

Aminopyrazol-Hybridverbindungen gegen Aggregation und Neurotoxizität des Alzheimer-Peptids

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Fakultät Chemie
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Julia März-Berberich

aus Essen

Essen 2010

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2006 bis April 2010 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Schrader am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen, durchgeführt.

Tag der Disputation: 29.06.10

Referent:	Prof. Dr. Thomas Schrader
Koreferent:	Prof. Dr. Gebhard Haberhauer
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Stephan Schulz

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Aminopyrazol-Hybridverbindungen gegen Aggregation und
Neurotoxizität des Alzheimer-Peptids“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, Mai 2010

Julia März-Berberich

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in einem Zeitraum von Oktober 2006 bis April 2010 am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader angefertigt.

Herrn Prof. Thomas Schrader danke ich für die Überlassung des interessanten interdisziplinären Themas und die wertvollen Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit. Des Weiteren bedanke ich mich für die große Freiheit bei der Bearbeitung des Themas sowie großzügige Unterstützung mit Institutsmitteln.

Herrn Prof. Dr. Gebhard Haberhauer danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Stephan Schulz danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Prof. Dr. Carsten Korth, Prof. Dr. Heinrich Sticht und Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die gelungene Kooperation. Für eine sehr angenehme Zusammenarbeit möchte ich Dr. Andreas Müller-Schiffmann, Dr. Luitgard Nagel-Steger, Dirk Bartnik und Anselm Horn danken.

Herrn Dipl.-Ing. Heinz Bandmann und Herrn Dr. Torsten Schaller danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und für die stetige Diskussionsbereitschaft. Zudem möchte ich Torsten Schaller für die Hilfe bei Arbeiten mit MacroModel und TableCurve danken.

Herrn Dipl.-Ing. Werner Karow und Herrn Dipl.-Ing. Winfried van Hoof danke ich für die Anfertigung der Massenspektren.

Frau Heike Wöll danke ich für die Durchführung der analytischen HPLC und Herstellung einiger Peptide am automatisierten Peptidsynthesizer.

Herrn Klaus Kowski danke ich für die Unterstützung bei technischen Problemen.

Frau Ingeborg Reiter danke ich für die Hilfe bei bürokratischen Problemen.

Dem Arbeitskreis Haberhauer möchte ich für die Benutzung des CD-Geräts danken, insbesondere Petra Schneider und Christine Kallweit für die Durchführung der CD-Messungen.

Herrn Wolfgang Meyer-Zaika danke ich für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen.

Frau Dr. Jolanta Polkowska möchte ich für die Durchführung der DLS-Messungen danken.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Peter Talbiersky, Frau Silvia Ernst, Constanze Wilch und Dr. Andreas Müller-Schiffmann danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich der Volkswagenstiftung für die finanzielle Unterstützung des Hauptprojektes dieser Arbeit und Übernahme der Reisekosten für Konferenzbesuche. Für die Finanzierung des Konferenzbesuches auf der ISMSC2008 in Las Vegas danke ich der Werdelmann-Stiftung.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Sergej und meiner Familie, die durch ihr Verständnis und ihre Hilfsbereitschaft den Fortgang dieser Arbeit unterstützten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Publikationen veröffentlicht oder eingereicht:

- International PCT-Application PCT/EP 2010/000437: New Compounds for the Treatment of Diseases Related to Protein Misfolding; Inventors: Thomas Schrader, Katrin Hochdörffer, Julia März-Berberich, Luitgard Nagel-Steger, Gal Bitan, Sharmistha Sinha, **2010**.
- A. Müller-Schiffmann, J. März-Berberich, A. Andreyeva, R. Röncke, D. Bartnik, O. Brener, J. Muyrers, A. H. C. Horn, K. Gottmann, K. Reymann, S. A Funke, L. Nagel-Steger, C. Moriscot, G. Schoehn, H. Sticht, D. Willbold, T. Schrader, C. Korth, Combining independent drug classes into superior, synergistically acting hybrid compounds, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, submitted.
- K. Hochdörffer, J. März-Berberich, L. Nagel-Steger, M. Epple, W. Meyer-Zaika, A.H.C. Horn, H. Sticht, S. Sinha, G. Bitan, T. Schrader, Interaction of rationally designed β -Alzheimer's Peptide A β , *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, submitted.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Poster auf folgenden Konferenzen präsentiert:

- *The third Joint International Symposium on Macrocyclic & Supramolecular Chemistry (III ISMSC)*, Las Vegas, 13.-18. Juli **2008**.
- *5th Status Symposium* (Volkswagen Stiftung) "Interplay between Molecular Conformations and Biological Function", Bad Kissingen, 6.-8. Oktober **2008**.
- *9th International Conference of Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Advances, Concepts and New Challenges*, Prag, 11.-15. März **2009**.

1	Einleitung	1
1.1	Protein-Fehlfaltungskrankheiten	1
1.2	Alzheimer-Krankheit	3
1.3	APP-Prozessierung	4
1.4	Amyloid- β -Peptid-Fibrillogenese	5
1.5	Struktur des A β -Peptids	7
1.6	Amyloid-Kaskaden-Hypothese	9
1.7	Therapieansätze	10
1.7.1	Aktuelle Therapien gegen AD	10
1.7.2	Anti-Amyloid-Therapien	11
1.7.3	Immuntherapie	21
1.7.4	Aminopyrazol-Liganden	22
2	Ziele der Arbeit	24
3	Synthese und molekulares Modelling	27
3.1	Linker	28
3.2	Hybridverbindungen mit D-Peptiden	31
3.2.1	Syntheseveruche unter Verwendung eines NHS-Aktivesters	32
3.2.2	Molekulares Modelling von Hybridverbindungen (<i>AK Sticht</i>)	36
3.2.3	Synthese von Hybridverbindungen an der festen Phase	39
3.2.4	Überblick der neuen Hybridverbindungen	46
3.3	Hybridverbindungen mit Antikörperfragmenten	48
3.3.1	Prionerkrankungen	52
3.3.2	Herstellung der Trimer-(W226-scFv)-Hybridverbindung	52
3.4	Trimere mit verschiedenen Haftgruppen	54
3.4.1	Trimer-TEG-Säure 41	54
3.4.2	Trimer-TEG-Dodecan 45	56
3.4.3	Trimer-TEG-Lysin 70	58
3.4.4	Trimer-TEG-Pentalysin 72	61
3.4.5	Trimer-TEG-Pentaarginin 74	64
3.4.6	Trimer-TEG-KLVFF-OH 77	67
3.4.7	Trimer-TEG-LPFFD-OH 79	69
3.4.8	Dimerisierung des Trimers 16	70
3.4.9	Überblick der neuen Trimer-Derivate	73
3.4.10	Berechnung der pharmakologischen Eigenschaften von Trimer-Derivaten	75

3.5 Trimer mit Pinzette	77
3.6 Trimer mit Fluoreszenzlabel	80
4. In vitro und in vivo Untersuchungen	82
4.1 Aggregationstests mit biophysikalischen Methoden	82
4.1.1 ThT-Fluoreszenztest	82
4.1.2 Circular dichroismus-Spektroskopie	95
4.1.3 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	101
4.1.4 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (<i>AK Willbold</i>)	105
4.2 Biologische Experimente	107
4.2.1 Anti-Oligomerisierungsassay (<i>AK Korth</i>)	107
4.2.2 Synaptische Übertragung (<i>AK Gottmann</i>)	110
4.2.3 Synaptische Plastizität (<i>AK Reymann</i>)	111
4.2.4 Antiprion-Aktivität der Hybridverbindung 55 (<i>AK Korth</i>)	113
4.2.5 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (<i>AK Willbold</i>)	116
4.2.6 MTT-Test (<i>AK Bitan, AK Willbold</i>)	117
4.3 Experimente zu Kolloiden	120
4.3.1 UV-Messungen	122
4.3.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)	123
4.3.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)	125
4.3.4 Untersuchungen mit DOSY-NMR	126
4.3.5 Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration	128
4.3.6 Aktivität der filtrierten Liganden-Lösungen im ThT-Test	129
4.3.7 Untersuchungen des Wirkmechanismus von Trimer-Derivaten	132
4.3.8 Zusammenfassung Experimente zu Kolloiden	134
5 Zusammenfassung und Ausblick	136
5.1 Zusammenfassung	136
5.2 Ausblick	140
6 Experimenteller Teil	144
6.1 Material und Methoden	144
6.2 Synthese der Linker 28, 29 und 30	148
6.3 Synthese der PMB-geschützten Trimer-Spacer-Säuren 40, 48, 50	155
6.4 Synthese der Trimer-Derivate 41, 45, 70, 81, 84	161
6.5 Synthese von Trimer-TEG-NTA 66	174
6.6 Kovalente Verknüpfung des Trimers 16 mit der Pinzette 89	181

6.7 Weitere Modifizierungen des Trimers 16	183
6.8 Manuelle Festphasensynthese von Peptiden	188
6.9 Automatisierte Festphasensynthese von Peptiden	194
6.10 Manuelle Festphasensynthese von Pyrazol-Peptid-Liganden	199
6.11 ThT-Fluoreszenzmessungen	214
6.11.1 ThT-Fluoreszenzmessungen mit 33 μ M A β (1-42)	214
6.11.2 ThT-Fluoreszenzmessungen mit 10 μ M A β (1-42)	217
6.11.3 Aggregation von A β (1-42) in Anwesenheit von Aggregationskeimen	219
6.11.4 ThT-Fluoreszenzmessungen mit Filtraten der Ligandenlösungen	219
6.12 TEM-Aufnahmen	220
6.13 CD-Messungen	221
6.14 UV-Messungen	222
6.15 DLS-Messungen	224
6.16 Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration	225
7 Literaturverzeichnis	226
8 Anhang	235

A β	Amyloid- β -Peptid
Ac	Acetyl
AD	Alzheimer Krankheit, engl. Alzheimer's disease
ADDLs	A β -derived diffusible ligands
AFM	Rasterkraft-Mikroskopie, engl. atomic force microscopy
Aib	Aminoisobuttersäure
AK	Arbeitskreis
Ala, A	Alanin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazolpropionat
AP	Aminopyrazol
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein, engl. amyloid precursor protein
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
APH	engl. anterior pharynx defective
Asp, D	Asparaginsäure, Aspartat
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
BACE	engl. beta-site APP cleaving enzyme 1
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	bovines Serumalbumin
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
CD	Circulardichroismus
CJK	Creutzfeld-Jakob-Krankheit
cmc	kritische Mizellenkonzentration
CTF	C-terminales Fragment von APP
Cys, C	Cystein
D	Diffusionskoeffizient
DD	Dodecan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylpyridin-4-amin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DOSY	Diffusionsseparierte Spektroskopie, engl. diffusion ordered spectroscopy
ECE	engl. endothelin converting enzyme
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-gallat
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom, engl. excitatory postsynaptic current
eq	Äquivalent, engl. equivalent
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
et al.	und andere, lat. et alia
EtOH	Ethanol
fEPSP	exzitatorische postsynaptische Feldpotentiale
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-ICR-MS	Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie
GABA	γ -Aminobuttersäure, engl. γ -aminobutyric acid
GAG	Glycosaminoglykan
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure, Glutamat
Gly, G	Glycin
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCTU	2-(6-Chlor-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HFIP	Hexafluoroisopropanol
His, H	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. high performance liquid chromatography
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HTP	Hochdurchsatz-Screening, engl. high-throughput screening
IAPP	Insel-Amyloid-Polypeptid
IDE	engl. insulin degrading enzyme

Ig	Immunglobulin
Ile, I	Isoleucin
Leu, L	Leucin
LRP	engl. low-density lipoprotein receptor-related protein
LTP	Langzeitpotenzierung, engl. long-term potentiation
Lys, K	Lysin
MD	Moleküldynamik
Me	Methyl
MeOH	Methanol
mEPSC	Miniatur exzitatorischer postsynaptischer Ströme
Met, M	Methionin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2-2,5-diphenyltetrazolimbromid
Mukaiyama	2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid
NEP	Neprilysin
NHS	<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid
NEt ₃	Triethylamin
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz, engl. nuclear magnetic resonance
NTA	Nitrilotriessigsäure, engl. nitrilotriacetic acid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	engl. phosphate buffered saline
PDB	Proteindatenbank
PEN	engl. presenilin enhancer
Phe, F	Phenylalanin
PK	Proteinase K
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl
Pro, P	Prolin
PrP ^C	zelluläres Prion-Protein, engl. cellular prion protein
PrP ^{Sc}	„Scrapie“-Prion-Protein
PyClop	Chlortripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
PyBOP	Benzothiazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
QELS	Quasielastische Lichtstreuung

Abkürzungsverzeichnis

RAGE	engl. receptor for advanced glycation end products
R _h	hydrodynamischer Radius
RT	Raumtemperatur
RU	engl. resonance units
Schmp	Schmelzpunkt
scFv	engl. single chain variable fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. sodium dodecyl sulfate
Ser, S	Serin
SPPS	Festphasen-Peptid-Synthese, engl. solid phase peptide synthesis
SPR	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie, engl. surface plasmon resonance spectroscopy
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TEG	Triethylenglykol
TEGDA	TEG-Diamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure, engl. trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
Thr, T	Threonin
ThT	Thioflavin T
TIS	Triisopropylsilan
TOF	Flugzeit, engl. time-of-flight
TPSA	engl. topological polar surface area
Trp, W	Tryptophan
Trt	Trityl
Tyr, Y	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val, V	Valin
Z	Benzyloxycarbonyl

1 Einleitung

1.1 Protein-Fehlfaltungskrankheiten

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen hat eine fundamentale Bedeutung für biologische Systeme. Bei Fehlfaltungen verlieren die Proteine oftmals ihre biologische Aktivität oder entwickeln sogar pathologische Funktionen. In den Zellen sorgen normalerweise spezielle Kontrollmechanismen dafür, dass die Proteine entweder ihre richtige Faltung einnehmen, z. B. durch die Hilfe der Chaperone, oder selektiert und im Proteasom abgebaut werden. Funktioniert dieses System nicht, können falsch gefaltete Proteine oder Peptide ungeordnete Aggregate oder amyloide Fibrillen bilden.^[1-4]

Die Bildung von Amyloid-Fibrillen ist symptomatisch für viele Amyloidose-Krankheiten, die größte Gruppe der Protein-Fehlfaltungskrankheiten.^[5-8] Einige Beispiele sind in der Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1: Beispiele einiger Amyloidosen.^[7]

Krankheit	Beteiligtes Protein/Peptid
Neurodegenerativ	
Alzheimer	Amyloid- β , Tau
Spongiforme Enzephalopathie	Prion-Protein oder seine Fragmente
Parkinson	α -Synuclein
Amyotrophe Lateralsklerose	Superoxiddismutase
Huntington	Huntingtin
Nicht neuropathisch (systemisch^a/lokal^b)	
AL Amyloidose	Ig-Leichtketten ^a
Hämodialyse-assoziierte Amyloidose	β 2-Microglobulin ^a
Hereditäre systemische Amyloidose	Lysozym ^a
Typ II Diabetes	Amylin (IAPP) ^b
Grauer Star	γ -Kristallin ^b

Bislang sind 23 verschiedene Proteine dafür bekannt Amyloid-Fibrillen *in vivo* zu bilden.^{[5, 9-}

^{11]} Die amyloidogenen Ablagerungen kommen neben der typischen extrazellulären Form in manchen Fällen auch intrazellulär vor.^[12, 13] Verschiedene Amyloidosen können sporadisch,

erblich, infektiös oder in Mischformen auftreten. Amyloid kann in jedem Gewebetyp abgelagert werden, wobei das Verteilungsmuster vom Proteintyp abhängig ist. Es wird zwischen systemischen und lokalen Krankheiten unterschieden.^[7, 14, 15]

Der deutsche Pathologe *Rudolf Virchow* führte 1854 den Begriff „amyloid“ (stärkeähnlich) ein. Er untersuchte die Ablagerungen aus humanem Gewebe und ging davon aus, dass sie stärkeartig seien, da sie sich in der Färbung mit Jod-Schwefelsäure blau-violett, wie Stärke, färbten.^[16, 17] Der Begriff Amyloid bezeichnet inzwischen fibrilläre Proteinaggregate. Diese besitzen eine starke Affinität zu bestimmten heteroaromatischen Farbstoffen wie Kongorot und Thioflavin T, erscheinen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen meist als langgestreckte, unverzweigte Fasern und weisen bei einer Röntgenbeugungsanalyse eine „cross- β “-Struktur auf.^[1, 18] In dieser Anordnung wird das zentrale strukturelle Rückgrat der Fibrillen aus prinzipiell unbegrenzt lang fortsetzenden β -Faltblättern gebildet. In der β -Faltblattgeometrie sind die β -Stränge der einzelnen Polypeptide senkrecht zur Fibrillenachse und die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen des Faltblattes parallel zur Fibrillenachse angeordnet (Abbildung 1.1). Die Stabilität von Amyloid-Fibrillen beruht im Allgemeinen auf nicht kovalenten Bindungen - vor allem Wasserstoffbrücken, hydrophoben Wechselwirkungen und π - π -Stapelwechselwirkungen, die sowohl zwischen den Seitenketten als auch innerhalb des Peptidrückgrats gebildet werden.^[18-22] Die fibrilläre Form zeigt im Vergleich zu α -helikalen oder ungeordneten Strukturen extrem schlechte Löslichkeit und hohe Proteasestabilität.^[4, 8, 23]

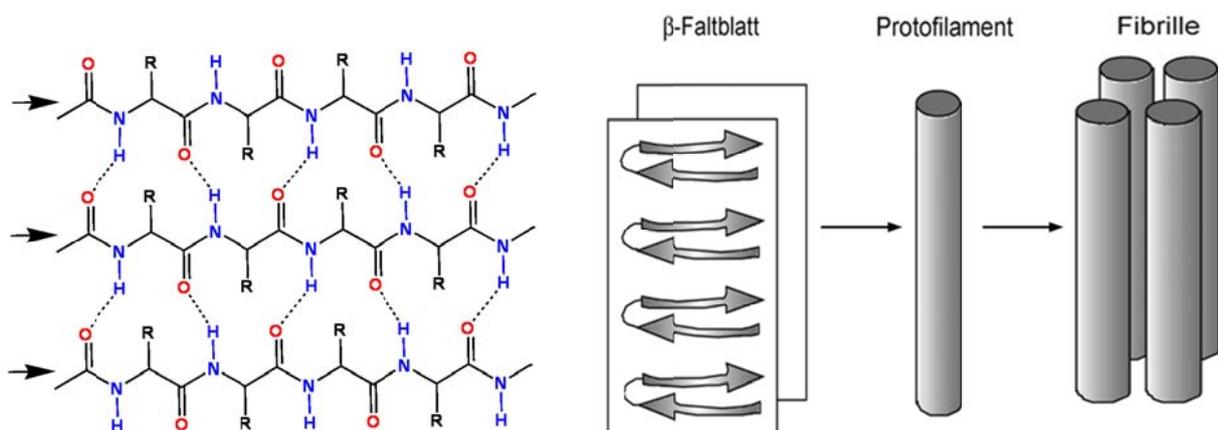


Abbildung 1.1: Paralleles β -Faltblatt (links). Hierarchische Struktur von Amyloid-Fibrillen (rechts).^[5]

1.2 Alzheimer-Krankheit

Aufgrund der kontinuierlich steigenden Lebenserwartung gewinnen Demenzerkrankungen zunehmend an klinischer, sozialer und auch ökonomischer Bedeutung. Die Alzheimer-Krankheit (Alzheimer's disease, AD) stellt mit ca. 60-70 % die häufigste Demenzform dar.^[24] Nach Schätzungen leiden derzeit weltweit über 25 Millionen Menschen an dieser Krankheit.^[25] Es wird erwartet, dass sich diese Zahl bis 2050 verdreifachen oder vervierfachen wird.^[26] Die Krankheit betrifft in den Industrieländern etwa 5 % der über 65-Jährigen und 25 % der über 80-Jährigen.^[27] Neben der am häufigsten vorkommenden sporadischen Form beruhen ca. 5 % der Fälle auf genetisch vererbten Mutationen.^[15]

Die Alzheimer-Krankheit wurde 1906 zum ersten Mal durch *Alois Alzheimer* beschrieben. Morbus Alzheimer ist eine progressive, degenerative und unheilbare Erkrankung des zentralen Nervensystems.^[28] Anfänglich zeichnet sie sich durch Vergesslichkeit aus und führt bei weiterem Fortschreiten zu starken Stimmungsschwankungen, zum Verlust des Urteilsvermögens und zu Veränderungen der Persönlichkeit, bis schließlich die Sprache und Steuerung des Körpers versagen. Der völlige geistige Verfall endet durchschnittlich 8 Jahre nach der Diagnose mit dem Tod.^[29] Die Diagnose der AD ist kompliziert und erfolgt oft im fortgeschrittenen Stadium. Es wird geschätzt, dass die Degeneration von Neuronen bereits 5-10 Jahre vor dem Auftreten der ersten klinischen Symptome einsetzt.^[30] Eine eindeutige Feststellung der Alzheimer-Krankheit erfolgt allerdings auch heute nur durch eine Autopsie, wenn im Gehirn die typischen im Krankheitsverlauf entstehenden Ablagerungen zu finden sind (Abbildung 1.2). Die intraneuronalen Aggregate (neuronalen Bündel) bestehen überwiegend aus dem Tau-Protein, das aufgrund einer Hyperphosphorylierung fibrilliert. Die extrazellulären senilen Plaques bestehen im Wesentlichen aus Amyloid- β -Peptid.

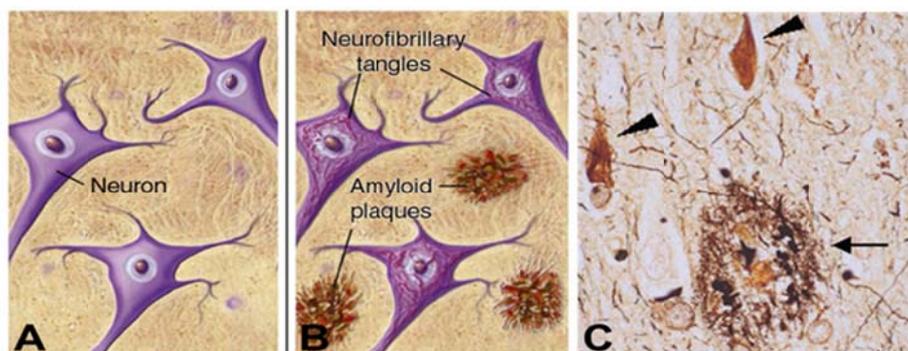


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung **A:** Gesunde Neuronen und **B:** Durch Alzheimer-Krankheit veränderte Neuronen mit Plaques und neurofibrillären Bündeln (engl. neurofibrillary tangles).^[31] **C:** Gehirnschnitt mit pathologischen Veränderungen, Pfeil: Plaques; Pfeilspitzen: neurofibrilläre Bündel.^[32]

1.3 APP-Prozessierung

Das Amyloid- β -Peptid ist ein Fragment des *Amyloid Precursor Proteins* (APP). Dieses Vorläuferprotein, ein Typ-I-Transmembranprotein aus bis zu 770 Aminosäuren mit einer größeren extrazellulären Domäne und einem relativ kurzem zytoplasmatischen Bereich, kann durch drei Proteasen (α -, β - und γ -Sekretasen) prozessiert werden.^[33] Die A β -Domäne beginnt in der Nähe der Membran auf der extrazellulären Seite und endet innerhalb der Membran (Abbildung 1.3a). Das Vorläuferprotein ist unter anderem an Zelladhäsion, Zellmigration, Neuritenwachstum und neuroprotektiven Prozessen beteiligt. Auch eine Funktion als Rezeptor auf der Zelloberfläche wird diskutiert.^[34] Die Prozessierung von APP kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen.^[35]

Bei der *nichtamyloidenen Prozessierung* (Abbildung 1.3b) wird durch die α -Sekretase inmitten der A β -Region, zwischen Lysin 16 und Leucin 17, geschnitten. Das führt zur Freisetzung eines sekretierbaren Teils der Ektodomäne (sAPP α) und eines kurzen membrangebundenen C-terminalen Fragments mit einer Länge von 83 Aminosäuren (C83). Die A β -Region wird hierbei zerstört, eine Freisetzung des Amyloidpeptids ist nicht mehr möglich. Die Spaltung des C83-Fragments durch γ -Sekretase führt zu einem kurzen p3-Peptid A β (17-40) oder A β (17-42).^[29, 36]

Der alternative und pathologisch relevante Weg wird als *amyloide Prozessierung* bezeichnet (Abbildung 1.3c). Nach Spaltung an der β -Sekretase-Spaltstelle, die in erster Linie durch das Enzym BACE1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) katalysiert wird und zur Sekretion eines großen Teils der extrazellulären Domäne (sAPP β) führt, bleibt ein Fragment aus 99-Aminosäuren (C99) zurück. Die Freisetzung der 39-43-Aminosäuren-langen A β -Peptide erfolgt durch einen als γ -Sekretase bezeichneten Enzymkomplex, der aus mindestens vier Komponenten Präsenilin, Nicastrin, APH-1 (anterior pharynx defective) und PEN-2 (presenilin enhancer 2) besteht. Bei der Spaltung werden vorwiegend A β (1-40) und A β (1-42) gebildet, wobei der Anteil an A β (1-40) bei 90 % liegt.^[37-39] Mutationen bestimmter Bestandteile des γ -Sekretase-Komplexes führen zur Erhöhung des Anteils an A β (1-42)-Peptid, was wiederum die Expression und Aktivität der β -Sekretase erhöht.^[40, 41]

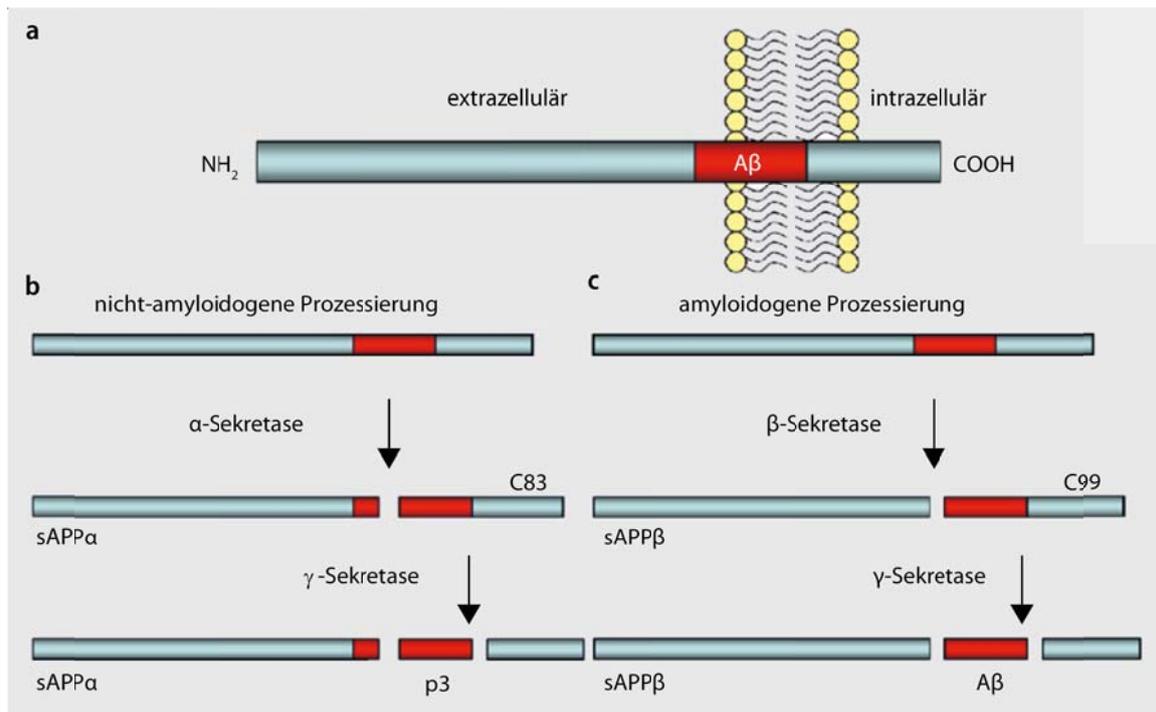


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins (APP). APP ist ein Transmembranprotein mit einer großen *N*-terminalen extrazellulären Domäne (a). Während bei der nichtamyloiden Prozessierung (b) durch α - und γ -Sekretase keine A β -Peptide entstehen, ist die amyloide Prozessierung durch β - und γ -Sekretase für die Bildung von A β -Peptiden verantwortlich (c).^[36]

1.4 Amyloid- β -Peptid-Fibrillogenese

Der Mechanismus der A β -Aggregation ist noch nicht im Einzelnen bekannt. Es wurden bereits viele unterschiedliche Modelle und Annahmen publiziert. In diesem Kapitel wird ein etabliertes Modell vorgestellt, das die aktuellen Vorstellungen der A β -Aggregation und -Oligomerisierung beschreibt.

Die ersten Untersuchungen der Umwandlung der A β -Monomere zu Fibrillen führten zur Annahme, dass A β -Assemblierung ein Beispiel der keimabhängigen Polymerisationsreaktion darstellt (Abbildung 1.4).^[42-45] Diese Reaktionen enthalten einen langsamen Keimbildungsschritt (Nucleation), der als „lag-phase“ bezeichnet wird, gefolgt von einer schnellen Fibrillenelongation.^[7] Für beide Vorgänge können Geschwindigkeitskonstanten k_n (Nucleation) und k_e (Elongation) bestimmt werden.

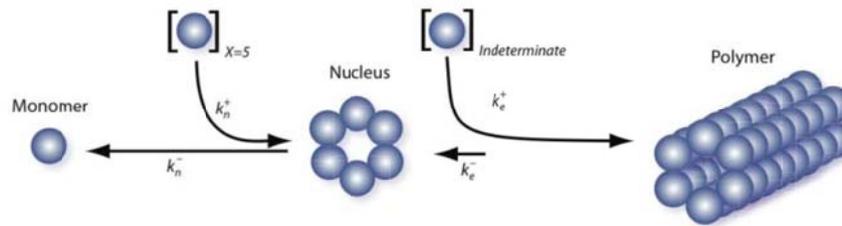


Abbildung 1.4: Keimabhängige Polymerisation mit $k_n^+ \ll k_n^-$ und $k_e^+ \gg k_e^-$.^[46]

Bei weiteren Untersuchungen zeigte jedoch die angeblich klassische Polymerisation eine unerwartete Komplexität.^[47-50] Eine Vielzahl der verschiedenen Assemblierungswege („on-pathway“ und „off-pathway“ der Fibrillenbildung) und die daraus resultierenden Intermediate wurden entdeckt (Abbildung 1.5).^[46, 51] In monomerer Form liegt das A β -Peptid ungefaltet vor als Gemisch aus mehreren zueinander im Gleichgewicht stehenden Konformeren.^[52] Für die „on-pathway“-Assemblierung (Abbildung 1.5) ist die Bildung eines partiell gefalteten Monomers, das eine Selbstassoziation zum Paranucleus eingeht, erforderlich. Nach der Paranucleus-Polymerisation zu Protofibrillen werden die reifen Fibrillen gebildet.^[46]

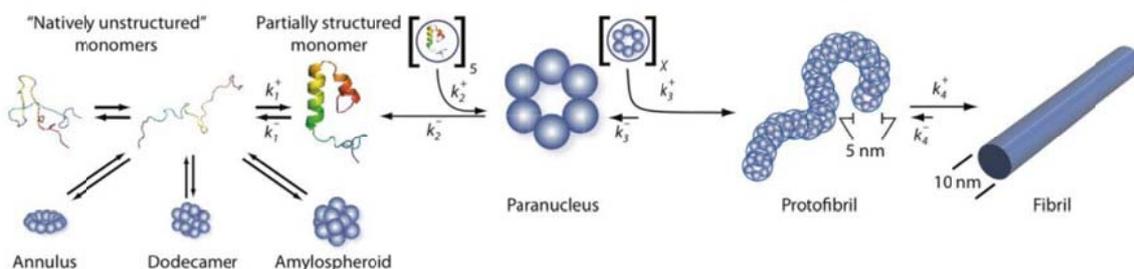


Abbildung 1.5: A β -Selbstassemblierung zu Fibrillen mit den Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_2 , k_3 , k_4 und weitere Assemblierungswege über Annuli, globuläre Dodecamere und Amylospheroide.^[46]

Es existieren interessanterweise noch mindestens vier weitere Intermediate: ADDLs (amyloid-derived diffusible ligands), A β *56, Globulomere und A β -Oligomere, die ebenfalls alle das A β -Hexamer als Grundbaustein enthalten können. Annuli, Globulomere und Amylospheroide sind Strukturen, die auf anderen Assemblierungswegen gebildet werden, wobei das Amylospheroid ein Produkt der „off-pathway“-Assemblierung zu sein scheint. In der Tabelle 1.2 sind einige lösliche A β -Aggregate mit ihren Eigenschaften zusammengestellt.

Tabelle 1.2: A β -Oligomere und ihre Eigenschaften^[46]

Name	Physikalische Eigenschaften und biologische Effekte
Paranucleus	Durchmesser: 5 nm, sphäroidal, nur A β_{42} , neuronaler Tod, Redoxeffekte
ADDL	~53 kDa, (12mer), nur A β_{42} , neuronaler Tod, LTP-Inhibierung, Ionkanalbildung, Gedächtnisverlust, im menschlichen Gehirn detektiert
A β *56	~56 kDa, (12mer), synaptische Dysfunktion, Gedächtnisverlust und kognitive Effekte, detektiert in Mäusen und Menschen
Globulomer	~60 kDa, (12mer), nur A β_{42} in SDS, LTP-Inhibierung
A β -Oligomer	~90 kDa, (15-20 Monomere), sphärisch, 2-5 nm Durchmesser, Erhöhung der Membrandurchlässigkeit, Apoptose, im menschlichen Gehirn detektiert
Protofibrillen	Durchmesser: 5 nm, <150 nm lang, (24-700 Monomere), A β_{40} oder A β_{42} , neuronaler Tod, Ionkanalbildung, Zerstörung der Calciumhomöostase
Annulus	150-250 kDa, 7-10 nm Außendurchmesser, 1.5-2.0 nm Innendurchmesser,
Amylosphäroid	~150-700 kDa, Durchmesser von 10-15 nm, A β_{42} oder A β_{40}

Abkürzungen: LTP: Langzeit-Potenzierung, engl. long-term potentiation; SDS: Natriumdodecylsulfat, engl. sodium dodecyl sulfate.

1.5 Struktur des A β -Peptids

Die A β -Sequenz hat einen amphiphilen Charakter. Das *N*-terminale Segment ist hydrophil, wogegen die letzten 12-14 *C*-terminalen Aminosäuren hydrophob sind und zur Ausbildung der β -Faltblatt-Struktur neigen (Abbildung 1.6). Diese Verteilung leitet sich von der ursprünglichen Lokalisierung des Peptids im Transmembran-Vorläuferprotein ab (Abbildung 1.3a).^[38, 53]



Abbildung 1.6: Sequenz von A β (1-42)-Peptid im Einbuchstabencode; geladene Aminosäuren-Seitenketten (rot: negativ, blau: positiv).

In Wasser-Alkohol-Gemischen oder in Mizellen-haltigen Lösungen nimmt das A β -Peptid eine α -helikale Konformation mit zwei helikalen Segmenten an, die durch eine β -Schleife (β -Turn) miteinander verbunden sind.^[54, 55] In wässrigen Lösungen wurde bei A β (1-40) eine Zufallsknäuel-Struktur beobachtet.^[56] Bei physiologischem pH-Wert nimmt A β (1-42) im Gegensatz zu A β (1-39) sehr schnell eine β -Faltblatt-Struktur an.^[57]

A β (1-42) ist im Vergleich zu A β (1-40) viel schlechter löslich und neigt stärker zur Polymerisation.^[37] Zudem wurde berichtet, dass die A β ₄₂-Aggregate eine höhere Zelltoxizität aufweisen als die A β ₄₀-Aggregate.^[39, 58] Die hydrophoben Aminosäuren im längeren Peptid spielen offensichtlich eine große Rolle bei der Selbstassemblierung.^[59-62] Computersimulationen durch *Urbanc et al.* zeigten, dass das A β ₄₀-Peptid im Gegensatz zum A β ₄₂-Peptid, welches ein *N*-Terminus mit höherer konformationeller Freiheit besitzt, kompaktere Oligomere bildet. Die kollabierten relativ hydrophilen *N*-terminalen Reste auf der A β ₄₀-Oligomeroberfläche können möglicherweise die hydrophoben Wechselwirkungen mit weiteren A β -Spezies verhindern.^[63] Auch in Bezug auf die Oxidation von Methionin 35 (M35) und ihre Auswirkung auf die Aggregation wurden enorme Unterschiede zwischen den beiden Peptiden festgestellt. Auf A β ₄₀-Oligomerisierung zeigte die Oxidation keinen Effekt, während das A β ₄₂-Peptid danach keinen Paranucleus mehr ausbilden konnte.^[60, 64]

Weder A β (1-40) noch A β (1-42) können kristallisiert werden, da sie sehr schnell fibrillisieren. Deswegen gibt es bislang keine Röntgenstruktur der beiden Peptide im monomeren Zustand. Unter kontrollierten Bedingungen konnten Amyloid-Fibrillen hergestellt werden, die für Festkörper-NMR-Untersuchungen geeignet waren.^[29] So untersuchten zunächst *Tycko et al.* das A β (1-40)-Peptid (Abbildung 1.7), später *Lührs et al.* das A β (1-42)-Peptid (Abbildung 1.8) und erstellten unter Berücksichtigung von Röntgenbeugungs- und TEM-Experimenten folgende Fibrillen-Modelle.^[65-67]

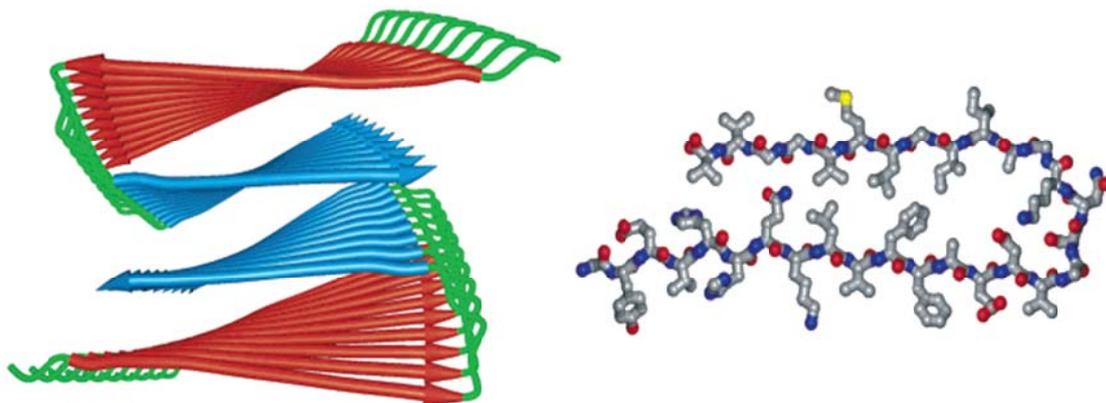


Abbildung 1.7: Strukturelles Modell von A β (1-40) nach *Tycko et al.*^[68] Links: Bändermodell der Fibrille bestehend aus vier β -Strängen, geformt durch zwei monomere Peptid-Einheiten. Strang eins und zwei eines Monomers sind jeweils in rot und blau dargestellt. Rechts: Monomere Struktur von A β (1-40), wie es in der Fibrille vorliegt. β -Faltblatt-Regionen: Y10-E22 und A30-V40.

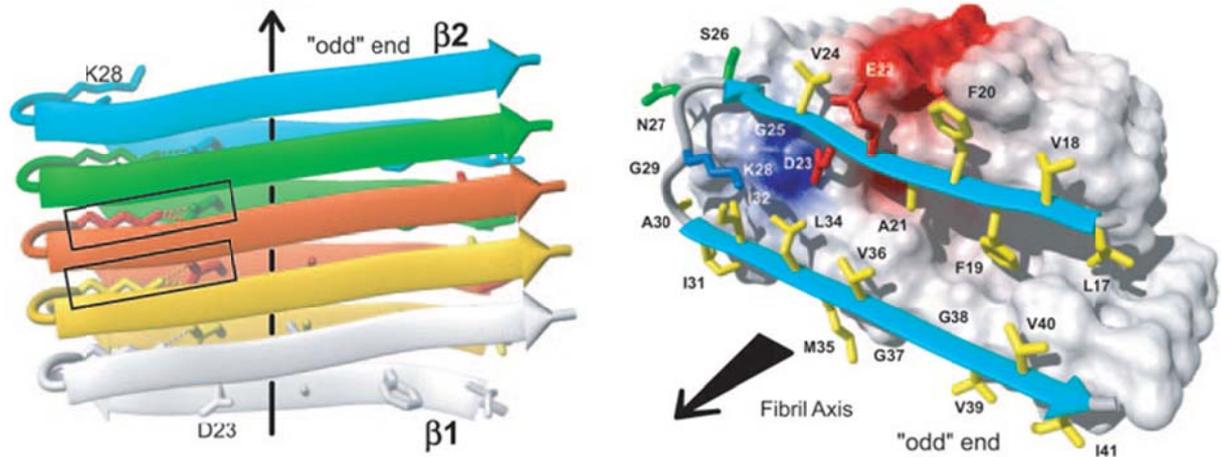


Abbildung 1.8: Strukturelles Modell von A β (1-42) nach *Lühns et al.*^[67] Links: Die Grundeinheit der Fibrille besteht aus zwei β -Strängen, die durch ein monomeres Peptid gebildet werden. Fünf Peptid-Einheiten sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. In schwarzen Kästchen sind die untersuchten Salzbrücken zwischen D23 und K28 angedeutet. Rechts: Fibrille aus einer anderen Perspektive. Beim terminalen „U“-förmigen Peptid ist die Anordnung der Seitenketten dargestellt. β -Faltblatt-Regionen: V18-S26 und I31-A42.

In beiden Modellen hat das Amyloid- β -Peptid eine „U“-Form, in der zwei β -Stränge über einen β -Turn miteinander verbunden sind. Diese Anordnung wird durch eine Salzbrücke zwischen Aspartat 23 und Lysin 28 stabilisiert. Die zentrale Bedeutung dieser Salzbrücke für die Stabilität der Fibrille wurde durch Untersuchungen des A β (1-40)-Lactams zwischen Aspartat 23 und Lysin 28 bekräftigt.^[69]

Ein weiteres wichtiges Strukturmotiv des A β -Peptids ist die (F19-F20)-Region. Befunde aus mehreren Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, dass die Stapelung aromatischer Ringe benachbarter β -Faltblatt-Bereiche die Aggregation beschleunigt und die Stabilität von Fibrillen erhöht.^[19, 70-72]

1.6 Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die neuropathologischen Befunde im Alzheimer-Gehirn führten zusammen mit der Feststellung einer erhöhten A β -Produktion infolge der Mutationen des APP-Gens auf Chromosom 21 zur Aufstellung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Sie schreibt den Plaque-Ablagerungen, als Folge der erhöhten A β -Konzentration, eine zentrale Rolle in der Pathogenese zu.^[73, 74] Die amyloiden Ablagerungen schädigen die Nervenzellen und lösen oxidativen Stress aus. Dies bewirkt eine Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, welches

ebenfalls aggregiert. Schlussendlich kommt es zu neuronaler Dysfunktion, Zelltod und Transmitterdefizit.^[74] Die histologischen Untersuchungen der Gehirne *post mortem* zeigten jedoch später, dass die Menge an Plaques nicht mit dem Ausmaß an Demenz korreliert.^[75, 76] Neuere Untersuchungen ergaben, dass lösliche Oligomere, nicht jedoch Monomere oder Fibrillen, bereits in niedrigen Konzentrationen neurotoxisch wirken, die Reizweiterleitung der Neuronen verhindern und viel besser mit der Schwere der Demenz korrelieren (Tabelle 1.2).^[77, 78] Die kleinsten neurotoxischen A β -Spezies sind A β -Dimere und -Trimere.^[79, 80] Es konnte zudem gezeigt werden, dass lösliche Oligomere bereits vor der Bildung von Plaques auftreten. Diese Befunde führen zu einer Modifikation der bestehenden Amyloid-Hypothese: Es wird nun davon ausgegangen, dass bereits die Aggregation der A β -Peptide zu löslichen Oligomeren der entscheidende Schritt ist, der zur neuronalen Degeneration führt.

1.7 Therapieansätze

1.7.1 Aktuelle Therapien gegen AD

Die gegenwärtige Behandlung ist rein symptomatisch und kann den Krankheitsverlauf nur verlangsamen. Zur Behandlung werden heute Antidementiva eingesetzt, die zwei Wirkgruppen zugeordnet werden können.

1) Acetylcholinesterase-Inhibitoren (Donepezil, Rivastigmine, Galantamin)

Bei Alzheimer-Patienten ist die Konzentration des Neurotransmitters Acetylcholin im Bereich der Synapsen niedriger als bei Gesunden und nimmt im Verlauf der Krankheit immer weiter ab. Durch den Einsatz von Acetylcholinesterase-Inhibitoren wird der Abbau des Acetylcholins im Gehirn verlangsamt, wodurch zeitweise die Informationsweiterleitung verbessert werden kann.

2) NMDA-Antagonisten (Memantin)

Über 70 % der Nervenzellen werden durch Glutamat gesteuert. Dieser Botenstoff bindet an Nervenzellen, unter anderem an den *N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor. Die Glutamatkonzentration zwischen den Nervenzellen kann bei Demenzpatienten erheblich ansteigen. Dies kann zur Funktionsstörung und zum Tod der Nervenzellen führen. Man nimmt an, dass ein NMDA-Antagonist die schädlichen Effekte der erhöhten Botenstoffkonzentration herabsetzen kann.^[24]

1.7.2 Anti-Amyloid-Therapien

Eine andere Kategorie von Substanzen stützt sich hauptsächlich auf die Amyloid-Hypothese und richtet sich gegen verschiedene Schritte des amyloidbildenden Stoffwechselweges, der vom β -Amyloid-Vorläuferprotein zu den krankheitsbestimmenden Amyloidplaques im Gehirn führt. Entgegen der symptomatischen Behandlung, die nur eine vorübergehende Besserung erzielt, hofft man, dass solche krankheitsbeeinflussenden Behandlungen den Verlauf der Krankheit spürbar verzögern können. Diese therapeutischen Strategien können in drei Gruppen unterteilt werden (Abbildung 1.9):^[30, 81]

1) Stimulation der $A\beta$ -Clearance:

- Immuntherapie;
- enzymatischer Abbau durch IDE (insulin degrading enzyme), ECE (endothelin converting enzyme) und Metallo-Endoproteasen wie NEP (Nepriylsin);
- Stimulation des LRP-Rezeptors (low-density lipoprotein receptor-related protein) oder Hemmung des RAGE (receptor for advanced glycation end products) und somit ein erhöhter $A\beta$ -Transport über die Blut-Hirn-Schranke (blood-brain barrier) ins Blut.^[24]

2) Reduktion der $A\beta$ -Produktion:

- Stimulation der α -Sekretase,^[82]
- Hemmung der β -Sekretase,^[83-87]
- Hemmung der γ -Sekretase;^[88-91]

3) Inhibierung der $A\beta$ -Aggregation mittels kleiner Moleküle z. B. durch Stabilisierung der $A\beta$ -Monomere, Reduktion der toxischen Oligomere und Neutralisation der größeren Aggregate.^[30, 92]

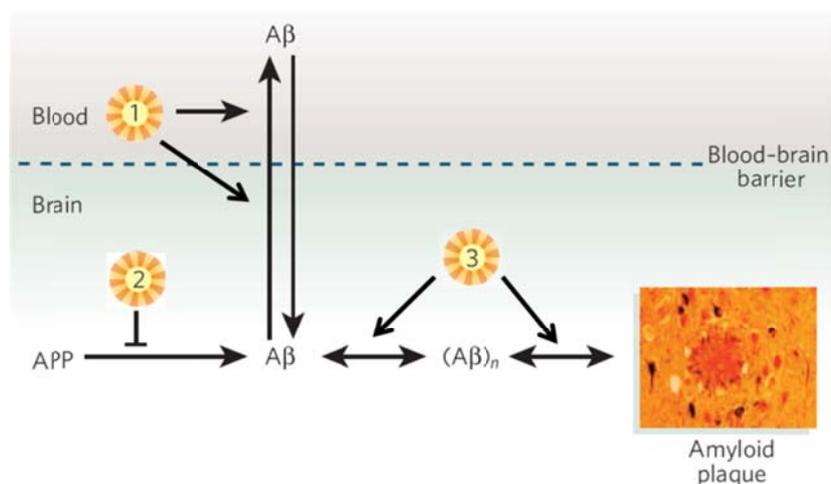


Abbildung 1.9: Drei therapeutische Strategien, die eine Reduktion des Amyloid-Peptids anstreben.^[30]

Aufgrund der Themenstellung dieser Arbeit und der enormen Vielfalt an Therapieansätzen werden im Folgenden nur Strategien zur Hemmung bzw. Modulation der Aggregation mit Hilfe von kleinen Molekülen vorgestellt (3. Gruppe der therapeutischen Strategien).

1.7.2.1 Synthetische Peptide

In der ersten Strategie wurde die Entwicklung von kurzen A β -Fragmenten, die in der Lage sind das A β -Wildtyp-Protein zu erkennen, verfolgt. *Tjernberg et al.* gehören zu einer der ersten Arbeitsgruppen, die homologe Ausschnitte des A β -Peptids untersuchten. Sie identifizierten A β (16-20), KLVFF, das an A β -Peptid binden und die Assemblierung zu Fibrillen verhindern konnte. Dieses kleine A β -Fragment wirkt als Aggregationshemmer, indem es über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen an die identische Peptidsequenz innerhalb des A β -Moleküls bindet.^[93] Des Weiteren wurden auch längere peptidische Aggregationshemmer, die diese Sequenz enthielten und Protease-stabile Peptide, bestehend aus D-Aminosäuren z. B. Iflrr und yflrr, entworfen und untersucht.^[94]

Parallel zu diesen Arbeiten konzentrierten sich *Soto et al.* auf die A β -Region 17-21 und entwickelten Peptide mit partieller Homologie zu diesem Abschnitt. Dabei wurden allerdings die Aminosäuren an den Schlüsselpositionen durch Prolin ersetzt. Peptide dieser Art z. B. LPFFD, konnten A β -Fibrillen in amorphe Aggregate umwandeln und somit die A β -Toxizität *in vivo* und *in vitro* herabsetzen. Deren D-Analoga, auch als „ β -sheet breaker“ bekannt, waren Protease-resistent und fähig die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren.^[95, 96]

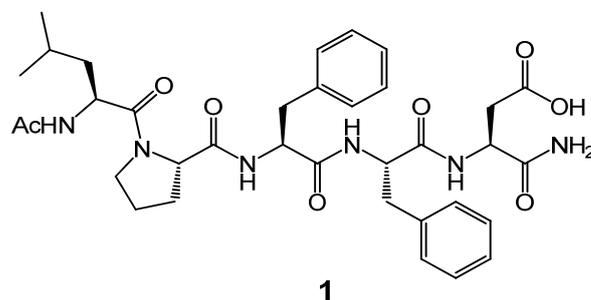


Abbildung 1.10: Modifiziertes L-Peptid (iA β 5p, **1**) nach *Soto et al.*^[97]

Alternativ zu bereits genannten Ansätzen wurden einige Verbindungen synthetisiert, die aus einem Selbsterkennungsmotiv, z. B. A β (15-20) oder A β (16-20), und einem hydrophilen „disrupting“-Element wie KKKKK, EEEEE oder DD bestehen.^[98-100] Solche stark geladenen

kosmotropen Einheiten erhöhen die Oberflächenspannung und können dadurch die gefaltete Proteinstruktur stabilisieren.^[101, 102] Interessanterweise konnten Verbindungen dieser Art, z. B. KLVFF-KKKKKK (**2**), die A β -Toxizität in Zellversuchen herabsetzen, jedoch die A β -Aggregation nicht verhindern. Im Gegenteil, die Größe und die Morphologie der Aggregate sind angestiegen bzw. haben sich verändert.^[101]

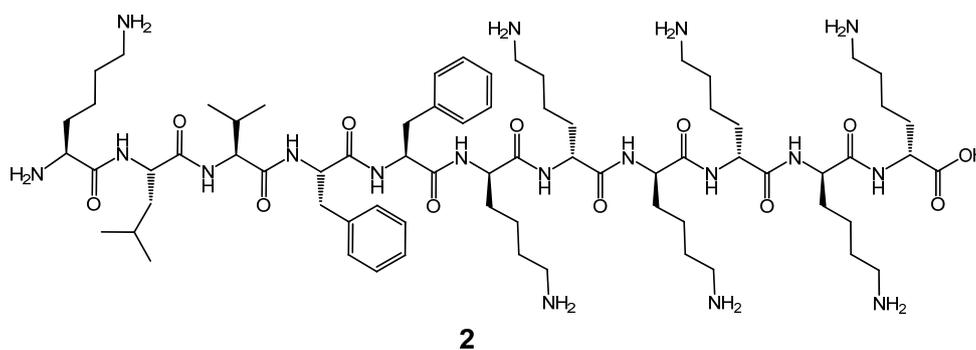


Abbildung 1.11: KLVFF-KKKKKK (**2**) nach *Kiessling, Murphy et al.*^[101]

Die Kombination des Selbsterkennungsmotivs mit einer sperrigen Gruppe ist die nächste Strategie, die *Findeis et al.* verfolgten. Die Verbindung Cholyl-LVFFA-OH (**3**) konnte die A β -Polymerisation hemmen und neuronale Zelllinien gegen A β -Toxizität schützen. Der therapeutische Einsatz dieser Substanz ist jedoch aufgrund des schnellen Abbaus in der Leber nicht möglich.^[103, 104]

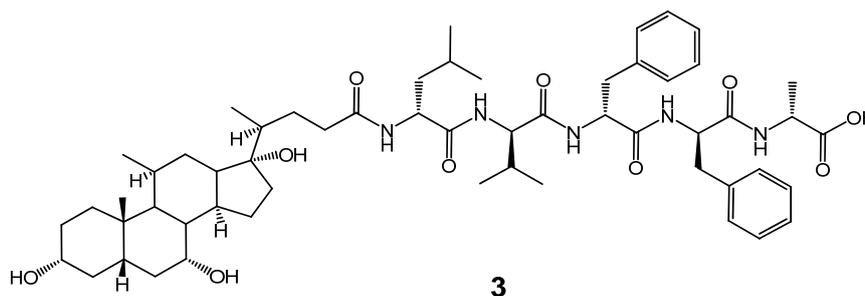


Abbildung 1.12: Cholyl-lvffa-OH (**3**) nach *Findeis et al.*^[103]

Auch die *N*-Methylierung von Peptiden entwickelt sich zu einem wirksamen Mittel für die Inhibierung der A β -Aggregation und einem Mechanismus zur Verlängerung der Peptid-Halbwertszeit *in vivo*. Alternierendes Ersetzen der Amidprotonen durch z. B. eine Methylgruppe führt zur Stabilisierung des Peptids in einer β -Faltblatt-Struktur, weil die tertiären Amide bevorzugt in einer *trans*-Konformation vorliegen. Diese kleinen löslichen β -

Faltblatt-Peptide besitzen eine blockierte Bindungsseite. Sobald der Ligand also an ein A β -Faltblattpeptid gebunden hat, ist diese Seite für eine Wechselwirkung über Wasserstoffbrückenbindungen mit einem weiteren A β -Aggregat blockiert. Mehrere Arbeitsgruppen modifizierten auf diese Weise verschiedene A β -Peptidabschnitte und zwar 25-35, 16-20 und 16-22.^[105-108] Einige dieser *N*-methylierten Liganden waren proteasestabil, membranpermeabel und konnten sowohl die Aggregation verhindern als auch die gebildeten Aggregate wieder auflösen.^[106, 107]

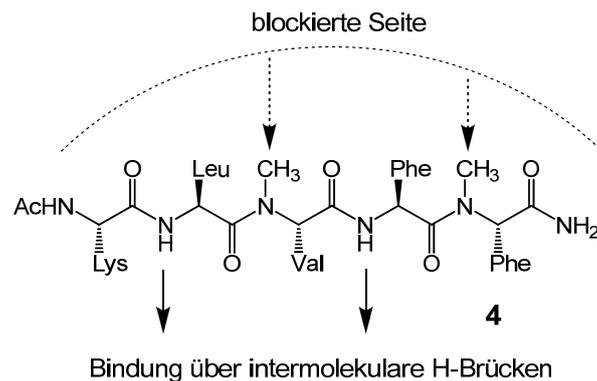


Abbildung 1.13: Struktur eines *N*-methylierten A β (16-20)-Peptids **4** nach Gordon, Meredith *et al.*^[107]

Substituenten, die größer als Methylgruppen sind, können ebenfalls gegen Amyloidosen wirken.^[109, 110] Kokkoni *et al.* verwendeten sperrigere Seitenketten und zwar *tert*-Butyl-, Cyclohexyl-, homo-Phenyl- und 2-Naphtylreste. Beim Untersuchen der erstellten Peptid-Bibliothek zeigte das D-Peptid D-[(*ch*Gly)-(Tyr)-(chGly)-(chGly)-(mLeu)]-NH₂ (**5**) die stärkste Effektivität. Die A β -Toxizität konnte mit Hilfe dieser Verbindung möglicherweise durch Aggregation der Oligomere zu nicht toxischen Fibrillen reduziert werden.^[110]

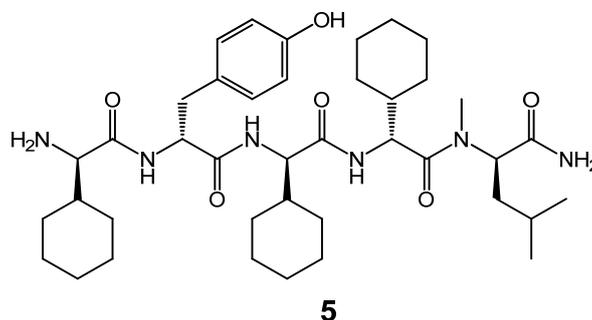


Abbildung 1.14: Struktur von D-[(*ch*Gly)-(Tyr)-(chGly)-(chGly)-(mLeu)]-NH₂ (**5**) nach Kokkoni *et al.*^[110]

In der Arbeitsgruppe von *E. Gazit* wurde ein kleines Inhibitor-Molekül, D-Trp-Aib **6**, entwickelt. Die Verbindung stellt eine Kombination aus Tryptophan als Erkennungseinheit, die aromatische Interaktionen mit den Phenylalaninen 19 und 20 im A β -Peptid eingeht, und Aminoisobuttersäure (Aib) als β -Faltblattbrecher dar. Laut Autoren lagert sich der Ligand bevorzugt an kleine A β -Oligomere an und reduziert ihre Toxizität auf Zellkulturen. Außerdem gelang es mit Hilfe dieser Verbindung die Zahl der amyloiden Ablagerungen im Gehirn von transgenen Mäusen signifikant zu reduzieren und die kognitiven Fähigkeiten zu verbessern.^[111]

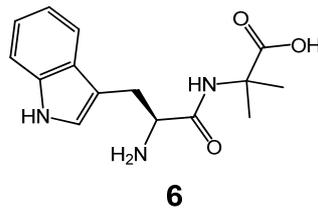


Abbildung 1.15: Struktur von D-Trp-Aib **6**.^[111]

Willbold et al. identifizierten mittels Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion zwei D-Peptide, die mit hoher Spezifität an A β (1-42) binden. Beide Peptide, D1 **7** und D3 **8**, bestehen aus 12 D-Aminosäuren und sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

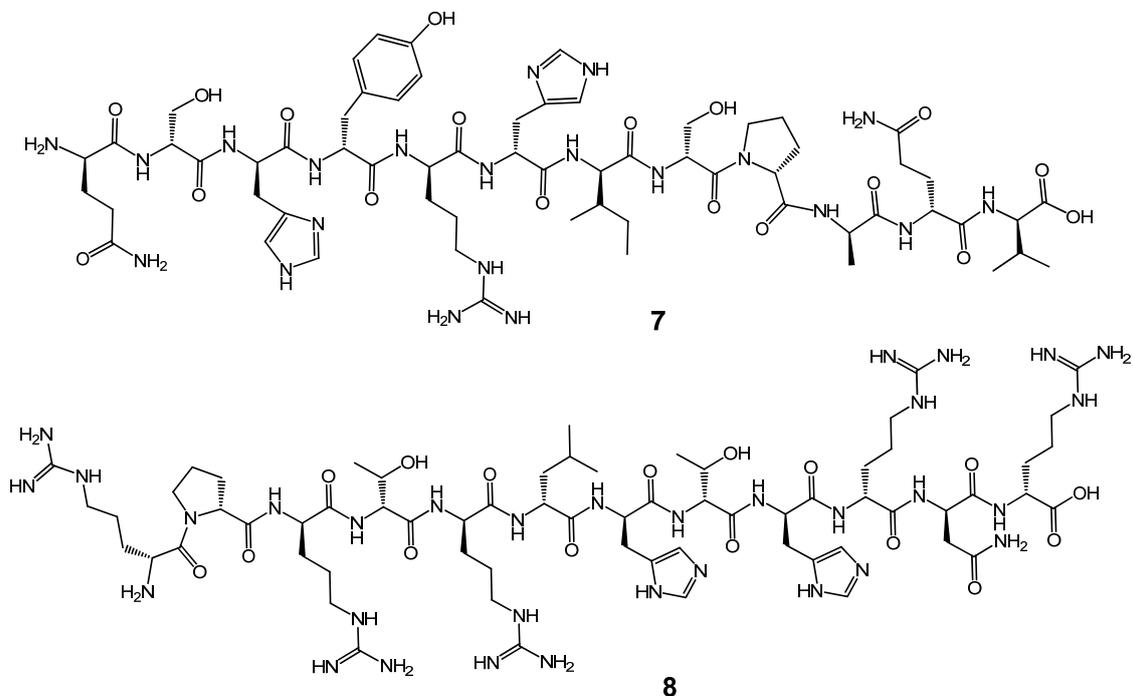


Abbildung 1.16: Strukturen von D1-Peptid **7** und D3-Peptid **8** nach *Willbold et al.*

Die Phagen-Display-Selektion ist heutzutage eine weit verbreitete Technik zum Anlegen von Peptidbibliotheken, die auf eine Bindung an ein bestimmtes Zielmolekül durchsucht werden können. Die Peptidbibliothek wird dabei an der Oberfläche der Bakteriophagen als eine Fusion der Peptide mit dem Hüllprotein der Phagen präsentiert. Auf diese Weise kann eine sehr große Anzahl von Phagen, die jeweils ein anderes Peptid tragen, konstruiert, repliziert, selektiert und amplifiziert werden. Zur Identifizierung der Peptide **7** und **8** durch *Willbold et al.* wurde ein Screening einer Peptid-Bibliothek mit ca. 10^9 unterschiedlichen Dodecamer-Peptid-Varianten durchgeführt. Zur Selektion wurde ein Spiegelbild des A β (1-42)-Peptids, welches aus D-Aminosäuren besteht, eingesetzt (Abbildung 1.17).^[112-114]

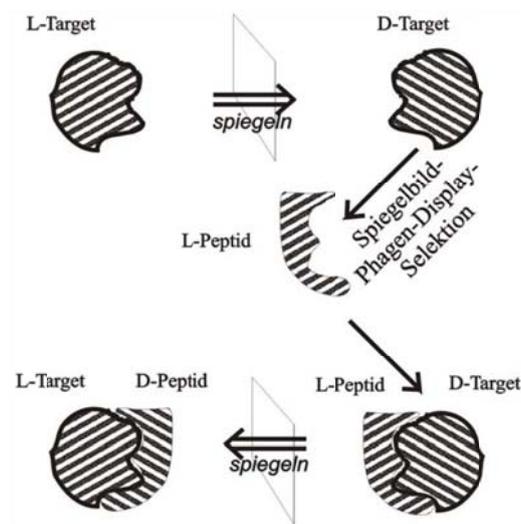


Abbildung 1.17: Schematische Darstellung der Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion. L-Peptide werden auf Bindung an das Spiegelbild des Zielproteins (D-Target) selektiert. Jedes selektierte L-Peptid wird an das D-Zielprotein (D-Target) gebunden. Das Spiegelbild dieses Komplexes ist ein D-Peptid und ein L-Zielprotein (L-Target).^[113]

Die erhaltenen D-Peptide sind im Vergleich zu L-Enantiomeren Protease-stabil und rufen keine Immunogenität hervor. Durch Selektion gegen aggregiertes A β (1-42)-Peptid als Zielpolypeptid wurde das D1-Peptid **7** identifiziert. Dieses zeigt eine starke Affinität gegenüber A β -Aggregaten mit einer Bindungskonstante im submikromolaren Bereich, bindet jedoch nicht an fibrilläre Ablagerungen anderer Amyloidosen.^[112] Zudem wurde bereits nachgewiesen, dass D1 auch *in vivo* an A β -Ablagerungen im Gehirn transgener Mäuse bindet.^[115] D1 ist zwar in der Lage die A β -Zelltoxizität und die Amyloid-Ablagerungen etwas zu reduzieren, eignet sich jedoch nicht als Aggregationshemmer, sondern vielmehr als eine molekulare Sonde für *in vivo* Imaging von amyloiden Plaques.^[116] Während der zweiten

Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion wurde monomeres und low-n-oligomeres D-A β (1-42)-Peptid eingesetzt. Dabei wurde das D3-Peptid ausgewählt, welches die Aggregation moduliert und *in vitro* die A β -Zelltoxizität herabsetzt. *In vivo* reduziert D3 die Plaque-Ablagerungen und Entzündungsprozesse im Gehirn transgener Mäuse.^[117, 118]

In vielen fibrillogenen Peptiden, die sich aus transmembranen Helices ableiten, kommt Glycin oft in einem GxxxG-Motiv (zwei Glycinreste getrennt durch drei beliebige Aminosäuren x) vor.^[119] In diesem Motiv sind die beiden Glycine zunächst in der Transmembran-Helix oder später im β -Faltblatt auf einer Seite angeordnet. Im Vorläufer-Protein APP vermittelt diese Sequenz eine Dimerisierung zweier Transmembransequenzen und beeinflusst die Länge des gebildeten A β -Peptids.^[119, 120] Durch die Abwesenheit der sperrigen Seitenketten am Glycin 33 und 37 können die gebildeten Furchen als Selbsterkennungseinheit dienen.^[119] *Sato et al.* konnten mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie erkennen, dass Methionin 35 den freien Raum in der Furche des Glycins 33 in A β ₄₀ (Abbildung 1.18, links) oder des Glycins 37 in A β ₄₂ (nicht dargestellt) einnimmt. Dadurch werden die Wechselwirkungen zwischen zwei Fibrillen stabilisiert. Daraufhin führten *Sato et al.* peptidische Verbindungen mit einer GxFxGxF-Struktur ein, wobei die Aminosäuren x variiert wurden. Die entworfenen Liganden, z. B. ⁺H₃N-RGTFEGKF-CONH₂ (**9**), konnten sich an das IxGxMxG-Motiv im C-terminalen hydrophoben Bereich des A β -Peptids anlagern und eine Wechselwirkung zu weiteren β -Faltblättern unterbrechen (Abbildung 1.18, rechts).^[121] Auf diese Weise wurde die Aggregation zu reifen Fibrillen inhibiert und die A β -Toxizität *in vitro* herabgesetzt.^[121]

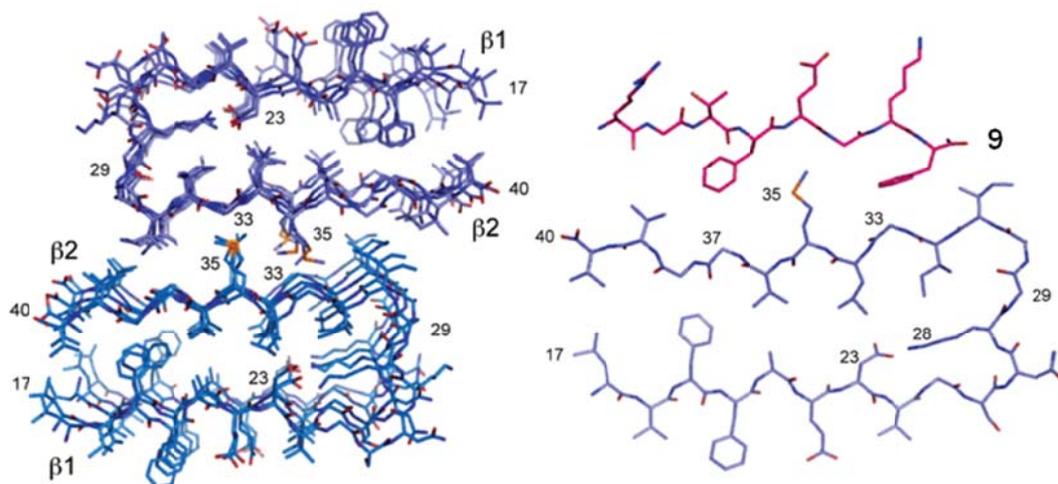


Abbildung 1.18: Links: Strukturelles Modell von A β (1-40). Rechts: Komplex zwischen A β (1-40) und ⁺H₃N-RGTFEGKF-CONH₂ **9** nach *Sato et al.*^[121]

1.7.2.2 Modifizierte Amyloid-Farbstoffe als Inhibitoren

Neben dem Sequenz-basierenden Wirkstoff-Design wurden mehrere kleine Moleküle, z. B. Kongorot, Chrysamin G und Thioflavin S, die von histologischen Farbstoffen abgeleitet wurden, untersucht. So konnte Kongorot (**10**), dessen Struktur der Abbildung 1.19 zu entnehmen ist, die Aggregation und Neurotoxizität von A β reduzieren, wirkte jedoch krebserregend und konnte die Blut-Hirn-Schranke nicht überqueren.^[122] Obwohl die Farbstoffderivate als Medikamente die klinischen Tests noch nicht erreichen konnten, werden diese und ähnliche Verbindungen zum Einsatz als Marker in bildgebenden Verfahren der Alzheimer-Diagnostik, z. B. in der Positronen-Emissionstechnologie, untersucht.^[123-130]

1.7.2.3 Metall-Chelatoren

Die Rolle der Metallionen bei der Alzheimer Krankheit und Metall-Chelatoren als therapeutische Mittel wurde in den letzten Jahren besonders kontrovers diskutiert.^[131-133] Das Alzheimer-Peptid besitzt im *N*-terminalen Bereich eine spezifische Bindungsseite für Cu²⁺- und Zn²⁺-Ionen, die sehr wahrscheinlich in A β -Aggregation involviert sind. Es wurde berichtet, dass Kupferionen *in vitro* an das A β -Peptid binden und dessen Assemblierung verstärken können.^[134-138] Mehrere Chelatoren wurden daraufhin auf ihre Effektivität gegen A β -Aggregation untersucht.^[131] 5-Chloro-7-iodo-8-hydroxychinolin (Clioquinol, **11**), ein Derivat eines Antimalariamittels, ist ein Übergangsmetall-Chelator, der die Plaque-Ablagerungen sowohl im Gehirngewebe *in vitro* als auch in Tierversuchen herabsetzt.^[132, 133] Aufgrund der schädlichen Nebenwirkungen wurde diese Verbindung aus den klinischen Tests abgezogen. Dort wird derzeit PBT2, ein Nachfolger des Clioquinols, untersucht.^[139]

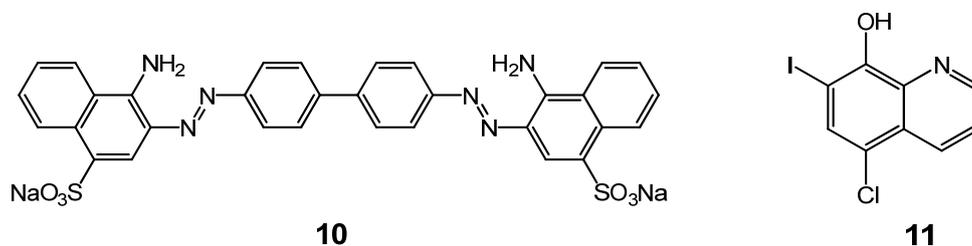


Abbildung 1.19: Strukturen von Kongorot (**10**) und Clioquinol (**11**).^[140]

1.7.2.4 Polyphenole

Zu den Polyphenolen gehören synthetische und in der Natur vorkommende kleine Moleküle, die ein oder mehrere Phenolringe enthalten. Es wird behauptet, dass natürliche polyphenole Verbindungen, die in Beeren, Früchten, Tee, Gewürzen und Pflanzen vorkommen, antioxidative, entzündungshemmende und anti-aggregierende Eigenschaften besitzen.^[141] In Abbildung 1.20 sind die an der A β -Fibrillognese am besten erforschten Phytochemikalien dargestellt. Curcumin (**12**) reduzierte in Tierversuchen zu 80 % die Plaque-Ablagerungen, wirkt aber auch antioxidativ und entzündungshemmend und wird zurzeit in China und in den USA in klinischen Studien an Alzheimer-Patienten untersucht.^[28, 139, 142, 143] (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG, **13**) reduzierte ebenfalls in Tierversuchen die Konzentrationen an löslichem und abgelagertem Amyloid- β -Peptid. Die neuroprotektive Wirkung dieses Catechins aus dem grünen Tee ist wahrscheinlich durch mehrere gleichzeitig ablaufende Mechanismen zu erklären.^[141, 144] Gingko biloba besitzt ebenfalls eine komplexe Wirkungsweise und wird derzeit in Kombination mit Curcumin in klinischen Studien (Phase II) untersucht.^[139] Weitere aggregationshemmende Polyphenole sind Tanninsäure, Salbeisäure B und Rosmarinsäure.^[26, 145]

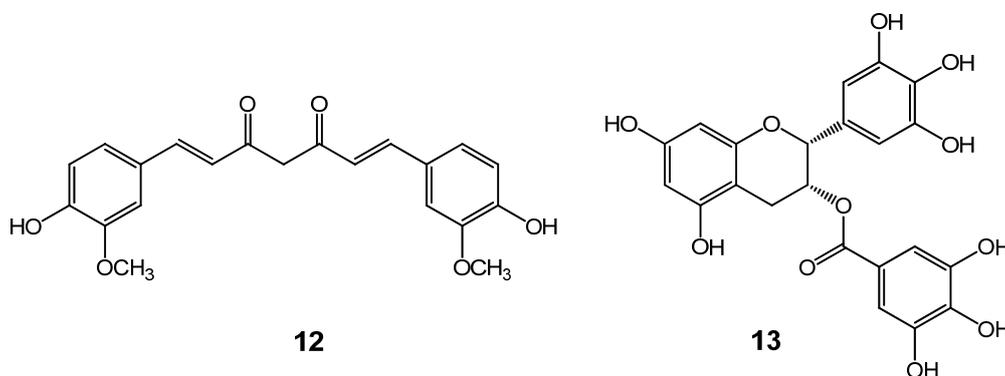


Abbildung 1.20: Strukturen von Curcumin (**12**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**13**).

1.7.2.5 GAG-Mimetika und kleine Moleküle auf der Lipidbasis als Inhibitoren

Glycosaminoglykane (GAG) sind ein Bestandteil der Plaque-Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Erkrankten.^[146] Viele Vertreter dieser Gruppe beschleunigen die A β -Assemblierung, indem sie an das Alzheimer-Peptid binden. Die Effektivität dieser Wechselwirkung korreliert mit der Anzahl der Sulfatgruppen.^{[139] [147]} Es wurde bestätigt, dass niedermolekulares Heparin dosisabhängig die A β -Toxizität hemmen kann.^[148] Diese Ergebnisse führten zur Entwicklung von kleinen sulfatierten Verbindungen, die

Glycosaminoglykan-A β -Bindung nachahmen und somit möglicherweise die toxischen A β -Spezies beseitigen könnten. In der Abbildung 1.21 ist 3-Amino-1-propansulfonsäure (**14**) (Homotaurin, Alzhemed[®]), ein GAG-Mimetikum, dargestellt, das an lösliche A β -Formen bindet und diese als Zufallsknäuel stabilisiert. In Tierversuchen konnte diese Verbindung die A β -Ablagerungen und die A β -Konzentration im Plasma reduzieren. Im klinischen Test (Phase III) zeigte die Verbindung jedoch keine Verbesserung der kognitiven Eigenschaften. Alzhemed[®] wird dennoch aufgrund der guten Verträglichkeit als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet.^[139] A β -Wechselwirkung mit Glycolipiden führte zur Entwicklung weiterer Strategien. *Scyllo*-Inositol (**15**) ist ein Stereoisomer des im Zentralnervensystem natürlich vorkommenden *myo*-Inositols. Das *Scyllo*-Isomer konnte im Maus-Modell die Plaque-Bildung, Synapsenschädigung und A β -induzierten kognitiven Defizite vermindern.^[149-151]

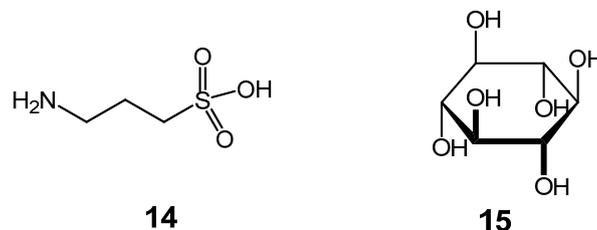


Abbildung 1.21: Strukturen von 3-Amino-1-propansulfonsäure (**14**) und *Scyllo*-Inositol (**15**).

1.7.2.6 Weitere Aggregationshemmer

Abgesehen von der neuroprotektiven Wirkung durch Redox-Effekte können manche Antioxidantien die A β -Assemblierung auch direkt beeinflussen. So wurden die Bildung, Elongation und Destabilisierung der A β -Fibrillen durch Vitamine A, B2, B6, C, E und β -Karotin beobachtet.

Manche Polyamine und eine Reihe verschiedener organischer Verbindungen einschließlich Nikotin, β -Cyclodextrin, Häm in und verwandter Porphyrine, Antracyclin (4'-Iodo-4'-deoxydoxorubicin), Hexadecyl-*N*-methylpiperidiniumbromid, Rifampicin und Melatonin wirken *in vitro* ebenfalls inhibierend auf die A β -Fibrillogenese.^[26]

1.7.3 Immuntherapie

Die A β -Immuntherapie ist ein weiterer Therapieansatz zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit. Das Konzept für diese Strategie geht auf eine Untersuchung an APP-transgenen Mäusen zurück, die durch subkutane Injektion von humanem fibrillärem A β_{42} -Peptid immunisiert waren, wonach sie anti-A β -Antikörper bildeten. Eine Untersuchung mehrere Monate nach der Impfung ergab, dass die Menge an Plaques im Vergleich zu ungeimpften Mäusen drastisch erniedrigt war. Dieser Befund ließ hoffen, dass die Impfung menschlicher AD-Patienten ebenfalls zu einer therapeutisch nützlichen Verringerung des A β -Peptids im Gehirn führen könnte.^[152]

Man unterscheidet bei der Immuntherapie zwischen zwei therapeutischen Eingriffen der aktiven und der passiven Immunisierung. Die aktive Immunisierung basiert auf der Injektion des A β -Peptids oder seiner Sequenzabschnitte, durch welche die Produktion des körpereigenen A β -spezifischen Antikörpers angeregt wird. Bei einer passiven Immunisierung werden die monoklonalen Antikörper direkt eingesetzt. Es existieren mehrere zum Teil in Experimenten bestätigte Mechanismen, welche die Wirkungsweise der A β -spezifischen Antikörper erklären: Antikörper können die Blut-Hirn-Schranke passieren, an Plaques binden und somit deren Phagozytose einleiten; Antikörper vermitteln die Dissoziation von A β -Fibrillen und Aggregaten und führen somit zum schnellen A β -Abbau; Antikörper bewirken eine Reduktion der A β -Konzentration im Blut und so einen Rückfluss von A β aus dem Gehirn ins Plasma.^[26, 153]

Eine aktive Immunisierung mit einem fibrillären A β (1-42)-Peptid (AN1792) wurde in klinischen Tests (Phase II) durchgeführt. Da jedoch 6 % der Probanden eine Meningoenzephalitis entwickelten, musste die Studie vorzeitig abgebrochen werden. Trotzdem konnten bei einem Teil der Patienten verbesserte kognitive Leistungen und eine Reduktion der amyloiden Ablagerungen im Gehirn beobachtet werden. Zurzeit werden vor allem N-terminale A β -Fragmente als Antigene untersucht.^[154, 155]

Gegenwärtig werden verschiedene passive Impfungen mit humanisierten anti-A β -Antikörpern gegen verschiedene Epitope des A β -Peptids klinisch getestet. Die passive Impfung hat den Vorteil, dass die Behandlung im Falle von Nebenwirkungen sofort unterbrochen werden kann und aktive Antikörper innerhalb weniger Wochen verschwinden. Außerdem können durch wiederholte Optimierungszyklen Antikörper der gewünschten Spezifität, Affinität und des gewünschten Wirkmechanismus erzeugt werden.^[152]

1.7.4 Aminopyrazol-Liganden

In der Arbeitsgruppe von *Thomas Schrader* wurden mittels rationalen Designs β -Faltblatt-Liganden bestehend aus Pyrazol-Derivaten entwickelt. Die ersten Untersuchungen erfolgten durch *Schrader* und *Kirsten* mit 3-Aminopyrazol in freier und acylierter Form. Es wurde gezeigt, dass diese Liganden die β -Faltblattkonformation in unpolaren organischen Lösungsmitteln stabilisieren können, indem sie an die Ober- und Unterseite des Peptids binden. Die Komplexbildung des Peptid-Rückgrats wird dabei durch ein ideales Donor-Akzeptor-Donor-Bindungsmotiv (D-A-D), komplementär zu dem Akzeptor-Donor-Akzeptor-Motiv (A-D-A) eines β -Faltblattpeptids, ermöglicht (Abbildung 1.22).^[156, 157]

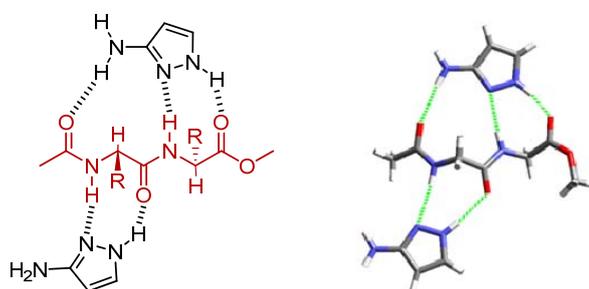


Abbildung 1.22: Stabilisierung eines Dipeptids (Ac-Gly-Gly-OMe, rot) in der β -Faltblatt-Konformation durch ein Aminopyrazol nach *Kirsten* und *Schrader* (Cerius², Molecular Simulations, Dreiding 2.21).^[157]

Eine Weiterentwicklung dieser Idee erfolgte durch *Wehner* und *Schrader* mittels Dimerisierung der 5-Methyl-3-aminopyrazol-Einheit (Abbildung 1.23). So konnte das Bindungsmotiv der Liganden erweitert werden, wodurch längere Peptidsequenzen abgedeckt wurden. Zur kovalenten Verknüpfung zweier Bausteine wurden verschiedene Dicarbonsäure-Spacer verwendet.^[158, 159]

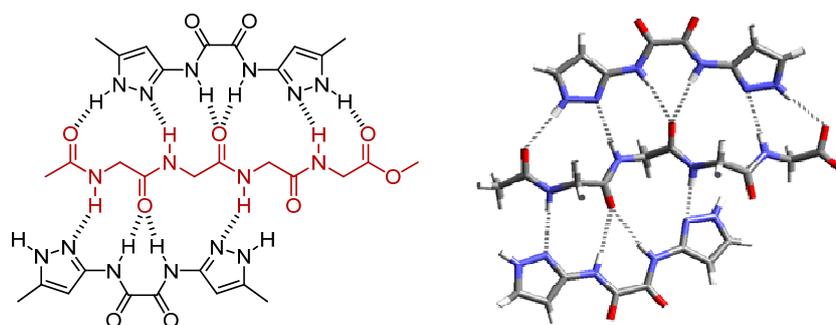


Abbildung 1.23: Minimierter Komplex zwischen einem dimeren β -sheet-Liganden und Tetraglycin (MacroModel 7.0, Amber*, Chloroform).^[159]

Durch *Rzepecki et al.* wurde dieses Konzept weiter optimiert, indem die zentrale 5-Methyl-3-aminopyrazoleinheit durch eine unnatürliche, heterozyklische Aminosäure (3-Aminopyrazol-5-carbonsäure) ausgetauscht wurde. Mit diesem Baustein wurden oligomere Rezeptoren hergestellt (Abbildung 1.24), die aufgrund der erhöhten Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen noch stärker an β -Faltblatt-Strukturen binden sollten.^[159, 160]

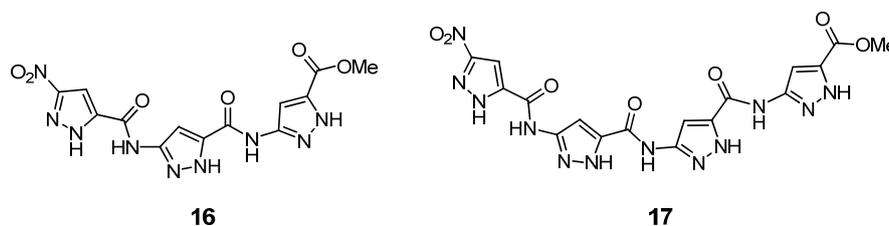


Abbildung 1.24: Oligomere Liganden: Trimer **16** und Tetramer **17**.

Allerdings zeigten die oligomeren Liganden mit steigender Anzahl an Pyrazol-Einheiten eine abnehmende Löslichkeit und eine Tendenz zur Selbstassoziation. Um diese Nebeneffekte zu unterdrücken, wurde die 3-Aminopyrazol-5-carbonsäure mit proteinogenen Aminosäuren zu Hybridverbindungen kombiniert (Abbildung 1.25).^[161, 162]

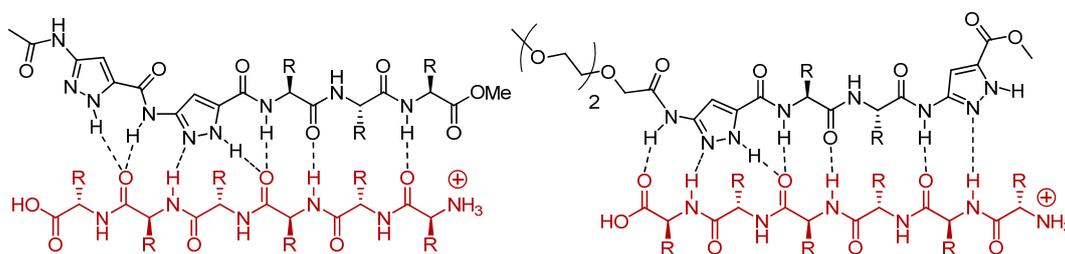


Abbildung 1.25: Postulierte Komplexe zwischen einem Hexapeptid (rot) und Hybridliganden.^[162]

Sowohl die wasserlöslichen Hybridliganden als auch der Ligand **16** verfügten über eine Affinität zur KKL₂VFF-Sequenz, die mit Hilfe von NMR-Titrationen und MD-Simulationen nachgewiesen wurde.^[163] In *in vitro* Experimenten und in Zellkultur-Assays mit neuronalen Zellen erwies sich das Kopf-Schwanz-verknüpfte Oligomer **16** als die potenteste Verbindung. In Untersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation zeigte das Trimer **16** inhibierende und disaggregierende Effekte. Im Gegensatz zu flexiblen Aminopyrazol-Peptid-Liganden ist das Trimer **16** wahrscheinlich in der Lage aufgrund seiner starren planaren Struktur an vorgeformte β -Faltblätter zu binden und kann möglicherweise deshalb die Aggregation kleinerer A β -Oligomere effektiv hemmen. Auch in Zellkultur-Experimenten setzte dieser Ligand die Zytotoxizität des β -Amyloids herab.^[161, 164, 165]

2 Ziele der Arbeit

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese bildet die Basis für die Entwicklung der kausalen Therapiestrategien. Aus diesem Grund sind Wirkstoffe, die in der Lage sind die A β -Fibrillogenese und/oder Plaque-Bildung zu verhindern, von großem therapeutischem Interesse. ^[139, 166] In der Literatur findet man neben den peptidischen Inhibitoren, deren Wirkung wahrscheinlich auf Peptid-Peptid-Wechselwirkungen basiert, auch eine Vielzahl kleiner, oft aromatischer Moleküle, deren Interaktionsart mit dem A β -Peptid bisher unbekannt ist. ^[167] Dementgegen gibt es für einige in den Vorarbeiten hergestellten Aminopyrazol-Derivate Anhaltspunkte für ihren Bindungsort im β -Amyloid-Peptid. Wie aus den in Vorarbeiten durchgeführten MD-Simulationen hervorgeht, bildet der Ligand Trimer **16** sowohl mit dem KKLVFF-Modellpeptid als auch mit dem KLVFF-Sequenzabschnitt der pentameren A β -Protofibrille einen stabilen Komplex (Abbildung 2.1). ^[163] Die Bindung erfolgt über Wasserstoffbrücken an das Peptidrückgrat, wobei die Phenylalanin-Reste eine Art hydrophobe Tasche um den Liganden bilden und den Komplex durch π - π -Stapel-Wechselwirkungen stabilisieren. Auf diese Weise wird die Aggregation der Protofibrille terminal blockiert. Eine Anlagerung von weiteren Peptidsträngen ist auf der Seite nicht möglich (Abbildung 2.1, rechts).

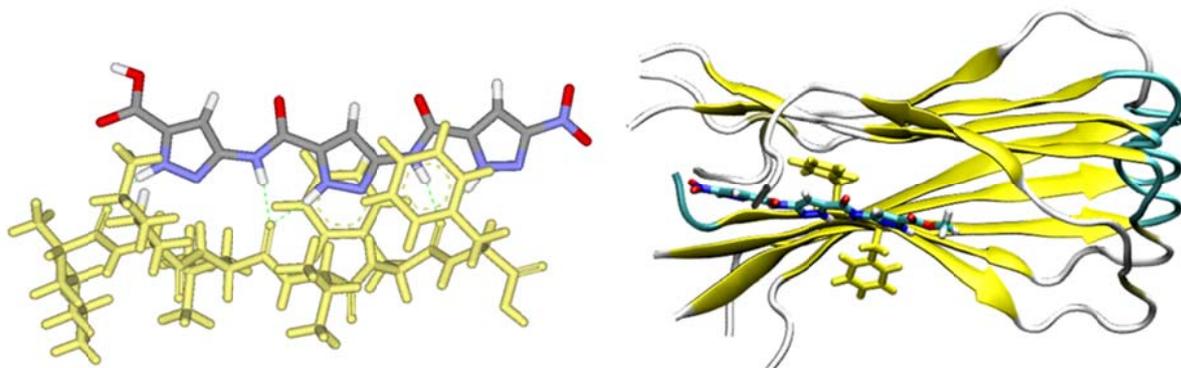


Abbildung 2.1: Links: Monte-Carlo-Simulation eines Komplexes zwischen dem Trimer **16** und Hexapeptid KKLVFF. Rechts: Komplexstruktur zwischen dem Trimer **16** und der pentameren A β -Protofibrille nach 20 ns MD-Simulation. Komplexstabilisierende Phenylalanin-Reste sind in gelb dargestellt. ^[163]

Da der Ligand **16** mit seiner inhibierenden und disaggregierenden Wirkung auf die A β -Fibrillogenese die größte Effektivität zeigte, sollte dieser im Nachfolgenden als Leitstruktur für mehrere unterschiedliche Projekte eingesetzt werden.

Im Rahmen des Kooperationsprojektes mit den Arbeitskreisen *Korth*, *Willbold* und *Sticht* war das primäre Ziel dieser Arbeit die Herstellung von bifunktionellen Hybridverbindungen. Hierzu sollte das Trimer **16** mit weiteren A β -Bindern, die sich in Größe und Wirkmechanismus erheblich unterscheiden, kovalent verbunden werden. Der Zweck dieser Fusion war es, die Affinität und Spezifität für das A β -Peptid im Vergleich zu Einzelkomponenten erheblich zu verbessern. Unter anderem war eine Verknüpfung mit den im Kapitel 1.7.2.1 vorgestellten D-Peptiden aus der Phagen-Display-Bibliothek, die entweder vorwiegend an fibrilläre (D1) oder an oligomere (D3) A β -Formen binden, vorgesehen. Des Weiteren sollte das Trimer **16** analog zu Dodecapeptiden mit im *AK Korth* entwickelten monoklonalen Antikörpern bzw. davon abgeleiteten rekombinanten Fragmenten (scFv) gegen unterschiedliche A β -Konformere kovalent verbunden werden. Um beiden Komponenten dieser Konjugate eine gleichzeitige Ansteuerung von zwei unterschiedlichen A β -Epitopen zu ermöglichen, sollte ein flexibler Spacer eingesetzt und in seiner Länge optimiert werden.

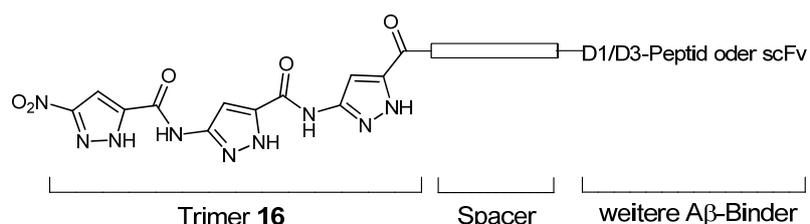


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Hybridverbindungen, bestehend aus der Trimer- (**16**), der D1- bzw. D3-Einheit oder dem Antikörperfragment (scFv) und einem Spacer.

Zur Herstellung solcher Hybridverbindungen war zunächst die Synthese eines am Trimer-Spacer vorinstallierten *N*-Hydroxysuccinimidesters, der bevorzugt mit primären Aminen reagiert, vorgesehen. Dieser Aktivester sollte später für Reaktionen mit dem *N*-Terminus von D-Peptiden oder mit Lysinen des Antikörperfragmentes eingesetzt werden, um auf diese Weise kovalent verbundene bifunktionelle Liganden zu erhalten. Zuerst wurde ein Triethylenglykol-Derivat als flexibler und löslichkeitsfördender Spacer für die Synthese festgelegt (Abbildung 2.3). Später sollte seine Länge variiert und vor allem basierend auf Moleküldynamik-Rechnungen im *AK Sticht* und parallelen biophysikalischen Experimenten optimiert werden.

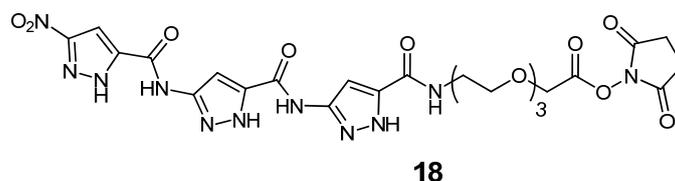


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Trimer-Triethylenglykol-Aktivesters **18**.

Ferner sollte der Rezeptor **16** zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit und Lipophilie mit polaren sowie hydrophoben Resten versehen und zur Steigerung der A β -Selektivität mit natürlichen peptidischen Erkennungssequenzen, wie KLVFF und LPFFD, modifiziert werden. Diese funktionalisierenden Einheiten sollten im Gegensatz zu Modifizierungen unmittelbar an der Leitstruktur **16** durch *Katrin Hochdörffer* über einen Triethylenglykol als Abstandhalter zu der am Peptidrückgrat bindenden Trimer-Struktur **16** eingeführt werden.^[168] Begleitend dazu war eine Dimerisierung der Verbindung **16** zur Erhöhung der Effektivität vorgesehen.

Des Weiteren sollte der Ligand **16** mit der in den Arbeitskreisen *Klärner* und *Schrader* entwickelten Phosphat-Pinzette, die A β -Aggregation durch Bindung und Blockierung der Lysine effektiv hemmen kann, kombiniert werden. Ein Rezeptor, welcher aus dem Trimer **16** und der Pinzette besteht, sollte demzufolge in der Lage sein gleichzeitig an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen im Amyloid- β -Peptid zu binden und somit die Polymerisation noch stärker zu unterdrücken.

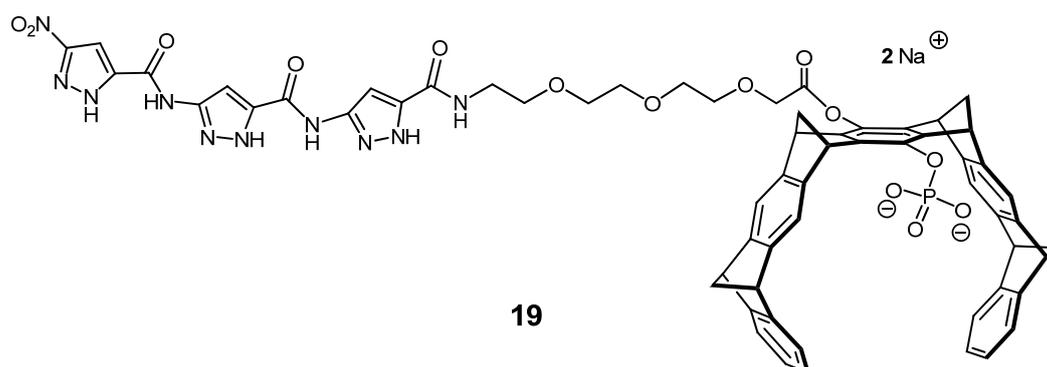


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Trimer-Triethylenglykol-Monophosphatpinzette **19**.

Parallel zu der Synthese waren Moleküldynamik-Rechnungen (*AK Sticht*) aller Liganden vorgesehen. Diese sollten nach erfolgreicher Synthese auf ihre aggregationshemmende Wirkung mittels ThT-Test, CD-Spektroskopie und TEM untersucht werden. In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen *Korth* und *Willbold* sollten die potentesten Substanzen auf ihre Fähigkeit, die Bildung von toxischen Oligomeren zu unterdrücken, mit Hilfe von Dichtegradienten-Ultrazentrifugation, einem Anti-Oligomerisierungsassay und A β -Zytotoxizitätstests untersucht werden.

3 Synthese und molekulares Modelling

Bevor die eigentlichen Strategien zur Herstellung von Hybridverbindungen und Trimer-Derivaten verfolgt werden konnten, musste das PMB-geschützte Trimer **16** synthetisiert werden. Um C-terminale Modifizierungen dieser Verbindung zu ermöglichen, wurde die Esterbindung basisch mit Lithiumhydroxid gespalten. In der Abbildung 3.1 ist das Syntheschema der PMB-geschützten Trimer-Säure **27** dargestellt, welche bereits von *Petra Rzepecki* und *Katrin Hochdörffer* beschrieben wurde.^[162, 168] Die Säure **27** diente als ein funktionalisierungsfähiger Grundbaustein für alle nachfolgenden Synthesen von Trimer-Derivaten und Hybridverbindungen.

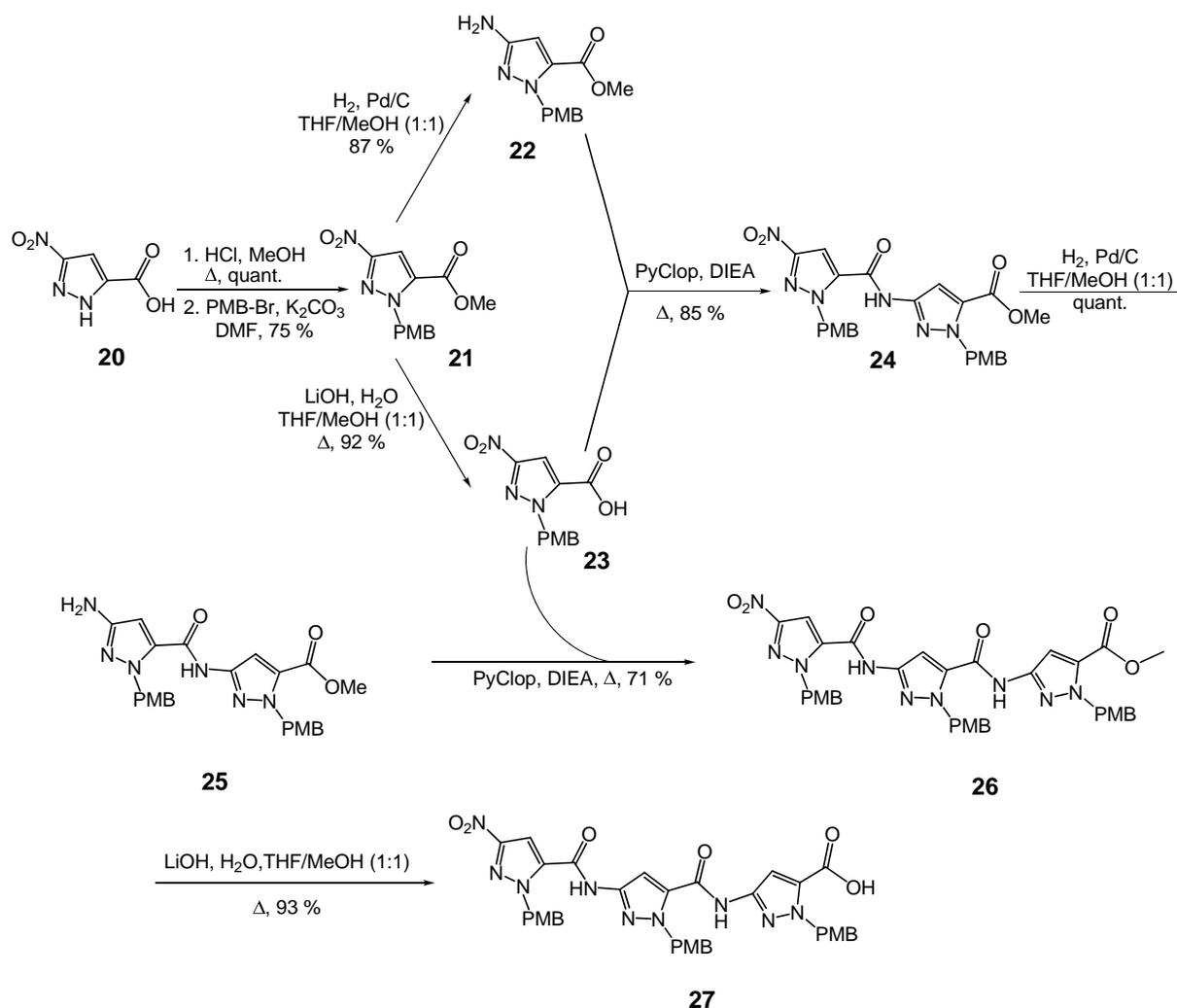


Abbildung 3.1: Syntheschema der PMB-geschützten Trimer-Säure **27**.

3.1 Linker

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit bestand darin, das Trimer-Grundgerüst mit anderen Rezeptoren und mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen kovalent zu verbinden. Die meisten Verknüpfungen wurden über einen Linker (Spacer) erstellt. In der Abbildung 3.2 ist die Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Linker dargestellt, wobei die Verbindungen **28**, **29** und **30** erst synthetisiert werden mussten. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit wurden bewusst überwiegend polare Triethylenglykol-Derivate (TEG) und keine hydrophoben Alkylketten als Spacer gewählt.

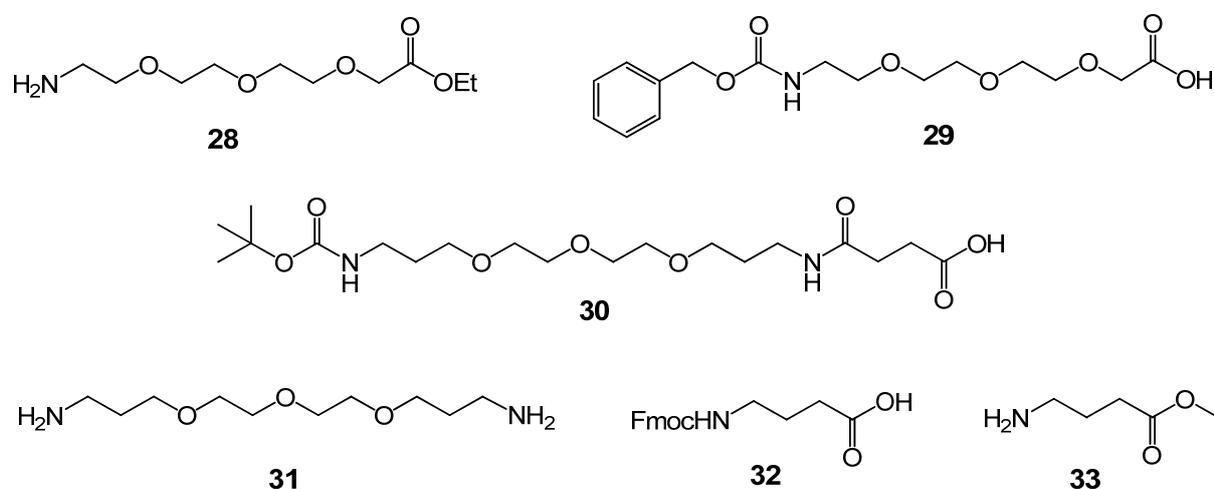


Abbildung 3.2: Übersicht der verwendeten und synthetisierten Linker.

Die erste Strategie zur Herstellung von Hybridverbindungen sah die Verwendung des TEG-Linkers **28** unter Ausbildung einer Amidbindung zwischen der terminalen Aminogruppe von **28** und der Säurefunktion von **27** vor. Die Linkersynthese erfolgte in vier Schritten (Abbildung 3.3). Ausgehend von 2-(2-Chlorethoxy)-ethoxy-ethanol (**34**) wurde in einer Veretherungsreaktion mit Ethyldiazoacetat in Anwesenheit von Bortrifluorid-Diethyletherat Ethyl-(2-(2-(2-chlorethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-acetat (**35**) hergestellt. Anschließend konnte durch Substitution des Chloridions mit Natriumazid die entsprechende Azidverbindung **36** synthetisiert werden.

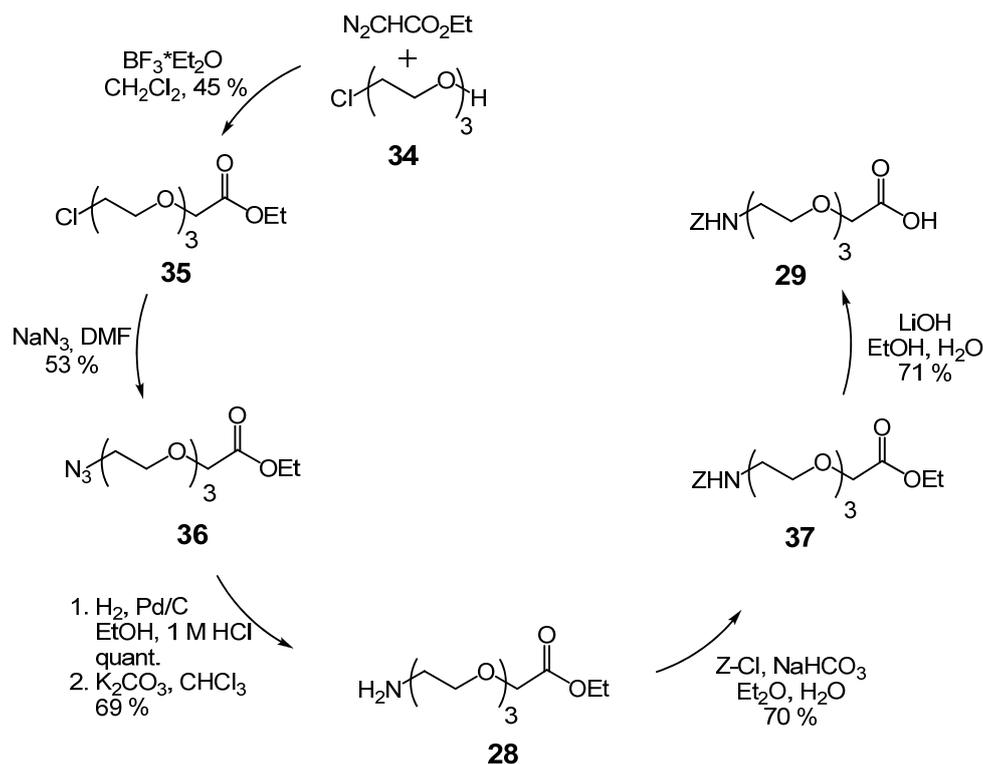


Abbildung 3.3: Synthese der Linker **28** und **29**.

Die Reduktion des Azids **36** mit Palladium auf Aktivkohle ergab allerdings neben dem gewünschten primären Amin **28** ein Gemisch verschiedener Nebenprodukte. Ein Beispiel dafür ist das sekundäre Amin **38** (Abbildung 3.4), das massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte. Außerdem sind bei diesem Reduktionsschritt Polymerisationsreaktionen und eine Lactambildung denkbar. Auch in der Literatur wird eine sehr niedrige Ausbeute dieser Reaktion beschrieben.^[169, 170]

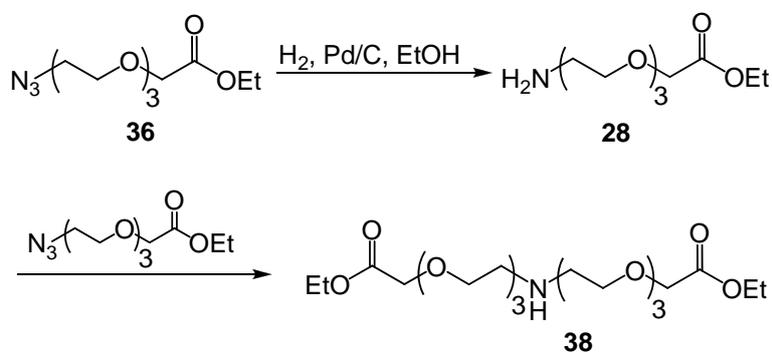


Abbildung 3.4: Bildung des sekundärenamins **38** anstelle des primärenamins **28**.

Um diese Reaktion zu optimieren und Ethyl-2-(2-(2-(2-aminoethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-acetat (**28**) in höherer Ausbeute und Reinheit zu erhalten, wurden zwei weitere Reduktionsmöglichkeiten in Betracht gezogen und zwar die Staudinger-Reduktion und die Reduktion mit einem Dithiol (Abbildung 3.5).^[171-174]

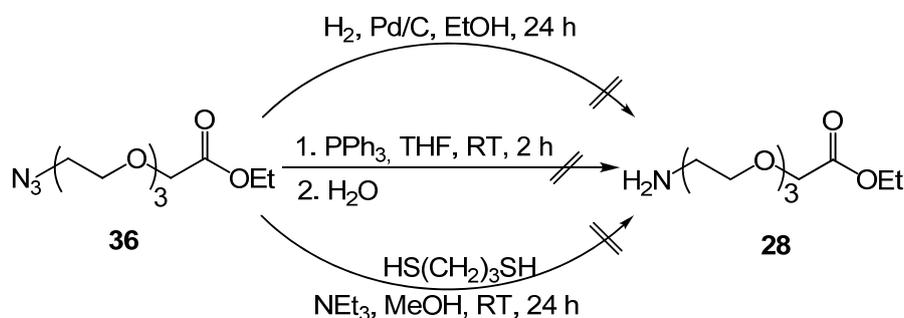


Abbildung 3.5: Drei Reduktionsversuche des Azids **36** zum primären Amin **28**.

Jedoch schlugen auch diese Reduktionsversuche fehl. Weder die Verwendung von Triphenylphosphin, noch von 1,3-Propandithiol waren geeignet, um das primäre Amin Nebenprodukt-frei herzustellen. In beiden Fällen wurden Produktgemische erhalten. Schließlich gelang der Durchbruch mittels Reduktion mit Palladium auf Aktivkohle in Gegenwart von 1 M Salzsäure, die das gewünschte Produkt als Hydrochlorid in quantitativer Ausbeute erbrachte (Abbildung 3.3). Das nach der Neutralisation mit Kaliumcarbonat erhaltene freie Amin **28** erwies sich allerdings als instabil und musste unmittelbar nach der Herstellung weiter umgesetzt werden.

Der Linker **29** wurde gemäß der Abbildung 3.3 nach einer Vorschrift von *Jolanta Polkowska* in zwei Schritten, durch Z-Schützung und anschließende Verseifung mit Lithiumhydroxid hergestellt. Die freie Säurefunktion soll später dazu dienen andere Verbindungen zunächst mit dem Linker zu verknüpfen und nach einer anschließenden Z-Entschützung an den C-Terminus des PMB-geschützten Trimers zu binden.

Ein weiterer Linker **30** wurde in zwei Schritten durch einseitige Boc-Schützung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (TEGDA) **31** und anschließende Kettenverlängerung mit gleichzeitiger Einführung einer Säurefunktion mit Hilfe von Bernsteinsäureanhydrid hergestellt (Abbildung 3.6).^[175]

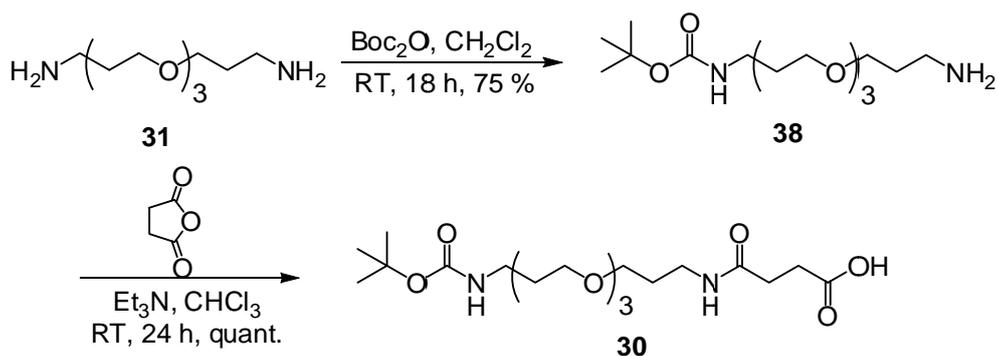


Abbildung 3.6: Syntheschema des Linkers **30**.

3.2 Hybridverbindungen mit D-Peptiden

In dieser Arbeit werden als Hybridverbindungen Rezeptoren verstanden, welche sich aus der Leitstruktur **16** sowie dem D-Peptid **7/8** oder einem Antikörperfragment zusammensetzen. Die Hybridverbindungen mit D-Peptiden, die im *AK Willbold* (Forschungszentrum Jülich) identifiziert wurden, sollten sich sowohl durch die β -Faltblatt-brechende Eigenschaft des Trimers **16** als auch durch die A β -Spezifität der D1/D3-Peptide auszeichnen. Da das D1 **7** überwiegend an das fibrilläre, wogegen das D3 **8** an das oligomere A β -Peptid bindet, ist vor allem bei Trimer-D3-Hybriden eine effiziente Aggregationshemmung zu erwarten. Die bifunktionellen Trimer-D3-Hybridverbindungen sollten also vorwiegend die toxischen A β -Oligomere ansteuern und diese „neutralisieren“ können (Abbildung 3.7). Die ersten Hybridverbindungen sollen das Triethylglykol-Derivat (TEG) als Spacer enthalten. Dieser soll vor allem die Wasserlöslichkeit der hydrophoben Aminopyrazol-Einheit erhöhen und dem Hybridmolekül eine gewisse Flexibilität verleihen.

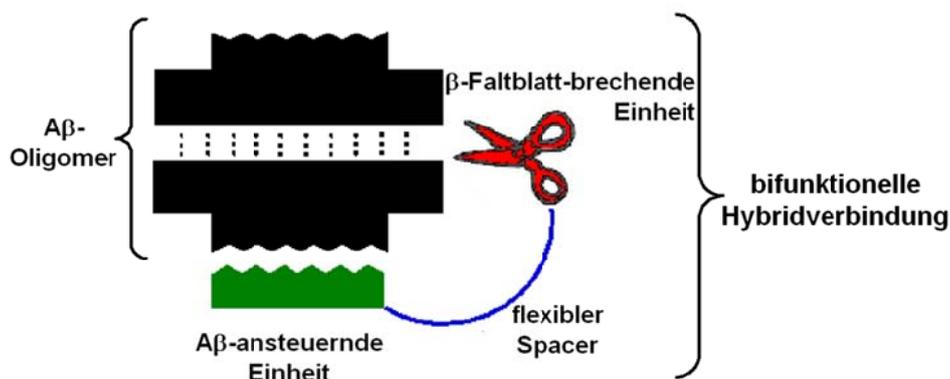


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Bifunktionalität von Trimer-D3-Hybridverbindungen.

3.2.1 Syntheseveruche unter Verwendung eines NHS-Aktivesters

Um D-Peptide sowie Antikörperfragmente über den TEG-Spacer an den trimeren Aminopyrazol-Liganden zu binden, sollte zunächst der Trimer-TEG-Aktivester **18** synthetisiert werden. *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) der Carbonsäuren werden oft als Acylierungsmittel für aliphatische Aminogruppen, vor allem bei Biomolekülen eingesetzt. Diese Aktivester finden ihre Verwendung vor allem bei der Modifizierung der Proteine (meistens an Lysinresten) und beim Immobilisieren diverser Verbindungen an Oberflächen. Durch Aminolyse der Ester kommt es unter schonenden Bedingungen zum Aufbau stabiler Amidbindungen.^[176-178]

Zur Herstellung des Trimer-TEG-Aktivesters **18** wurde zunächst die Trimer-Säure **27** in einer Kupplungsreaktion mit dem Amino-TEG-Linker **28** umgesetzt (Abbildung 3.8).

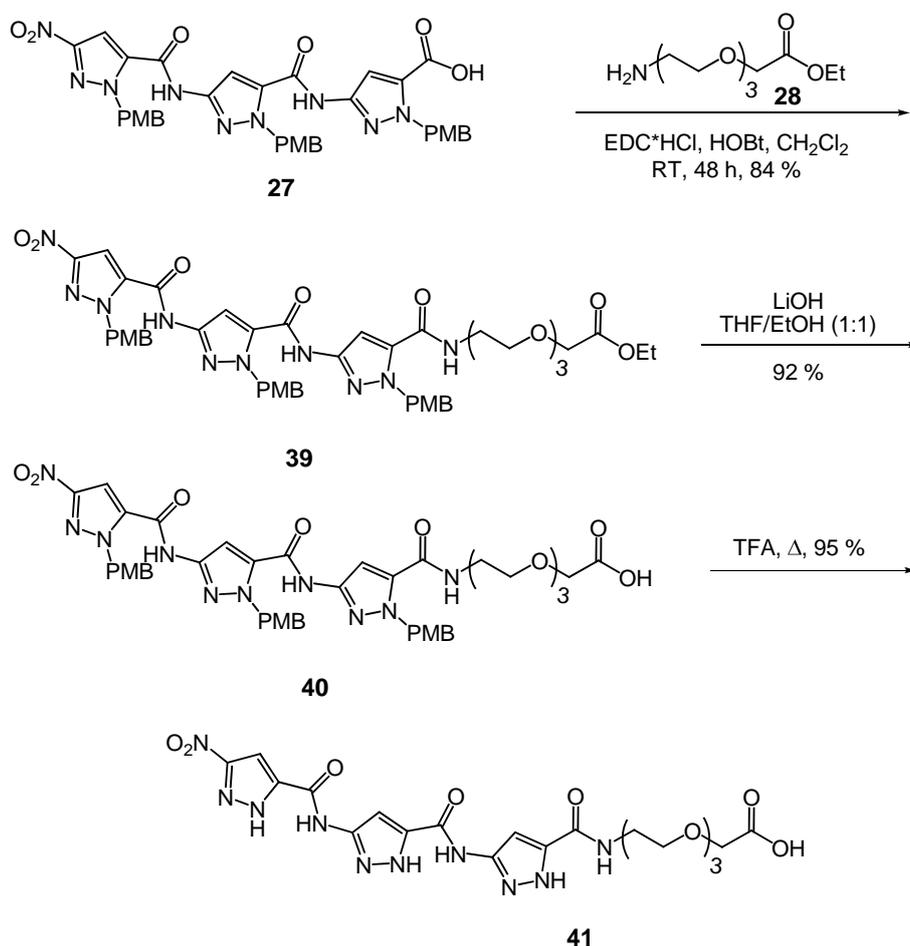


Abbildung 3.8: Syntheschema der Trimer-TEG-Säure (Trim-TEG-OH) **41**.

Die Reaktion erfolgte in einer guten Ausbeute mit EDC·HCl unter Zusatz von HOBt in Dichlormethan. Zuvor wurden Kupplungsversuche mit dem Hydrochlorid des Amins **28** in

Gegenwart von *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 4-(Dimethylamino)-Pyridin (DMAP) sowie dem Mukaiyama-Reagenz und DIEA durchgeführt, die allerdings entweder gar nicht oder nur in schlechten Ausbeuten zum gewünschten Produkt **39** führten. Nach der säulenchromatographischen Reinigung wurde die Verbindung **39** einer basischen Esterhydrolyse mit Lithiumhydroxid ausgesetzt. Die finale saure Entschützung mit Trifluoressigsäure (TFA) lieferte die PMB-freie Trimer-TEG-Säure **41**.

Die Trimer-TEG-Säure **41** sollte anschließend aktiviert werden. Die Herstellung der NHS-Aktivester erfolgt in der Regel durch Reaktion einer Säure mit *N*-Hydroxysuccinimid unter Zuhilfenahme von Carbodiimiden.^[179-183] In der nachfolgenden Reaktion wurde die zu aktivierende Säure **41** mit *N*-Hydroxysuccinimid und EDC*HCl in DMF zum Trimer-TEG-NHS-Ester **18** umgesetzt (Abbildung 3.9).^[184] Die Isolierung des Aktivesters **18** vom Edukt **41** gelang nicht. Allerdings beeinträchtigte dies nicht die Weiterverwendung des Aktivesters **18**, da die Anwesenheit des Edukts die nachfolgende Reaktion mit primären Aminen nicht stören sollte.

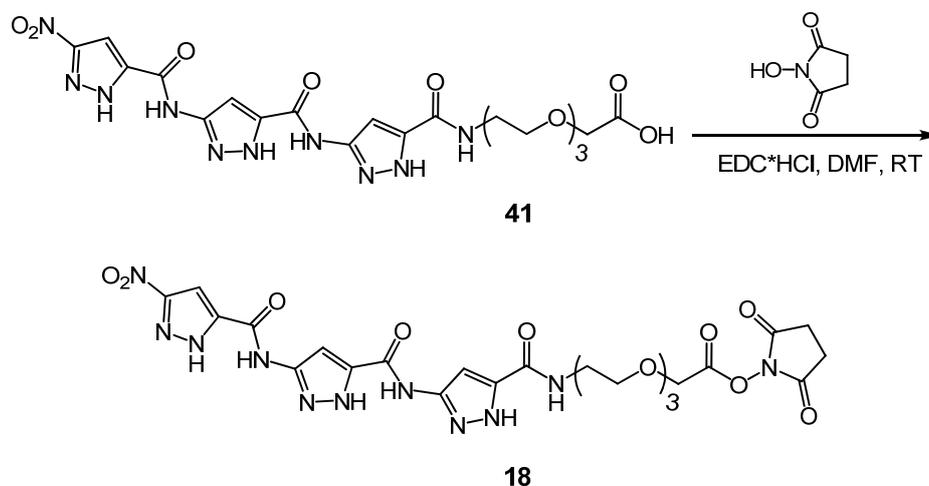


Abbildung 3.9: Synthese des Trimer-TEG-NHS-Aktivesters **18**.

Parallel dazu wurde eine weitere Strategie zur Herstellung des Aktivesters **18** verfolgt. Dabei sollte die noch PMB-geschützte Säure **40** aktiviert, säulenchromatographisch gereinigt und erst dann von den Schutzgruppen befreit werden. Der Vorteil dieser Strategie besteht vor allem darin, den Aktivester durch säulenchromatographische Trennung in reiner Form zu erhalten. Im letzten Arbeitsschritt muss der Aktivester allerdings zur Abspaltung der PMB-Gruppen mehrere Stunden mit heißer TFA behandelt werden. Da auch nach einer umfangreichen Literaturrecherche nicht geklärt werden konnte, ob die Aktivester solchen

drastischen Bedingungen standhalten können, wurde eine Testreaktion mit einer Modellverbindung durchgeführt. Hierzu wurde die Kapronsäure (**42**) mit NHS aktiviert, isoliert und den Bedingungen einer PMB-Entschützungsreaktion ausgesetzt (Abbildung 3.10). Dabei wurde festgestellt, dass zu etwa 50 % eine Umwandlung des Aktivesters **43** in die freie Säure **42** stattfand.

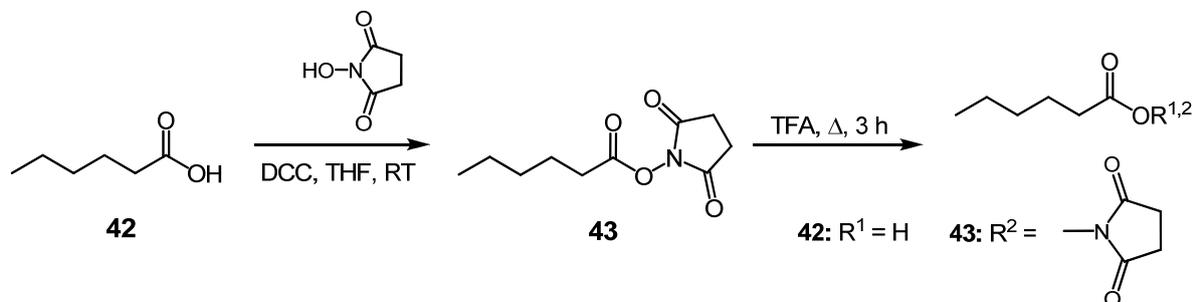


Abbildung 3.10: Herstellung des Aktivesters **43** und anschließende Behandlung mit TFA.

Zur gleichen Zeit wurde herausgefunden, dass durch den Einbau des TEG-Linkers und NHS-Esters nicht die gewünschte Wasserlöslichkeit erzielt werden konnte. Der NHS-Aktivester **18** war nur in DMSO und DMF gut löslich. Vor allem für die Verknüpfung mit dem scFv-Antikörperfragment muss aber der Aktivester **18** wasserlöslich sein, da ein Zusatz von organischen Lösungsmitteln zur Denaturierung des Proteins führen würde. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit wird oft polares, löslichkeitsförderndes *N*-Hydroxysulfosuccinimid anstelle des unpolaren *N*-Hydroxysuccinimids eingesetzt.^[185-187] Anknüpfend an diese in der Literatur verbreitete Verfahrensweise wurde die Trimer-TEG-Säure **41** mit *N*-Hydroxysulfosuccinimid und EDC*HCl in DMF gemäß der Abbildung 3.11 umgesetzt.

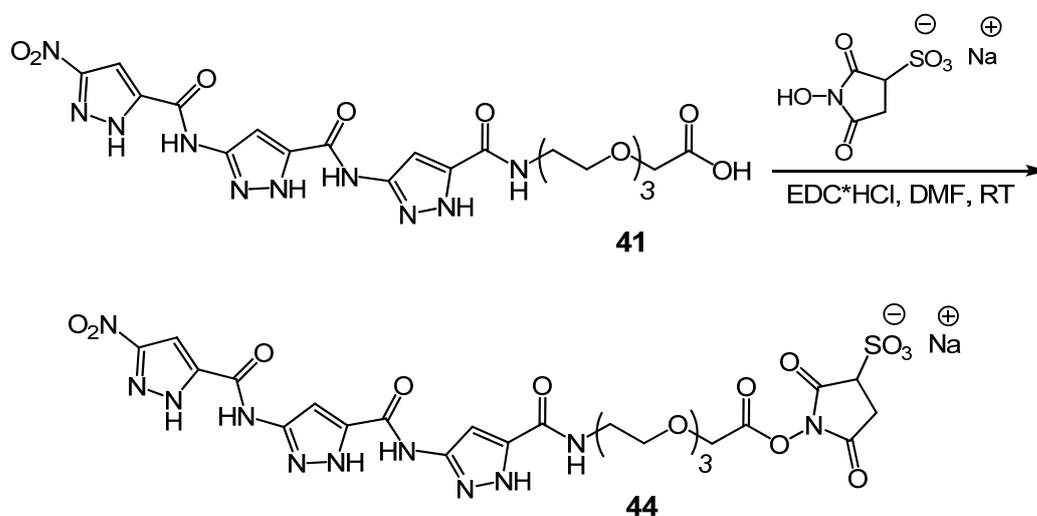


Abbildung 3.11: Synthese des Trimer-TEG-Sulfo-NHS-Aktivesters **44**.

Untersuchungen des Reaktionsgemisches mittels Massenspektrometrie (ESI-TOF) ergaben, dass der gewünschte Sulfo-NHS-Aktivester **44** gebildet wurde, aber aufgrund seiner Wasserlöslichkeit nicht isoliert werden konnte. Zudem stellte sich heraus, dass das Produkt **44** instabil ist und sich nach einer Behandlung mit Wasser langsam wieder zersetzt.

Modifizierungen und Konjugationsreaktionen, z. B. von Proteinen über NHS-Aktivester, sind sehr verbreitet. Die NHS- bzw. Sulfo-NHS-Aktivester werden jedoch in der Regel *in situ* hergestellt und direkt mit der zu modifizierenden Komponente umgesetzt.^[188] Solche Reaktionen werden meistens in wässrigem Milieu unter nativen Bedingungen durchgeführt, um eine Denaturierung von Proteinen zu vermeiden. Diese gängige Methode setzt die Wasserlöslichkeit der Substanzen voraus. Da aber die Trimer-TEG-Säure **41** nicht wasserlöslich ist, kann diese Strategie zur Herstellung der Hybridverbindungen, bestehend aus dem Trimer **16** und dem Antikörperfragment, nicht angewendet werden. Eine *in situ* Herstellung des Aktivesters ist nur in organischen Lösungsmitteln wie DMF oder DMSO möglich. Unter diesen Reaktionsbedingungen sollte eine Kupplung der Trimer-TEG-Säure **41** mit D1- und D3-Peptid, die keine strukturelle Änderung durch Einwirkung von organischen Lösungsmitteln erfahren, möglich sein.

Diese Reaktion sollte zunächst mit einer einfachen und kleineren Aminoverbindung anstelle von D-Peptiden erprobt werden. Hierzu wurde die Säure **41** zunächst mit NHS und EDC*HCl voraktiviert und nachfolgend ohne Isolierung mit Dodecylamin umgesetzt (Abbildung 3.12).

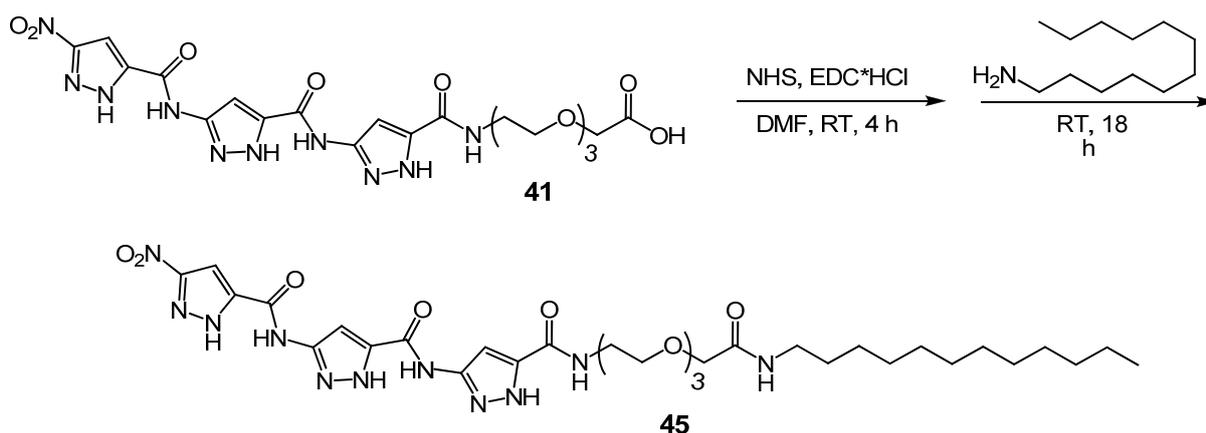


Abbildung 3.12: Synthese des Trimer-TEG-Dodecan (Trim-TEG-DD) **45** über einen NHS-Ester.

Das gewünschte Produkt, Trimer-TEG-DD **45**, konnte ohne weitere Reinigung isoliert und massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Die Verbindung **45** wurde auch auf einem anderen Weg, der im Kapitel 3.4.2 beschrieben wird, hergestellt. Der Vergleich der NMR-

Spektren zeigte, dass das über den NHS-Aktivester erhaltene Kupplungsprodukt eine geringere Reinheit aufwies und möglicherweise noch Kupplungsreagenzien enthielt. Auch die Abtrennung von dem wahrscheinlich noch enthaltenen Edukt, Trimer-TEG-Säure **41**, war ohne Reinigung nicht möglich. Prinzipiell zeigte diese Reaktion, dass über *in situ* Aktivesterherstellung weitere Gruppen bzw. Verbindungen am Trimer-Grundgerüst gebunden werden können, man aber anschließend eine Reinigung z. B. mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchführen sollte. Da das eingesetzte Dodecylamin nur eine aliphatische und damit reaktionsfähige Aminogruppe besitzt, sind in diesem Fall Nebenreaktionen ausgeschlossen. Enthält aber eine Verbindung, z. B. ein Peptid, mehrere Amino- bzw. Guanidinogruppen, können auch diese Reaktionen mit dem Aktivester eingehen. Aufgrund unterschiedlicher pK_a -Werte von α -NH₂ am N-Terminus, ϵ -NH₂ von Lysin und -NHCNHNH₂ von Arginin kann die Selektivität z. B. für die Aminogruppe am N-Terminus mittels Einstellung des pH-Wertes stark erhöht werden. Wenn man die Reaktion bei pH 8 durchführt, ist über die Hälfte der α -NH₂-Gruppen deprotoniert und dadurch für nucleophile Substitutionen aktiv, während die Aminogruppen von Lysin und die Guanidinogruppen von Arginin noch weitgehend protoniert und dadurch unreaktiv sind. In Wirklichkeit erhält man aber unter diesen Bedingungen meistens ein Gemisch aus mehreren Produkten. Dieses Resultat ist auch im Fall der Kupplung mit dem Antikörperfragment zu erwarten. Die D-Peptide enthalten kein Lysin, was die Zahl der Nebenreaktionen reduzieren sollte. Einige Nebenreaktionen können jedoch vermutlich nicht ausgeschlossen werden, da in D-Peptiden jeweils mehrere Arginine vorhanden sind. Eine Aufreinigung des gewünschten Kupplungsproduktes wäre sehr aufwendig oder überhaupt nicht möglich.

3.2.2 Molekulares Modelling von Hybridverbindungen (AK Sticht)

Parallel zu den ersten Syntheseversuchen sollten Komplexe zwischen dem A β -Peptid und den konzipierten Hybridverbindungen berechnet werden. Nach bisherigem Wissensstand ist allerdings der genaue Bindungsort der D1- **7** und D3-Peptide **8** am A β -Peptid oder seinen Aggregaten unbekannt. Das D3-Peptid **8** verfügt über fünf Arginine und zwei Histidine, die sich an jeder zweiten Position der Peptidsequenz befinden. Diese Aminosäuren können theoretisch durch elektrostatische Wechselwirkungen an saure Gruppen des A β -Peptids binden. Die Protofibrille nach *Lührs et al.* besitzt mehrere auf der Außenseite angeordnete Carboxylat-Reste, die sogenannte Glutamatleiter.^[67] Sie wird von den Glutamaten an Position 22 (E22) der benachbarten A β -Stränge gebildet. Diese Carboxylat-Gruppen sind frei

zugänglich und bieten sich deshalb hervorragend zur Bindung der Guanidino- und Aminogruppen des D3-Peptids **8** an. Als bevorzugte Bindungsstelle für das Trimer **16**, die zweite Komponente der Hybridverbindungen, gilt die KLVFF-Sequenz im A β -Peptid. Wie im Kapitel 2 bereits erläutert wurde, stabilisieren vor allem die aromatischen Phenylalanin-Reste über die π - π -Stapelwechselwirkungen den Komplex, in dem das Trimer **16** über Wasserstoffbrückenbindungen an das Peptidrückgrat gebunden ist (Abbildung 2.1). Nachdem für beide Komponenten ein potentieller Bindungsort festgelegt war, konnten die Moleküldynamik-Rechnungen von Trimer-TEG-D3, der ersten Hybridverbindung, im *AK Sticht* (Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg) durchgeführt werden. Dazu diente als Ausgangsstruktur die pentamere A β -Protofibrille aus NMR-spektroskopischen Daten nach *Lühns et al.* mit dem PDB-Code 2BEG.^[67] Diese Struktur wurde um vier A β -Peptidketten verlängert, damit alle Arginin- und Histidin-Reste des ausgedehnten D3-Peptids Wechselwirkungen zur Glutamatleiter eingehen können. Um komplementäre β -Stränge innerhalb eines „U“-förmigen Moleküls zu erhalten, wurde jede einzelne Peptidkette des Nonamers zudem um Glutamin 15 und Lysin 16 verlängert. Der *N*-Terminus wurde mit einer Acetylgruppe versehen, wogegen der *C*-Terminus ionisch blieb. An diese konstruierte nonamere A β -Protofibrille wurden dann beide A β -Binder, die zunächst nicht miteinander verbunden waren, simultan angedockt.

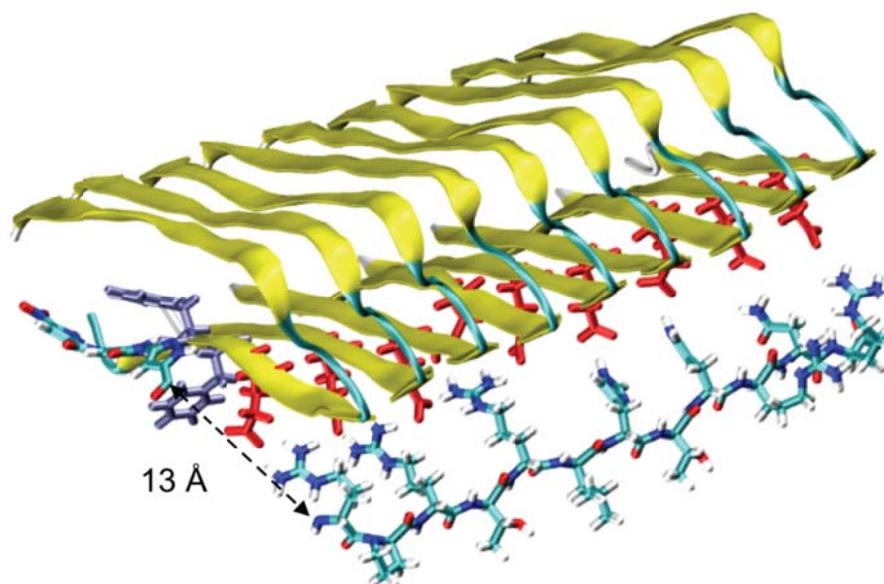


Abbildung 3.13: Modell eines Komplexes bestehend aus A β -Nonamer, Trimer **16** und D3 **8**. Die β -Stränge des nonameren A β -Bändermodells sind in gelb dargestellt, wobei die Glutamat 22-Reste in rot und stäbchenförmig angedeutet sind.

In der erhaltenen Komplexstruktur (Abbildung 3.13) liegt das D3-Peptid mit einer maximalen Anzahl der Bindungen zur Glutamatleiter vor, während sich das Trimer **16** in der „Phenylalanintasche“ des terminalen β -Stranges befindet. Der zwischen den beiden Liganden gemessene Abstand in diesem Bindungsmodus beträgt 13 Å und entspricht damit beinahe exakt der Länge des TEG-Spacers. Demgemäß sollte sich der TEG-Spacer sehr gut als Bindeglied und Abstandhalter zwischen den $A\beta$ -ansteuernden (D3 **8**) und β -Faltblatt brechenden (Trimer **16**) Einheiten eignen. Sollten die beiden Einzelverbindungen tatsächlich bevorzugt an die postulierten $A\beta$ -Bereiche binden, so ist die Wahl einer geeigneten räumlichen Entfernung für die konzertierte und kooperative Wechselwirkung dieser Komponenten von entscheidender Bedeutung. Um zu überprüfen, ob die vororientierten Bestandteile auch über den TEG-Spacer kovalent verbunden stabile Wechselwirkungen mit dem $A\beta$ -Peptid ausbilden können, wurde der Komplex minimiert und für 10 ns den MD-Simulationen ausgesetzt. Wie aus der resultierenden Struktur in der Abbildung 3.14 zu erkennen ist, zeigt die Hybridverbindung danach immer noch simultane Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Glutamatleiter und dem Peptidrückgrat des terminalen β -Stranges.

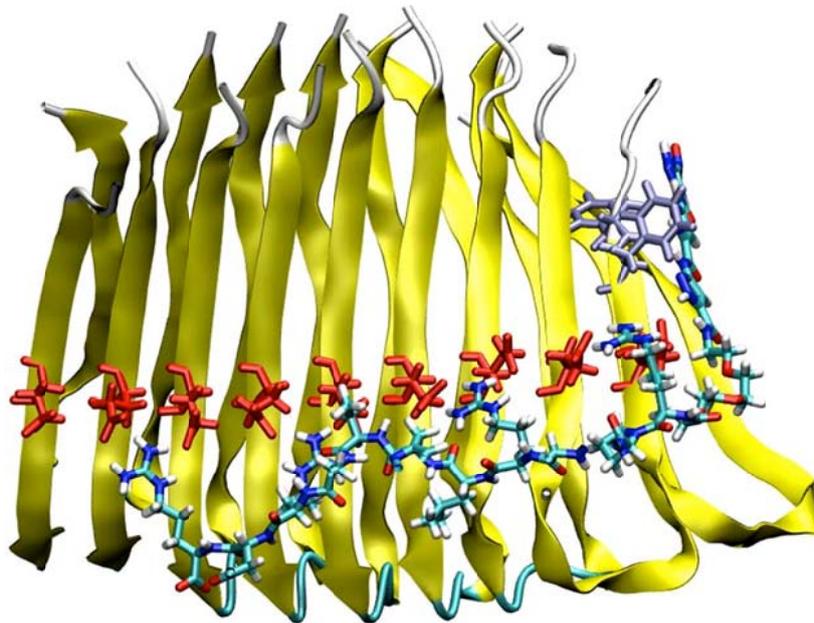


Abbildung 3.14: Präzisiertes Modell des $A\beta$ -Trimer-TEG-D3-Komplexes nach 10 ns MD-Simulation.

Im Laufe der molekularen Dynamik hat sich allerdings der Abstand zwischen den beiden Komponenten der Hybridverbindung im Vergleich zum Startkomplex (Abbildung 3.13) verkürzt. Daraus geht hervor, dass die Verwendung eines kürzeren Spacers anstelle von TEG vorteilhafter sein sollte. Dieser könnte zudem aufgrund eines geringeren Entropieverlustes nach der Bindung stabilere Wechselwirkungen zum $A\beta$ -Peptid eingehen. Der Einbau eines

noch längeren Spacers als TEG sollte sich dagegen aus Entropiegründen und gemäß den Ergebnissen der MD-Simulation negativ auf die Komplexstabilität auswirken. Bei einem vollständigen Verzicht auf einen Spacer (Null-Spacer) ist wiederum mit einer signifikanten Einschränkung in der Flexibilität, der Bindungsaffinität und somit auch in der Effektivität der Hybridverbindung zu rechnen. Welcher Spacer tatsächlich die optimale Länge besitzt, könnten jedoch erst die experimentellen Untersuchungen der verschiedenen Trimer-D3-Hybride zeigen. Aus diesem Grund sollten Hybridverbindungen mit allen Spacervariationen synthetisiert werden.

Da für das D1-Peptid **7** bisher kein denkbarer Bindungsort ermittelt werden konnte, waren auch keine Moleküldynamik-Rechnungen bzw. Minimierungen mit D1-enthaltenden Hybridverbindungen möglich. Trotzdem sollten alle überlegten Spacerlängen für Trimer-D3-Verbindungen auch auf Trimer-D1-Hybride übertragen werden.

3.2.3 Synthese von Hybridverbindungen an der festen Phase

Aufgrund der nicht ausreichenden Selektivität der NHS-Ester hinsichtlich der D-Peptide, die eine aufwendige Reinigung zur Folge hätte, wurde eine neue Strategie verfolgt. Die D-Peptide sollten zunächst unter Verwendung der Festphasen-Peptid-Synthese hergestellt und im letzten Schritt mit einer PMB-geschützten Trimer-Spacer-Säure, z. B. mit Trimer-TEG-OH **40**, gekuppelt werden. Da die Festphasen-Synthese in der Regel in DMF als Lösungsmittel durchgeführt wird, ist für diese Strategie keine Wasserlöslichkeit der Säure **40** erforderlich. Zudem können in diesem Fall alle Nebenreaktionen ausgeschlossen werden, weil die Kupplungsreaktion nur an einem freien Aminoterminus des am Trägermaterial gebundenen und an den Seitenketten geschützten Peptids erfolgen kann.

3.2.3.1 Synthese der D1- und D3-Peptide

Im ersten Schritt dieser Strategie mussten D1- und D3-Peptide mittels Festphasen-Peptid-Synthese (SPPS) hergestellt werden. Zu Testzwecken wurde vorerst das L-Isomer des D3-Peptids manuell an der festen Phase dargestellt. Bei der Herstellung nach der Fmoc-Strategie kam das Wang-Harz mit vorinstalliertem Fmoc-Arginin(Pbf) als polymerer Träger zum Einsatz. Die Kupplung der kommerziell erhältlichen Fmoc-Aminosäuren verlief unter Zuhilfenahme von HBTU als Kupplungsreagenz und Diisopropylethylamin (DIEA) als Base in DMF.^[189] Die Vollständigkeit der einzelnen Kupplungs- und Entschützungs-schritte wurde mit den Kaiser- und NF31-Tests sowie mit dem Bromphenolblau-Test für sekundäre Amine

kontrolliert.^[190, 191] Bei unvollständiger Kupplung musste diese wiederholt werden. Der Ablauf der Festphasen-Synthese von L3 ist dem nachfolgenden Reaktionsschema zu entnehmen. Nach elf Zyklen wurden zur Kontrolle, ob das gewünschte Dodecapeptid auf dem polymeren Träger immobilisiert vorlag, einige beladene und getrocknete Polymerkugeln für dreieinhalb Stunden mit einem „Cleavage-Cocktail“ aus Trifluoressigsäure (93 %), Triisopropylsilan (TIS, 5 %) und Wasser (2 %) behandelt. Die Lösung wurde filtriert, das Peptid aus kaltem Diethylether ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet. Eine Charakterisierung mittels Massenspektrometrie und HPLC ergab, dass das gewünschte Produkt in ausreichender Reinheit vorlag.

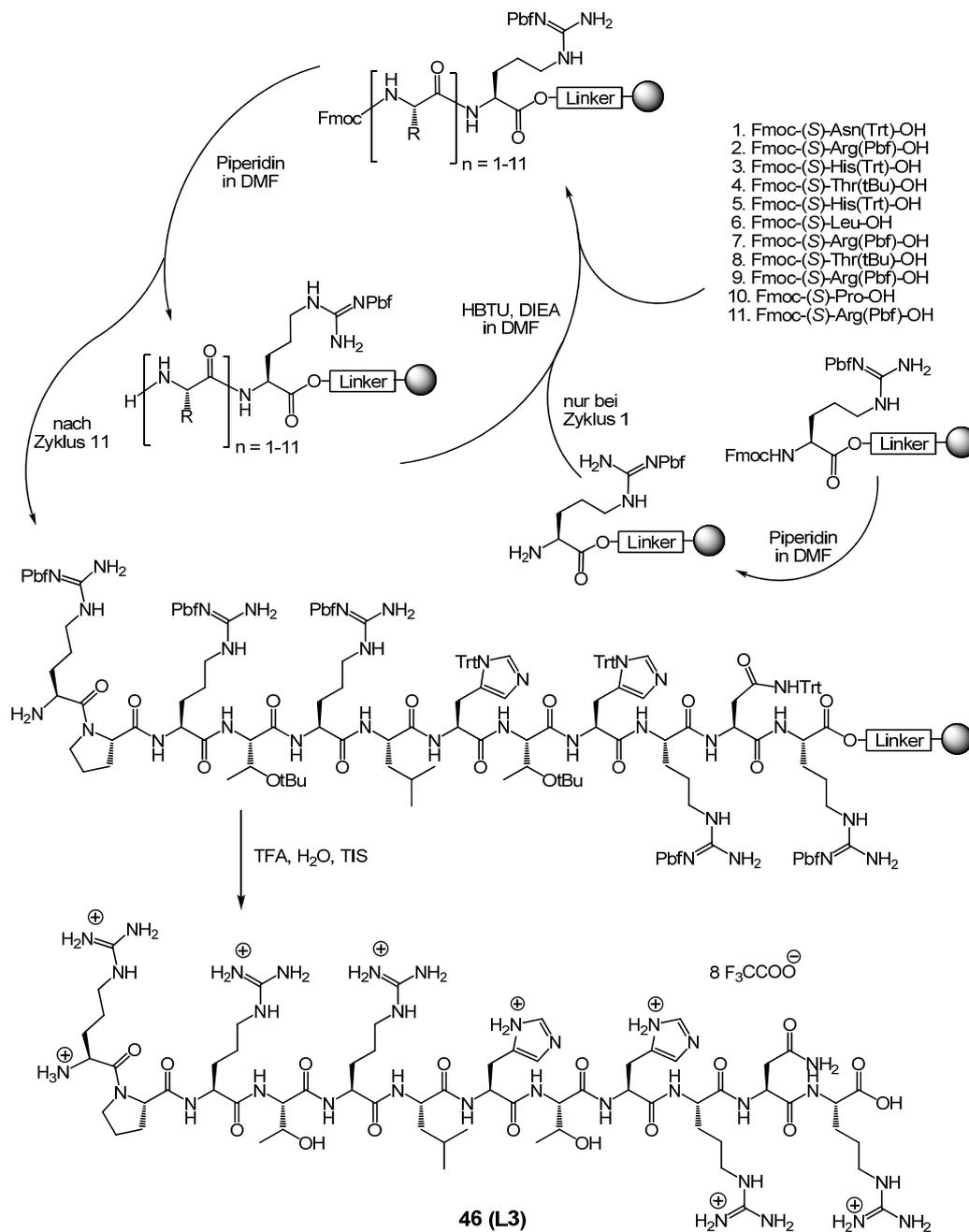


Abbildung 3.15: Syntheschema des L-Isomers von D3-Peptid 46.

Zur Herstellung der D1- und D3-Peptide **7** und **8** stand ein automatisierter Mikrowellen-Peptid-Synthesizer zur Verfügung. Auf die zeitaufwendige manuelle Synthese, die zur Darstellung des L-Isomers des D3-Peptids eingesetzt wurde, konnte nun verzichtet werden. Die Herstellung erfolgte ebenfalls unter Verwendung der standardmäßigen Fmoc-Strategie. Als polymerer Träger wurde Wang-Harz mit vorinstallierter Fmoc-geschützter Aminosäure, Fmoc-D-Valin bei D1 **7** und Fmoc-D-Arginin(Pbf) bei D3 **8** eingesetzt. Zur Aktivierung der Aminosäuren und anschließenden Kupplung wurden HCTU sowie Hünig-Base in *N*-Methylpyrrolidon (NMP) verwendet. Das Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen konnte, mit Piperidin in DMF erreicht werden. Zur Kontrolle, ob am Ende der Synthese tatsächlich die korrekte Sequenz in ausreichender Reinheit vorlag, wurde eine geringe Menge des Peptids analog zum L3-Peptid **46** vom polymeren Träger abgespalten. Die Peptide **7** und **8** konnten mit Massenspektrometrie und HPLC in hoher Reinheit nachgewiesen werden.

3.2.3.2 Synthese von PMB-geschützten Trimer-Spacer-Säuren

Um die Spacerlänge von Hybridverbindungen variieren zu können, sollten im ersten Schritt des Syntheseweges unterschiedlich lange Spacer an der PMB-geschützten Trimer-Säure **27** vorinstalliert werden. Diese Spacer müssen alle mit einer Säurefunktion enden, damit sie später am *N*-Terminus des jeweiligen D-Peptids angeknüpft werden können. Die PMB-geschützte Trimer-TEG-Säure **40**, die einen mittellangen Spacer, das Triethylenglykol-Derivat, enthält, stand aus der zuvor erprobten NHS-Ester-Strategie bereits zur Verfügung. Weiterhin wurden die γ -Aminobuttersäure (GABA) als kurzer Spacer und zwei hintereinander geschaltete TEG-Derivate als langer Spacer ausgewählt.

Zur Herstellung der Trimer-GABA-Säure **48** wurde der Methylester der γ -Aminobuttersäure zunächst in Gegenwart des Kupplungsreagenz PyBOP und der Base *N*-Methylmorpholin mit der Trimer-Säure **27** gekuppelt und anschließend mit Lithiumhydroxid einer basischen Esterhydrolyse ausgesetzt (Abbildung 3.16). Die erhaltene Trimer(PMB)-GABA-Säure **48** wurde später gemäß den Syntheseschemata 3.19 und 3.20 als Trimer(PMB)-Spacer-Säure zur Herstellung der Hybridverbindungen mit kurzem Spacer eingesetzt.

Um einen langen Spacer einzuführen wurde die PMB-geschützte Trimer-TEG-Säure **40** mit dem Amino-TEG-Linker **28** umgesetzt (Abbildung 3.17). Die Amidbildung fand in Gegenwart von EDC \cdot HCl und HOBT in Dichlormethan statt, worauf das nach einer säulenchromatographischen Trennung gereinigte Produkt, Trimer(PMB)-(TEG)₂-OEt **49**, einer basischen Esterhydrolyse mit Lithiumhydroxid ausgesetzt wurde. Das Endprodukt

Die Trimer-Säure **27** wurde insgesamt mit drei unterschiedlich langen Spacern versehen, die alle eine terminale Säurefunktion aufweisen. Die drei resultierenden Trimer(PMB)-Spacer-Säuren **40**, **48** und **50** sind in der Abbildung 3.18 dargestellt.

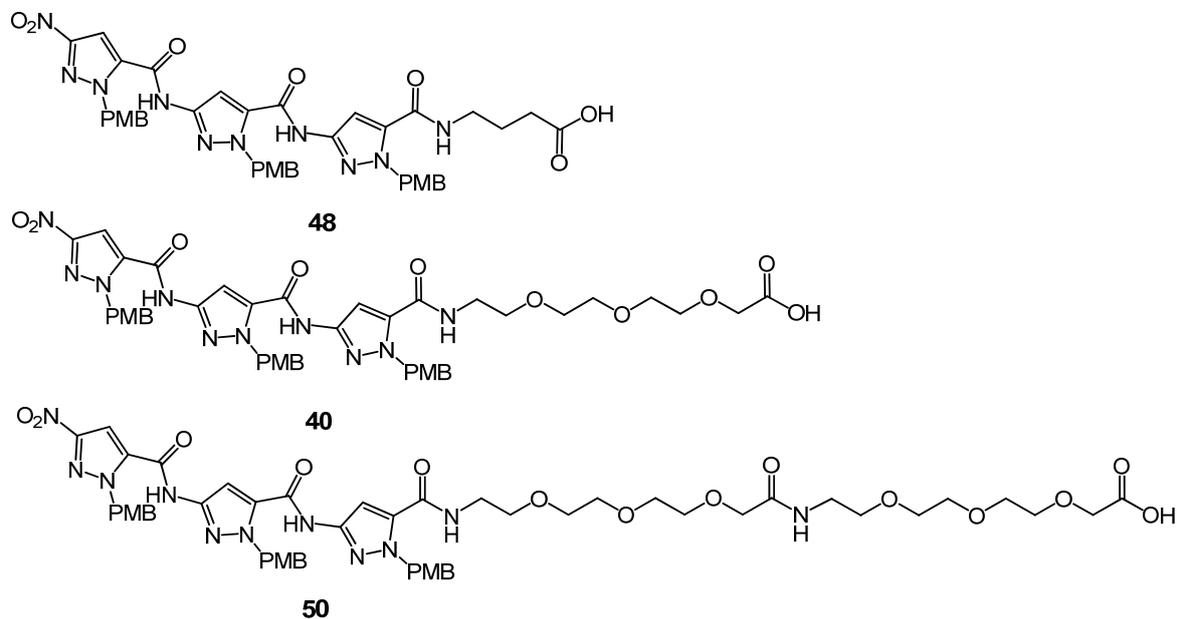


Abbildung 3.18: Übersicht der synthetisierten PMB-geschützten Trimer-Spacer-Säuren: Trimer-GABA-OH **48**, Trimer-TEG-OH **40** und Trimer-(TEG)₂-OH **50**.

3.2.3.3 Synthese von Hybridverbindungen

Im letzten Reaktionsschritt wurden die noch am Harz gebundenen und an den Seitenketten geschützten D1- und D3-Peptide jeweils mit allen hergestellten Trimer(PMB)-Spacer-Säuren **40**, **48**, **50** und das D3-Peptid außerdem noch mit der Trimer(PMB)-Säure **27** umgesetzt. Die Aktivierung und Kupplung dieser Säuren, die im zweifachen Überschuss eingesetzt wurden, erfolgte mit HCTU und DIEA in DMF. Zur Kontrolle des Kupplungsschrittes wurden Kaiser- und NF31-Tests verwendet. Im Fall, dass die Kupplungen nach 24 Stunden Reaktionszeit unvollständig waren, wurden die Reaktionslösungen einige Minuten lang in der Mikrowelle (siehe Kapitel 6.10) behandelt. Die Reaktionsschemata für Hybridverbindungen mit dem jeweiligen Peptid sind in den Abbildungen 3.19 und 3.20 aufgeführt. Die geschützten Hybridverbindungen wurden in einem „Cleavage-Cocktail“ vom Harz abgespalten. Hierbei wurden gleichzeitig die Peptid- und zum Teil auch die PMB-Schutzgruppen entfernt. Nach Behandlung mit Trifluoressigsäure bei 70 °C konnten die Hybridverbindungen vollständig entschützt werden.

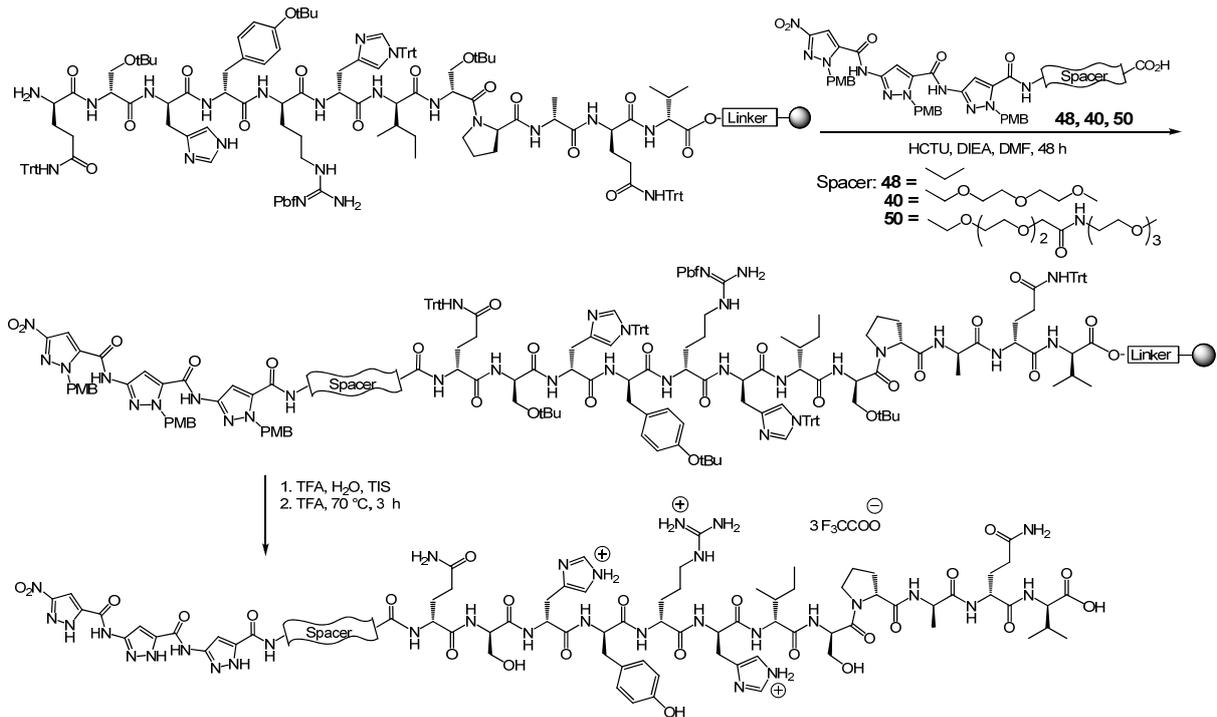


Abbildung 3.19: Konvergentes Syntheschema der Trimer-Spacer-D1-Hybride. Das immobilisierte und geschützte D1-Peptid wurde mit den Trimer-Spacer-Säuren **48**, **40** und **50** umgesetzt.

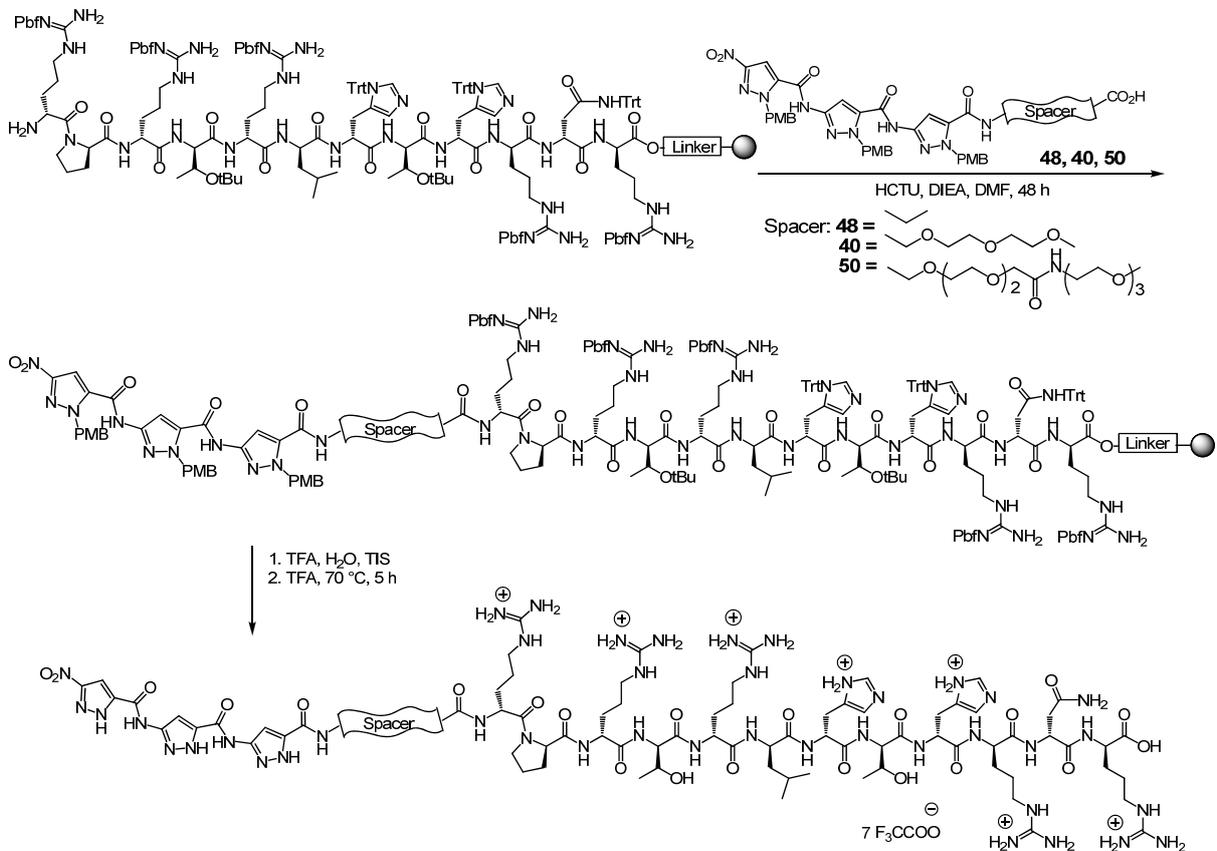


Abbildung 3.20: Konvergentes Syntheschema der Trimer-Spacer-D3-Hybride. Das immobilisierte und geschützte D3-Peptid wurde sowohl mit der Trimer(PMB)-Säure **27** als auch mit den Trimer-Spacer-Säuren **48**, **40**, **50** umgesetzt.

Da bei diesen Kupplungsreaktionen nie eine 100 %ige Kupplung erreicht werden konnte, mussten die Edukte, d.h. die nicht umgesetzten D-Peptide, abgetrennt werden. Dies gelang durch fraktionierendes Ausfällen. Hierbei wurden bei langsamer Zugabe des kalten Diethylethers zu noch in TFA gelösten Hybridverbindungen mehrere Feststoff-Fractionen erhalten. Wie sich herausstellte, fiel das Trimer-Peptid-Kupplungsprodukt immer zuerst aus und konnte auf diese Weise aufgereinigt werden. Die isolierten und anhand von HPLC und Massenspektrometrie analysierten Hybridverbindungen lagen alle in ausreichender Reinheit vor, so dass auf eine präparative HPLC-Reinigung verzichtet werden konnte.

Der Einbau des kurzen Spacers wurde zuvor auf einem linearen Syntheseweg erprobt. Im Gegensatz zur oben erläuterten zum Teil konvergenten Synthesestrategie erfolgte in diesem Fall zunächst die Anknüpfung der Fmoc-GABA-Säure **32** an die noch am polymeren Träger gebundenen und geschützten D1- und D3-Peptide. Nach der anschließenden Fmoc-Entschützung wurde die Kupplungsreaktion der Trimer-Säure **27** ausgeführt (Abbildung 3.21). Die Analyse der entschützten Verbindungen mit Massenspektrometrie und HPLC ergab, dass die Hybridverbindungen im Gemisch wahrscheinlich mit weiteren Zwischenprodukten vorliegen. Dies ist vermutlich auf unvollständige Kupplungsreaktionen der einzelnen Arbeitsschritte zurückzuführen. Auf eine präparative HPLC-Reinigung, die in diesem Fall mehrmals durchgeführt werden müsste und daher zu starken Ausbeuteverlusten geführt hätte, wurde verzichtet und eine konvergente Strategie, die bereits zuvor erläutert wurde, vorgezogen.

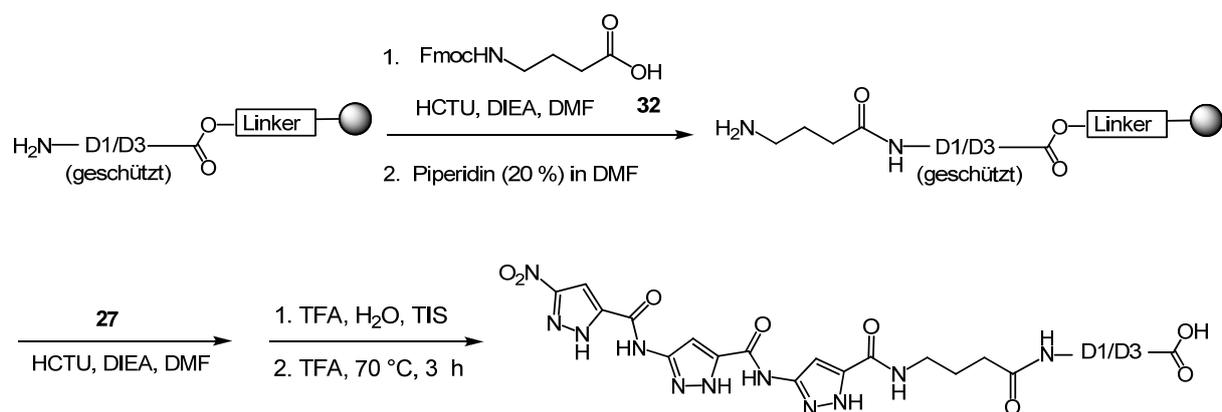


Abbildung 3.21: Lineare Synthese der Trimer-GABA-D1/D3-Peptide.

3.2.4 Überblick der neuen Hybridverbindungen

Es konnten insgesamt drei Trimer-D1- **51**, **52**, **53** und vier Trimer-D3-Hybridverbindungen **54**, **55**, **56**, **57**, deren Strukturen in Abbildungen 3.22 und 3.23 veranschaulicht sind, hergestellt werden. Zur Variation des Abstandes zwischen dem Trimer **16** und einem Peptid fanden ein kurzer (GABA), ein mittellanger (TEG) und ein langer (TEG-TEG) Spacer ihre Anwendung in der Synthese. Aufgrund mangelnder Selektivität der NHS-Ester musste von diesem Syntheseweg abgesehen werden, wonach schließlich die konvergente Festphasensynthese unter Verwendung von vorgefertigten Trimer-Spacer-Säuren **40**, **48**, **50** zum Erfolg führte. Die ersten Hinweise darauf, welche Abmessungen ein Spacer für die optimale simultane Bindung der beiden Hybridkomponenten an das A β -Peptid besitzen sollte, lieferten die MD-Simulationen. In biophysikalischen Untersuchungen wird diese Annahme später noch genauer untersucht.

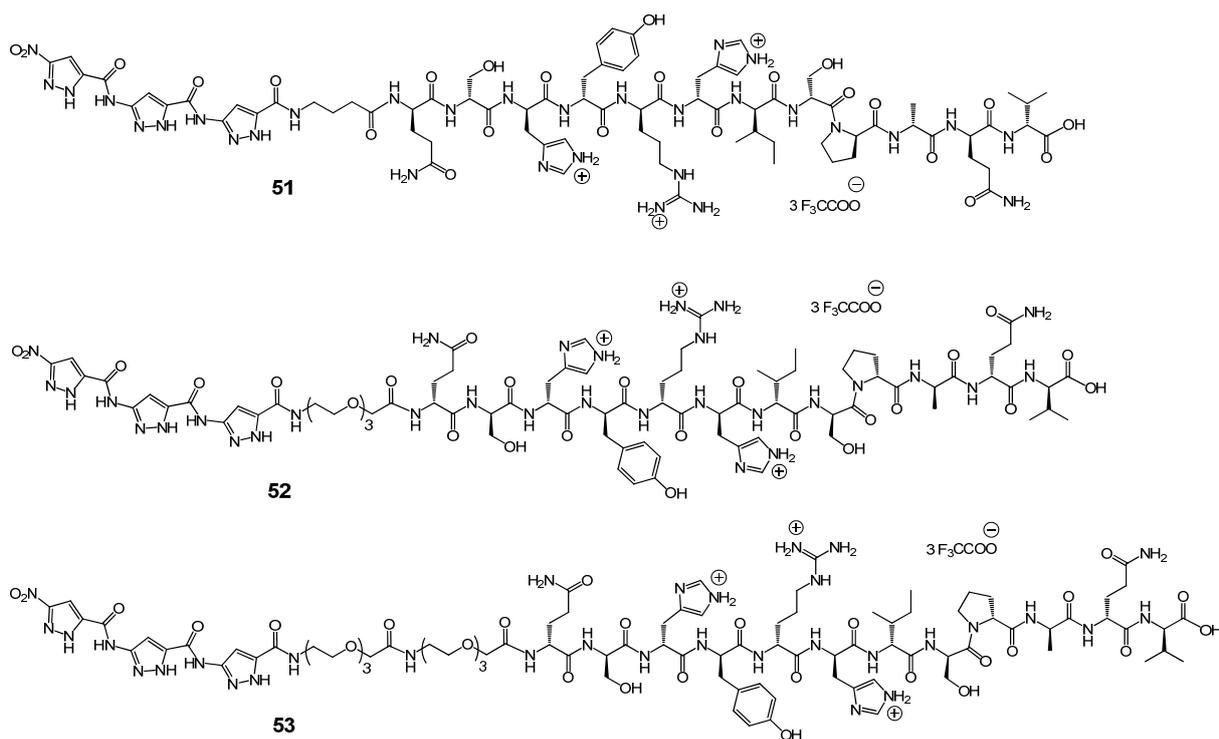


Abbildung 3.22: Übersicht der synthetisierten Trimer-D1-Hybridverbindungen **51-53**.

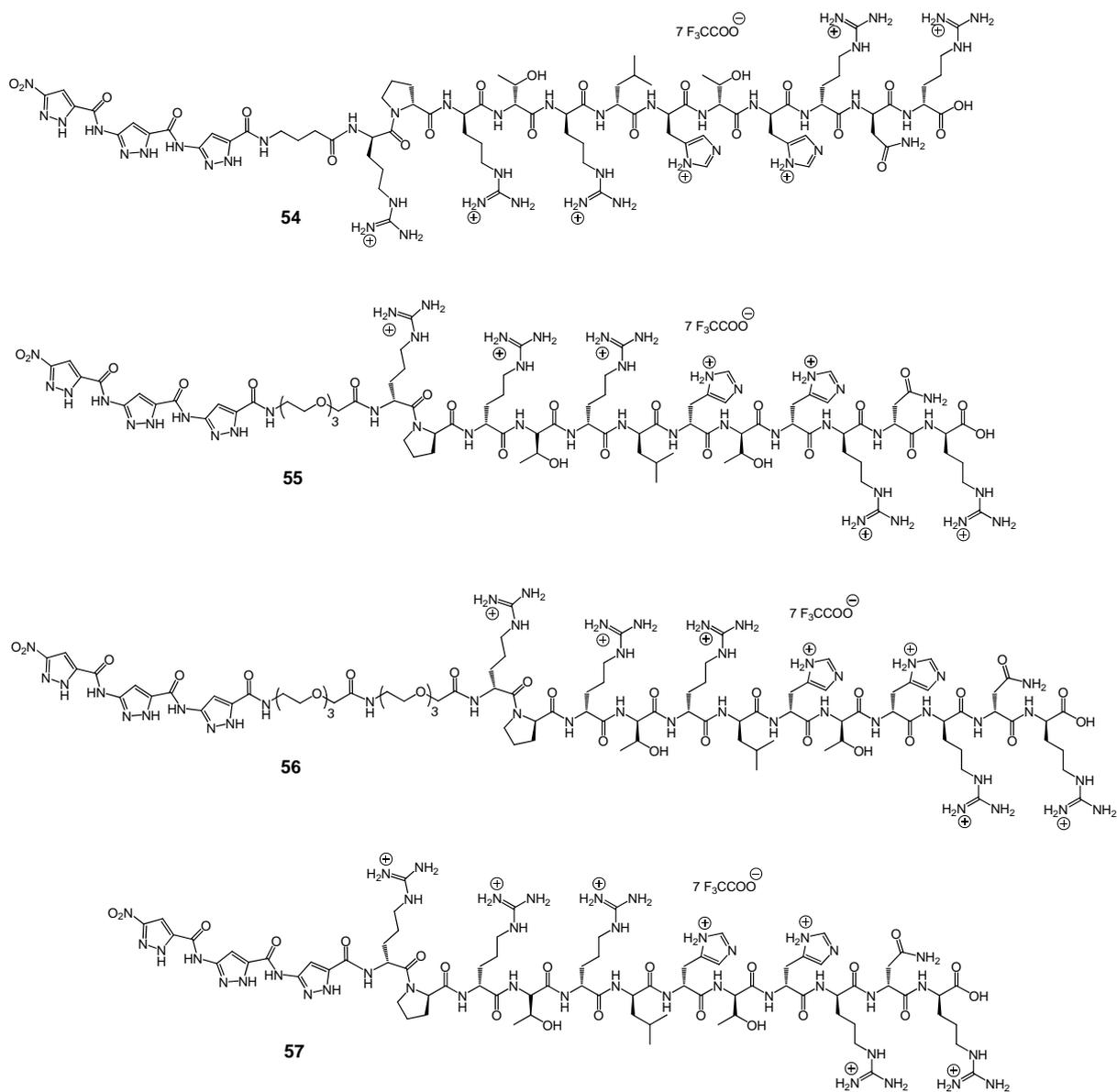


Abbildung 3.23: Übersicht der synthetisierten Trimer-D3-Hybridverbindungen 54-57.

3.3 Hybridverbindungen mit Antikörperfragmenten

In einem Kooperationsprojekt mit dem *AK Korth* (Heinrich Heine Universität Düsseldorf) sollte das Trimer **16** an den IC16-Antikörper oder an sein scFv-Fragment kovalent gebunden werden. Der monoklonale IC16-Antikörper bindet selektiv an die 1-16-Region des A β -Peptids und das sAPP α -Protein, das ebenfalls diesen Sequenzabschnitt enthält (siehe Kapitel 1.3). Eine kovalent verknüpfte Hybridverbindung sollte im Vergleich zu den Einzelkomponenten eine viel höhere Affinität und Spezifität zum A β -Peptid aufweisen und dadurch die Aggregation effektiver unterbinden können. Der durch die hohe Affinität des Antikörpers zum A β -Peptid hervorgerufene Wirkmechanismus dieser Hybridverbindung sieht erst die Bindung des Antikörperfragments vor, der die Komplexierung des an einem beweglichen Seitenarm positionierten Trimers **16** folgt.

Die Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind Y-förmige Proteine, die zwei Funktionen besitzen: Sie erkennen einerseits verschiedenste Antigene mit sehr hoher Spezifität und Affinität und lösen andererseits immunologische Effektormechanismen gegen das erkannte Antigen aus. Molekular gesehen ist das Y ein achsensymmetrisches Heterodimer bestehend aus zwei molekular identischen, schweren Ig-Ketten und zwei identischen, leichten Ig-Ketten (Abbildung 3.24). Disulfidbrücken verknüpfen jeweils eine leichte mit einer schweren Kette und verbinden auch die beiden schweren Ketten kovalent miteinander. Zwischen der ersten und zweiten konstanten Region der schweren Kette befindet sich die Gelenkregion, welche die sogenannte Fab- und Fc-Fragmente verbindet. Hypervariable Domänen der leichten und schweren Kette bilden gemeinsam die Antigenbindungsstellen, von denen der Antikörper zwei identische besitzt. Die Fc-Fragmente vermitteln dagegen die biologischen Effektorfunktionen.^[192]

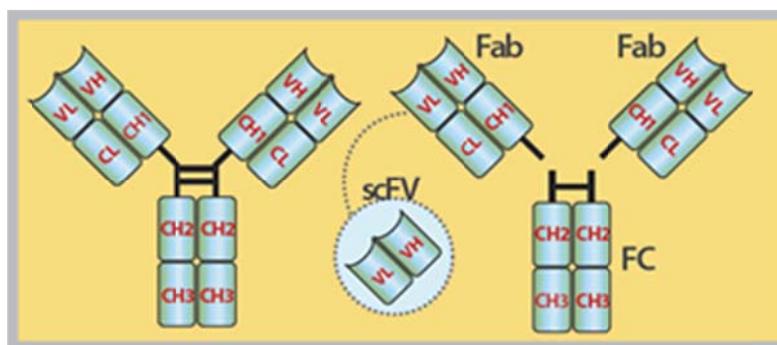


Abbildung 3.24: Struktur eines Antikörpers. **C:** Konstante Domäne; **Fab:** fragment of antigen binding; **Fc:** constant fragment; **H:** schwere Ig-Kette (unterteilt in Abschnitte 1-3); **L:** leichte Ig-Kette; **V:** variable Domäne; **scFv:** single chain variable fragment.

scFv-Antikörper (engl. single chain variable fragment) sind künstlich hergestellte Antikörperfragmente, die die Antigen-erkennenden variablen Domänen der leichten und der schweren Kette kovalent verbinden. scFv-Fragmente besitzen keine an die Fc-Einheit geknüpfte und über eine Aktivierung des Komplementsystems vermittelte Zytotoxizität. Die Selektivität und Affinität eines normalen Antikörpers bleiben jedoch erhalten.^[152]

Die erste Überlegung zur Herstellung des scFv-Trimer-Konjugates über einen NHS-Ester war aufgrund der Unlöslichkeit und Instabilität der synthetisierten Aktivester nicht realisierbar. Zudem hätte ein NHS-Aktivester keine Selektivität für ein bestimmtes an der Oberfläche des Peptids lokalisiertes Lysin und könnte auch an eine für die A β -Erkennung wichtige Region binden und diese damit blockieren.

Folglich wurde eine neue Strategie zum Kombinieren der beiden Elemente überlegt. Das IC16-scFv-Fragment enthält wie in der Regel alle rekombinanten Proteine ein C-terminales His-Tag, das eine Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglicht. Bei dem Reinigungsschritt bindet sich das aus sechs Histidinen zusammensetzende Peptid (6xHis-tag) an ein Säulenmaterial mit Nitrilotriessigsäure-Resten (engl. nitrilotriacetic acid, NTA). Dort liegen Ni²⁺-Ionen jeweils komplexiert durch ein NTA-„Köpfchen“ und zwei Wassermoleküle in oktaedrischen Komplexen vor. Die Ni²⁺-Ionen können mit zwei Histidin-Resten des Proteins im Austausch gegen Wasser interagieren, wobei ein stabiler oktaedrischer Komplex (Abbildung 3.25) gebildet wird. Dieser am scFv-Fragment vorhandene His-Tag sollte nun auch für die Herstellung der Antikörper-Trimer-Hybridverbindung gemäß der Abbildung 3.25 genutzt werden.

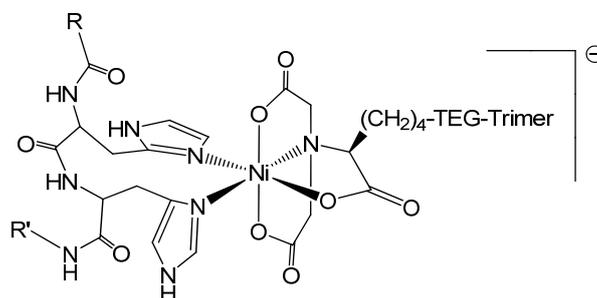


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung eines oktaedrischen $[\text{Ni}(\text{Trimer-TEG-NTA})\text{His}_2]$ -Komplexes.

Diese Idee weiterverfolgend wurde das Trimer-Grundgerüst mit einem NTA-Rest unter Verwendung des TEG-Spacers als Abstandhalter modifiziert (Abbildung 3.26). Ausgehend von $\text{H}_2\text{N}-(S)\text{-Lys}(Z)\text{-OMe}$ (**58**) wurde mittels Bis-Alkylierung unter Verwendung von Methylbromacetat als Alkylierungsmittel in Gegenwart von Kaliumcarbonat der Triester **59** synthetisiert. Anschließende Hydrogenolyse mit Palladium auf Aktivkohle führte zum freien Amin **60**.^[193] Diese Verbindung konnte nur massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Das aufgenommene $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wies sehr breite Signale auf und konnte deshalb nicht ausgewertet werden. Möglicherweise kommt es während der Entschützung zu Polymerisationsreaktionen und Lactambildung, was die niedrige Ausbeute der nachfolgenden Kupplungsreaktion mit $Z\text{-TEG-OH}$ **29** in Gegenwart von HCTU als Kupplungsreagenz und Lutidin als Base erklären könnte. Der Amino-TEG-NTA-Triester **62** wurde nach der hydrogenolytischen Abspaltung der Z -Schutzgruppe isoliert und in einer Kupplungsreaktion mit der Trimer-Säure **27** weiter umgesetzt. Dabei wurde EDC \cdot HCl als Kupplungsreagenz unter Zusatz von HOBt als Additiv verwendet. Die isolierte und gereinigte Verbindung **63** wurde einer alkalischen Esterspaltung mit LiOH ausgesetzt und anschließend mit TFA von PMB-Schutzgruppen befreit. Die Trimer-TEG-NTA-Säure **65** konnte nachfolgend mit äquivalenter Menge einer 0.2 M NaOH-Lösung in das wasserlösliche Trinatriumsalz **66** überführt werden.

Nach der erfolgreichen Synthese von Trimer-TEG-NTA **66** wurde diese Verbindung für die Komplexierung verwendet. Der erste Komplexierungsversuch wurde allerdings nicht wie vorgesehen mit dem IC16-scFv-Fragment, sondern mit einem scFv-Fragment des W226-Antikörpers unternommen, welcher in größerer Menge zur Verfügung stand und ebenfalls ein His-Tag enthielt. Dieser monoklonale Immunglobulin-G-Antikörper entstammte der Zelllinie W226, die durch Immunisierung von *Knock-out*-Mäusen mit PrP^{Sc} entstand. Der aus den variablen Fragmenten klonierte Einzelstrang-Antikörper W226-scFv bindet sowohl an PrP^{C} , als auch an PrP^{Sc} , hat eine Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich und zeigt eine sehr hohe Antiprion-Aktivität.^[194]

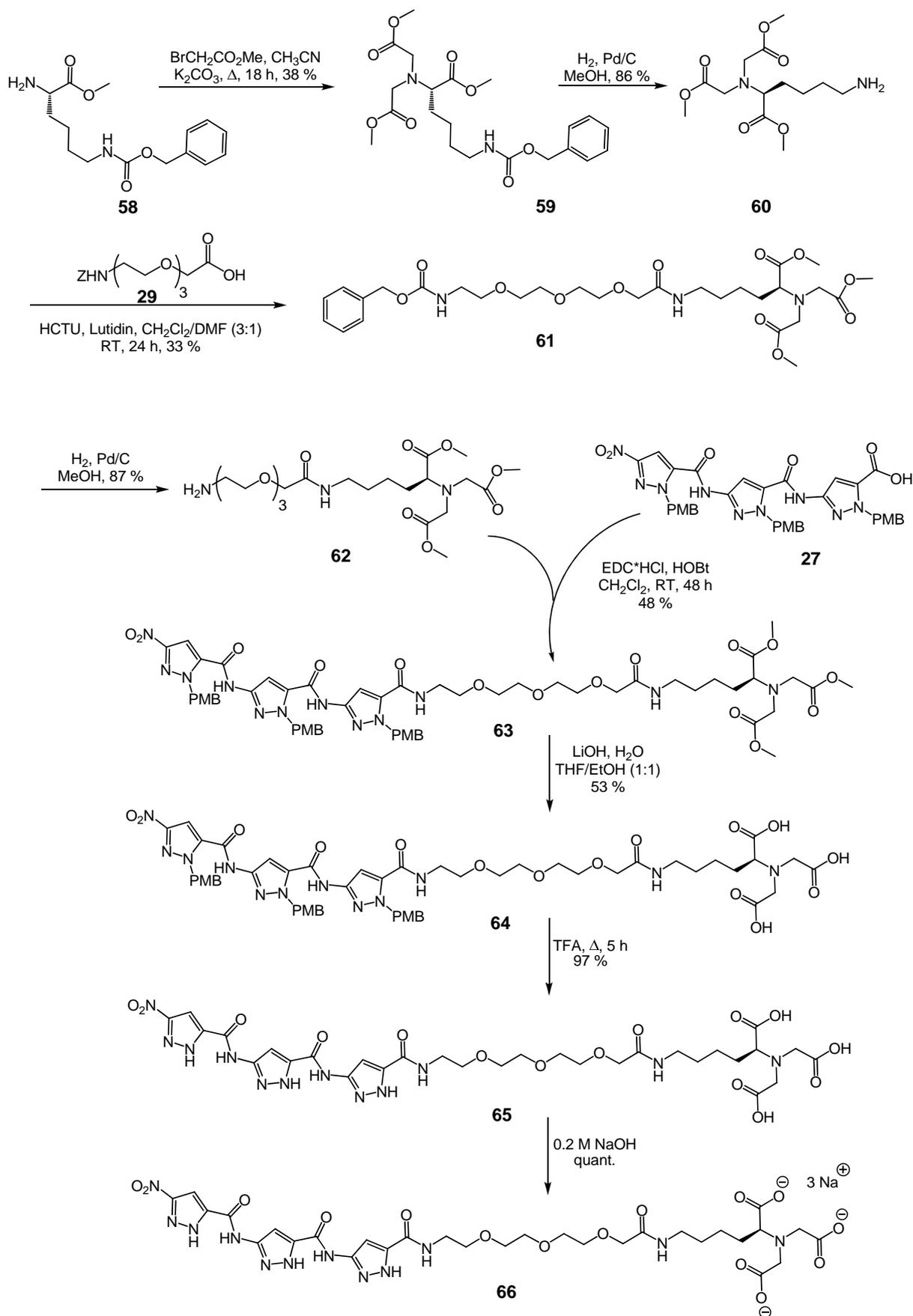


Abbildung 3.26: Syntheschema von Trimer-TEG-NTA 66.

3.3.1 Prionerkrankungen

Aufgrund der zusätzlichen Anwendung der Hybridverbindungen gegen das Prion-Protein werden die entsprechenden Krankheiten im Nachfolgenden kurz erläutert. Prionerkrankungen sind übertragbare spongiforme Enzephalopathien, die die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJK), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und Kuru bei Menschen und Traberkrankheit (engl. Scrapie) sowie bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Tieren einschließen. Es handelt sich hierbei um degenerative Hirnerkrankungen, die mit charakteristischen schwammartigen histologischen Veränderungen des Gehirns einhergehen und stets tödlich verlaufen. Nach der Theorie von *Stanley Prusiner* ist das Agens dieser Erkrankungen ein infektiöses Protein, das Prion (engl. proteinaceous infectious agent). Es handelt sich dabei um eine fehlgefaltete Form (PrP^{Sc} , Sc: Scrapie) eines normalerweise in allen Zelltypen vorkommenden und unschädlichen Prionproteins (PrP^{C}).^[195] PrP^{C} und PrP^{Sc} besitzen zwar die gleiche Aminosäuren-Sequenz und Masse von 33-35 kDa, unterscheiden sich aber grundlegend in ihren biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften, wie Löslichkeit, Stabilität und Struktur. Während das PrP^{C} hauptsächlich in α -helikaler Struktur vorliegt, Protease K (PK)-sensitiv und in nichtionischen Detergenzien löslich ist, weist die krankheitsassoziierte, infektiöse PrP^{Sc} -Form einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen auf und zeigt die Tendenz unlösliche Aggregate zu bilden. Der exakte Mechanismus der Umwandlung von PrP^{C} zu PrP^{Sc} ist noch nicht vollständig geklärt.^[196]

Seit einigen Jahren gibt es zudem den Verdacht, dass das Prion-Protein eine wichtige Rolle bei den neurodegenerativen Vorgängen der Alzheimer-Krankheit spielen könnte. Vor kurzem wurde festgestellt, dass eine Behandlung der Gehirnzellen von Mäusen, denen das PrP^{C} -Gen fehlte, mit β -Amyloid-Oligomeren nicht zur Reduktion der Langzeit-Potenzierung, wie bei den Zellen von normalen Mäusen, führte. $\text{A}\beta$ -Oligomere binden mit nanomolarer Affinität an zelluläres Prion-Protein (PrP^{C}), wobei das letzte hierbei als Rezeptor und Vermittler der synaptischen Dysfunktion dient. Später wurden Antikörper gegen das Prion-Protein entwickelt, die die Bindung der $\text{A}\beta$ -Oligomere verhinderten und somit die Zellen vor schädlicher Einwirkung der Amyloid- β -Oligomere schützten.^[197]

3.3.2 Herstellung der Trimer-(W226-scFv)-Hybridverbindung

Wie kürzlich herausgefunden wurde, ist das Trimer **16** in der Lage an beide Formen des Prion-Proteins (PrP^{C} und PrP^{Sc}) zu binden. Basierend auf diesen anhand eines wasserlöslichen

Trimer-Derivates gewonnene Erkenntnisse, die genauer erläutert im Kapitel 4.2.4 zu finden sind, könnte durch eine Kombination des W226-scFv-Fragmentes mit dem trimeren Aminopyrazol-Rezeptor eine noch höhere Affinität und eine stärkere Antiprion-Aktivität erzielt werden. Sollte die Komplexbildung zwischen W226-scFv und Trimer-TEG-NTA **66** erfolgreich verlaufen, könnte dieses Verfahren später auch auf die Verbindung des Trimers **16** mit dem A β -spezifischen IC16-scFv-Fragment angewandt werden. Bei einer Komplexbildung aller Histidine des 6xHis-Tags, ist im Idealfall mit einem 1:3-Komplex zu rechnen. Das scFv-Fragment könnte also mit drei Trimer-Molekülen modifiziert werden (Abbildung 3.27).

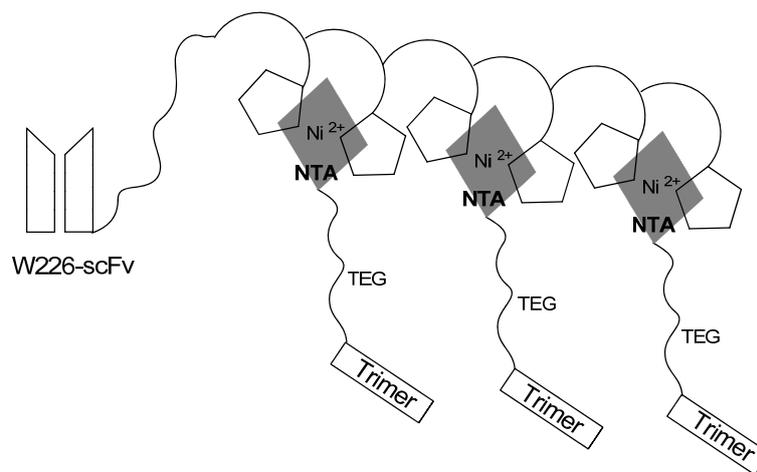


Abbildung 3.27: Schematische Darstellung eines 1:3-Komplexes aus W226-scFv und Chelator **66**.

Während bei einer nativen Messung mit Hilfe der Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie im positiven ESI-TOF-Modus durch *Uwe Linne* (Philipps-Universität Marburg) das W226-ScFv detektierbar war, konnte der gewünschte Komplex gemäß der Abbildung 3.27 mit dreifachem Überschuss an Trimer-TEG-NTA **66** und äquimolaren Mengen an Ni²⁺-Ionen bezüglich des Antikörperfragmentes leider nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist der Komplex nicht stabil genug, um ihn massenspektrometrisch nachweisen zu können. Um eine Komplexbildung von allen sechs Histidinen zu sichern wurden zusätzlich Versuche mit höherem Überschuss an Ni²⁺-Ionen und Chelator **66** unternommen. Unter diesen Bedingungen fand allerdings eine Proteindenaturierung statt, die sich durch Niederschlagsbildung auszeichnete.

Zur Erhöhung der Bindungsstabilität wird derzeit das W226-scFv-Fragment im *AK Korth* mit zehn Histidinen (10xHis-Tag) hergestellt. Da an diesem Protein eine Komplexbildung von fünf Trimer-Derivaten zugleich möglich ist, sollte dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Bindung statistisch gesehen viel höher liegen.

3.4 Trimere mit verschiedenen Haftgruppen

Das Trimer **16** zeigte bei biophysikalischen Untersuchungen eine moderate inhibierende und disaggregierende Wirkung auf die A β -Aggregation. Neben der Synthese von Hybridverbindungen sollte deshalb das Trimer **16** als Leitstruktur dienen, um durch verschiedene Modifizierungen optimiert zu werden. Mehrere Trimer-Derivate wurden bereits von *Katrin Hochdörffer* synthetisiert und untersucht, wobei bei einigen eine erhebliche Steigerung aggregationsinhibierender und neuroprotektiver Wirkungen festgestellt wurde.^[168] Parallel dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls Trimer-Modifizierungen vorgenommen und die hergestellten Derivate später untersucht.

3.4.1 Trimer-TEG-Säure **41**

Eines der Trimer-Derivate ist die zuvor synthetisierte Trimer-TEG-Säure **41**. Sie besitzt einen löslichkeitsfördernden Triethylenglykol-Rest, dessen Sauerstoffatome schwache Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, weshalb diese Verbindung in der Lage sein sollte weitere Interaktionen mit dem A β -Peptid einzugehen. Da die Verbindung **41** vor allem als Baustein für die Hybrid-Synthese diente, war es sinnvoll dieses Trimer-Derivat zu untersuchen, um zu sehen, wie sich der eingeführte TEG-Rest auf die Trimer-Leitstruktur auswirkt. Sehr wünschenswert waren gleiche bzw. verbesserte aggregationshemmende Eigenschaften des neuen Liganden **41** im Vergleich zum Trimer **16**. Der eingeführte TEG-Linker sollte die Funktion des Trimers auf keinen Fall stören oder abschwächen. Untersuchungen der TEG-modifizierten Trimer-Derivate mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und analytischer Ultrazentrifugation (*AK Willbold*) ergaben, dass die Verbindungen keine signifikante Abnahme der Aggregatgröße bewirken, jedoch die Entstehung kleinerer Oligomere fördern.^[168]

Im *AK Sticht* wurden einige Trimer-Derivate mittels Moleküldynamik-Simulationen (MD) in Wasser unter Verwendung von Amber9 bezüglich der Stabilität der minimierten Liganden-A β -Pentamer-Komplexe untersucht. Dabei wurden A β -Liganden-Komplexe benutzt, die zuvor mit dem Programm MacroModel 8 in Wasser mit dem Kraftfeld OPLS-2005 und jeweils 1500 Schritten minimiert wurden. Die pentamere A β -Protofibrille aus NMR-spektroskopischen Daten nach *Lühns et al.* mit dem PDB-Code 2BEG diente analog zu Berechnungen mit Trimer-D3-Hybridverbindungen als Ausgangsstruktur für die

Minimierungen und MD-Simulationen mit Trimer-Derivaten.^[67] Die MD-Rechnungen wurden mit der Trimer-TEG-Säure **41** und ihrem Derivat Trimer-TEG-NMe durchgeführt. In der Abbildung 3.28 sind die Liganden-A β -Komplexe nach 20 ns MD-Simulation dargestellt. In beiden Strukturen blieben während der MD-Simulation sowohl die Wasserstoffbrückenbindungen, als auch die π - π -Stapelwechselwirkungen der trimeren Aminopyrazol-Einheit erhalten. Dabei kam es zu einer Erhöhung der Flexibilität der A β -Protofibrille im *N*-terminalen Bereich. Sehr große Unterschiede sind in der resultierenden Orientierung der TEG-Reste zu beobachten. Während der TEG-OH-Rest oberhalb des terminalen „U“-förmigen A β -Moleküls angeordnet ist (Abbildung 3.28, links), lagert sich der TEG-NMe-Rest zwischen zwei β -Strängen des Pentamers an (Abbildung 3.28, rechts). Dieser TEG-NMe-Rest durchdringt vor allem die β -Turn-Region, die weniger stabil gestapelt ist und mit Wassermolekülen gefüllt ist. Diese Einlagerung kann möglicherweise zur Destabilisierung der Salzbrücke zwischen Aspartat 23 und Lysin 28 führen. Trimer-TEG-NMe geht folgende zusätzliche Wechselwirkungen mit dem A β -Peptid ein: TEG – Alanin 21 (A); TEG – Aspartat 23 (A); TEG – Glutamat 22 (A); TEG – Leucin 34 (B); NMe – Glutamat 22 (A); NMe – Aspartat 23 (A); NMe – Aspartat 23 (B). A steht für das oberste und B für das darunter liegende „U“-förmige A β -Molekül.

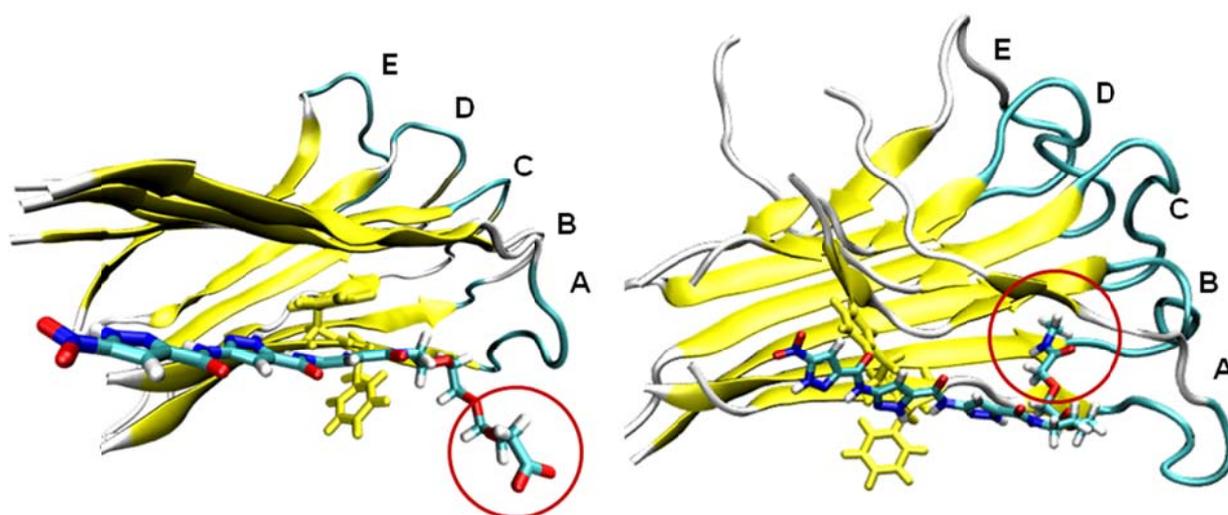


Abbildung 3.28: Komplexe von A β -Pentamer mit Trimer-TEG-OH **41** (links) und Trimer-TEG-NMe (rechts) nach 20 ns MD-Simulation.

3.4.2 Trimer-TEG-Dodecan 45

Einige weitere Trimer-Modifikationen basierten auf der Trimer-TEG-Säure **40**. Über den TEG-Spacer sollten im Gegensatz zu relativ großen Hybridverbindungen unterschiedliche kleinere funktionelle Gruppen eingeführt werden. Der TEG-Spacer diente also auch hier als Abstandhalter und Bindeglied zu den eingeführten Resten.

Um die Lipophilie des Trimers zu erhöhen, wurde das Aminopyrazol-Grundgerüst mit einem Alkylrest modifiziert. Dieser sollte hydrophobe und dispersive Wechselwirkungen mit ungeladenen Aminosäuren-Seitenketten in hydrophoben Bereichen des A β -Peptids eingehen und somit die Bindung des Liganden an das A β -Peptid weiter verstärken. Die Funktionalisierung erfolgte in einer Reaktion der PMB-geschützten Trimer-TEG-Säure **40** mit Dodecylamin in Gegenwart des Kupplungsreagenz EDC*HCl und des Additivs HOBT in Dichlormethan (Abbildung 3.29). Nach säulenchromatographischer Reinigung und anschließender Abspaltung der PMB-Schutzgruppe mit heißer TFA konnte der neue β -Faltblattligand Trimer-TEG-Dodecan (Trim-TEG-DD, **45**) isoliert werden.

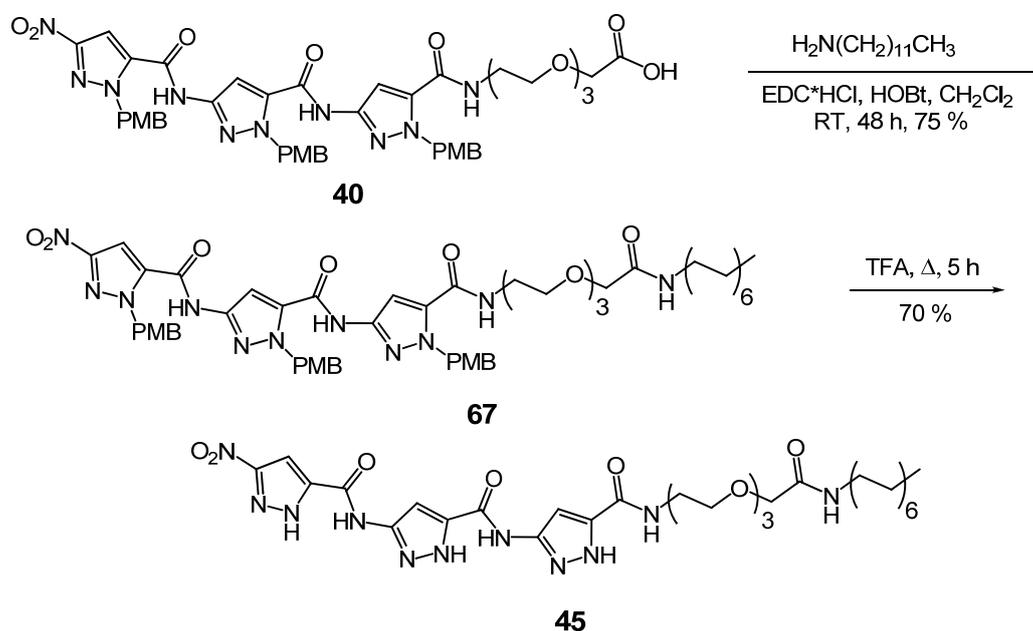


Abbildung 3.29: Syntheschema des Trim-TEG-DD **45**.

Das Trimer-Derivat **45** sollte ebenfalls im Komplex mit dem A β -Pentamer minimiert werden. Hierzu wurde der neu eingeführte Alkylrest zu Beginn der Minimierung entlang des terminalen Peptidrückgrats im Bereich mit vielen hydrophoben Aminosäuren vororientiert.

Abbildung 3.30 zeigt die minimierte Komplex-Struktur. Dieser Komplex wurde anschließend ebenfalls einer MD-Simulation (*AK Sticht*) unterworfen. Im Laufe der Berechnung löste sich der Alkylrest immer mehr von seiner vororientierten Lage ab und „wanderte“ entlang der Methionin-Leiter, die sich auf der Rückseite der Protofibrille auf Position 35 befindet, zu den darunter liegenden Peptidsträngen. Wie man aus der Abbildung 3.31, in der die resultierende Komplex-Struktur dargestellt ist, entnehmen kann, befindet sich der lipophile Rest vollständig auf der Rückseite der Protofibrille und geht Wechselwirkungen mit Leucin 34 (A), Methionin 35 (C), Isoleucin 32 (D) und Glycin 33 (D) ein. Gleichzeitig sind Interaktionen des TEG-Spacers mit Isoleucin 32, Glycin 33 und Leucin 34 der obersten Peptidkette A zu beobachten.

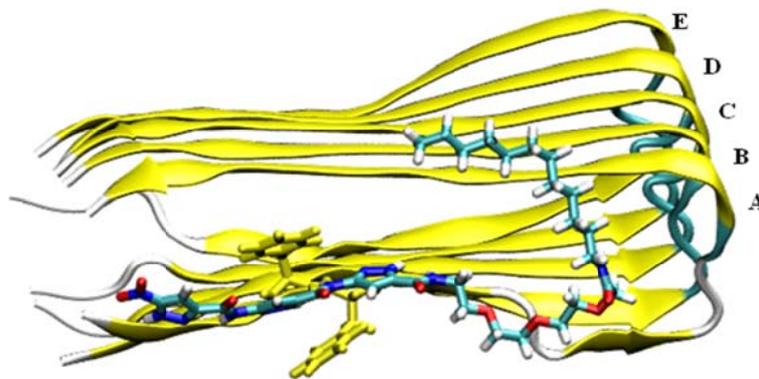


Abbildung 3.30: Für die MD-Simulation minimierte Startkomplexstruktur zwischen Trim-TEG-DD 45 und einer pentameren A β -Protofibrille.

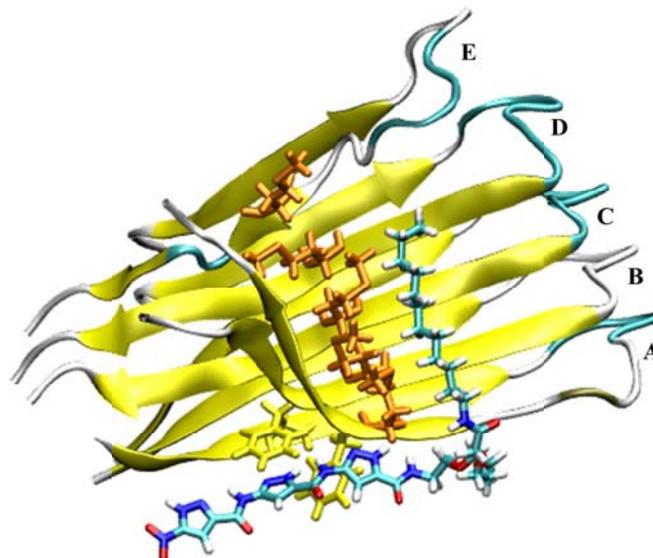


Abbildung 3.31: Komplex zwischen A β -Pentamer und Trim-TEG-DD 45 nach 20 ns MD-Simulation.

3.4.3 Trimer-TEG-Lysin 70

Ein weiteres Ziel war es, die Wasserlöslichkeit des trimeren Aminopyrazols **16** durch seine Funktionalisierung zu erhöhen. Schon in den Vorarbeiten wurde ein Lysin zur Erhöhung der Polarität eingebaut. So verknüpfte *Katrin Hochdörffer* das Trimer **16** mit einem Lysin-Methylester, um die wasserlösliche Verbindung **68** zu erhalten (Abbildung 3.32). Dies führte allerdings zu einer signifikanten Verminderung der inhibierenden und disaggregierenden Wirkung. Die Nähe der geladenen Seitenkette des Lysins wurde als eine mögliche Ursache für diesen Effekt diskutiert. So könnte das Ammoniumion die Wechselwirkungen des Trimer-Kerns an seinem Bindungsort blockieren bzw. abschwächen.

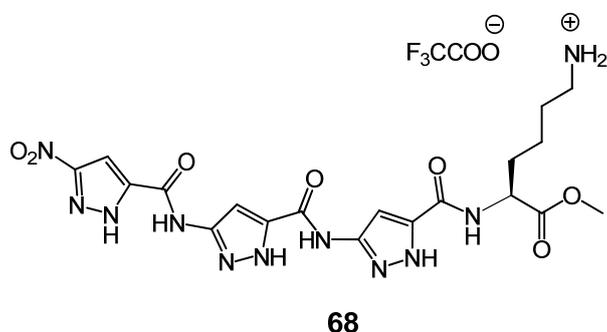


Abbildung 3.32: Struktur von Trimer-Lysin-OMe **68**.

Aufbauend auf dieser Theorie sollte der TEG-Spacer als Abstandhalter zwischen der geladenen Aminosäure Lysin und dem Trimer-Gerüst eingebaut werden. Als Ausgangsverbindung diente auch hier die PMB-geschützte Trimer-TEG-Säure **40**, die in einer Kupplungsreaktion mit Seitenketten-geschütztem Lysinmethylester in Gegenwart von PyBOP und NMM umgesetzt wurde. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung und anschließender Abspaltung der PMB-Schutzgruppen konnte der wasserlösliche Ligand **70** als Trifluoracetatsalz isoliert werden (Abbildung 3.33).

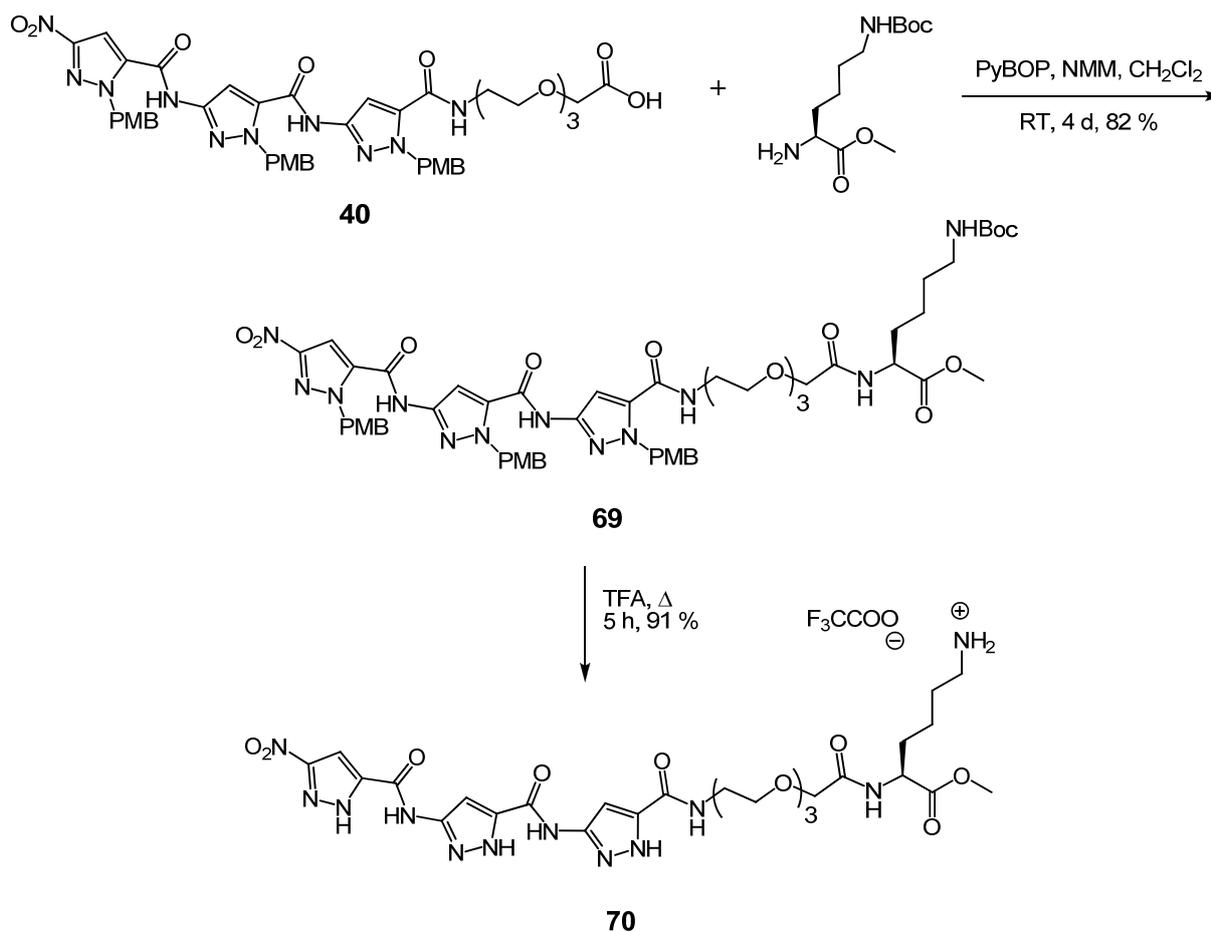


Abbildung 3.33: Syntheschema des Trimer-TEG-Lysins (Trim-TEG-K-OMe) **70**.

Um Kraftfeldrechnungen von Trimer-TEG-Lysin **70** durchführen zu können, musste die pentamere Protofibrille nach einem möglichen Bindungsort für das neu eingeführte Ammonium durchsucht werden. Hierfür eignet sich wieder die im Kapitel 3.2.2 beschriebene Glutamatleiter. Der TEG-Spacer sollte die Annäherung des Ammoniums zu unterschiedlich weit gelegenen Carboxylat-Resten ermöglichen. Die Lysin-Seitenkette wurde so vororientiert, dass sie eine Salzbrücke mit dem Glutamat 22 der Peptidkette B bilden konnte. Nach der Energieminimierung kam es zu einer Strukturstabilisierung, indem sich eine Chelatbrücke zwischen dem Ammonium und den Glutamationen der Peptidketten B und C ausbildete (Abbildung 3.34, links). Diese minimierte Struktur diente nachfolgend als Ausgangsstruktur für MD-Rechnungen (*AK Sticht*). Im Laufe der Simulation ging die Chelatbrücke verloren, wobei sich eine Salzbrücke zum Glutamat 22 der obersten Peptidkette A ausbildete und der TEG-Spacer in eine kompakte Anordnung überging (Abbildung 3.34, rechts). Diese Komplexstruktur blieb eine Zeit lang in der Simulation stabil, lagerte sich jedoch nach 20 ns zur Endstruktur (Abbildung 3.35) um, in der keine Wechselwirkung des Ammoniums zur Glutamatleiter mehr zu finden war. Der Lysinrest

geht dagegen Interaktionen zu Valin 18 und Phenylalanin 20 ein, während der TEG-Spacer zusätzliche Kontakte zu Leucin 34 und Phenylalanin 20 der oberen Peptidkette A eingeht. Die Ergebnisse der Moleküldynamikrechnungen deuten also daraufhin, dass ein einzelner kationischer Rest für die Ausbildung von stabilen polaren Wechselwirkungen mit der Glutamatleiter nicht ausreicht.

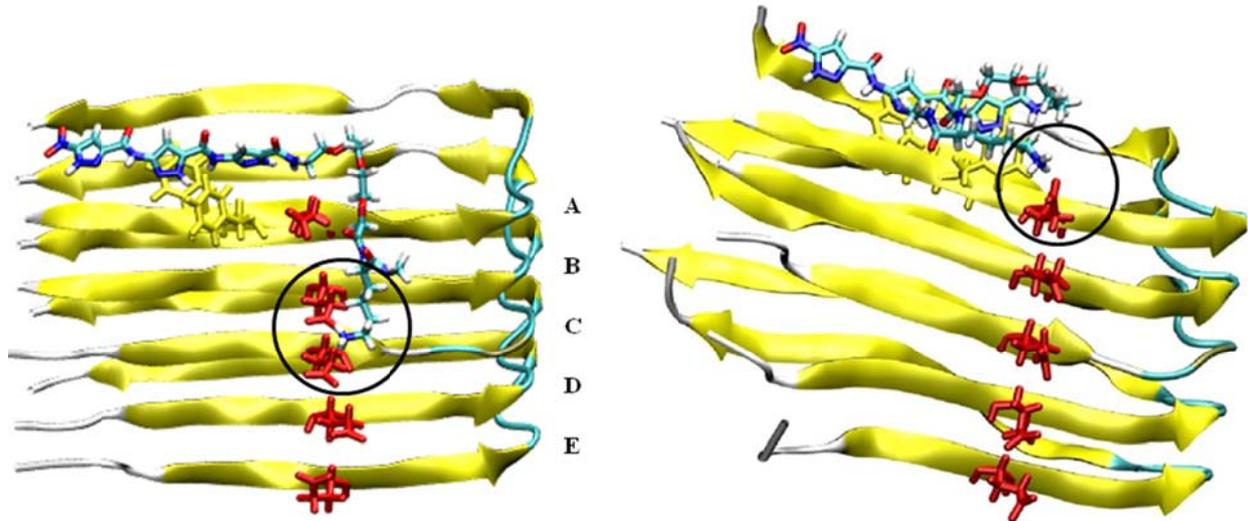


Abbildung 3.34: Links: Für MD-Simulation minimierte Startkomplexstruktur zwischen einer pentameren Protofibrille und dem Trimer-TEG-K-OMe **70**. Rechts: Komplexstruktur zwischen dem A β -Pentamer und Trimer-TEG-OMe **70** nach 16 ns MD-Simulation.

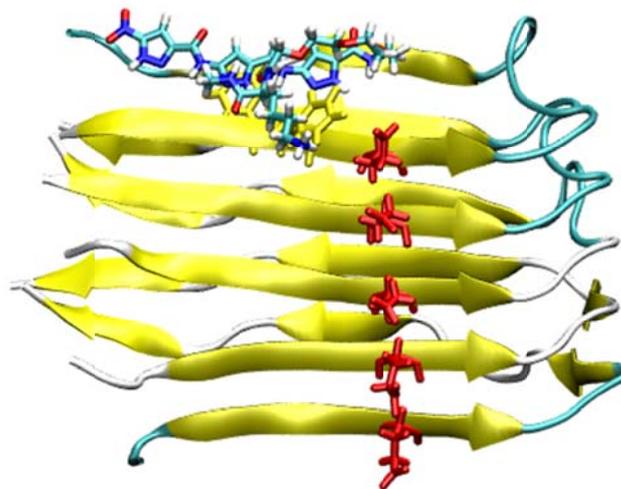


Abbildung 3.35: Komplex zwischen dem A β -Pentamer und dem Trimer-TEG-OMe **70** nach 20 ns MD-Simulation.

3.4.4 Trimer-TEG-Pentalysin 72

Basierend auf den Erkenntnissen aus den MD-Simulationen mit Trimer-TEG-Lysin **70**, aus denen hervorging, dass die Bindung eines einzigen Lysinrestes an saure Seitenketten des A β -Peptids nicht stabil genug war, sollte das Trimer **16** mit mehreren kationischen Resten C-terminal modifiziert werden, um haltbare und stabilere Interaktionen mit dem A β -Peptid zu erreichen. Die Zielstruktur seitens des A β -Peptids sollte also die Glutamatleiter bleiben. Durch eine Verlängerung des Trimers mit einer mehrfach positiv geladenen Seitenkette sollte die Glutamatleiter gleichzeitig an mehreren Stellen kontaktiert werden (Abbildung 3.36, rechts). Polylysin- und Polyargininketten eignen sich aufgrund der relativ einfachen Synthese als solche Erweiterungen. Der TEG-Spacer sollte auch hier als Abstandhalter zwischen dem Trimer und dem polykationischen Rest dienen. Solche polykationischen Peptide wurden bereits durch *Gibson* und *Murphy* mit der A β -Selbsterkennungssequenz KLVFF kombiniert. Die Untersuchung ergab, dass Verbindungen dieser Art die Morphologie der Aggregate verändern oder die A β -Aggregation sogar beschleunigen können.^[101]

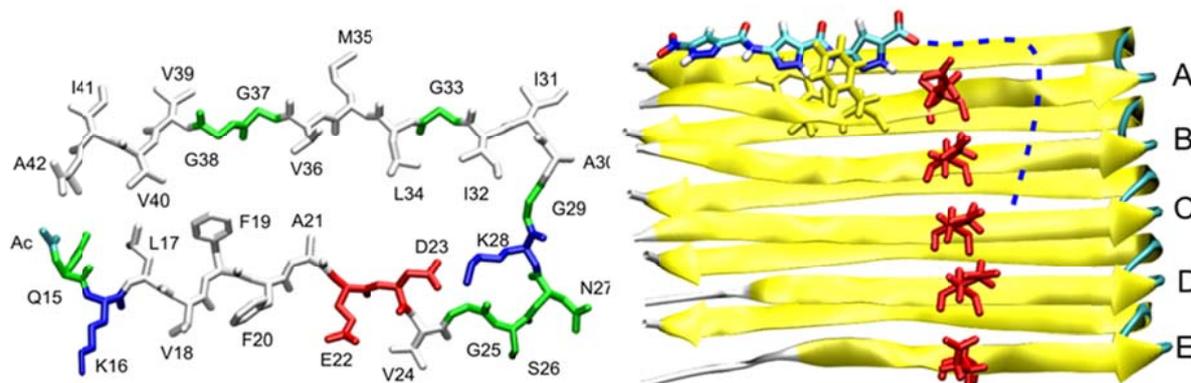


Abbildung 3.36: Links: A β -Struktur der Kette A aus der Protofibrille mit dem PDB-Code 2BEG.^[67] Die hydrophoben Reste sind in weiß, die polaren in grün und die negativ bzw. positiv geladenen in rot bzw. blau dargestellt. Rechts: Die Trimer-Einheit **16** ist an die beiden Phenylalanine 19 und 20 des terminalen A β -Stranges angedockt. Die Glutamate 22 sind stäbchenartig in rot dargestellt. Die blau gestrichelte Linie deutet eine mögliche Orientierung eines polykationischen Restes an.

In einer manuellen Festphasen-Peptid-Synthese wurde anknüpfend an die oben beschriebenen Überlegungen ein Trimer-TEG-Pentalysin **72** als polykationisch funktionalisiertes Trimer-Derivat hergestellt. Die Peptidsynthese erfolgte analog zum L3-Peptid (Kapitel 3.2.3.1) mittels manueller Fmoc-Strategie, wobei das Wang-Harz mit vorinstalliertem Fmoc-Glycin als polymerer Träger zum Einsatz kam. Die Kupplung des an der Seitenkette Boc-geschützten Fmoc-Lysins fand ebenfalls in Gegenwart von HBTU und Diisopropylethylamin (DIEA) in

DMF statt (Abbildung 3.37). Zu Testzwecken wurde eine kleine Menge des Peptids analog zu D-Peptiden abgespalten und analysiert.

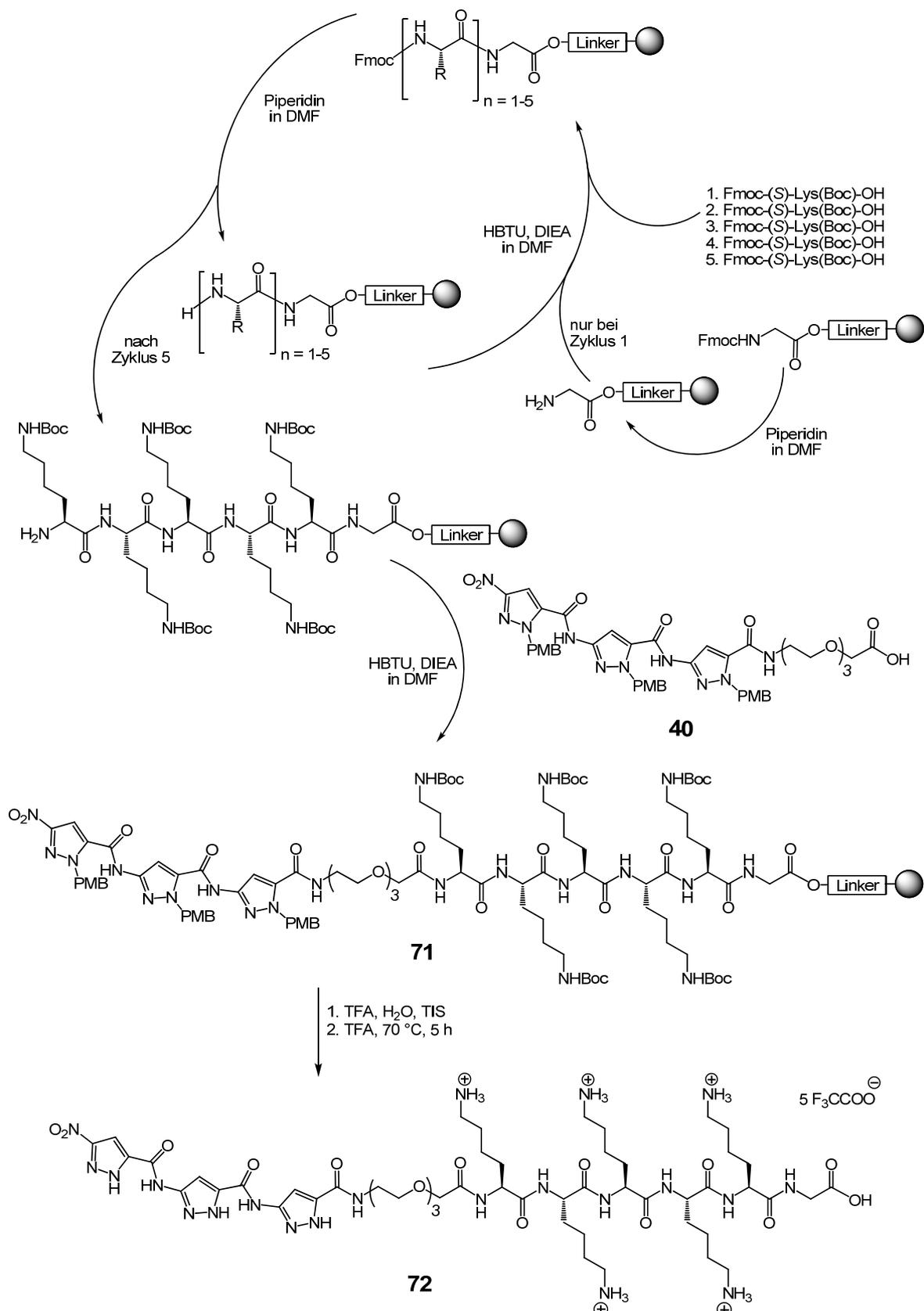


Abbildung 3.37: Syntheschema des Trimer-TEG-Pentalysins (Trim-TEG-KKKKKG-OH) **72**.

Anschließend wurde das noch am polymeren Träger gebundene Peptid entsprechend der Abbildung 3.37 mit Trimer(PMB)-TEG-Säure **40** in Gegenwart von HCTU und DIEA in DMF umgesetzt. Nach der vollständigen Kupplungsreaktion, die mit Hilfe von Kaiser- und NF31-Tests überprüft wurde, konnte die gesamte Verbindung vom Harz abgespalten und von Boc-Schutzgruppen befreit werden. Nach der Behandlung mit heißer TFA ließ sich der Ligand **72** als Trifluoracetatsalz isolieren.

Das Trimer-TEG-Pentalysin **72** wurde zunächst wie alle anderen Liganden auch im Komplex mit β -Pentamer minimiert. Die resultierende Komplexstruktur (Abbildung 3.38, links) beinhaltet zwei Salzbrücken von Ammoniumionen der Lysine 2 und 4 (K2 und K4) zu Carboxylatresten der Glutamatleiter, wobei drei weitere Lysin-Seitenketten nicht komplexiert, frei im Raum vorliegen.

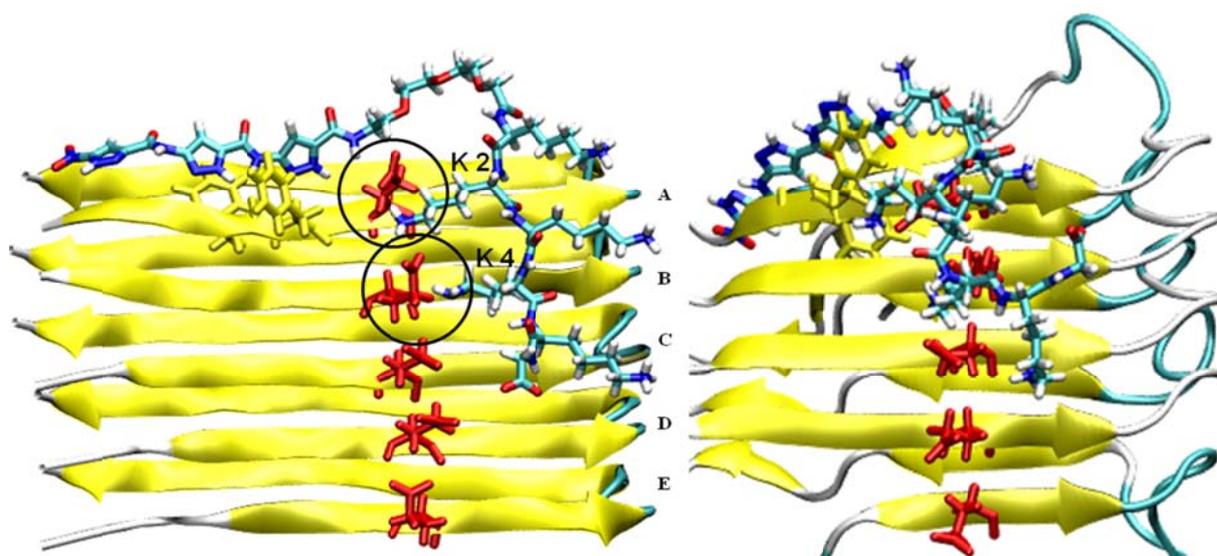


Abbildung 3.38: Links: Für MD-Simulation minimierte Start-Komplexstruktur zwischen Trimer-TEG-Pentalysin **72** und einer pentameren β -Protomer. Rechts: Komplex zwischen β -Pentamer und Trimer-TEG-Pentalysin **72** nach 20 ns MD-Simulation.

Die Komplexstruktur der Verbindung **72** nach 20 ns Moleküldynamiksimulation (Abbildung 3.38, rechts) bestätigt den angenommenen Bindungsmodus und die spezifischen Wechselwirkungen des pentapeptidischen Substituenten an der postulierten Bindungsstelle, der Glutamatleiter. Die Lysinseitenketten gehen dabei folgende Wechselwirkungen ein: Lysin 2 – Glutamat 22 (A); Lysin 4 – Glutamat 22 (B) und Lysin 4 – Glutamat 22 (C). In der resultierenden Endstruktur wird die Glutamatleiter also von nur zwei Lysinseitenketten komplexiert. Das Konzept eines polykationischen Substituenten sah aber anfangs noch mehr

Kontaktstellen zu sauren Resten des A β -Peptids vor. Obwohl der TEG-Spacer kompensierende Interaktionen zu Phenylalanin 20, Alanin 21, Aspartat 23 und Valin 24 der terminalen Peptidkette A eingeht, sind offenbar die Coulomb-Wechselwirkungen der polaren Lysinketten zum A β -Peptid weniger bedeutsam als zunächst angenommen.

3.4.5 Trimer-TEG-Pentaarginin 74

Nachfolgend wurde ein weiteres polykationisches Trimer-Derivat, Trimer-TEG-Pentaarginin **74**, das fünf Arginine enthält, synthetisiert. Während Lysin zu den Hofmeister-Kosmotropen zählt, welche die Oberflächenspannung erhöhen und gefaltete Proteinstrukturen stabilisieren, gehört Arginin zu den Hofmeister-Chaotropen und destabilisiert folglich gefaltete, insbesondere falsch gefaltete oder aggregierte Proteinstrukturen. Aus diesem Grund wird Arginin oft zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit den Proteinlösungen zugesetzt, welche zur Aggregation neigen.^[101, 198-201] Neben der erfolgsversprechenden Strategie zur Aggregationshemmung sollte der Einbau eines Pentaarginins zudem den Vergleich zu Trimer-D3-Hybriden, die ebenfalls jeweils fünf Arginine enthalten, verschaffen. In diesem Zusammenhang könnte überprüft werden, ob die spezielle Anordnung der Arginine in der D3-Komponente von entscheidender Bedeutung ist.

Analog zur D1- und D3-Peptidsynthese wurde das Pentaarginin am automatisierten Mikrowellen-Peptid-Synthesizer hergestellt. Als polymerer Träger wurde Wang-Harz mit vorinstalliertem Fmoc-Arginin(Pbf) eingesetzt. Eine Testabspaltung vom Harz mit anschließender Analyse durch Massenspektrometrie und HPLC ergab, dass das gewünschte Peptid in hoher Reinheit synthetisiert wurde. Die Kupplung der PMB-geschützten Trimer-TEG-Säure **40** an das am Harz gebundene Pentaarginin und anschließende Isolierung erfolgten gemäß dem nachfolgenden Reaktionsschema (Abbildung 3.39) und analog zur Herstellung von Trimer-TEG-Pentalysin **72**.

Für den hergestellten Liganden **74** würde man ähnliche Eigenschaften wie bei dem zuerst synthetisierten Pentalysin-Analogon sowohl im Bezug auf die A β -Aggregation als auch auf seine Löslichkeit erwarten. Es wurde jedoch schon während der Isolierung von Trim-TEG-RRRRR-OH **74** beobachtet, dass diese Verbindung ein vollkommen anderes Lösungsverhalten aufweist. Sie löste sich nur sehr langsam in TFA, in Wasser und DMSO dagegen überraschenderweise überhaupt nicht, obwohl man bei einer Verbindung mit vielen Argininen wie bei einem Derivat mit vielen Lysinen eine hohe Wasserlöslichkeit erwartet. Aus diesem

Grund konnte die Verbindung zunächst nicht charakterisiert werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Verbindung **74** in konzentrierter Salzsäure löslich ist, sie fällt allerdings bei einer 1:1-Verdünnung mit Wasser wieder vollständig aus. Schließlich konnte ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum im $\text{DCI/D}_2\text{O}$ -Gemisch (3:1) aufgenommen werden, in dem alle für diese Verbindung zu erwartenden Protonen im richtigen Intensitätsverhältnis zueinander zu finden sind (siehe Anhang). Der massenspektrometrische Nachweis gelang erst nach dem Gefriertrocknen der in TFA gelösten Verbindung **74**, die danach in niedrigen Konzentrationen in Wasser gelöst werden konnte.

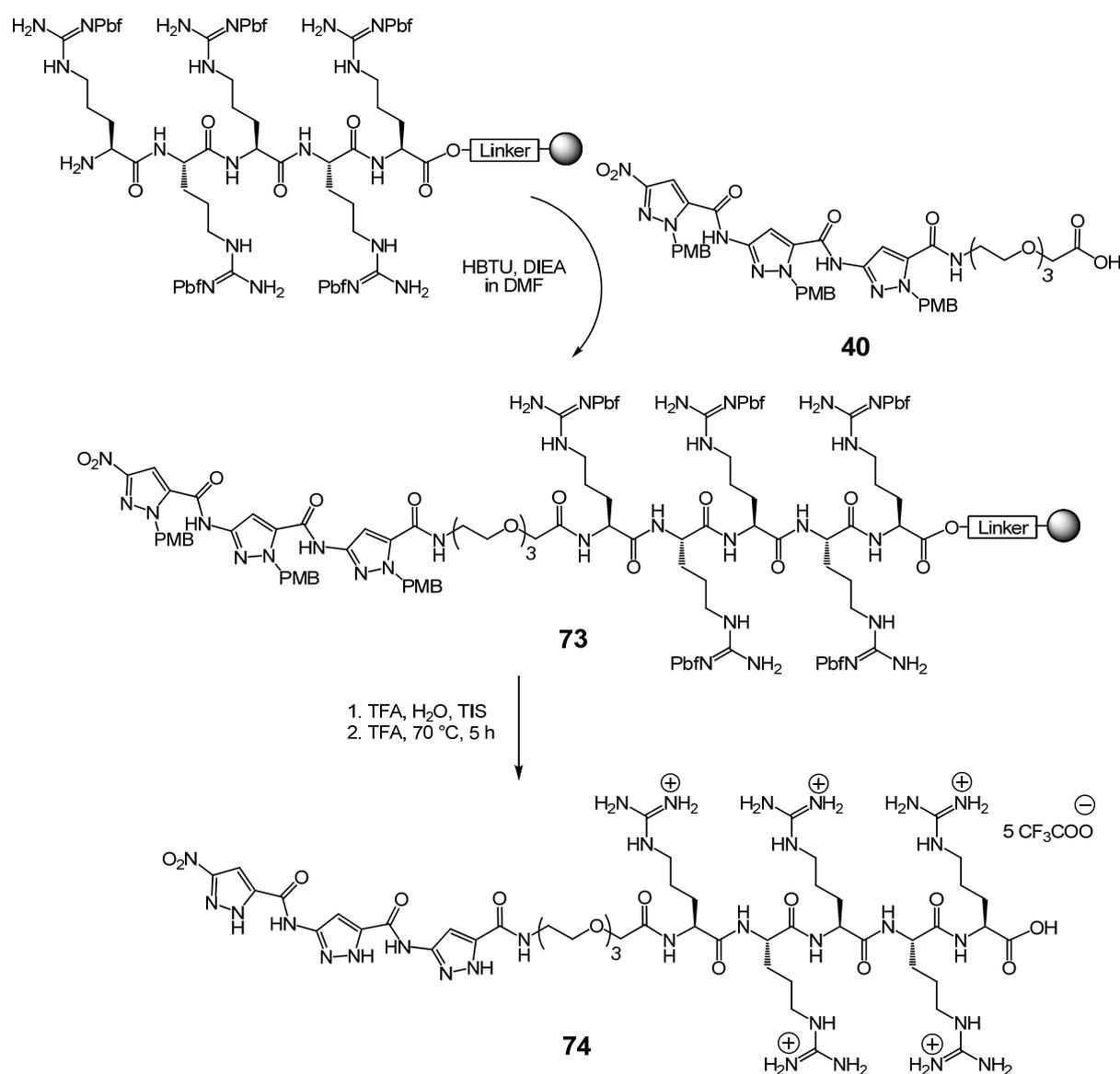


Abbildung 3.39: Syntheschema des Trimer-TEG-Pentaarginins (Trim-TEG-RRRRR-OH) **74**.

Obwohl schließlich feststand, dass es sich bei dem isolierten Feststoff um das gewünschte Derivat **74** handelt, konnte seine Wirkung aufgrund der schlechten Löslichkeit in keinem biophysikalischen Experiment erforscht werden. Stattdessen galt es zu ermitteln, warum die Substanz sich in ihren Eigenschaften so stark von Trimer-TEG-Pentalysin **72** unterscheidet und welche besondere Rolle dabei die Guanidiniumionen spielen. Zur Beantwortung dieser Frage wäre es sehr hilfreich eine Kristallstruktur dieser Verbindung zu erlangen. Allerdings scheiterten alle unternommenen Kristallisationsversuche, weil die Verbindung **74** nur in Form eines amorphen Niederschlags ausfiel. Offensichtlich liegt hier eine starke Tendenz zur Selbstassoziation vor, bei der die Guanidiniumionen von entscheidender Bedeutung sind. Wie zuvor erwähnt wurde, wird Arginin den Proteinlösungen zur Stabilisierung der nativ gefalteten Strukturen zugesetzt. Die Wirkungsweise dieser Aminosäure ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Es wird aber unter anderem angenommen, dass die Guanidiniumgruppe an aromatische Aminosäurereste über π -Kation-Wechselwirkungen binden und dadurch Aggregationshemmung von gefalteten Intermediaten bzw. Disaggregation von Proteinkomplexen einleiten kann.^[198, 202] Überträgt man diese Wechselwirkungen auf Trim-TEG-RRRRR-OH **74**, so sind bei dieser Verbindung ebenfalls π -Kation-Wechselwirkungen zwischen aromatischen Pyrazolringen und vorhandenen Guanidiniumionen der Arginine vorstellbar. Diese Annahme alleine kann allerdings die schlechte Löslichkeit des Pentaarginin-Liganden nicht erklären. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich diese π -Kation-Interaktionen stapeln und sich dadurch aus Schichten bestehende, unlösliche Aggregate bilden, in denen die polaren Guanidiniumionen vom Lösungsmittel abgeschirmt vorliegen. Dabei sind sowohl inter- als auch intramolekulare Wechselwirkungen denkbar. Zur Veranschaulichung der Interaktionen sollten Energieminimierungen mit Trimer-TEG-RRRRR-OH **74** in Wasser durchgeführt werden. Schon die ersten Versuche die intramolekularen Komplexe zu berechnen, ergaben jedoch, dass die einzelnen Wechselwirkungen zwischen einem Pyrazolring und Guanidiniumion nicht stabil sind. Dies bedeutet aber noch nicht, dass die Annahme des gestapelten π -Kation-Systems falsch ist. Möglicherweise können stabile Komplexe erst dann entstehen, wenn sich sehr viele Moleküle gleichzeitig an den Interaktionen beteiligen. Eine genaue Aufklärung kann aber wahrscheinlich nur anhand einer Kristallstruktur geschehen.

3.4.6 Trimer-TEG-KLVFF-OH **77**

Um die Spezifität des Trimers für das A β -Peptid zu erhöhen, sollte in nachfolgenden Modifizierungen das trimere Aminopyrazol **16** mit einem kurzen Peptidabschnitt aus A β (1-42) verknüpft werden. Dazu wurde zunächst die KLVFF-Sequenz, die bereits von *Tjernberg et al.* als eine der ersten Selbsterkennungseinheiten für das A β -Peptid eingesetzt wurde, ausgewählt.^[93] Damit das gesamte Molekül genug Flexibilität erhält, sollte zwischen Trimer- und KLVFF-Einheiten ein TEG-Spacer eingebaut werden. Nach erfolgreicher manueller Festphasen-Synthese des KLVFF-Peptids, die analog zur Synthese des L3-Peptids verlief, wurde das Pentapeptid mit PMB-geschützter Trimer-TEG-Säure **40** in Gegenwart von HBTU und DIEA in DMF gekuppelt. Nach Abspaltung der Schutzgruppen gelang es den neuen Liganden **77**, dessen Gesamtsynthese in der Abbildung 3.40 dargestellt ist, in ausreichender Reinheit zu isolieren.

Da das Trimer **16** im gleichen Sequenzabschnitt des A β -Peptids wie die KLVFF-Selbsterkennungssequenz bindet, besteht die Gefahr, dass die beiden Molekülteile um den selben Bindungsort im A β -Peptid konkurrieren, wodurch ein Teil des Liganden eventuell ohne Bindungspartner vorliegen könnte. Weiterhin ist denkbar, dass der Ligand **77** eine Selbstassoziation eingeht, indem das Aminopyrazol-Grundgerüst an die Phenylalanine des Peptidteils entweder intra- oder intermolekular bindet. Diese Überlegungen sind auch auf das nachfolgende peptidische Trimer-Derivat **79** übertragbar. Für beide Trimer-Derivate sind also sowohl eine signifikante Erhöhung der A β -Spezifität als auch eine Reduktion der Effektivität denkbar.

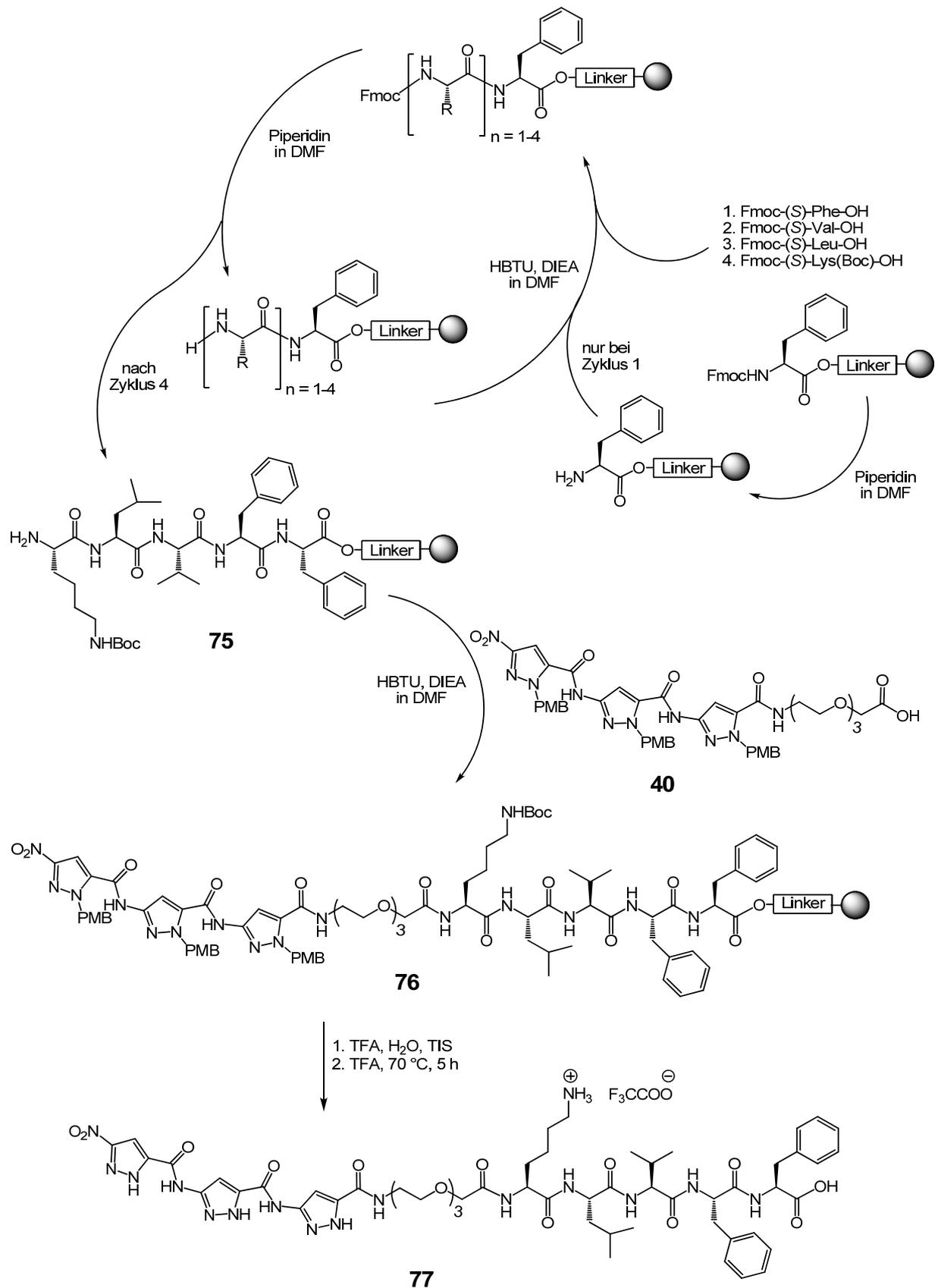


Abbildung 3.40: Syntheschema von Trimer-TEG-KLVFF-OH **77**.

3.4.7 Trimer-TEG-LPFFD-OH **79**

Das von *Soto et al.* entworfene LPFFD-Peptid, welches zur LVFFFA-Region im A β -Peptid komplementär ist, wurde im weiteren aussichtsreichen Ansatz eingeführt. Dabei wurde das LPFFD-Peptid mit Trimer **16** wieder über einen TEG-Spacer verknüpft. Nach der erfolgreichen LPFFD-Synthese, welche analog zur Herstellung von D1- und D3-Peptiden, jedoch unter Verwendung von Wang-Harz mit vorinstallierter Fmoc-Asparaginsäure(OtBu), am automatisierten Mikrowellen-Peptid-Synthesizer erfolgte. Anschließend konnte die Kupplung der PMB-geschützten Trimer-TEG-Säure **40** durchgeführt werden. Diese Reaktion erfolgte auch in DMF in Gegenwart von HCTU und Hünig-Base. Nach Abspaltung der Schutzgruppen konnte der neue Ligand **79**, dessen Gesamtsynthese in der Abbildung 3.41 dargestellt ist, in ausreichender Reinheit erhalten werden.

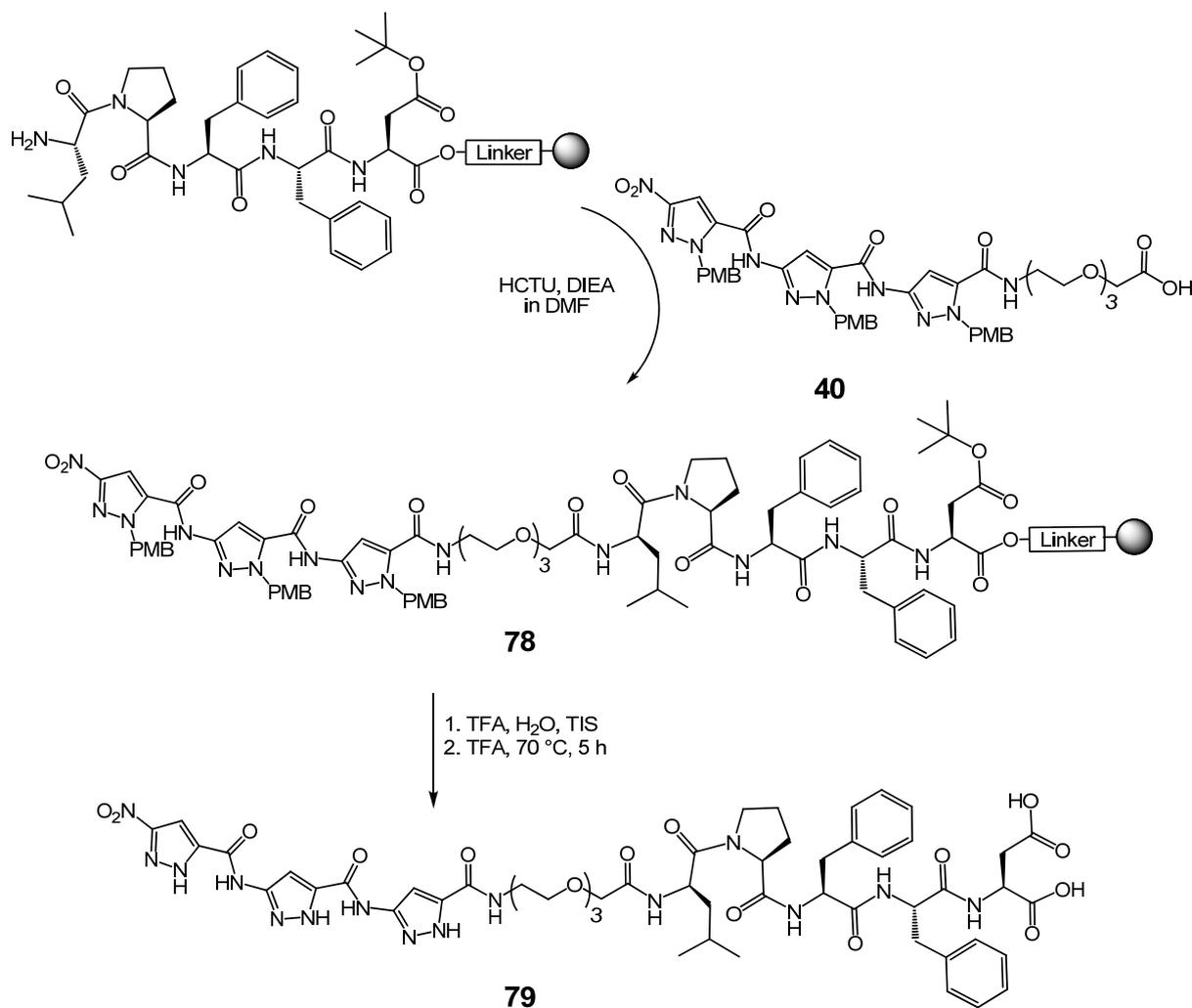


Abbildung 3.41: Syntheseschema von Trimer-TEG-LPFFD-OH **79**.

3.4.8 Dimerisierung des Trimers 16

In einem weiteren Ansatz sollten die Bindungseigenschaften und somit auch die Effektivität des Trimer-Liganden mittels seiner Dimerisierung erhöht werden. Ein ähnlicher Versuch wurde schon von *Petra Rzepecki* gestartet. Sie konnte einen tetrameren Aminopyrazol-Liganden **17** herstellen, der im Vergleich zum Trimer **16** eine stärkere Affinität zu Peptiden in β -Faltblattkonformation aufweisen sollte. Allerdings war dieser Rezeptor nur in heißem DMSO löslich, so dass weder Untersuchungen der Bindungseigenschaften noch biologische Experimente möglich waren.^[162] Um dieses Problem bei der Dimerisierung zu vermeiden, sollte zwischen den beiden Trimer-Einheiten ein Löslichkeitsfördernder Spacer geschaltet werden. Hierfür wurde die PMB-geschützte Trimer-Säure **27** in Gegenwart von EDC*HCl und HOBT mit einem symmetrischen 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (TEGDA) **31** umgesetzt (Abbildung 3.42). Nach einer säulenchromatographischen Reinigung und anschließender Entfernung der PMB-Schutzgruppen durch heiße TFA konnte der neue spiegelsymmetrische Ligand (Trimer)₂-TEGDA **81** erhalten werden.

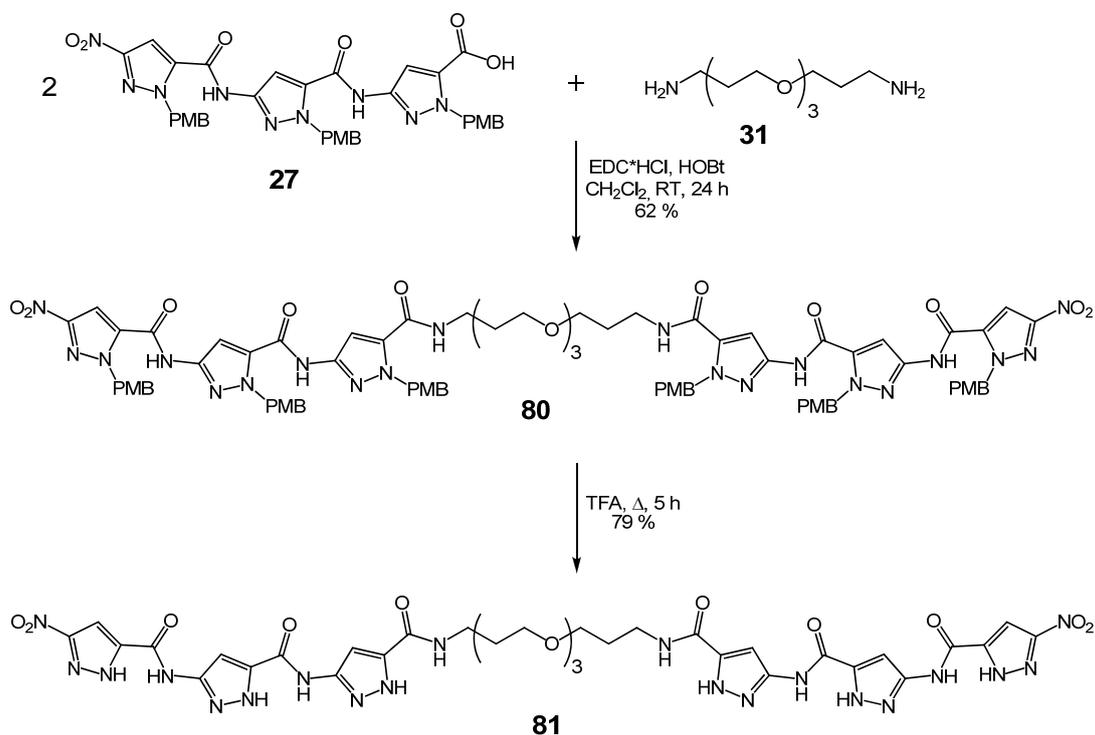


Abbildung 3.42: Syntheschema von (Trimer)₂-TEGDA **81**.

Leider zeichnete sich auch der neue Rezeptor **81** durch extreme Unlöslichkeit aus. Demzufolge bestand keine Möglichkeit diese Verbindung auf ihre aggregationsinhibierende Wirkung zu untersuchen. Es konnte lediglich eine stark verdünnte Lösung in DMSO-d₆ hergestellt werden, um NMR-Spektren aufzunehmen. Zur Erhöhung der Löslichkeit sollte das unlösliche Dimer **81** mit zwei Lysinen funktionalisiert werden. Gemäß der zunächst ausgewählten Syntheseroute, die in Abbildung 3.43 dargestellt ist, konnte die gewünschte Funktionalisierung nicht durchgeführt werden. Diese beinhaltet die von *Katrin Hochdörffer* ausgearbeitete Synthese von Trimer(PMB)-Lys(Boc)-OH **83**. Einer Kupplungsreaktion der Trimer(PMB)-Säure **27** mit H₂N-Lys(Boc)-OMe mit Hilfe von Mukaiyama als Kupplungsreagenz und DIEA als Base folgte die basenkatalysierte Methylesterspaltung, wodurch die Säure **83** erhalten wurde. Die nachfolgende Umsetzung von Trimer(PMB)-Lys(Boc)-OH **83** mit dem bereits oben verwendeten symmetrischen Spacer (TEGDA) **31** in Gegenwart von EDC·HCl und HOBt blieb allerdings erfolglos. Die massenspektrometrische Analyse des Reaktionsgemisches ergab, dass die Kupplungsreaktion nur an einem Aminoende des Spacers stattfinden konnte. Obwohl dieser kritische Reaktionsschritt in einem erneuten Ansatz wiederholt wurde, führte auch der zweite Versuch nicht zum gewünschten Produkt.

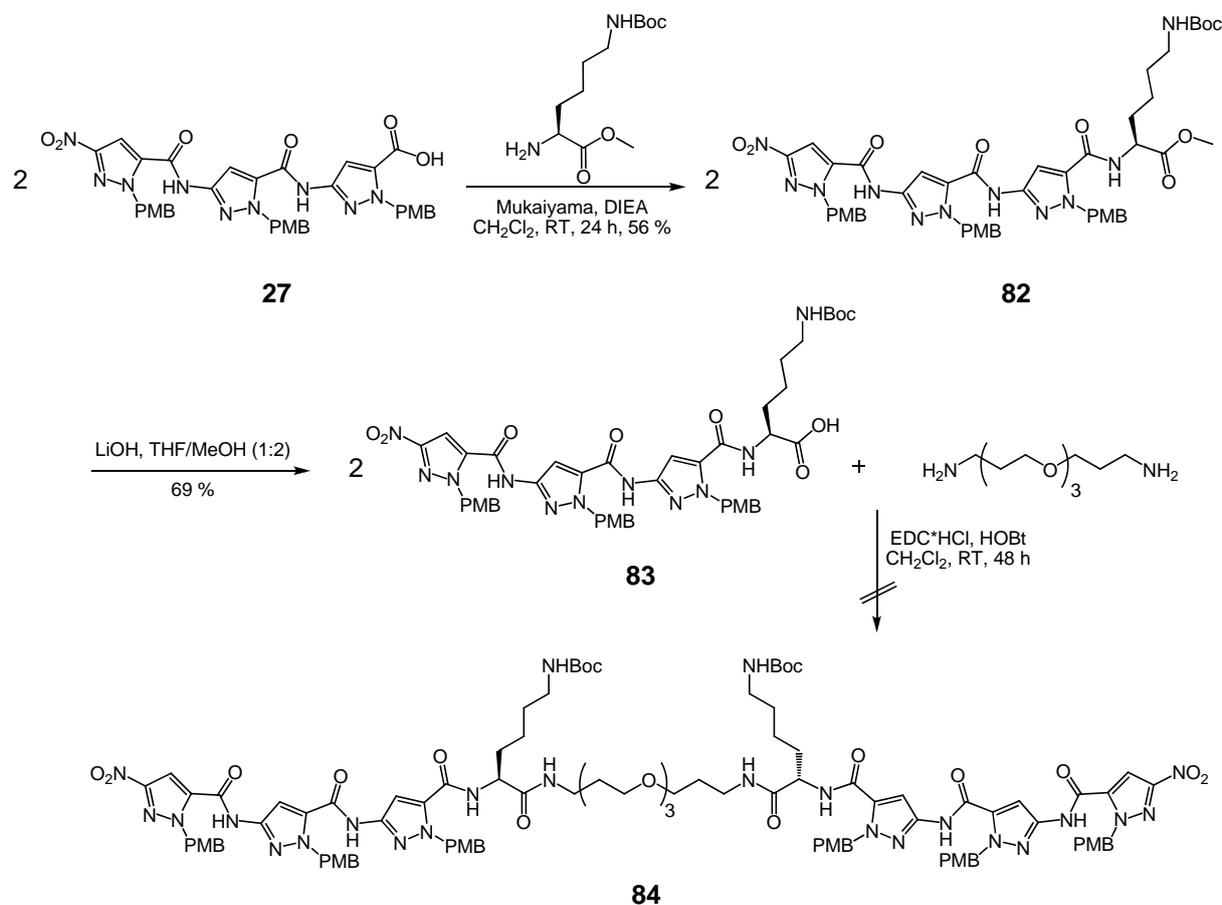


Abbildung 3.43: Syntheseversuch von (Trim-K)₂-TEGDA **84**.

Infolgedessen wurde eine alternative Syntheseroute ausgearbeitet, die mit der Umsetzung des Z-Lysin(Boc)-OH mit TEGDA **31** in Anwesenheit von DIC und DMAP beginnt (Abbildung 3.44). Der auf beiden Seiten mit Z-Lysin modifizierte Spacer **85** konnte anschließend hydrogenolytisch mit Palladium auf Aktivkohle von den beiden Benzylschutzgruppen befreit werden. Die anschließende Kupplung von diesem funktionalisierten Diaminospacer **86** mit PMB-geschützter Trimer-Säure **27** gelang in einer ausreichenden Ausbeute. Nach einer PMB-Entschützung konnte das (Trimer-K)₂-TEGDA **84** als Ditrifluoracetatsalz in einer beinahe quantitativen Ausbeute erhalten werden.

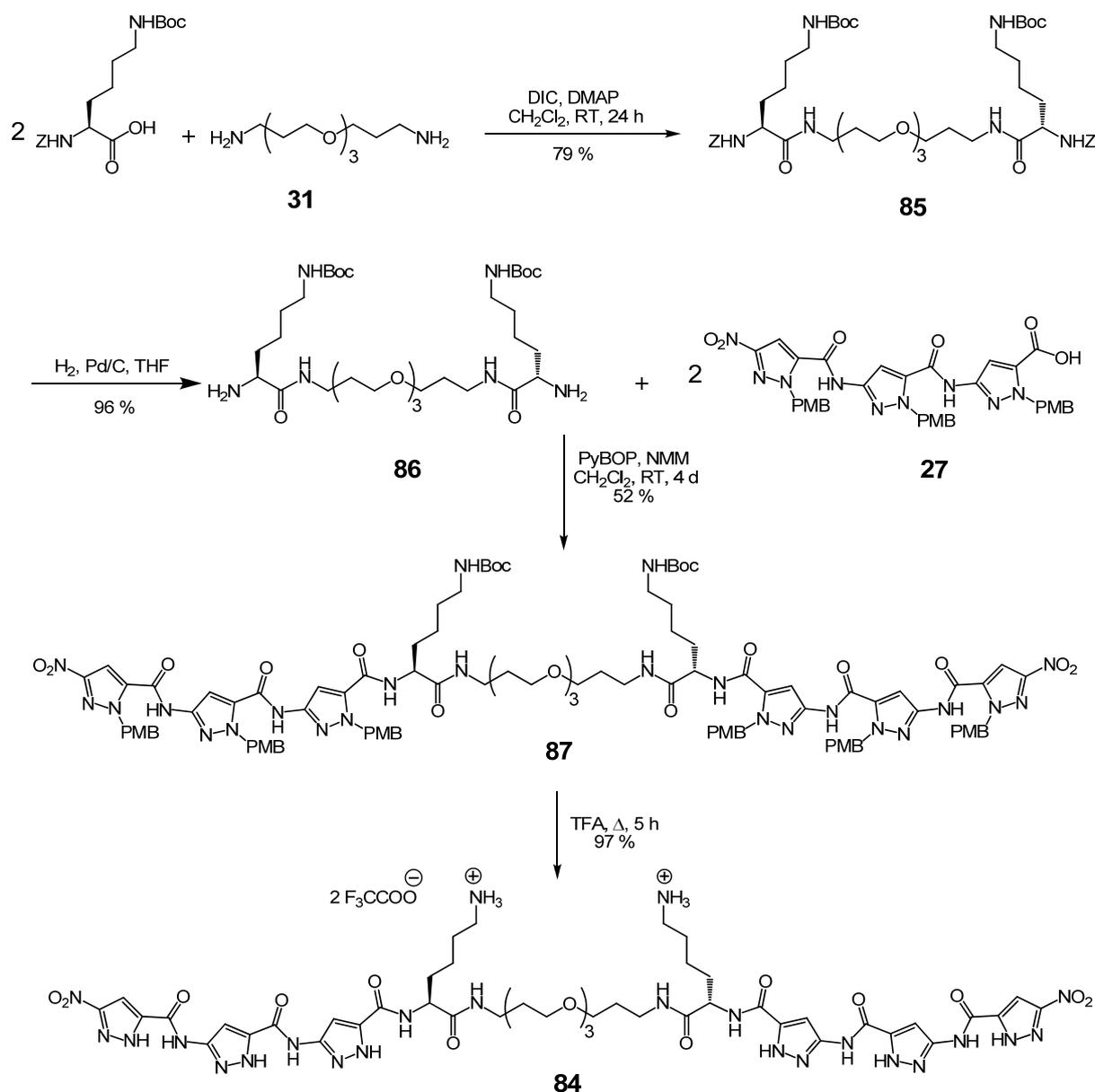


Abbildung 3.44: Syntheschema von (Trimer-K)₂-TEGDA **84**.

3.4.9 Überblick der neuen Trimer-Derivate

Auf der Basis der Leitstruktur **16** konnten erfolgreich mehrere neue β -Faltblattliganden hergestellt werden. Neben dem Einbau von kleinen Substituenten zur Erhöhung der Lipophilie bzw. der Wasserlöslichkeit, gelang es mittels Festphasen-Peptidsynthese kurze Peptidsequenzen, die bestimmte $\text{A}\beta$ -Epitope ansteuern sollten, einzuführen. Alle Modifizierungen wurden dabei über einen TEG-Spacer vorgenommen. Um die Bindungsaffinität von Rezeptor **16** zu erhöhen, konnte dieser zu einem löslichen und einem unlöslichen Rezeptor dimerisiert werden. Die durchgeführten Moleküldynamik-Rechnungen (*AK Sticht*) konnten für einige lösliche Trimer-Derivate die postulierten Bindungsorte der neuen Substituenten bestätigen. Die löslichen Liganden und insbesondere die aussichtsreichsten Derivate wurden später mittels ThT-Test, CD-Spektroskopie und TEM untersucht.

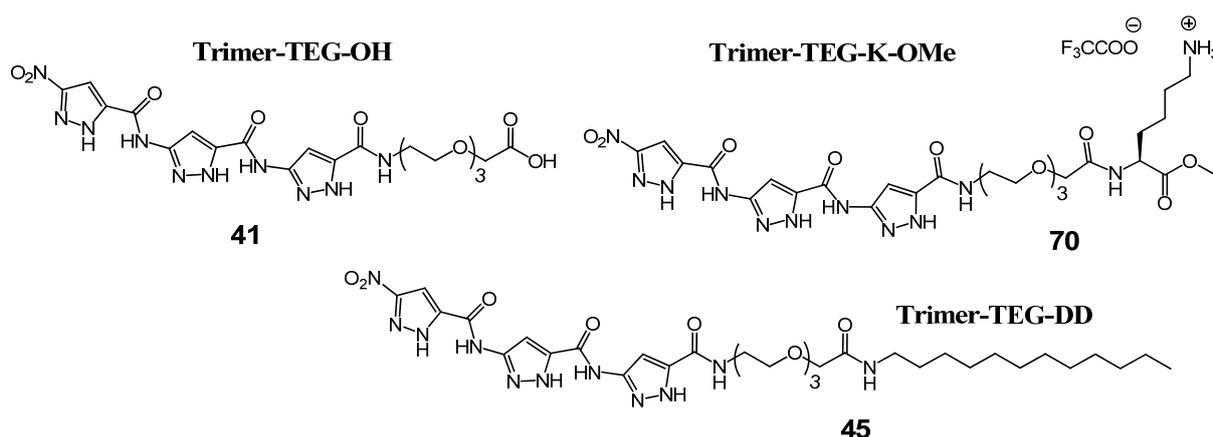


Abbildung 3.45: Strukturen der Trimer-Derivate mit kleinen eingeführten Gruppen.

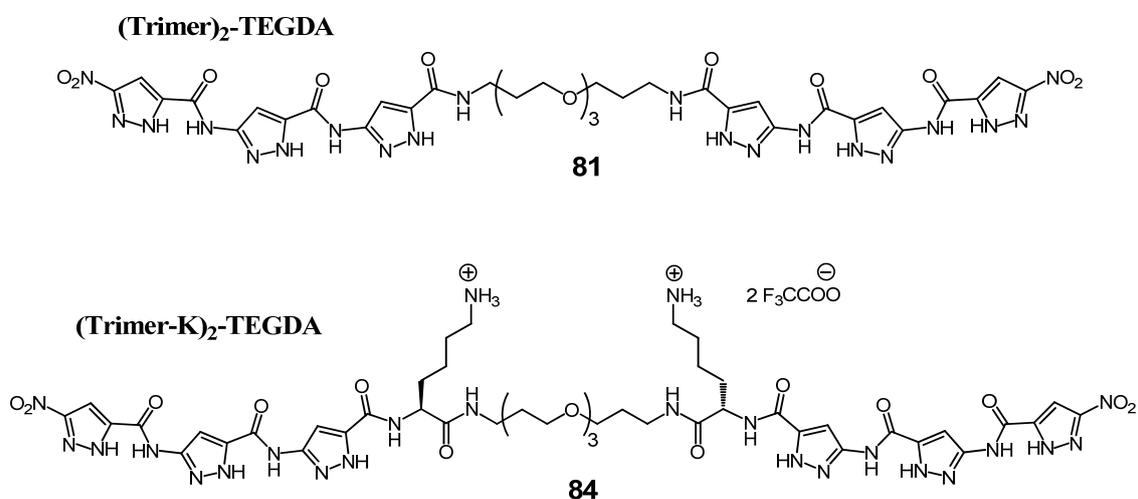


Abbildung 3.46: Dimere des Trimers.

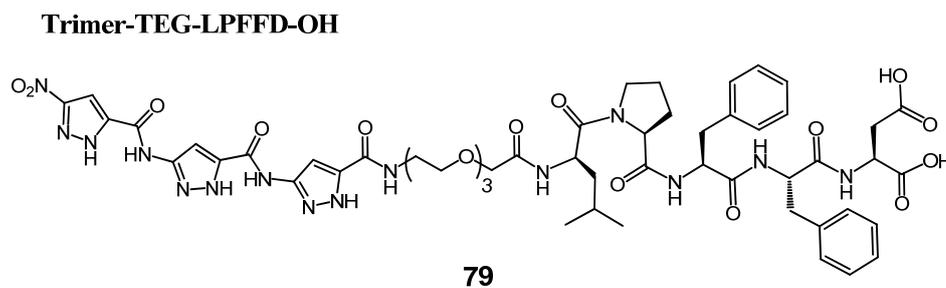
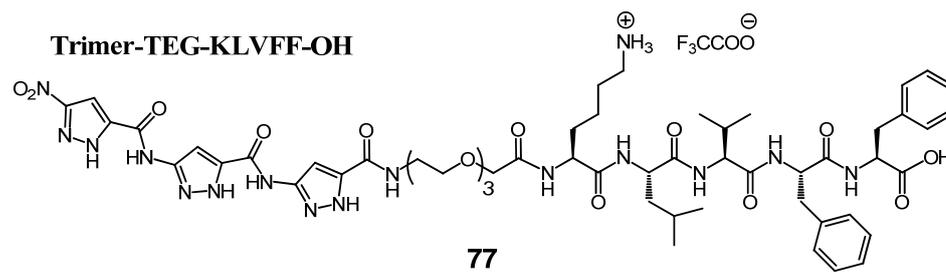
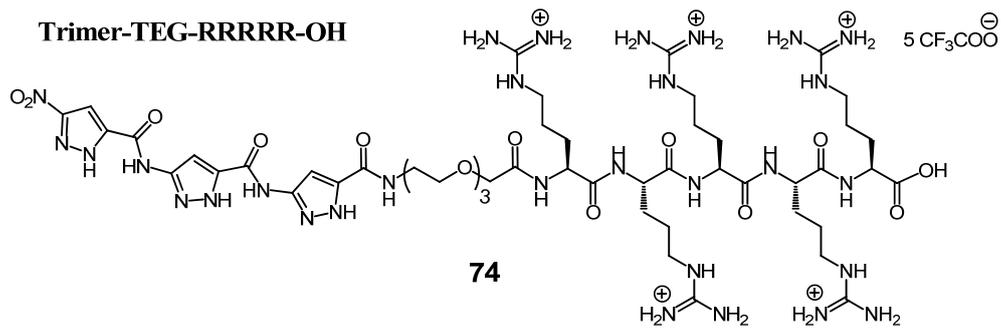
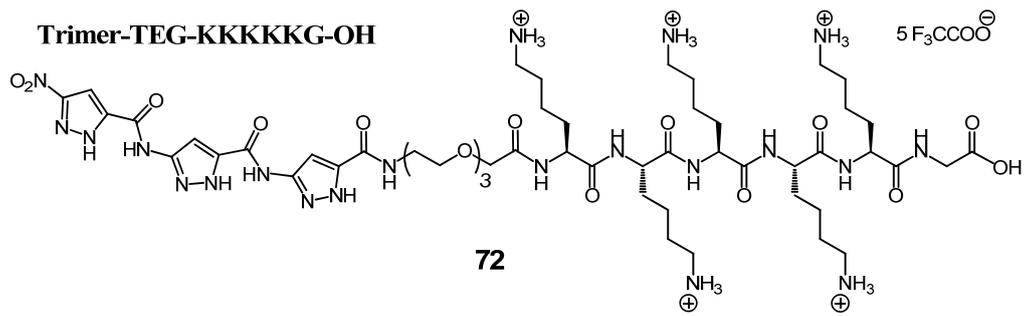


Abbildung 3.47: Semipeptidische Trimer-Derivate.

3.4.10 Berechnung der pharmakologischen Eigenschaften von Trimer-Derivaten

Bei der Entwicklung von Wirkstoffen besteht ein großes Interesse bestimmte Eigenschaften vorhersagen bzw. abschätzen zu können. Die Verabreichung eines Medikaments kann im Allgemeinen oral durch Absorption des Wirkstoffes im Magen-Darm-Trakt oder durch verschiedene Arten von Injektionen und Diffusionen durch Haut oder Schleimhäute erfolgen. Die orale Verabreichung wird in der Regel bevorzugt angestrebt.^[203] Wenn ein Wirkstoff auf das zentrale Nervensystem wirken soll, muss er mit lipophilen (Membranen) und wässrigen (z. B. Zytoplasma) Umgebungen wechselwirken können und zudem in der Lage sein die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Um die orale Verfügbarkeit von Substanzen abschätzen zu können, sind Parameter wie Lipophile, Größe und Ionisierungsgrad von entscheidender Bedeutung. Die Lipophilie einer Substanz wird quantitativ durch ihren Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (log P) ausgedrückt. Log P-Werte können gemessen oder mit relativ hoher Zuverlässigkeit berechnet werden. Ein weiterer nützvoller Parameter ist die sogenannte „molecular polar surface area“, welche ein Maß für die Polarität des Moleküls darstellt. Dieser Parameter ist definiert als Summe an Oberflächen, die zu polaren Atomen, wie Stickstoff- und Sauerstoffatomen in einem Molekül gehören, und kann ebenfalls berechnet werden.^[204] Eine weit verbreitete Faustregel für orale Verfügbarkeit wurde 1997 von *Lipinski et al.* aufgestellt. Diese „Lipinski’s rule of five“ besagt, dass eine Substanz wahrscheinlich eine schlechte Absorption oder Permeabilität besitzt, falls eine der folgenden Bedingungen zutrifft: Molmasse über 500 g/mol, mehr als 5 H-Brückendonatoren, mehr als 10 H-Brückenakzeptoren und $\text{Log P} > 5$.^[205, 206]

Mit Hilfe eines Molinspiration-Computerprogramms wurden miLog P-Werte (Molinspiration Log P) und TPSA-Werte (engl. topological polar surface area) für alle hergestellten Trimer-Derivate berechnet.^[207] Diese sind in der Tabelle 3.1 mit den Löslichkeiten und Molekulargewichten zusammengefasst.

Alle hergestellten Trimer-Derivate besitzen Molekulargewichte über 500 g/mol. Nur das Trimer **16**, die Leitstruktur selbst, liegt unterhalb dieses Wertes. Die Anzahl der H-Brückendonatoren beträgt bei den substituierten Trimer-Derivaten mindestens 6, beim Trimer **16** dagegen nur 5. Die Anzahl der H-Brückenakzeptoren liegt in der Leitstruktur **16** bei 6 und erhöht sich bei TEG-enthaltenden sowie semipeptidischen Derivaten auf über 10. Bis zu einer Größe von 70 Å hat die polare Oberfläche keinen negativen Einfluss. Ab 140 Å ist eine Verschlechterung der Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes zu erwarten. Die berechneten TPSA-Werte liegen bei allen Trimer-Derivaten sowie beim Trimer **16** über 140 Å. Nur die

berechneten miLog P-Werte überschreiten nicht die kritische Grenze und sind in allen Fällen unter 5. Das Einführen der hier gewählten Substituenten hatte also einen negativen Einfluss auf die oben erwähnten pharmakokinetischen Eigenschaften der Leitstruktur **16**. Verglichen mit allen Trimer-Derivaten besitzt das Trimer **16** nur einen zu hohen TPSA-Wert und liegt in anderen Punkten innerhalb der zulässigen Grenzen. Die Trimer-Derivate überschreiten die Grenzen von in der Regel mindestens drei Kriterien (Molekulargewicht, TPSA sowie Anzahl der H-Brückendonatoren) und besitzen deshalb voraussichtlich schlechte pharmakokinetische Eigenschaften.

Tabelle 3.1: Zusammenstellung der Eigenschaften von Trimer-Derivaten.

Verbindung	Mol.-Gewicht [g/mol]	Löslichkeit	miLog P	TPSA [Å]
Trimer 16	389.28	b	-0.26	216.37
Trim-TEG-OH 41	564.47	b	-2.07	284.17
Trim-TEG-K-OMe 70	706.66	a	-2.51	328.30
Trim-TEG-KKKKKG-OH 72	1262.38	a	-5.82	588.87
(Trim-K) ₂ -TEGDA 84	1191.14	a	-4.10	576.28
Trim-TEG-DD 45	731.80	b	+3.27	275.97
Trim-TEG-LPFFD-OH 79	1184.17	b	+0.58	441.10
Trim-TEG-KLVFF-OH 77	1199.27	b	-1.83	455.68

a) wasserlöslich bis min. 4.95 mM; b) löslich in DMSO und verdünnbar mit PBS bis zu einer 198 µM Lösung in 1xPBS/DMSO (90:10).

3.5 Trimer mit Pinzette

In einem weiteren Projekt dieser Doktorarbeit sollte das Trimer **16** mit einem weiteren Aggregationshemmer, der phosphatsubstituierten Pinzette **88** (Abbildung 3.48), kovalent verbunden werden. Das von *Klärner, Schrader et al.* entworfene wasserlösliche Rezeptormolekül bildet selektiv mit basischen Aminosäuren wie Arginin und Lysin recht stabile Wirt-Gast-Komplexe. Diese Eigenschaft wurde im Wesentlichen für zwei unterschiedliche biologische Anwendungen genutzt. Neben der enzymhemmenden Funktion ist das Rezeptormolekül in der Lage die Aggregation mehrerer Amyloid-bildender Proteine, unter anderem die des Alzheimer-Peptids, zu unterdrücken. Die letztere Eigenschaft wurde von *Gal Bitan* (David Geffen School of Medicine, Los Angeles) entdeckt und untersucht. Das Prinzip dieser Hemmung beruht auf der Komplexierung der basischen Aminosäuren (Lysine 16, 28 und Arginin 5) des A β -Peptids, die mittels Massen- und ^{15}N -NMR-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen werden konnte. Insbesondere die Komplexierung des Lysins 28 hätte gravierende Auswirkung auf die A β -Aggregation, da wie bereits im Kapitel 1.5 beschrieben wurde, die Ausbildung der Salzbrücke zwischen Lysin 28 und Aspartat 23 für die Ausbildung des β -Turns und somit für die Stabilität der Protofibrille von essentieller Bedeutung ist. Einen Beweis für die bevorzugte Komplexierung des Lysins 28 gibt es bislang jedoch nicht.

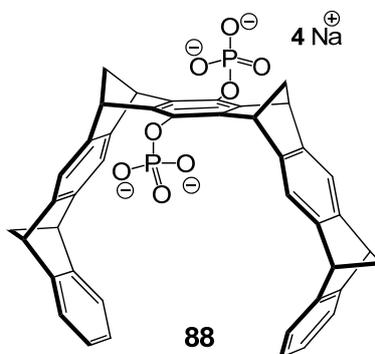


Abbildung 3.48: Struktur der Phosphat-Pinzette **88**.

Durch eine kovalente Verknüpfung der Pinzette **88** mit dem Trimer **16** sollte eine Ansteuerung von zwei unterschiedlichen Epitopen im Amyloid- β -Peptid ermöglicht werden. Damit die beiden Rezeptoreinheiten ihre jeweiligen Bindungsstellen ungehindert erreichen können, wurde ein Abstandhalter vorgesehen. Auch in diesem Fall wurde der zuvor synthetisierte TEG-Linker in Form von Trimer(PMB)-TEG-Säure **40** eingesetzt. In einer Veresterungsreaktion wurde diese mit der Dihydroxypinzette **89**, einer Vorstufe der Phosphat-

Pinzette **88**, die von *Peter Talbiersky* synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurde, umgesetzt (Abbildung 3.49). Die Reaktion verlief in Gegenwart von PyBOP und NMM. Neben dem eigentlichen Zielmolekül **90** wurde auch das bisubstituierte Produkt **91**, das keine weitere Anwendung fand, erhalten.

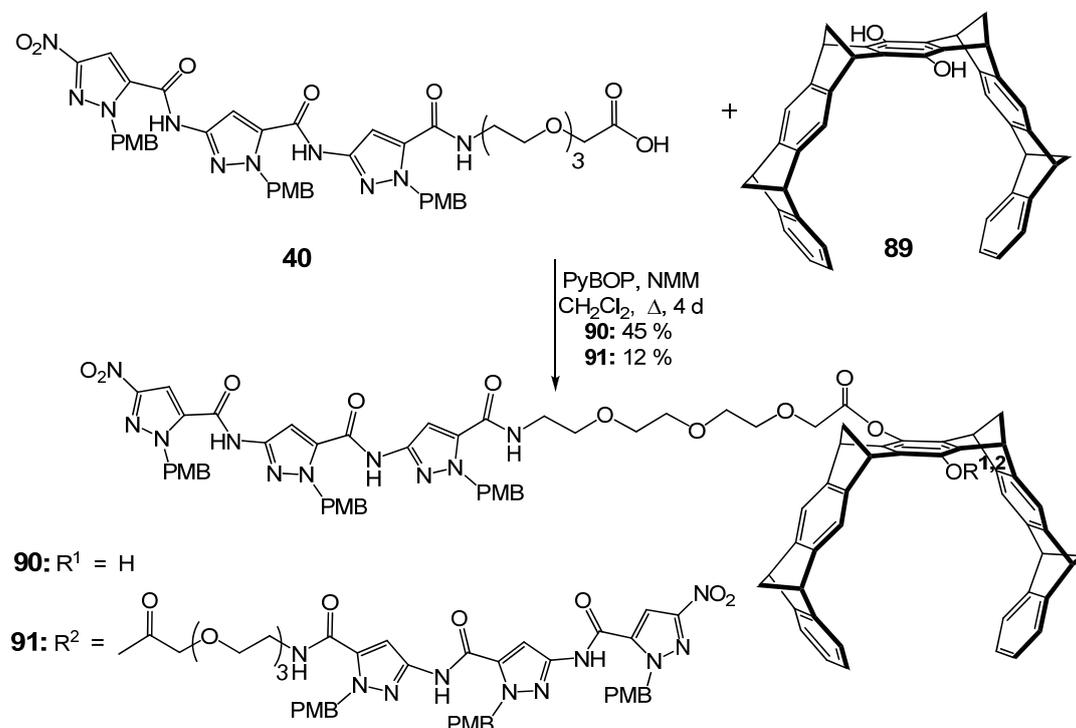


Abbildung 3.49: Synthese der Verbindungen **90** und **91**.

Im nächsten Schritt erfolgte die Phosphorylierung der freien Hydroxygruppe der Verbindung **90** durch Zugabe von Phosphoroxychlorid in Anwesenheit von Triethylamin als Base und anschließender Hydrolyse (Abbildung 3.50). Leider wurden im darauffolgenden PMB-Entschützungsprozess, der drastische Bedingungen erfordert, festgestellt, dass neben der Entfernung der Schutzgruppen auch die Esterbindung zwischen dem TEG-Linker und der Pinzette gespalten wurde (Abbildung 3.51). Trotz der gewählten wasserfreien Bedingungen, sowohl im Laufe der Reaktion als auch bei der anschließenden Fällung mit Diethylether, konnte diese Esterspaltung nicht verhindert werden. Des Weiteren wurde die PMB-Entschützung der nicht Phosphat-substituierten Vorstufe **90** vorgenommen, die ebenfalls zur Spaltung dieser Esterbindung führte (nicht dargestellt).

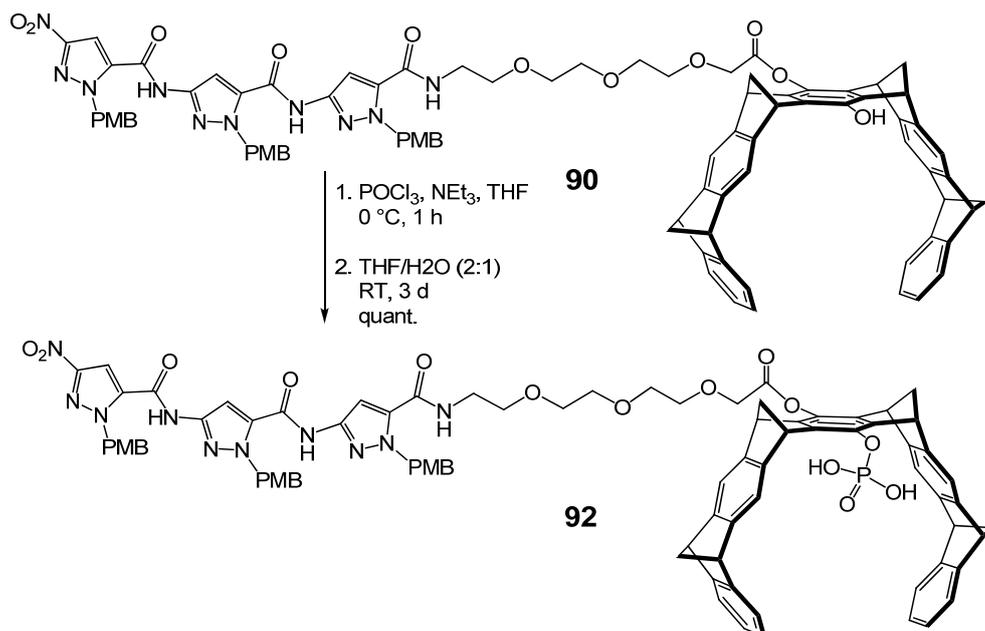


Abbildung 3.50: Synthese der Verbindung **92**.

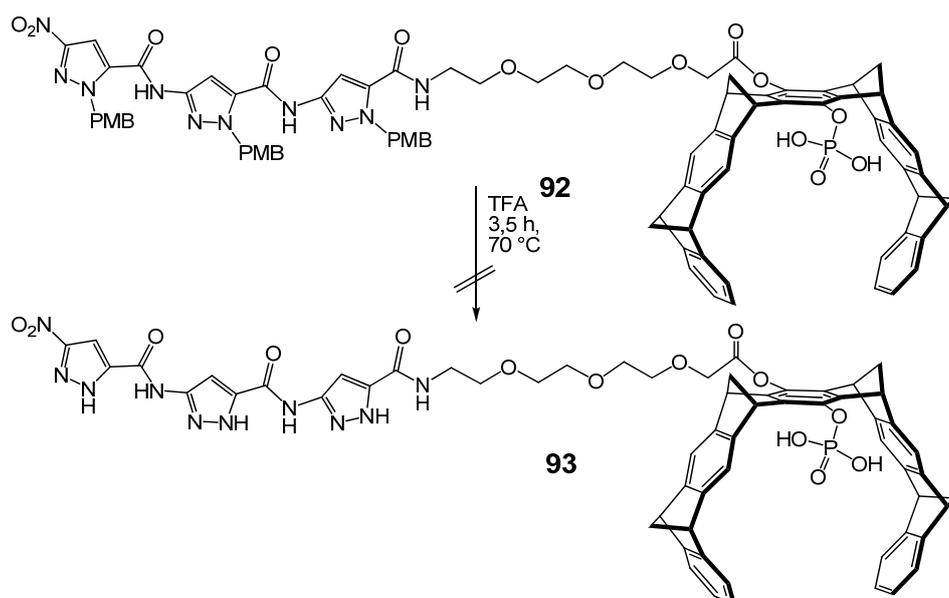


Abbildung 3.51: Syntheseversuch der Verbindung **93**.

Um die drastischen Bedingungen der PMB-Entschützung zu umgehen, wurde eine Kupplungsreaktion über den NHS-Aktivester vorgenommen. Da die NHS-Aktivester bevorzugt mit primären Aminogruppen reagieren, wurde hier anstelle der Dihydroxypinzette **89** eine einseitig funktionalisierte Pinzette **94**, die ebenfalls von *Peter Talbiersky* synthetisiert wurde, eingesetzt (Abbildung 3.52). Die Verbindung **94** besitzt eine terminale Aminogruppe und sollte als Nucleophil eine Substitutionsreaktion mit einem NHS-Aktivester eingehen können. Leider konnte auch auf diesem Syntheseweg das gewünschte Produkt **95** nicht erhalten werden.

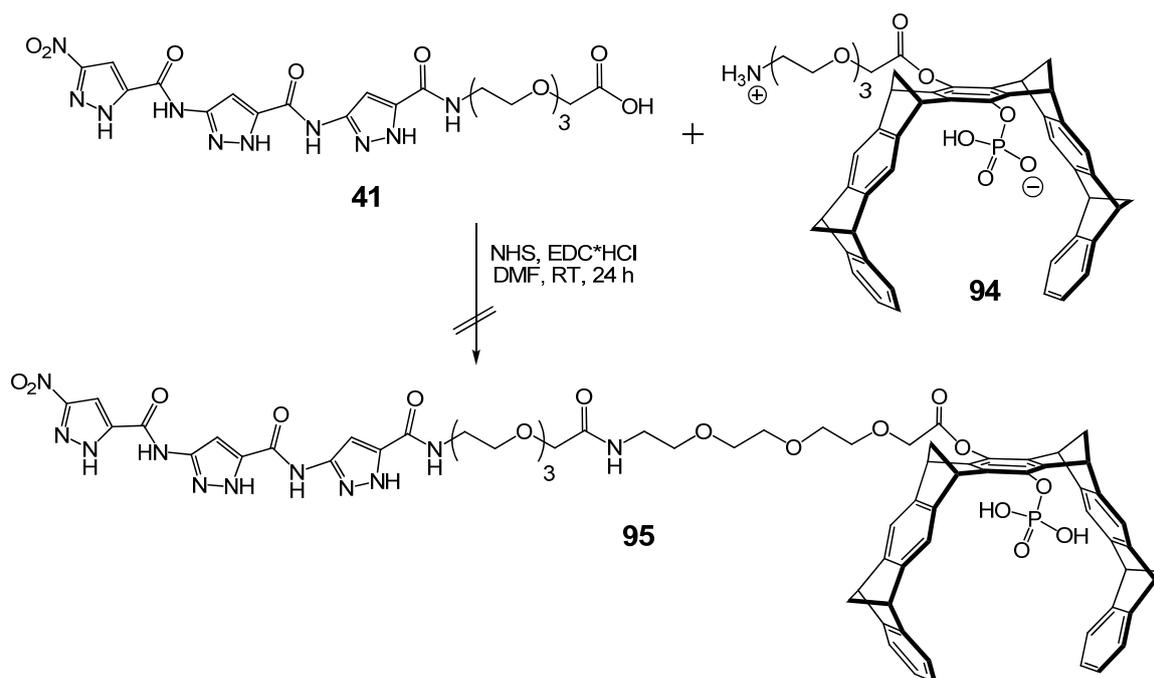


Abbildung 3.52: Syntheseversuch der Verbindung **95**.

3.6 Trimer mit Fluoreszenzlabel

Mit dem Trimer **16** konnten bisher keine Untersuchungen bezüglich seiner Zellmembrangängigkeit durchgeführt werden. Sehr interessant wäre es ebenfalls, die Affinität dieses β -Faltblattliganden bezüglich verschiedener Proteine bzw. Peptide zu erforschen. Für Untersuchungen dieser Art werden oft fluoreszenzmarkierte Rezeptoren eingesetzt. Zur Einführung einer Fluoreszenzsonde wurde das aminoreaktive Fluoresceinisothiocyanat (FITC) eingesetzt. Die Sonde ist in der Lage bei leicht basischen Bedingungen mit primären Aminen, unter Ausbildung eines Thioharnstoffderivates zu reagieren. Trimer-TEG-Lysin-OMe **70** wurde als Ausgangsverbindung für eine Konjugation mit FITC ausgewählt (Abbildung 3.53). Für die Kupplungsreaktion wurden die beiden Komponenten im äquimolaren Verhältnis eingesetzt. Da das Trimer-Derivat **70** keine Schutzgruppen enthält, müsste im Falle einer vollständigen Kupplung das Produkt nicht mehr gereinigt bzw. von den Kupplungsreagenzien befreit werden. Die Reaktion wurde in einem Gemisch aus DMSO und Carbonatpuffer (pH 9.8) durchgeführt, da FITC sehr schlecht wasserlöslich ist. Die massenspektrometrische Untersuchung des erhaltenen Feststoffes ergab, dass eine vollständige Umsetzung zum detektierten Produkt **96** stattgefunden hat.

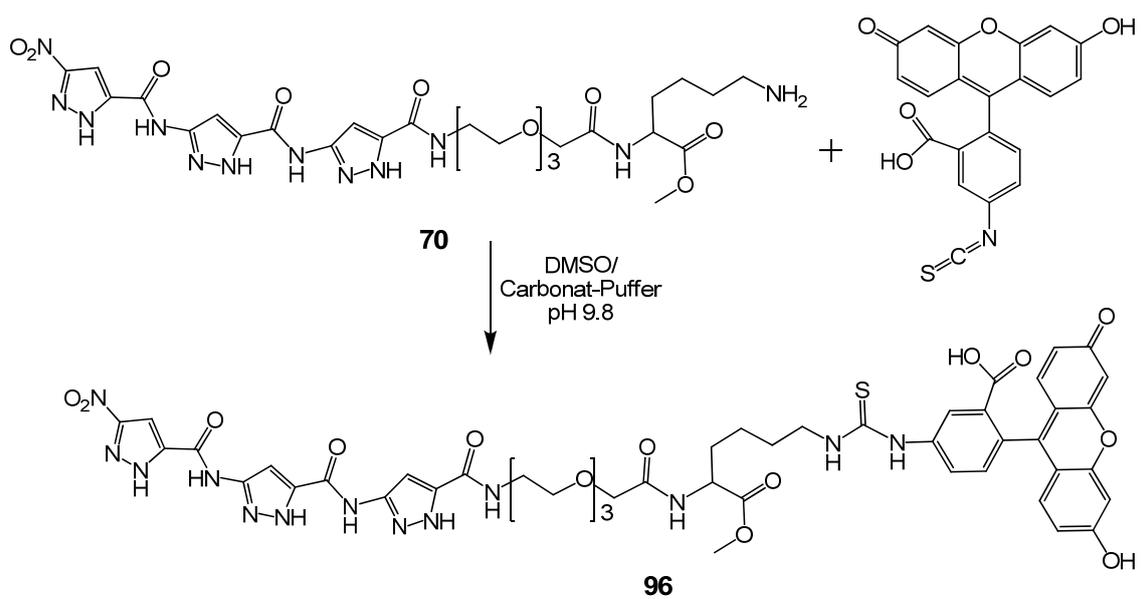


Abbildung 3.53: Synthese des fluoreszenzmarkierten Trimer-TEG-Lysins **96**.

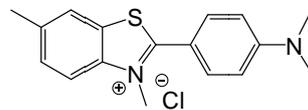
4. In vitro und in vivo Untersuchungen

4.1 Aggregationstests mit biophysikalischen Methoden

4.1.1 ThT-Fluoreszenztest

4.1.1.1 Beschreibung der Methode

Thioflavin T (ThT), dessen Strukturformel in Abbildung 4.1 dargestellt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit zum quantitativen Nachweis amyloider Strukturen eingesetzt.



97

Abbildung 4.1: Strukturformel von Thioflavin T (3,6-Dimethyl-2-(4-dimethylaminophenyl)-benzothiazoliumchlorid).

Thioflavin T ist ein ursprünglich in der Histologie genutzter Fluoreszenzfarbstoff. Zu den färbaren Strukturen gehören Mucopolysaccharide, Nukleinsäuren und insbesondere eine Reihe amyloider Fibrillen.^[208] ThT weist durch die Bindung an amyloide Proteinstrukturen charakteristische Änderungen seines Fluoreszenzspektrums auf. Diese zeigen sich durch batho- und hyperchrome Verschiebungen der Fluoreszenz des ThT/Amyloid-Komplexes gegenüber dem freien Farbstoff (siehe Abbildung 4.2).

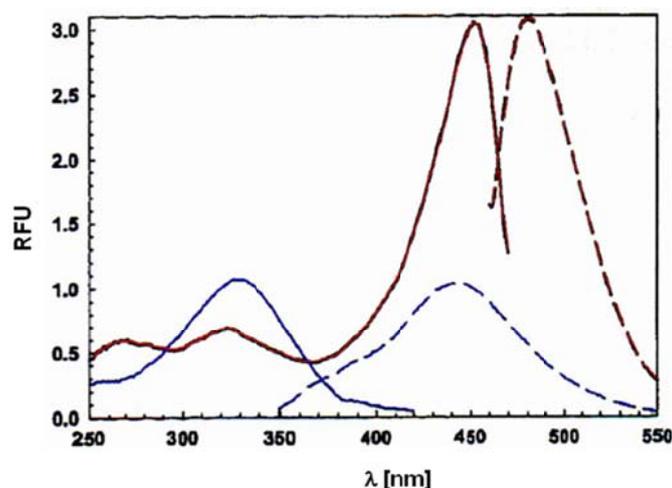


Abbildung 4.2: Fluoreszenz-Spektren von freiem (blau) und an A β (1-40)-Fibrillen gebundenem ThT (rot). Excitationsspektren (durchgezogene Linien) und Emissionsspektren (gestrichelte Linien).^[208]

Dieser Effekt wird oft genutzt um amyloide Fibrillen zu quantifizieren.^[208] Die Excitationswellenlänge kann so gewählt werden, dass nur gebundenes ThT angeregt wird. Das erhaltene Emissionsspektrum gibt also Aufschluss über die Menge des gebundenen Farbstoffes. Liegen in der untersuchten Lösung viele amyloide Strukturen vor, so kann viel ThT an diese binden, und die Fluoreszenzausbeute ist im Vergleich zu Lösungen mit wenig gebundenem ThT höher. Mit Hilfe des ThT-Fluoreszenztests lassen sich spezifisch amyloide A β -Fibrillen von amorphen Aggregaten unterscheiden. Es findet keine spektrale Verschiebung statt, wenn ThT an Monomere, kleine Oligomere oder amorphe Aggregate bindet.^[209] Die Interaktion zwischen ThT und amyloiden Fibrillen basiert auf gestapelter β -Faltblattstruktur. Demnach können auch Protofibrillen und größere Oligomere, deren Sekundärstruktur in β -Faltblatt-Konformation vorliegt, von ThT gebunden werden.

Der Mechanismus der Wechselwirkung zwischen ThT und Amyloid-Fibrillen ist bisher nur wenig verstanden. In einer weit verbreiteten Theorie wird eine Interkalation des ThT-Moleküls in Rillen bzw. Furchen der Amyloid-Fibrillen angenommen.^[210] Solche Zwischenräume verlaufen parallel zur Fibrillenachse, und werden durch vom Lösungsmittel ausgeschlossene Aminosäure-Seitenketten gebildet.^[211] Durch die Bindung des ThT-Moleküls in diesen Kanälen wird seine Rotation stark eingeschränkt, was eine drastische Erhöhung der Quantenausbeute zur Folge hat. Die geringe Quantenausbeute des freien Fluorophors wird der Rotation des Aminophenylrings relativ zum Benzothiazol-Ringsystem im elektronisch angeregten Zustand zugeschrieben, was zu einer Verkleinerung des delokalisierten π -Elektronensystems führt.^[212, 213]

4.1.1.2 Einfluss der synthetisierten Liganden auf A β (1-42)

Mit Hilfe des ThT-Fluoreszenztests wurden alle synthetisierten Liganden, die unter den benötigten Bedingungen gelöst werden konnten, auf ihre aggregationsinhibierende und disaggregierende Wirkung bezüglich des A β (1-42)-Peptids untersucht. Trimer-TEG-Pentaarginin **74** und (Trim)₂-TEGDA **81** konnten aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit nicht analysiert werden. Die Trimer-TEG-Säure **41** wurde bereits weitgehend durch *Katrin Hochdörffer* im ThT-Test untersucht und wird deshalb im Folgenden nicht beschrieben. Für ThT-Experimente musste das gekaufte A β ₄₂-Peptid zunächst mit Hexafluoroisopropanol (HFIP) monomerisiert und zum Ansetzen der Stammlösung in DMSO gelöst werden. Auf diese Weise hergestellte Aliquots konnten mehrere Monate bei -18 °C aufbewahrt werden, da

in DMSO keine β -Faltblattstruktur ausgebildet wird.^[214] Die genaue Zusammensetzung der Lösungen und Bedingungen für diesen Test sind im Kapitel 6.11.1 geschildert.

Aggregationsinhibierung durch Trimer-Derivate und Hybridverbindungen

Auf die aggregationsinhibierende Wirkung bei 33 μ M A β -Konzentration sollten folgende Liganden untersucht werden: Trim-TEG-K-OMe **70**, (Trim-K)₂-TEGDA **81**, Trim-TEG-KKKKKG-OH **72**, Trim-TEG-KLVFF-OH **77** und Trim-TEG-LPFFD-OH **79**. Des Weiteren sollte das Trimer-TEG-NTA **66**, das im Gegensatz zu polykationischen Verbindungen drei negative Ladungen enthält, vermessen werden. Alle Liganden wurden vorab auf ihre Eigenfluoreszenz und auf ihre Eigenschaft, das Fluoreszenzverhalten des ThT-Farbstoffes zu verändern, untersucht (siehe Kapitel 6.11.1). Hierbei wurden die Konzentrationen und Bedingungen analog zu Messungen mit dem A β ₄₂-Peptid gewählt. Für das Trimer-Derivat Trim-TEG-KLVFF-OH **77** wurde eine starke Fluoreszenz der Lösung in Anwesenheit von ThT beobachtet. Möglicherweise bildet der Ligand **77** analog zum A β -Sequenzabschnitt 16-20 (H₂N-KLVFF-COOH) fibrillenartige Aggregate, die mit ThT-Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden.^[215] Deshalb wurde diese Substanz im ThT-Test nicht weiter untersucht.

Zu den Aggregationsansätzen, die alle eine Endkonzentration von 33 μ M A β (1-42) in 1 x PBS (engl. phosphate buffered saline) aufwiesen, wurden sechs Äquivalente des jeweiligen Liganden dazugegeben. Die Ligandenzugabe erfolgte immer vor dem Inkubationsstart. Unter dem Kontrollansatz versteht man einen A β ₄₂-Aggregationsansatz, der ohne Liganden durchgeführt wird. Die Konzentrationen der anderen Bestandteile bleiben jedoch unverändert. Es wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen inkubiert. In der Abbildung 4.3 sind die inhibierenden Effekte aller untersuchten Trimer-Derivate in Form eines Säulendiagramms dargestellt. Die Ergebnisse sind in Prozent bezogen auf die Kontrolle (100%) angegeben. Hellblaue Säulen repräsentieren die lipophilen und orangefarbene die polaren Trimer-Derivate.

Das Experiment dient vor allem dem Vergleich der bereits in Vorarbeiten untersuchten Leitstruktur **16** mit neu synthetisierten Trimer-Derivaten. Mittels dieses Fluoreszenztests kann überprüft werden, ob die durchgeführte Modifikation die aggregationsinhibierende Wirkung verschärft oder verringert. Es sind jedoch in einigen Fällen relativ hohe Standardabweichungen der Mittelwerte zu beobachten, weshalb nicht statistisch darauf geschlossen werden kann, dass tatsächlich ein Unterschied zwischen den Verbindungen

gegeben ist. Das Trimer **16** konnte die A β -Aggregation auf 39 % herabsetzen.^[168] Die beiden lipophilen Derivate Trim-TEG-DD **45** (39 %) und Trim-TEG-LPFFD-OH **79** (34 %) unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Wirkung, wobei der Ligand **79** verglichen mit Trimer **16** einen leicht verbesserten Effekt ausübt. Die Auswirkungen der polaren Substituenten sind sehr unterschiedlich. Trim-TEG-NTA **66** scheint nahezu keinen Effekt auszuüben, wohingegen Trim-TEG-K-OMe **70** die ThT-Fluoreszenz auf 23 % herabsetzen konnte und somit als stärkster Inhibitor der A β -Aggregation im ThT-Test identifiziert wurde. (Trim-K)₂-TEGDA **84** und Trim-TEG-KKKKKKG-OH **72** reduzierten den ThT-Fluoreszenzwert auf 52 % und 48 % und sind damit laut diesem Experiment eher schwache Inhibitoren.

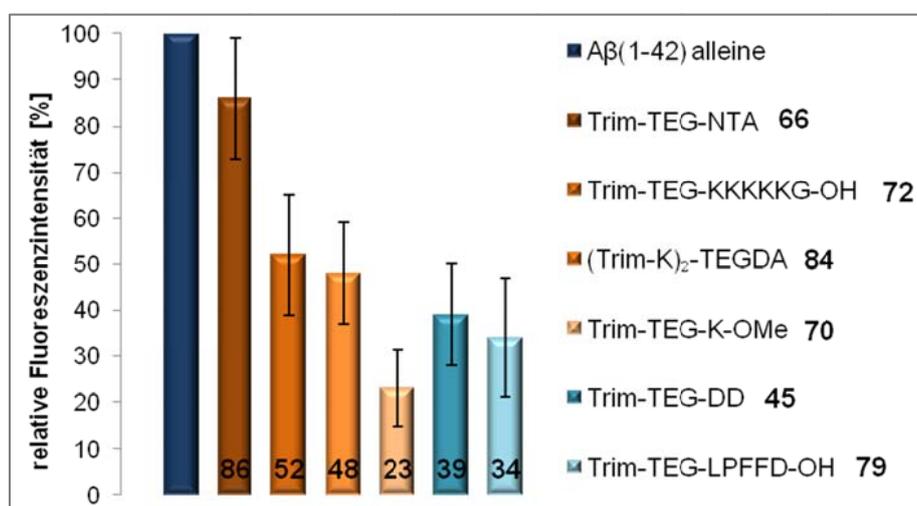


Abbildung 4.3: Inhibierung der Aggregation des A β (1-42)-Peptids (33 μ M) durch synthetisierte Trimer-Derivate (198 μ M, 6 eq bzgl. A β). Alle Werte sind in Prozent bezogen auf die Kontrolle (100 %) angegeben.

Bei 33 μ M A β -Konzentration konnten darüber hinaus alle hergestellten Hybridverbindungen bis auf Trimer-D3 **57**, das erst später synthetisiert wurde, bezüglich ihrer inhibierenden Wirkung untersucht werden. Die Durchführung des Experiments erfolgte analog zu den Inhibierungsansätzen in Gegenwart von Trimer-Derivaten. In der Abbildung 4.4 sind die inhibierenden Effekte der Hybridverbindungen in Form eines Säulendiagramms dargestellt. Die grünen Säulen repräsentieren die Trimer-D1-Hybride **51-53** und die violetten die Trimer-D3-Verbindungen **54-56**. Eine starke Spacerlängen-Abhängigkeit ist insbesondere bei Trimer-D1-Hybriden **51-53** zu beobachten. Während Trim-(TEG)₂-D1 **53** mit dem langen Spacer die A β -Aggregation nur schwach, auf 64 %, inhibieren kann, verstärkt sich der Effekt über den

mittellangen Spacer im Trim-TEG-D1 **52** (50 %) zu einer relativ hohen aggregationshemmenden Wirkung von Trim-GABA-D1 **51** (30 %) mit kurzem Spacer. Bei Trimer-D3-Hybriden **54-56** ist die Spacerlängenabhängigkeit viel schwächer ausgeprägt. So kann man bei den Liganden mit dem kurzen Spacer **54** (23 %) und mit dem mittellangen Spacer **55** (25 %) einen leichten, jedoch nicht signifikanten Unterschied der Mittelwerte feststellen. Lediglich das D3-Derivat mit dem langen Spacer **56**, besitzt einen deutlich höheren ThT-Fluoreszenzwert von 36 % und scheint hier deshalb von allen Trimer-D3-Hybridsubstanzen der schwächste Inhibitor zu sein. Nach dem Vergleich der Werte kann man also zusammenfassend sagen, dass die Verwendung eines kurzen GABA-Spacers sowohl bei D1- als auch bei D3-Hybridverbindungen am effektivsten zu sein scheint. Insgesamt waren die Trimer-D3-Hybridverbindungen viel effizienter als die entsprechenden Trimer-D1-Substanzen. Vor allem Trim-TEG-D3 **55** und Trim-GABA-D3 **54** gehören laut ThT-Experiment zu den potentesten Inhibitoren.

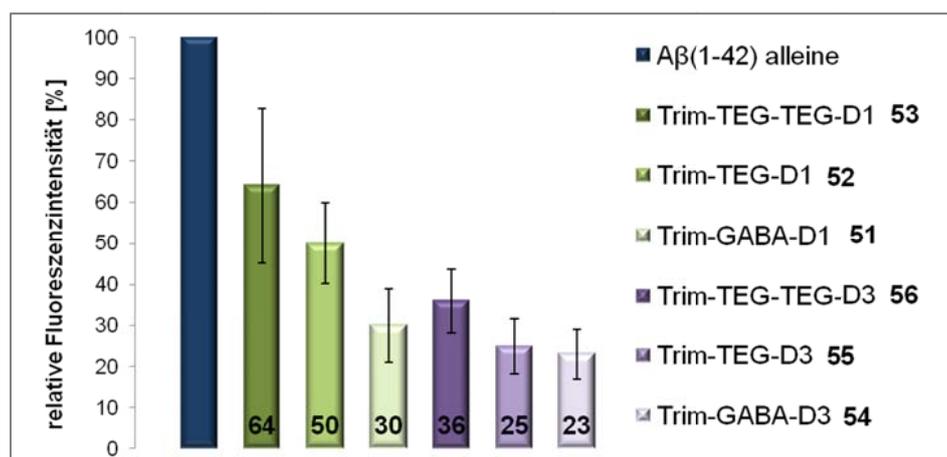


Abbildung 4.4: Inhibierung der Aggregation des Aβ(1-42)-Peptids (33 μM) durch synthetisierte Hybrid-Verbindungen (198 μM, 6 eq bzgl. Aβ). Alle Werte sind in Prozent bezogen auf die Kontrolle (100 %) angegeben.

Auflösung der Aggregate durch Trimer-Derivate und Hybridverbindungen

Ferner sollten die synthetisierten Liganden auf ihre Eigenschaft, bereits bestehende Aβ-Aggregate, z. B. Protofibrillen oder Fibrillen aufzulösen, geprüft werden. Hierzu wurden ebenfalls Untersuchungen mit dem Aβ₄₂-Peptid bei einer Konzentration von 33 μM vorgenommen. In diesem Fall wurden der zu testende Ligand (6 eq bzgl. Aβ) und

Thioflavin T zu den frisch hergestellten A β -Aggregaten zugegeben. Die erhaltenen Lösungen wurden anschließend wieder inkubiert und erst dann vermessen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.5 zusammengefasst. Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** und Trim-TEG-DD **45** sind kaum in der Lage die bereits gebildeten Aggregate aufzulösen, obwohl eine leichte Reduktion der Fluoreszenzintensität vorliegt (72 % und 86 %). Deren disaggregierende Wirkung ist viel schwächer als die aggregationshemmende, die zunächst untersucht wurde (Abbildung 4.3). Dagegen besitzen Trim-TEG-K-OMe **70** und (Trim-K)₂-TEGDA **84** sowie Hybride **52** und **55** eine ausgeprägte Fähigkeit die A β -Aggregate wieder aufzulösen. Somit zeigen Trim-TEG-D3 **55** und Trim-TEG-K-OMe **70** sowohl in Disaggregations- als auch schon in Inhibierungsuntersuchungen die stärkste Wirkung.

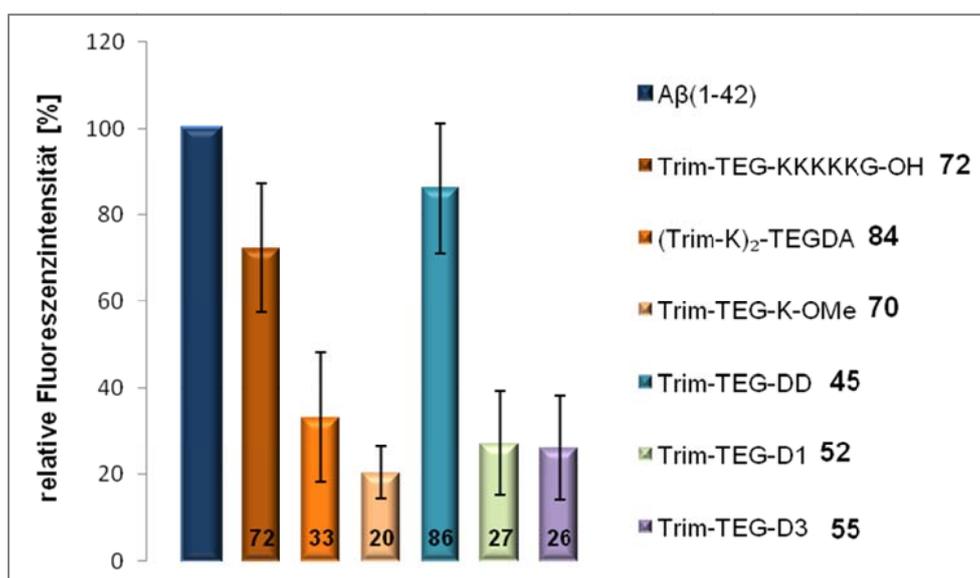


Abbildung 4.5: Disaggregation der A β (1-42)-Aggregate (33 μ M) durch synthetisierte Liganden (198 μ M, 6 eq bzgl. A β). Alle Werte sind in Prozent bezogen auf die Kontrolle (100 %) angegeben.

Dosis-Wirkungsbeziehung der synthetisierten Liganden

Aufgabe dieses Versuches war es, mit Hilfe des ThT-Fluoreszenztests eine Dosis-Wirkungsbeziehung für die potentesten Rezeptoren aufzustellen und IC₅₀- bzw. EC₅₀-Werte für diese zu ermitteln. Darunter versteht man in dem Fall die mittlere effektive Konzentration (Dosis), bei der ein halbmaximaler Effekt zu beobachten ist. Dazu wurden die Trimer-Derivate **70**, **72**, **79** und die vier Hybridverbindungen **51**, **52**, **54** und **55** ausgewählt. In diesem Experiment sollten außerdem weitere in der Literatur bekannte Aggregationshemmer

untersucht werden, um sie mit den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Liganden hinsichtlich der aggregationsinhibierenden Wirkung direkt vergleichen zu können. Es wurden folgende kommerziell erhältlichen Testsubstanzen eingesetzt: Clioquinol (5-Chloro-7-iodo-8-hydroxyquinolin, **11**), Curcumin (**12**), (-)-Epigallocatechingallat (EGCG, **13**) und *scyllo*-Inositol (**15**). Alle diese Verbindungen werden in der Literatur als wirksame Aggregationshemmer diskutiert und wurden bereits im Kapitel 1.7.2 vorgestellt.

In diesem Experiment betrug die Konzentration des A β (1-42)-Peptids 10 μ M. Die Wirkung der Liganden wurde bei sechs unterschiedlichen Konzentrationen, die von 0.5 μ M (0.05 eq bzgl. A β) bis 60 μ M (6 eq bzgl. A β) variierten, untersucht. Alle Liganden wurden vorab bei der maximalen Konzentration (60 μ M) auf ihre Eigenfluoreszenz und auf ihre Eigenschaft das Fluoreszenzverhalten des ThT-Farbstoffes zu verändern, untersucht. Die Konzentrationen und Bedingungen dieser Messungen wurden analog zu denen mit dem A β ₄₂-Peptid (10 μ M) gewählt. Obwohl die Vergleichssubstanz Curcumin (**12**) relativ hohe Fluoreszenzwerte sowohl allein als auch in Anwesenheit von Thioflavin T zeigte, wurde diese Verbindung weiter untersucht. Die Ergebnisse der ThT-Experimente resultierten aus der Gesamtfluoreszenz der Lösungen, die Eigenfluoreszenz der Liganden wurde nicht subtrahiert. Auswertungen der Fluoreszenzmessungen von allen Liganden ohne Alzheimer-Peptid sind im Kapitel 6.11.2 dargestellt.

Zur Darstellung von dosisabhängigen Effekten wurden „dose-response“-Kurven erstellt. Auf der Abszisse wurde der dekadische Logarithmus aus dem Zahlenwert der Ligandkonzentration gegen den erzielten Effekt (relative ThT-Fluoreszenzintensität in Prozent bezogen auf die Kontrolle) auf der Ordinate aufgetragen. Die Auftragung der Dosis-Antwort-Sigmoidalfunktion mit variabler Steigung und Ermittlung der IC₅₀-Werte erfolgte nach folgender Vier-Parameter-Gleichung.^[216, 217]

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{\left(\log \frac{x}{EC_{50}}\right)}} \quad (1)$$

Für die Berechnung der sigmoidalen Funktionen wurde jeweils ein hypothetischer Wert von 100 % bei 0.001 μ M Ligand in die Darstellung miteinbezogen. In der Abbildung 4.6 sind die „dose-response“-Kurven der Trimer-Derivate **70**, **72** und **79** zu sehen. Zwei Liganden konnten bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 60 μ M ihren maximalen Effekt erzielen, so dass die Kurven von **70** mit 26 % und von **79** mit 51 % in diesem Bereich ein Plateau

erreichten. Die IC_{50} -Werte bezogen auf die Maximalwerte von 24 % bzw. 51 % betragen $1.5 \mu\text{M}$ für Trim-TEG-K-OMe **70** bzw. $7.4 \mu\text{M}$ für Trim-TEG-LPFFD-OH **79**. Außerdem konnte der Ligand **70** bereits mit 0.6 eq bzgl. $A\beta$ die Aggregation auf ca. 40 % reduzieren. Dagegen konnte Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** bei seiner höchsten Konzentration von $60 \mu\text{M}$ den maximalen Effekt offensichtlich nicht erzielen. Es ist zu erwarten, dass bei steigender Ligandkonzentration die aggregationshemmende Wirkung weiter ansteigen kann. Obwohl die berechnete sigmoidale Funktion bei hohen Konzentrationen ein Plateau erreicht, sind starke Abweichungen von den gemessenen Werten zu erkennen, so dass der halbmaximale Effekt in diesem Fall nicht zuverlässig ermittelt werden kann.

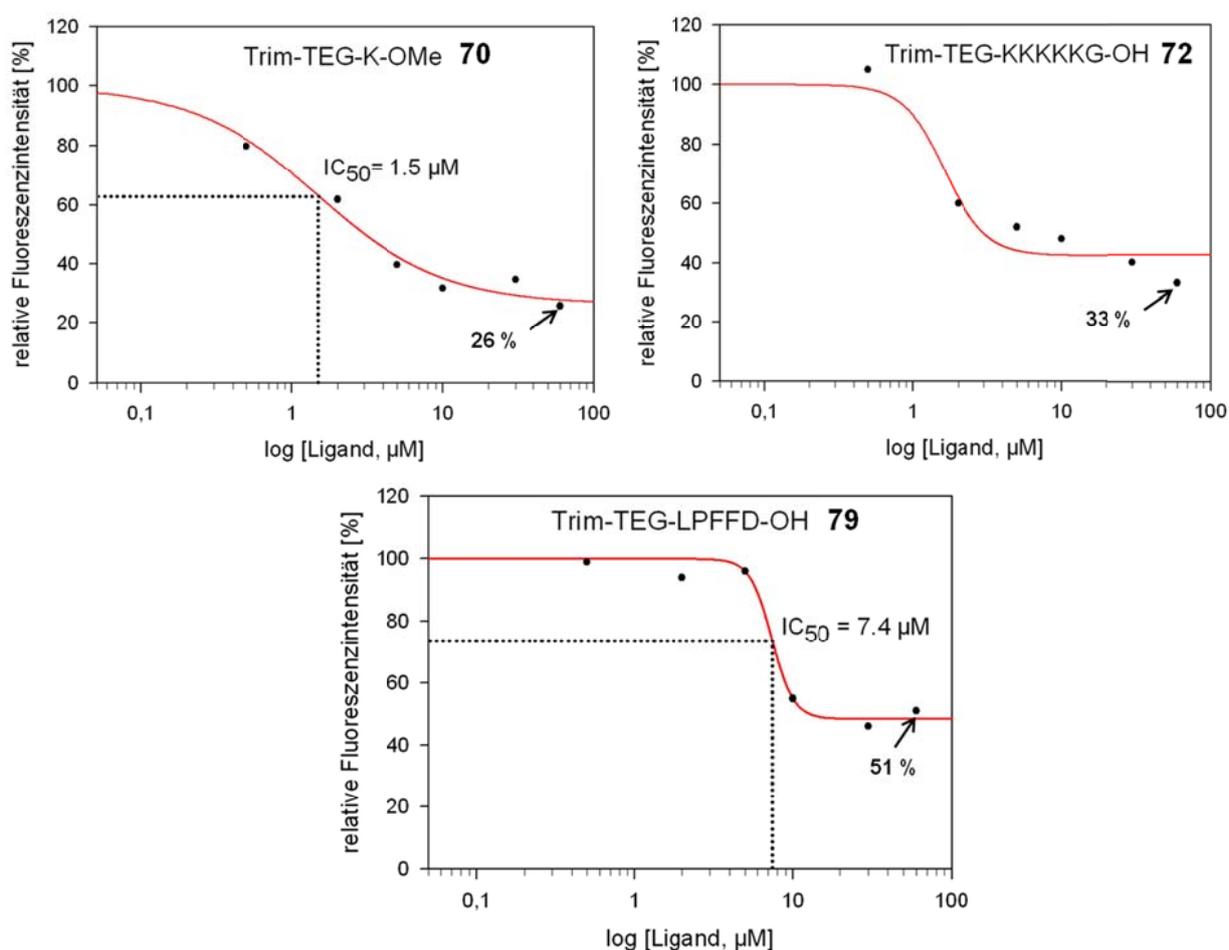


Abbildung 4.6: Übersicht der „dose-response“-Kurven und ermittelter IC_{50} -Werte von den synthetisierten Trimer-Derivaten: Trim-TEG-K-OMe **70**, Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** und Trim-TEG-LPFFD-OH **79** bei $10 \mu\text{M}$ $A\beta_{42}$ -Konzentration nach 72 Stunden Aggregationszeit.

Als nächstes sind die maximalen Effekte mit sechsfachem Überschuss an Ligand bei $10 \mu\text{M}$ und $33 \mu\text{M}$ $A\beta$ -Konzentrationen zu vergleichen. Während die Werte für Trim-TEG-

K-OMe **70** mit 23 % bei 33 μM und mit 26 % bei 10 μM A β -Konzentration gut übereinstimmen, sind bei den anderen beiden untersuchten Trimer-Derivaten **72** und **79** sehr große Unterschiede zu erkennen. Trim-Pentalysin **72** konnte bei hoher A β -Konzentration die Aggregation auf 52 % und bei niedriger Konzentration auf 33 % reduzieren. Dagegen war Trim-TEG-LPFFD-OH **79** mit 34 % im Vergleich zu 51 % bei 33 μM A β -Konzentration effektiver.

Nach der Übersichtsdarstellung der Liganden mit ihren jeweiligen IC₅₀-Werten sollten die „dose-response“-Kurven der Liganden zusätzlich durch Nebeneinanderstellung in der Abbildung 4.7 mit weiteren in der Literatur bekannten Aggregationsinhibitoren, darunter Clioquinol (**11**) und *Scyllo*-Inositol (**15**), verglichen werden. Für die Vergleichssubstanzen **11** und **15** konnten allerdings keine sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden. Diese Verbindungen zeigen nicht mit der Dosis korrelierende sprunghafte Effekte und erscheinen in diesem Experiment somit keineswegs als wirksame Aggregationsinhibitoren. Eine Aggregationsreduktion auf 54 % erreicht Clioquinol (**11**) erst bei einem sechsfachen Überschuss bezüglich A β (1-42) und ist somit etwas weniger wirksam als Trim-TEG-LPFFD-OH **79**, das Derivat mit der schwächsten Aggregationsinhibition in diesem Test. Trimer-TEG-K-OMe **70** zeigt im Vergleich zu den anderen Trimer-Derivaten auch in diesem Experiment die effektivste Wirkung bei allen verwendeten Konzentrationen.

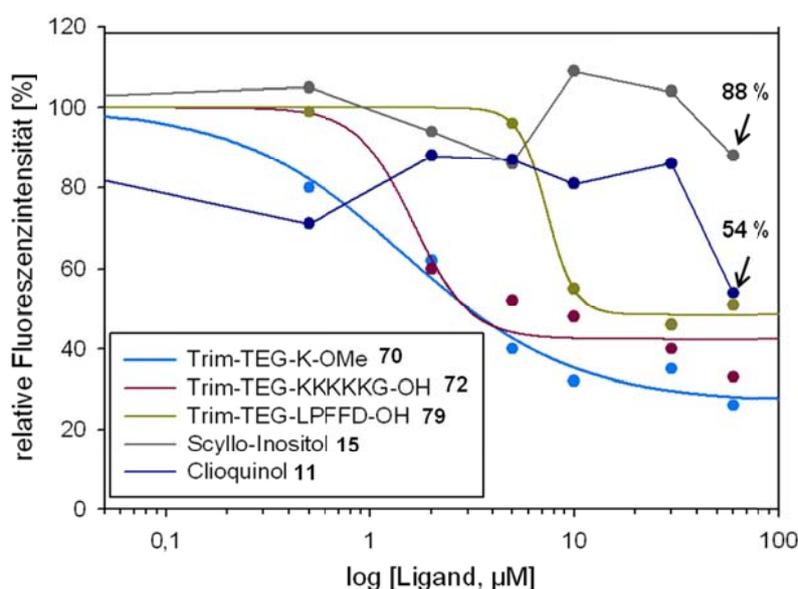


Abbildung 4.7: Nebeneinanderstellung der „dose-response“-Kurven von Trimer-Derivaten **70**, **72** und **79** zu Clioquinol (**11**) und *Scyllo*-Inositol (**15**) bei 10 μM A β ₄₂-Konzentration nach 72 Stunden Aggregationszeit.

Die Hybridverbindungen wurden ebenfalls zunächst untereinander (Abbildungen 4.8 und 4.9) und anschließend mit den potentesten käuflichen Verbindungen in ihrer Wirkung direkt verglichen. Die besten sigmoidalen Verläufe zeigen die Trimer-D3-Derivate **54** und **55**, für sie konnten die IC_{50} -Werte: $1.6 \mu\text{M}$ und $0.7 \mu\text{M}$ problemlos ermittelt werden. Für Trim-TEG-D1 **52** war die Berechnung des IC_{50} -Wertes nicht möglich, da sogar bei einem sechsfachen Überschuss bezüglich $A\beta(1-42)$ der maximale Effekt noch nicht erreicht wurde. Es ist zu erwarten, dass bei weiter steigender Konzentration an Trim-TEG-D1 **52** die Aggregation noch stärker unterdrückt werden kann. Dies bedeutet, dass der gewählte Konzentrationsbereich für diese Verbindung zur Berechnung des IC_{50} -Wertes nicht ausreichend war. Der IC_{50} -Wert von Trim-GABA-D1 **51** liegt mit $8.4 \mu\text{M}$ viel höher als der bei den Trimer-D3-Hybriden. Zudem ist seine aggregationsinhibierende Wirkung bei sechsfachem Überschuss deutlich schwächer im Vergleich zu den D3-Derivaten **54** und **55**. So konnten Trim-GABA-D1 **51** und Trim-TEG-D1 **52** die $A\beta$ -Agglomeration nur auf 40 % und 37 % reduzieren, wogegen Trim-TEG-D3 **55** und Trim-GABA-D3 **54** in der Lage waren diese auf 14 % und 7 % herabzusetzen.

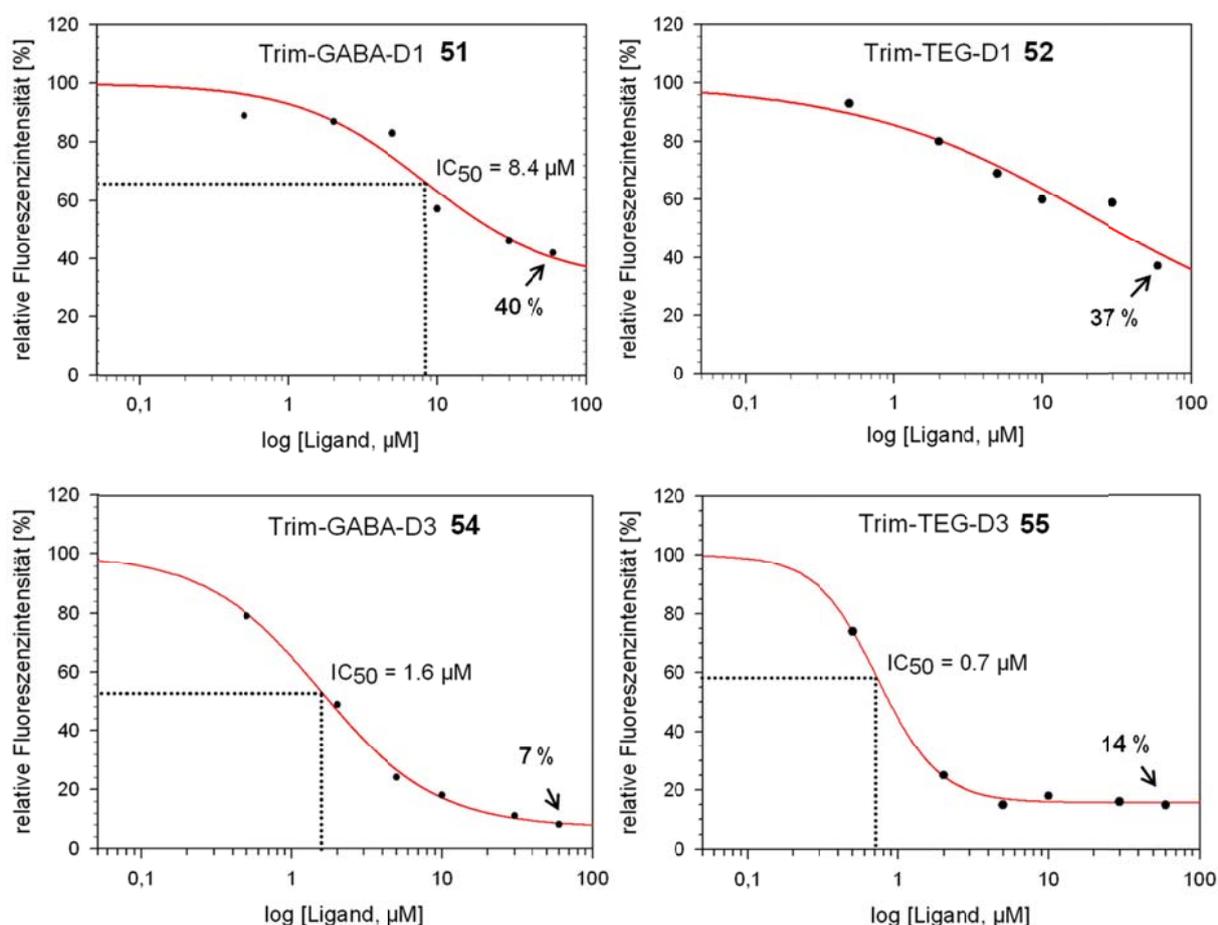


Abbildung 4.8: Übersicht der „dose-response“-Kurven und ermittelter IC_{50} -Werte der untersuchten Hybride **51**, **52**, **54** und **55** bei $10 \mu\text{M}$ $A\beta_{42}$ -Konzentration nach 72 Stunden Aggregationszeit.

Die Zusammenstellung der „dose-response“-Kurven in Abbildung 4.9 veranschaulicht jeweils die Ähnlichkeit des sigmoidalen Dosisabhängigkeitsverlaufs von den Trimer-D1- und Trimer-D3-Hybridverbindungen untereinander.

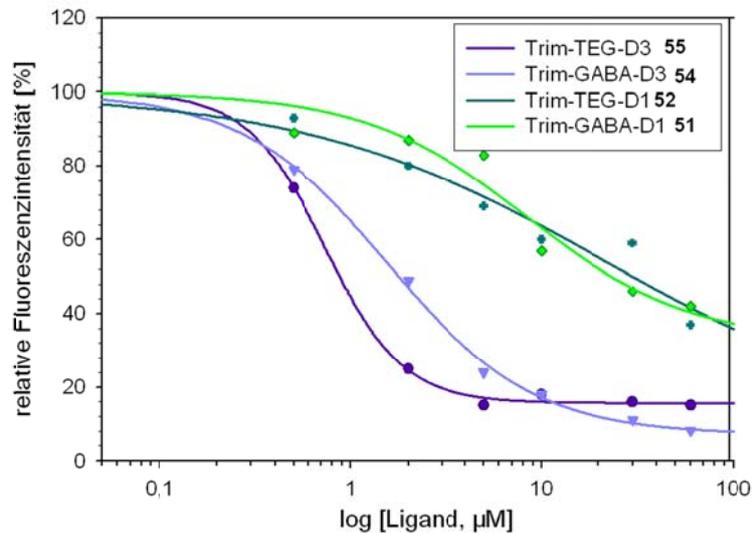


Abbildung 4.9: Nebeneinanderstellung der „dose-response“-Kurven von Trimer-D1- und Trimer-D3-Hybriden **51**, **52**, **54** und **55** bei 10 μM $\text{A}\beta_{42}$ -Konzentration nach 72 Stunden Aggregationszeit.

Der Vergleich der aggregationshemmenden Effekte der Hybridverbindungen **51-56** im sechsfachen Überschuss bei 10 μM und bei 33 μM $\text{A}\beta$ -Konzentration ist im nächsten Säulendiagramm dargestellt.

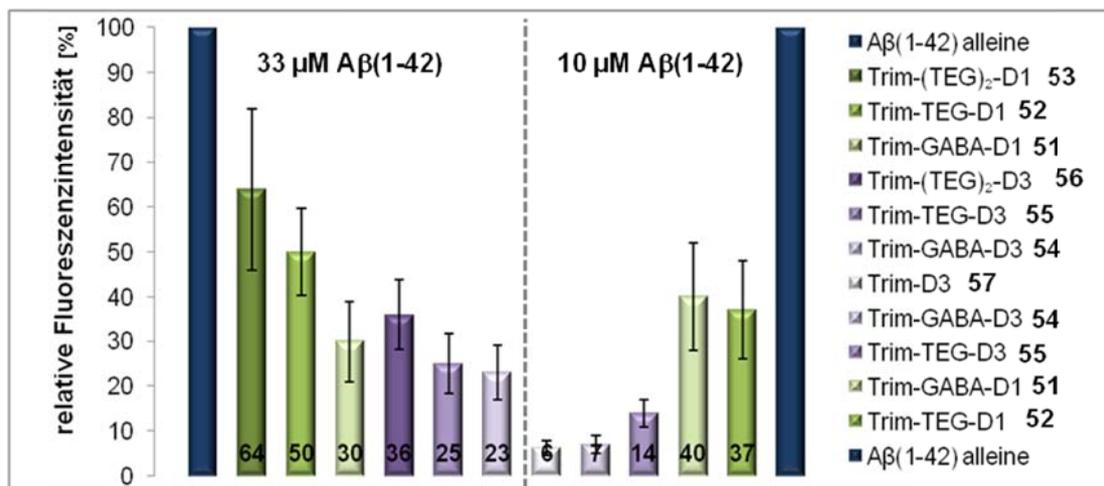


Abbildung 4.10: Inhibierung der Aggregation des $\text{A}\beta(1-42)$ -Peptids bei 33 μM (links) und 10 μM (rechts) Konzentrationen durch synthetisierte Hybride **51-57** mit jeweils sechsfachem Überschuss: 198 μM (links) und 60 μM (rechts). Alle Werte sind in Prozent bezogen auf die Kontrolle (100%) angegeben.

In der Abbildung 4.10 wird veranschaulicht, dass vor allem die Aggregationshemmung der Trimer-D3-Verbindungen **54** und **55** sehr stark von den Konzentrationen abhängt, wogegen die Trimer-D1-Hybride **51** und **52** bei beiden Peptidkonzentrationen ähnliche Effekte bewirken. So konnte bei 33 μM A β -Konzentration kein eindeutiger Unterschied zwischen Trim-GABA-D3 **54** und Trim-TEG-D3 **55** festgestellt werden. Dieser war jedoch bei der 10 μM A β -Konzentration gegeben. Der Ligand ohne Spacer Trim-D3 **57** besitzt mit einer Aggregationsreduktion auf 6 % eine ähnliche Wirkung wie Trim-GABA-D3 **54**. Es scheint also auch bei Trimer-D3-Derivaten eine Spacerlängen-Abhängigkeit vorzuliegen. Demnach sollten Trim-GABA-D3 **54** und Trim-D3 **57** die potentesten Hybridverbindungen sein.

Die wirksamsten Trimer-D3-Hybride **54** und **55** aus dem „dose-response“-Experiment werden in der Abbildung 4.11 den besten Vergleichssubstanzen aus diesem Experiment, Curcumin (**12**) und EGCG (**13**), gegenübergestellt. Bei der Betrachtung des Diagramms fällt auf, dass die ThT-Fluoreszenzwerte in Anwesenheit von Curcumin (**12**) keinen Sigmoidalverlauf aufweisen. Diese Verbindung kann aufgrund der vorhandenen Eigenfluoreszenz, die im Kapitel 6.11.2 dargestellt ist, und der möglichen Wechselwirkung mit dem ThT-Fluoreszenzfarbstoff bei den gegebenen Messbedingungen nur dem relativen Vergleich dienen.^[213] EGCG (**13**) dagegen besitzt keine Eigenfluoreszenz, zeigt eine ausgeprägte Dosisabhängigkeit und kann deshalb sehr gut zur Gegenüberstellung eingesetzt werden. Diese Vergleichsverbindung reduzierte bei sechsfachem Überschuss die Aggregation auf 5 % und zeigte somit die größte inhibierende Wirkung von allen untersuchten Verbindungen. In der Literatur wird die starke Wirkung dieses Polyphenols ebenfalls bestätigt.^[144]

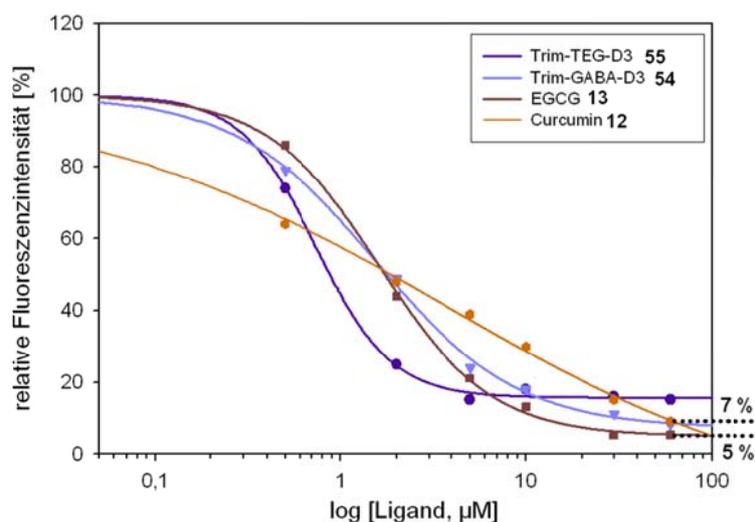


Abbildung 4.11: Gegenüberstellung der „dose-response“-Kurven von Trim-TEG-D3 **55**, Trim-GABA-D3 **54** und Referenzsubstanzen EGCG (**13**) und Curcumin (**12**) bei 10 μM A β_{42} -Konzentration nach 72 Stunden Aggregationszeit.

Der Kurvenverlauf von Trim-GABA-D3 **54** ähnelt stark dem des EGCG **13**. Bei maximaler Wirkung beträgt der Fluoreszenzwert nur noch 7 %. Der maximal erzielte Effekt von Trim-TEG-D3 **55** ist mit 15 % etwas schwächer. Jedoch zeigt die Testverbindung **55** bei substöchiometrischen Konzentrationen ($< 6 \mu\text{M}$) eine höhere aggregationsinhibierende Wirkung als EGCG (**13**).

Schließlich sollte die Effizienz der synthetisierten Trimer-D3-Hybride **54** und **55** mit den beiden Einzelkomponenten Trimer **16** und D3-Peptid **8** verglichen werden (Abbildung 4.12). Hierbei wurde allerdings das potenteste Trimer-Derivat **70** stellvertretend für Trimer **16** verwendet. Der direkte Vergleich zeigt, dass die Trimer-D3-Hybridverbindungen **54** und **55** die A β -Polymerisation viel effektiver unterdrücken können als die Einzelkomponenten **70** und **8**. Die maximal erzielten Fluoreszenzreduktionen der Einzelkomponenten sind deutlich niedriger. Vor allem das D3-Peptid **8** weist bei direktem Vergleich überraschenderweise eine sehr schwache Wirkung auf und kann die Aggregation des Alzheimer-Peptids bei sechsfachem Überschuss nur auf 64 % reduzieren. Dagegen sind die Hybridsubstanzen **54**, **55** und Trim-TEG-K-OMe **70** bereits bei substöchiometrischen Mengen bezüglich A β (1-42) sehr effizient. So konnte z. B. Trim-TEG-D3 **55** die Aggregation schon bei $2 \mu\text{M}$ Konzentration (0.2 eq bzgl. A β) auf ca. 26 % herabsetzen.

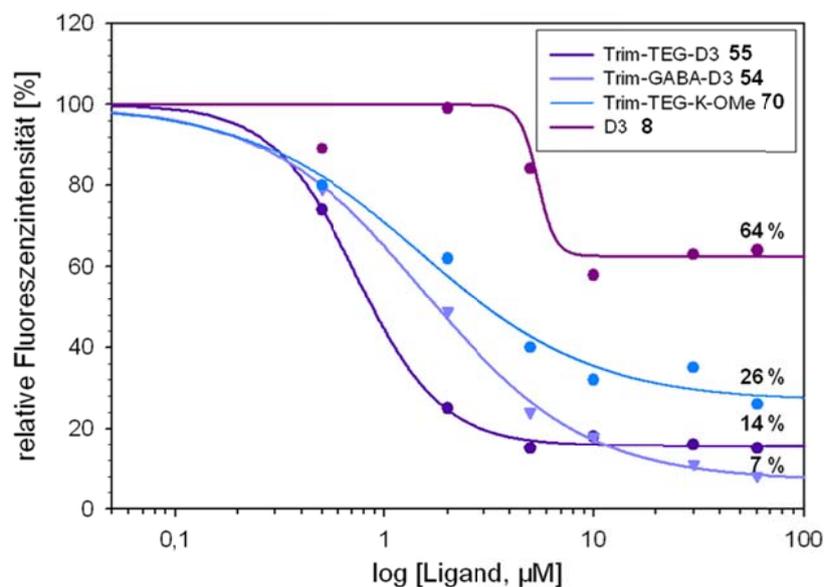


Abbildung 4.12: Gegenüberstellung der „dose-response“-Kurven von Trim-GABA-D3 **54**, Trim-TEG-D3 **55** und ihren Einzelkomponenten Trim-TEG-K-OMe **70** und D3 **8** bei $10 \mu\text{M}$ A β_{42} -Konzentration nach 72 Stunden Aggregationszeit.

4.1.2 Circulardichroismus-Spektroskopie

4.1.2.1 Beschreibung der Methode

Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie im UV-/VIS-Bereich.^[218]

Die Grundlage dieser Methode ist die Wechselwirkung linear polarisierten Lichts mit optisch aktiven Substanzen. Wird die linear polarisierte Welle beim Durchlaufen des Mediums wellenlängenabhängig in ihrer Polarisationsrichtung gedreht, so spricht man von einer optischen Rotationsdispersion. Werden die beiden circular polarisierten Komponenten, aus denen eine linear polarisierte Welle zusammengesetzt ist, zusätzlich verschieden stark absorbiert, so liegt Circulardichroismus vor. Diese Methode beruht also auf dem Unterschied in der Lichtabsorption von rechts- und linkspolarisiertem Licht.

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad (2)$$

Der Unterschied ($\Delta\varepsilon$) ist die eigentliche Messgröße. In der praktischen CD-Spektroskopie wird jedoch aus historischen Gründen die Elliptizität angegeben, wobei d die Schichtdicke in cm, c die Konzentration in g/cm^3 und ε' der Extinktionskoeffizient in cm^2/g ist.

$$\theta_\lambda = \textit{konst} \cdot (\varepsilon'_L - \varepsilon'_R) \cdot c \cdot d \text{ [Grad]} \quad (3) \quad \textit{mit} \quad \textit{konst} = \ln 10 \cdot \frac{180}{2\pi} \approx 33$$

Die Abhängigkeit der Elliptizität von der Wellenlänge des Lichts ergibt das CD-Spektrum. Je nachdem ob die rechts- oder linkscircular polarisierte Komponente stärker absorbiert wird, entsteht ein positiver oder negativer Circulardichroismus in Form einer Absorptionsbande.^[219] Ein CD-Effekt ist nur in Anwesenheit eines Chromophors in einer chiralen Umgebung möglich.

Die CD-Spektroskopie stellt eine wertvolle Methode dar, um Proteine und Peptide hinsichtlich ihrer Struktur in Lösung zu untersuchen.^[220] Das CD-Spektrum von Proteinen kann in drei Bereiche unterteilt werden:

- fernes UV (< 250 nm): Peptidbindungen: $n \rightarrow \pi^*$ (~216 nm), $\pi \rightarrow \pi^*$ (~195 nm, ~175 nm)
- nahes UV (250 – 300 nm): aromatische Aminosäurereste: $\pi \rightarrow \pi^*$ (250 – 300 nm), Disulfidbrücken: $n \rightarrow \sigma^*$ (~260 nm)
- nahes UV bis sichtbarer Bereich (300 – 700 nm): Proteine mit chromophoren prosthetischen Gruppen.^[221]

Das CD-Spektrum im fernen UV-Bereich resultiert aus elektronischen Übergängen innerhalb der Peptidgruppen, den hier zuständigen Chromophoren. Bei allen Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin ist das der Peptidgruppe benachbarte α -C-Atom asymmetrisch substituiert, das zur Asymmetrie in der Elektronenkonfiguration der Peptidbindung führt. So weisen die CD-Spektren im fernen UV-Bereich für die jeweilige Sekundärstruktur-Zusammensetzung eine charakteristische Gestalt auf.^[218, 221] Durch Analyse des aufgenommenen CD-Spektrums können die relativen Anteile der unterschiedlichen Sekundärelemente in der vorliegenden Probe ermittelt werden. In der Abbildung 4.13 sind schematisch typische CD-Spektren reiner Sekundärstrukturelemente dargestellt.

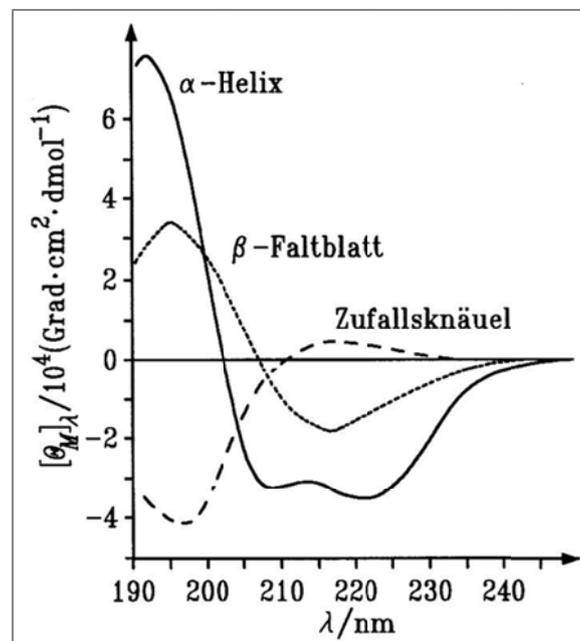


Abbildung 4.13: Typische CD-Spektren für α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel.^[222]

Die Circular dichroismus-Spektroskopie ist heutzutage eine der Standardmethoden, mit der ein Konformationswechsel von natürlich gefalteten bzw. ungefalteten monomeren Proteinen in β -Faltblatt-reiche Fibrillen veranschaulicht werden kann.^[223]

4.1.2.2 Untersuchungen mit der Circular dichroismus-Spektroskopie

Die CD-Messungen konnten nur von Substanzen durchgeführt werden, die entweder in reinem Wasser oder im Wasser/HFIP-Gemisch löslich waren. Da DMSO in dem für die Auswertung relevanten Bereich absorbiert, konnten lipophile Liganden, die nur in Wasser/DMSO-Gemischen löslich waren, nicht vermessen werden. Die Stammlösungen von wasserunlöslichen Liganden sowie von A β (1-42) wurden in HFIP angesetzt. Die Endkonzentration an HFIP in den vermessenen Proben betrug 2 % (v/v) bei Trim-TEG-K-OMe **70**, Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** und (Trim-K)₂-TEGDA **84** und 4 % (v/v) bei Trim-TEG-OH **41**, Trim-TEG-DD **45** und Trim-TEG-KLVFF-OH **77**. Es wurden Lösungen von A β ₄₂-Peptid alleine (10 μ M, Kontrolle) bzw. in Gegenwart von Ligand in äquivalenter Menge und reine Ligandenlösungen entsprechender Konzentration angesetzt. Die Messungen wurden in gepufferter, wässriger Lösung (Kaliumphosphatpuffer, pH 7.3) nach 48 Stunden Aggregationszeit bei Raumtemperatur von *Petra Schneider* und *Christine Kallweit* (AK *Haberhauer*, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt. Die Ligandenspektren wurden von den entsprechenden A β -Liganden-Spektren subtrahiert. Die resultierenden CD-Spektren lassen sich anhand der Wirksamkeit der Liganden in drei Gruppen einteilen, wobei jede Gruppe durch eine Abbildung (4.14, 4.16 und 4.17) repräsentiert wird. Zum Vergleich enthält jede Abbildung als Kontrolle ebenfalls ein CD-Spektrum des A β ₄₂-Peptids ohne Ligand. Das aggregierte Peptid weist mit einer positiven Bande bei ca. 200 nm und einer negativen Bande bei 218 nm das typische Spektrum eines parallelen β -Faltblatts auf.^[71, 224]

Abbildung 4.14 zeigt die Wirkung der Liganden (Trim-K)₂-TEGDA **84** und Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** auf die Sekundärstruktur des A β ₄₂-Peptids. Beide Verbindungen scheinen die β -Faltblattstruktur stark zu destabilisieren, da die typischen Banden bei 200 nm und 218 nm aufgelöst werden. Auffallend sind zudem in beiden Fällen die neu gebildeten Banden bei ca. 280 nm. In dem Bereich zwischen 260 nm und 320 nm absorbieren aromatische Aminosäuren (Phe: 255-270 nm, Tyr: 275-282 nm, Trp: 290-305 nm).^[225] Da die Trimer-Derivate in diesem Bereich keine CD-Aktivität aufweisen (siehe Abbildung 6.4, Kapitel 6.13) und im Bereich von 260-280 nm ein Absorptionsmaximum besitzen (siehe Abbildung 4.15), kann die Entstehung des neuen Maximums durch Komplexierung des Liganden in der „Phenylalanintasche“, die zu einem induzierten CD-Effekt führt, erklärt werden. Das würde bedeuten, dass die Liganden **72** und **84** jeweils einen stabilen Komplex mit dem Alzheimer-Peptid bilden und dessen Polymerisation verhindern bzw. modulieren können. Der induzierte

CD-Effekt bekräftigt somit die nach MD-Rechnungen erhaltene Komplexstruktur für Trimer-TEG-KKKKKKG-OH **72**, in der das Trimer-Grundgerüst in der „Phenylalanintasche“ gebunden vorliegt (Abbildung 3.38). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der CD-Spektroskopie, in der die Liganden **72** und **84** jeweils in äquimolarem Verhältnis zum Alzheimer-Peptid eingesetzt wurden, zeigten beide Trimer-Derivate **72** und **84** im ThT-Test sogar im sechsfachen Überschuss bezüglich A β (1-42) nur eine partielle Reduktion der A β -Aggregation. Diese wurde je nach gewählter Konzentration des Alzheimer-Peptids auf die Hälfte bis maximal auf ein Drittel reduziert (siehe Abbildungen 4.3 und 4.6).

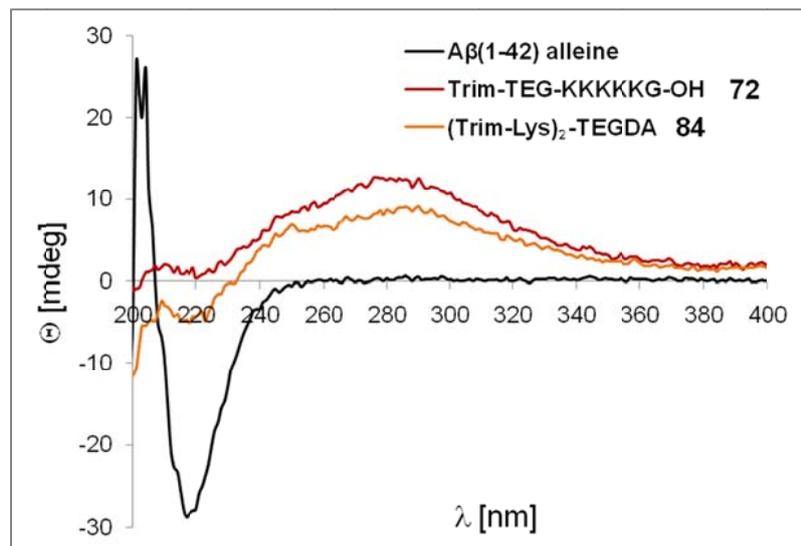


Abbildung 4.14: CD-Spektren der 10 μ M A β (1-42)-Lösungen nach 48 Stunden Aggregation entweder alleine (schwarz) oder in Anwesenheit von 10 μ M Trim-TEG-KKKKKKG-OH **72** (rot) bzw. 10 μ M (Trim-K) $_2$ -TEGDA **84** (orange) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7.3) bei Raumtemperatur.

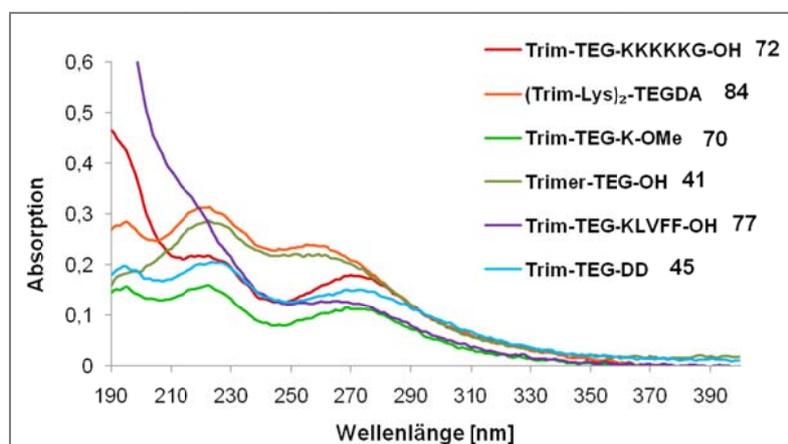


Abbildung 4.15: UV-Absorptionsspektren der Trimer-Derivate **41**, **45**, **70**, **72**, **77** und **84** 10 μ M in Kaliumphosphatpuffer (pH 7.3).

Abbildung 4.16 präsentiert den Einfluss der Trimer-Derivate **41** und **70** auf die A β -Konformation. Trim-TEG-OH **41** bewirkt nahezu keine Änderung der β -Faltblattstruktur. Beide entscheidenden Indizien für diese Anordnung bei 200 und 218 nm liegen immer noch stark ausgeprägt vor, wobei die Amplitude der negativen Bande leicht reduziert wurde. Trim-TEG-K-OMe **70** erzielte dagegen einen etwas stärkeren aggregationsinhibierenden Effekt. Die Intensität der negativen Bande wurde reduziert, wobei die positive vollständig aufgelöst werden konnte. Beide Trimer-Derivate **41** und **70** zeigen ebenfalls einen induzierten CD-Effekt bei ca. 280 nm. Dieser ist wahrscheinlich auch hier auf die stabile Komplexierung der Liganden in der „Phenylalanintasche“, die auch nach Moleküldynamik-Rechnungen in beiden Fällen stabil blieb (Abbildungen 3.28 und 3.35), zurückzuführen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte die Trimer-TEG-Säure **41** im ThT-Test ebenfalls nur eine moderate aggregationsinhibierende Wirkung (48 %).^[168] Im Gegensatz zu den Resultaten aus der CD-Spektroskopie wurde im ThT-Test eine viel stärkere Unterdrückung der A β -Agglomeration in Gegenwart von Trimer-TEG-K-OMe **70** beobachtet. Dieser Ligand reduzierte im sechsfachen Überschuss bezüglich A β (1-42) die Aggregation auf 23 % (Abbildung 4.3) und war im äquimolaren Verhältnis zum Alzheimer-Peptid (10 μ M) immer noch sehr wirksam, indem er die Aggregation auf ca. 32 % herabsetzte (Abbildung 4.6).

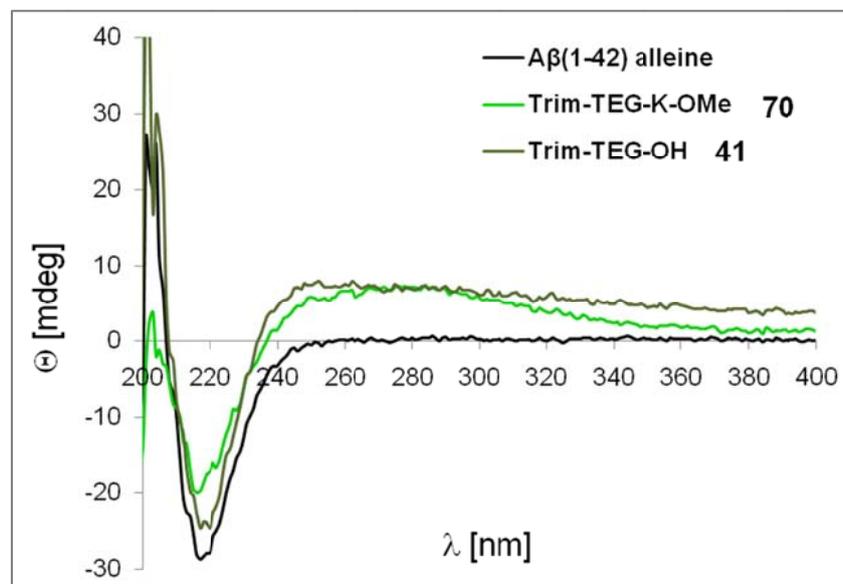


Abbildung 4.16: CD-Spektren der 10 μ M A β (1-42)-Lösungen nach 48 Stunden Aggregation entweder alleine (schwarz) oder in Anwesenheit von 10 μ M Trim-TEG-OH **41** (braun) bzw. 10 μ M Trim-TEG-Lys-OMe **70** (grün) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7.3) bei Raumtemperatur.

In der Abbildung 4.17 sind sehr ähnliche Effekte der Liganden **45** und **77** bezüglich der Sekundärstruktur des Alzheimer-Peptids dargestellt. Die Anwesenheit dieser Verbindungen bewirkte einerseits eine Verstärkung der Intensität des negativen Maximums, andererseits ist bei diesen Ligand-A β -Komplexen kein induzierter Effekt im Gegensatz zu den ersten beiden Ligandengruppen zu beobachten. Die Trimer-Derivate **45** und **77** scheinen also die β -Faltblattstruktur zu stabilisieren, ohne dabei an die „Phenylalanintasche“ des A β -Peptids zu binden. Diese Befunde für Trim-TEG-DD **45** widersprechen den Ergebnissen der ThT-Tests und MD-Simulationen. Im ThT-Test wurde die A β -Aggregation in Gegenwart dieses Liganden auf 39 % reduziert (Abbildung 4.3). Nach den MD-Simulationen wurde eine Komplex-Struktur mit einer stabilen Komplexierung der heterozyklischen Struktur in der „Phenylalanintasche“ erhalten (Abbildung 3.31). Allerdings dauerten die MD-Rechnungen nur 20 ns, wogegen das CD-Spektrum nach 48 Stunden aufgenommen wurde. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass der Trimer-F19/F20-Komplex bei länger dauernden MD-Simulationen zerfallen wird. Trim-TEG-KLVFF-OH **77** wurde nur mittels CD-Spektroskopie untersucht und kann deshalb mit keinen weiteren experimentellen Ergebnissen verglichen werden.

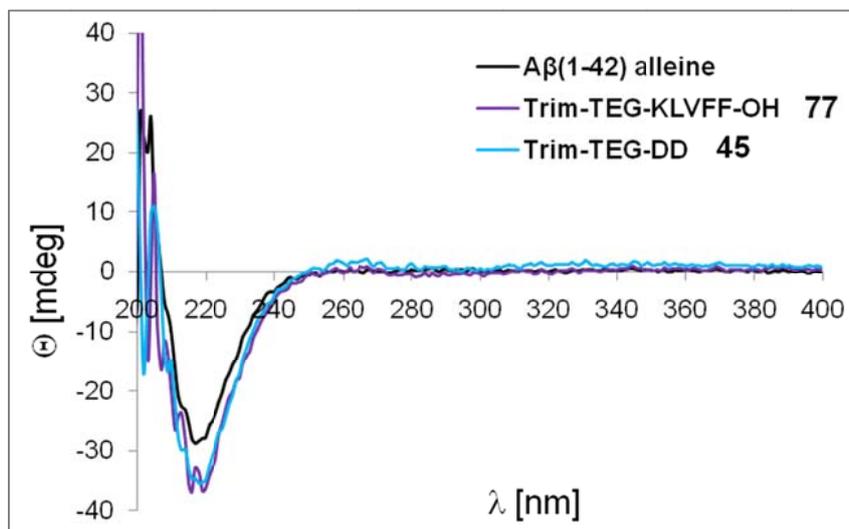


Abbildung 4.17: CD-Spektren der 10 μ M A β (1-42)-Lösungen nach 48 Stunden Aggregation entweder alleine (schwarz) oder in Anwesenheit von 10 μ M Trim-TEG-KLVFF-OH **77** (blau) bzw. 10 μ M Trim-TEG-DD **45** (lila) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7.3) bei Raumtemperatur.

4.1.3 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine bildgebende Methode, die unter anderem zur Untersuchung der Struktur und Morphologie von amyloiden Fibrillen eingesetzt wird.^[18, 226, 227] Bei dieser Betriebsart der Elektronenmikroskopie wird ein Elektronenstrahl von einer beheizten Kathode bzw. einem Feldemitter als Strahlungsquelle erzeugt. Das von Elektronen durchstrahlte Objekt, das zu diesem Zweck entsprechend dünn sein muss, wird mit magnetischen Linsensystemen abgebildet. Als Detektoren können z. B. Phosphorschirme oder photographische Emulsionen verwendet werden.^[228]

Auch anhand der TEM-Bilder, die im *AK Epple* (Universität Duisburg-Essen) aufgenommen wurden, sollte der Einfluss der synthetisierten Liganden auf die A β -Polymerisation untersucht werden. Die Liganden wurden hierbei im zehnfachen Überschuss bezüglich A β (1-42) eingesetzt. In der Abbildung 4.18 sind TEM-Aufnahmen von den inkubierten A β (1-42)-Lösungen in Anwesenheit von Trimer-Derivaten aufgeführt. Die TEM-Aufnahme 4.18A von reinem A β -Peptid dient als Kontrolle. Dort wurden vor allem reife Fibrillen identifiziert. Nach *Goldbury et al.* werden unverzweigte seilartige Aggregate, die eine Länge von 600 nm bis mehreren μm aufweisen, als reife Fibrillen charakterisiert.^[229] Ein weiteres Merkmal dieser Aggregate sind die Windungen, die „twisted ribbons“ genannt werden. Diese sind auch in der Abbildung 4.18A, exemplarisch durch rote Pfeile markiert, zu finden. Die Dicke der reifen Fibrillen beträgt in der Regel 5-10 nm. In Anwesenheit des Liganden Trimer **16** werden ebenfalls sehr lange (über 1 μm) Fasern beobachtet (Abbildung 4.18B), die jedoch dünner sind als die reinen A β -Fibrillen. An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass Trimer **16** selbst unter gleichen Aggregationsbedingungen dünne Fibrillen mit ähnlicher Morphologie bilden kann (Abbildung 4.19, links). Trim-TEG-OH **41** bewirkt dagegen die Entstehung von feineren, stark zusammengefassten Peptidfasern, die keine Windungen aufweisen und eine Länge von ca. 200 nm haben. Die TEM-Aufnahme dieser Strukturen ist in der Abbildung 4.18C zu sehen. Die Beobachtung von Peptidfasern in Gegenwart von Trim-TEG-OH **41** widerspricht nicht den Ergebnissen aus ThT- und CD-Experimenten (Abbildung 4.16), da auch dort nur eine moderate bis schwache Reduktion der Aggregation durch Trimer-Derivat **41** festgestellt wurde.^[168] Im Gegensatz zum Trimer **16** weist dieser Ligand keine Tendenz zur Selbstaggregation auf. Eine weitere Testverbindung Trim-TEG-K-OMe **70** kann wiederum selbst sowohl feine als auch sehr stark gewundene und bis zu 70 nm dicke Fasern, die in der Abbildung 4.19 (rechts) zu beobachten sind, ausbilden. Im Komplex des A β -

Peptids mit diesem Rezeptor entstehen Fasern, deren Dicke sich kaum von Fibrillen des reinen Amyloid- β -Peptids unterscheidet, die allerdings weniger langgestreckt und stark vernetzt bzw. verklebt sind. Da der Ligand **70** unter den verwendeten Bedingungen zur Faserbildung neigt, ist die TEM-Aufnahme des A β -Ligands **70** nur begrenzt interpretierbar und kann nicht in Korrelation mit Ergebnissen aus weiteren Experimenten gebracht werden. Weiterhin wurden auch die Liganden **72** und **79** mit Hilfe von TEM untersucht. Die Aufnahmen dieser Verbindungen sind ebenfalls in den Abbildungen 4.18E und 4.18F dargestellt. In Gegenwart von Trim-TEG-KKKKKKG-OH **72** sind weder reife A β -Fibrillen noch faserartige Überstrukturen zu erkennen. Der Ligand **72** scheint also in Übereinstimmung mit ThT- und CD-Experimenten (siehe Abbildungen 4.6 und 4.14) die A β -Aggregation stark zu unterdrücken. In Anwesenheit von Trim-TEG-LPFFD-OH **79** sind keine reifen A β -Fibrillen, sondern nur kurze sehr feine zum Teil faserartige Strukturen und runde bzw. verklumpte Aggregate zu erkennen. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen konnte der Ligand **79** im ThT-Test die A β -Aggregation auf 34 % reduzieren (Abbildung 4.3)

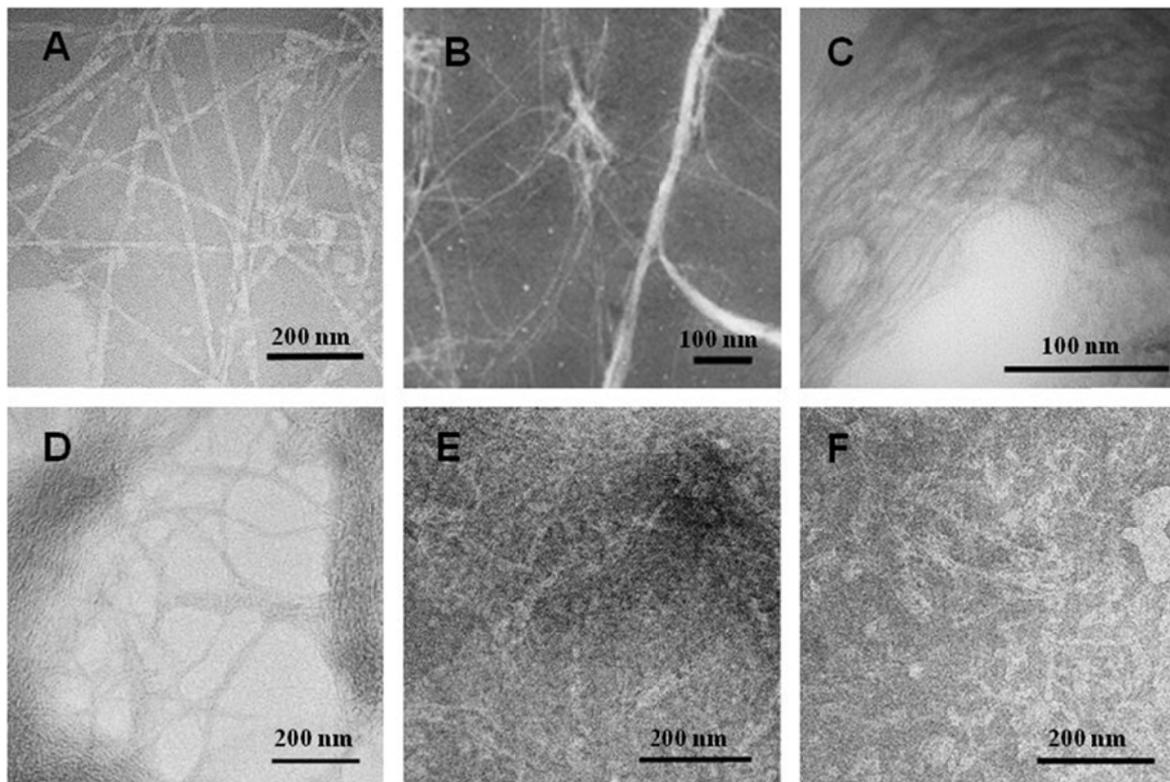


Abbildung 4.18: TEM-Aufnahmen. **A:** A β (1-42)-Fibrillen. **B-F:** 20 μ M A β (1-42) im Gemisch mit Trimer-Derivaten (200 μ M). **B:** Trimer-OMe **16**, **C:** Trimer-TEG-OH **41**, **D:** Trimer-TEG-Lys-OMe **70**, **E:** Trimer-TEG-KKKKKKG-OH **72**, **F:** Trimer-TEG-LPFFD-OH **79**.

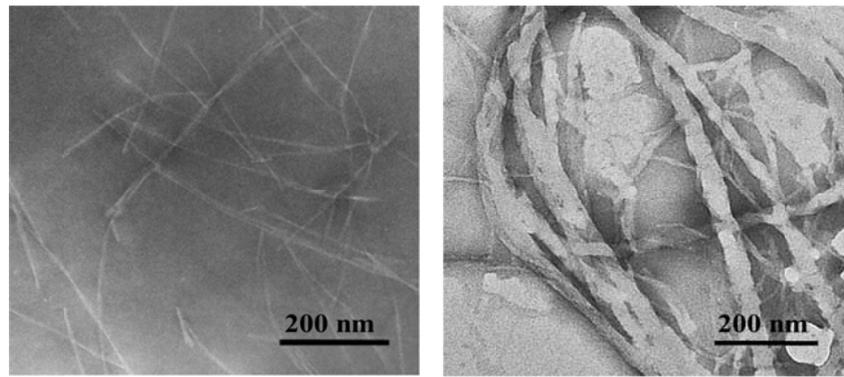


Abbildung 4.19: TEM-Aufnahmen von 200 μ M Liganden-Lösungen ohne A β (1-42). Links: Trimer-OMe **16**, rechts: Trimer-TEG-Lys-OMe **41**.

Die Abbildung 4.20(**B-D**) veranschaulicht die Effekte der Trimer-D1-Hybride auf die A β -Aggregation, die mit der Kontrolle 4.20A zu vergleichen sind. Die D1-Hybridverbindungen mit kurzem (**51**), mittellangem (**52**) und langem Spacer (**53**) unterscheiden sich laut den TEM-Aufnahmen kaum voneinander. In allen Aufnahmen sind noch feine geordnete, meist faserartige Strukturen zu erkennen, wobei die Abbildung 4.20B unscharf und demzufolge nicht interpretierbar ist. Auch laut ThT-Experimenten waren die Trimer-D1-Hybride **51-53** nicht in der Lage die Aggregation stärker als auf ein Drittel zu unterdrücken (Abbildungen 4.4 und 4.8). Außerdem wurde festgestellt, dass Trim-GABA-D1 **51** und Trim-TEG-D1 **52** selbst fibrilläre Aggregate bilden können. Wie in der Abbildung 4.21 aufgeführt ist, entstehen bei Trim-GABA-D1 **51** eher vernetzte und verklebte Fasern mit ca. 20 nm Dicke, dagegen scheint Trimer-TEG-D1 **52** verdrillte und verzweigte bis zu 100 nm dicke Fasern zu bilden.

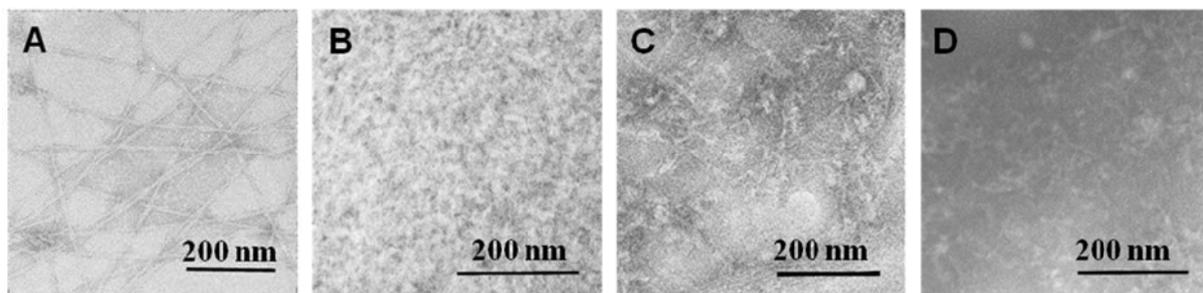


Abbildung 4.20: TEM-Aufnahmen. **A:** A β (1-42)-Peptid alleine. **B-D:** 20 μ M A β (1-42) im Gemisch mit Trimer-D1-Hybriden (200 μ M). **B:** Trimer-GABA-D1 **51**, **C:** Trimer-TEG-D1 **52**, **D:** Trimer-(TEG)₂-D1 **53**.

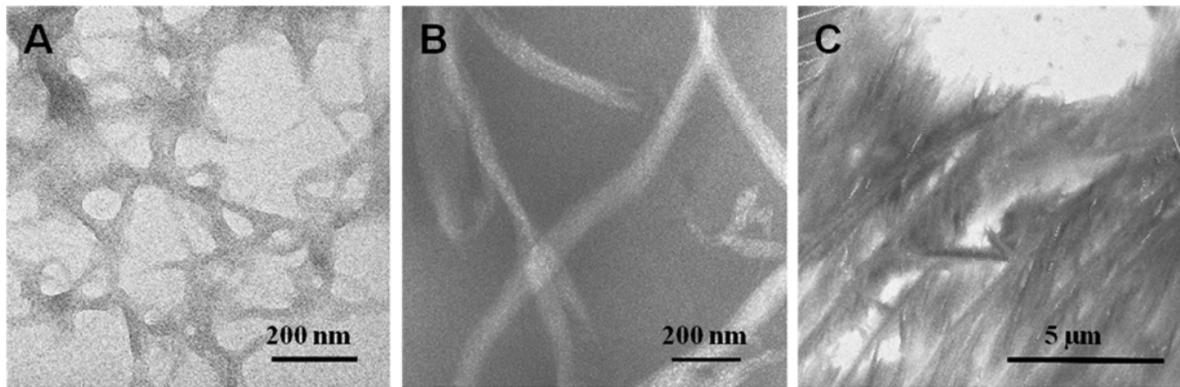


Abbildung 4.21: TEM-Aufnahmen von 200 μM Liganden-Lösungen ohne $\text{A}\beta(1-42)$ -Peptid: Trimer-GABA-D1 **51** (A), Trimer-TEG-D1 **52** (B) und Trimer-TEG-D3 **55** (C).

Ferner wurde die Wirkung der Trimer-D3-Hybridverbindungen **54-56** auf das Alzheimer-Peptid untersucht (Abbildung 4.22, **A-D**). Die TEM-Aufnahmen von allen drei Liganden sind wiederum sehr ähnlich zueinander, enthalten aber im Gegensatz zu Trimer-D1-Verbindungen **51-53** keine Fasern, sondern nur ungeordnete große Aggregate. Dies kann möglicherweise bedeuten, dass die Trimer-D3-Hybride **54-56** die Agglomeration des $\text{A}\beta$ -Peptids zu großen Aggregaten, die keine β -Faltblattstruktur aufweisen, fördern. Trimer-D3-Hybride **54-56** zeigten im ThT-Test ebenfalls die stärkste aggregationsinhibierende Wirkung von allen synthetisierten Liganden (Abbildungen 4.4 und 4.8). Die Aufnahme von Trim-TEG-D3 **55**, ohne $\text{A}\beta$ -Peptid in der Abbildung 4.22C veranschaulicht ebenfalls große Aggregate. Dabei handelt es sich um sehr lange (mehrere μm) geordnete, federartige Überstrukturen, die zu einer Schicht parallel angeordnet vorliegen.

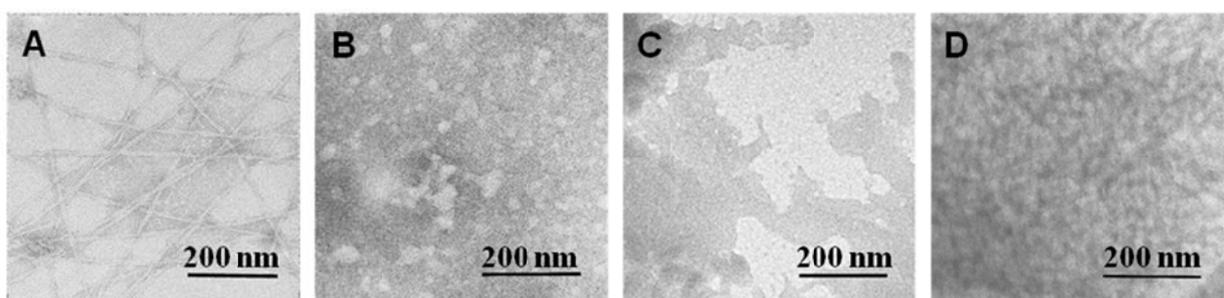


Abbildung 4.22: TEM-Aufnahmen. **A:** $\text{A}\beta(1-42)$ -Peptid alleine. **B-D:** 20 μM $\text{A}\beta(1-42)$ im Gemisch mit Trimer-D3-Hybriden (200 μM). **B:** Trimer-GABA-D3 **54**, **C:** Trimer-TEG-D3 **55**, **D:** Trimer-(TEG)₂-D3 **56**.

4.1.4 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (AK Willbold)

Um weitere Informationen über die detaillierte Größenverteilung der A β -Aggregate zu erhalten, sollten Hybridverbindungen mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation untersucht werden. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde nur Trimer-TEG-D3 **55** vermessen. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Molekül- oder Partikelgemische nach der Größe der Sedimentationskoeffizienten in einzelne Fraktionen auftrennen. Dazu wird zunächst ein diskontinuierlicher Dichtegradient hergestellt, indem man Lösungen vom Boden eines Zentrifugen-Röhrchens mit abnehmenden Dichten vorsichtig überschichtet. In diesem Fall wurde eine Methode von *Ward et al.* verwendet, bei der das Gradientenmaterial aus einer 60 %igen Iodixanollösung mit dem Namen OptiprepTM bestand.^[230] Mit Hilfe der durch dieses Gradientenmaterial eingestellte hohe Dichte können auch sehr große Partikel aufgetrennt werden. Zudem dient es dazu, die nach der Zentrifugation erhaltene Verteilung für eine kurze Zeit zu stabilisieren. Der eingestellte Stufengradient wurde mit A β_{42} /(A β_{42} +Ligand)-Lösungen überschichtet und bei 4 °C und 259.000 x g für 3 h zentrifugiert. Das „Ernten“ der Fraktionen erfolgte von oben nach unten durch vorsichtiges Abpipettieren, wobei insgesamt 14 Fraktionen erhalten wurden. Somit waren die 1. Fraktion mit der geringsten und die 14. Fraktion mit der höchsten Dichte. Anschließend wurden die geernteten Fraktionen aufgekocht und mit SDS-PAGE (engl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) und anschließender Silberfärbung analysiert. In der Abbildung 4.23 sind die Ergebnisse einer Dichtegradienten-Ultrazentrifugation von A β (1–42) alleine, als Kontrolle und in Gegenwart von Trimer-TEG-D3 **55**, Trimer-TEG-Pentalysin **72** und Trimer-Pentalysin dargestellt. Trimer-Pentalysin wurde von *Katrin Hochdörffer* synthetisiert und unterscheidet sich von der Verbindung **72** durch das Fehlen des TEG-Spacers. Vergleicht man die Verteilung der A β -Aggregate in Gegenwart von Hybridverbindung **55** mit der entsprechenden Kontrolle, so fällt direkt auf, dass die A β (1-42)-Peptidbanden im mittleren Bereich des Dichtegradienten fehlen. In diesem Bereich würden die A β -Oligomere, die bei der Kontrolle vorhanden sind, vorliegen. Der größte Teil des Peptids befindet sich in der 12. Fraktion. Im ThT-Test konnten jedoch keine amyloiden Fibrillen detektiert werden. Dies bedeutet, dass Trimer-TEG-D3 **55** oligomere bis protofibrilläre A β_{42} -Formen aus der Lösung präzipitiert bzw. in hochmolekulare ungeordnete Komplexe umwandelt. Wahrscheinlich sind solche Präzipitat-ähnliche Aggregate auch in TEM-Aufnahmen von Trimer-D3-Hybriden **54-56** zu beobachten (siehe Abbildung 4.22). Die Verschiebung des Aggregationszustandes in Richtung der monomeren A β -Spezies kann man

ausschließen, da die Proteinmenge in den oberen Fraktionen des Dichtegradienten in Anwesenheit der Hybridverbindung **55** abnimmt. Die im Gel visualisierten monomeren und evtl. dimeren A β -Banden sind deutlich schwächer, die tri- und tetrameren Peptidbanden fehlen vollständig.

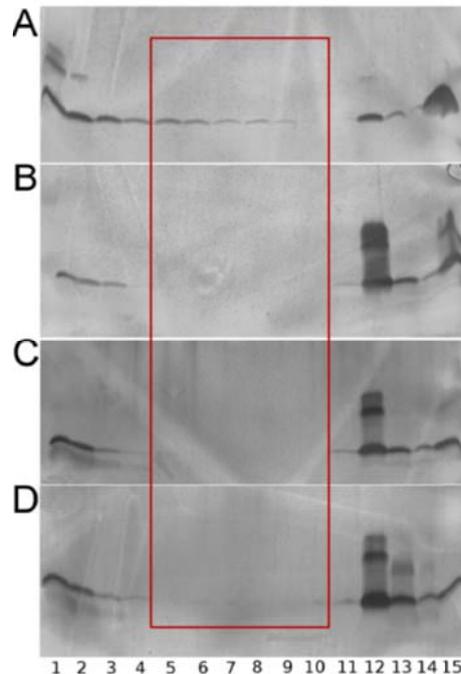


Abbildung 4.23: Modulation des A β_{42} -Aggregationsverhaltens durch Trimer-TEG-D3 **55**, Trimer-TEG-Pentalysin **72** und Trimer-Pentalysin; analysiert mit Hilfe eines OptiprepTM Dichtegradienten. Die Inkubationsgemische enthielten **A**: 125 μ M A β (1-42); **B**: 125 μ M A β (1-42) und 62.5 μ M Trimer-TEG-D3 **55**; **C**: 125 μ M A β (1-42) und 125 μ M Trimer-TEG-Pentalysin **72** und **D**: 125 μ M A β (1-42) und 125 μ M Trimer-Lysin.

Wie aus der Abbildung 4.23C mit Größenverteilung der A β -Aggregate in Anwesenheit von Trimer-TEG-Pentalysin **72** hervorgeht, präzipitiert dieser Ligand ebenfalls die A β_{42} -Oligomere und Protofibrillen zu größeren Aggregaten. Im Gegensatz zur Hybridsubstanz **55** sind jedoch in diesem Fall noch kleinere A β_{42} -Oligomere in den Fraktionen 4-5 vorhanden. Auch die Menge der mono- und dimeren Spezies in den Fraktionen 1-3 ist etwas größer als bei Verbindung **55**, aber deutlich kleiner als bei der Kontrolle. Die Anzahl der entstehenden A β_{42} -Ligand-Komplexe, die in der 12. Fraktion vorzufinden sind, ist geringer als bei Trimer-TEG-D3 **55**. Die A β_{42} -Verteilung im Dichtegradienten mit Trimer-Pentalysin ähnelt stark der Verbindung **72**. Hier sind aber die oligomeren und protofibrillären Banden in den Fraktionen 5-10 noch schwach zu sehen. Die entsprechenden Spezies werden also nicht präzipitiert. Die Hybridsubstanz **55** ist also schon bei substöchiometrischer Konzentration (62.4 μ M) viel wirksamer als die Pentamer-Derivate bei äquimolarer Konzentration (125 μ M).

4.2 Biologische Experimente

Da die Trimer-D3-Hybridverbindungen **54-56** in ThT-Test, TEM-Aufnahmen und anderen biophysikalischen Voruntersuchungen viel stärkere Effekte auf die A β -Aggregation zeigten, als die entsprechenden Trimer-D1-Verbindungen **51-53** und Trimer-Derivate, wurden die Liganden **54-56** intensiver untersucht. In manchen Experimenten wurden Trim-TEG-D1 **52** und Trimer-Derivate lediglich zum Vergleich herangezogen. Die meisten durchgeführten Untersuchungen waren bis zu diesem Zeitpunkt auf Trimer-TEG-D3 **55** eingeschränkt, weil diese Testverbindung zuerst synthetisiert wurde.

4.2.1 Anti-Oligomerisierungsassay (AK Korth)

Mit Hilfe eines Anti-Oligomerisierungsassays wurde überprüft, ob die Hybridverbindungen in der Lage sind die Bildung von A β -Oligomeren spezifisch zu unterdrücken. Bei diesem Experiment wurde eine Cho-Zelllinie eingesetzt, die ein mutiertes APP (V717F) überexprimiert und verstärkt das Alzheimer-Peptid sekretiert. Die Oligomerisierung verläuft in diesem Fall, im Gegensatz zu Lösungen aus synthetisch hergestelltem A β -Peptid, unter natürlicheren Bedingungen, also in Gegenwart von Zellmembranen und weiteren zellulären Bestandteilen, die bei der Aggregation von Bedeutung sein könnten. Um den Einfluss der synthetisierten Verbindungen auf die Oligomerbildung zu prüfen, wurden die Zellen mit Nährmedium, das die zu untersuchenden Hybridsubstanzen enthält, behandelt. Später wurde das A β -Peptid aus dem Zellüberstand mit immobilisiertem monoklonalem Antikörper gegen A β ₁₋₁₆ (IC16) immunpräzipitiert und anschließend mittels Western Blot untersucht. In der Abbildung 4.24 sind die Ergebnisse dieses Experiments visualisiert. Dabei sind die Effekte von Trimer-TEG-D3 **55** (JM169) bei unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zu den Effekten von den Einzelkomponenten, also D3-Peptid **8** und Trimer-TEG-Lysin **70** (AP), von dem 1:1-Gemisch aus den beiden Verbindungen und von dem D1-Peptid zu sehen. Trim-TEG-Lys **70** ist zwar in der Hybridverbindung nicht enthalten, wurde jedoch aufgrund seiner Wasserlöslichkeit repräsentativ für die hydrophobe Trimer-TEG-Säure **41** eingesetzt. Aus der Abbildung 4.24 ist eindeutig zu erkennen, dass Trim-TEG-D3 **55** konzentrationsabhängig die Oligomer-Bildung reduziert, wohingegen die Wirkungen von Trimer-Derivat **70**, D3- und D1-Peptiden viel schwächer sind. Besonders wichtig war es zu überprüfen, ob sich der Effekt von Hybridverbindung **55** mit zwei kovalent verbundenen aggregationsmodulierenden Einheiten

von der Wirkung des 1:1-Gemisches der Einzelverbindungen (D3/AP) unterscheidet. Mit dem Anti-Oligomerisierungsassay konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Hybridverbindung **55** die Menge an Oligomeren viel effektiver reduziert als das 1:1-Gemisch der Einzelkomponenten bei analogen Konzentrationen. In diesem Experiment wurde demzufolge festgestellt, dass die Hybridverbindung neue Eigenschaften aufweist, die weder die Einzelkomponenten (Trimer-Derivat **70** und D3 **8**) noch ein 1:1-Gemisch dieser Substanzen aufweist. Es scheint eine synergistische Wirkung beider aggregationshemmenden Komponenten vorzuliegen, welche nur in kovalent verknüpfter Form möglich ist.

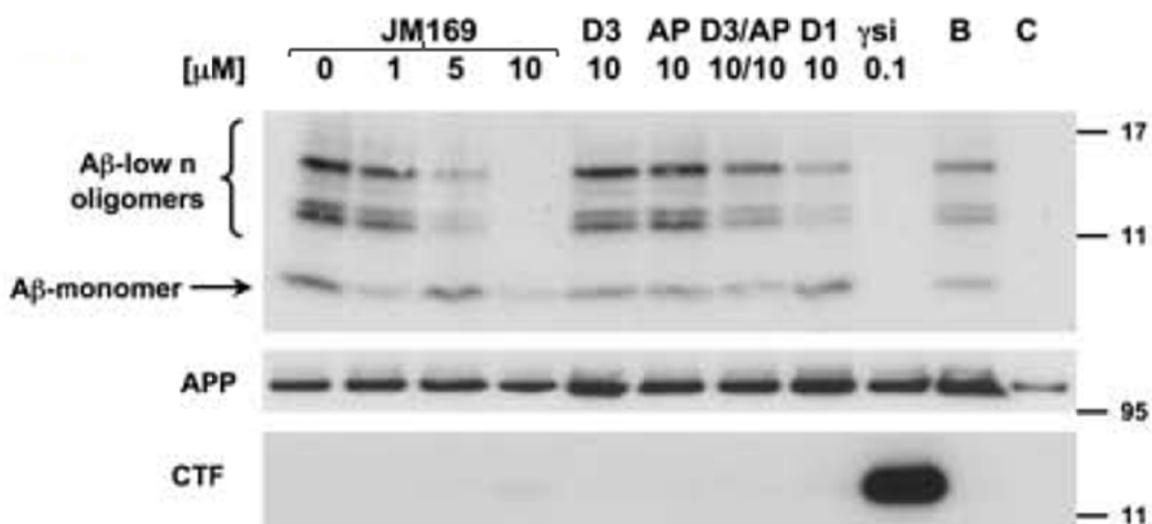


Abbildung 4.24: Western-Blot von immunpräzipitierten Aβ-Oligomeren und -Monomeren aus 7PA2-Zelllinien, die mit unterschiedlichen Substanzen (JM169: Trim-TEG-D3 **55**; AP: Trim-TEG-Lys **70**) behandelt wurden. 1, 5 und 10 sind die Konzentrationen der Testsubstanzen in μM. Die Proteinbanden für Aβ-Oligomere und -Monomere fehlen bei Wildtyp Cho-Zellen (**C**) und bei Zellen, die mit dem amyloidogene APP-Prozessierung hemmenden γ-Sekretase-Inhibitor LY411575 (**ysi**) behandelt wurden. Die Proteinmengen bei **B** dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden in diesem Fall nur mit DMSO in gleichen Konzentrationen wie bei den Testsubstanzen behandelt. Das APP wurde überall in großer Menge, ausgenommen in den nicht transfizierten Zellen (**C**), nachgewiesen. Um direkten Einfluss der Testsubstanzen auf die γ-Sekretase-Aktivität zu untersuchen, wurde in einem Kontroll-Blot das C-terminale Fragment von APP (CTF) dargestellt. Dies wird verstärkt bei Inhibierung der γ-Sekretase gebildet (siehe **ysi**).

Als die Synthese von allen drei Trimer-D3-Hybriden mit variabler Spacerlänge **54**, **55** und **56** abgeschlossen war, konnte ihre Wirkung im Anti-Oligomerisierungsassay verglichen werden. Die ersten Hinweise darauf, dass der vorhandene Spacer die Effizienz der

Hybridverbindungen beeinflusst, waren bereits im ThT-Fluoreszenztest zu erkennen (Abbildung 4.10). Im nachfolgenden Experiment sollte geprüft werden, ob eine Spacerlängenabhängigkeit auch in Bezug auf die Reduktion der A β -Oligomere besteht. Die Ergebnisse dieses Oligomerisierungsassays, der analog zu dem zuvor erläuterten Test durchgeführt wurde, sind in der Abbildung 4.25 veranschaulicht. Auch in diesem Fall zeigt das GABA-Derivat **54** den stärksten während die Trimer-(TEG)₂-Verbindung **56** einen zu Trimer-TEG-D3 **55** vergleichbaren Effekt auf die A β -Oligomerisierung aufweist. Trimer-GABA-D3 **54** konnte die Oligomer-Bildung sogar bei 1 μ M Konzentration signifikant reduzieren, wohingegen Trimer-TEG-D3 **55** und Trimer-(TEG)₂-D3 **56** bei diesen Konzentrationen keinen Effekt ausüben konnten. Daraus ergeben sich folgende EC₅₀-Werte: \sim 1 μ M für Trim-GABA-D3 **54** und \sim 5 μ M für Trim-TEG₂-D3 **56**.

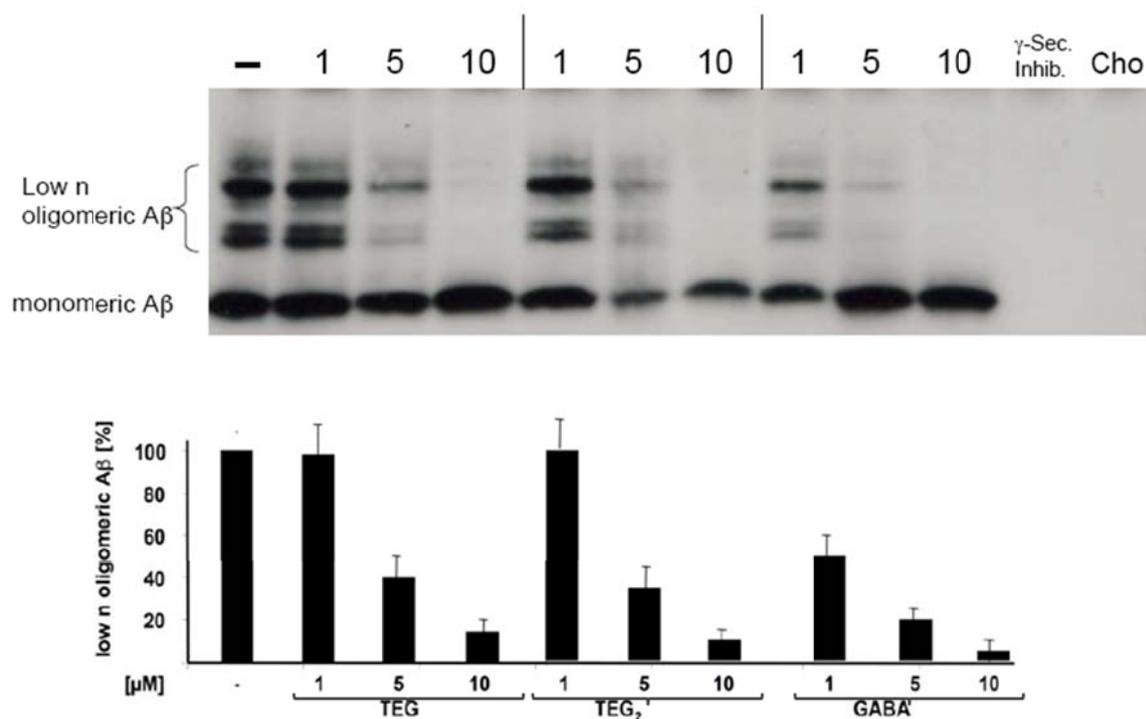


Abbildung 4.25: Effekt der variablen Spacerlänge auf die A β -Oligomerisierung in 7PA2-Zelllinien. 1, 5 und 10 sind die Konzentrationen der Testsubstanzen **54**, **55** und **56** in μ M. Oben: Western Blot; unten: prozentuale Darstellung der Bandenintensität aus dem Western Blot.

Die anschließende Untersuchung von Trim-D3 **57** (Abbildung 4.26) ergab, dass diese Hybridverbindung ebenfalls eine stärkere Wirkung als Trim-TEG-D3 **55** bezüglich der A β -Oligomerbildung aufweist (Abbildung 4.26, rechts) und deshalb dem Hybrid **54** mit dem

GABA-Spacer ähnelt. Außerdem zeigte dieser Test, dass der Ligand Trim-TEG-KKKKKG-OH **72**, welcher ebenfalls fünf positive Ladungen trägt die Oligomerbildung nicht unterdrücken kann, sondern diese sogar verstärkt. Zuvor wurde während der Moleküldynamik-Rechnungen festgestellt, dass die Komplexbildung der Glutamatleiter durch die D3-Komponente von **55** viel stabiler ist als die Komplexbildung durch die Pentalysin-Komponente von **72** (Abbildung 3.14 und 3.38).

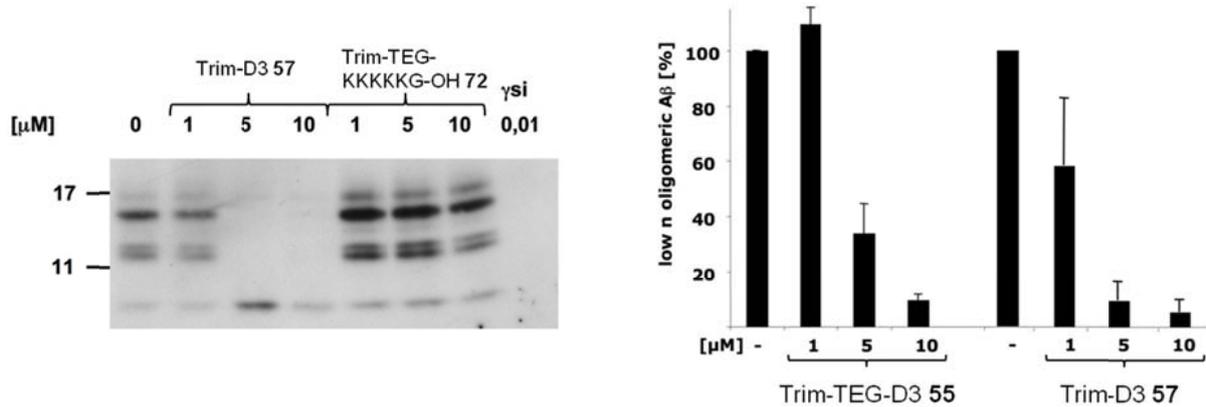


Abbildung 4.26: Effekt von Trim-D3 **57** und Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** auf die Aβ-Oligomerisierung in 7PA2-Zelllinien. 1, 5 und 10 sind die Konzentrationen der Testsubstanzen **57** und **70** in μM. Links: Western Blot; Rechts: prozentuale Darstellung der Bandenintensität von **57** und **55** aus dem Western Blot.

4.2.2 Synaptische Übertragung (AK Gottmann)

Nach dem derzeitigen Forschungsstand wirken die Aβ-Oligomere neurotoxisch, weil sie unter anderem die synaptische Übertragung und Aktivität schädigen. Bezug nehmend auf den Oligomerisierungsassay, in dem die Hybridverbindungen die Oligomerbildung unterdrücken konnten, sollte im nächsten Experiment untersucht werden, ob die Substanzen in der Lage sind, die Synapsen vor schädlicher Einwirkung der Fibrillogenes-Intermediate zu schützen. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte nur Trimer-TEG-D3 **55** untersucht werden. Die Messungen wurden im AK Gottmann (Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf) durchgeführt. Mittels einer physiologischen Methode, der *Patch-clamp*-Technik, wurden die Veränderungen der Miniatur exzitatorischer postsynaptischer Ströme (mEPSC) des AMPA-Rezeptors in Anwesenheit von Hybridsubstanz **55**

aufgenommen. Die mEPSC entstehen durch spontane Freisetzung einer konstanten Transmittermenge aus einem mit der präsynaptischen Membran verschmelzenden Vesikel und bilden die Grund- bzw. Spontanaktivität von Neuronen. Der wichtigste Neurotransmitter im zentralen Nervensystem ist Glutamat. Der AMPA-Rezeptor (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazolpropionat) ist einer der ionotropen, glutamatabhängigen Rezeptoren, der schnelle exzitatorische Transmission im Gehirn vermittelt.^[231] Als Modell dienten hierbei die Primärkulturen der kortikalen Mausneuronen. Nach der Behandlung der Gehirnzellen mit dem Zellüberstand aus dem Oligomerisierungsassay (siehe Kapitel 4.2.1), in dem A β -Oligomere enthalten waren, wurde eine signifikante Reduktion der mEPSC-Frequenz beobachtet. Enthielt der Zellüberstand zusätzlich Trim-TEG-D3 **55**, so war die A β -induzierte Reduktion mEPSC-Frequenz stark gehemmt, wobei die mEPSC-Amplitude nicht beeinträchtigt wurde (Abbildung 4.27). Die Hybridsubstanz **55** selbst hatte keinen schädigenden Einfluss auf die synaptischen Funktionen, die Frequenz und Amplitude blieben unverändert. Mit diesem Experiment wurde also gezeigt, dass Trim-TEG-D3 **55** die A β -Oligomer-induzierte Synapsentoxizität vorbeugen kann.

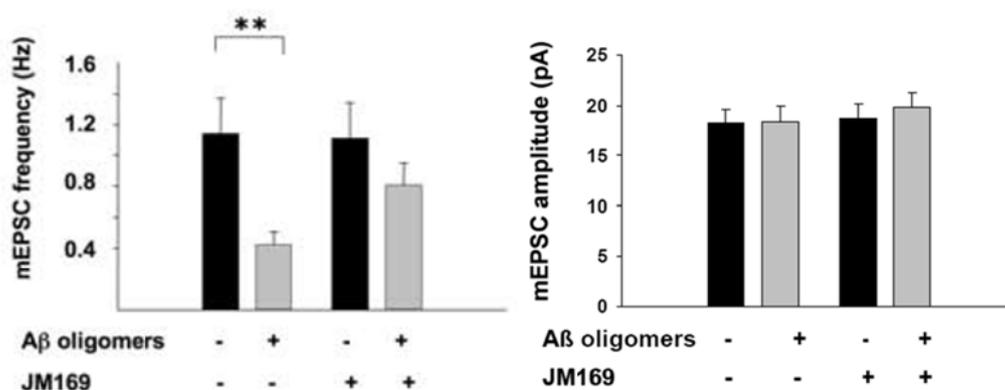


Abbildung 4.27: mEPSC-Frequenz und -Amplitude von Neuronen ohne (schwarz) und nach Behandlung mit 7PA2-Zellüberstand aus dem Oligomerisierungsassay (grau).

4.2.3 Synaptische Plastizität (AK Reymann)

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, wie effizient Trim-TEG-D3 **55** die Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität durch das A β (1-42)-Peptid aufheben kann. Diese Untersuchungen wurden im *AK Reymann* (Leibniz-Institut für Neurobiologie,

Magdeburg) durchgeführt. Unter synaptischer Plastizität versteht man die Regulierbarkeit der Synapse bezüglich der Effektivität ihrer synaptischen Übertragung. Man unterscheidet die Langzeit- von der Kurzzeitplastizität. Die langandauernde Veränderung der synaptischen Effektivität ist für die Entwicklung und das Lernen von entscheidender Wichtigkeit. Ein experimentelles Korrelat ist die sog. Langzeitpotenzierung (LTP), bei deren Funktionsweise die NMDA-Rezeptoren eine essentielle Rolle spielen. LTP stellt heutzutage ein allgemein anerkanntes Modell für neuronale Vorgänge wie Lernen und Gedächtnis, das auch zur Untersuchung von Trimer-TEG-D3 **55** herangezogen wurde, dar.^[232] Im vorliegenden Experiment wurden Maushirnschnitte mit $A\beta(1-42)$ -Oligomeren bzw. Hybridsubstanz **55** oder mit dem Gemisch aus den beiden behandelt. Die Oligomere mussten zuvor aus synthetischem $A\beta(1-42)$ -Peptid präpariert werden. Später wurden in den behandelten und unbehandelten Hippocampus-Schnitten exzitatorische postsynaptische Feldpotentiale (fEPSP) induziert und abgeleitet. Wie aus der Abbildung 4.28 hervorgeht, konnte Trim-TEG-D3 **55** die durch $A\beta$ -Oligomere herabgesetzte Langzeitpotenzierung wieder auf Werte, die sogar etwas höher als die entsprechenden Kontrollergebnisse liegen, anheben. Die Testsubstanz **55** alleine beeinflusst die Langzeitpotenzierung dagegen nicht.

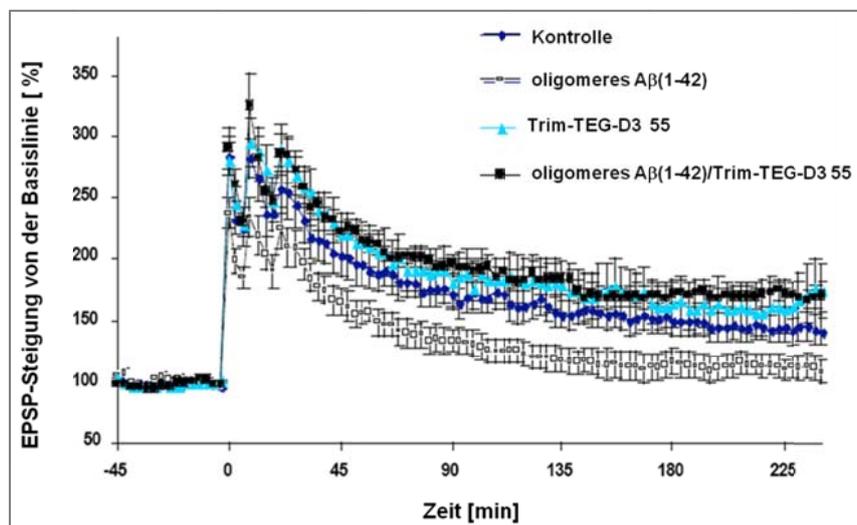


Abbildung 4.28: Langzeitpotenzierung von Maus-Hirnschnitten: unbehandelt (control) und behandelt nur mit $A\beta(1-42)$ -Oligomeren bzw. nur mit Trim-TEG-D3 **55** (JM169) oder mit $A\beta(1-42)$ -Oligomeren und Trim-TEG-D3 **55**.

4.2.4 Antiprion-Aktivität der Hybridverbindung 55 (AK Korth)

Neben den bekannten bereits beschriebenen Gemeinsamkeiten der amyloiden Proteine, wie z. B. die Anfärbbarkeit mit Thioflavin T und Kongorot, sind seit einigen Jahren Antikörper bekannt, die spezifisch diverse oligomere Aggregate, unabhängig von deren Sequenz, erkennen. Dazu gehören Oligomere oder Protofibrillen von α -Synuclein, Diabetes-assoziiertes Amylin (IAPP), Polyglutamin, Lysozym und Prion-Protein.^[233, 234] Diese Befunde lassen darauf schließen, dass es an der Oberfläche dieser verschiedenen Arten von Oligomeren gemeinsame bzw. typische Strukturen (Epitope) existieren.

Eine strukturelle Analogie zwischen A β -Peptid und Prionprotein konnte nachgewiesen werden, als bekannt wurde, dass der ~145-223-Sequenzabschnitt des aggregierten Prion-Proteins in einer parallelen nichtverdrillten β -Faltblatt-Konformation vorliegt.^[235-238]

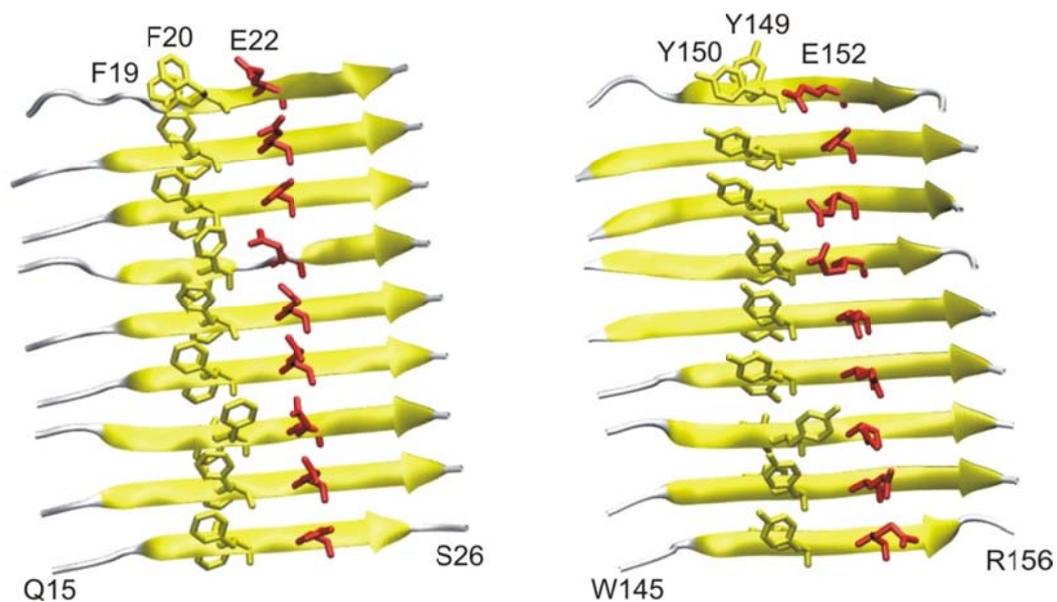


Abbildung 4.29: Struktureller Vergleich der fibrillären A β - und Prion-Proteine miteinander. Die Modelle zeigen Q15-S28-Sequenzabschnitte von A β -Peptid (links) und W145-R156-Sequenzabschnitte von PrP^{Sc} (rechts) aus jeweils einer nonameren Fibrille.

Wie sich dann nach molekularem Modellig herausstellte, liegt auch im Prion-Modell ein diaromatisches Motiv in der räumlichen Nachbarschaft zu einem sauren Aminosäurerest vor. Genau die gleiche Anordnung diente im A β -Modell als Bindungsmotiv für die Trimer-D3-Hybridverbindungen. Beim Prion-Modell befindet sich ein Glutamat 152 (E152) in der Nähe von zwei Tyrosinen Y149 und Y150 analog zum A β -Modell, in dem Glutamat 22 (E22) von

zwei Phenylalaninen F19, F20 benachbart ist (Abbildung 4.29). Der Abstand zwischen den beiden strukturellen Merkmalen ist in beiden Modellen somit identisch. Da also eine exakte Übereinstimmung der dreidimensionalen Anordnung des Bindungsmotivs vorhanden sein könnte, lag es nahe eine Wechselwirkung der Trimer-D3-Hybridsubstanzen auch bezüglich des Prionprotein PrP^{Sc} zu untersuchen.

Eine qualitative Analyse der Interaktionen der Hybridsubstanz und ihrer Einzelkomponenten mit Prion-Proteinen erfolgte mittels eines Pulldown-Experimentes (AK Korth). Bei dieser *in vitro*-Methode wurden die Testsubstanzen Trimer-TEG-Lys **70** oder D3 **8** bzw. Trimer-TEG-D3 **55** zuerst an eine feste Phase gebunden. Diese Immobilisierung erfolgte an einer NHS-Sepharose, diese reagiert unter physiologischen Bedingungen bevorzugt mit primären aliphatischen Aminogruppen. Da Trimer-TEG-Lysin **70** nur eine reaktionsfähige Aminogruppe an der Lysinseitenkette enthält, wird die Affinität des Trimer-Grundgerüsts nach der Immobilisierung nicht negativ beeinflusst. Das D3-Peptid **8** dagegen besitzt neben dem Aminoterminus fünf Arginine, die im Falle einer Nebenreaktion auch mit der NHS-Sepharose reagieren könnten. Trimer-TEG-D3 (JM169) weist sogar keine einzige aliphatische Aminogruppe auf und kann nur über eines der fünf Arginine immobilisiert werden. Auf dieser Annahme basierend wurden alle Testsubstanzen an eine mit NHS-Sepharose versehene feste Phase gebunden. Es ist jedoch hierbei zu bedenken, dass bedingt durch Blockierung der möglicherweise essentiellen Arginine bei D3 und Trimer-TEG-D3 **55** es zu einem Aktivitätsverlust kommen kann. Dessen zunächst ungeachtet wurden alle immobilisierten Liganden mit einem Mausgehirn-Homogenat, in dem das normale (N) oder das Scrapie-Prion-Protein (Sc) enthalten waren (Abbildung 4.30, „Input“), behandelt. Danach wurde das Prion-Protein aus dem immobilisierten Protein-Ligand-Komplex eluiert und mittels Western Blot detektiert (Abbildung 4.30). Da im Scrapie-Prion-Homogenat auch das PrP^C enthalten war, kann aus dem Experiment nur folgende Schlussfolgerung gezogen werden. Das D3-Peptid **8** weist eine ausgeprägte Selektivität für PrP^{Sc}, möglicherweise indem es die Glutamatleiter komplexiert. Dagegen bindet das Trimer-Derivat **70** zumindest das PrP^C wahrscheinlich über Wasserstoffbrücken und π - π -Stapelwechselwirkungen. Kombiniert man nun die beiden Einzelverbindungen **70** und D3 **8** zum TrimTEG-D3 **55**, so ist eine verstärkte und bevorzugte Bindung an das Scrapie-Prion-Protein zu erwarten. Allerdings kann aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Immobilisierung von Trim-TEG-D3 **55** keine qualitative Aussage über die Bindungsstärke und Selektivität dieser Hybridsubstanz getroffen werden. Aus den gewonnenen Ergebnissen ist lediglich abzuleiten, dass Trim-TEG-D3 **55** in der Lage ist an PrP zu binden.

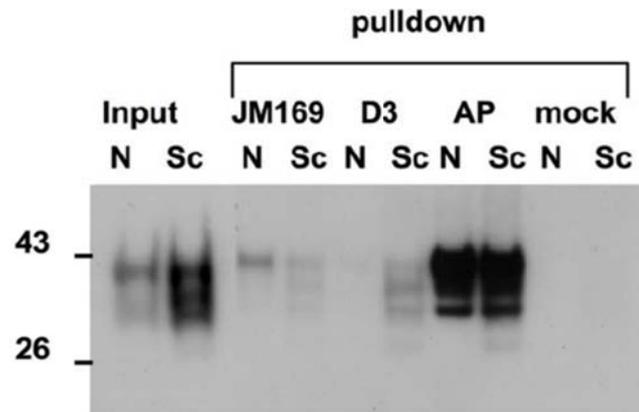


Abbildung 4.30: Western-Blot eines Pull-down-Experiments zeigt wie viel Prion-Protein an immobilisierte Liganden Trimer-TEG-D3 **55** (JM169), D3 und Trimer-TEG-Lysin **70** (AP) aus einem Mausgehirn-Homogenat (Input) gebunden wurde. Mock: Kontrolle.

Um zu untersuchen ob Trimer-D3-Hybridverbindungen in der Lage sind die Bildung von PrP^{Sc} zu inhibieren, wurden Zellexperimente mit Trimer-TEG-D3 **55** (JM169), durchgeführt (AK Korth). Zur Untersuchung der Modulation der Prion-Replikation wurden Prion-infizierte Neuroblastomzellen mit Trimer-TEG-D3 **55** und zum Vergleich mit Trimer-TEG-Lysin **70** oder D3-Peptid behandelt. Der Zellüberstand wurde danach mittels Western Blot untersucht (Abbildung 4.31). Die Hybridverbindung **55** zeigte einen signifikanten dosisabhängigen Effekt auf PrP^{Sc} in Gegenwart von Proteinase K (PK). Die Zugabe von PK erfolgte, damit nur das infektiöse und Protease-resistente PrP^{Sc} detektiert werden kann. Wie aus der Abbildung 4.31 (rechts) zu erkennen ist, konnte dagegen das Gemisch aus den Einzelkomponenten des Hybrides, in entsprechenden Konzentrationen, keinen Effekt auf PrP^{Sc} ausüben.

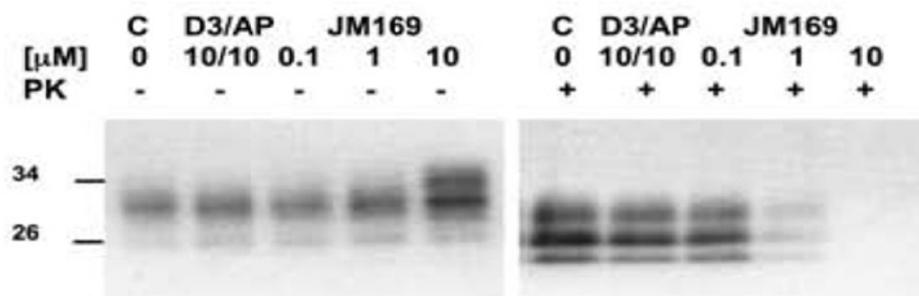


Abbildung 4.31: Western Blot aus dem Überstand der Prion-infizierten Zellen, die mit verschiedenen Testsubstanzen bei unterschiedlichen Konzentrationen mit (rechts) oder ohne (links) Proteinase K (PK) behandelt wurden. AP: Trimer-TEG-Lysin **70**, JM169: Trimer-TEG-D3 **55**.

4.2.5 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (AK Willbold)

Die Affinität der Hybridverbindungen zum A β -Peptid und zu ihren jeweiligen eigenen Peptidkomponenten wurde anhand der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (engl. surface plasmon resonance spectroscopy, SPR) bestimmt. Die SPR-Spektroskopie ist ein Verfahren zur Erfassung minimaler Änderungen des Brechungsindex im Analyten oder der Schichtdicke eines Filmes. Die Technik bedient sich dabei der Anregung einer Plasmonwelle in einem dünnen Film, z. B. aus Gold oder Silber.^[239] Mit Hilfe dieser Methode können biomolekulare Interaktionen in Echtzeit detektiert werden. Die Änderung der Lichtintensität und des Resonanzwinkels, welche von der Konzentration an Molekülen auf der Oberfläche abhängen, werden gemessen und in „resonance units“ (RU) angegeben. Basis dieser Technologie ist die Immobilisierung eines Interaktionspartners auf einem Sensorchip. Nach Injektion steigender Konzentration des zweiten Partners über den Sensorchip, kann sowohl die Bindungskinetik als auch die Affinität eines Liganden anhand von Änderungen im optischen Signal ermittelt werden.^[240]

Das primäre Ziel des hier vorliegenden Experimentes war es, die Affinitäten von Trimer-TEG-D1 **52** und Trimer-TEG-D3 **55** zum monomeren und fibrillären A β (1-42)-Peptid zu untersuchen. Die beiden Formen des A β -Peptids wurden dazu immobilisiert und mit Hybridverbindungen, in 1 x PBS gelöst, überströmt. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in der Abbildung 4.32 dargestellt. Der Ligand **52** konnte weder an das monomere noch an das fibrilläre A β -Peptid binden. Trimer-TEG-D3 **55** zeigte dagegen eine starke Wechselwirkung mit beiden Formen des β -Amyloid-Peptids. Eine quantitative Auswertung dieses Experimentes erfordert allerdings eine Übereinstimmung in der Geometrie und Anstiegshöhe (in RU) der Kurven bei Wiederholung des Experimentes. Diese Kriterien wurden jedoch nach dem zweiten Versuch nicht erfüllt. Dies kann möglicherweise durch eine Bildung unterschiedlicher Aggregate und deren Interaktion mit Alzheimer-Peptid erklärt werden. Diese Hinweise auf eine Selbstassoziation des Trimer-TEG-D3 **55** wurden im nachfolgenden SPR-Experiment weiter bekräftigt. Hier wurde überprüft, ob die Hybridsubstanzen eine Bindungsaffinität zu der jeweiligen Peptidkomponente, also D1 oder D3, die auf einem Sensorchip immobilisiert vorlagen, aufweisen und somit zur Selbstassoziation neigen. In beiden Fällen wurde ein Anstieg der Schichtdicke detektiert. Insbesondere band Trimer-TEG-D3 **55** sehr stark an immobilisiertes D3-Peptid. Die Ergebnisse der SPR-Spektroskopie deuten also einerseits darauf hin, dass die Hybridsubstanzen in irgendeiner Weise an ihre jeweiligen Peptidkomponenten binden und somit zur Selbstaggregation neigen, andererseits ist vor allem

Trim-TEG-D3 **55** in der Lage starke Interaktionen sowohl mit dem monomeren als auch mit dem fibrillären A β (1-42)-Peptid einzugehen. Für eine genauere Untersuchung der Interaktionen zwischen den Hybriden und dem Alzheimer-Peptid ist zur Vermeidung der Aggregatbildung eine weitere Optimierung der Löslichkeit der Hybridsubstanzen notwendig.

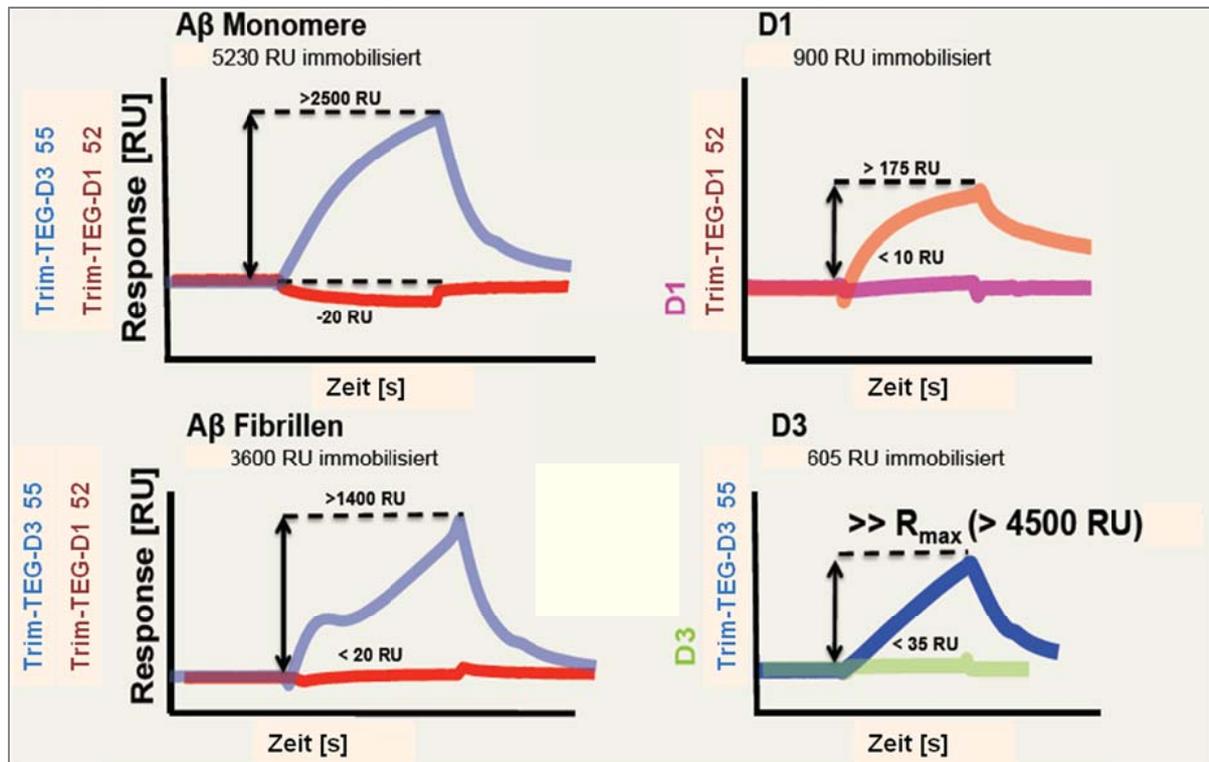


Abbildung 4.32: SPR-Bindungsexperimente: von Trimer-TEG-D3 **55** (JM169) an A β -Monomere (oben links), an A β -Fibrillen (unten links) und an das D3-Peptid (unten rechts); von Trimer-TEG-D1 **52** (Apz-TEG-D1) an A β -Monomere (oben links), an A β -Fibrillen (unten links) und an das D1-Peptid (oben rechts).

4.2.6 MTT-Test (AK Bitan, AK Willbold)

Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitäts-Test, bei dem Zellen *in vitro* mit dem gelben Tetrazoliumsalz behandelt werden, um ihre Lebensfähigkeit bzw. den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe zu messen. Der Nachweis der Zellaktivität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,2,5-diphenyltetrazolimbromid (MTT) zum blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan. Diese Umwandlung kann nur in intakten Mitochondrien lebender

Zellen durch die mitochondriale Dehydrogenase stattfinden. Nach der Lyse der Zellen kann der gebildete Farbstoff photometrisch gemessen und daraufhin quantifiziert werden.^[241]

Anhand des MTT-Tests sollte ermittelt werden, ob die hergestellten Verbindungen die Zellen vor schädlicher Wirkung des A β -Peptids schützen können. Dazu wurden Zellen in An- oder Abwesenheit der Testsubstanzen mit A β -Peptid behandelt. Mittels Vergleich der Werte konnte ermittelt werden, welche Verbindungen die größte protektive Wirkung besitzen. Die Zellvitalität ist dabei in Prozent, bezogen auf die jeweilige Kontrolle angegeben. Die Kontrollwerte wurden aus Zellen ermittelt, die weder mit A β -Peptid noch mit der Testsubstanz, sondern, falls die Verbindung wasserunlöslich war, nur mit DMSO-haltigem Puffer behandelt wurden.

4.2.6.1 Trimer-Derivate

Verbindungen, die zum Schutz von Zellen eingesetzt werden sollen, dürfen selbst keine Zelltoxizität aufweisen. Nachdem in Zellexperimenten nachgewiesen wurde, dass keine von den zu untersuchenden Verbindungen zelltoxisch wirkt, konnten alle Trimer-Derivate im MTT-Test mit A β -Peptid untersucht werden. Wie aus der Abbildung 4.33 zu erkennen ist, wiesen alle Verbindungen eine protektive Wirkung auf, wobei in den meisten Fällen die Zellaktivität in Anwesenheit der Testsubstanzen sogar deutlich über 100 % der Kontrolle anstieg. Für die potentesten Liganden wurden später die IC₅₀-Werte bestimmt (Tabelle 4.1).

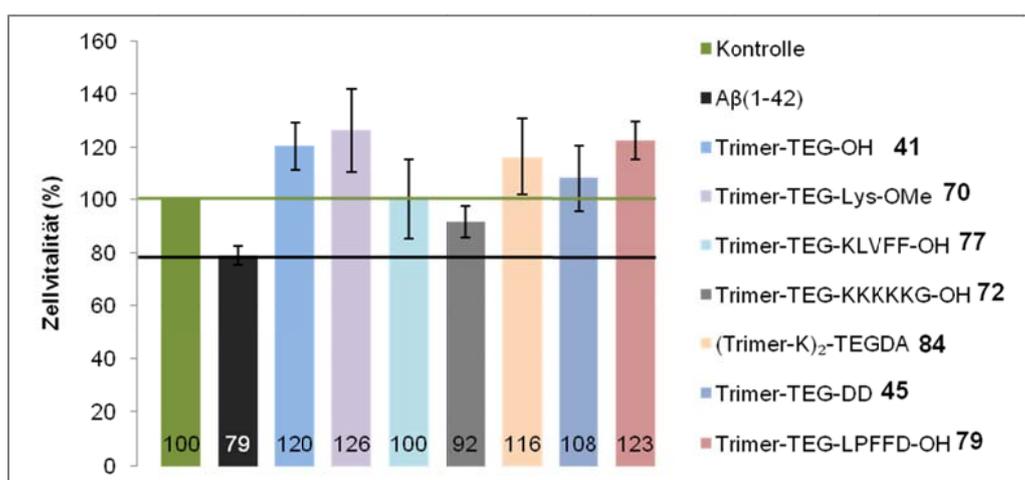


Abbildung 4.33: MTT-Test mit Trimer-Derivaten (100 μ M) an PC12-Zellen. Zellaktivität der ungeschädigten Zellen ist 100 % (grün), der mit A β ₄₂ (10 μ M) geschädigten Zellen ist 79 %. Alle Verbindungen erhöhen die Zellvitalität in Gegenwart von A β (1-42).

Obwohl Trimer-TEG-Lysin **70** bei 100 μM Konzentration die β -Amyloid-Zytotoxizität am besten unterdrücken konnte, zeigte diese Verbindung im „dose-response“-Experiment im Vergleich zu anderen Substanzen den höchsten IC_{50} -Wert (Tabelle 4.1). Dagegen konnte Trim-TEG-LPFFD-OH **79** die Zellaktivität schon bei 10 μM Konzentration signifikant erhöhen, indem es die Zahl der durch $\text{A}\beta$ -Peptid geschädigten Zellen um 50 % reduzierte.

Tabelle 4.1: IC_{50} -Werte der effektivsten Trimer-Derivate im MTT-Test.

Trimer-Derivat	IC_{50} [μM]
Trim-TEG-OH 41	35.3
Trim-TEG-K-OMe 70	52.7
(Trim-K) ₂ -TEGDA 84	21.5
Trim-TEG-LPFFD 79	10.1

4.2.6.2 Hybridverbindungen

Ferner erfolgten Ermittlungen der eigenen Zelltoxizität von Trim-TEG-D1 **52** und Trim-TEG-D3 **55** und ihrer Wirksamkeit gegen $\text{A}\beta$ -Zytotoxizität. Dabei wurden auch ihre Einzelkomponenten separat und im Gemisch mit 25 μM Konzentration zu den Zellen gegeben. Bis auf das D1-Peptid **7**, das die Zellvitalität auf ca. 80 % herabsetzte, zeigte keine Testverbindung eine ausgeprägte Zelltoxizität (Abbildung 4.34, oben). In Anwesenheit von 12.5 μM $\text{A}\beta(1-42)$ konnten sowohl die Einzelkomponenten in isolierter und gemischter Form (Trim-TEG-K-OMe **70**, D1 **7**) als auch die Hybridsubstanz **52** selbst die Zellvitalität erhöhen (Abbildung 4.34, unten links). Sie wirkten bei 25 μM Konzentration sehr ähnlich und ließen die Anzahl der überlebenden Zellen von ca. 50 % auf ca. 70 % ansteigen. Trim-TEG-D3 **55** erhöhte dagegen bei der gleichen Konzentration die Zellvitalität von ca. 35 % auf ca. 60 % (Abbildung 4.34, unten rechts), allerdings nicht so stark wie das D3-Peptid **8** und das Gemisch aus Trim-TEG-Lys **70** (ca. 80 %) und D3 **8** (ca. 90 %). Die Ergebnisse aus dieser Untersuchung widersprechen den Resultaten des Anti-Oligomerisierungsassays. Dort war ein Gemisch aus Einzelkomponenten weniger effektiv als die Hybridverbindung **55** mit kovalent verbundenen Aggregationsinhibitoren.

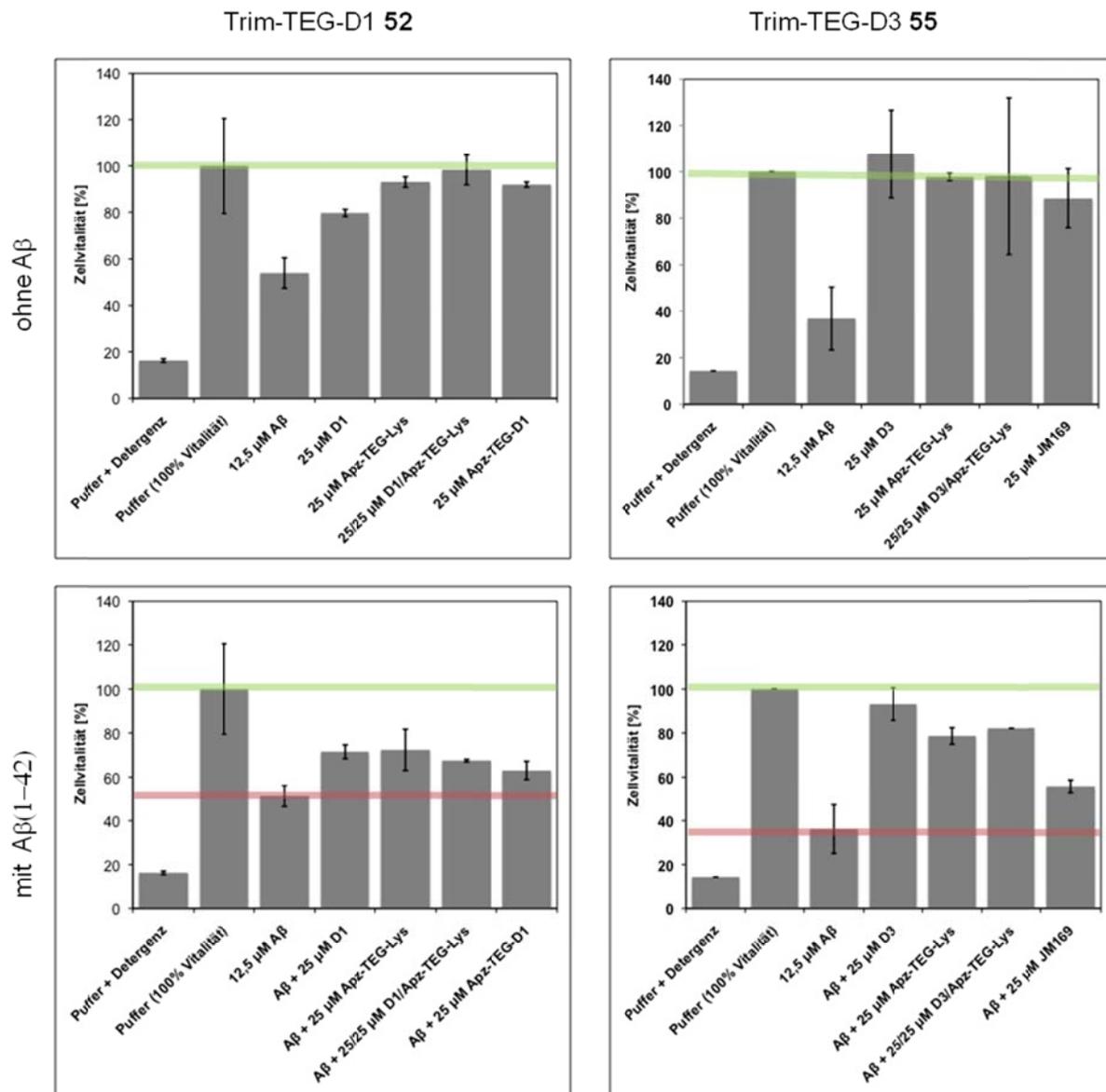


Abbildung 4.34: MTT-Test mit Trimer-TEG-D1/D3 **52/55**, D1- **7**, D3-Peptid **8** und Trim-TEG-Lys **70** an PC12-Zellen. Zellaktivität der ungeschädigten Zellen ist 100 % (grüne Linie) und der mit Aβ(1-42) geschädigten Zellen durch rote Linie gekennzeichnet. Apz-TEG-Lys: Trim-TEG-K-OMe **70**; JM169: Trim-TEG-D3 **55**; Apz-TEG-D1: Trim-TEG-D1 **52**.

4.3 Experimente zu Kolloiden

Neben den vielen Inhibitoren von Enzymen sowie von verschiedenen Rezeptoren sind derzeit mehrere Inhibitoren der Fibrillenbildung bekannt, deren aktive Form Kolloide sind. Solche kolloidalen Partikel bestehen oft aus kleinen organischen Molekülen und können von 30 bis zu 1000 nm groß sein. Ein wahrscheinlicher Wirkungsmechanismus solcher Partikel ist Bindung bzw. Adsorption des Enzyms oder Fibrillen-bildenden Peptids/Proteins an deren

Oberfläche und somit sein Ausschluss aus der Lösung.^[242, 243] Einige derartiger Inhibitoren wurden mittels virtuellen Screening und Hochdurchsatz-Screening (high-throughput screening, HTP) identifiziert, wiesen jedoch bei weiteren Untersuchungen keine Strukturaktivitätsbeziehung auf und stellten sich als unselektiv, nicht kompetitiv und Ionenstärke-abhängig heraus.^[244, 245]

Aus den Untersuchungen mit Transmissionselektronenmikroskopie gab es bereits Hinweise darauf, dass manche Liganden zur Selbstassoziation neigen, indem sie Fasern bilden. Runde kolloidale Aggregate wurden in TEM-Aufnahmen dagegen nicht beobachtet. Dennoch galt es mittels weiterer Untersuchungsmethoden zu überprüfen, in welchem Zustand die synthetisierten Liganden in durchgeführten Experimenten tatsächlich vorlagen. Die größte Wahrscheinlichkeit zur Aggregatbildung besteht bei hohen Ligandenkonzentrationen, wie z. B. bei der im ThT-Test gewählten Konzentration von 200 μM . In diesem Zusammenhang sollten Lösungen einiger synthetisierter Verbindungen mit Konzentrationen analog zum ThT-Test darauf untersucht werden, ob sie im monomeren oder aggregierten Zustand vorliegen. Es wurden insgesamt sieben Trimer-Derivate **41**, **45**, **68**, **70**, **72**, **79** und **84** sowie weitere von *Katrin Hochdörffer* synthetisierte Liganden **98**, **99**, **100**, **101** und **102** (siehe Abbildung 4.35) untersucht.

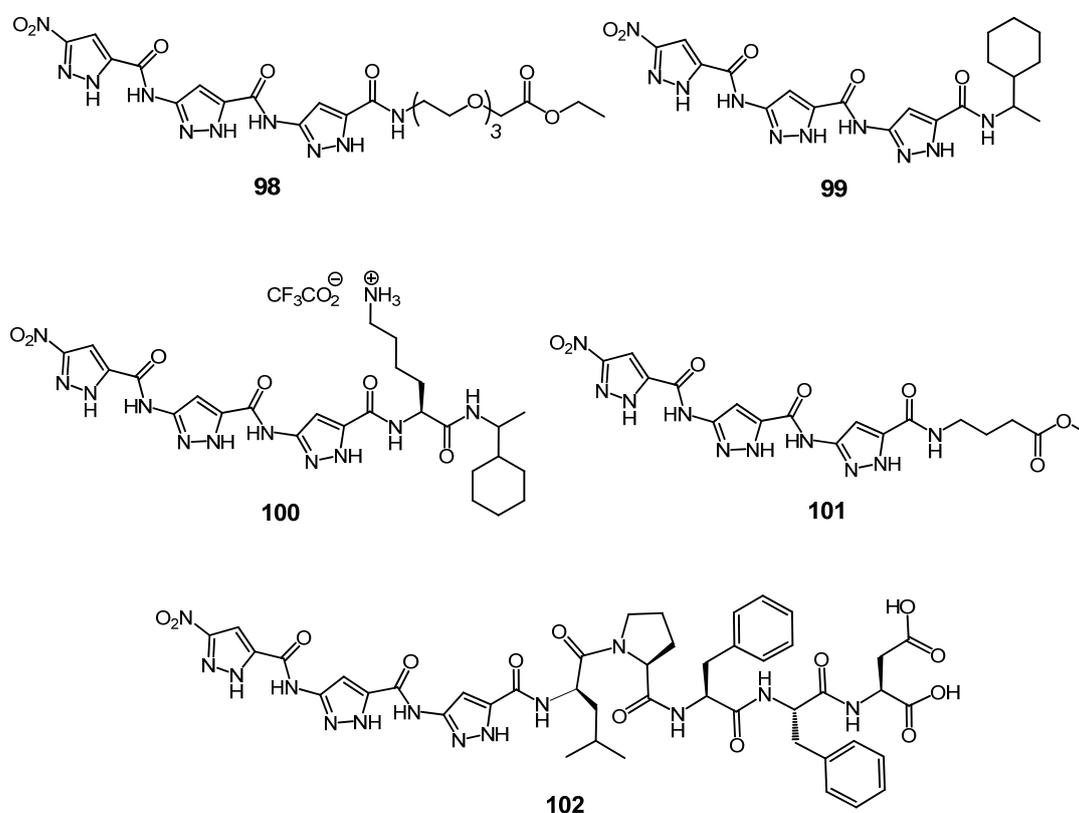


Abbildung 4.35: Übersicht weiterer Liganden (hergestellt von *Katrin Hochdörffer*), die auf Kolloidbildung untersucht wurden: Trim-TEG-OEt **98**, Trim-CHE **99**, Trim-K-CHE **100**, Trim-GABA-OMe **101** und Trim-LPFFD-OH **102**.

4.3.1 UV-Messungen

Liegen in den angesetzten Lösungen kolloidale Aggregate und/oder ungelöste Partikel vor, sollten sich diese durch Zentrifugation bzw. Filtration zumindest zum Teil abtrennen lassen. Diese Konzentrationsabnahme kann photometrisch quantitativ erfasst werden. Hierzu wurden UV-Messungen von den Liganden-Lösungen vor und nach dem Zentrifugieren bzw. Filtrieren durchgeführt. Die Resultate sind in den Abbildungen 6.5 und 6.6 (Kapitel 6.14) dargestellt. Die nach der Filtration und Zentrifugation aufgenommenen Absorptionsspektren waren für die jeweilige Verbindung in der Regel annähernd identisch. Dies bedeutet, dass durch Filtration und Zentrifugation die gleichen Mengen an Partikeln abgetrennt wurden. Anhand der aufgenommenen Absorptionsspektren lassen sich alle untersuchten Liganden in drei Gruppen **A-C** einteilen (siehe Abbildung 4.36).

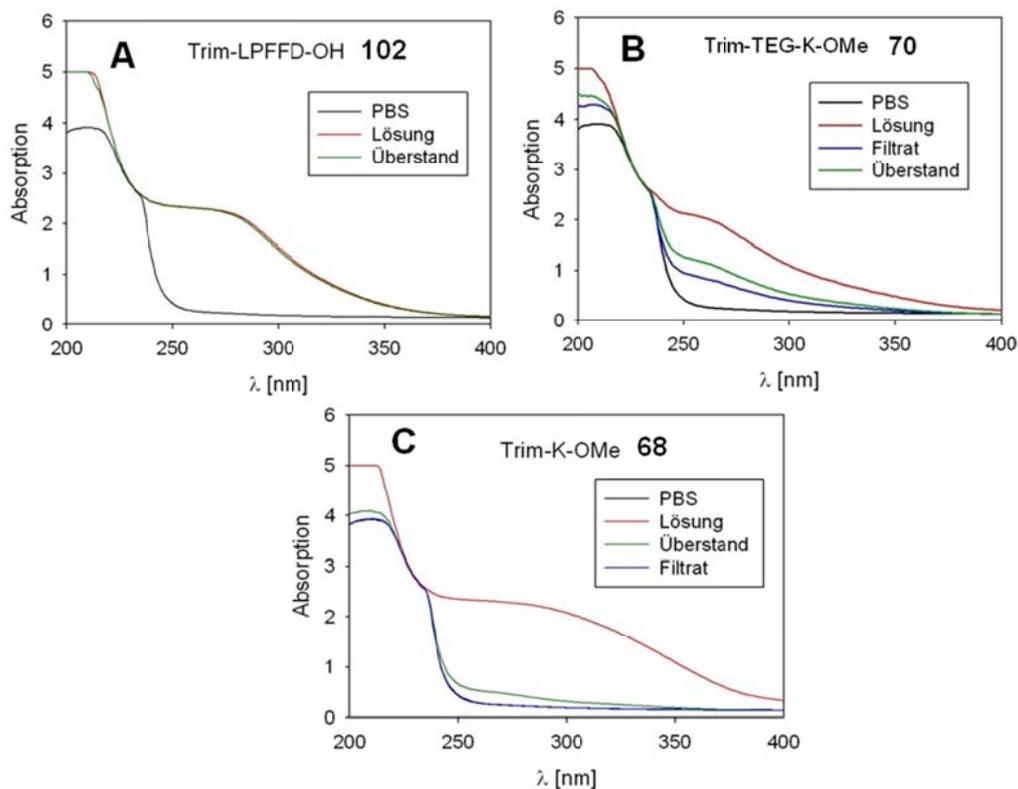


Abbildung 4.36: Drei typische Spektren von Trimer-Derivaten vor und nach der Zentrifugation oder Filtration.

Für die Gruppe **A** wurde keine Reduktion der Absorption beobachtet, das heißt die Lösungen enthielten weder ungelöste Partikel noch größere Kolloide. Dazu zählen Trim-TEG-KKKKKG-OH **72**, Trim-TEG-LPFFD-OH **79** und Trim-LPFFD **102**. Für die Gruppe **B** wurde ein signifikanter Rückgang der UV-Absorption festgestellt, so dass schätzungsweise

halbkonzentrierte Filtrate und Überstände erhalten wurden. Zu dieser Gruppe gehören Trim-TEG-K-OMe **70**, Trim-TEG-OH **41** und Trim-TEG-OEt **98**. Bei der letzten Gruppe **C** wurde eine fast vollständige Abnahme der Absorption beobachtet, was darauf hindeutet, dass diese Verbindungen entweder zum größten Teil ungelöst oder aggregiert vorlagen. Trim-DD **45**, Trim-GABA-OMe **101**, Trim-CHE **99**, Trim-K-CHE **100** und Trim-K-OMe **68** besitzen solche Eigenschaften. Insgesamt konnten Konzentrationsabnahmen bei hydrophoben sowie amphiphilen Trimer-Derivaten mit einem einfach geladenen Substituenten festgestellt werden. Bei semipeptidischen Liganden war dagegen keine Konzentrationsänderung zu beobachten.

4.3.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

4.3.2.1 Beschreibung der Methode

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist auch als Quasielastische Lichtstreuung (QELS) oder Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) bekannt. Sie eignet sich zur Messung von Partikeln zwischen einigen Nanometer und ca. 1 μm . Suspendierte Teilchen streuen das Licht mit einer geringen Intensität in alle Raumrichtungen nahezu gleich, weshalb die alleinige Messung des Streulichts als Maß für die Partikelgröße nicht geeignet ist. Suspendierte Nanopartikel und Makromoleküle unterliegen der Brown'schen Molekularbewegung. Diese hat zur Folge, dass das gestreute Licht in seiner Intensität schwankt. Die Streulichtfrequenz korreliert mit der Partikelgröße. Bei der dynamischen Lichtstreuung werden daher die Fluktuationen des gestreuten Lichts erfasst und zur Ermittlung einer Partikelgrößenverteilung genutzt. Kleine Partikel bewegen sich aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung schneller als große. Darauf beruht auch ihre schnelle Diffusion, so dass der Diffusionskoeffizient D ein Maß für diese Schwankungsbewegung darstellt. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung kann aus dem Diffusionskoeffizienten D der hydrodynamische Radius R_h der Probenbestandteile berechnet werden:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (4)$$

Der Parameter k ist die Boltzmann-Konstante ($\sim 1.4 \cdot 10^{-23}$ J/K), T ist die Temperatur und η die Viskosität des Lösungsmittels.^[246, 247]

4.3.2.2 Teilchengrößenanalyse

Um die Größe der möglicherweise vorhandenen kolloidalen Partikel bestimmen zu können, wurden DLS-Messungen von *Jolanta Polkowska* durchgeführt. Mit dieser Methode wurden allerdings nur die Verbindungen, für die es bereits in den UV-Messungen Hinweise auf Kolloidbildung gab (Gruppe **B** und **C**), untersucht. Um mechanische Verunreinigungen wie z. B. Staub und feine Fusseln aus der Lösung zu entfernen, wurden alle Lösungen zunächst durch Filter mit einer Porenweite von 650-750 nm filtriert. Da die meisten aus organischen Molekülen aufgebauten Kolloide diese Größe nicht überschreiten, sollten die gegebenenfalls vorhandenen Assoziateteilchen diesen Filter passieren können und im erhaltenen Filtrat nachweisbar sein. Für das Abtrennen von großen Aggregaten bzw. Kolloiden wurden Filter mit der Porenweite von 200 nm eingesetzt. In der Tabelle 4.2 sind Ergebnisse der untersuchten Liganden mit $PdI < 0.4$ dargestellt. Der Polydispersitätsindex (PdI) ist ein Maß für die Größenverteilung der Partikel in der Lösung. Eine ungefähre Teilchengrößenbestimmung ist nur mit $PdI < 0.3$ möglich. Lösungen mit $PdI > 0.3$ sind uneinheitlich, also sehr stark polydispers.^[248, 249] Außerdem ist zu beachten, dass mit dieser Methode nur Partikel mit einem Durchmesser größer als 1 nm detektierbar sind, so dass die Proben mit einem ermittelten hydrodynamischen Durchmesser unter 1 nm als aggregat- und kolloidfrei eingestuft werden können. Dazu zählen gemäß der Tabelle 4.2 Trim-CHE **99**, Trim-K-CHE **100** und Trim-GABA-OMe **101**. Nach der Filtration mit dem groben Filter wurden Partikel in Lösung von Trim-TEG-K-OMe **70** (~18 nm) detektiert. Eine weitere Filtration dieses Filtrates durch einen feineren Filter führte zur Erhöhung des PdI-Wertes. Dies kann möglicherweise durch weiterhin stattfindende Aggregationsvorgänge erklärt werden. Bestätigende Hinweise auf Selbstassoziation des Trimer-Derivates **70** gab es bereits neben den UV-Messungen in TEM-Aufnahmen, wo Fasern zu beobachten waren. Eine weitere Verbindung, bei der Partikel (~17 nm) nachgewiesen wurden, ist Trim-TEG-OEt **98**. Da die detektierten Partikel relativ klein sind, sollten sie auch den feinen Filter mit Porenweite von 200 nm passieren können. Überraschenderweise waren nach der Filtration keine Partikel mehr nachweisbar. Die untersuchte 200 μ M Lösung von **98** zeigte eine schwache Konzentrationsabnahme nach der Zentrifugation und Filtration. Im Gegensatz zu Trim-TEG-K-OMe **70** konnten in TEM-Aufnahmen von Trim-TEG-OEt **98** weder Fasern noch kolloidale Partikel beobachtet werden. Für detektierte Partikel von Trim-TEG-OH **41** gab es ebenfalls keine weiteren bestätigenden Hinweise (TEM-Aufnahmen) für die Bildung von Selbstassoziaten.

Tabelle 4.2: Ergebnisse aus den DLS-Messungen. Die Durchmesser sind auf das Volumen bezogen.

Verbindung	Filter 650-750 nm		Filter 200 nm	
	PdI	Durchmesser [nm]	PdI	Durchmesser [nm]
Trim-TEG-K-OMe 70	0.35	17.6 (86 %) 81.8 (10 %)		PdI > 0.5
Trim-CHE 99	0.30	0.7	0.26	0.7
Trim-K-CHE 100	0.21	0.7	0.44	0.7
Trim-TEG-OH 41			0.36	51.1 (99 %)
Trim-TEG-OEt 98	0.22	15.6 (80 %)	0.34	0.6
Trim-GABA-OMe 101	0.33	0.7	0.41	0.7

4.3.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

4.3.3.1 Beschreibung der Methode

Ein sehr flexibel einsetzbares Verfahren zur Untersuchung von Oberflächen ist die Rasterkraft-Mikroskopie (engl. atomic force microscopy, AFM). Das AFM misst die von Ort zu Ort wechselnde anziehende und abstoßende Wechselwirkungskraft, die bei hinreichend kleinem Abstand zwischen Unterlage und der darüber geführten Spitze messbar wird. Die Messgröße ist hier die Auslenkung des biegsamen Auslegers, an dem die Mess-Spitze befestigt ist. Man kann die Mess-Spitze beispielsweise mit einem am Ausleger reflektierten Lichtzeiger messen. Der Mechanismus der Bild-Entstehung ist sehr komplex. Er hängt von spezifischen Eigenschaften der Oberfläche und der physikalischen Natur der Wechselwirkungspotentiale ab. So können van-der-Waals-Kräfte, ionische, magnetische und elektrostatische Kräfte zur Abbildung beitragen. AFM ist besonders gut zur Abbildung von Polymeren und Biomolekülen geeignet.^[250]

4.3.3.2 Untersuchungen mit AFM

Um herauszufinden in welcher Form (monomer oder kolloidal) die im ThT-Test untersuchten Trimer-Derivate vorlagen, wurden AFM-Aufnahmen (*AK Schmuck*, Universität Duisburg-Essen) von zwei exemplarisch ausgewählten Liganden aufgenommen. Hierzu wurde die polare Verbindung **70**, die bereits in TEM und DLS Tendenz zur Selbstassoziation aufwies,

und das lipophile Derivat Trim-CHE **99**, das zumindest nach der Filtration in DLS monomer vorlag, ausgewählt. Die Untersuchungen konnten bei analogen Konzentrationen (198 μM) durchgeführt werden. Um Kristallisationsvorgänge des Puffers zu vermeiden, wurden die Proben in Wasser/DMSO (90:10) angesetzt. Zusätzlich wurden die Proben auf pH 7.4 eingestellt. Wie in der Abbildung 4.37 (links) dargestellt ist, konnten für Trim-TEG-K-OMe **70** Vesikel verschiedener Größen detektiert werden. Außerdem sind dort verschmolzene größere Spezies zu erkennen. Die Auswertung der Aufnahmen ergab, dass die Vesikel kollabiert vorliegen, weil sie wahrscheinlich mit der Mica-Trägeroberfläche interagieren. Der Durchmesser dieser kollabierten Vesikel variiert zwischen 40 und 50 nm, ihre Höhe dagegen zwischen 2.5 und 12 nm. Der exakte Durchmesser der kugelförmigen Partikel ist aus den Aufnahmen alleine nicht abzulesen. Durch Korrelation zu DLS-Messungen, in denen ein Durchmesser von ca. 18 nm ermittelt wurde, ist davon auszugehen, dass die Vesikelgröße in der AFM-Aufnahme mit der Größe aus DLS-Messungen ungefähr übereinstimmt. Die AFM-Aufnahme von Trim-CHE **99** (Abbildung 4.37, rechts) zeigt nur die Mica-Trägeroberfläche. Dies bedeutet, dass dieser Ligand unter den gewählten Bedingungen keine Selbstassoziation eingeht. Auch in TEM-Aufnahmen waren für diesen lipophilen Liganden keine Kolloide zu beobachten.

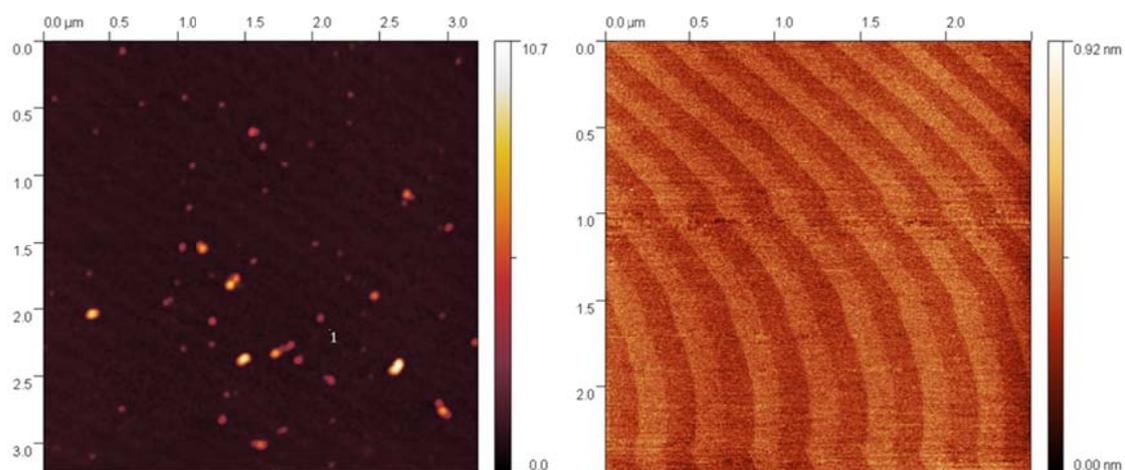


Abbildung 4.37: Repräsentative AFM-Aufnahme für eine 198 μM Lösung von Trim-TEG-K-OMe **70** (links) und Trim-CHE **99** (rechts) in Wasser/DMSO (90:10), pH 7.

4.3.4 Untersuchungen mit DOSY-NMR

Mit Hilfe eines DOSY-NMR-Experiments (engl. diffusion ordered spectroscopy) lässt sich der Diffusionskoeffizient eines Moleküls und damit indirekt seine Größe bestimmen. Von

allen untersuchten Verbindungen wurde nur Trim-TEG-K-OMe **70** konsequent in allen Experimenten als eine zur Selbstassoziation neigende Verbindung eingestuft. In einem parallelen Versuch sollte die Vesikelgröße anhand eines DOSY-NMR-Experiments ermittelt werden. Hierzu musste allerdings eine im Vergleich zu anderen Versuchen konzentriertere Lösung (ca. 1 mM) in einem D₂O/DMSO-d₆-Gemisch (90:10) angesetzt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen und Abwesenheit von Puffer, kann das Ergebnis deshalb von den Werten aus DLS und AFM abweichen. Im resultierenden zweidimensionalen Spektrum wird bei einem DOSY-NMR die chemische Verschiebung des ¹H-NMR-Spektrums von Trim-TEG-K-OMe **70** gegen den Logarithmus des Diffusionskoeffizienten aufgetragen. Aus dem DOSY-Spektrum wurde ein Diffusionskoeffizient von $5.01 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ermittelt. Dieser Diffusionskoeffizient wurde zusammen mit der Boltzmann-Konstante ($1.4 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$) und der von dem Wasser/DMSO-Gemisch (9:1) ermittelten Viskosität ($0.0012 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) zur Berechnung des hydrodynamischen Radius in die Stokes-Einstein-Gleichung (4) eingesetzt.

$$R_h = \frac{1.4 \cdot 10^{-23} \frac{\text{kgm}^2}{\text{s}^2\text{K}} \cdot 298 \text{ K}}{6 \cdot \pi \cdot 0.0012 \frac{\text{kg}}{\text{m s}} \cdot 5.01 \cdot 10^{-11} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}} = 3.7 \cdot 10^{-9} \text{ m} \approx 4 \text{ nm}$$

Aus der Abbildung 4.38 ist allerdings zu erkennen, dass der bestimmte Diffusionskoeffizient aus einem Bereich gemittelt werden musste. Dies entspricht einer Schwankung des hydrodynamischen Radius von 1.8-11.5 nm. Der gemittelte hydrodynamische Radius von $\sim 4 \text{ nm}$ ergibt einen Durchmesser von $\sim 8 \text{ nm}$. Dieser liegt somit unterhalb des aus DLS ermittelten Radius ($\sim 18 \text{ nm}$).

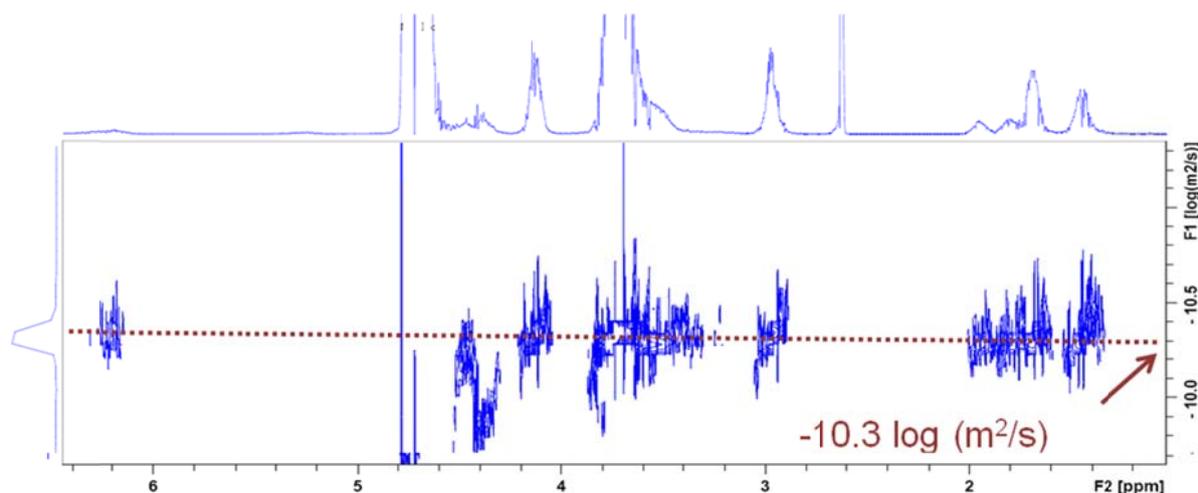


Abbildung 4.38: DOSY-NMR von Trim-TEG-K-OMe **70**, ¹H-NMR-Spektrum auf der Abszisse ist gegen den Diffusionskoeffizienten auf der Ordinate aufgetragen, 1 mM in D₂O/DMSO-d₆ (90:10).

4.3.5 Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration

Da in AFM-Aufnahmen von gelöstem Trim-TEG-K-OMe **70** Vesikel zu beobachten waren (Abbildung 4.37, links), sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob es sich dabei um Assoziationskolloide (Mizellen) handelt. Zusätzlich wurde Trim-TEG-KKKKKKG-OH **72** analysiert. Dieser Ligand ist ebenfalls ein Amphiphil, besitzt aber im Gegensatz zu Trim-TEG-K-OMe **70** mehrere positive Ladungen. Die Mizellenbildung setzt erst oberhalb einer bestimmten Konzentration ein. Diese wird als kritische Mizellenkonzentration (cmc) bezeichnet und kann anhand einer abrupten Änderung von verschiedenen physikalischen Größen erfasst werden wie z. B. der Oberflächenspannung, den Lichtstreuungseigenschaften oder anhand fluoreszenzspektroskopischer Untersuchungen, wie im Folgenden näher erläutert wird.^[251] Die fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration erfolgt über die Aufnahme von Fluoreszenzspektren von Pyren in Anwesenheit des mizellenbildenden Amphiphils steigender Konzentration. Dabei macht man sich die Intensitätsänderung der charakteristischen Feinstruktur des Pyrens in Lösung zunutze. Wie von *Kalyanasundaram et al.* gezeigt wurde, ist das Fluoreszenzspektrum stark abhängig von der Polarität in der Umgebung des Pyrens.^[252] Da Pyren unpolar ist, befindet es sich, falls Assoziationskolloide vorhanden sind, im unpolaren Kern der Mizellen. Aufgrund der hydrophoben Umgebung erfährt der Fluoreszenzfarbstoff so eine Änderung seines Fluoreszenzspektrums. Sollte diese Änderung und somit eine kritische Mizellenkonzentration für beide zu untersuchenden Liganden **70** und **72** festgestellt werden, könnte dies als Beweis für die Ausbildung mizellarer Strukturen dienen. Zur Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration in 1xPBS mit 10 % DMSO wurden die Intensitäten der Peaks bei 372.8 nm und 392.2 nm aus den Fluoreszenzspektren steigender Ligandenkonzentration (Abbildungen 4.39 und 4.40, links) zueinander ins Verhältnis gesetzt und gegen den Logarithmus der Ligandenkonzentration aufgetragen (Abbildungen 4.39 und 4.40, rechts). Dabei ist außerdem bei steigender Ligandenkonzentration eine Abnahme der Gesamtintensität des Fluoreszenzspektrums zu beobachten, die durch die Abnahme der Löslichkeit zu erklären ist. Die ermittelten kritischen Mizellenkonzentrationen sind für beide untersuchten Liganden **70** und **72** sehr ähnlich und betragen ca. 17 μM für Trim-TEG-K-OMe **70** und ca. 12 μM für Trim-TEG-KKKKKKG-OH **72**. Dies bedeutet, dass die Liganden **70** und **72** ab der entsprechenden Konzentration in 1xPBS mit 10 % DMSO Mizellen bilden. Dementsprechend muss es sich bei den im AFM detektierten Vesikeln von Trim-TEG-K-OMe **70** um Mizellen handeln.

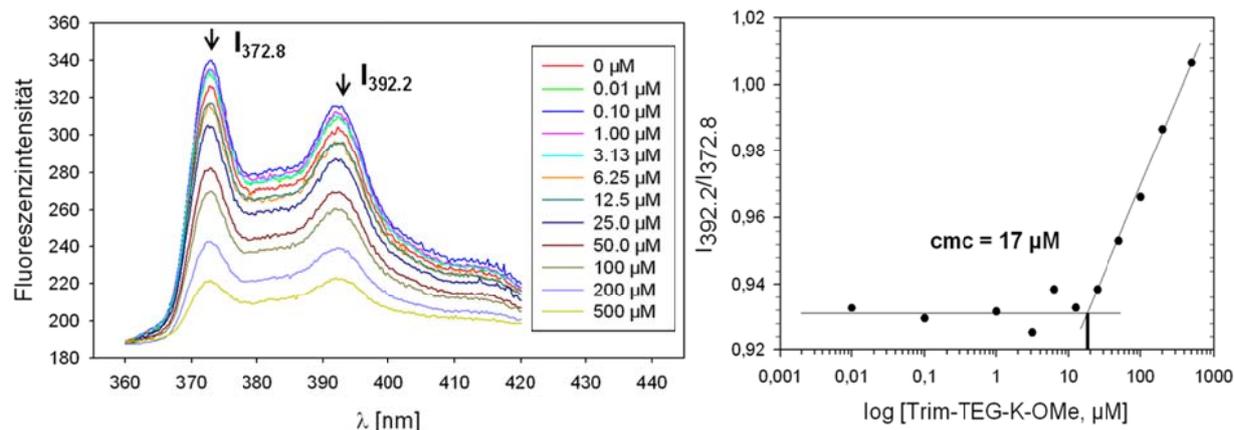


Abbildung 4.39: Links: Fluoreszenzmissionsspektren von Pyren (1 µM) entweder alleine oder in Gegenwart von Trim-TEG-K-OMe **70** bei Konzentrationen von 0,01-500 µM in 1xPBS mit 10 % DMSO; Rechts: Die Änderung des Intensitätsverhältnisses $I_{392.2}/I_{372.8}$ aus den Fluoreszenz-Emissionsspektren von Pyren in Gegenwart von Trim-TEG-K-OMe **70**.

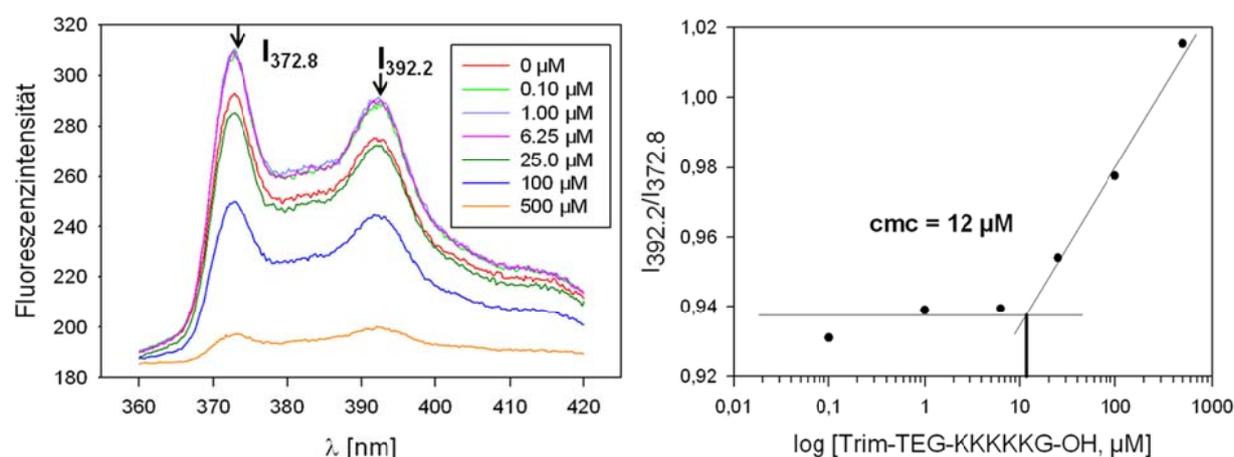


Abbildung 4.40: Links: Fluoreszenzmissionsspektren von Pyren (1 µM) entweder alleine oder in Gegenwart von Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** bei Konzentrationen von 0,1-500 µM im 1xPBS/DMSO-Gemisch (90:10); Rechts: Die Änderung des Intensitätsverhältnisses $I_{392.2}/I_{372.8}$ aus den Fluoreszenz-Emissionsspektren von Pyren in Gegenwart von Trim-TEG-KKKKKG-OH **72**.

4.3.6 Aktivität der filtrierten Liganden-Lösungen im ThT-Test

Nachdem die Liganden-Lösungen darauf untersucht wurden, ob sie Kolloide bzw. ungelöste Partikel enthalten und in welcher Form diese gegebenenfalls vorliegen, erfolgten im nachfolgenden Schritt die Aktivitätsmessungen der erhaltenen Filtrate (Porenweite 200 nm). Zuvor mussten die Liganden-Konzentrationen in den Filtraten bestimmt werden. Hierzu

wurden UV-Absorptionsspektren von Liganden-Lösungen mit folgenden Konzentrationen aufgenommen: 6.25-200 μM für Trimer-TEG-K-OMe **70** und 3.13-200 μM für Trimer-Lys-CHE **100** (Abbildungen 4.41 und 4.42, links). Aus diesen UV-Spektren wurde für die jeweilige Verbindung die Absorption bei 260 nm gegen die Konzentration aufgetragen (Abbildungen 4.41 und 4.42, rechts). Gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz konnten die Konzentrationen der Liganden in den Filtraten aus dem linearen Bereich dieser Auftragung abgelesen werden. Diese betragen 90 μM für Trimer-TEG-K-OMe **70** und 5.2 μM für Trimer-Lys-CHE **100**. Die ermittelten Konzentrationen einiger Liganden sind in der Tabelle 4.3 zusammengefasst.

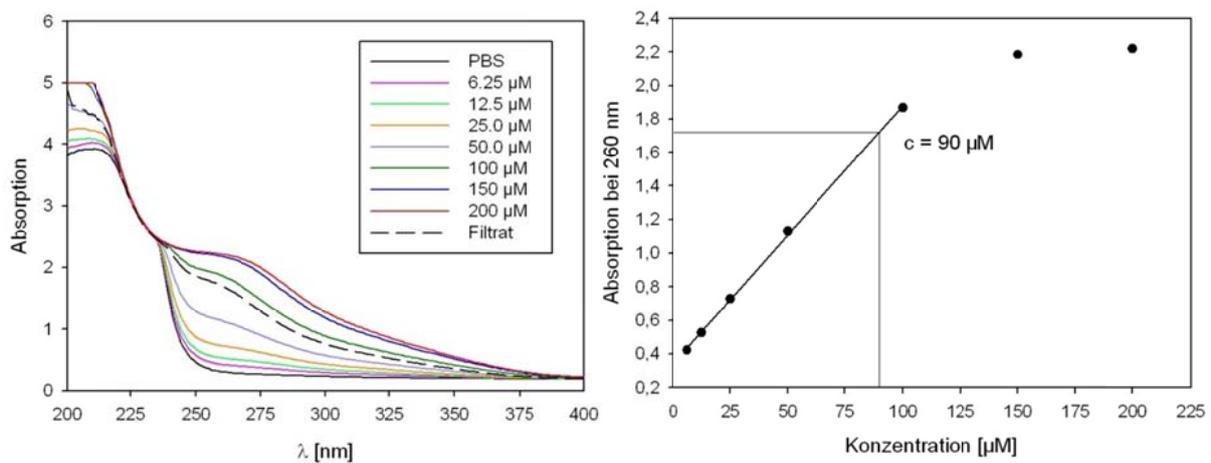


Abbildung 4.41: Links: Absorptionsspektren von Trimer-TEG-K-OMe **70** bei verschiedenen Konzentrationen; Rechts: konzentrationsabhängige Absorptionszunahme bei 260 nm. Konzentration von **70** im Filtrat beträgt 90 μM .

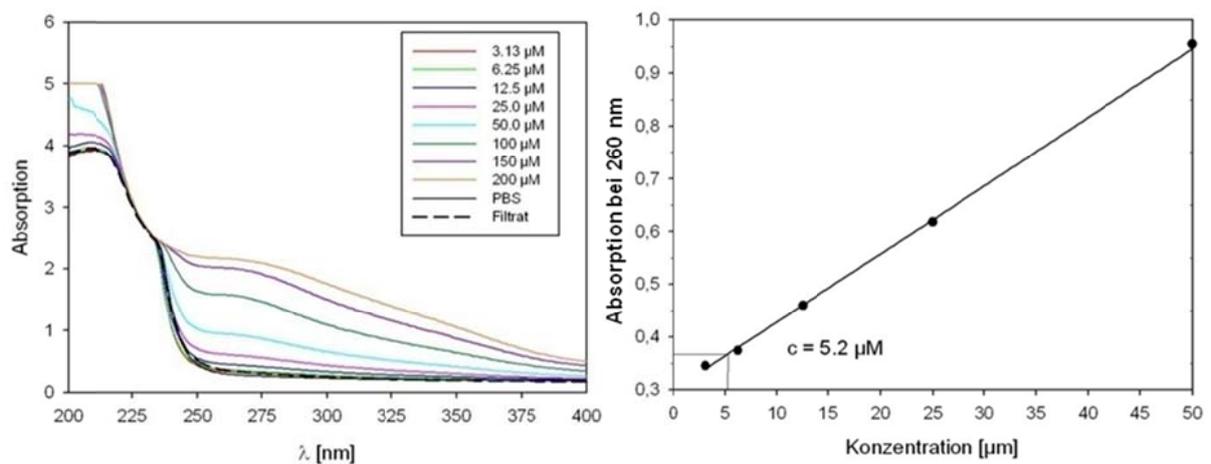


Abbildung 4.42: Links: Absorptionsspektren von Trimer-Lys-CHE **100** bei verschiedenen Konzentrationen; Rechts: konzentrationsabhängige Absorptionszunahme bei 260 nm. Konzentration von **100** im Filtrat beträgt 5.2 μM .

Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die erhaltenen Filtrate im ThT-Test auf ihre aggregationsinhibierende Wirkung untersucht. Für dieses Experiment mussten die Bedingungen der bereits beschriebenen Aggregation mit 33 μM A β (1-42) gewählt werden. Wenn Aggregate der Liganden für die Aggregationshemmung verantwortlich sind, sollte deren Entfernung aus der Lösung z. B. durch Filtration zur Abnahme der inhibierenden Wirkung führen. Die erhaltenen Aggregationsreduktionen mit den Filtraten sind den zuvor bestimmten Werten mit 198 μM Lösungen in der Tabelle 4.3 gegenübergestellt. Überraschend starke Inhibition wurde für Verbindungen **68** und **100** festgestellt, obwohl diese in sehr niedrigen Konzentrationen in Filtraten vorlagen. Besonders auffallend ist die starke Aggregationsinhibition auf 25 % von Trim-K-OMe **68** aus einer filtrierten Lösung, da dieser Ligand in früheren Untersuchungen die Agglomeration des Alzheimer-Peptids kaum unterdrücken konnte (86 %).^[168] Erwartungsgemäß sollten die Liganden **72** und **103** keine Änderung in ihrer Effektivität zeigen, da die Filtration in diesen Fällen die Ligandenkonzentration nicht beeinträchtigte. Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** wies nach dem Filtrieren überraschenderweise stärkere Inhibition auf, indem es die A β -Aggregation auf 16 % anstelle von zuvor ermittelten 52 % herabsetzte. Obwohl für Trim-TEG-K-OMe **70** und Trim-TEG-OH **41** eine signifikante Abnahme der Konzentrationen in den Filtraten von 198 μM auf 90 μM und 150 μM festgestellt wurde, änderte sich ihre Wirkung nur geringfügig. Da die Bildung der Assoziationskolloide für Trim-TEG-K-OMe **70** bei ca. 17 μM liegt, waren diese Überstrukturen auch im eingesetzten 90 μM Filtrat enthalten. Zudem wurden mittels DLS Partikel im Filtrat dieser Verbindung detektiert. Dies bedeutet, dass anhand dieses Experimentes nicht geklärt werden konnte, ob die monomere oder kolloidale Form von Trim-TEG-K-OMe **70** gegen die A β -Agglomeration aktiv ist.

Table 4.3: Inhibierung der Aggregation von 33 μM A β (1-42)-Peptid im ThT-Test durch Ligandenlösungen: gesamt (links) und filtriert (rechts).

Verbindung	gesamt		filtriert	
	c [μM]	Inhib. auf [%]	c [μM]	Inhib. auf [%]
Trim-TEG-K-OMe 70	198	24 \pm 8	90	35 \pm 5
Trim-TEG-KKKKKG-OH 72	198	52 \pm 13	198	16 \pm 3
Trim-K-CHE 100	198	30 \pm 9	5	37 \pm 16
Trim-LPFFD-OH 102	198	33 \pm 9	198	45 \pm 14
Trim-K-OMe 68	198	86 \pm 2	~5	25 \pm 3
Trim-TEG-OH 41	198	48 \pm 14	~150	59 \pm 13

4.3.7 Untersuchungen des Wirkmechanismus von Trimer-Derivaten

Da die in ThT-Test eingesetzten filtrierten Lösungen weiterhin teilweise Kolloide enthielten, konnte anhand dieses Experimentes nicht geklärt werden, ob die Assoziate oder die monomere Form der Liganden als Aggregationshemmer wirken. Die Gegebenheit von monomeren Liganden ist von grundlegender Bedeutung für die parallel zu Experimenten durchgeführten *in silico* Berechnungen der A β -Liganden-Komplexe, die auf monomerer Form der Rezeptormoleküle basieren. Falls die Wirkung der hergestellten Aggregationshemmer von den gebildeten Überstrukturen, z. B. Mizellen oder Kolloiden ausgeht, liegt hier ein unspezifischer Wirkmechanismus vor. Die Anwesenheit von z. B. mizellaren Strukturen muss jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, dass diese die aktiven Spezies darstellen. Es ist denkbar, dass die Assoziate selbst inaktiv sind und die durch A β -Komplexierung verbrauchte und wahrscheinlich im Gleichgewicht zu Überstrukturen stehende Monomere nachliefern.

Die ersten typischen Kriterien einer kolloidalen Aggregationshemmung wurden durch *Shoichet et al.* für das Prion-Protein aufgestellt. Eine Aggregationsinhibition, die durch kolloidale Formen vermittelt wird, zeichnet sich durch drei charakteristische Merkmale aus. Dazu gehören die Zeitabhängigkeit der Inhibition (**A**), Konzentrationsabhängigkeit von dem Zielprotein (**B**) und die Empfindlichkeit der Inhibition zu einer größeren Menge eines sekundären Proteins, wie bovines Serumalbumin (BSA, **C**).^[242]

Bezug nehmend auf diese Definition sollte im nächsten Schritt durch ThT-Test überprüft werden, ob die synthetisierten Trimer-Derivate die beschriebenen Kriterien erfüllen und somit als Kolloide wirken. Für dieses ThT-Experiment wurden einerseits das Mizellen- sowie Faserbildendes Trimer-Derivat **70** und andererseits der als Monomer eingestufte Ligand **102** gewählt. Trim-LPFFD-OH **102** sollte in diesem Fall also als Negativkontrolle bzw. als Vergleich mit dem möglicherweise als Kolloid wirkenden Liganden **70** dienen. Zur Untersuchung des Wirkmechanismus im ThT-Test mussten die in der Literatur oft beschriebenen Bedingungen einer Keim-induzierten Aggregation gewählt werden. Durch Zugabe von frisch präparierten A β_{42} -Keimen (engl. seeds) sollte die „lag-phase“ der A β -Agglomeration aufgehoben und die Aggregation somit beschleunigt werden.^[39] Die Kinetik der aufgenommenen Keim-induzierten A $\beta(1-42)$ -Aggregation ist der Aggregation von monomerem A $\beta(1-42)$ in der Abbildung 4.43 gegenübergestellt. Aus dieser Darstellung ist zu erkennen, dass die Aggregation vor allem in den ersten zwei Stunden durch Zugabe von A β_{42} -Keimen stark beschleunigt wurde.

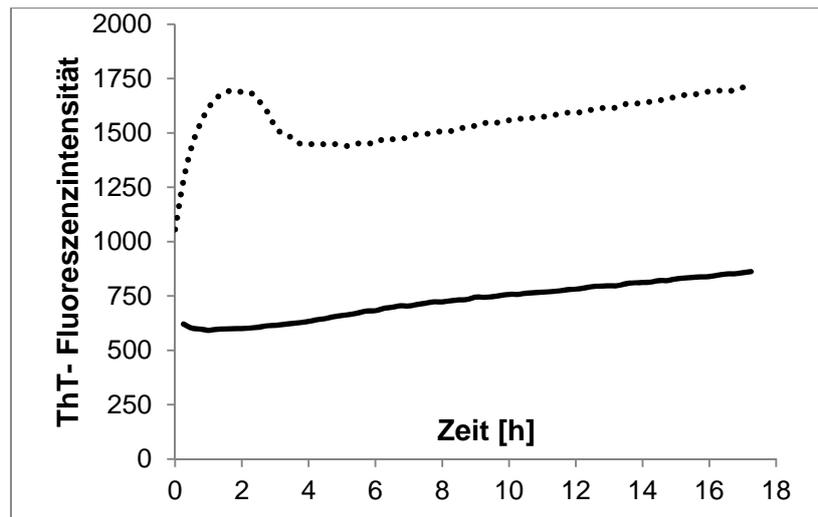


Abbildung 4.43: Aggregationskinetik von 33 μM monomerem $\text{A}\beta_{42}$ -Peptid alleine (durchgezogen) oder in Gegenwart von 10 % $\text{A}\beta_{42}$ -Keimen (gestrichelt).

Sollten die Liganden einen auf Kolloide basierenden Wirkmechanismus aufweisen, so muss die Preinkubation der $\text{A}\beta_{42}$ -Keime mit dem Liganden vor dem Aggregationsstart die aggregationshemmende Wirkung verstärken. Dieses Experiment stellt das Kriterium **A**, die Zeitabhängigkeit, dar und ist in der Abbildung 4.44 (links) dargestellt. Die Wirkung der Liganden **70** und **102** verschlechterte sich durch Preinkubation von 24 % auf 36% und von 14 % auf 24 %. Auch die Überprüfung auf Konzentrationsabhängigkeit (**B**) fiel negativ aus (Abbildung 4.44, rechts). In diesem Experiment sollte sich die Aggregationsinhibition bei einer höheren Konzentration an $\text{A}\beta_{42}$ -Keimen im Falle eines kolloidalen Mechanismus verschlechtern. Eine leichte, jedoch nicht signifikante Abnahme der Inhibition wurde bei Trim-LPFFD-OH **102** festgestellt. Diese Verbindung wurde aber anhand der zuvor beschriebenen Experimente als monomer eingestuft. Bei Trim-TEG-K-OMe **70** wurde kein Unterschied in der Wirkung in Gegenwart von 5 % zu 10 % Aggregationskeime und somit keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt. Die Durchführung des ThT-Aggregationstests in Gegenwart von 5 mg/mL war nicht auf das $\text{A}\beta(1-42)$ von dem Prion-Protein übertragbar, da das BSA selbst die $\text{A}\beta$ -Aggregation vollständig hemmte. Die Zugabe dieses sekundären Proteins sollte die Kolloide nicht auflösen, sondern diese möglicherweise durch Adsorption an deren Oberfläche absättigen, so dass diese keine Interaktion mit dem Zielprotein, in diesem Fall $\text{A}\beta(1-42)$, eingehen können.^[253]

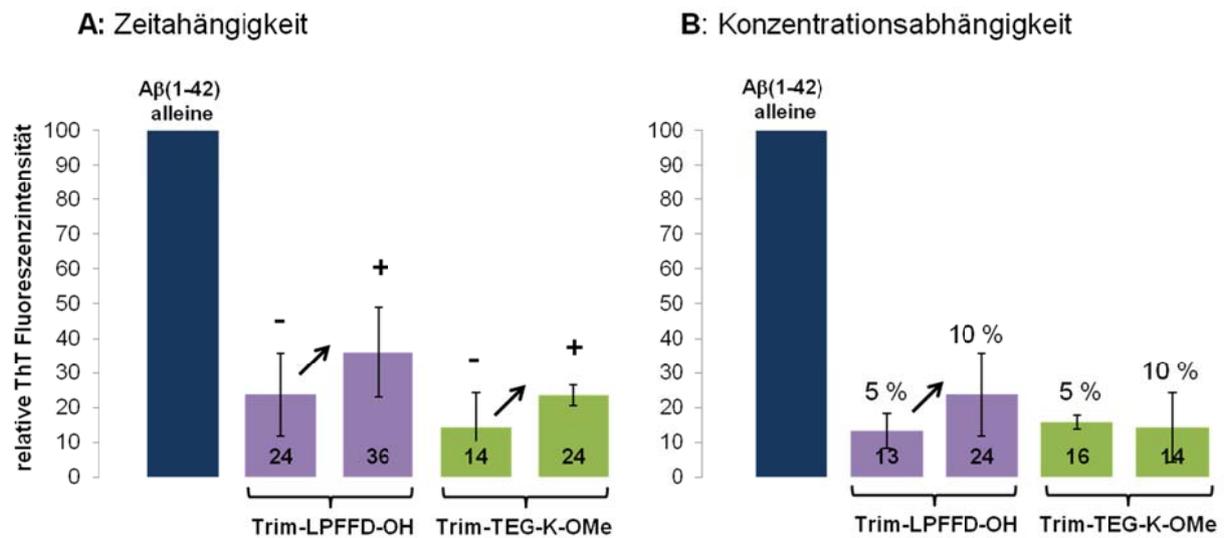


Abbildung 4.44: Inhibition der Keim-induzierten Aggregation von 33 µM Aβ(1-42). Zeitabhängigkeit **A:** Inhibition durch Trim-LPFFD-OH **102** und Trim-TEG-K-OMe **70** in Gegenwart von 10 % Aggregationskeime mit (+) und ohne 5 Minuten Preinkubation (-). Konzentrationsabhängigkeit **B:** Inhibition durch Trim-LPFFD-OH **102** und Trim-TEG-K-OMe **70** in Gegenwart von 5 % und 10 % Aggregationskeime.

4.3.8 Zusammenfassung Experimente zu Kolloiden

Zur Untersuchung der hergestellten Trimer-Derivate auf mögliche Kolloidbildung wurde eine Reihe von Experimenten (UV- und DLS-Messungen, DOSY-NMR, AFM-Aufnahmen und cmc-Bestimmung) durchgeführt. Trim-TEG-K-OMe **70**, das einzige Trimer-Derivat, das schon zuvor in TEM-Aufnahmen als potentieller Assoziat-Bildner eingestuft wurde, musste mit weiteren Techniken genauer untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass dieses und das weitere Amphiphil Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** Mizellenkolloide bilden. Die Trim-TEG-Derivate **41** und **98**, die nur in DLS jedoch teilweise mit nicht reproduzierbaren Ergebnissen Hinweise auf Selbstassoziation lieferten, wurden dagegen nicht genauer untersucht. Die filtrierten Ligandenlösungen wiesen im Vergleich zu nicht filtrierten Lösungen trotz zum Teil starker Konzentrationsabnahme keinen signifikanten Rückgang der aggregationshemmenden Wirkung im ThT-Test auf, was bei Kolloiden als aktive Spezies zu erwarten wäre. Aufbauend auf diesen Resultaten erschien es somit sinnvoll den Wirkungsmechanismus der Trimer-Derivate genauer zu untersuchen. Dabei galt es die Verbindungen auf Gegebenheit von charakteristischen Merkmalen einer kolloidalen Aggregationshemmung zu überprüfen. Doch weder Zeit- noch Konzentrationsabhängigkeit

der A β -Aggregationsinhibierung konnten in Anwesenheit des Mizellen- und Faser-bildenden Trimer-Derivates **70** nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass selbst Trim-TEG-K-OMe **70** bei dem eine ausgeprägte Tendenz zur Selbstassoziation vorliegt, als Monomer wirken muss. Die vorhandenen Assoziate sind also inaktiv und beeinflussen die Inhibition nicht. Eine weitere Bestärkung des nicht kolloidalen Wirkmechanismus lieferten die Disaggregationsversuche im ThT-Test. Nach bisherigem Forschungsstand interagieren die kolloidalen Partikel mit Peptiden und Proteinen, indem sie diese an der Oberfläche adsorbieren und somit aus der Lösung ausschließen. Fibrillenbildende Proteine und Peptide können wahrscheinlich nur im monomeren oder oligomeren Zustand an der Oberfläche von Kolloiden adsorbiert werden. Der Ausschluss der reifen Fibrillen aus der Lösung und somit deren Zerstörung bzw. Nichtnachweisbarkeit im ThT-Test ist auf diese Weise nicht denkbar. Deshalb dient der Befund über die annähernd gleiche Effektivität von Trim-TEG-K-OMe **70** im ThT-Test sowohl im Inhibierungs- als auch im Disaggregationsversuch als weiteres Argument für den nichtkolloidalen Wirkmechanismus. Außerdem wirkten die Liganden **70** und **72** bei 10 μ M Konzentration, also unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration, im monomeren Zustand in CD-spektroskopischen Untersuchungen und „dose-response“-ThT-Test aggregationshemmend. Auf diese Erkenntnisse aufbauend kann davon ausgegangen werden, dass Trim-TEG-OH **41**, Trim-TEG-OEt **98** und Trim-TEG-KKKKKG-OH **72**, die in Einzelexperimenten Tendenz zur Selbstassoziation zeigten, ebenfalls sehr wahrscheinlich einem nicht kolloidalen Wirkmechanismus unterliegen. Um diese Annahme zu untermauern, müssten diese Liganden analog zu **70** und **102** mit weiteren Techniken untersucht werden.

Auch für die Hybridverbindungen wurden die ersten Hinweise auf ihre Selbstassoziation gesammelt. So zeichneten sich einige Hybridverbindungen durch eine schlechte Wasserlöslichkeit aus und mussten zur Herstellung der Stammlösungen leicht erhitzt werden. Zudem wiesen die ¹H-NMR-Spektren dieser Verbindungen sehr breite Signale auf, welche sich erst bei ca. 90 °C verschärften (siehe Kapitel 6.10). Des Weiteren waren in TEM-Aufnahmen Assoziate der Verbindungen **51**, **52** und **55** zu beobachten. Außerdem neigten die Hybridsubstanzen zur Selbstassoziation in SPR-spektroskopischen Experimenten. Weitere Untersuchungen der Hybridverbindungen bezüglich deren Selbstassoziation wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Hybridverbindungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Reihe neuer β -Faltblattliganden auf Basis des trimeren Aminopyrazolliganden **16** synthetisiert werden. Eines der primären Ziele war es, die β -Faltblatt-brechende Aktivität des Trimers **16** mit der spezifischen A β -Erkennung der D-Peptide **6** und **7** aus der Phagen-Display-Bibliothek in bifunktionellen Hybridverbindungen zu vereinen. Mittels manueller und automatisierter Fmoc-Festphasen-Peptid-Synthese konnten insgesamt sieben Hybride **51-57** mit variabler Spacerlänge (Null-Spacer, GABA, TEG und TEG-TEG, Abbildung 5.1) in hoher Reinheit hergestellt werden.

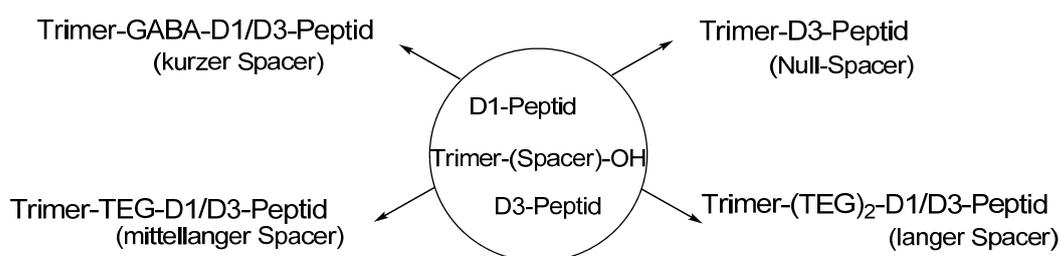


Abbildung 5.1: Übersicht der hergestellten Trimer-D1/D3-Hybridverbindungen.

Die synthetisierten Hybridverbindungen wurden im ThT-Fluoreszenztest, TEM sowie Anti-Oligomerisierungsassay (AK Korth) untersucht. Dabei wurden die Liganden, die das an A β -Oligomere bindende D3-Peptid **8** enthalten, als effiziente Inhibitoren der A β -Aggregation und -Oligomerisierung identifiziert. Die Bifunktionalität dieser Hybride ist in Abbildung 5.2 veranschaulicht. In Gegenwart von Trimer-D3-Hybriden konnten im Vergleich zu Trimer-D1-Verbindungen eine geringere Anzahl der anfärbaren Fibrillen im ThT-Test, keine fibrillenartigen Strukturen in TEM-Aufnahmen und bei vergleichbaren Konzentrationen eine effektivere Unterdrückung der A β -Oligomerbildung beobachtet werden.

Im Anti-Oligomerisierungsassay stellte sich zudem heraus, dass Trimer-D3-Hybride sich durch neue Eigenschaften auszeichnen, die weder die Einzelkomponenten noch deren Gemisch aufweisen. Dies bedeutet, dass die resultierende Wirksamkeit der Trimer-D3-Hybride nicht auf der Summe der einzelnen Substanzen beruht, sondern auf eine synergistische Wirkung des Trimers **16** und D3-Peptids **8** zurückzuführen ist. So wurde in

Anwesenheit von Trim-TEG-D3 **55**, im Vergleich zum 1:1-Gemisch der Einzelkomponenten bei analogen Konzentrationen, eine wesentlich geringere Menge an A β -Oligomeren detektiert.

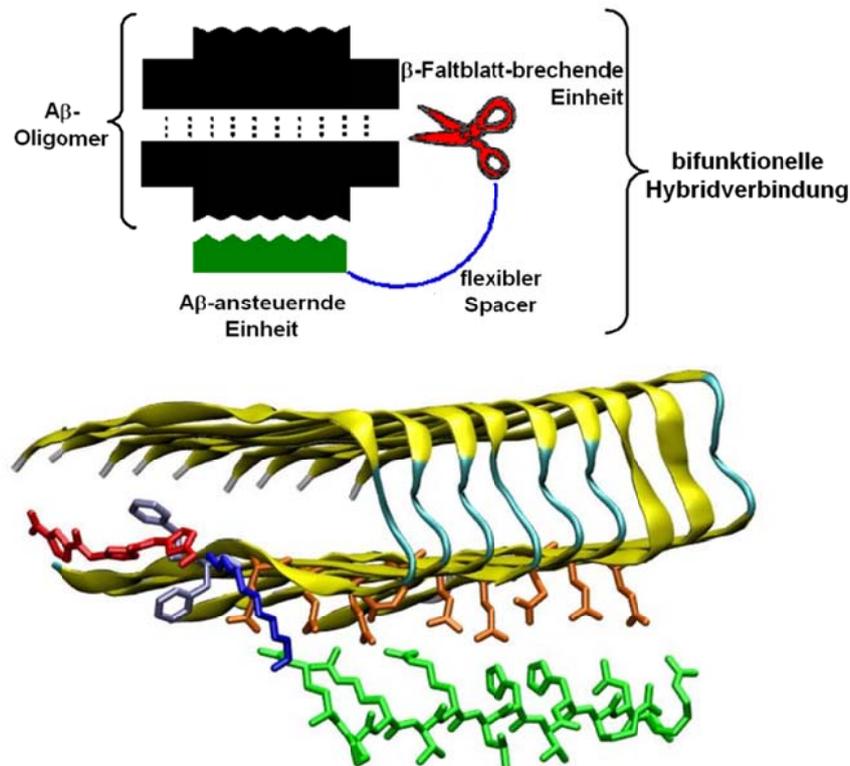


Abbildung 5.2: Oben: Schematische Darstellung der Bifunktionalität der Trimer-D3-Hybride. Unten: Modell eines Komplexes bestehend aus A β -Nonamer und Trim-TEG-D3 **55**. A β -Bändermodell: gelb, Glutamat 22-Reste: orange, Phenylalanin-Reste: violett, Trimer: rot, Spacer: blau, D3: grün.

Zur Berechnung der passenden Spacerlänge, die für eine optimale kooperative Wirkung der A β -ansteuernden und β -Faltblatt-brechenden Domänen von entscheidender Bedeutung ist, wurden MD-Simulationen von Trim-TEG-D3 **55** mit A β -Peptid im *AK Sticht* durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass für ideale räumliche Entfernung der Einzelkomponenten im angenommenen Bindungsmodus (Abbildung 5.2, unten) der GABA-Spacer die geeignete Länge aufweisen sollte. Deshalb werden derzeit weitere Moleküldynamik-Rechnungen mit den Verbindungen Trim-GABA-D3 **54** und Trim-D3 **57** durchgeführt.

Weiterhin wurde sowohl im ThT-Fluoreszenztest als auch im Anti-Oligomerisierungsassay eine ausgeprägte Dosis- und Spacerlängen-Abhängigkeit bei den Trimer-D3-Hybridliganden festgestellt. Hierbei setzten sich die Verbindungen mit dem kurzen GABA-Spacer **54** und dem Null-Spacer **57** als ungefähr gleich starke und potenteste Inhibitoren durch. Diese

Resultate bestätigten also teilweise die aus den MD-Berechnungen gewonnenen Annahmen. So konnten Trimer-GABA-D3 **54** und Trim-D3 **57** im ThT-Test die A β -Aggregation auf jeweils 7 % und 6 % erheblich unterdrücken und ähneln in ihrer Stärke dem aus der Literatur bekannten polyphenolischen Aggregationsinhibitor EGCG (**13**). Für Liganden **54** und **57** wurden in beiden durchgeführten Experimenten ähnliche IC₅₀-Werte von ca. 1 μ M ermittelt.

Basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (*AK Willbold*) und TEM wurde eine erhöhte Aggregation des Alzheimer-Peptids mit gleichzeitiger Umwandlung von Oligomeren und Protofibrillen in größere unstrukturierte Komplexe mit Trimer-D3-Hybriden als wahrscheinlicher Wirkmechanismus dieser Liganden postuliert.

Des Weiteren wurde exemplarisch an Trim-TEG-D3 **55** gezeigt, dass die Trim-D3-Hybride die A β -Oligomer-induzierte Reduktion der Synapsenaktivität vorbeugen sowie die Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität aufheben können. Die ersten Ergebnisse des MTT-Zytotoxizitätstests veranschaulichten zudem, dass Trimer-D1- sowie Trim-D3-Hybride selbst nicht zelltoxisch sind und Zellen vor einem schädlichen Einfluss des A β (1-42)-Peptids schützen können.

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem *AK Korth* wurden die ersten Versuche zur Herstellung von Hybridverbindungen bestehend aus Trimer **16** und einem scFv-Fragment des anti-Prion-aktiven W226-Antikörpers unternommen. Zu diesem Zweck konnte in einer achtstufigen Synthese Trim-TEG-NTA **66** hergestellt werden. Bei der Komplexierung über ein Ni²⁺-Ion stellte sich jedoch heraus, dass der Chelator **66** nur eine sehr schwache Bindung zum scFv-W226 eingehen kann. Aus diesem Grund wird im *AK Korth* derzeit versucht das W226-Antikörperfragment mit einem His-Tag aus zehn Histidinen zu gewinnen.

Trimer-Derivate

Neben der Herstellung der Hybridverbindungen **51-57** umfasste der synthetische Teil dieser Arbeit die Modifizierung der Leitstruktur **16**. Es konnten unter anderem mittels Festphasen-Synthese Trimer-Derivate mit kleinen Substituenten (**41**, **45** und **70**), semipeptidische Liganden (**72**, **74**, **77** und **79**) sowie dimere Trimer-Rezeptoren (**81** und **84**) erhalten werden. Während der MD-Simulationen mit dem A β -Pentamer (*AK Sticht*) wurde festgestellt, dass der Triethylglykolrest sich in die β -Turn-Region einlagern und diese dadurch destabilisieren kann, der Dodecylrest von **45** eine Affinität zum hydrophoben A β -Abschnitt im Bereich von

Ile32 bis Met35 aufweist und die positiv geladenen Reste von **70** und **72** nur schwache Interaktionen mit der negativ geladenen Glutamatleiter eingehen können. Gemäß den Ergebnissen aus Experimenten (ThT-Test, CD-Spektroskopie und TEM) wurden Trim-TEG-K-OMe **70**, Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** und Trim-TEG-LPFFD-OH **79** als effizienteste Inhibitoren der A β -Aggregation identifiziert. Die effektivste Wirkung im ThT-Test mit einer ausgeprägten Dosis-Wirkungsbeziehung und einer substöchiometrischen Aggregationshemmung konnte Trim-TEG-K-OMe **70** vorweisen. Der Ligand Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** erwies sich sowohl im ThT-Test (nach der Filtration der Lösung) als auch in der CD-Spektroskopie als ein sehr starker Aggregationshemmer. Der Ligand **72** konnte des Weiteren zusammen mit Trim-TEG-LPFFD-OH **79** in TEM-Untersuchungen die A β -Agglomeration effizient unterdrücken. Alle Trimer-Derivate waren in der Lage die Toxizität des A β (1-42) auf die Zellkulturen im MTT-Test zu reduzieren, wobei die Verbindungen selbst nicht toxisch wirkten. Auch in diesem Experiment stellte sich Trim-TEG-LPFFD-OH **79** mit dem IC₅₀-Wert von 10 μ M als der potenteste Wirkstoff heraus.

Unter Berücksichtigung der in den Vorarbeiten gewonnenen Erkenntnisse über Trimer-Derivate wurden vorwiegend über einen Spacer modifizierte hydrophobe und hydrophile Trimere als wirksame Liganden identifiziert. Lipophile Haftgruppen konnten in MD-Berechnungen hydrophobe Wechselwirkungen mit unpolaren Regionen des A β -Peptids eingehen und A β -Aggregation im ThT-Test effektiv inhibieren. Die Wirksamkeit der polaren Trimer-Derivate erhöhte sich mit steigender Anzahl von Ladungen sowohl im Bezug auf A β -Aggregation (CD-Spektroskopie, ThT-Test) als auch hinsichtlich der Stabilität der A β -Ligand-Komplexe während der Moleküldynamik-Rechnungen.

Derzeit stehen einige organische Verbindungen, unter anderem Inhibitoren der Fibrillenbildung, unter Verdacht nur als Kolloide und deshalb unspezifisch zu wirken. In diesem Zusammenhang wurde der Wirkmechanismus der Trimer-Derivate untersucht. Durch eine Reihe von Experimenten wie UV- und DLS-Messungen, TEM, AFM, DOSY-NMR und cmc-Bestimmung kristallisierte sich vor allem Trim-TEG-K-OMe **70** als ein Mizellen- und Faser-bildendes Trimer-Derivat heraus. Allerdings konnte in weiteren Experimenten nachgewiesen werden, dass die Wirkung von Verbindung **70** trotz vorhandener Kolloide von der monomeren Form ausgeht und deshalb selektiv sein muss. Für Trim-TEG-OH **41**, Trim-TEG-OEt **98** und Trim-TEG-KKKKKG-OH **74** konnte die Neigung zur Selbstassoziation nur in Einzelexperimenten nachgewiesen werden. Diese Verbindungen sowie andere amphiphile Liganden müssen noch genauer untersucht werden.

5.2 Ausblick

Weitere Untersuchungen und Modifizierungen der Hybridverbindungen

In der vorliegenden Arbeit konnten bifunktionelle Hybridverbindungen auf Basis des Trimers **16** und der D-Peptide **7** und **8** hergestellt und durch Variation der Spacerlänge optimiert werden. Während Trim-TEG-D3 **55** in einer Vielzahl von Experimenten wie Dichtegradienten-Ultrazentrifugation, Beeinflussung der synaptischen Aktivität und Plastizität sowie MTT-Zytotoxizitätstests eingesetzt wurde, fehlen bislang solche Untersuchungen sowohl für die effektivsten Inhibitoren **54** und **57** der Trimer-D3-Serie als auch für das Gemisch aus Einzelverbindungen. Diese Methoden könnten wahrscheinlich die bereits im Anti-Oligomerisierungsassay und ThT-Test erkannte synergistische Wirkung des β -Faltblattbrechers **16** und der A β -spezifischen Einheit **8** sowie die Spacerlängenabhängigkeit der Hybride weiter bekräftigen.

Mit einer Fluoreszenzsonde markiertes Trimer-D3-Hybrid könnte z. B. in der analytischen Ultrazentrifugation eingesetzt werden. Dort wäre ein direkter Nachweis der Komplexbildung des Alzheimer-Peptids möglich. Das Einführen einer Fluoreszenzsonde kann durchgeführt werden, indem man das Amino-Spacer-Trimer-D3 mit dem aminoreaktiven FITC umsetzt (Abbildung 5.3). Als Spacer würde sich eine kurze Alkylkette eignen.

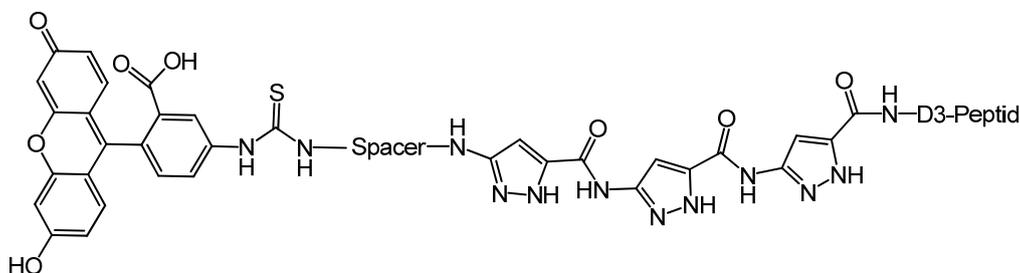


Abbildung 5.3: FITC-Spacer-Trimer-D3.

Ferner könnten die Trim-D1-Verbindungen analog zu Trimer-D3-Hybriden genauer darauf untersucht werden, ob auch innerhalb dieser Serie eine Spacerlängenabhängigkeit besteht. Die Entdeckung einer potentiellen Bindungsstelle für das D1-Peptid **7** in der Protofibrille würde auch für die Trimer-D1-Hybride die Komplexberechnung mittels Moleküldynamik ermöglichen.

Die nächste zwangsläufige Instanz für Verbindungen auf dem Weg zum Wirkstoff sind die Tierexperimente. Es ist zu erwarten, dass der in Kürze geplante Start der *in vivo* Versuche im APP-transgenen Mausmodell mit Trim-D3 **57** wertvolle Erkenntnisse über die Wirksamkeit der entwickelten Hybridverbindungen im lebenden Organismus liefern wird.

Von essentieller Bedeutung sind die Untersuchungen der synthetisierten Hybridverbindungen **51-57** auf die Selbstaggregation und Kolloidbildung. Die schlechte Löslichkeit und teilweise in TEM-Aufnahmen registrierte Aggregate deuten auf die Selbstassoziation hin. Insbesondere zeichnen sich die Trimer-D3-Hybride **54-57** durch schlechte Wasserlöslichkeit aus. Die Trimer-D3-Verbindungen enthalten mehrere Arginine und ähneln somit dem Trimer-Derivat Trim-TEG-RRRRR-OH **74**. Da beide Verbindungen schlecht löslich sind, könnte hier die Anwesenheit von Argininen eine besondere Rolle spielen und die Selbstassoziation auf eine noch ungeklärte Weise fördern. Der außergewöhnlich starke Beitrag der Arginine zur Selbstassoziation könnte z. B. anhand einer Kristallstruktur aufgeklärt werden. Die Analyse auf Kolloidbildung könnte andererseits analog zu der vorgenommenen Studie der Trimer-Derivate mit Experimenten wie UV- und DLS-Messungen, AFM, DOSY-NMR und cmc-Bestimmung durchgeführt werden. Des Weiteren sind Untersuchungen des Wirkmechanismus nach *Shoichet et al.* notwendig.^[242]

Der in dieser Arbeit entworfene Trimer-Spacer-Chelator **66** zur Herstellung von Hybridverbindungen mit scFv-Fragmenten des A β -spezifischen IC16- und anti-Prion-aktiven W226-Antikörpers konnte keine ausreichend starke Bindung über einen Ni²⁺-Komplex eingehen. Um die Affinität von Trim-TEG-NTA **66** zum Histidin-Tag zu erhöhen und somit einen stabileren Komplex zwischen Trimer und einem Antikörperfragment zu erhalten, könnte anstelle von NTA- ein Tris-NTA-Rest eingeführt werden (Abbildung 5.4). Dies ermöglicht eine gleichzeitige Komplexierung von bis zu zehn Histidinen.^[254]

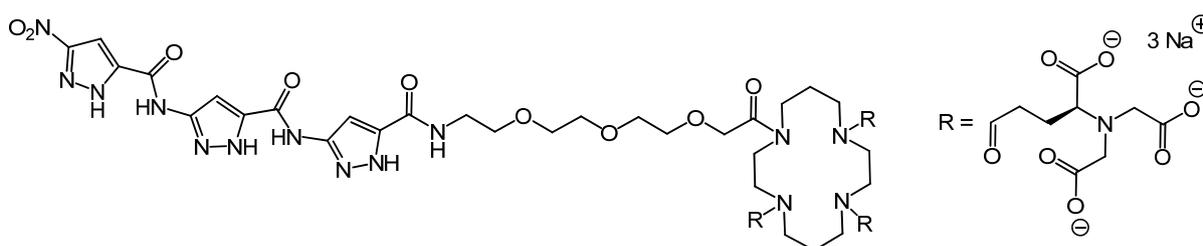


Abbildung 5.4: Struktur von Trimer-TEG-Tris-NTA.

Neue Modifizierungen des Trimers **16** sowie weitere Untersuchungen seiner Derivate

Neben weiteren Untersuchungen von amphiphilen Trimer-Derivaten Trim-TEG-KKKKKG-OH **72**, Trim-TEG-OH **41** und Trim-TEG-OEt **98** in Experimenten wie AFM, DOSY-NMR, cmc-Bestimmung sollten die genauen Löslichkeitsgrenzen für alle Trimer-Derivate ermittelt werden. Dies kann durch Messung der UV-Absorption in den Filtraten bzw.

Zentrifugationsüberständen geschehen. Um die Anwesenheit der ungelösten Partikel und somit die Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, dürfen die ermittelten Konzentrationsgrenzen in keinem Experiment überschritten werden.

Unter Verwendung der NMR-Spektroskopie bei physiologischem pH-Wert im Natriumphosphatpuffer könnten zudem die Wechselwirkungen zwischen dem A β (1-40)-Peptid und einem wasserlöslichen nicht aggregierenden Trimer-Derivat vermessen werden. Die vermutlich durch Komplexierung induzierte Verschiebung der aromatischen und Aminopyrazol-Signale könnte zusammen mit dem festgestellten induzierten CD-Effekt als Beweis für den postulierten Bindungsort im A β -Peptid dienen.

Durch Einführung verschiedener Substituenten wurde eine Reihe neuer Trimer-Derivate erhalten. Da die vorgenommenen Modifizierungen C-terminal erfolgen, wurden durch die Einführung von polaren Gruppen amphiphile Verbindungen erhalten. Wie die späteren Untersuchungen zeigen konnten, neigen Verbindungen dieser Art aufgrund ihrer Struktur zur Bildung von Assoziationskolloiden. Die Anwesenheit von hydrophilen Resten ist jedoch für die Erhöhung der Wasserlöslichkeit der Leitstruktur **16** unerlässlich. Um wasserlösliche jedoch nicht zur Selbstassoziation neigende Liganden zu erhalten, sollten die Modifizierungen zukünftig auf beiden Seiten des Grundgerüsts erfolgen. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit könnten Substituenten mit mehreren Hydroxygruppen eingeführt werden. Die Analyse der derzeit bekannten A β -Aggregationshemmer von *Török et al.* ergab, dass die Hydroxygruppe eine der verbreitetsten funktionellen Gruppen darstellt.^[167] Des Weiteren könnten Zuckerderivate und Sulfonatgruppen eingeführt werden. In der Abbildung 5.5 sind einige Modifizierungsvorschläge zusammengefasst.

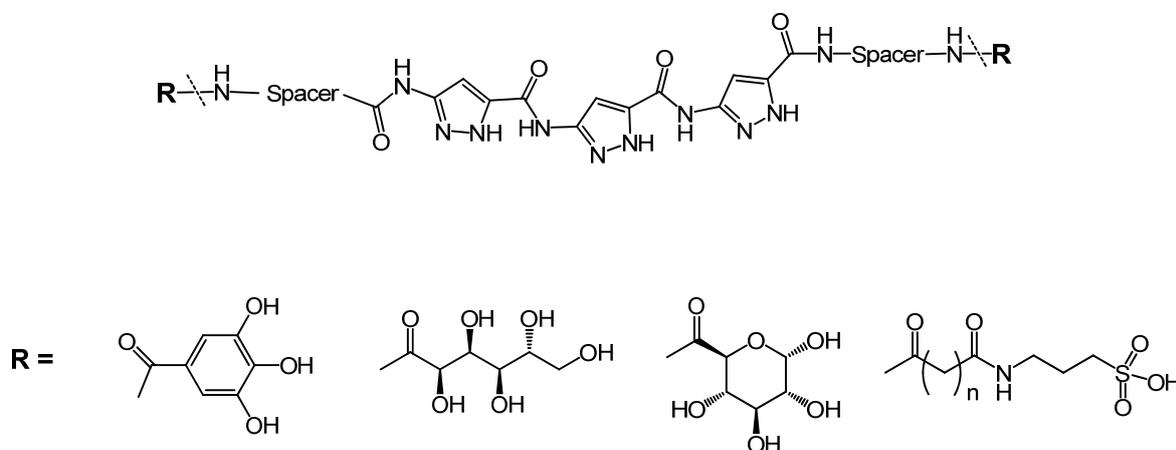


Abbildung 5.5: Vorschläge für Modifizierungen der Leitstruktur **16**.

Auch der Versuch, die Rezeptoren Trimer **16** und Pinzette **88** zu einer Verbindung zu vereinen, sollte fortgesetzt werden. Das Ersetzen der kritischen Esterbindung durch eine Etherbindung sollte dem Molekül eine ausreichende Stabilität für den PMB-Entschützungsprozess verleihen. Als Spacer könnte in diesem Fall wieder ein Triethylenglykolderivat eingesetzt werden.

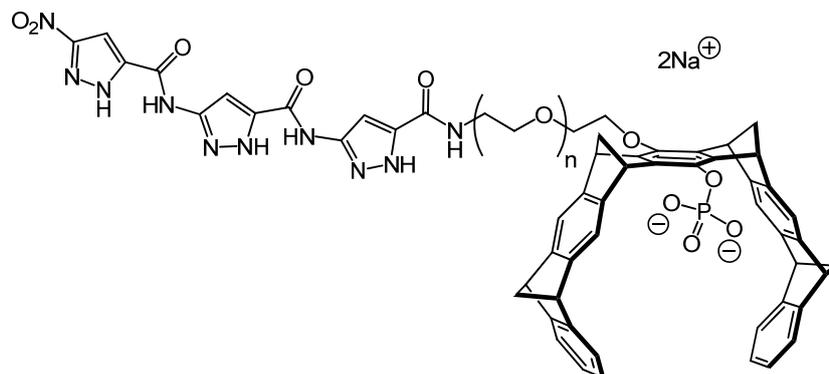


Abbildung 5.6: Struktur Trimer-Spacer-Phosphatpinzette ohne Esterbindung.

Alle bisher am Trimer **16** durchgeführten Modifizierungen mussten den drastischen Reaktionsbedingungen der PMB-Entschützung standhalten. Dagegen waren die Modifizierungen am entschützten Trimer **16** nur in seltenen Fällen möglich, da die Aminogruppen der Pyrazole unerwünschte Reaktionen eingehen können. So ist es wahrscheinlich, dass der Ersatz der PMB- durch die THP-Schutzgruppe, welche unter viel mildereren Bedingungen abgespalten werden kann, den Zugang für weitere Modifizierungen ermöglicht. Ausgehend von einem veresterten Z- und THP-geschützten monomeren Baustein könnte das THP-geschützte Trimer analog zum PMB-geschützten Trimer in einer fünfstufigen Synthese (Abbildung 3.1) hergestellt werden.

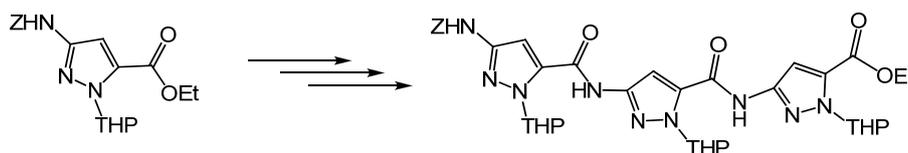


Abbildung 5.7: Schematische Darstellung der Synthese eines THP-geschützten Trimers.

6 Experimenteller Teil

6.1 Material und Methoden

Lösungsmittel

Je nach Bedarf wurden die verwendeten Lösungsmittel vor Gebrauch destilliert bzw. nach den in der Literatur beschriebenen Methoden getrocknet.^[255] Das verwendete entionisierte Wasser wurde im Bedarfsfall nochmals über eine Purelab UHQ Anlage (ELGA Berkefeld GmbH, Celle) entionisiert.

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *Across*, *Aldrich*, *Lancaster* und *Merck* bezogen. Aminosäuren, Kupplungsreagenzien und Harze für Festphasensynthese wurden von Firma *Novabiochem* bezogen. A β (1-42) wurde von Firma *Bachem* bezogen.

Chromatographie

Die Durchführung der analytischen Dünnschichtchromatographie (DC) zur Verfolgung des Reaktionsverlaufs erfolgte mit DC-Platten Polygram® SIL G/UV₂₅₄ bzw. Alugram® SIL G/UV₂₅₄ der Firma Macherey-Nagel.

Die präparative Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel 60 (Korngröße 0.063-0.200 mm) als stationäres Füllmaterial einer Fallsäule durchgeführt.

Sprühreagenzien

Ninhydrin-Lösung: 0.75 mg Ninhydrin wurden in 237.5 mL Isopropanol gelöst. Dazu wurden 12.5 mL Essigsäure (96 %) gegeben.

CAM-Lösung: 2 g Cersulfat, 50 g Ammoniummolybdat(VI)-Hexahydrat, 50 mL konz. Schwefelsäure und 400 ml Wasser.

HPLC-Chromatographie

HPLC-Chromatographie wurde an einer Jasco-Anlage (PU-980 Pumpe, UV-975 Detektor, DG-2080-53 Lösungsmittelentgaser, LG-980-02S 3-Kanal-Lösungsmittel-Mischer, Säule: Macherey-Nagel EC250/4 Nucleosil 100-3 C18) durchgeführt.

Schmelzpunkte

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit dem Gerät Büchi Melting Point B-540. Diese wurden unkorrigiert angegeben.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Thioflavin T Fluoreszenzmessungen wurden an einem Spektrometer InfiniTe 200 (Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland) durchgeführt.

Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte an dem Jasco FP-6500-Spektrofluorometer. Alle Lösungen wurden in einer Quarz-Rundküvette der Schichtdicke 1 cm vermessen.

UV/Vis-Spektren

Die UV/Vis-Spektren wurden mit dem Jasco V-550-Spektrometer aufgenommen. Die entsprechenden Lösungen wurden in einer Quarzküvette der Schichtdicke 1 cm vermessen.

CD-Spektren

Die CD-Spektren wurden am Jasco J-815 CD-Spektrometer im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Haberhauer an der Universität Duisburg-Essen (Standort Essen) durch Frau Schneider und Frau Kallweit durchgeführt. Die jeweiligen Lösungen wurden in einer Quarz-Küvette der Schichtdicke 1 cm vermessen. Verwendete Geräteeinstellungen: Start: 400 nm, Ende: 190 nm, data pitch 1 nm, Response: 1 s, Sensitivity: Standard, Scanning speed: 100 nm/min, Accumulation: 1, Temperatur: 22 °C.

DLS-Messungen

Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS) zur Bestimmung der Partikelgröße wurden an einem Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 bei 25 °C und einer Laserwellenlänge von 633 nm durchgeführt.

Massenspektren

Alle Massenspektren wurden von Herrn Dipl.-Ing. Karow und Herrn Dipl.-Ing. van Hoof an dem Bruker BioTOF II-Massenspektrometer mit Elektronensprayionisation aufgenommen.

NMR-Spektren

Die NMR-Messungen wurden sowohl am Bruker DMX 300 als auch am Bruker DRX 500 durchgeführt. Alle NMR-Experimente, die zur Aufklärung neuer Verbindungen dienen, d. h., eindimensionale (^1H ; ^{13}C ; DEPT 90; DEPT 135; ^{31}P) sowie zweidimensionale (^1H , ^1H -COSY; ^1H , ^{13}C -COSY; HMBC; HMQC) Messungen, wurden ausschließlich am Bruker DRX 500 von Herrn Dipl.-Ing. Bandmann und Herrn Dr. Schaller durchgeführt. Für die Kennzeichnung der Signal-Multiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: Singulett: s; Dublett: d; Triplett: t; Quartett: q; Multiplett: m; Dublett von Dublett: dd; breites Singulett: bs.

Lösungen für SPSS

Kaiser-Test:	5 % Ninhydrin in Ethanol (w/v) 80 % Phenol in Ethanol 2 mL der 1 mM wässrigen KCN-Lösung in 98 mL Pyridin ^[256]
NF31-Test:	2 mM Lösung in Acetonitril
Bromphenol-Test:	0.05 % Bromphenolblau in <i>N,N</i> -Dimethylacetamid (DMA)

Verwendete Puffer

PBS-Puffer (phosphate buffered saline) pH 7.3

137 mM NaCl

2.70 KCl

1.40 mM KH_2PO_4

4.30 mM Na_2HPO_4

Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.2) / Natriumphosphat-Puffer (pH 7.4)^[257]

100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$

100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$

Hydrogen- und Dihydrogen-Lösungen wurden gegeneinander auf den gewünschten pH-Wert titriert.

Carbonat-Puffer (pH 9.8)

1.6 g Na_2CO_3 und 2.9 g NaHCO_3 wurden in 500 mL Wasser gelöst.

Ammoniumchlorid-Puffer (pH 8.25)

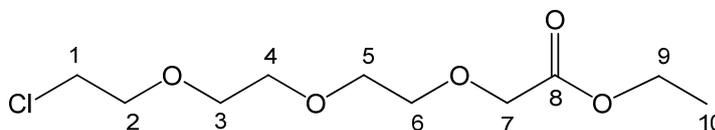
9.5 mL einer 2 M Ammoniumchloridlösung wurden mit 0.5 mL der 2 M NH_4OH -Lösung versetzt.^[258]

Kraftfeldrechnungen

Kraftfeldrechnungen wurden mit dem Programm MacroModel 8.0 der Firma Schroedinger durchgeführt. Dabei wurden die Komplexstrukturen mit dem Kraftfeld OPLS-2005 im Wasser minimiert.

6.2 Synthese der Linker 28, 29 und 30

Darstellung von Ethyl-(2-(2-(2-chlorethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-acetat 35

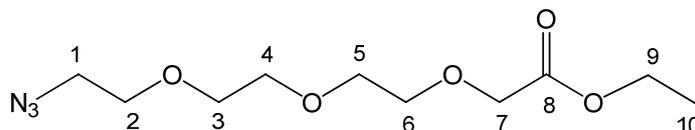


35

Unter Argon wurden 5.00 g, 4.31 mL (30.0 mmol, 1.00 eq) 2-(2-Chlorethoxy)-ethoxyethanol **34** in 90 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung wurden 3.15 mL (3.40 g, 30.0 mmol, 1.00 eq) Ethyldiazoacetat und 4-5 Tropfen Bortrifluorid-Diethyletherat zugegeben (Gasentwicklung). Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten lang bei 0 °C und weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Um Vollständigkeit der Reaktion zu überprüfen wurden weitere 2-3 Tropfen Bortrifluorid-Diethyletherat zugegeben. Da keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war, wurde das Reaktionsgemisch mit 15 mL 10 %iger Natriumhydroxid-Lösung versetzt und 10 Minuten lang gerührt. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt bei 120-128°C/0.02 mbar fraktionierend destilliert. Es konnten 3.49 g (13.3 mmol, 45 %) eines farblosen Öls erhalten werden.

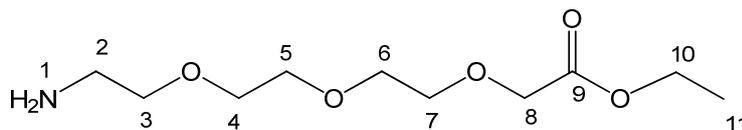
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.28 (t, 3H, H-10, ³J{H-10, H-9} = 7.26 Hz), 3.60-3.77 (m, 12H, H-(1-6)), 4.14 (s, 2H, H-7), 4.20 (q, 2H, H-9, ³J{H-9, H-10} = 7.26 Hz).

HRMS (ESI): [M + Na]⁺ = m/z für C₁₀H₁₉ClNaO₅: ber.: 277.0813; gef.: 277.0827.

Darstellung von Ethyl-(2-(2-(2-azidoethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-acetat **36****36**

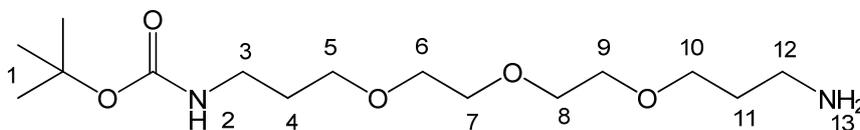
Unter Argon wurden 3.30 g (12.6 mmol, 1.00 eq) Ethyl-(2-(2-(2-chloroethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-acetat **35** und 1.23 g (18.9 mmol, 1.50 eq) Natriumazid in 40 mL absolutem DMF suspendiert und anschließend 5 h bei 100 °C zum Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch färbte sich während dieser Zeit orange. Nach dem Abkühlen wurde das DMF *in vacuo* abkondensiert. Der Rückstand wurde in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 30 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (2:1) gereinigt. Es konnten 1.58 mg (6.05 mmol, 48 %) eines farblosen Öls isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.28 (t, 3H, H-10, ³J{H-10, H-9} = 7.17 Hz), 3.39 (t, 2H, H-1, ³J{H-1, H-2} = 5.10 Hz), 3.66-3.76 (m, 10H, H-(2-6)), 4.25 (s, 2H, H-7), 4.21 (q, 2H, H-9 ³J{H-9, H-10} = 7.17 Hz). **HRMS (ESI):** [M + Na]⁺ = *m/z* für C₁₀H₁₉N₃NaO₅: ber.: 284.1217; gef.: 284.1237.

Darstellung von Ethyl-2-(2-(2-(2-aminoethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-acetat **28****28**

0.30 g (1.15 mmol, 1.00 eq) Azid **36** wurden in 7 mL Ethanol gelöst, mit 2.30 mL (2.30 mmol, 2.00 eq) 1 M HCl und 30 mg (10 %) Pd/C versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz (ESI-Kontrolle) hydriert. Danach wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* abkondensiert. Das erhaltene Hydrochlorid des Produktes **28** ist im Gegensatz zum freien Amin mehrere Monate bei -18°C lagerbar. So wurde die Aufarbeitung zum Amin unmittelbar vor dessen weiterer Umsetzung durchgeführt. Dazu wurden 350 mg (1.29 mmol) des Hydrochlorids in 20 mL Chloroform gelöst und erst mit 3 mL gesättigter K_2CO_3 -Lösung, dann mit 2 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde schnell am Rotationsverdampfer entfernt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum konnten 210 mg (0.89 mmol, 69 %) einer farblosen Flüssigkeit erhalten werden.

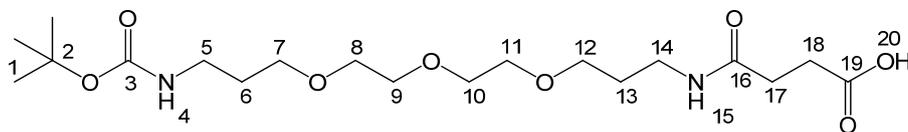
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.28 (t, 3H, H-11, $^3\text{J}\{\text{H-11}, \text{H-10} = 7.16 \text{ Hz}\}$), 1.85 (bs, 2H, H-1), 2.88 (t, 2H, H-2, $^3\text{J}\{\text{H-2}, \text{H-3} = 5.42 \text{ Hz}\}$), 3.53 (t, 2H, H-3, $^3\text{J}\{\text{H-43}, \text{H-42} = 5.42 \text{ Hz}\}$), 3.61-3.76 (m, 8H, H-(4-7)), 4.15 (s, 2H, H-8), 4.21 (q, 2H, H-10, $^3\text{J}\{\text{H-10}, \text{H-1} = 7.16 \text{ Hz}\}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.3, 41.8, 60.9, 68.8, 70.4, 70.6, 70.7, 71.0, 73.2, 170.6. **HRMS (ESI)**: $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{NO}_5$: ber.: 236.1492; gef.: 236.1511, $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NNaO}_5$: ber.: 258.1312; gef.: 258.1325.

Darstellung von *tert*-Butyl-3-(2-(2-(3-aminopropoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propyl-carbamat **38****38**

Unter Argon wurde eine Lösung aus 1.75 g (8.00 mmol, 0.50 eq) Di-*tert*-butyldicarbonat in 30 mL Dichlormethan tropfenweise zu einer Lösung aus 3.52 g (16.0 mmol, 1.00 eq) 4,7,10-Trioxatridecan-1,13-diamin **31** und 1.2 mL (8.80 mmol, 0.60 eq) Triethylamin in 40 mL Dichlormethan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend bei vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Reinigung mit dem Laufmittelgemisch aus Propylamin/Methanol/Dichlormethan (0.5:1:30) ergab 1.80 g (6.00 mmol, 75 %) eines farblosen Öls.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.43 (s, 9H, H-1), 1.71-1.82 (m, 4H, H-4, H-11), 2.35 (bs, 2H, H-13), 2.84-2.88 (m, 2H, H-3/12), 3.18-3.25 (m, 2H, H-3/12), 3.51-3.66 (m, 12H, H-(5-10)), 5.10 (bs, 1H, H-13). **HRMS (ESI)**: $[M + H]^+ = m/z$ für C₁₅H₃₃N₂O₅: ber.: 321.2384; gef.: 321.2434, $[M + Na]^+ = m/z$ für C₁₅H₃₂N₂NaO₅: ber.: 343.2203; gef.: 343.2257.

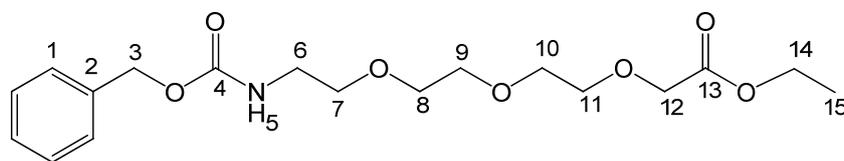
Darstellung von *N*-(3-(2-(2-(3-*tert*-Butoxycarbonylamino)propoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propyl)-bernsteinsäureamid **30**



30

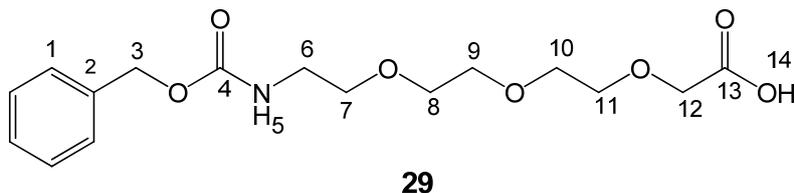
Unter Argon wurden 0.50 g (1.56 mmol, 1.00 eq) der Verbindung **38** in 7 mL Chloroform gelöst, mit 0.43 g (4.30 mmol, 2.75 eq) Bernsteinsäureanhydrid und 1.10 mL (0.80 g, 7.93 mmol, 5.08 eq) Triethylamin versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung färbte sich dunkelbraun. Nach einer DC-Kontrolle mit Propylamin/Methanol/Dichlormethan (0.5:1:30) wurde das Reaktionsgemisch mit 7.5 mL Wasser versetzt und mit einer gesättigten Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf pH 3 eingestellt. Anschließend wurde die wässrige Phase schnell dreimal mit je 10 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 mL dest. Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der ölige Rückstand im Hochpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 656 mg (1.56 mmol, quant.) eines braunen Öls isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.37 (s, 9H, H-1), 1.56-1.63 (m, 4H, H-6, H-13), 2.28 (t, 2H, H-17/18, ³J = 6.90 Hz), 2.41 (t, 2H, H-17/18, ³J = 6.90 Hz), 2.93-2.97 (m, 2H, H-5/14), 3.05-3.08 (m, 2H, H-5/14), 3.36-3.39 (m, 4H, H-7, H-12), 3.45-3.52 (m, 8H, H-(8-11)), 6.74 (t, 1H, H-4/15, ³J = 5.60 Hz), 7.79 (t, 1H, H-4/15, ³J = 5.34 Hz), 12.04 (bs, 1H, H-20).
¹³C-NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 28.3, 29.2, 29.4, 29.7, 30.0, 35.8, 37.2, 68.0, 68.1, 69.5, 69.8, 77.4, 79.2, 155.6, 170.9, 173.8. **HRMS (ESI)**: [M - H]⁻ = *m/z* für C₁₉H₃₅N₂O₈: ber.: 419.2399; gef.: 419.2401; [M + Na]⁺ = *m/z* für C₁₉H₃₆N₂NaO₈: ber.: 443.2364; gef.: 443.2381.

Darstellung von 2-(2-(2-Benzoyloxycarbonylaminoethoxy)-ethoxy)-ethoxyethansäureethylester 37**37**

320 mg (1.36 mmol, 1.00 eq) 2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-essigsäureethylester **28** und 128 mg (1.52 mmol, 1.20 eq) Natriumhydrogencarbonat wurden in 12 mL dest. Wasser suspendiert. Zu dieser Reaktionsmischung wurden 192 μ L (232 mg, 1.36 mmol, 1.00 eq) Chlorameisensäurebenzylester in 30 mL Diethylether gelöst zugetropft. Anschließend wurden weitere 128 mg (1.52 mmol, 1.20 eq) Natriumhydrogencarbonat zugegeben. Die Mischung wurde dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 30 mL Diethylether versetzt. Anschließend wurden die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer konnte der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (2:1) gereinigt werden, um 350 mg (0.95 mmol, 70 %) eines farblosen Öls zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.26 (t, 3H, H-15, $^3\text{J}\{\text{H-15}, \text{H-14} = 7.10 \text{ Hz}\}$), 3.37-3.42 (m, 2H, H-6), 3.55-3.70 (m, 10H, H-(7-11)), 4.10 (s, 2H, H-12), 4.19 (q, 2H, H-14, $^3\text{J}\{\text{H-14}, \text{H-15} = 7.10 \text{ Hz}\}$), 5.10 (s, 2H, H-3), 5.37 (bs, 1H, H-5), 7.30-7.37 (m, 5H, H-1). **Rf**: 0.05 in Cyclohexan/Ethylacetat (2:1). **HRMS (ESI)**: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NNaO}_7$: ber.: 392.1680; gef.: 392.1709.

Darstellung von 2-(2-(2-Benzoyloxycarbonylaminoethoxy)-ethoxy)-ethoxyethansäure 29

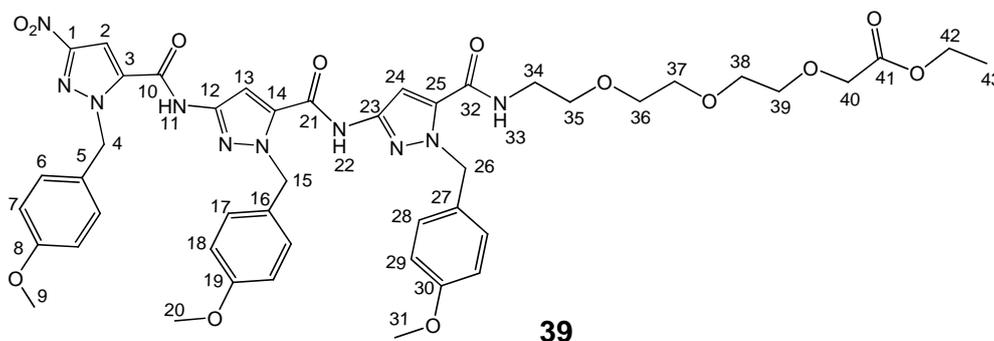
350 mg (0.95 mmol, 1.00 eq) (2-(2-(2-Benzoyloxycarbonylaminoethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-ethansäureethylester **37** wurden in Ethanol gelöst, mit 7.50 mL dest. Wasser und 137 mg (5.70 mmol, 6.00 eq) Lithiumhydroxid versetzt und 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbgefärbte trübe Lösung wurde mit 1 M Salzsäure auf pH 2 eingestellt, wobei die Lösung klar wurde. Anschließend wurde dreimal mit je 30 mL Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt, wonach der ölige Rückstand im Hochvakuum getrocknet wurde. Es konnten 230 mg (0.67 mmol, 71 %) eines farblosen Öls isoliert werden

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.28-3.30 (m, 2H, H-6), 3.45-3.65 (m, 10H, H-(7-11)), 4.04 (s, 2H, H-12), 5.02 (s, 2H, H-3), 5.32 (bs, 1H, H-5), 7.21-7.27 (m, 5H, H-1).

HRMS (ESI): $[M + Na]^+ = m/z$ für C₁₆H₂₃NNaO₇: ber.: 364.1367; gef.: 364.1395.

6.3 Synthese der PMB-geschützten Trimer-Spacer-Säuren **40**, **48**, **50**

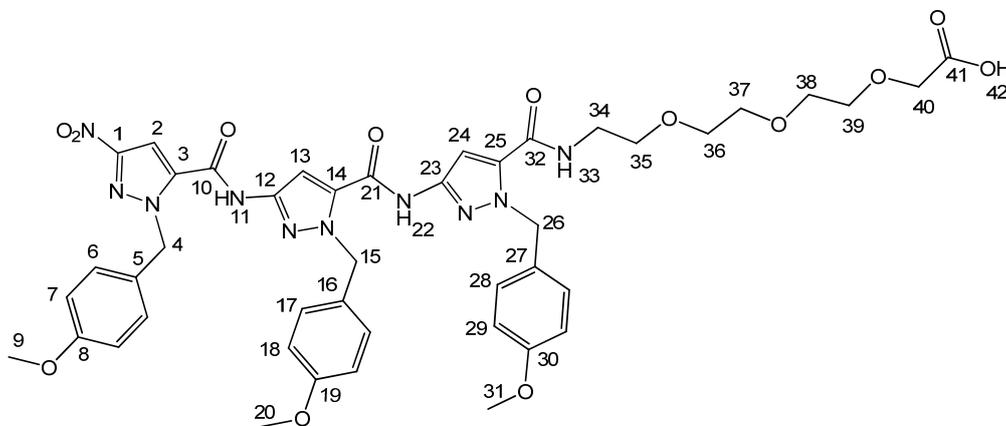
Darstellung von 1-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-carbonsäureethylester **39**



Unter Argon wurden 1.22 g (1.66 mmol, 1.00 eq) Trimer(PMB)-OH **27** in 70 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt. Zu der auf 0 °C gekühlten Suspension wurden anschließend in Intervallen von 10 Minuten 436 mg (3.66 mmol, 3.00 eq) HOBt, 699 mg (3.66 mmol, 3.00 eq) EDC·HCl und 700 mg (2.98 mmol, 1.80 eq) 2-(2-(2-Aminoethoxy)-ethoxy)-ethoxy-essigsäureethylester zugegeben und 48 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde mit jeweils 50 mL 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck konnte der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (70:1) gereinigt werden, um 1.32 g des leicht gelblichen Feststoffes (1.39 mmol, 84 %) zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.21 (t, 3H, H-43, ³J{H-43, H-42} = 7.00 Hz), 3.55-3.58 (m, 2H, H-34), 3.61-3.68 (m, 10H, H-(35-39)), 3.72-3.75 (3s, 9H, H-9, H-20, H-31), 4.11 (s, 2H, H-40), 4.14 (q, 2H, H-42, ³J{H-42, H-43} = 7.00 Hz), 5.57-5.77 (3s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.76-6.81 (m, 6H, CH_{Aromat}), 7.09 (bs, 2H, H-33, C-H_{Pyrazol}), 7.19-7.23 (m, 5H, CH_{Aromat}, CH_{Pyrazol}), 7.29 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.35-7.36 (m, 2H, CH_{Aromat}), 8.67 (s, 1H, N-H_{Amid}), 9.05 (s, 1H, NH_{Amid}). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.3, 39.6, 53.8, 54.0, 55.3, 56.0, 61.0, 68.7, 69.7, 70.4, 70.6, 70.9, 98.4, 99.1, 103.8, 114.0, 114.1, 114.2, 127.3, 128.9, 129.3, 129.4, 129.5, 130.2, 134.9, 135.9, 136.3, 144.8, 144.9, 154.2, 155.3, 156.3, 159.3, 159.4, 159.7, 159.9, 170.6. **Rf**: 0.10 Dichlormethan/Methanol (70:1). **Schmp.**: 62 °C. **HRMS (ESI)**: [M + H]⁺ = m/z für C₄₆H₅₃N₁₀O₁₃: ber.: 953.3788; gef.: 953.3808; [M + Na]⁺ = m/z für C₄₆H₅₂N₁₀NaO₁₃: ber.: 975.3608; gef.: 975.3633.

Darstellung von 1-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridec-13-carbonsäure 40

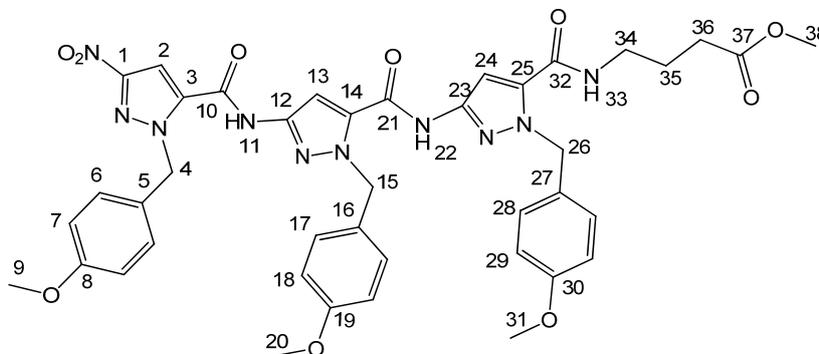


40

842 mg (0.88 mol, 1.00 eq) Trimer(PMB)-TEG-OEt **39** wurden in 40 mL THF/Ethanol-Gemisch (1:1) gelöst und mit 106 mg (4.42 mmol, 5.00 eq) Lithiumhydroxid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 50 mL Wasser aufgenommen und die Lösung mit 1 M Salzsäure angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit 1 M Salzsäure gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 753 mg (0.81 mmol, 92 %) eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.36-3.40 (m, 2H, H-34), 3.52-3.58 (m, 10H, H-(35-39)), 3.70-3.71 (2s, 9H, H-9, H-20, H-31), 4.00 (s, 2H, H-40), 5.60-5.80 (3s, 6H, CH₂Benzyl), 6.87-6.91 (m, 6H, CH_{Aromat}), 7.17-7.19 (m, 4H, CH_{Aromat}), 7.26-7.28 (m, 2H, CH_{Aromat}), 7.33 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.71 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.98 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 8.71 (t, 1H, H-33), 11.3 (s, 1H, NH_{Amid}), 11.5 (s, 1H, NH_{Amid}), 12.6 (bs, 1H, H-42). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 38.7, 52.7, 53.2, 55.0, 55.05, 55.1, 55.2, 67.6, 68.6, 69.5, 69.6, 69.7, 69.8, 99.6, 101.0, 105.1, 113.8, 113.9, 114.0, 128.0, 128.8, 129.0, 129.4, 129.6, 129.8, 134.3, 134.9, 136.8, 144.9, 145.2, 153.6, 155.4, 156.9, 158.6, 158.7, 159.1, 159.1, 171.6. **Schmp.:** 211°C. **HRMS (ESI):** $[M + Na]^+ = m/z$ für C₄₄H₄₈N₁₀NaO₁₃: ber.: 947.3295; gef.: 947.3315; $[M + 2Na-H]^+ = m/z$ für C₄₄H₄₇N₁₀Na₂O₁₃: ber.: 969.3114; gef.: 969.3131.

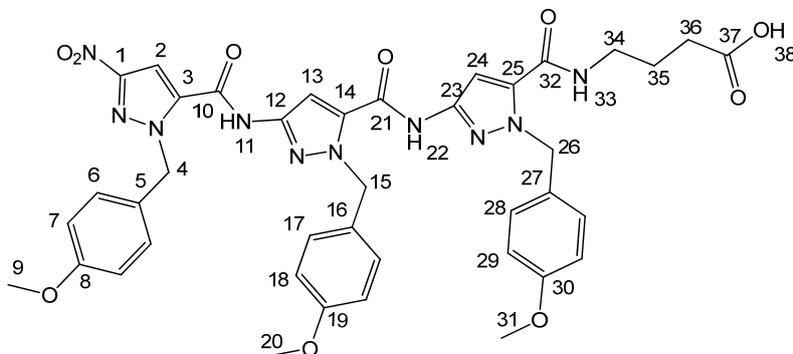
Darstellung von 4-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-butansäuremethylester **47**

**47**

Unter Argon wurden 100 mg (136 μmol , 1.00 eq) Trimer-Säure **27** in 30 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt. Zu dieser Suspension wurden 82.0 mg (90.0 μL , 816 μmol , 6.00 eq) *N*-Methylmorpholin, 212 mg (407 μmol , 3.00 eq) PyBOP und 42.0 mg (272 μmol , 2.00 eq) H_2N -GABA-OMe **33** zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Tage lang bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (100:1) gereinigt um 101 mg (120 μmol , 88 %) eines farblosen Feststoffes zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.90-1.99 (m, 2H), 2.42 (t, 2H), 3.44-3.50 (m, 2H), 3.71 (s, 3H, H-38), 3.76-3.77 (2s, 9H, H-9, H-20, H-31), 5.62-5.80 (3s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.48 (t, 1H, H-33 $^3\text{J}\{\text{H-33}, \text{H-34} = 5.54 \text{ Hz}\}$), 6.80-6.85 (m, 6H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.10 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.25-7.29 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.37-7.40 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.47 (bs, 1H, C-H_{Pyrazol}), 8.45 (s, 1H, NH_{Amid}), 8.50 (s, 1H, NH_{Amid}). **R_f** : 0.09 in Dichlormethan/Methanol (100:1). **Schmp.**: 199 °C. **HRMS (ESI)**: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{N}_{10}\text{NaO}_{10}$: ber.: 857.2978; gef.: 857.3004.

Darstellung von 4-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-butansäure **48**

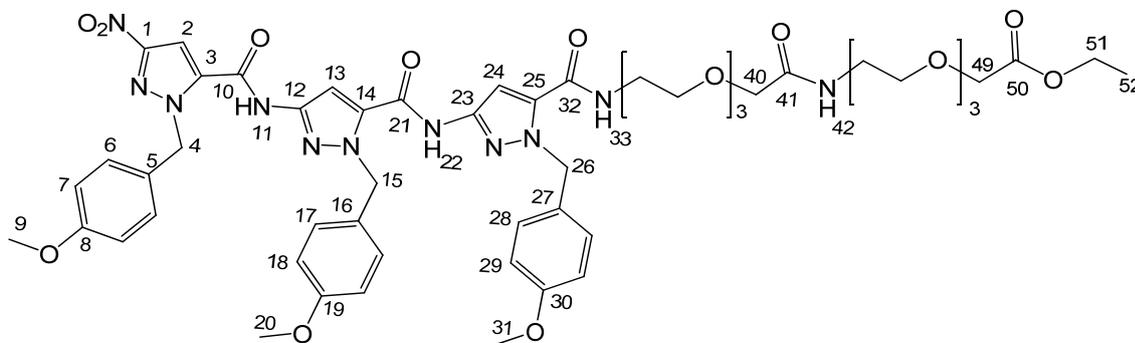


48

95.0 mg (114 μmol , 1.00 eq) Trimer(PMB)-GABA-OMe **47** wurden in 50 mL THF/Methanol-Gemisch (1:1) gelöst, mit 2 mL dest. Wasser und 20.0 mg (835 μmol , 7.32 eq) Lithiumhydroxid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 10 mL Wasser aufgenommen und die Lösung mit 1 M Salzsäure angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit 1 M Salzsäure gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 83.0 mg (101 μmol , 89 %) eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.72-1.78 (m, 2H, H-35), 2.27 (t, 2H, H-36, $^3\text{J}\{\text{H-36, H-35} = 7.67 \text{ Hz}\}$), 3.24-3.28 (m, 2H, H-34), 3.71-3.73 (3s, 9H, H-9, H-20, H-31), 5.62-5.83 (3s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.87-6.92 (m, 6H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.18-7.21 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.27-7.29 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.30 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.72 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.99 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 8.68-8.70 (bs, 1H, H-33), 11.34 (s, 1H, NH_{Amid}), 11.52 (s, 1H, NH_{Amid}), 12.10 (bs, 1H, H-38). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 24.3, 31.1, 38.2, 52.7, 53.2, 55.0, 55.05, 55.06, 55.1, 99.5, 100.9, 105.1, 113.8, 113.9, 114.0, 127.9, 128.7, 129.0, 129.4, 129.6, 129.8, 134.4, 135.1, 136.8, 144.9, 145.2, 153.6, 155.5, 156.9, 158.6, 158.7, 159.0, 159.1, 174.2. **Schmp.:** 210 °C. **HRMS (ESI):** $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{N}_{10}\text{O}_{10}$: ber.: 819.2856; gef.: 819.2978.

Darstellung von 1-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11,17,20,23-hexaoxa-2,14-diazapentacosan-25-carbonsäureethylester **49**

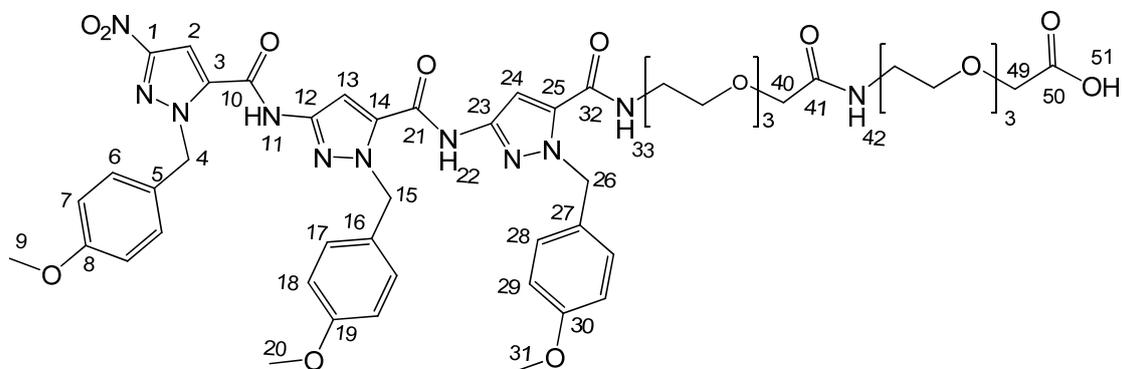


49

Unter Argon wurden 120 mg (0.13 mmol, 1.00 eq) Trimer-TEG-Säure **40** in 12 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt. Zu der auf 0 °C gekühlten Suspension wurden anschließend in Intervallen von 10 Minuten 46.0 mg (0.39 mmol, 3.00 eq) HOBt, 74.0 mg (0.39 mmol, 3.00 eq) EDC·HCl und 61.0 mg (0.26 mmol, 2.00 eq) H₂N-TEG-OEt **28** zugegeben und zwei Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde mit jeweils 15 mL 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck konnte der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (40:1) gereinigt werden, um 127 mg (0.11 mmol, 86 %) eines farblosen viskösen Öls zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.25, (t, 3H, H-52, ³J{H-52, H-51} = 7.14 Hz), 3.41-3.45 (m, 2H, H-43), 3.48-3.50 (m, 2H, H-44), 3.53-3.62 (m, 20H, H-(34-39)), H-(45-48), 3.72-3.75 (3s, 9H, H-9, H-20, H-31), 4.00 (s, 2H, H-49), 4.10 (s, 2H, H-40), 4.18 (q, 2H, ³J{H-51, H-52} = 7.14 Hz), 5.59-5.78 (3s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.76-6.81 (m, 6H, CH_{Aromat}), 7.14-7.25 (m, 7H, CH_{Aromat}, CH_{Pyrazol}, H-33, H-42), 7.36-7.40 (m, 3H, CH_{Aromat}, C-H_{Pyrazol}), 8.72 (s, 1H, NH_{Amid}), 9.18 (s, 1H, NH_{Amid}). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.3, 38.8, 39.6, 53.8, 54.0, 55.4, 56.0, 61.0, 68.7, 69.7, 69.9, 70.2, 70.3, 70.4, 70.52, 70.56, 70.6, 70.7, 70.8, 70.9, 98.4, 99.3, 104.0, 114.0, 114.1, 114.2, 127.4, 129.0, 129.4, 129.5, 130.2, 134.8, 135.8, 136.4, 144.9, 154.2, 155.3, 156.5, 159.3, 159.4, 159.7, 159.9, 170.5, 170.7. **Rf**: 0.04 in Dichlormethan/Methanol (40:1). **Schmp.**: 87.3 °C. **HRMS (ESI)**: [M + H]⁺ = *m/z* für C₅₄H₆₈N₁₁O₁₇: ber.: 1142.4789; gef.: 1142.4902; [M + Na]⁺ = *m/z* für C₅₄H₆₇N₁₁NaO₁₇: ber.: 1164.4609; gef.: 1164.4733.

Darstellung von 1-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11,17,20,23-hexaoxa-2,14-diazapentacosan-25-carbonsäure **50**



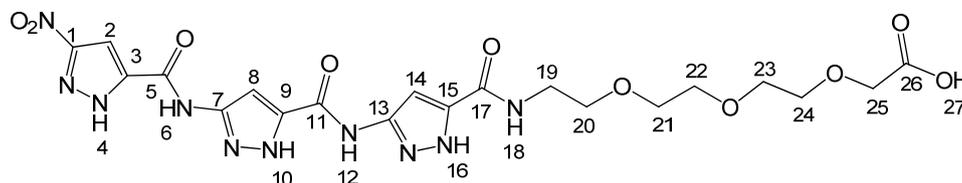
50

127 mg (111 μmol , 1.00 eq) Trimer(PMB)-TEG-TEG-OEt **49** wurden in 20 mL THF/Methanol-Gemisch (1:1) gelöst und mit 20.0 mg (835 mmol, 7.50 eq) Lithiumhydroxid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 15 mL Wasser aufgenommen und die Lösung mit 1 M Salzsäure angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wurde über eine Fritte abfiltriert. Der klebrige Feststoff wurde anschließend mit THF aus der Fritte ausgewaschen. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck und der anschließenden Trocknung des Rückstands im Hochvakuum konnten 117 mg (105 μmol , 95%) eines gelben viskösen Öls erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 3.24-3.28 (m, 2H, H-43), 3.37-3.43 (m, 4H, H-34, H-44), 3.49-3.61 (m, 18H, H-(35-39), H-(45-48)), 3.70, 3.71, 3.72 (3s, 9H, H-9, H-20, H-31), 3.87 (s, 2H, H-49), 4.01 (s, 2H, H-40), 5.62, 5.67, 5.81 (3s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.86-6.91 (m, 6H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.17-7.19 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.27-7.28 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.33 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.63 (t, 1H, H-33/42), 7.71 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.98 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 8.70 (t, 1H, H-33/42), 11.34 (s, 1H, NH_{Amid}), 11.50 (s, 1H, NH_{Amid}), 12.56 (bs, 1H, H-51). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 21.0, 25.1, 29.2, 30.4, 34.4, 38.0, 38.7, 52.8, 53.2, 55.00, 55.05, 55.06, 55.09, 67.0, 67.6, 68.6, 68.9, 69.4, 69.5, 69.6, 69.7, 69.8, 69.9, 70.2, 99.6, 100.9, 105.1, 113.7, 113.8, 114.0, 124.9, 127.9, 128.8, 129.0, 129.4, 129.6, 129.8, 134.3, 134.9, 136.8, 139.2, 144.9, 145.3, 153.6, 155.5, 156.9, 158.6, 158.7, 159.1, 159.2, 169.2, 171.6. **HRMS (ESI)**: $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{86}\text{H}_{77}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$: ber.: 1473.5615; gef.: 1473.5580; $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{86}\text{H}_{76}\text{N}_{10}\text{NaO}_{14}$: ber.: 1495.5435; gef.: 1495.5417.

6.4 Synthese der Trimer-Derivate 41, 45, 70, 81, 84

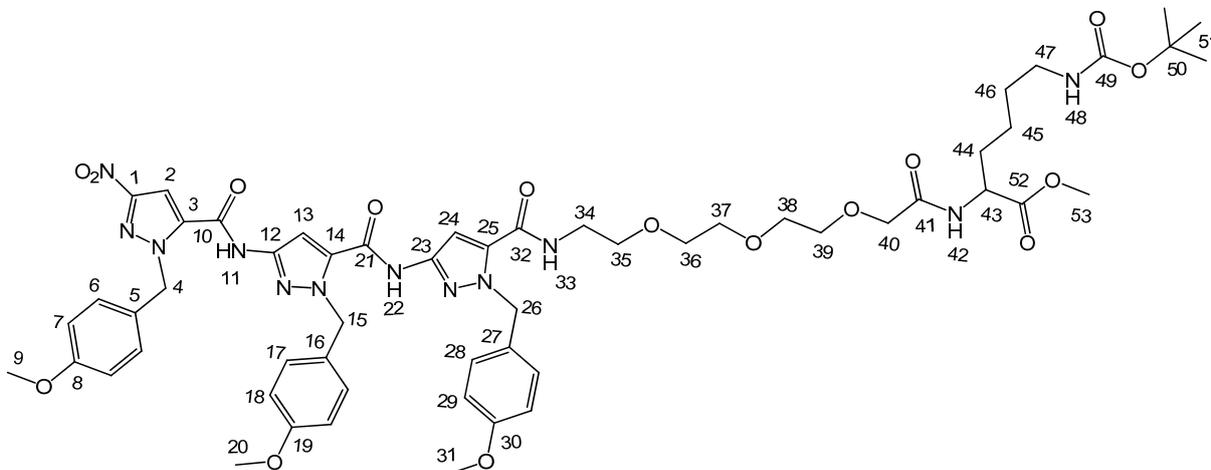
Darstellung von 1-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-carbonsäure **41**

**41**

53.0 mg (57.4 μmol) Trimer(PMB)-TEG-OH **41** wurden unter Argon in Trifluoressigsäure (3 mL) gelöst und unter Rühren für 5 Stunden auf 70 °C erhitzt. Die lila bis braun gefärbte Lösung wurde langsam mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der hierbei ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, die Mutterlauge entfernt und der farblose Feststoff dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 30 mg (53.2 μmol , 94 %) eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.39-3.40 (m, 2H, H-19), 3.52-3.57 (m, 10H, H-(20-24)), 4.01 (s, 2H, H-25), 7.16 (bs, 1H, NH_{Amid}), 7.57 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.94 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 8.55 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 11.09 (s, 1H, NH_{Amid}), 11.43 (bs, 1H, NH_{Amid}), 12.75 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$), 13.09 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$), 13.51 (bs, 1H, H-27), 14.98 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 39.5, 68.4, 69.7, 70.5, 70.56, 70.6, 70.7, 103.2, 139.6, 155.9, 156.8, 172.5. **Schmp.:** Zersetzung ab 349°C. **HRMS (ESI):** $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_{10}\text{NaO}_{10}$: ber.: 587.1569; gef.: 587.1553; $[\text{M} + 2\text{Na} - \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_{10}\text{Na}_2\text{O}_{10}$: ber.: 609.1389, gef.: 609.1388.

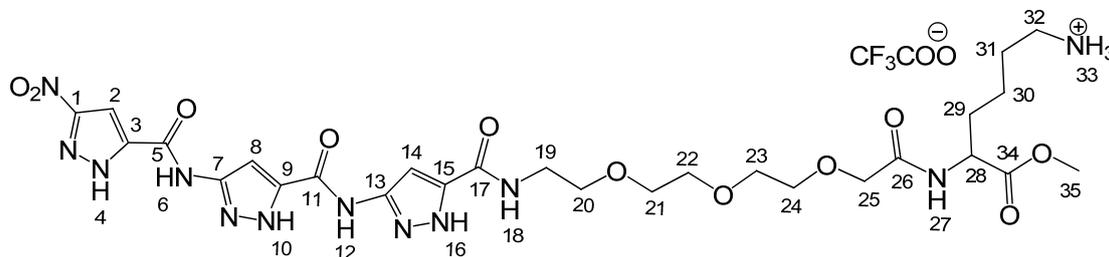
Darstellung von 15-(4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-butyl)-1-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2,14-diazahexadecan-16-carbonsäuremethylester **69**

**69**

Unter Argon wurden 105 mg (0.11 mmol, 1.00 eq) Trimer(PMB)-TEG-OH **40** in 30 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt. Die erhaltene Suspension wurde mit 39 μ L (35 mg, 0.34 mmol, 3.00 eq) *N*-Methylmorpholin 178 mg (0.34 mmol, 3.00 eq) PyBOP und 60.0 mg (0.20 mmol, 1.80 eq) *N*-Amino-*N*^ε-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(*S*)-lysin-carbonsäuremethylesterhydrochlorid versetzt und für 4 Tage unter Rühren auf 40 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der zurückbleibende Feststoff säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1 gereinigt, um 108 mg (0.11 mmol, 82 %) eines farblosen Feststoffes zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.25-1.41 (m, 13H, H-45, H-46, H-51), 1.58-1.83 (m, 2H, H-44), 3.00 (bs, 2H, H-47), 3.56-3.58 (m, 2H, H-34), 3.61-3.67 (m, 13H, H-(35-39), H-53), 3.72-3.76 (3s, 9H, H-9, H-20, H-31), 4.02 (s, 2H, H-40), 4.61-4.65 (m, 1H, H-43), 5.60-5.79 (2s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.76-6.81 (m, 6H, CH_{Aromat}), 7.09-7.40 (m, 11H, CH_{Aromat}, CH_{Pyrazol}, H-33, H-42), 8.68 (s, 1H, NH_{Amid}), 9.25 (s, 1H, NH_{Amid}). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 22.8, 28.6, 29.6, 32.2, 39.6, 40.3, 51.5, 52.5, 53.9, 54.0, 55.4, 56.1, 69.7, 70.3, 70.4, 70.5, 70.6, 71.0, 98.4, 99.3, 104.0, 114.0, 114.1, 114.2, 127.4, 129.0, 129.3, 129.4, 129.5, 130.2, 134.9, 135.8, 136.4, 114.9, 154.3, 155.4, 156.2, 156.5, 159.3, 159.4, 159.7, 159.9, 170.3, 172.9. **R_f**: 0.16 in Dichlormethan/Methanol (50:1). **Schmp.**: 79 °C. **HRMS (ESI)**: [M + H]⁺ = m/z für C₅₆H₇₁N₁₂O₁₆: ber.: 1167.5106; gef.: 1167.5169; [M + Na]⁺ = m/z für C₅₆H₇₀N₁₂NaO₁₆: ber.: 1189.4925, gef.: 1189.4979.

Darstellung von 15-(Methoxycarbonyl)-1-(3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2,14-diazanonadecan-19-ammonium Trifluoracetat **70**

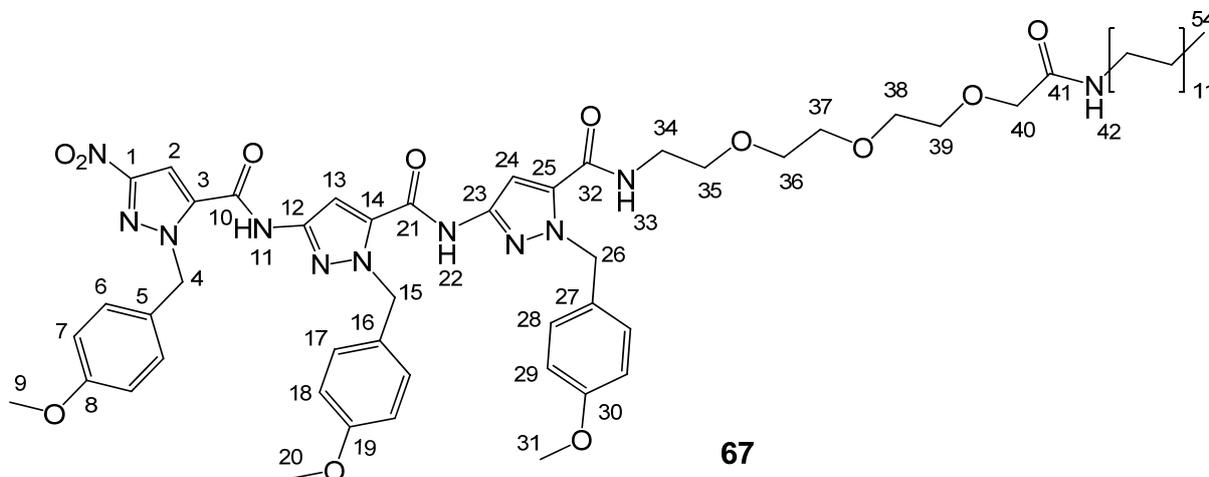


70

Unter Argon wurden 50.0 mg (42.9 μ mol) Trimer(PMB)-TEG-Lys(Boc)-OMe **69** in Trifluoressigsäure (3 mL) gelöst und unter Rühren für 5 Stunden auf 70 °C erhitzt. Die lila bis braun gefärbte Lösung wurde langsam mit eiskaltem Ether versetzt. Der hierbei ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, die Mutterlauge entfernt und der farblose Feststoff dreimal mit Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 32.0 mg (39.0 μ mol, 91 %) eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

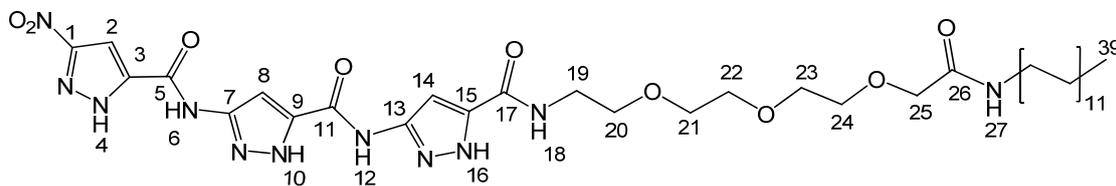
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.30-1.36 (m, 2H, H-30), 1.50-1.57 (m, 2H, H-31), 1.62-1.80 (m, 2H, H-29), 2.77 (bs, 2H, H-32), 3.40-3.44 (m, 2H, H-19), 3.54-3.60 (m, 10H, H-(20-24)), 3.64 (s, 3H, H-35), 3.95 (s, 2H, H-25), 4.31-4.34 (m, 1H, H-28), 7.28 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.60-7.63 (m, 4H, H-33, CH_{Pyrazol}), 7.95-7.98 (m, 2H, H-27, CH_{Pyrazol}), 8.64 (bs, 1H, H-18), 11.13 (s, 1H, NH_{Amid}), 11.41 (s, 1H, NH_{Amid}), 13.24 (s, 1H, NH_{Pyrazol}), 13.47 (s, 1H, NH_{Pyrazol}), 14.97 (s, 1H, NH_{Pyrazol}). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 22.3, 26.5, 30.2, 38.6, 51.1, 52.0, 68.8, 69.5, 69.7, 70.2, 97.2, 98.4, 102.2, 146.7, 158.6, 169.6, 172.2. **Schmp:** Zersetzung ab 360 °C. **HRMS (ESI):** $[M + H]^+ = m/z$ für C₂₇H₃₉N₁₂O₁₁: ber.:707.2856; gef.: 707.2851; $[M + Na]^+ = m/z$ für C₂₇H₃₈N₁₂NaO₁₁: 729.2675; gef.: 729.2670.

Darstellung von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-*N*-(11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatetracosyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **67**



Unter Argon wurden 0.05 g (54.1 μmol , 1.00 eq) Trimer-TEG-Säure **40** in 10 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt. Zu der auf 0 °C gekühlten Suspension wurden anschließend in Intervallen von 10 Minuten 19.0 mg (0.16 mmol, 3.00 eq) HOBt, 31.0 mg (0.16 mmol, 3.00 eq) EDC*HCl und 20.0 mg (0.11 mmol, 2.00 eq) Dodecylamin zugegeben und zwei Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde mit jeweils 15 mL 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck konnte der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (50:1) gereinigt werden, um 44.3 mg (40.6 μmol , 75 %) eines leicht gelblichen Feststoffes zu erhalten.

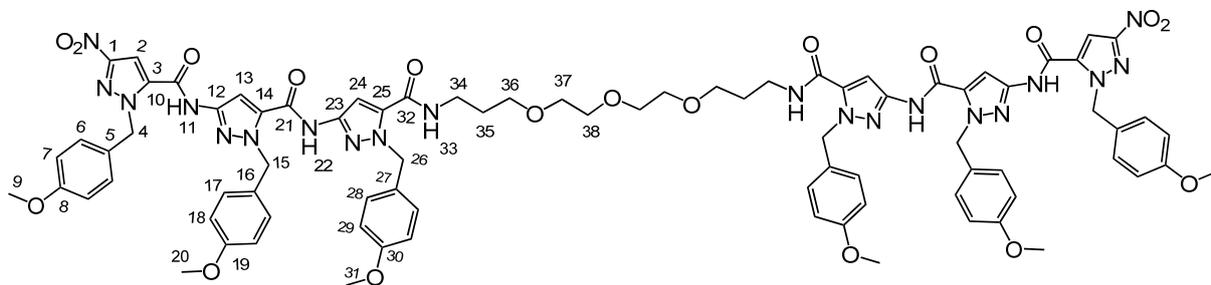
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.86 (t, 3H, H-54), 1.22 (bs, 18H, H-(45-53)), 1.42-1.50 (m, 2H, H-44), 3.20-3.26 (m, 2H, H-43), 3.56-3.64 (m, 12H, H-(34-39)), 3.72-3.75 (3s, 9H, H-9, H-20, H-31), 4.00 (s, 2H, H-40), 5.59-5.78 (2s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.75-6.81 (m, 6H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 6.88 (t, 1H, H-42), 6.97 (t, 1H, H-33), 7.11 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.17-7.26 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.34-7.38 (m, 3H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 8.62 (s, 1H, NH_{Amid}), 9.13 (s, 1H, NH_{Amid}). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.2, 22.8, 27.9, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.9, 32.0, 39.1, 39.6, 53.9, 54.0, 55.4, 56.1, 69.8, 70.4, 70.5, 70.6, 70.7, 70.8, 98.2, 99.1, 103.9, 114.0, 114.1, 114.2, 127.3, 128.9, 129.3, 129.4, 129.5, 130.2, 134.8, 135.8, 136.4, 144.9, 154.2, 155.3, 156.5, 159.3, 159.5, 159.6, 159.9, 170.1. **Schmp.:** 105 °C. **R_f:** 0.27 in Dichlormethan/Methanol (50:1). **HRMS (ESI):** $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{56}\text{H}_{74}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$: ber.: 1092.5513; gef.: 1092.5521; $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{56}\text{H}_{73}\text{N}_{11}\text{NaO}_{12}$: 1114.5332; gef.: 1114.5345.

Darstellung von 3-Nitro-*N*-(5-(5-(11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatetracosylcarbamoyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)carbamoyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid **45****45**

20.0 mg (18.3 μmol) Trim(PMB)-TEG-DD **67** wurden unter Argon in Trifluoressigsäure (2 mL) gelöst und unter Rühren für 5 Stunden auf 70 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde langsam mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der hierbei ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, die Mutterlauge entfernt, der farblose Feststoff dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 9.50 mg (12.7 μmol , 70 %) eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 0.83 (t, 3H, H-39), 1.21 (bs, 18H, H-(30-38)), 1.39 (m, 2H, H-29), 3.05-3.09 (m, 2H, H-28), 3.31-3.43 (bs, 2H, H-19), 3.56 (bs, 10H, H-(20-24)), 3.85 (s, 2H, H-25), 7.26 (bs, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}/\text{NH}_{\text{Amid}}$), 7.59-7.63 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$, H-27), 7.95 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 8.62 (bs, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}/\text{NH}_{\text{Amid}}$), 11.12 (bs, 1H, NH_{Amid}), 11.43 (bs, 1H, NH_{Amid}), 13.22 (bs, 1H, $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$), 13.47 (bs, 1H, $\text{NH}_{\text{Pyrazol}}$). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 13.9, 22.1, 26.4, 28.7, 29.0, 29.1, 31.3, 38.1, 68.8, 69.5, 69.6, 69.7, 69.9, 70.2, 98.2, 102.3, 155.1, 156.0, 169.1. **Schmp.:** Zersetzung ab 348 °C. **HRMS (ESI):** $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{N}_{11}\text{NaO}_9$: ber.: 754.3607; gef.: 754.3646; $[\text{M} + 2\text{Na} - \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_{11}\text{Na}_2\text{O}_9$: 776.3426; gef.: 776.3449.

Darstellung von *N,N'*-(3,3'-(2,2'-Oxy-bis(ethan-2,1-diyl)-bis(oxy))-bis(propan-3,1-diyl))-bis(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid) 80

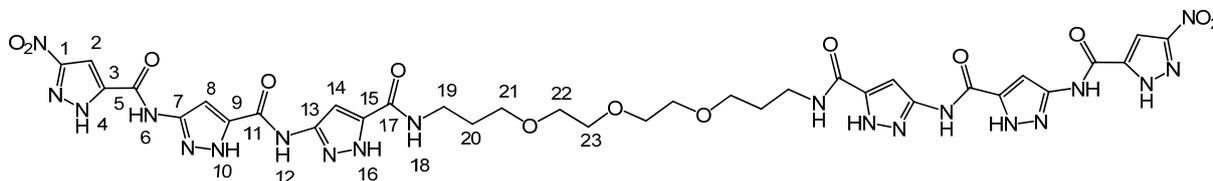


80

60.0 mg (81.6 μmol , 2.00 eq) Trimer(PMB)-OH **27** wurden unter Argon in 10 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt. Zu der auf 0 °C gekühlten Suspension wurden in zehn Minuten Intervallen 19.4 mg (0.16 mmol, 4.00 eq) HOBt, 31.0 mg (0.16 mmol, 4.00 eq) EDC*HCl und 9 μL , 9.00 mg (40.8 μmol , 1.00 eq) 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **31** zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 48 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit jeweils 15 mL 1 M HCl, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (70:1) ergab 42.0 mg (25.4 μmol , 62 %) eines farblosen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.75-1.80 (m, 2H, H-35), 3.43-3.45 (m, 2H, H-34), 3.51-3.55 (m, 4H, H-36, H-37/38), 3.68-3.69 (m, 2H, H-37/38), 3.70-3.74 (3s, 9H, H-9, H-20, H-31), 5.57-5.73 (3s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.73-6.81 (m, 6H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 6.97 (t, 1H, H-33), 7.09-7.24 (m, 7H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.33-7.34 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 8.76 (s, 1H, NH_{Amid}), 8.85 (s, 1H, NH_{Amid}). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 29.1, 38.7, 54.1, 54.3, 55.6, 56.3, 70.6, 70.7, 98.5, 99.5, 103.9, 114.3, 114.4, 114.5, 127.6, 129.2, 129.6, 129.7, 129.8, 130.4, 135.1, 136.3, 136.5, 145.0, 145.1, 154.4, 155.6, 156.8, 159.6, 159.7, 159.8, 160.2. **Schmp.:** 158 °C. **R_f:** 0.45 in Dichlormethan/Methanol (30:1).

Darstellung von *N,N'*-(5,5'-(5,5'-(3,3'-(2,2'-Oxy-bis(ethan-2,1-diyl)-bis(oxy))-bis(propan-3,1-diyl))-bis(azanediy)))-bis(oxomethylen)-bis(1*H*-pyrazol-5,3-diyl))-bis(azanediy))-bis(oxomethylen)-bis(1*H*-pyrazol-5,3-diyl))-bis(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamid) **81**

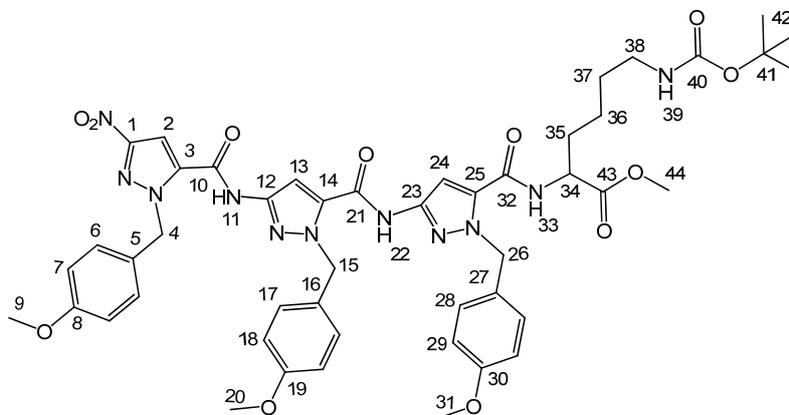


81

42.0 mg (25.4 μmol) der Verbindung **80** wurden unter Argon in Trifluoressigsäure (3 mL) gelöst und unter Rühren für 5 Stunden auf 70 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde langsam mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der hierbei ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, die Mutterlauge entfernt und der farblose Feststoff dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 23.0 mg (24.6 μmol , 97 %) eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.75-1.80 (m, 2H, H-20), 3.30-3.32 (m, 2H, H-19), 3.48 (t, 2H, H-21), 3.51-3.58 (m, 4H, H-22, H-23), 7.27-7.98 (3s, 3H, CH_{Pyrazol}), 8.57 (bs, 1H, H-18), 11.14 (s, 1H, NH_{Amid}), 11.45 (s, 1H, NH_{Amid}), 13.21 (s, 1H, NH_{Pyrazol}), 13.49 (s, 1H, NH_{Pyrazol}), 14.99 (s, 1H, NH_{Pyrazol}). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 29.3, 36.1, 68.1, 69.7, 97.0, 98.3, 102.2, 136.5, 136.9, 138.7, 146.5, 155.0, 155.9, 156.3, 158.5. **Schmp.:** Zersetzung ab 281 °C. **HRMS (ESI):** $[M + \text{Na}]^+ = m/z$ für C₃₄H₃₈N₂₀NaO₁₃: ber.: 957.2819; gef.: 957.2940.

Darstellung von 2-(1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido-6-(tert-butoxycarbonyl)-lysine-carbonsäuremethylester **82**

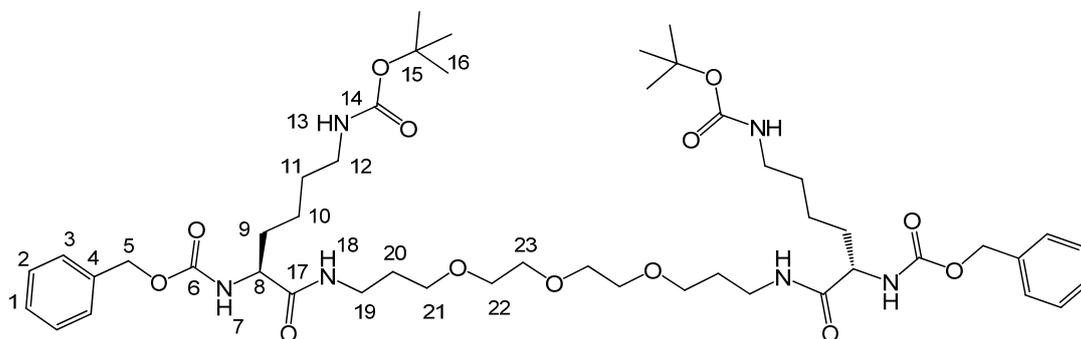


82

Unter Argon wurden 100 mg (136 μmol , 1.00 eq) Trimer(PMB)-OH **27** in 10 mL Dichlormethan vorgelegt. Die Suspension wurde danach mit 71.0 μL (53.0 mg, 408 μmol , 3.00 eq) versetzt. Nach vollständiger Lösung des Feststoffes, wurden der Lösung 52.0 mg (204 μmol , 1.50 eq) Mukaiyama-Reagenz und 61.0 mg (204 μmol , 1.50 eq) *N*-Amino-*N*^ε-(*tert*-butyloxycarbonyl)-(*S*)-lysine-carbonsäuremethylester-hydrochlorid zugesetzt. Danach wurde die Reaktionslösung 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde mit 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die Trocknung der vereinigten organischen Phasen erfolgte über Magnesiumsulfat. Nachfolgende Entfernung des Lösungsmittels und säulenchromatographische Reinigung mit *n*-Pentan/Ethylacetat (2:1) erbrachten eine Ausbeute von 75.0 mg (76.7 μmol , 56 %) des gewünschten Produktes.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.37-1.54 (m, 13H, H-42, H-36, H-37), 1.71-1.83 (m, 1H, H-35), 1.88-1.99 (m, 1H, H-35), 3.05-3.14 (m, 2H, H-38), 3.75-3.76 (2s, 9H, H-9, H-20, H-31), 3.80 (s, 3H, H-44), 4.35-4.42 (m, 1H, H-34), 5.58, 5.68, 5.81 (3s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.80-6.85 (m, 7H, H-33, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.10-7.29 (m, 6H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.45, 7.72, 7.98, (3s, 3H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 8.96 (bs, 1H, H-39), 11.38, 11.51 (2s, 2H, NH_{Amid}). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 13.9, 14.4, 19.4, 21.2, 21.3, 22.9, 28.6, 29.9, 30.9, 32.3, 40.4, 52.5, 53.9, 54.0, 54.3, 55.5, 56.3, 64.6, 98.4, 99.0, 99.1, 103.8, 14.2, 114.4, 127.4, 129.2, 129.6, 130.3, 134.9, 135.3, 136.3, 145.0, 154.4, 156.4, 159.5, 160.0, 173.1. **Schmp.:** 94 °C. **R_f:** 0.10 in *n*-Pentan/Ethylacetat 2:1. **HRMS (ESI):** $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{48}\text{H}_{56}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$: ber.: 978.4104; gef.: 978.4144; $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{48}\text{H}_{55}\text{N}_{11}\text{NaO}_{12}$: ber.: 1000.3924; gef.: 1000.3942.

Darstellung von *N,N'*-Di-*Z*-(*S*)-lys(Boc)-(3,3'-(2,2'-oxy-bis(ethan-2,1-diyl)-bis(oxy))-bis(propan-3,1-diyl)) 85

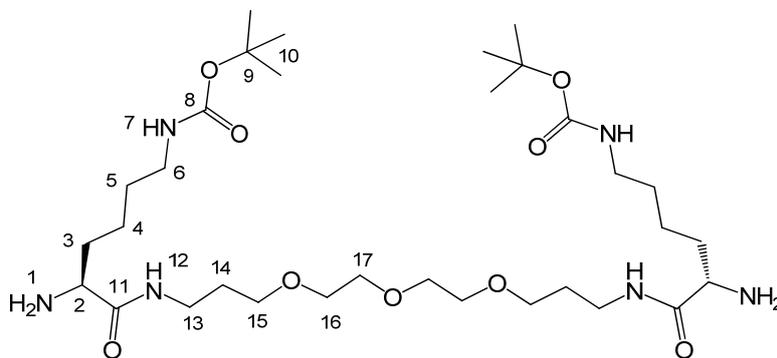


85

Unter Argon wurden 0.50 g (1.31 mol, 1.00 eq) *Z*-(*S*)-Lys(Boc)-OH in 15 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 32.0 mg (0.26 mmol, 0.20 eq) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), 250 mg (307 μ L, 1.97 mmol, 1.50 eq) Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 72.0 mg (72.0 μ L, 0.33 mmol, 0.25 eq) 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin wurde das Reaktionsgemisch 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Harnstoff wurde abfiltriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer konnte der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (30:1) gereinigt werden, um 250 mg (0.26 mmol, 79 %) eines farblosen viskösen Öls zu erhalten.

Da das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sehr breite Signale aufwies, konnten keine 2D-Spektren aufgenommen werden und somit auch keine Zuordnung durchgeführt werden.

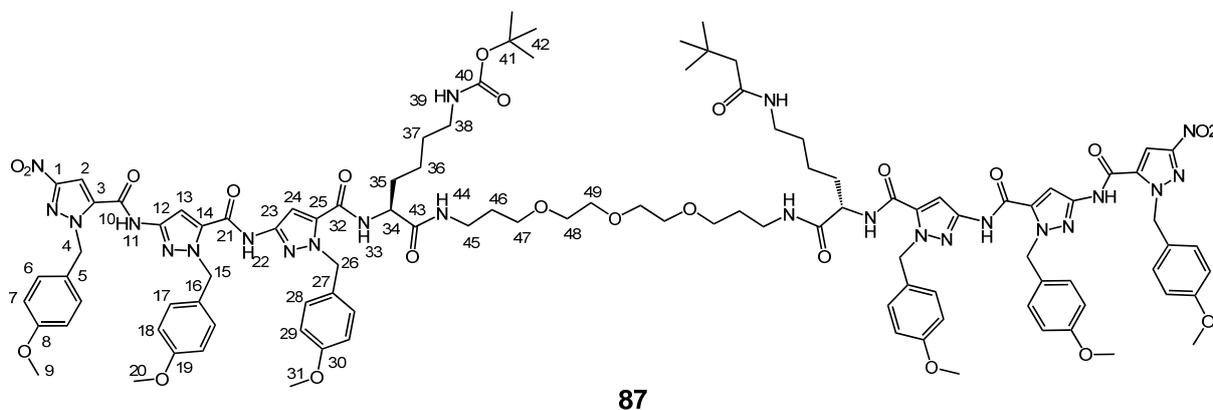
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.31-1.49 (m, 13H, H-10, H-11, H-16), 1.59-1.85 (m, 4H, H-9, H-20), 3.07 (bs, 2H, H-12), 3.26-3.40 (m, 2H, H-19), 3.52-3.61 (m, 6H, H-(21-23)), 4.11-4.16 (m, 1H, H-8), 4.74 (bs, 1H, H-13), 5.08 (s, 2H, H-5), 5.77 (bs, 1H, H-7), 6.89 (bs, 1H, H-18), 7.28-7.34 (m, 5H, H-(1-3)). **R_f** : 0.07 in Dichlormethan/Methanol (30:1). **HRMS (ESI)**: $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{48}\text{H}_{77}\text{N}_6\text{O}_{13}$: ber.: 945.5612; gef.: 945.5612; $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{N}_6\text{NaO}_{13}$: 967.5363; gef.: 967.5431.

Darstellung von Di-*tert*-butyl-(5*S*,23*S*)-5,23-diamino-6,22-dioxo-11,14,17-trioxa-7,21-diazaheptacosan-1,27-diylldicarbamat **86****86**

250 mg (0.26 mmol) der Verbindung **85** wurden in 50 mL Tetrahydrofuran gelöst, mit 30.0 mg Pd-C (10 %) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Pd-C wurde über Celite abfiltriert. Das Filtrat wurde anschließend am Membranpumpenvakuum vom Tetrahydrofuran befreit und der ölige Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 166 mg (0.25 mmol, 96 %) eines gelben Öls isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.33-1.55 (m, 13H, H-3, H-5, H-10), 1.77-1.80 (m, 6H, NH₂, H-4, H-14), 3.09-2.12 (m, 2H, H-6), 3.29-3.38 (m, 3H, H-2, H-13), 3.52-3.64 (m, 6H, H-15, H-16, H-17), 4.71 (bs, 1H, H-7), 7.54 (bs, 1H, H-12). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 23.1, 28.6, 29.4, 30.0, 30.5, 34.5, 34.9, 37.3, 40.3, 55.3, 62.6, 69.9, 70.4, 70.7, 79.2, 156.3, 175.3. **HRMS (ESI)**: $[M + H]^+ = m/z$ für C₃₂H₆₅N₆O₉: ber.: 677.4808; gef.: 677.4797; $[M + Na]^+ = m/z$ für C₃₂H₆₄N₆NaO₉: ber.: 699.4627; gef.: 699.4616.

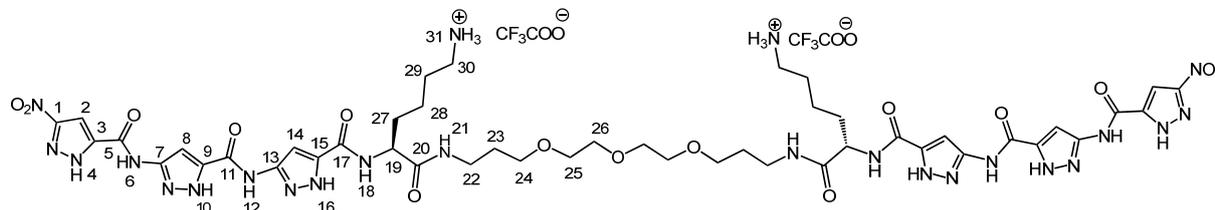
Darstellung von *tert*-Butyl-(10*S*,28*S*)-10,28-bis(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-2,2-dimethyl-4,11,27-trioxo-16,19,22-trioxa-5,12,26-triazadotriacontan-32-ylcarbammat **87**



Unter Argon wurden 26.0 mg (85.2 μmol , 2.50 eq) Trimer(PMB)-OH **27** in 20 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt. Zu dieser Suspension wurden 46.0 mg, 50.0 μL (0.46 mmol, 12.0 eq) *N*-Methylmorpholin, 59.0 mg (114 μmol , 3.00 eq) PyBOP und 26.0 mg (38.1 μmol , 1.00 eq) Verbindung **86** zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Tage lang bei 40°C gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck konnte der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (30:1) gereinigt werden, um 42.0 mg (19.9 μmol , 52 %) eines farblosen Feststoffes zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 333 K): δ [ppm] = 1.33-1.42 (m, 13H, H-36, H-37, H-42), 1.75-1.93 (m, 4H, H-35, H-46), 3.00-3.05 (m, 2H, H-38), 3.32-3.49 (m, 2H, H-45), 3.54-3.65 (m, 6H, H-(47-49)), 3.68-3.71 (3s, 9H, H-9, H-20, H-31), 4.47-4.51 (m, 1H, H-34), 4.67 (bs, 1H, H-39), 5.39-5.87 (m, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.71-6.80 (m, 6H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 6.90 (bs, 2H, H-44, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.10-7.17 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.25 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.33-7.53 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.49-7.53 (bs, 2H, H-33, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 8.48 (s, 1H, NH_{Amid}), 9.73 (s, 1H, NH_{Amid}). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 23.4, 28.8, 29.4, 30.1, 32.7, 38.7, 42.7, 54.0, 54.6, 55.6, 56.4, 70.1, 70.6, 70.8, 98.9, 99.9, 104.7, 114.4, 114.5, 114.6, 127.9, 129.4, 129.5, 129.6, 130.3, 135.3, 135.8, 136.8, 145.2, 145.7, 154.6, 156.2, 156.5, 159.7, 159.8, 160.1, 160.2, 172.2. **Rf**: 0.20 in Dichlormethan/Methanol (30:1). **Schmp.**: 157.3 °C. **HRMS (ESI)**: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{104}\text{H}_{126}\text{N}_{24}\text{NaO}_{25}$: ber.: 2134.9248; gef.: 2134.9258.

Darstellung von *N,N'*-((5*S*,23*S*)-1,27-Diamino-6,22-dioxo-11,14,17-trioxa-7,21-diaza-heptacosan-5,23-diyl)-bis(3-(3-(3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamid) 84



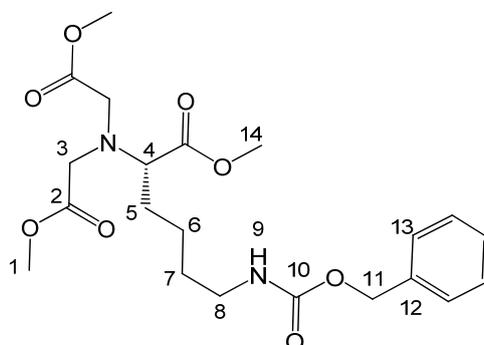
84

40.0 mg (18.9 μmol , 1.00 eq) Verbindung **87** wurden unter Argon in Trifluoressigsäure (3 mL) gelöst und unter Rühren für 5 Stunden auf 70 °C erhitzt. Die lila bis braun gefärbte Lösung wurde langsam mit eiskaltem Ether versetzt. Der hierbei ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, die Mutterlauge entfernt und der farblose Feststoff dreimal mit Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 26.0 mg (18.3 μmol , 97 %) eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.41-1.48 (m, 2H, H-28), 1.62-1.88 (m, 6H, H-23, H-27, H-29), 2.84 (t, 2H, H-30, $^3J\{\text{H-30, H-29} = 7.59 \text{ Hz}\}$), 3.18-3.22 (m, 2H, H-22), 3.46-3.59 (m, 6H, H-(24-26)), 4.44-4.48 (m, 1H, H-19), 6.96 (bs, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.21 (bs, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.54-7.56 (bs, 1H, H-21), 7.77 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.88 (bs, 1H, H-18), 10.45 (bs, 1H, NH_{Amid}), 10.98 (bs, 1H, NH_{Amid}). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 22.6, 26.7, 27.1, 29.3, 31.2, 35.9, 36.8, 38.7, 52.6, 67.3, 68.0, 69.4, 69.5, 69.6, 69.7, 102.3, 138.6, 155.1, 155.9, 157.8, 158.1, 171.3. **Schmp.:** 200 °C. **HRMS (ESI):** $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{46}\text{H}_{63}\text{N}_{24}\text{O}_{15}$: ber.: 1191.4899; gef.: 1191.4879; $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{46}\text{H}_{62}\text{N}_{24}\text{NaO}_{15}$: ber.: 1213.4719; gef.: 1213.4693.

6.5 Synthese von Trimer-TEG-NTA 66

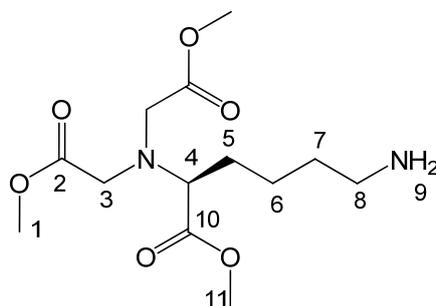
Darstellung von (*S*)-Dimethyl-2,2'-(6-(benzyloxycarbonylamino)-1-methoxy-1-oxohexan-2-ylazanediy)l)-diacetat 59



59

1.00 g (3.40 mmol, 1.00 eq) H_2N -(*S*)-Lys(*Z*)-OMe **58** wurde in 25 mL Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 5.20 g (34.0 mmol, 10.0 eq) Methylbromacetat und 9.40 g (68.0 mmol, 20.0 eq) Kaliumcarbonat wurde die erhaltene Suspension unter Rühren für 18 Stunden auf 85 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Gemisch über Celite filtriert und mit Acetonitril gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (2:1) gereinigt. Es konnten 560 mg (1.28 mmol, 38 %) eines farblosen Öls isoliert werden.

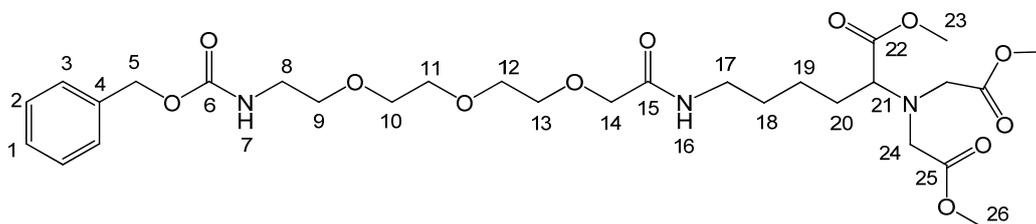
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.32-1.57 (m, 4H, H-6, H-7), 1.64-1.73 (m, 2H, H-5), 3.16-3.22 (m, 2H, H-8), 3.41 (t, 1H, H-4, $^3\text{J}\{\text{H-4}, \text{H-5} = 7.57 \text{ Hz}\}$), 3.62 (s, 4H, H-3), 3.66-3.67 (2s, 9H, H-1, H-14), 4.90 (bs, 1H, H-9), 5.09 (s, 2H, H-11), 7.30-7.37 (m, 5H, H-13). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 23.1 (C-6), 29.5 (C-7), 30.1 (C-5), 40.9 (C-8), 51.6 (C-3), 51.8 (C-1/15), 52.6 (C-1/15), 64.7 (C-4), 66.7 (C-11), 128.1 (C-13), 128.2 (C-13), 128.6 (C-13), 136.9 (C-12), 156.9 (C-10), 171.9 (C-2), 173.2 (C-14). **Rf**: 0.22 in Cyclohexan/Ethylacetat (2:1). **HRMS (ESI)**: $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_8$: ber.: 439.2075; gef.: 439.2100; $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{NaO}_8$: ber.: 461.1894; gef.: 461.1923.

Darstellung von (S)-2,2'-(6-Amino-1-methoxy-1-oxohexan-2-yl-azanediy)l)-diessigsäure-ethylester 60**60**

500 mg (1.14 mmol, 1.00 eq) Verbindung **59** wurden in 70 mL Methanol gelöst, mit 40.0 mg Pd/C (10 %) versetzt und bis zum vollständigen Umsatz unter Wasserstoffatmosphäre gerührt (DC-Kontrolle). Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 296 mg (0.98 mmol, 86 %) eines farblosen Öls isoliert werden, das sofort weiter umgesetzt wurde. Das aufgenommene ^1H -NMR-Spektrum wies sehr breite Signale auf, so dass eine Auswertung nicht möglich war.

HRMS (ESI): $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6$: ber.: 305.1707; gef.: 305.1727; $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}_6$: ber.: 327.1527; gef.: 327.1546.

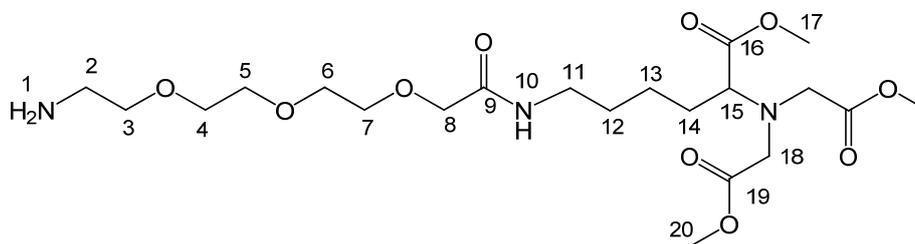
Darstellung von 6-(2-(2-(2-(2-Benzoyloxycarbonylamino-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-acetyl-amino)-2-(bis-methoxycarbonylmethyl-amino)-hexansäuremethylester **61**



61

Unter Argon wurden 246 mg (0.72 μmol , 1.00 eq) Z-TEG-OH **29** in einem Lösungsmittelgemisch aus absolutem Dichlormethan und DMF 3:1 (24 mL) vorgelegt. Die erhaltene Lösung wurde mit 368 mg (2.17 μmol , 3.00 eq), 300 mg (0.72 μmol , 1.00 eq) HCTU und 253 μL (2.17 μmol , 3.00 eq) Lutidin versetzt und 10 Minuten lang unter Eiskühlung voraktiviert. Anschließend wurden 220 mg (0.72 μmol , 1.00 eq) Amino-NTA **60** in 3 mL des gleichen Lösungsmittelgemisches gelöst und zum Reaktionsgemisch gegeben. Die erhaltene Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde mit je 50 mL 1 M HCl, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (40:1) gereinigt um 50 mg (0.24 μmol , 33 %) eines farblosen Öls erhalten.

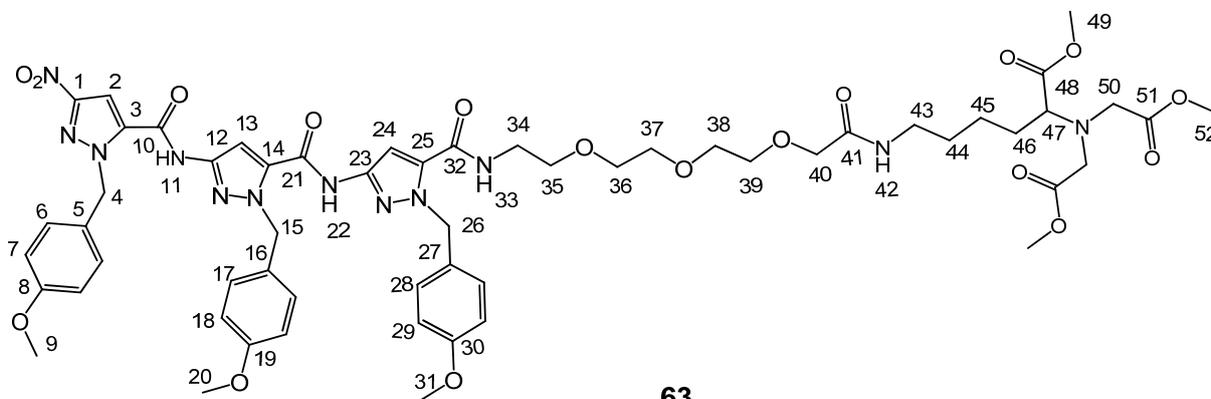
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.29 (m, 4H, H-18, H-19), 1.61-1.74 (m, 2H, H-20), 3.22-3.27 (m, 2H, H-17), 3.36-3.39 (m, 3H, H-8, H-21), 3.54-3.56 (m, 2H, H-9), 3.61-3.63 (m, 12H, H-(10-13), H-24), 3.67 (s, 9H, H-26), 3.96 (s, 2H, H-14), 5.08 (s, 2H, H-5), 5.44 (bs, 1H, H-7), 6.96 (bs, 1H, H-16), 7.28-7.34 (m, 5H, H-(1-3)). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 23.3, 29.3, 30.2, 38.8, 40.9, 51.5, 51.8, 52.5, 64.8, 66.8, 70.1, 70.3, 70.4, 70.5, 70.5, 128.2, 128.3, 170.0, 171.9, 173.1. **R_f** : 0.14 Dichlormethan/Methanol (40:1). **HRMS (ESI)**: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{NaO}_{12}$: ber.: 650.2895; gef.: 650.2978.

Darstellung von 6-(2-(2-(2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-acetylamino)-2-(bis-methoxycarbonyl-methyl-amino)-hexansäuremethylester 62**62**

110 mg (0.18 mmol) Z-TEG-NTA-OMe **61** wurden in 50 mL Methanol gelöst, mit 20.0 mg Pd-C (10 %) versetzt und bis zum vollständigen Umsatz unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach dem Abfiltrieren von Pd-C wurde das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 87.0 mg (0.18 mmol, 87 %) eines farblosen Öls isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.32-1.61 (m, 4H, H-12, H-13), 1.66-1.72 (m, 2H, H-14), 3.19-3.21 (m, 2H, H-2), 3.25-3.29 (m, 2H, H-11), 3.44 (t, 1H, H-15), 3.61 (s, 4H, H-18), 3.67-3.73 (m, 17H, H-17, H-20, H-(4-7)), 3.86-3.88 (m, 2H, H-3), 4.09 (s, 2H, H-8), 8.19 (bs, 2H, H-1). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 23.2 (C-13), 28.8 (C-12), 30.0 (C-14), 38.9 (C-11), 40.0 (C-2), 51.7 (C-17/20), 51.9 (C-17/20), 52.8 (C-18), 64.6 (C-15), 66.8 (C-3), 70.1-70.6 (C-(4-8)), 170.5 (C-9), 172.2 (C-19), 173.3 (C-16). **HRMS (ESI)**: $[M + H]^+ = m/z$ für C₂₁H₄₀N₃O₁₀: ber.: 494.2708; gef.: 494.2736; $[M + Na]^+ = m/z$ für C₂₁H₃₉N₃NaO₁₀: 516.2528; gef.: 516.2554.

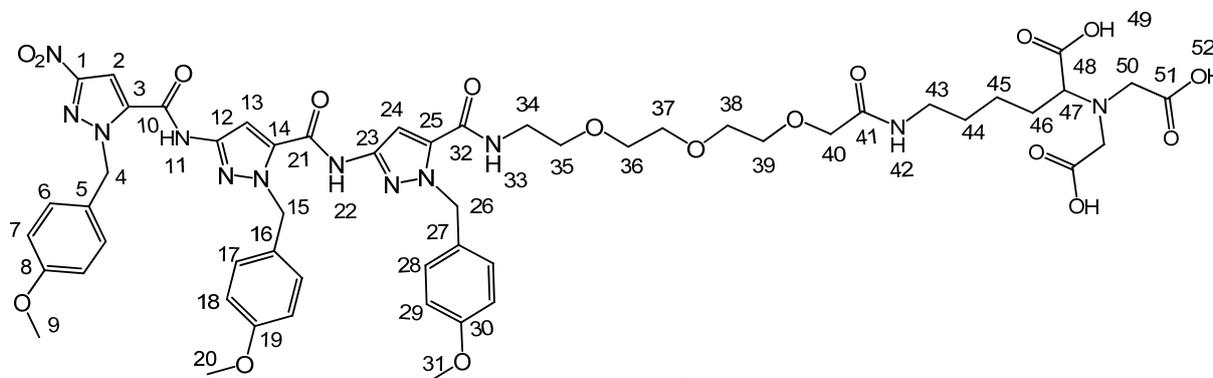
Darstellung von 20-(2-Methoxy-2-oxoethyl)-1-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-yl)-19-(methoxycarbonyl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2,14,20-triazadocosan-22-carbonsäuremethylester **63**

**63**

Unter Argon wurden 50.0 mg (67.8 μmol , 1.00 eq) Trimer(PMB)-OH **27** in 20 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt. Zu der auf 0 °C gekühlten Suspension wurden anschließend in Intervallen von 10 Minuten 24.0 mg (204 μmol , 3.00 eq) HOBt, 39.0 mg (204 μmol , 3.00 eq) EDC*HCl und 34.0 mg (67.8 μmol , 1.80 eq) H₂N-TEG-NTA-OMe **62** zugegeben und zwei Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde mit jeweils 20 mL 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Membranpumpenvakuum entfernt. Das gelbe Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 40:1 gereinigt um 39.0 mg (32.2 μmol , 48 %) eines farblosen Feststoffes zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.25-1.65 (m, 6H, H-(44-46)), 3.15-3.19 (m, 2H, H-43), 3.34 (t, 2H, H-47, ³J{H-47, H-46} = 7.60 Hz), 3.57-3.68 (m, 25H, H-(34-39), H-50, H-49, H-52), 3.74-3.76 (3s, 9H, H-9, H-20, H-31), 3.99 (s, 2H, H-40), 5.60-5.80 (3s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.77-6.83 (m, 6H, CH_{Aromat}), 6.88 (t, 1H, H-42, ³J{H-42, H-43} = 6.10 Hz), 7.07 (t, 1H, H-33, ³J{H-33, H-34} = 5.63 Hz), 7.14 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.20-7.27 (m, 5H, CH_{Pyrazol}, CH_{Aromat}), 7.37-7.39 (m, 3H, CH_{Pyrazol}, CH_{Aromat}), 8.66 (s, 1H, NH_{Amid}), 9.04 (s, 1H, NH_{Amid}).
¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 23.4, 29.3, 30.2, 38.8, 39.6, 51.6, 51.8, 52.5, 53.9, 54.0, 55.4, 56.1, 64.8, 69.7, 70.4, 70.5, 70.6, 70.7, 70.8, 98.3, 99.3, 103.9, 114.0, 114.1, 114.3, 127.3, 129.0, 129.4, 129.5, 129.6, 130.2, 134.9, 135.8, 136.4, 144.9, 154.2, 155.3, 156.5, 159.3, 159.5, 159.7, 159.9, 170.2, 172.1, 173.2. **Schmp.:** 57 °C, **R_f:** 0.16 in Dichlormethan/Methanol (40:1). **HRMS (ESI):** [M + Na]⁺ = m/z für C₅₇H₇₀N₁₂NaO₁₈: ber.: 1233.4823; gef.: 1233.4838.

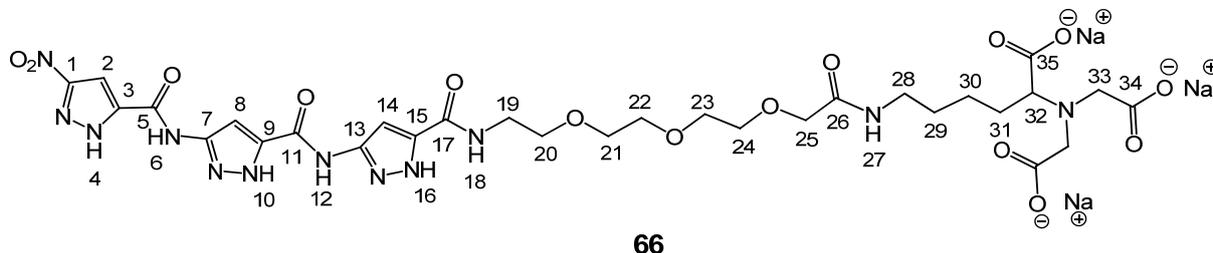
Darstellung von 19-Carboxy-20-(carboxymethyl)-1-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2,14,20-triazadocosan-22-carbonsäure **64**

**64**

39.0 mg (32.2 μmol , 1.00 eq) Trimer(PMB)-TEG-NTA-OMe **63** wurden in 20 mL THF-Methanol-Gemisch (1:1) gelöst, mit 2 mL dest. Wasser und 15.0 mg (630 μmol , 20.0 eq) Lithiumhydroxid versetzt. Das Reaktionsgemisch bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 10 mL Wasser aufgenommen und die Lösung mit 1 M Salzsäure angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit 1 M Salzsäure gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 20.0 mg (17.1 μmol , 53 %) eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 1.23-1.64 (m, 6H, H-(44-46)), 3.05-3.09 (m, 2H, H-43), 3.32 (t, 2H, H-47, $^3\text{J}\{\text{H-47}, \text{H-46} = 7.23 \text{ Hz}\}$), 3.37-3.56 (m, 16H, H-(34-39), H-50), 3.70-3.71 (2s, 9H, H-9, H-20, H-31), 3.84 (s, 2H, H-40), 5.61-5.81 (3s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.86-6.91 (m, 6H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.17-7.20 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.27-7.28 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 7.33 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.63 (bs, 1H, NH_{Amid}), 7.71 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.98 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 8.70-8.72 (bs, 1H, NH_{Amid}), 11.34 (s, 1H, NH_{Amid}), 11.50 (s, 1H, NH_{Amid}). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 23.0, 28.9, 29.3, 37.9, 38.7, 52.8, 53.2, 53.4, 54.9, 55.0, 55.1, 55.2, 64.4, 68.6, 69.6, 69.7, 69.9, 70.2, 99.6, 100.9, 105.1, 113.8, 113.9, 114.0, 127.9, 128.8, 129.0, 129.4, 129.6, 129.8, 134.4, 134.9, 136.8, 144.9, 145.2, 153.6, 155.5, 156.9, 158.6, 158.7, 159.1, 159.2, 169.0, 173.3, 174.0. **Schmp.:** 204 °C. **HRMS (ESI):** $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{54}\text{H}_{65}\text{N}_{12}\text{O}_{18}$: ber.: 1169.4452; gef.: 1169.4534, $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{54}\text{H}_{64}\text{N}_{12}\text{NaO}_{18}$: ber.: 1191.4418; gef.: 1191.4354.

Darstellung von Natrium-19-carboxylato-20-(carboxylatomethyl)-1-(3-(3-(3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2,14,20-triazadocosan-22-carboxylat **66**

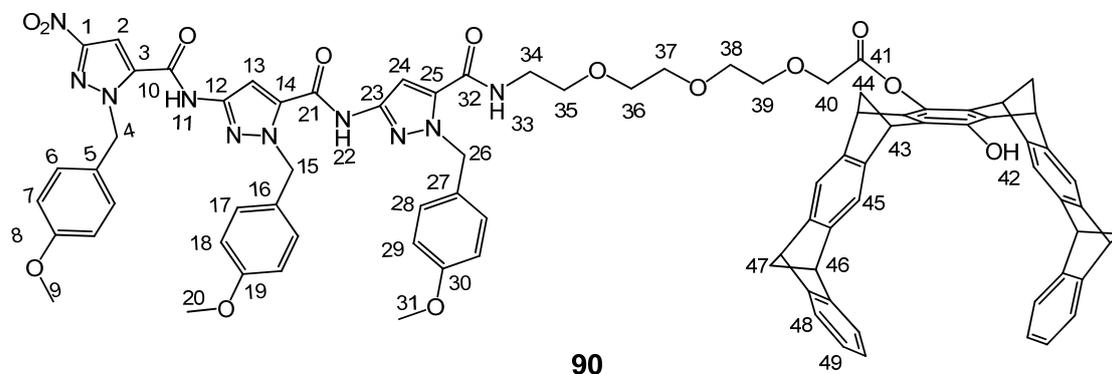


23.4 mg (20.0 μmol , 1.00 eq) Verbindung **64** wurden in 2 ml Trifluoressigsäure gelöst und für 5 h auf 70 °C erhitzt. Die lila gefärbte Lösung wurde abgekühlt und langsam mit eiskaltem Diethylether versetzt. Der hierbei ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, die Mutterlauge entfernt und der farblose Feststoff dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Der braun gefärbte Feststoff wurde mit 2.70 ml dest. Wasser und 300 μL (60.0 μmol) 200 mM Natriumhydroxidlösung versetzt, 2 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt und gefriergetrocknet. Es konnten 17.0 mg (19.4 μmol , 97 %) eines gelben Feststoffes isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10)): δ [ppm] = 1.35-1.81 (m, 6H, H-(29-31)), 3.20 (bs, 2H, H-28), 3.60-3.72 (m, 17H, H-(19-24), H-32, H-33), 4.01 (s, 2H, H-25), 6.82 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 6.94 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.44 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 8.07 (bs, 1H, NH_{Amid}). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10)): δ [ppm] = 23.9, 27.4, 28.5, 38.8, 39.1, 55.9, 68.4, 68.9, 69.6, 69.7, 69.8, 70.4, 96.4, 96.6, 104.0, 141.9, 143.5, 144.3, 146.1, 157.8, 160.7, 162.3, 162.7, 172.3. **Schmp.:** 244 °C. **HRMS (ESI):** $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-} = m/z$ für $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_{12}\text{O}_{15}$: ber.: 403.1284; gef.: 403.1293; $[\text{M} - 3\text{H} + \text{K}]^{2-} = m/z$ für $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{KN}_{12}\text{NaO}_{15}$: ber.: 422.1064; gef.: 422.1028; $[\text{M} - \text{H}]^- = m/z$ für $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_{12}\text{O}_{15}$: ber.: 807.2652; gef.: 807.2624.

6.6 Kovalente Verknüpfung des Trimers 16 mit der Pinzette 89

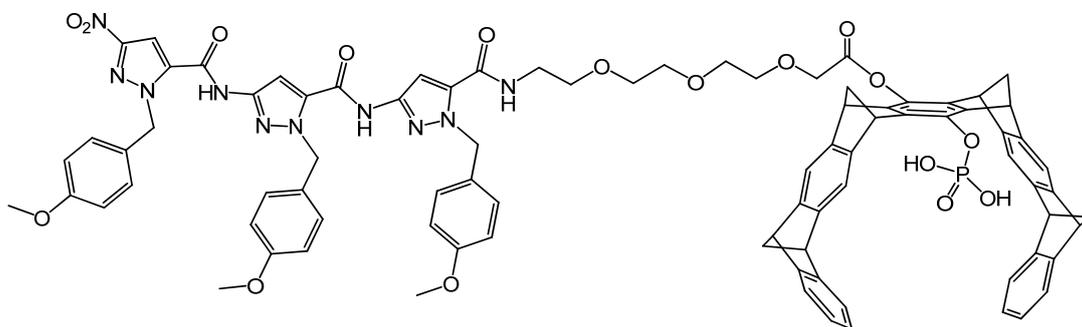
Darstellung von Trimer(PMB)-TEG-Pinzette-OH 90



Unter Argon wurden 196 mg (212 μmol , 0.80 eq) Trimer-TEG-Säure **40** in 90 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt. Die erhaltene Suspension wurde mit 84.0 μL (80.4 mg, 795 μmol , 3.00 eq) *N*-Methylmorpholin, 152 mg (291 μmol , 1.10 eq) PyBOP und 150 mg (0.27 μmol , 1.00 eq) Dihydroxypinzette **89** versetzt und für 48 Stunden unter Rühren auf 40 °C erhitzt. Nach dem Entfernen des Dichlormethans konnte der zurückbleibende Feststoff säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat/Cyclohexan (1:2) gereinigt werden, um 140 mg (95.0 μmol , 45 %) der monosubstituierten Pinzette (farbloser Feststoff) zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.11 (bs, 4H, $\text{CH}_2\text{-TEG}$), 2.35-2.48 (m, 8H, H-44, H-47), 3.16 (bs, 2H, $\text{CH}_2\text{-TEG}$), 3.54-3.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-TEG}$), 3.66 (s, 3H, H-9/20/31), 3.78-3.80 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{-TEG}$, H-9/20/31), 3.92-3.93 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-TEG}$), 3.98 (bs, 2H, H-43/46), 4.04 (bs, 4H, H-43/46) 4.26 (bs, 2H, H-43/46), 4.45 (s, 2H, H-40), 5.35 (bs, 1H, H-42), 5.72-5.84 (2s, 6H, H-4, H-15, H-26), 6.80-7.10 (m, 18H, $\text{CH}_{\text{Aromat(PMB)}}$, $\text{CH}_{\text{Aromat(Pinzette)}}$), 7.19 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.25 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.29-7.45 (m, 8H, H-33, C-H $_{\text{Pyrazol}}$, $\text{CH}_{\text{Aromat(PMB)}}$, $\text{CH}_{\text{Aromat(Pinzette)}}$), 8.32 (s, 1H, NH_{Amid}), 8.45 (s, 1H, NH_{Amid}). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 27.4, 30.0, 47.8, 49.1, 51.5, 51.6, 54.3, 54.6, 55.5, 55.6, 55.7, 56.6, 68.1, 69.0, 69.2, 69.9, 70.3, 70.7, 70.8, 72.2, 98.7, 99.1, 103.7, 116.7, 117.2, 121.7, 122.0, 125.1, 125.2, 127.5, 129.1, 19.8, 129.9, 130.6, 134.0, 135.1, 135.5, 136.1, 136.5, 137.9, 141.0, 143.0, 144.8, 145.1, 147.1, 147.4, 147.7, 147.9, 151.0, 151.1, 154.6, 155.3, 156.7, 159.2, 159.9, 160.3, 169.7. **Schmp.:** 180.7 °C. **HRMS (ESI):** $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{86}\text{H}_{77}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$: ber.: 1473.5615; gef.: 1473.5580; $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{86}\text{H}_{76}\text{N}_{10}\text{NaO}_{14}$: ber.: 1495.5435; gef.: 1495.5417.

Phosphorylierung von Trimer(PMB)-TEG-Pinzette-OH **90** zu Trimer(PMB)-TEG-Pinzette-OPO₃H₂ **92**

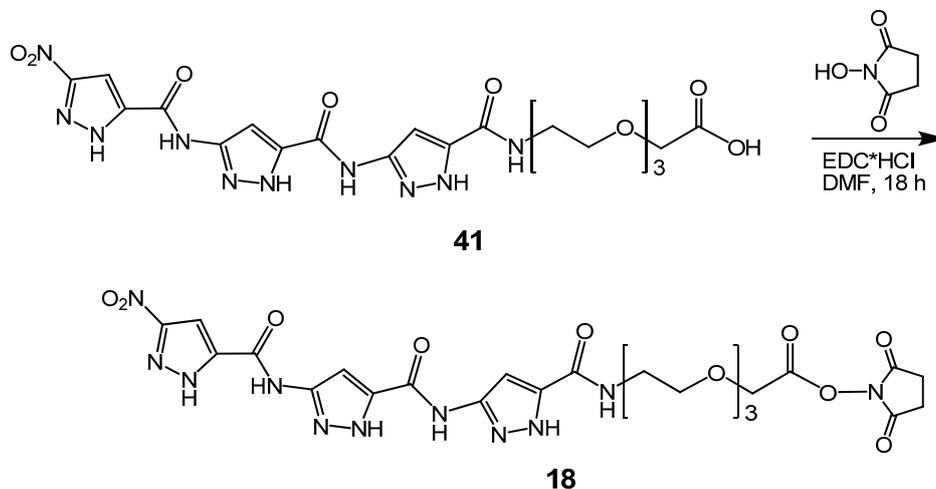


Unter Argon wurden 30.0 mg (20.4 μmol , 1.00 eq) Trimer(PMB)-TEG-Pinzette-OH **90** in absolutem Tetrahydrofuran gelöst. Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung wurden 43.0 μL (71.8 mg, 469 μmol , 23.0 eq) Phosphoroxchlorid und 10 Minuten später 17.0 μL (12.4 mg, 122 μmol , 6.00 eq) Triethylamin gegeben. Diese Reaktionsmischung wurde eine Stunde lang bei 0 °C gerührt und anschließend über eine D4-Fritte filtriert. Das Filtrat wurde schnell im Membranpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der klebrige Rückstand wurde mit wenig dest. Wasser aufgenommen und im Ultraschallbad behandelt. Der farblose Feststoff wurde über eine D4-Fritte abfiltriert und mehrmals mit dest. Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Feststoff mit einem THF/H₂O-Gemisch in einen Rundkolben überführt und weitere 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen von THF fiel ein farbloser Niederschlag aus. Dieser wurde abzentrifugiert, mit dest. Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 32.0 mg (20.4 μmol , quant.) an einem farblosen Feststoff isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.31-2.44 (m, 8H), 3.12 (bs, 2H), 3.51 (bs, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.65-3.72 (m, 8H), 3.78-3.90 (m, 2H), 3.95 (s, 4H), 4.01 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 5.59 (s, 1H), 5.70 (s, 4H), 5.77 (s, 2H), 6.77-6.91 (m, 10H), 7.01-7.07 (m, 8H), 7.18 (s, 1H), 7.31-7.39 (m, 10H), 8.64 (s, 1H), 8.74 (s, 1H). **¹³P-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.00. **HRMS (ESI)**: $[M - H]^- = m/z$ für C₈₆H₇₆N₁₀O₁₇P: ber.: 1552.5165; gef.: 1552.5175.

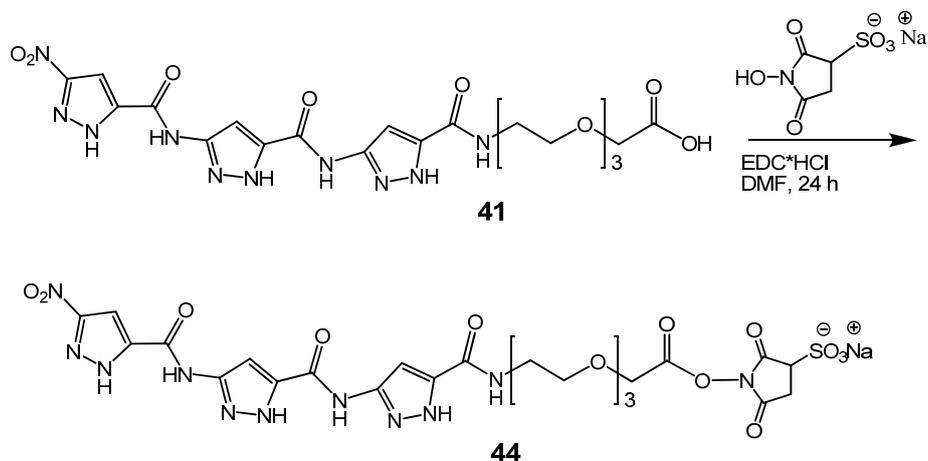
6.7 Weitere Modifizierungen des Trimers 16

Aktivierung von Trimer-TEG-OH **41** mit *N*-Hydroxysuccinimid



Unter Argon wurden 8.00 mg (14.0 μmol , 1.00 eq) Trimer-TEG-OH **41** in 1.30 mL DMF gelöst. Nach der Zugabe von 10.7 mg (56.0 μmol , 4.00 eq) EDC·HCl und 6.40 mg (56.0 μmol , 4.00 eq) *N*-Hydroxysuccinimid wurde die Reaktionsmischung 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. DMF wurde anschließend *in vacuo* abkondensiert, der Rückstand mit 3 mL dest. Wasser versetzt, zentrifugiert und erneut mit 3 mL dest. Wasser gewaschen. Der beige Feststoff wurde im Hochvakuum getrocknet. Ausbeute wurde nicht bestimmt. Beim erhaltenen Feststoff handelte es sich um ein Gemisch aus Edukt und Produkt.

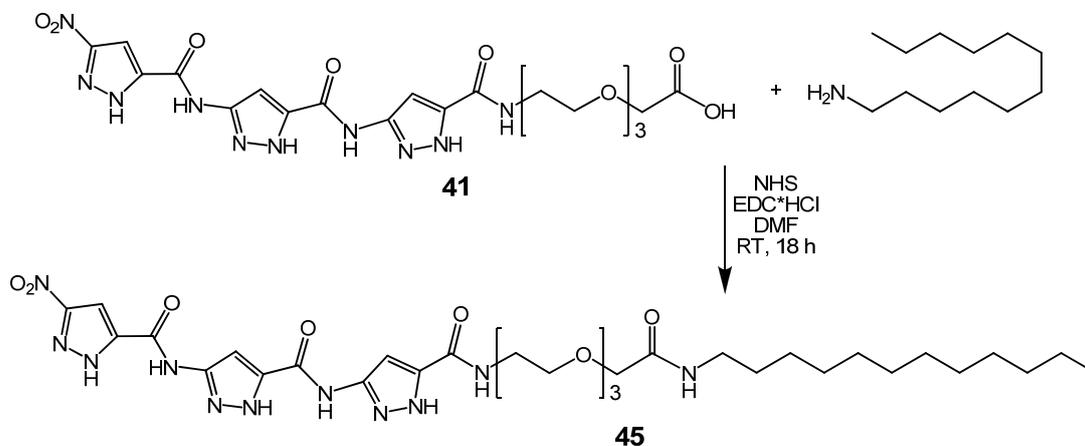
Aktivierung von Trimer-TEG-OH **41** mit *N*-Hydroxysulfosuccinimid



Unter Argon wurden 10.0 mg (17.7 μmol , 1.00 eq) Trimer-TEG-OH **41** in 1.00 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von 10.0 mg (5.31 μmol , 3.00 eq) EDC·HCl und 12.0 mg (5.31 μmol , 3.00 eq) *N*-Hydroxysulfosuccinimid wurde das Reaktionsgemisch 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. DMF wurde *in vacuo* abkondensiert. Der Rückstand wurde zwei Mal mit jeweils 3 mL Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die Analyse des Rohproduktes mittels Massenspektrometrie ergab, dass der gewünschte Aktivester **44** gebildet wurde. Um das Produkt zu isolieren wurde der Feststoff mit Wasser gewaschen. Der Aktivester **44** konnte dann weder im Rückstand noch in der wässrigen Phase mittels Massenspektrometrie detektiert werden.

HRMS (ESI): $[M + H]^+ = m/z$ für $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_{11}\text{NaO}_{15}\text{S}$: ber.: 764.1301; gef.: 764.2832;
 $[M - \text{Na} + 2H]^+ = m/z$ für $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_{11}\text{O}_{15}\text{S}$: ber.: 742.1482; gef.: 742.3016.

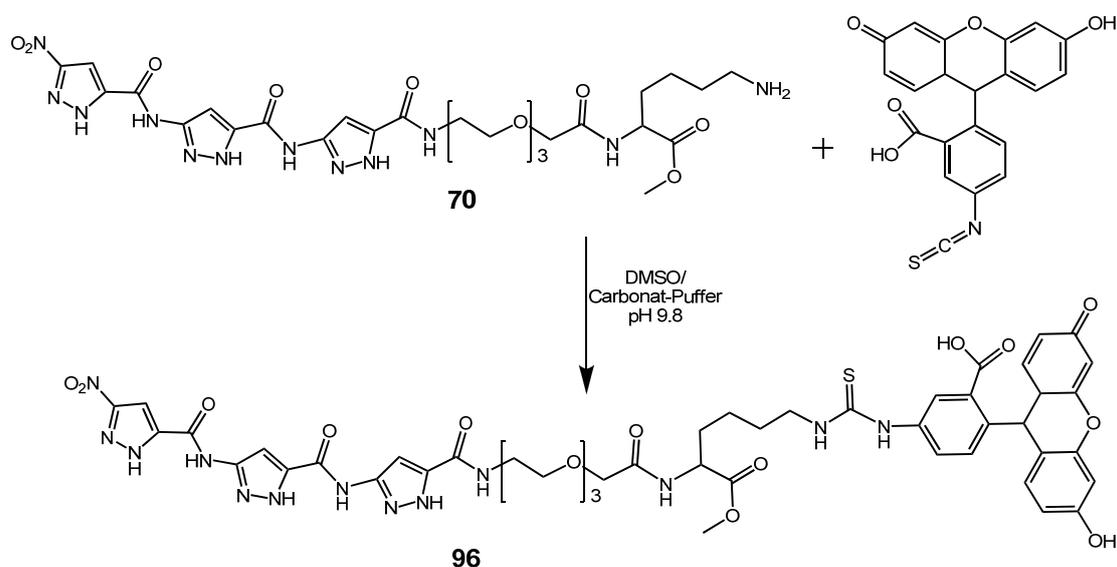
Darstellung von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-N-(11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatetracosyl)-1H-pyrazol-5-carboxamid **45**



5.00 mg (8.86 μmol , 1.00 eq) Trimer-TEG-OH **41** wurden in 5 mL DMF gelöst und mit 1.20 mg (10.6 μmol , 1.20 eq) *N*-Hydroxysuccinimid und 2.03 mg (10.6 μmol , 1.20 eq) 4 Stunden lang unter Rühren bei Raumtemperatur voraktiviert. Danach wurden 2.00 mg (10.6 μmol , 1.20 eq) Dodecylamin zugegeben und die gesamte Reaktionsmischung 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Abkondensieren von DMF *in vacuo* wurde der Rückstand mit 2 mL dest. Wasser versetzt, im Ultraschallbad behandelt und abzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Trocknung des erhaltenen Feststoffes im Hochvakuum. Ausbeute wurde nicht bestimmt.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 0.82-0.87 (m, 3H), 1.21-1.23 (m, 18H), 1.40 (bs, 2H), 3.05-3.09 (m, 2H), 3.54-3.56 (m, 10H), 3.85 (s, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.59-7.63 (m, 2H); 7.91 (bs, 1H), 8.64 (s, 1H), 11.10 (s, 1H), 11.34 (s, 1H), 13.21 (s, 1H), 13.44 (s, 1H), 14.98 (bs, 1H). **HRMS (ESI)**: $[M + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{N}_{11}\text{NaO}_9$; ber.: 754.3607; gef.: 754.3639.

Einführung der Fluoreszenzsonde Fluoresceinisothiocyanat unter Bildung von **96**



Zunächst wurde eine Lösung aus 1.22 mg FITC in 200 μL DMSO hergestellt. 77.0 μL (1.22 μmol , 1.00 eq) dieser FITC-Lösung wurden einem Gemisch aus 1.00 mg (1.22 μmol , 1.00 eq) Trimer-TEG-Lys-OMe **70** in 200 μL DMSO zugesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 200 μL Carbonat-Puffer (pH 9.8) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Untersuchung des gefriergetrockneten roten Feststoffes erfolgte mittels ESI-TOF-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , pH = 9.8): δ [ppm] = 1.30-1.39 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{Lys}}$), 1.54-1.58 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{Lys}}$), 1.71-1.78 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{Lys}}$), 2.99 (s, 2H, $\text{CH}_{2\text{Lys}}$), 3.50-3.63 (m, 12H, $\text{CH}_{2\text{TEG}}$), 3.94 (s, 2H, $\text{CH}_{2\text{TEG}}$), 4.32 (bs, 1H), 5.93 (s, 2H), 6.03 (d, 2H), 6.65 (d, 2H), 6.81 (bs, 1H), 6.96 (d, 2H), 7.16 (bs, 1H), 7.70 (bs, 1H), 8.03-8.31 (m, 3H), 10.13 (bs, 1H). **HRMS (ESI)**: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{48}\text{H}_{49}\text{N}_{13}\text{NaO}_{16}\text{S}$: ber.: 1118.3033; gef.: 118.3123; $[\text{M} + 2\text{Na} - \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{48}\text{H}_{48}\text{N}_{13}\text{Na}_2\text{O}_{16}\text{S}$: ber.: 1140.2853; gef.: 1140.2946; $[\text{M} + 3\text{Na} - 2\text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{48}\text{H}_{47}\text{N}_{13}\text{Na}_3\text{O}_{16}\text{S}$: ber.: 1162.2672; gef.: 1162.2721; $[\text{M} - \text{H}]^- = m/z$ für $\text{C}_{48}\text{H}_{48}\text{N}_{13}\text{O}_{16}\text{S}$: ber.: 1094.3068; gef.: 1094.3094; $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-} = m/z$ für $\text{C}_{48}\text{H}_{47}\text{N}_{13}\text{O}_{16}\text{S}$: ber.: 546.6498; gef.: 546.6495.

Darstellung des [(W226-scFv)₃(Trim-TEG-NTA)Ni]⁺-Komplexes

Zur Herstellung eines 1:3-Komplexes wurde die 10 µM W226-scFv-Lösung im flüchtigen 0.5 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 8.0) mit äquimolaren Mengen an Nickel(II)-Sulfat und dreifachem Überschuss an Trimer-TEG-NTA **66** versetzt. Um den Komplex nachzuweisen, wurden die Proben durch *Uwe Linne* (Philipps-Universität Marburg) mit Hilfe der Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) im positiven ESI-TOF-Modus untersucht. Während das reine Antikörperfragment mit einer Masse von 31.2 kDa nachweisbar war, konnte der Komplex nicht nachgewiesen werden.

6.8 Manuelle Festphasensynthese von Peptiden

Allgemeine Vorschrift I

Zur Darstellung der Peptide mittels manueller Fmoc-Festphasenpeptidsynthese wurden *Wang*-Harze mit jeweils einer vorinstallierten Fmoc-geschützten Aminosäure mit ggf. geschützter Seitenkette verwendet. Die Kupplung der kommerziell erhältlichen Fmoc-Aminosäuren erfolgte mit dem Kupplungsreagenz HBTU bzw. HCTU in Gegenwart von DIEA. Dabei wurden 8.00 eq Fmoc-Aminosäure mit ggf. geschützter Seitenkette, 7.62 eq HBTU bzw. HCTU und 16.0 eq DIEA pro Kupplungsschritt verwendet. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde eine 20%ige Piperidinlösung in DMF eingesetzt. Die Vollständigkeit der einzelnen Kupplungsschritte wurde mit Kaiser-, NF31-Test und teilweise mit Bromphenolblau-Test kontrolliert. Dazu wurden einige Polymerkugeln entnommen, gründlich mit DMF und DCM gewaschen und mit der jeweiligen Test-Lösung versetzt. Die Durchführung der Kaiser- und NF31-Tests erfolge 10 Minuten lang bei 80 °C im Thermomixer. Die Kontrolle mittels Bromphenolblau-Test verlief dagegen bei Raumtemperatur. Bei unvollständiger Umsetzung wurde der jeweilige Arbeitsschritt wiederholt und erneut kontrolliert. In der nachfolgenden Tabelle 6.1 sind die einzelnen Arbeitsschritte eines Entschützung-Kupplungszyklus aufgelistet. Damit eine vollständige Umsetzung bzw. Entschützung gewährleistet ist, musste vor Beginn der eigentlichen Festphasensynthese das Harz 80 Minuten lang in DMF gequollen werden.

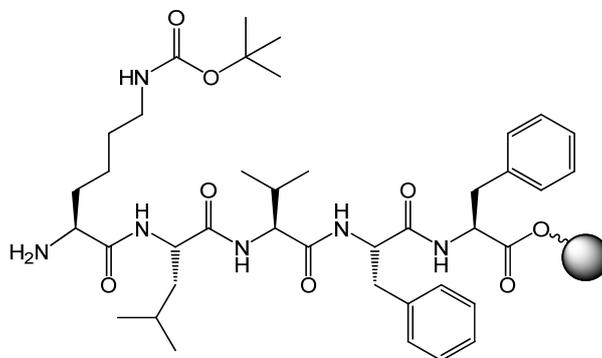
Tabelle 6.1: Arbeitsschritte eines Entschützung-Kupplungszyklus

Operation	Reagenzien	Zeit [min]
1. Entschützung	Piperidin in DMF (20%)	3
2. Entschützung	Piperidin in DMF (20%)	7
3. Kaiser-, NF31-, Bromphenolblautest	Test-Lösung	10
4. Kupplung	Fmoc-Aminosäure-OH	30
5. Kaiser-, NF31-, Bromphenolblautest	Test-Lösung	10

Nach jedem Operationsschritt wurde die Lösung vom Harz entfernt und das Harz gründlich mit DMF gewaschen. Insbesondere nach der Entschützung musste darauf geachtet werden, dass keine Spuren von Piperidin mehr vorhanden sind. Je nach Peptidlänge musste der gesamte Zyklus (Operation 1-5) für jede anzubringende Aminosäure unterschiedlich oft

durchgeführt werden. Um eine freie Aminogruppe am *N*-Terminus des Peptids zu erhalten, wurde die manuelle Festphasensynthese des Peptids mit einem Deblockierungsschritt (Operation 1-3) abgeschlossen. Zur Überprüfung, ob das gewünschte Peptid auf dem polymeren Träger immobilisiert vorlag, wurden 10.0 mg getrockneter Polymerkugeln für vier Stunden mit 4.30 mL Cleavage-Cocktail, bestehend aus Trifluoressigsäure (93 %), Triisopropylsilan (5 %) und dest. Wasser (2 %) behandelt. Im Anschluss wurde die Lösung mit freiem und entschütztem Peptid durch Filtration mittels einer D3-Fritte vom Harz abgetrennt, das Produkt aus kaltem Diethylether ausgefällt und dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde das Peptid in 1-1.5 mL dest. Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und mittels Massenspektrometrie, HPLC und teilweise mittels NMR-Spektroskopie untersucht.

Darstellung von festphasengebundenem Amino-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-(*S*)-lysinyl-(*S*)-leucinyl-(*S*)-valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalanin (H₂N-KLVFF-OH)

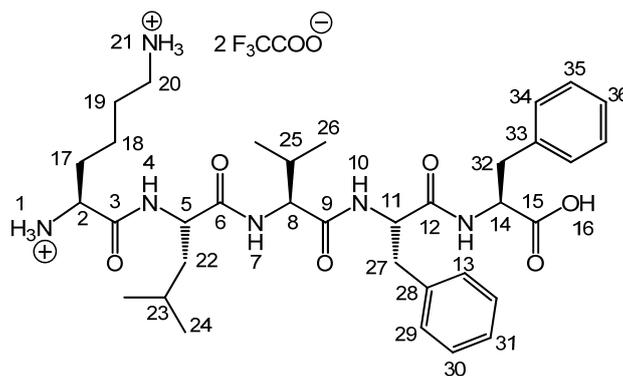


Die Darstellung des Pentapeptidyl-Harzes erfolgte mittels manueller Fmoc-Festphasensynthese. Als polymerer Träger kam ein mit Fmoc-Phenylalanin vorbeladenes Wang-Harz mit einer mittleren Beladung von 0.65 mmol/g zum Einsatz. Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren wurde mit HBTU und DIEA durchgeführt. Um die Kupplungsreagenz-Zugabe bei jedem Kupplungsschritt zu vereinfachen wurde eine 0.5 M HBTU-Stammlösung angesetzt. Pro Kupplungs- bzw. Deblockierungsschritt wurden 2.48 mL (1.24 mmol, 7.62 eq) HBTU-Lösung (0.5 M in DMF), 0.45 mL, 2.61 mmol (16.0 eq) DIEA oder 2.50 mL Piperidin in DMF (20 %) eingesetzt.

Kupplungseinwaagen:

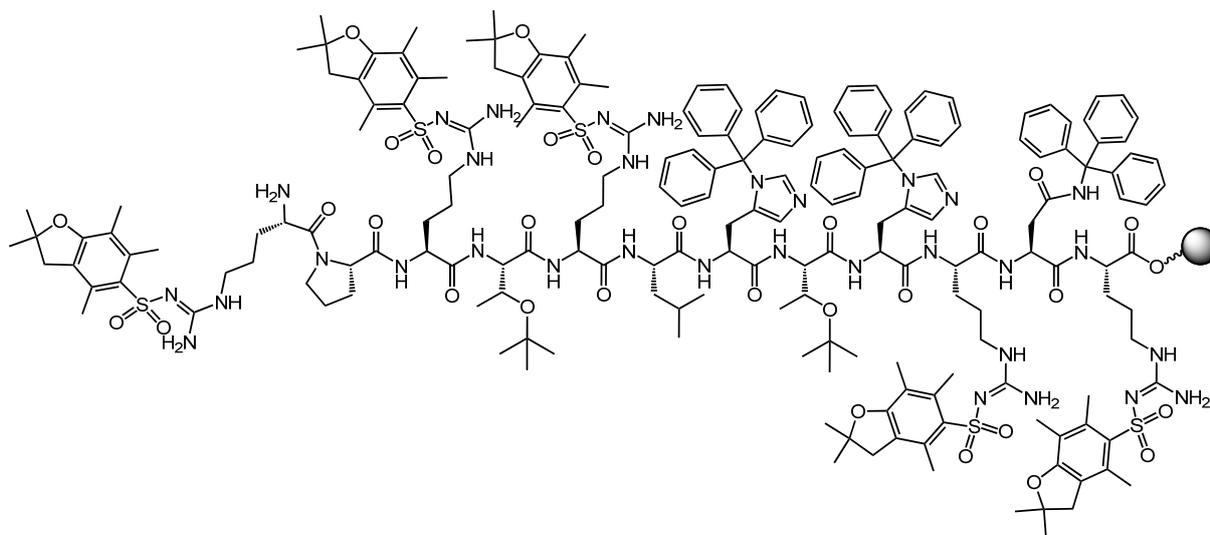
Fmoc-(<i>S</i>)-Phe- <i>Wang</i> -Harz:	250 mg (163 μ mol, 1.00 eq)
Fmoc-(<i>S</i>)-Phe-OH:	504 mg (1.30 mmol, 8.00 eq)
Fmoc-(<i>S</i>)-Val-OH:	441 mg (1.30 mmol, 8.00 eq)
Fmoc-(<i>S</i>)-Leu-OH:	459 mg (1.30 mmol, 8.00 eq)
Fmoc-(<i>S</i>)-Lys(Boc)-OH:	609 mg (1.30 mmol, 8.00 eq)

Die eingewogenen Fmoc-Aminosäuren wurden vor dem Kupplungsschritt mit HBTU-Lösung (0.5 M in DMF) versetzt. Zum Auflösen mussten schlecht lösliche Aminosäure-Gemische im Ultraschallbad behandelt werden. Die Base wurde erst unmittelbar vor der Zugabe zum Harz der HBTU-Aminosäure-Lösung in DMF zugesetzt. Jeder Deblockierungs-Kupplungszyklus wurde, wie in der allgemeinen Vorschrift I (Tabelle 6.1) beschrieben, durchgeführt. Die Vollständigkeit des jeweiligen Kupplungs- und Entschützungs-schritts wurde mit dem Kaiser- und NF31-Test verifiziert. Die Kupplung des Fmoc-Val-OH wurde zweimal wiederholt. Nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom *N*-Terminus wurde die Festphasensynthese beendet. Das Peptidyl-Harz wurde zunächst mit DMF und anschließend mit Dichlormethan gewaschen. Es war nach dem Trocknen im Hochvakuum mehrere Monate bei -18 °C lagerbar. Für analytische Zwecke wurden 50.0 mg dieses beladenen Harzes eingewogen und 3.5 Stunden lang bei Raumtemperatur mit dem Cleavage-Cocktail behandelt. Im Anschluss wurde die Lösung filtriert und das Produkt durch Zugabe des kalten Diethylethers ausgefällt. Der farblose Feststoff wurde mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 0.72-0.74 (m, 6H, H-26), 0.84-0.90 (m, 6H, H-24), 1.27-1.70 (m, 9H, H-17, H-18, H-19, H-22, H-23), 1.84-1.91 (m, 1H, H-25), 2.68-3.09 (m, 6H, H-20, H-27, H-32), 3.76-3.80 (m, 1H, H-2), 4.10-4.13 (m, 1H, H-8), 4.39-4.49 (m, 2H, H-5, H-14), 4.57-4.62 (m, 1H, H-11), 7.15-7.29 (m, 10H, H-(29-31), H-(34-36)), 7.77 (bs, 3H, H-21), 7.93-7.99 (m, 2H, H-10, H-7), 8.12-8.13 (bs, 3H, H-1), 8.28-8.30 (d, 1H, H-13), 8.48-8.49 (d, 1H, H-4), 12.80 (bs, 1H, H-16). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 18.0 (C-26), 19.1 (C-26), 20.8 (C-18), 21.6 (C-24), 23.1 (C-24), 24.0 (C-23), 26.4 (C-19), 30.5 (C-17), 30.7 (C-25), 36.7 (C-32), 37.6 (C-27), 38.4 (C-20), 40.5 (C-22), 51.2 (C-5), 51.7 (C-2), 53.2 (C-11), 53.4 (C-14), 57.6 (C-8), 126.1 (CH_{Aromat}), 126.4 (CH_{Aromat}), 127.9 (CH_{Aromat}), 128.2 (CH_{Aromat}), 129.0 (CH_{Aromat}), 129.1 (CH_{Aromat}), 137.3 (C-33), 137.6 (C-28), 157.9 (C_{Carbonyl}-TFA), 158.2 (C_{Carbonyl}-TFA), 168.2 (C-3), 170.3 (C-9), 170.9 (C-12), 171.3 (C-6), 172.6 (C-15). **HRMS (ESI):** [M + H]⁺ = m/z für C₃₅H₅₃N₆O₆: ber.: 653.4021; gef.: 653.4092; [M + Na]⁺ = m/z für C₃₅H₅₂N₆NaO₆: ber.: 675.3841; gef.: 675.3905.

Darstellung von festgebundenem Amino-(S)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(S)-prolinyl-(S)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(S)-tert.-butyl-threoninyl-(S)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(S)-leucinyl-(S)-trityl-histidinyl-(S)-tert.-butyl-threoninyl-(S)-trityl-histidinyl-(S)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(S)-trityl-asparaginyl-(S)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-arginin (H₂N-RPR TRL HTH RNR-OH)



Die Synthese des Dodecapeptidyl-Harzes erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift I und analog zur Herstellung von H₂N-KLVFF-OH (siehe oben). Die Kupplungszeiten betragen 60 Minuten, nur bei der Aminosäure 8 und 9 wurde die Reaktionszeit auf 24 Stunden ausgedehnt. Pro Kupplungs- bzw. Deblockierungsschritt wurden 1.09 mL (543 µmol, 7.62 eq) HBTU (0.5 M in DMF), 195 µL, (1.14 mmol, 16.0 eq) DIEA und 2.50 mL Piperidin in DMF (20 %) eingesetzt.

Kupplungseinwaagen:

Fmoc-(S)-Arg(Pbf)-Wang-Harz:	125 mg (71.3 µmol); Beladung: 0.57 mmol/g
Fmoc-(S)-Arg(Pbf)-OH:	648 mg (570 µmol, 8.00 eq)
Fmoc-(S)-Asn(Trt)-OH:	597 mg (570 µmol, 8.00 eq)
Fmoc-(S)-His(Trt)-OH:	620 mg (570 µmol, 8.00 eq)
Fmoc-(S)-Leu-OH:	353 mg (570 µmol, 8.00 eq)
Fmoc-(S)-Pro-OH:	337 mg (570 µmol, 8.00 eq)
Fmoc-(S)-Thr(tBu)-OH:	398 mg (570 µmol, 8.00 eq)

Das abgespaltene farblose Dodecapeptid wurde mittels Massenspektrometrie untersucht.

HRMS (ESI): $[M + 3H]^{3+} = m/z$ für $C_{65}H_{117}N_{32}O_{16}$: ber.: 533.9770; gef.: 533.9792;
 $[M + 4H]^{4+} = m/z$ für $C_{65}H_{118}N_{32}O_{16}$: ber.: 400.7345 gef.: 400.7363.

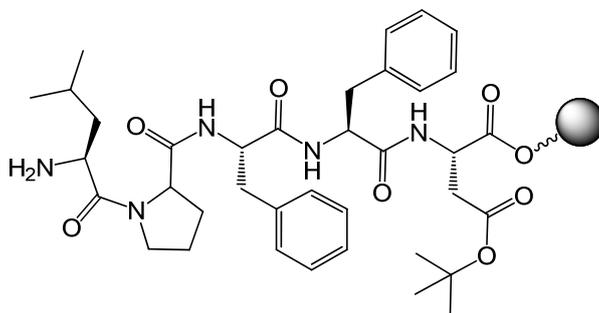
6.9 Automatisierte Festphasensynthese von Peptiden

Allgemeine Vorschrift II

Die automatisierte Fmoc-Festphasenpeptidsynthese erfolgte am kommerziellen Microwellen-Peptidsynthesizer (Liberty, CEM GmbH, Kamp-Lintfort). Die Ansatzgröße betrug 0.10 mmol. Für die Herstellung wurden Fmoc-Aminosäuren (0.20 M in DMF), Aktivator (0.50 M in DMF), *N,N*-Diisopropylethylamin (2.00 M in NMP) und Piperidin (20 % in DMF) als Lösungen eingesetzt.

Nach abgeschlossener Synthese wurde das beladene Harz mit Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Danach wurde wie bereits oben beschrieben eine Testabspaltung vom Harz vorgenommen, um zu überprüfen, ob das gewünschte Peptid immobilisiert auf dem polymeren Träger vorlag.

Darstellung von festgebundenem Amino-(*S*)-leuciny-(*S*)-prolinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-*tert*-butyl-asparaginsäure (H_2N -LPFFD-OH)



Die Synthese des Pentapeptidyl-Harzes erfolgte mittels automatisierter Fmoc-Festphasensynthese. Hierbei kam ein mit Fmoc-(*S*)-Asp(OtBu) vorbeladenes Wang-Harz mit einer mittleren Beladung von 0.58 mmol/g zum Einsatz.

Kupplungseinwaagen:

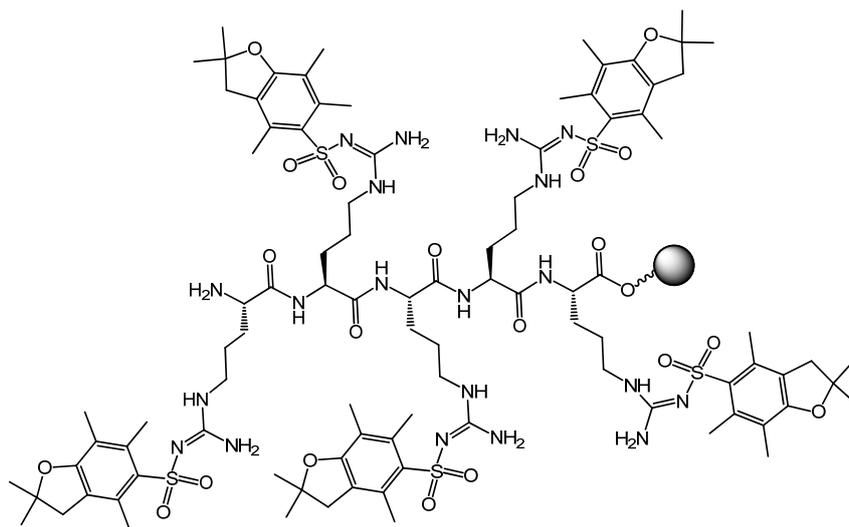
Fmoc-(<i>S</i>)-Asp(OtBu)-Wang-Harz:	172 mg (0.10 mmol); Beladung: 0.58 mmol/g
Fmoc-(<i>S</i>)-Leu-OH:	565 mg in 8.00 mL DMF
Fmoc-(<i>S</i>)-Phe-OH:	775 mg in 10.0 mL DMF
Fmoc-(<i>S</i>)-Pro-OH:	540 mg in 8.00 mL DMF
HBTU:	1.90 g in 10.0 mL DMF
DIEA:	3.50 mL in 6.50 mL NMP

Das durch eine Testabspaltung gewonnene farblose Pentapeptid wurde mittels HPLC und Massenspektrometrie untersucht.

HRMS (ESI): $[M - H]^- = m/z$ für $C_{33}H_{42}N_5O_8$: ber.: 636.3039; gef.: 636.3068; $[M + H]^+ = m/z$ für $C_{33}H_{44}N_5O_8$: ber.: 638.3184; gef.: 638.3222; $[M + Na]^+ = m/z$ für $C_{33}H_{43}N_5NaO_8$: ber.: 660.3004; gef.: 660.3041; $[M + K]^+ = m/z$ für $C_{33}H_{43}KN_5O_8$: ber.: 676.2743; gef.: 676.2733.

HPLC-Reinheit: 100 %; (RP 18 Säule, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min; Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Darstellung von festgebundenem Amino-(S)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(S)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(S)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(S)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(S)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-arginin ($\text{H}_2\text{N-RRRRR-OH}$)



Die Synthese des Pentapeptidyl-Harzes erfolgte analog der Herstellung von $\text{H}_2\text{N-LPFFD-OH}$ mittels automatisierter Fmoc-Festphasensynthese, unter Verwendung von Wang-Harz mit vorinstalliertem Fmoc-Arginin(Pbf) und einer mittleren Beladung von 0.57 mmol/g.

Kupplungseinwaagen:

Fmoc-Arg(Pbf)-Wang-Harz: 175 mg (0.10 mmol)

Fmoc-Arg(Pbf)-OH: 3.24 g in 25.0 mL DMF

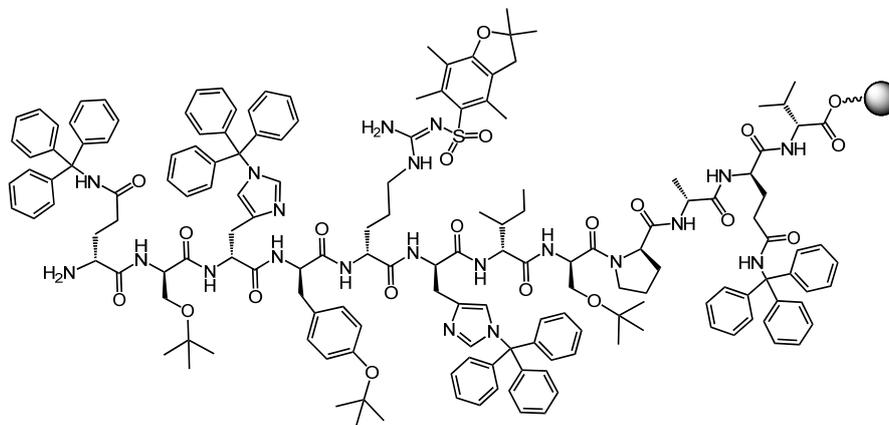
HBTU: 3.79 g in 20.0 mL DMF

DIEA: 3.50 mL in 6.50 mL NMP

Das abgespaltene farblose Pentapeptid wurde mittels HPLC und Massenspektrometrie untersucht.

HRMS (ESI): $[\text{M} + 2\text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{30}\text{H}_{63}\text{N}_{20}\text{O}_6$: ber.: 400.2653; gef.: 400.2673. **HPLC-Reinheit:** 81.8 %; (RP 18 Säule, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min; Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Darstellung von festgebundenem Amino-(*R*)-trityl-glutaminyl-(*R*)-*tert*-butyl-serinyl-(*R*)-trityl-histidinyl-(*R*)-*tert*-butyl-tyrosinyl-(*R*)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(*R*)-trityl-histidinyl-(*R*)-isoleucinyl-(*R*)-*tert*-butyl-serinyl-(*R*)-prolinyl-(*R*)-alaninyl-(*R*)-trityl-glutaminyl-(*R*)-valin (H₂N-qsh yrh isp aqv-OH)



Die Darstellung von dem Dodecapeptidyl-Harz erfolgte mittels automatisierter Fmoc-Festphasensynthese gemäß der allgemeinen Vorschrift II unter Verwendung von Wang-Harz mit vorinstalliertem Fmoc-(*R*)-Val und einer mittleren Beladung von 0.70 mmol/g.

Kupplungseinwaagen:

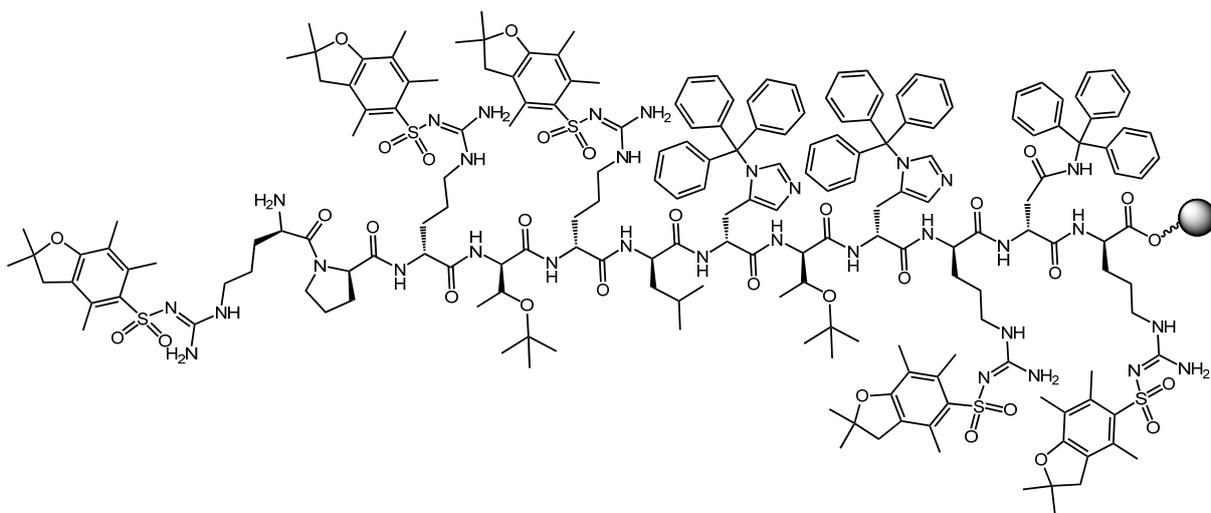
Fmoc-(<i>R</i>)-Val-Wang-Harz:	143 mg (0.10 mmol); Beladung: 0.70 mmol/g
Fmoc-(<i>R</i>)-Ala-OH:	498 mg in 8.00 mL DMF
Fmoc-(<i>R</i>)-Arg-OH:	1.17 g in 9.0 mL DMF
Fmoc-(<i>R</i>)-Gln(Trt)-OH:	1.10 g in 9.00 mL DMF
Fmoc-(<i>R</i>)-His(Trt)-OH:	1.12 g in 9.00 mL DMF
Fmoc-(<i>R</i>)-Ile-OH:	570 mg in 8.00 mL DMF
Fmoc-(<i>R</i>)-Pro-OH:	540 mg in 8.00 mL DMF
Fmoc-(<i>R</i>)-Ser(<i>t</i> Bu)-OH:	690 mg in 9.00 mL DMF
Fmoc-(<i>R</i>)-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH:	740 mg in 8.00 mL DMF
HCTU:	6.21 g in 30.0 mL DMF
DIEA:	9.00 mL in 16.0 mL NMP

Das abgespaltene Dodecapeptid wurde mittels HPLC und Massenspektrometrie untersucht.

HRMS (ESI): $[M + H]^+ = m/z$ für C₆₂H₉₆N₂₁O₁₈: ber.: 1422.7237; gef.: 1422.7305; $[M + Na]^+ = m/z$ für C₆₂H₉₅N₂₁NaO₁₈: ber.: 1444.7056; gef.: 1444.7087; $[M + 2H]^{2+} = m/z$ für C₆₂H₉₇N₂₁O₁₈: ber.: 711.8655 gef.: 711.8699; $[M + H, Na]^{2+} = m/z$ für C₆₂H₉₆N₂₁NaO₁₈: ber.:

722.8564; gef.: 722.8597; $[M + 3H]^{3+} = m/z$ für $C_{62}H_{98}N_{21}O_{18}$: ber.: 474.9127; gef.: 474.9139; $[M + 2H, Na]^+ = m/z$ für $C_{62}H_{97}N_{21}NaO_{18}$: ber.: 482.2401; gef.: 482.2379. **HPLC-Reinheit:** 95.3 %; (RP 18 Säule, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min; Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Darstellung von festgebundenem Amino-(R)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(R)-prolinyl-(R)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(R)-tert.-butyl-threoninyl-(R)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(R)-leucinyl-(R)-trityl-histidinyl-(R)-tert.-butyl-threoninyl-(R)-trityl-histidinyl-(R)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-argininyl-(R)-trityl-asparaginyl-(R)-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-arginin (H₂N-rpr trl hth rnr-OH)



Die Herstellung des Dodecapeptidyl-Harzes erfolgte mittels automatisierter Fmoc-Festphasensynthese gemäß der allgemeinen Vorschrift II unter Verwendung von Wang-Harz mit vorinstalliertem Fmoc-(R)-Arg(Pbf) und einer mittleren Beladung von 0.51 mmol/g.

Kupplungseinwaagen:

Fmoc-(R)-Arg(Pbf)-Wang-Harz: 196 mg (0.10 mmol); Beladung: 0.51 mmol/g

Fmoc-(R)-Arg(Pbf)-OH: 2.08 g in 25.0 mL DMF

Fmoc-(R)-Asn(Trt)-OH: 1.19 g in 10.0 mL DMF

Fmoc-(<i>R</i>)-His(Trt)-OH:	1.24 g in 10.0 mL DMF
Fmoc-(<i>R</i>)-Leu-OH:	710 mg in 10.0 mL DMF
Fmoc-(<i>R</i>)-Pro-OH:	680 mg in 10.0 mL DMF
Fmoc-(<i>R</i>)-Thr(<i>t</i> Bu)-OH:	800 mg in 10.0 mL DMF
HCTU:	6.20 g in 30.0 mL DMF
DIEA:	7.00 mL in 13.0 mL NMP

Das abgespaltene farblose Dodecapeptid wurde mittels HPLC und Massenspektrometrie untersucht.

HRMS (ESI): $[M + 2H]^{2+} = m/z$ für $C_{65}H_{116}N_{32}O_{16}$: ber.: 800.4618; gef.: 800.4663; $[M + 3H]^{3+} = m/z$ für $C_{65}H_{117}N_{32}O_{16}$: ber.: 533.9770; gef.: 533.9796; $[M + 4H]^{4+} = m/z$ für $C_{65}H_{118}N_{32}O_{16}$: ber.: 400.7345 gef.: 400.7371. **HPLC-Reinheit:** 80.6 %; (RP 18 Säule, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min; Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

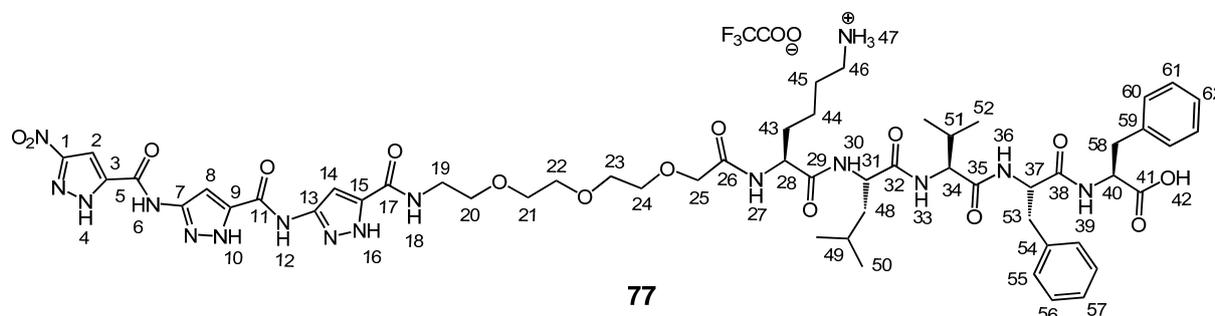
6.10 Manuelle Festphasensynthese von Pyrazol-Peptid-Liganden

Allgemeine Vorschrift III

Die hergestellten immobilisierten Peptide mit freier Aminogruppe wurden mittels manueller Festphasen-Methode mit PMB-geschützten Trimer-Derivaten, die ein freies Carbonsäureende enthalten, weiterumgesetzt. Dieser Kupplungsschritt erfolgte nach folgender Arbeitsweise: 1.50 eq PMB-geschützte Trimer-Spacer-Säure, 2.00 eq HCTU und 2.00 eq DIEA wurden in absolutem DMF gelöst und zum immobilisierten Peptid, das vorher ca. zwei Stunden lang in DMF gequollen wurde, gegeben. Die Kupplungsreaktion wurde zunächst 24 Stunden lang unter Schütteln bei Raumtemperatur und anschließend 10 Minuten lang bei 65 °C, 8 Watt in der Mikrowelle (CEM, Discover) durchgeführt. Eine Kontrolle mit Kaiser-, NF31-, Bromphenolblautest erfolgte sowohl unmittelbar vor dem Kupplungsschritt als auch danach. So konnte die Vollständigkeit der Kupplung durch den direkten Vergleich effektiv überprüft werden. Die Abspaltung des PMB-geschützten Trimer-Spacer-Peptids vom Harz und eine gleichzeitige Entschützung der Aminosäure-Seitenketten erfolgte unter Schütteln mit einem Cleavage-Cocktail (93 % Trifluoressigsäure, 5 % Triisopropylsilan und 2 % bidest. Wasser) für vier Stunden bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde filtriert, das PMB-geschützte

Produkt aus kaltem Diethylether ausgefällt, dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Während der Behandlung mit dem Cleavage-Cocktail wurden zum Teil die PMB-Schutzgruppen abgespalten, deswegen konnten keine Ausbeuten von diesen Zwischenprodukten bestimmt werden. Zur vollständigen PMB-Entschützung wurde der farblose Feststoff unter Argon in Trifluoressigsäure gelöst und für 5 Stunden unter Rühren auf 70 °C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt und das Produkt (Trimer-Spacer-Peptid) langsam aus Diethylether gefällt. Nach dem fraktionierenden Ausfällen wurden mehrere Feststoff-Fractionen erhalten. Wie sich herausstellte, fiel das Trimer-Peptid-Kupplungsprodukt immer zuerst aus. So enthielten die ersten Fractionen nur das gewünschte Produkt, in den nächsten Fractionen erhöhte sich der Anteil des nicht umgesetzten Peptids, bis schließlich die letzte Fraction größtenteils nur aus dem Peptid bestand. Dieses fraktionierende Fällen des Produkts ermöglichte das Gewinnen des reinen Hybrid-Liganden, so dass auf eine präparative HPLC-Reinigung verzichtet werden konnte. Der Feststoff wurde dreimal mit Diethylether gewaschen und im Hochpumpenvakuum getrocknet. Die wasserlöslichen Liganden wurden zusätzlich in 1-1.5 mL dest. Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

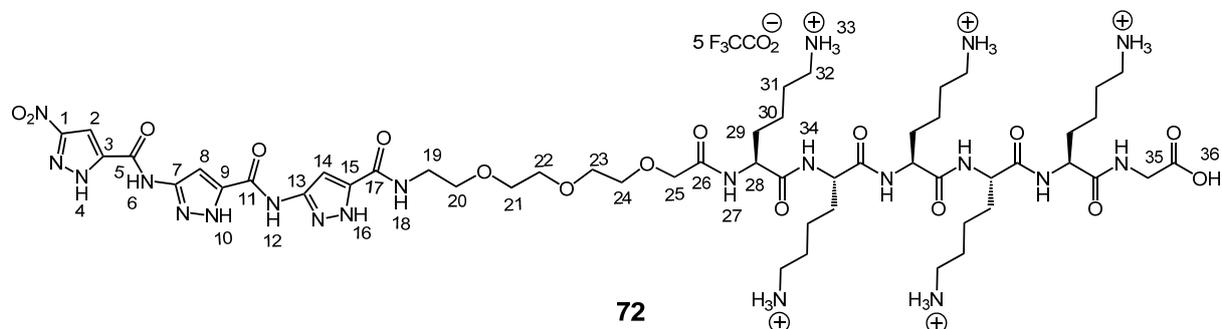
Darstellung von 1-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-(*S*)-lysinyl-(*S*)-leucinyl-(*S*)-valinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalanin (Trim-TEG-KLVFF-OH) 77



88.0 mg (41.0 μmol , 1.00 eq) der mit KLVFF-Peptid beladenen Polymerkugeln wurden in DMF vorgelegt und 80 Minuten lang gequollen. Anschließend wurde das Harz durch eine Filtration vom Lösungsmittel befreit, worauf eine Zugabe von 76.0 mg (82.0 μmol , 2.00 eq) Trimer(PMB)-TEG-OH **40**, 31.0 mg (82.0 μmol , 2.00 eq) HBTU und 14.0 μL (82.0 μmol , 2.00 eq) DIEA gelöst in 2 mL DMF folgte. Das Kupplungsgemisch wurde danach für 24 Stunden auf den Schüttler gestellt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch NF31- und Kaisertest überprüft. Die Abspaltung des Pyrazol-Peptid-Liganden vom Harz und anschließende Befreiung von PMB-Schutzgruppen erfolgten gemäß der allgemeinen Vorschrift III, wonach ein farbloser Feststoff isoliert wurde. Eine Ausbeute wurde nicht bestimmt.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 0.69-0.70 (m, 6H, H-52), 0.79-0.85 (m, 6H, H-50), 1.23-1.68 (m, 9H, H-43, H-44, H-45, H-48, H-49), 1.82-1.89 (m, 1H, H-51), 2.68-3.09 (m, 6H, H-46, H-53, H-58), 3.51-3.59 (m, 12H, H-(19-24)), 3.91 (s, 2H, H-25), 4.07-4.10 (m, 1H, H-34), 4.29-4.38 (m, 2H, H-28, H-31), 4.42-4.47 (m, 1H, H-40), 4.54-4.58 (m, 1H, H-37), 7.14-7.27 (m, 10H, H-(55-57), H-(60-62)), 7.62-7.63 (m, 3H, H-47), 7.69-7.70 (d, 1H, H-33), 7.92-7.93 (bs, 2H, H-36), 8.11-8.12 (d, 1H), 8.23-8.24 (d, 1H, H-39), 8.55 (bs, 1H), 11.10 (bs, 1H), 11.34 (s, 1H), 13.21 (bs, 1H), 13.49 (bs, 1H), 14.98 (bs, 1H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.7 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 18.0, 19.2, 21.6, 22.0, 23.1, 24.2, 26.7, 30.8, 31.9, 36.7, 37.6, 38.6, 38.8, 51.0, 51.4, 53.3, 53.4, 57.5, 68.8, 69.6, 69.8, 70.3, 102.3, 126.2, 126.5, 128.0, 128.2, 129.1, 137.3, 137.5, 155.1, 155.9, 169.0, 170.4, 170.9, 171.0, 171.6, 172.6. **HRMS (ESI)**: $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{55}\text{H}_{75}\text{N}_{16}\text{O}_{15}$: ber.: 11999.5592; gef.: 1199.5623; $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ für $\text{C}_{55}\text{H}_{74}\text{N}_{16}\text{NaO}_{15}$: ber.: 1221.5412; gef.: 1221.5464.

Darstellung von 1-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-glycin (Trim-TEG-KKKKKKG-OH) **72**



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift III und analog zu Trimer-TEG-KLVFF-OH **77**, wobei das mit KKKKKKG beladene Harz eingesetzt wurde.

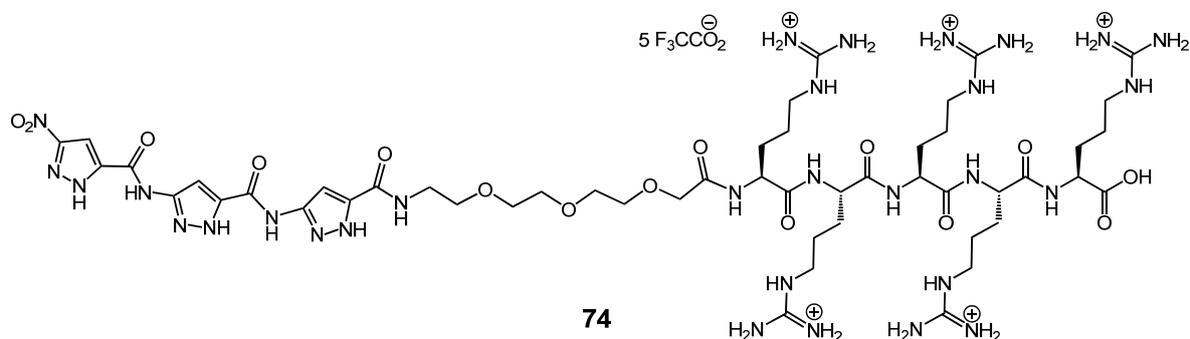
Kupplungseinwaagen:

H ₂ N-KKKKKG-Wang-Harz:	76.0 mg (31.0 μmol, 1.00 eq)
Trimer(PMB)-TEG-OH 40 :	58.0 mg (62.0 μmol, 2.00 eq)
HBTU:	24.0 mg (62.0 μmol, 2.00 eq)
DIEA:	11.0 μL (62.0 μmol, 2.00 eq)
DMF:	2.00 mL

Nach dem letzten PMB-Entschützungs-schritt und anschließender Gefriertrocknung wurden 26.5 mg (14.5 μmol, 47 %) eines farblosen Feststoffes erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.31 (bs, 10H, H-30), 1.49-1.65 (m, 20H, H-31, H-29), 2.76 (bs, 10H, H-32), 3.39-3.42 (m, 2H, H-19), 3.52-3.61 (m, 10H, H-(20-24)), 3.69-3.74 (m, 1H, H-35), 3.79-3.84 (m, 1H, H-35), 3.93 (s, 2H, H-25), 4.20-4.33 (m, 5H, H-28), 7.58 (bs, 15H), 7.93-8.01 (m, 4H), 8.11 (d, 1H, ³J = 7.26 Hz), 8.26 (t, 1H, ³J = 7.26 Hz), 8.68 (bs, 1H), 11.14 (s, 1H), 11.44 (s, 1H), 12.77 (bs, 1H), 13.19 (bs, 1H), 13.50 (bs, 1H), 14.96 (bs, 1H). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 22.0, 22.1, 22.2, 22.3, 26.5, 26.6, 26.7, 31.3, 31.4, 31.5, 38.6, 38.7, 51.8, 52.1, 52.2, 52.3, 68.8, 69.5, 69.6, 69.7, 70.2, 102.4, 116.0, 118.4, 157.8, 158.1, 158.3, 158.6, 169.4, 171.1, 171.2, 171.3, 171.4, 171.5, 171.7. **HRMS (ESI):** [M + 2H]²⁺ = m/z für C₅₂H₈₉N₂₁O₁₆: ber.: 631,8393; gef.: 631,8437; [M + 3H]³⁺ = m/z für C₅₂H₉₀N₂₁O₁₆: ber.: 421,5619; gef.: 421,5656. **HPLC-Reinheit:** 91.6 %; (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate: 0.5 mL/min, Retentionszeit: 18.1 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Darstellung von 1-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-(*S*)-argininyl-(*S*)-argininyl-(*S*)-argininyl-(*S*)-arginin (Trim-TEG-RRRRR-OH) **74**



Die Synthese erfolgte analog zu der Synthese von Trimer-TEG-KLVFF-OH **77**, wobei das mit RRRRR beladene Harz zum Einsatz kam.

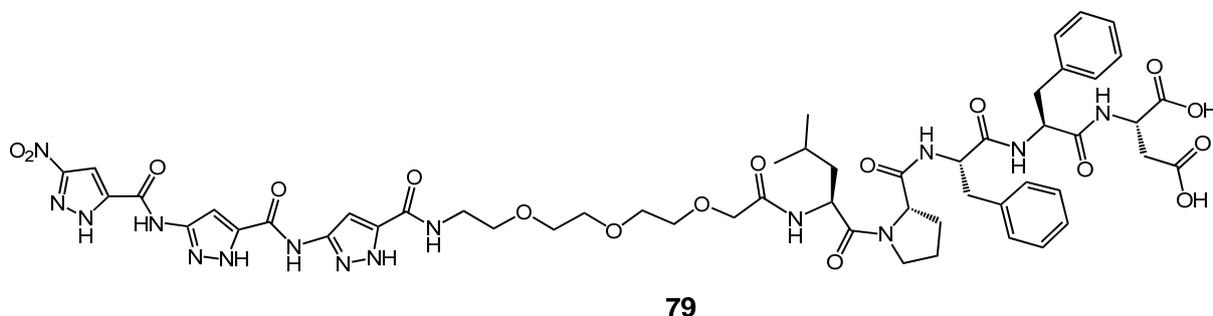
Kupplungseinwaagen:

H ₂ N-RRRRR-Wang-Harz:	186 mg (57.0 μmol, 1.00 eq)
Trimer(PMB)-TEG-OH 40 :	105 mg (114 μmol, 2.00 eq)
HCTU:	47.0 mg (114 μmol, 2.00 eq)
DIEA:	20.0 μL (114 μmol, 2.00 eq)
DMF:	2.00 mL

Nach der PMB-Entschützung konnten 66.0 mg (49.0 μmol, 86 %) eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, CF₃CO₂D): δ [ppm] = 1.96-2.31 (m, 20H, CH₂^β_{Arg}, CH₂^γ_{Arg}), 3.48-3.50 (m, 10H, CH₂^δ_{Arg}), 4.02-4.12 (m, 12H, CH₂_{TEG}), 4.45 (s, 2H, CH₂_{TEG}), 4.81-4.87 (m, 5H, CH^α_{Arg}), 7.57 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.77 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.98 (s, 1H, CH_{Pyrazol}). **HRMS (ESI):** [M + 2H]²⁺ = *m/z* für C₅₀H₈₆N₃₀O₁₅: ber.: 673,3439; gef.: 673,3472; [M + H + Na]²⁺ = *m/z* für C₅₀H₈₅N₃₀NaO₁₅: ber.: 684,3349; gef.: 684,3314.

Darstellung von 1-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-(*S*)-leucinyl-(*S*)-prolinyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-phenylalaninyl-(*S*)-*tert.*-butyl-asparaginsäure (Trimer-TEG-LPFFD-OH) 79



Die Synthese erfolgte analog zu der Synthese von Trimer-TEG-KLVFF-OH **77**, wobei das mit LPFFD beladene Harz eingesetzt wurde.

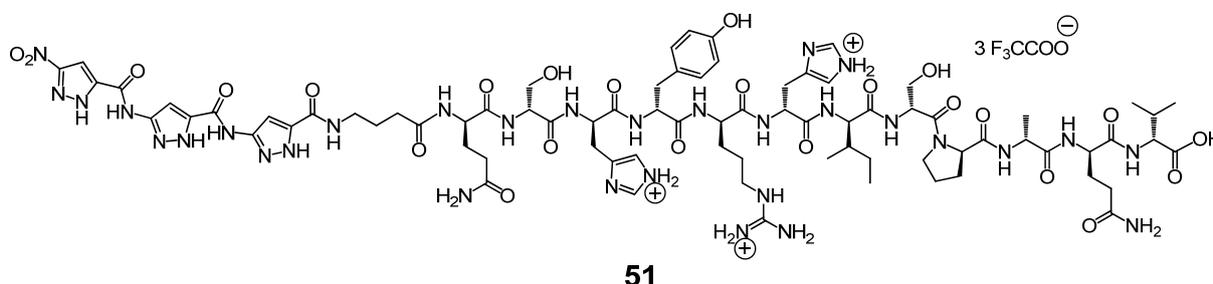
Kupplungseinwaagen:

H ₂ N-LPFFD-Wang-Harz:	80.0 mg (34.8 μmol, 1.00 eq)
Trimer(PMB)-TEG-OH 40 :	64.3 mg (69.6 μmol, 2.00 eq)
HCTU:	28.8 mg (69.6 μmol, 2.00 eq)
DIEA:	12.7 μL (69.6 μmol, 2.00 eq)
DMF:	2.00 mL

Nach dem Abspalten der PMB-Schutzgruppen wurden durch Fällen mit Diethylether drei Fraktionen erhalten. Nur die zweite Fraktion enthielt laut ¹H-NMR-Spektren das gewünschte Produkt in ausreichender Reinheit. Es konnten somit 9.30 mg (7.85 μmol, 23 %) eines farblosen Feststoffes isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 0.85-0.88 (m, 6H), 1.34-1.93 (m, 7H), 2.54-3.07 (m, 6H), 3.37-3.42 (m, 4H), 3.51-3.59 (m, 10H), 3.90 (s, 2H), 4.30-4.32 (m, 1H), 4.37-4.42 (m, 1H), 4.52-4.62 (m, 2H), 7.16-7.24 (m, 12H), 7.53 (bs, 1H), 7.65 (d, 1H), 7.77 (d, 1H), 7.93 (s, 1H), 8.00 (d, 1H), 8.35 (d, 1H), 8.52 (bs, 1H), 11.07 (s, 1H), 11.43 (s, 1H), 12.81 (bs, 2H), 13.48 (bs, 1H), 14.98 (s, 1H). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 21.3, 23.2, 23.3, 24.0, 24.2, 28.7, 36.0, 37.2, 37.6, 38.5, 40.3, 46.6, 48.0, 48.6, 53.4, 53.8, 59.2, 68.7, 69.5, 69.7, 70.2, 94.6, 96.7, 98.1, 102.3, 126.1, 126.2, 127.8, 127.9, 129.1, 129.2, 137.4, 137.5, 138.6, 155.0, 155.8, 168.9, 170.2, 170.5, 170.7, 171.1, 171.6, 172.1. **HRMS (ESI)**: [M - H]⁻ = *m/z* für C₅₃H₆₃N₁₅O₁₇: ber.: 590.7269; gef.: 590.7397.

Darstellung von 4-(3-(3-(3-Nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-oxobutan-(R)-glutaminyl-(R)-serinyl-(R)-histidinyl-(R)-tyrosinyl-(R)-arginyl-(R)-histidinyl-(R)-isoleucinyl-(R)-serinyl-(R)-prolinyl-(R)-alanyl-(R)-glutaminyl-(R)-valin (Trim-GABA-D1) 51



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift III, zum Einsatz kam das mit qshyrhispaqv beladene Harz.

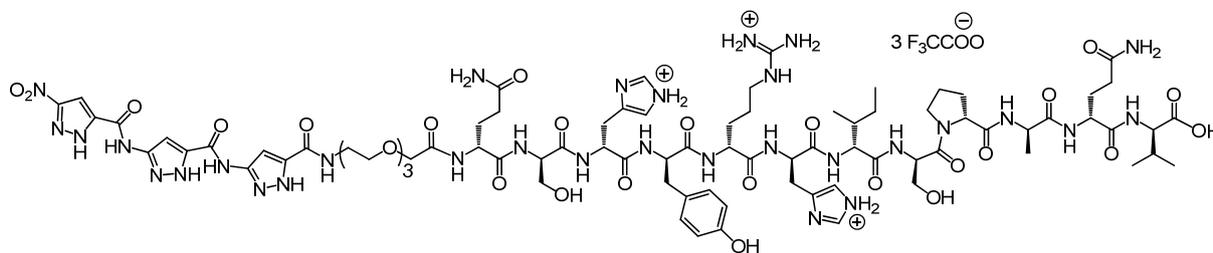
Kupplungseinwaagen:

H ₂ N-qshyrhispaqv-Wang-Harz:	150 mg (37.2 μmol, 1.00 eq)
Trimer(PMB)-GABA-OH 48 :	61.1 mg (74.4 μmol, 2.00 eq)
HCTU:	31.0 mg (74.4 μmol, 2.00 eq)
DIEA:	13.0 μL (74.4 μmol, 2.00 eq)
DMF:	2.00 mL

Die erhaltenen drei Fraktionen wurden mittels HPLC und ESI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Die Untersuchung zeigte, dass die erste Fraktion die höchste Reinheit besitzt. Die Ausbeute dieser Fraktion betrug insgesamt 33.0 mg (15.0 μmol, 40 %).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ [ppm] = 0.75-0.83 (m, 6H), 0.87-0.89 (m, 6H), 1.04-1.10 (m, 1H), 1.21-1.32 (m, 4H), 1.50-1.57 (m, 3H), 1.67-1.93 (m, 10H), 2.04-2.16 (m, 6H), 2.18-2.25 (m, 2H), 2.84-2.98 (m, 5H); 3.06-3.10 (m, 5H), 3.55-3.71 (m, 10H), 4.11-4.14 (m, 1H), 4.20-4.31 (m, 4H), 4.33-4.35 (m, 1H), 4.37-4.40 (m, 1H), 4.42-4.46 (m, 1H), 4.50-4.54 (m, 1H), 4.59-4.64 (m, 1H), 4.59-4.64 (m, 1H), 4.70 (bs, 1H), 5.13 (bs, 1H), 6.65 (d, 2H_{Tyr}, ³J = 8.49 Hz), 6.78-6.85 (m, 3H), 7.05 (d, 2H_{Tyr}, ³J = 8.49 Hz), 7.20-7.35 (m, 5H), 7.51 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.79-7.81 (m, 2H), 7.96-8.03 (m, 3H), 8.13-8.15 (m, 1H), 8.21-8.32 (m, 3H), 8.55 (bs, 1H), 11.14 (s, 1H), 11.45 (s, 1H), 13.20 (bs, 1H), 13.50 (bs, 1H), 14.08 (bs, 2H), 14.99 (bs, 1H). **HRMS (ESI):** [M + 2H]²⁺ = m/z für C₇₈H₁₁₁N₃₁O₂₄: ber.: 932.9204; gef.: 932.9235; [M + H + Na]²⁺ = m/z für C₇₈H₁₁₀N₃₁NaO₂₄: ber.: 943.9113; gef.: 943.9120. **HPLC-Reinheit:** 84.5 %; (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate: 0.5 mL/min, Retentionszeit: 21.2 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Darstellung von 1-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-(*R*)-glutaminy-(*R*)-seriny-(*R*)-histidiny-(*R*)-tyrosiny-(*R*)-argininy-(*R*)-histidiny-(*R*)-isoleuciny-(*R*)-seriny-(*R*)-proliny-(*R*)-alaniny-(*R*)-glutaminy-(*R*)-valin (Trim-TEG-D1) 52



52

Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift III unter Verwendung von dem mit qshyrhispaqv beladenen Harz.

Kupplungseinwaagen:

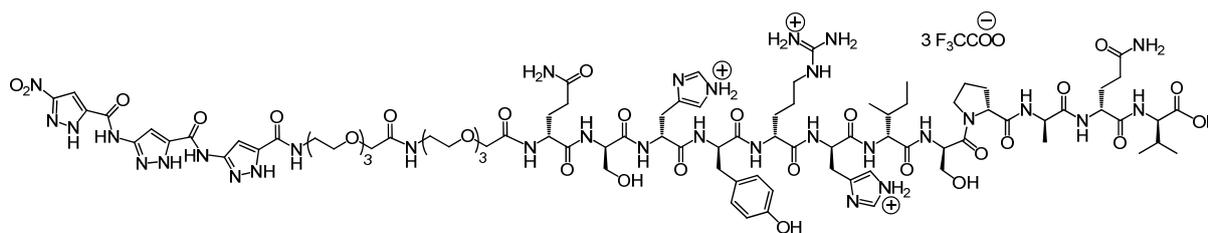
H ₂ N-qshyrhispaqv-Wang-Harz:	200 mg (49.6 μmol, 1.00 eq)
Trimer(PMB)-TEG-OH 40 :	91.7 mg (99.2 μmol, 2.00 eq)
HCTU:	41.0 mg (99.2 μmol, 2.00 eq)
DIEA:	17.0 μL (99.2 μmol, 2.00 eq)
DMF:	2.00 mL

Die Kupplungsreaktion wurde zunächst 24 Stunden lang unter Schütteln bei Raumtemperatur und anschließend 10 Minuten lang bei 65 °C, 8 Watt in der Mikrowelle (CEM, Discover) durchgeführt. Anschließend erfolgten, wie oben beschrieben, die Abspaltung vom Harz und die PMB-Entschützung in Trifluoressigsäure. Es konnten 50.5 mg (21.9 μmol, 44 %) des gefriergetrockneten farblosen Pyrazol-Peptids isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆, 348 K): δ [ppm] = 0.74-0.88 (m, 10H), 1.03-1.09 (m, 1H), 1.19-1.33 (m, 4H), 1.48 (bs, 3H), 1.65-1.94 (m, 8H), 2.03-2.14 (m, 6H), 2.81-2.98 (m, 4H), 3.07 (bs, 5H), 3.52-3.74 (m, 18H), 3.94 (s, 2H), 4.10-4.13 (m, 1H), 4.17-4.23 (m, 1H), 4.26-4.39 (m, 5H), 4.43 (bs, 1H), 4.49-4.54 (m, 1H), 4.58-4.62 (m, 1H), 4.70 (bs, 1H), 5.13 (bs, 1H), 6.64 (d, 2H, ³J = 8.25), 6.77-6.87 (m, 4H), 7.03 (d, 2H, ³J = 8.25), 7.19-7.37 (m, 5H), 7.49 (bs, 1H), 7.57 (bs, 1H), 7.80 (bs, 3H), 7.95 (bs, 2H), 8.14 (d, 1H, ³J = 7.57), 8.22-8.33 (m, 3H), 8.56 (bs, 1H), 8.87 (bs, 1H), 9.19 (s, 1H), 11.13 (s, 1H), 11.45 (s, 1H), 13.21 (bs, 1H), 13.49 (bs, 1H), 14.08 (bs, 2H), 14.99 (bs, 1H). **HRMS (ESI):** [M + 2H]²⁺ = *m/z* für C₈₂H₁₁₉N₃₁O₂₇: ber.: 985.4454; gef.: 985.4479; [M + H + Na]²⁺ = *m/z* für C₈₂H₁₁₉N₃₁O₂₇: ber.:

966.4364; gef.: 996.4390; $[M + 3H]^{3+} = m/z$ für $C_{82}H_{120}N_{31}O_{27}$: ber.: 657.2993; gef.: 657.3006; $[M + 2H + Na]^{3+} = m/z$ für $C_{82}H_{119}N_{31}NaO_{27}$: ber.: 664.6267; gef.: 664.6272.
HPLC-Reinheit: 79.1 %, (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate: 0.5 mL/min, Retentionszeit: 21.6 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Darstellung von 1-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1,13,25-trioxo-5,8,11,17,20,23-hexaoxa-2,14-diaza-pentacosan-(*R*)-glutaminy-(*R*)-seriny-(*R*)-histidiny-(*R*)-tyrosiny-(*R*)-argininy-(*R*)-histidiny-(*R*)-isoleuciny-(*R*)-seriny-(*R*)-proliny-(*R*)-aliny-(*R*)-glutaminy-(*R*)-valin (Trim-TEG-TEG-D1) 53



53

Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift III unter Verwendung von H₂N-qshyrhispaqv-Wang-Harz.

Kupplungseinwaagen:

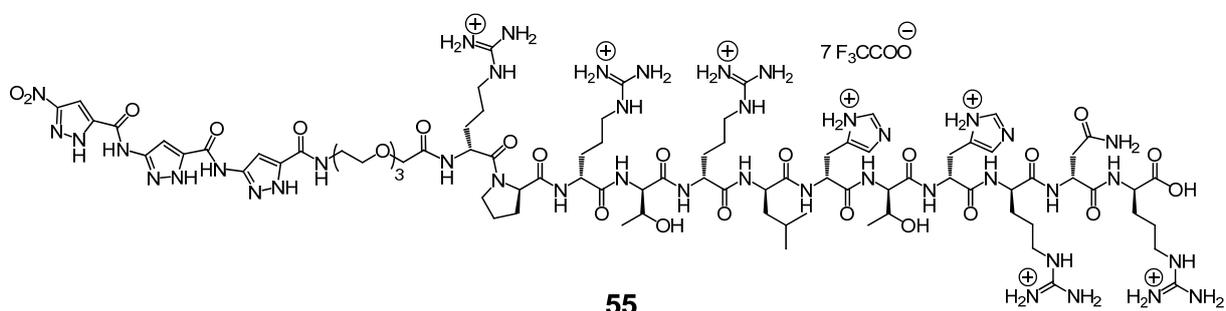
H ₂ N-qshyrhispaqv-Wang-Harz:	135 mg (33.5 μmol, 1.00 eq)
Trimer(PMB)-TEG ₂ -OH 50 :	74.6 mg (67.0 μmol, 2.00 eq)
HCTU:	27.7 mg (67.0 μmol, 2.00 eq)
DIEA:	11.5 μL (67.0 μmol, 2.00 eq)
DMF:	2.00 mL

Die erste Fraktion mit der höchsten Reinheit enthielt 26.0 mg (10.4 μmol, 31 %) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ [ppm] = 0.74-0.82 (m, 6H), 0.86-0.87 (m, 6H), 1.03-1.10 (m, 1H), 1.20-1.32 (m, 4H), 1.50 (bs, 3H), 1.65-1.92 (m, 9H), 2.03-2.13 (m, 6H), 2.81-2.99 (m, 5H), 3.04-3.09 (m, 5H), 3.51-3.74 (m, 28H), 3.88 (s, 2H), 3.94 (s, 2H), 4.10-4.13 (m, 1H),

4.17-4.39 (m, 7H), 4.44 (s, 1H), 4.50-4.54 (m, 1H), 4.58-4.62 (m, 1H), 4.66-4.73 (m, 1H), 5.13 (s, 1H), 6.64 (d, 2H_{Tyr}, J³ = 8.29 Hz), 6.79-6.86 (m, 3H), 7.03 (d, 2H_{Tyr}, J³ = 8.29 Hz), 7.25-7.36 (m, 5H), 7.50 (bs, 1H), 7.57 (bs, 1H), 7.66-7.68 (m, 1H), 7.78-7.81 (m, 1H), 7.90-8.01 (m, 3H), 8.14 (d, 1H), 8.23-8.31 (m, 3H), 8.56 (s, 1H), 8.91 (s, 2H), 9.19 (s, 1H), 11.12 (s, 1H), 11.43 (s, 1H), 13.20 (bs, 1H), 13.50 (bs, 1H), 14.06 (bs, 3H), 14.97 (bs, 1H). **HRMS (ESI):** $[M + 2H]^{2+} = m/z$ für C₉₀H₁₃₄N₃₂O₃₁: ber.: 1079.9955; gef.: 1080.0005; $[M + 3H]^{3+} = m/z$ für C₉₀H₁₃₅N₃₂O₃₁: ber.: 720.3327; gef.: 720.3366. **HPLC-Reinheit:** 84.8 %; (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate: 0.5 mL/min, Retentionszeit: 21.9 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Darstellung von 1-(3-(3-(3-Nitro-1H-pyrazole-5-carboxamido)-1H-pyrazole-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-yl)-1,13-dioxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-(R)-argininyl-(R)-prolinyl-(R)-argininyl-(R)-threoninyl-(R)-argininyl-(R)-leucinyl-(R)-histidinyl-(R)-threoninyl-(R)-histidinyl-(R)-argininyl-(R)-asparaginyl-(R)-arginin (Trim-TEG-D3) 55



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift III. Hierbei kam das mit rprtrlhthrn beladene Harz zum Einsatz.

Kupplungseinwaagen:

H ₂ N-rprtrlhthrn-Wang-Harz :	160 mg (31.0 μmol, 1.00 eq)
Trimer(PMB)-TEG-OH 40 :	57.3 mg (62.0 μmol, 2.00 eq)
HCTU:	26.0 mg (62.0 μmol, 2.00 eq)
DIEA:	11.0 μL (62.0 μmol, 2.00 eq)
DMF:	2.00 mL

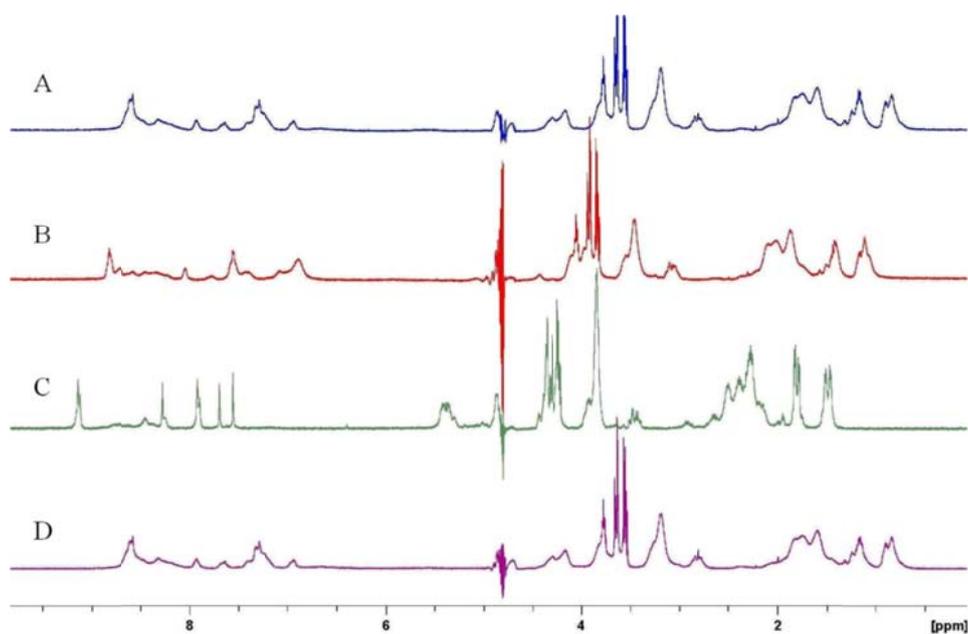
Nach der PMB-Entschützung wurde die kalte Reaktionslösung zum Fällen langsam mit kaltem und trockenem Diethylether versetzt, wobei 4 Fraktionen erhalten wurden. In den

ersten beiden Fraktionen lag das Produkt in hoher Reinheit vor. Sie wurden vereinigt, so dass insgesamt 33.0 mg (11.2 μmol , 36 %) eines farblosen Feststoffes isoliert werden konnten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- D_6 , 348 K): δ [ppm] = 0.81-0.89 (m, 6H), 1.03-1.06 (m, 4H), 1.19-1.22 (m, 2H), 1.27 (bs, 1H), 1.33 (bs, 1H), 1.56 (bs, 18H), 1.78 (bs, 6H), 1.88 (bs, 2H), 1.98 (bs, 1H), 2.09 (bs, 2H), 3.56-3.62 (m, 12H), 3.95 (s, 2H), 4.02 (bs, 2H), 4.20-4.41 (m, 8H), 4.63 (m, 4H), 7.01 (bs, 18H), 7.21-7.23 (m, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.52 (bs, 5H), 7.83-7.86 (m, 4H), 8.06-8.18 (m, 4H), 8.57 (bs, 1H), 10.73 (s, 1H), 11.19 (s, 1H).

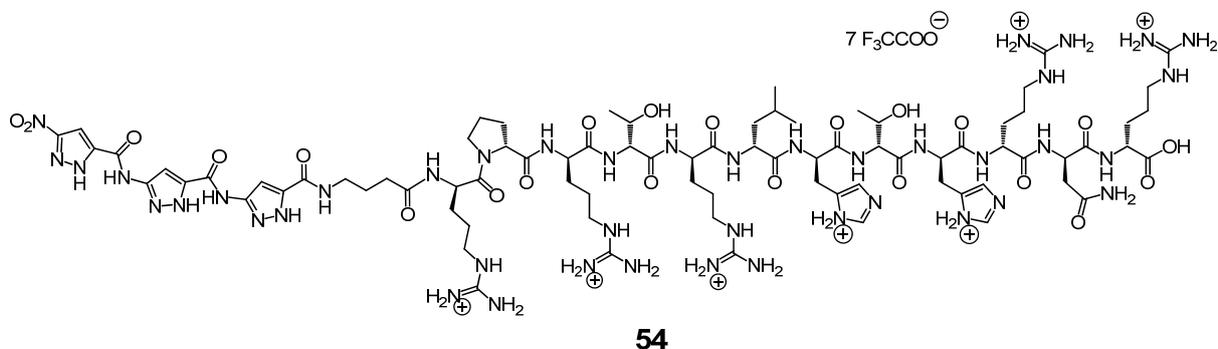
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), pH 4.50, 363 K): δ [ppm] = 1.46-1.54 (m, 6H, $\text{CH}_{3\text{Val}}$), 1.78-1.82 (m, 6H, $\text{CH}_{3\text{Thr}}$), 2.15-2.54 (m, 24H), 2.88-2.96 (m, 1H), 3.39-3.52 (m, 2H), 3.84-3.97 (m, 13H), 4.21-4.88 (bs, 2H), 5.31-5.44 (m, 4H), 7.56 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.70 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 7.90-7.92 (m, 2H, CH_{His}), 8.25 (bs, 1H, NH_{Amid}), 8.28 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{Pyrazol}}$), 8.45 (bs, NH_{Amid}), 9.12-9.14 (m, 2H, CH_{His}). **HRMS (ESI):** $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+} = m/z$ für $\text{C}_{85}\text{H}_{139}\text{N}_{42}\text{O}_{25}$: ber.: 716.3635; gef.: 716.3609; $[\text{M} + 2\text{H} + \text{Na}]^{3+} = m/z$ für $\text{C}_{85}\text{H}_{138}\text{N}_{42}\text{NaO}_{25}$: ber.: 723.6908; gef.: 723.6911; $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+} = m/z$ für $\text{C}_{85}\text{H}_{140}\text{N}_{42}\text{O}_{25}$: ber.: 537.2738; gef.: 537.2719. **HPLC-Reinheit:** 93.1 %; (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate: 0.5 mL/min, Retentionszeit: 19.1 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Trimer-TEG-D3 **55** wies bei Raumtemperatur sehr breite Signale auf und konnte deshalb nicht ausgewertet werden. Eine mögliche Ursache für die Verbreiterung der Linien kann die Selbstaggregation in Lösung sein. Auffällig ist ein Multiplett bei ca. 3.50 ppm, das unter anderem von den Methylengruppen des TEG-Spacers stammt, die an der Selbstassoziation nicht teilnehmen können. Sie liegen wahrscheinlich frei beweglich in Lösung vor und weisen dadurch scharfe Signale auf. Beim fortlaufenden Erhitzen verschieben sich alle Signale. Deren deutliche Verschärfung ist allerdings erst bei sehr hoher Temperatur (363 K) zu beobachten. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur scheint die Hybridverbindung **55** wieder in aggregierter Form vorzuliegen.



^1H -NMR-Spektren von Trimer-TEG-D3 **55** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10), pH 4.5, 500 MHz. Die Lösung wurde fortlaufend erhitzt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. **A**: 300 K; **B**: 323 K; **C**: 363 K; **D**: 298 K.

Darstellung von 4-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-oxobutan-(*R*)-argininyl-(*R*)-prolinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-leucinyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-asparaginyl-(*R*)-arginin (Trim-GABA-D3) 54



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift III, wobei das mit rprtrlhthnr beladene Harz eingesetzt wurde.

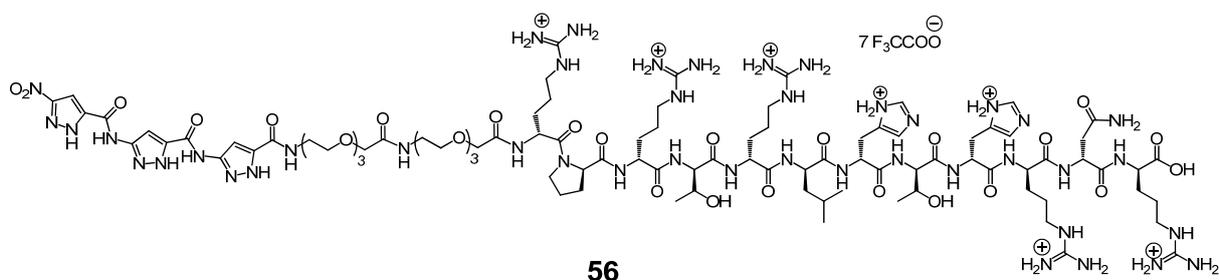
Kupplungseinwaagen:

H ₂ N-rprtrlhthnr-Wang-Harz:	80.0 mg (15.5 μmol, 1.00 eq)
Trimer(PMB)-GABA-OH 48 :	25.5 mg (31.0 μmol, 2.00 eq)
HCTU:	12.8 mg (31.0 μmol, 2.00 eq)
DIEA:	5.31 μL (31.0 μmol, 2.00 eq)
DMF:	2.00 mL

Es wurden drei Fraktionen erhalten. Laut HPLC enthielt nur die erste Fraktion das Pyrazol-Peptid in ausreichender Reinheit. Die restlichen Fraktionen enthielten zusätzlich das nicht umgesetzte Edukt, das D3-Peptid. Die Ausbeute betrug 9.00 mg (3.17 μmol, 21 %).

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O (9:1), pH 2.7, 298 K): δ [ppm] = 0.82-0.90 (m, 6H), 1.13-1.19 (m, 4H), 1.30-2.08 (m, 25H), 2.72-2.87 (m, 2H), 3.18-3.28 (m, 12H), 3.53-3.66 (m, 4H), 3.75-3.79 (m, 1H), 4.15-4.36 (m, 4H), 6.72 (bs, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 8.14-8.67 (m, 10H). **HRMS (ESI):** [M + 2H]²⁺ = *m/z* für C₈₁H₁₃₀N₄₂O₂₂: ber.: 1022.0179; gef.: 1022.0202; [M + H + Na]²⁺ = *m/z* für C₈₁H₁₂₉N₄₂NaO₂₂: ber.: 1032.5077; gef.: 1032.5090; [M + 3H]³⁺ = *m/z* für C₈₁H₁₃₁N₄₂O₂₇: ber.: 681.6810; gef.: 681.6832; [M + 4H]⁴⁺ = *m/z* für C₈₁H₁₃₂N₄₂O₂₂: ber.: 511.2620; gef.: 511.2630. **HPLC-Reinheit:** 91.2 %; (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate: 0.5 mL/min, Retentionszeit: 18.7 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Darstellung von 1-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-yl)-1,13,25-trioxo-5,8,11,17,20,23-hexaoxa-2,14-diaza-pentacosan-(*R*)-argininyl-(*R*)-prolinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-leucinyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-asparaginyl-(*R*)-arginin (Trim-TEG-TEG-D3) 56



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift III unter Verwendung von H₂N-rprtrlhthrn-Wangharz.

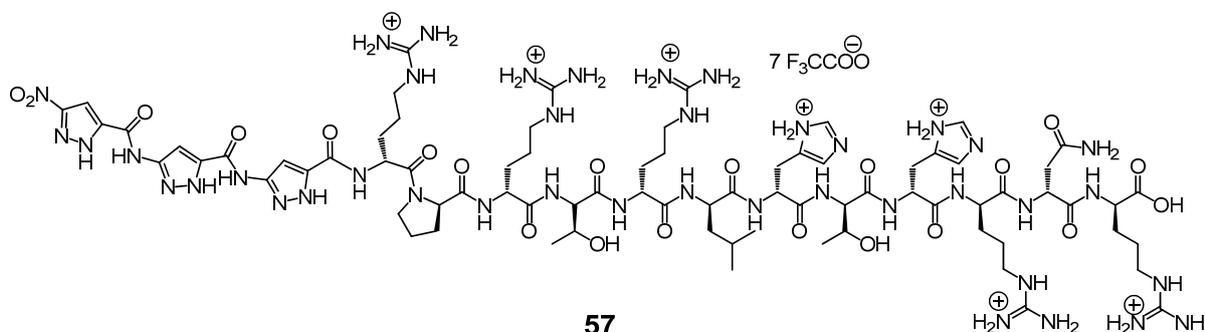
Kupplungseinwaagen:

H ₂ N-rprtrlhthrn-Wang-Harz:	135 mg (26.2 μmol, 1.00 eq)
Trimer(PMB)-TEG ₂ -OH 50 :	58.4 mg (52.4 μmol, 2.00 eq)
HCTU:	21.7 mg (52.4 μmol, 2.00 eq)
DIEA:	9.00 μL (52.4 μmol, 2.00 eq)
DMF:	2.00 mL

Die erhaltenen drei Fraktionen wurden mittels HPLC und ESI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Die Untersuchung zeigte, dass die erste Fraktion die höchste Reinheit besitzt. Es konnten somit 12.0 mg (3.83 μmol, 15 %) eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O (9:1), pH 3.5, 298 K): δ [ppm] = 0.83-0.90 (m, 6H), 1.14-2.03 (m, 27H), 2.75-2.86 (m, 2H), 3.20 (bs, 13H), 3.47-3.78 (m, 19H), 4.08-4.29 (m, 8H), 5.32 (bs, 1H), 6.71 (bs, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.20-7.35 (m, 6H), 7.62-7.69 (m, 1H), 8.09-9.04 (m, 10H). **HRMS (ESI)**: [M + 2H]²⁺ = *m/z* für C₉₃H₁₅₃N₄₃O₂₉: ber.: 1168.5917; gef.: 1168.5978; [M + 3H]³⁺ = *m/z* für C₉₃H₁₅₄N₄₃O₂₉: ber.: 779.3969; gef.: 779.4013; [M + 4H]⁴⁺ = *m/z* für C₉₃H₁₅₅N₄₃O₂₉: ber.: 584.7995; gef.: 584.8027. **HPLC-Reinheit**: 92.5 %, (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate: 0.5 mL/min, Retentionszeit: 19.8 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Darstellung von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*R*)-argininyl-(*R*)-prolinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-leucinyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-asparaginyl-(*R*)-arginin (Trim-D3) **57**



Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorschrift III unter Verwendung von H₂N-rprtrlhthrn-Wangharz.

Kupplungseinwaagen:

H ₂ N-rprtrlhthrn-Wang-Harz:	180 mg (34.9 μmol, 1.00 eq)
Trimer(PMB)-OH 27 :	103 mg (140 μmol, 4.00 eq)
HCTU:	58.0 mg (140 μmol, 4.00 eq)
DIEA:	24.0 μL (140 μmol, 4.00 eq)
DMF:	2.00 mL

Nach der Abspaltung vom Harz und der PMB-Entschützung in Trifluoressigsäure konnten 28.6 mg (10.0 μmol, 29 %) des gefriergetrockneten Pyrazol-Peptids **57** isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, H₂O/D₂O (9:1), 298 K): δ [ppm] = 0.79-0.85 (m, 6H), 1.11-1.16 (m, 6H), 1.33-2.02 (m, 21H), 2.73-2.82 (m, 4H), 3.16 (bs, 12H), 4.13-4.26 (m, 5H), 6.94 (bs, 2H), 7.16-7.31 (m, 10H), 7.61-7.67 (m, 2H), 8.20-8.61 (m, 12H). **HRMS (ESI)**: [M + 2H]²⁺ = *m/z* für C₇₇H₁₂₃N₄₁O₂₁: ber.: 979.4945; gef.: 979.4913; [M + 3H]³⁺ = *m/z* für C₇₇H₁₂₄N₄₁O₂₁: ber.: 652.9960; gef.: 652.9971; [M + 4H]⁴⁺ = *m/z* für C₇₇H₁₂₅N₄₁O₂₁: ber.: 490.2494; gef.: 490.2501; [M + 5H]⁵⁺ = *m/z* für C₇₇H₁₂₆N₄₁O₂₁: ber.: 392.2005; gef.: 392.2033. **HPLC-Reinheit**: 98.2 %; (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate: 0.5 mL/min, Retentionszeit: 18.7 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril).

6.11 ThT-Fluoreszenzmessungen

Zum Ansetzen der A β (1-42)-Peptid-Stammlösung wurde das von der Firma Bachem gelieferte Peptid zunächst mit Hexafluoroisopropanol (HFIP) behandelt. Diese Maßnahme ist erforderlich um das Peptid in monomerer Form zu erhalten. Bereits bestehende Aggregate sollen dadurch aufgelöst werden. Dazu wurde 1.00 mg des Peptids mit 200-300 μ L HFIP versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur dichtverschlossen aufbewahrt. In der Regel war danach die erhaltene Lösung klar und wies keinerlei ungelöste Rückstände auf. Waren jedoch noch ungelöste Partikel in der Lösung vorhanden, so wurde diese ca. zehn Minuten lang im Ultraschallbad behandelt. In manchen Fällen mussten die Rückstände sogar anschließend abfiltriert und die Masse des Peptids überprüft werden. Die klare A β (1-42)-Lösung wurde nachfolgend gefriergetrocknet. Die Gefriertrocknung dauerte im Durchschnitt ca. 5-6 Stunden, dabei wurde darauf geachtet, dass die Temperatur der Probe 4 °C nicht übersteigt. Der farblose voluminöse Feststoff konnte danach mehrere Wochen dichtverschlossen bei -18 °C aufbewahrt oder zum Ansetzen einer Stammlösung direkt weiterverwendet werden. Die Stammlösung (495 μ M oder 300 μ M) wurde nach dem Ansetzen schnell in Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Die A β -Aliquots wurden verschlossen, schockgefroren und bei -18 °C bis zu mehreren Monaten gelagert.

Die ThT-Fluoreszenzmessungen wurden in einer 384-Well-Palatte (nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 37 °C, einer Excitationswellenlänge von 446 nm (Bandbreite: 9 nm) und einer Emissionslänge von 490 nm mit einer Bandbreite von 20 nm. Jeder Messpunkt wurde über 40 Lichtblitze gemittelt. Die 384-Well-Plate wurde mit einer transparenten, DMSO beständigen Folie (Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) abgedeckt. Die manuelle Verstärkung betrug 70 % bei 33 μ M und 100 % bei 10 μ M A β -Konzentration.

6.11.1 ThT-Fluoreszenzmessungen mit 33 μ M A β (1-42)

Generell wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

c (A β ₄₂) = 495 μ M in wasserfreiem DMSO

c (Ligand) = 4.95 mM in wasserfreiem DMSO

c (ThT) = 62.7 μ M

Für Inhibierungs- bzw. Disaggregationsmessungen wurden Lösungen mit A β -Peptid alleine (Kontrolle) und A β -Peptid mit 6-fachem Überschuss an Ligand bzgl. A β angesetzt. Dazu wurden A β -Aliquots zunächst mit Ligand-Stammlösung bzw. DMSO, dann mit PBS, bidest. Wasser und ThT-Lösung versetzt. Zum Überprüfen der Liganden-Eigenfluoreszenz wurden Liganden-Lösungen mit und ohne ThT-Fluoreszenzfarbstoff angesetzt. Die genaue Zusammensetzung und Endkonzentrationen der zu vermessenden Lösungen sind den Tabellen 6.2 und 6.3 zu entnehmen.

Tabelle 6.2: Zusammensetzung der Inhibierungs- und Disaggregationsansätze

	A β_{42} -Lösung, 495 μ M [μ L]	Ligand-Lösung 4.95 mM [μ L]	DMSO [μ L]	H ₂ O [μ L]	PBS 10 x [μ L]	ThT-Lösung 62.7 μ M [μ L]
nur A β_{42}	4	-	2.4	38.1	6	9.5
A β_{42} + Ligand	4	2.4	-	38.1	6	9.5
nur Ligand	-	2.4	4	47.6	6	-
Ligand + ThT	-	2.4	4	38.1	6	9.5

Tabelle 6.3: Endkonzentrationen der Inhibierungs- und Disaggregationsansätze

	A β_{42}	Ligand	DMSO	PBS	ThT
nur A β_{42}	33 μ M	-	10.7 %	1 x	10 μ M
A β_{42} + Ligand	33 μ M	198 μ M	10.7 %	1 x	10 μ M
nur Ligand	-	198 μ M	10.7 %	1 x	-
Ligand mit ThT	-	198 μ M	10.7 %	1 x	10 μ M

6.11.1.1 Inhibierung der Aggregation

Die angesetzten Lösungen, die Amyloid- β -Peptid enthalten, wurden dichtverschlossen fünf Tage lang bei 37 °C im Thermomixer bei 650 rpm inkubiert, dann kurz zentrifugiert, in die 384-Well-Paltes überführt und vermessen. Mit jedem Ligand und A β -Peptid alleine wurden drei bis vier Lösungen angesetzt. Der Versuch wurde zwei- bis dreimal durchgeführt, so dass der Mittelwert aus mindestens sieben Werten berechnet werden konnte.

6.11.1.2 Auflösung bestehender Aggregate (Disaggregation)

Die Lösungen mit A β -Peptid wurden zunächst ohne Ligand dichtverschlossen fünf Tage lang bei 37 °C im Thermomixer bei 650 rpm inkubiert. Nach Ligand-Zugabe wurden die Lösungen erneut fünf Tage lang unter gleichen Bedingungen im Thermomixer behandelt, kurz zentrifugiert, in die 384-Well-Pallete überführt und vermessen. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, so dass der Mittelwert aus mindestens sechs Werten berechnet werden konnte.

6.11.1.3 Fluoreszenz der Liganden mit und ohne ThT

Die Ligandenlösungen mussten nicht inkubiert werden, sie wurden direkt vermessen. In den Abbildungen 6.1 und 6.2 sind Fluoreszenzintensitäten der Liganden (198 μ M) in prozentuellem Verhältnis zum ThT-Fluoreszenzwert in Gegenwart von 33 μ M A β ₄₂-Peptid (Kontrolle, 100 %, nach fünf Tagen Aggregation) dargestellt.

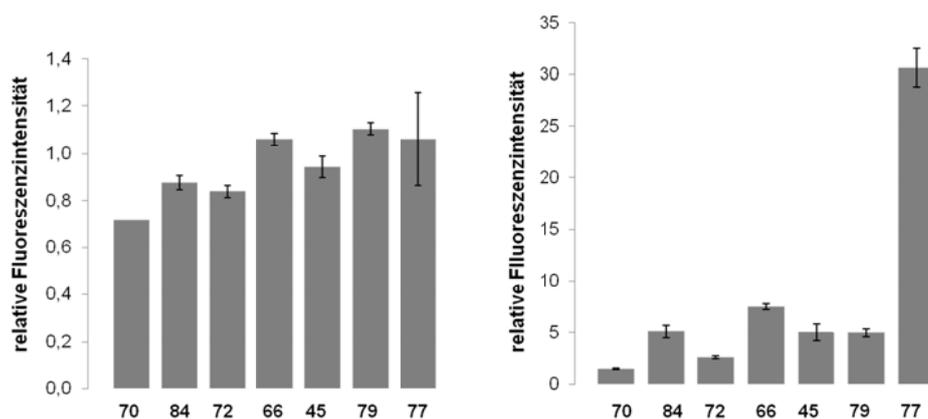


Abbildung 6.1: Relative Fluoreszenzintensität der Trimer-Derivate **45**, **66**, **70**, **72**, **77** und **79** (198 μ M) bezogen auf Kontrolle (100 %, 33 μ M A β ₄₂) ohne ThT (links) und mit ThT (rechts).

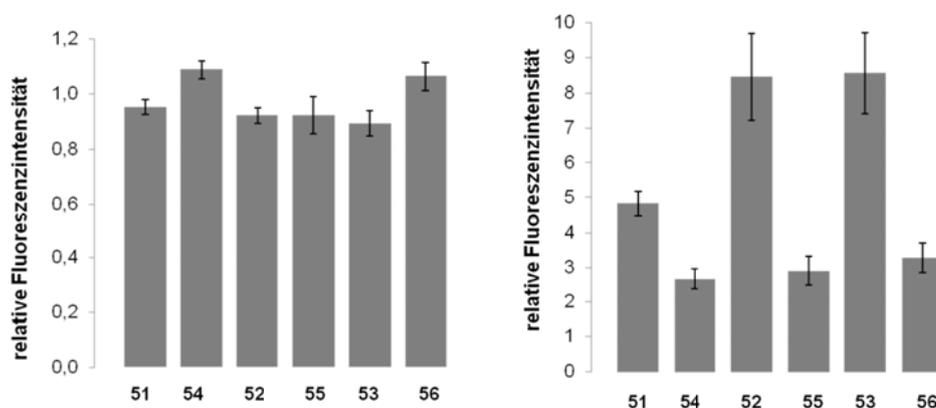


Abbildung 6.2: Relative Fluoreszenzintensität der Hybridverbindungen **51-56** (198 μ M) in Prozent bezogen auf Kontrolle (100 %, 33 μ M A β ₄₂) ohne ThT (links) und mit ThT (rechts).

6.11.2 ThT-Fluoreszenzmessungen mit 10 μM A β (1-42)

Generell wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

$c(\text{A}\beta_{42}) = 300 \mu\text{M}$ in wasserfreiem DMSO

$c(\text{ThT}) = 62.7 \mu\text{M}$ in bidest. Wasser

Für jeden Inhibitor bzw. Ligand wurden folgende Stammlösungen in DMSO oder bidest. Wasser angesetzt: 1.50 mM, 750 μM , 250 μM , 125 μM , 50 μM , 12.5 μM .

Die Kontroll-Lösungen enthielten auch hier nur das A β (1-42)-Peptid ohne Ligand. Die Inhibierende Wirkung der jeweiligen Testverbindung wurde bei deren verschiedenen Konzentrationen untersucht. Die Liganden-Endkonzentrationen betragen: 0.5 μM (0,05 eq bzgl. A β), 2.0 μM (0.2 eq bzgl. A β), 5.0 μM (0.5 eq bzgl. A β), 10 μM (1.0 eq bzgl. A β), 30 μM (3.0 eq bzgl. A β) und 60 μM (6.0 eq bzgl. A β). Die A β -Aliquots wurden zunächst mit Ligand-Stammlösung bzw. DMSO, dann mit PBS, bidest. Wasser und ThT-Lösung versetzt. Es wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Zum Überprüfen der Liganden-Eigenfluoreszenz wurden Liganden-Lösungen mit und ohne ThT angesetzt. Die genaue Zusammensetzung und Endkonzentrationen der zu vermessenden Lösungen sind den Tabellen 6.4 und 6.5 zu entnehmen.

Tabelle 6.4: Zusammensetzung der Inhibierungsansätze für Dosis-Wirkungsbeziehungen

	A β_{42} -Lösung, 300 μM [μL]	Ligand-Lösung variable Konz. [μL]	DMSO [μL]	H ₂ O [μL]	PBS 10 x [μL]	ThT-Lösung 62.7 μM [μL]
nur Aβ_{42}	2	-	2.4	46.7	6	2.9
Aβ_{42} + Ligand	2	2.4	-	46.7	6	2.9
nur Ligand	-	2.4	2	49.6	6	-
Ligand + ThT	-	2.4	2	46.7	6	2.9

Tabelle 6.5: Endkonzentrationen der Inhibierungsansätze für Dosis-Wirkungsbeziehungen

	A β_{42}	Ligand	DMSO	PBS	ThT
nur Aβ_{42}	10 μM	-	7.33 %	1 x	3.03 μM
Aβ_{42} + Ligand	10 μM	variabel	7.33 %	1 x	3.03 μM
nur Ligand	-	60 μM	7.33 %	1 x	-
Ligand mit ThT	-	60 μM	7.33 %	1 x	3.03 μM

Die angesetzten Lösungen wurden direkt in die 384-Well-Palatte überführt, 72 Stunden lang bei 37 °C inkubiert, wobei die Proben alle 60 Sekunden für 20 Sekunden orbital geschüttelt wurden, und anschließend vermessen (manuelle Verstärkung: 100 %). Mit jedem Ligand und A β -Peptid alleine wurden drei Lösungen angesetzt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, so dass der Mittelwert aus mindestens sieben Werten berechnet werden konnte. Aufgrund der hohen Fluoreszenzwerte der Platte bei manueller Verstärkung von 100 % mussten diese von den Fluoreszenzwerten der Lösungen subtrahiert werden.

6.11.2.1 Fluoreszenz der Liganden mit und ohne ThT

Die Ligandenlösungen mussten nicht inkubiert werden, sie wurden direkt vermessen. In der Abbildung 6.3 sind Fluoreszenzintensitäten der Liganden (60 μ M) in prozentuellem Verhältnis zum ThT-Fluoreszenzwert in Gegenwart von 10 μ M A β ₄₂-Peptid (Kontrolle, 100 %, nach 72 Stunden Aggregation) dargestellt.

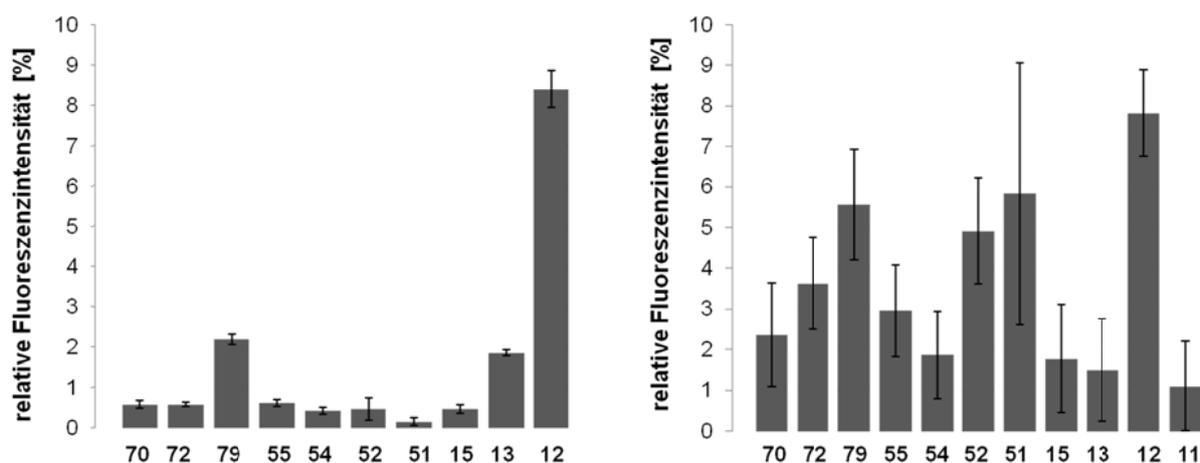


Abbildung 6.3: Relative Fluoreszenzintensität der Testverbindungen **12**, **13**, **15**, **51**, **52**, **54**, **55**, **70**, **72** und **79** (60 μ M) in Prozent ohne ThT (links) und mit ThT (rechts) bezogen auf Kontrolle (100 %, 10 μ M A β ₄₂).

6.11.3 Aggregation von A β (1-42) in Anwesenheit von Aggregationskeimen

Die Herstellung der Aggregationskeime erfolgte durch Inkubation des 33 μ M A β (1-42)-Peptids in 1xPBS-Lösung mit 10 % DMSO analog zur Herstellung der Aggregate für Disaggregationsexperimente. Die frisch hergestellten Fibrillen wurden anschließend mittels Ultraschall-Geräts (Brandson Sonifier® 250) unter Eiskühlung zerstört.^[39] Die hergestellte Lösung mit Aggregationskeimen wurde unmittelbar danach zu den Aggregationsansätzen gegeben.

Die Aufnahme von Kinetiken erfolge bei gleichen Einstellungen wie die Endpunkt-Messungen. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten dabei alle 15 Minuten, die Proben wurden zuvor immer für 30 s bei einer mittleren Intensität orbital geschüttelt.

Die Untersuchungen der Liganden auf ihre aggregationsinhibierenden Eigenschaften erfolgten in Anwesenheit von 5 % (Zugabe von 3 μ L der Aggregationskeimlösung) und 10 % (Zugabe von 6 μ L der Aggregationskeimlösung) Aggregationskeime. Die Konzentrationen der anderen Komponenten der Lösungen, die Dauer und die Bedingungen der Aggregation sowie die anschließenden Fluoreszenzmessungen wurden analog zu den bereits oben beschriebenen Messungen gewählt. Der Versuch wurde einmal durchgeführt. Der Mittelwert konnte aus sechs Werten berechnet werden.

Die Preinkubationsversuche erfolgten mit 10 % Aggregationskeime in der Lösung. Hierzu wurden 6 μ L der Aggregationskeimlösung mit 2.4 μ L der 4.95 mM Ligand-Stammlösung für 5 min im Gemisch aus 6 μ L PBS und 38.1 μ L bidest. Wasser preinkubiert. Anschließend wurden die Aggregationsversuche durch Zugabe von monomerem A β ₄₂-Peptid in DMSO (4 μ L, 495 μ M) und ThT-Lösung in Wasser (9.5 μ L 62.7 μ M) gestartet. Die Dauer und Bedingungen der Aggregation sowie die anschließenden Fluoreszenzmessungen wurden analog zu den bereits oben beschriebenen Messungen gewählt. Der Versuch wurde einmal durchgeführt. Der Mittelwert konnte aus sechs Werten berechnet werden.

6.11.4 ThT-Fluoreszenzmessungen mit Filtraten der Ligandenlösungen

Die Untersuchungen erfolgten analog zu Experimenten mit 33 μ M A β (1-42). Der Versuch wurde zweimal durchgeführt. Der Mittelwert konnte aus acht Werten berechnet werden. Die Mittelwertberechnung für Trimer-K-OMe **68** erfolgte aus vier Werten, da die Messung in diesem Fall nicht wiederholt werden konnte.

6.12 TEM-Aufnahmen

Herstellung der A β -Stammlösung für TEM-Aufnahmen

137 μg des A β (1-42)-Peptids, das vorher mit HFIP behandelt und lyophilisiert wurde, wurden eingewogen und in 137 μL 2 mM NaOH gelöst. 27 μL dieser Lösung wurden in ein Eppendorfgefäß gegeben und jeweils mit weiteren 231 mL bidest. Wasser versetzt.

Herstellung der Lösungen und Präparation der TEM-Netzchen (grids)

Für die TEM-Aufnahmen wurden drei Arten von Lösungen angesetzt: A β (1-42)-Peptid alleine, A β (1-42)-Peptid in Anwesenheit von Liganden und Liganden selbst. Mit diesen Lösungen wurden die Objektträgernetzchen später beschichtet. Für die Probenpräparation wurden mit amorpher Kohlefolie beschichtete Nickelnetzchen (Grids) verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Lösungen ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 6.6: Zusammensetzung der TEM-Lösungen.

Probe	A β 42- Lösung [μL]	NaPi 100 μM pH 7.4 [μL]	DMSO [μL]	Ligand in DMSO/H $_2$ O 5 mM [μL]	H $_2$ O [μL]
A β (1-42) alleine	43	5	2	-	-
A β (1-42) + Ligand	43	5	-	2	-
Ligand alleine	-	5	-	2	43

Die angesetzten Lösungen mit folgenden Endkonzentrationen: 20 μM A β (1-42)-Peptid- und 200 μM Ligand, wurden fünf Tage lang im Thermomixer bei 850 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden alle Lösungen 1:10 mit bidest. Wasser verdünnt. 5 μL der jeweiligen verdünnten Lösung wurden auf die Objektträgernetzchen aus Nickel aufgetragen, wobei die verwendeten Netzchen zur Präparation auf Parafilm, als Unterlage positioniert wurden. Die beschichteten Netzchen wurden 24 Stunden lang bei Raumtemperatur getrocknet, dann in jeweils einem Tropfen (50 μL) Ammoniumacetat-Lösung (100 mM), Ammoniumacetat-Lösung (10 mM) und Ammoniummolybdat-(VI)-Lösung (2 % in bidest. Wasser w/v) gewaschen. Jeder Wasch- bzw. Kontrastierungsschritt betrug 90 Sekunden. Besonders bei der Kontrastierung mit Ammoniummolybdat-(VI)-Lösung musste die Zeit genau eingehalten werden. Abschließender Schritt der Präparation war eine erneute Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur. Die verwendeten Kontrastierungs- und Waschlösungen wurden zuvor steril gefiltert.

6.13 CD-Messungen

Generell wurden CD-Spektren von Lösungen aufgenommen, die nur A β (1-42)-Peptid, A β (1-42)-Peptid und Ligand oder nur Ligand enthalten, aufgenommen. Zum Ansetzen der Lösungen wurde A β (1-42)-Peptid, das vorher mit HFIP behandelt und lyophilisiert wurde, verwendet. Eine 500 μ M A β (1-42)-Lösung in HFIP wurde unmittelbar vor den Messungen hergestellt. Desweiteren wurden Kaliumphosphatpuffer (5 μ M, pH 7.3) und Liganden-Lösungen in HFIP oder bidest. Wasser ebenfalls unmittelbar vor den Messungen angesetzt. Somit wurden nur die Liganden vermessen, die in HFIP bzw. H₂O bis zu einer Konzentration von 500 μ M löslich und danach in 5 μ M Kaliumphosphatpuffer (KaPi), ohne Präzipitatbildung, bis zu einer Konzentration von 10 μ M verdünnbar waren. Liganden-Stammlösungen von Trimer-TEG-K-OMe **70**, Trimer-TEG-KKKKKKG-OH **72** und (Trimer-K)₂TEGDA **84** wurden in bidest. Wasser angesetzt, wogegen Trimer-TEG-OH **41**, Trimer-TEG-DD **45** und Trimer-TEG-KLVFF-OH **77** nur in HFIP löslich waren. Die genaue Zusammensetzung der Lösungen ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 6.7: Zusammensetzung der CD-Lösungen.

Probe	KaPi 5 μ M [μ L]	A β (1-42)-Lsg 500 μ M [μ L]	Ligand-Lsg in HFIP/ H ₂ O 500 μ M [μ L]	HFIP [μ L]
A β (1-42) alleine	980	20	-	-
A β (1-42) + Ligand	960	20	20	-
Ligand alleine	960	-	20	20

Die angesetzten CD-Lösungen wurden 48 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vermessen. In der Abbildung 6.4 sind die CD-Spektren der Liganden, ohne A β -Peptid dargestellt. Diese Ligandenspektren wurden von den jeweiligen Gesamtspektren (Amyloid- β -Peptid in Anwesenheit von Ligand) substrahiert.

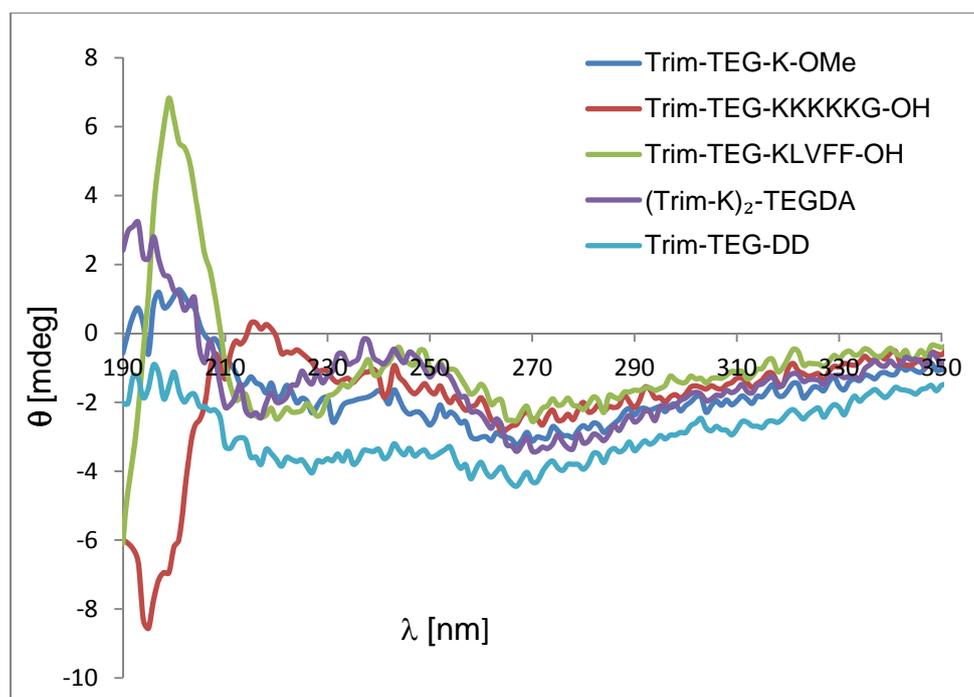


Abbildung 6.4: CD-Spektren von 10 μM Liganden-Lösungen in 5 μM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.3) bei Raumtemperatur.

6.14 UV-Messungen

Die UV-Spektren wurden zunächst von den Ligandenlösungen mit 198 μM Konzentration in 1xPBS/DMSO (90:10) aufgenommen. Anschließend wurden diese Lösungen aufgeteilt, wobei ein Teil durch einen Spritzenfilter (Porenweite 200 nm) filtriert und der andere bei 12100 g 30 Minuten lang zentrifugiert wurden. Von den entsprechenden Filtraten und Überständen wurden dann erneut UV-Spektren aufgenommen. In den Abbildungen 6.5 und 6.6 sind UV-Spektren von allen in diesem Experiment untersuchten Verbindungen dargestellt. Jedes Diagramm enthält einen direkten Vergleich der Gesamtabsorption der Lösung zum Filtrat, Überstand und zum reinen Puffer (PBS).

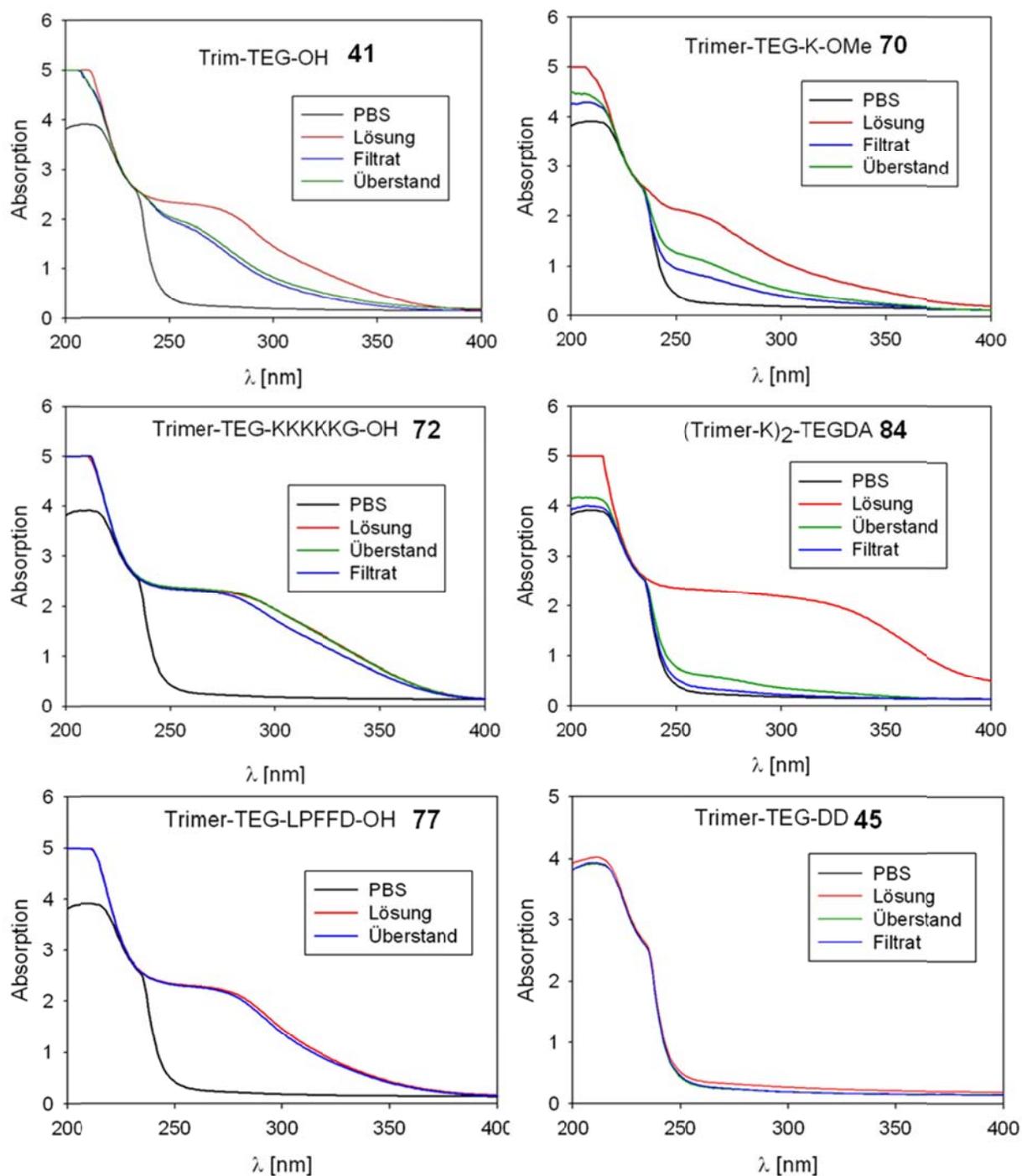


Abbildung 6.5: UV-Spektren von Liganden **41**, **45**, **70**, **72**, **77** und **84** vor der Filtration/ Zentrifugation: Lösung; nach der Filtration (0.2 µm Porenweite): Filtrat; nach der Zentrifugation (30 Minuten lang bei 12100 g): Überstand. UV-Absorption von PBS ist in jedem Diagramm in schwarz dargestellt.

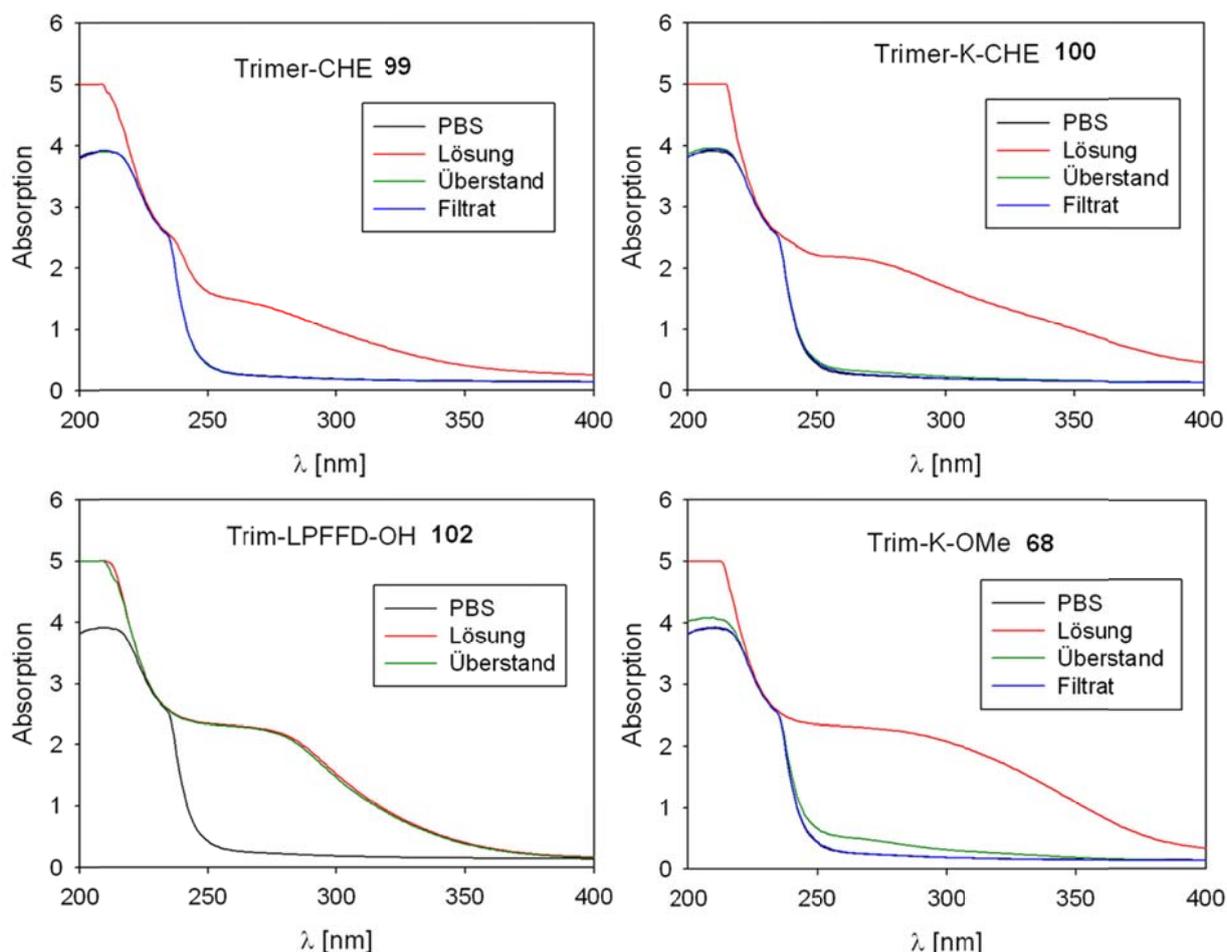


Abbildung 6.6: UV-Spektren von Liganden **68**, **99**, **100** und **102** vor der Filtration/Zentrifugation: Lösung; nach der Filtration (0.2 μm Porenweite): Filtrat; nach der Zentrifugation (30 Minuten lang bei 12100 g): Überstand. UV-Absorption von PBS ist in jedem Diagramm in schwarz dargestellt.

6.15 DLS-Messungen

Für die DLS-Messungen wurden 198 μM Ligandenlösungen in 1xPBS/DMSO (90:10) angesetzt. Die Herstellung erfolgte durch Verdünnen der 4.95 mM Liganden-Stammlösungen in DMSO oder Wasser analog zum Ansetzen der Aggregationslösungen für ThT-Fluoreszenztest. In diesem Fall wurden allerdings 2-3 mL Lösung von jeder zu untersuchenden Verbindung angesetzt. Diese Lösungen wurden durch zwei Spritzenfilter mit Porenweite 650-750 nm und 200 nm filtriert. Beide Filtrate wurden mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht.

6.16 Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration

Generell wurden folgende Stammlösungen für die Bestimmung frisch angesetzt.

c (Pyren) = 0.2 mM in Ethanol

c (Trim-TEG-K-OMe **70**) = 5 mM in bidest. Wasser.

C (Trim-TEG-KKKKKG-OH **72**) = 5 mM in bidest. Wasser

Zur Herstellung der Lösungen mit verschiedenen Liganden-Endkonzentrationen wurde die Pyrenlösung immer zuerst vorgelegt. Die Endkonzentration der Fluoreszenzsonde betrug in allen Lösungen 1 μM . Die frisch angesetzten Lösungen wurden vorsichtig vermischt, für zwei Stunden unter Lichtausschluss stehen lassen und anschließend vermessen. Die Endkonzentrationen an Liganden in μM betragen für Trim-TEG-K-OMe **70** 0.01, 0.1, 1.0, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100, 200, 500 und für Trim-TEG-KKKKKG-OH **72** 0.1, 1.0, 6.25, 25.0, 100, 500. Pyren wurde bei 343 nm angeregt. Die Fluoreszenzspektren wurden für einen Bereich von 360 bis 420 nm aufgenommen.^[259]

7 Literaturverzeichnis

- [1] C. M. Dobson, *Trends in Biochemical Sciences* **1999**, 24, 329.
- [2] C. M. Dobson, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2004**, 15, 3.
- [3] P. J. Thomas, B. H. Qu, P. L. Pedersen, *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, 20, 456.
- [4] P. R. Bharadwaj, A. K. Dubey, C. L. Masters, R. N. Martins, I. G. Macreadie, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2009**, 13, 412.
- [5] I. W. Hamley, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, 8128.
- [6] C. A. Ross, M. A. Poirier, *Nature Reviews Neuroscience* **2004**, 10, 10.
- [7] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annual Review of Biochemistry* **2006**, 75, 333.
- [8] A. Ghahghaei, N. Faridi, *J. Biomedical Science and Engineering* **2009**, 2, 345.
- [9] M. B. Pepys, *Annual Review of Medicine* **2006**, 57, 223.
- [10] M. R. Chapman, L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, S. J. Hultgren, *Science* **2002**, 295, 851.
- [11] J. W. Kelly, W. E. Balch, *Journal of Cell Biology* **2003**, 161, 461.
- [12] J. C. Rochet, P. T. Lansbury, *Current Opinion in Structural Biology* **2000**, 10, 60.
- [13] A. R. Wyatt, J. J. Yerbury, S. Poon, M. R. Wilson, *Current Medicinal Chemistry* **2009**, 16, 2855.
- [14] P. Westermark, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, C. L. Masters, G. Merlini, M. J. Saraiva, J. D. Sipeo, *Amyloid-Journal of Protein Folding Disorders* **2007**, 14, 179.
- [15] C. Soto, *Nature Reviews Neuroscience* **2003**, 4, 49.
- [16] S. Ladner-Merz, U. Muller-Ladner, *Zeitschrift Fur Rheumatologie* **2008**, 67, 677.
- [17] J. D. Sipe, *Annual Review of Biochemistry* **1992**, 61, 947.
- [18] K. E. Marshall, L. C. Serpell, *Biochemical Society Transactions* **2009**, 37, 671.
- [19] I. Cherny, E. Gazit, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47, 4062.
- [20] Y. Goto, H. Yagi, K. Yamaguchi, E. Chatani, T. Ban, *Current Pharmaceutical Design* **2008**, 14, 3205.
- [21] W. H. Binder, O. W. Smrzka, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, 7324.
- [22] E. Gazit, *Faseb Journal* **2002**, 16, 77.
- [23] J. Meinhardt, M. Fandrich, *Pathologie* **2009**, 30, 175.
- [24] R. J. van Marum, *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2008**, 22, 265.
- [25] L. D. Estrada, C. Soto, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2007**, 7, 115.
- [26] G. Yamin, K. Ono, M. Inayathullah, D. B. Teplow, *Current Pharmaceutical Design* **2008**, 14, 3231.
- [27] <http://www.onmeda.de/krankheiten/alzheimer-definition-1474-2.html>.
- [28] B. Ray, D. K. Lahiri, *Current Opinion in Pharmacology* **2009**, 9, 434.
- [29] A. Rauk, *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, 2698.
- [30] P. T. Lansbury, H. A. Lashuel, *Nature* **2006**, 443, 774.
- [31] http://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/illustrationen_plaquesfibrillen.htm.
- [32] J. P. Taylor, J. Hardy, K. H. Fischbeck, *Science* **2002**, 296, 1991.
- [33] D. J. Selkoe, *Physiological Reviews* **2001**, 81, 741.
- [34] H. Zheng, E. H. Koo, *Molecular Neurodegeneration* **2006**, 1, 5.
- [35] M. Pallas, A. Camins, *Current Pharmaceutical Design* **2006**, 12, 4389.
- [36] T. A. Bayer, O. Wirths, *Nervenarzt* **2008**, 79, 117.
- [37] J. E. Donahue, C. E. Johanson, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **2008**, 67, 634.

- [38] D. J. Selkoe, *Nature Cell Biology* **2004**, *6*, 1054.
- [39] A. Jan, O. Gokce, R. Luthi-Carter, H. A. Lashuel, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 28176.
- [40] D. J. Selkoe, M. B. Podlisny, *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **2002**, *3*, 67.
- [41] L. Giliberto, R. Borghi, A. Piccini, X. L. Wang, M. Guglielmotto, E. Tamagno, M. Tabatona, *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 9027.
- [42] A. Lomakin, D. S. Chung, D. A. Kirschner, D. B. Teplow, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 1125.
- [43] D. B. Teplow, *Amyloid-Journal of Protein Folding Disorders* **1998**, *5*, 121.
- [44] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condrón, D. B. Teplow, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 22364.
- [45] D. M. Walsh, D. M. Hartley, A. Lomakin, G. B. Benedek, D. J. Selkoe, D. B. Teplow, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 25945.
- [46] R. Roychaudhuri, M. Yang, M. M. Hoshi, D. B. Teplow, *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 4749.
- [47] G. Bitan, A. Lomakin, D. B. Teplow, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 35176.
- [48] S. Lesne, M. T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C. G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, K. H. Ashe, *Nature* **2006**, *440*, 352.
- [49] R. W. Hepler, K. M. Grimm, D. D. Nahas, P. Shughrue, G. Kinney, J. G. Joyce, *Biochemistry* **2006**, *45*, 15157.
- [50] Y. S. Gong, L. Chang, K. L. Viola, G. A. Krafft, W. L. Klein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 10417.
- [51] M. Necula, R. Kaye, S. Milton, C. G. Glabe, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 10311.
- [52] V. H. FINDER, R. Glockshuber, *Neurodegenerative Diseases* **2007**, *4*, 13.
- [53] L. C. Serpell, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **2000**, *1502*, 16.
- [54] M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11064.
- [55] O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A. M. D'Ursi, P. A. Temussi, D. Picone, *European Journal of Biochemistry* **2002**, *269*, 5642.
- [56] S. Zhang, K. Iwata, M. J. Lachenmann, J. W. Peng, S. Li, E. R. Stimson, Y. Lu, A. M. Felix, J. E. Maggio, J. P. Lee, *Journal of Structural Biology* **2000**, *130*, 130.
- [57] C. J. Barrow, M. G. Zagorski, *Science* **1991**, *253*, 179.
- [58] K. N. Dahlgren, A. M. Manelli, W. B. Stine, L. K. Baker, G. A. Krafft, M. J. LaDu, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 32046.
- [59] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693.
- [60] G. Bitan, D. B. Teplow, *Accounts of Chemical Research* **2004**, *37*, 357.
- [61] E. A. Fradinger, B. H. Monien, B. Urbanc, G. B. Benedek, G. Bitan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 14175.
- [62] S. J. Yun, B. Urbanc, L. Cruz, G. Bitan, D. B. Teplow, H. E. Stanley, *Biophysical Journal* **2007**, *92*, 4064.
- [63] B. Urbanc, L. Cruz, G. Bitan, D. B. Teplow, H. E. Stanley, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 17345.
- [64] G. Bitan, B. Tarus, S. S. Vollers, H. A. Lashuel, M. M. Condrón, J. E. Straub, D. B. Teplow, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 15359.
- [65] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. H. Guo, W. M. Yau, M. P. Mattson, R. Tycko, *Science* **2005**, *307*, 262.

- [66] O. N. Antzutkin, J. J. Balbach, J. Reed, R. Tycko, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 13045.
- [67] T. Luhrs, C. Ritter, D. Schubert, R. Riek, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 17342.
- [68] A. T. Petkova, W. M. Yau, R. Tycko, *Biochemistry* **2006**, *45*, 498.
- [69] K. L. Sciarretta, D. J. Gordon, A. T. Petkova, R. Tycko, S. C. Meredith, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6003.
- [70] M. L. Waters, *Biopolymers* **2004**, *76*, 435.
- [71] C. Hilbich, B. Kisterswoike, J. Reed, C. L. Masters, K. Beyreuther, *Journal of Molecular Biology* **1992**, *228*, 460.
- [72] G. Bitan, S. S. Vollers, D. B. Teplow, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 34882.
- [73] J. Hardy, D. Allsop, *Trends in Pharmacological Sciences* **1991**, *12*, 383.
- [74] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, *297*, 353.
- [75] B. J. Cummings, C. J. Pike, R. Shankle, C. W. Cotman, *Neurobiology of Aging* **1996**, *17*, 921.
- [76] P. V. Arriagada, J. H. Growdon, E. T. Hedleywhyte, B. T. Hyman, *Neurology* **1992**, *42*, 631.
- [77] D. M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva, M. J. Rowan, D. J. Selkoe, *Biochemical Society Transactions* **2002**, *30*, 552.
- [78] R. J. Castellani, H. G. Lee, X. W. Zhu, G. Perry, M. A. Smith, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **2008**, *67*, 523.
- [79] G. M. Shankar, S. M. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, D. M. Walsh, B. L. Sabatini, D. J. Selkoe, *Nature Medicine* **2008**, *14*, 837.
- [80] D. J. Selkoe, *Behavioural Brain Research* **2008**, *192*, 106.
- [81] A. C. Cuello, K. F. S. Bell, *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *5*, 15.
- [82] A. P. Kozikowski, I. Nowak, P. A. Petukhov, H. Hennings, L. L. Pearce, P. M. Blumberg, *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 364.
- [83] P. D. Edwards, J. S. Albert, M. Sylvester, L. L. Olsson, S. Patel, N. Spear, G. Tian, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 5912.
- [84] S. Hanessian, G. Q. Yang, J. M. Rondeau, U. Neumann, C. Betschart, M. Tintelnot-Blomley, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 4544.
- [85] N. Moitessier, E. Therrien, S. Hanessian, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 5885.
- [86] S. J. Patey, E. A. Edwards, E. A. Yates, J. E. Turnbull, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 6129.
- [87] S. J. Stachel, C. A. Coburn, S. Sankaranarayanan, A. J. Simon, S. L. Graham, J. P. Vacca, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 7252.
- [88] A. Y. Kornilova, C. Das, M. S. Wolfe, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 16470.
- [89] S. C. Mayer, A. F. Kreft, B. Harrison, M. S. Zhang, H. Zhou, J. S. Jacobsen, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 7348.
- [90] R. Narlawar, B. I. P. Revuelta, C. Haass, H. Steiner, B. Schmidt, K. Baumann, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 7588.
- [91] S. X. Zhou, H. Zhou, P. J. Walian, B. K. Jap, *Biochemistry* **2007**, *46*, 2553.
- [92] D. M. Walsh, D. J. Selkoe, *Journal of Neurochemistry* **2007**, *101*, 1172.
- [93] L. O. Tjernberg, J. Naslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlstrom, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 8545.
- [94] L. O. Tjernberg, C. Lilliehook, D. J. E. Callaway, J. Naslund, S. Hahne, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 17894.

- [95] C. Soto, M. S. Kindy, M. Baumann, B. Frangione, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, 226, 672.
- [96] C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. A. Kumar, E. M. Castano, B. Frangione, *Nature Medicine* **1998**, 4, 822.
- [97] C. Adessi, M. J. Frossard, M. Mutter, W. A. Banks, C. Soto, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 13905.
- [98] J. Ghanta, C. L. Shen, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 29525.
- [99] M. M. Pallitto, J. Ghanta, P. Heinzelman, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Biochemistry* **1999**, 38, 3570.
- [100] T. L. Lowe, A. Strzelec, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Biochemistry* **2001**, 40, 7882.
- [101] T. J. Gibson, R. M. Murphy, *Biochemistry* **2005**, 44, 8898.
- [102] T. Y. Lin, S. N. Timasheff, *Protein Science* **1996**, 5, 372.
- [103] M. A. Findeis, G. M. Musso, J. Wakefield, N. J. Hayward, S. M. Molineaux, *Biochemistry* **1999**, 38, 6791.
- [104] M. A. Findeis, J. J. Lee, M. Kelley, M. H. Zhang, J. Chin, W. Kubasek, S. M. Molineaux, *Amyloid-Journal of Protein Folding Disorders* **2001**, 8, 231.
- [105] E. Hughes, R. M. Burke, A. J. Doig, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 25109.
- [106] D. J. Gordon, K. L. Sciarretta, S. C. Meredith, *Biochemistry* **2001**, 40, 8237.
- [107] D. J. Gordon, R. Tappe, S. C. Meredith, *Journal of Peptide Research* **2002**, 60, 37.
- [108] M. Cruz, J. M. Tusell, D. Grillo-Bosch, F. Albericio, J. Serratos, F. Rabanal, E. Giralt, *Journal of Peptide Research* **2004**, 63, 324.
- [109] D. T. S. Rijkers, J. W. M. Hoppener, G. Posthuma, C. J. M. Lips, R. M. J. Liskamp, *Chemistry-a European Journal* **2002**, 8, 4285.
- [110] N. Kokkoni, K. Stott, H. Amijee, J. M. Mason, A. J. Doig, *Biochemistry* **2006**, 45, 9906.
- [111] A. Frydman-Marom, M. Rechter, I. Shefler, Y. Bram, D. E. Shalev, E. Gazit, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, 48, 1981.
- [112] K. Wiesehan, K. Buder, R. P. Linke, S. Patt, M. Stoldt, E. Unger, B. Schmitt, E. Bucci, D. Willbold, *Chembiochem* **2003**, 4, 748.
- [113] K. Wiesehan, D. Willbold, *Chembiochem* **2003**, 4, 811.
- [114] S. A. Funke, D. Willbold, *Molecular Biosystems* **2009**, 5, 783.
- [115] T. van Groen, I. Kadish, K. Wiesehan, S. A. Funke, D. Willbold, *Chemmedchem* **2009**, 4, 276.
- [116] K. Wiesehan, J. Stohr, L. Nagel-Steger, T. van Groen, D. Riesner, D. Willbold, *Protein Engineering Design & Selection* **2008**, 21, 241.
- [117] D. Bartnik, S. A. Funke, L. C. Andrei-Selmer, D. Willbold, *Rejuvenation Research* **2010**, 13.
- [118] T. van Groen, K. Wiesehan, S. A. Funke, I. Kadish, L. Nagel-Steger, D. Willbold, *Chemmedchem* **2008**, 3, 1848.
- [119] W. Liu, E. Crocker, W. Y. Zhang, J. I. Elliott, B. Luy, H. L. Li, S. Aimoto, S. O. Smith, *Biochemistry* **2005**, 44, 3591.
- [120] L. M. Munter, P. Voigt, A. Harmeier, D. Kaden, K. E. Gottschalk, C. Weise, R. Pipkorn, M. Schaefer, D. Langosch, G. Multhaup, *Embo Journal* **2007**, 26, 1702.
- [121] T. Sato, P. Kienlen-Campard, M. Ahmed, W. Liu, H. L. Li, J. I. Elliott, S. Aimoto, S. N. Constantinescu, J. N. Octave, S. O. Smith, *Biochemistry* **2006**, 45, 5503.
- [122] A. Lorenzo, B. A. Yankner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, 12243.
- [123] C. A. Mathis, B. J. Lopresti, W. E. Klunk, *Nuclear Medicine and Biology* **2007**, 34, 809.

- [124] R. Chandra, S. Oya, M. P. Kung, C. Hou, L. W. Jin, H. F. Kung, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 2415.
- [125] D. P. Flaherty, S. M. Walsh, T. Kiyota, Y. Dong, T. Ikezu, J. L. Vennerstrom, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 4986.
- [126] G. Henriksen, A. I. Hauser, A. D. Westwell, B. H. Yousefi, M. Schwaiger, A. Drzezga, H. J. Wester, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 1087.
- [127] M. Ono, H. Kawashima, A. Nonaka, T. Kawai, M. Haratake, H. Mori, M. P. Kung, H. F. Kung, H. Saji, M. Nakayama, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 2725.
- [128] W. C. Qu, M. P. Kung, C. Hou, T. E. Benedum, H. F. Kung, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 2157.
- [129] W. C. Qu, M. P. Kung, C. Hou, S. Oya, H. F. Kung, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 3380.
- [130] M. Zhang, J. Maeda, K. Kumata, T. Suhara, C. Halldin, K. Suzuki, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2006**, *33*, S313.
- [131] A. Caragounis, T. Du, G. F. Fi, P. J. Crouch, K. J. Barnham, A. R. White, *Biochemical Journal* **2007**, *407*, 435.
- [132] B. Raman, T. Ban, K. Yamaguchi, M. Sakai, T. Kawai, H. Naiki, Y. Goto, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 16157.
- [133] A. I. Bush, *Trends in Neurosciences* **2003**, *26*, 207.
- [134] R. Baruch-Suchodolsky, B. Fischer, *Biochemistry* **2008**, *47*, 7796.
- [135] K. Garai, B. Sahoo, S. K. Kaushalya, R. Desai, S. Maiti, *Biochemistry* **2007**, *46*, 10655.
- [136] J. W. Karr, V. A. Szalai, *Biochemistry* **2008**, *47*, 5006.
- [137] B. K. Shin, S. Saxena, *Biochemistry* **2008**, *47*, 9117.
- [138] C. Talmard, A. Bouzan, P. Faller, *Biochemistry* **2007**, *46*, 13658.
- [139] C. A. Hawkes, V. Ng, J. McLaurin, *Drug Development Research* **2009**, *70*, 111.
- [140] C. Soto, L. Estrada, *Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Aspects of Amyloid* **2005**, *38*, 351.
- [141] C. Ramassamy, *European Journal of Pharmacology* **2006**, *545*, 51.
- [142] S. A. Frautschy, W. Hu, P. Kim, S. A. Miller, T. Chu, M. E. Harris-White, G. M. Cole, *Neurobiology of Aging* **2001**, *22*, 993.
- [143] F. S. Yang, G. P. Lim, R. Kaye, C. G. Glabe, S. A. Frautschy, G. M. Cole, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 5892.
- [144] D. E. Ehrnhoefer, J. Bieschke, S. Engemann, A. Pastore, E. E. Wanker, *Nature Structural & Molecular Biology* **2008**, *15*, 558.
- [145] P. Inbar, M. R. Bautista, S. A. Takayama, J. Yang, *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 3502.
- [146] A. D. Snow, R. T. Sekiguchi, D. Nochlin, R. N. Kalaria, K. Kimata, *American Journal of Pathology* **1994**, *144*, 337.
- [147] P. E. Fraser, J. T. Nguyen, D. T. Chin, D. A. Kirschner, *Journal of Neurochemistry* **1992**, *59*, 1531.
- [148] L. Bergamaschini, E. Rossi, C. Storini, S. Pizzimenti, M. Distaso, C. Perego, A. De Luigi, C. Vergani, M. G. De Simoni, *Journal of Neuroscience* **2004**, *24*, 4181.
- [149] J. McLaurin, T. Franklin, A. Chakrabarty, P. E. Fraser, *Journal of Molecular Biology* **1998**, *278*, 183.
- [150] J. McLaurin, R. Golomb, A. Jurewicz, J. P. Antel, P. E. Fraser, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 18495.
- [151] J. McLaurin, M. E. Kierstead, M. E. Brown, P. E. Fraser, D. Westaway, P. St George-Hyslop, *Nature Medicine* **2006**, *12*, 801.
- [152] R. Jakob-Roetne, H. Jacobsen, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 3030.

- [153] H. L. Weiner, D. Frenkel, *Nature Reviews Immunology* **2006**, *6*, 490.
- [154] E. D. Roberson, L. Mucke, *Science* **2006**, *314*, 781.
- [155] T. J. Seabrook, L. Y. Jiang, K. Thomas, C. A. Lemere, *Journal of Neuroinflammation* **2006**, *3*.
- [156] T. Schrader, C. Kirsten, *Chemical Communications* **1996**, 2089.
- [157] C. N. Kirsten, T. H. Schrader, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 12061.
- [158] M. Wehner, *Dissertation, Philipps Universität Marburg* **2002**.
- [159] P. Rzepecki, M. Wehner, O. Molt, R. Zadnarm, K. Harms, T. Schrader, *Synthesis-Stuttgart* **2003**, 1815.
- [160] K. Cernovska, M. Kemter, H. C. Gallmeier, P. Rzepecki, T. Schrader, B. König, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, *2*, 1603.
- [161] P. Rzepecki, H. Gallmeier, N. Geib, B. König, T. Schrader, *Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 5168.
- [162] P. Rzepecki, *Dissertation, Philipps-Universität Marburg* **2004**.
- [163] P. Rzepecki, T. Schrader, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 3016.
- [164] P. Rzepecki, L. Nagel-Steger, S. Feuerstein, M. Wehner, T. Schrader, D. Riesner, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 47497.
- [165] T. Schrader, D. Riesner, P. Rzepecki, O. Molt, R. Zadnarm, M. Wehner, L. Nagel-Steger, K. Aschermann, C. Kirsten, **2002**.
- [166] H. Amijee, D. I. C. Scopes, *Journal of Alzheimers Disease* **2009**, *17*, 33.
- [167] B. Török, S. Dasgupta, M. Török, *Current Bioactive Compounds* **2008**, *4*, 159.
- [168] K. Hochdörffer, *Dissertation, Universität Duisburg-Essen* **2009**.
- [169] D. Boumrah, M. M. Campbell, S. Fenner, R. G. Kinsman, *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 7735.
- [170] D. Boumrah, M. M. Campbell, S. Fenner, R. G. Kinsman, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6977.
- [171] S. W. Jeong, D. F. O'Brien, *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 4799.
- [172] S. N. Maiti, P. Spevak, A. V. N. Reddy, *Synthetic Communications* **1988**, *18*, 1201.
- [173] F. Rolla, *Journal of Organic Chemistry* **1982**, *47*, 4327.
- [174] E. F. V. Scriven, K. Turnbull, *Chemical Reviews* **1988**, *88*, 297.
- [175] M. Trester-Zedlitz, K. Kamada, S. K. Burley, D. Fenyo, B. T. Chait, T. W. Muir, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 2416.
- [176] M. Bodanszky, M. A. Bednarek, *Journal of Protein Chemistry* **1989**, *8*, 461.
- [177] M. Wilchek, T. Miron, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2155.
- [178] P. Stefanowicz, I. Z. Siemion, *Polisch Journal of Chemistry* **1992**, *66*, 111.
- [179] M. J. Pfeiffer, S. B. Hanna, *Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 735.
- [180] S. Kim, S. Song, T. Lee, S. Jung, D. Kim, *Synthesis* **2004**, *6*, 847.
- [181] G. W. Anderson, F. M. Callahan, J. E. Zimmerman, *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86*, 1839.
- [182] Y. Molard, D. M. Bassani, J. P. Desvergne, N. Moran, J. H. R. Tucker, *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 8523.
- [183] B. Chipon, G. Clave, C. Bouteiller, M. Massonneau, P. Y. Renard, A. Romieu, *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 8279.
- [184] T. Ito, A. Kondo, S. Terada, S. Nishimoto, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 10934.
- [185] J. V. Staros, R. W. Wright, D. M. Swingle, *Analytical Biochemistry* **1986**, *156*, 220.
- [186] E. J. M. Tournier, J. Wallach, P. Blond, *Analytica Chimica Acta* **1998**, *361*, 33.
- [187] G. Crivat, K. Kikuchi, T. Nagano, T. Priel, M. Hershfinkel, I. Sekler, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 5799.

- [188] K. D. McCormick, K. Kobayashi, S. M. Goldin, N. L. Reddy, J. Meinwald, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 11155.
- [189] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, New York, **2000**.
- [190] E. Kaiser, R. L. Colescot, C. D. Bossing, P. I. Cook, *Analytical Biochemistry* **1970**, *34*, 595.
- [191] A. Madder, N. Farcy, N. G. C. Hosten, H. De Muynck, P. J. De Clercq, J. Barry, A. P. Davis, *European Journal of Organic Chemistry* **1999**, 2787.
- [192] C. Schütt, B. B., *Grundwissen Immunologie*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [193] B. R. Hart, K. J. Shea, *Macromolecules* **2002**, *35*, 6192.
- [194] A. Muller-Schiffmann, B. Petsch, S. R. Leliveld, J. Muyrers, A. Salwierz, C. Mangels, S. Schwarzinger, D. Riesner, L. Stitz, C. Korth, *Mol Immunol* **2009**, *46*, 532.
- [195] P. Federspil, P. A. Federspil, *HNO* **2002**, *50*, 316.
- [196] A. Aguzzi, M. Polymenidou, *Cell* **2004**, *116*, 313.
- [197] J. Lauren, D. A. Gimbel, H. B. Nygaard, J. W. Gilbert, S. M. Strittmatter, *Nature* **2009**, *457*, 1128.
- [198] K. Tsumoto, M. Umetsu, I. Kumagai, D. Ejima, J. S. Philo, T. Arakawa, *Biotechnology Progress* **2004**, *20*, 1301.
- [199] K. Shiraki, M. Kudou, S. Fujiwara, T. Imanaka, M. Takagi, *Journal of Biochemistry* **2002**, *132*, 591.
- [200] C. Lange, R. Rudolph, *Current Pharmaceutical Design* **2009**, *10*, 408.
- [201] Y. Kita, T. Arakawa, T. Y. Lin, S. N. Timasheff, *Biochemistry* **1994**, *33*, 15178.
- [202] M. M. Flocco, S. L. Mowbray, *Journal of Molecular Biology* **1994**, *235*, 709.
- [203] M. Wunderlich, *Biorelevante in vitro Methoden zur Vorhersage in vivo Verhaltens von schlecht wasserlöslich, schwach basischen Arzneistoffen*, Cuvillier Verlag, Göttingen, **2004**.
- [204] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 3714.
- [205] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23*, 3.
- [206] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3.
- [207] <http://www.molinspiration.com>.
- [208] H. Levine, *Amyloid-Journal of Protein Folding Disorders* **2005**, *12*, 5.
- [209] H. Levine, *Amyloid-International Journal of Experimental and Clinical Investigation* **1995**, *2*, 1.
- [210] V. Fodera, M. Groenning, V. Vetri, F. Librizzi, S. Spagnolo, C. Cornett, L. Olsen, M. van de Weert, M. Leone, *Journal of Physical Chemistry* **2008**, *112*, 15174.
- [211] M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley, A. M. Donald, *Journal of Structural Biology* **2005**, *149*, 30.
- [212] E. S. Voropai, M. P. Samtsov, K. N. Kaplevskii, A. A. Maskevich, V. I. Stepuro, O. I. Povarova, *Journal of Applied Spectroscopy* **2003**, *70*, 868.
- [213] S. A. Hudson, H. Ecroyd, T. W. Kee, J. A. Carver, *The FEBS journal* **2009**, *276*, 5960.
- [214] C. L. Shen, R. M. Murphy, *Biophysical Journal* **1995**, *69*, 640.
- [215] M. J. Krysmann, V. Castelletto, A. Kellarakis, I. W. Hamley, R. A. Hule, D. J. Pochan, *Biochemistry* **2008**, *47*, 4597.
- [216] TableCurve, SYSTAT Software GmbH.
- [217] SigmaPlot, SYSTAT Software GmbH.
- [218] M. Holzhauser, Springer-Verlag, Heidelberg, **1996**, pp. 103.
- [219] M. H. J. Galla H.J., *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1988**.
- [220] N. J. Greenfield, *Analytical Biochemistry* **1996**, *235*, 1.

- [221] N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, *Circular Dichroism*, Wiley-VCH, New York, **2000**.
- [222] R. Winter, F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner Studienbücher, Chemie, Stuttgart, **1998**.
- [223] S. Lee, E. J. Fernandez, T. A. Good, *Protein Science* **2007**, *16*, 723.
- [224] V. Rangachari, B. D. Moore, D. K. Reed, L. K. Sonoda, A. W. Bridges, E. Conboy, D. Hartigan, T. L. Rosenberry, *Biochemistry* **2007**, *46*, 12451.
- [225] S. M. Kelly, N. C. Price, *Current Protein and Peptide Science* **2000**, *1*, 349.
- [226] T. Stromer, L. C. Serpell, *Microscopy Research and Technique* **2005**, *67*, 210.
- [227] H. C. Mahler, W. Friess, U. Grauschopf, S. Kiese, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *98*, 2909.
- [228] N. Scharnagl, M. Schossig, *Chemie Ingenieur Technik* **2005**, *77*, 517.
- [229] C. Goldsbury, P. Frey, V. Olivieri, U. Aebi, S. A. Muller, *Journal of Molecular Biology* **2005**, *352*, 282.
- [230] R. V. Ward, K. H. Jennings, R. Jepras, W. Neville, J. B. Davis, A. George, E. H. Karran, D. R. Howlett, *Biochemical Journal* **2000**, *348*, 137.
- [231] D. J. Selkoe, A. Triller, Y. Christen, *Synaptic Plasticity and the Mechanism of Alzheimer's Disease*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2008**.
- [232] F. Schmidt, H.-G. Schaible, *Neuro- und Sinnesphysiologie*, 5. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2006**.
- [233] R. Kaye, E. Head, F. Sarsoza, S. Rasool, T. Gurlo, P. Butler, C. G. Glabe, *Molecular Neurodegeneration* **2007**, *2*.
- [234] R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe, *Science* **2003**, *300*, 486.
- [235] N. J. Cobb, F. D. Sonnichsen, H. McHaourab, W. K. Surewicz, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 18946.
- [236] F. Shewmaker, E. D. Ross, R. Tycko, R. B. Wickner, *Biochemistry* **2008**, *47*, 4000.
- [237] V. Smirnovas, J. I. Kim, X. J. Lu, R. Atarashi, B. Caughey, W. K. Surewicz, *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 24233.
- [238] C. Govaerts, H. Wille, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 8342.
- [239] R. W. Kessler, *Prozessanalytik*, Wiley-VCH Weinheim, **2006**.
- [240] D. J. Oshannessy, M. Brighamburke, K. K. Soneson, P. Hensley, I. Brooks, *Analytical Biochemistry* **1993**, *212*, 457.
- [241] M. Gareis, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **2006**, 354.
- [242] B. Y. Feng, B. H. Toyama, H. Wille, D. W. Colby, S. R. Collins, B. C. H. May, S. B. Prusiner, J. Weissman, B. K. Shoichet, *Nature Chemical Biology* **2008**, *4*, 197.
- [243] G. Yamin, P. Ruchala, D. B. Teplow, *Biochemistry* **2009**, *48*.
- [244] S. L. McGovern, E. Caselli, N. Grigorieff, B. K. Shoichet, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1712.
- [245] B. Y. Feng, A. Shelat, T. N. Doman, R. K. Guy, B. K. Shoichet, *Nature Chemical Biology* **2005**, *1*, 146.
- [246] M. Stieß, *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie I*, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **2009**.
- [247] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-dispersive Systeme*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2002**.
- [248] <http://www.chemie.de/articles>.
- [249] *Zetasizer Nano Series, User Manual (MAN0317), Issue 2.2, March 2005*.
- [250] H. Haken, H.-C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie*, 5. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, **2006**.

- [251] G. Adam, P. Lauser, G. Stark, *Physikalische Chemie und Physik*, 5. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [252] K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, *Journal of the American Chemical Society* **1977**, 99, 2039.
- [253] K. E. D. Coan, B. K. Shoichet, *Molecular Biosystems* **2007**, 3, 208.
- [254] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampe, J. Piehler, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 10205.
- [255] Autorenkollektiv, *Organikum*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [256] *Novabiochem-Katalog*, **2006/2007**.
- [257] M. Holzhauser, *Biochemische Labormethoden*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1997**.
- [258] G. Gottschalk, *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie* **1959**, 167, 342.
- [259] T. McPherson, A. Kidane, I. Szleifer, K. Park, *Langmuir* **1998**, 14, 176.

8 Anhang

NMR-Spektren von Verbindung 28

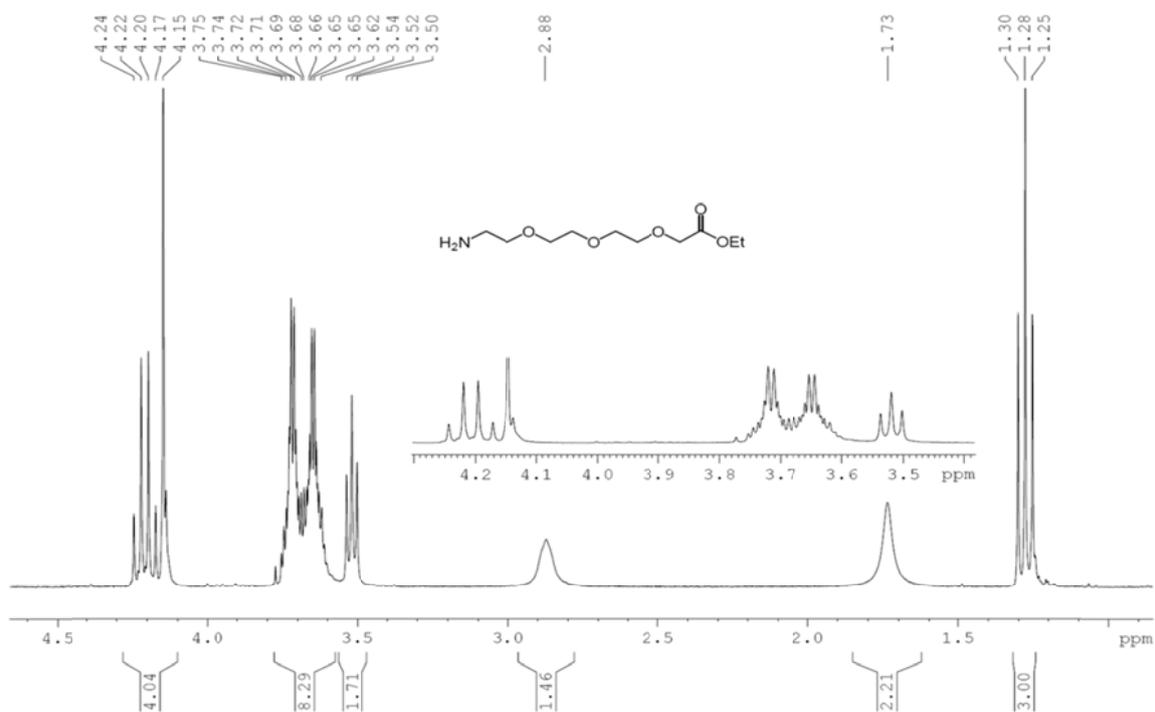


Abbildung 8.1: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **28** (CDCl_3 , 298 K, 500 MHz)

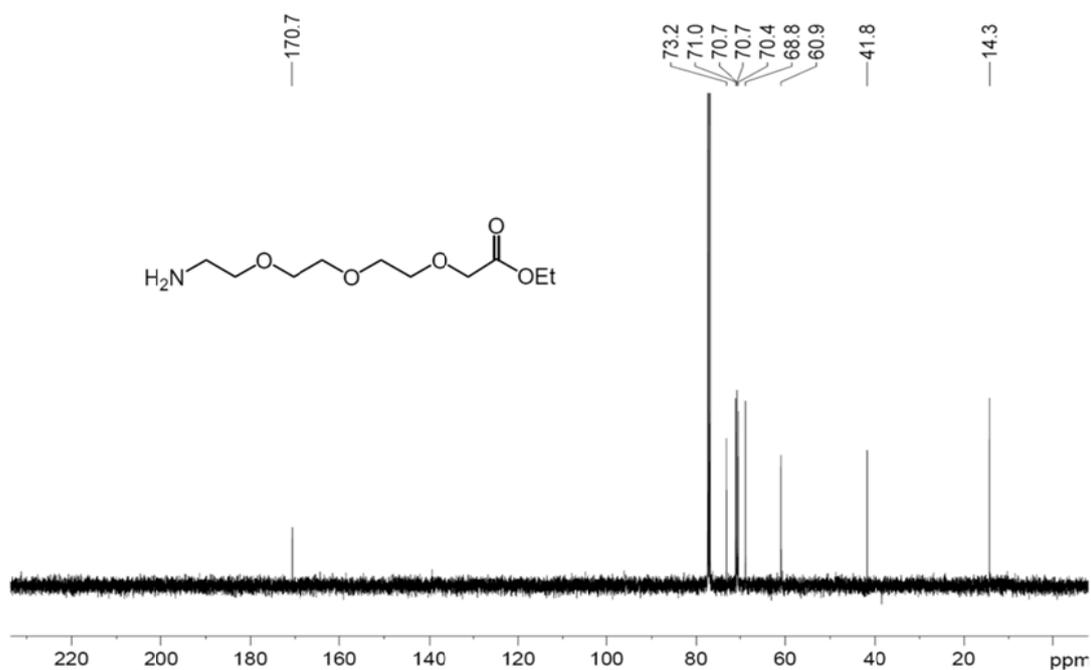
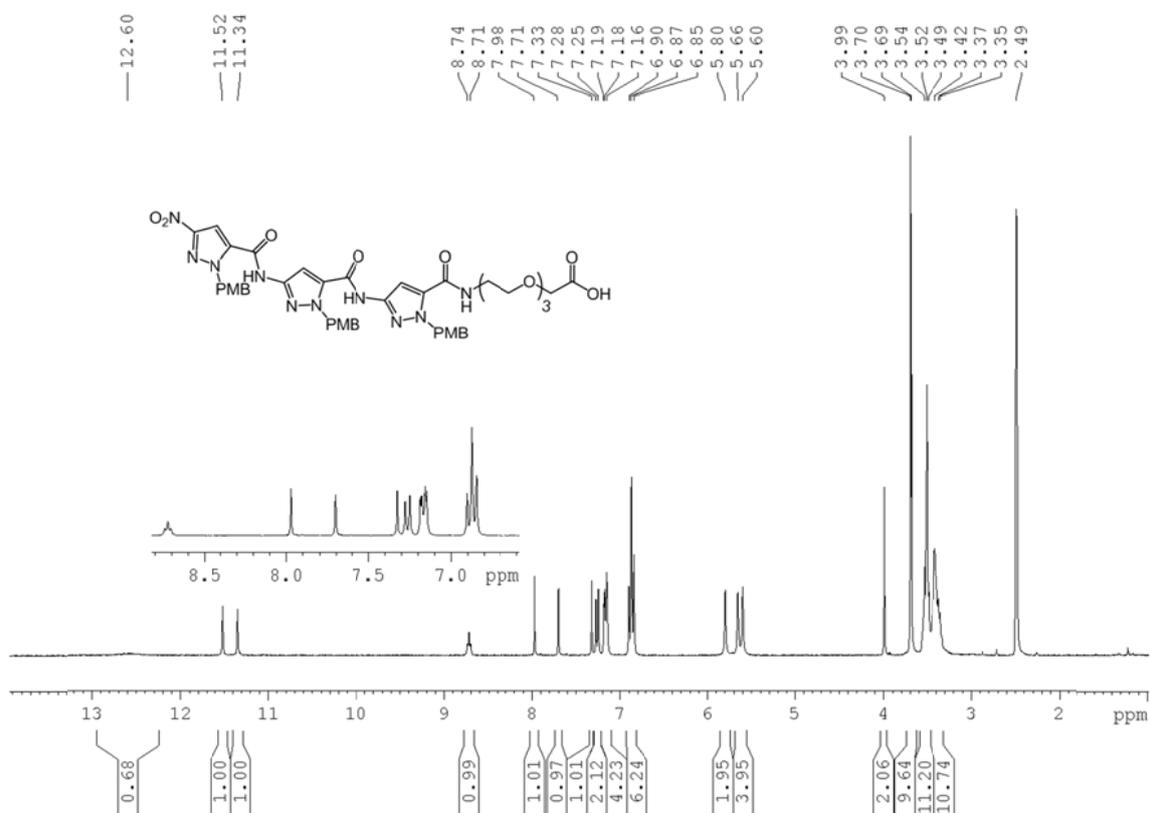
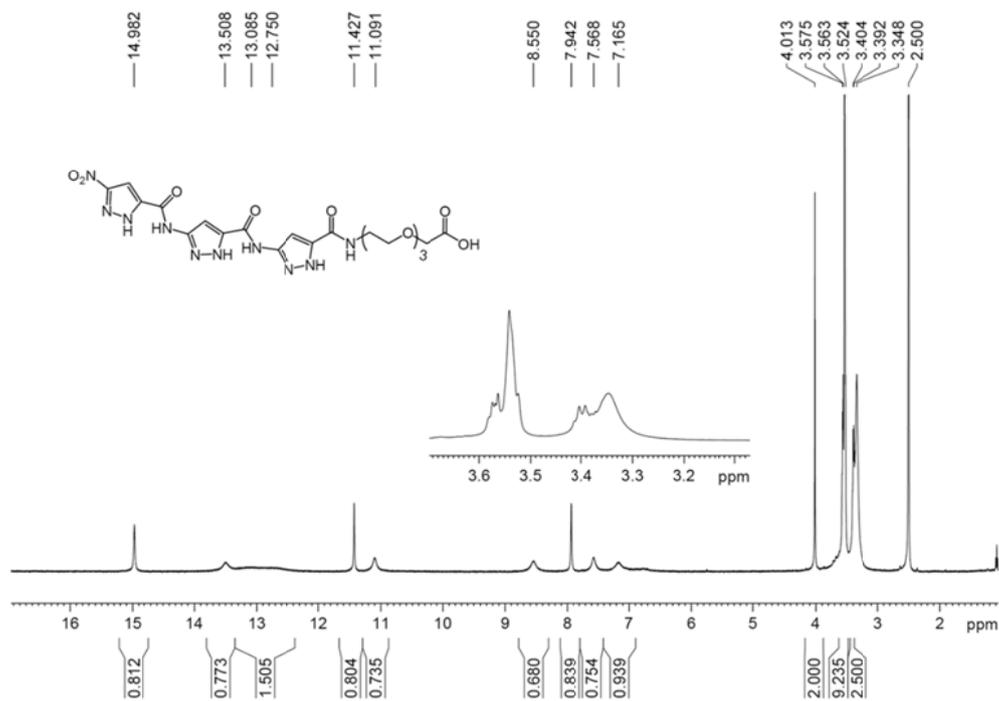


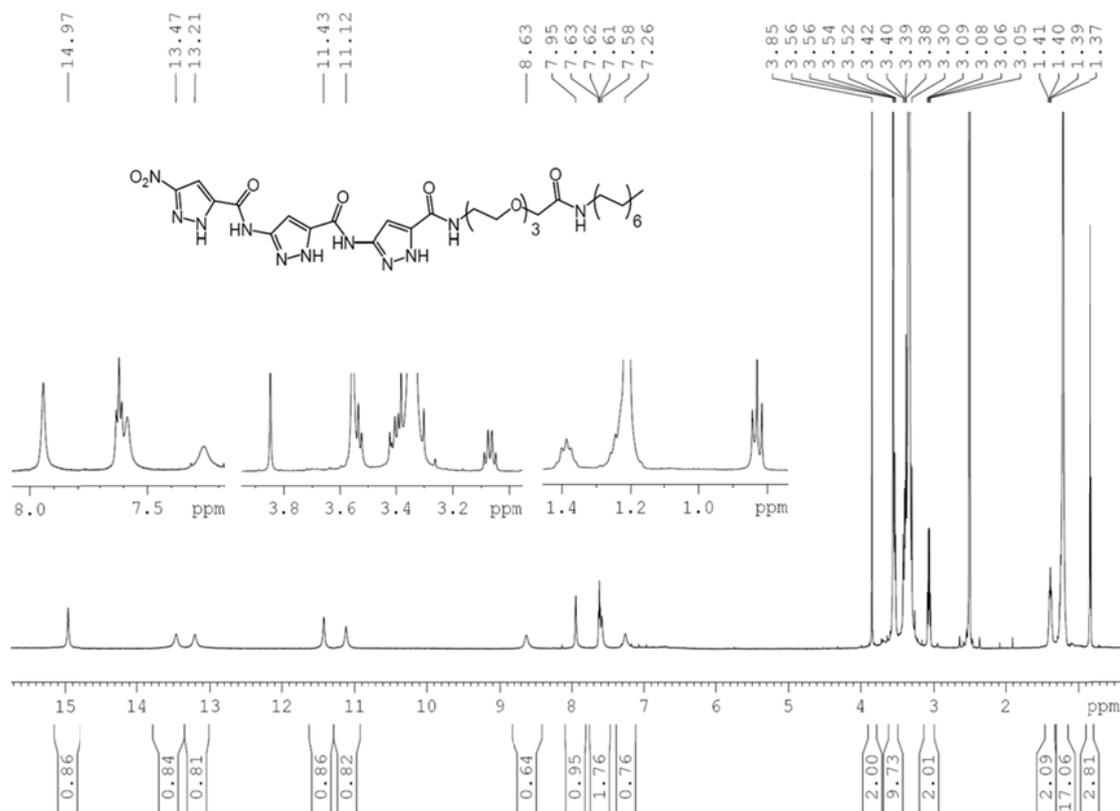
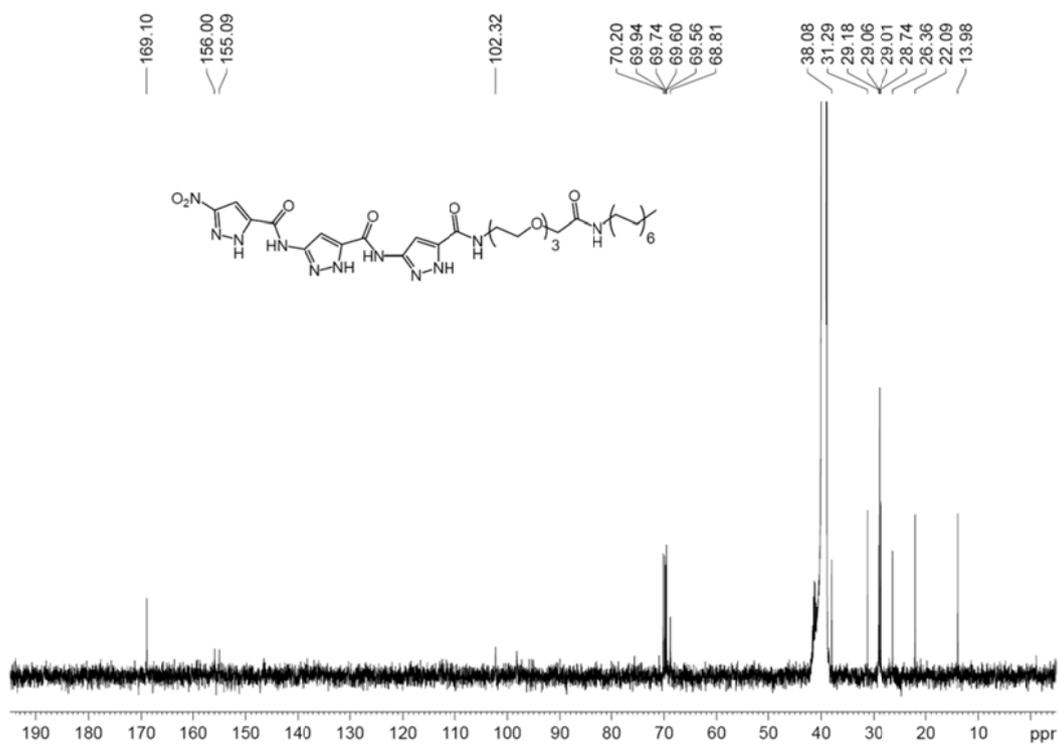
Abbildung 8.2: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **28** (CDCl_3 , 298 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektrum von Verbindung 40

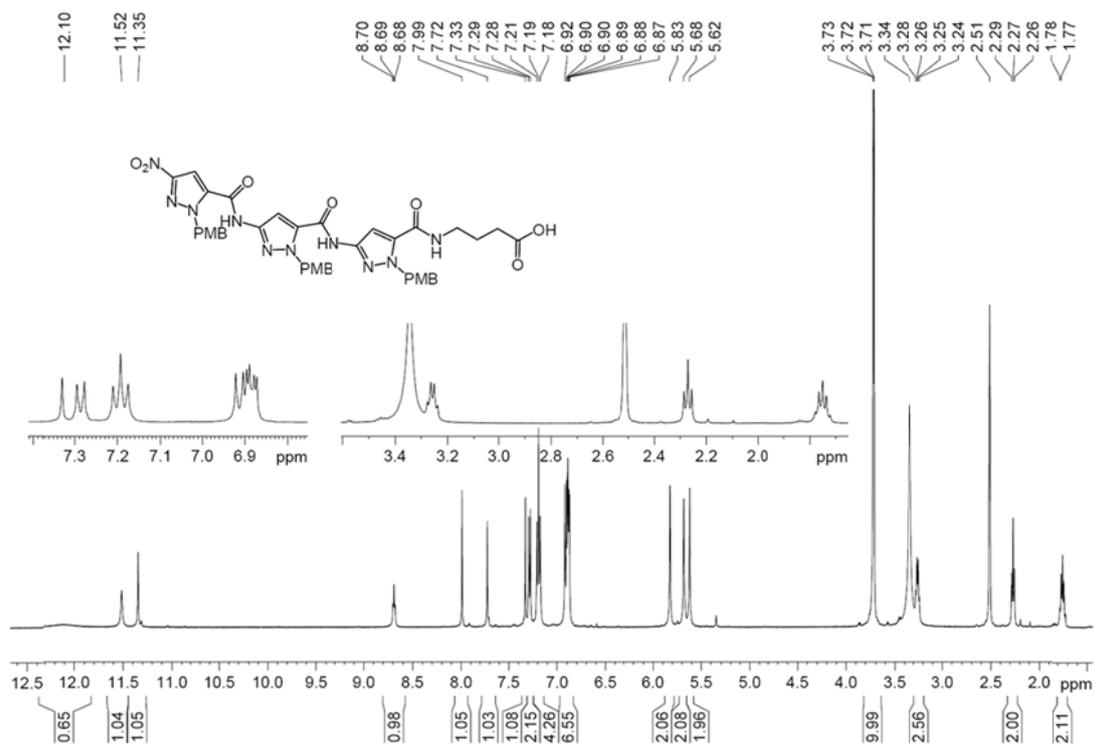
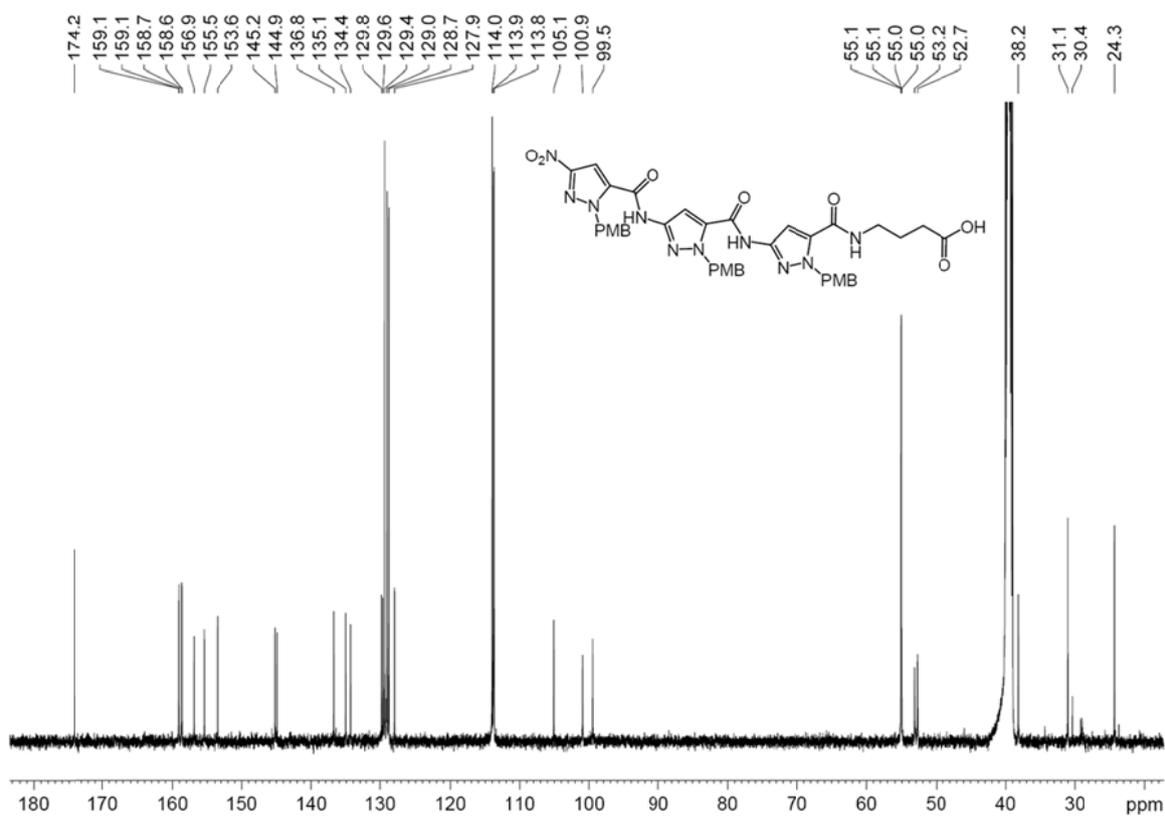
Abbildung 8.3: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **40** (DMSO-d_6 , 298 K, 500 MHz)

NMR-Spektren von Verbindung **41**

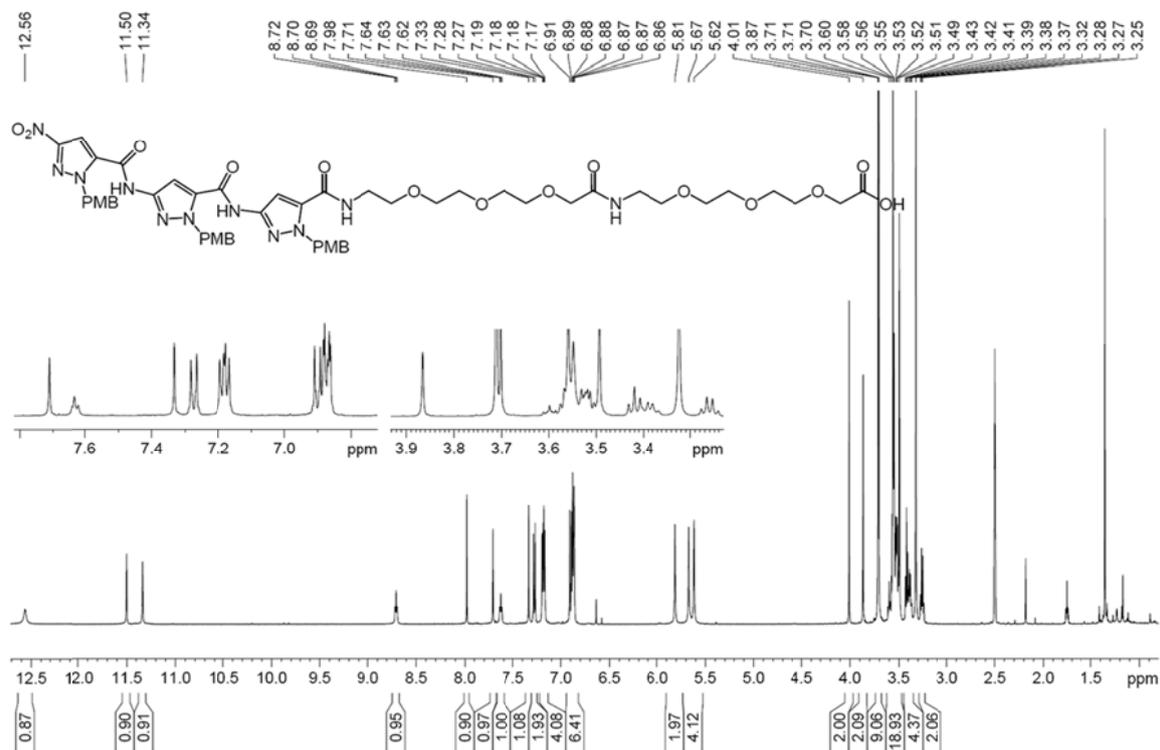
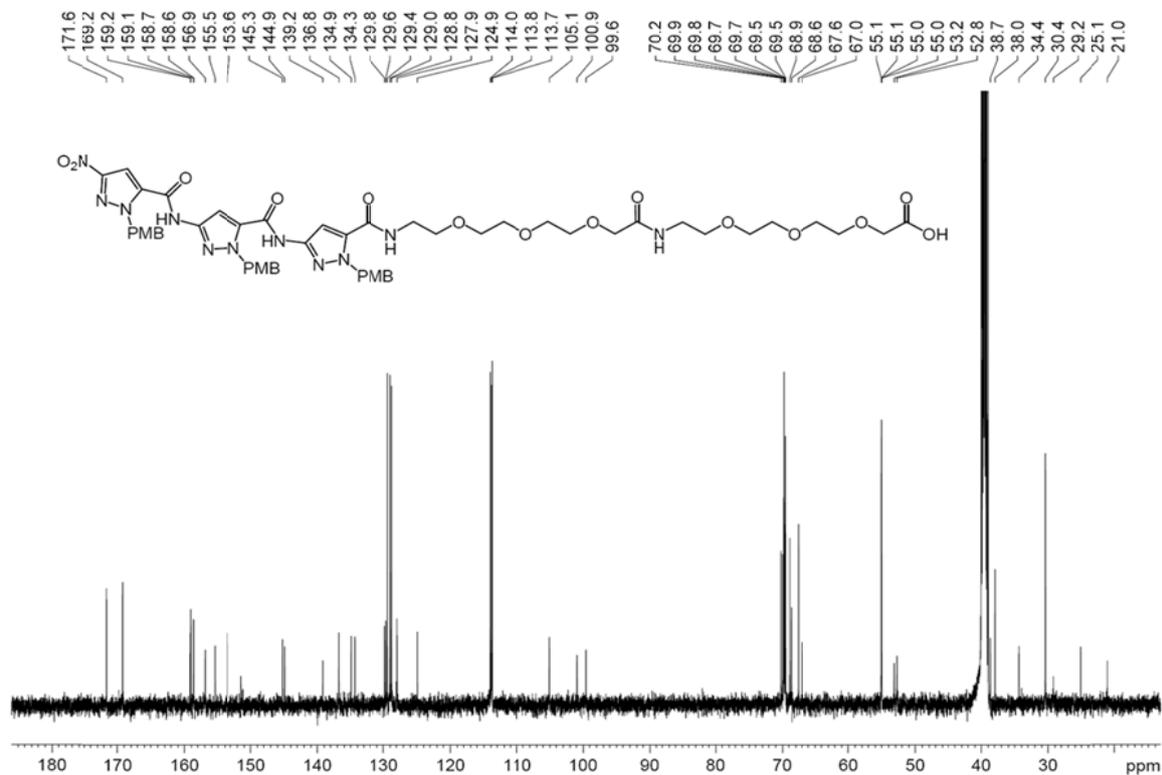
NMR-Spektren von Verbindung 45

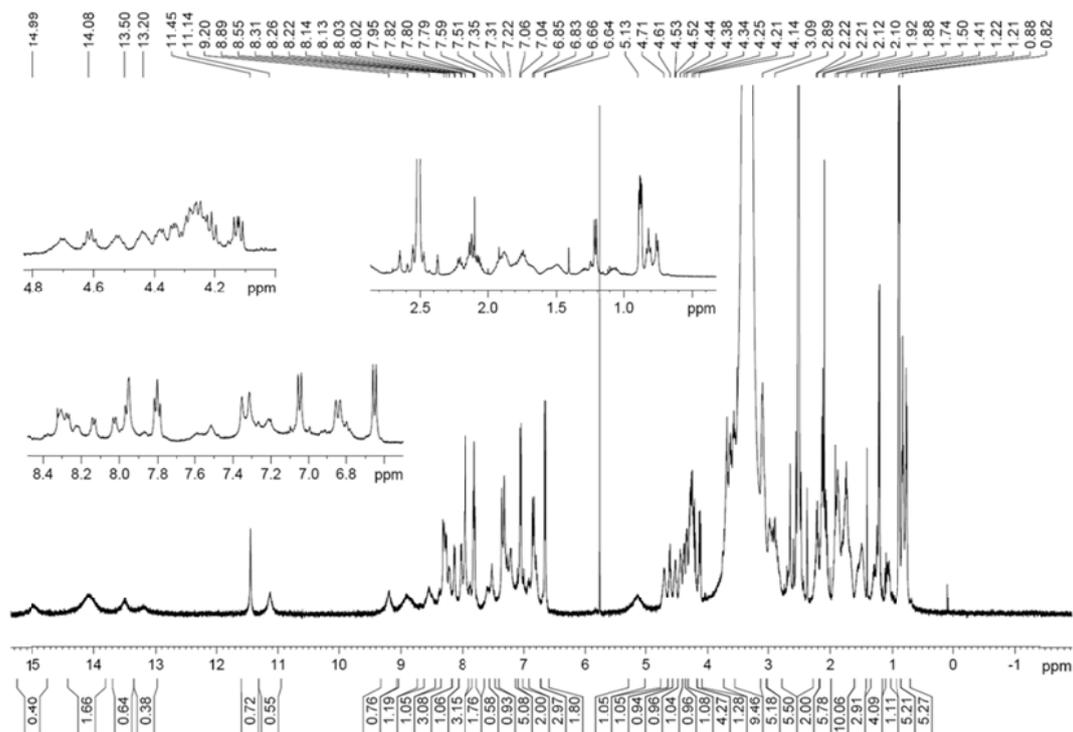
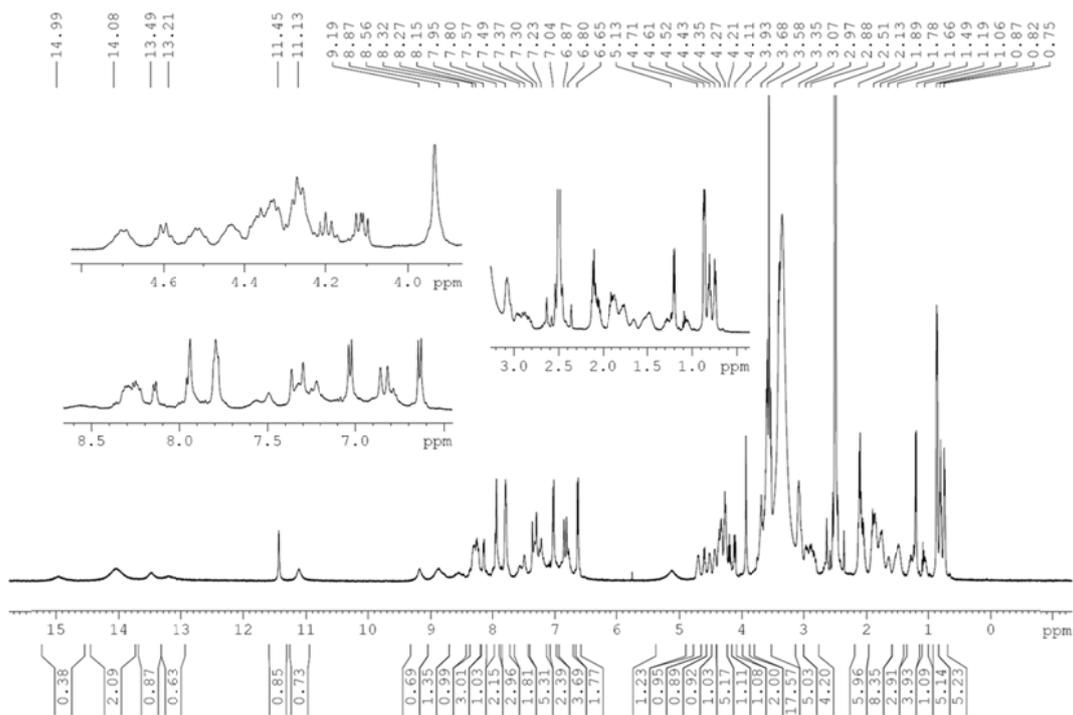
Abbildung 8.6: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 45 (DMSO- d_6 , 298 K, 500 MHz)Abbildung 8.7: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 45 (DMSO- d_6 , 298 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektren von Verbindung 48

Abbildung 8.8: ¹H-NMR-Spektrum von 48 (DMSO-d₆, 298 K, 500 MHz)Abbildung 8.9: ¹³C-NMR-Spektrum von 48 (DMSO-d₆, 298 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektren von Verbindung 50

Abbildung 8.10: ¹H-NMR-Spektrum von 50 (DMSO-d₆, 298 K, 500 MHz)Abbildung 8.11: ¹³C-NMR-Spektrum von 50 (DMSO-d₆, 298 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektrum von Trim-GABA-D1 51**Abbildung 8.12:** $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **51** (DMSO-d_6 , 300 K, 500 MHz)**NMR-Spektrum von Trim-TEG-D1 52****Abbildung 8.13:** $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **52** (DMSO-d_6 , 300 K, 500 MHz)

NMR-Spektrum von Trim-TEG-TEG-D1 53

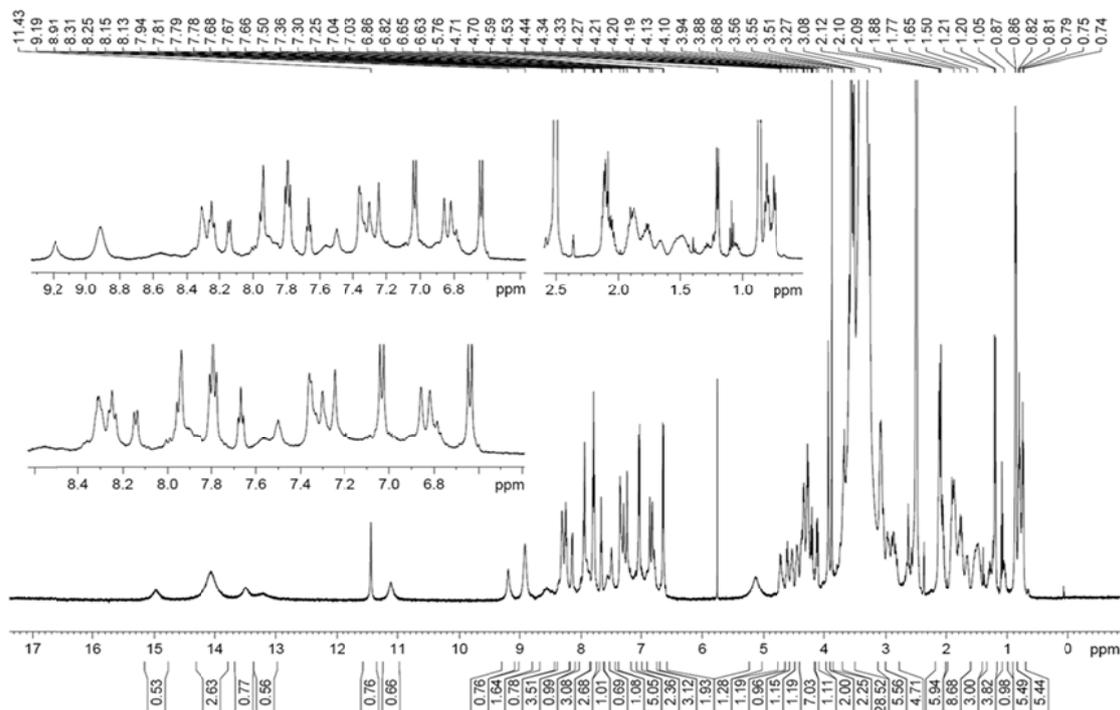


Abbildung 8.14: ^1H -NMR-Spektrum von **53** (DMSO- d_6 , 300 K, 500 MHz)

NMR-Spektrum von Trim-GABA-D3 54

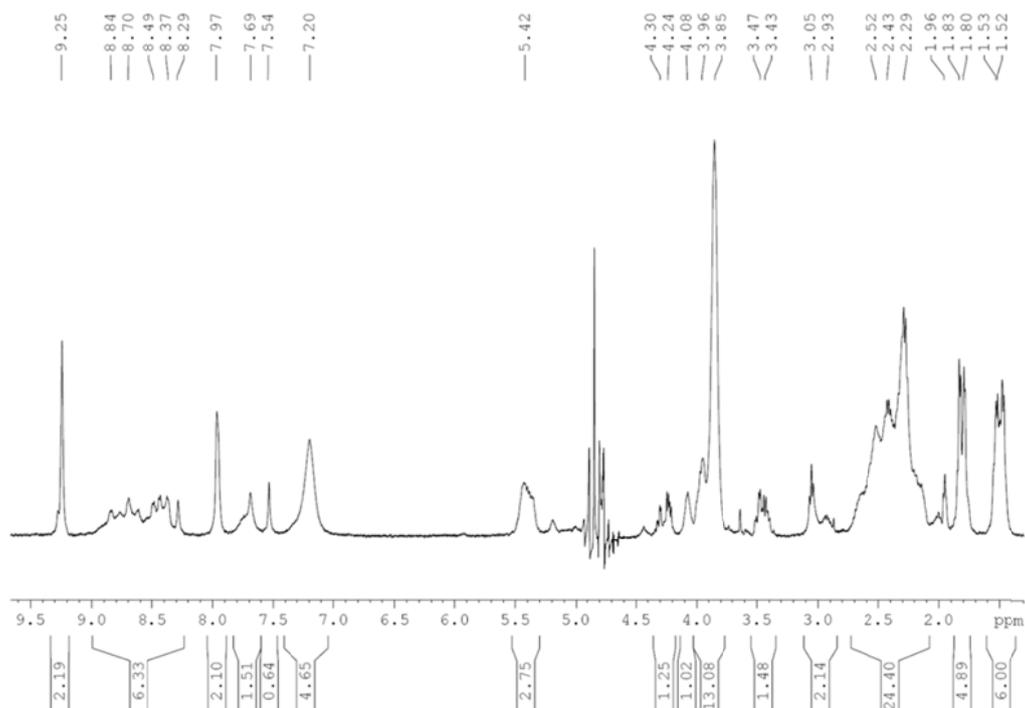


Abbildung 8.15: ^1H -NMR-Spektrum von **54** ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), 363 K, 500 MHz)

NMR-Spektrum von Trim-TEG-D3 55

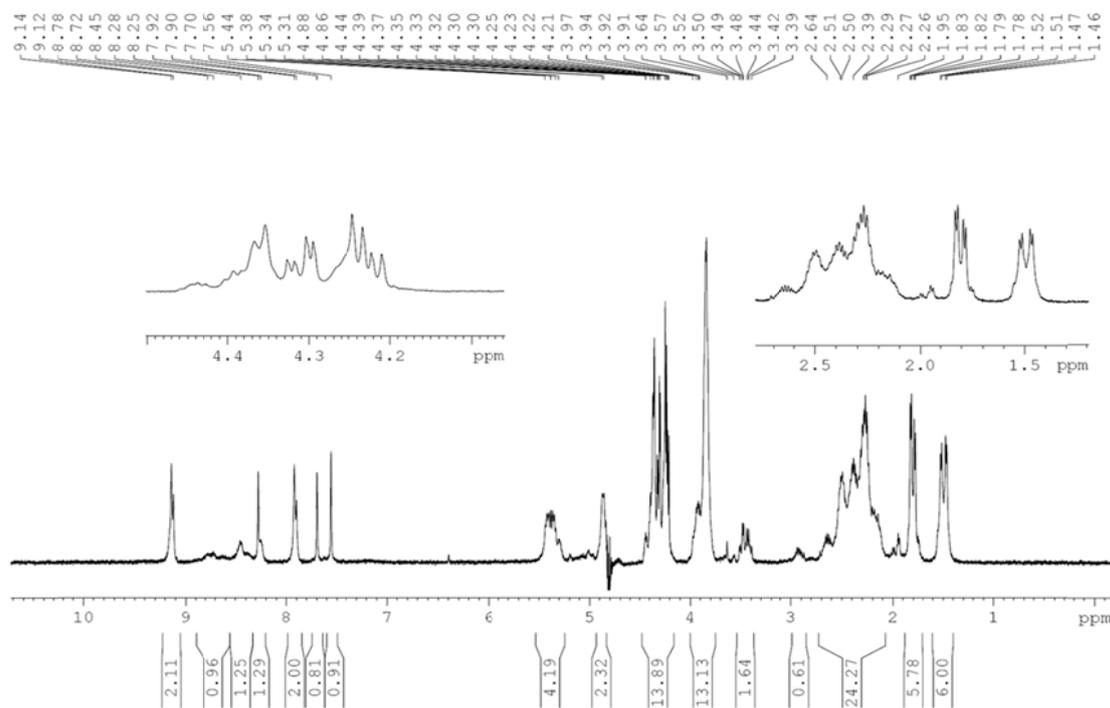


Abbildung 8.16: ^1H -NMR-Spektrum von **55** ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), 363 K, 500 MHz)

NMR-Spektrum von Trim-TEG-TEG-D3 56

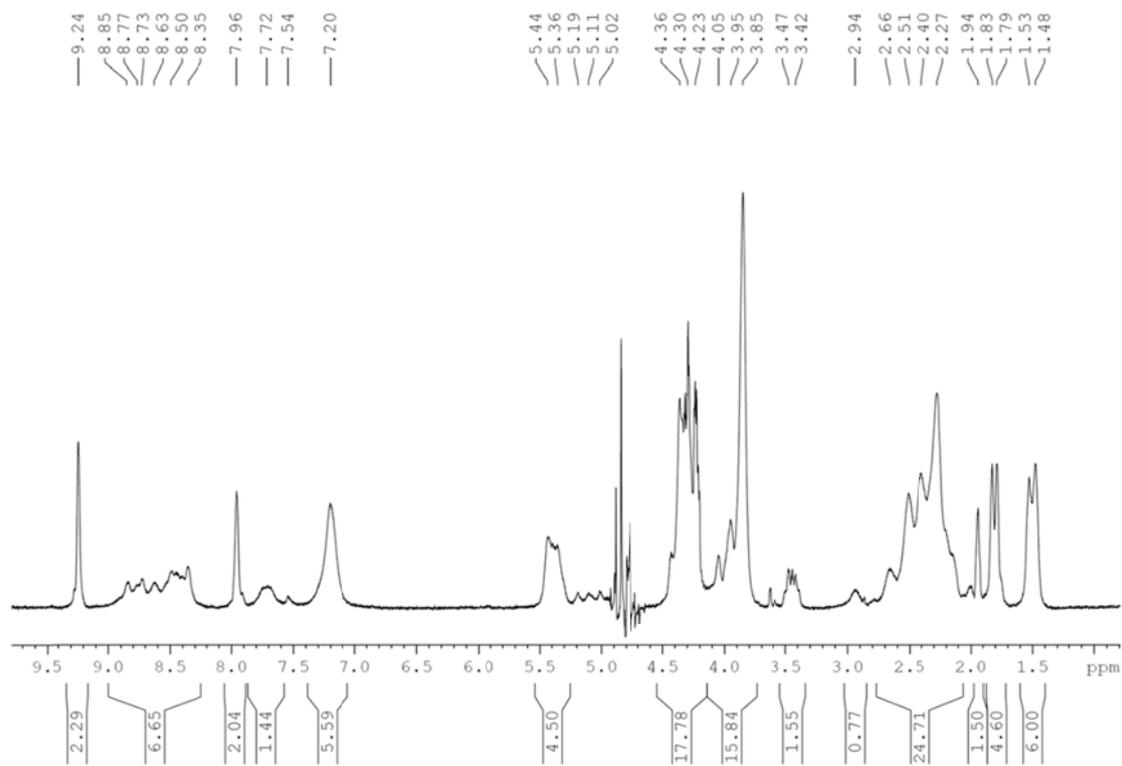


Abbildung 8.17: ^1H -NMR-Spektrum von **56** ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), 363 K, 500 MHz)

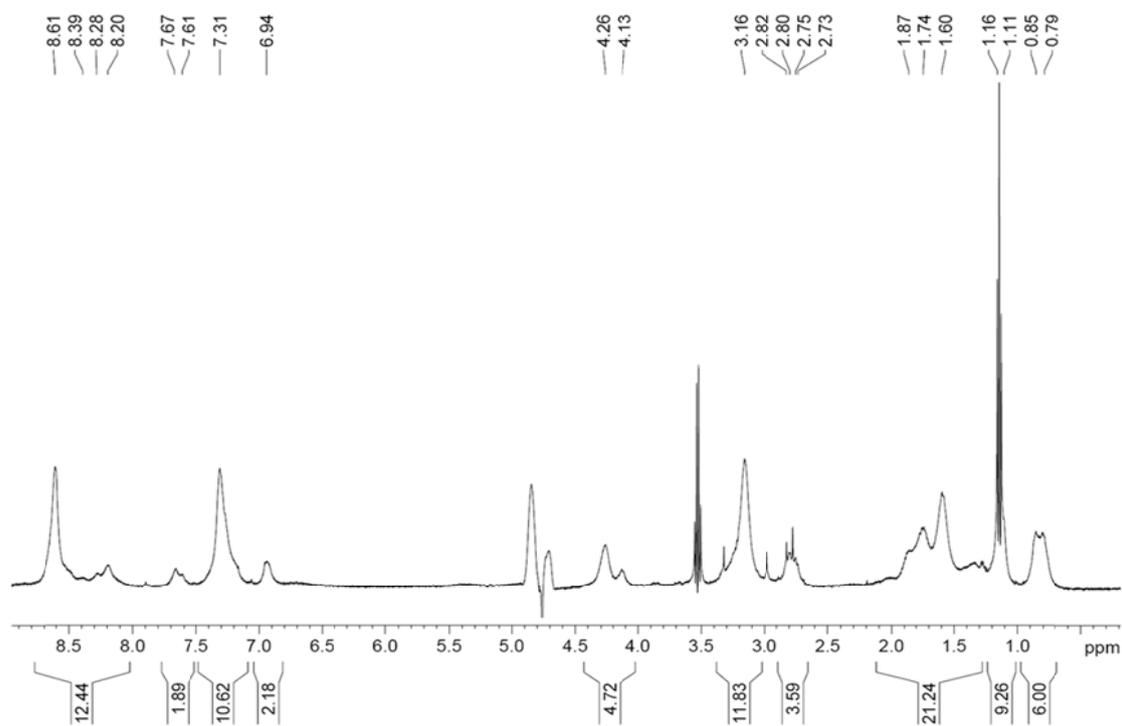
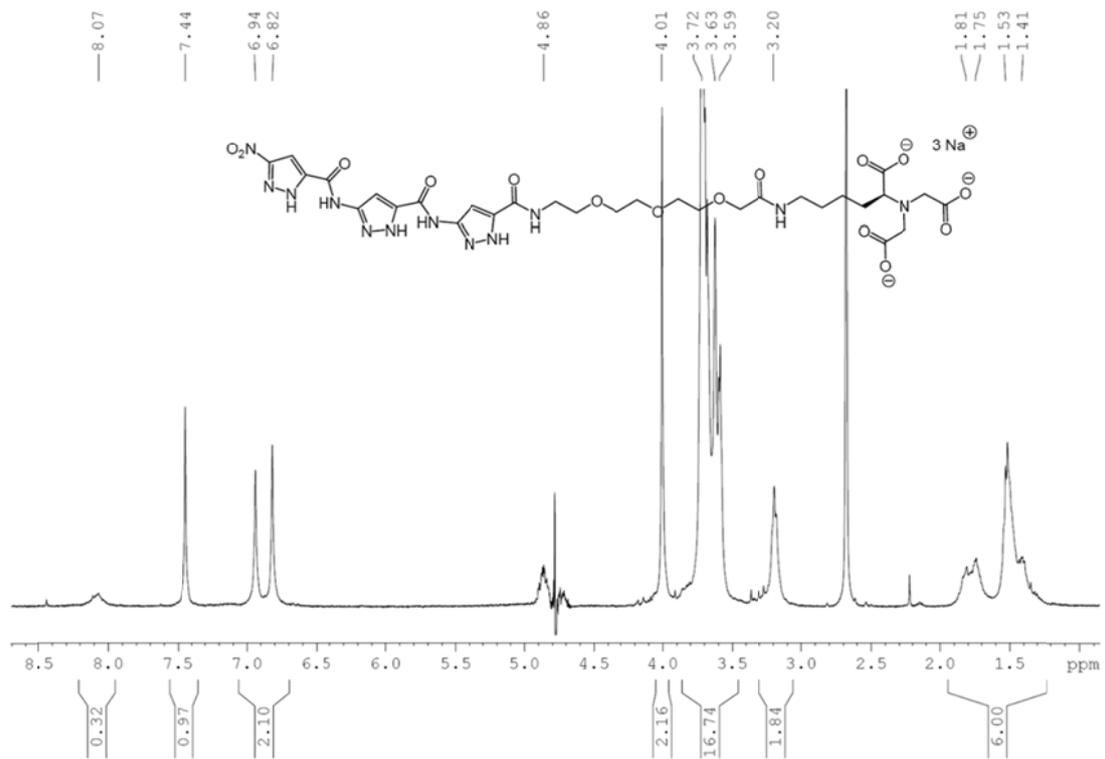
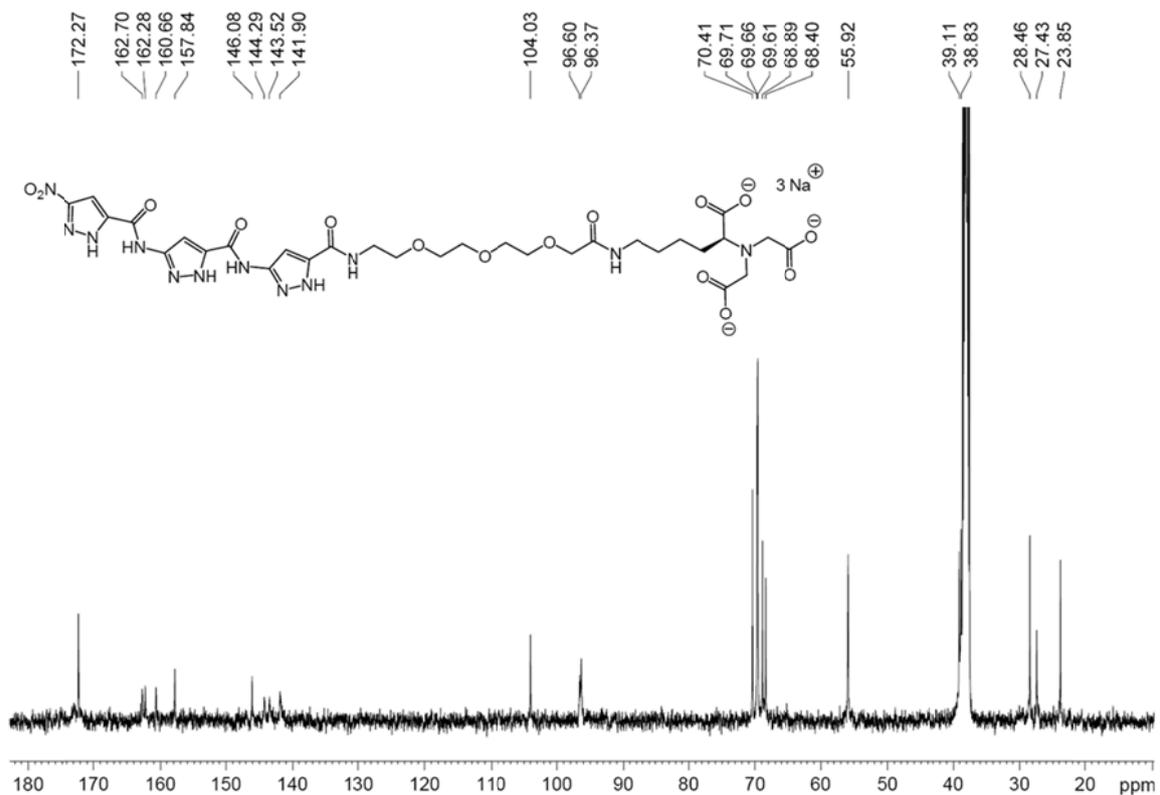
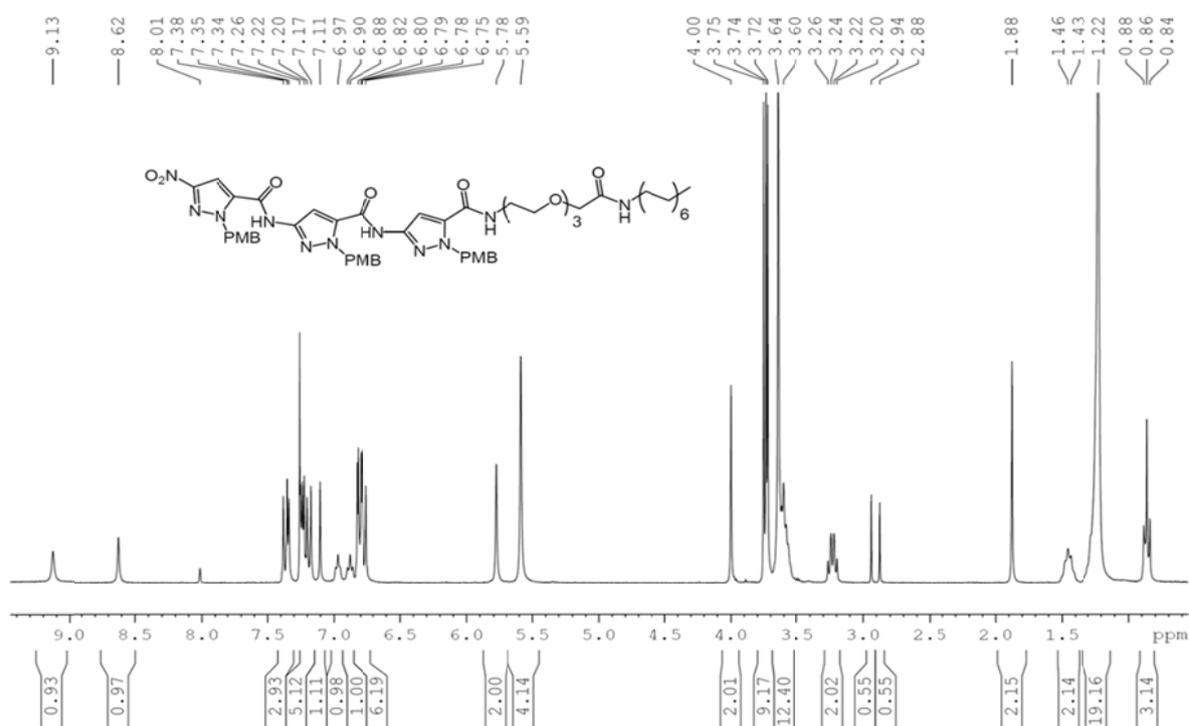
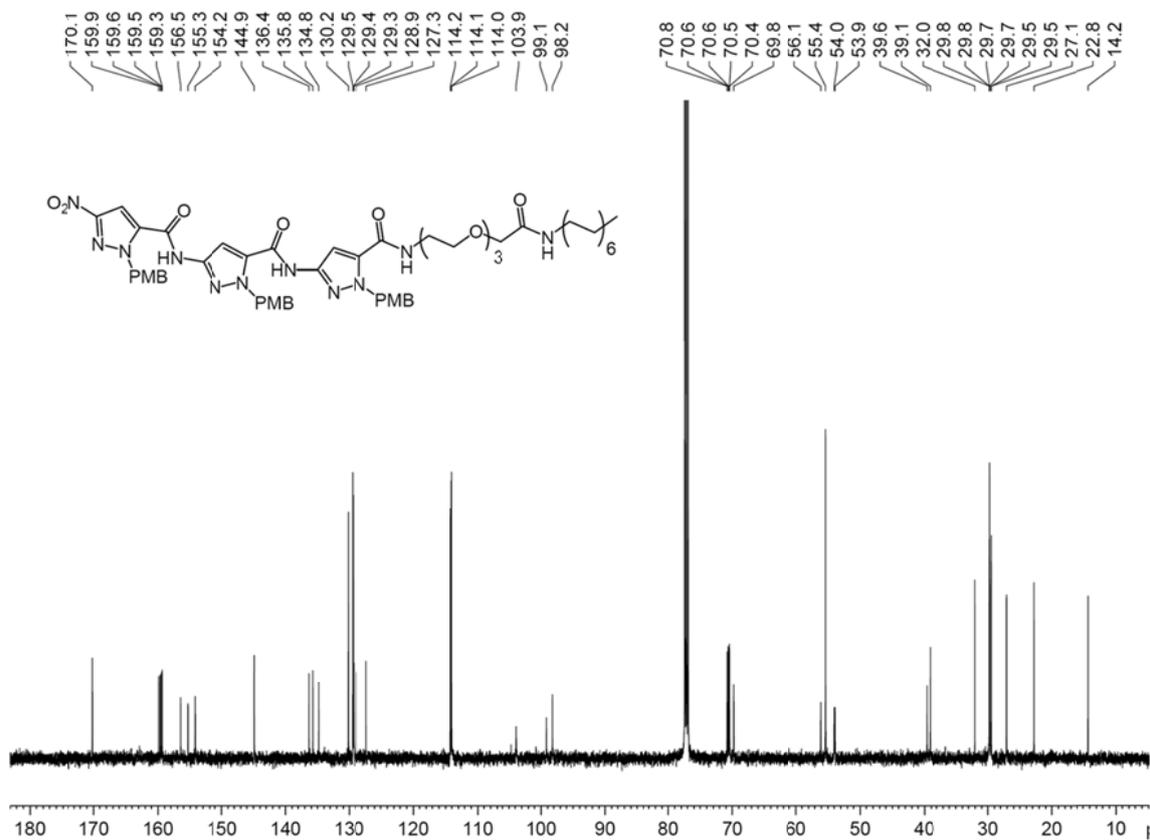
NMR-Spektrum von Trim-D3 57

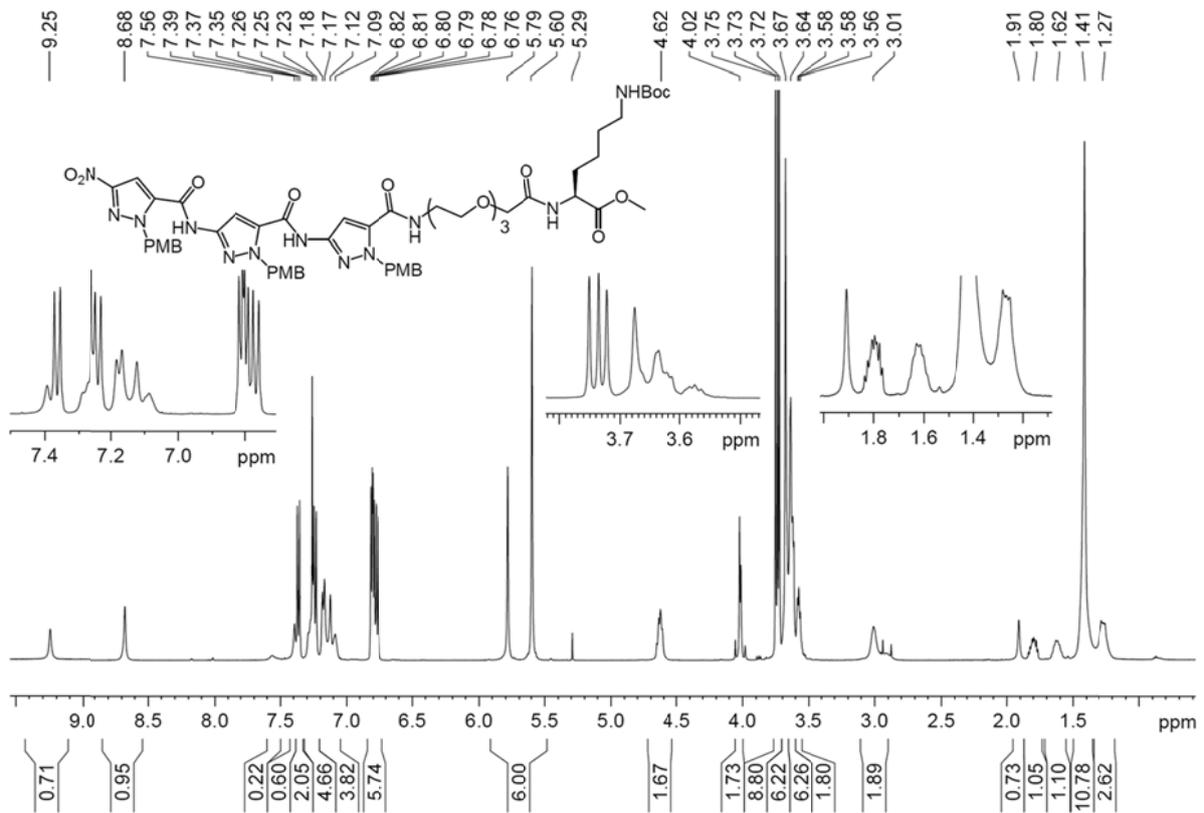
Abbildung 8.18: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **57** ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), 298 K, 500 MHz)

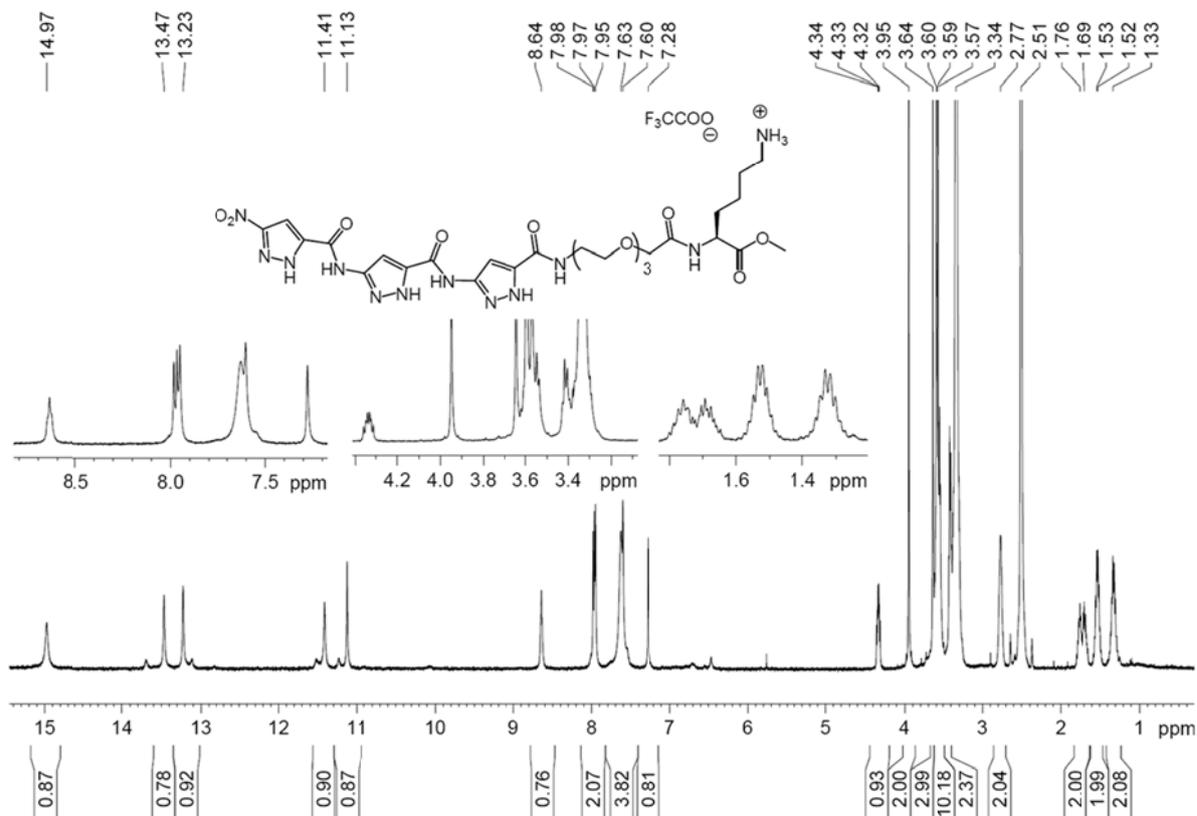
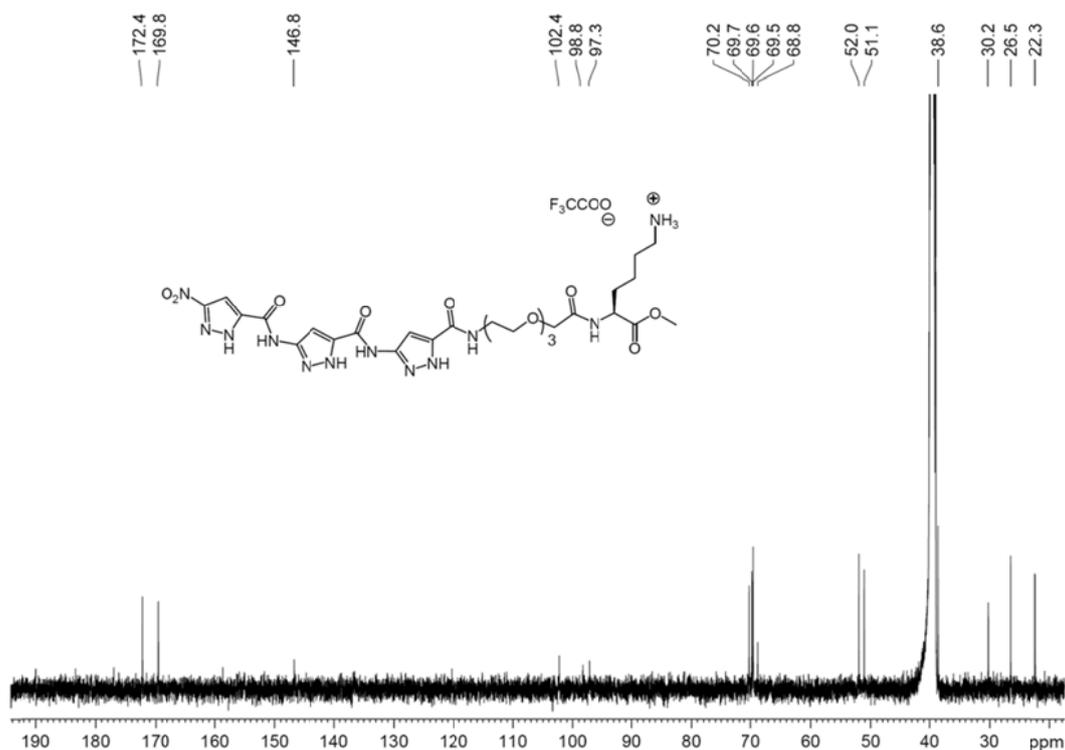
NMR-Spektren von Verbindung 66

Abbildung 8.21: ¹H-NMR-Spektrum von **66** (H₂O/D₂O 90:10, 298 K, 500 MHz)Abbildung 8.22: ¹³C-NMR-Spektrum von **66** (H₂O/D₂O 90:10, 298 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektren von Verbindung **67**Abbildung 8.23: ¹H-NMR-Spektrum von **67** (CDCl₃, 298 K, 500 MHz)Abbildung 8.24: ¹³C-NMR-Spektrum von **67** (CDCl₃, 298 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektrum von Verbindung 69

Abbildung 8.25: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **69** CDCl_3 , 298 K, 500 MHz)

NMR-Spektren von Verbindung **70**Abbildung 8.26: ¹H-NMR-Spektrum von **70** (DMSO-d₆, 298 K, 500 MHz)Abbildung 8.27: ¹³C-NMR-Spektrum von **70** (DMSO-d₆, 298 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektren von Trim-TEG-KKKKKG-OH 72

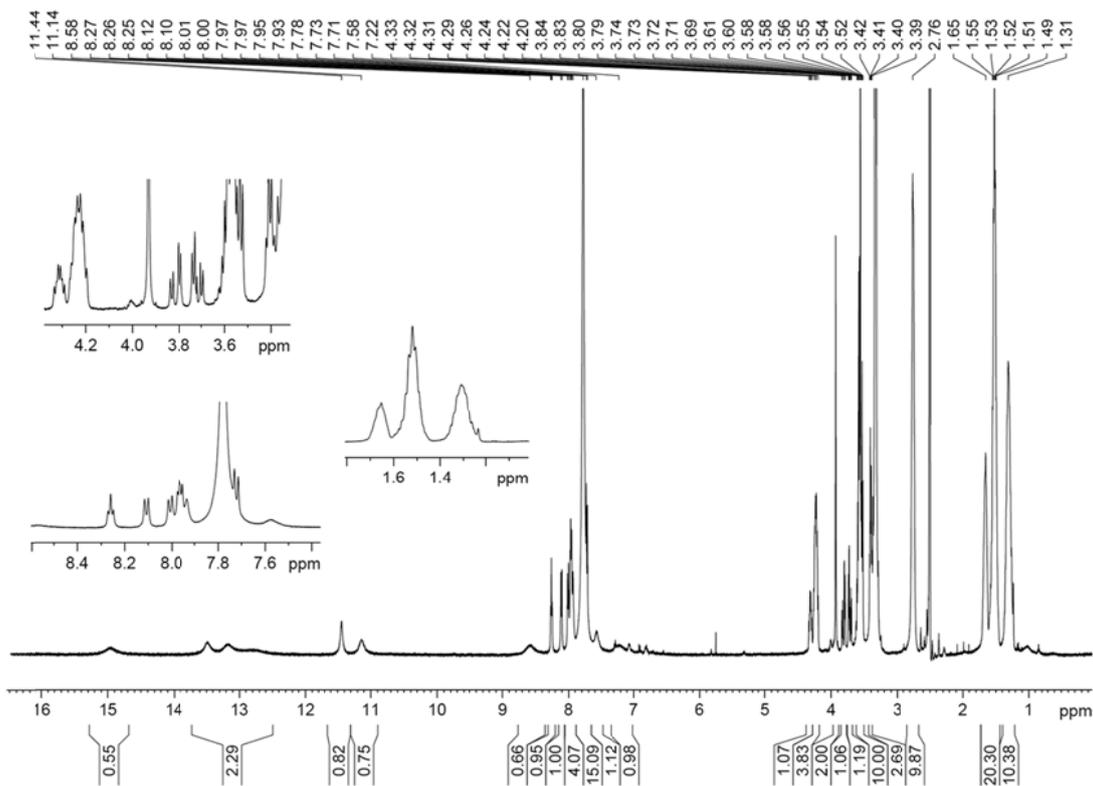


Abbildung 8.28: ^1H -NMR-Spektrum von **72** (DMSO- d_6 , 298 K, 500 MHz)

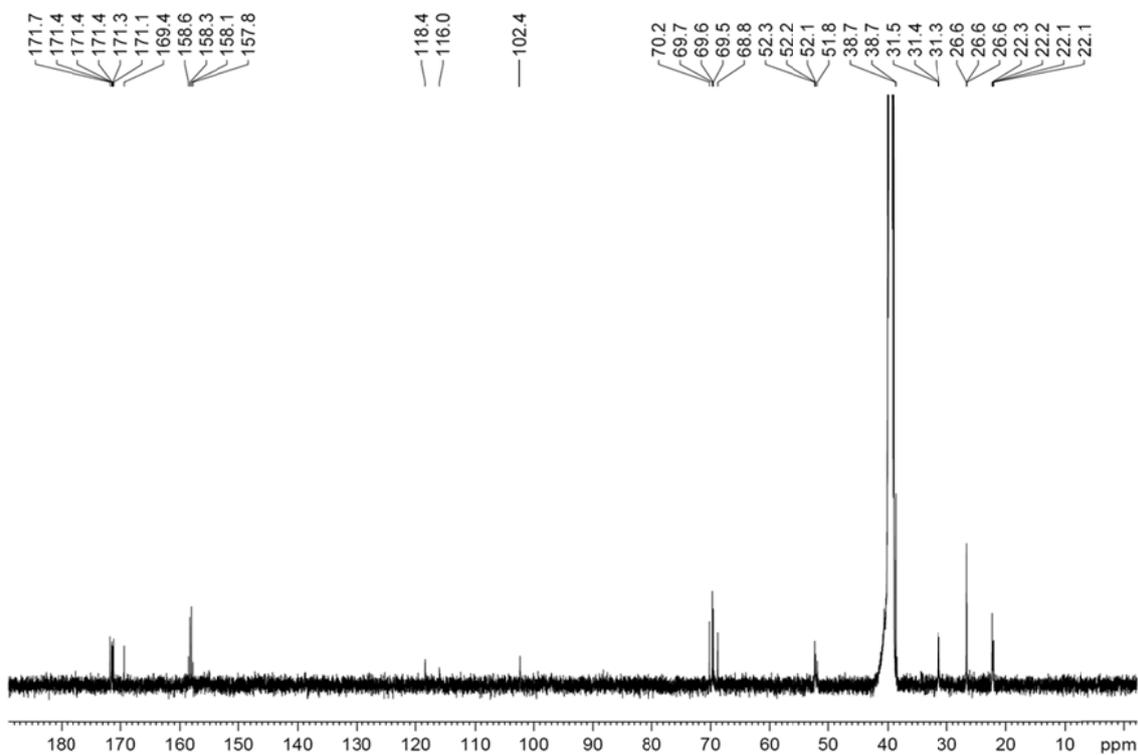


Abbildung 8.29: ^{13}C -NMR-Spektrum von **72** (DMSO- d_6 , 298 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektrum von Trim-TEG-RRRRR-OH 74

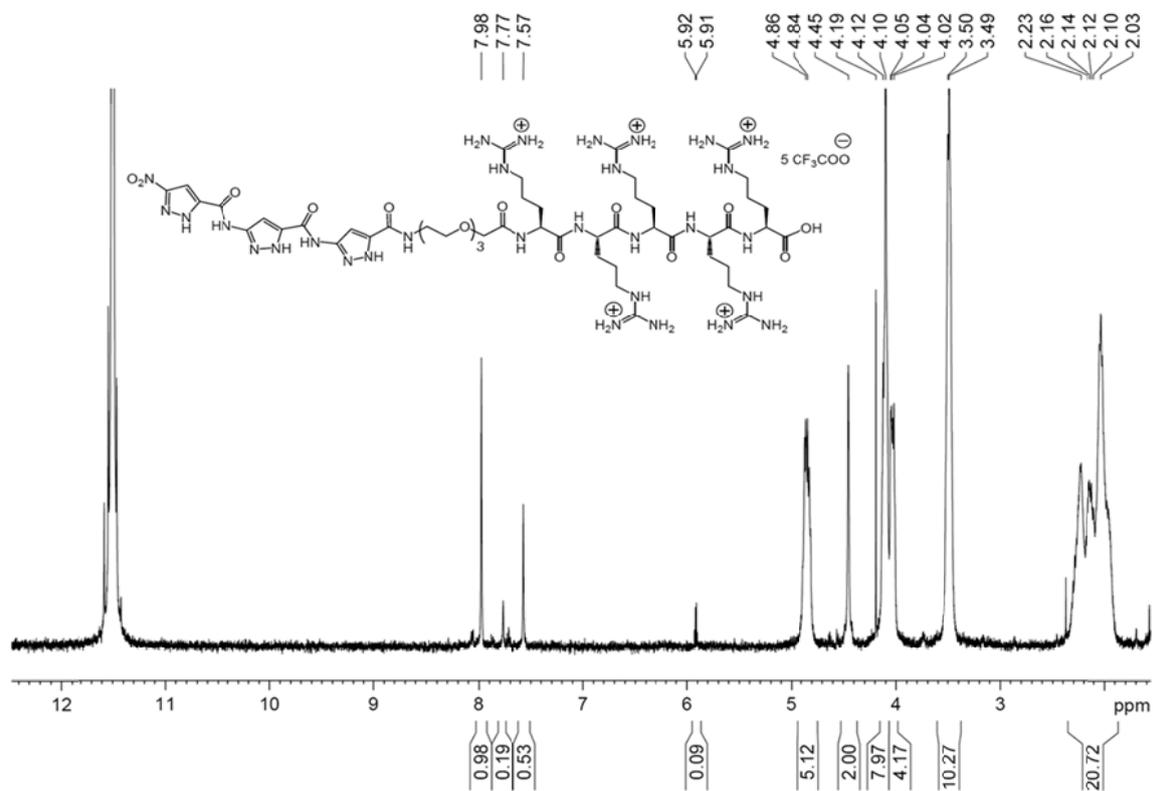
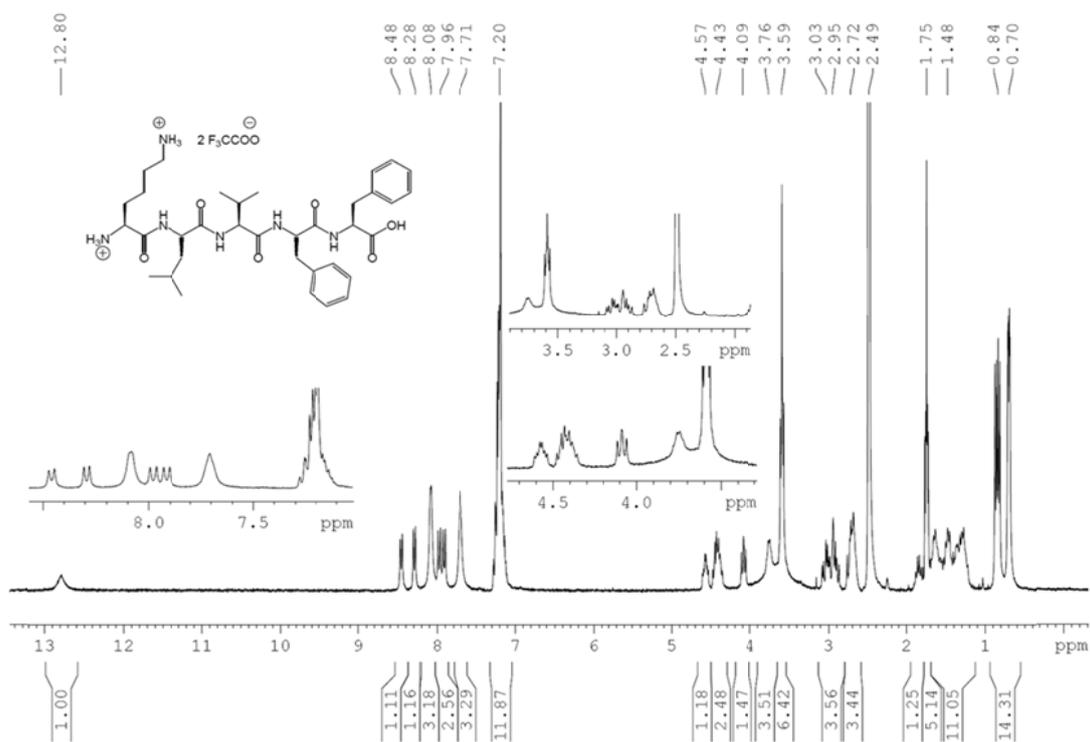
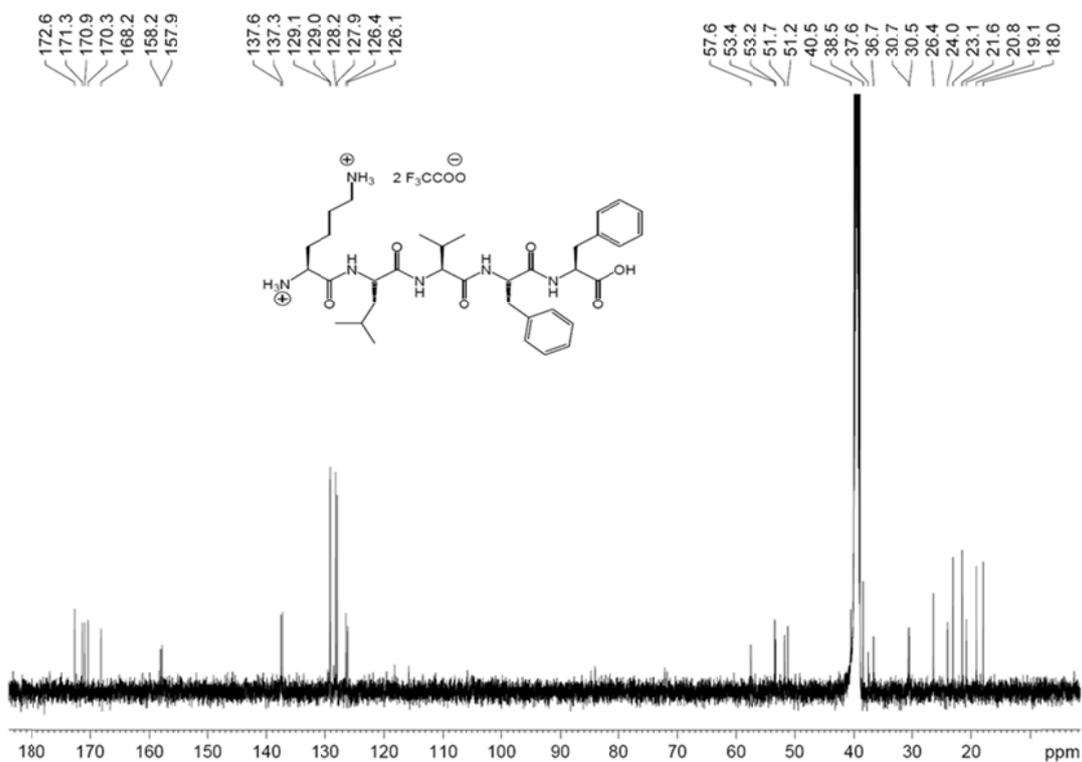
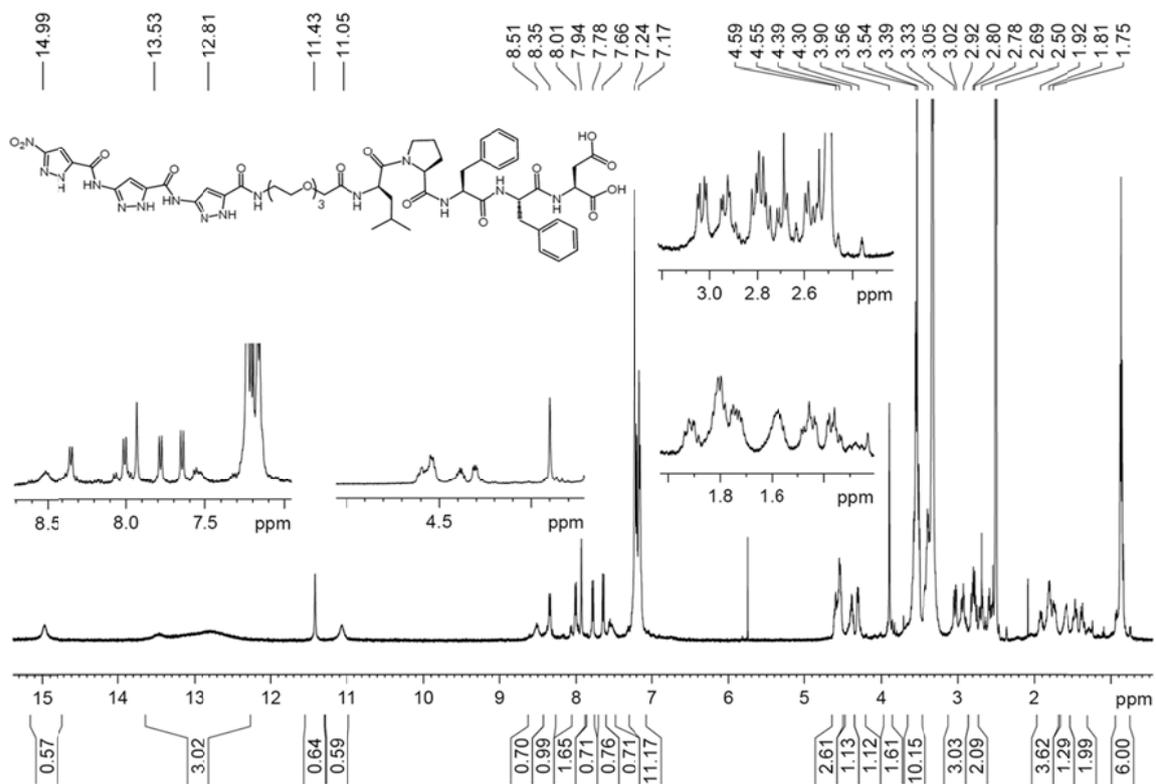
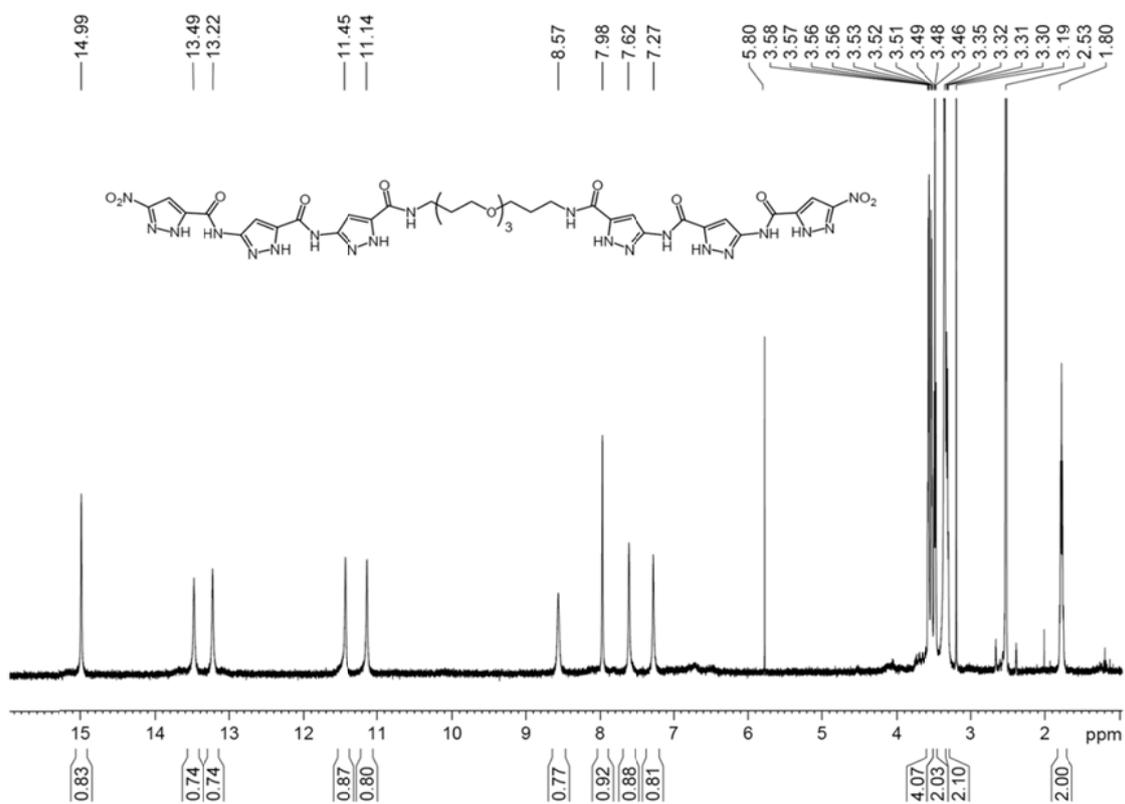
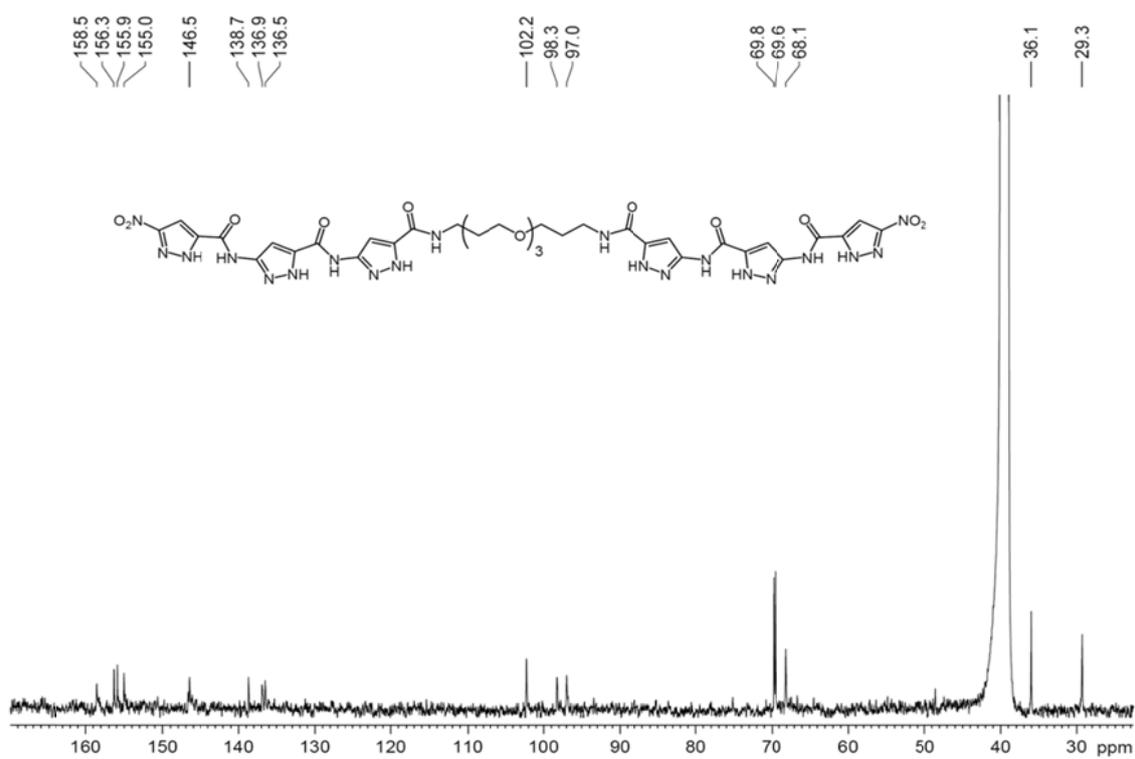
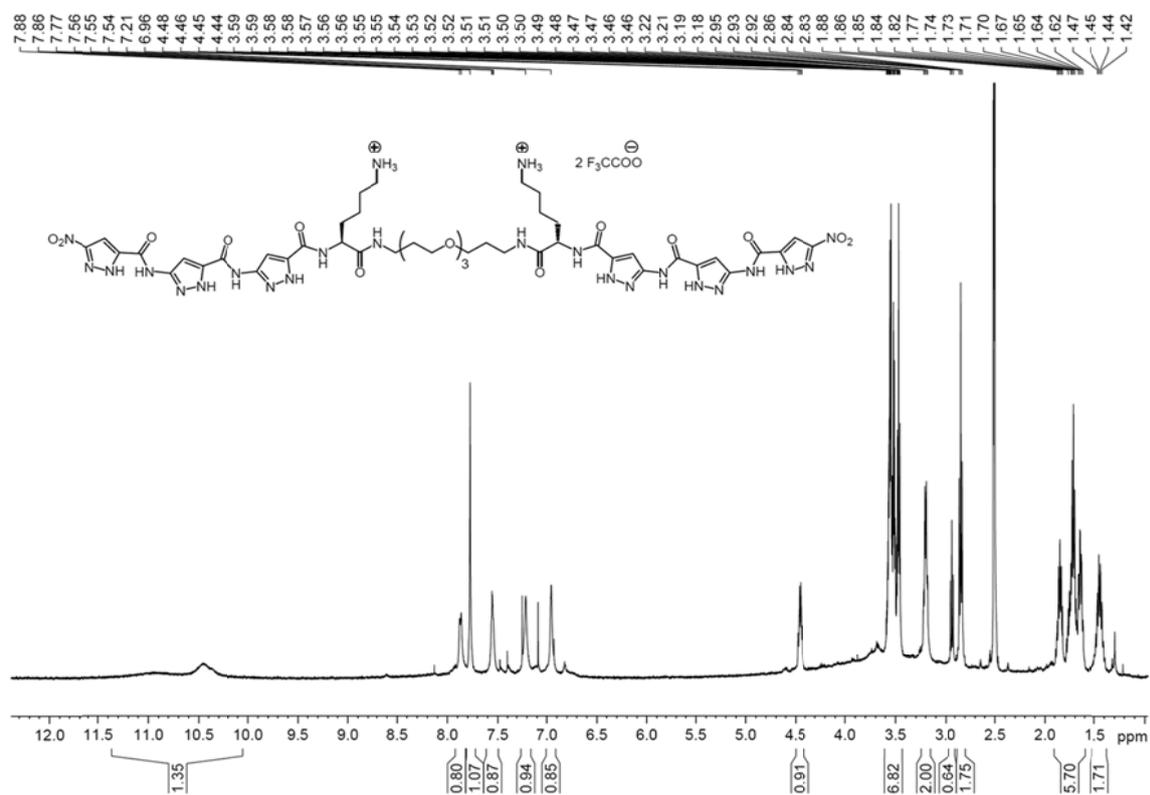
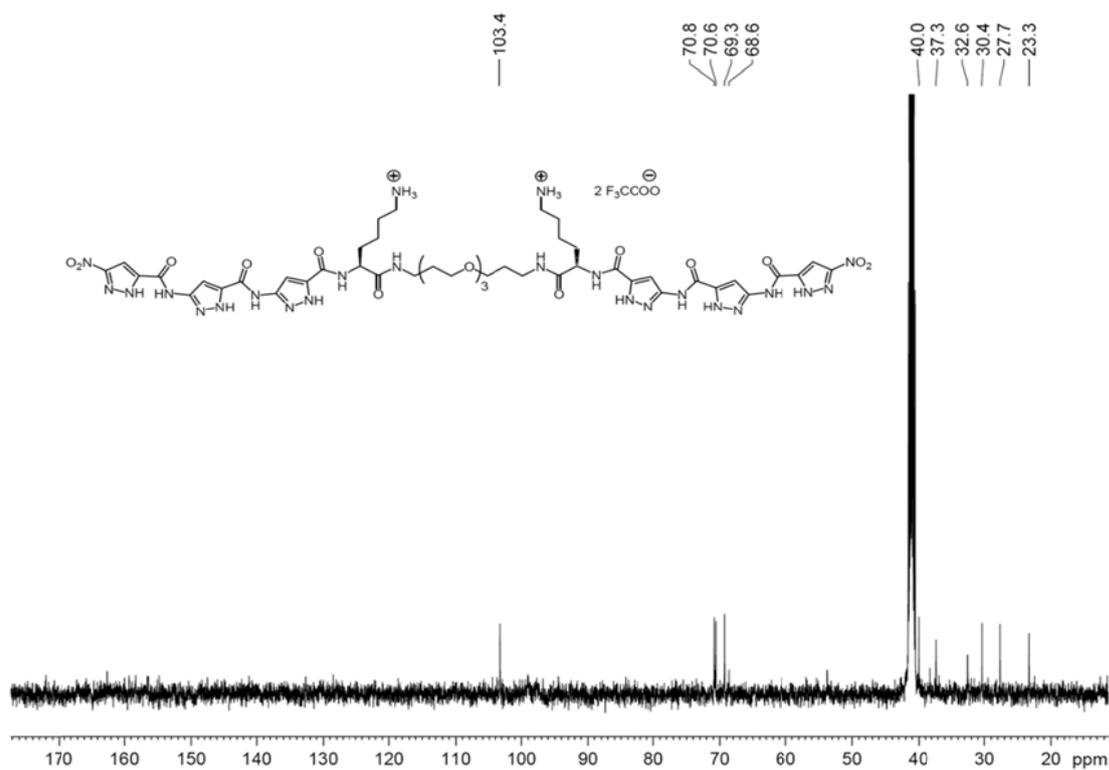


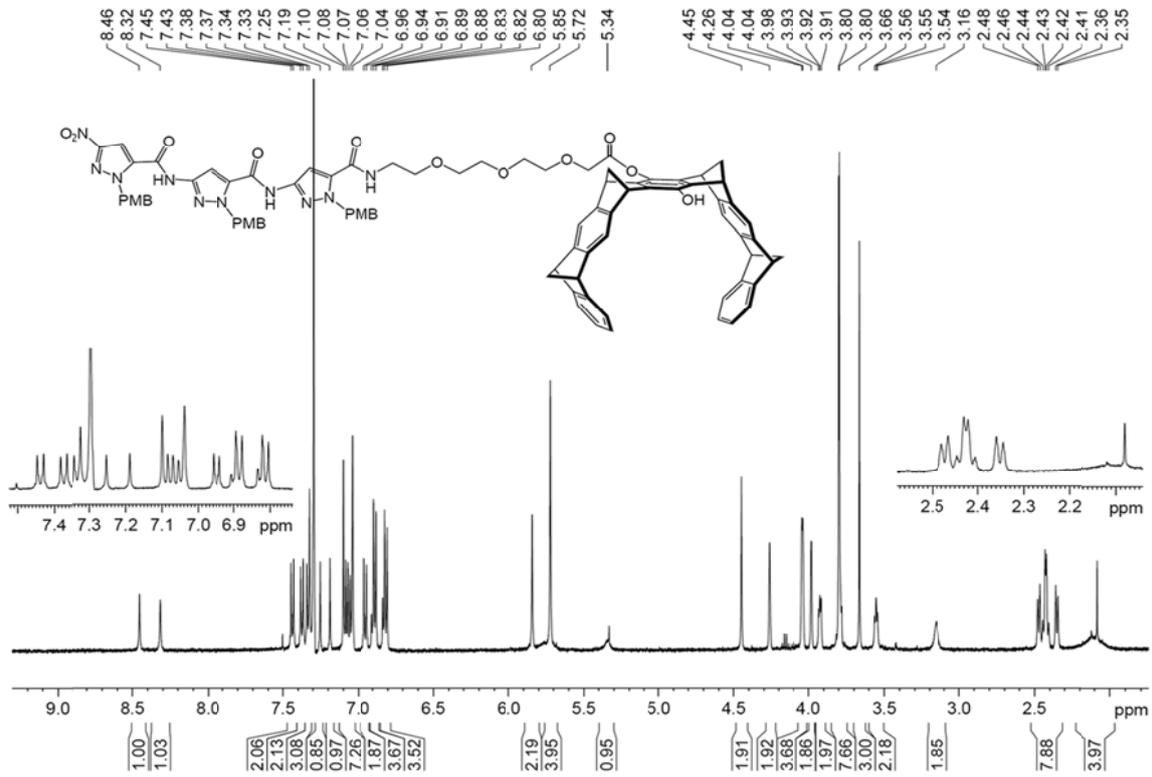
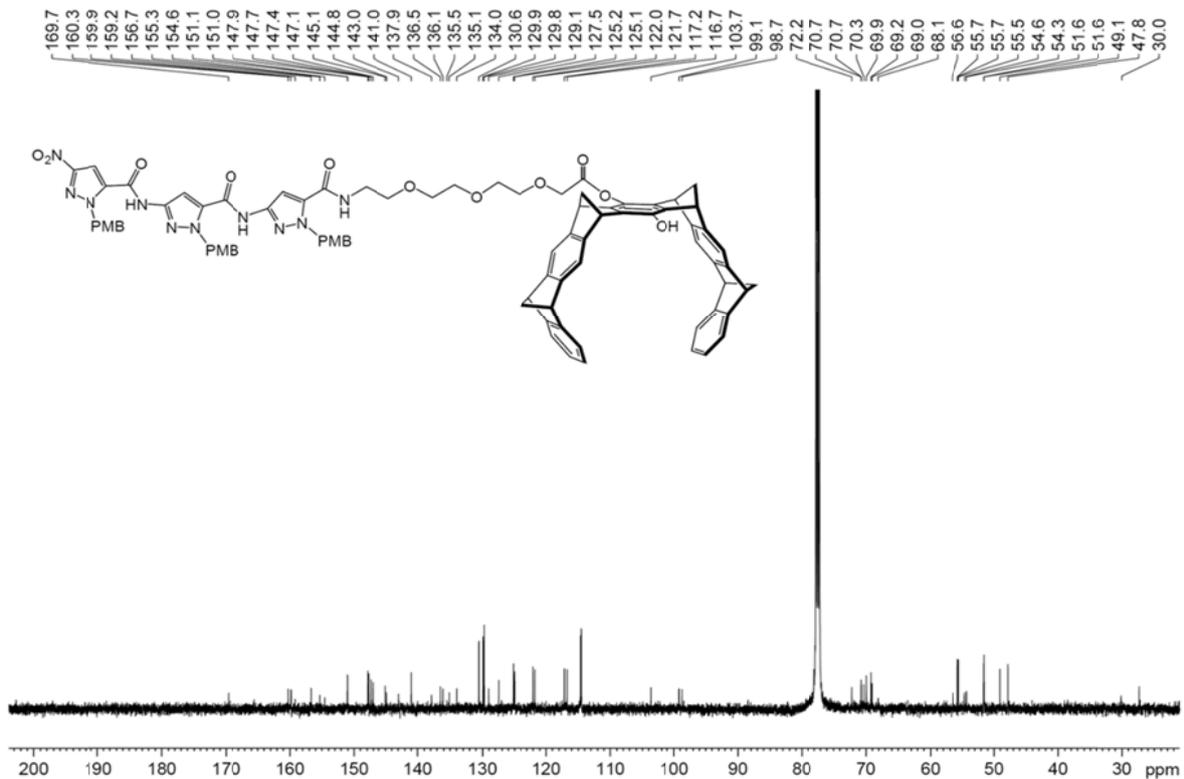
Abbildung 8.30: ^1H -NMR-Spektrum von Trimer-TEG-Pentalysin **74** in $\text{DCl}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1).

NMR-Spektren von H₂N-KLVFF-OHAbbildung 8.31: ¹H-NMR-Spektrum von H₂N-KLVFF-OH (DMSO-d₆, 298 K, 500 MHz)Abbildung 8.32: ¹³C-NMR-Spektrum von H₂N-KLVFF-OH (DMSO-d₆, 298 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektrum von Trim-TEG-LPFFD-OH **79**Abbildung 8.35: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **79** (DMSO-d_6 , 298 K, 500 MHz)

NMR-Spektren von Verbindung **81**Abbildung 8.36: ¹H-NMR-Spektrum von **81** (DMSO-d₆, 298 K, 500 MHz)Abbildung 8.37: ¹³C-NMR-Spektrum von **81** (DMSO-d₆, 298 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektren von Verbindung **84**Abbildung 8.38: ¹H-NMR-Spektrum von **84** (DMSO-d₆, 403 K, 500 MHz)Abbildung 8.39: ¹³C-NMR-Spektrum von **84** (DMSO-d₆, 403 K, 125.7 MHz)

NMR-Spektren von Verbindung **90**Abbildung 8.40: ¹H-NMR-Spektrum von **90** (CDCl₃, 298 K, 500 MHz)Abbildung 8.41: ¹³C-NMR-Spektrum von **90** (CDCl₃, 298 K, 125.7 MHz)

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Julia März-Berberich
Geburtsdatum	6/12/1979
Geburtsort	Barnaul
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schul Ausbildung

9/1998 - 6/2001	Berufskolleg Glockenspitz, Krefeld Abschluss Fachhochschulreife, Chemisch-technische Assistentin
-----------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------

Studium

10/2001 - 7/2006	Chemiestudium an der Universität Duisburg-Essen Abschluss Diplom-Chemikerin
1/2006 - 7/2006	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. R. Sustmann, Thema: Synthese und Untersuchung einer Fluoreszenzsonde zur Bestimmung von chelatisierbarem Eisen im Cytosol vitaler Zellen
10/2006 – 5/2010	Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. T. Schrader, Thema: Aminopyrazol-Hybridverbindungen gegen Aggregation und Neurotoxizität des Alzheimer-Peptids