Rolf Kleineweischede

Entwicklung einer induzierten Staudinger-Zyklisierung und ihre Anwendung in der Synthese von zyklischen Peptiden und Proteinen

Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Entwicklung einer induzierten Staudinger-Zyklisierung und ihre Anwendung in der Synthese von zyklischen Peptiden und Proteinen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Dissertation

von Diplom-Chemiker

Rolf Kleineweischede

aus Bönen (Westfalen)

Fachbereich Chemie, Biologie and Pharmazie
Institut für Chemie und Biochemie
Freie Universität Berlin

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.ddb.de abrufbar.
1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2009
Zugl.: Berlin (FU), Univ., Diss., 2009

978-3-86955-114-2

Diese Arbeit entstand in der Zeit von März 2006 bis Mai 2009 am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Hackenberger.

1. Gutachter: Dr. Christian Hackenberger, Freie Universität Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Haag, Freie Universität Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2009

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2009
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, 2009
Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-114-2

Danksagung

Ich danke Dr. Christian Hackenberger für die Übertragung des hoch interessanten Projekts, die Unterstützung, die Mittel und Freiheiten bei der Umsetzung der Themenstellung.

Prof. Rainer Haag möchte ich für seine Unterstützung danken. Sein offenes Ohr auch in schwierigen Situationen und seine Geduld habe ich immer als sehr angenehm empfunden. Zudem möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Meinen Laborkolleginnen Wiebke Fischer, Andrea Schulz, Evelina Burakowska und Indah Nurita danke ich für die fantastische Arbeitsatmosphäre und ständige Unterstützung.

Dank sage ich auch Herrn Dr. Andreas Schäfer für seinen Arbeitseifer und sein Interesse zur Strukturaufklärung. Dieser Dank gilt auch der gesamten NMR-Abteilung, sowie der Massenspektroskopie. Insbesondere auch Herrn Kolrep und Frau Oswald für die gute Kommunikation und die Möglichkeit auch mal kurzfristige Messungen durchführen zu können.

Zu großem Dank bin ich auch Prof. Dr. Rolf Breinbauer verpflichtet. Durch seinen Eifer und seinen Willen sein Wissen auch an seine Mitarbeiter weiterzugeben habe ich viel gelernt.

Herrn Winfried Münch sei für interessante Diskussionen, Hilfestellungen, sowie der Vermittlung seines reichhaltigen Erfahrungsschatzes im Bezug auf HPLC gedankt.

Der Arbeitsgruppe Hackenberger und dem Arbeitskreis Haag danke ich für ihre Unterstützung und ein harmonisches Umfeld.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung bedanken. Dies gilt insbesondere auch für meine Freundin Wiebke Ahlbrecht, die mir trotz mancher schwieriger Umstände immer zur Seite gestanden hat.

Abstract

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auf Basis der spurlosen Staudinger-Ligation ein Methodenspektrum zur induzierten Zyklisierung von Peptiden und Proteinen entwickelt werden. Basierend auf den Arbeiten von van Maarseveen et al.[163], die anhand eines Boran-geschützten Phosphinothioesters durch basische Endschützung eine Zyklisierung von Dipeptiden induzierten. Das Hauptaugenmerk lag hier vor allem darauf ein geeignetes System zu finden mit milden Abspaltbedingungen und dieses auf Peptidzyklisierungen anzuwenden. Außerdem sollte die Bioorthogonalität der Staudinger-Ligation nutzbar gemacht werden.

Auf der Grundlage, dass Boran-Komplexe gegenüber Säuren nicht stabil sind wurde eine Strategie entwickelt, um das Phosphin in einem Schritt mit den Aminosäure-Seitenketten zu entschützen. Es konnte gezeigt werden, dass das *S*-Acetyl(diphenylphosphino-(boran))methylthiol mit TFA entschützt werden kann. Dabei entstehen als Borverbindung unreaktive Borate die einen weiteren Reaktionsverlauf nicht beeinflussen. Nach Entschützung und Zugabe von Base konnte ein durch die Staudinger-Ligation vermittelter Acetyltransfer auf Azidoglycin und Benzylazid zum *N*-Acetylglycin und *N*-Acetylbenzylamin mit guten Umsätzen erreicht werden.

Diese Ergebnisse wurden anschließend auf die Zyklisierung von Peptiden übertragen. Der Vorteil gegenüber der basischen Entschützung liegt darin, dass über Fmoc-basierte synthetisch erhaltene Peptide nach Umsetzung zum Thioester durch die Säure gleichzeitig an den Aminosäureseitenketten und dem Phosphin entschützt werden. Hierdurch wird die Chemoselektivität der Staudinger-Ligation genutzt. Die Methode wurde auf verschiedene Peptide angewendet und man erhält die zyklischen Produkte in guten Ausbeuten. Dabei wird eine große Bandbreite an funktionellen Gruppen in den Aminosäureseitenketten toleriert. Lediglich bei Lysin- und Arginin-enthaltenden Peptiden treten aufgrund von Deprotonierung der Seitenketten Nebenreaktionen auf.

Eine Lösung bietet die Einstellung des pH-Wertes in wässrigen Puffern, um die Deprotonierungen zu minimieren. Die bei der Durchführung der Zyklisierung im wässrigen Milieu erhaltenen Ausbeuten sind mit denen im organischen Lösungsmittel vergleichbar. Auch die Anwendung auf die Zyklisierung Lysin- und Arginin-enthaltender Peptide war erfolgreich.

Abstract

In this work a induced cyclization method based on the traceless Staudinger-ligation was developed for peptidic and proteinogenic structures. Van Maarseveen et al. showed a strategy where they used a borane-protected phosphinothiol.[163] By deprotection of the phosphin via base they were able to induce the cyclization of lactones and dipeptides. But they didn't show how useful the method is to cyclize bigger peptidic structures. The main attention was to develop an approach which includes mild deprotection conditions and to transfer this into a peptide-cyclization. Important aspects are especially the use of the bioorthogonality of the Staudinger-ligation.

A borane-complex is not stabile aganist acid. Here is shown an acidic deprotection strategy first of all established on studies at small molecules. It is shown that an Diphenylphosphino-(borane)methanethiol acetate is deprotected by TFA. The resulting borane species is a unreactive borate, which did't interfere fellowing reactionsteps. After deprotection and adding a base it was possible to transfer the acetyl group from the linker system to azidoglycine or benzylazide to yield in a staudinger-ligation *N*-acetylglycine and *N*-acetylbenzylamine by good conversions.

This results were transfered to a peptide-cyclization. The advantage of the acidic deprotection is in contrast to basic conditions, that peptides synthesized with Fmoc-based chemistry were deprotected after the thioester synthesis at the amino acid sidechains and the phosphine in one step, to make use of the chemoselectivity of the Staudinger-ligation. The ligation methode was applicated on different peptides and the cyclization appeared in good yields. Moreover the reaction tolerated a wide range of different funcionalities in the amino acid sidechains. Only the cyclization of lysine and arginine included peptides is problematic. Because of the base addition during the reaction lysine and arginine sidechains can be deprotonated which results in sidereactions and lowers the yields.

A solution is the adjustment of the pH value to minimize deprotonations. Aqueous buffers enable this. Here is shown that the resulted yields of cyclizations in a buffer system are comparable with the results from the organic solvent. Also the cyclization of lysine and arginin containing peptides was successful.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen IV

1. Einleitung 1

2. Theoretischer Teil 3

2.1. Zyklische Peptide und Proteine 3

2.1.1. Zyklische Peptide und Proteine in Säugetieren 5

2.1.2. Zyklische Peptide und Proteine in Pflanzen 6

2.1.3. Zyklische Peptide in Pilzen 9

2.1.4. Zyklische Peptide und Proteine in Mikroorganismen 10

2.1.4.1. Microcin J25 14

2.1.4.2. Bacteriocin AS-48 16

2.2. Ligationsmethoden 21

2.2.1. Native chemische Ligation 22

2.2.2. Exprimierte Protein Ligation 25

2.2.3. Staudinger-Ligation 28

2.2.3.1. Staudinger Reaktion 28

2.2.3.2.Staudinger-Ligation 29

2.2.3.3. Anwendungen der Staudinger-Ligation 39

2.3. Zyklisierungsmethoden 50

2.3.1. Kupplungsreagenzien 50

2.3.1.1. In Lösung 50

2.3.1.2. Festphasenzyklisierungen 50

2.3.2. Ligationen 51

2.3.2.1. Native chemische Ligation 51

2.3.2.2. Staudinger Ligation 55

3. Aufgabenstellung 57

4. Spezieller Teil 59

4.1. Linker 59

4.1.1. Linkerssynthese und Azidoglycin 59

4.2. Staudinger-Ligation in DMF 60

4.2.1. Optimierungsstudien für Reaktion in DMF 61

4.2.1.1. Studie mit Azidoglycin 61

4.2.1.2. Studie mit Benzylazid 64

4.2.1.3. Abspaltbedingungen 65

4.2.1.4. Aufklärung der entstehenden Borverbindungen 67

4.2.2. Anwendung auf die Peptid-Zyklisierung in DMF 68

4.2.2.1. Ergebnisse 70

4.3. Wässrige Staudinger-Ligation 75

4.3.1. Optimierungsstudien 75

4.3.1.1. Die richtige Testsequenz 75

4.3.1.2. Puffer-Optimierung 79

4.3.1.3. Optimierung des pH-Wertes 81

4.3.2. Anwendung auf Lysin- und Arginin-enthaltende Peptide 85

4.3.2.1. Lysin-enthaltende Peptide 85

4.3.2.2. Arginin-enthaltende Peptide 90

4.4. Synthesezugang zu Seitenketten-zyklisierten Substraten 93

4.4.1. Optimierung der Festphasensynthese des Thioesterderivats 94

4.4.2. Übertragung auf die Seitenketten-Zyklisierung und Optimierung 98

4.4.2.1. Wang-Harz 98

4.4.2.2. Sulfonamid-Harz 100

4.5. Synthese des Bacteriocin AS-48 105

4.5.1. Peptidsynthese der Fragmente 107

4.5.1.1. Erste Synthesen 107

5. Zusammenfassung und Ausblick 116

6. Experimenteller Teil 122

6.1. Materialien und Methoden 122

6.2. Versuche zu Kapitel 4.1. 125

6.4. Versuche zu Kapitel 4.2.1. 128

6.5. Versuche zu Kapitel 4.2.2. 132

6.6. Versuche zu Kapitel 4.3.1. 137

6.7. Versuche zu Kapitel 4.32. 142

6.8. Versuche zu Kapitel 4.5.1. 145

6.9. Versuche zu Kapitel 4.5.2. 147

6.10. Versuche zu Kapitel 4.5. 149

7. Literatur 152

Anhang

Abkürzungen

A	Adenylierung
Ac	Acetyl
Ala	Alanin
anal.	analytisch
Ar	Aromat
ber.	berechnet
Boc	tert-Butoxycarbonyl
Bu	Butyl
Bzl	Benzyl
CBD	Chitin Bindungdomäne
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett (NMR-Zuordnung)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett(NMR-Zuordnung)
DF	dimere Form
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
Dmab	4-{N-[1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]-amino}benzyl
DMAP	*N,N*-Dimethylamidopyridin
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMF-d_7	deuteriertes *N,N*-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d_6	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dq	Dublett vom Quartett (NMR-Zuordnung)
dsep	Dublett vom Septett (NMR-Zuordnung)
EPL	exprimierte Protein Ligation
ESI	Elektrospray Ionisation
Et	Ethyl

Fam	5-[(N-(3'-Diphenylphosphinyl-4'-methoxycarbonyl)phenylcarbonyl)-aminoacetamido]fluorescein
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminhexafluorophosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HMPA	4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	hochauflösende Massenspektroskopie
IL8	Interleukin 8
Ile	Isoleucin
J	Kopplungskonstante (NMR-Zuordnung)
LC	liquid chromatography
LD_{50}	letale Dosis 50%
Lys	Lysin
m	Multiplett (NMR-Zuordnung)
M	molar
Me	Methyl
Met	Methionin
MS	Massenspektroskopie
Ms	Mesyl
MT	Methyltransferase
NCL	native chemische Ligation
Nf	Nonafluorobutansulfonat
NMP	*N*-Methylpyrrolidinon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NRPS	„nicht-ribosomale Peptidsynthetase"
O-2-PhiPr	2-Phenylisopropylester
Ox	Oxidation
PAMAM	Polyamidoamin
PCP	Peptid Carrier Protein
PEG	Polyethylenglykol

PEGA	Polyethylenglykol-Dimethylacrylamid-Copolymer
pH	neg. dekadischer Logarithmus der H^+-Konzentration
Ph	Phenyl
Phe	Phenylalanin
pK_s	neg. dek. Logarithmus der sauren Dissoziationskonstante
Pmb	*p*-Methoxybenzyl
ppm	parts per million
PyBOP®	1-Benzotriazolyloxy-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett (NMR-Zuordnung)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTD-1	Rhesus theta defensin 1
s	Singulett (NMR-Zuordnung)
Ser	Serin
SG	Schutzgruppe
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
t	Triplett (NMR-Zuordnung)
T	Carrier Protein
t_R	Retentionszeit
TE	Thioesterasedomäne
TFA	Trifluoressigsäure
TGA	Tentagel mit 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure als Linker
TGT	Tentagel mit 4-Carboxytrityl-Linker
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMSEt	2-Trimethylsilylethyl
ToF	time of flight
Trp	Tryptophan
UV	ultraviolettes Licht
Val	Valin

1. Einleitung

Bei der Betrachtung von biologisch aktiven Substanzen, die sich in Form von Naturstoffen in einer Vielzahl an Lebewesen finden, fällt auf, dass viele dieser Strukturen makrozyklisch sind oder mindestens ein Teilbereich derer zyklisiert ist[1]. Dies stellt sich häufig als essentiell für die dreidimensionale Struktur heraus. Vergleicht man die biologischen Aktivitäten solcher Substanzen mit den entsprechenden azyklischen Verwandten, so stellt man fest, dass die räumliche Anordnung ganz entscheidend für ihren Wirkmechanismus ist, da sie meist eine wesentlich höhere Aktivität besitzen.[2] Solche Verbindungen dienen in der Pharmazie als Leitmotive für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. In Abbildung 1 sind bekannte Vertreter solcher makrozyklischen Substanzen gezeigt, dabei sind die Namen des Erythromycin (**1**)[3] oder des von Schering vermarkteten Epothilon A (**2**)[4, 5], weltweit ein Begriff.

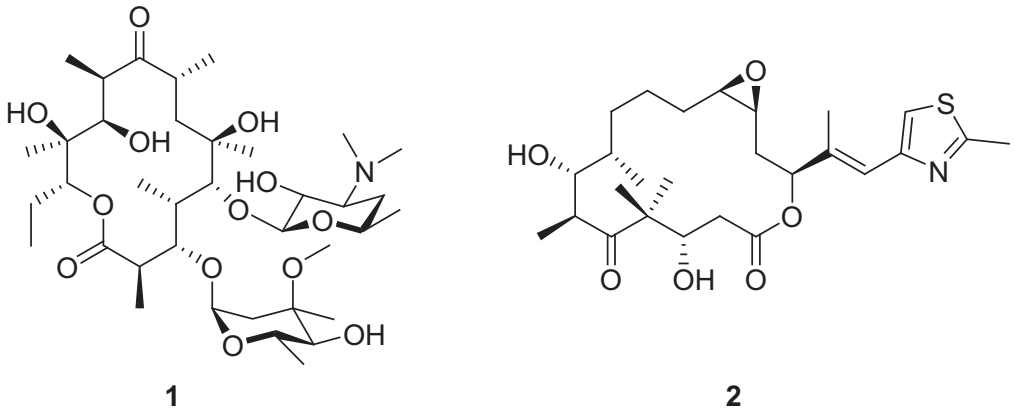
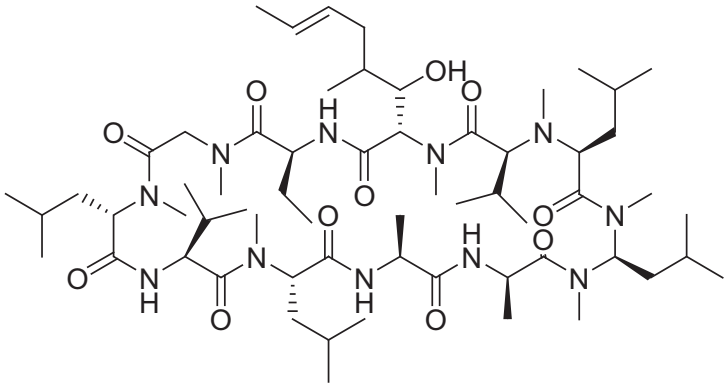


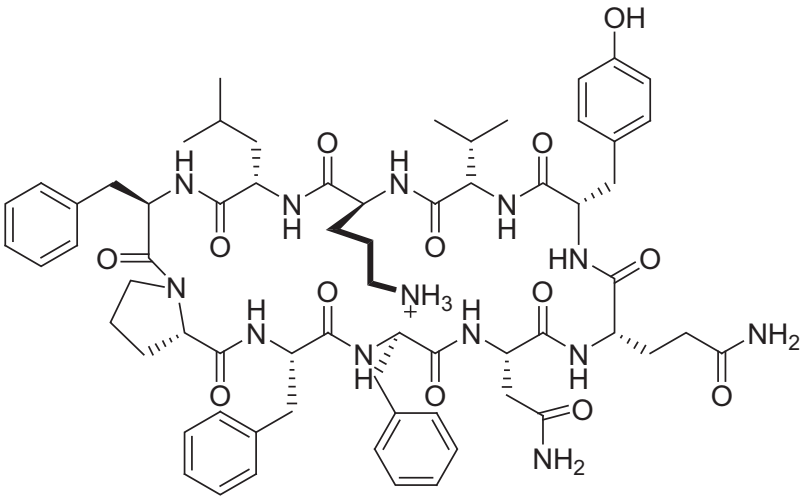
Abbildung 1: Erythromycin (**1**), Epothilon A (**2**)

Nicht nur Polyketide oder Polyketid-ähnliche Strukturen, auch eine große Zahl an zyklischen Peptiden und Proteinen besitzen eine pharmakologische Relevanz[2]. Diese Substanzen findet man über das gesamte Spektrum an auf der Erde existierenden Lebewesen, von Mikroorganismen, über Pflanzen bis hin zu Säugetieren. Die bisher bekannten Vertreter dieser proteogenen Stoffklasse unterscheiden sich teilweise in Aufbau und Größe deutlich voneinander, aber sie verbinden markante Merkmale, wie die makrozyklische Struktur oder biologische Aktivität. Des weiteren zeichnen sie sich durch ihre strukturelle Stabilität gegenüber proteolytischer Hydrolyse, aber auch durch thermische Stabilität aus.[6] Hinzu kommt noch ein aufgrund ihrer statischeren Struktur hervorgerufener entropischer Vorteil gegenüber linearen Spezies bei Wechselwirkungen mit ihren Zielmotiven.

Aufgrund ihrer biologischen Wirkungen sind solche Naturstoffe auch als Zielstrukturen für einen synthetischen Zugang für pharmazeutische Anwendungen interessant.



3



4

Abbildung 2: Die zyklischen Peptide Cyclosporin A (**3**) und Tyrocidin A (**4**)

In Abbildung 2 sind zwei Beispiele kleinerer nicht-ribosomaler zyklischer Peptide gezeigt. Es handelt sich um das Cyclosporin A (**3**)[7], ein Immunosupressivum und das Tyrocidin A (**4**)[8], welches antibiotische Aktivität besitzt.

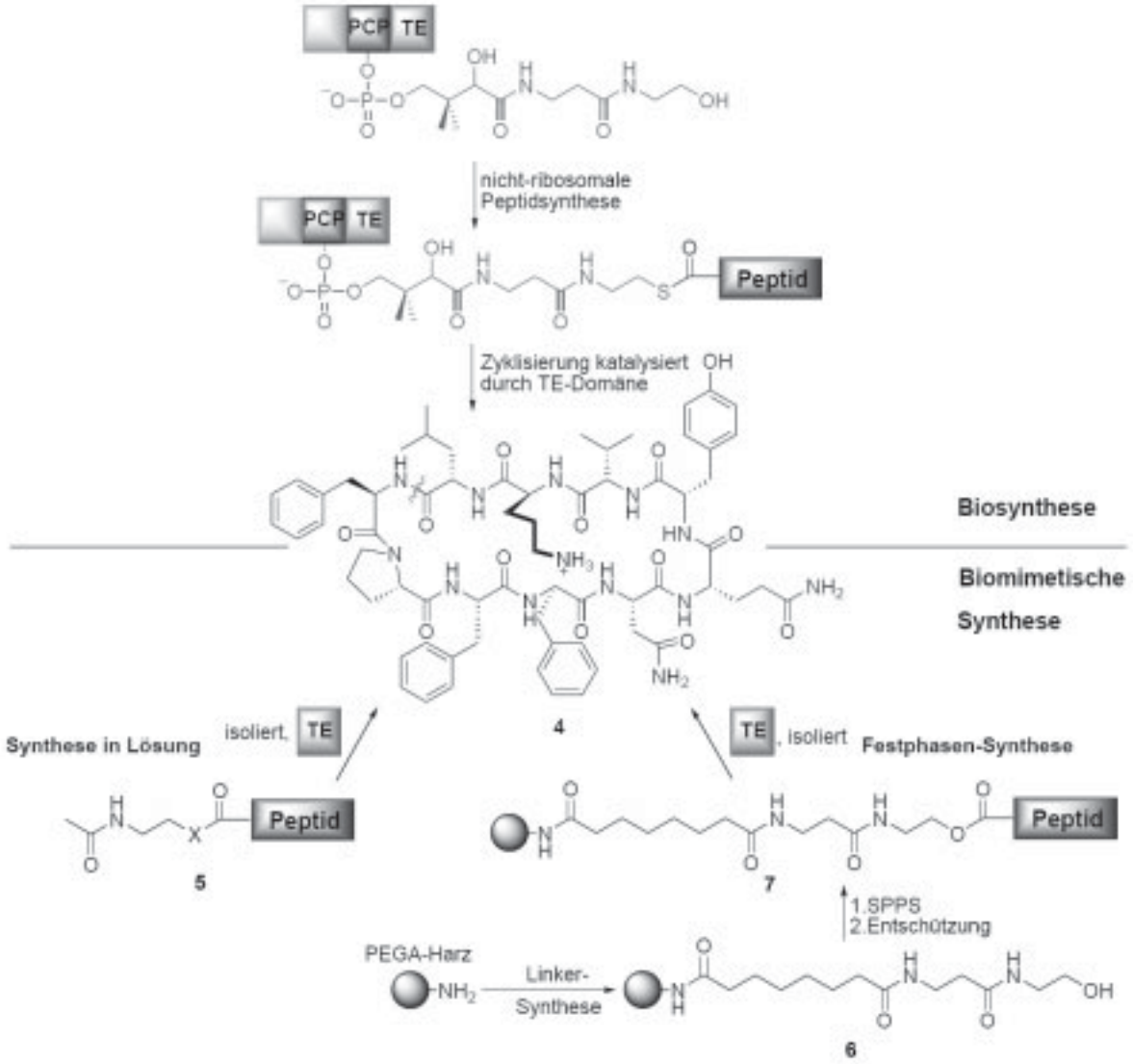
2. Theoretischer Teil

2.1. Zyklische Peptide und Proteine

Die Entdeckung der biologischen Wirkung zyklischer Peptide und Proteine geht weit zurück. Ein Großteil dieser Klasse wurden mit ihren Wirkungsweisen erst in den letzten 10 Jahren charakterisiert.[6] In den siebziger Jahren wurde von Gran et al. die Eigenschaften eines Extraktes aus *Oldenlandia affinis*, einer in Afrika beheimateten Pflanze entdeckt, welche Uteruskontraktionen auslöste. Als Ursache wurde damals ein 29 Aminosäuren langes Peptid namens Kalata B1 identifiziert,[9] wobei die Struktur unbekannt blieb. Erst 25 Jahre später wurde es als Genprodukt identifiziert und als zyklisches Peptid aufgeklärt.[10,11] Die Klasse dieser Verbindungen reicht von kleinen Peptidstrukturen, die weniger als 12 Aminosäuren haben, wie zum Beispiel das Cyclosporin A (**3**), bis hin zu großen DNA-kodierten Proteinen zwischen 14 und 70 Aminosäuren.[6] Zyklische Peptide und Proteine, die über eine Amidbindung verknüpft sind, zeichnen sich generell durch eine höhere Stabilität aus. Im Gegensatz zu linearen Strukturen besitzen sie keinen flexiblen C- oder N-Terminus und proteolytische Enzyme finden keinen Ansatzpunkt.[12]

Charakteristisch für zyklische Peptide und Proteine ist der fast ausschließliche Einsatz im Abwehrsystem des Wirtes. Dennoch unterscheiden sie sich in einigen Merkmalen. Man findet bei den bisher bekannten zyklischen Vertretern dieser Klasse aus Mikroorganismen Strukturen ohne Disulfidbrücken. Bei höheren Organismen werden diese jedoch fast durchweg ausgebildet.[13] Da das Gebiet der zyklischen Peptide und Proteine ein recht junges Forschungsfeld ist, sind viele Aspekte der Struktur-Wirkungs-Beziehungen noch ungenügend aufgeklärt. Die Biosynthesen vieler Peptide sind bislang nicht bekannt oder nur teilweise verstanden. Viele zyklische Vertreter stammen von azyklischen Vorläufer-Proteinen ab, die am N-Terminus ein Signalpeptid besitzen, das in den Spaltungs- und Zyklisierungsprozess integriert ist. Bei mehreren Verbindungen aus Pflanzen und Säugetieren beinhalten sie außerdem eine C-terminale Domäne, die bei der für die Zyklisierung relevanten Konformation eine Rolle spielen könnte. Interessanterweise gibt es keine exakt und nur sehr wenig natürlich vorkommende, lineare Analoga zu dieser Klasse der zyklischen Naturstoffe. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Schritt effizient und schnell abläuft, nachdem das lineare Vorläuferpeptid abgespalten wurde.[6] Ein enzymatischer Prozess ist daher vermutlich der entscheidende Weg zur Zyklisierung. Von diesen Enzymen wurden bisher erst wenige charakterisiert, die die nötige Spezifität für die relevanten chemischen Transformationen

besitzen. Eine Aufklärung der Biosynthese inklusive dem enzymatischen Zyklisierungsprozess des Tyrocidin A (**4**) veröffentlichten Burkart et al. 2002 (Schema 1).[14]



Schema 1: Biosynthese und biomimetische Synthese des Tyrocidin A (**4**)

Das lineare Vorläuferpeptid wird über eine Multidomäne der nicht-ribosomalen Synthetase, in jedem Schritt über einen Thioester an ein Trägerprotein verknüpft, aufgebaut. Dies entspricht dem biologischen Analogon zur Festphasensynthese. Im letzten Schritt wird über eine integrierte C-terminale Thioesterasedomäne (TE) die Zyklisierung durchgeführt. Weiterhin konnten Burkart et al zeigen, dass auch die isolierte Thioesterase-Domäne die Peptidzyklisierung in Lösung und an der Festphase (PEGA-Harz) katalysiert.[14] An der Festphase wurde das Peptid über einen biomimetischen Linker an das Harz gebunden

(Schema 1). Dabei toleriert die Esterase Variationen der Peptidlänge, wie auch ein breites Spektrum an unterschiedlichen Aminosäureseitenketten.[8, 15]

In den folgenden Kapiteln 2.1.1-2.1.4 werden die Strukturen einiger biologisch relevanter zyklischer Peptide und Proteine näher beschrieben. Dort sind sie in die Wirtsorganismen unterteilt, angefangen von den am weitesten entwickelten Lebewesen, den Säugetieren, über Pflanzen, Pilze bis hin zu Mikroorganismen.

2.1.1. Zyklische Peptide und Proteine in Säugetieren

Ein zyklisches Peptid in Säugetieren ist das RTD-1 (Rhesus theta defensin 1; Abbildung 3).[16] Diese zyklische Verbindung stammt aus den Leukozyten der Rhesusaffen und hat 18 Aminosäuren in seiner Sequenz. Es gehört mit seinen 6 Cysteinen und 5 Argininen zu den Cystein-reichen Peptiden. Diese bilden dabei drei Disulfidbrücken aus, die ähnlich einer Leiter angeordnet sind.

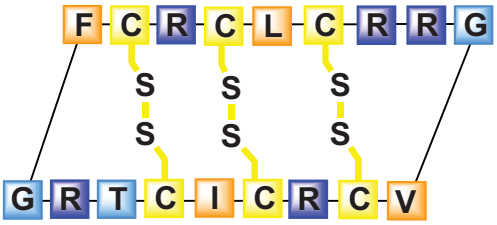
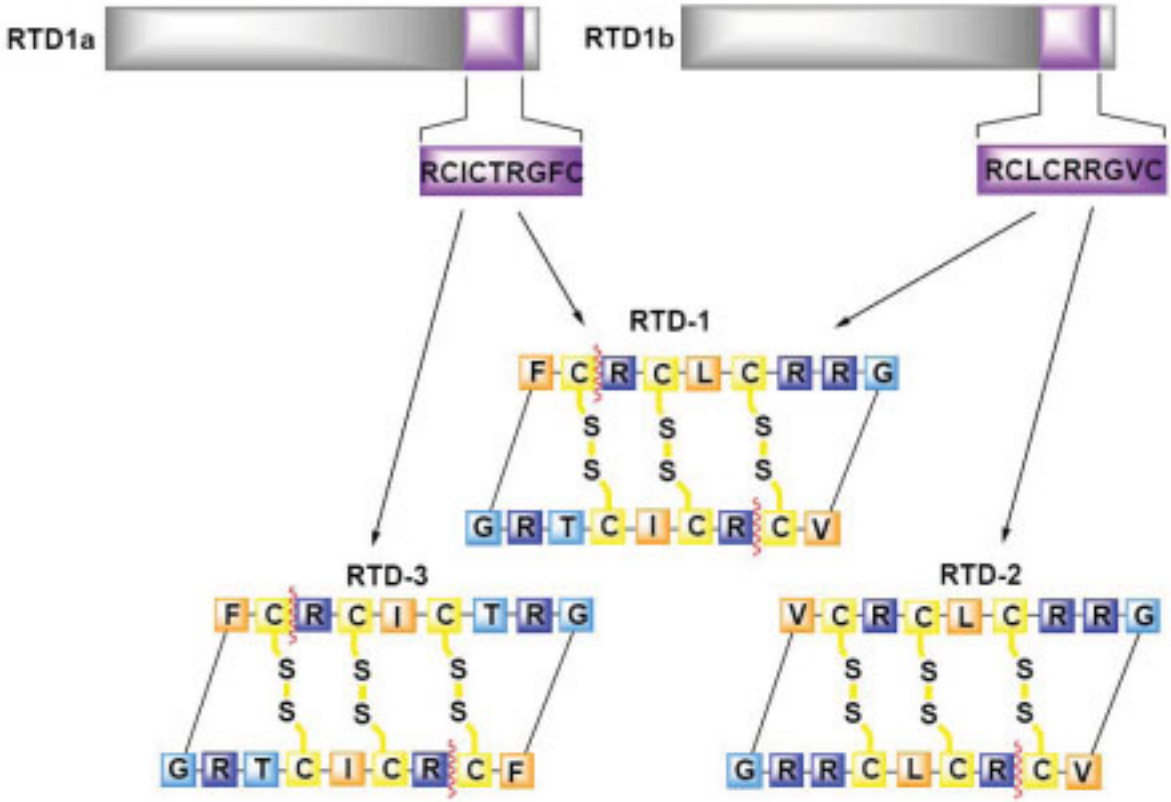


Abbildung 3: Struktur des RTD-1

Die übrige Struktur kennzeichnet sich durch zwei β-Stränge, die an den Enden jeweils mit einem engen Turn im Peptidrückgrat verknüpft sind. Haupteffekt der Zyklisierung ist wohl die Stabilität. Da RTD-1 aufgrund seines antibakteriellen Charakters zur Wirtsverteidigung gegenüber Bakterien eingesetzt wird, bringt ihm eine Stabilität gegen Proteolyse durch Exoproteasen einen entscheidenden Vorteil.[6]



Schema 2: Biosynthese des RTD-1

Die Biosynthese geht von RTD1a und RTD1b aus, die jeweils eine lineare Vorstufe des RTD-1 kodieren.[16] Diese werden dann in zwei Verknüpfungen miteinander zyklisiert. Zwar ist die Gensequenz der Vorstufen bekannt, die für die Spaltung und Zyklisierung verantwortlichen Enzyme bislang allerdings noch nicht. Man findet neben dem RTD-1 mit RTD-2 (ausgehend von RTD1b) und RTD-3 (ausgehend von RTD1a) noch zwei weitere Homodimere im Verhältnis 29:1:2 (Schema 2).[17,18]

2.1.2. Zyklische Peptide und Proteine in Pflanzen

In Pflanzen sind die Cyclotide beheimatet, die mit mehr als 45 Mitgliedern die größte Gruppe an zyklischen Proteinen darstellen. Sie haben eine Sequenzgröße von 28-37 Aminosäuren und stammen fast ausschließlich aus der in den Tropen ansässigen Familie der *Rubiaceae*. Ihre Strukturmerkmale sind die Zyklisierung und 6 Cysteine, die wie im RTD-1 drei Disulfidbrücken ausbilden. Im Gegensatz zum RTD-1 sind sie nicht wie eine Leiter angeordnet. Zwei Disulfidbrücken spannen mit dem Peptidrückgrat eine Ebene auf, die von der dritten geschnitten wird.[19] Solche Motive findet man in der Natur nicht nur bei den

Cyclotiden, sondern auch bei kleinen Toxinen[20] oder Wachstumsfaktoren.[21] Sie führen zu einer sehr hohen Stabiliät. Die peptidische Ringstruktur dient ebenfalls der Stabilität, ist allerdings für die dreidimensionale Anordnung der Cyclotide, wie Studien mit offenkettigen Analoga gezeigt haben, nicht maßgebend.[22] Dieses Merkmal führt dazu, dass die Peptide nicht nur gegenüber der Hydrolyse durch Proteasen, sondern auch gepaart mit den Disulfidbrücken gegenüber thermischer Denaturierung stabil sind.[23]

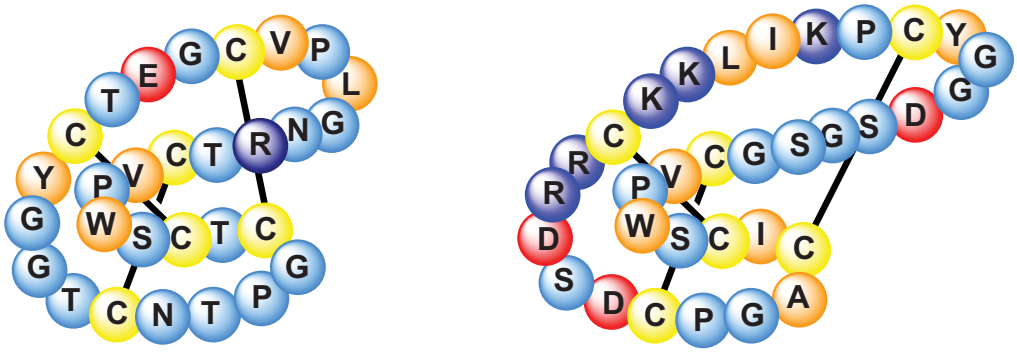


Abbildung 4: Darstellung des Kalata B1 (links) und des MCoTI-II (rechts)

Des weiteren gehören zu den Merkmalen auch drei β-Faltblattstränge. Cyclotide besitzen aufgrund dieser komplexen Strukturmerkmale diverse biologische Aktivitäten, wodurch sie in der Pharmazie häufig auch als Leitstrukturen dienen. Die Cyclotide Circulin A und B zeigen beispielsweise eine anti-HIV-Aktivität[24, 25] oder das Kalata B1, wie bereits eingangs erwähnt, führt zu Uterus-Kontraktionen.[26] Bei diesem Naturstoff wird vermutet, dass die eigentliche Aufgabe in der Abwehr von Insekten-Parasiten besteht.[11] Weitere Cyclotide wirken antibakteriell oder fungizid.[27] 2000 konnten Hernandez et al. dieser Familie mit MCoTI-II (Abbildung 4) noch eine weitere Gruppe zuordnen.[28] Diese konnten aus den Samen von *Momordica cochinchinensis*, einem Rebengewächs der Familie *Curcubitaceae*, isoliert werden. Die Substanzen zeigen die gleichen Strukturmerkmale wie Kalata B1 und sind die einzigen bisher entdeckten Beispiele, bei der die lineare Form parallel zur zyklischen Struktur im Organismus vorkommt. Dieser ist der einzige bekannte Vertreter mit diesem strukturellen Motiv, der ein Trypsin-Inhibitor ist. Die Biosynthese der Cyclotide ist weitgehend noch nicht bekannt. Im Fall des Kalata B1 konnte gezeigt werden, dass sie durch eine Multigen-Familie kodiert sind. Die Vorstufen sind mit jeweils einer Signalsequenz über mehrere Domänen verteilt. Diese müssen gespalten und verknüpft werden, wobei weder der genaue Mechanismus noch mögliche involvierte Enzyme bekannt sind.[11]

Es gibt in Pflanzen auch zyklische Peptidstrukturen, die keine Disulfidbrücken enthalten. In Abbildung 5 sind vier 2008 veröffentlichte Strukturen (**8**-**11**) gezeigt, die Wu et al. aus den Samen von *Annona montana* isolieren konnten.[29] *Annona montana* gehört zu einer großen Familie tropischer sowie subtropischer Bäume mit an die 2300 Arten und kommt hauptsächlich in den tropischen Gebieten Amerikas, Westindiens und dem Süden Taiwans vor.[30] Aus der Familie *Annonaceae* konnte bereits eine große Anzahl an Naturstoffen isoliert werden. Viele dieser Substanzen zeigen eine biologische Aktivität, wie zum Beispiel zytotoxische,[31] anti-Malaria,[32] pestizidische[33] oder entzündungshemmende Aktivität (**8**-**11**).[29, 34, 35] (Abbildung 5)

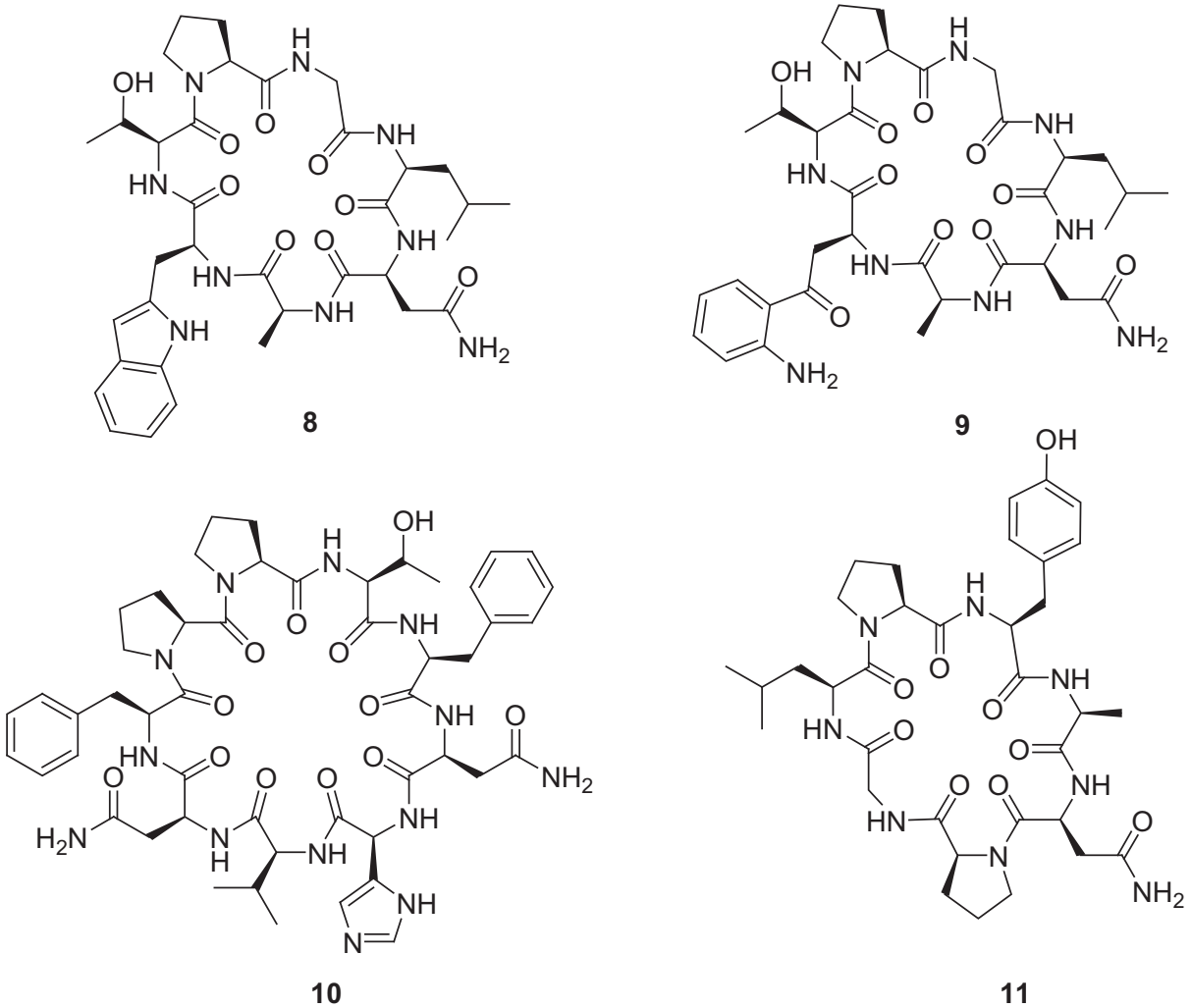
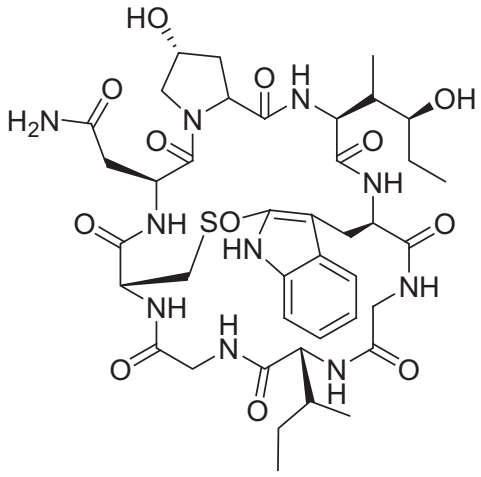
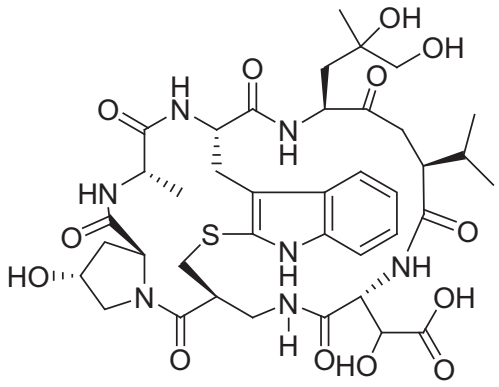


Abbildung 5: Zyklische Peptide aus *Annona montana*

2.1.3. Zyklische Peptide in Pilzen



12



13

Abbildung 6: Struktur von α-Amanitin (**12**) und Phallacidin (**13**)

Die in Abbildung 6 gezeigten α-Amanitin (**12**) und Phallacidin (**13**) sind Toxine zweier unterschiedlicher Toxinklassen, den Amatoxinen (**12**) und den Phallotoxinen (**13**). Beide werden von Pilzen der Gattung *Amanita* des Stammes *Phalloideae* produziert. Nicht alle Vertreter dieser Gattung produzieren Toxine, einige sind sogar essbar. Dennoch rühren mehr als 90% aller Pilzvergiftungen von dieser Gattung her. Für das α-Amanitin **12** liegt der LD_{50}-Wert für den Menschen bei ≈ 0.1 mg/kg. Ein Pilz der Gattung *Amanita bisporigera* kann bis zu 12 mg enthalten, allerdings besitzen nur die Fruchtkörper hohe Konzentrationen des Toxins.[36] Der Wirkmechanismus beinhaltet, dass Amatoxine aktiv in die Zellen aufgenommen werden und die RNA-Polymerase II inhibieren.[37] Die Phallotoxine wirken, indem sie das F-Actin stabilisieren,[38] allerdings sind sie aufgrund ihrer schlechten Resorption für eine orale Aufnahme kaum zugänglich.[37] **12** und **13** sind kleine bizyklische Peptide, mit acht beziehungsweise sieben Aminosäuren. Die Biosynthesen werden nicht von Peptidsynthetasen durchgeführt, sondern sowohl das α-Amanitin (**12**) als auch das Pallacidin (**13**) sind direkt über die Gene AMA1 und PHA1 kodiert.[37] Sie werden zunächst als Vorstufen mit Signalpeptidsequenz am N-Terminus synthetisiert, die dann von Oligopeptidasen gespalten werden. Die genaue Biosynthese ist noch nicht bekannt, da *Amanita*-Pilze schwierig zu kultivieren sind. Dennoch ist klar, dass die Genome von *Amanita bisporigera* und *Amanita phalloides* viele verschiedene Regionen mit Genen besitzen, die zu AMA1 und PHA1 ähnlich sind.[37] Sie können somit eine große Bandbreite an

verschiedensten 7-10 Aminosäuren langen zyklischen Peptiden synthetisieren, die ebenfalls toxische Wirkung zeigen können.

2.1.4. Zyklische Peptide und Proteine in Mikroorganismen

Man findet zyklische Peptide und Proteine über die gesamte Bandbreite an Mikroorganismen, dabei dienen sie meist zur Verteidigung.[6] Es gibt ein breites Spektrum an verschiedensten zyklischen Strukturen zu denen auch die in Abbildung 7 gezeigten kleinen Peptide **14-16** gehören. Auffällig ist, dass Disulfidbrücken in den Naturstoffen der Bakterien, im Gegensatz zu höher entwickelten Organismen, eher eine untergeordnete Rolle spielen.

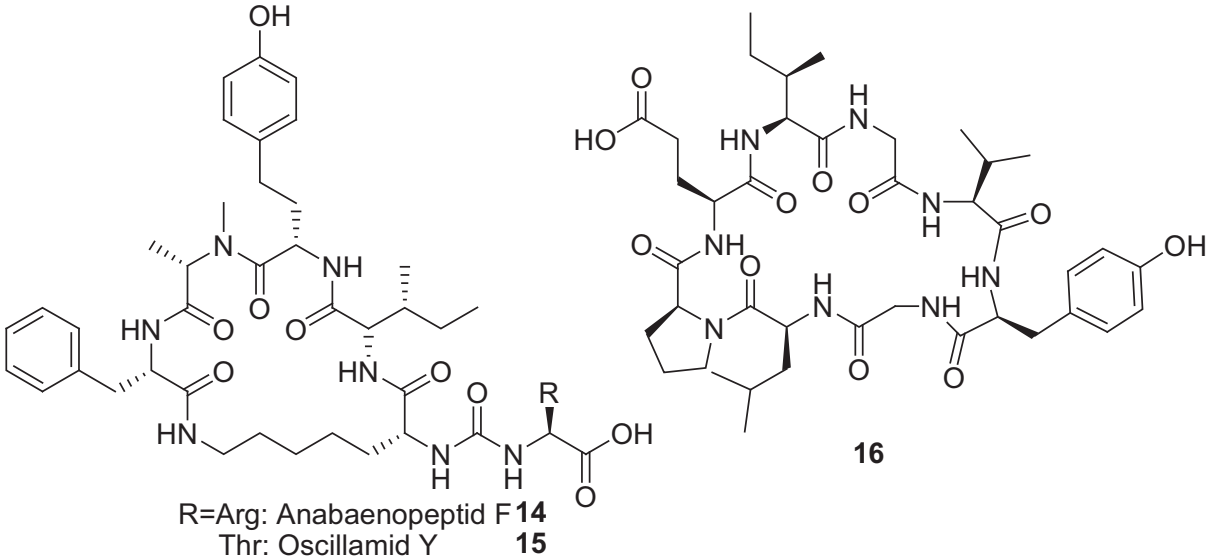
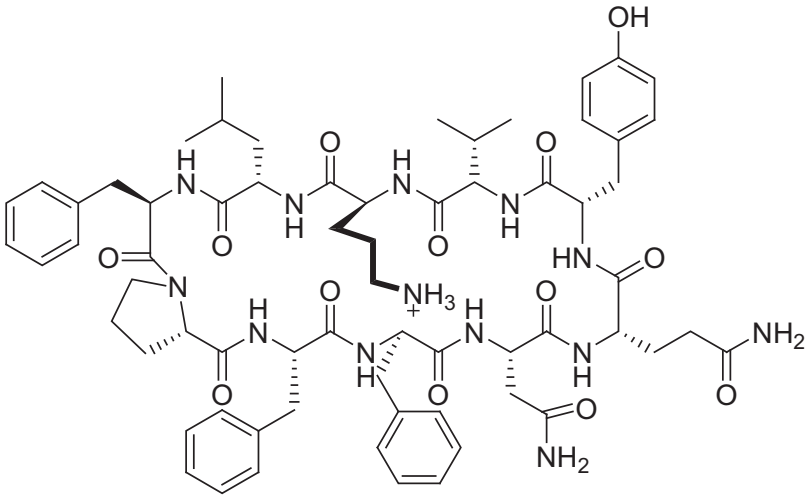


Abbildung 7: Strukturen von Anabaenopeptid F (**14**) und Oscillamid Y (**15**), Microphycin AL828 (**16**)

14-16 stammen aus den Cyanobakterien *Microcystis sp.* Die beiden Protease-Inhibitoren Anabaenopeptid F (**14**)[39] und Oscillamid Y (**15**) [40] sind bereits seit Mitte bis Ende der 90er Jahre bekannt, während das Microphycin AL828 (**16**) erst 2008 entdeckt und charakterisiert wurde.[41] Es handelt es sich um einen Aminoprotease-Inhibitor, der aus acht proteogenen Aminosäuren besteht. Bei diesen Naturstoffen gibt es strukturell kleinere Unterschiede. So ist **16** über das Peptidrückgrat zyklisiert, während bei **14** und **15** eine Lysin-Seitenkette mit dem C-Terminus verknüpft das zyklische Rückgrat bildet.

Ein weiteres Beispiel für kleine zyklische Peptide mit bis zu 10 Aminosäuren Länge ist das in Abbildung 8 gezeigte und in Kapitel 2.1. bereits erwähnte Tyrocidin A (**4**).[14]



4

Abbildung 8: Struktur des Tyrocidin A (**4**)

Es besitzt eine β-Faltblattstruktur und gehört zur Klasse kationischer Peptide, die in verschiedenen Bakterienstämmen zu finden sind. Diese kationischen Peptide wechselwirken entgegen dem üblichen Wirkmechanismus von Antibiotika nicht mit spezifischen Proteinen oder der RNA. Vielmehr wird vermutet, dass ihre Wirkung von unspezifischer Einlagerung in Zellmembranen herrührt.[42] Somit wird die osmotische und ionische Regulierung der Zellen unterbrochen. Dieser andere Wirkmechanismus macht diese Klasse von Peptiden für die Pharmazie äußerst interessant.

Des weiteren gibt es zyklische Strukturen, die nicht proteogene Aminosäuren enthalten. Zwei schon länger bekannte Vertreter solcher Peptide sind die in Abbildung 9 gezeigten Katanosin A (**17**) und B (**18**).[43] Sie besitzen jeweils neun Aminosäuren im Zyklus mit einer zwei Aminosäuren langen linearen Kette und gehören mit ihrer Ester-Bindung zwischen Hydroxyphenylalanin[3] und Serin[11] zur Familie der Depsipeptide.

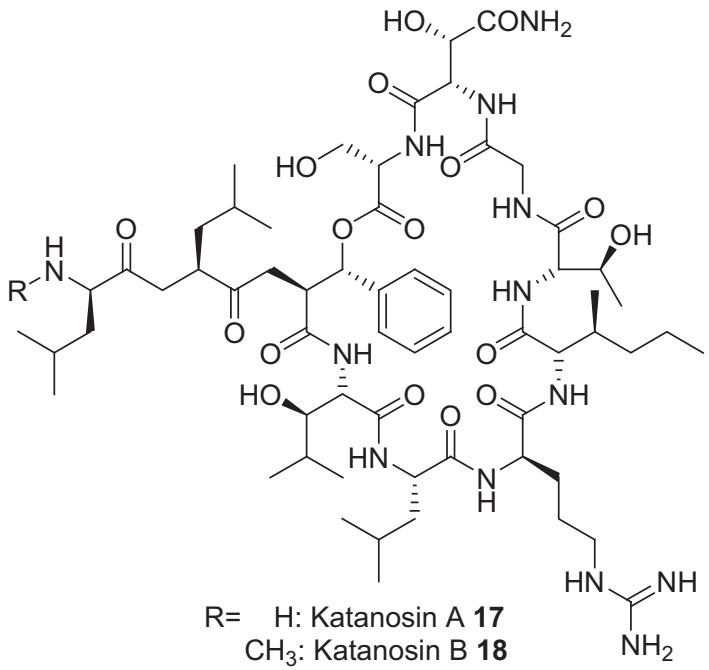


Abbildung 9: Struktur des Katanosin A (**17**)und B (**18**)

Katanosin A (**17**) und B (**18**) zeigen eine mäßige Aktivität gegenüber Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistenten *Enterococcus*-Stämmen und eine hohe gegenüber Gram-positiven Bakterien. Der Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Man weiß jedoch, dass sie die Peptidglykan-Biosynthese inhibieren.[44]

Eine weitere große Klasse zyklischer Heptapeptide, die nicht-proteinogene Aminosäuren beinhalten, stammt aus marinen Bakterien. Sie heißen Cyclomarine und die Strukturen einiger Beispiele (**19**-**22**) sind in Abbildung 10 gezeigt.

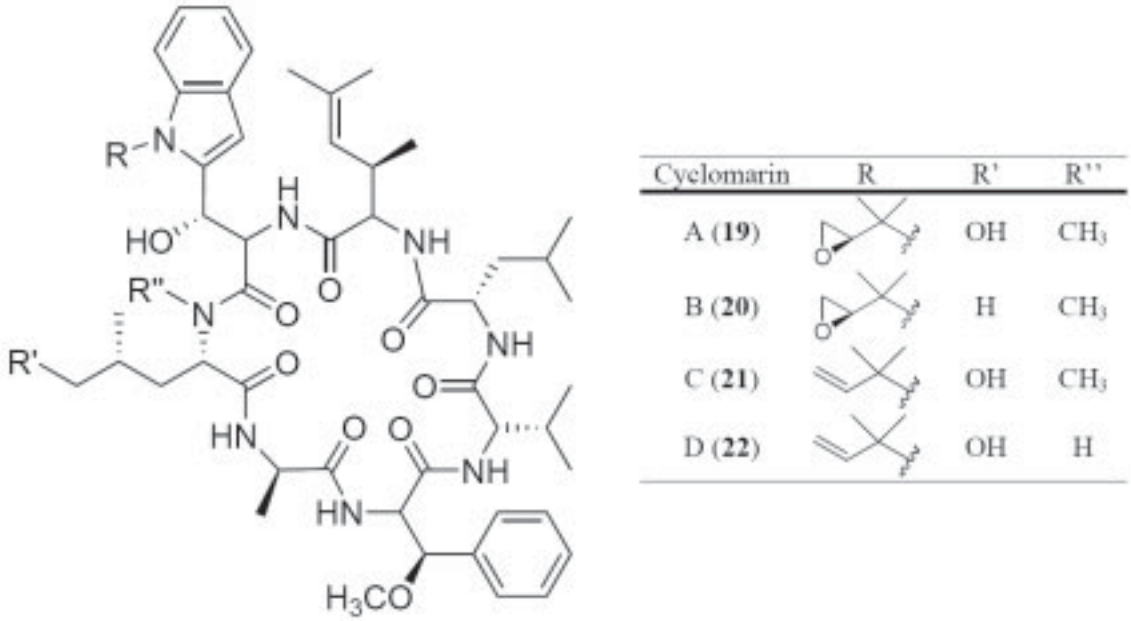
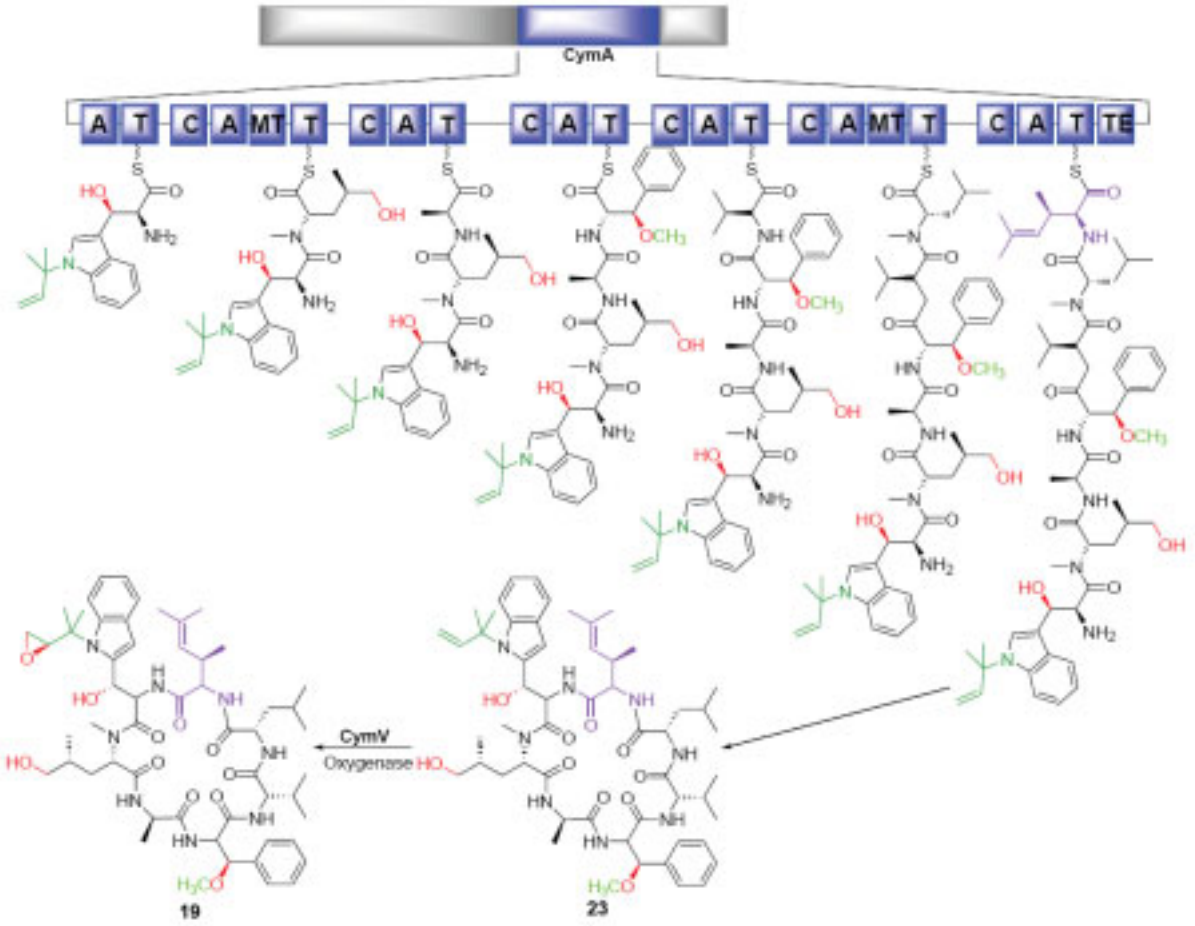


Abbildung 10: Struktur der Cyclomarine

Die Cyclomarine A-C (**19**-**21**), die effektive entzündungshemmende Wirkung besitzen, sind bereits seit 1999 bekannt,[45] während das Cyclomarin D (**22**) erst kürzlich von Moore et al. isoliert und charakterisiert wurde.[46] Besonders interessant sind die Modifikationen einzelner Aminosäuren. Neben *β*-Hydroxyphenylalanin, *N*-Methylleucin und 2-Amino-3,5-dimethylhex-4-ensäure finden sich auch die äußerst seltenen Modifikationen *N*-Methyl-*δ*-hydroxyleucin und *N*-(1,1-Dimethyl-2,3-epoxypropyl)-*β*-hydroxytryptophan. Die Biosynthese dieser hochinteressanten Strukturen ist bekannt.[46] Das Gen CymV kodiert die Oxygenase, die nach der Zyklisierung für die Epoxidierung des prenylierten Tryptophans verantwortlich ist. Auf dem wichtigsten und größten Gen (CymA) ist die „nicht-ribosomale Peptidsynthetase“ (NRPS) kodiert. Dieses Gen ist verantwortlich für die Hauptbiosynthese der Cyclomarine.

Die Biosynthese für **19** mit Hilfe der NRPS ist in Schema 3 gezeigt.

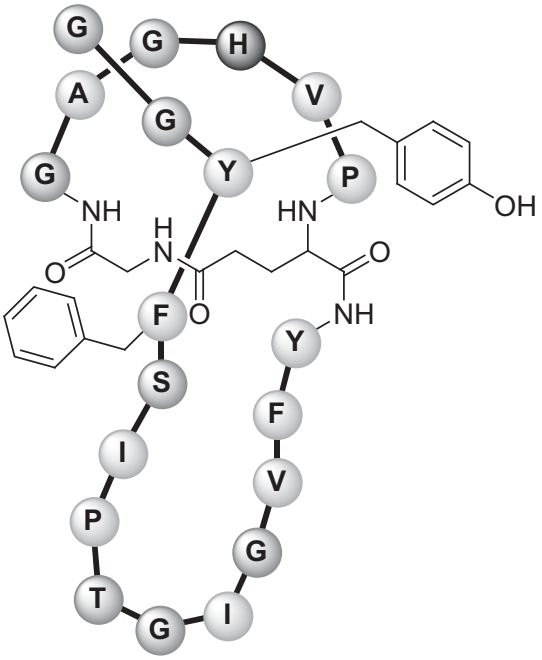


Schema 3: Biosynthese des Cyclomarin A (**19**) (A = Adenylierung; T = Carrier Protein; MT = Methyltransferase; TE = Thioesterase)

Zu Beginn wird zunächst die Kette C-terminal aufgebaut, dabei ist sie durchgängig an eine Carrier Bindungsdomäne geknüpft. Das letzte Modul ist ein Thioesterase-Modul, das für die Abspaltung mit gleichzeitiger Zyklisierung verantwortlich ist. Abschließend wird das prenylierte Tryptophan der Vorstufen von Cyclomarin A (**19**) und B (**20**) noch mit Hilfe der auf CymV kodierten Oxygenase oxidiert. Die in der Biosynthese rot markierten Bereiche sind durch oxidative Enzyme, dunkelgrün durch prenylierende Enzyme, hellgrün durch O-Methyltransferasen und lila durch die Synthese von 2-Amino-3,5-dimethylhex-4-ensäure entstanden.

2.1.4.1. Microcin J25

Microcine sind eine Gruppe von kleinen antibiotischen Peptiden und werden von verschiedenen Stämmen der *Enterobacteriaceae* produziert. Microcin J25 (**24**) unterscheidet sich gegenüber den übrigen Vertretern seiner Gruppe durch eine andere Sequenz und einen Makrozyklus. Als Gemeinsamkeiten weisen sie antibakterielle Aktivität auf. **24** wird von *Escherichia coli* produziert und besteht aus 21 Aminosäuren. 1999 wurde es zunächst von Rebuffat et al. fälschlicherweise als „Head-to-tail"-zyklisierte Struktur beschrieben.[47] Erst 2003 konnten Ebright et al.,[48] sowie Darst et al. [49] nahezu zeitgleich diesen Irrtum korrigieren.



24

Abbildung 11: Struktur des Microcin J25 (**24**)

Das Microcin J25 (**24**) besitzt einen kleinen Ring, der zwischen dem N-terminalen Amin und der Glutaminsäure-Seitenkette zyklisiert ist. Der C-terminale, lineare Teil verläuft durch den Ring und wird durch die geometrische Anordnung der aromatischen Reste des Phenylalanin und des Tyrosin in seiner Position fixiert. Die Struktur ist in Abbildung 11 gezeigt. In einer Wechselwirkung zwischen Zyklus und Schwanz wird ein kleines antiparalleles β-Faltblatt zwischen den Resten 19-20 des Schwanzes (β2) und den Resten 6-7 des Ringes (β1) ausgebildet.

Biosynthetisch wird das Microcin J25 (**24**) ribosomal gebildet, dabei ist es als 58 Aminosäuren lange, lineare Sequenz auf einem Plasmid codiert.[50] Hiervon dienen

37 Aminosäuren am N-Terminus vermutlich als Vorstufe, die zur Bildung der natürlichen oder zumindest einer dem nahekommenden Konformation dient. Neben dem Gen für die Vorstufe befinden sich die Gene zur Synthese und für den Transport des Microcin J25 (**24**) aus der Zelle auf dem Plasmid.

Eine synthetische Darstellung der „Head-to-tail"-Struktur konnten Dawson et al. 2001 zeigen. Sie verwendeten die Native Chemische Ligation mit anschließender Desulfurisierung.[51] Auf dieser Grundlage konnten Ebright et al. zeigen, dass diese „Head-to-tail"-Struktur nicht der biologischen Form entspricht (Abbildung 11).[48] Dies gelang auf Grundlage von ESI-MS/MS-Studien. Außerdem konnte durch HPLC-Experimente gezeigt werden, dass die synthetisierte „Head-to-tail"-Struktur eine andere Retentionszeit als das biologische Produkt hat. Die synthetische Struktur besitzt keine inhibierende Wirkung auf Bakterien. Darst et al. versuchten daraufhin die seitenkettenzyklisierte Struktur zu synthetisieren.[49] Sie erhielten eine Zyklisierung mit der falschen dreidimensionalen Anordnung, in der der lineare Teil nicht im Ring fixiert vorliegt. Tests zur Aktivität, der im Labor dargestellten Verbindungen, zeigten keinen positiven Befund.

Die biologische Wirkung von **24** beruht auf der Inhibierung von DNA-abhängiger RNA-Polymerase in Gram-negativen Bakterien. Diese ist das zentrale Enzym zur Genexpression der Bakterien. Dabei inhibiert das Peptid die Transkription durch Bindung in einem sekundären Kanal des Enzyms, durch den die Nukleotide zur aktiven Tasche geführt werden. Da es bisher nur wenige medizinisch angewendete Strukturen für eine Inhibierung der RNA-Polymerase gibt, bietet das Microcin J25 (**24**) gute Ansätze für die Pharmaforschung.

2.1.4.2. Bacteriocin AS-48

Bacteriocin AS-48 ist mit seinen 70 „Head-to-tail"-zyklisierten Aminosäuren das bisher größte bekannte zyklische Protein. Es wird von *Enterococcus faecalis sp. liquefaciens* produziert und besitzt ein breites Aktivitätsspektrum gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien.[52] Seine Biosynthese erfolgt ribosomal, wobei es auf dem Plasmid pMB2 kodiert ist. Zunächst wird es als Vorstufe am N-Terminus mit einem 35 Aminosäuren langen Signalpeptid synthetisiert und anschließend zwischen den Aminosäuren H^{-1} und M^{+1} entweder über eine spezifische Peptidase oder eine proteolytische Domäne des ABC-Transporters, an den es verknüpft ist, gespalten. Die folgende Zyklisierung ist die einzige posttranslationale Modifikation des AS-48.

Bacteriocin AS-48 besitzt, wie die übrigen zyklischen Peptide und Proteine, eine hohe thermische Stabilität. Das Protein ist ohne Aktivitätsverlust in einem Temperaturbereich von unter dem Gefrierpunkt bis 80 °C bei pH-Werten zwischen 3 und 8 stabil.[53, 54] Selbst für 15 min bei Temperaturen um 120 °C und pH < 6 nimmt die antibakterielle Aktivität nicht spürbar ab. Erst bei pH-Werten zwischen 6 und 8 bei gleicher thermischer Behandlung wird das Bacteriocin AS-48 inaktiv.[55, 56] Diese Eigenschaften, gepaart mit dem breiten antibakteriellen Spektrum, bieten attraktive Vorteile für den Einsatz im Bereich des Nahrungsmittelschutzes.

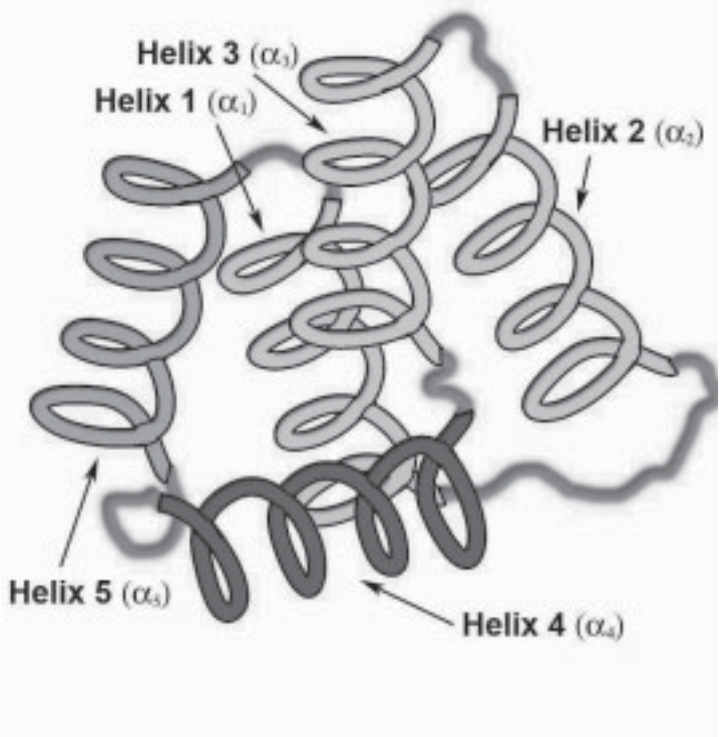


Abbildung 12: Anordung der α-Helices im Bacteriocin AS-48

Das Bacteriocin AS-48 besitzt neben hydrophoben viele basische und kaum saure Aminosäuren und hat somit einen stark basischen Charakter, der sich auch in einem hohen isoelektrischen Punkt von ca. 10.5 widerspiegelt. Deshalb gehört es, ähnlich wie das Tyrocidin A (**4**) (Kapitel 2.1.), zur Klasse der kationischen Peptide und Proteine. Der genaue strukturelle Aufbau besteht aus 5 α-Helices mit den Aminosäuren 9-21, 25-34, 37-45, 51-62 sowie 64-5, die jeweils über kurze Loops verknüpft sind.[57] Dabei verlaufen die Helices α_1 und α_2 antiparallel zueinander. α_4 steht fast senkrecht zu deren Ebene und α_3 wiederum senkrecht zu α_4, dabei durchschneidet sie die von α_1 und α_2 gebildete Ebene im Winkel von 40°. Den Abschluss bildet α_5, die fast senkrecht zu α_3 verläuft und mit den Helices α_4 und α_1 einen Winkel von 50° bildet (Abbildung 12).

Ein großer Teil der hydrophoben Seitenketten bilden den Kern, die übrigen bieten eine wasserabweisende Oberfläche auf den Helices α_1, α_2 und α_3. Die Reste des Val^{67}, Met^{1} und Phe^{5}, die in Helix α_5 zu finden sind, sind aufgrund ihrer Wechselwirkung mit dem Kern vermutlich essentiell für die globale Proteinstruktur. Interessanterweise liegt die biosynthetische Verknüpfungsstelle zwischen Met^{1} und Trp^{70} in der Helix α_5. Im Gegensatz zu anderen zyklischen Strukturen, ist die „Head-to-tail"-Zyklisierung vermutlich ganz entscheidend für die Struktur und für seine Stabilität mitverantwortlich. Die zehn in der Sequenz vorkommenden basischen Aminosäuren sind nicht über das gesamte Protein verteilt, sondern befinden sich alle in einem 26 Aminosäuren langen Segment (Helix α_4). Diese Konzentration führt zu einem starken Dipolmoment im Protein, das unter anderem entscheidend für den Wirkmechanismus ist.

Das Protein bildet Dimere aus.[58] In der dimeren Form I (DF-I) interagieren die beiden Proteine über die hydrophoben Helices α_1 und α_2. Dies führt zu einer verbesserten Wasserlöslichkeit, da mehr hydrophile Regionen zum Lösungsmittel gerichtet sind. In dieser Struktur liegt das Protein in Lösung vor. In der dimeren Form II (DF-II) wechselwirken die Protomere über die hydrophilen Helices α_4 und α_5 miteinander (Abbildung 13). So besitzt der Komplex nach außen einen eher hydrophoben Charakter, deshalb findet man diese Form auch bei Insertion in eine Membran. Die hydrophoben Bereiche können mit den aliphatischen Resten der Phospholipide wechselwirken, während ein hydrophilerer Bereich nach außen zu den Köpfen der Lipide und dem Lösungsmittel gerichtet ist. Bei niedrigem pH-Wert zeigt sich, dass ein Phosphation zwei protonierte Glutaminsäuren, ein Lysin und ein Tyrosin miteinander verlinkt. Dies imitiert die Wechselwirkung des Dimers mit den polaren Köpfen der Phospholipide in der Membran.

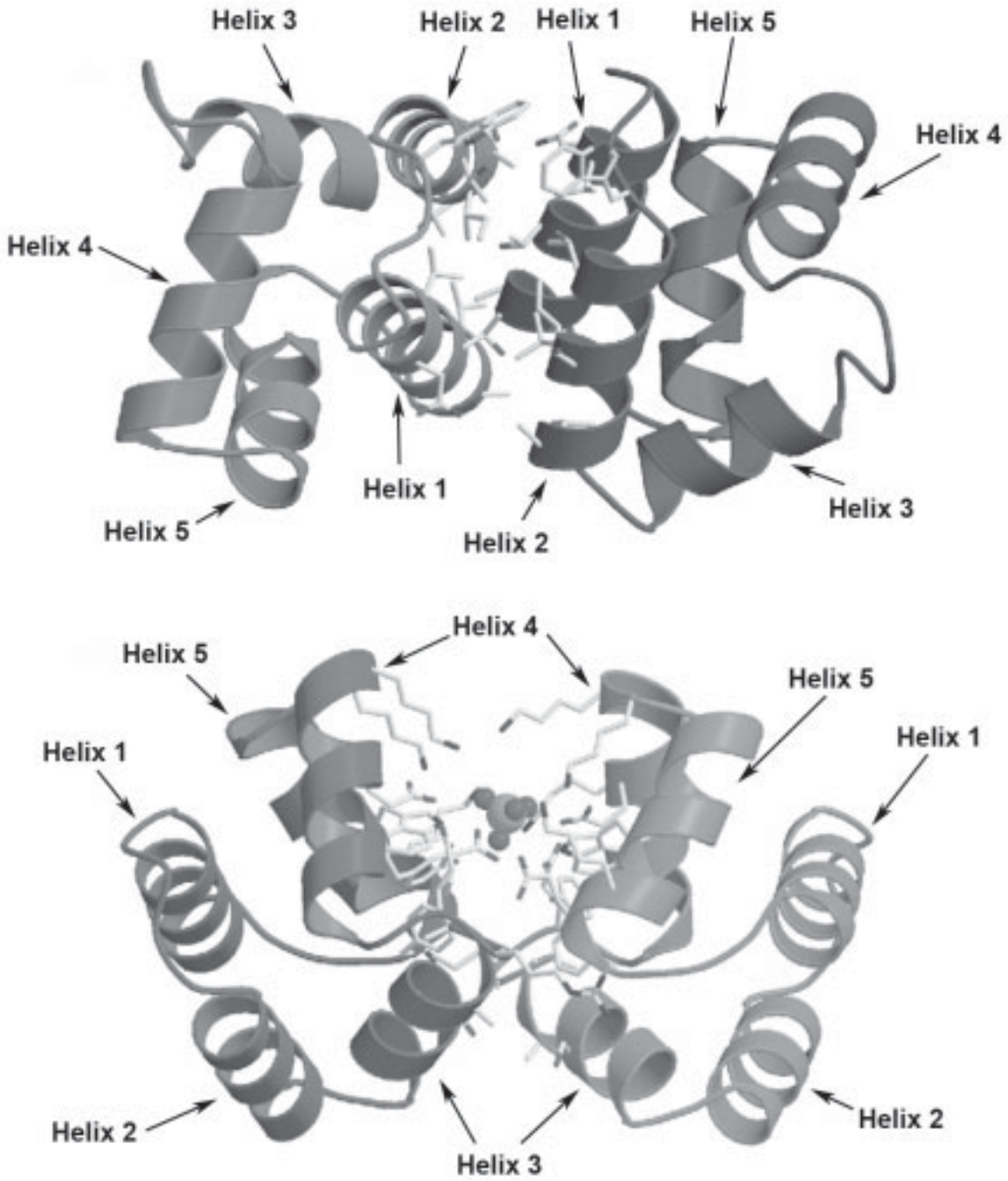
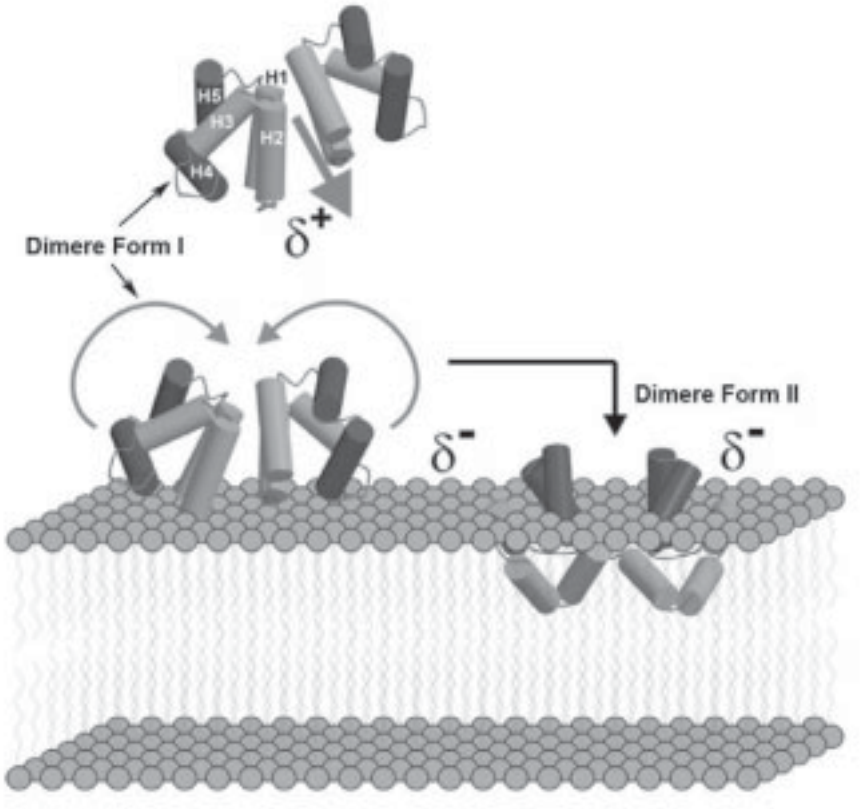


Abbildung 13: Aufbau der dimeren Formen des Bacteriocin AS-48 DF-I (oben) und DF-II (unten); lediglich die Aminosäureseitenketten, die in die Dimer-Bildung involviert sind, sind gezeigt, das Phosphation ist in der Ballschreibweise gezeigt (Abbildung modifiziert aus Albert et al. 2003)[58]

Der Wirkmechanismus des Bacteriocin AS-48 stellt sich wie folgt dar: Als kationisches Protein wird es aufgrund seines stark ausgeprägten Dipolcharakters von der negativen Zelloberfläche angezogen. Das Dimer befindet sich zunächst noch in der dimeren Form-I. Durch den auf der Zelloberfläche geringen pH wird diese Struktur durch Protonierung der

Glutaminsäureseitenketten destabilisiert und es kommt zur Umlagerung in die dimere Form-II bei gleichzeitiger Insertion in die Membran.[58] Dieser Vorgang ist in Schema 4 gezeigt. Das kationische Protein wirkt in der Membran wie ein externes elektrisches Feld, welches zur Porenbildung in der Zellmembran führt. Diese entstandene Durchlässigkeit der Membran führt schließlich zum Zelltod.



Schema 4: Insertion des Bacteriocin AS-48-Dimers in die Zellmembran (der Pfeil zeigt das Dipolmoment, Abbildung modifiziert aus Albert et al. 2003)[58]

Einen synthetischen Zugang zum Bacteriocin AS-48 gibt es bislang nicht. So konnten Rico et al. 2005 lediglich zeigen, dass ein 21 Aminosäuren langes synthetisches Peptidfragment aus AS-48, das die positiv geladene Region beinhaltet, keinerlei biologische Aktivität zeigt.[59] Wahrscheinlich spielt die dimere Struktur, gepaart mit der strukturellen Umlagerung, bei der Insertion eine wichtige Rolle und man benötigt einen hydrophoben Teil, der in der Membran mit den aliphatischen Resten der Phospholipide wechselwirken kann, um so die Insertion überhaupt zu realisieren.

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass Peptide und Proteine eine große Vielfalt an zyklischen Strukturmotiven aufweisen. Es ist zu vermuten, dass diese Naturstoffklasse noch wesentlich mehr unbekannte, nicht isolierte Mitglieder besitzt. Gerade ihre biologischen

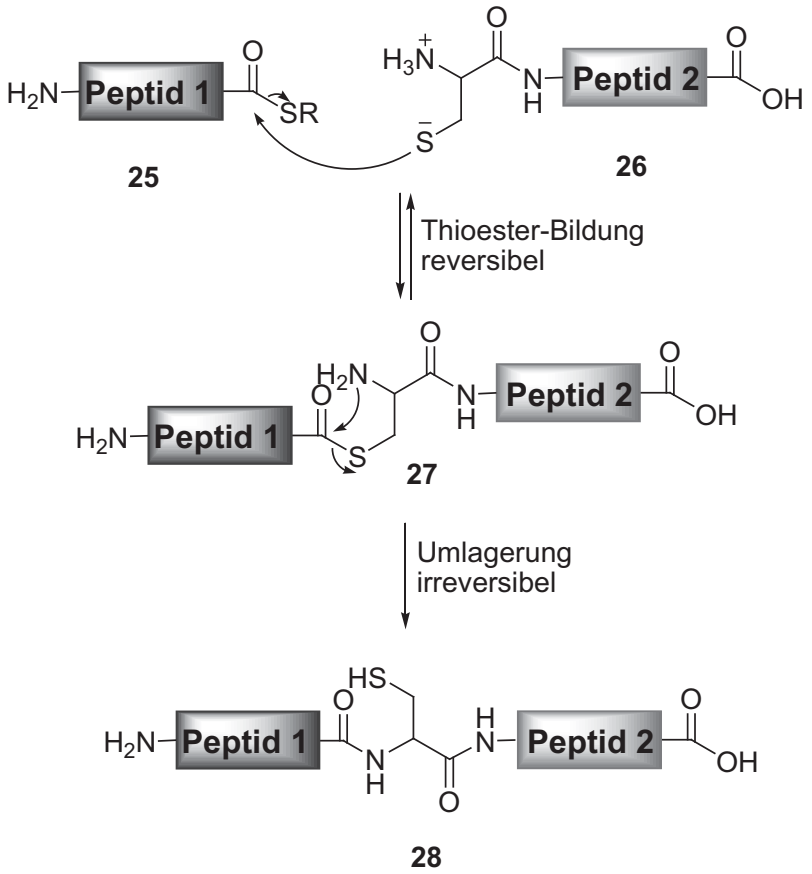
Funktionen und vor allem andere Wirkmechanismen gegenüber linearen Vertretern machen sie zu äußerst interessanten Zielmotiven.

2.2. Ligationsmethoden

Zyklische Peptide werden dargestellt, um deren komplexe Wirkmechanismen aufzuklären und die pharmazeutische Anwendung zu ermöglichen. Der organischen Synthese von Peptid- und Proteinstrukturen sind dabei Grenzen gesetzt. Die moderne Festphasenpeptidsynthese (SPPS) ist auf $\leq$ 40 Aminosäuren lange Sequenzen limitiert.[60-62] Die meisten Proteine beinhalten häufig weit mehr als hundert Aminosäuren, sodass man für eine chemische Synthese mindestens drei Fragmente benötigt, die miteinander verknüpft werden müssen. Gleichzeitig muss bei der Ligation von synthetischen aber auch biologisch exprimierten Polypeptiden, sowie bei der Einführung von Modifikationen in ein Peptid oder Protein eine hohe Chemoselektivität gewährleistet sein, da Proteine eine hohe Anzahl reaktiver Gruppen aufweisen. Um kompatibel mit der Peptid- oder Proteinstruktur zu sein, benötigt man milde Bedingungen in der Synthese. Man greift deshalb auf chemoselektive Ligationstechniken in Kombination mit organischen und biochemischen Methoden zurück, deren Anwendungen in einem biologischen Milieu attraktiv sind.[63] In den letzten fünfzehn Jahren sind verschiedene Ligationen entwickelt worden.[64] Im Rahmen dieser Arbeit wird in den folgenden Kapiteln nur auf die „Native Chemische Ligation“ (NCL, Kapitel 2.2.1.), die „Exprimierte Protein Ligation“ (EPL, Kapitel 2.2.2.) und die „Staudinger-Ligation“ (Kapitel 2.2.3.) eingegangen.

2.2.1. Native Chemische Ligation

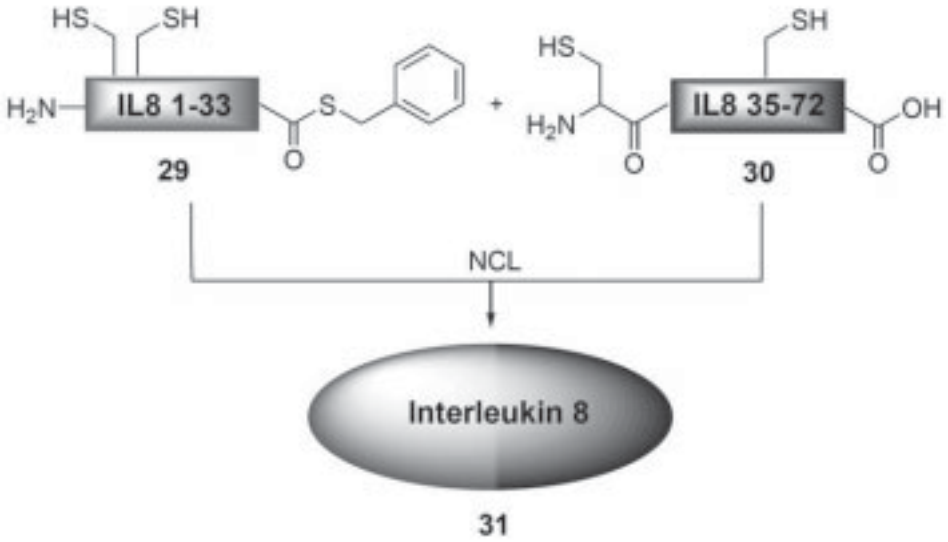
Das erste Verfahren ist die Native Chemische Ligation, die 1994 von Kent et al. eingeführt wurde.[65] Hierbei reagiert ein Thioesterderivat (**25**) mit einem Cystein eines Proteins oder Peptids (**26**) chemoselektiv, aber reversibel zu **27**. Ein N-terminales Cystein ist in der Lage durch einen S→N-Acyltransfer über einen fünfgliedrigen Übergangszustand irreversibel ein Amid (**28**) auszubilden (Schema 5). Diese Umlagerung erfolgt, da das entstehende **28** im Gegensatz zum Intermediat **27** thermodynamisch bevorzugt ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Ligation in der Peptidsequenz befindende Cysteine toleriert.



Schema 5: Native Chemische Ligation

Die Reaktionspartner sind leicht zugänglich. Das N-terminale Cystein lässt sich in der SPPS ohne große Schwierigkeiten einführen und auch Methoden für eine Synthese C-terminaler Thioester sind sowohl für eine Boc-, als auch für eine Fmoc-Strategie sehr gut etabliert.[66]

Kent et al. wendeten ihre Methode zunächst auch auf das 72 Aminosäuren lange menschliche Interleukin 8 (**31**) an (Schema 6).[65] Dieses Protein beinhaltet 4 Cysteine. Es werden zunächst zwei Peptide synthetisiert. Fragment 1 (**29**) beinhaltet die Aminosäuren 1-33 und ist C-terminal als Benzylthioester synthetisiert, während Fragment 2 (**30**) aus den Aminosäuren 34-72 und dem für die Native Chemische Ligation notwendigen N-terminalen Cystein besteht. Diese Fragmente werden abschließend zum fertigen Interleukin 8 (**31**) verknüpft.



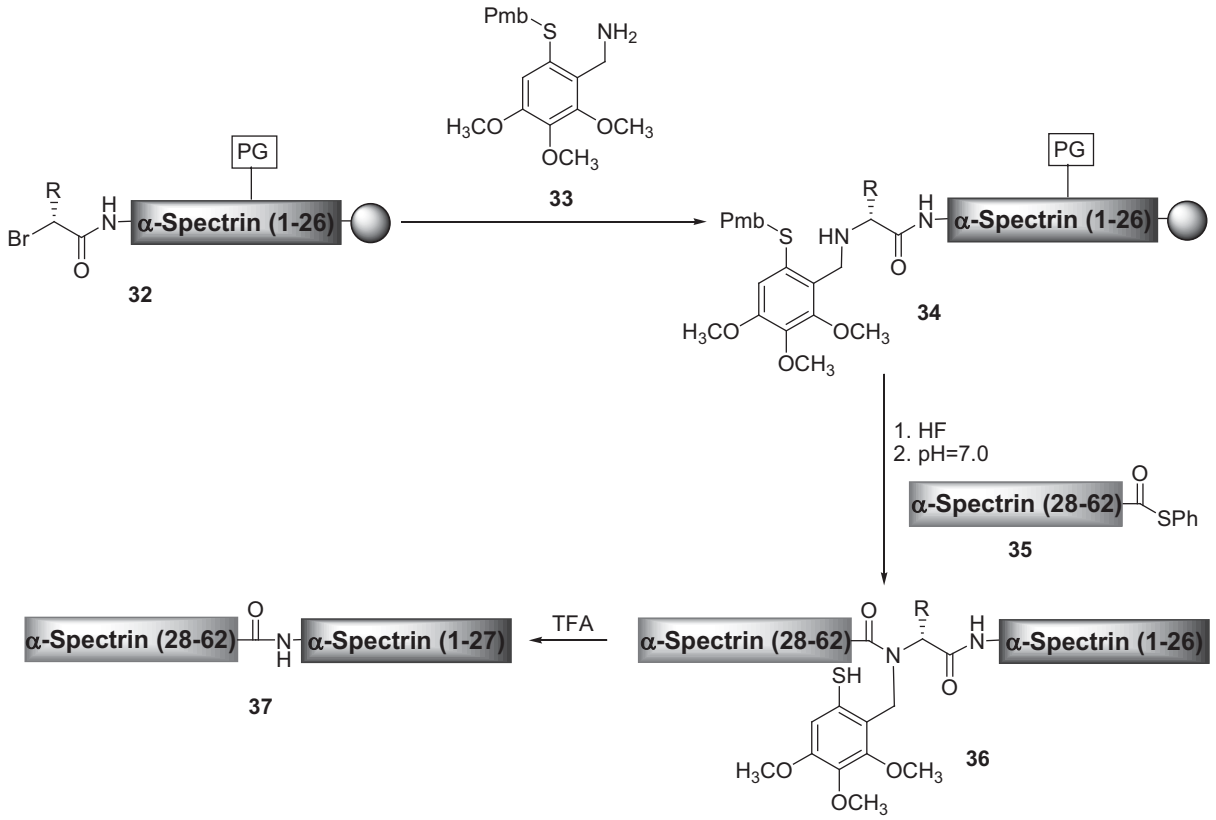
Schema 6: Synthese des Interleukin 8 durch Native Chemische Ligation

Ein großer methodischer Vorteil der Nativen Chemischen Ligation ist, dass sie alle in natürlichen Peptiden und Proteinen gewöhnlich vorkommenden funktionellen Gruppen toleriert. Außerdem können als Thioester am C-Terminus alle proteinogenen Aminosäuren verwendet werden.[67] Lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit wird je nach sterischem Anspruch der Aminosäure-Seitenkette deutlich beeinflusst. Der N-Terminus ist als Cystein definiert, was zu Einschränkungen in der Anwendbarkeit führt, da Cystein mit 1.7% von allen in natürlich Peptid- und Proteinstrukturen vorkommenden Aminosäuren am zweit wenigsten vorkommt.[68]

Im Laufe der Jahre wurde die Native Chemische Ligation weiterentwickelt. Homocystein[69] oder Selenocystein[70] wurden als Alternativen zu Cystein entdeckt. Ein anderer Ansatz beschäftigt sich mit der Desulfurisierung nach der Nativen Chemischen Ligation. Diese gelingt mit Raney-Nickel[71] oder Palladium und führt bei Cystein letztendlich zu einem Alanin.[51, 72] Ni-Katalysatoren können jedoch zu Aggregationen[73] und Nebenreaktionen, wie der Desulfurisierung von Methionin oder Epimerisierungen von sekundären Alkoholen, führen.[74, 75] Eine weitere sehr effiziente Variante, die homogen nach einem radikalischen

Mechanismus abläuft, wurde von Danishefsky et al. etabliert.[76] Diese ist gegenüber den heterogenen Methoden zu favorisieren, da die oben beschriebenen Probleme kompensiert werden können. Um das Spektrum der Nativen Chemischen Ligation zu erweitern, wurde sie auch auf β-verzweigte Cysteinderivate mit anschließender Desulfurisierung angewandt. Sie führen zum Phenylalanin[77] oder zum Valin[78, 79].

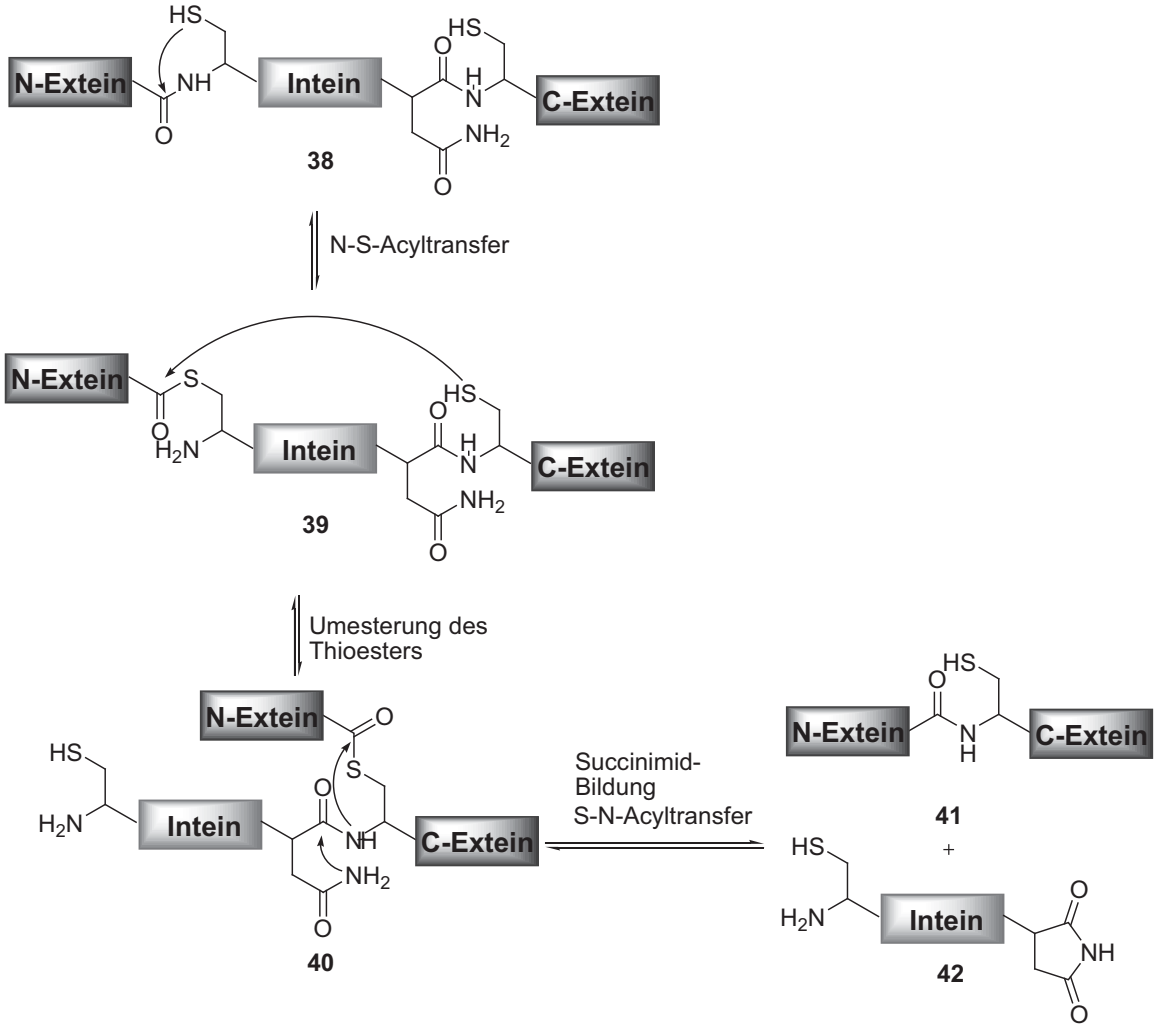
Eine weitere elegante Variante dieser Ligation bietet die Verwendung von Auxiliaren.[80] Mit 4,5,6-Trimethoxy-2-mercaptobenzyl als Auxiliar konnten Dawson et al. 2002 zum Beispiel eine Native Chemische Ligation in Abwesenheit von Cystein zeigen.[80] Als Modellstruktur wurde die SH3-Domaine des α-Spectrins (**37**) verwendet. Bei der in Schema 7 gezeigten Synthese wird zunächst unter Inversion der Konfiguration das Auxiliar **33** am N-Terminus eines α-Brompeptids **32** eingeführt. Nach Abspaltung des Peptids vom Harz und gleichzeitiger Entschützung der Aminosäureseitenketten, wird das ungeschützte Peptid **34** mit dem zweiten Peptidfragment **35** in Puffer bei pH = 7.0 umgesetzt. Man erhält die gewünschte SH3-Domaine des α-Spectrins mit dem noch eingebauten Thiol **36**. Nachteilig an diesem Verfahren sind die aufwendige Synthese des Auxiliars und dessen Abspaltung nach der Ligation.



Schema 7: Verwendung eines Auxiliars zur NCL für α-Spectrin (**37**) (Pmb = *p*-Methoxybenzyl)

2.2.2. Exprimierte Protein Ligation

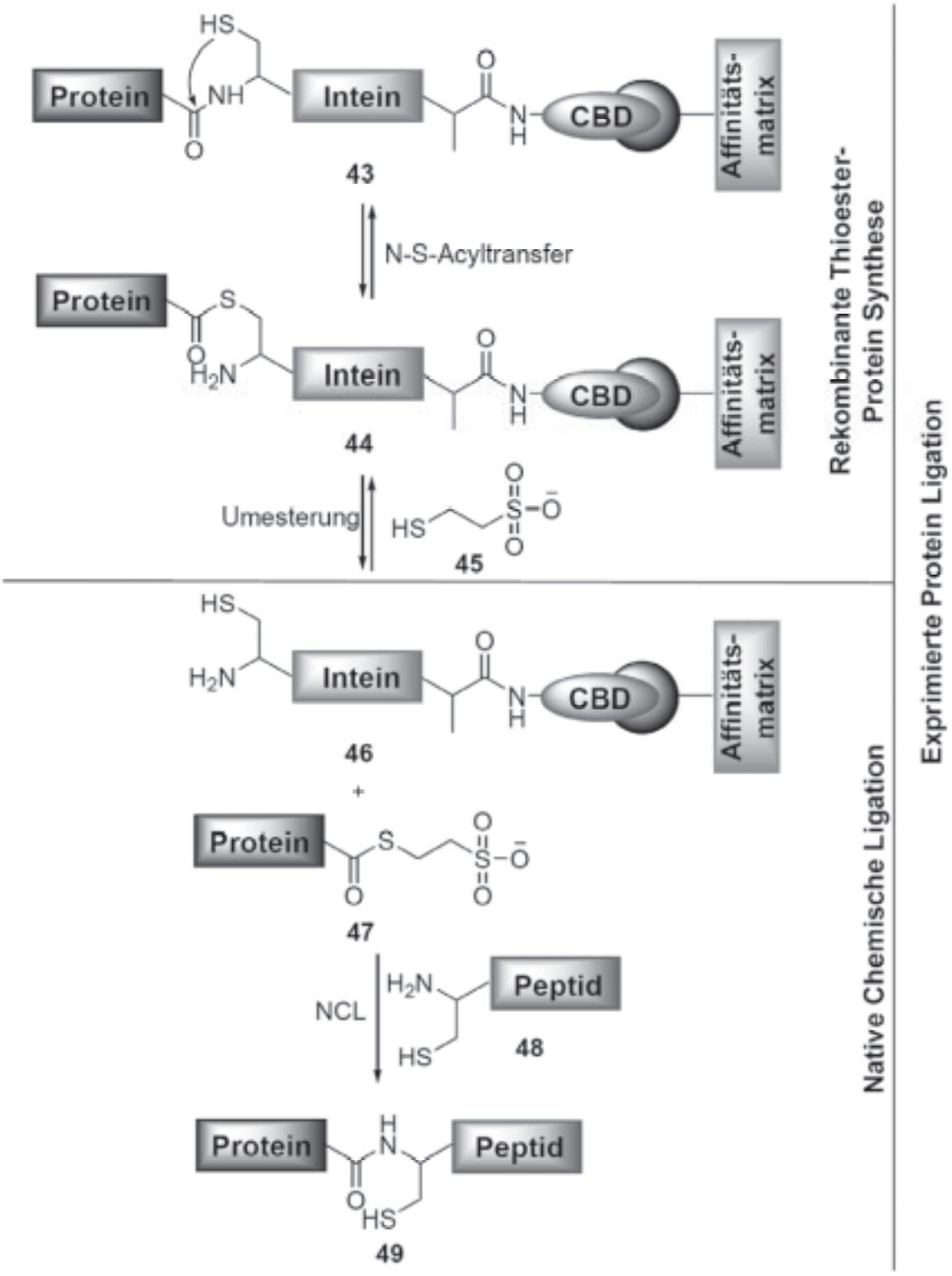
Die „Exprimierte Protein Ligation“ ist eine Erweiterung der Nativen Chemischen Ligation. Sie wurde von Cole et al. 1998 eingeführt und ist eine Native Chemische Ligation in der der α-Thioester ein rekombinant zugängliches Polypeptid ist.[81] Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Methoden zur Darstellung rekombinanter Proteinthioester limitiert.[62] Durch Spleißen können diese erhalten werden (Schema 8). Die Verknüpfung zweier Proteine, dem N- und dem C-Extein, wird dabei durch das proteininterne Intein katalysiert. In diesem Prozess sind mehrere Umlagerungen involviert.[60] So findet zunächst ein N→S-Acyltransfer statt, in dem das Cystein des Inteins am Carbonylkohlenstoff des N-Exteins angreift. Dem folgt eine Umesterung von **39** durch die ein Thioester zwischen dem Cystein des C-Exteins und dem Carbonylkohlenstoff des N-Exteins gebildet wird. Im letzten Schritt erfolgt die irreversible S→N-Umlagerung zum Peptid **41** und als Nebenprodukt erhält man das Succinimid **42**.



Schema 8: Protein-Spleißen

Proteinstrukturen mit N-terminalen Cysteinen können ebenfalls für Verknüpfungen in der nativen chemischen Ligation rekombinant hergestellt werden. Das Cystein wird genetisch mit einer Erkennungssequenz für eine Protease am N-Terminus des Proteins eingeführt. Nach der Exprimierung lässt sich die Erkennungssequenz selektiv durch die Protease abspalten und man erhält das frei N-terminale Cystein.[82-84]

Für die eigentliche Synthese des Thioesters bei der Exprimierten Protein Ligation benötigt man zunächst einen, auch kommerziell erhältlichen Inteinvektor, an den das relevante Protein auf genetischem Weg N-terminal fusioniert ist.[60] Der Protein-Intein-Baustein **43** wird über die Bindungsdomäne, zum Beispiel eine Chitin-Bindungsdomäne, an die Affinitätsmatrix immobilisiert. Wie beim Spleißen erfolgt im ersten Schritt reversibel ein N→S-Acyltransfer. Eine Mutation des C-terminalen Asparagin zum Alanin im Intein verhindert den vollständigen Prozess des Spleißens, sodass durch Zugabe eines gewünschten Thiols **47** das Protein von der Matrix abgespalten wird und nicht intramolekular abreagiert. Der erhaltene rekombinante Proteinthioester **47** kann in einer Nativen Chemischen Ligation mit einem synthetisch hergestellten C-terminalen Cysteinpeptid **48** umgesetzt werden. Es ist wahlweise möglich das N-terminale Cystein-Peptid rekombinant[84-88] und das C-terminale Thioesterderivat synthetisch herzustellen. In Schema 9 ist als Beispiel der Prozess der Exprimierten Protein Ligation mit rekombinantem Thioester **47** gezeigt. Durch diese Erweiterung wird die Native Chemische Ligation flexibler und es lassen sich Proteinstrukturen, die bis dato nicht zugänglich waren, auf semisynthetischem Weg darstellen.

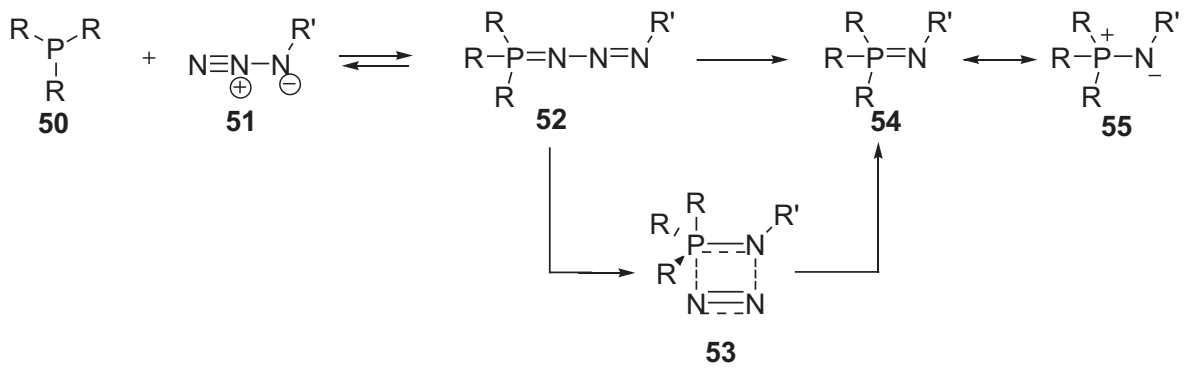


Schema 9: Rekombinante Thioestersynthese und Exprimierte Protein Ligation (EPL), CBD = Chitin Bindungdomäne

2.2.3. Staudinger-Ligation

2.2.3.1. Staudinger Reaktion

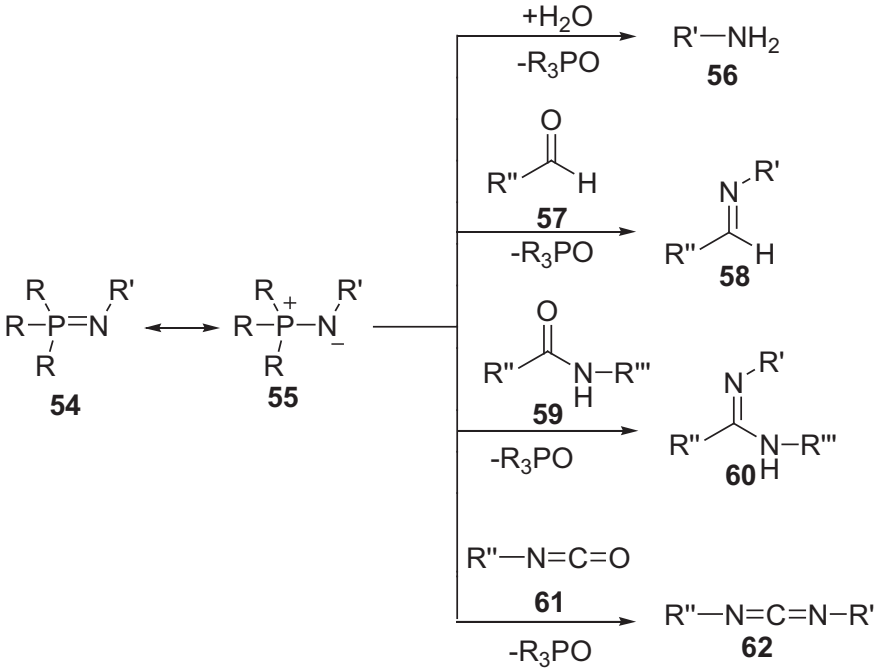
Im Jahr 1919 wurde von Herrmann Staudinger und Mitarbeitern die Staudinger-Reaktion veröffentlicht.[89] Er konnte zeigen, dass aus Arylphosphinen (**50**) mit Aziden (**51**) unter Abspaltung von Stickstoff Iminophosphorane (**54**) gebildet werden. Weitere Studien belegten später, dass diese Reaktion zunächst über ein Phosphazid **52** als Zwischenstufe erfolgt[90, 91] Für dessen Stabilität ist entscheidend, wie gut die positive Ladung delokalisiert werden kann. Je größer die Delokalisierung desto stabiler ist das Phosphazid (**52**). In einem viergliedrigen Übergangszustand **53** wird anschließend Stickstoff abgespalten und es bildet sich das Iminophosphoran **54** (Schema 10). Reaktionsgeschwindigkeitsbestimmend sind lediglich die Eigenschaften der Liganden am Phosphor und des Azids.



Schema 10: Staudinger-Reaktion (R = Aryl)[92]

Das Iminophosphoran **54** mit seinem nukleophilen Stickstoff geht mit diversen elektrophilen Reagenzien Reaktionen ein. Bei der Hydrolyse eines Iminophosphorans **54** erhält das korrespondierende Amin **56** und ein Phosphinoxid. Sie wird als Staudinger-Reduktion bezeichnet. Auch Umsetzungen mit Aldehyden (**57**) und Ketonen sind erfolgreich. Hierbei entstehen in einer Aza-Wittig-Reaktion Imine (**58**).[93] Bei Reaktionen mit Amiden (**59**) werden Amidine (**60**) gebildet oder mit Isocyanaten (**61**) dienen sie zur Darstellung von Carbodiimiden (**62**).

Einen Überblick über die verschiedenen Reaktionen gibt Schema 11

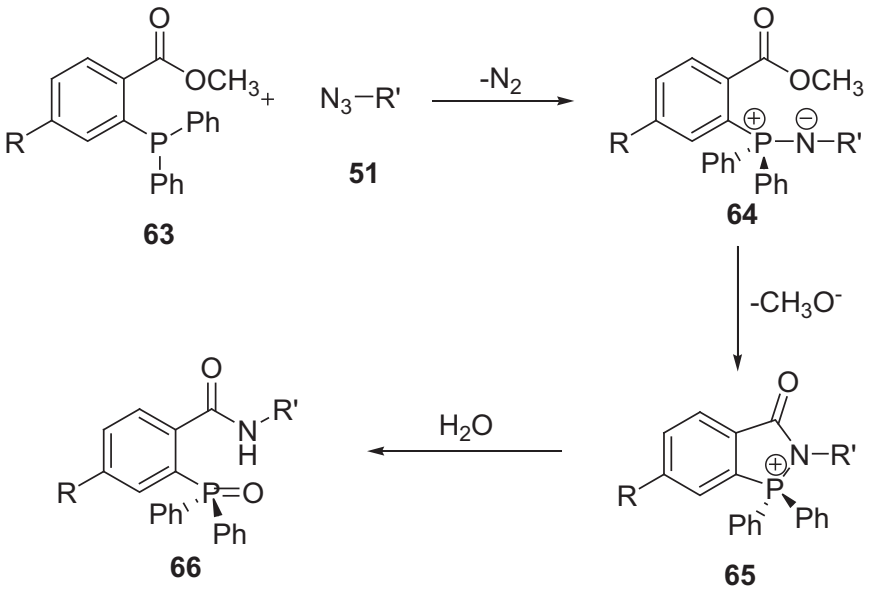


Schema 11: Aza-Ylid-Reaktionen mit Elektrophilen[93]

2.2.3.2.Staudinger-Ligation

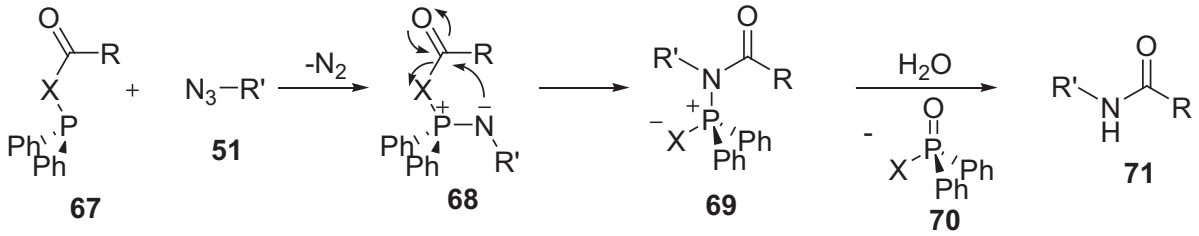
Obwohl die eigentliche Entdeckung der Staudinger-Reaktion bereits fast ein Jahrhundert zurück liegt, hat es bis Anfang des 21. Jahrhunderts gedauert bis Bertozzi et al. die Chemoselektivität dieser Reaktion für eine mögliche Ligationsmethode entdeckten und nutzbar machen konnten.[94] Der Vorteil dieser Reaktion ist, dass Phosphin und Azid zu fast allen funktionellen Gruppen in biologischen Systemen orthogonal sind. So findet man Azide in fast keinem natürlich vorkommenden biologischen System und sie reagieren trotz ihres stark reaktiven Charakters mit nur wenigen Reaktionspartnern. Das erste Beispiel einer nicht-spurlosen Staudinger-Ligation wurde 2000 von Bertozzi et al. veröffentlicht.[94]

Das von ihnen verwendete Linkersystem **63** (Schema 12) beinhaltet das Phosphin und mit der Ester-Gruppe eine elektrophile Falle. Diese fängt das bei der Reaktion entstehende Aza-Ylid **64** intramolekular ab, bevor im wässrigen Medium die Hydrolyse erfolgen würde. Bei dieser intramolekularen Reaktion entsteht eine stabile Amidbindung in **66**.



Schema 12: Nicht-spurlose Staudinger-Ligation von Bertozzi et al.[94]

Kurz darauf folgten nahezu parallel die Veröffentlichungen von Bertozzi et al.[95] und Raines et al.,[96] in denen sie eine neue „spurlose“ Variante der Staudinger-Ligation zeigten. Mit Aziden und Phosphinen verwendeten sie die selben Reaktionspartner wie bei der nicht-spurlosen Variante. Die Basis der Ligation bildet wieder die intramolekulare Reaktion eines Aza-Ylids **68** als Teil einer Iminophosphoran-Kondensation mit einem internen Elektrophil, einem Phosphinothioester. Diese Staudinger-Ligation wird als „spurlos“ bezeichnet, weil das entstehende Phosphinoxid **70**, wie in Schema 13 gezeigt, bei der Reaktion durch Hydrolyse freigesetzt wird und nicht im Molekül zurückbleibt.



Schema 13: Spurlose Staudinger-Ligation (X= alkylischer oder arylischer Linker)

Die spurlose Staudinger-Ligation ist somit deutlich attraktiver, da der Linker das biologische System verlässt. Ein im Molekül verbleibendes Phosphinoxid könnte aufgrund seiner Größe und Funktionalität die biologische Aktivität eines synthetisierten Bausteins entscheidend beeinflussen bzw. stören. Die synthetische Anwendung zur Verknüpfung von zwei Peptid- oder Proteinfragmenten unter Bildung einer Peptidbindung ist erst mit einer „spurlosen" Variante sinnvoll. Deshalb soll an dieser Stelle auf die „spurlose" Staudinger-Ligation und die verwendeten Linkersysteme intensiver eingegangen werden, da diese der vorliegenden Arbeit als Basis dienen.

Die verschiedenen Linkersysteme **72-76**, die bisher in der „spurlosen" Staudinger-Ligation Verwendung fanden, bauen auf einem phenylischen oder alkylischen Grundgerüst auf.[95-97] Einige Beispiele sind in Abbildung 14 aufgeführt.

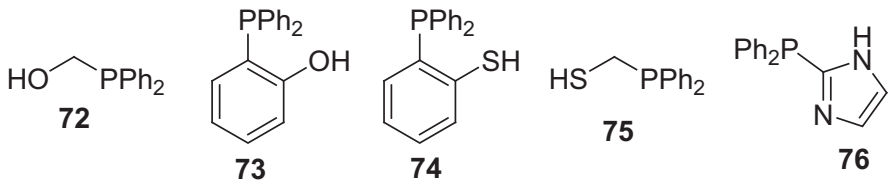
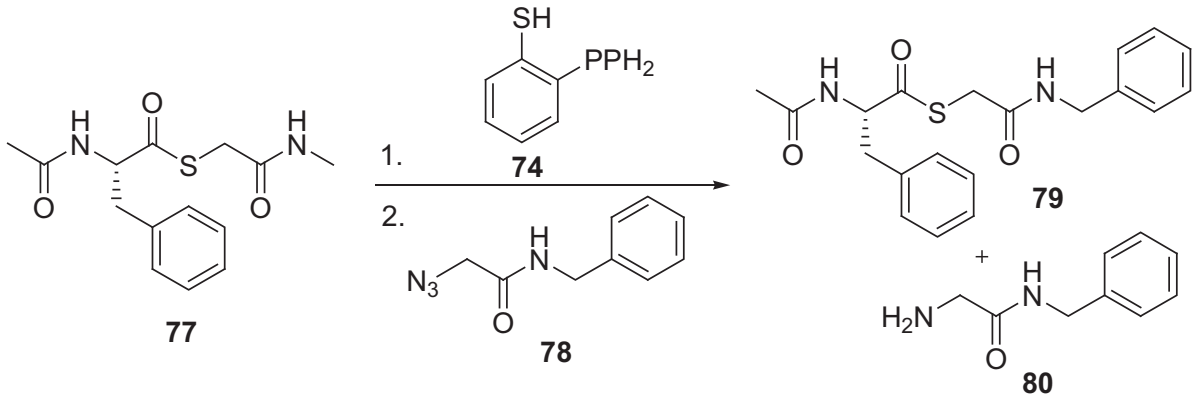
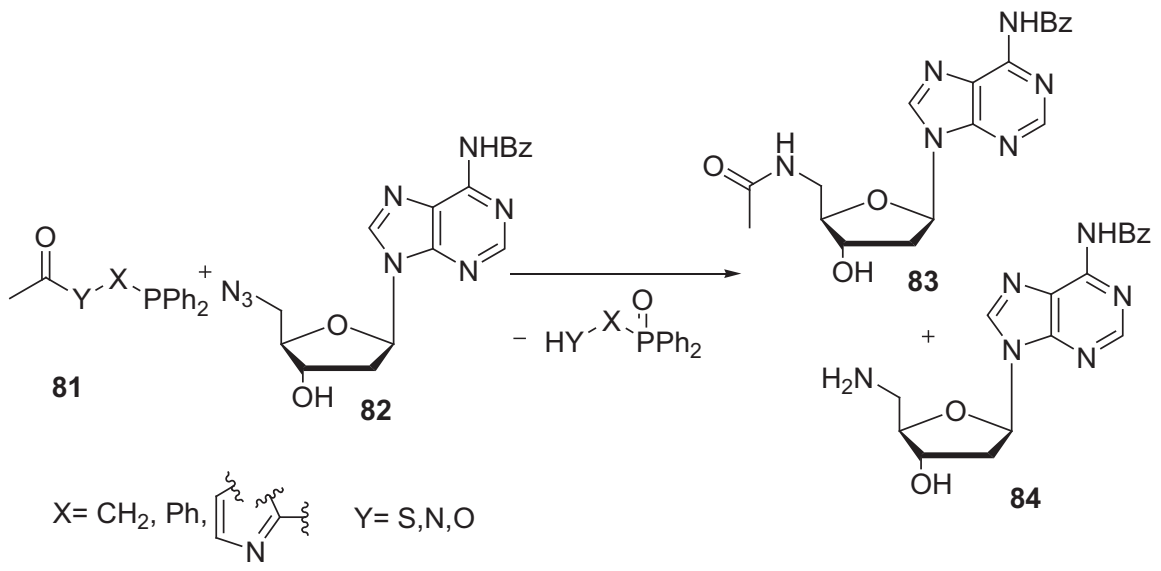


Abbildung 14: Linkersysteme für die spurlose Staudinger-Ligation[95-97]



Schema 14: Spurlose Staudinger-Ligation von Raines et al.[96]

Zunächst publizierten Raines et al. eine in Schema 14 gezeigte Staudinger-Ligation mit Phosphinothiophenol (**74**) als Linkersystem. Hier konkurriert die Hydrolyse des Iminophosphorans mit dem S→N-Acyltransfer, sodass die Menge an Amin **80** sehr hoch ist.[96]

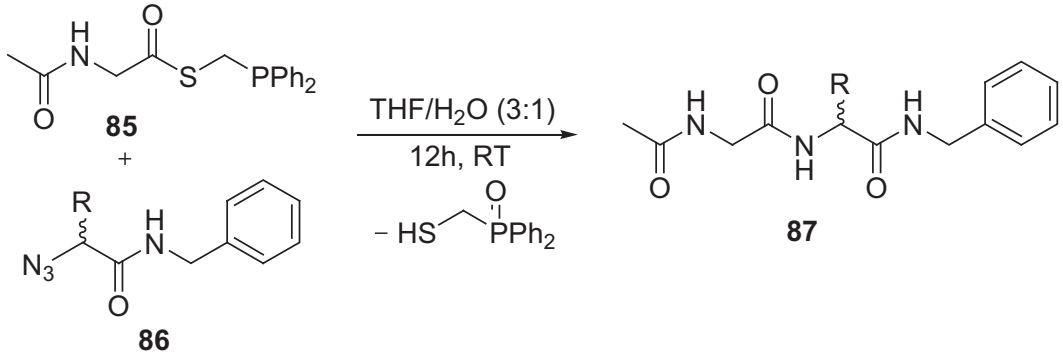


Schema 15: Allgemeines Reaktionsschema der Linkerstudie von Bertozzi et al.[95]

Etwa zeitgleich veröffentlichten Bertozzi et al. ihre Studien zu weiteren Linkersystemen.[95] Als Testderivat verwendeten sie ein Azidonukleosid **82**, das mit Hilfe der Linker acetyliert werden sollte. Das allgemeine Reaktionsschema ist in Schema 15 gezeigt.

Bei der Synthese mit Diphenylphosphinometylalkohol erhält man ausschließlich durch die Staudinger-Reduktion entstehendes Hydrolyseprodukt, was auf die schlechten Abgangsgruppeneigenschaften des alkylischen Alkohols zurückzuführen ist. Auch Bertozzi et al. verwendeten das Phosphinothiophenol (**74**) in ihrer Testreaktion als Linker. [95] Analog zu Raines zeigte sich der Hang zur Hydrolyse deutlich.[96] Die Ligation wurde effizienter mit einem auf Imidazol basierenden Linker. Die Reaktion beruht hierbei auf einem N→N-Acyltransfer. Der entscheidene Nachteil dieses Linkers ist jedoch die ausgesprochene Oxidationsempfindlichkeit des Phosphins. Insgesamt haben die Studien das beste Ergebnis auf der Basis des Diphenylphosphinophenols (**73**) geliefert. Es zeigt hohe Umsätze, sehr gute Ausbeuten und ist gleichzeitig weniger oxidationsempfindlich. Dies entspricht genau dem von Bertozzi et al. zuvor gestellten Anforderungsprofil. In komplexeren Systemen geht die Reaktionen aufgrund der hohen Nukleophilie des Phosphins mit schlechterer Chemoselektivität einher. Das beste Ergebnis einer Staudinger-Ligation konnte Raines et al. 2002 mit dem Diphenylphosphinomethylthiol (**75**) zeigen.[97]

Sie verwendeten die in Schema 16 gezeigte Ligation von verschiedenen Azidoaminosäuren mit acetyliertem Glycin als Proof-of-Principle. Als Modellsubstrate wählten sie mit Phenylalanin, Aspargin und Serin bewusst drei Aminosäuren, die moderate bis hohe Neigung zu Epimerisierung besitzen.



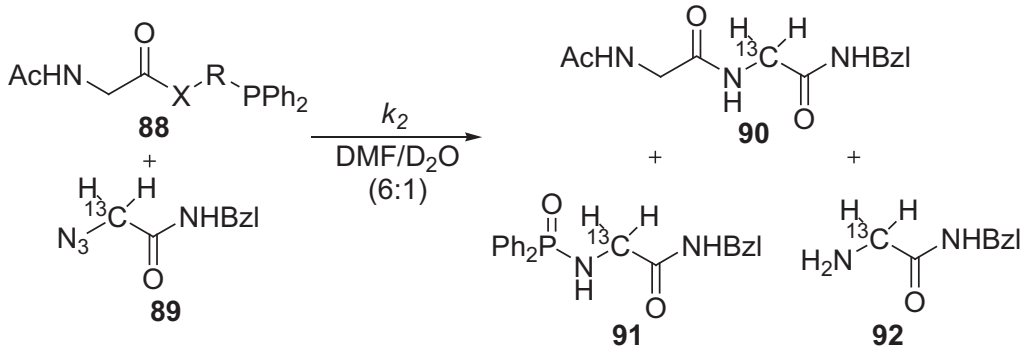
Schema 16: Ligation mit Diphenylphosphinomethylthiol (**75**)

Die Ergebnisse der Ligationen zeigen keinerlei Epimerisierungen, was den Nutzen der Methode zusätzlich untermauert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Durch Ligation gebildete Dipeptide

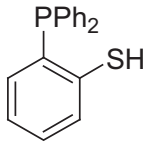
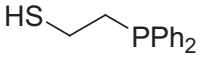
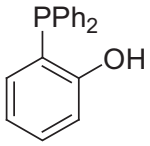
Azidoaminosäure (**86**)	Peptid (**87**)	Ausbeute/ %
Az-(L)Phe-NHBn (**86a**)	AcGly(L)PheNHBn (**87a**)	90
Az-(D)Phe-NHBn (**86b**)	AcGly(D)PheNHBn (**87b**)	93
Az-(L)Asp(OMe)-NHBn (**86c**)	AcGly(L)Asp(OMe)NHBn (**87c**)	91
Az-(D)Asp(OMe)-NHBn (**86d**)	AcGly(D)Asp(OMe)NHBn (**87d**)	95
Az-(L)Ser(Bn)-NHBn (**86e**)	AcGly(L)Ser(Bn)NHBn (**87e**)	92
Az-(D)Ser(Bn)-NHBn (**86f**)	AcGly(L)Ser(Bn)NHBn (**87f**)	99

Weniger effektive Kupplungsreagenzien und schlechte Reaktionsbedingungen, wie zum Beispiel eine falsche Lösungsmittelwahl, führen entweder zum Amin- (Staudinger-Reduktion) oder zum Phosphonamid-Nebenprodukt (Aza-Wittig-Reaktion). Phosphinoalkohole haben gegenüber den Thiolen geringere Umsatzraten oder eine geringe Chemoselektivität. Das Diphenylphosphinomethylthiol besitzt hingegen die höchsten Umsatzraten.[98] Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Schema 17 und Tabelle 2 gezeigt.

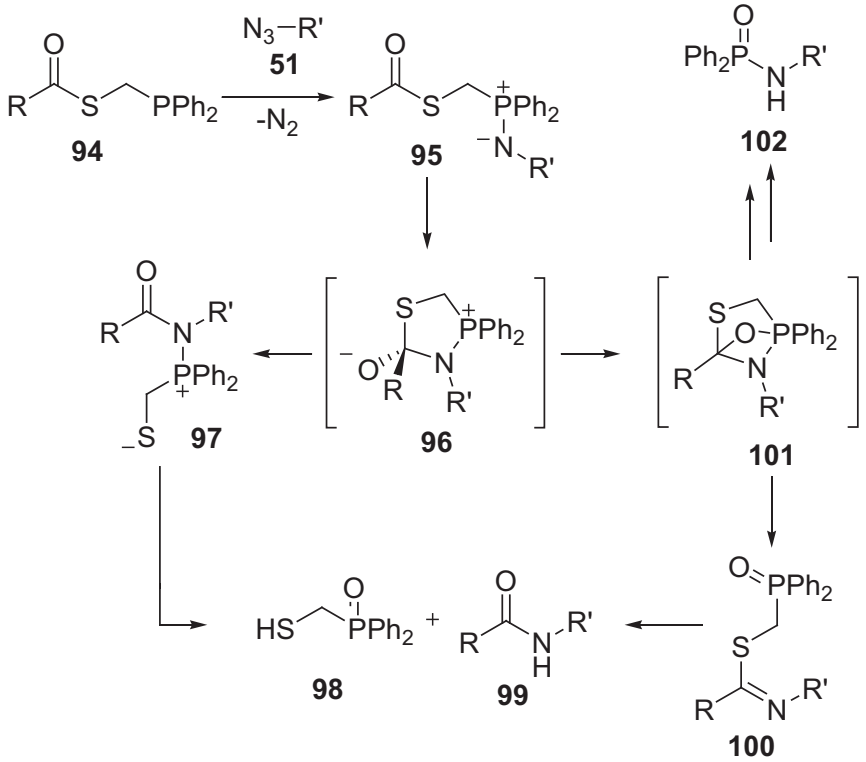


Schema 17: Reaktion zur Umsatzraten-Bestimmung und Chemoselektivität (X = S, O; R = Alkyl, Aryl) [98]

Tabelle 2: Ergebnisse zur Umsatzraten-Bestimmung und Chemoselektivität[98]

Kupplungsreagenz	k_2 (10^{-3} $M^{-1}s^{-1}$)	Amid **90**/ %	Amin **92**/ %	Phosphonamid **91**/ %
75	7.7 ± 0.3	95	3	2
 **74**	1.04 ± 0.05	38	62	0
72	0.12 ± 0.01	11	0	89
 **93**	0.65 ± 0.01	39	61	0
 **73**	7.43 ± 0.03	99	0	0

In Schema 18 ist der von Raines et al. aufgestellte genauere Mechanismus gezeigt.[98] Zunächst bildet sich ein Phosphazid, dieses lässt sich in polaren Lösungsmitteln besser stabilisieren, was zu einer höheren Umsatzrate führt. Unter Abspaltung von Stickstoff entsteht dann, wie bereits oben erwähnt, das Aza-Ylid **95**. Aufgrund des nukleophilen Charakters des Stickstoffatoms kann über ein tetrahedrales Intermediat (**96**) die Acylierung durch den Thioester erfolgen. Mit Hilfe eines freien Elektronenpaares des Sauerstoffs wird eine C=O-Doppelbindung ausgebildet und die C-S-Bindung gespalten. Es bildet sich das Amidophosphoniumsalz **97**. Die P-N-Bindung kann anschließend mit Hilfe von Wasser hydrolysiert werden und man erhält das erwünschte Amid **99** und als Nebenprodukt das Thiophosphinoxid **98**. Der Charakter der Abgangsgruppe im Fall des tetrahedralen Intermediats **96** ist ganz entscheidend dafür in welche Richtung die Reaktion auf dieser Stufe verläuft. So können Phosphinoalkohole als schlechtere Abgangsgruppen durch eine Aza-Wittig-Reaktion stabile Imidate bilden, im Fall der Phosphinothiole konnte jedoch kein analoges Thioimidat (**100**) nachgewiesen werden.



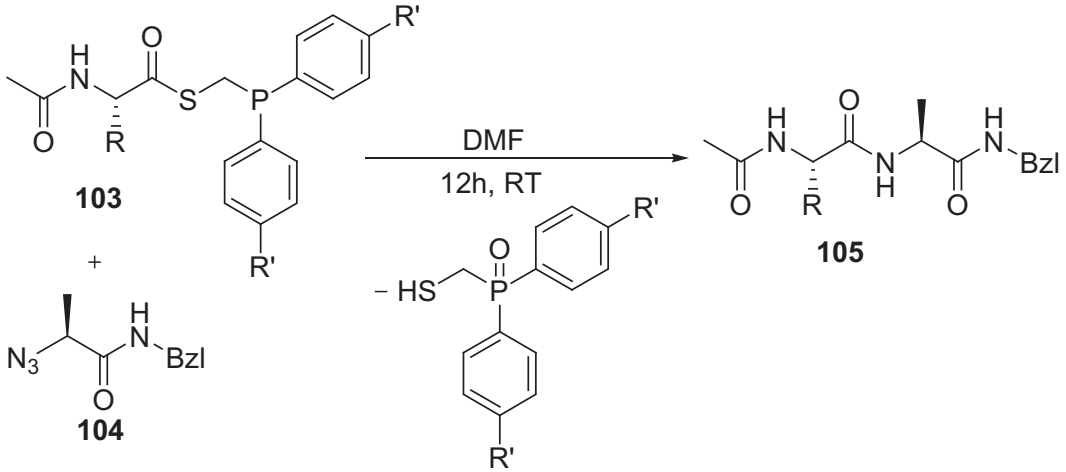
Schema 18: Detailierter Mechanismus der spurlosen Staudinger-Ligation[98]

Mit $H_2{}^{18}O$ konnte gezeigt werden, dass das Amid **99** nach der Reaktion lediglich ^{16}O enthält, während das Phosphinoxid **98** das ^{18}O beinhaltet.[98] Der Mechanismus, der zur Phosphonamid-Bildung führt, ist bisher nicht bekannt. Die Tatsache, dass das Phosphonamid

102 bei Verwendung von $H_2{}^{18}O$ ausschließlich ^{16}O enthält, impliziert aber, dass dieses ebenso über den Weg der Aza-Wittig-Reaktion verläuft.

Bei einer Reaktion in nicht wässrigem Medium läuft die Reaktion nach demselben Mechanismus ab und das entstandene Iminophosphoran fragmentiert schließlich zum gewünschten Peptid **99** und einem Thiaphosphiraniumsalz.

Bei der Verwendung des Diphenylphosphinomethylthiol **75** als Linker zur Verknüpfung von sterisch anspruchsvollen Aminosäuren nimmt die Ausbeute stark ab und das Aza-Wittig-Produkt (Phosphonamid **102**) stark zu.[99]. Der Schlüsselschritt ist das tetrahedrale Intermediat **96**. Die starke sterische Hinderung, da sowohl der Thioester als auch das Azid sekundär sind, führt zu einer erleichterten Bildung einer O-P-Bindung und damit zum Oxazaphosphetan **101**. Raines et al. konnten zeigen, dass eine Erhöhung der Elektronendichte am Phosphor die Ausbildung einer P-O-Bindung deutlich minimiert. Bei hoher Elektronendichte wird der Angriff des Sauerstoff am Phosphor immer unwahrscheinlicher und führt zur Ausbeutesteigerung des gewünschten Amids **99**.[99] Diesen Effekt kann man durch entsprechende Substitution der Phenylgruppen des Phosphins erreichen.[99]



Schema 19: Testreaktion zur spurlosen Staudinger-Ligation mit substituierten Phosphinliganden (R = CH_3, Ph; R' = H, Cl, OMe)

In Schema 19 ist die Testreaktion gezeigt. Es wurden das Diphenylphosphinomethylthiol (**75**), ein Thiophosphin mit Chlor-Substituenten in *para*-Position zum Phosphor als Linker mit elektronenarmem Phosphor und einem Linker mit Methoxy-Gruppen in *para*-Position als Linker mit elektronenreichem Phosphor miteinander verglichen. So konnten mit Hilfe der *para*-Methoxyphenyl-Liganden im Fall einer Alanin-Alanin-Kupplung vergleichbare Ausbeuten zur Glycin-Glycin-Kupplung mit Diphenylphosphinomethylthiol (**75**) erreicht werden, während der Chlor-substituierte Linker als Negativkontrolle fungierte. Durch

Änderung der Polarität des Lösungsmittels kann man den gleichen Effekt herbeiführen. Durch eine Erhöhung wird der polare Übergangszustand stabilisiert und dadurch nimmt die Geschwindigkeit der Reaktion zu. Bei sterisch anspruchsvollen Substraten führt ein unpolareres Lösungsmittel, obwohl die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich abnimmt, zu erhöhten Ausbeuten. Dies liegt vermutlich daran, dass in einem unpolaren Lösungsmittel die Ladung des Phosphor besser delokalisiert werden kann. Dadurch wird ein Angriff des Sauerstoff am Phosphor unwahrscheinlicher.

2007 konnten Raines et al. die spurlose Staudinger-Ligation für eine Anwendung in rein wässrigem Milieu zugänglich machen [100] und eröffneten damit, zumindest theoretisch, die Möglichkeit einer in-vivo-Anwendung im physiologischen Medium. Hierfür entwickelten sie ein wasserlösliches Linkersystem, das man durch rekombinante Thioestersynthese an ein Protein immobilisieren kann.

Raines et al. untersuchten die in Abbildung 15 gezeigten Linkersysteme auf ihre Tauglichkeit. Der Linker **106** zeigt schlechte Löslichkeitseigenschaften, dagegen ist die Wasserlöslichkeit der Linker **107** und **108** deutlich besser. Bei einer Testreaktion des Linkers **107** erhält man als Hauptprodukt das durch die Staudinger-Reduktion entstehende Amin. Zur Ausbeutesteigerung musste der pH-Wert erhöht werden. Dies ist allerdings aufgrund der starken Zunahme der Thioester-Hydrolyse bei hohem pH-Wert nur begrenzt möglich.[101] Reaktionsbedingungen nahe neutralem pH-Wert sind für die Staudinger-Ligation im wässrigen Milieu optimaler und die meisten Proteine besitzen dann die größte strukturelle Stabilität.

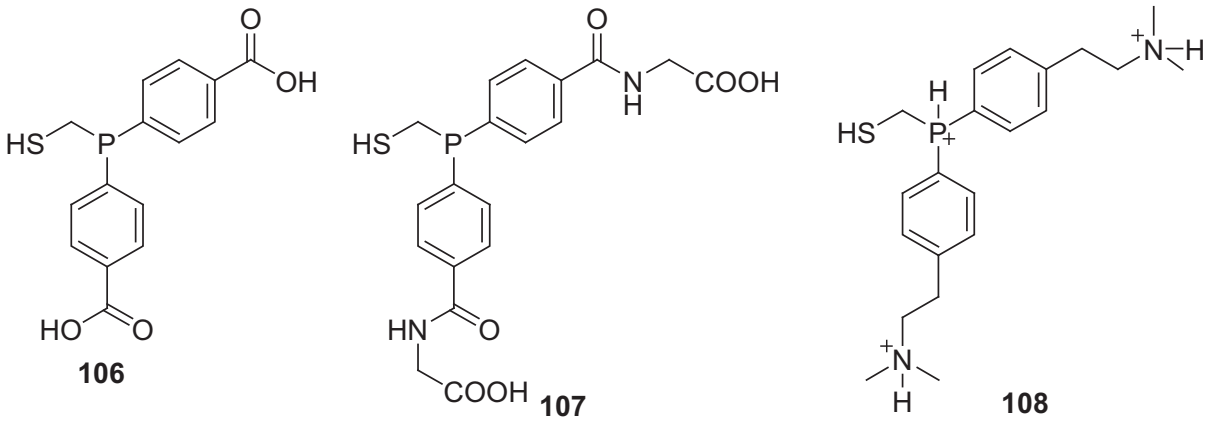
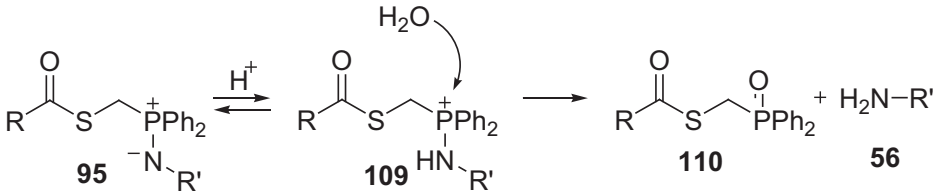


Abbildung 15: Linkersysteme für wässrige Staudinger-Ligation

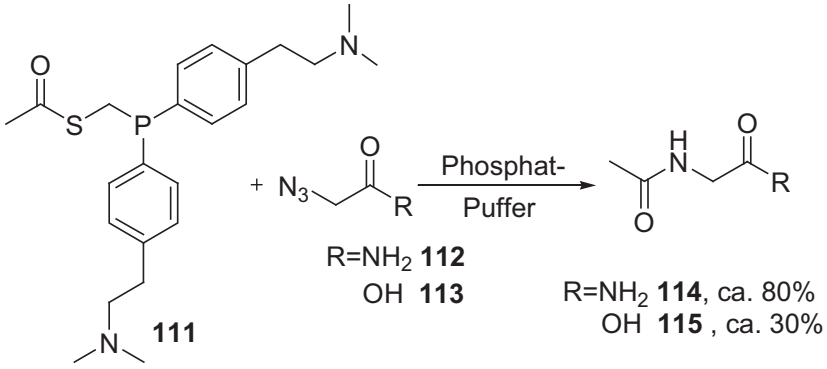
Das Schlüsselatom im protischen Lösungsmittel ist der Stickstoff des Iminophosphorans. Die S-N-Umlagerung erfordert einen deprotonierten Stickstoff. Gleichzeitig erhöht ein protonierter Iminophosphoran-Stickstoff (**109**) die Elektrophilie des Phosphors, was die

Wahrscheinlichkeit eines Angriffs von Wasser am Phosphor erhöht und zur Hydrolyse mit den Produkten **110** und **56** führt (Schema 20).



Schema 20: Protonierung und Hydrolyse des Iminophosphorans

Die tertiären Amine des Linkers **108** sorgen für Wasserlöslichkeit und unterdrücken gleichzeitig die Protonierung des Iminophosphoran-Stickstoffs. Das Ergebnis ist eine höhere Ausbeute im Fall des Amin-Linkers (**108**) bei pH ≥ 7.5. Die Relevanz dieser Deprotonierung zeigt sich im Vergleich der in Schema 21 dargestellten Reaktionen.



Schema 21: Vergleich der Staudinger-Ligationen mit Azidoglycinamid (**112**) und Azidoglycin (**113**)

Die Ausbeute der Reaktion von **111** mit Azidoglycinamid (**112**) ist dabei deutlich höher, als bei der Reaktion mit Azidoglycin (**113**). Dies ist durch den sauren Charakter der Azidoaminosäure zu erklären. Er erhöht die Wahrscheinlichkeit der Protonierung und führt letztendlich zu mehr Hydrolyse-Produkt.

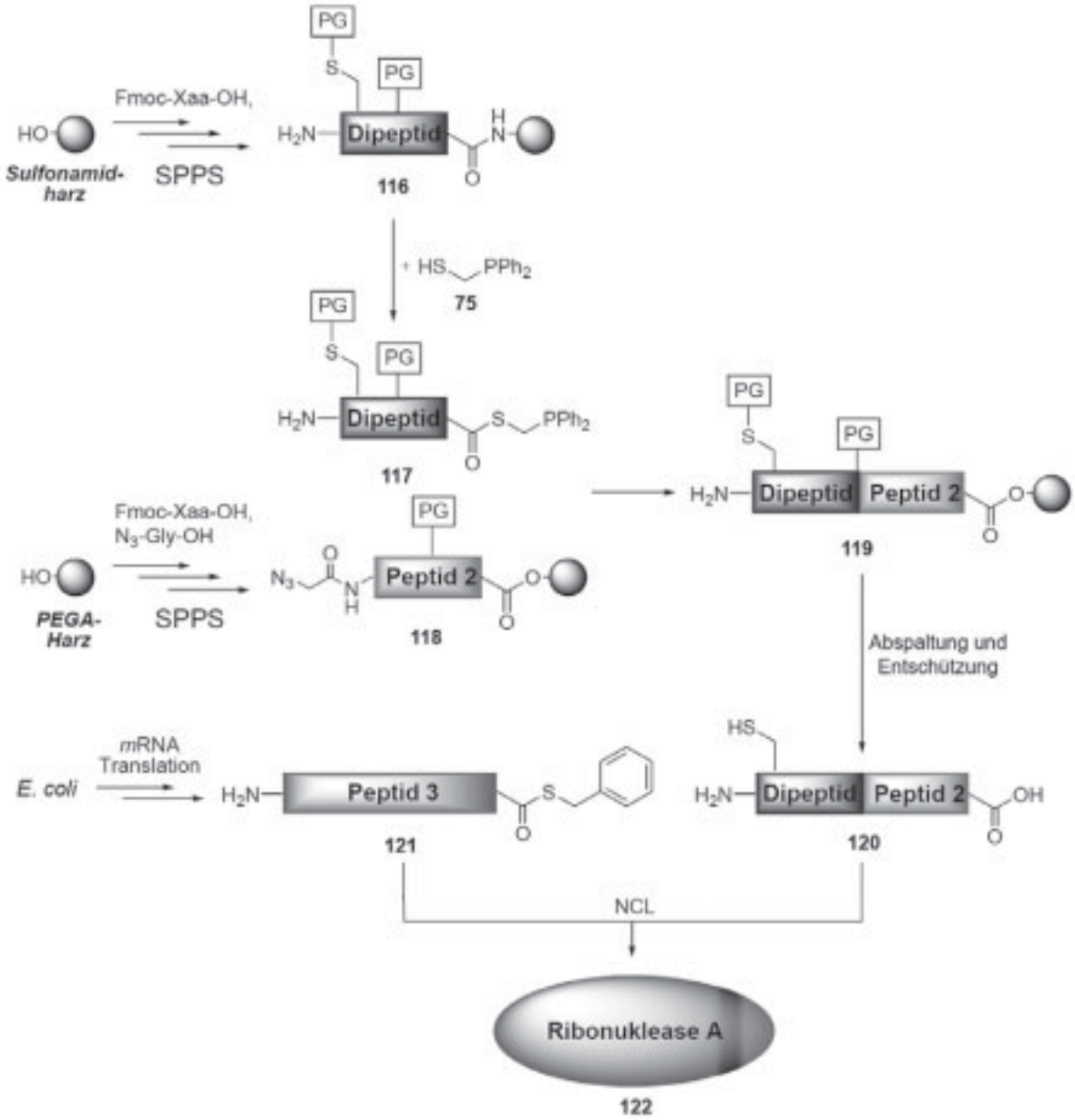
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Diphenylphosphinomethylthiol (**75**) als Linkergrundgerüst zu diesem Zeitpunkt am geeignetsten für die Staudinger-Ligation ist. Dieses lässt sich je nach Anforderung direkt verwenden oder durch in *para*-Position angebrachte Substituenten für die Anwendung sterisch anspruchsvollerer Kupplungspartner oder im wässrigen Milieu optimieren.

2.2.3.3. Anwendungen der Staudinger-Ligation

Kombination von Ligationsmethoden zur Synthese von Proteinen

Die Synthese von komplexen Proteinstrukturen auf chemischem Weg gestaltet sich oft schwierig, da diese häufig aus über hundert Aminosäuren in teilweise schwierig zu synthetisierenden Sequenzen bestehen. Daher ist angesichts der Limitierung der Festphasenpeptidsynthese eine Kombination mehrerer Ligationsmethoden unausweichlich. Bei Sequenzlängen von mehr als hundert Aminosäuren benötigt man mindestens drei zu verknüpfende Fragmente. Die Anforderungen an diese Methoden sind, die Orthogonalität zu den in biologischen Systemen vorkommenden funktionellen Gruppen zu berücksichtigen. Gleichzeitig müssen die verschiedenen Ligationen auch zueinander orthogonal sein. Die Staudinger-Ligation kann als ein Teilschritt zur Synthese komplexer Proteine Verwendung finden. 2003 veröffentlichten Raines et al. eine Synthese der als Modellprotein dienenden 124 Aminosäuren langen Ribonuklease A (**122**).[102] Die Schlüsselschritte waren *m*RNA Translation, Festphasenpeptidsynthese, NCL und eine Festphasen-Staudinger-Ligation. Ausgegangen wurde von drei verschiedenen Peptidfragmenten. Der erste Baustein war das 13 Aminosäuren lange Teilstück **118** (112-124), das als N-terminales Azid synthetisiert wurde. Dieses wurde unter Verwendung von Fmoc-Schutzgruppen mit HATU als Aktivierungsreagenz auf einem Hydroxyethylpolystyrol-(PEGA)-Harz hergestellt. Das PEGA-Harz wurde aufgrund seiner vielfältigen Lösungsmittelkompatibilität gewählt. Im letzten Schritt wurde Azidoglycin mit Hilfe von PyBOP® gekuppelt. Das zweite Fragment war das Dipeptid **116**, bestehend aus den Aminosäuren 110-111. Dieses wurde auf einem Sulfonamid-Harz synthetisiert und nach Aktivierung des Harzes mit Diphenylphosphinomethanthiol (**75**) als Nukleophil abgespalten. **118**, das am N-Terminus ein Cystein beinhaltet, wurde in einer Staudinger-Ligation auf der Festphase an das ebenfalls vollständig geschützte Fragment 1 gekuppelt.

Das nach Entschützung erhaltene Peptid **120** konnte anschließend in einer Nativen Chemischen Ligation an ein durch Biosynthese zuvor als C-terminaler Thioester synthetisiertes Fragment **121** (Aminosäuren 1-109) zum fertigen Protein **122** legiert werden (Schema 22).

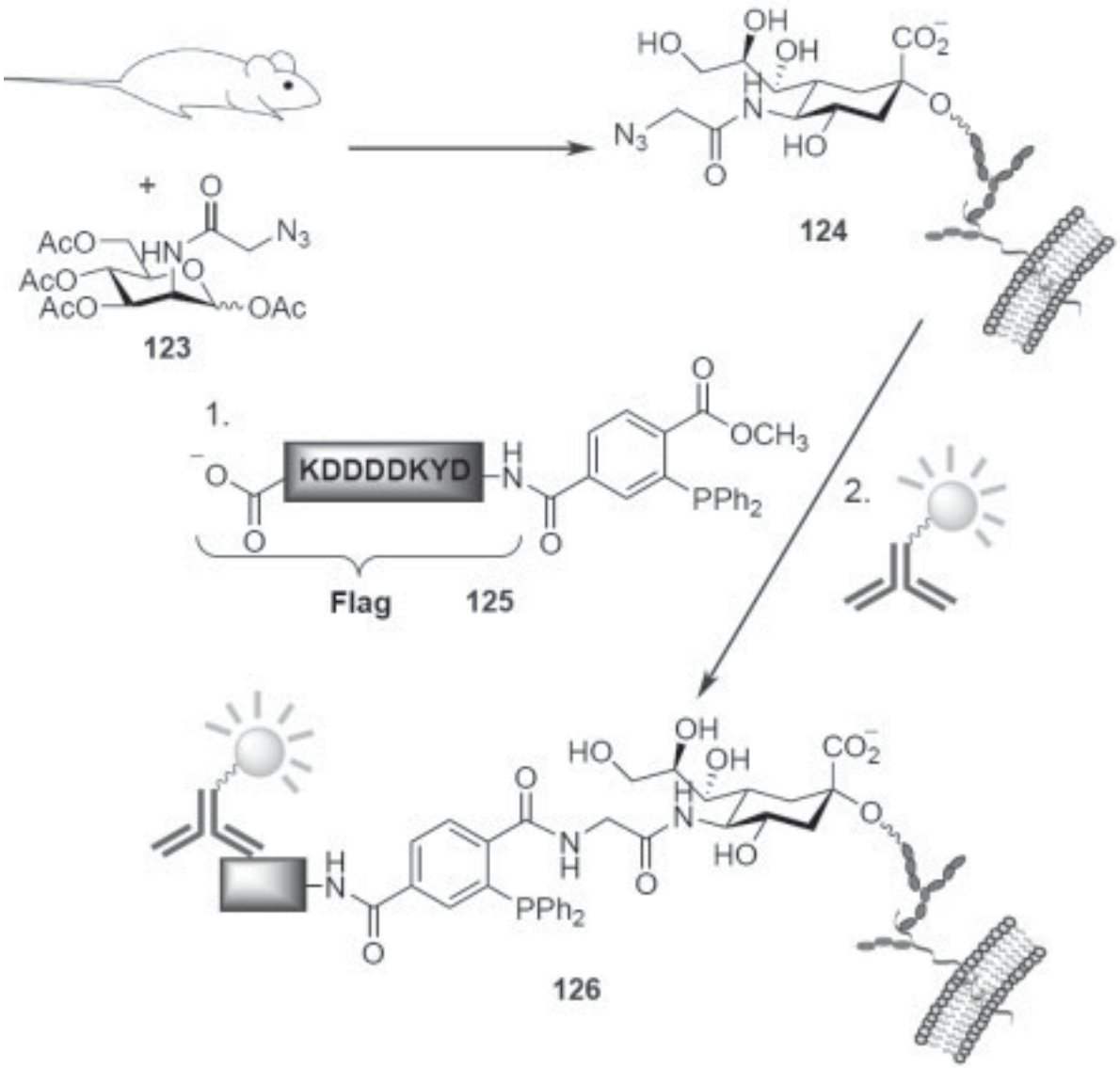


Schema 22: Synthese der Ribonuklease A (**122**)

Die Synthese bleibt allerdings den Beweis schuldig, dass die Staudinger-Ligation auch zur Kupplung größerer Peptidfragmente verwendet werden kann. Zusätzlich wurde eine mögliche Chemoselektivität durch die geschützten Peptide nicht zu nutze gemacht.

Zelloberflächenmodifizierung

In der Modifizierung von Zelloberflächen,[103] mit biologisch funktionellen Gruppen zur extrazellulären Kommunikation, findet die Staudinger Ligation eine weitere Anwendung. Zum Verständnis dieser Funktionen ist es wichtig Methoden zu haben, durch die diese Gruppen darstellbar sind. Gleichzeitig lässt sich die Auswahl funktioneller Gruppen durch die Immobilisierung nicht-biologischer Funktionalitäten noch erweitern. Bertozzi et al. konnten 2000 die Immobilisierung von Biotin auf Zelloberflächen durch die Staudinger-Ligation zeigen.[94] Als funktionelle Gruppe und Reaktionspartner für das Biotin auf der Zelloberfläche wurde das Azid gewählt. Es ist kleiner als die Phosphine und lässt sich auf der Zelloberfläche einfach darstellen. *N*-α-Azidoacetylmannosamin (**123**) wird zum Beispiel aufgrund der Toleranz von unnatürlichen Carbohydraten im Biosyntheseweg in kultivierten Zellen metabolisch zu *N*-α-Azidoacetylsialylsäure umgewandelt und in Zellmembran-Glykokonjugate eingebaut.[104-106] Diese können in einer Staudinger-Ligation mit biotinylierten wasserlöslichen Phosphinen reagieren und das Biotin auf der Zelloberfläche immobilisieren.[94] Analog lassen sich Flag-Peptide, die als Erkennungssequenzen für Antikörper mit gebundenen Fluorophoren dienen, immobilisieren (Schema 23).[79]

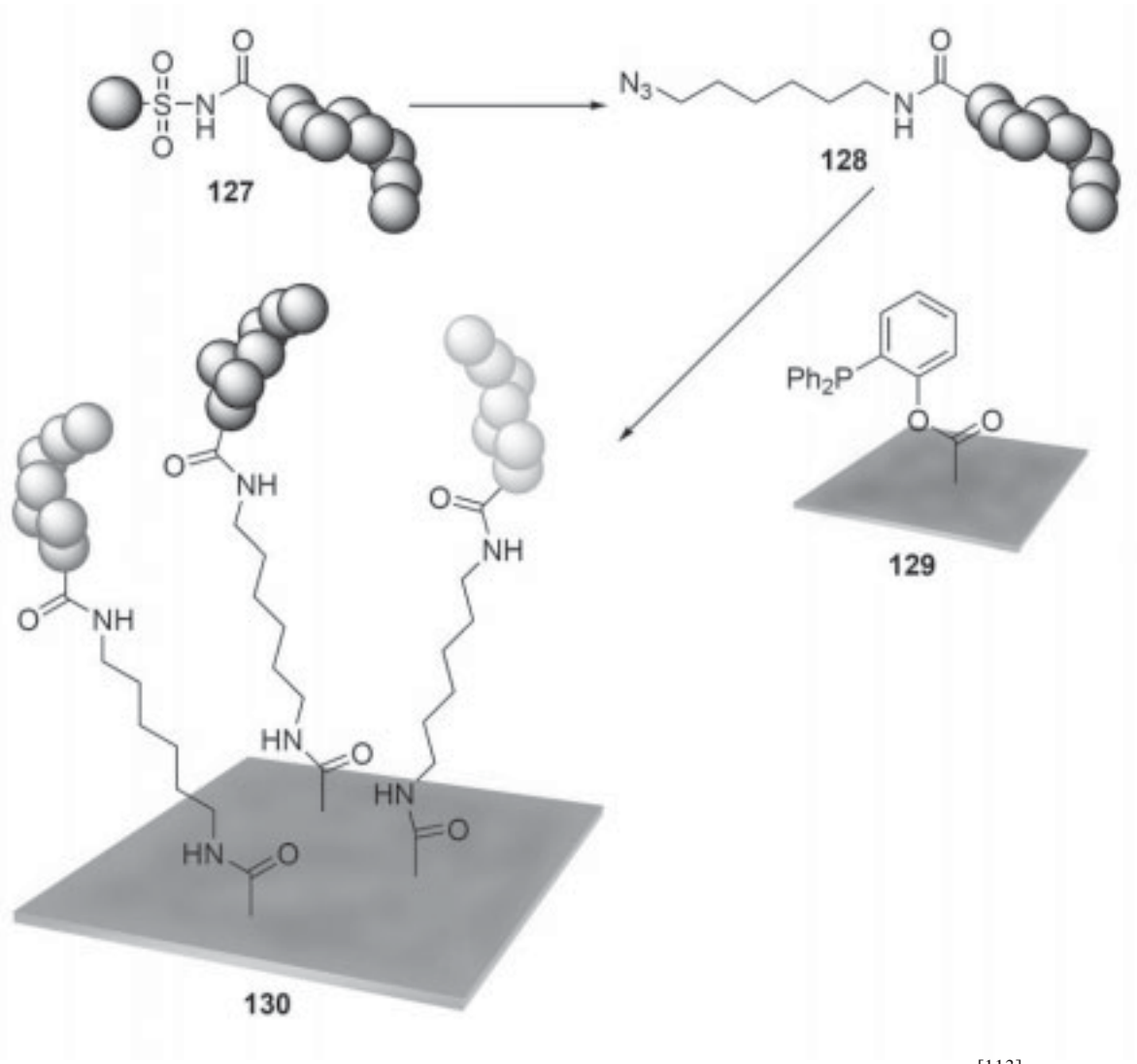


Schema 23: *In vivo* Immobilisierung an Zelloberflächen[107]

Immobilisierung an synthetischen Oberflächen

In den letzten Jahren nahm die Anwendung von Microarrays in der biologischen Forschung im Bereich der Analytik deutlich zu.[108, 109] Dies liegt an ihrem unschätzbaren Wert für Hochdurchsatz-Analysen, wobei nur geringe Mengen an Analyt benötigt werden. Zu diesem Forschungsgebiet gehören unter anderem DNA-Chips[110] und Protein-Microarrays[87, 111]. Microarrays werden zum Beispiel zur Detektion von Protein-Protein-, Protein-Ligand- oder Protein-Antikörper-Wechselwirkungen verwendet.[112] Wichtig bei der Immobilisierung ist die chemoselektive Methode. Da die Art der Immobilisierung im Bereich der Arrays sehr verschieden sein kann, ist die Tolerierung einer Vielzahl an Funktionalitäten unabdingbar.[113]

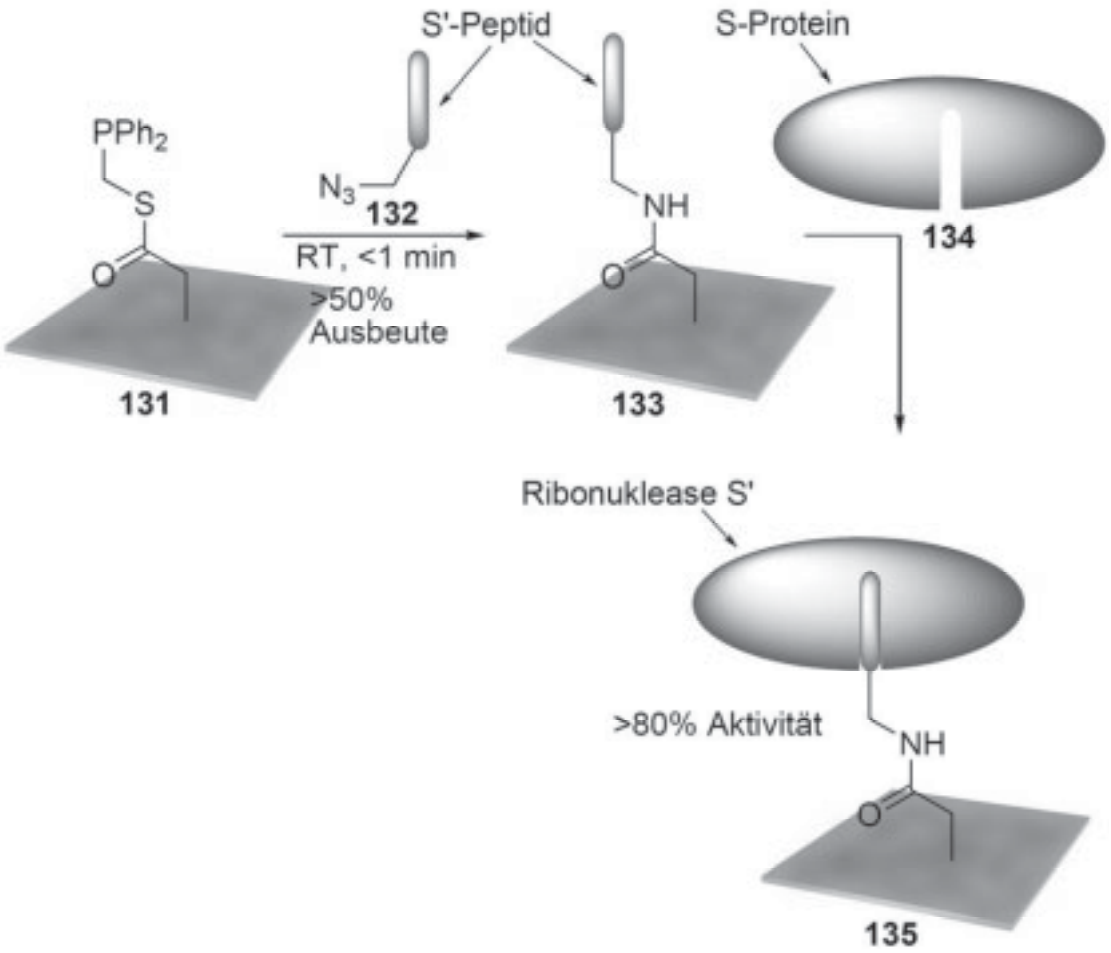
Gleichzeitig sollte die Methode unter milden Bedingungen ablaufen und hoch effizient sein. Waldmann et al. zeigten 2003, dass die Staudinger-Ligation ein gutes und effizientes Werkzeug zur Immobilisierung von „small molecules“ ist.[113]



Schema 24: Allgemeines Syntheseschema zur Immobilisierung auf Microarrays[113]

Ein allgemeines Reaktionsschema ist in Schema 24 gezeigt. Die Gruppe um Waldmann verwendete in ihren Versuchen Glasträger als Oberfläche, die mit Polyamidoamin (PAMAM) Dendrimeren der vierten Generation modifiziert waren.[113] Um freie Säurefunktionen zu erhalten, wurde die Oberfläche mit Glutaminsäureanhydrid umgesetzt. An die erhaltene Säure wurde anschließend 2-Diphenylphosphinophenol (**73**) gekuppelt. Über Festphasensynthese an einem Sulfonamidharz werden die „small molecules“ (**127)** dargestellt und nach Aktivierung durch Abspaltung mit 6-Azidohexylamin die Azidfunktion eingeführt. Die erhaltenen Azidobausteine (**128**) werden anschließend mittels Staudinger-Ligation auf der Oberfläche immobilisiert (**130**). Als Testsubstrate wurden unter anderem Biotin und Mannose als Azidbausteine verwendet.

Ein Beispiel für eine Protein-Immobilisierung zeigten Raines et al. 2003, bei der sie die Staudinger-Ligation als Immobilisierungsmethode, mit dem selbst entwickelten Diphenylphosphinomethylthiol (**75**) als Linker, verwendeten.[112] Als Modellprotein diente ihnen dabei Ribonuklease S'. Die Protease Subtilisin spaltet eine einzige Peptidbindung der Ribonuklease A. Das dabei entstehende S-Peptid und das gleichzeitig entstehende S-Protein (**134**) bilden, indem sie stark miteinander wechselwirken, die Ribonuklease S. Beide Fragmente für sich zeigen keinerlei Enzymaktivität. Jedoch zeigen bereits die ersten 15 Aminosäuren des S-Peptids in Wechselwirkung mit dem S-Protein (**134**) volle enzymatische Aktivität (Ribonuklease S'). In dieser Immobilisierungsstudie wurde das 15 Aminosäuren lange Peptid S' synthetisiert, mit Azid modifiziert und über Staudinger-Ligation immobilisiert. Als Oberflächen wurden für Arrays übliche Glasträger verwendet, die endständig mit Aminen funktionalisiert sind. Diese wurden mit Succinimidestern versehenen Polyethylenglykolen (PEG) gekuppelt, an die das Diphenylphosphinomethylthiol (**75**) immobilisiert wurde. Es wurden zwei Azidvarianten synthetisiert, wobei das Azid in der Lysin-Seitenkette und terminal verlinkt über PEG eingebaut wurde. Mit Hilfe der Staudinger-Ligation wurden die erhaltenen Azide **132** an der Glasoberfläche immobilisiert und mit dem S-Protein (**134**) inkubiert, um das vollständig aktive Enzym zu erhalten (Schema 25). Es zeigt sich, dass das terminale Azid besser geeignet ist. Bei dem über die Lysin-Seitenkette immobilisierten Protein geht Aktivität verloren, da die Lysin-Seitenkette in die Bindung involviert ist.

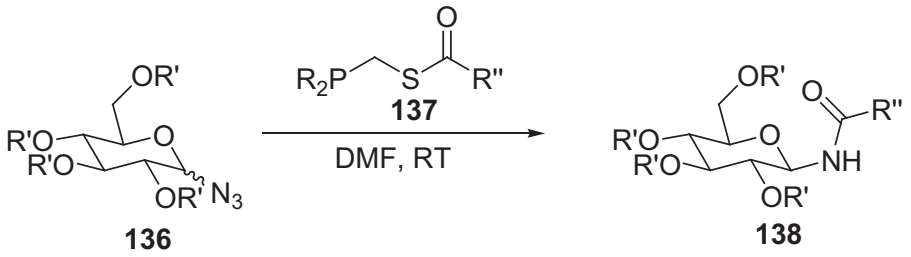


Schema 25: Immobilisierung der Ribonuklease S' auf Glasoberfläche (**135**)[112]

Glykosylierungen

N-Glykosylierungen stellen eine der wichtigsten posttranslationalen Modifizierungen von Proteinen dar.[114] Das Schlüsselmotiv sind Oligosaccharide, die über eine Amidbindung an ein Asparagin gekuppelt sind. Häufig wiederkehrende Aminosäuresequenzen sind Asn-Xxx-Thr oder Asn-Xxx-Ser, wobei Xxx eine beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann.[115] Prinzipiell können diese Strukturen durch Kondensation von Glykosylaminen mit aktivierten Carbonsäuren dargestellt werden.[116] Es entstehen aufgrund der Neigung der Glykosylamine zur Isomerisierung vielfach anomere Gemische, so dass an dieser Stelle stereoselektive Kupplungsmethoden zur Synthese von Glykopeptiden und -proteinen benötigt werden. Eine attraktive Möglichkeit bietet sich auch hier durch die spurlose Staudinger-Ligation. Bernardi et al. konnten 2005 mit Hilfe des 2-Diphenylphosphinophenol (**73**) die Kupplung zwischen α-Glykosylazid mit verschiedenen alkylischen Carbonsäuren zeigen.[117] Die Reaktion wurde bei 70 ^{o}C in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform oder Toluol durchgeführt. Durch das konfigurationslabile Beispiel erhielten sie Epimerengemische von ca.

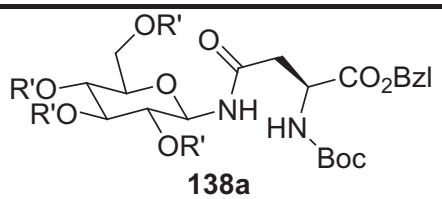
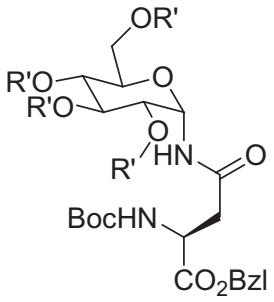
85:15 α:β. Ein Jahr zuvor konnten Kiessling et al. bereits die Glykosylierung von Asparaginsäure zeigen.[118] Ziel ihrer Arbeit war die Entwicklung eines Phosphinothioesters (**137**) basierend auf dem von Raines et al. [97] vorgestellten Phosphinomethylthiol (**75**). Dieser sollte in der Lage sein unter milden Bedingungen glykosylierte Asparaginsäure-Derivate **138** zu generieren. Ein zwischen Diphenylphosphinomethylthiol (**75**) und einem Glykosylazid (**136**) gebildetes Iminophosphoran ist deutlich weniger nukleophil als bei einer peptidischen Staudinger-Ligation. Dieser Umstand verlangsamt den anschließenden Acyltransfer stark beziehungsweise bringt ihn zum Erliegen. Darum ist die Entwicklung eines Linkersystems zur Erhöhung des nukleophilen Charakters des Iminophosphorans nötig. Wie in Kapitel 2.2.3.2 erwähnt, beeinflussen die Phosphin-Substituenten die sterischen und elektronischen Eigenschaften des Iminophosphorans maßgeblich. So entschieden sich Kiessling et al. für die Synthese von Phosphinothiollinkern mit alkylischen Substituenten am Phosphin.[118] Nachteil dieser alkylischen Derivate ist die wesentlich höhere Oxidationsanfälligkeit. Mit diesen Linkern war es möglich α–Glykosylamide (**138**) herzustellen, die mit arylischem Thiophosphinsystem nicht synthetisiert werden konnten.



Schema 26: Glykosylierung durch Staudinger-Ligation (R = Et, Bu, Ph; R' = Ac, Bzl; R'' = Boc-Asp-OBzl)

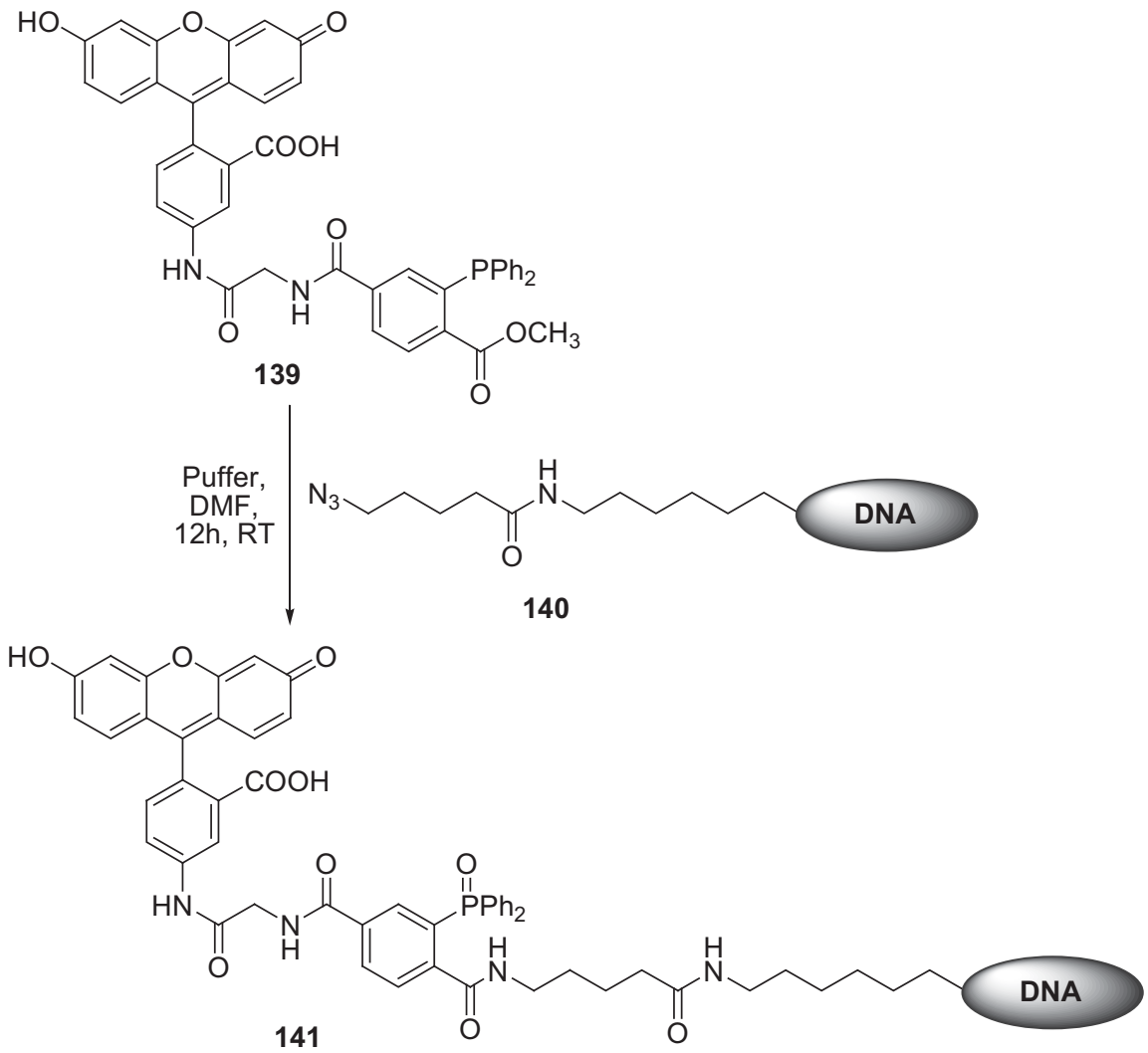
Die Reaktion ist in Schema 26 zusammen mit den Ergebnissen in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Ausbeuten der Linkersysteme

Produkt	Ausbeuten in %		
	R = Et (**137a**)	R = Bu (**137b**)	R = Ph (**137c**)
 **138a**	54	54	55
 **138b**	42	0	0

Ortsspezifische Markierung von Biokonjugaten

In der chemischen Biologie und für bioanalytische Verfahren spielt die ortsspezifische Markierung von biologischen Substraten eine übergeordnete Rolle. Hierzu müssen hoch selektive und effiziente Methoden für die Markierung in biologischen Systemen durch Fluorophore, Spinsonden, Affinitätsmarker und Erkennungsmotive bereitgestellt werden.[119] Bei der Markierung biologischer Systeme konnte die Staudinger Ligation ebenfalls verwendet werden. Ein Beispiel für eine Fluoreszenz-Markierung haben Ju et al. 2003 publiziert.[120] Ein Oligonukleotid wurde am 5'-Ende über einen alkylisches Linkersystem mit einer Azidgruppe versehen.



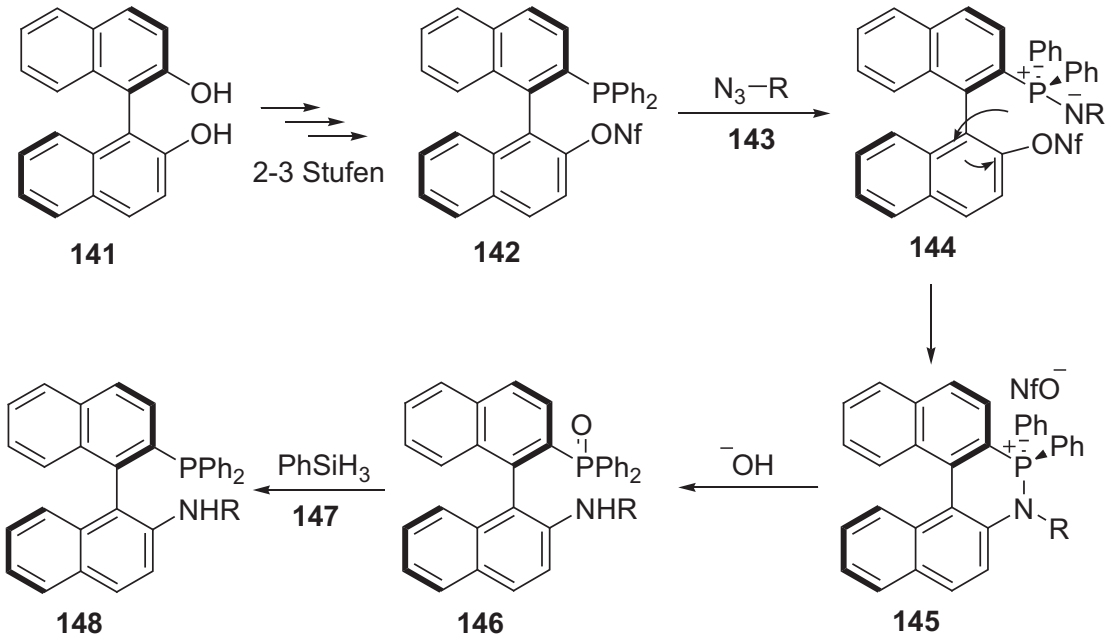
Schema 27: Fluoreszenzmarkierung von DNA-Oligonukleotiden

Dieses wurde dann in einer Staudinger-Ligation mit 5-[(N-(3'-Diphenylphosphinyl-4'-methoxycarbonyl)phenyl-carbonyl)aminoacetamido]fluorescein (Fam) (**139**) umgesetzt (Schema 27). Durch hohe Ausbeuten reichte zur Aufreinigung bereits eine Größenausschluss-Chromatographie und Entsalzung. Das so erhaltene Fam-markierte Oligonukleotid (**141**) konnte dann als Primer in der Sanger-Dideoxysequenzierung eingesetzt werden.

Zugang zu auf Binol basierenden P,N-Liganden

Eine eher ungewöhnliche Anwendung der Staudinger-Ligation findet sich in der Synthese von MAP-Typ P,N-Liganden.[121] 2,2'-substituierte 1,1'-Binaphtyl-Verbindungen finden vielfältige Anwendungen in der homogenen Katalyse. Dazu gehören auch heterobidentale MAP-Liganden, die aufgrund hoher Reaktivität und Selektivität in den verschiedensten Katalysereaktionen, wie zum Beispiel Hartwig-Buchwald-Aminierung oder Suzuki-Miayaura-Kupplung, Anwendung finden.[122] Ihre Synthese ist meist sehr komplex und aufwendig,

weshalb ein einfacher Zugang über eine intramolekulare Staudinger-Ligation sehr attraktiv ist. Van Maarseveen et al. konnten zeigen, dass eine solche Reaktion praktikabel ist und zudem eine hohe Diversität an Aziden zulässt.[123]



Schema 28: Synthese Binol-basierender P,N-Liganden

In Schema 28 ist die publizierte Synthese gezeigt. In 2-3 Schritten wurde aus dem R-Binol (**141**) das entsprechende Phosphin (**142**) synthetisiert. Dieses Phosphin kann dann mit Aziden (**143**) umgesetzt werden und es entsteht das entsprechende Iminophosphoran. Das Molekül interne –ONf dient im nächsten Schritt als Abgangsgruppe für den intramolekularen Angriff des Iminophosphorans. Durch Hydrolyse erhält man im Molekül **146** das gewünschte Amin und ein Phosphinoxid. Dieses kann abschließend mit Phenylsilan (**147**) zum aktiven Phosphin reduziert werden und es entsteht der gewünschter Ligand **148**.

2.3. Zyklisierungsmethoden

2.3.1. Kupplungsreagenzien

2.3.1.1. In Lösung

Bei der Zyklisierung durch Kupplungsreagenzien werden zunächst über SPPS lineare Peptidvorstufen synthetisiert und als seitenkettengeschützte Derivate abgespalten. Entscheidend ist die Anwendung säurelabiler Harze, die eine intakte Schützung der Aminosäureseitenketten gewährleisten.[124] Dazu geeignete Linkersysteme sind der 2-Chlortrityl-[124] und der 4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxybutylsäure-Linker[125]. Um den C- oder N-Terminus selektiv entschützen zu können, ist der Einsatz von orthogonalen Schutzgruppen wesentlich. Die Aktivierung der Säurefunktion erfolgt mit Aktivierungsreagenzien, wie zum Beispiel DCC mit HOAt[126] als Katalysator, dem Carbodiimid EDC[127] oder PyBOP[128], sowie HATU[129]. Unter Hochverdünnung wird die Zyklisierung mit dem freien Amin iniziiert. Über die Jahre wurde eine Großzahl an Aktivierungsreagenzien entwickelt, um verschiedenem, geeignete Kupplungsbedingungen zur Verfügung zu haben. Auch bei den orthogonalen Schutzgruppen gab es einige Entwicklungen. Mit Allyl-, Benzyl-, Dmab- für den C-Terminus und Fmoc-, Boc- oder der Z-Schutzgruppe für den N-Terminus gibt es ausreichend, kommerziell erhältliche Bausteine, die Alternativen für eine hohe Flexibilität bieten. Als Limitierung sind die in der Sequenzlänge begrenzte Synthese linearer peptidischer Vorstufen[95] und die sehr hohen Verdünnungen zu nennen.[96]

2.3.1.2. Festphasenzyklisierungen

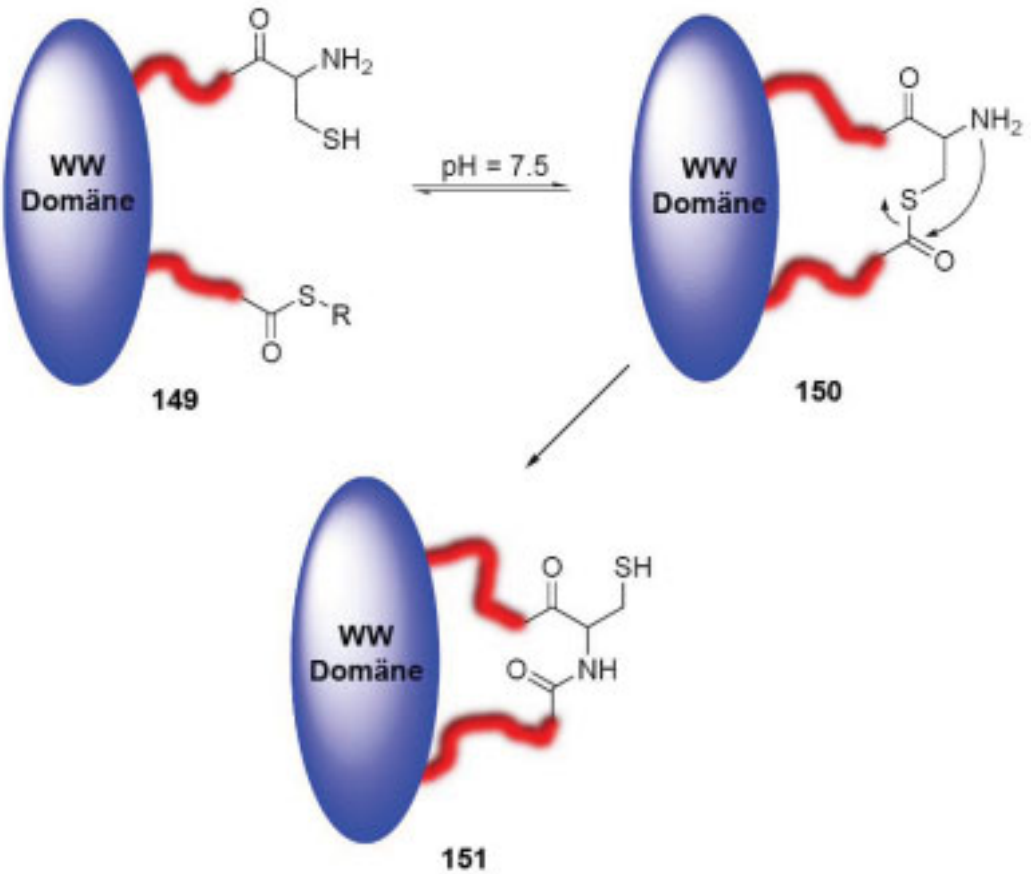
Die Peptide werden über eine Aminosäureseitenkette, wie zum Beispiel Asparaginsäure, am Harz immobilisiert.[130, 131] Im nächsten Schritt erfolgt die Zyklisierung über Aktivierungsreagenzien analog zur Reaktion in Lösung. Der entscheidende Vorteil bei der Makrozyklisierung auf der Festphase ist die Ausnutzung des Pseudoverdünnungseffekts.[132] Hierbei werden durch Immobilisierung hohe lokale Konzentrationen an Peptid erlaubt, ohne dass es zur Oligomerisierung kommt. Bei der Festphasenzyklisierung von Peptiden gab es vor allem entscheidende Entwicklungen bei den Harzen. Hierzu gehören das Kaiser-Oxim-Harz[133], oder Harze mit einem Arylhydrazid-Linker.[134] Auch safety-catch-Linker[135, 136] brachten für die Zyklisierung eine entscheidende Erweiterung.

2.3.2. Ligationen

2.3.2.1. Native Chemische Ligation

In vitro-Zyklisierung

Die Native Chemische Ligation in der Anwendung zur Zyklisierung von Peptiden und Proteinen bietet gegenüber herkömmlichen Strategien mit Aktivierungsreagenzien mehrere entscheidende Vorteile.[137] Die chemoselektive Methode ermöglicht eine Verknüpfung bei entschützten Aminosäure-Seitenketten und höheren Konzentrationen.[138, 139] Ein Beispiel ist die Zyklisierung von Proteindomänen, wie der WW Domäne eines menschlichen Yes Kinase verbundenen Proteins (YAP).[140, 141] WW Domänen (**149**) sind eine neuartige Klasse an Proteinmodulen, die in verschiedenen signalübertragenden und Zytoskelett relevanten Proteinen vorkommen. Muir et al. waren in der Lage durch die Rückgrat-Zyklisierung der WW Domäne **149** eine der natürlichen Form ähnliche und biologische aktive Form **151** zu generieren.[142] Eine schematische Darstellung ist in Schema 29 gezeigt.

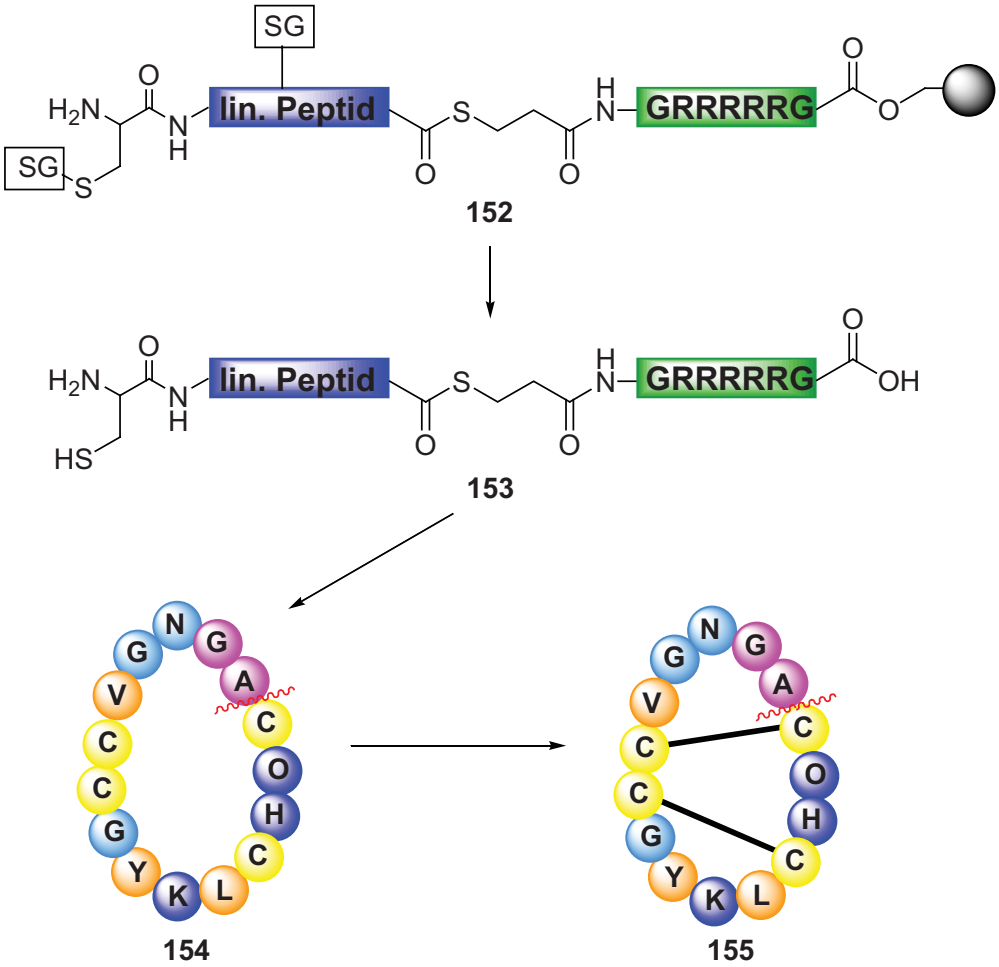


Schema 29: Zyklisierung der WW Domäne **149**

Zunächst kommt es zur Umesterung des C-terminalen Thioester mit dem N-terminalen Cystein. Durch einen S→N-Acyltransfer wird abschließend die irreversible Rückgrat-Zyklisierung (**151**) erhalten.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Zyklisierung linearer peptidischer Strukturen, bei denen für eine pharmazeutische Nutzung strukturelle Stabilität erforderlich ist.[143] Conotoxine, 10 bis 30 Aminosäuren lange Toxine, isoliert aus der Kegelschnecke, sind eine sehr interessante Verbindungsklasse.[144-146] Sie bieten ein breites Anwendungsspektrum bei Krankheiten, wie chronischen Schmerzen, Epilepsie, cardiovasculären Erkrankungen, psychiatrischen Störungen, Parkinson, Alsheimer und Krebs.[147-151] Die Stabilität ist durch zwei Disulfidbrücken gewährleistet, dennoch können Verbesserungen die Strukturen weiter optimieren.

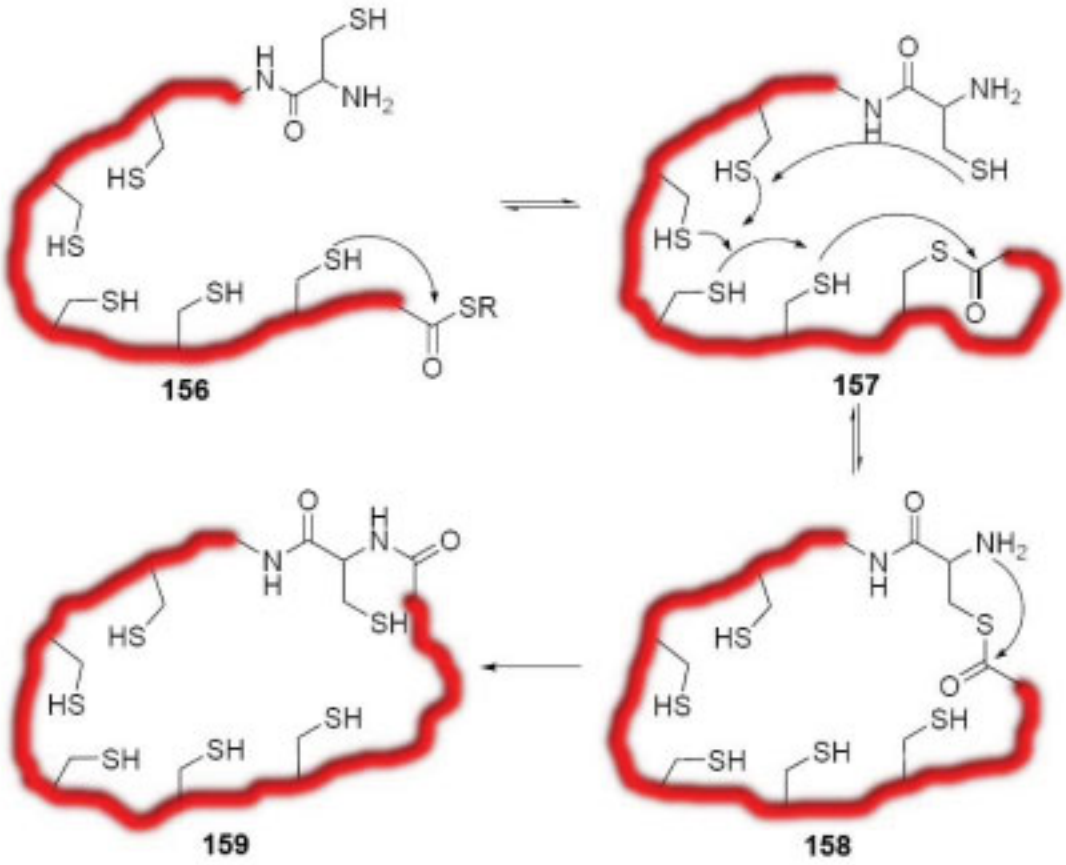
Das 13 Aminosäuren lange MrIA zeigt in seiner natürlichen Form zum Beispiel eine nicht zu erwartende geringe Stabilität.[152] 2006 konnten Craik et al. eine Stabilisierung der Struktur des MrIA über einen peptidischen Linker mit Zyklisierung zu **155** durch eine Native Chemische Ligation zeigen (Schema 30).[153]



Schema 30: Synthese des zyklischen Analogon des MrIA; rosa = Dipeptidlinker, Rote Linie = Verknüpfungsstelle

Als Linker fungieren Glycin und Alanin, die in die Sequenz integriert werden. Das Peptid **152** wird an der Festphase mit einem C-terminalen Thioester synthetisiert. Nach Abspaltung vom Harz erfolgt die Zyklisierung von **153** und in einem letzten Schritt werden die Cysteine oxidiert, um die Disulfidbrücken auszubilden.

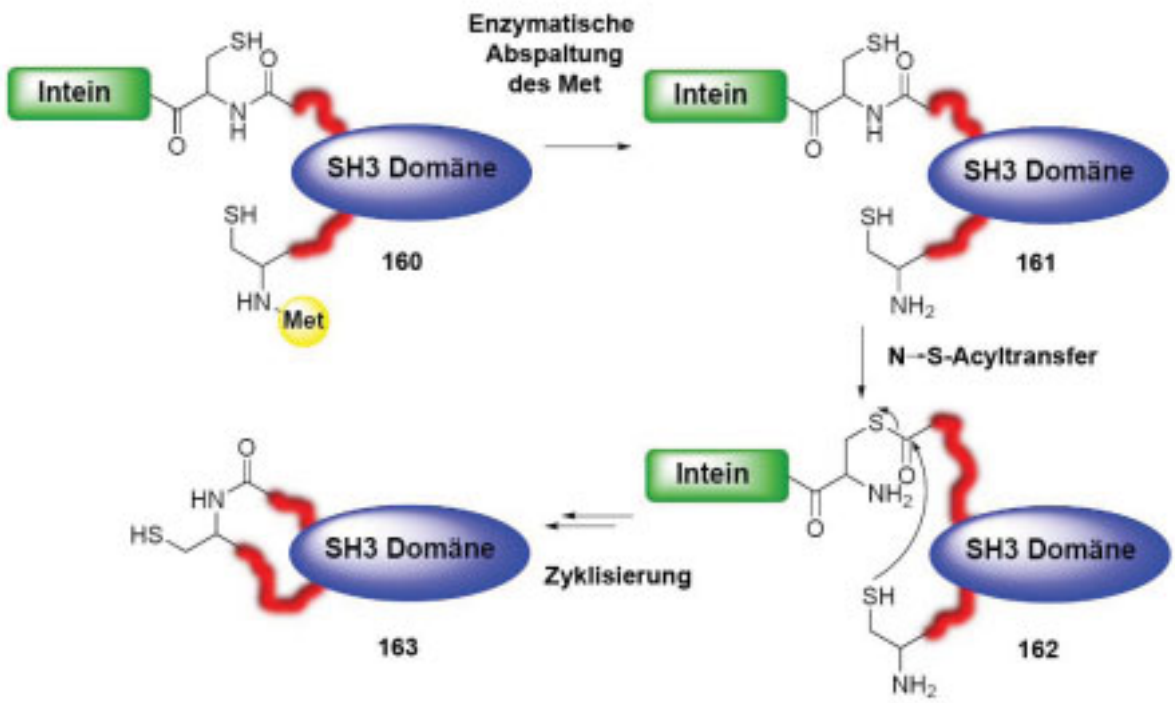
Eine mechanistisch interessante Variante der Zyklisierung mit NCL bieten die Cyclotide.[154] Es wird angenommen, dass der Mechanismus über eine sogenannte „Thia zip"-Reaktion verläuft.[27, 155] Hierbei helfen die Thiolseitenketten der Cysteine, wie in Schema 31 gezeigt, durch „Weiterreichung" des Thioesters zur Verknüpfung des C-Terminus mit dem N-Terminus. Abschließend erfolgt irreversibel der S→N-Acyltransfer und man erhält die Rückgrat-Zyklisierung (**159**). Auf diesem Weg wurden neben dem Kalata B1[156] auch das MCoTI-II[157, 158] oder Circulin[27] synthetisiert.



Schema 31: Zyklisierung der Cyclotide über „Thia zip"-Reaktion

Die Native Chemische Ligation fand außerdem Anwendung in den bereits in Kapitel 2.1.4.1 erwähnten Synthesen der „Head-to-Tail"- und der Seitenketten zyklisierten Struktur des Microcin J25.

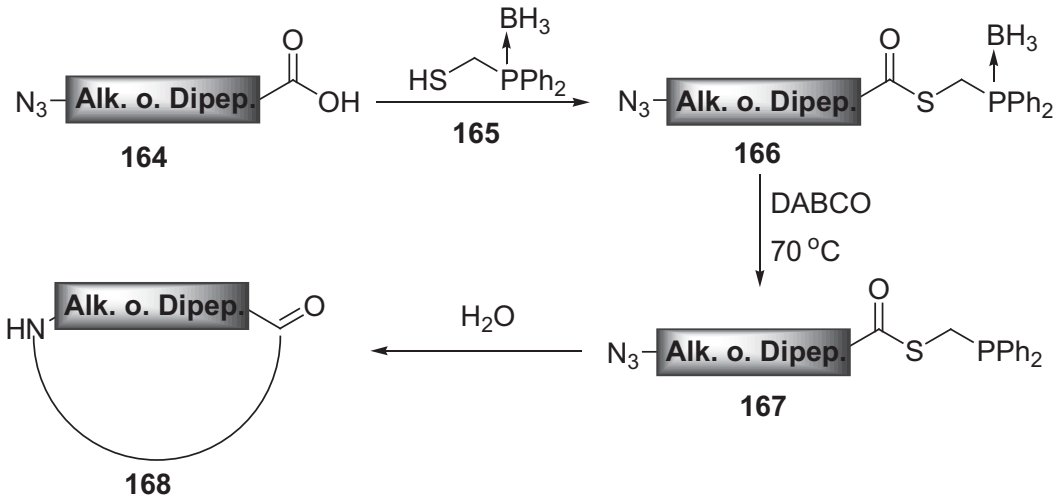
In vivo-Zyklisierung



Schema 32: *In vivo*-Zyklisierung der SH3 Domäne (**160**) über chemische Peptidligation

Die Möglichkeit der Einführung der reaktiven Gruppen in rekombinante Proteine eröffnet gleichzeitig die Chance für eine chemische Peptidligation *in vivo*.[159] Das N-terminale Cystein erhält man durch Protolyse eines Vorläuferproteins. In *E. coli* entfernt das Enzym Methionylaminopeptidase (MAP) Methionin vom Protein.[160] Die Effizienz ist dabei von der Aminosäurekombination abhängig, wobei die Spaltung der Methionin-Cystein-Bindung begünstigt ist. Der C-terminale Thioester wird hingegen durch Thiolyse eines entsprechenden Intein-Fusionsproteins erhalten. Bei einer Zyklisierung wird der Thiol Cofaktor nicht benötigt, wenn durch geringe Größe der Peptide oder durch die natürliche Faltung die reaktiven Gruppen nah beieinander liegen.[161] Ein Beispiel ist die von Muir et al. veröffentlichte Zyklisierung der SH3 Domäne **160** des c-Crk Adapterproteins in *E. coli*.[162] Schema 32 zeigt die Synthese, in der im ersten Schritt das Methionin enzymatisch abgespalten wird. Durch einen N→S-Acyltransfer am Intein entsteht der Thioester **162**, an den das N-terminale Cystein angreift und nach einem irreversiblen S→N-Acyltransfer erhält man das gewünschte Zyklisierungs-Produkt **163**.

2.3.2.2. Staudinger-Ligation



Schema 33: Staudinger-Zyklisierung

2003 konnten van Maarseveen et al. mit dem von Raines et al. etablierten Diphenylphosphinomethylthiol (**75**) als Linkersystem, Lactone und zyklische Dipeptide darstellen.[163] Der Mechanismus der Reaktion ist in Schema 33 gezeigt. Zunächst synthetisierten sie die entsprechenden Azide **164**. Im nächsten Schritt bildeten die freie Säurefunktion mit dem Boran-geschützten Diphenylphosphinomethylthiols (**165**) den Thioester **166**. Als Aktivierungsreagenzien wurden Carbodiimide verwendet. Durch Reaktion mit DABCO bei 70°C wurde das Phosphin entschützt, das intramolekular mit dem Azid über das Iminophosphoran abreagieren kann. Durch anschließende Hydrolyse erhielt man die gewünschte Amidbindung von **168**.

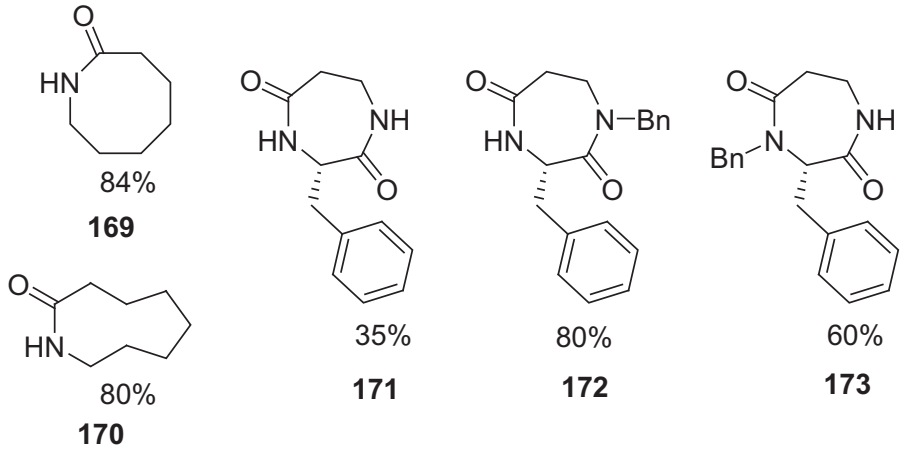


Abbildung 16: Zyklische Produkte

Die zyklischen Derivate (**169-173**) wurden in Ausbeuten von 35-84% erhalten (Abbildung 16). Bisher wurden jedoch lediglich Dipeptide zyklisiert. Zudem befanden sich keine funktionellen Gruppen in den Aminosäureseitenketten. Daher bleibt die Arbeit den Beweis schuldig, Anwendung in der Zyklisierung von größeren Peptiden und Proteinen zu finden. An dieser Stelle bietet sich dementsprechend noch ein enormes Entwicklungspotential.

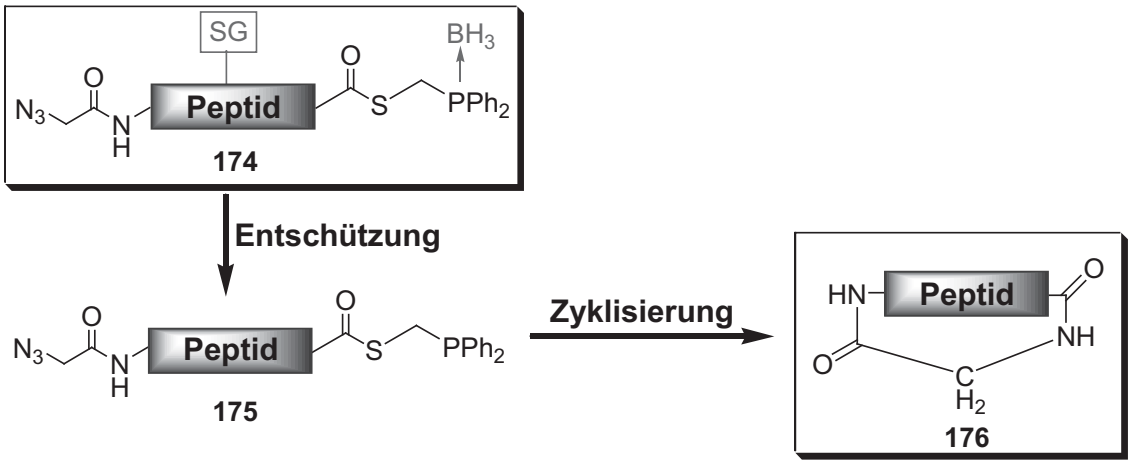
3. Aufgabenstellung

In Kapitel 2.1. wurde ein Überblick über das umfangreiche Gebiet zyklischer Peptide und Proteine gegeben. Ihr enormes Potential an biologischen Aktivitäten und ihre hohe Stabilität machen sie zu interessanten Targets für pharmazeutische Anwendungen. Deshalb besteht ein großes Interesse an synthetischen Werkzeugen, die die Synthese solcher Systeme vereinfachen oder gar erst ermöglichen.

Der in Kapitel 2.2. gezeigte Überblick über Synthesestrategien für Peptid- und Proteinstrukturen, sowie ihre Anwendung auf Zyklisierungen (Kapitel 2.3) zeigen, dass bis heute ein gutes Repertoire an Ligationsmethoden entwickelt wurde, dieses aber noch nicht genügend Flexibilität bietet.

Eine noch junge Ligationsmethode ist die spurlose Staudinger-Ligation. In der Zyklisierung von Peptiden und Proteinen fand sie bisher kaum Anwendung. 2003 publizierten van Maarseveen et al. eine Strategie zur induzierten Zyklisierung, in der sie Boran als Schutzgruppe für das Phosphin verwendeten und dieses basisch abspalteten.[165] Allerdings wurde die Methode bisher nur anhand der Zyklisierung von Dipeptiden durchgeführt. Gerade deshalb bietet die spurlose Staudinger-Ligation auch ein großes Potential zur Weiterentwicklung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine neue synthetische Methode für einen flexiblen Zugang zu zyklischen Peptiden (**176**) und Proteinen auf Basis der von van Maarseveen et al.[165] veröffentlichten Variante der spurlosen Staudinger-Ligation zu entwickeln.



Schema 34: Synthesestrategie

Zwei entscheidende Punkte spielten dabei eine Rolle. Es musste für das Phosphin eine Entschützungsstrategie entwickelt werden, die die Entschützung der Aminosäureseitenketten mit einbezieht. Dadurch käme die Bioorthogonalität der spurlosen Staudinger-Ligation erst zum Tragen. Der zweite Punkt ist die Übertragung der Kupplungsstrategie auf größere Peptidstrukturen. Erst die Makrozyklisierung bringt letztlich Erkenntnisse über die tatsächliche Flexibilität und Attraktivität der Methode. Zudem spielen bei zunehmender Größe des Systems Vorfaltungen und mögliche Vorkoordinationen eine immer größere Rolle. Durch diesen Aspekt gewinnt die Zyklisierung ungeschützter Peptid- und Proteinsysteme weiter an Attraktivität.

Ein mögliches Anwendungsgebiet bietet eine Synthese des 70 Aminosäuren langen Bacteriocin AS-48 und die Seitenketten-Zyklisierung des Microcin J25.

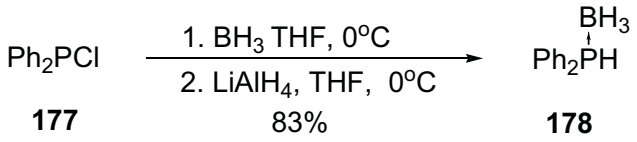
4. Spezieller Teil

Für die Staudinger-Zyklisierung wurde zunächst der benötigte Linker synthetisiert. Dieser wurden vor allem in Hinblick auf die Entwicklung einer Schutzgruppen- und Entschützungsstrategie ausgewählt. Die erhaltene Strategie wurde vor der eigentlichen Anwendung zunächst anhand von Modell-Studien etabliert. Anschließend erfolgte die Anwendung auf die Zyklisierung von Peptiden.

4.1. Linker

4.1.1. Linkersynthese und Azidoglycin

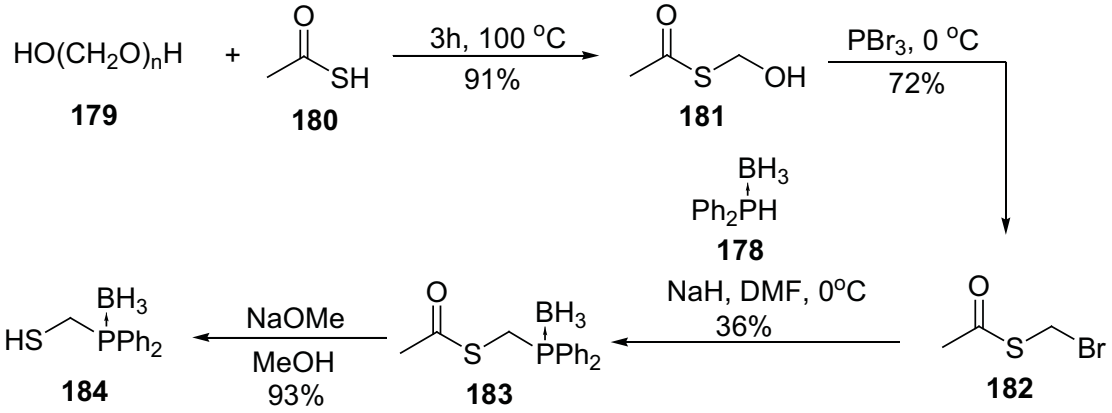
Für die Synthese des literaturbekannten arylischen Linkersystems Diphenylphosphin-(boran)methanthiol (**184**) wird zunächst das Diphenylphosphinboran (**178**) synthetisiert.[164] Hierzu wird Diphenylphosphinchlorid (**177**), wie in Schema 35 gezeigt, mit BH_3 geschützt und anschließend mit Lithiumaluminiumhydrid zum Phosphin **178** reduziert. Man erhält das gegen Oxidation geschützte Diphenylphosphin (**178**) in Ausbeuten von 83%.



Schema 35: Diphenylphosphinboran-Synthese

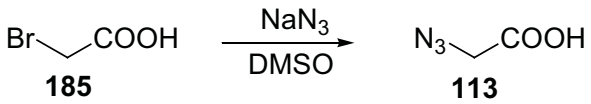
Für die weitere Synthese zum Diphenylphosphin(boran)methanthiol (**184**) wird Thioessigsäure (**180**) mit Formaldehyd (**179**) unter Rückfluss 3 h erhitzt und man erhält in sehr guten Ausbeuten von 91% das Hydroxymethylacetylsulfid (**181**), das bei 0 °C mit Phosphortribromid in 72% Ausbeute weiter zum Brommethylacetylsulfid (**182**) umgesetzt wird. Nachdem man das vorher synthetisierte Diphenylphosphinboran (**178**) mit Hilfe von Natriumhydrid bei 0 °C in DMF deprotoniert hat, greift dieses am Brommethylacetylsulfid (**182**) als Nukleophil an und man erhält das *S*-Acetyl(diphenylphosphino(boran))methylthiol (**183**), allerdings in mäßigen Ausbeuten von 36%. Diese Synthesestrategie wurde von Raines et al. etabliert.[97] Lediglich die Deacetylierung erfolgte entgegen dem von Raines et al. verwendeten Natriumhydroxid in Methanol mit Natriummethanolat. Dabei bietet das Methanolat mildere Abspaltbedingungen, sodass ein gleichzeitiges Abspalten der Boran-

Schutzgruppe vom Phosphin verhindert wird.[118] Die hier beschriebene Syntheseroute ist in Schema 36 gezeigt.



Schema 36: Synthese des Diphenylphosphino(boran)methanthiol (**184**)

Die Synthese des literaturbekannten Azidoglycin (**113**)[165], das als Reaktionspartner für die Staudinger-Ligation benötigt wird, ist in Schema 37 gezeigt. Bromessigsäure (**185**) wird bei Raumtemperatur mit Natriumazid in 100 mL DMSO über 12 h umgesetzt. Man erhält das Azidoglycin in 60 %iger Ausbeute.



Schema 37: Synthese des Azidoglycins (**113**)

4.2. Staudinger-Ligation in DMF

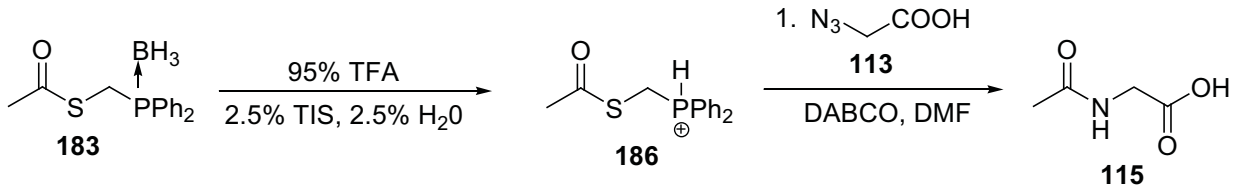
Die veröffentlichte Basen-induzierte Staudinger-Zyklisierung von van Maarseveen et al.[163] verwendet mit 70 °C hohe Temperaturen zur Abspaltung des Borans. Die von Raines et al.[97] optimierten Bedingungen für die Staudinger-Ligation benötigen zur Phosphinentschützung 40 °C.[166] Beide Gruppen nutzen dabei nicht die mögliche Chemoselektivität, da die Aminosäureseitenketten des synthetisierte Peptids nicht mitentschützt werden. Ein Verfahren, das Säure-induziert das Boran vom Phosphin abspaltet bei gleichzeitiger Entschützung der übrigen Schutzgruppen würde hingegen diese Chemoselektivität der Staudinger-Ligation nutzbar machen. Zudem wird ein Syntheseschritt gegenüber der basischen Syntheseroute gespart. Diese Entschützung wäre möglich, da bereits gezeigt wurde, dass Phosphinborane nicht stabil gegenüber Säure sind.[167, 168] Die saure Entschützung bietet damit die entscheidende Weiterentwicklung der von van Maarseveen et al. gezeigten Methode zum

Ringschluss,[163] vor allem im Hinblick auf bisher nicht gezeigte Zyklisierungen von größeren Peptiden oder Proteinen. Eine flexible und die Chemoselektivität nutzende Methode wäre in der Anwendung auf rekombinante Peptid- und Proteinstrukturen enorm wichtig. Zudem sollte es auch das höchste Ziel sein eine Möglichkeit der Verwendung im physiologischen Medium zu schaffen. Diese Gesichtspunkte könnten bei der hier postulierten Variante der Staudinger-Ligation aufgegriffen werden.

4.2.1. Optimierungsstudien für Reaktion in DMF

4.2.1.1. Studie mit Azidoglycin

Das Konzept der sauren Abspaltung des Boran-geschützten Phosphins wurde zunächst anhand eines niedermolekularen Modellsystems getestet. Hierbei sollte mittels acetyliertem Thiophosphin **183** die Acetylgruppe auf ein Azidoglycin (**113**) übertragen werden (Schema 38). Als Entschützungsbedingung wurde zunächst mit TFA:H_2O:TIS 95:2.5:2.5 ein für die Peptidabspaltung und -entschützung übliches System gewählt. Die Entschützung erfolgte unter Argonatmosphäre in 1 h. Anschließend wurde die überschüssige Säure mittels Hochvakuum entfernt. Nach Trocknung wurde der Rückstand in DMF gelöst und es wurden zur Deprotonierung mit zwei Äquivalenten DABCO eine sterisch gehinderte Base und das Azidoglycin (**113**) hinzugegeben. Die Reaktionspartner ließ man anschließend über 12 h bei RT reagieren.



Schema 38: Studie mit Azidoglycin (**113**)

Ergebnisse

In Abbildung 17 ist nun jeweils ein Ausschnitt des ^{1}H-NMRs zwischen 4.5-1.6 ppm gezeigt. Dabei wurde Reaktion zu den unterschiedlichen Schritten durchgeführt und diese mittels NMR untersucht. Die einzelnen Proben wurden dazu in DMF-d_7 gelöst und die Reaktion direkt im deuterierten DMF durchgeführt. Das rote Spektrum zeigt das acetylierte Thiophosphin-System nach der Abspaltung mit TFA und Trocknen am Hochvakuum. Man erkennt hier deutlich, dass nicht nur das Phosphoniumsalz (**186**) mit einer Verschiebung der CH_2-Protonen von 3.31 ppm, sondern in hohem Maße auch das freie Phosphin (**188**) vorliegt. Dessen CH_2-Protonen liegen dabei bei einer Verschiebung von 3.70 ppm.

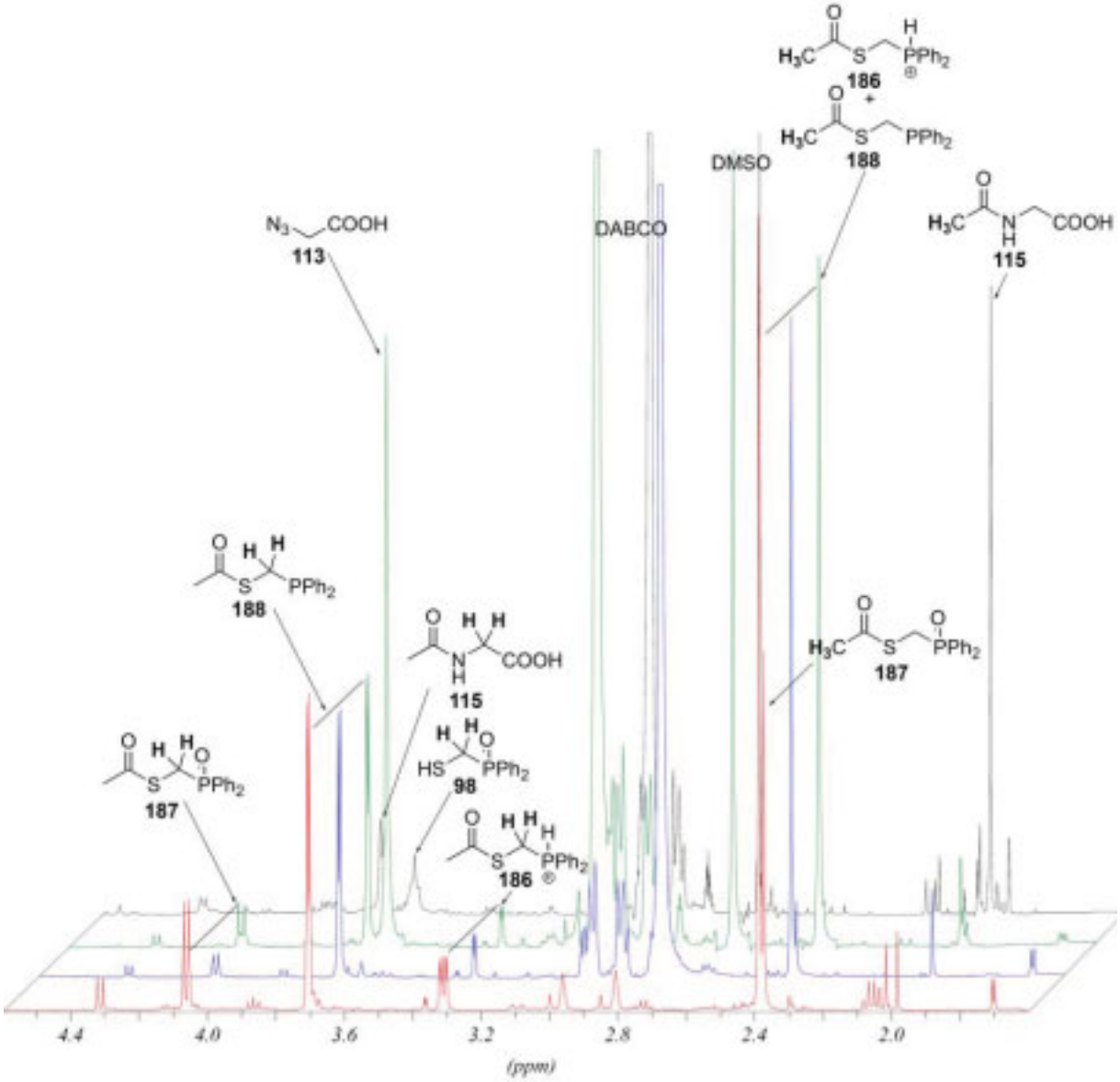


Abbildung 17: NMR-Studie zum Reaktionsverlauf mit Azidoglycin (**113**) (rotes Spektrum: **187**; blaues Spektrum: **187** + DABCO; grünes Spektrum: **187** + DABCO + Azidoglycin (**113**) nach 1h; schwarzes Spektrum: **187**+DABCO+ Azidoglycin (**113**) nach 12h)

Durch das Hochvakuum werden Reste der Säure vollständig entfernt und das gelöste Phophin ist fast neutralen Bedingungen ausgesetzt. Das Gleichgewicht verschiebt sich zur Seite des unprotonierten Phosphins (**188**). Dieser Umstand macht die Zwischenstufe deutlich anfälliger gegenüber Oxidation. Dies lässt sich auch anhand des Dubletts bei einer Verschiebung von 4.05 ppm im NMR-Spektrum verdeutlichen, das der CH_2-Gruppe des acetylierten Thiophosphinoxids (**187**) zugeordnet werden kann. Die dazugehörige CH_3-Gruppe findet man etwas Hochfeld verschoben bei 2.39 ppm.

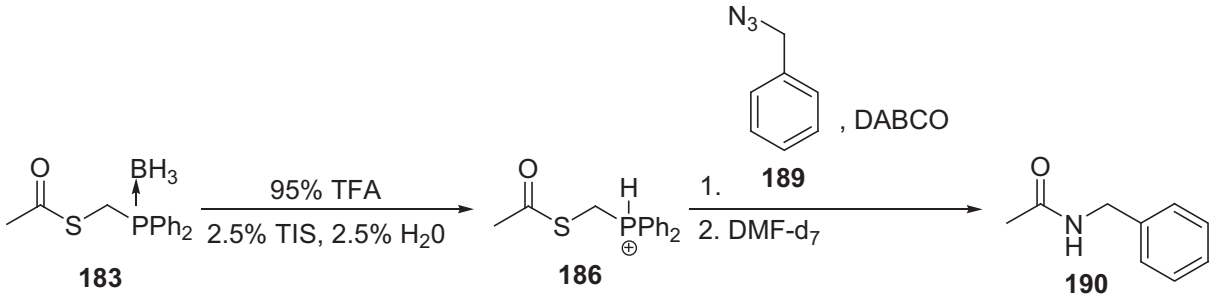
Löst man ein entschütztes acetyliertes Thiophosphin (**188**) direkt nach Trocknen im Hochvakuum in DMF-d_7 und gibt mit DABCO eine Base hinzu, so erhält man das in Abbildung 17 gezeigte blaue Spektrum. Man sieht einen Rückgang des protonierten Phosphins **186**, was sich anhand der CH_2-Gruppe bei einer Verschiebung von 3.31 ppm deutlich zeigt (Tabelle 4). Nach Entschützung, Lösen und der Zugabe von DABCO und Azidoglycin (**113**) zum Thiophosphin (**186**) erhielt man das grüne Spektrum nach 1h Reaktionszeit.

Tabelle 4: Verhältnis der Integrale der CH_2-Gruppe von **188** und **186**

Spektrum	Integrale	
	CH_2 (**188**)	CH_2 (**186**)
rot	2.00	1.89
blau	2.00	0.27
grün	2.00	0.23
schwarz	2.00	0.00

Man erkennt, dass noch keine Umsetzung erfolgt ist. Das Spektrum ist nahezu analog zum blauen Spektrum, wo noch keine Zugabe des Azids **113** erfolgte. Der Peak, bei einer Verschiebung von 3.64 ppm gehört zu den CH_2-Protonen des Azidoglycins (**113**). Nach 12 h Reaktionszeit ist das acetylierte Glycin (**115**) entstanden. Im schwarzen Spektrum der Abbildung 17 ist das Signal der CH_3-Protonen der Acetylgruppe bei 2.39 ppm Hochfeld verschoben auf 1.97 ppm. Dieses gehört zur Acetylgruppe des *N*-Acetylglycin (**115**). Dessen CH_2-Protonen lassen sich bei einer Verschiebung von 3.74 ppm finden. Die CH_2-Protonen des enstandenen Thiophosphinoxids **98** sind im Vergleich zum Phosphin **188** etwas Hochfeld verschoben und liegen bei 3.64 ppm. Diese Verschiebung fällt mit dem Signal des Azidoglycins (**113**) und dem DMSO zusammen. Das Signal des DMSO stammte aus der Herstellung des eingesetzte Azids **113**, dabei konnte das DMSO nicht vollständig entfernt werden. Deshalb konnte kein genauer Umsatz bestimmt werden.

4.2.1.2. Studie mit Benzylazid



Schema 39: Testreaktion zur Relevanz einer Base mit Benzylazid

Als Konsequenz der Ergebnisse in Kapitel 4.3.1.1. wurde entschieden, für die Testreaktionen zunächst ein weiteres Azid zu wählen. Hierfür wurde das Benzylazid (**189**) ausgesucht (Schema 39), da dessen Verschiebungen deutlich Tieffeld verschoben zu den anderen relevanten Signalen erscheinen sollten. Gleiches gilt für die Verschiebungen der Protonen des *N*-Acetylbenzylamins (**190**). Es wurden zwei Reaktionen zur Entschützung mit TFA 1 h gerührt und anschließend die Säure am Hochvakuum entfernt. Beide Reaktionen wurden in DMF-d_7 wieder gelöst. Es wurde jedoch nur in einem Fall DABCO und Benzylazid (**189**) hinzugefügt und 12 h gerührt. Die zweite Reaktion wurde parallel ohne Zugabe von Reagenzien gerührt.

Ergebnisse

Ausschnitte der erhaltenen ^{1}H-NMR-Spektren aus den jeweiligen Reaktionen sind in Abbildung 18 gezeigt. Das rote Spektrum gehört zur Entschützung von **183** und das schwarze Spektrum zur Umsetzung von entschütztem Phosphin **186** zu **190** bei Zugabe von Base und Azid **189**. Man erkennt bei dieser Reaktion, dass sie ohne Nebenprodukte abläuft und das Benzylamid (**190**) bei vollständigem Umsatz des Benzylazids (**189**) erhalten wird. Die CH_2-Protonen des Benzylazids (**189**) kommen in DMF bei 4.55 ppm. Dieser Bereich ist aus Gründen der Übersicht nicht mehr mit abgebildet. Das acetylierte Thiophosphin **188** wird gleichzeitig zum Thiophosphinoxid **98** umgesetzt. Das Signal bei einer Verschiebung von 3.64 ppm kann den CH_2-Protonen von **98** zugeordnet werden. Ebenso sind die Protonen der Acetyl-Gruppe von 2.39 ppm für das *S*-Acetylthiophosphin zu 2.04 ppm vollständig Hochfeld verschoben. Bei der Entschützung des Phosphins **183** ist hingegen ein größerer Anteil des entschützten Phosphins oxidiert. Die jeweiligen Peaks des Phosphinoxids **187** sind bei 4.05 ppm für die CH_2- und bei 2.37 ppm für die Protonen der Acetyl-Gruppe zu finden.

Außerdem liegt, wie bereits oben gezeigt, das entschützte Phosphin **188** teilweise protoniert als Phosphoniumsalz **186** vor.

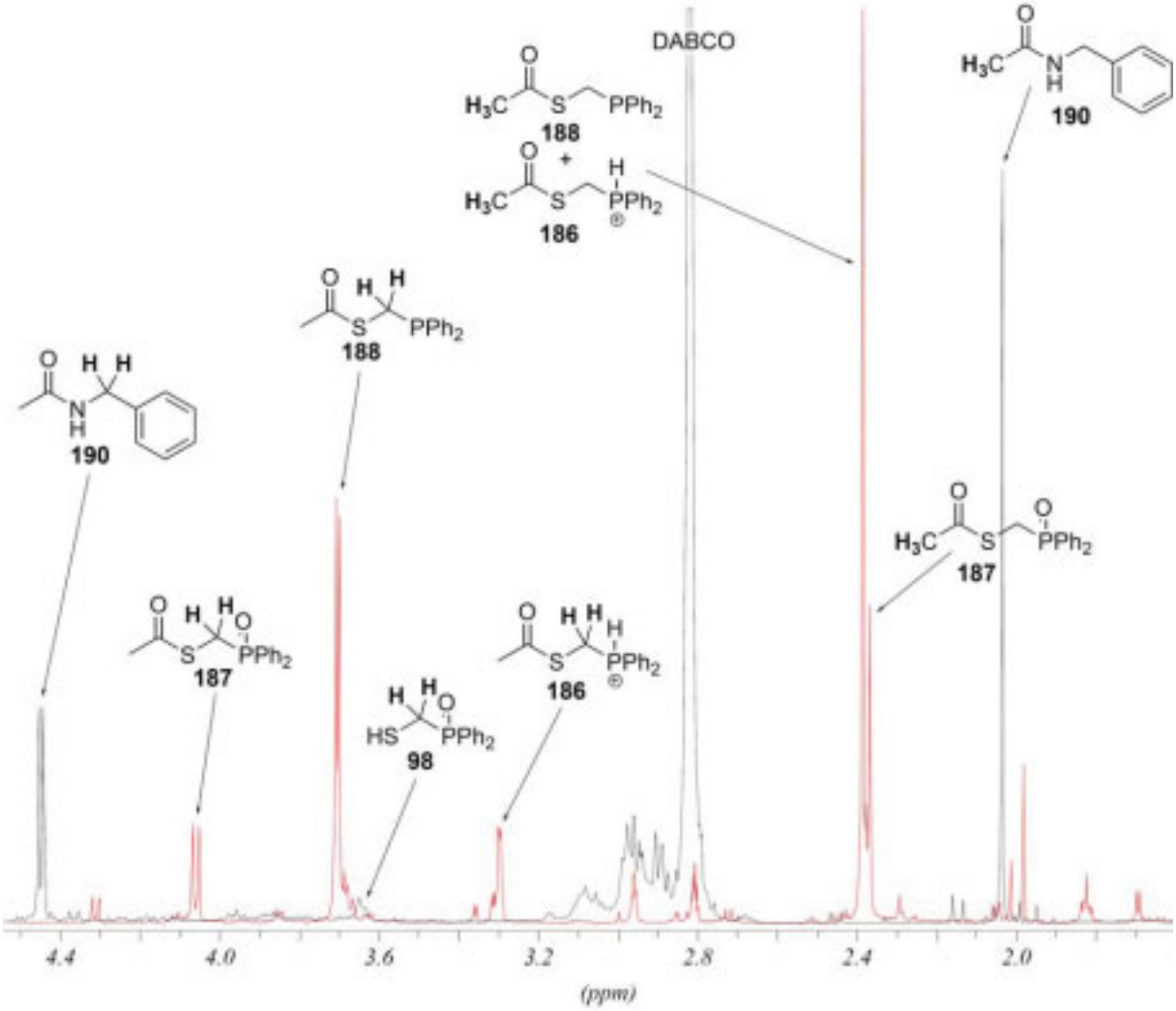
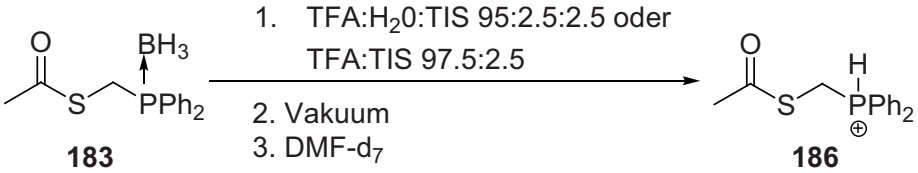


Abbildung 18: NMR-Spektren zur Testreaktion mit Benzylazid (rotes Spektrum: entschütztes Phosphin (**187**); schwarzes Spektrum: Umsetzung zum *N*-Acetylbenzylamin (**190**)

4.2.1.3. Abspaltbedingungen



Schema 40: Optimierung der Abspaltbedingungen

Um auszuschließen, dass der Abspaltcocktail aufgrund der enthaltenen 2.5% H_2O ein Oxidationsrisiko darstellt, wurde eine Testreihe zu den Abspaltbedingungen durchgeführt

(Schema 40). Zwei Testreaktionen wurden mit unterschiedlichen Abspaltbedingungen gemacht. Dabei wurde in einer Reaktion die schon zuvor verwendete Abspaltlösung mit TFA:H_2O:TIS 95:2.5:2.5 eingesetzt. In der anderen Reaktion wurde ein Abspaltcocktail bestehend aus 97.5% TFA und 2.5% TIS gewählt. Bei beiden Reaktionen wurde das geschützte *S*-Acetylthiophosphin (**183**) 1 h mit dem jeweiligen Abspaltcocktail gerührt und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Die erhaltene Rückstände wurden in DMF-d_7 gelöst und mittels NMR vermessen.

Ergebnisse

Ausschnitte der dazugehörenden ^{1}H-NMRs sind in Abbildung 19 gezeigt.

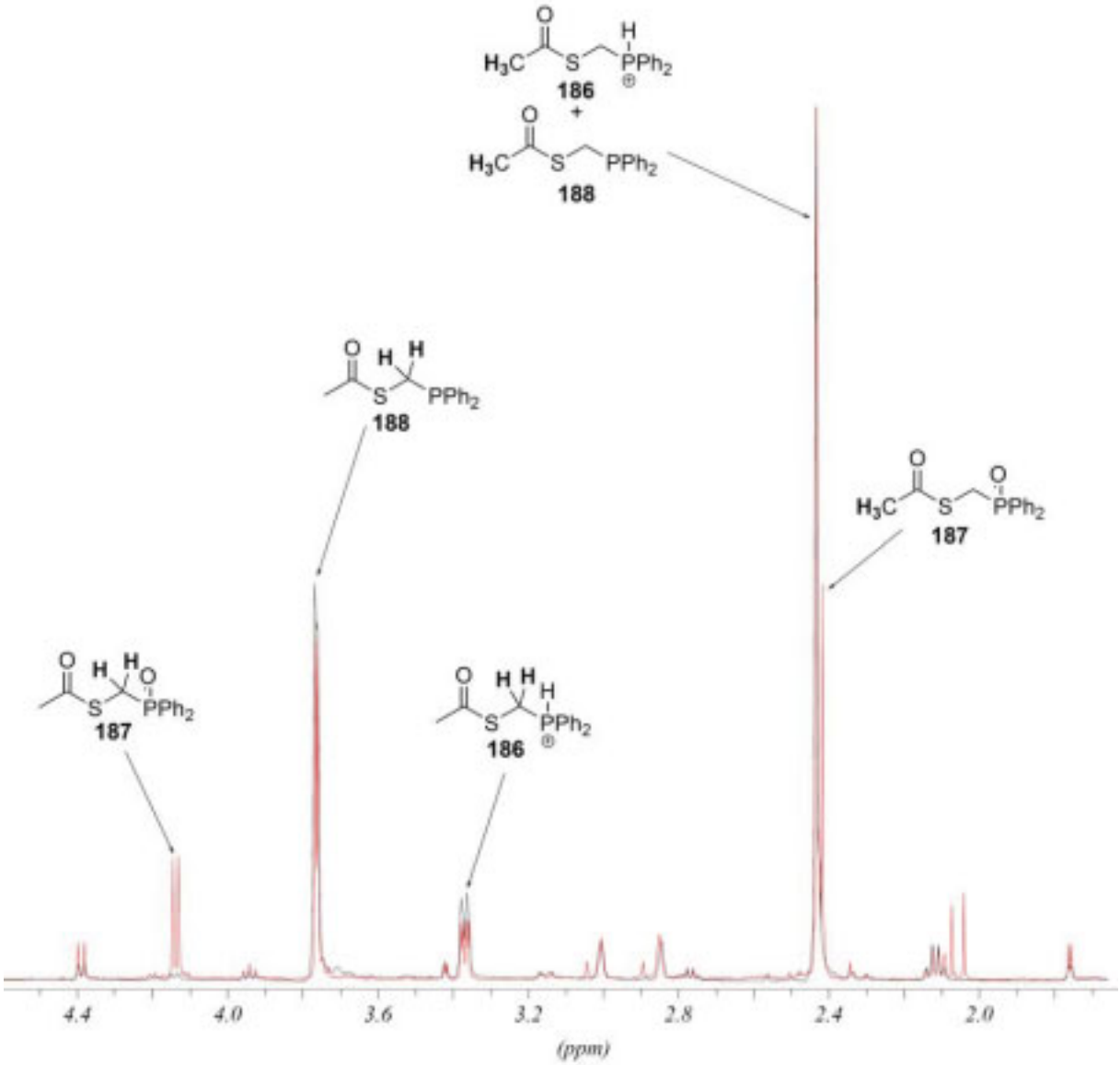


Abbildung 19: Vergleich der Abspaltungen mit TFA:TIS:H_2O 95:2.5:2.5 (rotes Spektrum) und TFA:TIS 97.5:2.5 (schwarzes Spektrum)

Das in rot gezeigte Spektrum gehört dabei zur Reaktion mit TFA:H_2O:TIS 95:2.5:2.5, während das schwarze Spektrum zur Probe, die mit TFA:TIS 97.5:2.5 behandelt wurde, gehört. Unter den Abspaltbedingungen mit H_2O ist mit einem Dublett der CH_2-Protonen bei einer Verschiebung von 4.05 ppm und einem Singulett der Acetyl-Gruppe bei 2.37 ppm das *S*-Acetylthiophosphinoxid (**187**) entstanden. Im Gegensatz dazu konnte **187** durch den Wechsel des Abspaltcocktails zu TFA:TIS 97.5:2.5 völlig eliminiert werden. Unter beiden Bedingungen besteht, wie auch in den bisherigen Reaktionen, ein Gleichgewicht zwischen dem Phosphoniumsalz **186** und dem unprotonierten Phosphin **188**.

4.2.1.4. Aufklärung der entstehenden Borverbindungen

Des weiteren ist für den Erfolg der Ligations-Methode im Bezug auf die spätere Anwendung auf Peptid- und Proteinsysteme ganz wesentlich, welche Borprodukte durch die saure Entschützung des Phosphins entsteht. Reaktive Borverbindungen im Peptid- oder Proteinsystem wären in der Lage mit verschiedenen funktionellen Gruppen Reaktionen einzugehen und diese beispielsweise zu reduzieren. Deshalb wurde mittels ^{11}B-NMR der Charakter des Bors in den unterschiedlichen Reaktionsstufen untersucht. Hierzu wurde zunächst das geschützte Diphenylphosphin(boran)methylthioacetat (**183**) über ^{11}B-NMR vermessen. Die Entschützung im Fall des freien Phosphins **188** wurde dabei analog den vorigen Reaktionen durchgeführt. Das Diphenylphosphin(boran)methylthioacetat (**183**) wurde mit TFA über 1 h entschützt, die Säure am Hochvakuum entfernt und der Rückstand in DMF-d_7 aufgenommen. Zusätzlich wurde DABCO als Base zugesetzt.

Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass sich aus dem zunächst tetrakoordinierten Phosphinboran ein trikoordiniertes Borat bildet. In Abbildung 20 sind die ^{11}B-Spektren gezeigt. Das linke Spektrum gehört zum geschützten *S*-Acetylthiophosphinboran (**183**), dessen Peak bei -26.1 ppm liegt. Die charakteristische Verschiebung zeigt, dass es sich um ein tetrakoordiniertes Bor handelt.[169, 170] Mit der Multiplizität eines Dublett vom Quartett zeigt sich die Kopplung zum einen mit dem Phosphor und zum anderen zu den 3 Protonen des Borans. Diese Zuordnung lässt sich auch eindeutig mit Entkopplungsexperimenten stützen. Im Gegensatz dazu zeigt die Tieffeld-Verschiebung des Peaks zu 7.60 ppm im rechten Spektrum, dass es sich hier um eine trikoordinierte Borverbindung handelt, da diese Verschiebung wiederum charakteristisch für trikoordinierte Borate ist.[169, 170]

Entkopplungsexperimente konnten außerdem zeigen, dass keine Koordination zum Phosphor mehr vorliegt.

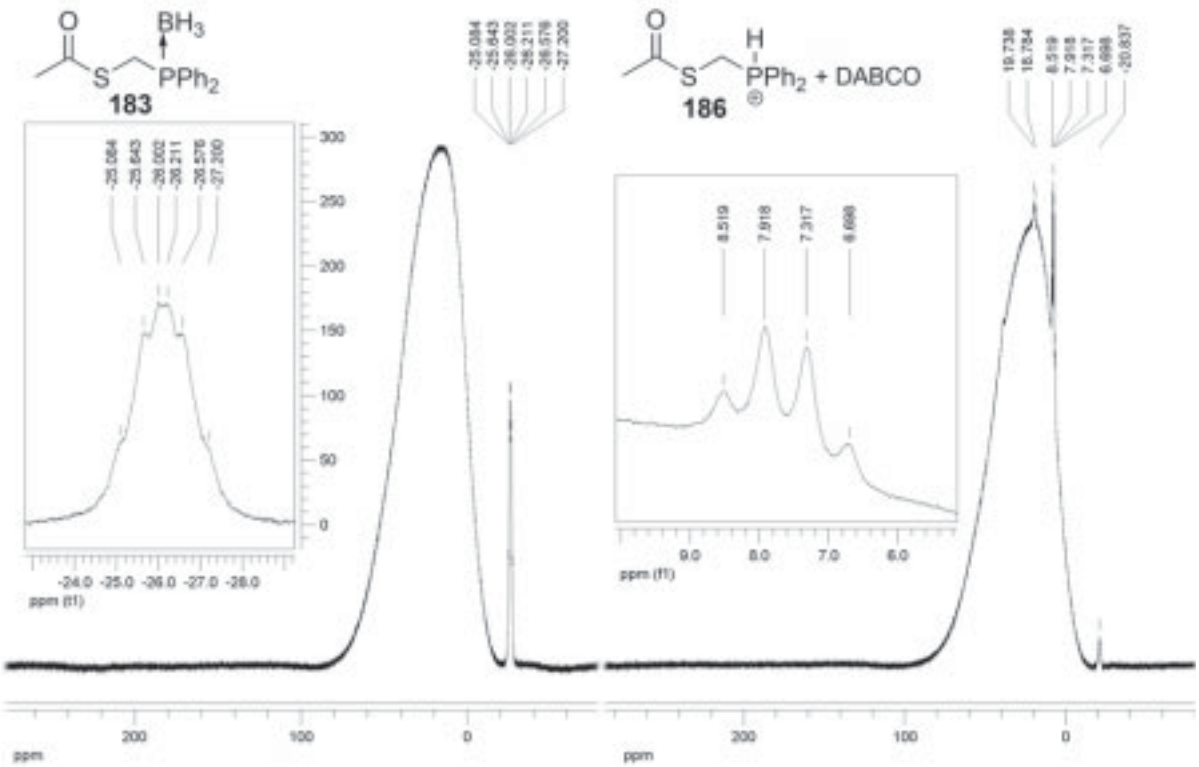


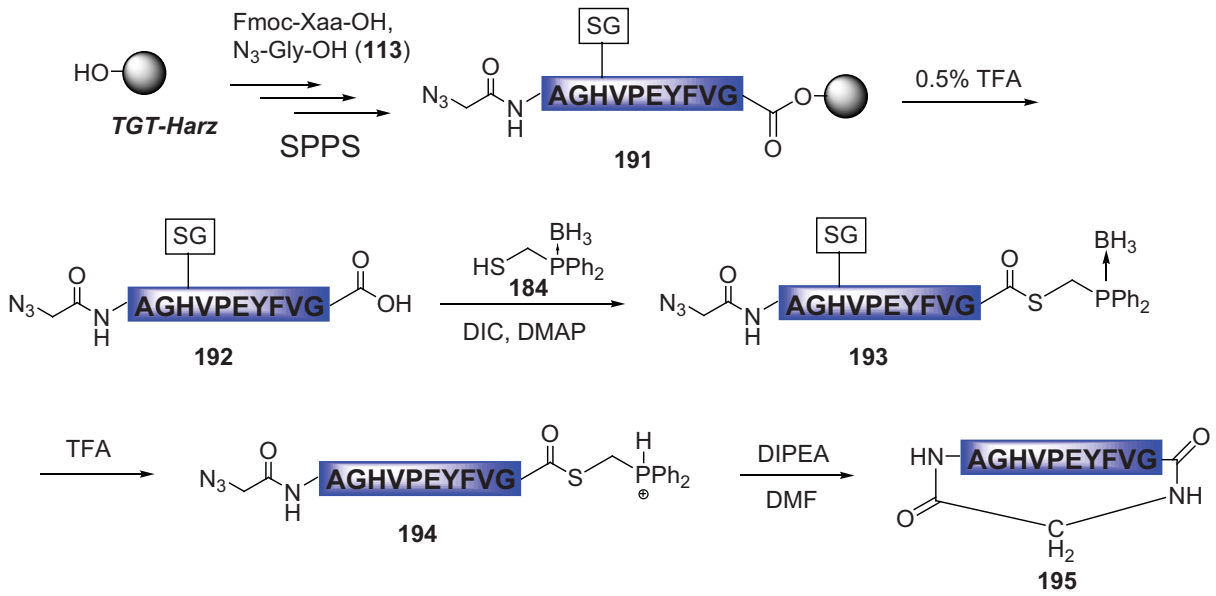
Abbildung 20: ^{11}B- Spektren des geschützten und des entschützten *S*-Acetylthiophosphins

4.2.2. Anwendung auf die Peptid-Zyklisierung in DMF

Anhand der Studien des Acetyltransfers auf Azidoglycin und Benzylazid konnte die Anwendbarkeit dieser neuen Variante der induzierten Staudinger-Ligation gezeigt werden. Durch die Optimierung der Abspaltbedingungen und dem Nachweis, dass durch die Abspaltung ein unreaktives Borat entsteht, sollten die Reaktionsbedingungen auf die Zyklisierung von Peptiden angewendet werden. Als geeignete Modellsequenz zur Zyklisierung wurde mit den Aminosäuren 1-11 des Microcin J25 ein Teil einer biologisch relevanten Struktur ausgewählt. Diese Teilsequenz enthält den in der natürlichen Struktur zyklisierten Abschnitt Gly^1-Glu^8 des Peptids. Die Erkenntnisse aus den Testreaktionen mit den niedermolekularen Modellsystemen wurden auf das peptidische System angewendet.[171]

Die Synthese beginnt, wie in Schema 41 gezeigt, mit der Festphasensynthese des Azidopeptids **191** unter Standard-Fmoc-Bedingungen auf einem säurelabilen TGT®-Harz. Das synthetisierte Peptid wurde anschließend mit 0.5% TFA von der Festphase abgespalten. Die Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten bleiben dabei intakt, sodass am frei werdenden

C-Terminus mit DIC als Kupplungsreagenz der Thioester **193** mit **184** hergestellt werden konnte.



Schema 41: Zyklisierung des Microcin J25-Baustein (AS 1-11)

Man erhielt das Azidopeptid-Thioester-Derivat **193** ohne weitere Aufreinigung. Dieses ließ sich mittels LC-MS charakterisieren. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe von 97.5%iger TFA das Boran bei gleichzeitiger Entschützung der Aminosäureseitenketten abgespalten. Das erhaltene Phosphoniumsalz **194** wurde nach Ausfällen in Diethylether direkt in DMF gelöst. Durch die Zugabe von DIPEA wurde das Phosphin deprotoniert und so die Zyklisierung induziert. Die Reaktion lief unter Rühren bei RT über 12 h. Anhand dieser Syntheseroute wurden zur Etablierung der Methode verschiedene Peptidsequenzen zyklisiert.

4.2.2.1. Ergebnisse

Die jeweiligen Zwischenstufen der Synthese sind stabil und können durch LC-MS charakterisiert werden. Der Thioester **193** ist die erste charakterisierte Stufe. Das dazugehörigen HPLC-Spektrum mit seiner Masse ist in Abbildung 21 gezeigt. Die einzige Verunreinigung ist der Rest des freien Thiols, des im Überschuss (1.5 Äquivalente) eingesetzten Phosphinbaustein **184**.

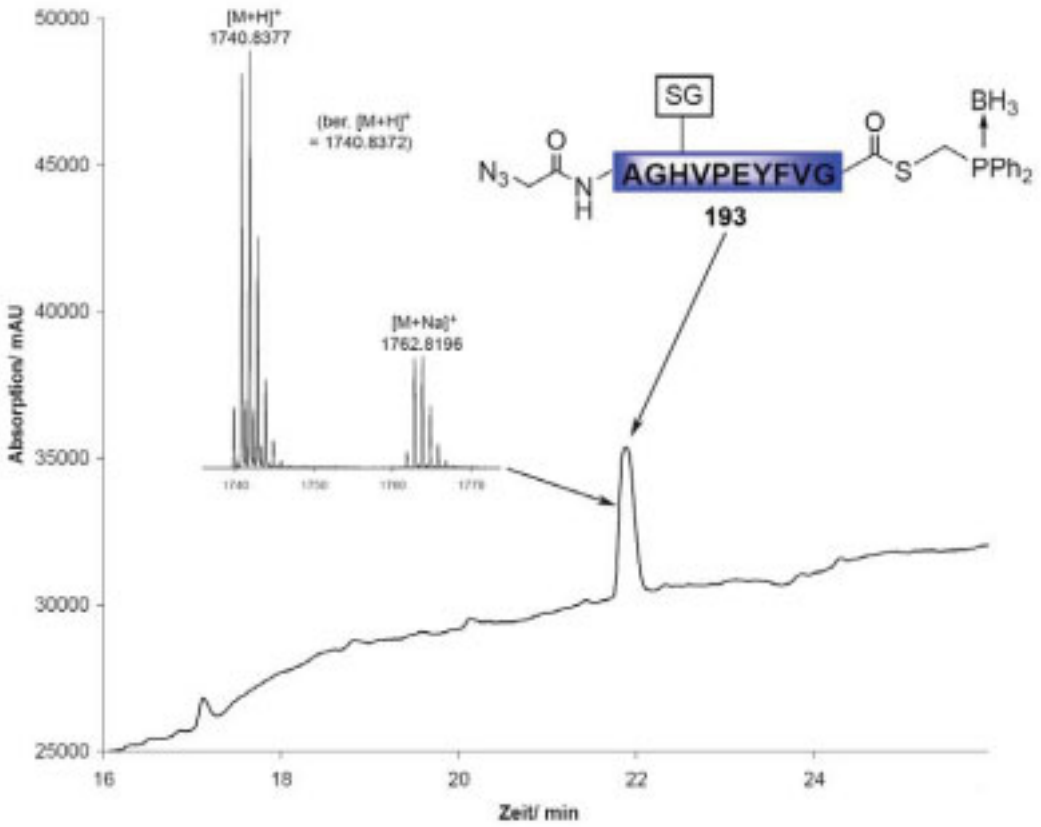


Abbildung 21: LC-MS des geschützten Azidopeptid-Thioester-Derivat

Im nächsten Schritt nach der Entschützung wird auch das erhaltene Phosphoniumsalz **194** über LC-MS charakterisiert (Abbildung 22). Dieser Reaktionsschritt führte zum gewünschten Produkt. Lediglich das aus der Thioestersynthese im Überschuss eingesetzte Thiol **196** ist als separater Peak zu erkennen.

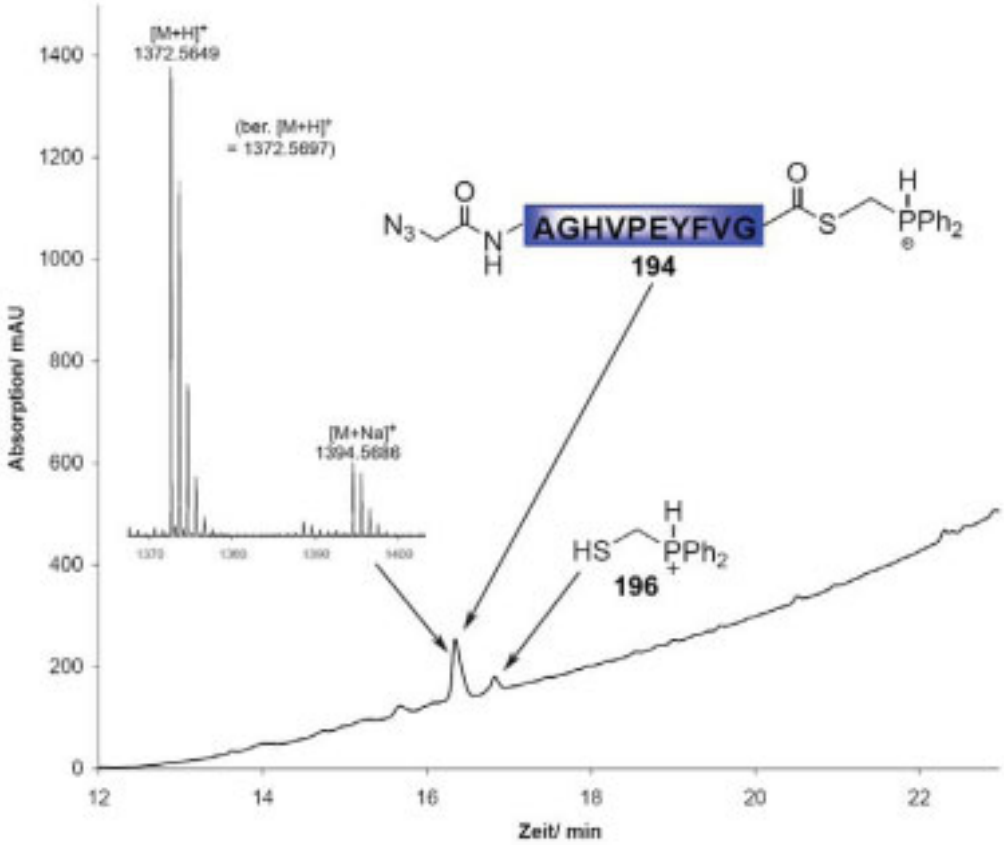


Abbildung 22: LC-MS des Peptidthioester-Phosphoniumsalzes **194**

Abbildung 23 zeigt das HPLC-Rohspektrum der Zyklisierung des entschützten Peptidderivats mit der Sequenz GAGHVPEYFVG (**195**). Nach Aufreinigung über reversed-phase HPLC erhält man das gewünschte zyklische Peptid in einer Ausbeute von 36%.

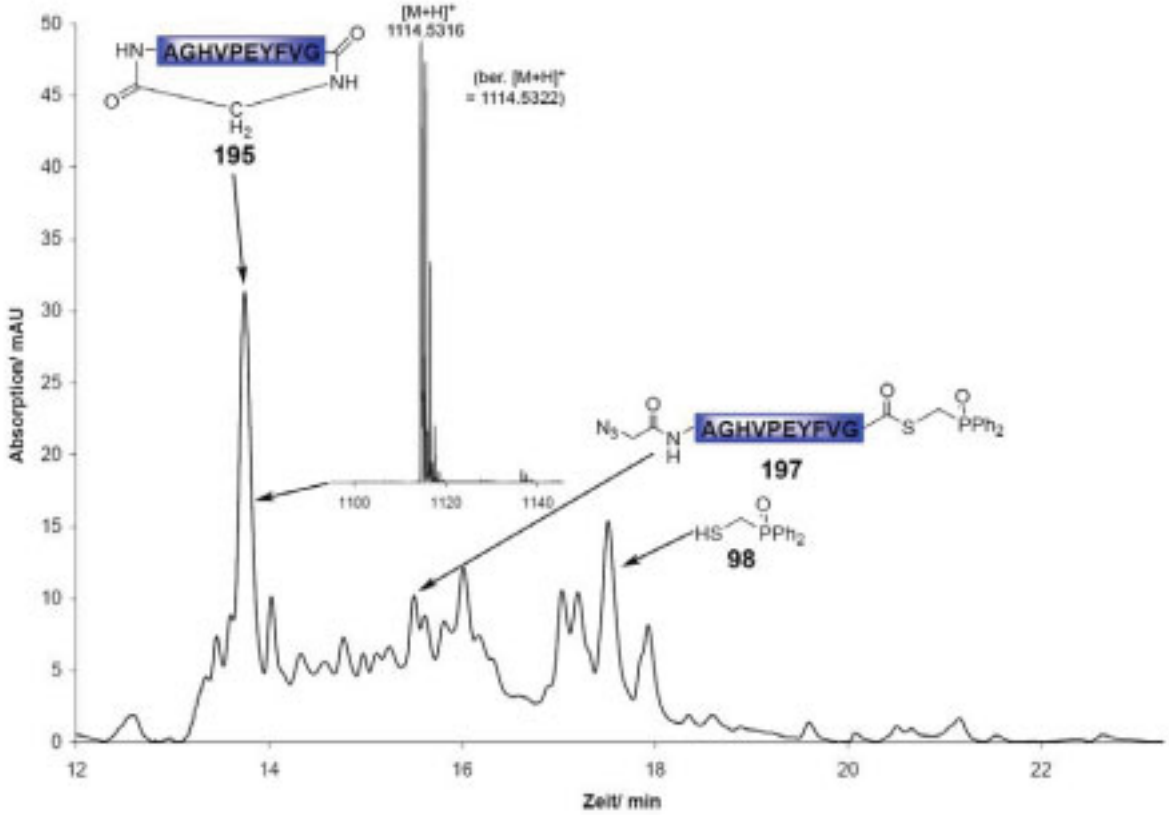


Abbildung 23: LC-MS-Rohspektrum der Staudinger-Zyklisierung

Zur Methodenetablierung wurden weitere Peptide zyklisiert und aufgereinigt. Die Ausbeuten wurden auf der Basis kalkuliert, dass bei der Abspaltung mit 0.5%iger TFA vom TGT®-Harz 35% Peptidmaterial erhalten werden. Die verwendeten Modellsequenzen sind detailliert mit den jeweiligen Ausbeuten in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Reaktionsausbeuten in DMF

Zyklische Peptide	Ausbeute/ %
zykl.-GAGHVPEYFVG (**195**)	36
zykl.-GGIVPQFYFAG (**198**)	31
zykl.-GIGTPISFYGG (**199**)	20
zykl.-GAGHVPEYFVGIGTPISFYGG (**200**)	12
zykl.-GAGRVPEYFVG (**201**)	11
zykl.-GGEHEEKYYEG (**202**)	-*

*konnte aufgrund des zu geringe Umsatzes zum Produkt präparativ nicht aufgereinigt werden

Der Fokus lag in diesen Studien vor allem darauf, ein möglichst breites Spektrum an funktionellen Gruppen in den Aminosäureseitenketten abzudecken. So wurden nicht nur hydrophobe Aminosäuren verwendet, sondern zum Beispiel auch hydrophile ungeladene Aminosäuren wie Glutamin. Auch das ganze Spektrum an Aminosäuren mit Alkoholfunktionalität wurde mit Serin, Threonin und Tyrosin abgedeckt. Es konnte gezeigt werden, dass von Lysin und Arginin abgesehen, die Staudinger-Zyklisierung ein großes Spektrum an funktionellen Gruppen toleriert. Lediglich bei der Sequenz zykl.-GIGTPISFYGG (**199**) liegt die Ausbeute mit 20% etwas unterhalb des Mittels. Dieses Peptid ist der zweite Teil des Microcins J25, der als linearer Schwanz in der natürlich vorkommenden Struktur vorliegt.

Auch eine Anwendung der Methode zur Zyklisierung noch größerer Peptide war erfolgreich. In Abbildung 24 ist die Synthese der head-to-tail-Struktur des Microcins J25 (**204**) gezeigt. Diese Form des Microcin J25 entspricht allerdings nicht der biologisch relevanten Struktur. Die Ausbeute liegt bei 12%. In keiner der Zyklisierungen konnten intermolekulare Verknüpfungen nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen kooperativen Prozess hin.

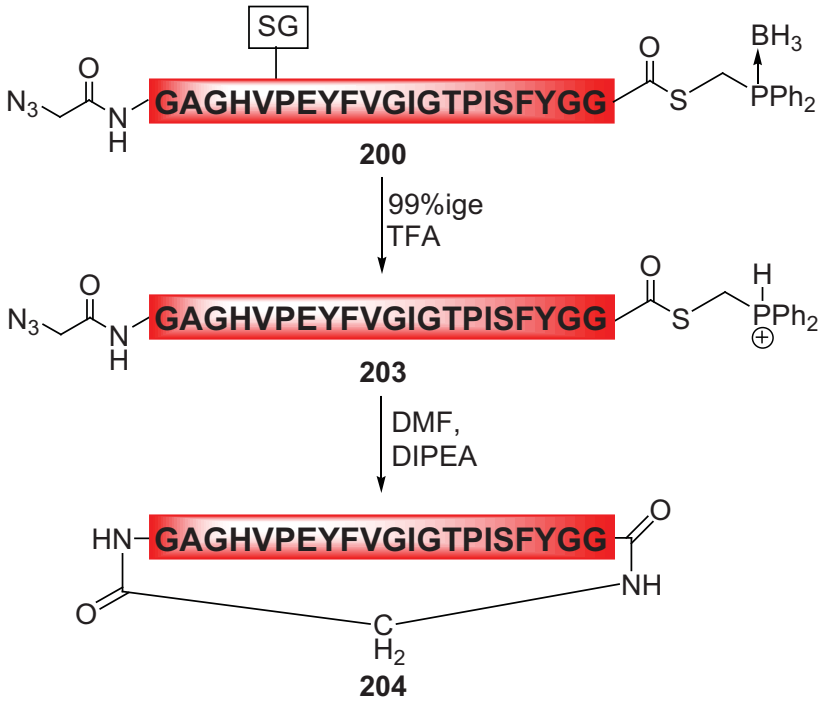


Abbildung 24: Head-to-tail-Zyklisierung des Microcin J25 (**200**)

Die Zyklisierung von Lysin- oder Arginin-haltigen Peptiden sind problematisch. Durch deprotonierte Amine oder Guanidingruppen kommt es zu Nebenreaktionen. Ein nukleophiler Angriff am Thioester konnte jedoch nur bei der Aminfunktion der Lysinseitenkette

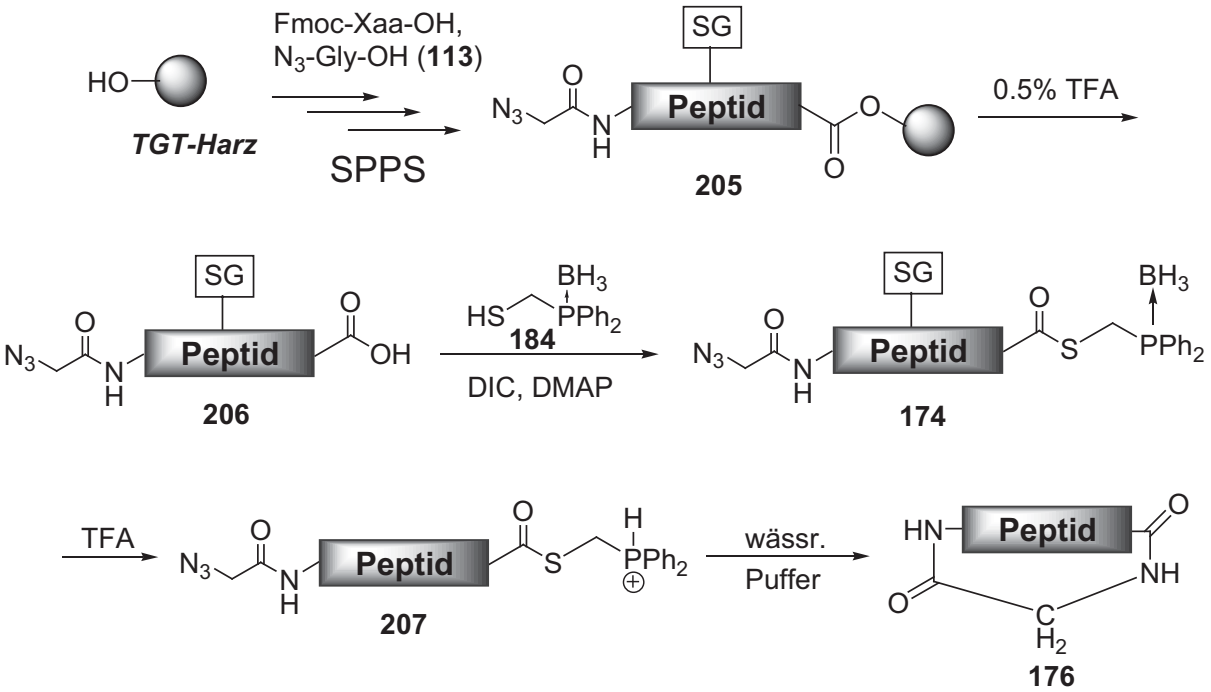
nachgewiesen werden. Die übrigen Nebenprodukte, die sowohl bei Lysin- als auch bei Arginin-haltigen Peptiden auftreten, konnten nicht identifiziert werden. Das Arginin-Peptid GAGRVPEYFVG (**201**) konnte mit 11% Ausbeute erhalten werden, während der Umsatz bei dem Lysin-Peptid GGEHEEKYYEG (**202**) so gering war, dass eine präparative Aufreinigung nicht mehr erfolgreich war. Anhand der pK_s-Werte lässt sich zusätzlich der Grad der Deprotonierung abschätzen. Mit 13 liegt der pK_s-Wert der Seitenkette des Arginins sehr hoch, dadurch ist die Wahrscheinlichkeit einer Deprotonierung geringer als bei Lysin jedoch ausreichend für eine schlechte Ausbeute. Das Lysin mit seinem pK_s-Wert der Seitenkette von ca. 11 bietet im hier basischen Milieu ein wesentlich größeres Potential für Nebenreaktionen. Aufgrund der Basenzugabe muss diese neue Variante der Staudinger-Zyklisierung in DMF als nicht vollständig bioorthogonal gewertet werden. Eine Möglichkeit dieses Problem zu reduzieren oder gar zu eliminieren würde eine genaue pH-Einstellung bieten. Diese ist jedoch nur in einem wässrigen Milieu möglich. Die bisher erhaltenen Ergebnisse sollten deshalb auf ein wässriges Puffersystem übertragen werden.

4.3. Wässrige Staudinger-Ligation

4.3.1. Optimierungsstudien

4.3.1.1. Die richtige Testsequenz

Die zur Zyklisierung in DMF verwendeten Peptide erwiesen sich für eine Reaktion im wässrigen Milieu als zu hydrophob. Diese schlechte Löslichkeit sollte durch Verwendung von hydrophileren peptidischen Testsequenzen kompensiert werden.



Schema 42: Allgemeines Reaktionsschema zur Sequenzoptimierung

An einem TGT®-Harz wurde das entsprechende Peptid mit der Standardfestphasen-peptidsynthese unter Anwendung der Fmoc-Strategie hergestellt. Durch Abspaltung mit 0.5%iger TFA erhielt man das vollständig geschützte Peptid **206** mit freiem C-Terminus. Im nächsten Schritt wurde mit Diisopropylcarbodiimid als Aktivierungsreagenz das borangeschützte Diphenylphosphinomethylthiol (**184**) gekuppelt. Der Thioester konnte mit 97.5%iger TFA zum Phosphoniumsalz **207** entschützt werden (Schema 42). Diese Schritte erfolgten analog zu der bereits beschriebenen Staudinger-Ligation mit DMF als Lösungsmittel. Das entschützte Peptid wurde anschließend in Ether ausgefällt und zur

besseren Löslichkeit in Lösungsmittel je nach Sequenz gelöst und gegebenenfalls DIPEA als Base zugegeben. Die genauen Zusammensetzungen sind in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6: Testreaktionen zur Sequenzoptimierung

Sequenz	Phosphat-Puffer	DMF	Base
GAGHVPEF(-NO_2)FVG	4 ml	1 ml	-
GAGHVPEF(-NO_2)FVG	4 ml	1 ml	DIPEA
GAEHEEEYFVG	4 ml	1 ml	DIPEA
GGEHEEEYYEG	5 ml	-	DIPEA

Ergebnisse

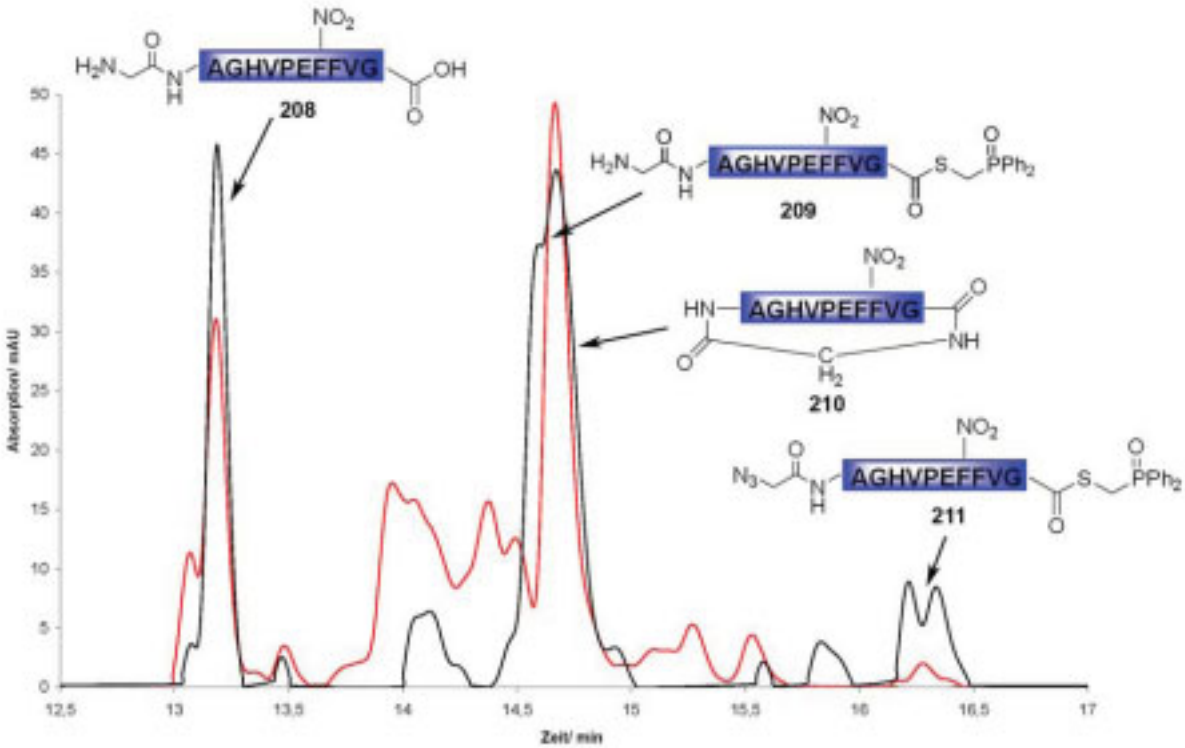


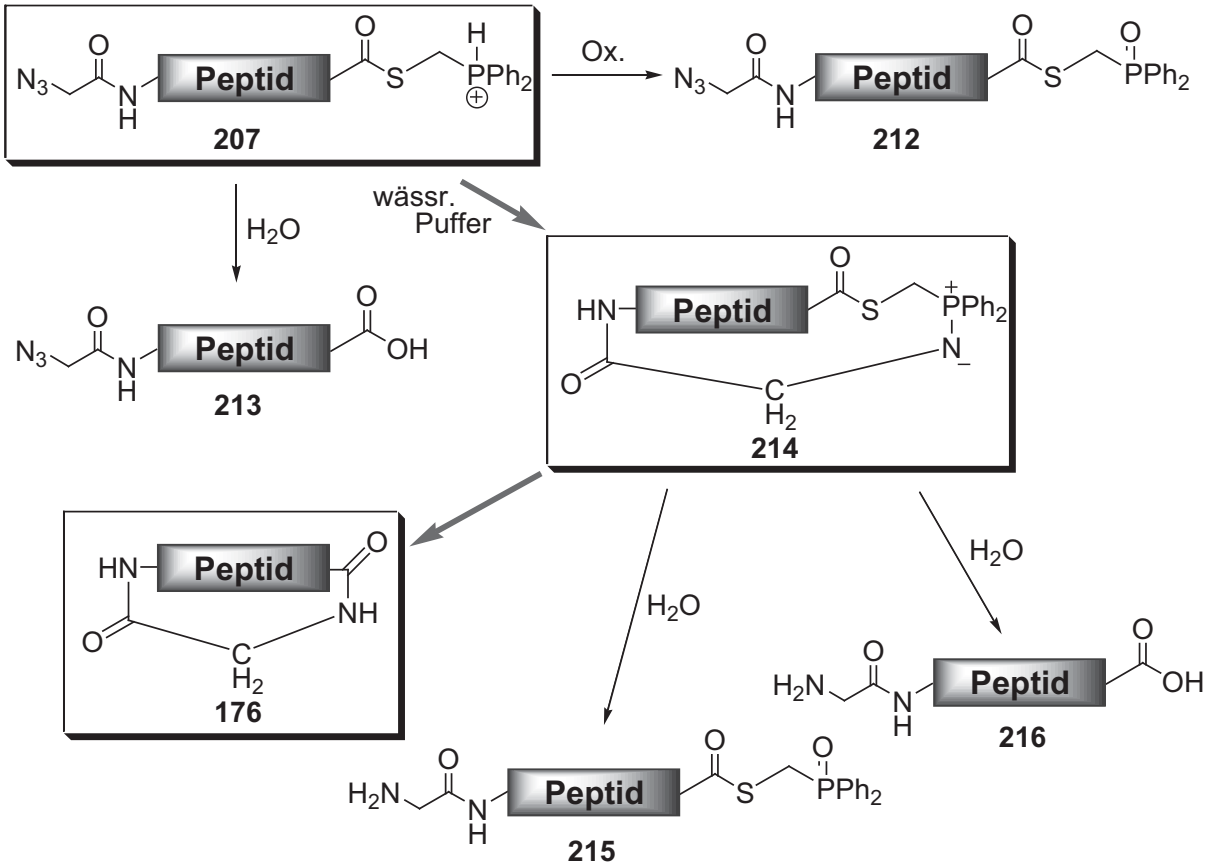
Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm der Studie zur Minimierung der Nebenprodukte; (schwarz) Spektrum ohne Basenzugabe; (rot) Spektrum mit Basenzugabe

Als Testsequenzen für die Staudinger-Zyklisierung in Phosphat-Puffer wurde eine vom Modellsubstrat aus dem Microcin J25 leicht abgewandelte Sequenz verwendet. Dabei wurde das Tyrosin durch ein Nitrophenylalanin ersetzt (GAGHVPEF(-NO_2)FVG). Dieses dient lediglich der Erhöhung der Intensität des UV-Signals. Das Peptid besitzt jedoch einen sehr hydrophoben Charakter, deshalb wurde aus Gründen der Löslichkeit ein Gemisch aus 4 ml 0.07M Phosphat-Puffer und 1 ml DMF verwendet. Das in Abbildung 25 gezeigte schwarze

Rohspektrum zeigt neben dem gewünschten Zyklisierungsprodukt in hohem Maße Hydrolyse- und Oxidations-Nebenprodukte.

Neben dem vollständig hydrolysierten Peptid **208**, in dem sowohl das Azid als auch der Thioester hydrolysiert werden, findet man Peptid mit intaktem Azid jedoch oxidiertem Phosphinothioester (**211**). Ein weiteres Nebenprodukt (**209**) wurde mit hydrolysiertem Azid und oxidiertem Phosphinothioester gefunden. Wie bei der Reaktion in DMF ist das Peptid nach Ausfällen in Diethylether durch die Entschützung mit 97.5%iger TFA so sauer, sodass der Puffer nicht ausreicht um die Säure zu neutralisieren und der entstehende pH in der Reaktionslösung liegt bei 3-4. Für die S→N-Umlagerung ist ein deprotonierter Stickstoff im Iminophosphoran erforderlich (Kapitel 2.2.3.2, Schema 18). Im Sauren liegt dieser hauptsächlich protoniert vor. Dies führt zu einer starken Verlangsamung der Ligation. Des weiteren liegt das Phosphin aufgrund seines pK_S-Wertes größtenteils noch protoniert vor,[172] sodass das Azid nicht angreifen kann. Eine solche Protonierung führt zur Destabilisierung des Thioesters, sodass dieser hydrolysiert wird, während das Azid intakt bleibt (**213**). Anders sieht es bei der Protonierung des Iminophosphorans aus. Diese führt zur Erhöhung der Elektrophilie des Phosphors und die Wahrscheinlichkeit eines Angriffs von Wasser am Phophor nimmt zu. Man erhält eine Staudinger-Reduktion mit einem Amin und Phosphinoxid als Produkt (**209**). Bei gleichzeitiger Hydrolyse des Thioesters erhält man das vollständig hydrolysierte Peptid (**208**). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass aus kinetischer Sicht die Hydrolyse schneller wird, was Hydrolyse- und Oxidationsprodukte zur Folge hat. Das in Abbildung 25 in rot gezeigte Rohspektrum zeigt, wie sowohl die Menge der Hydrolyse- als auch der Oxidations-Nebenprodukte durch Zugabe einer Base zur Zyklisierung, in diesem Fall DIPEA, stark zurückgeht. So findet man kaum Peptide mit oxidiertem Phosphin und intaktem Azid und auch die Phosphinoxid-Spezies **209** mit hydrolysiertem Azid ist kaum noch zu finden. Lediglich die vollständig hydrolysierte Verbindung **208** ist noch in größerem Maße vorhanden.

Einen Überblick über mögliche Nebenreaktionen gibt Schema 43.

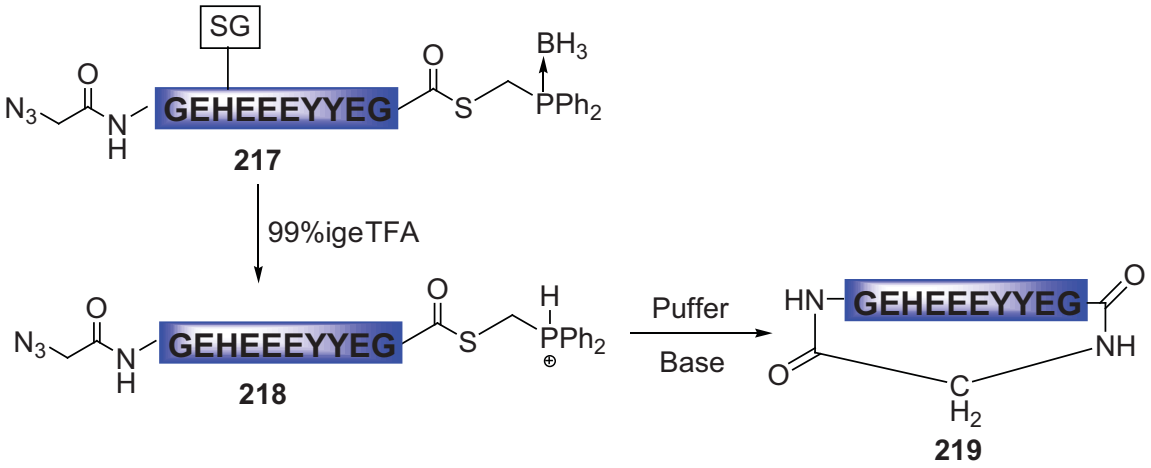


Schema 43: Mögliche Nebenreaktionen der wässrigen Staudinger-Ligation

Da die Löslichkeit des Peptids, die auch auf die große Hydrophobizität des Thiophosphin-Linkers zurückzuführen ist, trotz Zugabe von DMF nur wenig zufriedenstellend war wurde nach einem besser geeigneten Testsubstrat mit einem deutlich hydrophileren Charakter gesucht. So wurde das Peptid mit der Sequenz GAEHEEEYFVG getestet. In dieser Sequenz wurden die Aminosäuren mit hydrophoben Reste durch hydrophile Aminosäuren ersetzt. Die Löslichkeit wurde deutlich besser aber nicht ausreichend, sodass dem Puffer DMF zugesetzt werden musste. Mit dem Peptid GGEHEEEYYEG erhielt man eine gute Löslichkeit, hier konnte auf DMF verzichtet werden. Auch an dieser Stelle wird wieder DIPEA als Base zugeführt.

4.3.1.2. Puffer-Optimierung

Mit dieser erhaltenen Sequenz wurde nun eine Testreihe zur Optimierung des Puffersystems durchgeführt. Das geschützte Peptidthioesterderivat **217** wurde, wie in Schema 42 gezeigt, hergestellt. Nach einstündiger Entschützung mit 97.5%iger TFA wird das Peptid zunächst in Diethylether ausgefällt und anschließend in verschiedenen Puffern wieder aufgenommen. Dabei wurde in der Reaktion (Schema 44) der Phosphat-Puffer bei unterschiedlichen Molaritäten getestet, sowie die Wirkung zweier weiterer Puffersysteme untersucht (Tabelle 7). Nach Zugabe von Base wurde 12 h gerührt und die Reaktionslösungen anschließend mittels LC-MS analysiert.



Schema 44: Reaktionsschema zur Puffer-Optimierung

Tabelle 7: Puffer-Optimierung

Puffer	Molarität	Basenzugabe	Ergebnis
Phosphat-Puffer	0.07M	DIPEA	Zyklisierung
Phosphat-Puffer	0.14M	DIPEA	Zyklisierung
Phosphat-Puffer	0.7M	DIPEA	Zyklisierung
HEPES/Guanidin HCl	1M/6M	mit NaOH eingestellt	keine Zyklisierung
HEPES	1M	mit NaOH eingestellt	keine Zyklisierung
0.7M Phosphat/1M HEPES 4:1	1M	mit NaOH eingestellt	Hauptprodukt: Hydrolyse

Bei den verwendeten Puffern handelte es sich um 0.07, 0.14 und 0.7M Phosphat-Puffer, einem Puffer mit 1M HEPES/ 6M Guanidin, 1M HEPES und einem Gemisch aus 0.7M Phosphat-Puffer und HEPES-Puffer.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der LC-MS-Analyse sind in Tabelle 7 gezeigt. Bei Verwendung der beiden Puffer 1M HEPES/ 6M Guanidin und 1M HEPES konnte kein zyklisches Produkt erhalten werden. Mit dem Phosphat- und HEPES-Puffergemisch hoffte man die Hydrolyse als Nebenreaktion weiter minimieren zu können.[174] Es wurde das Gegenteil herausgefunden.

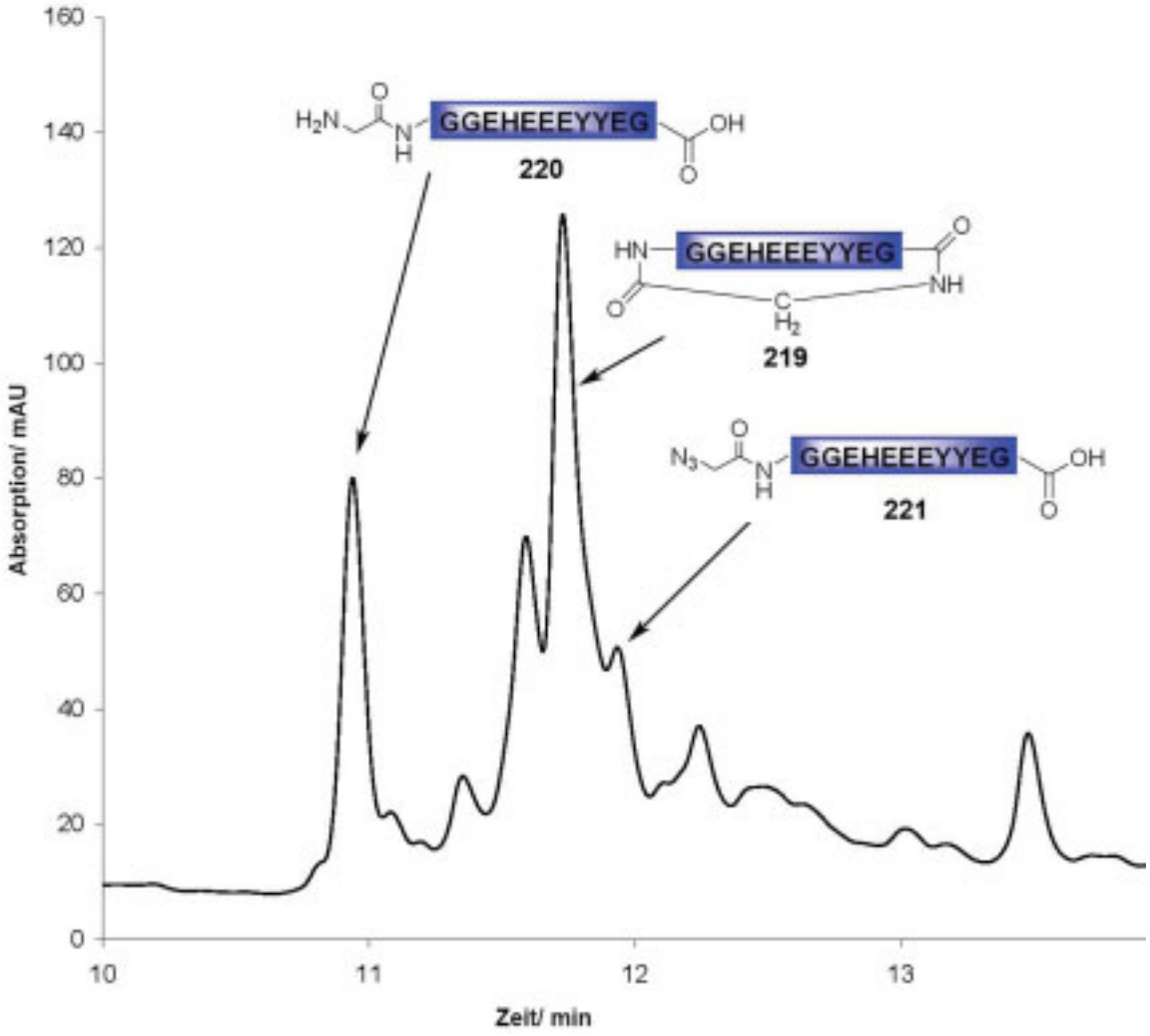


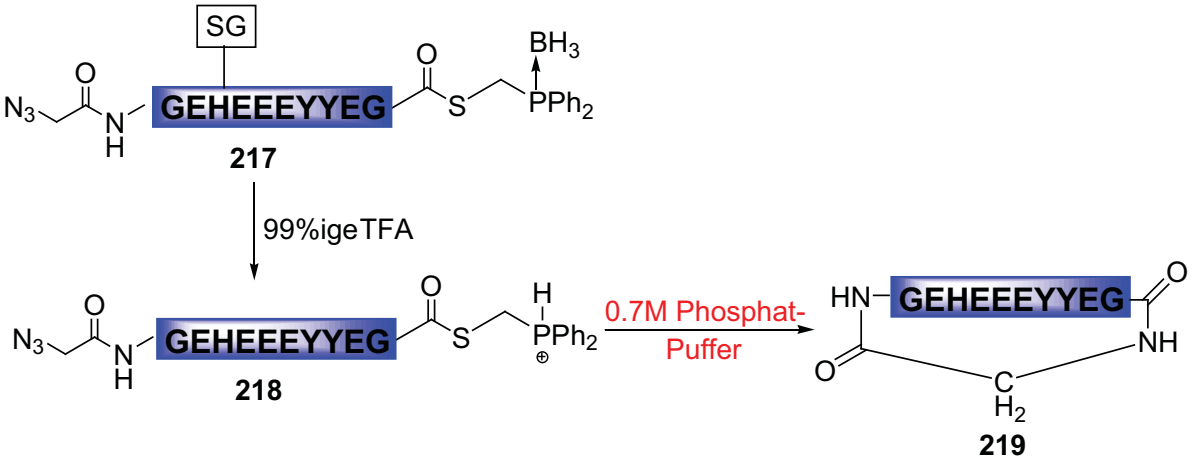
Abbildung 26: Reaktion der optimierten Testsequenz in 0.7M Phosphat-Puffer

Die Optimierung wurde auf den geeigneten Phosphat-Puffer fokussiert. Der 0.07M Phosphat-Puffer war zu schwach um das saure Peptid abzupuffern. Die vollständige Enfernung des Säureüberschusses am Hochvakuum war nicht erfolgreich und wurde versucht durch konzentriertere Puffer zu kompensieren. Das beste Ergebnis brachte letztlich ein 0.7M Phosphat-Puffer. In Abbildung 26 ist das Rohspektrum von dieser Reaktion gezeigt. Das Spektrum zeigt eine deutlich Optimierung der Synthese. Die Phosphinoxid-

Nebenprodukte konnten vollständig eliminiert werden. Lediglich hydrolysiertes Azidopeptid **221** und Nebenprodukt mit Thioesterhydrolyse (**220**) sind noch vorhanden. Das Nebenprodukt bei der Retentionszeit von 11.7 min mit der Masse 1283.4550 besitzt eine Massendifferenz von 2.9738 zum zyklischen Produkt (ber.: 1280.4812) und konnte nicht identifiziert werden.

4.3.1.3. Optimierung des pH-Wertes

Der pH-Wert ist essentiell für das Gelingen der Staudinger-Ligation in Wasser. Die Ausbeute des gebildeten Amids steigt mit Erhöhung des pH-Wertes. Gleichzeitig nimmt die Instabilität des Thioesters mit steigendem pH stark zu. Dies hat einen Produktrückgang zur Folge. Deshalb musste das für die Zyklisierung von Peptid- und Proteinstrukturen erforderliche Optimum des pH-Wertes gefunden werden. Hierzu wurde die Sequenz GGEHEEEYYEG verwendet.



Schema 45: Reaktionsschema zur pH-Optimierung

Zunächst wurde das Peptidthioesterphosphin, wie in Kapitel 4.3.1.1. beschrieben, hergestellt. Nach Aufnehmen des Peptids im 0.7M Phopshat-Puffer wird mit Hilfe von H_3PO_4 und NaOH der pH-Wert eingestellt. Die Reaktion ist in Schema 45 gezeigt. Die Zyklisierung erfolgte jeweils bei einem pH von 8.0, 7.5 und 7.0. Nach 12 h Rühren wurden die Reaktionslösungen mit Hilfe eines LC-MS analysiert.

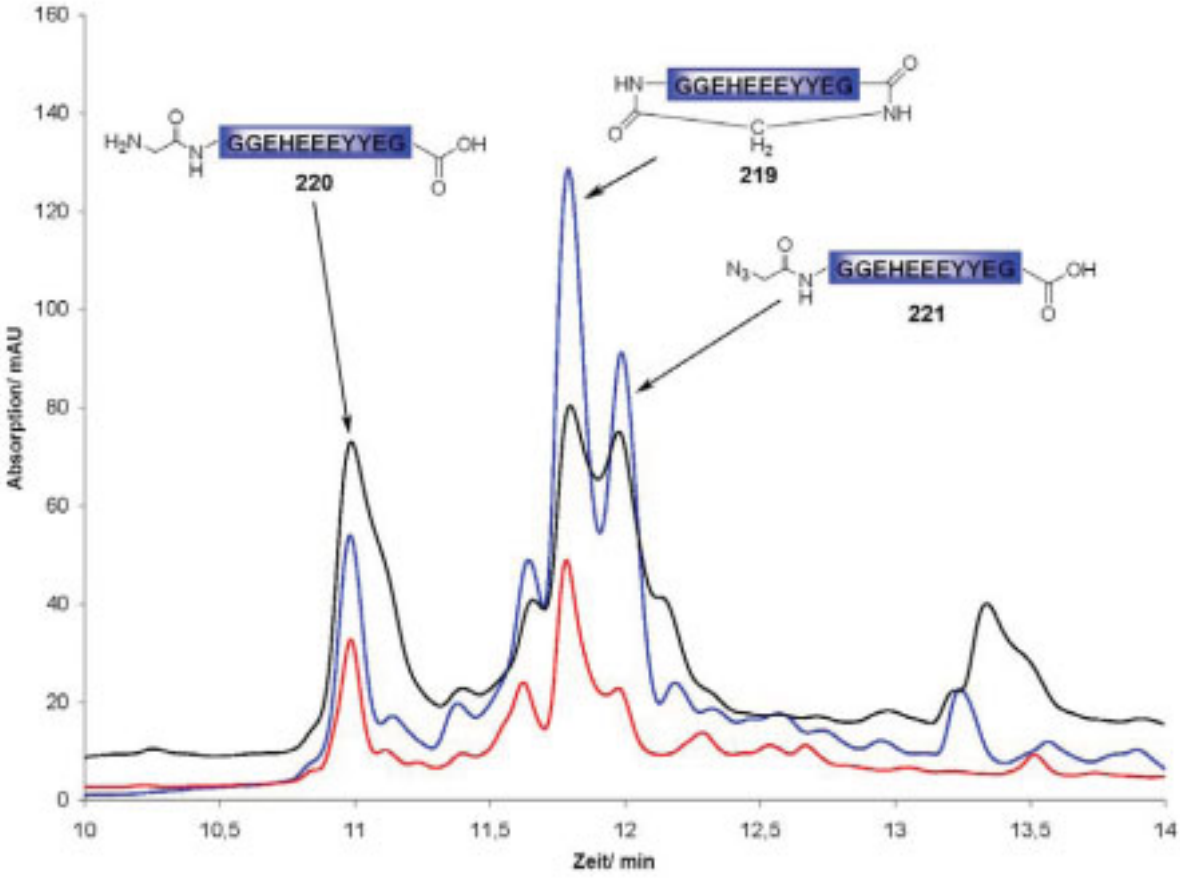
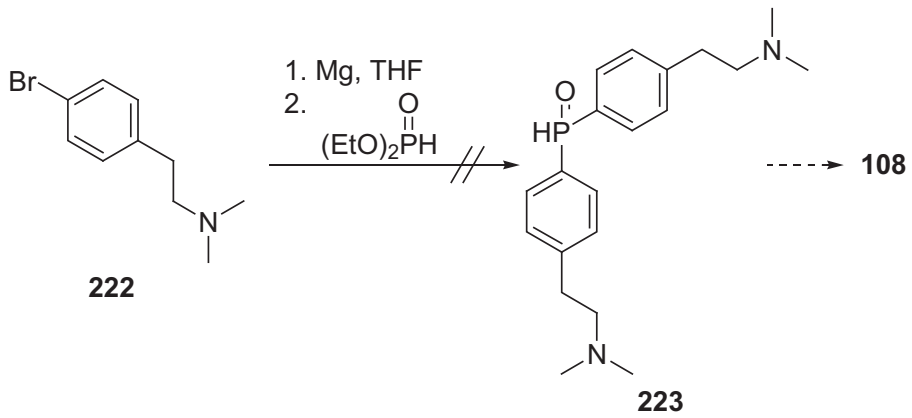


Abbildung 27: Reaktionsspektren des Standardpeptids (GGEHEEEYYEG) bei unterschiedlichen pH-Werten; pH = 7.0 (schwarz), pH = 7.5 (blau), pH = 8 (rot)

Die Abbildung 27 zeigt den Vergleich der HPLC-Spektren dieser Zyklisierungen. Im Vergleich zur Reaktion bei pH = 8.0 erfolgt bei pH = 7.5 eine Zunahme des Hydrolyse-Nebenprodukts **220** bei gleichzeitigem Anstieg des Hydrolyseprodukt **221** mit intaktem Azid im Verhältnis zum zyklischen Produkt **219**. Das Verhältnis **219**:**221** liegt bei pH = 8.0 mit 2.1:1.0 deutlich höher als bei pH = 7.5 mit nur noch 1.4:1.0. Da jedoch mit Absenken des pH-Wertes das Integral insgesamt um das dreifache zunimmt, fällt dieser Anstieg der Hydrolyse nicht so stark ins Gewicht. Diese Eindrücke spiegeln sich auch deutlich in den erhaltenen Ausbeuten wieder. Während man bei pH = 8.0 für **219** Ausbeuten von 10% erhält, liegen diese bei pH = 7.5 schon bei 37%. Wird die Reaktion nun bei pH = 7.0 durchgeführt, nimmt die Menge an Nebenprodukten im Verhältnis zum zyklischen Produkt signifikant zu. Die Erklärung für die Zunahme an Hydrolyseprodukten bei sinkendem pH-Wert besteht in der höheren Wahrscheinlichkeit für Protonierungen. Die Protonierung eines freien Phosphins führt zur Destabilisierung des Thioesters und damit zu einer erleichterten Hydrolyse. Es führt

zum Nebenprodukt **221** mit intaktem Azid. Wird jedoch das Iminophosphoran protoniert, kann eine Umlagerung zum tetrahedralen Intermediat nicht mehr erfolgen und die Ausbeute an zyklischem Produkt **219** wird ebenso reduziert. Zudem wird die Elektrophilie am Phosphor erhöht, sodass ein Angriff von Wasser erleichtert wird und es zur Staudinger-Reduktion kommt. Gleichzeitig führt eine Erhöhung der Elektrophilie zur Destabilisierung des Thioesters. Durch die daraus folgende Hydrolyse wird als Hauptnebenprodukt das Peptid mit hydrolysiertem Azid und Thioester **220** erhalten. Über die Tatsache, dass das Integral der Produkte aus der Reaktionslösung bei hohem pH-Wert stark abnimmt, kann nur spekuliert werden. Das Phänomen konnte bisher leider nicht aufgeklärt werden.

Zusammenfassend soll noch auf zwei Punkte hingewiesen werden. Raines et al. haben mit ihren Vergleichsreaktionen zwischen Azidoglycin (**113**) und Azidoglycinamid (**114**) gezeigt, dass im wässrigen Milieu Säurefunktionen im Peptid die Ausbeute mindern.[100] Eine saure Umgebung kann zur Protonierung des Iminophosphorans und damit zur Hydrolyse führen. In den für die wässrige Staudinger-Ligation synthetisierten Modellpeptidsequenzen wurden, um eine Wasserlöslichkeit der Peptide zu gewährleisten, einige Glutaminsäuren eingebaut. Diese führen ebenfalls zu einer höheren Wahrscheinlichkeit von Protonierungen und es kommt zum Ausbeuteverlust. Eine Optimierung wäre das von Raines et al. veröffentlichte wasserlösliche Linkersystem.[100] Neben der Anwendung der Methode auf unpolarere Peptide könnte gleichzeitig die Anzahl an Glutaminsäuren in der Peptidsequenz reduzieren werden. Gleichzeitig würden die tertiären Amine des Linkers das Phosphin und das gebildete Iminophosphoran zusätzlich vor Protonierung schützen und dadurch die Menge an ungewollten Hydrolyse-Nebenprodukten weiter reduzieren. So würde die Methode weiter an Attraktivität gewinnen. Bisherige Versuche zur Reproduktion der von Raines et al. publizierten Synthese scheiterten jedoch.[100] Es sollte das Bromid **222** zunächst in einen Grignard überführt und mit Diethylphosphit umgesetzt werden. Das entstehende Phosphinoxid **223** konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Schema 46).

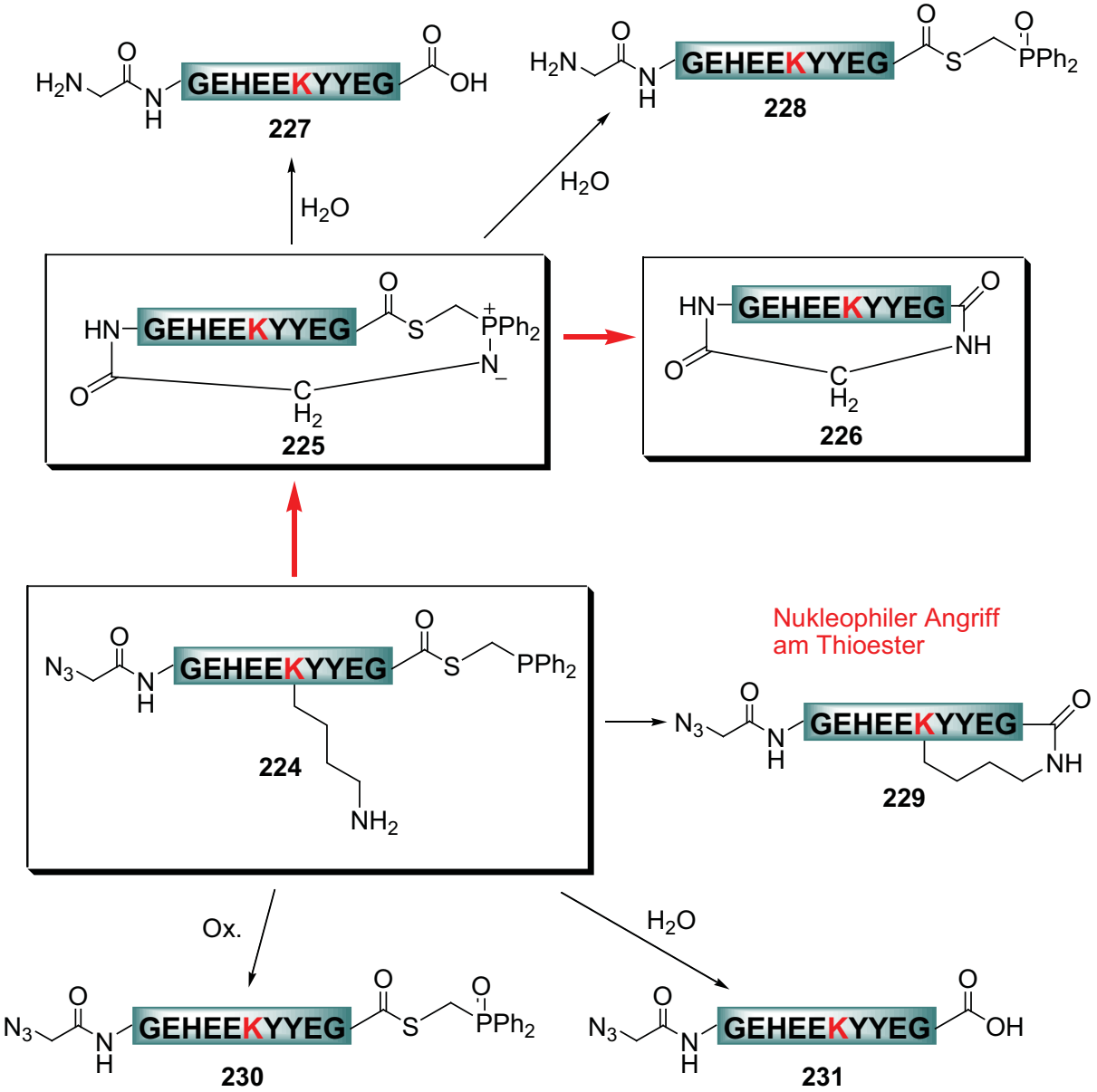


Schema 46: Versuchte Synthese des wässrigen Linkersystem **108**

Raines et al. haben mit dem hydrophilen Linker **108** die Staudinger-Ligation im wässrigen System mit 0.4M Phosphat-Puffer erforscht.[100] Ihr optimierter pH lag bei 8.0. Dieses Ergebnis konnte für das hier gezeigte System mit dem sehr hydrophoben Linker nicht bestätigt werden. Man erhielt die besten Ausbeuten bei pH = 7.5.

4.3.2. Anwendung auf Lysin- und Arginin-enthaltende Peptide

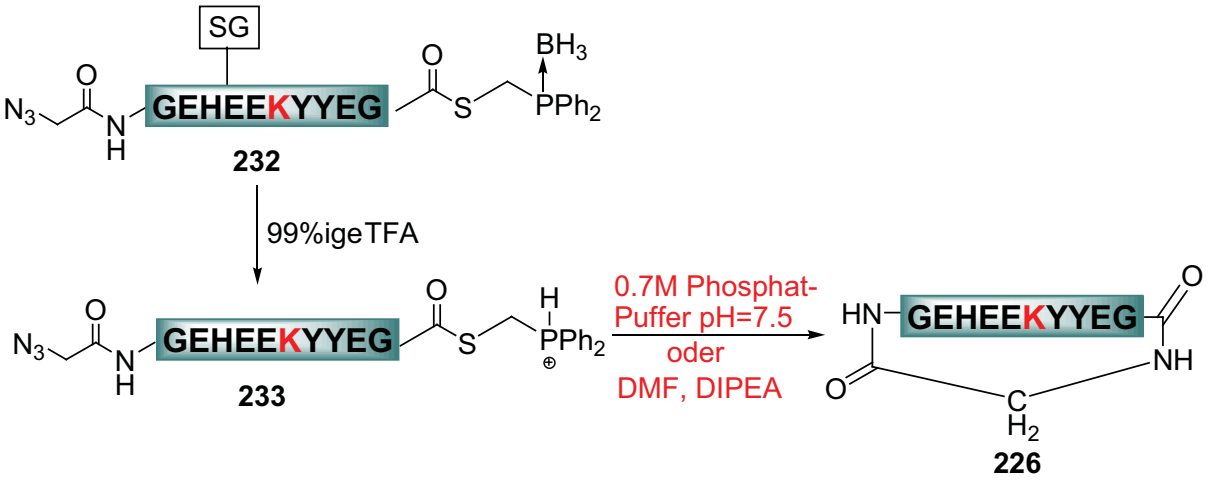
4.3.2.1. Lysin-enthaltende Peptide



Schema 47: Nebenreaktionen am Beispiel des Lysin-haltigen Peptids

Lysin und Arginin liegen im stark basischen Milieu deprotoniert vor. Sie bietet dadurch in ihrer Seitenkette ein Nukleophil an, das am Thioester angreifen kann. Ein solcher Angriff würde zu einer Seitenketten-Zyklisierung (**229**) führen. Es kommt zu Nebenreaktionen (Schema 47) und Ausbeuteverlusten. Da das wässrige Puffersystem eine genaue pH-Einstellung ermöglicht, ist eine Anwendung der Staudinger-Ligation auf Lysin- oder Arginin-enthaltende Peptid- oder Proteinstrukturen attraktiv. Für eine Testreihe mit einem

Lysin-enthaltenden Sequenz (GGEHEEKYYEG) wurde zunächst das Peptid wie in Kapitel 4.3.1.1. beschrieben zum Peptidthioesterphosphin **232** umgesetzt. In Schema 48 sind die weiteren Reaktionsschritte gezeigt. Es wurden zwei Reaktionen parallel durchgeführt. Nach Entschützen der Peptide und des Phosphins **233** mit 97.5%iger TFA wurden diese in trockenem und kalten Diethylether ausgefällt und im jeweiligen Lösungsmittel aufgenommen. Hierzu wurden der 0.7M Phosphat-Puffer bzw. trockenes DMF verwendet. In der Reaktion mit DMF wurde zusätzlich DIPEA als Base zugegeben. Im Phosphat-Puffer wurde der pH-Wert auf 7.5 eingestellt. Die Reaktionen wurden 12 h gerührt und anschließend mittels LC-MS analysiert. Die Peptide wurden über Reversed-Phase-HPLC aufgereinigt. Die Richtigkeit der Struktur konnte zusätzlich durch 2D-NMR-Experimente bestätigt werden.



Schema 48: Reaktionsschema der zu vergleichenden Reaktionen mit Lysin-Peptid

Ergebnisse

Vergleicht man in Abbildung 28 das Spektrum des Lys-enthaltenden Peptids in DMF mit dem im Phosphat-Puffer bei pH = 7.5, so sieht man, dass erst die pH-Einstellung gute Umsätze generiert. Die Menge des entstehenden zyklischen Peptids **226** in DMF ist so gering, dass das Produkt-Peptid bei der Aufreinigung nicht vom Reaktionsgemisch separiert werden konnte.

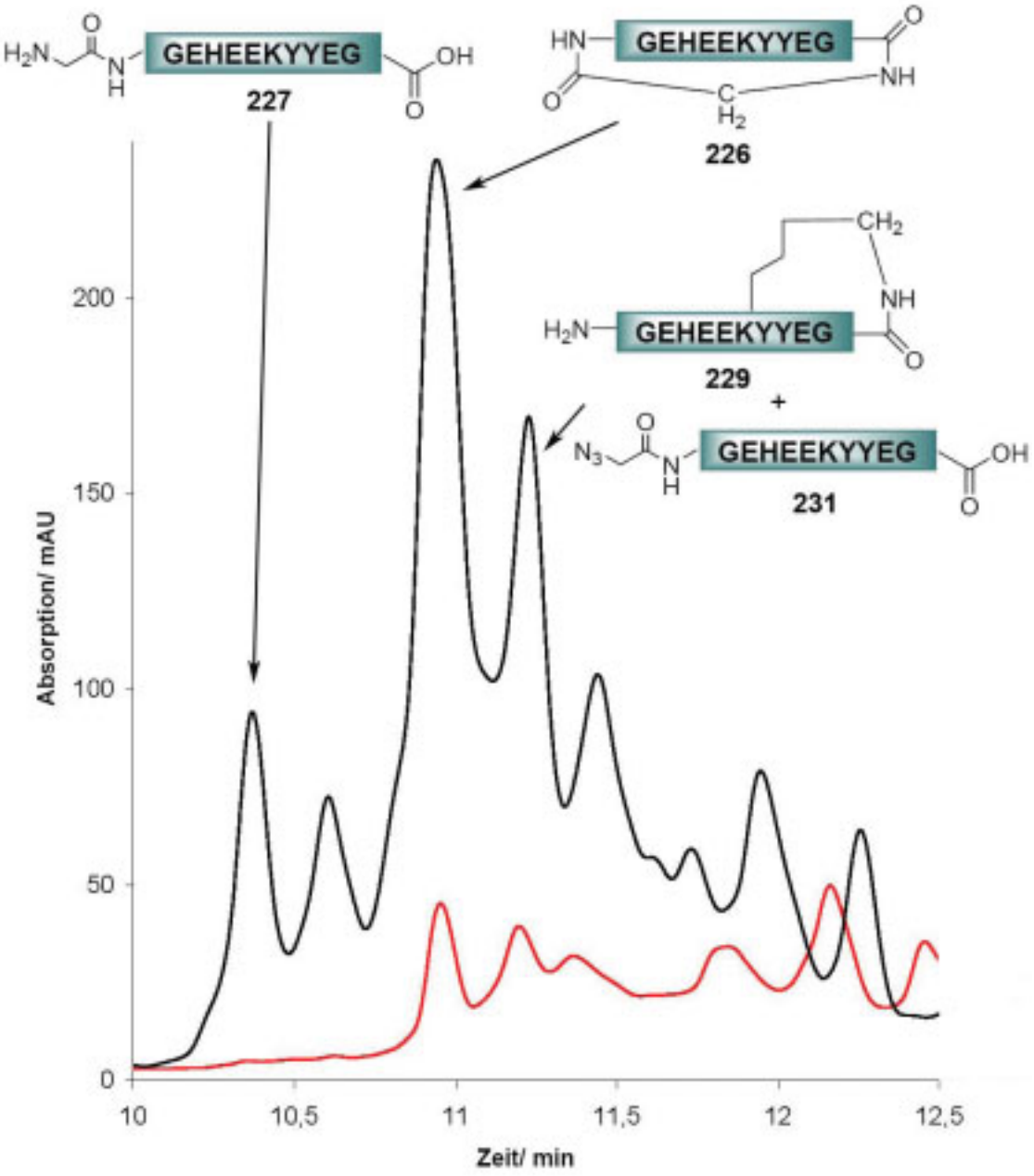


Abbildung 28: Vergleich der Reaktionen des Lysin-Peptids (GGEHEEKYYEG) in DMF (rot) und 0.7M Phosphat-Puffer bei pH = 7.5 (schwarz)

Auch das Verhältnis zwischen dem zyklischen Produkt **226** und dem seitenkettenzyklisierten Nebenprodukts **229** unterscheidet sich. Während in DMF deren Verhältnis fast 1:1 ist, ist im Phosphat-Puffers das Verhältnis 3:2. Zusätzlich muss bedacht werden, dass der Peak der Seitenketten-zyklisierten Spezies **229** in der Reaktion im wässrigen Milieu vom Thioesterhydrolyse-Produkt **231** überlagert wird, sodass das tatsächliche Verhältnis noch größer ist.

Die unterschiedlichen Verhältnisse sind über den pK_s-Wert der Seitenkette des Lysins zu erklären. Da der pK_s bei ca. 11 liegt, ist das Amin in der Reaktion überwiegend protoniert. Dadurch wird das Risiko von Nebenreaktionen deutlich verringert. Um diese Erkenntnisse weiter zu festigen, wurde zusätzlich noch der Vergleich zweier Reaktionen des Lysin-Peptids (GGEHEEKYYEG) bei unterschiedlichen pH-Werten gezogen. Die dazugehörenden Spektrenausschnitte sind in Abbildung 28 gezeigt.

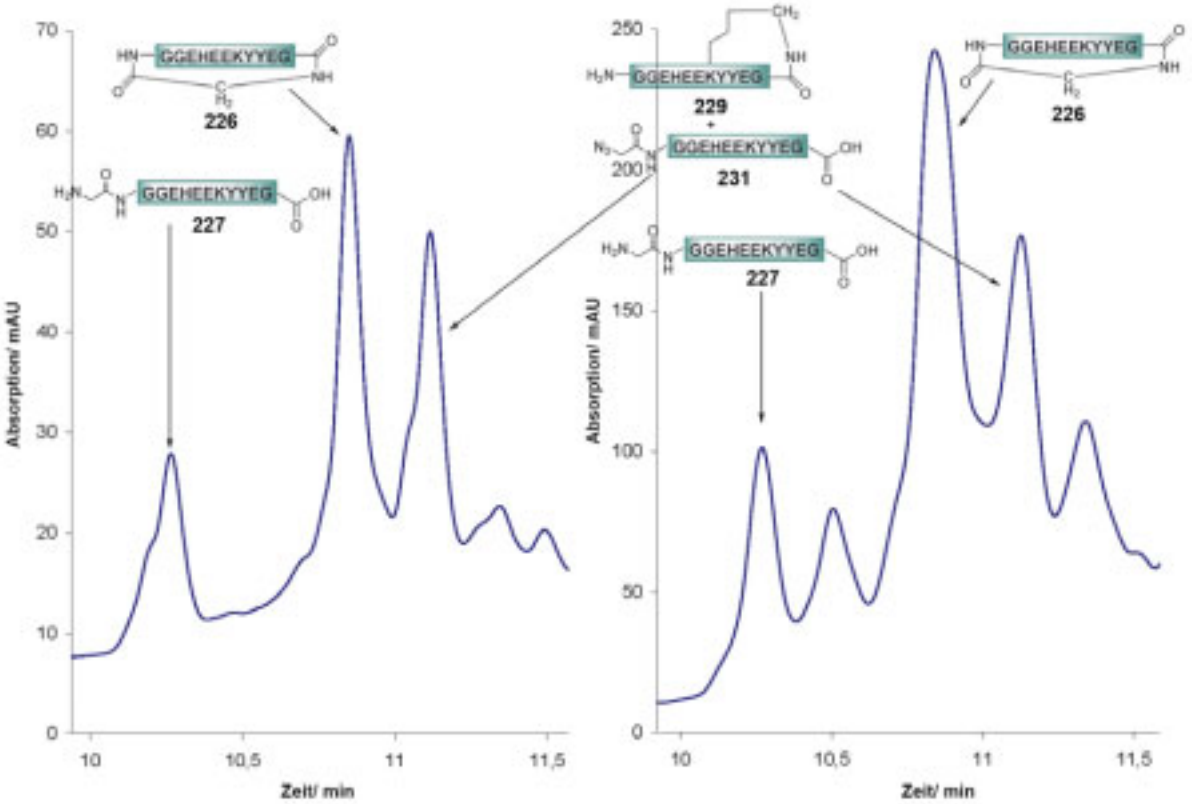


Abbildung 28: Reaktionen des Lysin-Peptids (GGEHEEKYYEG) in 0.7M Phosphat-Puffer bei 8.0 (links) und pH = 7.5 (rechts)

Wie bereits oben beschrieben, ist bei einem pH-Wert von 8.0 (Abbildung 28, links) auch im Fall des Lysin-Peptids die Intensität der Signale deutlich geringer als bei einem pH-Wert von 7.5 (Abbildung 28, rechts). Gleichzeitig erkennt man allerdings auch eine Änderung des Verhältnisses zwischen dem Produkt-Peak und dem Nebenprodukt-Peak. Letzterer umfasst die nicht voneinander zu trennenden Produkte mit der Hydrolyse des Thioesters (**231**) und der Seitenketten-Zyklisierung (**229**). Das Verhältnis Produkt:Nebenprodukt ist bei pH = 8.0 1.2:1.0. Bei pH = 7.5 ist das Verhältnis im Vergleich 1.4:1.0. Dieses Ergebnis unterstützt nochmals die Annahme, dass bei höheren pH-Wert die Wahrscheinlichkeit des unprotonierten Amins der Lysin-Seitenkette höher ist. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den erhaltenen

Ausbeuten wieder. So liegt die Ausbeute für die Reaktion bei pH = 8.0 mit 7% deutlich niedriger, als bei pH = 7.5 mit ≈21%.

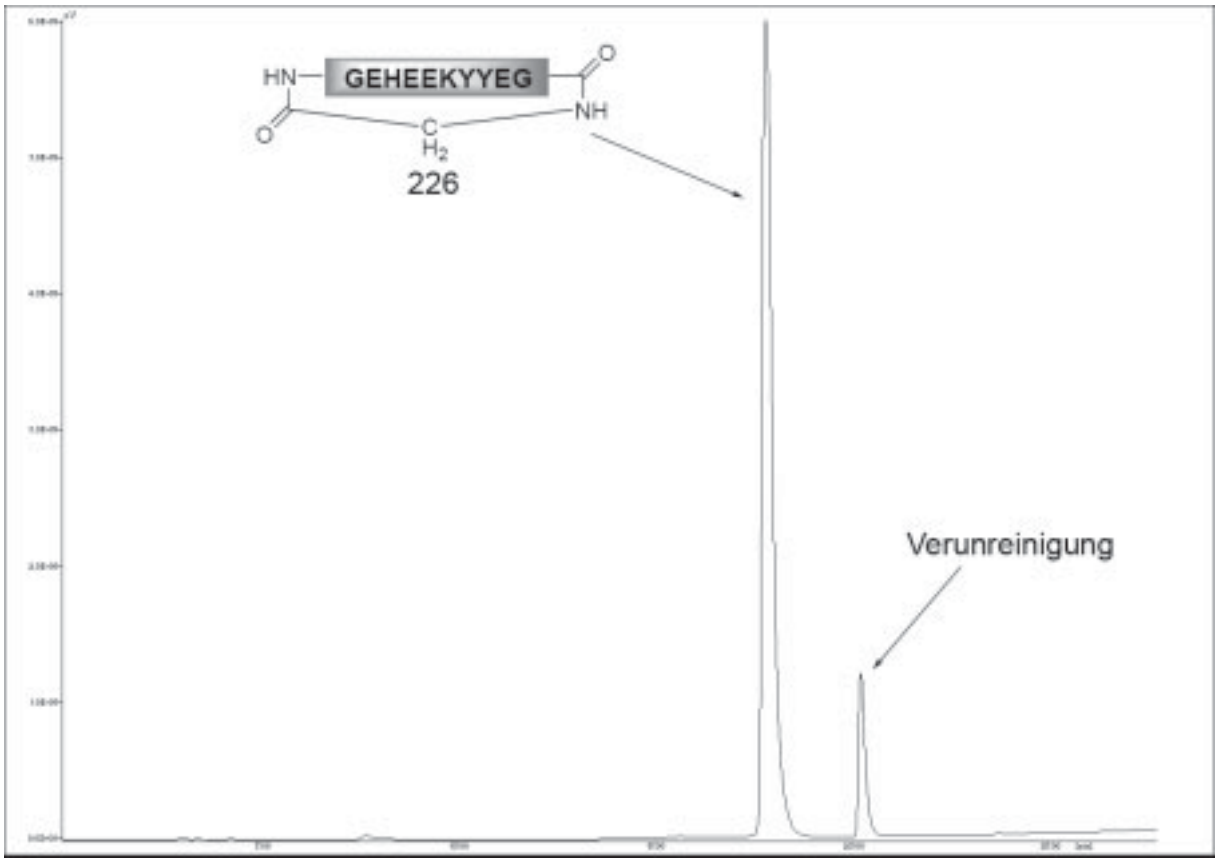
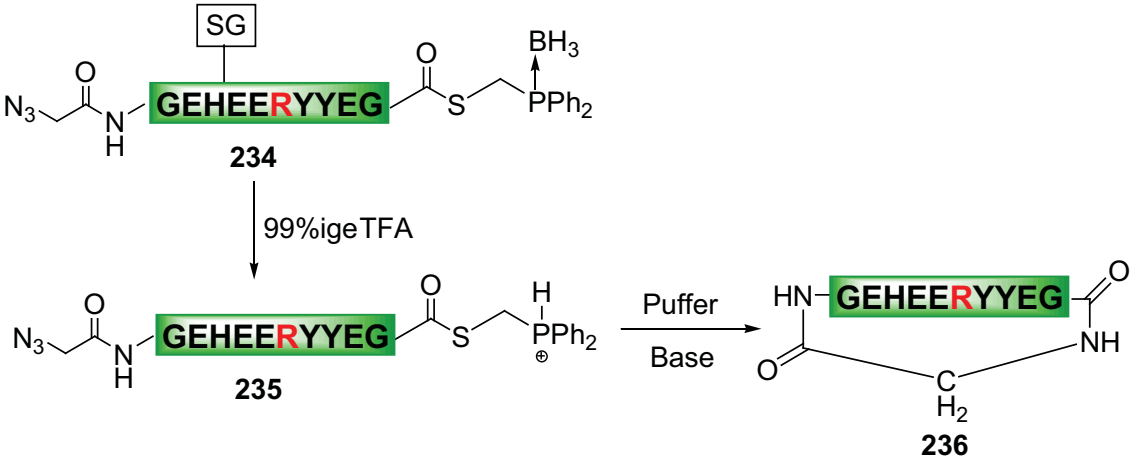


Abbildung 29: HPLC-Spektrum von **226** mit Verunreinigung

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich, hat man die Verbindung **226** nicht vollständig aufreinigen können. Trotz unterschiedlicher Gradienten und Säulenmaterialien konnte präparativ keine Auftrennung erreicht werden. Das gezeigte Spektrum wurde über eine analytische Waters Symmetry300™ C_{18} 5µm aufgenommen, von der keine präparative Säule vorhanden war. Da aber beide Substanzen eine ähnliche Masse haben, wurde eine ähnliche Absorption angenommen, der Grad der Verunreinigung über die Integrale der Peaks bestimmt und daraus die Ausbeute kalkuliert. Der Grad der Verunreinigung liegt bei ca. 30%. Die Verunreinigung konnte jedoch nicht identifiziert werden.

4.3.2.2. Arginin-enthaltende Peptide

Im Folgenden sollte auch die Praktikabilität im Bezug auf Arginin-enthaltende Peptidsequenzen gezeigt werden. Es wurde entschieden, die Sequenz in diesem Fall beizubehalten und lediglich das Lysin durch ein Arginin zu ersetzen (GGEHEERYYEG). Das Azidopeptid **232** wurde, wie in Kapitel 4.3.1.1. beschrieben, mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt und anschließend der Thioester synthetisiert. Die folgenden Schritte mit Entschützung und Zyklisierung sind in Schema 49 gezeigt. Auch eine Zyklisierung des Peptids mit der Sequenz GGEREEEYYEG wurde analog zu dem beschriebenen durchgeführt. In beiden Fällen wurde zum Vergleich parallel zu einer Reaktion im 0.7M Phosphat-Puffer bei pH = 7.5 eine Reaktion in DMF mit Zugabe von DIPEA als Base durchgeführt.



Schema 49: Reaktion der Staudinger-Zyklisierung mit Arginin-Peptid

Ergebnisse

Der Verlauf der Reaktion ist ähnlich zu den Reaktionen mit Lysin-enthaltenden Peptid. Der pK_s-Wert der Guanidingruppe des Arginin ist mit 13 so hoch, dass man schon bei pH = 8.0 keine Nebenreaktion der Guanidingruppe in Form einer Zyklisierung beobachten kann. Leider konnte bei dem Peptid mit der Sequenz GGEHEERYYEG (**236**) keine Aufreinigung erfolgen, da dieses zur Aggregatbildung neigt und dadurch unlöslich ausfällt. Dies kann nicht nur an der hohen Salzkonzentration des Phosphat-Puffers liegen, da das Problem auch bei der Vergleichsreaktion in DMF auftrat. Zwar war das Produktgemisch in DMF vollständig löslich, allerdings konnte nach Entfernen des Lösungsmittels das Produktgemisch nicht wieder gelöst werden.

In Abbildung 30 ist das analytische HPLC-Spektrum der Reaktion in 0.7M Phosphat-Puffer gezeigt. Die Probe wurde hoch verdünnt um Aggregationen zu vermeiden. Ein direkter

Vergleich mit dem in Abbildung 31 gezeigten Spektrum der Reaktion in DMF ist daher nicht möglich.

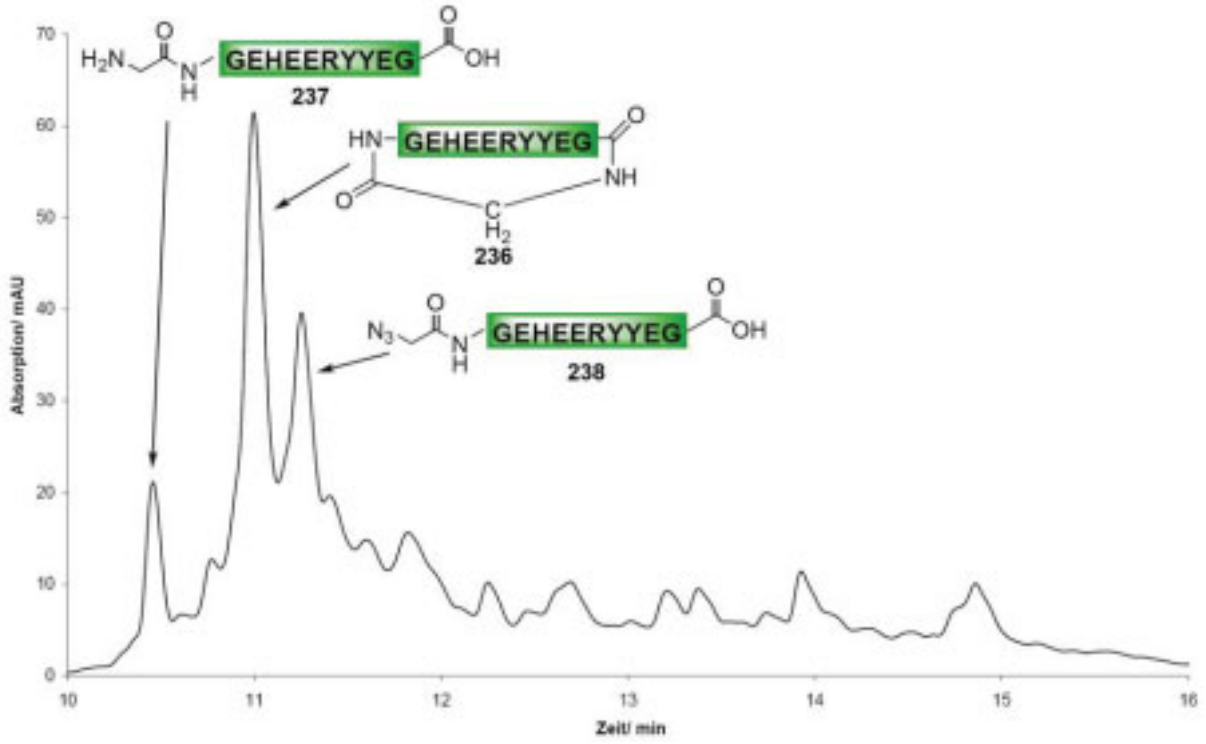


Abbildung 30: HPLC-Spektrum der Zyklisierung des Peptids (GGEHEERYYEG) in 0.7M Phosphat-Puffer

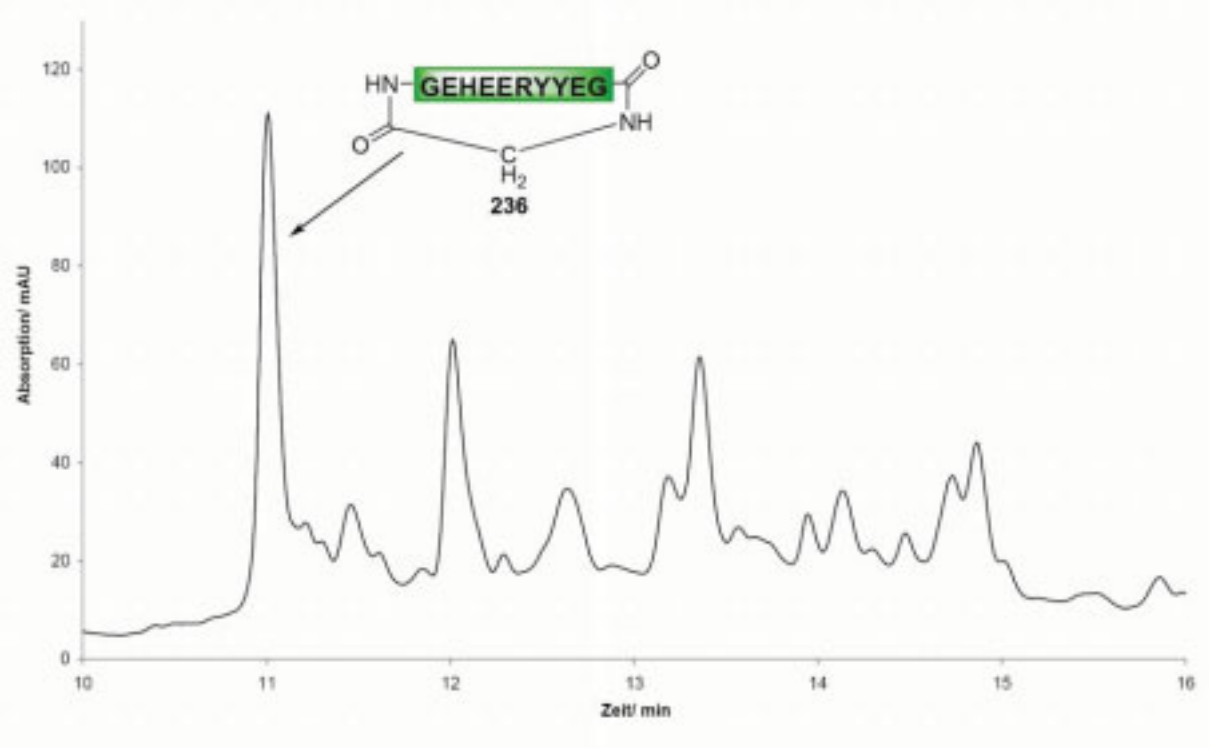


Abbildung 31: HPLC-Spektrum der Zyklisierung des Peptids (GGEHEERYYEG) in DMF

Vergleichbar zu der Reaktion mit dem Lysinpeptid **232** sind bei der Reaktion der Arginin-haltigen Sequenz im Phosphat-Puffer als Nebenprodukte nur Hydrolyse-Produkte zu erkennen. Bei der Reaktion in DMF tritt keine Hydrolyse auf, dafür nicht zu identifizierende Nebenprodukte.

In DMF ließen sich mit dem Arginin-Peptid (GAGRVPEYFVG) **201** diese Erkenntnisse bestätigen. Man erhält mit 11% eine sehr gering Ausbeute und es entstehen viele Nebenprodukte (siehe Kapitel 4.2.2.1). Eine Vergleichsreaktion mit diesem Peptid ist in einem wässrigen Medium jedoch aufgrund des hydrophoben Charakters nicht möglich. Das Spektrum zeigt, dass die Seitenkette des Arginin keine Seitenkettenzyklisierung eingeht. Es kommt jedoch zu undefinierten Nebenreaktionen und daraus resultierenden schlechten Ausbeuten (Abbildung 32).

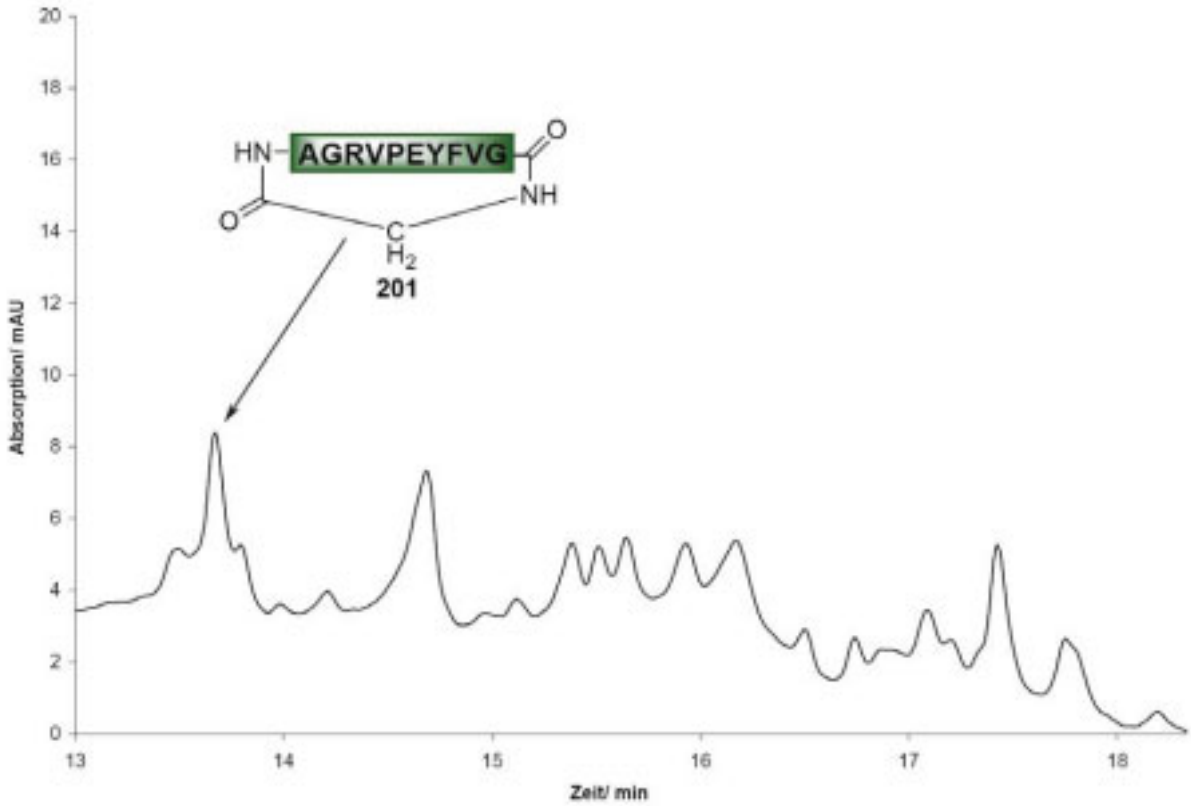


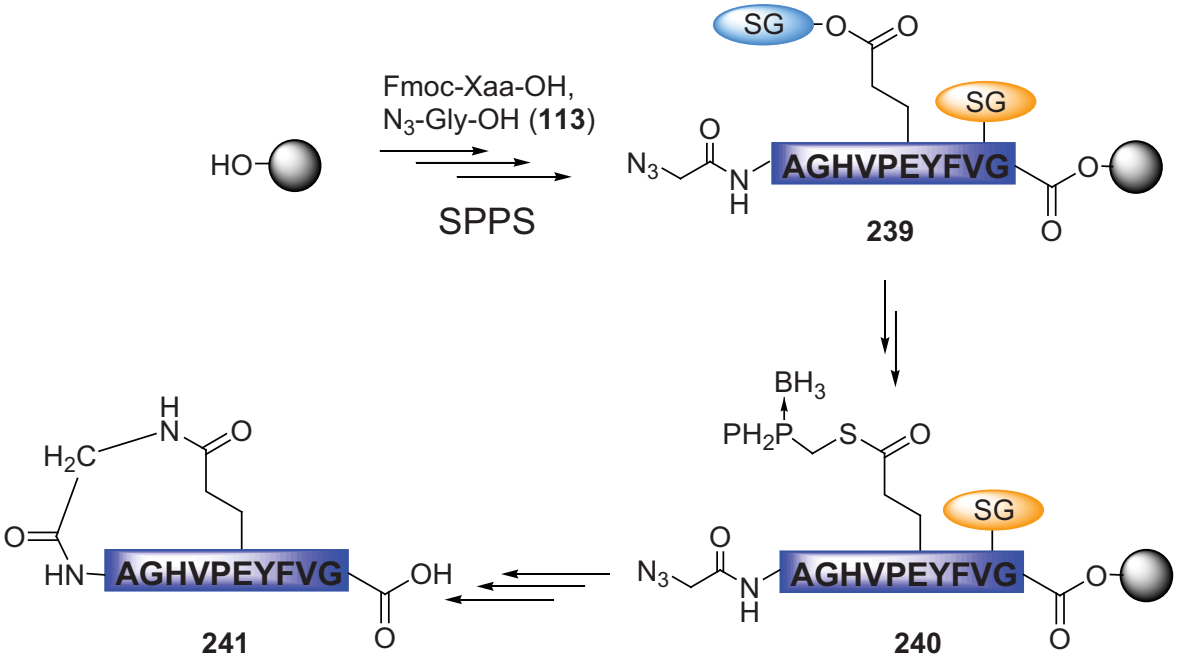
Abbildung 32: Rohspektrum der Zyklisierung des Peptids mit der Sequenz GAGRVPEYFVG

In weiteren Testreaktionen wurde mit dem Peptid GGEREEEYYEG ein Arginin-haltiges für die wässrige Staudinger-Ligation geeignetes Peptid verwendet. Hierbei wurde in der Standard-Sequenz GGEHEEEYYEG das Histidin durch ein Arginin ersetzt. Man eliminierte durch die veränderte Sequenz die Aggregationen. Es wurden wiederum parallel zwei

Reaktionen, eine in 0.7M Phosphat-Puffer und eine in DMF, durchgeführt. Die Ausbeute an zyklischem Peptid im Phosphat-Puffer mit 13% unterscheiden sich jedoch kaum von der Ausbeute in DMF mit 10%. Im Vergleich zu fast allen bisher verwendeten Peptiden wurde bei der Sequenz GGEREEEYYEG das Histidin durch Arginin ausgetauscht. Die niedrigen Ausbeuten könnten daraufhin deuten, dass ein mit seinem aromatischen System sterisch anspruchsvolles Histidin die Bildung für eine Zyklisierung ungünstiger Faltungen erschwert. Eine räumliche Nähe der reagierenden Gruppen ist vorteilhaft für die Geschwindigkeit der Zyklisierung, sodass die Hydrolyse an Bedeutung verliert.

4.4. Synthesezugang zu Seitenketten-zyklisierten Substraten

Der Überblick über natürlich vorkommende zyklische Peptide und Proteine in Kapitel 2.1.4. zeigt, dass es nicht nur Head-to-tail-Strukturen gibt. Neben den Depsipeptiden sind vor allem auch Seitenkettenzyklisierungen relevant. Dabei kann die Verknüpfung sowohl über Lysinseitenketten als auch über Säurefunktionen in der Seitenkette mit dem C- bzw. N-Terminus erfolgen. Eine Grundlage dieser Arbeit bildet die Zyklisierung des Microcin J25 über die Seitenkette. Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit einem möglichen Zugang zu solchen Strukturen. In diesem Rahmen soll zunächst ein in der Seitenkette positionierter Thioester an der Aminosäure Glu an der Festphase synthetisiert werden, um ihn nach Abspaltung in Lösung mit dem N-terminalen Azid über die entwickelte Methode der Staudinger-Ligation zu zyklisieren (Schema50).



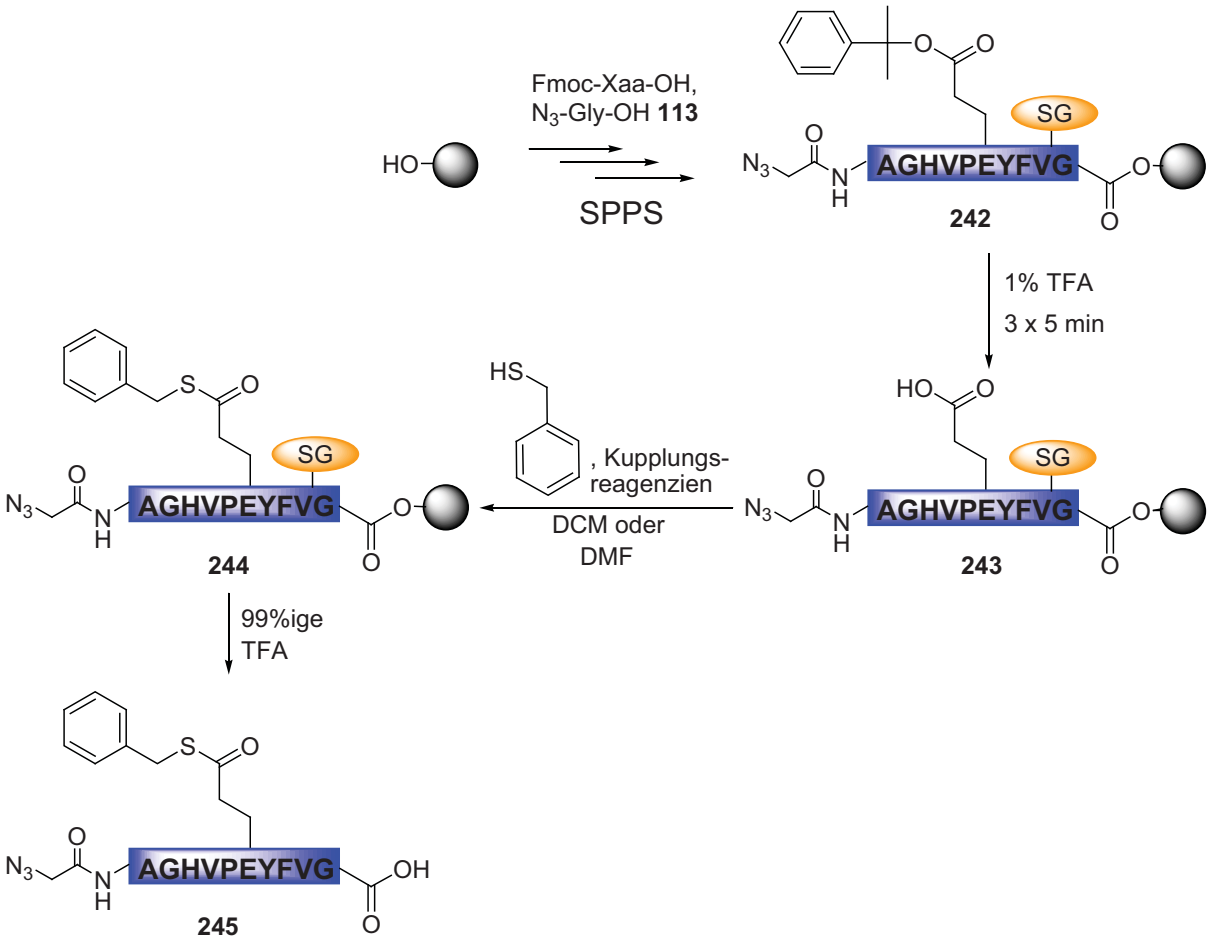
Schema 50: Allgemeines Reaktionsschema zur Seitenketten-Zyklisierung

Hierzu wurden verschiedene Kupplungsreagenzien, Harze, sowie orthogonale Schutzgruppen an der Glutaminsäure-Seitenkette ausgetestet. Als Testsequenz wurde das Fragment mit den Aminosäuren 1-11 des Microcin J25 verwendet. Dies erscheint auch hier als gute Ausgangsposition für eine Optimierung, da eine spätere Anwendung auf das Microcin J25 erfolgen soll. Darst et al.[49] mussten das Peptid für die native chemische Ligation zunächst mit Cystein modifizieren. Mit der Staudinger-Ligation fiele dieser Schritt weg und es wäre denkbar eine der natürlichen Faltung ähnliche Konformation zu bekommen. Dies wäre eine neue Möglichkeit auf synthetischem Weg eine Zyklisierung zu erreichen, in der der lineare Teil des Peptids vom Ring umschlossen ist (siehe Kapitel 2.1.4.1.).

4.4.1. Optimierung der Festphasensynthese des Thioesterderivats

Als Ausgangspunkt wurde zunächst als Schutzgruppe für die Glutaminsäure-Seitenkette das O-2-PhiPr gewählt. Diese säurelabile Schutzgruppe lässt sich unter äußerst milden sauren Bedingungen abspalten und ist in einer Fmoc-Strategie basierenden Peptidsynthese als Baustein leicht einführbar. Zunächst wurde das Peptid (**242**) unter Standardfestphasen-bedingungen an einem Wang-Harz synthetisiert. Mit dem HMPA-PEGA- und dem TGA-Harz wurden aber auch weitere Harze mit unterschiedlichen Quelleigenschaften getestet. Die erhaltenen festphasengebundenen Peptide (**242**) wurden dann mit 1%iger TFA entschützt, um das O-2-PhiPr abzuspalten. Die freie Säurefunktion der Aminosäureseitenkette wurde unter

Verwendung verschiedener Kupplungsreagenzien mit Benzylmercaptan zum Thioester (**244**) umgesetzt, um die optimalen Kupplungsreagenzien zu bestimmen. Als Lösungsmittel wurde zunächst Dichlormethan verwendet. Im letzten Schritt wird der Peptidthioester (**244**) mit 97.5%iger TFA vom Harz abgespalten (Schema 51) und das Peptid über LC-MS analysiert.



Schema 51: Thioestersynthese an der Festphase

An Kupplungsreagenzien wurden unter anderem mit DIC und DMAP die bereits in Lösung erfolgreich verwendeten Bedingungen getestet. DIC in Kombination mit HOBt und DMAP, wie es Lee et al.[174] für eine Festphasen-Thioestersynthese beschrieben, sowie PyBOP® als ein aktiveres Kupplungsreagenz, wurde ebenfalls verwendet. Letzteres ist auf die Arbeiten von Wang et al. 2007 zurückzuführen.[175] Die Gruppe führte eine Optimierungsstudie für die Festphasensynthese eines Thioesters durch, an deren Ende PyBOP® mit DIPEA als Base das bestes Kupplungssystem bildeten. Außerdem wurde das PyBOP® gleichzeitig mit HOBt als Koreagenz getestet. Zunächst brachte keines der Kupplungsreagenzien den Erfolg. Mögliche Erklärungsansätze sind, dass es in Dichlormethan auf dem Harz zur Aggregatbildung kommen kann, sodass die innen liegende Glutaminsäure von den Reagenzien nur schlecht

oder gar nicht erreicht werden kann. Eine Lösung bieten besser quellende Harze, da hier die Säurefunktion besser zugänglich sein sollte. Als Harze wurden das HMPA-PEGA-Harz und ein TGA-Harz verwendet. So bietet das HMPA-PEGA-Harz, dass auf einem Polyethylenglykol basiert sehr gute Quelleigenschaften, führte aber aus ungeklärter Ursache nicht zum Erfolg. Auch die verwendeten verschiedenen Kupplungsreagenzien zeigten dabei keine Unterschiede. Mit dem auf Tentagel basierenden TGA-Harz konnte eine geringfügige Produktbildung nachgewiesen werden. Der gewünschte Thioester **245** besitzt die Masse 1265.

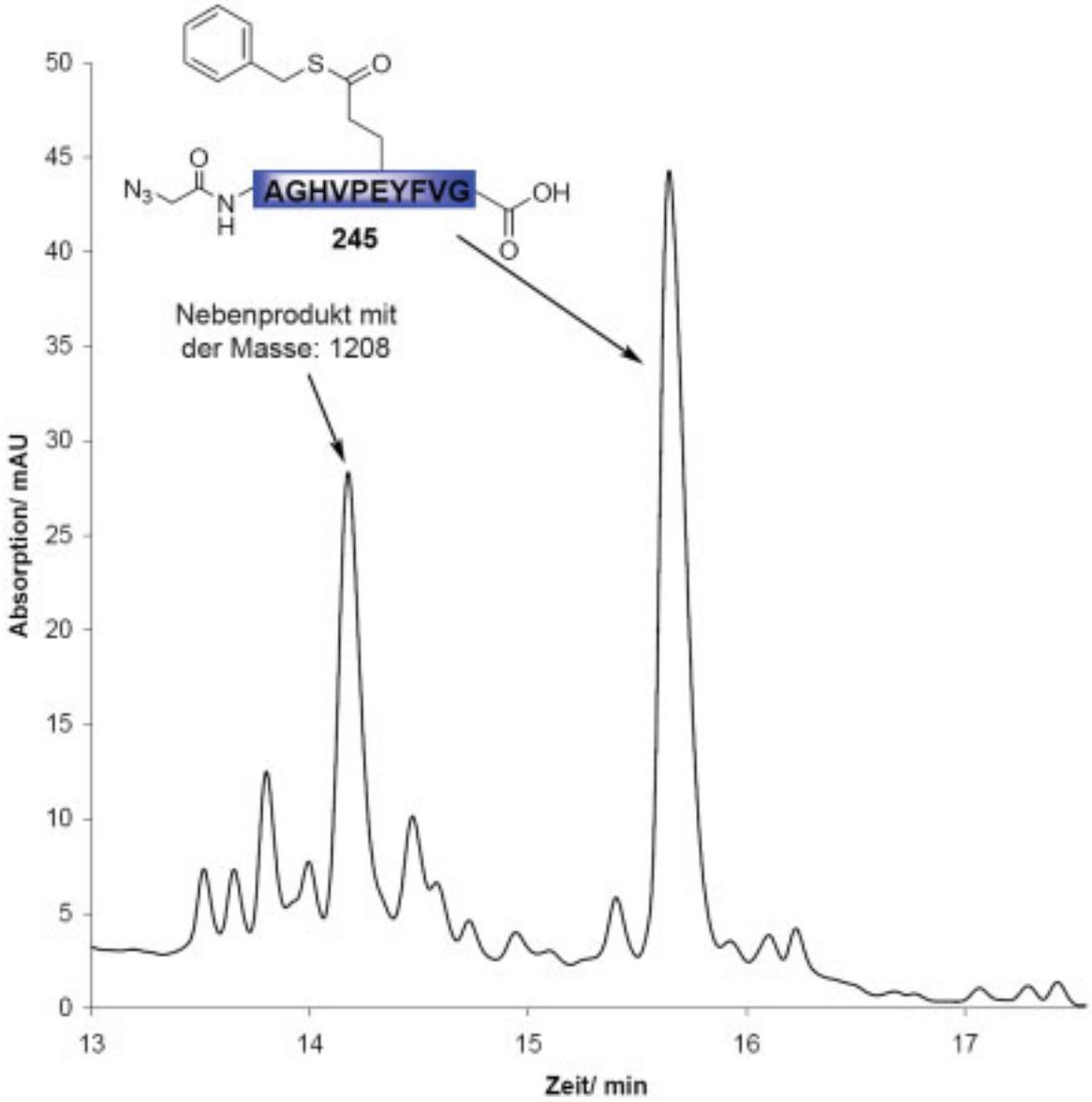


Abbildung 33: HPLC-Spektrum der Festphasen-Thioestersynthese mit Benzylmercaptan

Allerdings sind auch hier die Hauptkomponenten das Edukt und ein nicht identifiziertes Produkt mit der Masse 1400. Die verschiedenen Kupplungsreagenzien hatten keinen Einfluss. Eine weitere Möglichkeit der Problemlösung bieten polare Lösungsmittel. Sie sind in der

Lage die Aggregationen auf dem Harz aufzulösen, sodass die Poren für die Reagenzien wieder zugänglich werden und die Thioesterbildung ablaufen kann. Deshalb wurde Dichlormethan durch Dimethylformamid ersetzt und eine Reaktion auf einem Wang-Harz mit PyBOP als Kupplungsreagenz und DIPEA als Base durchgeführt. Man erhält den gewünschten Thioester **245** als Hauptprodukt und geringe Mengen eines nicht identifizierten Nebenprodukts mit der Masse 1208 (Abbildung 33). Eine detaillierte Auflistung aller Testreaktionen ist in Tabelle 8 gezeigt.

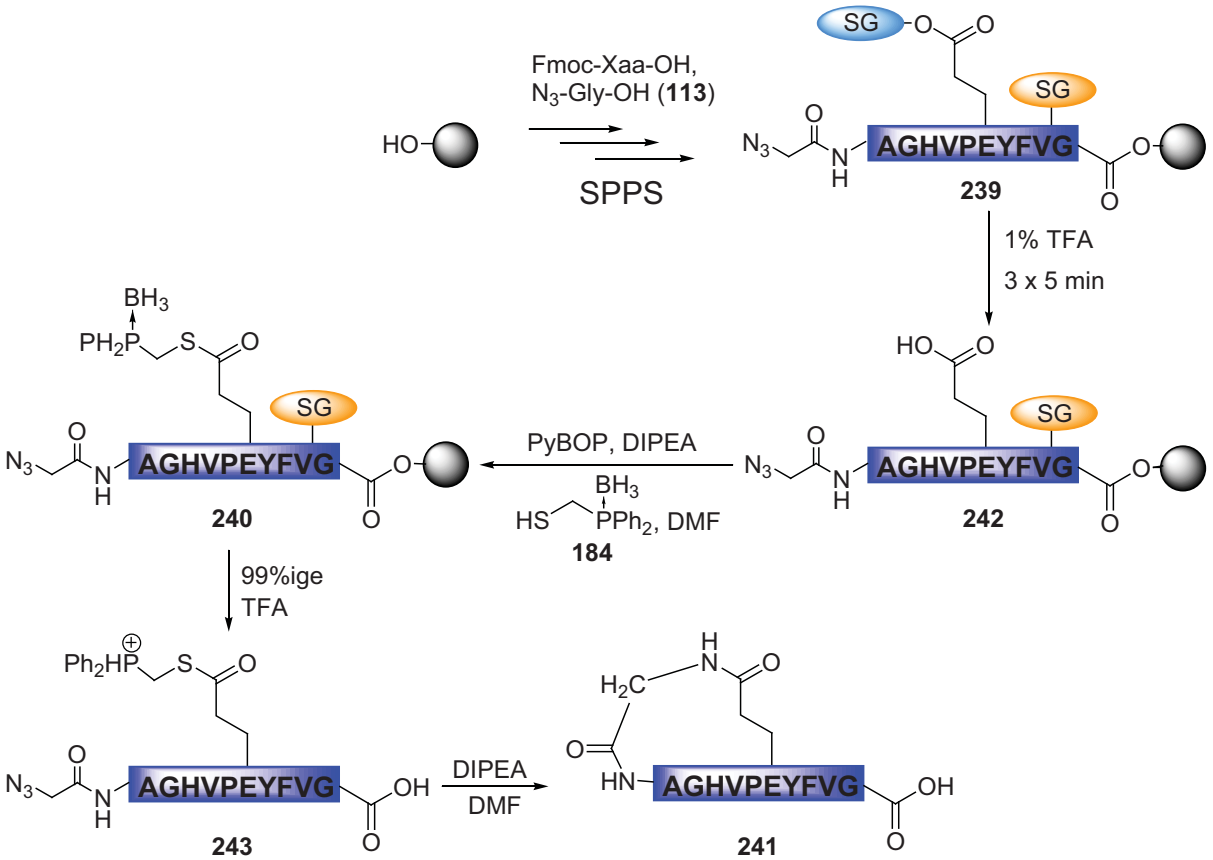
Tabbelle 8: Reaktionen zur Optimierung der Festphasen-Thioestersynthese

Harz	Kupplungs -reagenzien	Lösungs-mittel	Produkt	Edukt	Sonstige Massen
Wang	PyBOP, DIPEA	DCM	-	+	
Wang	PyBOP, HOBt	DCM	-	+	
Wang	DIC, HOBt, DMAP	DMF	-	+	
Wang	PyBOP, DIPEA	DMF	+	-	1208
HMPA-PEGA	PyBOP, DIPEA	DCM	-	+	1400
HMPA-PEGA	DIC, DMAP	DCM	-	+	1400
TGA	PyBOP, DIPEA	DCM	in Spuren	+	1400
TGA	DIC, DMAP	DCM	in Spuren	+	1400

4.4.2. Übertragung auf die Seitenketten-Zyklisierung und Optimierung

4.4.2.1. Wang-Harz

Die erhaltenen Reaktionsbedingungen sollten nun auf die Kupplung des Boran-geschützten Diphenylphosphinomethylthiol (**184**) und eine anschließende Staudinger-Zyklisierung angewendet werden. Hierzu wurde das auf einem Wang-Harz immobilisierte 11 Aminosäuren lange Fragment des Microcin J25 (**239**) verwendet. Als Schutzgruppe diente zunächst wiederum das säurelabile O-2-PhiPr. Die entstandene freie Säurefunktion kann dann mit PyBOP®, DIPEA als Base und **184** umgesetzt werden. Das synthetisierte Thioesterderivat **240** wird anschließend mit 97.5%iger TFA 3 h vom Harz abgespalten und gleichzeitig entschützt. Nach Ausfällen in Ether und lösen in DMF wird durch Zugabe von DIPEA als Base die Staudinger-Ligation initiiert (Schema 52).



Schema 52: Synthese eines Seitenketten-zyklisierten Peptids am Wang-Harz

Ergebnisse

Bei den Aktivierungsreagenzien zur Synthese des Thioesters wurden zunächst 5 Äqivalente PyBOP und 10 Äquivalente DIPEA gewählt. Das erhaltene Rohspektrum ist in Abbildung 34 gezeigt. Dabei ist das Hauptprodukt mit der Masse 1140 das Peptid mit intaktem Azid minus H_2O. Diese H_2O-Abspaltung kann dadurch erklärt werden, dass es bei zu hoher Basenkonzentration zur Imid-Bildung der Glutaminsäure mit dem Rückgrat kommt.

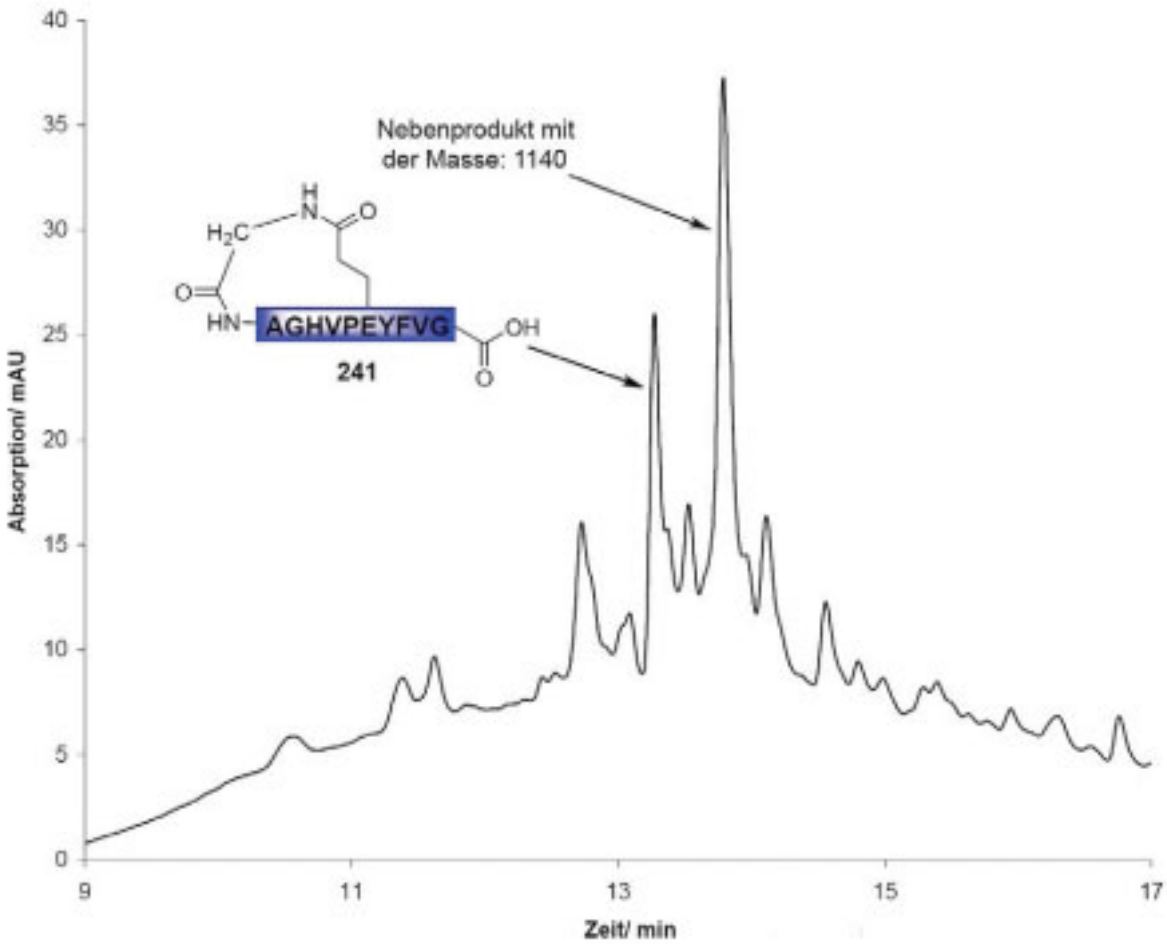


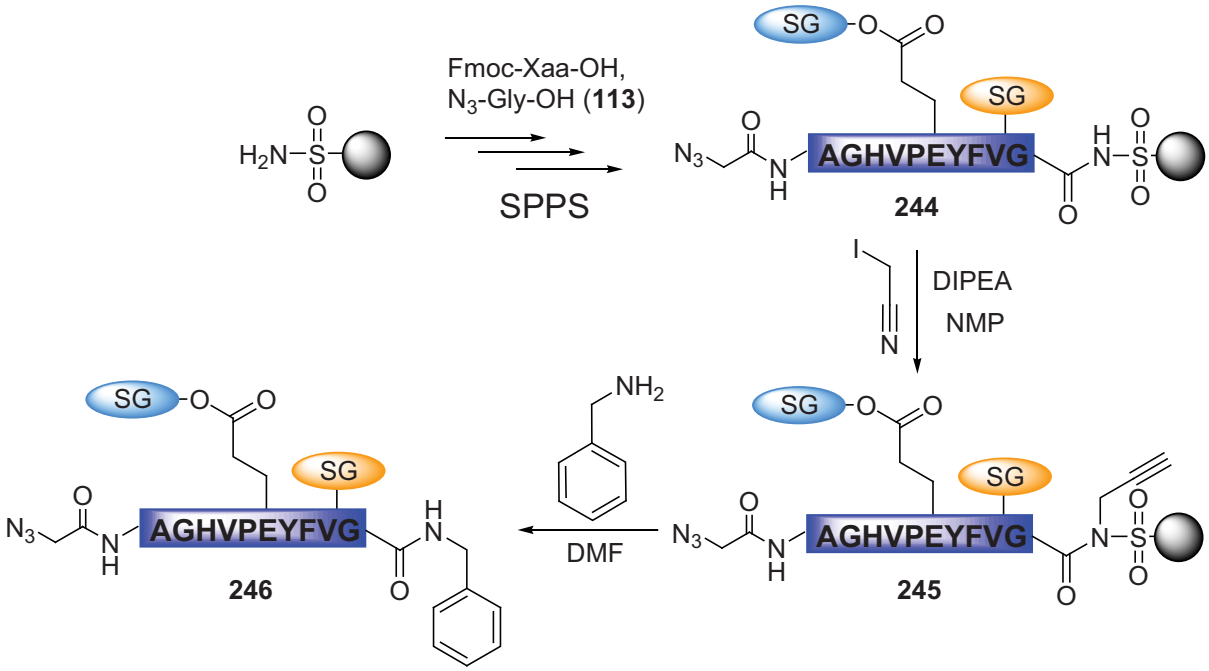
Abbildung 34: HPLC-Spektrum der ersten Seitenketten-Zyklisierung

Die Glutaminsäure-Seitenkette ist dadurch gleichzeitig für eine Thioestersynthese nicht mehr verfügbar. Der zweitgrößte Peak gehört zum gewünschten zyklischen Peptid **241** mit der Masse 1114. Um das Nebenprodukt zu minimieren, wurde eine Testreaktion mit jeweils 10 Äquivalenten PyBOP® und DIPEA durchgeführt. Zwar konnte auf diesem Weg die Nebenreaktion zur Glutarimid-Bildung verhindert werden, dafür gab es aber deutlich mehr andere Nebenprodukte, die nicht weiter aufgeklärt werden konnten.

Ein weiteres Problem stellt die dreistündige Abspaltung dar. Dieser Zeitraum ist zu lang und kann aufgrund der Protonierung des Phosphins zur Destabilisierung des Thioesters führen, weitere Nebenreaktionen verursachen und die Ausbeuten schmälern.

4.4.2.2. Sulfonamid-Harz

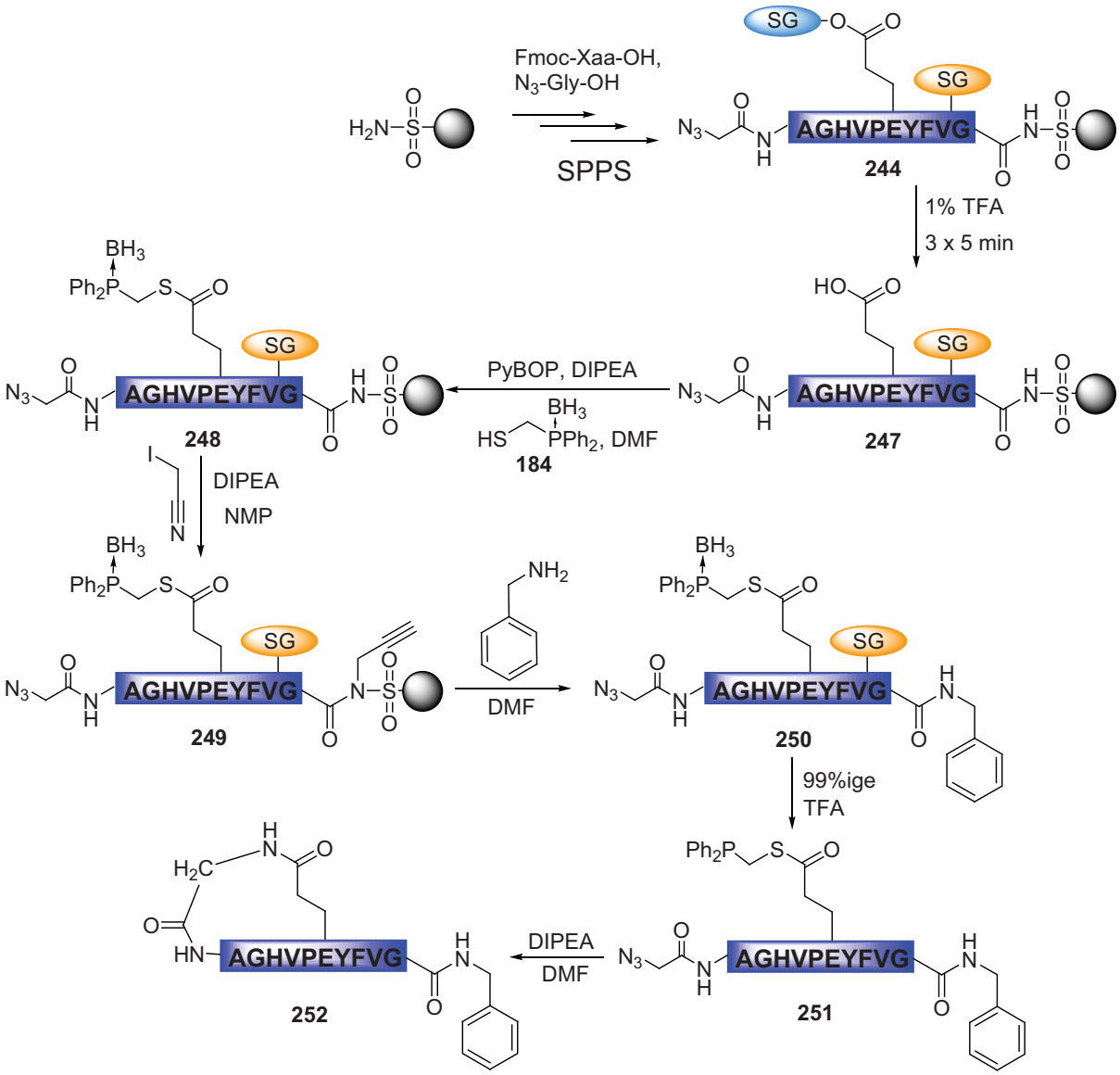
Eine Möglichkeit, lange saure Abspaltungen zu vermeiden, ist die Verwendung anderer Harze, an denen die Peptide unter anderen Bedingungen abgespalten werden. Ein Beispiel ist das Sulfonamid-Harz. Dieses besitzt einen Safety-catch-Linker. Das Peptid wird unter den Standardbedingungen der Peptidfestphasensynthese auf dem Harz immobilisiert. Als erstes wurde eine Testabspaltung gemacht. Wie in Schema 53 gezeigt, wird das Harz für die Abspaltung zunächst aktiviert. Hierzu werden Iodacetonitril und DIPEA als Base in NMP gelöst zum Harz gegeben und dieses unter Lichtausschluss 24 h geschüttelt. Anschließend wird das Peptid **245** mit Hilfe eines nukleophilen Angriffs vom Harz abgespalten. Als Nukleophil wurde Benzylamin verwendet. Dazu gibt man in DMF gelöstes Benzylamin zum gewaschenen Harz **245** und es wird für weitere 12 h geschüttelt.



Schema 53: Abspaltung vom Sulfonamid-Harz

Mit dieser Abspaltung, sollte die Thioestersynthese mit anschließender Zyklisierung auf dem Sulfonamid-Harz durchgeführt werden. Nach Synthese des Peptids wird analog zur Reaktion auf dem Wang-Harz (Kapitel 4.5.2.1.) zunächst der Thioester **244** synthetisiert. Als

Schutzgruppe wurde auch hier das säurelabile O-2-PhiPr verwendet. Nach der Entschützung mit 1%iger TFA wird mit PyBOP® und DIPEA das Diphenylphosphino(boran)methylthiol (**184**) an die freigewordene Säurefunktion verestert. Das erhaltene Peptidthioesterderivat **247** wird mit den beschriebenen Abspaltbedingungen vom Harz abgespalten und anschließend mit 97.5%iger TFA entschützt. Nach Ausfällen in Diethylether wird es in DMF gelöst und durch Zugabe von DIPEA die Zyklisierung induziert. Die genaue Synthese ist in Schema 54 gezeigt.

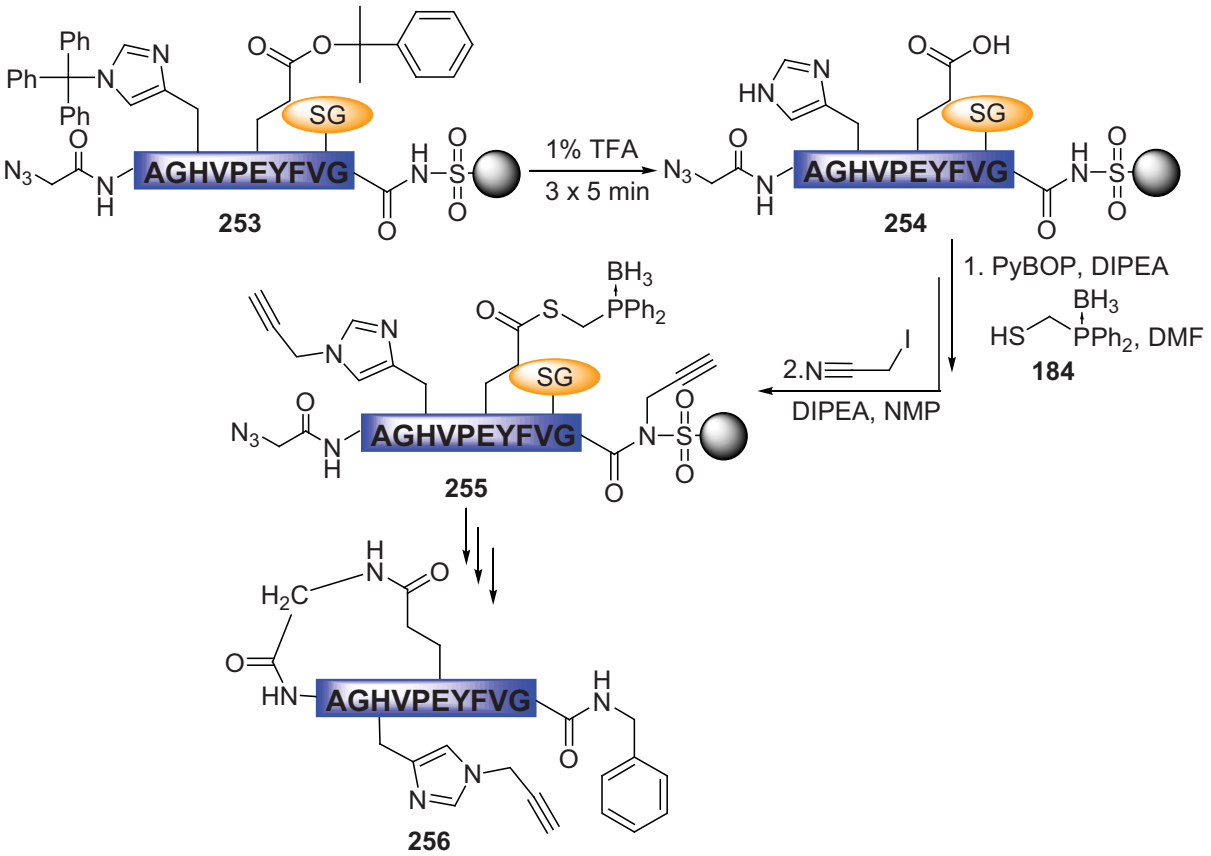


Schema 54: Einbeziehung eines Sulfonamid-Harzes in die Seitenketten-Zyklisierung

Ergebnisse

Es stellte sich heraus, dass das Umstellen auf das Sulfonamid-Harz zwar die gewünschte Zyklisierung zu **252** lieferte, aber durch die Abspaltbedingungen ein Großteil des Produkts alkyliert wurde. Zudem gibt es auch einige weitere Nebenprodukte. Die Alkylierung ist

einfach zu erklären, wenn man die Synthese genauer betrachtet. So kann durch die Entschützung der Glutaminsäure-Seitenkette gleichzeitig die Trityl-Schutzgruppe des Histidins abgespalten werden (**254**). Es entsteht mit dem freien NH eine geeignete Position zur Alkylierung, wenn das Harz zur Abspaltung mit Iodacetonitril aktiviert wird (Schema55).



Schema 83: Zyklisierung auf Sulfonamid-Harz mit gleichzeitiger ungewollter Alkylierung des Histidin

In Abbildung 35 ist das HPLC-Spektrum dieser Reaktion gezeigt.

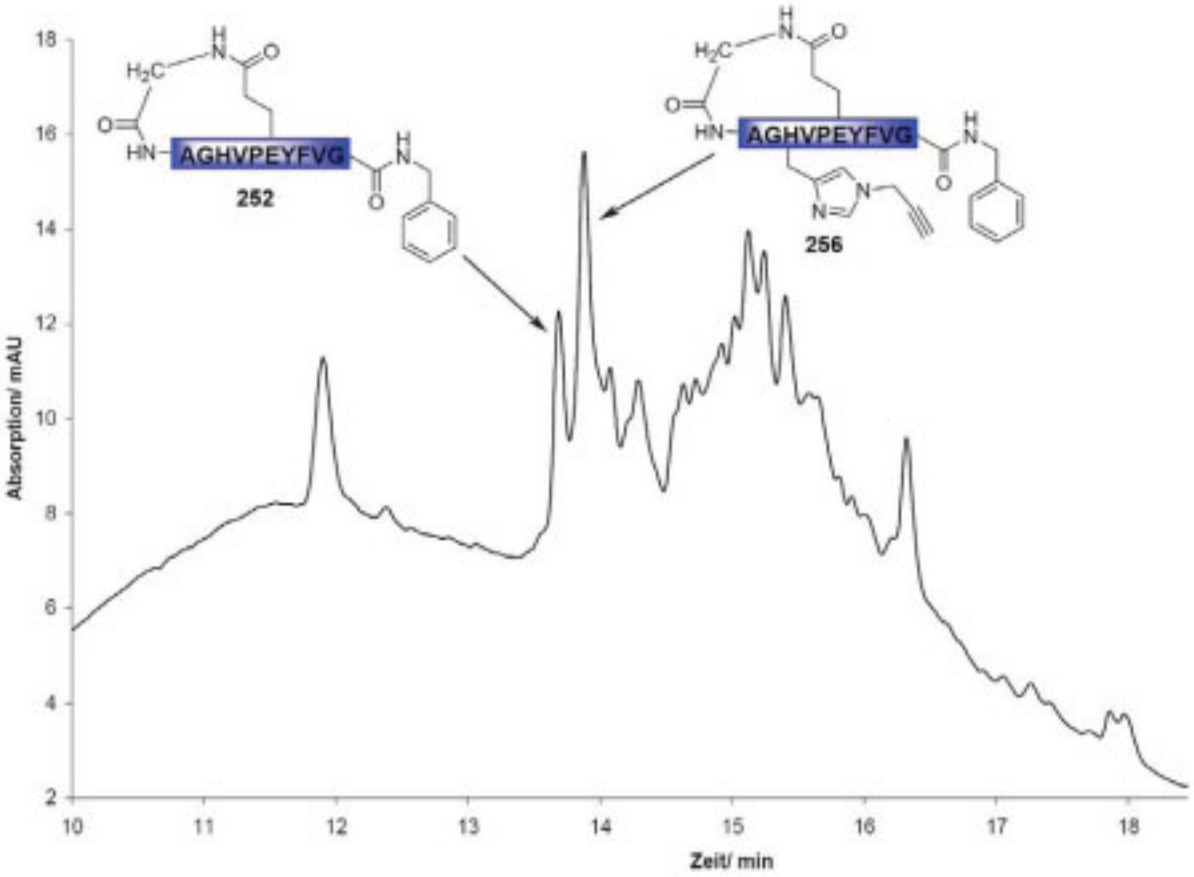


Abbildung 35: HPLC-Spektrum der Synthese auf einem Sulfonamid-Harz mit anschließender Zyklisierung

Die Zeit der Entschützung wurde verkürzt, um die Wahrscheinlichkeit der Trityl-Abspaltung zu minimieren. Dies hatte jedoch keinen Erfolg. Eine weitere Möglichkeit wäre anstelle der Trityl-Schutzgruppe am Histidin Boc als Schutzgruppe zu verwenden. Allerdings schirmt Boc den Stickstoff des Histidins bei weitem nicht so gut ab und die Boc-Gruppe ist instabil gegenüber längerer Behandlung mit Piperidin. Es kommt zur Entschützung des NH am Imidazolring des Histidin.[176] Auch in der späteren Synthese wäre eine zur Instabilität neigende Schutzgruppe wegen der Nukleophilie des Imidazol-Stickstoff ungeeignet. So wäre die Alternative eine andere, orthogonale Schutzgruppe an der Säurefunktion. Dabei gibt es drei in Frage kommende (Abbildung 36), wovon zwei kommerziell erhältlich sind. Dies sind die Dmab- (**258**) und die Allyl-Schutzgruppe (**257**).

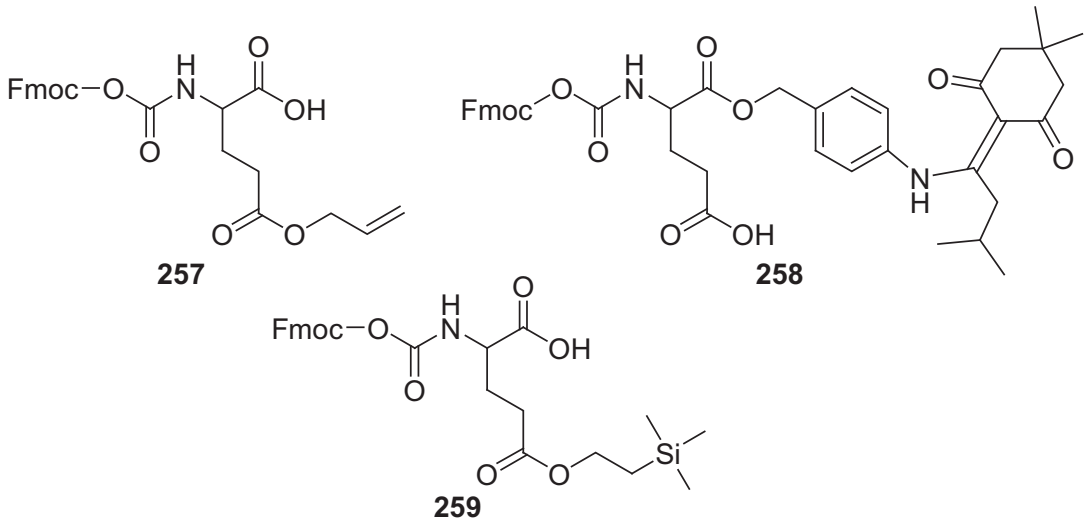
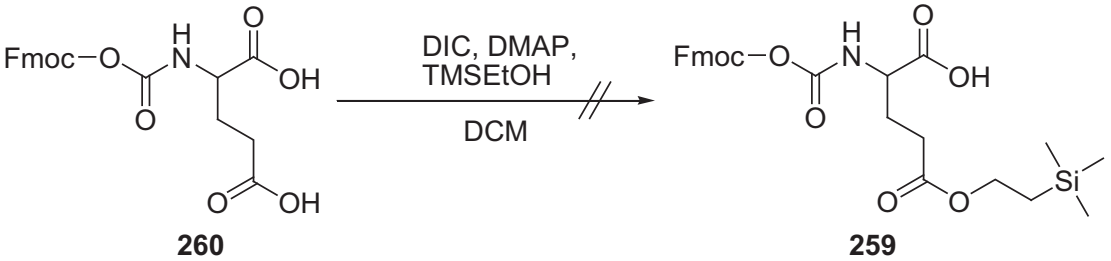


Abbildung 36: Fmoc-Building Blocks, C-terminale Schutzgruppen: Allyl (**257**), Dmab (**258**), TMSEt (**259**)

Die Dmab-Schutzgruppe (**258**) stellte sich sehr schnell als unbrauchbar heraus. Schon bei der Peptidsynthese kommt es beim Versuch des Einbaus zu Komplikationen, was einen Abbruch der Sequenz zur Folge hat. Ähnliche Probleme sind auch schon mehrfach in der Literatur beschrieben, in denen es mit Dmab-geschützter Asparaginsäure zur N-terminalen Imid-Bildung kam.[177-179] Solche Strukturen konnten allerdings hier bei der Glutaminsäure nicht identifiziert werden. Deshalb wurde versucht mit der Allyl-Schutzgruppe (**257**) eine Alternative zu finden. Da die Abspaltung Palladium-katalysiert ist, kommt es auch hier zu Problemen, vermutlich mit dem sich im Peptid befindenden Azid.



Schema 56: TMSEt-Schützung

Als letzte Schutzgruppe bleibt die unter milden Bedingungen mit Tetrabutylammoniumfluorid abspaltbare TMSEt-Schutzgruppe (**259**). Diese ist als Baustein für die Fmoc-Strategie in der Glutaminsäure-Seitenkette kommerziell nicht erhältlich. So wurde versucht sie zu synthetisieren. Als Ausgangssubstanz wurde die N-terminal Fmoc- und C-terminal Allyl-geschützte Glutaminsäure (**260**) verwendet. Diese wurde mit DIC und DMAP in DCM aktiviert und mit Trimethylsilylethanol umgesetzt (Schema 56). Diese Synthese konnte jedoch

nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Der Vorteil dieser Schutzgruppe wäre immens. Sie würde auch eine Synthese auf einem TGT®-Harz ermöglichen, was eine Effizienzsteigerung bedeuten würde. So verliefe eine spätere Abspaltung vom Harz deutlich schneller als im Vergleich zum Wang-Harz. Gegenüber dem Sulfonamid-Harz ist die Abspaltung vom TGT®-Harz unkomplizierter und wesentlich schneller (nur ein Syntheseschritt), zudem würden die Probleme mit Alkylierungen auch behoben.

4.5. Synthese des Bacteriocin AS-48

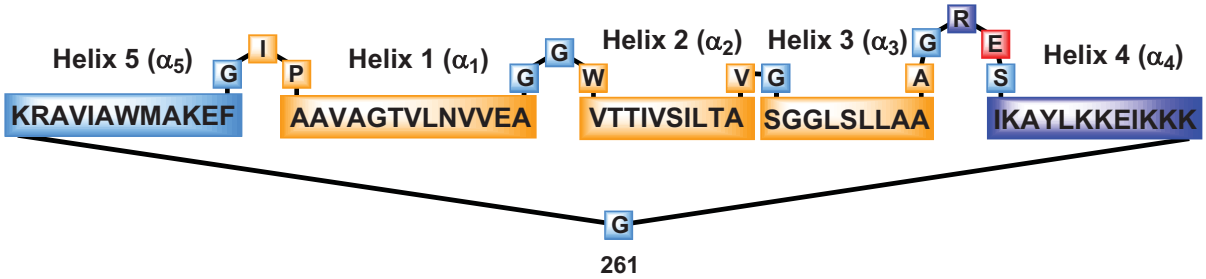
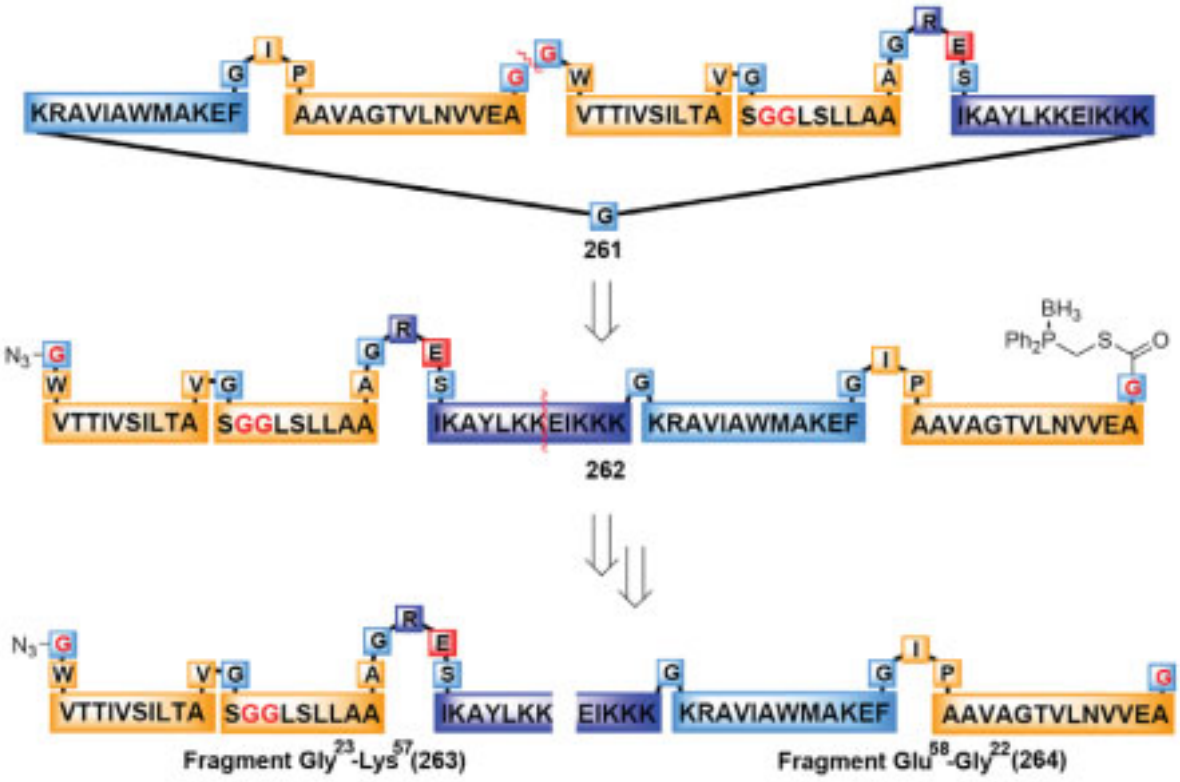


Abbildung 37: Schematische Darstellung des Aufbaus von Bacteriocin AS-48

Das Bacteriocin AS-48 (**261**) (Kapitel 2.1.4.2) findet aufgrund seines breiten Wirkspektrums Anwendung in der Lebensmittelchemie, trotzdem gibt es bisher noch keinen synthetischen Zugang. Durch seine Größe, es handelt sich um ein mit 70 Aminosäuren recht großes zyklisches Protein, bietet es ein interessantes Target für die Anwendung der entwickelten Zyklisierungsstrategie. Bei einer genaueren Betrachtung der Sequenz des Bacteriocin AS-48 (**261**) (Abbildung 37), gibt es für eine spurlose Staudinger-Ligation zwei retrosynthetische Ansätze. Dies sind die beiden Glycin-Glycin-Bindungen. Die eine befindet sich im Loop zwischen den Helices α_1 und α_2 während die zweite in der Helix α_3 liegt. Eine Spaltung des Rückgrats in einer Helix kann zur Destabilisierung der räumlichen Struktur führen, deshalb sollte die Bindung zwischen Gly^{22} und Gly^{23} zur Ligation verwendet werden.

Schema 57 zeigt die erste Retrosynthese. Aufgrund der Sequenzlänge benötigt man zur Totalsynthese noch mindestens eine weitere Ligation, da die Sequenz aus mindestens zwei Strängen hergestellt werden muss. Nach Spaltung der zyklischen Struktur erhält man nach Fragmentierung der linearen Vorstufe **262** zwei 35 Aminosäuren lange Stränge (**263** und **264**). Deren Verknüpfungsstelle zwischen Lys[57] und Glu[58] liegt dabei allerdings in einer Region die aufgrund ihres sterischen Anspruchs ungünstig für Ligationen ist.

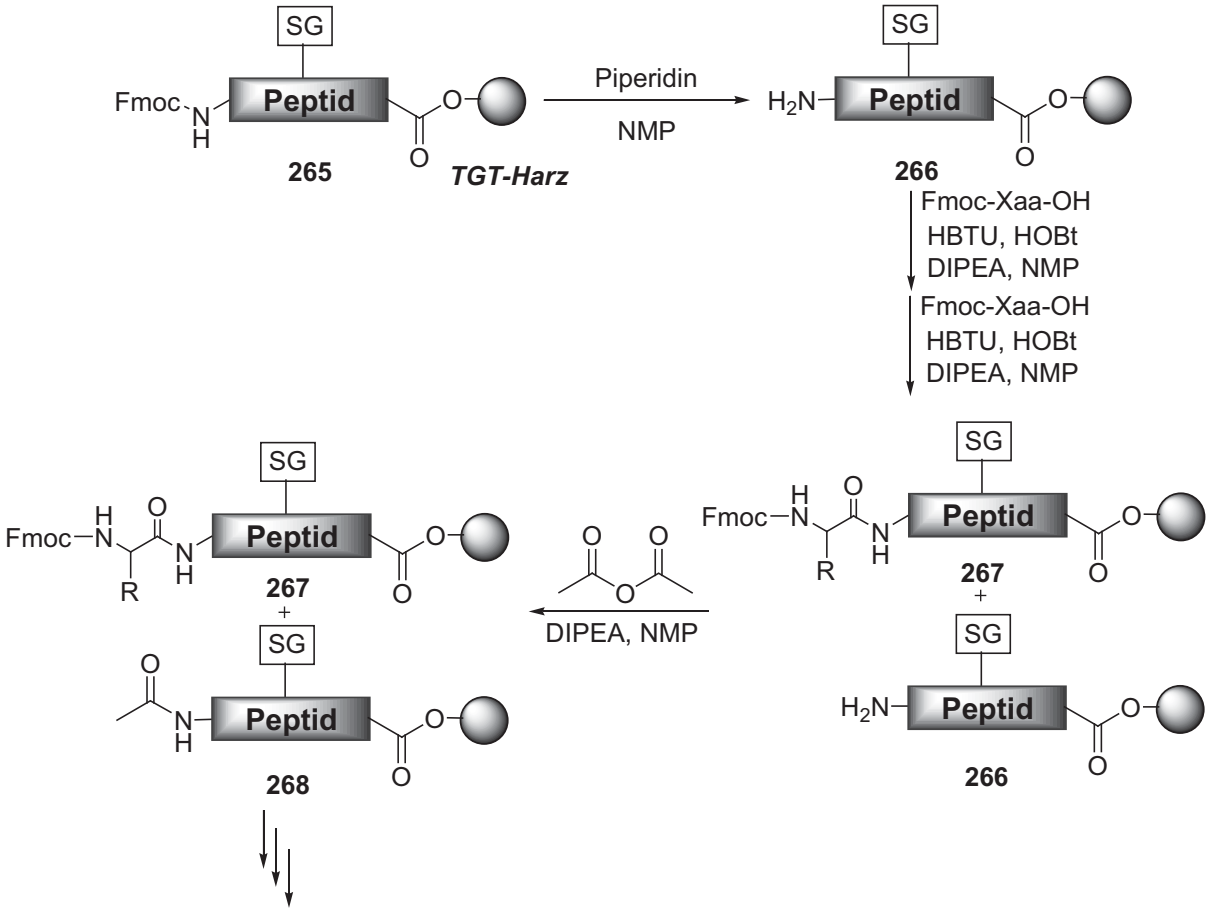


Schema 57: Mögliche Retrosynthese beginnend mit zwei Peptid-Fragmenten

4.5.1. Peptidsynthese der Fragmente

4.5.1.1. Erste Synthesen

Zur Synthese der Peptidstränge Glu[58]-Gly[22] (**264**) und Gly[23]-Lys[57] (**263**) wurde die Standardfestphasenpeptidsynthese basierend auf einer Fmoc-Strategie verwendet. Aufgrund der schwierigen Synthese wurden in jedem Schritt Doppelkupplungen verwendet und nach jeder Aminosäure ein „Capping“ durchgeführt, um zu viele Nebenprodukte zu verhindern. Als Capping-Cocktail wurde Acetanhydrid mit DIPEA als Base in DMF verwendet.

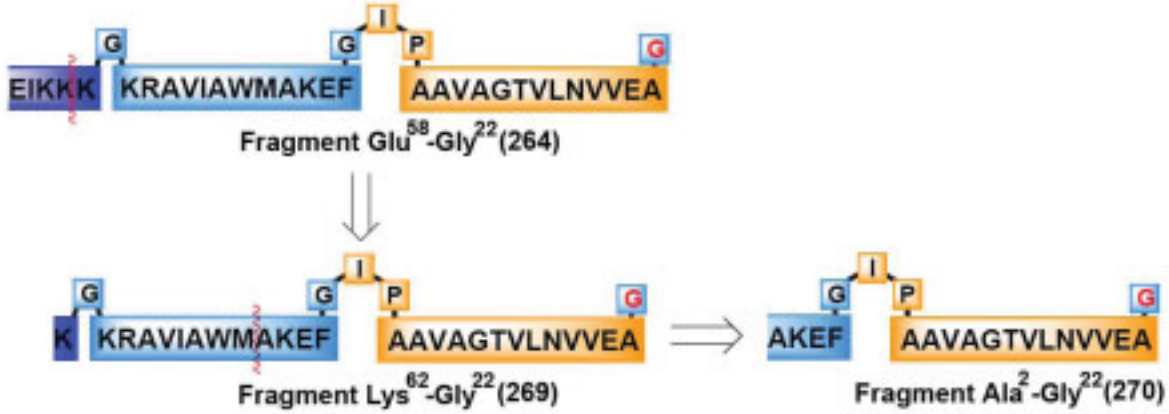


Schema 58: Allgemeines Reaktionsschema zur Peptidsynthese mit Doppelkupplung und Capping

Ein allgemeines Schema zur Kupplung einer Aminosäure mit den einzelnen Syntheseschritten ist in Schema 58 gezeigt. Die Synthesen wurden mehrmals unterbrochen, um Testabspaltungen mittels ESI-ToF zu untersuchen.

Ergebnisse

In Schema 59 ist die Retrosynthese des Fragment Glu^{58}-Gly^{22} (**264**) gezeigt. Es wird in zwei Abschnitten synthetisiert und jeder Teilschritt über ESI-ToF analysiert. Die Synthese wird im ersten Schritt bis Ala^{2} (**270**) durchgeführt. Die zweite Kupplungssequenz erfolgt bis Lys^{62} (**269**).



Schema 59: Retrosynthese des Fragment Glu^{58}-Gly^{22} (**264**)

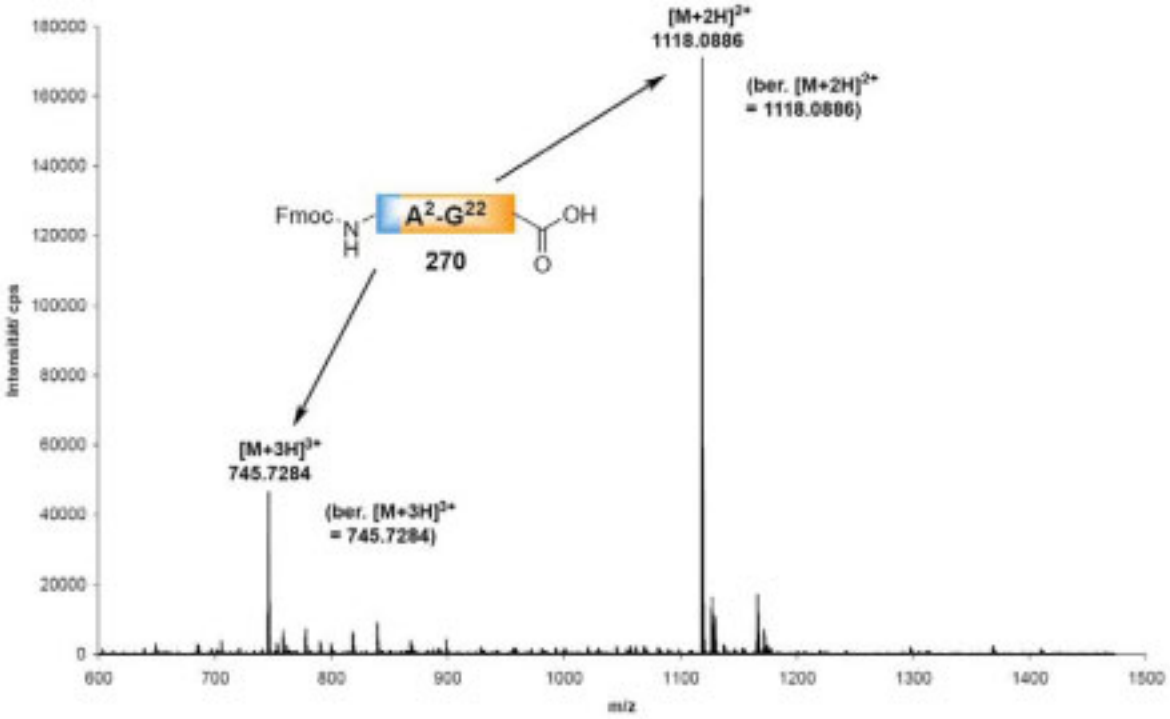


Abbildung 38: Roh-Massenspektrum des Fragmentabschnitts Ala^{2}-Gly^{22}

Begonnen wurde mit dem 21 Aminosäuren lange Abschnitt Ala^{2}-Gly^{22} (**270**) vom Peptidstrang Glu^{58}-Gly^{22} (**264**) und man erhielt das in Abbildung 38 gezeigte Spektrum. Die

Synthese verläuft bis zu diesem Zeitpunkt gut und es sind nur wenige Nebenprodukte zu erkennen. Eindeutig sind die Signale für $[M+2H]^{2+}$ bei 1118.0886 [ber.: 1118.0886] und für $[M+3H]^{3+}$ bei 745.7284 [ber.: 745.7284]. Die Synthese wird bis Lys^{62} fortgeführt und eine weitere Testabspaltung gemacht. Zu diesem Zeitpunkt ist das Peptid **269** so hydrophob, dass es nur in einem Gemisch aus DMSO und Acetonitril gelöst werden konnte. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 39 gezeigt. Die Nebenprodukte nehmen deutlich zu, das Ergebnis ist aber für ein hydrophobes Peptid mit 31 Aminosäuren (**269**) noch gut. Man findet mit 1125.9485 [ber.: 1125.9480] das $[M+3H]^{3+}$-Signal und mit 844.7146 [ber.: 844.7130] das Signal des $[M+4H]^{4+}$. Allerdings gibt es auch ein deutliches $[M+3H]^{3+}$-Signal bei 1140.6120, das dem Produkt nicht zugeordnet werden kann.

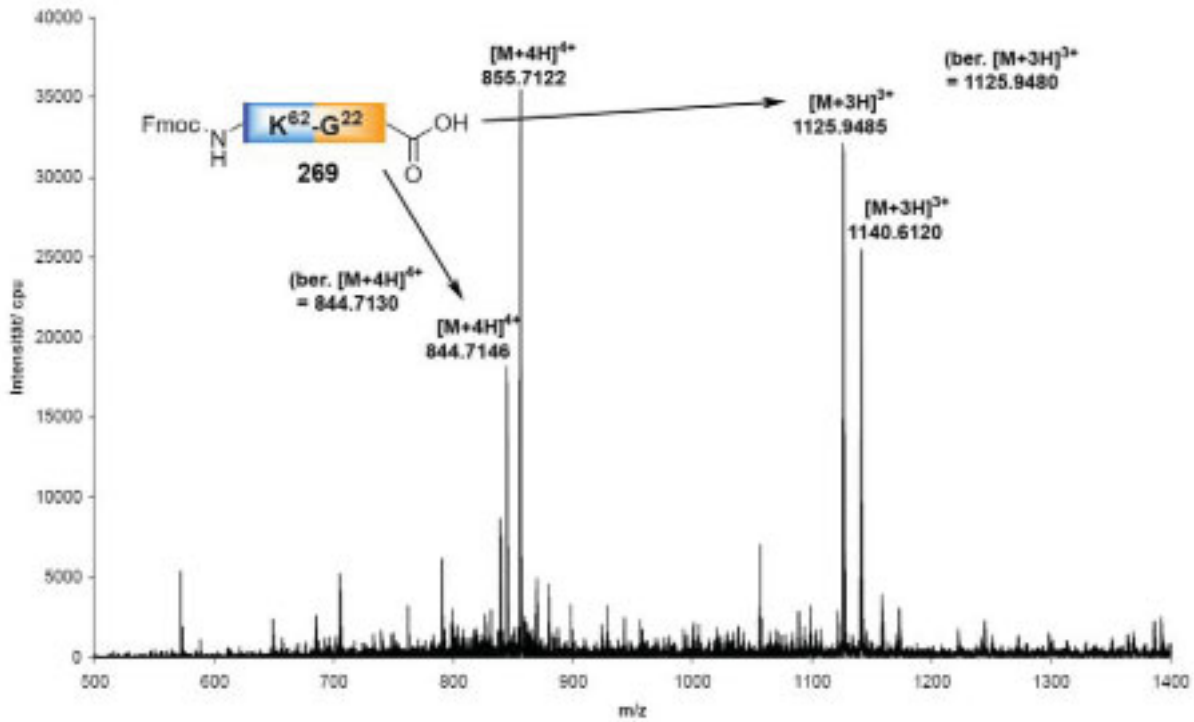


Abbildung 39: Roh-Massenspektrum des Fragmentabschnitts Lys^{62}-Gly^{22}

In einem letzten Syntheseschritt werden noch die Aminosäuren Glu^{58}-Lys^{61} gekuppelt und eine Testabspaltung durchgeführt. Die Analyse des entstandenen Peptids über ESI-ToF ist in Abbildung 40 gezeigt. Die letzten vier Aminosäuren lassen sich ohne Probleme einbauen. Man findet neben dem $[M+3H]^{3+}$-Signal des Produkts bei 1292.0571 [ber.: 1292.0535] ein Signal bei 1306.7179. Dessen Massendifferenz ist identisch zu dem nicht identifizierten $[M+3H]^{3+}$-Signal der Stufe zuvor. Die übrigen kleineren Nebenprodukte sind nahezu

unverändert. Die Sequenz birgt keine problematischen Abschnitte mit Ausnahme des hohen Anteils hydrophober Aminosäuren im ersten Abschnitt (Ala^{66}-Gly^{22}).

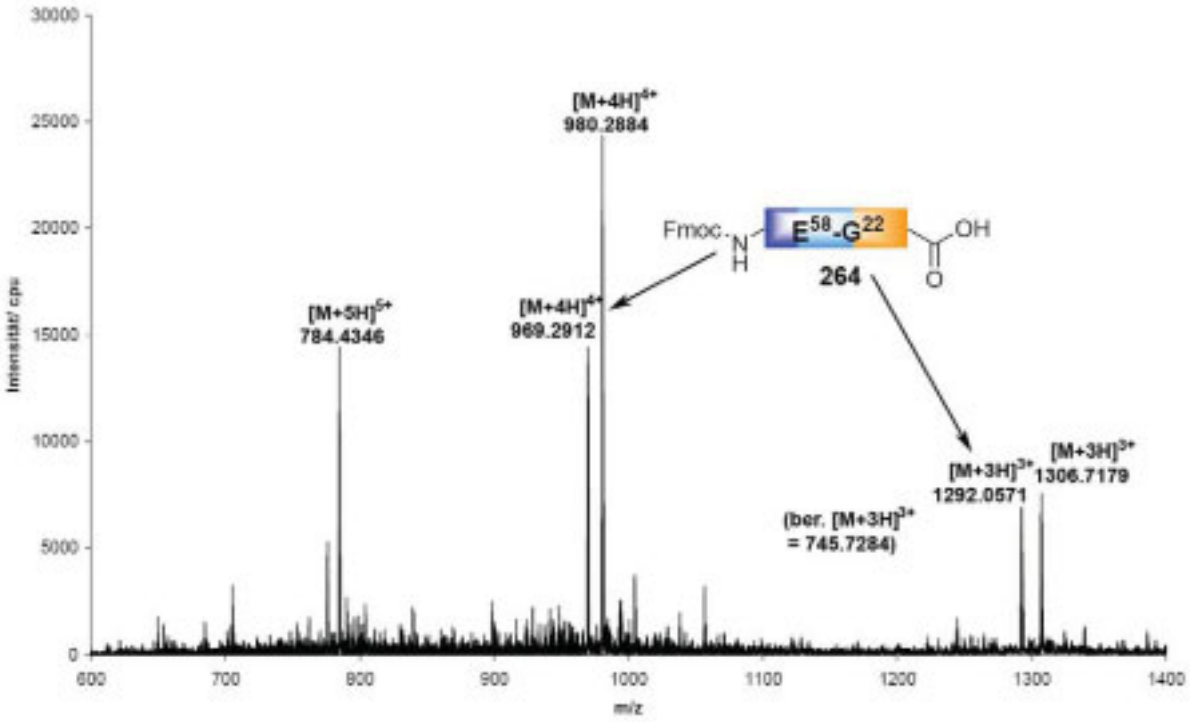
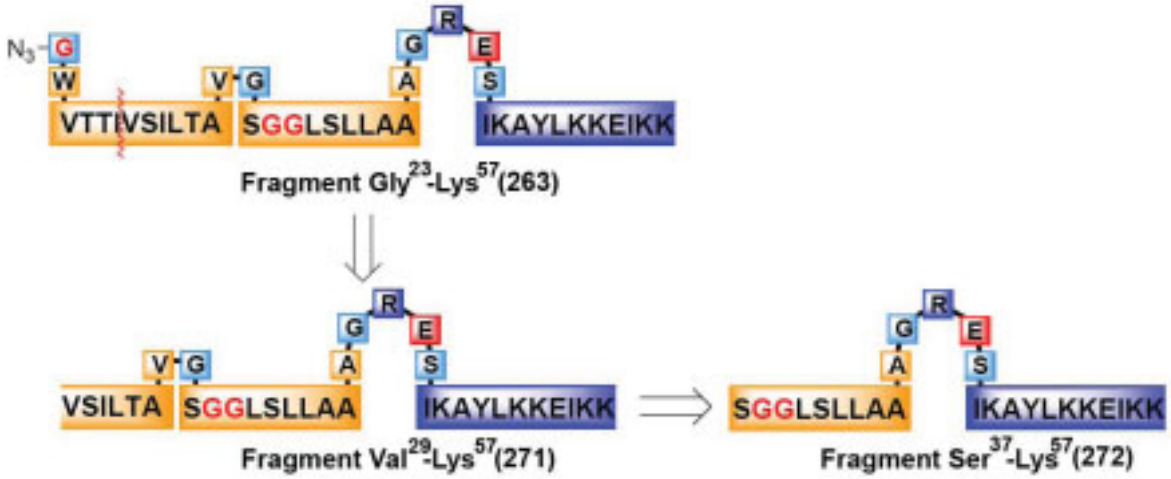


Abbildung 40: Roh-Massenspektrum des Fragments Glu^{58}-Gly^{22} (**264**)



Schema 60: Retrosynthese des Fragment Gly^{23}-Lys^{57} (**263**)

Die in Schema 60 gezeigte Retrosynthese gehört zum zweiten Fragment mit den Aminosäuren Gly^{23}-Lys^{57} (**263**). Die Synthese erfolgt in zwei Abschnitten, nach denen zur Analyse jeweils ein ESI-ToF aufgenommen wird. Im ersten Schritt wird bis Ser^{37} (**272**) und im zweiten bis Val^{29} (**271**) gekuppelt.

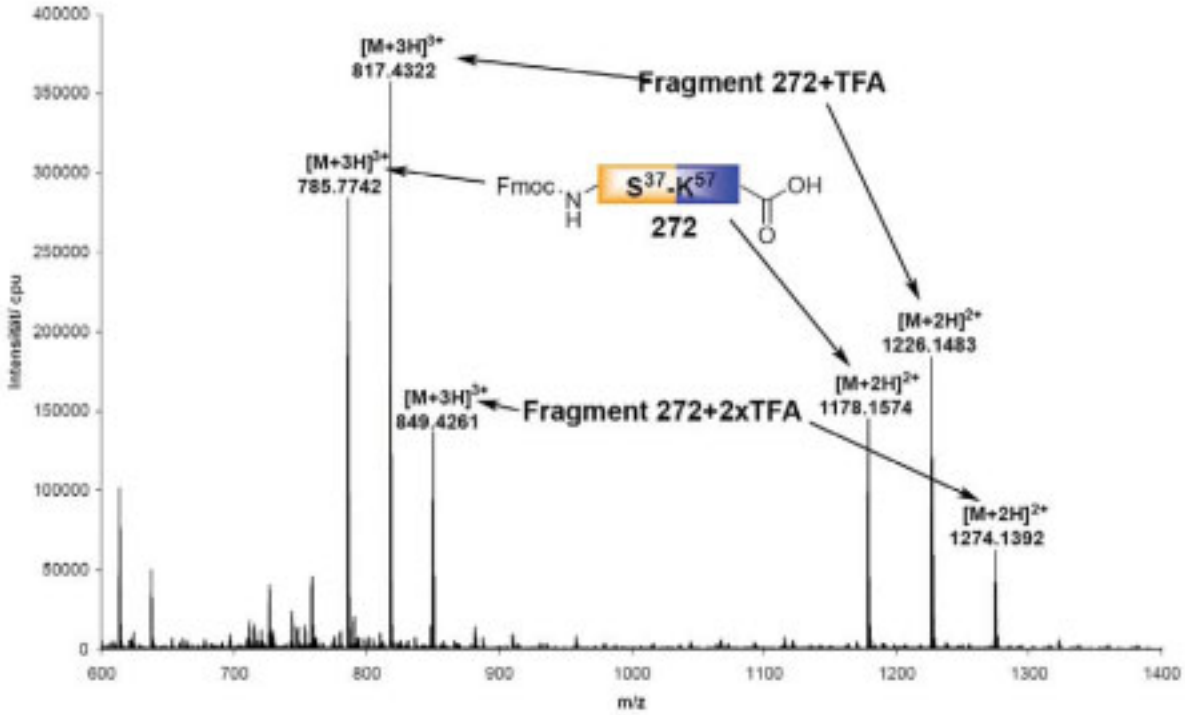


Abbildung 41: Roh-Massenspektrum des Fragmentabschnitts Ser^{37}-Lys^{57} (**272**)

Zunächst wurde der 21 Aminosäuren lange Abschnitt Ser^{37}-Lys^{57} (**272**) synthetisiert. Die Testabspaltung ergab im ESI-ToF das in Abbildung 41 gezeigte Spektrum. Das Signal mit der Masse 1178.1574 [ber.: 1178.1574] gehört zum gewünschten Produkt **272** . Die Massen 1226.1456 und 1274.1367 sind Adukte des Peptidfragments Ser^{37}-Lys^{57}, die während der Abspaltung an ihren Alkoholfunktionen des Serin und Threonin ein oder zweimal mit TFA verestert wurden. Die Massendifferenz beträgt dabei pro TFA-Molekül +96. In Abbildung 41 sieht man, dass auf dieser Stufe neben dem Produkt **272** einige wenige Nebenprodukte entstanden sind. Innerhalb dieses Fragments liegt ein sehr hydrophober Bereich mit drei Alaninen in Folge. Das Abspaltungsprotokoll des Peptidsynthesizers deutete auf Aggregatbildung hin. Diese kann schlechtere Abspaltungen und Kupplungen zur Folge haben, da die N-terminale Aminosäure nicht mehr gut zugänglich ist. Das Massenspektrum zeigt zu diesem Zeitpunkt dieses Probleme nicht, da nur wenig Nebenprodukte erkennbar sind (Abbildung 41).

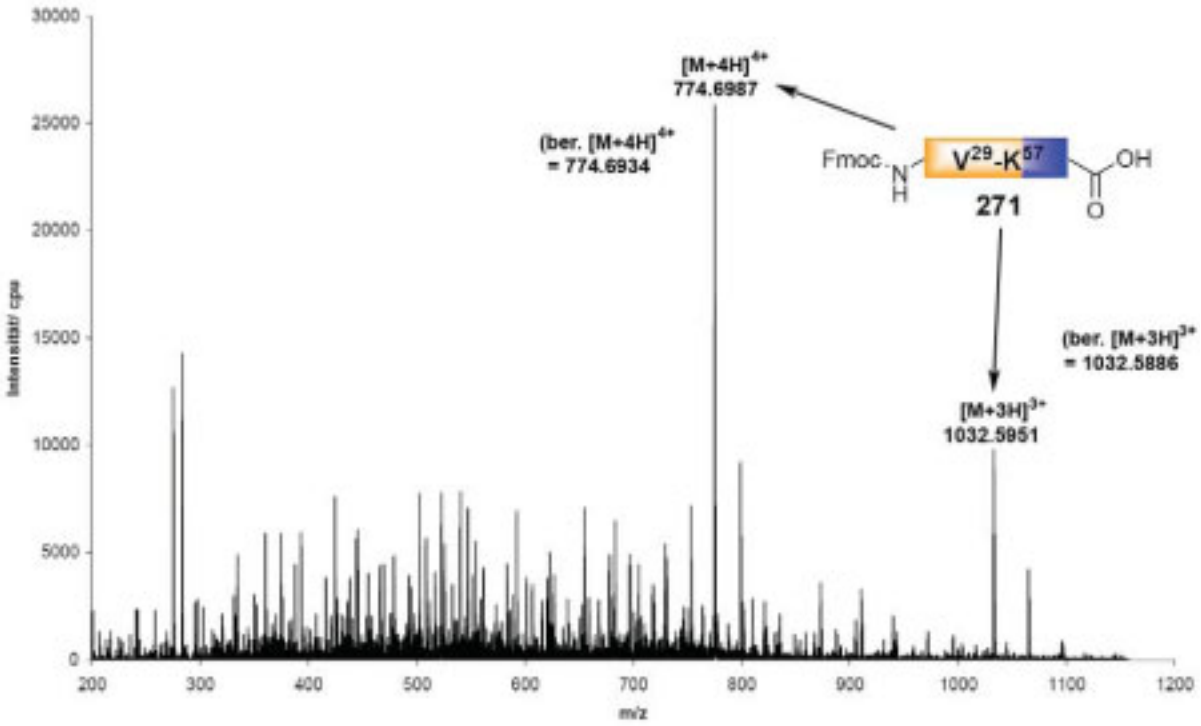


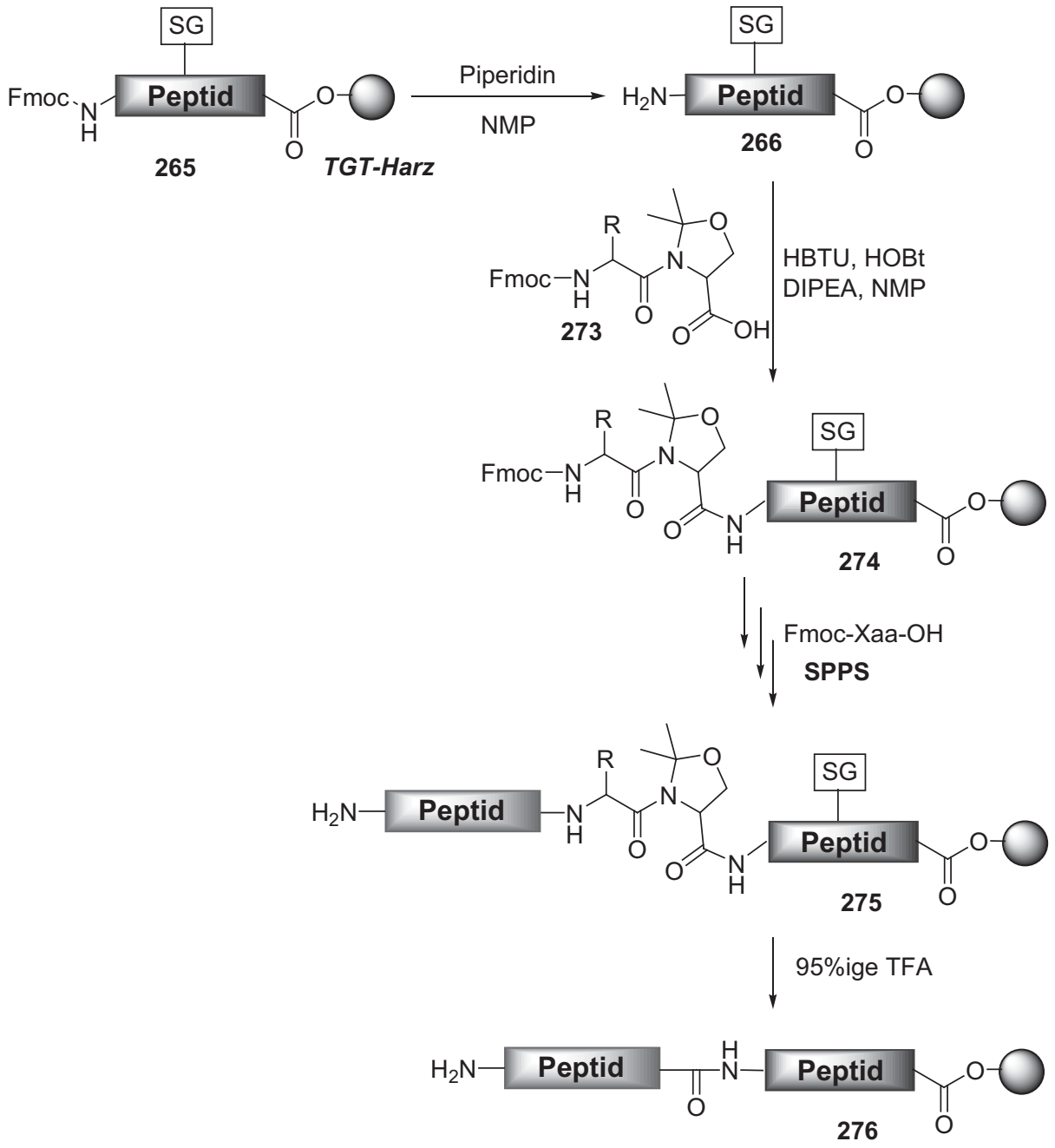
Abbildung 42: Roh-Massenspektrum des Fragmentabschnitts Val^{29}-Lys^{57} (**271**)

Kuppelt man die nächsten acht Aminosäuren bis einschließlich Val^{29} so erhält man (Abbildung 42). zwar das gewünschte Fragment mit den Signalen für $[M+3H]^3$ bei 1032.5951 [ber.: 1032.5886], oder auch das $[M+4H]^{4+}$-Signal bei 774.6987 [ber.: 774.6934]. Das Spektrum zeigt daneben aber auch sehr viele Nebenprodukte. Dies ist auf etliche unerwünschte Reaktionen bei den letzten acht Kupplungen zurückzuführen.
Nach Einführung der verbleibenden sechs Aminosäuren zum vollständigen Peptidfragment gibt es mehrere Hauptsignale, die aber nicht mit der Masse des gewünschten Produkts korrelieren. Ein Grund für die hier auftretenden schlechten Kupplungen könnte der Abschnitt mit den drei aufeinanderfolgenden Alaninen Ala^{44}-Ala^{46} und daraus folgende Aggregatbildung sein. Aber auch der Bereich Val^{25}-Ile^{28} mit zwei Threoninen scheint schwierig.

4.5.1.2. Pseudoproline

Pseudoproline bieten einen möglichen Lösungsansatz. Durch die Verbrückung der Serin- oder Threonin-Seitenkette mit dem Amid-Stickstoff des Rückgrats einer beliebigen Aminosäure wird eine Prolin-ähnliche Struktur ausgebildet.

Durch die Pseudoproline (**273**) wird die Sekundärstruktur der Peptide zerstört. Dies vermindert die Bildung von Aggregaten und führt zu besseren Entschützungen und Kupplungen.[180] Die Pseudoproline (**273**) sind als Dipeptide Fmoc-geschützt kommerziell erhältlich und lassen sich wie eine normale Aminosäure unter Standardbedingungen kuppeln (Schema 61).



Schema 61: Peptidsynthese mit Pseudoprolin-Einbau

Durch eine spätere TFA-Entschützung verliert das Peptid **275** die Verbrückungen. So ist kein weiterer Syntheseschritt zur Entschützung nötig. Diese Pseudoproline (**273**) sollten im

Fragment Lys^{62}-Gly^{22} (**269**) möglichst über die gesamte Sequenz verteilt, aber vor allem vor und nach den Problemregionen eingebaut werden. In Abbildung 43 ist die Struktur des Bacteriocin mit den eingebauten Pseudoprolinen (**273**) gezeigt. Die Problemregionen sind rot umkreist.

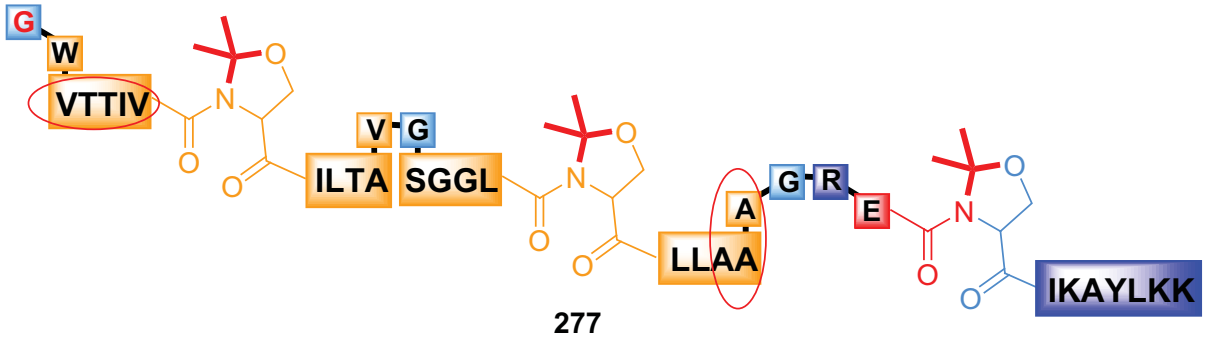


Abbildung 43: Fragment Lys^{62}-Gly^{22} mit Pseudoprolinen (**277**)

Ergebnisse

Leider konnte durch den Einbau von Pseudoprolinen das Problem nur teilweise gelöst werden. Die Synthese läuft zunächst deutlich besser und auch die auftretenden Kupplungsprobleme in der Alanin reichen Region wurden eliminiert. Das Abspaltmuster zeigte keine Aggregationen mehr an. Dennoch fiel die Synthese im Anschluss an diese Region wieder deutlich ab und das Ergebnis bei einer Synthese bis zum Gly^{22} ist identisch mit dem zuvor erhaltenen. Es gibt wiederum mehrere Hauptpeaks wovon jedoch keiner dem gewünschten Produkt entspricht. Es bleibt festzuhalten, dass eine Synthesestrategie mit dem Aufbau von nur zwei Peptidfragmenten im Fall der sehr komplexen und schwierigen Sequenz des Bacteriocin AS-48 nicht in Frage kommt. Der Teilbereich von Glu^{58}-Gly^{22} ist als ein Strang über Festphasenpeptidsynthese darstellbar. Probleme gibt es lediglich auf den Sequenzabschnitt Gly^{23}-Lys^{62}. Infolgedessen muss an dieser Stelle überlegt werden, wie eine weitere retrosynthetische Zerlegung erfolgen kann.

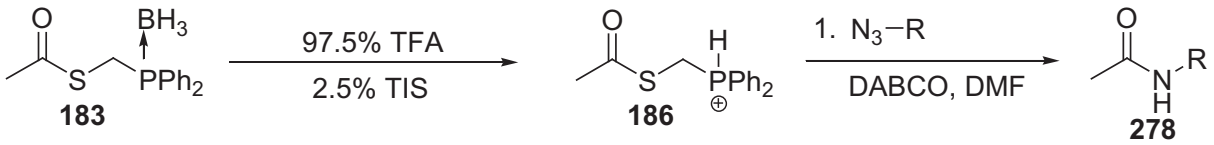
Dies bedeutet gleichzeitig, dass hier mehrere Ligationsmethoden zum Einsatz kommen müssen. Die Herausforderung besteht darin, dass es zum einen keine Cysteine und nur die zwei Glycin-Glycin-Bindungen im Bacteriocin AS-48 (**261**) gibt (siehe Abbildung 37). Da sich die Synthese eines so komplexen Systems als sehr umfangreich und aufwendig darstellt, wurde entschieden, dass dieses Teilprojekt den Rahmen dieser Doktorarbeit übersteigt. Allerdings gibt es in der Arbeitsgruppe ein interessantes Projekt, in dem Systeme für mehrere Ligationen als Eintopfreaktion zugänglich gemacht werden sollen. Vielleicht führt dieser

Aspekt zu einem späteren Zeitpunkt zur Möglichkeit, die hier angefangene Synthese erneut anzugehen und zum Erfolg zu führen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auf Basis der spurlosen Staudinger-Ligation ein Methodenspektrum zur induzierten Zyklisierung von Peptiden und Proteinen entwickelt werden basierend auf den Arbeiten von van Maarseveen et al.[163], die anhand eines Boran-geschützten Phosphinothioesters durch basische Endschützung eine Zyklisierung von Dipeptiden induzierten. Das Hauptaugenmerk lag hier vor allem darauf, ein geeignetes System zu finden, das mildere Abspaltbedingungen bei Raumtemperatur toleriert und somit den Transfer auf Peptidzyklisierungen ermöglicht. Des weiteren sollte die Bioorthogonalität der Staudinger-Ligation nutzbar gemacht werden, um so mögliche Vorteile einer Vorfaltung peptidischer und proteinischer Strukturen für die Makrozyklisierung zu nutzen.

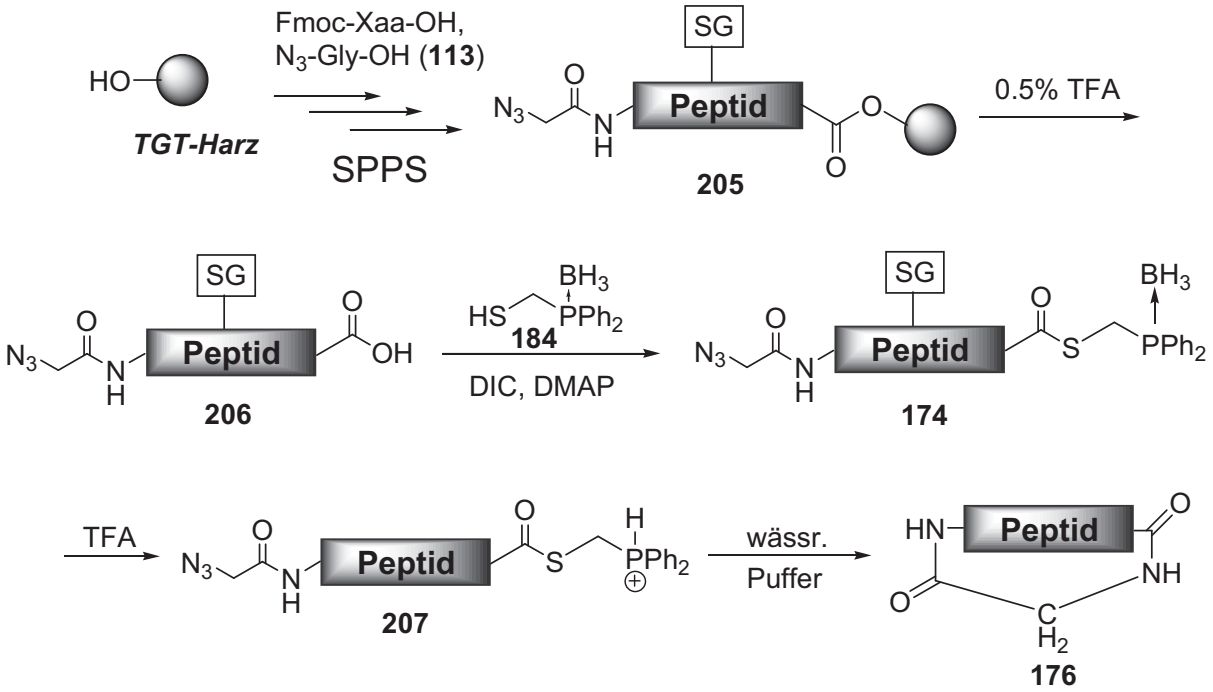
Boran-Komplexe sind gegenüber Säure nicht stabil.[168] Auf dieser Grundlage wurde eine Strategie entwickelt, um das Phosphin im Zusammenhang einer Entschützung der Aminosäure-Seitenketten in einem Schritt mit zu entschützen. Dies macht die Bioorthogonalität der Staudinger-Ligation nutzbar und spart gleichzeitig einen Syntheseschritt, sodass die Effizienz der Methode deutlich erhöht wird. Zunächst wurde anhand des *S*-Acetyl(diphenylphosphino(boran))methylthiol (**183**) die Entschützung mit TFA getestet. Mit Azidoglycin (**113**) und Benzylazid (**189**) wurden zwei niedermolekulare Testsubstrate gewählt, um die Staudinger-Ligation unter diesen Bedingungen zu untersuchen (Schema 62). Es konnte gezeigt werden, dass die Methode am Beispiel der Acetylierung zum *N*-Acetylglycin (**115**) oder *N*-Acetylbenzylamin (**190**) abläuft und man bei der Staudinger-Ligation mit Benzylazid (**189**) einen über NMR ermittelten Umsatz von 99% erhält. Über ^{11}B-NMR konnte einwandfrei nachgewiesen werden, dass durch die Entschützung ein unreaktives trikoordiniertes Borat entsteht.



Schema 62: Studie mit niedermolekularen Aziden (R = Glycin oder Benzyl)

Im nächsten Schritt sollten die erhaltenen Ergebnisse auf peptidische Systeme übertragen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich zunächst aus einem Azidopeptid nach Abspaltung von einem säurelabilen TGT-Harz mit Aktivierungsreagenzien ein C-terminaler

dem Diphenylphosphino(boran))methylthiol (**184**) darstellen ließ. Unter Anwendung der Abspaltbedingungen TFA:TIS 97.5:2.5 erfolgte die Entschützung der Aminosäureseitenketten und des Phosphins in einem Schritt und es entstand ein Phosphoniumsalz, das sich durch Zugabe von DIPEA als Base aktivieren ließ und so die Zyklisierung eingeht (Schema 63).

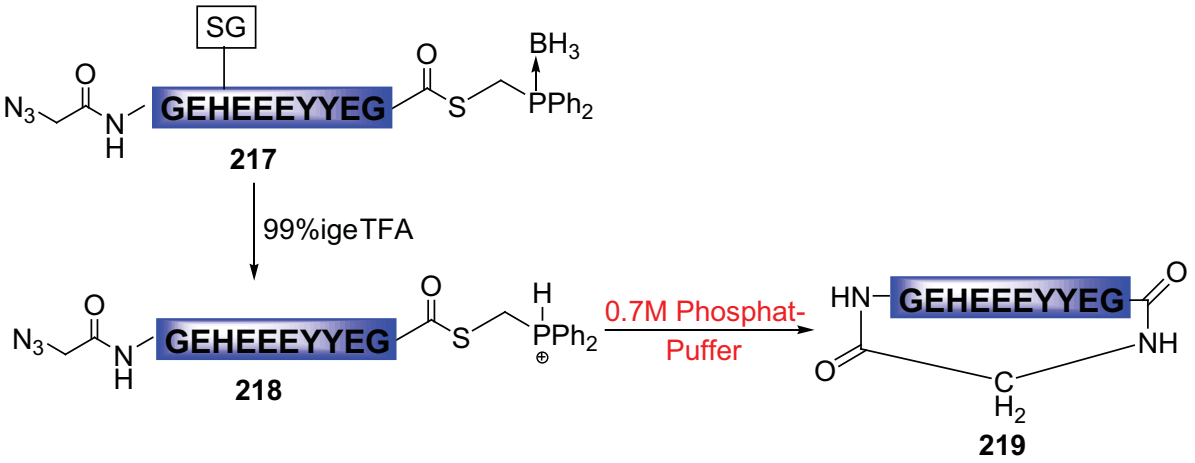


Schema 63: Staudinger-Zyklisierung am peptidischen System

Es konnte durch die Synthese verschiedener zyklischer Peptide gezeigt werden, dass die Methode ein breites Spektrum an Aminosäuren in der Sequenz toleriert. Lediglich mit Lysin und Arginin gab es Schwierigkeiten, da aufgrund des basischen Milieus der Reaktion die Seitenketten des Lysin und des Arginin deprotoniert werden können. Somit können sie am Carbonylkohlenstoff des Thioesters angreifen und Nebenreaktionen verursachen. Des weiteren gibt es keine intermolekularen Kupplungen, was ebenfalls für die Effizienz der Methode spricht. Somit konnte eine prinzipielle Methode zur sauren Entschützung etabliert werden.

Um noch mehr Flexibilität zu erreichen und um eine höhere Chemoselektivität bei der Verwendung von den Aminosäuren Lysin und Arginin zu gewährleisten, sollten die bisherigen Ergebnisse auf ein wässriges System übertragen werden, dessen Vorteil darin liegt, dass der pH-Wert im Gegensatz zur Reaktion in DMF einstellbar ist. Eine Reaktion bei nur milden basischen Bedingungen minimiert die Wahrscheinlichkeit einer Deprotonierung der

milden basischen Bedingungen minimiert die Wahrscheinlichkeit einer Deprotonierung der Aminosäureseitenketten des Lysin und des Arginins deutlich und führt zu weniger Nebenreaktionen. Allerdings können durch den hydrobhoben Charakter des hier verwendeten Linker, um eine ausreichende Löslichkeit in wässrigen System zu gewährleisten, nur sehr hydrophile Peptide eingesetzt werden. Die beste Löslichkeit besaß das Peptid mit der Testsequenz GGEHEEEYYEG. Anhand dieses Peptids wurde das für die Staudinger-Ligation richtige Puffersystem identifiziert. Es stellte sich heraus, dass man mit 0.7M Phosphat-Puffer einen sehr hoch konzentrierten Puffer benötigt, um die von der Entschützung im Peptid verbliebenen Reste an Säure abzupuffern. In dem so erhaltenen System wurden anschließend Zyklisierungen im pH-Bereich von 7-8 durchgeführt. Die optimalsten Bedingungen wurden als pH = 7.5 gefunden (Schema 64).



Schema 64: Staudinger-Zyklisierung in 0.7M-Phosphat-Puffer bei pH = 7.5

Diese optimierten Bedingungen konnten schließlich erfolgreich auf ein Lysin-enthaltendes Peptid mit der Sequenz GGEHEEKYYEG angewendet werden. Es wurde eine den Reaktionen in DMF vergleichbare Ausbeute erhalten. Dagegen war eine Produktisolierung dieses Peptids bei einer Reaktion in DMF aufgrund des geringen Umsatzes nicht mehr möglich. Durch strukturelle Gegebenheiten war die direkte Übertragung der Ergebnisse auf das Arginin-enthaltende Peptid mit der Sequenz GGEHEERYYEG nur eingeschränkt möglich. Die zyklische Struktur dieses Peptids verursachte eine Aggregatbildung, woraufhin es unlöslich ausfiel und eine Aufreinigung nicht mehr möglich war. Anhand eines in starker Verdünnung aufgenommenen analytischen HPLC-Spektrums konnte aber ein identischer Reaktionsverlauf zu den übrigen Reaktionen in 0.7M Phosphat-Puffer gezeigt werden. Ein Arginin-enthaltendes Peptid mit der Sequenz GGEREEEYYEG konnte aufgereinigt werden, allerdings ist die Menge an Nebenprodukt mit hydrolysiertem Thioester und intaktem Azid

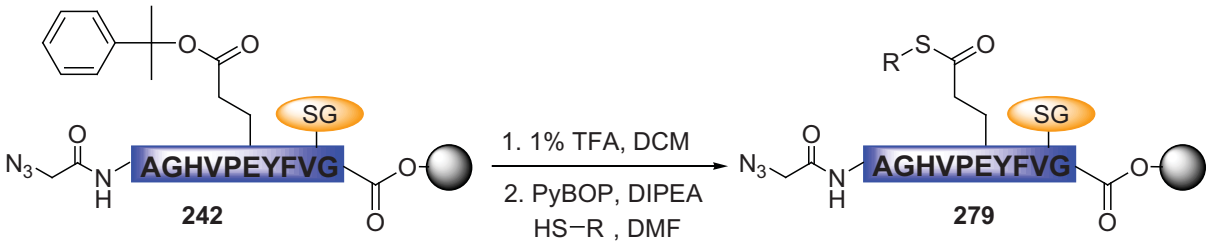
sehr groß. Dies spiegelte sich auch in der Ausbeute an zyklischem Peptid mit 13% wieder. Eine Erklärung für die besseren Umsätze in anderen Testpeptiden wäre, dass ein mit seinem Imidazolring sterisch anspruchsvolles Histidin die Bildung einer für die Zyklisierung ungünstigen Struktur erschwert.

In dieser Arbeit konnte eine neue Variante der spurlosen Staudinger-Ligation zur Zyklisierung von Peptiden entwickelt und etabliert werden. Es war möglich diese zum ersten Mal auch auf größere Peptide als Dipeptide anzuwenden. Dabei wurde die Option geschaffen je nach Anforderung zwischen einem organischen oder einem wässrigen Milieu zu wählen. Auch die nicht gegebenen Chemoselektivität der Zyklisierung von Lysin- und Arginin-haltigen Peptiden in DMF konnte im wässrigen System gelöst werden.

Eine Anwendung dieser entwickelten Methode sollte das 70 Aminosäuren lange Head-to-tail-zyklisierte Proteine Bacteriocin AS-48 (**261**) sein. Es sollten zunächst zwei 35 Aminosäuren lange Fragmente über Standardfestphasenpeptidsynthese synthetisiert werden. Dies waren Glu^{58}-Gly^{22} (**264**) und Gly^{23}-Lys^{57}(**263**). Es war möglich den Strang Glu^{58}-Gly^{22} (**264**) über eine automatisierte Synthese mit Doppelkupplungsschritten und „Capping“ darzustellen. Der zweite Strang mit den Aminosäuren Gly^{23}-Lys^{57} (**263**) konnte jedoch nicht synthetisiert werden. Auch hier wurde versucht, das Fragment analog zu dem anderen Fragment herzustellen. Es zeigte sich allerdings, dass ein sehr hydrophober Bereich mit drei Alaninen in Folge zu Aggregationen führt, die zu schlechten Kupplungen führten. Hierdurch entstanden eine Vielzahl von Nebenprodukten. Nach Kupplung des ebenfalls schwierigen Sequenzbereichs Val^{25}-Ile^{28} zum Ende des Fragments wurde kein gewünschtes Produkt mehr erhalten. Abhilfe für diese Syntheseprobleme sollte die Einführung von Pseudoprolinen schaffen, das angestrebte fertige Fragment wurde aber auch hier nicht erhalten.

Nach wie vor bietet das Bacteriocin AS-48 (**261**) ein äußerst interessantes und attraktives Zielmotiv, wenn gleich es aufgrund der Sequenzlänge und den Syntheseschwierigkeiten nur schwer zugänglich ist. Vielleicht bietet das äußerst interessante Teilprojekt aus der Arbeitsgruppe, in dem Systeme für mehrere Ligationen als Eintopfreaktion zugänglich gemacht werden sollen, zu einem späteren Zeitpunkt die Möglichkeit die hier angefangene Synthese erneut anzugehen und zum Erfolg zu führen. Denkbar ist hier die gleichzeitige Verwendung von spurloser Staudinger- und nativer chemischer Ligation im wässrigen Milieu.

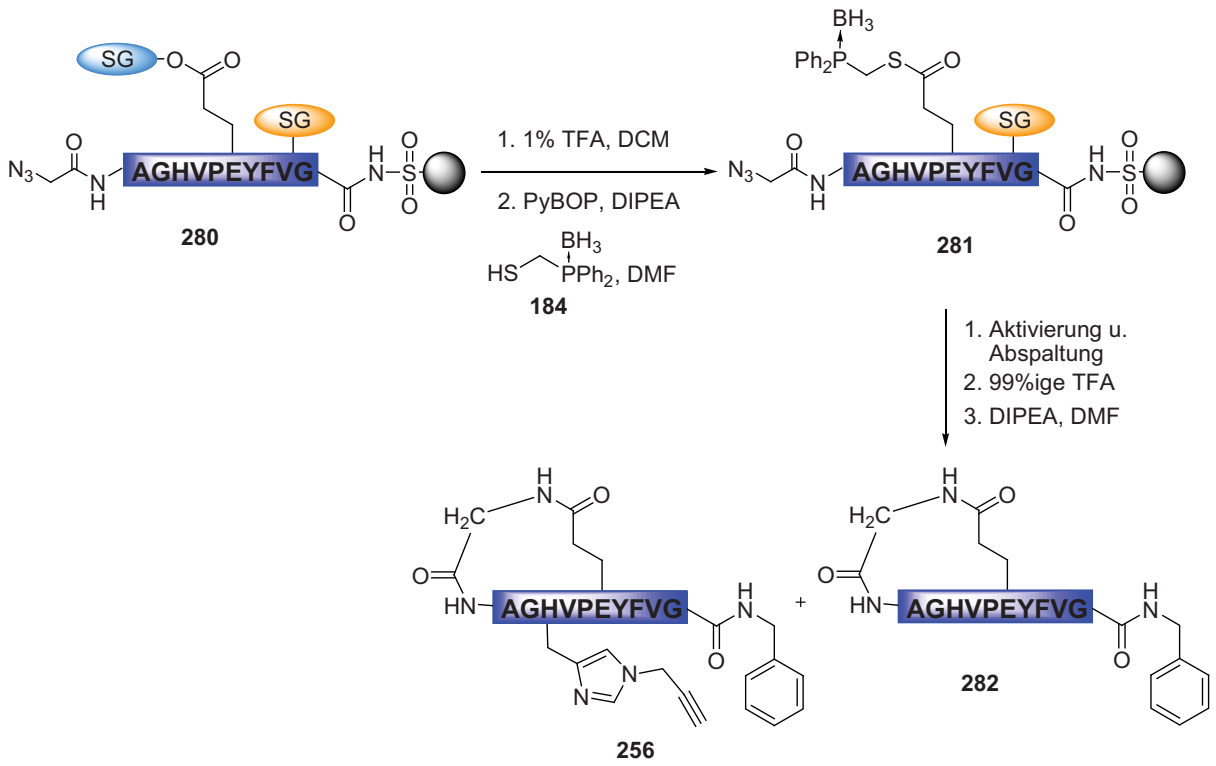
Neben der Head-to-tail-Zyklisierung sollte außerdem eine Methode zur Seitenketten-Zyklisierung geschaffen werden, um Strukturen wie das Microcin J25 zu synthetisieren. Hierzu sollte der Thioester an der Festphase synthetisiert werden und nach Abspaltung die Zyklisierung erfolgen.



Schema 65: Festphasen-Thioester-Synthese

Zunächst wurde die Thiostersynthese auf einem Wang-Harz mit Benzylmercaptan als Thiol optimiert und mit PyBOP® und DIPEA in DMF konnten optimale Kupplungsbedingungen identifiziert werden. Ein allgemeines Reaktionschema ist in Schema 65 gezeigt. Die erhaltenen Kupplungsbedingungen wurden auf das Diphenylphosphino(boran)-methylthiol (**184**) übertragen und das Peptid vom Harz abgespalten. Durch Zugabe von DIPEA als Base in DMF wurde die Zyklisierung induziert. Es stellte sich heraus, dass die Abspaltbedingungen auf dem Wang-Harz mit einer Reaktionszeit von 3h aufgrund der Instabilität des Thioesters unter sauren Bedingungen zur verstärkten Bildung eines Nebenprodukts führten.

Aus diesem Grund wurde die Synthese auf ein Sulfonamid-Harz übertragen (Schema 66). Zwar erhält man hier das Zyklisierungsprodukt als Hauptprodukt, allerdings wurde ein Großteil des Produkts alkyliert erhalten. Diese Alkylierung ist durch eine Entschützung des Histidin bei der Abspaltung der orthogonalen Schutzgruppe an der Glutaminsäure zu erklären. Bei der Aktivierung des Harzes mit Iodacetonitril bietet der Imidazol-Stickstoff eine geeignete Alkylierungsstelle.



Schema 66: Synthese auf Sulfonamid-Harz

Beim Ansatz zur Seitenketten-Zyklisierung, der eine Darstellung von Strukturen wie das Microcin J25 ermöglichen könnte, bedarf es allerdings noch weiterer Optimierungen. Durch geeignete Kombination an Harz und orthogonaler Schutzgruppe, sollte es aber auch möglich sein, eine Struktur wie das Microcin J25 zu synthetisieren. Ein Einsatz der TMSEt-Schutzgruppe (**259**) würde mit einer Abspaltung durch TBAF auch die Verwendung säurelabiler Harze, wie dem TGT-Harz, ermöglichen. Durch die verkürzten Abspaltzeiten könnte die Bildung von Nebenprodukten deutlich reduziert werden.

6. Experimenteller Teil

6.1. Materialien und Methoden

Reagenzien

Alle verwendeten Ausgangschemikalien wurden von ACROS, Aldrich oder Novabiochem bezogen. Die trockenen Lösungsmittel wurden aus einem „solvent system“ der Firma Braun verwendet oder bei ACROS trocken und über Molsieb gelagert gekauft. Die deuterierten Lösungsmittel stammen von der Firma Deutero.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Kieselgelplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F_{254}) verwendet. Detektiert wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm.

Säulenchromatographie

Die präparative Aufreinigung erfolgte auf Kieselgel 60 (0.040-0.063 nm, 230-400 mesh ASTM) gestiftet von der Firma Schering.

NMR-Spektroskopie

^{1}H, ^{13}C, ^{31}P und ^{11}B-NMR-Spektren wurden entweder mit einem Bruker AC 250 (125 MHz; 250 MHz), einem AMX 500 (125 MHz, 500 MHz) oder einem 400 (100 MHz, 400MHz) Instrument aufgenommen. Die 2D-Spektren zur Peptidaufklärung wurden mit einem Bruker AVANCE III 700 MHz (175 MHz, 700 MHz) aufgenommen. Als deuterierte Lösungsmittel wurden $CDCl_3$, DMSO-d_6 und DMF-d_7 verwendet. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm relativ zur Resonanz vom Lösungsmittel angegeben.[181] Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben und die Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, dq = Doublett vom Quartett, dsep = Doublett vom Septett, q = Quartett, t = Triplett, m = Multiplett.

LC-MS

Die analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit angeschlossenem Massendetektor wurde an einem Gerät der Firma Agilent 6210 ToF LC-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA durchgeführt. Als Massendetektor dient eine ESI-ToF-Einheit. Als Säule für

die HPLC wurde eine Agilent Eclipse XDB-C_{18} Säule (5 µm, 4.6x150 mm) mit einer Flussrate von 0.5 mL/min. verwendet.

Zur Auftrennung wurde der Standardgradient (Gradient A) mit folgenden Spezifikationen: 3 min konstant bei 3 % CH_3CN mit 1 % AcOH, dann Gradient über 19 min: 3 % bis 100 % CH_3CN (mit 1 % AcOH)) gewählt.

Präparative HPLC

Die präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur Aufreinigung peptidischer Substrate wurde an einer JASCO PU-2086/2087 durchgeführt. Als Säule wurde eine Nucleosil 50-5 (20x250 mm, Flussrate: 18.9 ml/ min) verwendet und als Laufmittel diente Acetonitril und H_2O.

Es wurde ein Standardgradientensystem (Gardient B: 5 min konstant bei 7 % CH_3CN (mit 0.1 % TFA), dann Gradient über 30 min: 7 % bis 95 % CH_3CN (mit 0.1 % TFA)) verwendet. Die Detektion erfolgte bei Wellenlängen von 228 und 280 nm.

Die Aufreinigung der wässrigen Staudinger-Zyklisierungen erfolgte mit einem anderen Gradienten (Gradient C: 5 min konstant bei 0 % CH_3CN (mit 0.1 % TFA), dann Gradient über 30 min: 0 % bis 100 % CH_3CN (mit 0.1 % TFA)). Die Detektion erfolgte bei Wellenlängen von 228 und 280 nm.

Peptid-Synthese

Peptide wurden auf einem ABI 433A Peptid Synthesizer der Firma Applied Biosystems mit Standardkupplungsreagenzien HBTU/HOBt (Fast-moc Protokoll) synthetisiert. Als Harz wurde, falls nicht anders beschrieben, ein TGT®-Harz (Novabiochem) verwendet, an das die erste Aminosäure (Gly) bereits immobilisiert ist.

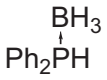
Ausbeute-Bestimmung der Peptidzyklisierungen

Die Ausbeuten wurden auf der Basis kalkuliert, dass bei der Abspaltung mit 0.5%iger TFA vom TGT®-Harz 35% Peptidmaterial erhalten werden. Zur Bestimmung der Abspaltung wurde die Standard-Fmoc-Bestimmung durchgeführt.[182] Hierzu wurde zunächst das am Harz

immobilisierte Fmoc-Glycin mit 0.5%iger TFA 2h abgespalten. Mit dem Rückstand wurde die Bestimmung durchgeführt.

6.2. Versuche zu Kapitel 4.1.

Diphenylphosphinboran (178)



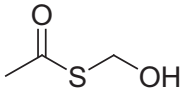
In einem sekurierten 100 mL Schlenkkolben werden 3.4 mL Diphenylphosphinchlorid (18 mmol, 4.00 g) (**177**) in 7 mL trockenem THF vorgelegt. Bei 0 ^{o}C tropft man unter Argon 23.5 mL einer 1 M BH_3·THF-Lösung in THF über einen Zeitraum von ca. 15 min hinzu. Nach 1h Rühren gibt man zum erhaltenen Phosphin-Boran-Komplex unter Argon spatelweise 1.2 Äq. Lithiumaluminiumhydrid (0.83 g, 22 mmol). Das Reaktionsgemisch wird 5 h gerührt und anschließend unter starkem Rühren auf ein Gemisch aus ca. 7 mL konz. HCl und ca. 75 g Eis pipettiert. Nach 15 minütigem Rühren wird die wässrige Phase dreimal mit 20 mL Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und eingeengt. Das erhaltene Öl wird mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, Ø = 3 cm, Länge: 11 cm) aufgereinigt. Als Laufmittel wird Toluol verwendet. Man erhält das Diphenylphosphinboran (**178**) als weißen Feststoff in einer Ausbeute von 83%.

$R_f = 0.79$

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.72-7.64 (m, 4H, Ar-**H**), 7.41-7.50 (m, 6H, Ar-**H**), 6.31 (dq, *J* = 379, 7.08 Hz, P-**H**), 1.62-0.52 (q, *J* = 86.7 Hz, -B**H$_3$**)

Die analytischen Werte stimmen mit den Literaturdaten überein.[164]

Hydroxymethylacetylsulfid (181)



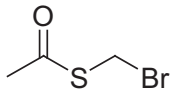
In einem 100 mL Einhalskolben werden 23.4 ml Thioessigsäure (0.33 mol, 25 g) (**180**) vorgelegt. Hierzu gibt man 1 Äq. Paraformaldehyd (0.33 mol, 10 g) (**179**). Die erhaltene Suspension wird 3 h unter Rückfluß gekocht, bis sich eine klare gelbe Lösung gebildet hat.

Diese Lösung wird im Vakuum destilliert. Man erhält einen Vorlauf bei 40-50 °C, die Produktfraktion kommt bei 60-66 °C. Das Hydroxymethylacetylsulfid (**181**) wird gelbes Öl in einer Ausbeute von 91% erhalten.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.99 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, AcS-C**H$_2$**-OH), 3.92 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, AcS-CH_2-O**H**), 2.34 (s, 3H, **Ac**S-CH_2-OH)

Die analytischen Werte stimmen mit den Literaturdaten überein.[183]

Brommethylacetylsulfid (182)

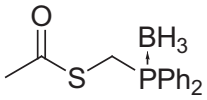


26.62 g des Hydroxymethylacetylsulfid (0.25 mol) (**181**) werden in einem 50 mL Zweihalskolben vorgelegt. Dann werden vorsichtig über einen Zeitraum von ca. 30 min 0.33 Äq. Phosphortribromid (21.66 g, 0.08 mol) bei 0 °C zum Hydroxymethylacetylsulfid (**181**) getropft, dabei darf die Temperatur 8 °C nicht übersteigen. Nach Beenden der Zugabe wird weitere 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend das Reaktionsgemisch über einen Zeitraum von 40 min auf RT erwärmt. Dann wird es unter starkem Rühren vorsichtig in ein Eis-Wasser-Gemisch getropft. Um sicherzustellen, das überschüssiges Phosphortribromid mit dem Wasser abreagiert ist, wird die Suspension 1 h gerührt. Anschließend extrahiert man dreimal mit 20 mL Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und eingeengt. Das erhaltene Rohprodukt wird im Vakuum destilliert. Man erhält das Brommethylacetylsulfid (**182**) als gelbliches Öl bei 45-50 °C in einer Ausbeute von 68%.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.70 (s, 2H, AcS-C**H$_2$**-Br), 2.40 (s, 3H, **Ac**S-CH_2-OH)

Die analytischen Werte stimmen mit den Literaturdaten überein.[183]

S-Acetyl(diphenylphosphino(boran))methylthiol (183)



In einem sekurierten 50 mL Schlenkgefäß werden unter Argon 1.14 g des Diphenylphosphinboran (5.7 mmol) (**178**) in 4 mL trockenem DMF vorgelegt und auf 0 °C runtergekühlt. Unter Gasentwicklung werden zu dieser Lösung portionsweise 1.2 Äq. Natriumhydrid (0.16 6.8 mmol) gegeben. Nach 30 min rühren wird 1 Äq. Brommethylacetylsulfid (0.96 g, 5.7 mmol) (**182**) langsam zugetropft, dabei entfärbt sich die zuvor gelbe Lösung. Anschließend lässt man das Reaktionsgemisch auf RT erwärmen. Nach 12 h Rühren wird das DMF im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Hexan:Ethylacetat 9:1 als Laufmittel aufgereinigt (Kieselgel, Ø = 3 cm, Länge: 23 cm). Man erhält das *S*-Acetyl(diphenylphosphino(boran))methylthiol (**183**) als weißen Feststoff in einer Ausbeute von 36%.

$R_f = 0.26$

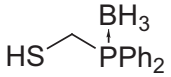
^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.75-7.66 (m, 4H, Ar-**H**), 7.56-7.41 (m, 6H, Ar-**H**), 3.71 (d, J = 7.08 Hz, -C**H$_2$**-), 2.25 (s, -C**H**$_3$), 1.54-0.47 (q, J = 93.8 Hz, -B**H$_3$**)

^{31}P-NMR (202 MHz, DMF-d$_7$): δ = 18.34

^{11}B-NMR (161 MHz, DMF-d$_7$): δ = –26.42 (m)

Die analytischen Werte stimmen mit den Literaturdaten überein.[97]

Diphenylphosphin(boran)methylthiol (184)



500 mg des *S*-Acetyl(diphenylphosphin(boran))methylthiol (1.74 mmol) (**183**) werden in 8 ml Methanol gelöst und 0.41 ml einer 30%igen Natriummethanolat-Lösung in Methanol zugegeben. Dann wird das Reaktionsgemisch 10 min gerührt. Hierauf wird es mit Hilfe von

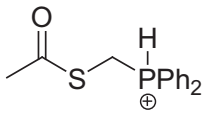
1M HCl neutralisiert und anschließend das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Die so erhaltene wässrige Phase wird dreimal mit 10 mL Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und man erhält ohne weitere Aufreinigung das Diphenylphosphin-(boran)methylthiol (**184**) als farbloses zähflüssiges Öl in einer Ausbeute von 93%.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ 7.76-7.67 (m, 4H, Ar-**H**), 7.43-7.57 (m, 6H, Ar-**H**), 3.19 (dd, *J* = 6 Hz, 8 Hz, -C**H$_2$**-), 1.89 (dt, *J* = 8 Hz, 7 Hz, -S**H**), 1.59-0.48 (q, *J* = 93.8 Hz, -B**H$_3$**)

Die analytischen Werte stimmen mit den Literaturdaten überein.[184]

6.4. Versuche zu Kapitel 4.2.1.

Phosphoniumsalz des *S*-Acetyl(diphenylphosphin)methylthiol (186)

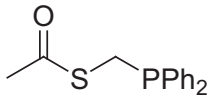


In einem sekurierten 25 mL Schlenkrohr werden unter Argon 92 mg des *S*-Acetyl-(diphenylphosphino(boran))methylthiol (0.32 mmol) (**183**) vorgelegt. Hierzu gibt man 0.5 mL eines Abspaltcocktails bestehend aus 95% TFA, 2.5% Triisopropylsilan und 2.5% H_2O und rührt 1 h. Nach Entfernen der TFA am Hochvakuum über 12 h wird der Rückstand in DMF-d_7 gelöst und dreimal entgast. Anschließend wird das Produkt über NMR charakterisiert.

^{1}H NMR (500 MHz, DMF-d_7): δ = 7.69-7.63 (m, 5H, Phenyl-Ox.), 7.58-7.48 (m, 12.5H, Phenyl-Salz u. Phenyl-Phosphin), 4.10 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, -P-C**H$_2$**-S- Ox.), 3.74 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H, -P-C**H$_2$**-S- Phosphin), 3.35 (dd, *J* = 7.8, 2.9 Hz, 0.5H, -P-C**H$_2$**-S- Salz), 2.38 (s, 3.75H, -CH_2SCOC**H$_3$** Salz u. Phosphin), 2.37 (s, 1.5H, -CH_2SCOC**H$_3$** Ox.)

^{31}P-NMR (202 MHz, DMF-d_7): δ = –10.38 (Phosphin), -4.12 (Salz), 46.56 (Ox.)
^{11}B-NMR (161 MHz, DMF-d_7): δ = -20.93 (tetrakoordiniert), 21.87 (trikoordiniert)

S-Acetyl(diphenylphosphin)methylthiol (188)



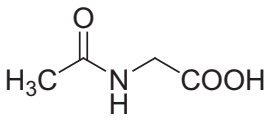
In einem sekurierten 25 mL Schlenkrohr werden unter Argon 92 mg des *S*-Acetyl-(diphenylphosphino(boran))methylthiol (0.32 mmol) (**183**) vorgelegt. Hierzu gibt man 0.5 mL eines Abspaltcocktails bestehend aus 95% TFA, 2.5% Triisopropylsilan und 2.5% H_2O und rührt 1 h. Nach Entfernen der TFA am Hochvakuum über 12h wird der Rückstand in DMF-d_7 gelöst und dreimal entgast. Anschließend werden 72 mg DABCO (2 Äq., 0.64 mmol) zugegeben, weitere dreimal entgast und das Reaktionsgemisch über NMR charakterisiert.

^{1}H NMR (500 MHz, DMF-d_7): δ = 7.69-7.63 (m, 1.25H, Phenyl-Ox.), 7.58-7.48 (m, 11.25H, Phenyl-Salz u. Phenyl-Phosphin), 4.06 (d, *J* = 7.2 Hz, 0.25H, -P-C**H$_2$**-S- Ox.), 3.70 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H, -P-C**H$_2$**-S- Phosphin), 3.31 (d, *J* = 2.9 Hz, 0.25H, -P-C**H$_2$**-S- Salz), 2.39 (s, 3.5H, -CH_2SCOC**H$_3$** Salz u. Phosphin), 2.38 (s, 0.5H, -CH_2SCOC**H$_3$** Ox.)

^{31}P-NMR (202 MHz, DMF-d_7): δ = –10.39 (Phosphin), -4.12 (Salz), 46.54 (Ox.)

^{11}B-NMR (161 MHz, DMF-d_7): δ = 7.56 (q, *J* = 96.2 Hz) (trikoordiniert)

N-Acetylglycin (115)



In einem sekurierten 25 mL Schlenkrohr werden unter Argon 92 mg des *S*-Acetyl-(diphenylphosphino(boran))methylthiol (0.32 mmol) (**183**) vorgelegt. Hierzu gibt man 0.5 mL TFA:TIS:H_2O 95:2.5:2.5 und rührt 1h. Nach Entfernen der TFA am Hochvakuum über 12 h wird der Rückstand in DMF-d_7 gelöst und dreimal entgast. Hierzu gibt man 72 mg DABCO (2 Äq., 0.64 mmol) und 32 mg Azidoglycin (1 Äq., 0.32 mmol) (**113**), anschließend wird weitere dreimal entgast. Die Reaktionslösung wird jeweils nach 1 h und 12 h unter Argon in

ein ausgeheiztes NMR-Röhrchen überführt und das Reaktionsgemisch über NMR charakterisiert.

Nach 1 h:

^{1}H NMR (500 MHz, DMF-d_7): δ = 7.70-7.62 (m, 2H, Phenyl-Ox.), 7.58-7.48 (m, 11.25H, Phenyl-Salz u. Phenyl-Phosphin), 4.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 0.35H, -P-C**H$_2$**-S- Ox.), 3.70 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H, -P-C**H$_2$**-S- Phosphin), 3.64 (s, 4.4H, N_3-C**H$_2$**-COOH), 3.31 (d, *J* = 2.8 Hz, 0.25H, -P-C**H$_2$**-S- Salz), 2.39 (s, 3.5H, -CH_2SCOC**H$_3$** Salz u. Phosphin), 2.38 (s, 0.5H, -CH_2SCOC**H$_3$** Ox.)

^{31}P-NMR (202 MHz, DMF-d_7): δ = –10.43 (Phosphin), -4.17 (Salz), 46.59 (Ox.)

^{11}B-NMR (161 MHz, DMF-d_7): δ = 7.57 (q, *J* = 98.8 Hz) (trikoordiniert)

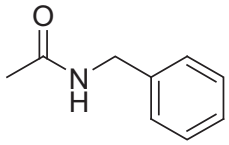
Nach 12 h:

^{1}H NMR (500 MHz, DMF-d_7): δ = 7.99-7.96 (m, 6H), 7.71-7.62 (m, 12H, Phenyl-Ox.), 3.74 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, AcNH-C**H$_2$**-COOH), 3.65 (d, *J* = 3.4 Hz, -P-C**H$_2$**-S- Ox./ s, N_3-C**H$_2$**-COOH, gesamt:1.4H), 1.97 (s, 3H, **H$_3$**CONH-CH_2-COOH)

^{13}C NMR (125 MHz, DMF-d_7): δ = 170.9 (Carboxyl), 133.8 (Phenyl), 132.9 (d, Phenyl), 130.6 (d, Phenyl), 53.4 (N_3-**C**H_2-COOH), 47.7 (HS-**C**H_2-$POPh_2$), 44.7 (AcNH-**C**H_2-COOH), 42.4 (DMSO), 24.1 (H_3**C**ONH-CH_2-COOH)

Die analytischen Werte stimmen mit den Literaturdaten überein.[185]

N-Acetylbenzylamin (190)



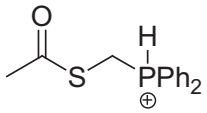
In einem sekurierten 25 mL Schlenkrohr werden unter Argon 92 mg des *S*-Acetyl-(diphenylphosphino(boran))methylthiol (0.32 mmol) (**183**) vorgelegt, 0.5 mL TFA:TIS:H_2O 95:2.5:2.5 zugegeben und 1 h gerührt. Nach Entfernen der TFA am Hochvakuum über 12h wird der Rückstand in DMF-d_7 gelöst und dreimal entgast. Hierzu gibt man 72 mg DABCO (2 Äq., 0.64 mmol) und 43 mg Benzylazid (1 Äq., 0.32 mmol) (**189**) und es wird wiederum dreimal entgast. Die Reaktionslösung wird anschließend direkt über NMR charakterisiert.

^{1}H NMR (500 MHz, DMF-d_7): δ = 8.01-7.98 (m, 5H), 7.66-7.61 (m, 8H, Phenyl-Ox.), 7.40-7.39 (m, 5H, H_3CONH-CH_2-**Ph**), 4.45 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, AcNH-C**H_2**-Ph), 3.64 (m, 0.4H, -P-C**H_2**-S- Ox.), 2.04 (s, 3H, **H_3**CONH-CH_2-Ph)

^{13}C NMR (125 MHz, DMF-d_7): δ = 171.2 (Carboxyl), 142.0 (Benzyl C^1), 133.7 (Phenyl), 133.1 (d, Phenyl), 130.6 (d, Phenyl), 130.1 (Benzyl C^3, C^5), 129.3 (Benzyl C^2, C^6), 128.6 (Benzyl C^4), 53.4 (Spuren N_3-**C**H_2-Ph), 47.7 (HS-**C**H_2-$POPh_2$), 44.5 (AcNH-**C**H_2-Ph), 24.1 (H_3**C**ONH-CH_2-Ph)

Die analytischen Werte stimmen mit den Literaturdaten überein.[186]

Optimierung der Phosphin-Entschützung (Phosphoniumsalz-Bildung) (186)



In einem sekurierten 25 mL Schlenkrohr werden unter Argon 92 mg des *S*-Acetyl-(diphenylphosphino(boran))methylthiol (0.32 mmol) (**183**) vorgelegt, 0.5 mL TFA:TIS 97.5:2.5 zugegeben und 1 h gerührt. Nach Entfernen der TFA am Hochvakuum über 12 h wird der Rückstand in DMF-d_7 gelöst und direkt über NMR charakterisiert.

^{1}H NMR (500 MHz, DMF-d_7): δ = 7.57-7.48 (m, 12.5H, Phenyl-Salz u. Phenyl-Phosphin), 3.71 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, -P-C**H$_2$**-S- Phosphin), 3.32 (dd, *J* = 7.6, 2.5 Hz, 0.7H, -P-C**H$_2$**-S-Salz), 2.39 (s, 3H, -CH_2SCOC**H$_3$** Salz u. Phosphin)

Weitere Charakterisierungen siehe Phosphoniumsalz des *S*-Acetyl-(diphenylphosphin)-methylthiol (**186**)

6.5. Versuche zu Kapitel 4.2.2.

S-Azidopeptid-(diphenylphosphin(boran))methylthiol (193)

Nach automatisierter Peptidsynthese des Azidopeptids auf einem TGT®-Harz werden 0.033 mmol immobilisiertes Peptid (**191**) mit 0.5%iger TFA in Dichlormethan mit 2.5% Triisopropylsilan ohne Entschützung der Aminosäureseitenketten vom Harz abgespalten. Die Abspaltlösung wird in ein 25 mL Schlenkrohr überführt und das Harz noch zweimal mit Dichlormethan gewaschen. Das so erhaltene Peptid (**192**) wird im Hochvakuum getrocknet und der Rückstand wieder in 3 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen. Hierzu gibt man unter Argon 17.5 µL DIC (3 Äq. 12.5 mg, 0.99 mmol), eine katalytische Menge DMAP und 12.2 mg Diphenylphosphin(boran)methylthiol (1.5 Äq., 0.050 mmol)

(**184**). Nach 12 h rühren unter Argon ist die Reaktion beendet und das Lösungsmittel kann im Vakuum entfernt werden. Die Reaktion wird mit Hilfe einer LC-MS-Analyse charakterisiert, dabei besitzt das *S*-Azidopeptid-(diphenylphosphin(boran))methylthiol (**193**) eine Retentionszeit von 21.88 min (Gradient A).

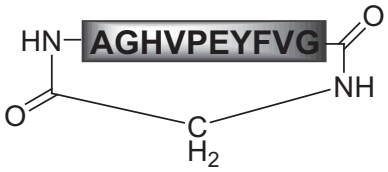
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1740.8377 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1740.8372)

Phosphoniumsalz des *S*-Azidopeptid(diphenylphosphin)methylthiol (194)

Zum aus der Reaktion zum *S*-Azidopeptid-(diphenylphosphin(boran))methylthiol (**193**) erhaltenen Rückstand werden 0.5 mL TFA:TIS 97.5:2.5 gegeben und 1 h gerührt. Anschließend wird das Peptid in 10 mL kaltem trockenen Diethylether ausgefällt. Nach Abzentrifugieren wird das Peptid in 5 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und unter Argon in ein sekuriertes 25 mL Schlenkrohr überführt und dreimal mit Vakuum/ Argon-Zyklen entgast. Aus dieser Lösung wird mit Hilfe einer LC-MS-Analyse das entstandene Phosphoniumsalz des *S*-Azidopeptid-(diphenylphosphin)methylthiol (**194**) charakterisiert, dabei besitzt es eine Retentionszeit von 16.35 min (Gradient A).

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1372.5649 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1372.5697)

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GAGHVPEYFVG (195)



Zu dem erhaltenen Phosphoniumsalz des *S*-Azidopeptid-(diphenylphosphin)methylthiol (**194**) in 5 mL Dimethylformamid werden zügig 100 µL DIPEA (0.61 mmol) gegeben und die Reaktionslösung weitere dreimal mit Vakuum/ Argon-Zyklen entgast. Anschließend wird 12 h unter Argon gerührt. Die Reaktionslösung wird direkt über LC-MS analysiert, dabei

besitzt das zyklische Peptid (**195**) eine Retentionszeit von 19.78 min (Gradient A). Anschließend werden 50% des Rohprodukts über präparative HPLC aufgereinigt.

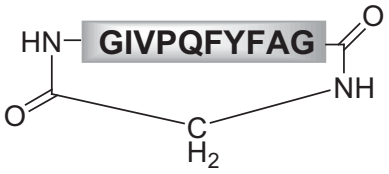
Ausbeute: 1.2 mg (1.1 µmol, 36%)

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1114.5316 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1114.5322)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Staudinger-Zyklisierung in DMF (AAV1)

Zunächst wird das Azidopeptid mittels automatisierter Peptidsynthese mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol auf einem TGT®-Harz hergestellt. 0.033 mmol dieses immobilisierten Peptids werden mit TFA:TIS:DCM 0.5:2.5:97 ohne Entschützung der Aminosäureseitenketten vom Harz abgespalten. Nach 2h rühren wird die Abspaltlösung in ein 25 mL Schlenkrohr überführt und das Harz noch zweimal mit Dichlormethan gewaschen. Das so erhaltene Peptid wird im Hochvakuum getrocknet und der Rückstand wieder in 3 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen. Hierzu gibt man unter Argon 17.5 µL DIC (3 Äq. 12.5 mg, 0.99 mmol), eine katalytische Menge DMAP und 12.2 mg Diphenylphosphin(boran)methylthiol (1.5 Äq., 0.050 mmol) und lässt das Reaktiongemisch 12 h unter Argon rühren. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zu dem so erhaltenen Rückstand gibt man zur Entschützung 0.5 mL TFA:TIS 97.5:2.5 und rührt 1 h. Das vollständig entschützte Phosphoniumsalz des *S*-Azidopeptid-(diphenylphosphin)methylthiol wird schließlich in 10 mL kaltem trockenen Diethylether ausgefällt und abzentrifugiert. Anschließend wird das Peptid in 5 mL trockenem Dimethylformamid gelöst, unter Argon in ein sekuriertes 25 mL Schlenkrohr überführt und dreimal mit Vakuum/ Argon-Zyklen entgast. Nach Zugabe von 100 µL DIPEA (0.61 mmol) folgen drei weitere Vakuum/ Argon-Zyklen. Schließlich wird die Reaktion 12 h unter Argon gerührt. Das DMF wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird daraufhin über eine präparative HPLC (Gradient B) aufgereinigt.

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GGIVPQFYFAG (198)

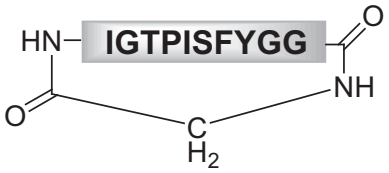


Die Herstellung erfolgt nach **AAV1** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GGIVPQFYFAG). Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert und anschließend werden 50% des Ansatzes über eine präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 1.9 mg (1.8 µmol, 31%)

HPLC (Gradient A): t_R = 16.13 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1050.5244 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1050.5365)

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GIGTPISFYGG (199)

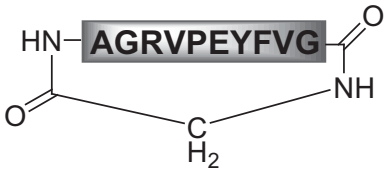


Die Herstellung erfolgt nach **AAV1** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GIGTPISFYGG). Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert und anschließend werden 50% des Ansatzes über eine präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 1.2 mg (1.1 µmol, 20%)

HPLC(Gradient A): t_R = 15.37 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1077.5364 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1077.5474)

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GAGRVPEYFVG (201)

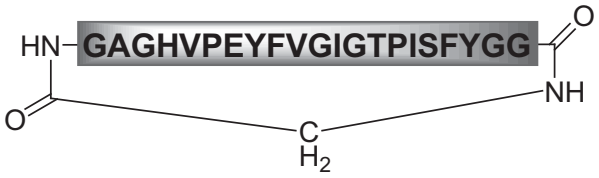


Die Herstellung erfolgt nach **AAV1** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GAGRVPEYFVG). Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert und anschließend werden 50% des Ansatzes über eine präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0.7 mg (0.6 µmol, 11%)

HPLC (Gradient A): t_R = 13.67 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1133.5745 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1133.5848)

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GAGHVPEYFVGIGTPISFYGG (200)



Die Herstellung erfolgt nach **AAV1** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GAGHVPEYFVGIGTPISFYGG). Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert und anschließend über eine präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 2.88 mg (1.4µmol, 12%)

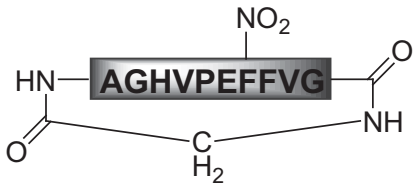
HPLC (Gradient A): t_R = 16.09 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 2107.0337 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 2107.0393), 1054.0136 $[M+2H]^{2+}$ (ber.: m/z = 1054.0236)

6.6. Versuche zu Kapitel 4.3.1.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Staudinger-Zyklisierung in Phosphat-Puffer mit Basenzugabe (AAV2)

Zunächst wird das Azidopeptid mittels automatisierter Peptidsynthese mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol auf einem TGT®-Harz hergestellt. 0.033 mmol dieses immobilisierten Peptids werden mit TFA:TIS:DCM 0.5:2.5:97 versetzt und 2 h gerührt. Die Abspaltung erfolgt ohne Entschützung der Aminosäureseitenketten. Die Abspaltlösung wird in ein 25 mL Schlenkrohr überführt und das Harz noch zweimal mit Dichlormethan gewaschen. Das so erhaltene Peptid wird im Hochvakuum getrocknet und der Rückstand wieder in 3 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen. Hierzu gibt man unter Argon 17.5 µL DIC (3 Äq. 12.5 mg, 0.99 mmol), eine katalytische Menge DMAP und 12.2 mg Diphenylphosphin(boran)-methylthiol (1.5 Äq., 0.050 mmol) hinzu und lässt das Reaktiongemisch 12 h unter Argon rühren. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zu dem so erhaltenen Rückstand gibt man zur Entschützung 0.5 mL TFA:TIS 97.5:2.5 und rührt 1 h. Das vollständig entschützte Phosphoniumsalz des *S*-Azidopeptid(diphenylphosphin)methylthiol wird schließlich in 10 mL kaltem trockenen Diethylether ausgefällt und abzentrifugiert. Anschließend wird das Peptid in 5 mL Lösungsmittel gelöst, unter Argon in ein 25 mL Schlenkrohr überführt und dreimal mit Vakuum/ Argon-Zyklen entgast. Nach eventueller Zugabe von 100 µL DIPEA (0.61 mmol) folgen drei weitere Vakuum/ Argon-Zyklen. Schließlich wird die Reaktion 12h unter Argon gerührt.

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GAGHVPEF(-NO_2)FVG (210) ohne Base

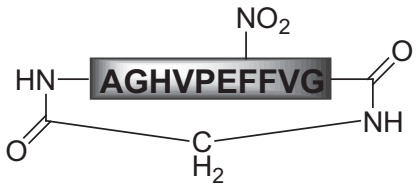


Die Durchführung erfolgt nach **AAV2** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GAGHVPEF(-NO_2)FVG). Als Lösungsmittel werden 4 mL eines 0.07M Phosphat-puffers und 1 mL DMF verwendet. Es wird keine Base zugegeben. Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert.

HPLC (Gradient A): t_R = 14.67 min

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1143.5264 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1143.5328)

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GAGHVPEF(-NO_2)FVG (211) mit Base

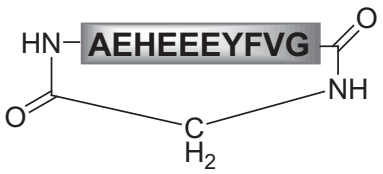


Die Durchführung erfolgt nach **AAV2** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GAGHVPEF(-NO_2)FVG). Als Lösungsmittel werden 4 mL eines 0.07M Phosphat-puffers und 1 mL DMF verwendet. Es werden 100 µL DIPEA (0.61 mmol) als Base zugegeben. Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert.

HPLC (Gradient A): t_R = 14.67 min

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1143.5692 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1143.5328)

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GAEHEEEYFVG (283)

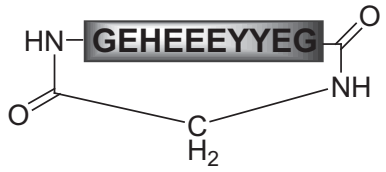


Die Durchführung erfolgt nach **AAV2** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GAEHEEEYFVG). Als Lösungsmittel werden 4 mL eines 0.07M Phosphat-Puffers und 1 mL DMF verwendet. Es werden 100 µL DIPEA (0.61 mmol) als Base zugegeben. Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert.

HPLC (Gradient A): t_R = 13.11 min

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1248.5263 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1248.5278)

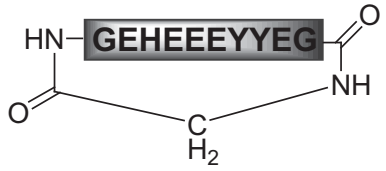
Zyklisierung zum Peptid zykl.-GGEHEEEYYEG (219)



Die Durchführung erfolgt nach **AAV2** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GGEHEEEYYEG). Als Lösungsmittel werden 5 mL eines 0.07M Phosphat-Puffers verwendet und 100 µL DIPEA (0.61 mmol) als Base zugegeben. Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert.

HPLC (Gradient A): t_R = 11.45 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1280.4664 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1280.4812)

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GGEHEEEYYEG/ (219) Puffer-Optimierung



Die Durchführung erfolgt nach **AAV2** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GGEHEEEYYEG). Als Lösungsmittel werden 5 mL eines Puffers verwendet und jeweils Base zugegeben. Die genauen Zusammensetzungen der Ansätze sind in Tabelle 9 gezeigt. Die Rohprodukte werden über LC-MS (Gradient A) charakterisiert.

Tabelle 9: Puffer-Optimierung

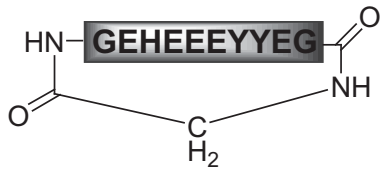
Puffer	Molarität	Basenzugabe	Ergebnis
Phosphat-Puffer	0.07M	DIPEA	Zyklisierung
Phosphat-Puffer	0.14M	DIPEA	Zyklisierung
Phosphat-Puffer	0.7M	DIPEA	Zyklisierung
HEPES/Guanidin HCl	1M/6M	mit NaOH eingestellt	keine Zyklisierung
HEPES	1M	mit NaOH eingestellt	keine Zyklisierung
0.7M Phosphat/1M HEPES 4:1		mit NaOH eingestellt	Hauptprodukt: Hydrolyse

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Staudinger-Zyklisierung in Phosphat-Puffer mit pH-Einstellung (AAV3)

Zunächst wird das Azidopeptid mittels automatisierter Peptidsynthese mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol auf einem TGT®-Harz hergestellt. 0.033 mmol dieses immobilisierten Peptids werden mit TFA:TIS:DCM 0.5:2.5:97 versetzt und 2 h gerührt. Die Abspaltung erfolgt ohne Entschützung der Aminosäureseitenketten. Die Reaktionslösung wird in ein 25 mL Schlenkrohr überführt und das Harz noch zweimal mit Dichlormethan gewaschen. Das so erhaltene Peptid wird im Hochvakuum getrocknet und der Rückstand wieder in 3 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen. Hierzu gibt man unter Argon 17.5 µL DIC (3 Äq., 12.5 mg, 0.99 mmol), eine katalytische Menge DMAP und 12.2 mg Diphenylphosphin-(boran)methylthiol (1.5 Äq., 0.050 mmol) und lässt das Reaktiongemisch 12 h unter Argon

rühren. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zu dem so erhaltenen Rückstand gibt man zur Entschützung 0.5 mL TFA:TIS 97.5:2.5 und rührt 1 h. Das vollständig entschützte Phosphoniumsalz des *S*-Azidopeptid-(diphenylphosphin)methylthiol wird in 10 mL kaltem trockenen Diethylether ausgefällt und abzentrifugiert. Das Peptid wird in 5 mL 0.7M Phosphat-Puffer gelöst, unter Argon in ein 25 mL Schlenkrohr überführt und dreimal mit Vakuum/ Argon-Zyklen entgast. Anschließend wird der entsprechende pH-Wert mit Hilfe von H_3PO_4 und NaOH eingestellt und die Reaktion 12 h unter Argon gerührt.

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GGEHEEEYYEG (219) / pH-Optimierung



Es werden drei Ansätze gemacht, wobei die Herstellung nach **AAV3** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GGEHEEEYYEG) erfolgt. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird in den drei Ansätzen auf 7.0, 7.5 und 8.0 eingestellt. Die Rohprodukte werden über LC-MS charakterisiert und anschließend über eine präparative HPLC (Gradient C) aufgereinigt.

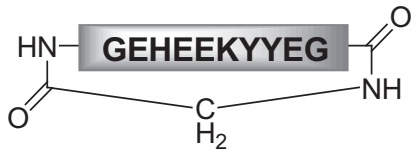
Optimale Bedingungen: pH = 7.5

Produkt: 5.4 mg (4.2 µmol, 37%)

HPLC (Gradient A): t_R = 11.79 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1280.4705 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1280.4812)

6.7. Versuche zu Kapitel 4.32.

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GGEHEEKYYEG (226) in Phosphat-Puffer

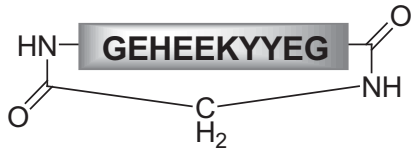


Es werden drei Ansätze gemacht, wobei die Herstellung nach **AAV3** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GGEHEEKYYEG) erfolgt. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird auf pH = 7.5 eingestellt. Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert und anschließend über eine präparative HPLC (Gradient C) aufgereinigt. Des weiteren wurde die Richtigkeit der Struktur über 2D-NMR-Experimente bestätigt.

Ausbeute: 3.0 mg (mit 30% unabtrennbarer Verunreinigung, bestimmt über anal. HPLC mit einer Waters-Säule Symmetry300™ C_{18} 5µm (4.6 x 250 mm, Flussrate: 1.0 ml/ min) über ein Standardgradientensystem (Gradient C))

HPLC (Gradient A): t_R = 10.84 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1279.5217 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1279.5336)

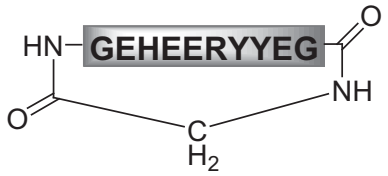
Zyklisierung zum Peptid zykl.-GGEHEEKYYEG (226) in DMF



Es werden drei Ansätze gemacht, wobei die Herstellung nach **AAV1** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GGEHEEKYYEG) erfolgt. Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert.

HPLC: t_R = 10.95 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1279.5258 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1279.5336)

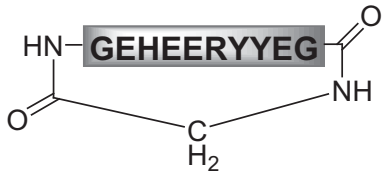
Zyklisierung zum Peptid zykl.-GGEHEERYYEG (236) in DMF



Die Durchführung erfolgt nach **AAV1** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz GGEHEEEYYEG. Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert.

HPLC (Gradient A): t_R = 11.01 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1307.5276 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1307.5397)

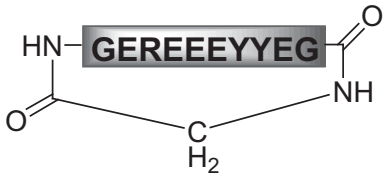
Zyklisierung zum Peptid zykl.-GGEHEERYYEG (236) in 0.7M Phosphat-Puffer



Die Durchführung erfolgt nach **AAV3** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz GGEHEEEYYEG. Der pH-Wert wird dabei auf pH = 7.5 eingestellt. Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert.

HPLC (Gradient A): t_R = 11.04 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1307.5287 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1307.5397)

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GGEREEEYYEG (284) in DMF

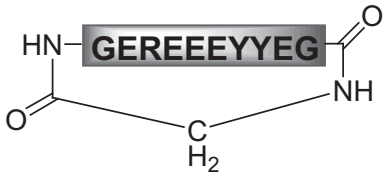


Die Durchführung erfolgt nach **AAV1** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GGEREEEYYEG). Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert und anschließend über eine präparative HPLC (Gradient C) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.9 mg (1.5 µmol, 13%)

HPLC (Gradient A): t_R = 11.85 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1299.5154 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1299.5234)

Zyklisierung zum Peptid zykl.-GGEREEEYYEG (284) in 0.7M Phosphat-Puffer



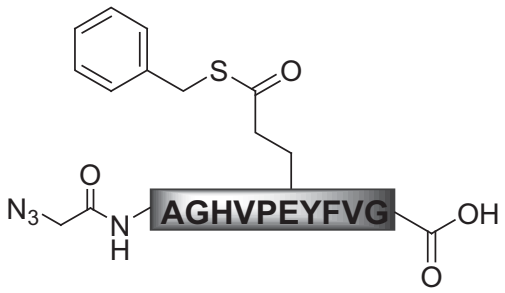
Die Durchführung erfolgt nach **AAV3** mit 0.033 mmol des immobilisierten Peptids mit der Sequenz (GGEREEEYYEG). Der pH-Wert wird dabei auf pH = 7.5 eingestellt. Das Rohprodukt wird über LC-MS charakterisiert und anschließend über eine präparative HPLC (Gradient C) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.4 mg (1.1 µmol, 10%)

HPLC (Gradient A): t_R = 11.81 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1299.5127 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1299.5234)

6.8. Versuche zu Kapitel 4.5.1.

S-(Azidopeptid)benzylthiol (N_3-GAGHVPE(-SBzl)YFVG) (245)



Zunächst wird das Azidopeptid mit der Sequenz GAGHVPEYFVG mit dem Baustein Fmoc-Glu(O-2-PhiPr)-OH synthetisiert. Die Synthese erfolgt automatisiert mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol auf einem Wang-Harz. Es wird nur ein Teil des Harzes für die Reaktion verwendet. Hierfür wird es in einem Festphasenreaktor 20 min in Dichlormethan vorgequollen. Anschließend wird das Harz 3x5 min mit 1%iger TFA geschüttelt. Nach gründlichem Waschen gibt man 0.5 mL Lösungsmittel, Aktivierungsreagenzien und 5 µL Benzylmercaptan (5 Äq., 8 mg, 63 µmol) hinzu und schüttelt über 12 h. Das Harz wird mehrmals gewaschen und mit 0.5 mL TFA:TIS 97.5:2.5 versetzt und weitere 3h geschüttelt. Das abgespaltenen Peptid wird schließlich in 10 mL kaltem trockenen Diethylether ausgefällt, abzentrifugiert und über LC-MS charakterisiert. Eine Auflistung der gewählten Reaktionsbedingungen ist in Tabelle 10 gegeben.

Tabelle 10: Reaktionen zur Optimierung der Festphasen-Thioestersynthese

Harz	Ansatzgröße	Aktivierungsreagenzien	Lösungs -mittel
Wang	13 µmol	5 Äq. PyBOP® (33 mg/63 µmol), 10 Äq. DIPEA (21 µL/125 µmol)	DCM
Wang	33 µmol	5 Äq. PyBOP® (86 mg, 165 µmol), 5 Äq. HOBt (22 mg, 165 µmol	DCM
Wang	33 µmol	2 Äq. DIC (10µl/66 µmol), HOBt (9 mg/66µmol), DMAP (kat. M.)	DMF
Wang	13 µmol	5 Äq. PyBOP® (33 mg/63 µmol), 10 Äq. DIPEA (21 µL/125 µmol)	DMF
HMPA-PEGA	13 µmol	5 Äq. PyBOP® (33 mg/63 µmol), 5 Äq. DIPEA (10 µL/63 µmol)	DCM
HMPA-PEGA	13 µmol	5 Äq. DIC (11 µL, 63µmol), kat. Menge DMAP	DCM
TGA	13 µmol	5 Äq. PyBOP® (33 mg/63 µmol), 5 Äq. DIPEA (10 µL/63 µmol)	DCM
TGA	13 µmol	5 Äq. DIC (11 µL, 63µmol), kat. Menge DMAP	DCM

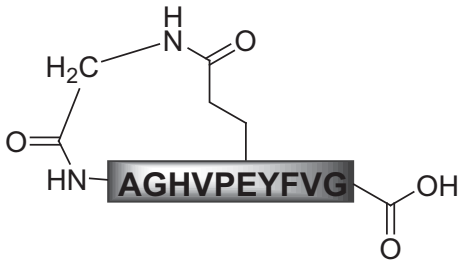
Optimale Bedingungen: 5 Äq. PyBOP® (33 mg/63 µmol), 10 Äq. DIPEA (21 µL/125 µmol) als Aktivierungsreagenzien in DMF

HPLC (Gradient A): t_R = 15.65 min

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1264.6765 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1264.5595)

6.9. Versuche zu Kapitel 4.5.2.

Zyklisierung zum Peptid zykl.-(GAGHVPE)YFVG-COOH (241)

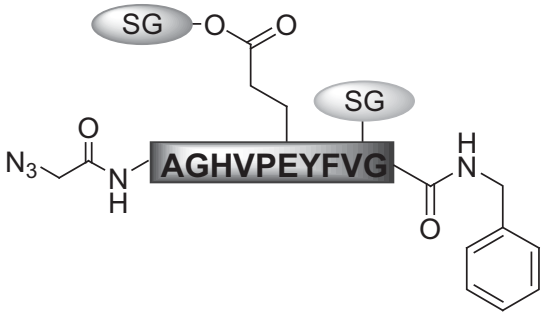


Das Azidopeptid mit der Sequenz GAGHVPEYFVG wird mit dem Baustein Fmoc-Glu(O-2-PhiPr)-OH synthetisiert. Die Synthese erfolgt automatisiert mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol auf einem Wang-Harz. Hiervon werden 13 µmol immobilisiertes Peptid für die weitere Synthese verwendet. Das Harz wird in einem Festphasenreaktor 20 min in Dichlormethan vorgequollen. Anschließend wird es 3x5 min mit 1%iger TFA geschüttelt. Nach gründlichem Waschen gibt man 0.5 mL DMF, 33 mg PyBOP® (5 Äq., 63 µmol), 21 µL DIPEA (10 Äq., 16 mg, 125 µmol) und 12.2 mg Diphenylphosphin(boran)methylthiol (5 Äq., 63 µmol) (**184**) hinzu und schüttelt über 12 h. Das Harz wird zweimal mit DMF und darauf zweimal mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wird es mit 0.5 mL TFA:TIS 97.5:2.5 versetzt und weitere 3 h geschüttelt. Das abgespaltene und entschützte Peptidphosphoniumsalz wird schließlich in 10 mL kaltem trockenen Diethylether ausgefällt und abzentrifugiert. Hierauf wird es in 2 mL trockenem DMF aufgenommen und unter Argon in ein ausgeheiztes 10 mL Schlenkrohr überführt. Nach dreimaligem Entgasen durch Vakuum/ Argon-Zyklen werden 40 µL DIPEA (20 Äq., 244 µmol) zugegeben und weitere dreimal entgast. Die Reaktions-lösung wird unter Argon bei RT über 12 h gerührt und das Rohprodukt über LC-MS charakterisiert.

Hauptpeak: Imid der Glutaminsäure
HPLC(Gradient A): t_R = 13.79 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1140.5474 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1140.5348)

Produktpeak:
HPLC (Gradient A): t_R = 13.27 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1114.5366 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1114.5322)

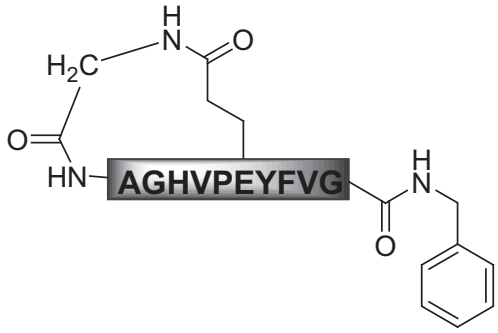
Testabspaltung zum geschützten Peptid N_3-GAGHVPEYFVG-CONHBzl (246)



13 µmol des auf einem Sulfonamid-Harz immobilisierten Peptids werden unter Lichtausschluß in 0.5 mL NMP mit 27 µL Iodacetonitril (30 Äq., 63 mg, 375 µmol) und 10 µL DIPEA (5 Äq., 8 mg, 63 µmol) 24 h geschüttelt. Das Harz wird mit DMF gewaschen und nach Zugabe von 11 µL Benzylamin (8 Äq., 11 mg, 100µmol) in 0.5 mL DMF weitere 12 h geschüttelt. Die Reaktionslösung wird direkt über ESI-ToF charakterisiert.

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1663.8481 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1663.8705)

Zyklisierung zum Peptid zykl.-(GAGHVPE)YFVG-CONHBzl (252)



Es wird das Azidopeptid mit der Sequenz (GAGHVPEYFVG) und O-2-PhiPr als Schutzgruppe an der Glutaminsäure-Seitenkette verwendet. Die Synthese erfolgt automatisiert mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol auf einem Sulfonamid-Harz. Es werden 13 µmol immobilisiertes Peptid für die weitere Synthese verwendet. Das Harz wird in einem Festphasenreaktor 20 min in Dichlormethan vorgequollen. Anschließend wird es 3x5 min mit 1%iger TFA geschüttelt. Nach gründlichem Waschen gibt man 0.5 mL DMF, 33 mg PyBOP®

(5 Äq., 63 µmol), 21 µL DIPEA (10 Äq., 16 mg, 125 µmol) und 12.2 mg Diphenylphosphin-(boran)methylthiol (5 Äq., 63 µmol) (**184**) hinzu und schüttelt über 12 h. Nach mehrmaligem Waschen wird das Harz unter Lichtausschluß in 0.5 mL NMP mit 27 µL Iodacetonitril (30 Äq., 63 mg, 375 µmol) und 10 µL DIPEA (5 Äq., 8 mg, 63 µmol) 24 h geschüttelt. Das Harz wird mit DMF gewaschen und nach Zugabe von 11 µL Benzylamin (8 Äq., 11 mg, 100 µmol) in 0.5 mL DMF weitere 12 h geschüttelt. Die Reaktionslösung wird in ein 10 mL Schlenkrohr überführt und das DMF am Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird zur Entschützung 1h unter Rühren mit 0.5 mL TFA:TIS 97.5:2.5 behandelt. Das vollständig entschützte Phosphoniumsalz des Azidopeptids wird schließlich in 10 mL kaltem trockenen Diethylether ausgefällt und abzentrifugiert. Anschließend wird das Peptid in 2 mL trockenem Dimethylformamid gelöst, unter Argon in ein ausgeheiztes 10 mL Schlenkrohr überführt und dreimal mit Vakuum/ Argon-Zyklen entgast. Nach Zugabe von 40 µL DIPEA (244µmol) folgen 3 weitere Vakuum/ Argon-Zyklen. Schließlich wird die Reaktion 12 h unter Argon gerührt und das Rohprodukt über LC-MS charakterisiert.

Hauptpeak: Alkylierungsprodukt
HPLC (Gradient A): t_R = 13.88 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1242.6044 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1242.6290)

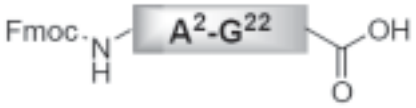
Produktpeak:
HPLC (Gradient A): t_R = 13.69 min
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1203.5933 $[M+H]^+$ (ber.: m/z = 1203.6061)

6.10. Versuche zu Kapitel 4.5.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Peptid-Fragmente des Bacteriocin AS-48 (AAV4)

Die Peptidsynthese der Bacteriocin AS-48-Fragmente erfolgt automatisiert. Als Protokoll wird das Fastmoc-Protokoll mit der Verwendung von Doppelkupplungen gewählt. Des weiteren erfolgt nach jeder Kupplung ein zusätzlicher Capping-Schritt mit Acetanhydrid, DIPEA und HOBt in NMP gelöst.

Bacteriocin AS-48-Fragment Fmoc-A^2-G^{22} (270)



Die Herstellung erfolgt nach **AAV4** mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol. Das Rohprodukt wird über ESI-ToF charakterisiert.

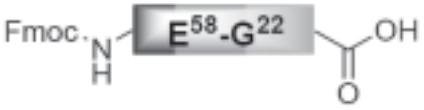
HRMS (ESI-ToF): m/z = 1118.0880 $[M+2H]^{2+}$ (ber.: m/z = 1118.0886)

Bacteriocin AS-48-Fragment Fmoc-K^{62}-G^{22} (269)

Die Herstellung erfolgt nach **AAV4** mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol. Das Rohprodukt wird über ESI-ToF charakterisiert.

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1125.9485 $[M+3H]^{3+}$ (ber.: m/z = 1125.9480), 844.7146 $[M+4H]^{4+}$ (ber.: m/z = 844.7130)

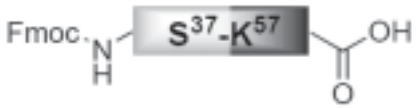
Bacteriocin AS-48-Fragment Fmoc-E^{58}-G^{22} (264)



Die Herstellung erfolgt nach **AAV4** mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol. Das Rohprodukt wird über ESI-ToF charakterisiert.

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1292.0571 $[M+3H]^{3+}$ (ber.: m/z = 1292.0535)

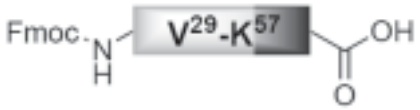
Bacteriocin AS-48-Fragment Fmoc-Ser^{37}-Lys^{57}(272)



Die Herstellung erfolgt nach **AAV4** mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol. Das Rohprodukt wird über ESI-ToF charakterisiert.

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1178.1574 $[M+2H]^{2+}$ (ber.: m/z = 1178.1574)

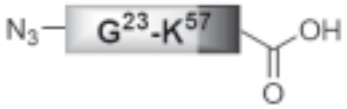
Bacteriocin AS-48-Fragment Fmoc-Val^{29}-Lys^{57} (271)



Die Herstellung erfolgt nach **AAV4** mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol. Das Rohprodukt wird über ESI-ToF charakterisiert.

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1032.5951 $[M+3H]^{3+}$ (ber.: m/z = 1032.5886), 774.6987 $[M+4H]^{4+}$ (ber.: m/z = 774.6934)

Bacteriocin AS-48-Fragment Fmoc-Gly^{23}-Lys^{57}(263)



Die Herstellung erfolgt nach **AAV4** mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol. Das Rohprodukt wird über ESI-ToF charakterisiert.

HRMS (ESI-ToF): m/z = 1201.0077, 1233.0030, 1264.9961, 1296.9927 $[M+3H]^{3+}$ (ber.für Produkt-$[M+3H]^{3+}$: m/z = 1186.3463)

7. Literatur

[1] J. Rizo, L. M. Gierasch, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 387-418.

[2] R. M. Kohli, C. T. Walsh, *Chem. Commun.* **2003**, 297-307.

[3] D. A. Evans, A. S. Kim, R. Metternich, V. J. Novack, *J. Am. Chem. Soc*. **1998**, *120*, 5921-5942.

[4] K. C. Nicolaou, F. Roschangar, D. Vourloumis, *Angew. Chem*. **1998**, *110*, 2120-2153, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2015 – 2045.

[5] G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1671-1673.

[6] M. Trabi, D. J. Craik, *TRENDS Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 132-138.

[7] A. Rüegger, M. Kuhn, H. Lichti, H.-R. Loosli, R. Huguenin, Ch. Quiquerenz, A. von Wartburg, *Helv.* **1976**, *59*, 1075-1092.

[8] J. W. Trauger, R. M. Kohli, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, *Nature* **2000**, *407*, 215-218.

[9] L. Gran, *Acta Pharma*col. *Toxikol.* **1973**, *33*, 400-408.

[10] O. Saether, D. J. Craik, I. D. Campbell, K. Sletten, J. Juul, D. G. Norman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4147-4158.

[11] C. Jennings, J. West, C. Waine, D. Craik, M. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10614-10619.

[12] D. J. Craik, *Science* **2006**, *311*, 1563-1564.

[13] D. J. Craik, N. L. Daly, I. Saska, M. Trabi, K. J. Rosengren, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 4011-4021.

[14] R. M. Kohli, C. T. Walsh, M. D. Burkart, *Nature* **2002**, *418*, 658-661.

[15] R. M. Kohli, J. W. Trauger, D. Schwarzer, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7099-7108.

[16] Y.-Q. Tang, J. Yuan, G. Osapay, K. Osapay, D. Tran, C. J. Miller, A. J. Ouelette, M. E. Selsted, *Science* **1999**, *286*, 498-502.

[17] D. Tran, P. A. Tran, Y. Q. Tang, J. Yuan, T. Cole, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3079-3084.

[18] L. Leonova,V. N. Kokryakov, G. Aleshina, T. Hong, T. Nguyen, C. Q. Zhao, A. J. Waring, R. I. Lehrer, *J. Leukocyte Biol*. **2001**, *70*, 461-464.

[19] M. Trabi, H. J. Schirra, D. J. Craik, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4211-4221.

[20] P. K. Pallaghy, K. J. Nielsen, D. J. Craik, R. S. Norton, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 1833-1839.

[21] N. Q. McDonald, W. A. Hendrickson, *Cell* **1993**, *73*, 421-424.

[22] N. L. Daly, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19068-19075.

[23] L. Gran, F. Sandberg, K. Sletten, *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *70*, 197-203.

[24] C. A. Semple, P. Gautier, K. Taylor, J. R. Dorin, *Mol. Divers* **2006**, *10*, 575–584.

[25] Z. O. Shenkarev, K. D. Nadezhdin, V. A. Sobol, A. G. Sobol, L. Skjeldal, *FEBS Journal* **2006**, *273*, 2658–2672.

[26] C. Jennings, K. J. Rosengren, N.L. Daly, M. Plant, J. Stevens, M. J. Scanlon, C. Waine, D. G. Norman, M. A. Anderson, and D. J. Craik, *Biochemistry* **2005**, *44*, 851–860.

[27] J. P. Tam, Y. A. Lu, J. L. Yang, K. W. Chiu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8913-8918.

[28] J.-F. Hernandez, J. Gaqnon, L. Chiche, T. M. Nquyen, J. P. Andrieu, A. Heitz, T. T. Honq, T. T. C. Pham, D. L. Nquyen, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5722-5730.

[29] P.-H. Chuang, P.-W. Hsieh, Y.-L. Yang, K.-F. Hua, F.-R. Chang, J. Shiea, S.-H. Wu, Y.-C. Wu, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1365-1370.

[30] A. Bermejo, B. Figadere, M. C. Zafra-Polo, I. Barrachina, E. Estornell, D. Cortes, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 269-303.

[31] F. Q.Alali, X. X.Liu, J. L. McLaughlin, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 504–540.

[32] P. Padma, R. L. Khosa, M. Sahai, *Indian J. Nat. Prod* **1995**, *11*, 3–15.

[33] X. P. Fang, M. J. Rieser, Z. M. Gu, G. X. Zhao, J. L. McLaughlin, *Phytochem. Anal.* **1993**, *4*, 27–48.

[34] S. H Yeh, F. R. Chang, Y. C. Wu, Y. L. Yang, S. K. Zhuo, T. L. Hwang, *Planta Med.* **2005**, *71*, 904–909.

[35] Y. L. Yang, F. R. Chang, T. L. Hwang, W. T. Chang, Y. C. Wu, *Planta Med.* **2004**, *70*, 256–258.

[36] T. Wieland, *Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms, Springer,* New York **1986**.

[37] H. E. Hallen, H. Luo, J. S. Scott-Craig, J. D. Walton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 19097-19101.

[38] J. R. Bamburg, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1999**, *15*, 185-230.

[39] H. J. Shin, H. Matsuda, M. Mukarami, K. Yamaguchi, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 139-141.

[40] T. Sano, K. Kaya, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5933-5936.

[41] S. Gesner-Apter, S. Carmeli, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6628-6634.

[42] K. Matsuzaki, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 1-10.

[43] F. von Nussbaum, S. Anlauf, J. Benet-Buchholz, D. Häbich, J. Köbberling, L. Musza, J. Telser, H. Rübsamen-Waigmann, N. A. Brunner, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2085–2088, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2039-2042.

[44] J.-M. Campagne, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8700-8704, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8547-8552.

[45] M. K. Renner, Y. C. Cheng, P. R. Jensen, W. Frankmoelle, C. A. Kauffman, W. Fencial, E. Lobkovsky, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11273-11276.

[46] A. W. Schultz, D.-C. Oh, J. R. Carney, R. T. Williamson, D. W. Udwary, P. R. Jensen, S. J. Gould, W. Fencial, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4507-4516.

[47] A. Blond, J. Peduzzi, C. Goulard, M. J. Chiuchiolo, M. Barthelemy, Y. Prigent, R. A. Salomon, R. N. Farias, F. Moreno, S. Rebuffat, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 747-755.

[48] M. J. Bayro, J. Mukhopadhyay, G. V. T. Swapna, J. Y. Huang, L.-C. Ma, E. Sineva, P. E. Dawson, G. T. Montelione, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12382-12383.

[49] K.-A. Wilson, M. Kalkum, J. Ottesen, J. Yuzenkova, B. T. Chait, R. Landick, T. Muir, K. Severinov, S. A. Darst, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12475-12483.

[50] J. Solbiati, M. Ciaccio, R. Farias, J. Gonzalez-Pastor, F. Moreno, R. Salomon, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2659-2662.

[51] L. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526-533.

[52] M. Maqueda, A. Gálvez, M. M. Bueno, M. J. Sanchez-Barrena, C. Gonzalez, A. Albert, M. Rico, E. Valdivia, *Curr. Prot. Pep. Sci.* **2004**, *5*, 399-416.

[53] A. Gálvez, M. Maqueda, E. Valdivia, A. Quesada, E. Monzoya, *Can. J. Microbiol.* **1986**, *32*, 765-771.

[54] H. Abriouel, E. Valdivia, M. Martinez-Bueno, M. Maqueda, A. Gálvez, *J. Microbiol. Meth.*, **2003**, *55*, 599-605.

[55] H. Abriouel, E. Valdivia, A. Gálvez , M. Maqueda, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, *64*, 4623-4626.

[56] H. Abriouel, E. Valdivia, A. Gálvez , M. Maqueda, *Curr. Microbiol.*, **2001**, *42*, 89-95.

[57] G. M. Langdon, M. Bruix, A. Galvez, E. Valdivia, M. Maqueda, M. Rico, *J. Biomol. NMR* **2000**, *1*, 173-175.

[58] M. J. Sanchez-Barrena, M. Martinez-Ripoll, A. Galvez, E. Valdivia, M. Maqueda, V. Cruz, A. Albert, *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 541-549.

[59] M. A. Jimenez, A. C. Barrachi-Saccilotto, E. Valdivia, M. Maqueda, M. Rico, *J. Pep. Sci.* **2005**, *11*, 29-36.

[60] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249-289.

[61] G. Casi, D. Hilvert, *Curr. Opin. Struc. Biol*. **2003**, *13*, 297-303.

[62] R. M. Hofmann, T. W. Muir, *Curr. Opin. Biotechnol*. **2002**, *13*, 297-303.

[63] H. Hang, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727-736.

[64] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182-10228, *Angew. Chem Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030-10074.

[65] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science*, **1994**, *266*, 776-779.

[66] J. A. Camarero, A. R. Mitchell, *Protein Pept. Lett.* **2005**, *12*, 723–728.

[67] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10068–10073.

[68] P. McCaldon, P. Argos, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1988**, *4*, 99-122.

[69] J. P. Tam, Q. Yu, *Biopolymer* **1998**, *46*, 319-327.

[70] R. Quaderer, A. Sewing, D. Hilvert, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1197-1225.

[71] M. T. Perlstein, M. Z. Atassi, S. H. Cheng, Biochim. *Biophys. Acta Protein Struct.* **1971**, *236*, 174–182.

[72] B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 687-690.

[73] S. He, D. Bauman, J. S. Davis, A. Loyola, K. Nishioka, J. L.Gronlund, D. Reinberg, F. Meng, N. Kelleher, D. G. McCafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12033–12038.

[74] K. Nishide, Y. Shigeta, K. Obata, T. Inoue, M. Node,*Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2271–2274.

[75] M. Node, K. Nishide, Y. Shigeta, K. Obata, H. Shiraki, H. Kunishige, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12883–12894.

[76] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408–9412, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252.

[77] D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10064–10065.

[78] C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6912–6915, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6807–6810.

[79] J. Chen, Q. Wan, Y. Yuan, J. Zhu, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8649–8652, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8521 – 8524.

[80] J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4642-4646.

[81] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 6705-6710.

[82] M. A. Shogren-Knaak, C. L. Peterson, *Methods Enzymol.* **2003**,*375*, 62–76.

[83] T. J. Tolbert, D. Franke, C. H.Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**,*13*, 909–915.

[84] T. J. Tolbert, C.-H.Wong, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2275–2278, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2171–2174.

[85] C. P. R. Hackenberger, M. Chen, B. Imperiali, *Bioorg. Med. Chem.* **2006,** *14*, 5043–5048.

[86] S. Mathys, T. C. Evans, Jr., I. C. Chute, H. Wu, S. Chong, J. Benner, X.-Q. J. Liu, M. Q. Xu, *Gene* **1999**, *231*, 1–13.

[87] D. Macmillan, L. Arham, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9530–9531.

[88] I. E. Gentle, D. P. De Souza, M. Baca, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 658–663.

[89] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 2007-2010.

[90] Y. G. Golobov, I. N. Zhumurova, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 437-472.

[91] Y. G. Golobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406.

[92] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168-3178, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106-3116.

[93] H. Staudinger, E. Hauser, *Helv. Chim. Acta* **1921**, *4*, 861.

[94] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.

[95] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.

[96] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941.

[97] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4993-4996.

[98] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820-8828.

[99] M. B. Soellner, A. Tam, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9824-9830.

[100] A. Tam, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11421-11430.

[101] L. H. Noda, S. A. Kuby, H. A. Lardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 913-917.

[102] B. L. Nilsson, R. J Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268-5269.

[103] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nature Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.

[104] O. T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidts, W. Reutter, *Glycobiology* **2001**, ***11***, 11R-18R.

[105] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *7*, 616-625.

[106] E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893-14902.

[107] J. A. Prescher, D. H Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873-877.

[108] K.S. Lam, R.Renil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 353-358.

[109] C. O. Mellet, J.M. G. Fernandez, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 819-822.

[110] M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1326-1341, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1276-1289.

[111] D. S. Wilson, S. Nock, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 510-517, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 494-500.

[112] M. B. Soellner, K. A Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790-11791.

[113] M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Soulère, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010-6014, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830-5834.

[114] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, *291*, 2357-2364.

[115] G. W. Hart, K. Brew, G. A. Grant, R. A. Bradshaw, W. J. Lennarz, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9747-9752.

[116] V. Y.. Dudkin, J. S. Miller, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *43*, 1355-1359.

[117] A. Bianchi, A. Russo, A. Bernardi, *Tetrahedron: Assymmetry* **2005**, *16*, 381-386.

[118] Y. He, R. J. Hinklin, J. Chang, L. L. Kiessling, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4479-4482.

[119] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, *Academic Press*, San Diego, **1996**.

[120] C. C.-Y. Wang, T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 697-701.

[121] R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, *Wiley*, New York, **1994**.

[122] P. J. Guiry, C. P. Saunders, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 497-537.

[123] P. N. M. Botman, O. David, A. Amore, J. Dinkelaar, M. T. Vlaar, K. Goubitz, J. Fraanje, H. Schenk, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3553-3555, *Angew.Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3471-3473.

[124] J. Wermuth, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328-1335.

[125] D. Lim, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9632-9640.

[126] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.

[127] S. Nozaki, *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 162-167.

[128] S. Davies, *J. Pep. Sci.* **2003**, *9*, 471-501.

[129] J. N. Lambert, J. P. Mitchell, K. D. Roberts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 471-484.

[130] J. Alsina, F. Rabonal, F. Albericio, G. Barany, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9633-9636.

[131] A. F. Spatola, K. Dorlak, P. Romanovskis, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 591-594.

[132] M. B. Soellner, A. Tam, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9824-9830.

[133] W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3258-3261.

[134] C. Rosenbaum, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5677-5680.

[135] L. Yang, G. Moriello, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8197-8200.

[136] G. T. Bourne, S. W. Golding, R. P. McGeary, W. D. F. Meutermans, A. Jones, G. R. Marshall, P. F. Alewood, M. L. Smythe , *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7706-7713.

[137] Y. Shao, W. Lu, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3911-3914.

[138] L. Zhang, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2363-2370.

[139] J. A. Camarero, T. W. Muir, *Chem. Commun.* **1997**, *1*, 1369-1370.

[140] M. Sudol, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **1996**, *65*, 113-132.

[141] M. Sudol, H. I. Chen, C. Bougeret, A. Einbond, P. Bork, *FEBS Lett.* **1995**, *369*, 67-71.

[142] J. A. Camarero, J. Pavel, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 361-364, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 347-349.

[143] H. Iwai, A. Pluncktbun, *FEBS Lett.* **1999**, *459*, 166-172

[144] H. Terlau, B. M. Olivera, *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 41-68.

[145] D. J. Adams, P. F. Alewood, D. J. Craik, R. D. Drinkwater, R. J. Lewis, *Drug Dev. Res.* **1999**, *46*, 219-234.

[146] B. M. Olivera, L. J. Cruzab, *Toxicon* **2001**, *39*, 7-14.

[147] B. J. Livett, K. R. Gayler, Z. Khalil, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1715-1723.

[148] P. S. Staats, T. Yearwood, S. G. Charapata, R. W. Presly, M. S. Wallace, M. Byas-Smith, R. Fisher, D. A. Bryce, E. A. Mangieri, R. R. Luther, M. Mayo, D. McGuire, D. Ellis, *J. Am. Med. Assoc.* **2004**, *291*, 63-70.

[149] H. R. Arias, M. P. Blanton, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, *32*, 1017-1028.

[150] K. J. Nielsen, L. Thomas, R. J. Lewis, P. F. Alewood, D. J. Craik, *J. Mol. Biol.* **1996**, *263*, 297-310.

[151] L. J. Dutton, D. J. Craik, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 327-344.

[152] C. K. Nielsen, R. J. Lewis, P. F. Alewood, R. D. Drinkwater, M. Patterson, T. L. Yaksh, D. McCumber, M. T. Smith, *Pain* **2005**, *118*, 112-124.

[153] E. S. Lovelace, C. J. Armishaw, M. L. Colgrave, M. E. Wahlstrom, P. F. Alewood, N. L. Daly, D. J. Craik, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6561-6568.

[154] T. L. Aboye, R. J. Clark, D. J. Craik, U. Göransson, *Chem. Bio. Chem.* **2008**, *9*, 103-113.

[155] J. P. Tam, Y. A. Lu, Q. T. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4316-4324.

[156] N. L. Daly, S. Love, P. F. Alewood, D. J. Craik, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10606-10614.

[157] L. Chiche, A. Heitz, J. C. Gelly, J. Gracy, P. T. T. Chau, P. T. Ha, J. F. Hernandez, D. Le-Nguyen, *Curr. Protein & Peptide Sci.* **2004**, *5*, 341-349.

[158] P. Thongyoo, E. W. Tate, R. J. Leatherbarrow, *Chem. Commun.* **2006**, 2848-2850.

[159] G. J. Cotton, T. W. Muir, *Chemistry and Biology* **1999**, *6*, 247-256.

[160] P. H. Hirel, M. J. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 8247-8251.

[161] J. A. Camarero, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5597-5598.

[162] J. A. Camarero, D. Fushman, D. Cowburn, T. W. Muir, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2479-2484.

[163] O. David, W. J. N. Meester, H. Bieräugel, H. E. Schoemaker, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4509-4511, *Angew.Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4373-4375.

[164] T. Imamoto, T. Oshiki, T. Onozawa, T. Kusumoto, K. Sato, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5244-5252.

[165] J. T. Lindquist, J. C. Pelletier *Or. Lett.* **2001**, *3*, 781-783.

[166] I. Papp, Master-Thesis, Berlin, **2006**.

[167] M. Scheideman, P. Shapland, E. Vedejs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10502-10503.

[168] P. Shapland, E. Vedejs, *J. Org. Chem*. **2004**, *69*, 4094-4100.

[169] H. Nöth, B. Wrackmeyer in *NMR Spectroscopy of Boron Compounds*, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, **1978**.

[170] For an overview of ^{11}B-NMR chemical shifts see: http://www.chemistry.sdsu.edu/research/BNMR.

[171] R. Kleineweischede, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem*. **2008**, *120*, 6073–6077, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5984–5988.

[172] A. Tam, R. T. Raines *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1055-1063.

[173] R. J. Payne, S. Ficht, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2008**, *120,* 4483-4487, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4411-4415.

[174] H. Kim, J. K. Cho, S. Aimoto, Y.-S. Lee, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1149-1151.

[175] L. Li, P. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 29-32.

[176] P. Sieber, B. Riniker, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6031-6034.

[177] J. Ruczynski, B. Lewandowska, P. Mucha, P. Rekowski, *J. Pep. Sci.* **2008**, *14*, 335-341.

[178] K. F. Medzihradszky, N. P. Ambulos, A. Khatri, G. Osapay, H. A. Remmer, A. Somogyi, S. A. Kates, *Lett. Pep. Sci.* **2002**, *8*, 1-12.

[179] T. Johnson, M. Liley, T. J. Cheeseright, F. Begum, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2000**, *1*, 2811-2820.

[180] M. Mutter, A. Nefzi, T. Sato, X. Sun, F. Wahl, T. Wohr, *Pep. Res.* **1995**, *8,* 145-153.

[181] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

[182] M. Gude J. Ryf, P. D. White, *Lett. Pept. Sci*. **2003**, *9*, 203-206.

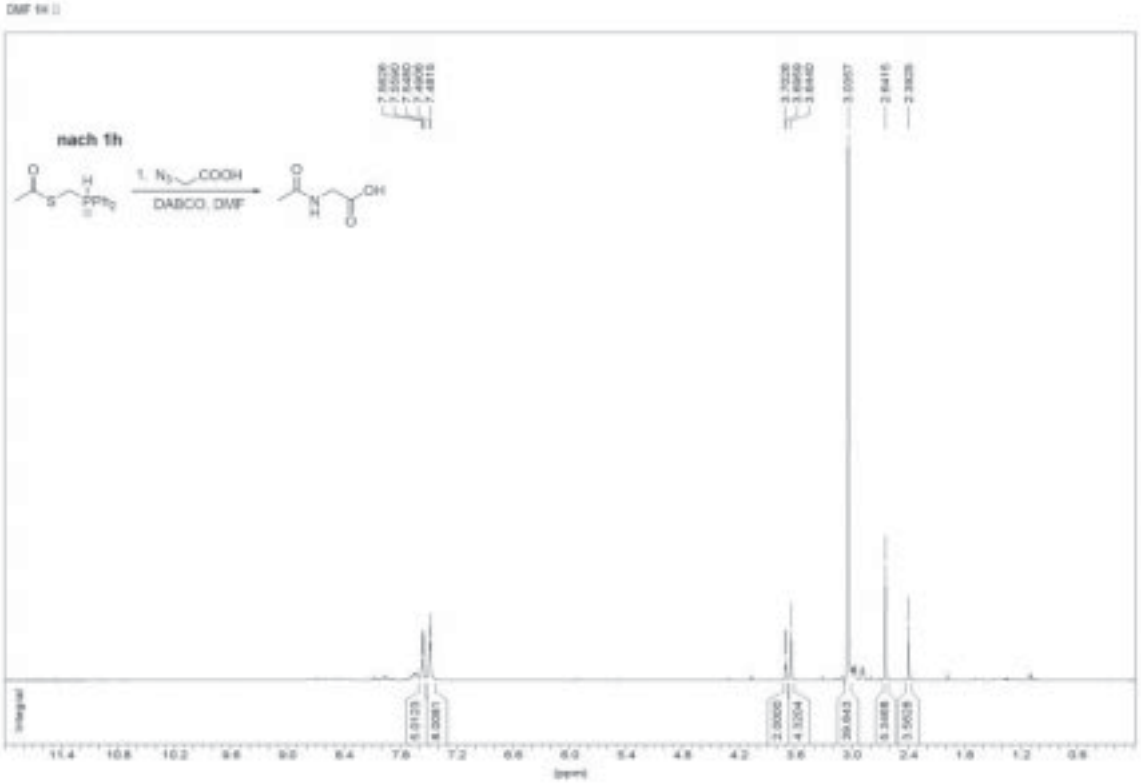
[183] G. K Farrington, A. Kumar, F.C. Wedler, *Org. Prep. Proced Int.* **1989**, *21*, 390-392.

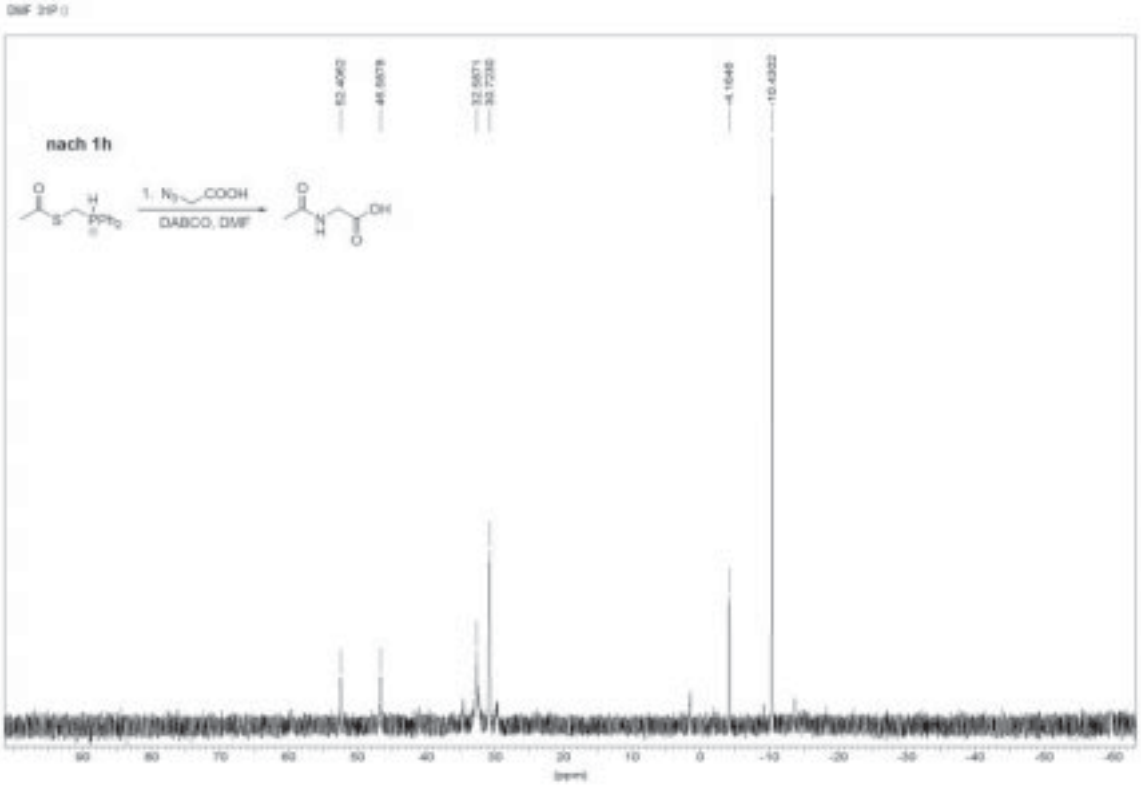
[184] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9-12.

[185] M. A. Mesaik, S. Rahat, K. M. Khan, Zia-Ullah, M. I. Choudhary, S. Murad, Z. Ismail, Atta-ur-Rahman, A. Ahmad, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2049-2057.

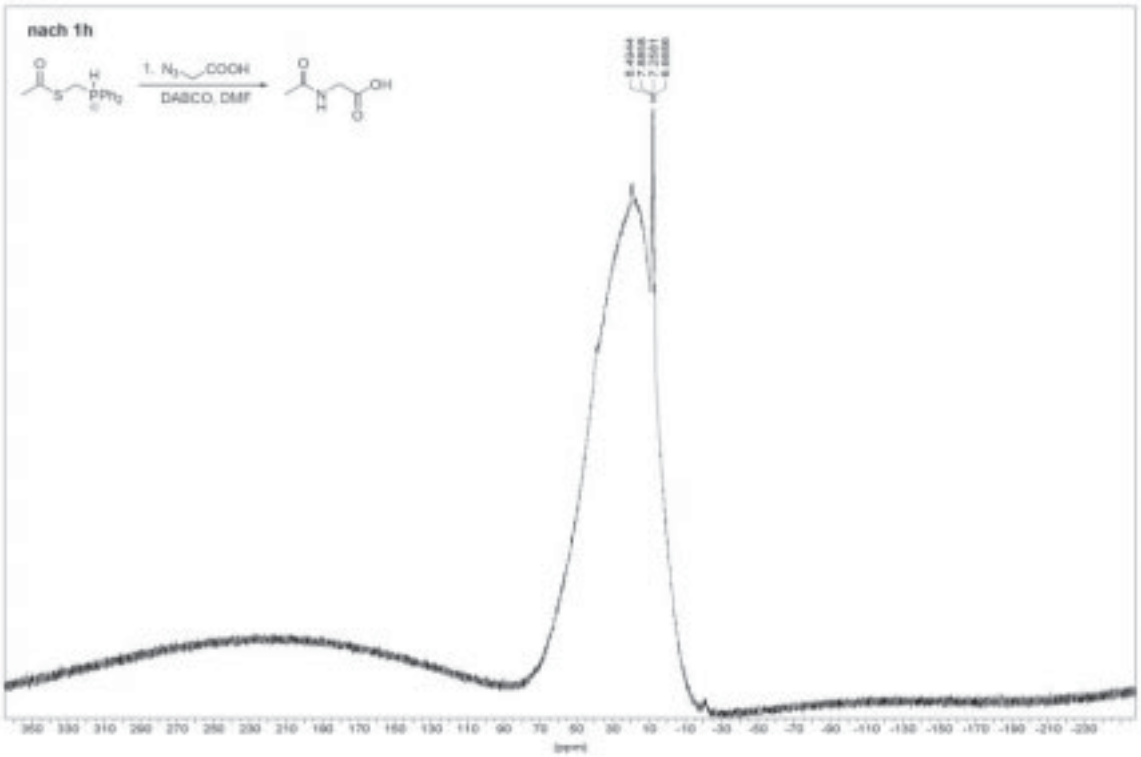
[186] C. Imrie, T. A. Modro, E. R. Rohwer, C. C. P. Wagener, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5643-5649.

Anhang

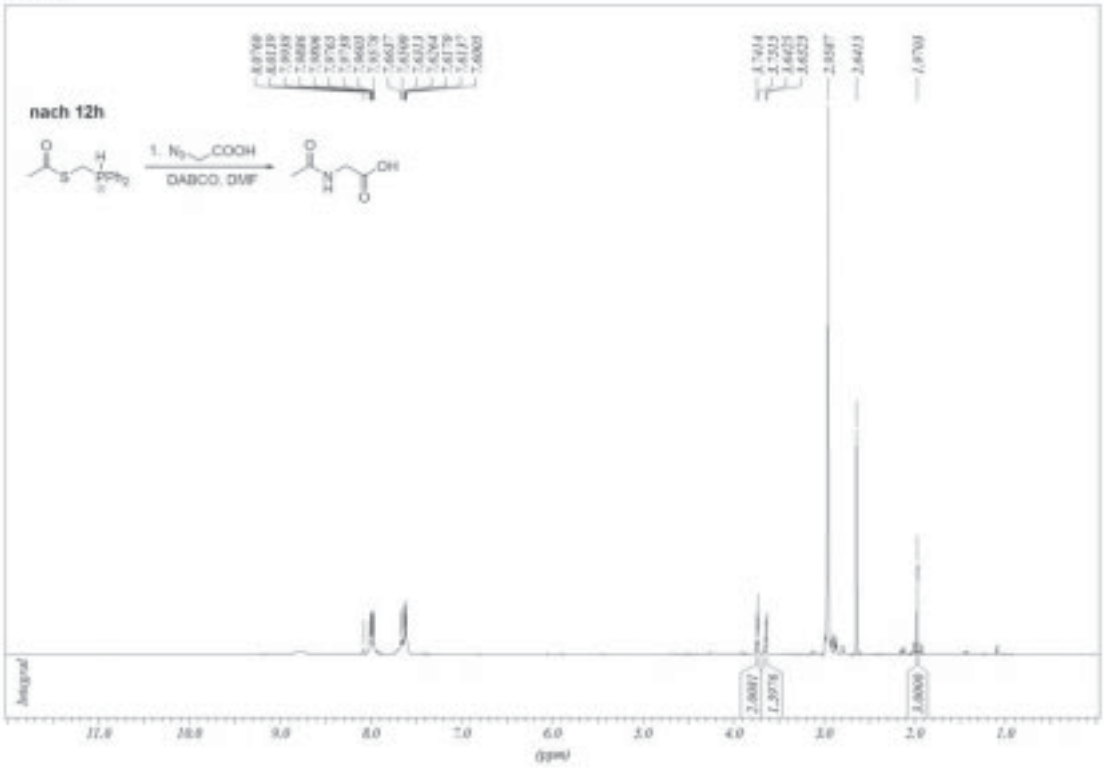

nach 1h
1. N3 COOH
DABCO, DMF
Integral
(ppm)


nach 1h
1. N3 COOH
DABCO, DMF
(ppm)

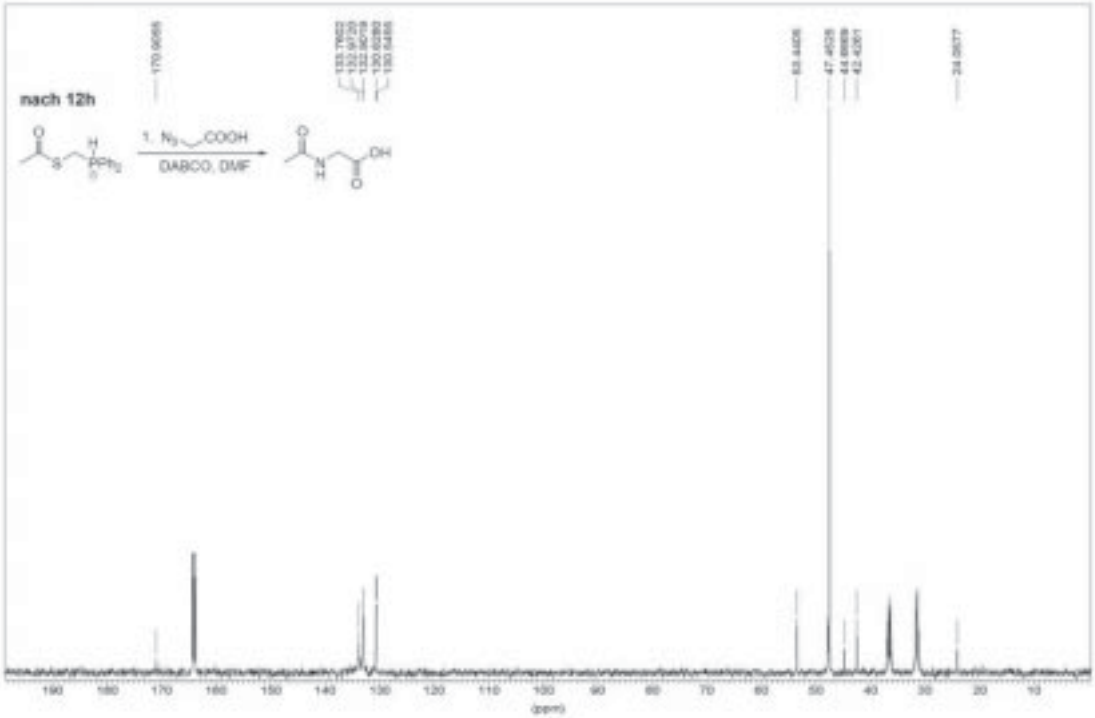
118 DMF



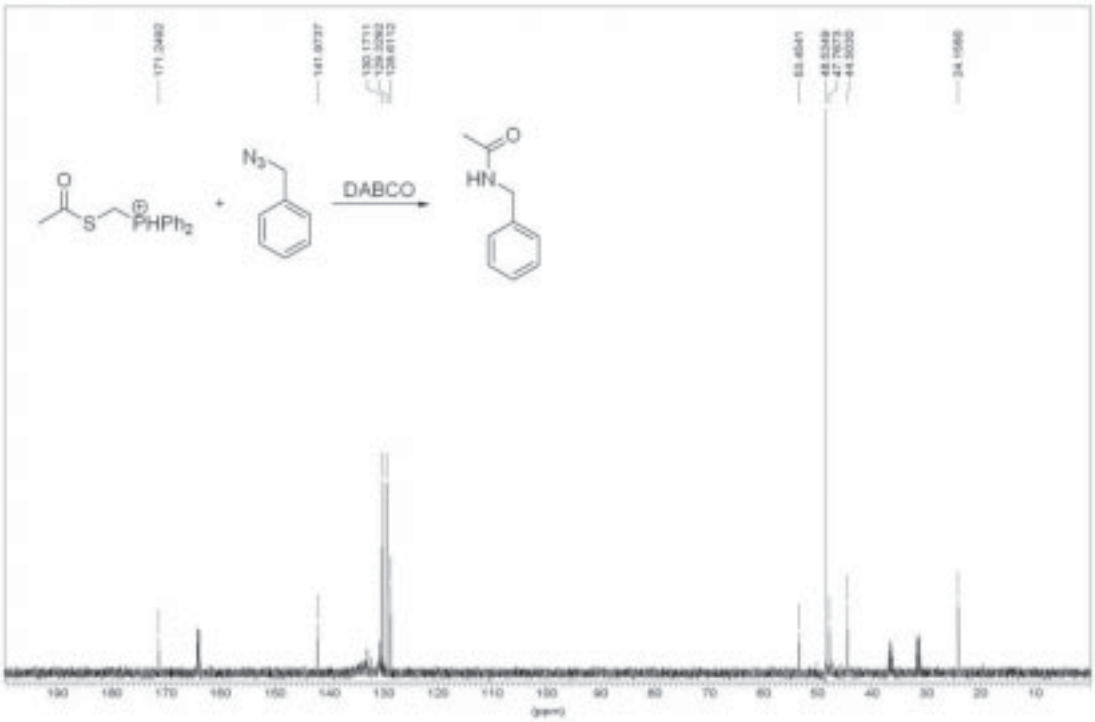
fr DMF-07



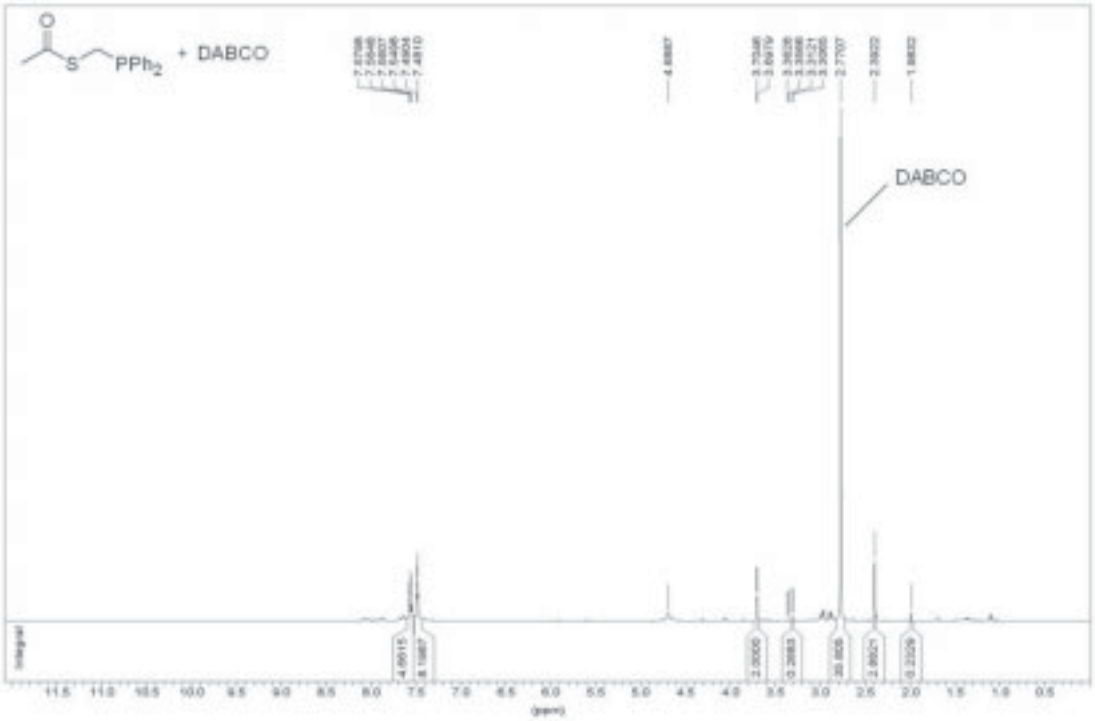
13C DMF-D7

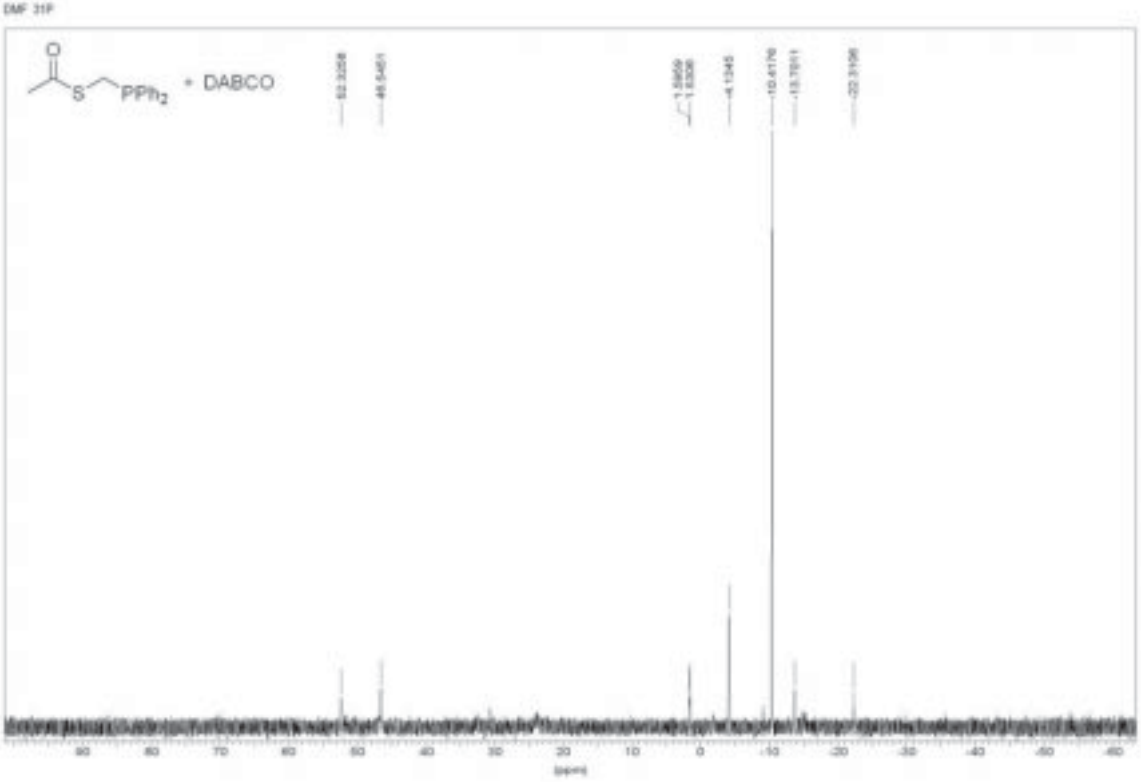

nach 12h
1. N3 COOH
DABCO, DMF
170.9666
133.7602
132.9729
132.9529
132.0759
130.5486
53.5426
47.4528
44.6669
42.4261
24.0577
(ppm)

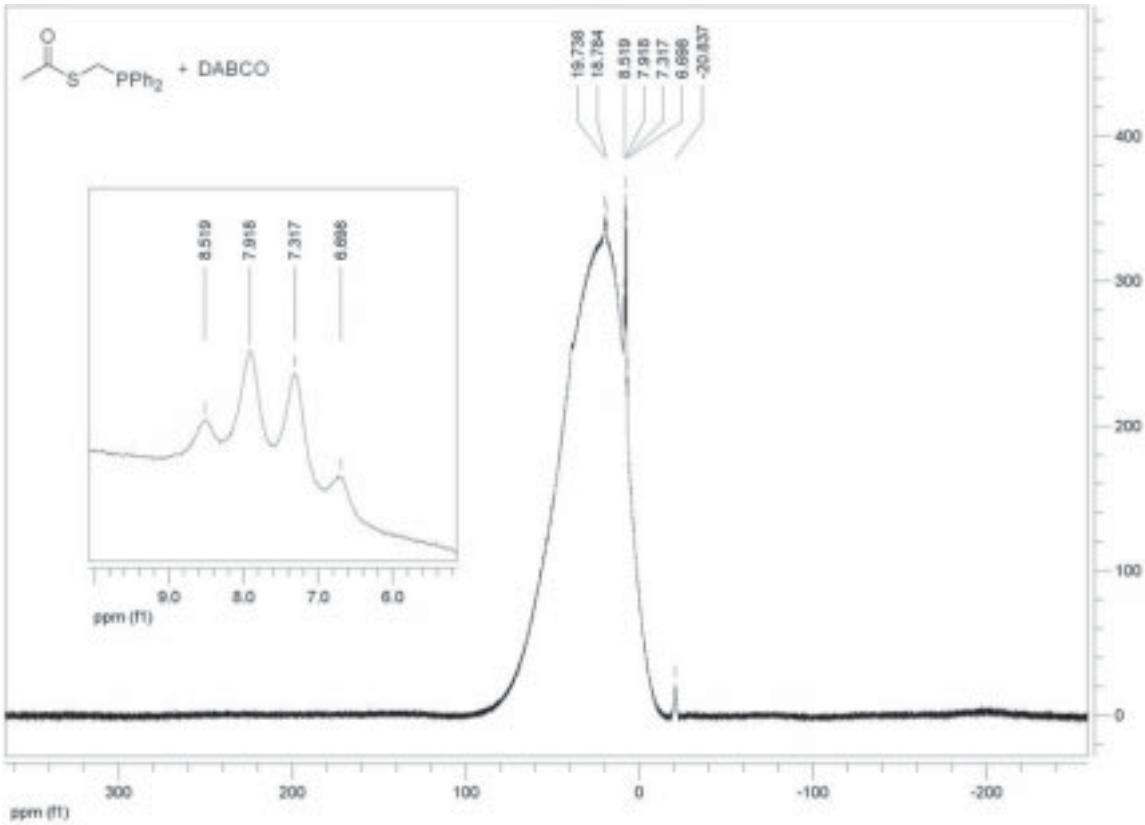
13C DMF-07

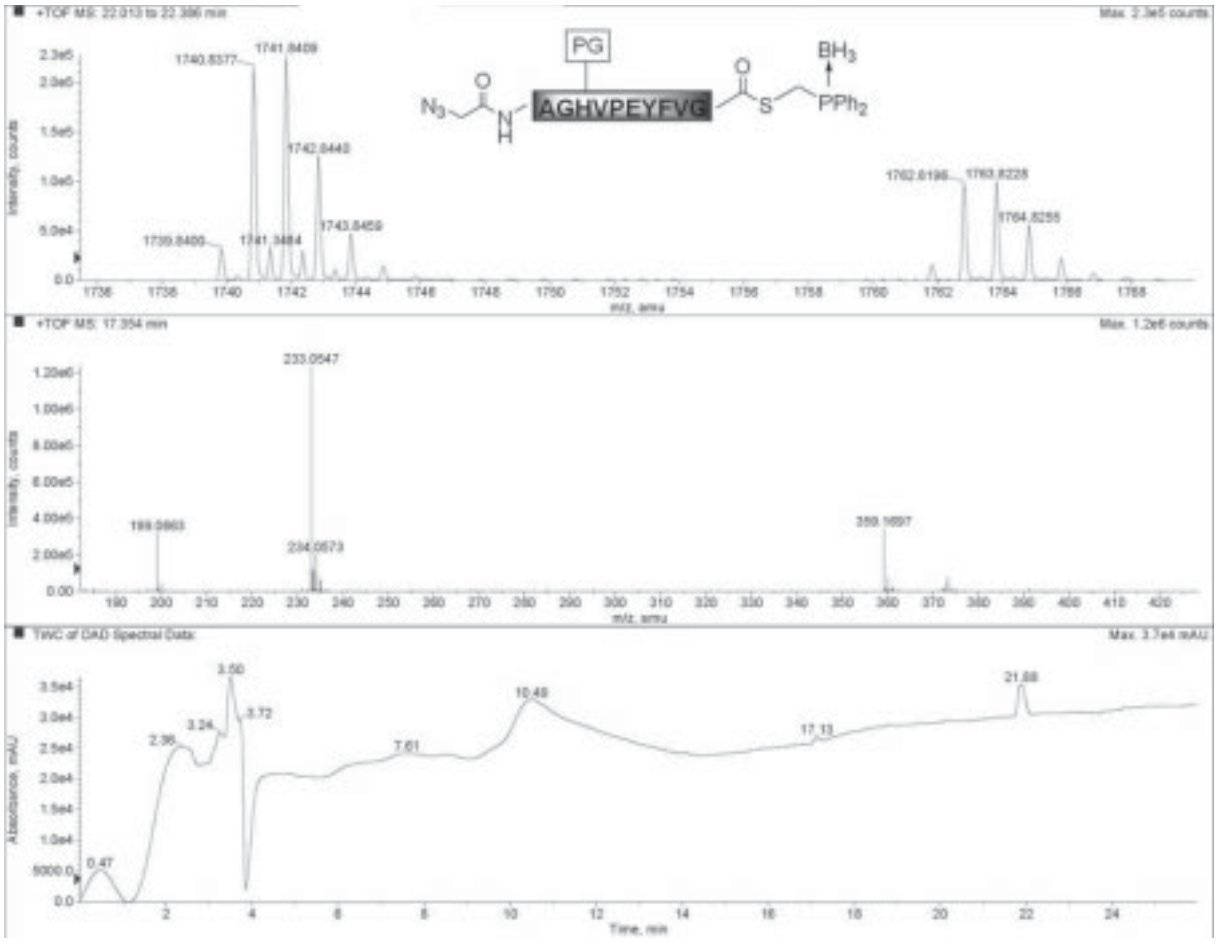


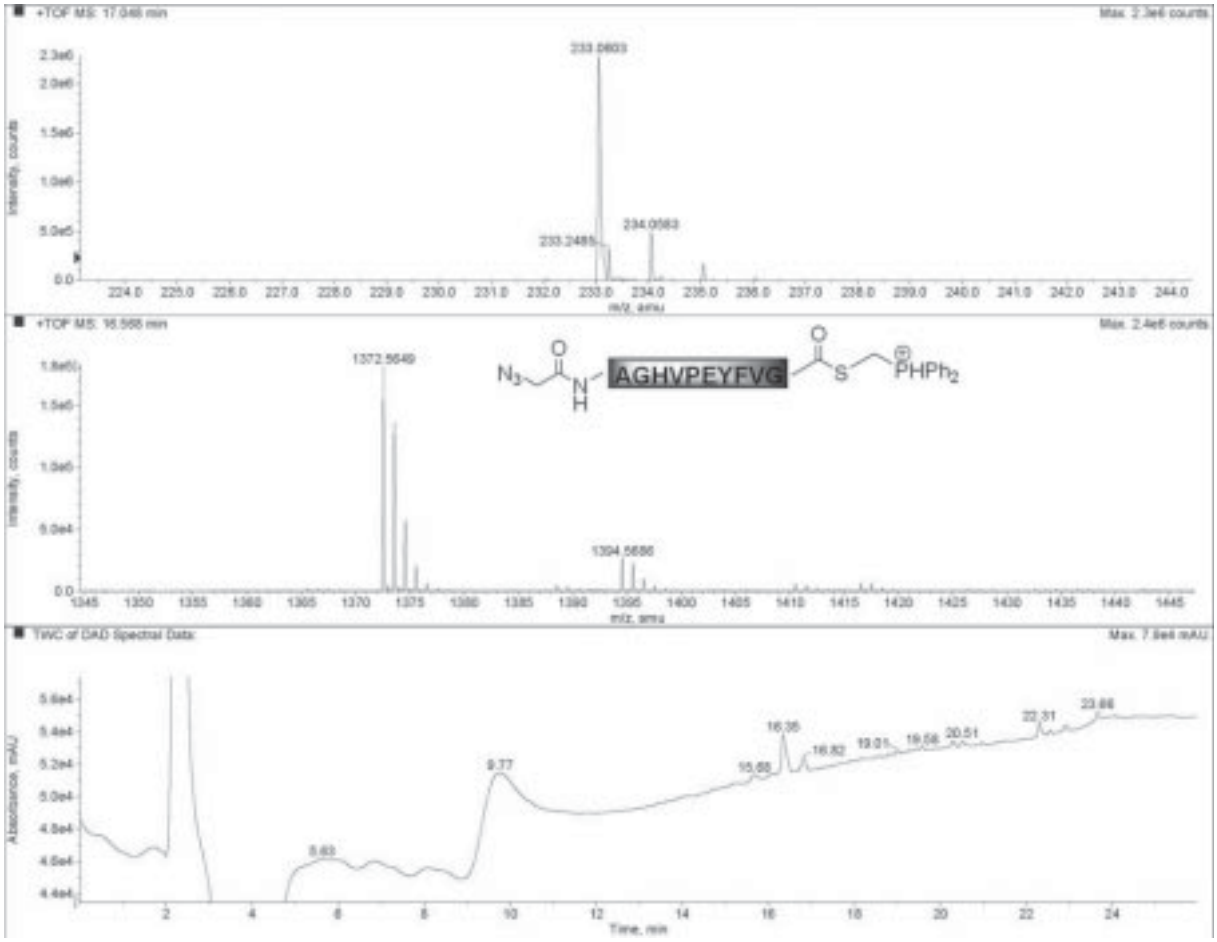
DMF 1H

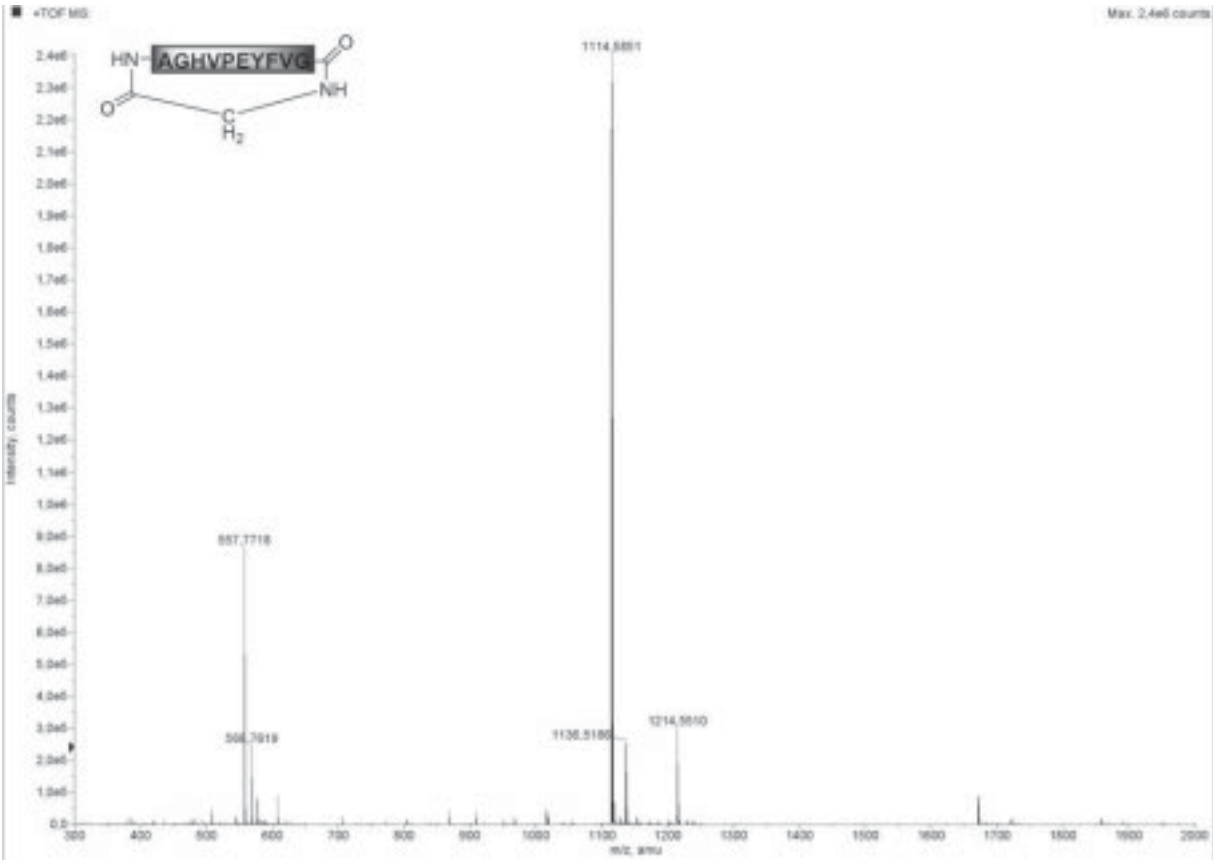


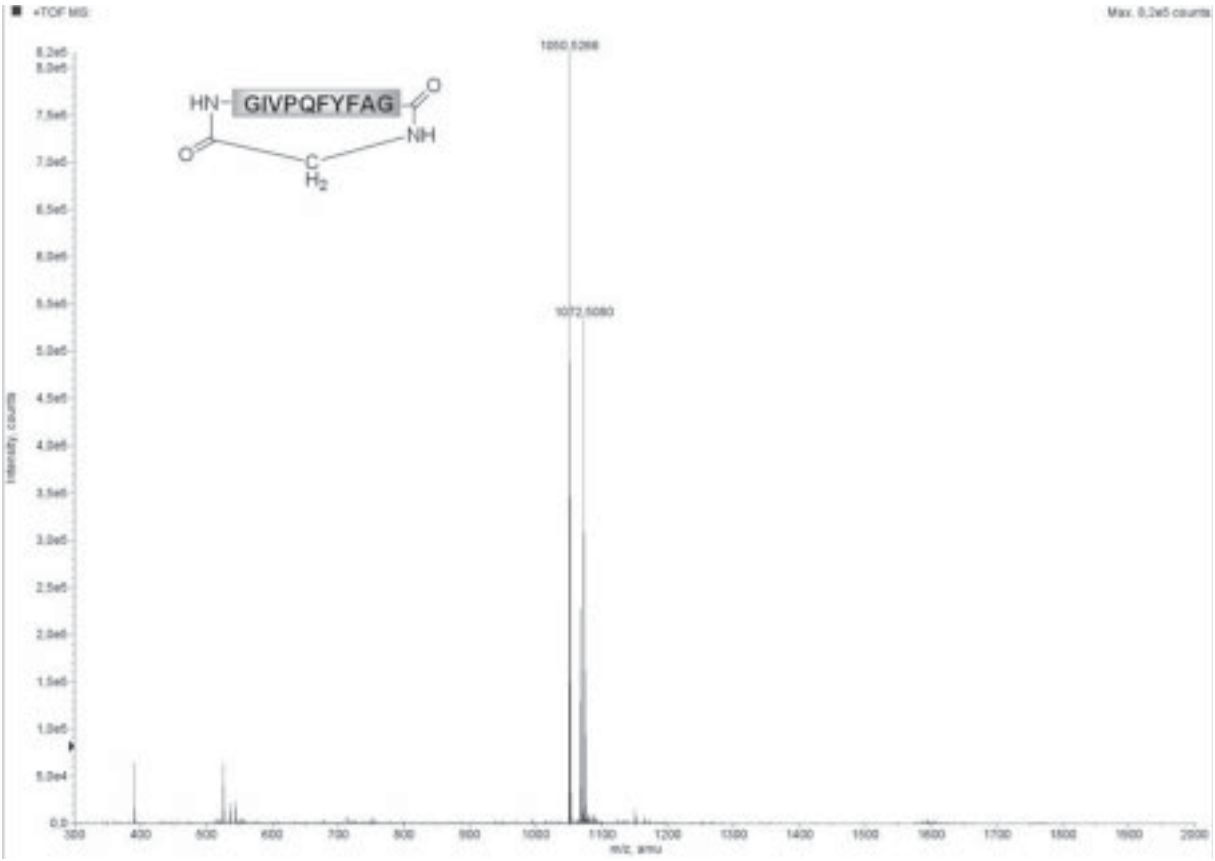

DMF 31P
+ DABCO
52.3258
49.5461
1.5659
1.5308
-4.1345
-10.4176
-13.7011
-22.3106
(ppm)

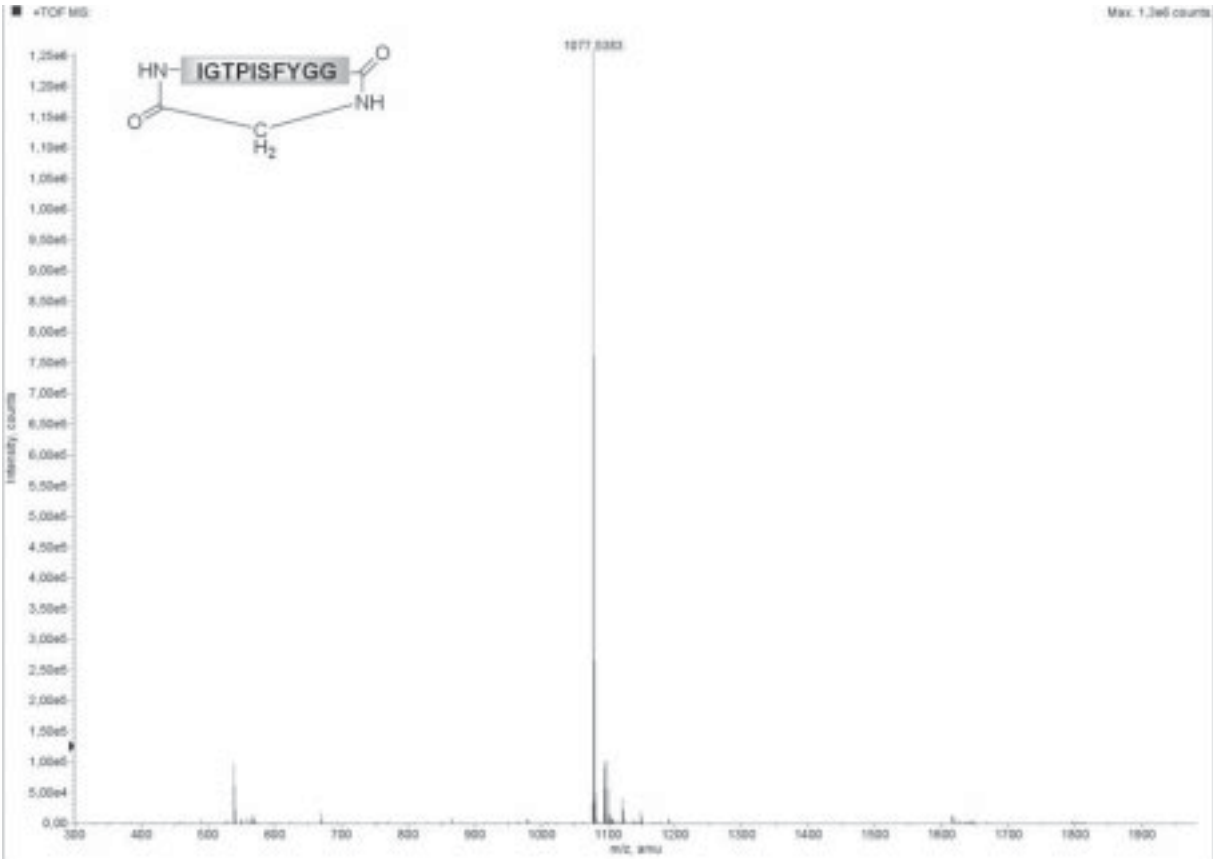

+ DABCO
19.738
18.784
8.519
7.918
7.317
6.696
-20.837
8.519
7.918
7.317
6.696
9.0
8.0
7.0
6.0
ppm (f1)
400
300
200
100
0
300
200
100
0
-100
-200
ppm (f1)

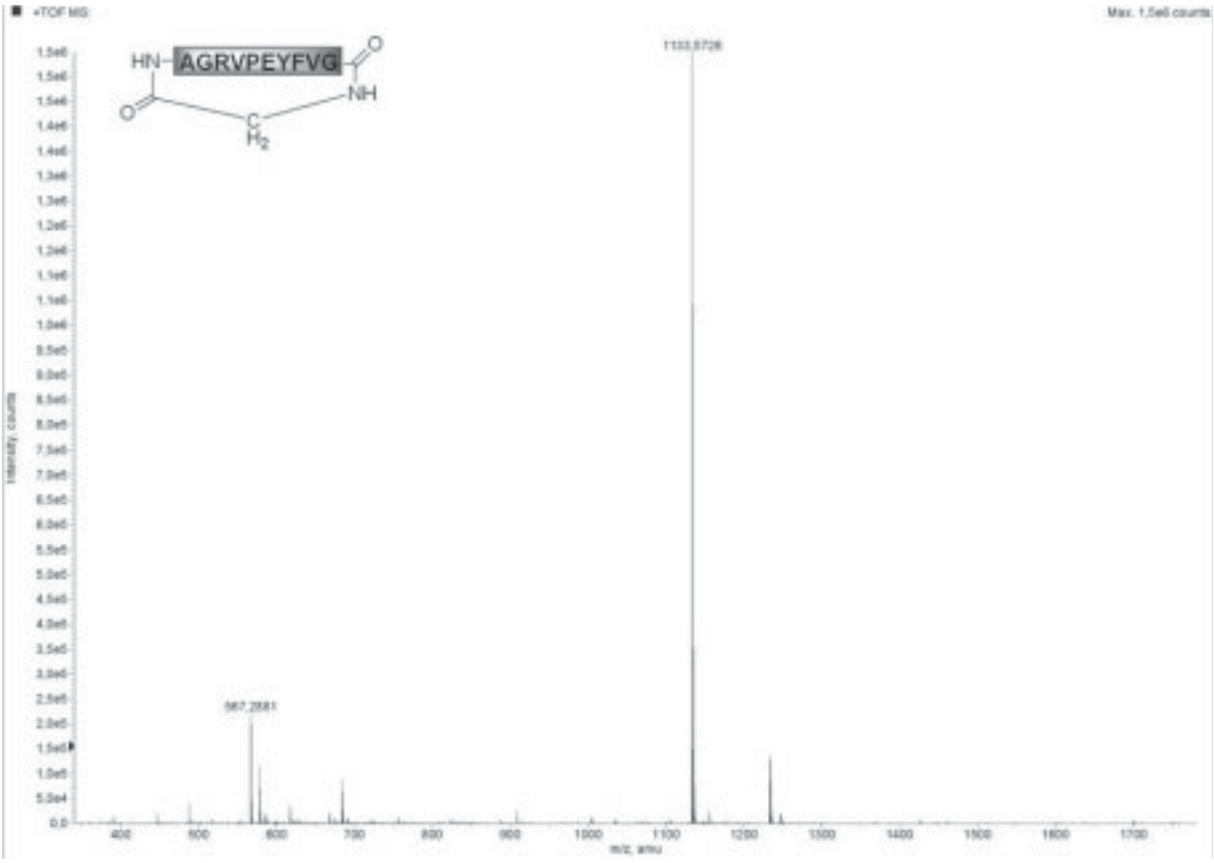

+TOF MS: 22.013 to 22.386 min
Max. 2.3e5 counts
PG
AGHVPEYFVG
BH3
PPh2
1740.8377
1741.8409
1742.8443
1743.8459
1739.8400
1741.3484
1762.8196
1763.8228
1764.8255
Intensity, counts
m/z, amu
+TOF MS: 17.354 min
Max. 1.2e6 counts
233.0547
199.0863
234.0573
359.1697
TWC of DAD Spectral Data:
Max. 3.7e4 mAU
3.50
3.24
3.72
2.96
7.61
10.48
17.13
21.88
0.47
Absorbance, mAU
Time, min

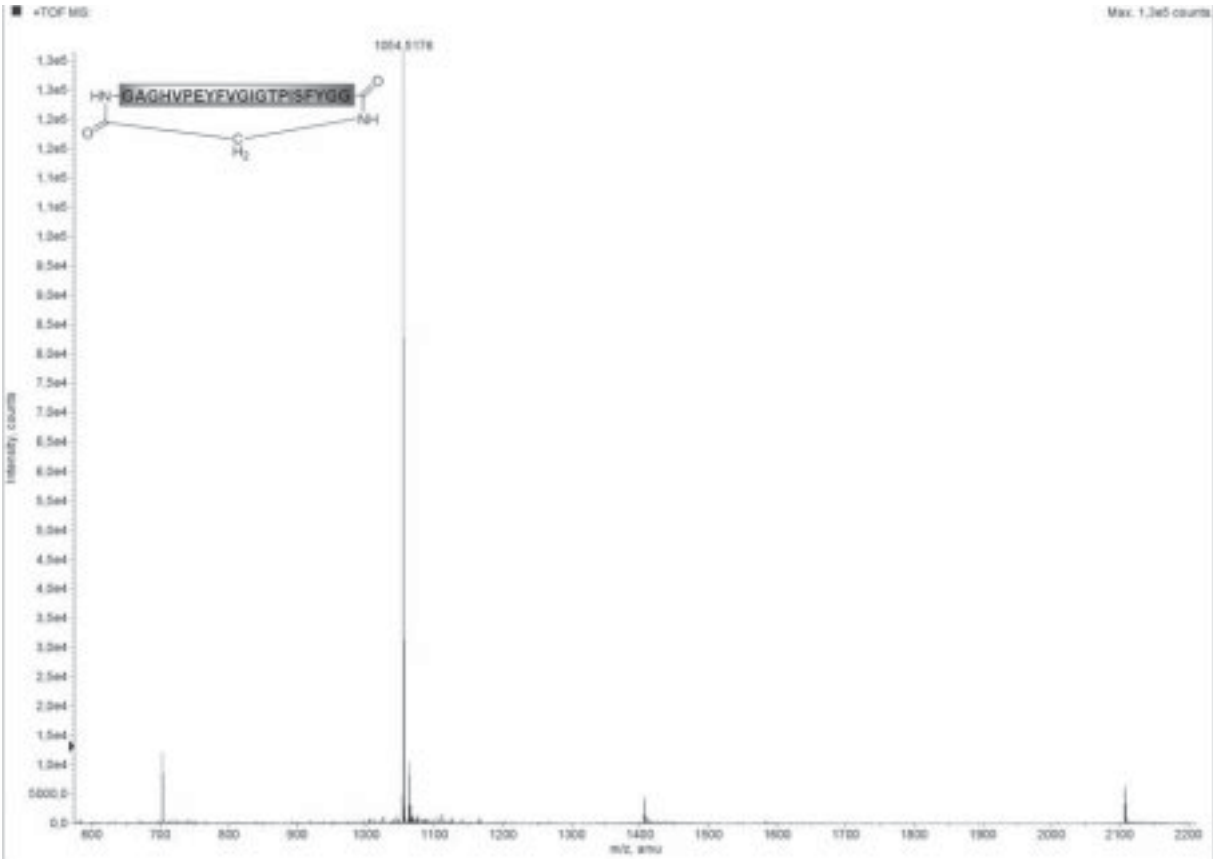

+TOF MS: 17.046 min
Max. 2.3e6 counts
233.0603
233.2485
234.0583
Intensity, counts
m/z, amu
+TOF MS: 16.565 min
Max. 2.4e6 counts
1372.5649
AGHVPEYFVG
PHPh2
1394.5686
TWC of DAD Spectral Data:
Max. 7.5e4 mAU
5.63
9.77
15.68
16.35
16.82
19.01
19.58
20.51
22.31
23.66
Absorbance, mAU
Time, min

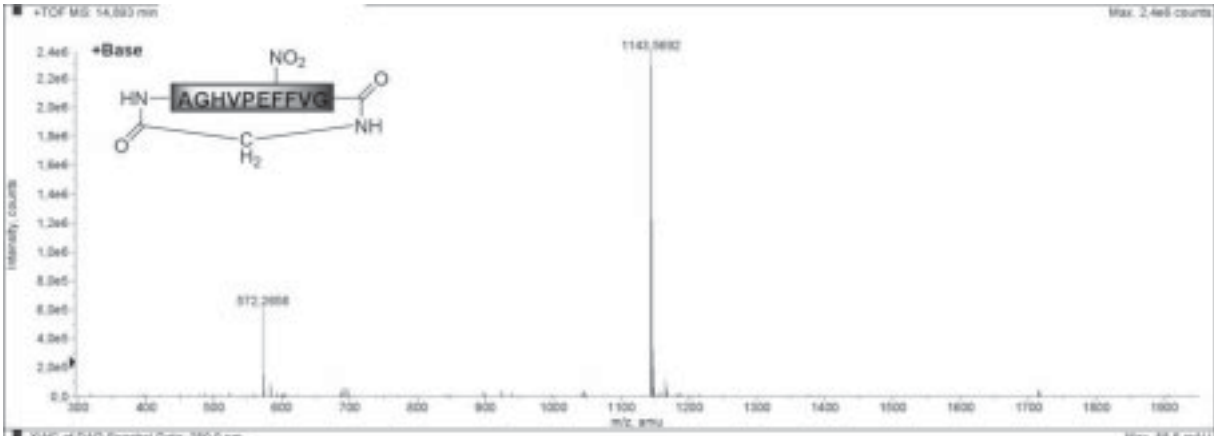

+TOF MS:
Max. 2.4e6 counts
HN-AGHVPEYFVG
NH
C
H2
1114.5851
557.7718
1214.5610
Intensity, counts
m/z, amu

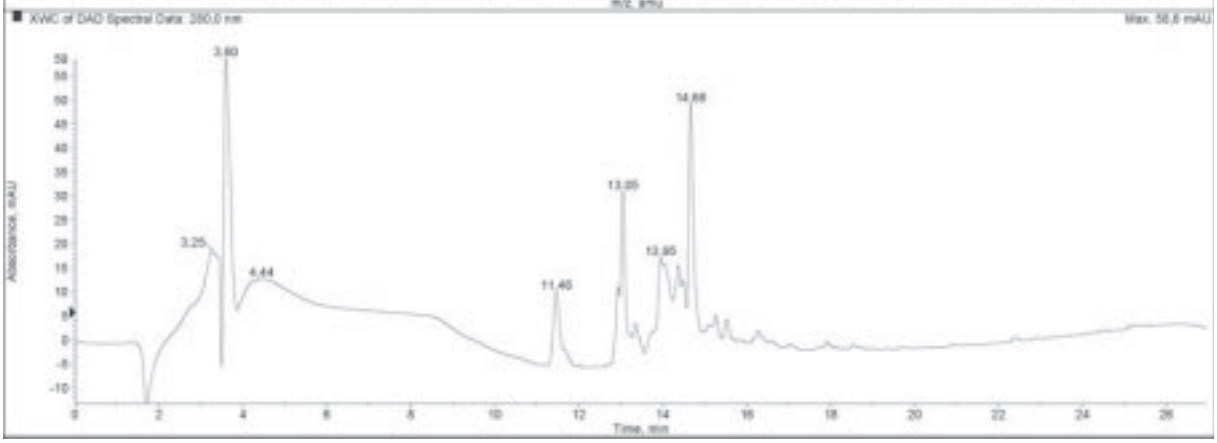

+TOF MS:
Max. 8.2e5 counts
HN-GIVPQFYFAG
NH
C
H2
1050.5266
1072.5080
Intensity, counts
m/z, amu

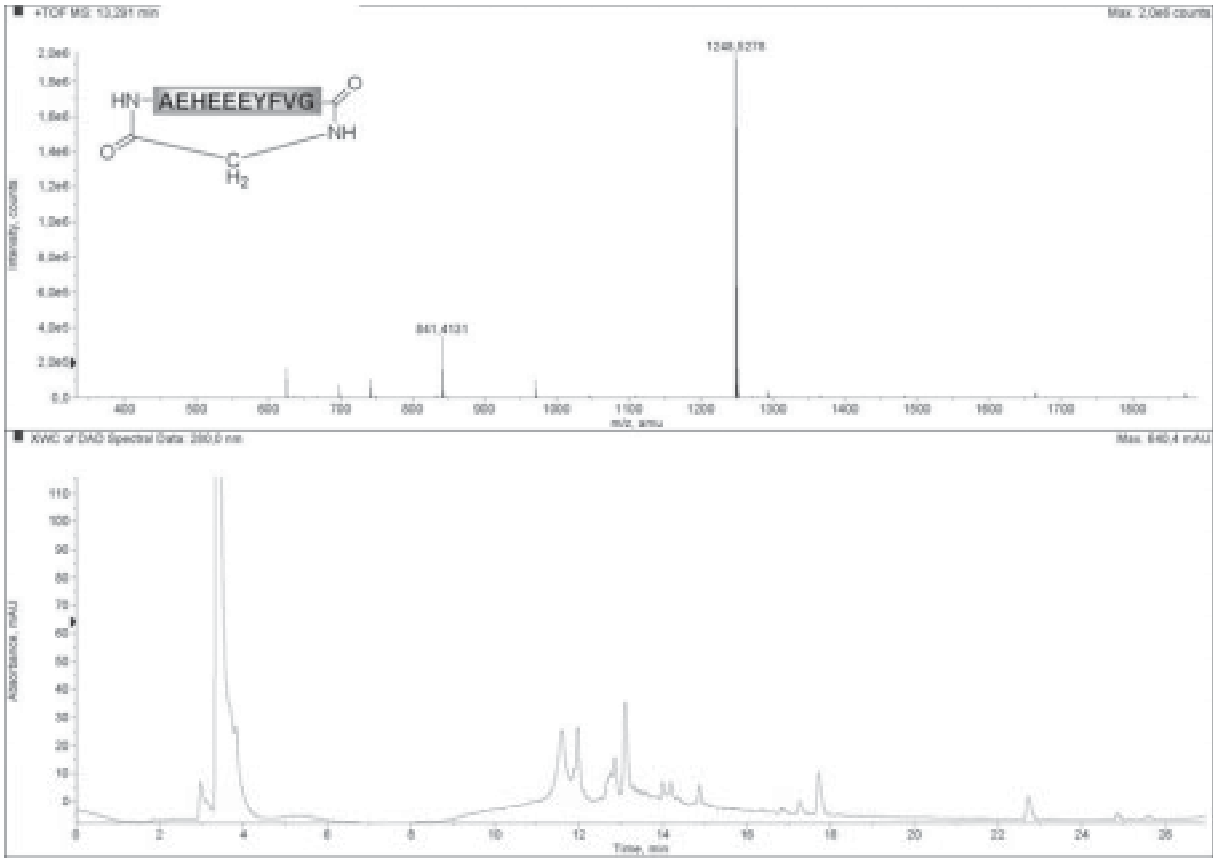

+TOF MS:
Max. 1.3e6 counts
HN-IGTPISFYGG-O
NH
O
C
H2
1071.5383
Intensity, counts
m/z, amu

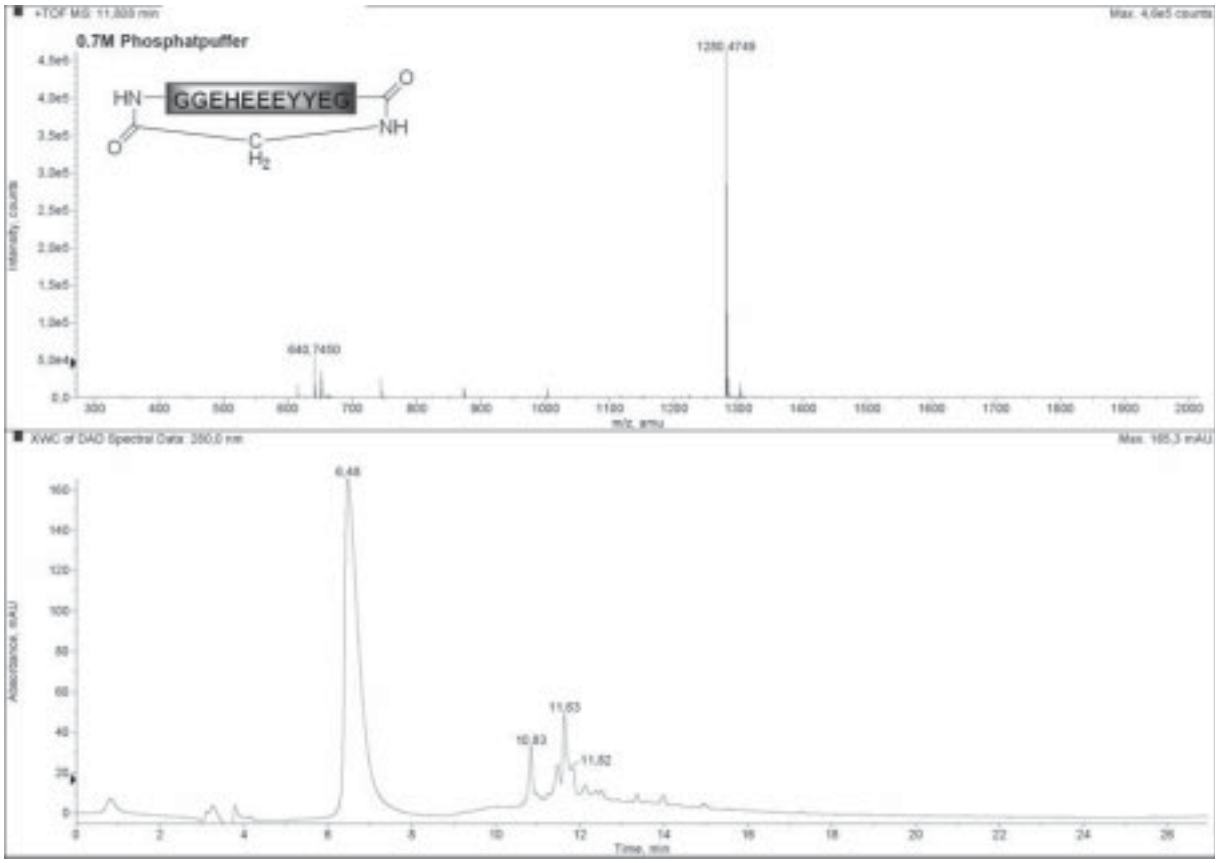

+TOF MS:
Max. 1.5e6 counts
HN-AGRVPEYFVG-O
NH
O
C
H2
1133.5728
567.2881
Intensity, counts
m/z, amu

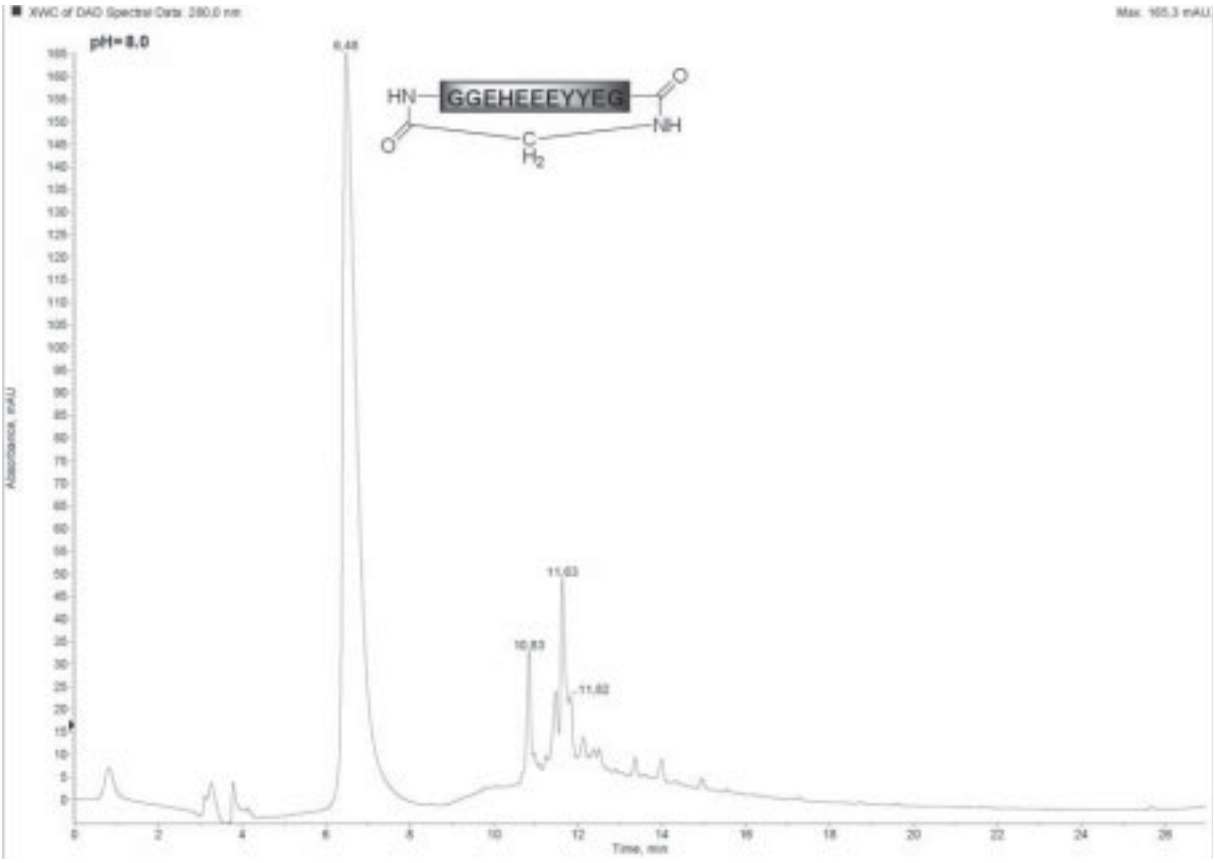

+TOF MS:
Max. 1.3e5 counts
1064.5176
HN
GAGHVPEYFVGIGTPISFYGG
O
NH
C
H2
Intensity, counts
m/z, amu

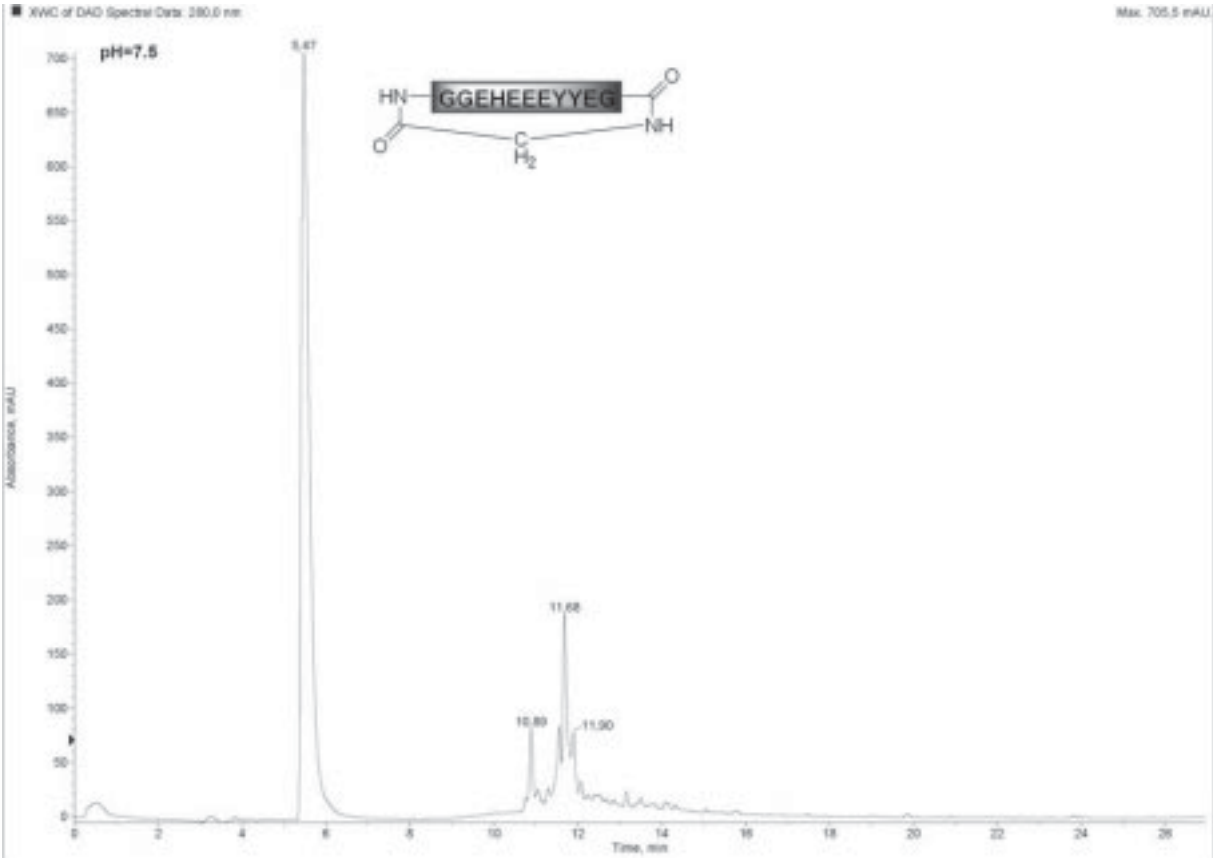

+TOF MS: 14.893 min
Max. 2.4e6 counts
+Base
NO2
HN
AGHVPEFFVG
O
NH
C
H2
1143.5692
572.2858
Intensity, counts
m/z, amu

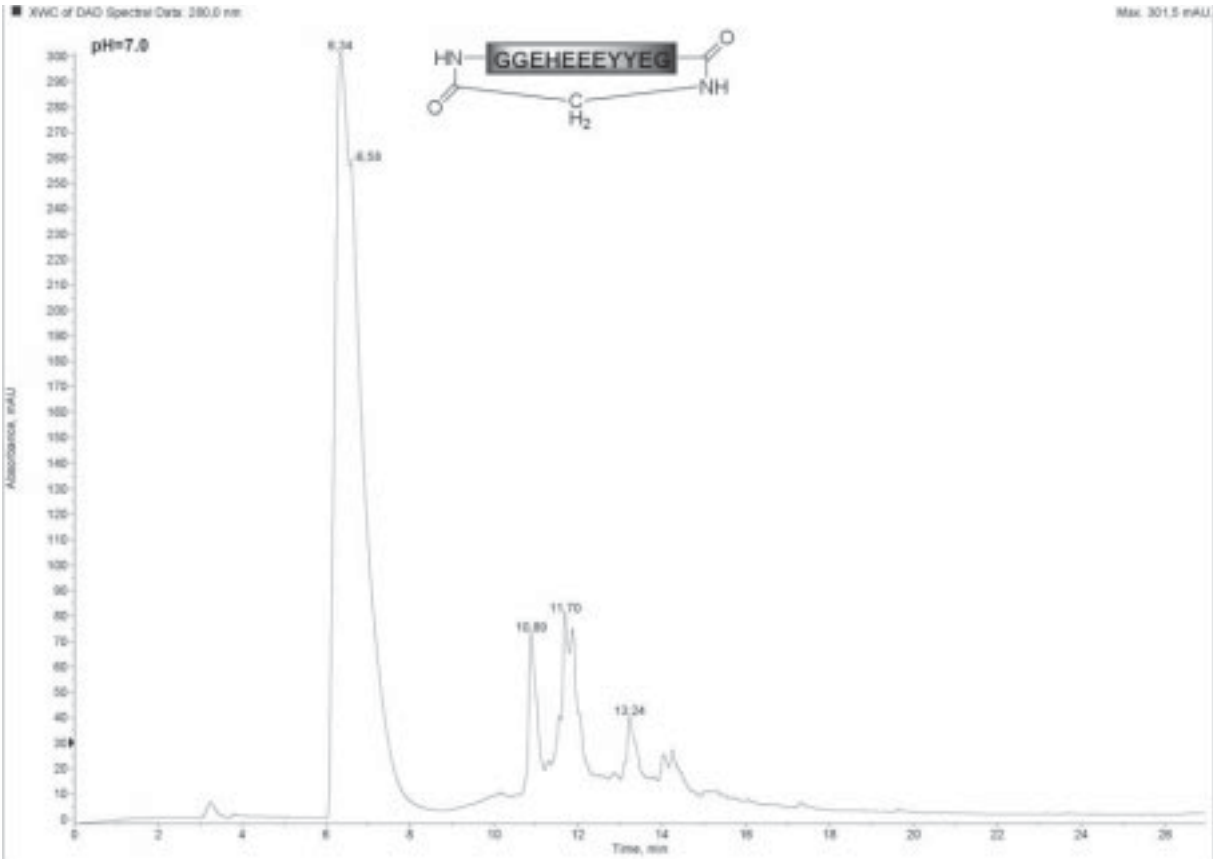

XWC of DAD Spectral Data: 280.0 nm
Max. 58.6 mAU
3.60
3.25
4.44
11.46
13.05
13.95
14.68
Absorbance, mAU
Time, min

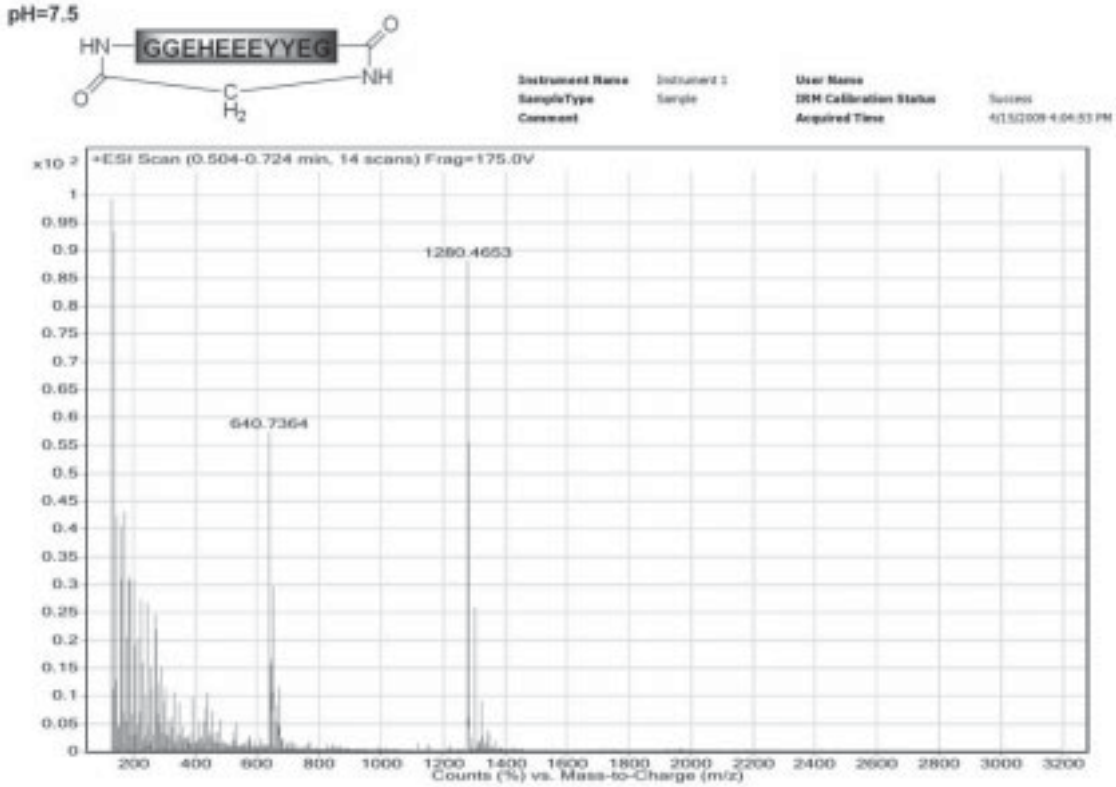

+TOF MS: 10.291 min
Max. 2.0e6 counts
HN
AEHEEEYFVG
O
NH
C
H2
1248.5278
841.4131
Intensity, counts
m/z, amu
XWC of DAD Spectral Data: 280.0 nm
Max. 840.4 mAU
Absorbance, mAU
Time, min

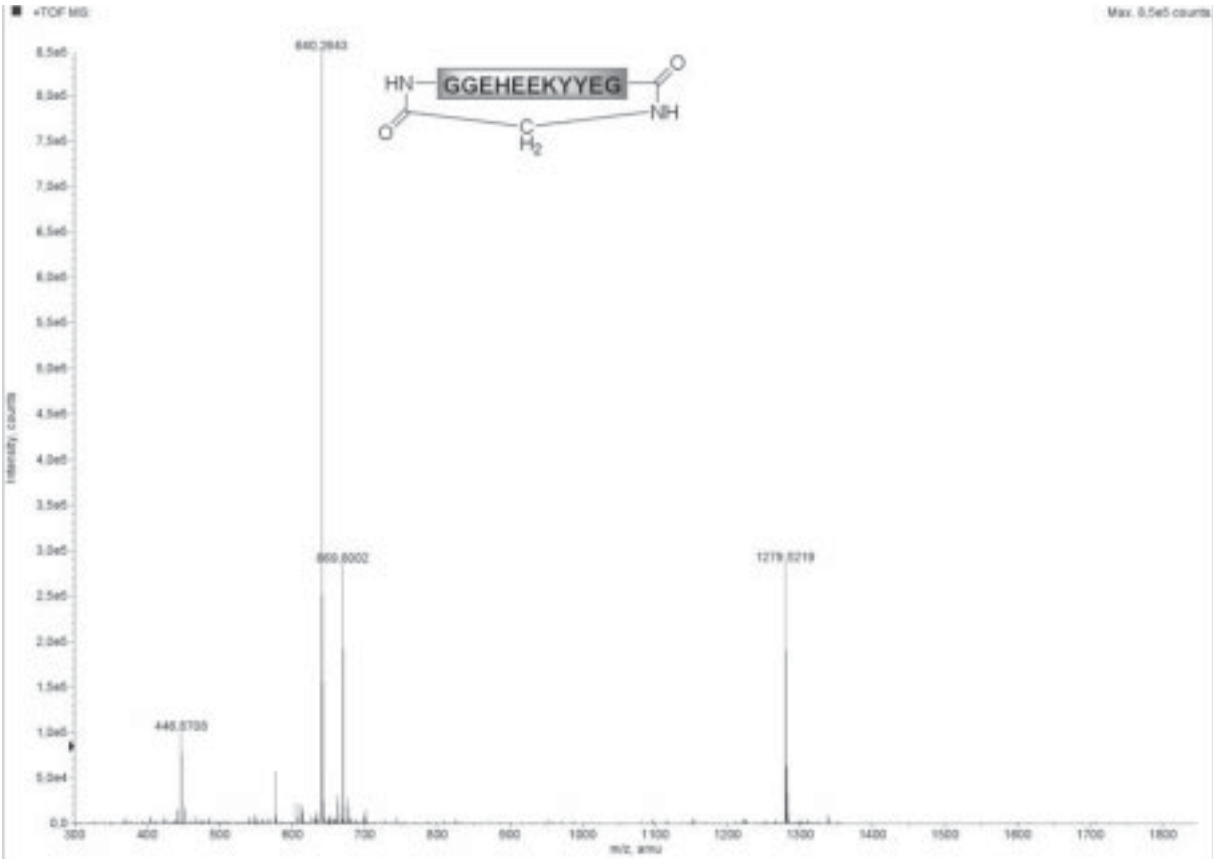

+TOF MS: 11.889 min
Max. 4.6e5 counts
0.7M Phosphatpuffer
HN
GGEHEEEYYEG
O
NH
C
H2
1280.4749
640.7450
Intensity, counts
m/z, amu
XWC of DAD Spectral Data: 280.0 nm
Max. 165.3 mAU
6.48
10.83
11.63
11.82
Absorbance, mAU
Time, min

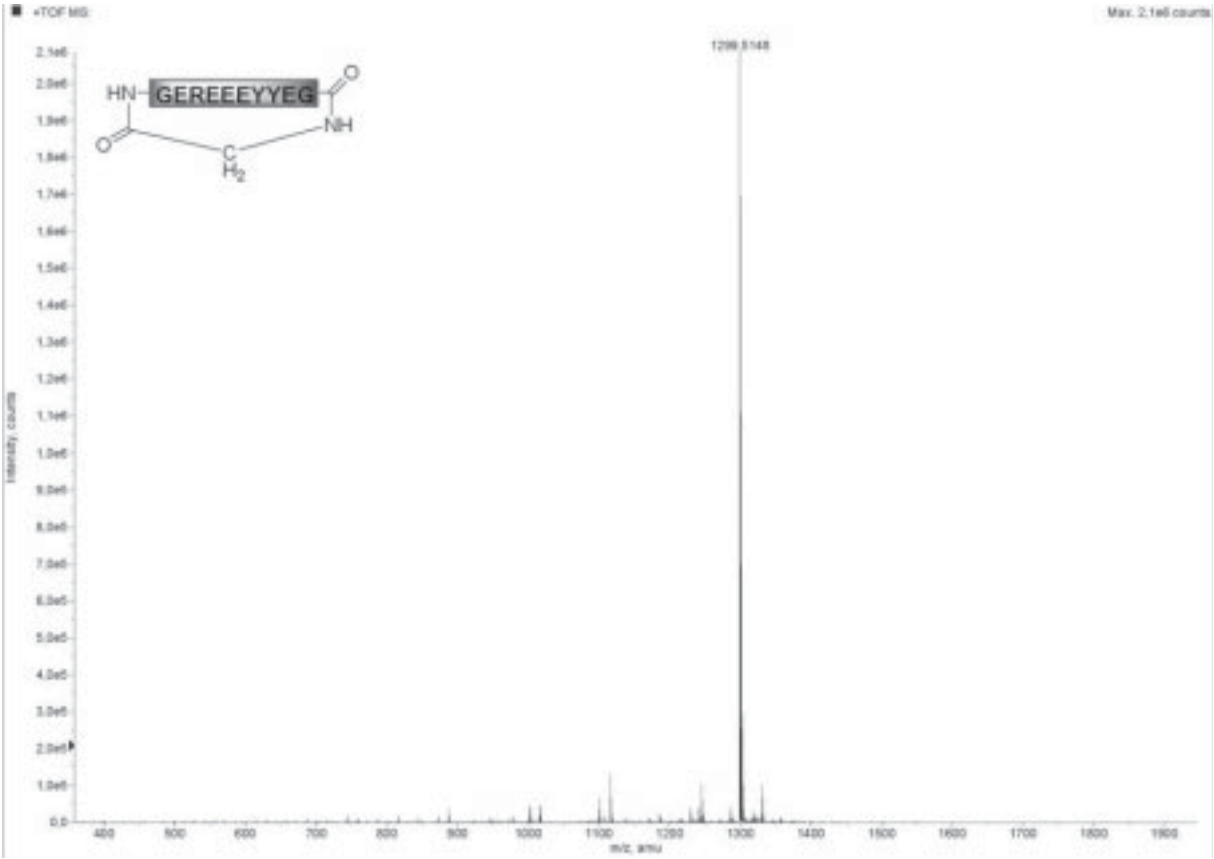

XWC of DAD Spectral Data: 280.0 nm
Max. 165.3 mAU
pH=8.0
6.48
HN
GGEHEEEYYEG
O
NH
C
H2
11.63
10.83
11.82
Absorbance, mAU
Time, min

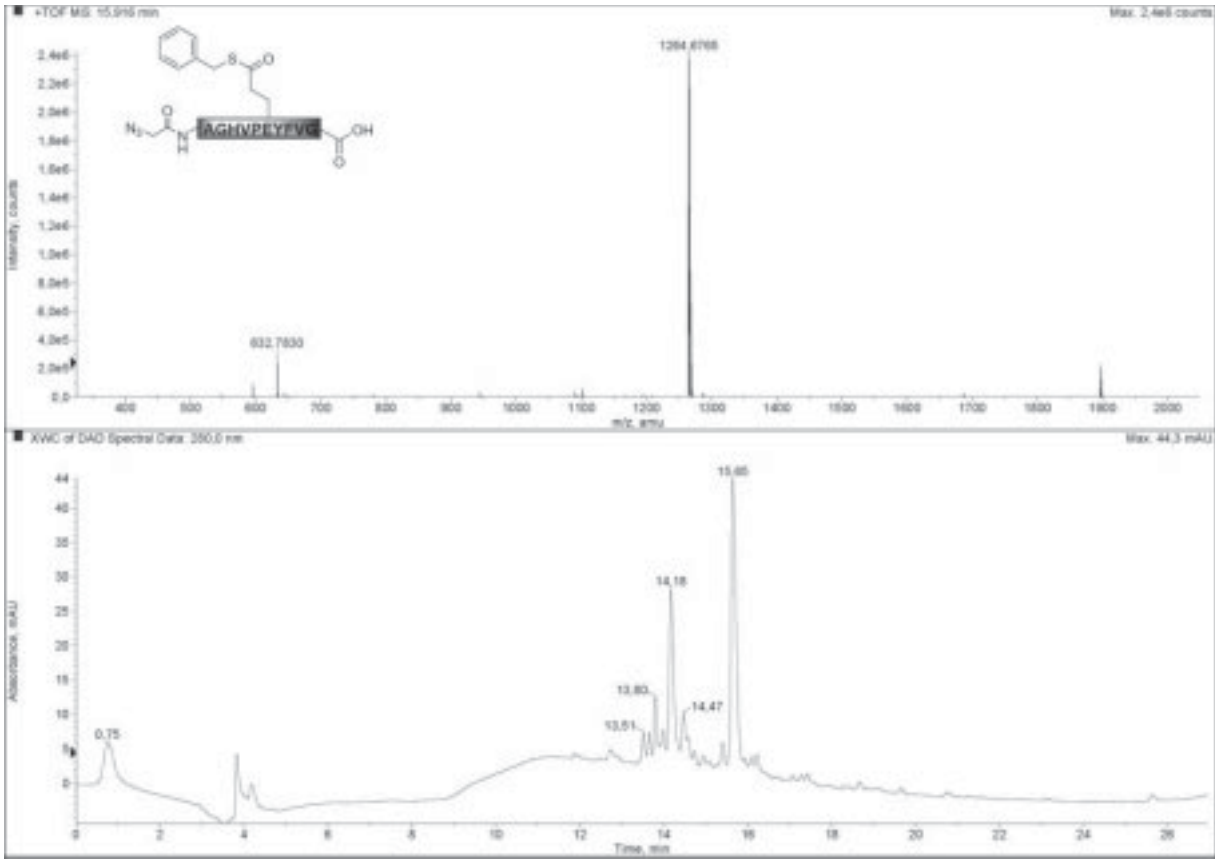

XWC of DAD Spectral Data: 280.0 nm
Max. 705.5 mAU
pH=7.5
5.47
HN
GGEHEEEYYEG
O
NH
C
H2
11.68
10.89
11.90
Absorbance, mAU
Time, min

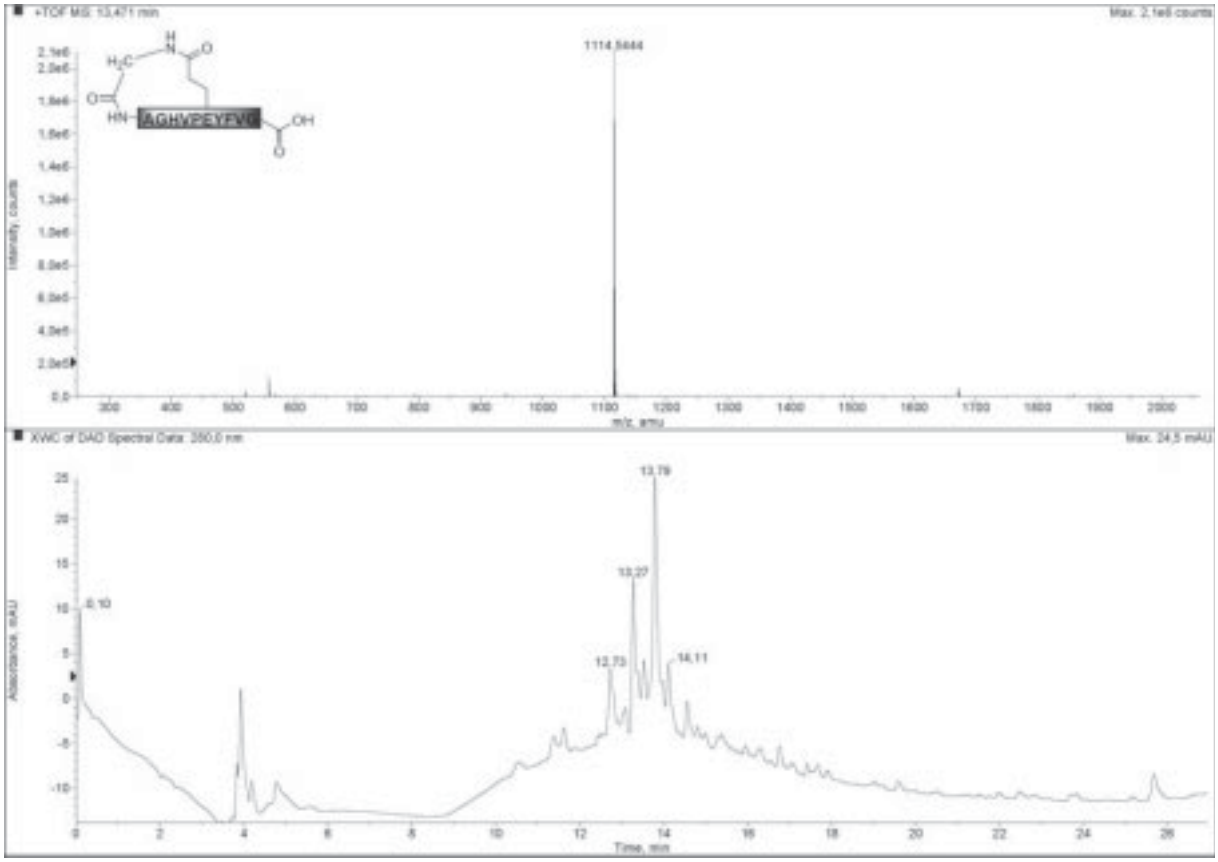

XWC of DAD Spectral Data: 280.0 nm
Max. 301.5 mAU
pH=7.0
HN
GGEHEEEYYEG
O
NH
C
H2
6.34
6.59
10.89
11.70
13.24
Absorbance, mAU
Time, min

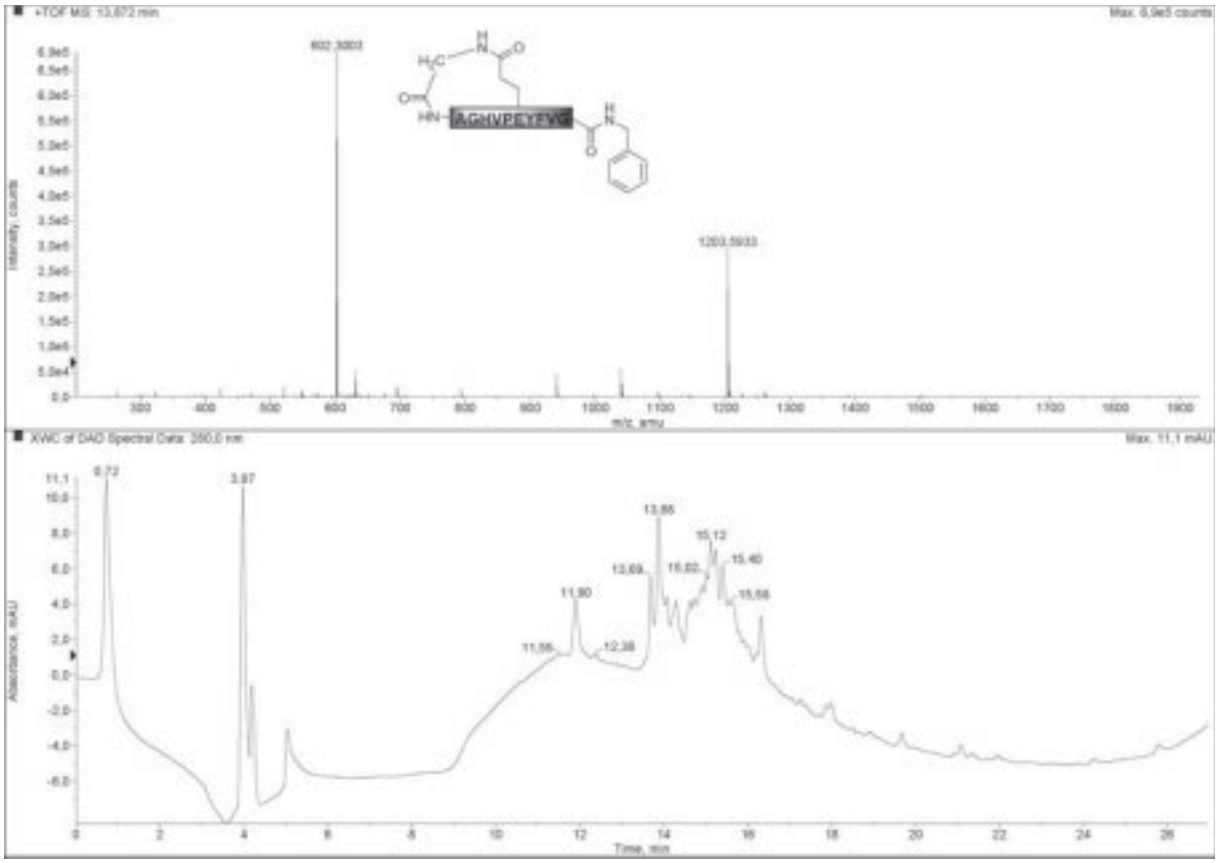

pH=7.5
HN
GGEHEEEYYEG
O
NH
C
H2
Instrument Name
Instrument 1
User Name
SampleType
Sample
IRM Calibration Status
Success
Comment
Acquired Time
4/15/2009 4:04:53 PM
x10 2
+ESI Scan (0.504-0.724 min, 14 scans) Frag=175.0V
1280.4653
640.7364
Counts (%) vs. Mass-to-Charge (m/z)


+TOF MS:
Max. 8.5e5 counts
640.2843
HN
GGEHEEKYYEG
O
NH
C
H2
660.6002
1279.5219
446.5755
Intensity, counts
m/z, amu


+TOF MS:
Max. 2.1e6 counts
1298.5148
HN
GEREEEYYEG
O
NH
C
H2
Intensity, counts
m/z, amu


+TOF MS: 15.916 min
Max. 2.4e6 counts
1264.6768
632.7830
AGHVPEYFVG
Intensity, counts
m/z, amu
XWC of DAD Spectral Data: 350.0 nm
Max. 44.3 mAU
15.65
14.18
13.80
13.51
14.47
0.75
Absorbance, mAU
Time, min


+TOF MS: 13.471 min
Max. 2.1e6 counts
1114.5644
AGHVPEYFVG
Intensity, counts
m/z, amu
XWC of DAD Spectral Data: 350.0 nm
Max. 24.5 mAU
13.79
13.27
12.73
14.11
0.10
Absorbance, mAU
Time, min


+TOF MS: 13.872 min
Max. 6.9e5 counts
602.3303
1200.5933
AGHVPEYFVG
Intensity, counts
m/z, amu
XWC of DAD Spectral Data: 350.0 nm
Max. 11.1 mAU
0.72
3.97
11.90
11.55
12.38
13.69
13.85
15.12
15.40
15.68
16.02
Absorbance, mAU
Time, min