

*Templat-vermittelte Synthese zyklischer Peptide an
programmierten Coiled-Coil-Gerüsten*

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

“Doctor rerum naturalium”

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Chemie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Wolf Mathis Rink

aus Wetzlar

Göttingen, 2022

Betreuungsausschuss

Jun.-Prof. Dr. Franziska Thomas

Institut für Organische Chemie (OCI), Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Prof. Dr. Claudia Steinem

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie (IOBC), Georg-August-Universität
Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission

Referentin:

Jun.-Prof. Dr. Franziska Thomas

Institut für Organische Chemie (OCI), Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Korreferentin:

Prof. Dr. Claudia Steinem

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie (IOBC), Georg-August-Universität
Göttingen

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Manuel Alcarazo

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie (IOBC), Georg-August-Universität
Göttingen

Dr. Holm Frauendorf

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie (IOBC), Georg-August-Universität
Göttingen

Prof. Dr. Hartmut Laatsch

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie (IOBC), Georg-August-Universität
Göttingen

Prof. Dr. Dietmar Stalke

Institut für Anorganische Chemie (IAC), Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2022

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Jun.-Prof. Dr. Franziska Thomas am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie (IOBC) der Georg-August-Universität Göttingen im Zeitraum Oktober 2015 bis Januar 2020 angefertigt.

Diese Arbeit wurde durch die *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (TH-2008/2-1) gefördert.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass eine entsprechende Promotion noch an keiner anderen Hochschule im In- oder Ausland beantragt wurde. Die eingereichte Dissertation oder Teile von ihr wurden und werden nicht für ein anderes Promotionsvorhaben verwendet.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Templatvermittelte Synthese zyklischer Peptide an programmierten Coiled-Coil Gerüsten" selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, Februar 2022

(Wolf Mathis Rink)

Meiner Familie

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2015 bis Mai 2019 am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie (IOBC) der Georg-August-Universität Göttingen.

Mein aufrichtiger und besonderer Dank gilt

Jun.-Prof. Dr. Franziska Thomas

für die außerordentliche wissenschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Bearbeitung dieses vielfältigen Forschungsvorhabens.

Kurzzusammenfassung

In den letzten Jahren kam es in der Forschung zu einer Renaissance makrozyklischer Peptide. Aufgrund der eingeschränkten Konformation besitzen sie eine hohe Substratspezifität und weisen, gemessen an ihrer Größe, eine große Oberfläche auf. Dies zeigt sich in ihrer hohen Effizienz Protein-Protein-Interaktionen (PPI) gezielt beeinflussen zu können. Als Biopharmazeutika, wie Antibiotika, zeichnen sie sich durch ihre erhöhte Stabilität und niedrige Immunogenität aus. Über gezielte chemische Modifikationen können zyklische Peptide die Blut-Hirn-Schranke überwinden und Zellmembranen durchdringen. Die Makrozyklisierung von kurzen Peptiden mit weniger als sieben Aminosäureresten ist aufgrund der steigenden Ringspannung schwierig. Darüber hinaus nutzen alternative Synthesewege vielfach die Verwendung von orthogonalen Schutzgruppenstrategien und senken so die Löslichkeit.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Templat-vermittelten Peptidzyklisierung unter Verwendung des parallelen heterodimeren Coiled-Coils. Dieses Gerüst erlaubt die modulare Funktionalisierung der beiden Peptidstränge. Dazu sollte das Zyklisierungsziel als C-terminaler Peptidthioester mit einer Alkin-modifizierten Aminosäureseitenkette über die CuAAC-Reaktion mit einem Azid-funktionalisierten Coil-Trägerstrang verbunden werden. Durch Assoziation eines komplementären Thiol-modifizierten Coil-Strangs sollte über eine intermediär gebildete Haarnadelstruktur eine räumliche Nähe zwischen den reaktiven Gruppen der Peptid-Termini geschaffen werden. Diese Vororganisation erlaubt dann eine schnelle Abreaktion über eine Kopf-zu-Schwanz-Makrozyklisierung.

Das optimierte CuAAC-Reaktionsprotokoll zeigte anteilige Formylierung eines *N*-terminalen Cysteinpeptidthioesters zum entsprechenden Thiazolidin. Durch mechanistische Überlegungen und Kontrollexperimente konnte *tert*-Butanol als Formylquelle identifiziert werden. Über die Feinjustierung des Verhältnisses von Kupfer zu Cu(I)-stabilisierenden Ligand konnten geeignete und robuste Bedingungen für die Coil-Peptiddekoration mit *N*-Cysteinpeptidthioestern als Zyklisierungsziel gefunden werden.

Als Makrozyklisierungsreaktionen wurde neben der direkten Aminolyse auch die Native Chemische Ligation (NCL) untersucht. Die Coiled-Coil-vermittelte Aminolyse eines Heptapeptidthioesters zeigte die Bildung sehr stabiler Haarnadelstrukturen unter neutralen Bedingungen. Die Verwendung von Imidazol in PBS-Puffer bei pH 9 führte anschließend zu einer Zyklisierung, wobei jedoch ein unerwünschter *side chain-to-tail*-Makrozyklus als wahrscheinliches Hauptprodukt erhalten wurde. Durch Austausch der *N*-terminalen

Aminosäure mit Cystein wurde die Zyklisierung über eine Native Chemische Ligation für Hepta-, Hexa-, Penta- und Tetrapeptide untersucht. Die Zyklisierung der Hepta- bis Pentapeptide erfolgte dabei sowohl für die Coiled-Coil-vermittelte Reaktion als auch die Hintergrundreaktion schnell. Nur für das Tetrapeptid mit einem C-terminalen Glycin konnte eine erfolgreiche Zyklisierung aus der Haarnadelstruktur nachgewiesen werden. Die zwei Tetrapeptide mit sterisch anspruchsvolleren C-terminalen Aminosäuren Alanin und Serin führten zur Bildung von Haarnadelstrukturen, die langsamer als die nicht Templat-vermittelte Reaktion zyklisierten und eine systematische Betrachtung der Orientierung der Haarnadelstruktur nötig machen.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung der zu zyklisierenden Peptide an Coil-Peptide eine zügige und erfolgreiche Zyklisierung von Hepta- bis Pentapeptiden möglich war. Diese können zukünftig für den Aufbau von Cyclopeptidbibliotheken an Coiled-Coil-Gerüsten und zur Entwicklung von Bindungsassays genutzt werden.

Schlüsselworte: Coiled-Coil, Templat, Makrozyklisierung, CuAAC, Peptidthioester, direkte Aminolyse, Native Chemische Ligation

Abstract

In recent years, macrocyclic peptides have experienced a renaissance in research. Due to their restricted conformation, they have a high substrate specificity and, relative to their size, a large surface area. This is reflected in their high efficiency to target protein-protein interactions (PPI). As biopharmaceuticals such as antibiotics, they are characterized by their increased stability and low immunogenicity. Targeted chemical modifications allow cyclic peptides to cross the blood-brain barrier and penetrate cell membranes. Macrocyclization of short peptides with less than seven amino acid residues is difficult due to increasing ring tension. In addition, alternative syntheses in numerous cases employ orthogonal protecting group strategies, thus lowering solubility.

The aim of this work was to develop a template-mediated peptide cyclization using the parallel heterodimeric coiled coil. This scaffold allows modular functionalization of the two peptide strands. For this purpose, the cyclization target should be attached as a *C*-terminal peptide thioester with an alkyne-modified amino acid side chain to an azide-functionalized coil strand using the CuAAC reaction. The association of a complementary thiol-modified coil strand is intended to create spatial proximity between the reactive groups of the peptide termini *via* an intermediately formed hairpin structure. This pre-organization then enables a rapid reaction through head-to-tail macrocyclization.

The optimized CuAAC reaction protocol showed proportional formylation of an *N*-terminal cysteine peptide thioester to the corresponding thiazolidine. Mechanistic considerations and control experiments identified *tert*-butanol as the formyl source. By fine-tuning the ratio of copper to Cu(I)-stabilizing ligand, suitable and robust conditions were identified for coil peptide decoration with *N*-cysteine peptide thioesters as cyclization targets.

In addition to direct aminolysis, native chemical ligation (NCL) was investigated as a macrocyclization reaction. Coiled-coil-mediated aminolysis of a heptapeptide thioester showed the formation of very stable hairpin structures under neutral conditions. Subsequently, the use of imidazole in PBS buffer at pH 9 led to cyclization, but an undesired side chain-to-tail macrocycle was obtained as the most probable major product. By replacing the *N*-terminal amino acid with cysteine, cyclization *via* native chemical ligation was investigated for hepta-, hexa-, penta-, and tetrapeptides. Cyclization of the hepta- to pentapeptides was rapid in both the coiled-coil-mediated reaction and the background reaction. Only the tetrapeptide with a *C*-terminal glycine was successfully cyclized from the hairpin structure. The two tetrapeptides with sterically more demanding *C*-terminal amino acids alanine and serine led to the

formation of hairpin structures that cyclized more slowly than the non-template-mediated reaction, requiring a systematic consideration of the orientation of the hairpin structure.

It was shown that by binding the to be cyclized peptides to coil peptides, rapid and successful cyclization of hepta- to pentapeptides was possible. In the future, these can be used to build up cyclopeptide libraries on coiled-coil scaffolds and to develop binding assays.

Keywords: coiled-coil, template, macrocyclization, CuAAC, peptide thioester, direct aminolysis, native chemical ligation

Teile der Kapitel 1.1 und 1.2 dieser Dissertation wurden publiziert in:

W. M. Rink, F. Thomas, “*De Novo Designed α -Helical Coiled-Coil Peptides as Scaffolds for Chemical Reactions*”, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 1665–1677.

DOI: 10.1002/chem.201802849

Teile des Kapitels 3.3 dieser Dissertation wurden publiziert in:

W. M. Rink, F. Thomas, “*Decoration of coiled-coil peptides with N-cysteine peptide thioesters as cyclic peptide precursors using CuAAC click chemistry*”, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 7493–7497.

DOI: 10.1021/acs.orglett.8b03261

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Coiled-Coils und ihr <i>de novo</i> Design	3
1.2	Templat-vermittelte Reaktionen	8
1.2.1	Das Coiled-Coil-Gerüst als Ligase	8
1.2.2	Coiled-Coil-Peptide mit Transferase-Aktivität.....	11
1.2.3	Coiled-Coil-vermitteltes Proteinlabelling.....	13
1.3	Peptidzyklisierungen.....	15
2	Aufgabenstellung	19
3	Ergebnisse und Diskussion	22
3.1	Design der Templat-vermittelten Zyklisierung an programmierten Coiled-Coils.....	22
3.2	Peptidsynthese und Funktionalisierung	27
3.2.1	Synthese der Azid-funktionalisierten Coil-Stränge	29
3.2.2	Synthese der Thiol-funktionalisierten Coil-Stränge	30
3.2.3	Synthese der Peptidthioester als Zyklisierungsziel.....	32
3.3	Entwicklung eines effizienten Kupfer-Click Protokolls	40
3.3.1	Optimierung der CuAAC-Reaktion in Lösung.....	41
3.3.2	Untersuchungen zur Substratbreite.....	51
3.3.3	Die CuAAC-Reaktion von <i>N</i> -Cysteinylpeptidthioestern in Lösung.....	56
3.3.4	Mechanistische Betrachtungen der CuAAC-Reaktion von <i>N</i> -Cysteinylpeptiden	62
3.3.5	Weitere Bedingungen der CuAAC-Reaktion in Lösung	68
3.3.6	Die CuAAC-Reaktion an der Festphase als alternativer Zugang zu <i>N</i> -Cysteinylpeptidthioester-Konjugaten	71
3.3.7	Mechanistische Betrachtung der Folgechemie durch Thioesterifizierung an der festen Phase.....	84
3.3.8	Optimierungsversuche an der Festphase.....	89
3.3.9	Kurzzusammenfassung der CuAAC-Reaktion	93
3.4	Coiled-Coil-vermittelte Lactamisierungs- und Ligationsreaktionen	95
3.4.1	Coiled-Coil-vermittelter Ansatz zur direkten Aminolyse.....	96
3.4.2	Coiled-Coil-vermittelter Ansatz zur Nativen Chemischen Ligation	109
3.4.3	Kurzzusammenfassung der Coiled-Coil-vermittelten Zyklisierungsversuche	132
4	Zusammenfassung und Ausblick	134

5	Experimenteller Teil	140
5.1	Allgemein.....	140
5.2	Allgemeine Vorschriften (AV)	146
5.2.1	Harzbeladung	146
5.2.2	Automatisierte Festphasenpeptidsynthese	149
5.2.3	Manuelle Festphasenpeptidsynthese, Transformationen an der Festphase und spezielle Freisetzungen der Peptide.....	151
5.2.4	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)	154
5.2.5	Ligationsversuche zur direkten Aminolyse und Nativen Chemischen Ligation.....	158
5.3	Synthesevorschriften und Versuchsdurchführungen	160
5.3.1	Bausteinsynthesen.....	160
5.3.2	Synthese der <i>N</i> -Azid-Coil-Peptide.....	163
5.3.3	Synthese der <i>N</i> -Thiol-Coil-Peptide.....	169
5.3.4	Synthese der Peptidthioester	172
5.3.5	Synthese der vollgeschützten Peptidsäuren	180
5.3.6	Synthese der Peptidsäuren	183
5.3.7	Synthese der CuAAC-Konjugate in Lösung.....	187
5.3.8	Synthese der CuAAC-Konjugate an der Festphase	198
5.3.9	Optimierung der CuAAC-Reaktion von <i>N</i> -Cysteinylpeptiden mit Deuterierungs-experiment zum Ursprung der Formylquelle.....	210
5.4	HPLC-Reaktionsverfolgungen.....	216
5.4.1	CuAAC-Reaktionsverfolgung der Untersuchungen zur Substratbreite (Tabelle 11).....	216
5.4.2	Coiled-Coil-vermittelte direkte Aminolyse	230
5.4.3	Coiled-Coil-vermittelte Native Chemische Ligation (NCL)	247
6	Literaturverzeichnis.....	282
7	Anhang	294
7.1	Chromatogramme und Massenspektren der synthetisierten Peptide	294
7.1.1	<i>N</i> -Azid-Coil-Peptide	294
7.1.2	<i>N</i> -Thiol-Coil-Peptide	298
7.1.3	Peptidthioester	300
7.1.4	Vollgeschützte Peptidsäuren.....	304
7.1.5	Peptidsäuren.....	306
7.1.6	CuAAC-Konjugate	308
7.2	Zusätzliche Chromatogramme und Massenspektren der CuAAC-Reaktionen	315
7.2.1	Chromatogramme und Massenspektren der CuAAC- Reaktionsoptimierung.....	315

Inhaltsverzeichnis

7.2.2	MALDI-TOF-Massenspektren ausgewählter Nebenprodukte der CuAAC-Reaktion an der Festphase	317
7.3	Zusätzliche Chromatogramme und Massenspektren der Zyklisierungsversuche	319
7.3.1	Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse	319
7.3.2	Native chemische Ligation (NCL).....	334
	Abkürzungsverzeichnis	337
	Danksagung.....	340
	Lebenslauf.....	343

1 Einleitung

Makrozyklische Peptide sind rigide Polypeptide die sowohl aus proteinogenen als auch nicht-proteinogenen Aminosäuren bestehen können. Sie können sowohl in der Natur gefunden als auch spezifisch im Labor synthetisiert werden. Auf Grund ihrer rigiden Struktur besitzen sie nicht nur eine hohe proteolytische Stabilität, sondern auch eine erhöhte Bindungsspezifität und -stabilität. Die große Oberfläche bei vergleichsweise geringer Größe ermöglicht zudem eine große Interaktionsfläche, wodurch sie eine zu Antikörpern vergleichbare Affinität und Spezifität besitzen. Darüber hinaus können viele dieser Peptide so modifiziert werden, dass sie durch Zellmembranen transportiert werden und die Blut-Hirn-Schranke überwinden können.^[2-5]

So wurden bereits über 1000 natürliche zyklische Peptide entdeckt von denen eine Vielzahl biologisch aktiv ist und somit die Einsatzmöglichkeiten vielfältig sind. Mehr als 40 verschiedene zyklische Peptide werden bereits als Therapeutika eingesetzt und hunderte befinden sich aktuell in klinischen oder präklinischen Studien.^[3]

Häufig finden zyklische Peptide Verwendung als Antibiotika. Beispielsweise ist Vancomycin, ein natürliches zyklisches Glykopeptid, ein häufig verwendeter Wirkstoff in Antibiotika. Es wurde Mitte der 80er Jahre von der FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) zugelassen und inhibiert die Synthese der Zellwand grampositiver Bakterien. Eingesetzt wird es zur Behandlung von Methicillin-resistenten Staphylokokken (genauer *Staphylococcus aureus*, MRSA), die unter anderem Entzündungen der Haut, Blutbahn und Knochen sowie Meningitis und Endokarditis auslösen können.^[3,6] Ein weiteres wichtiges Antibiotikum ist Daptomycin. Es ist ein zyklisches Lipopeptid und wirksam gegen verschiedene resistente grampositive Bakterien, wenn Antibiotika wie Vancomycin keine Wirkung mehr zeigen. Daptomycin bindet an Calcium-Ionen und durchbricht anschließend die Zellmembran was wiederum zum Zelltod des Bakteriums führt.^[3]

Des Weiteren werden zyklische Peptide als Antimykotika eingesetzt. Eine moderate bis hohe Aktivität gegen vier unterschiedliche pflanzenschädigende Pilze zeigte beispielsweise ein zyklisches Tetrapeptid isoliert aus zwei Mangrovenpilzen.^[6,7] Ein weiteres Antimykotikum ist Colisporifungin, das die wachstumshemmende Wirkung von Caspofungin gegen den Schimmelpilz *Apergillus fumigatus* verstärkt.^[8]

Darüber hinaus zeigten bereits einige zyklische Peptide eine zytostatische Wirkung gegen Krebszellen und werden in der Krebstherapie eingesetzt.^[3,6] So haben beispielsweise Psychrophiline, die aus unterschiedlichen Stämmen des Pinselschimmels (*Penicillium*) isoliert

Einleitung

wurden und aus einem zyklischen Tripeptid bestehen, je nach Derivat eine hemmende Wirkung auf unterschiedliche Arten von Krebszellen.^[3,6] Die Gymnopeptide A und B wurden aus dem spindeligen Rübbling (*gymnopus fusipes*) isoliert und zeigen eine stärkere antiproliferative Wirkung auf unterschiedliche humane Krebszelllinien im Vergleich zu dem Zytostatikum Cisplatin.^[9]

Malformin E ist ein zyklisches Pentapeptid mit der Sequenz cyclo-(Leu-Val-Ile-Cys-Cys) und wurde aus einer Kulturbrühe des Pilzes *Aspergillus tamaris* aus dem Feigenbaum (*Ficus carica*) als Disulfid gewonnen. Es zeigt nicht nur eine hohe Zytotoxizität gegenüber Krebszellen, sondern auch eine antibakterielle und antimykotische Aktivität.^[10]

Darüber hinaus zeigen verschiedene zyklische Peptide auch antivirale Aktivitäten oder werden unter anderem bei Osteoporose, Diabetes und als Immunsuppressiva bei Organtransplantationen eingesetzt.^[3]

Im letzten Jahrzehnt rückten zyklische Peptide zudem als Inhibitoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen immer weiter in den Fokus. Beispielsweise zeigte ein von Amylin (Insel-Amyloid-Polypeptid, IAPP) abgeleitetes zyklisches Peptid die Inhibierung der Bildung von Amyloidfibrillen des Beta-Amyloid Peptids ($A\beta$), dessen extrazelluläre Plaques ein pathologisches Merkmal der Alzheimer-Krankheit sind.^[2,11]

Die Vielfalt an zyklischen Peptiden ist unerschöpflich. Zur Untersuchung von vielversprechenden Leitstrukturen bieten sich Bibliothek-Designs an. Dazu können zyklischen Peptide an beispielsweise verlässlich faltenden Peptidstrukturen wie Coiled-Coils gebunden werden und können zur Detektion von Bindungsereignissen in Hochdurchsatzscreenings genutzt werden.

1.1 Coiled-Coils und ihr *de novo* Design

Coiled-Coils (CC) sind interessante Bausteine für Anwendungen in der synthetischen Biologie und biomimetischen Materialforschung.^[12] Durch das Verständnis dieses Proteinfaltungsmotivs waren und sind die Aufstellung von einfach anzuwendenden Designregeln Gegenstand der aktuellen Forschung.^[13]

Die Sequenz-Struktur-Beziehungen lassen sich auf ein sich wiederholendes Heptadenmuster reduzieren, in dem sich hydrophobe (h) und polare (p) Aminosäurereste in einer **hpphppp**-Sequenz für klassische Coiled-Coils wiederfinden. Ein Beispiel für ein solch klassisches Coiled-Coil ist in Abbildung 1A gezeigt.

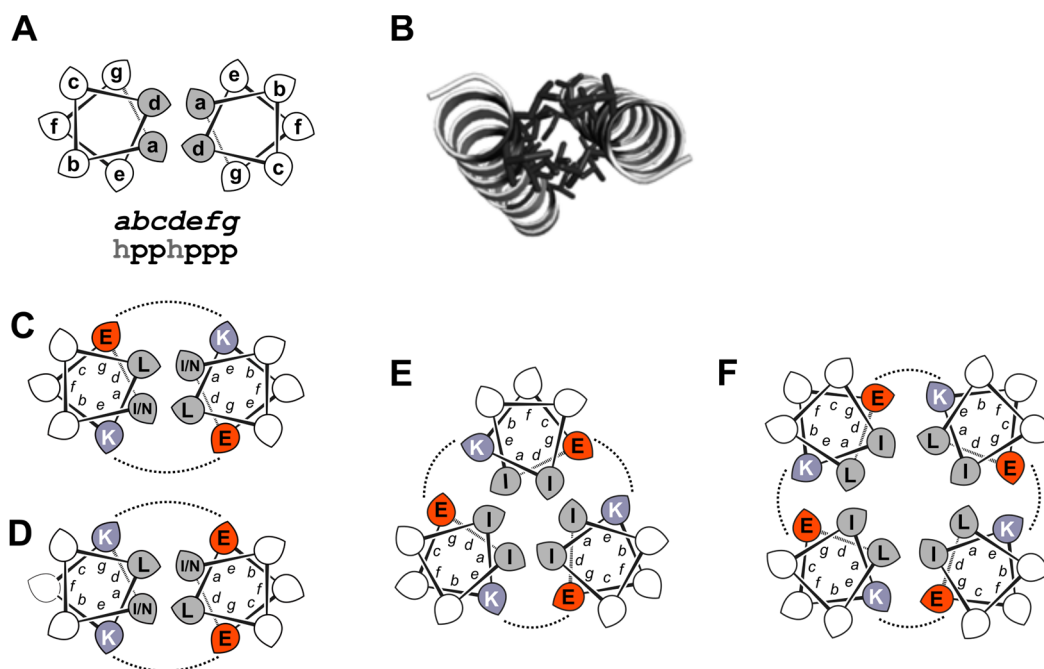


Abbildung 1: Struktur und *de novo* Design von Coiled-Coil-Peptiden. A) Helixraddarstellung der Heptadenwiederholungssequenzmuster von Coiled-Coils (CC) des Typs **hpphppp**. Die Sequenzpositionen sind dem **abcdefg**-Register zugewiesen. Die hydrophoben Reste an Position **a** und **d** sind *grau*, die polaren Reste in Position **bc** und **efg** sind *weiß* hinterlegt. B) Aufsicht auf die Röntgenkristallstruktur eines *de novo* designten CC-Homodimers (pdb 4DZM).^[14] *De novo* designte Coiled-Coil-Sequenzen von C) einem parallelen CC-Homodimer, D) einem parallelen CC-Heterodimer, E) einem parallelen CC-Homotrimer und F) einem parallelen CC-Homotetramer.^[14,15] Die geladenen Reste sind in *rot* für Glutamat (sauer) und in *blau* für Lysin (basisch) dargestellt. Die gepunkteten Linien zeigen die möglichen elektrostatischen Interaktionen. Copyright 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Mit Erlaubnis übernommen und abgewandelt von Lit. [13].

Anstelle der **hpphppp**-Sequenz ist die Darstellung der Heptadenwiederholung in einem **abcdefg**-Register etabliert.^[16] Besitzt ein Peptid ein solches Sequenzmuster, faltet dieses sich

Einleitung

zu einer amphiphilen α -Helix, wobei die hydrophoben **a**- und **d**-Reste auf die eine Seite zeigen und die polaren **b**-, **c**-, **e**-, **f**-, **g**-Reste auf der anderen Seite präsentiert sind. Durch den hydrophoben Effekt lagern und winden sich solche α -Helices über ihre hydrophobe **ad**-Flächen zu einer linkshändigen Supercoil-Struktur an- und umeinander. Diese Struktur beruht auf einem leichten Versatz der Helixpackung, in dem das Sequenzmuster mit sieben Aminosäureresten und den 3.6-Resten pro Helixwindung zueinanderfinden. Neben den **a**- und **d**-Resten an der Coiled-Coil-Grenzfläche sind auch die flankierenden **e**- und **g**-Reste an der Wechselwirkung beteiligt. Diese Reste sind in einer so genannten *knobs-into-holes*-Manier (KIH, dt.: Knopf-in-Loch) dicht gepackt.^[17]

Coiled-Coils existieren trotz dieser einfach erscheinenden Sequenzmuster in einer Vielzahl oligomerer Zustände, wie homo- oder heteromer, und Orientierungen zueinander (parallel oder antiparallel).^[18] Viele dieser Strukturen sind durch *de novo* Design zugänglich. Abbildung 1C-F enthält Beispiele für Coiled-Coils vom Dimer bis zum Tetramer.

Der oligomere Zustand eines Coiled-Coil-Assemblats wird hauptsächlich durch die Reste an den **a**- und **d**-Positionen gesteuert.^[19,20] Aufgrund der unterschiedlichen *knobs-into-holes*-Packungsmodi in Coiled-Coil-Dimeren, Coiled-Coil-Trimeren und Coiled-Coil-Tetrameren können Aminosäurereste mit unterschiedlichen sterischen Anforderungen an den hydrophoben **a**- und **d**-Positionen untergebracht werden.^[12] Es wurde experimentell in einer systematischen Studie von HARBURY *et al.* festgestellt, dass ein Isoleucin-Leucin-Kern, bei dem die Isoleucinreste die **a**-Positionen und die Leucinreste die **d**-Positionen besetzen, zur Bildung eines Coiled-Coil-Dimers führen.^[19] Installiert man beispielsweise ein Isoleucin an sowohl **a**- und **d**-Position wird ein trimeres Coiled-Coil gebildet. Bei der Umkehrung zu Isoleucin auf **a** und Leucin auf **d** werden hingegen Coiled-Coil-Tetramere erhalten. HARBURY *et al.* zeigten des Weiteren, dass durch andere Kombinationen hydrophober Aminosäuren wie beispielsweise Valin verschiedene oligomere Zustände der GCN4-Leucinzippervarianten eingenommen werden.

In der Natur kommen vor allem polare Reste wie Asparagin an **a**-Positionen in Coiled-Coil-Dimeren vor.^[21,22] Der Asparaginrest erhöht in zentraler Position die Spezifität für ein dimeres Coiled-Coil.^[14] Dies wird häufig als negatives Design bezeichnet, da die Asparaginreste auf den hydrophoben Kern strukturell destabilisierend wirken. In Coiled-Coil-Dimeren stehen sich die Asparaginreste jedoch im hydrophoben Kern gegenüber und bilden eine dynamische Wasserstoffbrücke, die den Verlust an struktureller Stabilität teilweise kompensiert.^[23] Die Dimerspezifität beruht auf der Änderung der KIH-Packung und verhindert so die Bildung von Trimeren oder Tetrameren. Mithilfe von Asparagin im

Einleitung

hydrophoben Kern kann überdies die Helixorientierung gesteuert werden und so das *de novo* Design von parallelen und antiparallelen Coiled-Coils ermöglicht werden.^[24,25] Ein Einbau in **a**-Position ist folglich fundamental für das gezielte Design homodimerer und heterodimerer Coiled-Coils. Neben Asparagin konnte die Gruppe um KENNAN die allgemeine Gültigkeit der Rolle polarer Aminosäurereste in dieser Position durch Verwendung von anderen hydrophilen und sogar geladenen Aminosäureresten zeigen.^[26-28]

Geladene Aminosäurereste an den **e**- und **g**-Positionen, die die hydrophobe Naht säumen, tragen wesentlich zur Ausrichtung des Coiled-Coils und zur Spezifität der homo- gegenüber heteromeren Assemblate bei.^[29,30] In homomeren Coiled-Coils sind die **e**- und **g**-Positionen mit entgegengesetzt geladenen Resten besetzt, die den Zusammenbau durch attraktive Ladungswechselwirkungen stabilisieren.^[14] In heteromeren Coiled-Coils hingegen ist das Ladungsmuster an diesen Positionen so beschaffen, dass aufgrund von Ladungsabstoßung homomere Assemblierungen im Vergleich zu heteromeren Assemblierungen deutlich destabilisiert sind.^[29] Im einfachsten Fall eines heterodimeren Coiled-Coils ist ein Strang vollständig positiv geladen, mit Lysinresten an den Positionen **e** und **g**, während der andere Strang negativ geladen ist und Glutaminsäurereste an diesen Positionen trägt.^[15,31,32] Ähnliche Designstrategien wurden für Coiled-Coil-Heterotrimerer^[33] und Coiled-Coil-Heterotetramere^[34] verwendet. Durch die Verwendung komplexerer Ladungsmuster ist es in Kombination mit negativem Design, d. h. der Einführung von Asparaginresten an verschiedenen **a**-Positionen im hydrophoben Kern, möglich sogenannte orthogonale heterodimere Coiled-Coils zu entwerfen, die mit sehr hoher Spezifität interagieren.^[20,35,36]

Das *de novo* Design von parallelen heterotrimeren Coiled-Coils ist dagegen herausfordernder, kann aber durch die Anpassung der Ladungsmuster in den drei Coil-Strängen erreicht werden.^[33,37] Des Weiteren kann ein sterischer Abgleich zum Design heterotrimerer CCs genutzt werden, in dem sterisch anspruchsvolle nicht-kanonische Aminosäuren an einer zentralen **a**-Position mit kleinen Aminosäureresten wie Alanin packen.^[38-41]

Auf der Grundlage dieser experimentellen Befunde war es möglich grundlegende Kriterien für parallele Coiled-Coil-Homodimere und -Heterodimere, Coiled-Coil-Trimere und Coiled-Coil-Tetramere aufzustellen (Abbildung 1C-F).^[14,15] Diese beinhalten die HARBURY-Regeln für die Reste des hydrophoben Kerns (**a/d**-Position), die den Oligomerezustand bestimmen (Ile/Leu - CC-Dimer, Ile/Ile - CC-Trimer, Leu/Ile - CC-Tetramer) und werden um die Asparagin-Kernreste in Coiled-Coil-Dimeren, sowie die Einführung geladener Reste an den Positionen **e** und **g** zur Steuerung der Homo- bzw. Heterospezifität erweitert. Die übrigen Positionen des Coiled-Coil-Registers sind mit helixbegünstigenden Resten wie Alanin oder

Einleitung

Glutamin besetzt. Die *f*-Position eignet sich im Allgemeinen am besten für die Coiled-Coil-Modifikation, da sie vollständig der Lösungsmittel-Umgebung ausgesetzt ist.

In Coiled-Coils höherer oligomerer Ordnung (> 4 α -Helices) sind die *a*- und *d*-Positionen mit Leucin und Isoleucinresten besetzt. Dies ist ebenfalls bei Coiled-Coil-Tetrameren der Fall. Aus diesem Grund kann die Kernpackung nicht zur Erklärung der Faltungsunterschiede zwischen tetrameren Coiled-Coils oder Coiled-Coil-Anordnungen höherer Ordnung bemüht werden. Das klassische **hpphppp**-Sequenzmuster stößt somit an seine Grenzen und andere Heptad-Wiederholungsmuster müssen berücksichtigt werden.^[12,42]

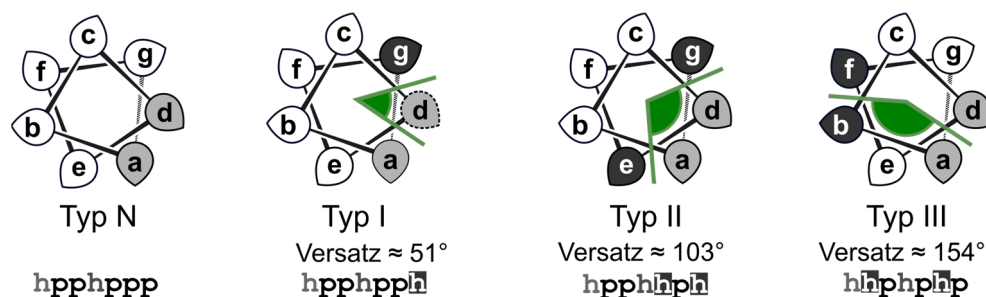


Abbildung 2: Helixraddarstellung der Heptadenwiederholungsmuster von Typ N, Typ I, Typ II und Typ III Coiled-Coils. Die Blattform der C_α -Atome jedes Rests zeigt die Orientierung des C_α - zum C_β -Atom. Reste die an KIH-Packung beteiligt sind, sind *grau* und *dunkelgrau* eingefärbt. Polare Reste sind mit *weißem* Hintergrund dargestellt.

Diese Berücksichtigung führt zu einer Klassifizierung von Coiled-Coils in vier Gruppen (Abbildung 2):^[43] Die Typ N Coiled-Coils basieren auf dem klassischen **hpphppp**-Muster und bilden hauptsächlich CC-Dimere. Coiled-Coil-Trimere und -Tetramere werden hingegen besser mit einem **hpphhph**-Sequenzmuster beschrieben, da flankierende Reste (z. B. die *g*-Positionen) gelegentlich Teil des hydrophoben Kerns sind und so die hydrophobe Seite erweitern. Diese Coiled-Coils werden als Typ I bezeichnet. Bei CCs höherer Ordnung mit vier bis sieben α -Helices liegen zwei hydrophobe Bänder vor, die unabhängig voneinander mit der jeweils benachbarten α -Helix interagieren und somit *e*- und *g*-Reste in die *knobs-into-holes*-Packung einschließen. Diese Coiled-Coils vom Typ II weisen eine **hpphhph**-Heptadenwiederholung auf. Coiled-Coil-Peptide mit acht oder mehr α -Helices sowie Coiled-Coil-Bänder basieren auf einem **hhphphp**-Sequenzmuster, das als Typ III bezeichnet wird.

Im Vergleich zum parallelen Coiled-Coil-Design sind antiparallele CC-Designregeln schwieriger zu formulieren und werden meist für CC-Dimere berichtet.^[12] Das Design gelingt durch eingebettete polare Reste, die die Struktur in Richtung einer parallelen oder

Einleitung

antiparallelen Ausrichtung lenken.^[24] Darüber hinaus führen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den *e*- und *e'*- oder *g*- und *g'*-Resten der jeweiligen Coilstränge zu antiparallelen CCs, während in parallelen CCs solche Wechselwirkungen zwischen *e*- und *g'*-Resten bestehen. Dies kann ausgenutzt werden, um die antiparallele Ausrichtung zu fördern.^[25] Durch computergestütztes Design war es möglich, orthogonale, antiparallele heterodimere Coiled-Coils zu realisieren.^[44-46] Über die Dimere hinausgehende antiparallele Coiled-Coils, werden in der Regel maßgeschneidert entworfen.^[47,48] Beispielsweise wurden antiparallele CC-Tetramere, die auf einem Typ-I-Heptadenwiederholungsmuster basieren, von DEGRADO und Mitarbeitern entworfen.^[49]

Mit den vorgestellten Regeln des Coiled-Coil-Designs und der damit einhergehenden Vielzahl an zugänglichen Coiled-Coil-Strukturen kann das *bottom-up*-Design (dt.: von Grund auf) funktioneller Peptidgerüste realisiert werden.

1.2 Templat-vermittelte Reaktionen

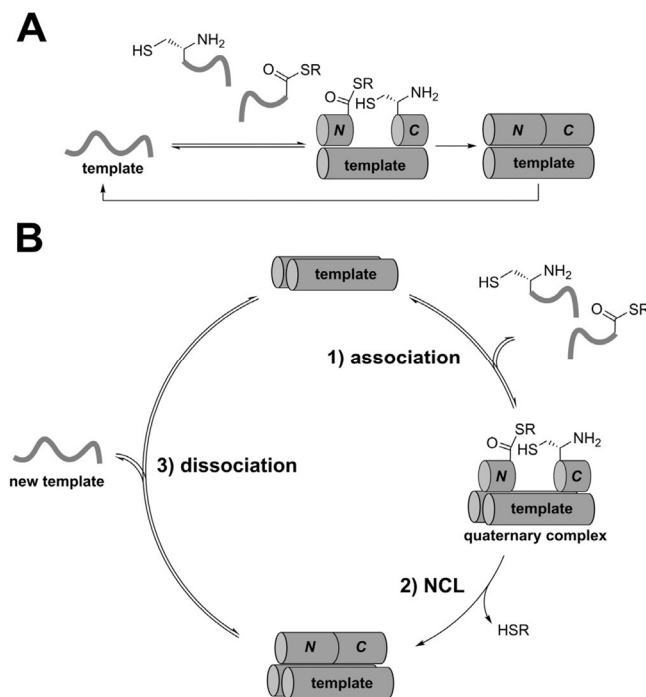
Die Effizienz, Stereoselektivität und Substratspezifität, mit der Enzyme biochemische Reaktionen vermitteln, konnte bis heute von chemischen Katalysatoren nicht nachgeahmt werden.^[1] Die Funktion von Proteinen wird maßgeblich durch die räumliche, dreidimensionale Struktur vorgegeben. Das Verständnis der Proteinfaltung ist allerdings bis heute limitiert, wenngleich Computeralgorithmen wie zuletzt ALPHAFOLD die Grenzen unseres Verständnisses neu definieren.^[50] Die Entwicklung des Designs funktionaler, nativer Proteinstrukturen ist durch die Komplexität der Proteinfaltung und dem mangelndem Verständnis an Sequenz-Struktur-Beziehungen zumeist auf das Engineering solcher Proteine beschränkt. Das komplette *de novo* Design benötigt jedoch das vollumfängliche Verständnis der Beziehung von Struktur und Funktion.^[13] Mit kleinen gut untersuchten Proteinfaltungsmotiven können in einem Baukasten-artigen Ansatz funktionelle Peptidgerüste aufgebaut werden. Zu solchen Peptidgerüsten gehören auch Coiled-Coils, die in der Vergangenheit als Vermittler verschiedenster Reaktionen vorgestellt wurden. *De novo* entworfene Coiled-Coils sind in der Lage Ligations- und Transferreaktionen, Esterhydrolysen und Redox-Reaktionen zu vermitteln, sowie Protein-Markierungsstrategien zu ermöglichen.^[13]

1.2.1 Das Coiled-Coil-Gerüst als Ligase

Zur Nachahmung von nativen Ligasen, welche die Kondensation von DNA oder Proteinfragmenten über die Anordnung der reaktiven Gruppen katalysieren, kann auch das Coiled-Coil-Gerüst als Modellligase agieren. Dabei erwies sich das Coiled-Coil-Dimer als ideale Plattform, da es die Coiled-Coil-Erkennung über die Reste in den Positionen *a*, *d*, *e*, und *g* des Coiled-Coil-Registers dirigiert (vgl. Kapitel 1.1). Die erste beschriebene Coiled-Coil-Ligase wurde von GHADIRI *et al.* als selbstreplizierendes System designt.^[51] Basierend auf einem homodimeren GCN4-Leucizipper fragmentierten sie dieses Peptid an einer *b* und *c*-Seite in zwei Teile und funktionalisierten das *C*-Fragment mit einem Cystein am *N*-Terminus und das *N*-Fragment als Peptidthioester am *C*-Terminus. Das Prinzip ist in Schema 1A gezeigt. In Lösung wurden die Fragmente von einem GCN4-Strang voller Länge assoziiert und die Templat-vermittelte Native Chemische Ligation (NCL) ermöglicht. Die NCL ist eine chemoselektive Reaktion zwischen einem Peptidthioester und einem

Einleitung

Cysteinylopeptid, die über eine Transthioesterifizierung und anschließendem intramolekularem $S \rightarrow N$ -Acyltransfer zur Ausbildung einer Peptidbindung führt (siehe dazu auch Schema 6 in Kapitel 1.3). GHADIRI und Kollegen beobachteten bei dieser Kondensation zum Ligationsprodukt eine autokatalytische Effizienz von ca. 500 und eine Geschwindigkeitserhöhung der Reaktion von 540% im Vergleich zur Hintergrundreaktion. Dabei diente das neugebildete Ligationsprodukt der zwei Fragmente selbst als neues Templat und beschleunigte so die Reaktion.



Schema 1: Coiled-Coil-Ligasen. A) Selbstreplikation eines Coiled-Coil-Homodimers. Anfänglich dient ein ganzer Coil-Strang als Templat für die NCL-basierte Ligation der Coiled-Coil-Fragmente. Die Templat-vermittelte Coiled-Coil-Ligation an Heterodimeren verläuft über den gleichen Mechanismus. B) Vorgeschlagener Mechanismus des Katalysezyklus der Selbstreplikation. Copyright 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Mit Erlaubnis übernommen und abgewandelt von Lit. [13].

Der Mechanismus des Katalysezyklus dieser Selbstreplikation ist nicht gänzlich aufgeklärt. Wahrscheinlich verläuft er über die Bildung eines Dimer-Trimer-Gleichgewichts, wie in Schema 1B gezeigt. Durch ein fehlendes Dimer-spezififizierendes Element, wie beispielsweise eines Asparaginrests im hydrophoben Kern, ist die Bildung eines Coiled-Coil-Trimers anzunehmen. Im Fall eines Dimer-spezifischen Coiled-Coil-Templats wäre überdies eine Produktinhibierung möglich. Mit Hilfe kinetischer Analysen wird der folgende Mechanismus unterstützt: Der Katalysezyklus wird im ersten Schritt durch die Assoziation der Fragmente an

Einleitung

ein CC-Dimer initiiert.^[52] Der gebildete quaternäre Komplex vermittelt im zweiten Schritt, durch Vororganisation der reaktiven Termini, die Nähe-induzierte NCL-Reaktion zum replizierten, vollständigen Coil-Peptid. Durch die Dissoziation des neuen Templat-Komplexes wird der Katalysezyklus im abschließenden, dritten Schritt geschlossen. Das freigesetzte Ligationsprodukt wirkt selbst als neues Reaktionstemplat im nächsten Katalysezyklus.

Auf Basis dieses ersten, Coiled-Coil-basierenden Selbstreplikationssystems wurde eine Vielzahl an weitergehenden Studien, Designs und Konzepten angestoßen. Als weiteres Beispiel seien die Arbeiten von CHMIELEWSKI *et al.* genannt, die ein vollständig *de novo* designtes Coiled-Coil unter pH- und Ionenkontrolle nutzten.^[53] Das Konzept der Selbstreplikation über die Fragmentierung eines Coil-Strangs und NCL entsprach im Wesentlichen der Chemie GHADIRIS. Das entworfene Coiled-Coil besaß einen Leucin-Leucin-Kern und Glutamat an den Positionen *e* und *g*. Mittels pH-Kontrolle konnte das Peptid unter neutralen Bedingungen aufgrund von elektrostatischen Repulsionen als Monomer ungefalten vorliegen, während es im Säuren zu einem Homodimer assoziierte. Nur unter sauren Bedingungen konnte eine Selbstreplikation mit einer autokatalytischen Effizienz von über 900 stattfinden. Weitere Verfeinerungen des Templats, die alle auf der Destabilisierung des homodimeren Coiled-Coils beruhten, konnten zeigen, dass eine uneindeutige Assoziation (Oligomerisierung) der CCs durch eine Vermeidung von Produktinhibierung der Schlüssel für katalytische Effizienzen im Bereich von Enzymen (10^5), wie beispielsweise der Gluthationtransferase, ist.^[54]

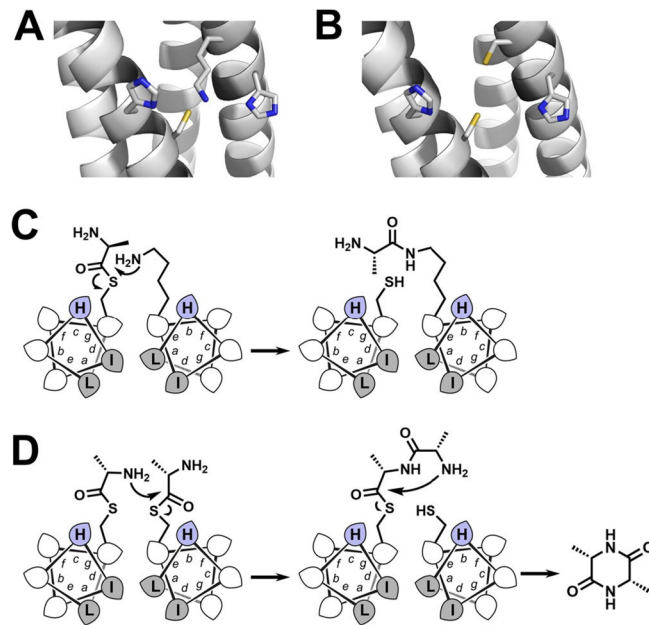
Das Design von Coiled-Coil-basierten Ligasen ähnelt grundsätzlich dem der selbstreplizierenden Coiled-Coil-Peptide (analog Schema 1A). Anstelle des homodimeren Coiled-Coils werden allerdings heterodimere Peptide verwendet. SEVERIN *et al.* nutzten beispielsweise das GCN4-System mit einem Valin-Leucin-Kern, das die homomere Form gegenüber der heterodimeren Form schwächte.^[55] Das Templat besaß ausschließlich Lysin auf den Positionen *e* und *g*, während das fragmentierte, komplementäre Coil-Peptid ausschließlich negative Ladungen trug. Auch hier war das Konzept über Coiled-Coil Assoziation und anschließender NCL der Fragmente identisch zu den bisher vorgestellten Konzepten. Die beobachtete katalytische Effizienz betrug 10^4 und war damit 4100-fach schneller als die entsprechende Hintergrundreaktion und zeigte das Potential der Coiled-Coil-vermittelten Peptidligation. Unlängst wurde eine selbstorganisierende Faser auf Grundlage von Coiled-Coils vorgestellt, mit deren Hilfe die Templat-vermittelte Kondensation von Polypeptiden großer Längen gelang.^[56]

1.2.2 Coiled-Coil-Peptide mit Transferase-Aktivität

Neben der Nutzung von Coiled-Coils als Assoziationsmodule zur Untersuchung komplexer biologischer Systeme, können diese auch als Reaktionsplattformen genutzt werden.^[13] Damit lassen sich beispielsweise Schlüsselschritte von Synthesemaschinerien, wie der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase (NRPS), nachahmen und tragen so zum Verständnis dieser bei. NRPSs kommen unter anderem in Pilzen vor und bestehen aus unterschiedlichen Modulen.^[57] Zu den Modulen zählt die Adenylierungsdomäne (A), die Aminosäuren zu Thioestern aktiviert. Die aktivierte Aminosäure wird im Anschluss an das Peptidträgerprotein (PCP) weitergegeben und der Transfer der aufgebauten Peptidkette zur Aminogruppe der nächsten Aminosäure über die Kondensationsdomäne (C) vermittelt. Die Terminierungsdomäne (TE) katalysiert abschließend die Produktfreisetzung.

Ein biomimetisches Modell eines Coiled-Coil-Gerüsts für die PCP- und C-Domäne wurde von der Gruppe um GHADIRI entwickelt (Schema 2A).^[58-60] Das auf Modelling basierende *de novo* Design dieser Aminoacyltransferase beinhaltete die Einbringung eines Cysteinrests zur Beladung mit einem Substrat an der aktiven Stelle eines Coiled-Coil-Tetramers.^[59] Als Acylakzeptor wurde ein Lysinrest installiert. Als zusätzliche Komponente wurde Histidin, welches die katalytische Aktivität durch Säure/Base-Aktivierung oder Wasserstoffbrückenbindungen erhöhen sollte, eingeführt. Durch die dichte Packung des hydrophoben Coiled-Coil-Kerns mussten die funktionalen Aminosäurereste an den Flanken des Coiled-Coil-Gerüsts in den Positionen **b**, **c**, **e** und **g** des CC-Registers eingeführt werden.

Erste Studien wurden schrittweise durchgeführt. Zunächst wurde in einem großen Überschuss der Aminosäurerest in einer Transthoesterifizierung auf das Cystein übertragen. Die anschließende Übertragung des Alaninrests auf das Lysin eines Tripeptids ergab eine 5400-fache Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit für den Schritt des Aminoacyltransfers gegenüber der Hintergrundreaktion (Schema 2C).

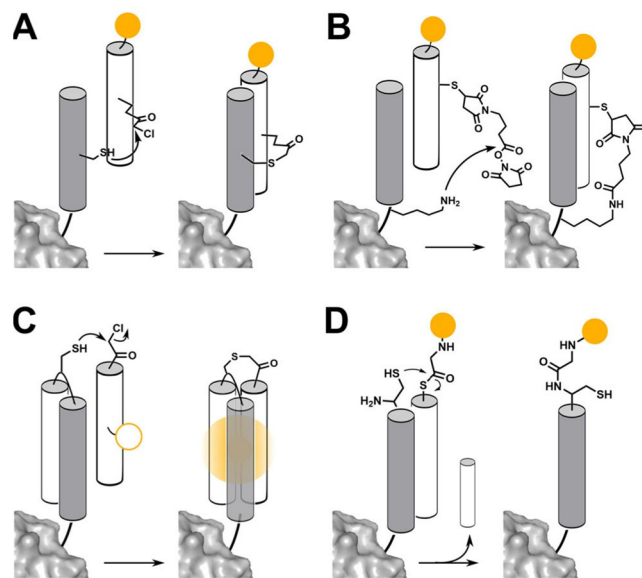


Schema 2: Coiled-Coil-Transferasen. A) PYMOL-Modell des aktiven Zentrums der ersten Generation einer *de novo* entworfenen Aminoacyltransferase. Hervorgehoben sind der Cystein-Rest (Substratbeladung), der Lysin-Rest (Acylakzeptor) und die Histidin-Reste (Säure-Base-Katalyse der Reaktion).^[59] B) PYMOL-Modell des aktiven Zentrums einer *de novo*-Aminoacyltransferase der zweiten Generation.^[61] Hervorgehoben sind die beiden Cystein-Reste, die die Substratbeladung, den Acyltransfer und die Produktfreisetzung ermöglichen. C) Schematische Darstellung der Acyltransferreaktion einer *de novo* entworfenen, CC-basierten Acyltransferase. Die Reste der aktiven Seite wurden an den Positionen *b*, *c*, *e* und *g* des CC-Registers eingefügt. D) Acyltransferreaktion und Produktfreisetzung in einer CC-basierten Transferase der zweiten Generation. Zur Verdeutlichung sind nur zwei der vier α -Helices in der Helixraddarstellung gezeigt. Copyright 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Mit Erlaubnis übernommen von Lit. [13].

In den darauffolgenden Arbeiten wurde die katalysierte Bildung von Diketopiperazin (DKP) untersucht.^[59,60] Dazu wurde der Lysinrest, wie in Schema 2B gezeigt, durch Cystein ersetzt. Dieses Design erlaubte erstmals die Kombination aller wichtigen NRPS-Schritte wie Substratbeladung, Acyltransfer und Freisetzung. Diese zweite Generation der *de novo*-Aminoacyltransferase führt, wie in Schema 2D gezeigt, nach der Substratbeladung über einen *S*→*N*-Acyltransfer zur Bildung eines Dipeptidthioesters. Die anschließende intramolekulare Aminolyse liefert die Diketopiperazin-Spezies, die mit der Produktfreisetzung einhergeht. Diese Reaktion konnte für eine Vielzahl an homo- und hetero-DKPs gezeigt werden, wengleich die Reaktion nur einen geringen Turnover besaß.^[60]

1.2.3 Coiled-Coil-vermitteltes Proteinlabelling

Die Coiled-Coil-vermittelten Ligationen aus Kapitel 1.2.1 zeigten bereits sehr schnelle und quantitative Umsetzungen für Nähe-induzierte Reaktionen. Dies macht die Verwendung von Coiled-Coils für das *in vivo* Labelling interessant.^[13] Die Labellingstrategien basieren hauptsächlich auf der Nutzung von heterodimeren und trimeren Coiled-Coils und wurden bereits für kovalentes Quervernetzen (*cross-linking*), Acyltransferreaktionen und C-H-Aktivierungen gezeigt.



Schema 3: Coiled-Coil-vermittelte Proteinmarkierung. A-B) Durch die Assoziation eines heterodimeren Coiled-Coils vermittelte kovalente Bindung der fluoreszenzmarkierten Sonde an den Tag. C) Coiled-Coil-Leucinzipper-Tag. Ein Helix-Schleife-Helix-Segment (*helix-loop-helix*) eines antiparallelen trimeren Coiled-Coils ist als Tag an das zu untersuchende Protein (POI) fusioniert. Die fluoreszenzmarkierte Sonde wird bei der Coiled-Coil-Assoziation quervernetzt. D) Übertragung des Fluoreszenzfarbstoffs bei der Assoziation von Sonde und Tag. Die Sonde dissoziiert nach dem Acyltransfer. Copyright 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Mit Erlaubnis übernommen und abgewandelt von Lit. [13].

Mithilfe des E3/K3-Coiled-Coils konnten MAZUZAKI und Kollegen eine nicht-kovalente Proteinlabellingstrategie auf Basis der Coiled-Coil-Assoziation vorstellen.^[62] Das Coiled-Coil zeigt eine gute Komplexstabilität im nanomolaren Bereich und eine hohe Assoziationsgeschwindigkeit. Laut Konzept sollte ein Coil-Strang fluoreszenzmarkiert vorliegen und die Rolle einer Sonde übernehmen. Der andere Coil-Strang sollte als Tag an das zu untersuchende Protein (*protein of interest*, POI) fusioniert werden. Auf diese Weise

Einleitung

konnte die Bildgebung von lebenden Zellen erfolgen. Allerdings besaß das System durch die nicht-kovalente Bindung nur eine geringe, diffusionsbedingte Lebenszeit.

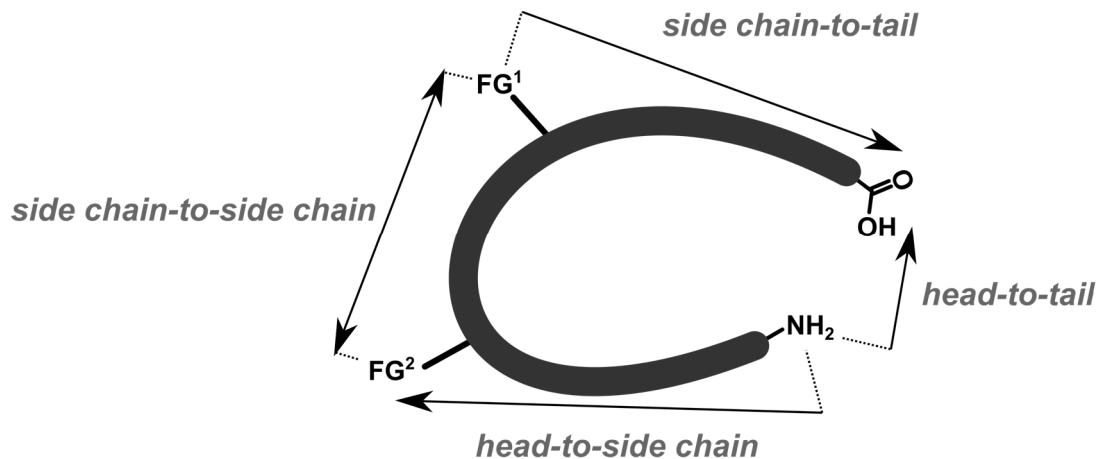
Aus diesem Grund wurden Nähe-induzierte Alkylierungen zur kovalenten Verknüpfung untersucht und erfolgreich durchgeführt. Solche Alkylierungen konnten für die Reaktion eines Cysteins mit einem Chloracylrest (Schema 3A)^[63,64] sowie für die Acylierung eines Lysins mit einem Succinimidylcarbonsäureester (Schema 3B)^[65] gezeigt werden. Die Reaktionsgeschwindigkeiten belaufen sich auf Minuten bis wenige Stunden.

Die in Schema 3C gezeigte Strategie nutzt hingegen ein antiparalleles trimeres Coiled-Coil mit einer chromogenen Sonde.^[66-68] Der Coil-Loop-Coil-Tag wird an das POI fusioniert. Über einen im Loopbereich befindlichen Cysteinrest wird die Sonde, welche eine Chloracylgruppe aufweist, kovalent gebunden. Durch die anschließende Coiled-Coil-Assoziation wird die chromogene Gruppe im hydrophoben Kern begraben und beginnt zu fluoreszieren.

Neben diesen nukleophilen Substitutionsreaktionen zur kovalenten Bindung einer Fluoreszenzsonde, wurden auch Acyltransferreaktionen, wie die von SEITZ und Kollegen vorgestellte Übertragung eines kleinen Fluoreszenzlabels von der Sonde auf den Tag (Schema 3D), beschrieben.^[69] Durch die Coiled-Coil-Assoziation wird eine NCL-Reaktion zur Übertragung der Sonde ermöglicht. Diese führt zu einer kovalenten Bindung und ist bereits nach zwei Minuten vollständig. Einsatz fand diese äußerst schnelle Labellingmethode in der Bildgebung von verschiedenen G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren.^[70]

1.3 Peptidzyklisierungen

Die Peptidzyklisierung ist ein geeignetes Werkzeug um beispielsweise die Wirksamkeit peptidischer Medikamente über die Einschränkung der Konformation zu steigern. Die vier Möglichkeiten der Peptidzyklisierung sind in Schema 4 gezeigt.



Schema 4: Beispielhafte Darstellung der vier möglichen intramolekularen Peptidverknüpfungen.^[71]

Dabei können beispielsweise zwei Seitenketten (*side chain-to-side chain*) miteinander verknüpft werden, der Kopf (*N*-Terminus) mit einer Seitenkette (*head-to-side chain*) oder eine Seitenkette mit dem Schwanz (*C*-Terminus, *side chain-to-tail*). Dazu stehen alle Möglichkeiten der Synthesechemie zur Verfügung, wobei die *head-to-tail*-Zyklisierung (dt.: Kopf-zu-Schwanz) die mit am meisten verwendete Zyklisierungsmethode darstellt. Die Möglichkeiten, Synthesestrategien und Anwendungen auf dem Gebiet der Peptidmakrozyklisierung sind unerschöpflich und Teil der aktuellen Forschung.^[71-73]

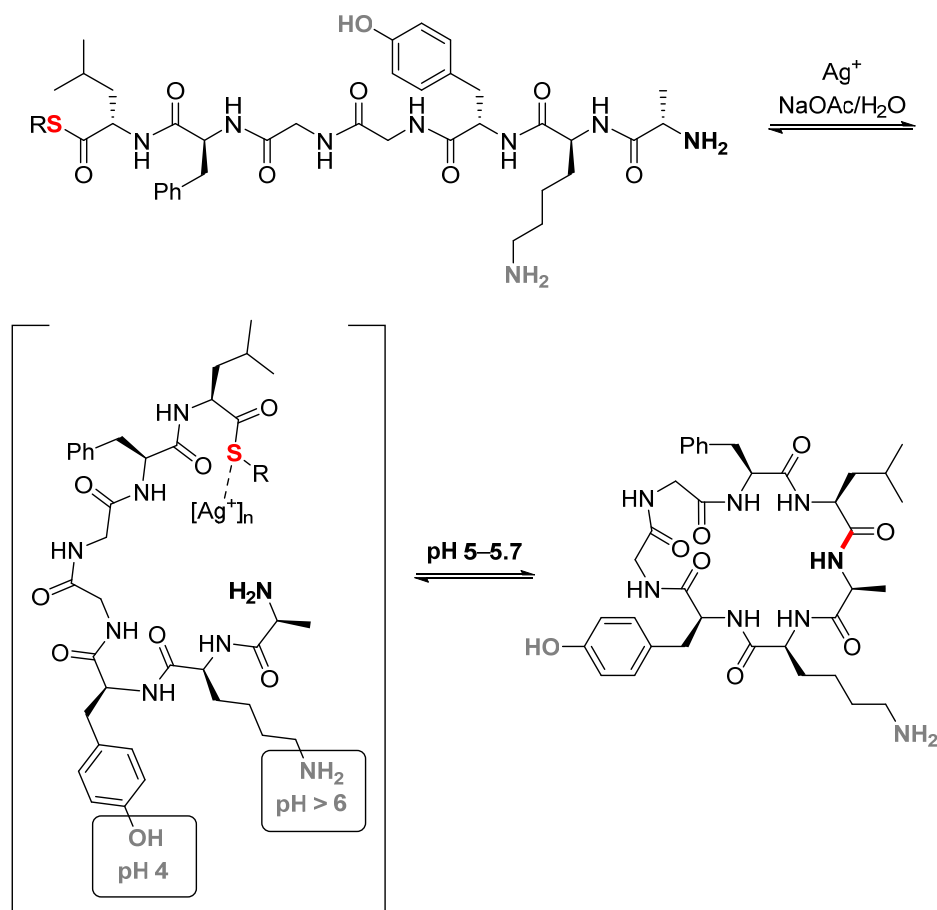
Die auf den ersten Blick einfachste Variante, um solche Ringe aufzubauen, ist die direkte Aminolyse. Grundsätzlich handelt es sich hierbei um eine intramolekularisierte Kondensationsreaktion zweier, wenn möglich, ungeschützter Peptidfragmente, wobei der *C*-Terminus als Peptidthioester aktiviert vorliegt. Vorallem kleine bis mittlere Ringgrößen sind oft schwierig zu synthetisieren, da der Grundzustand der Peptidbindung in *E*-Geometrie vorliegt und eine ringartige Präzyklisierungskonformation so verhindert wird.^[71] Große Makrozyklen hingegen können diese Allylspannung^[74] kompensieren. Neben der Ringgröße sind nicht-offensichtliches Probleme der *head-to-tail*-Zyklisierung (dt.: Kopf-zu-Schwanz), die Cyclooligomerisierung durch intermolekulare Kondensation sowie die *C*-terminale Epimerisierung, wie von SCHMIDT und LANGER am Beispiel der Zyklisierung eines *all*-*L*-Pentapeptid-Pentafluorphenylesters gezeigt.^[75] Auch die Wahl der Position innerhalb der

Einleitung

linearen Sequenz zur Peptidzyklisierung erwies sich als ausschlaggebend für den Ausgang der Makrozyklisierung. Allgemein hin kann gelten, dass die Makrozyklisierung besser an sterisch ungehinderten Aminosäureresten in höheren Ausbeuten verläuft.^[71]

Die Gruppe um HOUGHTEN zeigte, dass durch die Verwendung von wässrigem Imidazol (1.5 M) in Acetonitril die direkte Aminolyse von Peptidthioestern zur Makrozyklisierung von Peptiden mit 5 bis 11 Aminosäureresten möglich ist.^[76] Ähnlich der Rolle von Imidazol als Katalysator für die Übertragung aktivierter Acylgruppen wird angenommen, dass die Makrozyklisierung über die nukleophile Aktivierung des Peptidthioestercarbonyls zu einem reaktiven Acylimidazolyl-Intermediat verläuft. Dieses reagiert anschließend langsam mit dem als Nukleophil agierenden Amin des *N*-Terminus ab. Die Reaktionen lieferten gute Ausbeuten und wurden bei 37 °C und für 72 h Reaktionszeit durchgeführt. Es wurde eine starke Abhängigkeit zwischen Ringspannung und Chemoselektivität beobachtet, in der beispielsweise *N*-terminales Lysin hauptsächlich über die ϵ -Aminogruppe zyklisierte.

Zu den gängigen Templat-vermittelten Makrozyklisierungen gehören unter anderem die Nutzung von molekulargeprägten Kavitäten an Polymeren zur Schaffung kleiner, definierter Reaktionsräume, zur Vermeidung von unerwünschten Oligomerisierungen, oder beispielsweise die Verwendung von Metallionen.^[71] Die Gruppe um TAM und ZHANG zeigten am Beispiel der Zyklisierung von Peptidthioestern mit Silber(I)-Ionen in wässriger Lösung erfolgreich die Makrozyklisierung ungeschützter Peptidthioester (Schema 5).^[77] Durch die gleichzeitige Silber(I)-Koordination der Termini werden diese in eine Präzyklisierungskonformation gebracht. Dabei wirkt das Metall durch die Koordination des Peptidthioesterschwefels sowohl enthalpisch, da es das Mercaptan zu einer guten Abgangsgruppe macht, als auch entropisch. Es zeigte sich, dass sich in Anwesenheit von Lysin und Tyrosin über die Einstellung des pH-Werts der Reaktion eine Chemoselektivität der Makrozyklisierungsreaktion erreichen ließ. Diese korreliert mit der nach BLAKE und LI berichteten Affinität gemäß $S \gg N > O$ innerhalb ihrer Studien zur Aktivierung von Peptidthioestern.^[78] Der Mechanismus ist vereinfacht in Schema 5 gezeigt.



Schema 5: Chemoselektive Silber(I)-vermittelte Makrozyklisierung eines Peptidthioesters nach TAM und ZHANG. In Abhängigkeit des pH-Werts kommt es entweder zur *head-to-tail*-Zyklisierung oder über die Seitenkette des Lysins (pH > 6) oder des Tyrosins (pH 4) zur *side chain-to-tail*-Zyklisierung.^[78]

Neben der Metallion-vermittelten Makrozyklisierung berichteten VIDOVIĆ *et al.* unlängst von einer Chlorid-assistierten Peptidzyklisierung ungeschützter, *in situ* generierter Benzotriazinester in Dimethylformamid mit Tetraethylammoniumchlorid.^[79] Der vorgeschlagene Mechanismus verläuft über die Koordination der Amidstickstoffe des Peptidrückgrats, die zu einer Vorformung der Ringstruktur führt. Unter den angewandten basischen Bedingungen kann anschließend die *N*-Aminogruppe nukleophil den Ester angreifen. Im Fall interner Lysinreste mussten diese jedoch Boc-geschützt vorliegen.

Neben der 1963 durch MERRIFIELD eingeführten Festphasenpeptidsynthese^[80] war die 1994 von DAWSON, MUIR und KENT vorgestellte Native Chemische Ligation (NCL)^[81] zur Verknüpfung ungeschützter Peptidfragmente eine der revolutionärsten Methoden auf dem Gebiet der Peptidchemie des letzten Jahrtausend.^[82] Wenngleich die zugrunde liegende Reaktion bereits 1953 von WIELAND *et al.* vorgestellt worden war, dauerte es 40 Jahre, bis

Einleitung

diese erstmalig zur Synthese von Proteinen genutzt wurde. In der NCL werden unter milden Bedingungen zwei Peptidfragmente miteinander verknüpft. Dabei wird ein Fragment als schwach aktivierter Peptidthioester vorgelegt, während das Andere ein freies *N*-terminales Cystein aufweist. Durch die Nukleophilie der freien Thiolgruppe des Cysteins kommt es zu einem Thiolaustausch in Form einer Transthoesterifizierung. Dieser Schritt ist reversibel, jedoch kommt es unter einem spontanem *S*→*N*-Acylyltransfer, ermöglicht durch einen favorisierten 5-gliedrigen Übergangszustand, zur irreversiblen Bildung der thermodynamisch stabileren Amidbindung der *N*-Aminogruppe.^[83] TAM und Kollegen konnten an verschiedenen *N*-Cysteinylpeptidthioestern mit 5-26 Aminosäureresten, mit unter anderem Cystein, Histidin und auch Lysin innerhalb der Peptidsequenz, die schnelle Bildung der gewünschten Produkte unter Bildung von Kleinstmengen an oligomeren Nebenprodukten zeigen.^[84] Der Mechanismus der NCL sei beispielhaft in Schema 6 gezeigt.



Schema 6: Mechanismus der Nativen Chemischen Ligation (NCL) am Beispiel der *head-to-tail*-Peptidzyklisierung.^[71,83]

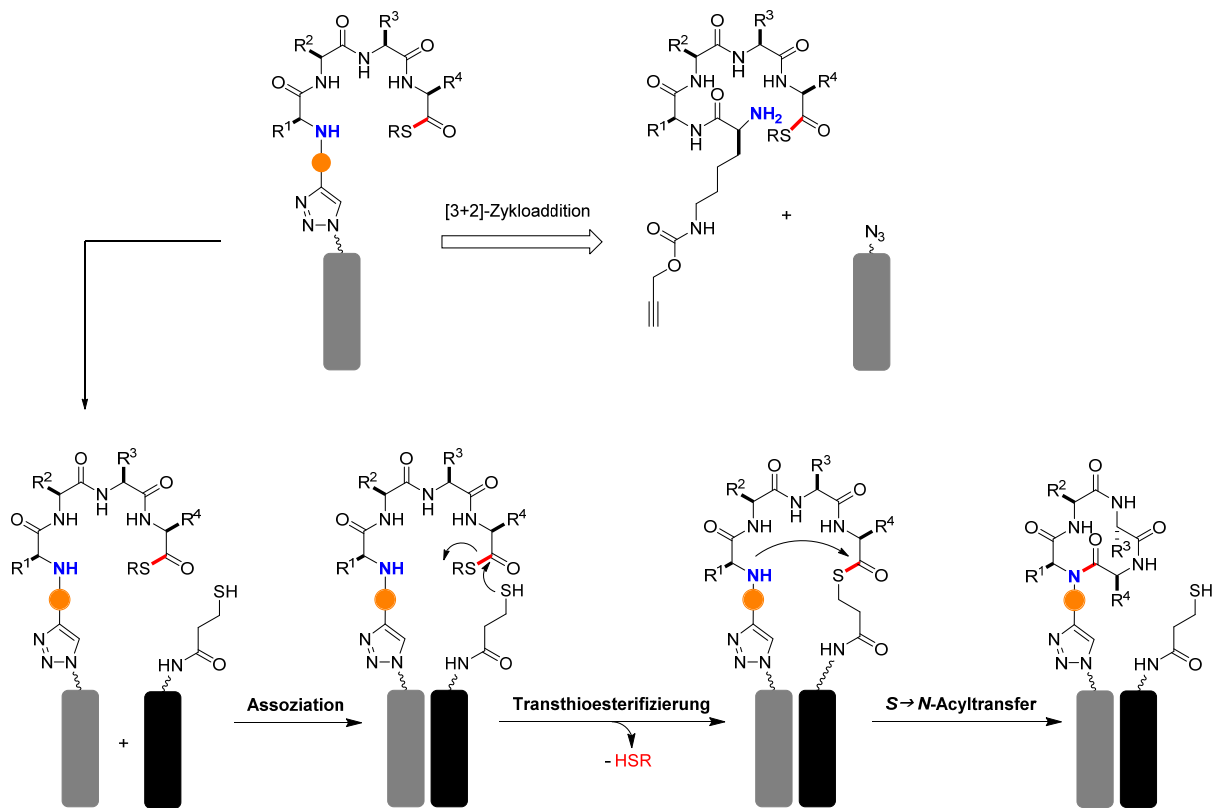
Vor allem die hohe Selektivität, Effizienz und breite Anwendbarkeit machen die NCL zu einem mächtigen Werkzeug in der Protein- und Peptidchemie, welche weiterhin genutzt und sukzessive weiterentwickelt wird.^[82,85] Ein nicht von der Hand zu weisender Nachteil ist der, dass ein *N*-terminales Cystein notwendig ist. Durch die niedrige natürliche Häufigkeit in Proteinen, muss folglich entweder die Sequenz angepasst oder das ligierte Produkt gezielt umgewandelt werden. Dazu besteht beispielsweise die Möglichkeit Cystein mithilfe von Natriumborhydrid und Raney-Nickel in das entsprechende Alanin zu überführen.^[86,87] Eine Möglichkeit, eine Cystein-freie Ligation zweier Peptidfragmente durchzuführen, ist die Verwendung sogenannter NCL-Auxiliare. Diese verfügen häufig über eine freie Thiolgruppe und sind am *N*-Terminus des endständigen Peptidfragments angebracht, wodurch sie die Rolle des Cysteins übernehmen.^[88,89] Für die Anwendung der *head-to-tail*-Zyklisierung gibt es bis heute allerdings nur wenige Beispiele mit NCL-Auxiliaren.^[90]

2 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine neue Templat-vermittelte Zyklisierungsstrategie kleiner, ungeschützter Peptide entwickelt und untersucht werden. Zyklische Peptide besitzen eine höhere Stabilität gegenüber der hydrolytischen Spaltung durch Exo- und Endoproteasen als ihre linearen Analoga.^[91] Mit dem Fortschritt der automatisierten Peptidsynthese, welche die Synthese von Peptiden effizienter und ökonomischer gestaltet, und spätestens seit dem Aufkommen des computergestützten Wirkstoffdesigns steigen der Anteil und die Nachfrage an Peptid-basierten Medikamenten jährlich. Sie werden in der Wirkstoffforschung, als Therapeutika und Nanomaterialien eingesetzt.^[71,92] Allein aus der Natur konnten bis heute unzählige zyklische Peptide mit vielversprechenden biologischen und pharmazeutischen Aktivitäten isoliert werden.^[93] Die Synthese zyklische Peptide mit den zur Verfügung stehenden Methoden ist hingegen oftmals schwierig.^[71] Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung weiterer Strategien und Zugänge zur Makrozyklisierung von Peptiden wichtig und Teil der aktuellen Forschung. Zur Überwindung der entropisch ungünstigen Präzyklisierungskonformation linearer Peptide bieten sich folglich Template an, die diesen Makrozyklisierungsschritt unterstützen oder sogar beschleunigen.

Das Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung einer räumlichen, durch Nähe-induzierten Peptidmakrozyklisierungsstrategie unter Verwendung des heterodimeren Coiled-Coil-Gerüsts. Das Coiled-Coil-Proteinfaltungsmotiv mit den bereits identifizierten Sequenz-Struktur-Beziehungen erlauben das *de novo* Design kleiner und zuverlässig faltender Peptide. Vom Reißbrett aus kann das Coiled-Coil durch chemische Synthese dargestellt und modifiziert werden. Das heterodimere, parallele Coiled-Coil-Motiv eignet sich besonders als Templat in der Vermittlung chemischer Reaktionen zweier Reaktanden. Dieses besteht aus zwei unterschiedlichen amphiphilen, α -helikalen Peptidsträngen, die über die hydrophoben Flächen zu einer linkshändigen Superhelix assoziieren. Durch die Länge der eingesetzten Coil-Stränge und die Wechselwirkung der beteiligten Aminosäurereste kann die Interaktion im heterodimeren Coiled-Coil gesteuert werden. Dies ermöglicht die Entwicklung eines hochspezifisch interagierenden Coiled-Coil-Templats, das auf einem modularen Syntheszugang der Peptidbausteine basiert. Diese Bausteine können zur Studie der Reaktionsvermittlung frei kombiniert werden und erlauben es, mögliche Ursache-Wirkungs-Beziehungen zu ermitteln. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde das heterodimere, parallele Coiled-Coil als geeignetes Templat zur Vermittlung der Peptidmakrozyklisierung identifiziert. Das Konzept ist in Schema 7 dargestellt.

Aufgabenstellung



Schema 7: Eine neuartige Makrozyklisierungsstrategie zur Synthese zyklischer Peptide mit Hilfe eines Coiled-Coil-Gerüsts.

Zur Realisierung dieses Vorhabens soll das zu zyklisierende Peptid als C-terminaler Peptidthioester N-terminal über einen, wenn möglich, reversibel gebundenen Linker an einen Coil-Strang des heterodimeren Coiled-Coil-Motivs gebunden werden. Dies geschieht innerhalb der hier vorgestellten Arbeiten über die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit einem N-terminal modifizierten Azid-Coil-Strang. Die Makrozyklisierung wird durch Assoziation des komplementären Coil-Strangs, der N-terminal mit einer Thioleinheit modifiziert ist, vermittelt werden. Dazu wird zunächst durch eine Umthioesterung der C- und N-Terminus des zu zyklisierenden Peptids in räumliche Nähe gebracht. Durch diese Intramolekularisierung der ansonsten ungünstigen Präzyklisierungskonformation kann anschließend durch beispielsweise die direkte Aminolyse oder Native Chemische Ligation (NCL) der Ringschluss erfolgen. Das zyklische Peptid verbleibt dabei auf dem N-terminal gebundenen Coil-Strang, und der Thiol-modifizierte Coil-Strang wird freigesetzt. Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, dass die Reaktionsvermittlung sowohl stöchiometrisch als auch katalytisch erfolgen kann.

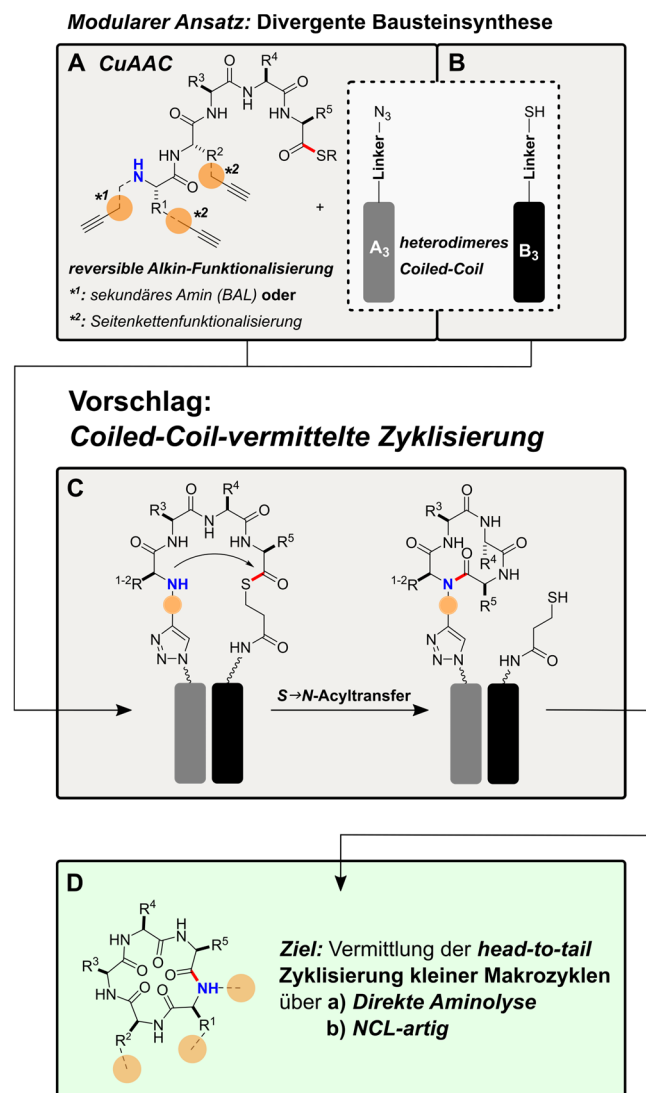
Aufgabenstellung

Zur Untersuchung der postulierten Coiled-Coil-vermittelten Peptidzyklisierung werden verschiedene Thiol-funktionalisierte Coil-Stränge synthetisiert. Ebenso werden verschiedene Azid-modifizierte Coil-Peptide dargestellt und so eine Modellierung der Haarnadelstruktur im Präzyklisierungsschritt erreicht. Des Weiteren werden verschiedene Peptidthioester von vier bis sieben Aminosäureresten als Zyklisierungsziele untersucht werden. Auch der Einfluss der C-terminalen Aminosäure des Peptidthioesters ist Gegenstand dieser Arbeit. Mit Hilfe der analytischen HPLC und Massenspektrometrie werden die Reaktionen verfolgt und analysiert. In zukünftigen Projekten kann durch die Wahl einer reversiblen Verknüpfung zum Coil-Peptid, wie beispielsweise eines säurelabilen *Backbone Amide Linkers* eine reversible Anbindung der zu zyklisierenden Peptidthioester an Coil-Stränge zur reversiblen Immobilisierung auf Oberflächen dienen. Perspektivisch soll die Methode für die Synthese von Bibliotheken zyklischer Peptide etabliert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Design der Templat-vermittelten Zyklisierung an programmierten Coiled-Coils

Die im Rahmen dieser Arbeit angestrebte Coiled-Coil-vermittelte Synthese kleiner Peptidmakrozyklen der Größe von 4 bis 7 Aminosäureresten sollte für die direkte Aminolyse und die Native Chemische Ligation (NCL) als Ringschlussreaktionen untersucht werden. Ein Schlüsselement dieses Konzepts ist die durch Coiled-Coil-Assoziation vermittelte Kondensation des *N*- und *C*-Terminus durch die Vorformung einer Präzyklisierungsstruktur des zu zyklisierenden, linearen Peptids. Das Konzept ist in Schema 8 gezeigt.



Schema 8: Konzept der Entwicklung einer Coiled-Coil-vermittelten Makrozyklisierung an programmierten Coiled-Coil-Gerüsten.

Als Modellsystem für das Design des Coiled-Coil-Templatgerüsts aus Schema 8 (Kachel A und B) diente das von THOMAS *et al.* *de novo* designte, heterodimere Coiled-Coil N-A₃B₃,^[15] das selbst auf den von HODGES und LITOWSKI vorgestellten EK-Peptiden basiert.^[31] Durch die Einführung eines Asparagin-Rests (Asn, N) in zentraler, gegenüberliegender α -Position innerhalb des hydrophoben Kerns wird die parallele Orientierung und die Dimerspezifität programmiert und erreicht.^[23] Die Sequenzen sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Sequenzen der N-A₃B₃ Peptide. Die Peptide wurden als C-terminale Amide synthetisiert und N-terminal funktionalisiert.

		Sequenz- und Heptadenregister			
		<i>gabcdef gabcdef gabcdef</i>			
N-A ₃ B ₃	N-A ₃	G	EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ GG
	N-B ₃	G	KIAALKY	KNAALKK	KIAALKQ GG

Durch den Aufbau aus zwei unterschiedlichen Coil-Peptiden, A₃ und B₃, lassen sich diese individuell modifizieren und so reaktive Gruppen in räumliche Nähe bringen. Das Proteinfaltungsmotiv des parallelen heterodimeren Coiled-Coils besteht aus zwei amphiphilen α -helikalen Peptidsträngen, die über ihre hydrophoben Flächen zu einer linkshändigen Superhelix assoziieren.^[12] Die Heptadenwiederholung von hydrophoben (h) und polaren (p) Aminosäureresten solch amphiphiler Helices lassen sich nach dem Muster **hpphppp** beschreiben. Diese Sequenz-Struktur-Beziehungen erklären die Interaktionen im heterodimeren Coiled-Coil und ermöglichen die Programmierung der Bindungsassoziationsstärke, und erlauben das *de novo* Design hochspezifisch interagierende heterodimerer Coiled-Coils, auch orthogonale Coiled-Coils genannt. Das in dieser Arbeit gewählte Coiled-Coil mit einer Länge von drei Heptaden besitzt eine Dissoziationskonstante (K_D -Wert) von 3.1×10^{-6} M und erlaubt durch diese, im Vergleich zu heterodimeren Coiled-Coils längerer Heptaden, einen leichten Strangaustausch. GROTH *et al.* konnten zeigen, dass für einen präparativ nützlichen Strangaustausch ein K_D -Wertunterschied von Faktor 10 notwendig ist.^[32] Dies ist vor allem vor dem Hintergrund der Entwicklung funktioneller Systeme oder eines kombinatorischen Formats, wie beispielsweise für Peptidarrays interessant. Letzteres kann für die Synthese von an Coiled-Coils präsentierten Makrozyklen und für die Detektion von Bindungsereignissen in Bindungsassays genutzt werden.

Das praktische Konzept in Schema 8 (Kachel C) zur Entwicklung einer Coiled-Coil-vermittelten Makrozyklisierung im Baukastenprinzip beinhaltet die reversible

Alkinfunktionalisierung des *N*-Terminus eines *C*-terminalen Peptidthioesters als Zyklisierungsziel. Diese Zyklisierungsleitstruktur wird reversibel an das zu diesem Zweck Azid-funktionalisierte Coil-Peptid mittels der orthogonalen Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) gebunden (Schema 8, Kachel A). Die Assoziation mit einem Thiol-modifizierten komplementären Coil-Strang (Schema 8, Kachel B) führt über einen Thiolaustausch im Peptidthioester zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur und damit, so postuliert, zur Vorformung der *head-to-tail*-Ringschlusskonformation. Durch die Wahl geeigneter Aminosäuren im Linkerbereich der Coil-Strangtermini soll diese Haarnadelstruktur modellierbar sein (Schema 8, Kachel A und B). Die Haarnadelstruktur reagiert anschließend über eine direkte oder eine Thiol-vermittelte (NCL-artige) Aminolyse zum gewünschten makrozyklischen Peptid ab (Schema 8, Kachel C und D).

Als Zyklisierungsziel wurde das osteogene Wachstumspeptid (*osteogenic growth peptide*, OGP) gewählt. Die Sequenz ist in Tabelle 2 – Eintrag 1 gezeigt.

Tabelle 2: Sequenzen des *N*- und *C*-terminal verkürzten osteogenen Wachstumspeptids (OGP).

Eintrag	Analogon	Sequenz
1	OGP	ALKRQGRTLYGFGG
2	OGP (10–14)	YGFGG
3	OGP (10–13)	YGF
4	OGP (10–12)	YGF
5 ^a	OGP (10–11)	YG

a) YGF-Motiv ist grundsätzliches Pharmakophor für OGP-artige Aktivität.^[94]

OGP ist im Serum von Säugetieren in mikromolekularen Konzentrationen vorhanden und erhöht die Knochenbildung und die poröse (trabekuläre) Knochendichte. Durch Zugabe in Mäusen und Ratten konnte gezeigt werden, dass die Heilung von Knochenbrüchen beschleunigt bzw. stimuliert werden kann.^[94] Aus diesem Grund sind OGP und *C*-terminal verkürzte Analoga beispielsweise als knochenaufbauende Anabolika und hämatopoetische (blutbildende) Stimulatoren Gegenstand aktueller Forschung. Darüber hinaus reguliert das Peptid in Stromazellen des Knochenmarks die Proliferation (Zell- oder Gewebeerneuerung), die basische Phosphatase-Aktivität (ALP) sowie die Matrixmineralisierung über einen autokrinen/parakrinen Mechanismus oder kurz gesagt die Knochenmineralisierung.^[94] OGP ist außerhalb der Zelle mit Bindungsproteinen komplexiert und wird nach der Dissoziation von Proteasen proteolytisch aktiviert und zum bioaktiven OGP(10–14) gespalten (Tabelle 2 –

Eintrag 2). OGP(1–9) besitzt damit die Rolle einer Zugangsdomäne während der C-Terminus die Rolle des Nachricht- und Adressbereichs einnimmt. Durch die genaue Kenntnis der Struktur-Wirkungsbeziehungen konnten der Tyrosin- (Tyr¹⁰) und Phenylalaninrest (Phe¹²) als Hauptpharmakophore für die OGP-artige Aktivität identifiziert werden.^[95] Die Zyklisierung zu cOGP(10–14) zeigte eine vollständige Aktivität und unterstreicht die Rolle der räumlichen Anordnung der bioaktiven, molekularen Topologie.^[96] Die Identifikation möglicher OGP-Rezeptoren ist des Weiteren Teil aktueller Forschung und kann durch die Präsentation zyklischer Peptidbibliotheken auf Basis des Motivs YGF an Coiled-Coils vorangetrieben werden. Neben diesen interessanten biologischen Aktivitäten und der möglichen Reduktion auf die Aminosäuresequenz YGF (Tabelle 2 – Eintrag 4) als wichtigstes Pharmakophor mit spezifischer räumlicher Organisation, wurde OGP(10–14) aufgrund weniger funktioneller Gruppen als grundlegendes Modellpeptid gewählt.

Für die Alkylfunktionalisierung zur späteren Anbindung an ein Coil-Peptid mittels CuAAC-Reaktion standen verschiedene Möglichkeiten bzw. Positionen zur Verfügung (Schema 8, Kachel A). Zwei dieser Möglichkeiten sind in Abbildung 3 gezeigt.

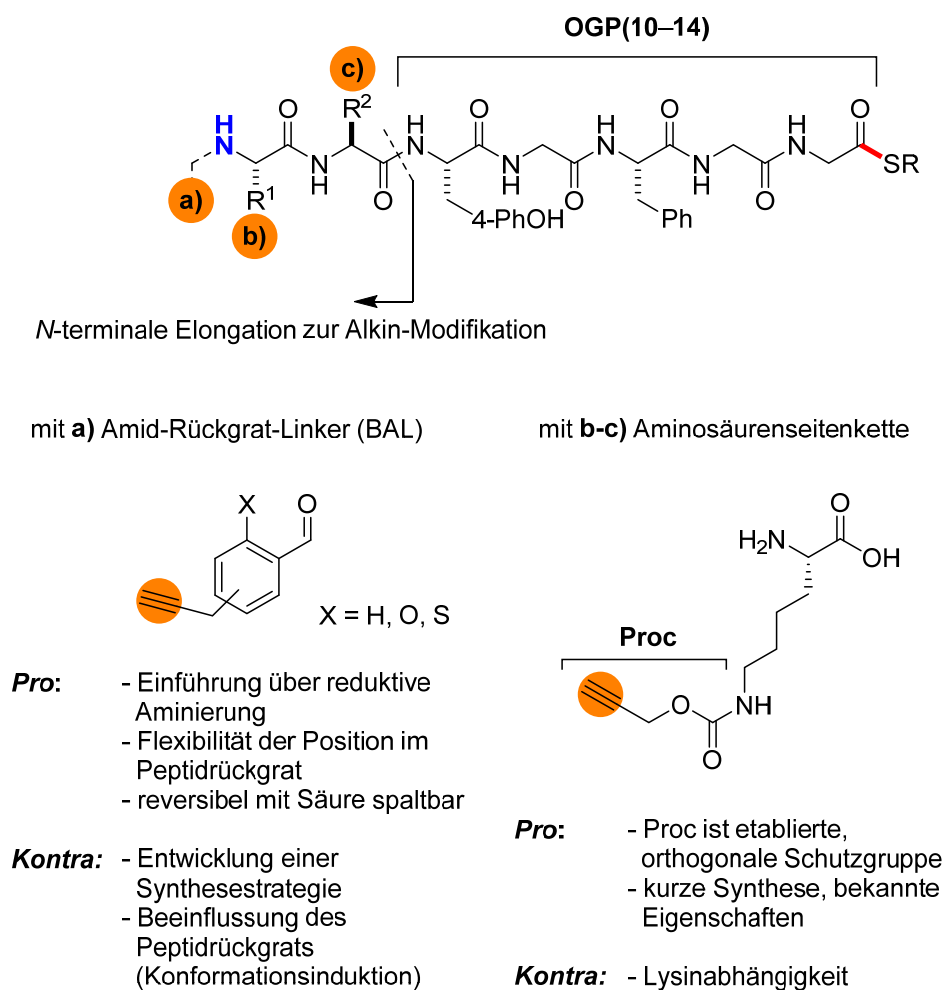


Abbildung 3: Vorgeschlagene Alkin-Modifikationen der Leitstruktur OGP(10–14) für die Entwicklung einer Coiled-Coil-vermittelten Peptidzyklisierung.

Allgemein sollte das Zyklisierungszielpeptid als C-terminaler Thioester synthetisiert werden, welches einen Alkin-modifizierten Amid-Rückgrat-Linker (*Backbone Amide Linker*, BAL) oder eine Alkin-modifizierte Aminosäureseitenkette besitzen sollte (Abbildung 3 a) und b)). Ein BAL besitzt den Vorteil, dass dieser frei im Rückgrat innerhalb der Peptidsynthese über eine reduktive Aminierung eingeführt werden kann. Allerdings ist die Synthese und Etablierung eines solchen Alkin-modifizierten Linkers nicht trivial und Gegenstand andauernder Forschung in der Arbeitsgruppe THOMAS. Aufgrund dessen und einer möglichen Konformationsinduktion des Peptidrückgrats wurde die Anbringung des Alkins über die Seitenkette eines Lysins verfolgt. Die Propargyloxycarbamat-Schutzgruppe (Proc oder Poc) wurde als geeignete, einfach handhabbare und orthogonale Schutzgruppe gewählt. Sie lässt sich beispielsweise innerhalb der Nativen Chemischen Ligation *in situ* mit Palladium(II)-chlorid innerhalb weniger Minuten spalten. Dies wurde unter anderem von der Arbeitsgruppe

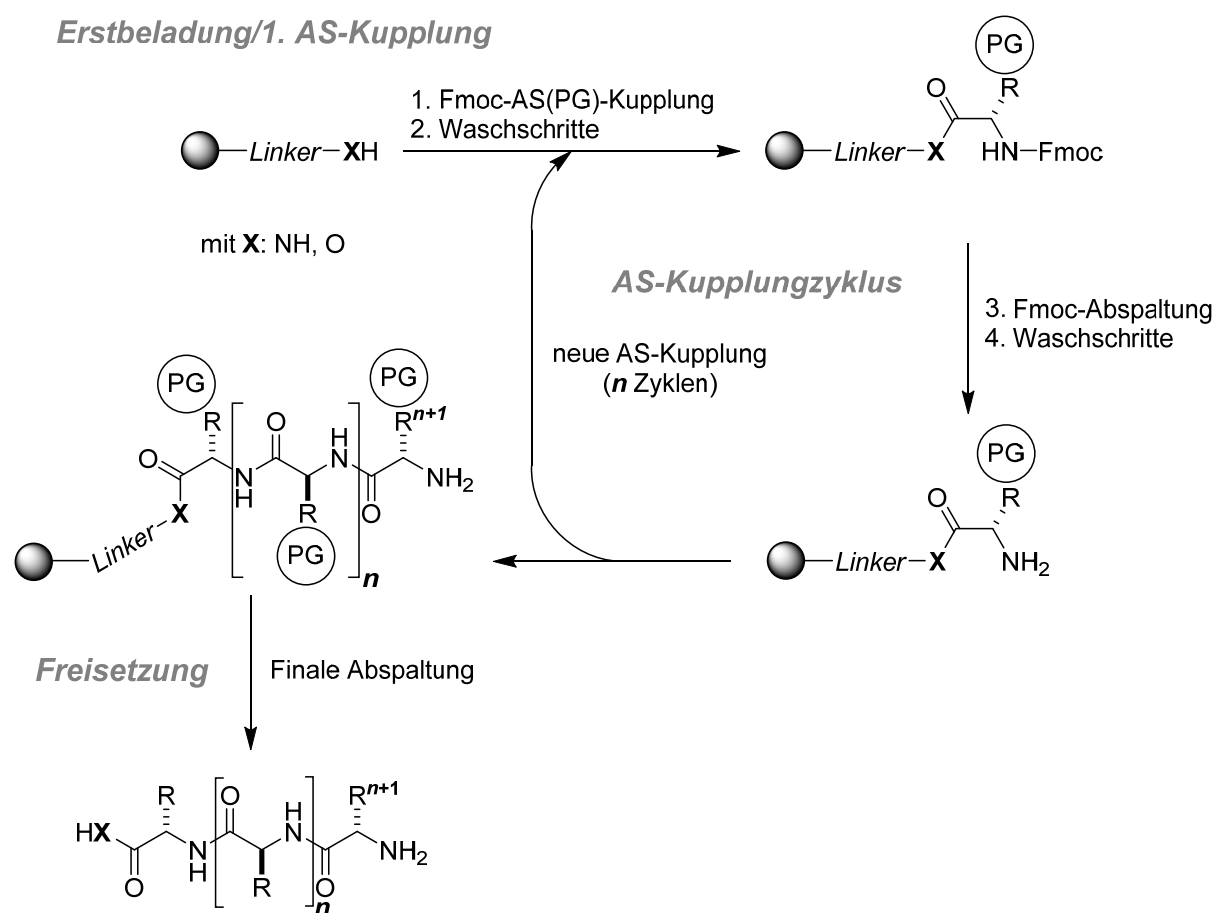
von BRIK am Beispiel der Verwendung von Proc als N_α -Schutzgruppe gezeigt.^[97,98] Eine Verankerung an der freien ε -Aminogruppe eines Lysins erschien vielversprechend, da diese Verankerung einen nur moderaten Einfluss auf das Peptidrückgrat und die natürliche Faltung des Zyklisierungssziels in Lösung aufweisen sollte. Die Stabilität der Triazolylcarbamat-Gruppe des CuAAC-Konjugats wurde gegenüber Säuren und Laugen als hoch eingestuft, was eine reversible Anbringung an den Coil-Strang und damit die finale Freisetzung des Makrozyklus erschweren kann.

Wie in Schema 8 (Kachel D) gezeigt, kann die Abhängigkeit von Lysin die Einführung einer weiteren Aminosäure am N -Terminus der Leitstruktur erfordern. Für eine direkte Aminolyse sollte ein N -terminales Alanin und für eine NCL-artige, Coiled-Coil-vermittelte Zyklisierung ein N -terminales Cystein genutzt werden.

3.2 Peptidsynthese und Funktionalisierung

Seit der Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese (*solid-phase peptide synthesis*, SPPS) durch MERRIFIELD 1963 wurde diese permanent weiter entwickelt und verbesserte Schutzgruppenstrategien, Festphasen und Bedingungen etabliert (für Übersichtsartikel siehe Lit. [99,100]).^[80] Die SPPS ist bis heute die wichtigste Methode für die effiziente chemische Synthese von Polypeptiden mit einer Länge von bis zu 50 Aminosäureresten. Die Synthese erfolgt klassischerweise durch die kovalente Verankerung der C -terminalen Aminosäure über ihre Carbonsäurefunktion. Dadurch wird die Peptidsequenz vom C - zum N -Terminus aufgebaut. Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden basierend auf der automatisierten, mikrowellenunterstützten Festphasenpeptidsynthese (SPPS) dargestellt. Dabei wurde die orthogonale Fmoc/ t Bu-Schutzgruppenstrategie verfolgt. Diese wurde erstmals von MEIENHOFER und Kollegen 1978 vorgestellt und basiert auf der Differenzierung der N -terminalen Aminoschutzgruppe und den Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäurebausteine.^[101] Dazu wurde für die N_α -Schutzgruppe die unter milden Bedingungen mit Piperidin abspaltbare Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc) gewählt und für die Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren die säurelabilen und mit Trifluoressigsäure spaltbaren *tert*-Butyl-Schutzgruppen: *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) und *tert*-Butyl (t Bu). Die finale Entschützung mit Trifluoressigsäure (TFA) führt im Fall säurelabiler Festphasen-Linker zur Freisetzung des ungeschützten Peptids. Durch die Wahl des Festphasen-Linkers können entweder C -terminale Peptidsäuren (z.B. Wang-Harze) oder

Peptidamide (z.B. Rink Harze) erhalten werden. In der Praxis verläuft die Synthese über die Aktivierung der Carbonsäurefunktion mithilfe geeigneter Kupplungsreagenzien. Mikrowellenunterstützt wird diese anschließend an das Harz kondensiert. Durch Waschschrte kann die beladene Festphase gereinigt werden, und die anschließende Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe führt zur Freisetzung der Aminogruppe. Durch die Abfolge an Waschschrten, Kupplungszyklen und Entschützungen wird so die Peptidsequenz automatisiert aufgebaut. Ein allgemeines Schema der SPPS ist in Schema 9 gezeigt.



Schema 9: Allgemeines Schema der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) am Beispiel der Fmoc-Strategie. Mit AS = Aminosäure, R = Aminosäureseitenkette (nicht jede AS besitzt eine Schutzgruppe) und PG = Schutzgruppe (säurelabil).^[102]

Ein Nachteil dieser linearen Synthese ist die fortschreitende Peptidkettenaggregation der vollgeschützten Sequenzen. Dadurch kann es im Kupplungsschritt durch beispielsweise eine ausbleibende oder nicht vollständige Kupplung der Aminosäuren zu Abbruchsequenzen und ungewollten Nebenprodukten kommen. In solchen Fällen führen die sich wiederholenden Schritte der Aminosäurekupplung zu verringerten Ausbeuten und Reinheiten, weshalb bei

anspruchsvollen, langen Peptidsequenzen auf die chemische Ligation zur Verknüpfung zweier kürzerer Peptidfragmente zurückgegriffen werden kann.

3.2.1 Synthese der Azid-funktionalisierten Coil-Stränge

Die Azid-Funktionalisierung von Peptiden ist aufgrund ihrer Orthogonalität eine etablierte Methode und ermöglicht beispielsweise die Modifikation über die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit Alkinbausteinen.^[103] Ebenfalls werden Azid-funktionalisierte Peptide, wie in der von HACKENBERGER und Kollegen gezeigten *traceless* Staudinger-Ligation, zur Peptidzyklisierung eingesetzt.^[104]

Die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Azidopeptid-Coils zur späteren Funktionalisierung mithilfe der CuAAC-Reaktion war geradlinig und folgte der Fmoc/Bu-Schutzgruppenstrategie. Zum Aufbau einer kleinen Bibliothek verschiedener *N*-terminaler Linkerlängen sollten weitere Aminosäuren und verschiedene Azidosäuren miteinander kombiniert werden. Die entsprechenden Bausteine waren käuflich zu erwerben. Mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese wurde zunächst das Coil-Peptid A₃ (Tabelle 1) an der festen Phase synthetisiert. Anschließend wurde das Peptid an der Festphase manuell mit verschiedenen weiteren Aminosäuren oder Carbonsäurebausteinen und final mit dem entsprechenden Azid-funktionalisierten Baustein modifiziert. Die automatisierte, mikrowellenunterstützte SPPS erfolgte an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz als Festphase. Einem Standardsyntheseprotokoll des *Liberty Blue* Peptidsynthesizers der Firma *CEM* folgend, wurde die Synthese mit *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) als Aktivator und Oxyma Pure[®] als Aktivatorbase durchgeführt. Nach den Kupplungsschritten wurde mit Piperidin in DMF (1:4, *v/v*) die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Die *N*-terminale Funktionalisierung mit nicht-standard Fmoc-Aminosäuren wie β -Alanin, γ -Aminobuttersäure sowie den Azidosäuren erfolgte durch manuelle Aminosäurekupplung bei Raumtemperatur mit PyBrOP[®] oder PyBOP[®] als Aktivator und Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base. Bei den Bausteinen mit einer freien *N_α*-Aminogruppe wurde diese mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Die finale Freisetzung des gewünschten Peptids unter Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit einem Gemisch aus Trifluoressigsäure/Trisopropylsilan/Wasser (90:5:5, *v/v/v*).^[105] Mit Hilfe der semipräparativen HPLC-Aufreinigung (*High Performance Liquid Chromatography*, dt.: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) an der Umkehrphase konnten auf diese Weise alle gewünschten

N-Azidopeptid-Coils erhalten werden. Eine Übersicht der erhaltenen Azide ist in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Sequenzen der Bibliothek der an A₃-Coil gebundenen Azide **1**. Die Abkürzungen stehen für Azidoglycin (G(N₃)), 5-Azidopentansäure (N₃-(CH₂)₄CO-), Azidoalanin (A(N₃)) und ε-Azidolysin (K(N₃)).

Coil-Peptid A ₃							
Sequenz- und Heptadenregister							
Eintrag	Linker	<i>gabcdef gabcdef gabcdef</i>				Verbindung	
1	G (N ₃)	EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG-NH ₂	1a	
1 ^a	G (N ₃)	EIAALEQ	ENAALEW	EIAALEQ	GG-NH ₂	1a(K7Q)^a	
2	G (N ₃)	G EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG-NH ₂	1b	
3	Ac-A (N ₃)	G EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG-NH ₂	1c	
4	N ₃ -(CH ₂) ₄ CO	G EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG-NH ₂	1d	
5	Ac-K (N ₃)	G EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG-NH ₂	1e	
6	Ac-K (N ₃)	G	G EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG-NH ₂	1f
7	Ac-K (N ₃)	βAla	G EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG-NH ₂	1g
8	Ac-K (N ₃)	γAbu	G EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG-NH ₂	1h

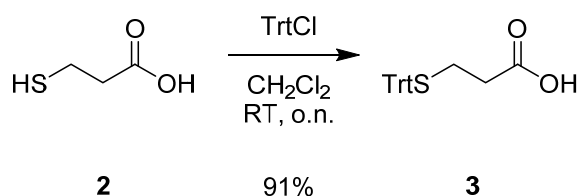
a) Sequenz der sich in Kapitel 3.4.1 ergebenden Kontrollreaktionen.

Durch die Synthese dieser Azidopeptide wurde eine kleine Bibliothek mit acht unterschiedlich langen und verzweigten A₃-Coil-Azidopeptiden **1a-h** erhalten.

3.2.2 Synthese der Thiol-funktionalisierten Coil-Stränge

Das komplementäre Coil-Peptid B₃ sollte mit einem gut zugänglichen und unverzweigten Thiol-Baustein *N*-terminal funktionalisiert werden. Auch hier sollte in Kombination mit verschiedenen Aminosäuren als *N*-terminale Linker eine kleine Bibliothek von zunächst nur vier Thiolpeptiden synthetisiert werden. Für die Thiolfunktionalisierung wurde 3-Mercaptopropionsäure (**2**) gewählt, welche unter Standard-SPPS-Bedingungen eingeführt werden kann. Dazu musste die freie Thiol-Gruppe zunächst orthogonal geschützt werden. Die Trityl-Schutzgruppe ist ebenso wie die *tert*-Butylschutzgruppen säurelabil und kann im finalen Abspaltungsschritt von der Festphase, analog der Synthese der Azidopeptide, mit einem Abspaltungscocktail aus Trifluoressigsäure (TFA), Wasser und Triisopropylsilan (TIPS) zusammen mit dem Peptid abgespalten werden. Triisopropylsilan dient hierbei als

Abfangreagenz reaktiver Carbokationen, wie die des Triphenylcarbeniums (Tritylkations) und anderer sauer abgespaltener Aminosäureseitenketten-Schutzgruppen. Die Einführung der Schutzgruppe erfolgte ausgehend von 3-Mercaptopropionsäure (**2**) durch Umsetzung mit Triphenylmethylchlorid unter Schutzgasbedingungen nach einer Vorschrift von BARTELS *et al.* (Schema 10).^[106]



Schema 10: Darstellung des Thiol-Bausteins **3** nach BARTELS *et al.*.^[106]

Auf diese Weise konnte der gewünschte *S*-Tritylmercaptopropionsäure-Baustein **3** mit einer Ausbeute von 91 % in kristalliner Form erhalten werden. Die Synthese kann im Multigramm-Maßstab erfolgen, und der erhaltene farblose, kristalline Feststoff ist gut handhabbar und für Jahre bei 8 °C stabil.

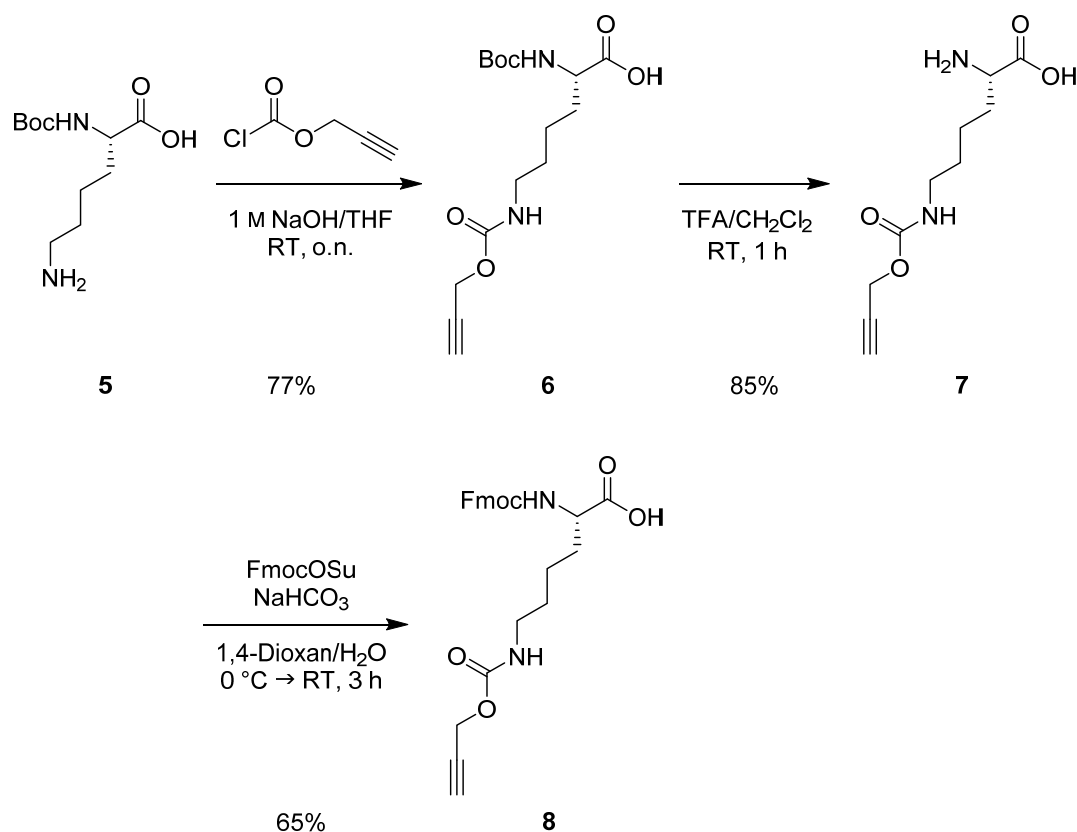
Die Synthese der gewünschten Thiol-funktionalisierten Coil-Stränge erfolgte analog der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Synthese durch die automatisierte, mikrowellenunterstützte Festphasenpeptidsynthese an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz. Die *N*-terminale Funktionalisierung mit nicht-standard Fmoc-Aminosäuren wie β -Alanin, γ -Aminobuttersäure sowie dem Thiol-Baustein **3** erfolgte ebenfalls durch die manuelle Aminosäurekupplung bei Raumtemperatur mit PyBrOP[®] als Aktivator und Diisopropylethylamin (DIPEA) als Aktivatorbase. Auf diese Weise wurden die Thiol-funktionalisierten B₃-Coil-Peptide erhalten. Eine Übersicht der dargestellten Thiole ist in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: Sequenzen der Bibliothek der Mercaptopropionsäure-funktionalisierten B₃-Peptide **4**.

Coil-Peptid B₃						
Sequenz- und Heptadenregister						
Eintrag	Linker		<i>gabcdef</i>	<i>gabcdef</i>	<i>gabcdef</i>	Verbindung
1	HS-(CH ₂) ₂ CO		G KIAALKY	KNAALKK	KIAALKQ GG-NH ₂	Thiol A, 4a
2	HS-(CH ₂) ₂ CO	G	G KIAALKY	KNAALKK	KIAALKQ GG-NH ₂	Thiol B, 4b
3	HS-(CH ₂) ₂ CO	β Ala	G KIAALKY	KNAALKK	KIAALKQ GG-NH ₂	Thiol C, 4c
4	HS-(CH ₂) ₂ CO	γ Abu	G KIAALKY	KNAALKK	KIAALKQ GG-NH ₂	Thiol D, 4d

3.2.3 Synthese der Peptidthioester als Zyklisierungsziel

Die gängigste chemische Transformation zur Aktivierung C-terminaler Peptidsäuren ist die Thioesterifizierung. Peptidthioester werden, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, in einer Vielzahl chemischer Synthesen eingesetzt. Als prominentes Beispiel sei hier die Native Chemische Ligation zur Synthese kleiner Proteine genannt.^[81] Die Thioestersynthese an Thiol-modifizierten Festphasen schließt den Einsatz der Fmoc/'Bu-Schutzgruppenstrategie aus. Durch die Elektrophilie des Thioesters und der damit einhergehenden Labilität gegenüber nukleophilen Reagenzien, wie des zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe verwendeten Piperidins, wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl an alternativen Fmoc-basierten Synthesewegen entwickelt. Allgemein wird dabei das Peptid an der Festphase dargestellt und im Anschluss selektiv in den entsprechenden Thioester überführt. Neben weniger nukleophilen Fmoc-Abspaltungsreagenzien^[107] seien auch die Seitenketten-Verankerung an der Festphase mit maskierter Thioestereinheit^[108] oder der von KENNER *et al.* entwickelte *Safety-Catch Linker*^[109,110] zur Fmoc-basierten Peptidthioestersynthese genannt. Für die in dieser Arbeit verfolgte Synthese wurde eine direkte Peptidthioestersynthese einer vollgeschützten Peptidsäure in Lösung gewählt. Zur Umgehung von Löslichkeitsproblemen entwickelte FLEMER ein Protokoll zur epimerisierungsfreien *in situ* Thioesterifizierung.^[111] Nach diesem Protokoll wurden auch die hier besprochenen Peptidthioester synthetisiert. Der für die Fmoc/'Bu-Strategie benötigte Fmoc-geschützte, Alkin-modifizierte Baustein sollte in wenigen Schritten und großen Ansätzen darstellbar sein. Die Synthese des N_α -Fmoc- und N_ϵ -Propargyloxycarbamat-geschützten Lysins (Fmoc-Lys(Proc)-OH, **8**) sollte nach einer einstufigen Synthese nach LI *et al.* ausgehend von Fmoc-Lysin durch Umsetzung mit Chlorameisensäurepropargylester erfolgen.^[112] Die Fmoc-Schutzgruppe zeigte hingegen nicht die berichtete Stabilität im alkalischen Milieu. Aus diesem Grund wurde die Synthese ausgehend von *N*-Boc-Lysin (**5**) angepasst. Das Reaktionsschema ist in Schema 11 gezeigt.



Schema 11: Synthesesequenz der Darstellung von Fmoc-L-Lys(Proc)-OH (**8**).

Im ersten Schritt der Synthese wurde unter SCHOTTEN-BAUMANN-Bedingungen die Aminogruppe der Lysin-Seitenkette mit Propargyloxycarbamat (Proc) in 77% Ausbeute geschützt. Die Boc-Schutzgruppe konnte anschließend unter sauren Bedingungen in 85% Ausbeute in das freie α -Lysin(Proc) **7** überführt werden. Für die Fmoc-Peptidsynthese wurde im letzten Schritt die Fmoc-Schutzgruppe in 65% Ausbeute zum gewünschten Baustein **8** eingeführt und in der Peptidsynthese eingesetzt.

Analog zu der in Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Synthese wurde anschließend mithilfe der automatisierten, mikrowellenunterstützten Festphasenpeptidsynthese die Peptidsequenz bis zur Position des Lysins **8** an säurelabilem HMPB-ChemMatrix[®] Harz (4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)buttersäure) oder einem 2-Chlortritylchloridharz aufgebaut. Diese Harze erlauben es, mit 1% Trifluoressigsäure in Dichlormethan die vollgeschützte Peptidsäure von der Festphase abzuspalten. Der Alkin-Baustein Fmoc-Lys(Proc) (**8**) wurde manuell eingeführt, da dies das Arbeiten unter geringeren Konzentrationen erlaubte und damit weniger Baustein eingesetzt werden konnte. Ebenso wurde die letzte *N*-terminale Aminosäure, anders als von FLEMER vorgeschlagen, direkt als *N*-Boc-Aminosäure manuell und analog der vorherigen Synthesen eingeführt. Die Abspaltung

wurde mit 1% TFA in Dichlormethan durchgeführt und die leicht saure Abspaltungslösung mit einem Überschuss an Benzylmercaptan, 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und DIC als Aktivatoren sowie DIPEA als Aktivatorbase über Nacht bei Raumtemperatur äquilibriert. Durch Aufkonzentration des Reaktionsgemischs und anschließender Behandlung mit einem Gemisch aus TFA/TIPS/Wasser (90:5:5, v/v/v) konnten die gewünschten Benzylpeptidthioester **9** erhalten werden. Die Proc-Schutzgruppe des Lysins erwies sich unter diesen Bedingungen als stabil und zeigte nur in Ausnahmen zu vernachlässigende Mengen an vermutlich *Thiol-yne*-Nebenprodukt (Alkin-Hydrothiolierung), das mittels semipräparativer HPLC abgetrennt werden konnte. Auf diese Weise wurden die folgenden, in Tabelle 5 aufgeführten Peptidthioester **9** für die CuAAC-Modifizierung der Azid-Coil-Peptide **1** dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht der synthetisierten Peptidthioester **9** (mit K = K(Proc)).

Eintrag	Sequenzen des Benzylpeptid- thioesters (C-SBn)	Verbindung
1	AKYGFGG	9a
1(K/A)	KAYGFGG	9a(K/A)
2	CKYGFGG	9b
3	Thz* *KYGFGG	9c
4	C(S ^t Bu)* *KYGFGG	9d
5	CKYGF	9e
6	CKYGF	9f
7	CKYG	9g
8	CKYA	9h
9	CKYS	9i
10	CKYI	9j

Entgegen der von FLEMER berichteten Thioestersynthese, die auch für anfällige Peptide epimerisierungsfrei ist, wurden für jede der Synthesen der Tetrapeptide mit endständigem Alanin (Ala, **9h**), Serin (Ser, **9i**) und Isoleucin (Ile, **9j**) aus Tabelle 5 – Einträge 8-10 zwei Hauptprodukte erhalten. Nach semipräparativer HPLC-Aufreinigung der erhaltenen Rohpeptide konnten mittels analytischer HPLC unterschiedliche Retentionszeiten der fraktionierten, isolierten Peptide beobachtet werden (Abbildung 4).^[111] Mittels MALDI-TOF-MS und hochauflöser ESI-MS wurden jeweils identische Massen für die beiden HPLC-

Ergebnisse und Diskussion

Spezies nachgewiesen. Ein Verhältnis der Peakflächen und damit einhergehend der Epimerisierung kann durch die Fraktionierung der Rohpeptide innerhalb der HPLC-Aufreinigung nicht angegeben werden. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 4 gezeigt und in Tabelle 6 die Retentionszeiten aufgelistet. Die Co-Injektion zweier Proben des C-Ile Peptidthioesters **9j** (Abbildung 4C) bestätigten die Annahme zweier Spezies.

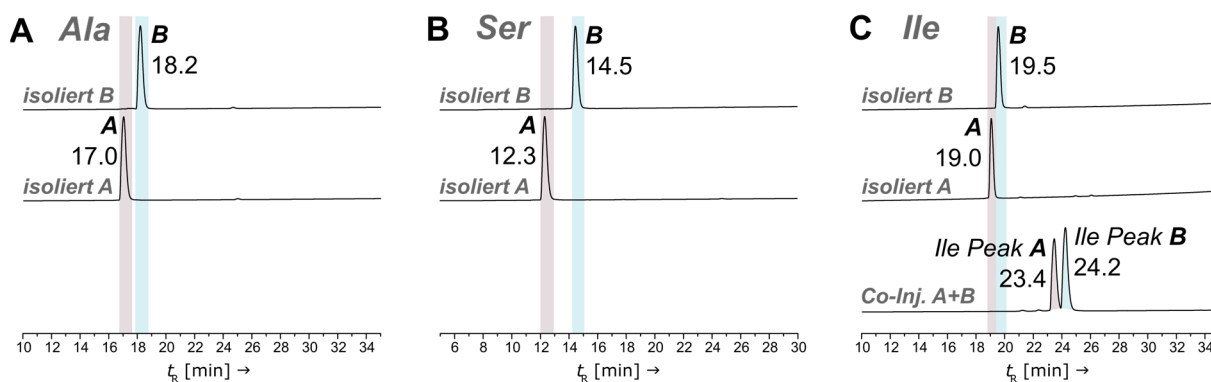


Abbildung 4: HPLC-Spuren (220 nm) der isolierten und aufgereinigten Tetrapeptidthioester **9** mit A) CK(Proc)YA-SBn (**9h**) und B) CK(Proc)YS-SBn (**9i**) mit einem Gradienten von 30-60% MeCN in Wasser (+ 0.1% TFA, 50 °C) und C) CK(Proc)YI-SBn (**9j**) mit einem Gradienten von 30-80% MeCN in Wasser (+ 0.1% TFA, 50 °C). Die Co-Injektion in C) zweier Proben (je >90% Reinheit) wurde mit einem Gradienten von 30-60% MeCN in Wasser (+ 0.1% TFA, 50 °C) durchgeführt.

Tabelle 6: Übersicht der erhaltenen analytischen HPLC-Retentionszeiten und des spezifischen Drehwerts. Die Konzentration (*c*) der spezifischen Drehwertmessung von **9g** und **9j** betragen $0.5 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{ mL}^{-1}$ in MeCN/Wasser (1:9, v/v, + 0.1% TFA).

	HPLC-Peak (H-CK(Proc)YX-SBn)	Retentionszeit t_R / min	Spezif. Drehwert $[\alpha]_D^{28}$
9g	Gly	16.1	- 24.0
9h	Ala Peak A	17.0	n. d.
	Ala Peak B	18.2	n. d.
9i	Ser Peak A	12.3	n. d.
	Ser Peak B	14.5	n. d.
9j	Ile Peak A	19.0	+ 8.0
	Ile Peak B	19.5	- 40.0

Neben den unterschiedlichen Retentionszeiten der analytischen HPLC zeigte die Bestimmung der spezifischen Drehwerte für Ile **9j** (Peak B) und Gly **9g** jeweils einen negativen Wert und

nur für Peak A des Isoleucinthioesters einen positiven Wert. Zusätzlich wurden CD-Spektren aufgenommen. Die Ergebnisse der CD-Spektroskopiemessungen sind in Abbildung 5 gezeigt.

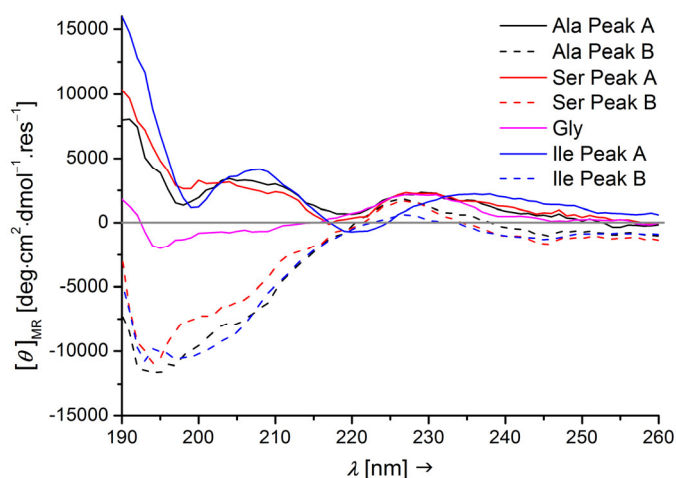
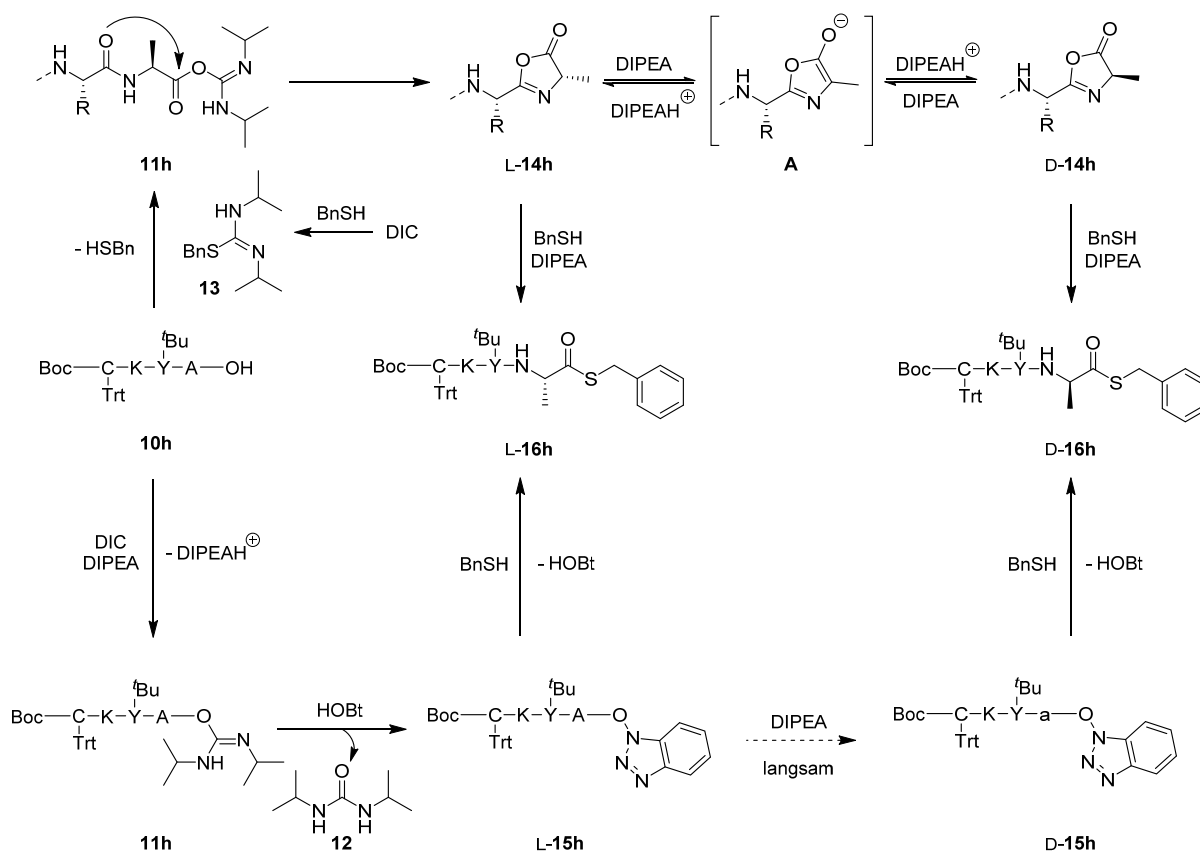


Abbildung 5: Übersicht der CD-Spektren der erhaltenen Peak-Spezies A und B der Peptidthioester H-CK(Proc)YG-SBn (**9g**), H-CK(Proc)YA-SBn (**9h**), H-CK(Proc)YS-SBn (**9i**) und H-CK(Proc)YI-SBn (**9j**). Bedingungen: 100 μM in MeCN/Wasser (1:9, v/v, + 0.1 % TFA) bei 20 °C.

Aus dem vergleichbaren Verlauf der CD-Spektren der jeweiligen Peak-Spezies A und B untereinander, wurde im Vergleich zum achiralen Gly-Peptidthioester **9g** sowie der erhaltenen spezifischen Drehwerte geschlussfolgert, dass es sich bei den Peak-Spezies A um die L-L-L-D-Epimere handelt und bei B um die Spezies *all*-L. Die *all*-L-Spezies folgen dabei dem anzunehmenden CD-Spektrum der ungeordneten Struktur eines *random coils* (zum Vergleich gängiger Konformationen und entsprechender CD-Spektren siehe GREENFIELD).^[113] Eine weitergehende Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie wurde aufgrund der erforderlichen Materialmenge nicht durchgeführt. Für die weiteren Synthesen und Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die nicht-epimerisierten Peptidthioester (*all*-L) der Peak-Spezies B verwendet. Die Ursache für die beobachtete Epimerisierung ist wahrscheinlich auf den Thioesterifizierungsschritt unter basischen Bedingungen zurückzuführen. Anzumerken ist, dass auch Phenylalanin anfällig für Epimerisierung ist. Für diesen Pentapeptidthioester **9f** konnte jedoch mittels analytischer HPLC keine Epimerisierung beobachtet werden.

Der mögliche Mechanismus der beobachteten Epimerisierung im Thioesterifizierungsschritt ist in Schema 12 gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 12: Vorgeschlagener Mechanismus der C-terminalen Epimerisierung innerhalb des Thioesterifizierungsschritts am Beispiel des vollgeschützten Tetrapeptids **10h** (C-Ala). Frei nach NAGALINGAM *et al.*^[114] Die Proc-Seitenkettenschutzgruppe des Lysins (K) wurde zur besseren Übersicht nicht eingezeichnet.

Während der *in situ* Thioesterifizierung der vollgeschützten Peptidsäure, hier am Beispiel des Tetrapeptids **10h**, wird zunächst das Carboxylat mit DIC und DIPEA oder mit *N,N'*-Diisopropyl-*S*-benzylthioharnstoff (**13**) zum entsprechenden *O*-Acylharnstoff **11h** umgesetzt. Dieser reagiert anschließend schnell mit HOBt unter Abspaltung des Isoharnstoffs **12** zum Aktivester L-**15h** oder unter den basischen Bedingungen zum 1,3-Oxazol-5(2*H*)-on L-**14h**. Die Epimerisierung findet vornehmlich ausgehend von der Oxazolone-Spezies **14h** statt, die von DIPEA zum mesomeriestabilisierten **A** deprotoniert werden kann und durch Reprotonierung in das entsprechende Oxazolone D-**14h** überführt wird. Die Oxazolone reagieren, ebenso wie der Benzotriazolylester **15h** mit Benzylmercaptan zum gewünschten Peptidthioester L-**16h** sowie D-**16h**. In ihrer Signifikanz stellt diese Nebenreaktion im Fall der hier vorgestellten Thioesterifizierung der Tetrapeptide eine interessante Ausnahme dar. Zukünftige Optimierungen der Thioesterifizierung sollten sich zunächst auf den Einfluss kürzerer Reaktionszeiten konzentrieren. Ist das Verhältnis der Epimere identisch, so kann von

dem hier postulierten Mechanismus über die Oxazolonzwischenstufe ausgegangen und alternative Kupplungsreagenzien in Erwägung gezogen werden.

Zur Untersuchung der Substratbreite des zu entwickelnden CuAAC-Reaktionsprotokolls, die zur Dekoration des Coil-Peptids **A₃** genutzt wurde, wurden auf der Basis des hier vorgestellten Protokolls des Weiteren die entsprechenden Peptidsäuren in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Übersicht der synthetisierten Peptidsäuren **17** (mit K = K(Proc)).

Eintrag	Sequenzen der Peptidsäuren	Verbindung
1	AKYGF \mathbf{F} GG	17a
2	AKYGH \mathbf{H} GG	17k
3	AKYGC \mathbf{C} GG	17l
4	AKYGE \mathbf{E} GG	17m
5	AKYGR \mathbf{R} GG	17n
6	AKYGM \mathbf{M} GG	17o

Dazu wurde der Phe-Rest der Heptapeptidsequenz **17a** mit verschiedenen anspruchsvollen Aminosäureresten substituiert. Anstelle der *in situ* Thioesterifizierung, wurden die Peptide an der Festphase direkt mit einem Gemisch aus TFA/TIPS/Wasser (90:5:5, v/v/v) behandelt und so die gewünschten entschützten Peptidsäuren **17** erhalten.

Auch die Synthese vollgeschützter Peptidsäuren für die Untersuchung einer Festphasengebundenen CuAAC-Reaktion konnte analog der Peptidthioestersynthese erfolgen. Diese sind aufgrund der unterschiedlichen Aminosäurereste im Peptid interessant. Anstelle der Thioesterifizierung wurde das leicht saure Reaktionsgemisch der vollgeschützten abgespaltenen Peptidspezies mit einem Gemisch aus Pyridin in Methanol behandelt. Auf diese Weise wurden die in Tabelle 8 gezeigten, vollgeschützten Peptidsäuren **10** dargestellt.

Tabelle 8: Übersicht der synthetisierten Peptidsäuren **10** (mit C = *N*-Boc-Cys(Trt), K = Lys(Proc), Y = Tyr('Bu)).

Eintrag	Sequenzen der vollgeschützten Peptidsäuren	Verbindung
1	CKYGF ₂ GG	10b
2	CKYGF ₂ G	10e
3	CKYGF ₂	10f
4	CKYGF ₂	10g

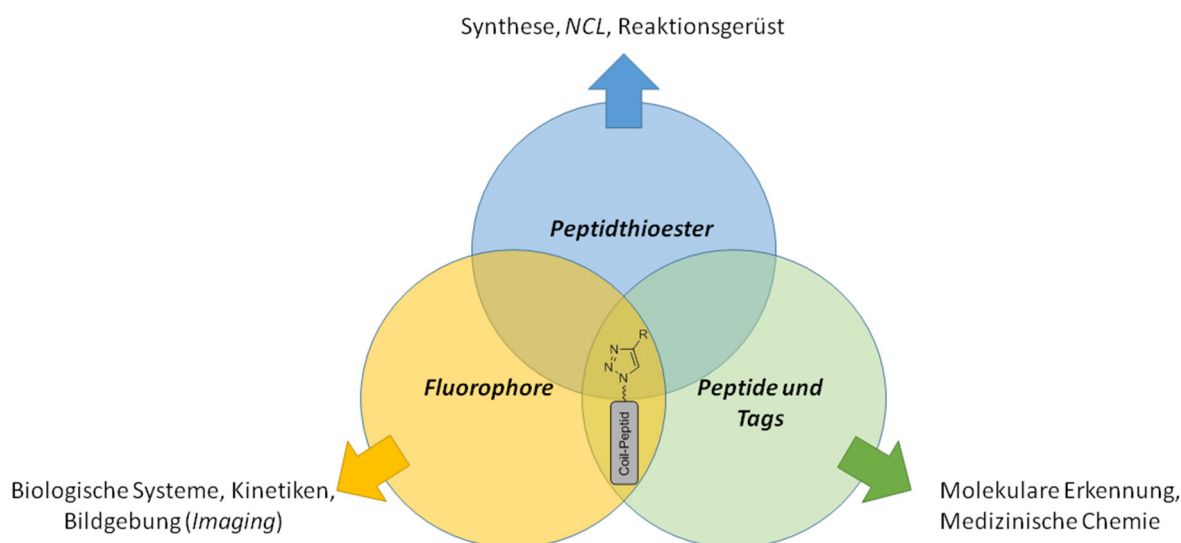
Diese können nach erfolgter CuAAC-Reaktion harzgebunden und vollgeschützt aufgrund ihrer freien Carboxygruppe in den entsprechenden Thioester überführt werden. Der finale Abspaltungsschritt bietet einen alternativen Zugang zu Coil-dekorierten Peptidthioestern.

3.3 Entwicklung eines effizienten Kupfer-Click Protokolls

Zur angestrebten Untersuchung einer sowohl Templat-vermittelten Zyklisierung eines voraktivierten Substrates über direkte Aminolyse (Kapitel 3.4.1) als auch über die Native Chemische Ligation (Kapitel 3.4.2) mussten die zu zyklisierenden Zielverbindungen an ein Coil-Peptid konjugiert werden. Zu diesem Zweck sollte die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) genutzt werden. Bei der CuAAC handelt es sich um eine Reaktion zwischen einem organischen Azid und einem terminalen oder internen Alkin, welche über eine 1,3-dipolare Cycloaddition (*Huisgen*-Reaktion) einen 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazol-Ring regioselektiv aufbaut.^[103,115-117] Diese Reaktion gehört zu einer Klasse bioorthogonaler Reaktionen, die unter dem Sammelbegriff Click-Reaktionen zusammengefasst sind. Aufgrund der Bioorthogonalität können CuAAC-Reaktionen in natürlichen Systemen hoch chemoselektiv verlaufen.^[118] Nach Definition sind Click-Reaktionen schnell, irreversibel und verlaufen unter milden Bedingungen. Sie weisen eine breite Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen auf und liefern aus diesem Grund keine Nebenprodukte.^[119] Grundsätzlich erfüllt die CuAAC diese Kriterien, allerdings offenbart sie in der Praxis auch einige Einschränkungen. Zunächst variieren die Reaktionszeiten von Minuten bis Tagen.^[120] Der größte Nachteil ist allerdings die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*ROS*), welche in der Bildung unerwünschter Nebenprodukte resultieren können und im Kontext der Konjugation von Biopolymeren wie Peptiden und Proteinen unterdrückt werden müssen.^[121-123] Zur Minimierung dieses Problems wurden beispielsweise Opferliganden entwickelt und als Additiv der Reaktion zugegeben oder die Reaktion wurde in Kupfer-Flussreaktoren durchgeführt.^[121,124] Trotz dieser Herausforderungen überwiegen die Vorteile dieser Reaktion. Daher ist es nicht überraschend, dass die CuAAC-Reaktion und die Kupfer-freie *strain-promoted* (dt. spannungsvermittelte) Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) vielfach in der chemischen Biologie und dem Design von Biomaterialien Anwendung findet.^[118,125-128]

Aus diesen Gründen und vor dem Hintergrund, dass es sich bei der CuAAC um eine gut untersuchte Biokonjugationstechnik handelt, wurde deren Verwendung als zielführend für die Konjugation der in dieser Arbeit besprochenen Zyklisierungsvorläufer erachtet (siehe Kapitel 3.2.3). Ungeachtet dessen können herausfordernde Aminosäuren wie Cystein (Cys), Methionin (Met), Arginin (Arg) oder Histidin (His) sowie Hydrolyse-anfällige funktionelle Gruppen wie die in dieser Arbeit besprochenen Thioester **9** zu Nebenreaktionen oder sogar zur Inhibierung der Reaktion führen. Erste Versuche der angestrebten Konjugation sind in Tabelle 10 aufgeführt und werden im Verlauf dieses Kapitels im Detail erörtert. Es wird

deutlich, dass es keine allgemeingültigen Reaktionsbedingungen für die Konjugation von Coil-Peptiden gibt und Faktoren wie die gewählte Kupferquelle, stabilisierende Liganden, Temperatur, Lösungsmittel und Wahl eines geeigneten Reduktionsmittels für den Ausgang der Reaktion entscheidend sind. Es erscheint offensichtlich, dass die in der Literatur genannten Bedingungen jeweils für die angegebene Reaktion und das spezifische Problem optimiert sind. Solche Optimierungen verschlingen nicht nur Ressourcen, sondern sind auch kosten- und vor allen Dingen zeitintensiv. Aus diesem Grund wurde die Realisierung einer allgemeinen Vorschrift in Form eines schnellen und effizienten Zugangs zur Dekoration von heterodimeren Coiled-Coil Peptiden (CC) mit kurzen Peptidthioestern als Vorläufer für zyklische Peptide ohne zusätzliche Schutzgruppen mittels CuAAC angestrebt. Ebenso sollte die Substratbreite für die optimierten Bedingungen in Bezug auf weitere Dekorationen von Coil-Strängen mit beispielsweise Peptiden mit schwierigen Aminosäuren, mit Fluorophoren sowie mit Tags (dt. Markierung oder Etikett) untersucht und herausgearbeitet werden (Schema 13).



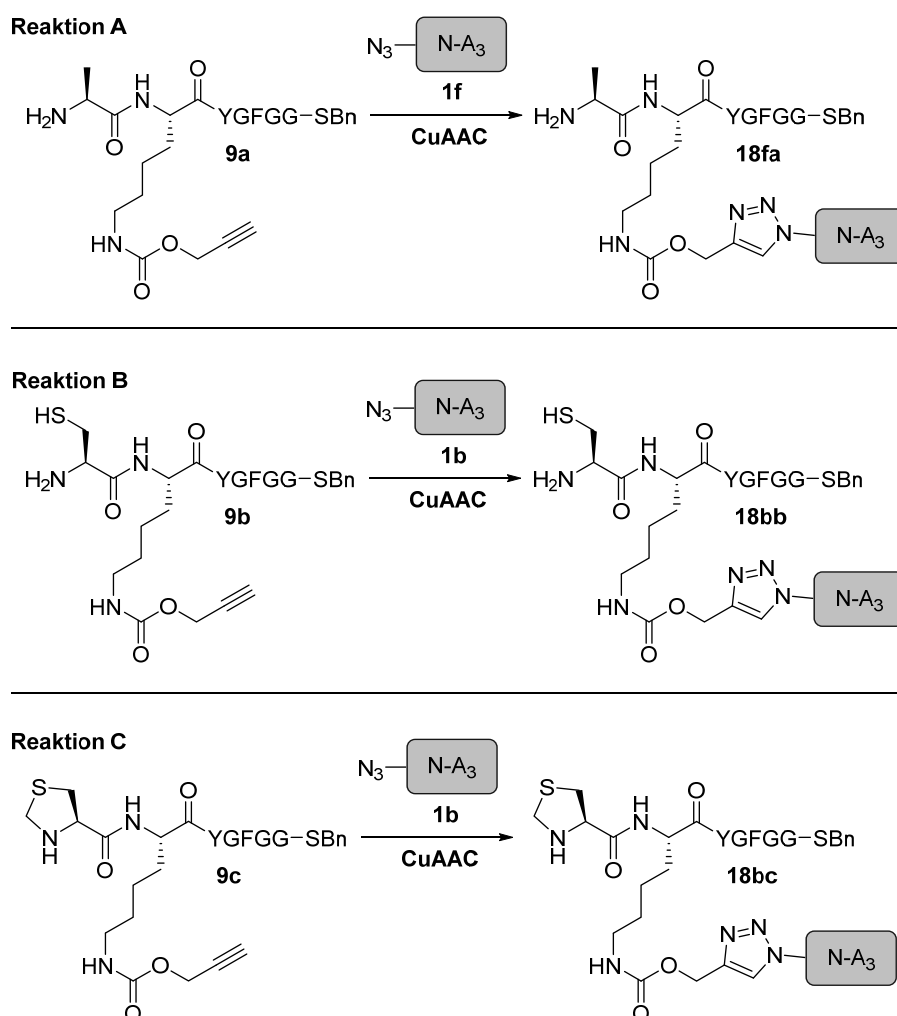
Schema 13: Schematische Darstellung möglicher Anwendungen der angestrebten CuAAC Click-Konjugate.

3.3.1 Optimierung der CuAAC-Reaktion in Lösung

Eine generelle Herausforderung für die CuAAC-Reaktion ist trotz der berichteten hohen Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen die Anwesenheit von chelatisierenden funktionellen Gruppen wie beispielsweise *N*-terminalem Cystein (Cys). Nach bestem Wissensstand sind bis dato nur zwei Berichte bekannt, welche eine erfolgreiche CuAAC-

Ergebnisse und Diskussion

Reaktion in Anwesenheit von freiem *N*-terminalem Cys unter der Nutzung von hohen Konzentrationen von entweder Kupfer(II)sulfat und Reduktionsmittel oder Kupfer(I)-stabilisierenden Liganden erfolgreich beschreiben.^[129,130] Zur Identifizierung geeigneter Reaktionsbedingungen wurde aus diesem Grund zunächst Cys gemieden und die CuAAC-Reaktion anhand der Umsetzung des Alkins in Form des *N*-Alanylpeptidthioesters **9a** mit dem *N*-Azidopeptid **1f** untersucht (Schema 14, Reaktion A). Reaktionen B und C sind Inhalt der darauffolgenden Kapitel.



Schema 14: Die grundlegenden CuAAC-Reaktionen der Alkinpeptidthioester **9a-c** und des Azid-Coil Peptids *N*-A₃ **1b** und **1f**.^[1]

In den hier beschriebenen Versuchen wurde allein der in Tabelle 9 dargestellte Glu-reiche A₃-Coilstrang des parallelen, heterodimeren CC-Peptids *N*-A₃B₃ genutzt (siehe auch Übersicht in Tabelle 3).^[15,32] Dieses als Trägerstrang (*N*-A₃) für den zyklischen Peptid-

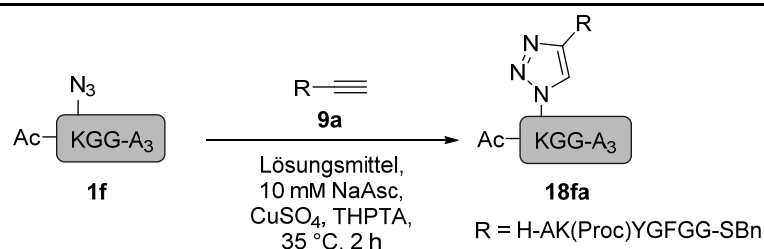
vorläufer gewählte Coil wurde entweder mit Azidolysin oder Azidoglycin *N*-terminal zum entsprechenden Azidopeptid **1** funktionalisiert.

Tabelle 9: Sequenzen der *de novo* designten heterodimeren Coils N-A₃ und N-B₃.^[15]

Coil-Peptide		Sequenz und Heptadenregister					
				<i>gabcdef</i>	<i>gabcdef</i>	<i>gabcdef</i>	
1b	N ₃ -Gly-(N-A ₃)	G (N ₃)	G	EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG
1f	Ac-Lys(N ₃)-(N-A ₃)	K (N ₃)	GG	EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG
4	N-B ₃		G	KIAALKY	KNAALKK	KIAALKQ	GG

Die Kernsequenz des Modell-Alkinpeptids **9** ist der minimalen Sequenz des *osteogenic growth peptide* (OGP, dt. osteogenes Wachstumspeptid) entnommen.^[96] Als Alkin-Einheit wurde Propargyloxycarbonyl-Lysin (Lys(Proc)) als vorletzte Aminosäure eingeführt. Alle Peptide wurden, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, über Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese dargestellt.^[111,131]

In Tabelle 10 sind ausgewählte Reaktionen der Optimierungsarbeit aufgeführt. Alle Reaktionen wurden in einer Konzentration von 1 mM und einer Ansatzgröße von 100 nmol bezogen auf das Azid **1f** in Anwesenheit von Kupfer(II)sulfat und reduzierendem Natriumascorbat durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionen bei 35 °C durchgeführt. Das Azid **1** und das Alkin **9a** wurden vor den jeweiligen Versuchen zusammen in einem Reagiergefäß gefriergetrocknet. Die so vorgelegten Edukte wurden durch Zugabe von *tert*-Butanol oder Acetonitril und Reinstwasser oder PBS-Puffer gelöst und mit der entsprechenden Stammlösung aus Kupfer(II)sulfat oder Kupfer(II)sulfat/Ligand versetzt. Durch Zugabe der aus einer Stammlösung entnommenen Menge an Natriumascorbat (NaAsc) wurde die Reaktion gestartet und in einem Thermoschüttler bei konstanter Temperatur inkubiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden nach 2 min, 1 h und 2 h Aliquote (10 µL, 6 nmol bezogen auf Azid **1**) entnommen und mittels analytischer HPLC vermessen. Die Peaks wurden gesammelt und mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert. Eine Übersicht aller Chromatogramme der Tabelle 10 ist im Anhang dieser Arbeit in Abbildung A.3 zu finden. Ausgewählte Chromatogramme der Einträge 5-9 und 11 der Tabelle 10 sind in Abbildung 6 dargestellt.

Tabelle 10: Optimierung der CuAAC-Reaktion an Coil-Peptiden.

Eintrag	Azid [mM]	Alkin [mM]	CuSO ₄ [mM]	Ligand [mM]	Lösungsmittel (v/v)	Ausbeute ^a /%
1 ^b	1.0	1.0	1.0	-	PBS	-
2 ^c	1.0	1.0	1.0	-	^t BuOH/PBS (1:4)	-
3 ^{d,e}	1.0	1.0	0.1	-	MeCN/H ₂ O (7:13)	-
4 ^{f,e}	1.0	1.0	0.1	-	MeCN/PBS (7:13)	-
5 ^f	1.0	1.0	0.1	-	^t BuOH/H ₂ O (4:1)	17 ^g
6	1.0	1.0	6.7	-	MeCN/PBS (7:3)	< 7
7	1.0	1.0	6.7	-	^t BuOH/PBS (7:3)	58
8	1.0	2.0	6.7	-	^t BuOH/PBS (7:3)	86 ^g
9	1.0	2.0	6.7	13.4	^t BuOH/PBS (7:3)	86 ^g
10	1.0	1.0	6.7	13.4	^t BuOH/PBS (7:3)	70
11	1.0	1.2	6.7	13.4	^t BuOH/PBS (7:3)	96

a) Ausbeuten basieren auf der Integration der HPLC-Spuren bei 280 nm relativ zu umgesetzten Azid **1f**. b) Mit 5 mM NaAsc bei 21 °C und nach 3 h. c) Mit 5 mM NaAsc bei 21 °C und nach 4 d. d) Mit 0.5 mM NaAsc bei 25 °C und nach 3 h. e) Es wurden entgaste Lösungsmittel verwendet. f) Mit 0.2 mM NaAsc. g) Integration der HPLC-Spuren wurde durch die Bildung von Aggregaten von **9a** mit **18fa** erschwert.

In einer ersten Reaktion (Tabelle 10 – Eintrag 1 (siehe auch Kapitel 7.2 Abbildung A.3A)) mit äquimolaren Mengen Azid **1f**, Alkin **9a** und Kupfer(II)sulfat wurde festgestellt, dass das Alkin **9a** in PBS-Puffer unter diesen Bedingungen bei Raumtemperatur schwer löslich ist. Das Verhältnis von Kupfer(II)/Natriumascorbat wurde aus einem Protokoll von SMITH *et al.* übernommen.^[132] Auch nach 20 h Reaktionszeit bei einem 5-fachen Überschuss an Natriumascorbat als Reduktionsmittel konnte kein Nachweis der Bildung des entsprechenden Click-Konjugates **18fa** mittels HPLC und MALDI-TOF-MS erfolgen. Letztere gab allerdings Hinweise auf Spuren an Diin von **9a**. Diese Kupfer-katalysierte Dimerisierung kann durch eine GLASER-Kupplung, die in einer Nebenreaktion mit Cu(I) möglich ist, oder einer EGLINTON-Kupplung, die mit Cu(II) möglich ist, erfolgen.

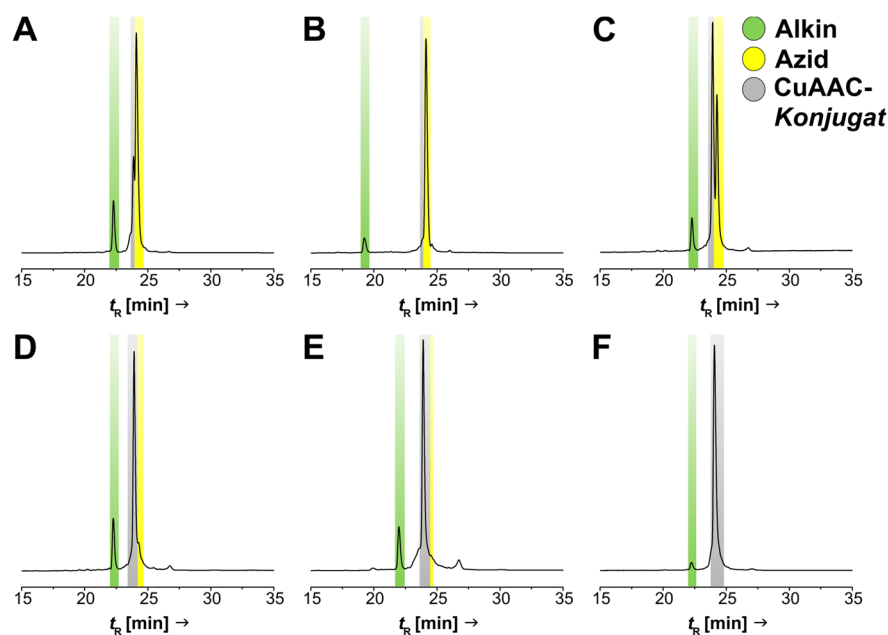


Abbildung 6: Optimierung der CuAAC-Reaktion. Ausgewählte, analytische HPLC-Spuren der CuAAC von Azid **1f** (gelb) mit Alkin **9a** (grün) nach den in Tabelle 10 angegebenen Bedingungen und Reaktionszeiten. Das gewünschte Click-Konjugat **18fa** ist grau unterlegt. A) Tabelle 10 – Eintrag 5, B) Tabelle 10 – Eintrag 6 mit HPLC-Säulenofen bei 50 °C, C) Tabelle 10 – Eintrag 7, D) Tabelle 10 – Eintrag 8, E) Tabelle 10 – Eintrag 9 und F) Tabelle 10 – Eintrag 11. Die HPLC-Spuren wurden bei 280 nm und einem Gradienten von 30-60% Acetonitril in H₂O (+ 0.1% TFA) in 30 min aufgezeichnet.

Die CuAAC-Reaktion mit *tert*-Butanol als additives Lösungsmittel wurde von ROSTOVTSEV *et al.* als besonders effizient beschrieben.^[116] Unter identischen Bedingungen mit einem Anteil von 20% *tert*-Butanol in PBS-Puffer wurde eine bessere Löslichkeit der eingesetzten Peptide festgestellt, jedoch konnte auch nach 4 Tagen keine CuAAC-Reaktion nachgewiesen werden (Tabelle 10 – Eintrag 2 (siehe auch Kapitel 7.2 Abbildung A.3B)).^[116] Die massenspektrometrische Untersuchung der Schulter des Azid-Peaks **1f** mittels MALDI-TOF-MS konnte hier allein ein Gemisch aus Alkin **9a** und Azid **1f** nachweisen und legte eine Form der Aggregation beider Spezies oder einen Kupfer(II)-Chelatkomplex nahe (vgl. Abbildung A.3 in Anhang 7.2). Dies verdeutlichte, dass nicht allein Löslichkeitsprobleme die CuAAC-Reaktion störten, sondern womöglich eine Komplexbildung der funktionellen Gruppen durch überschüssiges, katalytisch-inaktives Kupfer(II) stattfand und damit eine erfolgreiche Cycloaddition verhinderte. Aus diesen Gründen und zur Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses wurde ein vollständiger Wechsel auf Acetonitril als additives Lösungsmittel mit einem Anteil von 35% in Wasser untersucht und die Mengen an Kupfer(II)sulfat und Reduktionsmittel um das 10-fache gesenkt (Tabelle 10 – Eintrag 3, Kapitel 7.2 Abbildung A.3C). Trotz der Verwendung von entgastem Lösungsmitteln konnte

18fa weder nach 3 h Reaktionszeit noch nach mehreren Tagen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde zurück zu einem Lösungsmittelgemisch von PBS mit 35% Acetonitril bei 35 °C gewechselt und die Menge an Natriumascorbat auf 0.2 mM vermindert (Tabelle 10 – Eintrag 4, Kapitel 7.2 Abbildung A.3D). Nach 2 h Reaktionszeit konnte auch hier kein Produkt **18fa** nachgewiesen werden. Aufgrund des geringen Umsatzes wurde dieses Reaktionsgemisch nachträglich auf Bedingungen ähnlich der nach LEE *et al.* beschriebenen Umsetzungen angepasst.^[130] Dazu wurden zusätzlich 5 μ L Kupfer(II)sulfat (6.6 mM) und 5 μ L Natriumascorbat (9.8 mM) zum Reaktionsgemisch gegeben. Dies führte zu einer langsamen Bildung an gewünschtem Click-Produkt **18fa**: 8% nach weiteren 3 h und insgesamt 46% nach einer Reaktionszeit von zusätzlichen 20 h. Aufgrund der signifikanten Änderungen des katalytischen Systems konnten keine qualitativen Aussagen getroffen werden und seien daher hier lediglich erwähnt. Der pH-Wert des *CuAAC-Puffers* betrug rund 5.2 und der des Reaktionsgemischs 7.9. Phänomenologisch lässt sich jedoch konstatieren, dass ein höherer Anteil an Kupfer(II)sulfat und Reduktionsmittel bei neutralen bis leicht sauren Bedingungen vorteilhaft erscheint.

Vor diesem Hintergrund wurde die Reaktion nochmals in einem Überschuss an *tert*-Butanol durchgeführt. Dieser Wechsel auf ein Lösungsmittelsystem mit *tert*-Butanol als Hauptkomponente (80% in Wasser) unter identischen Bedingungen zu Tabelle 10 – Eintrag 4 führte zu einer wesentlichen Verbesserung mit einer Ausbeute von 17% nach 2 h Reaktionszeit, welche sich auch nach 4 h Reaktionszeit nicht weiter erhöhte (Tabelle 10 – Eintrag 5, Abbildung 6A). Es konnte somit geschlussfolgert werden, dass ein Überschuss an organischem Lösungsmittel in Verbindung mit erhöhten Mengen Kupfer(II) und Reduktionsmittel zu Reaktionsumsätzen führt. Die Reaktion wurde folglich mit einem Kupfer(II)/NaAsc-Verhältnis nach LEE *et al.* von 6.7 mM/10 mM (vgl. Tabelle 10 – Eintrag 4) unter Verwendung von 70% Acetonitril in PBS durchgeführt (Tabelle 10 – Eintrag 6, Abbildung 6B). Dies wiederum führte zu einer verminderten Ausbeute **18fa** von rund 7% und ließ den Schluss zu, dass *tert*-Butanol das geeignetere Lösungsmittel für die hier untersuchte Umsetzung ist. Erst die Verbindung beider Erkenntnisse von *tert*-Butanol im Überschuss in Verbindung mit den Bedingungen nach LEE *et al.* bildeten einen guten Ausgangspunkt weiterer Optimierungsarbeiten.^[130] Die Wiederholung der Reaktion unter identischen Bedingungen mit 70% *tert*-Butanol in PBS führte zu 58% Ausbeute nach 2 h Reaktionszeit (Tabelle 10– Eintrag 7, Abbildung 6C) und ist vermutlich, neben dem Überschuss an Kupfer(II) und NaAsc auf die Verwendung von PBS-Puffer anstelle von Reinstwasser zurückzuführen. Eine weitere Verbesserung der CuAAC-Reaktion auf 86% Ausbeute wurde

durch einen Überschuss an Alkin **9a** (2 mM) erreicht (Tabelle 10– Eintrag 8, Abbildung 6D) und konnte auch durch den Einsatz eines wasserlöslichen THPTA-Liganden (Tris((1-Hydroxypropyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amin) nicht weiter erhöht werden (Tabelle 10 – Eintrag 9, Abbildung 6E). Bei THPTA handelt es sich um einen wasserlöslichen Liganden, der die katalytisch-aktive Kupfer(I)-Spezies stabilisiert, vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unter Selbstdegradation schützt und durch seine chelatisierenden Eigenschaften die Bildung von Aggregaten wie Alkin-Cluster minimiert.^[121,126] Trotz dieser beschriebenen Eigenschaften von THPTA wurde eine vermehrte Bildung unbekannter Chelate bzw. Aggregate beobachtet, die die Isolierung des Click-Konjugates **18fa** erschwerten und auf den Einsatz eines zweifachen Überschusses an Alkin **9a** zurückzuführen sind. Zum einen kann die Vermutung, dass Kupfer(II) reaktive Gruppen komplexiert bedeuten, dass es zu einer Absättigung der reaktiven Gruppen kommt, die für katalytisch-aktives Kupfer(I) nicht mehr zugänglich sind. Zusätzlich können Kupfer(II)-Komplexe gebildet werden, die in ihrer Koordination nicht mehr durch das Reduktionsmittel NaAsc reduziert werden können. Auf der anderen Seite kann das Alkin mit Kupfer(I) unreaktive Cluster^[126] bilden und damit die katalytisch-aktive Konzentration an Kupfer(I) absenken und selbst das Alkin als Reaktanten dem System entziehen.

Aus diesem Grund wurde die Reaktion mit einem äquimolaren Verhältnis der Reaktanten und unter den bisher optimierten Bedingungen wiederholt. Dabei kam es zu einer Verschlechterung der Ausbeute auf 70% an gewünschtem Click-Konjugat **18fa** (Tabelle 10 – Eintrag 10). Gleichzeitig schien das Alkin bereits nach 2 h vollständig verbraucht zu sein (siehe Anhang 7.2 Abbildung A.3 – Chromatogramm J). Daraus lässt sich schließen, dass ein Überschuss an **9a** benötigt wird, aber die Bedingungen aus den vorherigen Reaktionen eine schnelle und effiziente CuAAC-Konjugation gewährleisten. Somit wurde die Menge an Alkin **9a** auf lediglich 1.2 mM erhöht und auf diese Weise ein nahezu vollständiger Umsatz mit einer HPLC-Ausbeute von 96% unter Minimierung von Aggregaten in Form zusätzlicher Peaks realisiert (Tabelle 10 – Eintrag 11, Abbildung 6 – Chromatogramm F). Dies, sowie der Vorteil der Verwendung von THPTA als Ligand, wird anhand des Vergleichs zweier Chromatogramme in Abbildung 7 deutlich.

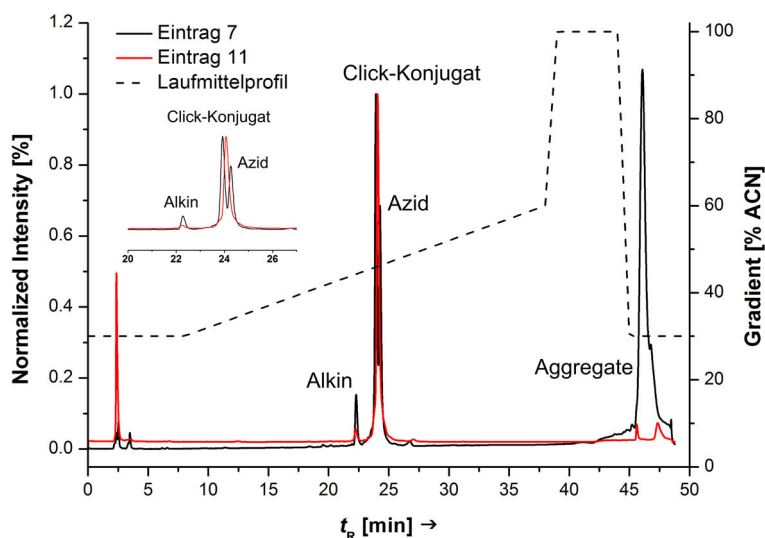


Abbildung 7: Vergleich der HPLC-Spuren bei 280 nm zwischen einer CuAAC-Reaktion mit schlechtem Umsatz (Tabelle 10 – Eintrag 7) mit der optimierten CuAAC-Reaktion (Tabelle 10 – Eintrag 11).

Hervorzuheben ist, dass unter den optimierten Bedingungen (*rot*) im Waschgang mit 100% Acetonitril (+ 0.1% TFA) des HPLC-Laufs eine signifikante Minimierung an nicht mittels MS analysierbaren, schwerlöslichen Aggregaten und/oder Nebenprodukten erzielt werden konnte (Abbildung 7). Der Injektionspeak erscheint aufgrund von THPTA hingegen signifikant (*rot*, $t_R = 2.5$ min). Eine erfolgreiche Verminderung an Kupfer(II)sulfat/THPTA (Stoffmengenverhältnis 1:2) sowie Natriumascorbat (10 mM) konnte in einem Abteilungspraktikum von FELIX KALTENHÄUSER nicht erzielt werden. Damit wurde ein effizientes CuAAC-Reaktionsprotokoll, wie in Tabelle 10 – Eintrag 11 beschrieben, für dieses Substratsystem etabliert.

Die optimierten Bedingungen erlaubten auch ein *Upscaling* der Ansatzgröße auf die fünffache Menge an Azid **1f** (500 nmol) und Alkin **9a** (600 nmol) und erwiesen sich hinsichtlich Durchführung und Produktisolierung als praktikabel. Hauptsächlich lässt sich dies auf den Einsatz von THPTA als Liganden zurückführen. Eine direkte Aufreinigung des Reaktionsgemisches durch semipräparative HPLC war durch den hohen Anteil an *tert*-Butanol nicht möglich. Ursächlich ist, dass das injizierte Reaktionsgemisch unter den Arbeitsdrücken einer semipräparativen HPLC entgast und damit die Wechselwirkung Analyt/Umkehrphase stört und eine Trennung erschwert oder sogar verhindert. Das Reaktionsgemisch wurde aus diesem Grund zunächst mit Acetonitril/Wasser (1:4, *v/v* mit + 0.1% TFA) verdünnt, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss

gefriergetrocknet. Innerhalb der Reaktion führte der THPTA-Ligand neben der Erhöhung der Lebenszeit des aktiven Katalysatorsystems dazu, dass es zu keinen oder nicht zu berücksichtigenden Mengen an Peptid-Kupferkomplexen kam. Dies hätte analog des BIURET-Tests eine intensive violette Färbung des Reaktionsgemischs durch Kupfer(II)-Peptidkomplexe zur Folge. Überdies konnte im aufgereinigten Produkt **18fa** keine Anwesenheit von Kupfer(II)peptid-Komplexen mittels Massenspektrometrie und auch UV/VIS, hier der DAD-Detektor der analytischen HPLC oder das *NanoDrop* UV-Spektrometer, in Form einer Absorption bei 540/550 nm nachgewiesen werden. Phänomenologisch ließ sich die erhöhte Lebenszeit des katalytischen Systems bereits durch das Fehlen einer intensiv blauen Färbung des Kupfer(II)-Ligand Chelatkomplexes im Reaktionsgemisch feststellen. Stattdessen wurde eine anfänglich gelbliche Färbung, hervorgerufen durch polynukleare Organokupferspezies, beobachtet, die langsam innerhalb der ersten Stunde der Reaktion verblasste.^[133] Zu erwähnen ist, dass das Reaktionsgemisch als zweiphasiges System erscheint, in welchem sich ein einzelner, wässriger Tropfen bei fehlender Durchmischung am Reagiergefäß-Boden abscheidet. Dies ist auf eine lokal hohe PBS-Konzentration zurückzuführen und zeigt einen gewissen Grad an Salzübersättigung im Reaktionsgemisch an. Bei der Aufreinigung des gefriergetrockneten Reaktionsgemischrückstands führte der Überschuss an THPTA-Ligand dazu, dass bei neuerlichem Anlösen Kupfer, hier primär Kupfer(II), in Lösung ging, was durch eine bläuliche Färbung des Kupfer(II)-THPTA-Komplexes sichtbar war. Die gefriergetrockneten Rohpeptide **18fa** selbst verhielten sich hingegen uneinheitlich und besaßen eine farblose oder bläuliche, in manchen Fällen auch violette bis rot-braune Färbung (vgl. BIURET-Reaktion). Der THPTA-Ligand schützt aber das Peptid, indem er Kupfer wieder in Lösung bringt. Eine anschließende Filtration über einen Spritzenfilter und semipräparative HPLC-Aufreinigung reichten aus, um potenzielle Kupfersalze zu entfernen bzw. deren Bildung zu unterdrücken.

Die Verwendung von Chelatisierungsmitteln (z.B. CupriSorbTM, einem Kupfer-spezifischen Chelatisierungsharz aus dem Anwendungsbereich der Wasseraufarbeitung mit unbekannter Zusammensetzung) oder zusätzlichen Aufreinigungsschritten mit Sep-Pack (Firma *Waters*) zur Entfernung möglicher Kupfersalze aus dem Rohprodukt vor oder nach Gefriertrocknung führten zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen und erwiesen sich schlussendlich als überflüssig. Im Fall von CupriSorbTM führte dessen Einsatz sogar zu signifikanten Materialverlusten durch Adsorption des Peptids an der Polymeroberfläche.

Ergebnisse und Diskussion

An dieser Stelle sei angemerkt, dass auch Coiled-Coils unter den gefundenen CuAAC-Bedingungen gefaltet vorliegen (Abbildung 8). Dazu wurden CD-Spektren des Coil-Peptids Azid N-A₃ **1b** mit Coil-Peptid N-B₃ **4** in dem hier optimierten CuAAC-Lösungsmittelgemisch mit PBS/*tert*-Butanol aufgenommen und mit Wasser/*tert*-Butanol bei verschiedenen Temperaturen verglichen. Dargestellt ist hier das in dieser Arbeit verwendete parallele, heterodimere N-A₃B₃ Coiled-Coil. Dies ist unter anderem für mögliche Anwendungen der optimierten CuAAC-Reaktionsbedingungen in Eintopfreaktionen oder biologischen bzw. natürlichen Systemen interessant.

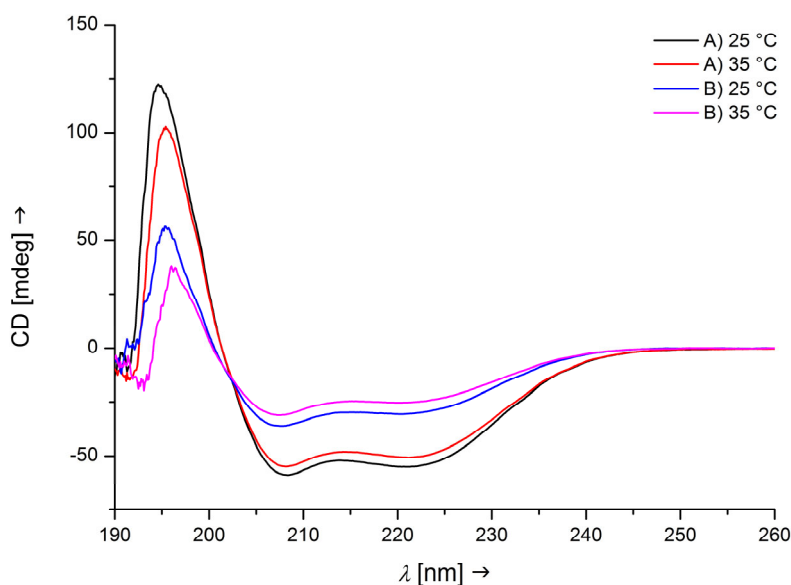
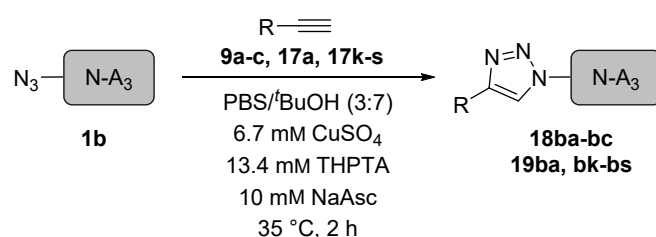


Abbildung 8: CD-Spektren der aus **1b** und N-B₃ **4** gebildeten, parallelen, heterodimeren Coiled-Coils N-A₃B₃ in verschiedenen Puffern und einer Konzentration von 50 µM. A) Neutralisiertes Reinstwasser/*tert*-Butanol (3:7, v/v) und B) PBS/*tert*-Butanol (3:7, v/v) bei verschiedenen Temperaturen. Zur Synthese und Charakterisierung von N-B₃ **4** siehe GROTH *et al.*.^[1,32]

3.3.2 Untersuchungen zur Substratbreite

Vor dem Hintergrund der Etablierung eines allgemeinen Syntheseprotokolls für die Dekoration von Coil-Peptiden wurden die optimierten Bedingungen auf ihre breite Anwendbarkeit hin untersucht (vgl. Tabelle 10 – Eintrag 11). Neben Alkynylpeptidsäuren **17a/17k-o** wurden auch typische Alkin-modifizierte Fluoreszenz- und Affinitäts-Label **17p-s** unter den optimierten Reaktionsbedingungen umgesetzt und sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Substratbreite des optimierten CuAAC-Protokolls.^[1] Die entsprechenden Chromatogramme und Massenspektren sind in Kapitel 5.4.1 gezeigt.



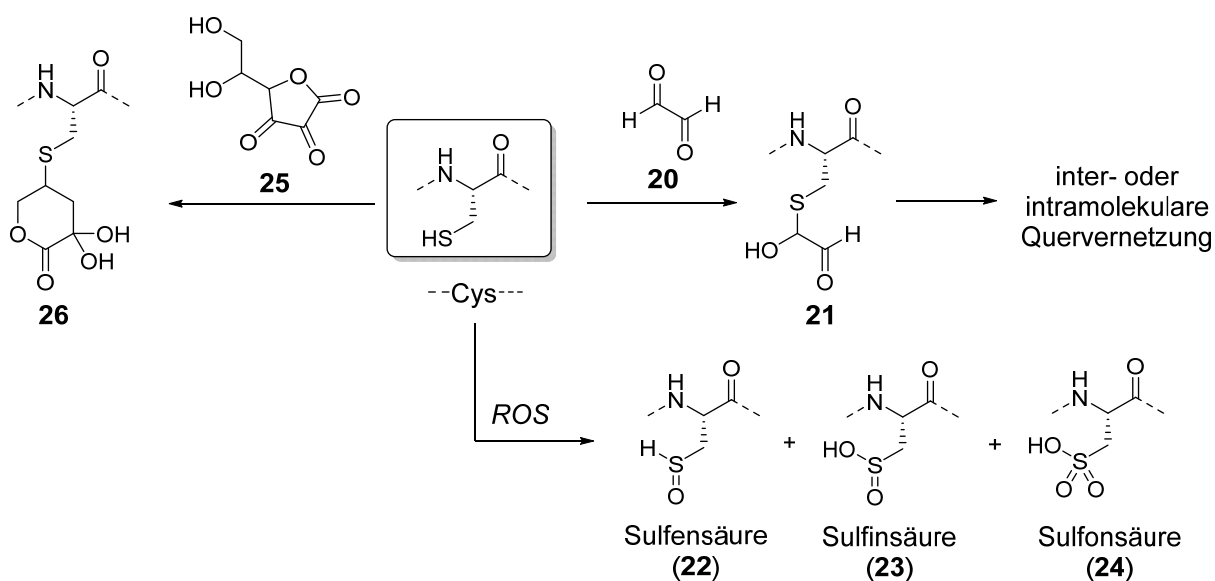
Eintrag	Alkin	Produkt	Ausbeute ^a /%
1	H-AK(Proc)YGFGG-SBn (9a)	18ba	92
2 ^b	H-CK(Proc)YGFGG-SBn (9b)	18bb	~38
3 ^b	Thz-K(Proc)YGFGG-SBn (9c)	18bc	~37
4	H-AK(Proc)YGFGG-OH (17a)	19ba	95
5	H-AK(Proc)YGHGG-OH (17k)	19bk	90
6	H-AK(Proc)YGCGG-OH (17l)	19bl	82
7	H-AK(Proc)YGEKG-OH (17m)	19bm	96
8	H-AK(Proc)YGRGG-OH (17n)	19bn	91
9	H-AK(Proc)YGMGG-OH (17o)	19bo	88
10	Biotin-propargylamid (17p)	19bp	87
11	5-FAM-propargylamid (17q)	19bq	92
12	6-TAMRA-propargylamid (17r)	19br	92
13 ^c	1-Ethynylpyren (17s)	19bs	81

a) Ausbeuten basieren auf der Integration der HPLC-Spuren und der Relation zu umgesetzten Azid **1b** und Reinheit. b) Keine Basislinienseparation von **18bb** und **18bc**. c) Nach 4 h.

Als Peptide wurden Sequenzen analog zu **9a** gewählt, die sich nur in dem AS-Rest in Position 1 und 5 unterscheiden. Durch Substitution des Phenylalanin-Rests (Phe, **17a**) in Position 5 mit

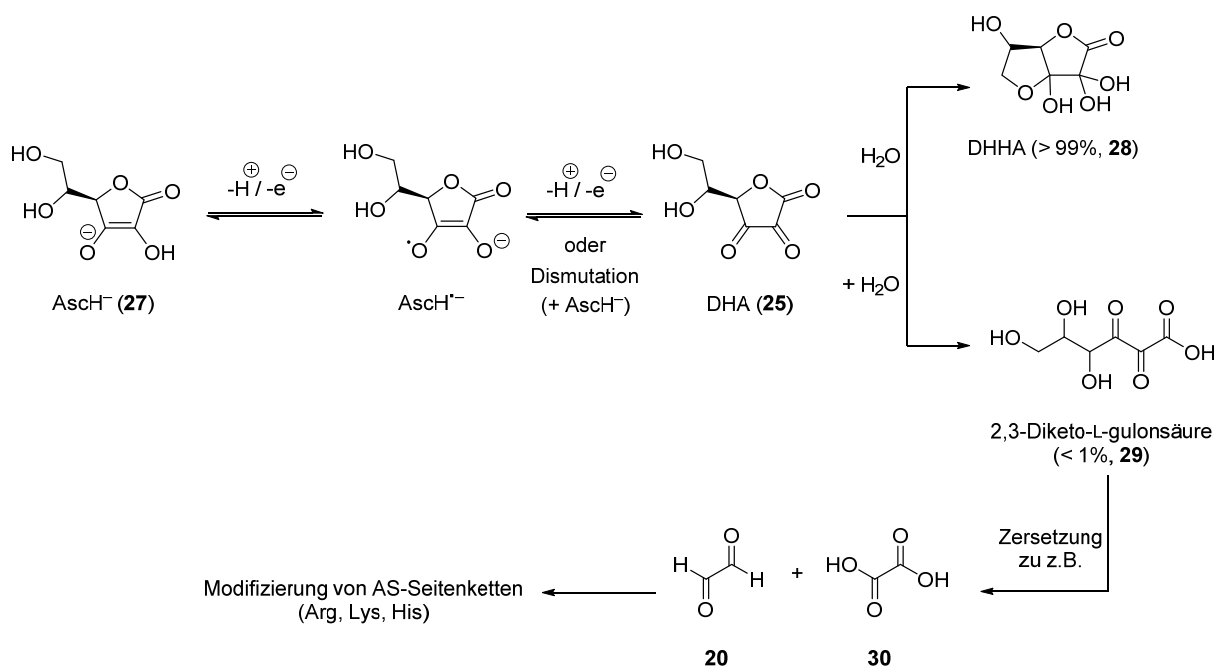
Histidin (His, **17k**), Cys (**17l**), Glutamat (Glu, **17m**), Arginin (Arg, **17n**) und Methionin (Met, **17o**) wurden Aminosäurereste eingeführt, für die im Zusammenhang mit der CuAAC-Reaktion Nebenreaktionen durch Oxidation oder Konjugation mit Ascorbat-Nebenprodukten wie Glyoxal (**20**) berichtet wurden (vgl.

Schema 15).^[121,134,135] Glyoxal (**20**) kann durch eine MAILLARD-Reaktion mit Amino- und Thiol-Gruppen von Biomolekülen zur Bildung von Addukten **21** und Quervernetzungen, sogenannten *advanced glycation end-products* (AGEs, dt. fortgeschrittene Glykierungsendprodukte) führen.



Schema 15: Literaturbekannte Modifikationen am Beispiel von Cystein-haltigen Peptiden und Proteinen innerhalb der CuAAC-Reaktion mit Natriumascorbat als Reduktionsmittel.^[121,134,135]

Ascorbat (**27**) ist ein sehr gutes Antioxidans, welches schnell mit einer Vielzahl an Radikalen zum Ascorbatradikal reagiert und anschließend in einer pH-abhängigen Dismutation zu Dehydroascorbinsäure (DHA, **25**) und Ascorbat (AscH^- , **27**) abreagiert.^[135-137] Diese Dismutation wird durch die Anwesenheit von Phosphationen, wie hier durch die Verwendung von PBS-Puffer, begünstigt.^[136] Eine schematische Darstellung dieser Umsetzung ist in Schema 16 gezeigt.^[138]



Schema 16: Vereinfachte Darstellung der Umwandlung des initial durch Oxidation gebildeten Ascorbatradikals zu DHA (25) und möglicher Folgechemie zu unter anderem Glyoxal (20).

In dieser Arbeit wird Natriumascorbat als Reduktionsmittel zur Reduktion von Kupfer(II) zu Kupfer(I) genutzt. Damit ist Ascorbat (27) auch ein Prooxidans, welches mit Sauerstoff freie Radikale und sogar Wasserstoffperoxid in einer Metall-katalysierten HABER-WEISS Reaktion, auch bekannt als Superoxid-getriebene FENTON-Reaktion, bildet. Diese Reaktion ist genauer in Kapitel 3.3.3 (Schema 17) dargestellt. In einer FENTON-ähnlichen Reaktion wird anschließend Kupfer(I)-katalysiert Wasserstoffperoxid zu Hydroxid und einem Hydroxyl-Radikal gespalten. Eine Autoxidation des Dianions Asc^{2-} mit Luftsauerstoff zum Ascorbat-Radikal $\text{Asc}^{\cdot-}$ und Superoxid $\text{O}_2^{\cdot-}$ ist ebenfalls eine mögliche ROS-Quelle. Aus diesem Grund wurden diese Reaktionen in entgasten Lösungsmitteln durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein detailliertes Protokoll in einer allgemeinen Arbeitsvorschrift (AV16) entwickelt, welches es zulässt, geringe Mengen an *CuAAC-Puffer* ohne Lösungsmittelverlust zuverlässig und reproduzierbar zu handhaben. In nahezu allen Fällen konnte vollständiger Umsatz innerhalb von 2 h erzielt und die Konjugationsprodukte **19ba** bis **19bo** in exzellenten Ausbeuten und Qualitäten erhalten werden. Im Fall des oxidationsanfälligen His (**19bk**, Tabelle 11 – Eintrag 5) sowie dem mit Ascorbat-Nebenprodukten zur Kondensation neigenden Arg (**19bn**, Tabelle 11 – Eintrag 8) konnten neben den Peptidsäuren Phe (**19ba**, Tabelle 11 – Eintrag 4) und Glu (**19bm**, Tabelle 11 – Eintrag 7) auch der Peptidthioester **18ba** (Tabelle 11 – Eintrag 1) an Luft in vergleichbaren Ausbeuten und ohne ungewollte Nebenreaktionen erhalten

werden (siehe Kapitel 5.4.1). Ungewollte Oxidation der Aminosäureseitenketten konnte allein im Spurenbereich der Basislinie der Rohspektren von *N*-Cys (**18bb**, Tabelle 11 – Eintrag 2) und *N*-Thz (**18bc**, Tabelle 11 – Eintrag 3) Peptidthioestern mittels Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS, Massenspektren in Kapitel 5.4.1) detektiert werden. In diesen Fällen konnten Basislinienspuren der entsprechend isolierten (aufgefangenen) CuAAC-Konjugationsprodukte Cys (**18bb**, Tabelle 11 – Eintrag 2 und 3) in Form von wahrscheinlich Sulfensäure (**22**, +O) und Sulfinsäure (**23**, +2O) sowie im entsprechenden Thz **18bc** in Form von vermutlich Sulfoxid (+O) und Sulfon (+2O) zugewiesen werden (vgl. Strukturen in Schema 15). Der Nachweis von Sulfensäure (**22**) muss hierbei mit Skepsis betrachtet werden, da diese instabil ist und in Anwesenheit freier Thiole schnell zum entsprechenden Disulfid abgefangen wird.^[139,140] Überdies zeigten die beiden letztgenannten Umsetzungen der Thioester **9b** und **9c** nur geringe Ausbeuten von rund 37% und 38% an den gewünschten Produkten **18bb** und **18bc**.

Zur Identifikation und Charakterisierung der zu Oxidation neigenden, isolierten CuAAC-Konjugate **18** und **19** sollte die schnell und eigenständig durchführbare MALDI-TOF-MS Analyse durch die Elektrosprayionisation (ESI)-HRMS ergänzt werden. Gerade im Fall der HPLC-gestützten Reaktionsverfolgung dieser komplexen Reaktionsgemische spielte die Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-MS eine signifikante Rolle, da es hier zu schwer interpretierbaren Massenspektren kommen konnte. Diese Ergebnisse konnten anschließend durch HR-MS abgeklärt und damit bestätigt oder widerlegt werden. Zunächst stellte sich hier 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix der Wahl heraus, da bei α -Cyano-4-hydroxymtsäure (CHA) die Laser-induzierte Fragmentierung (z. B. bzgl. Triazolyl-Rest)^[141,142] zu nicht identifizierbaren Spezies mit schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen führte. Dies lässt sich darauf zurückzuführen, dass CHA effizienter ionisiert und die Energie des Lasers stärker auf den Analyten übertragen wird.^[143] Des Weiteren führte bei der Reaktionsverfolgung die Detektion von Matrix-Clustern^[144] im positiven Ionenmodus des MALDI zu schwer-interpretierbaren Massenspektren. Im Einklang mit der Literatur traten auch Lösungsmittelmolekül-Addukte (vornehmlich mit dem Molekülion $[M+H]^+$) und Alkaliion-Addukte auf.^[145] Gerade im Fall von Cysteinylpeptiden oder -proteinen kann es nach WANG *et al.* zu einer Fragmentierung durch intramolekulare Amidbindungsspaltung von protonierten Peptidionen kommen.^[139] Diese wird im ESI (positiven Ionenmodus) durch die Oxidation zu Cysteinsulfinsäure (**23**) oder Cysteinsulfonsäure (**24**) verstärkt. Mechanistisch wird dabei die Cys-AS-Amidbindung durch eine intramolekulare Anhydridbildung zu zwei Peptidfragmenten gespalten.^[139] Im vorliegenden Fall entspräche dies einer Massendifferenz

von ($-103 m/z$). Diese spezielle Art der Fragmentierung von oxidierten Cysteinylpeptiden innerhalb der MS-Analyse konnte jedoch weder in der ESI-MS noch in der MALDI-MS beobachtet werden und spräche im Zweifel gegen eine signifikante Oxidation der *N*-Cysteinyl-Sulflhydrylgruppe von **18bb**.

Die CuAAC-Reaktionen in Tabelle 11 – Einträge 10-13 des Biotin-propargylamids (**17p**) und der Fluoreszenzfarbstoffe 5-Carboxyfluorescein-propargylamid (5-FAM, **17q**), 6-Carboxytetramethylrodhamin-propargylamid (5-TAMRA, **17r**) wie auch 1-Ethynylpyren (**17s**) waren ebenso erfolgreich, wenngleich die CuAAC-Reaktion von **17s** nach 4 h nur eine Ausbeute von 81% des Konjugationsprodukts **19bs** ergab. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der verminderten Reaktivität der mit dem Pyren konjugierten Alkin-Gruppe.

Innerhalb der Click-Chemie und der hier verwendeten CuAAC-Reaktion von Biomolekülen gilt die Arbeit unter Schutzgasbedingungen als unattraktiv und umständlich. Des Weiteren wird oft darauf verwiesen, dass nicht jedes Labor das nötige Equipment oder *Know-How* besitzt und eine Entgasung der Lösungsmittel in solch kleinen Maßstäben umständlich und herausfordernd ist.^[121] Die hier beschriebenen und im Detail in einer Art Schritt für Schritt-Anleitung in Kapitel 5.2.4 des Experimentalteils vorgestellten Bedingungen sind auf das Notwendigste reduziert und optimiert. Sie gewährleisten eine reproduzierbare und erfolgreiche Umsetzung der herausfordernden Peptidsäuren **17** und -thioester **9**. Das Equipment ist in jedem chemischen Labor zu finden und die Durchführung der Experimente ist sowohl zeitlich als auch finanziell nicht anspruchsvoll. Die Möglichkeit eines einfachen Zugangs zu den hier beschriebenen CuAAC-Konjugaten **18** und **19** übersteigt den geringfügigen Mehraufwand der beschriebenen Methodik.

3.3.3 Die CuAAC-Reaktion von *N*-Cysteinylpeptidthioestern in Lösung

Im vorherigen Kapitel 3.3.2 wurden bereits die Ergebnisse mit dem *N*-Cysteinylpeptidthioester **9b** (Tabelle 11 – Eintrag 2) und dem *N*-Thiazolidinylpeptidthioester **9c** (Tabelle 11 – Eintrag 3) vorgestellt, die nun näher erläutert werden sollen. Die Übertragung des entwickelten und breit anwendbaren CuAAC-Protokolls auf den priorisierten *N*-Cysteinylpeptidthioester **9b** (Schema 14, Reaktion B) führte innerhalb von 2 h zu vollständigem Umsatz, zeigte allerdings die Bildung zweier Hauptprodukte (Tabelle 11 – Eintrag 2). Neben dem gewünschten CuAAC-Konjugationsprodukt **18bb** wurde ein Produkt mit einer Massendifferenz von plus 14 in einem Verhältnis von 1.2:1 (ermittelt über Integration der Peakflächen mittels HPLC, Abbildung 9) identifiziert. Im nächsten Schritt wurde die CuAAC-Reaktion mit dem Peptidthioester **9c** durchgeführt, in welchem das *N*-terminale Cys als Thiazolidin (Thz) maskiert worden war (Schema 14, Reaktion C).^[146] Das *N*-Thiazolidin ist ein oft verwendeter *N*-Cystein-Vorläufer in beispielsweise Eintopfligationen, da es als orthogonale Schutzgruppe genutzt wird, die nach erfolgter Ligation des aktivierten *C*-Terminus durch Kupfer(II), durch *O*-Methylhydroxylamin in Lösung oder durch Palladium(II) gespalten werden kann und im Anschluss einer neuerlichen NCL zur Verfügung steht.^[97,130,147] Wie bereits von LEE *et al.* beschrieben, konnte hier die partielle Spaltung des Thiazolidins unter CuAAC-Bedingungen nachgewiesen werden.^[130] Auf diese Weise wurde neben dem als Thiazolidin-geschützten Konjugationsprodukt **18bc** auch das Konjugationsprodukt mit freiem *N*-terminalem Cys **18bb** in 53 % Ausbeute erhalten. Interessanterweise waren die HPLC-Spuren der CuAAC-Reaktionen von **9b** mit **1b** (Schema 14, Reaktion B; Abbildung 9A) und **9c** mit **1b** (Schema 14, Reaktion C; Abbildung 9B) sehr ähnlich. Wie in Abbildung 9 gezeigt, besaß das hauptsächliche Nebenprodukt in Abbildung 9B die gleiche Retentionszeit wie **18bc** in Abbildung 9A mit identischer Masse. Dies führte zu dem Schluss, dass unter diesen Bedingungen des CuAAC-Protokolls das freie *N*-terminale Cys zum *N*-Thz formyliert wurde.

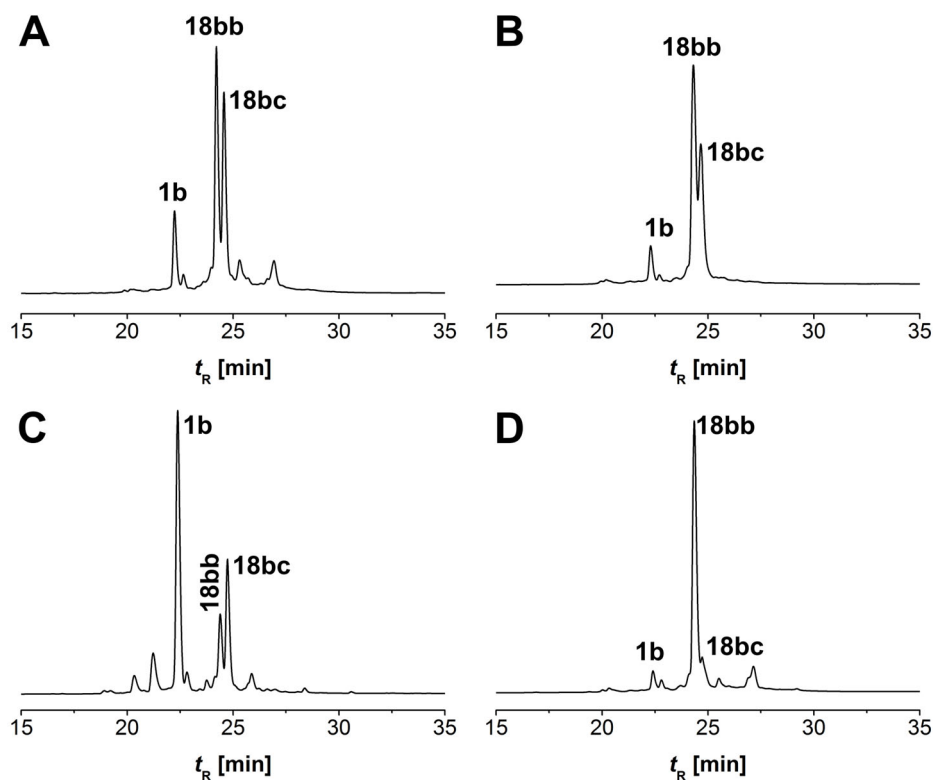
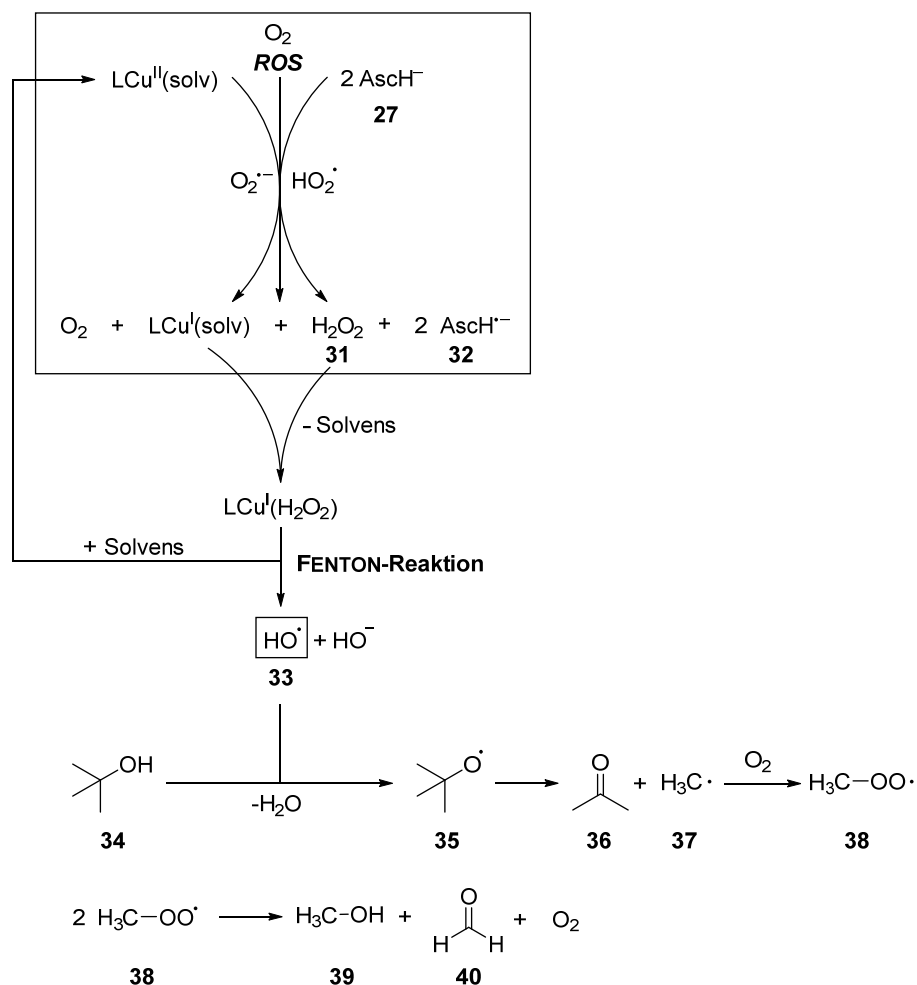


Abbildung 9: Analytische HPLC-Spuren (Gradient 30-60% Acetonitril in Wasser mit 0.1% TFA, 50 °C) bei 280 nm der CuAAC-Reaktion von *N*-Cysteinylopeptidthioester **9b** (A, C-D) und *N*-Thiazolidinylpeptidthioester **9c** (B) mit Azid $N-A_3$ **1b** in Anwesenheit von 13.4 mM THPTA (A-B), 33.5 mM THPTA (C) und 3.4 mM THPTA (D).

Die Gleichgewichtsreaktion von Cystein und Formaldehyd unter der Bildung des Thiazolidinkondensationsprodukts ist bekannt.^[148-150] Zur Identifizierung der Formylquelle wurden die während der CuAAC-Reaktion ablaufenden Reduktions-Oxidations-Reaktionen genauer betrachtet und in Schema 17 skizziert.



Schema 17: Bildung von Formaldehyd (**40**) ausgehend von *tert*-Butanol (**34**) und Hydroxylradikalen (**33**). Hydroxylradikale werden innerhalb der CuAAC-Reaktion in einer FENTON-Reaktion gebildet.^[151-154]

Die Reduktion von Kupfer(II) zu Kupfer(I) durch Ascorbat **27** führt zur Bildung von Spuren an Wasserstoffperoxid (**31**), das weiter innerhalb einer Kupfer(I)-vermittelten FENTON-artigen Reaktion zu Hydroxylradikalen **33** disproportionieren kann.^[153] Es ist hinlänglich bekannt, dass *tert*-Butanol (**34**) ein wirksamer Hydroxylradikalfänger ist.^[151,152] Dies macht die Verwendung dieses Lösungsmittels in der Konjugation von Biopeptiden attraktiv und wird gerade in diesem Einsatzgebiet beworben und erfolgreich eingesetzt, wenngleich nicht in Funktion eines Radikalfängers.^[121] In der Literatur, hier im Speziellen der Troposphärenchemie, ist gut beschrieben, dass *tert*-Butanol (**34**) unter Einfluss von UV-Licht oder Ozon zu Aceton (**36**) und einem Methylradikal (**37**) zerfällt.^[154] In dem hier vorliegenden Fall ist allerdings die Bildung eines *tert*-Butoxid-Radikals (**35**) durch Reaktion mit einem Hydroxylradikal (**33**) wahrscheinlich, das dann zu Aceton (**36**) und einem Methylradikal (**37**) zerfällt. Dieses Methylradikal kann von einem Sauerstoffmolekül weiter zu einem Methylperoxyradikal (**38**) oxidiert werden, das wiederum zu Methanol (**39**),

Sauerstoff und Formaldehyd (**40**) disproportionieren kann.^[155] Die letztgenannte Reaktion verläuft über eine Tetroxid-Spezies in Form eines zyklischen Übergangszustands nach RUSSEL, weshalb auch von einem RUSSEL-type Mechanismus gesprochen werden kann.^[156,157] Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die CuAAC-Reaktion von **9b** und **1b** in vollständig deuteriertem *tert*-Butanol unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels hochaufgelöster ESI-MS charakterisiert (Abbildung 10). Im direkten Vergleich zu der zuvor durchgeführten CuAAC-Reaktion in nicht-deuteriertem *tert*-Butanol besaß das Nebenprodukt eine um 2 erhöhte Masse (Abbildung 10C). Dieses Ergebnis bestätigte, dass ausschließlich deuteriertes Formaldehyd eingebaut wurde und bestätigte zudem, dass *tert*-Butanol in der Tat die gesuchte Formylquelle darstellte.

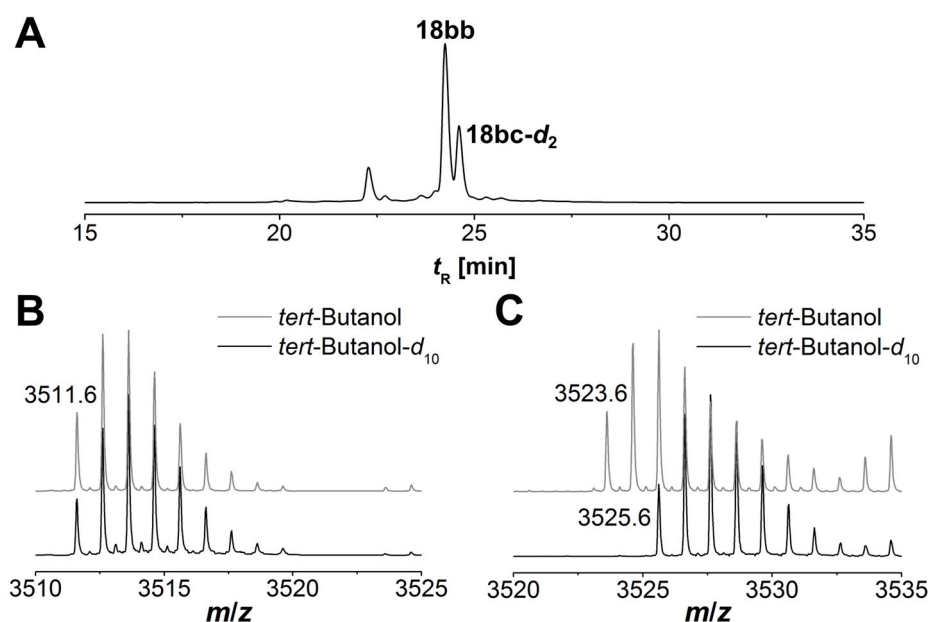
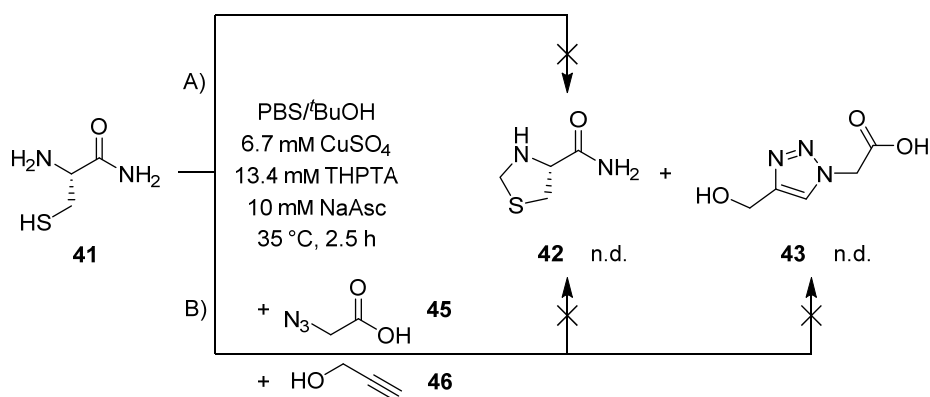


Abbildung 10: CuAAC des *N*-Cysteinylpeptidthioesters **9b** an Azid N-A₃ **1b** in *tert*-Butanol-d₁₀ und in Anwesenheit von 13,4 mM THPTA. A) Analytische HPLC-Spur bei 280 nm der Reaktion nach 2 h. B) Hochaufgelöste ESI-Massenspektren der Konjugationsprodukte **18bb** und C) der formylierten Konjugationsprodukte **18bc** der Reaktionen in *tert*-Butanol-d₁₀ und *tert*-Butanol.

Versuche zum Nachweis von sich frei in Lösung befindlichem Formaldehyd (**40**) mit Cysteamid (**41**) oder einem unspezifischen Aldehyd-Nachweis mit dem Schiffsreagenz (Fuchsin), das zu einer violetten Färbung der Proben führen sollte, waren nicht erfolgreich. Wie in Kapitel 5.3.9 beschrieben, wurde Cysteamid (**41**) mit dem hier beschriebenen CuAAC-Puffer behandelt und mittels ESI-MS untersucht. Ebenfalls wurde der Versuch in Anwesenheit von Propargylalkohol (**46**) und Azidoessigsäure (**45**) zur Evaluation des

Einfluss des CuAAC-Katalysezyklus wiederholt. In beiden Fällen konnte L-Thiazolidin-4-carbonsäure (**42**) nicht nachgewiesen werden (Schema 18).



Schema 18: Abfangversuche von Formaldehyd (**40**) mit Cysteamid (**41**) unter den vorgestellten CuAAC-Bedingungen A) allein im CuAAC-Reaktionspuffer und B) in Anwesenheit eines Azids **45** und Alkins **46**.

Im Fall der CuAAC-Reaktion (Schema 18B) konnte keinerlei Produktbildung an **43** nachgewiesen werden und legt die Vermutung einer Inhibierung des Katalysezyklus durch freies Cysteamid (**41**) nahe. Die Versuche mit Fuchsin (Schiffsreagenz) besaßen keine Aussagekraft, da alle Proben sich analog der Blindproben (beispielsweise Wasser) verhielten und sich mit der Zeit violett färbten.

Von den bereits beschriebenen mechanistischen Überlegungen wurde abgeleitet, dass durch die Zugabe von Wasserstoffperoxidfängern die Formaldehydbildung unterdrückt werden kann. Dies sollte als Konsequenz die CuAAC-Reaktion von *N*-Cysteinylpeptiden ermöglichen. Ausführliche Studien von HONG *et al.* identifizierten das bereits hier erfolgreich eingesetzte THPTA als Opferliganden (*Scavenger*, selbstopfernder Reduktant), der sich teilweise während der CuAAC-Reaktion unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid zersetzt und damit ROS in der Koordinationssphäre des Kupfers zum Zeitpunkt der Entstehung abfängt.^[121,158] SEMENOV *et al.* konnten diese schützende Eigenschaft mittels NMR-Reaktionsverfolgung für THPTA beobachten, aber die Struktur des gebildeten Produkts nicht definieren.^[159] Das Problem der Metall-katalysierten HABER-WEISS-Reaktion, einer Superoxid-angetriebenen FENTON-Reaktion, innerhalb der CuAAC-Reaktion konnte überdies quantifiziert und die Wasserstoffperoxid-Konzentration und damit die Hydroxylradikal-Konzentration im zeitlichen Verlauf mit und ohne THPTA-Liganden (bei verschiedenen Cu(II)- und NaAsc-Konzentrationen) bestimmt werden.^[121] Dabei wurde gezeigt, dass mit THPTA-Liganden die Konzentration an Wasserstoffperoxid nach 60 min Reaktionszeit sehr

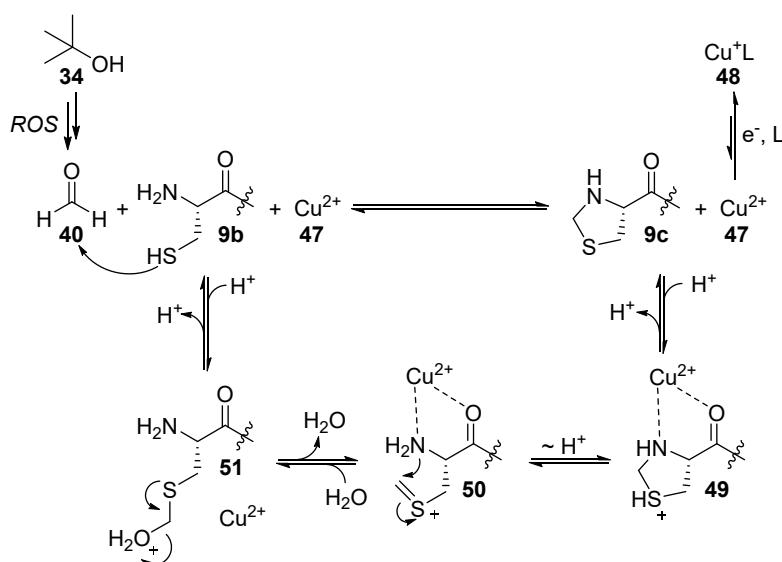
gering bis vernachlässigbar klein gehalten werden kann. Nichtsdestotrotz war die Wasserstoffperoxid-Konzentration in allen Fällen innerhalb der ersten 10 min der CuAAC-Reaktion hoch und sank erst im weiteren Verlauf der Reaktion. Vor diesem Hintergrund wurde folglich die Menge an Ligand von 13.4 mM Konzentration (CuSO₄/THPTA (1:2)) zu 33.5 mM Konzentration (CuSO₄/THPTA (1:5)) erhöht. In Übereinstimmung mit der Literatur war die CuAAC-Reaktion signifikant verlangsamt. Allerdings änderte sich überraschenderweise das Verhältnis von nicht-formyliertem **18bb** zu formyliertem Konjugationsprodukt **18bc** zugunsten des unerwünschten **18bc** (Abbildung 9C). Dies indizierte, dass auch hier die ROS-Bildung nicht vollständig unterdrückt worden war, und legt im Kontext der Studien HONGS *et al.* die Vermutung nahe, dass die in der Anfangsphase (Induktionsphase) gebildeten ROS vornehmlich bei der Reorganisation des Katalysators und beim Durchlaufen der ersten Katalysezyklen der CuAAC-Reaktion zur Bildung von Formaldehyd führten.^[121] Laut der Literatur ist die Art und Weise dieser Reorganisation des Katalysators bzw. der katalytisch aktiven Spezies noch unbekannt und damit rein hypothetisch.^[133] Die Reaktion wurde somit mit wesentlich geringerer Menge an THPTA (3.4 mM) durchgeführt. Das Startmaterial war nach 2 h nahezu vollständig umgesetzt und das gewünschte Produkt **18bb** wurde in präparativ sinnvollen 74% Ausbeute erhalten, wobei 9% des formylierten Produkts **18bc** gebildet wurden (Abbildung 9D).

Zusammenfassend wurde ein robustes und schnelles CuAAC-Protokoll für die Konjugation von Azid-Coil-Peptiden **1** mit *N*-Cysteinylopeptidthioestern **9b** und anderen anspruchsvollen Verbindungen präsentiert, welches nun auf größere Ansätze übertragen werden musste. Als präparatives Problem stellte sich bei 500 nmol-Ansätzen (bzgl. eingesetztem Azid **1**), also der fünffachen Menge der hier beschriebenen Optimierungsarbeiten, die große Menge an eingesetztem *tert*-Butanol (350 μ L) heraus. Dieses führte bei direkter semipräparativer HPLC-Aufreinigung der Reaktionsgemische neben der Entgasung auf der Umkehrphase zu keiner Trennung, was eine direkte Aufreinigung nicht ermöglichte (vgl. *Upscaling* in Kapitel 3.3.1). Eine Gefriertrocknung, wie bei dem *N*-Ala-CuAAC-Konjugat **18ba** mit anschließender HPLC war durch die Bildung von Aggregaten und entsprechenden Disulfiden nicht gangbar. Dieses Problem wurde durch das Behandeln des Reaktionsgemischs nach 2 h Reaktionszeit mit einer entgasten, wässrigen Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)-Lösung (2.72 mM, 50 μ L) für 5 min und anschließendem Verdünnen mit entgastem Wasser (+ 0.1% TFA, 955 μ L) gelöst. Die TCEP-Lösung diente dazu, möglicherweise entstandenes Disulfid von **18bb** zu spalten. Der Einsatz eines Überschusses an entgastem Wasser ermöglichte in der

Folge eine direkte semipräparative HPLC-Aufreinigung. Ein detailliertes Protokoll ist in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift AV17 (Kapitel 5.2.4) festgehalten. Auf diese Weise konnten die gewünschten *N*-Cys-CuAAC-Konjugate **18** in präparativ-sinnvollen Mengen erhalten werden.

3.3.4 Mechanistische Betrachtungen der CuAAC-Reaktion von *N*-Cysteinylpeptiden

Anhand der zuvor erhaltenen Ergebnisse lässt sich der folgende Reaktionsmechanismus für die Formylierung von freiem *N*-Cystein innerhalb der CuAAC in wässrigem *tert*-Butanol (**34**) postulieren (Schema 19).



Schema 19: Hypothetischer Mechanismus der Formylierung von *N*-Cysteinylpeptiden **9b** (oder **18bb**) während der CuAAC in wässrigem *tert*-Butanol (**34**).

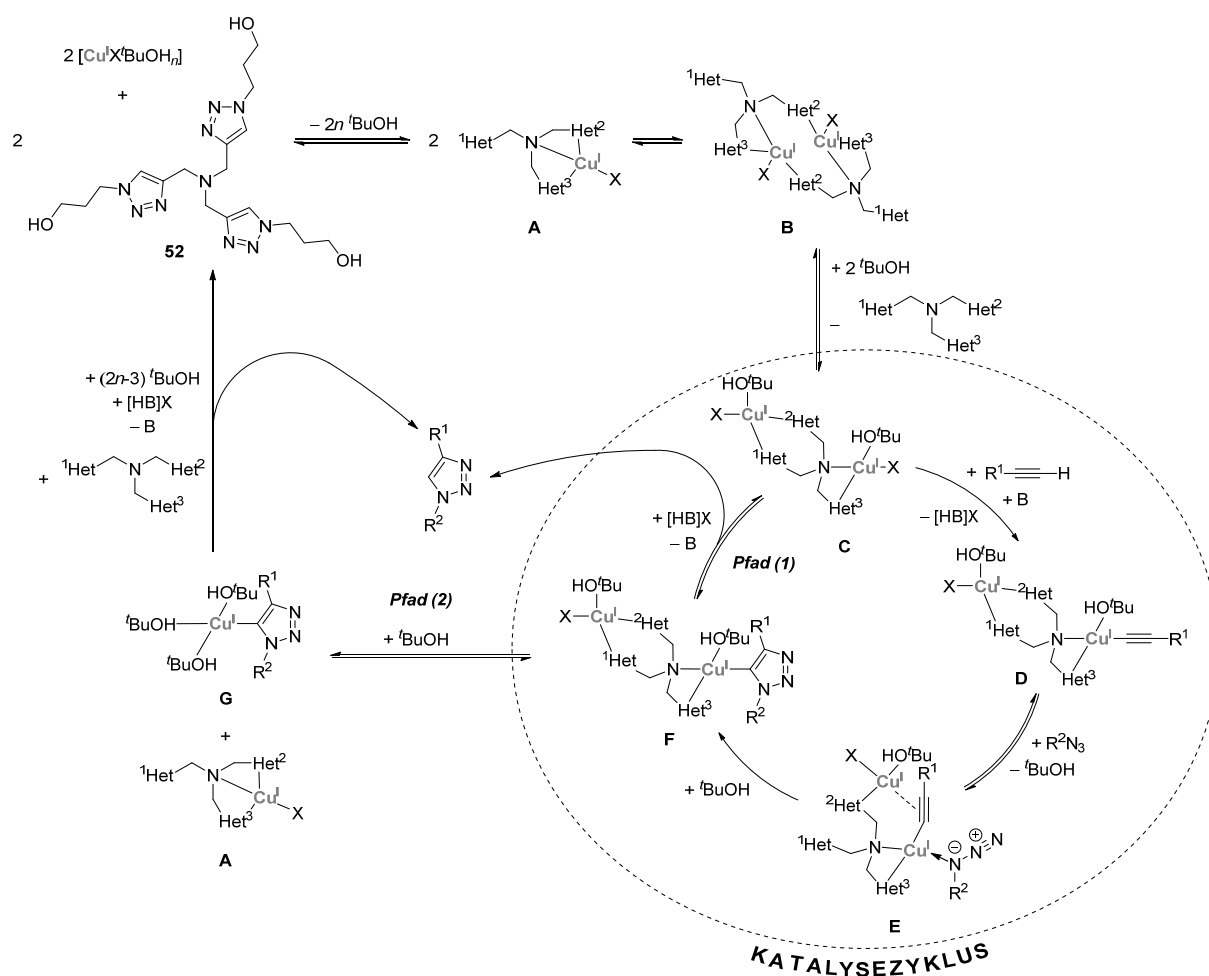
Wie in Schema 19 gezeigt, wird Formaldehyd (**40**) durch die Oxidation von *tert*-Butanol (**34**) durch ROS und schrittweiser Zersetzung der oxidierten Spezies gebildet (detailliert siehe Schema 17). Die 1,2-Addition der Sulfhydrylgruppe **9b** an die Carbonylgruppe des Formaldehyds (**40**) und anschließende Eliminierung von Wasser führt zu dem Thioniumion **50**. Dieses ist ein hochreaktives Elektrophil, welches mit der terminalen Aminogruppe eine nucleophile Additionsreaktion eingeht und die Thiazolidin-Spezies **9c** bildet. Die Spaltung des Thiazolidins hingegen wird durch Kupfer(II) (**47**) katalysiert, welches durch den Stickstoff im Ring und die Carbonylgruppe der Amidbindung in **49** komplexiert ist.^[160,161] Dies schwächt das *N,S*-Acetal und fördert erheblich die Rückreaktion zu Cystein **9b**.

Die beobachtete, wesentlich langsamere Spaltung des Thiazolidins **9c** bzw. **18bc** aus Abbildung 9C (Kapitel 3.3.3) bei höheren Mengen an THPTA lässt sich dadurch erklären, dass der THPTA-Ligand Kupfer(I) stabilisiert und damit anreichert, während die Menge an Kupfer(II) reduziert wird. Gleichzeitig wird die Reaktionsgeschwindigkeit der CuAAC-Reaktion stark verlangsamt. Eine Konkurrenz von Ligandmolekülen und dem Azidsubstrat um freie Koordinationsstellen am Kupfer(I)zentrum des katalytisch aktiven Kupfer(I)acetylid-Komplexes innerhalb des Katalysezyklus ist dabei denkbar. FINN *et al.* teilten verschiedene Liganden in umfassenden Studien in drei verschiedene Klassen ein, und zwar in Bezug auf ihre Bindungsfähigkeit, kinetische Geschwindigkeitsordnung und katalytische Leistung.^[162] Das in dieser Arbeit verwendete THPTA gehört zu Liganden der *Klasse I*, die in Form ihrer Triazolyle eine im Vergleich zu Pyridyl oder Benzimidazolyl geringere Affinität gegenüber Kupfer(I)ionen besitzen. Es koordiniert somit schwach an Kupfer(I)ionen und behält auch in wässriger Lösung im Gemisch mit organischen Lösungsmitteln bei einem Überschuss an Ligand von $\geq 2:1$ (Ligand:Kupfer(I)-Verhältnis) seine hohe katalytische Aktivität. Das konnte in der Optimierungsarbeit der CuAAC-Reaktion in Kapitel 3.3.1 bestätigt werden. Diese Beobachtung beruht laut FINN *et al.* auf den relativen Donorstärken der eingesetzten Lösungsmittel.^[162] So sind beispielsweise Dimethylsulfoxid (DMSO) oder *N,N*-Dimethylformamid (DMF) starke Donor-Lösungsmittel, während Wasser ein sehr schwacher Donor ist. Alkohole gelten ebenfalls als relativ starke Donor-Lösungsmittel, allerdings schwächer als DMSO oder DMF. Daher können Liganden der *Klasse I* durch Lösungsmittelmoleküle wie dem hier verwendeten *tert*-Butanol (**34**) am Metallzentrum verdrängt werden. Auf diese Weise können sie durch ihren Donorcharakter die Ligandbeschleunigte CuAAC-Katalyse stören.^[133] Es ist unwahrscheinlich, dass der Einfluss des Lösungsmittels in diesem Fall die CuAAC-Reaktion verlangsamt, wenn ein großer Überschuss an Ligand vorhanden ist, daher ist die Annahme einer verlangsamenen Konkurrenz des Liganden mit den Substraten am wahrscheinlichsten. RODIONOV *et al.* zeigten am Beispiel eines Benzimidazolyl-Liganden (ebenfalls *Klasse I*), dass mit weniger eingesetztem Ligand eine anfänglich schnellere Reaktion beobachtet wurde.^[163] Der geringfügige Verlust an Aktivität wurde auf die Möglichkeit der Gleichgewichtsverschiebung zwischen verschiedenen aktiven Katalysatorspezies zurückgeführt, welche entscheidend für unterschiedliche, multinukleare Kupferaggregate erscheint.^[133,163,164] Allerdings wurden von KENNEDY *et al.* auch berichtet, dass THPTA erheblich das Kupfer(II)/Kupfer(I)-Redoxpotential moduliert und damit auch die FENTON-Chemie (ROS) maßgeblich beeinflusst.^[165] CHAN *et al.* konnten mit Cyclovoltametriemessungen zeigen, dass das Redox-

Ergebnisse und Diskussion

Potential des Cu(I)/Cu(II)-Paares beim Wechsel von Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA) zu THPTA um etwa 300 mV steigt.^[166] Ein Einfluss des Redoxpotentials auf die Bildung und Spaltung des Thiazolidins **9c** und **18bc** kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

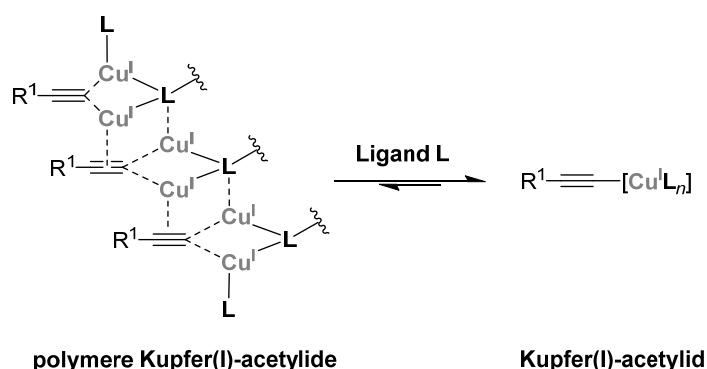
Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit dem von PRESOLSKI *et al.* im Jahr 2010 vorgeschlagenen CuAAC-Reaktionsmechanismus in Anwesenheit von tripodalen Tris(heteroarylmethyl)amin-Liganden wie dem in dieser Arbeit eingesetzten THPTA (**52**) unter Beachtung der koordinierenden Lösungsmittel-Moleküle und inhibierender Spezies (Schema 20).^[167]



Schema 20: Abgewandelte schematische Darstellung des Ligand-beschleunigten Katalysemechanismus mit tripodalen Tris(heteroarylmethyl)amin-Liganden, hier THPTA (**52**), nach PRESOLSKI *et al.*^[133,167] Mit einbezogen wurde die Koordination von Lösungsmittelmolekülen, hier *tert*-Butanol (**34**), und inhibierende Spezies (mit Base (B), Halogeniden (X), n = ganze Zahlen und Het = koordinierende Heteroaryls substituenten der tripodalen Liganden, hier Triazolyl).

Der vorgestellte Mechanismus der FENTON-Reaktion zur Entstehung von Formaldehyd (Schema 17) und des postulierten Mechanismus der Thiazolidin (**9c** und **18bc**)-Bildung und -Spaltung (Schema 19) verlaufen vermutlich simultan zum oder innerhalb des in Schema 20 skizzierten Mechanismus. Dabei sollte der vorgeschlagene Mechanismus der Kupfer(II)-katalysierten Bildung und Spaltung des Thiazolidins aus Schema 19 wahrscheinlicher in einem vom Katalysezyklus getrennten Pfad mit Kupfer(II)ionen ablaufen.

Nach FOKIN *et al.* ist der größte Vorteil des Einsatzes von Hilfsliganden, wie TBTA oder THPTA (**52**), eine ausgewogene Koordinationschemie mit Kupfer(I)ionen. Sie binden weder zu stark, was eine Koordination des Alkins oder Azids erschweren oder verhindern würde, noch binden sie zu schwach, was wiederum der katalytisch aktiven Kupfer(I)acetylid-Spezies erlauben würde polymere Spezies zu bilden. Solche polymeren Spezies sind unreaktiv in der CuAAC-Reaktion (Schema 21).^[168]



Schema 21: *Off-Cycle*-Gleichgewicht zwischen unreaktiven Kupfer(I)acetylide (*links*) und katalytisch aktiven monomerem Kupfer(I)acetylid (*rechts*) nach HEIN *et al.* in Anwesenheit geeigneter Liganden (L).^[168]

Ebenfalls katalytisch inaktiv, sind nach PRESOLSKI *et al.* die in Schema 20 gezeigten Kupfer(I)-Komplexe **A** und **B**. Diese Komplexe werden aus dem *in situ* dargestellten, solvatisierten Präkatalysator $[\text{Cu}^{\text{I}}\text{X}(\text{tBuOH})_n]$ in Anwesenheit von THPTA-Liganden (**52**) im Überschuss gebildet (oder wenn dieser zu stark bindet). Als Gegenion kann neben anderen anionischen Liganden des Reaktionsgemisches (Sulfat, Phosphat) vor allen Dingen von Chlorid aus dem in dieser Arbeit verwendeten PBS-Puffer ausgegangen werden. Chlorid-Ionen besitzen eine Affinität gegenüber Kupfer(I)ionen, welche vergleichbar zu der von Aziden ist.^[163] Die Chlorid-Ionen können auch die CuAAC-Reaktion verlangsamen oder

sogar verhindern, da sie einen großen Einfluss auf die Speziierung¹ und Nuklearität¹ von Acetylidkomplexen besitzen, wenngleich diese immer polynukleare Strukturen aufweisen.^[133,169,170] Wie Dichtefunktionstheorie (DFT)-Studien zeigten, kann durch das Fehlen eines weiteren Kupferzentrums im mononuklearen Komplex **A** der *C-N*-Bindungsbildende Schritt nicht beschleunigt werden.^[171,172] Im Komplex **B** hingegen sind beide Kupfer(I)-Ionen koordinativ gesättigt, so dass das Azid schlecht oder nicht gebunden werden kann. Durch die Verwendung von THPTA hingegen kann dieser durch den Austausch mit Lösungsmittel-Liganden, hier am Beispiel von *tert*-Butanol, zum katalytisch aktiven Komplex **C** reagieren. In Anwesenheit von Base, wie z.B. NaAsc, kann der Acetylid-Komplex **D** gebildet werden. Die Bildung des Kupfer(I)-Alkin π -Komplexes, der eine Deprotonierung des Alkins in diesem Schritt erlaubt, wurde in Schema 20 ausgespart. Unter Verdrängung eines weiteren Lösungsmittel-Liganden koordiniert anschließend das Azid in Komplex **E** an das gleiche Kupfer(I)-Ion des Acetylidkomplexes, was den *C-N*-Bindungsbildungsschritt erlaubt. Auf diese Weise wird der Kupfer(I)-triazolid-Komplex **F** unter Koordination eines Lösungsmittel-Liganden gebildet. Dieser Komplex **F** kann nun auf zwei Wegen abgebaut werden, was die Gesamtgeschwindigkeitsordnung der Reaktion in Bezug auf die Konzentration an Kupfer(I)-Ionen und Ligand entscheidet. In schwachen Donorlösungsmitteln bleibt der dinukleare Komplex intakt und durch Protonierung wird der Ausgangskomplex **C** unter Freisetzung des 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazol-Produkts zurückgebildet. Diese nach *Pfad 1* verlaufende Reaktion führt zu einer Reaktion 1. Ordnung in Abhängigkeit zur Konzentration des dinuklearen Kupfer(I)-Katalysators, da es zu keiner Änderung der Anzahl an Kupfer(I)-Ionen kommt. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist mit $k \cdot c(\text{Cu}_2\text{L})$ gegeben. In starken Donorlösungsmitteln hingegen kann davon ausgegangen werden, dass der dinukleare Komplex **F** über *Pfad 2* in zwei unterschiedliche, mononukleare Komplexe **A** und **G** zerfällt. Da ein THPTA-Ligand und zwei Kupfer(I)-Zentren sich zurückfinden müssen, ist dieser *Pfad 2* in Übereinstimmung mit einer Reaktion 2. Ordnung in Abhängigkeit zur Konzentration an Kupfer(I). In diesem Fall, nach dem auch wahrscheinlich größtenteils die Reaktion in wässrigem *tert*-Butanol verläuft, ist die Geschwindigkeit der Reaktion durch $k \cdot c^2(\text{Cu}^I) \cdot c(\text{L})$ gegeben. Der Kupfer(I)-triazolid-Komplex **G** reagiert analog Komplex **F** unter Protonierung zum gewünschten Produkt. Durch den Austausch von Lösungsmittelliganden mit einem THPTA-Liganden wird in Verbindung mit Komplex **A** die katalytisch aktive Spezies **C**

¹ Speziierung: Vorgang (chemisch) der Bildung chemischer Formen einer Substanz. Nuklearität: Die Anzahl an Metallatom-Zentren in einem Komplex, Cluster oder allgemein einer Koordinationsverbindung.

Ergebnisse und Diskussion

zurückgebildet. Es erscheint somit anschaulich, dass durch die Koordination und den ständigen Austausch der Lösungsmittel-Liganden in Anwesenheit von Restsauerstoffmengen und damit Wasserstoffperoxid im Reaktionsgemisch eine Bildung von Formaldehyd über die FENTON-Reaktion (vgl. Schema 17) innerhalb des beschriebenen CuAAC-Mechanismus möglich ist. *tert*-Butanol (**34**) könnte somit ROS noch vor den THPTA-Liganden (**52**) abfangen und selbst als eine Art Opferligand agieren.

Neben den hier vorgestellten optimierten Bedingungen mit einem Kupfer(II)-zu-Ligand-Verhältnis von 2:1 wurde auch die Reaktion in Abwesenheit von THPTA untersucht und zwischen den Umsetzungen von *N*-Cys **9b** und *N*-Thz **9c** verglichen (Abbildung 11).

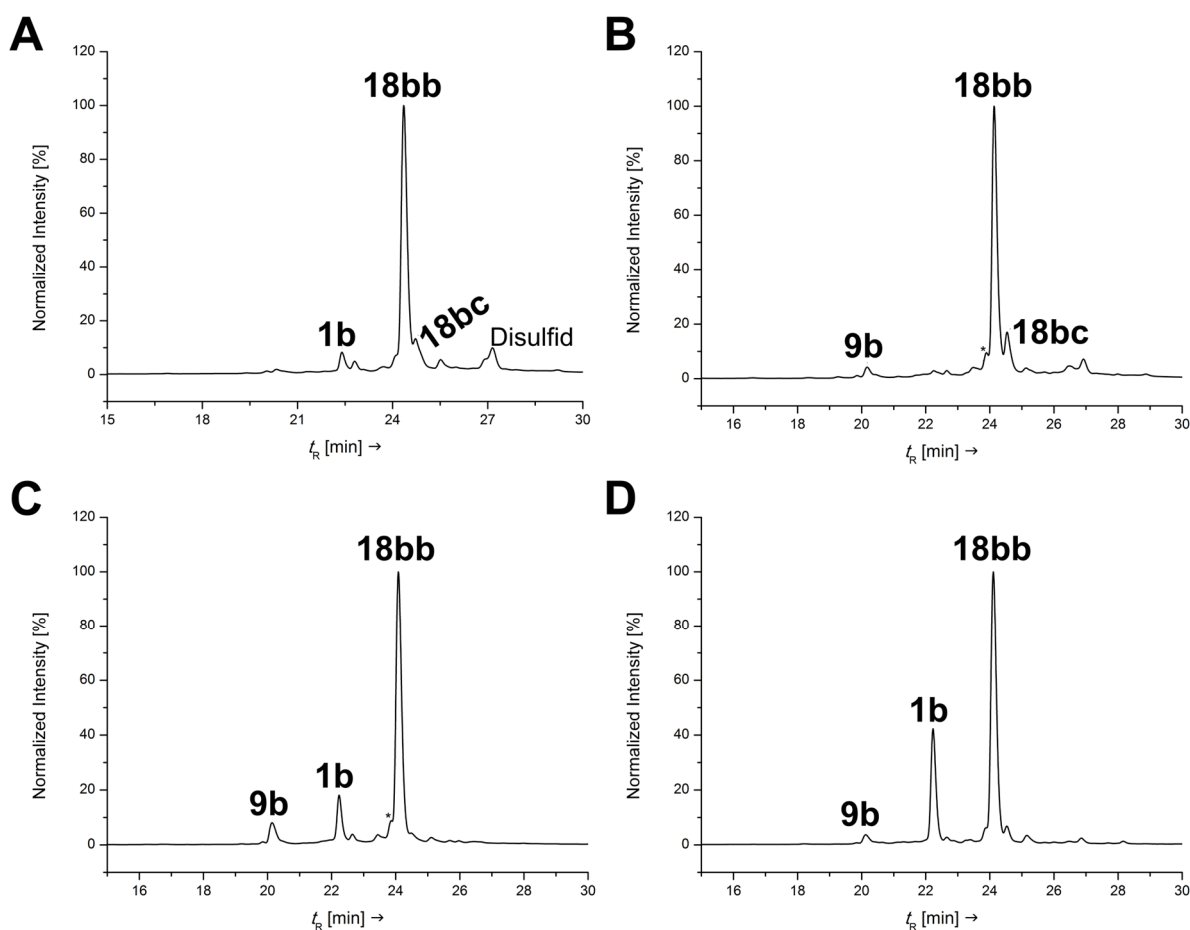


Abbildung 11: Analytische HPLC-Spuren (Gradient 30-60% Acetonitril in Wasser mit 0.1% TFA, 50 °C) der CuAAC-Reaktion von **9b** (A und C) bzw. **9c** (B und D) mit **1b** nach 2 h Reaktionszeit. A-B) mit einem CuSO₄/THPTA-Verhältnis von 2:1 (6.7 mM/3.4 mM) und C-D) mit CuSO₄ in Abwesenheit von THPTA (6.7 mM).

Es zeigte sich, dass ausgehend von *N*-Thz **9c** die durch Cu(II)-katalysierte Spaltung des Thiazolidins zu Formaldehyd zu einer drastischen Verlangsamung der CuAAC-Reaktion in

Abwesenheit von THPTA führt (Abbildung 11D). Im Verhältnis von 2:1 (Abbildung 11B) hingegen ist diese vergleichbar mit der hier im Detail besprochenen Reaktion mit *N*-Cys **9b** (Abbildung 11A). Für die Reaktion in Abwesenheit von Ligand (Abbildung 11C) wurden im Chromatogramm nur Spuren an formyliertem **18bc** und während der HPLC-unterstützten Reaktionsverfolgung über 2 h keinerlei Bildung von **9c** nachgewiesen. Dies wird durch die von KENNEDY *et al.* berichtete Beeinflussung des Redox-Potentials des Cu(II)/Cu(I)-Systems gestützt und gibt damit einen Hinweis darauf, dass der THPTA-Ligand selbst maßgeblich zur Bildung von Formaldehyd beitragen könnte.^[165] Die CuAAC-Reaktion selbst müsste jedoch über einen etwas anderen als den in Schema 20 dargestellten Ligand-beschleunigten Mechanismus verlaufen. Obwohl schlussendlich die Ergebnisse den postulierten Mechanismus unterstützen, kann eine Korrelation zwischen der eingesetzten Menge an Ligand und einer Erhöhung von ROS, welche schlussendlich zu Formaldehydbildung führen, nicht ausgeschlossen werden. Ebenso kann bei den angegebenen HPLC-Ausbeuten nicht von „gebildetem“, formyliertem CuAAC-Konjugationsprodukt **18bc** gesprochen werden, da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion zwischen **18bc** und **18bb** handelt. Dabei kann zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage über die tatsächlich vorliegende Menge an Formaldehyd unter den verschiedenen Bedingungen getroffen werden. Es ist anzunehmen, dass die Menge an nicht komplexiertem Cu(II) die Rückreaktion in Schema 19 maßgeblich beeinflusst. Überdies bleibt unbekannt, inwieweit die Sulfhydrylgruppe des *N*-Cysteins, neben dem Einfluss von THPTA (**52**), die Reduktions-Oxidationschemie in Kupfer(II)/Kupfer(I) beeinflusst. Ein direkter Vergleich eines Einsatzes von TBTA anstelle von THPTA als Hilfsligand könnte hier Antworten liefern. Erst jüngst berichteten CALVO *et al.* in einer ausgiebigen Studie, am Beispiel des humanen Kupfer-bindenden Proteins Metallothionein-3 (MT-3), von Cu(I)₄-Thiolat (CysS₅₋₆)-Clustern mit ungewöhnlicher Inertheit gegenüber Sauerstoff.^[173]

3.3.5 Weitere Bedingungen der CuAAC-Reaktion in Lösung

Zur Vollständigkeit sei genannt, dass neben dem in Kapitel 3.3.3 beschriebenen CuAAC-Protokoll für *N*-Cysteinylopeptidthioester wie **9b** anfänglich auch andere Kupferquellen, Lösungsmittel, Schutzgruppen und Reduktionsmittel zur Diskussion standen. Eine Auswahl dieser weiteren Reaktionen ist in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12: Übersicht weiterer Bedingungen zur Synthese von *N*-Cysteinylpeptidthioester-Konjugaten.

Eintrag	Alkin	Cu-Quelle [mM]	52 [mM]	NaAsc [mM]	Additiv [mM]	Lösungsmittel (v/v)	T [°C]
1	9b	CuSO ₄ (6.7)	13.4	10.0	-	^t BuOH/PBS (7:3)	35
2	9c	CuSO ₄ (6.7)	13.4	10.0	-	^t BuOH/PBS (7:3)	35
3 ^a	9b	CuSO ₄ (6.7)	13.4	10.0	-	^t BuOH/PBS (7:3)	35
4	9b	CuSO ₄ (6.7)	13.4	10.0	-	MeCN oder DMSO/PBS (7:13)	35
5	9b	CuSO ₄ (6.7)	13.4	10.0	-	DMF/PBS (7:3)	35
6	9c	CuSO ₄ (6.7)	13.4	-	TCEP (10 mM)	MeCN/PBS (7:3)	35
7	9c	CuSO ₄ (6.7)	13.4	10.0	TCEP (10 mM)	DMF/PBS (7:3)	35
8	9c	Cu(I)Br (1.0)	2.7	-	-	MeCN oder DMF/PBS (7:3)	35
9 ^b	9b	Cu-Draht	-	10.0	-	DMF	45
10	9b-S^tBu	CuSO ₄ (6.7)	13.4	10.0	-	DMF/PBS (7:3)	35

Alle Reaktionen wurden an Luft durchgeführt. a) PBS mit einem pH 6.0. b) Die Konzentration an Alkin betrug 0.12 mM und an Azid 0.1 mM.

Die ersten Reaktionen unter den hier vorgestellten optimierten Bedingungen (vgl. Kapitel 3.3.1) führten, da nicht unter Schutzgasbedingungen durchgeführt, zu sehr guten Ergebnissen nach 1 h Reaktionszeit bei nicht-vollständigem Umsatz bezüglich des Azids **1b** (Tabelle 12, Bed. 1-2). Sie zeigten aber nach 2 h die erhebliche Bildung von unerwünschtem Disulfid an **9b** und waren in Verbindung der Bildung des zu diesem Zeitpunkt unerklärlichen Produktgemischs *N*-Cys/Thz (**18bb/18bc**) nicht eindeutig identifizierbar. Zwar ließ sich das Cys-Cys Disulfid mittels TCEP spalten, allerdings wurden zu diesem Zeitpunkt auch weitere Möglichkeiten der CuAAC-Reaktion von *N*-Cysteinylopeptidthioestern in Betracht gezogen, die allerdings alle nicht zu der gewünschten, effektiven und praktikablen Umsetzung führten. Aus diesem Grund sei hier eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse unter den entsprechenden weiteren CuAAC-Bedingungen aus Tabelle 12 aufgeführt.

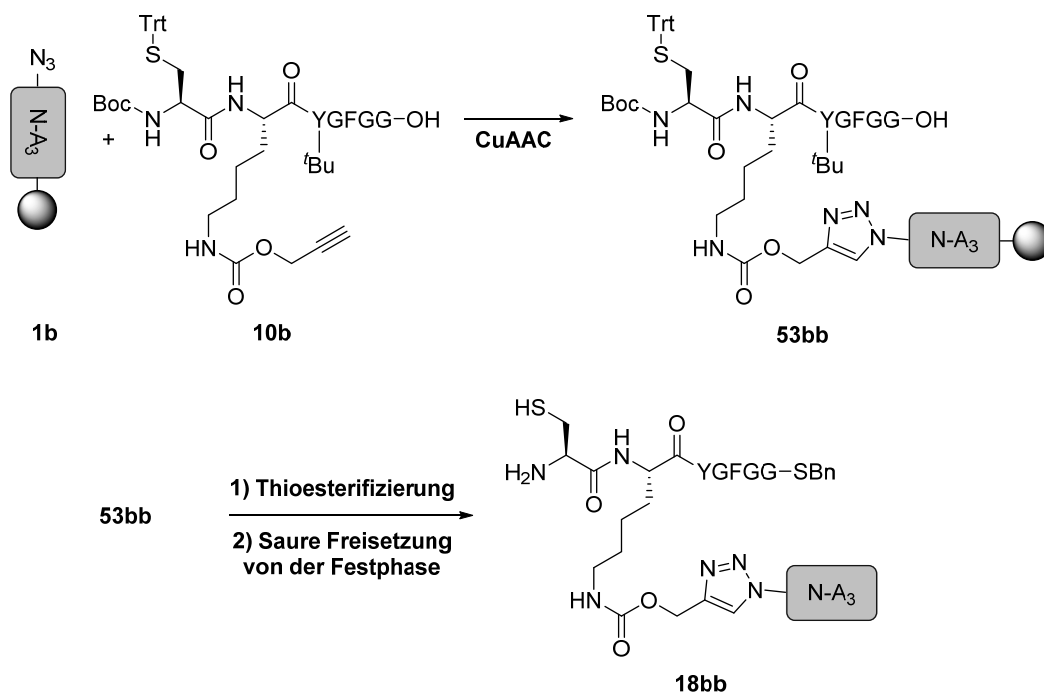
Der Einsatz von auf pH 6.0 eingestelltem PBS-Puffer unter den klassisch optimierten CuAAC-Bedingungen führte zu einer schnelleren Disulfid-Bildung des Produkts **18bb** innerhalb der CuAAC-Reaktion von **9b** (Tabelle 12, Bed. 3). Der Wechsel von *tert*-Butanol zu Acetonitril oder Dimethylsulfoxid als organische Lösungsmittelkomponente führte hingegen zu keinem Umsatz (Tabelle 12, Bed. 4). Dies wurde primär auf eine schlechtere Löslichkeit der Reaktanden zurückgeführt. Für die Umsetzung von *N*-Thz **9c** erscheint Dimethylformamid als mögliche Alternative. Zwar wird ein geringerer Umsatz ($\geq 60\%$ bezogen auf eingesetztes Azid **1b** in Verbindung mit einem zum Erliegen kommenden Katalysatorsystem nach 2 h Reaktionszeit beobachtet, aber als Hauptprodukt wird das entsprechende **18bc** erhalten (Tabelle 12, Bed. 5). Bemerkenswerter Weise wurden nur Spuren an unmaskiertem **18bb** beobachtet. Der Einsatz von TCEP anstelle von Natriumascorbat, sowie dessen Einsatz als Additiv, innerhalb der CuAAC-Reaktion führte in allen Fällen zu schlechterem oder keinerlei Umsatz (Tabelle 12, Bed. 6-7). Dies ist im Einklang der Studien nach HONG *et al.*^[121] Der Einsatz von TCEP kann überdies in einer STAUDINGER-Reaktion das eingesetzte Azid zum Amin unter der Bildung von Phosphinoxid reduzieren und ist im Kontext der CuAAC-Reaktion auch als Nebenreaktion berichtet worden.^[118,133,174] Nach LIU *et al.* kann TCEP ebenfalls, wenn auch sehr langsam, unter milden Bedingungen Cystein-haltige Proteine an der Cystein-Position spalten.^[175] Auch eine TCEP-vermittelte bzw. -basierte Desulfurierung wurde im Kontext der NCL beschrieben. Diese konnte nach ROHDE *et al.* jedoch durch Zugabe von NaAsc verhindert werden.^[176] Dies sollte somit in der unter Eintrag 7 in Tabelle 12 durchgeführten CuAAC-Reaktion keine Rolle spielen. Der Einsatz von Kupfer(I)bromid anstelle von Kupfer(II)sulfat bei der Reaktion von **9c** in DMF führte zu keinem Umsatz (Tabelle 12, Bed. 8). Ebenfalls nicht erfolgreich, wenn

auch mit nachweisbarem Umsatz, war der Einsatz von Kupferdraht in DMF (Tabelle 12, Bed. 9). Damit wurde die Verwendung dieser und weiterer Kupferpräkatalysatoren nicht weiterverfolgt. Neben dem *N*-Cysteinylpeptidthioester **9b** und dem bereits angesprochenen *N*-Thiazolidinylpeptidthioester **9c** wurde auch der Einsatz der Disulfid-Schutzgruppe *S*-*tert*-Butyl (*S'*Bu) zur Schützung der Thiol-Seitenkette in **9b** untersucht. Neben der problematischen Synthese dieses *N*-Cys(*S'*Bu)-Peptidthioesters **9b-S'**Bu, die auf Disulfid-Austausch unter basischen Bedingungen im Thioesterifizierungsschritt beruhte, führten die CuAAC-Reaktionsbedingungen nach 2 h Reaktionszeit in Verbindung mit den in simultan ablaufenden Nebenreaktionen auftretenden Radikalspezies zu einer Vielzahl an Nebenprodukten bei geringem Umsatz. Als Hauptprodukt wurde nicht das gewünschte, *S'*Bu-geschützte CuAAC-Konjugat erhalten, sondern das Disulfid von **18bb**. Aufgrund dessen wurde diese Schutzgruppenstrategie verworfen.

3.3.6 Die CuAAC-Reaktion an der Festphase als alternativer Zugang zu *N*-Cysteinylpeptidthioester-Konjugaten

Neben der in den Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 vorgestellten, erfolgreichen Etablierung eines effizienten CuAAC-Protokolls in Lösung, wurde parallel die Click-Reaktion an der Festphase als alternativer Zugang zu *N*-Cysteinylpeptidthioester-Konjugaten **18** untersucht. Dieses Vorhaben beruhte auf den anfänglichen Problemen der Umsetzungen des in Kapitel 3.3.3 beschriebenen *N*-Cysteinylpeptidthioesters **9b**. Die Vorteile dieses Synthesezugangs liegen darin, dass alle Aminosäureseitenketten geschützt vorliegen und die Funktionalisierung an dem polymergebundenen Peptid eine einfache Aufreinigung in den Zwischenschritten durch das Waschen mit geeigneten Lösungsmitteln eröffnet (siehe Kapitel 3.2). In Schema 22 ist dieser Zugang zu *N*-Cysteinylpeptidthioester **18bb** exemplarisch gezeigt. Dazu wird im ersten Schritt das Polymer gebundene Azidpeptid **1b** mit dem ebenfalls vollgeschützten Alkin **10b** unter CuAAC-Bedingungen umgesetzt. Die freie *C*-terminale Peptidsäure kann anschließend zum gewünschten Harz-gebundenen Peptidthioester, hier ein Benzylthioester, umgesetzt werden. Nach der sauren Freisetzung des thioesterifizierten Click-Konjugats **18bb**, kann dieses durch semipräparative HPLC aufgereinigt werden.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 22: Schematische Darstellung des angestrebten Zugangs zu *N*-Cysteinylpeptidthioestern **18** über die Modifikation eines an die Festphase gebundenen, vollgeschützten Azids **1b** mit der vollgeschützten *N*-Boc-Cysteinylpeptidsäure **10b**. Die anschließende Thioesterifizierung und saure Freisetzung von der Festphase liefert das gewünschte **18bb**.

Um die Ergebnisse dieser Arbeit einordnen zu können, sollen zunächst jedoch die literaturbekannten Schwierigkeiten dieses Synthesezugangs hervorgehoben werden. Dazu ist in Abbildung 12 eine vereinfachte Übersicht möglicher Herausforderungen gezeigt.

Problem 1: Alkin in Lösung

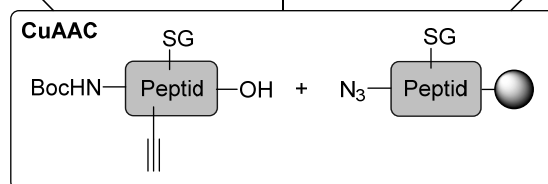
- oxidative Alkin-Alkin-Kupplung in CuAAC
- polynukleare Cu-Alkin-Cluster

Problem 2: stabile Cu-Triazolid-Komplexe

- Protonierung zum Produkt vs. Rkt. mit Elektrophilen im Thioesterifizierungsschritt

Problem 3: mangelhafte Aufreinigung des Harzes

- Waschschrte nach CuAAC eliminieren nicht Cu-Reste
- im Thioesterifizierungsschritt kann es zur Bildung von ROS kommen



Problem 5: Reagenzien der CuAAC (2)

- Generierung von "I⁺" bzw. I₂ innerhalb der CuAAC
- oxidative Folgechemie mit Cys(Trt)

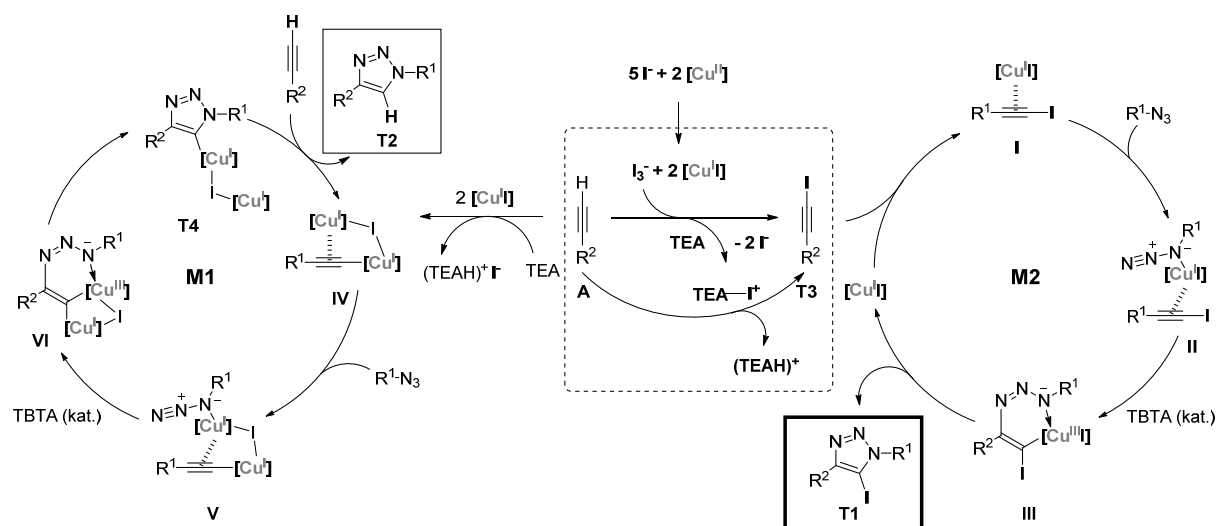
Problem 4: Reagenzien der CuAAC (1)

- CuI + NaAsc können in CuAAC über 1-Iodalkine zu 5-Iodtriazolen reagieren

Abbildung 12: Übersicht über mögliche Probleme in der CuAAC an der Festphase unter Berücksichtigung der anschließenden Folgechemie der Thioesterifizierung mit Benzylmercaptan.

Nach TORNØE *et al.* ist beschrieben, dass die CuAAC-Reaktion an der Festphase ausschließlich mit polymergebundenen Alkinen praktikabel ist.^[103,126] Die Gründe hierfür sind in der Bildung von oxidativen Kupplungsprodukten (GLASER- und EGLINTON-Kupplungen) der eingesetzten Alkine **10** zu finden (Abbildung 12, Problem 1). Die Bildung dieser Diin-Nebenprodukte kann jedoch durch die Arbeit unter Schutzgasbedingungen unterdrückt werden. Ebenfalls kann es durch die Verwendung von Kupfer(I)iodid als Präkatalysator in organischen Lösungsmitteln verstärkt zur Bildung von polynuklearen Kupfer-Acetylid-Clustern, wie bereits in Kapitel 3.3.3 (Schema 21) gezeigt, kommen. Das Iodid wirkt dabei als verbrückender Ligand.^[126] Solche Cluster-Komplexe können hingegen nicht bei der Bindung des Alkins an der Oberfläche eines Polymerharzes entstehen, da hier eine hinreichend große räumliche Verteilung der funktionellen Alkin-Gruppen vorliegt. Wie bereits in Kapitel 3.3.3 angesprochen, sind diese polynuklearen Cluster bzw. Komplexe unreaktiv und stören oder unterbinden den CuAAC-Katalysezyklus. Des Weiteren kann die Verwendung von Kupfer(I)iodid zusammen mit einem milden Reduktionsmittel wie dem hier verwendeten NaAsc dazu führen, dass der gebildete Kupfer-Triazolid-Komplex **T4** durch Elektrophile abgefangen wird und nicht durch Protonierung zum gewünschten Produkt reagiert (Abbildung 12, Problem 2). Ebenso ist bekannt, dass bei der Verwendung von Kupfer(I)iodid auch die entsprechenden 5-Iodtriazole **T1** als Nebenprodukte auftreten können. Wie auch in

Schema 23 zeigt, können solche 5-Iodtriazole beispielsweise durch die *in situ* Generierung von 1-Iodalkinen **T3** entstehen oder durch das Abfangen des Kupfer-Triazolid-Komplexes **T4** mit einem formalen „I⁺“ (Abbildung 12, Probleme 4 und 5).^[126,133] Das in Abbildung 12 geschilderte Problem 3, die mangelnde Abtrennung von Kupferresten nach der CuAAC-Reaktion vom Polymerharz durch Waschen mit gängigen Lösungsmitteln wurde hingegen so in der Literatur nicht gefunden werden.



Schema 23: Der nach BARSOUM *et al.* postulierte Mechanismus der Bildung von 5-Iodtriazolen **T1** über die *in situ* Generierung von Triiodid ausgehend von Kupfer(II)salzen in Anwesenheit von Iodid (hier Natriumiodid), einer Aminbase (TEA) und katalytischen Mengen an Hilfsligand (TBTA).^[177]

Der genaue Mechanismus der als Nebenprodukt anfallenden 5-Iodtriazole **T1** in der CuAAC-Reaktion mit Kupfer(I)iodid ist abschließend nicht vollständig geklärt. Eine genauere Betrachtung kann allerdings zur Erklärung der in Abbildung 12 genannten Probleme 2, 4 und 5 herangezogen werden. Einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis trugen BARSOUM *et al.* 2015 durch ihren Kernresonanzspektroskopie (NMR)-gestützten und in Schema 23 skizzierten Mechanismus der Bildung von 5-Iodtriazolen **T1** bei.^[177] Als Kupferquelle diente Kupfer(II)perchlorat und als Additiv stöchiometrische Mengen an Natrium- oder Lithiumiodid. Ein Hilfsligand kann, laut den Autoren, in manchen Fällen zum Schließen des Katalysezyklus notwendig sein. Das Kupfer(II)salz bildet zunächst, durch eine *in situ* Reduktion mit einem Alkaliiodid, den Kupfer(I)iodid-Katalysator unter der Bildung von Triiodid oder Iod. Dieser Vorgang wird beispielsweise in der Iodometrie, einer titrimetrischen Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung reduzierender oder oxidierender Analyten genutzt. Ausgehend von einem entsprechenden Arylalkin **A** und sukzessiver Titration mit

einer nukleophilen Aminbase wie Triethylamin (TEA) konnte gezeigt werden, dass das entsprechende 1-Iodalkin **T3** schnell innerhalb von fünf Minuten gebildet wird. Dieses wird anschließend in einem separaten Mechanismus über eine π -Koordination **I** mit Kupfer(I)iodid aktiviert. Dieser mechanistische Pfad (**M2**) ist damit schneller als die Reaktion des Alkins **A** unter dem bekannten CuAAC-Mechanismus (**M1**), welcher zunächst über das entsprechende Kupfer(I)-Triazolid **T4** als Zwischenprodukt verläuft. Ausgehend von Iodalkinen **T3** konnte in anderen Reaktionen bereits gezeigt werden, dass ein Kupfer(I)-Halogenaustausch unwahrscheinlich ist, da auch in protischen Lösungsmitteln wie Ethanol die exklusive Bildung der 5-Iodtriazole **T1** beobachtet wurde und damit ein mechanistischer Pfad wie in Schema 23 plausibel ist.^[133] Im Falle einer intermediären Bildung von Kupfer(I)triazoliden **T4** hätte folglich die Bildung der entsprechenden protonierten Triazolide **T2** beobachtet werden müssen. Umgekehrt kann die Reaktion zu 5-Iodtriazolen **T1** allerdings auch, wenn auch signifikant langsamer, über den entsprechenden Kupfer(I)triazolid-Komplex **T4** verlaufen. Dies konnte in einem Experiment mit einem NHC-stabilisierten Kupfer(I)triazolid-Komplex gezeigt werden.^[177] Dieser reagiert in Anwesenheit eines „I⁺“-Synthons, so wie beispielsweise Iod (I₂) oder Triiodid (I₃⁻) schnell zum entsprechenden 5-Iodtriazol **T1**. Somit ist es denkbar, dass solche 5-Iodtriazole **T1** unter Anwendung der in dieser Arbeit angestrebten Verwendung von Kupfer(I)iodid und Natriumascorbat in Dimethylformamid als eine Art oxidatives Nebenprodukt auftreten können. Wird angenommen, dass es im Verlauf der CuAAC-Reaktion zu Spuren an oxidiertem Kupfer(II) kommen kann, beispielsweise durch Restmengen an Sauerstoff, sollte dieses zunächst durch Natriumascorbat reduziert werden. Da Natriumascorbat ebenfalls als Base fungieren kann, sollten dementsprechende Mengen an Natriumiodid vorhanden sein. Die Kombination von Natriumiodid und Kupfer(II) könnte somit zur *in situ* Generierung von Triiodid oder Iod als Iodinierungsreagenzien führen. Je nach Reaktionsfortschritt, könnte dies nun analog zu Schema 23 zu den entsprechenden 1-Iodalkinen **T3** führen, welche stark von der Anwesenheit von Aminbasen abhängig sind. Ebenso könnte es aber den Kupfer(I)-Triazolid-Komplex **T4** zum entsprechenden 5-Iodtriazolid **T1** halogenieren. Über welchen mechanistischen Pfad des in Schema 23 gezeigten postulierten Mechanismus nun die mögliche Bildung der 5-Iodtriazole **T1** als Nebenprodukte innerhalb der CuAAC-Reaktion unter den hier verwendeten Bedingungen mit Kupferiodid und Natriumascorbat in Dimethylformamid verlaufen könnte, kann nicht beantwortet werden.

Trotz all dieser möglichen Nebenreaktionen muss in dem hier vorliegenden Synthesevorhaben und der zugrundeliegenden Synthesestrategie der beschriebenen CuAAC-Konjugate **18** der Azid-Coil-Strang polymergebunden vorliegen (Tabelle 13).²

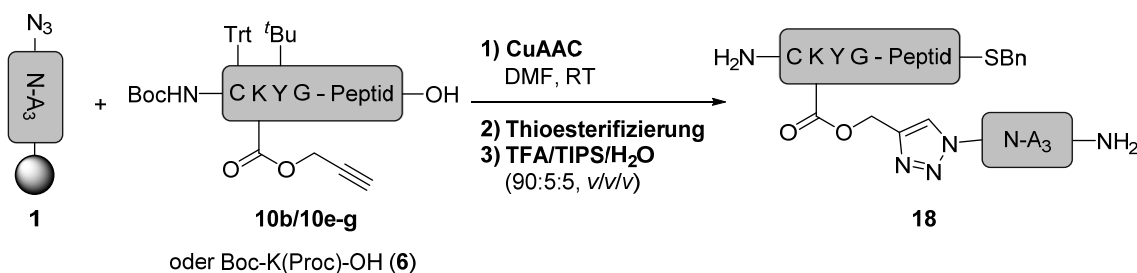
Tabelle 13: Sequenzen der in diesem Unterkapitel verwendeten Festphasen-gebundenen A3-Coil-Peptide.

Coil-Peptide		Sequenz und Heptadenregister					
				<i>gabcdef</i>	<i>gabcdef</i>	<i>gabcdef</i>	
1a	N ₃ -Gly-(N-A ₃ (-G))	N ₃ -Gly		EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG
1b	N ₃ -Gly-(N-A ₃)	N ₃ -Gly	G	EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ	GG

Vor dem Hintergrund der in Abbildung 12 gezeigten Problematiken wurden Versuche mit dem Ziel durchgeführt, selbst bei hinnehmbaren, schlechteren Umsätzen, entsprechende CuAAC-Konjugate **18** für die angestrebten Folgestudien zu erhalten. Die durchgeführten Reaktionen sind in Tabelle 14 chronologisch aufgeführt und wurden mit den in Tabelle 13 dargestellten polymergebundenen Aziden durchgeführt.

Die verwendeten vollgeschützten Peptidsäuren **10** unterschieden sich allein in den vier C-terminalen Aminosäuren (Sequenzen CKYGF_{GG} **10b** → CKYG **10g**), deren Sequenzen sukzessive um je einen Aminosäurerest verkürzt wurden und keine Seitenketten-Schutzgruppen aufwiesen. Die entsprechenden Thioesterifizierungen der vollgeschützten Peptide in Lösung zeigten keinerlei Probleme (siehe Kapitel 3.2.3) und sollten auch hier in vergleichbarer Weise nach der Click-Konjugation reagieren. In den Einträgen 1-7 der Tabelle 14 sind die ersten Reaktionen vor dem Hintergrund der Gangbarkeit dieses Syntheszugangs zu *N*-Cysteinylpeptidthioestern **18** gezeigt.

² Eine Substitution Alkin/Azid bedarf einer neuen Synthesestrategie: Neben dem Einsatz eines säurelabilen Harzes zur Synthese eines vollgeschützten *N*-Azid-Coil-Strangs **1** und den damit verbundenen Löslichkeits- und Aufreinigungsproblemen des vollständig geschützten Peptids (≥ 24 Aminosäuren), hätte die freie C-terminale Carbonsäureeinheit des Azids **1** eine neue Schutzgruppenstrategie bedurft. Diese wäre notwendig, da die zu thioesterifizierende Carbonsäurefunktion der Zyklisierungsverbindung **10** nicht mit der des Azids **1** zu unterscheiden wäre und damit weiterer Festphasen-Modifikationen bedurft hätten, wie bspw. einer temporären Alloc-Schutzung der Carbonsäure. Je nach Sequenz wäre alternativ eine Seitenketten-Verknüpfung an der Festphase denkbar.

Tabelle 14: Chronologisch durchgeführte CuAAC-Reaktionen an der Festphase.

Eintrag	Azid 1	Alkin 10	CuI	NaAsc	$t_{\text{Rkt.}}$ (CuAAC)	Umsatz	
	/μmol (Äq.)	/μmol (Äq.)	/μmol (Äq.)	/μmol (Äq.)	/h	CuAAC/Thio.	
1 ^{a,b}	1a << 1.0 (1.0)	10b 1.0 (1.0)	5.3 (5.3)	6.1 (6.1)	48		+
2 ^b	1a << 4.0 (1.6)	10b 2.5 (1.0)	10.0 (4.0)	10.0 (4.0)	48	+	++
3 ^b	1a << 4.0 (1.6)	10e 2.5 (1.0)	10.0 (4.0)	10.0 (4.0)	48	+	+
4 ^b	1a << 4.0 (1.6)	10f 2.5 (1.0)	10.0 (4.0)	10.0 (4.0)	48		
5 ^b	1a << 4.0 (1.6)	10g 2.5 (1.0)	10.0 (4.0)	10.0 (4.0)	48	+	
6 ^{b,d}	1b << 4.0 (1.0)	6 4.0 (1.0)	10.0 (2.5)	10.0 (2.5)	23		
7 ^{b,c,d}	1b << 2.0 (2.0)	10b 1.0 (1.0)	10.0 (10.0)	10.0 (10.0)	5	+	
8 ^{c,d,e}	1b 1.0 (1.0)	10f 1.0 (1.0)	3.7 (3.7)	6.5 (6.5)	26	+	
9 ^{c,d,e}	1b 1.0 (1.0)	10g 1.0 (1.0)	11.0 (11.0)	11.0 (11.0)	26	f)	
10 ^{c,d,e}	1b 1.0 (1.0)	10e 1.0 (1.0)	2.6 (2.6)	3.0 (3.0)	48	-	-

a) Thioesterifizierung nach FICHT *et al.* mit einer Lösung aus BnSH (24.0 Äq.), HOBt (30.0 Äq.), DIPEA (37.5 Äq.) und DIC (30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (4:1, v/v) für 1.5 h (2×).^[178] b) Thioesterifizierung nach FICHT *et al.* mit längerer Reaktionszeit (1× 1 h, 1× o.n.). c) Thioesterifizierung nach FICHT *et al.* ohne DIPEA analog zu b). d) Waschen des Harzes nach der CuAAC-Reaktion mit Versene-Lösung. e) Die Beladungsdichte des Azidpeptid-Harzes **1b** wurde zum Zeitpunkt der letzten Fmoc-AS-Kupplung bestimmt. f) Es wurde ein hoher Umsatz beobachtet, allerdings das in 5-Position iodierter Produkt **18bg-I** erhalten. Der Umsatz ist auf nicht umgesetztes Azid **1** bzw. im Fall der Thioesterifizierung auf nicht umgesetzte freie Peptidsäure des Click-Konjugats **19** bezogen: - = kein Umsatz, + = geringer Umsatz, ++ = moderater Umsatz, hoher Umsatz.

Die CuAAC-Reaktionen an der Festphase wurden nach einer abgewandelten Methode nach MIDDEL *et al.* unter Schutzgasbedingungen durchgeführt.^[179] Die Reaktionen wurden an Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harzen durchgeführt, bei welchen in Einträgen 1-7 keine Beladungsdichten nach der Kupplung des entsprechenden Azidpeptids **1** bestimmt wurden. Allgemein wird die Beladungsdichte kolorimetrisch mittels Fmoc-Monitorings nach der Kupplung der letzten Fmoc-geschützten Aminosäure durchgeführt, allerdings wurde hier von der Beladungsdichteangabe seitens des Herstellers ausgegangen. Diese ist mit rund 500 $\mu\text{mol/g}$ etwa um den Faktor 9 höher als die Beladungsdichte des in den Einträgen 8-10 (Tabelle 14) eingesetzten Azids **1b**, bei welchen die Beladungsdichte zum Zeitpunkt der letzten Fmoc-geschützten Aminosäurekupplung mit 56.8 $\mu\text{mol/g}$ bestimmt wurde. Es kann davon ausgegangen werden, dass dies in einer ähnlichen Größenordnung in den Einträgen 1-7 der Fall war und damit jeweils ein sehr großer Überschuss an vollgeschütztem Alkin **10** eingesetzt wurde. Aus diesem Grund sind in den Einträgen 1-7 die ursprünglich angenommenen Mengen an polymergebundenem Azid **1** angegeben, aber durch das „<<-“ Zeichen entsprechend angepasst.

In den ersten Reaktionen wurde die vollgeschützte *N*-Boc-Alkynylpeptidsäure **10b** mit Polymer-gebundenem Azid **1a** und Kupfer(I)iodid als Katalysator sowie Natriumascorbat (NaAsc) als Reduktionsmittel in wasserfreiem Dimethylformamid umgesetzt (Tabelle 14, Einträge 1-2). Anschließend wurde das Harz ausgiebig mit Dimethylformamid, Diethylether und Dichlormethan analog zu MIDDEL *et al.* gewaschen.^[179] Wie in Abbildung 13A gezeigt, zeigte die saure Testabspaltung nach 48 h das gewünschte Click-Konjugat **19ab** als Peptidsäure in guter Reinheit, aber auch noch Restmengen an Azid **1a**. Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass die CuAAC-Reaktion an der Festphase trotz eines großen Überschusses an Alkin **10b**, wahrscheinlich einer 9-fachen Menge, zu keinem vollständigen Umsatz bezüglich des Azids **1a** führte.

Die anschließende Thioesterifizierung nach einer Vorschrift von FICHT *et al.* konnte durch die Reaktion mit einem Gemisch aus Benzylmercaptan (BnSH, 24.0 Äq.), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt, 30.0 Äq.), Diisopropylethylamin (DIPEA, 37.5 Äq.) und *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC, 30.0 Äq.) in *abs.* Dichlormethan/Dimethylformamid (4:1, *v/v*) innerhalb von zweimal 1.5 h Reaktionszeit ebenfalls nicht zur Vollständigkeit gebracht werden und zeigte nur einen geringen Umsatz (Abbildung 13B).

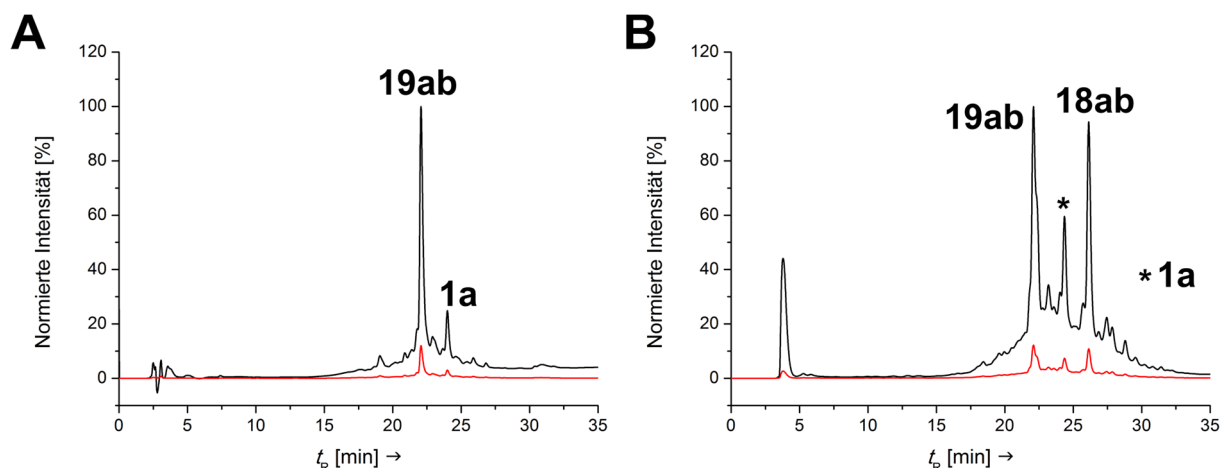


Abbildung 13: HPLC-Spuren der Testreaktion nach Tabelle 14 – Eintrag 1 von **1a** mit **10b** (Gradient 30-60% Acetonitril in Wasser + 0.1% TFA, 30 min, 50 °C, *schwarz*: 220 nm und *rot*: 280 nm). A) Ergebnis der Testabspaltung der CuAAC-Reaktion nach 48 h Reaktionszeit (analytisch). B) Ergebnis der Thioesterifizierung an der Festphase nach saurer Abspaltung mit TFA/TIPS/H₂O (90:5:5, v/v/v, semipräparativ). Mit Azid **1a**, CuAAC-Produkt (**19ab**, Peptidsäure) und Thioesterifizierungsprodukt (**18ab**).

Zur Thioesterifizierung wird das Harz mit obengenanntem Gemisch für 1.5 h behandelt, die Lösung wird verworfen und erneut mit einem frisch angesetzten Gemisch für 1.5 h reagiert. Aufgrund der erfolgreichen CuAAC-Reaktion, aber der anschließend unvollständigen Thioesterifizierung, wurde die Reaktion mit den vier vollgeschützten Alkin-Peptidsäuren **10b/10e-g** unter leichter Verminderung der Menge an Kupfer(Diodid und NaAsc auf jeweils 4.0 Äq. gegenüber der eingesetzten Menge an Alkin parallel wiederholt. Die erhaltenen Click-Konjugat-Harze wurden, ohne vorherige Testabspaltung, mit Benzylmercaptan thioesterifiziert (Tabelle 14, Einträge 2-5). Das Ergebnis der CuAAC wurde durch die Menge an verbliebenem Azid **1a** nach der Thioesterifizierung chromatographisch bewertet. Um eine vollständige Thioesterifizierung in diesem Schritt zu erhalten, wurden längere Reaktionszeiten von einmalig 1 h und im Anschluss einmalig über Nacht durchgeführt. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abbildung 14 gezeigt. In drei der vier Fälle konnte nur ein geringer Umsatz bezüglich des Azids **1a** innerhalb der CuAAC-Reaktion festgestellt werden. Aus diesem Grund und durch Nebenprodukte wurden hier auch schwer aufzureinigende Rohpeptid-Gemische (Abbildung 14) nach der Thioesterifizierung erhalten, welche sich darüber hinaus qualitativ stark unterschieden. Nur in Tabelle 14 – Eintrag 4 konnte ein vollständiger Umsatz bezüglich eingesetzten Azids **1a** erzielt werden und unterstreicht die von TORNØE *et al.* beschriebenen Schwierigkeiten der CuAAC mit festphasengebundenen Aziden durch die hier beobachtete mangelnde Reproduzierbarkeit der Umsetzungen (Tabelle 14, Eintrag 2-5).^[103]

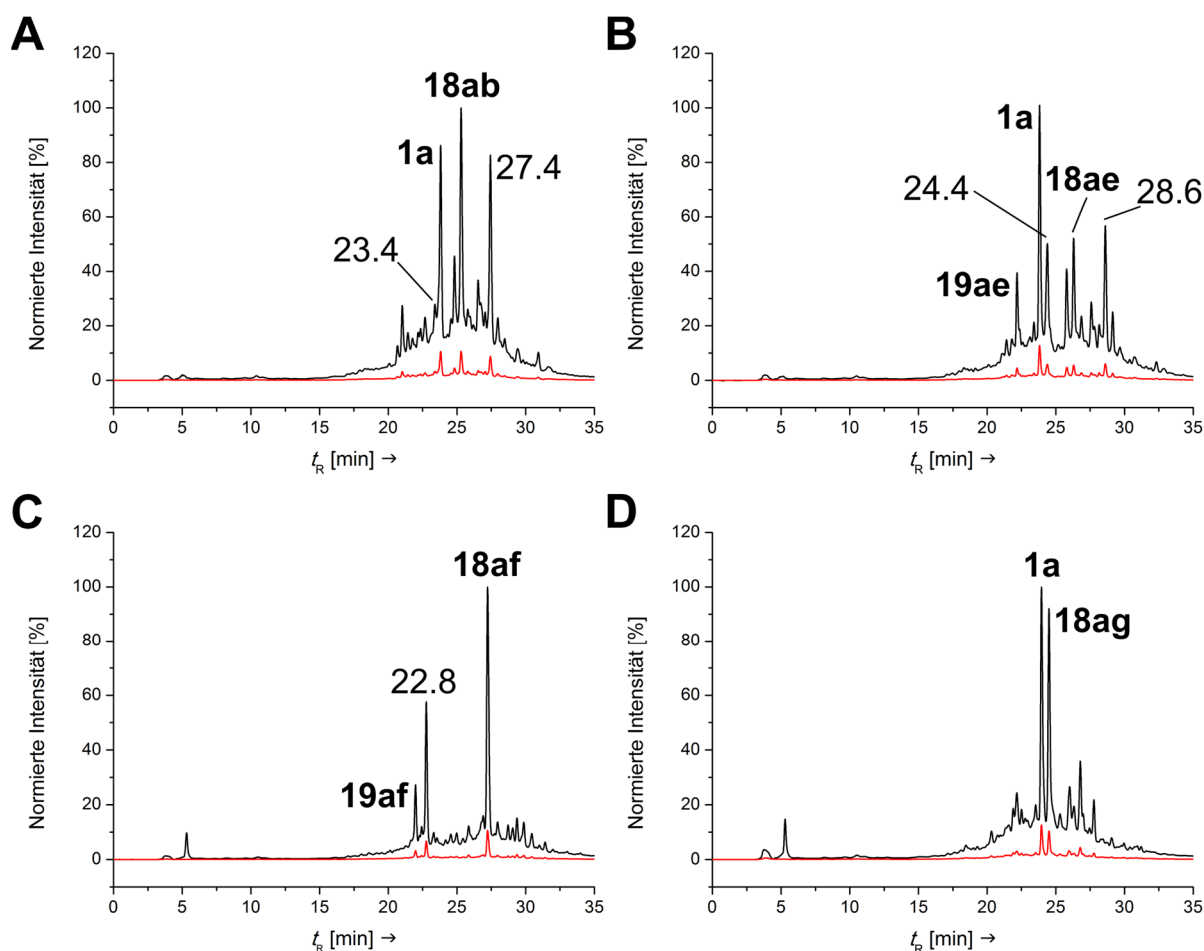


Abbildung 14: Übersicht der semipräparativen HPLC-Spuren (Gradient 30-60% Acetonitril in Wasser + 0.1 % TFA, 50 °C; *schwarz*: 220 nm und *rot*: 280 nm) der erhaltenen Rohprodukte **18ab/18ae-ag** (Tabelle 14, Einträge 2-5). A) Tabelle 14 – Eintrag 2, B) Tabelle 14 – Eintrag 3, C) Tabelle 14 – Eintrag 4 und D) Tabelle 14 – Eintrag 5 der CuAAC-Reaktion, Thioesterifizierung und saurer Freisetzung der entsprechenden Produkte von der Festphase. MALDI-TOF-MS Spektren der markierten Retentionszeiten sind in Anhang 7.2.2 in Abbildung A.4 exemplarisch zusammengefasst. Mit Azid (**1a**), CuAAC-Produkt (**19**, Peptidsäure) und Thioesterifizierungsprodukt (**18**).

Mittels MALDI-TOF-MS konnte unter anderem die anteilige Oxidation von Tryptophan als Ursache für die schlechte Qualität in Form von Nebenprodukten identifiziert werden und spiegelt sich in der Qualität der erhaltenen Chromatogramme wider. Eine Quantifizierung der Nebenprodukte mittels HPLC ist hier nicht möglich und zeigte sich allein in den erhaltenen MALDI-TOF-Massenspektren der isolierten Peaks. Dies war im Fall der ersten Reaktion von **18ab** (Tabelle 14 – Eintrag 1) nicht festgestellt worden. Eine genaue Peakzuordnung konnte nur unter Vorbehalt erfolgen, da auch geringe Mengen an Verunreinigung im MALDI-TOF-MS als signifikante Verunreinigung erscheinen können. Wengleich auch die Oxidation dieses Aminosäurerests im Abspaltungsschritt mit Trifluoressigsäure (TFA) als Problem

bekannt ist,^[180] muss hier von einer signifikanteren Oxidation des vollgeschützten Peptides in der Thioesterifizierungsreaktion ausgegangen werden. Der Einfluss längerer Reaktionszeiten im Thioesterifizierungsschritt erscheint als mögliches Problem und sollte auf eine unzureichende Abtrennung von Kupfer-Spezies im Waschschriff nach erfolgter CuAAC-Reaktion zurückzuführen sein (vgl. Abbildung 12 – *Problem 3*). Im Fall der CuAAC-Reaktion an der Festphase sind keine Studien bezüglich der Oxidation von Aminosäureseitenketten bekannt und können auch hier vermutlich vernachlässigt werden, was durch den Vergleich der Rohchromatogramme aus Abbildung 13 und Abbildung 14 hervorgeht.³ Ein Peptidverlust durch Oxidation innerhalb der CuAAC ist allein im Fall von ungeschützten Peptiden in Lösung hinlänglich bekannt und beschrieben.^[122] In den Reaktionen der Tabelle 14 (Einträge 2-5) konnte für die isolierten HPLC-Peaks mittels MALDI-TOF-MS eine Signalverbreiterung der entsprechenden thioesterifizierten CuAAC-Konjugate **18** detektiert werden, welche zu einer Massendifferenz von +4-5 m/z führte (vgl. exemplarisch **18ab** Abbildung 15A aus Tabelle 14 – Eintrag 1 mit **18ab** Abbildung 15B aus Tabelle 14 – Eintrag 2). Dies spricht für eine Oxidation von Tryptophan zu Kynurenine (Kyn, +4 m/z) oder *N*-Formylkynurenin (NFK, +32 m/z). Mittels UV/VIS-Spektroskopie konnte für die isolierten Konjugate **18** eine solche Oxidation zu NFK nur in Spuren nachgewiesen werden (Abbildung 15D). Laut Literatur besitzt *N*-Formylkynurenin ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 315-320 nm, was in diesem Beispiel von **18ag** bei 316 nm gezeigt werden konnte.^[181,182] Die weitere Oxidation zu Kynurenin mit einem in der Literatur gefundenen Wert von 365 nm kann an dieser Stelle weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.^[181,182] Im direkten Vergleich der beiden ersten Reaktionen zu **18ab** blieb der MS-Peak bei 3495.2 bzw. 3495.4 m/z unverändert (Abbildung 15A und B) und bestätigt somit das entsprechende K^+ -Addukt (+38 m/z) des gewünschten Produkts **18ab** und nicht eine mögliche +2O-Oxidation (+32 m/z) oder die entsprechende Bildung von *N*-Formylkynurenin (+32 m/z). Festzuhalten ist, dass die entsprechenden Massenspektren nur bedingt durch das Absorptionsspektrum gestützt werden können und sich die im MALDI-TOF-MS beobachtete signifikante Oxidation auch auf entsprechende Probenvorbereitungen und bzw. oder messtechnische (Laser-induzierte) Phänomene zurückführen lassen könnten. So zeigten alleine die $[M+H]^+$ -Massen der isolierten Produkte **18ab/18ae-ag** eine Massendifferenz von

³ Es konnte eine Veröffentlichung dazu gefunden werden, in der, in einer moderaten Ausbeute von 62%, ein Boc-geschütztes Indol, *N*-Boc-3-Methylindol, durch Oxone (2 $KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$) mit EDTA und Natriumhydrogencarbonat in wässrigem Aceton zum entsprechenden 3-Hydroxy-3-methylindol-2-on umgesetzt wurde. [Suárez-Castillo *et al. Heterocycles* **2012**, 85, 2147]

Ergebnisse und Diskussion

+4 m/z an. Je nach Probenvorbereitung und Laserintensität kann es, wie in Abbildung 15A-C zu sehen ist, auch zu Fragmentierungen innerhalb der MALDI-TOF-MS der CuAAC-Konjugate kommen (~ 2700 - $2800 m/z$). Im Anhang dieser Arbeit in Kapitel 7.1.6 sind die entsprechenden Chromatogramme und Massenspektren der isolierten Produkte (bzw. Produktgemische) der semipräparativen HPLC-Aufreinigung der Einträge 2-5 (Tabelle 14) gezeigt. Dabei zeigt vor allem die Qualität der Chromatogramme der isolierten Produkte aus Tabelle 14 – Einträge 2 und 3 die schwierige Aufreinigung der erhaltenen Produktgemische.

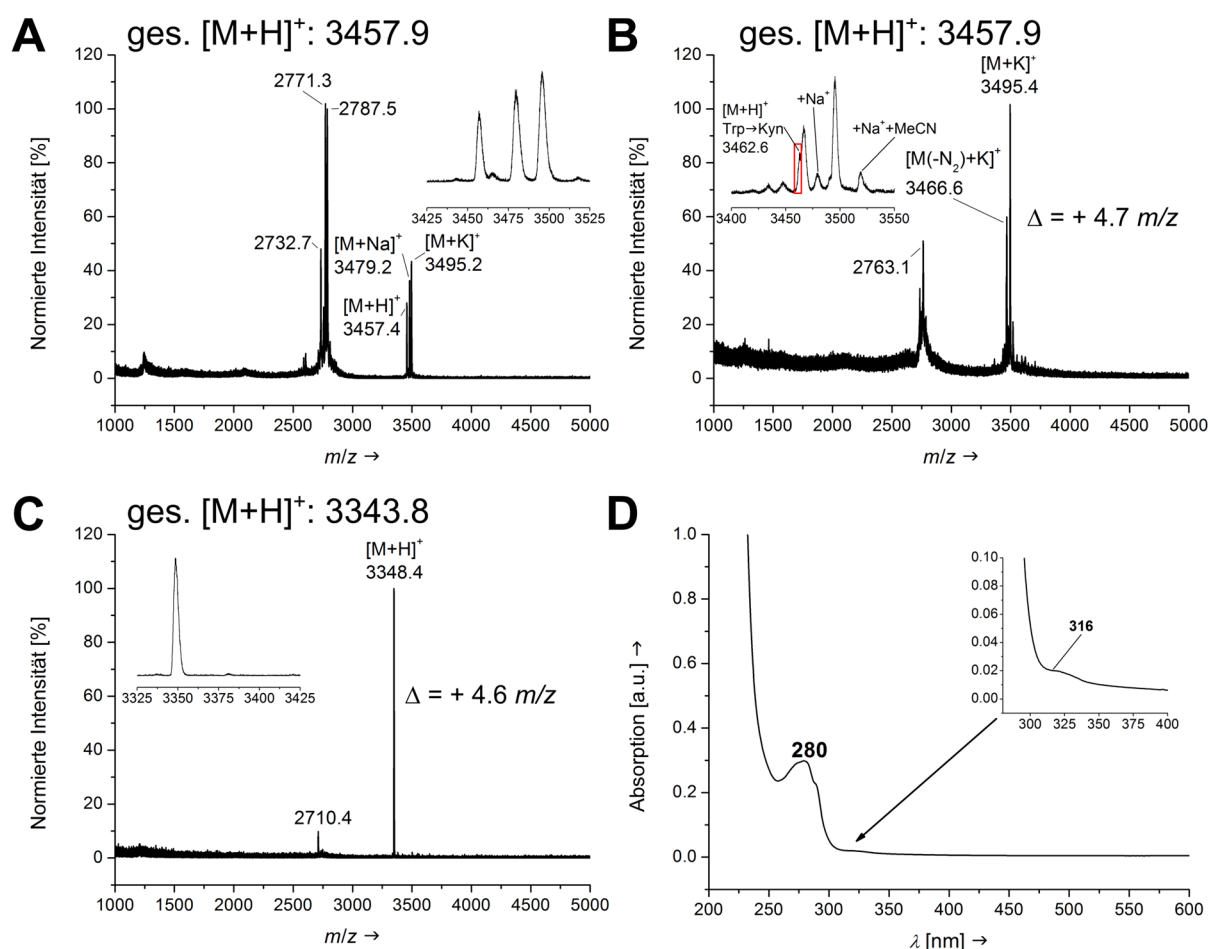


Abbildung 15: Vergleich der MALDI-TOF-Massenspektren zwischen den isolierten Produkten **18ab** aus A) Tabelle 14 – Eintrag 1 und B) Tabelle 14 – Eintrag 2 mit C) dem isolierten Produkt **18ag** aus Tabelle 14 – Eintrag 4 und D) dem entsprechenden Absorptionsspektrum (UV/VIS, Hintergrund korrigiert) einer in Acetonitril/Wasser (1:3, v/v, + 0.1 % TFA) gelösten Probe von **18ag**.

In drei der vier Fälle der in Tabelle 14 aufgeführten Reaktionen – Einträge 2-5 (HPLC-Spuren Abbildung 14) konnten die folgenden Gemeinsamkeiten mittels MALDI-TOF-MS ermittelt werden (für eine Übersicht siehe Kapitel 7.2.2). Neben den mit anteiliger Oxidation verunreinigten gewünschten Thioester-CuAAC-Konjugaten **18ab/18ae-ag** konnten für die mit

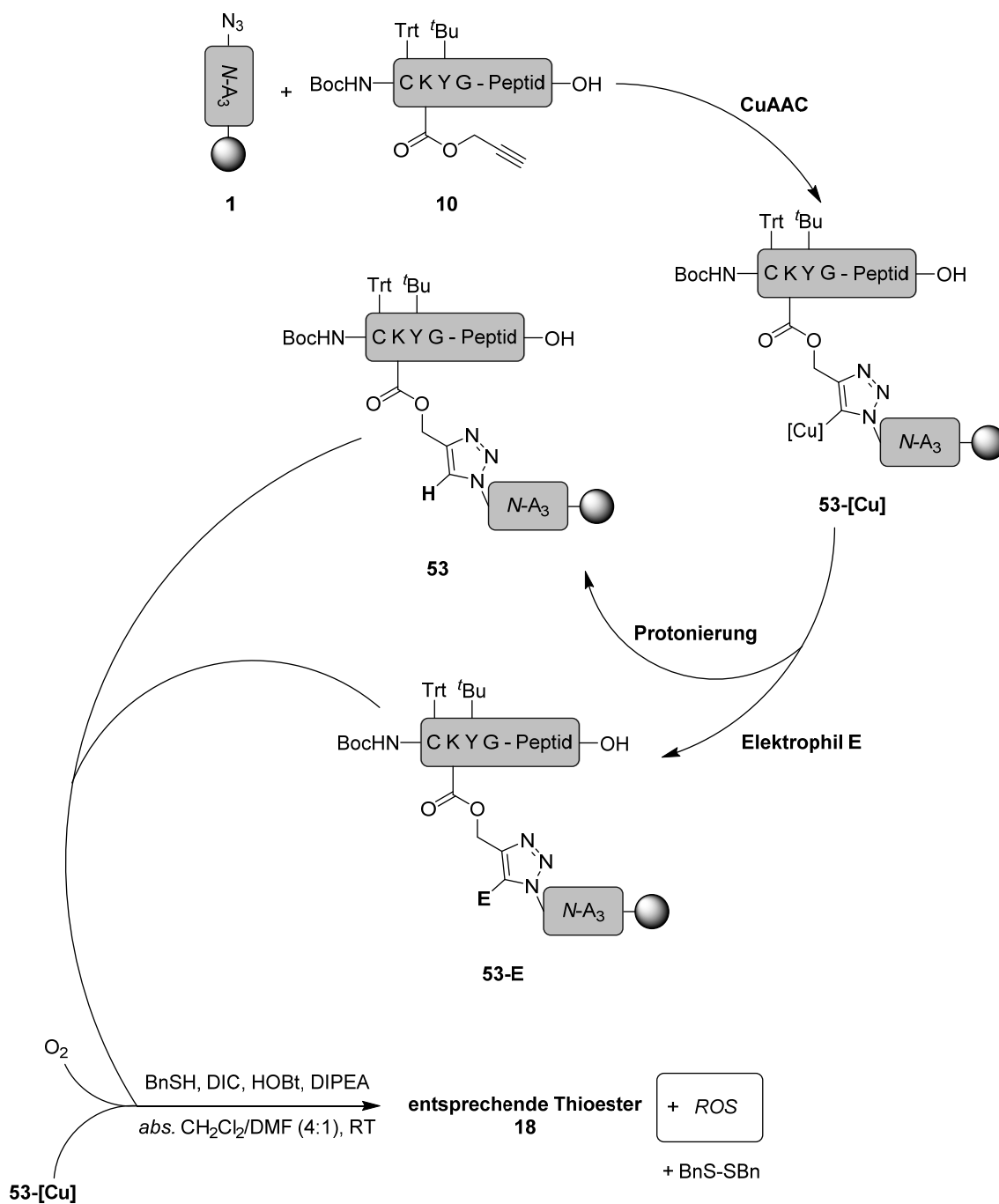
einer Retentionszeit versehenen Peaks der Chromatogramme aus Abbildung 14 Produkte mit gleichen Massendifferenzen zum entsprechenden Konjugat **18ab/18ae-ag** identifiziert werden. Für die Einträge 2-4 (Tabelle 14, Abbildung 15A ($t_R = 23.4$ min), B ($t_R = 24.4$ min) und C ($t_R = 22.8$ min)) wurden Nebenprodukte mit einer geringeren Retentionszeit als das gewünschte Produkt mit einer Massendifferenz von $-120 m/z$ nachgewiesen ($M_w(\text{Benzylmercaptan}) = 124 m/z$). Dies deutet auf eine *head-to-tail*-Zyklisierung (engl. Kopf-zu-Schwanz) der zu Kynurenin oxidierten Petidthioesterkonjugate **18** hin und setzt eine anteilige Trt-Entschützung des Cysteins im Thioesterifizierungsschritt voraus. Des Weiteren konnten Nebenprodukte mit einer höheren Retentionszeit und einer Massendifferenz von rund $-27 m/z$ für die Einträge 2-3 (Tabelle 14, Abbildung 15A ($t_R = 27.4$ min) und B ($t_R = 28.6$ min)) nachgewiesen werden.

Neben der angesprochenen möglichen, anteiligen Oxidation in Tabelle 14 – Einträge 2-4 (Abbildung 14), welche dann zu möglicher Folgechemie im Abspaltungsschritt mit TFA führen könnte, kann auch eine Funktionalisierung in 5-Position des innerhalb der CuAAC-Reaktion gebildeten Cu-Triazolids (vgl. **T4** in Schema 23) nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der Komplexität der Rohpeptidgemische und mangelnder chromatographischer Trennleistung, können diese Annahmen nur unzureichend untermauert werden. Aus diesen Gründen wird die Diskussion der Ergebnisse aus Tabelle 14 nach einer mechanistischen Betrachtung der Thiosterifizierung in Kapitel 3.3.8 fortgesetzt.

3.3.7 Mechanistische Betrachtung der Folgechemie durch Thioesterifizierung an der festen Phase

Die mögliche Chemie, die zu der Vielzahl an Nebenprodukten führte und durch die hohe Anzahl an Peaks in den Chromatogrammen wiedergespiegelt wird, soll im folgenden Abschnitt kurz hypothetisch erläutert werden. Gestützt werden diese Annahmen durch die beobachteten Massendifferenzen und liefern schlussendlich anhand der Ergebnisse die Möglichkeit, diese Nebenreaktionen zu unterbinden.

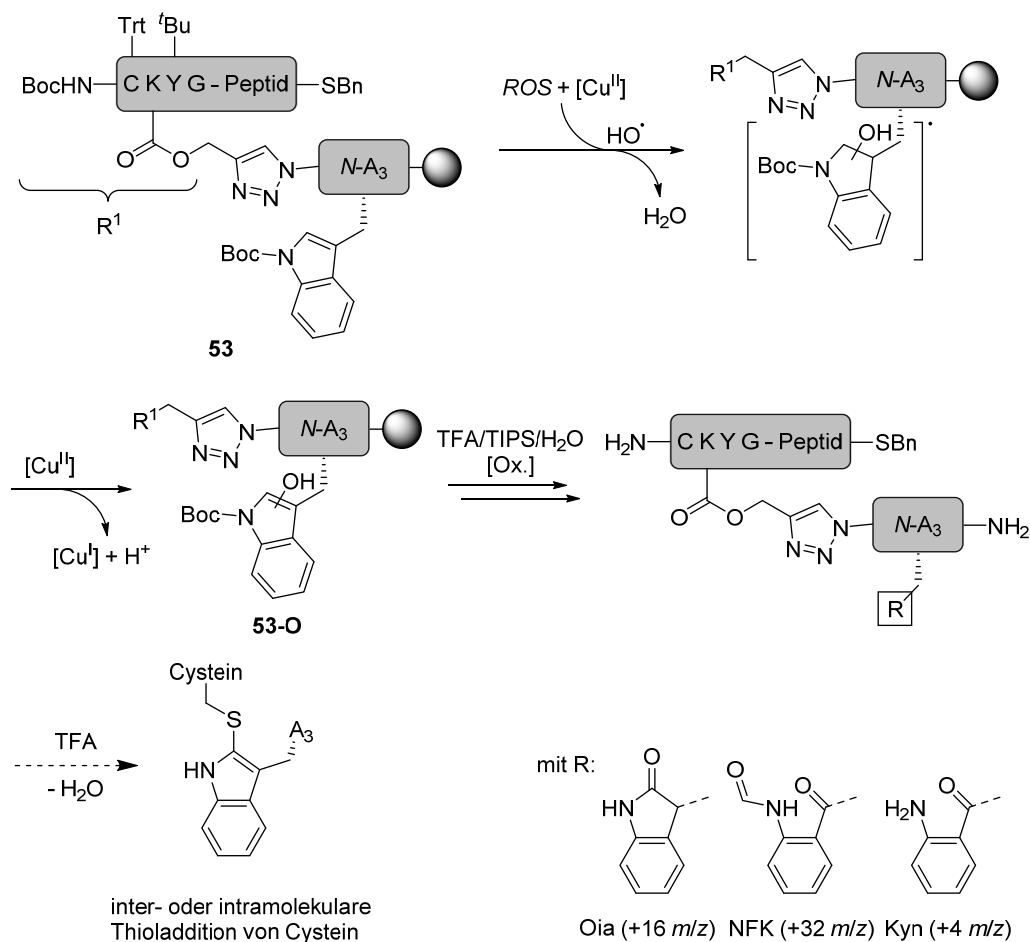
Wie bereits angesprochen zeigt der Vergleich der erhaltenen Chromatogramme zwischen Eintrag 1 (Tabelle 14, Abbildung 13A und B) und den Ergebnissen der Einträge 2-5 (Tabelle 14, Abbildung 14A-D), dass der Thioesterifizierungsschritt mit Benzylmercaptan und möglichen Restmengen an Luftsauerstoff zu Nebenreaktionen führt. Zu erklären ist dies durch vermutlich signifikante Mengen an 5-Kupfer(I)-Triazoliden **T4** aus der vorherigen CuAAC-Reaktion, wie beispielsweise in Schema 23 oder Schema 24 gezeigt. Diese waren unter den wasserfreien Bedingungen stabil und ließen sich nicht durch Ascorbat innerhalb der CuAAC-Reaktion zum gewünschten Produkt reprotonieren. Solche Komplexe zeigen mitunter eine große Stabilität. NOLTE *et al.* konnten beispielweise ein solches Kupfer(I)-Triazolid mit einem sterisch anspruchsvollen NHC-Liganden isolieren und darüber hinaus aus Dichlormethan/Pentan umkristallisieren.^[183] Neben Kupfer(I)-Triazolid-Resten sind auch Restmengen von an der Festphase verbliebenen Kupferresten denkbar, welche nicht durch die angewandten Waschschrte entfernt werden konnten. Das Waschen des Harzes nach der CuAAC-Reaktion mit *abs.* Dimethylformamid, Diethylether und Dichlormethan ist somit unzureichend.



Schema 24: Mögliche Folgechemie im Thioesterifizierungsschritt der innerhalb der CuAAC-Reaktion entstandenen [Cu]-Triazolid-Komplexe **53-[Cu]** mit einem Elektrophil **E** bzw. Luftsauerstoff. Für einen vorgeschlagenen Mechanismus des Abfangens des Kupfer(I)-Triazolids mit einem Elektrophil siehe WANG und WEI *et al.*^[184,185]

Die Bildung der Kupfer-Triazolid-Komplexe lässt sich an der Festphase nicht nachweisen, da innerhalb der sauren Testabspaltung der abschließende Protonierungsschritt unter Rückbildung des Katalysators ermöglicht wird (vgl. Qualität der Chromatogramme in Abbildung 13). Durch die anschließende Thioesterifizierung mit Benzylmercaptan,

1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), Diisopropylethylamin (DIPEA) und Diisopropylcarbodiimid (DIC) unter aeroben Bedingungen in einem Gemisch aus wasserfreiem Dichlormethan/Dimethylformamid (4:1, v/v) kann es durch Kupfer(I) oder Kupfer(II) zur Bildung von ROS kommen, welche bei längeren Reaktionszeiten zur Bildung von Nebenprodukten führen (Schema 24). Ebenso kann der Kupfer-Triazolid-Komplex, wie in Schema 24 gezeigt, durch Elektrophile in 5-Position alkyliert (**53-E**) werden. Nach WANG und WEI *et al.* sind solche Abfangreaktionen jedoch nur mit Elektrophilen mit guten Abgangsgruppen wie Alkylhalogeniden oder entsprechenden Heteroatomelektrophilen (Thio-, Seleno- und Amino-) untersucht worden.^[184,185] Das im Thioesterifizierungs-Cocktail enthaltene Elektrophil DIC könnte ebenfalls mit einem 5-Kupfertriazolid **53-[Cu]** reagieren.



Schema 25: Vorgeschlagener Reaktionspfad der möglichen Oxidation innerhalb des Thioesterifizierungsschritts frei adaptiert nach GRASSI *et al.*^[186] Anschließende Freisetzung von der Festphase mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser und säurekatalysierter Folgechemie mit freien Thiolen, hier Cystein.^[180,186] Der detaillierte Mechanismus der Oxidation von Tryptophan (ungeschützt) ist unbekannt.^[187]

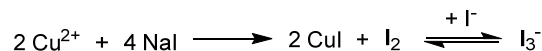
Analog der in Kapitel 3.3.3 beschriebenen HABER-WEISS-Reaktion, können gebildete ROS wie in Schema 25 gezeigt, zu beispielsweise einem Superoxid- oder Hydroxyl-Radikal reagieren, das anschließend den Indol-Ring des *N*-Boc-geschützten Tryptophans zu **53-O** hydroxylieren kann. Das gebildete Indol-Radikal kann anschließend Kupfer(II) zurück zu Kupfer(I) reduzieren, und das gebildete Oxindolalanine (Oia) kann anschließend weiter innerhalb der sauren Freisetzung von der Festphase mit TFA/TIPS/Wasser oxidiert werden.^[188] Auf diese Weise können neben dem Oia auch *N*-Formylkynurenin (NFK) und Kynurenin (Kyn) entstehen. Neben dieser indirekten Metall-katalysierten Oxidation in Schema 24 ist auch eine durch möglicherweise Triiodid oder Iodid verstärkte Oxidation denkbar, welche im Thioesterifizierungsschritt zum Tragen kommt. Die Bildung von Iod oder Triiodid beruht auf der Reduktion von Kupfer(II) mit Iodid (vgl. Schema 23). Die durch Iod oder formal „I⁺“-vermittelte Oxidation von Tryptophan ist hinlänglich bekannt.^[189] Dabei wird die Indol-Doppelbindung durch die Bildung eines Iodoniumions aktiviert und durch Wasser zum entsprechenden Oia unter Iodwasserstoff-Abspaltung umgesetzt. Dieses kann analog weiter oxidiert werden oder im Abspaltungsschritt ebenso säurekatalysiert inter- oder intramolekular mit der Thiol-Gruppe eines Cysteins kondensieren.^[180] Eine Kombination beider Oxidationsmöglichkeiten könnte die Vielzahl an Nebenprodukten mit einer möglichen Massendifferenz von +4, +16 und +32 *m/z* erklären, wobei allein die Masse +4 *m/z* eindeutig identifiziert werden konnte.

Wie bereits angesprochen kann eine Massendifferenz von rund -124 *m/z* für die beobachteten Nebenprodukte durch eine Zyklisierung des *N*-Cysteinylpeptidthioesters unter Freisetzung von Benzylmercaptan (-124 *m/z*) erklärt werden. Die Retentionszeiten dieser polarerer Produkte stützen dies.

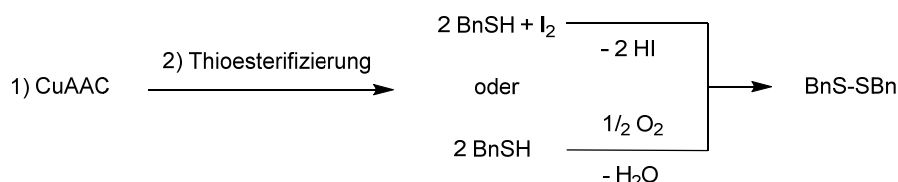
Die Massendifferenz von rund -30 *m/z* für die beobachteten, unpolarerer Nebenprodukte könnte ein Hinweis für die Bildung von Dehydroalanin (Dha, -34 *m/z*) ausgehend von Cystein mit anteiliger Tryptophanoxidation zu Kyn (+4 *m/z*) sein. Dies würde in der Tat bestätigen, dass Triiodid oder Iod innerhalb des Thioesterifizierungsschritts entstand (Tabelle 14 – Einträge 2-5). Es ist bekannt, dass Trt-geschütztes Cystein durch Iod in Anwesenheit eines Disulfids, z. B. Benzylsulfid, in das entsprechende Cystein-Benzylmercaptandisulfid überführt wird. Diese Reaktion verläuft häufig innerhalb weniger Minuten in Dimethylformamid ab.^[190] Für eine detaillierte Übersicht möglicher Reaktionen zwischen Cystein und Iod siehe beispielsweise RAMACHANDRAN.^[191] Solche Disulfide können anschließend unter den herrschenden basischen Bedingungen mit DIPEA zum

Dehydroalanin eliminieren.^[192] Der entsprechende Mechanismus ist in Schema 26 vereinfacht skizziert.

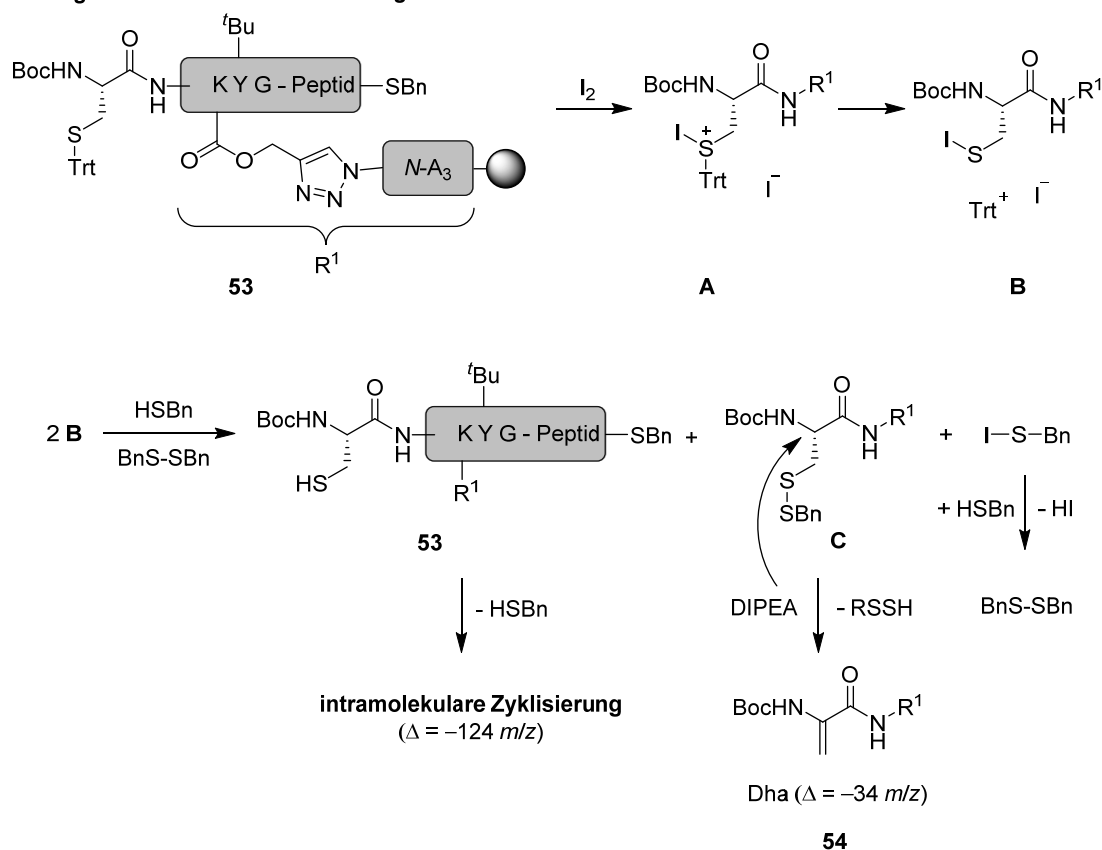
A.1) Mögliche Bildung von Iod und Triiodid innerhalb der CuAAC:



A.2) Mögliche Bildung von Benzyldisulfid in der Thioesterifizierung bei Restmengen Kupfer(II) und Iodid:



B.1) Mögliche Iod-vermittelte Trt-Spaltung innerhalb CuAAC-Reaktion mit Folgechemie in Thioesterifizierungsschritt:



Schema 26: Übersicht über Ursprung und mögliche Folgechemie von Iod. A.1) Bildung von Iod innerhalb der CuAAC-Reaktion.^[177] A.2) Bildung von Benzyldisulfid durch Restmengen an Kupfer, Iod oder Luftsauerstoff innerhalb des Thioesterifizierungsschritts. B.1) Iod-vermittelte Oxidation des Trityl-geschützten Cysteins in **53** unter Bildung eines Iodsulfoniumions **A**, das zum entsprechenden Sulfenyliodid **B** reagiert.^[190] Dieses kann dann mit Benzylmercaptan zum entsprechenden Trt-entschützten Peptidthioester reagieren oder durch in Lösung oxidiertes Benzylsulfid zum gemischten Disulfid **C** reagieren. Ersteres kann anschließend unter den basischen Bedingungen mit DIPEA im Thioesterifizierungsschritt harzgebunden zyklisieren und Letzteres zu Dehydroalanin **54** eliminieren.^[192]

Wie in dem Mechanismus in Schema 23 bzw. Schema 26 A.1) dargestellt, kann Kupfer(II) durch Natriumiodid zu Triiodid oder Iod reduziert werden. Das Iodid stammt dabei aus dem Kupfer-Triazolid-Komplex **T4**. Benzylmercaptan kann Metall-katalysiert, durch Luftsauerstoff oder durch eine Oxidation mit Iod in das entsprechende Benzyldisulfid überführt werden (Schema 26 A.2)). Wie in Schema 26 B.1) gezeigt reagiert Iod unter Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe zum Sulfenyliodid **B**, welches anschließend auf mindestens zwei Wegen weiterreagieren kann. Mit Benzylmercaptan, welches im Thioesterifizierungsschritt im starken Überschuss vorliegt, kann es unter Bildung von Benzylsulfenyliodid zur Reprotonierung des Thiols kommen, welches anschließend harzgebunden intramolekular mit dem C-terminalen Thioester reagiert und zyklisiert. Des Weiteren kann **B** durch die Reaktion mit dem Benzyldisulfid zum gemischten Disulfid **C** austauschen. Dieses eliminiert anschließend zum Dehydroalanin **54** mit einer Massendifferenz von $-34 m/z$. Mittels MALDI-TOF-MS wurden eine Massendifferenz von $-30 m/z$ festgestellt und legt, wie bereits zuvor beschrieben, eine zusätzliche anteilige Oxidation von Tryptophan zu Kyn ($+4 m/z$) nahe. Wenngleich die beobachteten Mengen an Nebenprodukten zu gering für eine ausführliche Analytik waren, legen die Chromatogramme und MALDI-TOF-Massenspektren eine solche Art der Iod-unterstützten Redox-Chemie in Verbindung mit Benzylmercaptan und Restmengen an Kupfer nahe. Ein Nachweis für eine Funktionalisierung in 5-Position mit beispielsweise DIC konnte in allen Fällen nicht bestätigt werden.

3.3.8 Optimierungsversuche an der Festphase

Da gemäß der Ergebnisse der Tabelle 14 (Einträge 2-5) offensichtlich noch signifikante Mengen an Kupfer am Harz vorhanden waren, wurde eine Möglichkeit gesucht, diese im Waschschrift der Festphase nach der CuAAC-Reaktion zu minimieren oder sogar vollständig zu entfernen. Hierfür wurde die Reaktion nochmals mit *N*-Boc-Lys(Proc)-OH (**6**) als Modellreaktion durchgeführt (Tabelle 14, Eintrag 6). Dabei wurde festgestellt, dass die CuAAC-Reaktion bereits nach 9 h Reaktionszeit vollständig abgelaufen war. Zur Spaltung möglicher Kupfer-Triazolid-Komplexe und Abtrennung schwerlöslicher Kupferkomplexe wurde das Harz ausgiebig mit Versene-Lösung, einer 60%-igen ethanolischen EDTA-Lösung, gewaschen. Die anschließende Thioesterifizierung zum gewünschten Produkt verlief ohne nennenswerte Mengen an Nebenprodukten und nur Spuren an vermeintlicher Trp-

Oxidation (geringfügig polarere Retentionszeit als die des Produkts **18bt**) konnten detektiert werden. Die entsprechenden HPLC-Spuren sind in Abbildung 16 gezeigt. Die MALDI-TOF-Massenspektren zeigten keine Peakverbreiterung in Form einer Massendifferenz von +4 m/z und bestätigten die Notwendigkeit eines zusätzlichen Waschschriffs zur Abtrennung möglicher Kupferreste von der Festphase.

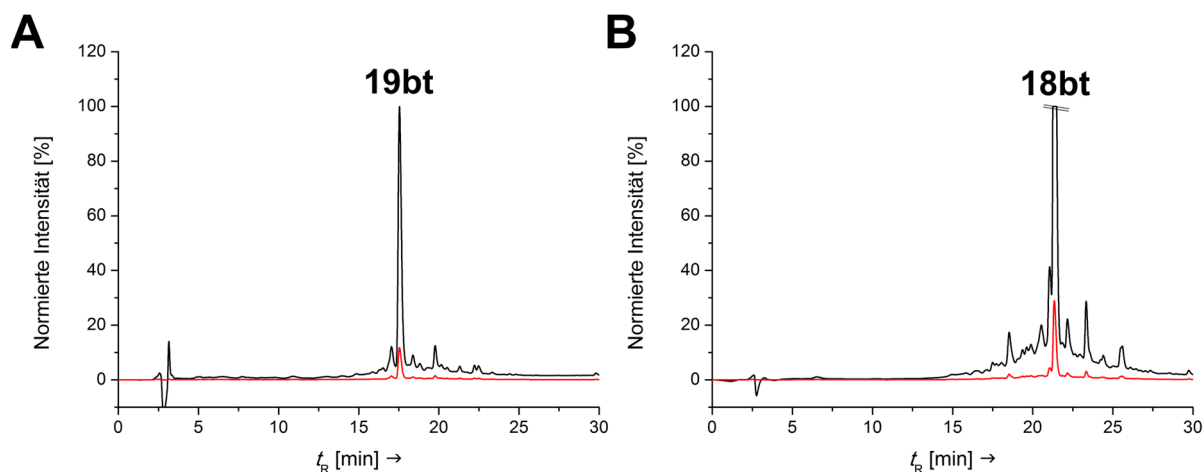


Abbildung 16: Übersicht der HPLC-Spuren (analytisch, Gradient 30-60% Acetonitril in Wasser + 0.1% TFA, 30 min, 50 °C; *schwarz*: 220 nm und *rot*: 280 nm) der erhaltenen Rohprodukte nach A) CuAAC-Reaktion nach 23 h (9 h identisch) und B) Thioesterifizierung der Reaktion von **1b** mit **6** (Tabelle 14 – Eintrag 6). Mit CuAAC-Produkt (**19bt**, Peptidsäure) und Thioesterifizierungsprodukt (**18bt**).

Für eine bessere Vergleichbarkeit dieses Ergebnisses (Tabelle 14, Eintrag 6) wurde die Reaktion mit der vollgeschützten Peptidsäure **10b** wiederholt und ebenfalls mit Versene-Lösung gewaschen (Tabelle 14, Eintrag 7). Da das Azid innerhalb der semipräparativen HPLC-Aufreinigung abtrennbar ist, wurde in diesem Fall ein angenommener Überschuss von 2 Äq. Azid-Harz eingesetzt. Die Menge an Kupfer(I)iodid und NaAsc gegenüber des Alkins **10b** wurde erhöht, aber die Reaktionszeit auf 5 h gesenkt (Tabelle 14, Eintrag 7). Die Reaktion zeigte einen geringen Umsatz an Azid an ($\ll 50\%$, Abbildung 17A). Da in den vorangegangenen Versuchen (Tabelle 14, Einträge 2-5) noch Reste an freier Peptidsäure **19** nach der Thioesterifizierung festgestellt wurden, wurde nun der Einfluss von zusätzlicher Base, hier DIPEA, innerhalb des Thioesterifizierungsschritts untersucht. Dazu wurde der Ansatz geteilt und analog mit und ohne Base thioesterifiziert. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 17B und C gezeigt, dass die Reaktion ohne Aminbase signifikant schneller verlief. Die eingesetzte Aminbase könnte im Allgemeinen im Thioesterifizierungsschritt stören und die durch DIC-aktivierte Carbonsäure in Form des *O*-Acylisoharnstoffs deaktivieren, wodurch die Reaktion verlangsamt wird (siehe Kapitel 3.2.3).

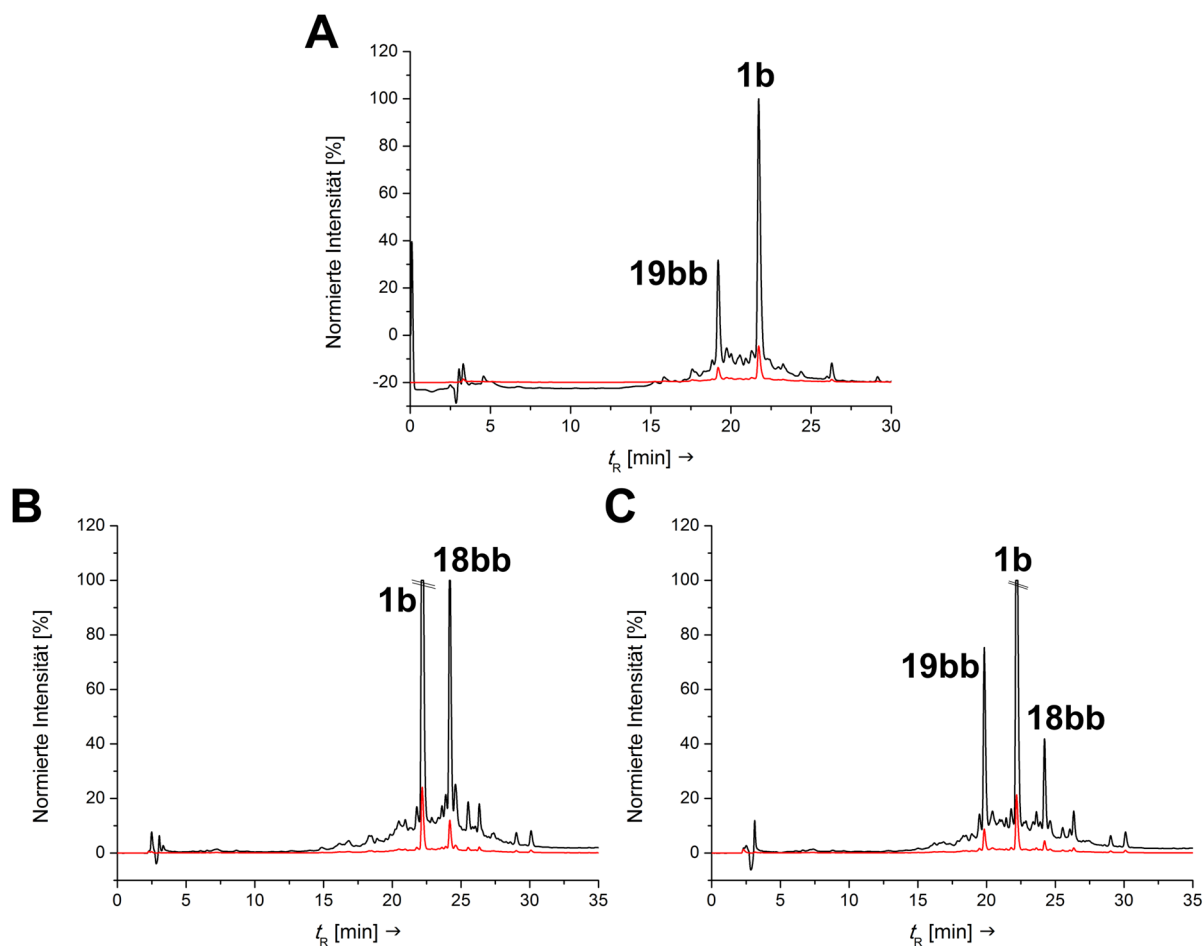


Abbildung 17: Übersicht der HPLC-Spuren (analytisch, Gradient 30-60% Acetonitril in Wasser + 0.1% TFA, 30 min, 50 °C; schwarz: 220 nm und rot: 280 nm) der erhaltenen Rohprodukte. A) Nach der CuAAC-Reaktion von **1b** mit **10b** nach 5 h und B) anschließender Thioesterifizierung der Reaktion ohne DIPEA und C) mit DIPEA (C, Tabelle 14 – Eintrag 7). Mit Azid (**1b**), CuAAC-Produkt (**19bb**, Peptidsäure) und Thioesterifizierungsprodukt (**18bb**).

Die darauffolgenden drei Reaktionen (Tabelle 14, Einträge 8-10) wurden nun nochmals unter Berücksichtigung der Beladungsdichte des Azid-gebundenen Peptidharzes **1b** durchgeführt. Dabei wurden das Azid **1b** mit den entsprechenden vollgeschützten Peptidsäuren **10** in äquimolaren Mengen umgesetzt. Die Menge an Kupfer(I)iodid wurde zunächst in Eintrag 8 im Vergleich zu Eintrag 1 (Tabelle 14) vermindert, die Menge an Natriumascorbat entsprach hierbei in etwa der gleichen Menge. Die Reaktionszeit der CuAAC-Reaktion wurde auf 26 h verkürzt. Die Reaktion zeigte nur einen Umsatz von weniger als 50% gegenüber eingesetztem Azid **1b**. Die Thioesterifizierung verlief ohne detektierbare Nebenprodukte, jedoch zeigte das isolierte Produkt **18bf** Spuren an 5-Iod Nebenprodukt im MALDI-TOF-MS an. In Tabelle 14 – Eintrag 9 wurde die Menge an Kupfer(I)iodid/NaAsc auf je 11 Äq. ähnlich zu Tabelle 14 – Eintrag 7 erhöht. In diesem Fall konnte nach einer analogen Reaktionszeit und entsprechender

Thioesterifizierung ausschließlich das in 5-Position iodierter Produkt **18bg-I** mit Spuren an gewünschtem Produkt **18bg** (MALDI-TOF-MS) erhalten werden. Die entsprechende HPLC-Spur des Rohprodukts sowie das MALDI-TOF-Massenspektrum sind in Abbildung 18 gezeigt.

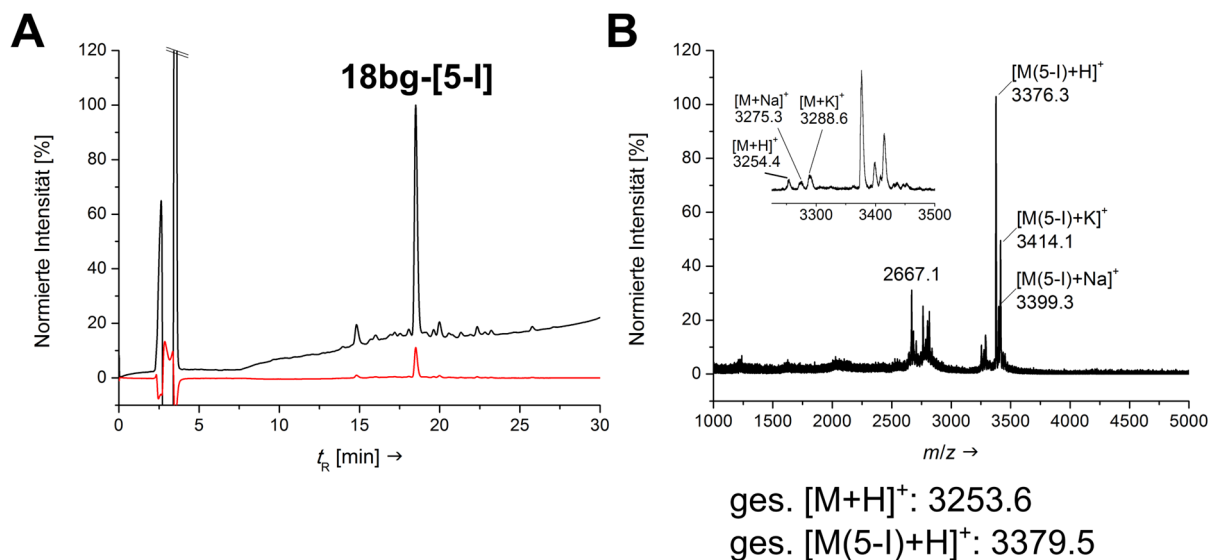


Abbildung 18: Übersicht des aus einer Reaktion im starken Überschuss mit Kupfer(I)iodid/Natriumascorbat erhaltenen Produkts. A) Rohchromatogramm (analytisch, Gradient 30-60% Acetonitril in Wasser + 0.1% TFA, 30 min, 50 °C; *schwarz*: 220 nm und *rot*: 280 nm) und B) MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten Produkts **18bg-I** (Tabelle 14 – Eintrag 9).

Die hauptsächliche Bildung des 5-Iodtriazol Produkts **18-I** scheint somit stark abhängig von der eingesetzten Menge an Präkatalysator und Natriumascorbat, sowie dem Alkin-zu-Azid-Verhältnis zu sein.

Die Verminderung der Menge an Kupfer(I)iodid und Natriumascorbat auf vergleichbare Mengen der als optimal erscheinenden Bedingungen aus Tabelle 14 – Eintrag 6, bei gleichzeitiger Erhöhung der Reaktionszeit auf 48 h, führte zu keinerlei Umsatz und das Azid **1b** wurde zurückerhalten (Tabelle 14, Eintrag 10).

Zur Vollständigkeit sei noch genannt, dass eine Übertragung der Bedingungen aus Kapitel 3.3.3 nicht möglich war. Zwar konnte gezeigt werden, dass das Harz sehr gut in *tert*-Butanol/Wasser (7:3, v/v) quillt, allerdings konnte keinerlei Umsatz unter den Bedingungen mit Kupfer(II)sulfat/THPTA (6.7 mM/13.4 mM) und NaAsc (10.0 mM) nach 14 h Reaktionszeit bei 40 °C erhalten werden. Eine weitere Reaktion mit Kupfer(I)iodid (20 mM) in *abs.* Dimethylsulfoxid/Acetonitril (1:4, v/v) mit 2,6-Lutidin als Ligand bei 40 °C

scheiterte aufgrund mangelnder Quelleigenschaften des Polymerharzes in diesem Lösungsmittelgemisch.

Damit lässt sich konstatieren, dass die CuAAC-Reaktion an der Festphase in der Tat nicht mit Azid-gebundenen Substraten reproduzierbar war und nicht praktikabel durchgeführt werden kann. Bei sehr großen Überschüssen an Alkin **10** (≥ 10 Äq.) konnten die entsprechenden CuAAC-Konjugate **18** in variierenden Umsätzen bezogen auf das Azid **1a** dargestellt werden. Durch das Auswaschen von Kupferresten mit Versene-Lösung konnte jedoch eine Verminderung an oxidierten Nebenprodukten im darauffolgenden Thioesterifizierungsschritt erreicht werden, was fundamental für eine erfolgreiche Thioesterifizierung war. Es stellte sich des Weiteren heraus, dass der Einsatz von DIPEA als Base zu einer Verlangsamung der Thioesterifizierung führte. Durch die Übertragung der Ergebnisse auf die Umsetzung mit äquimolaren Mengen an polymergebundenem Azid **1b** mit Alkin **10** konnte anschließend gezeigt werden, dass die CuAAC-Reaktion in der hier vorgestellten Art und Weise an der Festphase nicht zu realisieren ist. Für eine zukünftige Strategie mit Alkin-gebundenen Peptidharzen sollten aber die vorgestellten Ergebnisse eine fundierte Grundlage für eine erfolgreiche CuAAC-Reaktion an der Festphase mit anschließender Thioesterifizierung bieten.

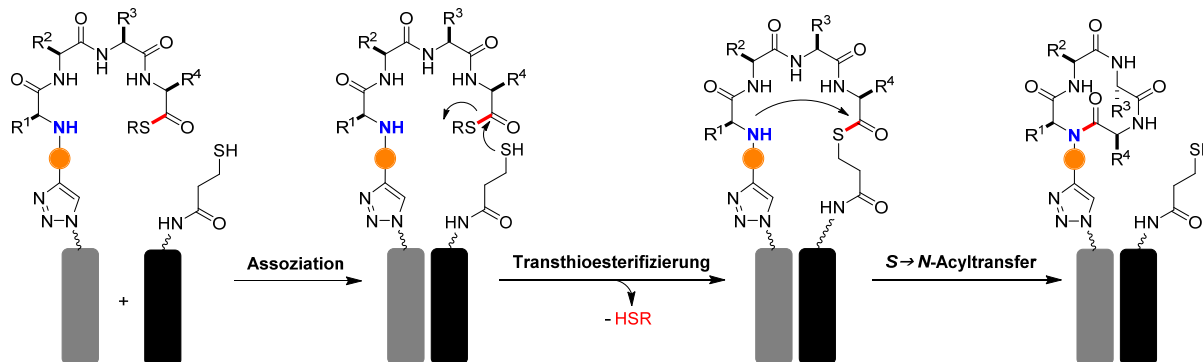
3.3.9 Kurzzusammenfassung der CuAAC-Reaktion

Die Entwicklung eines effizienten Kupfer-katalysierten Azid-Alkin Cycloadditions (CuAAC)-Protokolls für die Dekoration von Coiled-Coil-Peptiden in Lösung konnte erfolgreich und reproduzierbar gezeigt werden. Dieses Protokoll nutzt *tert*-Butanol und PBS-Puffer als Lösungsmittelgemisch, Kupfersulfat und THPTA in einem 1:2-Verhältnis und reduzierendes Natriumascorbat als katalytisches System (Kapitel 3.3.1). Diese Bedingungen tolerieren alle Aminosäuren wie auch gebräuchliche Tag- und Fluoreszenzlabel (Kapitel 3.3.2). Mit *N*-Alanylpeptidthioestern **9a** (Kapitel 3.3.1) und mit *N*-Cysteinylpeptidthioestern **9b** (Kapitel 3.3.2 und 3.3.3) konnten entsprechende *N*-Azidocoils **1** erfolgreich dekoriert werden, wobei sich *N*-terminales Cys als anspruchsvolle Herausforderung erwies. Innerhalb dieser Studien konnte eine anteilige Formylierung des *N*-terminalen Cysteinylpeptids **9b** beobachtet werden, welche bisher noch nicht im Kontext der CuAAC-Reaktion beschrieben wurde. Die mechanistische Analyse mit deuteriertem *tert*-Butanol als Lösungsmittelkomponente führte anschließend zur Identifizierung der Formylquelle. Durch Oxidation mit

ROS reagiert und zerfällt *tert*-Butanol zu Formaldehyd, Methanol und Sauerstoff. Es wurde weitergehend festgestellt, dass die Formylierung von *N*-Cys zu Thiazolidin (Thz) in einem Gleichgewicht mit der Kupfer(II)-vermittelten Thiazolidinspaltung steht, und dass dieses Gleichgewicht durch die Menge an Kupfer(I)-stabilisierendem THPTA-Liganden beeinflusst werden kann. Durch ein Kupfersulfat-zu-THPTA-Verhältnis von 2:1 unter ansonsten identischen Bedingungen konnte das gewünschte Kondensationsprodukt in 74% Ausbeute erhalten werden. Nach bestem Wissen berichteten nur zwei Veröffentlichungen die CuAAC-Reaktion von Peptiden mit *N*-terminalem Cystein. Allerdings wurden hohe Mengen an Kupfer(II) und/oder Ligand zusammen mit langen Reaktionszeiten benötigt.^[129,130] Der hier beschriebene Ansatz ist hingegen schnell und verläuft unter milden Bedingungen. Durch eine eingehende Betrachtung der literaturbekannten, postulierten Mechanismen der CuAAC-Reaktion konnten somit geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden, unter welchen die unerwünschte Nebenreaktion unterdrückt bzw. die Reaktion zum gewünschten Produkt favorisiert wurde. Ebenso konnten die Reaktionen auf präparativ sinnvolle Mengen hochskaliert (*Upscaling*) werden. Wenngleich die Entwicklung einer CuAAC-Reaktion an der Festphase als alternativer Zugang nicht erfolgreich war, wurden in den Kapiteln 3.3.6 und 3.3.8 fundierte Ergebnisse für zukünftige, harzgebundene Alkine und deren CuAAC-Reaktion erhalten. Durch die Entwicklung dieses robusten Synthesezugangs zur Dekoration von Coiled-Coils mit Peptidthioestern, sollte nun im nächsten Schritt die Coiled-Coil-vermittelte Synthese zyklischer Peptide untersucht werden.

3.4 Coiled-Coil-vermittelte Lactamierungs- und Ligationsreaktionen

Zur Untersuchung der Templat-vermittelten Makrozyklisierung ungeschützter Peptidthioester **9** wurden nun die in Kapitel 3.3 synthetisierten Coil-Peptid-gebundenen Peptidthioester **18** untersucht. In Verbindung mit den in Kapitel 3.2.2 synthetisierten Thiol-Coil-Peptiden **4** sollte das sich in Lösung bildende Coiled-Coil (CC) als Reaktionstemplat dienen. Die entsprechende Makrozyklisierung sollte über eine *head-to-tail*-Zyklisierung (dt.: Kopf-zu-Schwanz) erfolgen. Dabei eröffnen sich die beiden folgenden Möglichkeiten: 1) Die Lactamisierung, also direkte Aminolyse, durch den nukleophilen Angriff der α -Aminogruppe der *N*-ständigen Aminosäure eines ungeschützten Peptidthioesters oder 2) die Native Chemische Ligation (NCL) durch die Cystein-beschleunigte intramolekulare Thioesterbildung. Die NCL bietet hier den Vorteil, dass allein das *N*-terminale Cystein nach dem reversiblen *S*→*S*-Transthiosterifizierungsschritt in einem irreversiblen *S*→*N*-Acylshift zum gewünschten Cyclopeptid reagieren kann und somit chemoselektiv ist.^[81] Die direkte Aminolyse hingegen verläuft oft langsam, unselektiv und damit in schlechten Ausbeuten.^[76] In Schema 27 ist der vorgeschlagene Verlauf der angestrebten CC-vermittelten direkten Aminolyse exemplarisch gezeigt.



Schema 27: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Coiled-Coil-vermittelten direkten Aminolyse zur Darstellung zyklischer Peptide.

Durch die in Schema 27 gezeigte Intramolekularisierung einer geeigneten Präzyklisierungskonformation des ungeschützten Peptidthioesters, sollte anhand der klassischen *head-to-tail*-Zyklisierung untersucht werden, ob eine Templat-vermittelte Zyklisierung ebenfalls über Coiled-Coil-Wechselwirkungen realisiert werden kann.

3.4.1 Coiled-Coil-vermittelter Ansatz zur direkten Aminolyse

Für die Untersuchungen der Templat-vermittelten direkten Aminolyse eines mittels CuAAC-dekorierten Coil-Peptids mit einem Peptidthioester **18** als Zyklisierungsvorläufer wurde das Heptapeptid **9a** ausgewählt (Abbildung 19). Die Synthese der Peptidvorläufer, für die in diesem Kapitel besprochene Coiled-Coil (CC)-vermittelte direkte Aminolyse, erfolgte gemäß der in Kapitel 3.3 vorgestellten optimierten CuAAC-Reaktion zwischen dem Alkin-funktionalisierten Peptidthioester **9a** und den entsprechenden Aziden **1**. Auf diese Weise konnte der Zyklisierungsvorläufer in einem kombinatorischen Ansatz an Coil-Peptiden verschiedener, *N*-terminaler Linkerlängen dargestellt werden. Die Synthese der Thiol-funktionalisierten Coil-Peptide erfolgte gemäß Kapitel 3.2.2 über die klassische Festphasenpeptidsynthese an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix Harzen. Eine Übersicht der primären Sequenzen der verwendeten Coiled-Coils ist in Tabelle 15 aufgeführt.

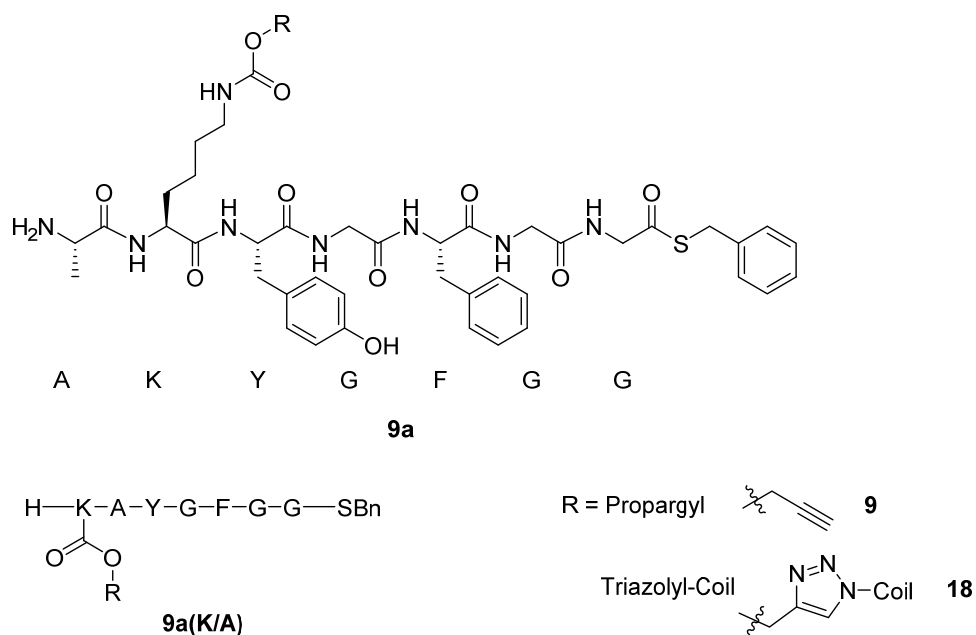


Abbildung 19: Struktur und Sequenzen der in der Templat-vermittelten direkten Aminolyse (Laktamisierung) untersuchten Peptidthioester **9a** und **18**.

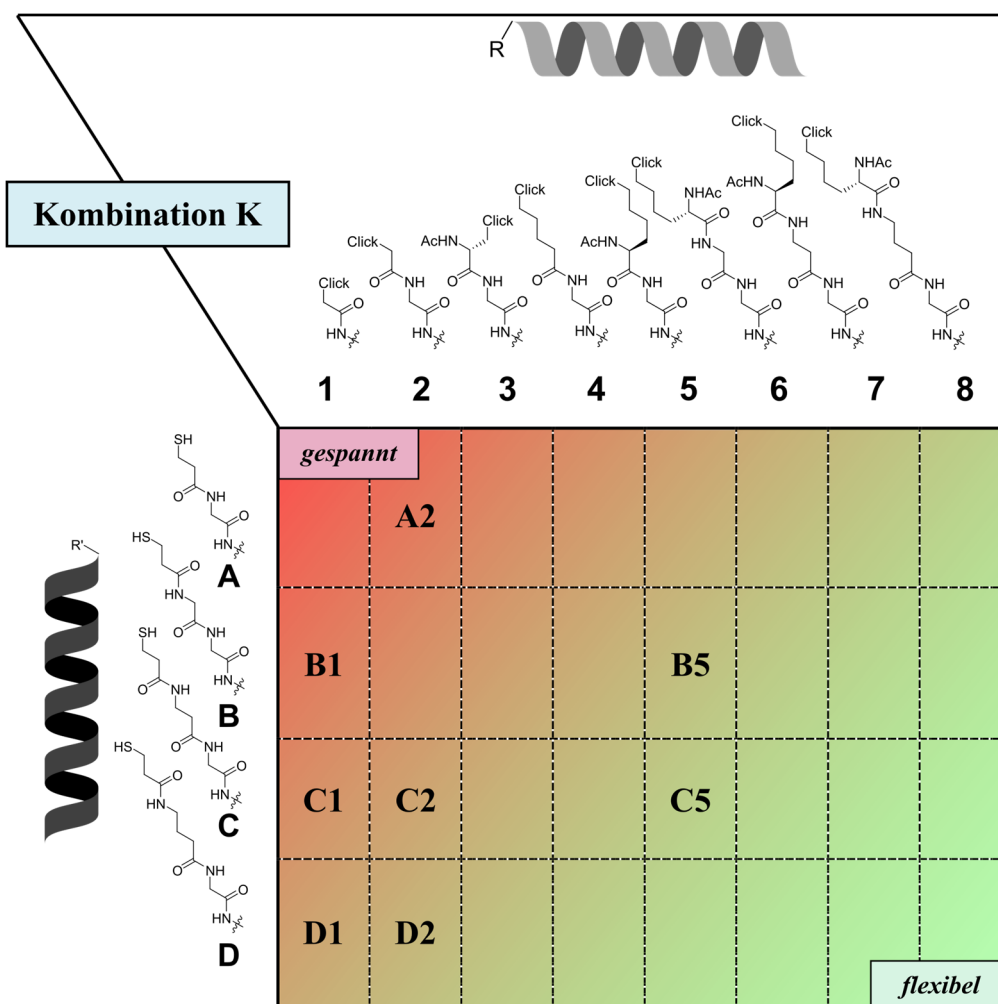
Auf diese Weise kann eine Bibliothek an Thioester-Coil-Peptiden **18** und Thiol-Coil-Peptiden **4** erhalten werden, die gemäß Tabelle 16 miteinander kombiniert werden können. Durch die Wahl geeigneter Kombinationen kann somit der Einfluss der Flexibilität des Systems auf die Aminolyse-getriebene Zyklisierung studiert werden.

Tabelle 15: Sequenzen der *de novo* designten heterodimeren Coils.^[15]

Coil-Peptide	Sequenz und Heptadenregister			
		<i>gabcdef</i>	<i>gabcdef</i>	<i>gabcdef</i>
1 N-A ₃	Linker	EIAALEK	ENAALEW	EIAALEQ GG
1(K7Q) N-A ₃ (K7Q)	Linker	EIAALEQ	ENAALEW	EIAALEQ GG
4 N-B ₃	Linker	KIAALKY	KNAALKK	KIAALKQ GG

Aus der Fülle der 32 möglichen Kombinationen wurden, wie in Tabelle 16 gezeigt, zunächst die Coil-Peptide mit Azid-Linkern mittlerer bis sehr kurzer Länge untersucht.

Tabelle 16: Übersicht (schematisch) der 32 möglichen Kombinationen der Linker an Coil-Peptid A₃ (**18**, *grau*) und B₃ (**4**, *schwarz*). Die untersuchten Linker werden als Kombination aus z. B. KA**1** angegeben.

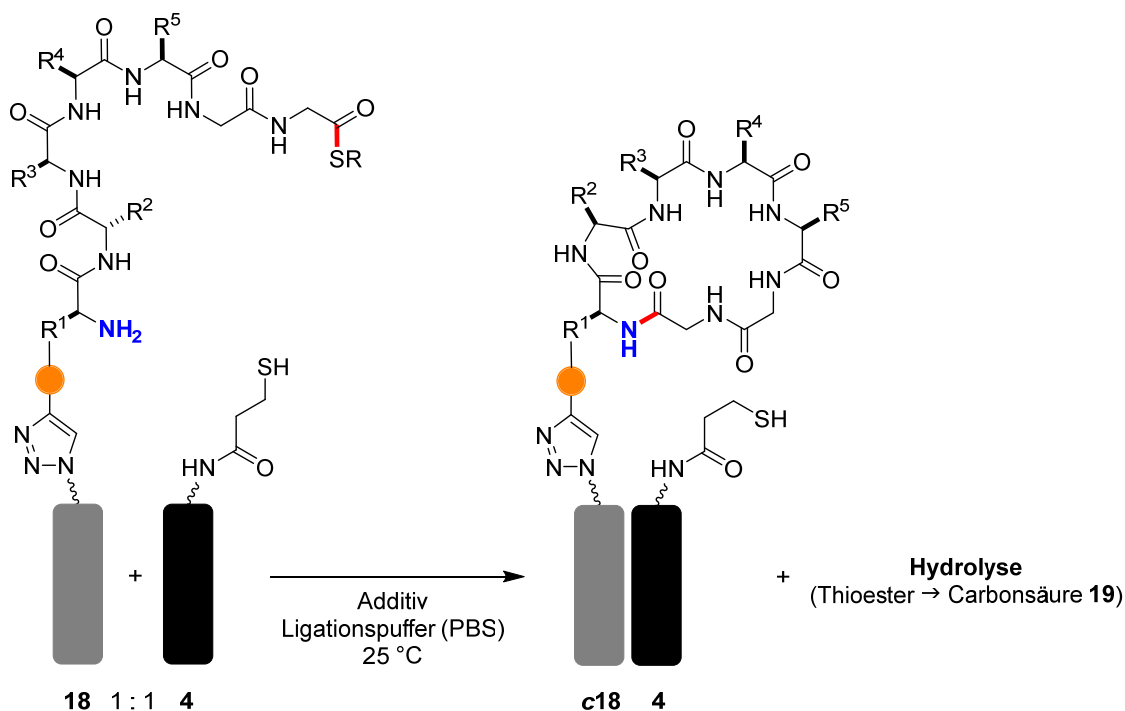


Diese Linkerlängen wurden unter der Annahme gewählt, dass die Haarnadelstrukturen mit geringeren, konformationellen Freiheiten eine Abreaktion durch Aminolyse beschleunigen.

Ergebnisse und Diskussion

Über die Assoziation der ungefalteten Peptide war postuliert, dass sich zunächst das heterodimere, parallele Coiled-Coil bildet.^[32] Über eine Transthoesterifizierung des Thiolstrangs (**4**, Acylakzeptorstrang) mit dem C-terminalen Thioester des Zyklisierungsvorläufers (**18**, Acyldonorstrang) wird unter Abspaltung des Mercaptans, hier Benzylmercaptan, eine Haarnadelstruktur ausgebildet. Durch die geeignete Wahl der verwendeten Linkerlängen zwischen den funktionellen Gruppen kann die Haarnadelstruktur modelliert und eine räumliche Nähe zwischen *N*- und *C*-Terminus des Zyklisierungsvorläufers erreicht werden. Auf diese Weise wird die Zielsequenz präzyklisiert und der intramolekulare *S*→*N*-Acyltransfer und somit die *head-to-tail*-Zyklisierung (*engl.* Kopf-zu-Schwanz) unter Freisetzung des *N*-Thiolstrangs **4** erleichtert. Eine Voraussetzung für die Zyklisierung über die direkte Aminolyse ist, dass durch die räumliche Nähe beider Gruppen der *pK_s*-Wert des freien Amins ausreichend abgesenkt ist.

Zur Untersuchung dieser Annahme wurde das mit dem Zyklisierungsvorläufer dekorierte Coil-Peptid zusammen mit dem Thiol-funktionalisierten Coil **4** in einem 1:1-Verhältnis vorgelegt. Durch Zugabe eines Ligationpuffers wurde die Reaktion gestartet (Schema 28).



Schema 28: Schematische Darstellung der CC-vermittelten direkten Aminolyse.

Als Puffersystem für die CC-vermittelte direkte Aminolyse wurde zunächst ein Gemisch aus Natriumascorbat (NaAsc) und Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in PBS-Puffer (pH 7.5) nach ROHDE *et al.* gewählt.^[176] Die Forschungsgruppe um SEITZ konnte anhand dieses

Ergebnisse und Diskussion

Gemisches zeigen, dass die NCL sehr gut und unter diesen Bedingungen ohne die Bildung von Nebenprodukten gelingt. Da es unter der Verwendung von TCEP als Reduktionsmittel innerhalb längerer Reaktionszeiten zur Entschwefelung kommen kann, was am Beispiel der Umwandlung von Cystein in Alanin bzw. Dehydroalanin gezeigt wurde, konnte mit Natriumascorbat als Additiv diese Nebenreaktion unterdrückt werden.

Zunächst wurde der Zyklisierungsvorläufer mit mittlerer Linkerlänge (Lys(N₃)Gly, siehe Tabelle 16 „5“) in der Umsetzung mit den Thiol-Coils, Thiol B (KB5) und C (KC5), gegenüber einer Hintergrund- bzw. Kontrollmessung (ohne Thiol-Coil, K-5) verglichen. Des Weiteren wurde eine kurze Thioesterpeptidsequenz (Linker Gly(N₃)Gly, „2“) mit Thiol C (KC2) und einem noch etwas längeren Thiol D (γ AbuGly, KD2) verglichen. Alle Reaktionen wurden in 0.1 mM Konzentration durchgeführt. Die Reaktionsverfolgung erfolgte durch die Entnahme eines Aliquots aus dem Reaktionsgemisch, welches zur Reaktionsbeendigung zu Ameisensäure gegeben und anschließend mittels RP-HPLC analysiert wurde. Eine solche repräsentative Reaktionsverfolgung ist in Abbildung 20 gezeigt.

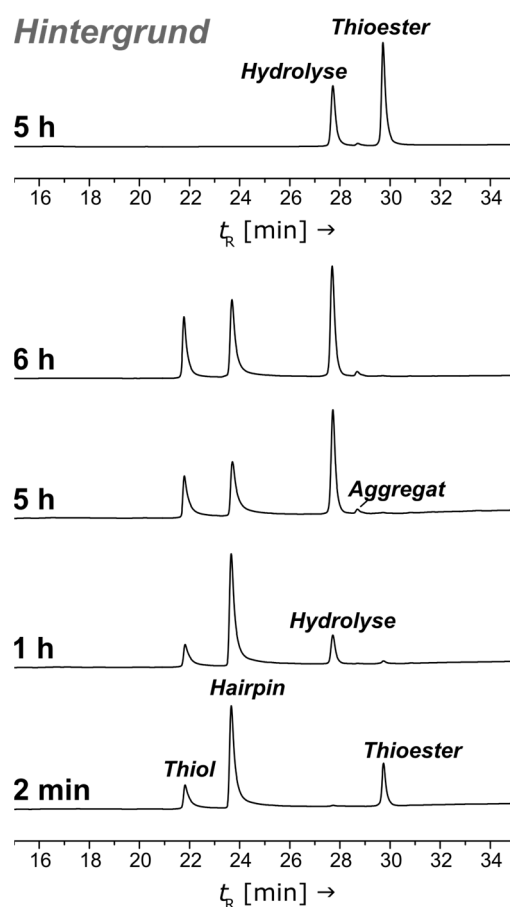


Abbildung 20: Repräsentative Darstellung der HPLC-Reaktionsverfolgung bei 220 nm der Kombination KB5 aus Tabelle 16 zusammen mit einem Chromatogramm der Hintergrundmessung von K-5 (18ea, ohne Thiol-Coil).

Ergebnisse und Diskussion

Durch die Integration der Peakflächen wurde die HPLC-Ausbeute der entsprechenden Produkte bestimmt und gegen die Reaktionszeit aufgetragen (Abbildung 21). Durch verschiedene Einflüsse wie die Homogenität des Reaktionsgemisches, Probenvorbereitung bzw. -entnahme und das Fehlen eines internen Standards ist der Fehler der einzelnen Messpunkte nicht zu ermitteln. Dennoch ist aus den Messungen ein qualitativer Reaktionsverlauf nachvollziehbar.

Es zeigte sich, dass nach 1 h Reaktionszeit in drei der vier Fälle in 70-80 % HPLC-Ausbeute die Haarnadelstruktur (*engl.* Hairpin, HP) gebildet wurde (Abbildung 21A). Nach 2 min Reaktionszeit zeigte das Thiol B (Linker mit GlyGly, **KB5**) gegenüber Thiol C (Linker mit β AlaGly, **KC5**) eine signifikant schnellere Bildung des Hairpins. Neben der Bildung des Hairpins wurde jedoch auch in erheblichem Maß Hydrolyse, ca. 60 % nach 5 h Reaktionszeit, sowohl des Thioesterstartmaterials als auch des Hairpins zur entsprechenden Peptidsäure **19** beobachtet (Abbildung 21B).

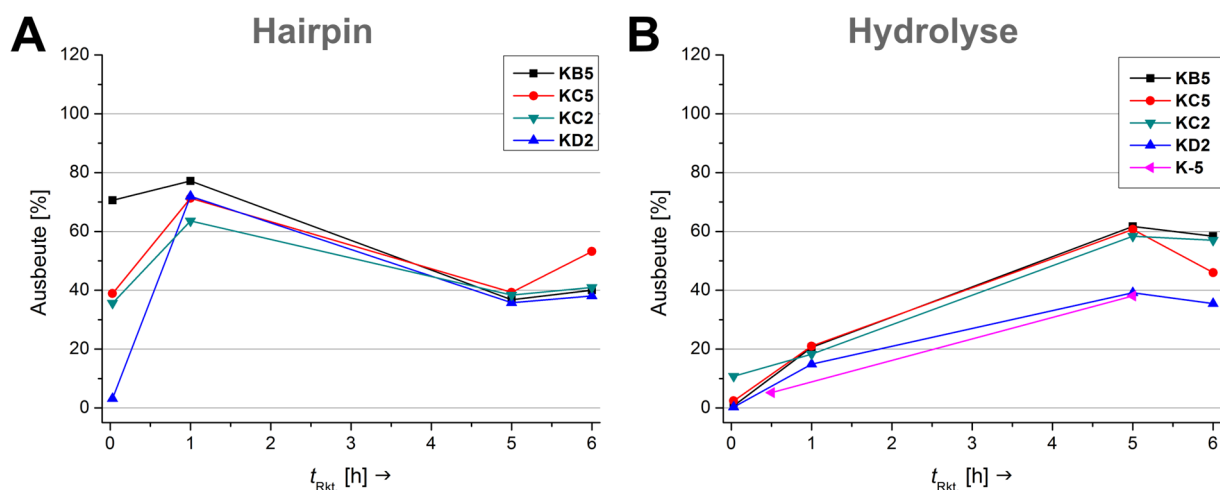


Abbildung 21: Zeitliche Auftragung der Bildung bzw. HPLC-Ausbeute (in %) der beobachteten Haarnadelstrukturen (A) und der detektierten Hydrolyse des Thioesters (B) in 20 mM TCEP/50 mM NaAsc/PBS (pH 7.6) bei 25 °C. Aufgetragen sind die Ergebnisse der HPLC-Reaktionsverfolgung für die Reaktion mittlerer Linkerlänge (Lys(N₃)Gly **18ea**) des Zyklisierungsvorläufers (*schwarz* (**KB5**) und *rot* (**KC5**)), sowie für die eines kürzeren Linkers (Gly(N₃)Gly **18ba**; *türkis* (**KC2**) und *blau* (**KD2**)). Die Blindmessung des Thioesters erfolgte für die Linkerlänge Lys(N₃)Gly (**K-5** (**18ea**), *violett*). Der erste Messpunkt ist nach 2 min Reaktionszeit.

Dabei zeigt sich, dass gerade die in der Haarnadelstruktur gespannten Systeme **KB5**, **KC5** und **KC2** eine erheblich höhere Hydrolyse als das entsprechend flexiblere **KD2** aufweisen. Letztere folgt in guter Näherung der Hydrolyse des Thioesters **K-5** in der Hintergrundmessung. Dadurch erscheint unter diesen Bedingungen die Linkerlänge am

dekorierten Coil-Peptid weniger relevant für den Reaktionsverlauf als die Linkerlänge des Thiolcoils.

Die Unterschiede der detektierten und berechneten HPLC-Ausbeuten nach 5 h und 6 h zeigen die Ungenauigkeit in den Messpunkten, da weder von einer erneuten Bildung von Hairpin als auch einer Rückreaktion von Peptidsäure unter diesen Bedingungen ausgegangen werden kann. Da nur eine steigende Hydrolyse zu erwarten ist, bewegt sich hier der Fehler der Messung in einem Bereich von $\pm 15\%$. Nichtsdestotrotz können klare Trends notiert werden: 1) Die beobachtete Hydrolyse unter Verwendung von 20 mM TCEP/50 mM NaAsc in PBS (pH 7.6) ist in drei von vier Fällen für sowohl flexible als auch kurze Linkerlängen größer als die Hydrolyserate der Hintergrundmessung. 2) Die Bildung des Hairpins erscheint in den ersten Minuten bei flexibel verknüpften Thioestern **18** mit einem kürzeren Linker im Thiol-Coil **4** schneller (**KB5** und **KC5**). 3) Der kürzer verknüpfte Thioester reagiert ebenfalls schneller mit kürzeren Thiolen (**KC2**), während zu flexible Linker im Thiol-Coil als konformationell ungünstig erscheinen (**KD2**). 4) Es konnte in allen vier Fällen, sowie der Blindmessung, keine Zyklisierung nachgewiesen werden.

Aufgrund der substantiellen Nebenreaktion in Form der Hydrolyse wurde ein anderes Puffersystem untersucht. Durch die schnellen Reaktionszeiten wurde davon ausgegangen, dass auf NaAsc und TCEP verzichtet werden kann. Dazu wurden die Reaktionen in PBS-Puffer bei pH 7.5 und pH 8.1 ohne Additive durchgeführt. Als Modellsystem dienten hier die Thioester mit verkürztem Linker (GlyGly, **18ba**), welche sowohl mit dem längsten als auch kürzesten Thiol-Linker **4a** verglichen wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

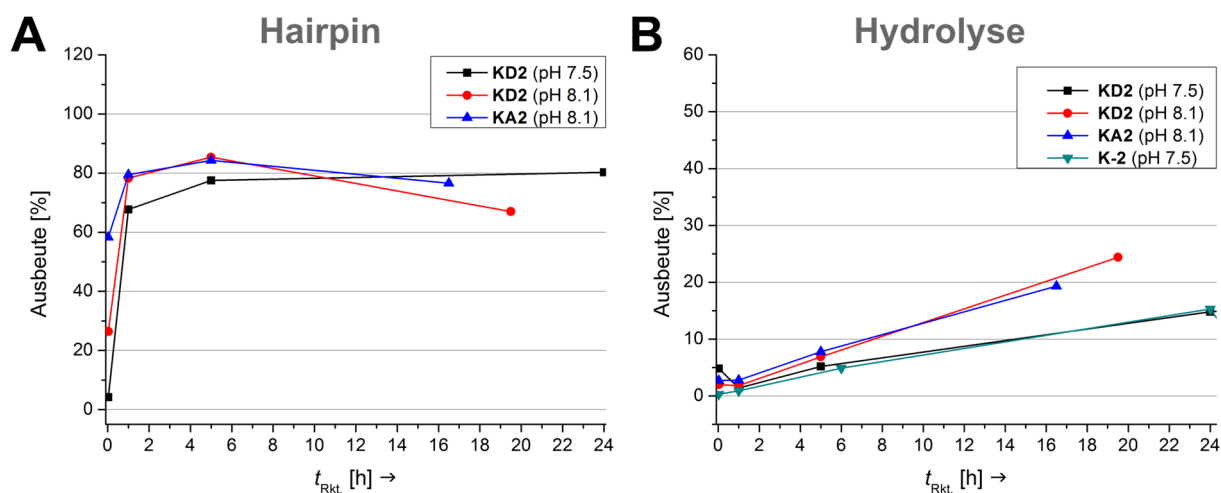


Abbildung 22: Zeitliche Auftragung der Bildung bzw. HPLC-Ausbeute (in %) der beobachteten Haarnadelstrukturen (A) und der detektierten Hydrolyse des Thioesters **18ba** (B) in PBS-Puffer (pH 7.5 und pH 8.1) bei 25 °C. Aufgetragen sind die HPLC-Reaktionsverfolgungen für die Reaktion gleicher Linkerlänge (Gly(N₃)Gly, **18ba**) des Zyklisierungsvorläufers im Vergleich zur Reaktion mit dem flexiblen Thiol D bei pH 7.5 (KD2, schwarz) und pH 8.1 (KD2, rot), sowie dem kürzesten Thiol A (Linker: Gly; blau (KA2)). Die Hintergrundmessung ohne Thiol-Coil erfolgte bei pH 7.5 (K-2, türkis).

Die Reaktionen in PBS-Puffer bei pH 7.5 zeigten die Bildung von Hairpin in vergleichbaren Ausbeuten innerhalb der ersten Stunde an, was durch die reduzierte Hydrolyserate von unter 5% des Coil-Peptidthioesters **18ba** über die anfänglichen 5-6 h begründet werden kann. Es zeigt sich aus der Auftragung der anteiligen Hydrolyse, dass auch hier die Reaktion mit der Blindmessung K-2 korreliert. Damit ist zudem erwiesen, dass die zuvor eingesetzten Additive eine Thioesterhydrolyse unterstützen. In Abwesenheit dieser ist sogar bei der Verwendung von PBS-Puffer im pH-Bereich von acht eine genügend große Unterdrückung dieser Nebenreaktion feststellbar. Allerdings konnte auch unter diesen Bedingungen keine signifikante Bildung des zyklisierten Produkts **c18ba** beobachtet oder mittels MS nachgewiesen werden. Die Haarnadelstrukturen zeigten in allen Fällen eine hohe Stabilität von 5 h und, im Fall von neutralem PBS-Puffer, bis sogar einem Tag. Sowohl für den flexibelsten Hairpin von KD2 als auch den gespanntesten KA2 konnten innerhalb der ersten 5 h keine signifikanten Unterschiede in ihrer Stabilität festgestellt werden. Allein die gespannteste Kombination KA2 bildete sich bei pH 7.5 etwas langsamer. Die Gründe für eine ausbleibende Zyklisierung können neben einer nicht ausreichenden räumlichen Nähe des N- und C-Terminus, was den S→N-Acyltransfer verhindert, auch eine weiterhin zu geringe Basizität des N-terminalen Amins sein.

Ergebnisse und Diskussion

Um den Einfluss der Position der Verknüpfung des Zyklisierungsvorläufers mit dem Coil-Peptid zu untersuchen, wurde das *N*-terminale Ala mit dem Linker-modifizierten Lys an Position 2 getauscht ($K \leftrightarrow A$, siehe Abbildung 19 Verbindung **9a** und **9a(K/A)**). Dazu sollte zunächst der Reaktionsverlauf unter neutralen Bedingungen in PBS-Puffer (pH 7.5) verfolgt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 gezeigt.

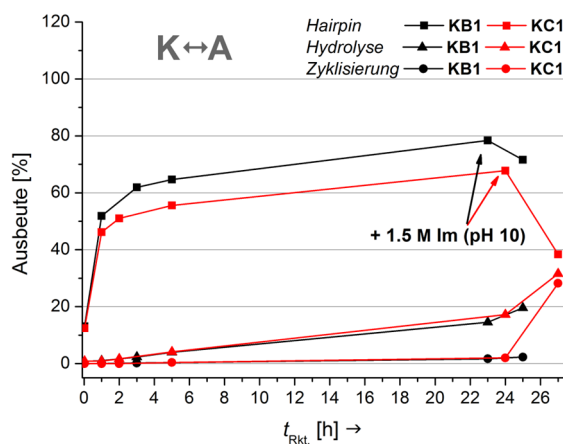


Abbildung 23: Zeitliche Auftragung der HPLC-Ausbeuten der beobachteten Haarnadelstrukturen (Viereck), der detektierten Hydrolyse (Dreieck) und zyklischen Produkts (**c18aa(K/A)**, Kreis) des Thioesters **18aa(K/A)** (A/K(Linker)-Austausch) in %. Aufgetragen sind die HPLC-Reaktionsverfolgungen für die Reaktion gleicher Linkerlänge (Gly(N₃)) des Zyklisierungsvorläufers **18aa(K/A)** im Vergleich der Reaktionen mit Thiol B (**KB1**, schwarz) und C (**KC1**, rot) bei pH 7.5 (PBS-Puffer). Nach 23 h bzw. 24 h Reaktionszeit wurde eine wässrige 1.5 M Imidazol-Lösung (pH 10) zum Reaktionsgemisch hinzugegeben.

Der *N*-terminale K/A-Austausch innerhalb des Zyklisierungsziels **18aa** hat keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung der Haarnadelstruktur, welche analog zu den vorherigen Messungen verlief. Auch hier erscheint die Transthoesterifizierung mit Thiol B **4b** geringfügig schneller. Die Hydrolyse-Rate ist ebenfalls gering und entspricht den bisherigen Befunden in Abbildung 22. Nach 23 h bzw. 24 h wurden je 1.5 M Imidazol-Lösung (pH 10) zu den Reaktionsgemischen gegeben und mittels HPLC und MS untersucht. Während der Hairpin **KB1** mit Thiol B eine weniger geeignete Konformation zur Zyklisierung aufweist, wurde neben steigender Hydrolyse ($\Delta +14\%$ Ausbeute) eine signifikante Produktbildung ($\Delta +26\%$ Ausbeute) im Fall des flexibleren Thiols C **4c** in **KC1** beobachtet. Diese lässt sich klar aus der Haarnadelstruktur ableiten, wenn auch eine anteilige Hintergrundreaktion ausgehend vom Startmaterial (87% Umsatz an Thioester zum Zeitpunkt der Imidazol-Zugabe) nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Schlussendlich kann jedoch gezeigt werden, dass schrittweise über die Bildung der Haarnadelstruktur und der

anschließenden Zugabe einer nukleophilen Stickstoffbase, Imidazol, die direkte Aminolyse zur *head-to-tail*-Zyklisierung möglich ist. Der Grund für die Wahl von Imidazol als Additiv liegt in der literaturbekannten Verwendung von Imidazol in Acetonitril zur direkten Aminolyse von Peptidthioestern zu entsprechenden zyklischen Peptiden nach Li *et al.* begründet.^[76] Der angenommene Mechanismus verläuft über den nukleophilen Angriff des Imidazols an die C-terminale Carbonylgruppe. Das erhaltene Acyl-Imidazol-Zwischenprodukt reagiert anschließend entweder langsam mit Wasser (Hydrolyse) oder mit freien Aminogruppen, die eine höhere Nucleophilie besitzen.^[76,193]

Um einen direkten Vergleich zu der zuvor beschriebenen schrittweisen Zyklisierung zu erhalten, wurde mit K/A-ausgetauschten Peptidthioestern weitergearbeitet. Da etwas flexiblere Thiole zu besseren Ergebnissen bezüglich der gewünschten Zyklisierung führten (vgl. Abbildung 23), wurden die Reaktionen direkt in 1.5 M Im/PBS (pH 9.1) durchgeführt. Neben der Nucleophilie des Imidazols ist die gleichzeitige Absenkung des pH-Wertes auf den Ausgang der angestrebten direkten Aminolyse interessant. Es ist überdies denkbar, dass Imidazol lokal den *S*→*N*-Acyltransfer über das Säure-Base-Verhalten fördert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 gezeigt.

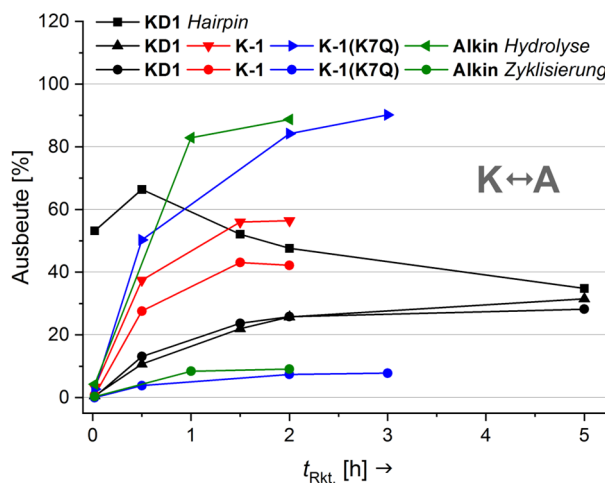
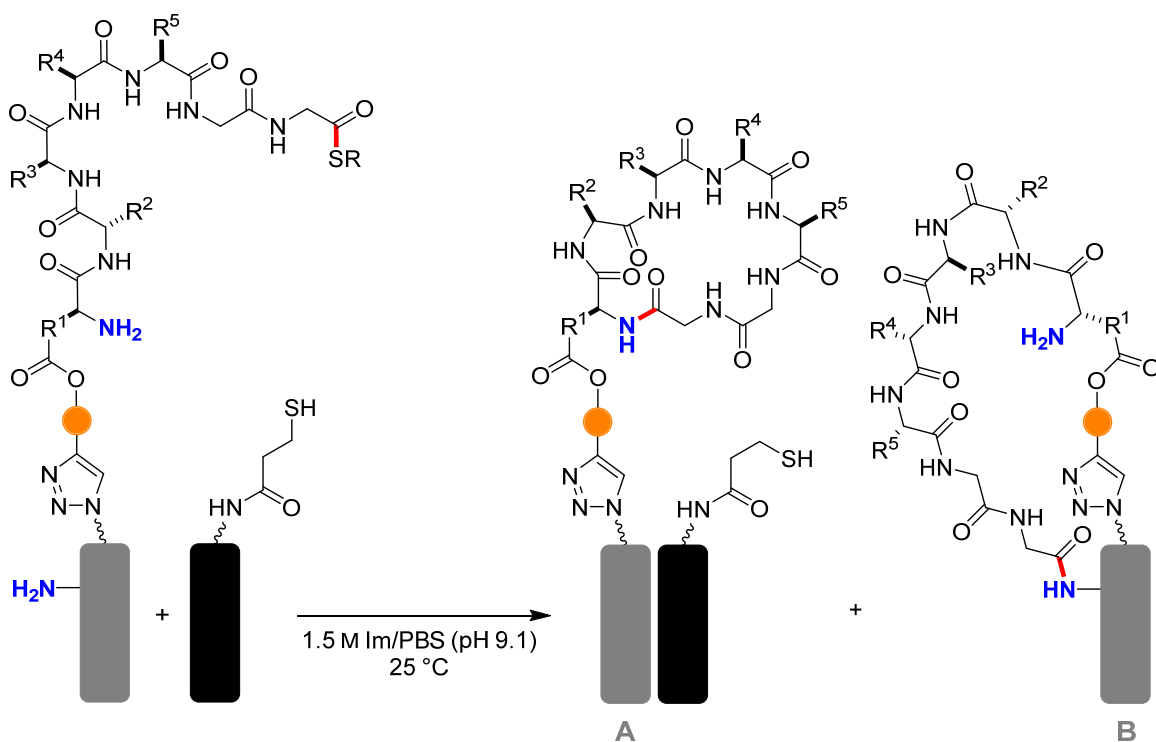


Abbildung 24: Zeitliche Auftragung der HPLC-Ausbeuten der beobachteten Haarnadelstrukturen (Viereck), der detektierten Hydrolyse (Dreieck) und zyklischen Produkts (*c18aa*(K/A), Kreis) des Thioesters *18aa*(K/A) (A/K(Linker)-Austausch) in %. Aufgetragen sind die HPLC-Reaktionsverfolgungen für die Reaktion gleicher Linkerlängen (Gly(N₃)) des Zyklisierungsvorläufers mit Thiol D (KD1, schwarz) im Vergleich zur Blindmessung des Startmaterials *18aa*(K/A) (rot), des Startmaterials mit einem Lysin-zu-Glutamin-Austausch (K7Q) im Coil-Peptid *18a*(K7Q)a(K/A) (blau), sowie des Alkinpeptidthioesters *9a*(K/A) (grün). Alle Reaktionen wurden in 1.5 M Im/PBS (pH 9.1) bei 25 °C durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurde die Reaktion anhand der Kombination **KD1**, mit flexiblem Thiol und kurzem Linker zwischen Zyklisierungsziel und Coil-Peptid (**18aa(K/A)**), CC-vermittelt durchgeführt. Es zeigt sich, dass die Zyklisierung und die Hydrolyse in diesem Fall gleichermaßen verlaufen und eine Ausbeute um je 30% nach 5 h Reaktionszeit liefern. Im Fall der Blindmessung **K-1** des Thioester-dekorierten Coilstrangs verlief die Zyklisierung hingegen langsamer als die entsprechende Hydrolyse des Thioesters, aber im Vergleich zur CC-vermittelten Reaktion **KD1** um den Faktor 1.5 schneller. Zur Untersuchung dieses Befundes wurde die Sequenz des Coilstrangs betrachtet und die Aminosäure Lysin in Position 7 des Coil-Peptids, mit ihrer unter diesen Bedingungen möglicherweise nukleophilen Aminogruppe, durch Glutamin substituiert (**18a(K7Q)a(K/A)**), vgl. Sequenz **1(K7Q)** in Tabelle 15). Ebenfalls wurde der Alkinthioester **9a(K/A)** unter diesen Bedingungen umgesetzt. In beiden Fällen konnte eine nahezu identische, hohe Hydrolyse (> 80%) und geringe Zyklisierung (< 10%) nachgewiesen werden.

Hervorzuheben ist, dass nach 2 h die Hintergrundmessung **K-1** (Abbildung 24, *rot*) die doppelte Ausbeute an Zyklisierungsprodukt (~40%) im Vergleich zur CC-vermittelten Zyklisierung **KD1** (Abbildung 24, *schwarz*) gebildet hatte und die vierfache Ausbeute bezogen auf das Alkin **9a(K/A)** (Abbildung 24, *grün*) sowie das K7Q Coil-Peptid in **K-1(K7Q)** (Abbildung 24, *blau*). Diese Befunde bezüglich der Zyklisierung können sich wie folgt erklären lassen und sind in Schema 29 vereinfacht dargestellt: Durch die Flexibilität der Linkerregion des Thioesters oder einer Vorkonformation des Zyklisierungsziels befindet sich der C-Terminus in räumlicher Nähe zu der Lysin-Seitenkette in Position 7 des Coilstrangs A₃. Begründet durch die ähnlichen pK_s-Werte der α - und ϵ -Aminogruppen in Lysin, kann eine Zyklisierung zwischen Seitenkette und Schwanz (*side chain-to-tail*, B) oder Kopf und Schwanz (*head-to-tail*, A) stattfinden.



Schema 29: Schematische Darstellung der CC-vermittelten direkten Aminolyse unter *head-to-tail* (A) und *side chain-to-tail*-Zyklisierung (B).

Ähnliches wurde auch von Li *et al.* im Zusammenhang mit den zuvor genannten Studien der Imidazol-katalysierten Zyklisierung genannt.^[76] Dabei zeigten sie, dass *N*-terminales Lysin im Fall einer direkten Aminolyse vorrangig über die ϵ -Aminogruppe der Seitenkette zyklisiert. Im Fall eines internen Lysins konnte jedoch keine Präferenz festgestellt werden. Ursächlich ist demnach sowohl die Nukleophilie des freien Amins als auch die Ringgröße des Produkts (+4 bei Seitenkette). Anhand der Befunde und im Speziellen der Ligationsversuche an K7Q (**18a(K7Q)a(K/A)**), kann konstatiert werden, dass die gewünschte *head-to-tail*-Zyklisierung als Nebenprodukt entsteht, während das Hauptprodukt mit großer Wahrscheinlichkeit das entsprechende *side chain-to-tail*-Produkt ist. Eine Differenzierung dieser potenziellen Zyklisierungsprodukte verschiedener Ringgrößen war innerhalb dieser Arbeit mittels HPLC nicht möglich. Zur Illustration wurde mit dem Programm HYPERCHEM eine Energie-minimierte Struktur des Thioestertriazolyls erstellt und mittels PYMOL frei am Coiled-Coil positioniert. Aus Abbildung 25 wird die mögliche Vorkonformation des Peptidthioesters **18a(K/A)** und dessen Ausrichtung am dekorierten Coil-Strang ersichtlich.

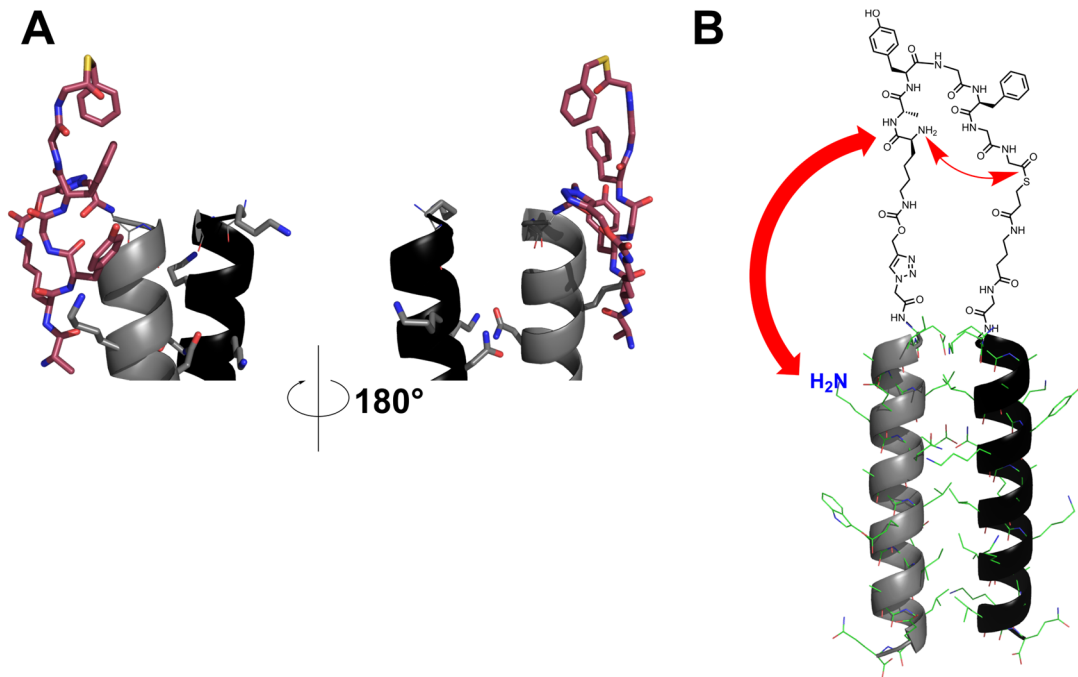
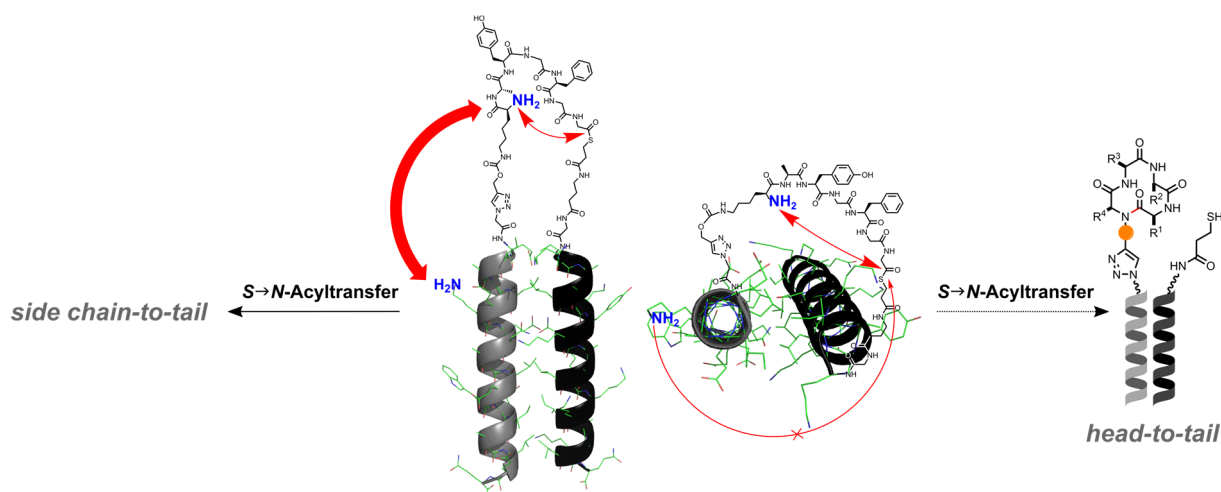


Abbildung 25: A) Mittels HYPERCHEM Energie-minimierte Struktur des Thioester-Rests von **18a(K/A)** am CC (*lila*) und B) mit PYMOL dargestelltes und ausgerichtetes Modell der idealisierten Haarnadelstruktur des CC. Ein Kontakt ist nur bei einem Abknicken der Struktur in Richtung des Lysins möglich.

Die Gruppe um KIRSHENBAUM berichtete unlängst von ihren Untersuchungen der Templierung eines homodimeren Coiled-Coils.^[194] Die *N*-terminale Modifizierung beider Coil-Stränge mittels CuAAC-Reaktion mit einem sechs Reste beinhaltenden, zyklischen Peptoid zeigte, dass die Schmelztemperatur von 30 °C auf 40 °C erhöht wurde. Mit Hilfe von Molekulardynamik-Simulationen stellten sie die Hypothese auf, dass die Stabilitätssteigerung auf die Bewegungseinschränkung der beiden *N*-Termini des CCs zurückzuführen sei. Aufgrund des Templat kommt es zu einer Vororganisation der Coil-Peptide und damit zur Erhöhung der Helix-Helix-Kontakte und der damit verbundenen hydrophoben Wechselwirkung des CCs. Durch molekulare Modellierung wurde eine Struktur postuliert, in der das zyklische Peptoid-Gerüst an den *N*-Termini abknickt und an eine Flanke des CC geneigt ist. Ein ähnliches Abknicken des Hairpins ist in dem hier behandelten Fall anzunehmen.

Ebenfalls ist anzunehmen, dass die gewünschte räumliche Nähe der funktionellen Gruppen des Thioesters nicht vollständig durch das Coiled-Coil-Templat vermittelt werden konnte. Der Einfluss der Triazolylgruppe am Lysin des Peptidthioesters als möglicher *turn-inducer* (dt.: Windungsinduktor) zur Vorkonformation des Peptidthioesterrückgrats wurde ebenfalls untersucht und zeigte keinerlei Einfluss. Entsprechende Graphen der Reaktionsverfolgung

sind in Abbildung A.2 in Kapitel 5.4.2 des Experimentalteils gezeigt. Wenngleich anteilig *head-to-tail*-Zyklisierungen beobachtet wurden, zeigten die entsprechenden Hintergrundmessungen, dass in erheblichem Maß eine *side chain-to-tail*-Zyklisierung erfolgte. Inwieweit innerhalb der hier besprochenen CC-vermittelten Makrozyklisierung neben der wahrscheinlicheren *side chain-to-tail*-Zyklisierung die gewünschte *head-to-tail*-Zyklisierung ablief, kann abschließend nicht beantwortet werden. Vor diesem Hintergrund ist in Schema 30 die zu erwartende direkte Aminolyse in Abhängigkeit der Orientierung der Haarnadel skizziert.

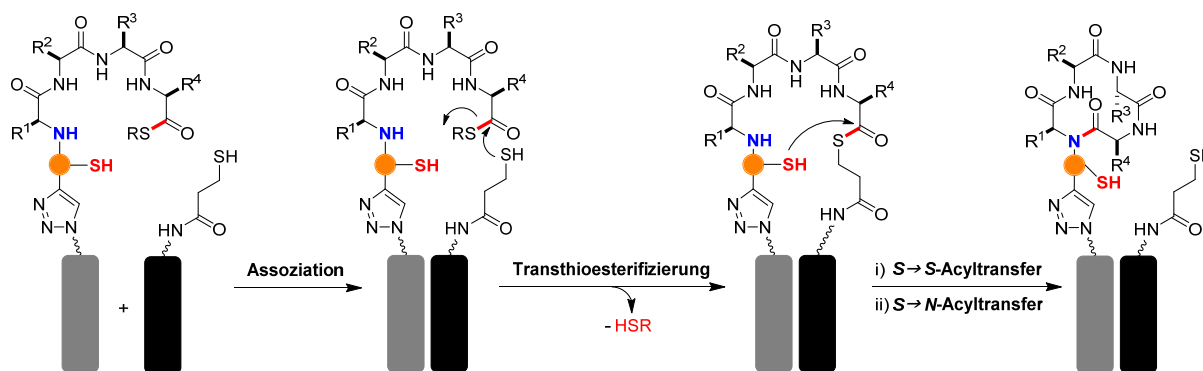


Schema 30: Schematische Darstellung des Zusammenhangs der Ausrichtung der Hairpinstruktur relativ zum CC und der zu erwartenden direkten Aminolyse.

Es konnte mittels der CC-vermittelten direkten Aminolyse gezeigt werden, dass sich sehr stabile Haarnadelstrukturen aufbauen lassen. Eine geeignete Präzyklisierungskonformation kann durch die Wahl geeigneter Linker, sowie durch Veränderungen des Coiled-Coil-Gerüsts erfolgen. Beispielsweise wäre eine Verlängerung eines Coil-Strangs um eine halbe Heptade denkbar, wodurch die Haarnadelstruktur in eine günstigere Konformation gezwungen werden kann. Aufgrund der Ergebnislage und der herausfordernden Fragestellung bezüglich des Reaktionsverlaufes wurde im weiteren Verlauf der Untersuchung einer CC-vermittelten Makrozyklisierung eine CC-vermittelte Zyklisierung über die NCL angestrebt. Unter neutralen NCL-Bedingungen mit Cysteinylpeptidthioestern sollte eine unerwünschte *side chain-to-tail*-Zyklisierung ausgeschlossen sein.

3.4.2 Coiled-Coil-vermittelter Ansatz zur Nativen Chemischen Ligation

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der in Kapitel 3.4.1 diskutierten Coiled-Coil-vermittelten direkten Aminolyse wurde nun die Coiled-Coil-vermittelte Native Chemische Ligation (CC-vermittelte NCL) untersucht.^[81] Diese ist in Schema 31 vereinfacht dargestellt.



Schema 31: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen CC-vermittelten Nativen Chemischen Ligation (NCL) zur Darstellung zyklischer Peptide. Das CuAAC-Konjugat ist zur Veranschaulichung reduziert dargestellt.

Die Ergebnisse der Versuche zur Templat-vermittelten direkten Aminolyse zeigten, dass sich unter neutralen bis leicht basischen Bedingungen im wässrigen Medium innerhalb von Sekunden bis Minuten eine Haarnadelstruktur ausbilden ließ. Diese verläuft über die Assoziation zum heterodimeren, parallelen Coiled-Coil und anschließender Transthoesterifizierung eines C-terminal voraktivierten Peptidthioesters **18** und dem komplementären N-Thiol-Coilstrang **4**. Diese Haarnadelstrukturen zeigten eine hohe Stabilität über Stunden bis Tage bei geringer, anteiliger Hydrolyse zur entsprechenden unreaktiven Peptidsäure **19** des ehemaligen Peptidthioesters. Der Einfluss der Linker zwischen den Coil-Peptiden und dem Seitenketten-verknüpften Peptidthioester des Acyldonorstrangs A₃ (**18**) bzw. der Thiol-Funktion im Akzeptorstrang B₃ (**4**) zeigte eine Korrelation zwischen der Flexibilität des N-Thiol-Coils **4** und der Transthoesterifizierungsrate im Haarnadel-Bildungsschritt innerhalb der ersten Minuten der Reaktion. Durch die unter neutralen Bedingungen bestehende, erniedrigte Nukleophilie des freien N-terminalen Amins wurde unter Zusatz von Imidazol im Ligationspuffer die Reaktivität des Amins erfolgreich erhöht und der intramolekularisierte Zyklisierungsschritt ermöglicht. Allerdings führte die pH-Wert Erhöhung zu einer mangelnden Diskriminierung zwischen dem gewünschten N-terminalen Amin des Zyklisierungsvorläufers **19** und der Lysin-Seitenkette des Acylakzeptorstrangs. Dies führte schlussendlich zu einem Produktgemisch zwischen Kopf-zu-Schwanz- und Seitenketten-zu-Schwanz-zyklisierten Makrozyklen, wobei die Ergebnisse für die

Seitenketten-zu-Schwanz-Zyklisierung als Hauptprodukt sprechen. Durch die Beobachtung des gewünschten Zyklisierungsprodukts bestätigt, sollte nun die CC-vermittelte NCL untersucht werden. Diese sollte unter neutralen Bedingungen eine ausreichende Diskriminierung der funktionellen Gruppen erlauben und so ausschließlich das gewünschte Kopf-zu-Schwanz Zyklisierungsprodukt liefern (siehe Schema 31).

Dazu erfolgte die Synthese der in diesem Kapitel besprochenen Peptide **18** über die in Kapitel 3.3.3 optimierten Bedingungen für die CuAAC-Reaktion zur Dekorierung des *N*-Azid-Coil-Peptids **1** mit *N*-Cysteinylpeptidthioestern **9b** und **9e-j**. Die folgenden, in Abbildung 26 gezeigten, Peptidthioester **18** wurden auf diese Weise erfolgreich synthetisiert und untersucht.

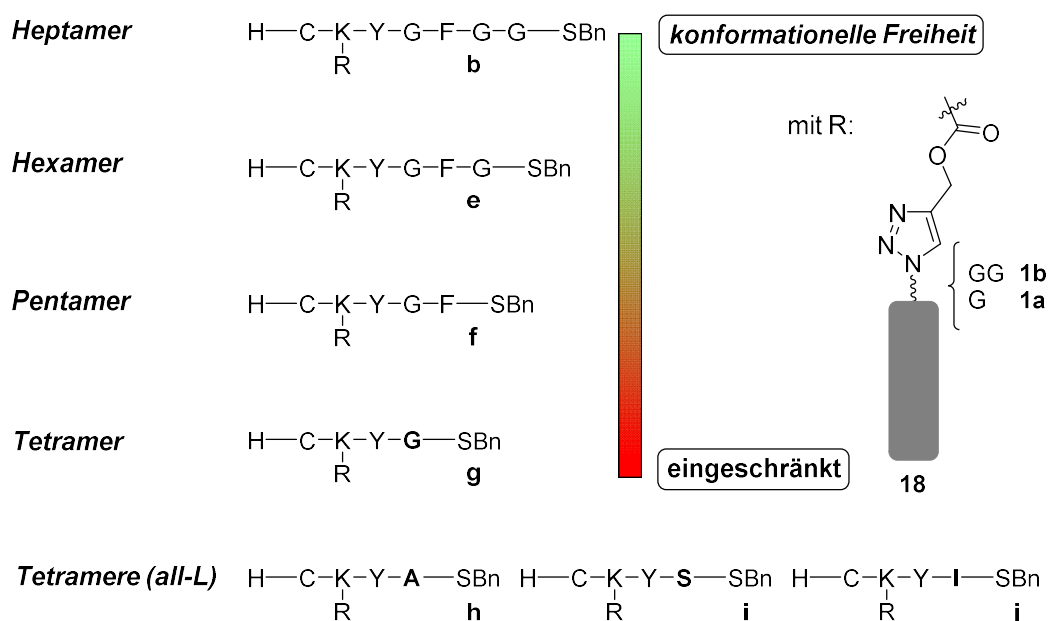


Abbildung 26: Übersicht der in diesem Kapitel untersuchten Peptidthioester **18** der CC-vermittelte Native Chemische Ligation (NCL) zur Darstellung zyklischer Peptide.

Der anfänglich untersuchte Heptapeptidthioester (**b**) wurde sukzessive *C*-terminal verkürzt und die dargestellten Hexa-, Penta- und Tetrapeptidthioester (**e,f,g**) jeweils unter NCL-Bedingungen untersucht. Des Weiteren wurde im Fall des Tetrapeptids das achirale, *C*-terminale Glycin durch die sterisch anspruchsvolleren *L*-Aminosäuren *L*-Ala (**h**), *L*-Ser (**i**) und *L*-Ile (**j**) substituiert. Neben der Templat-vermittelten Zyklisierung wurden auch die entsprechenden Hintergrundreaktionen von **18**, ohne Thiol-Coil-Peptide **4** und entsprechender Alkin-funktionalisierter Peptidthioester **9** untersucht und sollen im Folgenden gegenübergestellt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Alle Ligationsreaktionen dieser Arbeit wurden in wässrigem PBS-Puffer bei pH 7.5 durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse des vorherigen Kapitels 3.4.1 wurde auch hier zunächst auf die Verwendung von Additiven verzichtet. Natriumascorbat, das bei langen Reaktionszeiten als Radikalfänger die Entschwefelung von beispielsweise Cystein verhindert, hatte einen erheblichen Einfluss auf die Hydrolyserate der eingesetzten Peptidthioester gezeigt.^[176] Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass die Reaktivität der eingesetzten Benzylthioester im Transthoesterifizierungsschritt hoch ist und gleichzeitig eine vom pH-Wert und den eingesetzten Additiven abhängige Hydrolyse als Hintergrundreaktion vorlag. Damit wurde auf den literaturbekannten Zusatz von Mercaptanen zur Reaktionsbeschleunigung der NCL-Reaktion abgesehen.^[195] Die Verwendung von Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) wurde anfänglich ebenfalls gemieden, erwies sich aber im Verlauf der ersten Untersuchungen trotz Arbeitens unter anaeroben Bedingungen in entgasten Lösungsmitteln als entscheidend für die Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Ligationsreaktionen wurden mittels analytischer HPLC bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die Identifizierung der isolierten Spezies erfolgte mittels MALDI-TOF-MS oder ESI-MS.

Zur Untersuchung der CC-vermittelten Zyklisierung wurden zunächst die flexibelsten Thiol-Coilstränge Thiol C **4c** und D **4d** eingesetzt. Aus der direkten Aminolyse war für das Thiol C **4c** und D **4d** festgestellt worden, dass die Ausbildung der Haarnadelstruktur innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten über den Transthoesterifizierungsschritt verläuft. Diese Haarnadelstruktur konnte in flexiblen Kombinationen (vgl. Tabelle 16 in Kapitel 3.4.1) schneller als die gespannteren Kombinationen durch die Zugabe einer wässrigen Imidazol-Lösung zur pH-Wert-Anhebung abreagieren (s. Abbildung 23 und Abbildung 24 in Kapitel 3.4.1). Das Ergebnis beruht vermutlich hauptsächlich auf der unerwünschten *side chain-to-tail*-Zyklisierung mit einem freien Lysin des Coil-Peptids. Durch die Wahl ähnlicher Linkerlängen sollte ein Vergleich zu den Versuchen der direkten Aminolyse geschaffen werden. Falls nötig, konnten anschließend die Untersuchungen auf kürzere Thiol-Linkerlängen **4** erweitert werden.

Wie bereits angesprochen wurden die ersten Versuche unter Schutzgasatmosphäre und in entgasten Lösungsmitteln durchgeführt. Als Reaktionspuffer wurde PBS-Puffer (pH 7.5) genutzt. Später zeigte sich, dass die Verwendung von 0.2 mM TCEP in PBS-Puffer (pH 7.5) zu einer höheren Reproduzierbarkeit unter Minimierung von möglichen Nebenreaktionen wie der Disulfid-Bildung ratsam war. Diese Puffer wurden eingefroren und vor dem jeweiligen

Versuch unter Vakuum aufgetaut und mit Argon beschickt. Die eingesetzten Coil-Peptide **18** und **4** wurden äquimolar als Feststoff vorgelegt und unter Stickstoff-Atmosphäre zum Reaktionsstart mit dem entgasten Puffer zu einer Konzentration von 0.1 mM versetzt, durchmischt und in einem Thermoschüttler bei einer konstanten Reaktionstemperatur von 25 °C reagiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden je 5 nmol (bezogen auf eingesetztes Peptid) des Reaktionsgemisches in einem sanften Stickstoffgegenstrom entnommen und die Reaktion mit 1 μ L Ameisensäure gestoppt und mittels analytischer HPLC analysiert. Eine Übersicht der ersten Ergebnisse der Makrozyklisierungsversuche des Hepta- bis Tetrapeptids über die Native Chemische Ligation (NCL) ist in Abbildung 27 auf S. 113 gezeigt.

Die ersten Untersuchungen in PBS-Puffer bei pH 7.5 zeigten für das Heptapeptid (Abbildung 27A) bereits nach 2 min einen nahezu vollständigen Umsatz zum gewünschten zyklischen Produkt. Ohne die Verwendung eines HPLC-Säulenofens kam es in diesem Fall zu einem starken Tailing, weshalb die Chromatogramme in Abbildung 27A der tatsächlichen Menge an Thiol D **4d** nicht gerecht werden. Die HPLC-Analyse der Hintergrundmessung des Heptapeptidthioester-dekorierten Coil-Peptids **18bb** unter identischen Bedingungen zeigte einen minimal geringeren Umsatz nach 1 h Reaktionszeit. Allgemein ist in diesem und allen weiteren Fällen das gewählte Intervall der Reaktionsverfolgung zu groß. Aufgrund der schnellen Reaktionszeit wurde sich im Folgenden speziell auf die erste Minute der CC-vermittelten Zyklisierung fokussiert.

Das untersuchte Hexapeptid (Abbildung 27B) zeigte CC-vermittelt bereits nach 1 min Reaktionszeit einen nahezu vollständigen Umsatz, während nach 1 h Reaktionszeit in der Kontrollreaktion noch ein geringfügig höherer Anteil an linearem Vorläufer nachzuweisen war. Auch hier wurde sich im Folgenden auf den Umsatz der ersten Minute fokussiert.

Im Fall des Pentapeptids (Abbildung 27C) wurde anders als in den Fällen des Heptapeptids (A, **18bb**) und des Hexapeptids (B, **18be**) das Coil-Peptid A₃ ohne Gly-Linker **18af** eingesetzt. Überdies wurde das geringfügig kürzere Thiol C verwendet. Auch hier konnte innerhalb von 2 min ein signifikanter Umsatz beobachtet werden. Nach einer Minute Reaktionszeit konnte das intramolekulare S→S-Acyltransfer-Intermediat des Zyklisierungsschritts isoliert und nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall zeigte die Kontrollreaktion einen geringfügig niedrigeren Umsatz zum gewünschten zyklischen Pentapeptid an.

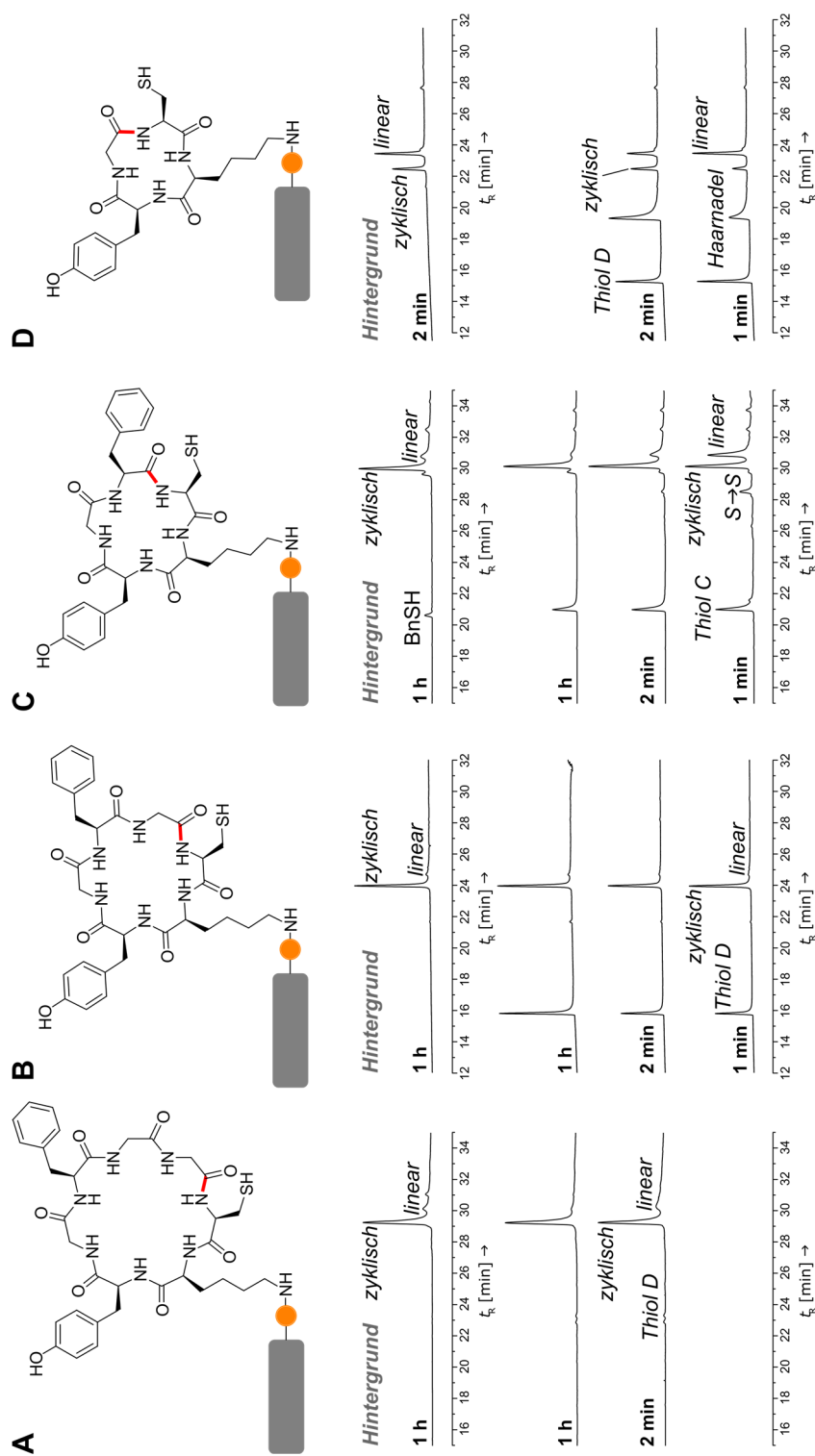


Abbildung 27. Übersicht der HPLC-vermittelten Synthese kleiner, zyklischer Peptide verschiedener Ringgrößen bei 25 °C und 0.1 mM Konzentration in PBS-Puffer (pH 7.5). Dargestellt sind die HPLC-Spuren (Gradient 10-70% Acetonitril in Wasser (+0.1% TFA), 50 °C, 280 nm) der jeweiligen ersten Versuche. Im Querformat von *links* nach *rechts* für A) das Heptapeptid **18bb** nach 2 min und 1 h Reaktionszeit mit Thiol D **4d** (ohne Säulenofen bei RT), für B) das Hexapeptid **18be** nach 1 min, 2 min und 1 h mit Thiol D (mit 0.2 mM TCEP), für C) das Pentapeptid **18af** (kein Gly-Linker) nach 1 min, 2 min und 1 h Reaktionszeit mit Thiol D **4d** (mit 0.2 mM TCEP) und D) das Tetrapeptid **18bg** nach 1 min und 2 min mit Thiol D (mit 0.2 mM TCEP). Die entsprechenden Kontrolle (Hintergrundmessung) nach 1 h Reaktionszeit (für das Tetrapeptid nur 2 min) des jeweiligen Zyklisierungspeptid-Coils **18** ohne Zusatz eines Thiol-Coil-Peptids **4** unter identischen Bedingungen ist *oben* dargestellt. Die Identifizierung und Zuordnung der detektierten Verbindungen erfolgte mittels MALDI-TOF-MS.

Anzumerken ist, dass das eingesetzte Edukt **18af** augenscheinlich anteilig epimerisiert vorlag. Zurückzuführen ist dies mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Synthese des Alkin-modifizierten C-terminalen Phenylalaninthioesters **9f** über die, laut Literatur, epimerisierungsfreie *in situ* Thioesterifizierung nach FLEMER.^[111] Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in Kapitel 3.2.3 für die C-terminalen Aminosäuren Ala, Ser und Ile berichtet. Die Epimerisierungsprodukte des Pentapeptids konnten erst nach der Zyklisierung durch HPLC getrennt werden. Das Vorliegen zweier Ringkonformere ist als plausible Alternative zur Epimerisierung nicht gänzlich auszuschließen.

Im Fall des Tetrapeptids (Abbildung 27D) konnte erstmals nach 1 min und 2 min die postulierte Haarnadelstruktur nachgewiesen werden. Die Kontrollreaktion nach 2 min zeigte einen geringeren Umsatz an, während das Produkt-zu-Edukt-Verhältnis in der CC-vermittelten Synthese nahezu 1:1 betrug. Nicht gewichtet ist hier das lineare Edukt **18bg**, welches in der Haarnadelstruktur gebunden vorliegt. Für ein besseres Verständnis müssen längere Reaktionszeiten im Fall des Tetramers beachtet werden.

Nachfolgend wurde, beginnend mit dem Heptapeptid, jede Makrozyklengröße genauer auf einen möglichen Templat-Effekt hin untersucht. Dazu wurden die ersten Minuten der jeweiligen Umsetzung zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten betrachtet. Des Weiteren wurden die Alkin-funktionalisierten Peptidthioester **18bb** und **9b** unter vergleichbaren Bedingungen untersucht. Eine repräsentative Übersicht der Ligationsversuche zum Heptapeptidthioester **9b** und **18bb** und dem zeitlichen Verlauf der ersten 60 s Ligationszeit sind in Abbildung 28 gezeigt.

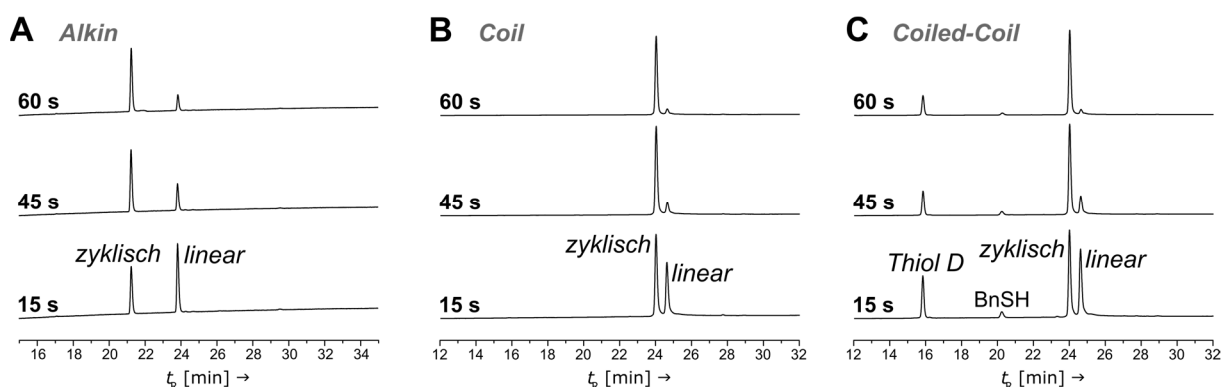


Abbildung 28: Repräsentative Übersicht der analytischen HPLC-Spuren (280 nm) der Reaktionsverfolgungen der Makrozyklisierung des Heptapeptids (0.1 mM) innerhalb der ersten 60 s Ligationszeit. A) der Heptapeptidthioester H-CK(Proc)YGFGG-SBn (**9b**), B) das Coil-Peptid-dekorierte Heptapeptid **18bb** und in C) die CC-vermittelten Zyklisierung mit Thiol D **4d**. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C und in 0.2 mM TCEP/PBS (pH 7.5) durchgeführt. Im Fall von A) mit MeCN in 0.2 mM TCEP/PBS (1:3, v/v, pH 7.5).

Ausgehend vom entsprechenden Heptapeptid **9b** wurde dieses ebenso wie das Coil-dekorierte Heptapeptid **18bb** in Kontrollversuchen untersucht. Der Peptidthioester **9b** offenbarte dabei unter den verwendeten Ligationsbedingungen in 0.2 mM TCEP/PBS (pH 7.5) als Ligationspuffer eine geringe Löslichkeit und führte damit zu falsch interpretierbaren Ergebnissen. Es zeigte sich, dass das entsprechende Cycloprodukt **c9b** eine höhere Löslichkeit als der lineare Ausgangsstoff **9b** besaß und somit ein falsches Produkt- zu- Edukt-Verhältnis lieferte. Das Chromatogramm der erneut gelösten Probe nach 3 h Reaktionszeit ist in Abbildung A.21 im Anhang Kapitel 7.3.2 dargestellt und zeigt einen Umsatz von nur rund 30% zum Cycloheptapeptid **c9b** an. Erst durch die Verwendung von Acetonitril (MeCN) als Additiv konnten reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Die erhaltenen Chromatogramme sind exemplarisch in Abbildung 28A gezeigt. Es ist bemerkenswert, dass in diesem Fall die Makrozyklisierung innerhalb von 2-3 min bereits nahezu vollständig verlief. Dies stellt eine Ausnahme für die Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb der Makrozyklisierung kurzer Peptide dar, die oft Tage bis Wochen bei höheren Temperaturen benötigen.^[71] Das Coil-dekorierte Heptapeptid **18bb** zeigte innerhalb der ersten 60 s eine noch schnellere Zyklisierungsgeschwindigkeit gegenüber **9b**, wie in Abbildung 28B gezeigt ist. Auf der einen Seite ist dies vorraussichtlich nicht auf eine erhöhte Löslichkeit im wässrigen Ligationspuffer zurückzuführen, sondern auf einen Einfluss von MeCN innerhalb der Zyklisierung des Peptidthioesters **9b**. So ist beispielsweise durch den Einsatz von MeCN in PBS-Puffer in einem Volumenverhältnis von 1:3 die Salzkonzentration geringer als in reinem PBS-Puffer. Dies könnte einen Einfluss auf die Peptidfaltung des Peptidthioesters in Lösung haben und so die Zyklisierungsrate dämpfen. Auf der anderen Seite kann der Coil-Peptidrest dazu führen, dass durch Diffusionsprozesse die zyklische Konformation partiell vorgeformt wird und eine Makrozyklisierung des C-terminal Gly-reichen Peptidthioesters beschleunigt wird. Durch die allgemein schnelle Zyklisierungsgeschwindigkeit kann von einer signifikanten Vorkonformation des Zyklisierungsvorläufers ausgegangen werden, welche den Zyklisierungsschritt beschleunigt. Der direkte Vergleich mit der CC-vermittelten Zyklisierung, dargestellt in Abbildung 28C, konnte keinen Templat-Effekt bestätigen. Ebenfalls konnte hier keine Haarnadelstruktur, wie aus dem vorangegangenen Kapitel 3.4.1 der direkten Aminolyse bekannt, beobachtet werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Makrozyklisierung entspricht in diesem Fall wesentlich der Reaktionskontrolle des Coil-dekorierten Heptapeptids **18bb**. Da in der direkten Aminolyse bereits festgestellt wurde, dass sich die Haarnadelstruktur sehr schnell innerhalb der ersten 120 s bildet, kann auch hier von einer simultanen Transthoesterifizierung ausgegangen werden, welche aber direkt weiter zum

gewünschten Cycloheptapeptid **c18bb** abreagiert. Damit einher geht die Annahme, dass es sich im Fall der Makrozyklisierung des Heptapeptids um einen diffusionskontrollierten Transthoesterifizierungsschritt des *N*- und *C*-Terminus handelt, welcher weder die Bildung einer Haarnadelstruktur stört noch die Zyklisierung beschleunigt. Eine vereinfachte Darstellung der Diffusion der Termini des linearen Peptidvorläufers ist in Abbildung 29 dargestellt.

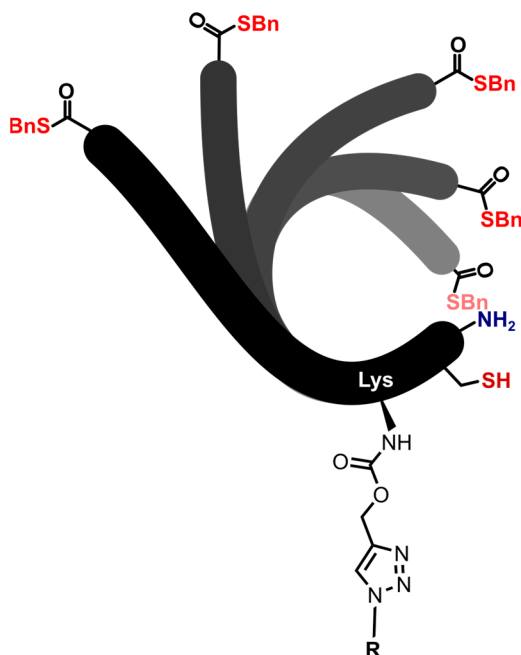


Abbildung 29: Schematische Darstellung der diffusionskontrollierten Molekülbewegung eines linearen Peptidthioesters (mit R = Coil-Peptid). Über diese kommt es zur intramolekularen Präorganisation zwischen *N*-terminalem Cys und *C*-terminalem Peptidthioesters und ermöglicht so die Makrozyklisierung.

Dabei ist festzuhalten, dass die CC-vermittelte Zyklisierung grundsätzlich möglich ist, da hier wiederum keine Verlangsamung der bereits schnellverlaufenden Zyklisierung stattfand. Da aus den Versuchen zur direkten Aminolyse in Kapitel 3.4.1 bekannt ist, dass die CC-Assoziation schneller verläuft und der Transthoesterifizierungsschritt zur Haarnadelstruktur in einer ähnlichen Reaktionsgeschwindigkeit wie der hier vorliegenden Zyklisierung abläuft, kann von einer richtigen räumlichen Anordnung der *N*-Termini und der entsprechenden funktionellen Gruppen ausgegangen werden. Dies sollte mit noch gespannteren Peptidthioestern die Beobachtung eines Templat-Effekts möglich machen.

Zur besseren Veranschaulichung wurde die Produktbildung der HPLC-Spuren aus Abbildung 28 der entsprechend gebildeten Cycloheptapeptide in % gegen die Reaktionszeit aufgetragen (Abbildung 30).

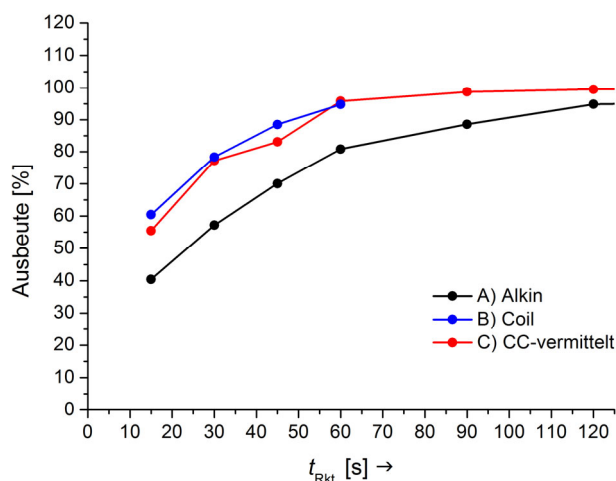


Abbildung 30: Auftragung der Ausbeute der Zyklisierung in % für das untersuchte Heptapeptid $c[\text{CKYGFGG}]$ mit A) dem Heptapeptidthioester **9b** (schwarz), B) dem Coil-Peptid-dekorierte Heptapeptid **18bb** (blau) und C) der CC-vermittelten Zyklisierung mit Thiol D **4d** (rot).

Wie in Abbildung 30 dargestellt, ist die Reaktion des Coil-dekorierten Heptapeptids **18bb** ebenso wie die CC-vermittelte Zyklisierung nahezu identisch und nach 60 s bis 90 s Reaktionszeit vollständig. Die Zyklisierung des Alkynyl-Peptidthioesters **9b** hingegen benötigte eine längere Ligationszeit. Der Verlauf der Produktbildungen zeigt in allen drei Fällen einen ähnlichen Verlauf mit sehr schneller Produktbildungsrate innerhalb der ersten 60 s. Nur die Reaktion von **9b** in einem Ligationspuffer aus 25% Acetonitril in 0.2 mM TCEP/PBS ist langsamer und hat einen um etwa 20% geringeren Umsatz.

Als nächstes wurde das um ein Glycin C-terminal verkürzte Hexapeptid H-CKYGF G -SBn **9e** und **18be** untersucht. Die entsprechenden Reaktionen wurden analog zu dem zuvor gezeigten Heptapeptid und unter identischen Bedingungen durchgeführt. In Abbildung 31 sind ausgewählte HPLC-Spuren der Reaktionsverfolgung dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

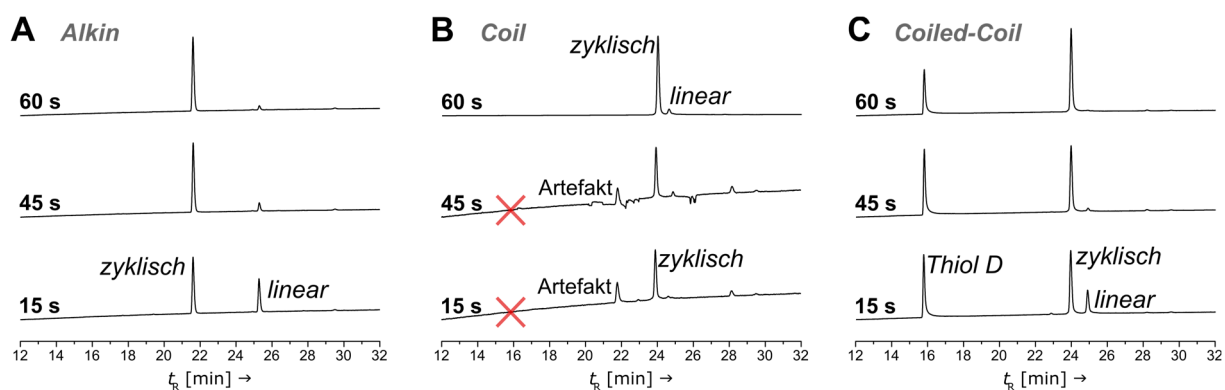


Abbildung 31: Repräsentative Übersicht der analytischen HPLC-Spuren (280 nm) der Reaktionsverfolgungen der Makrozyklisierung des Hexapeptids (0.1 mM) innerhalb der ersten 60 s Ligationszeit. A) der Hexapeptidthioester H-CK(Proc)YGFG-SBn (**9e**), B) das Coil-Peptid-dekorierte Hexapeptid **18be** und in C) die CC-vermittelte Zyklisierung mit Thiol D **4d**. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C und in 0.2 mM TCEP/PBS (pH 7.5) durchgeführt. Im Fall von A) mit MeCN in 0.2 mM TCEP/PBS (1:3, v/v, pH 7.5). In B) mit einem roten Kreuz markiert sind die HPLC-Spuren, die aufgrund eines Detektorproblems nicht verlässlich mit einbezogen werden können (60 s nach Tausch der Lampen).

Wie auch der Heptapeptidthioester wurde auch der Hexapeptidthioester in Kontrollversuchen untersucht. Der Peptidthioester **9e** offenbarte dabei unter den verwendeten Ligationsbedingungen in 0.2 mM TCEP/PBS (pH 7.5) als Ligationspuffer ebenfalls eine geringe Löslichkeit. Das Chromatogramm der erneut gelösten Probe nach 6.5 h Reaktionszeit ist in Abbildung A.22 im Anhang Kapitel 7.3.2 dargestellt und zeigt keinen vollständigen Umsatz zum Cyclohexapeptid **c9e**. Die Verwendung von Acetonitril als Co-Solvens führte auch hier zu reproduzierbaren Ergebnissen und zu nahezu vollständigem Umsatz innerhalb von 60 s (Abbildung 31A und Abbildung 32). Dieser Versuch wurde dreifach durchgeführt und eine Standardabweichung zur Abschätzung des Fehlers bestimmt. Wie in Abbildung 31B dargestellt, zeigte das Coil-dekorierte Hexapeptid **18be** innerhalb der ersten 60 s eine Inhomogenität des Reaktionsgemisches an, welche auf Löslichkeitsprobleme innerhalb dieser Zeitspanne schließen lässt. Aufgrund von Detektorproblemen, die vor der 60 s-Messung behoben wurden, können die Ausbeuten dieses Zeitraums nicht beachtet werden. Der Versuch wurde nicht wiederholt. Im Vergleich dazu verlief die CC-vermittelte Makrozyklisierung mit Thiol D **4d**, dargestellt in Abbildung 31C, bereits nach 45 s bis 60 s nahezu vollständig ab. Ein Templat-Effekt kann nicht substanziell untermauert werden, jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Makrozyklisierung in den ersten 90 s, wie auch schon im Fall des Heptapeptids, geringfügig höher als die des Alkins **9e**. Dies ist in Abbildung 32 durch die Auftragung der Produktausbeute der Makrozyklisierungen gegen die Reaktionszeit veranschaulicht. Dabei ist festzuhalten, dass die Reproduzierbarkeit im Falle des Alkins nach

Ergebnisse und Diskussion

45 s Reaktionszeit hoch ist. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass auch die CC-vermittelte Makrozyklisierung zu dieser Messzeit mit einem geringen Fehler behaftet ist. Interessanterweise ist das Hexapeptid **18be** nach 15 s bereits um 65-70% zyklisiert, während das Heptapeptid **18bb** zwischen 40-60% zyklisiert vorlag. Dieser Befund unterstützt den Einfluss einer postulierten, Zyklisierungs-unterstützenden Vorkonformation des linearen Peptids.

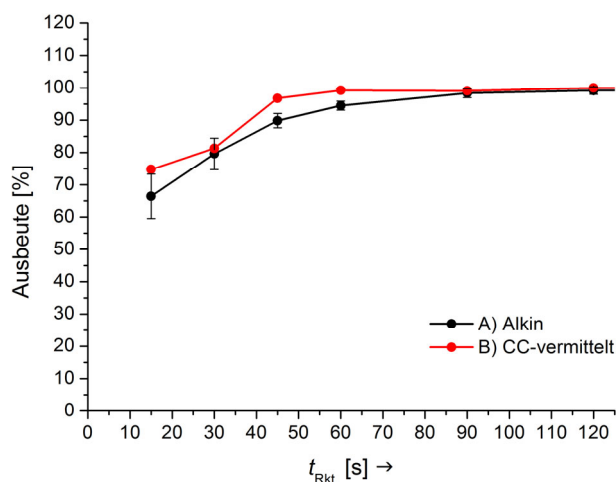


Abbildung 32: Auftragung der Ausbeute in % für das untersuchte Hexapeptid $c[CKYGFG]$ mit A) dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messreihen (mit der Standardabweichung als Fehlerbalken) des Hexapeptidthioesters **9e** (schwarz) und in B) der CC-vermittelten Zyklisierung von **18be** mit Thiol **D 4d** (rot). Die Ausbeute der Ligation des Hexapeptids **18be** ohne Thiol-Coil lag nach 60 s bei 90%.

Es lässt sich festhalten, dass die CC-vermittelte Makrozyklisierung und die dreifach durchgeführte Makrozyklisierung des Alkins **9e** gegenüber der Kontrollreaktion mit dem Coil-dekoriertem Hexapeptid **18be**, welches erhebliche Löslichkeitsprobleme zeigte, eine saubere und schnelle Makrozyklisierung erlaubte.

Als nächstes wurde das um ein weiteres Glycin C-terminal verkürzte Pentapeptid H-CKYGF-SBn **9f** und **18bf** untersucht. Die entsprechenden Reaktionen wurden analog zu den zuvor gezeigten Hepta- und Hexapeptiden und unter identischen Bedingungen durchgeführt. In Abbildung 33 sind ausgewählte HPLC-Spuren der Reaktionsverfolgung des sterisch anspruchsvollen C-terminalen Phenylalaninpeptidthioesters dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

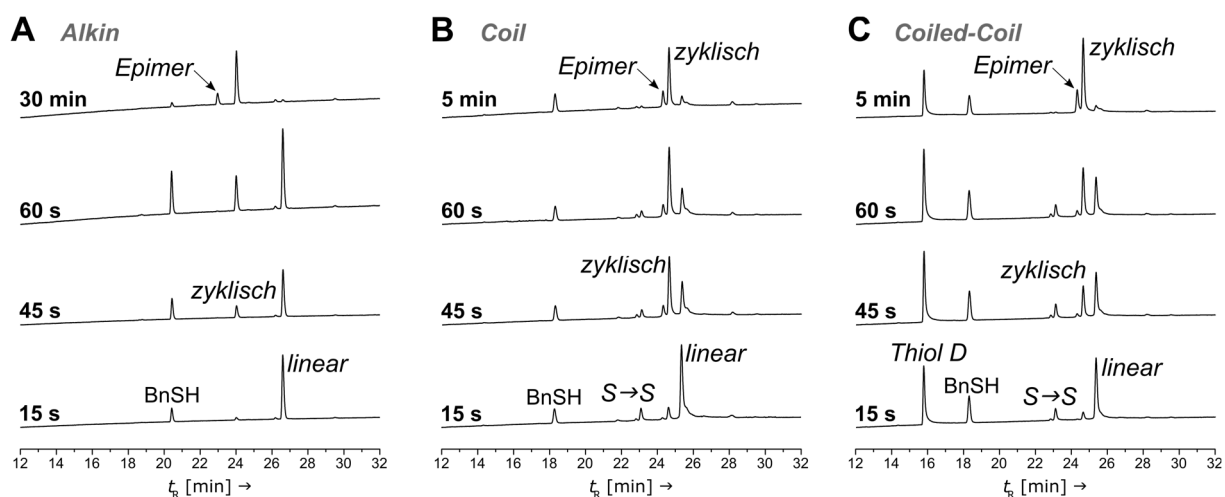


Abbildung 33: Repräsentative Übersicht der analytischen HPLC-Spuren (280 nm) der Reaktionsverfolgungen der Makrozyklisierung des Pentapeptids (0.1 mM) innerhalb der ersten 60 s Ligationszeit. Zusätzlich wurden auch HPLC-Spuren nach vergleichsweise langen Ligationszeiten (5 min und 30 min) mitdargestellt. A) der Pentapeptidthioester H-CK(Proc)YGF-SBn (**9f**), B) das Coil-Peptid-dekorierteres Pentapeptid **18bf** und in C) die CC-vermittelte Zyklisierung mit Thiol D **4d**. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C und in 0.2 mM TCEP/PBS (pH 7.5) durchgeführt. Im Fall von A) mit MeCN in 0.2 mM TCEP/PBS (1:3, v/v, pH 7.5). Die mit Benzylmercaptan (BnSH) beschrifteten Peaks wurden zusätzlich mittels MS untersucht und waren nicht analysierbar.

Auch in diesem Versuch zeigte der Peptidthioester **9f** unter den verwendeten Ligationsbedingungen in 0.2 mM TCEP/PBS (pH 7.5) als Ligationspuffer eine geringe Löslichkeit. Das Chromatogramm der erneut gelösten Probe nach 6.5 h Reaktionszeit ist in Abbildung A.23 im Anhang Kapitel 7.3.2 dargestellt und zeigt genau wie das Hepta- und Hexapeptid keinen vollständigen Umsatz zum Cyclopentapeptid $c[\text{CKYGF}]$ **c9f**. Die Verwendung von Acetonitril als Co-Solvens (Abbildung 33A) führte auch hier zu reproduzierbaren Ergebnissen, wie aus den Fehlerbalken der dreifach durchgeführten Reaktion in Abbildung 34 zu sehen ist. Die Reaktion verlief signifikant langsamer und führte nach 60 s zu einer Ausbeute von rund 40% und nach 120 s zu 60%. Insgesamt benötigte die Reaktion für eine Zyklisierungsproduktausbeute von 80% 5 min. Es konnte darüber hinaus eine weitere Spezies der gleichen Masse wie der des Zyklisierungsprodukts **c9f** beobachtet werden. Dies wird auf eine Epimerisierung des C-terminalen Phenylalanins zurückgeführt. Das Verhältnis D-zu-L-Phe, bestimmt nach 30 min, betrug hier 1:4.7 und stammt wahrscheinlich aus der Thioesterifizierung der Peptidthioestersynthese. Die graphische Darstellung der Ausbeute in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ist in Abbildung 34 gezeigt. Wie in Abbildung 33B dargestellt, zeigte das Coil-dekorierte Pentapeptid **18bf** einen höheren Umsatz und bereits nach 60 s rund 70% an Zyklisierungsprodukt. Durch fehlende

Ergebnisse und Diskussion

Basislinientrennung wurde das Epimerenverhältnis auf 1:4.3 (D-zu-L-Phe nach 5 min) bestimmt. Es wurde erstmalig das entsprechende $S \rightarrow S$ -Acyltransferintermediat beobachtet, welches innerhalb der ersten 3 min der Ligation langsam abreagierte. Zur Auswertung wurde dieses Intermediat bereits als gewünschtes Produkt **c18bf** gezählt. Die CC-vermittelte Makrozyklisierung mit Thiol **D 4d**, dargestellt in Abbildung 33C, verlief etwas langsamer als die der Hintergrundreaktion (B) und schneller als die des Alkins (**9f**, A). Ein Templat-Effekt kann hier ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der fehlenden Basislinientrennung war das bestimmte Epimerenverhältnis von 1:3.7 (D-zu-L-Phe nach 5 min) etwas ungünstiger für die L-Phenylalaninspezies als bei der Kontrollreaktion (B). Auch hier konnte das entsprechende $S \rightarrow S$ -Acyltransferintermediat beobachtet werden. Wie bereits angesprochen sind in Abbildung 34 die Makrozyklisierungsverläufe durch die Auftragung der Produktausbeute der Makrozyklisierungen gegen die Reaktionszeit veranschaulicht.

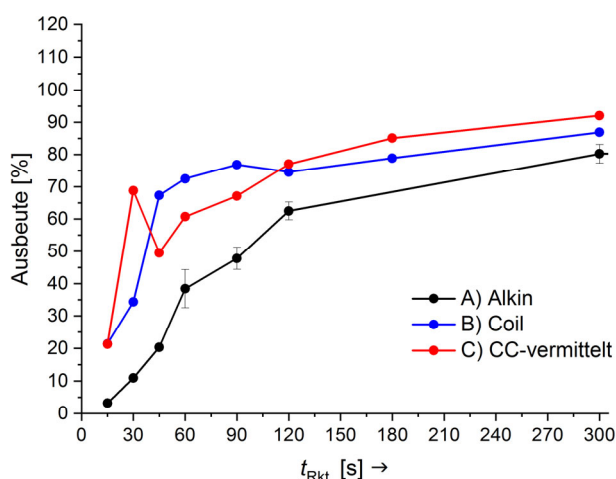


Abbildung 34: Auftragung der Ausbeute in % für das untersuchte Pentapeptid $c[\text{CKYGF}]$ mit A) dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messreihen (mit der Standardabweichung als Fehlerbalken) des Pentapeptidthioesters **9f** (schwarz), B) dem Coil-Peptid-dekorierte Pentapeptid **18bf** (blau) und in C) die CC-vermittelten Zyklisierung mit Thiol **D 4d** (rot). Für die Ausbeute wurden die beobachteten Epimere und das intramolekulare $S \rightarrow S$ -Acyltransferintermediat als Zyklisierungsprodukt gesehen und fließen mit in die dargestellten Ausbeuten ein.

Es wird ersichtlich, dass die Makrozyklisierung des Pentapeptids ähnlich der des Hepta- und Hexapeptids verläuft. Der Grund für die langsamere Zyklisierung des Pentapeptids gegenüber dem Hepta- und Hexapeptid beruht, neben dem sterischen Anspruch des C-terminalen Thioesters und der damit einhergehenden geringeren Reaktivität, auf der reduzierten Diffusion der Termini aufgrund der geringeren Länge des Peptids. Auch hier konnte keine

Haarnadelstruktur trotz langsamerer Reaktionszeiten detektiert werden. Dies spricht dafür, dass eine gebildete Haarnadel direkt zum $S \rightarrow S$ -Acyltransferintermediat abreagiert.

Eine weitere Verkürzung des Pentapeptids führte zu dem Tetrapeptid H-CKYG-SBn, das wie die drei vorangegangenen Peptide untersucht wurde. Wie bereits in Abbildung 27D dargestellt, benötigt die Makrozyklisierung des Tetrapeptids längere Ligationszeiten, als die anfänglichen 2 min.

Zunächst wurde jedoch der in Abbildung 27D beobachtete und ab 45 s Reaktionszeit isolierte Hairpin (Haarnadel) separat untersucht. Dazu wurden die gesammelten Fraktionen der analytischen HPLC der Ligationsreaktionsverfolgung der CC-vermittelten Makrozyklisierung von **18bg** mit Thiol D **4d** vereint und gefriergetrocknet. Das erhaltene Produkt wurde in unbekannter Konzentration erneut mit Ligationspuffer (0.2 mM TCEP/PBS (pH 7.5)) versetzt und eine Probe nach 15 min Ligationszeit mittels analytischer HPLC vermessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 35 gezeigt.

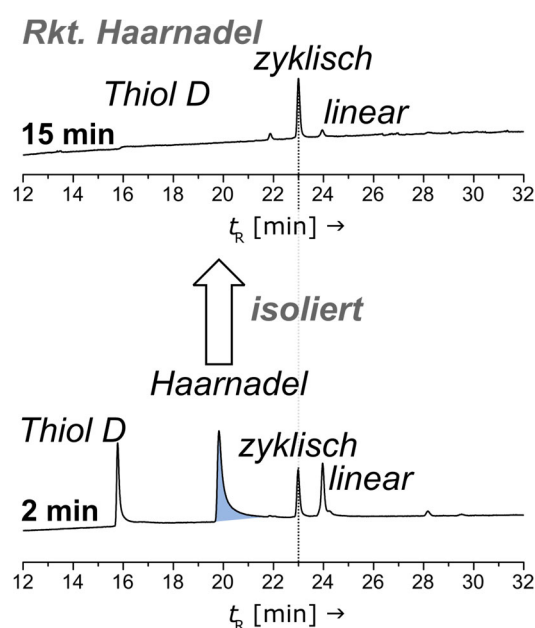


Abbildung 35: Die Reaktion der isolierten Haarnadelstruktur (*blau*) aus der CC-vermittelten Makrozyklisierung von **18bg** mit **4d** aus Abbildung 27D nach 15 min Reaktionszeit in 0.2 mM TCEP/PBS (pH 7.5) bei 25 °C.

Durch die erneute Reaktion der isolierten Haarnadelstruktur konnte gezeigt werden, dass aus einer flexiblen Haarnadelstruktur mit Thiol D **4d** der intramolekulare $S \rightarrow S$ -Acyltransfer unter Abreaktion zum gewünschten Cyclotetrapeptid abläuft.

Ergebnisse und Diskussion

Das Alkin **9g** musste, wie bereits für die vorherigen Peptidthioester gezeigt, durch die schlechte Löslichkeit in reinem Puffer zur Hintergrundmessung mit MeCN als Co-Solvens reagiert werden (vgl. erneut gelöstes Reaktionsprodukt in Abbildung A.24 in Kapitel 7.3.2 des Anhangs). Da auch der Verdacht bestand, dass der Coil-Peptid-gebundene Tetrapeptidthioester eine verminderte Löslichkeit in PBS-Puffer besaß, wurden zunächst Zyklisierungsversuche mit Acetonitril in 0.2 mM TCEP/PBS (1:3, v/v) durchgeführt, in denen die Thiol-Coil-Peptide **D 4d**, **C 4c** und **B 4b** miteinander verglichen wurden. Der pH-Wert des Ligationspuffers wurde auf 7.9 leicht angehoben. Zur Untersuchung der Zyklisierungsgeschwindigkeit wurden erneut Kinetikmessungen unter angepassten, größeren Zeitintervallen durchgeführt und sind in Abbildung 36 gezeigt.

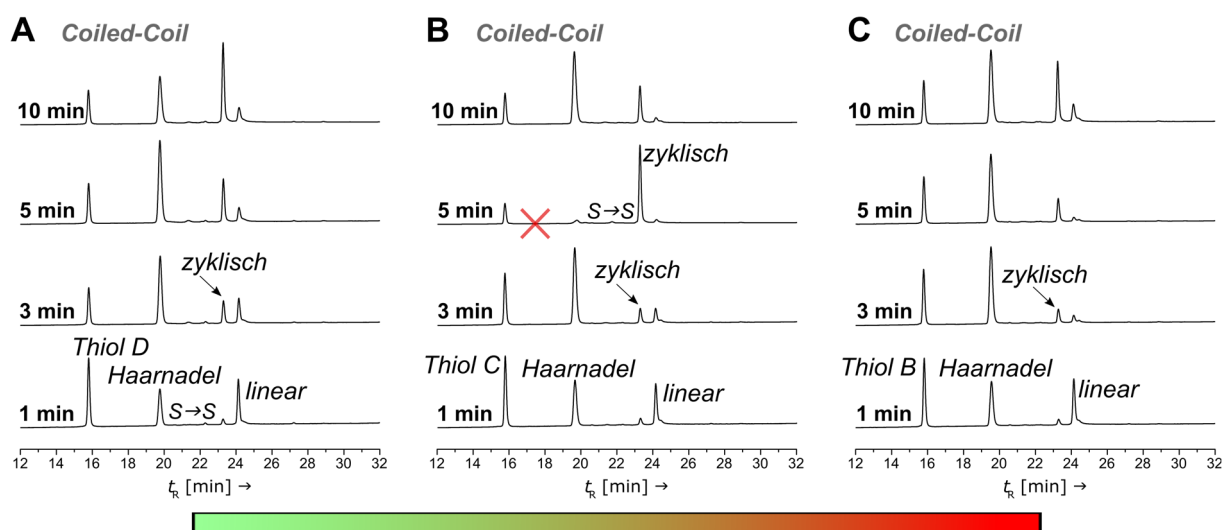


Abbildung 36: Übersicht der analytischen HPLC-Spuren (280 nm) der Reaktionsverfolgungen der Makrozyklisierung des Tetrapeptids **18bg** (0.1 mM) innerhalb von 10 min Ligationszeit. A) Die CC-vermittelte Zyklisierung mit Thiol **D 4d**. B) Die CC-vermittelte Zyklisierung mit Thiol **C 4c**. C) Die CC-vermittelte Zyklisierung mit Thiol **B 4b**. Durch einen farblichen Balken soll die Flexibilität der Haarnadelstruktur von *grün* (langer Thiollinker) bis *rot* (kurzer Thiollinker) widerspiegelt werden. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C und mit Acetonitril in 0.2 mM TCEP/PBS (1:3, v/v, pH 7.9) durchgeführt. In B), der Messung nach 5 min, wurde die Reaktion nicht durch Zugabe von Ameisensäure gestoppt (*rotes Kreuz*), zeigt aber nach unbekannter Zeit einen vollständigen Umsatz zum gewünschten Cyclotetrapeptid **c18bg**.

Die graphische Auftragung der Ausbeuten an Haarnadelstruktur und gewünschtem Cycloprodukt **c18bg** gegen die Ligationszeit sind in Abbildung 37 gezeigt.

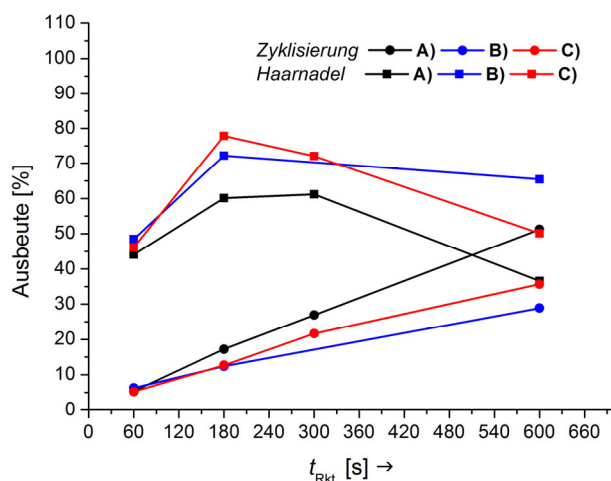


Abbildung 37: Graphische Darstellung der Haarnadel- und Zyklisierungsproduktbildung in % gegen die Reaktionszeit. Gegenübergestellt sind die berechneten Ausbeuten der CC-vermittelten NCL mit A) Thiol D **4d** (schwarz), B) Thiol C **4c** (blau) und C) Thiol B **4b** (rot) aus Abbildung 36 des Thiol-Reaktionsvergleichs mit **18bg**. Für B) wurde der Messwert nach 300 s als Ausreißer gewertet und nicht mit einbezogen.

In allen Fällen kommt es innerhalb einer Minute zur Bildung der entsprechenden Haarnadelstruktur in vergleichbaren Ausbeuten von rund 45%. Dabei scheint die CC-vermittelte Makrozyklisierung mit dem flexibelsten und längsten Thiollinker Thiol D **4d** schneller als Thiol B **4b** (hier am kürzesten), welches wiederum etwas schneller als Thiol C **4c** (mittlere Länge) zum gewünschten Cyclopeptid **c18bg** abreagiert. Nach 10 min wurden Ausbeuten zwischen 30% und 50% erhalten. Anzumerken ist, dass die in Messreihe B) der Abbildung 36 nicht-beendete CC-vermittelte Zyklisierung mit Thiol C (entnommen nach 5 min) eine nahezu vollständige Reaktion zum gewünschten Cyclotetrapeptid nach unbekannter Zeit zeigte.

Auch hier wurden die Haarnadelstrukturen isoliert und abermals in unbekannter Konzentration im Ligationspuffer reagiert. Im Anhang des Kapitels 7.3.2 sind die Reaktionen dieser isolierten Haarnadelstrukturen in Abbildung A.25 gezeigt, die unter diesen Bedingungen eine hohe Stabilität aufwiesen. Für Thiol D konnte nach 5 min keine Makrozyklisierung beobachtet werden, während die Reaktionen mit den kürzeren Thiolen C und B einen geringen Umsatz zeigten. Zur Erinnerung, ohne Acetonitril als Co-Solvens konnte bereits in Abbildung 35 gezeigt werden, dass eine Haarnadelstruktur mit Thiol D nach 15 min vollständig zum Makrozyklus abreagiert. Dies ist ein Indiz für den Einfluss von MeCN auf die Zyklisierungsrate in PBS-Puffer. Aufgrund der Ergebnisse wurden abschließend nochmals Thiol C mit Thiol B in der CC-vermittelten Makrozyklisierung gegenüber dem Coil-Peptid **18bg** und dem Peptidthioester **9g** verglichen. Die HPLC-

Ergebnisse und Diskussion

Reaktionsverfolgung ist exemplarisch in Abbildung 38 gezeigt (Thiol B in Abbildung A.26 im Anhang Kapitel 7.3.2).

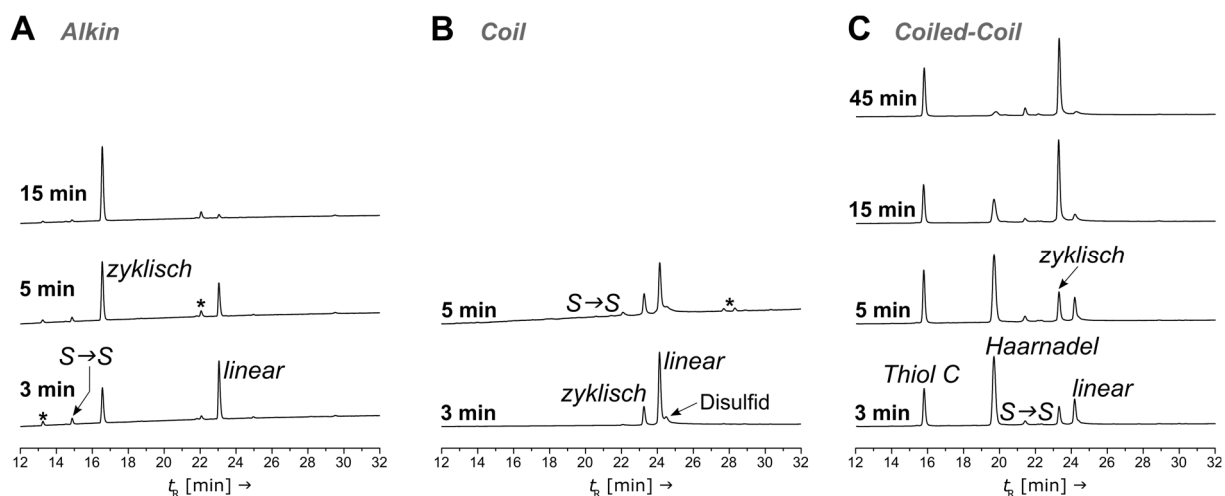


Abbildung 38: Repräsentative Übersicht der analytischen HPLC-Spuren (280 nm) der Reaktionsverfolgungen der Makrozyklisierung des Tetrapeptids (0.1 mM) innerhalb der ersten 45 min Ligationszeit. A) Der Tetrapeptidthioester H-CK(Proc)YG-SBn (**9g**) bis 15 min, B) das Coil-Peptid-dekorierte Tetrapeptid **18bg** bis 5 min und in C) die CC-vermittelten Zyklisierung mit Thiol C **4c** bis 45 min. Die entsprechende CC-vermittelten Zyklisierung mit Thiol B **4b** ist in Abbildung A.26 (Anhang Kapitel 7.3.2) gezeigt. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C und mit MeCN in 0.2 mM TCEP/PBS (1:3, v/v, pH 7.9) durchgeführt. Unbekannte Spezies sind mit einem Asterisk (*) markiert.

Da auch hier die Reaktionszeiten von 10 min zu kurz erschienen, wurden die Zeitintervalle erneut angepasst und bis zu einer Stunde Ligationszeit verfolgt. Im gleichen Zug wurde für jeden Messpunkt eine einzelne Reaktion durchgeführt, um den Einfluss einer nicht-invasiven Reaktionsverfolgung zu bewerten. Durch Löslichkeitsunterschiede der beiden Coil-Peptid-Komponenten kann es in den ersten Probenentnahmen zu einer Veränderung der Stöchiometrie und damit zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen. Die Auftragung der HPLC-Ausbeute gegen die Reaktionszeit führte zu den in Abbildung 39 gezeigten Reaktionsverläufen.

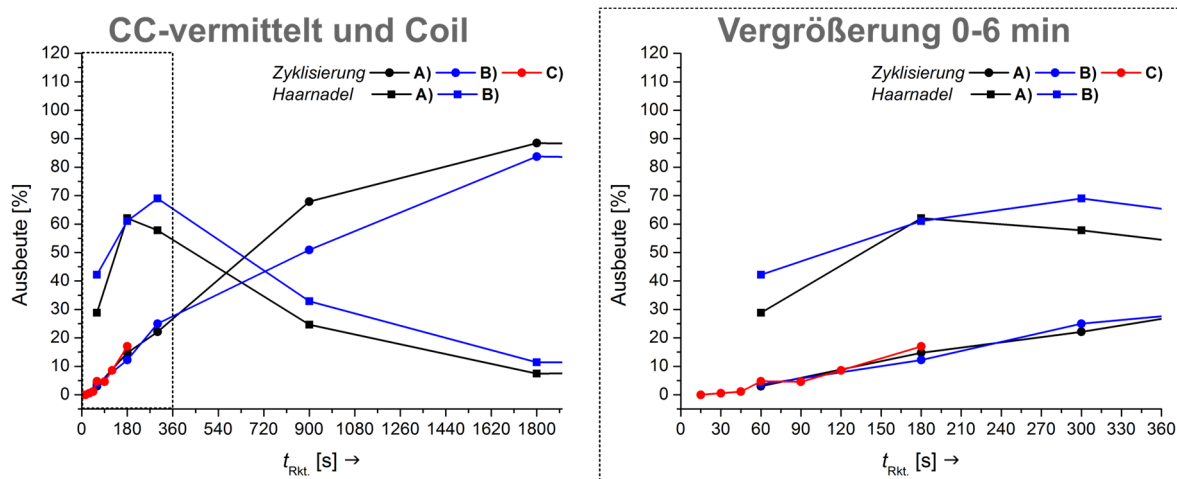


Abbildung 39: Graphische Darstellung der Haarnadel- und Zyklisierungsproduktbildung in % gegen die Reaktionszeit bis 30 min (1800 s). Gezeigt sind die berechneten Ausbeuten der CC-vermittelten NCL in eigenständigen Reaktionen je Messpunkt mit A) Thiol C **4c** (schwarz), B) Thiol B **4b** (blau) und C) der Kontrollreaktion des Coil-Peptids **18bg** ohne Thiol aus Abbildung 38 (rot). Die Kontrollmessungen in C) wurden aus einem Reaktionsansatz entnommen.

Die erhaltenen Kurvenverläufe zeigen einen vergleichbaren Verlauf der Zyklisierungsproduktbildung in einer ähnlichen Größenordnung wie bei den zuvor gezeigten Reaktionen mit Proben aus einem Reaktionsgemisch. Die Kurvenverläufe der beiden CC-vermittelten NCL verlaufen nahezu parallel und zeigen damit eine homogenere Reaktionsmischung, in der die Unterschiede zwischen Thiol C (Abbildung 38C) und Thiol B (Abbildung A.26 in Anhang Kapitel 7.3.2) weniger groß erscheinen als in Abbildung 37 gezeigt. Auch die Kontrollmessung des Coil-Peptids, mit einer kürzeren Reaktionszeit, verläuft identisch (Abbildung 38B). Es kann kein Templat-Effekt für die CC-vermittelte Reaktion verschiedener Thiollinkertlängen für das Tetrapeptid **18bg** gezeigt werden. Die beobachteten, geringen Unterschiede in den Messpunkten der CC-vermittelten NCL zur Makrozyklisierung lassen sich auf den Fehler der Probenvorbereitung oder Reaktionsführung zurückführen, aber liegen in allen Fällen in der zu erwartenden Größenordnung der Ausbeute. Die Ausbeute stagnierte innerhalb der Reaktionszeit um 90%, da es bei pH 7.9 zu Disulfid-Bildung des Ausgangsstoffes kam. Das Disulfid wurde hier durch den Ligationspuffer und unter diesen Bedingungen nur sehr langsam reduziert, weshalb ab 30 min Reaktionszeit nur noch ein sehr flacher Anstieg der Produktbildung beobachtet werden konnte. Die Zyklisierung ist somit wahrscheinlich im Zeitraum von 15 min bis 30 min abgeschlossen, wenn keine anteilige Disulfid-Bildung des Ausgangsstoffs vorliegen sollte. Für das Tetrapeptid wurden ebenfalls drei Messreihen des Peptidthioesters **9g** (exemplarisch in Abbildung 38A) unter identischen Bedingungen für den Zeitraum von 30 min durchgeführt und sollen mit den

erhaltenen Ergebnissen abschließend und unter Vorbehalt verglichen werden. Die graphische Darstellung der Reaktionsverläufe im Vergleich zu den bereits in Abbildung 38B und 38C gezeigten Ligationsversuchen ist in Abbildung 40 gezeigt.

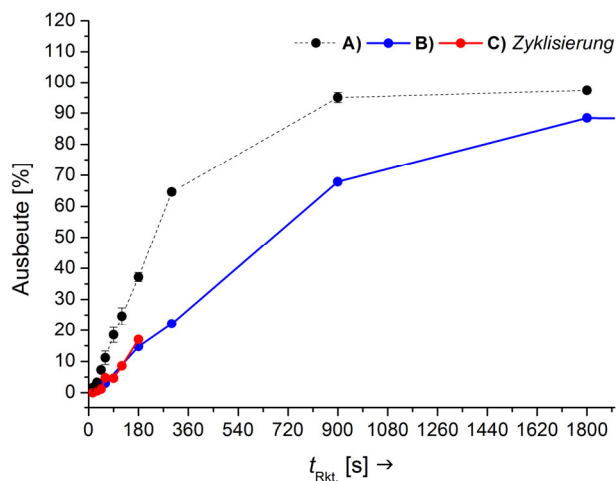


Abbildung 40: Auftragung der Ausbeute in % für das untersuchte Tetrapeptid $c[\text{CKYG}]$ mit A) dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messreihen (mit der Standardabweichung als Fehlerbalken) des Tetrapeptidthioesters **9g** (schwarz), B) der CC-vermittelten Zyklisierung mit Thiol C **4c** (blau) und C) das Coil-Peptid-dekorierte Tetrapeptid **18bg** (rot). Die Messpunkte von A) entsprechen aufgrund von Löslichkeitsproblemen des Edukts nach jetzigem Kenntnisstand nicht der realen Ausbeute (gestrichelte Linie).

Die Zyklisierung des Peptidthioesters **9g** zeigte innerhalb der drei Messreihen des Zyklisierungsversuchs im Zeitraum von 5 min Ligationszeit erhebliche, mit dem bloßen Auge sichtbare Löslichkeitsprobleme, die auch unter Verwendung von Acetonitril als Co-Solvens bestanden. Nichtsdestotrotz zeigte die Standardabweichung des Mittelwerts einen sehr geringen Fehler. Wie aus Abbildung 40 ersichtlich, reagiert das freie **9g** erstmals um den Faktor 2-3 schneller als die Hintergrundreaktion des Coil-gebundenen Tetrapeptids **18bg** und die CC-vermittelte Zyklisierung mit Thiol C **4c**. Zum jetzigen Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass es sich durch Löslichkeitsprobleme des Startmaterials **9g** um einen systematischen Fehler handelt, in der das besser lösliche Cyclotetrapeptid $c9g$ in einem falschen Verhältnis zum Edukt dargestellt wird. Eine Überprüfung dieses Befundes durch eine erneute Lösung des Reaktionsgemisches in geeigneten Lösungsmitteln, analog der im Anhang gezeigten Versuche der Zyklisierung in reinem PBS-Puffer, muss an dieser Stelle schuldig geblieben werden. Für das im Folgenden untersuchte Tetrapeptid CKYA **9h** konnte diese Hypothese jedoch bestätigt werden (Verweis auf Abbildung 42A). Es ist nach den bisherigen Erkenntnissen der Makrozyklisierungen des Hepta-, Hexa- und Pentapeptids davon

Ergebnisse und Diskussion

auszugehen, dass **9g** ebenfalls geringfügig langsamer reagieren sollte. Von einer Verlangsamung durch die Konjugation an ein Coil-Peptid kann nicht ausgegangen werden. Ebenso zeigt die Übereinstimmung der Kontrollreaktion des Coil-Peptids mit der CC-vermittelten NCL durch den beobachteten identischen Verlauf, dass die Haarnadelbildung keine Reaktionsverlangsamung nach sich zieht. Auch in der Zyklisierung des Tetrapeptids **18bg** konnte somit kein Templat-Effekt beobachtet werden. Die beobachtete langsamere Reaktion korreliert mit der sukzessiven Abnahme der Makrozyklisierungsgeschwindigkeit der zuvor besprochenen, längeren Peptidsequenzen und ist damit auf die geringere Diffusion des Tetrapeptids zurückzuführen.

Des Weiteren wurden die folgenden Tetrapeptide untersucht, bei denen das C-terminale Gly durch die chiralen Aminosäuren L-Ala, L-Ser und L-Ile substituiert wurde. Eine Übersicht der Zielverbindungen ist in Abbildung 41 gezeigt.

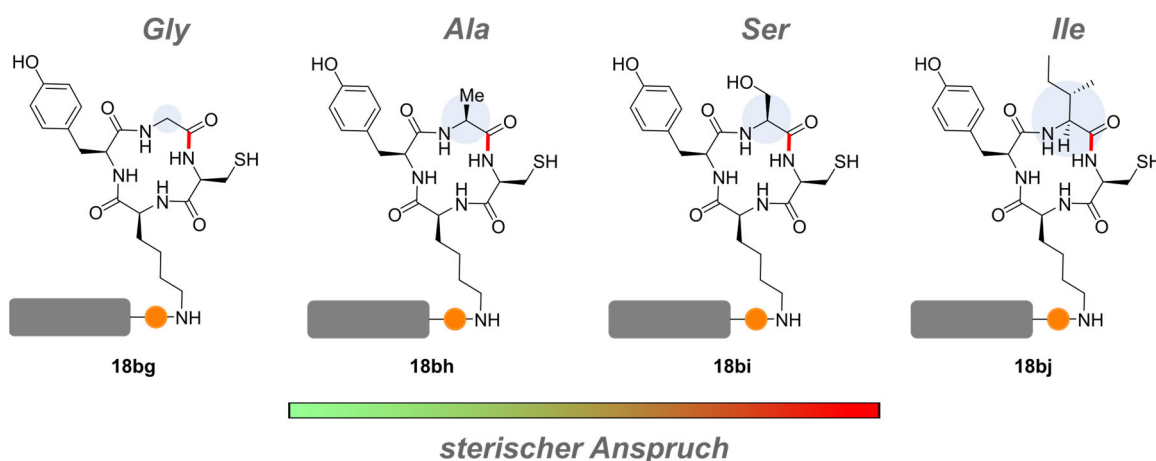


Abbildung 41: Übersicht der untersuchten Tetrapeptide **18bg-bj** als Makrozyklisierungsziel.

Alle CC-vermittelten NCL-Reaktionen wurden mit dem Thiol **4c** mit MeCN in 0.2 mM TCEP/PBS (1:3, v/v) bei pH 7.9 durchgeführt. Die Ergebnisse mit C-terminalem Gly legten nahe, dass kein signifikanter Unterschied zwischen dem längsten Thiol **4d** und dem kürzeren Thiol **4b** bestand und somit dieses als moderat flexible Variante eingesetzt wurde. Die CC-vermittelte Makrozyklisierung sowie die Hintergrundmessung des entsprechenden Coil-Peptids wurden nach 3 min und 30 min verfolgt und sollten eine qualitative Aussage gegenüber der Ligationsversuche des C-Gly Peptidthioesters erlauben, welcher in einem Zeitraum von 15 min bis 30 min nahezu vollständig zyklisiert. Die Ergebnisse der Zyklisierungsversuche des Tetrapeptids CKYA **9h** und **18bh** sind in Abbildung 42 gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

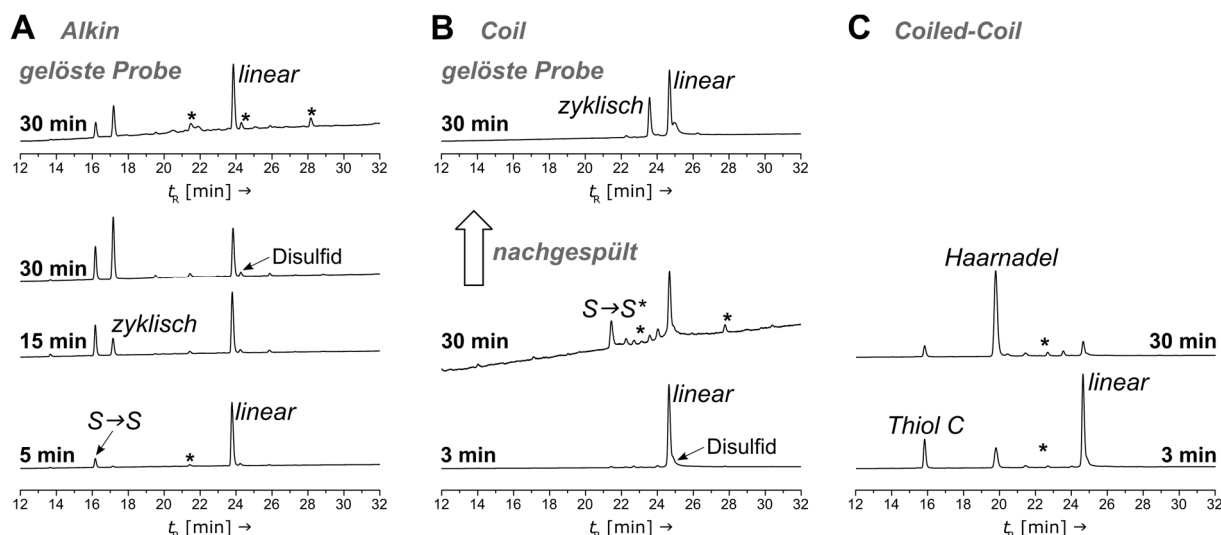


Abbildung 42: Repräsentative Übersicht der analytischen HPLC-Spuren (280 nm) der Reaktionsverfolgungen der Makrozyklisierung des Tetrapeptids (0.1 mM) innerhalb von 30 min Ligationszeit. A) Der Tetrapeptidthioester H-CK(Proc)YA-SBn (**9h**), B) das Coil-Peptid-dekorierte Tetrapeptid **18bh** und C) die CC-vermittelten Zyklisierung mit Thiol C **4c**. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C und mit MeCN in 0.2 mM TCEP/PBS (1:3, v/v, pH 7.9) durchgeführt. Für B) musste das HPLC-Vial der Messung nach 30 min erneut gelöst werden. Unbekannte Spezies sind mit einem Asterisk (*) markiert.

Die Ergebnisse der Messungen des Peptidthioesters **9h** (repräsentativ eine der drei unabhängigen Messungen in Abbildung 42A) zeigten die bereits für das C-terminale Gly vermutete und nun bestätigte schlechte Löslichkeit im Ligationspuffer mit Acetonitril bei pH 7.9. Während die Reaktion eine Zyklisierung über das entsprechende $S \rightarrow S$ -Acyltransfer-Intermediat indizierte, in der nach 30 min Reaktionszeit bereits mehr als 50% des Edukts abreagiert waren, zeigte die erneute Lösung des gefriergetrockneten Reaktionsgemischs des gleichen Reaktionsansatzes kaum Umsatz. Durch die invasive Reaktionsverfolgung, in der aus demselben Ansatz die Proben zu den angegebenen Reaktionszeiten entnommen wurden, kann hier keine quantitative Aussage getroffen werden. Bei den bisherigen Versuchen erneut gelöster, gefriergetrockneter Reaktionsgemische wurden Reaktionen betrachtet, aus denen keine Proben entnommen wurden. Das Coil-gebundene Tetrapeptid **18bh** präzipitierte während der Analyse des Reaktionsgemischs (Abbildung 42B) nach 30 min Reaktionszeit. Das nachgespülte HPLC-Vial lieferte darauffolgend den Nachweis für die Bildung des gewünschten Produkts. Auch hier kann keine quantitative Aussage getroffen werden. Die CC-vermittelte Reaktion mit **4c** hingegen zeigte eine schnelle Haarnadelbildung innerhalb von 30 min Reaktionszeit, wobei allerdings keine nachweisbare Produktbildung des gewünschten, zyklisierten Tetrapeptids **c18bh** beobachtet wurde. Es ist anzunehmen, dass im Fall des chiralen Ala als C-terminale Aminosäure die Haarnadelregion erstmalig in einer ungünstigen

Ergebnisse und Diskussion

Präzyklisierungskonformation vorliegt und die intramolekularisierte NCL verhindert bzw. bremst. Auf eine Auftragung der erhaltenen Ergebnisse gegen die Reaktionszeit wurde aus diesem Grund verzichtet.

Im Fall des Ser wurden analoge Ergebnisse wie für Ala erhalten. Auch hier zeigte der Peptidthioester **9i** nach erneutem Anlösen einer gefriergetrockneten Probe, dass die erhaltenen Ergebnisse der vorherigen, dreifach durchgeführten Versuche nicht exakt die Reaktion widerspiegeln.

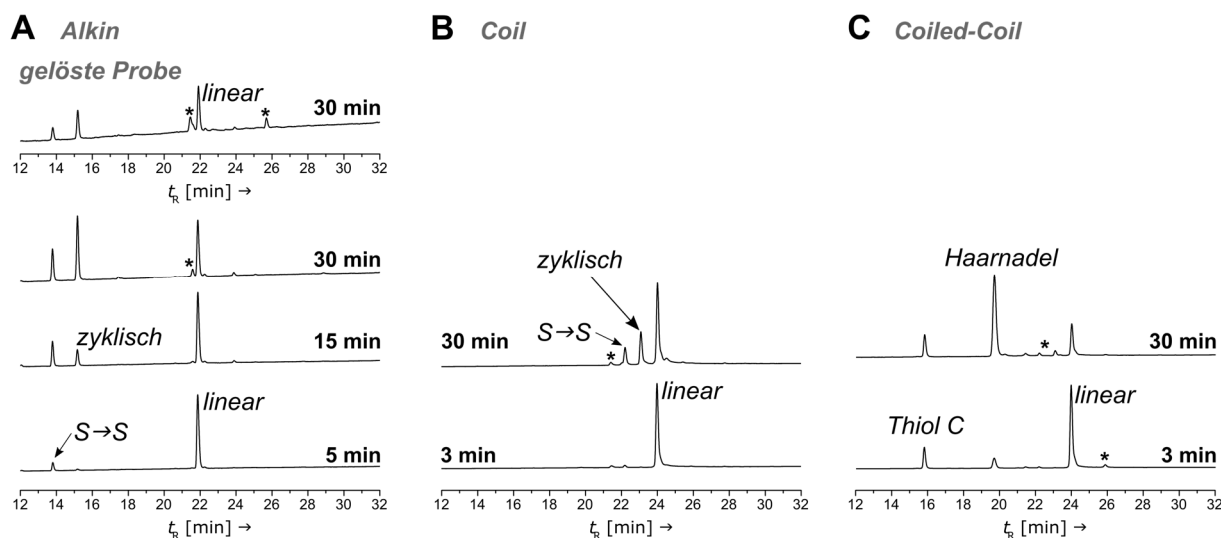


Abbildung 43: Repräsentative Übersicht der analytischen HPLC-Spuren (280 nm) der Reaktionsverfolgungen der Makrozyklisierung des Tetrapeptids (0.1 mM) innerhalb von 30 min Ligationszeit. A) Der Tetrapeptidthioester H-CK(Proc)YS-SBn (**9i**), B) das Coil-Peptid-dekorierte Tetrapeptid **18bi** und C) die CC-vermittelten Zyklisierung mit Thiol C **4c**. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C und mit MeCN in 0.2 mM TCEP/PBS (1:3, v/v, pH 7.9) durchgeführt. Für A) wurde die Reaktion zusätzlich nach 30 min beendet und eine Probe des gefriergetrockneten Reaktionsgemischs erneut gelöst und vermessen. Unbekannte Spezies sind mit einem Asterisk (*) markiert.

Auch hier wurde ein Reaktionsgemisch vermessen, aus dem bereits Proben entnommen worden waren. Ein Verlauf, wie er in Abbildung 43B gezeigt ist, erscheint wahrscheinlicher. Die CC-vermittelte Reaktion zeigte auch hier eine moderate Haarnadelbildung, welche wiederum nicht signifikant abreagierte und eine ungünstige Konformation der Haarnadel nahelegt.

Der Ile-Peptidthioester **9j** bzw. **18bj** zeigte keinerlei nennenswerte Reaktivität. Weder die Hintergrundmessungen in Abbildung 44A und 44B noch die CC-vermittelte Makrozyklisierung konnten den Nachweis einer Produktbildung erbringen.

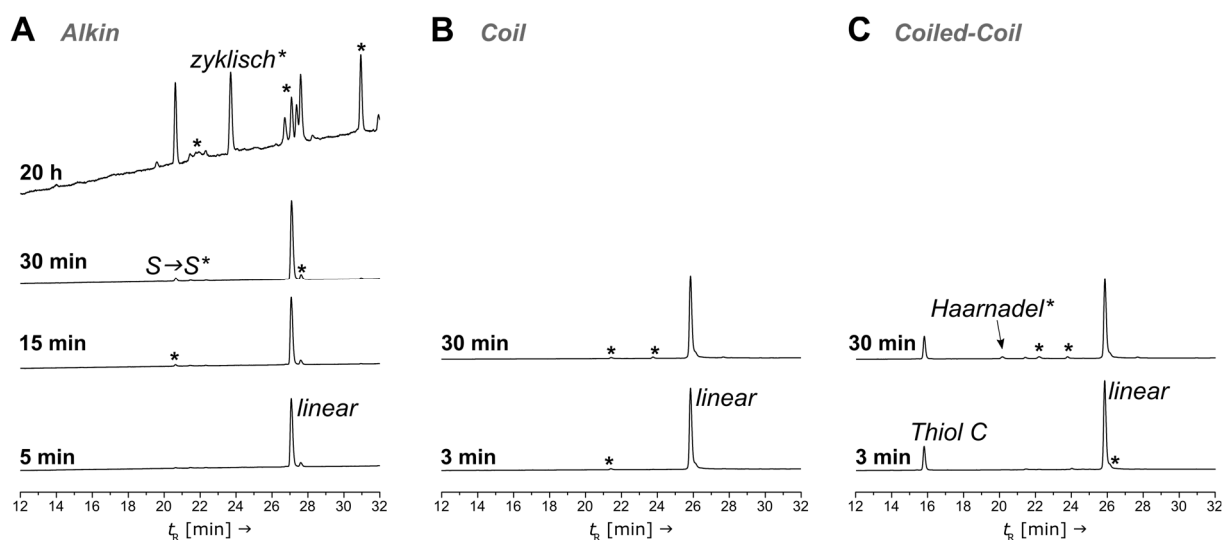


Abbildung 44: Repräsentative Übersicht der analytischen HPLC-Spuren (280 nm) der Reaktionsverfolgungen der Makrozyklisierung des Tetrapeptids (0.1 mM) innerhalb von 30 min Ligationszeit. A) Der Tetrapeptidthioester H-CK(Proc)YI-SBn (**9j**), B) das Coil-Peptid-dekorierte Tetrapeptid **18bj** und C) die CC-vermittelten Zyklisierung mit Thiol C **4c**. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C und mit MeCN in 0.2 mM TCEP/PBS (1:3, v/v, pH 7.9) durchgeführt. Für A) wurde die Reaktion zusätzlich einmalig für 20 h Reaktionszeit verfolgt. Unbekannte Spezies bzw. vermutete, aber nicht bestätigte Spezies sind mit einem Asterisk (*) markiert.

Die Reaktion über einen Zeitraum von 20 h für das Alkin **9j** zeigte eine Vielzahl an Produkten, welche auf Disulfidbildung zurückzuführen sind. Eine Zuordnung der beobachteten Spezies konnte nicht erfolgen, spiegelt allerdings die sehr langsame Reaktion des sterisch-anspruchsvollen Peptidthioesters wider.

Aus den Ergebnissen aller CC-vermittelten Zyklisierungsversuche ist ersichtlich, dass die Haarnadelstruktur in allen untersuchten Fällen zu flexibel ist und die diffusionskontrollierte Zyklisierung ungehindert ablaufen kann. Im Fall sterisch anspruchsvoller C-terminaler Aminosäuren verläuft die Reaktion auch für Pentapeptide gut, wie am Beispiel des Phenylalanins gezeigt, während im Fall von Tetrapeptiden mit sterisch anspruchsvollem C-Terminus die erhaltenen Haarnadeln nicht abreagieren können und langsamer verlaufen als die Coil-Peptid-gebundene Hintergrundreaktion. Im Fall sterisch anspruchsvollerer Aminosäuren ist hierfür wahrscheinlich die Verknüpfung des Zyklisierungsziels über das Amin der Lysin-Seitenkette ausschlaggebend. Dadurch wird eine zu große Flexibilität der Haarnadelregion erzielt, welche dann zur Relaxation anstatt einer intramolekularen NCL zwischen N-terminalem Cys und dem Peptidthioester eine ungünstige Struktur einnimmt. Eine Darstellung der Lysin-Seitenkettenverknüpfung ist beispielsweise in Abbildung 41 gezeigt. Somit erscheint der Lysinrest als ungeeigneter Verknüpfungspunkt zum Zyklisierungsziel.

Kurze Peptidthioester sollten folglich näher an den *N*-Terminus des Coil-Peptids **1** gebracht werden, wenn eine Templat-vermittelte Zyklisierung stattfinden soll.

3.4.3 Kurzzusammenfassung der Coiled-Coil-vermittelten Zyklisierungsversuche

Die mittels eines Coiled-Coil-Gerüsts als Templat angestrebte Vermittlung zweier Makrozyklisierungsansätze wurde untersucht. Der erste Ansatz bestand darin ein lineares Heptapeptid mit als Benzylthioester voraktiviertem *C*-Terminus über eine Kopf-zu-Schwanz-Lactamisierung, also einer direkten Aminolyse, zu zyklisieren. Der zweite Ansatz beruhte auf der zusätzlichen „Aktivierung“ des *N*-Terminus, durch Nutzung von Cys, das die NCL-Reaktion über einen intramolekularisierten *S*→*S*-Acyltransfer beschleunigt. Die linearen Peptidvorläufer **9** wurden an einem Coil-Peptid **1** gebunden (**18**) und zusammen mit einem *N*-Thiol-Coil-Peptid **4** in PBS-Puffer bei 25 °C reagiert. Das Templat, ein heterodimeres Coiled-Coil, bildet sich anschließend sehr schnell in Lösung. Der *C*-Terminus des Peptidthioesters **18** wird von dem *N*-Thiol **4** des Templats über eine Transthioesterifizierung eingefangen und zwingt, so postuliert, die reaktiven Termini in räumliche Nähe. Dies erlaubt es über eine Präzyklisierungskonformation die *head-to-tail*-Zyklisierung zu beschleunigen, zu steuern und zu modulieren.

Die Versuche zur CC-vermittelten direkten Aminolyse erlaubten ein verbessertes Verständnis der Reaktion und damit einhergehend das Identifizieren geeigneter Reaktionsbedingungen. Es wurde erkannt, dass die angestrebte Bibliothek verschiedener Linkerlängen der Verknüpfung Peptidthioester-Coil in **18** auf sehr kurze Linkerlängen beschränkt werden konnte, da bereits die Lysin-Seitenkette der Verknüpfung von Thioester mit Coil-Peptid eine gewisse Flexibilität erlaubte. Daher wurde sich im Verlauf der Studien auf die Länge der Linkerregion des Thiol-Coils in **4** konzentriert. Auf diese Weise konnten sehr stabile Haarnadelstrukturen aufgebaut werden. Diese reagierten unter neutralen Bedingungen aufgrund der *pK_s*-Werte der Aminogruppe nicht ab. Durch Verwendung von Imidazol in PBS-Puffer bei pH 9 konnte erstmals eine Zyklisierung unter gleichgroßer Hydrolyse des Peptidthioesters beobachtet werden. Durch gezielte Substitution eines Lysins im Coil-Peptid konnte jedoch gezeigt werden, dass das wahrscheinliche Hauptprodukt eine unerwünschte *side chain-to-tail*-Makrozyklisierung ist. Durch Kontrollversuche wurde diese Annahme gestützt und lieferte das Bild einer an den Flanken des CC-Templats abgeknickten Haarnadelstruktur, bedingt durch eine zu große Flexibilität der Linkerregionen.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Differenzierung der Aminogruppen wurde die NCL mit einem Cysteinylpeptidthioester unter neutralen Bedingungen untersucht. Das Bild der flexiblen Haarnadelstruktur wurde jedoch auch durch die NCL-basierte CC-vermittelte Zyklisierung bestätigt.

Die Gly-reichen Peptidthioester des Hepta- bis Pentapeptids zeigten eine diffusionskontrollierte Zyklisierung innerhalb weniger Minuten. Die Haarnadelstruktur ist in allen Fällen zu flexibel und die diffusionskontrollierte Zyklisierung kann ungehindert ablaufen, jedoch nicht signifikant beschleunigt werden. Das Tetrapeptid mit einem C-terminalen Gly reagiert ebenfalls vollständig innerhalb von 30 min, während die Tetrapeptide mit sterisch anspruchsvollen C-Termini zu Haarnadeln reagieren, welche nicht ungehindert abreagieren können. Diese Makrozyklisierungen verlaufen langsamer als die Coil-Peptid-gebundene Hintergrundreaktionen. Es wird angenommen, dass durch die Verknüpfungsstrategie der Peptidthioester mit dem Coil-Peptid eine zu große Flexibilität besteht. Die schnell gebildeten Haarnadeln, außer im Fall des Ile-Peptidthioesters, welches keine Reaktion zeigte, folgen der sterisch überladenen, linearen Peptidsequenz und weichen in eine für die Zyklisierung ungünstige Konformation aus, wodurch die Diffusionen der Termini gehindert erscheinen. In Abbildung 45 ist eine Übersicht der beobachteten Zyklisierungsgeschwindigkeiten vereinfacht dargestellt.

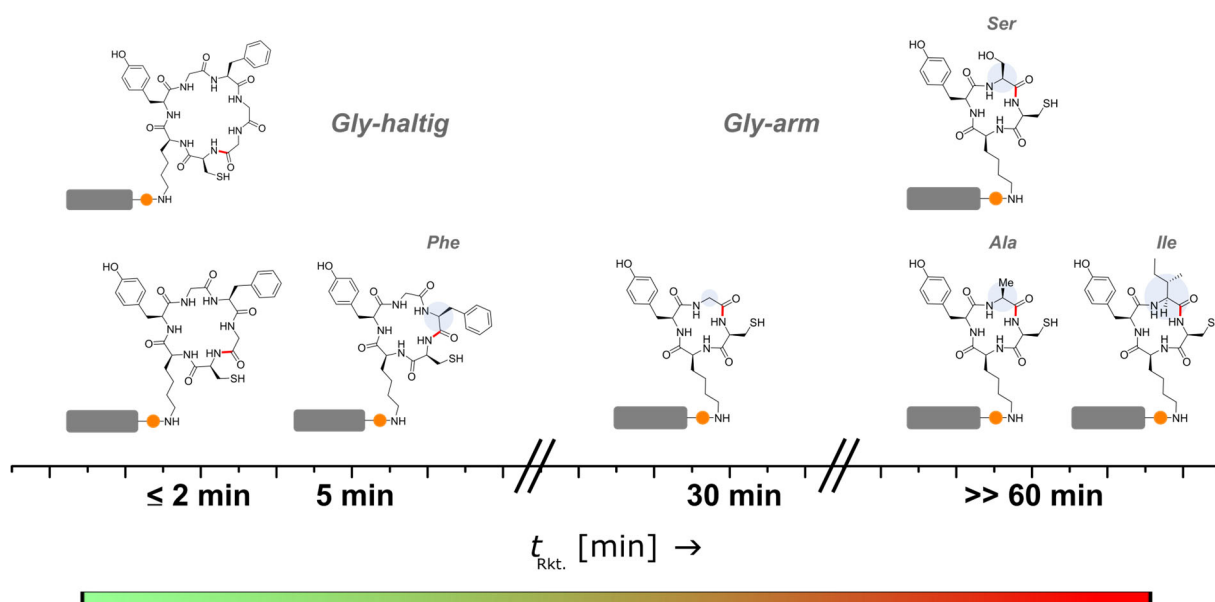
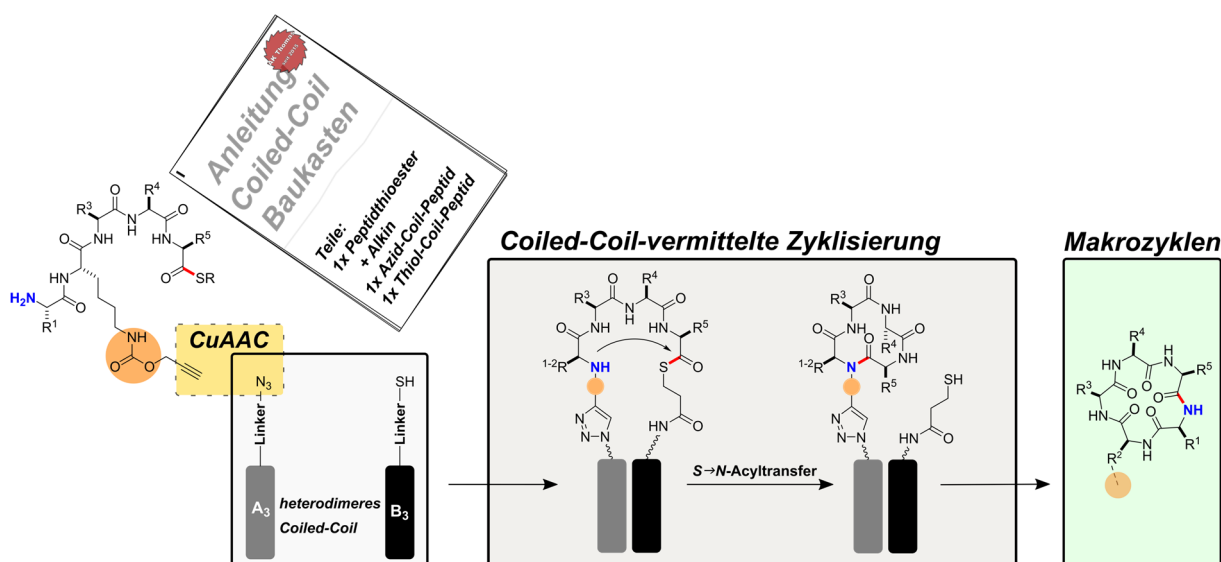


Abbildung 45: Übersicht der beobachteten Makrozyklisierungszeiten der untersuchten Ringgrößen der NCL-Versuche.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung neuer Zugänge, wie einer Templat-vermittelten Peptidmakrozyklisierung, ist vor dem Hintergrund des hohen pharmakologischen Potenzials zyklischer Peptide interessant. Durch die Zyklisierung linearer Peptide kann des Weiteren die Effizienz von Peptidwirkstoffen durch die Erhöhung der Bioverfügbarkeit aufgrund einer verbesserten Proteasestabilität erzielt und der hydrophobe Kollaps vermieden werden.^[71,196] Auch die Vorformung der wirksamen Konformation kann dadurch erhöht werden. Die chemische Synthese von Peptidmakrozyklen ist aufgrund der Ringspannung in Ringsystemen von unter sieben Aminosäureresten jedoch anspruchsvoll.^[71] In der Natur ist die Peptidzyklisierung nicht auf die in dieser Arbeit besprochenen *head-to-tail*-Zyklen beschränkt, sondern zeigt oftmals hochkomplexe und mehrfach verbrückte Ringsysteme zwischen *head-to-tail*- und *side chain-to-tail*-Zyklen. Die chemische Synthese solcher komplexer Makrozyklen beruht häufig auf ausgefeilten, orthogonalen Schutzgruppenstrategien. Durch die eingeschränkte Löslichkeit der geschützten Peptide ist dieser Zugang jedoch limitiert, was den Einsatz ungeschützter Peptide attraktiv macht. Für eine sequenzunabhängige Makrozyklisierung bieten sich Template an, welche die linearen Peptide konformationell vororganisieren und den Zyklisierungsschritt beschleunigen oder erst ermöglichen.^[71]



Schema 32: Konzept der Coiled-Coil-vermittelten Peptidzyklisierung.

Als solches Templat wurde das aus einem A-Strang und einem B-Strang bestehende heterodimere Coiled-Coil gewählt. Durch die Kenntnis der Sequenz-Strukturbeziehungen

dieses selbständig faltenden α -helikalen Proteinfaltungsmotivs können gezielt Oligomerenzustände und Assoziationsstärken von Grund auf programmiert werden (*de novo Design*).^[15] Das heterodimere Coiled-Coil eignet sich durch seine zwei orthogonalen Peptidstränge und ihre hochspezifische Interaktion dazu zwei potenzielle Reaktanden in räumliche Nähe zu bringen und die gewünschte Reaktion zu beschleunigen. Das Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung einer Coiled-Coil-vermittelten Peptidmakrozyklisierung über einen *head-to-tail*-Ringschluss (Schema 32).

Die Coiled-Coil-vermittelte Peptidzyklisierung basiert auf der reversiblen Verankerung des zu zyklisierenden Peptidthioesters auf einem Coil-Trägerstrang und dessen Zyklisierung nach Assoziation des komplementären Thiol-modifizierten Coil-Strangs über die direkte Aminolyse oder die Native Chemical Ligation (NCL). Durch die Ausbildung einer Haarnadelstruktur als Intermediat sollte nach diesem Konzept die *head-to-tail*-Makrozyklisierung gegenüber der nicht-Coiled-Coil-vermittelten Hintergrundreaktion erleichtert werden. Das Thiol-modifizierte Coil wird daraufhin zurückgewonnen, während das zyklisierte Produkt am Coil-Strang verbleibt und in einem zusätzlichen Schritt freigesetzt werden muss. Als zur Thioesterfunktionalität des Zyklisierungsziels orthogonale Peptidmodifikation wurde die CuAAC-Reaktion gewählt. Dazu musste einer der Coil-Stränge mit einem Azid funktionalisiert werden, während der Peptidthioester eine Alkylgruppe trug.

Der erste Teil dieser Doktorarbeit befasste sich mit der Synthese der drei Bausteine: 1) eines Peptidthioesters mit Alkylgruppe, 2) eines Azid-funktionalisierten Coil-Peptids und 3) eines Thiol-Coils. Die Synthese aufbauend auf dem von THOMAS *et al.* entwickelten N-A₃B₃ Coiled-Coil gelang für die der Azide auf A₃ **1** und der Thiole auf B₃ **4** über Standard Fmoc-SPPS.^[15] Zwischen Coil-Strang und diesen funktionellen Gruppen wurden verschiedene *Linker* in Form zusätzlicher Aminocarbonsäuren installiert, was eine spätere Modellierung der Präzyklisierungszwischenstufe in der Haarnadel ermöglichen sollte und zunächst eine kleine Bibliothek verschieden flexibler Verankerungen an den Coil-Peptiden lieferte. Auf der Grundlage des Knochenwachstumspeptids OGP(10-14) wurden die zu zyklisierenden Peptide als C-terminaler Peptidthioester synthetisiert. Die Sequenz dieser Leitstruktur wurde zur Coil-Funktionalisierung mit einem Lysin und einem N-terminalen Alanin zur direkten Aminolyse bzw. einem Cystein zur NCL-artigen Makrozyklisierung erweitert. Der Lysin-Rest besaß zur Konjugation mit dem Azid-Coil eine Proc-Seitenkettenschutzgruppe, ein Alkylcarbamat. Die Synthese der Peptidthioester **9** konnte erfolgreich für C-terminales Glycin durchgeführt werden. Chirale Aminosäuretermini zeigten jedoch einen signifikanten Anteil an

Epimerisierung, was eine zukünftige Optimierung der Thioesterifizierungsbedingungen erforderlich macht. Nichtsdestotrotz waren die Epimere mittels semipräparativer HPLC trennbar und die gewünschten *all*-L-Peptidthioester konnten in der Folgechemie eingesetzt werden.

Im zweiten Teil wurde mit den entsprechenden Alkin-modifizierten Peptidthioestern **9** die CuAAC-Reaktion zur Verankerung an den Azid-Coils **1** erfolgreich in Lösung etabliert. Für *N*-Alaninpeptidthioester wurden geeignete Bedingungen mit Kupfer(II)sulfat und THPTA im Verhältnis 1:2 als Ligand in *tert*-Butanol/PBS als Lösungsmittelsystem mit Natriumascorbat als Reduktionsmittel gefunden. Diese Bedingungen erlaubten eine reproduzierbare CuAAC-Reaktion, die alle Aminosäuren sowie gebräuchliche Tag- und Fluoreszenzlabel toleriert. Problematisch gestaltete sich allerdings die Synthese der Konjugate aus Cysteinylpeptidthioestern, dem Cyclopeptidvorläufer für eine NCL-artige Zyklisierung, mit dem Coil-Trägerstrang **1** über die CuAAC-Clickreaktion. Es wurde festgestellt, dass der *N*-terminale Cysteinrest durch das verwendete *tert*-Butanol als Lösungsmittel unter den CuAAC-Bedingungen formyliert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass *tert*-Butanol über die Oxidation mit ROS zu Formaldehyd, Methanol und Sauerstoff zerfällt. Die Formylierung von Cystein zu Thiazolidin steht dabei im Gleichgewicht mit der Kupfer(II)-vermittelten Thiazolidinspaltung und kann folglich durch die Menge an Kupfer(I)-stabilisierendem THPTA-Liganden beeinflusst werden. Über eine Feinjustierung des Verhältnisses an Kupferspezies und Cu(I)-stabilisierenden THPTA-Liganden konnten die CuAAC-Bedingungen optimiert und ein präparativer Zugang zur Dekoration von Coil-Peptiden mit *N*-Cysteinylpeptidthioestern entwickelt werden. Durch ein Kupfersulfat-THPTA-Verhältnis von 2:1 konnte letztlich das gewünschte Konjugationsprodukt in 74% HPLC-Ausbeute erhalten werden. Die Entwicklung eines Protokolls für die CuAAC-Reaktion an der Festphase lieferte überdies grundlegende Erkenntnisse für eine zukünftige harzbasierte CuAAC-Reaktion mit anschließender Thioesterifizierung. Wesentlich ist hier, dass das Alkin harzgebunden vorliegt. Dies konnte aufgrund des in dieser Arbeit verfolgten Konzepts nicht realisiert werden.

Im dritten und letzten Kapitel dieser Arbeit wurde die mittels eines Coiled-Coil-Gerüsts als Templat angestrebte Vermittlung zweier Makrozyklisierungsansätze untersucht. Der Begriff Templat ist aus der Koordinationschemie entlehnt, in der eine Templat-Reaktion Ligand-abhängig die Reaktion zwischen mindestens zwei Reaktanden an benachbarten Koordinationsseiten am Metallzentrum durch Präorganisation fördert. Im Fall von Templat-

vermittelten Makrozyklisierungen werden nach Klassifizierung allgemein hin molekulare Gerüste gezählt, die weder verbraucht noch kovalent gebunden sind.^[71] Dazu zählt das in dieser Arbeit besprochene Gerüst im engsten Sinne nicht, da ein Coil-Strang aufgrund der Azidfunktionalisierung verbraucht wird und darüber hinaus das Peptid innerhalb der Reaktion kovalent gebunden ist. Zunächst wurde in einem ersten Ansatz die Zyklisierung eines linearen Heptapeptids mit als Benzylthioester voraktiviertem C-Terminus über eine *head-to-tail*-Aminolyse untersucht. Der zweite Ansatz beruhte auf der zusätzlichen „Aktivierung“ des N-Terminus durch Nutzung von Cystein. Der Cysteinrest sollte durch einen zusätzlichen *Capture*-Schritt der Thioseitenkette die NCL-Reaktion über einen intramolekularisierten *S*→*S*-Acyltransfer beschleunigen. Die Coil-gebundenen linearen Peptidvorläufer **18** wurden über die CuAAC-Reaktion an einem Coil-Peptid gebunden und zusammen mit einem N-Thiol-Coil-Peptid **4** in PBS-Puffer bei 25 °C reagiert. Die Versuche zur Coiled-Coil-vermittelten direkten Aminolyse erlaubten ein verbessertes Verständnis der Reaktion und damit einhergehend die Identifikation geeigneter Reaktionsbedingungen. Es wurde erkannt, dass sehr kurze Linkerlängen der Coil-Termini ausreichend waren und somit die angestrebte Bibliothek verschiedener Linkerlängen der Verknüpfung Peptidthioester zu Coil-Peptid nicht notwendig war. Grund hierfür scheint die Flexibilität der Lysin-Seitenkette der Verknüpfung des Thioesters **9** mit dem Coil-Peptid **1** zu sein. Durch Variation der Linkerlängen auf Seiten des Thiol-Coils **4** konnten sehr stabile Haarnadelstrukturen aufgebaut werden. Diese reagierten unter neutralen Bedingungen aufgrund der pK_s-Werte der α-Aminogruppe nicht ab. Die Zyklisierung konnte daraufhin erstmals durch die Verwendung von Imidazol in PBS-Puffer bei pH 9 unter gleichschneller Hydrolyse des Peptidthioesters **18** durchgeführt werden. Durch gezielte Substitution eines Lysins mit einem nicht-nukleophilen Glutaminrest im Coil-Peptid **1** konnte jedoch gezeigt werden, dass das wahrscheinliche Hauptprodukt eine unerwünschte *side chain-to-tail*-Makrozyklisierung ist. Durch Kontrollversuche wurde diese Annahme gestützt und lieferte das Bild einer durch eine zu große Linkerflexibilität an den Flanken des CC-Templats abgelenkten Haarnadelstruktur. Vor dem Hintergrund dieser zu hohen Flexibilität der Haarnadelstruktur müssen zukünftig alternative, kürzere Verankerungen untersucht werden, die nicht auf die Lysin-Seitenkette limitiert sind. Dafür können sich Rückgrat-Amid-Linker (BAL) mit einer Alkylgruppen-Funktionalisierung eignen. Zur Nachahmung der Natur könnten des Weiteren Histidinreste in den Bereich der Haarnadelstruktur am Coiled-Coil eingeführt werden. Dies kann zu einer Aktivierung des Thioesters führen oder aber den lokalen pK_s-Wert der terminalen α-Aminogruppe senken und so eine *head-to-tail*-Zyklisierung ermöglichen.

Zusammenfassung und Ausblick

Zur Differenzierung der Aminogruppen wurde die NCL mit einem Cysteinylpeptidthioester unter neutralen Bedingungen untersucht. Das Bild der flexiblen Haarnadelstruktur wurde auch durch die NCL-basierte CC-vermittelte Zyklisierung bestätigt.

Die Glycin-reichen Peptidthioester der Hepta- bis Pentapeptide zeigten eine diffusionskontrollierte Zyklisierung innerhalb weniger Minuten. Die Haarnadelstruktur ist in allen Fällen zu flexibel und die diffusionskontrollierte Zyklisierung kann ungehindert ablaufen, jedoch nicht signifikant beschleunigt werden. Das Tetrapeptid mit einem C-terminalen Gly reagiert ebenfalls vollständig innerhalb von 30 min, während die Tetrapeptide mit sterisch anspruchsvollen C-Termini zu Haarnadeln reagieren, welche nicht ungehindert abreagieren können. Diese Makrozyklisierungen verlaufen langsamer als die der Coil-Peptid-gebundenen Hintergrundreaktionen. Es wird angenommen, dass durch die Verknüpfungsstrategie der Peptidthioester mit dem Coil-Peptid eine zu große Flexibilität besteht. Die schnell gebildeten Haarnadeln, mit Ausnahme des Ile-Peptidthioesters, folgen der sterisch überladenen linearen Peptidsequenz und weichen in eine für die Zyklisierung ungünstige Konformation aus, wodurch die Diffusion der Termini gehindert erscheint. In Abbildung 46 ist eine Übersicht der beobachteten Zyklisierungsgeschwindigkeiten vereinfacht dargestellt.

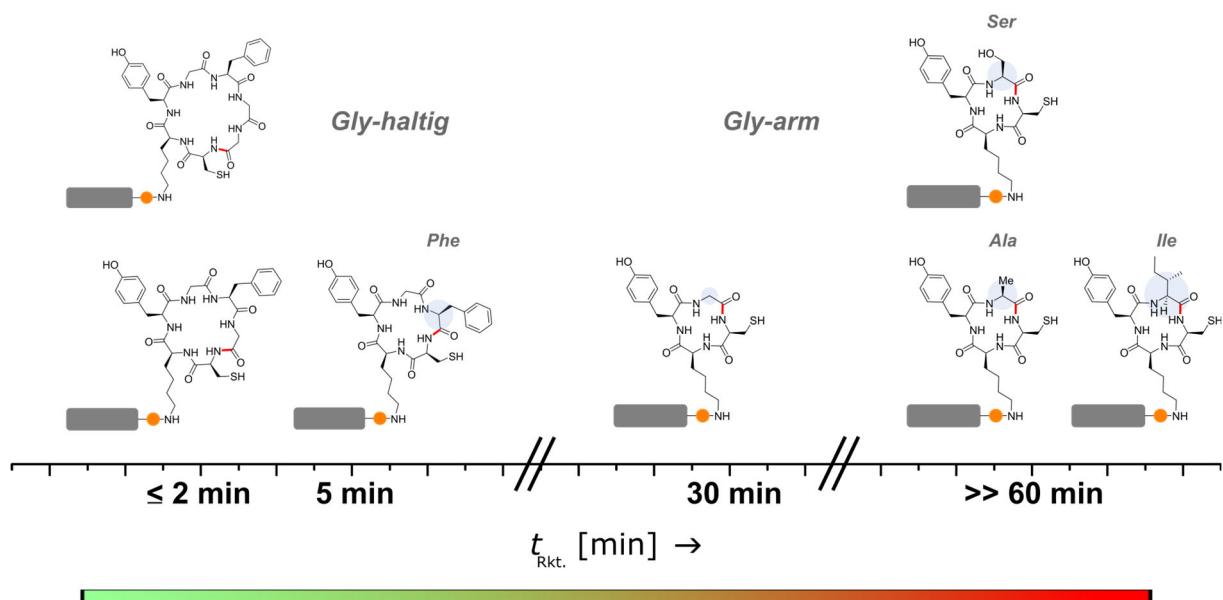


Abbildung 46: Übersicht der beobachteten Makrozyklisierungszeiten der untersuchten Ringgrößen der NCL-Versuche.

Zusammenfassung und Ausblick

Im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Coiled-Coil-vermittelten Zyklisierung konnte gezeigt werden, dass der Coil-Tag die Löslichkeit des zyklischen Peptids und seines Vorläufers erhöht. In Gegenwart beider Coil-Stränge verlief die Zyklisierung über das Coiled-Coil-Templat unter Ausbildung einer Haarnadelstruktur. Der Nachweis eines beschleunigenden Templat-Effekts hingegen konnte nicht erbracht werden. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass in dieser Arbeit zu flexible Verknüpfungen zum Zyklisierungsziel gewählt wurden. Im Fall sterisch anspruchsvoller all-L-Tetrapeptide kann überdies eine nicht-produktive Orientierung der *N*-Termini des Coiled-Coils einen Einfluss haben. Zur Untersuchung dieser Annahme sollte zukünftig auch ein Coil mit einer weiteren halben Heptade innerhalb einer systematischen Betrachtung des Linkerbereichs untersucht werden. Nichtsdestotrotz erlauben die bisherigen Ergebnisse bereits für die Hepta- bis Pentapeptide eine Generierung von Cyclopeptidbibliotheken, in der sich das Coil-Peptid als Tag für eine Detektion von Bindungsereignissen in Bindungsassays anbietet.

Die Freisetzung der Makrozyklen vom Coil-Peptid **18** konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Es wird angenommen, dass dies mit starken Säuren wie Trifluormethansulfonsäure möglich ist.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemein

Chemikalien. Fmoc-geschützte Aminosäuren wurden von *GL Biochem LTD* (Shanghai, China), Boc-geschützte Aminosäuren von *ChemPUR* (Karlsruhe, Deutschland), *Alfa Aesar™* (*Fisher Scientific GmbH*, Schwerte, Deutschland), *Sigma Aldrich* (Taufkirchen, Deutschland) und *ORPEGEN Pharma* (Heidelberg, Deutschland) bezogen. DIC und OxymaPure® wurden von *Iris Biotech GmbH* (Marktredwitz, Deutschland) und PyBrOP und PyBOP von *GL Biochem LTD* (Shanghai, China) erhalten. *H-Rink-Amid-ChemMatrix®* Harz, *HMPB-ChemMatrix®* Harz, *H-Gly-HMPB-ChemMatrix®* Harz und 2-Chlortritylchlorid Harz (1% DVB, *Novabiochem®*) wurden von *Sigma Aldrich* (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. DMF, welches für Peptidsynthese genutzt wurde, wurde von *Fisher Scientific GmbH* (Schwerte, Deutschland) oder *Th. Geyer* (Renningen, Deutschland) geliefert und besaß *peptide grade*-Qualität. *tert*-Butanol p.a. (99.5%) wurde von *Grüssing GmbH Analytica* (Filsum, Deutschland) bezogen. 1-Ethynylpyren, FAM-Alkin (5-Isomer), TAMRA-Alkin (6-Isomer) und Biotin-Alkin wurden von *Lumiprobe GmbH* (Hannover, Deutschland) geliefert und entsprachen 95% Reinheitsfarbstoffen, zertifiziert mittels ¹H-NMR und HPLC-MS seitens des Herstellers. Acetonitril für HPLC wurde von *Fisher Scientific GmbH* (Schwerte, Deutschland) oder *Th. Geyer* (Renningen, Deutschland) erhalten und besaß HPLC-Güte (*HPLC grade quality*). Reinstwasser für HPLC und Reaktionen wurde durch die Reinigung von demineralisiertem Wasser mit einem Aufreinigungsapparat *arium® mini* von *Sartorius* (Göttingen, Deutschland) erhalten. Alle anderen Reagenzien wurden von *Sigma Aldrich* (Taufkirchen, Deutschland), *Thermo Fisher* (Langenselbold, Deutschland), *VWR International* (Darmstadt, Deutschland) und *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) geliefert. Alle Reagenzien besaßen Synthesegüte (*synthesis grade quality*) und wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Synthetisierte Chemikalien wurden bei -20 °C gelagert.

Dünnschichtchromatographie (DC) und Säulenchromatographie. DC-Analyse wurde auf DC-Platten aus Aluminium mit Kieselgel 60 F₂₅₄ von *Merck* durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Anfärben mit Cer(IV)-Ammoniummolybdat (0.5 g Ammoniumcer(IV)sulfat in 0.6 M H₂SO₄ (250 mL), 12 g Ammoniummolybdat-Hexahydrat), Kaliumpermanganat (0.5 Gew.% in 1 M NaOH) oder durch Fluoreszenzlöschung mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm).

Säulenchromatographie wurde an *MN Kieselgel 60 M (Macherey-Nagel, 0.040-0.063 mm)* durchgeführt.

Kernresonanzspektroskopie (NMR). NMR-Spektren wurden an *Varian Instrumenten (Mercury 300, Mercury VX 300, Unity 300, VNMRs-300)* und *Bruker Instrumenten (Avance III 400, Avance III HD 400)* unter Verwendung von Chloroform-*d*, DMSO-*d*₆ oder D₂O als internem Standard gemessen.^[197]

Sicherheit/Gefahren. Ordnungsgemäße Sicherheitsvorkehrungen sollten bei der Arbeit mit organischen Aziden, wie in dieser Arbeit beschrieben, getroffen werden. Organische Azide sind explosionsgefährdend. Die Azid-Funktionalität kann durch starke Säuren protoniert werden und hochgiftige Stickstoffwasserstoffsäure (HN₃) freisetzen. Aus diesem Grund sollten Peptidabspaltungen von der festen Phase unter Verwendung von Trifluoressigsäure in Digestorien und gut ventilierten Laboren erfolgen. Die Aufreinigung von Rohpeptiden mit Azid-Funktionalität sollte ebenfalls, wenn möglich, in gut belüfteten Laboratorien erfolgen. Bei der semipräparativen HPLC, insbesondere bei Verwendung eines Säulenofens, empfiehlt es sich, einen Laborabzug über den Lösungsmittelabfall und der Sammelposition zu positionieren. Die explosionsgefährdenden Eigenschaften betreffend, sollte die sogenannte „*Rule of Six*“⁴ oder „*nitrogen rule*“⁵ zwingend beachtet werden (für weitere Informationen siehe u.a. KOLB *et al.* und BRÄSE *et al.*).^[119,198] Unter Beachtung dieser Sicherheitsrisiken, ausreichender Vorbereitung und unter Anwendung guter Laborpraxis können diese Verbindungen unter standard organisch-chemischen Laborbedingungen gehandhabt, gelagert und verwendet werden.

⁴ Die „*Rule of Six*“ besagt, dass sechs Kohlenstoffatome (oder andere Atome ähnlicher Größe) pro energiereicher funktioneller Gruppe in einem Molekül genügend Verdünnungsstabilität zur sicheren Handhabung gewährleisten sollten.

⁵ Die „*nitrogen rule*“ oder „*azide rule*“ besagt, dass die Gesamtzahl an Stickstoffatomen in organischen Aziden nicht die von Kohlenstoffatomen übersteigen sollte. Zur verallgemeinerten Hilfe und Abschätzung der Stabilität des verwendeten oder synthetisierten Azids kann das Verhältnis Kohlenstoff (mit Sauerstoff) zu Stickstoff betrachtet werden. Es ist zwingend zu beachten: $(N_C + N_O) / N_N \geq 3$ (N Anzahl an Atomen). Verbindungen „ ≥ 1 “ sollten unterhalb von Raumtemperatur gelagert werden. Kleiner „1“ sollte hingegen niemals isoliert werden.

Peptidsynthese. Die automatisierte mikrowellenunterstützte Festphasenpeptidsynthese wurde im 0.1 mmol Maßstab an einem *Liberty Blue*, einem mikrowellenunterstützten, automatisierten Peptidsynthesizer von *CEM* mit einem *HT-12* Harzwechsler durchgeführt. Die Synthese wurde durch die Anwendung eines standardisierten Fmoc/*tert*-Butyl-Protokolls mittels Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Oxyma Pure® als Kupplungsreagenzien und einer Lösung aus Piperidin in Dimethylformamid (1:4, v/v) zur Fmoc-Abspaltung durchgeführt. Die manuelle Kupplung an der Festphase wurde in einer BD-Spritze (*Discardit™ II*) von *Becton Dickinson*, welche mit einem PE-Filter (35 µm Porengröße) ausgerüstet war, durchgeführt.

Peptidaufreinigung. Die Peptide wurden mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) an der Umkehrphase (*reversed-phase*, RP) an einem *JASCO* Chromatographiesystem (Pumpen *PU-2080 Plus*, Entgaser *DG-2080-53*, Detektor *MD-2010 Plus*, Säulenofen *CO-4060*) bei einer Flussrate von 3 mL/min und an einer *Nucleodur 100-5-C18 ec* (250 mm × 10 mm, 5 µm) Säule von *Macherey-Nagel* aufgereinigt. Es wurden lineare Gradienten in 30 min von Wasser und Acetonitril (Puffer A: Wasser mit 0.1 % TFA, Puffer B: Acetonitril mit 0.1 % TFA) angewandt. Wenn nicht anders angegeben wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

Methode A: Gradient 35-60 % B in 30 min.

Methode B: Gradient 30-60 % B in 30 min.

Methode C: Gradient 10-50 % B in 30 min.

Methode D: Gradient 30-80 % B in 30 min.

Methode E: Gradient 50-100 % B in 30 min.

Methode F: Gradient 10-40 % B in 30 min.

Methode G: Gradient 5-35 % B in 30 min.

Methode H: Gradient 10-70 % B in 30 min.

Peptidcharakterisierung. Die Peptide wurden über Massenspektrometrie (MS) identifiziert. Hochaufgelöste Elektrospray-Ionisation (ESI (HR-MS)) Massenspektren wurden an einem *maXis* (ESI-QTOF-MS) Instrument oder einem *micrOTOF* (ESI-TOF-MS mit HPLC (*Agilent 1200 series*)) von *Bruker Daltonik* aufgenommen. Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitmassenspektrometer (MALDI-TOF) Massenspektren wurden im positiven Ionen-Reflektormodus mit externer Kalibration an einem *Autoflex Speed* Instrument von *Bruker Daltonik* aufgenommen. Dazu wurden die Peptidlösungen mit einer gesättigten Lösung aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB; *Sigma Aldrich*) Matrix in Acetonitril/Wasser (1:1, v/v) auf einer geschliffenen Stahlplatte in einem eins zu eins Verhältnis (1 μ L/1 μ L) kokristallisiert. Die detektierten Ionenmassen werden in *m/z* (Masse zu Ladung) angegeben. Analytische HPLC-Messungen wurden an einem *JASCO* Chromatographiesystem (Pumpen *PU-2085 Plus*, Detektor *MD-2010 Plus*, Autosampler *AS-2055 Plus*, Säulenthermostat *CO-2060*) und einer *Nucleodur 100-5-C18* (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm) Umkehrphasensäule von *Macherey-Nagel* bei einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Analytisches HPLC-Reaktionsmonitoring wurde an einem *JASCO* Chromatographiesystem (Pumpen *PU-2080 Plus*, Entgaser *DG-2080-53*, Detektor *MD-2010 Plus*, Säulenofen *CO-4060* bei 50 °C) und einer *Nucleodur 100-5-C18* (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm) Umkehrphasensäule von *Macherey-Nagel* bei einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Zur Peptidcharakterisierung und zum Reaktionsmonitoring wurden lineare Gradienten von Wasser und Acetonitril (Puffer A: Wasser mit 0.1% TFA, Puffer B: Acetonitril mit 0.1% TFA) in 30 min genutzt. Die verwendeten Gradienten stimmen mit den zuvor genannten semipräparativen Gradienten überein. Die Chromatogramme wurden bei 220 nm und 280 nm Wellenlänge aufgezeichnet.

Reaktionen mit Peptiden. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Reaktionen in phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS, 8.2 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM K₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) durchgeführt.^[199] Die Reaktionen wurden in 1.5 mL oder 2.0 mL *Micro Tubes* mit Verschluss und Graduierung sowie *Universal Fit Screw Caps* mit O-Ring von *VWR International* (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Des Weiteren wurde ein Thermoschüttler *Multifunctional Thermo Shaker MKR 13* mit *Thermoblock* für *Micro Tubes* von *Hettich Benelux B.V.* (PC Geldermalsen, Niederlande) zur Temperaturkontrolle verwendet.

HPLC-Ausbeuten. Die HPLC-Ausbeuten der Reaktionsmonitorings wurden durch Integration der entsprechenden Peakflächen der bei 280 nm detektierten Spuren berechnet. Die Werte wurden um den Beitrag zusätzlicher Chromophore relativ zu den allein Trp-enthaltenden Aziden **1** bei 280 nm korrigiert ($\epsilon_{280}(\text{Tyr}) = 1480 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280}(\text{Trp}) = 5540 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ und $\epsilon_{280}(\text{Pyren}) = 3593 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).^[200] Der Wert für Pyren wurde von *PhotochemCAD*TM 3 (ID: C06) übernommen.^[201]

Bestimmung der Peptidkonzentration. Peptidkonzentrationen wurden durch die Messung der UV-Absorption bei 278 nm ($\epsilon_{278}(\text{Trp}) = 5600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) oder 274 nm ($\epsilon_{274}(\text{Tyr}) = 1420 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) und Verwendung eines *NanoDrop 2000* UV/VIS-Spektrophotometers von *Thermo Scientific* bestimmt.^[202,203] Mit dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz (Gleichung 1) lässt sich die Konzentration c in $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ wie folgt bestimmen:

$$c [\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}] = \frac{A}{\epsilon [\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}] \cdot d [\text{cm}]}$$

Gleichung 1: Nach der Konzentration c umgestellte Gleichung nach LAMBERT-BEER.

Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ sind dabei abhängig vom Analyten und der eingestrahlten Wellenlänge und verhalten sich additiv. Im Fall des Vorhandenseins von sowohl Trp als auch Tyr wurde die Messung bei 278 nm unter Verwendung obengenannter molarer Extinktionskoeffizienten durchgeführt. Die Messung erfolgte in einer *High Precision Cell* Küvette aus Quarz *SUPRASIL*[®] mit einer Durchtrittslänge bzw. Schichtdicke von 10 mm von *Hellma*[®] *Analytix*. Die Küvette wurde nach jeder Messung durch jeweils dreimaliges Waschen mit einer wässrigen Lösung von *Hellmanex*[®] *III*, entionisiertem Reinstwasser und Ethanol gesäubert.

Gefriertrocknung der Peptide. Zur Entfernung von Wasser und Restmengen anderer organischer Solventien, wie Acetonitril, aus den gelösten Peptidproben, wurde die Gefriertrocknung genutzt. Die Proben wurden dazu in flüssigem Stickstoff eingefroren und direkt an einem *Alpha 2-4 LDplus* Gefriertrocknungsapparat mit einer Vakuumpumpe der Firma *Martin Christ* gefriergetrocknet.

Circulardichroismus (CD) Spektroskopie. CD-Spektren wurden an einem *JASCO J-1500* CD-Spektrometer, welches mit einer *JASCO PTC-510* Temperaturmesseinheit ausgestattet war, gemessen. Die Temperatur wurde am gehärteten Block gemessen und die Messzelle wurde kontinuierlich mit Stickstoff gespült. Die CD-Spektren wurden bei 50 μM Peptidkonzentration und einem Probenvolumen von 200 μL in neutralisiertem Wasser (pH 7.5)/*tert*-Butanol (3:7, v/v) oder in PBS/*tert*-Butanol (3:7, v/v) bei 25 °C und 35 °C in einer 1 mm Quartzküvette von *Starna* bei 100 $\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ Scangeschwindigkeit in einem kontinuierlichen Scanmodus mit einer 2000 mdeg/1.0 dOD CD-Skala aufgenommen. Die Küvette wurde nach jeder Messung mit je dreimal wässriger *Hellmanex*[®] III-Lösung, entionisiertem Reinstwasser, und Ethanol gewaschen. Die mittlere, molare Restelliptizität $[\theta]_{\text{MR}}$ in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{res}^{-1}$ wurde wie folgt berechnet:

$$[\theta]_{\text{MR}}(\lambda) [\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{res}^{-1}] = \frac{100 \cdot \theta(\lambda)}{l \cdot c \cdot n}$$

Gleichung 2: Formel zur Berechnung der mittleren, molaren Restelliptizität $[\theta]_{\text{MR}}$ mit der Elliptizität θ [mdeg], der optischen Pfadlänge l [cm], der Peptidkonzentration c [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$] und der Anzahl an Aminosäureresten n [res].

Drehwerte. Die Bestimmung der Drehwerte erfolgte mit einem Polarimeter *MCP 150* der Firma *Anton Paar* und bei der Wellenlänge der D-Linie (589 nm) einer Natriumdampf-Lampe. In diesem Kreispolarimeter ist die Lichtquelle durch eine LED ersetzt. Die Temperatur T der Messung wird in °C angegeben. Das Thermoelement zur Einstellung einer konstanten Temperatur war defekt und die Temperatur wurde manuell an einem Thermometer abgelesen und notiert. Die Konzentration c der Probe ist in $\text{g} \cdot 100^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ angegeben. Die Schichtdicke d der verwendeten Küvette bzw. Flusszelle betrug 2.5 mm bei einem Durchmesser von 5 mm. Der gemessene, spezifische Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^T$ ist in $\text{deg} \cdot \text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}$ angegeben.

5.2 Allgemeine Vorschriften (AV)

5.2.1 Harzbeladung

AV1: Erstbeladung von HMPB-ChemMatrix® Harz

Die Harzbeladung wurde gemäß der Literatur wie folgt durchgeführt:^[204] Eine bekannte Menge an HMPB-ChemMatrix® Harz (35-100 mesh, 0.40-0.65 mmol·g⁻¹ Beladungsdichte) wurde in einer minimalen Menge an wasserfreiem Dimethylformamid in einem konischen Zentrifugenröhrchen gequollen. Die entsprechende Fmoc-Aminosäure (10 Äq. relativ zum mittleren Beladungsgrad) wurde in wasserfreiem Dichlormethan in einem Rundkolben mit Calciumchlorid-Trockenrohr gelöst. Zu der Aminosäure-Lösung wurde *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC, 5.0 Äq.) als Aktivator gegeben und das Reaktionsgemisch für 1 h bei 0 °C langsam gerührt. Die aktivierte Fmoc-Aminosäure wurde unter vermindertem Druck konzentriert und in der geringsten Menge an trockenem Dimethylformamid erneut gelöst. Die aktivierte Aminosäure-Lösung wurde zum gequollenen Harz gegeben, *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP, 0.1 Äq.) hinzugegeben und das Harz langsam über Nacht geschüttelt. Das Harz wurde in eine BD-Spritze überführt, welche mit einem Filter versehen war. Das Harz wurde mit Dimethylformamid (5×) und Dichlormethan (5×) gewaschen und vor der Bestimmung der Beladungsdichte unter vermindertem Druck getrocknet.

AV2: Erstbeladung an 2-Chlortritylchlorid Harz

Die Harzbeladung wurde gemäß der Literatur wie folgt durchgeführt:^[204] Das 2-Chlortritylchlorid Harz (1.0 g, 1.5 mmol, 100-200 mesh, 1.5 mmol/g Beladung, Polystyrol vernetzt mit 1% Divinylbenzol) wurde in einer BD-Spritze mit Filter in wasserfreiem Dichlormethan für 30 min gequollen, mit wasserfreiem Dichlormethan (2×) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die Fmoc-Aminosäure (2.0 Äq., 3.0 mmol) wurde in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen für 30 min in einem Exsikkator unter vermindertem Druck gelagert, mit Stickstoff beschickt und anschließend in wasserfreiem Dichlormethan (10 mL/g) gelöst. *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, 4.0 Äq., 12 mmol) und das getrocknete Harz wurden im Gegenstrom zugegeben. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit Parafilm gesichert und langsam für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wurde in eine BD-Spritze mit Filter überführt und mit einer Mischung aus wasserfreiem Dichlormethan/Methanol/Diisopropylamin (17:2:1, v/v/v, 4 · 7.5 mL), Dichlormethan (10 · 7.5 mL), Dimethylformamid

(5 · 7.5 mL) und Dichlormethan (7 · 7.5 mL) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

AV3: Ermittlung der Harzbeladung

UV-spektroskopische Bestimmung der Harzbeladung von Fmoc-beladenen Harzen. Nach einem Fmoc-Monitoring Protokoll von GUDE *et al.*^[205] wurde eine quantitative Bestimmung der Beladung der ersten Aminosäure an einem *ThermoFisher NanoDrop* Spektrophotometer durchgeführt (für eine Genauigkeitsstudie verschiedener Harze siehe EISSLER *et al.*^[206]). Dafür wurden 5-10 mg des Harzes exakt eingewogen und in einen 10 mL Messkolben gegeben. Eine Lösung von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU, 2% in Dimethylformamid, 2.0 mL) wurde hinzugegeben. Die Suspension wurde langsam für 1 h geschüttelt und die Lösung anschließend mit Acetonitril auf 10 mL verdünnt. 2 mL der Lösung wurden entnommen und mit Acetonitril in einem Messkolben auf ein Endvolumen von 25 mL weiter verdünnt (Verdünnungskoeffizient $f = (2/25)^{-1} = 12.5$). Die Absorption des abgespaltenen Dibenzofulvens (9-Methylenfluoren) wurde in einer *Micro* Spektrophotometer-Küvette (Quarz) mit schwarzen Wänden von *Starna Scientific* mit der Schichtdicke d von 1 cm, um den Beitrag des Hintergrunds der Referenzlösung korrigiert, gemessen.

$$\rho_{\text{Harz}} [\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}] = \frac{A \cdot V [\text{L}] \cdot f}{\epsilon_{\lambda} [\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdot d [\text{cm}]} \cdot \frac{1}{m_{\text{Harz}} [\text{in mg}]} \cdot 10^6$$

Gleichung 3: Gleichung zur Bestimmung der Harzbeladung ρ mit der gemessenen Absorption A , dem molaren Extinktionskoeffizient ϵ bei indizierter Wellenlänge, der Schichtdicke d , dem Volumen V , dem Verdünnungskoeffizienten f , der Masse des eingewogen Harzes m_{Harz} und der Beladungsdichte des Harzes ρ_{Harz} . Entsprechende Einheiten sind der Gleichung zu entnehmen.

Die Detektion bei 304 nm mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{304} = 7624 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ vereinfacht Gleichung 3 zu der folgenden Gleichung 4:

$$\rho_{\text{Harz}} [\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}] = \frac{A \cdot 16.4}{m_{\text{Harz}} [\text{in mg}]}$$

Gleichung 4: Vereinfachte Gleichung für die Bestimmung der Harzbeladung bei einer Wellenlänge von 304 nm.

Experimenteller Teil

Die Detektion bei 294 nm mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{294} = 8794 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ vereinfacht Gleichung 3 zu der folgenden Gleichung 5:

$$\rho_{\text{Harz}} [\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}] = \frac{A \cdot 14.2}{m_{\text{Harz}} [\text{in mg}]}$$

Gleichung 5: Vereinfachte Gleichung für die Bestimmung der Harzbeladung bei einer Wellenlänge von 294 nm.

Die Messungen wurden dreifach durchgeführt und für 304 nm und 294 nm gemittelt. Die so erhaltenen mittleren Werte der Harzbeladung ρ für 294 nm und 304 nm wurden abschließend ebenfalls gemittelt.

AV4: Trityl-Monitoring für die Bestimmung der Konzentration vollgeschützter Peptidsäuren

Für die Bestimmung der Konzentration von *N*-Cys voll-geschützter Peptidsäuren wurde ein kolorimetrisches Tritylkation (Trt^+)-Monitoring durchgeführt.^[207,208] Eine Probe der Substanz wurde in einem exakten Volumen von wasserfreiem Dimethylformamid gelöst. Ein Aliquot von $5 \mu\text{L}$ wurde entnommen und in einer *Micro* Spektrophotometer-Küvette (Quarz) mit schwarzen Wänden von *Starna Scientific* mit einer Schichtdicke d von 1 cm mit exakt $900 \mu\text{L}$ einer Lösung von 10% Trifluoressigsäure (TFA) in wasserfreiem Dichlormethan ($f = (5/905)^{-1} = 181$) verdünnt. Die verdünnte Probe wurde langsam für 30 min geschüttelt und anschließend, um den Beitrag des Hintergrunds der Referenzlösung korrigiert, vermessen.

$$n_{\text{Probe}} [\mu\text{mol}] = \frac{A \cdot V [\text{mL}] \cdot f}{\varepsilon_{\lambda} [\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}] \cdot d [\text{cm}]} \cdot 10^3$$

Gleichung 6: Gleichung zur Bestimmung der gelösten Substanzprobenmenge n_{Probe} an voll-geschützter, Trt^+ -enthaltender Peptidsäure mit der gemessenen Absorption A , dem molaren Extinktionskoeffizient ε bei indizierter Wellenlänge, der Schichtdicke d , dem Volumen V und dem Verdünnungskoeffizienten f .

Die Probe wurde sowohl bei 408 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{408} = 36400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ als auch bei 431 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{431} = 37360 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ gemessen. Die Messungen wurden zweifach durchgeführt. Die Probenmenge wurde als Mittelwert beider Wellenlängen bestimmt.

5.2.2 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

AV5: Automatisierte Festphasenpeptidsynthese an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix® Harz

Peptidamide wurden an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix® Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol an einem *Liberty Blue* mikrowellenuntersützten, automatisierten Peptidsynthesizer von *CEM* mit *HT-12* Harzwechsler hergestellt. Das Harz wurde vor der Synthese in Dimethylformamid (8 mL) für 30 min gequollen. Die Synthese wurde nach einem einheitlichen Fmoc/*tert*-Butyl-Protokoll mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Hydroxyiminocyanessigsäureethylester (Oxyma Pure®) als Kupplungsreagenzien und einer Lösung von Piperidin in Dimethylformamid (1:4, v/v) zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe durchgeführt. Die automatisierten Kupplungen erfolgten gemäß einer nach VANESSA REUSCHE in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. FRANZISKA THOMAS modifizierten *CarboMax*TM Methode^[209,210] von *CEM*.^[211]

Kupplungszyklen der modifizierten *CarboMax*TM-Methode:

Single coupling (step 1 - 9) and double coupling (step 1 - 14):

General: Bubble on 5 s; Bubble off 2 s, ΔT 1 °C.

1	Deprotection	Standard (nur für 1. Kupplung)
2	Deprotection	Standard
3	Wash	V = 4 mL; drain = 10
4	Wash	V = 4 mL; drain = 5
5	Wash	V = 4 mL; drain = 5
6	Wash	V = 4 mL; drain = 5
7	Coupling	105 °C (90 °C, P = 280 W, hold time 20 s and 105 °C, P = 80 W, hold time 60 s)
8	Wash	V = 4 mL; drain = 10
9	Wash	V = 4 mL; drain = 5
10	Wash	V = 4 mL; drain = 5
11	Wash	V = 4 mL; drain = 5
12	Coupling	105 °C (90 °C, P = 280 W, hold time 20 s and 105 °C, P = 80 W, hold time 60 s)
13	Wash	V = 4 mL; drain = 10
14	Wash	V = 4 mL; drain = 5

Experimenteller Teil

Ein Überschuss an Fmoc-L-Aminosäure (0.2 M) und Aktivator DIC (0.5 M, 2 mL/Kupplungsschritt) in Dimethylformamid wurde zusammen mit einer Aktivatorbase-Mischung aus Oxyma Pure[®] (1.0 M) und DIPEA (0.1 M) in Dimethylformamid (1 mL/Kupplungsschritt) genutzt (Harz/AS/Aktivator/Aktivatorbase, 1:5:10:10). Die mikrowellenunterstützte Kupplung wurde bei 105 °C für 1 min durchgeführt. Doppelkupplungen wurden für Gly, Ala und Ile angewendet. Sofern nicht anders beschrieben, wurde abschließend *final deprotection* (engl. abschließende Entschützung) durchgeführt. Das Harz wurde in eine BD-Spritze mit Filter überführt und mit Dichlormethan (3 · 8 mL) gewaschen, unter vermindertem Druck getrocknet und bei –20 °C gelagert.

AV6: Automatisierte Festphasenpeptidsynthese an säurelabilen Harzen

Peptidsäuren, vollgeschützte Peptidsäuren und Peptidthioester wurden gemäß AV5 an vorbeladenem HMPB-ChemMatrix[®] Harz oder vorbeladenem 2-Chlortritylharz (Polystyrol vernetzt mit 1% DVB) in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol hergestellt. Die automatisierten Kupplungen erfolgten gemäß des einheitlichen *CEM high-swelling* (engl. stark quellend) Protokolls für HMPB-ChemMatrix[®] Harz oder einer modifizierten *CarboMaxTM* Methode von *CEM* für säurelabile Harze, wie 2-Chlortritylharze, mikrowellenunterstützt bei 90 °C.^[210]

Kupplungszyklen der modifizierten CarboMaxTM Methode für 2-Chlortritylharz:

General: Bubble on 2 s; Bubble off 3 s, ΔT 1 °C.

1	Deprotection	Standard (nur für 1. Kupplung)
2	Deprotection	Standard
3	Wash	V = 4 mL; drain = 10
4	Wash	V = 4 mL; drain = 5
5	Wash	V = 4 mL; drain = 5
6	Coupling	90 °C (75 °C, P = 170 W, hold time 15 s and 90 °C, P = 30 W, hold time 110 s)
7	Wash	V = 4 mL; drain = 10

AV7: Freisetzung von der Festphase

Die saure Abspaltung der in 0.1 mmol Ansatzgröße dargestellten Peptide vom Harz erfolgte durch die Behandlung mit einem Gemisch aus Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (90:5:5, v/v/v, 8 mL, 3 h) in einem Zentrifugenröhrchen oder einer BD-Spritze mit Filter. Das Harz wurde anschließend mit weiteren 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen und die vereinten sauren Fraktionen in einem Zentrifugenröhrchen auf ein Drittel des Anfangsvolumens im Stickstoffstrom konzentriert. Das Rohpeptid wurde aus eiskaltem Diethylether (40 mL, -20 °C) gefällt und durch Zentrifugation und Dekantieren des Überstands isoliert. Das Präzipitat wurde zweifach mit eiskaltem Diethylether analog gewaschen, unter vermindertem Druck getrocknet und mit 5 mL eines 1:1-Gemischs (v/v) von Acetonitril und Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Auf diese Weise wurden die entsprechenden Peptide in Form eines voluminösen, feinen Feststoffs erhalten.

5.2.3 Manuelle Festphasenpeptidsynthese, Transformationen an der Festphase und spezielle Freisetzungen der Peptide

AV8: Allgemeine manuelle Festphasenpeptidsynthese

Manuelle Kupplungen wurden für die finale Kupplung der Azidamino- und Azidsäuren, der Thiole, der Alkin-enthaltenden Bausteine, wie auch der *N*-terminalen Boc-L-Aminosäuren, durchgeführt. Diese wurden, wenn nicht anders beschrieben, in BD-Spritzen mit Filter gemäß dem folgenden, allgemeinen Kupplungsprotokoll durchgeführt: Der entsprechende Baustein (2.0 Äq.) wurde in Dimethylformamid mit einer Endkonzentration von 0.1 mM gelöst. Das Kupplungsreagenz Bromtripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBroP[®], 2.0 Äq.) oder Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP[®], 2.0 Äq.) und Diisopropylethylamin (4.0 Äq.) wurden zu der Lösung gegeben. Die Reaktionsmischung wurde zu dem gequollenen Peptidharz gegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 1 h unter langsamem Schütteln equilibriert. Das Peptidharz wurde anschließend mit Dimethylformamid (5×), Dichlormethan (5×) und erneut Dimethylformamid (5×) gewaschen. Die Fmoc-Entschützung wurde durch die Behandlung des gequollenen Peptidharzes mit einer Lösung aus Piperidin in Dimethylformamid (1:4, v/v, 2 · 4 mL für 2 min) erreicht. Das Peptidharz wurde anschließend mit Dimethylformamid (5×), Dichlormethan (5×) und erneut Dimethylformamid (5×) gewaschen. *N*-Acetylierung der entsprechend gekennzeichneten

Peptide wurde durch Equilibrierung der Peptidharze mit Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:9, v/v, 5 mL) für 5 min bei Raumtemperatur erreicht.

AV9: Manuelle Festphasenpeptidsynthese von Peptidamiden

Peptidamide wurden an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz gemäß AV5 dargestellt. Die Carbonsäuren γ Abu, β Ala oder auch Gly und zuletzt die *N*-Azidsäure-Bausteine oder die *S*-Tritylmercaptopropionsäure (3) wurden manuell gemäß dem Kupplungsprotokoll AV8 eingeführt. Die Freisetzung der Peptide von der Festphase erfolgte nach AV7.

AV10: Manuelle Festphasenpeptidsynthese von Peptidsäuren

Peptidsäuren wurden gemäß AV6 an vorbeladenen HMPB-ChemMatrix[®]- oder 2-Chlortritylharzen (Polystyrol vernetzt mit 1% DVB) synthetisiert. Der Baustein, Fmoc-Lys(Proc)-OH (8), wurde manuell nach einem abgewandelten Kupplungsprotokoll gemäß AV8 wie folgt gekuppelt: 1.1 Äq. Fmoc-Lys(Proc)-OH, 1.1 Äq. PyBroP[®] (oder 1.1 Äq. ByPOB[®]) und 2.2 Äq. DIPEA (0.1 M in Dimethylformamid). Die *N*-terminale Aminosäure (hier *N*-Boc) wurde abschließend gemäß AV8 gekuppelt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Freisetzung der Peptide von der Festphase nach AV7.

AV11: Manuelle Festphasenpeptidsynthese vollgeschützter Peptidsäuren

Vollgeschützte Peptidsäuren wurden an vorbeladenen HMPB-ChemMatrix[®]- oder 2-Chlortritylharzen (Polystyrol vernetzt mit 1% DVB) analog zu AV10 dargestellt. Im Unterschied dazu erfolgte die Freisetzung von der Festphase wie folgend beschrieben: Nachdem das Peptidharz ausreichend mit Dichlormethan gewaschen wurde, erfolgte die Abspaltung des vollgeschützten Peptids nach einem Protokoll von Prof. Dr. FRANZISKA THOMAS^[212] durch die Behandlung des Peptidharzes (0.1 mmol) in einer BD-Spritze mit Filter mit einer Lösung von 1% Trifluoressigsäure in Dichlormethan (7 · 4 mL für je 2 min). Die sauren Lösungen der Abspaltungsschritte wurden in einem Rundkolben vereint, in welchem eine Lösung aus Pyridin in Methanol (4 mL, 1:9, v/v) vorgelegt wurde (1.35 Äq. Pyridin

relativ zu der eingesetzten Menge an Trifluoressigsäure; siehe dazu auch *Novabiochem* Method 3-30, S. 3.30).^[204] Das Harz wurde mit Dichlormethan (5 · 4 mL), Methanol (5 · 4 mL), Dichlormethan (2 · 4 mL) und erneut Methanol (2 · 4 mL) gewaschen und die Waschlösungen mit der Abspalllösung vereint. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck konzentriert und der Rückstand schrittweise in einem 1:1-Gemisch (v/v) aus Acetonitril und Wasser (+ 0.1 % TFA) gelöst. Nach Gefriertrocknung wird die vollgeschützte Peptidsäure in Form eines feinen, farblosen Feststoffs erhalten.

AV12: Manuelle Festphasenpeptidsynthese von Peptidthioestern

Peptidthioester wurden an vorbeladenen HMPB-ChemMatrix[®]- oder 2-Chlortritylharzen (Polystyrol vernetzt mit 1 % DVB) analog zu AV10 dargestellt. Im Unterschied dazu erfolgte die Freisetzung von der Festphase wie folgend beschrieben: Nachdem das Peptidharz ausreichend mit Dichlormethan gewaschen wurde, erfolgte die Abspaltung des vollgeschützten Peptids nach einem Protokoll von FLEMER durch die Behandlung des Peptidharzes (0.1 mmol) in einer BD-Spritze mit Filter mit einer Lösung von 1 % TFA in Dichlormethan (6 · 3 mL für je 3 min).^[111] Die sauren Lösungen der Abspaltungsschritte wurden in einem Rundkolben mit 31.2 Äq. DIPEA (1.1 Äq. relativ zu der Menge an eingesetzter Trifluoressigsäure) vereint. Benzylmercaptan (30 Äq.), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt, 20 Äq.), DIC (20 Äq.) und weitere 31.2 Äq. DIPEA wurden hinzugegeben und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck konzentriert und der Rückstand mit einer Lösung von Trifluoressigsäure/Trisopropylsilan/Wasser (90:5:5, v/v/v, 8 mL) für 3 h bei Raumtemperatur behandelt. Die Abspaltungslösung wurde auf ein Fünftel des Ausgangsvolumens in einem Stickstoffstrom konzentriert. Das Rohpeptid wurde in eiskaltem Diethylether (15 mL, -20 °C) gefällt und durch Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes isoliert. Das Präzipitat wurde zweifach mit eiskaltem Diethylether gewaschen, unter vermindertem Druck getrocknet und in 5 mL eines 1:1-Gemischs (v/v) aus Acetonitril und Wasser (+ 0.1 % TFA) gelöst und zum Erhalt des entschützten Peptidthioesters in Form eines farblosen, feinen Feststoffs gefriergetrocknet.

AV13: Thioesterifizierung an der Festphase

Thioesterifizierung an der Festphase wurde in 0.1 mmol Ansatzgröße in einer BD-Spritze mit Filter an der freien Carbonsäure-Funktion der Harz-gebundenen Click-Konjugate nach einer abgewandelten Methode nach FICHT *et al.* unter Lichtausschluss durchgeführt.^[178] Das Peptidharz wurde in wasserfreiem Dichlormethan (1 mL) gequollen. Eine Lösung von Benzylmercaptan (24 Äq.), HOBt (30 Äq.) und DIC (30 Äq.) in wasserfreiem Dichlormethan/Dimethylformamid (1:4, v/v, 0.5 mL) wurde hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur equilibriert. Die Lösung wurde verworfen, das Harz mit einer identischen Benzylmercaptan-Lösung versetzt und über Nacht unter langsamen Schütteln behandelt. Das Harz wurde mit Dichlormethan (5 · 1 mL), Dimethylformamid (5 · 1 mL) und Dichlormethan (5 · 1 mL) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die saure Freisetzung von der Festphase wurde analog zu AV7 mit Trifluoressigsäure/Trisopropylsilan/Wasser (90:5:5, v/v/v, 2 mL, 3 h) durchgeführt. Das Harz wurde mit weiterer Trifluoressigsäure (1 mL) gewaschen und die vereinten sauren Lösungen wurden in einem Stickstoffstrom auf ein Drittel des Anfangsvolumens konzentriert. Das Rohpeptid wurde dann in eiskaltem Diethylether (1.5 mL, -20 °C) gefällt und durch Zentrifugation und Dekantieren des Überstands isoliert. Das Präzipitat wurde zweifach mit eiskaltem Diethylether gewaschen, unter vermindertem Druck getrocknet und in 1 mL eines 1:4-Gemischs (v/v) von Acetonitril und Wasser (+ 0.1% TFA) gelöst und zum Erhalt eines farblosen, feinen Feststoffs gefriergetrocknet.

5.2.4 Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)

AV14: *On-resin* CuAAC Click-Reaktion

Die CuAAC an der Festphase wurde nach einem abgewandelten Protokoll nach MIDDEL *et al.* durchgeführt.^[179,213] Das Azid-funktionalisierte, harzgebundene Peptid **1** (1.0 Äq.) wurde in einer BD-Spritze mit Filter zusammen mit Kupfer(I)iodid (1.4 Äq.) und Natriumascorbat (1.5 Äq.) vorgelegt und 30 min in einem Exsikkator entgast. Das vollgeschützte Alkinpeptid **10** (1.0 Äq.) wurde in einem 5 mL Zentrifugenröhrchen ebenfalls für 30 min simultan in einem Exsikkator entgast. Anschließend wurde sowohl die BD-Spritze als auch das Zentrifugenröhrchen mit Stickstoff beschickt. Das Alkynylpeptid wurde im Stickstoff-Gegenstrom in wasserfreiem Dimethylformamid (5 mL/10 µmol) gelöst, mit der vorbereiteten

BD-Spritze aufgezogen, mit einem Spritzenverschluss und Parafilm gesichert und unter Lichtausschluss für 1 d geschüttelt. Das Harz wurde anschließend mit Dimethylformamid (5×), Versene-Lösung⁶ (10×),^[214] Dimethylformamid (10×), Diethylether (5×) und Dichlormethan (10×) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die Thioesterifizierung und Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV13**.

AV15: Optimierte CuAAC Click-Reaktion in Lösung

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Proben von Peptid-Stammlösungen in Acetonitril/Wasser (1:4, v/v, + 0.1 % TFA) vorbereitet. Das entsprechende Azid-Peptid **1** (100 nmol) wurde in einem 1.5 mL Reagiergefäß mit Graduierung vorgelegt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden 120 nmol des Alkins **9** (oder **17**) hinzugegeben, eingefroren und sofort gefriergetrocknet. Im Fall der Alkine Biotinpropargylamid (**17p**), 5-FAM-propargylamid (**17q**), 6-TAMRA-propargylamid (**17r**) und 1-Ethynylpyren (**17s**) wurden Stammlösungen in Dimethylformamid vorbereitet. Die benötigte Menge (120 nmol) wurde in ein 1.5 mL Reagiergefäß überführt, mit Wasser verdünnt und vor der Zugabe der entsprechenden Azid-Lösung gefriergetrocknet. Die Stammlösungen für den *CuAAC-Puffer* wurden wie folgt hergestellt: 107.0 mg Kupfersulfat wurden in 10.0 mL Wasser (67 mM) und 198.1 mg Natriumascorbat wurden in 10.0 mL Wasser (100 mM) gelöst. Diese Stammlösungen wurden vor dem Gebrauch mindestens 12 h eingefroren und vor den jeweiligen Umsetzungen aufgetaut. Von der Kupfersulfat-Stammlösung (67 mM) wurden 200 μ L entnommen und mit 11.64 mg Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA) versetzt (67 mM CuSO₄/134 mM THPTA Stammlösung). Diese wurde ebenfalls vor Gebrauch eingefroren und nicht länger als zwei Wochen verwendet. Die CuAAC-Reaktionen wurden in einer 1 mM Konzentration, bezogen auf **1**, durchgeführt. Zu dem gefriergetrockneten Azid/Alkinpeptid-Gemisch wurden nacheinander 70 μ L *tert*-Butanol, 10 μ L PBS (10× Stamm), 10 μ L CuSO₄/THPTA-Puffer und 10 μ L Natriumascorbat-Stammlösung hinzugegeben (Endkonzentrationen: CuSO₄/THPTA (6.7 mM/13.4 mM), NaAsc (10.0 mM)) und das Gemisch wurde in einem Thermoschüttler bei 35 °C equilibriert. Zum HPLC-Reaktionsmonitoring wurden Aliquote von 10 μ L (10 nmol) zu den angegebenen Zeiten entnommen und direkt mittels analytischer HPLC vermessen.

⁶ Versene-Lösung: Eine 60%-ige ethanolische EDTA-Lösung. Dazu werden 4.5 g Na₂EDTA Dihydrat in 100 mL Wasser gelöst, mit 150 mL Ethanol gemischt und filtriert.

Experimenteller Teil

Große Ansätze mit 500 nmol Azid und 600 nmol Alkin wurden ebenfalls in einer 1 mM Konzentration analog mit 350 μL *tert*-Butanol, 50 μL PBS (10 \times Stamm), 50 μL CuSO_4 /THPTA-Puffer und 50 μL Natriumascorbat durchgeführt. Nach 2 h wurde das Reaktionsgemisch mit Acetonitril/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) verdünnt und vor der semipräparativen HPLC-Aufreinigung gefriergetrocknet.

AV16: CuAAC-Reaktion unter Schutzgasbedingungen in Lösung

Das analog zu AV15 vorbereitete, vorgefriergetrocknete Peptidgemisch (Reagiergefäß (A), 100 nmol Azid **1**/120 nmol Alkin **9** oder **17**) wurde in einer passenden Vakuumkammer mit Zugang zu Vakuum und Schutzgas über einen Hahn, hier ein kleiner Exsikkator, platziert (siehe Versuchsaufbau Abbildung A.1 links).



Abbildung A.1: Allgemeiner Versuchsaufbau der Probenvorbereitung (links) und allgemeiner Versuchsaufbau zur Probenentnahme unter Schutzgasbedingungen (rechts).^[1]

Zur Vorbereitung des *CuAAC*-Puffers wurde ein zweites Reaktionsgefäß (B) in flüssigem Stickstoff platziert und nacheinander 70 μL *tert*-Butanol, 10 μL PBS (10 \times Stamm), 10 μL CuSO_4 /THPTA Puffer und 10 μL Natriumascorbat zugegeben und so schockgefroren. Reaktionsgefäß (B) wurde ebenfalls in die Vakuumkammer gestellt, welche anschließend 4 min unter vermindertem Druck entgast wurde. Reaktionsgefäß (B) wurde erlaubt aufzutauen (6 min), bevor die Vakuumkammer mit Stickstoff beschickt wurde. Reaktionsgefäß (B) wurde mit einem Verschluss gesichert, an einem Schüttler gemischt, kurz anzentrifugiert und erneut schockgefroren. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde der so vorbereitete *CuAAC*-Puffer im Stickstoff-Gegenstrom innerhalb der Vakuumkammer von

Reagiergefäß (B) in Reagiergefäß (A, Peptid-Gemisch) überführt, welches sofort mit einem Verschluss gesichert, mit einem Schüttler gemischt und kurz anzentrifugiert (Tischzentrifuge Mini-Zentrifuge ROTILABO® der Firma *Carl Roth*) wurde. Reagiergefäß (A) wurde anschließend in einem Thermoschüttler platziert (35 °C, 200 rpm (100% Short-Mix)) und ein 10 µL (10 nmol) Aliquot für das analytische HPLC-Reaktionsmonitoring im sanften Gegenstrom entnommen (siehe Versuchsaufbau Abbildung A.1).

AV17: Upscaling der CuAAC-Reaktion für *N*-Cysteinylpeptidthioester unter Schutzgasbedingungen in Lösung

Analog AV15 wurden die Kupfersulfat- (67 mM) und Natriumascorbat-Stammlösungen (100 mM) vorbereitet und gehandhabt. Für den *CuAAC-Puffer* wurden vor der Reaktion von der CuSO₄/THPTA-Stammlösung aus AV15 50 µL entnommen und mit 450 µL Kupfersulfat-Stammlösung zum eigentlichen *CuAAC-Puffer* verdünnt (67 mM CuSO₄/13.4 mM THPTA). Des Weiteren wurde eine Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Lösung (TCEP) vorbereitet. Dazu wurden 1.56 mg TCEP Hydrochlorid in 1 mL Wasser gelöst und 500 µL der Lösung auf 1 mL verdünnt (2.72 mM). Die CuAAC-Reaktionen wurden in 1 mM Konzentration durchgeführt und analog zu AV15 (350 µL *tert*-Butanol, 50 µL PBS (10× Stamm), 50 µL CuSO₄/THPTA-Puffer und 50 µL Natriumascorbat-Stammlösung) vorbereitet. Zu dem gefriergetrockneten Azid-/Alkinpeptid-Gemisch (500 nmol Azid **1**/600 nmol Alkin **9**) wurde ein Rührfisch (1 mm × 5 mm) und der entgaste *CuAAC-Puffer* (entgast analog AV16 mit 10-15 min am Vakuum und 5-10 min auftauen bei geschlossenem Vakuumhahn) hinzugegeben und das Gemisch in einem Thermoschüttler bei 35 °C equilibriert. Nach 1 min, 60 min und 115 min wurde das Reagiergefäß neu mit Stickstoff beschickt, mit einem Schüttler gemischt und anzentrifugiert. Nach 115 min wurde die entgaste TCEP-Lösung (50 µL) hinzugegeben und für 5 min weiter equilibriert. Das Reaktionsgemisch wurde im Stickstoffgegenstrom mit 955 µL entgastem Wasser (+ 0.1% TFA) suspendiert, mit weiteren 200 µL entgastem Acetonitril (+ 0.1% TFA) gelöst und direkt in den HPLC-Loop (2 mL Loop-Volumen) injiziert. Das Reagiergefäß wurde mit 400 µL Acetonitril/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) nachgespült und ebenfalls in den HPLC-Loop injiziert bevor die semipräparative Aufreinigung gestartet wurde. In Fällen schwerlöslicherer Click-Konjugate konnte die Menge an Wasser (+ 0.1% TFA) auf 855 µL reduziert werden und die entsprechenden Gemische mit 200 µL Acetonitril (+ 0.1% TFA) gelöst und weiteren 300 µL Acetonitril analog nachgespült werden.

5.2.5 Ligationsversuche zur direkten Aminolyse und Nativen Chemischen Ligation

AV18: Zyklisierungen über die direkte Aminolyse

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Proben von Peptid-Stammlösungen in Acetonitril/Wasser (1:4, v/v, + 0.1 % TFA) vorbereitet. Der entsprechende Peptidthioester (**18**, 1.0 Äq.) wurde in einem 1.5 mL Reagiergefäß mit Graduierung vorgelegt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Fall der Coiled-Coil-vermittelten Zyklisierung wurde anschließend das entsprechende Thiol (**4**, 1.0 Äq.) hinzugegeben, in flüssigem Stickstoff eingefroren und sofort gefriergetrocknet. Der entsprechende *Ligationspuffer*, bestehend aus PBS-Puffer und angegebenen Additiven, wurde separat in einem Stickstoffkolben eingefroren und vor der Reaktion im Vakuum aufgetaut und mit Schutzgas beschickt. Die *Ligationspuffer* wurden nicht länger als zwei Wochen verwendet und zwischen den Reaktionen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Zyklisierungsreaktionen wurden unter Schutzgasatmosphäre in $100\text{ }\mu\text{M}$ Konzentration (äquimolar **18** und **4**) in dem angegeben, entgasten *Ligationspuffer* bei $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. In analoger Weise zu dem Versuchsaufbau in Abbildung A.1 in **AV16** wurde das gefriergetrocknete Reaktandengemisch in einem Exsikkator für 30 min entgast und mit Schutzgas beschickt, bevor durch Zugabe des *Ligationspuffers* im Schutzgas-Gegenstrom die Reaktion gestartet wurde. Das Reagiergefäß wurde verschlossen, geschüttelt, anzenrifugiert und in einem Thermoschüttler bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ equilibriert. Zur HPLC-Reaktionsverfolgung wurden Aliquote von $50\text{ }\mu\text{L}$ (5 nmol bezogen auf einen Reaktant) im Schutzgas-Gegenstrom zu den angegebenen Zeiten entnommen und in ein Reagiergefäß mit $1\text{ }\mu\text{L}$ Ameisensäure gegeben, durchmischt und auf diese Weise die Reaktion beendet. Anschließend wurden diese Proben mittels analytischer HPLC vermessen.

AV19: Zyklisierungen über die Native Chemische Ligation (NCL)

Wenn nicht anders angegeben wurden die Reaktionen analog **AV18** vorbereitet und durchgeführt. Im Fall der Verwendung von Acetonitril als Additiv wurde dieses vor der Zugabe zum wässrigen *Ligationspuffer* 30 min lang durch die Durchleitung von Stickstoff entgast. Zur HPLC-Reaktionsverfolgung wurden Aliquote in der entsprechenden Volumenmenge (Angabe nmol bezogen auf einen Reaktant) im Schutzgas-Gegenstrom zu den angegebenen Zeiten entnommen und in ein Reagiergefäß mit $1\text{ }\mu\text{L}$ Ameisensäure gegeben. Im Fall der Verwendung von Acetonitril als Co-Solvens kann es zur leichten Aufkonzentration

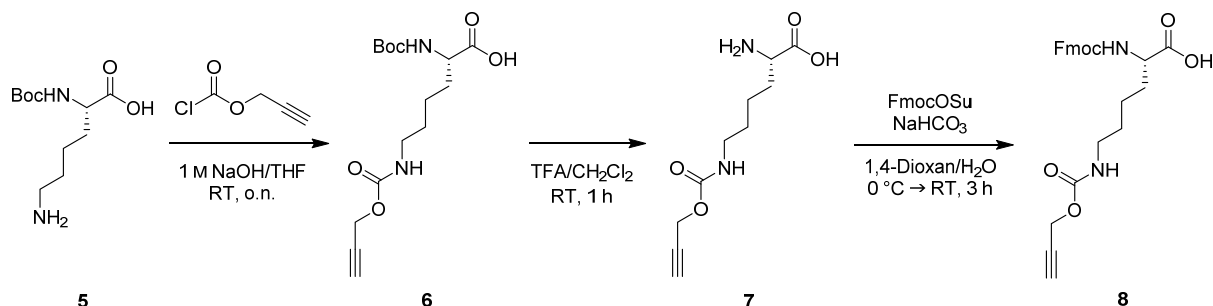
Experimenteller Teil

des Reaktionsgemisches im sanften Stickstoff-Gegenstrom kommen. Anschließend wurden die Proben mittels analytischer HPLC manuell oder automatisiert an einer analytischen HPLC-Anlage mit Autosampler-Einheit vermessen.

5.3 Synthesevorschriften und Versuchsdurchführungen

5.3.1 Bausteinsynthesen

Synthese von Fmoc-Lys(Proc)-OH (8)



*N*_ε-Proc-L-Lysin (7) wurde nach einer Vorschrift von DADOVÁ *et al.* ausgehend von kommerziell erhältlichem *N*_α-Boc-L-Lysin (5) synthetisiert.^[215] Dazu wurde zunächst *N*_α-Boc-L-Lysin (5, 2.00 g, 8.12 mmol, 1.25 Äq.) in Tetrahydrofuran (20 mL) suspendiert und mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung (20 mL) versetzt. Die Suspension wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 0 °C gekühlt, wodurch eine klare Lösung erhalten wurde. Propargylchloroformiat (0.77 g, 6.50 mmol, 0.63 mL, 1.00 Äq.) wurde über einen Zeitraum von 5 min langsam zugetropft und die Lösung für weitere 10 min bei 0 °C gerührt. Die gelbliche Lösung wurde auf Raumtemperatur aufgetaut und über Nacht weitere 15 h gerührt. Die Lösung wurde anschließend auf 0 °C gekühlt und mit eiskaltem Diethylether (200 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M Salzsäure angesäuert und mit Essigsäureethylester (3 · 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur konzentriert und Lösungsmittelreste im Feinvakuum entfernt. Es wurden 2.06 g (6.27 mmol, 96%) der Verbindung *N*_α-Boc-*N*_ε-Proc-L-Lysin (6) in Form eines gelblichen Schaums erhalten. Die NMR-Daten stimmten mit der Literatur überein.^[215] **HR-MS (ESI) (*m/z*):** ber. für C₁₅H₂₄N₂O₆Na [M+Na]⁺: 351.1527, gef.: 351.1527; ber. für C₁₅H₂₅N₂O₆ [M+H]⁺: 329.1707, gef.: 329.1708.

*N*_α-Boc-*N*_ε-Proc-L-Lysin (6, 2.00 g, 6.09 mmol, 1.00 Äq.) wurde in Dichlormethan (20 mL) gelöst. Trifluoressigsäure (20 mL) wurde innerhalb von 30 min über einen Tropftrichter hinzugegeben und für weitere 30 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Stickstoffstrom auf 2-5 mL aufkonzentriert und in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Der Rückstand wurde mit -20 °C kaltem Diethylether (25 mL) versetzt, auf einem Laborschüttler geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wurde auf diese Weise weitere zweimal mit kaltem Diethylether (25 mL) behandelt und das

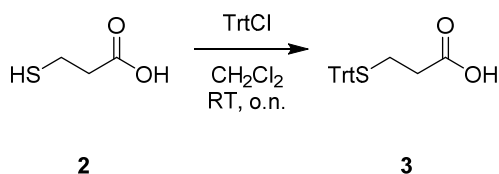
Experimenteller Teil

Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser/1,4-Dioxan (4:1, v/v) aufgenommen und gefriergetrocknet. Auf diese Weise wurden 1.18 g (5.17 mmol, 85 %) des gewünschten Produkts *N*_ε-Proc-L-Lysin (**7**) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Die NMR-Daten stimmten mit der Literatur überein.^[215] **HR-MS (ESI)** (*m/z*): ber. für C₁₀H₁₆N₂O₄Na [M+Na]⁺: 251.1002, gef.: 251.1007; ber. für C₁₀H₁₇N₂O₄ [M+H]⁺: 229.1183, gef.: 229.1183.

*N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-Lysin (**8**) wurde nach einem Protokoll zur Fmoc-Schützung nach ROSS *et al.* synthetisiert.^[216] Die Reaktionszeit und die Aufarbeitung wurden nach einem Protokoll von CRIVICI *et al.* in der folgenden Vorschrift angepasst.^[217] *N*_ε-Proc-L-Lysin (**7**, 1.18 g, 5.17 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einem Gemisch aus Wasser (63 mL) und 1,4-Dioxan (95 mL) suspendiert. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und mit Natriumhydrogencarbonat (1.39 g, 16.5 mmol, 3.20 Äq.) und *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid (FmocOSu, 1.92 g, 5.69 mmol, 1.10 Äq.) versetzt. Die farblose Suspension wurde für 2 h bei 0 °C und anschließend 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat in kaltes Wasser (75 mL) gegeben. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (2 · 100 mL) gewaschen, auf 0 °C gekühlt und mit wässriger Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (2 · 100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchloridlösung (100 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (*R*_f = 0.23, Essigsäureethylester/*n*-Hexan/Ameisensäure 60:40:1, v/v/v) wurden 1.52 g (3.37 mmol, 65 %) der Zielverbindung *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-Lysin (**8**) in Form eines farblosen, amorphen Feststoffs erhalten.⁷ Die NMR-Daten stimmten mit der Literatur überein.^[112] **HR-MS (ESI)** (*m/z*): ber. für C₂₅H₂₆N₂O₆Na [M+Na]⁺: 473.1683, gef.: 468.1685; ber. für C₂₅H₃₀N₃O₆ [M+NH₄]⁺: 468.2129, gef.: 468.2132; ber. für C₂₅H₂₇N₂O₆ [M+H]⁺: 451.1864, gef.: 451.1869.

⁷ Zum Erhalt eines farblosen und stabilen Feststoffs wurde das Produkt in Dichlormethan gelöst und Petrolether hinzugegeben. Das Lösungsmittelgemisch wurde bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck konzentriert und dieser Vorgang solange wiederholt bis ein farbloser Schaum erhalten wurde. Lösungsmittelreste wurden unter vermindertem Druck entfernt. Anmerkung: In der Handhabung sollte mit einem Spatel keine Kraft auf den Feststoff ausgeübt werden, da auf diese Weise ein klebriges Harz erhalten wird.

Synthese von 3-(Tritylthio)propionsäure (**3**)



3-(Tritylthio)propionsäure (**3**) wurde nach einer Vorschrift von BARTELS *et al.* ausgehend von kommerziell erhältlicher 3-Mercaptopropionsäure (**2**) synthetisiert.^[106] Unter Schutzgasatmosphäre wurde Tritylchlorid (1.67 g, 5.99 mmol, 1.00 Äq.) in *abs.* Dichlormethan (120 mL) gelöst. 3-Mercaptopropionsäure (**2**, 0.52 mL, 5.99 mmol, 1.00 Äq.) wurde hinzugegeben und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel der erhaltenen, farblosen Suspension wurde unter vermindertem Druck entfernt und der farblose Feststoff direkt umkristallisiert. Dazu wurde das Rohprodukt in der Siedehitze in Methanol (178 mL) gelöst. Demineralisiertes Wasser wurde zugetropft, bis das Produkt anfang auszufallen. Die heiße Lösung wurde filtriert, das Filtrat langsam auf Raumtemperatur gekühlt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Nach Filtration und Entfernung von Lösungsmittelresten unter vermindertem Druck in einem Exsikkator über *OrangeGel* wurden 1.89 g (5.42 mmol, 91%) der Zielverbindung **3** in Form farbloser Kristalle erhalten. Die NMR-Daten stimmten mit der Literatur nach RUGGLES *et al.* überein.^[218]

5.3.2 Synthese der *N*-Azid-Coil-Peptide

Synthese von G(N₃)-A₃-GG-NH₂ (**1a**)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. 2-Azidoessigsäure (Azidoglycin) wurde nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplung). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid **1a** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₁₀H₁₇₃N₃₁O₃₈ (2537.7730 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 2536.2558 Da).

HPLC (Methode A): *t_R* = 13.1 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₁₁₀H₁₇₃N₃₁O₃₈K⁺ [M+K]⁺: 2576.9, gef.: 2576.6; ber. für C₁₁₀H₁₇₃N₃₁O₃₈Na⁺ [M+Na]⁺: 2560.8, gef.: 2560.6; ber. für C₁₁₂H₁₇₇N₃₀O₃₈⁺ [M(-N₂)+H+ACN]⁺: 2551.8, gef.: 2553.6; ber. für C₁₁₀H₁₇₃N₂₉O₃₈K⁺ [M(-N₂)+K]⁺: 2548.9, gef.: 2549.5; ber. für C₁₁₀H₁₇₄N₃₁O₃₈⁺ [M+H]⁺: 2538.8, gef.: 2537.6; ber. für C₁₁₀H₁₇₃N₂₉O₃₈Na⁺ [M(-N₂)+Na]⁺: 2532.8, gef.: 2533.4.

Synthese von G(N₃)-A₃-GG-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz (**1a**)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol ohne *final deprotection* der Fmoc-Schutzgruppe synthetisiert. Vor der Einführung des Azidbausteins wurde die Beladung des Harzes mittels **AV3** bestimmt. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe manuell nach **AV8** entfernt und 2-Azidoessigsäure (Azidoglycin) nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplung). Die Beladung des Harzes wurde wie zuvor bestimmt angenommen. Mittels einer Testabspaltung von 1 mg Harz und anschließender analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS wurde die Qualität des so dargestellten Peptidharzes überprüft. Die Analytik stimmte mit der von **1a** überein.

Synthese von G(N₃)-A₃(K7Q)-GG-NH₂ (1a(K7Q))



Gemäß AV9 wurde das Peptid nach AV5 an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix® Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. 2-Azidoessigsäure (Azidoglycin) wurde nach AV8 manuell eingeführt (Doppelkupplung). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach AV7. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid 1a(K7Q) mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₀₉H₁₆₉N₃₁O₃₉ (2537.7290 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 2536.2194 Da).

HPLC (Methode B): *t*_R = 18.9 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₁₀₉H₁₆₉N₃₁O₃₉K⁺ [M+K]⁺: 2576.8, gef.: 2576.5; ber. für C₁₀₉H₁₆₉N₃₁O₃₉Na⁺ [M+Na]⁺: 2560.7, gef.: 2560.5; ber. für C₁₁₁H₁₇₃N₃₀O₃₉⁺ [M(-N₂)+H+ACN]⁺: 2551.8, gef.: 2553.5; ber. für C₁₀₉H₁₆₉N₂₉O₃₉K⁺ [M(-N₂)+K]⁺: 2548.8, gef.: 2549.4; ber. für C₁₀₉H₁₇₀N₃₁O₃₉⁺ [M+H]⁺: 2538.7, gef.: 2538.5.

Synthese von G(N₃)-G-A₃-GG-NH₂ (1b)



Gemäß AV9 wurde das Peptid nach AV5 an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix® Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. 2-Azidoessigsäure (Azidoglycin) wurde nach AV8 manuell eingeführt (Doppelkupplung). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach AV7. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid 1b mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₁₂H₁₇₆N₃₂O₃₉ (2594.8250 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 2593.2772 Da).

HPLC (Methode A): *t*_R = 13.2 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₁₁₂H₁₇₇N₃₂O₃₉⁺ [M+H]⁺: 2595.8, gef.: 2595.3; ber. für C₁₁₂H₁₇₇N₃₀O₃₉⁺ [M(-N₂)+H]⁺: 2567.8, gef.: 2569.3.

HR-MS (ESI) (m/z): ber. für $C_{112}H_{178}N_{32}O_{39}^{2+}$ $[M+2H]^{2+}$: 1297.6459, gef.: 1297.6458; ber. für $C_{112}H_{179}N_{32}O_{39}^{3+}$ $[M+3H]^{3+}$: 865.4330, gef.: 865.4333.

Synthese von **G(N₃)-G-A₃-GG-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz (1b)**



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol ohne *final deprotection* der Fmoc-Schutzgruppe synthetisiert. Vor der Einführung des Azidbausteins wurde die Beladung des Harzes mittels **AV3** bestimmt und betrug 56.8 $\mu\text{mol/g}$. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe manuell nach **AV8** entfernt und 2-Azidoessigsäure (Azidoglycin) nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplung). Die Beladung des Harzes wurde wie zuvor bestimmt angenommen. Mittels einer Testabspaltung von 1 mg Harz analog **AV7** mit 0.5 mL Abspalllösung und anschließender analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS wurde die Qualität des so dargestellten Peptidharzes überprüft. Die Analytik stimmte mit der von **1b** überein.

Synthese von **Ac-A(N₃)G-A₃-GG-NH₂ (1c)**



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. Fmoc- β -Azido-L-alanin wurde nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplung) und abschließend acetyliert. Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid **1c** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $C_{115}H_{181}N_{33}O_{40}$ ($2665.9040 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 2664.3144 Da).

HPLC (Methode A): $t_R = 12.7 \text{ min}$.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{115}H_{181}N_{33}O_{40}Na^+$ $[M+Na]^+$: 2688.9, gef.: 2688.4; ber. für $C_{115}H_{182}N_{33}O_{40}^+$ $[M+H]^+$: 2666.9, gef.: 2666.3; ber. für $C_{115}H_{181}N_{31}O_{40}Na^+$ $[M(-N_2)+Na]^+$: 2660.9, gef.: 2661.3; ber. für $C_{115}H_{182}N_{31}O_{40}^+$ $[M(-N_2)+H]^+$: 2638.9, gef.: 2639.2.

Synthese von $N_3-(CH_2)_4CO-G-A_3-GG-NH_2$ (**1d**)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. 5-Azidopentansäure wurde nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplung). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid **1d** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $C_{115}H_{182}N_{32}O_{39}$ (2636.9060 $g \cdot mol^{-1}$; Exakte Masse: 2635.3242 Da).

HPLC (Methode A): $t_R = 14.6$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{115}H_{182}N_{32}O_{39}K^+$ $[M+K]^+$: 2676.0, gef.: 2675.4; ber. für $C_{115}H_{182}N_{32}O_{39}Na^+$ $[M+Na]^+$: 2659.9, gef.: 2659.4; ber. für $C_{115}H_{183}N_{32}O_{39}^+$ $[M+H]^+$: 2637.9, gef.: 2637.5.

Synthese von $Ac-K(N_3)G-A_3-GG-NH_2$ (**1e**)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. N_α -Fmoc- ϵ -Azido-L-lysin wurde nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplung) und abschließend acetyliert. Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid

Experimenteller Teil

1e mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₁₈H₁₈₇N₃₃O₄₀ (2707.9850 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 2706.3613 Da).

HPLC (Methode A): $t_R = 15.1$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₁₁₈H₁₈₈N₃₃O₄₀⁺ [M+H]⁺: 2709.0, gef.: 2708.5.

Synthese von Ac-K(N₃)GG-A₃-GG-NH₂ (**1f**)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. Fmoc-Glycin und *N*_α-Fmoc-ε-Azido-L-lysin wurden nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplungen) und abschließend acetyliert. Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid **1f** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₂₀H₁₉₀N₃₄O₄₁ (2765.0370 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 2763.3828 Da).

HPLC (Methode A): $t_R = 16.3$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₁₂₀H₁₉₀N₃₄O₄₁Na⁺ [M+Na]⁺: 2788.0, gef.: 2787.5; ber. für C₁₂₀H₁₉₁N₃₄O₄₁⁺ [M+H]⁺: 2766.1, gef.: 2765.5.

HR-MS (ESI) (m/z): ber. für C₁₂₀H₁₉₀N₃₄O₄₁Na₂²⁺ [M+2Na]²⁺: 1404.6806, gef.: 1404.6806; ber. für C₁₂₀H₁₉₁N₃₄O₄₁Na²⁺ [M+H+Na]²⁺: 1393.6896, gef.: 1393.6907; ber. für C₁₂₀H₁₉₂N₃₄O₄₁²⁺ [M+2H]²⁺: 1382.6987, gef.: 1382.6972; ber. für C₁₂₀H₁₉₀N₃₄O₄₁Na₃³⁺ [M+3Na]³⁺: 944.1168, gef.: 944.1164; ber. für C₁₂₀H₁₉₂N₃₄O₄₁Na³⁺ [M+2H+Na]³⁺: 929.4622, gef.: 929.4619; ber. für C₁₂₀H₁₉₃N₃₄O₄₁³⁺ [M+3H]³⁺: 922.1349, gef.: 922.1342; ber. für C₁₂₀H₁₉₀N₃₄O₄₁Na₄⁴⁺ [M+4Na]⁴⁺: 713.8349, gef.: 713.8348; ber. für C₁₂₀H₁₉₃N₃₄O₄₁Na⁴⁺ [M+3H+Na]⁴⁺: 697.3485, gef.: 697.3485; ber. für C₁₂₀H₁₉₄N₃₄O₄₁⁴⁺ [M+4H]⁴⁺: 691.8530, gef.: 691.8503.

Synthese von Ac-K(N₃)βAlaG-A₃-GG-NH₂ (**1g**)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. Fmoc-β-Alanin und *N*_α-Fmoc-ε-Azido-L-lysin wurden nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplungen) und abschließend acetyliert. Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid **1g** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₂₁H₁₉₂N₃₄O₄₁ (2779.0640 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 2777.3984 Da).

HPLC (Methode A): *t*_R = 15.5 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₁₂₁H₁₉₃N₃₄O₄₁⁺ [M+H]⁺: 2780.1, gef.: 2779.5.

Synthese von Ac-K(N₃)γAbuG-A₃-GG-NH₂ (**1h**)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. Fmoc-γ-Aminobutansäure und *N*_α-Fmoc-ε-Azido-L-lysin wurden nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplungen) und abschließend acetyliert. Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid **1h** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₂₂H₁₉₄N₃₄O₄₁ (2793.0910 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 2791.4141 Da).

HPLC (Methode A): *t*_R = 14.8 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₁₂₂H₁₉₅N₃₄O₄₁⁺ [M+H]⁺: 2794.1, gef.: 2793.6.

5.3.3 Synthese der N-Thiol-Coil-Peptide

Synthese von HS-(CH₂)₂CO-G-B₃-GG-NH₂ (Thiol A, 4a)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. 3-(Tritylthio)propionsäure (**3**) wurde nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplung). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode C) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid **4a** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₁₇H₂₀₈N₃₄O₂₈S (2571.2210 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 2569.5618 Da).

HPLC (Methode C): *t_R* = 19.5 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₁₁₇H₂₀₈N₃₄O₂₈SK⁺ [M+K]⁺: 2610.3, gef.: 2610.4; ber. für C₁₁₇H₂₀₈N₃₄O₂₈SNa⁺ [M+Na]⁺: 2594.2, gef.: 2594.7; ber. für C₁₁₇H₂₀₉N₃₄O₂₈S⁺ [M+H]⁺: 2572.2, gef.: 2572.5.

Synthese von HS-(CH₂)₂CO-GG-B₃-GG-NH₂ (Thiol B, 4b)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. Fmoc-Glycin und 3-(Tritylthio)propionsäure (**3**) wurden nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode C) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid **4b** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₁₉H₂₁₁N₃₅O₂₉S (2628.2730 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 2626.5833 Da).

HPLC (Methode C): *t_R* = 19.5 min.

Experimenteller Teil

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{119}H_{211}N_{35}O_{29}SK^+$ $[M+K]^+$: 2667.4, gef.: 2666.1; ber. für $C_{119}H_{211}N_{35}O_{29}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 2651.3, gef.: 2650.2; ber. für $C_{119}H_{212}N_{35}O_{29}S^+$ $[M+H]^+$: 2629.3, gef.: 2628.2.

Synthese von HS-(CH₂)₂CO-βAlaG-B₃-GG-NH₂ (Thiol C, 4c)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. Fmoc-β-Alanin und 3-(Tritylthio)propionsäure (**3**) wurden nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode C) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Peptid **4c** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $C_{120}H_{213}N_{35}O_{29}S$ (2642.3000 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 2640.5989 Da).

HPLC (Methode C): $t_R = 19.2$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{120}H_{213}N_{35}O_{29}SK^+$ $[M+K]^+$: 2681.4, gef.: 2680.1; ber. für $C_{120}H_{213}N_{35}O_{29}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 2665.3, gef.: 2664.1; ber. für $C_{120}H_{214}N_{35}O_{29}S^+$ $[M+H]^+$: 2643.3, gef.: 2642.1.

Synthese von HS-(CH₂)₂CO-γAbuG-B₃-GG-NH₂ (Thiol D, 4d)



Gemäß **AV9** wurde das Peptid nach **AV5** an *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. Fmoc-γ-Aminobutansäure und 3-(Tritylthio)propionsäure (**3**) wurden nach **AV8** manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode C) durchgeführt und das so erhaltene,

Experimenteller Teil

gewünschte Peptid **4d** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf Identität und Reinheit überprüft.

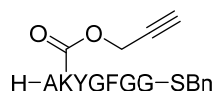
Summenformel: $C_{121}H_{215}N_{35}O_{29}S$ ($2656.3270 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 2654.6146 Da).

HPLC (Methode C): $t_R = 20.4 \text{ min}$.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{121}H_{215}N_{35}O_{29}SK^+$ $[M+K]^+$: 2695.4, gef.: 2694.5; ber. für $C_{121}H_{215}N_{35}O_{29}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 2679.3, gef.: 2678.5; ber. für $C_{121}H_{216}N_{35}O_{29}S^+$ $[M+H]^+$: 2657.3, gef.: 2656.5.

5.3.4 Synthese der Peptidthioester

Synthese von H-AK(Proc)YGFGG-SBn (9a)



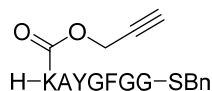
Gemäß **AV12** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem HMPB-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und Boc-L-Alanin wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach **AV12**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und der so erhaltene, gewünschte Peptidthioester **9a** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₄₄H₅₄N₈O₁₀S (887.0220 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 886.3684 Da).

HPLC (Methode A): *t*_R = 18.8 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₄₄H₅₅N₈O₁₀S⁺ [M+H]⁺: 888.0, gef.: 887.8.

Synthese von H-K(Proc)AYGFGG-SBn (9a(K/A))



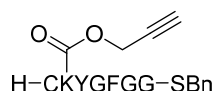
Gemäß **AV12** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem HMPB-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. Fmoc-L-Alanin und *N*_α-Boc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**6**) wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach **AV12**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode A) durchgeführt und der so erhaltene, gewünschte Peptidthioester **9a(K/A)** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₄₄H₅₄N₈O₁₀S (887.0220 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 886.3684 Da).

HPLC (Methode A): *t*_R = 15.4 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₄₄H₅₄N₈O₁₀SK⁺ [M+K]⁺: 926.1, gef.: 926.1; ber. für C₄₄H₅₄N₈O₁₀SNa⁺ [M+Na]⁺: 910.0, gef.: 910.1; ber. für C₄₄H₅₅N₈O₁₀S⁺ [M+H]⁺: 888.0, gef.: 888.1.

Synthese von H-CK(Proc)YGFGG-SBn (9b)



Gemäß **AV12** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N* α -Fmoc-*N* ϵ -Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-*S*-Trityl-L-cystein wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach **AV12**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und der so erhaltene, gewünschte Peptidthioester **9b** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

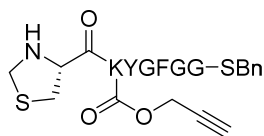
Summenformel: C₄₄H₅₄N₈O₁₀S₂ (919.0820 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 918.3404 Da).

HPLC (Methode B): *t*_R = 18.5 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₄₄H₅₄N₈O₁₀S₂K⁺ [M+K]⁺: 958.2, gef.: 957.1; ber. für C₄₄H₅₄N₈O₁₀S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 942.1, gef.: 941.1; ber. für C₄₄H₅₅N₈O₁₀S₂⁺ [M+H]⁺: 920.1, gef.: 919.1.

HR-MS (ESI) (*m/z*): ber. für C₄₄H₅₄N₈O₁₀S₂Na [M+Na]⁺: 941.3297, gef.: 941.3307; ber. für C₄₄H₅₄N₈O₁₀S₂ [M+H]⁺: 919.3477, gef.: 919.3486.

Synthese von H-ThzK(Proc)YGFGG-SBn (9c)



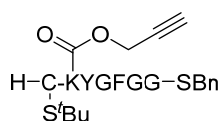
Gemäß **AV12** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem HMPB-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-L-4-Thiazolidincarbonsäure wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach **AV12**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und der so erhaltene, gewünschte Peptidthioester **9c** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₄₅H₅₄N₈O₁₀S₂ (931.0930 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 930.3404 Da).

HPLC (Methode B): *t*_R = 18.3 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₄₅H₅₄N₈O₁₀S₂K⁺ [M+K]⁺: 970.2, gef.: 968.5; ber. für C₄₅H₅₄N₈O₁₀S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 954.1, gef.: 952.5; ber. für C₄₅H₅₅N₈O₁₀S₂⁺ [M+H]⁺: 932.1, gef.: 930.6.

Synthese von H-C(S'Bu)K(Proc)YGFGG-SBn (9d)



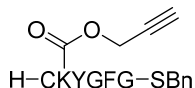
Gemäß **AV12** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem HMPB-ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-*S*-*S'*Butyl-L-cystein wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach **AV12**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und der so erhaltene, gewünschte Peptidthioester **9d** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit hin überprüft.

Summenformel: C₄₈H₆₂N₈O₁₀S₃ (1007.2500 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 1006.3751 Da).

HPLC (Methode B): $t_R = 16.7$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{48}H_{62}N_8O_{10}S_3K^+$ $[M+K]^+$: 1046.4, gef.: 1045.5.

Synthese von H-CK(Proc)YGFG-SBn (9e)



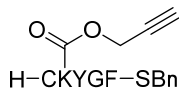
Gemäß **AV12** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. N_α -Fmoc- N_ϵ -Proc-L-lysin (**8**) und N -Boc- S -Trityl-L-cystein wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach **AV12**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und der so erhaltene, gewünschte Peptidthioester **9e** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $C_{42}H_{51}N_7O_9S_2$ (862.0300 g·mol $^{-1}$; Exakte Masse: 861.3190 Da).

HPLC (Methode B; 50 °C): $t_R = 23.8$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{42}H_{51}N_7O_9S_2K^+$ $[M+K]^+$: 901.1, gef.: 900.5; ber. für $C_{42}H_{51}N_7O_9S_2Na^+$ $[M+Na]^+$: 885.0, gef.: 884.6; ber. für $C_{42}H_{52}N_7O_9S_2^+$ $[M+H]^+$: 863.0, gef.: 862.6.

Synthese von H-CK(Proc)YGF-SBn (9f)



Gemäß **AV12** wurde das Peptid nach **AV6** an Phenylalanin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. N_α -Fmoc- N_ϵ -Proc-L-lysin (**8**) und N -Boc- S -Trityl-L-cystein wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach **AV12**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und der so erhaltene, gewünschte

Experimenteller Teil

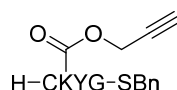
Peptidthioester **9f** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₄₀H₄₈N₆O₈S₂ (804.9780 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 804.2975 Da).

HPLC (Methode B): $t_R = 21.7$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₄₀H₄₉N₆O₈S₂⁺ [M+H]⁺: 806.0, gef.: 805.2.

Synthese von H-CK(Proc)YG-SBn (**9g**)



Gemäß **AV12** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-*S*-Trityl-L-cystein wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach **AV12**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und der so erhaltene, gewünschte Peptidthioester **9g** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf Identität und Reinheit überprüft. Des Weiteren wurde der spezifische Drehwert bestimmt und ein CD-Spektrum aufgenommen.

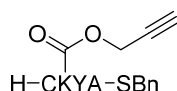
Summenformel: C₃₁H₃₉N₅O₇S₂ (657.8010 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 657.2291 Da).

Spezif. Drehwert: $[\alpha]_D^{28} = -24.0$ ($c = 0.5$ g·100⁻¹·mL⁻¹ in Wasser (+ 0.1 % TFA)).

HPLC (Methode B): $t_R = 16.1$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₃₁H₄₀N₅O₇S₂⁺ [M+H]⁺: 658.8, gef.: 658.1.

Synthese von H-CK(Proc)YA-SBn (9h)



Gemäß **AV12** wurde das Peptid nach **AV6** an Alanin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N* α -Fmoc-*N* ϵ -Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-*S*-Trityl-L-cystein wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach **AV12**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und die so getrennten, C-terminal epimerisierten Peptidthioester **9h** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf deren Identität und Reinheit überprüft. Des Weiteren wurden CD-Spektren aufgenommen.

Summenformel: C₃₂H₄₁N₅O₇S₂ (671.8280 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 671.2447 Da).

Peak A (D-Ala):

HPLC (Methode B): *t*_R = 17.0 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₃₂H₄₁N₅O₇S₂K⁺ [M+K]⁺: 710.9, gef.: 710.2; ber. für C₃₂H₄₁N₅O₇S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 694.8, gef.: 694.2; ber. für C₃₂H₄₂N₅O₇S₂⁺ [M+H]⁺: 672.8, gef.: 672.3.

HR-MS (ESI) (*m/z*): ber. für C₃₂H₄₁N₅O₇S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 694.2340, gef.: 694.2330; ber. für C₃₂H₄₂N₅O₇S₂⁺ [M+H]⁺: 672.2520, gef.: 672.2516.

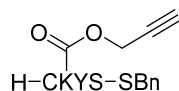
Peak B (L-Ala, 9h):

HPLC (Methode B): *t*_R = 18.2 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₃₂H₄₁N₅O₇S₂K⁺ [M+K]⁺: 710.9, gef.: 710.2; ber. für C₃₂H₄₁N₅O₇S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 694.8, gef.: 694.3; ber. für C₃₂H₄₂N₅O₇S₂⁺ [M+H]⁺: 672.8, gef.: 672.3.

HR-MS (ESI) (*m/z*): ber. für C₃₂H₄₁N₅O₇S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 694.2340, gef.: 694.2332; ber. für C₃₂H₄₂N₅O₇S₂⁺ [M+H]⁺: 672.2520, gef.: 672.2514.

Synthese von H-CK(Proc)YS-SBn (9i)



Gemäß **AV12** wurde das Peptid nach **AV6** an Serin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N* α -Fmoc-*N* ϵ -Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-*S*-Trityl-L-cystein wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach **AV12**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und die so getrennten, C-terminal epimerisierten Peptidthioester **9i** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf deren Identität und Reinheit überprüft. Des Weiteren wurden CD-Spektren aufgenommen.

Summenformel: C₃₂H₄₁N₅O₈S₂ (687.8270 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 687.2397 Da).

Peak A (D-Ser):

HPLC (Methode B): $t_R = 12.3$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₃₂H₄₁N₅O₈S₂K⁺ [M+K]⁺: 726.9, gef.: 726.3; ber. für C₃₂H₄₁N₅O₈S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 710.8, gef.: 710.3; ber. für C₃₂H₄₂N₅O₈S₂⁺ [M+H]⁺: 688.8, gef.: 688.3.

HR-MS (ESI) (m/z): ber. für C₃₂H₄₁N₅O₈S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 710.2289, gef.: 710.2288; ber. für C₃₂H₄₂N₅O₈S₂⁺ [M+H]⁺: 688.2469, gef.: 688.2470.

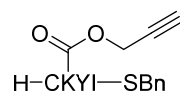
Peak B (L-Ser, 9i):

HPLC (Methode B): $t_R = 14.5$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₃₂H₄₁N₅O₈S₂K⁺ [M+K]⁺: 726.9, gef.: 726.3; ber. für C₃₂H₄₁N₅O₈S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 710.8, gef.: 710.3; ber. für C₃₂H₄₂N₅O₈S₂⁺ [M+H]⁺: 688.8, gef.: 688.4.

HR-MS (ESI) (m/z): ber. für C₃₂H₄₁N₅O₈S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 710.2289, gef.: 710.2288; ber. für C₃₂H₄₂N₅O₈S₂⁺ [M+H]⁺: 688.2469, gef.: 688.2471.

Synthese von H-CK(Proc)YI-SBn (9j)



Gemäß AV12 wurde das Peptid nach AV6 an Isoleucin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. N_α -Fmoc- N_ϵ -Proc-L-lysin (8) und N -Boc- S -Trityl-L-cystein wurden wie in AV10 beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase mit *in situ* Thioesterifizierung erfolgte nach AV12. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode D) durchgeführt und die so getrennten, C -terminal epimerisierten Peptidthioester 9j mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf deren Identität und Reinheit überprüft. Des Weiteren wurden die spezifischen Drehwerte bestimmt und CD-Spektren aufgenommen.

Summenformel: $C_{35}H_{47}N_5O_7S_2$ (713.9090 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 713.2917 Da).

Peak A (D-Ile):

Spezif. Drehwert: $[\alpha]_D^{28} = +8.0$ ($c = 0.5 \text{ g}\cdot 100^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Acetonitril/Wasser (1:9, v/v, + 0.1% TFA).

HPLC (Methode D): $t_R = 19.0$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{35}H_{47}N_5O_7S_2K^+$ $[M+K]^+$: 753.0, gef.: 752.3; ber. für $C_{35}H_{47}N_5O_7S_2Na^+$ $[M+Na]^+$: 736.9, gef.: 736.3; ber. für $C_{35}H_{48}N_5O_7S_2^+$ $[M+H]^+$: 714.9, gef.: 714.3.

HR-MS (ESI) (m/z): ber. für $C_{35}H_{47}N_5O_7S_2Na^+$ $[M+Na]^+$: 736.2809, gef.: 736.2797; ber. für $C_{35}H_{48}N_5O_7S_2^+$ $[M+H]^+$: 714.2990, gef.: 714.2980.

Peak B (L-Ile, 9j):

Spezif. Drehwert: $[\alpha]_D^{28} = -40.0$ ($c = 0.5 \text{ g}\cdot 100^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Acetonitril/Wasser (1:9, v/v, + 0.1% TFA).

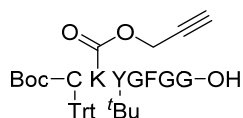
HPLC (Methode D): $t_R = 19.5$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{35}H_{47}N_5O_7S_2K^+$ $[M+K]^+$: 753.0, gef.: 752.3; ber. für $C_{35}H_{47}N_5O_7S_2Na^+$ $[M+Na]^+$: 736.9, gef.: 736.3; ber. für $C_{35}H_{48}N_5O_7S_2^+$ $[M+H]^+$: 714.9, gef.: 714.3.

HR-MS (ESI) (m/z): ber. für $C_{35}H_{47}N_5O_7S_2Na^+$ $[M+Na]^+$: 736.2809, gef.: 736.2800; ber. für $C_{35}H_{48}N_5O_7S_2^+$ $[M+H]^+$: 714.2990, gef.: 714.2980.

5.3.5 Synthese der vollgeschützten Peptidsäuren

Synthese von Boc-C(Trt)K(Proc)Y(^tBu)GFGG-OH (10b)



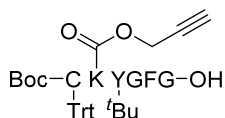
Gemäß AV11 wurde das Peptid nach AV6 an Glycin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-*S*-Trityl-L-cystein wurden wie in AV10 beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die vollgeschützte Freisetzung von der Festphase erfolgte nach AV11. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode E) durchgeführt und die so erhaltene, gewünschte vollgeschützte Peptidsäure **10b** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf deren Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₆₅H₇₈N₈O₁₃S (1211.4420 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 1210.5409 Da).

HPLC (Methode E, 50 °C): *t*_R = 20.3 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₆₅H₇₈N₈O₁₃SK⁺ [M+K]⁺: 1250.5, gef.: 1250.4; ber. für C₆₅H₇₈N₈O₁₃SNa⁺ [M+Na]⁺: 1234.4, gef.: 1234.4.

Synthese von Boc-C(Trt)K(Proc)Y(^tBu)GFG-OH (10e)



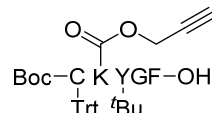
Gemäß AV11 wurde das Peptid nach AV6 an Glycin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-*S*-Trityl-L-cystein wurden wie in AV10 beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die vollgeschützte Freisetzung von der Festphase erfolgte nach AV11. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode E) durchgeführt und die so erhaltene, gewünschte vollgeschützte Peptidsäure **10e** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf deren Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₆₃H₇₅N₇O₁₂S (1154.3900 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 1153.5194 Da).

HPLC (Methode E, 50 °C): *t*_R = 21.2 min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{63}H_{75}N_7O_{12}SK^+$ $[M+K]^+$: 1193.5, gef.: 1192.0; (m/z): ber. für $C_{63}H_{75}N_7O_{12}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 1177.4, gef.: 1176.1.

Synthese von Boc-C(Trt)K(Proc)Y(^tBu)GF-OH (**10f**)



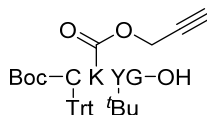
Gemäß **AV11** wurde das Peptid nach **AV6** an Phenylalanin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. N_α -Fmoc- N_ϵ -Proc-L-lysin (**8**) und N -Boc- S -Trityl-L-cystein wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die vollgeschützte Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV11**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode E) durchgeführt und die so erhaltene, gewünschte vollgeschützte Peptidsäure **10f** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf deren Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $C_{61}H_{72}N_6O_{11}S$ ($1097.3380 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 1096.4980 Da).

HPLC (Methode E, 50°C): $t_R = 22.4 \text{ min}$.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{61}H_{72}N_6O_{11}SK^+$ $[M+K]^+$: 1136.4, gef.: 1135.1; ber. für $C_{61}H_{72}N_6O_{11}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 1120.3, gef.: 1119.1.

Synthese von Boc-C(Trt)K(Proc)Y(^tBu)G-OH (**10g**)



Gemäß **AV11** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem 2-Chlortrityl-Polystyrolharz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. N_α -Fmoc- N_ϵ -Proc-L-lysin (**8**) und N -Boc- S -Trityl-L-cystein wurden wie in **AV10** beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die vollgeschützte Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV11**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode E) durchgeführt und die so erhaltene, gewünschte vollgeschützte Peptidsäure **10g** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf deren Identität und Reinheit überprüft.

Experimenteller Teil

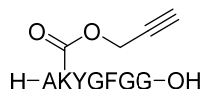
Summenformel: $C_{52}H_{63}N_5O_{10}S$ ($950.1610 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 949.4296 Da).

HPLC (Methode E, $50 \text{ }^\circ\text{C}$): $t_R = 20.8 \text{ min}$.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{52}H_{63}N_5O_{10}SK^+$ $[M+K]^+$: 989.3, gef.: 988.1; ber. für $C_{52}H_{63}N_5O_{10}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 973.2, gef.: 972.1.

5.3.6 Synthese der Peptidsäuren

Synthese von H-AK(Proc)YGFGG-OH (17a)



Gemäß **AV10** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem HMPB ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-L-Alanin wurden wie beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode F) durchgeführt und die so erhaltene, gewünschte Peptidsäure **17a** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf deren Identität und Reinheit überprüft.

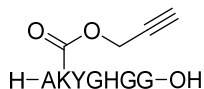
Summenformel: C₃₇H₄₈N₈O₁₁ (780.8360 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 780.3443 Da).

HPLC (Methode F): *t*_R = 23.6 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₃₇H₄₈N₈O₁₁K⁺ [M+K]⁺: 819.9, gef.: 819.4; ber. für C₃₇H₄₈N₈O₁₁Na⁺ [M+Na]⁺: 803.8, gef.: 803.4; ber. für C₃₇H₄₉N₈O₁₁H⁺ [M+H]⁺: 781.8, gef.: 781.4.

HR-MS (ESI) (*m/z*): ber. für C₃₇H₄₈N₈O₁₁Na [M+Na]⁺: 803.3335, gef.: 803.3326; ber. für C₃₇H₄₉N₈O₁₁ [M+H]⁺: 781.3515, gef.: 781.3508.

Synthese von H-AK(Proc)YGHGG-OH (17k)



Gemäß **AV10** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem HMPB ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-L-Alanin wurden wie beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode G) durchgeführt und die so erhaltene, gewünschte Peptidsäure **17k** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf deren Identität und Reinheit überprüft. Aufgrund der Polarität des Analyten, muss dieser in Wasser (+ 0.1 % TFA) ohne Acetonitrilanteil gelöst werden.

Experimenteller Teil

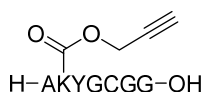
Summenformel: C₃₄H₄₆N₁₀O₁₁ (770.8010 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 770.3348 Da).

HPLC (Methode G): *t*_R = 19.1 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₃₄H₄₇N₁₀O₁₁⁺ [M+H]⁺: 771.8, gef.: 771.3.

HR-MS (ESI) (*m/z*): ber. für C₃₄H₄₆N₁₀O₁₁Na⁺ [M+Na]⁺: 793.3240, gef.: 793.3210; ber. für C₃₄H₄₇N₁₀O₁₁⁺ [M+H]⁺: 771.3420, gef.: 771.3409.

Synthese von H-AK(Proc)YGCGG-OH (17l)



Gemäß **AV10** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem HMPB ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-L-Alanin wurden wie beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode F) durchgeführt und die so erhaltene, gewünschte Peptidsäure **17l** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf deren Identität und Reinheit überprüft.

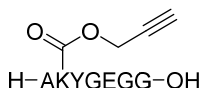
Summenformel: C₃₁H₄₄N₈O₁₁S (736.7980 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 736.2850 Da).

HPLC (Methode F): *t*_R = 18.1 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₃₁H₄₅N₈O₁₁S⁺ [M+H]⁺: 737.8, gef.: 737.5.

HR-MS (ESI) (*m/z*): ber. für C₃₁H₄₄N₈O₁₁SNa⁺ [M+Na]⁺: 759.2742, gef.: 759.2736; ber. für C₃₁H₄₄N₈O₁₁S⁺ [M+H]⁺: 737.2923, gef.: 737.2919.

Synthese von H-AK(Proc)YGEGG-OH (17m)



Gemäß **AV10** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem HMPB ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-L-Alanin wurden wie beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung

Experimenteller Teil

des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode G) durchgeführt und die so erhaltene, gewünschte Peptidsäure **17m** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf deren Identität und Reinheit überprüft. Aufgrund der Polarität des Analyten, muss dieser in Wasser (+ 0.1 % TFA) ohne Acetonitrilanteil gelöst werden.

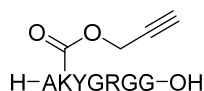
Summenformel: $C_{33}H_{46}N_8O_{13}$ ($762.7740 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 762.3184 Da).

HPLC (Methode G): $t_R = 20.9 \text{ min}$.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{33}H_{47}N_8O_{13}^+ [M+H]^+$: 763.8, gef.: 763.6.

HR-MS (ESI) (m/z): ber. für $C_{33}H_{46}N_8O_{13}Na^+ [M+Na]^+$: 785.3077, gef.: 785.3062; ber. für $C_{33}H_{47}N_8O_{13}^+ [M+H]^+$: 763.3257, gef.: 763.3248.

Synthese von H-AK(Proc)YGRGG-OH (**17n**)



Gemäß **AV10** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem HMPB ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. N_α -Fmoc- N_ϵ -Proc-L-lysin (**8**) und N -Boc-L-Alanin wurden wie beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode G) durchgeführt und die so erhaltene, gewünschte Peptidsäure **17n** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf deren Identität und Reinheit überprüft. Aufgrund der Polarität des Analyten, muss dieser in Wasser (+ 0.1 % TFA) ohne Acetonitrilanteil gelöst werden.

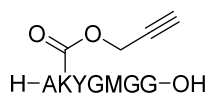
Summenformel: $C_{34}H_{51}N_{11}O_{11}$ ($789.8480 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 789.3770 Da).

HPLC (Methode G): $t_R = 19.5 \text{ min}$.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{34}H_{52}N_{11}O_{11}^+ [M+H]^+$: 790.9, gef.: 790.4.

HR-MS (ESI) (m/z): ber. für $C_{34}H_{51}N_{11}O_{11}Na^+ [M+Na]^+$: 812.3662, gef.: 812.3645; ber. für $C_{34}H_{52}N_{11}O_{11}^+ [M+H]^+$: 790.3842, gef.: 790.3835; ber. für $C_{34}H_{53}N_{11}O_{11}^{2+} [M+2H]^{2+}$: 395.6958, gef.: 395.6957.

Synthese von H-AK(Proc)YGMGG-OH (**17o**)



Gemäß **AV10** wurde das Peptid nach **AV6** an Glycin-vorbeladenem HMPB ChemMatrix[®] Harz in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol synthetisiert. *N*_α-Fmoc-*N*_ε-Proc-L-lysin (**8**) und *N*-Boc-L-Alanin wurden wie beschrieben manuell eingeführt (Doppelkupplungen). Die Freisetzung von der Festphase erfolgte nach **AV7**. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode F) durchgeführt und die so erhaltene, gewünschte Peptidsäure **17o** mittels analytischer HPLC, MALDI-TOF-MS und ESI (HR-MS) auf deren Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₃₃H₄₈N₈O₁₁S (764.8520 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 764.3163 Da).

HPLC (Methode F): *t*_R = 20.3 min.

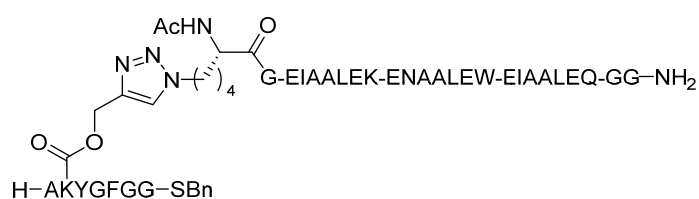
MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₃₃H₄₉N₈O₁₁S⁺ [M+H]⁺: 765.9, gef.: 765.5.

HR-MS (ESI) (*m/z*): ber. für C₃₃H₄₇N₈O₁₁SNa₂⁺ [M(Na)+Na]⁺: 809.2875, gef.: 809.2879; ber. für C₃₃H₄₈N₈O₁₁SNa⁺ [M+Na]⁺: 787.3055, gef.: 787.3056; ber. für C₃₃H₄₉N₈O₁₁S⁺ [M+H]⁺: 765.3236, gef.: 765.3237.

5.3.7 Synthese der CuAAC-Konjugate in Lösung

Die in der Benennung der *Click*-Konjugate als *Peptid Coil* hervorgehobenen Peptidreste entsprechen den abgebildeten und *N*-funktionalisierten A₃-Peptiden. Die Benennung erfolgt nach Peptidthioesterkonjugat **18** oder Peptidsäurekonjugat **19**. Der erste kleingeschriebene, lateinische Buchstabe bezieht sich auf das eingesetzte Azid **1** und der zweite auf das entsprechende Alkynylpeptid **9**, **10** oder **17**.

Synthese von *Click*-Konjugat H-AK(*N_e*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGFGG-SBn (**18ea**)



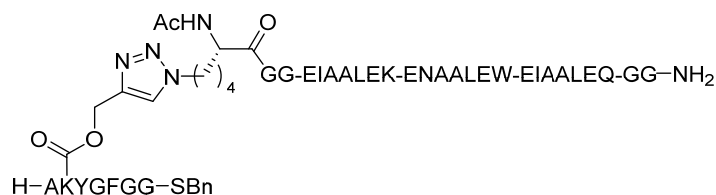
Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV15** mit Azid-Coil **1e** (500 nmol) und Peptidthioester **9a** (600 nmol) in 1 mM Konzentration in 500 μ L des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Dazu wurde das vorgelegte Peptidgemisch in 350 μ L *tert*-Butanol suspendiert, mit 50 μ L PBS (10 \times Stamm) gelöst und mit 50 μ L CuSO₄/THPTA-Puffer (67 mM/134 mM) versetzt. Durch Zugabe von 50 μ L der Natriumascorbat-Stammlösung (100 mM) wurde die Reaktion gestartet. Nach 1 min, 30 min, 60 min und 90 min wurde das Reaktionsgemisch geschüttelt und kurz zentrifugiert. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde das Reaktionsgemisch mit Acetonitril/Wasser (1:4, *v/v*, + 0.1% TFA) auf 1 mL verdünnt und gefriergetrocknet. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte *Click*-Konjugat **18ea** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₆₂H₂₄₁N₄₁O₅₀S (3595.0070 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3592.7297 Da).

HPLC (Methode B): *t_R* = 21.4 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₁₆₂H₂₄₁N₄₁O₅₀SK⁺ [M+K]⁺: 3634.1, gef.: 3634.2; ber. für C₁₆₂H₂₄₁N₄₁O₅₀SNa⁺ [M+Na]⁺: 3618.0, gef.: 3618.3; ber. für C₁₆₂H₂₄₂N₄₁O₅₀S⁺ [M+H]⁺: 3596.0, gef.: 3596.2.

Synthese von Click-Konjugat H-AK(*N*_ε-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGFGG-SBn (18fa)



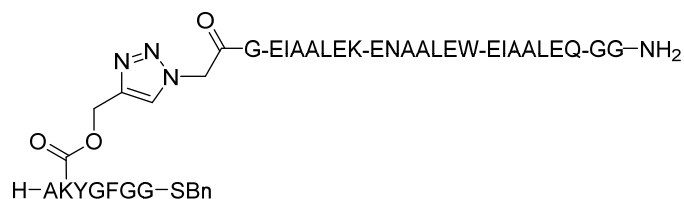
Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV15** mit Azid-Coil **1f** (500 nmol) und Peptidthioester **9a** (600 nmol) in 1 mM Konzentration in 500 μ L des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Dazu wurde das vorgelegte Peptidgemisch in 350 μ L *tert*-Butanol suspendiert, mit 50 μ L PBS (10 \times Stamm) gelöst und mit 50 μ L CuSO₄/THPTA-Puffer (67 mM/134 mM) versetzt. Durch Zugabe von 50 μ L der Natriumascorbat-Stammlösung (100 mM) wurde die Reaktion gestartet. Nach 1 min, 30 min, 60 min und 90 min wurde das Reaktionsgemisch geschüttelt und kurz zentrifugiert. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde das Reaktionsgemisch mit Acetonitril/Wasser (1:4, *v/v*, + 0.1% TFA) auf 1 mL verdünnt und gefriergetrocknet. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte *Click*-Konjugat **18fa** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₆₄H₂₄₄N₄₂O₅₁S (3652.0590 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3649.7511 Da).

HPLC (Methode B): *t*_R = 20.5 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₁₆₄H₂₄₄N₄₂O₅₁SK⁺ [M+K]⁺: 3691.2, gef.: 3691.4; ber. für C₁₆₄H₂₄₄N₄₂O₅₁SNa⁺ [M+Na]⁺: 3675.1, gef.: 3675.4; ber. für C₁₆₄H₂₄₅N₄₂O₅₁S⁺ [M+H]⁺: 3653.1, gef.: 3653.5.

Synthese von Click-Konjugat H-AK(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGFGG-SBn (18ba)



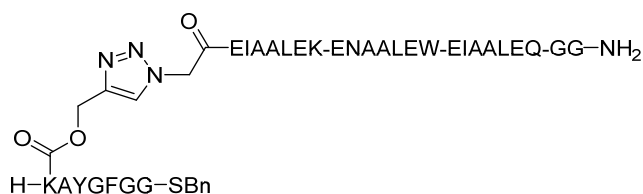
Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV15** mit Azid-Coil **1b** (500 nmol) und Peptidthioester **9a** (600 nmol) in 1 mM Konzentration in 500 μL des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Dazu wurde das vorgelegte Peptidgemisch in 350 μL *tert*-Butanol suspendiert, mit 50 μL PBS (10 \times Stamm) gelöst und mit 50 μL CuSO₄/THPTA-Puffer (67 mM/134 mM) versetzt. Durch Zugabe von 50 μL der Natriumascorbat-Stammlösung (100 mM) wurde die Reaktion gestartet. Nach 1 min, 30 min, 60 min und 90 min wurde das Reaktionsgemisch geschüttelt und kurz an zentrifugiert. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde das Reaktionsgemisch mit Acetonitril/Wasser (1:4, *v/v*, + 0.1% TFA) auf 1 mL verdünnt und gefriergetrocknet. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte *Click*-Konjugat **18ba** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₅₆H₂₃₀N₄₀O₄₉S (3481.8470 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3479.6456 Da).

HPLC (Methode B): *t_R* = 20.7 min.

MALDI-TOF-MS (*m/z*): ber. für C₁₅₆H₂₃₁N₄₀O₄₉S⁺ [M+H]⁺: 3482.9, gef.: 3483.5.

Synthese von Click-Konjugat H-K(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)AYGFGG-SBn (18aa(K/A))



Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV15** mit Azid-Coil **1a** (500 nmol) und Peptidthioester **9a(K/A)** (600 nmol) in 1 mM Konzentration in 500 μL des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Dazu wurde das vorgelegte Peptidgemisch in 350 μL *tert*-Butanol suspendiert,

Experimenteller Teil

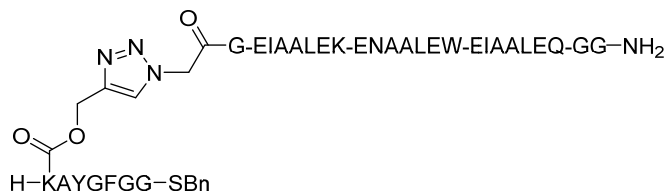
mit 50 μL PBS (10 \times Stamm) gelöst und mit 50 μL $\text{CuSO}_4/\text{THPTA}$ -Puffer (67 mM/134 mM) versetzt. Durch Zugabe von 50 μL der Natriumascorbat-Stammlösung (100 mM) wurde die Reaktion gestartet. Nach 1 min, 30 min, 60 min und 90 min wurde das Reaktionsgemisch geschüttelt und kurz anzentrifugiert. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde das Reaktionsgemisch mit Acetonitril/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) auf 1 mL verdünnt und gefriergetrocknet. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte *Click*-Konjugat **18aa(K/A)** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $\text{C}_{154}\text{H}_{227}\text{N}_{39}\text{O}_{48}\text{S}$ (3424.7950 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3422.6241 Da).

HPLC (Methode B): $t_{\text{R}} = 18.9$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $\text{C}_{154}\text{H}_{228}\text{N}_{39}\text{O}_{48}\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 3425.8, gef.: 3426.7.

Synthese von *Click*-Konjugat H-K(N_{ϵ} -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)AYGFGG-SBn (**18ba(K/A)**)



Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV15** mit Azid-Coil **1b** (500 nmol) und Peptidthioester **9a(K/A)** (600 nmol) in 1 mM Konzentration in 500 μL des *CuAAC*-Puffers durchgeführt. Dazu wurde das vorgelegte Peptidgemisch in 350 μL *tert*-Butanol suspendiert, mit 50 μL PBS (10 \times Stamm) gelöst und mit 50 μL $\text{CuSO}_4/\text{THPTA}$ -Puffer (67 mM/134 mM) versetzt. Durch Zugabe von 50 μL der Natriumascorbat-Stammlösung (100 mM) wurde die Reaktion gestartet. Nach 1 min, 30 min, 60 min und 90 min wurde das Reaktionsgemisch geschüttelt und kurz anzentrifugiert. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde das Reaktionsgemisch mit Acetonitril/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) auf 1 mL verdünnt und gefriergetrocknet. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte *Click*-Konjugat **18ba(K/A)** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

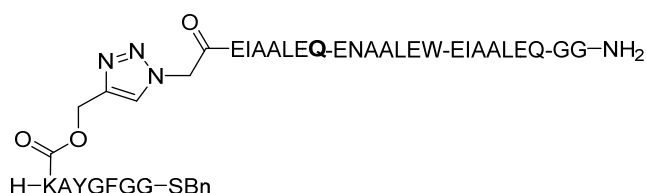
Experimenteller Teil

Summenformel: C₁₅₆H₂₃₀N₄₀O₄₉S (3481.8470 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3479.6456 Da).

HPLC (Methode B): $t_R = 20.9$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₁₅₆H₂₃₁N₄₀O₄₉S⁺ [M+H]⁺: 3482.9, gef.: 3483.6.

Synthese von *Click-Konjugat H-K(N_ε-(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)AYGFGG-SBn (18a(K/Q)a(K/A))*



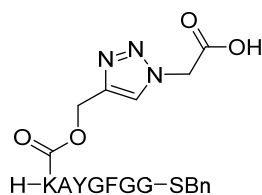
Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV15** mit Azid-Coil **1a(K7Q)** (500 nmol) und Peptidthioester **9a(K/A)** (600 nmol) in 1 mM Konzentration in 500 μ L des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Dazu wurde das vorgelegte Peptidgemisch in 350 μ L *tert*-Butanol suspendiert, mit 50 μ L PBS (10 \times Stamm) gelöst und mit 50 μ L CuSO₄/THPTA-Puffer (67 mM/134 mM) versetzt. Durch Zugabe von 50 μ L der Natriumascorbat-Stammlösung (100 mM) wurde die Reaktion gestartet. Nach 1 min, 30 min, 60 min und 90 min wurde das Reaktionsgemisch geschüttelt und kurz zentrifugiert. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde das Reaktionsgemisch mit Acetonitril/Wasser (1:4, *v/v*, + 0.1% TFA) auf 1 mL verdünnt und gefriergetrocknet. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte *Click-Konjugat 18a(K7Q)a(K/A)* mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₅₃H₂₂₃N₃₉O₄₉S (3424.7510 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3422.5878 Da).

HPLC (Methode B): $t_R = 22.3$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₁₅₃H₂₂₄N₃₉O₄₉S⁺ [M+H]⁺: 3425.8, gef.: 3427.1.

Synthese von Click-Konjugat H-K(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)AYGFGG-SBn (18(45)a(K/A))



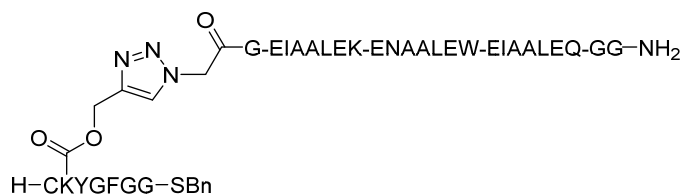
Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV15** mit 2-Azidoessigsäure (**45**, 500 nmol) und Peptidthioester **9a(K/A)** (600 nmol) in 1 mM Konzentration in 500 μL des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Dazu wurde das vorgelegte Peptidgemisch in 350 μL *tert*-Butanol suspendiert, mit 50 μL PBS (10 \times Stamm) gelöst und mit 50 μL CuSO₄/THPTA-Puffer (67 mM/134 mM) versetzt. Durch Zugabe von 50 μL der Natriumascorbat-Stammlösung (100 mM) wurde die Reaktion gestartet. Nach 1 min, 30 min, 60 min und 90 min wurde das Reaktionsgemisch geschüttelt und kurz zentrifugiert. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde das Reaktionsgemisch mit Acetonitril/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) auf 1 mL verdünnt und gefriergetrocknet. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte *Click*-Konjugat **18(45)a(K/A)** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₄₆H₅₇N₁₁O₁₂S (988.0870 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 987.3909 Da).

HPLC (Methode B): $t_R = 13.9$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₄₆H₅₇N₁₁O₁₂SNa⁺ [M+Na]⁺: 1011.1, gef.: 1010.9; ber. für C₄₆H₅₈N₁₁O₁₂S⁺ [M+H]⁺: 989.1, gef.: 988.9.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (18bb)



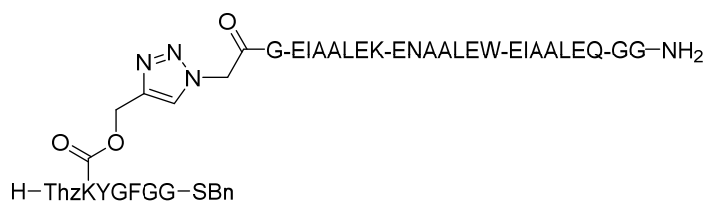
Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV16** mit Azid-Coil **1b** (500 nmol) und Peptidthioester **9b** (600 nmol) unter Schutzgasatmosphäre in 1 mM Konzentration in 500 μ L des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach **AV16** und nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt. Das so erhaltene gewünschte Click-Konjugat **18bb** wurde mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $C_{156}H_{230}N_{40}O_{49}S_2$ (3513.9070 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3511.6177 Da).

HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 20.6$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{156}H_{231}N_{40}O_{49}S_2^+ [M+H]^+$: 3514.9, gef.: 3515.1.

Synthese von Click-Konjugat H-ThzK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)-methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (18bc)



Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV16** mit Azid-Coil **1b** (500 nmol) und Peptidthioester **9c** (600 nmol) unter Schutzgasatmosphäre in 1 mM Konzentration in 500 μ L des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach **AV16** und nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt. Das so erhaltene gewünschte Click-Konjugat **18bc** wurde mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

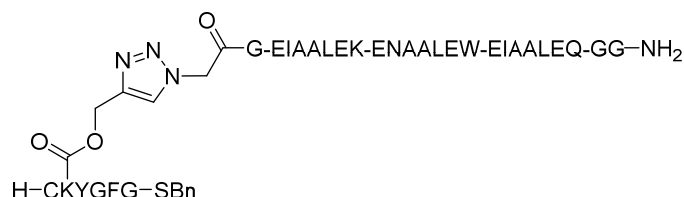
Summenformel: $C_{157}H_{230}N_{40}O_{49}S_2$ (3525.9180 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3523.6177 Da).

Experimenteller Teil

HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 21.5$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{157}H_{231}N_{40}O_{49}S_2^+$ $[M+H]^+$: 3526.9, gef.: 3527.5.

Synthese von *Click-Konjugat H-CK(N_ε-(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGFG-SBn (18be)*



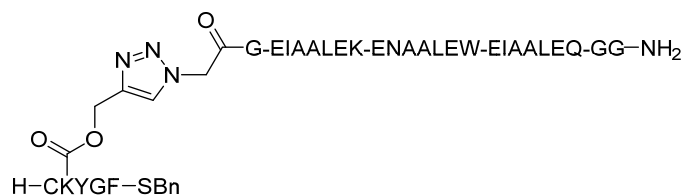
Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV16** mit Azid-Coil **1b** (500 nmol) und Peptidthioester **9e** (600 nmol) unter Schutzgasatmosphäre in 1 mM Konzentration in 500 μ L des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach **AV16** und nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt. Das so erhaltene gewünschte Click-Konjugat **18be** wurde mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $C_{154}H_{227}N_{39}O_{48}S_2$ (3456.8550 g \cdot mol⁻¹; Exakte Masse: 3454.5962 Da).

HPLC (Methode B): $t_R = 21.0$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{154}H_{227}N_{39}O_{48}S_2K^+$ $[M+K]^+$: 3496.0, gef.: 3496.3; ber. für $C_{154}H_{227}N_{39}O_{48}S_2Na^+$ $[M+Na]^+$: 3479.8, gef.: 3480.4; ber. für $C_{154}H_{228}N_{39}O_{48}S_2^+$ $[M+H]^+$: 3457.9, gef.: 3458.5.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGF-SBn (18bf)



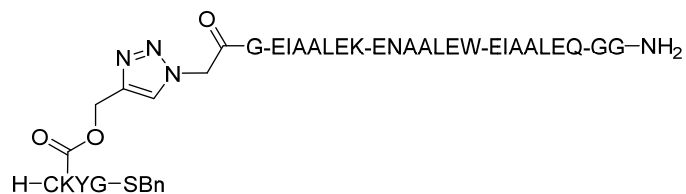
Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV16** mit Azid-Coil **1b** (500 nmol) und Peptidthioester **9f** (600 nmol) unter Schutzgasatmosphäre in 1 mM Konzentration in 500 μ L des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach **AV16** und nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt. Das so erhaltene gewünschte Click-Konjugat **18bf** wurde mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf deren Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₅₂H₂₂₄N₃₈O₄₇S₂ (3399.8030 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3397.5747 Da).

HPLC (Methode B): $t_R = 22.6$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₁₅₂H₂₂₅N₃₈O₄₇S₂⁺ [M+H]⁺: 3400.8, gef.: 3401.7.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YG-SBn (18bg)



Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV16** mit Azid-Coil **1b** (500 nmol) und Peptidthioester **9g** (600 nmol) unter Schutzgasatmosphäre in 1 mM Konzentration in 500 μ L des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach **AV16** und nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt. Das so erhaltene, gewünschte Click-Konjugat **18bg** wurde mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf deren Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: C₁₄₃H₂₁₅N₃₇O₄₆S₂ (3252.6260 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3250.5063 Da).

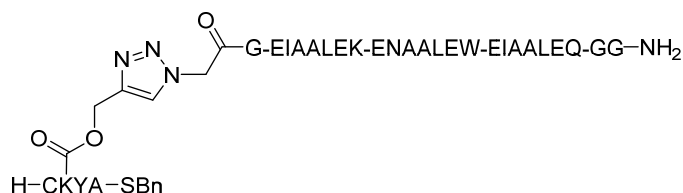
HPLC (Methode B): $t_R = 19.3$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für C₁₄₃H₂₁₅N₃₇O₄₆S₂K⁺ [M+K]⁺: 3291.7, gef.: 3292.1; ber. für

Experimenteller Teil

$C_{143}H_{215}N_{37}O_{46}S_2Na^+$ $[M+Na]^+$: 3275.6, gef.: 3275.1; ber. für $C_{143}H_{216}N_{37}O_{46}S_2^+$ $[M+H]^+$: 3253.6, gef.: 3253.1.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YA-SBn (18bh)



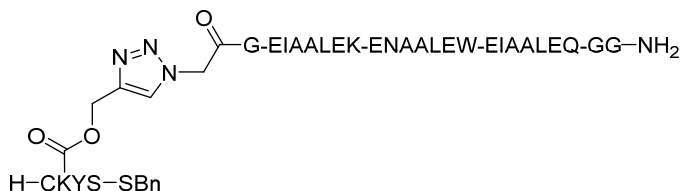
Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV16** mit Azid-Coil **1b** (500 nmol) und L-Ala Peptidthioester **9h** (600 nmol) unter Schutzgasatmosphäre in 1 mM Konzentration in 500 μ L des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach **AV16** und nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt. Das so erhaltene gewünschte Click-Konjugat **18bh** wurde mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $C_{144}H_{217}N_{37}O_{46}S_2$ (3266.6530 $g \cdot mol^{-1}$; Exakte Masse: 3264.5220 Da).

HPLC (Methode B): $t_R = 20.5$ min.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{144}H_{217}N_{37}O_{46}S_2K^+$ $[M+K]^+$: 3305.8, gef.: 3305.2; ber. für $C_{144}H_{218}N_{37}O_{46}S_2^+$ $[M+H]^+$: 3267.7, gef.: 3267.2.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YS-SBn (18bi)



Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV16** mit Azid-Coil **1b** (500 nmol) und L-Ser Peptidthioester **9i** (600 nmol) unter Schutzgasatmosphäre in 1 mM Konzentration in 500 μ L des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach **AV16** und nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt. Das so

Experimenteller Teil

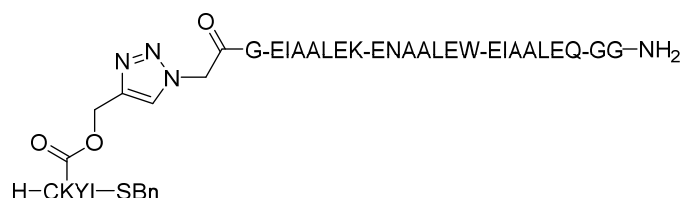
erhaltene gewünschte Click-Konjugat **18bi** wurde mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $C_{144}H_{217}N_{37}O_{47}S_2$ ($3282.6520 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3280.5169 Da).

HPLC (Methode B): $t_R = 19.4 \text{ min}$.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{144}H_{218}N_{37}O_{47}S_2^+ [M+H]^+$: 3283.7, gef.: 3283.0.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(N_ϵ -(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YI-SBn (**18bj**)



Die CuAAC-Reaktion in Lösung wurde nach **AV16** mit Azid-Coil **1b** (500 nmol) und L-Ile Peptidthioester **9j** (600 nmol) unter Schutzgasatmosphäre in 1 mM Konzentration in 500 μL des *CuAAC-Puffers* durchgeführt. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach **AV16** und nach Kapitel 5.1 (Methode B) durchgeführt. Das so erhaltene gewünschte Click-Konjugat **18bj** wurde mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $C_{147}H_{223}N_{37}O_{46}S_2$ ($3308.7340 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3306.5689 Da).

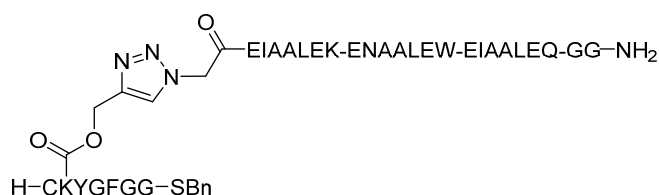
HPLC (Methode B): $t_R = 22.7 \text{ min}$.

MALDI-TOF-MS (m/z): ber. für $C_{147}H_{224}N_{37}O_{46}S_2^+ [M+H]^+$: 3309.7, gef.: 3309.0.

5.3.8 Synthese der CuAAC-Konjugate an der Festphase

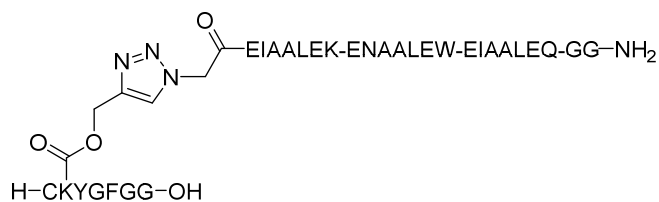
Die in der Benennung der *Click*-Konjugate als *Peptid Coil* hervorgehobenen Peptidreste entsprechen den abgebildeten und *N*-funktionalisierten A₃-Peptiden. Die Benennung erfolgt nach Peptidthioesterkonjugat **18** oder Peptidsäurekonjugat **19**. Der erste kleingeschriebene, lateinische Buchstabe bezieht sich auf das eingesetzte Azid **1** und der zweite auf das entsprechende Alkynylpeptid **9**, **10** oder **17**.

Synthese von *Click*-Konjugat H-CK(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGFGG-SBn (**18ab**)



Die CuAAC-Reaktion wurde in zwei Ansätzen durchgeführt.

Ansatz 1 (Tabelle 14 – Eintrag 1): Die CuAAC-Reaktion wurde nach **AV14** an der Festphase durchgeführt. Die entsprechende Menge an vollgeschützter Alkynylpeptidsäure **10b** wurde mittels **AV4** bestimmt und vor der Reaktion in einem Reagiergefäß aliquotiert und gefriergetrocknet. Ausgehend von der Beladungsdichte des Herstellers (0.54 mmol/g) des *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harzes wurde das Polymer-gebundene Azid **1a** (1.0 μmol, 1.0 Äq.) in einem Spritzenreaktor zusammen mit Kupfer(I)iodid (1.0 mg, 5.3 μmol, 5.3 Äq.) und Natriumascorbat (1.2 mg, 6.1 μmol, 6.1 Äq.) eingewogen und mit dem vollgeschützten Alkin **10b** (1.0 μmol, 1.0 Äq.) gelöst in *abs.* Dimethylformamid (1.0 mL) für 2 d bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Lösung wurde verworfen und das Harz, von **AV14** abweichend, mit Dimethylformamid (3×), Diethylether (3×) und Dichlormethan (5×) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Vor der anschließenden Thioesterifizierung an der Festphase wurde von dem getrockneten Harz 1 mg entnommen und mittels einer sauren Testabspaltung (0.5 mL Trifluoressigsäure/Trisopropylsilan/Wasser, 90:5:5, *v/v/v*) analog **AV7** von der Festphase freigesetzt. Mit Hilfe analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS wurde die Qualität des so dargestellten Click-Konjugats (freie Peptidsäure **19ab**) überprüft.



Summenformel: C₁₄₇H₂₂₁N₃₉O₄₉S (3350.6690 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3348.5721 Da).

HPLC (Methode B, 50 °C): *t_R* = 22.1 min (**19ab**).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): **19ab** ber. für C₁₄₇H₂₂₂N₃₉O₄₉S⁺ [M+H]⁺: 3351.7, gef.: 3350.5; ber. für C₁₄₇H₂₂₁N₃₉O₄₉SNa⁺ [M+Na]⁺: 3373.7, gef.: 3373.0; ber. für C₁₄₇H₂₂₁N₃₉O₄₉SK⁺ [M+K]⁺: 3389.8, gef.: 3389.2.

Die Thioesterifizierung an der Festphase erfolgte analog **AV13** mit Diisopropylethylamin, durch zweimalige Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (2.8 μL, 24.0 μmol, 24.0 Äq.), HOBt (4.05 mg, 30 μmol, 30.0 Äq), DIPEA (6.4 μL, 37.5 μmol, 37.5 Äq.) und DIC (4.6 μL, 30.0 μmol, 30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, *v/v*) für jeweils 1.5 h bei Raumtemperatur. Das so behandelte Harz wurde mit Dichlormethan (5×), Dimethylformamid (5×) und Dichlormethan (10×) gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend das funktionalisierte Peptid nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (1.0 mL, 90:5:5, *v/v/v*) von der Festphase freigesetzt. Analytische HPLC zeigte keinen vollständigen Umsatz zum gewünschten Peptidthioester **18ab**.

Summenformel: C₁₅₄H₂₂₇N₃₉O₄₈S₂ (3456.8550 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3454.5962 Da).

HPLC (Methode B, 50 °C): *t_R* = 26.1 min (**18ab**).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): **18ab** ber. für C₁₅₄H₂₂₈N₃₉O₄₈S₂⁺ [M+H]⁺: 3457.9, gef.: 3457.4; ber. für C₁₅₄H₂₂₇N₃₉O₄₈S₂Na⁺ [M+Na]⁺: 3479.8, gef.: 3479.2; ber. für C₁₅₄H₂₂₇N₃₉O₄₈S₂K⁺ [M+K]⁺: 3496.0, gef.: 3495.2.

Ansatz 2 (Tabelle 14 – Eintrag 2): Die CuAAC-Reaktion wurde nach **AV14** an der Festphase durchgeführt. Die entsprechende Menge an vollgeschützter Alkinylopeptidsäure **10b** wurde mittels **AV4** bestimmt und vor der Reaktion in einem Reagiergefäß aliquotiert und gefriergetrocknet. Ausgehend von der Beladungsdichte des Herstellers (0.54 mmol/g) des *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz wurde das Polymer-gebundene Azid **1a** (4.0 μmol, 1.6 Äq.) in einem Spritzenreaktor zusammen mit Kupfer(I)iodid (1.9 mg, 10.0 μmol, 4.0 Äq.)

Experimenteller Teil

und Natriumascorbat (2.0 mg, 10.0 μmol , 4.0 Äq.) eingewogen und mit dem vollgeschützten Alkin **10b** (2.5 μmol , 1.0 Äq.) gelöst in *abs.* Dimethylformamid (1.0 mL) für 2 d bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Lösung wurde verworfen und das Harz, von **AV14** abweichend, mit Dimethylformamid (3 \times), Diethylether (3 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Thioesterifizierung an der Festphase erfolgte analog **AV13** mit Diisopropylethylamin, durch zweimalige Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (7.1 μL , 60.0 μmol , 24.0 Äq.), HOBt (10.1 mg, 75.0 μmol , 30.0 Äq), DIPEA (16.1 μL , 94.0 μmol , 37.5 Äq.) und DIC (11.6 μL , 75.0 μmol , 30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, v/v) für 1 h und 21 h bei Raumtemperatur. Das so behandelte Harz wurde mit Dichlormethan (5 \times), Dimethylformamid (5 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend das funktionalisierte Peptid nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (1.0 mL, 90:5:5, v/v/v) von der Festphase freigesetzt. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung des erhaltenen Rohpeptids wurde nach Kapitel 5.1 und Methode B (50 °C) durchgeführt und das so erhaltene, gewünschte Click-Konjugat **18ab** mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS auf dessen Identität und Reinheit überprüft.

Summenformel: $\text{C}_{154}\text{H}_{227}\text{N}_{39}\text{O}_{48}\text{S}_2$ (3456.8550 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3454.5962 Da).

HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 24.1$ min (**18ab**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **18ab** ber. für $\text{C}_{154}\text{H}_{227}\text{N}_{37}\text{O}_{48}\text{S}_2\text{K}^+$ $[\text{M}(-\text{N}_2)+\text{K}]^+$: 3467.9, gef.: 3466.6; ber. für $\text{C}_{154}\text{H}_{227}\text{N}_{39}\text{O}_{48}\text{S}_2\text{K}^+$ $[\text{M}+\text{K}]^+$: 3496.0, gef.: 3495.4.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGFG-SBn (**18ae**)

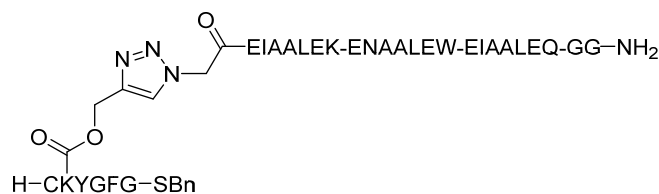


Tabelle 14 – Eintrag 3. Die CuAAC-Reaktion wurde nach **AV14** an der Festphase durchgeführt. Die entsprechende Menge an vollgeschützter Alkynylpeptidsäure **10e** wurde mittels **AV4** bestimmt und vor der Reaktion in einem Reagiergefäß aliquotiert und gefriergetrocknet. Ausgehend von der Beladungsdichte des Herstellers (0.54 mmol/g) des

Experimenteller Teil

H-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz wurde das Polymer-gebundene Azid **1a** (4.0 μmol , 1.6 $\text{\AA}q.$) in einem Spritzenreaktor zusammen mit Kupfer(I)iodid (1.9 mg, 10.0 μmol , 4.0 $\text{\AA}q.$) und Natriumascorbat (2.0 mg, 10.0 μmol , 4.0 $\text{\AA}q.$) eingewogen und mit dem vollgeschützten Alkin **10e** (2.5 μmol , 1.0 $\text{\AA}q.$) gelöst in *abs.* Dimethylformamid (1.0 mL) für 2 d bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Lösung wurde verworfen und das Harz, von **AV14** abweichend, mit Dimethylformamid (3 \times), Diethylether (3 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Thioesterifizierung an der Festphase erfolgte analog **AV13**, mit Diisopropylethylamin, durch zweimalige Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (7.1 μL , 60.0 μmol , 24.0 $\text{\AA}q.$), HOBt (10.1 mg, 75.0 μmol , 30.0 $\text{\AA}q.$), DIPEA (16.1 μL , 94.0 μmol , 37.5 $\text{\AA}q.$) und DIC (11.6 μL , 75.0 μmol , 30.0 $\text{\AA}q.$) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, *v/v*) für 1 h und 21 h bei Raumtemperatur. Das so behandelte Harz wurde mit Dichlormethan (5 \times), Dimethylformamid (5 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend das funktionalisierte Peptid nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (1.0 mL, 90:5:5, *v/v/v*) von der Festphase freigesetzt. Das so erhaltene Rohpeptid wurde vollständig mittels semipräparativer HPLC (Methode B, 50 °C) aufgereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{152}\text{H}_{224}\text{N}_{38}\text{O}_{47}\text{S}_2$ (3399.8030 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3397.5747 Da).

HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 25.0$ min (**18ae**).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): **18ae** ber. für $\text{C}_{152}\text{H}_{225}\text{N}_{38}\text{O}_{47}\text{S}_2^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 3400.8, gef.: 3404.3.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(N_ϵ -(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGF-SBn (**18af**)

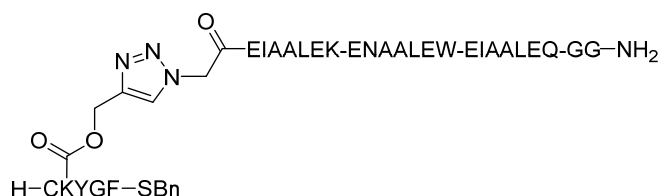


Tabelle 14 – Eintrag 4. Die CuAAC-Reaktion wurde nach **AV14** an der Festphase durchgeführt. Die entsprechende Menge an vollgeschützter Alkylpeptidsäure **10f** wurde mittels **AV4** bestimmt und vor der Reaktion in einem Reagiergefäß aliquotiert und gefriergetrocknet. Ausgehend von der Beladungsdichte des Herstellers (0.54 mmol/g) des

H-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz wurde das Polymer-gebundene Azid **1a** (4.0 μmol , 1.6 Äq.) in einem Spritzenreaktor zusammen mit Kupfer(I)iodid (1.9 mg, 10.0 μmol , 4.0 Äq.) und Natriumascorbat (2.0 mg, 10.0 μmol , 4.0 Äq.) eingewogen und mit dem vollgeschützten Alkin **10f** (2.5 μmol , 1.0 Äq.) gelöst in *abs.* Dimethylformamid (1.0 mL) für 2 d bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Lösung wurde verworfen und das Harz, von **AV14** abweichend, mit Dimethylformamid (3 \times), Diethylether (3 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Thioesterifizierung an der Festphase erfolgte analog **AV13**, mit Diisopropylethylamin, durch zweimalige Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (7.1 μL , 60.0 μmol , 24.0 Äq.), HOBt (10.1 mg, 75.0 μmol , 30.0 Äq), DIPEA (16.1 μL , 94.0 μmol , 37.5 Äq.) und DIC (11.6 μL , 75.0 μmol , 30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, *v/v*) für 1 h und 21 h bei Raumtemperatur. Das so behandelte Harz wurde mit Dichlormethan (5 \times), Dimethylformamid (5 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend das funktionalisierte Peptid nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (1.0 mL, 90:5:5, *v/v/v*) von der Festphase freigesetzt. Das so erhaltene Rohpeptid wurde vollständig mittels semipräparativer HPLC (Methode B, 50 °C) aufgereinigt.

Summenformel: C₁₅₀H₂₂₁N₃₇O₄₆S₂ (3342.7510 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3340.5533 Da).

HPLC (Methode B): $t_{\text{R}} = 26.0$ min (**18af**).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): **18af** ber. für C₁₅₀H₂₂₂N₃₇O₄₆S₂⁺ [M+H]⁺: 3343.8, gef.: 3348.4.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(*N*_ε-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YG-SBn (**18ag**)

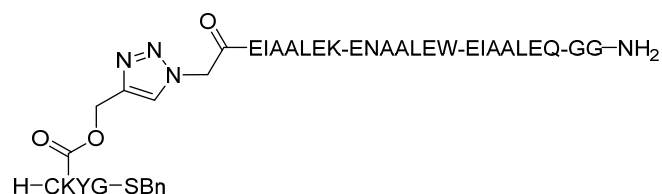


Tabelle 14 – Eintrag 5. Die CuAAC-Reaktion wurde nach **AV14** an der Festphase durchgeführt. Die entsprechende Menge an vollgeschützter Alkynylpeptidsäure **10g** wurde mittels **AV4** bestimmt und vor der Reaktion in einem Reagiergefäß aliquotiert und gefriergetrocknet. Ausgehend von der Beladungsdichte des Herstellers (0.54 mmol/g) des *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz wurde das Polymer-gebundene Azid **1a** (4.0 μmol ,

Experimenteller Teil

1.6 Äq.) in einem Spritzenreaktor zusammen mit Kupfer(I)iodid (1.9 mg, 10.0 μmol , 4.0 Äq.) und Natriumascorbat (2.0 mg, 10.0 μmol , 4.0 Äq.) eingewogen und mit dem vollgeschützten Alkin **10g** (2.5 μmol , 1.0 Äq.) gelöst in *abs.* Dimethylformamid (1.0 mL) für 2 d bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Lösung wurde verworfen und das Harz, von **AV14** abweichend, mit Dimethylformamid (3 \times), Diethylether (3 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Thioesterifizierung an der Festphase erfolgte analog **AV13**, mit Diisopropylethylamin, durch zweimalige Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (7.1 μL , 60.0 μmol , 24.0 Äq.), HOBt (10.1 mg, 75.0 μmol , 30.0 Äq), DIPEA (16.1 μL , 94.0 μmol , 37.5 Äq.) und DIC (11.6 μL , 75.0 μmol , 30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, v/v) für 1 h und 21 h bei Raumtemperatur. Das so behandelte Harz wurde mit Dichlormethan (5 \times), Dimethylformamid (5 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend das funktionalisierte Peptid nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (1.0 mL, 90:5:5, v/v/v) von der Festphase freigesetzt. Das so erhaltene Rohpeptid wurde vollständig mittels semipräparativer HPLC (Methode B, 50 °C) aufgereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{141}\text{H}_{212}\text{N}_{36}\text{O}_{45}\text{S}_2$ (3195.5740 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3193.4849 Da).

HPLC (Methode B): $t_{\text{R}} = 23.1$ min (**18ag**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **18ag** ber. für $\text{C}_{141}\text{H}_{213}\text{N}_{36}\text{O}_{45}\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 3196.6, gef.: 3200.1; ber. für $\text{C}_{141}\text{H}_{212}\text{N}_{36}\text{O}_{45}\text{S}_2\text{K}^+$ $[\text{M}+\text{K}]^+$: 3234.7, gef.: 3232.3.

Synthese von Click-Konjugat H-K(N_{ϵ} -(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)-SBn (**18bt**)

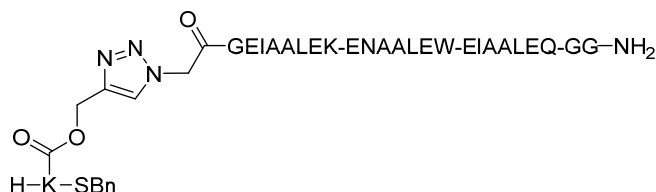
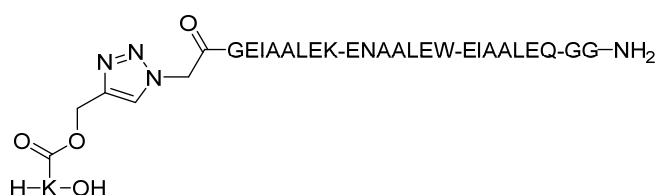


Tabelle 14 – Eintrag 6. Die CuAAC-Reaktion wurde nach **AV14** an der Festphase durchgeführt. Ausgehend von der Beladungsdichte des Herstellers (0.54 mmol/g) des *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz wurde das Polymer-gebundene Azid **1b** (4.0 μmol , 1.0 Äq.) in einem Spritzenreaktor zusammen mit Kupfer(I)iodid (1.9 mg, 10.0 μmol , 2.5 Äq.) und Natriumascorbat (2.0 mg, 10.0 μmol , 2.5 Äq.) eingewogen und mit N_{α} -Boc- N_{ϵ} -Proc-L-Lysin

Experimenteller Teil

(**6**, 4.0 μmol , 1.0 Äq.) gelöst in *abs.* Dimethylformamid (1.0 mL) für 23 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach 9 h und 23 h wurden etwa 1 mg des Harzes entnommen, mit Dimethylformamid (3 \times), Versene-Lösung (3 \times), Dimethylformamid (3 \times), Diethylether (3 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen und mittels einer sauren Testabspaltung (0.5 mL Trifluoressigsäure/Trisopropylsilan/Wasser, 90:5:5, *v/v/v*) analog **AV7** von der Festphase freigesetzt. Mit Hilfe analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS wurde die Qualität des so dargestellten Click-Konjugats (freie Peptidsäure) überprüft. Die Lösung wurde verworfen und das Harz mit Dimethylformamid (5 \times), Versene-Lösung (10 \times), Dimethylformamid (5 \times), Diethylether (5 \times) und Dichlormethan (10 \times) gewaschen.



Summenformel: $\text{C}_{122}\text{H}_{192}\text{N}_{34}\text{O}_{43}$ (2823.0730 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 2821.3883).

HPLC (Rohprodukt, Methode B, 50 °C): $t_{\text{R}} = 17.5$ min (**19bt**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **19bt** ber. für $\text{C}_{122}\text{H}_{193}\text{N}_{34}\text{O}_{43}^{+}$ $[\text{M}+\text{H}]^{+}$: 2824.1, gef.: 2825.0; $\text{C}_{122}\text{H}_{192}\text{N}_{34}\text{O}_{43}\text{Na}^{+}$ $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$: 2846.1, gef.: 2847.1, $\text{C}_{122}\text{H}_{192}\text{N}_{34}\text{O}_{43}\text{K}^{+}$ $[\text{M}+\text{K}]^{+}$: 2862.2, gef.: 2863.1.

Die Thioesterifizierung an der Festphase erfolgte analog **AV13** mit Diisopropylethylamin, durch zweimalige Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (7.1 μL , 60.0 μmol , 24.0 Äq.), HOBt (10.1 mg, 75.0 μmol , 30.0 Äq), DIPEA (16.1 μL , 94.0 μmol , 37.5 Äq.) und DIC (11.6 μL , 75.0 μmol , 30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, *v/v*) für 1 h und 12 h bei Raumtemperatur. Das so behandelte Harz wurde mit Dichlormethan (5 \times), Dimethylformamid (5 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend 1 mg des Harzes nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Trisopropylsilan/Wasser (1.0 mL, 90:5:5, *v/v/v*) behandelt und das funktionalisierte Peptid von der Festphase freigesetzt. Mit Hilfe analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS wurde die Qualität des so dargestellten Click-Konjugats überprüft. Das Produkt wurde nicht semipräparativ isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{129}\text{H}_{198}\text{N}_{34}\text{O}_{42}\text{S}$ (2929.2590 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 2927.4124).

HPLC (Rohprodukt, Methode B, 50 °C): $t_{\text{R}} = 21.4$ min (**18bt**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **18bt** ber. für $\text{C}_{129}\text{H}_{199}\text{N}_{34}\text{O}_{42}\text{S}^{+}$ $[\text{M}+\text{H}]^{+}$: 2930.3, gef.: 2931.1, ber. für $\text{C}_{131}\text{H}_{202}\text{N}_{35}\text{O}_{42}\text{S}^{+}$ $[\text{M}+\text{ACN}+\text{H}]^{+}$: 2971.3, gef.: 2969.1.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGFGG-SBn (18bb)

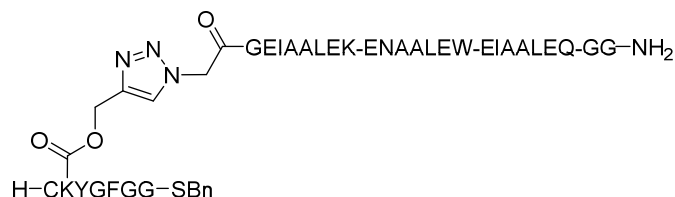
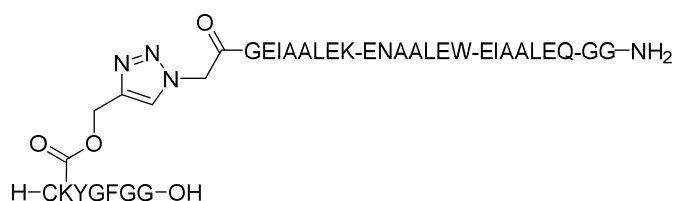


Tabelle 14 – Eintrag 7. Die CuAAC-Reaktion wurde nach **AV14** an der Festphase durchgeführt. Die entsprechende Menge an vollgeschützter Alkynylpeptidsäure **10b** wurde mittels **AV4** bestimmt und vor der Reaktion in einem Reagiergefäß aliquotiert und gefriergetrocknet. Ausgehend von der Beladungsdichte des Herstellers (0.54 mmol/g) des *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz wurde das Polymer-gebundene Azid **1b** (2.0 μmol, 2.0 Äq.) in einem Spritzenreaktor zusammen mit Kupfer(I)iodid (1.9 mg, 10.0 μmol, 10.0 Äq.) und Natriumascorbat (2.0 mg, 10.0 μmol, 10.0 Äq.) eingewogen und mit dem vollgeschützten Alkin **10b** (1.0 μmol, 1.0 Äq.) gelöst in *abs.* Dimethylformamid (1.0 mL) für 5 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Lösung wurde verworfen und das Harz mit Dimethylformamid (5×), Versene-Lösung (10×), Dimethylformamid (5×), Diethylether (5×) und Dichlormethan (10×) gewaschen und am Vakuum getrocknet. Mittels einer sauren Testabspaltung von 1 mg des so dargestellten Harzes (0.5 mL Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser, 90:5:5, *v/v/v*) wurde das Peptid analog **AV7** von der Festphase freigesetzt und mit Hilfe analytischer HPLC die Qualität des so dargestellten Click-Konjugats überprüft.



Summenformel: C₁₄₉H₂₂₄N₄₀O₅₀S (3407.7210 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3405.5936).

HPLC (Rohprodukt, Methode B, 50 °C): *t_R* = 19.2 min (**19bb**).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): **19bb** ber. für C₁₄₉H₂₂₅N₄₀O₅₀S⁺ [M+H]⁺: 3408.7, gef.: 3411.1.

Die Thioesterifizierung an der Festphase erfolgte analog **AV13** auf zwei Wegen. Die Harzmenge wurde geteilt und nach **AV13** mit (*Ansatz 2*) und ohne Diisopropylethylamin (*Ansatz 1*) durchgeführt:

Experimenteller Teil

Ansatz 1: Das Harz wurde zweimal mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (2.8 μL , 24.0 μmol , 24.0 Äq.), HOBt (4.1 mg, 30.0 μmol , 30.0 Äq) und DIC (4.6 μL , 30.0 μmol , 30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, *v/v*) für 1 h und 21 h bei Raumtemperatur behandelt.

Ansatz 2: Das Harz wurde zweimal mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (2.8 μL , 24.0 μmol , 24.0 Äq.), HOBt (4.1 mg, 30.0 μmol , 30.0 Äq), DIPEA (6.4 μL , 37.5 μmol , 37.5 Äq.) und DIC (4.6 μL , 30.0 μmol , 30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, *v/v*) für 1 h und 21 h bei Raumtemperatur behandelt.

Die Harze aus *Ansatz 1 und 2* wurden jeweils mit Dichlormethan (5 \times), Dimethylformamid (5 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Trisopropylsilan/Wasser (1.0 mL, 90:5:5, *v/v/v*) behandelt. Die so erhaltenen Rohpeptide wurden mittels analytischer HPLC untersucht und anschließend vollständig mittels semipräparativer HPLC (Methode B, 50 °C) aufgereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{156}\text{H}_{230}\text{N}_{40}\text{O}_{49}\text{S}_2$ (3513.9070 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3511.6177).

HPLC (Methode B, 50 °C): $t_{\text{R}} = 18.3$ min (**18bb**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **18bb** ber. für $\text{C}_{156}\text{H}_{231}\text{N}_{40}\text{O}_{49}\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 3514.9, gef.: 3516.3.

Synthese von *Click-Konjugat H-CK(N_ε-(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGF-SBn (18bf)*

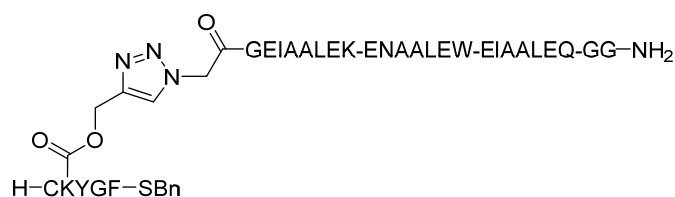


Tabelle 14 – Eintrag 8. Die CuAAC-Reaktion wurde nach **AV14** an der Festphase durchgeführt. Die entsprechende Menge an vollgeschützter Alkynylpeptidsäure **10f** wurde mittels **AV4** bestimmt und vor der Reaktion in einem Reagiergefäß aliquotiert und gefriergetrocknet. Das mit dem Azid **1b** (1.0 μmol , 1.0 Äq.) funktionalisierte *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz (Beladungsdichte 56.8 $\mu\text{mol/g}$) wurde in einem Spritzenreaktor zusammen mit Kupfer(I)iodid (0.7 mg, 3.7 μmol , 3.7 Äq.) und Natriumascorbat (1.3 mg, 6.5 μmol , 6.5 Äq.) eingewogen und mit dem vollgeschützten Alkin **10f** (1.0 μmol , 1.0 Äq.) gelöst in *abs.* Dimethylformamid (0.5 mL) für 26 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die

Experimenteller Teil

Lösung wurde verworfen und das Harz mit Dimethylformamid (5×), Versene-Lösung (10×), Dimethylformamid (5×), Diethylether (5×) und Dichlormethan (10×) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Thioesterifizierung an der Festphase erfolgte analog **AV13** durch zweimalige Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (2.8 μL , 24.0 μmol , 24.0 Äq.), HOBt (4.1 mg, 30.0 μmol , 30.0 Äq.), DIC (4.6 μL , 30.0 μmol , 30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, *v/v*) für 1 h und 18 h bei Raumtemperatur. Das so behandelte Harz wurde mit Dichlormethan (5×), Dimethylformamid (5×) und Dichlormethan (5×) gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend 1 mg des Harzes nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Trisopropylsilan/Wasser (1.0 mL, 90:5:5, *v/v/v*) behandelt und von der Festphase freigesetzt. Das so erhaltene Rohpeptid wurde vollständig mittels semipräparativer HPLC (Methode B, 50 °C) aufgereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{152}\text{H}_{224}\text{N}_{38}\text{O}_{47}\text{S}_2$ (3399.8030 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3397.5747 Da).

HPLC (Methode B, 50 °C): $t_{\text{R}} = 22.6$ min (**18bf**).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): **18bf** ber. für $\text{C}_{152}\text{H}_{225}\text{N}_{38}\text{O}_{47}\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 3400.8, gef.: 3400.4, ber. für $\text{C}_{152}\text{H}_{224}\text{N}_{38}\text{O}_{47}\text{S}_2\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 3422.8, gef.: 3422.2; ber. für $\text{C}_{152}\text{H}_{224}\text{N}_{38}\text{O}_{47}\text{S}_2\text{K}^+$ $[\text{M}+\text{K}]^+$: 3438.9, gef.: 3438.2.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(N_{ϵ} -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YG-SBn (**18bg**)

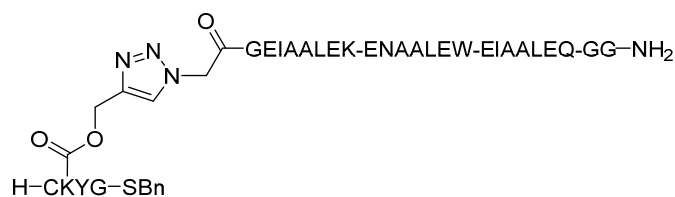


Tabelle 14 – Eintrag 9. Die CuAAC-Reaktion wurde nach **AV14** an der Festphase durchgeführt. Die entsprechende Menge an vollgeschützter Alkynylpeptidsäure **10g** wurde mittels **AV4** bestimmt und vor der Reaktion in einem Reagiergefäß aliquotiert und gefriergetrocknet. Das mit dem Azid **1b** (1.0 μmol , 1.0 Äq.) funktionalisierte *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz (Beladungsdichte 56.8 $\mu\text{mol/g}$) wurde in einem Spritzenreaktor zusammen mit Kupfer(I)iodid (2.1 mg, 11.0 μmol , 11.0 Äq.) und Natriumascorbat (2.1 mg, 11.0 μmol , 11.0 Äq.) eingewogen und mit dem vollgeschützten Alkin **10g** (1.0 μmol , 1.0 Äq.)

Experimenteller Teil

gelöst in *abs.* Dimethylformamid (0.5 mL) für 26 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Lösung wurde verworfen und das Harz mit Dimethylformamid (5×), Versene-Lösung (10×), Dimethylformamid (5×), Diethylether (5×) und Dichlormethan (10×) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Thioesterifizierung an der Festphase erfolgte analog **AV13** durch zweimalige Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (2.8 μL , 24.0 μmol , 24.0 Äq.), HOBt (4.1 mg, 30.0 μmol , 30.0 Äq), DIC (4.6 μL , 30.0 μmol , 30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, v/v) für 1 h und 18 h bei Raumtemperatur. Das so behandelte Harz wurde mit Dichlormethan (5×), Dimethylformamid (5×) und Dichlormethan (5×) gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend 1 mg des Harzes nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (1.0 mL, 90:5:5, v/v/v) von der Festphase freigesetzt und das so erhaltene Rohpeptid mittels analytischer HPLC MALDI-TOF-MS auf die Qualität des so dargestellten Click-Konjugats hin überprüft. Das gesamte Peptid wurde nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (2.0 mL, 90:5:5, v/v/v) freigesetzt und mit Hilfe analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS wurde die Qualität des so dargestellten Click-Konjugats überprüft. Das Produkt wurde nicht semipräparativ isoliert. Es konnte allein das entsprechende 5-Iod Produkt **18bg-I** nachgewiesen werden.

Summenformel **18bg**: $\text{C}_{143}\text{H}_{215}\text{N}_{37}\text{O}_{46}\text{S}_2$ (3252.6260 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3250.5063 Da).

HPLC (Roh, Methode B, 50 °C): $t_{\text{R}} = 18.5$ min (**18bg-I**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **18bg-I** ber. für $\text{C}_{143}\text{H}_{215}\text{IN}_{37}\text{O}_{46}\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 3379.5, gef.: 3376.3; ber. für $\text{C}_{143}\text{H}_{214}\text{IN}_{37}\text{O}_{46}\text{S}_2\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 3401.5, gef.: 3399.3; ber. für $\text{C}_{143}\text{H}_{214}\text{IN}_{37}\text{O}_{46}\text{S}_2\text{K}^+$ $[\text{M}+\text{K}]^+$: 3417.6, gef.: 3414.1.

Synthese von Click-Konjugat H-CK(N_{ϵ} -(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGFG-SBn (**18be**)

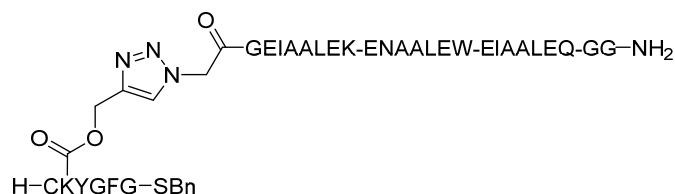


Tabelle 14 – Eintrag 10. Die CuAAC-Reaktion wurde nach **AV14** an der Festphase durchgeführt. Die entsprechende Menge an vollgeschützter Alkynylpeptidsäure **10e** wurde

Experimenteller Teil

mittels **AV4** bestimmt und vor der Reaktion in einem Reagiergefäß aliquotiert und gefriergetrocknet. Das mit dem Azid **1b** (1.0 μmol , 1.0 Äq.) funktionalisierte *H*-Rink-Amid-ChemMatrix[®] Harz (Beladungsdichte 56.8 $\mu\text{mol/g}$) wurde in einem Spritzenreaktor zusammen mit Kupfer(I)iodid (0.5 mg, 2.6 μmol , 2.6 Äq.) und Natriumascorbat (0.6 mg, 3.0 μmol , 3.0 Äq.) eingewogen und mit dem vollgeschützten Alkin **10e** (1.0 μmol , 1.0 Äq.) gelöst in *abs.* Dimethylformamid (0.5 mL) für 48 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Lösung wurde verworfen und das Harz mit Dimethylformamid (5 \times), Versene-Lösung (10 \times), Dimethylformamid (5 \times), Diethylether (5 \times) und Dichlormethan (10 \times) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

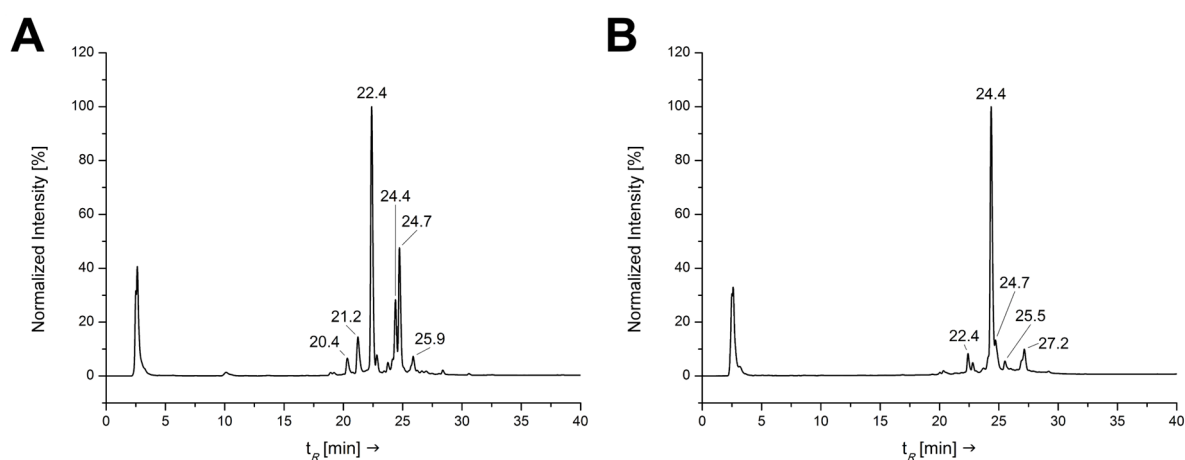
Die Thioesterifizierung an der Festphase erfolgte analog **AV13** durch zweimalige Behandlung des Harzes mit einer Lösung aus Benzylmercaptan (2.8 μL , 24.0 μmol , 24.0 Äq.), HOBt (4.1 mg, 30.0 μmol , 30.0 Äq), DIC (4.6 μL , 30.0 μmol , 30.0 Äq.) in *abs.* DCM/DMF (0.5 mL, 4:1, *v/v*) für 1 h und 18 h bei Raumtemperatur. Das so behandelte Harz wurde mit Dichlormethan (5 \times), Dimethylformamid (5 \times) und Dichlormethan (5 \times) gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend 1 mg des Harzes nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (1.0 mL, 90:5:5, *v/v/v*) von der Festphase freigesetzt und das so erhaltene Rohpeptid mittels analytischer HPLC MALDI-TOF-MS auf die Qualität des so dargestellten Click-Konjugats hin überprüft. Es wurde kein Umsatz festgestellt. Das gesamte Peptid wurde nach **AV7** mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (2.0 mL, 90:5:5, *v/v/v*) freigesetzt und mit Hilfe analytischer HPLC und MALDI-TOF-MS (Methode B, 50 °C) untersucht. Es konnte keinerlei Umsatz festgestellt werden und das Azid **1b** wurde zurückgewonnen.

Summenformel: C₁₅₄H₂₂₇N₃₉O₄₈S₂ (3456.8550 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3454.5962 Da).

5.3.9 Optimierung der CuAAC-Reaktion von *N*-Cysteinylpeptiden mit Deuterierungsexperiment zum Ursprung der Formylquelle

Optimierung der Synthese von *Click*-Konjugat H-CK(*N*_ε-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (**18bb**)

Gemäß **AV16** wurden **1b** mit **9b** mit einem CuSO₄/THPTA-Verhältnis von 1:5 (6.7 mM/33.5 mM) in **A** und einem CuSO₄/THPTA-Verhältnis von 2:1 (6.7 mM/3.4 mM) in **B** umgesetzt. Die Reaktionen wurden nach 2 h Reaktionszeit beendet und mittels analytischer HPLC verfolgt. Die Zuordnung der erhaltenen Produkte erfolgte mittels MALDI-TOF-MS und stimmten mit den bereits erhaltenen analytischen Daten aus Kapitel 5.3.7 überein.



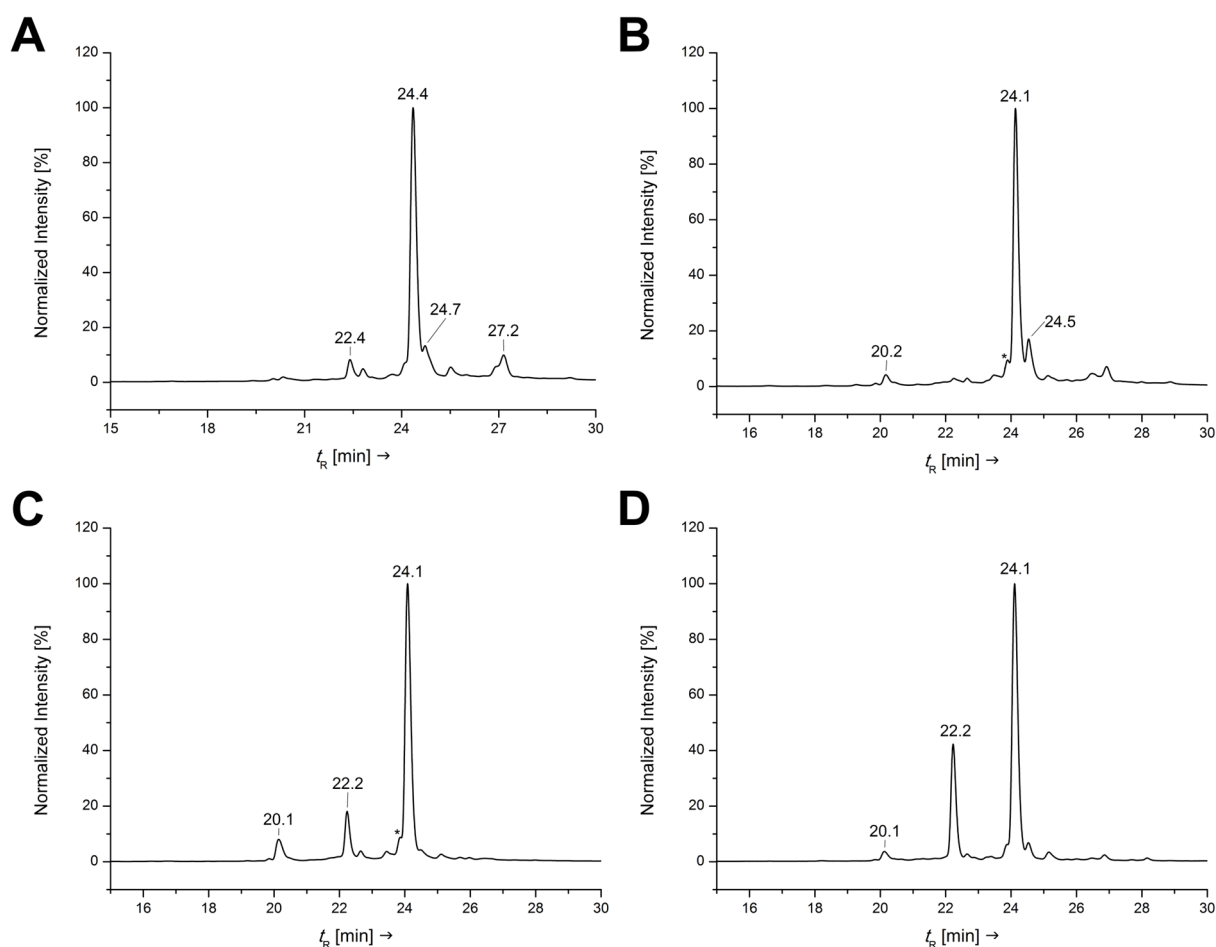
Analytische HPLC-Spuren der CuAAC-Reaktion von **9b** mit **1b** mit **A**: CuSO₄/THPTA-Verhältnis von 1:5 und **B**: CuSO₄/THPTA-Verhältnis von 2:1 unter ansonsten identischen Bedingungen nach **AV16** (verfolgt bei 280 nm nach 2 h).

A: HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 20.4$ min (**9b**), $t_R = 21.2$ min (**9c**), $t_R = 22.4$ min (**1b**, 57%), $t_R = 24.4$ min (**18bb**, 13%), $t_R = 24.7$ min (**18bc**, 22%) und $t_R = 25.9$ min (**18bc** Aggregat).

B: HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 22.4$ min (**1b**, 5%), $t_R = 24.4$ min (**18bb**, 74%), $t_R = 24.7$ min (**18bc**, 9%), $t_R = 25.5$ min (**18bc** Aggregat)), $t_R = 27.2$ min (**18bb** Aggregat mit Spuren an Disulfid).

Vergleich zwischen *N*-Cysteinylpeptidthioester **9b** mit *N*-Thiazolidinylpeptidthioester **9c** unter den optimierten Bedingungen

Gemäß AV16 wurden **1b** mit **9b** in **A** bzw. **9c** in **B** mit einem CuSO₄/THPTA-Verhältnis von 2:1 (6.7 mM/3.4 mM) umgesetzt. Des Weiteren wurden **1b** mit **9b** in **C** bzw. **9c** in **D** mit CuSO₄ (6.7 mM) ohne THPTA umgesetzt. Die Reaktionen wurden mittels analytischer HPLC (50 °C) nach 2 h verfolgt. Die Zuordnung der erhaltenen Produkte erfolgte mittels MALDI-TOF-MS und stimmten mit den bereits erhaltenen analytischen Daten aus Kapitel 5.3.7 überein.



Analytische HPLC-Spuren (Gradient B, 50 °C) der CuAAC-Reaktion von **9b** bzw. **9c** mit **1b**. **A** und **B**: CuSO₄/THPTA-Verhältnis von 2:1 und **C** und **D**: CuSO₄/THPTA-Verhältnis von 1:0 unter ansonsten identischen Bedingungen nach AV16 (verfolgt bei 280 nm nach 2 h).

A: HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 22.4$ min (**1b**, 5%), $t_R = 24.4$ min (**18bb**, 74%), $t_R = 24.7$ min (**18bc**, 9%), $t_R = 25.5$ min (**18bc** Aggregat), $t_R = 27.2$ min (**18bb** Aggregat mit Spuren an Disulfid).

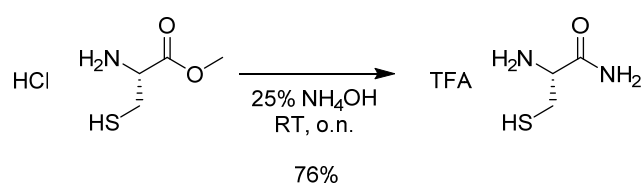
Experimenteller Teil

B: HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 20.2$ min (**9b**), $t_R = 24.1$ min (**18bb**), $t_R = 24.5$ min (**18bc**).

C: HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 20.1$ min (**9b**), $t_R = 22.2$ min (**1b**), $t_R = 24.1$ min (**18bb**).

D: HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 20.1$ min (**9b**), $t_R = 22.2$ min (**1b**), $t_R = 24.1$ min (**18bb**).

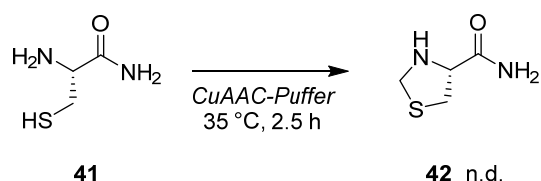
Synthese von L-Cysteamid (**41**)



L-Cysteinmethylester Hydrochlorid (1.00 g, 5.83 mmol) wurde in 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung (6 mL) gelöst und unter Schutzgasatmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde über eine Etherbrücke im Vakuum entfernt und der erhaltene farblose Feststoff in Acetonitril/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) aufgenommen und gefriergetrocknet. Auf diese Weise wurden 1.03 g (4.40 mmol) des gewünschten Produkts **41** in Form eines farblosen Feststoffs in 76% Ausbeute erhalten. Die NMR-Daten stimmten mit der Literatur überein.^[219]

HR-MS (ESI) (m/z): ber. für $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}_2\text{OS}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 121.0430, gef.: 121.0431; ber. für $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}_2\text{OSNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 143.0250, gef.: 143.0246.

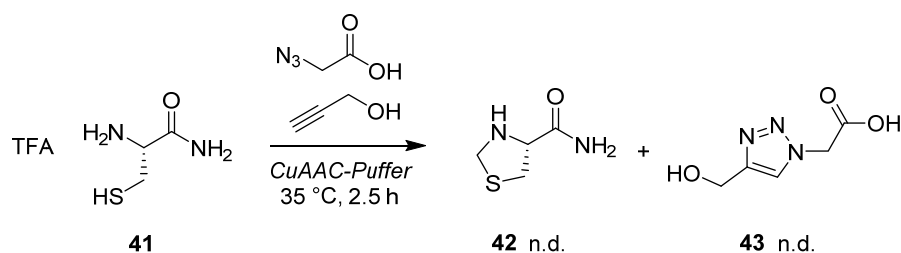
Formaldehyd-Nachweis mit Cysteamid unter CuAAC-Bedingungen



A) L-Cysteamid (**41**, 10 mg, 42.7 μmol) wurde gemäß **AV16** in 100 μL *CuAAC-Puffer* (CuSO_4 (6.7 mM), THPTA (13.4 mM), NaAsc (10 mM), 70 μL *tert*-Butanol, 10 μL PBS (10 \times)) für 2.5 h bei 35 °C behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 400 μL Acetonitril/Wasser (1:1, v/v, + 0.1% TFA) versetzt, gefriergetrocknet und mittels ESI (HR-

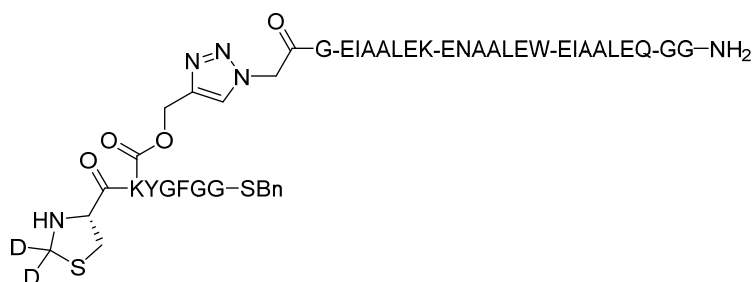
Experimenteller Teil

MS) untersucht. Es konnte keine Bildung von L-Thiazolidin-4-carbonsäureamid (**42**) nachgewiesen werden.



B) L-Cysteamid (**41**, 10 mg, 42.7 μmol) wurde gemäß **AV16** in 100 μL *CuAAC-Puffer* (CuSO_4 (6.7 mM), THPTA (13.4 mM), NaAsc (10 mM), 70 μL *tert*-Butanol, 10 μL PBS (10 \times)) zusammen mit Azidoglycin (**45**, 100 nmol) und Propargylalkohol (120 nmol) für 2.5 h bei 35 °C behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 400 μL Acetonitril/Wasser (1:1, v/v, + 0.1% TFA) versetzt, gefriergetrocknet und mittels ESI (HR-MS) untersucht. Es konnte weder die Bildung von L-Thiazolidin-4-carbonsäureamid (**42**) noch von 2-(4-(Hydroxymethyl)-1H-[1,2,3]-triazol-1-yl)essigsäure (**43**) nachgewiesen werden.

Synthese von Click-Konjugat H-Thz(d_2)K(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (**18bc- d_2**)



Das Deuterierungsexperiment wurde gemäß **AV16** in *tert*-Butanol- d_{10} /PBS in der Umsetzung von **1b** mit **9b** durchgeführt. Nach 2 h wurde ein Aliquot (10 μL) mittels analytischer HPLC untersucht und das Reaktionsgemisch mit entgastem Wasser (+ 0.1% TFA) verdünnt und direkt gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde über semipräparative HPLC aufgereinigt und die isolierten Produkte nach Gefrier Trocknung separat in Wasser/Acetonitril (4:1, v/v, + 0.1% TFA) gelöst und für 1 h gerührt. Die so behandelten Produkte wurden gefriergetrocknet und erneut für 1 h in entgastem Wasser/Acetonitril (4:1, v/v, + 0.1% TFA) für 1 h gerührt und

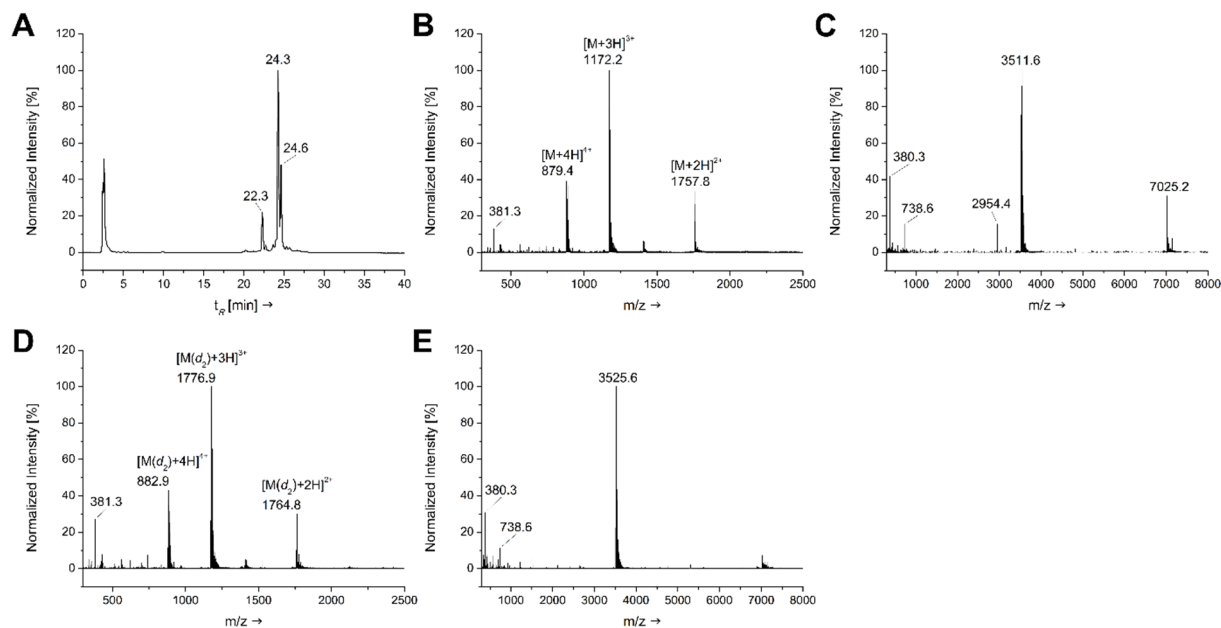
Experimenteller Teil

abschließend gefriergetrocknet. Die so erhaltenen Produkte **18bb** und **18bc-d₂** wurden mittels ESI (HR-MS) charakterisiert.

Summenformeln:

18bb: C₁₅₆H₂₃₀N₄₀O₄₉S₂ (3513.9070 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3511.6177 Da).

18bc-d₂: C₁₅₇H₂₂₈D₂N₄₀O₄₉S₂ (3527.9302 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3525.6302 Da).



A: HPLC Methode B (analytisch, 50 °C) nach 2 h bei 280 nm (t_R = 22.3 min (**1b**, 13%), t_R = 24.3 min (**18bb**, 53%), t_R = 24.6 min (**18bc-d₂**, 27%)).

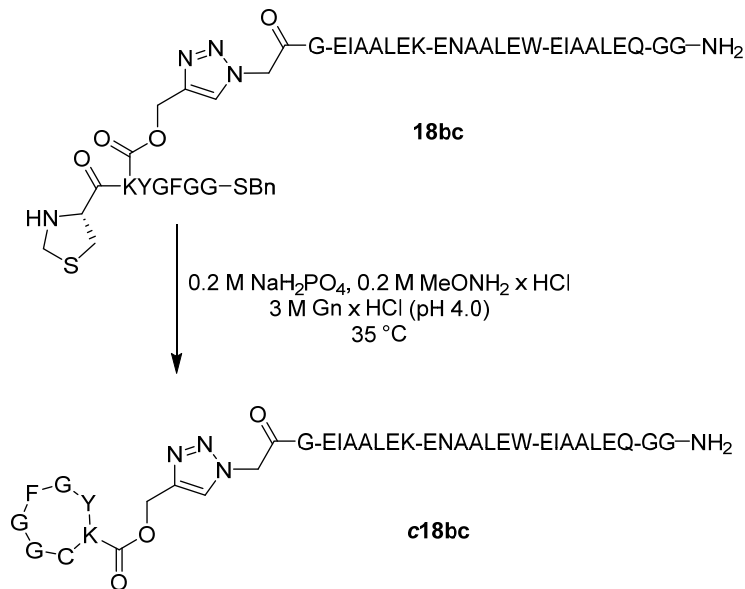
B: HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von isoliertem **18bb** ber. für $[M+H+Na]^{2+}$: 1767.8072, gef.: 1767.8072; ber. für $[M+2H]^{2+}$: 1756.8161, gef.: 1756.8157; ber. für $[M+2H+Na]^{3+}$: 1178.8738, gef.: 1178.8751; ber. für $[M+3H]^{3+}$: 1171.5465, gef.: 1171.5464; ber. für $[M+3H+Na]^{4+}$: 884.4072, gef.: 884.4073; ber. für $[M+4H]^{4+}$: 878.9117, gef.: 878.9112 und

C: dekonvoliertes Spektrum von **18bb** calc. $[M]$: 3511.6, gef.: 3511.6; ber. für $[M(Na)]$: 3533.6, gef.: 3533.6; ber. für $[M(K)]$: 3549.6, gef.: 3549.6.

D: HR-MS (ESI) Rohspektrum (m/z) von **18bc-d₂** ber. für $[M(d_2)+H+Na]^{2+}$: 1774.8134, gef.: 1774.8119; ber. für $[M(d_2)+2H]^{2+}$: 1763.8224, gef.: 1763.8210; ber. für $[M(d_2)+2H+Na]^{3+}$: 1183.5447, gef.: 1183.5464; ber. für $[M(d_2)+3H]^{3+}$: 1176.2174, gef.: 1176.2173; ber. für $[M(d_2)+3H+Na]^{4+}$: 887.9103, gef.: 887.9103; ber. für $[M(d_2)+4H]^{4+}$: 882.4148, gef.: 882.4147 und

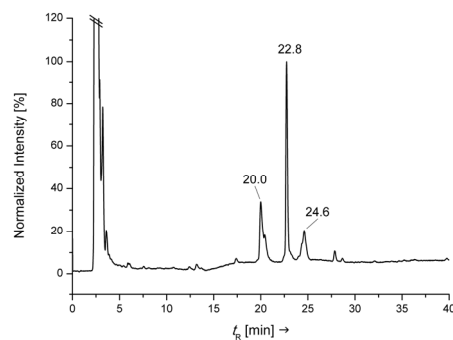
E: dekonvoliertes Spektrum von **18bc-d₂** ber. für $[M(d_2)]$: 3525.6, gef.: 3525.6; ber. für $[M(Na)]$: 3547.6, gef.: 3547.6; ber. für $[M(K)]$: 3563.6, gef.: 3563.6.

Umsetzung von Click-Konjugat H-ThzK(*N*_ε-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)-methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (**18bc**)



In einer Testumsetzung zur Spaltung des Thiazolidin-Rings wurde **18bc** (unbekannte Menge) nach HIRANO *et al.* mit *O*-Methylhydroxylamin Hydrochlorid umgesetzt.^[220] Dazu wurde **18bc** mit dem folgenden frisch hergestellten Puffer (210 μ L) bei 35 °C für 21 h umgesetzt: 0.2 M NaH₂PO₄/0.2 M MeONH₂·HCl/3 M Gn·HCl (pH 4.0). Nach 0 min und 6 h wurden 70 μ L Aliquote entnommen und mittels analytischer HPLC (Methode B bei 50 °C) vermessen. Die Peaks wurden gesammelt und mittels ESI- und MALDI-TOF-MS untersucht. Als Hauptprodukt wurde das Zyklisierungsprodukt **c18bb** erhalten. Als Nebenprodukt wurde die hydrolysierte *N*-Cysteinylpeptidsäure von **19bb** im Gemisch mit nicht umgesetzten Edukt **18bc** erhalten.

Summenformel: C₁₄₉H₂₂₂N₄₀O₄₉S (3389.7060 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3387.5830 Da).



HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 20.0$ min (unbekannte Nebenprodukte; vermutlich *O*-Methylhydroxylamin basierte Thioesterhydrolyse), $t_R = 22.8$ min (**c18bb**), $t_R = 24.6$ min (**19bb**).

HR-MS (ESI) (m/z): **c18bb** ($t_R = 22.8$ min) ber. für $C_{149}H_{222}N_{40}O_{49}SNa_2^{2+}$ $[M+2Na]^{2+}$: 1716.7807, gef.: 1716.7826; ber. für $C_{149}H_{224}N_{40}O_{49}S^{3+}$ $[M+2H]^{2+}$: 1694.7988, gef.: 1694.8000; ber. für $C_{149}H_{222}N_{40}O_{49}SNa_3^{3+}$ $[M+3Na]^{3+}$: 1152.1836, gef.: 1152.1840; ber. für $C_{149}H_{225}N_{40}O_{49}S^{3+}$ $[M+3H]^{3+}$: 1130.2016, gef.: 1130.2033.

18bc ($t_R = 24.6$ min) ber. für $C_{157}H_{233}N_{40}O_{49}S_2^{3+}$ $[M+3H]^{3+}$: 1175.5465, gef.: 1175.5496; ber. für $C_{157}H_{234}N_{40}O_{49}S_2^{4+}$ $[M+4H]^{4+}$: 881.9117, gef.: 881.9122.

5.4 HPLC-Reaktionsverfolgungen

5.4.1 CuAAC-Reaktionsverfolgung der Untersuchungen zur Substratbreite

(Tabelle 11)

Synthese der CuAAC-Konjugate der Substratbreite (*Scope*) verschiedener Peptidthioester **9**, Peptidsäuren **17**, Fluorophoren und Tags mit Azid **1b** aus Tabelle 11. Den jeweiligen Synthesen angehängt sind die analytischen HPLC-Spuren der CuAAC-Reaktionsgemische (aufgenommen bei 280 nm nach 2 h Reaktionszeit) zusammen mit den MALDI-TOF- oder ESI (HR-MS)-Massenspektren. Die gezeigten Massenspektren entsprechen den jeweiligen Hauptpeaks und den angegebenen Peptidkonjugaten **18** bzw. **19** der Reaktion zwischen **9** bzw. **17** mit Azid **1b**. In den abgebildeten Massenspektren sind die jeweiligen Massen (m/z) mit einer relativen Intensität von 100% ausgewählt und beschriftet. Des Weiteren wurden in diesen Massenspektren Massen (m/z) $\geq 10\%$ der normierten Intensitäten beschriftet. Wie in Kapitel 5.1 beschrieben erfolgte die Bestimmung der angegebenen Ausbeuten in Tabelle 11 durch die Integration der Peakflächen. Diese wurden gemäß ihres Beitrags durch zusätzliche Chromophore relativ zu dem allein Trp enthaltendem Azid **1b** bei 280 nm korrigiert ($\epsilon_{280}(\text{Tyr}) = 1480 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{280}(\text{Trp}) = 5540 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{280}(\text{Pyren}) = 3593 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Pyren-Wert übernommen aus PhotochemCADTM 3, ID: C06).^[201] Die Durchführung erfolgte analog nach **AV15** unter Standardbedingungen an Luft oder nach **AV16** unter Schutzgasbedingungen.

Synthese von *Click-Konjugat H-AK(N_ε-(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGFGG-SBn (18ba)*

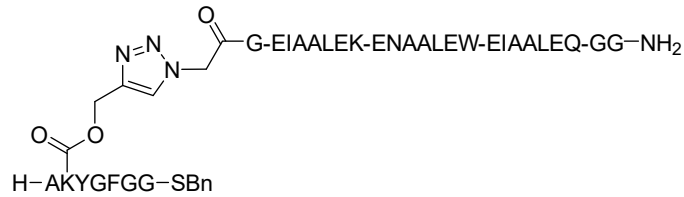
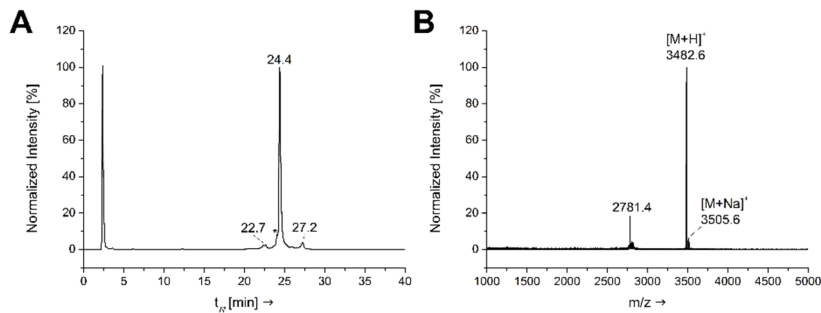


Tabelle 11 – **Eintrag 1**. Die Reaktion wurde gemäß **AV15** mit **1b** und **9a** durchgeführt.

Summenformel: C₁₅₆H₂₃₀N₄₀O₄₉S (3481.8470 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3479.6456 Da).



A: HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 22.7$ min (**9a/18ba** Aggregate), t_R^* (**9a/18ba** Aggregat), $t_R = 24.4$ min (**18ba**), $t_R = 27.2$ min (**18ba** Aggregat).

B: MALDI-TOF-MS (m/z) Massenspektrum von **18ba** ber. für C₁₅₆H₂₃₁N₄₀O₄₉S⁺ [M+H]⁺: 3482.9, gef. 3482.6; ber. für C₁₅₆H₂₃₀N₄₀O₄₉SN⁺ [M+Na]⁺: 3504.8, gef.: 3505.6 (2781.4 entspricht MALDI-induziertem Fragmentierungsprodukt).

Synthese von **Click-Konjugat H-CK(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGFGG-SBn (18bb)**

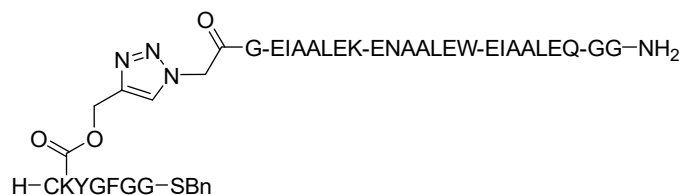
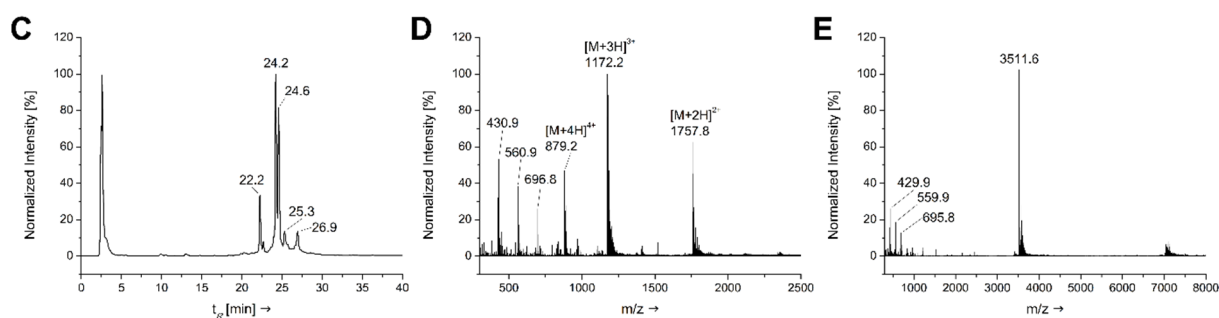


Tabelle 11 – **Eintrag 2**. Die Reaktion wurde gemäß **AV16** mit **1b** und **9b** durchgeführt.

Summenformel: C₁₅₆H₂₃₀N₄₀O₄₉S₂ (3513.9070 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3511.6177 Da).



C: HPLC (Methode B, 50 °C): $t_R = 22.2$ min (**1b**, 14%), $t_R = 24.2$ min (**18bb**, 38%), $t_R = 24.6$ min (**18bc**, 32%), $t_R = 25.3$ min (**18bb/18bc** Aggregat mit Spuren von einfacher (+O) und doppelter (+2O) Oxidation im MALDI-TOF-MS), $t_R = 26.9$ min (**18bb** Aggregat mit Spuren von Disulfid).

D: HR-MS (ESI) (*m/z*) Rohspektrum von **18bb** ber. für C₁₅₆H₂₃₂N₄₀O₄₉S₂²⁺ [M+2H]²⁺: 1756.8161, gef.: 1756.8194; ber. für C₁₅₆H₂₃₃N₄₀O₄₉S₂³⁺ [M+3H]³⁺: 1171.5465, gef.: 1171.5494; ber. für C₁₅₆H₂₃₄N₄₀O₄₉S₂⁴⁺ [M+4H]⁴⁺: 878.9117, gef.: 878.9142 (Massen bei 430.9, 560.9 und 696.8 entsprechen Natriumtrifluoroacetat-Clustern [F₃C₂O₂Na]_n).

E: Dekonvoliertes Massenspektrum von 18bb ber. für [M]: 3511.6, gef. 3511.6; ber. für [M(Na)]: 3533.6, gef.: 3533.6; ber. für [M(Na₂)]: 3555.6, gef.: 3555.6.

Synthese von Click-Konjugat H-ThzK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)-methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (**18bc**)

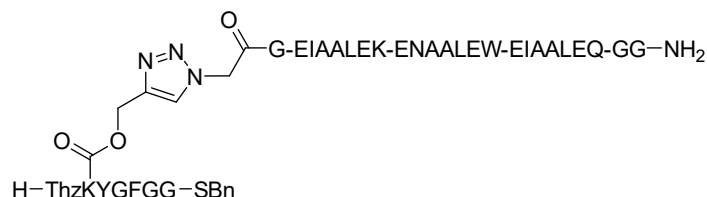
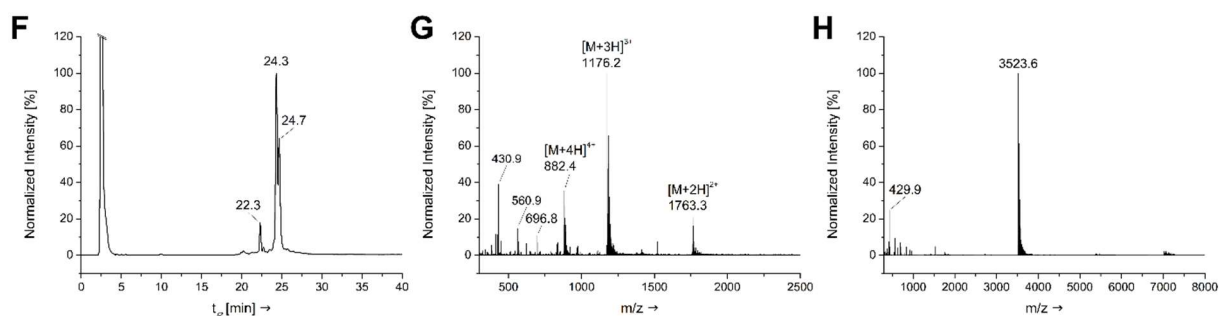


Tabelle 11 – Eintrag 3. Die Reaktion wurde gemäß AV16 mit **1b** und **9c** durchgeführt.

Summenformel: $C_{157}H_{230}N_{40}O_{49}S_2$ ($3525.9180 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3523.6177 Da).



F: HPLC (Methode B, $50 \text{ }^\circ\text{C}$): $t_R = 22.3 \text{ min}$ (**1b**, 8%), $t_R = 24.3 \text{ min}$ (**18bb**, 53%), $t_R = 24.7 \text{ min}$ (**18bc**, 37%).

G: HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von **18bc** ber. für $C_{157}H_{230}N_{40}O_{49}S_2Na_2^{2+}$ $[M+2Na]^{2+}$: 1784.7981, gef.: 1784.8004; ber. für $C_{157}H_{232}N_{40}O_{49}S_2^{2+}$ $[M+2H]^{2+}$: 1762.8161, gef.: 1762.8193; ber. für $C_{157}H_{230}N_{40}O_{49}S_2Na_3^{3+}$ $[M+3Na]^{3+}$: 1197.5284, gef.: 1197.5311; ber. für $C_{157}H_{233}N_{40}O_{49}S_2^{3+}$ $[M+3H]^{3+}$: 1175.5465, gef.: 1175.5492; ber. für $C_{157}H_{230}N_{40}O_{49}S_2Na_4^{4+}$ $[M+4Na]^{4+}$: 903.8936, gef.: 903.8949; ber. für $C_{157}H_{234}N_{40}O_{49}S_2^{4+}$ $[M+4H]^{4+}$: 881.9117, gef.: 881.9141 (Massen bei 430.9, 560.9 und 696.8 entsprechen Natriumtrifluoroacetat-Clustern $[F_3C_2O_2Na]_n$; nicht eindeutiger Nachweis von Oxidation zu +2O und +O im Basislinienrauschen).

H: Dekonvoliertes Massenspektrum von **18bc** ber. für $[M]$: 3523.6, gef.: 3523.6; ber. für $[M(Na)]$: 3545.6, gef.: 3545.6; ber. für $[M(Na_2)]$: 3567.6, gef.: 3567.6; ber. für $[M(Na_3)]$: 3589.6, gef.: 3589.6.

Synthese von **Click-Konjugat H-AK(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGHGG-OH (19bk)**

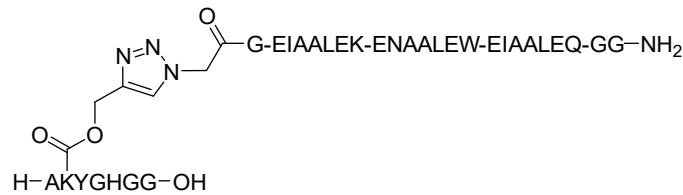
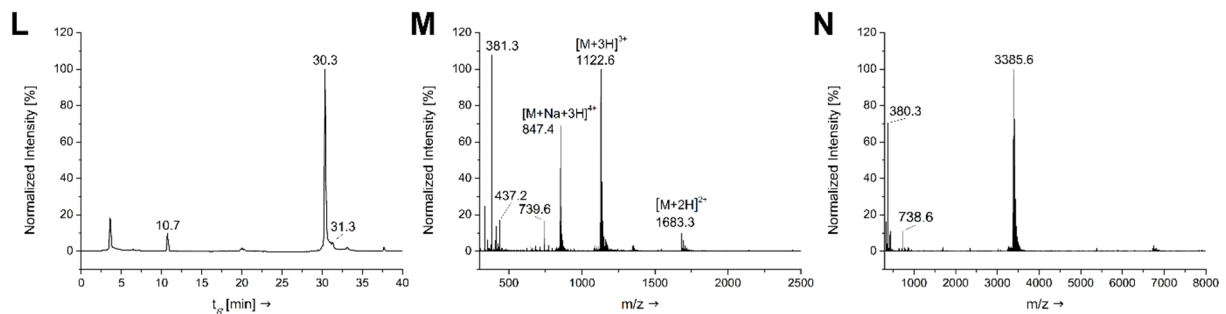


Tabelle 11 – **Eintrag 5**. Die Reaktion wurde gemäß **AV16** mit **1b** und **17k** durchgeführt.

Summenformel: C₁₄₆H₂₂₂N₄₂O₅₀ (3365.6260 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3363.6120 Da).



L: HPLC (Methode I, 50 °C): *t_R* = 10.7 min (degradiertes THPTA), *t_R* = 30.3 min (**19bk**), *t_R* = 31.3 min (**19bk** Aggregat).

M: HR-MS (ESI) (*m/z*) Rohspektrum von **19bk** ber. für C₁₄₆H₂₂₄N₄₂O₅₀²⁺ [M+2H]²⁺: 1682.8133, gef.: 1682.8164; ber. für C₁₄₆H₂₂₂N₄₂O₅₀Na₃³⁺ [M+3Na]³⁺: 1144.1932, gef.: 1144.1963; ber. für C₁₄₆H₂₂₅N₄₂O₅₀³⁺ [M+3H]³⁺: 1122.2113, gef.: 1122.2151; ber. für C₁₄₆H₂₂₂N₄₂O₅₀Na₄⁴⁺ [M+4Na]⁴⁺: 863.8922, gef.: 863.8945; ber. für C₁₄₆H₂₂₆N₄₂O₅₀⁴⁺ [M+4H]⁴⁺: 841.9103, gef.: 841.9117.

N: Dekonvoliertes Massenspektrum von **19bk** ber. für [M]: 3363.6, gef.: 3363.6, ber. für [M+Na]: 3385.6, gef.: 3385.6; ber. für [M+2Na]: 3407.6, gef.: 3407.6. (Anmerkung: Die Reaktion unter aeroben Standardbedingungen (**AV15**) führte zu vergleichbaren 86% **19bk** ebenfalls ohne nachweisbare Oxidation (+O)).

Synthese von Click-Konjugat H-AK(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGCGG-OH (19bl)

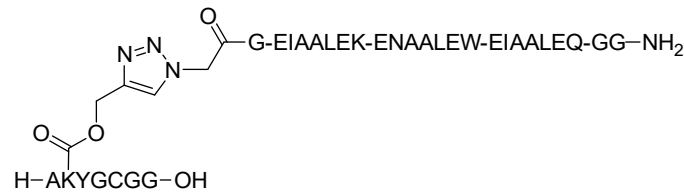
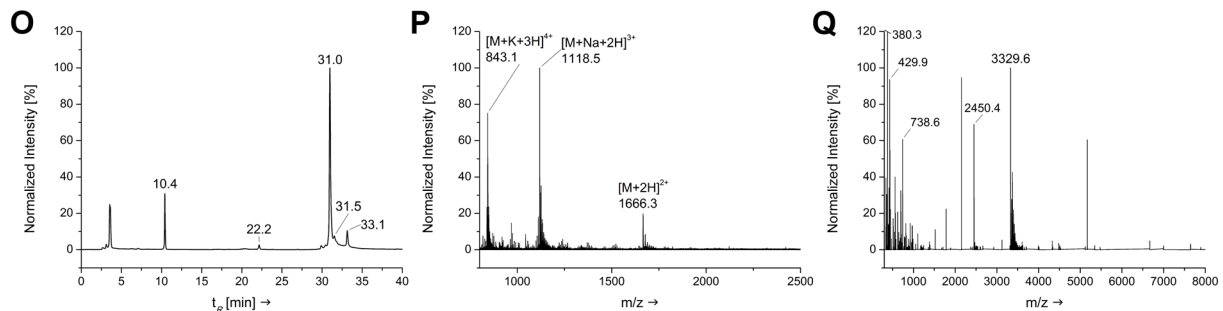


Tabelle 11 – Eintrag 6. Die Reaktion wurde gemäß AV16 mit **1b** und **17l** durchgeführt.

Summenformel: C₁₄₃H₂₂₀N₄₀O₅₀S (3331.6230 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3329.5623 Da).



O: HPLC (Methode I, 50 °C): $t_R = 10.4$ min (vermutlich degradiertes THPTA), $t_R = 31.0$ min (**19bl**, 82%), $t_R = 31.5$ min (**19bl** Aggregat und Spuren von **19bl** mit **17l** Disulfid), $t_R = 33.1$ min (**1b**, 9%).

P: HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von **19bl** ber. für C₁₄₃H₂₂₀N₄₀O₅₀SNa₂²⁺ [M+2Na]²⁺: 1687.7704, gef.: 1687.7757; ber. für C₁₄₃H₂₂₂N₄₀O₅₀S²⁺ [M+2H]²⁺: 1665.7884, gef.: 1665.7934; ber. für C₁₄₃H₂₂₀N₄₀O₅₀SNa₃³⁺ [M+3Na]³⁺: 1132.8433, gef.: 1132.8444; ber. für C₁₄₃H₂₂₃N₄₀O₅₀S³⁺ [M+3H]³⁺: 1110.8614, gef.: 1110.8601; ber. für C₁₄₃H₂₂₄N₄₀O₅₀S⁴⁺ [M+4H]⁴⁺: 833.3978, gef.: 833.4004.

Q: Dekonvoliertes Massenspektrum von **19bl** ber. [M]: 3329.6, gef.: 3329.6.

Synthese von *Click-Konjugat H-AK(N_ε-(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGEGG-OH (19bm)*

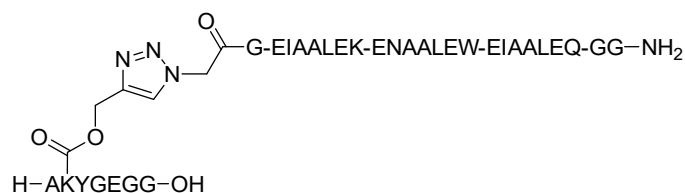
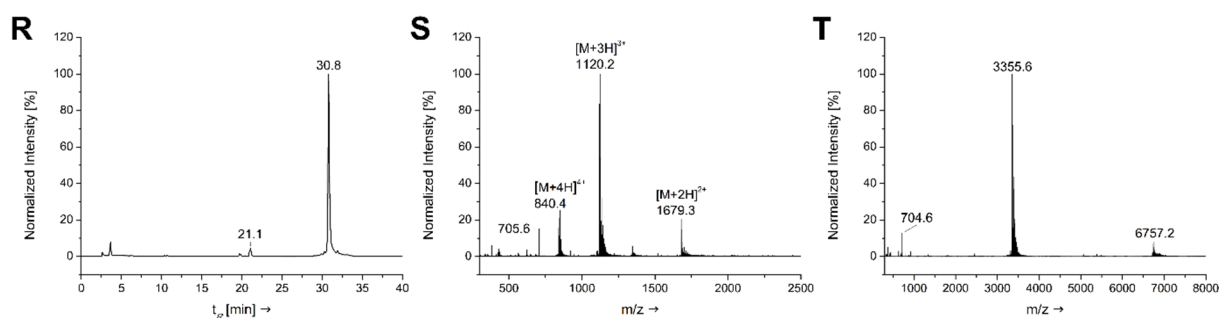


Tabelle 11 – Eintrag 7. Die Reaktion wurde gemäß AV15 mit **1b** und **17m** durchgeführt.

Summenformel: C₁₄₅H₂₂₂N₄₀O₅₂ (3357.5590 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3355.5957 Da).



R: HPLC (Methode I, 50 °C): $t_R = 21.1$ min (**17m**), $t_R = 30.8$ min (**19bm**).

S: HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von **19bm** ber. für C₁₄₅H₂₂₃N₄₀O₅₂Na²⁺ [M+H+Na]²⁺: 1689.7961, gef.: 1689.7973; ber. für C₁₄₅H₂₂₄N₄₀O₅₂²⁺ [M+2H]²⁺: 1678.8051, gef.: 1678.8077; ber. für C₁₄₅H₂₂₄N₄₀O₅₂K³⁺ [M+2H+K]³⁺: 1132.1911, gef.: 1132.1939; ber. für C₁₄₅H₂₂₄N₄₀O₅₂Na³⁺ [M+2H+Na]³⁺: 1126.8665, gef.: 1126.8686; ber. für C₁₄₅H₂₂₅N₄₀O₅₂³⁺ [M+3H]³⁺: 1119.5392; gef.: 1119.5401; ber. für C₁₄₅H₂₂₅N₄₀O₅₂K⁴⁺ [M+3H+K]⁴⁺: 849.3952, gef.: 849.3939; ber. für C₁₄₅H₂₂₅N₄₀O₅₂Na⁴⁺ [M+3H+Na]⁴⁺: 845.4017, gef.: 845.4018; ber. für C₁₄₅H₂₂₆N₄₀O₅₂⁴⁺ [M+4H]⁴⁺: 839.9062, gef.: 839.9060.

T: Dekonvoliertes Massenspektrum von **19bm** ber. für [M]: 3355.6, gef.: 3355.6.

Synthese von **Click-Konjugat H-AK(*N_e*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGRGG-OH (19bn)**

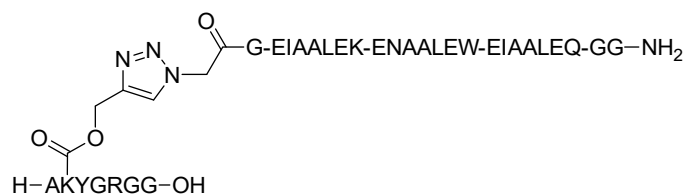
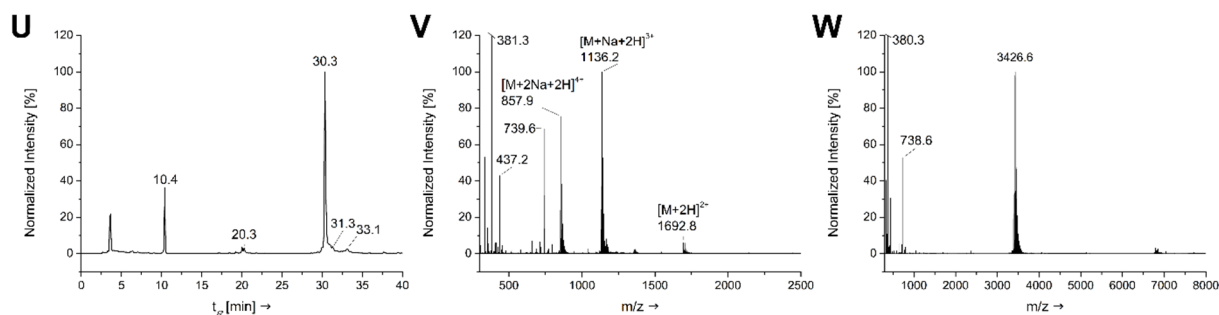


Tabelle 11 – **Eintrag 8**. Die Reaktion wurde gemäß **AV16** mit **1b** und **17n** durchgeführt.

Summenformel: C₁₄₆H₂₂₇N₄₃O₅₀ (3384.6730 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3382.6542 Da).



U: HPLC (Methode I, 50 °C): $t_R = 10.4$ min (vermutlich degradiertes THPTA), $t_R = 20.3$ min (**17n**), $t_R = 30.3$ min (**19bn**)*, $t_R = 31.3$ min (**19bn** Aggregat*), $t_R = 33.1$ min (**19bn** Aggregat*).

V: HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von **19bn** ber. für C₁₄₆H₂₂₇N₄₃O₅₀Na₂²⁺ [M+2Na]²⁺: 1714.3163, gef.: 1714.3205; ber. für C₁₄₆H₂₂₉N₄₃O₅₀²⁺ [M+2H]²⁺: 1692.3344, gef.: 1692.3386; ber. für C₁₄₆H₂₂₇N₄₃O₅₀Na₃³⁺ [M+3Na]³⁺: 1150.5406, gef.: 1150.5443; ber. für C₁₄₆H₂₃₀N₄₃O₅₀³⁺ [M+3H]³⁺: 1128.5587, gef.: 1128.5620; ber. für C₁₄₆H₂₂₇N₄₃O₅₀Na₄⁴⁺ [M+4Na]⁴⁺: 868.6528, gef.: 868.6556.

W: Dekonvoliertes Massenspektrum von **19bn** ber. für [M]: 3382.7, gef.: 3382.7; ber. für [M(Na)]: 3404.6, gef.: 3404.6; ber. für [M(Na₂)]: 3426.6, gef.: 3426.6; ber. für [M(Na₃)]: 3448.6, gef.: 3448.6. (Anmerkung: Die Reaktion unter aeroben Standardbedingungen (**AV15**) führte zu vergleichbaren 87% **19bn**. In beiden Fällen konnten weder Glyoxal- noch 2,3-Diketogulonat-Kondensationsnebenprodukte nachgewiesen werden.

Synthese von **Click-Konjugat H-AK(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxy-carbonyl)YGMGG-OH (19bo)**

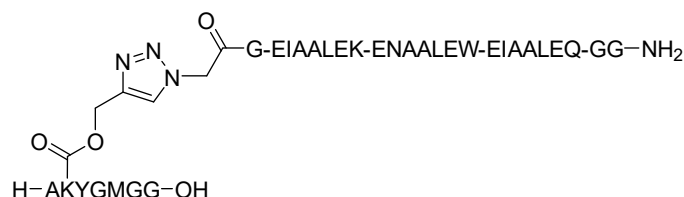
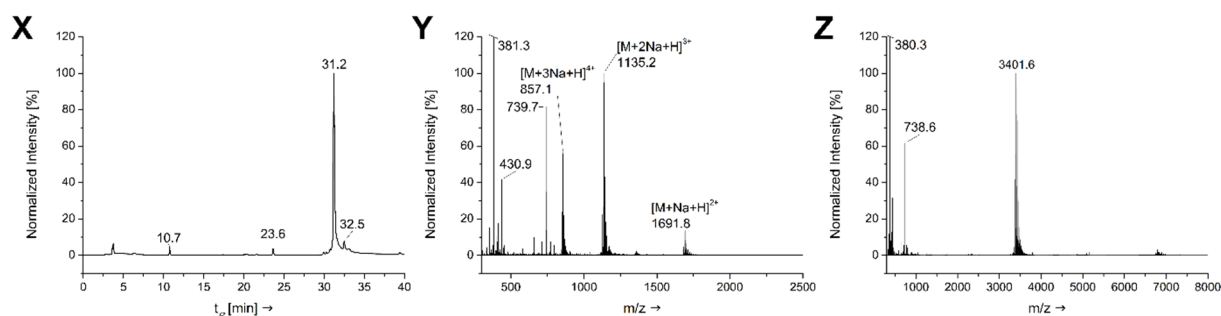


Tabelle 11 – **Eintrag 9**. Die Reaktion wurde gemäß **AV16** mit **1b** und **17o** durchgeführt.

Summenformel: C₁₄₅H₂₂₄N₄₀O₅₀S (3359.6770 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3357.5936 Da).



X: HPLC (Methode I, 50 °C): $t_R = 10.7$ min (vermutlich degradiertes THPTA), $t_R = 23.6$ min (**17o**), $t_R = 31.2$ min (**19bo**), $t_R = 32.5$ min (**19bo** Aggregat).

Y: HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von **19bo** ber. Für C₁₄₅H₂₂₄N₄₀O₅₀SNa₂²⁺ [M+2Na]²⁺: 1701.7860, gef.: 1701.7886; ber. für C₁₄₅H₂₂₆N₄₀O₅₀S²⁺ [M+2H]²⁺: 1679.8041, gef.: 1679.8067; ber. für C₁₄₅H₂₂₄N₄₀O₅₀SNa₃³⁺ [M+3Na]³⁺: 1142.1871, gef.: 1142.1895; ber. für C₁₄₅H₂₂₅N₄₀O₅₀SNa₂³⁺ [M+H+2Na]³⁺: 1134.8598, gef.: 1134.8618; ber. für C₁₄₅H₂₂₇N₄₀O₅₀S³⁺ [M+3H]³⁺: 1120.2051, gef.: 1120.2032; ber. für C₁₄₅H₂₂₄N₄₀O₅₀SNa₄⁴⁺ [M+4Na]⁴⁺: 862.3876, gef.: 862.3896; ber. für C₁₄₅H₂₂₅N₄₀O₅₀SNa₃⁴⁺ [M+H+3Na]⁴⁺: 856.8921, gef.: 856.8932; ber. für C₁₄₅H₂₂₆N₄₀O₅₀SNa₂⁴⁺ [M+2H+2Na]⁴⁺: 851.3966, gef.: 851.3985.

Z: Dekonvoliertes Spektrum von **19bo** ber. [M]: 3357.6, gef.: 3357.6; ber. für [M(Na)]: 3379.6, gef.: 3379.6; ber. für [M(Na₂)]: 3401.6, gef.: 3401.6; ber. für [M(Na₃)]: 3423.5, gef.: 3423.5; ber. für [M(Na₄)]: 3444.5, gef.: 3445.5; ber. für [M(Na₅)]: 3467.5, gef.: 3467.5; ber. für [M(Na₆)]: 3489.5, gef.: 3489.5.

Synthese von **Click-Konjugat** *N*-((1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methyl)biotinamid (**19bp**)

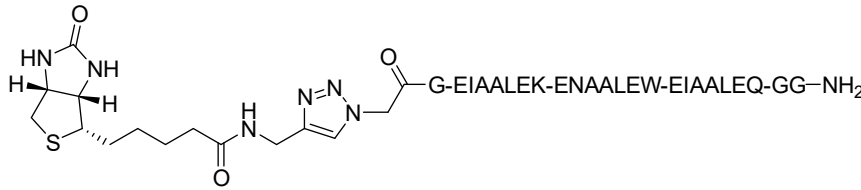
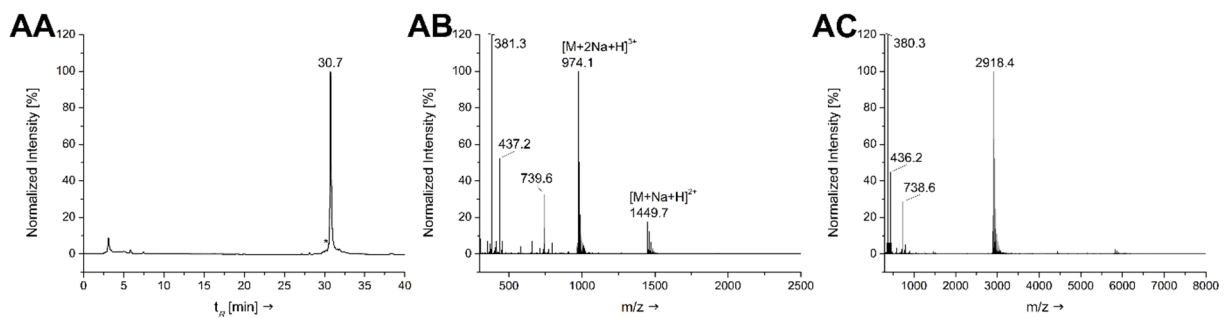


Tabelle 11 – **Eintrag 10**. Die Reaktion wurde gemäß **AV16** mit **1b** und Biotin-propargylamid (**17p**) durchgeführt.

Summenformel: $C_{125}H_{195}N_{35}O_{41}S$ ($2876.1990 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 2874.3970 Da).



Synthese von *Click-Konjugat N-((1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methyl)-5-FAM-amid (19bq)*

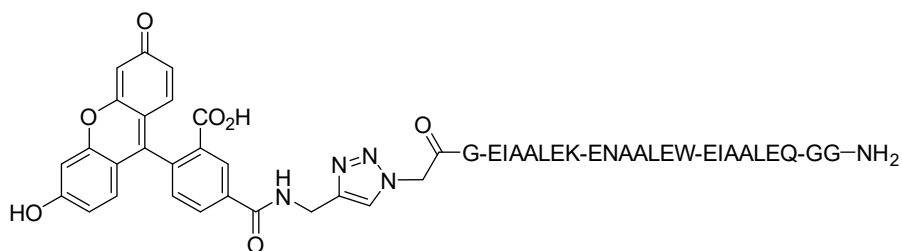
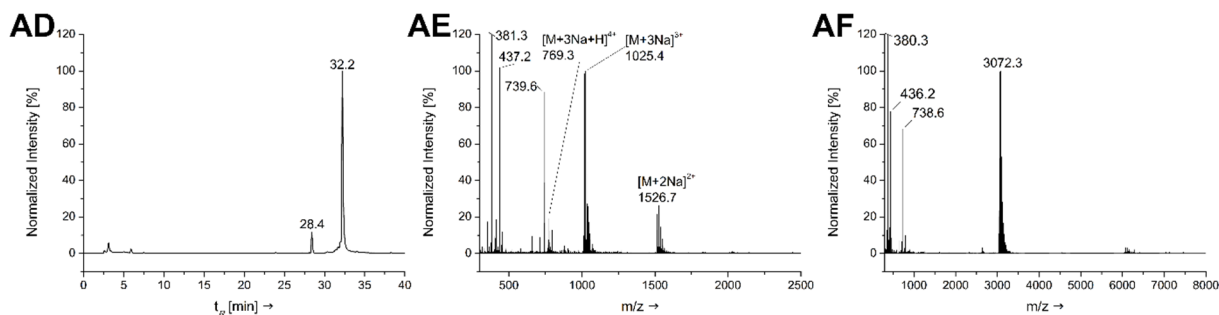


Tabelle 11 – **Eintrag 11**. Die Reaktion wurde gemäß AV15 mit **1b** und 5-FAM-propargylamid (**17q**) durchgeführt.

Summenformel: C₁₃₆H₁₉₁N₃₃O₄₅ (3008.2100 g·mol⁻¹; Exakte Masse: 3006.3672 Da).



AD: HPLC (Methode J, 50 °C): $t_R = 28.4$ min (**17q**), $t_R = 32.2$ min (**19bq**).

AE: HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von **19bq** ber. für C₁₃₆H₁₈₉N₃₃O₄₅Na₂²⁺ [M-2H+4Na]²⁺: 1548.1548, gef.: 1548.1577; ber. für C₁₃₆H₁₉₀N₃₃O₄₅Na₃²⁺ [M-H+3Na]²⁺: 1537.1638, gef.: 1537.1663; ber. für C₁₃₆H₁₉₁N₃₃O₄₅Na₂²⁺ [M+2Na]²⁺: 1526.1728, gef.: 1526.1763; ber. für C₁₃₆H₁₉₂N₃₃O₄₅Na²⁺ [M+H+Na]²⁺: 1515.1818, gef.: 1515.1840; ber. für C₁₃₆H₁₉₀N₃₃O₄₅Na₄³⁺ [M-H+4Na]³⁺: 1032.4389, gef.: 1032.4412; ber. für C₁₃₆H₁₉₁N₃₃O₄₅Na₃³⁺ [M+3Na]³⁺: 1025.1116, gef.: 1025.1136; ber. für C₁₃₆H₁₉₂N₃₃O₄₅Na₂³⁺ [M+H+2Na]³⁺: 1017.7843, gef.: 1017.7863; ber. für C₁₃₆H₁₉₃N₃₃O₄₅Na³⁺ [M+Na+2H]³⁺: 1010.4570, gef.: 1010.4574.

AF: Dekonvoliertes Massenspektrum von **19bq** ber. für [M]: 3006.4, gef. 3006.4; ber. für [M(Na)]: 3028.3, gef.: 3028.4; ber. für [M(Na₂)]: 3050.3, gef.: 30503; ber. für [M(Na₃)]: 3072.3, gef.: 3072.3; ber. für [M(Na₄)]: 3094.3, gef.: 3094.3.

Synthese von **Click-Konjugat N-((1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methyl)-6-TAMRA-amid (19br)**

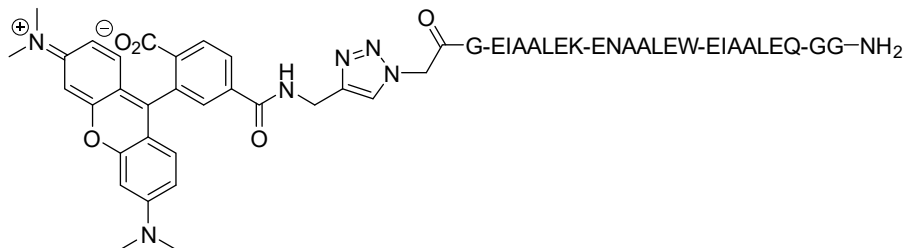
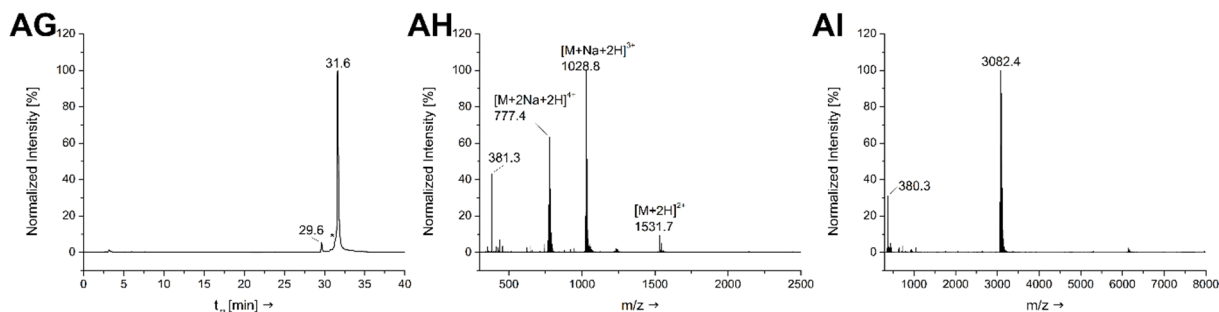


Tabelle 11 – **Eintrag 12**. Die Reaktion wurde gemäß **AV15** mit **1b** und 6-TAMRA-propargylamid (**17r**) durchgeführt.

Summenformel: $C_{140}H_{201}N_{35}O_{43}$ ($3062.3500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 3060.4618 Da).



AG: HPLC (Methode J, $50 \text{ }^\circ\text{C}$): $t_R = 29.6 \text{ min}$ (**17r**), t_R^* (**19br** Aggregate), $t_R = 31.6 \text{ min}$ (**19br**).

AH: HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von **19br** ber. für $C_{140}H_{202}N_{35}O_{43}Na^{2+}$ $[M+H+Na]^{2+}$: 1542.2291 , gef.: 1542.2328 ; ber. für $C_{140}H_{203}N_{35}O_{43}^{2+}$ $[M+2H]^{2+}$: 1531.2382 , gef.: 1531.2412 ; ber. für $C_{140}H_{201}N_{35}O_{43}Na_3^{3+}$ $[M+3Na]^{3+}$: 1043.1431 , gef.: 1043.1454 ; ber. für $C_{140}H_{202}N_{35}O_{43}Na_2^{3+}$ $[M+H+2Na]^{3+}$: 1035.8158 , gef.: 1035.8177 ; ber. für $C_{140}H_{203}N_{35}O_{43}Na^{3+}$ $[M+2H+Na]^{3+}$: 1028.4885 , gef.: 1028.4902 ; ber. für $C_{140}H_{204}N_{35}O_{43}^{3+}$ $[M+3H]^{3+}$: 1021.1612 , gef.: 1021.1642 ; ber. für $C_{140}H_{202}N_{35}O_{43}Na_3^{4+}$ $[M+H+3Na]^{4+}$: 782.6092 , gef.: 782.6107 ; ber. für $C_{140}H_{203}N_{35}O_{43}Na_2^{4+}$ $[M+2H+2Na]^{4+}$: 777.1337 , gef.: 777.1151 ; ber. für $C_{140}H_{204}N_{35}O_{43}Na^{4+}$ $[M+3H+Na]^{4+}$: 771.6182 , gef.: 771.6085 .

AI: Dekonvoliertes Massenspektrum von **19br** ber. für $[M]$: 3060.5 , gef.: 3060.5 ; ber. für $[M(Na)]$: 3082.4 , gef.: 3082.4 ; ber. für $[M(Na_2)]$: 3104.4 , gef.: 3104.4 .

Synthese von *Click-Konjugat 1-((1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)pyren (19bs)*

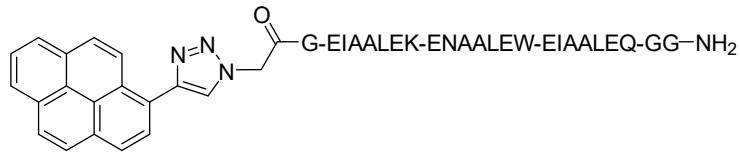
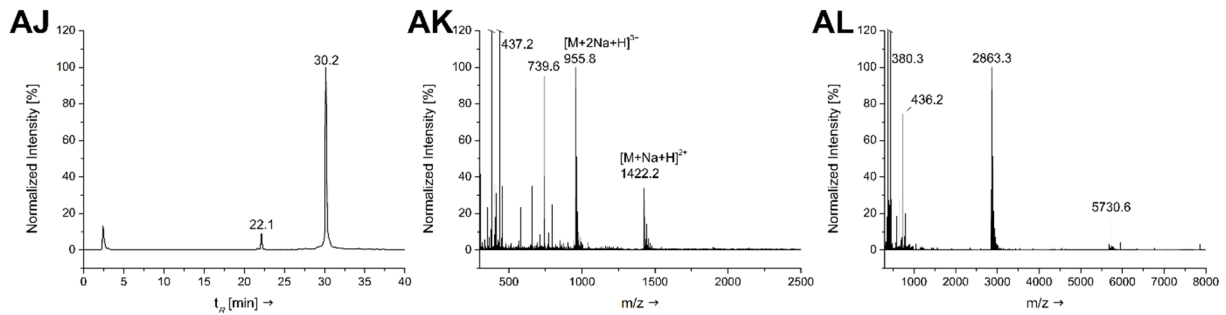


Tabelle 11 – **Eintrag 13**. Die Reaktion wurde gemäß **AV16** mit **1b** und 1-Ethynylpyren (**17s**) durchgeführt.

Summenformel: $C_{130}H_{186}N_{32}O_{39}$ ($2821.1030 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Exakte Masse: 2819.3555 Da).



AJ: HPLC nach 4 h (Methode B, $50 \text{ }^\circ\text{C}$): $t_R = 22.1 \text{ min}$ (**1b**, 10%), $t_R = 30.2 \text{ min}$ (**19bs**).

AK: HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von **19bs** ber. für $C_{130}H_{186}N_{32}O_{39}Na_2$ $[M+2Na]^{2+}$: 1432.6670 , gef.: 1432.6693 , ber. für $C_{130}H_{186}N_{32}O_{39}Na_3$ $[M+3Na]^{3+}$: 962.7744 , gef.: 962.7758 ; ber. für $C_{130}H_{187}N_{32}O_{39}Na_2$ $[M+H+2Na]^{3+}$: 955.4471 , gef.: 955.4486 .

AL: Dekonvoliertes Massenspektrum von **19bs** ber. für $[M(Na)]$: 2841.3 , gef.: 2841.3 ; ber. für $[M(Na_2)]$: 2863.3 , gef.: 2863.3 ; ber. für $[M(Na_3)]$: 2885.3 , gef.: 2885.3 .

5.4.2 Coiled-Coil-vermittelte direkte Aminolyse

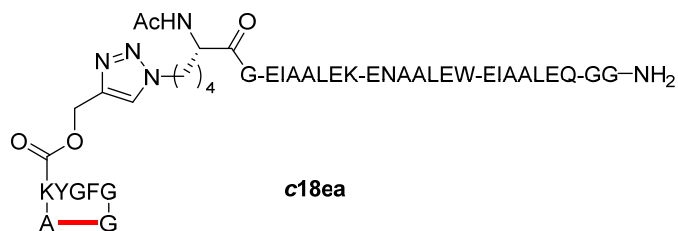
Die Durchführung der Zyklisierungsversuche zur direkten Aminolyse erfolgte analog AV18 unter Schutzgasbedingungen mit dem entsprechend angegebenen *Ligationspuffer*.

- **Bedingungen 1:** 20 mM TCEP und 50 mM Natriumascorbat in PBS-Puffer (pH 7.6)
- **Bedingungen 2:** PBS-Puffer (pH 7.5)
- **Bedingungen 3:** PBS-Puffer (pH 8.0)
- **Bedingungen 4:** 0.1 M Imidazol in PBS-Puffer (pH 9.1)

Die Reaktionsverfolgung erfolgte durch die Bestimmung der Ausbeute über die Integration der mithilfe von HPLC detektierten Peakflächen. Die erhaltenen Peakflächen wurden in einer vereinfachten Näherung zur Quantifizierung nach KUIPERS *et al.* gewichtet.^[221] Diese Tabellenwerte der für 214 nm angegebenen molaren, dekadischen Extinktionskoeffizienten (ϵ_{214}) der Aminosäuren wurden für die hier aufgezeichneten HPLC-Spuren bei 220 nm adaptiert und für die entsprechenden Peptidsequenzen aufsummiert. Die erhaltenen Peakflächen wurden mit den so berechneten Extinktionskoeffizienten (ϵ_{220}) analog eines Responsefaktors bzw. Kalibrierfaktors gewichtet. Zur Berechnung der entsprechenden Ausbeute wurde die durch Integration bestimmte, umgesetzte Menge an Analyt A_{Produkt} durch die Peakfläche der eingesetzten Menge der Leitkomponente A_{Edukt} bestimmt. Als Näherung dieser hier unbekanntes Größe wurde die Menge der eingesetzten Leitkomponente A_{Edukt} gleich der Summe aller gewichteten, auf A_{Edukt} zurückzuführende Peakflächen bezogen und sind in % angegeben. Als repräsentatives Beispiel sei die Berechnung der Ausbeute an Zyklisierungsprodukt dargestellt:

$$\text{Ausbeute [\%]} = \frac{\int \text{Zyklisierungsprodukt}}{\sum \int \text{Thioester und Produkte(aus Thioester)}} \cdot 100$$

Der Umsatz ist des Weiteren für den entsprechenden Thioester **9** angegeben. Die entsprechenden HPLC-Spuren, Massenspektren und die Auswertung sind in Kapitel 7.3.1 des Anhangs gezeigt.



Kombination KB5: Reaktion **18ea** mit **4b** (Abbildung 20 und Abbildung 21).

Bedingungen 1. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* aus 20 mM TCEP und 50 mM Natriumascorbat in PBS-Puffer (pH 7.6) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18ea**, 30 nmol) und Thiol B (**4b**, 30 nmol) in 300 μ L *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μ L (5 nmol) Aliquote nach 2 min, 1 h, 5 h, 6 h (100 μ L Aliquot) und 27 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μ L) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.1 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.5 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.1: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18ea**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %						Umsatz Thioester / %
	Thiol B ^b	Thioester	Hairpin	Hydrolyse	Zyklisierung	Aggregate	
	$t_{\text{R}} = 21.9$ min $\epsilon_{220} = 31362^c$	$t_{\text{R}} = 29.8$ min $\epsilon_{220} = 74318^c$	$t_{\text{R}} = 23.7$ min $\epsilon_{220} = 105680^c$	$t_{\text{R}} = 27.8$ min $\epsilon_{220} = 74318^c$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 75241^c$	$t_{\text{R}} = 28.7$ min $\epsilon_{220} = 105680^c$	
2 min	43.9	28.7	70.6	0.7	-	-	71.3
1 h	41.6	2.2	77.2	20.6	-	-	97.8
5 h	66.7	-	36.8	61.7	-	1.5	100
6 h	67.2	-	40.0	58.4	-	1.5	100
27 h	96.8	-	-	97.2	-	2.8	100

a) Die Ausbeute ist auf die Gesamtmenge an eingesetztem Edukt und den erhaltenen, normierten Peakflächen bezogen. b) Aus den erhaltenen Ausbeuten des eingesetzten Thiols ist ein großer Fehler ersichtlich. Die erhaltenen Werte sollten in der Theorie mit denen des entstandenen Hairpins korrelieren. c) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* entlehnte und berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.^[221]

Kombination K-5: Reaktion **18ea** (Abbildung 21).

Bedingungen 1. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* aus 20 mM TCEP und 50 mM Natriumascorbat in PBS-Puffer (pH 7.6) durchgeführt. Der Peptidthioester **18ea**, 12.4 nmol) wurde in 124 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 30 min und 5 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.2 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung A.6 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt. Die erhaltenen Massenspektren stimmten mit den bereits erhaltenen Massen überein.

Tabelle A.2: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18ea**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %			Umsatz Thioester / %
	Thioester	Hydrolyse	Zyklisierung	
	$t_{\text{R}} = 29.8 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 74318^{\text{a}}$	$t_{\text{R}} = 27.8 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 74318^{\text{a}}$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 75241^{\text{a}}$	
30 min	95.0	5.0	-	5.0
5 h	62.0	38.0	-	38.0

a) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

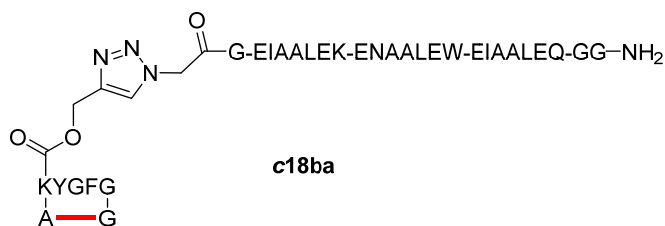
Kombination KC5: Reaktion **18ea** mit **4c** (Abbildung 21).

Bedingungen 1. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* aus 20 mM TCEP und 50 mM Natriumascorbat in PBS-Puffer (pH 7.6) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18ea**, 30 nmol) und Thiol C (**4c**, 30 nmol) in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 2 min, 1 h (60 μL Aliquot), 5 h und 6 h (100 μL Aliquot) entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.3 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.7 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.3: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18ea**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %						Umsatz Thioester / %
	Thiol C	Thioester	Hairpin	Hydrolyse	Zyklisierung	Aggregate	
	$t_{\text{R}} = 21.8 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 31362^{\text{b}}$	$t_{\text{R}} = 29.7 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 74318^{\text{b}}$	$t_{\text{R}} = 23.7 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 105680^{\text{b}}$	$t_{\text{R}} = 27.7 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 74318^{\text{b}}$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 75241^{\text{b}}$	$t_{\text{R}} = 28.7 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 105680^{\text{b}}$	
2 min	87.3	58.7	38.9	2.4	-	-	41.3
1 h	78.6	7.7	71.3	21.0	-	-	92.3
5 h	91.0	-	39.3	60.7	-	-	100
6 h	84.1	-	53.2	46.0	-	0.8	100

a) Die Ausbeute ist auf die Gesamtmenge an eingesetztem Edukt und den erhaltenen, normierten Peakflächen bezogen. Die erhaltenen Werte sollten in der Theorie mit denen des entstandenen Hairpins korrelieren. b) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.



Kombination KD2: Reaktion **18ba** mit **4d** (Abbildung 21).

Bedingungen 1. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* aus 20 mM TCEP und 50 mM Natriumascorbat in PBS-Puffer (pH 7.6) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18ba**, 30 nmol) und Thiol D (**4d**, 30 nmol) in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 2 min, 1 h (60 μL Aliquot), 5 h, 6 h (100 μL Aliquot) und 17 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.4 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.8 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.4: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18ba**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %						Umsatz Thioester / %
	Thiol D ^b	Thioester	Hairpin	Hydrolyse	Zyklisierung	Aggregate	
	$t_{\text{R}} = 21.8 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 31362^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 30.1 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 71487^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 24.5 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 102849^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 27.9 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 71487^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 72410^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 28.9 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 102849^{\text{c}}$	
2 min	94.9	96.4	3.2	0.4	-	-	3.6
1 h	17.9	10.5	72.0	17.3	-	0.2	89.5
5 h	55.5	5.2	35.8	57.5	-	1.5	94.8
6 h	56.4	0.7	38.1	59.7	-	1.5	99.3
17 h	94.2	1.7	3.3	92.7	-	2.2	98.3

a) Die Ausbeute ist auf die Gesamtmenge an eingesetztem Edukt und den erhaltenen, normierten Peakflächen bezogen. b) Aus den erhaltenen Ausbeuten des eingesetzten Thiols ist ein großer Fehler ersichtlich. Die erhaltenen Werte sollten in der Theorie mit denen des entstandenen Hairpins korrelieren. c) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Kombination KC2: Reaktion **18ba** mit **4c** (Abbildung 21).

Bedingungen 1. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* aus 20 mM TCEP und 50 mM Natriumascorbat in PBS-Puffer (pH 7.6) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18ba**, 30 nmol) und Thiol C (**4c**, 30 nmol) in 300 μ L *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μ L (5 nmol) Aliquote nach 2 min, 1 h, 5 h, 6 h und 48 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μ L) gequenchet. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.5 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.9 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.5: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18ba**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %						Umsatz Thioester / %
	Thiol C ^b	Thioester	Hairpin	Hydrolyse	Zyklisierung	Aggregate	
	$t_{\text{R}} = 21.9 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 31362^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 30.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 71487^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 24.1 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 102849^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 27.9 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 71487^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 72410^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 29.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 102849^{\text{c}}$	
2 min	34.2	53.0	35.6	10.8	0.6	-	47.0
1 h	14.3	17.8	63.6	18.3	0.3	-	82.2
5 h	42.9	2.0	38.4	58.4	-	1.2	98.0
6 h	48.0	0.7	41.0	57.0	-	1.2	99.3
48 h	96.1	-	-	97.2	-	2.8	100

a) Die Ausbeute ist auf die Gesamtmenge an eingesetztem Edukt und den erhaltenen, normierten Peakflächen bezogen. b) Die erhaltenen Werte korrelieren hier mit denen des entstandenen Hairpins. c) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Kombination KD2: Reaktion **18ba** mit **4d** (Abbildung 22, pH 7.5).

Bedingungen 2. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (PBS-Puffer, pH 7.5) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18ba**, 30 nmol) und Thiol D (**4d**, 30 nmol) in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 2 min, 1 h, 5 h, 24 h und 26 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequenchet. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Im Fall der Messung nach 26 h wurde ein HPLC-Säulenofen bei 50 °C mitgenutzt. Die Auswertung ist in Tabelle A.6 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.10 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.6: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18ba**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %						Umsatz Thioester / %
	Thiol D ^b	Thioester	Hairpin	Hydrolyse	Zyklisierung	Aggregate	
	$t_{\text{R}} = 21.8 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 31362^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 30.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 71487^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 24.7 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 102849^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 28.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 71487^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 72410^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 29.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 102849^{\text{c}}$	
2 min	94.3	91.0	4.2	4.8	-	0.1	9.0
1 h	6.9	30.8	67.7	1.4	-	0.1	69.2
5 h	0.0	16.7	77.5	5.2	-	0.6	83.3
24 h	0.0	2.4	80.3	14.8	-	2.5	97.6
26 h	0.0	0.8	81.4	15.3	-	2.5	99.2

a) Die Ausbeute ist auf die Gesamtmenge an eingesetztem Edukt und den erhaltenen, normierten Peakflächen bezogen. b) Die erhaltenen Werte korrelieren hier mit denen des entstandenen Hairpins. c) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Kombination K-2: Reaktion **18ba** (Abbildung 22, pH 7.5).

Bedingungen 2. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (PBS-Puffer, pH 7.5) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18ba**, 12.4 nmol) wurde in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 2 min, 1 h, 6 h, 24 h und 27 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.7 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung A.11 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt. Die erhaltenen Massenspektren stimmten mit den bereits erhaltenen Massen überein.

Tabelle A.7: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18ba**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %			Umsatz Thioester / %
	Thioester	Hydrolyse	Zyklisierung	
	$t_{\text{R}} = 30.1 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 74318^{\text{a}}$	$t_{\text{R}} = 28.1 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 74318^{\text{a}}$	$t_{\text{R}} = 29.1 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 75241^{\text{a}}$	
2 min	99.7	0.3	-	0.3
1 h	99.2	0.8	-	0.8
6 h	94.6	4.9	0.6	94.6
24 h	82.4	15.3	2.4	82.4
27 h ^b	78.7	18.5	3.9	78.7

a) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. b) Durch Überladung des UV-Detektors bei 220 nm kann nur eine näherungsweise Angabe gemacht werden.

Kombination KD2: Reaktion **18ba** mit **4d** (Abbildung 22, pH 8.0).

Bedingungen 3. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (PBS-Puffer, pH 8.0) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18ba**, 30 nmol) und Thiol D (**4d**, 30 nmol) in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 2 min, 1 h, 5 h und 19.5 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequenchet. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.8 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.12 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.8: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18ba**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %						Umsatz Thioester / %
	Thiol D ^b	Thioester	Hairpin	Hydrolyse	Zyklisierung	Aggregate	
	$t_{\text{R}} = 21.8 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 31362^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 30.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 71487^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 24.7 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 102849^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 28.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 71487^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 29.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 72410^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 102849^{\text{c}}$	
2 min	52.8	71.4	26.4	2.0	0.2	-	28.6
1 h	12.6	19.7	78.3	1.8	0.2	-	80.3
5 h	11.0	6.9	85.4	6.9	0.8	-	93.1
19.5 h	14.1	4.6	67.0	24.4	4.0	-	95.4

a) Die Ausbeute ist auf die Gesamtmenge an eingesetztem Edukt und den erhaltenen, normierten Peakflächen bezogen. b) Die erhaltenen Werte korrelieren hier mit denen des entstandenen Hairpins. c) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

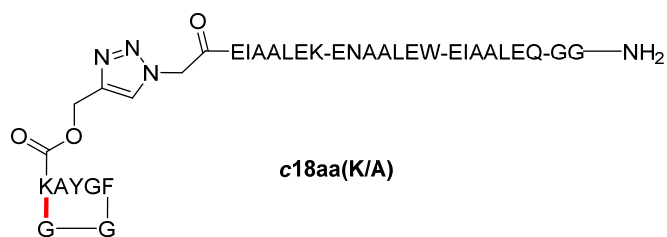
Kombination KA2: Reaktion **18ba** mit **4a** (Abbildung 22, pH 8.0).

Bedingungen 3. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (PBS-Puffer, pH 8.0) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18ba**, 30 nmol) und Thiol A (**4a**, 30 nmol) in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 2 min, 1 h, 5 h, 16.5 h und 46 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequenchet. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.9 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.13 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.9: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18ba**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %						Umsatz Thioester / %
	Thiol A ^b	Thioester	Hairpin	Hydrolyse	Zyklisierung	Aggregate	
	$t_{\text{R}} = 21.9 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 31341^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 30.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 71487^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 24.3 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 102828^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 28.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 71487^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 29.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 72410^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 102828^{\text{c}}$	
2 min	28.4	38.6	58.3	2.7	0.4	-	61.4
1 h	9.0	17.4	79.5	2.8	0.2	-	82.6
5 h	8.5	7.1	84.3	7.8	0.9	-	92.9
16.5 h	15.1	1.3	76.6	19.3	2.8	-	98.7
46 h	28.4	0.3	52.3	41.0	6.4	-	99.7

a) Die Ausbeute ist auf die Gesamtmenge an eingesetztem Edukt und den erhaltenen, normierten Peakflächen bezogen. b) Die erhaltenen Werte korrelieren hier mit denen des entstandenen Hairpins. c) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.



Kombination KB1(K/A): Reaktion **18aa(K/A)** mit **4b** (Abbildung 23).

Bedingungen 2. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (PBS-Puffer, pH 7.5) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18aa(K/A)**, 30 nmol) und Thiol B (**4b**, 30 nmol) in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 1 min, 1 h, 3 h, 5 h und 23 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Das Reaktionsgemisch wurde des Weiteren nach 23 h mit 1.5 M Imidazol-Lösung (10 μL , pH 10) versetzt und eine weitere Stunde reagiert und analog vermessen. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.10 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.14 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.10: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18aa(K/A)**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %						Umsatz Thioester / %
	Thiol B ^b	Thioester	Hairpin	Hydrolyse	Zyklisierung	Aggregate	
	$t_{\text{R}} = 21.7 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 31362^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 30.2 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 70564^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 23.9 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 101962^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 28.2 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 70564^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 29.2 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 72410^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 101962^{\text{c}}$	
1 min	81.7	86.9	13.1	0.8	-	-	13.1
1 h	15.6	47.2	51.9	1.0	-	-	52.8
3 h	15.5	35.6	61.9	2.3	0.2	-	64.4
5 h	14.6	30.9	64.7	4.0	0.4	-	69.1
23 h	12.5	5.4	78.4	14.5	1.7	-	94.6
24 h ^d	13.3	6.6	71.6	19.6	2.3	-	93.4

a) Die Ausbeute ist auf die Gesamtmenge an eingesetztem Edukt und den erhaltenen, normierten Peakflächen bezogen. b) Die erhaltenen Werte korrelieren hier mit denen des entstandenen Hairpins. c) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. d) Nach Zugabe von 1.5 M Imidazol-Lösung (1 μL , pH 10) und 1 h Reaktionszeit.

Kombination KC1(K/A): Reaktion **18aa(K/A)** mit **4c** (Abbildung 23).

Bedingungen 2. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (PBS-Puffer, pH 7.5) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18aa(K/A)**, 30 nmol) und Thiol C (**4c**, 30 nmol) in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 1 min, 1 h, 2 h, 5 h und 24 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequenchet. Das Reaktionsgemisch wurde des Weiteren nach 24 h mit 1.5 M Imidazol-Lösung (10 μL , pH 10) versetzt und weitere 3 h reagiert und analog vermessen. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.11 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.15 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.11: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18aa(K/A)**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %						Umsatz Thioester / %
	Thiol C ^b	Thioester	Hairpin	Hydrolyse	Zyklisierung	Aggregate	
	$t_{\text{R}} = 22.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 31362^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 30.2 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 70564^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 24.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 101962^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 28.2 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 70564^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 29.2 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 72410^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 101962^{\text{c}}$	
1 min	80.2	86.8	12.4	0.9	-	-	13.2
1 h	23.6	52.9	46.2	0.9	-	-	47.1
2 h	20.5	47.2	51.0	1.7	-	-	52.8
5 h	14.8	39.9	55.6	4.1	0.4	-	60.1
24 h	13.4	13.0	67.8	17.2	2.0	-	87.0
27 h ^d	22.7	1.8	38.4	31.6	28.2	-	98.2

a) Die Ausbeute ist auf die Gesamtmenge an eingesetztem Edukt und den erhaltenen, normierten Peakflächen bezogen. b) Die erhaltenen Werte korrelieren hier mit denen des entstandenen Hairpins. c) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. d) Nach Zugabe von 0.1 M Imidazol und 3 h Reaktionszeit.

Kombination KD1(K/A): Reaktion **18aa(K/A)** mit **4d** (Abbildung 24).

Bedingungen 4. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (0.1 M Imidazol in PBS-Puffer, pH 9.1) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18aa(K/A)**, 30 nmol) und Thiol D (**4d**, 30 nmol) in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 1 min, 30 min, 1.5 h, 2 h und 5 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.12 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.16 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.12: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18aa(K/A)**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %						Umsatz Thioester / %
	Thiol D ^b	Thioester	Hairpin	Hydrolyse	Zyklisierung	Aggregate	
	$t_{\text{R}} = 22.0 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 31362^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 30.2 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 70564^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 24.4 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 101962^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 28.2 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 70564^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = 29.3 \text{ min}$ $\epsilon_{220} = 72410^{\text{c}}$	$t_{\text{R}} = \text{n.d.}$ $\epsilon_{220} = 101962^{\text{c}}$	
1 min	29.4	45.9	53.2	0.6	0.2	-	54.1
30 min	20.1	9.8	66.4	10.7	13.1	-	90.2
1.5 h	32.9	2.2	52.1	22.0	23.7	-	97.8
2 h	35.3	0.9	47.6	25.7	25.8	-	99.1
5 h	27.5	5.5	34.8	31.5	28.2	-	94.5

a) Die Ausbeute ist auf die Gesamtmenge an eingesetztem Edukt und den erhaltenen, normierten Peakflächen bezogen. b) Die erhaltenen Werte korrelieren hier mit denen des entstandenen Hairpins. c) ϵ_{220} ist der nach KUIPERS *et al.* berechnete molare, dekadische Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Kombination K-1(K/A): Reaktion **18aa(K/A)** (Abbildung 24).

Bedingungen 4. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (0.1 M Imidazol in PBS-Puffer, pH 9.1) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18aa(K/A)**, 30 nmol) wurde in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 1 min, 30 min, 1.5 h und 2 h (mit HPLC-Säulenofen, 50 °C) entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.13 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.17 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.13: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18aa(K/A)**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %			Umsatz Thioester / %
	Thioester	Hydrolyse	Zyklisierung	
	$t_{\text{R}} = 30.2 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 27.4 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 29.0 \text{ min}$	
1 min	95.9	3.3	0.8	4.1
30 min	35.0	37.4	27.6	65.0
1.5 h	0.9	56.0	43.1	99.1
2 h	1.4	56.4	42.2	98.6

a) Im Fall der Hintergrundmessung kann die Ausbeute aus dem prozentualen Flächenverhältnis der Peaks ermittelt werden.

Hintergrundmessung Triazolylpeptidthioester 18(45)a(K/A).

Bedingungen 4. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (0.1 M Imidazol in PBS-Puffer, pH 9.1) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18(45)a(K/A)**, 30 nmol) wurde in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 100 μL (10 nmol) Aliquote nach 1 min, 1 h und 2 h entnommen und mit Ameisensäure (2 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.14 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.18 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.14: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18(45)a(K/A)**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %			Umsatz Thioester / %
	Thioester	Hydrolyse	Zyklisierung	
	$t_{\text{R}} = 28.3 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 21.6 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 24.2 \text{ min}$	
1 min	97.2	2.5	1.3	2.8
1 h	15.9	74.6	9.5	84.1
2 h	2.1	87.1	10.8	97.9

a) Im Fall der Hintergrundmessung kann die Ausbeute aus dem prozentualen Flächenverhältnis der Peaks ermittelt werden.

Hintergrundmessung Alkinpeptidthioester **9a(K/A)** (Abbildung 24).

Bedingungen 4. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (0.1 M Imidazol in PBS-Puffer, pH 9.1) durchgeführt. Der Peptidthioester (**9a(K/A)**, 90 nmol) wurde in 900 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 100 μL (10 nmol) Aliquote nach 1 min, 1 h und 2 h entnommen und mit Ameisensäure (2 μL) gequenchet. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.15 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.19 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.15: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **9a(K/A)**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %			Umsatz Thioester / %
	Thioester	Hydrolyse	Zyklisierung	
	$t_{\text{R}} = 30.0 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 23.3 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 26.8 \text{ min}$	
1 min	95.4	4.3	0.3	4.6
1 h	8.7	82.9	8.4	91.3
2 h	2.2	88.7	9.1	97.8

a) Im Fall der Hintergrundmessung kann die Ausbeute aus dem prozentualen Flächenverhältnis der Peaks ermittelt werden.

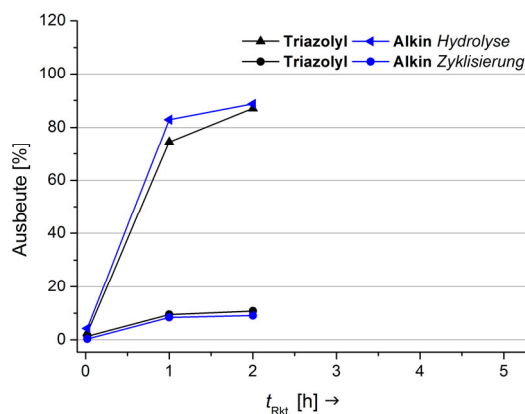


Abbildung A.2: Zeitliche Auftragung der HPLC-Ausbeuten der beobachteten Hydrolyse (Dreieck) und des zyklischen Produkts (Kreis) der Thioester (K/A(Linker)-Austausch) in %. Aufgetragen sind die HPLC-Reaktionsverfolgungen für die Reaktion des Triazolyl-Thioesters (**18(45)a(K/A)**), *schwarz*) im Vergleich zur Hintergrundmessung des nicht CuAAC-konjugierten Alkins (**9a(K/A)**), *blau*). Alle Reaktionen wurden in 1.5 M Im/PBS (pH 9.1) bei 25 °C durchgeführt.

Kombination K-1: Reaktion von **18aa(K/A)** (Kontrolle neutral zu Abbildung 24).

Bedingungen 2. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (PBS-Puffer, pH 7.5) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18aa(K/A)**, 90 nmol) wurde in 900 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 100 μL (10 nmol) Aliquote nach 1 min, 1 h und ~ 3 d entnommen und mit Ameisensäure (2 μL) gequenchet. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.16 aufgeführt. Die erhaltenen MALDI-TOF-Massenspektren und Retentionszeiten (t_{R}) der HPLC-Reaktionsverfolgung stimmten mit den bisherigen Ergebnissen überein.

Tabelle A.16: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18aa(K/A)**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %			Umsatz Thioester / %
	Thioester	Hydrolyse	Zyklisierung	
	$t_{\text{R}} = 28.3$ min	$t_{\text{R}} = 21.6$ min	$t_{\text{R}} = 24.2$ min	
1 min	100	-	-	0.0
1 h	99.2	0.8	-	0.8
3 d	59.1	38.8	2.1	40.9

a) Im Fall der Hintergrundmessung kann die Ausbeute aus dem prozentualen Flächenverhältnis der Peaks ermittelt werden.

Kombination K-1(K7Q): Reaktion **18a(K7Q)a(K/A)** (Abbildung 24).

Bedingungen 4. Die Reaktion wurde nach **AV18** in einem *Ligationspuffer* (0.1 M Imidazol in PBS-Puffer, pH 9.1) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18a(K7Q)a(K/A)**), 90 nmol) wurde in 900 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 100 μL (10 nmol) Aliquote nach 1 min, 30 min, 2 h, 3 h und 24 h entnommen und mit Ameisensäure (2 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.17 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren ist in Abbildung A.20 (Anhang Kapitel 7.3.1) gezeigt.

Tabelle A.17: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse, sowie des Umsatzes an eingesetztem Thioester **18a(K7Q)a(K/A)**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute ^a / %			Umsatz Thioester / %
	Thioester	Hydrolyse	Zyklisierung	
	$t_{\text{R}} = 30.5 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 28.1 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 29.4 \text{ min}$	
1 min	97.3	2.7	-	2.7
30 min	45.9	50.3	3.8	54.1
2 h	8.4	84.2	7.4	91.6
3 h	1.0	90.2	7.8	99.0

a) Im Fall der Hintergrundmessung kann die Ausbeute aus dem prozentualen Flächenverhältnis der Peaks ermittelt werden.

5.4.3 Coiled-Coil-vermittelte Native Chemische Ligation (NCL)

Die Durchführung der Zyklisierungsversuche zur NCL erfolgte analog **AV19** unter Schutzgasbedingungen mit dem entsprechend angegebenen *Ligationspuffer*.

- **Bedingungen 2:** PBS-Puffer (pH 7.5)
- **Bedingungen 5:** 0.2 mM TCEP in PBS-Puffer (pH 7.5)
- **Bedingungen 6:** 0.2 mM TCEP in MeCN/PBS-Puffer (1:3, v/v, pH 7.5)
- **Bedingungen 7:** 0.2 mM TCEP in MeCN/PBS-Puffer (1:3, v/v, pH 7.9)

Die Reaktionsverfolgung erfolgte durch die Bestimmung der Ausbeute über die Integration der mithilfe von HPLC detektierten Peakflächen des Zyklisierungsprodukts **c18** relativ zur Peakfläche des eingesetzten Peptidthioesters **18** oder **9** bei 280 nm. Allgemein konnte hier auf eine Gewichtung der erhaltenen Peakflächen verzichtet werden. Dies trifft nicht auf die Reaktionen zu, in denen eine Haarnadelstruktur detektiert wurde. Die Ausbeute wird in % angegeben. Die entsprechenden HPLC-Spuren und Massenspektren sind, falls nicht bereits in der Diskussion in Kapitel 3.4.2, in Kapitel 7.3.2 des Anhangs gezeigt. Zur besseren Übersicht ist die Darstellung auf jeweils drei HPLC-Spuren repräsentativ beschränkt worden. Die Ausbeuten sind tabellarisch notiert. Im Fall der Messung von Triplikaten wurde ebenfalls nur einer der Versuche beispielhaft, graphisch dargestellt.

Die Reaktionsverfolgung der Kinetikmessungen wurde analog **AV19** durchgeführt. Das mit Schutzgas beschickte Reagiergefäß wurde in einem Exsikkator im Schutzgasgegenstrom positioniert. Der Ligationspuffer wurde stets frisch in einer Ansatzgröße von 1 mL angesetzt. Durch die Zugabe des *Ligationspuffers* wurde die Reaktion gestartet, die Probe verschlossen, ca. 5 s geschüttelt, an Luft geöffnet und die erste Probe nach 15 s entnommen (T = 21 °C). Durch das Vorgehen wurde eine zeitliche Ungenauigkeit der Zeitpunkte der Probenentnahme der ersten 60 s von ± 3 s eingehalten, welche mittels einer mitlaufenden Stoppuhr überprüft wurde. Das jeweilige Aliquot wurde direkt in ein HPLC-Vial (Glas mit Einsatz) mit vorgelegter Ameisensäure (1 µL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nach 60 s kurz unter einem Stickstoffstrom positioniert, verschlossen, geschüttelt und anzentrifugiert. Die entnommenen Proben konnten durch die kurzen Zeitintervalle erstmals nach 90 s geschüttelt werden. Ab 90 s wurde die Reaktion in einem Thermoschüttler bei 25 °C durchgeführt. Die restlichen Probenentnahmen verliefen wie in **AV19** beschrieben und unter einem leichten Stickstoff-Gegenstrom. Die HPLC-Messungen erfolgten automatisiert und mit HPLC-Methode H bei 50 °C Säulenofentemperatur.

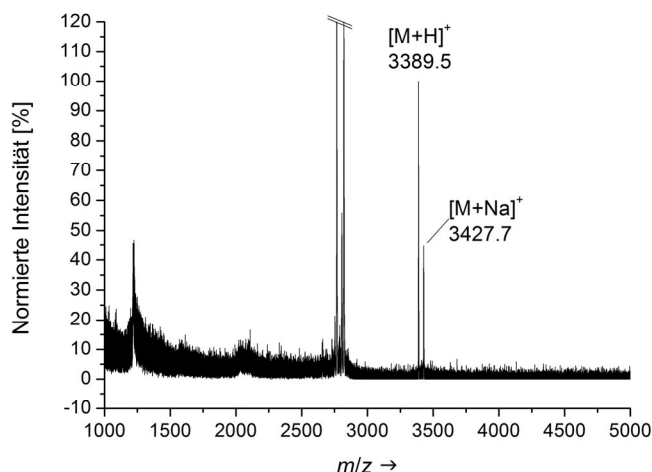
I. Heptapeptidthioester

CC-vermittelte NCL von **18bb** mit Thiol **D** (**4d**) in PBS-Puffer

Bedingungen 2. Die Reaktion wurde nach **AV19** in PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18bb**, 30 nmol) und Thiol **D** (**4d**, 30 nmol) in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 2 min und 1 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 27A (Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 29.3$ min (**c18bb**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **c18bb** ber. für $\text{C}_{149}\text{H}_{223}\text{N}_{40}\text{O}_{49}\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 3390.7, gef.: 3389.5; ber. für $\text{C}_{149}\text{H}_{222}\text{N}_{40}\text{O}_{49}\text{SK}^+$ $[\text{M}+\text{K}]^+$: 3428.8, gef.: 3427.7.



Hintergrundreaktion des Peptidthioesters **18bb**

Bedingungen 2. Die Reaktion wurde nach **AV19** in PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18bb**, 20 nmol) wurde in 200 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 2 min, 1 h und 6 h entnommen und mit Ameisensäure (2 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Ein Chromatogramm nach 1 h Reaktionszeit ist in Abbildung 27A (Kapitel 3.4.2) gezeigt. Die analytischen Daten stimmen mit dem gewünschten Produkt **c18bb** überein.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 29.3$ min (**c18bb**).

HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von **c18bb** ber. für $C_{149}H_{225}N_{40}O_{49}S_2^{3+}$ $[M+3H]^{3+}$: 1130.2016, gef.: 1130.2031; ber. für $C_{149}H_{224}N_{40}O_{49}S_2Na^{3+}$ $[M+2H+Na]^{3+}$: 1137.5289, gef.: 1137.5267; ber. für $C_{149}H_{224}N_{40}O_{49}S_2^{3+}$ $[M+2H]^{2+}$: 1694.7988, gef.: 1694.7989.

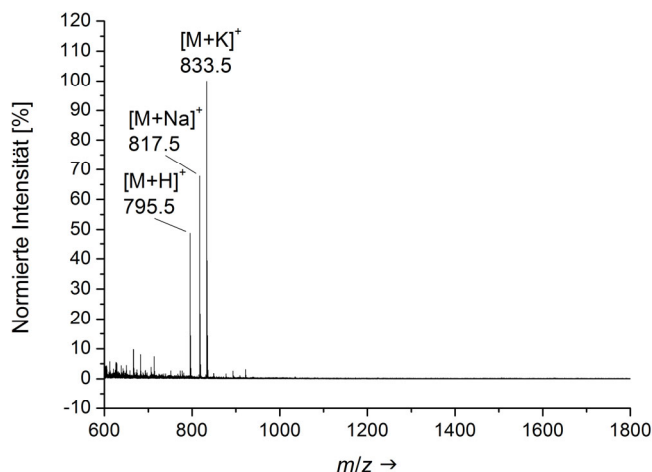
Hintergrundreaktion des Alkynylpeptidthioesters **9b**

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Der Peptidthioester **9b** (100 nmol) wurde in 1000 μ L *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 100 μ L (10 nmol) Aliquote nach 60 s, 90 s, 120 s, 30 min, 1 h entnommen und mit Ameisensäure (2 μ L) gequencht. Das Reaktionsgemisch wurde nach 3 h durch die Zugabe von Ameisensäure (10 μ L) behandelt, eingefroren und gefriergetrocknet. Das Rohproduktgemisch wurde anschließend in MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1 % TFA) gelöst und mittels analyt. HPLC mit Methode H (10-70%B in 30 min) abschließend vermessen. Ein Chromatogramm nach 1 h Reaktionszeit und der erneut gelösten Probe sind in Abbildung A.21 (Anhang Kapitel 7.3.2) gezeigt. Die analytischen Daten stimmen mit dem gewünschten Produkt **c9b** überein.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 26.4$ min (**c9b**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **c9b** ber. für $C_{37}H_{47}N_8O_{10}S^+$ $[M+H]^+$: 795.9, gef.: 795.5; ber. für $C_{37}H_{46}N_8O_{10}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 817.9, gef.: 817.5; ber. für $C_{37}H_{46}N_8O_{10}SK^+$ $[M+K]^+$: 834.0, gef.: 833.5.

HR-MS (ESI) (m/z) Rohspektrum von **c9b** ber. für $C_{37}H_{47}N_8O_{10}S^+$ $[M+H]^+$: 795.3130, gef.: 795.3120; ber. für $C_{37}H_{50}N_9O_{10}SNa^+$ $[M+NH_4]^+$: 812.3396, gef.: 812.3383; ber. für $C_{37}H_{46}N_8O_{10}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 817.2950, gef.: 817.2944.



Kinetikmessung der CC-vermittelten NCL mit Thiol D (4d)

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach AV19 in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18bb**, 48 nmol) und Thiol D (**4d**, 48 nmol) in 480 μ L *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μ L (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s und 5 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μ L) gequencht. Das Reaktionsgefäß der Messung nach 5 min wurde mit 20 μ L MeCN/Wasser (v/v, 1:4, + 0.1% TFA) nachgespült. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 50 μ L MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 95 μ L) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.18 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 28C (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 24.0$ min (**c18bb**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **c18bb** ber. für $C_{149}H_{223}N_{40}O_{49}S^+$ $[M+H]^+$: 3390.7, gef.: 3388.9; ber. für $C_{149}H_{222}N_{40}O_{49}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 3412.7, gef.: 3412.6; ber. für $C_{149}H_{222}N_{40}O_{49}SK^+$ $[M+K]^+$: 3428.8, gef.: 3429.1.

Tabelle A.18: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL.

$t_{Rkt.}$	HPLC-Ausbeute / %
	Zyklisierung
	$t_R = 24.0$ min
15 s	55.5
30 s	77.2
45 s	83.1
60 s	95.8
90 s	98.7
120 s	99.5
180 s	99.8
5 min	100

Kinetikmessung der Hintergrundreaktion des Peptidthioesters **18bb**

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18bb**, 24 nmol) wurde in 240 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s und 60 s entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Das Reaktionsgefäß der Messung nach 60 s wurde mit 20 μL MeCN/Wasser (v/v, 1:4, + 0.1 % TFA) nachgespült. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 30 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1 % TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 95 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.19 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 28B (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt. Die MALDI-TOF-MS stimmte mit den bisherigen Ergebnissen überein.

Tabelle A.19: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der Kontrollmessung des Peptidthioesters **18bb**.

HPLC-Ausbeute / %	
$t_{\text{Rkt.}}$	Zyklisierung
	$t_{\text{R}} = 24.0 \text{ min}$
15 s	60.4
30 s	78.3
45 s	88.5
60 s	94.8

Kinetikmessung des Alkynylpeptidthioesters **9b**

Bedingungen 6. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (v/v, 1:3, pH 7.6) durchgeführt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der Peptidthioester (**9b**, 66 nmol) wurde in 660 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s, 5 min und 30 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Der Rückstand wurde ebenfalls mit Ameisensäure versetzt (1 μL) und gefriergetrocknet. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 55 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.20 aufgeführt. Eine Übersicht der

Experimenteller Teil

erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 28A (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt. Die MALDI-TOF-MS stimmte mit den bisherigen Ergebnissen überein.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 21.2$ min (**c9b**).

Tabelle A.20: Ermittelter Mittelwert der Ausbeuten aus drei unabhängigen Versuchen der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der Kontrollmessung des Peptidthioesters **9b**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Mittelwert
	Zyklisierung Messreihe 1-3
	$t_R = 21.2$ min
15 s	39.5 ± 4.4
30 s ^a	76.8 ± 14.0
45 s ^a	78.5 ± 15.4
60 s	77.3 ± 2.8
90 s	87.0 ± 1.3
120 s	95.7 ± 1.9
5 min	98.3 ± 0.5
15 min	99.5 ± 0.4
30 min	99.8 ± 0.3

a) In Abbildung 30 wurde nur eine der drei Messreihen repräsentativ aufgetragen, da nach 30 s und 45 s die Werte in zwei Messreihen als Ausreißer identifiziert werden konnten. Ein möglicher Grund ist eine zufällig in beiden Fällen mangelhaft erfolgte Reaktionsbeendigung durch Ameisensäure.

II. Hexapeptidthioester

Anmerkung: Die Zuordnung der HPLC-Peaks der CC-vermittelten Makrozyklisierung sowie der Hintergrundmessung des Coil-Peptids konnte für den Hexapeptidthioester nur durch Vergleich der HPLC-Spuren mit den Ergebnissen des Heptapeptidthioesters aus Kapitel 5.4.3 – I. erfolgen. Entsprechende MALDI-TOF-Massenspektren zeigten das gewünschte Produkt, aber wurden nicht dokumentiert und können in dieser Arbeit nicht angegeben werden. Die Kontrollmessung des Hexapeptidthioesters **9e** und die mittels MALDI-TOF-MS erfolgte Zuordnung der Spezies sollen als hinreichende Validierung der dargestellten Ergebnisse angesehen werden.

CC-vermittelte NCL von **18be** mit Thiol **D (4d)** in PBS-Puffer

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18be**, 18 nmol) und Thiol **D (4d)**, 18 nmol) in 180 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 60 s, 120 s und 1 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 27B (Kapitel 3.4.2) gezeigt. Nach 1 min Reaktionszeit wurde das gewünschte Produkt **c18be** in 89% HPLC-Ausbeute erhalten.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 24.0$ min (**c18be**).

Hintergrundreaktion des Peptidthioesters **18be**

Bedingungen 2. Die Reaktion wurde nach **AV19** in PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18be**, 20 nmol) wurde in 200 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 50 μL (5 nmol) Aliquote nach 2 min, 1 h und 6 h entnommen und mit Ameisensäure (2 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Ein Chromatogramm nach 1 h Reaktionszeit ist in Abbildung 27B (Kapitel 3.4.2) gezeigt. Die analytischen Daten stimmen mit dem gewünschten Produkt **c18be** überein. Nach 1 min Reaktionszeit wurde das gewünschte Produkt **c18be** in 87% HPLC-Ausbeute erhalten.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 24.0$ min (**c18be**).

Hintergrundreaktion des Alkynylpeptidthioesters **9e**

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.4) durchgeführt. Der Peptidthioester (**9e**, 66 nmol) wurde in 660 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C für 6.5 h ohne Reaktionsverfolgung reagiert. Es wurde mit Ameisensäure (11 μL) gequenchet. Das Reaktionsgemisch wurde eingefroren und gefriergetrocknet. Das Rohproduktgemisch wurde anschließend in MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1 % TFA) gelöst und mittels analyt. HPLC vermessen. Die analytische HPLC wurde mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Ein Chromatogramm nach 6.5 h Reaktionszeit und der erneut gelösten Probe sind in Abbildung A.22 (Anhang Kapitel 7.3.2) gezeigt. Die analytischen Daten stimmen mit dem gewünschten Produkt **c9e** überein.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 24.6$ min (**c9e**).

Kinetikmessung der CC-vermittelten NCL mit Thiol D **4d**

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18be**, 48 nmol) und Thiol D (**4d**, 48 nmol) in 480 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s und 5 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequenchet. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1 % TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.21 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 31C (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 24.0$ min (**c18be**).

Tabelle A.21: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Zyklisierung $t_{\text{R}} = 24.0 \text{ min}$
15 s	74.5
30 s	81.3
45 s	96.8
60 s	99.3
90 s	99.1
120 s	100
180 s	100
5 min	100

Kinetikmessung der Hintergrundreaktion des Peptidthioesters **18be**

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18be**, 24 nmol) wurde in 240 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s und 60 s entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1 % TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) wurde manuell mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.22 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 31B (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 23.9 \text{ min}$ (**c18be**).

Tabelle A.22: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der Kontrollmessung des Peptidthioesters **18be**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Zyklisierung $t_{\text{R}} = 23.9 \text{ min}$
15 s ^a	n. d.
30 s ^a	n. d.
45 s ^a	n. d.
60 s	90.0

a) Detektorprobleme.

Kinetikmessung des Alkylpeptidthioesters **9e**

Bedingungen 6. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (v/v, 1:3, pH 7.6) durchgeführt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der Peptidthioester (**9e**, 66 nmol) wurde in 660 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 5 min, 15 min und 30 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Der Rückstand wurde ebenfalls mit Ameisensäure versetzt (1 μL) und gefriergetrocknet. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 55 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.23 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 31A (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 21.6$ min (**c9e**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **c9e** ber. für $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_9\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 738.8, gef.: 738.3; ber. für $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_9\text{SNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 760.8, gef.: 760.3; ber. für $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_9\text{SK}^+$ $[\text{M}+\text{K}]^+$: 776.9, gef.: 776.2.

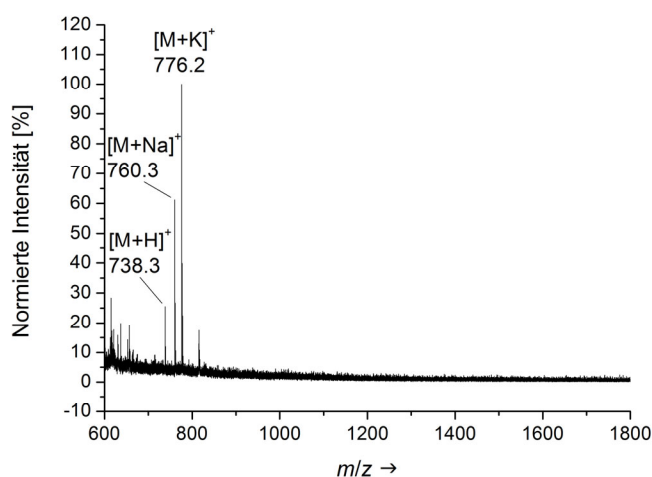


Tabelle A.23: Ermittelter Mittelwert der Ausbeuten aus drei unabhängigen Versuchen der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der Kontrollmessung des Peptidthioesters **9e**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	<i>Mittelwert</i>
	Zyklisierung Messreihe 1-3
	$t_{\text{R}} = 21.6 \text{ min}$
15 s	66.5 ± 6.9
30 s	79.6 ± 4.8
45 s	89.8 ± 2.2
60 s	94.5 ± 1.4
90 s	98.4 ± 1.4
120 s	99.2 ± 1.2
5 min	99.7 ± 0.5
15 min	99.6 ± 0.6
30 min	100 ± 0

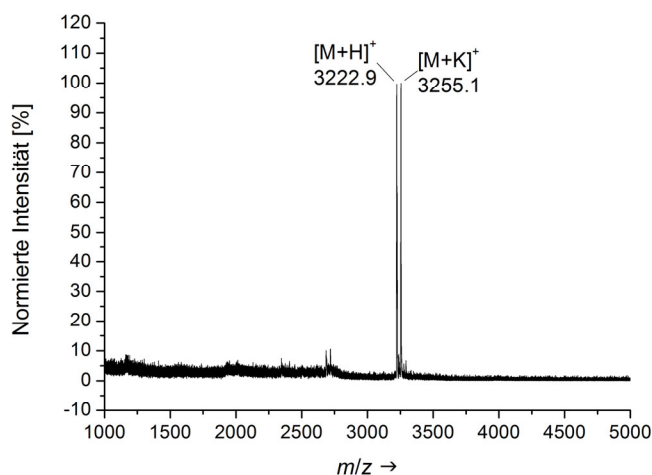
III. Pentapeptidthioester

CC-vermittelte NCL von **18af** mit Thiol **C** (**4c**) in PBS-Puffer

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.4) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18af**, 30 nmol) und Thiol **D** (**4c**, 30 nmol) in 300 μ L *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μ L (6 nmol) Aliquote nach 60 s, 90 s, 120 s, 30 min und 1 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μ L) gequenchet. Die analytische HPLC wurde manuell mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 27C (Kapitel 3.4.2) gezeigt. Nach 2 min Reaktionszeit wurde ein HPLC-Umsatz von 87% zum gewünschten Produkt erhalten. Das Cycloprodukt lag als Epimerengemisch vor.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 30.2$ min (**c18af**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **c18af** ber. für $C_{143}H_{214}N_{37}O_{46}S^+$ $[M+H]^+$: 3219.6, gef.: 3222.9; ber. für $C_{143}H_{213}N_{37}O_{46}SK^+$ $[M+K]^+$: 3257.6, gef.: 3255.1.



Hintergrundreaktion des Peptidthioesters **18af**

Bedingungen 2. Die Reaktion wurde nach **AV19** in PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18af**, 30 nmol) wurde in 300 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 60 s, 90 s, 120 s, 30 min und 1 h entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die analytische HPLC wurde manuell mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Ein Chromatogramm nach 1 h Reaktionszeit ist in Abbildung 27C (Kapitel 3.4.2) gezeigt. Die analytischen Daten stimmen mit dem gewünschten Produkt **c18af** überein. Nach 2 min Reaktionszeit wurde ein HPLC-Umsatz von 72% zum gewünschten Produkt erhalten. Das Cycloprodukt lag als Epimerengemisch vor. Die analytischen Daten stimmen mit dem gewünschten Produkt **c18af** überein.

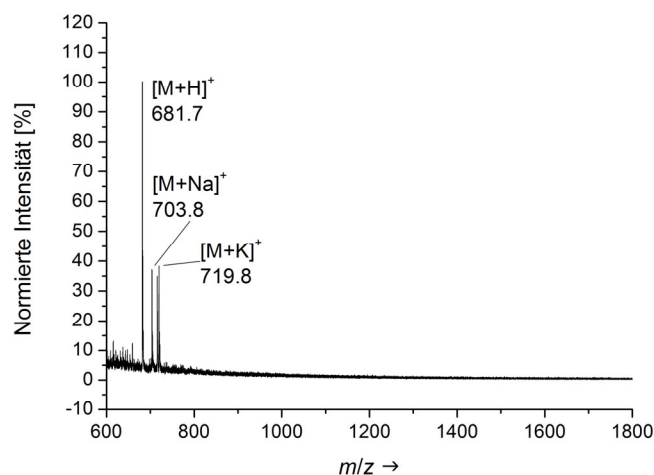
HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 30.2$ min (**c18af**).

Hintergrundreaktion des Alkynylpeptidthioesters **9f**

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.4) durchgeführt. Der Peptidthioester (**9f**, 66 nmol) wurde in 660 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C für 6.5 h ohne Reaktionsverfolgung reagiert. Es wurde mit Ameisensäure (11 μL) gequencht. Das Reaktionsgemisch wurde eingefroren und gefriergetrocknet. Das Rohproduktgemisch wurde anschließend in MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1 % TFA) gelöst und mittels analyt. HPLC vermessen. Die analytische HPLC wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Ein Chromatogramm nach 6.5 h Reaktionszeit und der erneut gelösten Probe sind in Abbildung A.23 (Anhang Kapitel 7.3.2) gezeigt. Die analytischen Daten stimmen mit dem gewünschten Produkt **c9f** überein.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 24.0$ min (**c9f**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **c9f** ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 681.8, gef.: 681.7; ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_8\text{SNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 703.8, gef.: 703.8; ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_8\text{SK}^+$ $[\text{M}+\text{K}]^+$: 719.9, gef.: 719.8.



Kinetikmessung der CC-vermittelten NCL von **18bf** mit Thiol **D** (**4d**)

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18bf**, 48 nmol) und Thiol **D** (**4d**, 48 nmol) in 480 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s und 5 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 55 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.24 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 33C (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 24.6$ min (**c18bf**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **c18bf** ber. für $\text{C}_{145}\text{H}_{217}\text{N}_{38}\text{O}_{47}\text{S}^+$ $[M+H]^+$: 3276.6, gef.: 3277.5; ber. für $\text{C}_{145}\text{H}_{216}\text{N}_{38}\text{O}_{47}\text{SK}^+$ $[M+K]^+$: 3314.7, gef.: 3315.5.

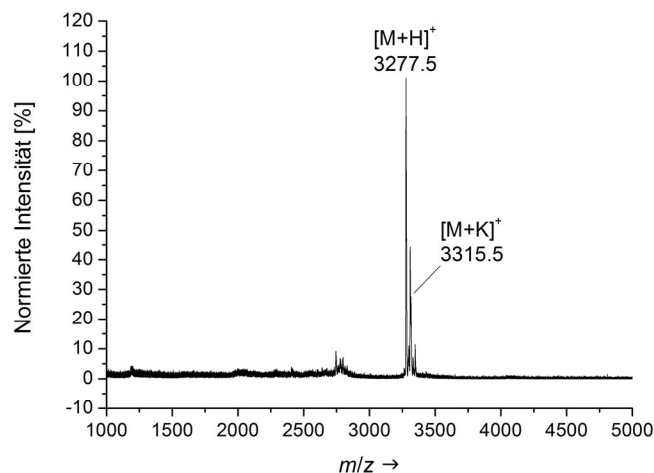


Tabelle A.24: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Zyklisierung $t_{\text{R}} = 24.6 \text{ min}$
15 s	21.3
30 s	68.8
45 s	49.5
60 s	60.7
90 s	67.1
120 s	77.0
180 s	85.1
5 min	92.1

Kinetikmessung der Hintergrundreaktion des Peptidthioesters **18bf**

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.5) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18bf**, 24 nmol) wurde in 240 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 180 s und 5 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 55 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.25 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 33B (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 24.6 \text{ min}$ (**c18bf**).

Tabelle A.25: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der Kontrollmessung des Peptidthioesters **18bf**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Zyklisierung $t_{\text{R}} = 24.6 \text{ min}$
15 s	21.4
30 s	34.3
45 s	67.4
60 s	72.5
90 s	76.8
120 s	74.6
180 s	78.9
5 min	89.9

Kinetikmessung des Alkynylpeptidthioesters **9f**

Bedingungen 6. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (v/v, 1:3, pH 7.4) durchgeführt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der Peptidthioester (**9f**, 66 nmol) wurde in 660 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 5 min, 15 min und 30 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Der Rückstand wurde ebenfalls mit Ameisensäure versetzt (1 μL) und gefriergetrocknet. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 55 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.26 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 33A (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt. Die analytischen Daten stimmen mit dem gewünschten Produkt **c9f** überein.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 24.0 \text{ min}$ (**c9f**).

Tabelle A.26: Ermittelter Mittelwert der Ausbeuten aus drei unabhängigen Versuchen der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der Kontrollmessung des Peptidthioesters **9f**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Mittelwert
	Zyklisierung Messreihe 1-3 $t_{\text{R}} = 24.0 \text{ min}$
15 s	3.2 ± 0.3
30 s ^a	10.9 ± 0.6
45 s ^a	20.3 ± 0.9
60 s	38.4 ± 5.9
90 s	47.8 ± 3.4
120 s	62.5 ± 2.8
5 min	80.2 ± 2.9
15 min	92.8 ± 2.1
30 min	98.3 ± 1.2

IV. Tetrapeptidthioester

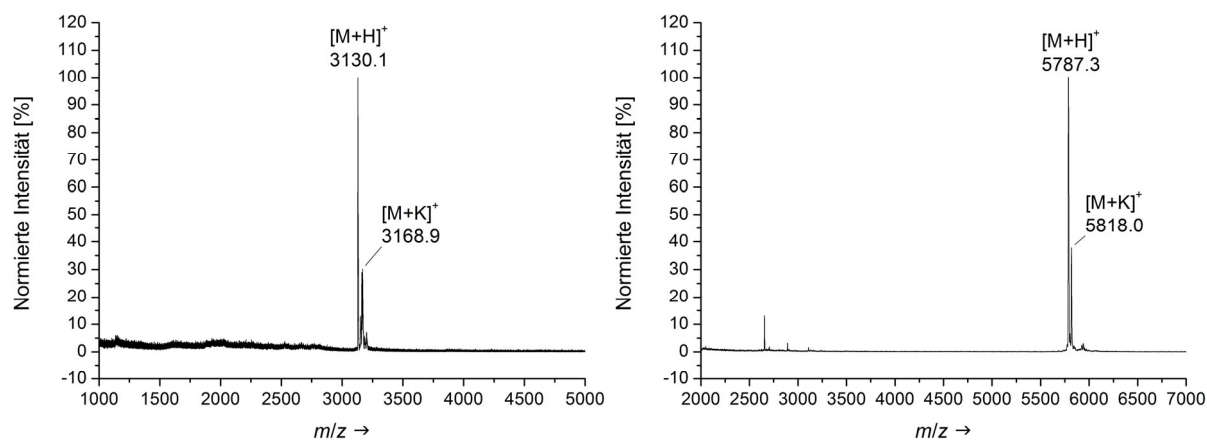
CC-vermittelte NCL von **18bg** mit Thiol **D** (**4d**)

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.3) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18bg**, 48 nmol) und Thiol **D** (**4d**, 48 nmol) in 480 μ L *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μ L (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s und 5 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μ L) gequenchet. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μ L MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1 % TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μ L) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Ab Messpunkt 45 s wurde die Haarnadelspezies isoliert. Eine repräsentative Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 27D (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt. Das Verhältnis Edukt **18bg** zu zyklisiertem Produkt **c18bg** beträgt ca. 1:1. Die isolierte Haarnadelspezies wurde gefriergetrocknet und für weitere 15 min in unbekannter Konzentration im *Ligationspuffer* (200 μ L) reagiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 35 (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 23.0$ min (**c18bg**).

MALDI-TOF-MS (m/z): **c18bg** ber. für $C_{136}H_{208}N_{37}O_{46}S^+$ $[M+H]^+$: 3129.4, gef.: 3130.1; ber. für $C_{136}H_{207}N_{37}O_{46}SK^+$ $[M+K]^+$: 3167.5, gef.: 3168.9.

MALDI-TOF-MS (m/z): Haarnadel ber. für $C_{257}H_{423}N_{72}O_{75}S^+$ $[M+H]^+$: 5785.8, gef.: 5787.3; ber. für $C_{257}H_{422}N_{72}O_{75}SK^+$ $[M+K]^+$: 5823.8, gef.: 5818.0.



Hintergrundreaktion des Peptidthioesters 18bg

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.3) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18bg**, 40 nmol) wurde in 400 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s und 180 s (nur 4 nmol Aliquot) entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequencht. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Ein repräsentatives Chromatogramm nach 2 min Reaktionszeit ist in Abbildung 27D (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt und spiegelt einen Umsatz von 38% wider.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 23.0$ min (**c18bg**).

Hintergrundreaktion des Alkynylpeptidthioesters 9g

Bedingungen 5. Die Reaktion wurde nach **AV19** in 0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.4) durchgeführt. Der Peptidthioester (**9g**, 66 nmol) wurde in 660 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C für 6.5 h ohne Reaktionsverfolgung reagiert. Es wurde mit Ameisensäure (11 μL) gequencht. Das Reaktionsgemisch wurde eingefroren und gefriergetrocknet. Das Rohproduktgemisch wurde anschließend in MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1% TFA) gelöst und mittels analyt. HPLC vermessen. Die analytische HPLC wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Ein Chromatogramm nach 6.5 h Reaktionszeit und der erneut gelösten Probe sind in Abbildung A.24 (Anhang Kapitel 7.3.2) gezeigt. Die analytischen Daten stimmen mit dem gewünschten Produkt **c9g** überein.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 16.6$ min (**c9g**).

CC-vermittelte NCL von **18bg** mit Thiol **D (4d)** und längerer Ligationszeit

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18bg**, 26 nmol) und Thiol **D (4d)**, 26 nmol) in 260 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 60 s, 180 s, 5 min und 10 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) versetzt. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Haarnadelspezies wurde isoliert. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.27 aufgeführt. Eine repräsentative Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 36A (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt. Die isolierte Haarnadelspezies wurde gefriergetrocknet und in unbekannter Konzentration im *Ligationspuffer* (100 μL) reagiert. Nach 1 min und 5 min wurden erneut entsprechende Proben mittels analyt. HPLC untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung A.25A (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 23.3$ min (**c18bg**).

Tabelle A.27: Ermittelte Ausbeuten der gewichteten, analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL bei 280 nm.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %	
	Haarnadel	Zyklisierung
	$t_{\text{R}} = 19.8$ min	$t_{\text{R}} = 23.3$ min
60 s	44.1	5.3
180 s	60.1	17.2
5 min	61.2	26.9
10 min	36.6	51.2

CC-vermittelte NCL von **18bg** mit Thiol C (**4c**) und längerer Ligationszeit

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18bg**, 26 nmol) und Thiol C (**4c**, 26 nmol) in 260 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 60 s, 180 s, 5 min und 10 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) versetzt. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Haarnadelspezies wurde isoliert. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.28 aufgeführt. Eine repräsentative Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 36B (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt. Die isolierte Haarnadelspezies wurde gefriergetrocknet und in unbekannter Konzentration im *Ligationspuffer* (100 μL) reagiert. Nach 1 min und 5 min wurden erneut entsprechende Proben mittels analyt. HPLC untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung A.25B (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt und spiegelt rund 26% Umsatz wider.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 23.3$ min (**c18bg**).

MALDI-TOF-MS (m/z): Haarnadel ber. für $\text{C}_{256}\text{H}_{421}\text{N}_{72}\text{O}_{75}\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 5771.7, gef.: 5774.9.

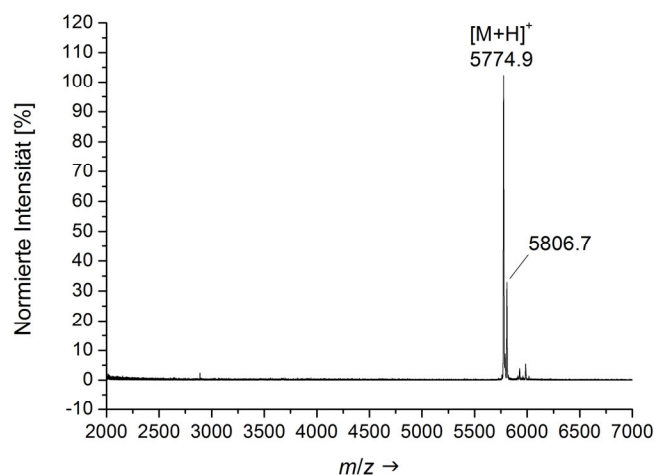


Tabelle A.28: Ermittelte Ausbeuten der gewichteten, analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL bei 280 nm.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %	
	Haarnadel	Zyklisierung
	$t_{\text{R}} = 19.6 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 23.3 \text{ min}$
60 s	48.5	6.3
180 s	72.2	12.4
5 min ^a	5.0	90.4
10 min	65.5	28.9

a) Fehler bei Zugabe von Ameisensäure. Der Messpunkt wurde als Ausreißer behandelt.

CC-vermittelte NCL von **18bg** mit Thiol **B (4b)** und längerer Ligationszeit

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Äquimolar wurden der Peptidthioester (**18bg**, 26 nmol) und Thiol **B (4b)**, 26 nmol) in 260 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 60 s, 180 s, 5 min und 10 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) versetzt. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Haarnadelspezies wurde isoliert. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.29 aufgeführt. Eine repräsentative Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 36C (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt. Die isolierte Haarnadelspezies wurde gefriergetrocknet und in unbekannter Konzentration im *Ligationspuffer* (100 μL) reagiert. Nach 1 min und 5 min wurden erneut entsprechende Proben mittels analyt. HPLC untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung A.25C (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt und spiegelt rund 37% Umsatz wider.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 23.3 \text{ min}$ (**c18bg**).

MALDI-TOF-MS (m/z): Haarnadel (nach Gefrier Trocknung) ber. für $\text{C}_{255}\text{H}_{419}\text{N}_{72}\text{O}_{75}\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 5757.7, gef.: 5760.8.

Experimenteller Teil

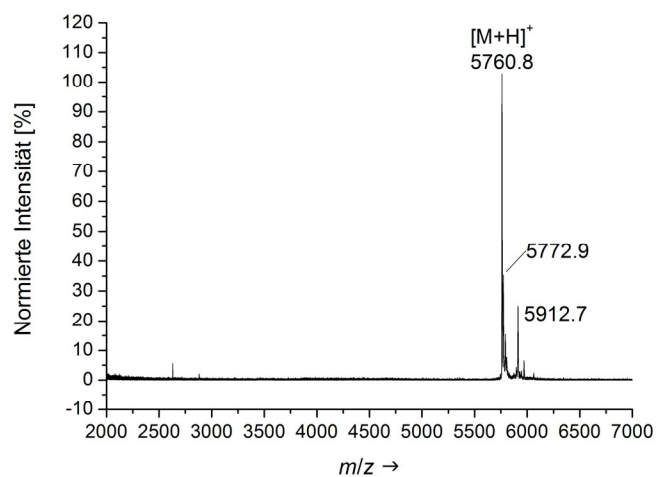


Tabelle A.29: Ermittelte Ausbeuten der gewichteten, analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL bei 280 nm.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %	
	Haarnadel	Zyklisierung
	$t_{\text{R}} = 19.5 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 23.3 \text{ min}$
60 s	46.1	5.2
180 s	77.9	12.7
5 min	72.0	21.7
10 min	50.2	35.7

Kinetikmessung der CC-vermittelten NCL mit Thiol C (4c) und angepasster Ligationszeit

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach AV19 in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Abweichend von bisherigen Versuchen wurden die Reaktionen getrennt für jeden Messpunkt durchgeführt. Dazu wurden jeweils äquimolar der Peptidthioester (**18bg**, 6 nmol) und Thiol C (**4c**, 6 nmol) in 60 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurde zu den Reaktionsgemischen zu den angegebenen Zeitpunkten Ameisensäure (1 μL) zugegeben. Es wurden Reaktionen für 60 s, 180 s, 5 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden in HPLC-Glasvials überführt, mit 20 μL MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1% TFA) versetzt und mittels analytischer HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) vermessen. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.30 aufgeführt. Eine repräsentative Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 38C (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt. Die analytischen Daten stimmten mit den bisherigen Versuchen überein.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 23.3$ min (**c18bg**).

Tabelle A.30: Ermittelte Ausbeuten der gewichteten, analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL bei 280 nm.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %	
	Haarnadel	Zyklisierung
	$t_{\text{R}} = 19.7$ min	$t_{\text{R}} = 23.3$ min
60 s	28.9	3.0
180 s	62.1	14.8
5 min	57.8	22.1
15 min	24.7	67.9
30 min	7.5	88.5
45 min	8.1	87.6
1 h	6.7	88.2

Kinetikmessung der CC-vermittelten NCL mit Thiol B (4b) und angepasster Ligationszeit

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach AV19 in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Abweichend von bisherigen Versuchen wurden die Reaktionen getrennt für jeden Messpunkt durchgeführt. Dazu wurden jeweils äquimolar der Peptidthioester (**18bg**, 6 nmol) und Thiol B (**4b**, 6 nmol) in 60 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurde zu den Reaktionsgemischen zu den angegebenen Zeitpunkten Ameisensäure (1 μL) zugegeben. Es wurden Reaktionen für 60 s, 180 s, 5 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden in HPLC-Glasvials überführt, mit 20 μL MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1% TFA) versetzt und mittels analytischer HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) vermessen. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.31 aufgeführt. Eine repräsentative Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung A.26 (Anhang Kapitel 7.3.2) gezeigt. Die analytischen Daten stimmten mit den bisherigen Versuchen überein.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 23.3$ min (**c18bg**).

Tabelle A.31: Ermittelte Ausbeuten der gewichteten, analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL bei 280 nm.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %	
	Haarnadel	Zyklisierung
	$t_{\text{R}} = 19.7$ min	$t_{\text{R}} = 23.3$ min
60 s	42.2	3.6
180 s	61.1	12.2
5 min	69.3	25.0
15 min	32.9	50.9
30 min	11.5	83.7
45 min	11.2	82.7
1 h	10.0	83.1

Kinetikmessung der Hintergrundreaktion des Peptidthioesters **18bg** und angepasster Ligationszeit

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Der Peptidthioester (**18bg**, 48 nmol) wurde in 480 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s und 5 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequenchet. Innerhalb der ersten Messungen wurden bis 2 min Löslichkeitsprobleme beobachtet. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1 % TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70 %B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.32 aufgeführt. Eine repräsentative Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 38B (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 23.3$ min (**c18bg**).

Tabelle A.32: Ermittelte Ausbeuten der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Zyklisierung $t_{\text{R}} = 23.3$ min
15 s ^a	0
30 s	0.6
45 s	1.1
60 s	4.7
90 s	4.6
120 s	8.6
180 s	17.0
5 min ^a	9.7

a) Wurde aufgrund der beobachteten Löslichkeitsprobleme als Ausreißer gewertet.

Kinetikmessung des Alkynylpeptidthioesters **9g** und angepasster Ligationszeit

Bedingungen 6. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (v/v, 1:3, pH 7.4) durchgeführt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der Peptidthioester (**9g**, 66 nmol) wurde in 660 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s, 5 min, 15 min und 30 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) gequenchet. Es wurden signifikante Löslichkeitsprobleme (≤ 5 min Reaktionszeit) beobachtet. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 55 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung ist in Tabelle A.33 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 38A (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 16.6$ min (**c9g**).

Tabelle A.33: Ermittelter Mittelwert der Ausbeuten aus drei unabhängigen Versuchen der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der Kontrollmessung des Peptidthioesters **9g**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Mittelwert
	Zyklisierung Messreihe 1-3 $t_{\text{R}} = 16.6$ min
15 s	1.6 \pm 0.1
30 s ^a	3.3 \pm 0.4
45 s ^a	7.3 \pm 0.9
60 s	11.2 \pm 2.2
90 s	18.5 \pm 2.4
120 s	24.6 \pm 2.8
180 s	37.2 \pm 1.5
5 min	64.6 \pm 0.9
15 min	95.0 \pm 1.7
30 min	97.3 \pm 0.8

V. Weitere Tetrapeptidthioester

V.1 Alanin

Test-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL mit Thiol C (4c)

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach AV19 in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Abweichend von bisherigen Versuchen wurden die Reaktionen getrennt für zwei Messpunkte durchgeführt. Dazu wurden jeweils äquimolar der Peptidthioester (**18bh**, 6 nmol) und Thiol C (**4c**, 6 nmol) in 60 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden zu den Reaktionsgemischen zu den angegebenen Zeitpunkten Ameisensäure (1 μL) gegeben. Es wurden Reaktionen für 180 s, und 30 min durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden in HPLC-Glasvials überführt, mit 20 μL MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1% TFA) versetzt und mittels analytischer HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) vermessen. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.34 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 42C (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 23.6$ (**c18bh**).

MALDI-TOF-MS (m/z): Haarnadel ber. für $\text{C}_{257}\text{H}_{423}\text{N}_{72}\text{O}_{75}\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 5785.8, gef.: 5788.5.

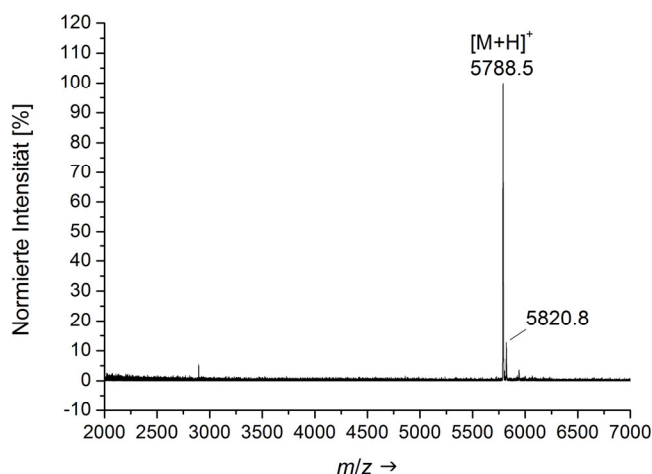


Tabelle A.34: Ermittelte Ausbeuten der gewichteten, analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL bei 280 nm.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %	
	Haarnadel	Zyklisierung
	$t_{\text{R}} = 19.8 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 23.6 \text{ min}$
180 s	17.8	0.1
30 min	82.0	3.8

Test-Reaktionsverfolgung der Hintergrundreaktion des Peptidthioesters **18bh**

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Abweichend von bisherigen Versuchen wurden die Reaktionen getrennt für zwei Messpunkte durchgeführt. Dazu wurde der Peptidthioester (**18bh**, 6 nmol) in 60 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden zu den Reaktionsgemischen zu den angegebenen Zeitpunkten Ameisensäure (1 μL) gegeben. Es wurden Reaktionen für 180 s, und 30 min durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden in HPLC-Glasvials überführt, mit 20 μL MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1% TFA) versetzt und mittels analytischer HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) vermessen. Die Probe nach 30 min Ligationszeit wurde erneut gelöst und vermessen. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.35 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 42B (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 23.6$ (**c18bh**).

Tabelle A.35: Ermittelte Ausbeuten der gewichteten, analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL bei 280 nm.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Zyklisierung
	$t_{\text{R}} = 23.6 \text{ min}$
180 s	-
30 min ^a	ca. 30

a) Erneut gelöste Probe.

Test-Reaktionsverfolgung des Alkynylpeptidthioesters **9h**

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der Peptidthioester (**9h**, 66 nmol) wurde in 660 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s, 5 min, 15 min und 30 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) versetzt. Für eine Messung wurde eine gefriergetrocknete und erneut gelöste Probe nach 30 min Reaktionszeit vermessen. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.36 aufgeführt. Eine repräsentative Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 42A (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 17.2$ min (**c9h**).

HR-MS (ESI) (m/z): **c9h** ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 548.2173, gef.: 548.2164; ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_7\text{SNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 570.1993, gef.: 570.1977.

Tabelle A.36: Ermittelter Mittelwert der Ausbeuten aus drei unabhängigen Versuchen der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der Kontrollmessung des Peptidthioesters **9h**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Mittelwert
	Zyklisierung ^a Messreihe 1-3
	$t_{\text{R}} = 16.6$ min
15 s	0.8 ± 0.1
30 s ^a	1.1 ± 0.1
45 s ^a	1.8 ± 0.2
60 s	2.2 ± 0.1
90 s	3.1 ± 0.2
120 s	4.3 ± 0.4
180 s	6.8 ± 0.7
5 min ^a	13.7 ± 5.2
15 min ^a	41.0 ± 2.4
30 min ^a	64.6 ± 1.8
gelöst ^b	40.6

a) S→S-Acyltransfer-Intermediat wurde zu Produkt gezählt. b) Einzelne Messung.

V.2 Serin

Test-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL mit Thiol C (4c)

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach AV19 in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Abweichend von bisherigen Versuchen wurden die Reaktionen getrennt für zwei Messpunkte durchgeführt. Dazu wurden jeweils äquimolar der Peptidthioester (**18bi**, 6 nmol) und Thiol C (**4c**, 6 nmol) in 60 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden zu den Reaktionsgemischen zu den angegebenen Zeitpunkten Ameisensäure (1 μL) gegeben. Es wurden Reaktionen für 180 s, und 30 min durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden in HPLC-Glasvials überführt, mit 20 μL MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1% TFA) versetzt und mittels analytischer HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) vermessen. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.37 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 43C (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_R = 23.1$ min (**c18bi**).

MALDI-TOF-MS (m/z): Haarnadel ber. für $\text{C}_{257}\text{H}_{423}\text{N}_{72}\text{O}_{76}\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 5801.8, gef.: 5804.4.

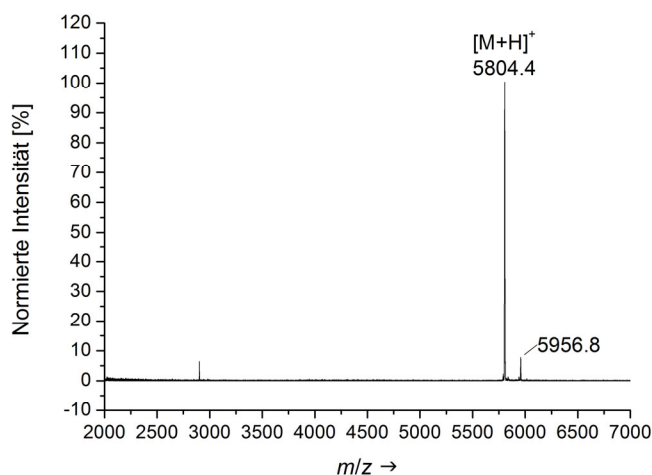


Tabelle A.37: Ermittelte Ausbeuten der gewichteten, analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL bei 280 nm.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %	
	Haarnadel	Zyklisierung
	$t_{\text{R}} = 19.7 \text{ min}$	$t_{\text{R}} = 23.1 \text{ min}$
180 s	10.8	n.d.
30 min	70.4	3.8

Test-Reaktionsverfolgung der Hintergrundreaktion des Peptidthioesters 18bi
Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach AV19 in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Abweichend von bisherigen Versuchen wurden die Reaktionen getrennt für zwei Messpunkte durchgeführt. Dazu wurde der Peptidthioester (**18bi**, 6 nmol) in 60 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden zu den Reaktionsgemischen zu den angegebenen Zeitpunkten Ameisensäure (1 μL) gegeben. Es wurden Reaktionen für 180 s, und 30 min durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden in HPLC-Glasvials überführt, mit 20 μL MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1 % TFA) versetzt und mittels analytischer HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) vermessen. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.38 aufgeführt. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 43B (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 23.1 \text{ min}$ (**18bi**).

Tabelle A.38: Ermittelte Ausbeuten der gewichteten, analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL bei 280 nm.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Zyklisierung
	$t_{\text{R}} = 23.1 \text{ min}$
180 s	2.1
30 min ^a	34.5

a) *S*→*S*-Acyltransfer-Intermediat wurde zu Produkt gezählt.

Test-Reaktionsverfolgung des Alkinylpeptidthioesters **9i**

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der Peptidthioester (**9i**, 66 nmol) wurde in 660 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μL (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s, 5 min, 15 min und 30 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μL) versetzt. Für eine Messung wurde eine gefriergetrocknete und erneut gelöste Probe nach 30 min Reaktionszeit vermessen. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μL MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Die Auswertung der Reaktionsverfolgung ist in Tabelle A.39 aufgeführt. Eine repräsentative Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 43A (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): $t_{\text{R}} = 15.2$ min (**c9i**).

HR-MS (ESI) (m/z): **c9i** ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 564.2123, gef.: 564.2123; ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_8\text{SNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 586.1942, gef.: 586.1931.

Tabelle A.39: Ermittelter Mittelwert der Ausbeuten aus drei unabhängigen Versuchen der analytischen HPLC-Reaktionsverfolgung der Kontrollmessung des Peptidthioesters **9i**.

$t_{\text{Rkt.}}$	HPLC-Ausbeute / %
	Mittelwert
	Zyklisierung ^a Messreihe 1-3 $t_{\text{R}} = 15.2$ min
15 s	0
30 s ^a	0.6 \pm 0.4
45 s ^a	1.3 \pm 0.2
60 s	1.7 \pm 0.2
90 s	2.6 \pm 0.5
120 s	3.4 \pm 0.5
180 s	5.6 \pm 0.8
5 min ^a	10.7 \pm 0.8
15 min ^a	38.1 \pm 3.4
30 min ^a	65.9 \pm 5.7
gelöst ^b	47.7

a) *S* \rightarrow *S*-Acyltransfer-Intermediat wurde zu Produkt gezählt. b) Einzelne Messung.

V.3 Isoleucin

Test-Reaktionsverfolgung der CC-vermittelten NCL mit Thiol C (4c)

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach AV19 in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Abweichend von bisherigen Versuchen wurden die Reaktionen getrennt für zwei Messpunkte durchgeführt. Dazu wurde der Peptidthioester (**18bj**, 6 nmol) in 60 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden zu den Reaktionsgemischen zu den angegebenen Zeitpunkten Ameisensäure (1 μL) gegeben. Es wurden Reaktionen für 180 s, und 30 min durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden in HPLC-Glasvials überführt, mit 20 μL MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1% TFA) versetzt und mittels analytischer HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) vermessen. Es wurde kein signifikanter Umsatz beobachtet. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 44 C (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): t_{R} = n.d. (**c18bj**).

Test-Reaktionsverfolgung der Hintergrundreaktion des Peptidthioesters 18bj

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach AV19 in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Abweichend von bisherigen Versuchen wurden die Reaktionen getrennt für zwei Messpunkte durchgeführt. Dazu wurde der Peptidthioester (**18bj**, 6 nmol) in 60 μL *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden zu den Reaktionsgemischen zu den angegebenen Zeitpunkten Ameisensäure (1 μL) gegeben. Es wurden Reaktionen für 180 s, und 30 min durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden in HPLC-Glasvials überführt, mit 20 μL MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1% TFA) versetzt und mittels analytischer HPLC (Injektionsvolumen 65 μL) automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) vermessen. Es wurde kein signifikanter Umsatz beobachtet. Eine Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 44B (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

HPLC (Methode H, 50 °C): t_{R} = n.d. (**c18bj**).

Test-Reaktionsverfolgung des Alkynylpeptidthioesters 9j

Bedingungen 7. Die Reaktion wurde nach **AV19** in MeCN/0.2 mM TCEP/PBS-Puffer (pH 7.9) durchgeführt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der Peptidthioester (**9j**, 66 nmol) wurde in 660 μ L *Ligationspuffer* (0.1 mM) bei 25 °C reagiert. Zur Reaktionsverfolgung wurden 60 μ L (6 nmol) Aliquote nach 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s, 5 min, 15 min und 30 min entnommen und mit Ameisensäure (1 μ L) versetzt. Eine einzelne Probe wurde für 20 h reagiert. Die Aliquote in HPLC-Glasvials wurden mit 10 μ L MeCN/Wasser (1:4, v/v, + 0.1% TFA) versetzt. Die analytische HPLC (Injektionsvolumen 65 μ L) wurde automatisiert mit Methode H (10-70%B in 30 min) durchgeführt. Es wurde kein signifikanter Umsatz beobachtet. Eine repräsentative Übersicht der erhaltenen Chromatogramme ist in Abbildung 44A (Diskussion Kapitel 3.4.2) gezeigt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] W. M. Rink, F. Thomas, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 7493–7497.
- [2] V. Armiento, A. Spanopoulou, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 3372–3384; *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 3396–3409.
- [3] X. Jing, K. Jin, *Med. Res. Rev.* **2020**, *40*, 753–810.
- [4] A. A. Vinogradov, Y. Yin, H. Suga, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4167–4181.
- [5] P. G. Dougherty, Z. Qian, D. Pei, *Biochem. J.* **2017**, *474*, 1109–1125.
- [6] M. A. Abdalla, L. J. McGaw, *Molecules* **2018**, *23*, 2080.
- [7] C. Li, J. Wang, C. Luo, W. Ding, D. G. Cox, *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 616–621.
- [8] F. J. Ortíz-López, M. C. Monteiro, V. González-Menéndez, J. R. Tormo, O. Genilloud, G. F. Bills, F. Vicente, C. Zhang, T. Roemer, S. B. Singh, F. Reyes, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 468–475.
- [9] A. Ványolós, M. Dékány, B. Kovács, B. Krámos, P. Bérdi, I. Zupkó, J. Hohmann, Z. Béni, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2688–2691.
- [10] Y.-M. Ma, X.-A. Liang, H.-C. Zhang, R. Liu, *J. Agri. Food. Chem.* **2016**, *64*, 3789–3793.
- [11] A. Spanopoulou, L. Heidrich, H.-R. Chen, C. Frost, D. Hrle, E. Malideli, K. Hille, A. Grammatikopoulos, J. Bernhagen, M. Zacharias, G. Rammes, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 14503–14508; *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 14711–14716.
- [12] D. N. Woolfson, *Coiled-Coil Design: Updated and Upgraded*, in *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms* (Eds.: D. A. D. Parry, J. M. Squire), Springer International Publishing, Cham, **2017**, S. 35–61.
- [13] W. M. Rink, F. Thomas, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 1665–1677.
- [14] J. M. Fletcher, A. L. Boyle, M. Bruning, G. J. Bartlett, T. L. Vincent, N. R. Zaccai, C. T. Armstrong, E. H. C. Bromley, P. J. Booth, R. L. Brady, A. R. Thomson, D. N. Woolfson, *ACS Synth. Biol.* **2012**, *1*, 240–250.
- [15] F. Thomas, A. L. Boyle, A. J. Burton, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5161–5166.
- [16] L. Truebestein, T. A. Leonard, *BioEssays* **2016**, *38*, 903–916.
- [17] F. Crick, *Acta Cryst.* **1953**, *6*, 689–697.
- [18] O. D. Testa, E. Moutevelis, D. N. Woolfson, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D315–D322.

- [19] P. B. Harbury, T. Zhang, P. S. Kim, T. Alber, *Science* **1993**, *262*, 1401–1407.
- [20] J. M. Fletcher, G. J. Bartlett, A. L. Boyle, J. J. Danon, L. E. Rush, A. N. Lupas, D. N. Woolfson, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 528–538.
- [21] J. N. M. Glover, S. C. Harrison, *Nature* **1995**, *373*, 257–261.
- [22] D. L. Akey, V. N. Malashkevich, P. S. Kim, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6352–6360.
- [23] F. Thomas, A. Niitsu, A. Oregioni, G. J. Bartlett, D. N. Woolfson, *Biochemistry* **2017**, *56*, 6544–6554.
- [24] M. G. Oakley, P. S. Kim, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12603–12610.
- [25] D. L. McClain, H. L. Woods, M. G. Oakley, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3151–3152.
- [26] M. L. Diss, A. J. Kennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1321–1327.
- [27] M. L. Diss, A. J. Kennan, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3797–3800.
- [28] S. J. Ryan, A. J. Kennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10255–10260.
- [29] K. J. Lumb, P. S. Kim, *Science* **1995**, *268*, 436–439.
- [30] P. Lavigne, F. D. Sönnichsen, C. M. Kay, R. S. Hodges, *Science* **1996**, *271*, 1136–1137.
- [31] J. R. Litowski, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37272–37279.
- [32] M. C. Groth, W. M. Rink, N. F. Meyer, F. Thomas, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 4308–4316.
- [33] S. Nautiyal, D. N. Woolfson, D. S. King, T. Alber, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11645–11651.
- [34] B. C. Root, L. D. Pellegrino, E. D. Crawford, B. Kokona, R. Fairman, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 329–336.
- [35] E. H. C. Bromley, R. B. Sessions, A. R. Thomson, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 928–930.
- [36] H. Gradišar, S. Božič, T. Doles, D. Vengust, I. Hafner-Bratkovič, A. Mertelj, B. Webb, A. Šali, S. Klavžar, R. Jerala, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 362–366.
- [37] S. Nautiyal, T. Alber, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 84–90.
- [38] N. A. Schnarr, A. J. Kennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11081–11082.
- [39] N. A. Schnarr, A. J. Kennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9779–9783.
- [40] N. A. Schnarr, A. J. Kennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 667–671.
- [41] P. Travisano, A. J. Kennan, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4219–4222.

- [42] J. Walshaw, D. N. Woolfson, *J. Struct. Biol.* **2003**, *144*, 349–361.
- [43] D. N. Woolfson, G. J. Bartlett, M. Bruning, A. R. Thomson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 432–441.
- [44] E. B. Hadley, O. D. Testa, D. N. Woolfson, S. H. Gellman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 530.
- [45] J. D. Steinkruger, G. J. Bartlett, E. B. Hadley, L. Fay, D. N. Woolfson, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2626–2633.
- [46] C. Negron, A. E. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16544–16556.
- [47] A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, *Pept. Sci.* **1996**, *40*, 495–504.
- [48] N. L. Ogihara, M. S. Weiss, D. Eisenberg, W. F. DeGrado, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 80–88.
- [49] S. F. Betz, W. F. DeGrado, *Biochemistry* **1996**, *35*, 6955–6962.
- [50] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, *Nature* **2021**, *596*, 583–589.
- [51] D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, *382*, 525–528.
- [52] K. Severin, D. H. Lee, J. A. Martinez, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1017–1024.
- [53] S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10559–10560.
- [54] R. Issac, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6808–6809.
- [55] K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, M. R. Ghadiri, *Nature* **1997**, *389*, 706–709.
- [56] M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14074–14081.
- [57] M. Strieker, A. Tanović, M. A. Marahiel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 234–240.
- [58] K. M. Wilcoxon, L. J. Leman, D. A. Weinberger, Z.-Z. Huang, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 748–749.
- [59] L. J. Leman, D. A. Weinberger, Z.-Z. Huang, K. M. Wilcoxon, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2959–2966.
- [60] Z.-Z. Huang, L. J. Leman, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1758–1761; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1782–1785.

- [61] Y. Chen, D. S. Black, P. J. Reilly, *Protein Sci.* **2016**, *25*, 1942–1953.
- [62] Y. Yano, A. Yano, S. Oishi, Y. Sugimoto, G. Tsujimoto, N. Fujii, K. Matsuzaki, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 341–345.
- [63] K. Kawano, Y. Yano, K. Omae, S. Matsuzaki, K. Matsuzaki, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3454–3461.
- [64] H. Yamashita, Y. Yano, K. Kawano, K. Matsuzaki, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2015**, *1848*, 1359–1366.
- [65] J. Wang, Y. Yu, J. Xia, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 178–187.
- [66] Y. Yano, N. Furukawa, S. Ono, Y. Takeda, K. Matsuzaki, *Pept. Sci.* **2016**, *106*, 484–490.
- [67] W. Nomura, N. Ohashi, A. Mori, H. Tamamura, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1080–1085.
- [68] W. Nomura, T. Mino, T. Narumi, N. Ohashi, A. Masuda, C. Hashimoto, H. Tsutsumi, H. Tamamura, *Pept. Sci.* **2010**, *94*, 843–852.
- [69] U. Reinhardt, J. Lotze, S. Zernia, K. Mörl, A. G. Beck-Sickinger, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10237–10241; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10402–10406.
- [70] U. Reinhardt, J. Lotze, K. Mörl, A. G. Beck-Sickinger, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2106–2117.
- [71] C. J. White, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 509–524.
- [72] H. C. Hayes, L. Y. P. Luk, Y.-H. Tsai, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 3983–4001.
- [73] C. Bechtler, C. Lamers, *RSC Med. Chem.* **2021**, *12*, 1325–1351.
- [74] R. W. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 1124–1134; *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1147–1157.
- [75] U. Schmidt, J. Langer, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 67–73.
- [76] Y. Li, A. Yongye, M. Giulianotti, K. Martinez-Mayorga, Y. Yu, R. A. Houghten, *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 1066–1072.
- [77] L. Zhang, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4375–4378.
- [78] J. Blake, C. H. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4055.
- [79] N. Vidović, G. Horvat, D. Riva, T. Rinkovec, N. Cindro, V. Tomišić, G. Speranza, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 2129–2134.
- [80] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [81] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.

- [82] S. B. H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338–351.
- [83] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640–6646.
- [84] L. Zhang, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2363–2370.
- [85] A. C. Conibear, E. E. Watson, R. J. Payne, C. F. W. Becker, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 9046–9068.
- [86] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533.
- [87] B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 687–690.
- [88] J. Offer, *Pept. Sci.* **2010**, *94*, 530–541.
- [89] O. Fuchs, S. Trunschke, H. Hanebrink, M. Reimann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 19483–19490; *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 19633–19640.
- [90] S. Tchertchian, O. Hartley, P. Botti, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9208–9214.
- [91] J. D. A. Tyndall, T. Nall, D. P. Fairlie, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 973–1000.
- [92] A. Tapeinou, M.-T. Matsoukas, C. Simal, T. Tselios, *Pept. Sci.* **2015**, *104*, 453–461.
- [93] L. Thorstholm, D. J. Craik, *Drug Disc. Today Technol.* **2012**, *9*, e13–e21.
- [94] I. Bab, M. Chorev, *Pept. Sci.* **2002**, *66*, 33–48.
- [95] Y.-C. Chen, I. Bab, N. Mansur, M. Namdar-Attar, H. Gavish, M. Vidson, A. Muhlrاد, A. Shteyer, M. Chorev, *J. Pept. Res.* **2000**, *56*, 147–156.
- [96] Chen, A. Muhlrاد, A. Shteyer, M. Vidson, I. Bab, M. Chorev, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1624–1632.
- [97] M. Jbara, S. K. Maity, M. Seenayah, A. Brik, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5069–5075.
- [98] M. Jbara, S. K. Maity, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10644–10655; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 10780–10792.
- [99] J. M. Palomo, *RSC Advances* **2014**, *4*, 32658–32672.
- [100] A. Isidro-Llobet, M. N. Kenworthy, S. Mukherjee, M. E. Kopach, K. Wegner, F. Gallou, A. G. Smith, F. Roschangar, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 4615–4628.
- [101] C.-D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246–249.
- [102] V. Mäde, S. Els-Heindl, A. G. Beck-Sickinger, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1197–1212.
- [103] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

- [104] R. Kleineweischede, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5984–5988; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6073–6077.
- [105] P. E. Schneggenburger, B. Worbs, U. Diederichsen, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 10–14.
- [106] J. Bartels, P. Lu, K. Maurer, A. V. Walker, K. D. Moeller, *Langmuir* **2011**, *27*, 11199–11205.
- [107] X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8669–8672.
- [108] J. Brask, F. Albericio, K. J. Jensen, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2951–2953.
- [109] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. D* **1971**, 636–637.
- [110] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369–11374.
- [111] S. Flemer, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 693–696.
- [112] J. Li, J. Yu, J. Zhao, J. Wang, S. Zheng, S. Lin, L. Chen, M. Yang, S. Jia, X. Zhang, P. R. Chen, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 352–361.
- [113] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2876–2890.
- [114] A. C. Nagalingam, S. E. Radford, S. L. Warriner, *Synlett* **2007**, *2007*, 2517–2520.
- [115] R. Huisgen, *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 333, 357.
- [116] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711.
- [117] A. A. H. Ahmad Fuaad, F. Azmi, M. Skwarczynski, I. Toth, *Molecules* **2013**, *18*, 13148–13174.
- [118] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133.
- [119] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075.
- [120] E. Haldón, M. C. Nicasio, P. J. Pérez, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9528–9550.
- [121] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879–9883; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 10063–10067.
- [122] S. Li, H. Cai, J. He, H. Chen, S. Lam, T. Cai, Z. Zhu, S. J. Bark, C. Cai, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 2315–2322.
- [123] F. Saito, H. Noda, J. W. Bode, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1026–1033.
- [124] M. Z. C. Hatit, L. F. Reichenbach, J. M. Tobin, F. Vilela, G. A. Burley, A. J. B. Watson, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4021.

- [125] W. Tang, M. L. Becker, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7013–7039.
- [126] J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302–1315.
- [127] E. Lallana, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8794–8804; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8956–8966.
- [128] C. J. Pickens, S. N. Johnson, M. M. Pressnall, M. A. Leon, C. J. Berkland, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 686–701.
- [129] J. P. Richardson, C.-H. Chan, J. Blanc, M. Saadi, D. Macmillan, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1351–1360.
- [130] D. J. Lee, K. Mandal, P. W. R. Harris, M. A. Brimble, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5270–5273.
- [131] F. Mende, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1232–1240; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1266–1274.
- [132] J. M. Smith, F. Vitali, S. A. Archer, R. Fasan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5075–5080; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5181–5186.
- [133] R. Berg, B. F. Straub, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2715–2750.
- [134] A. C. Conibear, K. Farbiarz, R. L. Mayer, M. Matveenko, H. Kählig, C. F. W. Becker, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6205–6211.
- [135] N. Shangari, T. S. Chan, K. Chan, S. Huai Wu, P. J. O'Brien, *Mol. Nutr. Food. Res.* **2007**, *51*, 445–455.
- [136] G. R. Buettner, B. A. Jurkiewicz, *Rad. Res.* **1996**, *145*, 532–541.
- [137] B. Frei, S. Lawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11037.
- [138] W. Bors, G. R. Buettner, *The vitamin C radical and its reactions in Vitamin C in Health and Disease*, (Eds.: L. Packer, J. Fuchs), Marcel Dekker, Inc., New York, **1997**, S. 75–94.
- [139] Y. Wang, S. Vivekananda, L. Men, Q. Zhang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 697–702.
- [140] J.-P. R. Chauvin, D. A. Pratt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 6255–6259; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 6351–6355.
- [141] A. M. Yol, D. E. Dabney, S.-F. Wang, B. A. Laurent, M. D. Foster, R. P. Quirk, S. M. Grayson, C. Wesdemiotis, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, *24*, 74–82.
- [142] C. H. Sohn, J. E. Lee, M. J. Sweredoski, R. L. J. Graham, G. T. Smith, S. Hess, G. Czerwieniec, J. A. Loo, R. J. Deshaies, J. L. Beauchamp, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2672–2680.
- [143] C. Zhang, H. Zhang, D. W. Litchfield, K. K.-C. Yeung, *Spectroscopy* **2010**, *25*, 48–55.

- [144] M. Petković, J. Schiller, M. Müller, R. Süß, K. Arnold, J. Arnhold, *Zeitschrift für Naturforschung B* **2009**, *64*, 331–334.
- [145] B. O. Keller, J. Sui, A. B. Young, R. M. Whittall, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *627*, 71–81.
- [146] D. Bang, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3985–3988; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4089–4092.
- [147] R. J. Spears, C. McMahon, V. Chudasama, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 11098–11155.
- [148] S. Ratner, H. T. Clarke, *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 200–206.
- [149] R. G. Kallen, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6227–6235.
- [150] J. J. A. G. Kamps, R. J. Hopkinson, C. J. Schofield, T. D. W. Claridge, *Commun. Chem.* **2019**, *2*, 126.
- [151] M. V. Piechowski, M.-A. Thelen, J. Hoigné, R. E. Bühler, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 1448–1454.
- [152] S. Teton, A. Mellouki, G. Le Bras, H. Sidebottom, *Int. J. Chem. Kinet.* **1996**, *28*, 291–297.
- [153] A. N. Pham, G. Xing, C. J. Miller, T. D. Waite, *J. Cat.* **2013**, *301*, 54–64.
- [154] T. Garoma, M. D. Gurol, *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 5246–5252.
- [155] J.-F. Müller, Z. Liu, V. S. Nguyen, T. Stavrakou, J. N. Harvey, J. Peeters, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13213.
- [156] G. A. Russell, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3871–3877.
- [157] A. I. Cederbaum, A. Qureshi, G. Cohen, *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 3517–3524.
- [158] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.
- [159] S. N. Semenov, L. Belding, B. J. Cafferty, M. P. S. Mousavi, A. M. Finogenova, R. S. Cruz, E. V. Skorb, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 10221–10232.
- [160] A. Dondoni, A. Marra, D. Perrone, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 275–277.
- [161] K. Giełzak-Koćwin, W. Wojciechowski, *Trans. Met. Chem.* **1996**, *21*, 312–316.
- [162] M. G. Finn, V. O. Rodionov. Patent WO 2009/038685 A1, March 26, 2009.
- [163] V. O. Rodionov, S. I. Presolski, S. Gardinier, Y.-H. Lim, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12696–12704.
- [164] V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. Díaz Díaz, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12705–12712.

- [165] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993–18001.
- [166] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [167] S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570–14576.
- [168] J. E. Hein, L. B. Krasnova, V. V. Fokin, *Org. Synth.* **2011**, *88*, 238–246.
- [169] B. M. Mykhalichko, O. N. Temkin, M. G. Mys'kiv, *Russ. Chem. Rev.* **2000**, *69*, 957–984.
- [170] J. Diez, M. P. Gamasa, J. Gimeno, E. Lastra, A. Aguirre, S. Garcia-Granda, *Organometallics* **1993**, *12*, 2213–2220.
- [171] M. Ahlquist, V. V. Fokin, *Organometallics* **2007**, *26*, 4389–4391.
- [172] B. F. Straub, *Chem. Commun.* **2007**, 3868–3870.
- [173] J. S. Calvo, R. L. E. Villones, N. J. York, E. Stefaniak, G. E. Hamilton, A. L. Stelling, W. Bal, B. S. Pierce, G. Meloni, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, Artikel ASAP. DOI: 10.1021/jacs.1021c03984.
- [174] N. Nepomniaschii, V. Grimminger, A. Cohen, S. DiGiovanni, H. A. Lashuel, A. Brik, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5243–5246.
- [175] P. Liu, B. W. O'Mara, B. M. Warrack, W. Wu, Y. Huang, Y. Zhang, R. Zhao, M. Lin, M. S. Ackerman, P. K. Hocknell, G. Chen, L. Tao, S. Rieble, J. Wang, D. B. Wang-Iverson, A. A. Tymiak, M. J. Grace, R. J. Russell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 837–844.
- [176] H. Rohde, J. Schmalisch, Z. Harpaz, F. Diezmann, O. Seitz, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1396–1400.
- [177] D. N. Barsoum, N. Okashah, X. Zhang, L. Zhu, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 9542–9551.
- [178] S. Ficht, R. J. Payne, R. T. Guy, C.-H. Wong, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3620–3629.
- [179] S. Middel, *Photocleavable Templates for PNA Base Pairing Mediated Native Chemical Ligation*, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen (Göttingen), **2016**.
- [180] J. Pawlas, T. Svensson, J. H. Rasmussen, *RSC Advances* **2019**, *9*, 38928–38934.
- [181] T. M. Dreaden, J. Chen, S. Rexroth, B. A. Barry, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 22632–22641.
- [182] Q. Han, H. Robinson, J. Li, *Biochem. J.* **2012**, *446*, 253–260.
- [183] C. Nolte, P. Mayer, B. F. Straub, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2101–2103; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2147–2149.

- [184] W. Wang, X. Peng, F. Wei, C.-H. Tung, Z. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 649–653; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 659–663.
- [185] F. Wei, W. Wang, Y. Ma, C.-H. Tung, Z. Xu, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 14188–14199.
- [186] L. Grassi, C. Cabrele, *Amino Acids* **2019**, *51*, 1409–1431.
- [187] E. Folzer, K. Diepold, K. Bomans, C. Finkler, R. Schmidt, P. Bulau, J. Huwyler, H.-C. Mahler, A. V. Koulov, *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 2824–2831.
- [188] T. Todorovski, M. Fedorova, L. Hennig, R. Hoffmann, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 256–262.
- [189] N. M. Alexander, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 1946–1952.
- [190] B. Kamber, A. Hartmann, K. Eisler, B. Riniker, P. Sieber, W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 2358–2363.
- [191] L. K. Ramachandran, *Chem. Rev.* **1956**, *56*, 199–218.
- [192] J. M. Chalker, S. B. Gunnoo, O. Boutureira, S. C. Gerstberger, M. Fernández-González, G. J. L. Bernardes, L. Griffin, H. Hailu, C. J. Schofield, B. G. Davis, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1666–1676.
- [193] K. G. Byler, Y. Li, R. A. Houghten, K. Martinez-Mayorga, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2979–2987.
- [194] L. Jiang, K. Kirshenbaum, *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 2312–2320.
- [195] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4325–4329.
- [196] D. S. Nielsen, N. E. Shepherd, W. Xu, A. J. Lucke, M. J. Stoermer, D. P. Fairlie, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8094–8128.
- [197] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [198] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188–5240; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5320–5374.
- [199] *Cold Spring Harb. Protoc.*; 2006; doi: 10.1101/pdb.rec8247.
- [200] H. Mach, C. R. Middaugh, R. V. Lewis, *Anal. Biochem.* **1992**, *200*, 74–80.
- [201] M. Taniguchi, H. Du, J. S. Lindsey, *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 277–289.
- [202] J. E. Bailey, *UV absorption characteristics of N-acetyl methyl esters of the aromatic amino acids, cystine, and N-acetylcysteine*, in *Handbook of Biochemistry* (Ed.: H. A. Sober), Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, **1968**, S. B-18.
- [203] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2411–2423.

- [204] Novabiochem, *Novabiochem: Peptide Synthesis*, Merck KGaA, Darmstadt, **2014/2015**, S. 3.6, 3.30.
- [205] M. Gude, J. Ryf, P. D. White, *Lett. Pept. Sci.* **2002**, *9*, 203–206.
- [206] S. Eissler, M. Kley, D. Bächle, G. Loidl, T. Meier, D. Samson, *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 757–762.
- [207] V. Gold, B. W. V. Hawes, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1951**, 2102–2111.
- [208] R. Raz, *Development of a Tert-Butyl Thiol Linker for the Synthesis of Peptide Thioesters and Thioacids for Application in Chemical Ligation Methods*, Dissertation, Freie Universität Berlin (Berlin), **2011**.
- [209] J. M. Collins, S. K. Singh, K. A. Porter, *An Improved Coupling Method for Peptide Synthesis at Elevated Temperature*, präsentiert auf APS 2015, Poster P382. Abgerufen von CEM Corporation Website am 19.11.2019:
http://www.cem.de/documents/produkte/peptid/525_Poster_LibBlue_2015APS_DIEA_method.pdf.
- [210] CEM Corporation (2018), *CarboMAX™ – Enhanced Peptide Coupling at Elevated Temperature* (Application Note ap0124). Abgerufen von CEM Corporation Website am 19.11.2019:
<http://cem.com/media/contenttype/media/literature/ap0124v2-cem.pdf>.
- [211] V. Reusche, *geplante Dissertation*, Georg-August-Universität Göttingen (Göttingen), **Feb. 2022**.
- [212] F. Thomas (geb. Mende), *Fmoc-basierte Festphasensynthese von Peptidthioestern mit Selbstreinigungseffekt*, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2010**.
- [213] S. Middel, C. H. Panse, S. Nawratil, U. Diederichsen, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 2328–2332.
- [214] S. Nielsen, *Food Analysis*, 3rd ed., Kluwer Academic, New York, **2003**, S. 344.
- [215] J. Dadová, M. Vrábek, M. Adámik, M. Brázdová, R. Pohl, M. Fojta, M. Hocek, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16091–16102.
- [216] A. C. Ross, S. M. K. McKinnie, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2008–2011.
- [217] A. Crivici, G. Lajoie, *Synthetic Communications* **1993**, *23*, 49–53.
- [218] E. L. Ruggles, P. B. Decker, R. J. Hondal, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1257–1267.
- [219] D. M. Mofford, S. T. Adams, G. S. K. K. Reddy, G. R. Reddy, S. C. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8684–8687.
- [220] K. Hirano, M. Izumi, D. Macmillan, K. Tezuka, T. Tsuji, Y. Kajihara, *J. Carbohydr. Chem.* **2011**, *30*, 306–319.

Literaturverzeichnis

[221] B. J. H. Kuipers, H. Gruppen, *J. Agri. Food. Chem.* **2007**, 55, 5445-5451.

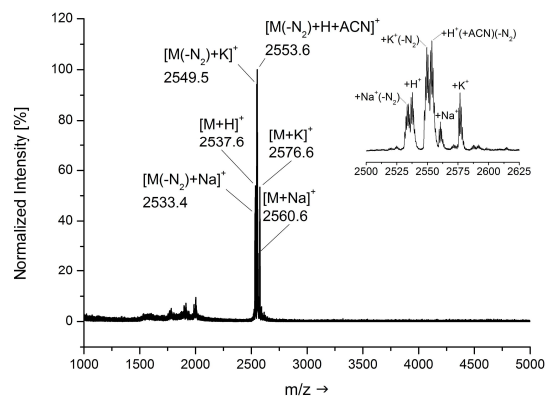
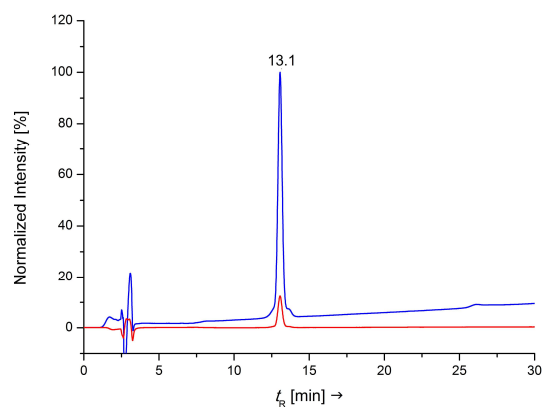
7 Anhang

7.1 Chromatogramme und Massenspektren der synthetisierten Peptide

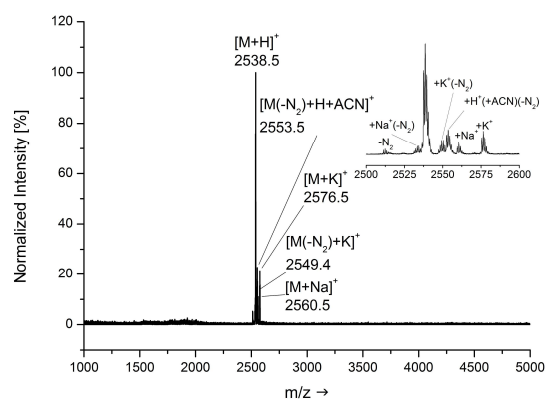
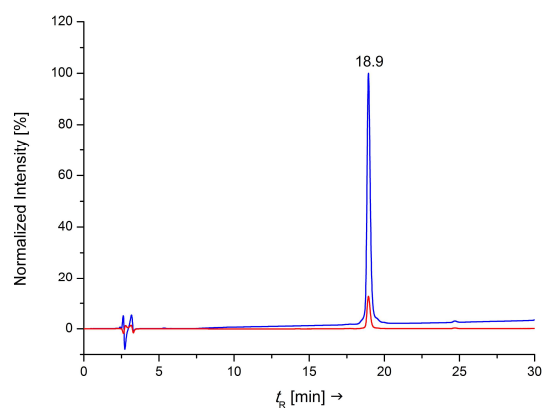
Analytische HPLC-Spuren (*links*, aufgezeichnet bei 220 nm (blau) und 280 nm (rot) sowie MALDI-TOF-MS Spektren (*rechts*) bzw., wenn angegeben, ESI-HRMS Spektren (*rechts*). Massen wurden nicht notiert für Intensitäten < 10%, sind aber in den MS-Spektren, falls bekannt, angegeben. Die gezeigten Spektren wurden auf den Peak der höchsten Intensität normiert und sind als *Normalized Intensity* (engl. Normierte Intensität) oder Normierte Intensität dargestellt.

7.1.1 N-Azid-Coil-Peptide

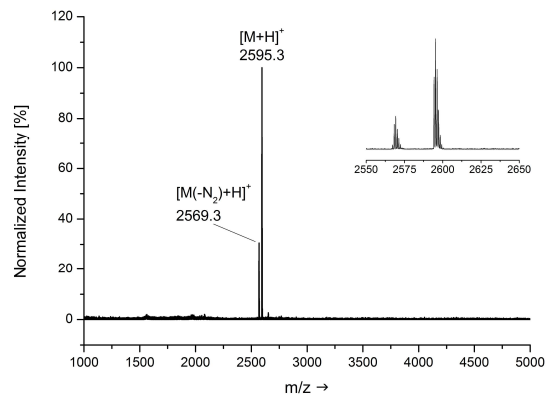
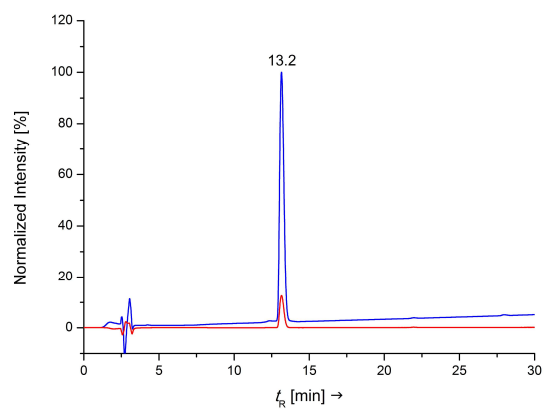
G(N₃)-A₃-GG-NH₂ (1a)



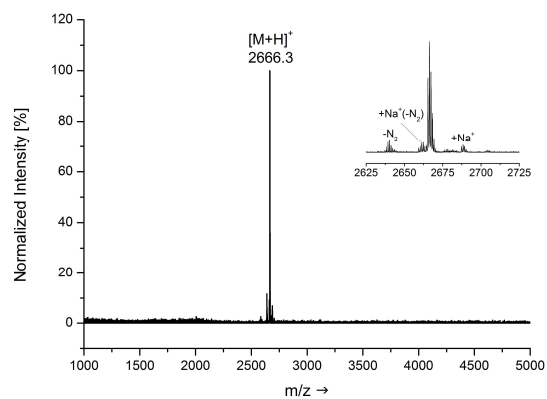
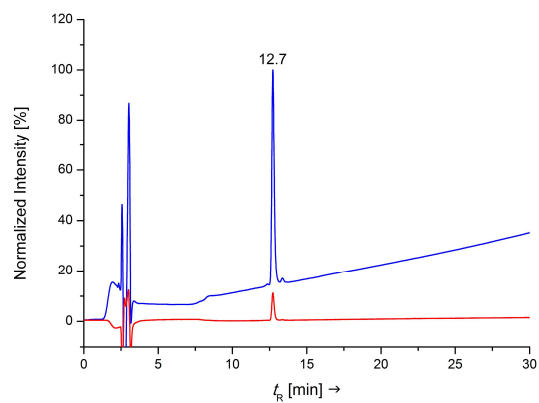
G(N₃)-A₃(K7Q)-GG-NH₂ (1a(K7Q))



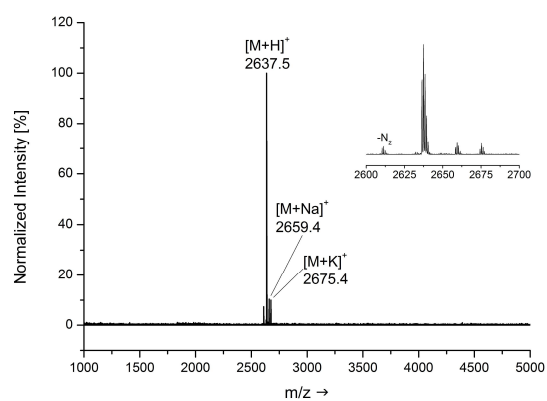
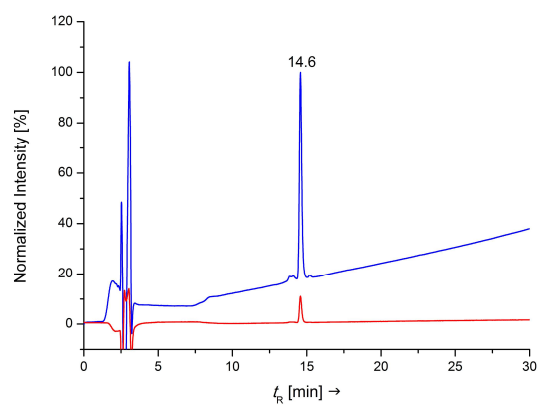
G(N₃)G-A₃-GG-NH₂ (1b)

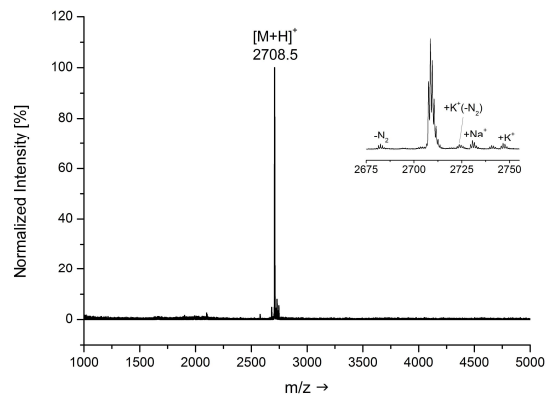
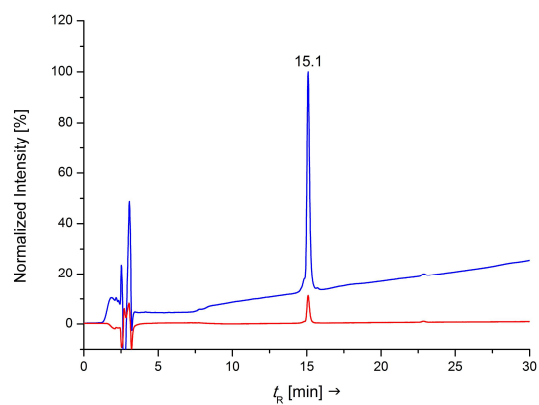
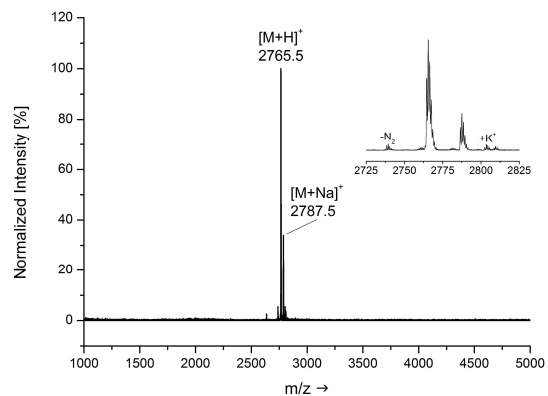
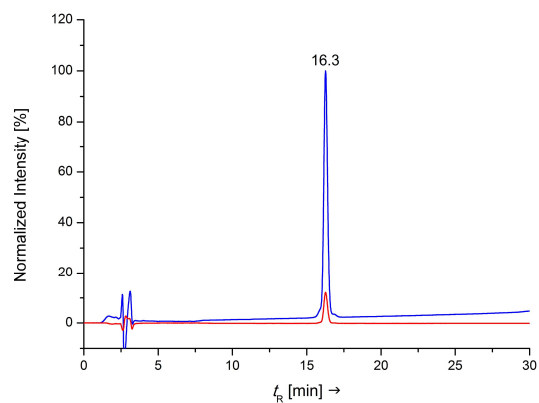
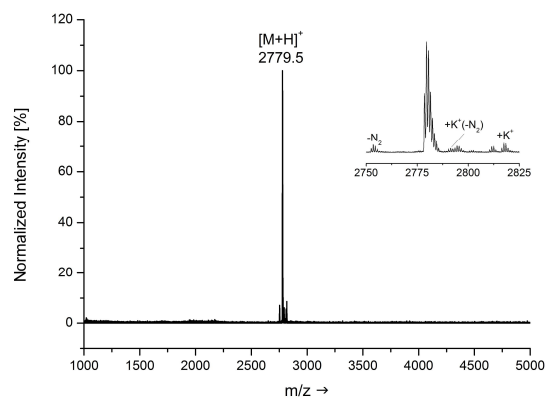
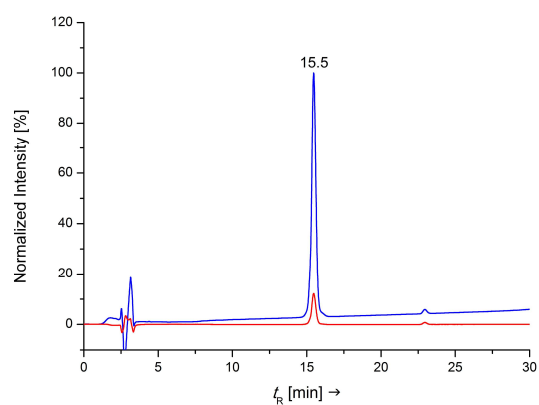


Ac-A(N₃)G-A₃-GG-NH₂ (1c)

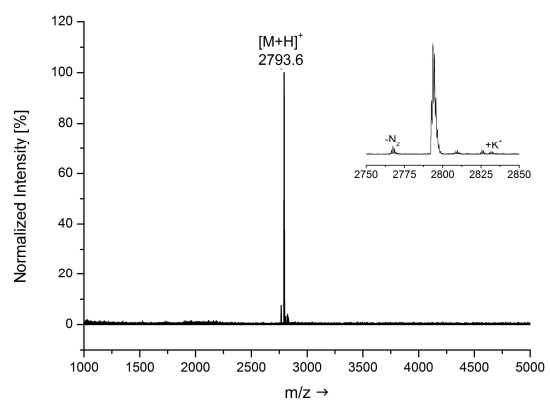
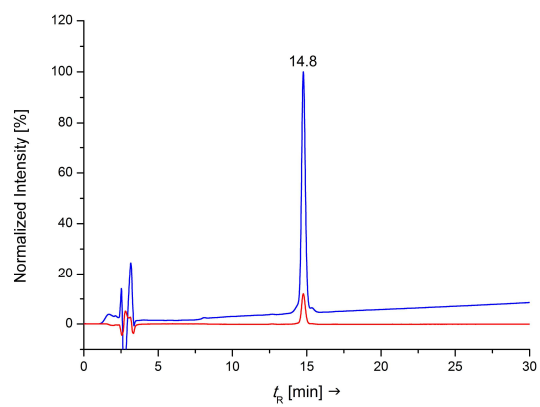


N₃-(CH₂)₄CO-G-A₃-GG-NH₂ (1d)



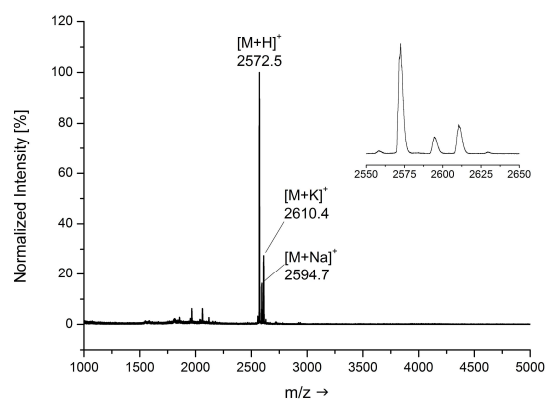
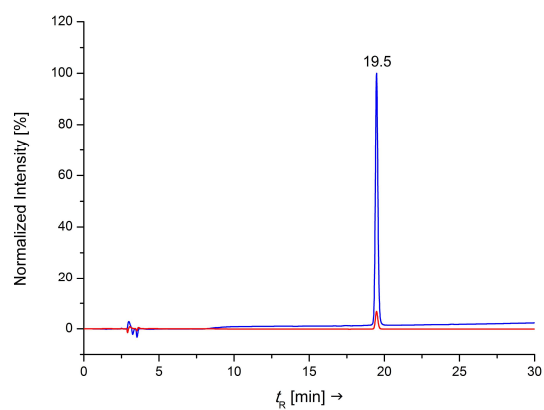
Ac-K(N₃)G-A₃-GG-NH₂ (1e)**Ac-K(N₃)GG-A₃-GG-NH₂ (1f)****Ac-K(N₃) β AlaG-A₃-GG-NH₂ (1g)**

Ac-K(N₃) γ AbuG-A₃-GG-NH₂ (1h)

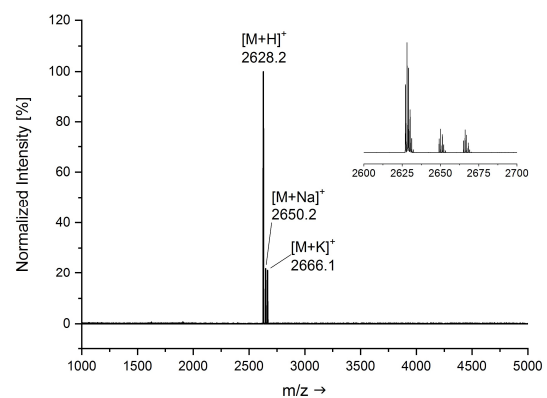
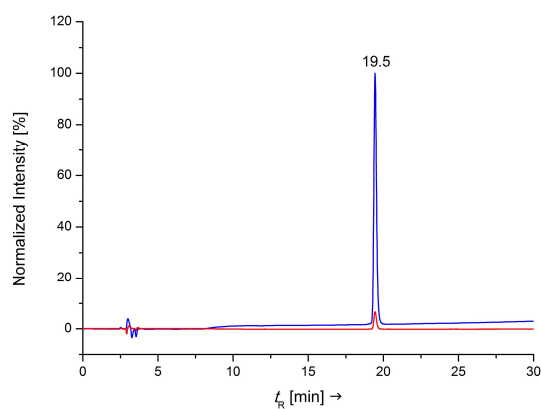


7.1.2 N-Thiol-Coil-Peptide

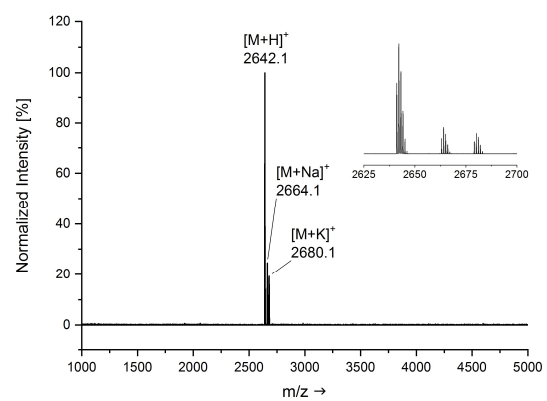
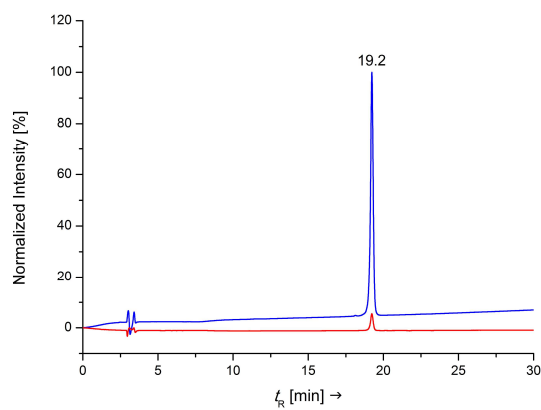
HS-(CH₂)₂CO-G-B₃-GG-NH₂ (4a)



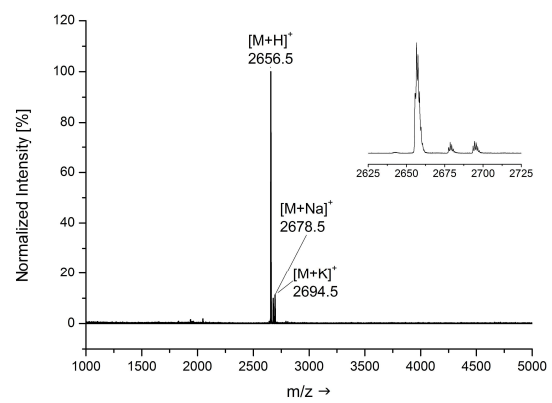
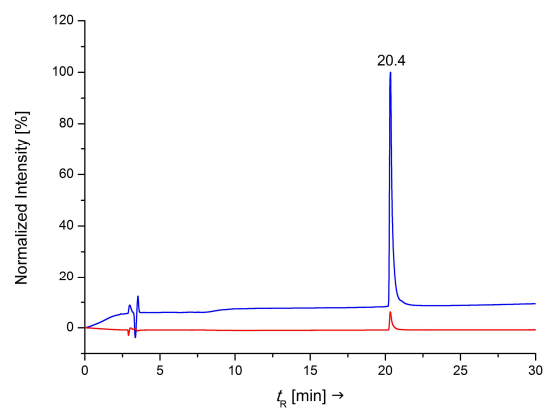
HS-(CH₂)₂CO-GG-B₃-GG-NH₂ (4b)



HS-(CH₂)₂CO- β AlaG-B₃-GG-NH₂ (4c)

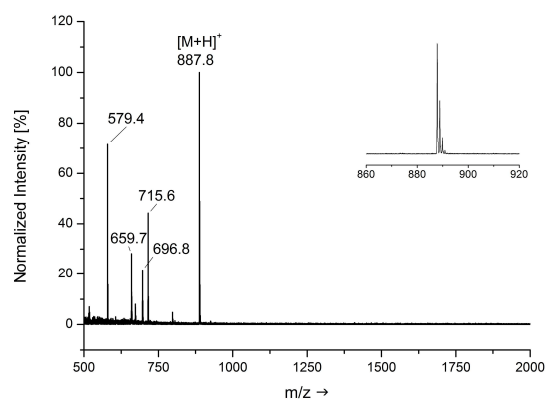
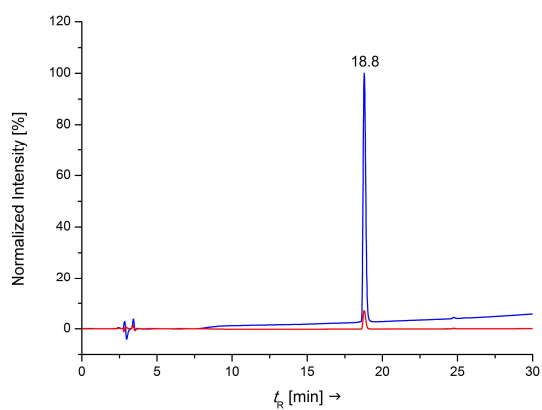


HS-(CH₂)₂CO- γ AbuG-B₃-GG-NH₂ (4d)

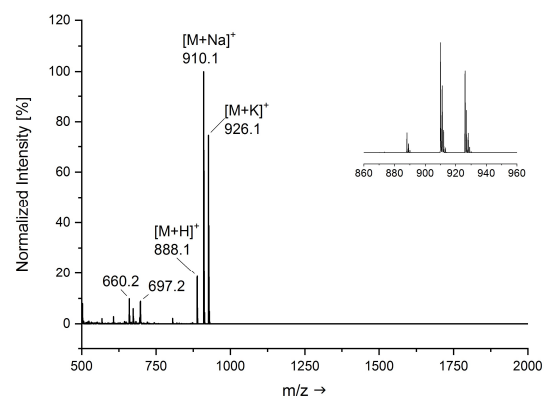
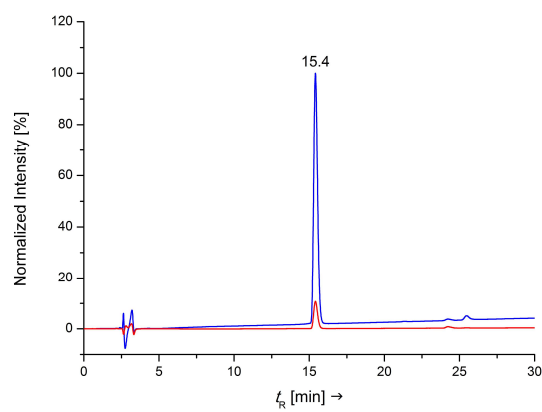


7.1.3 Peptidthioester

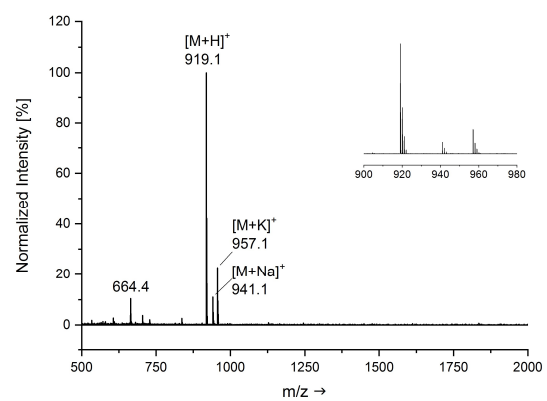
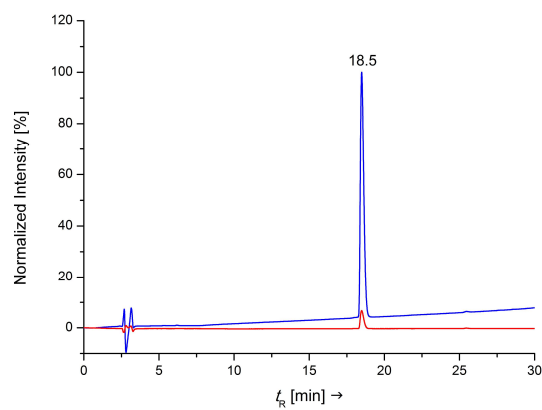
H-AK(Proc)YGFGG-SBn (9a)



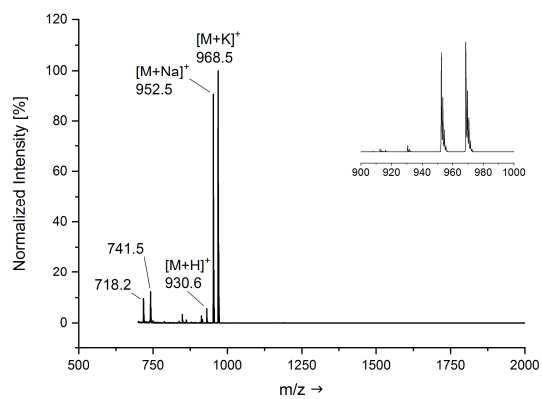
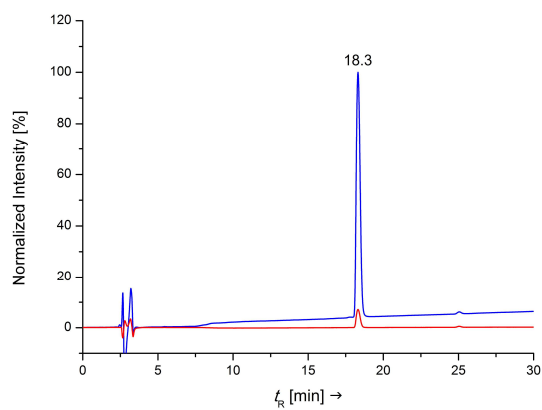
H-K(Proc)AYGFGG-SBn (9a(A/K))



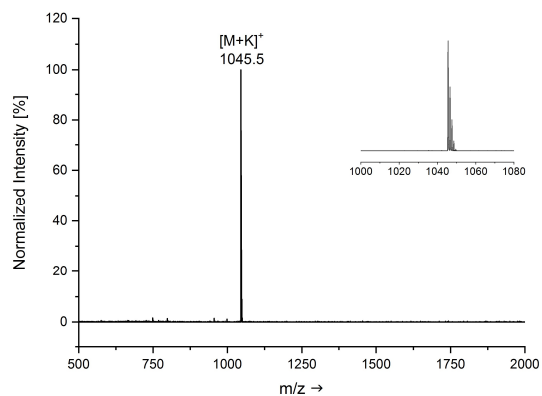
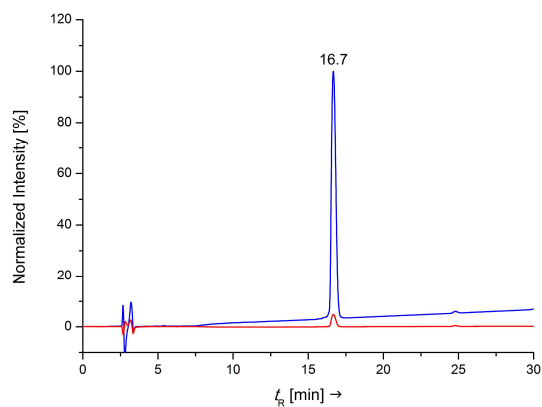
H-CK(Proc)YGFGG-SBn (9b)



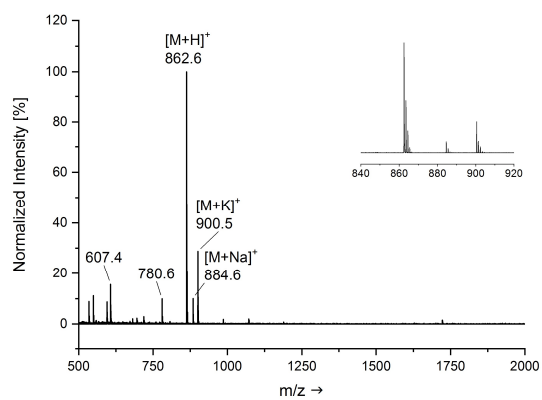
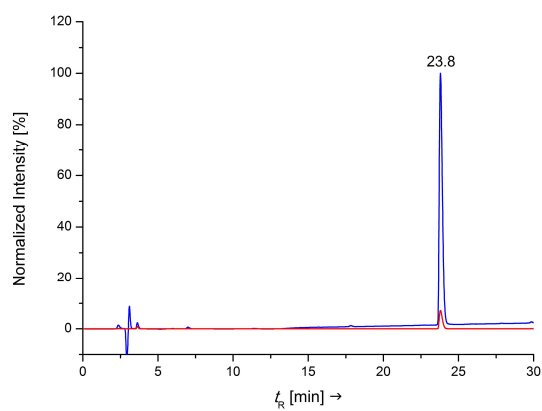
H-ThzK(Proc)YGFGG-SBn (9c)



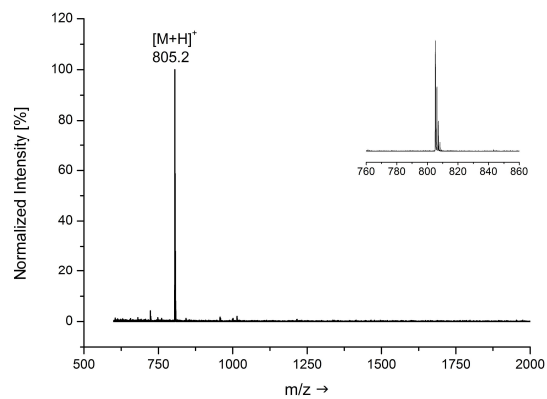
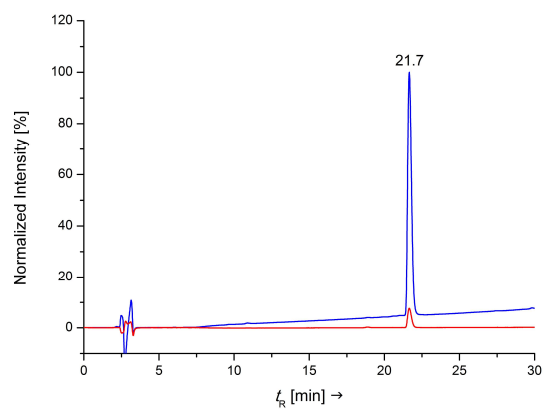
H-C(S'Bu)K(Proc)YGFGG-SBn (9d)



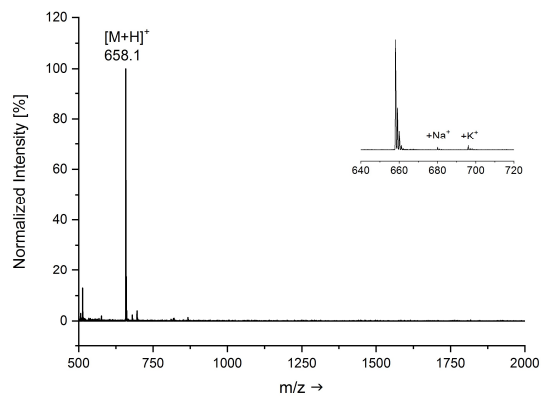
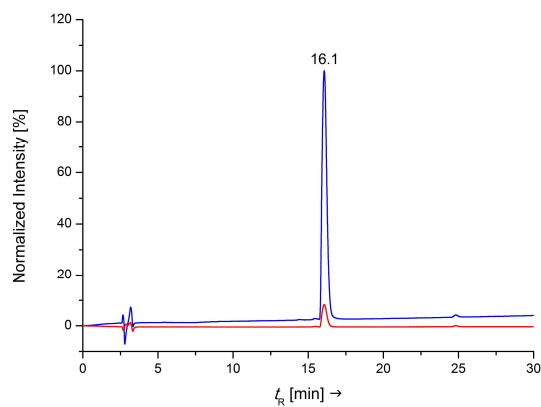
H-CK(Proc)YGFGG-SBn (9e)



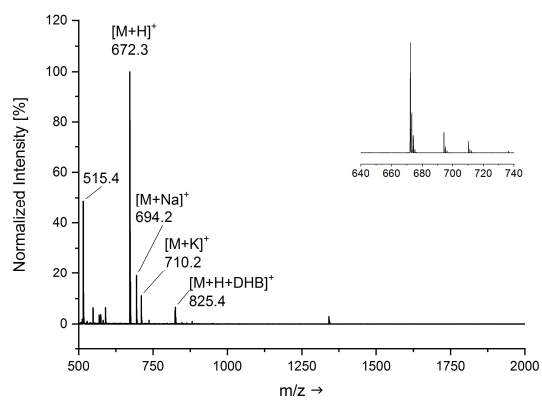
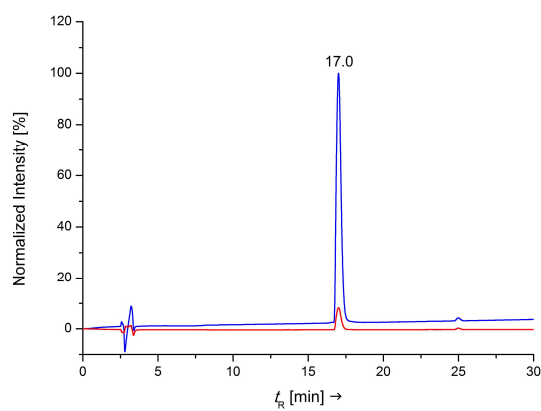
H-CK(Proc)YGF-SBn (9f)



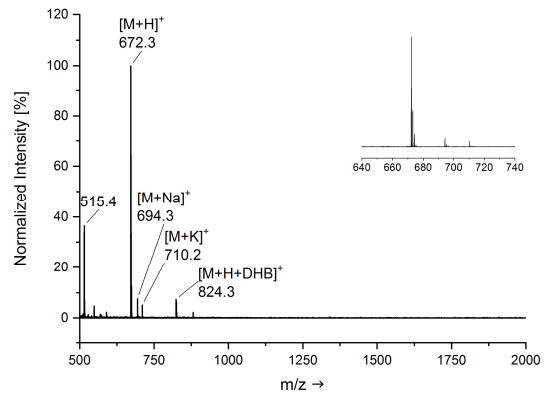
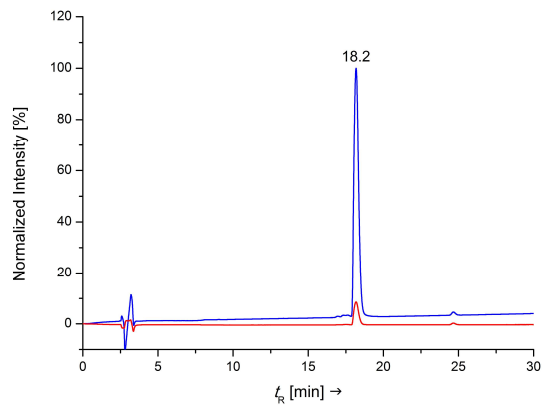
H-CK(Proc)YG-SBn (9g)



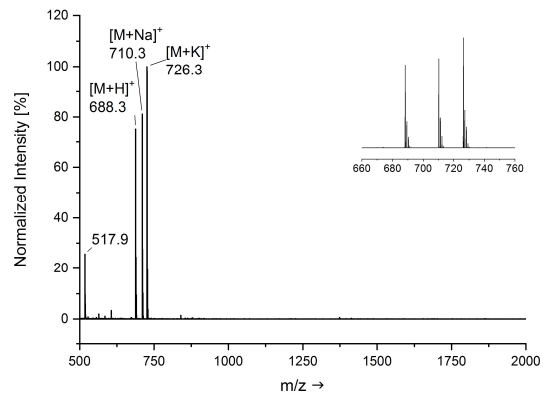
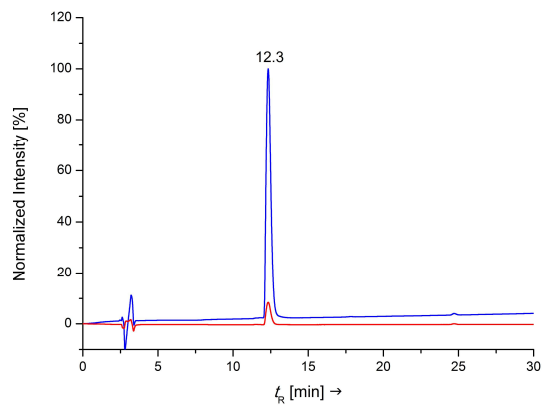
H-CK(Proc)Y-D-Ala-SBn (D-9h)



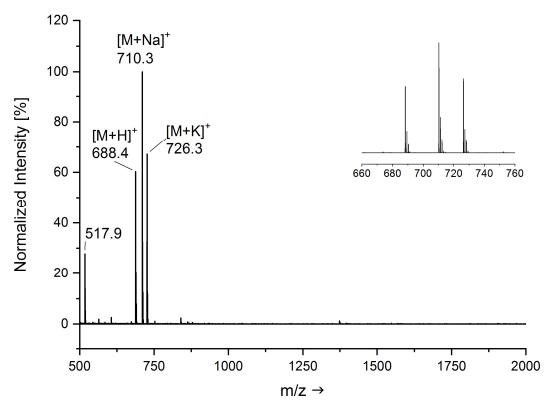
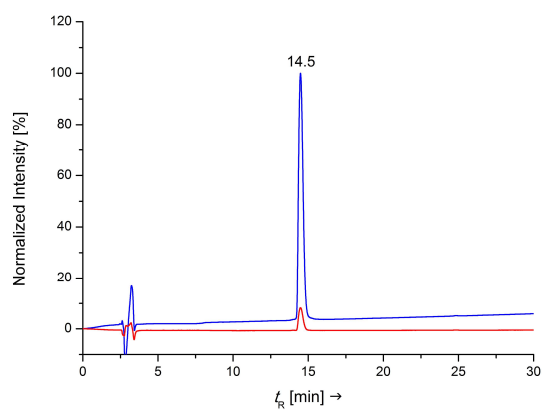
H-CK(Proc)Y-L-Ala-SBn (9h)



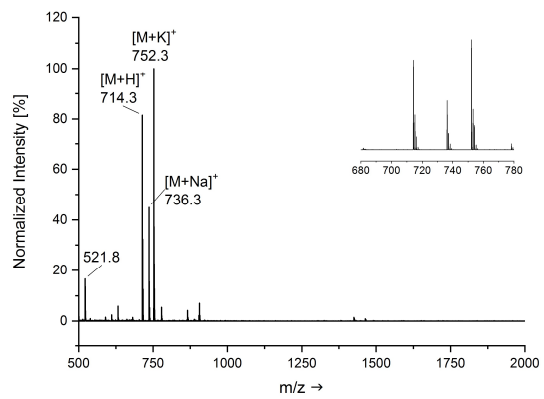
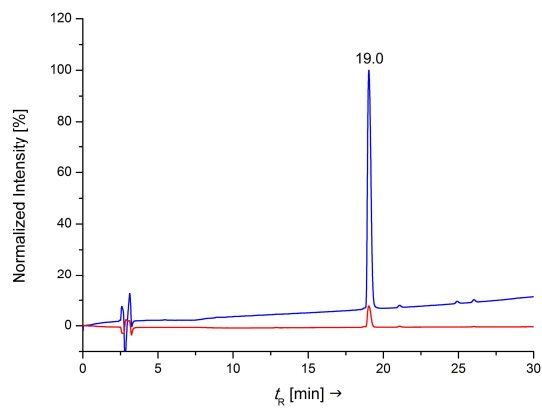
H-CK(Proc)Y-D-Ser-SBn (D-9i)



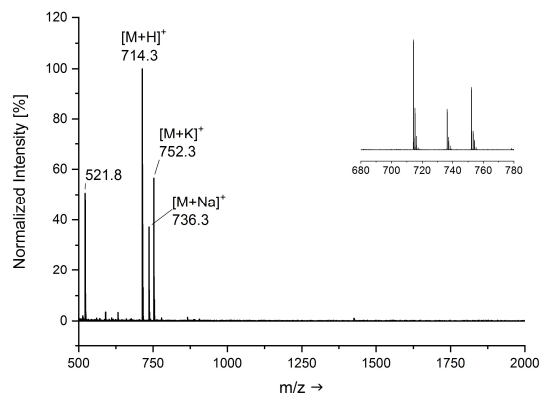
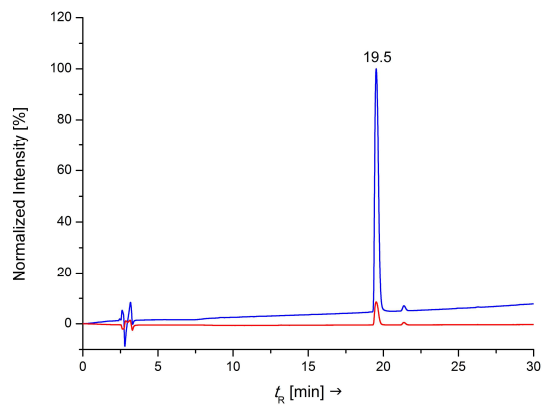
H-CK(Proc)Y-L-Ser-SBn (9i)



H-CK(Proc)Y-D-Ile-SBn (D-9j)

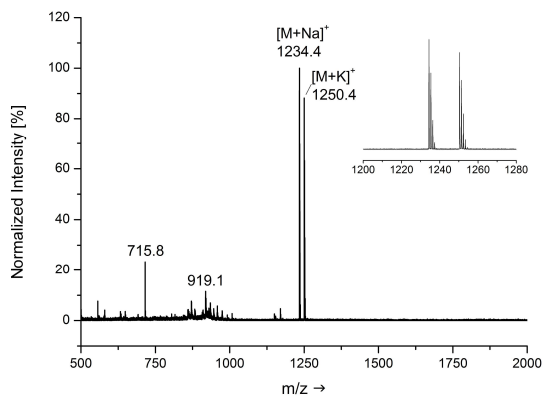
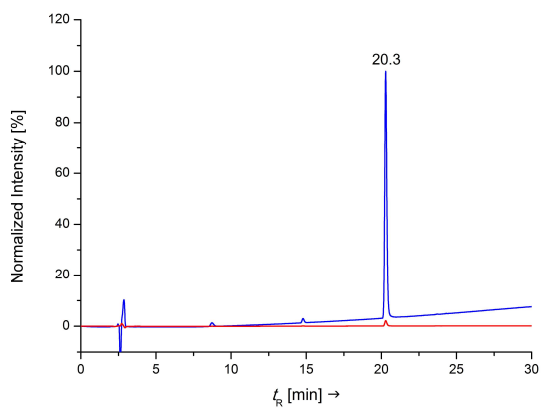


H-CK(Proc)Y-L-Ile-SBn (9j)

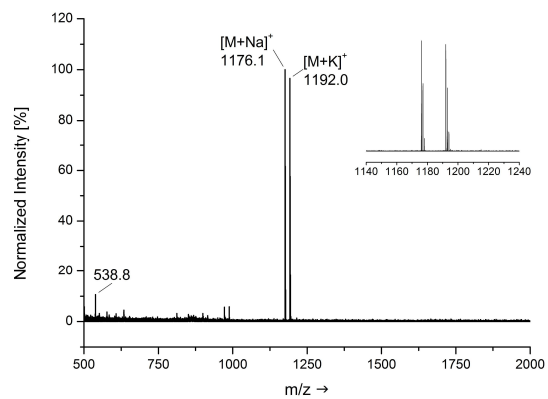
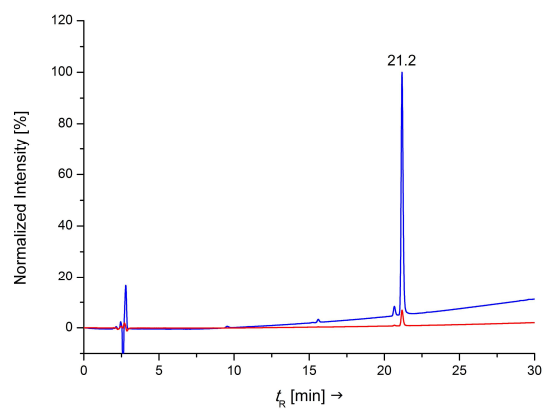


7.1.4 Vollgeschützte Peptidsäuren

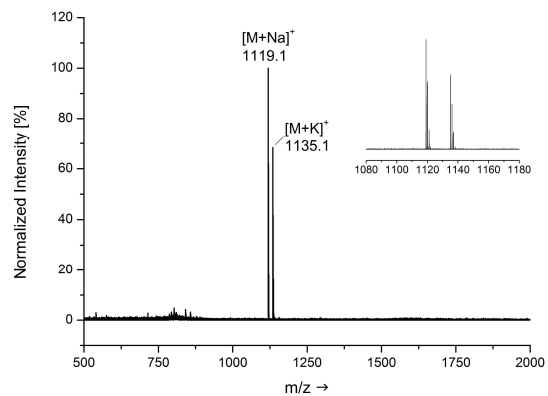
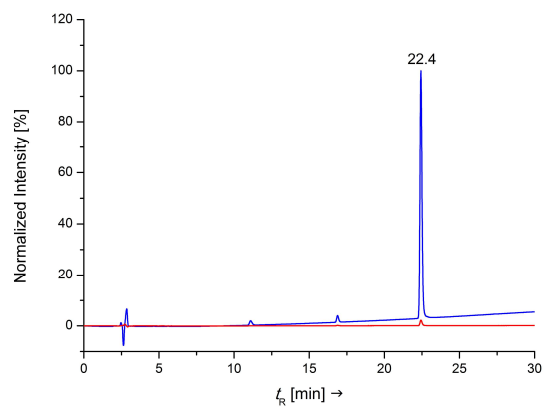
Boc-C(Trt)K(Proc)Y(^tBu)GFGG-OH (10a)



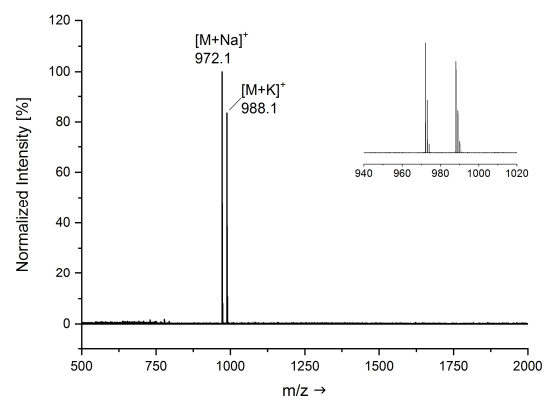
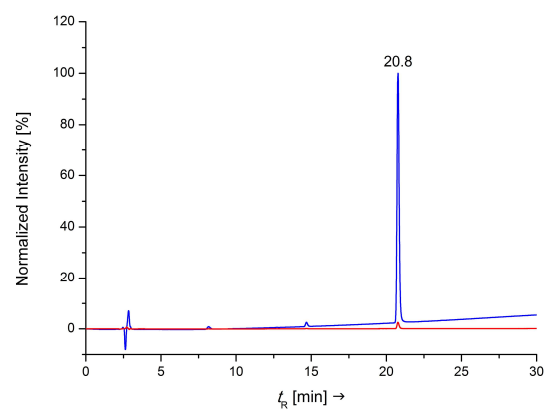
Boc-C(Trt)K(Proc)Y('Bu)GFG-OH (10e)



Boc-C(Trt)K(Proc)Y('Bu)GF-OH (10f)

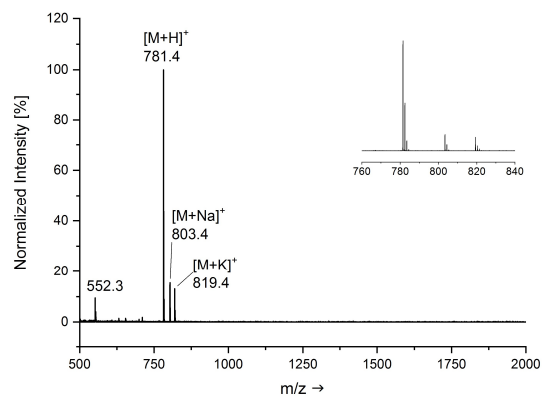
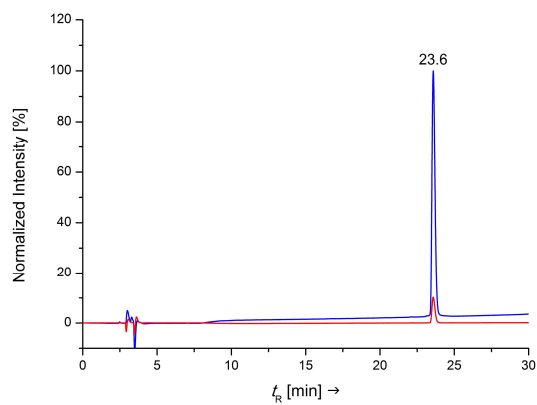


Boc-C(Trt)K(Proc)Y('Bu)G-OH (10g)

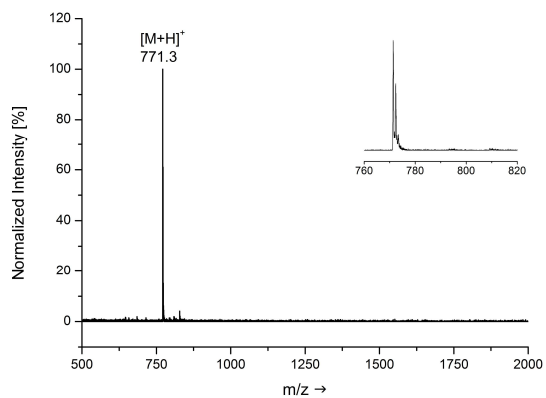
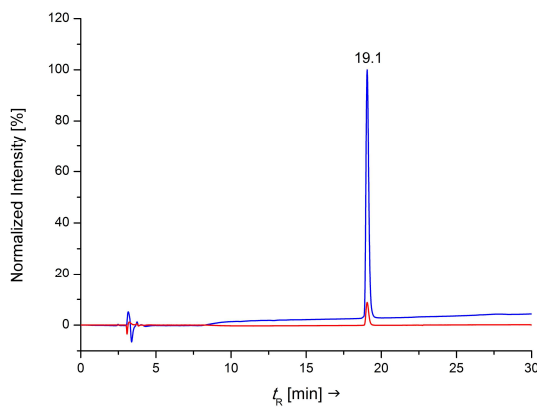


7.1.5 Peptidsäuren

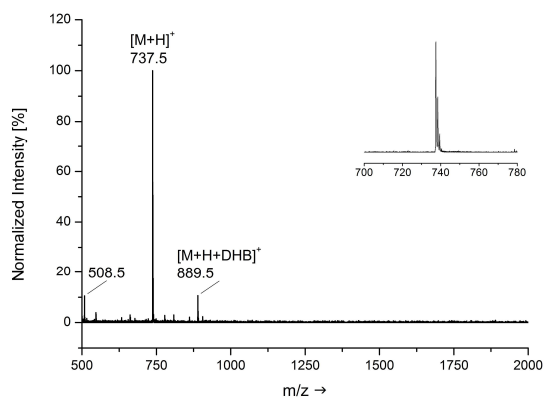
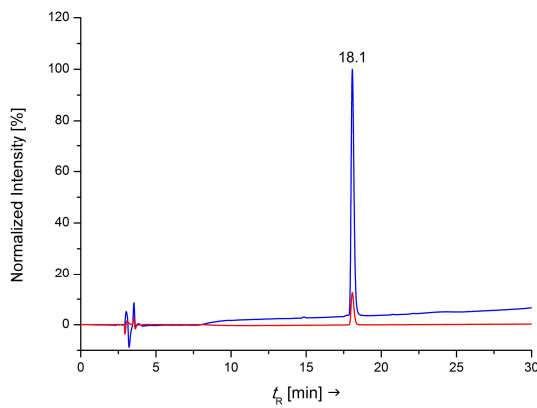
H-AK(Proc)YGFGG-OH (17a)



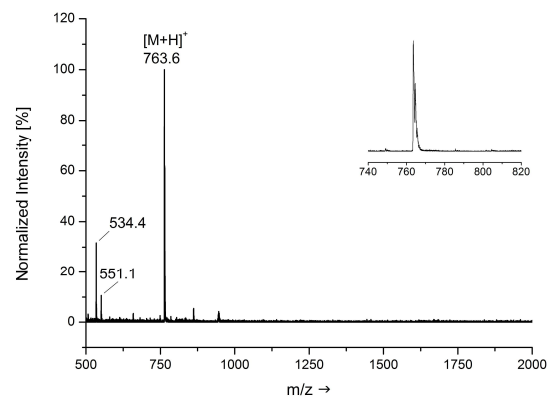
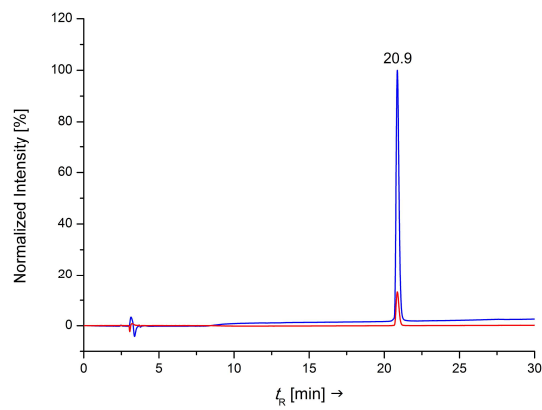
H-AK(Proc)YGHGG-OH (17k)



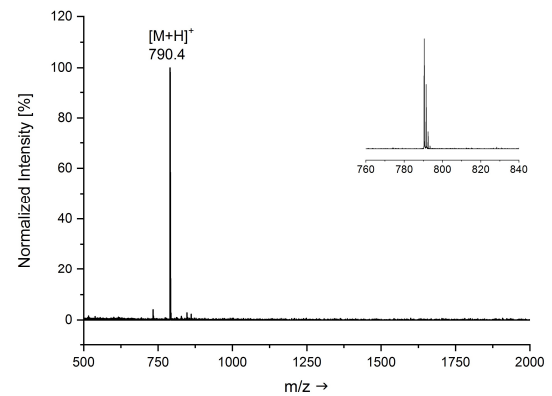
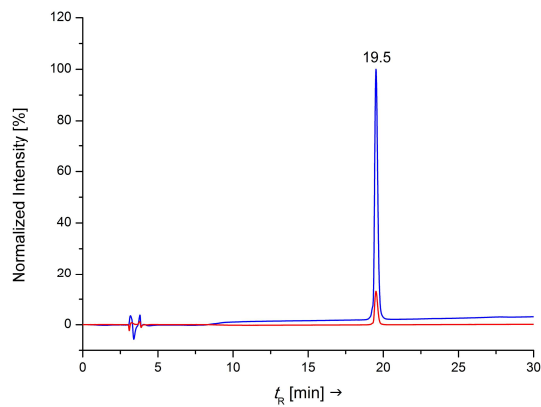
H-AK(Proc)YGCGG-OH (17l)



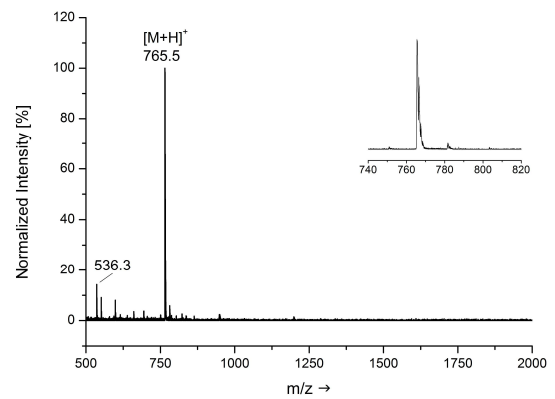
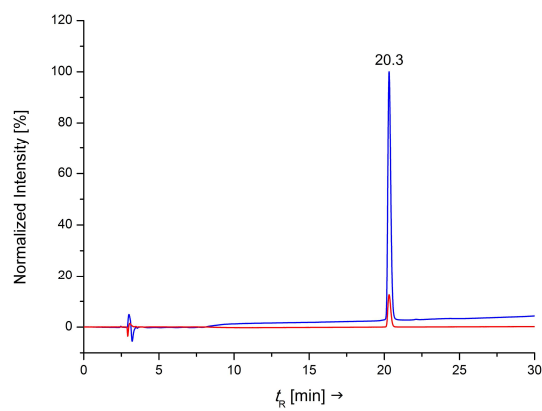
H-AK(Proc)YGEGG-OH (17m)



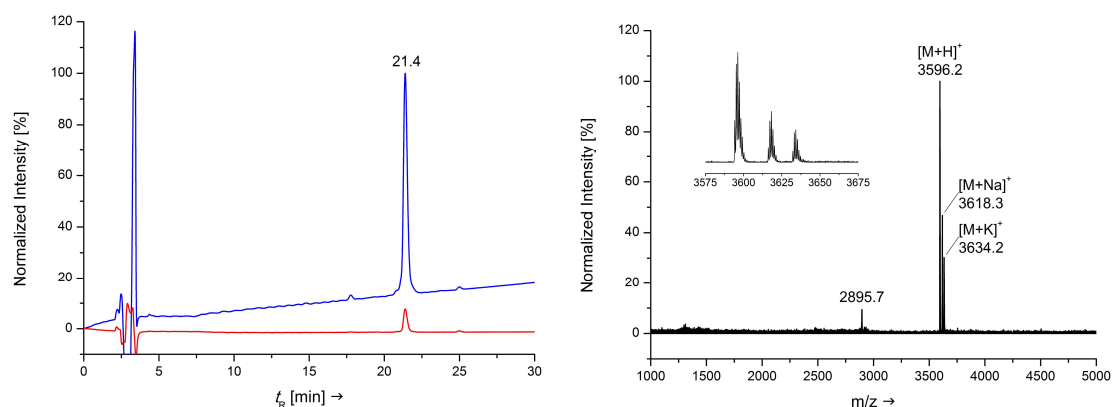
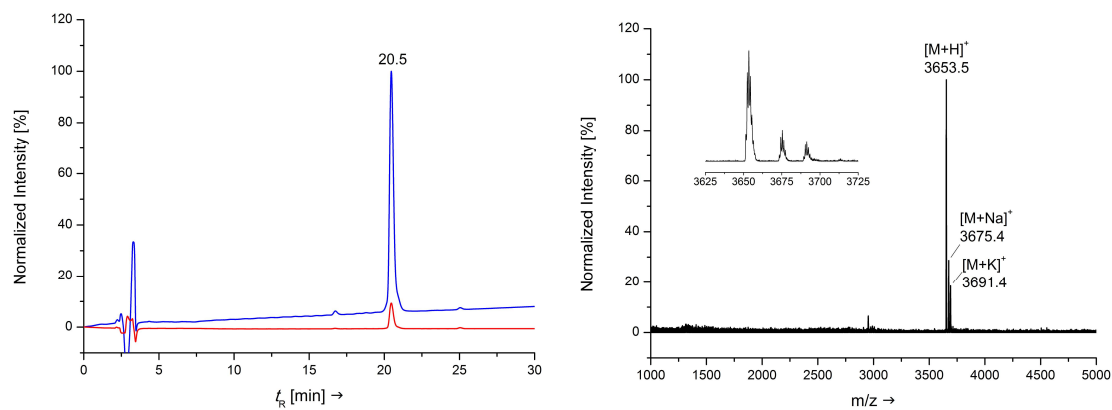
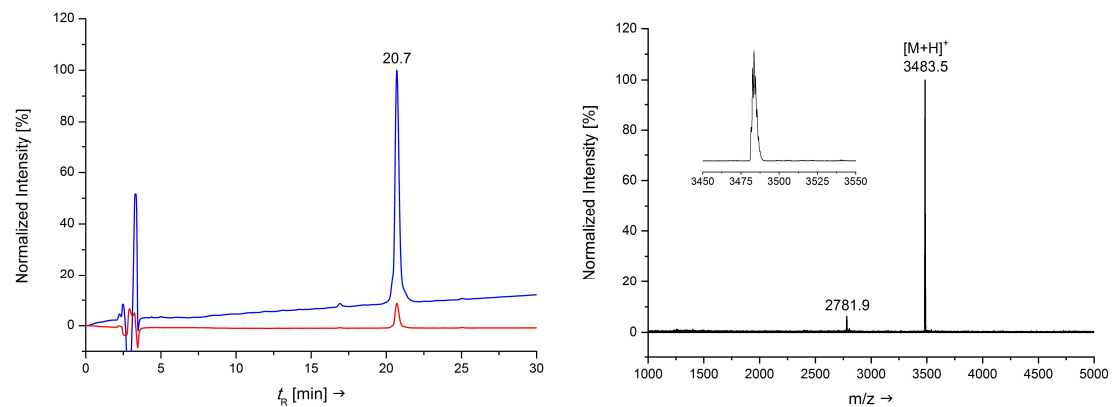
H-AK(Proc)YGRGG-OH (17n)



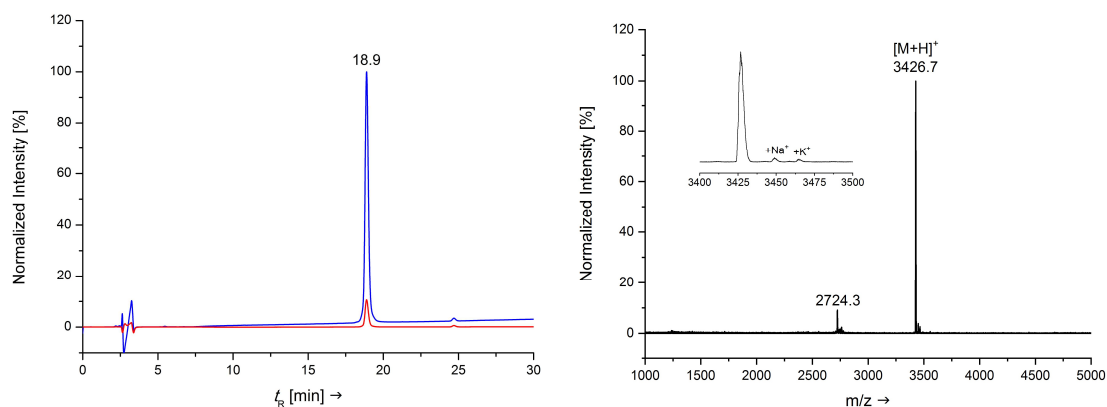
H-AK(Proc)YGMGG-OH (17o)



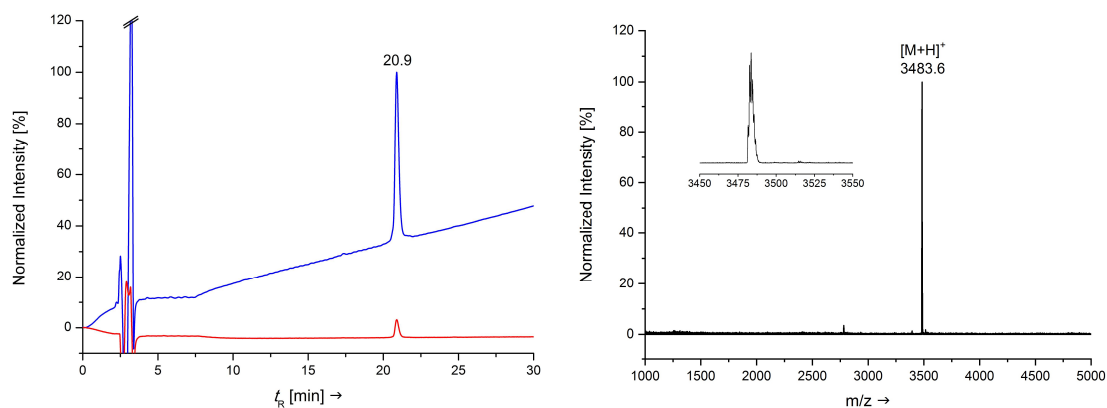
7.1.6 CuAAC-Konjugate

H-AK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (18ea)H-AK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (18fa)H-AK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (18ba)

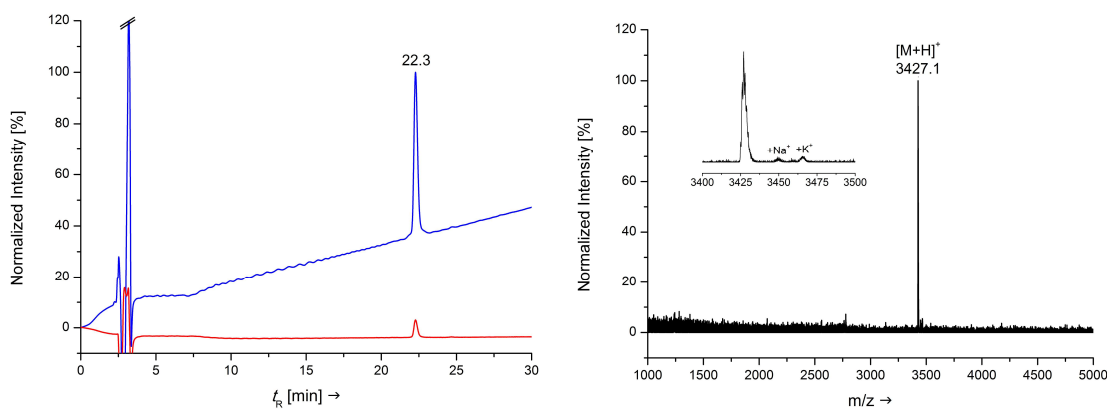
**H-K(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)AYGFGG-SBn
(18aa(K/A))**



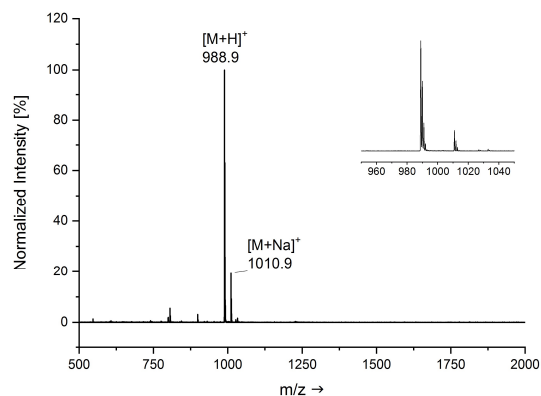
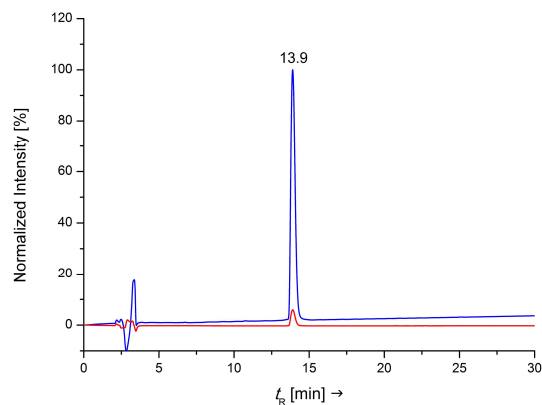
**H-K(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)AYGFGG-SBn
(18ba(K/A))**



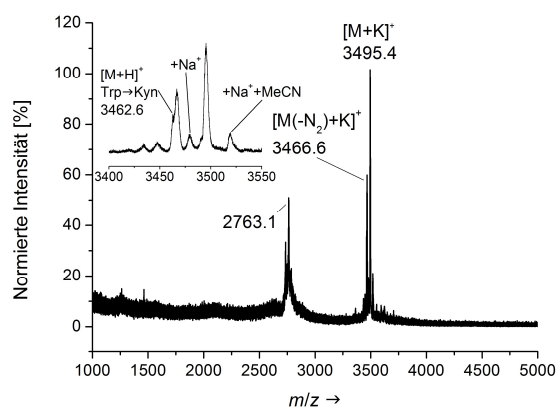
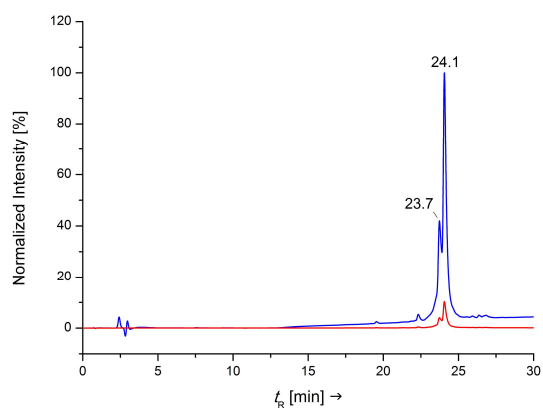
**H-K(*N_ε*-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)AYGFGG-SBn
(18a(K7Q)a(K/A))**



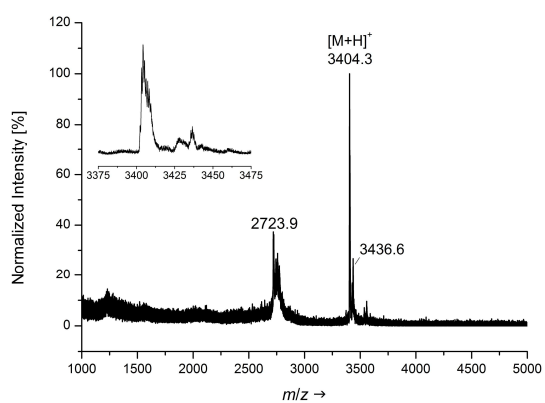
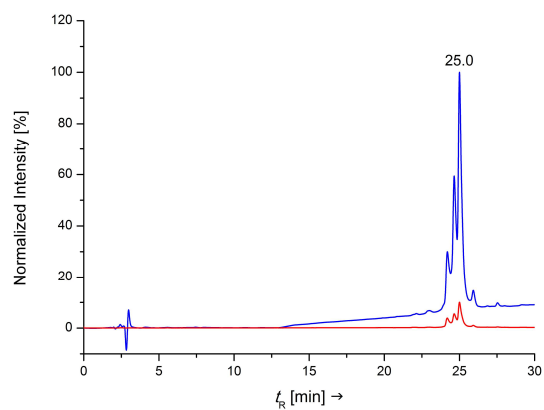
**H-K(N_{ϵ} -(1-(essigsäure)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)AYGFGG-SBn
(18(45)a(K/A))**



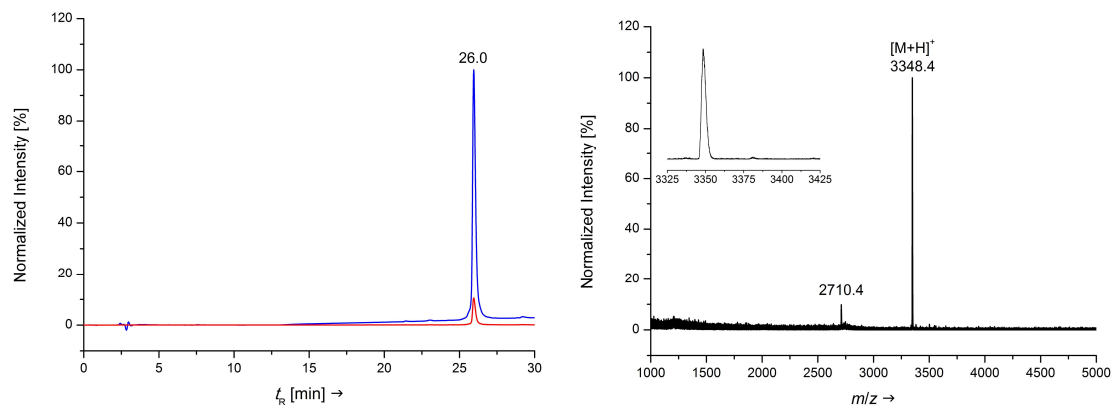
**H-CK(N_{ϵ} -(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (18ab)
– Ansatz 2 (Tabelle 14 – Eintrag 2)**



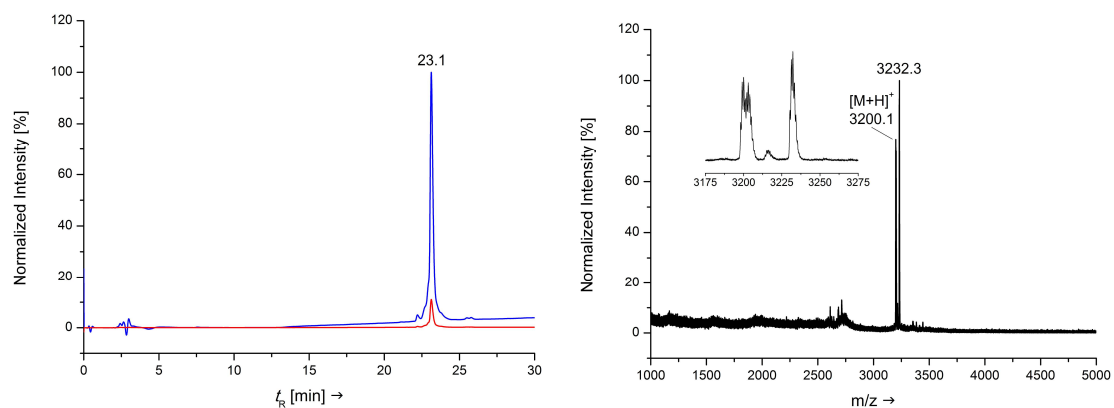
**H-CK(N_{ϵ} -(1-(Peptid Coil)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (18ae)
(Tabelle 14 – Eintrag 3)**



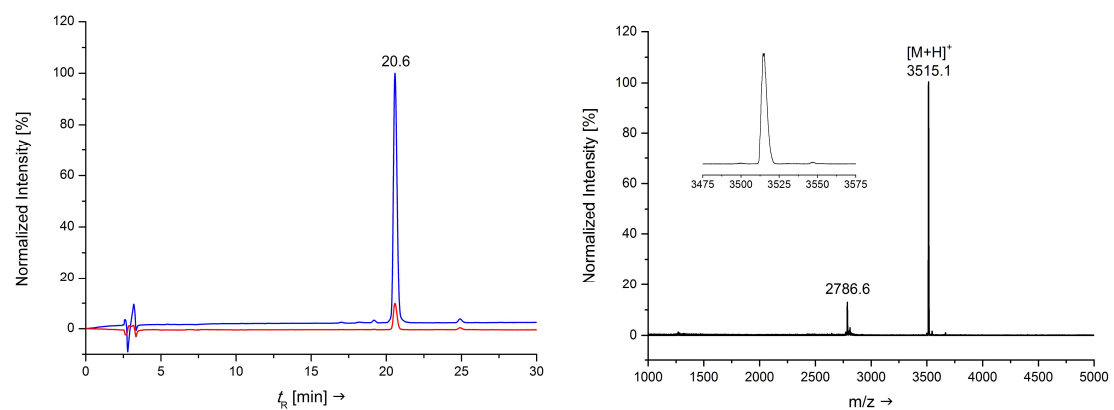
H-CK(N_{ϵ} -(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGF-SBn (18af)
(Tabelle 14 – Eintrag 4)



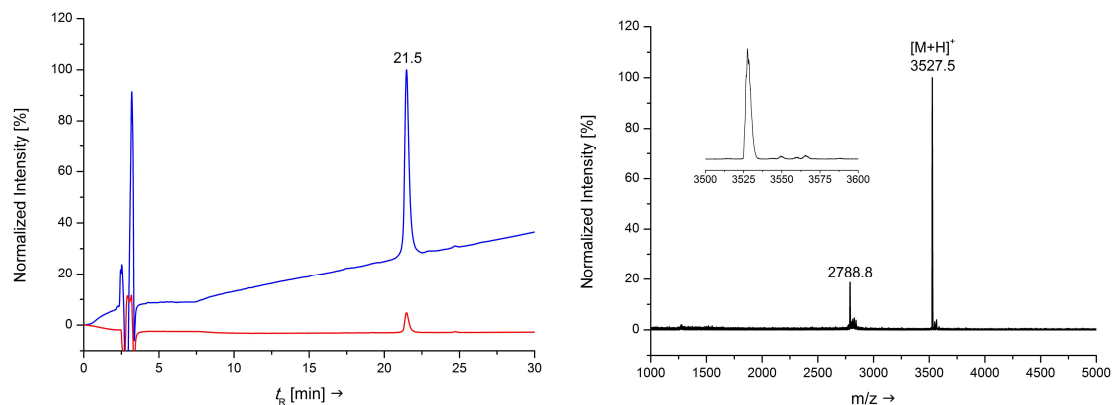
H-CK(N_{ϵ} -(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YG-SBn (18ag)
(Tabelle 14 – Eintrag 5)



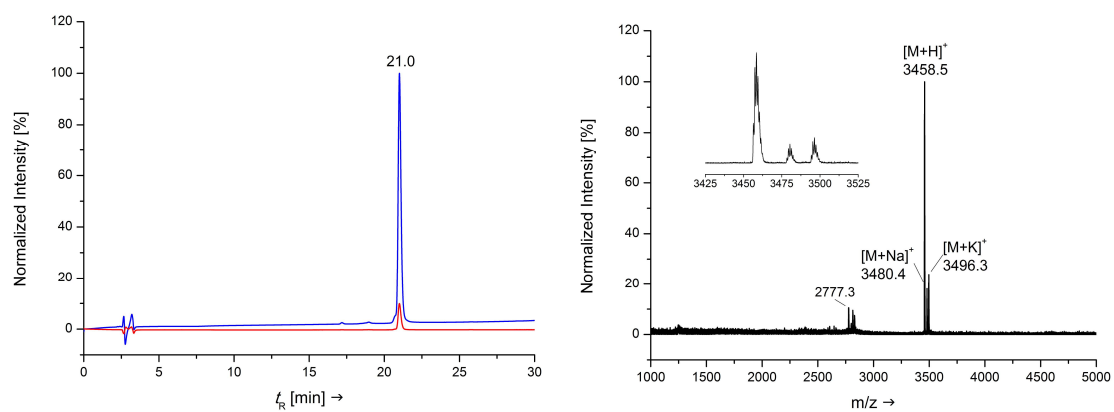
H-CK(N_{ϵ} -(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGFGG-SBn (18bb)



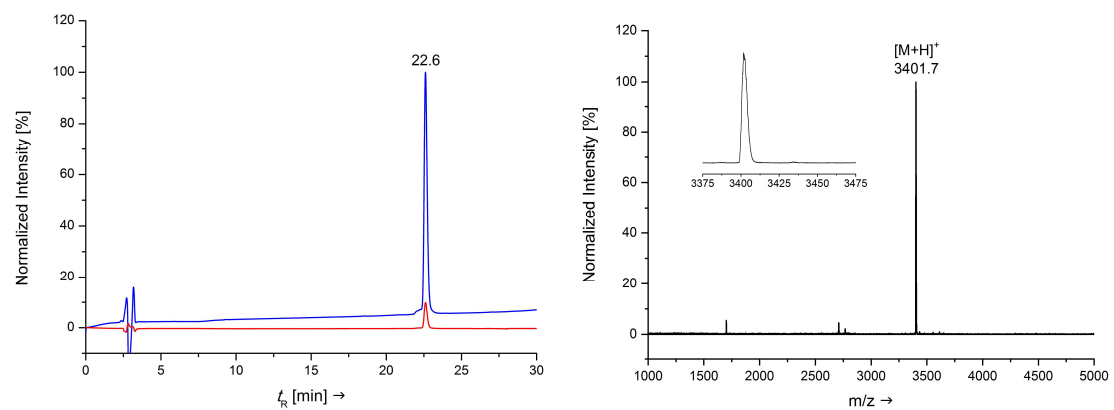
H-ThzK(*N*_ε-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGF²GG-SBn (18bc)

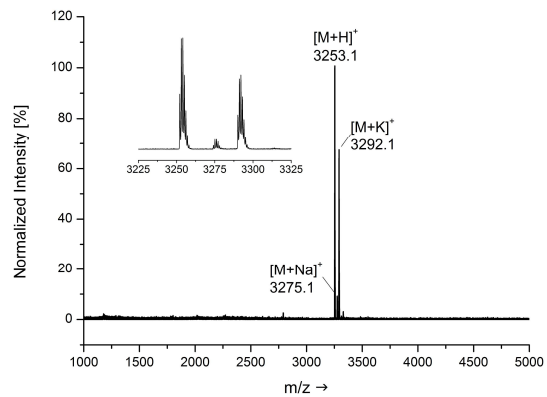
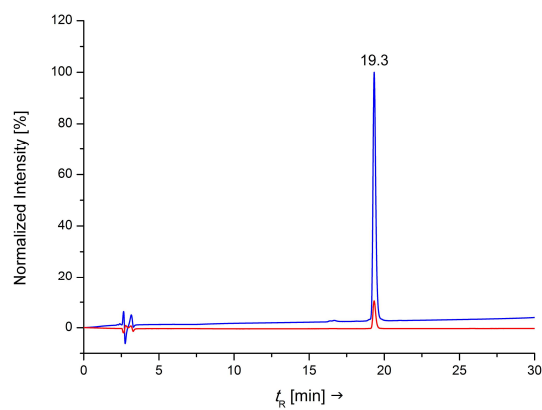
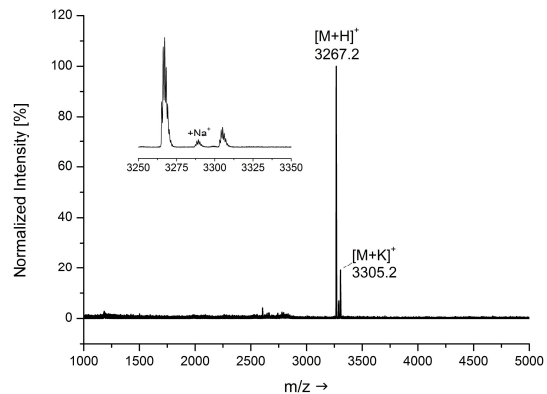
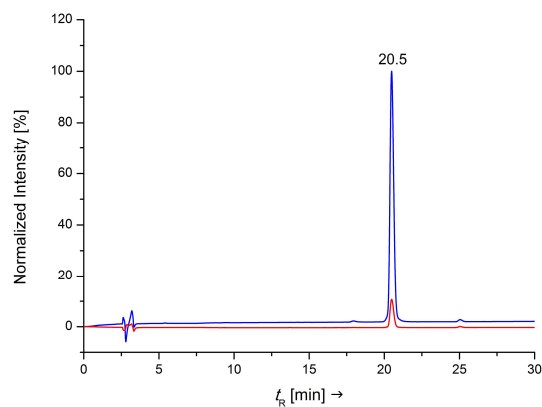
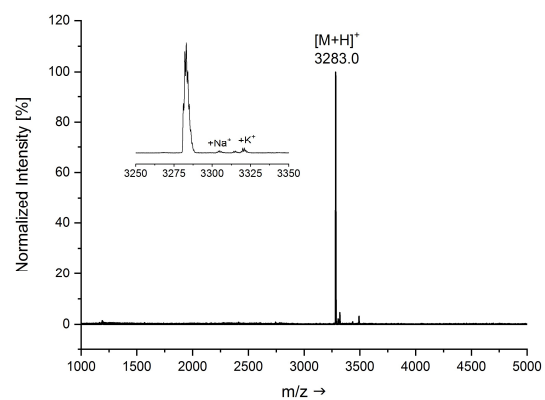
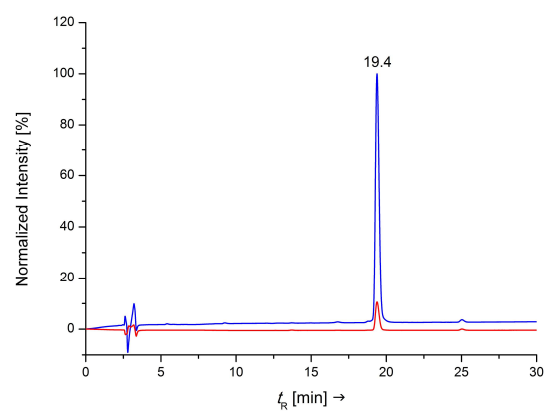


H-CK(*N*_ε-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGF²GG-SBn (18be)

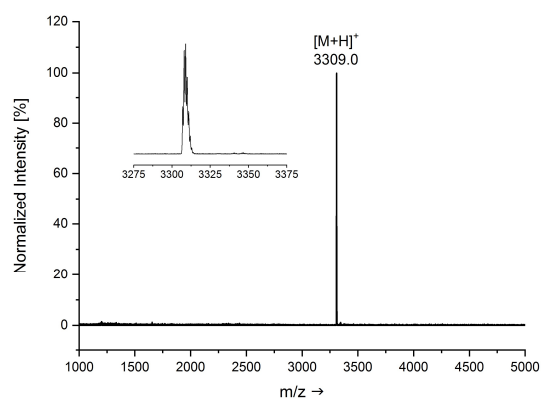
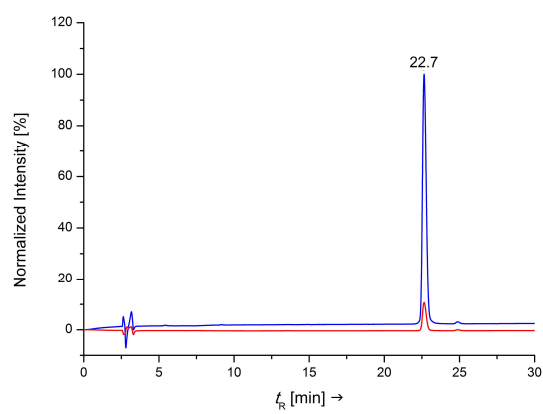


H-CK(*N*_ε-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YGF-SBn (18bf) (Tabelle 14 – Eintrag 8)



H-CK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YG-SBn (18bg)**H-CK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YA-SBn (18bh)****H-CK(N_ϵ -(1-(*Peptid Coil*)-1H-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YS-SBn (18bi)**

H-CK(*N*_ε-(1-(*Peptid Coil*)-1*H*-[1,2,3]-triazol-4-yl)methoxycarbonyl)YI-SBn (18bj)



7.2 Zusätzliche Chromatogramme und Massenspektren der CuAAC-Reaktionen

7.2.1 Chromatogramme und Massenspektren der CuAAC-Reaktionsoptimierung

Zu Tabelle 10 aus Kapitel 3.3.1.

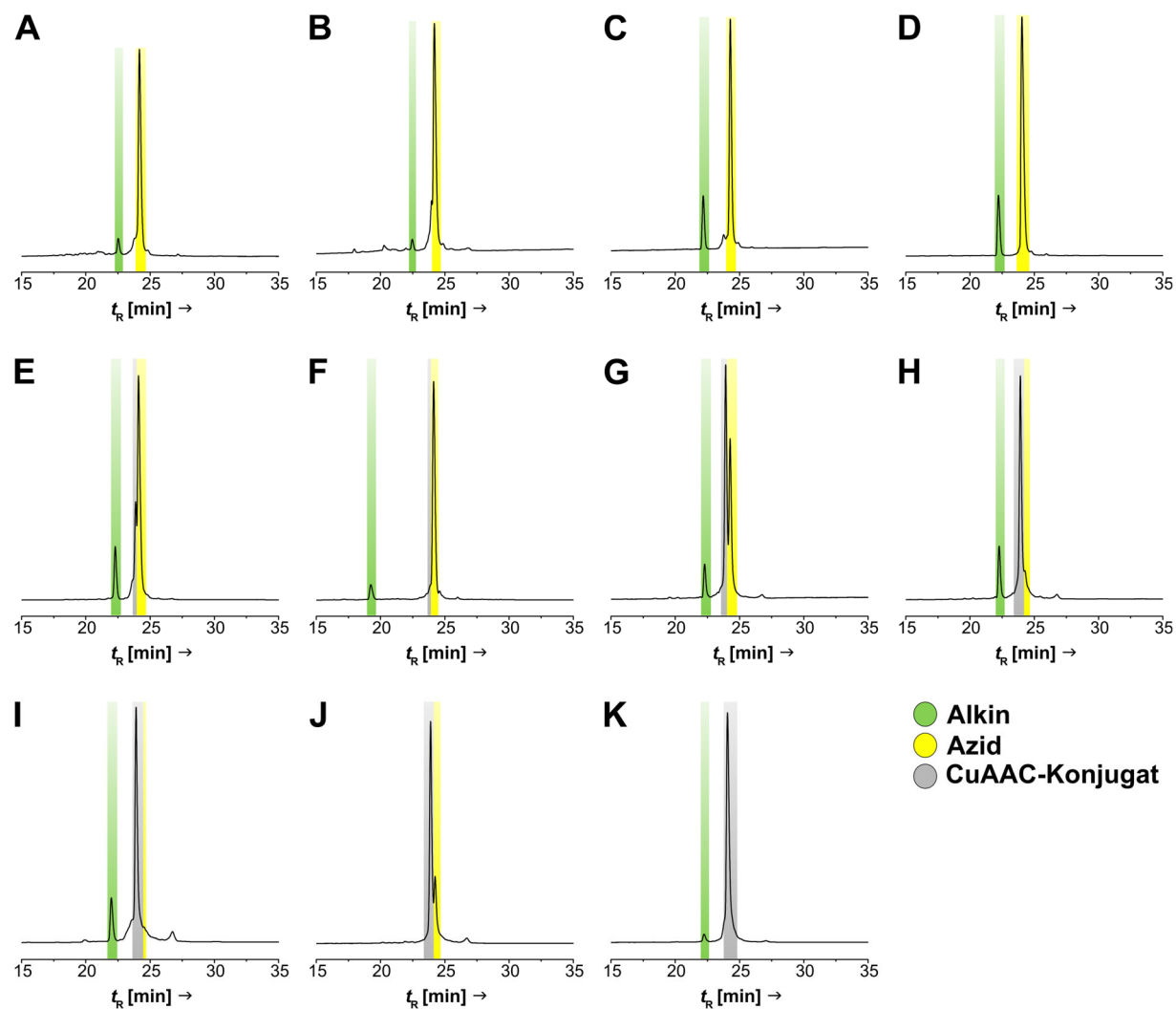


Abbildung A.3: Optimierung der CuAAC-Reaktion. Analytische HPLC-Spuren bei 280 nm (Methode B, 30-60% Puffer B in A in 30 min, A-E bei RT, F-K bei 50 °C) der CuAAC-Reaktion von Azid **1f** (gelb) mit Alkin **9a** (grün) zum Click-Konjugat **18fa** (grau) nach den in Tabelle 10 angegebenen Bedingungen und Reaktionszeiten. Die schrittweise Durchführung erfolgte analog zu AV15. In A) PBS mit 5 mM NaAsc und äquimolaren Mengen **1f**, **9a** und Kupfersulfat bei 21 °C nach 3 h (Tabelle 10 – Eintrag 1), B) *tert*-Butanol/PBS (1:4, v/v) mit 5 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f**, **9a** und Kupfersulfat bei 21 °C nach 4 d (Tabelle 10 – Eintrag 2), C) Acetonitril/Wasser (7:13, v/v, entgast) mit 0.1 mM Kupfersulfat, 0.5 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 25 °C nach 3 h (Tabelle 10 – Eintrag 3), D) Acetonitril/PBS (7:13, v/v, entgast) mit 0.1 mM Kupfersulfat, 0.2 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 25 °C nach 3 h (Tabelle 10 – Eintrag 4), E) *tert*-Butanol/Wasser (4:1, v/v) mit 0.1 mM Kupfersulfat, 0.2 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 5), F) *tert*-Butanol/Wasser (4:1, v/v) mit 0.1 mM Kupfersulfat, 0.2 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 6), G) *tert*-Butanol/Wasser (4:1, v/v) mit 0.1 mM Kupfersulfat, 0.2 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 7), H) *tert*-Butanol/Wasser (4:1, v/v) mit 0.1 mM Kupfersulfat, 0.2 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 8), I) *tert*-Butanol/Wasser (4:1, v/v) mit 0.1 mM Kupfersulfat, 0.2 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 9), J) *tert*-Butanol/Wasser (4:1, v/v) mit 0.1 mM Kupfersulfat, 0.2 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 10), K) *tert*-Butanol/Wasser (4:1, v/v) mit 0.1 mM Kupfersulfat, 0.2 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 11).

Anhang

Eintrag 5), F) Acetonitril/PBS (7:3, v/v) mit 6.7 mM Kupfersulfat, 10 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 6), G) *tert*-Butanol/PBS (7:3, v/v) mit 6.7 mM Kupfersulfat, 10 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 7), H) *tert*-Butanol/PBS (7:3, v/v) mit 6.7 mM Kupfersulfat, 10 mM Natriumascorbat und 1 mM **1f** und 2 mM **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 8), I) *tert*-Butanol/PBS (7:3, v/v) mit 6.7 mM Kupfersulfat, 13.4 mM THPTA, 10 mM Natriumascorbat und 1 mM **1f** und 2 mM **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 9), J) *tert*-Butanol/PBS (7:3, v/v) mit 6.7 mM Kupfersulfat, 13.4 mM THPTA, 10 mM Natriumascorbat und äquimolaren Mengen **1f** und **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 10) und K) *tert*-Butanol/PBS (7:3, v/v) mit 6.7 mM Kupfersulfat, 13.4 mM THPTA, 10 mM Natriumascorbat und 1 mM **1f** und 1.2 mM **9a** bei 35 °C nach 2 h (Tabelle 10 – Eintrag 11).

7.2.2 MALDI-TOF-Massenspektren ausgewählter Nebenprodukte der CuAAC-Reaktion an der Festphase

Zu Tabelle 14 aus Kapitel 3.3.6.

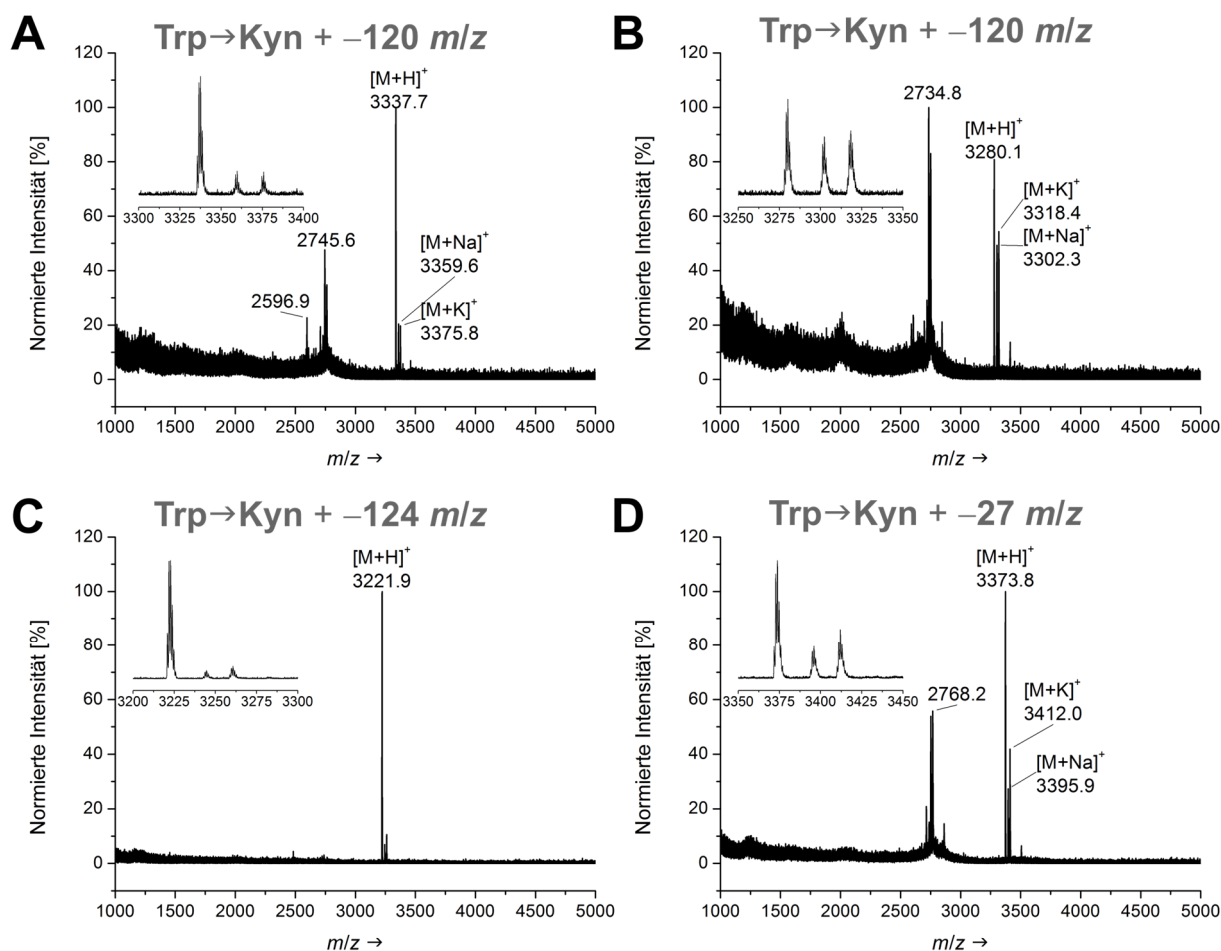


Abbildung A.4: Exemplarisch ausgewählte MALDI-TOF-Massenspektren der in Tabelle 14 – Einträge 2, 3 und 4 erhaltenen Nebenprodukte. Die entsprechenden semipräparativen HPLC-Spuren sind in Abbildung 14 gezeigt. A) Tabelle 14 – Eintrag 2, MALDI-TOF-Massenspektrum des Peaks der Retentionszeit $t_R = 23.4$ min. B) Tabelle 14 – Eintrag 3, MALDI-TOF-Massenspektrum des Peaks der Retentionszeit $t_R = 24.4$ min. C) Tabelle 14 – Eintrag 4, MALDI-TOF-Massenspektrum des Peaks der Retentionszeit $t_R = 22.8$ min. D) Tabelle 14 – Eintrag 3, MALDI-TOF-Massenspektrum des Peaks der Retentionszeit $t_R = 28.6$ min. Eine Zuordnung der erhaltenen Ergebnisse ist tabellarisch in Tabelle A.40 gezeigt.

Tabelle A.40. Auflistung der erhaltenen Nebenprodukte aus Abbildung A.4, ihrer möglichen Produktmodifikation und entsprechend berechnete und mittels MALDI-TOF-MS gefundene Massen.

Kachel	t_R / min	ursprüngliche Produktmasse	wahrscheinliche Produktmodifikation	erhaltene Produktmasse
A	23.4	18ab ber. für $C_{154}H_{228}N_{39}O_{48}S_2^+$ [M+H] ⁺ : 3457.9 <i>m/z</i>	Zyklisierung + Oxidation Trp→Kyn	ber. für $C_{146}H_{220}N_{39}O_{49}S^+$ [M+H] ⁺ : 3337.7, gef.: 3337.7; ber. für $C_{146}H_{219}N_{39}O_{49}SNa^+$ [M+Na] ⁺ : 3359.6, gef. 3359.6; ber. für $C_{146}H_{219}N_{39}O_{49}SK^+$ [M+K] ⁺ : 3375.7, gef. 3375.8
B	24.4	18ae ber. für $C_{152}H_{225}N_{38}O_{47}S_2^+$ [M+H] ⁺ : 3400.8 <i>m/z</i>	Zyklisierung + Oxidation Trp→Kyn	ber. für $C_{144}H_{217}N_{38}O_{48}S^+$ [M+H] ⁺ : 3280.6, gef.: 3280.1; ber. für $C_{144}H_{216}N_{38}O_{48}SNa^+$ [M+Na] ⁺ : 3302.6, gef. 3302.3; ber. für $C_{144}H_{216}N_{38}O_{48}SK^+$ [M+K] ⁺ : 3318.7, gef. 3318.4
C	22.8	18af ber. für $C_{150}H_{222}N_{37}O_{46}S_2^+$ [M+H] ⁺ : 3343.8 <i>m/z</i>	Zyklisierung	ber. für $C_{143}H_{213}N_{37}O_{46}S^+$ [M+H] ⁺ : 3219.6, gef.: 3221.9
D	28.6	18ae siehe Eintrag/Kachel B	Cys→Dha + Oxidation Trp→Kyn oder Cys→Ala + Oxidation Trp→Kyn	ber. für $C_{151}H_{223}N_{38}O_{48}S^+$ [M+H] ⁺ : 3370.7, gef.: 3373.8; ber. für $C_{151}H_{222}N_{38}O_{48}SNa^+$ [M+Na] ⁺ : 3392.7, gef. 3395.9; ber. für $C_{151}H_{222}N_{38}O_{48}SK^+$ [M+K] ⁺ : 3408.8, gef. 3412.0 ber. für $C_{151}H_{225}N_{38}O_{48}S^+$ [M+H] ⁺ : 3372.7, gef.: 3373.8; ber. für $C_{151}H_{224}N_{38}O_{48}SNa^+$ [M+Na] ⁺ : 3394.7, gef. 3395.9; ber. für $C_{151}H_{224}N_{38}O_{48}SK^+$ [M+K] ⁺ : 3410.8, gef. 3412.0

7.3 Zusätzliche Chromatogramme und Massenspektren der Zyklisierungsversuche

7.3.1 Reaktionsverfolgung der direkten Aminolyse

Zu Tabelle 16 aus Kapitel 3.4.1.

Kombination KB5: Reaktion 18ea mit 4b (Abbildung 20 und Abbildung 21).

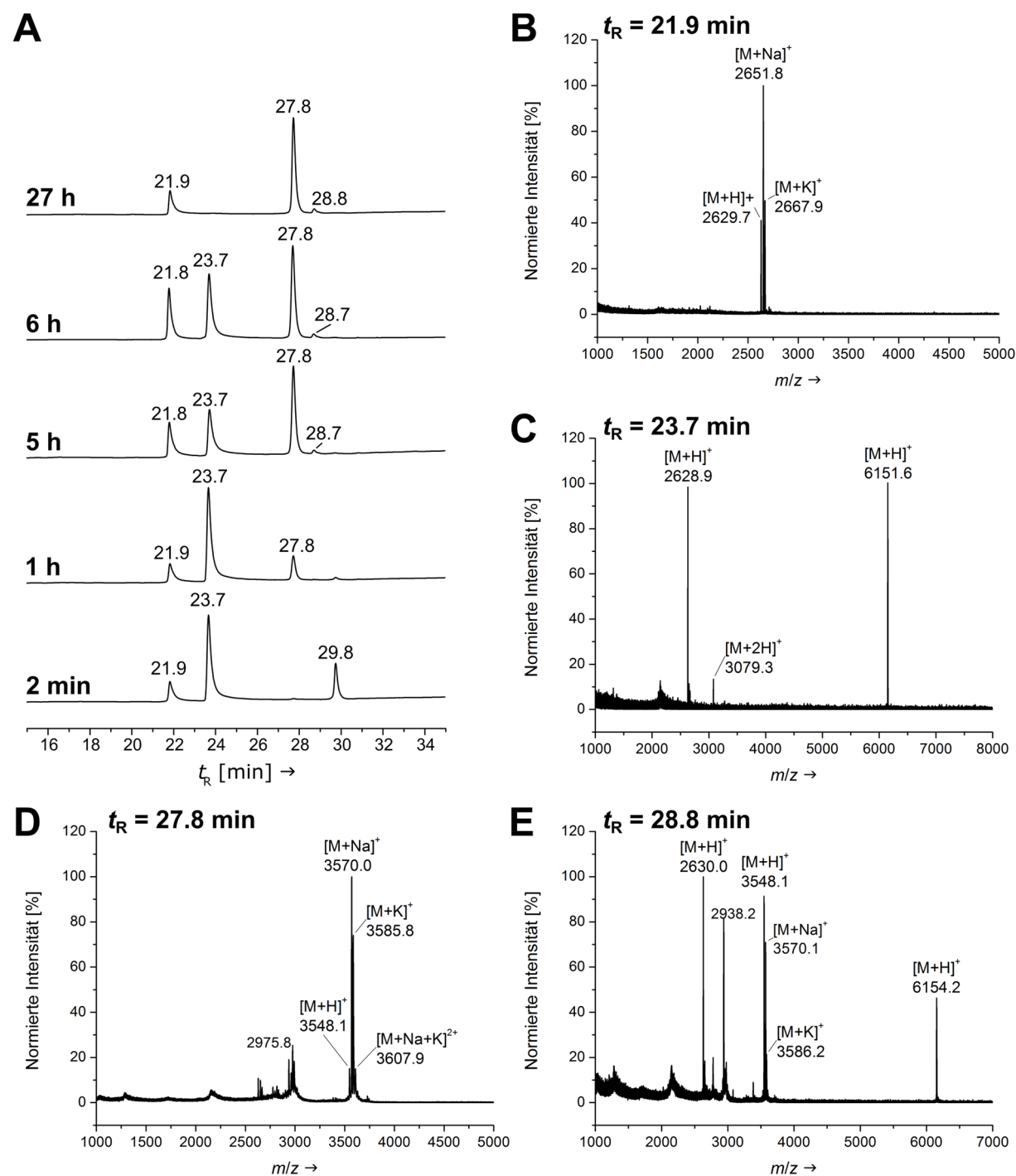


Abbildung A.5: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und entsprechende MALDI-TOF-Massenspektren der isolierten Peaks nach Retentionszeit t_R geordnet (B-E). Die

Anhang

Peaks entsprechen Thiol B (**4b**) ($t_R = 21.9$ min), Hairpin ($t_R = 23.7$ min), Hydrolyse ($t_R = 27.8$ min), Aggregate ($t_R = 28.8$ min) und Thioester **18ea** ($t_R = 29.8$ min). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Thiol B (**4b**) ($M_w = 2628.2730$) bei $t_R = 21.9$ min. C) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hairpin ($M_w = 6156.1310$) bei $t_R = 23.7$ min ber. für $C_{276}H_{448}N_{77}O_{80}S^+ [M+H]^+$: 6157.2, gef.: 6151.5; ber. für $C_{276}H_{449}N_{77}O_{80}S^{2+} [M+2H]^{2+}$: 3078.2, gef.: 3079.3. D) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hydrolyse **19ea** ($M_w = 3545.8730$) bei $t_R = 27.8$ min ber. für $C_{157}H_{239}N_{42}O_{52}^+ [M+H]^+$: 3546.9, gef.: 3548.1; ber. für $C_{157}H_{238}N_{42}O_{52}Na^+ [M+Na]^+$: 3568.9, gef.: 3570.0; ber. für $C_{157}H_{238}N_{42}O_{52}K^+ [M+K]^+$: 3585.0, gef.: 3585.8; ber. für $C_{157}H_{238}N_{42}O_{52}NaK^{2+} [M+Na+K]^{2+}$: 3608.0, gef.: 3607.9. E) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Aggregat bei $t_R = 28.7$ min gef. für Thiol $[M+H]^+$: 2630.0; gef. für Hydrolyse $[M+H]^+$: 3548.1; $[M+Na]^+$: 3570.1; $[M+K]^+$: 3586.2 und gef. für Hairpin $[M+H]^+$: 6154.2. Für Vergleich mit ber. Werten siehe oben.

Kombination K-5: Reaktion **18ea** (Abbildung 21).

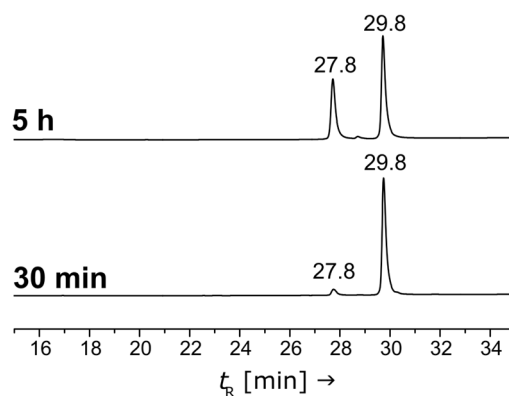


Abbildung A.6: Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung der Hintergrundreaktion von Thioester **18ea**. Der Peak bei $t_R = 27.8$ min entspricht dem Hydrolyseprodukt. Der Peak bei $t_R = 29.8$ min entspricht dem eingesetzten Peptidthioester **18ea**.

Kombination KC5: Reaktion 18ea mit 4c (Abbildung 21).

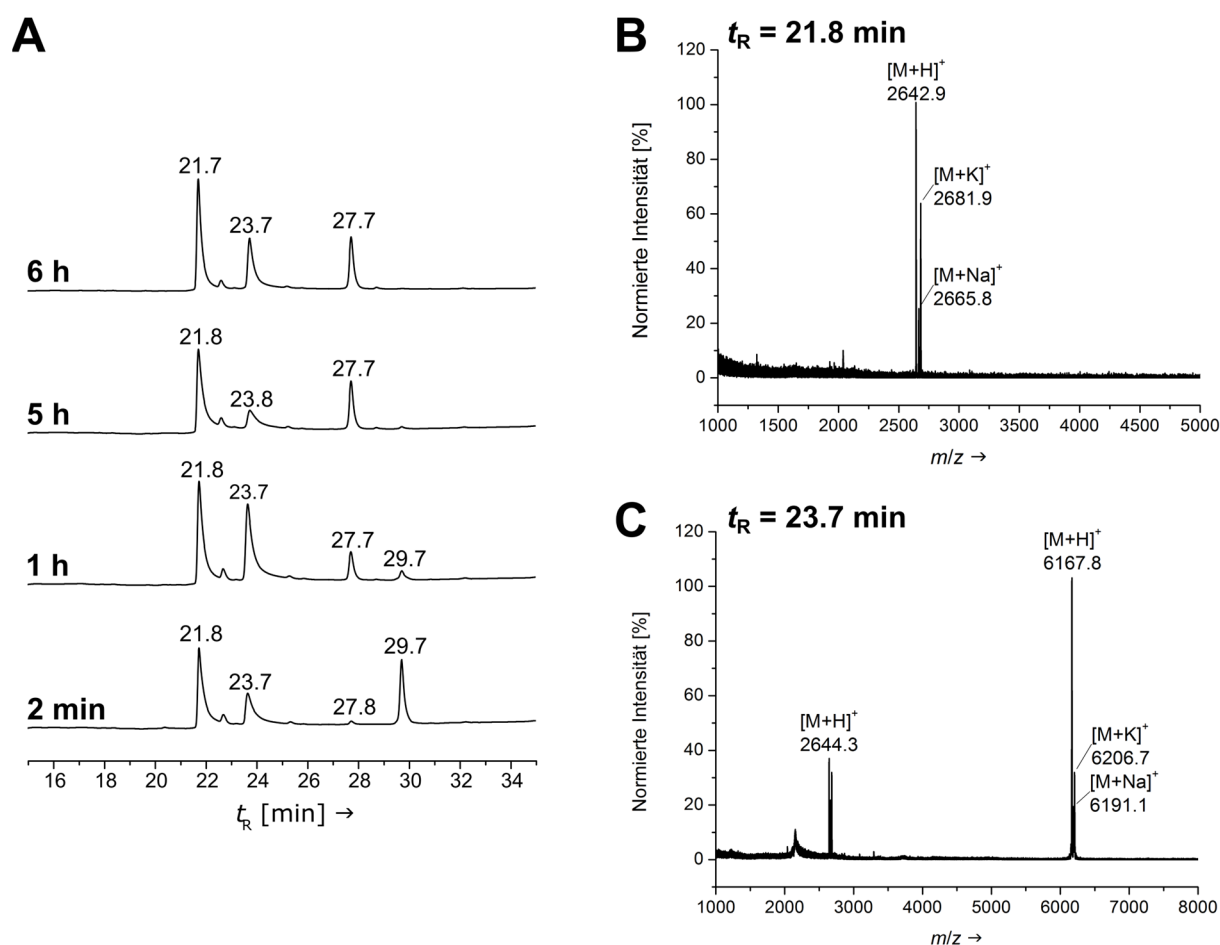


Abbildung A.7: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B)-C) entsprechende MALDI-TOF-Massenspektren der isolierten Peaks nach Retentionszeit t_R geordnet. Die Peaks entsprechen Thiol C (**4c**) ($t_R = 21.8 \text{ min}$), Hairpin ($t_R = 23.7 \text{ min}$), Hydrolyse ($t_R = 27.7 \text{ min}$), Aggregate ($t_R = 28.7 \text{ min}$; nicht markiert) und Thioester **18ea** ($t_R = 29.7 \text{ min}$). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Thiol C (**4c**) ($M_w = 2642.3000$) bei $t_R = 21.8 \text{ min}$ ber. für $C_{120}H_{214}N_{35}O_{29}S^+$ $[M+H]^+$: 2643.3, gef.: 2642.9; ber. für $C_{120}H_{213}N_{35}O_{29}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 2665.3, gef.: 2665.8; ber. für $C_{120}H_{213}N_{35}O_{29}SK^+$ $[M+K]^+$: 2681.4, gef.: 2681.9. C) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hairpin ($M_w = 6170.1580$) bei $t_R = 23.7 \text{ min}$ ber. für $C_{277}H_{450}N_{77}O_{80}S^+$ $[M+H]^+$: 6171.2, gef.: 6167.8; ber. für $C_{277}H_{449}N_{77}O_{80}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 6193.2, gef.: 6191.1; ber. für $C_{277}H_{449}N_{77}O_{80}SK^+$ $[M+K]^+$: 6209.3, gef.: 6206.7.

Kombination KD2: Reaktion 18ba mit 4d (Abbildung 21).

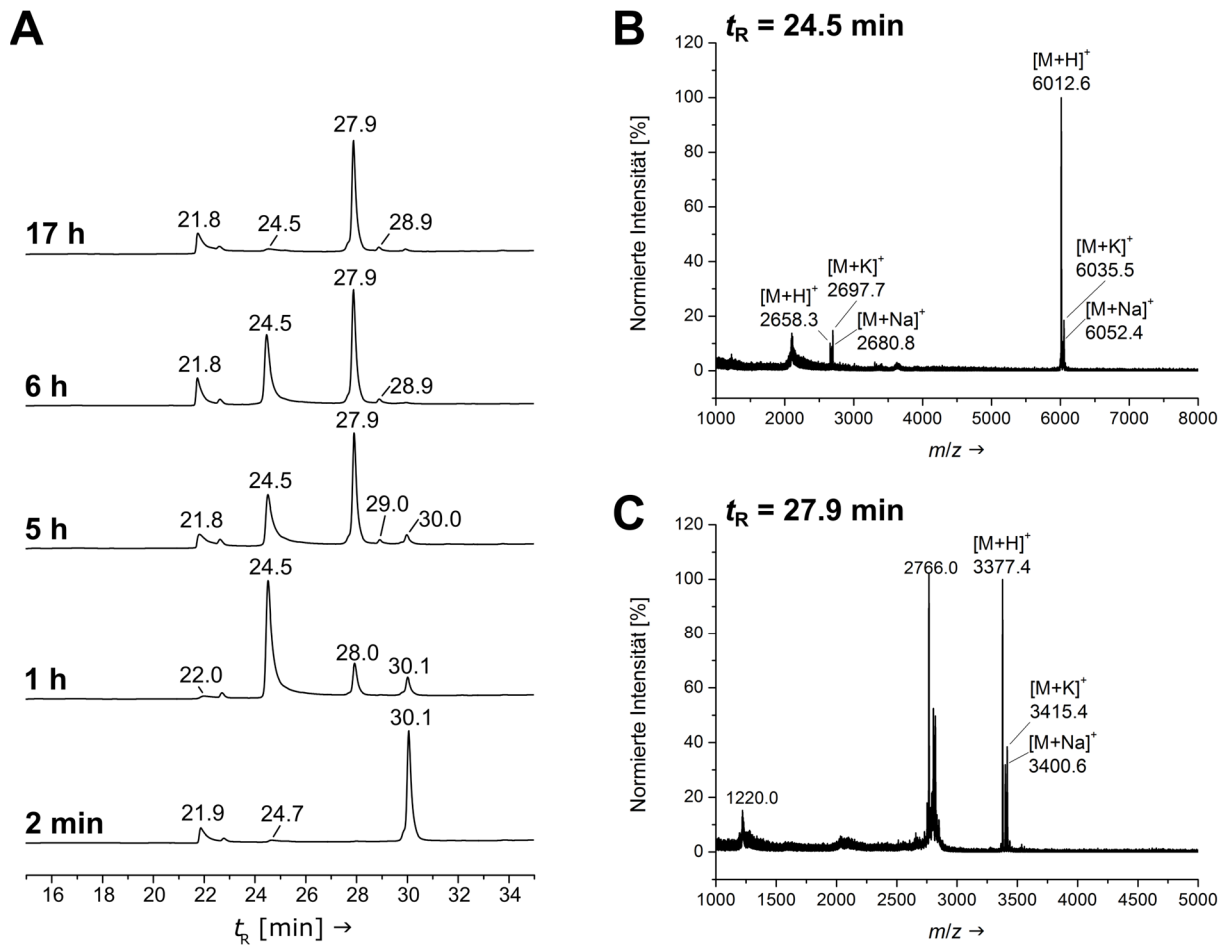


Abbildung A.8: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B)-C) entsprechende MALDI-TOF-Massenspektren der isolierten Peaks nach Retentionszeit t_R geordnet. Die Peaks entsprechen Thiol D (**4d**) ($t_R = 21.9 \text{ min}$), Hairpin ($t_R = 24.5 \text{ min}$), Hydrolyse ($t_R = 27.9 \text{ min}$), Aggregate ($t_R = 29.0 \text{ min}$) und Thioester **18ba** ($t_R = 30.1 \text{ min}$). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hairpin ($M_w = 6013.9730$) bei $t_R = 24.5 \text{ min}$ ber. für $C_{270}H_{438}N_{75}O_{78}S^+$ $[M+H]^+$: 6015.0, gef.: 6012.6; ber. für $C_{270}H_{437}N_{75}O_{78}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 6037.0, gef.: 6035.5; ber. für $C_{270}H_{437}N_{75}O_{78}SK^+$ $[M+K]^+$: 6053.1, gef.: 6052.4. C) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hydrolyse **19ba** ($M_w = 3375.6610$) bei $t_R = 27.9 \text{ min}$ ber. für $C_{149}H_{225}N_{40}O_{50}^+$ $[M+H]^+$: 3376.7, gef.: 3377.4; ber. für $C_{149}H_{224}N_{40}O_{50}Na^+$ $[M+Na]^+$: 3398.7, gef.: 3400.6; ber. für $C_{149}H_{224}N_{40}O_{50}K^+$ $[M+K]^+$: 3414.8, gef.: 3415.4.

Kombination KC2: Reaktion 18ba mit 4c (Abbildung 21).

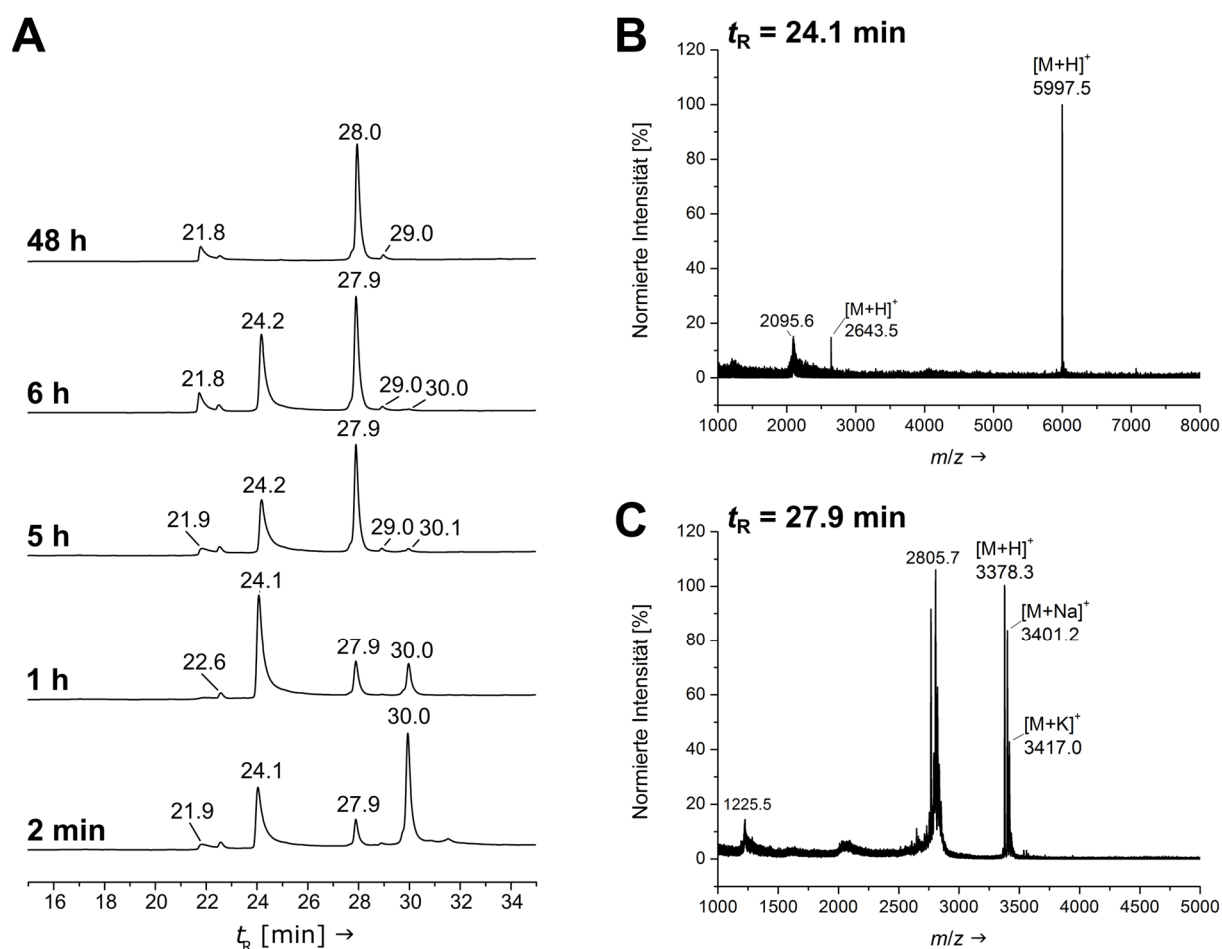


Abbildung A.9: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B)-C) entsprechende MALDI-TOF-Massenspektren der isolierten Peaks nach Retentionszeit t_R geordnet. Die Peaks entsprechen Thiol C (**4c**) ($t_R = 21.9$ min), Hairpin ($t_R = 24.1$ min), Hydrolyse ($t_R = 27.9$ min), Aggregate ($t_R = 29.0$ min) und Thioester **18ba** ($t_R = 30.0$ min). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hairpin ($M_w = 5999.9460$) bei $t_R = 24.1$ min ber. für $C_{269}H_{436}N_{75}O_{78}S^+$ $[M+H]^+$: 6001.0, gef.: 5997.5. C) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hydrolyse **19ba** ($M_w = 3375.6610$) bei $t_R = 27.9$ min ber. für $C_{149}H_{225}N_{40}O_{50}^+$ $[M+H]^+$: 3376.7, gef.: 3378.3; ber. für $C_{149}H_{224}N_{40}O_{50}Na^+$ $[M+Na]^+$: 3398.7, gef.: 3401.2; ber. für $C_{149}H_{224}N_{40}O_{50}K^+$ $[M+K]^+$: 3414.8, gef.: 3417.0.

Kombination KD2: Reaktion **18ba** mit **4d** (Abbildung 22, pH 7.5).

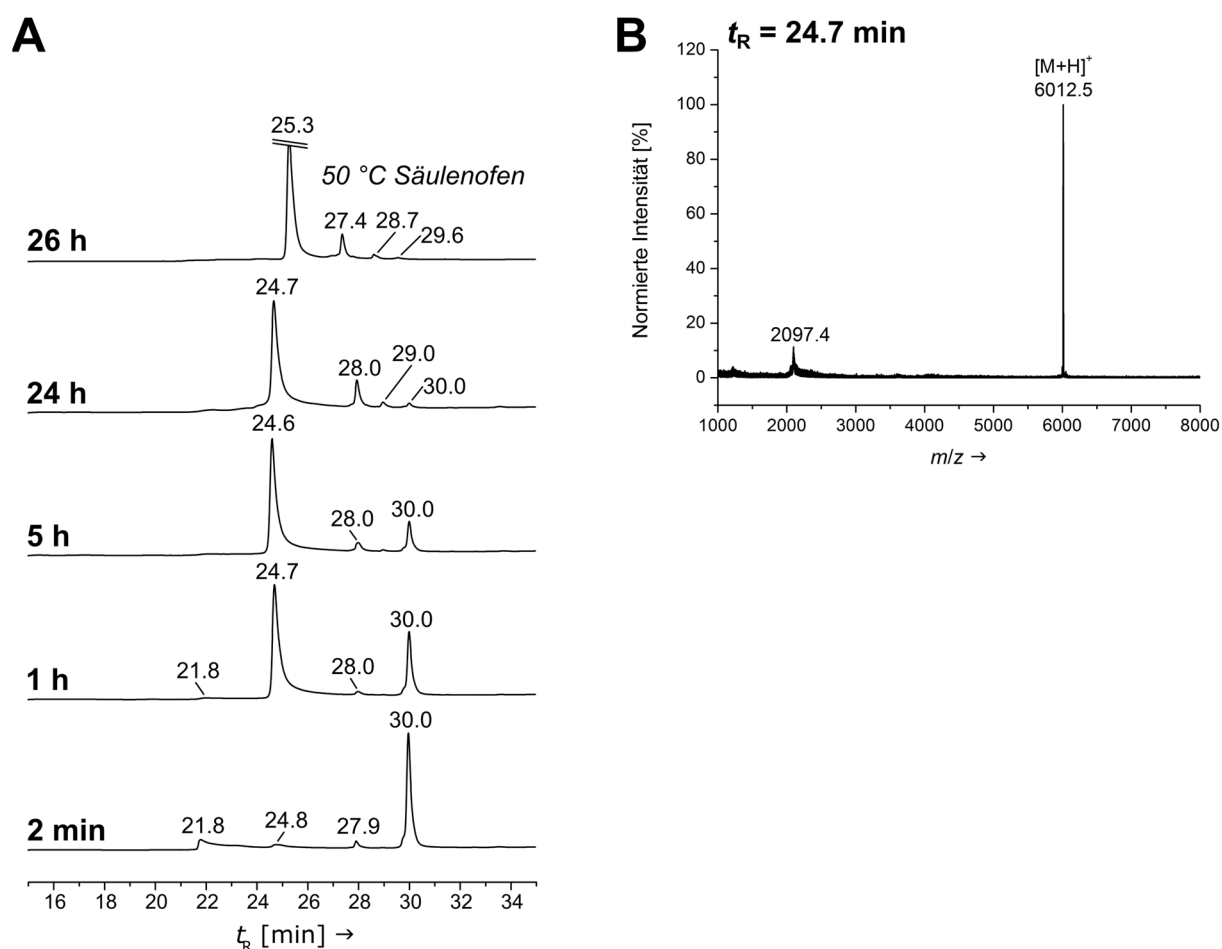


Abbildung A.10: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B)-C) entsprechende MALDI-TOF-Massenspektren der isolierten Peaks nach Retentionszeit t_R geordnet. Die Peaks entsprechen Thiol D (**4d**) ($t_R = 21.8$ min), Hairpin ($t_R = 24.7$ min), Hydrolyse ($t_R = 28.0$ min), Aggregate ($t_R = 29.0$ min) und Thioester **18ba** ($t_R = 30.0$ min). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hairpin ($M_W = 6013.9730$) bei $t_R = 24.7$ min ber. für $C_{270}H_{438}N_{75}O_{78}S^+$ $[M+H]^+$: 6015.0, gef.: 6012.5.

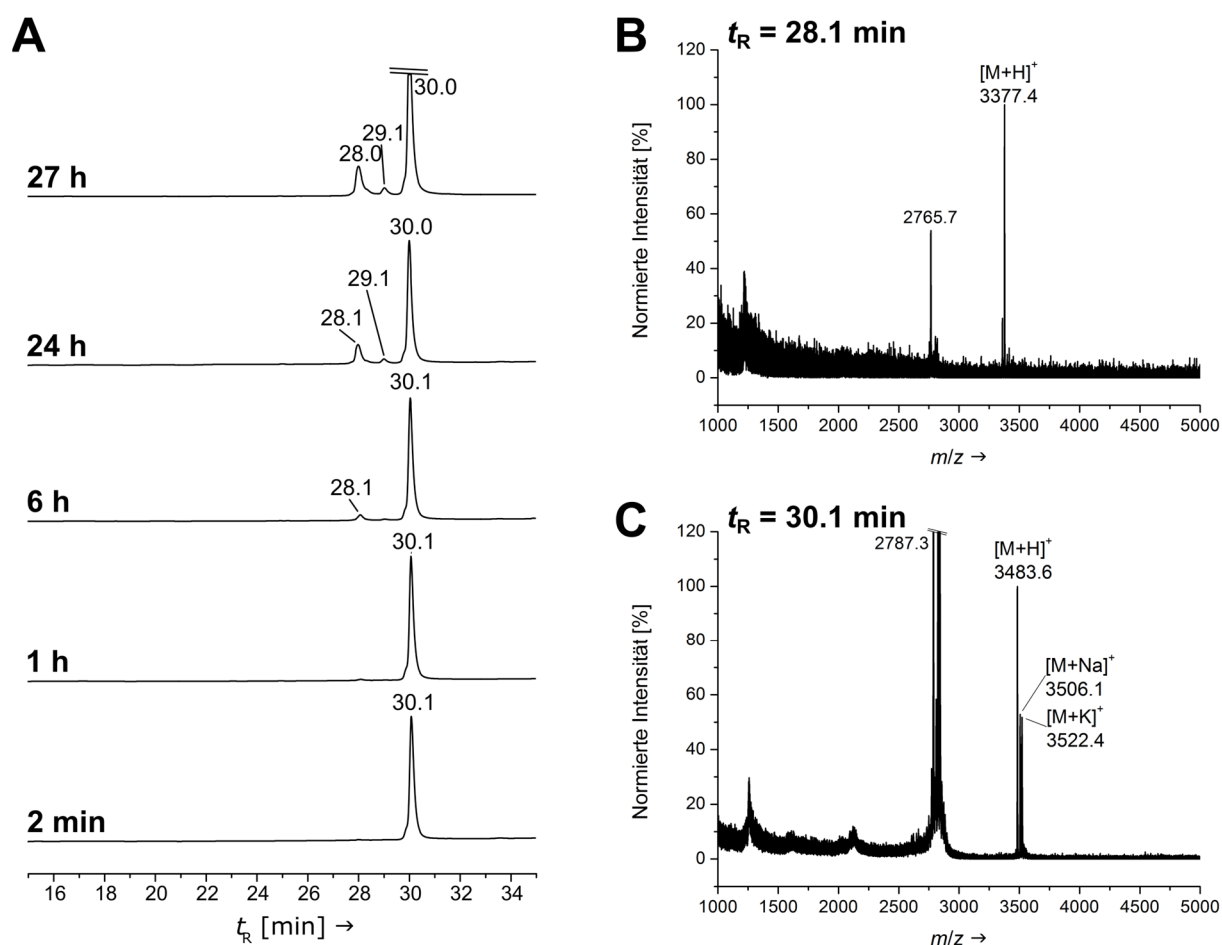
Kombination K-2: Reaktion **18ba** (Abbildung 22, pH 7.5).

Abbildung A.11: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung der Hintergrundreaktion von Thioester **18ba**. Der Peak bei $t_R = 28.1$ min entspricht dem Hydrolyseprodukt, der Peak bei $t_R = 29.1$ min entspricht dem Zyklisierungsprodukt. Der Peak bei $t_R = 30.1$ min entspricht dem eingesetzten Peptidthioester **18ba**. Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hydrolyse **19ba** ($M_w = 3375.6610$) bei $t_R = 28.1$ min ber. für $C_{149}H_{225}N_{40}O_{50}^+$ $[M+H]^+$: 3376.7, gef.: 3377.4. C) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Thioester **18ba** ($M_w = 3481.8470$) bei $t_R = 30.1$ min ber. für $C_{156}H_{231}N_{40}O_{49}S^+$ $[M+H]^+$: 3482.9, gef.: 3483.6; ber. für $C_{156}H_{230}N_{40}O_{49}SNa^+$ $[M+Na]^+$: 3504.8, gef.: 3506.1; ber. für $C_{156}H_{230}N_{40}O_{49}SK^+$ $[M+K]^+$: 3521.0, gef.: 3522.4.

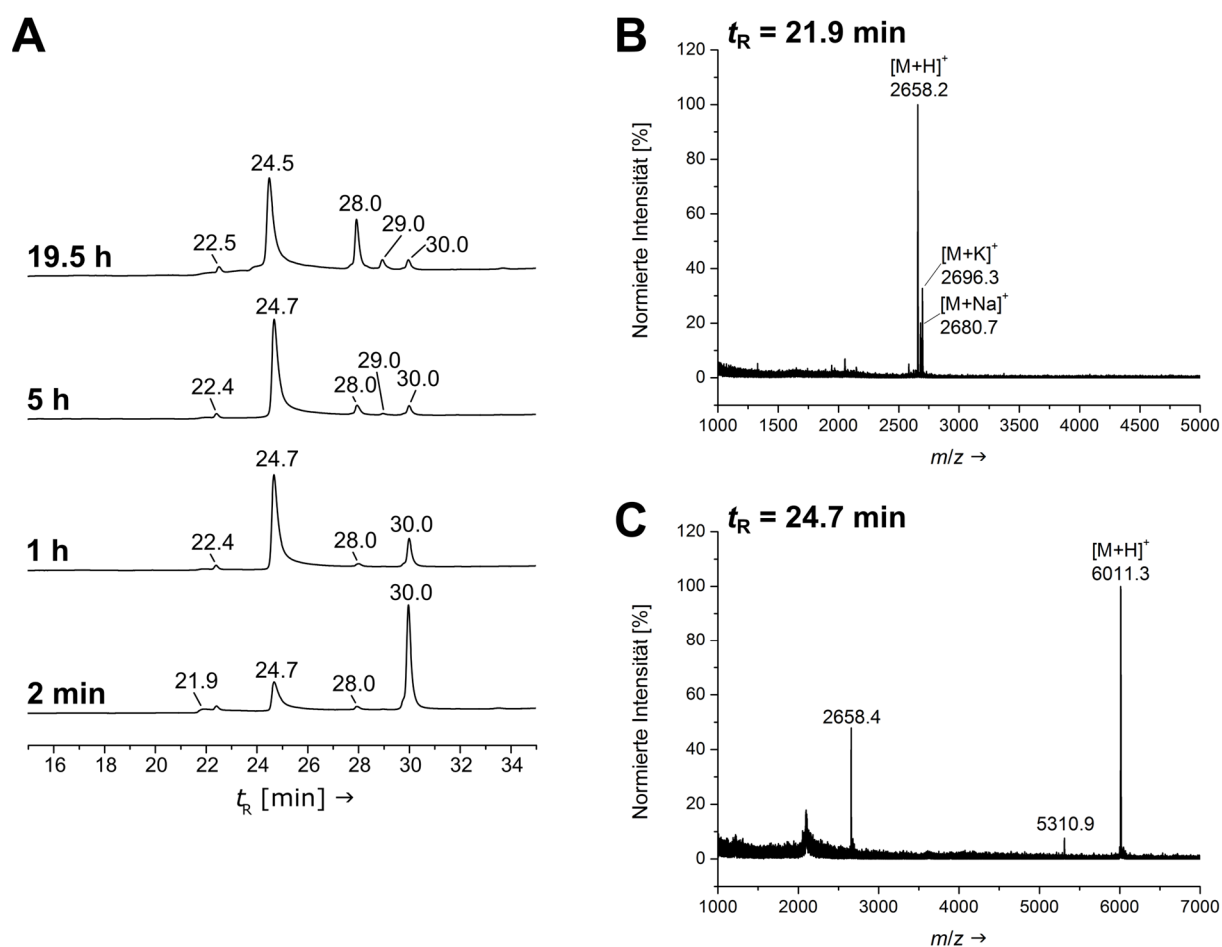
Kombination KD2: Reaktion 18ba mit 4d (Abbildung 22, pH 8.0).

Abbildung A.12: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B)-C) entsprechende MALDI-TOF-Massenspektren der isolierten Peaks nach Retentionszeit t_R geordnet. Die Peaks entsprechen Thiol D (**4d**) ($t_R = 21.9 \text{ min}$ und 22.4 min Disulfid), Hairpin ($t_R = 24.7 \text{ min}$), Hydrolyse ($t_R = 28.0 \text{ min}$), Zyklisierung ($t_R = 29.0 \text{ min}$) und Thioester **18ba** ($t_R = 30.0 \text{ min}$). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Thiol D (**4d**) ($M_w = 2656.3270$) bei $t_R = 21.9 \text{ min}$ ber. für $C_{121}H_{216}N_{35}O_{29}S^+ [M+H]^+$: 2657.3, gef.: 2658.2; ber. für $C_{121}H_{215}N_{35}O_{29}SNa^+ [M+Na]^+$: 2679.3, gef.: 2680.7; ber. für $C_{121}H_{215}N_{35}O_{29}SK^+ [M+K]^+$: 2695.4, gef.: 2696.3. B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hairpin ($M_w = 6013.9730$) bei $t_R = 24.7 \text{ min}$ ber. für $C_{270}H_{438}N_{75}O_{78}S^+ [M+H]^+$: 6015.0, gef.: 6011.3.

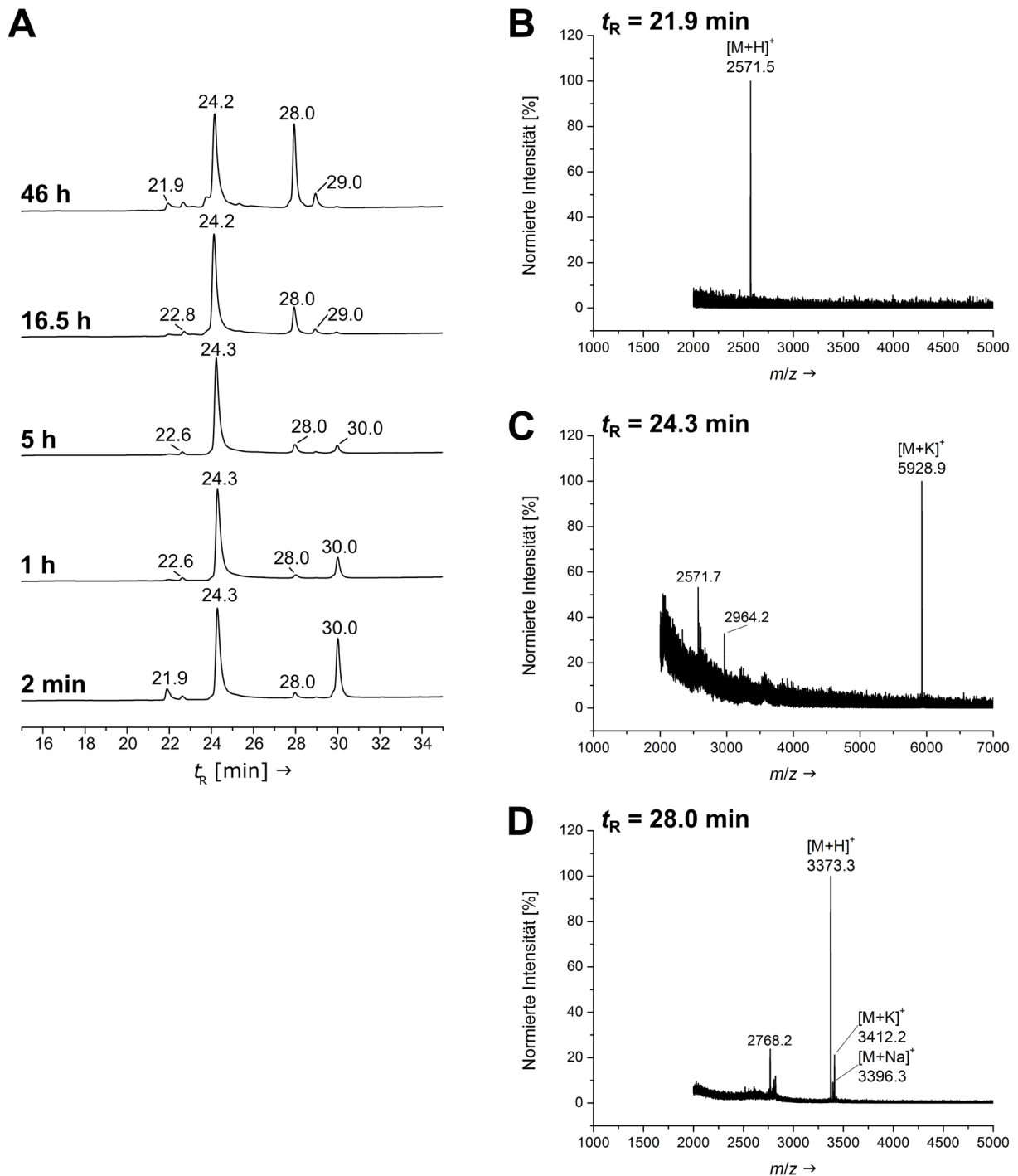
Kombination KA2: Reaktion 18ba mit 4a (Abbildung 22, pH 8.0).

Abbildung A.13: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B)-D) entsprechende MALDI-TOF-Massenspektren der isolierten Peaks nach Retentionszeit t_R geordnet. Die Peaks entsprechen Thiol A (**4a**) ($t_R = 21.9$ min und 22.6 min Disulfid), Hairpin ($t_R = 24.3$ min), Hydrolyse ($t_R = 28.0$ min), Zyklisierung ($t_R = 29.0$ min) und Thioester **18ba** ($t_R = 30.0$ min). Die Auswertung ergab B) MALDI-TOF-MS (m/z) Rohspektrum von Thiol A (**4a**) ($M_w = 2571.2210$) bei $t_R = 21.9$ min ber. für $C_{117}H_{209}N_{34}O_{28}S^+$ $[M+H]^+$: 2572.2, gef.: 2571.5. C) MALDI-TOF-MS (m/z) Rohspektrum von Hairpin ($M_w = 5885.8420$) bei $t_R = 24.3$ min ber. für $C_{265}H_{429}N_{73}O_{76}SK^+$ $[M+K]^+$: 5924.9, gef.: 5928.9. D) MALDI-TOF-MS (m/z) Rohspektrum von Hydrolyse **19ba** ($M_w = 3375.6610$) bei $t_R = 28.0$ min ber. für $C_{149}H_{225}N_{40}O_{49}^+$

$[M+H]^+$: 3376.7, gef.: 3373.3; ber. für $C_{149}H_{224}N_{40}O_{49}Na^+$ $[M+Na]^+$: 3398.7, gef.: 3396.3; ber. für $C_{149}H_{224}N_{40}O_{49}K^+$ $[M+K]^+$: 3414.8, gef.: 3412.2.

Kombination KB1(K/A): Reaktion 18aa(K/A) mit 4b (Abbildung 23).

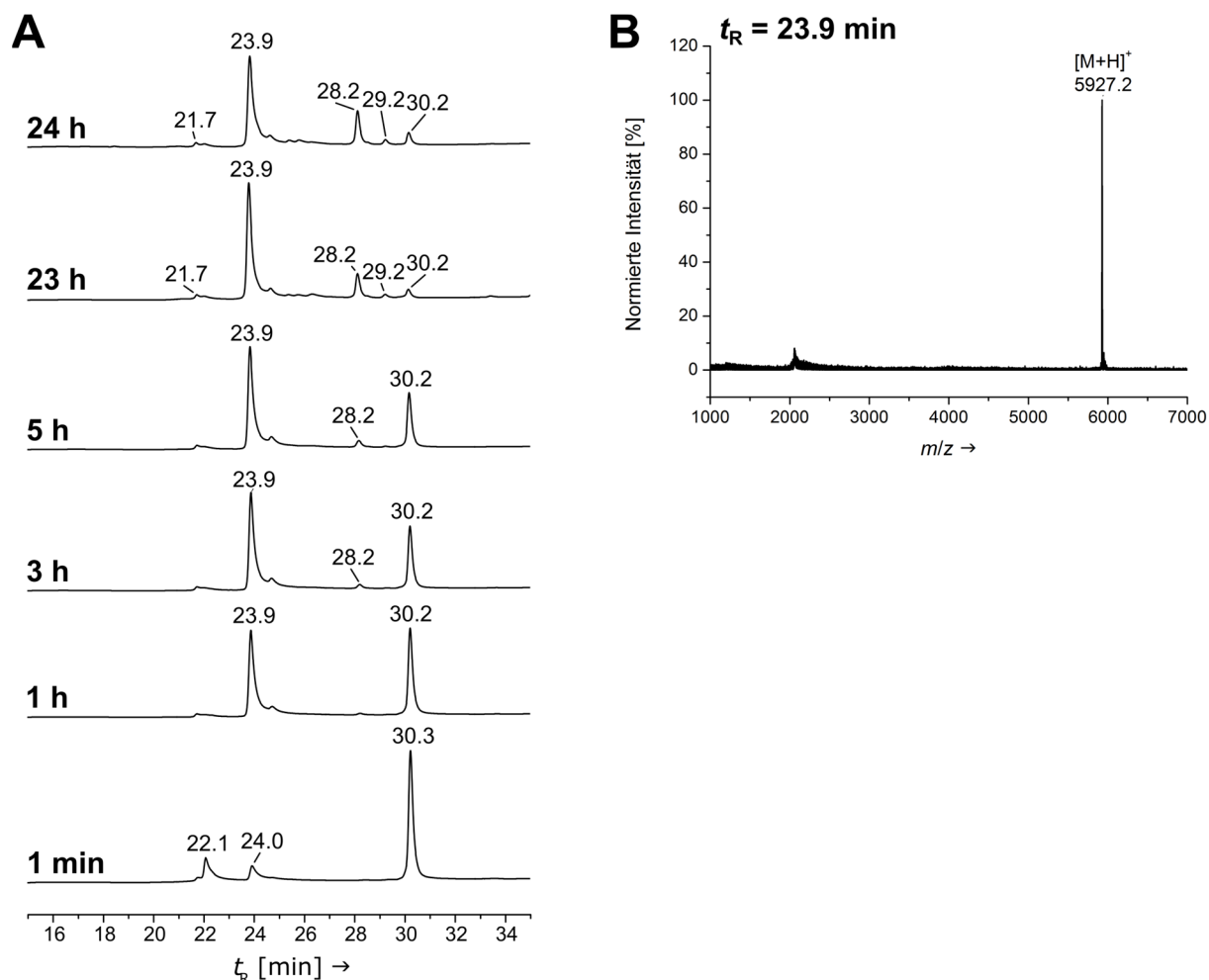


Abbildung A.14: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B) das entsprechende MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten Hairpins mit einer Retentionszeit von $t_R = 23.9$ min. Die Peaks entsprechen Thiol B (**4b**) ($t_R = 22.1$ min), Hairpin ($t_R = 23.9$ min), Hydrolyse ($t_R = 28.2$ min), Zyklisierung ($t_R = 29.2$ min) und Thioester **18aa(K/A)** ($t_R = 30.2$ min). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hairpin ($M_W = 5928.8670$) bei $t_R = 23.9$ min ber. für $C_{266}H_{431}N_{74}O_{77}S^+$ $[M+H]^+$: 5929.9, gef.: 5927.2.

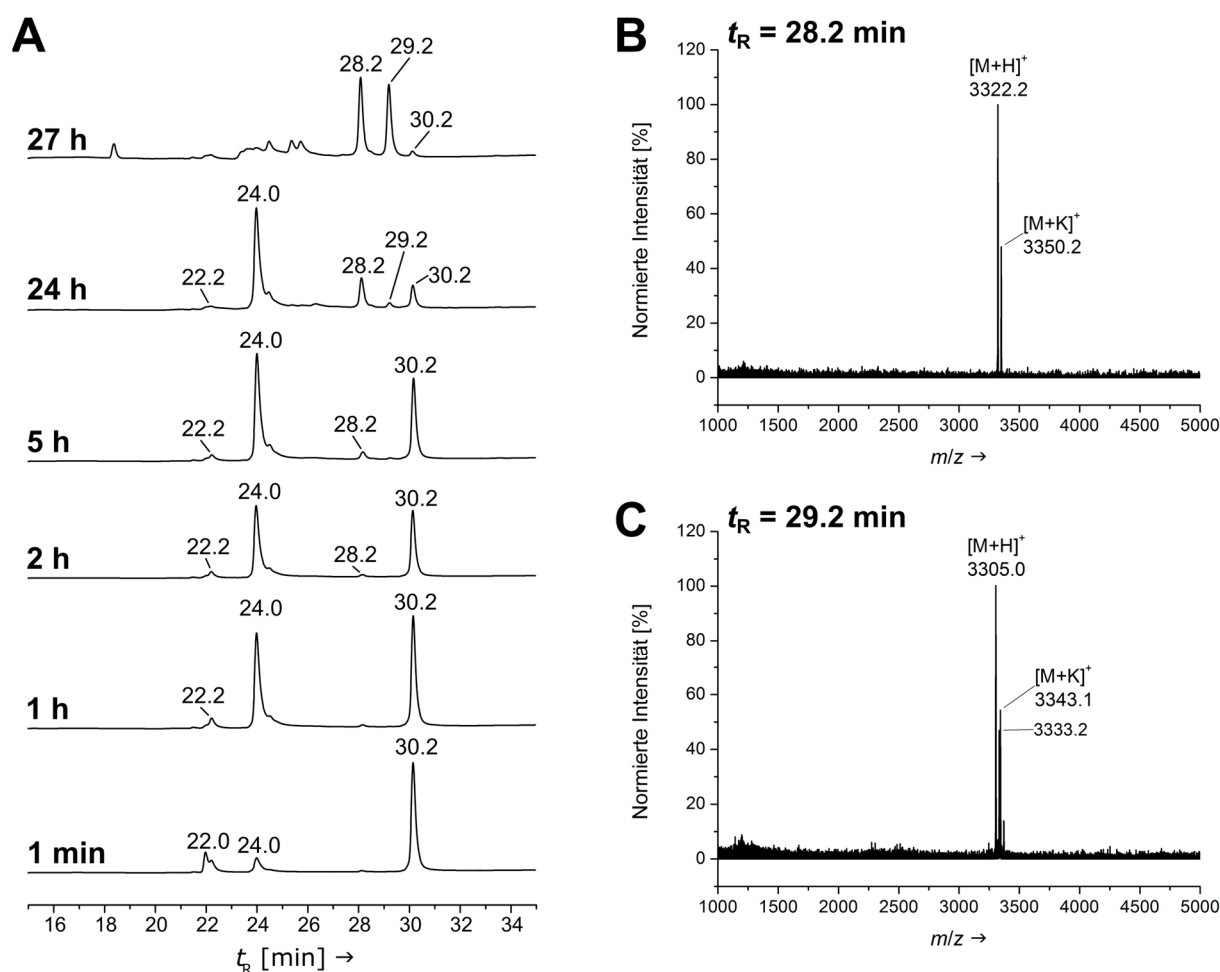
Kombination KC1(K/A): Reaktion 18aa(K/A) mit 4c (Abbildung 23).

Abbildung A.15: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B)-C) die entsprechenden MALDI-TOF-Massenspektren der isolierten Peaks nach t_R geordnet. Die Peaks entsprechen Thiol C (**4c**) ($t_R = 22.2$ min), Hairpin ($t_R = 24.0$ min), Hydrolyse ($t_R = 28.2$ min), Zyklisierung ($t_R = 29.2$ min) und Thioester **18aa(K/A)** ($t_R = 30.2$ min). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hydrolyse **19aa(K/A)** ($M_W = 3318.6090$) bei $t_R = 28.2$ min ber. für $C_{147}H_{222}N_{39}O_{49}^+$ $[M+H]^+$: 3319.6, gef.: 3322.2; ber. für $C_{147}H_{221}N_{39}O_{48}K^+$ $[M+K]^+$: 3357.7, gef.: 3350.2. C) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Zyklisierung **c18aa(K/A)** ($M_W = 3300.5940$) bei $t_R = 29.2$ min ber. für $C_{147}H_{220}N_{39}O_{48}^+$ $[M+H]^+$: 3301.6, gef.: 3305.0; ber. für $C_{147}H_{219}N_{39}O_{48}K^+$ $[M+K]^+$: 3339.7, gef.: 3343.1.

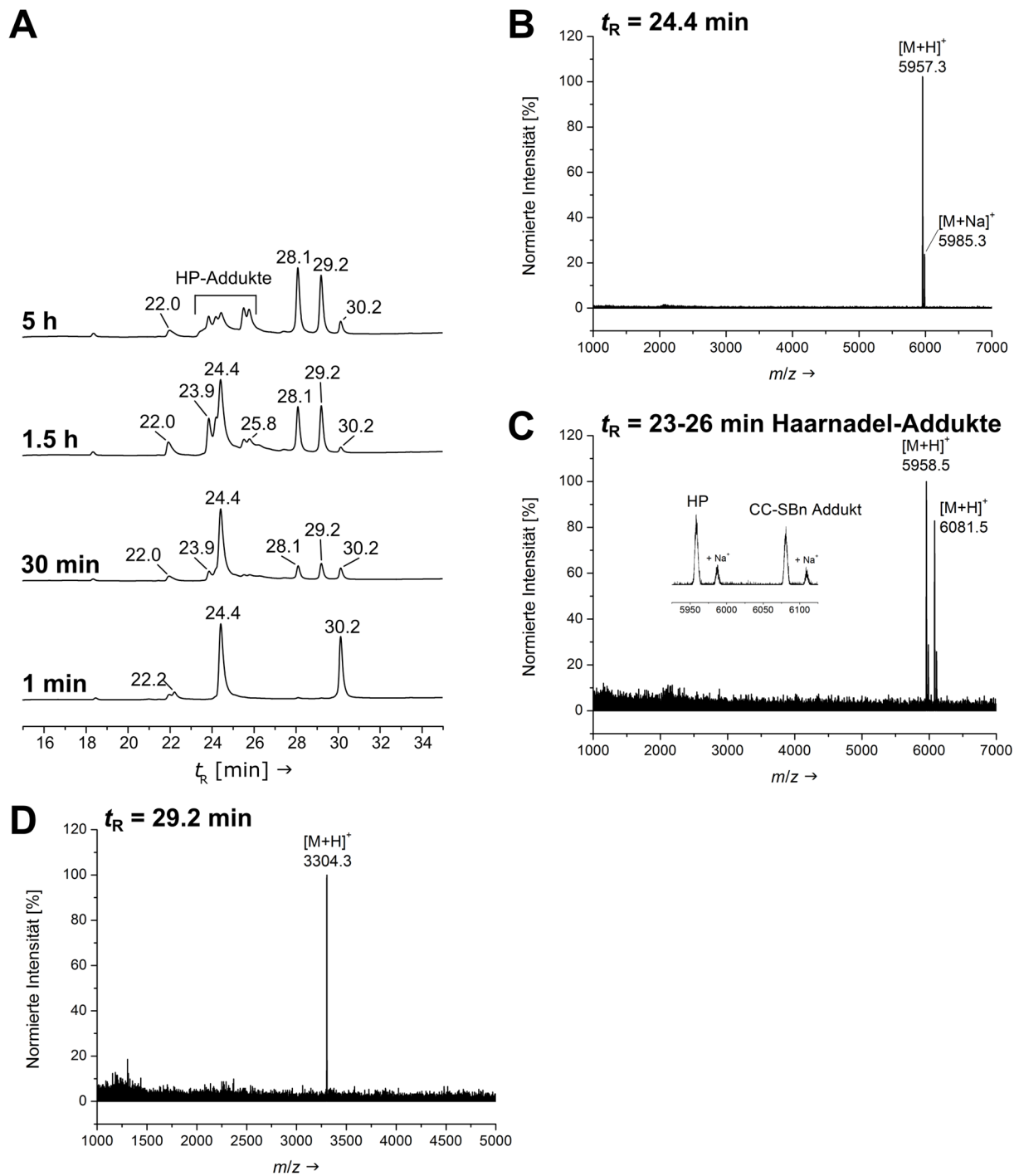
Kombination KD1(K/A): Reaktion 18aa(K/A) mit 4d (Abbildung 24).

Abbildung A.16: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B)-C) die entsprechenden MALDI-TOF-Massenspektren der isolierten Peaks nach t_R geordnet. Die Peaks entsprechen Thiol D (**4d**) ($t_R = 22.0$ min), Hairpin ($t_R = 24.4$ min), Hydrolyse ($t_R = 28.1$ min), Zyklisierung ($t_R = 29.2$ min) und Thioester **18aa(K/A)** ($t_R = 30.2$ min). Des Weiteren wurden im Bereich $t_R = 23-27$ min verschiedene Haarnadel und Coiled-Coil (CC)-Aggregate beobachtet. Diese werden hier auf die Bedingungen zurückgeführt und erscheinen nicht-kovalent. Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Hairpin ($M_W = 5956.9210$) bei $t_R = 24.4$ min ber. für $C_{268}H_{435}N_{74}O_{77}S^+$ $[M+H]^+$: 5957.9, gef.: 5957.3. C) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Aggregaten bei $t_R = 23-27$ min ber. für Hairpin $C_{268}H_{435}N_{74}O_{77}S^+$ $[M+H]^+$: 5957.9,

gef.: 5958.5; ber. für CC-SBn $C_{275}H_{443}N_{74}O_{77}S_2^+$ $[M+H]^+$: 6082.1, gef.: 6081.5. D) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Zyklisierung **c18aa(K/A)** ($M_w = 3300.5940$) bei $t_R = 29.2$ min ber. für $C_{147}H_{220}N_{39}O_{48}^+$ $[M+H]^+$: 3301.6, gef.: 3304.3.

Kombination K-1(K/A): Reaktion 18aa(K/A) (Abbildung 24).

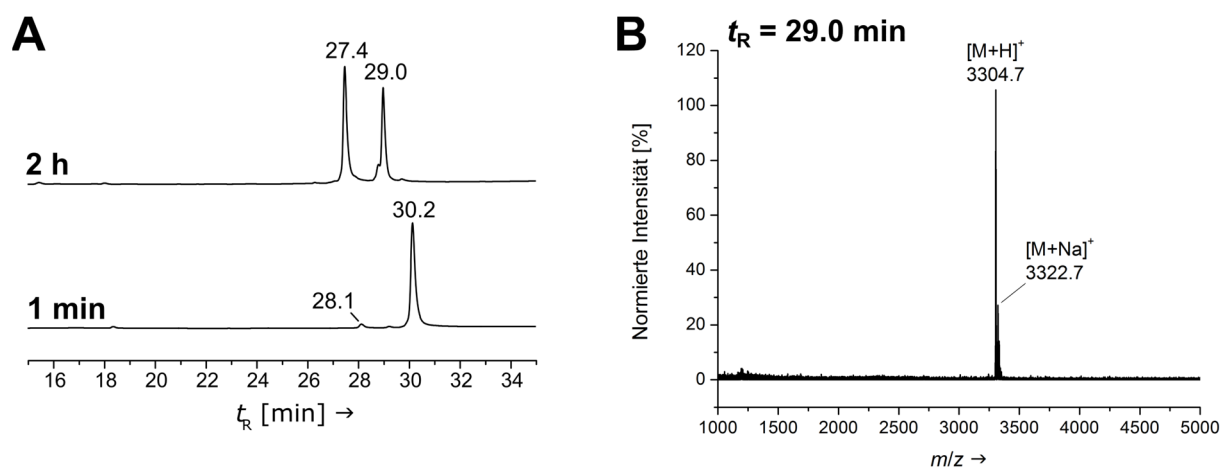


Abbildung A.17: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B) das entsprechenden MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten Peaks. Die Peaks entsprechen Hydrolyse ($t_R = 27.4$ min), Zyklisierung ($t_R = 29.0$ min) und Thioester **18aa(K/A)** ($t_R = 30.2$ min). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Zyklisierung **c18aa(K/A)** ($M_w = 3300.5940$) bei $t_R = 29.0$ min ber. für $C_{147}H_{220}N_{39}O_{48}^+$ $[M+H]^+$: 3301.6, gef.: 3304.7; ber. für $C_{147}H_{219}N_{39}O_{48}Na^+$ $[M+Na]^+$: 3323.6, gef.: 3322.7.

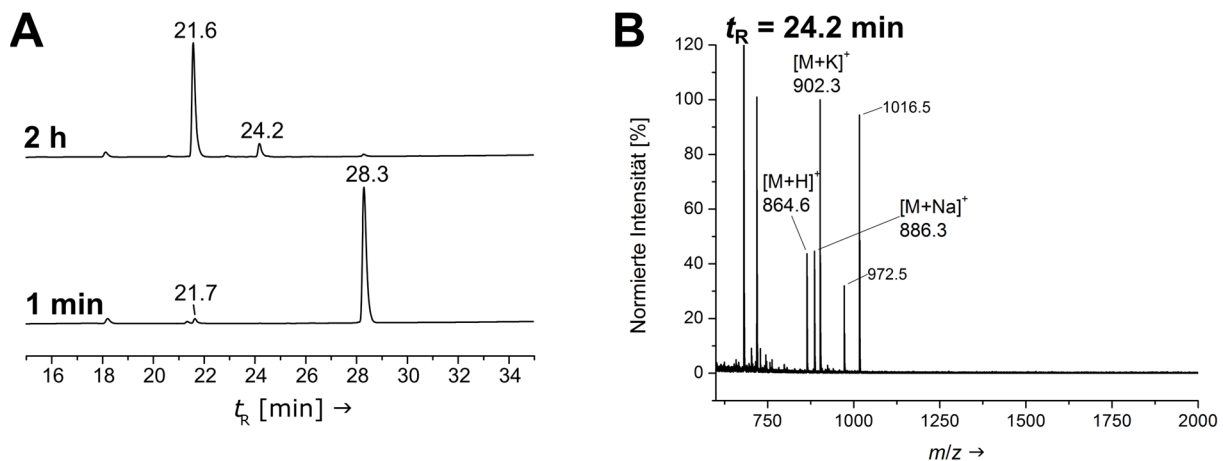
Hintergrundmessung Triazolylpeptidthioester **18(45)a(K/A)**.

Abbildung A.18: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B) das entsprechenden MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten Peaks. Die Peaks entsprechen Hydrolyse ($t_R = 21.6$ min), Zyklisierung ($t_R = 24.2$ min) und Thioester **18(45)a(K/A)** ($t_R = 28.3$ min). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Zyklisierung **c18(45)a(K/A)** ($M_W = 863.8860$) bei $t_R = 24.2$ min ber. für $C_{39}H_{50}N_{11}O_{12}^+$ $[M+H]^+$: 864.8, gef.: 864.6; ber. für $C_{39}H_{49}N_{11}O_{12}Na^+$ $[M+Na]^+$: 886.9, gef.: 886.3; $C_{39}H_{49}N_{11}O_{12}K^+$ $[M+K]^+$: 902.9, gef.: 902.3.

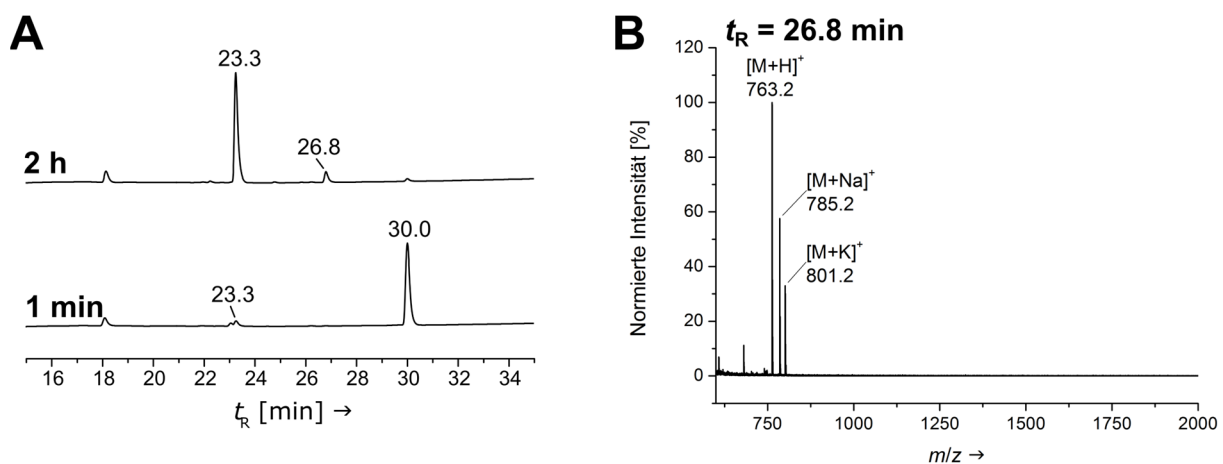
Hintergrundmessung Alkinpeptidthioester **9a(K/A)** (Abbildung 24).

Abbildung A.19: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B) das entsprechenden MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten Peaks. Die Peaks entsprechen Hydrolyse ($t_R = 23.3$ min), Zyklisierung ($t_R = 26.8$ min) und Thioester **9a(K/A)** ($t_R = 30.0$ min). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Zyklisierung **c9a(K/A)** ($M_W = 762.8210$) bei $t_R = 26.8$ min ber. für $C_{37}H_{47}N_8O_{10}^+$ $[M+H]^+$: 763.8, gef.: 763.2; ber. für $C_{37}H_{46}N_8O_{10}Na^+$ $[M+Na]^+$: 785.8, gef.: 785.2; $C_{37}H_{46}N_8O_{10}K^+$ $[M+K]^+$: 801.9, gef.: 801.2.

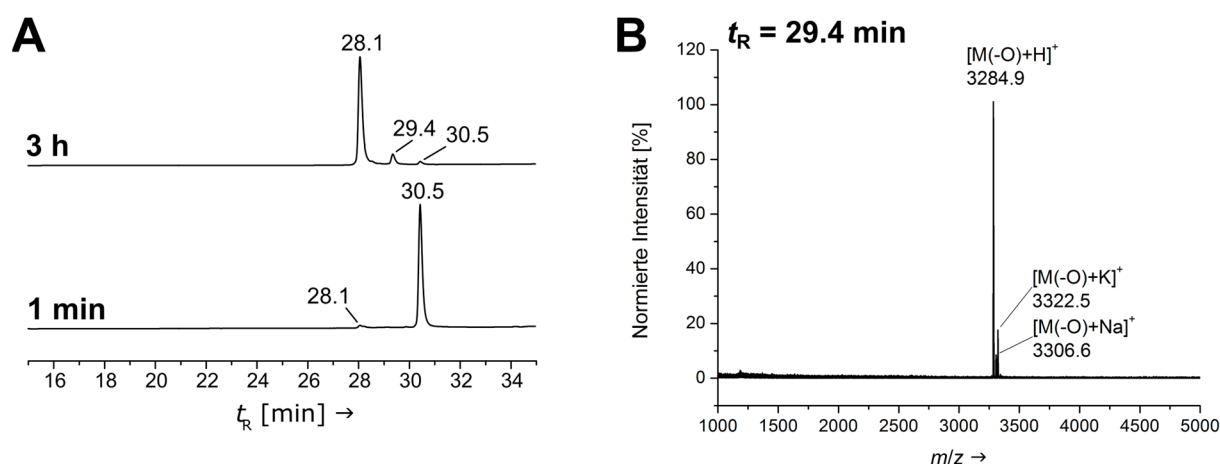
Kombination K-1(K7Q): Reaktion 18a(K7Q)a(K/A) (Abbildung 24).

Abbildung A.20: A) Analytische HPLC-Spuren (Methode H, 220 nm) der Reaktionsverfolgung und B) das entsprechenden MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten Peaks. Die Peaks entsprechen Hydrolyse ($t_R = 28.1$ min), Zyklisierung ($t_R = 29.4$ min) und Thioester **18a(K7Q)a(K/A)** ($t_R = 30.5$ min). Die Auswertung ergab B) **MALDI-TOF-MS** (m/z) Rohspektrum von Zyklisierung **c18a(K7Q)a(K/A)** ($M_W = 3300.5500$) bei $t_R = 29.4$ min ber. für $C_{146}H_{216}N_{39}O_{49}^+ [M+H]^+$: 3301.6, gef.: 3284.9 (-O); ber. für $C_{146}H_{215}N_{39}O_{49}Na^+ [M+Na]^+$: 3323.5, gef.: 3306.6 (-O); ber. für $C_{146}H_{215}N_{39}O_{49}K^+ [M+K]^+$: 3339.7, gef.: 3322.5 (-O). **HR-MS (ESI)** (m/z) Rohspektrum (dekonvuliert) von $t_R = 29.4$ min zeigte hingegen Carbamylierung (Isocyan Säure aus Urea-Verunreinigung möglich) des Zyklisierungsprodukts: ber. für $C_{147}H_{216}N_{40}O_{50} [M(+HCNO)]$: 3343.6, gef. 3343.5.

7.3.2 Native chemische Ligation (NCL)

Ergänzung zu Abbildung 28 in Kapitel 3.4.2.

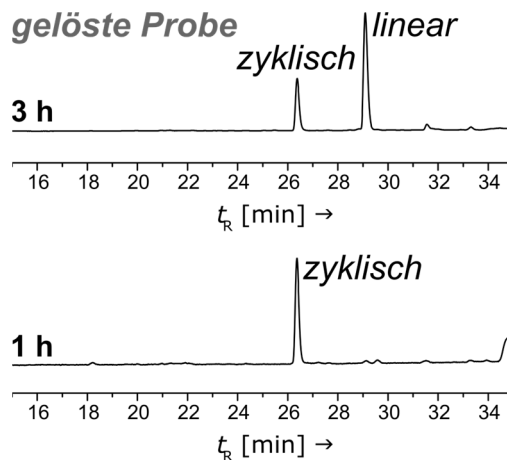


Abbildung A.21: Vergleich zweier analytischer HPLC-Spuren (Methode H, 280 nm) der Reaktion von Alkinylheptapeptidthioester **9b** in 0.2 mM TCEP in PBS (pH 7.5). Nach 1 h Reaktionszeit und des nach 3 h aufgearbeiteten und erneut vermessenen Reaktionsgemischs (gelöst in MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1 % TFA)).

Ergänzung zu Abbildung 31 in Kapitel 3.4.2.

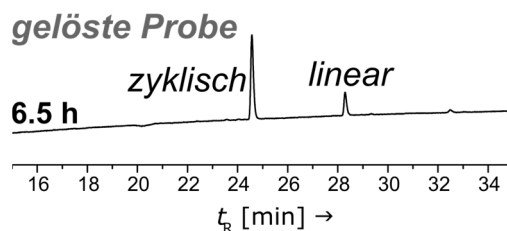


Abbildung A.22: HPLC-Spur (Methode H, 50 °C, 280 nm) der Reaktion von Alkinylhexapeptidthioester **9e** in 0.2 mM TCEP in PBS (pH 7.5). Dieses Reaktionsgemisch wurde nach 6.5 h Reaktionszeit aufgearbeitet und erneut vermessen (gelöst in MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1 % TFA)).

Ergänzung zu Abbildung 33 in Kapitel 3.4.2.

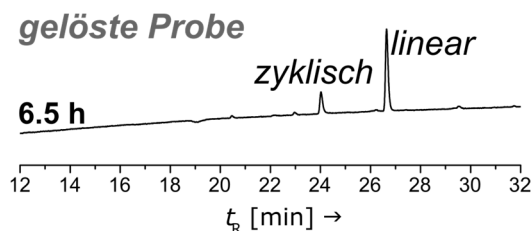


Abbildung A.23: HPLC-Spur (Methode H, 50 °C, 280 nm) der Reaktion von Alkinylpentapeptidthioester **9f** in 0.2 mM TCEP in PBS (pH 7.5). Dieses Reaktionsgemisch wurde nach 6.5 h Reaktionszeit aufgearbeitet und erneut vermessen (gelöst in MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1 % TFA)).

Ergänzung zu Abbildung 36 in Kapitel 3.4.2.

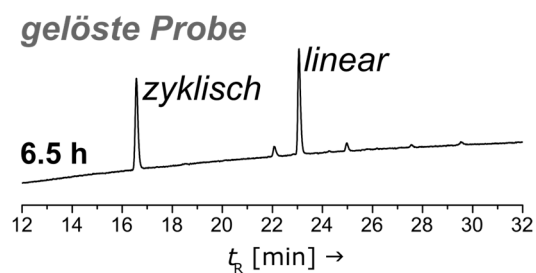


Abbildung A.24: HPLC-Spur (Methode H, 50 °C, 280 nm) der Reaktion von Alkinyltetrapeptidthioester **9g** in 0.2 mM TCEP in PBS (pH 7.5). Dieses Reaktionsgemisch wurde nach 6.5 h Reaktionszeit aufgearbeitet und erneut vermessen (gelöst in MeCN/Wasser (1:3, v/v, + 0.1% TFA)).

Ergänzung zu Abbildung 36 in Kapitel 3.4.2.

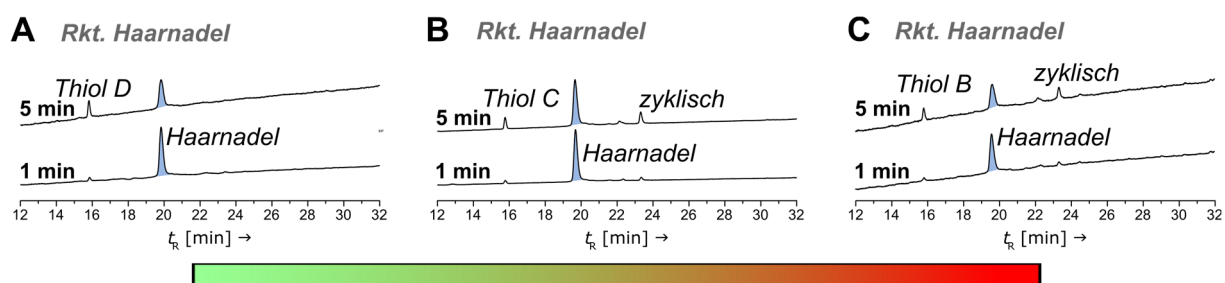


Abbildung A.25: Übersicht der erneuten Ligationsreaktionen der isolierten Haarnadeln nach 1 min und 5 min mit A) der CC-vermittelten Zyklisierung von **18bg** mit Thiol D **4d**, B) der CC-vermittelten Zyklisierung von **18bg** mit Thiol C **4c** und C) der CC-vermittelten Zyklisierung von **18bg** mit Thiol B **4b** aus Abbildung 36.

Ergänzung zu Abbildung 39 in Kapitel 3.4.2.

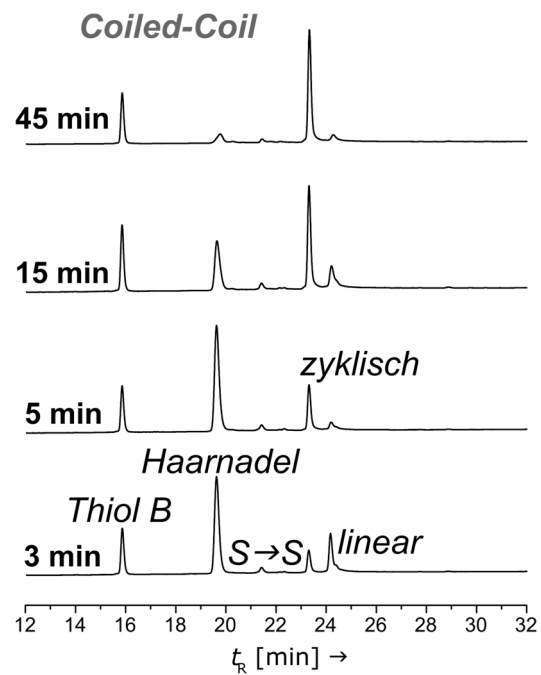


Abbildung A.26: Repräsentative Übersicht der erhaltenen HPLC-Spuren der Kinetikmessung der CC-vermittelten NCL von **18bg** mit Thiol B (**4b**) und angepasster Ligationszeiten der CKYG-Zyklisierung.

Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit aufgeführten Aminosäuren werden in üblicher Weise durch den Ein- oder den Dreibuchstabencode abgekürzt. Die verwendeten Einheiten entsprechen den in üblicherweise verwendeten *SI*-Einheiten.

Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril (MeCN)
Äq.	Äquivalent
BAL	<i>backbone amide linker</i> (dt.: Rückgratverankerung)
β Ala	<i>beta</i> -Alanin
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
°C	Grad
CC	Coiled-Coil
CHA	α -Cyano-4-hydroxycimtsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DEE	Diethylether
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrosprayionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (dt.: und andere)
FAM	5(6)-Carboxyfluorescein
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
γ Abu	<i>gamma</i> -Aminobuttersäure
Gdm·HCl	Guanidiniumhydrochlorid
gef.	Gefunden
h	Stunde

Anhang

HMPB	(Hydroxymethyl)-4-phenoxyessigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (dt.: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HR-MS	<i>high resolution mass spectrometry</i> (dt.: hochauflösende Massenspektrometrie)
λ	Wellenlänge
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption and ionization - time of flight</i> (dt.: matrixunterstützte Laserdesorptionsionisation-Flugzeit)
MS	Massenspektrometrie
MeCN	Acetonitril
M_w	<i>molecular weight</i> (dt.: Molekulargewicht)
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NCL	Native chemische Ligation
n.d.	<i>not determined</i> (dt.: nicht bestimmt)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (dt.: Kernspinresonanz)
OGP	<i>osteogenic growth peptide</i> (dt.: Knochenwachstumspeptid)
o.n.	<i>over night</i> (dt.: über Nacht)
Oxyrna Pure [®]	Hydroxyiminocyanessigsäureethylester
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepuffertes Salin)
Proc	Propargyloxycarbamat
PyBOP [®]	1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
PyBroP [®]	Bromtripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
R_f	Retentionsfaktor
RP	<i>reversed phase</i> (dt.: Umkehrphase)
SG	<i>protecting group</i> (dt.: Schutzgruppe)
SI	Internationales Einheitensystem
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> (dt.: Festphasenpeptidsynthese)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP	Tris(carboxyethyl)phosphin

Anhang

TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
t_R	Retentionszeit
Trt	Trityl
UV/VIS	Ultraviolett/ <i>visible</i> (dt.: sichtbar)

Liste der Aminosäuren

Alanin (Ala, A)	Glutamin (Gln, Q)	Tryptophan (Trp, W)
Arginin (Arg, R)	Isoleucin (Ile, I)	Tyrosin (Tyr, Y)
Asparagin (Asn, N)	Leucin (Leu, L)	
Cystein (Cys, C)	Lysin (Lys, K)	
Glycin (Gly, G)	Methionin (Met, M)	
Histidin (His, H)	Phenylalanin (Phe, F)	
Glutamat (Glu, E)	Serin (Ser, S)	

Danksagung

Wie das Leben so spielt ergeben sich neue Möglichkeiten bevor der vorherige Lebensabschnitt abgeschlossen werden konnte. Meinen Freunden und Wegbegleitern sei diese Danksagung gewidmet.

Ich möchte meiner Mentorin Jun.-Prof. Dr. FRANZISKA THOMAS für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit danken mich an einem sehr interessanten, herausfordernden und faszinierenden Projekt teilhaben zu lassen. Ich bin ihr dankbar für die fortwährende, große Unterstützung und die gewährten wissenschaftlichen Freiheiten bei meinen, ab und an verbissenen, Ideen. Als Team der Stunde Null haben wir Neues gelernt, sind Wagnisse eingegangen und haben mit Willenskraft und Enthusiasmus neue Wege beschritten.

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. CLAUDIA STEINEM für die Übernahme des Korreferats und ihre kritische und dadurch konstruktive Betreuung bedanken. Ihr Blick auf mein Thema aus der Perspektive Ihrer Expertise war eine große Hilfe und stets eine Freude. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern meiner Prüfungskommission, namentlich Herrn Prof. Dr. MANUEL ALCARAZO, Herrn Dr. HOLM FRAUENDORF, Herrn Prof. Dr. HARTMUT LAATSCH und Prof. Dr. DIETMAR STALKE bedanken.

Unbedingt in einem Atemzug mit meinen beiden Referentinnen zu nennen ist Herr Prof. Dr. ULF DIEDERICHSEN, dem ich sehr dankbar für die Möglichkeit bin, die Infrastruktur seiner Forschungsgruppe und deren Fachkenntnisse zu nutzen. Des Weiteren bin ich über alle Maßen dankbar dafür an den Arbeitsgruppenseminaren konstruktiv teilnehmen zu dürfen und auch ein Stück weit Teil seiner Gruppe gewesen zu sein. Seine Rückmeldung und seine Meinung waren ebenfalls ein wesentliche Teile die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau AOIFE NEVILLE und Frau ANGELA HEINEMANN des Büros der Arbeitsgruppe Diederichsen danke ich für Ihre großzügige Hilfe, Zeit und Geduld bei allen administrativen Aufgaben und Ihre freundliche und hilfsbereite Art in allen Belangen.

Mein besonderer Dank gelten Herrn THOMAS SCHUCHARDT und Frau GYÖRGYI SOMMER-UDVARNOKI der Abteilung *Zentrale Analytik* für die Messung der ESI-MS Spektren meiner Click-Konjugate und ihrer Geduld meinen unzähligen Fragen nach möglichen Nebenprodukten nachzugehen. Ich danke Herrn Dr. HOLM FRAUENDORF für die Möglichkeit des freien Zugangs zu dem MALDI-TOF-Massenspektrometer und dem damit entgegengebrachten Vertrauen ebenso wie für seine Fachkenntnis und stete Hilfe.

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Dr. CHRISTOPHER GOLZ für die Einführung an das Polarimeter und dem gesamten Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. MANUEL ALCARAZO für die Möglichkeit ihre Gerätschaft zur Messung der spezifischen Drehwerte zu nutzen.

Herrn RALF GERKE danke ich für seine Hilfe als guter Geist des OC-Praktikumsgebäudes, sowie „unseren“ Hausmeistern Herrn WOLFRAM MATTHIES und SASCHA HERWIG für Ihre Hilfsbereitschaft. Ebenso möchte ich voller Dankbarkeit allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Chemikalienlagers, der Chemie-Werkstätten und natürlich der Verwaltung des IOBCs für Ihre vorbildliche, hilfsbereite und tatkräftige Arbeit danken. Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Dekanats möchte ich für Ihre unkomplizierte Hilfe, insbesondere vor dem Hintergrund der Einreichung dieser Arbeit, meinen Dank aussprechen.

Meinem neuen Arbeitgeber, mit Herrn Dr. ANDREAS ROLFS und Frau Dr. MARZENA ORDA-ZGADZAJ, gebührt mein großer Dank für ihre Unterstützung und die eingeräumte Zeit diese Arbeit fertigstellen zu können.

Ich möchte mich bei meinen ehemaligen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Thomas in Göttingen, Dr. VIKTORIA MRĐEN DEBONO, Dr. ROBERT SCHIRMACHER und VANESSA REUSCHE für die gemeinsame, spannende und schöne Zeit bedanken. Ebenso möchte ich mich insbesondere bei unseren „Langzeitmitgliedern“ Dr. SELDA GLOWACKI (geb. KABATAS), NILS MEYER, NIELS BENJAMIN PAUL, HERMANN NEITZ und TRUC LAM PHAM, sowie allen ehemaligen Masterstudenten, Bachelorstudenten und Praktikanten über all die Jahre bedanken. Es hat mir große Freude bereitet Teil eures wissenschaftlichen Werdegangs gewesen zu sein und ich danke euch für die gute und amüsante Zusammenarbeit in Labor P125.

Meinen Vertiefern (Forschungspraktikanten) Dr. BENEDIKT KUGLER, Dr. FLORIAN GRIMM, Dr. MARTIN KLOOS, FELIX KALTENHÄUSER und „meinem“ Bachelorstudenten JOSCHUA ZACHMANN danke ich für Ihr Engagement, ihre Zeit und ihre Begeisterung für unsere Forschung an einem neuartigen NCL-Auxiliar.

Bei Dr. BENEDIKT KUGLER und Dr. MIKE GROTH entschuldige ich mich für meinen negativen musikalischen Einfluss während ihrer Zeit als Masterstudenten in unserer Arbeitsgruppe. Es freut mich aber umso mehr, dass nach langem Sträuben erkannt wurde das Säulenchromatographie an Kieselgel in der Tat schneller und mit höherer Trennleistung unter dem Einfluss von Scooter (die älteren Werke) funktioniert. Danke, dass ihr diese Tradition weitergibt und -lebt.

Danksagung

Ein großes Dankeschön an meine Korrekturleser VANESSA REUSCHE und Dr. BENEDIKT KUGLER.

Allen aktuellen und insbesondere ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Diederichsen möchte ich für Ihre freundliche Aufnahme aller Mitglieder der Arbeitsgruppe Thomas und, ganz besonders, mir selbst danken. Danke dafür, dass ihr es einem sehr leicht gemacht habt. Ohne Euch hätte es nicht funktioniert.

Den Doktoren, die der hohen Kunst des Tischfußballs mittäglich zugeneigt waren, danke ich zutiefst für viele schöne Momente und Bilder.

Dr. STEPHEN MIDDEL, Dr. JAN-DIRK WEHLAND und NILS MEYER möchte ich für die vielen schöne Stunden nach Feierabend danken.

Dr. MARTIN KLOOS und VANESSA REUSCHE danke ich dafür mich mit zum Bouldern und Klettern genommen zu haben und so einen wunderbaren Ausgleich zum Labor gefunden zu haben.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Marburgern Dr. STEFAN LENZ, Dr. NICHOLAS RAU, Dr. JOHANNES MARTIN, THORSTEN LEDER, MICHAEL BIEDENBACH, RAFFAEL STRICKLER und MAXIMILIAN JUNG für die gemeinsamen, jährlichen Bergtouren bedanken. Es ist die beste Selbsthilfegruppe, die keine Selbsthilfegruppe sein will.

Ich bin FALKO REMMERT, JULIUS KLING, MICHEL SCHLEENBECKER und DENNIS PFAFF dankbar sie meine Freunde nennen zu dürfen.

Bei meinen Eltern und meinen beiden Schwestern bedanke ich mich für Alles.

Meiner Partnerin VANESSA danke ich für ihre Geduld, ihre Großherzigkeit, ihr Vertrauen in uns und dafür mich zu stützen, wenn ich es nicht selbst vermag.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.