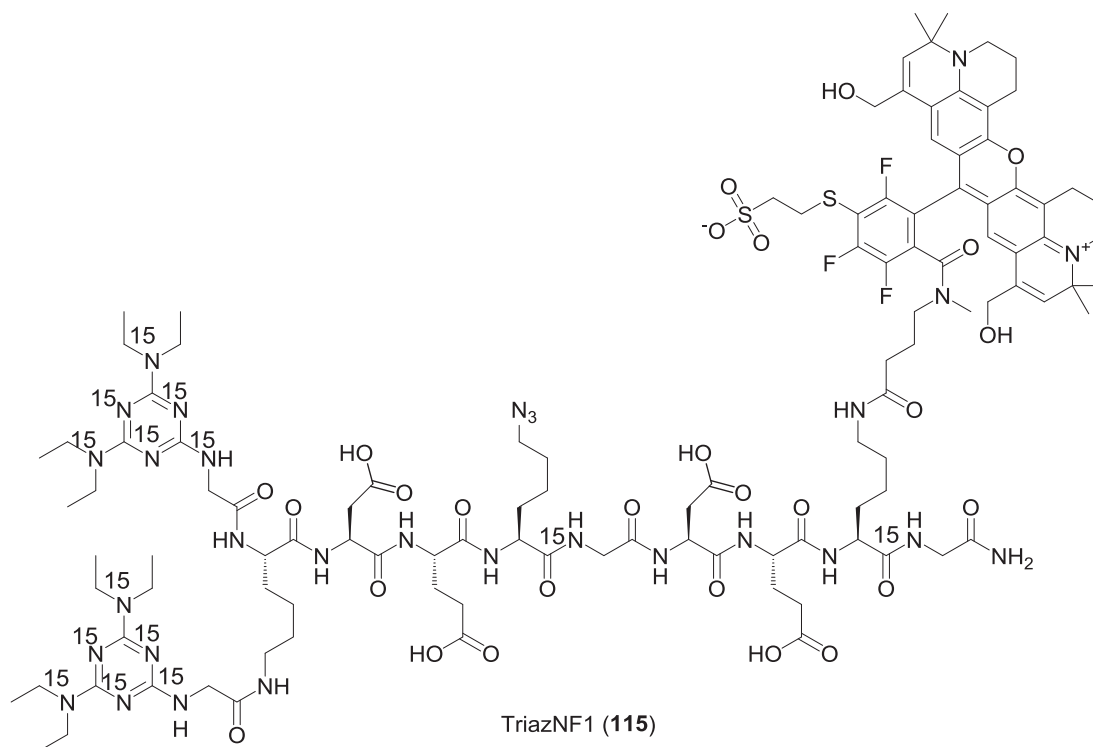


Abbildung 6.3: TriazNF1 (115) contains $14 \times {}^{15}\text{N}$ as a chemoselective biomolecule label for SPILL-based approaches.

8. Experimenteller Teil

8.1 Allgemeines

Synthetisierte Verbindungen. Vorschriften von literaturbekannten Zwischenstufen, die zur Synthese der Zielverbindungen verwendet wurden, wurden zur vollständigen Darstellung dieser Arbeit in den experimentellen Teil mit aufgenommen. Diese Vorschriften sind mit einem Verweis auf die entnommene Quelle kenntlich gemacht und dem Literaturverzeichnis zu entnehmen.

8.1.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Reagenzien. Die verwendeten, kommerziell erhältlichen Materialien und Chemikalien wurden von den Firmen *Acros-Organics*, *ABCR*, *Alfa Aesar*, *Carl Roth*, *Fisher Scientific*, *Fluka*, *Lanchester*, *Merck*, *TCl* und *Sigma Aldrich* bezogen und entsprachen der Qualität „zur Synthese“ oder „zur Analyse“. Die kommerziell erhältlichen Aminosäuren, Kupplungsreagenzien sowie Harze wurden von den Firmen *Bachem*, *GL Biochem*, *Iris Biotech* und *Novabiochem* (*Merck Millipore*) erhalten. Für die Synthese der ^{15}N -isotopenreinen Verbindungen wurden die Ausgangsmaterialien von der Firma *Deutero* bezogen. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden von *Abberior* und *Lumiprobe* erworben.

Lösungsmittel. Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Trockene Lösungsmittel wurden in der Qualität „puriss., absolut, über Molekularsieb“ in Septum-verschlossenen Flaschen von den Firmen *Fluka*, *Sigma* und *Acros-Organics* bezogen. Deuterierte Lösungsmittel für NMR wurden von der Firma *Deutero* verwendet. Methanol und Acetonitril für die HPLC-Trennungen wurden mit ausgewiesener „HPLC-Qualität“ von den Firmen *Fisher Scientific*, *Sigma-Aldrich* und *VWR* erhalten. Für die HPLC-Chromatographie verwendetes, demineralisiertes Wasser wurde durch die Reinstwasseranlage *Simplicity* der Firma *Millipore* mit vorgeschalteter VE-Patrone B 10D gereinigt. Der optimale Reinheitsgrad wurde durch den elektrischen Widerstand von $18.2\ \Omega$ angezeigt. Das Entgasen von Lösungsmitteln erfolgte für die HPLC-Chromatographie mittels Rühren unter Vakuum und für Reaktionen mittels Durchleiten von Argon oder Stickstoff in die Lösung.

Reaktionen. Luft- und wasserempfindliche Reaktionen wurden unter inerter Schutzgasatmosphäre durch die Verwendung von Argon (>99.996%) oder Stickstoff (>99.996%) durchgeführt. Das Gas wurde mittels eines mit Blaugel bzw. Gelbgel, Bimsstein und KOH beschickten Trockenturms nachgetrocknet. Die für die Umsetzung verwendeten Glasgeräte wurden vor der Reaktion mit Hilfe eines Heißluftgebläses unter Vakuum ausgeheizt, im Vakuum abgekühlt und anschließend mit Inertgas beschickt. Dieser Vorgang wurde je zweimal durchgeführt. Die hergestellten Substanzen wurden vor weiterer Umsetzung im Vakuum getrocknet sowie lyophilisiert um den Anteil an Feuchtigkeit soweit wie möglich zu reduzieren. Für Reaktionen mit sehr kleinen Ansätzen in nicht-hitzeresistenten Mikroreaktionsgefäßen



(Eppendorf) wurde die SCHLENK-Technik ohne Heizen eingesetzt. Die Zugabe von Feststoffen erfolgte für empfindliche Reaktionen unter Schutzgas-Gegenstrom.

Lyophilisieren. Die Substanz wurde in Wasser gelöst bzw. suspendiert und in einem Glaskolben mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde die Substanz an einem *Christ*-Alpha-2-4-Lyophilisator unter Vakuum gefriergetrocknet. In gleicher Weise wurde der Inhalt von Mikroreaktionsgefäßen in einer Vakuumzentrifuge RVC 2-18 der Firma *Christ* lyophilisiert.

Chromatographie.

Dünnschichtchromatographie (DC): Die stationäre Phase bestand aus Dünnschichtfertigplatten mit Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 0.25 mm) als Trägermaterial auf Aluminiumfolie der Firma *Merck*. Zur Detektion der Substanzen dienten die Fluoreszenzlösungen bei einer Wellenlänge von 254 nm und 366 nm sowie Tauchreagenzien zur Färbung. Als Färbereagenzien wurde eine 3%ige, ethanolische Ninhydrin-Lösung [0.30 g Ninhydrin, 3.00 mL Essigsäure (AcOH), 100 mL Ethanol] sowie eine Kaliumpermanganat-Lösung (200 mL Wasser, 2.00 g KMnO₄, 13.3 g K₂CO₃, 3.30 mL 5%ige aq. NaOH) verwendet, die nach Tauchen der DC-Platten unter Heißluft getrocknet wurden. Die Laufmittelverhältnisse und die entsprechenden R_f-Werte sind bei der Charakterisierung der jeweiligen Verbindungen angegeben.

Flash-Säulenchromatographie: Zur präparativen Säulenchromatographie wurden die Säulen mit Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 40–63 µm (230–400 mesh ASTM) unter einem Überdruck von 0.5–1.0 bar als Suspension in dem jeweiligen Laufmittel nass gepackt. Dabei wurde an Säulenmaterial 50-200facher Überschuss an Kieselgel im Vergleich zur Substratmenge verwendet. Das Substrat wurde entweder als Feststoff, auf Kieselgel 60 der Firma *Merck* (Korngröße 40–63 µm) adsorbiert oder als konzentrierte Lösung im entsprechendem Laufmittel aufgetragen. Die Adsorption erfolgte durch Lösen des Produktes in einem geeigneten Lösungsmittel und Zugabe von vier-bis fünffachen Menge an Kieselgel. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt/Kieselgel-Gemisch auf die Säule aufgetragen. Die Trennung erfolgte ebenfalls unter einem Überdruck von 0.5–1.0 bar. Die Produktfraktionen wurden mittels DC ermittelt. Die verwendeten Laufmittelgemische zur Reinigung der Produkte sind der jeweiligen Synthesvorschrift zu entnehmen.

Reverse Phase Chromatographie (RP): Es wurde RP-Kieselgel der Firma *YMC* (ODS-A, AA06S50, 60 Å, S-50 µm, C-18) verwendet. Die Säule wurde mit einer Suspension des Kieselgels in Methanol nass gepackt und anschließend mit demineralisiertem Wasser mehrmals gewaschen. Die Substanz als konzentrierte Lösung in Wasser wurde auf die mit Wasser äquilibrierte Säulenpackung gegeben. Der Gradient an Methanol wurde schrittweise erhöht. Die Produktfraktionen wurden mittels DC ermittelt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC): Die Reinigungen wurden an Geräten der Firma *Amersham Pharmacia Biotech*, Pharmacia Äkta Standardsystem (Pumtyp P-903, variable Wellenlängen-UV-Detektor Typ UV-900) durchgeführt. Folgende C18-Säulen der Firma *Machery-Nagel* wurden eingesetzt:

Analytisch	MN Nucleodur® (C18, 100 Å, 250 x 4.6 mm I.D., S-5 µm, Flussrate: 1 mL/min).
------------	---

Semipräparativ MN Nucleodur® (C18, 100 Å, 250 x 10 mm I.D., S-5 µm, Flussrate: 3 mL/min).

Die analytischen Trennungen wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min und die semipräparativen Trennungen mit einer Fließgeschwindigkeit von 3 mL/min im Gradientenbetrieb durchgeführt. Zur Reinigung der Substanzen wurden die Lösungsmittel Acetonitril und bidestilliertes Wasser in Anwesenheit von 0.1% TFA verwendet. Dabei wurde für jeden Lauf der lineare Gradient von **A** (bidestilliertes Wasser + 0.1% TFA) zu **B** (Acetonitril/bidestilliertes Wasser, 8:2 + 0.1% TFA) über einem Zeitraum von 30 min erhöht. Vor der Reinigung wurde die Rohsubstanz als konzentrierte Lösung in bidestilliertes Wasser ohne oder mit Acetonitril-Anteil gelöst. Für den analytischen Lauf wurden 20–90 µL und für den semipräparativen Lauf (200–900 µL) injiziert. Die UV-Detektion erfolgte über drei verschiedene Wellenlängen (215 nm, 254 nm und 280 nm). Bei Fluorophor-markierten Peptiden wurde zur Detektion neben 215 nm und 254 nm längere Wellenlängen, nahe ihrer maximalen Absorption, statt 280 nm verwendet.

8.1.2 Charakterisierung

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR). Die NMR-Spektren wurden an Spektrometern der Firma *Varian* (Mercury (VX) 300, Unity 300, Inova-500, Inova 600) aufgenommen. Die Proben temperatur betrug im Fall von CDCl₃ als Lösungsmittel 298 K und für CD₃OD-, D₂O und [D₆]DMSO 298 K oder 308 K. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ-Skala notiert (TMS = 0 ppm). Als interner Standard dienten Tetramethylsilan (TMS) oder die Resonanzen der Restprotonen der verwendeten Lösungsmittel CDCl₃: 7.24 ppm (¹H-NMR) und 77.0 ppm (¹³C-NMR), CD₃OD: 3.31 ppm (¹H-NMR) und 49.0 ppm (¹³C-NMR), D₂O: 4.79 ppm (¹H-NMR) sowie [D₆]DMSO: 2.49 ppm (¹H-NMR) und 39.5 ppm (¹³C-NMR). Die Multiplizität der Signale sind mit den Abkürzungen s = singulett, d = dublett, dd = dublett von dupplet, t = triplett, q = quartett und m = multipllett, s_{br} = breites singulett, dd = dublett von dublett, dt = dublett von triplett, dq = dublett von quartett, ddd = dublett von dublett von dublett festgelegt. Die Kopplungskonstanten ⁿJ_{XY} sind in Hertz (Hz) angegeben, wobei n die Zahl der überbrückten Bindungen angibt, über welche die Kopplung der Kerne X und Y erfolgt. Die Kerne wurden im Fall von ¹H,¹H-Kopplungen bei der Kopplungskonstante nicht mit angegeben. ¹³C-NMR-Spektren wurden ¹H-entkoppelt oder als APT aufgenommen. Die Zuordnung der Signale erfolgte mittels zweidimensionaler NMR-Experimente [¹H-¹H]-COSY-, HSQC- und HMBC-Experimenten. Die verwendeten Messfrequenzen sind bei der Charakterisierung der Verbindungen jeweils angegeben.

Massenspektrometrie. Die ESI-Massenspektren wurden an einem Gerät der Firma *Finnigan* (Typ LQC oder TSQ 7000) und *Bruker* micrOTOF gemessen. Die Angaben erfolgen in Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (*m/z*-Werte). Die Aufnahme der hochaufgelösten ESI-Massenspektren (HR-MS) erfolgte an einem *Bruker* FT-ICR-MS APEX-Q IV 7T-Spektrometer.

ESI-Massenspektren für Aggregatsstudien wurden an *Bruker* micrOTOF-Q II oder *Bruker* maXis ESI-QTOF-MS Instrument aufgenommen.



UV-Spektroskopie. Die UV-Spektren wurden mit den Geräten *JASCO V-550 UV/Vis-* und *JASCO V-650 UV/Vis-Spektrometer* aufgenommen. Die präsentierten Kurven wurden nach SAVITZKY-GOLAY gefiltert. Die Bestimmung der Konzentration von Fluorophor-markierten Verbindungen erfolgte an Nanodrop 2000c der Firma *Thermo Scientific*. Die Berechnung der Konzentration erfolgte über das LAMBERT-BEER'sche-Gesetz mittels Absorption bei entsprechender Wellenlänge des verwendeten Fluorophors, wobei der Extinktionskoeffizient aus Herstellerangaben entnommen wurde. Die Konzentration [mol/L] wurde mittels folgender Gleichung berechnet:

$$c = \frac{A}{\varepsilon \times d}$$

A : Absorption bei entsprechender Wellenlänge des Fluorophors,

ε : der dekadische molare Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$],

d : die Schichtdicke der Küvette [cm].

Diese Methode wurde außerdem zur Bestimmung der Belegungsdichte (siehe AAV 4) verwendet.

Infrarot (IR)-Spektroskopie. Die IR-Spektren wurden an einem *Jasco FTIR-4100* Spektrometer in einem Bereich von $450\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ aufgenommen. Die Messdaten sind in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] angegeben und die Intensitäten der Signale unterteilt in vs (sehr stark), s (stark), m (medium), w (schwach).

Circulardichroismus-Spektroskopie (CD). Die Messungen wurden mit einem *JASCO J-810A* Spektropolarimeter, ausgerüstet mit einem *JASCO PTC-423S* Peltierelement, aufgenommen. Der Probenraum wurde während der Messung mit Stickstoff gespült. Die Temperatur wurde direkt neben der Küvette im Temperierblock gemessen. Folgende Messparameter wurden eingestellt:

Data Mode: CD und Absorption, *Band Width*: 1.0 nm, *Response*: 2 s, *Sensitivity*: 100 mdeg, *Datapitch*: 0.2 nm, *Scanning speed*: 100 nm/min, *Akkumulationen*: 5. Die Spektren wurden um die verwendete Probenkonzentration (20 μM) und der Länge der Quarzglasküvetten (1 cm) korrigiert und die Kurven nach SAVITZKY-GOLAY gefiltert. Dabei wurde die molare Elliptizität Θ_{molar} mit der Einheit $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ nach folgender Gleichung umgerechnet:

$$\Theta_{\text{molar}} = 100 \times \frac{CD}{c \cdot l}$$

CD : erhaltene Elliptizität in mdeg wurde als deg in die Formel eingesetzt,

c = Probenkonzentration [mol cm^{-3}],

l = Schichtdicke der Küvette [cm].

Aufgetragen wurden: y-Achse = $\Theta_{\text{molar}} \times 10^3$ [$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$] und x-Achse = Wellenlänge [nm].

Dynamische Lichtstreuung (DLS). Die Messungen wurden an einem Zetasizer Nano S der Firma *Malvern* mit einem Laser (633 nm) unter Verwendung von 12 mm Polystyrol (PS)-Küvetten durchgeführt. Die Verteilung der Intensitäten ergab sich von 15 Läufen je 200 s pro

Messung. Die Temperatur während den Messungen betrug 20 °C. Alle Messungen wurden bei einem Detektionswinkel von 173° aufgenommen. Die Umrechnung auf Anzahl (%) erfolgte mit der gelieferten Software unter Berücksichtigung des Brechungsindex für Proteine.

Programme. Zur Zeichnung von Strukturen sowie Berechnung der Molmassen und Angaben von Summenformeln wurde das Programm ChemBioDraw von *Perkin Elmer* verwendet. Graphische Darstellungen erfolgten mit OriginPro 8.5 und NMR-Auswertungen wurden mit MestReNova 7 durchgeführt.

8.1.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Synthese der Diazoketone

Unter Schutzgasatmosphäre wurde die Aminosäure (1.00 Äq.) in trockenem THF (~10 mL/g Aminosäure) gelöst und auf -21 °C gekühlt. Anschließend wurde Triethylamin (1.10 Äq.) und Isobutylchlorformiat (1.10 Äq.) zugetropft und 45 min bei -21 °C – -15 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C erwärmt und unter Lichtausschluss Diazomethan^[62] in Diethylether (0.6–0.7 M, 2.00 Äq.) zugegeben. Nach 0.5 h bei 0 °C wurden weitere 4–6 h bei RT gerührt und die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure (2.00 Äq.) beendet. Es wurden Et₂O (~10 mL/g Aminosäure) und entweder gesättigte NaHCO₃-Lösung (~10 mL/g Aminosäure) oder eine 6%ige, wässrige NaHCO₃-Lösung (~10 mL/g Fmoc-geschützte Aminosäure) zugegeben und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit einer gesättigten NH₄Cl-Lösung (~10 mL/g Aminosäure) und einer gesättigten NaCl-Lösung (~10 mL/g Aminosäure) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde im Vakuum getrocknet. Entweder wurde das Produkt ohne zusätzliche Aufreinigung weiter umgesetzt oder säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

AAV 2: Synthese der β³-Aminosäuren

Zu einer Lösung von Diazoketon (1.00 Äq.) in THF/H₂O (9:1) wurde unter Lichtausschluss Silberbenzoat (0.10 Äq.) bei 0 °C zugegeben und anschließend im Ultraschallbad (1.5–4.5 h) behandelt. Die Reaktion wurde mittels DC verfolgt und nach Vollendung mit H₂O (~10 mL/g Aminosäure) versetzt, mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 2 gebracht und mit Et₂O oder EtOAc (~10 mL/g Aminosäure) versetzt. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit Et₂O oder EtOAc (3 × ~10 mL/g Aminosäure) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.



AAV 3: Erstbelegung des Harzes

Drei verschiedene Harze wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet: Rink-Amid-MBHA-Harz (0.36 mmol/g), Sieber-Amid-Harz (0.76 mmol/g) und 4-Fmoc-hydrazino-benzoyl-AM-Nova-Gel (0.49 mmol/g). Zuvor wurde eine Mikrowellen-unterstützte Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20% in NMP oder DMF, 30 s, 50 W, 50 °C und 180 s, 50 W, 50 °C) vorgenommen und nach Waschen des Harzes mit NMP, DCM, NMP bzw. DMF, DCM, DMF (je 3 ×) wurde die Kupplung eingeleitet.

- Rink-Amid-MBHA-Harz:
 1. Fmoc-Leu-OH (5.0 Äq./3.0 Äq.), HOBt (4.9 Äq./2.9 Äq.), DIC (4.5 Äq./2.7 Äq.) in NMP (40 µL/µmol) unter manueller Mikrowellen-Aktivierung (10 min, 25 W, 50 °C).
 2. Fmoc-Gly-OH (5.0 Äq./3.0 Äq.), HBTU (4.5 Äq./2.7 Äq.), HOBt (5.0 Äq./3.0 Äq.), DIPEA (14 Äq.) in NMP (40 µL/µmol) unter manueller Mikrowellen-Aktivierung (10 min, 25 W, 50 °C).
- Sieber-Amid-MBHA-Harz:
 1. Fmoc-β-Ala-OH (5.0 Äq./3.0 Äq.), HATU (4.5 Äq./2.7 Äq.), HOAt (5.0 Äq./3.0 Äq.), DIPEA (10 Äq.) in DMF (40 µL/µmol) unter manueller Mikrowellen-Aktivierung (10 min, 25 W, 50 °C).
 2. Fmoc-Gly-OH bzw. Fmoc-¹⁵N-Gly-OH (**109**) (5.0 Äq./3.0 Äq.), HATU (4.5 Äq./2.7 Äq.), HOAt (5.0 Äq./3.0 Äq.), DIPEA (14 Äq.) in DMF (40 µL/µmol) unter manueller Mikrowellen-Aktivierung (10 min, 25 W, 50 °C).
- 4-Fmoc-hydrazino-benzoyl-AM-Nova-Gel (0.49 mmol/g):

Boc-L-Lys(Fmoc)-OH (**5**) (5.0 Äq.), HATU (4.5 Äq.), HOAt (5.0 Äq.), DIPEA (14 Äq.) in DMF (40 µL/µmol) bei Raumtemperatur über Nacht.

Nach Waschen des Harzes mit NMP bzw. DMF gefolgt von DCM, Methanol, DCM (je 3 ×) wurde das Harz im Vakuum getrocknet und eine Bestimmung der Belegungsdichte nach AAV 4 durchgeführt.

AAV 4: Bestimmung der Belegungsdichte

Die Belegungsdichte für Fmoc-geschützte Aminosäuren wurde über UV-Absorption nach GÜDE^[79] bestimmt. Hierzu wurde das Harz (~5 mg) in einem Messkoben (10 mL) überführt und mit 2 mL 2%iger DBU in DMF-Lösung versetzt. Nach 1 h vorsichtigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Mischung mit Acetonitril auf 10 mL aufgefüllt, verdünnt (1:125, v/v) und in eine UV-Präzisionsküvette (1 x 1 cm) überführt. Die Absorption des abgespaltenen Fmoc-dibenzofulvens wurde bei 304 nm ($\epsilon_{304} = 7624 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) detektiert und gegen eine Referenz korrigiert. Die Bestimmung der Belegungsdichte erfolgte nach dem LAMBERT-BEER'schem Gesetz. Unter Beibehaltung der Bedingungen, in der lediglich die eingesetzte Harzmenge variierte, ergab sich folgende Gleichung:

$$n = \frac{(Abs_{Probe} - Abs_{Ref}) \times 16.4}{m_{Harz}}$$

n : Belegungsdichte [mmol g⁻¹], Abs_{Probe} : Absorption Probe, Abs_{Ref} : Absorption Referenz, m_{Harz} : Molmasse der Aminosäure [mg].

AAV 5: Manuelle Festphasen-Peptidsynthese nach MERRIFIELD^[77] (Boc-Protokoll)

Die manuelle Synthese erfolgte an einem Boc-L-Lys(Fmoc) vorbelegtem 4-Hydrazino-benzoyl-AM-Nova-Gel. Die Synthese erfolgte in einer Glasfritte gemäß dem folgenden Synthesesyklus:

1. **Quellen.** Das Harz wurde in DMF/DCM (2:1, 2 mL) über 2 h gequollen.
2. **Acetylieren (capping).** Es wurde mit DMF/Essigsäureanhydrid (Ac_2O)/DIPEA (8:1:1, 2×2 mL je 10 min) gerührt, anschließend mit DMF/DCM (1:1, 3×2 mL) gewaschen und mit DMF/DCM (1:1, 2×2 mL je 2 min) für 2 min gerührt.
3. **Entschützen.** Das an das Harz gebundene Peptid wurde mit TFA/*m*-Cresol (95:5, 2×2 mL) gewaschen und mit TFA/*m*-Cresol (95:5, 2×2 mL je 3 min) langsam gerührt. Das Harz wurde anschließend mit DMF/DCM (1:1, 3×2 mL) gewaschen und mit DMF/DCM (1:1, 2×2 mL je 2 min) gerührt.
4. **Kuppeln.** Eine Lösung der Boc- β^3 -Aminosäure (5.00 Äq.) und HATU (4.50 Äq.) in DMF ($40 \mu\text{L}/\mu\text{mol}$) wurde mit HOAt (5.00 Äq.) und DIPEA (14.0 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde zum Harz gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.
5. **Waschen.** Anschließend wurde dreimal mit je 2 mL DMF/DCM (1:1, 3×2 mL) gewaschen.
6. **Acetylieren (capping).** Das Harz wurde mit DMF/ Ac_2O /DIPEA (8:1:1, 2×2 mL je 3 min) gerührt, anschließend mit je 2 mL DMF/DCM (1:1, 3×2 mL) gewaschen und mit DMF/DCM (1:1, 2×2 mL je 2 min) gerührt.

Die Schritte 3-6 wurden bis zum erreichender gewünschten Peptidsequenz wiederholt.

AAV 6: Mikrowellen-unterstützte manuelle Festphasen-Peptidsynthese nach Fmoc-Protokoll

Die manuelle Mikrowellen-unterstützte Festphasen-Peptidsynthese erfolgte an einem DiscoverSPS Mikrowellen-Synthesizer (CEM). Das Harz wurde in eine Discardit™II-Spritze (Becton Dickinson, BD) mit Polyethylen-Fritte transferiert und in DMF für 1 h quellen lassen.

Zur Peptid-Propagation von Fmoc-L-Aminosäuren wurden folgende Schritte ausgeführt.

1. **Entschützen.** Die Fmoc-Schutzgruppe wurde nach Behandeln mit Piperidin (20% in DMF bzw. NMP) und Mikrowellen-Aktivierung (2×2 mL, 30 s, 50 W, 50 °C und 180 s, 50 W, 50 °C) entfernt. Anschließend wurde mit DMF, NMP, DCM, DMF ($3 \times$ je 2 mL) bzw. mit NMP, DMF, DCM, NMP ($3 \times$ je 2 mL) gewaschen.
2. **Kuppeln.** Die jeweilige Aminosäure (5.0 Äq./3.0 Äq.) wurde mit den Aktivatoren HBTU (4.5 Äq./2.7 Äq.) und HOBt (5.0 Äq./3.0 Äq.), DIPEA (10 Äq.) in DMF bzw. NMP ($40 \mu\text{L}/\mu\text{mol}$) zu dem Harz gegeben und unter Mikrowellen-Aktivierung (10 min, 25 W, 50 °C) gekuppelt. Anschließend wurde mit DMF, NMP, DCM, DMF ($3 \times$ je 2 mL) bzw. mit NMP, DMF, DCM, NMP ($3 \times$ je 2 mL) gewaschen.

Nach Erreichen der gewünschten Peptidsequenz wurde der *N*-Terminus Fmoc-entschützt, das Harz mit NMP, DMF, DCM, NMP, DCM, MeOH, DCM (je 3×2 mL) gewaschen und eine Abspaltung nach AAV 8 durchgeführt.



Bei folgenden Aminosäuren wurden spezielle Bedingungen angewandt:

- Für Cystein-Kupplungen wurde entweder HBTU (4.5 Äq./2.7 Äq.), HOBt (5.0 Äq./3.0 Äq.), DIPEA (10 Äq.) in DMF bzw. NMP (40 µL/µmol) oder DIC (4.5 Äq./2.7 Äq.), HOBt (5.0 Äq./3.0 Äq.) in NMP (40 µL/µmol) verwendet und unter milderen Bedingungen die Kupplung (10 min, 20 W, 40 °C) durchgeführt.
- In Asparaginsäure-enthaltenen Sequenzen wurde zur Fmoc-Entschützung konsequent 20% Piperidin in DMF bzw. NMP + 0.1 M HOBt eingesetzt.
- Für β³-Aminosäuren wurden die Aktivatoren HATU (4.5 Äq./2.7 Äq.) und HOAt (5.0 Äq./3.0 Äq.), DIPEA (10 Äq.) in DMF bzw. NMP (40 µL/µmol) verwendet und eine Mikrowellen-Aktivierung (10 min, 25 W, 60 °C) angewandt.
- Für Fmoc-ACHC-OH (5.0 Äq./3.0 Äq.) wurden die Aktivatoren HATU (4.5 Äq./2.7 Äq.), HOAt (5.0 Äq./3.0 Äq.), DIPEA (10 Äq.) und 0.8 M LiCl in NMP (40 µL/µmol) verwendet und eine Mikrowellen-Aktivierung (10 min, 25 W, 45 °C) angewandt. Bei jedem zweiten ACHC in der Sequenz wurde die Kupplungszeit auf 20 min erhöht.

AAV 7: Automatisierte Festphasen-Peptidsynthese

Automatisierte Festphasen-Peptidsynthese nach Fmoc-Protokoll wurde an einem *Microwave Peptide Synthesizer* (CEM Discover™ mit CEM Liberty™-Einheiten) der Firma CEM durchgeführt. Die Synthese erfolgte an einem zuvor belegtem Rink-Amid-MBHA-Harz (Belegungsdichte = 0.36 mmol/g) in einem 100 µmol-Ansatz. Die eingesetzte Mikrowellenenergie wurde über die Temperatur im Reaktionsgefäß gesteuert. Es wurden Standardreagenzien und Protokolle verwendet. Zur Entschützung von Fmoc wurde Piperidin (20% in NMP + 0.1 M HOBt, 2 × 2.5 mL, 75 °C, 30 s, 25 W und 75 °C, 180 s, 25 W) verwendet. Fmoc-Aminosäuren wurden als 0.2 M Lösungen in NMP eingesetzt. Die Kupplungen erfolgten unter Aktivierung mit HBTU/HOBt (0.5 M/0.45 M in DMF) und DIPEA (2 M in NMP) und Mikrowellen-Aktivierung (75 °C, 300 s, 25 W). Die Kupplungen wurden doppelt ausgeführt. Die Aminosäure Fmoc-Arg(Pbf)-OH wurde unter speziellen Bedingungen (600 s, 0 W und 75 °C, 300 s, 25 W) gekuppelt. Nach der Synthese wurde das N-terminal Fmoc-geschützte Harz in eine BD-Spritze mit PE-Fritte transferiert, mit NMP, DCM, Methanol, DCM (3 ×) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Im nächsten Schritt erfolgte eine N-terminale Fmoc-Entschützung gefolgt von Reaktion auf dem Harz oder die Abspaltung nach AAV 8.

AAV 8: Abspaltung vom Trägermaterial und Vorreinigung

Die Abspaltung erfolgte je nach Peptid angepassten Lösungen (siehe unten). Das Harz wurde mit der Abspalllösung versetzt und 1–2 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Nach Trennen des Harzes von der Lösung wurde das Harz mit wenigen mL der Abspalllösung gespült. Die vereinigten Filtrate wurden im Stickstoff-Gegenstrom eingeengt und anschließend mit kaltem Diethylether (–21 °C) gefällt. Die Suspension wurde im Zentrifugenröhrchen an der Zentrifuge Sigma 2K15C zentrifugiert (30 min bei 9000 U/min und –10–0 °C) und der Überstand verworfen. Die Prozedur wurde dreimal wiederholt und das Rohpeptid im Vakuum getrocknet.

Folgende Abspalllösungen wurden eingesetzt:

Lösung 1: TFA/*m*-Cresol (95:5, v/v),

Lösung 2: TFA/EDT/TIS/H₂O (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v),

Lösung 3: TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v),

Lösung 4: TFA/2-Propanthiol/TIS/H₂O (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v).

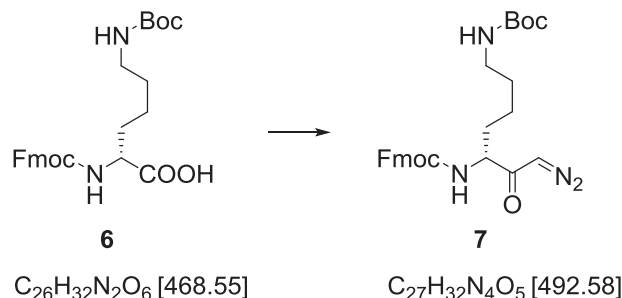
Wenn eine 10%ige Lösung in DCM zur Abspaltung verwendet wurde (Kapitel 8.2, 8.3), wurde nach Trennen des Harzes von der Lösung, die Lösung mit der jeweiligen konzentrierten Lösung versetzt und 0.5–1 h inkubiert, um eine vollständige Entschützung der Schutzgruppen (Boc) zu erzielen. Anschließend wurde wie zuvor beschrieben fortgefahren.



8.2 Synthese von Janusmolekül-funktionalisierten β^3 -Peptiden

8.2.1 Vorschriften zum Synthese der β^3 -Aminosäuren

(7) (*R*)-3-((((9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-7-((*tert*-butoxy-carbonyl)-amino)-1-diazoheptan-2-on, Fmoc-D-Lys(Boc)-CHN₂^[61]



Ausgehend von Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (**6**) (14.1 g, 30.0 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **7** nach AAV 1 (Kapitel 8.1.3) durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (3:2, v/v) gereinigt. Die Verbindung **7** (14.8 g, 30.0 mmol, quant.) wurde in Form eines gelben Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 3:2, v/v): $R_f = 0.25$.

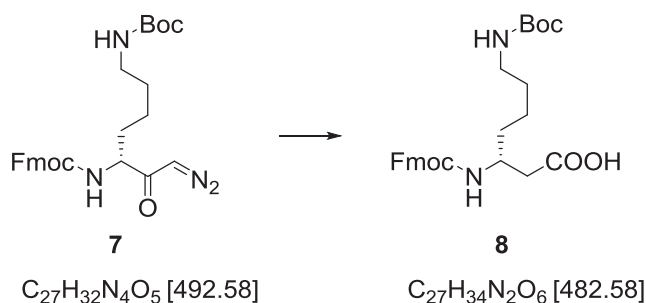
¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.14–1.70 (m, 6 H, β -H₂, γ -H₂, δ -H₂), 2.87–2.94 (m, 2 H, ϵ -H₂), 3.86–3.99 (m, 1 H, α -H), 4.19–4.25 (m, 1 H, Fmoc-CH), 4.30–4.40 (m, 2 H, Fmoc-CH₂), 5.96 (s, 1 H, CHN₂), 6.68–6.75 (m, 1 H, NH-Boc), 7.31–7.44 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.65 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 1 H, NH-Fmoc), 7.72 (d, ³*J* = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.88 (d, ³*J* = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.17$ (C(CH₃)₃), 22.72, 29.04, 30.25 (β -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂), 38.99–40.00 (ϵ -CH₂ im Signalbereich von [D₆]DMSO), 46.73 (Fmoc-CH), 52.49 (CHN₂), 58.49 (α -CH), 65.44 (Fmoc-CH₂), 77.25 (C(CH₃)₃), 119.98, 125.10, 126.91, 127.50 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 140.68, 143.71 (4 × Fmoc-C_{Ar}), 155.50, 155.93 (Boc-CO, Fmoc-CO), 195.15 (COCHN₂) ppm.

MS (ESI): $m/z = 510.3$ [$M + \text{NH}_4$]⁺, 515.2 [$M + \text{Na}$]⁺, 1007.5 [$2M + \text{Na}$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₅	berechnet	510.2711 [$M + \text{NH}_4$] ⁺ , 515.2265 [$M + \text{Na}$] ⁺ ,
	gefunden	510.2697 [$M + \text{NH}_4$] ⁺ , 515.2255 [$M + \text{Na}$] ⁺ .

(8) (R)-3-(((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-7-((tert-butoxy-carbonyl)-amino)-heptansäure, Fmoc-D-β³-hLys(Boc)-OH^[61]



Ausgehend von Fmoc-D-Lys(Boc)-CHN₂ (**7**) (7.32 g, 14.9 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **8** nach AAV 2 (Kapitel 8.1.3) durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (9:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **8** (5.88 g, 9.95 mmol, 67%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 9:1, v/v): $R_f = 0.58$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.12–1.45 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.25–2.42 (m, 2 H, α-H₂), 2.85–2.92 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.69–3.83 (m, 1 H, β-H), 4.16–4.36 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 6.65–6.72 (m, 1 H, NH-Boc), 7.15 (d, ³J = 8.6 Hz, 1 H, NH-Fmoc), 7.30–7.43 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.68 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.88 (d, ³J = 7.2 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 11.93 (s_{br}, 1 H, COOH) ppm.

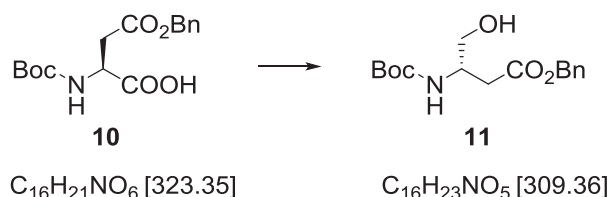
¹³C-NMR (75 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.19$ (C(CH₃)₃), 22.69, 29.23, 33.84 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 38.50–39.99 (α-CH₂, ζ-CH₂ im Signalbereich von [D₆]DMSO), 46.76 (Fmoc-CH), 47.85 (β-CH), 65.07 (Fmoc-CH₂), 77.21 (C(CH₃)₃), 119.98, 125.07, 126.92, 127.48 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 140.65, 143.76, 143.89 (4 × Fmoc-C_{Ar}), 155.44, 155.48 (Boc-C=O, Fmoc-C=O), 172.42 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 505.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 978.5 [$2M + \text{Na}$]⁺, 481.2 [$M - \text{H}$]⁻, 963.5 [$2M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C₂₇H₃₄N₂O₆ berechnet 505.2309 [$M + \text{Na}$]⁺, 481.2344 [$M - \text{H}$]⁻,
 gefunden 505.2319 [$M + \text{Na}$]⁺, 481.2343 [$M - \text{H}$]⁻.



**(11) (S)-Benzyl-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-4-hydroxybutanoat,
Boc-D-β³-hSer-OBn^[17]**



Unter Schutzgasatmosphäre wurde zu einer Lösung von Boc-Asp(Obn)-OH (**10**) (7.00 g, 21.6 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem THF (70 mL) bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ NEM (2.88 mL, 2.62 g, 22.7 mmol, 1.05 Äq.) gefolgt von Isobutylchlorformiat (2.95 mL, 3.10 g, 22.7 mmol, 1.05 Äq.) zugetropft. Nach 1 h Rühren bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Reaktionsmischung mit Natriumborhydrid (2.04 g, 54.0 mmol, 2.50 Äq.) versetzt und weitere 5 min gerührt. Anschließend wurde Methanol (150 mL) bei $-10 - 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ über 40 min zugetropft und nach weiteren 30 min Rühren bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung neutralisiert. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile wurde mit EtOAc ($3 \times 70\text{ mL}$) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung, H_2O (50 mL), einer wässrigen, 6%igen NaHCO_3 -Lösung (50 mL), H_2O ($2 \times 50\text{ mL}$) und gesättigter NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (1:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **11** (5.60 g, 18.1 mmol, 84%) konnte in Form eines farblosen Öls erhalten werden, welches nach Lyophilisieren und Lagern bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ als farbloser Feststoff vorlag.

Analytische Daten:

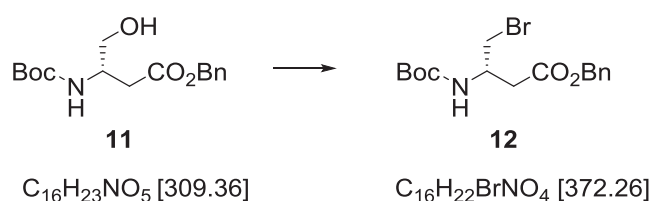
DC (Pentan/EtOAc, 2:1, v/v): $R_f = 0.20$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3 , RT): $\delta = 1.40$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.64 (d, $^3J = 6.2\text{ Hz}$, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 2.95 (s_{br} , 1 H, OH), 3.63 (d, $^3J = 4.9\text{ Hz}$, 2 H, $\gamma\text{-H}_2$), 3.93–4.03 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 5.09 (s, 2 H, CH_2Ph), 5.27 (d, $^3J = 8.1\text{ Hz}$, 1 H, NH-Boc), 7.28–7.34 (m, 5 H, $5 \times \text{Ph-H}$) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl_3 , RT): $\delta = 28.25$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 35.94 ($\alpha\text{-CH}_2$), 49.32 ($\beta\text{-CH}$), 64.21 ($\gamma\text{-CH}_2$), 66.52 (CH_2Ph), 79.73 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.14, 128.24, 128.50 ($5 \times \text{Ph-CH}$), 135.49 (Ph-C), 155.72 (Boc-CO), 171.55 (COOBn) ppm.

MS (ESI): $m/z = 310.2$ [$M + \text{H}$]⁺, 332.1 [$M + \text{Na}$]⁺, 641.3 [$2M + \text{Na}$]⁺.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_5$	berechnet	310.1649 [$M + \text{H}$] ⁺ , 332.1468 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 348.1208 [$M + \text{K}$] ⁺ ,
	gefunden	310.1642 [$M + \text{H}$] ⁺ , 332.1466 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 348.1203 [$M + \text{K}$] ⁺ .

(12) (S)-Benzyl-4-bromo-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-butanoat^[17]

Unter Schutzgasatmosphäre wurde zu einer Lösung von Boc-D-β³-hSer-OBn (**11**) (1.72 g, 5.55 mmol, 1.21 Äq.) und Tetrabrommethan (1.53 g, 4.61 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem DCM (35 mL) unter Rühren bei -15 °C Triphenylphosphin (1.21 g, 4.59 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde 30 min bei dieser Temperatur und anschließend weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung auf Kieselgel aufgezogen und anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (8:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **13** (1.15 g, 3.09 mmol, 67%) konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 8:1, v/v): $R_f = 0.49$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT): $\delta = 1.42$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.65–2.82 (m, 2 H, α-H₂), 3.50–3.62 (m, 2 H, γ-H₂), 4.15–4.30 (m, 1 H, β-H), 5.12 (s, 2 H, CH₂Ph), 7.28–7.39 (m, 5 H, 5 × Ph-H) ppm.

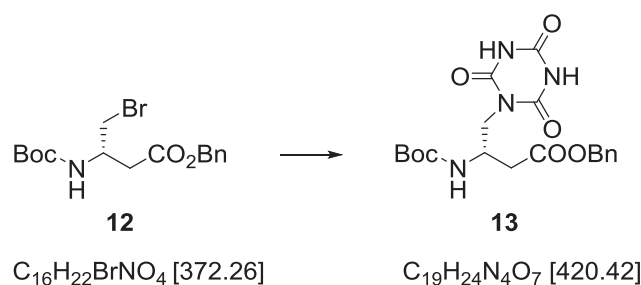
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT): $\delta = 28.28$ (C(CH₃)₃), 36.12 (γ-CH₂), 37.00 (α-CH₂), 47.62 (β-CH), 66.69 (CH₂Ph), 80.04 (C(CH₃)₃), 128.21, 128.39, 128.60 (5 × Ph-CH), 135.40 (Ph-C), 154.72 (Boc-CO), 170.60 (COOBn) ppm.

MS (ESI): $m/z = 394.1$ [$M + \text{Na}$]⁺, 767.2 [$2M + \text{Na}$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₁₆ H ₂₂ BrNO ₄	berechnet	394.0624 [$M + \text{Na}$] ⁺ ,
	gefunden	394.0628 [$M + \text{Na}$] ⁺ .



(13) (S)-Benzyl-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-4-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazin-an-1-yl)-butanoat, Boc-D-β³-hDap(CYA)-OBn^[17]



Unter Schutzgasatmosphäre wurde zu einer Lösung von (S)-Benzyl-4-bromo-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)butanoat (**12**) (1.99 g, 5.36 mmol, 1.00 Äq.) und Cyanursäure (3.46 g, 26.8 mmol, 5.00 Äq.) in trockenem DMF (45 mL) DBU (840 µL, 857 mg, 5.63 mmol, 1.05 Äq.) unter Rühren zugetropft, auf 70 °C erhitzt und 2 d bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in H₂O (50 mL) suspendiert, mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung ein pH-Wert von 5 eingestellt und DCM (50 mL) zugegeben. Der farblose Niederschlag, überschüssige Cyanursäure, wurde abfiltriert und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 × 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Extrakt auf Kieselgel aufgezogen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM → DCM/MeOH (96:4, v/v) gereinigt. Die Verbindung **13** (1.18 g, 2.80 mmol, 52%) konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

DC (DCM/Methanol, 96:4, v/v): $R_f = 0.15$.

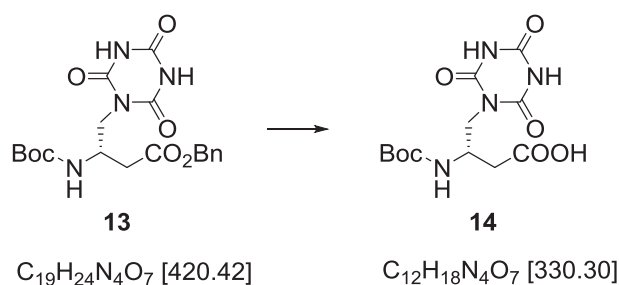
¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.32$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.53–2.66 (m, 2 H, α-H₂), 3.59–3.69 (m, 1 H, γ-H), 3.75–3.84 (m, 1 H, γ-H), 4.15–4.29 (m, 1 H, β-H), 5.08 (s, 2 H, CH₂Ph), 6.70 (d, ³J = 9.0 Hz, 1 H, NH-Boc), 7.28–7.38 (m, 5 H, 5 × Ph-H), 11.29 (s_{br}, 2 H, 2 × CYA-NH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.02$ (C(CH₃)₃), 36.30 (α-CH₂), 44.09 (γ-CH₂), 45.48 (β-CH), 65.43 (CH₂Ph), 77.66 (C(CH₃)₃), 127.62, 127.80, 128.27 (5 × Ph-CH), 136.04 (Ph-C), 148.54, 149.90 (3 × CYA-CO), 155.16 (Boc-CO), 170.35 (COOBn) ppm.

MS (ESI): $m/z = 443.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 863.3 [$2M + \text{Na}$]⁺, 419.2 [$M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₇	berechnet	443.1537 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 419.1572 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	443.1540 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 419.1572 [$M - \text{H}$] ⁻ .

(14) (S)-3-((*tert*-Butoxycarbonyl)-amino)-4-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1yl)-butansäure, Boc-D-β³-hDap(CYA)-OH^[17]



Boc-D-β³-hDap(CYA)-OBn (**13**) (685 mg, 1.63 mmol, 1.00 Äq.) wurde in Dioxan/H₂O (6:4, 13 mL, v/v) gelöst und mit einer wässrigen, 1 M NaOH-Lösung (3.2 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung neutralisiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung an RP-Gel (H₂O → H₂O/MeOH, 1:1, v/v). Die Verbindung **14** (492 mg, 1.49 mmol, 91%) konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

DC (Aceton/H₂O, 10:1, v/v): R_f = 0.72.

¹H-NMR (600 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 1.31 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.14 (s_{br}, 2 H, α-H₂), 3.48–3.59 (m, 1 H, β-H), 3.92–3.99 (m, 2 H, γ-H₂), 6.79 (s_{br}, 1 H, NH-Boc) ppm.

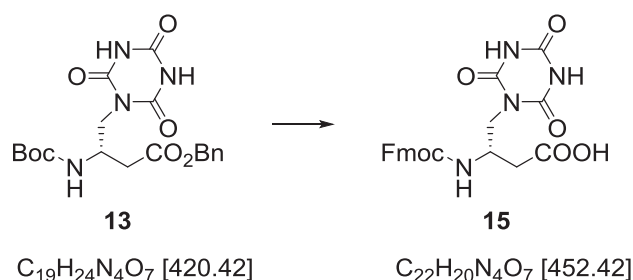
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 28.09 (C(CH₃)₃), 29.61 (α-CH₂), 44.33 (γ-CH₂), 46.25 (β-CH), 77.13 (C(CH₃)₃), 151.27, 151.73 (3 × CYA-CO), 154.89 (Boc-CO), 173.93 (COOH) ppm.

MS (ESI): m/z = 353.1 [M + Na]⁺, 683.2 [$2M$ + Na]⁺, 329.1 [M - H]⁻, 659.2 [$2M$ - H]⁻.

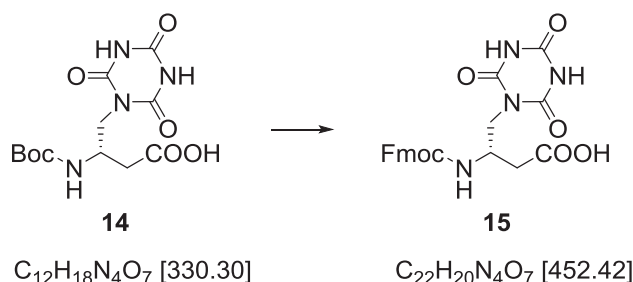
HR-MS (ESI): C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₇	berechnet	353.1068 [M + Na] ⁺ , 329.1103 [M - H] ⁻ .
	gefunden	353.1065 [M + Na] ⁺ , 329.1103 [M - H] ⁻ .



(15) (S)-3-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-4-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-yl)-butansäure, Fmoc-D-β³-hDap(CYA)-OH



Variante 1: Boc-D-β³-hDap(CYA)-OBn (**13**) (244 mg, 580 μmol, 1.00 Äq.) wurde in Dioxan/H₂O (6:4, 4.5 mL, v/v) gelöst und mit einer wässrigen 1 M NaOH-Lösung (1.1 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung neutralisiert. Nach Lyophilisieren wurde bei 0 °C TFA/H₂O (95:5, 7.35 mL, v/v) zugegeben und 1 h bei dieser Temperatur sowie 1 h bei Raumtemperatur gerührt. TFA wurde im N₂-Gegenstrom entfernt und der Rückstand nach Zugabe von H₂O (6 mL) mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung neutralisiert, auf 0 °C gebracht und NaHCO₃ (73.0 mg, 870 μmol, 1.50 Äq.) zugegeben. Fmoc-OSu (294 mg, 870 μmol, 1.50 Äq.) wurde in Dioxan (6 mL) gelöst und zur Reaktionslösung zugetropft. Nach 1 h Rühren bei 0 °C wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dioxan wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung neutralisiert, H₂O (20 mL) zugegeben und mit DCM (3 × 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung auf pH = 1 gebracht. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem H₂O (3 × 5 mL) gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurde der Feststoff in wässriger, 1 M HCl-Lösung (5 mL) aufgenommen und erneut abfiltriert sowie mit kaltem H₂O (3 × 5 mL) gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum und Lyophilisieren konnte die Verbindung **15** (199 mg, 440 μmol, 76%) in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.



Variante 2: Boc-D-β³-hDap(CYA)-OH (**14**) (120 mg, 363 μmol, 1.00 Äq.) wurde bei 0 °C in TFA/H₂O (95:5, 4.20 mL, v/v) gelöst, 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde TFA im N₂-Gegenstrom entfernt. Der Rückstand wurde mit H₂O (4 mL) versetzt, mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung neutralisiert und NaHCO₃ (45.8 mg, 545 μmol, 1.50 Äq.) zugegeben. Nach Kühlen auf 0 °C wurde zu der Lösung Fmoc-OSu (184 mg, 545 μmol, 1.50 Äq.) in Dioxan (6 mL) zugetropft, 1 h bei 0 °C und über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von H₂O (10 mL) wurde mit DCM (3 × 10 mL) extrahiert und die organische Phase verworfen. Die wässrige Phase wurde mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 1 gebracht. Der ausfallende Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem H₂O (3 × 5 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Verbindung **15** (113 mg, 249 μmol, 69%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (EE/MeOH/H₂O/AcOH, 10:1:1:0.1, v/v/v/v): $R_f = 0.51$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 2.37\text{--}2.46$ (m, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 3.70–3.76 (m, 1 H, $\gamma\text{-H}$), 3.81–3.88 (m, 1 H, $\gamma\text{-H}$), 4.09–4.28 (m, 4 H, $\beta\text{-H}$, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 7.25 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, NH-Fmoc), 7.30–7.43 (m, 4 H, 4 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}), 7.62–7.67 (m, 2 H, 2 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}), 7.88 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, 2 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}), 11.28 (s_{br}, 1 H, COOH) ppm.

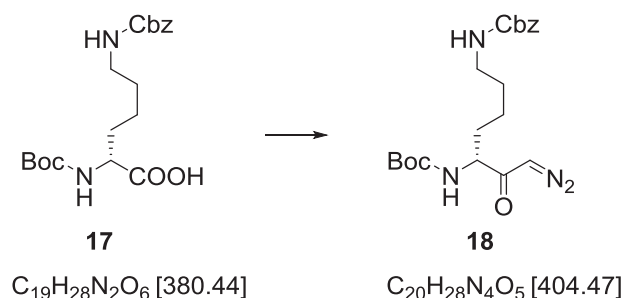
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 36.69$ ($\alpha\text{-CH}_2$), 43.78 ($\gamma\text{-CH}_2$), 46.29 ($\beta\text{-CH}$), 46.70 (Fmoc-CH), 65.51 (Fmoc-CH₂), 119.99, 125.12, 125.28, 126.98, 127.05, 127.53 (8 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}), 140.56, 140.63 (2 $\times$ Fmoc-C_{Ar}), 143.69, 143.89 (2 $\times$ Fmoc-C_{Ar}), 148.57, 149.98 (3 $\times$ CYA-CO), 155.61 (Fmoc-C=O), 171.98 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 475.1$ [$M + \text{Na}$]⁺, 927.3 [$2M + \text{Na}$]⁺, 451.1 [$M - \text{H}$]⁻, 903.3 [$2M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₂ H ₂₀ N ₄ O ₇	berechnet	475.1224 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 451.1259 [$M - \text{H}$] ⁻ .
	gefunden	475.1216 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 451.1253 [$M - \text{H}$] ⁻ .



(18) (R)-7-(((Benzyloxy)-carbonyl)-amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-1-diazo-heptan-2-on, Boc-D-Lys(Cbz)-CHN₂^[249]



Ausgehend von Boc-D-Lys(Cbz)-OH **17** (7.00 g, 18.4 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **18** nach AAV 1 (Kapitel 8.1.3) durchgeführt. Die Verbindung **18** (14.8 g, 18.4 mmol, quant.) wurde in Form eines gelben Öls isoliert und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 3:2, v/v): $R_f = 0.19$.

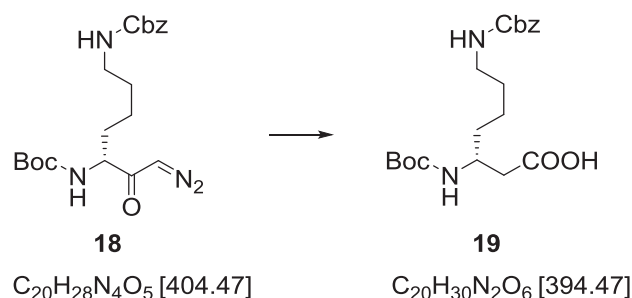
¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.39$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.15–1.69 (m, 6 H, β -H₂, γ -H₂, δ -H₂), 2.95–3.01 (m, 2 H, ϵ -H₂), 3.77–3.92 (m, 1 H, α -H), 5.01 (s, 2 H, CH₂Ph), 6.00 (s_{br}, 1 H, CHN₂), 7.12–7.19 (m, 2 H, NH-Boc, NH-Cbz), 7.26–7.38 (m, 5 H, 5 × Ph-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.11$ (C(CH₃)₃), 22.69, 28.95, 30.30 (β -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂), 38.99–40.00 (ϵ -CH₂ im Signalbereich von [D₆]DMSO), 52.35 (CHN₂), 58.18 (α -CH), 65.04 (CH₂Ph), 78.20 (C(CH₃)₃), 127.59, 128.23 (5 × Ph-CH), 137.21 (Ph-C), 155.37, 156.02 (Boc-CO, Cbz-CO), 195.65 (COCHN₂) ppm.

MS (ESI): $m/z = 427.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 443.2 [$M + \text{K}$]⁺, 831.4 [$2M + \text{Na}$]⁺, 403.2 [$M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₀ H ₂₈ N ₄ O ₅	berechnet	427.1952 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 443.1691 [$M + \text{K}$] ⁺ ,
	gefunden	427.1948 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 443.1688 [$M + \text{K}$] ⁺ .

(19) (R)-7-(((Benzyloxy)-carbonyl)-amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)- amino)-heptansäure, Boc-D-β³-hLys(Cbz)-OH^[14,249]



Ausgehend von Boc-D-Lys(Cbz)-CHN₂ (**18**) (7.44 g, 18.4 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **19** nach AAV 2 (Kapitel 8.1.3) durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (9:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **19** (6.08 g, 15.4 mmol, 84%) wurde in Form eines hellgelben bis farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 3:2, v/v): $R_f = 0.39$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.12–1.46 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.22–2.37 (m, 2 H, α-H₂), 2.94–3.00 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.64–3.76 (m, 1 H, β-H), 5.00 (s, 2 H, CH₂Ph), 6.60 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1 H, NH-Boc), 7.12–7.19 (m, 1 H, NH-Cbz), 7.26–7.38 (m, 5 H, 5 × Ph-H), 1.37 (s_{br}, 1 H, COOH) ppm.

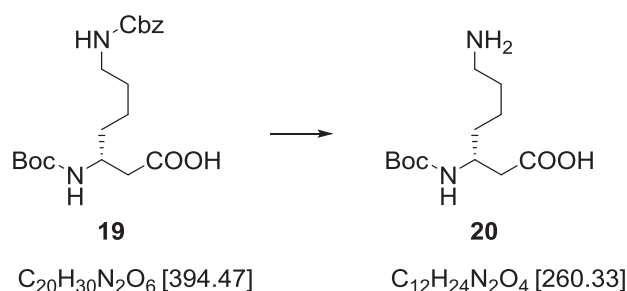
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.17$ (C(CH₃)₃), 22.69, 29.13, 33.89 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂, ζ-CH₂), 47.26 (α-CH₂), 48.51 (β-CH), 65.01 (CH₂Ph), 77.33 (C(CH₃)₃), 127.58, 128.22 (5 × Ph-CH), 137.23 (Ph-C), 154.98, 155.99 (Boc-CO, Cbz-CO), 172.53 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 417.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 433.2 [$M + \text{K}$]⁺, 393.2 [$M - \text{H}$]⁻.

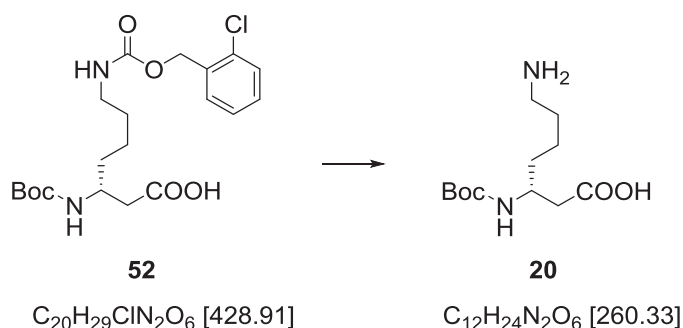
HR-MS (ESI): C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₆	berechnet	417.1996 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 433.1735 [$M + \text{K}$] ⁺ , 393.2031 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	417.1990 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 433.1732 [$M + \text{K}$] ⁺ , 393.2037 [$M - \text{H}$] ⁻ .



(20) (R)-7-Amino-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-heptansäure, Boc-D-β³-hLys-OH



Variante 1: Boc-D-β³-hLys(Cbz)-OH (**19**) (6.03 g, 15.3 mmol, 1.00 Äq.) wurde in EtOH (100 mL) gelöst. Nach Entgasen der Lösung wurde Pd/C (5%, 1.64 g) zugegeben und unter H₂-Atmosphäre 16.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Pd/C abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Die Verbindung **20** (3.90 g, 15.0 mmol, 98%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.



Variante 2: Boc-D-β³-hLys(2-Cl-Cbz)-OH (**52**) (7.94 g, 18.5 mmol, 1.00 Äq.) wurde in EtOH (120 mL) gelöst. Nach Entgasen der Lösung wurde Pd/C (5%, 1.50 g) zugegeben und unter H₂-Atmosphäre 19.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Pd/C abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels säulenchromatographischer Reinigung an RP-Gel (H₂O → H₂O/MeOH, 1:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **20** (4.65 g, 17.8 mmol, 97%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

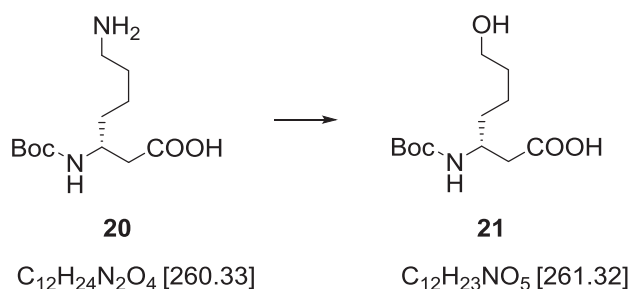
DC (EtOAc/MeOH/H₂O/AcOH, 6:2:2:1 + NaCl, v/v/v/v): $R_f = 0.15$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.20–1.63 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.22–2.38 (m, 2 H, α-H₂), 2.69–2.77 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.64–3.77 (m, 1 H, β-H), 6.65 (d, ³J = 8.7 Hz, 1 H, Boc-NH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.20$ (C(CH₃)₃), 22.40, 26.65, 33.58 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 38.50 (α-CH₂), 38.50–39.99 (ζ-CH₂ im Signalfeld von [D₆]DMSO), 47.07 (β-CH), 77.32 (C(CH₃)₃), 154.81 (Boc-C=O), 172.45 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 261.2$ [$M + H$]⁺, 521.3 [$2M + H$]⁺, 295.1 [$M - H$]⁻, 519.3 [$2M - H$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	berechnet	261.1809 [$M + H$] ⁺ , 283.1628 [$M + Na$] ⁺ , 259.1663 [$M - H$] ⁻ ,
	gefunden	261.1809 [$M + H$] ⁺ , 283.1624 [$M + Na$] ⁺ , 259.1663 [$M - H$] ⁻ .

(21) (R)-3-((tert-Butoxycarbonyl)-amino)-7-hydroxy-heptansäure

Boc-D-β³-hLys-OH (**20**) (3.86 g, 14.8 mmol, 1.00 Äq.) wurde in H₂O (57 mL) suspendiert und bei 60 °C wässrige, 4 M NaOH-Lösung (5.72 mL) zugegeben. Natriumpentacyano-nitrosylferrat(II)-Dihydrat (6.75 g, 22.6 mmol, 1.53 Äq.) wurde in kleineren Portionen über 1 h zugegeben, während der pH-Wert durch Zugabe von weiterer wässriger, 4 M NaOH-Lösung (5.72 mL) auf 9.5 gehalten wurde. Anschließend wurde bei 60 °C weitere 5 h erhitzt. Danach wurde die Reaktionsmischung auf 10 °C gekühlt und mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung ein pH-Wert von 1 eingestellt. Die entstehende Lösung wurde mit EtOAc (4 × 100 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Extrakt auf Kieselgel aufgezogen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (24:1 + 0.25% AcOH → 9:1 + 1% AcOH, v/v) gereinigt. Nach Coevaporieren mit Toluol (3 × 20 mL) um überschüssige AcOH zu entfernen, Trocknen im Vakuum und Lyophilisieren wurde die Verbindung **21** (1.92 g, 7.34 mmol, 50%) in Form eines hellgelben Öls isoliert.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 9:1 + 1% AcOH, v/v/v): $R_f = 0.43$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.13–1.49 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.21–2.36 (m, 2 H, α-H₂), 3.36 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2 H, ζ-H₂), 3.64–3.76 (m, 1 H, β-H), 6.58 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1 H, NH-Boc) ppm.

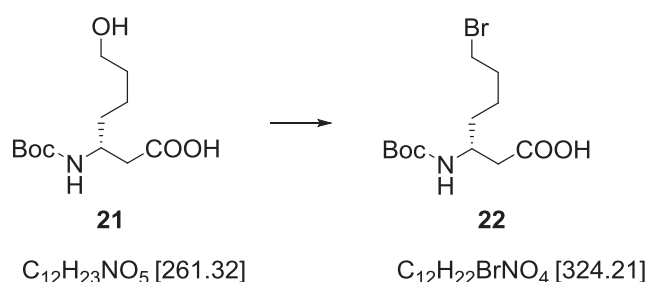
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.20$ (C(CH₃)₃), 21.97, 32.26, 34.14 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 39.91 (α-CH₂), 47.33 (β-CH), 60.61 (ζ-CH₂), 77.32 (C(CH₃)₃), 154.99 (Boc-C=O), 172.55 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 284.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 545.3 [$2M + \text{Na}$]⁺, 260.2 [$M - \text{H}$]⁻, 521.3 [$2M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₂ H ₂₃ NO ₅	berechnet	284.1468 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 260.1503 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	284.1473 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 260.1506 [$M - \text{H}$] ⁻ .



(22) (R)-7-Bromo-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-heptansäure



Unter Schutzgasatmosphäre wurde zu einer Lösung von (R)-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-7-hydroxyheptansäure (**21**) (1.87 g, 7.16 mmol, 1.00 Äq.) und Tetrabrommethan (3.56 g, 10.7 mmol, 1.50 Äq.) in trockenem DCM (40 mL) unter Rühren bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ Triphenylphosphin (2.82 g, 10.7 mmol, 1.50 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde 30 min bei dieser Temperatur und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung auf Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (24:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **22** (1.03 g, 3.19 mmol, 45%) konnte in Form eines hellgelben Öls isoliert werden, welches nach Lagern bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ als farbloser Feststoff vorlag.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 24:1 + 0.4% AcOH, v/v/v): $R_f = 0.41$.

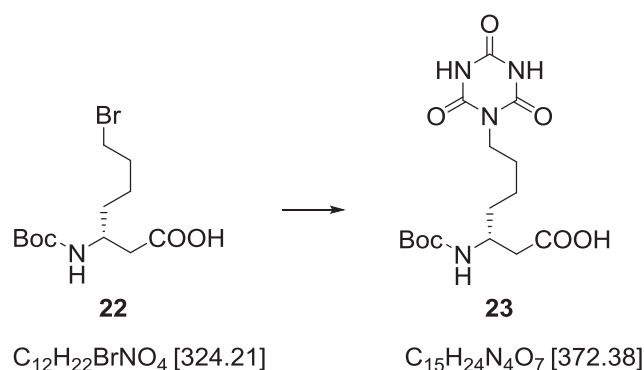
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.22–1.86 (m, 6 H, $\gamma\text{-H}_2$, $\delta\text{-H}_2$, $\epsilon\text{-H}_2$), 2.22–2.37 (m, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 3.50 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 2 H, $\zeta\text{-H}_2$), 3.63–3.78 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 6.62 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 1 H, NH-Boc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 28.20$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.03, 31.89, 33.29 ($\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$, $\epsilon\text{-CH}_2$), 34.89 ($\zeta\text{-CH}_2$), 38.99–39.99 ($\alpha\text{-CH}_2$ im Signalfeldbereich von $[\text{D}_6]\text{DMSO}$), 47.02 ($\beta\text{-CH}$), 77.35 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 154.93 (Boc- C=O), 172.70 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 346.1$ [$M + \text{Na}$] $^+$, 362.1 [$M + \text{K}$] $^+$, 322.1 [$M - \text{H}$] $^-$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{BrNO}_4$	berechnet	346.0624 [$M + \text{Na}$] $^+$, 362.0364 [$M + \text{K}$] $^+$, 322.0659 [$M - \text{H}$] $^-$,
	gefunden	346.0629 [$M + \text{Na}$] $^+$, 362.0364 [$M + \text{K}$] $^+$, 322.0661 [$M - \text{H}$] $^-$.

(23) (R)-3-((*tert*-Butoxycarbonyl)-amino)-7-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-yl)-heptansäure, Boc-D-β³-hLys(CYA)-OH



Unter Schutzgasatmosphäre wurde zu einer Lösung von (*R*)-7-Bromo-3-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)heptansäure (**22**) (605 mg, 1.87 mmol, 1.00 Äq.) und Cyanursäure (1.20 g, 9.33 mmol, 5.00 Äq.) in trockenem DMF (12 mL) DBU (279 µL, 285 mg, 1.87 mmol, 1.00 Äq.) unter Rühren zugetropft, auf 70 °C erhitzt und 2 d bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in H₂O (50 mL) suspendiert, mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung ein pH-Wert von 5 eingestellt und DCM (50 mL) zugegeben. Der farblose Niederschlag, überschüssige Cyanursäure, wurde abfiltriert und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 × 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und auf Kieselgel aufgezogen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (96:4 + 0.5% AcOH, v/v/v) → DCM/MeOH (9:1 + 0.5% AcOH, v/v/v) gereinigt. Um überschüssige AcOH zu entfernen folgte Coevaporieren mit Toluol (3 × 20 mL). Die Verbindung **23** (605 mg, 1.87 mmol, 52%) konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 9:1 + 0.5% AcOH, v/v/v): $R_f = 0.35$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.36$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.14–1.56 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.15–2.36 (m, 2 H, α-H₂), 3.54–3.75 (m, 3 H, β-H, ζ-H₂), 6.56–6.65 (m, 1 H, NH-Boc), 11.39 (s_{br}, 1 H, COOH) ppm.

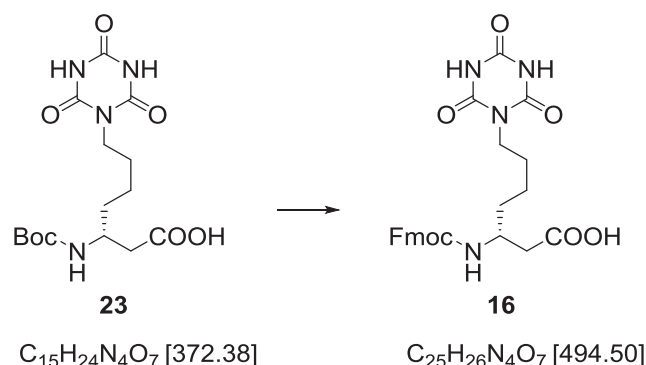
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.21$ (C(CH₃)₃), 22.74, 27.27, 34.06 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 38.99–40.23 (α-CH₂ im Signalbereich von [D₆]DMSO), 40.36 (ζ-CH₂), 47.31 (β-CH), 77.39 (C(CH₃)₃), 148.72, 149.86 (3 × CYA-CO), 154.98 (Boc-CO), 173.20 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 395.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 411.1 [$M + \text{K}$]⁺, 371.2 [$M - \text{H}$]⁻, 743.3 [$2M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₅ H ₂₄ N ₄ O ₇	berechnet	395.1537 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 371.1572 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	395.1536 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 371.1574 [$M - \text{H}$] ⁻ .



(16) (R)-3-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-7-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-yl)-heptansäure, Fmoc-D-β³-hLys(CYA)-OH



Boc-D-β³-hLys(CYA)-OH (**23**) (163 mg, 438 μmol, 1.00 Äq.) wurde bei 0 °C in TFA/H₂O (95:5, 7 mL, v/v) gelöst, 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde TFA im N₂-Gegenstrom entfernt, der Rückstand mit Toluol (3 x 10 mL) und Et₂O (10 mL) coevaporiert und nach Trocknen im Vakuum lyophilisiert. Anschließend wurde das Boc-entschützte Zwischenprodukt in H₂O gelöst (3 mL) und NaHCO₃ (56.7 mg, 675 μmol, 1.54 Äq.) zugegeben. Nach Kühlen auf 0 °C wurde zu der Lösung Fmoc-OSu (228 mg, 676 μmol, 1.54 Äq.) in Dioxan (3 mL) zugetropft, 1 h bei 0 °C und über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von H₂O (20 mL) wurde mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung ein pH-Wert von 1 eingestellt und die wässrige Phase mit DCM (4 x 30 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Extrakt auf Kieselgel aufgezogen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (96:4 + 0.5% AcOH, v/v/v) → DCM/MeOH (9:1 + 0.5% AcOH, v/v/v) gereinigt. Um überschüssige AcOH zu entfernen folgte Coevaporieren mit Toluol (3 x 20 mL). Die Verbindung **16** (195 mg, 394 μmol, 90%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 9:1 + 0.5% AcOH, v/v/v): $R_f = 0.43$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.14\text{--}1.61$ (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.15–2.37 (m, 2 H, α-H₂), 3.61 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, ζ-H₂), 3.69–3.80 (m, 1 H, β-H), 4.15–4.36 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 7.18 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, NH-Fmoc), 7.30–7.43 (m, 4 H, 4 x Fmoc-CH_{Ar}), 7.68 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, 2 x Fmoc-CH_{Ar}), 7.87 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, 2 x Fmoc-CH_{Ar}) ppm.

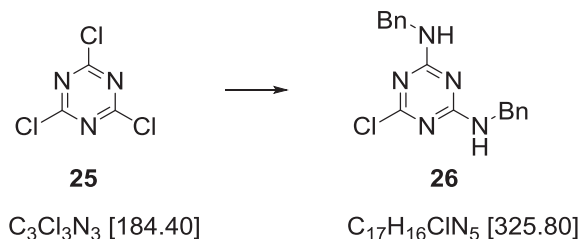
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 22.68, 27.25, 33.87$ (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 38.50–39.99 (α-CH₂ im Signalbereich von [D₆]DMSO), 40.31 (ζ-CH₂), 46.78 (Fmoc-CH), 47.69 (β-CH), 65.06 (Fmoc-CH₂), 119.96, 125.13, 126.95, 127.48 (8 x Fmoc-CH_{Ar}), 139.36, 143.80, 143.92 (4 x Fmoc-C_{Ar}), 148.72, 149.86 (3 x CYA-CO), 155.45 (Fmoc-C=O), 173.24 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 517.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 533.2 [$M + \text{K}$]⁺, 493.2 [$M - \text{H}$]⁻, 987.4 [$2M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₅ H ₂₆ N ₄ O ₇	berechnet	517.1694 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 533.1433 [$M + \text{K}$] ⁺ , 493.1729 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	517.1688 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 533.1422 [$M + \text{K}$] ⁺ , 493.1729 [$M - \text{H}$] ⁻ .

(26) *N*²,*N*⁴-Dibenzyl-6-chlor-1,3,5-triazin-2,4-diamin

Ein anderer synthetischer Zugang zu Verbindung **26** ist literaturbekannt.^[250]



Variante 1: Zu 2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin (**25**) (2.00 g, 10.8 mmol, 1.00 Äq.), K_2CO_3 (3.00 g, 21.7 mmol, 2.00 Äq.), 18-Krone-6 (57.1 mg, 216 μmol , 0.02 Äq.) in Toluol (100 mL) wurde bei -15°C Benzylamin (2.33 g, 21.7 mmol, 2.00 Äq.) zugetropft und nach 1 h Rühren bei -15°C auf RT gebracht und weitere 48 h gerührt. Anschließend wurde der Niederschlag abfiltriert und mit H_2O ($3 \times 10\text{ mL}$) gewaschen und nach Trocknen im Vakuum lyophilisiert. Die Verbindung **26** (3.51 g, 10.8 mmol, quant.) konnte in Form eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

Variante 2: 2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin (**25**) (92.2 mg, 500 μmol , 1.00 Äq.) wurde unter Schutzgasatmosphäre in trockenem THF (4 mL) gelöst und Benzylamin (220 μL , 21.4 mg, 2.00 mmol, 4.00 Äq.) zugetropft. Anschließend wurde mit Hilfe von Mikrowellen-Aktivierung 10 min bei 70°C und bei max. Leistung von 90 W die Reaktionsmischung zur Reaktion gebracht. Nach Waschen mit H_2O ($4 \times 5\text{ mL}$) und Trocknen im Vakuum konnte die Verbindung **26** (150 mg, 460 μmol , 92%) in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

DC ($^i\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$, 5:2:1 + NaCl, v/v/v): $R_f = 0.38$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 323 K): $\delta = 4.41$ (s, 4 H, $2 \times \text{CH}_2\text{Ph}$), 7.21–7.28 (m, 10 H, $10 \times \text{Ph-H}$), 8.10–8.30 (m, 2 H, $2 \times \text{NH-Bn}$) ppm.

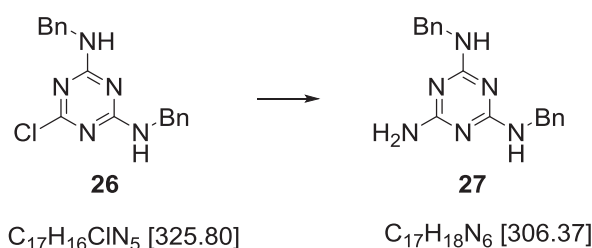
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 323 K): $\delta = 43.49$ ($2 \times \text{CH}_2\text{Ph}$), 126.37, 126.78, 126.99, 127.83, 127.88 ($10 \times \text{Ph-CH}$), 138.89 ($2 \times \text{Ph-C}$), 165.16 ($2 \times \text{NH-TAT-C}$), 167.50 (Cl-TAT-C) ppm.

MS (ESI): $m/z = 326.1$ [$M + \text{H}$]⁺, 348.1 [$M + \text{Na}$]⁺, 364.1 [$M + \text{K}$]⁺, 324.1 [$M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{ClN}_5$	berechnet	348.0986 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 324.1021 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	348.0976 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 324.1016 [$M - \text{H}$] ⁻ .



(27) *N*²,*N*⁴-Dibenzyl-1,3,5-triazin-2,4,6-triamin



*N*²,*N*⁴-Dibenzyl-6-chloro-1,3,5-triazin-2,4-diamin (**26**) (150 mg, 460 µmol, 1.00 Äq.) wurde in einem Ace Druckgefäß (l = 17.8 cm, äußerer Ø = 19 mm, 18 mL Gesamtvolumen) mit kondensiertem NH₃ (10 mL) versetzt und nach Verschließen 1 d bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen wurde der Niederschlag mit H₂O (5 × 50 mL) gewaschen und nach Trocknen im Vakuum lyophilisiert. Die Verbindung **27** (141 mg, 460 µmol, quant.) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

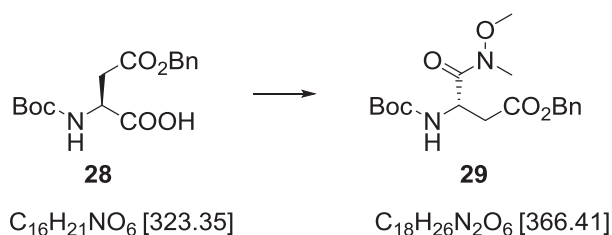
¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 4.42 (s, 4 H, 2 × CH₂Ph), 7.18–7.34 (m, 10 H, 10 × Ph-H), 8.21–8.40 (m, 2 H, 2 × NH-Bn) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 43.52 (2 × CH₂Ph), 126.49, 126.96, 127.11, 127.95, 128.02 (10 × Ph-CH), 139.01 (2 × Ph-C), 165.18 (2 × NH-TAT-C), 168.11 (Cl-TAT-C) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 307.2 [*M* + H]⁺.

HR-MS (ESI): C ₁₇ H ₁₈ N ₆	berechnet	307.1666 [<i>M</i> + H] ⁺ ,
	gefunden	307.1667 [<i>M</i> + H] ⁺ .

(29) (S)-Benzyl-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-4-(methoxy(methyl)-amino)-4-oxobutanoat



Unter Schutzgasatmosphäre wurde zu einer Lösung von Boc-Asp(OBn)-OH (**28**) (2.00 g, 6.19 mmol, 1.00 Äq.), N,O-Dimethylhydroxylamin-hydrochlorid (1.22 g, 11.8 mmol, 1.90 Äq.) und NEM (5.23 mL, 4.76 g, 41.3 mmol, 6.67 Äq.) in trockenem DCM (60 mL) bei -10°C 1-Propanphosphonsäurecycloanhydrid (PPA) in DMF (50 Gew.%, 4.05 mL, 6.81 mmol, 1.10 Äq.) zugetropft und 1.5 h bei dieser Temperatur sowie 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt, EtOAc (50 mL) zugegeben und die organische Phase mit einer wässrigen, 5%igen KHSO_4 -Lösung (4×25 mL), einer wässrigen, 2.5%igen NaHCO_3 -Lösung (4×25 mL) und H_2O (3×25 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Produkt **29** (1.77 g, 4.83 mmol, 78%), welches in Form eines hellgelben Öls isoliert wurde, konnte ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt werden.

Analytische Daten:

DC (EtOAc): $R_f = 0.58$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.51–2.76 (m, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 3.10 (s, 3 H, N- CH_3), 3.68 (s, 3 H, N- OCH_3), 4.79–4.86 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 5.09 (s, 2 H, CH_2Ph), 7.16–7.23 (m, 1 H, NH-Boc), 7.31–7.38 (m, 5 H, $5 \times \text{Ph-H}$) ppm.

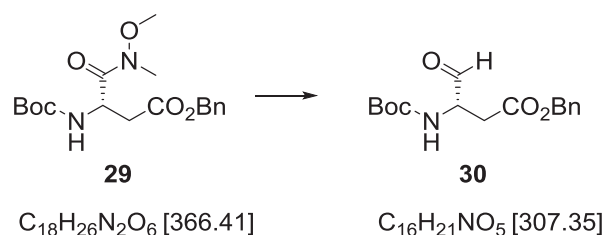
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 28.07$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.06 (N- CH_3), 35.63 ($\alpha\text{-CH}_2$), 47.35 ($\beta\text{-CH}$), 60.95 (N- OCH_3), 65.52 (CH_2Ph), 78.06 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.52 ($2 \times \text{Ph-CH}$), 127.71 ($\text{Ph-CH}_{\text{para}}$), 128.12 ($2 \times \text{Ph-CH}$), 135.77 ($\text{Ph-C}_{\text{ipso}}$), 154.74 (Boc- C=O), 169.59 (C=OObn) ppm.

MS (ESI): $m/z = 367.2$ [$M + \text{H}$] $^+$, 389.2 [$M + \text{Na}$] $^+$, 755.3 [$2M + \text{Na}$] $^+$, 365.2 [$M - \text{H}$] $^-$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$	berechnet	367.1864 [$M + \text{H}$] $^+$, 389.1683 [$M + \text{Na}$] $^+$, 365.1718 [$M - \text{H}$] $^-$,
	gefunden	367.1865 [$M + \text{H}$] $^+$, 389.1683 [$M + \text{Na}$] $^+$, 365.1716 [$M - \text{H}$] $^-$.



(30) (S)-Benzyl-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-4-oxobutanoat



Unter Schutzgasatmosphäre wurde zu einer Lösung von (S)-Benzyl-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-(methoxy(methyl)amino)-4-oxobutanoat (**29**) (1.77 g, 4.83 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem THF (70 mL) 1 M DIBAH-Lösung in THF (9.66 mL, 1.37 g, 9.66 mmol, 2.00 Äq.) bei -78°C tropfenweise über 2 h hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit verdünnter Na/K-Tartrat-Lösung (30 mL) versetzt und auf RT gerbacht. Nach Zugabe weiterer K/Na-Tartrat-Lösung (60 mL) wurde 40 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Et_2O (5×50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (1:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **30** (678 mg, 2.21 mmol, 46%) konnte in Form eines hellgelben Öls erhalten werden.

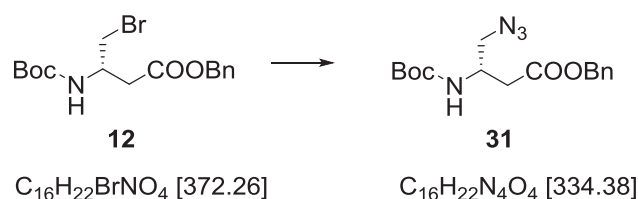
Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 1:1, v/v): $R_f = 0.58$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 1.36$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.44–2.90 (m, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 4.20–4.29 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 5.11 (s, 2 H, CH_2Ph), 7.19–7.38 (m, 5 H, $5 \times \text{Ph-H}$), 9.48 (s, 1 H, CHO) ppm.

MS (ESI): $m/z = 306.1$ [$M - \text{H}$] $^-$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_5$	berechnet	306.1347 [$M - \text{H}$] $^-$,
	gefunden	306.1339 [$M - \text{H}$] $^-$.

(31) Benzyl-(S)-4-azido-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-butanoat

Unter Schutzgasatmosphäre wurde zu einer Lösung von Verbindung **12** (3.82 g, 10.3 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem DMF (80 mL) NaN_3 (837 mg, 12.9 mmol, 1.25 Äq.) in einer Portion zugegeben und 5 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde DMF unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EtOAc (100 mL) aufgenommen und mit H_2O (2×50 mL) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (5:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **31** (3.11 g, 9.30 mmol, 91%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 5:1, v/v): $R_f = 0.35$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , RT): $\delta = 1.38$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.55–2.69 (m, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 3.39–3.53 (m, 2 H, $\gamma\text{-H}_2$), 4.03–4.14 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 5.11 (s, 2 H, CH_2Ph), 7.29–7.38 (m, 5 H, $5 \times \text{Ph-H}$) ppm.

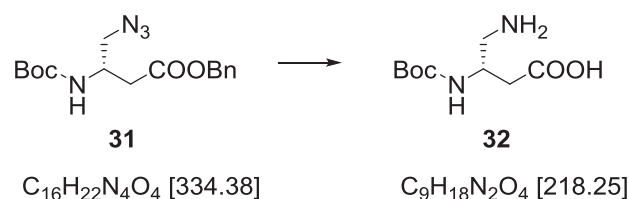
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , RT): $\delta = 28.33$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 36.26 ($\alpha\text{-CH}_2$), 47.20 ($\beta\text{-CH}$), 53.56 ($\gamma\text{-CH}_2$), 66.68 (CH_2Ph), 79.90 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.16 ($2 \times \text{Ph-CH}$), 128.29 ($\text{Ph-CH}_{\text{para}}$), 128.49 ($2 \times \text{Ph-CH}$), 135.30 ($\text{Ph-C}_{\text{ipso}}$), 154.75 (Boc-CO), 170.57 (CO_2Bn) ppm.

MS (ESI): $m/z = 357.2$ [$M + \text{Na}$] $^+$, 691.4 [$2M + \text{Na}$] $^+$, 333.1 [$M - \text{H}$] $^-$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$	berechnet	357.1533 [$M + \text{Na}$] $^+$, 333.1568 [$M - \text{H}$] $^-$,
	gefunden	357.1533 [$M + \text{Na}$] $^+$, 333.1565 [$M - \text{H}$] $^-$.



(32) (S)-4-Amino-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-butansäure, Boc-D-β³-hDap-OH



Die Verbindung **31** (3.10 g, 9.27 mmol, 1.00 Äq.) wurde in EtOH (40 mL) gelöst und 45 min unter Argon-Gegenstrom entgast. Anschließend wurde unter Schutzgasatmosphäre Pd/C (5%ig, 750 mg) in einer Portion dazugegeben, die Reaktionslösung mit H₂-Gas gesättigt und unter H₂-Atmosphäre bei RT über Nacht gerührt. Nach Filtrieren wurde das Filtrat eingengt und im Vakuum getrocknet. Nach Lyophilisieren wurde das Produkt **32** (1.79 g, 8.22 mmol, 89%) in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

DC (iPrOH/H₂O/AcOH, 5:2:1, v/v/v): $R_f = 0.66$.

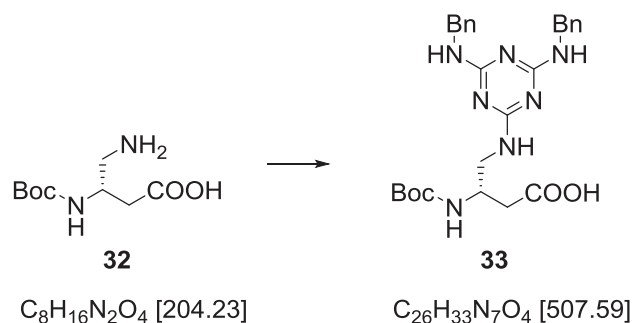
¹H-NMR (300 MHz, D₂O, 308 K): $\delta = 1.20$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.24 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, α -H₂), 2.77–2.84 (m, 1 H, γ -H), 2.93–2.99 (m, 1 H, γ -H), 3.84–4.00 (m, 1 H, β -H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, 308 K): $\delta = 25.10$ (C(CH₃)₃), 37.34 (α -CH₂), 40.12 (γ -CH₂), 43.90 (β -CH), 78.59 (C(CH₃)₃), 154.35 (Boc-CO), 174.19 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 219.2$ [$M + H$]⁺, 241.1 [$M + Na$]⁺, 459.3 [$2M + Na$]⁺, 217.1 [$M - H$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₄	berechnet	219.1339 [$M + H$] ⁺ , 241.1159 [$M + Na$] ⁺ , 217.1194 [$M - H$] ⁻ ,
	gefunden	219.1339 [$M + H$] ⁺ , 241.1162 [$M + Na$] ⁺ , 217.1196 [$M - H$] ⁻ .

(33) (S)-4-((4,6-Bis(benzylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-3-(tert-butoxy-carbonyl)-aminobutansäure



Eine Mischung aus Boc-D-β³-hDap-OH (**32**) (300 mg, 1.37 mmol, 1.00 Äq.), *N*²,*N*⁴-Dibenzyl-6-chloro-1,3,5-triazin-2,4-diamin (**26**) (896 mg, 2.75 mmol, 2.00 Äq.) und K₂CO₃ (383 mg, 2.75 mmol, 2.00 Äq.) in DMSO (6 mL) wurde bei 85 °C über Nacht erhitzt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit MeOH (50 mL) versetzt und der Niederschlag 1 abfiltriert und verworfen. Nach Einengen des Filtrats wurde der Rückstand in H₂O (50 mL) aufgenommen und mit einer wässrigen 5%igen KHSO₄-Lösung ein pH-Wert von 5 eingestellt. Der Niederschlag 2 wurde abfiltriert und das Filtrat mit DCM (4 × 50 mL) extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ und Entfernen der flüchtigen Bestandteile wurde das Rohprodukt mit dem Niederschlag 2 vereint und säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (9:1 + 1% AcOH, v/v/v) gereinigt. Nach Coevaporieren mit Toluol (3 × 10 mL) und Trocknen im Vakuum konnte die Verbindung **33** (283 mg, 558 μmol, 41%) in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 9:1 + 1% AcOH, v/v/v): *R*_f = 0.44.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO-[D₇]DMF, 308 K): δ = 1.35 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.32–2.40 (m, 2 H, α-H₂), 3.18–3.38 (m, 2 H, γ-H₂), 3.85–4.01 (m, 1 H, β-H), 4.42 (s, 4 H, 2 × CH₂Ph), 7.15–7.36 (m, 10 H, 10 × Ph-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO-[D₇]DMF, 308 K): δ = 28.14 (C(CH₃)₃), 36.86 (α-CH₂), 42.98 (2 × CH₂Ph), 43.33 (γ-CH₂), 47.98 (β-CH), 77.57 (C(CH₃)₃), 126.16, 126.76, 127.81 (10 × Ph-CH), 140.57 (2 × Ph-C), 154.82 (Boc-C=O), 165.41 (2 × Bn-TAT-C), 172.27 (COOH) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 508.3 [*M* + H]⁺, 1015.6 [2*M* + H]⁺, 506.2 [*M* - H]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₆ H ₃₃ N ₇ O ₄	berechnet	508.2667 [<i>M</i> + H] ⁺ , 506.2521 [<i>M</i> - H] ⁻ ,
	gefunden	508.2665 [<i>M</i> + H] ⁺ , 506.2511 [<i>M</i> - H] ⁻ .



(37) (R)-3-Amino-2-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-propansäure, Boc-D-Dap-OH^[251]



Zu einer Suspension von Boc-D-Asn-OH (**36**) (7.00 g, 30.1 mmol, 1.00 Äq.) in einem Gemisch aus $\text{CH}_3\text{CN}/\text{EtOAc}/\text{H}_2\text{O}$ (2:2:1, 105 mL, v/v/v) wurde bei 0 °C PIDA (11.7 g, 36.2 mmol, 1.20 Äq.) zugegeben und 5 min bei 0 °C gerührt. Nach 6 h Rühren bei RT wurde die Reaktionsmischung über Nacht bei 4 °C gelagert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit EtOAc (15 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, der Rückstand in EtOAc (20 mL) suspendiert und 1 h bei 60 °C gerührt. Der verbliebene Niederschlag wurde abfiltriert und mit EtOAc (15 mL) gewaschen. Die vereinigten Feststoffe wurden im Vakuum getrocknet und lyophilisiert. Anschließend wurde auf 60 °C erhitzt und über Nacht stehen gelassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem EtOAc (3 × 50 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, der Vorgang wiederholt und die Niederschläge vereint. Die Verbindung **37** (5.08 g, 24.9 mmol, 83%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

DC (EtOAc/MeOH/ H_2O /AcOH, 6:2:1:1 + NaCl, v/v/v/v): $R_f = 0.55$.

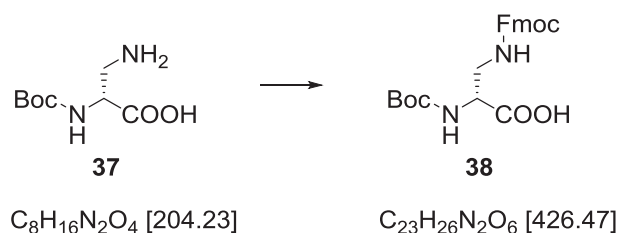
¹H-NMR (300 MHz, D_2O , 308 K): $\delta = 1.49$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.21–3.28 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 3.40–3.46 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 4.13–4.24 (m, 1 H, $\alpha\text{-H}$), 4.72 (s, 2 H, NH_2) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, D_2O , 308 K): $\delta = 30.26$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 43.82 ($\beta\text{-CH}_2$), 55.57 ($\alpha\text{-CH}$), 84.21 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 159.90 (Boc- C=O), 177.32 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 205.1$ [$M + \text{H}$]⁺, 227.1 [$M + \text{Na}$]⁺, 409.3 [$2M + \text{H}$]⁺, 203.1 [$M - \text{H}$]⁻, 407.2 [$2M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$	berechnet	205.1183 [$M + \text{H}$] ⁺ , 227.1002 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 203.1037 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	205.1184 [$M + \text{H}$] ⁺ , 227.1006 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 203.1036 [$M - \text{H}$] ⁻ .

(38) (R)-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-2-((tert-butoxy-carbonyl)-amino)-propansäure, Boc-D-Dap(Fmoc)-OH^[252]



Boc-D-Dap-OH (**37**) (3.29 g, 16.1 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einer wässrigen 10%igen NaHCO_3 -Lösung (35 mL) gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit Fmoc-Cl (4.94 g, 19.1 mmol, 1.18 Äq.) in Dioxan (35 mL) versetzt, 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde H_2O (350 mL) zugegeben, mit Et_2O (2 × 350 mL) extrahiert und die organische Phase verworfen. Die wässrige Phase wurde mit einer wässrigen 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 1 gebracht und mit EtOAc (3 × 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet. Das Produkt **38** (6.87 g, 16.1 mmol, quant.) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

DC (EtOAc/MeOH, 4:1, v/v): $R_f = 0.42$.

¹H-NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 1.38$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.29–3.40 (m, 2 H, $\beta\text{-H}_2$), 3.97–4.13 (m, 1 H, $\alpha\text{-H}$), 4.19–4.30 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 6.91 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, NH-Boc), 7.30–7.44 (m, 5 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}, NH-Fmoc), 7.68 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.88 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 12.53 (s_{br}, 1 H, COOH) ppm.

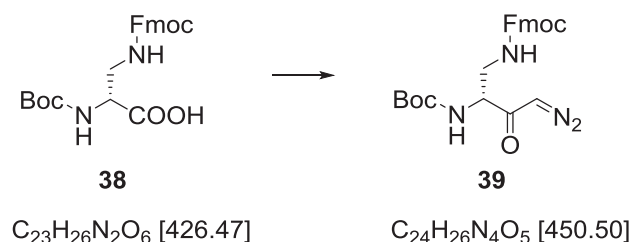
¹³C-NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 28.10$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 41.54 ($\beta\text{-CH}_2$), 46.61 (Fmoc-CH), 53.60 ($\alpha\text{-CH}$), 69.84 (Fmoc-CH₂), 78.14 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 119.88, 124.94, 126.85, 127.40 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 140.49 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 143.61 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 155.97, 155.09 (Boc-C=O, Fmoc-C=O), 171.88 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 427.2$ [$M + \text{H}$]⁺, 444.2 [$M + \text{NH}_4$]⁺, 449.0 [$M + \text{Na}$]⁺, 875.1 [$2M + \text{Na}$]⁺, 425.2 [$M - \text{H}$][−], 851.4 [$2M - \text{H}$][−].

HR-MS (ESI): $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$	berechnet	427.1864 [$M + \text{H}$] ⁺ , 444.2129 [$M + \text{NH}_4$] ⁺ , 449.1683 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 425.1718 [$M - \text{H}$] [−] ,
	gefunden	427.1857 [$M + \text{H}$] ⁺ , 444.2126 [$M + \text{NH}_4$] ⁺ , 449.1671 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 425.1721 [$M - \text{H}$] [−] .



(39) (R)-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-3-(tert-butoxy-carbonyl)-amino-1-diazobutan-2-on, Boc-D-Dap(Fmoc)-CHN₂



Ausgehend von Boc-D-Dap(Fmoc)-OH (**38**) (5.90 g, 13.8 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **39** nach AAV 1 durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (3:2 → 1:1 → 0:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **39** (5.14 g, 11.4 mmol, 84%) wurde in Form eines gelben Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 3:2, v/v): $R_f = 0.29$.

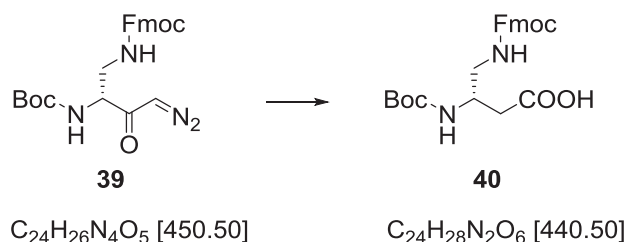
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT): $\delta = 1.42$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.39–3.61 (m, 2 H, β -H₂), 4.10–4.47 (m, 4 H, α -H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 5.38 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 1 H, NH-Fmoc), 5.55 (s_{br}, 1 H, CHN₂), 5.75 (d, $^3J = 6.2$ Hz, 1 H, NH-Boc), 7.26–7.40 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.56 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.74 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, RT): $\delta = 28.26$ (C(CH₃)₃), 42.82 (β -CH₂), 47.14 (Fmoc-CH), 54.58 (CHN₂), 58.29 (α -CH), 66.90 (Fmoc-CH₂), 80.41 (C(CH₃)₃), 119.93, 124.94, 127.02, 127.70 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 141.24 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 143.73 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 157.19, 155.68 (Boc-C=O, Fmoc-C=O), 192.75 (COCHN₂) ppm.

MS (ESI): $m/z = 451.2$ [$M + H$]⁺, 473.2 [$M + Na$]⁺, 923.4 [$2M + Na$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₂₄ H ₂₆ N ₄ O ₅	berechnet	451.1976 [$M + H$] ⁺ , 473.1795 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	451.1970 [$M + H$] ⁺ , 473.1793 [$M + Na$] ⁺ .

(40) (S)-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-3-(tert-butoxy-carbonyl)-aminobutansäure, Boc-D-β³-hDap(Fmoc)-OH



Ausgehend von Boc-D-Dap(Fmoc)-CHN₂ (**39**) (5.07 g, 11.3 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **40** nach AAV 2 durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten EtOAc/MeOH (1:0 → 9:1 + 1% AcOH, v/v/v) gereinigt. Die Verbindung **40** (4.31 g, 9.78 mmol, 87%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (EtOAc): $R_f = 0.46$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.27–2.40 (m, 2 H, α-H₂), 2.99–3.13 (m, 2 H, γ-H₂), 3.81–3.92 (m, 1 H, β-H), 4.15–4.34 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 6.61 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1 H, NH-Boc), 7.30–7.43 (m, 5 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}, NH-Fmoc), 7.69 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.88 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 12.08 (s, 1 H, COOH) ppm.

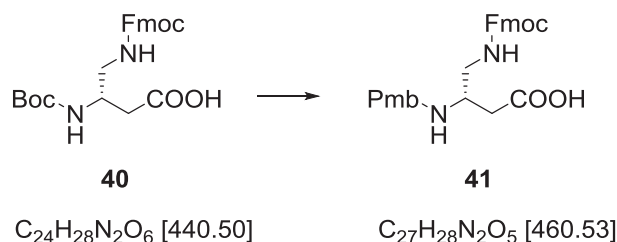
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.16$ (C(CH₃)₃), 36.59 (α-CH₂), 43.79 (γ-CH₂), 46.69 (Fmoc-CH), 47.63 (β-CH), 65.35 (Fmoc-CH₂), 77.58 (C(CH₃)₃), 119.87, 124.95, 126.83, 127.38 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 140.49 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 143.66 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 154.70, 156.11 (Boc-C=O, Fmoc-C=O), 172.11 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 463.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 903.4 [$2M + \text{Na}$]⁺, 439.2 [$M - \text{H}$]⁻, 879.4 [$2M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₆	berechnet	463.1840 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 439.1875 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	463.1852 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 439.1880 [$M - \text{H}$] ⁻ .



(41) (S)-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-3-((4-methoxy-benzyl)-amino)-butansäure, Pmb-D-β³-hDap(Fmoc)-OH



Variante 1: Boc-D-β³-hDap(Fmoc)-OH (**40**) (700 mg, 1.59 mmol, 1.00 Äq.) wurde bei 0 °C in TFA/H₂O (95:5, 16.3 mL, v/v) gelöst, 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde TFA im N₂-Gegenstrom entfernt, der Rückstand mit Toluol (3 × 10 mL) und Et₂O (10 mL) coevaporiert und nach Trocknen im Vakuum lyophilisiert. Danach wurde H-D-β³-hDap(Fmoc)-OH·TFA in MeOH (7.5 mL) gelöst, mit *p*-Anisaldehyd (290 µL, 325 mg, 2.39 mmol, 1.50 Äq.) versetzt und DIPEA (664 µL, 492 mg, 3.81 mmol, 2.40 Äq.) zugetropft. Nach 1 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gebracht, MeOH (7.5 mL) zugegeben und NaBH₄ (90.0 mg, 2.38 mmol, 1.50 Äq.) portionsweise zugegeben. Nach 2 h Rühren bei 0 °C wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck wurde H₂O (50 mL) zugegeben, mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung ein pH-Wert von 2 eingestellt und mit Et₂O (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (2:1 → 1:1 → 0:1, v/v) → EE/MeOH (4:1 + 0.5% AcOH, v/v/v) gereinigt. Die Verbindung **41** (651 mg, 1.41 mmol, 89%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Variante 2: Boc-D-β³-hDap(Fmoc)-OH (**40**) (198 mg, 450 µmol, 1.00 Äq.) wurde bei 0 °C in TFA/H₂O (95:5, 7 mL, v/v) gelöst, 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. TFA wurde im N₂-Gegenstrom entfernt, der Rückstand mit Toluol (3 × 10 mL) und Et₂O (10 mL) coevaporiert und nach Trocknen im Vakuum lyophilisiert. Anschließend wurde H-D-β³-hDap(Fmoc)-OH·TFA mit EtOAc (5 mL) versetzt, *p*-Anisaldehyd (82.1 µL, 91.9 mg, 675 µmol, 1.50 Äq.) zugegeben und nach Kühlen auf 0 °C DIPEA (188 µL, 140 mg, 1.08 mmol, 2.40 Äq.) zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf RT gebracht und solange gerührt, bis die Lösung wieder klar wurde. Danach wurde MgSO₄ (270 mg) zugegeben und 1 d bei RT gerührt. Nach Filtrieren über MgSO₄ wurden die flüchtigen Bestandteile des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH gelöst, auf 0 °C gebracht und nach 15 min NaBH₄ (25.5 mg, 674 µmol, 1.50 Äq.) zugegeben. Nach 2 h Rühren bei 0 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in H₂O gelöst und mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung ein pH-Bereich von 2–3 eingestellt, mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (2:1 → 1:1 → 0:1, v/v) → EtOAc/MeOH (4:1 + 0.5% AcOH → 0:1 + 0.5% AcOH, v/v/v) gereinigt. Produkt **41** wurde mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung versetzt, mit EtOAc extrahiert (3 × 50 mL) und nach Trocknen über MgSO₄ das Lösungsmittel entfernt. Die Verbindung **62** (132 mg, 287 µmol, 64%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

DC (EtOAc/MeOH/H₂O/AcOH, 10:1:1:0.1, v/v/v/v): $R_f = 0.19$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 2.35\text{--}2.41$ (m, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 3.10–3.21 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 3.22–3.31 (m, 2 H, $\gamma\text{-H}_2$), 3.72 (s, 3 H, OCH₃), 3.83–3.98 (m, 2 H, Pmb-CH₂), 4.20–4.25 (m, 1 H, Fmoc-CH), 4.32–4.38 (m, 2 H, Fmoc-CH₂), 6.87–6.91 (m, 2 H, 2 $\times$ Pmb-CH_{Ar}), 7.10–7.26 (m, 2 H, 2 $\times$ Pmb-CH_{Ar}), 7.30–7.43 (m, 5 H, 4 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}, NH-Fmoc), 7.70 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, 2 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}), 7.88 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, 2 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}) ppm.

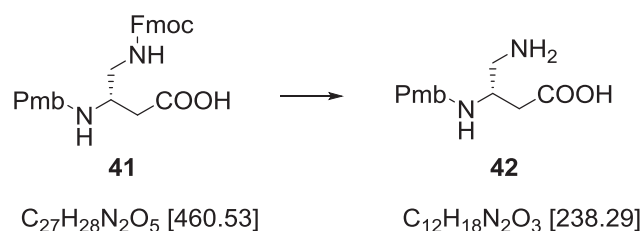
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 34.90$ ($\alpha\text{-CH}_2$), 41.64 ($\gamma\text{-CH}_2$), 46.71 (Fmoc-CH), 48.01 (Pmb-CH₂), 53.73 ($\beta\text{-CH}$), 55.01 (OCH₃), 65.53 (Fmoc-CH₂), 113.75 (2 $\times$ Pmb-CH_{Ar}), 120.03, 125.08, 126.98, 127.55 (8 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}), 128.11, 128.82, 130.13 (2 $\times$ Pmb-CH_{Ar}, Pmb-C_{Ar}), 140.69 (2 $\times$ Fmoc-C_{Ar}), 143.80 (2 $\times$ Fmoc-C_{Ar}), 156.50, 158.82 (OCH₃-Ph-C, Fmoc-CO), 172.74 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 461.2$ [$M + H$]⁺, 459.2 [$M - H$][−].

HR-MS (ESI): C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₅	berechnet	461.2071 [$M + H$] ⁺ , 483.1890 [$M + Na$] ⁺ , 459.1925 [$M - H$] [−] ,
	gefunden	461.2071 [$M + H$] ⁺ , 483.1884 [$M + Na$] ⁺ , 459.1917 [$M - H$] [−] .



(42) (S)-4-Amino-3-((4-methoxybenzyl)-amino)-butansäure, Pmb-D-β³-hDap-OH



Zu einer Lösung von Pmb-D-β³-hDap(Fmoc)-OH (**41**) (650 mg, 1.41 mmol, 1.00 Äq.) in Acetonitril (8 mL) wurde Piperidin (153 µL, 131 mg, 1.55 mmol, 1.10 Äq.) zugetropft und 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über Kieselgel (l: 4 cm, Ø = 4.8 cm) mit Aceton/H₂O (5:1, v/v) filtriert. Die Verbindung **42** (279 mg, 1.17 mmol, 83%) wurde in Form eines hellgelben Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Aceton/H₂O, 5:1, v/v): R_f = 0.21.

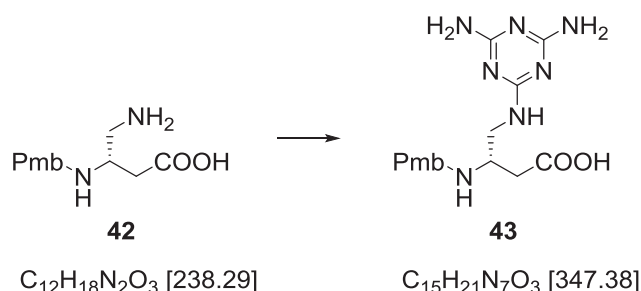
¹H-NMR (300 MHz, D₂O, 308 K): δ = 2.44–2.62 (m, 2 H, α-H₂), 2.97–3.11 (m, 2 H, γ-H₂), 3.22–3.30 (m, 1 H, β-H), 3.84 (s, 3 H, OCH₃), 3.82–3.95 (m, 2 H, Pmb-CH₂), 7.00–7.05 (m, 2 H, 2 × Pmb-CH_{Ar}), 7.36–7.40 (m, 2 H, 2 × Pmb-CH_{Ar}) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, 308 K): δ = 41.26 (α-CH₂), 44.50 (γ-CH₂), 51.41 (Pmb-CH₂), 55.70 (β-CH), 57.98 (OCH₃), 116.87 (2 × Pmb-CH_{Ar}), 132.34, 132.80 (2 × Pmb-CH_{Ar}, Pmb-C_{Ar}), 161.04 (OCH₃-Ph-C), 181.33 (COOH) ppm.

MS (ESI): m/z = 239.2 [$M + H$]⁺, 261.1 [$M + Na$]⁺, 237.1 [$M - H$]⁻, 475.3 [$2M - H$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃	berechnet	239.1390 [$M + H$] ⁺ , 261.1210 [$M + Na$] ⁺ , 237.1245 [$M - H$] ⁻ ,
	gefunden	239.1398 [$M + H$] ⁺ , 261.1211 [$M + Na$] ⁺ , 237.1242 [$M - H$] ⁻ .

(43) (S)-4-((4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-3-((4-methoxybenzyl)-amino)-butansäure, Pmb-D-β³-hDap(TAT)-OH



Variante 1: Pmb-D-β³-hDap-OH (**42**) (231 mg, 969 μmol, 1.00 Äq.), K₂CO₃ (268 mg, 1.94 mmol, 2.00 Äq.) und 6-Chloro-2,4-diamino-1,3,5-triazin (282 mg, 1.94 mmol, 2.00 Äq.) wurden in DMSO (12 mL) suspendiert und 8 h bei 88 °C gerührt und über Nacht bei 4 °C gelagert. DMSO wurde unter vermindertem Druck entfernt, H₂O (10 mL) zugegeben und mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde in MeOH (10 mL) suspendiert auf Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Aceton/H₂O (5:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **43** (241 mg, 694 μmol, 72%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Variante 2: Pmb-D-β³-hDap-OH (**42**) (50.0 mg, 210 μmol, 1.00 Äq.) und 2,4-Diamino-6-chlorotriazin (36.7 mg, 252 μmol, 1.20 Äq.) wurde in H₂O (4 mL) suspendiert und eine wässrige, 1 M NaOH-Lösung (315 μL, 315 μmol, 1.50 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde 8 h bei 88 °C erhitzt. Der Niederschlag, überschüssiges 6-Chloro-2,4-diamino-1,3,5-triazin, wurde abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Filtrat wurde mit Kieselgel versetzt und das Rohprodukt auf Kieselgel adsorbiert. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit den Eluenten Aceton/H₂O (5:1, v/v). Die Verbindung **43** (43.0 mg, 124 μmol, 59%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Aceton/H₂O, 5:1, v/v): *R_f* = 0.19.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 2.16–2.36 (m, 2 H, α-H₂), 3.09–3.18 (m, 2 H, γ-H₂), 3.30–3.38 (m, 1 H, β-H), 3.72 (s, 3 H, OCH₃), 3.83–3.96 (m, 2 H, Pmb-CH₂), 6.16 (s_{br}, 4 H, 2 × NH₂), 6.64 (t, ³*J* = 5.6 Hz, 1 H, NH-Pmb), 6.85–6.88 (m, 2 H, 2 × Pmb-CH_{Ar}), 7.26–7.29 (m, 2 H, 2 × Pmb-CH_{Ar}) ppm.

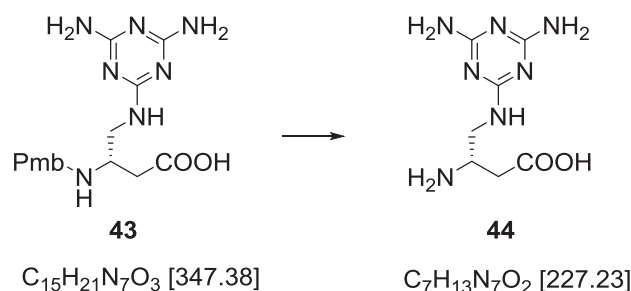
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 35.76 (α-CH₂), 42.05 (γ-CH₂), 47.97 (Pmb-CH₂), 54.27 (β-CH), 55.01 (OCH₃), 113.72 (2 × Pmb-CH_{Ar}), 128.94 (Pmb-C_{Ar}), 129.92 (2 × Pmb-CH_{Ar}), 158.64 (OCH₃-Ph-C), 166.46, 166.90 (3 × TAT-C), 173.61 (COOH) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 348.2 [*M* + H]⁺, 370.2 [*M* + Na]⁺, 346.2 [*M* - H]⁻, 693.2 [2*M* - H]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₅ H ₂₁ N ₇ O ₃	berechnet	348.1779 [<i>M</i> + H] ⁺ , 370.1598 [<i>M</i> + Na] ⁺ , 346.1633 [<i>M</i> - H] ⁻ ,
	gefunden	348.1791 [<i>M</i> + H] ⁺ , 370.1604 [<i>M</i> + Na] ⁺ , 346.1627 [<i>M</i> - H] ⁻ .



**(44) (S)-3-Amino-4-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)-aminobutansäure,
H-D-β³-hDap(TAT)-OH**



Pmb-D-β³-hDap(TAT)-OH (**43**) (240 mg, 691 μmol, 1.00 Äq.) wurde in Acetonitril/H₂O (5:1, 15 mL, v/v) suspendiert, Cer(IV)ammoniumnitrat (1.89 g, 3.45 mmol, 5.00 Äq.) zugegeben und 1 d bei RT gerührt. Nach Extrahieren mit DCM (5 × 50 mL) wurde gesättigte NaHCO₃-Lösung zugegeben und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an RP-Gel mit den Eluenten H₂O → H₂O/MeOH (5:95, v/v) gereinigt. Die Verbindung **44** (146 mg, 643 μmol, 93%) wurde in Form eines hellgelben Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (EtOAc/MeOH/H₂O/AcOH, 6:2:2:1, v/v/v/v): R_f = 0.09.

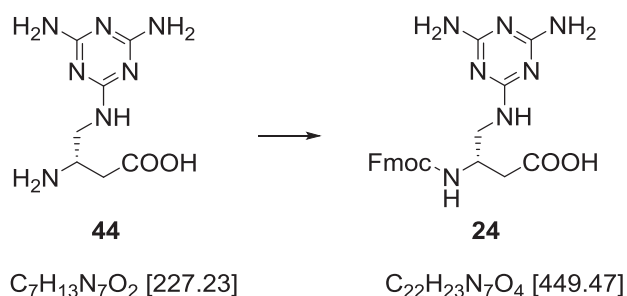
¹H-NMR (300 MHz, D₂O, 308 K): δ = 2.41–2.60 (m, 2 H, α-H₂), 3.46–3.55 (m, 2 H, γ-H₂), 3.57–3.67 (m, 1 H, β-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, 308 K): δ = 40.89 (α-CH₂), 45.65 (γ-CH₂), 52.07 (β-CH), 168.90, 169.25 (3 × TAT-C), 180.89 (COOH) ppm.

MS (ESI): m/z = 228.1 [$M + H$]⁺, 250.1 [$M + Na$]⁺, 226.1 [$M - H$]⁻, 453.2 [$2M - H$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₇ H ₁₃ N ₇ O ₂	berechnet	228.1203 [$M + H$] ⁺ , 250.1023 [$M + Na$] ⁺ , 226.1058 [$M - H$] ⁻ ,
	gefunden	228.1204 [$M + H$] ⁺ , 250.1024 [$M + Na$] ⁺ , 226.1051 [$M - H$] ⁻ .

(24) (S)-3-(((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-4-((4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-butansäure, Fmoc-D-β³-hDap(TAT)-OH



H-D-β³-hDap(TAT)-OH (**44**) (141 mg, 616 μmol, 1.00 Äq.) in einer wässrigen 10%igen NaHCO₃-Lösung (1.61 mL) gelöst und bei 0 °C Fmoc-Cl (193 mg, 746 μmol, 1.21 Äq.) in Dioxan (6 mL) zugetropft. Nach 1 h Rühren bei 0 °C wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde H₂O (100 mL) und Et₂O (80 mL) zugegeben und nach Trennen der Phasen die wässrige Phase mit Et₂O (3 × 80 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung auf pH 1 gebracht und mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaHCO₃-Lösung bei 0 °C neutralisiert, lyophilisiert und auf Kieselgel aufgezogen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und auf Kieselgel gezogen. Nach separater säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit den Eluenten Aceton/H₂O (10:1, v/v) konnte jeweils das Produkt **24** isoliert werden. Nach Vereinigung wurde Verbindung **24** (277 mg, 616 μmol, quant.) in Form eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (EtOAc/MeOH/H₂O/AcOH, 10:1:1:0.1, v/v/v/v): *R_f* = 0.34.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 2.26–2.45 (m, 2 H, α-H₂), 3.12–3.37 (m, 2 H, γ-H₂), 3.85–4.06 (m, 1 H, β-H), 4.07–4.39 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 6.11 (s_{br}, 4 H, 2 × NH₂), 6.45 (s_{br}, 1 H, NH-Fmoc), 7.22–7.47 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.60–7.68 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.85–7.93 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 37.16 (α-CH₂), 43.24 (γ-CH₂), 46.58 (Fmoc-CH), 48.53 (β-CH), 65.39 (Fmoc-CH₂), 119.84, 125.05, 125.10, 126.93, 127.40 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 140.51 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 143.66, 143.74 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 155.42 (Fmoc-CO), 166.39, 166.70 (3 × TAT-C), 172.55 (COOH) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 450.2 [*M* + H]⁺, 472.2 [*M* + Na]⁺, 448.2 [*M* - H]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₂ H ₂₃ N ₇ O ₄	berechnet	450.1884 [<i>M</i> + H] ⁺ , 448.1739 [<i>M</i> - H] ⁻ ,
	gefunden	450.1884 [<i>M</i> + H] ⁺ , 448.1729 [<i>M</i> - H] ⁻ .



(46) (R)-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-3-aminopropansäure, Fmoc-D-Dap-OH^[253]



Zu einer Suspension aus Fmoc-D-Asn-OH (**45**) (7.00 g, 19.8 mmol, 1.00 Äq.) in einem Gemisch aus CH₃CN/EtOAc/H₂O (2:2:1, 105 mL, v/v/v) wurde bei 0 °C PIDA (7.67 g, 23.8 mmol, 1.20 Äq.) zugegeben und 5 min bei 16 °C gerührt. Nach 4 h Rühren bei RT wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit EtOAc (15 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, der Rückstand in EtOAc (100 mL) suspendiert und 0.5 h bei 60 °C gerührt. Der verbliebene Niederschlag wurde abfiltriert und mit EtOAc (10 mL) sowie Et₂O (10 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde erneut unter vermindertem Druck eingeeengt und der Vorgang wiederholt. Die vereinigten Feststoffe wurden im Vakuum getrocknet und lyophilisiert. Die Verbindung **46** (4.25 g, 13.0 mmol, 66%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

DC (EtOAc/MeOH/H₂O/AcOH, 6:2:2:1, v/v/v/v): *R*_f = 0.55.

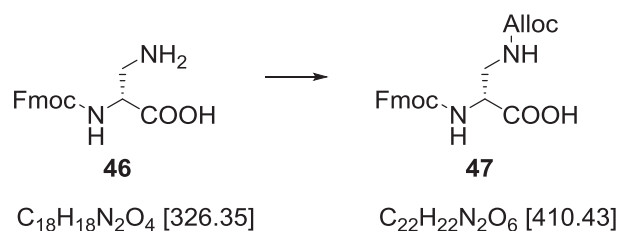
¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 2.85–2.99 (m, 1 H, β-H), 3.00–3.13 (m, 1 H, β-H), 3.81–3.87 (m, 1 H, α-H), 4.20–4.29 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 6.92 (s_{br}, 1 H, NH-Fmoc), 7.29–7.43 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.70 (d, ³*J* = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.87 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 40.65 (α-CH), 41.46 (β-CH₂), 46.56 (Fmoc-CH), 65.56 (Fmoc-CH₂), 119.98, 124.99, 126.87, 127.69 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 139.26, 140.52, 142.45, 143.69 (4 × Fmoc-C_{Ar}), 155.47 (Fmoc-C=O), 171.69 (COOH) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 327.1 [*M* + H]⁺, 349.1 [*M* + Na]⁺, 325.1 [*M* - H]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₄	berechnet	327.1339 [<i>M</i> + H] ⁺ , 349.1159 [<i>M</i> + Na] ⁺ , 325.1194 [<i>M</i> - H] ⁻ ,
	gefunden	327.1340 [<i>M</i> + H] ⁺ , 349.1154 [<i>M</i> + Na] ⁺ , 325.1182 [<i>M</i> - H] ⁻ .

(47) (R)-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-3-(((allyloxy)-carbonyl)-amino)-propansäure, Fmoc-D-Dap(Alloc)-OH



Zu einer Suspension von Fmoc-D-Dap-OH (**46**) (4.05 g, 12.5 mmol, 1.00 Äq.) und NaHCO_3 (1.58 g, 18.8 mmol, 1.50 Äq.) in Dioxan/ H_2O (1:1, 50 mL, v/v) wurde bei 0 °C Chlorameisensäureallylester (1.99 g, 2.26 g, 18.8 mmol, 1.50 Äq.) zugetropft und 40 min bei dieser Temperatur gerührt. Dioxan wurde unter vermindertem Druck entfernt, die Reaktionsmischung mit einer wässrigen, 10%igen HCl-Lösung auf pH 1 gebracht und mit DCM (3 $\times$ 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM $\rightarrow$ DCM/MeOH (9:1 + 0.5% AcOH, v/v/v) gereinigt. Die Verbindung **47** (3.12 g, 7.60 mmol, 61%) konnte in Form eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 9:1 + 0.5% AcOH, v/v/v): $R_f = 0.54$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , 308 K): $\delta = 3.37\text{--}3.65$ (m, 2 H, $\beta\text{-H}_2$), 4.12–4.35 (m, 4 H, $\alpha\text{-H}$, Fmoc-CH, Fmoc- CH_2), 4.45 (d, $^3J = 5.3$ Hz, 2 H, Alloc- $\text{CH}_{2,\text{sp}3}$), 5.07–5.26 (m, 2 H, Alloc- $\text{CH}_{2,\text{sp}2}$), 5.79–5.92 (m, 1 H, Alloc-CH), 7.22–7.36 (m, 4 H, 4 $\times$ Fmoc- CH_{Ar}), 7.61 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, 2 $\times$ Fmoc- CH_{Ar}), 7.74 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 2 H, 2 $\times$ Fmoc- CH_{Ar}) ppm.

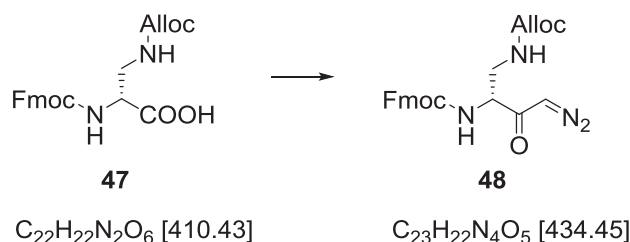
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD , 308 K): $\delta = 43.89$ ($\beta\text{-CH}_2$), 48.33 (Fmoc-CH), 57.39 ($\alpha\text{-CH}$), 66.66 (Alloc- $\text{CH}_{2,\text{sp}3}$), 68.12 (Fmoc- CH_2), 117.65 (Alloc- $\text{CH}_{2,\text{sp}2}$), 120.88, 126.24, 128.14, 128.73, 129.20, 129.90 (8 $\times$ Fmoc- CH_{Ar}), 134.30 (Alloc-CH), 142.52, 145.28 (4 $\times$ Fmoc- C_{Ar}), 158.45, 159.05 (Fmoc- C=O , Alloc- C=O) ppm.

MS (ESI): $m/z = 411.2$ [$M + \text{H}$] $^+$, 433.2 [$M + \text{Na}$] $^+$, 409.1 [$M - \text{H}$] $^-$, 819.3 [$2M - \text{H}$] $^-$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$	berechnet	411.1551 [$M + \text{H}$] $^+$, 433.1370 [$M + \text{Na}$] $^+$, 409.1405 [$M - \text{H}$] $^-$,
	gefunden	411.1543 [$M + \text{H}$] $^+$, 433.1360 [$M + \text{Na}$] $^+$, 409.1398 [$M - \text{H}$] $^-$.



(48) (R)-3-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-4-((((allyloxy)-carbonyl)-amino)-1-diazo-butan-2-on, Fmoc-D-Dap(Alloc)-CHN₂



Ausgehend von Fmoc-D-Dap(Alloc)-OH **47** (3.05 g, 7.43 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **48** nach AAV 1 durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (3:2) gereinigt. Die Verbindung **48** (1.64 g, 3.78 mmol, 51%) wurde in Form eines gelben Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 3:2, v/v): $R_f = 0.20$.

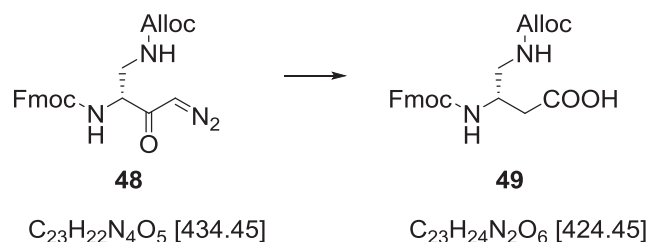
¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 3.16\text{--}3.42$ (m, 2 H, $\beta\text{-H}_2$), 4.07–4.52 (m, 6 H, $\alpha\text{-H}$, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂, Alloc-CH_{2,sp3}), 5.14–5.29 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp2}), 5.81–5.95 (m, 1 H, Alloc-CH), 5.98 (s, 1 H, CHN₂), 7.22 (s_{br}, 1 H, NH-Alloc), 7.31–7.44 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.62 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H, NH-Fmoc), 7.72 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.89 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 41.32$ ($\beta\text{-CH}_2$), 46.67 (Fmoc-CH), 53.46 (CHN₂), 58.23 ($\alpha\text{-CH}$), 64.38 (Alloc-CH_{2,sp3}), 65.65 (Fmoc-CH₂), 116.83 (Alloc-CH_{2,sp2}), 120.01, 125.09, 125.13, 126.96, 127.55 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 133.47 (Alloc-CH), 140.69, 143.71 (4 × Fmoc-C_{Ar}), 155.79, 155.99 (Fmoc-C=O, Alloc-C=O), 193.05 (C=OCHN₂) ppm.

MS (ESI): $m/z = 435.2$ [$M + H$]⁺, 457.2 [$M + Na$]⁺, 891.3 [$2M + Na$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₂₃ H ₂₂ N ₄ O ₅	berechnet	435.1663 [$M + H$] ⁺ , 457.1482 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	435.1666 [$M + H$] ⁺ , 457.1480 [$M + Na$] ⁺ .

(49) (S)-3-(((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-4-(((allyloxy)-carbonyl)-amino)-butansäure, Fmoc-D-β³-hDap(Alloc)-OH



Ausgehend von Fmoc-D-Dap(Alloc)-CHN₂ (**48**) (1.57 g, 3.61 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **49** nach AAV 2 durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten EtOAc → EtOAc/MeOH (4:1 + 0.5% AcOH, v/v/v) gereinigt. Die Verbindung **49** (1.36 g, 3.19 mmol, 89%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (EtOAc/MeOH, 4:1 + 0.5% AcOH, v/v/v): $R_f = 0.75$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 2.29\text{--}2.45$ (m, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 3.10–3.14 (m, 2 H, $\gamma\text{-H}_2$), 3.84–3.97 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 4.22–4.27 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 4.45 (d, $^3J = 5.2$ Hz, 2 H, Alloc-CH_{2,sp3}), 5.11–5.28 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp2}), 5.82–5.95 (m, 1 H, Alloc-CH), 7.16–7.21 (m, 2 H, NH-Fmoc, NH-Alloc), 7.23–7.45 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.69 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.87 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}) ppm.

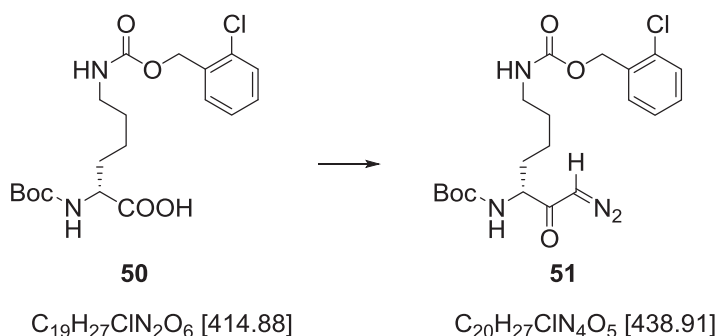
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 37.06$ ($\alpha\text{-CH}_2$), 43.79 ($\gamma\text{-CH}_2$), 46.67 (Fmoc-CH), 48.29 ($\beta\text{-CH}$), 64.25 (Alloc-CH_{2,sp3}), 65.93 (Fmoc-CH₂), 116.78 (Alloc-CH_{2,sp2}), 119.98, 125.17, 126.98, 127.51, 127.97, 128.83 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 133.64 (Alloc-CH), 140.62, 143.82 (4 × Fmoc-C_{Ar}), 155.43, 156.14 (Fmoc-C=O, Alloc-C=O), 172.82 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 425.2$ [$M + H$]⁺, 447.2 [$M + Na$]⁺, 871.3 [$2M + Na$]⁺, 423.1 [$M - H$]⁻, 847.3 [$2M - H$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₆	berechnet	425.1707 [$M + H$] ⁺ , 447.1527 [$M + Na$] ⁺ , 423.1562 [$M - H$] ⁻ ,
	gefunden	425.1700 [$M + H$] ⁺ , 447.1528 [$M + Na$] ⁺ , 423.1552 [$M - H$] ⁻ .



(51) (R)-3-((*tert*-Butoxycarbonyl)-amino)-7-((((2-chlorobenzyl)-oxy)-carbonyl)-amino)-1-diazoheptan-2-on, Boc-D-Lys(2-Cl-Cbz)-CHN₂



Ausgehend von Boc-D-Lys(2-Cl-Cbz)-OH (**50**) (5.00 g, 12.1 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **51** nach AAV 1 (Kapitel 8.1.3) durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (3:2, v/v) gereinigt. Die Verbindung **51** (5.14 g, 11.7 mmol, 97%) konnte in Form eines gelben Öls isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 3:2, v/v): $R_f = 0.25$.

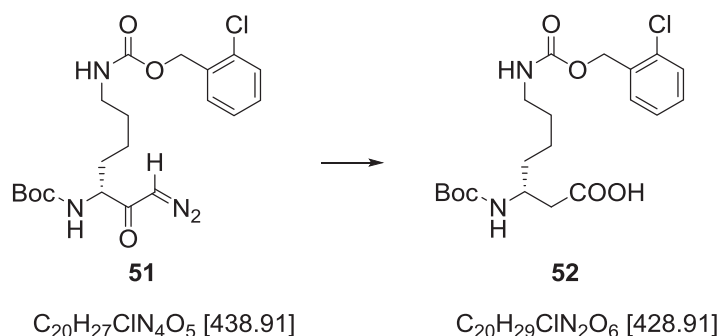
¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.39$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.22–1.68 (m, 6 H, β -H₂, γ -H₂, δ -H₂), 2.96–3.02 (m, 2 H, ϵ -H₂), 3.80–3.92 (m, 1 H, α -H), 5.09 (s, 2 H, CH₂Ph), 6.00 (s, 1 H, CHN₂), 7.13 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H, NH-Boc), 7.28 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 1 H, NH-Cbz), 7.34–7.49 (m, 4 H, 4 x Ph-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.09$ (C(CH₃)₃), 22.66, 28.90, 30.29 (β -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂, 38.50–39.99 (ϵ -CH₂ im Signalbereich von [D₆]DMSO), 52.34 (CHN₂), 58.18 (α -CH), 62.45 (CH₂Ph), 77.17 (C(CH₃)₃), 127.15, 129.14, 129.57 (5 x Ph-CH), 134.54 (Ph-C), 155.35, 155.70 (Boc-CO, Cbz-CO), 195.63 (COCHN₂) ppm.

MS (ESI): $m/z = 461.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 899.3 [$2M + \text{Na}$]⁺, 437.2 [$M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₀ H ₂₇ ClN ₄ O ₅	berechnet	439.1743 [$M + \text{H}$] ⁺ , 461.1562 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 437.1597 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	439.1731 [$M + \text{H}$] ⁺ , 461.1553 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 437.1587 [$M - \text{H}$] ⁻ .

(52) (R)-3-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-7-(((2-chlorobenzyl)-oxy)-carbonyl)-amino)-heptansäure, Boc-D-β³-hLys(2-Cl-Cbz)-OH



Ausgehend von Boc-D-Lys(2-Cl-Cbz)-CHN₂ (**51**) (5.11 g, 11.7 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **52** nach AAV 2 (Kapitel 8.1.3) durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (9:1 → 9:1 + 0.5% AcOH, v/v/v) gereinigt. Um überschüssiges AcOH zu entfernen, wurde mit Toluol (3 x 20 mL) coevaporiert. Die Verbindung **52** (4.26 g, 9.94 mmol, 85%) wurde in Form eines zähen, hellgelben Öls isoliert.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 9:1, v/v): $R_f = 0.45$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.14–1.46 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.21–2.37 (m, 2 H, α-H₂), 2.94–3.02 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.63–3.75 (m, 1 H, β-H), 5.08 (s, 2 H, CH₂Ph), 6.60 (d, ³ $J = 8.8$ Hz, 1 H, NH-Boc), 7.24–7.27 (m, 1 H, NH-Cbz), 7.38–7.49 (m, 4 H, 4 x Ph-H) ppm.

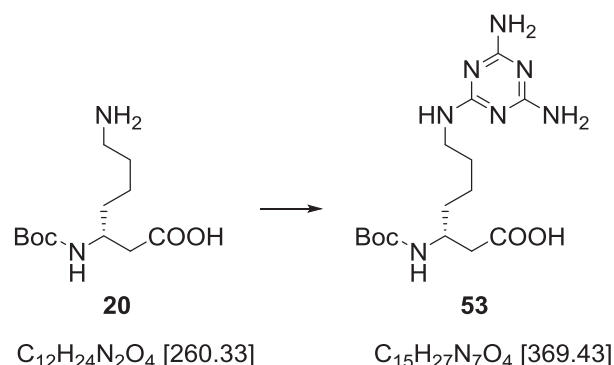
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.17$ (C(CH₃)₃), 22.69, 29.09, 33.90 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 38.50–39.99 (α-CH₂, ζ-CH₂ im Signalbereich von [D₆]DMSO), 47.28 (β-CH), 62.42 (CH₂Ph), 77.31 (C(CH₃)₃), 127.17, 129.14, 129.50, 129.55 (4 x Ph-CH), 132.17, 134.57 (Ph-C), 154.97, 155.68 (Boc-C=O, Cbz-C=O), 172.71 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 451.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 879.3 [$2M + \text{Na}$]⁺, 427.2 [$M - \text{H}$]⁻, 855.3 [$M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₀ H ₂₉ ClN ₂ O ₆	berechnet	429.1787 [$M + \text{H}$] ⁺ , 451.1606 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 427.1641 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	429.1778 [$M + \text{H}$] ⁺ , 451.1610 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 427.1640 [$M - \text{H}$] ⁻ .



(53) (R)-3-((tert-Butoxycarbonyl)-amino)-7-((4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-heptansäure, Boc-D-β³-hLys(TAT)-OH



Boc-D-β³-hLys-OH (**20**) (3.00 g, 11.5 mmol, 1.00 Äq.), K₂CO₃ (3.18 g, 23.0 mmol, 2.00 Äq.) und 2,4-Diamino-6-chlorotriazin (3.35 g, 23.0 mmol, 2.00 Äq.) wurden in DMSO (55 mL) suspendiert und bei 91 °C 18.5 h erhitzt. DMSO wurde unter vermindertem Druck entfernt und MeOH (50 mL) zugegeben. Der farblose Niederschlag, überschüssiges 6-Chloro-2,4-diamino-1,3,5-triazin, wurde abfiltriert und mit MeOH (3 × 10 mL) gewaschen. Die flüchtigen Bestandteile des Filtrats wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde erneut in MeOH (50 mL) suspendiert, auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Aceton/H₂O (20:1 → 10:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **53** (2.99 g, 8.09 mmol, 70%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Aceton/H₂O, 10:1, v/v): *R_f* = 0.39.

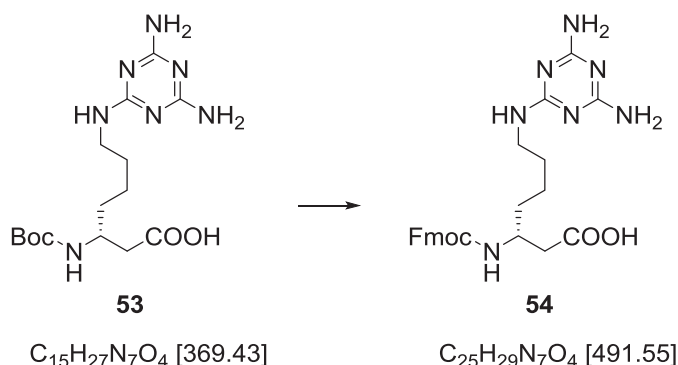
¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 1.36 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.15–1.46 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 1.99–2.14 (m, 2 H, α-H₂), 3.10–3.17 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.50–3.63 (m, 1 H, β-H), 6.05 (s_{br}, 4 H, 2 × NH₂), 6.43 (t, ³*J* = 5.6 Hz, 1 H, TAT-NH), 6.93 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 1 H, NH-Boc) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 28.29 (C(CH₃)₃), 23.38, 29.34, 34.24 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 38.50–39.99 (α-CH₂ im Signalbereich von [D₆]DMSO), 42.17 (ζ-CH₂), 48.02 (β-CH), 76.94 (C(CH₃)₃), 154.70 (Boc-C=O), 166.06, 166.85 (3 × TAT-C), 175.67 (COOH) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 370.2 [*M* + H]⁺, 392.2 [*M* + Na]⁺, 368.2 [*M* - H]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₅ H ₂₇ N ₇ O ₄	berechnet	370.2197 [<i>M</i> + H] ⁺ , 368.2052 [<i>M</i> - H] ⁻ ,
	gefunden	370.2195 [<i>M</i> + H] ⁺ , 368.2052 [<i>M</i> - H] ⁻ .

(54) (R)-3-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-7-((4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-heptansäure, Fmoc-D-β³-hLys(TAT)-OH



Boc-D-β³-hLys(TAT)-OH (**53**) (1.01 g, 2.73 mmol, 1.00 Äq.) wurde bei 0 °C in TFA/H₂O (95:5, 10 mL, v/v) gelöst, 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde TFA im N₂-Gegenstrom entfernt und der Rückstand mit Toluol (3 × 15 mL) und Et₂O (2 × 15 mL) coevaporiert und nach Trocknen im Vakuum lyophilisiert. Anschließend wurde das D-β³-hLys(TAT)-OH·TFA in H₂O (10 mL) gelöst und mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Danach wurde NaHCO₃ (344 mg, 4.01 mmol, 1.50 Äq.) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde Fmoc-OSu (1.38 g, 4.01 mmol, 1.50 Äq.) in Dioxan (10 mL) zugetropft, 1 h bei 0 °C und über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von H₂O (10 mL) wurde mit Et₂O (3 × 10 mL) extrahiert und die organische Phase verworfen. Die wässrige Phase wurde mit einer wässrigen 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 1 gebracht, der ausfallende Niederschlag abfiltriert und mit H₂O/MeOH (3 × 15 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Verbindung **54** (861 mg, 1.75 mmol, 64%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 1.11–1.54 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.16–2.43 (m, 2 H, α-H₂), 3.04–3.24 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.71–3.85 (m, 1 H, β-H), 4.21–4.30 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 5.99 (s_{br}, 4 H, 2 × NH₂), 6.39 (s_{br}, 1 H, TAT-NH), 7.17 (d, ³J = 8.1 Hz, 1 H, NH-Fmoc), 7.32–7.43 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.67–7.69 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.86–7.88 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}) ppm.

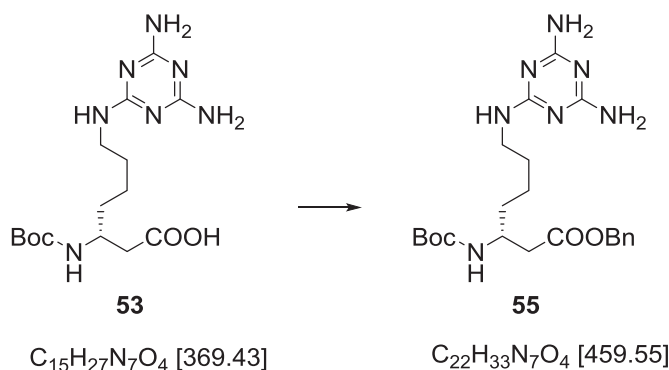
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 22.68, 25.16, 29.15, 33.90 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 38.50–39.99 (α-CH₂, ζ-CH₂ im Signalbereich von [D₆]DMSO), 46.76 (Fmoc-CH), 47.94 (β-CH), 65.08 (Fmoc-CH₂), 119.98, 125.08, 126.95, 127.51 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 140.65, 143.77, 143.89 (4 × Fmoc-C_{Ar}), 155.47 (Fmoc-C=O), 166.21, 166.69 (3 × TAT-C), 172.62 (COOH) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 492.2 [*M* + H]⁺, 490.2 [*M* - H]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₅ H ₂₉ N ₇ O ₄	berechnet	492.2354 [<i>M</i> + H] ⁺ , 490.2208 [<i>M</i> - H] ⁻ ,
	gefunden	492.2354 [<i>M</i> + H] ⁺ , 490.2209 [<i>M</i> - H] ⁻ .



(55) (R)-Benzyl-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino-7-((4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-heptanoat, Boc-D-β³-hLys(TAT)-OBn



Unter Schutzgasatmosphäre wurde zu einer Lösung von Boc-D-β³-hLys(TAT)-OH (**53**) (450 mg, 1.22 mmol, 1.00 Äq.) und NaHCO₃ (107 mg, 1.27 mmol, 1.04 Äq.) in DMF (15 mL) bei 0 °C BnBr (176 µL, 253 mg, 1.48 mmol, 1.21 Äq.) zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit H₂O (50 mL) sowie DCM (50 mL) versetzt. Nach Trennen der Phasen wurde die wässrige Phase mit DCM (2 × 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Aceton/H₂O (10:0.25, v/v) gereinigt. Die Verbindung **55** (115 mg, 250 µmol, 21%) konnte in Form eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (Aceton/H₂O, 10:0.25, v/v): $R_f = 0.47$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.36$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.15–1.46 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.43–2.46 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 2 H, α-H₂), 3.10–3.18 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.70–3.82 (m, 1 H, β-H), 5.08 (s, 2 H, CH₂Ph), 5.94 (s_{br}, 4 H, 2 × NH₂), 6.33 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 1 H, TAT-NH), 6.68 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1 H, NH-Boc), 7.28–7.37 (m, 5 H, 5 × Ph-H) ppm.

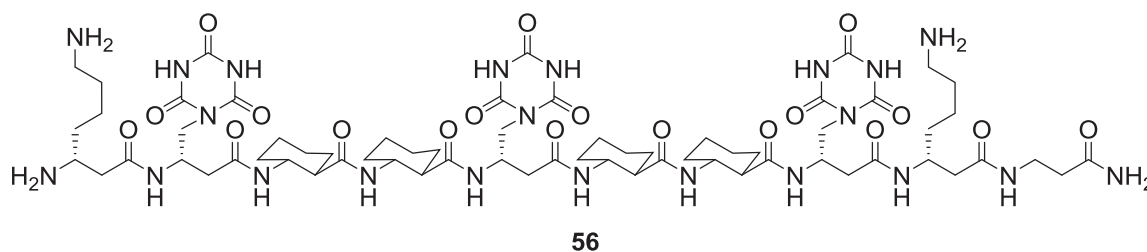
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.16$ (C(CH₃)₃), 22.87, 29.13, 33.96 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 38.50–39.99 (α-CH₂, ζ-CH₂ im Signalbereich von [D₆]DMSO), 47.55 (β-CH), 65.37 (CH₂Ph), 77.46 (C(CH₃)₃), 127.78, 127.84, 128.28 (5 × Ph-CH), 136.09 (Ph-C), 155.00 (Boc-CO), 166.32, 167.05 (3 × TAT-C), 170.77 (COOBn) ppm.

MS (ESI): $m/z = 460.3$ [$M + H$]⁺, 482.3 [$M + Na$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₂₂ H ₃₃ N ₇ O ₄	berechnet	460.2667 [$M + H$] ⁺ , 482.2483 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	460.2668 [$M + H$] ⁺ , 482.2486 [$M + Na$] ⁺ .

8.2.2 Vorschriften zur Synthese der β^3 -Peptide

(56) H-D- β^3 -hLys-D- β^3 -hDap(CYA)-R,R-ACHC-R,R-ACHC-D- β^3 -hDap(CYA)-R,R-ACHC-R,R-ACHC-D- β^3 -hDap(CYA)-D- β^3 -hLys- β -Ala-NH₂^[17]



56

C₆₆H₁₀₄N₂₂O₁₉ [1509.69]

Das Peptid **56** wurde gemäß AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese (20.0 μ mol) an einem mit zuvor Fmoc- β -Ala vorbelegtem Sieber-Amid-Harz (0.74 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-D- β^3 -hDap(CYA)-OH (**15**), Fmoc-R,R-ACHC-OH (**9**) und Fmoc-D- β^3 -hLys(Boc)-OH (**8**). Anschließend wurde das Peptid **56** (~ 10.0 μ mol) nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 1 in DCM vom Trägermaterial abgespalten (Kapitel 8.1.3). Die Verbindung **56** konnte nach Reinigung mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 25 $\rightarrow$ 45% B in 30 min) in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

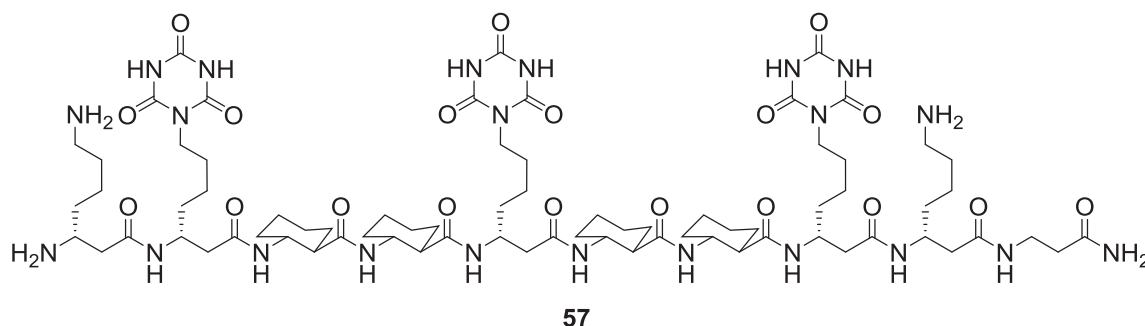
HPLC (analytisch, Gradient: 25 $\rightarrow$ 45% B in 30 min): t_R = 17.65 min.

MS (ESI): m/z = 503.9 [$M + 3H$]³⁺, 755.4 [$M + 2H$]²⁺, 1509.8 [$M + H$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₆₆ H ₁₀₄ N ₂₂ O ₁₉	berechnet	503.9355	[$M + 3H$] ³⁺ ,	755.3997	[$M + 2H$] ²⁺ ,
			1509.7921	[$M + H$] ⁺ ,	
	gefunden	503.9371	[$M + 3H$] ³⁺ ,	755.3993	[$M + 2H$] ²⁺ ,
			1509.7924	[$M + H$] ⁺ .	



(57) H-D-β³-hLys-D-β³-hLys(CYA)-R,R-ACHC-R,R-ACHC-D-β³-hLys(CYA)-R,R-ACHC-R,R-ACHC-D-β³-hLys(CYA)-D-β³-hLys-β-Ala-NH₂



57

C₇₅H₁₂₂N₂₂O₁₉ [1635.94]

Das Peptid **57** wurde gemäß AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese (15.0 μmol) an einem mit zuvor Fmoc-β-Ala vorbelegtem Sieber-Amid-Harz (0.74 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-D-β³-hLys(CYA)-OH (**16**), Fmoc-R,R-ACHC-OH (**9**) und Fmoc-D-β³-hLys(Boc)-OH (**8**). Anschließend wurde das Peptid **57** (7.50 μmol) nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 1 in DCM vom Trägermaterial abgespalten (Kapitel 8.1.3). Die Verbindung **57** konnte nach HPLC-Reinigung (semipräparativ, Gradient: 25 → 45% B in 30 min) in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

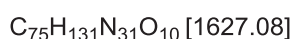
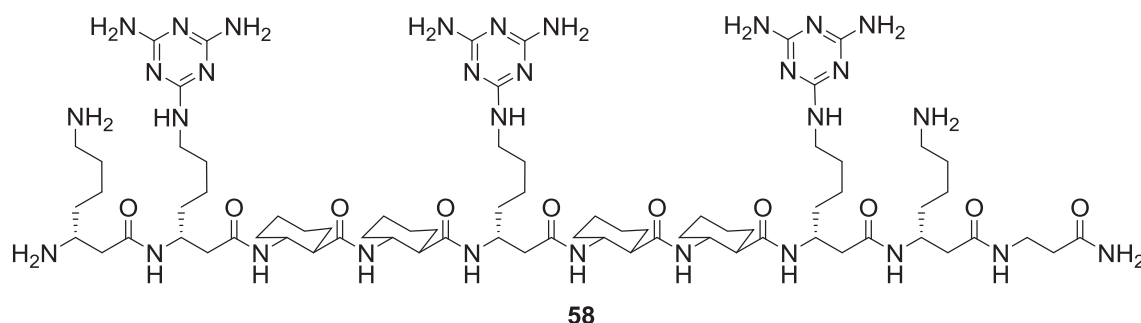
Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 25 → 45% B in 30 min): $t_R = 21.40$ min.

MS (ESI): $m/z = 546.0$ [$M + 3H$]³⁺, 818.5 [$M + 2H$]²⁺, 1636.0 [$M + H$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₇₅ H ₁₂₂ N ₂₂ O ₁₉	berechnet	818.4701 [$M + 2H$] ²⁺ , 1635.9329 [$M + H$] ⁺ ,
	gefunden	818.4706 [$M + 2H$] ²⁺ , 1635.9327 [$M + H$] ⁺ .

(58) H-D- β^3 -hLys-D- β^3 -hLys(TAT)-R,R-ACHC-R,R-ACHC-D- β^3 -hLys(TAT)-R,R-ACHC-R,R-ACHC-D- β^3 -hLys(TAT)-D- β^3 -hLys- β -Ala-NH₂



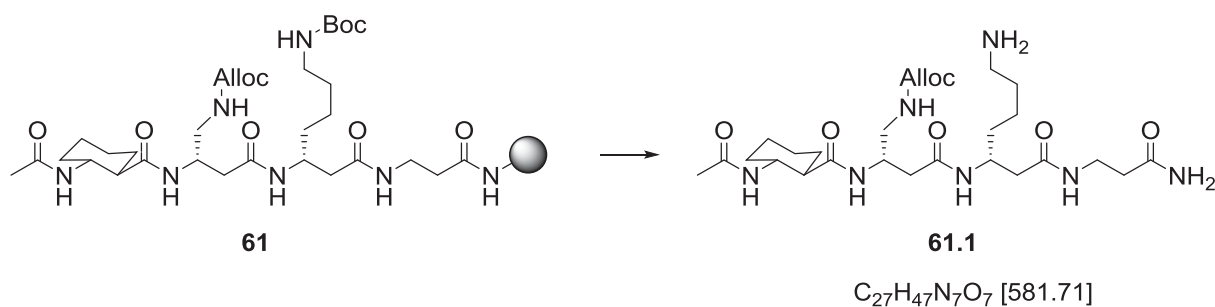
Das Peptid **58** wurde gemäß AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese (20.0 μ mol) an einem mit zuvor Fmoc- β -Ala vorbelegtem Sieber-Amid-Harz (0.74 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-D- β^3 -hLys(TAT)-OH (**54**), Fmoc-R,R-ACHC-OH (**9**) und Fmoc-D- β^3 -hLys(Boc)-OH (**8**). Anschließend wurde das Peptid **58** (10.0 μ mol) nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 1 in DCM vom Trägermaterial abgespalten (Kapitel 8.1.3). Die Verbindung **58** konnte nach HPLC-Reinigung (semipräparativ, Gradient: 25 $\rightarrow$ 40% B in 30 min) in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 25 $\rightarrow$ 40% B in 30 min): t_R = 19.75 min.

MS (ESI): m/z = 407.8 [$M + 4H$]⁴⁺, 543.0 [$M + 3H$]³⁺, 814.1 [$M + 2H$]²⁺, 1627.1 [$M + H$]⁺.

HR-MS (ESI): $C_{75}H_{131}N_{31}O_{10}$	berechnet	543.0304 [$M + 3H$] ³⁺ , 814.0420 [$M + 2H$] ²⁺ , 1627.0768 [$M + H$] ⁺ ,
	gefunden	543.0299 [$M + 3H$] ³⁺ , 814.0419 [$M + 2H$] ²⁺ , 1627.0781 [$M + H$] ⁺ .

(61) Ac-*R,R*-ACHC-D-β³-hDap(Alloc)-D-β³-hLys-β-Ala-NH₂

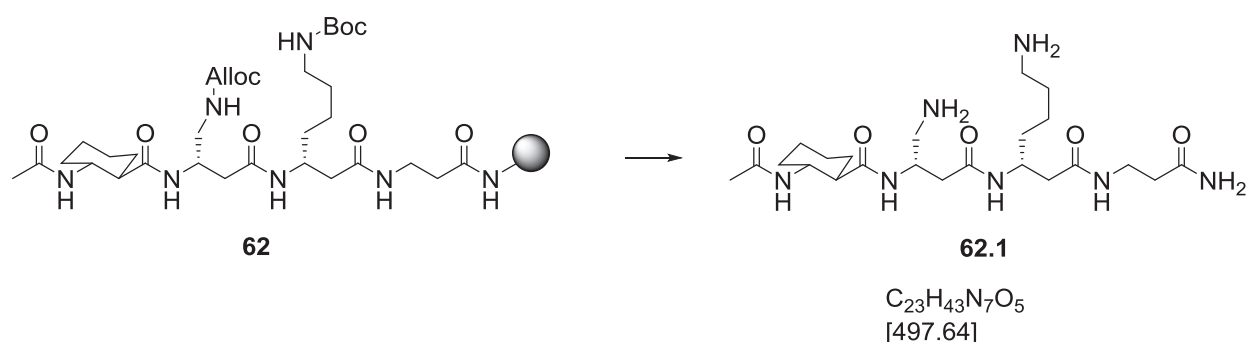
Das Peptid **61** (50.0 μmol) wurde gemäß AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese an einem mit zuvor Fmoc-β-Ala vorbelegtem Sieberamid-Harz (0.74 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-D-β³-hLys(Boc)-OH (**8**), Fmoc-*R,R*-ACHC-OH (**9**) und Fmoc-D-β³-hDap(Alloc)-OH (**49**). Anschließend erfolgte eine Testabsplaltung des Peptids **61** nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 1 in DCM vom Trägermaterial (Kapitel 8.1.3). Das Peptid **61.1** wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten. Die harzgebundene Version **61** konnte im nächsten Schritt weiter umgesetzt werden.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 0 → 40% B in 30 min): $t_R = 24.62$ min.

MS (ESI): $m/z = 582.4$ [$M + H$]⁺, 604.4 [$M + Na$]⁺, 580.3 [$M - H$]⁻.

HR-MS (ESI): $C_{27}H_{47}N_7O_7$	berechnet	582.3610	[$M + H$] ⁺ ,	604.3429	[$M + Na$] ⁺ ,
			580.3464	[$M - H$] ⁻ ,	
	gefunden	582.3608	[$M + H$] ⁺ ,	604.3426	[$M + Na$] ⁺ , 580.3451
			[$M - H$] ⁻ .		

(62) Ac-*R,R*-ACHC-D- β^3 -hDap-D- β^3 -hLys- β -Ala-NH₂

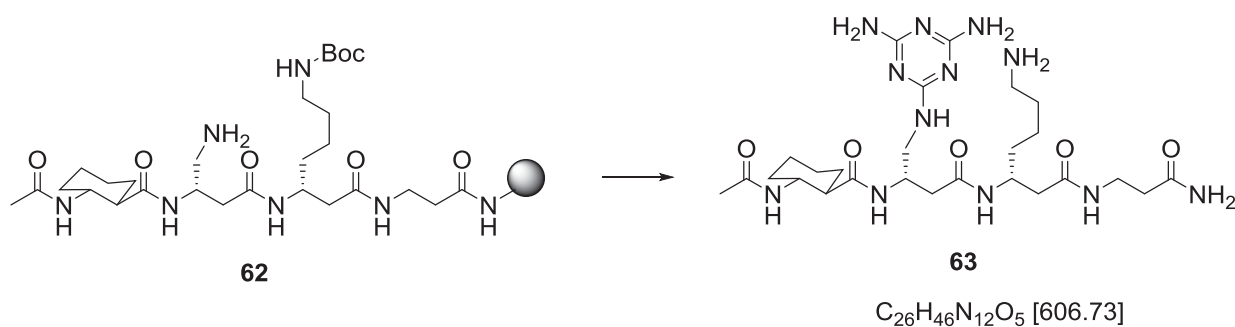
Das harzgebundene Peptid **62** (49.0 μ mol, 1.00 Äq.) wurde unter Schutzgasatmosphäre mit trockenem DMF (2 mL) gefolgt von Dimethylaminoboran (120 mg, 2.00 mmol, 40 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (5.78 mg, 5.00 μ mol, 0.10 Äq.) versetzt. Anschließend wurde 3 h bei RT Schutzgas durch die Lösung geleitet und dadurch ein mechanisches Rühren vermieden. Danach wurde das Harz in eine BD-Spritze überführt und mit DCM, MeOH, DCM (je 7 x 2 mL) gewaschen gefolgt von einer Testabspaltung des Peptids **62.1** nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 1 in DCM (Kapitel 8.1.3). Das Peptid **62.1** wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten. Das harzgebundene Peptid **62** konnte im nächsten Schritt weiter umgesetzt werden.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 0 $\rightarrow$ 40% B in 30 min): t_R = 15.30 min.

MS (ESI): m/z = 249.7 [$M + 2H$]²⁺, 498.4 [$M + H$]⁺, 520.3 [$M + Na$]⁺.

HR-MS (ESI): $C_{23}H_{43}N_7O_5$	berechnet	498.3398 [$M + H$] ⁺ , 520.3218 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	498.3398 [$M + H$] ⁺ , 520.3209 [$M + Na$] ⁺ .

(63) Ac-R,R-ACHC-D-β³-hDap(TAT)-D-β³-hLys-β-Ala-NH₂

Das harzgebundene Peptid **62** (~22.0 mg, 11.0 μmol, 1.00 Äq.) wurde in eine BD-Spritze überführt und mit 2-Chlor-4,6-diamino-1,3,5-triazin (4.80 mg, 33.0 μmol, 3.00 Äq.), K₂CO₃ (4.56 mg, 33.0 μmol, 3.00 Äq.) und DMSO (1 mL) versetzt. Die Reaktion wurde unter Mikrowellen-Aktivierung (3 h, 50 W, 80 °C) durchgeführt und anschließend eine Testabspaltung des Peptids **63** nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 1 in DCM vollzogen (Kapitel 8.1.3). Die Verbindung **63** konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 0 → 40% B in 30 min): $t_R = 18.41$ min.

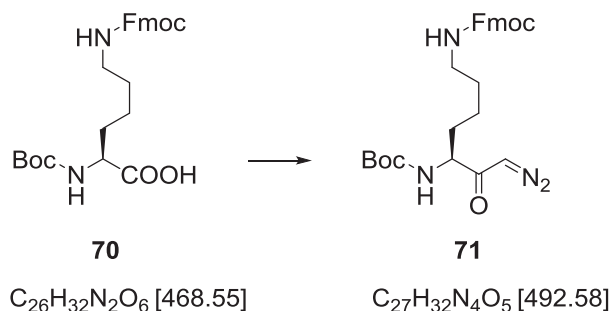
MS (ESI): $m/z = 304.2$ [$M + 2H$]²⁺, 607.4 [$M + H$]⁺, 629.4 [$M + Na$]⁺.

HR-MS (ESI): $C_{26}H_{46}N_{12}O_5$	berechnet	607.3787 [$M + H$] ⁺ , 629.3606 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	607.3785 [$M + H$] ⁺ , 629.3598 [$M + Na$] ⁺ .

8.3 Synthese von trifunktionalen Cyclo- β^3 -Peptiden

8.3.1 Vorschriften zur Synthese der β^3 -Aminosäuren

(71) (S)-3-((*tert*-Butoxy-carbonyl)-amino-7-((((9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-7-amino)-1-diazoheptan-2-on, Boc-L-Lys(Fmoc)-CHN₂^[19]



Ausgehend von Boc-L-Lys(Fmoc)-OH (**70**) (5.00 g, 10.7 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **71** nach AAV 1 durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (3:2, v/v) gereinigt. Die Verbindung **71** (4.87 g, 9.88 mmol, 93%) wurde in Form eines gelben Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 3:2, v/v): $R_f = 0.25$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT): $\delta = 1.41$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.20–1.84 (m, 6 H, β -H₂, γ -H₂, δ -H₂), 3.07–3.22 (m, 2 H, ϵ -H₂), 4.07–4.22 (m, 2 H, α -H, Fmoc-CH), 4.30–4.47 (m, 2 H, Fmoc-CH₂), 4.80–4.88 (m, 1 H, NH-Fmoc), 5.13–5.21 (m, 1 H, NH-Boc), 5.42 (s_{br}, 1 H, CHN₂), 7.22–7.40 (m, 4 H, 4 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}), 7.52–7.58 (m, 2 H, 2 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}), 7.69–7.75 (m, 2 H, 2 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}) ppm.

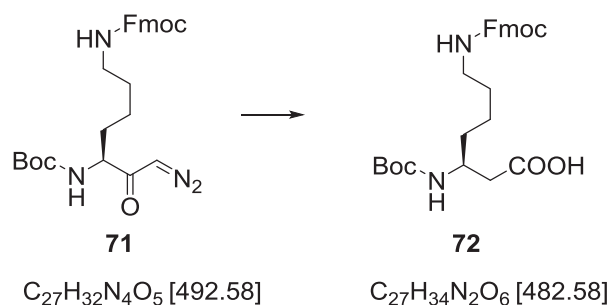
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT): $\delta = 28.30$ (C(CH₃)₃), 22.34, 29.53, 32.02 (β -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂), 40.44 (ϵ -CH₂), 47.28 (Fmoc-CH), 53.90 (CHN₂), 57.08 (α -CH), 66.57 (Fmoc-CH₂), 80.04 (C(CH₃)₃), 119.93, 124.98, 127.01, 127.64 (8 $\times$ Fmoc-CH_{Ar}), 141.30, 143.94 (4 $\times$ Fmoc-C_{Ar}), 155.50, 156.56 (Boc-C=O, Fmoc-C=O), 193.94 (C=OCHN₂) ppm.

MS (ESI): $m/z = 515.2$ [$M + Na$]⁺, 1007.5 [$2M + Na$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₅	berechnet	515.2265 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	515.2267 [$M + Na$] ⁺ .



(72) (S)-7-((((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-amino)-3-((tert-butoxy-carbon-yl)-amino)-heptansäure, Boc-L-β³-hLys(Fmoc)-OH^[19]



Ausgehend von Boc-L-Lys(Fmoc)-CHN₂ (**71**) (4.84 g, 9.83 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **72** nach AAV 2 (Kapitel 8.1.3) durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (12:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **72** (4.06 g, 8.41 mmol, 86%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 9:1 + 3% AcOH, v/v/v): $R_f = 0.52$.

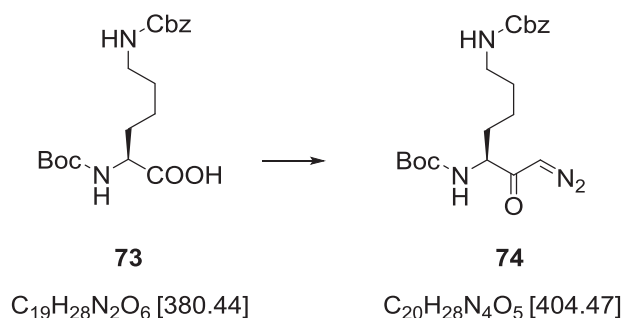
¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.10–1.58 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.20–2.40 (m, 2 H, α-H₂), 2.95–3.03 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.68–3.80 (m, 1 H, β-H), 4.18–4.23 (m, 1 H, Fmoc-CH), 4.29–4.37 (m, 2 H, Fmoc-CH₂), 6.60 (d, ³J = 8.6 Hz, 1 H, NH-Boc), 7.19–7.22 (m, 1 H, NH-Fmoc), 7.30–7.43 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.68 (d, ³J = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.87 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 11.99 (s_{br}, 1 H, COOH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.18$ (C(CH₃)₃), 22.73, 29.14, 33.95 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 39.89 (ζ-CH₂), 40.16 (α-CH₂), 46.77 (Fmoc-CH), 47.31 (β-CH), 65.15 (Fmoc-CH₂), 77.36 (C(CH₃)₃), 119.97, 125.04, 126.94, 127.48 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 140.68, 143.89 (4 × Fmoc-C_{Ar}), 155.50, 156.00 (Boc-CO, Fmoc-CO), 172.55 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 505.3$ [$M + \text{Na}$]⁺, 987.5 [$2M + \text{Na}$]⁺, 481.2 [$M - \text{H}$]⁻, 963.5 [$2M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₆	berechnet	505.2309 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 481.2344 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	505.2309 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 481.2344 [$M - \text{H}$] ⁻ .

(74) (S)-7-(((Benzyloxy)-carbonyl)-amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-1-diazoheptan-2-on, Boc-L-Lys(Cbz)-CHN₂^[19]



Ausgehend von Boc-L-Lys(Cbz)-OH (**73**) (3.00 g, 7.89 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **74** nach AAV1 durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (3:2, v/v) gereinigt. Die Verbindung **74** (2.88 g, 7.12 mmol, 90%) wurde in Form eines gelben Öls isoliert.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 3:2, v/v): $R_f = 0.22$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT): $\delta = 1.43$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.29–1.85 (m, 6 H, β -H₂, γ -H₂, δ -H₂), 3.15–3.22 (m, 2 H, ϵ -H₂), 4.07–4.20 (m, 1 H, α -H), 4.76–4.92 (m, 1 H, NH-Cbz), 5.09 (s, 2 H, CH₂Ph), 5.21–5.24 (m, 1 H, NH-Boc), 5.44 (s_{br}, 1 H, CHN₂), 7.27–7.39 (m, 5 H, 5 x Ph-H) ppm.

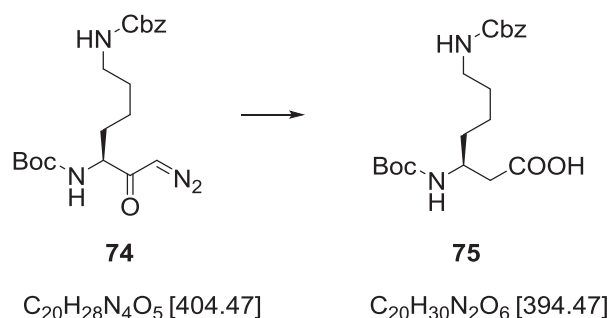
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT): $\delta = 28.29$ (C(CH₃)₃), 22.26, 29.49, 31.96 (β -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂), 40.38 (ϵ -CH₂), 53.86 (CHN₂), 57.19 (α -CH), 66.64 (CH₂Ph), 80.02 (C(CH₃)₃), 128.08, 128.48 (5 x Ph-CH), 136.50 (Ph-C), 155.51, 156.54 (Boc-CO, Cbz-CO), 193.97 (COCHN₂) ppm.

MS (ESI): $m/z = 427.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 831.4 [$2M + \text{Na}$]⁺, 403.2 [$M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₀ H ₂₈ N ₄ O ₅	berechnet	427.1952 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 403.1987 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	427.1951 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 403.1983 [$M - \text{H}$] ⁻ .



(75) (S)-7-(((Benzyloxy)-carbonyl)-amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-heptansäure, Boc-L-β³-hLys(Cbz)-OH^[19]



Zu einer Lösung aus Boc-L-Lys(Cbz)-CHN₂ (**74**) (2.83 g, 7.00 mmol, 1.00 Äq.) und THF/H₂O (9:1, 35 mL) wurde unter Lichtausschluss Silberbenzoat (176 mg, 0.77 mmol, 0.10 Äq.) in Triethylamin (2.91 mL, 2.12 g, 21.0 mmol, 3.00 Äq.) bei -15 °C zugetropft. Nach einer 0.5 h Rühren bei -15 °C wurde die Reaktionsmischung auf RT gebracht und bei dieser Temperatur 21 h gerührt. Danach wurde Et₂O (100 mL) zugegeben und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (3 × 50 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit einer wässrigen, 2 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 2 gebracht und mit Et₂O (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (24:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **75** (1.78 g, 4.50 mmol, 64%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

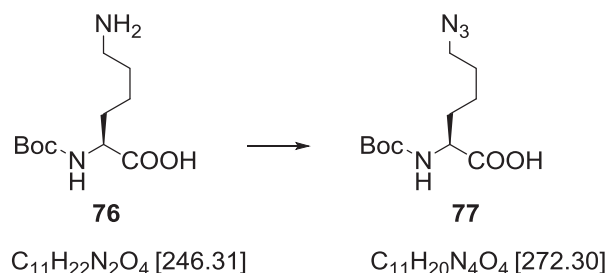
DC (DCM/MeOH, 24:1, v/v): $R_f = 0.38$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, RT): $\delta = 1.39$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.26–1.60 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.44–2.53 (m, 2 H, α-H₂), 3.12–3.18 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.79–3.94 (m, 1 H, β-H), 5.06 (s, 2 H, CH₂Ph), 4.97–5.13 (m, 2 H, NH-Cbz, NH-Boc), 7.27–7.35 (m, 5 H, 5 × Ph-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, RT): $\delta = 28.39$ (C(CH₃)₃), 23.08, 29.42, 34.05 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 39.39 (α-CH₂), 40.16 (ζ-CH₂), 47.23 (β-CH), 66.61 (CH₂Ph), 79.47 (C(CH₃)₃), 127.94, 128.36 (5 × Ph-CH), 136.43 (Ph-C), 155.55, 156.47 (Boc-C=O, Cbz-C=O), 175.52 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 417.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 811.5 [$2M + \text{Na}$]⁺, 393.2 [$M - \text{H}$]⁻, 787.4 [$2M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₆	berechnet	417.1996 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 393.2031 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	417.1992 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 393.2030 [$M - \text{H}$] ⁻ .

(77) *N*²-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*⁶-diazo-L-lysin, Boc-L-Lys(N₃)-OH^[19]**Variante 1**

Natriumazid (19.5 g, 30.0 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einer Mischung aus H₂O/DCM (1:2, 180 mL, v/v) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Trifluormethansulfonsäureanhydrid (10.1 mL, 0.17 g, 60.0 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegotropft und 2 h bei 0 °C gerührt. Die Phasen wurden getrennt und mit DCM (2 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter K₂CO₃-Lösung (100 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die TfN₃-Lösung wurde ohne Aufarbeitung weiter umgesetzt.

Boc-L-Lys-OH (**76**) (7.39 g, 30.0 mmol, 1.00 Äq.) wurde in MeOH (150 mL) gelöst und K₂CO₃ (8.29 g, 60.0 mmol, 2.00 Äq.) in H₂O (80 mL) sowie CuSO₄ (0.75 g, 3.00 mmol, 0.10 Äq.) in H₂O (3 mL) zugegeben. Anschließend wurde die TfN₃-Lösung über 1 h dazugetropft und 15 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit einem Phosphatpuffer (pH = 6, 87.5 mL) und H₂O (87.5 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (2:1 + 0.5% AcOH) gereinigt. Die Verbindung **77** (5.35 g, 28.0 mmol, 93%) wurde in Form eines gelben Öls isoliert, welches nach Lagern bei -21 °C als gelber Feststoff vorlag.

Variante 2

Boc-L-Lys-OH (**76**) (7.00 g, 28.4 mmol, 1.00 Äq.), K₂CO₃ (7.85 g, 56.8 mmol, 2.00 Äq.) und 1*H*-Imidazol-1-sulfonylazid-hydrochlorid^[12,13] (**80**) (7.14 g, 34.1 mmol, 1.20 Äq.) wurden in H₂O/MeOH (1:4, 50 mL, v/v) suspendiert, bei einem pH-Bereich zwischen 8 - 9 CuSO₄·5H₂O (709 mg, 2.84 mmol, 0.10 Äq.) zugegeben und 5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde MeOH unter vermindertem Druck entfernt und die Reaktionsmischung mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung neutralisiert. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 150 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit einem Phosphatpuffer (pH = 6, 200 mL) sowie gesättigter NaCl-Lösung (2 × 100 mL) gewaschen, und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt im Vakuum getrocknet. Die Verbindung **77** (7.56 g, 27.8 mmol, 98%) wurde in Form eines gelben Öls erhalten.

**Analytische Daten:**

DC (Pentan/EtOAc, 2:1 + 0.5% AcOH, v/v/v): $R_f = 0.31$.

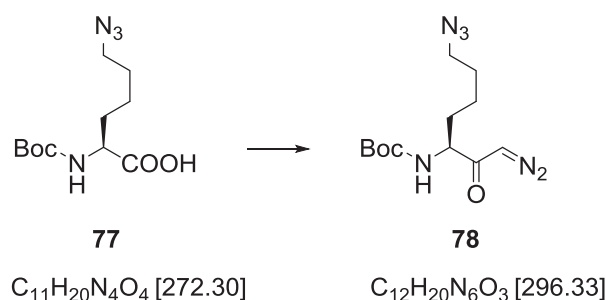
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , RT): $\delta = 1.40$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.30–1.87 (m, 6 H, $\beta\text{-H}_2$, $\gamma\text{-H}_2$, $\delta\text{-H}_2$), 3.24 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 2 H, $\epsilon\text{-H}_2$), 4.05–4.21 (m, 1 H, $\alpha\text{-H}$), 5.46 (s_{br} , 1 H, NH-Boc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , RT): $\delta = 28.36$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.72, 28.48, 31.98 ($\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$), 51.18 ($\epsilon\text{-CH}_2$), 54.20 ($\alpha\text{-CH}$), 80.13 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 155.91 (Boc- C=O), 178.07 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 295.2$ [$M + \text{Na}$] $^+$, 567.3 [$2M + \text{Na}$] $^+$, 271.1 [$M - \text{H}$] $^-$, 543.3 [$2M - \text{H}$] $^-$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$	berechnet	295.1377 [$M + \text{Na}$] $^+$, 271.1412 [$M - \text{H}$] $^-$,
	gefunden	295.1377 [$M + \text{Na}$] $^+$, 271.1411 [$M - \text{H}$] $^-$.

**(78) (S)-7-Azido-3-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)-1-diazoheptan-2-on,
Boc-L-Lys(N₃)-CHN₂^[19]**



Ausgehend von Boc-L-Lys(N₃)-OH (**77**) (7.53 g, 27.6 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **78** nach AAV 1 durchgeführt. Nach Extraktion und Trocknen im Vakuum wurde die Verbindung **78** in Form eines gelben Öls ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 3:2 + 0.5% AcOH, v/v): $R_f = 0.64$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.39$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.17–1.71 (m, 6 H, β -H₂, γ -H₂, δ -H₂), 3.27–3.33 (m, 2 H, ε -H₂), 3.77–3.96 (m, 1 H, α -H), 6.02 (s_{br}, 1 H, CHN₂), 7.18 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1 H, NH-Boc) ppm.

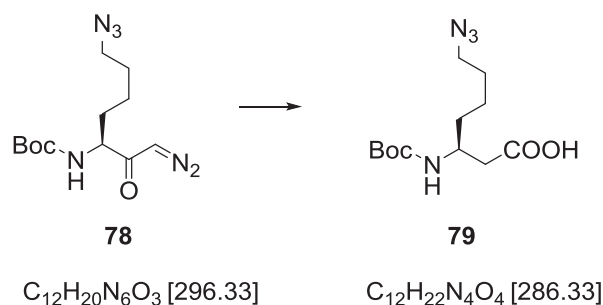
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.07$ (C(CH₃)₃), 22.67, 27.80, 30.13 (β -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂), 50.45 (ε -CH₂), 52.41 (CHN₂), 57.94 (α -CH), 78.17 (C(CH₃)₃), 155.33 (Boc-C=O), 195.48 (COCHN₂) ppm.

MS (ESI): $m/z = 319.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 615.3 [$2M + \text{Na}$]⁺, 295.2 [$M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₂ H ₂₀ N ₆ O ₃	berechnet	319.1489 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 295.1524 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	319.1488 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 295.1524 [$M - \text{H}$] ⁻ .



**(79) (S)-7-Azido-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-heptansäure,
Boc-L-β³-hLys(N₃)-OH^[19]**



Ausgehend von Boc-L-Lys(N₃)-CHN₂ (**78**) (8.17 g, 27.6 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **79** nach AAV 2 durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (24:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **79** (5.12 g, 17.9 mmol, 65%) wurde in Form eines gelben Öls erhalten, welches nach Lagern bei -21 °C sich verfestigte.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 9:1, v/v): *R_f* = 0.55.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 1.37 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.16–1.60 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.23–2.38 (m, 2 H, α-H₂), 3.29 (t, ³*J* = 6.8 Hz, 2 H, ζ-H₂), 3.67–3.78 (m, 1 H, β-H), 6.61 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1 H, NH-Boc), 11.95 (s_{br}, 1 H, COOH) ppm.

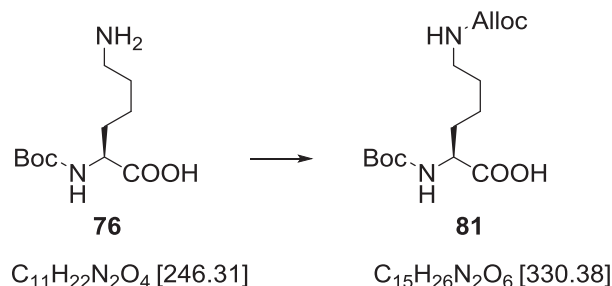
¹³C-NMR (75 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 28.16 (C(CH₃)₃), 22.62, 27.96, 33.72 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂, ζ-CH₂), 39.85 (α-CH₂), 47.06 (β-CH), 50.60 (ζ-CH₂), 77.38 (C(CH₃)₃), 155.01 (Boc-CO), 172.45 (COOH) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 309.2 [*M* + Na]⁺, 595.4 [2*M* + Na]⁺, 285.2 [*M* - H]⁻, 571.3 [2*M* - H]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₂ H ₂₂ N ₄ O ₄	berechnet	309.1533 [<i>M</i> + Na] ⁺ , 285.1568 [<i>M</i> - H] ⁻ ,
	gefunden	309.1539 [<i>M</i> + Na] ⁺ , 285.1575 [<i>M</i> - H] ⁻ .

(81) *N*⁶-((Allyloxy)-carbonyl)-*N*²-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-lysin, Boc-L-Lys(Alloc)-OH

Ein anderer synthetischer Zugang zu Verbindung **81** ist literaturbekannt.^[254]



Zu einer Suspension von Boc-L-Lys-OH (**76**) (7.00 g, 28.4 mmol, 1.00 Äq.) und Na_2CO_3 (7.23 g, 68.2 mmol, 2.40 Äq.) in THF/ H_2O (1:1, 70 mL) wurde bei 0 °C Chlorameisensäureallylester (3.62 mL, 4.11 g, 34.1 mmol, 1.20 Äq.) zugetropft und 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde THF unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mit Et_2O (3 × 50 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Bereich von 1–2 gebracht und mit DCM (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluent EtOAc (+0.5% AcOH, v/v) gereinigt. Die Verbindung **81** (7.03 g, 21.3 mmol, 75%) wurde in Form eines gelben Öls isoliert.

Analytische Daten:

DC (EtOAc + 0.5% AcOH, v/v): $R_f = 0.72$.

¹H-NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 1.38$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.24–1.68 (m, 6 H, $\beta\text{-H}_2$, $\gamma\text{-H}_2$, $\delta\text{-H}_2$), 2.93–2.99 (m, 2 H, $\epsilon\text{-H}_2$), 3.79–3.87 (m, 1 H, $\alpha\text{-H}$), 4.45 (d, $^3J = 5.4$ Hz, 2 H, Alloc- $\text{CH}_{2,\text{sp}3}$), 5.13–5.29 (m, 2 H, Alloc- $\text{CH}_{2,\text{sp}2}$), 5.83–5.96 (m, 1 H, Alloc-CH), 6.93 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, NH-Boc), 7.07–7.16 (m, 1 H, NH-Alloc) ppm.

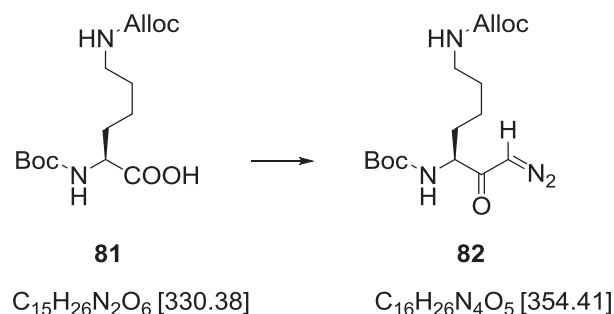
¹³C-NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 28.14$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.79, 28.92, 30.40 ($\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$), 38.07 ($\epsilon\text{-CH}_2$), 53.39 ($\alpha\text{-CH}$), 64.04 (Alloc- $\text{CH}_{2,\text{sp}3}$), 77.87 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 116.72 (Alloc- $\text{CH}_{2,\text{sp}2}$), 133.78 (Alloc-CH), 155.50, 155.83 (Boc- C=O , Alloc- C=O), 174.08 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 353.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 683.3 [$2M + \text{Na}$]⁺, 329.2 [$M - \text{H}$][−], 659.4 [$2M - \text{H}$][−].

HR-MS (ESI): $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$	berechnet	331.1864 [$M + \text{H}$] ⁺ , 353.1683 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 329.1718 [$M - \text{H}$] [−] ,
	gefunden	331.1859 [$M + \text{H}$] ⁺ , 353.1683 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 329.1719 [$M - \text{H}$] [−] .



(82) (S)-7-(((Allyloxy)-carbonyl)-amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-1-diazoheptan-2-on, Boc-L-Lys(Alloc)-CHN₂^[255]



Ausgehend von Boc-L-Lys(Alloc)-OH (**81**) (7.01 g, 21.2 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **82** nach AAV 1 durchgeführt. Nach Extraktion und Trocknen im Vakuum wurde die Verbindung **82** in Form eines gelben Öls ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 1:1, v/v): $R_f = 0.66$.

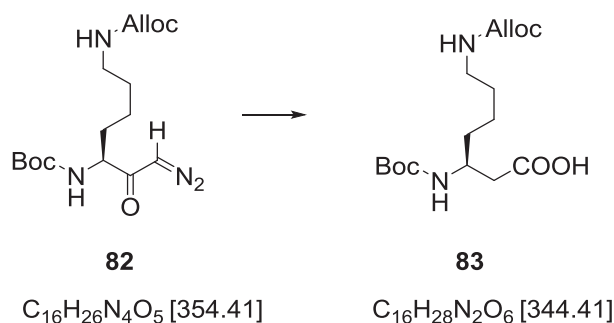
¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.39$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.17–1.72 (m, 6 H, β -H₂, γ -H₂, δ -H₂), 2.93–2.99 (m, 2 H, ϵ -H₂), 3.80–3.91 (m, 1 H, α -H), 4.45 (d, $^3J = 5.3$ Hz, 2 H, Alloc-CH_{2,sp3}), 5.13–5.29 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp2}), 5.83–5.96 (m, 1 H, Alloc-CH), 6.00 (s, 1 H, CHN₂), 7.05–7.18 (m, 2 H, NH-Boc, NH-Alloc) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.10$ (C(CH₃)₃), 22.66, 28.94, 30.28 (β -CH₂, γ -CH₂, δ -CH₂), 38.04 (ϵ -CH₂), 52.32 (CHN₂), 58.12 (α -CH), 64.01 (Alloc-CH_{2,sp3}), 78.16 (C(CH₃)₃), 116.68 (Alloc-CH_{2,sp2}), 133.77 (Alloc-CH), 155.34, 155.80 (Boc-C=O, Alloc-C=O), 195.63 (C=OCHN₂) ppm.

MS (ESI): $m/z = 355.2$ [$M + H$]⁺, 377.2 [$M + Na$]⁺, 731.4 [$2M + Na$]⁺, 353.2 [$M - H$]⁻.

HR-MS (ESI): $C_{16}H_{26}N_4O_5$	berechnet	355.1976 [$M + H$] ⁺ , 377.1795 [$M + Na$] ⁺ , 353.1830 [$M - H$] ⁻ ,
	gefunden	355.1974 [$M + H$] ⁺ , 377.1793 [$M + Na$] ⁺ , 353.1827 [$M - H$] ⁻ .

(83) (S)-7-(((Allyloxy)-carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)-amino)-heptansäure, Boc-L-β³-hLys(Alloc)-OH^[255]



Ausgehend von Boc-L-Lys(Alloc)-CHN₂ (**82**) (7.01 g, 19.8 mmol, 1.00 Äq.) wurde die Synthese der Verbindung **83** nach AAV 2 durchgeführt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/EtOAc (1:1 + 0.5% AcOH, v/v/v) gereinigt. Die Verbindung **83** (4.88 g, 14.9 mmol, 72%) wurde in Form eines gelben Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 1:1, v/v): $R_f = 0.50$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.37$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.15–1.45 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.22–2.37 (m, 2 H, α-H₂), 2.92–2.98 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.64–3.77 (m, 1 H, β-H), 4.45 (d, ³J = 5.3 Hz, 2 H, Alloc-CH_{2,sp3}), 5.12–5.29 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp2}), 5.83–5.96 (m, 1 H, Alloc-CH), 6.58 (d, ³J = 8.9 Hz, 1 H, NH-Boc), 7.04–7.11 (m, 1 H, NH-Alloc), 12.00 (s_{br}, 1 H, COOH) ppm.

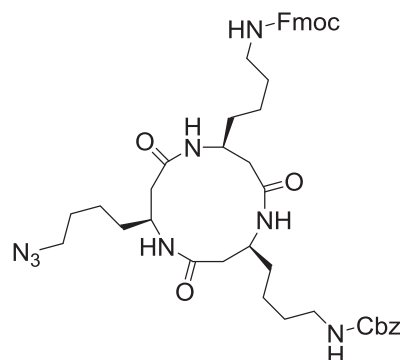
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.20$ (C(CH₃)₃), 22.70, 29.16, 33.91 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 39.83 (ζ-CH₂), 40.14 (α-CH₂), 47.28 (β-CH), 64.04 (Alloc-CH_{2,sp3}), 77.38 (C(CH₃)₃), 116.70 (Alloc-CH_{2,sp2}), 133.81 (Alloc-CH), 155.02, 155.85 (Boc-C=O, Alloc-C=O), 172.50 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 367.2$ [$M + \text{Na}$]⁺, 711.4 [$2M + \text{Na}$]⁺, 343.2 [$M - \text{H}$]⁻, 687.4 [$2M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₆	berechnet	345.2020 [$M + \text{H}$] ⁺ , 367.1840 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 343.1875 [$M - \text{H}$] ⁻ ,
	gefunden	345.2019 [$M + \text{H}$] ⁺ , 367.1844 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 343.1876 [$M - \text{H}$] ⁻ .

8.4.1 Vorschriften zur Synthese der Cyclo- β^3 -Peptide

(69) Cyclo(β^3 -hLys(N_3)- β^3 -hLys(Cbz)- β^3 -hLys(Fmoc))^[19]



69

 $C_{44}H_{56}N_8O_7$ [808.98]

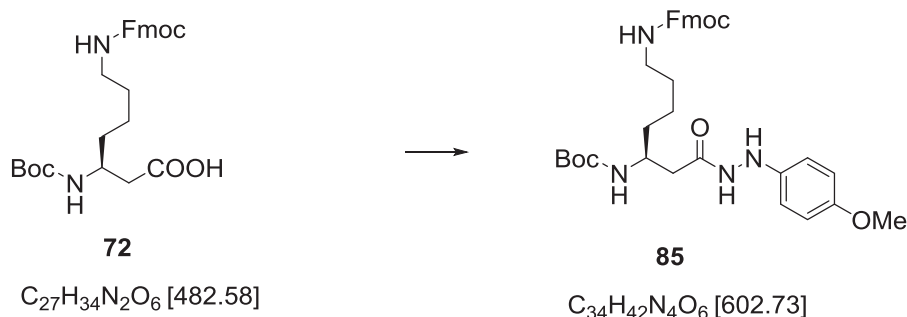
Die Peptidsequenz Fmoc-L- β^3 -hLys(N_3)-L- β^3 -hLys(Cbz)-L- β^3 -hLys(Fmoc)-X (X = Harz) wurde an einem 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl-AM-NovaGel-Harz (0.49 mmol/g, 408 mg, 200 μ mol, 1.00 Äq.) nach AAV 3 mit der Aminosäure Boc-L- β^3 -hLys(Fmoc)-OH (**72**) belegt. Nach Bestimmung der Belegungsdichte nach AAV 4, wurde nach AAV 5 Boc-L- β^3 -hLys(Cbz)-OH (**75**) und Boc-L- β^3 -hLys(N_3)-OH (**79**) gekuppelt. Anschließend wurde das N-terminal entschützte Harz mit DCM (3 $\times$ 3 mL) gewaschen und der Hydrazinobenzoyl-Linker mit N-Bromsuccinimid (71.2 mg, 400 μ mol, 2.00 Äq.) und Pyridin (32.0 mL, 31.6 mg, 400 μ mol, 2.00 Äq.) in DCM (3 mL) für 7 min zum Acyldiazon oxidiert. Das Harz wurde mit trockenem DCM (3 $\times$ 3 mL) gewaschen, mit einer Lösung aus DIPEA (34.8 μ L, 25.8 mg, 2.00 mmol, 10.0 Äq.) in trockenem DCM (5.0 mL) versetzt und für 48 h rotieren lassen. Danach wurde das Harz mit DCM (5 $\times$ 3 mL) gewaschen und das Lösungsmittel der vereinigten Filtrate unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (96:4, v/v) gereinigt. Die Verbindung **69** (41.5 mg, 51.0 μ mol, 26%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 9:1, v/v): R_f = 0.51.

MS (ESI): m/z = 831.4 [$M + Na$]⁺, 1640.8 [$2M + Na$]⁺.

HR-MS (ESI): $C_{44}H_{56}N_8O_7$	berechnet	831.4164 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	831.4170 [$M + Na$] ⁺ .

(85) Boc-L-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe

Unter Schutzgasatmosphäre wurden 4-Methoxyphenylhydrazin-hydrochlorid (**84**) (14.0 g, 8.00 mmol, 1.00 Äq.), Boc-L-β³-hLys(Fmoc)-OH (**72**) (5.02 g, 10.4 mmol, 1.30 Äq.) und HATU (3.95 g, 10.4 mmol, 1.30 Äq.) in trockenem DMF (80 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach 10 min wurde bei 0 °C DIPEA (4.60 mL, 3.41 g, 26.4 mmol, 3.30 Äq.) zugetropft, 3 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck eingeeengt (nicht bis zur Trockene). Der Rückstand wurde in H₂O/MeOH (1:1, 100 mL, v/v) suspendiert, der Niederschlag abfiltriert und mit H₂O/MeOH (1:1, 3 × 50 mL, v/v) gewaschen. Die Verbindung **85** (4.80 g, 7.96 mmol, quant.) wurde in Form eines hellbraunen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

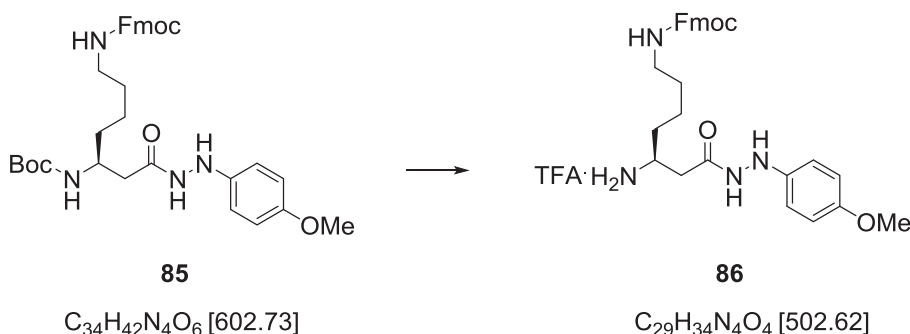
DC (DCM/MeOH, 10:1, v/v): $R_f = 0.52$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.06\text{--}1.49$ (m, 6 H, $\gamma\text{-H}_2$, $\delta\text{-H}_2$, $\varepsilon\text{-H}_2$), 1.38 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.21–2.41 (m, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 2.91–3.04 (m, 2 H, $\zeta\text{-H}_2$), 3.64 (s, 3 H, OCH₃), 3.68–3.84 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 4.18–4.36 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 6.60–6.81 (m, 5 H, NH-Boc, 4 × Ph-H), 7.22–7.26 (m, 1 H, NH-Fmoc), 7.30–7.43 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.67–7.70 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.88 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 9.59 (s, 1 H, NH-NH-PhOMe) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.19$ (C(CH₃)₃), 22.69, 29.24, 33.93 ($\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$, $\varepsilon\text{-CH}_2$), 40.16 ($\alpha\text{-CH}_2$), 40.18 ($\zeta\text{-CH}_2$), 46.74 (Fmoc-CH), 47.66 ($\beta\text{-CH}$), 55.19 (OCH₃), 65.14 (Fmoc-CH₂), 77.36 (C(CH₃)₃), 113.58, 114.08 (4 × Ph-CH), 119.97, 125.04, 126.93, 127.48 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 140.65 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 143.16 (Ph-C), 143.86 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 152.52 (Ph-C), 154.94, 155.99 (Boc-C=O, Fmoc-C=O), 169.93 (CONH-NH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 603.3$ [$M + H$]⁺, 625.3 [$M + Na$]⁺, 1227.6 [$2M + Na$]⁺, 601.3 [$M - H$][−]

HR-MS (ESI): C ₃₄ H ₄₂ N ₄ O ₆	berechnet	603.3177 [$M + H$] ⁺ , 625.2997 [$M + Na$] ⁺ , 601.3032 [$M - H$] [−]
	gefunden	603.3174 [$M + H$] ⁺ , 625.3001 [$M + Na$] ⁺ , 601.3021 [$M - H$] [−]

**(86) H-L-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe**

Boc-L-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe (**85**) (3.01 g, 5.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde bei 0 °C mit einer Mischung aus TFA (23 mL) und 2-Propanthiol (2.35 mL, 1.90 g, 25.0 mmol, 5.00 Äq.) versetzt, 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. Danach wurde überschüssiges TFA im N₂-Gegenstrom entfernt, der Rückstand mit Toluol (3 × 30 mL) und Et₂O (3 × 30 mL) coevaporiert. Nach Trocknen im Vakuum wurde lyophilisiert. Die Verbindung **86** wurde in Form eines braunen Feststoffes erhalten und ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt umgesetzt.

Analytische Daten:

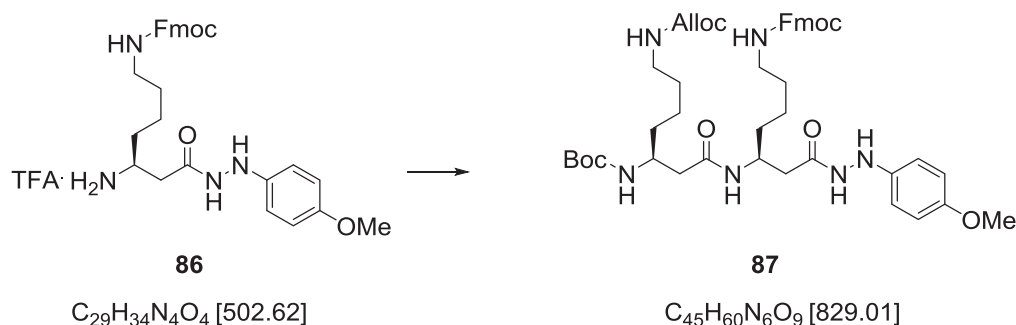
DC (CHCl₃/MeOH/H₂O/AcOH + NaCl, 70:30:3:0.35, v/v/v/v): R_f = 0.57.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 1.14–1.62 (m, 6 H, γ-H₂, δ-H₂, ε-H₂), 2.45–2.55 (m, 2 H, α-H₂), 2.89–3.04 (m, 2 H, ζ-H₂), 3.28–3.45 (m, 1 H, β-H), 3.65 (s, 3 H, OCH₃), 4.17–4.37 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 6.68–6.83 (m, 4 H, 4 × Ph-H), 7.15–7.43 (m, 5 H, NH-Fmoc, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.66–7.68 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.87–7.89 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 9.24 (s, 1 H, NH-NH-PhOMe), 9.24 (s, 1 H, NH-NH-PhOMe), 9.90 (s, 1 H, NH-NH-PhOMe) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 21.75, 29.04, 31.70 (γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 35.24 (α-CH₂), 40.09 (ζ-CH₂), 46.73 (Fmoc-CH), 47.83 (β-CH), 55.20 (OCH₃), 65.09 (Fmoc-CH₂), 113.59, 114.07 (4 × Ph-CH), 119.89, 124.88, 126.81, 127.37 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 140.52 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 142.67 (Ph-C), 143.69 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 152.57 (Ph-C), 155.87 (Fmoc-C=O), 168.87 (CONH-NH) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 503.3 [*M* + H]⁺, 1005.5 [2*M* + H]⁺, 615.3 [*M*·TFA - H]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₉ H ₃₄ N ₄ O ₄	berechnet	503.2653 [<i>M</i> + H] ⁺ , 615.2436 [<i>M</i> ·TFA - H] ⁻ ,
	gefunden	503.2667 [<i>M</i> + H] ⁺ , 615.2437 [<i>M</i> ·TFA - H] ⁻ .

(87) Boc-L-β³-hLys(Alloc)-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe

Unter Schutzgasatmosphäre wurden H-L-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe (**86**) (5.00 mmol, 1.00 Äq.), Boc-L-β³-hLys(Alloc)-OH (**83**) (2.24 g, 6.50 mmol, 1.30 Äq.) und HATU (2.47 g, 6.50 mmol, 1.30 Äq.) in trockenem DMF (85 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach 10 min wurde bei 0 °C DIPEA (3.48 mL, 2.58 g, 20.0 mmol, 4.00 Äq.) zugetropft, 3 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck eingeeengt (nicht bis zur Trockene). Der Rückstand wurde in H₂O/MeOH (1:1, 100 mL, v/v) suspendiert, der Niederschlag abfiltriert und mit H₂O/MeOH (1:1, 3 × 50 mL, v/v) gewaschen. Die Verbindung **87** (3.79 g, 4.58 mmol, 92%) wurde in Form eines hellbraunen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

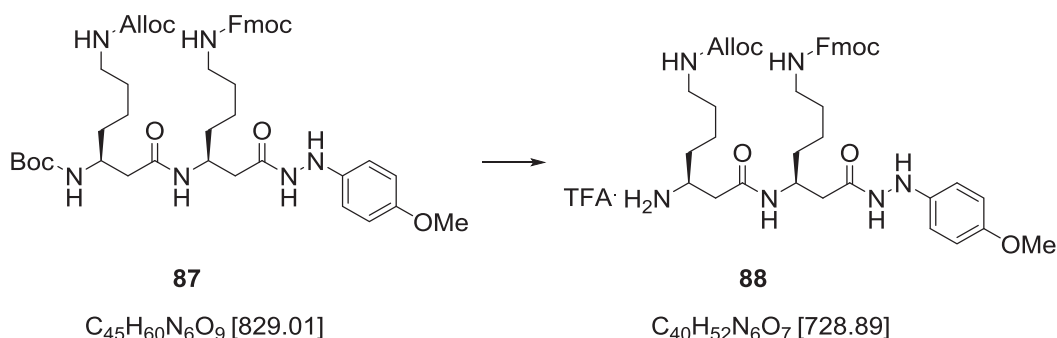
DC (DCM/MeOH, 10:1, v/v): $R_f = 0.46$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.13\text{--}1.53$ (m, 12 H, 2 × γ-H₂, 2 × δ-H₂, 2 × ε-H₂), 1.38 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.11–2.34 (m, 4 H, 2 × α-H₂), 2.90–3.01 (m, 4 H, 2 × ζ-H₂), 3.64 (s, 3 H, OCH₃), 3.66–3.77 (m, 1 H, β-H), 4.02–4.12 (m, 1 H, β-H), 4.18–4.30 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 4.43–4.45 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp3}), 5.12–5.28 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp2}), 5.82–5.95 (m, 1 H, Alloc-CH), 6.52–6.55 (m, 1 H, NH-Boc), 6.63–6.81 (m, 4 H, 4 × Ph-H), 7.03–7.10 (m, 1 H, NH-Alloc), 7.16–7.24 (m, 1 H, NH-Fmoc), 7.28–7.43 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.62–7.69 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.88 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 8.84 (s, 1 H, NH-NH-PhOMe), 9.56–9.57 (m, 1 H, NH-NH-PhOMe) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.17$ (C(CH₃)₃), 22.63, 22.67, 29.23, 33.37, 33.69 (2 × γ-CH₂, 2 × δ-CH₂, 2 × ε-CH₂), 40.00 (α-CH₂), 40.17 (2 × ζ-CH₂), 41.36 (α-CH₂), 45.88 (β-CH), 46.73 (Fmoc-CH), 47.65 (β-CH), 55.20 (OCH₃), 64.00 (Alloc-CH_{2,sp3}), 65.15 (Fmoc-CH₂), 77.31 (C(CH₃)₃), 113.55, 114.11 (4 × Ph-CH), 116.69 (Alloc-CH_{2,sp2}), 119.97, 125.03, 126.93, 127.48 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 133.76 (Alloc-CH), 140.65 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 143.18 (Ph-C), 143.86 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 152.56 (Ph-C), 154.93, 155.79, 155.98 (Boc-CO, Alloc-CO, Fmoc-CO), 169.46, 169.70 (CONH, CONH-NH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 829.5$ [$M + H$]⁺, 851.4 [$M + Na$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₄₅ H ₆₀ N ₆ O ₉	berechnet	829.4495 [$M + H$] ⁺ , 851.4314 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	829.4504 [$M + H$] ⁺ , 851.4326 [$M + Na$] ⁺ .


(88) H-L-β³-hLys(Alloc)-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe


Boc-L-β³-hLys(Alloc)-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe (**87**) (2.90 g, 3.50 mmol, 1.00 Äq.) wurde auf 0 °C gekühlt und eine Mischung aus TFA (20 mL) und 2-Propanthiol (1.65 mL, 1.34 g, 17.5 mmol, 5.00 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. Danach wurde überschüssiges TFA im N₂-Gegenstrom entfernt, der Rückstand mit Toluol (3 × 20 mL) und Et₂O (3 × 20 mL) coevaporiert. Nach Trocknen im Vakuum wurde lyophilisiert. Die Verbindung **88** wurde in Form eines bräunlichen Öls erhalten und ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt umgesetzt.

Analytische Daten:

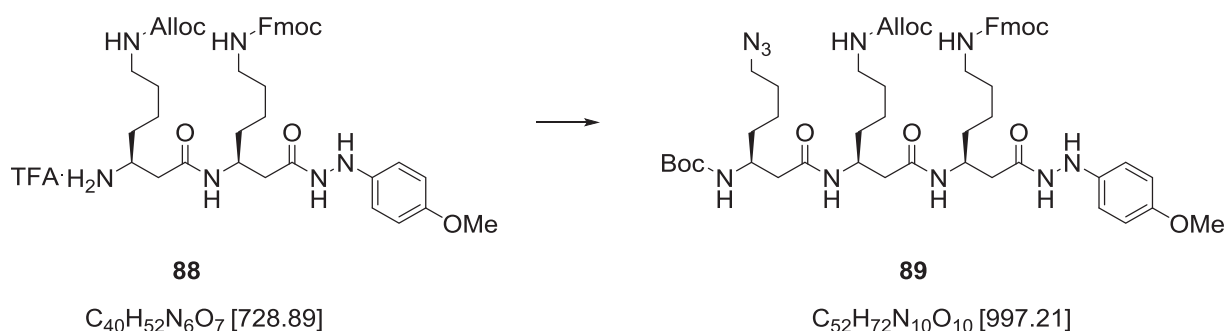
DC (CHCl₃/MeOH/H₂O/AcOH + NaCl, 70:30:3:0.35, v/v/v/v): *R_f* = 0.82.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 1.06–1.59 (m, 12 H, 2 × γ-H₂, 2 × δ-H₂, 2 × ε-H₂), 2.24–2.46 (m, 4 H, 2 × α-H₂), 2.91–3.02 (m, 4 H, 2 × ζ-H₂), 3.31–3.42 (m, 1 H, β-H), 3.65 (s, 3 H, OCH₃), 4.04–4.15 (m, 1 H, β-H), 4.18–4.31 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 4.44–4.46 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp3}), 5.13–5.28 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp2}), 5.82–5.95 (m, 1 H, Alloc-CH), 6.67–6.82 (m, 4 H, 4 × Ph-H), 7.07–7.15 (m, 1 H, NH-Alloc), 7.19–7.27 (m, 1 H, NH-Fmoc), 7.30–7.43 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH), 7.66–7.69 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH), 7.88 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH), 8.13 (s_{br}, 2 H, NH₂), 8.90 (s_{br}, 1 H, NH-NH-PhOMe), 9.68 (s_{br}, 1 H, NH-NH-PhOMe) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 21.69, 22.69, 28.99, 29.26, 31.76, 33.48 (2 × γ-CH₂, 2 × δ-CH₂, 2 × ε-CH₂), 37.23, 38.76 (2 × α-CH₂), 40.20 (2 × ζ-CH₂), 46.21 (β-CH), 46.77 (Fmoc-CH), 48.20 (β-CH), 55.24 (OCH₃), 64.09 (Alloc-CH_{2,sp3}), 65.17 (Fmoc-CH₂), 113.62, 114.17 (4 × Ph-CH), 116.78 (Alloc-CH_{2,sp2}), 120.01, 125.05, 126.96, 127.52 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 133.75 (Alloc-CH), 140.68 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 143.13 (Ph-C), 143.88 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 152.62 (Ph-C), 155.87, 156.04 (Alloc-CO, Fmoc-CO), 168.71, 169.75 (CONH, CONH-NH) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 729.4 [*M* + H]⁺, 751.4 [*M* + Na]⁺, 727.5 [*M* - H]⁻.

HR-MS (ESI): C ₄₀ H ₅₂ N ₆ O ₇	berechnet	729.3970 [<i>M</i> + H] ⁺ , 751.3790 [<i>M</i> + Na] ⁺ , 727.3825 [<i>M</i> - H] ⁻ ,
	gefunden	729.3973 [<i>M</i> + H] ⁺ , 751.3785 [<i>M</i> + Na] ⁺ , 727.3822 [<i>M</i> - H] ⁻ .

(89) Boc-L-β³-hLys(N₃)-β³-hLys(Alloc)-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe

Unter Schutzgasatmosphäre wurden H-L-β³-hLys(Alloc)-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe (**88**) (3.50 mmol, 1.00 Äq.), Boc-L-β³-hLys(N₃)-OH (**79**) (1.30 g, 4.55 mmol, 1.30 Äq.) und HATU (1.73 g, 4.55 mmol, 1.30 Äq.) in trockenem DMF (60 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach 10 min wurde bei 0 °C DIPEA (2.44 mL, 1.81 g, 14.0 mmol, 4.00 Äq.) zugetropft, 3 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck eingengt (nicht bis zur Trockene). Der Rückstand wurde in H₂O/MeOH (1:1, 100 mL, v/v) suspendiert, der Niederschlag abfiltriert und nach Waschen mit H₂O/MeOH (1:1, 3 × 50 mL) im Vakuum getrocknet. Die Verbindung **89** (3.32 g, 3.33 mmol, 95%) wurde in Form eines hellbraunen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 10:1, v/v): $R_f = 0.44$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.13$ – 1.58 (m, 18 H, 3 × γ -H₂, 3 × δ -H₂, 3 × ϵ -H₂), 1.37 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.12–2.40 (m, 6 H, 3 × α -H₂), 2.91–3.00 (m, 4 H, 2 × ζ -H₂), 3.25–3.31 (m, 2 H, ζ -H₂), 3.64 (s, 3 H, OCH₃), 3.69–3.78 (m, 1 H, β -H), 3.97–4.11 (m, 2 H, 2 × β -H), 4.18–4.30 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 4.43–4.45 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp3}), 5.12–5.28 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp2}), 5.82–5.95 (m, 1 H, Alloc-CH), 6.54–6.61 (m, 1 H, NH-Boc), 6.66–6.81 (m, 4 H, 4 × Ph-H), 7.03–7.09 (m, 1 H, NH-Alloc), 7.17–7.25 (m, 1 H, NH-Fmoc), 7.30–7.43 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.66–7.69 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.87 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 9.56–9.57 (m, 1 H, NH-NH-PhOMe) ppm.

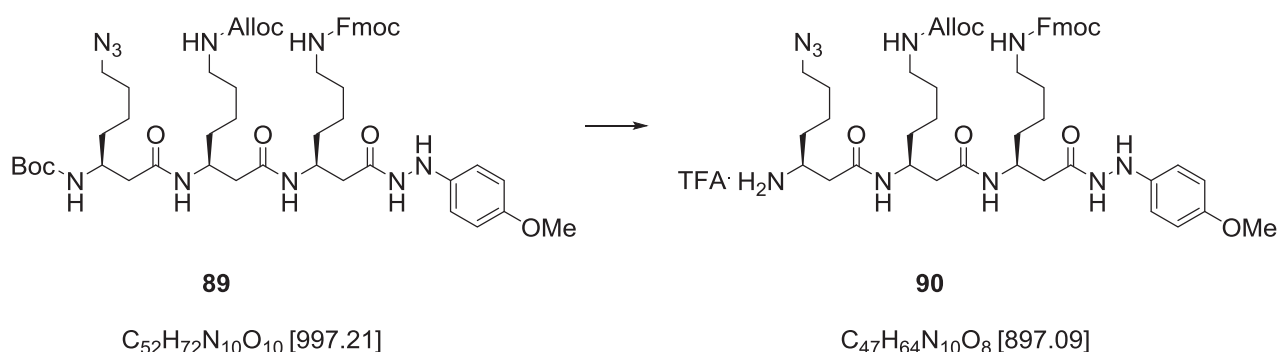
¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 28.14$ (C(CH₃)₃), 22.54, 22.62, 22.69, 28.00, 29.22, 29.27, 33.27, 33.40 (3 × γ -CH₂, 3 × δ -CH₂, 3 × ϵ -CH₂), 38.94 (α -CH₂), 40.18 (ζ -CH₂), 41.31, 41.21 (2 × α -CH₂), 45.96, 45.89 (2 × β -CH), 46.73 (Fmoc-CH), 47.71 (β -CH), 50.60 (ζ -CH₂), 55.19 (OCH₃), 64.00 (Alloc-CH_{2,sp3}), 65.16 (Fmoc-CH₂), 77.33 (C(CH₃)₃), 113.56, 114.10 (4 × Ph-CH), 116.66 (Alloc-CH_{2,sp2}), 119.96, 125.03, 126.92, 127.47 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 133.76 (Alloc-CH), 140.64 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 143.16 (Ph-C), 143.86 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 152.57 (Ph-C), 154.95, 155.77, 155.98 (Boc-C=O, Alloc-C=O, Fmoc-C=O), 169.25, 169.34, 169.72 (2 × CONH, CONH-NH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 997.6$ [$M + H$]⁺, 1019.5 [$M + Na$]⁺, 995.6 [$M - H$]⁻.

HR-MS (ESI): $C_{52}H_{72}N_{10}O_{10}$	berechnet	997.5506 [$M + H$] ⁺ , 1019.5325 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	997.5506 [$M + H$] ⁺ , 1019.5333 [$M + Na$] ⁺ .



(90) H-L-β³-hLys(N₃)-β³-hLys(Alloc)-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe



Boc-L-β³-hLys(N₃)-β³-hLys(Alloc)-β³-hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe (**89**) (150 mg, 0.15 mmol, 1.00 Äq.) wurde auf 0 °C gekühlt und eine Mischung aus TFA/2-Propanthiol (99.9:0.1, 15 mL, v/v) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. Danach wurde überschüssiges TFA im N₂-Gegenstrom entfernt, der Rückstand mit Toluol (3 x 20 mL) und Et₂O (2 x 10 mL) coevaporiert. Nach Trocknen im Vakuum wurde lyophilisiert. Die Verbindung **90** wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten und sollte ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt umgesetzt werden.

Analytische Daten:

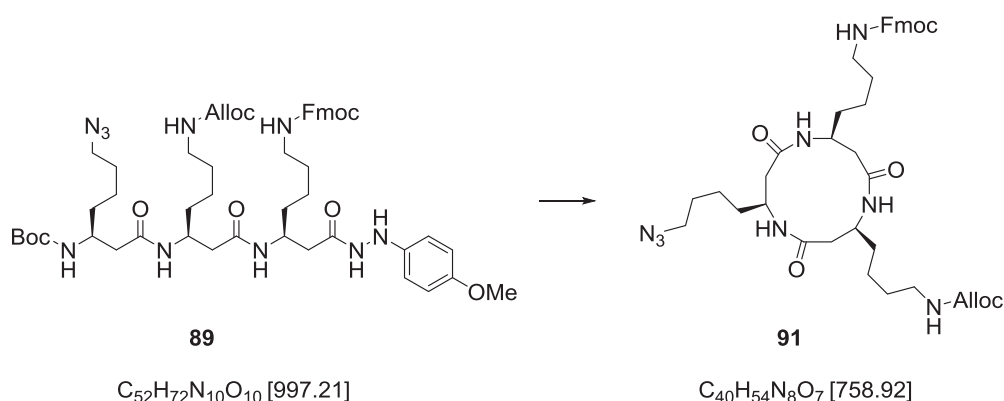
DC (DCM/MeOH, 10:1, v/v): $R_f = 0.25$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 1.08$ – 1.65 (m, 18 H, 3 × γ -H₂, 3 × δ -H₂, 3 × ϵ -H₂), 2.14 – 2.47 (m, 6 H, 3 × α -H₂), 2.89 – 3.02 (m, 4 H, 2 × ζ -H₂), 3.25 – 3.44 (m, 3 H, ζ -H₂, β -H), 3.64 (s, 3 H, OCH₃), 3.99 – 4.13 (m, 2 H, 2 × β -H), 4.17 – 4.33 (m, 3 H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 4.43 – 4.45 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp3}), 5.12 – 5.27 (m, 2 H, Alloc-CH_{2,sp2}), 5.82 – 5.94 (m, 1 H, Alloc-CH), 6.66 – 6.82 (m, 4 H, 4 × Ph-H), 7.04 – 7.12 (m, 1 H, NH-Alloc), 7.20 – 7.43 (m, 5 H, NH-Fmoc, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.66 – 7.69 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.86 – 7.88 (m, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 9.63 (s_{br}, 1 H, NH-NH-PhOMe) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): $\delta = 21.69$, 22.64 , 22.68 , 27.84 , 29.27 , 31.61 , 33.40 , 33.51 (3 × γ -CH₂, 3 × δ -CH₂, 3 × ϵ -CH₂), 37.20 (α -CH₂), 38.47 (ζ -CH₂), 38.92 (α -CH₂), 40.19 , 40.25 (2 × ζ -CH₂), 40.96 (α -CH₂), 45.95 , 46.31 (2 × β -CH), 46.77 (Fmoc-CH), 48.15 (β -CH), 50.38 (ζ -CH₂), 55.23 (OCH₃), 64.05 (Alloc-CH_{2,sp3}), 65.21 (Fmoc-CH₂), 113.64 , 114.15 (4 × Ph-CH), 116.72 (Alloc-CH_{2,sp2}), 120.01 , 125.07 , 126.96 , 127.52 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 133.78 (Alloc-CH), 140.69 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 143.16 (Ph-C), 143.89 (2 × Fmoc-C_{Ar}), 152.63 (Ph-C), 155.85 , 156.05 (Alloc-CO, Fmoc-CO), 168.63 , 169.34 , 169.82 (2 × CONH, CONH-NH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 897.5$ [$M + H$]⁺, 919.5 [$M + Na$]⁺, 1009.6 [$M \cdot TFA - H$]⁺.

HR-MS (ESI): $C_{47}H_{64}N_{10}O_8$	berechnet	897.4981 [$M + H$] ⁺ , 919.4801 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	897.4983 [$M + H$] ⁺ , 919.4802 [$M + Na$] ⁺ .

(91) Cyclo(β^3 -hLys(N_3)- β^3 -hLys(Alloc)- β^3 -hLys(Fmoc))

Boc-L- β^3 -hLys(N_3)- β^3 -hLys(Alloc)- β^3 -hLys(Fmoc)-N₂H₂-PhOMe (**89**) (150 mg, 150 μ mol, 1.00 Äq.) wurde in THF (10 mL) suspendiert und DIPEA (25.0 μ L, 150 μ mol, 1.00 Äq.), H₂O (500 μ L), CuCl₂ (20.2 mg, 150 μ mol, 1.00 Äq.) zugegeben. Nach 2 h Rühren bei RT wurde H₂O (25 mL), eine wässrige 1 M HCl-Lösung (25 mL) und EtOAc (50 mL) zugegeben und nach Phasentrennung die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Phosphatpuffer (pH = 7, 25 mL) sowie einer ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde TFA/H₂O (95:5, 10 mL, v/v) bei 0 °C zugegeben, 1 h bei dieser Temperatur und 1 h bei 0 °C gerührt. Nach Entfernen von TFA im N₂-Gegenstrom wurde der Rückstand mit Toluol (3 x 10 mL) und Et₂O (3 x 10 mL) coevaporiert, im Vakuum getrocknet und lyophilisiert. Das N- und C-terminal entschütztes Peptid wurde unter Schutzgasatmosphäre in trockenem DMF (80 mL) gelöst und HATU (570 mg, 1.50 mmol, 10.0 Äq.) zugegeben. Nach Kühlen auf 0 °C wurde DIPEA (36.6 μ L, 0.27 g, 2.10 mmol, 14.0 Äq.) zugetropft, 3 h bei dieser Temperatur und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in DCM (50 mL) aufgenommen und mit H₂O (3 x 30 mL) gewaschen. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile wurde MeOH (10 mL) zugegeben und der ausgefallene Niederschlag mit MeOH (3 x 10 mL) gewaschen. Die Verbindung **91** (19.6 mg, 25.8 μ mol, 17%) konnte in Form eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (DCM/MeOH, 96:4, v/v): R_f = 0.36.

MS (ESI): m/z = 797.4 [$M + K$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₄₀ H ₅₄ N ₈ O ₇	berechnet	759.4188 [$M + H$] ⁺ , 781.4008 [$M + Na$] ⁺ , 797.3747 [$M + K$] ⁺ ,
	gefunden	759.4184 [$M + H$] ⁺ , 781.3992 [$M + Na$] ⁺ , 797.3736 [$M + K$] ⁺ .



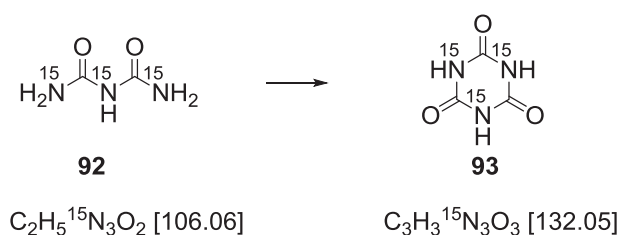
8.4 Synthese von Biomolekülmarkern für Sekundärionen-Massenspektrometrie

8.4.1 Vorschriften zu ^{15}N -Biomolekülmarkern

(93) $^{15}\text{N}_3$ -1,3,5-Triazinan-2,4,6-trion ($^{15}\text{N}_3$ -Cyanursäure)

Die Verbindung ist literaturbekannt (Patent).^[189]

Das natürliche Analogon, 1,3,5-Triazinan-2,4,6-trion (Cyanursäure), wurde zuvor auf gleiche Weise synthetisiert.



Unter Argonatmosphäre wurde trockenes Ethanol (35 mL) vorgelegt und Natrium (644 mg, 28.0 mmol, 3.30 Äq.) portionsweise zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde zu der NaOEt/EtOH-Lösung $^{15}\text{N}_3$ -Biuret (**92**) (900 mg, 8.49 mmol, 1.00 Äq.) hinzugefügt und 16 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und in H_2O (5 mL) suspendiert. Anschließend wurde auf 0 °C gekühlt und konzentrierte HCl-Lösung zugetropft. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem H_2O (3 × 5 mL) gewaschen und nach Vortrocknen im Vakuum lyophilisiert. Die Verbindung **93** (940 mg, 7.12 mmol, 84%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

^1H -NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): δ = 11.10 (s, 3 H, 3 × ^{15}NH) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): δ = 149.82 (dt, $^1J_{^{13}\text{C},^{15}\text{N}}$ = 17.9 Hz, $^3J_{^{13}\text{C},^{15}\text{N}}$ = 1.9 Hz, 3 × CO) ppm.

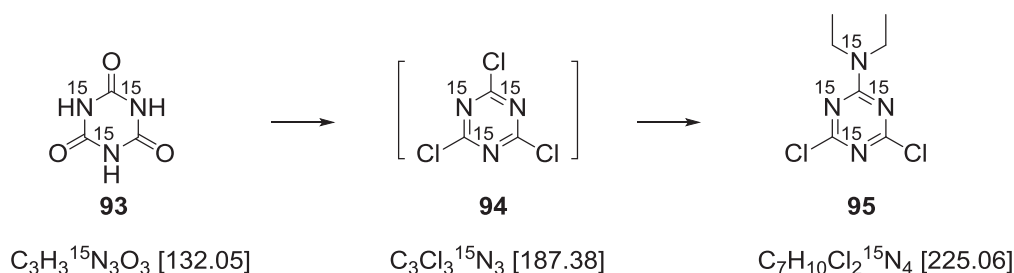
IR (Diamant-ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3197m und 3054m (NH), 1756w, 1735w und 1689vs (CO), 1441s, 1408s, 1389s, 1042m, 1031m, 782s, 756s, 742s, 689m.

MS (ESI): m/z = 131.0 [$M - \text{H}$].

HR-MS (ESI): $\text{C}_3\text{H}_3^{15}\text{N}_3\text{O}_3$	berechnet	131.0013 [$M - \text{H}$],
	gefunden	131.0013 [$M - \text{H}$].

(95) $^{15}\text{N}_4$ -4,6-Dichloro-*N,N*-diethyl-1,3,5-triazin-2-amin

Das natürliche Analogon, 4,6-Dichloro-*N,N*-diethyl-1,3,5-triazin-2-amin, wurde zuvor auf gleiche Weise synthetisiert.



$^{15}\text{N}_3$ -Cyanursäure (**93**) (300 mg, 2.27 mmol, 1.00 Äq.) wurde mit PCl_5 (1.49 g, 7.16 mmol, 3.15 Äq.) und POCl_3 (5.0 mL) unter Argonatmosphäre 11 h refluxiert. Nach Kühlen auf Raumtemperatur wurde überschüssiges POCl_3 unter vermindertem Druck entfernt, in DCM (10 mL) gelöst und mit eiskaltem H_2O (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und abfiltriert. Die Verbindung **94** in DCM wurde ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

^{15}N -Diethylamin-hydrochlorid (260 mg, 2.32 mmol, 1.02 Äq.), K_2CO_3 (640 mg, 4.64 mmol, 2.04 Äq.), 18-Krone-6 (6.13 mg, 23.2 μmol , 0.01 Äq.) wurden in abs. DCM (5 mL) unter Schutzgasatmosphäre suspendiert und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die 2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazin (**94**) in DCM bei -10°C zugegeben, 1 h bei dieser Temperatur und 1 h bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von H_2O (50 mL) wurden die Phasen getrennt. Wässrige Phase wurde mit EtOAc (2×50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet, auf Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Pentan/Ethylacetat (95:5, v/v) gereinigt. Das Produkt **95** wurde in Form von farblosen Kristallen (92.8 mg, 0.41 mmol, 18%) erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 95:5, v/v): $R_f = 0.41$.

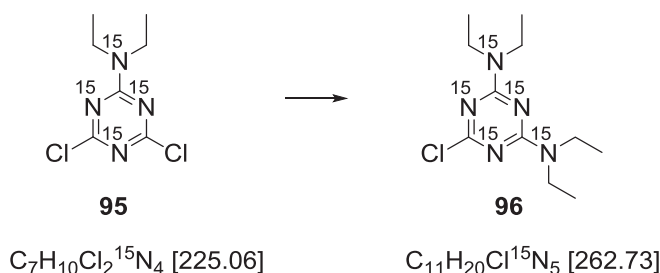
MS (ESI): $m/z = 225.0$ [$M + \text{H}$] $^+$, 247.0 [$M + \text{Na}$] $^+$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{Cl}_2^{15}\text{N}_4$	berechnet	225.0237 [$M + \text{H}$] $^+$, 247.0056 [$M + \text{Na}$] $^+$,
	gefunden	225.0238 [$M + \text{H}$] $^+$, 247.0051 [$M + \text{Na}$] $^+$.



(96) $^{15}\text{N}_5$ -6-Chloro- N^2,N^2,N^4,N^4 -tetraethyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin

Das natürliche Analogon, 6-Chloro- N^2,N^2,N^4,N^4 -tetraethyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin, wurde zuvor auf gleiche Weise synthetisiert.



Zur Verbindung **95** (92.8 mg, 412 μmol , 1.00 Äq.), K_2CO_3 (120 mg, 868 μmol , 2.10 Äq.) und 18-Krone-6 (2.19 mg, 8.28 μmol , 0.02 Äq.) in trockenem Toluol (5 mL) wurde bei -15°C ^{15}N -Diethylamin-hydrochlorid (50.4 mg, 456 μmol , 1.10 Äq.) zugegeben, 1 h bei -15°C gerührt, auf RT gebracht und weitere 40 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, H_2O (50 mL) und EtOAc (50 mL) zugegeben. Nach Trennen der Phasen wurde die wässrige Phase mit EtOAc (2×50 mL) extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (95:5, v/v) gereinigt. Das Produkt **96** (103 mg, 392 μmol , 95%) wurde in Form eines farblosen, leicht schmelzenden Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Pentan/EtOAc, 95:5, v/v): $R_f = 0.55$.

^1H -NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): 1.06–1.14 (m, 12 H, $4 \times \text{CH}_3$), 3.49 (dq, $^3J_{1\text{H},1\text{H}} = 6.8$ Hz, $^2J_{1\text{H},15\text{N}} = 2.6$ Hz, 8 H, $4 \times \text{CH}_2$) ppm.

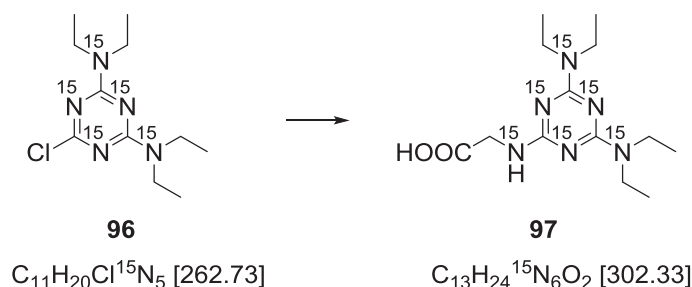
^{13}C -NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 12.79$ (d, $^2J_{13\text{C},15\text{N}} = 64.0$ Hz, $4 \times \text{CH}_3$), 41.00 (ddd, $^1J_{13\text{C},15\text{N}} = 41.0$ Hz, $^3J_{13\text{C},15\text{N}} = 11.0$ Hz, $^5J_{13\text{C},15\text{N}} = 2.8$ Hz, $4 \times \text{CH}_2$), 163.28 (dd, $^1J_{13\text{C},15\text{N}} = 0.2$ Hz, TAT-C), 168.10–168.27 (m, $2 \times \text{TAT-C}$) ppm.

MS (ESI): $m/z = 263.1$ [$M + \text{H}$] $^+$, 285.1 [$M + \text{Na}$] $^+$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{Cl}^{15}\text{N}_5$	berechnet	263.1332 [$M + \text{H}$] $^+$,
	gefunden	263.1334 [$M + \text{H}$] $^+$.

(97) $^{15}\text{N}_6$ -((4,6-Bis-(diethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-ethansäure, TriazGly-OH

Das natürliche Analogon, ((4,6-Bis(diethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)ethansäure, wurde zuvor auf gleiche Weise synthetisiert.



Verbindung **96** (42.0 mg, 160 μmol , 1.00 Äq.), ^{15}N -Glycin (42.0 mg, 552 μmol , 3.45 Äq.) und K_2CO_3 (88.4 mg, 640 μmol , 4.00 Äq.) wurden in DMSO suspendiert und 24 h bei 88–89 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, H_2O (10 mL) zugegeben, auf 0 °C gebracht und mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 3 gebracht. Die wässrige Phase wurde mit DCM (5 $\times$ 20 mL) extrahiert und über MgSO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Aceton/ H_2O (20:1 $\rightarrow$ 10:1, v/v) gereinigt. Das Produkt **97** (31.2 mg, 103 μmol , 65%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Analytische Daten:

DC (Aceton/ H_2O , 95:5, v/v): $R_f = 0.38$.

^1H -NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 1.07$ (dt, $^3J_{1\text{H},1\text{H}} = 6.9$ Hz, $^3J_{1\text{H},15\text{N}} = 2.5$ Hz, 12 H, $4 \times \text{CH}_3$), 3.45 (q, $^3J_{1\text{H},1\text{H}} = 6.9$ Hz, 8 H, $4 \times \text{CH}_2$), 3.78 (d, $^3J_{1\text{H},1\text{H}} = 6.6$ Hz, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 6.53 (d, $^1J_{1\text{H},15\text{N}} = 93.0$ Hz, 1 H, ^{15}NH) ppm.

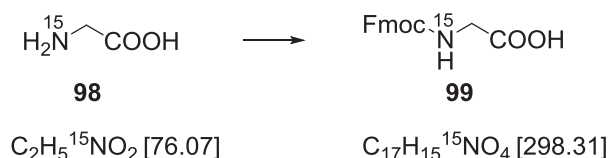
^{13}C -NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 13.37$ (s, $4 \times \text{CH}_3$), 40.43 (s, $4 \times \text{CH}_2$), 42.52–42.70 (m, $\alpha\text{-CH}_2$), 163.57–164.21 (m, TAT-C), 165.57 (d, $^1J_{13\text{C},15\text{N}} = 26.0$ Hz, $2 \times \text{TAT-C}$), 172.51 (s, COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 303.2$ [$M + \text{H}$] $^+$, 325.2 [$M + \text{Na}$] $^+$, 301.2 [$M - \text{H}$] $^-$, 603.4 [$2M - \text{H}$] $^-$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{13}\text{H}_{24}^{15}\text{N}_6\text{O}_2$	berechnet	303.1856 [$M + \text{H}$] $^+$, 325.1675 [$M + \text{Na}$] $^+$, 301.1710 [$M - \text{H}$] $^-$,
	gefunden	303.1855 [$M + \text{H}$] $^+$, 325.1672 [$M + \text{Na}$] $^+$, 301.1713 [$M - \text{H}$] $^-$.



(99) ^{15}N -(((9H-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-glycin, Fmoc- ^{15}N -Gly-OH^[256]



Zu einer Lösung aus ^{15}N -Glycin (**98**) (250 mg, 3.29 mmol, 1.00 Äq.) in einer wässrigen, 10%igen Na_2CO_3 -Lösung (5 mL) wurde bei 0 °C Fmoc-Cl (1.02 g, 3.94 mmol, 1.20 Äq.) in Dioxan (5 mL) zugetropft, 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde H_2O (50 mL) und Et_2O (50 mL) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O (3×50 mL) extrahiert und die Etherphase verworfen. Die wässrige Phase wurde mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung auf pH = 3 gebracht und der ausfallende Niederschlag durch Extrahieren mit EtOAc (3×50 mL) in die organische Phase überführt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten Aceton/ H_2O (10:1, v/v) gereinigt. Die Verbindung **99** (760 mg, 2.55 mmol, 78%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

DC (Aceton/ H_2O , 20:1, v/v): $R_f = 0.29$.

^1H -NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 3.66$ (d, $^3J = 6.0$ Hz, 2 H, $\alpha\text{-H}_2$), 4.21–4.31 (m, 3 H, Fmoc- CH_2 , Fmoc-CH), 7.30–7.44 (m, 4 H, $4 \times \text{Fmoc-CH}_{\text{Ar}}$), 7.62–7.72 (m, $2 \times \text{Fmoc-CH}_{\text{Ar}}$), 7.88 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, $2 \times \text{Fmoc-CH}_{\text{Ar}}$) ppm.

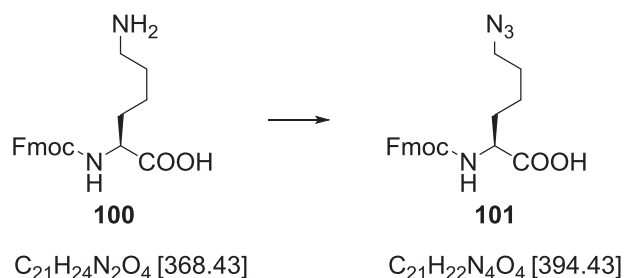
^{13}C -NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 308 K): $\delta = 42.30$ (d, $^1J_{^{13}\text{C},^{15}\text{N}} = 13.2$ Hz, $\alpha\text{-CH}_2$), 46.46 (Fmoc-CH), 65.62 (Fmoc- CH_2), 120.00, 125.13, 126.99, 127.54 ($8 \times \text{Fmoc-CH}_{\text{Ar}}$), 140.65, 143.77 ($4 \times \text{Fmoc-C}_{\text{Ar}}$), 156.24 (d, $^1J_{^{13}\text{C},^{15}\text{N}} = 26.8$ Hz, Fmoc- C=O), 171.57 (COOH) ppm.

MS (ESI): $m/z = 299.1$ [$M + \text{H}$] $^+$, 321.1 [$M + \text{Na}$] $^+$, 619.1 [$2M + \text{Na}$] $^+$, 297.1 [$M - \text{H}$] $^-$, 595.2 [$2M - \text{H}$] $^-$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{17}\text{H}_{15}^{15}\text{NO}_4$ berechnet 299.1044 [$M + \text{H}$] $^+$, 321.0864 [$M + \text{Na}$] $^+$, 297.0899 [$M - \text{H}$] $^-$,

 gefunden 299.1038 [$M + \text{H}$] $^+$, 321.0865 [$M + \text{Na}$] $^+$, 297.0900 [$M - \text{H}$] $^-$.

**(101) *N*²-(((9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxy)-carbonyl)-*N*⁶-diazo-L-lysin,
Fmoc-L-Lys(N₃)-OH^[192,193]**



Fmoc-L-Lys-OH (**100**) (2.63 g, 7.14 mmol, 1.00 Äq.), K₂CO₃ (1.97 g, 14.28 mmol, 2.00 Äq.), Imidazol-1-sulfonyl-azid-hydrochlorid^[12,14] (**80**) (1.80 g, 8.58 mmol, 1.20 Äq.) und CuSO₄·5H₂O (178 mg, 713 µmol, 0.10 Äq.) wurden in MeOH (90 mL) suspendiert und nach Kühlen auf 0 °C mit H₂O (15 mL) versetzt um die Suspension zu lösen. Die Reaktionslösung wurde 0.5 h bei 0 °C und anschließend 18 h bei RT gerührt. Die organische Phase wurde unter vermindertem Druck entfernt, H₂O (50 mL) zugegeben, mit einer wässrigen, 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 4 gebracht und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer gesättigten NaCl-Lösung (2 × 100 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit den Eluenten DCM/MeOH (9:1, v/v) gereinigt. Um Spuren von Cu²⁺-Ionen zu entfernen wurde das Produkt in EtOAc (100 mL) gelöst und mit Phosphatpuffer (pH = 6, 100 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Verbindung **101** (2.50 g, 6.34 mmol, 89%) wurde in Form eines gelben Öls isoliert, welches nach Lagern bei -21 °C als gelblicher Feststoff vorlag.

Analytische Daten:

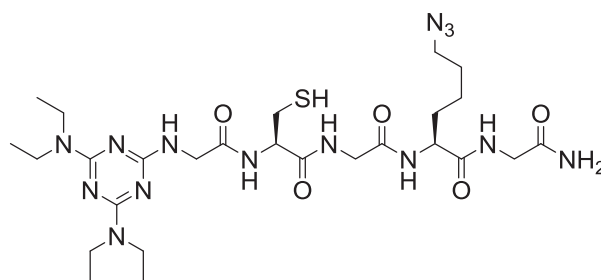
DC (EtOAc/MeOH/H₂O/AcOH, 10:1:1:0.1, v/v/v/v): *R*_f = 0.74.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 1.32–1.81 (m, 6 H, β-H₂, γ-H₂, δ-H₂), 3.32 (t, ³*J* = 6.8 Hz, 2 H, ε-H₂), 3.92–4.00 (m, 1 H, α-H), 4.20–4.31 (m, 3 H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH), 7.30–7.44 (m, 4 H, 4 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.58–7.61 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1 H, NH-Fmoc), 7.73 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 7.88 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH_{Ar}), 12.53 (s_{br}, 1 H, COOH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 308 K): δ = 22.82, 27.76, 30.26 (β-CH₂, γ-CH₂, δ-CH₂), 46.64 (Fmoc-CH), 50.47 (ε-CH₂), 53.61 (α-CH), 65.54 (Fmoc-CH₂), 120.00, 125.16, 126.94, 127.52 (8 × Fmoc-CH_{Ar}), 140.65, 143.78 (4 × Fmoc-C_{Ar}), 156.06 (Fmoc-C=O), 173.69 (COOH) ppm.

MS (ESI): *m/z* = 417.1 [*M* + Na]⁺, 811.3 [2*M* + Na]⁺, 393.2 [*M* - H]⁻, 787.3 [2*M* - H]⁻.

HR-MS (ESI): C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₄	berechnet	395.1714 [<i>M</i> + H] ⁺ , 417.1533 [<i>M</i> + Na] ⁺ , 393.1568 [<i>M</i> - H] ⁻ ,
	gefunden	395.1704 [<i>M</i> + H] ⁺ , 417.1525 [<i>M</i> + Na] ⁺ , 393.1567 [<i>M</i> - H] ⁻ .

**(102) TAT-Cys-Gly-Lys(N₃)-Gly-NH₂****102**

Das Peptid **102** wurde gemäß AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese (15.0 µmol) an einem Fmoc-Gly vorbelegtem Sieberamid-Harz (0.76 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(N₃)-OH (**101**), Fmoc-Cys(Trt)-OH und das natürliche Analogon von **97** ((4,6-Bis-(diethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-ethansäure. Anschließend wurde das Peptid **102** (15.0 µmol) nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 2 in DCM vom Trägermaterial abgespalten (Kapitel 8.1.3) und mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 40 → 90% B in 30 min) gereinigt. Die Verbindung **102** konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

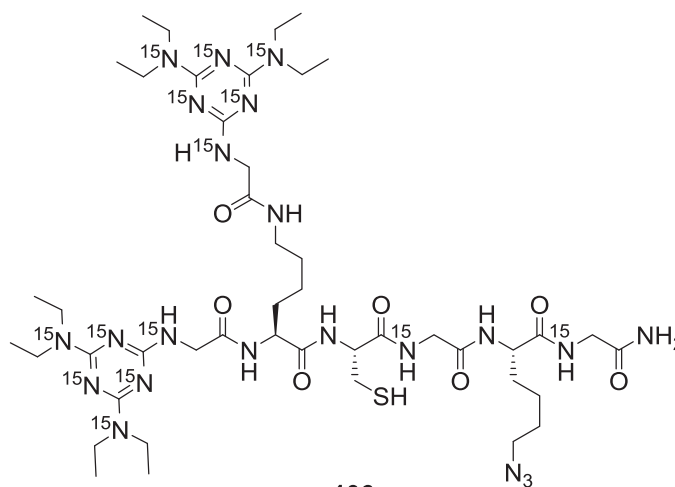
HPLC (analytisch, Gradient: 40 → 90% B in 30 min): $t_R = 10.96$ min.

MS (ESI): $m/z = 667.4$ [$M + H$]⁺, 1333.7 [$2M + H$]⁺, 665.3 [$M - H$]⁻.

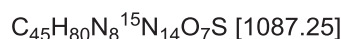
HR-MS (ESI): $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_{14}\text{O}_5\text{S}$	berechnet	667.3569 [$M + H$] ⁺ , 689.3389 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 665.3424 [$M - H$] ⁻ ,
	gefunden	667.3569 [$M + H$] ⁺ , 689.3383 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 665.3426 [$M - H$] ⁻ .

(106) $^{15}\text{N}_6$ -TAT-Lys($^{15}\text{N}_6$ -TAT)-Cys- ^{15}N -Gly-Lys(N_3)- ^{15}N -Gly-NH₂

Das natürliche Analogon, TAT-Lys(TAT)-Cys-Gly-Lys(N_3)-Gly-NH₂ (**103**) wurde zuvor auf gleiche Weise synthetisiert.



106



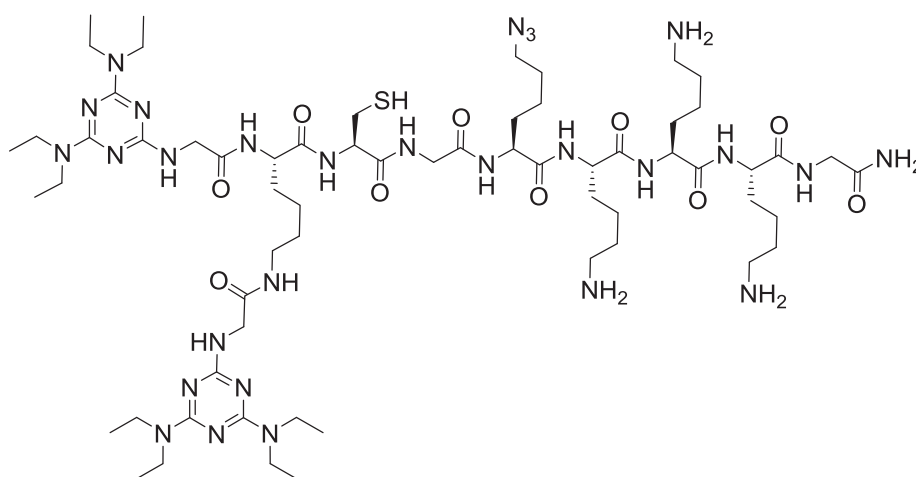
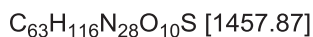
Das Peptid **106** wurde gemäß AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese (15.0 μmol) an einem Fmoc- ^{15}N -Gly vorbelegtem Sieberamid-Harz (0.75 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc- ^{15}N -Gly-OH (**99**), Fmoc-Lys(N_3)-OH (**101**), Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH sowie $^{15}\text{N}_6$ -((4,6-Bis-(diethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-ethansäure (**97**). Anschließend wurde das Peptid **106** (15.0 μmol) nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 2 in DCM vom Trägermaterial abgespalten (Kapitel 8.1.3) und mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 40 $\rightarrow$ 90% B in 30 min) gereinigt. Die Verbindung **106** (6.50 mg, 5.98 μmol , 40%) konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 40 $\rightarrow$ 90% B in 30 min): t_R = 17.63 min.

MS (ESI): m/z = 544.3 [$M + 2\text{H}$]²⁺, 1087.6 [$M + \text{H}$]⁺.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{45}\text{H}_{80}\text{N}_8^{15}\text{N}_{14}\text{O}_7\text{S}$	berechnet	544.3016 [$M + 2\text{H}$] ²⁺ , 1087.5959 [$M + \text{H}$] ⁺ , 1109.5778 [$M + \text{Na}$] ⁺ ,
	gefunden	544.3005 [$M + 2\text{H}$] ²⁺ , 1087.5967 [$M + \text{H}$] ⁺ , 1109.5762 [$M + \text{Na}$] ⁺ .

(107) TAT-Lys(TAT)-Cys-Gly-Lys(N₃)-Lys-Lys-Lys-Gly-NH₂**107**

Das Peptid **107** wurde gemäß AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese (15.0 μmol) an einem Fmoc-Gly vorbelegtem Sieberamid-Harz (0.76 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(N₃)-OH (**101**), Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH und Fmoc-Lys(Fmoc)-OH sowie das natürliche Analogon von ((4,6-Bis-(diethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-ethansäure (**97**). Anschließend wurde das Peptid **107** (15.0 μmol) nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 4 in DCM vom Trägermaterial abgespalten (Kapitel 8.1.3). Das Peptid **107** konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden und wurde ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

Analytische Daten:

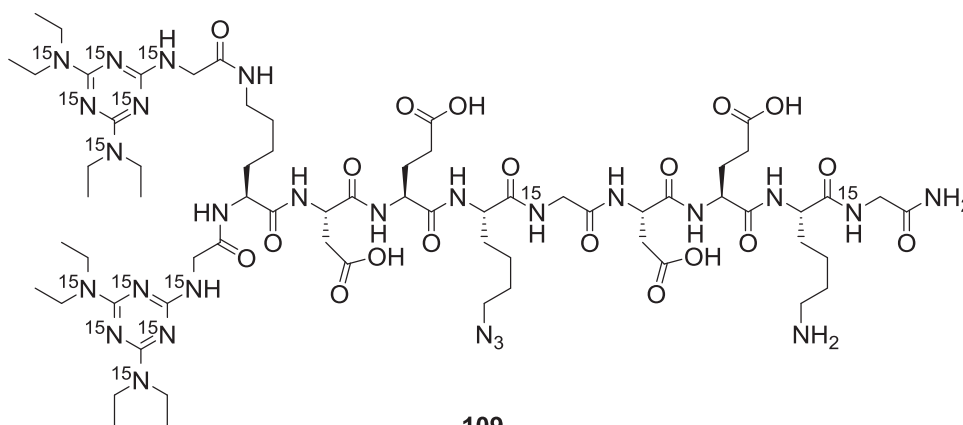
HPLC (analytisch, Gradient: 40 $\rightarrow$ 90% B in 30 min): $t_R = 22.17$ min.

MS (ESI): $m/z = 486.6 [M + 3H]^{3+}$, 729.5 $[M + 2H]^{2+}$, 1457.9 $[M + H]^+$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{63}\text{H}_{116}\text{N}_{28}\text{O}_{10}\text{S}$	berechnet	486.6456	$[M + 3H]^{3+}$,	729.4648	$[M + 2H]^{2+}$,
			1457.9223	$[M + H]^+$.	
	gefunden	486.6467	$[M + 3H]^{3+}$,	729.4648	$[M + 2H]^{2+}$,
			1457.9226	$[M + H]^+$.	

(109) $^{15}\text{N}_6$ -TAT-Lys($^{15}\text{N}_6$ -TAT)-Asp-Glu-Lys(N_3)- ^{15}N -Gly-Asp-Glu-Lys- ^{15}N -Gly-NH $_2$

Das natürliche Analogon, TAT-Lys(TAT)-Asp-Glu-Lys(N_3)-Gly-Asp-Glu-Lys-Gly-NH $_2$ (**108**), wurde zuvor auf gleiche Weise synthetisiert.

**109**

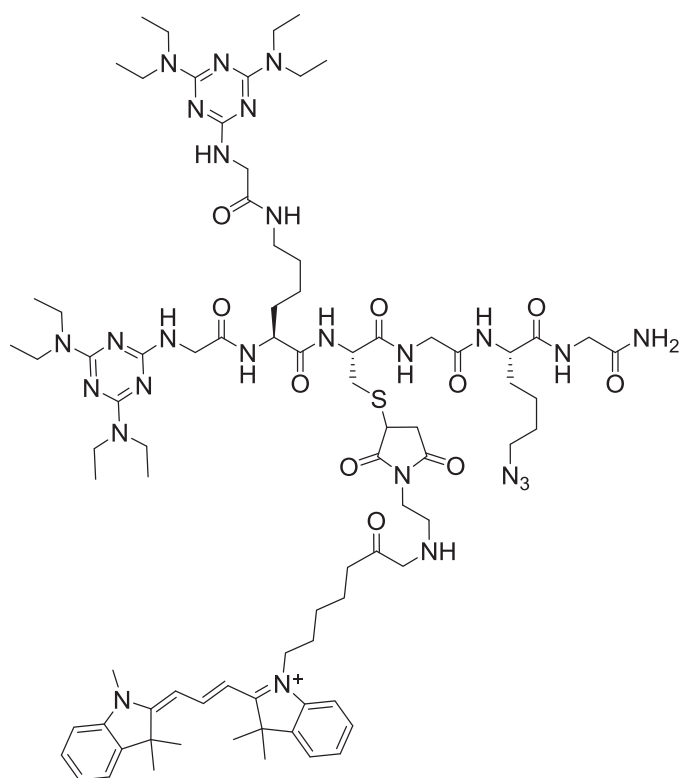
Das Peptid **109** wurde gemäß AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese (15.0 μmol) an einem Fmoc- ^{15}N -Gly vorbelegtem Sieberamid-Harz (0.75 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(O t Bu)-OH, Fmoc- ^{15}N -Gly-OH (**99**), Fmoc-Lys(N_3)-OH (**101**), Fmoc-Asp(O t Bu)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH sowie $^{15}\text{N}_6$ -[(4,6-Bis(diethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino]ethansäure (**89**). Anschließend wurde das Peptid **109** (15.0 μmol) nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 3 in DCM vom Trägermaterial abgespalten (Kapitel 8.1.3) und mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 40 $\rightarrow$ 80% B in 30 min) gereinigt. Die Verbindung **109** konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 40 $\rightarrow$ 80% B in 30 min): t_R = 13.80 min.

MS (ESI): m/z = 534.3 [$M + 3\text{H}$] $^{3+}$, 800.9 [$M + 2\text{H}$] $^{2+}$, 1600.8 [$M + \text{H}$] $^{+}$, 798.9 [$M - 2\text{H}$] $^{2-}$, 1598.8 [$M - \text{H}$] $^{-}$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{66}\text{H}_{111}\text{N}_{13}^{15}\text{N}_{14}\text{O}_{19}$	berechnet	534.2784 [$M + 3\text{H}$] $^{3+}$, 800.9140 [$M + 2\text{H}$] $^{2+}$, 1600.8207 [$M + \text{H}$] $^{+}$,
	gefunden	534.2781 [$M + 3\text{H}$] $^{3+}$, 800.9134 [$M + 2\text{H}$] $^{2+}$, 1600.8219 [$M + \text{H}$] $^{+}$.

**(110) TAT-Lys(TAT)-Cys(Cy5)-Gly-Lys(N₃)-Gly-NH₂****110**C₈₁H₁₂₃N₂₆O₁₀S⁺ [1653.11]

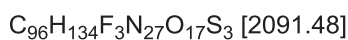
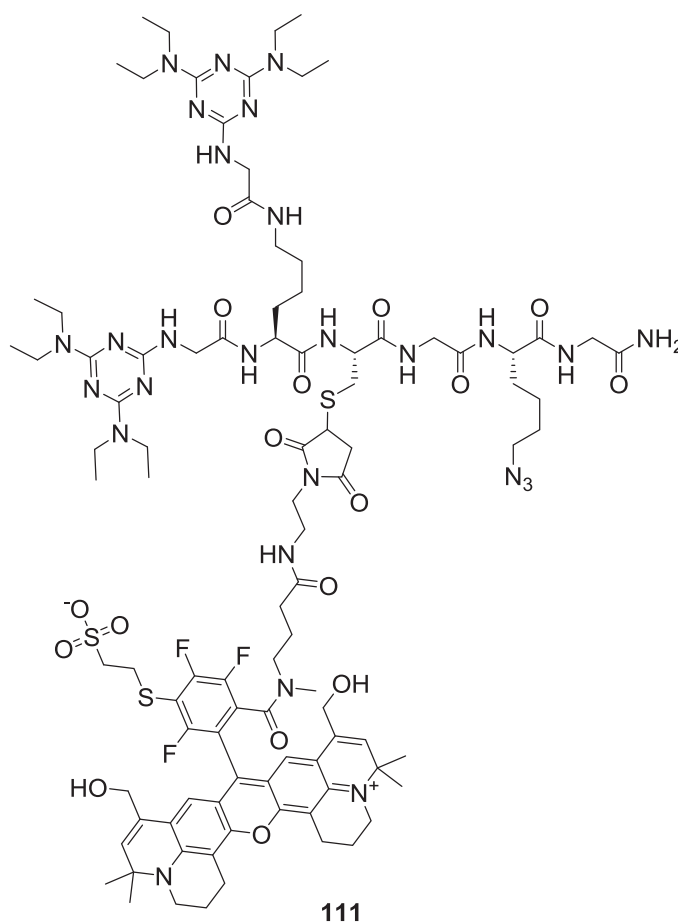
Das Peptid **103** (912 µg, 850 nmol, 1.00 Äq.) wurde in ein Mikroreaktionsgefäß (*Eppendorf*) gegeben, unter Argonatmosphäre mit entgastem PBS-Puffer (pH = 7.26, 20 mM Phosphatpuffer + 100 mM NaCl, 912 µL) und trockenem DMF (120 µL) versetzt. Anschließend wurde Cy3-Maleimid (75.0 µL, 630 µg, 1.02 µmol, 1.20 Äq.) in trockenem DMF zugegeben und unter Lichtausschluss 2 h bei RT geschüttelt und anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert. Daraufgehend erfolgte die Reinigung mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 40 → 90% B in 30 min). Die Verbindung **110** (1.41 mg, 850 nmol, quant.) wurde in Form eines roten Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 40 → 90% B in 30 min): t_R = 20.21 min.

MS (ESI): m/z = 551.3 [$M + 3H$]³⁺, 826.5 [$M + H$]²⁺, 1653.0 [$M + H$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₈₁ H ₁₂₃ N ₂₆ O ₁₀ S ⁺	berechnet	551.3259 [$M + 2H$] ³⁺ , 826.4852 [$M + H$] ²⁺ , 1651.9631 [M] ⁺ ,
	gefunden	551.3269 [$M + 2H$] ³⁺ , 826.4842 [$M + H$] ²⁺ , 1651.9627 [M] ⁺ .

(111) TAT-Lys(TAT)-Cys(Star635)-Gly-Lys(N₃)-Gly-NH₂

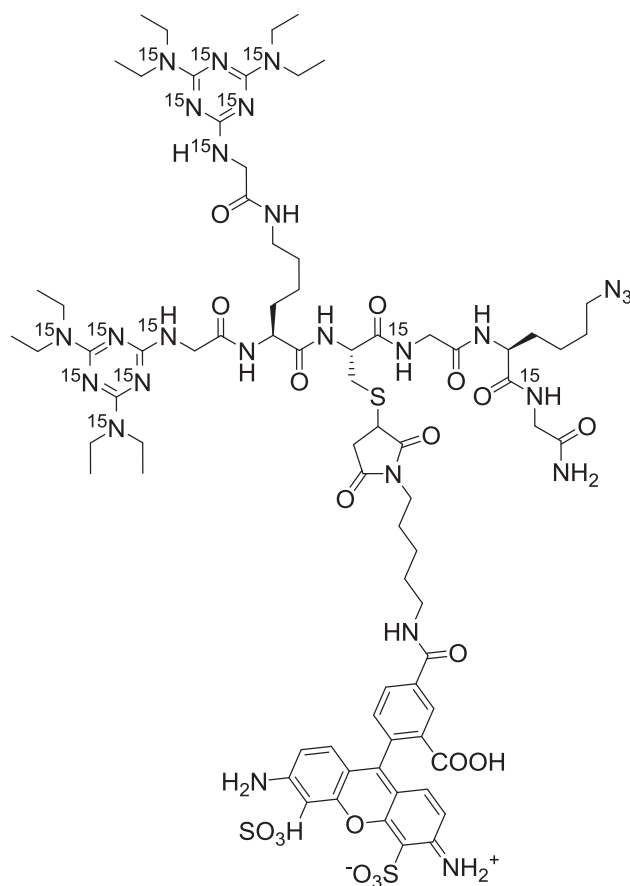
Das Peptid **103** (1.05 mg, 978 nmol, 2.49 Äq.) wurde in ein Mikroreaktionsgefäß (*Eppendorf*) gegeben, unter Argonatmosphäre mit entgastem PBS-Puffer (pH = 7.26, 20 mM Phosphatpuffer + 100 mM NaCl, 950 µL) und trockenem DMF (100 µL) versetzt. Anschließend wurde Abberior®Star635-Maleimid (40.0 µL, 400 µg, 393 nmol, 1.00 Äq.) in trockenem DMF zugegeben und unter Lichtausschluss 3 h bei RT geschüttelt und anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert. Darauffolgend erfolgte die Reinigung mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 30 → 90% B in 30 min). Die Verbindung **111** (340 µg, 163 nmol, 42%) wurde in Form eines blauen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 30 → 90% B in 30 min): t_R = 20.85–22.93 min.

MS (ESI): m/z = 1046.5 [$M + 2H$]²⁺, 2092.0 [$M + H$]⁺.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{96}\text{H}_{134}\text{F}_3\text{N}_{27}\text{O}_{17}\text{S}_3$	berechnet	697.9937 [$M + 3H$] ³⁺ , 1046.4869 [$M + 2H$] ²⁺ , 2090.9638 [$M + H$] ⁺ ,
	gefunden	697.9940 [$M + 3H$] ³⁺ , 1046.4862 [$M + 2H$] ²⁺ , 2090.9638 [$M + H$] ⁺ .

(112) $^{15}\text{N}_6$ -TAT-Lys($^{15}\text{N}_6$ -TAT)-Cys(Alexa Fluor488)- ^{15}N -Gly-Lys(N_3)- ^{15}N -Gly-NH₂**112**C₇₅H₁₀₆N₁₂¹⁵N₁₄O₁₉S₃ [1785.92]

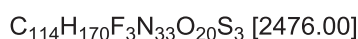
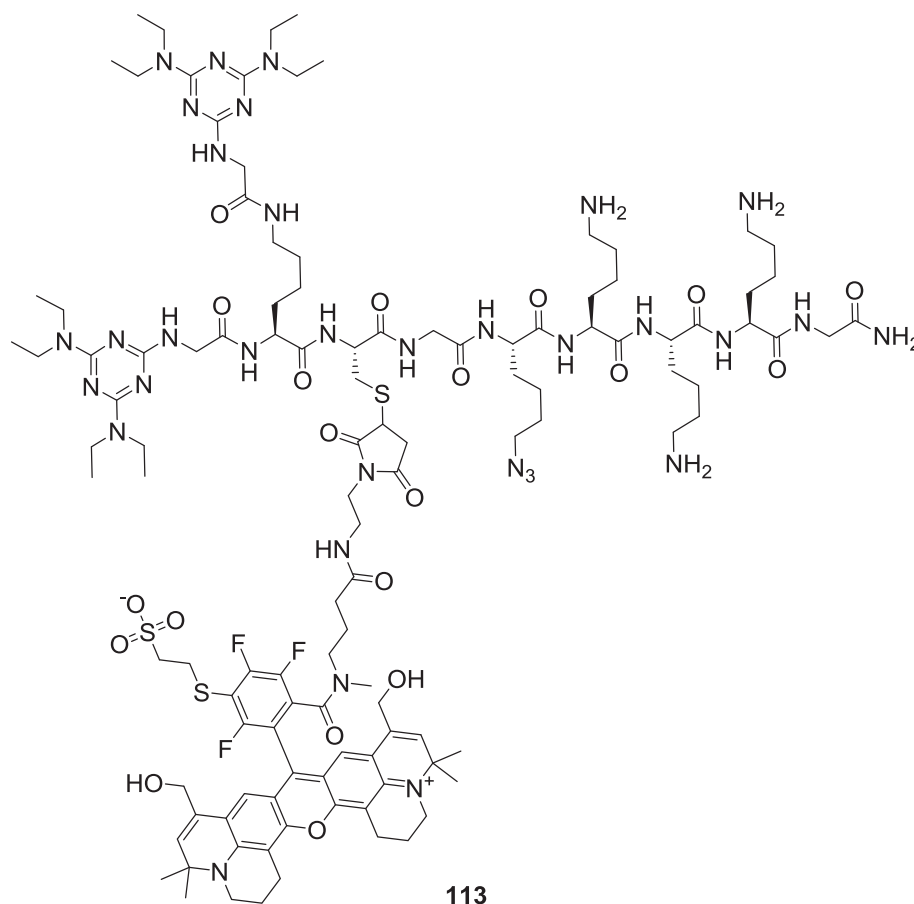
Das Peptid **106** (1.40 mg, 1.29 μmol , 1.65 Äq.) wurde in ein Mikroreaktionsgefäß (*Eppendorf*) gegeben, unter Argonatmosphäre mit entgastem PBS-Puffer (pH = 7.26, 20 mM Phosphatpuffer + 100 mM NaCl, 920 μL) versetzt. Anschließend wurde Alexa Fluor®488-Maleimid (80.0 μL , 580 μg , 780 nmol, 1.00 Äq.) in trockenem DMF zugegeben und unter Lichtausschluss 2 h bei RT geschüttelt und anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert. Darauffolgend erfolgte die Reinigung mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 50 → 80% B in 30 min). Die Verbindung **112** (420 μg , 235 nmol, 30%) wurde in Form eines orange-roten Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 50 → 80% B in 30 min): t_R = 15.14 min.

MS (ESI): m/z = 904.4 [$M + \text{Na} + \text{H}$]²⁺, 1785.7 [$M + \text{H}$]⁺, 891.4 [$M - \text{H}$]²⁻, 1783.7 [$M - \text{H}$]⁻.

HR-MS (ESI): C ₇₅ H ₁₀₆ N ₁₂ ¹⁵ N ₁₄ O ₁₉ S ₃	berechnet	893.3510	[$M + 2\text{H}$] ²⁺ ,	1785.6947
			[$M + \text{H}$] ⁺ ,	
	gefunden	893.3500	[$M + 2\text{H}$] ²⁺ ,	1785.6944
			[$M + \text{H}$] ⁺ .	

(113) TAT-Lys(TAT)-Cys(Star635)-Gly-Lys(N₃)-Lys-Lys-Lys-Gly-NH₂

Das Peptid **107** (600 µg, 412 nmol, 1.00 Äq.) wurde in ein Mikroreaktionsgefäß (*Eppendorf*) gegeben, unter Argonatmosphäre mit entgastem PBS-Puffer (pH = 7.26, 20 mM Phosphatpuffer + 100 mM NaCl, 600 µL) versetzt. Anschließend wurde Abberior®Star635-Maleimid (43.0 µL, 430 µg, 422 nmol, 1.02 Äq.) in trockenem DMF zugegeben und unter Lichtausschluss 2 h bei RT geschüttelt und anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert. Darauffolgend erfolgte die Reinigung mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 40 → 90% B in 30 min). Die Verbindung **113** (240 µg, 96.9 nmol, 24%) wurde in Form eines blauen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

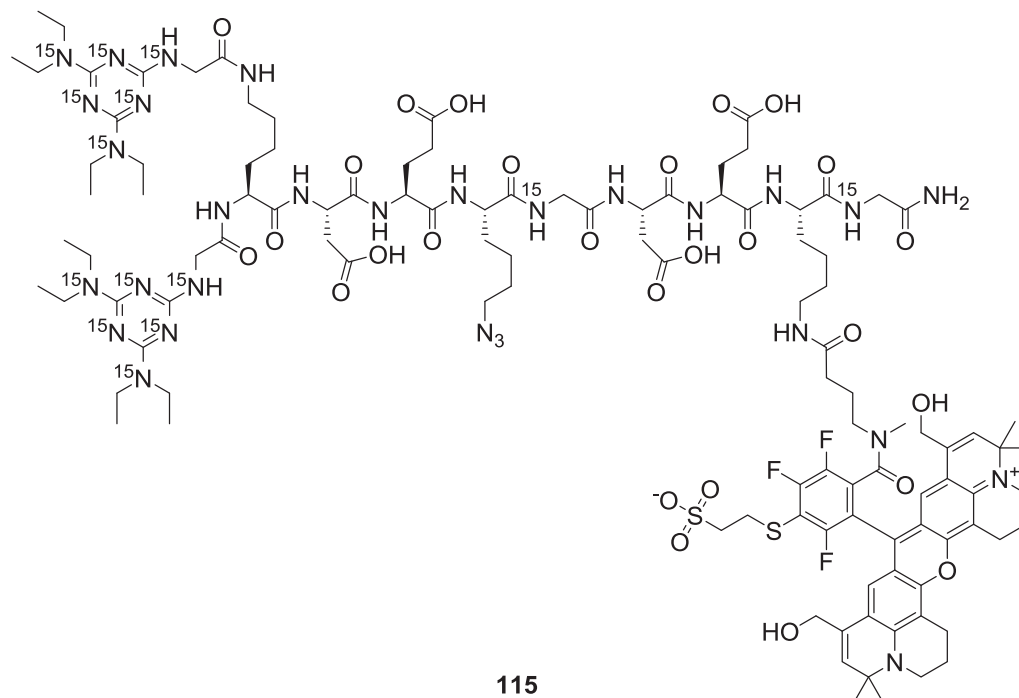
HPLC (analytisch, Gradient: 40 → 90% B in 30 min): $t_R = 15.04\text{--}16.25$ min.

MS (ESI): $m/z = 619.8 [M + 4H]^{4+}$, $826.1 [M + 3H]^{3+}$, $1238.7 [M + 2H]^{2+}$,

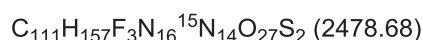
HR-MS (ESI): $\text{C}_{114}\text{H}_{170}\text{F}_3\text{N}_{33}\text{O}_{20}\text{S}_3$	berechnet	619.8183 $[M + 4H]^{4+}$, 826.0887 $[M + 3H]^{3+}$, 1238.6294 $[M + 2H]^{2+}$,
	gefunden	619.8233 $[M + 4H]^{4+}$, 826.0920 $[M + 3H]^{3+}$, 1238.6319 $[M + 2H]^{2+}$.

(115) $^{15}\text{N}_6$ -TAT-Lys($^{15}\text{N}_6$ -TAT)-Asp-Glu-Lys(N_3)- ^{15}N -Gly-Asp-Glu-Lys(Star635)- ^{15}N -Gly-NH $_2$ (TriazNF1)

Das natürliche Analogon, TAT-Lys(TAT)-Asp-Glu-Lys(N_3)-Gly-Asp-Glu-Lys(Star635)-Gly-NH $_2$ (**114**), wurde zuvor auf gleiche Weise synthetisiert.



115



Das Peptid **109** (1.10 mg, 687 nmol, 2.64 Äq.) wurde in ein Mikroreaktionsgefäß (*Eppendorf*) gegeben, unter Argonatmosphäre mit DIPEA (2.72 μL , 2.02 mg, 15.6 μmol , 60.0 Äq.) in trockenem DMF (500 μL) versetzt und anschließend Abberior®Star635-NHS-ester (250 μg , 260 nmol, 1.00 Äq.) in DMF (25 μL) zugefügt und unter Lichtausschluss 19 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 40 $\rightarrow$ 90% B in 30 min) aufgereinigt. Die Verbindung **115** (303 μg , 122 nmol, 47%) wurde in Form eines blauen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

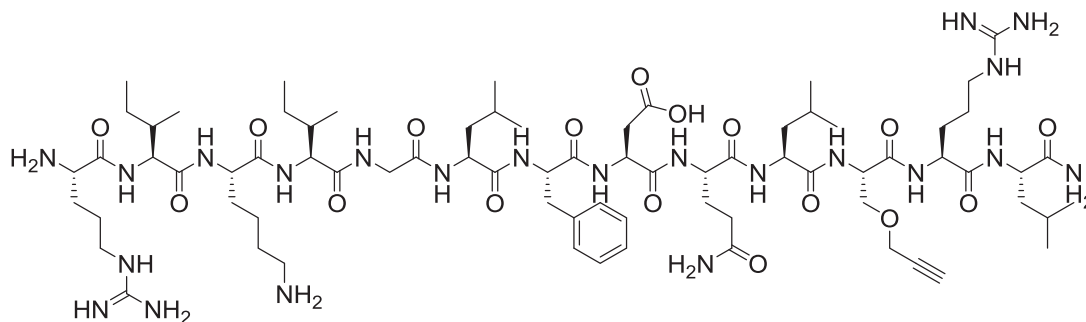
HPLC (analytisch, Gradient: 40 $\rightarrow$ 90% B in 30 min): t_R = 19.04–20.72 min.

MS (ESI): m/z = 1240.1 [$M + 2\text{H}$] $^{2+}$, 1262.1 [$M + 2\text{Na}$] $^{2+}$, 825.0 [$M - 3\text{H}$] $^{3-}$, 1238.0 [$M - 2\text{H}$] $^{2-}$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{111}\text{H}_{157}\text{F}_3\text{N}_{16}^{15}\text{N}_{14}\text{O}_{27}\text{S}_2$

berechnet 849.0173 [$M + 3\text{Na}$] $^{3+}$, 1240.0495 [$M + 2\text{H}$] $^{2+}$, 1262.0314 [$M + 2\text{Na}$] $^{2+}$, 1238.0349 [$M - 2\text{H}$] $^{2-}$,

gefunden 849.0166 [$M + 3\text{Na}$] $^{3+}$, 1240.0490 [$M + 2\text{H}$] $^{2+}$, 1262.0305 [$M + 2\text{Na}$] $^{2+}$, 1238.0361 [$M - 2\text{H}$] $^{2-}$.

(116) H-R-I-K-I-G-L-F-D-Q-L-S(Propargyl)-R-L-NH₂**116**C₇₄H₁₂₆N₂₂O₁₇ [1595.96]

Das Peptid **116** wurde gemäß AAV 7 (Kapitel 8.1.3) durch automatische Festphasen-Peptidsynthese (100 µmol) an einem Fmoc-Leu vorbelegtem Rinkamid-Harz (0.76 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(Propargyl)-OH²⁸, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH und Fmoc-Lys(Boc)-OH. Anschließend wurde eine Testabspaltung durchgeführt, indem das Peptid **116** nach AAV 8 mit Lösung 3 vom Trägermaterial abgespalten wurde (Kapitel 8.1.3). Das Peptid konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden. Das harzgebundene und vollgeschützte Peptid **116** wurde weiter umgesetzt.

Analytische Daten:

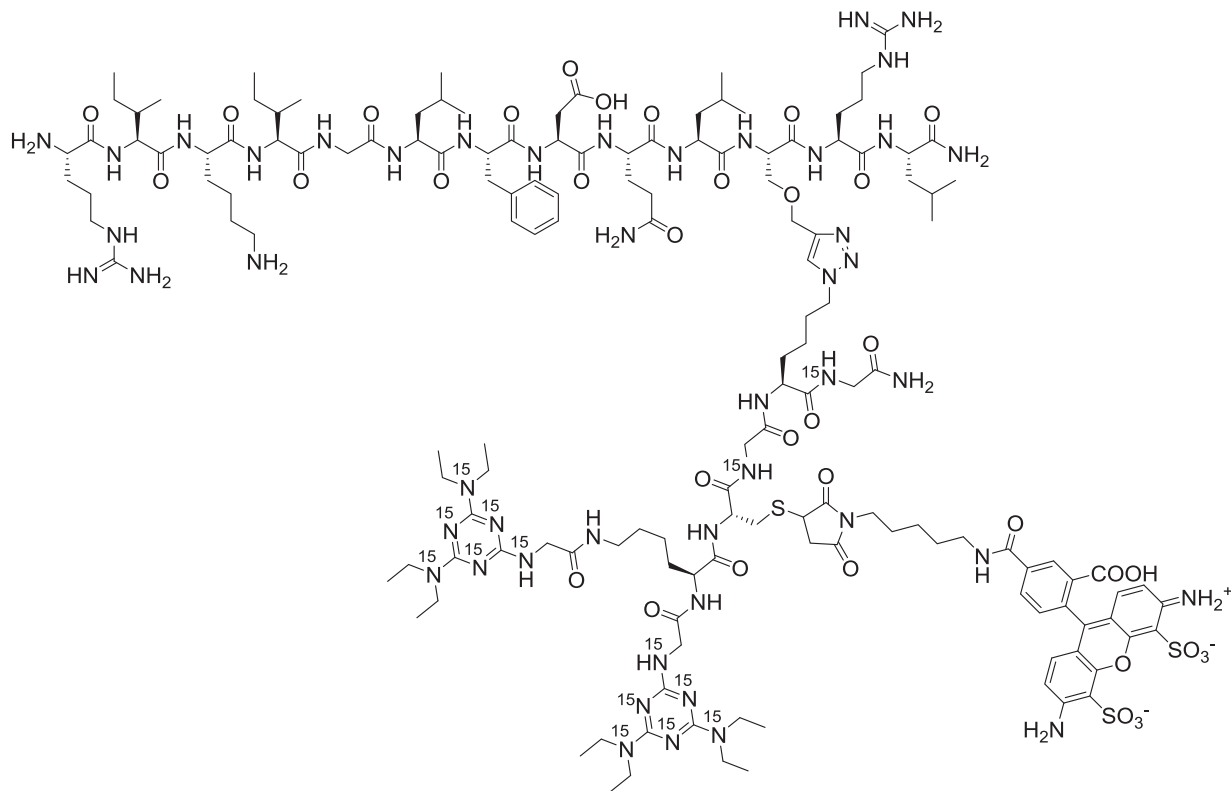
HPLC (analytisch, Gradient: 20 → 90% B in 30 min): t_R = 16.51 min.

MS (ESI): m/z = 532.7 [$M + 3H$]³⁺, 798.5 [$M + 2H$]²⁺, 1596.0 [$M + H$]⁺.

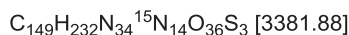
HR-MS (ESI): C ₇₄ H ₁₂₆ N ₂₂ O ₁₇	berechnet	532.6630	[$M + 3H$] ³⁺ ,	798.4908	[$M + 2H$] ²⁺ ,
		1595.9744	[$M + H$] ⁺ ,		
	gefunden	532.6618	[$M + 3H$] ³⁺ ,	798.4914	[$M + 2H$] ²⁺ ,
		1595.9728	[$M + H$] ⁺ .		

²⁸ Von Dr. H. RADZEY aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. U. DIEDERICHSEN zur Verfügung gestellt.

(117) H-R-I-K-I-G-L-F-D-Q-L-S(X= TAT-K(TAT))-C(Alexa Fluor488)-G-K(X)-G-NH₂)-R-L-NH₂



117



Das harzgebundene und vollgeschützte Peptid **116** (0.36 mmol/g, ~910 nmol, 6.79 Äq.), CuI (192 µg, 1.01 µmol, 7.54 Äq.), Natriumascorbat (240 µg, 1.21 µmol, 9.03 Äq.) und das Azid **112** (240 µg, 134 nmol, 1.00 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre mit trockenem DMF (250 µL) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt. Das Harz wurde im Anschluss mit DMF (5 × 1 mL) und DCM (10 × 1 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das Peptid nach AAV 8 mit Lösung 3 vom Trägermaterial abgespalten (Kapitel 8.1.3) und mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 40 → 80% B in 30 min) gereinigt. Die Verbindung **117** konnte in Form eines orange-roten Feststoffes isoliert werden.

Analytische Daten:

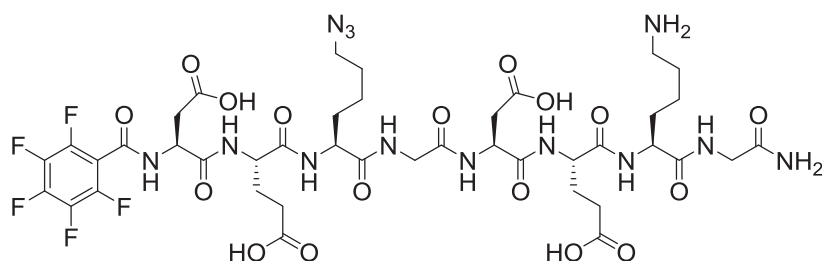
HPLC (analytisch, Gradient: 40 → 80% B in 30 min): t_R = 16.53–17.53 min.

MS (ESI): m/z = 846.4 [$M + 4H$]⁴⁺, 1127.9 [$M + 3H$]³⁺.

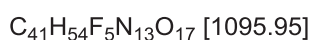
HR-MS (ESI): $C_{149}H_{232}N_{34}^{15}N_{14}O_{36}S_3$	berechnet	677.3395 [$M + 5H$] ⁵⁺ , 846.4225 [$M + 4H$] ⁴⁺ , 1127.8931 [$M + 3H$] ³⁺ ,
	gefunden	677.3410 [$M + 5H$] ⁵⁺ , 846.4234 [$M + 4H$] ⁴⁺ , 1127.8946 [$M + 3H$] ³⁺ .

8.4.1 Vorschriften zu ^{19}F -Biomolekülmarkern

(119) $(\text{F}_5\text{Bz})\text{-Asp-Glu-Lys}(\text{N}_3)\text{-Gly-Asp-Glu-Lys-Gly-NH}_2$



119



Peptid **119** wurde gemäß AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese (10.0 μmol) an einem mit zuvor Fmoc-Gly vorbelegtem Sieberamid-Harz (0.76 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-Asp(O^tBu)-OH und Fmoc-Lys(N₃)-OH (**101**) sowie 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzoessäure (**118**). Anschließend wurde das Peptid **119** (10.0 μmol) nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 3 in DCM vom Trägermaterial abgespalten (Kapitel 8.1.3) und mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 30 $\rightarrow$ 80% B in 30 min) gereinigt. Die Verbindung **119** konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

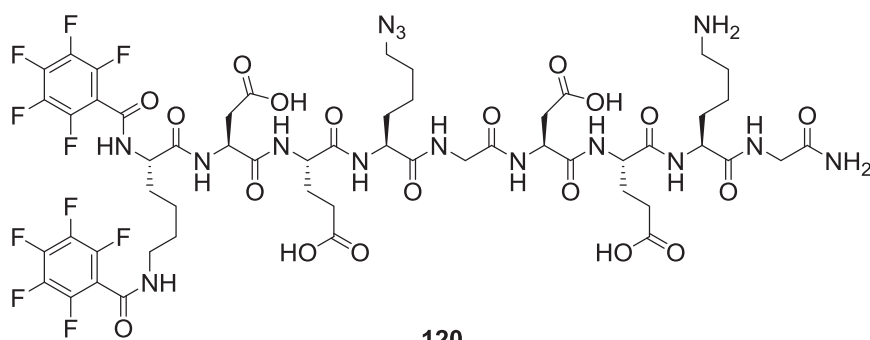
HPLC (analytisch, Gradient: 30 $\rightarrow$ 80% B in 30 min): $t_R = 12.27$ min.

MS (ESI): $m/z = 1096.4$ [$M + H$]⁺, 1094.4 [$M - H$]⁻.

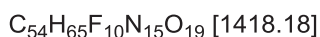
HR-MS (ESI): $\text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{F}_5\text{N}_{13}\text{O}_{17}$	berechnet	1096.3754 [$M + H$] ⁺ , 1118.3573 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 1094.3608 [$M - H$] ⁻ ;
	gefunden	1096.3756 [$M + H$] ⁺ , 1118.3574 [$M + \text{Na}$] ⁺ , 1094.3607 [$M - H$] ⁻ .



(120) (F₅Bz)-Lys(F₅Bz)-Asp-Glu-Lys(N₃)-Gly-Asp-Glu-Lys-Gly-NH₂



120



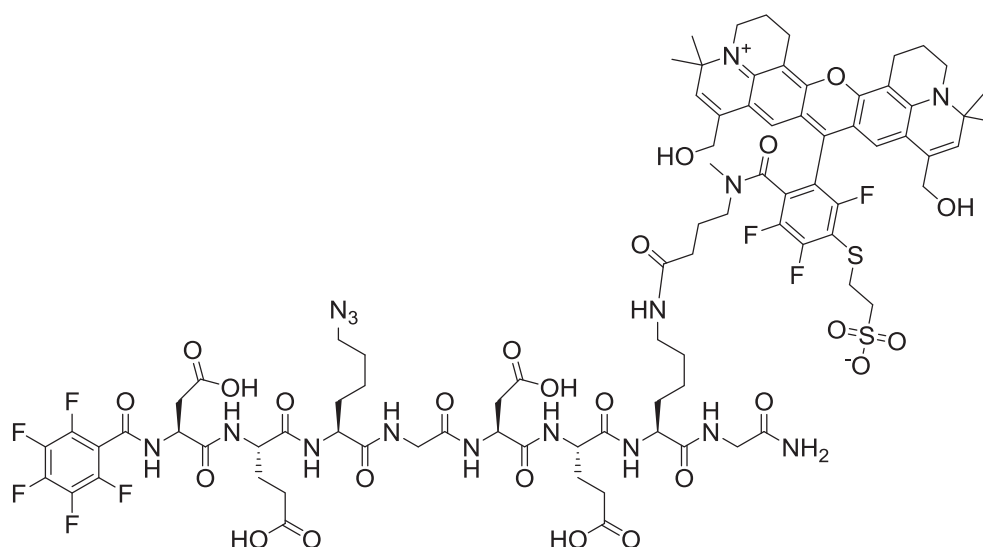
Peptid **120** wurde gemäß AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese (10.0 μ mol) an einem mit zuvor Fmoc-Gly vorbelegtem Sieberamid-Harz (0.76 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH und Fmoc-Lys(N₃)-OH (**101**) sowie 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzoessäure (**118**). Anschließend wurde das Peptid **120** (10.0 μ mol) nach AAV 8 mit einer 10%igen Lösung 3 in DCM vom Trägermaterial abgespalten (Kapitel 8.1.3) und mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 40 $\rightarrow$ 90% B in 30 min) gereinigt. Die Verbindung **120** wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 40 $\rightarrow$ 90% B in 30 min): t_R = 12.95 min.

MS (ESI): m/z = 720.8 [$M + Na + H$]²⁺, 1418.5 [$M + H$]⁺, 1440.5 [$M + Na$]⁺, 707.7 [$M - 2H$]²⁻, 1416.4 [$M - H$]⁻.

HR-MS (ESI): $C_{54}H_{65}F_{10}N_{15}O_{19}$	berechnet	1418.4494 [$M + H$] ⁺ , 1440.4314 [$M + Na$] ⁺ , 707.7138 [$M - 2H$] ²⁻ , 1416.4349 [$M - H$] ⁻ ,
	gefunden	1418.4515 [$M + H$] ⁺ , 1440.4318 [$M + Na$] ⁺ , 707.7130 [$M - 2H$] ²⁻ , 1416.4343 [$M - H$] ⁻ .

(121) (F₅Bz)-Asp-Glu-Lys(N₃)-Gly-Asp-Glu-Lys(Star635)-Gly-NH₂**121**C₈₆H₁₀₀F₈N₁₆O₂₅S₂ [1973.94]

Peptid **119** (430 µg, 392 nmol, 1.50 Äq.) wurde in ein Mikroreaktionsgefäß (*Eppendorf*) gegeben, unter Argonatmosphäre mit DIPEA (10.0 µL, 22.3 µmol, 86.0 Äq.) in trockenem DMF (300 µL) versetzt und anschließend Abberior®Star635-NHS-ester (250 µg, 260 nmol, 1.00 Äq.) in DMF (25 µL) zugefügt und unter Lichtausschluss 17 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 30 → 80% B in 30 min) gereinigt. Die Verbindung **121** (160 µg, 81.1 nmol, 31%) wurde in Form eines blauen Feststoffes erhalten.

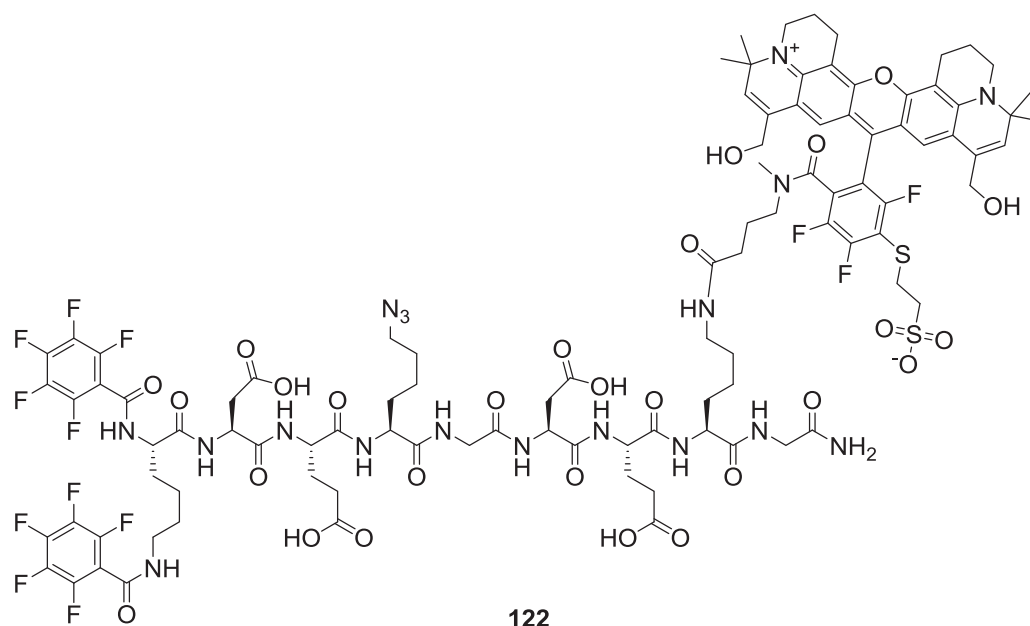
Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 30 → 80% B in 30 min): t_R = 19.24–21.42 min.

MS (ESI): m/z = 1009.8 [$M + 2Na$]²⁺, 1020.8 [$M + 3Na$]²⁺, 985.3 [$M - 2H$]²⁻.

HR-MS (ESI): C ₈₆ H ₁₀₀ F ₈ N ₁₆ O ₂₅ S ₂	berechnet	1009.3072 [$M + 2Na$] ²⁺ , 1020.7998 [$M - H + 3Na$] ²⁺ , 985.3107 [$M - 2H$] ²⁻ ,
	gefunden	1009.3068 [$M + 2Na$] ²⁺ , 1020.7973 [$M - H + 3Na$] ²⁺ , 985.3125 [$M - 2H$] ²⁻ .

(122) (F₅Bz)-Lys(F₅Bz)-Asp-Glu-Lys(N₃)-Gly-Asp-Glu-Lys(Star635)-Gly-NH₂ (SK155)



122

C₉₉H₁₁₁F₁₃N₁₈O₂₇S₂ [2296.18]

Peptid **120** (550 µg, 388 nmol, 1.50 Äq.) wurde in ein Mikroreaktionsgefäß (*Eppendorf*) gegeben, unter Argonatmosphäre mit DIPEA (10.0 µL, 22.3 µmol, 86.0 Äq.) in trockenem DMF (300 µL) versetzt und anschließend Abberior®Star635-NHS-ester (250 µg, 260 nmol, 1.00 Äq.) in DMF (25 µL) zugefügt und unter Lichtausschluss 17 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 40 → 90% B in 30 min) gereinigt. Die Verbindung **122** (130 µg, 56.6 nmol, 22%) wurde in Form eines blauen Feststoffes erhalten.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 40 → 90% B in 30 min): $t_R = 21.74\text{--}23.48$ min.

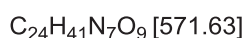
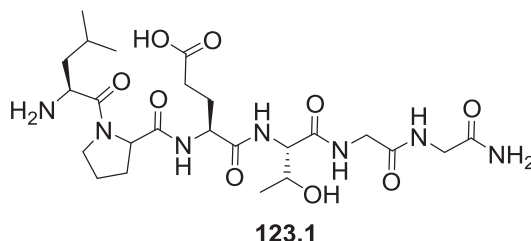
MS (ESI): $m/z = 1170.9 [M + 2Na]^{2+}$, 1181.9 $[M + 3Na]^{2+}$, 1146.8 $[M - H]^{2-}$.

HR-MS (ESI): C ₉₉ H ₁₁₁ F ₁₃ N ₁₈ O ₂₇ S ₂	berechnet	787.8926	$[M + 3Na]^{3+}$,	1170.3442
			$[M + 2Na]^{2+}$,	1181.8367 $[M - H + 3Na]^{2+}$,
	gefunden	787.8913	$[M + 3Na]^{3+}$,	1170.3446
			$[M + 2Na]^{2+}$,	1181.8350 $[M - H + 3Na]^{2+}$.

8.5 Synthese von markierten Peptiden mit Sortase A-Erkennungsmotiv

(123.1) LPETGG-NH₂^[26]

Die Synthese erfolgte nach literaturbekannter Vorschrift^[26] unter modifizierten Bedingungen.



Das Peptid **123.1** wurde nach AAV 7 (Kapitel 8.1.3) durch automatische Festphasen-Peptidsynthese (100 μ mol) an einem mit zuvor Fmoc-Gly vorbelegtem Rink-Amid-MBHA-Harz (0.36 mmol/g) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuren waren Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Glu(O^{*t*}Bu)-OH, Fmoc-Pro-OH und Fmoc-Leu-OH. Anschließend wurde das Peptid **123.1** (~5.50 μ mol) nach AAV 8 mit Lösung 3 (Kapitel 8.1.3) vom Trägermaterial abgespalten. Die Verbindung **123.1** (3.07 mg, 5.37 mmol, 97%) konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

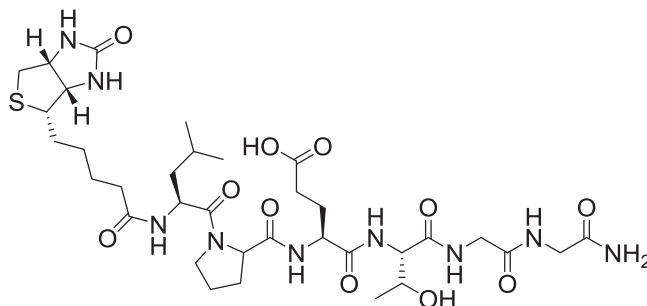
HPLC (analytisch, Gradient: 5 $\rightarrow$ 50% B in 30 min): t_R = 13.87 min.

MS (ESI): m/z = 572.3 [$M + H$]⁺, 594.3 [$M + Na$]⁺, 1143.6 [$M + 2H$]⁺, 570.3 [$M - H$]⁻.

HR-MS (ESI): $C_{24}H_{41}N_7O_9$	berechnet	572.3036 [$M + H$] ⁺ , 594.2858 [$M + Na$] ⁺ , 570.2893 [$M - H$] ⁻ ,
	gefunden	572.3039 [$M + H$] ⁺ , 594.2853 [$M + Na$] ⁺ , 570.2889 [$M - H$] ⁻ .

(125) Biotin-LPETGG-NH₂^[26]

Die Synthese erfolgte nach literaturbekannter Vorschrift^[26] unter modifizierten Bedingungen.

**125**

C₃₄H₅₅N₉O₁₁S [797.93]

Das auf dem Rink-Amid-MBHA-Harz (0.36 mmol/g) befindliche, Seitenketten-geschützte Peptid **123** (~10.0 µmol) wurde nach AAV 6 (Kapitel 8.1.3) durch manuelle Festphasen-Peptidsynthese unter Verwendung der Cystein-Kupplungsbedingungen (10 min, 40 °C, 20 W) *N*-terminal mit Biotin verknüpft. Das Peptid **125** wurde nach AAV 8 mit Lösung 3 (Kapitel 8.1.3) vom Harz abgespalten und mittels HPLC (semipräparativ, Gradient: 5 → 50% B in 30 min) gereinigt. Die Verbindung **125** (3.42 mg, 4.29 mmol, 43%) konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Analytische Daten:

HPLC (analytisch, Gradient: 5 → 50% B in 30 min): $t_R = 23.64$ min.

MS (ESI): $m/z = 798.4$ [$M + H$]⁺, 820.4 [$M + Na$]⁺.

HR-MS (ESI): C ₃₄ H ₅₅ N ₉ O ₁₁ S	berechnet	798.3815 [$M + H$] ⁺ , 820.3634 [$M + Na$] ⁺ ,
	gefunden	798.3819 [$M + H$] ⁺ , 820.3636 [$M + Na$] ⁺ .



9. Anhang

Tabelle 9.1: Strukturen und Codes der für diese Arbeit relevanten und kommerziell erwerblichen Aminosäuren.

Aminosäure	Struktur	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
β-Alanin		β-Ala	-
Alanin		Ala	A
Arginin		Arg	R
Asparagin		Asn	N
Asparaginsäure		Asp	D
Cystein		Cys	C
Glutamin		Gln	Q
Glutaminsäure		Glu	E
Glycin		Gly	G
Isoleucin		Ile	I
Leucin		Leu	L
Lysin		Lys	K

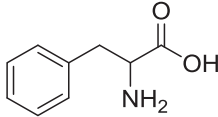
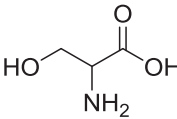
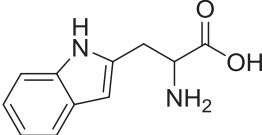
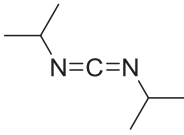
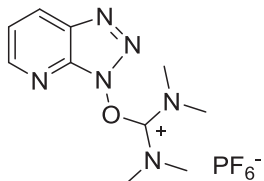
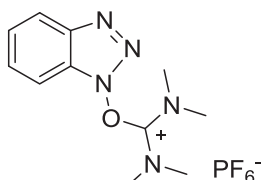
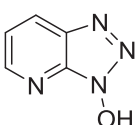
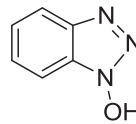
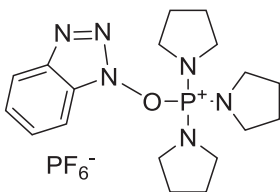
Phenylalanin		Phe	F
Serin		Ser	S
Tryptophan		Trp	W

Tabelle 9.2: Strukturen der verwendeten Kupplungsreagenzien.

Kupplungsreagenz	Struktur
DIC <i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid	
HATU <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat	
HBTU <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat	
HOAt 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol	
HOBt 1-Hydroxybenzotriazol	
PyBOP Benzotriazol-1-yl-oxy-tripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat	



10. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
AA	Ammoniumacetat
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
ACHC	<i>trans</i> -2-Aminocyclohexancarbonsäure
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
AG	Abgangsgruppe
Alloc	Allyloxycarbonyl
aq.	wässrig
Äq.	Äquivalente
AS	Aminosäure
BD	<i>Becton Dickinson</i>
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
br	breit
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
°C	Grad Celsius
CAT	<i>chemoselective addressable template</i>
CAN	Cer(IV)ammoniumnitrat
Cbz	Carboxybenzyl
CD	Circulardichroismus
COSY	correlation spectroscopy
CYA	Cyanursäure
δ	chemische Verschiebung

<i>D</i>	Diffusionskoeffizient
<i>d</i>	dublett
<i>dd</i>	dublett von dublett
<i>ddd</i>	dublett von dublett von dublett
<i>d_h</i>	hydrodynamischer Durchmesser
<i>dt</i>	dublett von triplet
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
[D ₆]DMSO	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ϵ	Extinktionskoeffizient
η	Viskosität
EDT	1,2-Ethandithiol
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
FC	<i>flash</i> -Säulenchromatographie
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GFP	grün fluoreszierendes Protein
<i>h</i>	Stunde



HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium- hexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
hDap	Homodipropionsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hLys	Homolysin
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HR	<i>high resolution</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
I	Intensität
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante
k	Boltzmann-Konstante
konz.	konzentriert
l	Länge
IR	Infrarot
m	Masse
m	<i>medium</i>
<i>m</i>	meta
M	molar
M	Molmasse
m	Multipllett
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung
MBHA	4-Methylbenzyhydrylamin
Me	Methyl
MeOH	Methanol

MHz	Megahertz
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MSI	<i>mass spectrometry imaging</i>
<i>n</i>	Beladungsdichte
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCL	<i>native chemical ligation</i>
NEM	<i>N</i> -Ethylmorpholin
NEt ₃	Triethylamin
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin-2-on
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
<i>o</i>	ortho
OAc	Acetat
oSG	orthogonale Schutzgruppe
Su	Succinimid
<i>p</i>	para
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglycol
Ph	Phenyl
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PIDA	Diacetoxiodbenzol
Pmb	<i>p</i> -Methoxybenzyl
PNT	<i>peptide nanotube</i>
PPA	<i>propanphosphonic acid</i>
ppm	<i>part per million</i>
ⁱ PrOH	Isopropanol
PS	Polystyrol



PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat
q	Quartett
R	Rest
RAFT	<i>regioselective addressable functionalized template</i>
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP	<i>reverse phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	singulett
s	<i>strong</i>
SEM	<i>scanning electron microscope</i>
SG	Schutzgruppe
SIMS	Sekundärionen-Massenspektrometrie
SNAP-25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
θ	Elliptizität
T	Thymin
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TAT	Triaminotriazin
TAP	Triaminopyrimidin
TASP	Templat-assoziierte synthetische Proteine
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran

TIS	Triisopropylsilan
t_R	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
U/Minute	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
VIS	<i>visible</i>
vs	<i>very strong</i>
w	<i>weak</i>
z. B.	zum Beispiel

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) empfohlenen Richtlinien. Firmennamen und Fachausdrücke, die aus dem Englischen oder Lateinischen übernommen wurden, sind kursiv geschrieben.



11. Literaturverzeichnis

- [1] W. Müller-Esterl, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage, Heidelberg **2009**.
- [2] D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York **2001**.
- [3] E. Uhlmann, *Chemie Unserer Zeit* **1998**, 3, 150–160.
- [4] H. S. Chan, K. A. Dill, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1996**, 24, 335–344.
- [5] W. F. DeGrado, C. Summa, V. Pavone, F. Nastri, A. Lombardi, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 779–819.
- [6] M. Levitt, M. Gerstein, E. Huang, S. Subbiah, J. Tsai, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 549–579.
- [7] D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, G. Guichard, T. Hintermann, B. Jaun, J. L. Matthews, J. V. Schreiber, *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 932–982.
- [8] D. H. Appella, J. J. Barchi, S. R. Durell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 2309–2310.
- [9] J. Frackenpohl, P. I. Arvidsson, J. V. Schreiber, D. Seebach, *Chembiochem* **2001**, 2, 445–455.
- [10] S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 173–180.
- [11] U. Koert, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1922–1923.
- [12] D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodivers.* **2004**, 1, 1111–1239.
- [13] J. X. Qiu, E. J. Petersson, E. E. Matthews, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11338–11339.
- [14] P. Chakraborty, U. Diederichsen, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 3207–3216.
- [15] R. Srivastava, A. K. Ray, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4793–4800.
- [16] A. Weiß, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5531–5539.
- [17] R. Srivastava, *Design, Synthesis, and Molecular Self-Assembly of β -Peptides*, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen **2009**.
- [18] P. Timmerman, L. J. Prins, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3191–3205.
- [19] F. Stein, T. Mehmood, T. Plass, J. H. Zaidi, U. Diederichsen, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 1576–1583.
- [20] F. Fujimura, S. Kimura, *Org. Lett.* **2007**, 9, 793–796.
- [21] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, 19, 780–782.
- [22] M. L. Pacholski, N. Winograd, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2977–3006.

- [23] S. G. Boxer, M. L. Kraft, P. K. Weber, *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, *38*, 53–74.
- [24] C. Lechene, F. Hillion, G. McMahon, D. Benson, A. M. Kleinfeld, J. P. Kampf, D. Distel, Y. Luyten, J. Bonventre, D. Hentschel, K. M. Park, S. Ito, M. Schwartz, G. Benichou, G. Slodzian, *J. Biol.* **2006**, *5*, 20.
- [25] H. Sahoo, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 7017–7029.
- [26] C. S. Theile, M. D. Witte, A. E. M. Blom, L. Kundrat, H. L. Ploegh, C. P. Guimaraes, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1800–1807.
- [27] T. Proft, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *32*, 1–10.
- [28] G. Licini, L. J. Prins, P. Scrimin, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 969–977.
- [29] R. P. Cheng, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 512–520.
- [30] A. Khan, C. Kaiser, S. Hecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1878–1881.
- [31] N. Delsuc, J. M. Léger, S. Massip, I. Huc, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 214–217.
- [32] C. M. Goodman, S. Choi, S. Shandler, W. F. DeGrado, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 252–262.
- [33] R. N. Zuckermann, E. J. Martin, D. C. Spellmeyer, G. B. Stauber, K. R. Shoemaker, J. M. Kerr, G. M. Figliozzi, D. A. Goff, M. A. Siani, R. J. Simon, S. C. Banville, E. G. Brown, L. Wang, L. S. Richter, W. H. Moos, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2678–2685.
- [34] A. J. Karlsson, W. C. Pomerantz, B. Weisblum, S. H. Gellman, S. P. Palecek, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12630–12631.
- [35] E. A. Porter, X. Wang, H. S. Lee, B. Weisblum, S. H. Gellman, *Nature* **2000**, *404*, 565.
- [36] R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232.
- [37] R. W. Hooft, C. Sander, G. Vriend, *Comput. Appl. Biosci.* **1997**, *13*, 425–430.
- [38] C. P. R. Hackenberger, *Chemie Unserer Zeit* **2006**, *40*, 174–183.
- [39] D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Commun.* **1997**, *1*, 2015–2022.
- [40] N. Rathore, S. H. Gellman, J. J. de Pablo, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3425–3435.
- [41] D. Seebach, P. E. Ciceri, M. Overhand, J. Bernhard, D. Rigo, L. Oberer, U. Hommel, R. Amstutz, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043–2066.
- [42] D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071–13072.
- [43] C. A. Miller, S. H. Gellman, N. L. Abbott, J. J. de Pablo, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3123–3136.
- [44] M. R. Lee, T. L. Raguse, M. Schinnerl, W. C. Pomerantz, X. Wang, P. Wipf, S. H. Gellman, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1801–1804.



- [45] P. I. Arvidsson, M. Rueping, D. Seebach, *Chem. Commun.* **2001**, 5, 649–650.
- [46] R. P. Cheng, W. F. Degrado, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5162–5163.
- [47] J. A. Kritzer, J. Tirado-Rives, S. A. Hart, J. D. Lear, W. L. Jorgensen, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 167–178.
- [48] S. A. Hart, A. B. F. Bahadoor, E. E. Matthews, X. J. Qiu, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4022–4023.
- [49] D. A. Guarracino, H. R. Chiang, T. N. Banks, J. D. Lear, M. E. Hodsdon, A. Schepartz, *Org. Lett.* **2006**, 8, 807–810.
- [50] L. J. Prins, D. N. Reinhoudt, P. Timmerman, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2446–2492.
- [51] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science* **1991**, 254, 1312–1319.
- [52] P. Timmerman, J.-L. Weidmann, K. A. Jolliffe, L. J. Prins, D. N. Reinhoudt, S. Shinkai, L. Frish, Y. Cohen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **2000**, 2077–2089.
- [53] G. M. Whitesides, E. S. Simanek, J. P. Mathias, C. T. Seto, D. N. Chin, M. Mammen, D. M. Gordon, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 37–44.
- [54] M. Hubert, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem.* **1996**, 11, 1306–1309.
- [55] F. Rakotondradany, A. Palmer, V. Toader, B. Chen, M. A. Whitehead, H. F. Sleiman, *Chem. Commun.* **2005**, 5441–5443.
- [56] M. Liu, M. P. Sibi, *Tetrahedron* **2002**, 58, 7991–8035.
- [57] D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodivers.* **2004**, 1, 1111–1239.
- [58] J. M. Bland, *Synth. Commun.* **1995**, 25, 467–477.
- [59] Z. Guo, M. Xian, W. Zhang, A. McGill, P. G. Wang, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 99–106.
- [60] A. Hamze, J.-F. Hernandez, P. Fulcrand, J. Martinez, *J. Org. Chem.* **2003**, 7316–7321.
- [61] N. J. Pawar, N. S. Sidhu, G. M. Sheldrick, D. D. Dhavale, U. Diederichsen, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, 10, 948–955.
- [62] F. Arndt, C. R. Noller, I. Bergsteinsson, *Org. Synth.* **1935**, 15, 3.
- [63] H. S. G. Beckmann, F. Nie, C. E. Hagerman, H. Johansson, Y. S. Tan, D. Wilcke, D. R. Spring, *Nat. Chem.* **2013**, 5, 861–867.
- [64] F. Johnson, E. R. Marinelli, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 3913–3915.
- [65] H. Maltz, M. A. Grant, M. C. Navaroli, *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 363–364.
- [66] Á. Kathó, Z. Bódi, L. Dózsa, M. T. Beck, *Inorg. Chim. Acta* **1984**, 83, 145–150.

- [67] J. T. Thurston, J. R. Dudley, D. W. Kaiser, I. Hechenbleikner, F. C. Schaefer, D. Holm-Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 2981–2983.
- [68] G. Blotny, *Tetrahedron* **2006**, 62, 9507–9522.
- [69] M. Vidal-Mosquera, A. Fernández-Carvajal, A. Moure, P. Valente, R. Planells-Cases, J. M. González-Ros, J. Bujons, A. Ferrer-Montiel, A. Messeguer, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 7441–7452.
- [70] S. Samaritani, P. Peluso, C. Malanga, R. Menicagli, *Eur J. Org. Chem.* **2002**, 1551–1555.
- [71] M. Zheng, C. Xu, J. Ma, Y. Sun, F. Du, H. Liu, L. Lin, C. Li, J. Ding, K. Chen, H. Jiang, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 1815–1827.
- [72] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*, 3. Auflage, John Wiley & Sons, New York **1999**.
- [73] L. Zhang, G. S. Kauffman, J. A. Pesti, J. Yin, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6918–6920.
- [74] F. Ruan, Y. Chen, K. Itoh, T. Sasaki, P. B. Hopkins, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4347–4354.
- [75] Y. Zeng, Y. Pratumyot, X. Piao, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 832–835.
- [76] T. Kimmerlin, D. Seebach, *J. Pept. Res.* **2005**, 65, 229–260.
- [77] R. B. Merrifield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, 24, 799–810.
- [78] R. B. Merrifield, *Biochemistry* **1964**, 3, 1385–1390.
- [79] M. Gude, J. Ryf, P. D. White, *Lett. Pept. Sci.* **2002**, 9, 203–206.
- [80] J. K. Murray, S. H. Gellman, *Org. Lett.* **2005**, 7, 1517–1520.
- [81] R. W. Woody, *Methods Enzymol.* **1995**, 246, 34–71.
- [82] N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, Eds. *Circular Dichroism: Principles and Application*; Wiley-VCH, New York, **2000**.
- [83] R. C. Hirt, R. G. Schmitt, *Spectrochim. Acta* **1958**, 12, 127–138.
- [84] I. M. Klotz, T. Askounis, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 801–803.
- [85] F. H. Frimmel, R. Niessner, *Nanoparticles in the Water Cycle: Properties, Analysis and Environmental Relevance*, Springer Verlag, 1. Auflage, Berlin **2010**.
- [86] R. Murphy, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, 8, 25–30.
- [87] R. Shaw, User Training Malvern, *Dynamic Light Scattering Training*.
- [88] *Malvern Instruments, Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes* (Technical note).



- [89] A. Hawe, W. L. Hulse, W. Jiskoot, R. T. Forbes, *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2302–2310.
- [90] F. He, G. W. Becker, J. R. Litowski, L. O. Narhi, D. N. Brems, V. I. Razinkov, *Anal. Biochem.* **2010**, *399*, 141–143.
- [91] B. Lorber, F. Fischer, M. Bailly, H. Roy, D. Kern, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2012**, *40*, 372–382.
- [92] A. Ranganathan, V. R. Pedireddi, C. N. R. Rao, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1752–1753.
- [93] M. C. Chen, B. J. Cafferty, I. Mamajanov, I. Gállego, J. Khanam, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, DOI 10.1021/ja410124v.
- [94] B. J. Cafferty, I. Gállego, M. C. Chen, K. I. Farley, R. Eritja, N. V. Hud, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2447–2450.
- [95] D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206–6212.
- [96] D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913–941.
- [97] D. Musumeci, M. D. Ward, *CrystEngComm* **2011**, *13*, 1067.
- [98] N. E. Chayen, E. Saridakis, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 147–153.
- [99] C. A. Schalley, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley VCH Verlag, 1. Auflage, Weinheim **2007**.
- [100] M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 551.
- [101] J. P. Segrest, H. De Loof, J. G. Dohlman, C. G. Brouillette, G. M. Anantharamaiah, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1990**, *8*, 103–117.
- [102] S. Kamtekar, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1013–1022.
- [103] K. S. Åkerfeldt, J. D. Lear, Z. R. Wasserman, L. A. Chung, W. F. Degrado, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 191–197.
- [104] M. Mutter, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 260–265.
- [105] G. Tuchscherer, M. Mutter, *J. Biotechnol.* **1995**, *41*, 197–210.
- [106] M. Mutter, G. G. Tuchscherer, C. Miller, K. H. Altmann, R. I. Carey, D. F. Wyss, A. M. Labhardt, J. E. Rivier, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1463–1470.
- [107] M. Mutter, G. Tuchscherer, *Makromol. Rapid Commun.* **1988**, *9*, 437–433.
- [108] M. Fahnenschmidt, R. Bittl, E. Schlodder, W. Haehnel, W. Lubitz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 4082–4090.
- [109] D. Grell, J. S. Richardson, M. Mutter, *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 146–151.

- [110] G. Tuchscherer, B. Dörner, U. Sila, B. Kamber, M. Mutter, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3559–3575.
- [111] S. Peluso, T. Rückle, C. Lehmann, M. Mutter, C. Peggion, M. Crisma, *Chembiochem* **2001**, *2*, 432–437.
- [112] O. Avrutina, M. Empting, S. Fabritz, M. Daneschdar, H. Frauendorf, U. Diederichsen, H. Kolmar, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4177–4185.
- [113] M. Galibert, L. Sancey, O. Renaudet, J.-L. Coll, P. Dumy, D. Boturyn, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5133–5138.
- [114] P. Dumy, I. M. Eggleston, G. Esposito, S. Nicula, M. Mutter, *Biopolymers* **1996**, *39*, 297–308.
- [115] G. Tuchscherer, M. Mutter, *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 3–10.
- [116] G. Tuchscherer, M. Mutter, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 2153–2162.
- [117] O. Renaudet, P. Dumy, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243–246.
- [118] U. Koert, *Chemie unserer Zeit* **1997**, *31*, 20–26.
- [119] J. Sanchez-Quesada, M. R. Ghadir, H. Bayley, O. Braha, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11757–11766.
- [120] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* **1993**, *366*, 324–327.
- [121] S. Fernandez-Lopez, H. S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. a Weinberger, K. M. Wilcoxen, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, *412*, 452–455.
- [122] I. W. Hamley, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 6984–7000.
- [123] D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 988–1011.
- [124] J. D. Hartgerink, T. D. Clark, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1367–1372.
- [125] J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785–10786.
- [126] T. D. Clark, L. K. Buehler, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651–656.
- [127] D. Seebach, J. L. Matthews, A. Meden, T. Wessels, C. Baerlocher, L. B. McCusker, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173–182.
- [128] K. Gademann, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 957–962.
- [129] D. Gauthier, D. Gauthier, P. Baillargeon, P. Baillargeon, M. Drouin, M. Drouin, Y. L. Dory, Y. L. Dory, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4635–4638.
- [130] F. Fujimura, T. Hirata, T. Morita, S. Kimura, Y. Horikawa, J. Sugiyama, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2394–2400.



- [131] R. J. Brea, C. Reiriz, J. R. Granja, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1448–1456.
- [132] U. M. Kotyrba, K. Pröpper, E.-F. Sachs, A. Myanovska, T. Joppe, F. Lissy, G. M. Sheldrick, K. Koszinowski, U. Diederichsen, *ChemistryOpen* **2014**, 3, 152–160.
- [133] J. N. Lambert, J. P. Mitchell, K. D. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 471–484.
- [134] A. Ehrlich, S. Rothmund, M. Brudel, M. Beyermann, L. A. Carpino, M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 471–448.
- [135] J. S. Zheng, S. Tang, Y. Guo, H. N. Chang, L. Liu, *ChemBioChem* **2012**, 13, 542–546.
- [136] C. J. White, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **2011**, 3, 509–524.
- [137] R. Kleineweischede, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6073–6077.
- [138] C. Rosenbaum, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5677–5680.
- [139] R. Kelly, *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 453–456.
- [140] Y. Kwon, K. Welsh, A. R. Mitchell, J. A. Camarero, *Org. Lett.* **2004**, 6, 3801–3804.
- [141] A. B. Smith, A. K. Charnley, E. F. Mesaros, O. Kikuchi, W. Wang, A. Benowitz, C. Chu, J. Feng, K. Chen, A. Lin, F. C. heng, L. Taylor, R. Hirschmann, *Org. Lett.* **2005**, 7, 399–402.
- [142] Y. Ishihara, S. Kimura, *J. Pept. Sci.* **2010**, 16, 110–114.
- [143] E. R. Amstalden van Hove, D. F. Smith, R. M. A. Heeren, *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 3946–3954.
- [144] J. Pól, M. Strohalm, V. Havlíček, M. Volný, *Histochem. Cell Biol.* **2010**, 134, 423–443.
- [145] R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4751–4760.
- [146] R. Castaing, G. Slodzian, *J. Microscopie* **1962**, 1, 395–410.
- [147] J. L. Guerquin-Kern, T. D. Wu, C. Quintana, A. Croisy, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2005**, 1724, 228–238.
- [148] W. Römer, T. Di Wu, P. Duchambon, M. Amessou, D. Carrez, L. Johannes, J. L. Guerquin-Kern, *Appl. Surf. Sci.* **2006**, 252, 6925–6930.
- [149] A. Benninghoven, *Surf. Sci.* **1973**, 35, 427–457.
- [150] P. Hoppe, S. Cohen, A. Meibom, *Geostand. Geoanalytical Res.* **2013**, 37, 111–154.
- [151] C. Guillermier, M. L. Steinhauser, C. P. Lechene, *Surf. Interface Anal.* **2014**, 46, 150–153.
- [152] R. Peteranderl, C. Lechene, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 478–485.
- [153] V. J. Orphan, C. H. House, K. U. Hinrichs, K. D. McKeegan, E. F. DeLong, *Science* **2001**, 293, 484–487.

- [154] Y. Q. Guan, Y. Y. Cai, X. Zhang, Y. T. Lee, M. Opas, *Microsc. Res. Tech.* **2008**, *71*, 146–157.
- [155] K. Gevaert, F. Impens, B. Ghesquière, P. Van Damme, A. Lambrechts, J. Vandekerckhove, *Proteomics* **2008**, *8*, 4873–4885.
- [156] H. Sahoo, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 7017.
- [157] R. Schoenheimer, D. Rittenberg, *Science* **1938**, *87*, 221–226.
- [158] A. Delaune, A. Cabin-Flaman, G. Legent, D. Gibouin, C. Smet-Nocca, F. Lefebvre, A. Benecke, M. Vasse, C. Ripoll, *PLoS One* **2013**, *8*, DOI 10.1371/journal.pone.0056559.
- [159] J. W. Gouw, B. B. J. Tops, P. Mortensen, A. J. R. Heck, J. Krijgsveld, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7796–7803.
- [160] D.-S. Zhang, V. Piazza, B. J. Perrin, A. K. Rzadzinska, J. C. Poczatek, M. Wang, H. M. Prosser, J. M. Ervasti, D. P. Corey, C. P. Lechene, *Nature* **2012**, *481*, 520–524.
- [161] S. Baboo, B. Bhushan, H. Jiang, C. R. M. Grovenor, P. Pierre, B. G. Davis, P. R. Cook, *PLoS One* **2014**, *9*, DOI 10.1371/journal.pone.0099346.
- [162] S. K. Saka, A. Vogts, K. Kröhnert, F. Hillion, S. O. Rizzoli, J. T. Wessels, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3664.
- [163] Y. Q. Guan, Y. Y. Cai, X. Zhang, Y. T. Lee, M. Opas, *Microsc. Res. Tech.* **2008**, *71*, 146–157.
- [164] M. L. Steinhauser, A. P. Bailey, S. E. Senyo, C. Guillermier, T. S. Perlstein, A. P. Gould, R. T. Lee, C. P. Lechene, *Nature* **2012**, *481*, 516–519.
- [165] S. E. Senyo, M. L. Steinhauser, C. L. Pizzimenti, V. K. Yang, L. Cai, M. Wang, T.-D. Wu, J.-L. Guerquin-Kern, C. P. Lechene, R. T. Lee, *Nature* **2013**, *493*, 433–6.
- [166] A. Cabin-Flaman, A.-F. Monnier, Y. Coffinier, J.-N. Audinot, D. Gibouin, T. Wirtz, R. Boukherroub, H.-N. Migeon, A. Bensimon, L. Jannièr, et al., *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6940–7.
- [167] A. M. Kleinfeld, J. P. Kampf, C. Lechene, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1572–1580.
- [168] C. Galli Marxer, M. L. Kraft, P. K. Weber, I. D. Hutcheon, S. G. Boxer, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2965–2975.
- [169] J. F. Frisz, H. A. Klitzing, K. Lous, I. D. Hutcheon, P. K. Weber, J. Zimmerberg, M. L. Kraft, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 16855–16861.
- [170] J. F. Frisz, K. Lou, H. A. Klitzing, W. P. Hanafin, V. Lizunov, R. L. Wilson, K. J. Carpenter, R. Kim, I. D. Hutcheon, J. Zimmerberg, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, E613–22.
- [171] S. Behrens, T. Lösekann, J. Pett-Ridge, P. K. Weber, W. O. Ng, B. S. Stevenson, I. D. Hutcheon, D. A. Relman, A. M. Spormann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 3143–3150.
- [172] N. Musat, H. Halm, B. Winterholler, P. Hoppe, S. Peduzzi, F. Hillion, F. Horreard, R. Amann, B. B. Jørgensen, M. M. M. Kuypers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 17861–17866.



- [173] N. Musat, H. Stryhanyuk, P. Bombach, L. Adrian, J. N. Audinot, H. H. Richnow, *Syst. Appl. Microbiol.* **2014**, 37, 267–276.
- [174] J.-L. Guerquin-Kern, F. Hillion, J.-C. Madelmont, P. Labarre, J. Papon, A. Croisy, *Biomed. Eng. Online* **2004**, 3, 10.
- [175] L. E. Wedlock, M. R. Kilburn, R. Liu, J. A. Shaw, S. J. Berners-Price, N. P. Farrell, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 6944–6946.
- [176] A. A. Legin, A. Schintlmeister, M. A. Jakupec, M. Galanski, I. Lichtscheidl, M. Wagner, B. K. Keppler, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 3135–3143.
- [177] K. J. Carpenter, P. K. Weber, M. L. Davisson, J. Pett-Ridge, M. I. Haverty, P. J. Keeling, *Microsc. Microanal.* **2013**, 19, 1490–1501.
- [178] H. Jiang, E. Favaro, C. N. Goulbourne, P. D. Rakowska, G. M. Hughes, M. G. Ryadnov, L. G. Fong, S. G. Young, D. J. P. Ferguson, A. L. Harris, et al., *Methods* **2014**, 68, 317–324.
- [179] J. R. Knowles, *Science* **1987**, 236, 1252–1258.
- [180] D. Mendel, V. W. Cornish, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24, 435–462.
- [181] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 413–444.
- [182] J. W. Chin, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, 83, 379–408.
- [183] S. Greiss, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14196–14199.
- [184] S. T. Dieck, A. Müller, A. Nehring, F. I. Hinz, I. Bartnik, E. M. Schuman, D. C. Dieterich, *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2012**, 1, 1–29.
- [185] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952–3015.
- [186] S. Milles, S. Tyagi, N. Banterle, C. Koehler, V. Vandelinder, T. Plass, A. P. Neal, E. A. Lemke, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 5187–5195.
- [187] K. Horisawa, *Front. Physiol.* **2014**, 5, 1–6.
- [188] E. M. Smolin, L. Rapoport, *The chemistry of heterocyclic compounds, s-triazines and derivatives*, Interscience publishers Inc., New York **1956**.
- [189] Pat., CN 101497587, 2009.
- [190] Y. Luo, L. Zhang, W. Yang, W. Liu, W. Lu, M. Li, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2011**, 54, 171–172.
- [191] C. G. Fields, G. B. Fields, R. L. Noble, T. A. Cross, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, 33, 298–303.
- [192] C. Byrne, P. A. McEwan, J. Emsley, P. M. Fischer, W. C. Chan, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2589–2591.
- [193] E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, 9, 3797–3800.

- [194] Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4307–4312.
- [195] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, WH Freeman & Company, 4. Auflage, New York **2004**.
- [196] K. Tyagarajan, E. Pretzer, J. E. Wiktorowicz, *Electrophoresis* **2003**, *24*, 2348–2358.
- [197] Y. Chen, A. S. Kamlet, J. B. Steinman, D. R. Liu, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 146–153.
- [198] H. Huang, D. L. Rabenstein, *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 548–553.
- [199] K. Konno, M. Hisada, H. Naoki, Y. Itagaki, T. Yasuhara, Y. Nakata, A. Miwa, N. Kawai, *Neurosci. Lett.* **2000**, *285*, 29–32.
- [200] Y. Sahara, M. Gotoh, K. Konno, A. Miwa, H. Tsubokawa, H. P. C. Robinson, N. Kawai, *Eur. J. Neurosci.* **2000**, *12*, 1961–1970.
- [201] E. Kinoshita, H. Maejima, K. Yamaoka, K. Konno, N. Kawai, E. Shimizu, S. Yokote, H. Nakayama, I. Seyama, *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1457–1463.
- [202] N. Kawai, K. Konno, *Neurosci. Lett.* **2004**, *361*, 44–46.
- [203] S. Yokote, R. Setoguchi, E. Shimizu, N. Mishima, K. Kawahara, A. Kuniyasu, T. Shirasaki, K. Takahama, K. Konno, N. Kawai, et al., *Heterocycles* **2009**, *79*, 925–933.
- [204] E. Schiavon, M. Stevens, A. J. Zaharenko, K. Konno, J. Tytgat, E. Wanke, *FEBS J.* **2010**, *277*, 918–930.
- [205] J. L. Lauer, C. G. Fields, G. B. Fields, *Lett. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 194–205.
- [206] T. Michels, R. Dölling, U. Haberkorn, W. Mier, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5218–5221.
- [207] C. Nadler, Extending the scope of protein synthesis by a novel auxiliary-based native chemical ligation strategy, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen **2013**.
- [208] R. Jahn, R. H. Scheller, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 631–643.
- [209] A. S. Lygina, K. Meyenberg, R. Jahn, U. Diederichsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8597–8601.
- [210] K. Meyenberg, A. S. Lygina, G. van den Bogaart, R. Jahn, U. Diederichsen, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9405–9407.
- [211] S. Hamada, S. Fujita, *Histochemistry* **1983**, *79*, 219–226.
- [212] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802–805.
- [213] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3964–3967.
- [214] F. Paneth, *Naturwissenschaften* **1920**, *8*, 839–842.
- [215] U. Diederichsen, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1999**, *47*, 805–809.



- [216] K. Tomita, S. Oishi, H. Ohno, N. Fujii, *Biopolymers* **2008**, *90*, 503–511.
- [217] H. Yamazaki, M. Tamaoki, M. Oohashi, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2000**, *39*, 4744–4748.
- [218] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763–775.
- [219] M. Sameiro, T. Gonçalves, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190–212.
- [220] M. Brinkley, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 2–13.
- [221] D. E. Mason, D. C. Liebler, *J. Proteome Res.* **2003**, 265–272.
- [222] H. Neumann, *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2057–2064.
- [223] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [224] D. P. Nguyen, H. Lusic, H. Neumann, P. B. Kapadnis, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8720–8721.
- [225] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249–1262.
- [226] N. J. Agard, J. a Prescher, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [227] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 19–24.
- [228] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.
- [229] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.
- [230] K. Lang, L. Davis, S. Wallace, M. Mahesh, D. J. Cox, M. L. Blackman, J. M. Fox, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10317–10320.
- [231] H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2670–2671.
- [232] J. M. Antos, G. L. Chew, C. P. Guimaraes, N. C. Yoder, G. M. Grotenbreg, M. W. L. Popp, H. L. Ploegh, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10800–10801.
- [233] R. L. Policarpo, H. Kang, X. Liao, A. E. Rabideau, M. D. Simon, B. L. Pentelute, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *126*, 9203–9208.
- [234] T. Porstmann, S. T. Kiessig, *J. Immunol. Methods* **1992**, *150*, 5–21.
- [235] C. P. Guimaraes, M. D. Witte, C. S. Theile, G. Bozkurt, L. Kundrat, A. E. M. Blom, H. L. Ploegh, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1787–99.
- [236] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228.
- [237] W. W. Navarre, O. Schneewind, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 174–229.
- [238] G. K. Paterson, T. J. Mitchell, *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 89–95.

- [239] M. Goedert, *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, 2, 492–501.
- [240] M. Baba, S. Nakajo, P.-H. Tu, T. Tomita, K. Nakaya, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski, T. Iwatsubo, *Am. J. Pathol.* **1998**, 4, 879–884.
- [241] T. F. Outeiro, S. Lindquist, *Science* **2003**, 302, 1772–1775.
- [242] E. Gazit, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 267–269.
- [243] L. C. Zanetti-Domingues, C. J. Tynan, D. J. Rolfe, D. T. Clarke, M. Martin-Fernandez, *PLoS One* **2013**, 8, DOI 10.1371/journal.pone.0074200.
- [244] N. Lunau, K. Seelhorst, S. Kahl, K. Tscherch, C. Stacke, S. Rohn, J. Thiem, U. Hahn, C. Meier, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 17379–17390.
- [245] C. A. Wurm, K. Kolmakov, F. Göttfert, H. Ta, M. Bossi, H. Schill, S. Berning, S. Jakobs, G. Donnert, V. N. Belov, S. W. Hell, *Opt. Nanoscopy* **2012**, 1, 7.
- [246] J. Roth, P. Saremaslani, C. Zuber, *Histochemistry* **1992**, 98, 229–236.
- [247] R. Pei, Z. Cheng, E. Wang, X. Yang, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 355–361.
- [248] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, 243, 85–88.
- [249] A. M. Brückner, P. Chakraborty, S. H. Gellman, U. Diederichsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4395–4399.
- [250] M. Zheng, C. Xu, J. Ma, Y. Sun, F. Du, H. Liu, L. Lin, C. Li, J. Ding, K. Chen, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 1815–1827.
- [251] N. Audic, G. Potier, N. A. Sasaki, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 773–80.
- [252] N. Bayó-Puxan, A. Fernández, J. Tulla-Puche, E. Riego, M. Álvarez, F. Albericio, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, 13, 295–306.
- [253] Y. Rew, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 8820–8826.
- [254] H.-W. Ai, J. W. Lee, P. G. Schultz, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5506–5508.
- [255] E. Vaz, S. A. Dames, M. Geyer, L. Brunsveld, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 1365–1373.
- [256] C. G. Fields, G. B. Fields, R. L. Noble and T. A. Cross, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, 33, 298.
- [257] R. Ricciarelli, J. M. Zingg, A. Azzi, *FASEB J.* **2001**, 15, 2314–2325.
- [258] F. Arndt, C. R. Noller, S. Lieberman, *Org. Synth.* **1943**, 2, 461.
- [259] D. H. Appella, P. R. Leplae, T. L. Raguse, S. H. Gellman, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4766–4769.
- [260] M. Schinnerl, J. K. Murray, J. M. Langenhan, S. H. Gellman, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 721–726.
- [261] T. J. Beveridge, *Biotech. Histochem.* **2001**, 76, 111–118.



Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. ULF DIEDERICHSEN für die interessanten Themenstellungen, die sehr gute Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft, verbunden mit der mir gewährten wissenschaftliche Freiheit und die freundliche Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. LUTZ ACKERMANN danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. FRANC MEYER, Herrn Prof. Dr. KONRAD KOSZINOWSKI, Herrn Prof. Dr. PHILIPP VANA und Frau Dr. INKE SIEWERT danke ich für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. SILVIO O. RIZZOLI, INGRID-CHRISTIANA VREJA, Dr. FELIPE OPAZO, Dr. SINEM K. SAKA und Dr. CARMEN HÖSCHEN für das gemeinsame Projekt und die tolle Zusammenarbeit. INGRID-CHRISTIANA VREJA danke ich ausserdem für die Aufnahmen, die sie mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat, um die Applikation der Biomolekülmarker zu zeigen. Im Rahmen meines Janus-Projektes möchte ich mich besonders bei Prof. KONRAD KOSZINOWSKI und Dr. HOLM FRAUENDORF für die massenspektrometrischen Messungen, DENNIS HÜBNER aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. PHILIPP VANA für die DLS und AFM-Messungen, ANNA V. LÜBBEN aus dem Arbeitskreis von Prof. GEORGE M. SHELDRIK und JENS LÜBBEN aus dem Arbeitskreis von PD Dr. Habil. BIRGER DITTRICH für die Kristallisationsexperimente und Dr. K. TECHMER für die SEM-Messungen bedanken.

Meinen Bachelorstudenten MARIO FISCHER und AMIR KHARRAZIZADEH sowie meinen Praktikanten danke ich für ihr engagiertes Arbeiten.

Der NMR-Abteilung unter der ehemaligen Leitung von REINHARDT MACHINEK und der aktuellen Leitung von Dr. MICHAEL JOHN, sowie der Massenabteilung unter der Leitung von Dr. HOLM FRAUENDORF danke ich für die zahlreichen Messungen.

Für das Korrekturlesen Teile dieser Arbeit danke ich JULIA GRAF, BARBARA HUBRICH, MEIKE JUNIUS, SWANTJE NAWRATIL, ANASTASIYA MYANOVSKA, JANINE WEGNER, ULRIKE ROST, CHRISTINE HANSEN, DENNIS HÜBNER, ANNA V. LÜBBEN, HARITA RAO und JAN-DIRK WEHLAND.

JULIANE GRÄFE, ANGELA HEINEMANN und AOIFE NEVILLE danke ich für deren umfassende organisatorische Unterstützung. DANIEL FRANK danke ich für die tatkräftige und zuverlässige Unterstützung bei technischen Fragen und Problemen.

Allen ehemaligen und aktuellen Kollegen und Kolleginnen des Arbeitskreises DIEDERICHSEN danke ich für die schöne Atmosphäre sowie die Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit während meiner gesamten Promotionszeit.

Meinen ehemaligen und jetzigen Kollegen aus dem Labor 106 sowie Labor P110/112 Dr. JULIAN STROHMEIER, Dr. TANJA POLUPANOW, Dr. DIANA PETERSEN, MEIKE JUNIUS, Dr. URSULA KOTYRBA und JULIA GRAF danke ich für die schöne gemeinsame Zeit und der tollen Atmosphäre.

Der größte Dank gilt meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden für all die Jahre der unermüdlichen seelischen Unterstützung und ihrem aufgebrachten Verständnis, vorallem in arbeitsintensiven Phasen meiner Promotionszeit.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Selda Kabatas
 Geburtsdatum: 06.03.1984
 Geburtsort: Göttingen
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

AUSBILDUNG

07/2015	Promotionsprüfung
04/2011 – 06/2015	Promotion am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen, im Arbeitskreis von Prof. Dr. ULF DIEDERICHSEN <i>„Synthese Artifiziereller Peptide zur Erzeugung von Supramolekularen Architekturen und zur Markierung von Biomolekülen“</i>
03/2010 – 03/2011	Diplomarbeit am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen, im Arbeitskreis von Prof. Dr. ULF DIEDERICHSEN <i>“Synthese Janusmolekül-funktionalisierter β-Aminosäuren zur Organisation von β-Peptidhelices“</i>
10/2004 – 02/2010	Chemiestudium an der Georg-August-Universität Göttingen
07/2004	Abitur, Fachgymnasium Wirtschaft, Berufsbildende Schulen I (BBS 1) - Arnoldi Schule Göttingen

LEHRAKTIVITÄTEN

04/2013 – 07/2013	Assistentin – Betreuung eines Bachelorstudenten
06/2013 – 08/2013	Assistentin – im <i>Chemisches Praktikum für Human-/Zahnmediziner</i>
01/2013 – 03/2013	Assistentin – im <i>Chemisches Praktikum für Human-/Zahnmediziner</i>
04/2012 – 09/2012	Assistentin – im <i>Organisch-Chemisches Praktikum für Dipl. Biologen und Lehramtskandidaten/innen</i>
01/2012 – 03/2012	Assistentin – im <i>Chemisches Praktikum für Human-/Zahnmediziner</i>
04/2011 – 09/2011	Assistentin – im <i>Organisch-Chemisches Praktikum für Dipl. Biologen und Kandidaten des Lehramts „Chemie an Gymnasien“</i>
04/2011 – 06/2011	Assistentin – Betreuung eines Bachelorstudenten





