

Synthese und Untersuchung von Alanyl-PNA Oligomeren und deren Einfluß auf β -Faltblatt Strukturen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Ružica Ranevski
aus Arnsberg

Göttingen 2006

D 7

Referent: Prof. Dr. Ulf Diederichsen

Korreferent: Prof. Dr. Axel Zeeck

Tag der mündlichen Prüfung: 04. 05. 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2002 bis Februar 2006 unter der Leitung von Prof. Dr. U. Diederichsen am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. U. Diederichsen für die interessante Themenstellung sowie für die Unterstützung und Förderung während des Fortgangs dieser Arbeit.

**meinen Eltern, Stanko
und Holger**

Da ersann die zeusentsprossene
Helena andres
Und sie warf in den
Wein, von welchem sie tranken,
ein Mittel gegen Kummer
und Grole und aller
üblen Gedächtnis

Homer. Odyssee

**Da bi mogao raditi sve ono što želi,
treba se roditi ili kao kralj ili kao ludak.**

Aristotel

**Jači je ko pobedi sebe
nego onaj ko savlada
najjačem bedeme.**

Ovidije

Inhaltsverzeichnis

I. ALLGEMEINER TEIL.....	1
1 Einleitung.....	1
2 Grundlegende Aspekte.....	5
2.1 Peptide	5
2.1.1 Sekundärstrukturen/ β -Faltblatt ^[8 a-c]	5
2.1.2 Am Rückgrat <i>N</i> -methylierte Peptide ^[16]	7
2.1.3 Peptidnucleinsäuren (PNAs)	9
2.2 Ligationen	14
2.3 Humanes Interleukin-8 Derivat (hIL-8)	19
3 Synthese von Nucleoaminosäuren	21
3.1 Synthese der Monomerbausteine	21
3.2 Synthese <i>N</i> -methylierter Nucleoaminosäuren ^[43 a-c]	23
3.3 Synthese von <i>N</i> -methylierten und Seitenketten-geschützten Aminosäuren ^[48 a-c]	27
4 Alanyl-PNA Doppelstränge mit Basenfehlstellen und deren Stabilität (T_m)	28
4.1 Basenfehlstellen in der Sequenz der Alanyl-PNA Oligomere	28
4.2 Modifikationen im Rückgrat: <i>N</i> -methylierte Alanyl-PNA Oligomere	45
5 α-Peptid/Alanyl-Peptidnucleinsäure-Chimäre.....	48
5.1 Synthese und Stabilitätsverhalten der α -Peptid/Alanyl- Peptidnucleinsäuren	48
6 Synthese des Interleukin-8 (hIL-8)/Alanyl-PNA Derivats	59
7 Ligationsverfahren nach <i>Bordusa</i> mit Alanyl-PNA	64
8 Zusammenfassung und Ausblick.....	68
9 Summary and Outlook.....	71
II. EXPERIMENTELLER TEIL	74
1 Allgemeine Arbeitstechniken.....	74

1.1	Allgemeine Methoden.....	74
1.2	Chromatographie.....	75
1.3	Spektroskopie.....	76
2	Synthesen.....	79
2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften(AAV)	79
2.1.1	AAV1: Bestimmung der Enantiomerenreinheit in Anlehnung an Lohse ^[41a]	79
2.1.2	AAV2: Kupplung der ersten Aminosäure an das Harz.....	79
2.1.3	AAV3: Manuelle Synthese der Peptidnucleinsäure - Oligomere mittels Boc-Festphasenstrategie ^[66 a-c]	80
2.1.3.1	AAV3.1: Allgemeines Kupplungsprotokoll	80
2.1.3.2	AAV3.2: Kupplungsprotokoll beim Einsatz von Aminosäuren mit Fehlstellungen:	82
2.1.3.3	AAV3.3: Manuelle Synthese des Peptides mittels Fmoc-Festphasen-strategie ^[66 a]	83
2.2	Synthese von Alanyl-Nucleoaminosäuren ^[47]	85
2.2.1	(S)-N-tert-Butoxycarbonyl-β-(N-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-alanin (39)	85
2.2.2	(R)-N-tert-Butoxycarbonyl-β-(N-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-alanin (39a)	86
2.2.3	(S)-N-tert-Butoxycarbonyl-β-(2-amino-6-chlor-9-purinyl)-alanin (36) ^[47]	86
2.2.4	(R)-N-tert-Butoxycarbonyl-β-(2-amino-6-chlor-9-purinyl)-alanin (36a).....	87
2.2.5	β-(9-Guaninyl)-alanin (90).....	88
2.2.6	(S)-N-tert-Butoxycarbonyl-β-(9-guaninyl)-alanin (37).....	89
2.2.7	(R)-N-tert-Butoxycarbonyl-β-(9-guaninyl)-alanin (37a)	90
2.2.8	(S)-N-Butoxycarbonyl-β-(1-thyminyl)-L-alanin (38)	90
2.2.9	(S)-N-Butoxycarbonyl-β-(9-adeninyl)-L-alanin (40) ^[47]	92
2.3	Synthese von N-methylierten Alanyl-Nucleoaminosäuren	93
2.3.1	(S)-N-Butoxycarbonyl-N-methyl-L-serinlacton (42)	93
2.3.2	(S)-N-tert-Butoxycarbonyl-N-methyl-β-(N-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-alanin (45)	94
2.3.3	(S)-N-tert-Butoxycarbonyl-N-methyl-β-(2-amino-6-chlor-9-purinyl)-alanin (93)	96
2.3.4	N-Methyl-β-(9-guaninyl)-alanin (94)	97
2.3.5	(S)-N-tert-Butoxycarbonyl-N-methyl-β-(9-guaninyl)-alanin (43)	98
2.3.6	(S)-N-Butoxycarbonyl-N-methyl-β-(1-thyminyl)-L-alanin (44).....	100
2.3.7	(S)-N-Butoxycarbonyl-N-methyl-β-(9-adeninyl)-L-alanin (46).....	102
2.4	Synthesen von geschützten N-methylierten Aminosäuren.....	103
2.4.1	(S)-N-α-tert-Butoxycarbonyl-N-methyl-benzyl-cystein (56).....	103
2.4.2	3-(Benzylamino)-2-(tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino)propansäure (57) ^[67 a-c]	105
2.5	Synthese der Alanyl-Peptidnucleinsäuren (Alanyl-PNAs).....	106
2.5.1	H-AlaC-AlaC-AlaT-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH ₂ (59).....	106
2.5.2	H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaT-AlaG-AlaG-Lys-NH ₂ (60)	107

2.5.3	H-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH ₂ (61)	109
2.5.4	H-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-Lys-NH ₂ (63).....	110
2.5.5	H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-Lys-NH ₂ (62)	111
2.5.6	H-Lys-AlaG-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH ₂ (65)	112
2.5.7	H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-AlaC-Lys-NH ₂ (64)	113
2.5.8	H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-OH (80)	114
2.5.9	H-AlaC-AlaC-AlaG-Glu-AlaG-AlaG-Gly-OH (66)	115
2.5.10	H-AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC-Gly-OH (81)	116
2.5.11	H-AlaT-AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC-Gly-OH (93).....	117
2.5.12	H-(Me)AlaCAlaC-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH ₂ (67).....	118
2.5.13	H-AlaC-AlaC-(Me)AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH ₂ (68).....	119
2.6	Synthese der Peptid/Alanyl-PNA Sequenz	121
2.6.1	Ac-SPGKTYTEVPGOKILQVGPGG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG- AlaG-K (72)	121
2.6.2	Ac-OKILQVGNGG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-K (73).....	123
2.6.3	Ac-SPGKTYTEVPGOKILQVGPG-NH ₂ (69)	125
2.6.4	IL-8/Alanyl-PNA Derivat (76).....	126
2.7	Ligation nach <i>Bordusa</i>	128

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....130

IV. LITERATURVERZEICHNIS133

I. Allgemeiner Teil

1 Einleitung

Die meisten der heute gegen die verschiedensten Krankheiten eingesetzten Arzneimittel entfalten ihre Wirkung durch Wechselwirkungen mit Proteinen, insbesondere mit Enzymen und Rezeptoren, die mit der jeweiligen Krankheit in Zusammenhang stehen.^[1] Ursache für viele Krankheiten sind fehlerhafte genetische Informationen. Die Funktion und Eigenschaften von Proteinen sind eng mit der dreidimensionalen Anordnung ihrer Sekundärstrukturen und ihrer Konformationsänderungen verbunden. Eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ist ein essentieller Vorgang bei der Proteinerkennung durch kleine Moleküle sowie bei Protein-Protein und Protein-DNA Wechselwirkungen.^[2] Eine kontrollierbare Veränderung in der Konformation stellt ein wichtiges Werkzeug für die Steuerung einer Proteinfunktion und deren Eigenschaft dar. Es ist daher von großem Interesse die spezifische Erkennung von Proteinen sowie Proteindomänen zu kontrollieren. Hierbei sind nicht nur die erwähnten Konformationswechsel bei der Entwicklung neuer molekularer Schalter und Erkennungseinheiten von Bedeutung, sondern auch die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinen. Die entwickelten Erkennungsdomänen können als Hilfswerkzeuge bei der Untersuchung von Proteinfunktionen und deren Mechanismen sowie bei Interaktionen zwischen Proteinen, zum Beispiel der Signaltransduktion, dienen. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, modifizierte kleine Proteine mit Erkennungseinheiten darzustellen, welche mit komplementären Molekülen in Wechselwirkung treten und somit eine Konformationsänderung induzieren können. Dazu sollen Alanyl-Peptidnucleinsäuren (Alanyl-PNAs) als molekulare Schalter für β -Faltblatt-Sekundärstrukturen dienen. Alanyl-PNAs bestehen aus Alanyl-Aminosäuren, die in ihrer Seitenkette verschiedene Nucleobasen tragen.

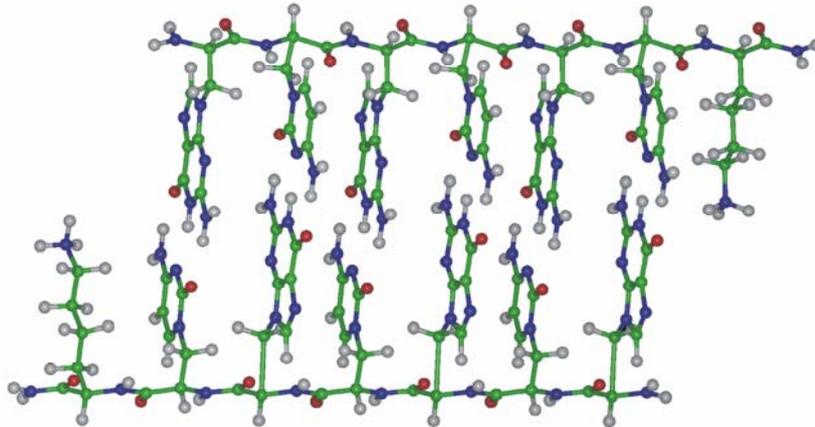


Abb. 1 Darstellung des linearen Doppelstranges der Alanyl-PNA.^[3a, 3b]

Bei der Alanyl-PNA handelt es sich um ein alternierend aufgebautes Peptid, deren Seitenketten sich aufgrund der Alternanz der Aminosäuren auf eine Seite des Rückgrates orientieren und durch Wasserstoffbrückenbindungen einen linearen Doppelstrang ausbilden können (Abb. 1). Die in der Alanyl-PNA vorkommenden Nucleoaminosäuren treten mit einer komplementären Nucleobase bzw. einem komplementären Strang in Wechselwirkung. Komplementäre Alanyl-PNA Hexamere bilden stabile Doppelstränge mit linearer Topologie aus (Abb. 1). Die Doppelstrangstabilisierung kommt durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelungen der Nucleobasen zustande. Im gepaarten Zustand liegt das Rückgrat des Hexamers in einer β -Faltblatt Konformation vor, während der Einzelstrang in einer zufällig ausgebildeten Anordnung vorliegt, so dass das „Schalten“ durch das Paaren bzw. Entpaaren ermöglicht wird. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Stabilisierungseigenschaft und die Ausbildung einer β -Faltblattstruktur der Alanyl-PNA Hexamere zu nutze gemacht. Ein Alanyl-PNA Hexamer (z.B. Alanyl-PNA Oligomer **2** in Abb. 2) wird als Teil einer β -Faltblattestruktur eines Peptids (z.B. Peptid **1** Abb. 2) bzw. Proteins eingebaut. Das Alanyl-PNA Oligomer wird als Doppelstrang oder bei einer „gestörten“ β -Faltblattstruktur eines Peptids bzw. Proteins, als Alanyl-PNA Hexamer Einzelstrang, eingebaut. Durch den Einbau kommt es zum Einfluss bzw. zu einer Wechselwirkung der Alanyl-PNA und damit zu einer Schaltfunktionen durch Stabilisierung bzw. Destabilisierung der dreidimensionalen Struktur der Peptide bzw. Proteine.^[4 a-g]

Somit werden komplementäre Alanyl-PNA Oligomere als neue molekulare konformationellen „Schalter“ in der Peptidchemie eingeführt.

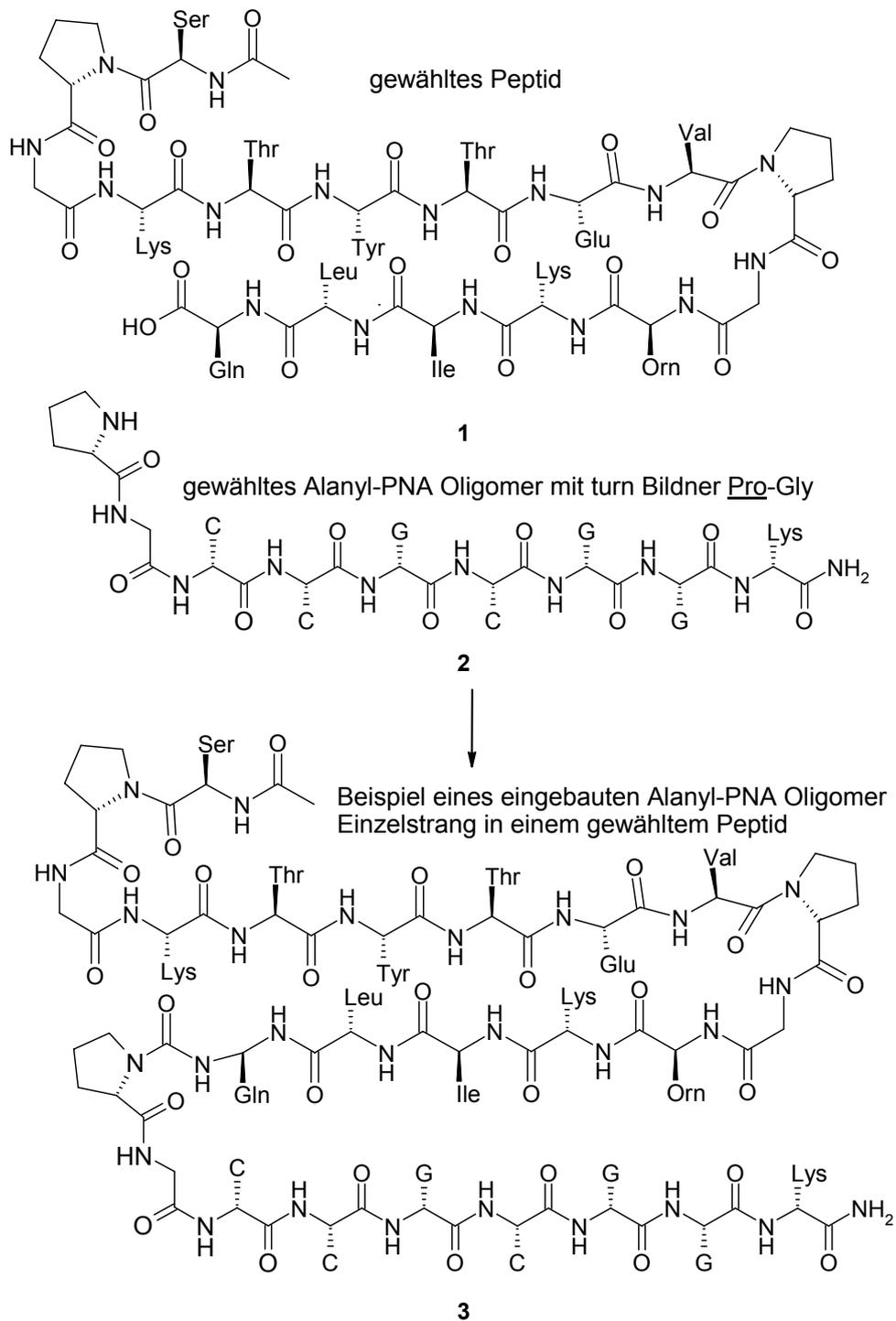


Abb. 2 Beispiel eines gewählten Alanyl-PNA Oligomers mit turn Bildner Pro-Gly **2**, welches in ein β -Faltblatt Peptid **1** eingebaut wird und Einfluss ausüben kann (G = Guanin, C = Cytosin).

Als Protein wurde das menschliche Cytokin Interleukin 8 (hIL-8) und ein Peptid **1**, welches *Gellmann et al.* NMR-spektroskopisch charakterisiert haben, verwendet.^[5]

Einen weiteren Teil dieser Arbeit stellte die Entwicklung der Synthese *N*-methylierter Nucleobasen dar, welche in die Alanyl-PNA eingebaut werden sollten, um eventuell auftretende Rückgrataggregationen zu vermeiden. Ferner sollten NMR-spektroskopische Untersuchungen eines solchen Alanyl-PNA Doppelstranges und seines Paarungsverhaltens durchgeführt werden. Die biologische Aktivität *N*-methylierter Peptide, sowie deren therapeutischer Nutzen werden von *Fairlie et al.* zurzeit maßgeblich diskutiert.^[6 a-d] So wird die *N*-Methylierung des Rückgrates von Peptiden in vielen Arbeiten vorgestellt und ist bei der Synthese aggregationsarmer Proteine und Peptide von großem Nutzen.^[7 a-e] Jedoch sind die Synthesewege mit Schwierigkeiten behaftet, die sich in geringen Ausbeuten, Racemisierung oder teuren Reagenzien wieder spiegeln. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine optimierte Synthese zur Darstellung *N*-methylierter Nucleoaminosäuren und weiterer Aminosäuren entwickelt werden.

2 Grundlegende Aspekte

2.1 Peptide

2.1.1 Sekundärstrukturen/ β -Faltblatt^[8 a-c]

Die Funktion von Proteinen hängt im wesentlichen von ihrer dreidimensionalen Struktur und der Konformation innerhalb des Proteins ab. Die spezifische Erkennung unterschiedlicher Proteine oder derer Domänen würde einen erheblichen Fortschritt bedeuten. Hierbei sind Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Wechselwirkungen ein wesentliches Interessengebiet. Es steht zu hoffen, dass durch bessere Kenntnisse in diesem Bereich neue künstliche Erkennungseinheiten und Schalter entwickelt und diese auf molekularer Ebene kontrolliert werden können. Diese Schalter könnten dann als Werkzeuge bei der Untersuchung der Proteinfunktionen und ihrer Mechanismen fungieren. Weiterhin wären sie in der Interaktion zwischen Proteinen beispielsweise bei der Signaltransduktion einsetzbar.

Es ist bekannt, dass Konformationsübergänge, Faltungen und Fehlfaltungen von Proteinen und Peptiden bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen eine große Rolle spielen.^[9] Als Beispiel sei hier die Konformationsänderung in löslichen Amyloid- β -Vorstufen erwähnt, die zu einer aggregierten β -Faltblattstruktur führt und eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung von zerebralen Ablagerungen hat und damit charakteristisch für die Alzheimer-Erkrankung ist.^[10 a-c] Oligo- und Polypeptide mit ausgeprägter Tendenz zur Ausbildung einer β -Faltblattstruktur neigen zu irreversibler Selbstaggregation. Dies geschieht aufgrund der engen Verknüpfung von Sekundärstruktur, Tertiärstruktur und den physikochemischen Eigenschaften dieser Peptide, wodurch eine Untersuchung dieser Peptide sehr aufwendig ist.^[9]

Weiterhin ist die Stabilität der β -Faltblattstruktur, wie auch die der α -Helices, abhängig von der Länge des Peptids. Ferner müssen bei der β -Faltblattstruktur zwei orthogonale „Dimensionen“ betrachtet werden, die zum einen entlang des Stranges verlaufen bzw. senkrecht darauf zeigen. Im Unterschied dazu ist bei den α -Helices nur eine eindimensionale Betrachtung entlang der

Achse von Bedeutung.^[11] Ein dritter wichtiger Faktor bei den β -Faltblattstrukturen sind deren *turn* Bildner. Es ist bekannt, dass D-Pro-Gly sowie Asn-Gly gerade für kleine Moleküle gute *turn* Bildner darstellen, wobei Asn-Gly der schwächere *turn* Bildner der beiden ist.^[12 a-c, 13] Um die schwachen Interaktionen während einer Faltung zu betrachten, wurde ein β -hairpin (zwei *anti*-parallele Stränge, die mit einem *reverse* β -turn verknüpft sind) als einfaches System ausgewählt. 1998 stellte Searle *et al.* das Model eines β -Faltblattes aus 16 Aminosäuren vor. Die beiden β -Faltblatt-Sequenzen wurden mittels Asn-Gly verknüpft. Der Ans-Gly *turn* stellt den *turn*-Typ I' dar (Abb. 3).^[14]

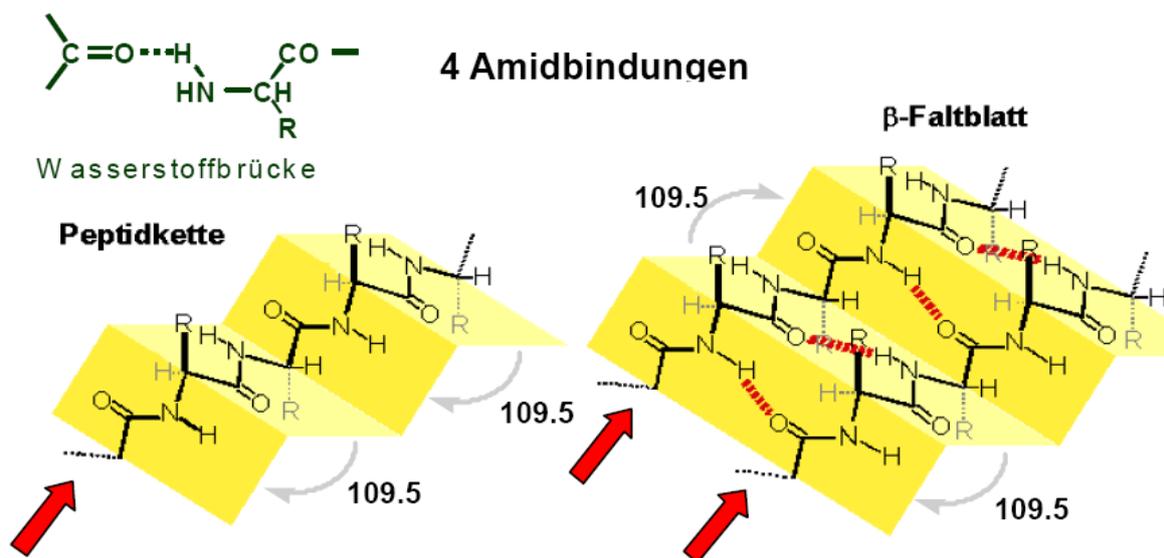


Abb. 3 β -Faltblattstruktur von Proteinen, deren Winkel und Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Sequenz von Polypeptiden hat einen maßgebenden Einfluss auf die Sekundär-, Tertiär- und ggf. Quartärstrukturen, da sich die Aminosäuren nur durch ihre Seitenkettenfunktionen (eine Ausnahme bildet Prolin) unterscheiden. Folglich können sich Modifizierungen der Aminosäureseitenketten, wie die Phosphorylierung, direkt auf die Struktur dieser Peptide auswirken.^[15] Die Modifizierungen stellen meist einen reversiblen Prozess dar, so dass die Natur ein sehr effizientes Werkzeug zur gezielten Beeinflussung

der Struktur und damit letztlich der Funktion von Polypeptiden zur Verfügung hat.

2.1.2 Am Rückgrat *N*-methylierte Peptide^[16]

Wie schon erwähnt ist die dreidimensionale Struktur von Polypeptiden im Wesentlichen von der Aminosäure Sequenz abhängig. Ferner wirken sich Modifikationen des Rückgrats auf die dreidimensionale Struktur aus. Es werden in der Natur sehr häufig lineare sowie helicale Peptide mit *N*-methylierten Aminosäuren vorgefunden.^[17] Diese besitzen interessante biologische Aktivitäten, wie antifungale, anti-inflammatorische und immunsuppressive Eigenschaften. Als Beispiel soll das Cyclosporin aus dem *fungus Beauveria nivea* genannt werden.^[18 a, 18 b] Die Synthese solcher Peptide ist mit Problemen verbunden, dass sich z.B. häufig Aggregate ausbilden oder es zu ungewollten Nebenreaktionen kommt, welche im Anschluss besprochen werden.

Säuren wie TFA, welche bei der Entschützung, sowie bei der Abspaltung vom Harz eingesetzt werden, fördern die Hydrolyse des *N*-methylierten Peptides **4**. Außerdem wird unter sauren Bedingungen die Racemisierung begünstigt, da der methylierte Stickstoff deutlich basischer ist und die Tautomerisierung zum Oxazoloniumion **9** (Abb. 4), welches eine pseudo aromatische Struktur bildet, fördert.^[19 a-d] Um solch eine Racemisierung zu vermeiden, kann der α -Stickstoff durch Urethane geschützt werden. Es ist ebenso bekannt, dass die Acylierung eines Peptides am *N*-Terminus den Prozess der Oxazoloniumionenbildung fördert. Bei der Synthese des Peptides nach 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Strategie kann auf Säure zur Entschützung verzichtet werden, zur Kupplung *N*-methylierter Aminosäuren ist sie gegenüber der *tert.*- Butoxycarbonyl (Boc) Strategie zu bevorzugen.^[20 a-b]

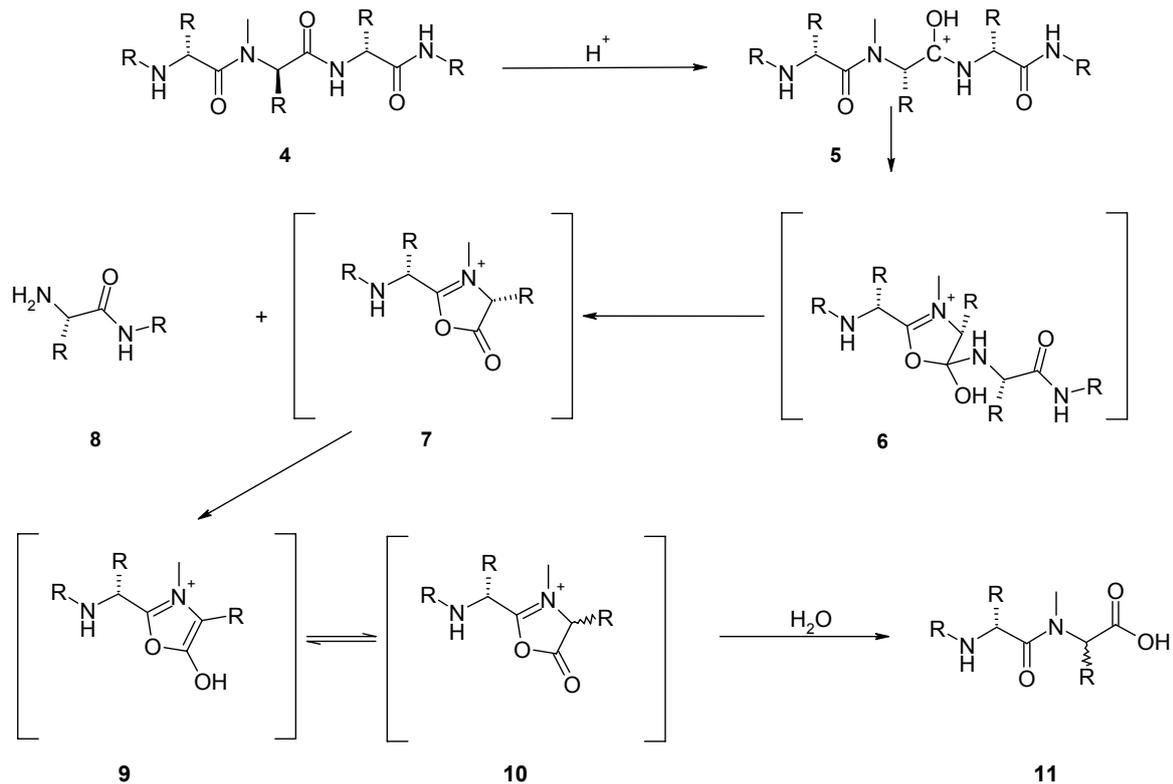


Abb. 4 Beschriebener Mechanismus der Hydrolyse von *N*-methylierten Peptidsequenzen.^[20a]

Für die Sekundärstruktur und die Eigenschaften von Peptiden und Proteinen spielt neben der Seitenkette auch das Rückgrat eine wesentliche Rolle. Durch den Austausch des Sauerstoffatoms am Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung durch Schwefel wird unter Bildung einer Thioxamidbindung eine höhere Stabilität generiert. Auch der Einbau einer *N*-methylierten Aminosäure kann Einfluss auf die Strukturbildung, z.B. als β -Faltblatt „Destabilisator“, haben.^[21 a-b] Eine Rückgrataggregation kann auf diese Weise verhindert werden (Abb. 5).

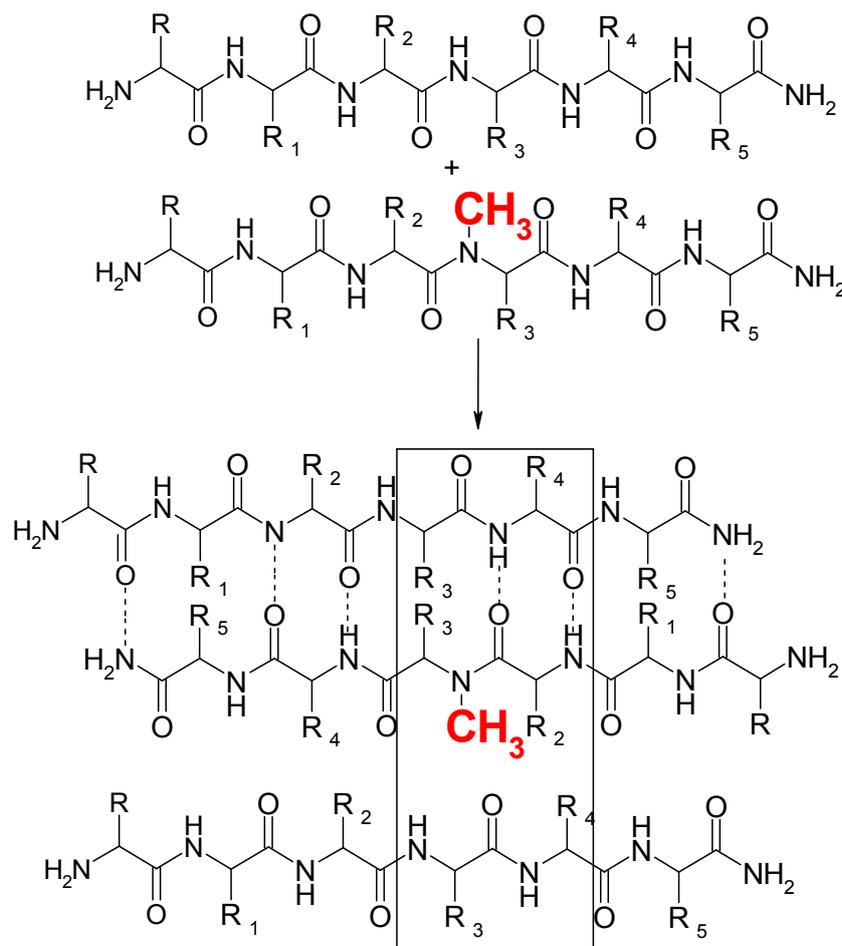


Abb. 5 Peptid mit *N*-metyliertem Rückgrat: β -Faltblatt Aggregation kann verhindert werden.

Dabei reicht nur eine *N*-alkylierte Stelle aus, um beispielsweise eine β -Faltblattstapelung zu umgehen.^[22]

2.1.3 Peptidnucleinsäuren (PNAs)

Peptidnucleinsäuren (PNAs) wurden erstmals von einer dänischen Arbeitsgruppe um Buchardt, Nielsen, Egholm und Berg beschrieben.^[23 a-c] Es wurde mittels Computergestützten Designs eine auf Aminoethylglycineinheiten basierende PNA (Nielsen-PNA) **13** entwickelt, die eine effiziente Hybridisierung mit komplementären DNA und RNA-Strängen ausbildet. Die Aminoethylglycin-PNA hat sich als gutes DNA- und RNA-komplementäres

System erwiesen, welches eine gute Bindungsaffinität aufweist. Jedoch besitzt Nielsen-PNA unter physiologischen Bedingungen eine schlechte Löslichkeit

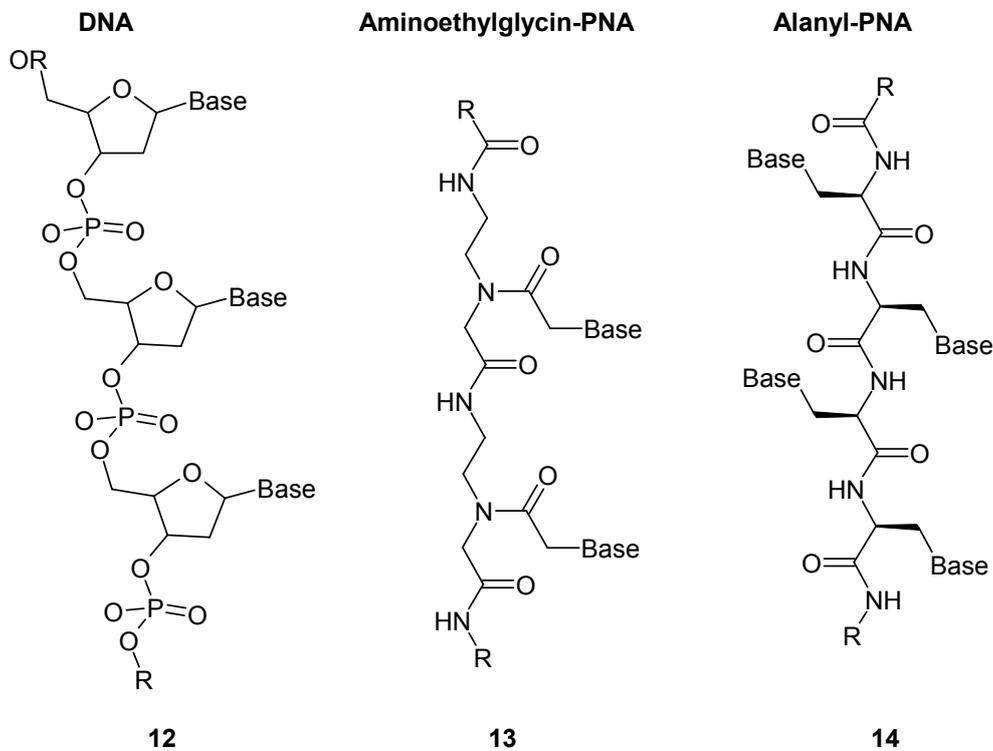


Abb. 6 Darstellung der DNA, Aminoethylglycin-PNA (Nielsen-PNA) und Alanyl-PNA.

Eine weitere Peptidnukleinsäure stellt die Alanyl-PNA **14** dar (Abb. 6). Die Alanyl-PNA bindet, obwohl die Isosteriekriterien erfüllt sind, nicht an DNA oder RNA.^[24] Die Nucleobasen sind über die β -Position des Alanins mit dem Peptidrückgrat alternierend verknüpft, wodurch sich alle Nucleobasen auf eine Seite orientieren (Abb. 7). Dies führt dazu, dass sich ein linearer Doppelstrang mit einem komplementären Oligomer ausbilden kann. Der Abstand der einzelnen Nucleobasen zueinander beträgt 3.6 Å. Dieses entspricht in etwa dem idealen Basenabstand von 3.4 Å einer B-DNA. Die Stabilisierung des Doppelstrangs und dessen hohe Rigidität beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Wechselwirkungen, Solvenseffekten und Stapelung der Nucleobasen.

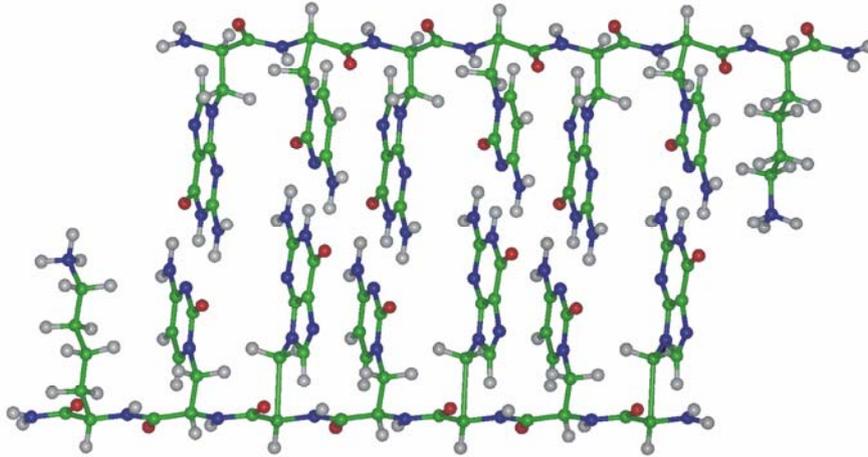


Abb. 7 Darstellung des linearen Doppelstranges der Alanyl-PNA^[3 a-b]

Da die linearen Paarungskomplexe der Alanyl-PNA keinen topologischen Zwängen durch Helicität unterliegen, sind prinzipiell alle Orientierungen der Basenpaare erlaubt. Im Gegensatz zur DNA, welche aufgrund ihrer helicalen Topologie ausschließlich im *Watson-Crick* Paarungsmodus paaren kann. So sind, neben einer *Watson-Crick*, *reverse Watson-Crick* auch noch eine *Hoogsteen* und *reverse Hoogsteen* Paarungen möglich (Abb. 8).^[3 a-b, 25]

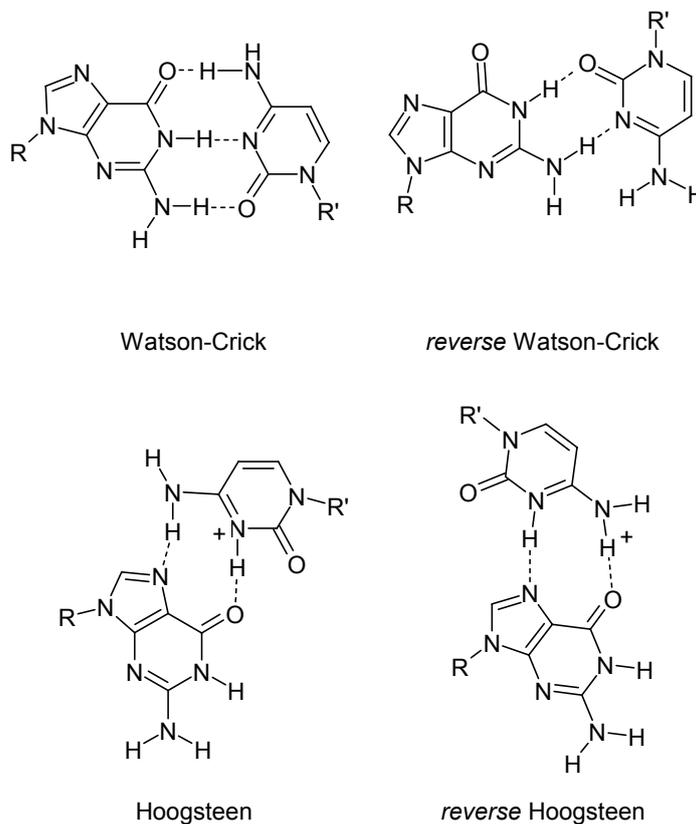


Abb. 8 Basenpaarungsmodi für ein GC Alanyl-PNA Basenpaar (G = Guanin, C = Cytosin). Die Hoogsteen Basenpaarungen kommen nur im sauren Milieu vor.

Der jeweilige *reverse* Paarungsmodus wird durch eine Spiegelung einer der beiden Nucleobasen erhalten, wodurch die Ausrichtung der komplementären Nucleobasen und die relative Lage des Rückgrats zueinander geändert wird. Die Verteilung der Donor- bzw. Akzeptor-Funktionalitäten an den Nucleobasen und die Rückgrat-Topologie legen die Paarungsselektivitäten fest. Durch die Orientierung der paarenden Oligomere (parallel oder antiparallel) und die Konfiguration miteinander paarender Nucleoaminosäuren im Doppelstrang (homochiral oder heterochiral) wird der Paarungsmodus festgelegt. Die linearen, rigiden und stabilen Paarungskomplexeigenschaften der Alanyl-PNA Oligomere machen diese für Untersuchungen als Modell eines Nucleobasenstapels interessant. Durch Modifikationen der Alanyl-PNA Oligomere kann das Paarungsverhalten und damit die Wechselwirkungen bzw. die entstandenen Einflüsse untersucht werden.

Die Sequenzen der Alanyl-PNA werden so gewählt, dass die Doppelstränge antiparallel orientiert sind.^[3 a-b] Die Bevorzugung der antiparallelen Orientierung beruht unter anderem auf der Abstoßung der positiv geladenen C-terminalen Lysine. Den Beitrag der verschiedenen Paarungsmodi an der Stabilität der Alanyl-PNA wird durch mehrere Oligomere unterschiedlicher Orientierungs-selektivität durch die *UV*-Schmelztemperatur T_m ermittelt.^{[3 a-b, 4 a-}

^{g]} Die durch die *UV*-Schmelzkurven ermittelte Stabilitätsverhalten der zwei folgenden Oligomere H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**15**) und H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**16**) zeigen ein zu erwartendes Ergebnis von $T_m = 58$ °C. Die Selbstpaarung von **15** bzw. **16** kann nur im *reverse* Watson-Crick Modus verwirklicht werden. Die Schmelztemperaturen liegen erwartungsgemäß niedriger als bei dem Heterodimer. Die Alanyl-PNA **15** weist eine Schmelztemperatur von $T_m = 41$ °C und die Alanyl-PNA **16** eine von $T_m = 40$ °C auf. Die Enantiomerenpaarung nahm hingegen einen *Watson-Crick* Modus ein, wodurch die höhere Stabilität erklärt werden kann.^[3 a]

Die Alanyl-PNA besteht, wie bereits erwähnt, aus einem regulären Peptid mit alternierenden konfigurierten Alanyl-Einheiten, deren Seitenketten kovalent mit

Nucleobasen substituiert sind. Komplementäre Alanyl-PNA Hexamere bilden stabile lineare Doppelstränge basierend auf spezifischer Nucleobasen-Erkennung aus. Da das Peptid-Rückgrat im Alanyl-PNA Duplex eine β -Faltblatt-Konformation einnimmt, hingegen im Einzelstrang als *random coil* vorliegt, kann von einem molekularen konformationeller „Schalter“ in Bezug auf das Peptidrückgrat gesteuert werden. Dieser kann durch Paarung bzw. Entpaarung eingesetzt werden.

2.2 Ligationen

Bei der Untersuchung von biologischen Systemen stellt sich Molekularbiologen und Chemikern immer wieder auf die Aufgabe, zwei molekulare Einheiten miteinander zu verknüpfen, etwa ein komplexes Kohlenhydrat mit einem Peptid, eine molekulare Sonde mit einem Biopolymer oder einfach zwei Peptide.^[26] Biologische Systeme sind nicht nur strukturell sehr komplex, sondern auch divers in ihrer funktionellen Reaktivität. Aus diesem Grund ist es von Interesse chemoselektive Ligationsreaktionen zu entwickeln, in denen selektiv zwei funktionelle Gruppen in einer wässrigen Umgebung zur Reaktion gebracht werden sollen. Diese ausgewählten funktionellen Gruppen müssen dabei nicht nur wechselseitig selektiv sein, sondern auch andere Funktionalitäten tolerieren. Auf diese Weise würde sich eine Schutzgruppenstrategie erübrigen, wodurch die Synthese um einige Reaktionsschritte verkürzt würde. Ein weiterer Vorteil der Ligationsmethoden ist, dass Peptide, die mittels SPPS eine Größe von maximal 40-50 Aminosäuren erreichen können, durch die entsprechenden Ligationen beliebig vergrößert werden können.^[27] So können via *native chemical ligation* (NCL) 100-150 bzw. bei der *expressed protein ligation* über 500 Aminosäuren aneinander gekuppelt werden.^[27] Die Mechanismen einiger bekannter Ligationsmethoden seien im Folgenden genannt.

Die *native chemical ligation* nach *Kent et. al.*, ermöglicht die Kupplung zweier ungeschützter Peptidfragmente (gezeigt durch Peptid 1 und Peptid 2) (Abb. 10).^[28 a-e] Das Fragment **17**, welches ein *N*-terminales Cystein enthält, wird mittels SPPS aufgebaut. Das zweite Fragment **18** trägt am C-Terminus einen Thioester. Durch die chemoselektive Reaktion und die irreversible S-N-Acyverschiebung wird eine neue kovalente Bindung geknüpft.

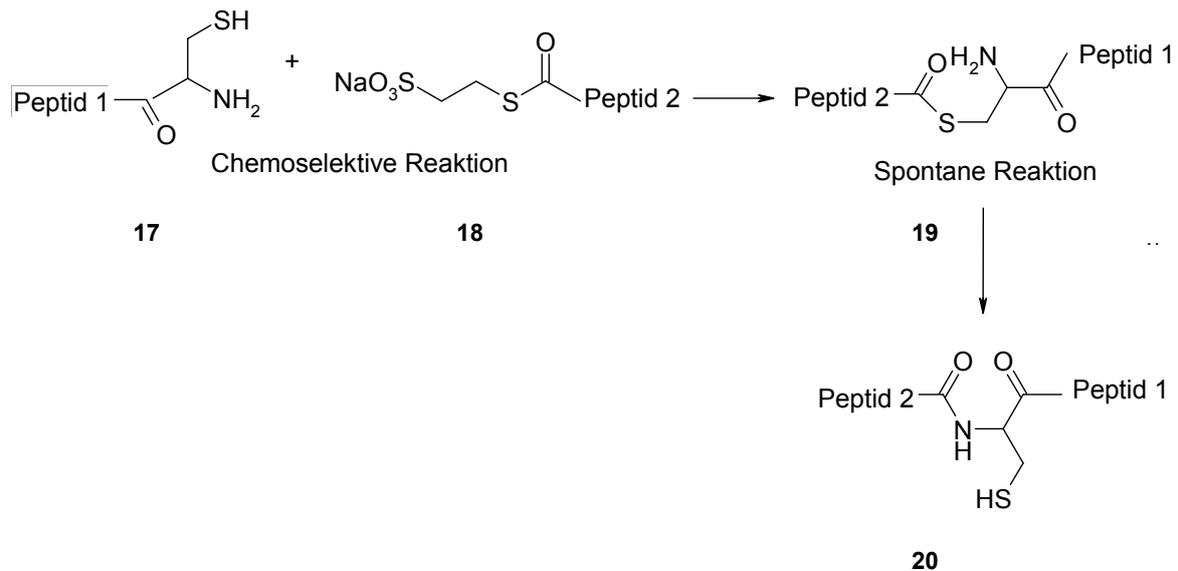


Abb. 9 Mechanismus der *native chemical ligation* von Kent.^[29]

Ein viel versprechender Ansatz ist, die Kombination von biosynthetischen Methoden mit chemischen Reaktionen. Eine Möglichkeit wäre die chemische Synthese des Thioesters **18** und die Expression des an der Ligation beteiligten Peptides. Besteht die Notwendigkeit, die C-terminale Carboxylgruppe, eines Peptides in einem Thioester zu überführen, so kann auf die Strategie des *Splicens* zurückgegriffen werden.^[30 a-c] Proteine, welche einen intramolekularen Prozess des *Splicens* durchführen, weisen eine N-Extein-Intein-C-Extein Sequenz auf. Beim Spliceprozess wird das Intein **23** aus dem System entfernt, so dass die Sequenzfolge N-Extein-C-Extein **22** im System verbleibt (Abb. 11).

N-S-Acylwanderung

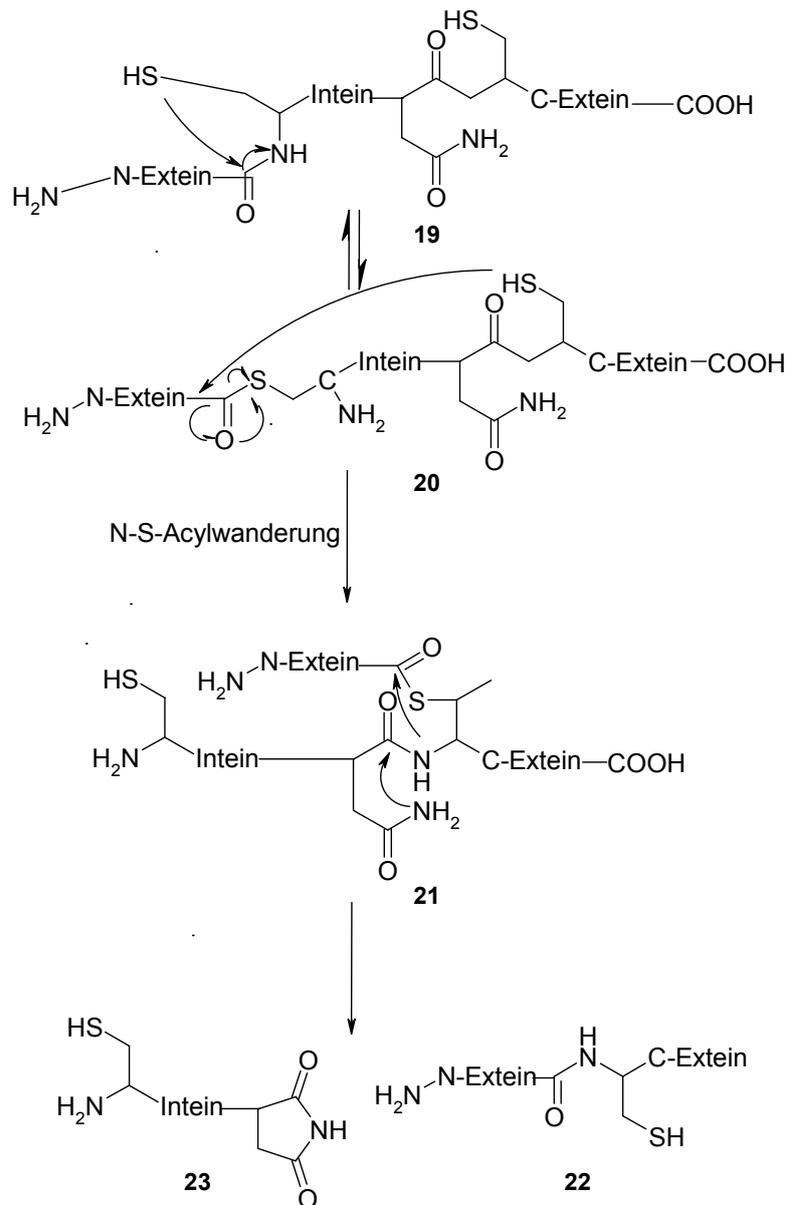


Abb. 10 Mechanismus des intramolekularen Splicens.^[30 c]

Setzt man bei diesem Prozess mutante Inteine-Proteine ein, so stoppt der Prozess nach dem ersten Schritt. Das dabei entstandene Thioester verbrückte Protein kann mittels Thioreagenzien abgespalten werden. Es wird direkt das Thioester Produkt erhalten.^[31] Dieser Prozess wird allgemein als *expressed protein ligation* (EPL) bezeichnet und erlangte große Bedeutung.^[32 a-b]

Die *extended chemical ligation* beruht auf der Darstellung eines aus dem System entfernbaren N^α -(1-Phenyl-2-mercaptoethyl)-Aminosäure-Derivates **28** (Abb. 11).

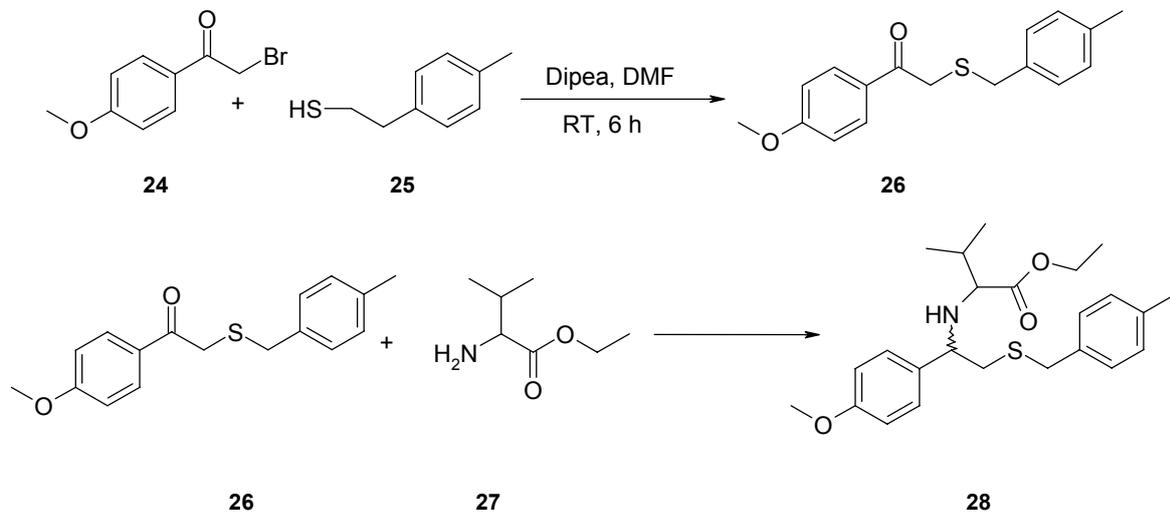


Abb. 11 Synthese eines N^α -(1-Phenyl-2-mercaptoethyl) Valin Derivates **28**.^[33]

Diese Ligationmethode bietet den Vorteil, dass kein Cystein in der Sequenz vorhanden sein, bzw. dass kein zusätzliches Cystein eingebaut werden muss. *Botti et al.* haben die N^α -Auxiliary-Derivate Glycin und Alanin mittels reduktiver Aminierung dargestellt. Es wurden verschiedene Methoden, wie Kupplung ohne Schutzgruppen mit säure-/basenlabiler Schützung oder Schützung durch ein Thiazolidin-Derivat getestet (Abb. 11, 12).^[33]

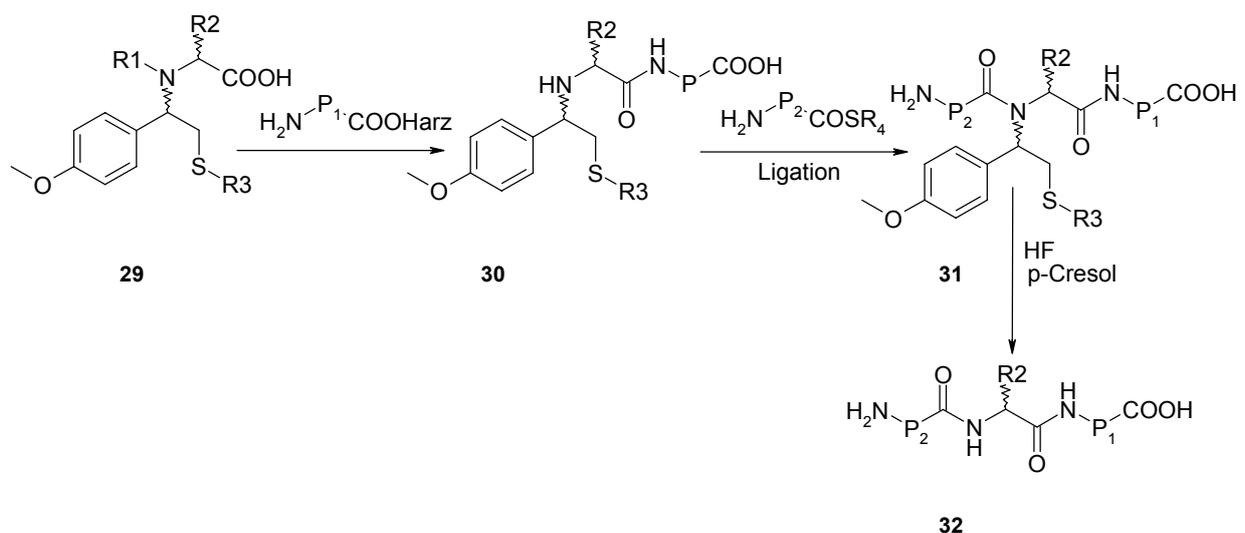


Abb. 12 N^α -(1-Phenyl-2-mercaptoethyl)-Aminosäure-Derivat zur ECL. R_1 =H oder Schutzgruppe, R_2 =Aminosäure mit Seitenkette, R_3 =Schwefel Schutzgruppe, R_4 =Alkylgruppe, P_1 und P_2 =Peptide.^[33]

Bordusa et al. beschäftigt sich mit der Substratmimetika vermittelten Peptidsynthese, welche eine Strategie zur spezifitätsunabhängigen, irreversiblen Ligation darstellt. Diese Methode der enzymatischen Ligation bietet Vorteile zum einen durch die Tatsache, dass es nicht möglich ist, die Racemisierung bei chemischen Peptidsynthesen gänzlich zu unterdrücken, zum anderen ist der experimentelle Aufwand bei reversibler Schützung von Drittfunktionen der zu verknüpfenden Aminosäurebausteine sehr hoch.^[34] Bereits 1991 wurde über die Anwendung von Acylaminosäure-4-guanidinophenylester (**33**) (Abb. 13) für Trypsin katalysierte Peptidsynthesen berichtet.

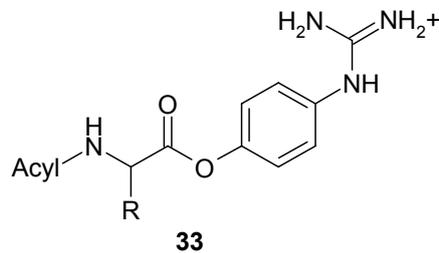


Abb. 13 Acylaminosäure-4-guanidinophenylester (**33**).^[35]

Bei dieser Methode, wird das kationische Zentrum der 4-Guanidinophenylester(OGp)-Einheit in das aktive Zentrum von Trypsin gleichsam als Mimetikum für trypsinspezifische Aminosäureseitenketten wie Argenin oder Lysin eingepasst und somit irreversibel eine Peptidbindung dargestellt.^[36 a-b]

2.3 Humanes Interleukin-8 Derivat (hIL-8)

Das Immunsystem verwendet eine Reihe verschiedener Rezeptoren, um Pathogene zu erkennen und darauf zu reagieren. Die Rezeptoren, die Oberflächen von Bakterien direkt erkennen, binden häufig an Wiederholungsmuster, wie Kohlenhydrat- und Lipidgruppen, die für mikrobielle Oberflächen charakteristisch sind, aber nicht in der Körperzelle vorkommen.^[37] Die Rezeptoren, die Krankheitserreger erkennen, besitzen auch eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung für die induzierten Antworten, die für lokale Entzündungen verantwortlich sind, bei der Mobilisierung neuer Effektorzellen, der Eindämmung von lokalen Infektionen und beim Auslösen von adaptiven Immunantworten. Die Übertragung solcher Signale kann durch eine Familie von signalgebenden Rezeptoren erfolgen, die als Toll-Rezeptoren bezeichnet werden und welche unter anderem eine Reihe von Genen aktivieren, darunter auch Gene des Cytokins, die bei der Steuerung der adaptiven Immunantwort von entscheidender Bedeutung sind.^[38] Die angeborene Immunität beruht unter anderem auf Cytokinen. Cytokine sind kleine Proteine, die im Körper von verschiedenen Zellen freigesetzt werden und durch Bindung an spezifische Rezeptoren Reaktionen auslösen. Chemokine sind eine Klasse von Cytokinen mit der Eigenschaft von Chemoattraktoren, die Zellen veranlassen können, zur Quelle der Chemokine zu wandern (z.B. IL (Interleukin)-8).^[39 a-b]

Das menschliche Interleukin 8 (hIL-8) (Abb. 14) (hier 77 Aminosäuren) stellt ein chemotaktisches Cytokin dar, welches neutrophile Aktivität aufweist. Es spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese einer großen Anzahl verschiedener inflammatorischer Krankheiten. IL-8 war das erste Chemokin, das kloniert und charakterisiert wurde. Dieses Cytokin gehört zu der Gruppe der CXC Chemokine, bei denen strukturell zwei Cysteine durch eine andere Aminosäure getrennt sind.^[39 a] Es entsteht nach der Abspaltung als ein *precursor* aus 99 Aminosäuren. Die bekannteste Struktur besteht aus 72 Aminosäuren und beinhaltet vier Cysteine die zwei Disulfidbrücken bilden.^[40]

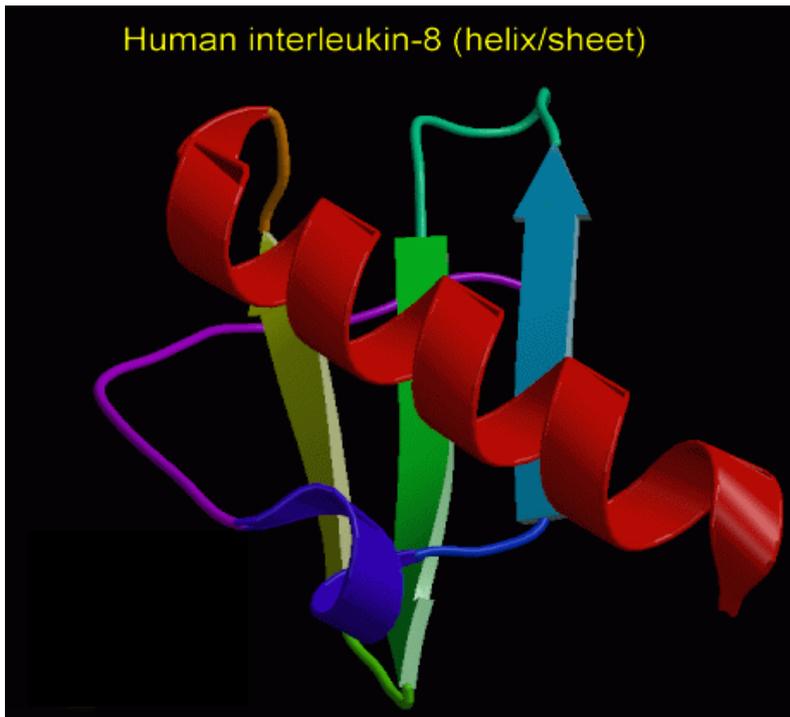


Abb. 14 Struktur des humanen Interleukin-8 (hIL-8).

Das humane Interleukin-8 (hIL-8) ist gegenüber Hitze, extremen pH-Werten, Peptidasen und Denaturierung stabil. Es besteht aus drei antiparallelen β -Faltblatt Strängen und einer α -Helix (von Aminosäure 56 beginnend), welche durch *loops* miteinander verbunden sind.

3 Synthese von Nucleoaminosäuren

3.1 Synthese der Monomerbausteine

Die Nucleoaminosäuren Boc-AlaC-OH (**39**), Boc-AlaT-OH (**38**), Boc-AlaA-OH (**40**) und Boc-AlaG-OH (**37**) wurden ausgehend von Serin (Ser) in hoher Ausbeute und hoher Enantiomerenreinheit nach *P. Lohse* synthetisiert (Abb. 15).^[41 a-b] Im ersten Schritt wird *N*-Boc-L-Serinlacton **35** sowie das entsprechende D-Enantiomer aus den entsprechenden von enantiomerenreinen *N*-Boc-L-Serin **34** bzw. dem entsprechenden D-Enantiomer unter *Mitsunobu*-Bedingungen dargestellt.^[42] Die Ausbeute beträgt in beiden Fällen 54 %. Die Ringöffnung erfolgt durch einen nucleophilen Angriff der Nucleobasen. Hierbei wird die Vorschrift von *Lohse* auf die Nucleobase Guanin und Cytosin übertragen und angepasst. Die Guanin-substituierte Aminosäure wird über einen längeren Reaktionsweg analog zu *Weicherding* (Abb. 15) dargestellt, da die Nucleophilie des Guanins für eine Ringöffnung nicht ausreicht.^[47] Die Darstellung der Cytosin-Alanyl- (Boc-AlaC^Z-OH) **39** und der Thymin-Alanyl-Nucleoaminosäuren gelang analog durch eine nucleophile Ringöffnung mit der entsprechenden Nucleobase, sowie mit DBU als Base. Bei der Verwendung von Adenin als Nucleophil wird K₂CO₃ als Base verwendet. Zur Darstellung der Guanin-substituierten Aminosäure wird 2-Amino-6-chlorpurin verwendet. Die Verwendung des geschützten Cytosins beruhte einerseits auf der besseren Löslichkeit und der resultierenden höheren Ausbeute die bei 74 % lag; und andererseits ist eine geschützte exozyklische Aminofunktion in der nachfolgenden Festphasensynthese von erheblichem Vorteil, da sie so keine störenden Nebenreaktionen eingehen kann. Die nach *Lohse* und *Weicherding* synthetisierten Aminosäuren wurden in Ausbeuten von 74 % für Boc-AlaC-OH (**39**), 86 % für Boc-AlaT-OH (**38**), 31 % für Boc-AlaA-OH (**40**) und 92 % Boc-AlaG-OH (**37**) erhalten (Abb. 15).

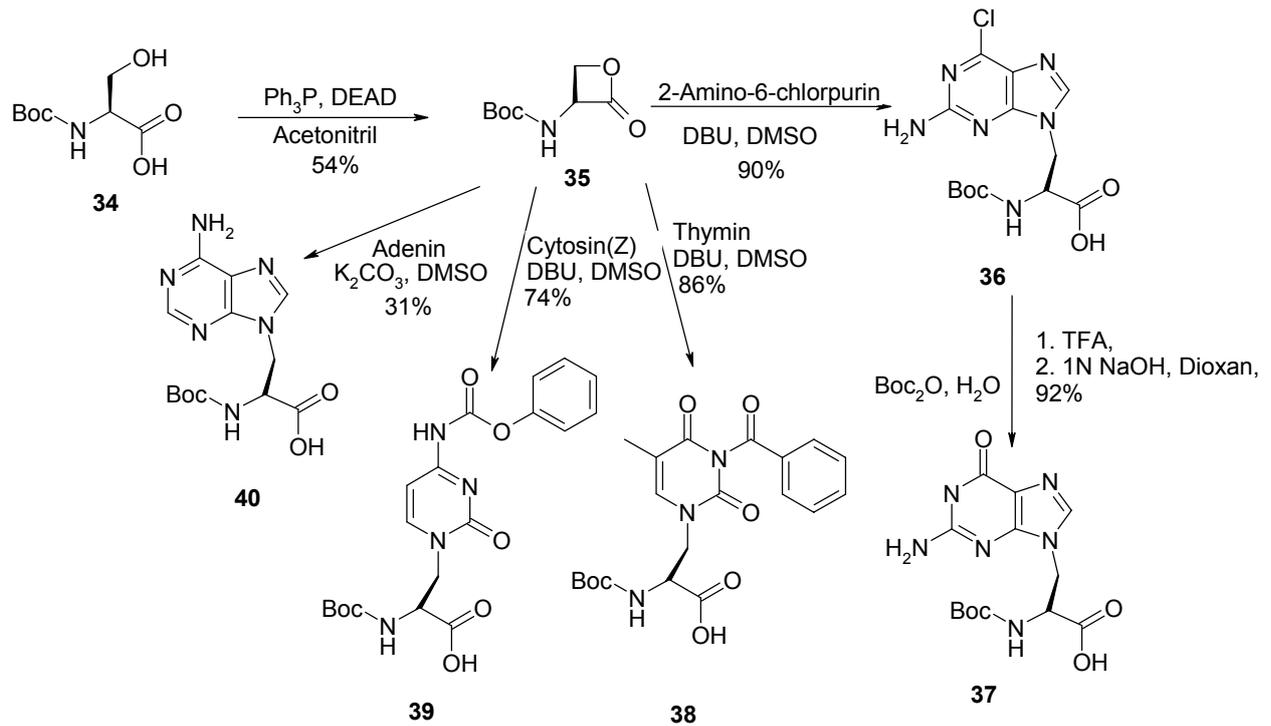


Abb. 15 Synthese der Alanyl-Aminosäuren 37-40.

3.2 Synthese *N*-methylierter Nucleoaminosäuren^[43 a-c]

Die Synthese *N*-methylierter Nucleoaminosäuren wurde in Analogie zur Synthese entsprechender Alanyl-PNA Monomerbausteine entwickelt (Abb. 16).^[41 b, 44] Aus dem *N*-methylierten Serin **41** konnte unter *Mitsunobu*-Bedingungen das entsprechende *N*-methylierte Serinlacton (**42**) in sehr guter Ausbeute von 74 % gewonnen werden. Die Ringöffnung erfolgte durch nucleophilen Angriff der Nucleobasen. Als Basen wurde DBU und K_2CO_3 eingesetzt. Es wurden Ausbeuten von Boc-(Me)AlaC-OH **46** (62%) und Boc-(Me)AlaT-OH **44** (31%) erreicht. Bei der Ringöffnung mit Adenin wurde K_2CO_3 als Base verwendet und eine Ausbeute von Boc-(Me)AlaA-OH (**43**) (36 %) erlangt. Die geringe Ausbeute von **44** mit 31 % ließ sich auf den ersten Versuch zurückführen, wo es sich um das Testen der Reaktion handelte und die nicht weiter optimiert wurde. Folgereaktionen wurden nicht benötigt. Die Ausbeute der *N*-methylierten Nucleoaminosäure **46** ließ sich durch die geringe Nucleophilie des Adenins erklären. Schon die Ausbeute der nicht Alanyl-Nucleoaminosäure **40** war gering.

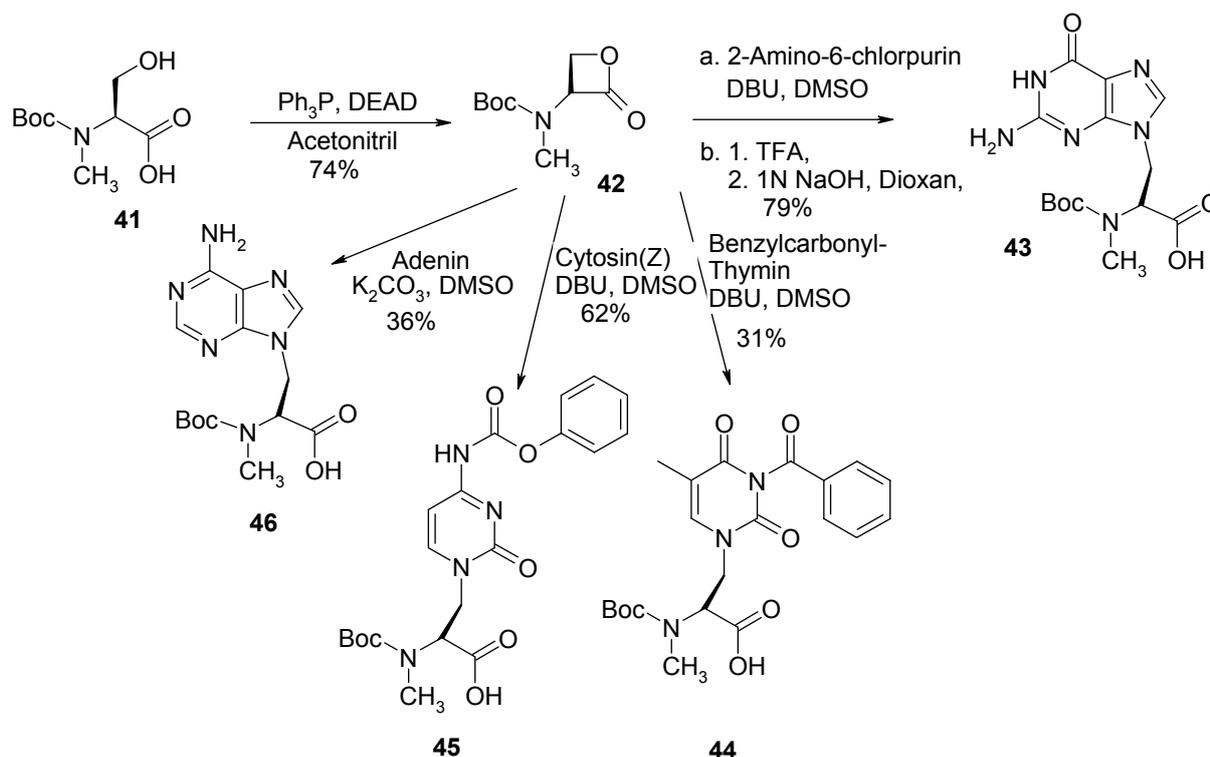


Abb. 16 Synthese der *N*-methylierten Nucleoaminosäuren **43-46**.

Bei der Reaktion von Guanin **47** mit (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-L-serinlacton **42** wurde kein Umsatz beobachtet, da Guanin zu schlecht löslich war und auch die verbesserte Elektrophilie des Lactonrings die geringe Nucleophilie des Guanins nicht ausgleichen konnte.

Es wurden sowohl DBU als auch K_2CO_3 als Base verwendet, sowie die Temperatur auf 40 °C/50 °C und 60 °C variiert. Die Reaktionszeit wurde jeweils bis maximal 3 d verlängert. Die Reaktion wurde analog zu Abbildung 16 mit einem 2-Amino-6-chlorpurin durchgeführt und führte zu einer Ausbeute von 79 % nach Schritt b (Abb. 16).

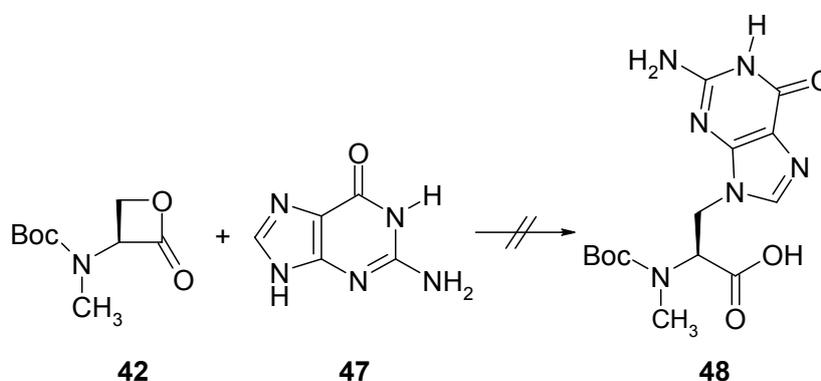


Abb. 17 Umsetzungsversuch von Guanin **47** mit (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-L-serinlacton **42**.

Neben Guanin wurde die Synthese ebenfalls mit 7-Carbaguanin **51** durchgeführt, da hier die *Hoogsteen* Seite blockiert ist und nur Wasserstoffbrückenbindungen über die *Watson-Crick* Seite möglich sind. Somit sollte ein maximaler Aggregationsschutz in dem Oligomer vorhanden sein. Die Nucleobase wurde nach der Vorschrift von *Kerwin et al.*, über eine Eintopfreaktion dargestellt.^[45] Hierbei wurden 2,6-Diamino-6-hydroxypyridinin **49** mit α -Chloroacetaldehyd **50** in DMF umgesetzt (Abb. 18). Das Reaktionsende wurde nach 12 h Rühren bei Raumtemperatur mit einer Ausbeute von 75 % erreicht.

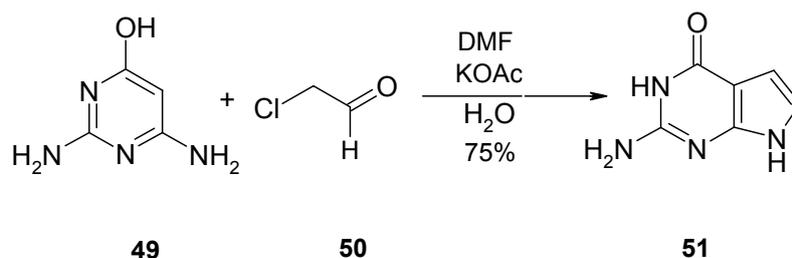


Abb. 18 Synthese des 7-Carboguanins **51**.

Das Produkt **51** wurde mit (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-L-serinlacton **42** umgesetzt (Abb. 19). Es wurde K_2CO_3 als Base verwendet, jedoch kein Produkt gefunden. Es kam nicht zur gewünschten Ringöffnung. Es wurde ebenso die Base DBU verwendet, das gewünschte Produkt entstand. Es konnten mittels ESI-MS ermittelt werden. Das Produkt konnte trotz Variationen des Laufmittels nicht chromatographisch getrennt werden. Weiterhin wurden bei dem Umsetzungsversuch die Temperaturen zwischen 35–60 °C und die Reaktionszeiten zwischen 12 h–3 d variiert, was jedoch nicht zur Verbesserung führte.

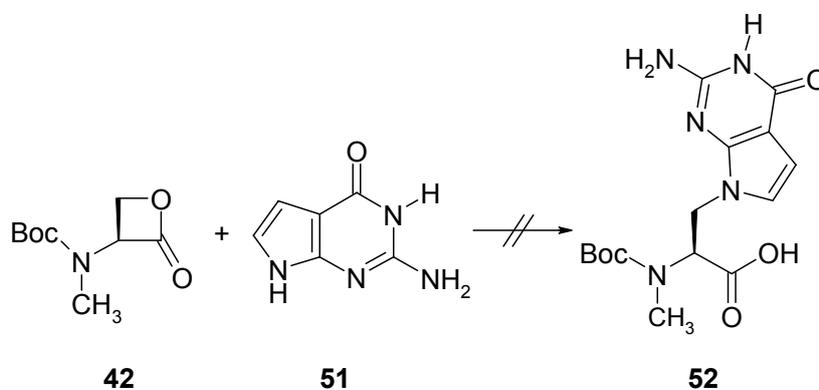


Abb. 19 Umsetzungsversuch zur Carboguaninnucleoaminosäure **52**.

7-Deazaguanin **51** wurde zur Verbesserung der Löslichkeit und Nucleophilie in das chlorierte Purin **53** nach *See/a* und Mitarbeiter mittels TEBA und $POCl_3$ umgewandelt (Abb. 20).^[46 a-b]

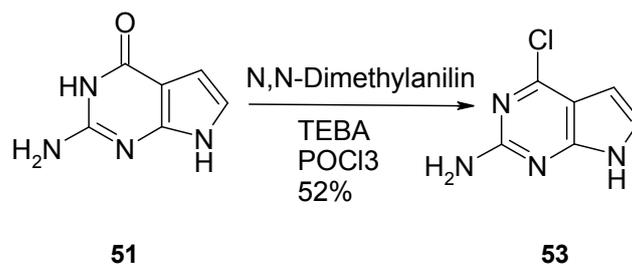


Abb. 20 Umwandlung von 7-Carboguanin zu 2-Amino-7-carba-6-chlorpurin (**53**).

Das Produkt der Umwandlung wurde nach Filtration in einer Ausbeute von 52 % erhalten. Das lichtempfindliche 2-Amino-7-carba-6-chlorpurin (**53**) erforderte ein Vorgehen unter Lichtausschluss. Die Verwendung von DBU bot sich auf Grund der guten Nucleophilie des Purinanalogs 2-Amino-6-chlorpurin an.^[47] Neben dem gewünschten nucleophilen Angriff an der β -Position des Lactons bestand die Möglichkeit der Ringöffnung am Carbonyl-C-Atom, was sicherlich eine bedeutende Nebenreaktion sein sollte. Da die Reaktion unter Schutzgasatmosphäre und Feuchtigkeitsausschluss stattfand, ließ sich eine Zersetzung der Edukte ausschließen. Unter Einsatz von Kaliumcarbonat oder DBU als Base, temperieren auf 40–60 °C und Verlängerung der Reaktionszeiten auf jeweils 12 h fand keine Reaktion statt (Abb. 23).

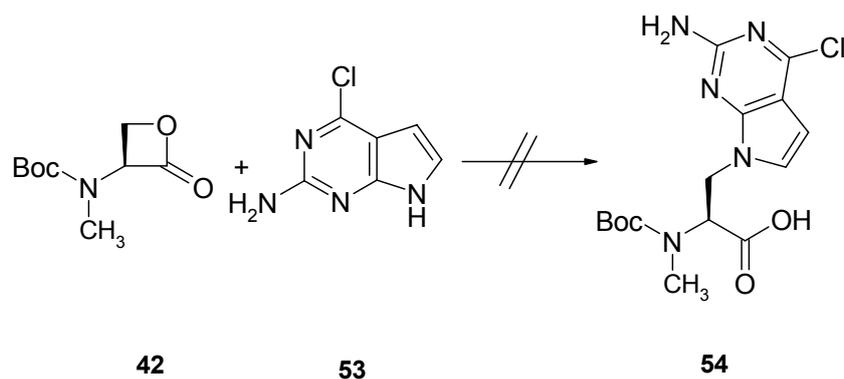


Abb. 21 Ringöffnungsversuch durch 2-Amino-7-carba-6-chlorpurin **54**.

3.3 Synthese von *N*-methylierten und Seitenketten-geschützten Aminosäuren^[48 a-c]

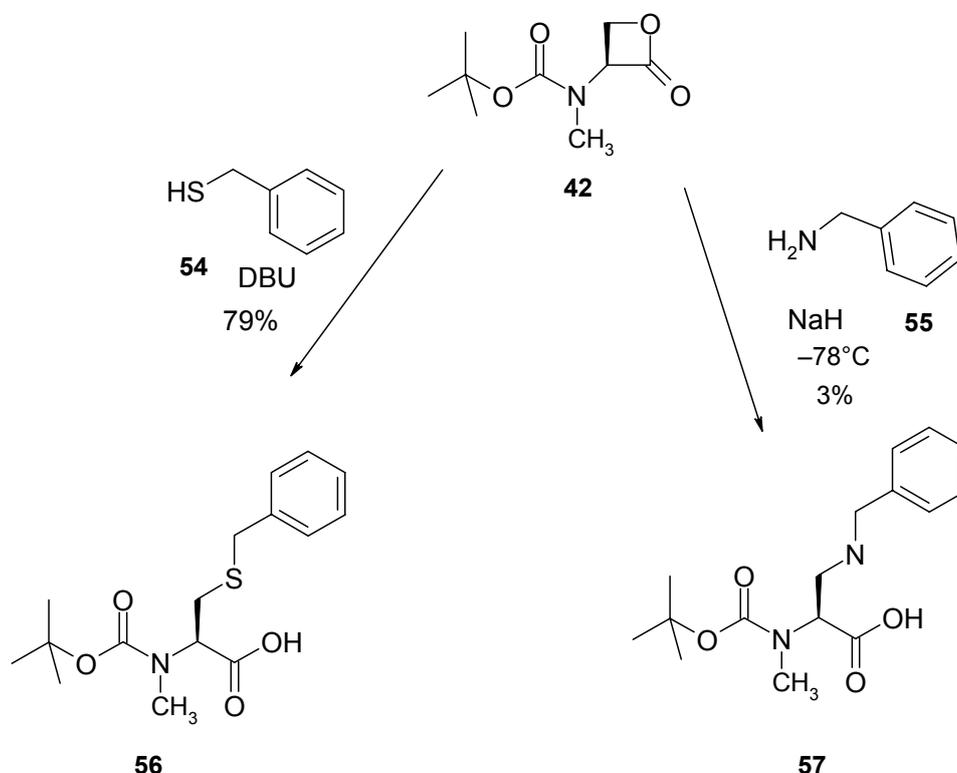


Abb. 22 Synthese der *N*-methylierten Aminosäuren **56-57**.

Die Synthese des *N*-methylierten Cystein Derivats (Boc-(Me)Cys(Bzl)-OH) **56** erfolgte nach der gleichen Strategie wie die Synthese der *N*-methylierten Nucleoaminosäuren. Als Base konnte hier DBU verwendet werden, wobei die alkylierte Aminosäure in einer Ausbeute von 79 % erhalten wurde. Weitere Versuche mit Nucleophilen wie Benzylamin **55** und *N,N*-Dibenzylhydroxylamin funktionierten nicht so gut.^[49 a-c] Variationen der Synthesebedingungen bei der Umsetzung von Benzylamin mit *N*-methylierten Serinlacton mit NaH als Base bei einer Temperatur von -78°C wurden durchgeführt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 3 % erhalten und konnte massenspektrometrisch und NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.^[50 a-c]

4 Alanyl-PNA Doppelstränge mit Basenfehlstellen und deren Stabilität (T_m)

4.1 Basenfehlstellen in der Sequenz der Alanyl-PNA Oligomere

Der gut definierte Basenstapel der Alanyl-PNA Hexamer Doppelstränge (Kapitel 1.1) sollte mittels *NMR*-Spektroskopie einer Strukturaufklärung unterzogen werden. Dieses stellte sich jedoch als problematisch heraus, da die Oligomere im Gegensatz zum mikromolaren Bereich im millimolaren Bereich vermutlich aufgrund von Aggregationen nur sehr schwer löslich waren. Die Selbstpaarung des Oligomers H-Lys-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-OH **58** wurde im wässrigen Medium, in einem D_2O *Shigemi*-Röhrchen *NMR*-spektroskopisch untersucht (Abb. 23). Dazu wurden 3 mM des Oligomers **58** in 200 μ L D_2O/H_2O (1:9), welches 100 mM NaCl und 10 mM Phosphat Puffer (pH = 7) enthielt, vermessen. Die Messungen wurden an einem *DRX* 600 MHz und *DRX* 800 MHz *Bruker* Spektrometer durchgeführt. Es wurde eine *WATERGATE* oder/und *jump and return* Pulssequenz/Versuch verwendet. Vor Beginn der Messung wurde die Probe einem *annealing* unterworfen und anschließend 18 h bei 4 °C gelagert. Das aufgenommene Spektrum wies schwache charakteristische Imino-Protonen Signale im Bereich der Watson-Crick Paarung bei 288 K auf. Die Signale erlitten einen Intensitätsverlust bei Erniedrigen der Temperatur. Jedoch zeigte sich eine Verbreiterung anderer Signale, was auf Aggregation hinwies.

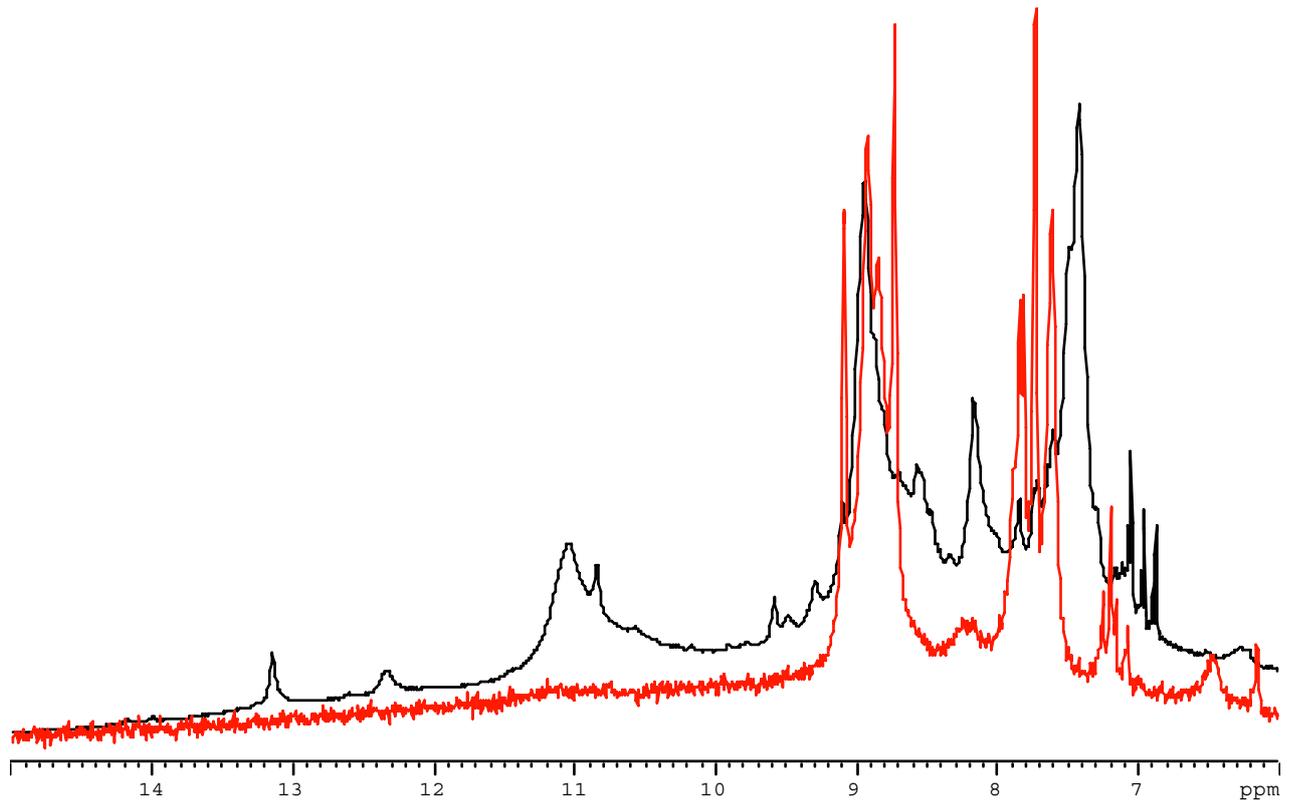


Abb. 23 1D NMR-Spektrum des H-Lys-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-OH (**58**) bei 274 K im Bereich der Iminoresonanz (Watson-Crick Base Paarungs Bereich) zwischen 11 and 14 ppm (schwarz) und bei 298 K, Signale des Alanyl-PNA Einzelstranges (rot).

Es wurde Abhilfe erhofft, indem Fehlstellen in die Alanyl-PNA-Stränge eingebaut wurden, wodurch eine geringere Stabilität der Selbstpaarung sowie eine erhöhte Löslichkeit erreicht werden sollte. Die in Tabelle 2 gezeigten Sequenzen der Alanyl-PNA Oligomere mit den angegebenen Fehlstellen wurden hergestellt. Die Schmelztemperaturen der Selbstpaarungen wurden denen der Enantiomerenpaarung gegenübergestellt. Es wurden verschiedene Puffersysteme getestet, wodurch die ideale Umgebung für die Oligomere gefunden werden sollte. Die pH-Werte der Puffer wurden zwischen pH = 7-7.5 gehalten. Die benutzten vier Systeme waren; **1.** 10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0; **2.** 10 mM AcONH₄/AcOH, 100 mM NaCl; pH = 7.0; **3.** 10 mM; Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5 und **4.** Wasser, 100 mM NaCl. Die Oligomere wurden bei Konzentrationen zwischen 3-12 μM gemessen, wobei die gefundenen Schmelztemperaturen in den erwarteten Bereichen lagen (je höher die Konzentration, desto höher die Schmelztemperatur T_m).

	Sequenz	T_m [°C]	T_m [°C]	T_m [°C]
		Phosphat- Puffer	Tris- Puffer	NH ₄ OAc- Puffer
16	H-AlaC- <u>AlaC</u> -AlaG- <u>AlaC</u> -AlaG- <u>AlaG</u> -Lys-NH ₂	41		
15	H- <u>AlaC</u> -AlaC- <u>AlaG</u> -AlaC- <u>AlaG</u> -AlaG- <u>Lys</u> -NH ₂	40		
	16+15	58		
59	H-AlaC- <u>AlaC</u> -AlaT- <u>AlaC</u> -AlaG- <u>AlaG</u> -Lys-NH ₂	12	16	16
60	H- <u>AlaC</u> -AlaC- <u>AlaG</u> -AlaT- <u>AlaG</u> -AlaG- <u>Lys</u> -NH ₂	15		12
	59+60	15		
61	H-AlaC- <u>AlaC</u> -Glu- <u>AlaC</u> -AlaG- <u>AlaG</u> -Lys-NH ₂	<5	5	12
62	H- <u>AlaC</u> -AlaC- <u>AlaG</u> -Lys- <u>AlaG</u> -AlaG- <u>Lys</u> -NH ₂	12	<5	12
	61+62	15	34	32
63	H-AlaC- <u>AlaC</u> -Glu- <u>AlaC</u> -AlaG- <u>AlaG</u> -Lys- <u>Lys</u> - NH ₂	33	<5	
	62+63	34	30	
64	H- <u>AlaC</u> -AlaC- <u>AlaG</u> -Lys- <u>AlaG</u> -AlaG- <u>AlaC</u> - Lys-NH ₂	12	12	12
65	H-Lys- <u>AlaG</u> -AlaC- <u>AlaC</u> -Glu- <u>AlaC</u> -AlaG- <u>AlaG</u> -Lys-NH ₂	17	11	12
	64+65	32 ¹	19	11
66	H-AlaC-AlaC- <u>AlaG</u> -Glu- <u>AlaG</u> -AlaG-Gly-OH	43 ¹	54 ¹	20

Tab. 1 Schmelztemperatur der Alanyl-PNA Oligomere.

Wie in Abb. 24 a/b und Abb. 25 ersichtlich, wurde mit der Fehlstelle, hier durch die Nucleobase Boc-AlaT-OH, die Schmelztemperatur T_m erheblich bei der Selbstpaarung gesenkt.

¹ inverse Schmelzkurve

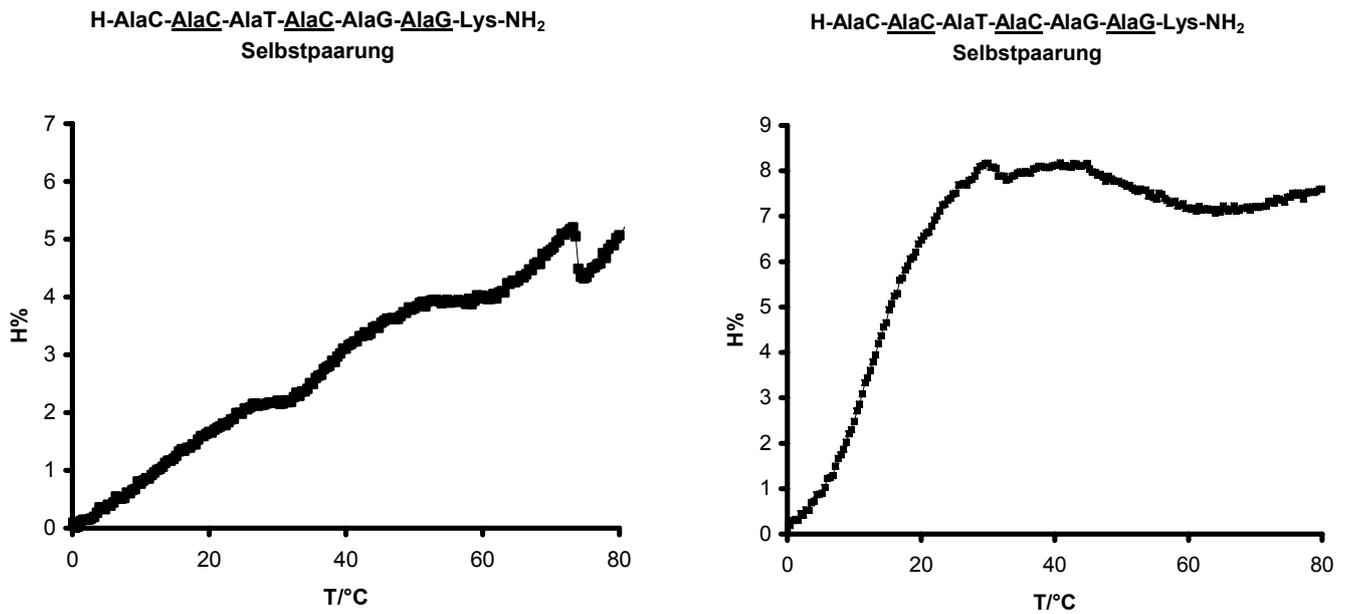


Abb. 24 Oligomer **59** jeweils bei $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, a. im Puffersystem **1** (10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 16 \text{ °C}$; b. im Puffersystem **2** (10 mM AcONH₄/AcOH, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 16 \text{ °C}$.

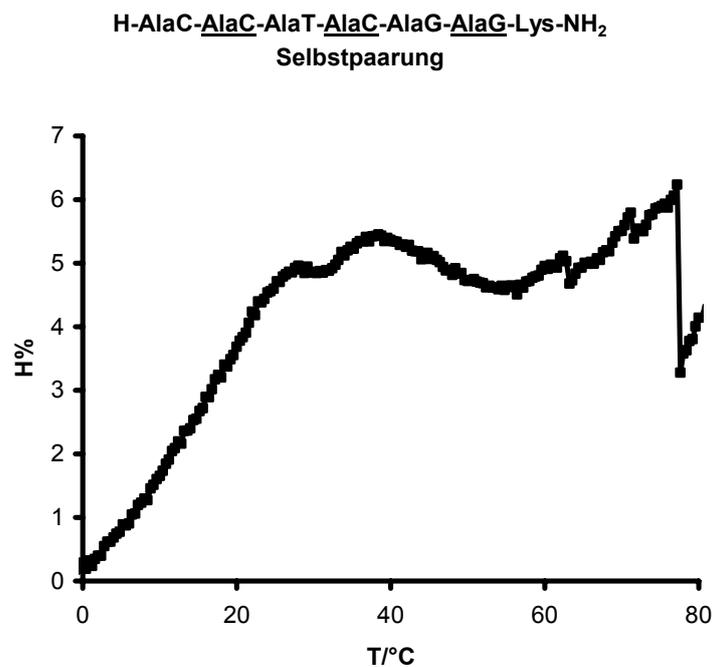


Abb. 25 Oligomer **59** jeweils bei $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, a. im Puffersystem **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5) $T_m = 16 \text{ °C}$.

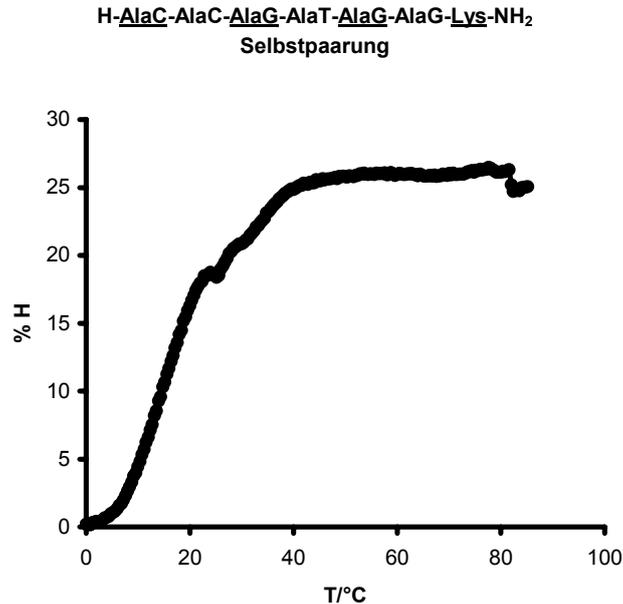


Abb. 26 Oligomer **60** bei $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, im Puffersystem **1** (10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 15 \text{ }^\circ\text{C}$.

Im Vergleich zu dem in Puffersystem **1** (10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0) vermessenen Oligomer H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**16**) wiesen die modifizierten Oligomere H-AlaC-AlaC-AlaT-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**59**) und H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaT-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**60**) eine deutlich geringere Stabilität auf. Der Einbau einer Boc-AlaT-OH Basenfehlstelle führte zu einer Destabilisierung auf 16 °C (Abb. 24 a), so dass Doppelstränge mit herabgesetzter Selbstpaarungstendenz erhalten wurden. Auch die in den Puffersystemen **2** (10 mM AcONH₄/AcOH, 100 mM NaCl; pH = 7.0) mit $T_m = 16 \text{ }^\circ\text{C}$ und **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5) mit $T_m = 12 \text{ }^\circ\text{C}$ erhaltenen Stabilitäten befinden sich im gleichem Stabilitätsbereich. Die beiden Oligomere **59** und **60** wurden hinsichtlich der Doppelstrangbildung im Puffersystem **1** (10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0) vermessen. Der Phosphat-Puffer wurde verwendet, um Vergleiche mit vorherigen Arbeiten ziehen zu können.

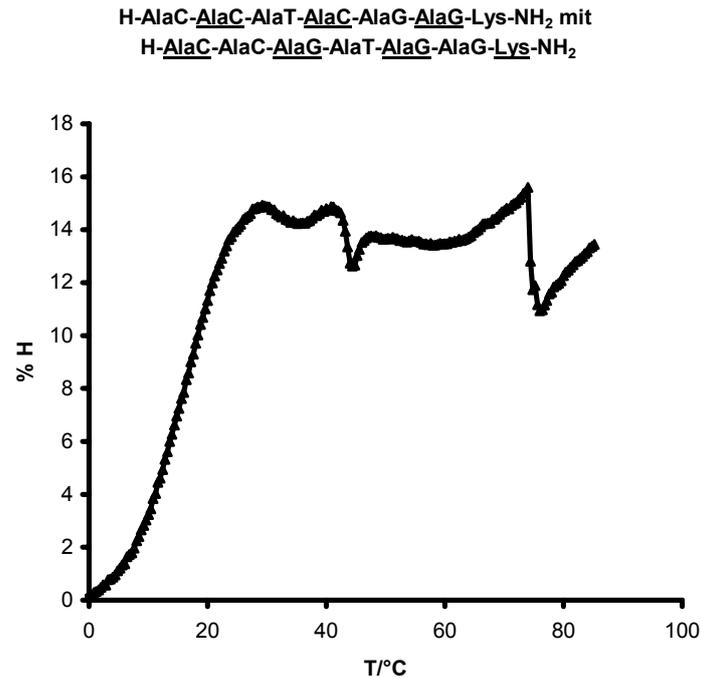


Abb. 27 Mischung der Oligomere **59** und **60** bei je 6 μM , $\lambda = 260 \text{ nm}$, im Puffersystem 1 (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 15 \text{ }^\circ\text{C}$.

Das Ergebnis der UV-Schmelzkurvenbestimmung zeigte eine Schmelztemperatur von $T_m = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ auf, was im Stabilitätsbereich der Selbstpaarung liegt. Es konnte gezeigt werden, dass die eingebauten Basenfehlstellen die Selbstpaarung destabilisieren und die Doppelstrangbildung der enantiomeren Oligomere **59** und **60** nicht fördert. Auch die Oligomere **59** und **60** wiesen bei mikromolarer Konzentration eine schlechte Löslichkeit auf, was im Hinblick auf die NMR-Spektroskopie keine Verbesserung darstellte.

So sollten mit den Alanyl-PNA Oligomeren H-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**61**) und H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**62**) Aminosäuren eingeführt werden. Die in die komplementären Oligomere **62** und **61** eingebauten Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure tragen zur Verbesserung der Löslichkeit bei und bilden ein komplementäres Ionenpaar aus (Abb. 28 a/b und 29). Es wurde erwartet, dass Lysin und Glutaminsäure einen Beitrag zur Stabilität liefern. Bei der Bestimmung der Schmelztemperaturen T_m der Einzelstränge wurden für das Oligomer H-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**61**) Schmelztemperaturen gefunden. Im Puffersystemen **1** (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, 100 mM NaCl; pH = 7.0) wurde eine Stabilität von $T_m = 35 \text{ }^\circ\text{C}$

gefunden. Für die Puffersysteme **2** (10 mM AcONH₄/AcOH, 100 mM NaCl; pH = 7.0) und **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5) wurde keine Stabilität ermittelt. Der Grund für den Hyperchromizitätsanstieg (H%) bei einer Temperatur von 60 °C ist einem Abdampfeffekt zuzuordnen (Abb. 28 b und 29).

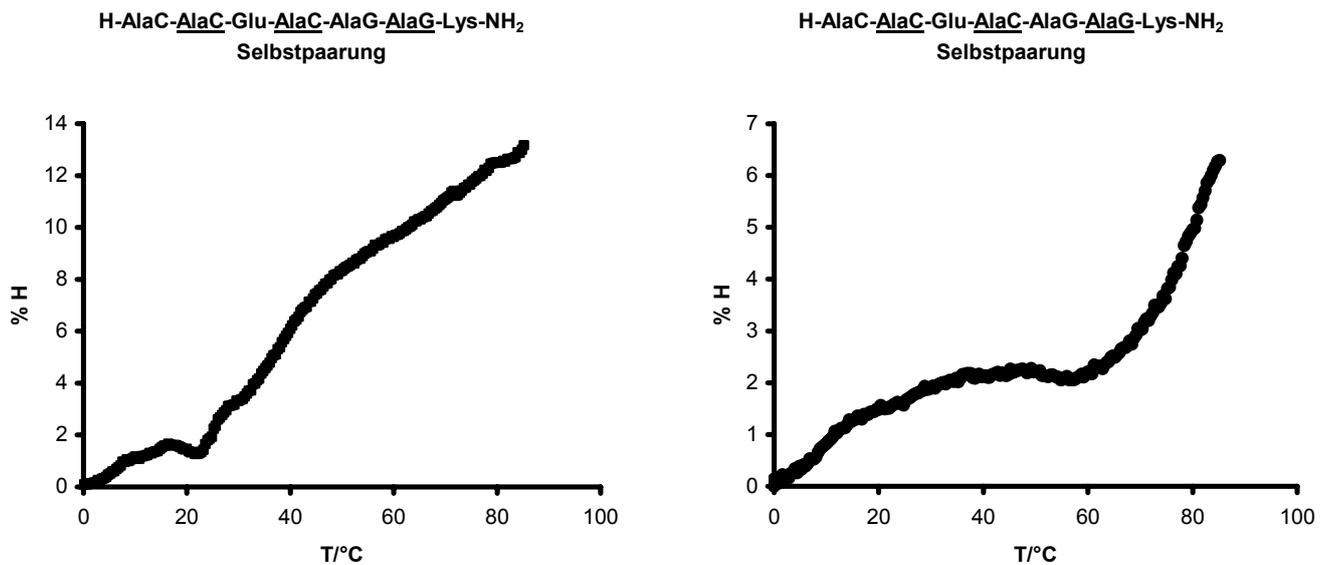


Abb. 28 Oligomer **61** jeweils bei $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, a. im Puffersystem **1** (10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 35 \text{ °C}$; b. im Puffersystem **2** (10 mM AcONH₄/AcOH, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = <0 \text{ °C}$, Bei der Temperatur $<65 \text{ °C}$ macht sich ein Abdampfen des Lösungsmittels bemerkbar.

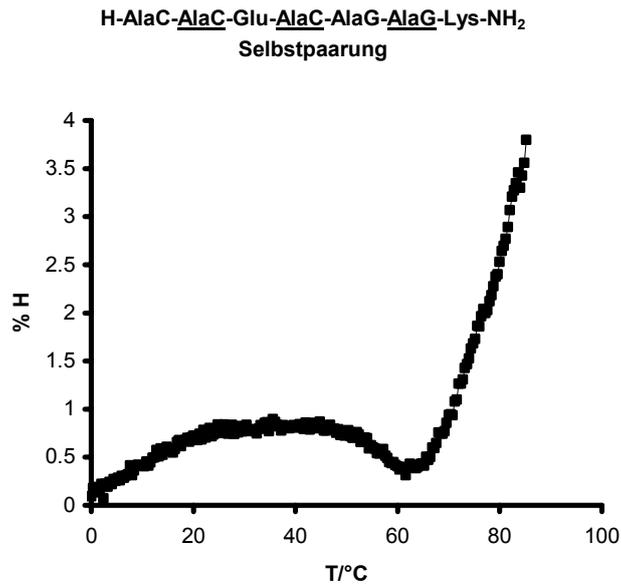


Abb. 29 Oligomer **61** bei $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, im Puffersystem **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5) $T_m = < 0 \text{ }^\circ\text{C}$. Bei der Temperatur $< 65 \text{ }^\circ\text{C}$ macht sich ein Abdampfen des Lösungsmittels bemerkbar.

A



Selbstpaarung

B



Selbstpaarung

C



Duplexbildung

Abb. 30 Selbstpaarungskomplex und Duplexkomplexe der der Sequenz H-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**61**) und H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**62**) in der antiparallelen heterochiralen Konformation.

Wahrscheinlich ist die Fehlstelle gebildet durch Glutaminsäure und die dadurch vorhandene Abstoßung der beiden negativen Ladungen für die niedrige Schmelztemperatur verantwortlich (Abb. 30 B).

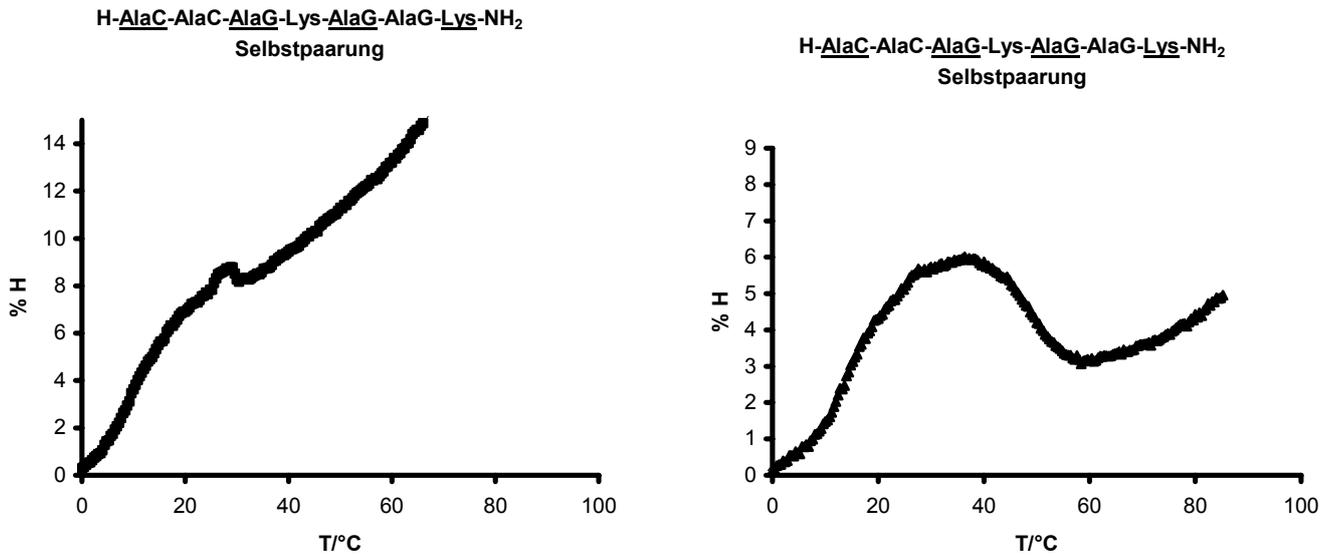


Abb. 31 Oligomer **62** bei je $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, a. im Puffersystem **1** (10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 12 \text{ }^\circ\text{C}$; b. im Puffersystem **2** (10 mM AcONH₄/AcOH, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 12 \text{ }^\circ\text{C}$.

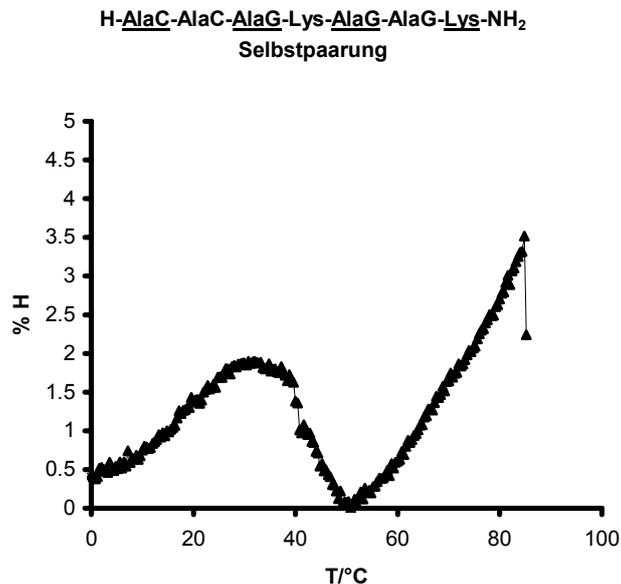


Abb. 32 Oligomer **62** bei $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, im Puffersystem **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5) $T_m = \text{keinen}$, Abdampfeffekt.

Bei der Bestimmung der Stabilität des Oligomers H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**62**) wurde im Puffersystem **1** (10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0) eine Stabilität von $T_m = 12 \text{ }^\circ\text{C}$ gefunden (Abb. 31 a). Dies weist, ebenso wie das Oligomer **61** auf eine Abstoßung der beiden

gleichen Ladungen währen einer Selbstpaarung hin (Abb. 30 A), wobei es zur Erniedrigung der Stabilität kommt. Beide Systeme wiesen eine erhohnte Löslichkeit gegenüber den vorherigen Oligomeren auf. In dem Puffersystem **2** (10 mM AcONH₄/AcOH, 100 mM NaCl; pH = 7.0) wurde ebenso eine Stabilität von $T_m = 12^\circ\text{C}$ gefunden. Im Puffersystem **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5) wurde keine Ausbildung eines Doppelstranges ermittelt. Die steigende Absorption bei einer Temperatur von $> 50^\circ\text{C}$ deutet auf ein Abdampfeffekt hin.

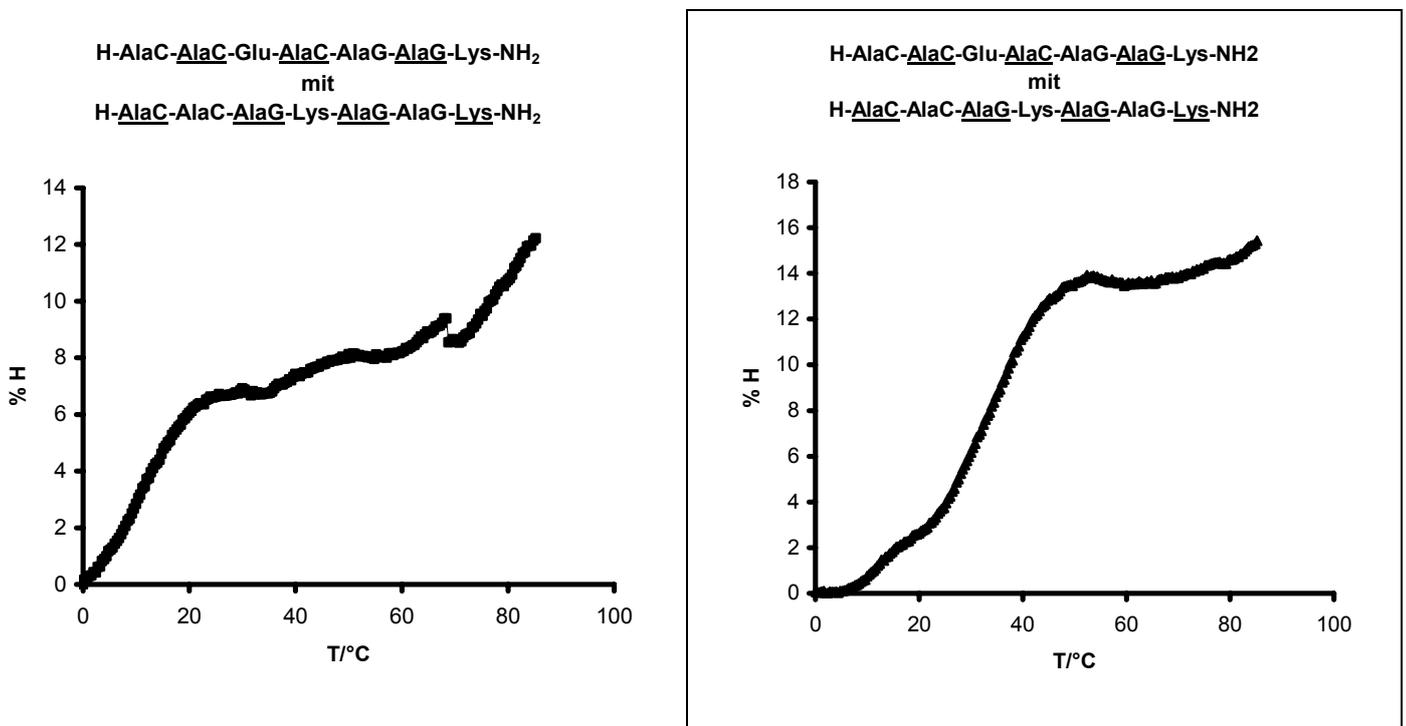


Abb. 33 Mischung der Oligomer **61** und **62** bei je $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, a. im Puffersystem **1** (10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 15^\circ\text{C}$; b. im Puffersystem **2** (10 mM AcONH₄/AcOH, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 32^\circ\text{C}$.

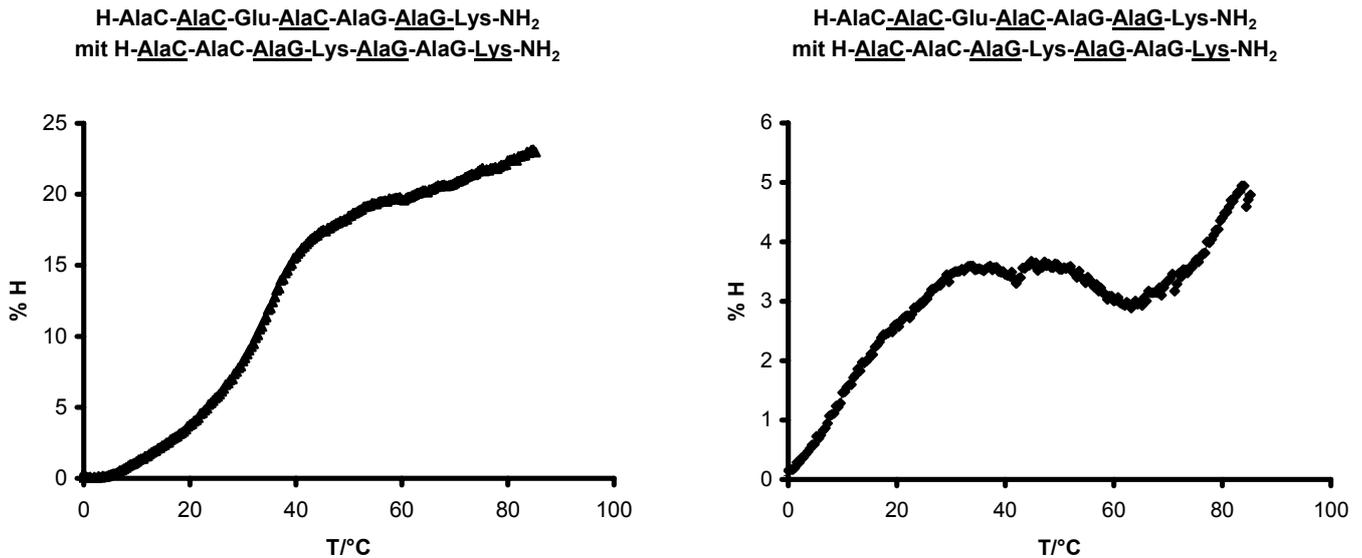


Abb. 34 Mischung der Oligomere **61** und **62** bei je $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, a. Puffersystem **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5) $T_m = 32 \text{ }^\circ\text{C}$, b. in Wasser, 100 mM NaCl $T_m = 15 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die Mischung der beiden Oligomere H-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**61**) und H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**62**) wurden in allen drei Puffersystemen und zusätzlich in Wasser/NaCl hinsichtlich der Doppelstrangstabilität untersucht (Abb. 33 a/b und 34 a/b). Die Doppelstrangbildung wies im Puffersystem **1** (10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0) einen Stabilitätswert von $T_m = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ auf (Abb. 33 a) auf. Im Puffersystem **2** (10 mM AcONH₄/AcOH, 100 mM NaCl; pH = 7.0) fand man eine Stabilität von $T_m = 32 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abb. 33 b). Eine ähnliche Stabilität ergab die Doppelstrangbildung der beiden Oligomere **61** und **62** im Puffersystem **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5), wo eine Schmelztemperatur von $T_m = 34 \text{ }^\circ\text{C}$ nachgewiesen werden konnte (Abb. 34 a). Im System **4** wurde eine erheblich geringere Stabilität von $T_m = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abb. 34 b) nachgewiesen, jedoch ist dieser Stabilitätswert gleich dem des Systems **1**. Im Vergleich zu den Stabilitätswerten der Oligomere H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**15**) mit seinem Gegenstrang **16** ist es eine Verringerung in der Stabilität um ca. 20 °C. Dieser Verlust der Stabilität beruht auf den Fehlstellen Lysin und Glutaminsäure. Das Stabilitätsverhalten in den unterschiedlichen Puffersystemen zeigt die Abhängigkeit der Schmelztemperatur von der vorliegenden

Umgebung auf. Die beiden Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure weisen gegensätzliche Ladungen auf und bilden somit ein Ionenpaar aus.

Um eine bessere Stabilität bei gleich bleibender Löslichkeit zu erreichen, wurden die Oligomere in einem weiteren Ansatz um jeweils eine Nucleoaminosäure verlängert (Abb. 35 a/b, 36 und 37a/b). Es wurde eine höhere Stabilität des sich bildenden Doppelstranges erwartet, da sich mehr *Watson-Crick* Wasserstoffbrücken ausbilden können. Bei der Selbstpaarung, wurden beim Oligomer H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-AlaC-Lys-NH₂ (**64**) in den drei Puffersystemen Stabilitäten T_m ermittelt. Im Phosphat-Puffersystem (**1**) wurde eine Stabilität von 12 °C Im Ammoniumacetat-Puffersystem **2** wurde ebenso eine Stabilität von $T_m = 12$ °C gemessen, jedoch lag hier eine erheblich niedrigere Hyperchromizität (H%) vor. Die Intensität der Hyperchromizität im Tris-Puffersystem **3** liegt im gleichen Bereich wie im Puffersystem **2** auch die ermittelte Stabilität ist mit $T_m = 13$ °C identisch. Dies zeigt im Vergleich zu den kurzen Sequenzen, dass eine Stabilisierung um ca. 5 °C durch die weiteren Nucleobasen erreicht werden konnte.

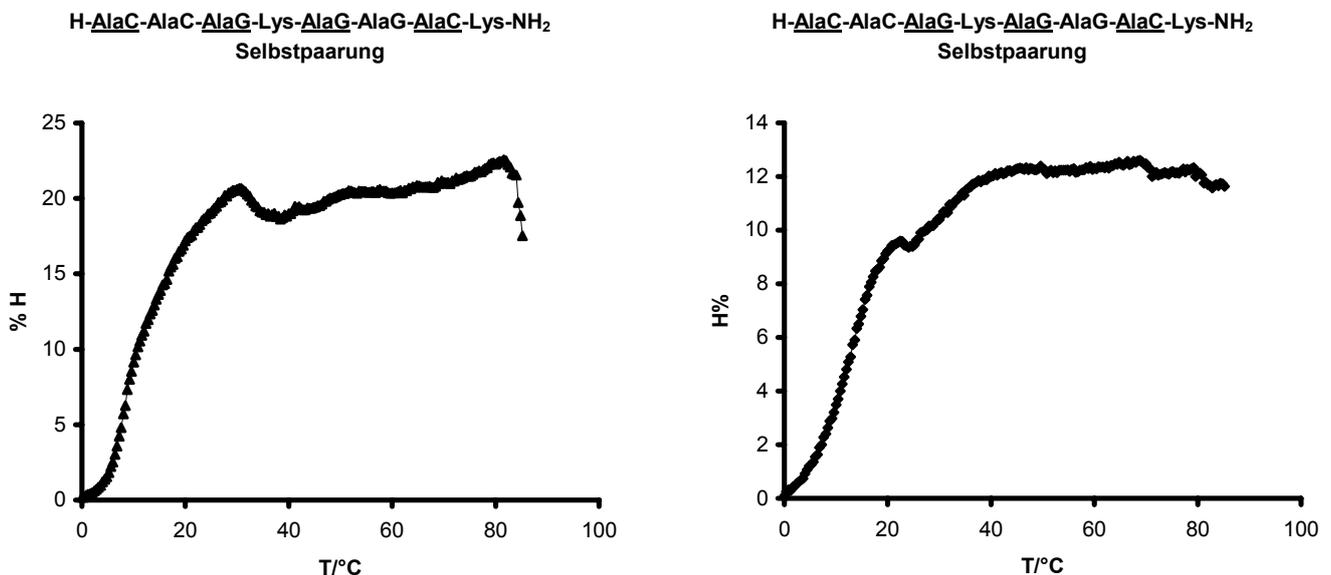


Abb. 35 Oligomer **64** jeweils bei $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, a. im Puffersystem **1** (10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 12^\circ\text{C}$; b. im Puffersystem **2** (10 mM AcONH₄/AcOH, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 12^\circ\text{C}$.

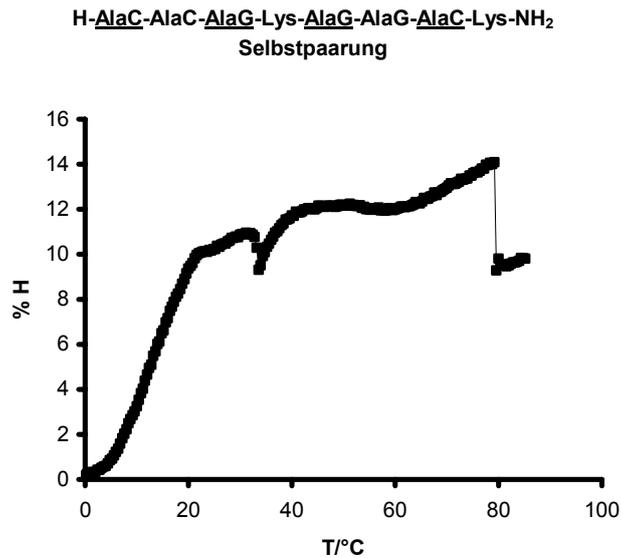


Abb. 36 Oligomer **64** bei $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, im Puffersystem **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5) $T_m = 13 \text{ }^\circ\text{C}$.

Beim Alanyl-PNA Gegenoligomer H-Lys-AlaG-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**65**) wurde im Puffersystem **1** eine Stabilität von $T_m = 17 \text{ }^\circ\text{C}$ ermittelt (Abb. 38 a). Im Puffersysteme **3** fand man eine Stabilität von $T_m = 11 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abb. 38 b). Im Puffersystem **2** wurde keine Stabilität ermittelt. Auch bei den Hyperchromizitäten wurden unterschiede gefunden. So weist die Selbstpaarung im Puffersystem **1** (Abb. 37 a) eine erheblich höhere Hyperchromizität auf als im Puffersystem **3** (Abb. 37 b).

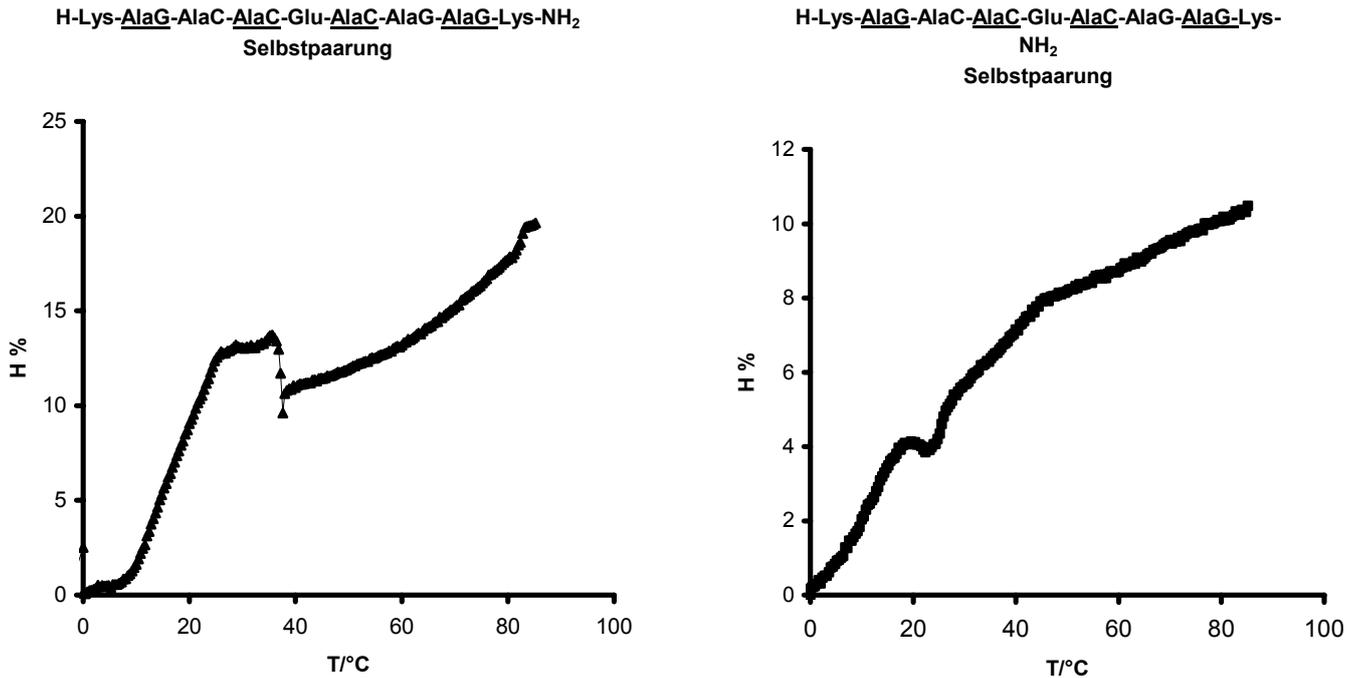


Abb. 37 Oligomer **65** jeweils bei $c = 6 \mu\text{M}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$, a. im Puffersystem **1** (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, 100 mM NaCl; pH = 7.0) $T_m = 17^\circ\text{C}$; b. im Puffersystem **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5) $T_m = 11^\circ\text{C}$.

Das Ergebnis der Schmelzkurve des Gemisches beider Oligomere **64** und **65** im Tris-Puffer System wies eine leichte Stabilisierung in Bezug auf die Einzelstränge auf. Vergleicht man dieses Ergebnis jedoch mit den vorherigen Messungen, so konnte durch das Einbringen der zusätzlichen Aminosäure keine deutliche Verbesserung des Systems erreicht werden. Die Ausbildung von Doppelsträngen durch die Alanyl-PNA Oligomere **64** und **65** führte offensichtlich zu einem Spezies-Gemisch mit $T_m = 18^\circ\text{C}$ und möglicherweise auch mit $T_m = 45^\circ\text{C}$ (Abb. 38).

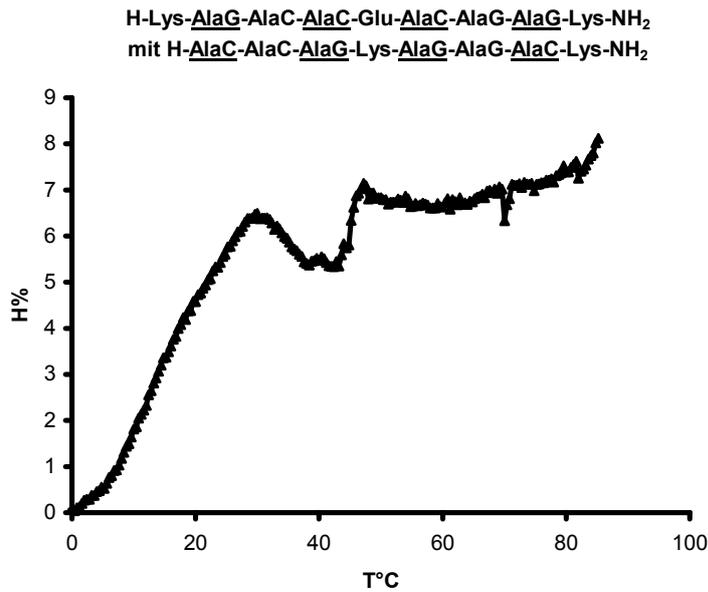


Abb. 38 Doppelstrangbildung einer 1:1 Mischung der Oligomer **64** und **65** bei je 6 μM , $\lambda = 260 \text{ nm}$, im Puffersystem **3** (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl; pH = 7.5) $T_m = 18 \text{ }^\circ\text{C}$ und möglicherweise $T_m = 45 \text{ }^\circ\text{C}$.

Durch den Vergleich der vermessenen Schmelzkurven und den erhaltenen Ergebnissen der Stabilität wurden Oligomere zur *NMR*-spektroskopischen Untersuchung ausgewählt. Auch der Puffer wurde durch den Vergleich der Temperaturen neu bestimmt, so dass das Oligomer H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-Lys-OH (**62**) ebenso wie das Oligomer H-Lys-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-OH (**58**) für die *NMR*-Spektroskopie vorbereitet wurde. Es wurde eine Konzentration von 3 mM im Phosphat Puffer (siehe oben) gewählt. Bei der Messung des Oligomers **62**, bildeten sich bei 278 K die Aggregate aus und über 278 K erhielt man scharfe Signale (Abb. 39), welche auf den Einzelstrang hinwiesen. Die in Wasser ergab bei einer Temperatur von 278 K ebenso eine geringe Signalintensität, die auf Aggregation hindeutete (Abb. 40).

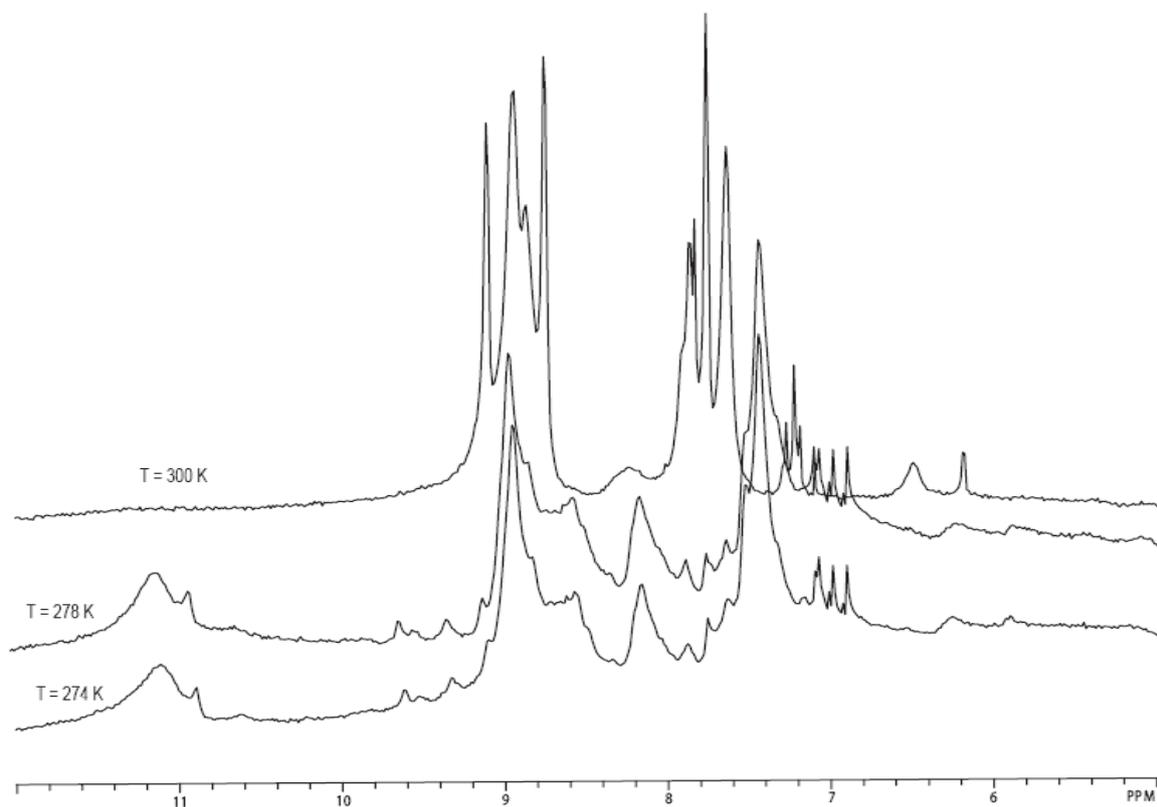


Abb. 39 1D NMR-Spektrum des H-Lys-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-Lys-OH (**62**) in Puffer 1 bei 274 K bei 278 K und 300 K.

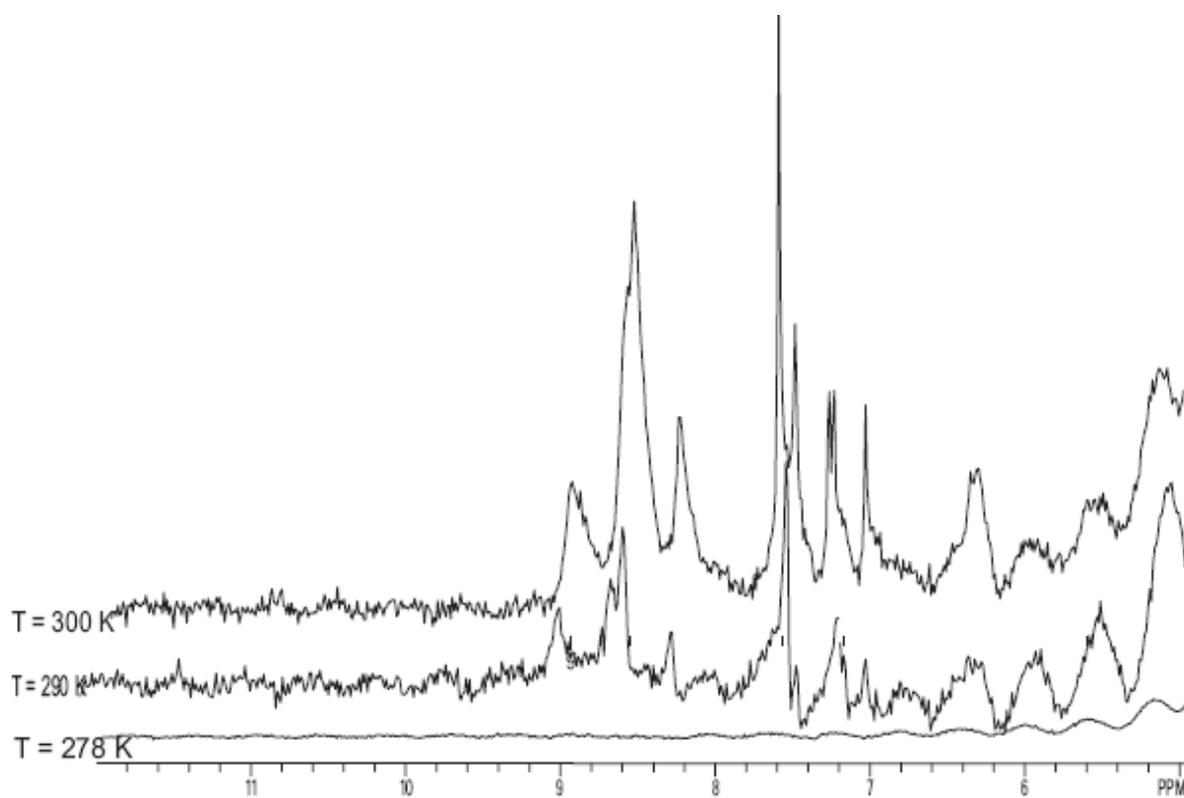


Abb. 40 1D NMR-Spektrum des H-Lys-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-Lys-OH (**62**) in Wasser bei 278 K bei 290 K und 300 K.

Oberhalb von 278 K wurden Signale im gewünschten Bereich erhalten, jedoch die der Einzelstrangaggregation. Die Vermessung der Selbstpaarung war hier nicht erfolgreich. Weiter wurde das Oligomer H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-Lys-OH (**62**) mit dem Gegenstrang H-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-OH (**61**) (3 mM) im Ammoniumacetat Puffer **2** (10 mM Ammoniumacetat/100 mM NaCl, pH = 6.5) vermessen. Auch hier wurden Aggregationen beobachtet, jedoch bei einer Temperatur von 305 K. Da die Aggregationen im μM -Bereich nicht auftraten, wurde die *NMR*-Probe einer Verdünnungsreihe unterzogen. Die Probe wurde auf 1.5 mM, 1 mM und 0.75 mM verdünnt, wobei man bei Verringerung der Konzentration eine bessere Löslichkeit erkannte. Nach einigen Stunden wurde ein Niederschlag nachgewiesen, welcher auf eine erneute Aggregation hinwies. Die Vermessung des Doppelstranges der Alanyl-PNA in noch niedrigeren Konzentrationsbereichen erwies sich nicht als aussagekräftig. Ein weiterer Versuch, lag darin den pH-Wertes auf pH = 5 zu senken, da die Iminoproteine in diesem Bereich langsamer austauschen und sie besser zu sehen sind und weiterhin die Löslichkeit der Alanyl-PNA dadurch deutlich erhöht wurde. Jedoch wurde auch bei dieser Versuchsreihe Aggregation beobachtet und somit der Doppelstrang nicht bestätigt.

4.2 Modifikationen im Rückgrat: *N*-methylierte Alanyl-PNA Oligomere

Um eine eventuell vorliegende Rückgrataggregation zu unterbinden, wurden *N*-methylierte Nucleoaminosäuren synthetisiert und diese in Oligomere eingebaut. Das Einbauen der *N*-methylierten Nucleoaminosäuren in Oligomere erwies sich als problematisch, da die *N*-methylierten Nucleoaminosäuren sowie die auf diesen folgenden Nucleoaminosäuren langsam und in geringer Ausbeute die Amid-Bindung bilden.^[51] Weiterhin gibt es bei den *N*-methylierten Aminosäuren sowie den Alanyl-PNA Nucleoaminosäuren während der Abspaltung vom Harz bekannte Nebenreaktionen (Kapitel 2.1.2). Zur Abhilfe der schlechten Kupplungsausbeute der *N*-methylierten Nucleoaminosäuren wurden zahlreiche Kupplungsreagenzien getestet. Es wurde das in der Literatur für *N*-methylierten Aminosäuren bekannte Kupplungsreagenz Chlorotris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphat (PyCloP) gewählt und die Kupplungsdauer auf 12 h erhöht.^[52 a-c] Die vorher getesteten Kupplungsreagenzien BOP,^[53] Cl-BOP^[54] und PyBOP^[52 a] führten zu keinen positiven Ergebnissen. Die folgenden Nucleoaminosäuren wurde mit dem Kupplungsreagenz 7-Azabenzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat (PyAOP)^[55] zur Reaktion gebracht. Auch hier ergab die Kupplung mittels PyBOP kein entsprechend positives Ergebnis. Diese wurde mittels einer Doppelkupplung von je 12 h erreicht. Anschließend wurde das Peptid mittels *m*-Cresol/TFA/TFMSA (1:8:1) vom Harz abgespalten. Hierbei kommt es zur Nebenreaktion, da Oligomere mit einer *N*-methylierten Aminosäure nicht säurestabil sind (Kapitel 1.2).^[56 a-b]

Die folgenden Sequenzen H-(Me)AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**67**) und H-AlaC-AlaC-(Me)AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**68**) wurden trotz erheblicher Ausbeuteverluste durch die Nebenreaktionen hergestellt. Hierbei war die Synthese des Oligomers **67** am einfachsten, da sich der *N*-methylierte Baustein am *N*-Terminus befand und somit die Hydrolyse erschwert bzw. gar nicht stattfindet. Bei dem Oligomer **68** wurde die Ausbeute um die Hälfte verringert (Abb. 41).

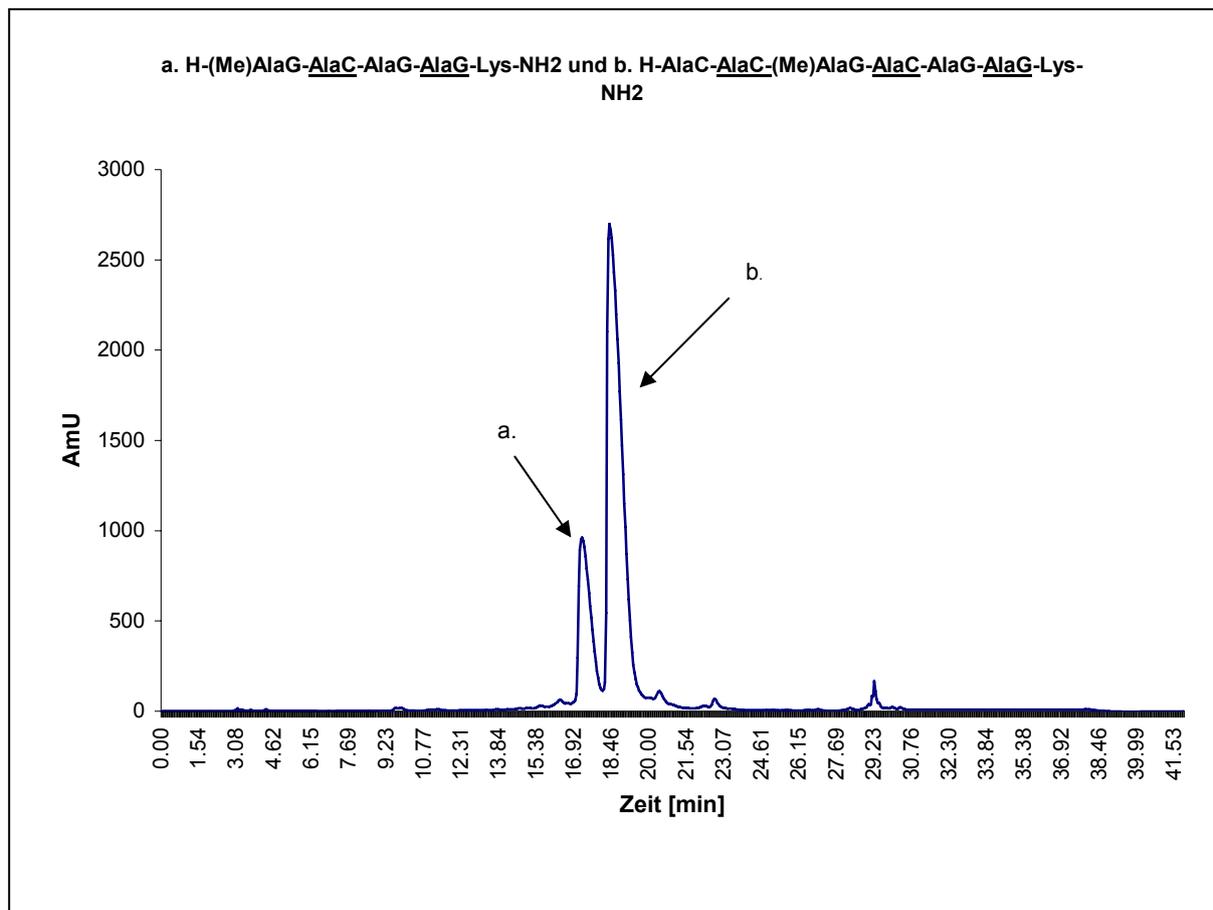


Abb. 41 HPLC-Diagramm des Oligomers H-AlaC-AlaC-(Me)AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ **68** (b) und dessen hydrolysierten Abspaltprodukt (a), Gradient: 5 auf 20 % Acetonitril in 30 min.

Die *N*-methylierten Oligomere **67** und **68** wurden UV-spektroskopisch untersucht. Das Oligomer **67** wies bei der Untersuchung der Selbstpaarung eine niedrige Schmelztemperatur von $T_m = 18\text{ °C}$ auf, was auf eine Störung der Paarung hinwies (Abb. 42). Da sich hier die Methylgruppe jedoch *N*-Terminal befindet, wurden trotz der niedrigen Selbstpaarung keine hohen Stabilitätsverluste bei einer Duplexbildung mit einem Gegenstrang erwartet. Das Oligomer **67** wies zwei Schmelztemperaturübergänge von $T_m = 14\text{ °C}$ und $T_m = 47\text{ °C}$ auf (Abb. 43). Im Vergleich zum Doppelstrang des nicht methylierten Alanyl-PNA Oligomers **58** mit $T_m = 42\text{ °C}$ ist die geringe Stabilität der beiden methylierten Oligomere **68** $T_m = 14\text{ °C}$ (Abb. 42) und **67** $T_m = 18\text{ °C}$ (Abb. 43) unerwartet. Möglicherweise wirkt sich die Methylierung auf die Rückgratkonformationen und die Kinetik der Duplexbildung aus. Die Stabilität

von $T_m = 47\text{ °C}$ (Abb. 43) für das methylierte Alanyl-PNA Oligomer **68** entspricht recht genau den Erwartungen, da Methylierung sich auch hinsichtlich der Solvathülle auswirken sollte.

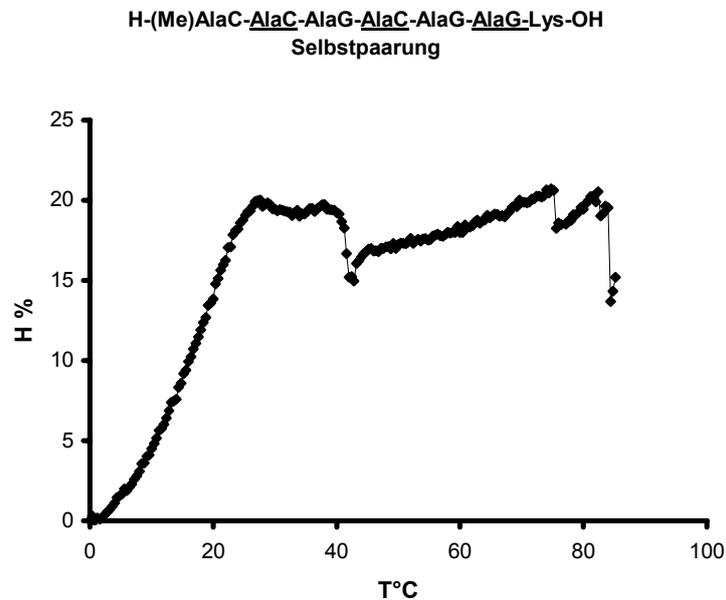


Abb. 42 Oligomer **67** bei $c = 6\text{ }\mu\text{M}$, $\lambda = 260\text{ nm}$, im Puffersystem **1** (10 mm $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, 100 mm NaCl; pH = 7.0) $T_m = 18\text{ °C}$

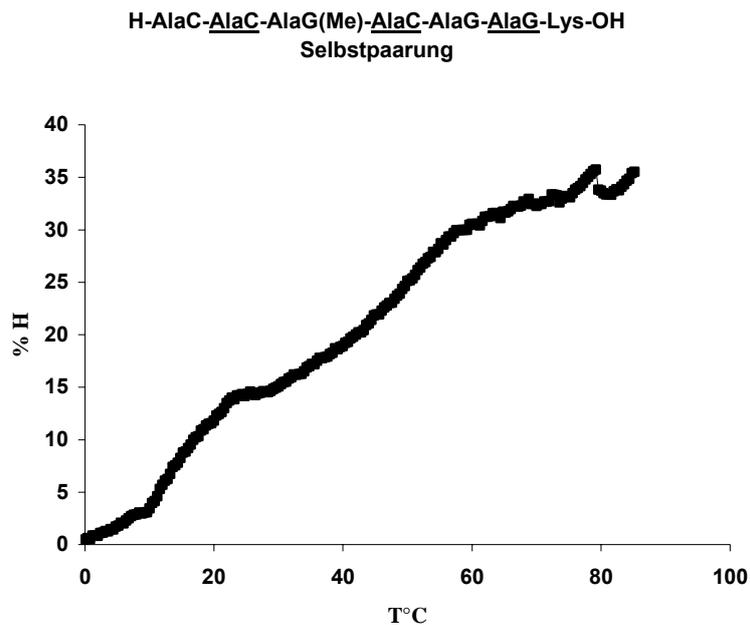


Abb. 43 Oligomer **68** bei $c = 6\text{ }\mu\text{M}$, $\lambda = 260\text{ nm}$, im Puffersystem **1** (10 mm $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, 100 mm NaCl; pH = 7.0) $T_m = 14\text{ °C}$ und $T_m = 47\text{ °C}$.

Die Alanyl-PNAs **67** und **68** wurden auch *NMR*-spektroskopisch untersucht, wobei in einem wässrigen System gemessen wurde. Die Untersuchung des Oligomers **67** führte leider ebenfalls zur Aggregation. Diese konnte durch die endständige, *N*-terminale Methylierung nicht unterbunden werden. Der Methyl-Substituent verhindert nur geringfügig, die Wechselwirkungen über das Rückgrat. Oligomer **68** sollte zu besseren Ergebnissen führen, da sich die Methylierung in der Mitte der Sequenz befindet und somit ein ausreichender Verlust der Rückgratwechselwirkung erhofft wurde. Diese Ergebnisse stehen noch aus.

Zur Verbesserung der Ausbeute und der Aggregation könnte neben der Methylierung ein Einbau von reversiblen *N*-Schutzgruppen am Peptidrückgrat in Erwägung gezogen werden. Mit der Entwicklung der *N*-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-Schutzgruppe (Hmb) ist es möglich, bisher schwer zugängliche Sequenzen effizienter zu synthetisieren.^[57] Die sterische Hinderung, die durch den *N*-Alkylrest verursacht wird, verringert die Acylierungs-geschwindigkeit für die Aminokomponente. Diese Möglichkeiten kann aber nur begrenzt angewendet werden, da sie schon bei der Kupplung von Valin an (Hmb)- Valin versagt.^[58] Eine weitere temporäre *N*-Schutzgruppe ist die Dimethoxybenzylschutzgruppe (Dmb). Auch wenn assoziationsbedingte Syntheseschwierigkeiten durch die Einführung temporärer Amidschutzgruppen reduziert werden können, so erwächst daraus das Problem der sterischen Hinderung bei Kupplungen an *N*-Alkylaminosäurereste.

5 α -Peptid/Alanyl-Peptidnucleinsäure-Chimäre

5.1 Synthese und Stabilitätsverhalten der α -Peptid/Alanyl-Peptid-nucleinsäuren

In vorherigen Arbeiten, wurde ein Gramacidin-S Analogon mit einer *N*-terminalen Alanyl-PNA Sequenz mittels SPPS darstellt. (Abb. 44).^[59] Bei Zugabe eines komplementären Alanyl-PNA Oligomers wurde eine Doppelstrangbildung mit β -Faltblattstruktur ausgebildet und damit ein Einfluss bzw.

eine Strukturveränderung hervorgerufen. In diesem Gramacidin-S Analogon dienten die Aminosäuren D-Pro und Phe als *turn* Bildner. Wie theoretisch erwartet wurde bei UV-Messungen keine Selbstpaarung ermittelt. Erst bei Zugabe des komplementären Gegenstrangs konnte die erwartete Doppelstrangbildung ($T_m = 49\text{ °C}$) nachgewiesen werden. Dieser ermittelte Wert korreliert gut mit den Werten eines Doppelstranges mit den Alanyl-PNA Oligomeren **15** und **16**.

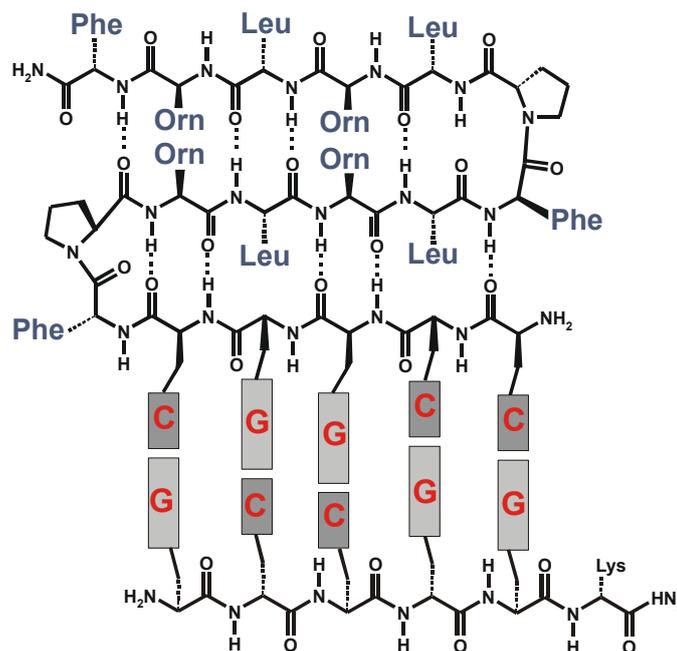


Abb. 44 Alanyl-PNA/Peptid Chimera. Duplexbildung mit dem komplementären Alanyl-PNA Oligomer welches β -sheet Bildung induzieren kann.

NMR-Studien zeigten jedoch, dass das Gramacidin/Alanyl-PNA Chimäre System als Einzelstrang bereits eine erhebliche Preorganisation des β -Faltblatts aufwies, so dass dieses Modell-System für die Konformationsänderungsuntersuchungen zu stabil war.

Die Alanyl-PNA sollte in Modellpeptide und Proteine als Teil eines β -Faltblattes (Doppelstrang) oder eines gestörten β -Faltblattes (Einzelstrang) eingebaut werden und somit eine Schaltfunktion durch Stabilisierung oder Destabilisierung erreichen. Weiterhin wäre die Möglichkeit gegeben, komplementäre PNAs in zwei oder mehr unterschiedliche Proteine einzubauen und somit eine gegenseitige Erkennung durch die Alanyl-PNA Oligomere zu

erreichen. Dadurch würde die Möglichkeit gegeben, Proteine zu steuern, sie zu stabilisieren bzw. zu destabilisieren oder gezielt zu schalten (Kapitel 2.1.1). Auf dem Wissen aus Kapitel 2.1.1 gestützt wurde für diese Arbeit eine durch *Gellmann et al.* NMR-spektroskopisch untersuchte und als β -Faltblatt ausgewiesene Sequenz **69** ausgewählt (Abb. 45).^[60]

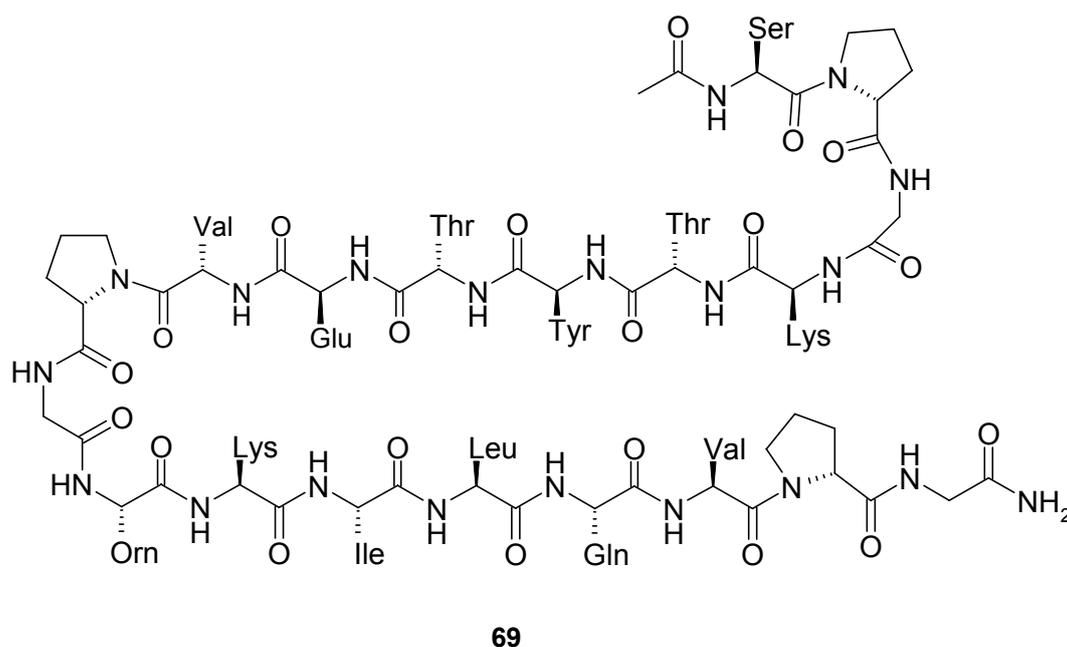


Abb. 45 Teilausschnitt des von *Gellmann et al.* vorgestellten Peptids **69**.

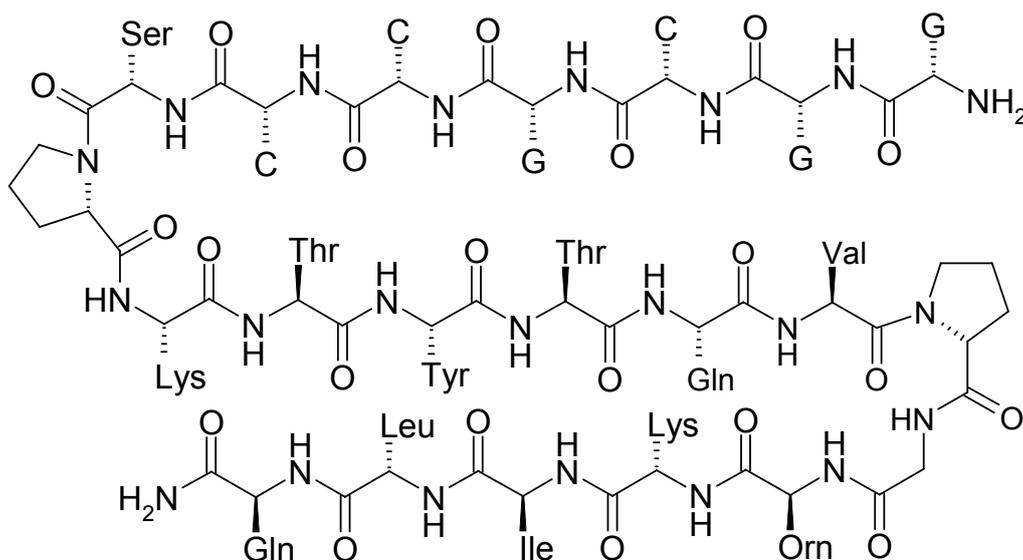
Dieses Modell-Peptid enthält den gut beschriebenen *turn*-Bildner D-Pro-Gly und weiterhin ein durch Wasserstoffbrücken und Ladungserkennung stabilisiertes β -Faltblatt.^[60] Als Erkennungseinheit wurde ein Alanyl-PNA Hexamer H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**16**), welches am C-Terminus verknüpft wurde, verwendet. Die Verknüpfung der Alanyl-PNA mit dem Peptid erwies sich mittels *Boc*-Strategie als schwierig. Zur Optimierung wurden zusätzlich zu einer Doppelkupplung der Aminosäuren die Kupplungsreagenzien variiert (Tab. 3).

Kupplungsreagenzien und Seitenschutzgruppen des Cysteins, StBu, Trityl (Trt) und Acetamidomethyl (Acm) eingesetzt. Die *ECL* Ligationmethode wurde aufgrund der notwendigen Darstellung des N^{α} -(1-Phenyl-2-mercaptoethyl) Aminosäure-Derivates verworfen (Kapitel 2.2).

Variante	Variation	Ergebnis
A	HATU/HOAt	kein Umsatz
B	HCTU/CI-HOBt	kein Umsatz
C	HBTU/HOBt	kein Umsatz
D	HCTU/CI-HOBt/LiCl-Lösung	kein Umsatz
E	Alanyl-PNA auf Boc-Strategie./Peptid auf Fmoc-Strategie	kein Umsatz
F	<i>native chemical ligation</i>	kein Umsatz
G	<i>extended chemical ligation</i>	kein Umsatz
H	C-terminal Peptid/N-terminal Alanyl-PNA	kein Umsatz
I	C-terminal Peptid/N-terminal Alanyl-PNA, Austausch von <i>turn</i> Bildner auf Asn	kein Umsatz
J	<i>convergent method</i>	kein Umsatz
K	zwei Mal Glycin einfügen, Boc-Strategie	kein Umsatz
L	zwei Mal Glycin einfügen, Alanyl-PNA Boc-Strategie/Peptid Fmoc-Strategie	Umsatz

Tab. 2 Variation der Kupplungsbedingungen und verschiedene Synthesestrategien.

Eine weitere Überlegung (**H**) ging dahin, erst das Peptid (C-terminal) und anschließend das Alanyl-PNA Oligomer N-terminal anzuschließen (Abb. 47). Hierzu wurde ein Boc-Glu(OBzl)-MBHA Harz verwendet. Das Polypeptid **72** wurde mittels *Boc*-Strategie aufgebaut. Dabei wurden die Aktivatoren HATU und HOBt verwendet.



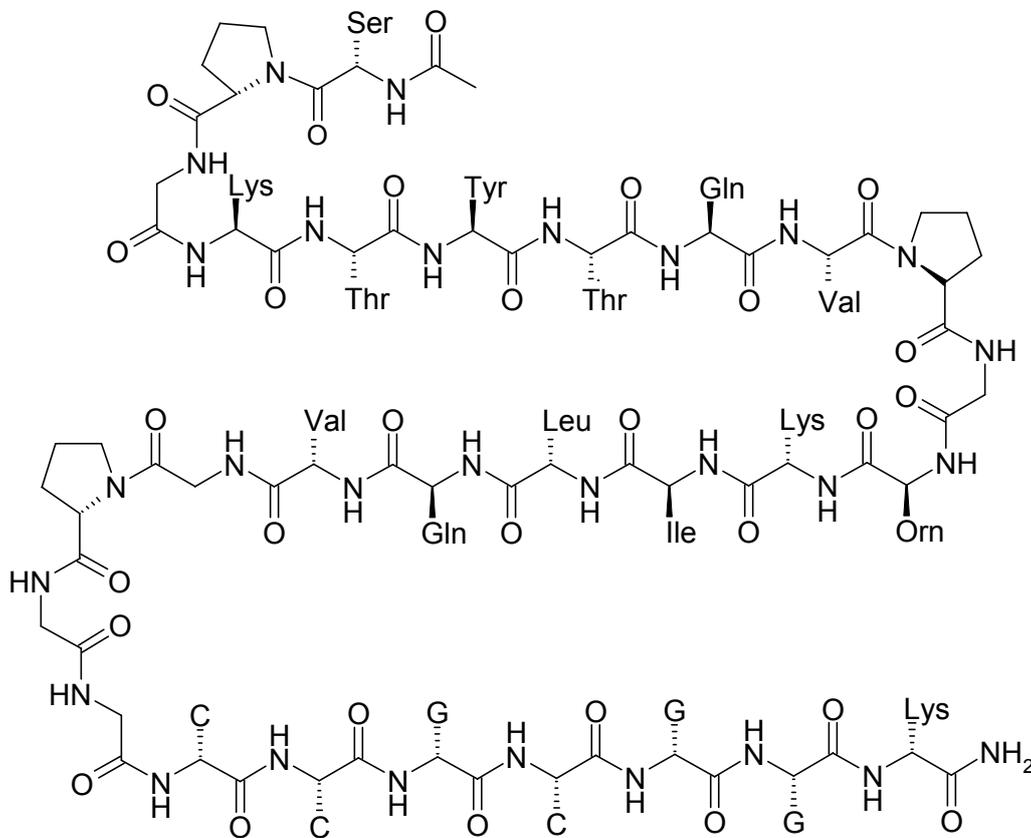
71

Abb. 47 Modellpeptid/Alanyl-PNA Sequenz 71 (G = Guanin, C = Cytosin).

Der Versuch führte ebenfalls nicht zum gewünschten Ergebnis. Auch die Variation des *turn* Bildners von D-Pro auf Asn (I) brachte nicht das gewünschte Produkt. Es wurde angenommen, dass die Voraggregation zu stark war, so dass das Harz nicht mehr ausreichend quellen konnte und eine Anlagerung, auch aus Gründen der geringen Abstände der einzelnen Seitenketten des β -Faltblatts, verhindert wurde.

Im nächste Ansatz (J) wurden einzelne voll geschützte Peptidfragmente hergestellt, wobei die Problematik entstand, dass die gewählten Schutzgruppen sowohl gegen *Fmoc*- (da man sie mittels dieser aufbauen wollte und die *Fmoc*-Strategie am häufigsten und erfolgreichsten ist), als auch *Boc*-Chemie (jeweils an den *N*-termini), stabil sein sollten. Das Alanyl-PNA Hexamer wurde, wie schon beschrieben, hergestellt und am Harz belassen. Die Peptidfragmente wurden am H-Gly-2-Cl-Trt-Harz aufgebaut. Ein Fragmentteil war Boc-Lys-Thr-Tyr-Thr-Glu-Val-Pro-Gly-Orn-Lys-Leu-Gln-Val-Pro-Gly mit den Schutzgruppen 4-Methyltrityl (Mtt) für Ornitin (Orn), Benzyloxycarbonyl (Z) für Lysin (Lys), Benzyloxy (OBzl) für Glutaminsäure (Glu), 2-Bromobenzyloxycarbonyl (2-Br-Z) für Tyrosin (Tyr) sowie Benzyl (Bzl)

für Threonin (Thr). Die letzte Aminosäure musste *Boc*-geschützt sein, da die Gesamtsequenz zur *Boc*-Strategie kompatibel sein sollte



72

Abb. 48 Modellpeptid/Alanyl-PNA Sequenz **72** verlängert durch zwei Aminosäuren Gly.

Die Abspaltung erfolgte mittels Hexafluoroisopropanol (HFIP) in Dichlormethan (DCM). Dieser Versuch ergab nicht die gewünschten Oligomere. Bei Methode **J** musste C-terminal immer ein Glycin vorhanden sein, so dass das Peptid in drei Teile zerlegt wurde: **a.** C-terminal die Alanyl-PNA am MBHA-Harz; **b.** die Sequenz Boc-Lys-Thr-Tyr-Thr-Glu-Val-Pro-Gly und **c.** N-terminal Val-Phe-Ile-Thr-Ser-Pro-Gly (Schutzgruppen: Benzyl (Bzl) für Serin (Ser)). Die Sequenzen **b.** und **c.** wurden vollständig geschützt an H-Gly-2-Cl-Trt-Harz aufgebaut. Während die Synthese der Oligomere **a** und **b** verwirklicht werden konnte, gelang die für Oligomer **c** nicht, so dass auch diese Strategie verworfen wurde. Näheres Betrachten des vorliegenden *turn*-Bildners und dessen Umgebung führte zu der Annahme, dass der *turn* sterisch gehindert sein

könnte. Daher, wurde der *turn* weiter nach außen verlegt, indem zwei Aminosäuren (Gly) eingeschoben wurden (Abb. 48) (**K**). Erst die Zweiteilung der Synthese in a. *Boc*-Strategie unter Verwendung von HATU und HOAt als Aktivatoren für den Alanyl-PNA Teil und b. *Fmoc*-Strategie unter Verwendung von HCTU und Cl-HOBt als Kupplungsreagenzien für den Peptidteil ab der Aminosäure Gly brachte das gewünschte Produkt (**L**). Beide Strategien wurden wegen der besseren Löslichkeit der Alanyl-Nucleobasen und der Aminosäuren im Lösungsmittel NMP durchgeführt.

Die darauf folgenden UV-Schmelzkurven ergaben die folgenden Ergebnisse (Abb. 49, 51 a/b). Um das Stabilitätsverhalten der α -Peptidnucleinsäuren noch besser diskutieren zu können, wurde im Phosphat-Puffer die Selbstpaarung der intakten Sequenz H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**15**) gemessen. Hierbei wurden Schmelztemperaturen von $T_m = 16\text{ °C}$ und $T_m = 35\text{ °C}$ ermittelt.

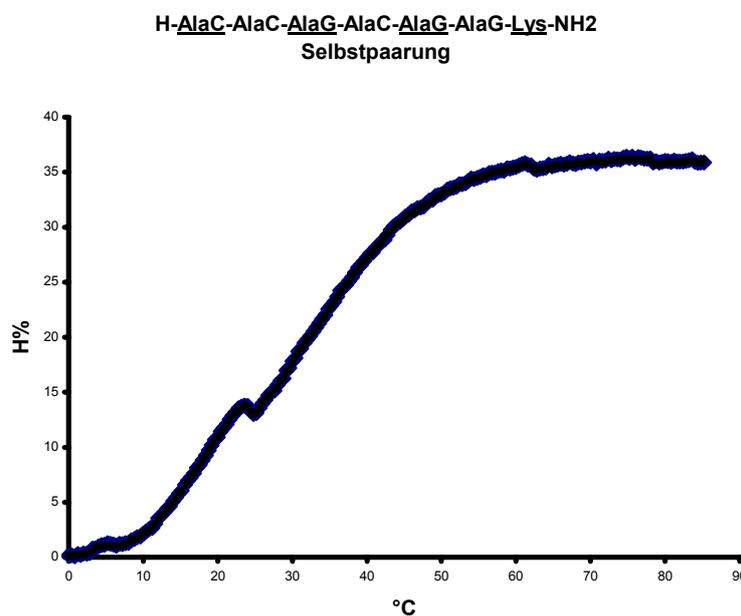


Abb. 49 Oligomer **15** in Phosphat Puffer **1**, Selbstpaarung, bei $c = 6\ \mu\text{M}$, $T_m = 16\text{ °C}$ und $T_m = 35\text{ °C}$.

Aufgrund früherer Arbeiten war eine Stabilität von $T_m = 42\text{ °C}$ zu erwarten. Für das Auftreten einer Schmelztemperatur bei $T_m = 16\text{ °C}$ gibt es keine plausible Erklärung. In Abbildung 50 sind die möglichen antiparallelen homochirale

Duplexbildungen der Peptid-Alanyl-PNA/Alanyl-PNA Gegenstrangoligomer (Abb. 50 A) und α -Peptid-Alanyl-PNA/ α -Peptid-Alanyl-PNA Selbstpaarung (Abb. 50 B) dargestellt.

A.

Peptid-C-C-G-C-G-G-Lys

Lys-G-G-C-G-C-C

antiparallel, heterochiral

B.

Peptid-C-C-G-C-G-G-Lys

Lys-G-G-C-G-C-C-Peptid

antiparallel, heterochiral

Abb. 50 Paarungsmöglichkeiten des Peptid **72** mit und ohne Gegenstrang **15**.

Für die Selbstpaarung der Peptid/PNA Sequenz **72** wurde eine Schmelztemperatur von $T_m = 16^\circ\text{C}$ und $T_m = 35^\circ\text{C}$ ermittelt (Abb. 51 b). Dies ist vergleichsweise mit einer *reverse Watson-Crick* Selbstpaarung der Alanyl-PNA ein erniedrigter Wert. Für das Peptid/Alanyl-PNA Chimära **72** mit dem Gegenstrang H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys (**15**) wurde ein dominanter Übergang von $T_m = 24^\circ\text{C}$ gefunden (Abb. 51 a).

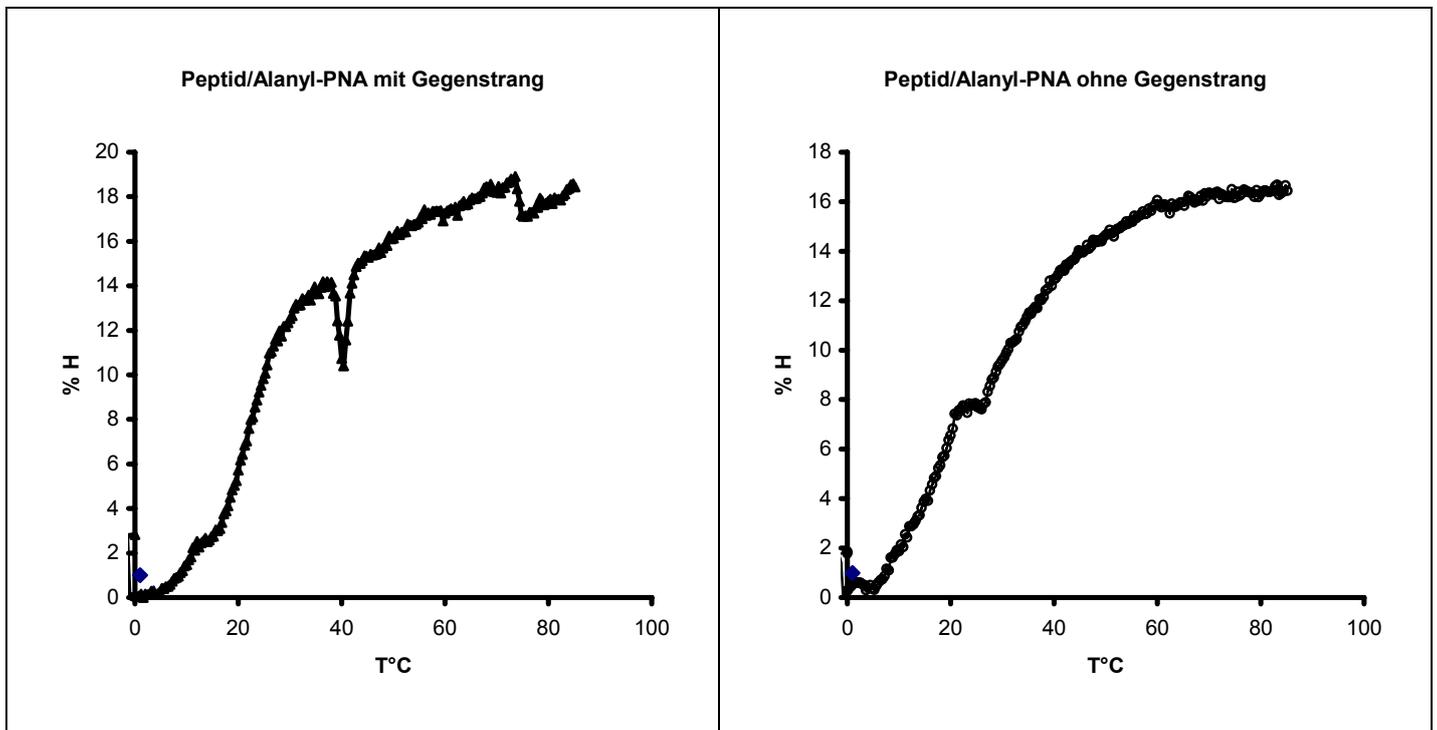


Abb. 51 Peptid/Alanyl-PNA Modellsequenz **72** a. mit Gegenstrang $T_m = 12^\circ\text{C}$ und $T_m = 24^\circ\text{C}$ b. ohne Gegenstrang $T_m = 16^\circ\text{C}$ und $T_m = 35^\circ\text{C}$ im Puffersystem **1**, Konzentration je $c = 6.0\ \mu\text{M}$.

Es kann nicht mit Sicherheit auf die Ausbildung eines Heteroduplexes geschlossen werden. Aus diesem Grund wurde eine Sequenz untersucht die neben einer Verkürzung der Sequenz einen anderen *turn*-Bildner aufweist (Asn-Gly), der in der Literatur als nicht so stabil und eindeutig beschrieben wird (Abb. 52).^[65] Die Sequenz des Testpeptid/Alanyl-PNA Oligomers weist nur einen *turn* auf, was eine größere Beeinflussung durch den Alanyl-PNA Gegenstrang vermuten lässt. Es wurden Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Das Ergebnis der Selbstpaarung des Oligomers **73** wies eine Stabilisierung von $T_m = 18\text{ °C}$ auf (Abb. 53 b), was sich mit der Stabilität des Peptides **72** deckt und somit nicht von der Länge der Sequenz, sondern nur von dem Alanyl-PNA Oligomer **15** im Modellpeptid **73** und **72** abhängig ist. Das Experiment mit dem erforderlichen Gegenstrang **15** wies zwei Übergänge von $T_m = 20\text{ °C}$ und $T_m = 32\text{ °C}$ auf. Hierbei wurde die Stabilität $T_m = 20\text{ °C}$ der Selbstpaarung des Peptides **73** zugeordnet (Abb. 53 a). Die Stabilität bei $T_m = 32\text{ °C}$ wurde der Stabilisierung durch den Gegenstrang zugeordnet (Abb. 53 a).

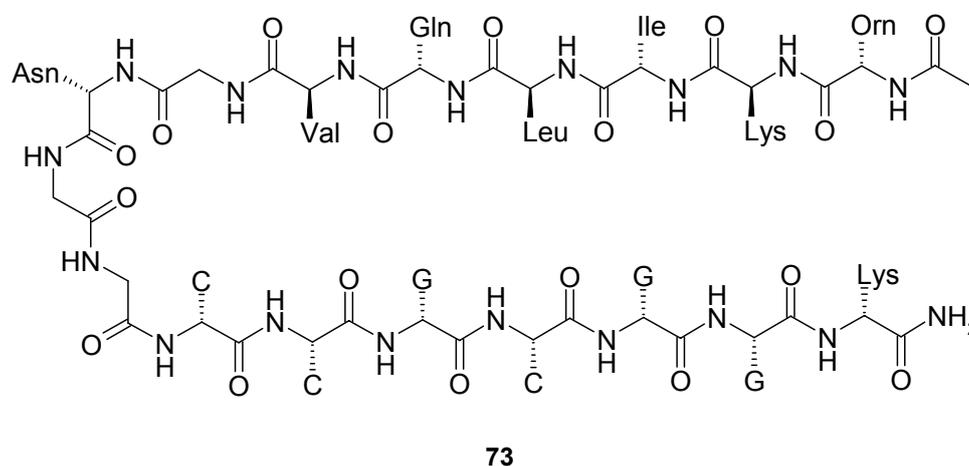


Abb. 52 Peptid/Alanyl-PNA Chimära **73** (G = Guanin, C = Cytosin).

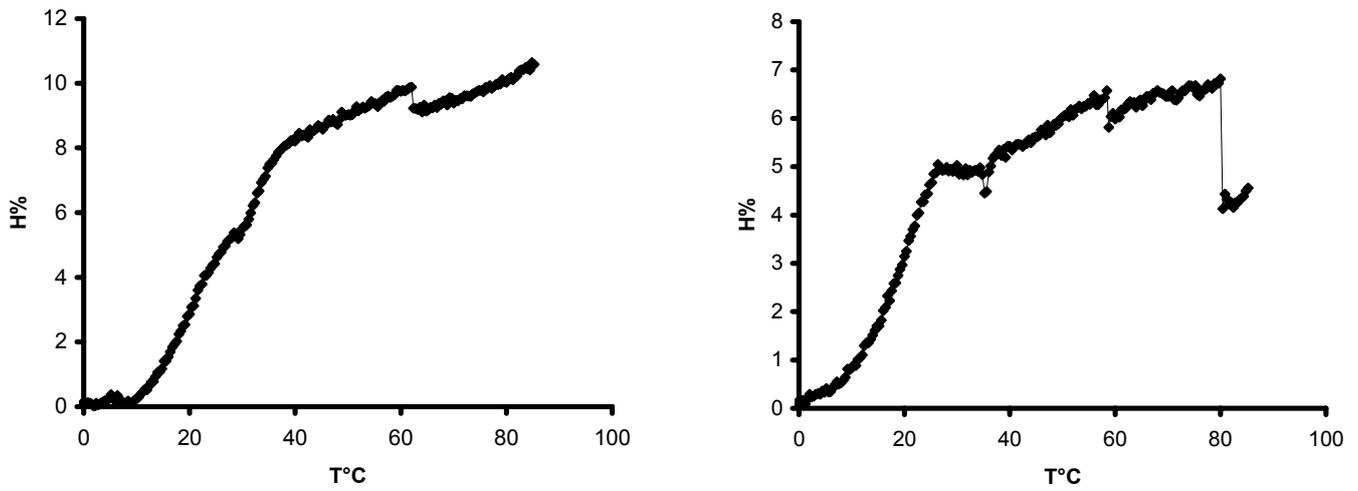


Abb. 53. Peptid/Alanyl-PNA Modellsequenz **73** a. mit Gegenstrang, $T_m = 20$ °C und $T_m = 32$ °C; b. ohne Gegenstrang, $T_m = 18$ °C im Puffersystem **1**, bei je einer Konzentration von $c = 6.0$ μM .

6 Synthese des Interleukin-8 (hIL-8)/Alanyl-PNA Derivats

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Projekt von *M. Hoffmann* weitergeführt werden, welches die Synthese von hIL-8 Analoga mit eingebauter Alanyl-PNA beinhaltet.^[59] Es wurde versucht die C-terminale Helix des humanen Interleukin-8 (hIL-8) Proteins mit Alanyl-PNA hinsichtlich strukturgebender Eigenschaften zu imitieren (Abb. 55).

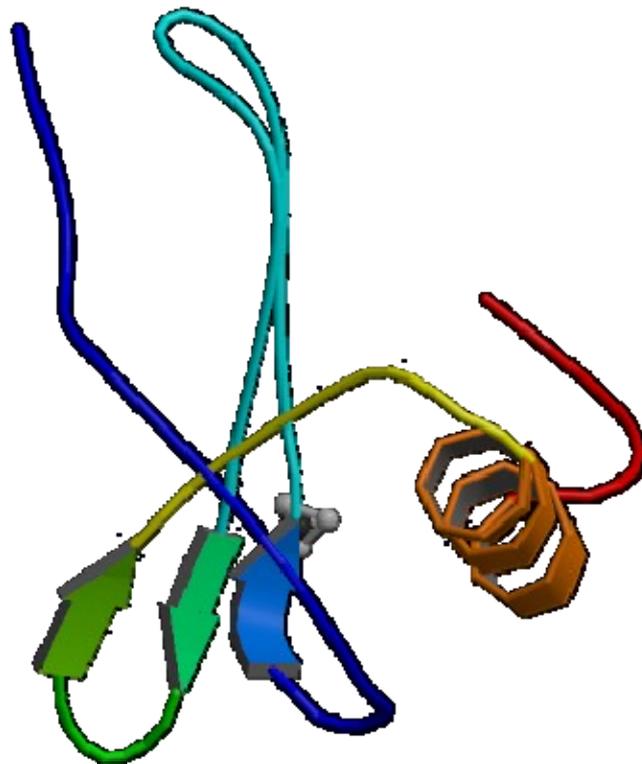


Abb. 54 Gesamtstruktur des humanen Interleukin-8.

Modifiziert wurden die Aminosäuren 56-77 des Interleukin-8 (IL-8) **74** die die α -Helix bilden (Abb. 55). Anstelle der α -Helix wurde eine Alanyl-PNA Sequenz eingebaut, so dass unter Zugabe des komplementären Gegenstranges Konformationsänderungen des Proteins erzeugt werden sollten, welche Einfluss auf die Aktivität des Proteins haben sollte.

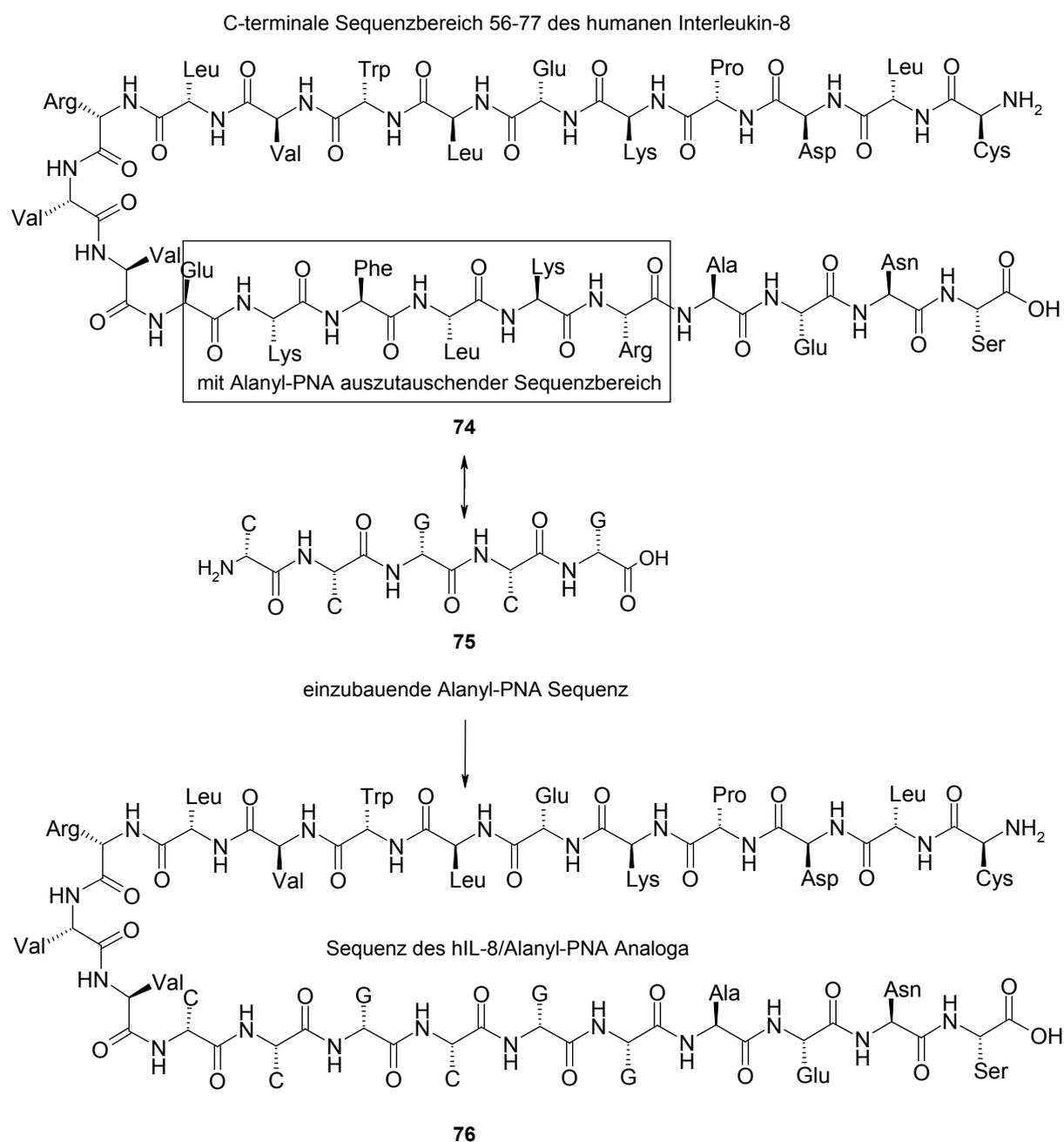


Abb. 55 Darstellung des synthetisierten Sequenzbereiches des Interleukin-8 **74**, der verwendeten Alanyl-PNA Sequenz **75** sowie das daraus resultierenden hIL-8/Alanyl-PNA Analogons **76**.

Die Synthese wurde mittels *Boc*-Strategie an Ser(OBzl)-PAM-Harz versucht. Hierbei kam es zum Abbruch der Reaktion an der Position 66 (Val), 59 (Lys) und 56 (Cys). Der Peptid/Alanyl-PNA Teil der Sequenz bis Nucleoaminosäure 68 konnte mittels Massenspektrometrie stets nachgewiesen werden. Die Nucleoaminosäuren wurden mittels HATU/HOAt in NMP aktiviert. Die Aminosäuren wurden zu Beginn mittels HBTU/HOBt aktiviert (**AA**). Da dies nicht zum Erfolg führte, wurden die Kupplungsreagenzien variiert. Es wurden

noch HCTU/HOBt-Cl (**BB**) und BOP (**CC**) getestet, jedoch ohne Erfolg. Weiterhin wurde die Ligationstrategie in Erwägung gezogen (**DD**), jedoch wurde auch hier der Aminosäureester des Valins nicht erfolgreich dargestellt. Der Einbau eines Cysteins nach der Aminosäure Valin 67 (**EE**) gelang nicht, so dass die Anwendung einer *native chemical Ligation* nicht zum Zuge kommen konnte.

Experiment	Variation	Ergebnis
AA	Alanyl-PNA (HATU/HOAt)/Peptid (HBTU/HOBt)	kein Umsatz
BB	Alanyl-PNA (HATU/HOAt)/Peptid (HCTU/Cl-HOBt)	kein Umsatz
CC	Alanyl-PNA (HATU/HOAt)/Peptid (BOP)	kein Umsatz
DD	<i>native chemical ligation</i> (ab AlaC)	kein Umsatz
EE	<i>native chemical ligation</i> (ab Val)	kein Umsatz
FF	Alanyl-PNA (Boc-Strat.)/ Peptid (Fmoc-Strat.)	kein Umsatz
GG	Austausch Glutamin gegen Leucin	kein Umsatz
HH	<i>expressed protein ligation</i>	kein Umsatz
II	Austausch von Glutamin/Asparagin gegen Leu	Umsatz

Tab. 3 Synthesestrategien zur Darstellung des Interleukin-8/Alanyl-PNA Derivats **76**.

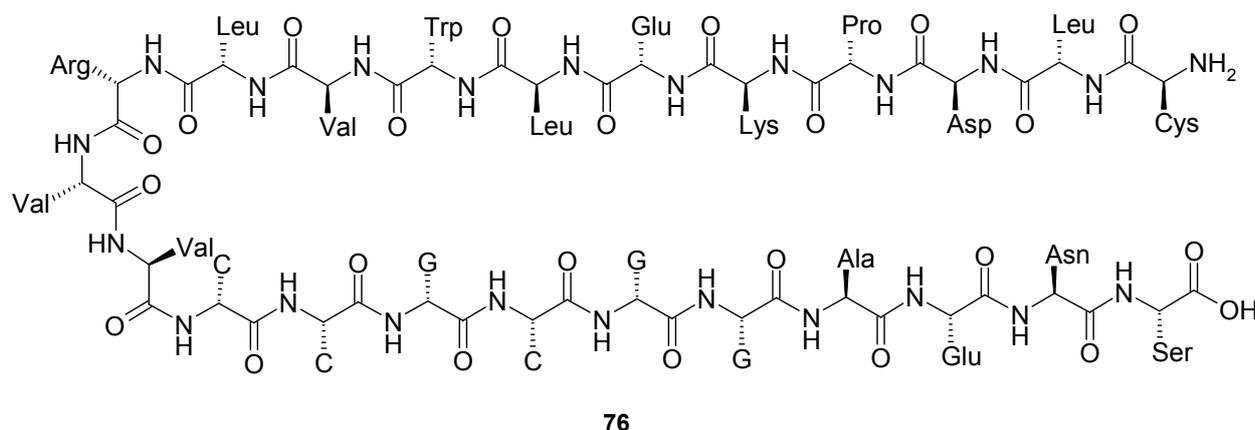


Abb. 56 Sequenz der IL-8/Alanyl-PNA Analoga **76** (G = Guanin, C = Cytosin).

Anschließend wurde auch hier der erste Teil des Peptides (Peptid/Alanyl-PNA Teil (56-77)) mittels *Boc*-Strategie aufgebaut und die restliche Sequenz mittels *Fmoc*-Strategie verlängert (**FF**). Hierbei kam es zu ersten Erfolgen. Sequenzbereiche bis zur Aminosäure Valin 66 wurden nicht mehr in der Massenanalyse nachgewiesen. Auch der Austausch der Aminosäure Glutamin (Gln), die zu starken Nebenreaktionen führt, durch die Aminosäure Leucin (Leu) in Kombination mit der *Fmoc*-Strategie ergab nicht das gewünschte Produkt (**GG**). Ein weiterer Ansatz ergab sich über die *expressed protein ligation* (**HH**) (Kapitel 2.2). Es wurde die Darstellung des *N*^α-(1-Phenyl-2-mercaptoethyl)-Aminosäure-Derivats angestrebt. Zuerst wurde das Keton **26** hergestellt (Abb. 57). Hierfür wurden das Thiol **25** und das Bromid **24** mittels Hünig-Base (Dipea) in DMF umgesetzt. Das 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(4-methylbenzylsulfanyl)ethanon (**26**) wurde in einer Ausbeute von 64 % erhalten.

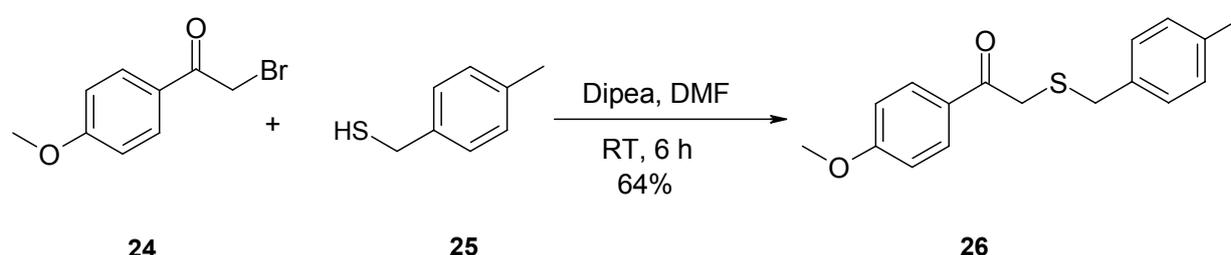


Abb. 57 Synthese des Ketons **26**.

Weiterhin wurde das Keton **26** mit Glycinethylester Hydrochlorid **77** und Valinethylester Hydrochlorid **27** in einer reduktiven Aminierung umgesetzt. Die Synthese (eine Eintopfreaktion) wurde, wie von *Botti et al.* beschrieben, durchgeführt.^[64 a] Dabei wurde das 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(4-methylbenzylsulfanyl)ethanon (**26**) mit dem entsprechenden Aminosäureester und Bor-trifluoriddiethylrat (BFEE) unter Wasserabscheidung in einer *Dean-Stark* Apparatur umgesetzt. Das zu erwartende Produkt konnte nicht erhalten werden.

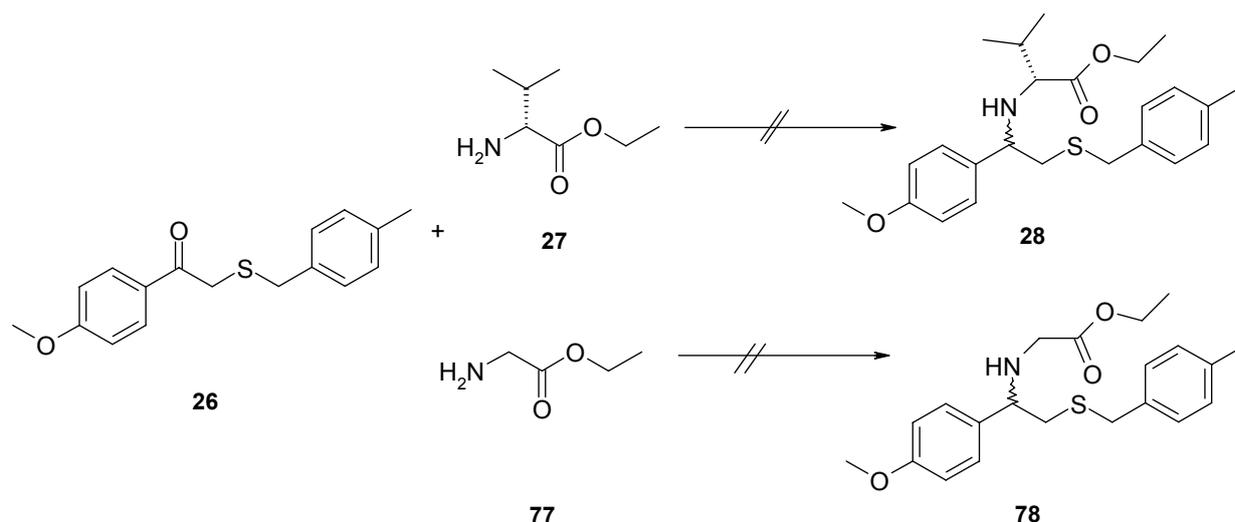


Abb. 58 Synthesestrategie zur Komponente 28 und 78.

Erst der Austausch der Aminosäure Glutamin (Gln) und zusätzlich Asparagin (Asn) ermöglichte es, eine sehr geringe Menge des gewünschten Produktes 74 zu isolieren (II). Jedoch war die isolierte Menge nicht ausreichend, um weitere Versuche (außer dem ESI-MS) durchzuführen (Abb. 59).

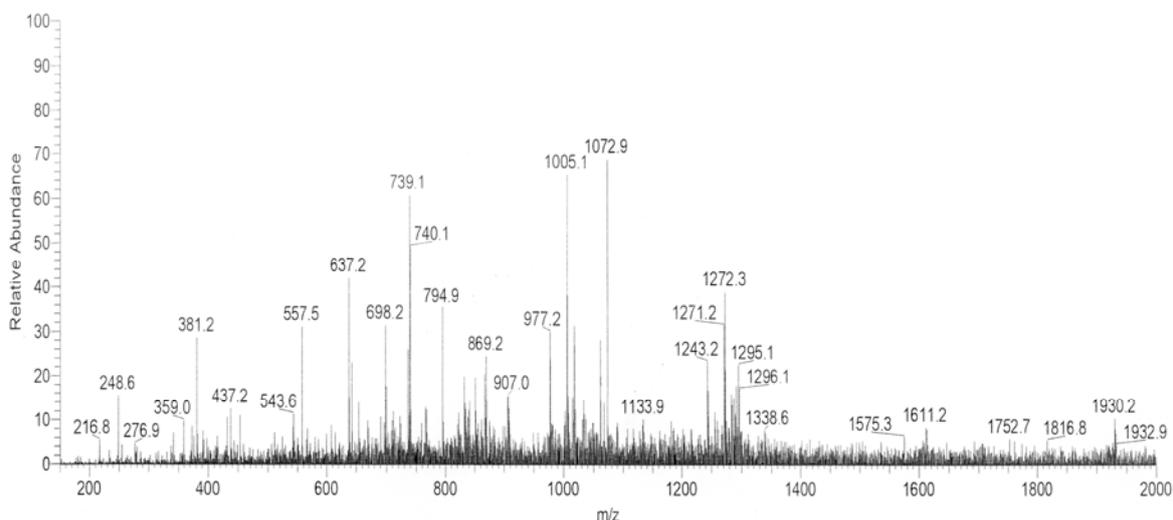


Abb. 59 Massenspektrum des synthetisierten IL-8-Derivats.

Für die Aminosäure Cystein wurde DIC als Aktivator und die Schutzgruppe Trityl (Trt) verwendet. Gründe für das Misslingen dieser Festphasensynthese können an den voluminösen Schutzgruppen, Seitenketten oder der Lage der geladenen Aminosäuren (siehe Lysin (Lys) und Glutaminsäure (Glu)) liegen. Aufgrund sterischer Hinderung der Amino- bzw. der angreifenden

Carboxylkomponente waren die Reaktanden möglicherweise zu unaktiv und damit einer unvollständigen Acylierungen unterworfen. Andererseits kann es bei Verlängerung der Peptidkette durch Ausbildung intra- und/oder intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Übergang von *random-coil*-Strukturen zu β -Faltblatt- und α -helikalen Strukturen kommen. Infolge der Ausbildung von übergeordneten Strukturen kommt es zu einer Aggregation des Harzes verbunden mit verschlechterter Solvataion wodurch die Quellung des Harzes nicht mehr in ausreichendem Maße gegeben ist. Dadurch wird auch die Diffusion der reaktiven Komponenten in die Harzmatrix erschwert. Dies führt zu Problemen bei der Kupplung und beim Nachweis nicht umgesetzter Aminogruppen. Nach Abspaltung vom Harz kann es bei derartigen Peptiden durch die Assoziation der Peptidketten zu Problemen bei der Charakterisierung und Reinigung kommen.

7 Ligationsverfahren nach *Bordusa* mit Alanyl-PNA

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Bordusa* (Halle) wurden Alanyl-PNA Oligomere mit Peptiden ligiert (Abb. 60). Das Verfahren dieser Ligation wurde in Kapitel 2.2 näher erläutert.

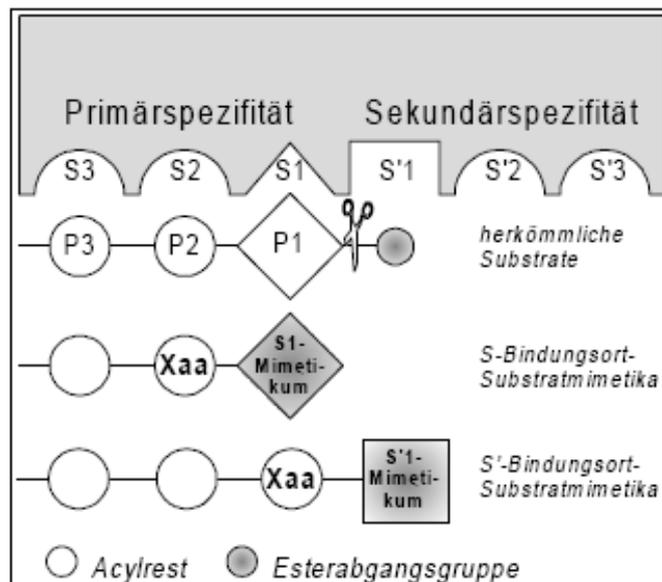


Abb. 60 Prinzip der substratvermittelten Einbindung von Donorestern in die Bindungsregion einer Protease.

Substratmimetika zeigen Wechselwirkungen über Estergruppen mit dem Enzym, wobei je nach Bindungsort der Spezifitätsdeterminanten zwischen S- und S'-Bindungsort-Substratmimetikum unterschieden werden kann. Das allgemeine Prinzip der Substratmimetika-vermittelten Einbindung eines Acyldonoresters in das aktive Zentrum einer Protease ist in Abb. 60 dargestellt. Durch die Wechselwirkung der Esterabgangsgruppe mit der Enzymoberfläche im aktiven Zentrum wird der Acyldonorester so in die Substratbindung eingebunden, dass das Enzym den Acylrest unter Ausbildung eines Acylenzymintermediats übernehmen kann. Die angreifende nucleophile Aminkomponente bildet zunächst mit dem Acylenzymintermediat ein Acylenzym-Nucleophil-Komplex aus, welcher in das Peptidfragment und das Enzym zerfällt.

Es wurden hierzu die Oligomere (AlaA-AlaT)₂-Lys-NH₂ (**79**), H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-OH (**80**), H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**16**), H-AlaC-AlaC-AlaG-Glu-AlaG-AlaG-Gly-OH (**66**) und H-AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC-Gly-OH (**81**) mittels Boc-SPPS an den belegten Harzen Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH-MBHA, Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH-Merrifield und Boc-Gly-OH-Merrifield synthetisiert. Als Kupplungsreagenzien wurden die Standardreagenzien HATU und HOAt verwendet. Die synthetisierten Oligomere wurden nach der oben beschriebenen Methode an Peptide ligiert, wobei alle Ligationen in wässriger Umgebung in einem HEPES-Puffer und bei 25 °C durchgeführt wurden. Zum Lösen des Esters wurde DMSO verwendet. Die Reaktionszeiten betragen 1–2 h. Der erste Versuch beinhaltete eine Ligation mit dem Peptid Ac-Phe-Gly-Gly-OGp (**82**), Clostripain (Enzym) und H-(AlaA-AlaT)₂-Lys-NH₂ (**79**) (Abb. 60). Es wurden 10–20 % des Produktes Boc-Phe-Gly-Gly-(AlaA-AlaT)₂-Lys-NH₂ (**83**) hergestellt. Das Produkt **83** wurde mittels MALDI-ToF, als [M+H]⁺, [M+Na]⁺ und [M+K]⁺ ermittelt.

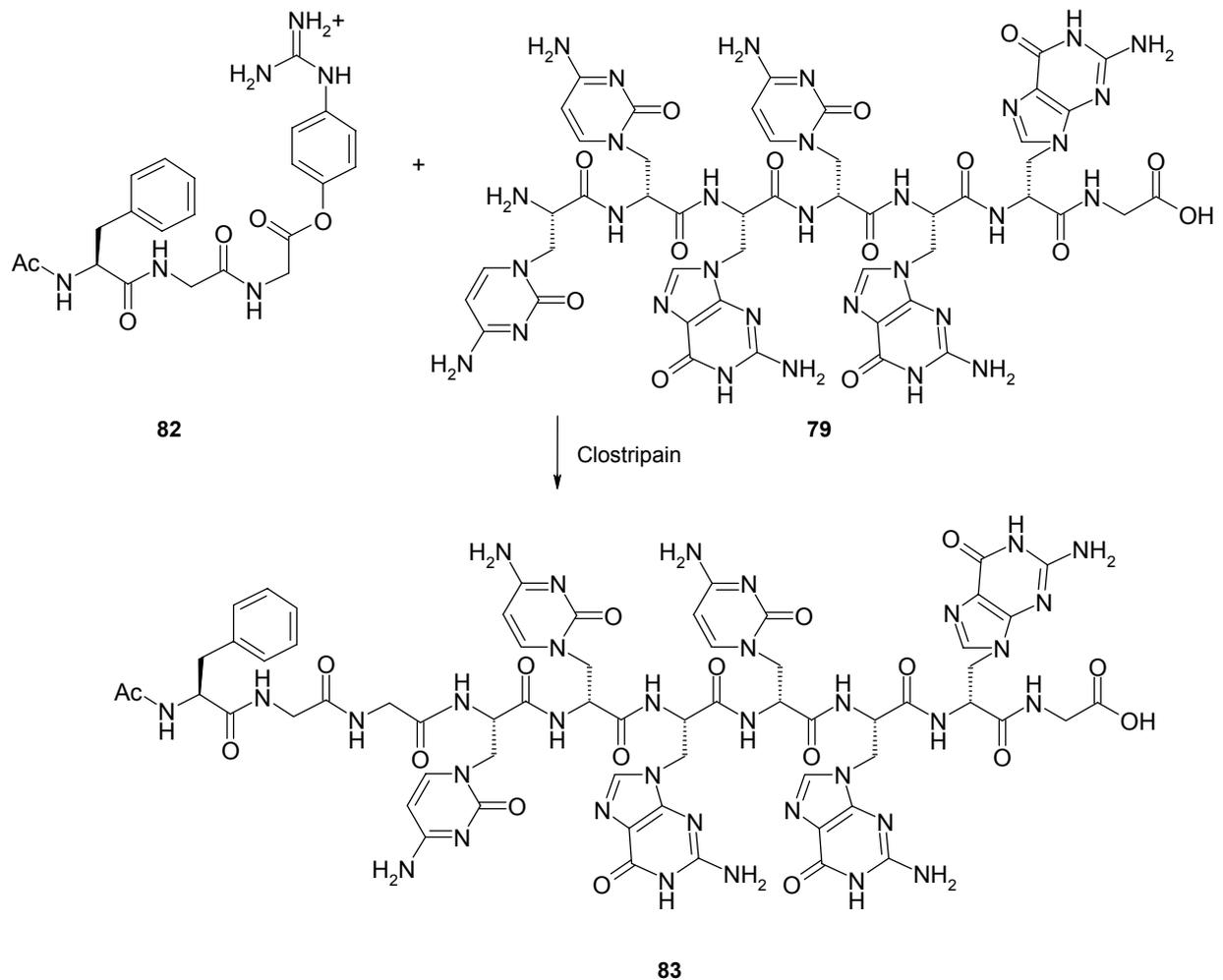


Abb. 61 Enzymatische Ligation nach *Bordusa et al.*

Ein weitere Umsetzung wurde mit dem Peptid Ac-Lys-Leu-Pro-Gly-Trp-Glu-Lys-Arg-Met-Ser-Arg-Ser-Ser-Gly-OGp **84** und H-(AlaG-AlaT)₂-Lys-NH₂ **79** unter Katalyse mit dem Enzym Clostripain bei 10-20 °C zu dem Produkt Ac-Lys-Leu-Pro-Gly-Trp-Glu-Lys-Arg-Met-Ser-Arg-Ser-Ser-Gly-(AlaA-AlaT)₂-Lys-NH₂ (**85**) durchgeführt. Das Produkt **85** wurde mittels MALDI-ToF als [M+H]⁺ identifiziert. Der dritte Versuch erfolgte mit Oligomer H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-OH **80**. Um eine bessere Selektivität für die Ligation zu erreichen, wurde hierbei die C-terminale Aminogruppe durch eine Carboxylgruppe ersetzt. Das Testpeptid wurde nach einer Sequenz von *Gellmann et al.* gewählt Ac-Val-Phe-Ile-Thr-Ser-Pro-Gly-Lys(Z)-Thr-Tyr-Thr-Glu-Val-Pro-Gly-Orn-Lys(Z)-Ile-Leu-Gln-Val-Pro-Gly-OGp (**86**). Das Produkt bekam man zu 9 % als Ac-Val-Phe-Ile-Thr-Ser-Pro-Gly-Lys(Z)-Thr-Tyr-Thr-

Glu-Val-Pro-Gly-Orn-Lys(Z)-Ile-Leu-Gln-Val-Pro-Gly-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-OH (**87**) (MALDI-ToF ergab $[M+H]^+$). Im Gegensatz zu Kapitel 5 mussten hier keine weiteren Glycine eingebunden werden, um die gewünschten Alanyl-PNA Oligomere an das Peptid zu ligieren, was einen erheblichen Vorteil darstellt.

Die unerwartet niedrige Ausbeute der Sequenz **80** gegenüber den Sequenzen mit einer C-terminalen NH_2 -Gruppe könnte darin begründet liegen, dass Aminogruppen den Fortgang der Peptidketten imitieren und somit eine bessere Einpassung des Substrates in die Substratbindungstasche des Enzyms bewirken. Ferner kann es zu einer Veränderung des pK-Wertes der Substanz kommen, die sich auf die Synthese auswirkt.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die Funktion und Aktivität von Proteinen hängt im wesentlichen von der dreidimensionalen Struktur und der Konformation des Proteins ab. Die Konformationswechsel sowie die Wechselwirkung zwischen Proteinen, beeinflusst durch einen molekularen Schalter, würden maßgeblich zur biologischen Aktivitätsänderung und sowie deren Funktion beitragen. Die als Schalter verwendeten Alanyl-PNA Oligomere sind Oligopeptide mit alternierender Konfiguration und mit Nucleobasen, die an der β -Position der Alanyl-Aminosäure kovalent gebunden sind

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Interaktionen und damit die Stabilität von verschiedenen komplementärer Alanyl-PNA Oligomere mit Hinblick auf eine mögliche „Schalter“-Funktion mittels *UV*- und *NMR*-spektroskopie untersucht. Die untersuchten Alanyl-PNA Oligomere unterschieden sich in den Längen und durch die eingebauten Fehlstellen. Weiterhin wurden verschiedene Puffersysteme für die Untersuchung gewählt. Ein zweiter Punkt dieser Arbeit war der Einbau eines Alanyl-PNA Stranges in ein Peptid oder Protein. Durch Zugabe eines komplementären Alanyl-PNA-Gegenstranges sollte sich ein β -Faltblatt stabilisieren lassen. Weiterhin wurde nach einer effizienten Methode gesucht, um *N*-methylierte Aminosäurederivate ausgehend von *N*-Methyl-Serinlacton **42** zu entwickeln und diese in alanyl-PNA Oligomere einbauen zu können. Durch das Ersetzen der C-Terminalen Helix des humanen Interleukin 8 (hIL-8) (Aminosäure 56-77) durch ein alanyl-PNA Hexamer wollten wir eine Schaltung des helicalen C-Terminus zu einer anderen stabilen Konformation erreichen. Der Einbau von alanyl-PNA Oligomere in Peptide und Proteine erweist sich als schwierig, so dass wir am Ende dieser Arbeit in Kooperation mit dem Arbeitskreis *Bordusa* eine enzymatische Ligation zum Einbau durchgeführt haben.

Der Erste Teil dieser Arbeit, wurden verschiedene Alanyl-PNA Oligomere unterschiedlicher Länge dargestellt, wobei um Aggregationen zu vermeiden auch die nicht komplementäre Nucleoaminosäure Boc-AlaT-OH, sowie die Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure eingebaut wurden. Anhand dieser

Sequenzen wurden neben der temperaturabhängigen *UV*-Spektroskopie in Kooperation mit der Abteilung Griesinger auch *NMR*-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich deutlich, dass die Modifikationen einen Einfluss auf die Selbstpaarung hatten. Der Einbau der geladenen Aminosäuren Lysin und Glutamin führte zu einer Verbesserung der Löslichkeit. Die *NMR*-spektroskopischen Messungen zeigten, dass die Aggregation in reinen G/C-Alanyl-PNA Oligomeren höher ist als die der Oligomere mit Modifikationen. Eine Rückgratmethylierung versprach Abhilfe hinsichtlich Aggregation im für die *NMR*-Spektroskopie erforderlichen Konzentrationsbereich. Eine *N*-terminale *N*-methylierte Nucleoaminosäure im Oligomer **67** brachte keine Abhilfe bei der Vermeidung der Aggregation. Die Messung zentral eingebauter *N*-methylierter Nucleoaminosäure im Oligomer **68** wird noch *NMR*-spektroskopisch ermittelt.

Viertens, befassten wir uns mit den „Schalter Funktionen“ und somit den Wechselwirkender alternierenden alanyl-PNA Oligomere. Beim Einbau von Alanyl-PNA Oligomeren in β -Faltblatt bildende Peptide, sollte der Einfluss der Alanyl-PNAs und damit die Schaltfähigkeit der Sekundärstruktur untersucht werden. Die Peptid/PNA Sequenz Ac-Ser-Pro-Gly-Lys-Thr-Tyr-Thr-Glu-Val-Pro-Gly-Orn-Lys-Ile-Leu-Gln-Val-Gly-Pro-Gly-Gly-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**85**) konnte hergestellt werden, jedoch nicht mit seinem Gegenstrang zur Paarung gebracht werden. Dies kann auf sterische Faktoren sowie Wechselwirkungen der Nucleoaminosäuren der Alanyl-PNA mit den Aminosäuren aus dem Peptid hinweisen. Um eine bessere Wechselwirkung mit komplementären Alanyl-PNA Oligomeren zu erreichen, wurde ein kürzeres, weniger rigides Peptid Ac-Orn-Lys-Ile-Leu-Gln-Val-Gly-Asn-Gly-Gly-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**87**) mit schwächerem *turn*-Bildner hergestellt. Erwartungsgemäß wurde hierbei ein viel größerer Einfluss des Gegenstranges auf die Peptid/PNA Sequenz beobachtet.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasste sich mit dem Einbau eines PNA-Hexamers in ein menschliches Interleukin 8 (hIL-8) bzw. in einen Teil dieser Sequenz (Aminosäure 56 bis 77). Es sollte gezeigt werden, dass auch ein Hexamer durch die Technik der *native chemical ligation* in größere Peptide

eingebaut werden kann. Weiterhin, sollte gezeigt werden, dass die Struktur des C-terminalen Endes durch Zugabe eines komplementären Gegenstranges in eine stabile Sekundärstruktur überführt werden kann. Hierfür wurde im Arbeitskreis Beck-Sickinger ein Teil des humanen Interleukin-8 hIL-8 (1-55), als C-terminaler Thioester durch Expression des Fusionsproteins in *E. coli* und *expressed protein ligation*.

Der letzte Punkt dieser Arbeit war eine enzymatische Ligation in Kooperation mit dem Arbeitskreis *Bordusa*. Hierbei sollten Alanyl-PNA Oligomere verschiedener Länge sowie N-terminale Nucleoaminosäuren mittels Enzym Clostripain an verschiedene Sequenzen ligiert werden.

Die *Bordusa* Ligationen stellten sich als eine erfolgreiche und gute Methode zum Einbau von Alanyl-PNA in größere Peptide dar. Die manuelle Synthese war nur durch Verlängerung der Sequenz um zwei Glycine möglich. Insgesamt konnte in dieser Arbeit eine viel versprechende neue Synthese zur Darstellung von *N*-methylierten Aminosäuren sowie Nucleoaminosäuren entwickelt und deren Einbau in Oligomere gezeigt werden. Die Ligationmethode von *Bordusa* stellt eine sehr effiziente Methode dar, um die Alanyl-PNA Oligomere in große Systeme einzubauen und wird aufgrund dieses Erfolges sicherlich eine gute Option auch zur Darstellung des Interleukin-8 Derivates und weiterer größerer Peptid/PNA Sequenzen sein. Zur Optimierung dieser Schaltfunktion wäre es denkbar, eine *N*-metylierte Alanyl-PNA in den komplementärstrang einzubauen. Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung wäre ein Einbau von Aminosäuren gegensätzlicher Ladung in die Oligomere.

9 Summary and Outlook

The activity and properties of proteins mainly depend on the three-dimensional arrangement of their secondary structure elements and their conformation. Conformational changes as well as protein-protein interactions, be influenced by molecular switches, contribute to changes in biological activity and the function of peptide. The molecular switches used are alanyl peptide nucleic acids (alanyl-PNA), alternating oligopeptides based on amino acid alanyl with nucleobases attached to the β -position.

In the present work we studied the interaction and so the stability of different complementary alanyl-PNA oligomers with varying mismatches, lengths and buffers by using *UV*- and *NMR*-spectroscopy. Further on, alanyl-PNA was be incorporated in β -sheet forming peptides. In addition, we aimed to develop an efficient method to synthesize *N*-methylated amino acid derivatives from *N*-methyl-serinelactone **42** (Figure 61) and incorporate *N*-methylated nucleo-amino acids in alanyl-PNAs. By replacing C-terminal helix of humane interleukine 8 (hIL-8) (amino acids 56-77) with an alanyl-PNA hexamer we wanted to switch from a helical-structured C-terminus to nother stable secondary structure. It is very difficult to incorporate alanyl-PNA in peptides or proteins, so that we decided at end our study to performed the enzymatic ligation in cooperation with the *Bordusa* group.

The first aim part of this work was to understand the interaction and so the stability of different complementary alanyl-PNA oligomers with varying mismatches and buffers by using *UV*- and *NMR*-spectroscopy. The stability of duplex was investigated by varying the lengths of different alanyl-PNA oligomers. To avoid aggregation problems, we incorporated Boc-AlaT-OH or amino acids lysine and glutamine as a mismatch. The structure and the conformational changes of this sequences were investigated by temperature-dependent *UV*- and *NMR*-spectroscopy. We found that a modification increased/reduced the selfpairing. In order to increase the solubility of alanyl-PNA oligomers, amino acids lysine and glutamine were incorporated. *NMR*-

spectroscopy revealed higher aggregation in pure G/C-alanyl-PNA than in the modified oligomers.

To avoid aggregation the oligomere **68** with a central incorporated *N*-methylated nucleoamino acid was prepared. In addition, the complementary alanyl-PNA with charged *N*-alkyl chains was prepared to enable *NMR*-spectroscopy measurements blocking one aggregation side.

The fourth goal of this work was to investigate interactions of alternating alanyl-PNA oligomers as *molecular switches*. Based on the specific nucleobase recognition, the two complementary alanyl-PNA hexamers provide a stable double strand with linear topology. Considering this, one alanyl-PNA hexamer was inserted in a peptide or protein to stabilize a β -sheet conformation. Alanyl-PNAs randomly brought together from a single strand. Two complementary strands are able to form duplex, resulting in the β -strand conformation. Next, alanyl-PNA was incorporated either in the model peptide or in proteins to function as a disturbed β -sheet (PNA double strand). As such the duplex formed a switchable de-/stabilizing element of protein conformation.

Further on, alanyl-PNA was incorporated in β -sheet forming peptides as well as in proteins in order to function either as a part of a β -sheet (PNA double strand) or a disturbed β -sheet (PNA single strand). The peptide/PNA sequence Ac-Ser-Pro-Gly-Lys-Thr-Tyr-Thr-Glu-Val-Pro-Gly-Orn-Lys-Ile-Leu-Gln-Val-Gly-Pro-Gly-Gly-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**85**) was synthesized, but the recognition of the complementary alanyl-PNAs failed. This could be due to the sterical or electronical interactions between the nucleoamino acids (alanyl-PNA) and the amino acids of peptide.

Because of this, and a shorter and less rigid peptide containing a weaker β -turn Ac-Orn-Lys-Ile-Leu-Gln-Val-Gly-Asn-Gly-Gly-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**87**) (Figure 60) was synthesized. A much more intensive influence was measured between complementary alanyl-PNA and peptide/PNA sequence, confirming our hypotheses.

As fifth part of this work, the C-terminal helix of humane interleukine 8 (hIL-8) (amino acids 56-77) was replaced with a peptide sequence that contained an alanyl-PNA hexamer with the intention to switch from a structured C-terminus

to a stable secondary structure. In the present approach the *native chemical ligation* was applied to obtain protein/alanyl-PNA-chimera that allows to switch the protein conformation and to modify the protein interaction by the base pairing. Interleukin 8 is the first example we already obtained the preliminary data from. The fragment hIL-8 (1-55) was expressed in *E. coli* by the IMPACT system and purified by the *Beck-Sickinger* group.

A last aim, was an enzymatic ligation in cooperation with the *Bordusa* group. For this reason, it was necessary to synthesize alanyl-PNA oligomeres of different lengths and *N*-terminal nucleo amino acids. The ligation step was done by using different sequences and clostripain as an enzyme (Figure 61). *Bordusa* ligation formed out to be a promising method to incorporate alanyl-PNA in peptides or proteins. The existence of **70** with *SPPS* (solid phase peptide synthesizer), was made possible by extending its sequence with two glycines.

In conclusion, this work describes a novel method to synthesize *N*-methylated amino and nucleo amino acids and incorporated them in alanyl-PNA oligomers. We suggest that the *Bordusa* ligation method is an efficient strategy to incorporate into alanyl-PNA in peptides and proteins. Furthermore, to optimize/prevent the switching attachment and aggregation problems a *N*-methylation over this peptide backbone to one or more central nucleo amino acids of the strand would be done.

II. Experimenteller Teil

1 Allgemeine Arbeitstechniken

1.1 Allgemeine Methoden

Reagenzien

Die verwendeten Harze wurden von der Firma *Novabiochem* bezogen. Die Peptidkupplungsreagenzien stammen von *Applied Biosystems*, *IRIS Biotech* und *Novabiochem*. Die Aminosäurederivate wurden von *Novabiochem*, *Fluka*, *MultiSyntech* und *Bachem* erhalten. Alle anderen Reagenzien stammen von *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, *Lancaster* und *Acros* und entsprachen der Qualität ‚zur Synthese‘.

Lyophilisieren

Die wässrigen Lösungen wurden mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren und an einem *Christ-Alpha-2-4*-Lyophilisator gefriergetrocknet. Bei kleineren Mengen wurden die Substanzen an einer *Speed-Vac RC 10.22*. der Firma *Joan* lyophilisiert.

Lösungsmittel

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. DMF abs. und THF abs. wurden von *Fluka* in der Qualität *puriss. absolut* bezogen. Pyridin und Dichlormethan wurden über CaH_2 getrocknet und destilliert. Lösungsmittel für die HPLC wurden vor Verwendung durch Rühren im Vakuum entgast. Acetonitril (*HPLC-Qualität*) stammte von *Acros Organics* und Wasser wurde mittels einer Wasseraufbereitungsanlage ‚Simplicity‘ der Firma *Milipore* aufbereitet.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einer *Büchi-510* Schmelzpunktapparatur bestimmt und sind nicht korrigiert.

Reaktionen

Für Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss diente das Gas Argon (99.996%) als Inertgas.

1.2 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden Dünnschichtfertigplatten mit Aluminiumfolie als Trägermaterial der Firma *Merck* verwendet (Kieselgel 60 F254, Schichtdicke 0.25 mm). Zum Nachweis der Substanzen diente die Fluoreszenzlösung bei einer Wellenlänge von 254 nm sowie die Tauchfärbung mit Ninhydrin-Lösung (500 mL Ethanol, 3.00 mL Essigsäure, 1.00 g Ninhydrin).

Flash-Säulenchromatographie (FC)

Als Säulenmaterial wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 40 – 62 μm verwendet. Die Säulen wurden nass mit 50–100fachem Überschuss an Kieselgel befüllt und das Substanzgemisch als konzentrierte Lösung (im Laufmittel) aufgetragen.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analytische und präparative HPLC wurden an Geräten der Firma *Pharmacia* (Äkta Basic, P900, UV 900) und *JASCO* (semipräparative HPLC Anlage mit 2 Pumpen 2080-20-PU sowie einem programmierbaren 875-UV-Detektor) durchgeführt.

Analytik YMC-Säulen (J'sphere ODS-H80, 250 × 4.6 mm, 4 μm , 80 Å, C-18 und J'sphere ODS - H80, 150 × 4.6 mm, 4 μm , 80 Å, C – 18, Fluss: 1 mL/min)
·*Sephasil Peptide* Säule (250 × 4.6 mm, 5 μm , 100 Å, C-18, Fluss: 1 mL/min)

Semipräparativ ·YMC-Säulen (J'sphere ODS-H80, 150 × 10 mm, 4 µm, 80 Å, C-18, Fluss: 3 mL/min und J'sphere ODS-H80, 250 × 20 mm, 4 µm, 80 Å, C-18, Fluss: 10 mL/min).

Die Gradienten der Laufmittel **A** (H₂O + 0.1 % TFA) und **B** (ACN + 0.1 % TFA), **B'** (ACN/H₂O (9:1) + 0.1 % TFA) bzw. **B''** (ACN/H₂O (8:2) + 0.1 % TFA) sind jeweils angegeben. Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 218 nm, 254 nm und 280 nm.

Reverse Phase Chromatographie (RP)

Es wurde RP-Kieselgel der Firma YMC (ODS-A, AA06S50, 60 Å, S-50 µm, C-18) verwendet. Die Substanzen wurden in wenig Wasser suspendiert und auf die mit Wasser äquilibrierte Säulenpackung gegeben. Der Gehalt an Methanol wurde stufenweise erhöht.

1.3 Spektroskopie

Circulardichroismus-Spektroskopie (CD)

Die Messungen wurden an einem JASCO J-810A Spektropolarimeter, ausgerüstet mit einer JASCO PTC423S Temperiereinheit, durchgeführt. Der Probenraum wurde kontinuierlich mit Stickstoff gespült. Die Temperatur wurde im Temperierblock in Nachbarschaft zur Küvette gemessen. Alle Messungen wurden mit 5 Akkumulationen, 1.0 nm *bandwidth*, 1.0 s *response* und, wenn nicht anders angegeben, mit einem *scan speed* von 50 nm/min durchgeführt. Messungen in Lösung wurden in Quarzglasküvetten (0.25 cm oder 1.0 cm) durchgeführt.

UV-Spektroskopie (UV)

Die UV-Spektren wurden in einer Quarzglasküvette (1.0 cm) mit einem JASCO V-550 oder einem Perkin Elmer Lambda 10 UV/VIS Spektrometer aufgenommen.

Die Schmelzkurven wurden mit einem *JASCO V-550* Spektrometer, ausgerüstet mit einer programmierbaren *JASCO ETC-505S/ETC-505T* Peltier-Temperiereinheit, aufgenommen. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Spektren in einer Quarzglasküvette (1.0 cm) bei 260 nm aufgenommen. Die Konzentrationen der Oligomere wurden bei 80 °C aus der UV-Absorption berechnet. Es wurde folgendes Temperaturprogramm für die temperaturabhängigen UV-Messungen verwendet:

28 °C → 80 °C (6 °C/min) → 85 °C (3 min) → -2 °C (3 °C/min)
→ -2 °C (5 min) → 85 °C (180 min) → -2 °C (180 min) →
28 °C (5 min).

Die Hyperchromizität (H%) ist definiert als

$$H\% = \frac{(A_T - A_0) \cdot 100}{A_0}, \quad (1)$$

wobei A_0 den kleinsten Absorptionswert entspricht.

Massenspektrometrie (MS)

Die ESI-Massenspektren wurden an einem Gerät der Firma *Finnigan* (Typ LCQ oder TSQ 7000) aufgenommen. Die Aufnahme der EI-Massenspektren erfolgte an einem Instrument der Firma *Varian* (Typ MAT 731). Die Aufnahme der hochaufgelösten ESI-Massenspektren (HR-MS) erfolgte an einem APEX-Q IV 7T-Spektrometer der Firma *Bruker*.

Infrarot-Spektroskopie (IR)

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte an einem Gerät der Firma *Perkin Elmer* Typ 1600 Series FT-IR unter Benutzung von KBr-Presslingen.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden an *Varian Unity 300* oder *Varian INOVA 600* Spektrometern aufgenommen. Die Proben temperatur betrug im Fall von CDCl_3 27 °C und für $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, falls nicht anders angegeben, 35 °C. Die chemische Verschiebung der Signale sind in Einheiten der δ -Skala registriert (TMS = 0 ppm). Als interner Standard dienen die Resonanzsignale der Restprotonen der verwendeten deuterierten Lösungsmittel CDCl_3 : 7.24 ppm (^1H -NMR) und 77.0 ppm (^{13}C -NMR), $[\text{D}_6]\text{DMSO}$: 2.49 ppm (^1H -NMR), 39.5 ppm (^{13}C -NMR). Die Multiplizitäten der Signale werden durch die Abkürzungen s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, br. s = breites Singulett charakterisiert. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. ^{13}C -NMR-Spektren wurden als ^1H -Breitband-entkoppelte oder als ATP-Spektren aufgenommen. Die Signalzuordnung erfolgte mit Hilfe von $[\text{H}, \text{H}]\text{-COSY}$, HMQC- und HMBC-Experimenten. Für die Auswertung der Peptidspektren wurden TOCSY, NOESY und DQF-COSY als 2D-Spektren mit einbezogen. Die NMR-Spektren der methylierten-Alanyl-PNA wurden an 400-800 MHz *Bruker* Spektrometern aufgenommen. Die Proben wurden in einem *Shigemi D₂O*-Röhrchen (200 μm) gelöst und *WATERGATE* oder *jump and return* Pulssequenzen verwendet.

Optische Drehung

Die Drehwerte wurden mit dem Polarimeter 241 MC der Firma Perkin-Elmer gemessen. Der spezifische Drehwert errechnet sich wie folgt:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l} \quad (2)$$

Hierbei sind α der gemessene Drehwert bei 20 °C und der Wellenlänge D (Natriumlinie 589 nm), c die Konzentration in g/100 mL und l die Küvettenlänge in dm.

2 Synthesen

2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften(AAV)

2.1.1 AAV1: Bestimmung der Enantiomerenreinheit in Anlehnung an Lohse^[41a]

Zu der jeweiligen 5 μmol (1.0 eq) Alanyl-Nucleoaminosäure wurde 120 μL TFA gegeben und die Lösung für 10 min bei RT geschüttelt. Nach entfernen der TFA im Hochvakuum entfernt wurde, wurde der Rückstand mit 175 μL bidest. Wasser sowie 175 μL (pH 9, $c = 1.20 \text{ mol/L}$) NaHCO_3 -Puffer aufgenommen und hierzu eine Lösung von 8.68 mg (30.0 μmol , 6.0 eq.) *N*-Boc-L-Ala-OSu in 350 μL THF gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h bei RT geschüttelt, mit 10 %iger TFA auf pH 2.5 angesäuert, der Feststoff filtriert. 5 μL wurden für die HPLC-Analytik entnommen und die Diastereomere an einer RP-C-18 Säule getrennt. Die Integration der Absorptionsbanden bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ ergab das jeweilige Enantiomerenverhältnis.

2.1.2 AAV2: Kupplung der ersten Aminosäure an das Harz

In einer kleinen Säule wurden 1.0 g MBHA-Polystyrolharz (Belegungs-dichte 0.66 mmol/g) eingewogen und 2 h in DCM quellen lassen. Anschließend wurde eine Lösung aus 2.0 mmol (1.0 eq.) einer *N*-terminalen *Boc*-geschützten Aminosäure, 0.62 g (2.0 mmol) TBTU und 0.30 g (2.0 mmol) HOBt \times H_2O in 10 mL NMP zugegeben. Nach fünf Minuten wurde 0.68 mL (4.0 mmol) DIPEA zur Reaktionsmischung gegeben und die Lösung 2 h bei RT rotiert. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von DIPEA wiederholt auf einen Wert von 8 - 8.5 eingestellt. Das Reaktionsende zeichnet sich durch einen konstanten pH-Wert aus. Das Harz wurde mehrmals mit NMP und DCM gewaschen und die Reaktion am Harz in der gleichen Ansatzgröße wiederholt. Nach der Doppelkupplung wurde das belegte Harz im Hochvakuum getrocknet

und die Belegungsdichte mit der folgenden Formel gravimetrisch bestimmt:

$$n = \frac{m_{ges} - m_{Harz}}{(MG_{X_{aa}} - MG_{Wasser}) \cdot m_{Harz}} \cdot 1000 \quad (3)$$

Hierbei steht n für die Belegungsdichte bezogen auf das verwendete Harz in mmol/g; m_{ges} für die Gesamtmasse des Polymers nach der Doppelkupplung in g, m_{Harz} für die Masse des eingesetzten Harzes in g und $MG_{X_{aa}}$ bzw. MG_{Wasser} für die Molmassen der *Boc*-geschützten Aminosäure bzw. von Wasser.

2.1.3 AAV3: Manuelle Synthese der Peptidnucleinsäure - Oligomere mittels Boc-Festphasenstrategie^[66 a-c]

2.1.3.1 AAV3.1: Allgemeines Kupplungsprotokoll

Die Peptidnucleinsäuren wurden über Boc-Festphasensynthese nach folgendem Syntheszyklus an *N*-Boc-D-Lys(Z)-MBHA-Harz, *N*-Boc-L-Lys(Z)-MBHA-Harz, *N*-Boc-D-Lys(2-Cl-Z)-Merrifield-Harz oder *N*-Boc-Gly-Merrifield-Harz (Belegungsdichte $n = 0.43\text{--}0.70$ mmol/g) aufgebaut. Die Festphasensynthese wurde in einer kleinen Säule durchgeführt, welche zur Reaktion langsam rotiert wurde.

A1: Quellen:

Das Harz wurde 3 h in DCM/NMP (1:1) gequollen.

B1: Entschützen:

Das harzgebundene Peptid wurde mit einer Lösung aus 5 % *m*-Cresol in TFA (3 × 5 min, 1 mL) bei RT behandelt.

C1: Waschen:

Das Harz wurde zunächst mit DCM (5×1 mL) und anschließend mit DCM/NMP (1:1, 5×1 mL) gewaschen.

D1: Entstapeln:

Es wurde sowohl zum Neutralisieren, als auch zum Entstapeln mit Pyridin (5×1 mL, 1×3 min) gewaschen und das Harz im Stickstoffstrom für 3 min getrocknet.

E1: Kuppeln:

Es wurden 5.0 eq. der jeweiligen Boc-geschützten Nucleoaminosäure mit 4.5 eq. HATU und 5.0 eq. HOAt (bei den *N*-methylierten Nucleoaminosäuren wurden 4.5 eq. PyCloP und PyAOP verwendet) zu dem Harz gegeben und in NMP gelöst. Nach 3 min wurden 12 eq. DIPEA zugegeben und die Reaktionsmischung für die jeweils angegebene Zeit rotiert.

F1: Waschen:

Die überschüssigen Kupplungsreagenzien wurden nach der Kupplung vom Harz gewaschen. Dazu wurde mit NMP (5×1 mL), DCM/NMP (1:1, 5×1 mL), Piperidin/NMP (1:9, 3×1 mL) und mit DCM/NMP (1:1, 5×1 mL) gewaschen.

G1: Cappen:

Um die Bildung unerwünschter Peptidsequenzen zu vermeiden, wurden mögliche freie Aminofunktionen des harzgebundenen Peptides mit einer Lösung aus Ac_2O /DIPEA/NMP (1:1:8, 2×5 min, 1 mL) acetyliert.

H1: Waschen:

Das Harz wurde mit DCM/NMP (1:1, 5×1 mL), mit Piperidin/NMP (1:9, 3×1 mL) und mit DCM/NMP (1:1, 5×1 mL) gewaschen.

Die Schritte B1 bis H1 wurden unter Verwendung der jeweiligen Nucleoaminosäuren bis zum Ende der gewünschten Sequenz wiederholt. Nach der letzten Kupplung wurde das Cappen (G1) ausgelassen. Stattdessen wurde das Harz mit DCM/NMP (1:1, 5 × 1 mL), DCM (5 × 1 mL) und Methanol (5 × 1 mL) gewaschen. Nachdem das Harz im Vakuum über KOH über Nacht getrocknet wurde, wurde das gewünschte Peptid mit TFMSA/*m*-Cresol/TFA (1:1:8, 2 mL, 120 min) vom Harz abgespalten. Das erhaltene Filtrat wurde evaporiert und der Rückstand mit gekühltem *tert*-Butylmethylether ((±)-Ether) präzipitiert. Der so erhaltene Feststoff wurde zentrifugiert und der (±)-Ether abpipettiert. Zur Reinigung wurde dieser Vorgang zwei bis drei Mal wiederholt und der erhaltene Feststoff aus Wasser lyophilisiert.

2.1.3.2AAV3.2: Kupplungsprotokoll beim Einsatz von Aminosäuren mit Fehlstellungen:

Eine Abweichung von dem angegebenen Protokoll wurde beim Verwenden von Aminosäuren als Fehlstellen ab dem Punkt D1 notwendig, da es verstärkt zur Bildung von Nebenprodukten kam. Es wurde nicht mehr entstapelt, sondern nur neutralisiert. Es wurden folgende Veränderungen am Protokoll vorgenommen:

D2: Neutralisieren:

Es wurde zum Neutralisieren TEA (2 × 1 mL, 2 × 5 min) verwendet.

E2: Waschen:

Das Harz wurde mit DCM/NMP (1:1, 5 × 1 mL), mit Piperidin/NMP (1:9, 3 × 1 mL) und mit DCM/NMP (1:1, 5 × 1 mL) gewaschen.

F2: Kuppeln:

Es wurden 5.0 eq. der jeweiligen Boc-geschützten Aminosäure mit 4.5 eq. HCTU und 5.0 eq. Cl-HOBt zu dem Harz gegeben und in NMP

gelöst. Nach 3 min wurden 12 eq. DIPEA zugegeben und die Reaktionsmischung für die jeweils angegebene Zeit rotiert.

2.1.3.3AAV3.3: Manuelle Synthese des Peptides mittels Fmoc-Festphasen-strategie^[66 a]

Die Peptide **72**, **73** und das IL-8-Analoga **76** wurden mittels Festphasensynthese (SPPS) dargestellt. Der Alanyl-PNA Teil wurde nach der oben beschriebenen Boc - Strategie **AV3.1** und der Peptid Teil nach dem nachfolgenden Synthesezyklus an Alanyl-PNA-*N*-Boc-D-Lys(Z)-MBHA-Harz oder Alanyl-PNA-*N*-Boc-L-Lys(Z)-MBHA-Harz (Belegungsdichte $n = 0.43-0.66$ mmol/g) und an Alanyl-PNA-*N*-Boc-L-Ser(Bzl)-PAM-Harz (Bzl = Benzyl-) (Belegungsdichte $n = 0.44$ mmol/g) aufgebaut. Die Festphasensynthese fand in einer kleinen Säule statt, welche zur Reaktion langsam rotiert wurde.

A3: Quellen:

Das Harz wurde 3 h in DCM/NMP (1:1) quellen gelassen.

B3: Entschützen:

Das harzgebundene Peptid wurde mit einer Lösung von 20 % Piperidin in NMP (1 × 5 min, 1 × 15 min, 1 mL) bei RT rotiert.

C3: Waschen:

Anschließend wurde das Harz mit NMP (5 × 1 mL) und DCM/NMP (1:1, 5 × 1 mL) gespült.

D3: Kuppeln:

Es wurden 5.0 eq. der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure mit 4.5 eq. HCTU und 5.0 eq. HOBt-Cl in NMP gelöst und 12 eq. DIPEA (20 min preaktiviert) zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung wurde für die jeweils angegebene Zeit rotiert. Die Kupplungen wurden,

wenn nicht anders vermerkt, als Doppelkupplung (2 × 50 min) durchgeführt.

E3: Waschen:

Die überschüssigen Kupplungsreagenzien wurden nach der Kupplung vom Harz gewaschen. Dazu wurde mit NMP (5 × 1 mL), DCM/NMP (1:1, 5 × 1 mL), mit Isopropylamin (2 × 1 mL) und mit DCM/NMP (1:1, 5 × 1 mL) gespült.

F3: Cappen:

Um die Bildung unerwünschter Peptidsequenzen zu vermeiden, wurden mögliche freie Aminofunktionen des harzgebundenen Peptides mit einer Lösung aus Ac₂O/DIPEA/NMP (1:1:8, 2 × 5 min, 2 mL) acetyliert.

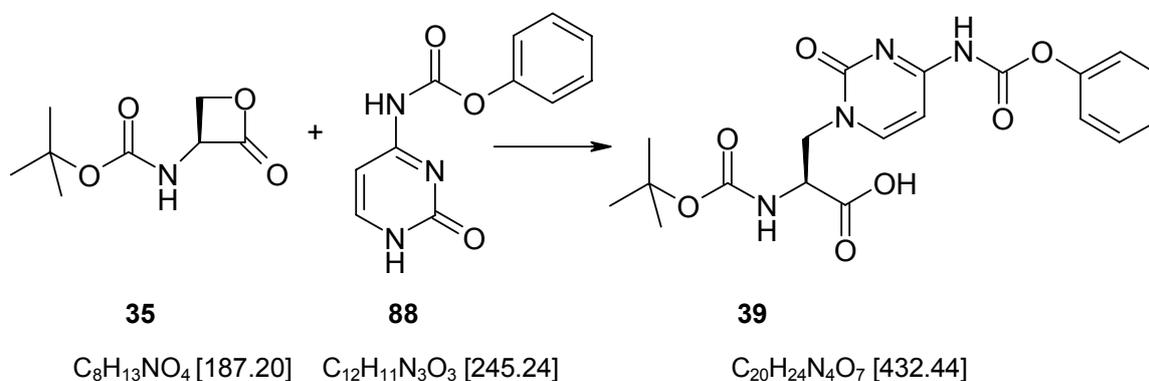
G3: Waschen:

Das Harz wurde mit NMP (5 × 1 mL), DCM/NMP (1:1, 5 × 1 mL), mit Isopropylamin (2 × 1 mL) und mit DCM/NMP (1:1, 5 × 1 mL) gewaschen.

Die Schritte B3 bis G3 wurden unter Verwendung der jeweiligen Aminosäure bis zum Ende der gewünschten Sequenz wiederholt. Nach der letzten Kupplung wurden die Schritte B3 und C3 wiederholt und das Harz zusätzlich mit DCM (5 × 1 mL) gewaschen. Nachdem das Harz im Vakuum über KOH über Nacht (12 h) getrocknet wurde, wurde es mit der jeweiligen Abspaltungslösung für 2 h versetzt. Das am MBHA-Harz gebundene Peptid wurde mit der Abspaltungslösung TFMSA/*m*-Cresol/TFA (1:1:8, 2 mL) und das am PAM-Harz gebundene Peptid mit EDT/Thioanisol/TFA/TFMSA (0.3, 0.6, 1:1:8, 2 mL) behandelt. Die erhaltenen Filtrate wurden evaporiert und der Rückstand mit gekühltem *tert*-Butylmethylether präzipitiert. Die Mischung wurde zentrifugiert, der *tert*-Butylmethylether dekantiert, dieser Vorgang wurde zwei bis drei Mal wiederholt. Der Feststoff wurde aus Wasser lyophilisiert.

2.2 Synthese von Alanyl-Nucleoaminosäuren^[47]

2.2.1 (S)-N-tert-Butoxycarbonyl- β -(N-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-alanin (**39**)



Zu einer Suspension von 4.56 g (18.6 mmol, 2.0 eq.) *N*-4-Benzyloxycarbonyl-1-cytosin (**88**) in 15 mL trockenem DMSO wurden unter Argonatmosphäre 2.08 mL (2.12 g, 13.9 mmol, 1.50 eq.) DBU zugetropft. Anschließend wurde innerhalb von 15 min eine Lösung aus 1.74 g (9.31 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-tert-Butoxycarbonyl-serinlacton (**35**) in 5.0 mL trockenem DMSO zugetropft und weitere 3 h gerührt. Die Reaktion wurde mittels Zugabe von 837 μ L (13.9 mmol, 1.5 eq.) Essigsäure beendet. Aus dem Reaktionsgemisch wurde das Produkt mittels FC an Kieselgel (10 cm, \varnothing 6 cm; Essigester/Methanol 9:1, Gradient 0.2-1 % Essigsäure pro 500 mL) isoliert. Es wurden 2.94 g (6.73 mmol, 74 %, **39**, ee = 98%) des Produkts als gelber Feststoff erhalten.

DC (Essigester/Methanol/Wasser/Essigsäure (10:1:1:0.5, NaCl ges.) R_f = 0.31.

¹H-NMR (300 MHz, [D_6]DMSO)

δ = 1.27 (s, 9 H, *t*-Bu), 3.39-3.47 (m, 1 H, β -H), 4.00-4.13 (m, 1 H, α -H), 4.45 (dd, 1 H, J = 12.7, 3.5 Hz, β -H), 5.17 (s, 2 H, CH_2 Ph), 6.21 (s, 1 H, *NHBoc*), 6.86 (d, 1 H, J = 7.2 Hz, H-5), 7.34-7.41 (m, 5 H, Ph), 7.86 (d, J = 7.2 Hz, 1 H, H-6), 10.6 (br. s, 1 H, *COOH*) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, [D₆]DMSO)

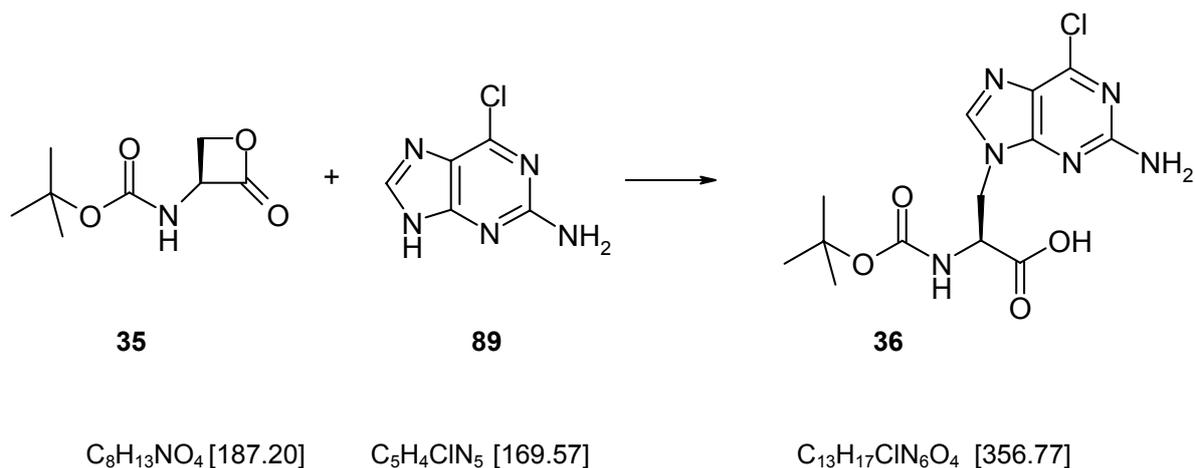
δ = 27.9 (C(CH₃)₃), 52.5 (β -C), 53.2 (α -C), 66.2 (CH₂Ph), 77.6 (C(CH₃)₃), 93.1 (C-5), 127.7 (*m*-C, Ph), 127.9 (*p*-C, Ph), 128.3 (*o*-C, Ph), 135.9 (C-4), 150.1 (C-6), 153.2 (C-2), 154.9 (CONH), 162.4 (CONH), 171.2 (COOH) ppm.

HPLC für (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-alanin (**39**) (**AAV1**; Gradient 30% auf 60% B' (Acetonitril + 0.1 % TFA) in 30 min, λ = 254 nm) t_R = 21.9 min.

2.2.2 (*R*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-alanin (**39a**)

Die Synthesevorschrift und die analytische Daten entsprechen mit Ausnahme der HPLC-Analytik jenen des (*S*)-Enantiomers.

2.2.3 (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(2-amino-6-chlor-9-puriny)-alanin (**36**)^[47]



Zu einer Suspension bestehend aus 2.05 g (12.1 mmol, 1.3 eq.) 2-Amino-6-chlorpurin (**89**) in 5 mL Dimethylsulfoxid wurden innerhalb von 15 min 1.53 mL (1.56 g, 10.2 mmol, 1.1 eq.) DBU zugetropft und 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurde innerhalb weiterer 15 min eine Lösung bestehend aus 1.74 g (9.31 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-serinlacton (**35**) in 5 mL

Dimethylsulfoxid zugegeben. Es wurde 3 h bei RT gerührt und die Reaktion durch Zugabe von 584 μL (0.52 g, 8.74 mmol, 1.1 eq.) Essigsäure beendet. Die Reinigung erfolgte mittels FC an Kieselgel (12 cm, \varnothing 6 cm, Essigester/Methanol (8:2), Gradient 0.2-1 % Essigsäure pro 1000 mL). Es wurden 1.73 g (4.83 mmol, 52 %, **36**) des Produktes als weißer Feststoff isoliert.

DC (Chloroform/Methanol/Wasser/Essigsäure 70:30:3:0.3) $R_f = 0.24$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)

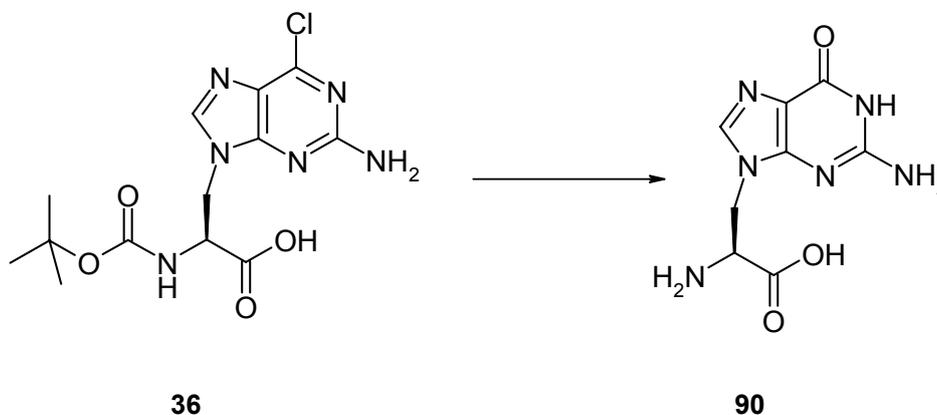
$\delta = 1.07$ (s, 1.5 H, *t*-Bu), 1.26 (s, 7.5 H, *t*-Bu), 4.15 (dd, $J = 10$, $J = 14$ Hz, 1 H, β -H), 4.30-4.41 (m, 1 H, α -H), 4.39-4.46 (m, 1 H; β -H), 6.85 (s, 2 H, NH_2), 6.94 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, NHBoc), 7.92 (s, 1 H, H-8) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)

$\delta = 27.9$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 44.3 (β -C), 53.2 (α -C), 78.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), 123.3 (C-5), 143.5 (C-8), 149.1 (C-6), 154.1 (C-2), 155.0 (CONH), 159.6 (C-4), 171.1 (COOH) ppm.

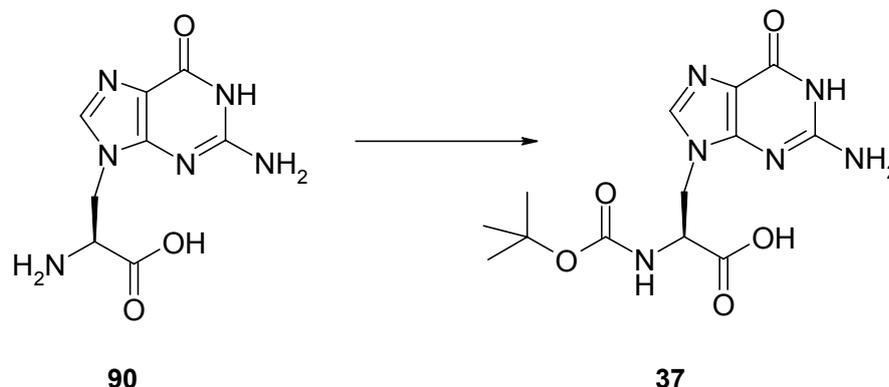
2.2.4 (R)-N-tert-Butoxycarbonyl- β -(2-amino-6-chlor-9-puriny)-alanin (36a)

Die Synthesevorschrift und die analytischen Daten entsprechen jenen der (S)-Enantiomeren.

2.2.5 β -(9-Guaninyl)-alanin (**90**) $C_{13}H_{17}ClN_6O_4$ [356.77] $C_8H_{10}N_6O_3$ [238.21]

Eine Lösung aus 2.68 g (7.51 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(2-amino-6-chlor-9-purinyl)-alanin (**36**) und 33 mL TFA/Wasser 3:1 wurde 5 d bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung unter Zugabe von Toluol bis zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt.

DC (*iso*-Propanol/Wasser/Essigsäure 5:2:1, NaCl ges.): $R_f = 0.37$.

2.2.6 (S)-N-tert-Butoxycarbonyl- β -(9-guaninyl)-alanin (37) $C_8H_{10}N_6O_3$ [238.24] $C_{13}H_{18}N_6O_5$ [338.33]

Es wurden 1.79 g (7.51 mmol, 1.0 eq.) des Rohprodukts (S)-N-tert-Butoxycarbonyl- β -(9-guaninyl)-alanin (91) in 48 mL Wasser/1N NaOH/Dioxan (1:1:2) suspendiert und mit 1N NaOH ein pH-Wert von 9–9.5 eingestellt. Anschließend wurde zur Suspension bei 0 °C 1.8 g (8.26 mmol, 1.1 eq.) N-Di-tert-Butyldicarboxylat gegeben. Es wurde 45 min bei 0 °C gerührt und weitere 60 h bei RT. Das Gemisch wurde mit 1N HCl auf einen pH-Wert von 6.0–6.5 gebracht und bis zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels FC an RP-Kieselgel (10 cm, Ø 2 cm, Wasser, Gradient 8 % Methanol pro 500 mL) gereinigt. Es wurden 2.34 g (6.91 mmol, 92 %, **37**, ee = 91 %) des Produktes als Feststoff isoliert.

DC (*iso*-Propanol/Wasser/Essigsäure 5:2:1:NaCl ges.) $R_f = 0.53$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[D_6]$ DMSO)

$\delta = 1.07$ (s, 9 H, *t*-Bu Rotamer), 3.84-4.03 (m, 2 H, β -H, α -H), 4.43 (d, $J = 10.9$ Hz, 1 H, β -H), 6.09-6.22 (m, 1 H, NHBoc), 6.75 (s, 2 H, NH_2), 7.50 (s, 1 H, H-8), 11.1 (br. s, 1 H, NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $[D_6]$ DMSO)

$\delta = 28.0$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 45.2 ($\beta\text{-C}$), 55.3 ($\alpha\text{-C}$), 77.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), 116.1 (C-5), 137.6 (C-8), 151.5 (C-6), 153.6 (C-2), 154.8 (CONH), 157.1 (C-4), 172.1 (COOH) ppm.

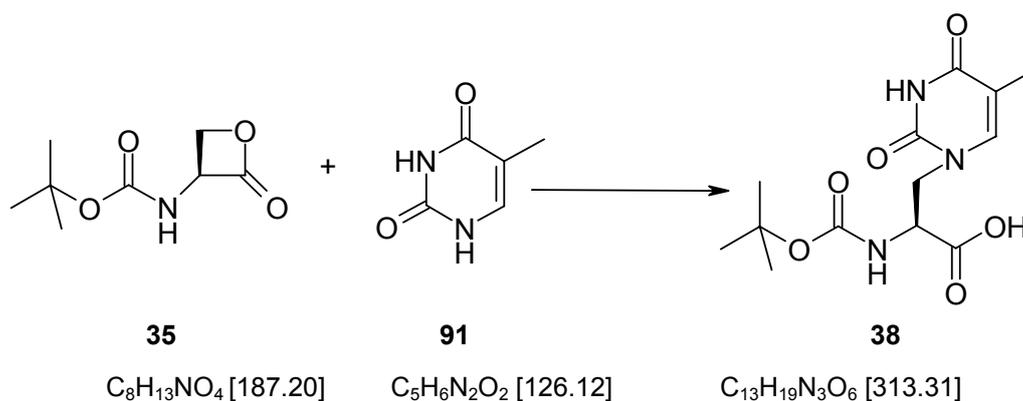
HPLC für (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(9-guaninyl)-alanin (**37**) (**AAV1**; Gradient 5% auf 20% B' (Acetonitril + 0.1 %TFA) in 30 min, $\lambda = 254$ nm) $t_R = 26.1$ min.

2.2.7 (*R*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(9-guaninyl)-alanin (**37a**)

Die Synthesevorschrift und die analytische Daten entsprechen mit Ausnahme der HPLC-Analytik jenen der (*S*)-Enantiomeren. Das Produkt wies eine Enantiomerenreinheit von $ee = 97\%$ auf.

HPLC für (*R*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl- β -(9-guaninyl)-alanin (**37a**) (**AAV1**; Gradient 5% auf 20% Acetonitril in 30 min, $\lambda = 254$ nm) $t_R = 29.3$ min.

2.2.8 (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl- β -(1-thyminyl)-L-alanin (**38**)



Unter Argon wurden 1.35 g (10.6 mmol, 2.1 eq.) Thymin **91** in 5 mL absolutem Dimethylsulfoxid suspendiert. Es wurden 1.93 mL (8.01 mmol, 1.5 eq.) DBU zugegeben und 10 min gerührt. Anschließend wurde innerhalb von 35 min

eine Lösung aus 1.00 g (5.34 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-serinlacton (**35**) in 8 mL Dimethylsulfoxid zu der Vorlage getropft, wobei Temperatur auf 35 °C anstieg. Es wurde 12 h bei RT gerührt und die Reaktion durch 460 μ L (8.01 mmol, 1.5 eq.) Essigsäure beendet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt mittels FC an Kieselgel (10 cm, \varnothing 4 cm, Essigester/Methanol 8:2, Gradient: Essigsäure 0-0.5 % pro 1000 mL) gereinigt. Es wurden 936 mg (2.93 mmol, 56 %) (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl- β -(1-thyminyl)-L-alanin (**38**) isoliert.

DC (Essigester/Methanol 8:2, 254 nm) $R_f = 0.32$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, [D_6]DMSO)

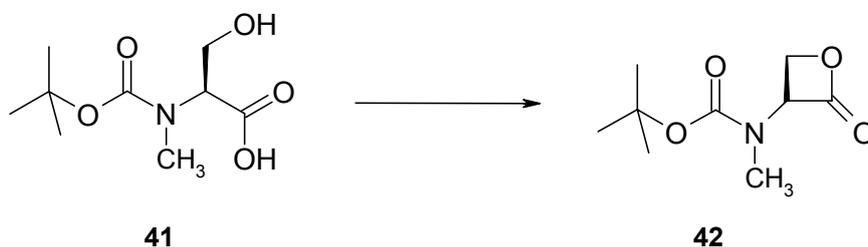
$\delta = 1.24$ (s, 9 H, *t*-Bu), 1.72 (d, $J = 0.9$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{-C}$), 3.43-3.51 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 4.17-4.23 (m, 1 H, $\beta\text{-H}$), 4.31-4.39 (m, 1 H, $\alpha\text{-H}$), 6.71 (br. s, 1 H, *NHBoc*), 7.32 (d, $J = 0.8$ Hz, 1 H, H-6), 11.3 (s, 1 H, *NH*-3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, [D_6]DMSO)

$\delta = 12.0$ (C CH_3), 27.6 (C(CH_3) $_3$), 48.7 ($\beta\text{-C}$), 51.4 ($\alpha\text{-C}$), 78.8 (C(CH_3) $_3$), 107.7 (C-5), 141.9 (C-6), 150.0 (C-2), 155.2 (CONH), 164.2 (C-2), 171.2 (COOH) ppm.

2.3 Synthese von *N*-methylierten Alanyl-Nucleoaminosäuren

2.3.1 (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-L-serinlacton (**42**)



$C_9H_{17}NO_5$ [219.24]

$C_9H_{14}NO_4$ [201.22]

Unter einer Argonatmosphäre wurden 6.04 g (23.1 mmol, 1.0 eq.) Triphenylphosphin in 100 mL absolutem Acetonitril gelöst und auf $-40\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. In der Kälte wurden innerhalb von 15 min 3.58 mL (22.1 mmol, 1.0 eq.) DEAD zugetropft und 15 min gerührt. Anschließend wurden 6.04 g (22.8 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-L-serin (**41**) in 50 mL absolutem Acetonitril gelöst und langsam zur Reaktionsmischung getropft. Die Reaktion wurde 2 h bei $-35\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und weitere 5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum bei $45\text{ }^\circ\text{C}$ entfernt, das Rohprodukt in 50 mL Hexan/Essigester (3:1) aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Die entstandene Suspension wurde mittels FC an Kieselgel (20 cm, \varnothing 7 cm, Hexan/Essigester 3:1) gereinigt. Nach Trocknung wurden 3.37 g (16.75 mmol, 73.5 %, **42**) des gewünschten Produkts isoliert.

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -44$ ($c = 0.75$ in Methanol).

DC (Hexan/Essigester 3:1, 254 nm) $R_f = 0.37$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[D_6]\text{DMSO}$)

$\delta = 1.47$ (s, 9 H, t-Bu), 2.98 (s, 3 H, CH_3), 4.43 (d, 2 H, CH_2), 5.00–5.50 (m, 1 H, CH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $[D_6]$ DMSO)

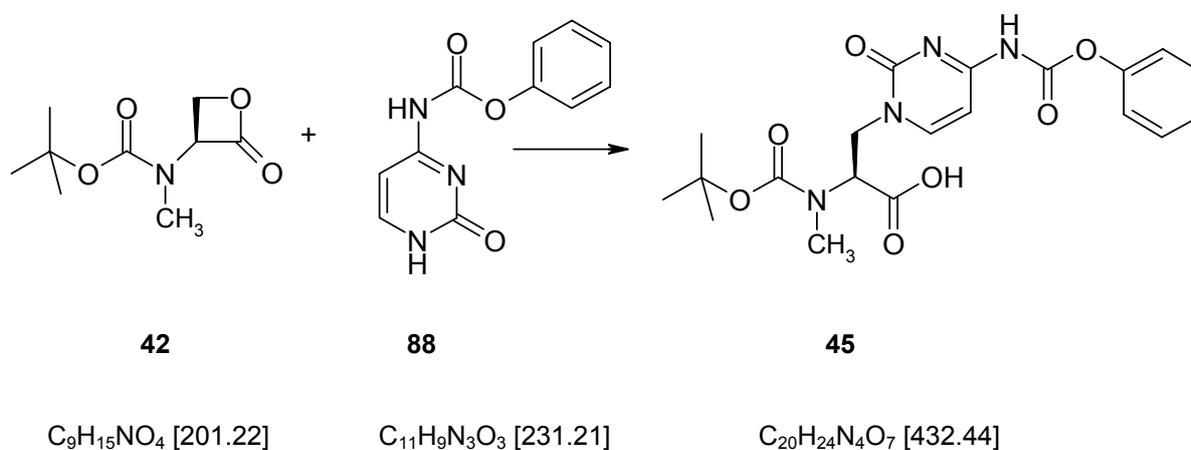
$\delta = 27.8$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.3 (NCH_3), 58.7 (C-3), 64.4 (C-2), 76.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 77.0 (CO), 77.2 (CO-Lacton) ppm.

HPLC für (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-L-serinlacton (**42**) (**AAV1**; Gradient 10% auf 18% Acetonitril in 30 min, $\lambda = 254$ nm) $t_R = 22.1$ min.

IR (Film) $\tilde{\nu} = 2980, 2935, 1833, 1762, 1697, 1482, 1455, 1401, 1370, 1352, 1329, 1302, 1254, 1111, 1051, 968, 941$ cm^{-1} .

MS (HRMS) m/z 224.08938 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet für 224.08933 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3.2 (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl- β -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-alanin (**45**)



Bei RT wurde zu einer Suspension von 753 mg (2.43 mmol, 1.0 eq.) *N*-4-Benzyloxycarbonyl-1-cytosin (**88**) in 3 mL absolutem Dimethylsulfoxid langsam 332 μL (2.20 mmol, 1.5 eq.) DBU getropft und die Reaktionsmischung für 15 min gerührt. Anschließend wurden 293 mg (1.53 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-L-serinlacton (**42**), gelöst in 2 mL absolutem Dimethylsulfoxid, zur Reaktion getropft und 3 h gerührt. Die Reaktion wurde durch 127 μL (2.20 mmol, 1.5 eq.) Essigsäure beendet. Das Lösungsmittel

wurde im Hochvakuum entfernt, der Rückstand in 5 mL Methanol suspendiert und zentrifugiert. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels FC an Kieselgel (20 cm, Ø 3 cm, /Methanol 9:1, Gradient: Essigsäure 0.2-1.0 % auf 1000 mL) gereinigt. Das Produkt **45** wurde zu 409.2 mg (0.95 mmol, 63 %, ee = 99 %.) erhalten

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -143$ (c = 0.5 g/100 mL in DMSO).

DC (Essigester/Methanol/Essigsäure 9:1:0.1, $\lambda = 254$ nm) $R_f = 0.53$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[D_6]$ DMSO)

$\delta = 1.29$ (s, 9 H, *t*-Bu), 2.69 (NCH₃), 4.06-4.13 (m, 1 H, β -H), 4.35-4.48 (m, 1 H, α -H), 4.76-4.82 (m, 1 H, β -H), 5.17 (s, 2 H, CH₂Ph), 6.94 (d, 1 H, $J = 7.2$ Hz, H-5), 7.38-7.40 (m, 5 H, Ph), 7.86 (d, 1 H, $J = 7.3$ Hz, H-6) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $[D_6]$ DMSO)

$\delta = 27.5$ (C(CH₃)₃), 27.8 (NCH₃), 57.0 (β -C), 57.7 (α -C), 66.3 (CH₂Ph), 78.6 (C(CH₃)₃), 93.6 (C-5), 127.6 (*m*-C, Ph), 127.7 (*p*-C, Ph), 127.9 (*o*-C, Ph), 135.8 (C-4), 150.0 (C-6), 154.3 (C-2), 155.2 (CONH), 162.7 (CONH), 164.9 (COOH) ppm.

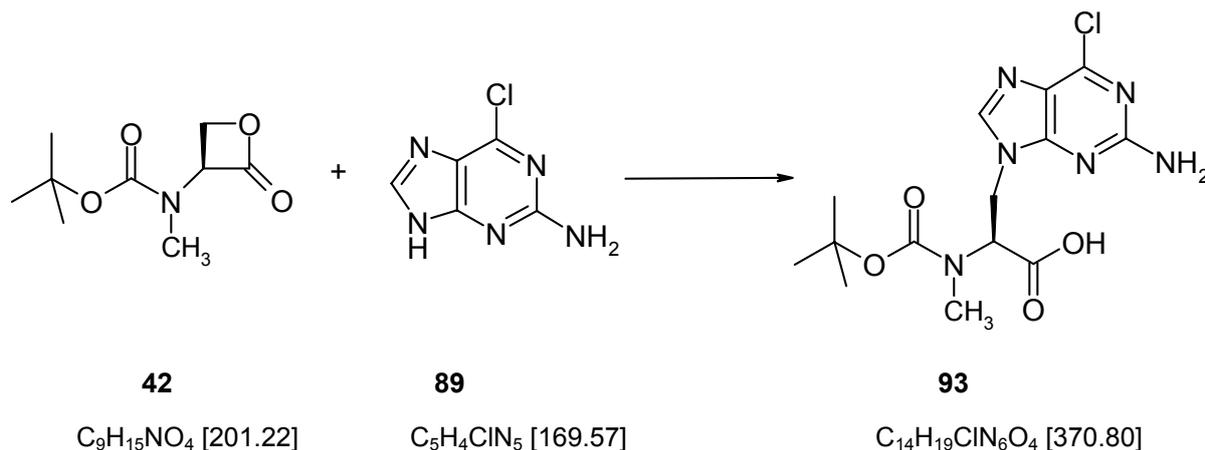
HPLC für (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl- β -(*N*-4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl)-alanin (**45**) (**AAV1**; Gradient 20 % auf 48 % B' (Acetonitril + 0.1 % TFA) in 30 min, $\lambda = 254$ nm) $t_R = 14.3$ min.

IR (KBr) $\tilde{\nu} = 3429, 2977, 1686, 1560, 1499, 1369, 1322, 1214, 1153, 1064, 788, 698$ cm⁻¹.

UV/VIS (Methanol) $\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 201, 240, 297$ nm.

MS (HRMS) m/z 447.18760 $[M+H]^+$, 883.36818 $[2M+H]^+$ berechnet für 447.18743 $[M+H]^+$.

2.3.3 (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl- β -(2-amino-6-chlor-9-puriny)-alanin (**93**)



Es wurden 688 mg (4.11 mmol, 1.3 eq.) 2-Amino-6-chlorpurin (**89**) in 2 mL absolutem Dimethylsulfoxid suspendiert und unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wurde bei RT 513 μ L (3.44 mmol, 1.1 eq.) DBU langsam zutropft und die Reaktionsmischung 15 min weitergerührt. Eine Lösung aus 628 mg (3.10 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-L-serinlacton (**42**) in 2 mL absolutem Dimethylsulfoxid wurde zur Reaktion getropft und 4 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 196 μ L (3.42 mmol, 1.1 eq.) Essigsäure beendet. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum aus dem System entfernt. Der ölige Rückstand wurde mittels FC an Kieselgel (20 cm, \varnothing 3 cm, Essigester/Methanol 8:2, Gradient: Essigsäure 0.2-1.0 % auf 1000 mL) gereinigt. Das Produkt **93** wurde zu 77 % (2.39 mmol, 889 mg) isoliert.

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -109.3$ ($c = 0.3$ g/100 mL in DMSO).

DC (Essigester/Methanol/Essigsäure 8:2:0.1, $\lambda = 254$ nm): $R_f = 0.52$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO)

δ = 1.06 (s, 7.5 H, *t*-Bu), 1.20 (s, 1.5 H, *t*-Bu), 2.70 (s, 2.5 H, N-CH₃) 2.74 (s, 0.5 H, N-CH₃), 4.45-4.51 (m, 1 H, β -H), 4.80-4.89 (m, 2 H, α -H, β -H), 6.85 (s, 2 H, NH₂), 8.01 (s, 1 H, H-8) ppm.

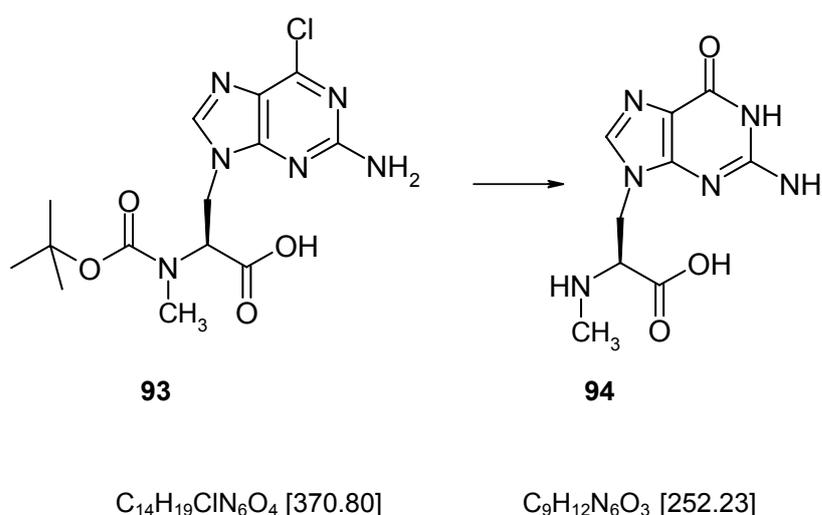
¹³C-NMR (75 MHz, [D₆]DMSO)

δ = 27.3 (C(CH₃)₃), 39.9 (β -C), 41.6 (NCH₃), 57.4 (α -C), 78.8 (C(CH₃)), 123.2 (C-5), 142.3 (C-8), 149.5 (C-6), 154.2 (C-2), 155.0 (CONH), 160.0 (C-4), 170.2 (COOH) ppm.

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3347, 2977, 1693, 1616, 1565, 1520, 1469, 1393, 1368, 1155, 916, 785, 643 cm⁻¹.

UV/VIS (Methanol) λ_{\max} = 201, 222, 310 nm.

MS (HRMS) *m/z* 371.12309 [M+H]⁺ berechnet für 371.12291 [M+H]⁺.

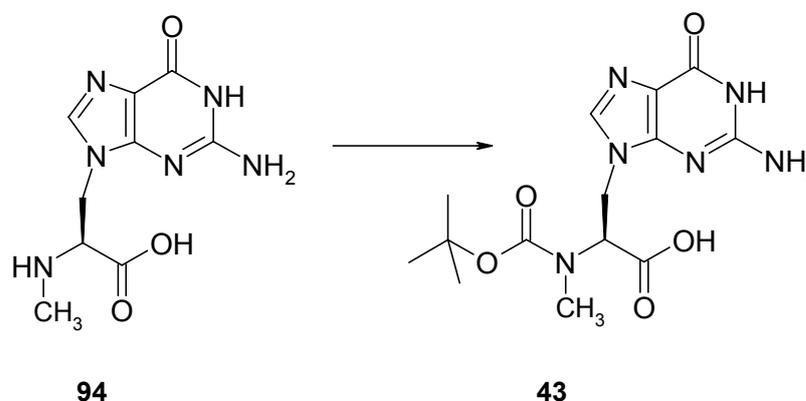
2.3.4 *N*-Methyl- β -(9-guaninyl)-alanin (94)

Eine Lösung aus 869 mg (2.34 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl- β -(2-amino-6-chlor-9-puriny)-alanin (**93**) und 12 mL TFA/H₂O 3:1 wurde über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung unter Zugabe von Toluol bis zur Trockene eingeeengt. Das Rohprodukt wurde zweimal in 10 mL 1N HCl aufgenommen und wiederholt eingeeengt. Der Feststoff wurde ohne weitere Aufarbeitung im Folgeschritt eingesetzt.

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -10.8$ ($c = 0.5$ g/100 mL in DMSO).

UV/VIS (Methanol) $\lambda_{\max} = 202, 554$ nm.

2.3.5 (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl- β -(9-guaninyl)-alanin (**43**)



C₉H₁₂N₆O₃ [252.23]

C₁₄H₂₀N₆O₅ [352.35]

Bei RT wurde das Rohprodukt **94** in 10 mL Wasser/NaOH/Dioxan 1:1:2 suspendiert. Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH auf einen Wert von pH = 9.5 eingestellt. Die Suspension wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt, mit 563 mg (2.61 mmol, 1.1 eq.) *N*-Di-*tert*-Butyldicarboxylat versetzt. Die Lösung wurde auf RT erwärmt Es wurde über 2 h kontrolliert und gegebenenfalls erneut auf 9.5 eingestellt. Nachdem die Lösung über Nacht gerührt wurde, wurden weitere 60.0 mg (0.27 mmol, 0.1 eq.) *N*-Di-*tert*-Butyldicarboxylat zugegeben.

Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH auf 9.5 eingestellt und erneut kontrolliert. Anschließend wurde mit 1N HCl auf einen pH-Wert von pH = 6 eingestellt und das Lösungsmittelgemisch im Hochvakuum entfernt. Der Feststoff wurde anschließend mittels FC an RP-Kieselgel (20 cm, Ø 3 cm, H₂O, Gradient 8 % Methanol pro 500 mL) gereinigt. Die Ausbeute betrug 79 % (522.6 mg, 1.48 mmol, **43**, ee = 93 %).

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -73.4$ (c = 0.3 g/100 mL in DMSO).

DC (Essigester/Methanol 8:2, Gradient: Essigsäure 0.2-1.0 % auf 1000 mL, 254 nm) $R_f = 0.69$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO)

$\delta = 1.11$ (s, 9 H, *t*-Bu-Rotamer), 2.71 (s, 3 H, CH₃-N), 4.95 (m, 1 H, β -H), 4.42 (dd, $J_1 = -14.5$, $J_2 = -3.5$, 1 H, β -H), 4.59 (dd, $J_1 = -11.3$, $J_2 = -3.9$, 1 H, α -H), 6.47 (br. s, 1 H, NHBoc), 7.38 (s, 1 H, H-6) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, [D₆]DMSO)

$\delta = 27.9$ (C(CH₃)₃), 27.5 (CCH₃), 42.7 (β -C), 60,4 (α -C), 77,8 (C(CH₃)₃), 116.5 (C-5), 137.2 (C-6), 151.2 (C-2), 154.2 (CONH), 155.2 (C-2), 171.2 (COOH) ppm.

HPLC für (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl- β -(9-guaninyl)-alanin (**43**)

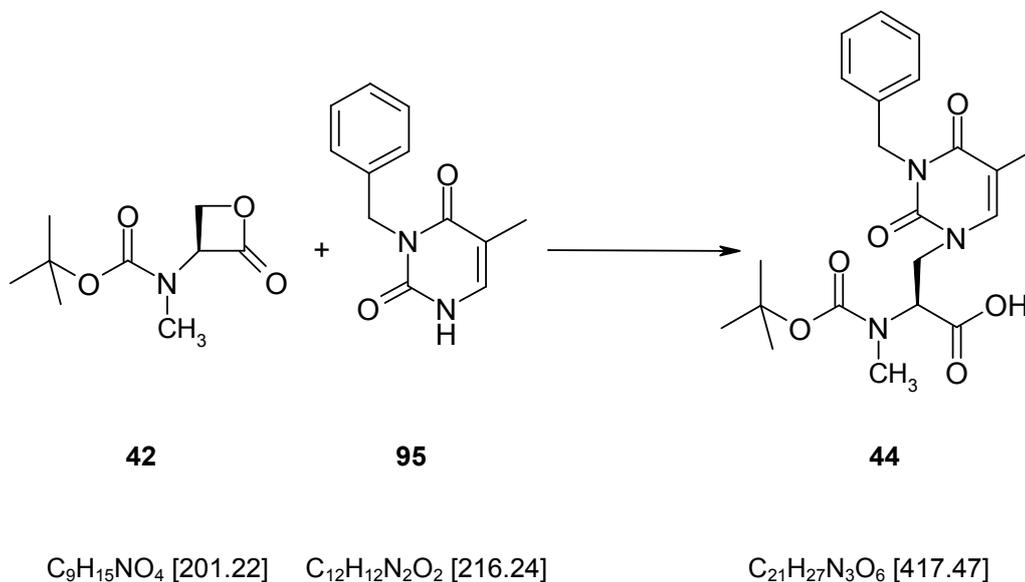
(**AAV1**; Gradient 0 % auf 15 % B' (Acetonitril + 0.1 %TFA) in 30 min, $\lambda = 280$ nm) $t_R = 6.3$ min.

IR (KBr) $\tilde{\nu} = 3430, 1684, 1541, 1483, 1444, 1387, 1252, 1161, 961, 861, 781, 690, 643$ cm⁻¹.

UV/VIS (Methanol) $\lambda_{\max} = 255$ nm.

MS (ESI) *m/z* (%) 353.1 [*M*+*H*]⁺ (100), 704.8 [*2M*+*H*]⁺(20).

2.3.6 (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-β-(1-thyminyl)-*L*-alanin (**44**)



Unter Argon wurden 215 mg (1.01 mmol, 1.0 eq.) *N*-3-Benzylcarbonyl-1-thymin (**95**) in 3 mL Dimethylsulfoxid suspendiert. Zur Suspension wurden 111 μ L (0.78 mmol, 1.5 eq.) DBU zugegeben und 15 min bei RT gerührt. Innerhalb weiterer 15 min wurden zur Reaktionsmischung 100 mg (0.51 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-serinlacton (**42**) gelöst in 1 mL Dimethylsulfoxid getropft. Die Reaktion wurde bei RT 3 h gerührt. Anschließend wurde mit 43.0 μ L (0.82 mmol, 1.1 eq.) Essigsäure die Reaktion beendet und das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels FC an Kieselgel (Essigester/Methanol 8:2, Gradient: 0.1 %-0.3 % Essigsäure pro 1000 mL). Die Ausbeute des Produkts **44** betrug 31 % (0.12 mmol, 50.1 mg, ee = 98 %).

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -92$ (c = 0.5 g/100 mL in DMSO).

DC (Essigester/Methanol/Essigsäure 8:2:0.05, $\lambda = 254$ nm) $R_f = 0.69$.

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO)

δ = 1.38 (s, 9 H, *t*-Bu), 1.40 (s, 3 H, CH₃-C), 1.82 (br. s, 2 H, 3-*N*CH₂), 2.77 (br. s, 3 H, N-CH₃), 3.86-3.91 (m, 1 H, β -H), 4.14-4.24 (m, 1 H, β -H), 4.72-4.83 (m, 1 H, α -H), 7.51-7.63 (m, 1 H,), 7.72-7.77 (m, 5 H, *Ph*) 7.93-7.06 (m, 1 H, H-6) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, [D₆]DMSO)

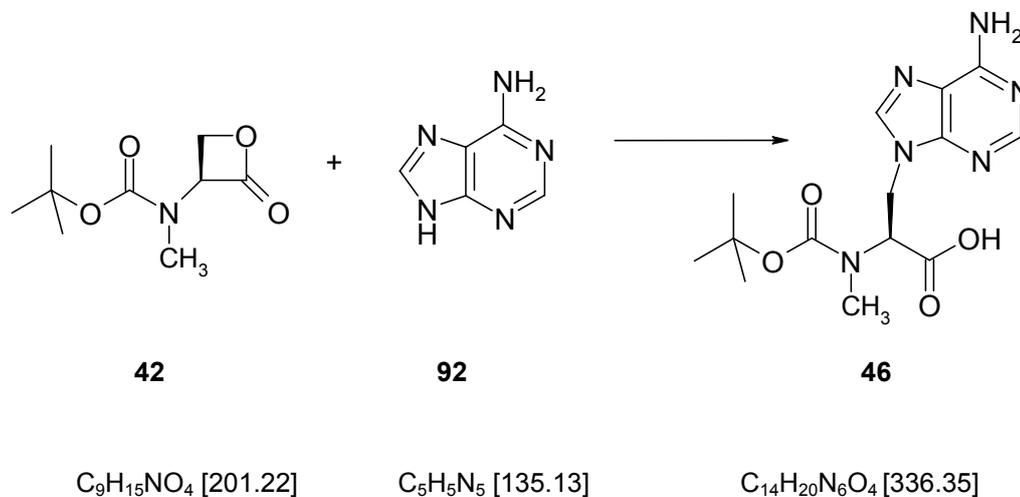
δ = 11.0 (CCH₃), 27.8 (C(CH₃)₃), 30.8 (N-CH₃) 40.4 (β -C), 78,5 (α -C), 78.8 (C(CH₃)₃), 107.7 (s, C-5), 127.7 (C-*Ph*), 127.8 (C-*Ph*), 127.9 (C-6), 128.8 (C-2), 131.8 (*Ph*, q-C), 134.6 (CONH), 142.0 (C-2), 171.2 (COOH) ppm.

HPLC für (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl- β -(1-thyminy)-L-alanin (**44**) (**AAV1**; Gradient 0 % auf 15 % B' (Acetonitril + 0.1 % TFA) in 30 min, λ = 280 nm) t_R = 6.8 min.

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ = 2978, 1749, 1699, 1659, 1442, 1387, 1321, 1354, 1157, 988, 763 cm⁻¹.

UV/VIS (Methanol) λ_{max} = 202, 272 nm.

MS (ESI) *m/z* (%) 350.0 [M+Na] (86), 326.1 [M-H]⁻, 653.0 [2M-H]⁻ (98).

2.3.7 (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl- β -(9-adeninyl)-L-alanin (**46**)

Unter Argon wurden 80 mg (0.43 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-L-serinlacton (**42**) 81 mg (0.67 mmol, 1.5 eq.) Adenin und 55 mg (0.43 mmol, 1.0 eq.) K_2CO_3 in 2 mL absolutem Dimethylsulfoxid suspendiert und bei 10 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 45.6 μ L (0.85 mmol, 2.0 eq.) Essigsäure abgebrochen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels FC an Kieselgel (Essigester/Methanol/Wasser 8:1.4:0.6, Gradient: 0.2-0.5 % Essigsäure auf 1000 mL). Es wurden 48.5 mg (0.14 mmol, 36 %, **46**) erhalten.

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -34$ ($c = 0.4$ g/100 mL in DMSO).

DC (Essigester/Methanol 8:2, $\lambda = 254$ nm) $R_f = 0.35$.

1H -NMR (300 MHz, $[D_6]DMSO$)

$\delta = 1.72$ (s, 9 H, *t*-Bu) 2.71 (s, 3 H, N- CH_3), 3.80-3.86 (m, 1 H, β -H), 4.05-4.10 (m, 1 H, β -H), 4.32-4.36 (m, 1 H, α -H), 7.01 (s, 2 H, NH_2), 7.94 (s, 1 H, H-8), 8.11 (s, 1 H, H-2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)

$\delta = 27.1$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.7 (N-CH_3), 40.0 ($\beta\text{-C}$), 60.1 ($\alpha\text{-C}$), 77.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 118.8 (C-5), 141.0 (C-6), 149.7 (C-4), 152.0 (CONH), 155.8 (C-6), 175.9 (COOH) ppm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3350, 1746, 1602, 1482, 1416, 1327, 1246, 1159, 1048, 765 \text{ cm}^{-1}$.

UV/VIS (Methanol) $\lambda_{\text{max}} = 204, 260 \text{ nm}$.

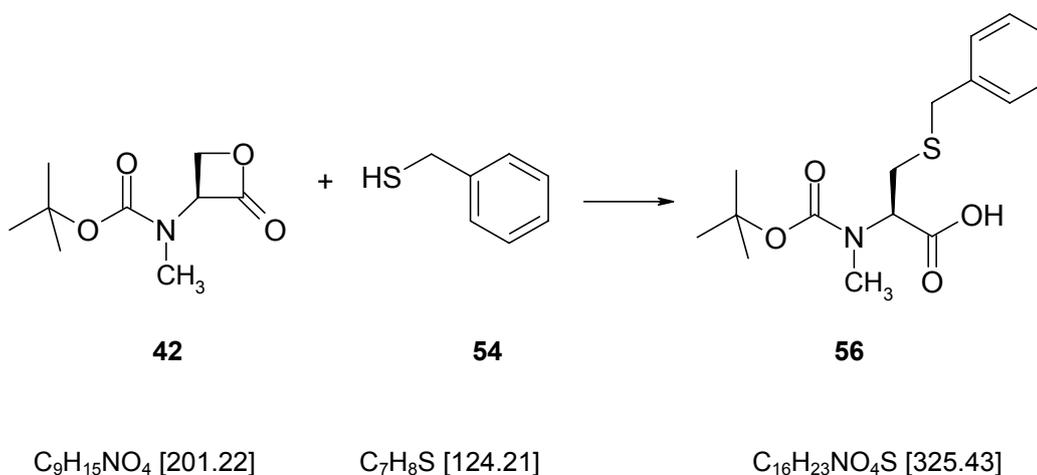
MS (ESI) m/z (%) 335.1 $[\text{M-H}]^-$ (100), 381.1 $[\text{M-H}+2\text{Na}]^+$ (100), 670.9 $[2\text{M-H}]^-$ (14), 739.1 $[2\text{M-2H}+3\text{Na}]^+$ (22), 693.2 $[2\text{M-2H}+\text{Na}]^-$ (34).

Enantiomerenreinheit mittels HPLC (siehe Punkt 2.1.1):

$t_{\text{R}} = 6.8 \text{ min}$ (Gradient: 0-15 % B' in 30 min, $\lambda = 280 \text{ nm}$), ee = 98 %.

2.4 Synthesen von geschützten *N*-methylierten Aminosäuren

2.4.1 (*S*)-*N*- α -*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-benzyl-cystein (**56**)



Unter Argon wurde eine Lösung aus 118 μL (1.01 mmol, 2.0 eq.) Benzylmercaptan (**54**) in 0.92 μL absolutem Dimethylsulfoxid vorgelegt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb von 15 min 112 μL (0.83 mmol, 1.5 eq.) DBU getropft und 15 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 100 mg (0.54 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-serinlacton (**42**) in 0.6 mL absolutem Dimethylsulfoxid zur Reaktionslösung getropft und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 43 μL (0.82 mmol, 1.5 eq.) Essigsäure beendet, das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der Feststoff mittels FC an Kieselgel (20 cm, \varnothing 2 cm; a. 200 mL Hexan: Essigester 2:1; b. 150 mL Essigester, c. 250 mL Essigester: Methanol 10:1 und d. Gradient 1 % Essigsäure) gereinigt. Das Produkt wurde in Diethylether gelöst und mit Pentan versetzt bis eine leichte Trübung entstand. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht auf $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, wobei ein weißer Niederschlag ausfiel. Das Lösungsmittel wurde dekantiert und das Produkt getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels FC an Kieselgel (Laufmittel: a. Hexan: Essigester 2:1 b. Essigester, c. Essigester/Methanol 10:1, d. Essigester/Methanol 10:1, Gradient: 0.1 % Essigsäure) gereinigt, es wurden 79 % (0.39 mmol, 128 mg) des gewünschten Produktes **56** erhalten.

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -68.0$ (c = 0.4 g/100 mL in DMSO).

DC (Essigester/Methanol 9:1, Gradient: 0.1 % Essigsäure, 254 nm) $R_f = 0.43$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO)

$\delta = 1.43$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.66 (s, 3 H, NCH_3), 2.93-2.99 (m, 1 H, $\alpha\text{-H}$), 3.74 (s, 2 H, NH_2), 4.31 (dd, $J_1 = 10.1$, $J_2 = 4.5$ Hz, 1 H, $\beta\text{-H}$), 4.58 (dd, $J_1 = 10.1$, $J_2 = 4.5$ Hz, 1 H, $\beta\text{-H}$), 7.31-7.34 (m, 5 H, *Ph*-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, [D₆]DMSO)

δ = 28.0 (C(CH₃)₃), 30.5 34.6 (β -C), 34.9 (β -C), (α -C), 57.4 (Benzyl-C), 59.2 (Benzyl-C), 78.6 (C(CH₃)₃), 126.7, 128.8, 138.3 (*Ph*), 138.4 (C_q-Ph), 154.7 (CON), 154.3 (CO), 155.6 (COOH) ppm.

HPLC für (*S*)-*N*- α -*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-methyl-benzyl-cystein (**56**)

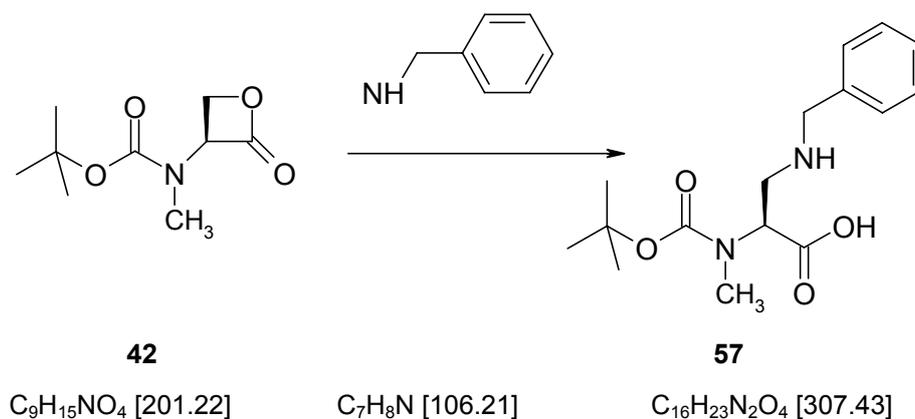
(**AAV1**; Gradient 0 % auf 15 % B' (Acetonitril + 0.1 % TFA) in 30 min, λ = 280 nm) t_R = 6.8 min.

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3433, 2976, 1688, 1602, 1481, 1453, 1391, 1367, 1325, 1251, 1163, 1071, 929, 702 cm⁻¹.

UV/VIS (Methanol) λ_{max} = 201 nm.

MS (ESI) m/z (%) 672 [2M+Na]⁺ (100), 348 [M+Na]⁺ (92), 648 [2M-Na]⁻ (78), 324 [M-H]⁻ (21).

2.4.2 3-(Benzylamino)-2-(*tert*-butoxycarbonyl)(methyl)amino)propan- säure (**57**)^[67 a-c]



Zu einer Suspension aus 47.6 μ L (46.8 mg, 0.43 mmol, d = 0.98 g/mL, 1.1 eq.) Benzylamin und 1.4 mL absolutem Dimethylformamid wurden 9.5 mg (0.40 mmol, 1.0 eq.) Natriumhydrid gegeben. Die Reaktionsmischung wurde

2 h weitergerührt, anschließend auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und 80.1 mg (0.40 mmol, 1.0 eq.) *N*-Methylserinlacton (**42**), gelöst in 1.0 mL absolutem Dimethylformamid, innerhalb 1 h zugetropft. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand mittels FC an Kieselgel (Laufmittel: Essigester/Methanol (8:2), Gradient: 0.2 % Essigsäure auf 1000 mL) gereinigt. Es wurden 9.1 mg (0.03 mmol, 3 %) Produkt **57** erhalten.

DC (Essigester/Methanol (9:1), 0.1 % Essigsäure) $R_f = 0.45$.

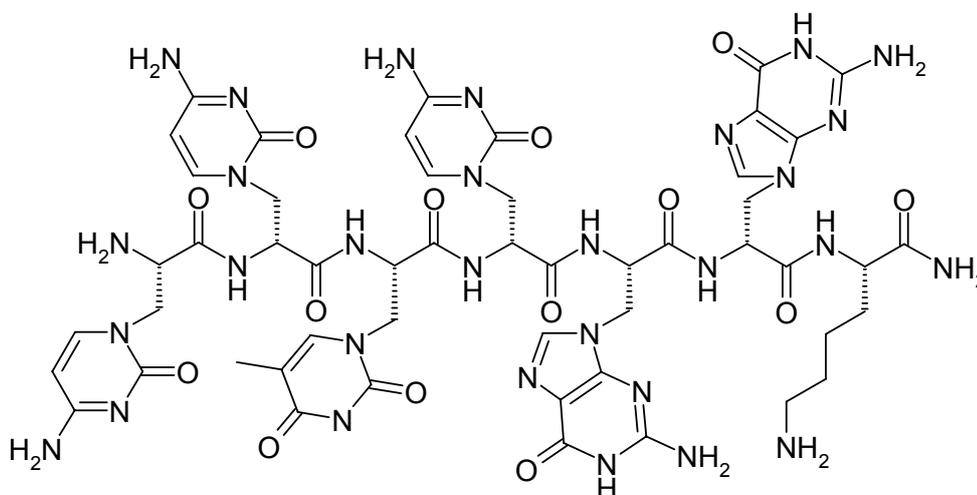
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)

$\delta = 2.49$ (s, 9 H, t-Bu), 3.07 (s, 3 H, CH_3), 3.98-4.91 (m, 5 H, CH_2 , $\alpha\text{-H}$, $\beta\text{-H}$), 7.37-7.51 (m, 5 H, *Ph*) ppm.

ESI-MS (m/z) (%) 639 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ (34), 617 $[\text{2M}+\text{H}]^+$ (14), 353 $[\text{M}-\text{H}+\text{2Na}]^+$ (22), 331 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 309 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 307 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (88).

2.5 Synthese der Alanyl-Peptidnucleinsäuren (Alanyl-PNAs)

2.5.1 H-AlaC-AlaC-AlaT-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**59**)



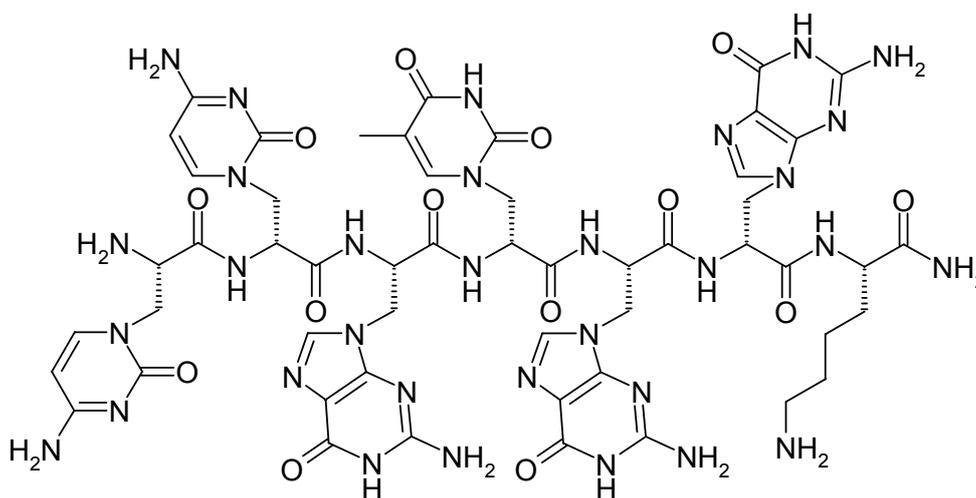
59

Das Heptamer **59** wurde an 74.8 mg (0.03 mmol, 0.43 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-L-Lys(Z)-MBHA-Harz nach **AAV3.1** aufgebaut. Die Kupplungszeit für 54.4 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH betrug 2 h. Die Kupplungszeiten für 69.5 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH und 50.4 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-L-AlaT-OH betragen jeweils 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 55.0 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) HATU und 21.9 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 66.2 μL (0.38 mmol, 12 eq.) DIPEA verwendet. Alle Kupplungsschritte wurden in 600 μL NMP durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 2.32 mg (1.8 μmol , 6 %) des reinen Oligomers **59** enthalten.

HPLC (Gradient: 5 - 20 % B' in 30 min, 254 nm, 280 nm) $t_{\text{R}} = 19.06$ min.

MS (ESI) (m/z) (%): 1322.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (15), 661.5 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (44).

2.5.2 H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaT-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**60**)



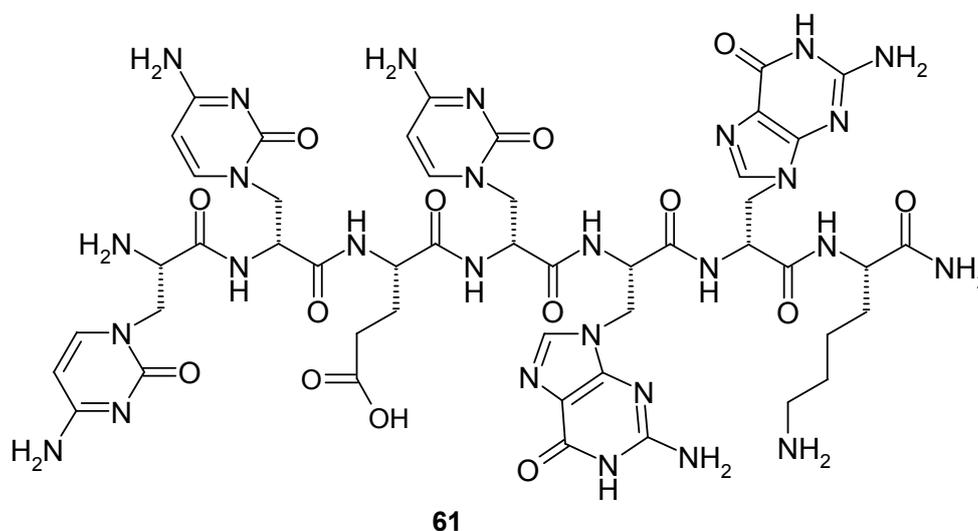
61

$\text{C}_{52}\text{H}_{64}\text{N}_{32}\text{O}_{14}$ [1361.30]

Das komplementäre Oligomer **60** zum Oligomer **59** wurde an 51.5 mg (0.03 mmol, 0.6 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-D-Lys(Z)-MBHA-Harz dem Kupplungsprotokoll **AVV3.1** aufgebaut. Die Kupplungszeiten für die jeweiligen Alanyl-Nucleobasen betragen für 52.4 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH 2 h, für 67.0 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D,L-AlaC(Z)-OH sowie für 48.6 mg (0.155 mmol, 5.0 eq.) Boc-L-AlaT-OH jeweils 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 53.2 mg (0.140 mmol, 4.5 eq.) HATU und 21.0 mg (0.155 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 64.0 μ L (0.393 mmol, 12 eq.) DIPEA verwendet. Die Aktivierung erfolgte *in situ* am Harz. Als Reaktionslösungsmittel wurden 800 μ L NMP verwendet. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer **60** aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 1.1 mg (0.8 μ mol, 3 %) des reinen Oligomers erhalten.

HPLC (Gradient: 5 - 20 % B'' in 30 min, 254 nm, 280 nm) $t_R = 21.37$ min.

MS (ESI) (m/z) (%): 1361.6 $[M+H]^+$ (8), 681.6 $[M+2H]^{2+}$ (100).

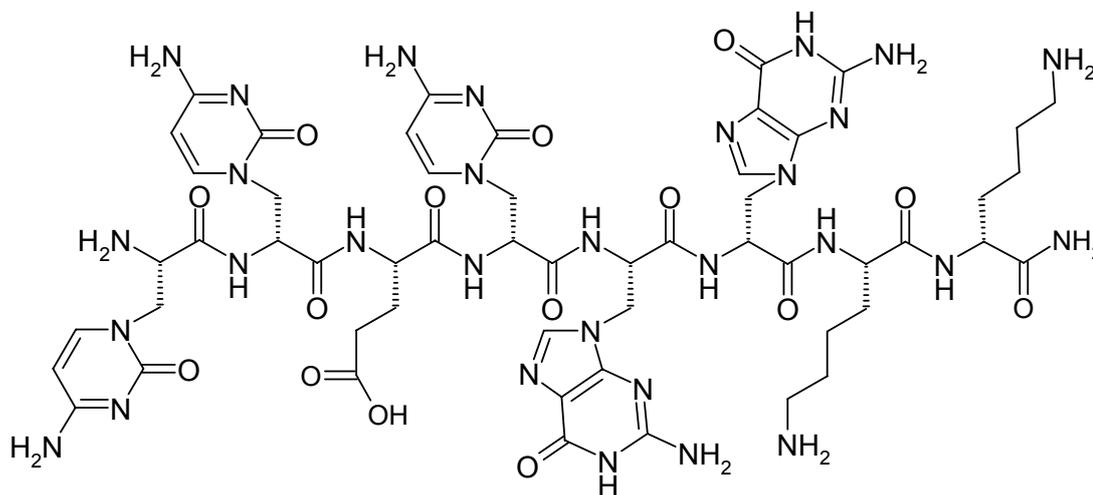
2.5.3 H-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (61)

Das Heptamer **61** wurde nach dem Kupplungsprotokoll **AVV 3.1** mit der angegebenen Ausnahme unter **AVV 3.2** an 71.6 mg (0.03 mmol, 1.0 eq., 0.43 mmol/g) Boc-L-Lys(Z)-MBHA-Harz dargestellt. Die Kupplungszeiten für die jeweiligen Alanyl-Nucleobasen betragen für 52.0 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH 2 h und für 66.5 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH 60 min. Die Kupplungszeit für 51.9 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-Glu(OBzl)-OH betrug 60 min und wurde wie in **AVV 3.2** beschrieben durchgeführt. Als Kupplungsreagenzien wurden 52.7 mg (0.13 mmol, 4.5 eq.) HATU und 20.9 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 62.9 μL (0.36 mmol, 12 eq.) DIPEA sowohl für die Alanyl-Nucleobasen, als auch für die Glutaminsäure verwendet. Die Aktivierung erfolgte für die Nucleobasen *in situ* am Harz und für die Aminosäure mit 2 min pre-Aktivierung. Als Reaktionslösungsmittel wurden 800 μL NMP verwendet. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer **61** aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 3.5 mg (3.1 μmol , 9 %) des reinen Oligomers erhalten.

HPLC (Gradient: 5 - 17 % B'' in 25 min, 254 nm, 280 nm) $t_{\text{R}} = 16.56$ min.

MS (ESI) (m/z) (%): 1255 $[M+NH_4^{+}]^{+}$ (14), 628 $[M+NH_4^{+}+H]^{2+}$ (94).

2.5.4 H-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-Lys-NH₂ (**63**)



63

$C_{53}H_{72}N_{30}O_{15}$ [1369.36]

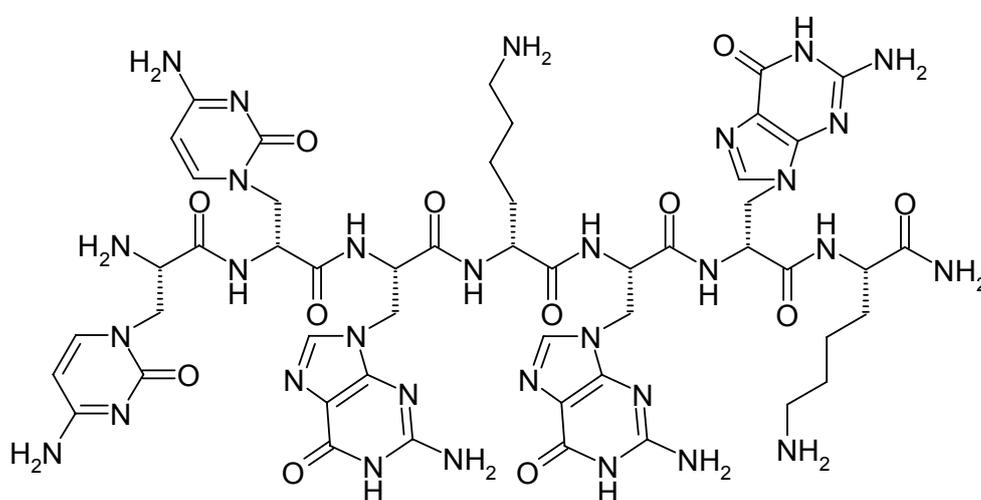
Das Octamer **63** wurde nach dem Kupplungsprotokoll **AAV 3.1** mit der angegebenen Ausnahme unter **AAV 3.2** an 55.6 mg (0.03 mmol, 0.6 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-D-Lys(Z)-MBHA-Harz dargestellt. Die Kupplungszeiten für die jeweiligen Alanyl-Nucleobasen betragen, für 56.5 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH 2 h und für 72.2 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH 60 min. Die Kupplungszeit für 56.3 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-Glu(OBzl)-OH und 69.3 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH betrug 60 min und wurden nach **AAV 3.2** beschrieben zur Kupplung gebracht. Als Kupplungsreagenzien wurden 57.1 mg (0.15 mmol, 4.5 eq.) HATU und 22.7 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 686 μ L (0.40 mmol, 12 eq.) DIPEA für die Alanyl-Nucleobasen. Für die Aminosäuren Glutamin sowie Lysin wurde 57.1 mg (0.15 mmol, 4.5 eq.) HBTU und 22.7 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) HOBt verwendet. Die Aktivierung erfolgte für die Nucleobasen *in situ* am Harz und für die Aminosäure mit 2 min pre-Aktivierung. Als Reaktionslösungsmittel wurden 700 μ L NMP verwendet. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer **63**

aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 8.8 mg (6.0 μmol , 20 %) des reinen Oligomers erhalten.

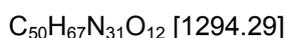
HPLC (Gradient: 6 - 14 % B'' in 23 min, 254 nm, 280 nm) $t_R = 20.98$ min.

MS (ESI) (m/z) (%): 692.6 $[\text{M}+\text{NH}_4^++\text{H}]^{2+}$.

2.5.5 H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**62**)



62



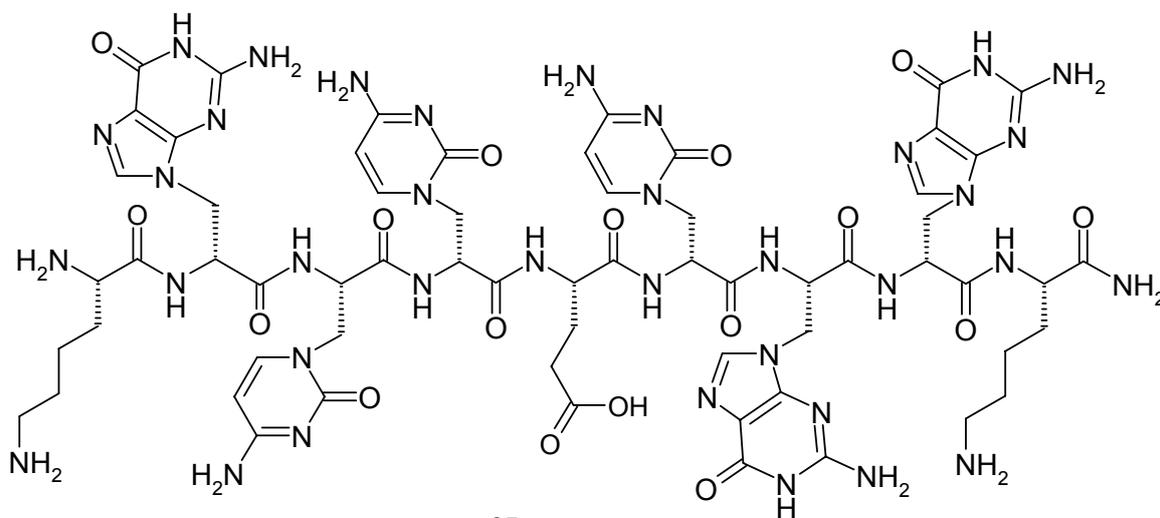
Der Gegenstrang **62** zum Oligomer **61** wurde an 53.6 mg (0.03 mmol, 0.6 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-D-Lys(Z)-MBHA-Harz nach dem im allgemeinen Teil beschriebenen Kupplungsprotokoll **AAV 3.1** für Alanyl-Nucleobasen und für die Aminosäure Lysin nach **AAV 3.2** aufgebaut. Die Kupplungszeiten für die jeweiligen Alanyl-Nucleobasen betragen, für 54.1 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH 120 min; für 69.2 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-D, L-AlaC(Z)-OH und für 66.4 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 54.7 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) HATU und 21.8 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) HOAt für die Nucleoaminosäuren und für Lysin,

sowie jeweils 65.8 μL (0.38 mmol, 12 eq.) DIPEA, verwendet. Die Aktivierung erfolgte für die Nucleobausteine *in situ* am Harz und mit 2 min pre-Aktivierung bei der Aminosäure. Als Reaktionslösungsmittel wurden 700 μL NMP verwendet. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer **62** aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 2.9 mg (2.3 μmol , 7 %) des reinen Oligomers erhalten.

HPLC (Gradient: 6 - 14 % B'' in 24 min, 254 nm, 280 nm) $t_{\text{R}} = 17.02$ min.

MS (ESI) (m/z) (%): 648.1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

2.5.6 H-Lys-AlaG-AlaC-AlaC-Glu-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**65**)



65

$\text{C}_{63}\text{H}_{86}\text{N}_{36}\text{O}_{15}$ [1587.62]

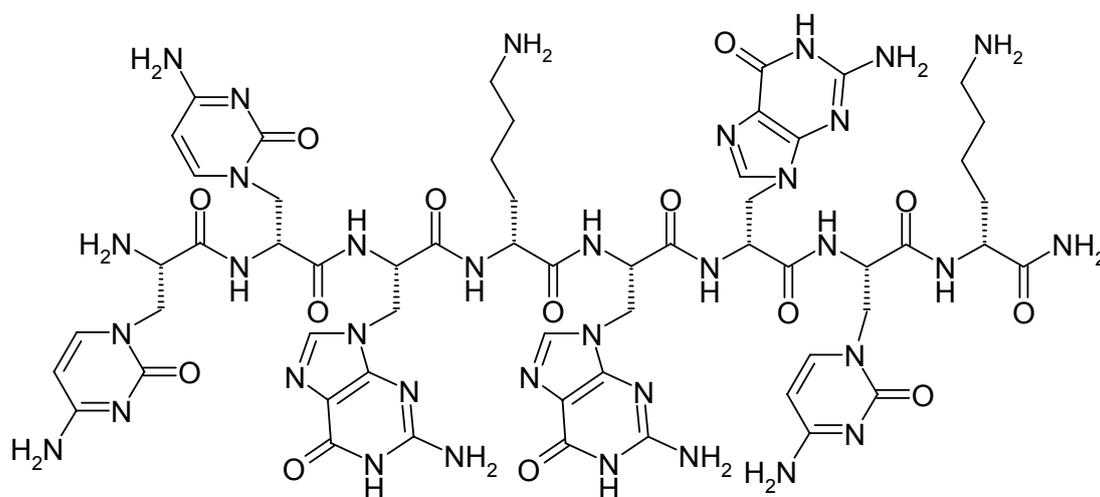
Der Alanyl-PNA-Einzelstrang **65** wurde nach **AVV 3.1** an 70.6 mg (0.03 mmol, 0.43 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-L-Lys(Z)-MBHA-Harz dargestellt. Die Kupplungszeiten für die jeweiligen Alanyl-Nucleobasen betragen, für 51.3 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH 2 h. Für 65.6 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D, L-AlaC(Z)-OH, 51.2 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-Glu(OBzl)-OH und 62.9 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-Lys(2Cl-Z)-OH betrug die Kupplungszeit 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 51.9 mg (0.137 mmol, 4.5 eq.)

HATU und 21.5 mg (0.152 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie je 62.1 μL (0.364 mmol, 12 eq.) DIPEA für die Alanyl-Nucleobasen und für die Aminosäuren Glutamin und Lysin verwendet. Die Aktivierung erfolgte für die Nucleobasen *in situ* am Harz und für die Aminosäuren mit 2 min voraktiviert. Als Lösungsmittel wurden 800 μL NMP verwendet. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer **65** aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 3.2 mg (2.4 μmol , 7 %) des reinen Oligomers erhalten.

HPLC (Gradient: 5 - 25 % B'' in 30 min, 254 nm, 280 nm) $t_{\text{R}} = 17.21$ min.

MS (ESI) (m/z) (%): 803 $[\text{M}+\text{NH}_4+\text{H}]^{2+}$ (100).

2.5.7 H-AlaC-AlaC-AlaG-Lys-AlaG-AlaG-AlaC-Lys-NH₂ (**64**)



64

$\text{C}_{57}\text{H}_{75}\text{N}_{35}\text{O}_{14}$ [1474.26]

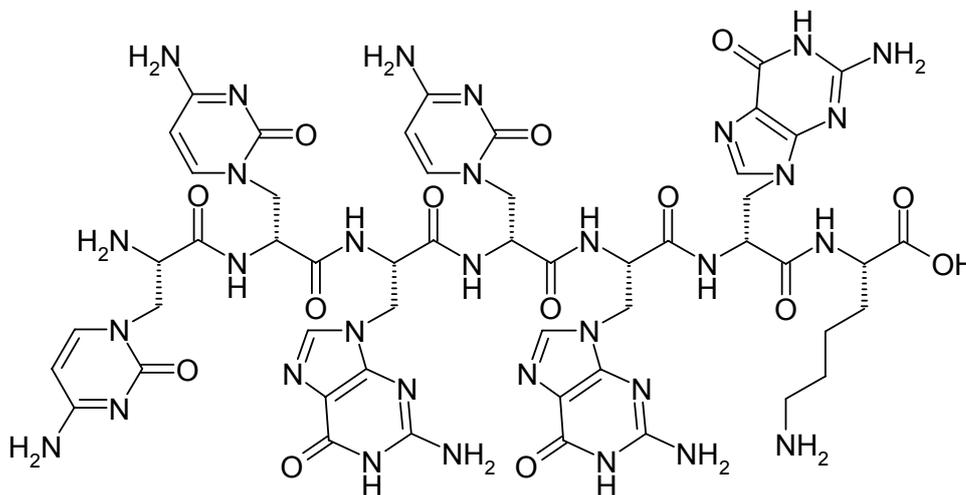
Die Alanyl-PNA **64** stellt den Gegenstrang zum Oligomer **65** dar und wurde an 74.7 mg (30 μmol , 0.43 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-L-Lys(Z)-MBHA-Harz, nach dem im allgemeinen Teil beschriebenen Kupplungsprotokoll **AAV 3.1**, für Nucleoaminosäuren und für die Aminosäure Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH mit der Abweichung nach **AAV 3.2**, aufgebaut. Die Kupplungszeiten für die jeweiligen

Alanyl-Nucleobasen betragen für 54.3 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH 2 h, für 69.4 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH und für 66.6 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH betrug die Kupplungszeit 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 54.9 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) HATU und 21.9 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 65.7 μL (0.38 mmol, 12 eq.) DIPEA verwendet. Die Aktivierung erfolgte für die Nucleoaminosäure-Bausteine *in situ* am Harz und für die Aminosäure mit 2 min voraktiviert. Als Reaktionslösungsmittel wurden 700 μL NMP verwendet. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer **64** aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 2.4 mg (2.2 μmol , 5 %) des reinen Oligomers erhalten.

HPLC (Gradient: 5 - 30 % B'' in 30 min, 254 nm, 280 nm) $t_{\text{R}} = 25.81$ min.

MS (ESI) (m/z) (%): 738 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100), 1474 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (5).

2.5.8 H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-OH (**80**)



80

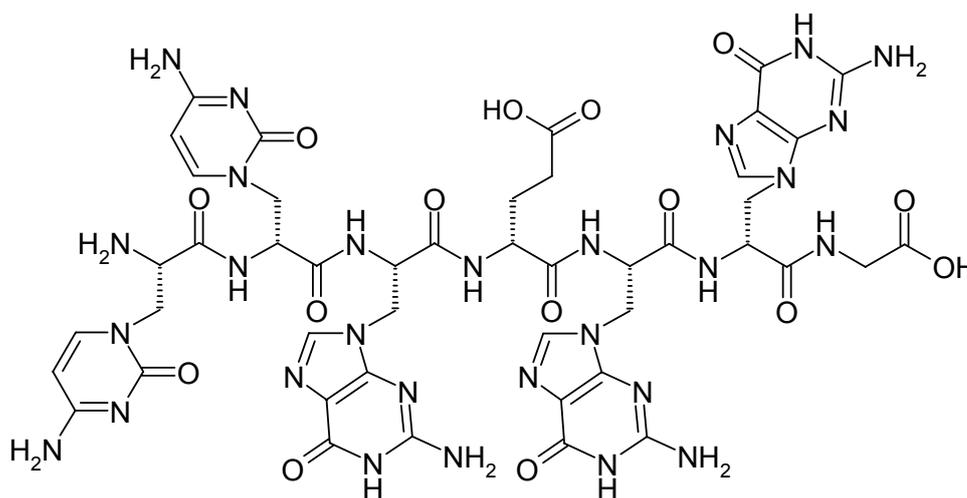


Das Oligomer **80** wurde an 48.0 mg (0.02 mmol, 0.45 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-Merrifield-Harz nach **AAV 3.1** aufgebaut. Die Kupplungszeit für 36.5 mg (0.10 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH betrug 2 h. Die Kupplungszeiten für 46.7 mg (0.10 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH betrug 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 36.9 mg (0.09 mmol, 4.5 eq.) HATU und 14.7 mg (0.10 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 37.0 μL (0.21 mmol, 10 eq.) DIPEA verwendet. Die einzelnen Einfachkupplungen wurden in 600 μL NMP durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 4.7 mg (3.6 μmol , 16 %) des reinen Oligomers **80** erhalten.

HPLC (Gradient: 5 - 15 % B' in 30 min, 254 nm, 280 nm) $t_{\text{R}} = 24.50$ min.

MS (ESI) (m/z) (%): 674.7 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

2.5.9 H-AlaC-AlaC-AlaG-Glu-AlaG-AlaG-Gly-OH (**66**)



66

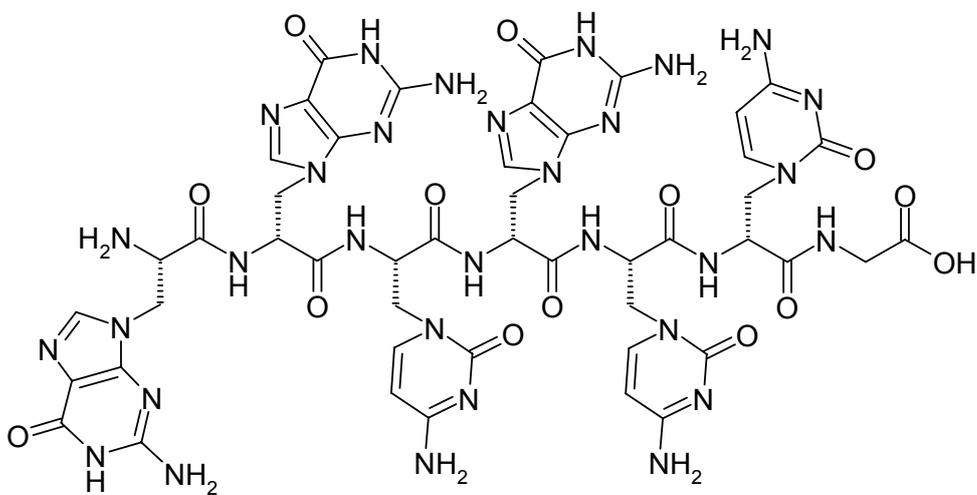


Oligomer **66** wurde an 53.3 mg (0.03 mmol, 0.70 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-Gly-Merrifield-Harz nach **AAV 3.1** aufgebaut. Die Kupplungszeit für 63.1 mg (0.18 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH betrug 2 h und für 80.6 mg (0.18 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 63.8 mg (0.16 mmol, 4.5 eq.) HATU und 25.4 mg (0.18 mmol, 5 eq.) HOAt sowie 76.3 μ L (0.44 mmol, 12 eq.) DIPEA verwendet. Die eingesetzte Aminosäure 62.9 mg (0.18 mmol, 5 eq.) Boc-Glu(OBzl)-OH wurde nach **AAV 3.2** mit 63.7 mg (0.44 mmol, 4.5 eq.) HBTU und 25.2 mg (0.18 mmol, 5 eq.) HOBt als Kupplungsreagenzien 60 min zur Reaktion gebracht. Die Menge an DIPEA wurde analog der Menge für die Nucleobasen-Bausteine gewählt. Die Einfachkupplungen wurden in 600 μ L NMP durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 2.06 mg (2.0 μ mol, 5 %) des reinen Oligomers **67** erhalten.

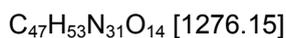
HPLC (Gradient: 5 - 20 % B' in 30 min, 254 nm, 280 nm) t_R = 18.87 min.

MS (ESI) (m/z) (%) 1226.1 $[M+H]^+$ (8), 613.5 $[M+2H]^{2+}$ (100).

2.5.10 H-AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC-Gly-OH (**81**)



81

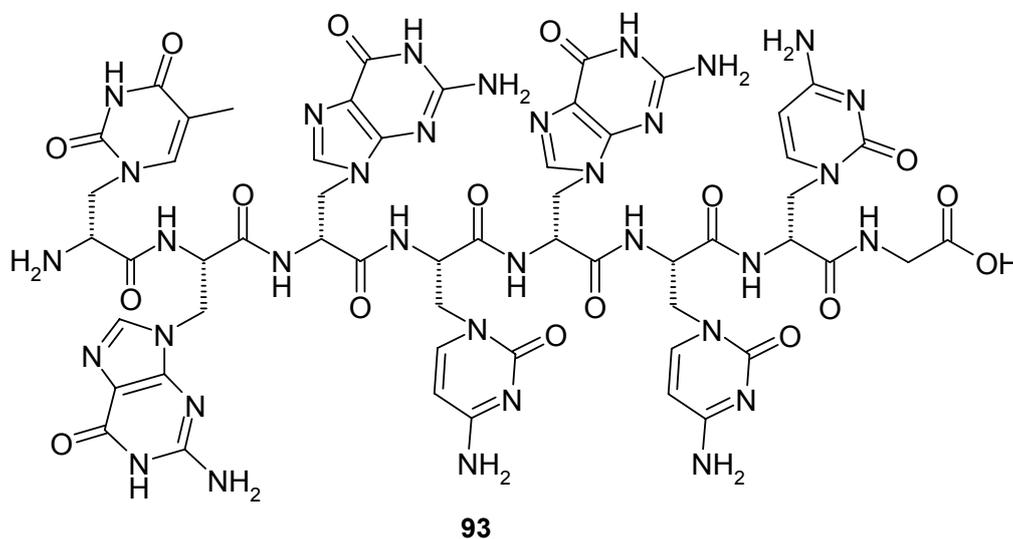


Das Oligomer **81** wurde an 100 mg (0.07 mmol, 0.70 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-Gly-Merrifield-Harz nach **AAV 3.1** aufgebaut. Die Kupplungszeit für 144 mg (0.35 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH betrug 2 h und für 152 mg (0.35 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH 60 min Als Kupplungsreagenzien wurden 120 mg (0.31 mmol, 4.5 eq.) HATU und 47.9 mg (0.352 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 144 μL (0.84 mmol, 12 eq.) DIPEA verwendet. Die einzelnen Einfachkupplungen wurden in 600 μL NMP durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 1.4 mg (1.5 μmol , 3 %) des reinen Oligomers **81** erhalten.

HPLC (Gradient: 5 - 20 % B' in 30 min, 254 nm, 280 nm) $t_{\text{R}} = 15.54$ min.

MS (ESI) (m/z) (%) 1276.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (68), 638.5 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100).

2.5.11 H-AlaT-AlaG-AlaG-AlaC-AlaG-AlaC-AlaC-Gly-OH (**93**)



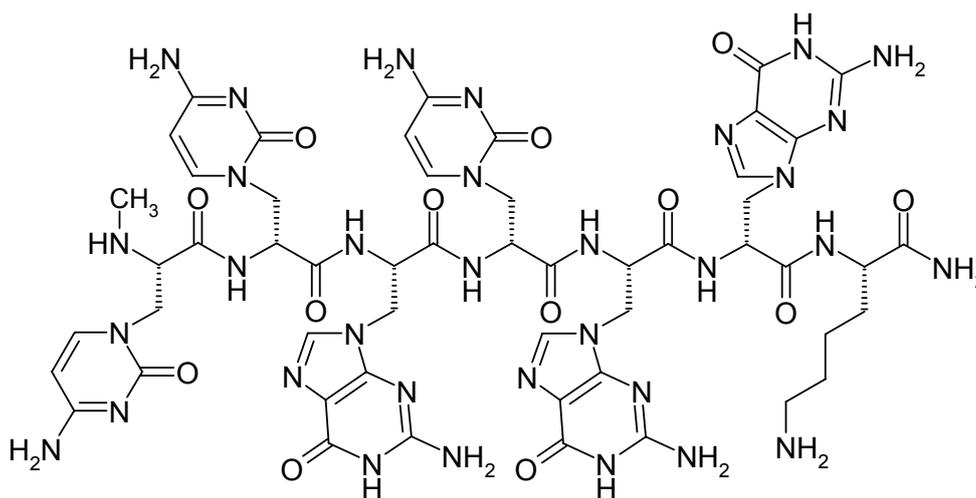
Das Oligomer **93** wurde nach **AAV 3.1** an 100 mg (0.07 mmol, 70 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-Gly-Merrifield-Harz aufgebaut. Es wurden 54.0 mg (0.17 mmol, 5.0 eq.) Boc-L-AlaT-OH mit 59.9 mg (0.15 mmol, 4.5 eq.) HATU, 23.8 mg

(0.17 mmol, 5 eq.) HOAt und 71.6 μL (0.42 mmol, 12 eq.) DIPEA als Kupplungsreagenzien 2 h zur Reaktion gebracht. Die Einfachkupplungen wurden in 600 μL NMP durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 1.3 mg (1.2 μmol , 3 %) des reinen Oligomers **93** erhalten.

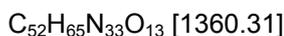
HPLC (Gradient: 5 - 20 % B' in 30 min, 254 nm) t_{R} = 16.65 min.

MS (ESI) m/z (%): 737 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100), 1512 $[\text{M}+43]^{+}$ (18).

2.5.12 H-(Me)AlaCAlaC-AlaC-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**67**)



67



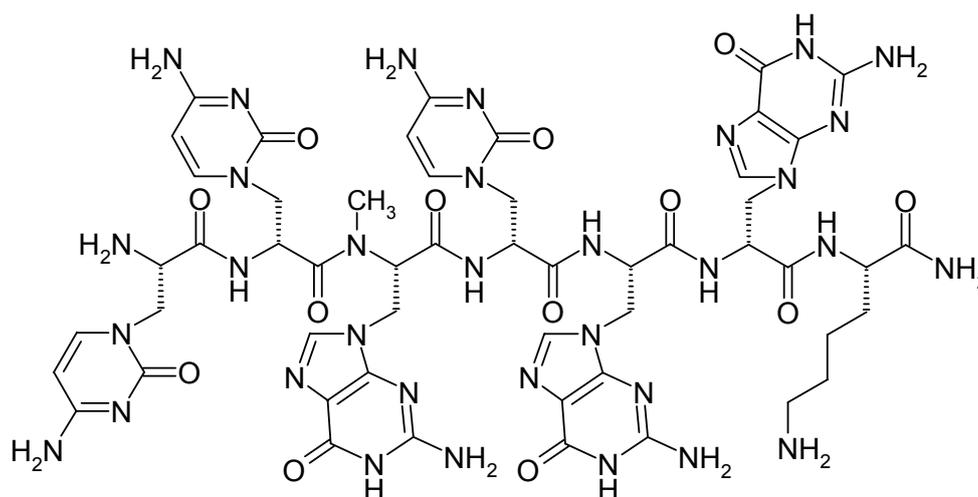
Das am Rückgrat monomethylierte Oligomer **67** wurde an 73.5 mg (0.03 mmol, 0.43 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-Lys(2-Cl-Z)-MBHA-Harz nach **AVV 3.1** aufgebaut. Die Kupplungszeit für 53.4 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH betrug 2 h und für 68.3 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 54.1 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) HATU und 21.5 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 64.6 μL (0.37 mmol, 12 eq.) DIPEA verwendet. Für 68.3 mg (0.158 mmol, 5.0 eq.) der *N*-terminal

methylierten Nucleoaminosäure Boc-(Me)AlaC-OH wurde als Kupplungsreagenz 61.1 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) PyCloP, sowie 64.6 μL (0.37 mmol, 12 eq.) DIPEA, verwendet. Die Kupplungsdauer betrug 9 h. Die Einfachkupplungen wurden in 600 μL NMP durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 2.7 mg (2.0 μmol , 6 %) des reinen Oligomers **67** enthalten.

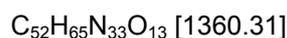
HPLC (Gradient: 5 - 25 % B' in 30 min, 254 nm, 280 nm) t_R = 15.22 min.

MS (ESI) (m/z) (%) 1361.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (10), 681.1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100).

2.5.13 H-AlaC-AlaC-(Me)AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-NH₂ (**68**)



68



Das am Rückgrat monomethylierte Oligomer **68** wurde analog zum Oligomer **67** aufgebaut. Es wurde an 72.3 mg (0.03 mmol, 0.43 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-MBHA-Harz verwendet. Die Kupplungszeit für 52.5 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH betrug 2 h und für 67.1 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 53.2 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) HATU und 21.1 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) HOAt

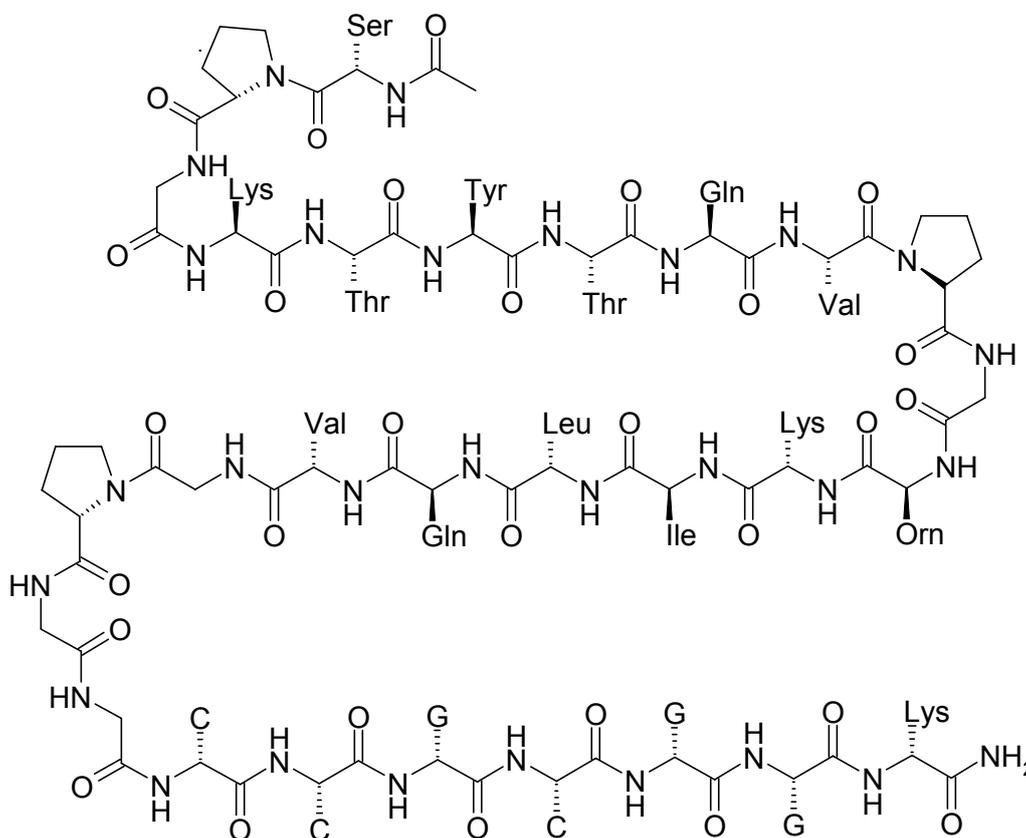
sowie 63.6 μL (0.37 mmol, 12 eq.) DIPEA verwendet. Für 54.8 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) der *N*-terminal methylierten Nucleoaminosäure Boc-(Me)AlaG-OH wurde als Kupplungsreagenz 60.2 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) PyCloP sowie 63.6 μL (0.37 mmol, 12 eq.) DIPEA, verwendet. Die Kupplungsdauer betrug 9 h. Die auf den methylierten Baustein folgende Nucleoaminosäure Boc-D-AlaC-OH wurde mittels des Aktivators PyAOP aktiviert. Es wurden 72.9 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) PyAOP eingesetzt, die Kupplungszeit betrug zwei mal 8 h. Die Einfachkupplungen sowie die Doppelkupplung wurden in 600 μL NMP durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 1.7 mg (2.0 μmol , 6 %) des reinen Oligomers **68** erhalten.

HPLC (Gradient: 5 - 20 % B' in 30 min, 254 nm, 280 nm) $t_R = 18.80$ min.

ESI-MS (m/z) (%): 1362.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (10), 681.2 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (53).

2.6 Synthese der Peptid/Alanyl-PNA Sequenz

2.6.1 Ac-SPGKTYTEVPGOKILQVGPGG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-K (72)



72

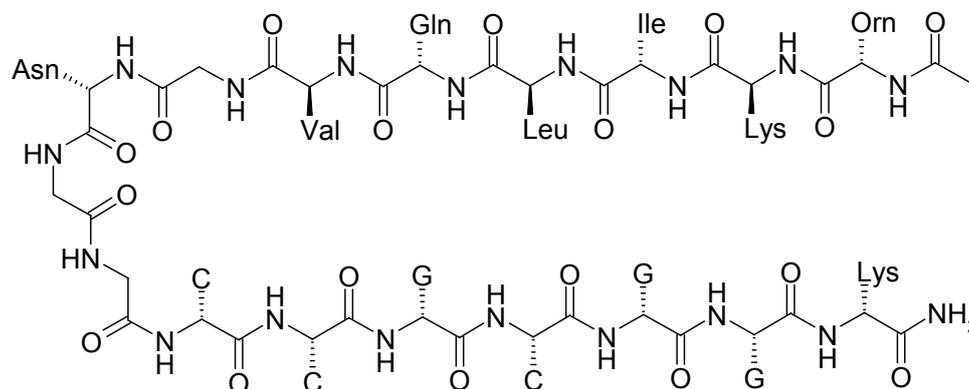
C₁₄₇H₂₁₈N₅₈O₄₂ [3466.74]

Das Alanyl-PNA- β -Faltblatt Peptid **72** wurde bis zum AlaC-Baustein nach der Boc-Strategie **AAV 3.1** und von dort nach der Fmoc-Strategie **AAV 3.3** aufgebaut. Es wurde 75.4 mg (0.03 mmol, 0.43 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-MBHA-Harz verwendet. Die Kupplungszeit für 54.8 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH betrug 2 h. Die Kupplungszeiten für 69.9 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH betrug 60 min Als Kupplungsreagenzien wurden 55.4 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) HATU und 22.0 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 66.3 μ L (0.38 mmol, 12 eq.) DIPEA verwendet. Anschließend wurde die letzte Nucleoaminosäure Boc-L-AlaC-OH

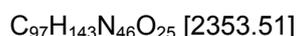
durch dreimal 3 min waschen mit 1 mL TFA/*m*-Cresol (95:5) entschützt. Nachdem fünfmal 1 mL NMP und NMP/DCM (1:1) gewaschen wurde die Alanyl-PNA mit 1 mL Pyridin zweimal 5 min neutralisiert. Die Aminosäuren wurden mit den folgenden Schutzgruppen und Einwaagen verwendet; 48.2 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Gly-OH, 54.7 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-D-Pro-OH, 54.9 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Val-OH, 98.9 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Gln(Trt)-OH, 75.9 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Lys(Boc)-OH, 57.3 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Leu-OH, 57.3 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Ile-OH, 73.6 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Orn(Boc)-OH, 74.4 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Glu(OBzl)-OH, 69.9 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Thr(Bzl)-OH, 99.9 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Tyr(2-Br-Z)-OH und 67.6 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Ser(Bzl)-OH. Die Fmoc-SPPS wurde nach der allgemeinen Vorschrift **AAV 3.3** durchgeführt, wobei als Kupplungsreagenz 57.0 mg (0.13 mmol, 4.5 eq.) HCTU und 20.7 mg (0.16 mmol, 5.0 eq.) HOBt verwendet wurden. Alle Aminosäuren wurden doppelt gekuppelt. Die Kupplungsdauer für Fmoc-D-Pro-OH betrug je 2 h, für Fmoc-Val-OH je 90 min, für die übrigen Aminosäuren wurde eine Kupplungszeit von 45 min für die erste Kupplung und 30 min für die Doppelkupplung verwendet. Die Kupplungen wurden in 700 μ L NMP durchgeführt. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 1.5 mg (2 μ mol, 5 %) des reinen Oligomers **72** erhalten.

HPLC (Gradient: 5 - 50 % B' in 30 min, 254 nm, 280 nm) t_R = 15.42 min.

MS (HRMS) (m/z): 3467.67045 $[M]_0$ (berechnet: 3467.67056), 867.92523 $[M+4H]^{4+}$ (berechnet: 867.92492), 694.54120 $[M+5H]^{5+}$ (berechnet: 694.54139).

2.6.2 Ac-OKILQVGNGG-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-K-NH₂ (73)

73



Das Alanyl-PNA- β -Faltblatt Peptid **73** wurde ebenfalls mittels beider Schutzgruppen-Strategien **AAV 3.1** und **AAV 3.3** aufgebaut. Die Sequenz, wurde bis zum AlaC-Baustein mittels der Boc-Strategie und ab dem AlaC mittels der Fmoc-Strategie aufgebaut. Es wurde 72.9 mg (0.03 mmol, 0.43 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-MBHA-Harz verwendet. Die Kupplungszeit für 53.6 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH betrug 2 h und für 67.7 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 53.6 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) HATU und 21.3 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 64.2 μL (0.37 mmol, 12 eq.) DIPEA verwendet. Anschließend wurde die letzte Nucleoaminosäure Boc-L-AlaC-OH durch dreimal 3 min waschen mit 1 mL TFA/*m*-Cresol (95:5) entschützt. Nach dem Waschen mit fünfmal 1 mL NMP und NMP/DCM (1:1) wurde die Alanyl-PNA mittels 1 mL Pyridin zweimal 5 min neutralisiert. Die einzelnen Aminosäuren wurden mit den unter **2.6.1** aufgeführten Schutzgruppen eingesetzt. Die Aminosäureeinwaagen (wobei 5 Äquivalente eingesetzt wurden) wurden wie folgt verwendet; 46.6 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Gly-OH, 93.5 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Asn(Trt)-OH, 53.2 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Val-OH, 95.7 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Gln(Trt)-OH, 73.4 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Lys(Boc)-OH, 55.4 mg (0.15 mmol,

5.0 eq.) Fmoc-Leu-OH und (0.15 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Ile-OH, sowie 71.2 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Fmoc-Orn(Boc)-OH. Als Kupplungsreagenz wurden 58.4 mg (0.14 mmol, 4.5 eq.) HCTU und 26.6 mg (0.15 mmol, 5.0 eq.) Cl-HOBt verwendet. Alle Aminosäuren wurden doppelt gekuppelt. Die Kupplungsdauer für Fmoc-L-Asn(Trt)-OH betrug je 90 min, für Fmoc-Val-OH je 60 min, für die übrigen Aminosäuren wurde eine Kupplungszeit von 40 min für die erste Kupplung und 30 min für die Doppelkupplung verwendet. Die Kupplung wurden in 700 μ L NMP durchgeführt. Auf die letzte Aminosäure, folgten eine Endschtzung und eine anschließende Acetylierung. Die Kupplungsdauer der Acetyl-Gruppe betrug zweimal 60 min. Nach der folgenden Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 1.0 mg (1.5 μ mol, 5 %) des reinen Oligomers **73** erhalten.

HPLC (Gradient: 5 - 30 % B' in 30 min, 254 nm, 280 nm) t_R = 19.22 min.

MS (ESI) (m/z) (%): 1186. $[M+NH_4+H]^{2+}$ (34), 790.7 $[M+NH_4+2H]^{3+}$ (100).

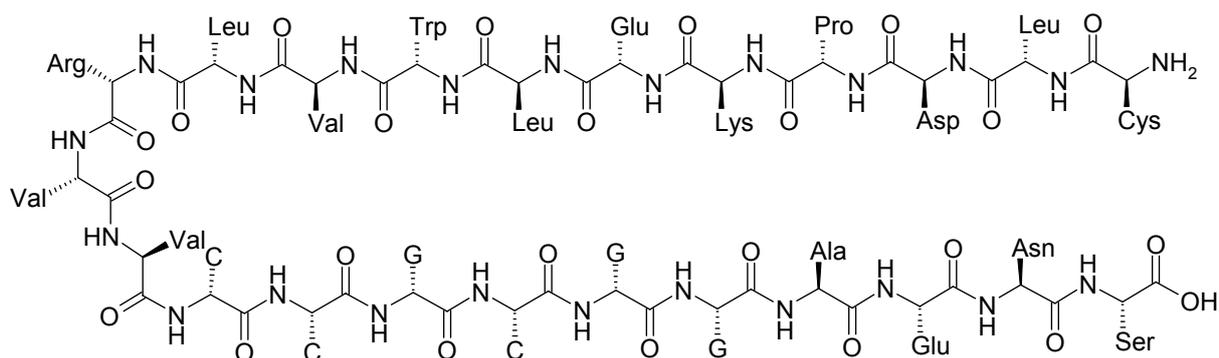
MS (HRS) m/z : 2371.13 $[M+NH_4]^+$ berechnet 2353.51 $C_{97}H_{143}N_{46}O_2$.

Die Kupplung wurden in 800 μL NMP durchgeführt. Auf der letzten Aminosäure, folgten eine Endschutzung und eine anschließende Acetylierung. Die Kupplungsdauer der Acetyl-Gruppe betrug zweimal 60 min. Nach der Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Es wurden 2.4 mg (1.7 μmol , 7 %) des reinen Oligomers **69** enthalten.

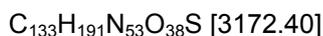
HPLC (Gradient: 10 - 60 % B' in 30 min, 254 nm, 280 nm) $t_R = 16.85$ min.

ESI-MS (m/z) (%): 1013.9 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (30), 676.6 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (100).

2.6.4 IL-8/Alanyl-PNA Derivat (**76**)



76



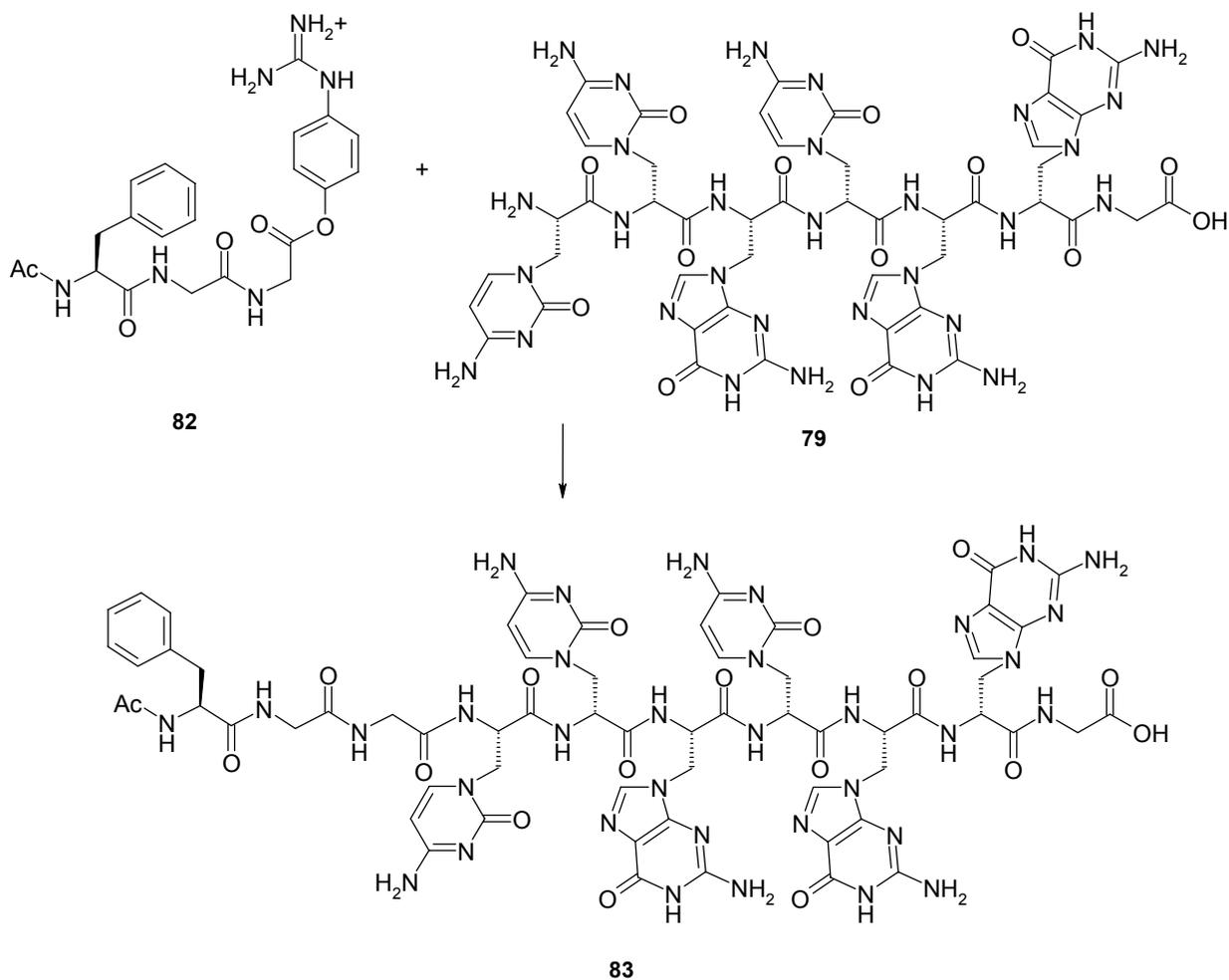
Das IL8/Alanyl-PNA Derivat **76** wurde mittels beider Schutzgruppen-Strategien aufgebaut. Die Sequenz bis zum AlaC-Baustein wurde mittels der Boc-Strategie **AVV 3.1** und ab dem AlaC mittels der Fmoc-Strategie **AVV 3.2** aufgebaut. Es wurde an 47.8 mg (0.02 mmol, 0.44 mmol/g, 1.0 eq.) Boc-L-Ser(Bzl)-PAM-Harz verwendet. Die Kupplungszeit für 35.6 mg (0.10 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaG-OH betrug 2 h. Die Kupplungszeiten für 45.8 mg (0.10 mmol, 5.0 eq.) Boc-D/L-AlaC(Z)-OH betrug 60 min. Als Kupplungsreagenzien wurden 36.1 mg (0.09 mmol, 4.5 eq.) HATU und

14.3 mg (0.10 mmol, 5.0 eq.) HOAt sowie 43.2 μ L (0.25 mmol, 12 eq.) DIPEA verwendet. Anschließend wurde die Nucleoaminosäure Boc-L-AlaC-OH durch dreimal 3 min waschen mit 1 mL TFA/m-Cresol (95:5) entschützt. Nach dem Waschen mit fünf Mal 1 mL NMP und NMP/DCM (1:1) wurde die Alanyl-PNA mittels 1 mL Pyridin zweimal 5 min neutralisiert. Die Aminosäureeinwaagen (bezogen auf 5 eq.) wurden wie folgt verwendet 35.8 mg Fmoc-Val-OH, 49.4 mg Fmoc-Lys(Boc)-OH, 37.3 mg Fmoc-Leu-OH und 55.2 mg Fmoc-Trp(Boc)-OH, 43.4 mg Fmoc-Asp(OtBu)-OH, 35.6 mg Fmoc-Pro-OH. Die Fmoc-SPPS wurde nach der allgemeinen Vorschrift **AAV3.3** durchgeführt, wobei als Kupplungsreagenz 39.3 mg (0.09 mmol, 4.5 eq.) HCTU und 17.9 mg (0.10 mmol, 5.0 eq.) Cl-HOBt verwendet wurden. Alle Aminosäuren wurden doppelt gekuppelt. Die Kupplungsdauer der Aminosäuren betrug 40 min für die erste Kupplung und 30 min für die Doppelkupplung. Die Kupplung wurden in 500 μ L NMP durchgeführt. Auf Leucin folgte die Kupplung des Fmoc-Cys(Trt)-OH, hierzu wurde 33.2 μ L (0.21, 10 eq.) DIC als Kupplungsreagenz verwendet. Die Kupplungszeit betrug bei Cystein je 2 h. Nach der folgenden Abspaltung wurde das Oligomer aus Wasser lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt. Die gereinigte Menge reichte Menge reichte für die Massenbestimmung.

HPLC (Gradient: 5 - 60 % B' in 30 min, 254 nm, 280 nm) t_R = 11.5 min.

MS (ESI) m/z 1072 $[M+43+4H]^{3+}$ (69), 794 $[M+4H]^{4+}$ (36).

2.7 Ligation nach Bordusa



Die Ligationen wurden bei 25 °C in je 0.2 M HEPES-Puffer durchgeführt. Der Puffer wurde auf pH = 8.0 eingestellt und beinhaltete 0.1 mol NaCl und 0.01 mol CaCl₂. Der Ester **82** wurde in Dimethylformamid gelöst und zum Puffersystem gegeben. Die Reaktionszeiten betragen 1-2 h. Es wurden die folgenden drei Ligationsexperimente durchgeführt,

a. 2 mmol Boc-Phe-Gly-Gly-OGp, 4 mmol (AlaG-AlaT)₂-Lys-NH₂ mit 5 μmol Clostripain (Enzym). Es wurden 10-20 % des Peptides Boc-Phe-Gly-Gly-(AlaG-AlaT)₂-Lys-NH₂ (**79**) erhalten.

MALDI-ToF 1305,93 [M+H]⁺, 1327.92 [M+Na]⁺, 1343.86 [M+K]⁺ theoretisch 1305 [M]₀.

b. 2 mmol Ac-Lys-Leu-Pro-Gly-Trp-Glu-Lys-Arg-Met-Ser-Arg-Ser-Ser-Gly-OGp (**84**) mit 4 mmol (AlaG-AlaT)₂-Lys-NH₂ (**79**) und 5 μmol Clostripain (Enzym) zu 10-20 % Produkt Ac-Lys-Leu-Pro-Gly-Trp-Glu-Lys-Arg-Met-Ser-Arg-Ser-Ser-Gly-(AlaG-AlaT)₂-Lys-NH₂ (**85**) umgesetzt.

MALDI-ToF 2700.65 [M+NH₄]⁺ theoretisch 2683 [M]₀.

c. 2 mmol Ac-Val-Phe-Ile-Thr-Ser-Pro-Gly-Lys(Z)-Thr-Tyr-Thr-Glu-Val-Pro-Gly-Orn-Lys(Z)-Ile-Leu-Gln-Val-Pro-Gly-OGp (**86**) mit 4 mmol H-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-OH (**80**) und 20 μmol Clostripain zu 9 % Ac-Val-Phe-Ile-Thr-Ser-Pro-Gly-Lys(Z)-Thr-Tyr-Thr-Glu-Val-Pro-Gly-Orn-Lys(Z)-Ile-Leu-Gln-Val-Pro-Gly-AlaC-AlaC-AlaG-AlaC-AlaG-AlaG-Lys-COOH (**87**).

MALDI-ToF 4110 [M+Na]⁺ theoretisch 4087 [M]₀

Die enzymatischen Ansätze wurden zeitabhängig per analytische HPLC untersucht, wobei die Produkte manuell aufgefangen wurden.

III. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Ala	Alanin
AlaC	<i>N-tert</i> -Butoxycarbonyl- β -(<i>N</i> -4-benzyloxycarbonyl-1-cytosinyl) - alanin
AlaG	<i>N-tert</i> -Butoxycarbonyl- β -(9-guaninyl)-alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Aspargin
ber.	Berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
br.	breit
2-Br-Z	2-Bromobenzyloxycaronyl
Bzl	Benzyl
BOP	O-Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphat
C	Cytosin
CD	Circular Dichroismus
Cys	Cystein
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DIC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyl-ethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
[D ₆]DMSO	Hexadeuterodimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDT	1,2-Ethandithiol
EE	Essigsäureethylester
eq.	Äquivalente
ESI	Elektronensprayionisation
FC	<i>flash</i> -Chromatographie
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT	Fourier-Transformation
G	Guanin
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
Glu	Glutaminsäure
HATU	<i>N</i> -(7-Aza-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	<i>N</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCTU	<i>o</i> -(1 <i>H</i> -6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HOAc	Essigsäure
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Cl-HOBt	Chlor-1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ile	Isoleucin
IR	Infrarotspektroskopie
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MBHA	4-Methylbenzyhydrylamin
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin-2-on
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>

OBzl	Benzyloxy
OtBu	<i>t</i> -Butoxy
Orn	Ornithin
Phe	Phenylalanin
PNA	Peptidnukleinsäure
PyAOP	7-Azabenzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphat
PyCloP	Chlortripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
Pro	Prolin
PS	Polystyrol
q	Quartett
RP	<i>reverse phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
Ser	Serin
t	Triplett
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
Trp	Tryptophan
Trt	Trityl
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolettspektroskopie
WC	Watson-Crick
Z	Benzoyloxycarbonyl

IV. Literaturverzeichnis

- [1] W. H. Fremann and company, *Molekular cell biology 4.0* **2000**, media connected.
- [2] A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3277-3280.
- [3] a) U. Diederichsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 445-448. b) U. Diederichsen, D. Weicherding, N. Diezemann, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1058-1066.
- [4] a) U. Diederichsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *13*, 1743-1746; b) U. Diederichsen, H. W. Schmitt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 302-305; c) U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1966-1969; d) U. Diederichsen, D. Weicherding, *Synlett* **1999**, *S1*, 917-920; e) U. Diederichsen, D. P. Weicherding, E. Vockelmann, *Chimia* **1998**, *9*, 467; f) U. Diederichsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 165; g) U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2411-2413; h) U. Diederichsen, C. M. Biro, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1417-1420.
- [5] F. A. Syud, H. E. Stanger, H. Schenk Mortell, J. F. Espinosa, J. D. Fisk, C. G. Fry, S. H. Gelmann, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 553.
- [6] a) R. March, *curr. Med Chem.* **1995**, *2*, 654; b) S. Zhang, T. Govender, T. Norström, P. I. Arvidsson, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6918; c) L. Aurelio, R. T. C. Brownlee, A. B. Hughes, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5823; d) L. Aurelio, J. S. Box, R. T. C. Brownlee, A. B. Hughes, B. E. Sleebs, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2652.
- [7] a) J. M. Ostresh, G. M. Husar, S. Blondelle, B. Dorner, P.A. Weber, R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1994**, *91*, 11138; b) S. M. Miller, R. J. Simon, R. N. Zuckermann, J. M. Keer, W. H. Moos, *Drug Dev. Res.* **1995**, *35* 20; c) E. Hughes, R. M. Burke, A. J. Doig, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25109; d) A. J. Doig, E. Hughes, R. M. Burke, T. J. Su, R. K. Heenan, J. Lu, *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 537; e) J. M. Mason, N. Kokkoni, K. Stott, A. J. Doig, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 526.

- [8] a) B. Vitoux, A. Aubry, M. T. Cung, M. Marraud, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1986**, 27, 617; b) S. R. Griffiths-Jones, M. S. Searle, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8350; c) T. Kortemme, M. Ramirez-Alvarado, L. Serrano, *Science* **1998**, 281, 253.
- [9] A. Aggeli, N. Boden, S. Zhang, *Self-Assembling Peptide Systems in Biology, Medicine and Engineering* **2001**.
- [10] a) B. Sommer, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, 2, 87; b) C. Soto, *Mol. Med Today* **1999**, 5, 343; c) P. Hammerström, R. L. Wisenman, E. T. Powers, J. W. Kelly, *Science* **2003**, 299, 713.
- [11] H. L. Schenk, S. H. Gellmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4869.
- [12] a) H. E. Stanger, F. H. Syud, J. F. Espinosa, I. Giriat, T. Muir, S. H. Gellmann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98, 12015; b) G. J. Sharman, M. S. Searler, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5291; c) S. R. Ragothman, S. K. Awasthi, P. Barlaman, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 137.
- [13] H. E. Stanger, S. H. Gellmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4236.
- [14] M. Searle, *Biopolymers* **2004**, 76, 185.
- [15] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley VCH Verlag GmbH & Co.KGaA., Hrsg.: A. G. Beck-Sickinger, U. Hahn, Weinheim **2002**.
- [16] J. Coste, E. Frerot, P. Jouin, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1967.
- [17] C. A. Jasseway, P. Travels, *Immunologie*, Spektrum Verlag, **2001**.
- [18] a) N. Sewald, *Angew. Chem. Int.* **2002**, 41, 4661; b) R. M. Wenger, *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 2672.
- [19] a) J. Urban, T. Vaisar, R. Shen, M. S. Lee, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, 47, 182 ; b) G. V. Reddy, G. V. Rao, D. S. Iyengar, *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 1985; c) U. Kertscher, M. Bienert, E. Krause, N. F. Sepetov, B. Mehlis, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, 41, 207; d) N. F. Sepetov, M. A. Krymsky, M. V. Ovchinikov, Z. D. Bessalova, O. L. Isakova, M. Soucek, M. Lebel, *Peptide Res.* **1991**, 4, 308.
- [20] a) M. Teixido, F. Albericio, E. Giralt, *J. Peptide Res.* **2005**, 65, 153; b) J. R. McDermott, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem.* **1973**, 51, 2555.

- [21] a) T. L. Lowe, A. Strzelec, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7882; b) A. Karpuniotu, A. Schmauder, K. Tenedis, *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 339.
- [22] D. T. S. Rijkers, J. W. M. Höppner, G. Posthuma, C. J. M. Lips, R. M. J. Liskamp, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4285.
- [23] a) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500; b) B. Hyrup, P. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 5-23; c) A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3277-3280.
- [24] A. Löberding, B. Mielke, C. Schwemler, E. Schwenner, U. Stropp, W. Springer, A. Kretschmer, T. Pötter, EP 0646595 A1, **1995**;
- [25] A. Volbeda, A. Lahm, F. Sakiyama, D. Suck, *EMBO Journal* **1991**, *10*, 1607-1618.
- [26] M. Köhn, R. Breinsbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168.
- [27] H. Hang, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727.
- [28] a) C. F. Lui, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6584; b) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 766; c) T. W. Muir, P. E. Dawson, S. B. Kent, *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 266; d) J. P. Tam, Q. Yu, Z. Miao, *Biopolymers* **1999**, *51*, 311.
- [29] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. Kent, J. A. Ellamm, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684.
- [30] a) H. Paulus, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 375; b) H. Paulus, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 447; c) R. David, M. P. O. Richter, A. G. Beck-Sickinger, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 663.
- [31] S. Chong, F. B. Mersha, D. G. Comb, M. E. Scott, D. Landry, L. M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R.-B. Kucera, C. A. Hirvonen, J. J. Pelletier, H. Paulus, M. Q. Xu, *Gene* **1997**, *192*, 271.
- [32] a) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705; b) G. J. Cotton, T. W. Muir, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 253.
- [33] S. Tchertchian, O. Hartley, P. Botti, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9208.
- [34] H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 189.
- [35] V. Cerovsky, F. Bordusa, *J. Peptide Res.* **2000**, *55*, 325.

- [36] a) M. Thormann, S. Thust, H.-J. Hofmann, F. Bordusa, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6056; b) N. Welhovsky, F. Bordusa, *FEBS Letters* **1999**, *443*, 220.
- [37] C. A. Janeway, P. Travers, *Immunologie 5. Auflage*, Spektrum-Verlag.
- [38] K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira, *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21*, 335.
- [39] a) M. Baggiolini, B. Dewald, B. Moser, *Annu. Rev. Immunol.*, **1997**, *15*, 675; b) M. Baggiolini, I. Clark-Lewis, *FEBS Letters* **1992**, *307*, 97.
- [40] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 9. Auflage*, **2005**, Urban & Fischer.
- [41] a) P. Lohse, B. Oberhauser, B. Oberhauser-Hofbauer, G. Baschang, A. Eschenmoser, *Croatia Chim. Acta* **1996**, *69*, 535; b) P. Lohse, „*Synthese und Eigenschaften von oligomeren Nukleodipeptamidinium-Salzen*“, Dissertation, ETH Zürich, **1992**.
- [42] L. D. Arnold, T.H. Kalanter, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7105.
- [43] a) L. Aurelio, T. C. Brownlee, A. B. Hughes, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5823; b) S. Zhang, T. Govender, T. Norström, P. I. Arvidsson, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6918; c) J. H. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243.
- [44] P. Lohse, B. Oberhauser, B. Oberhauser-Hofbauer, G. Baschang, A. Eschenmoser, *Croatia Chim. Acta* **1996**, *69*, 535.
- [45] T. M. Fletcher, B. E. Cathers, K. S. Ravikumar, B. M. Mamiya, S. M. Kerwin, *Bioorganic Chemistry* **2001**, *29*, 36.
- [46] a) F. Seela, U. Lüpke, *Chem. Ber.* **1977**, *110*, 1462; b) F. Seela, A. Kehne, H.-D. Winkeler, *Liebigs Ann.* **1983**, 137.
- [47] D. Weicherding, *Synthese von Alanyl- und Homoalanyl-Peptidnucleinsäuren -Untersuchung der Homologie, der Wechselwirkungen mit Aminosäuren und des photoinduzierten Elektronentransfers*, Dissertation, TU-München, **2000** eingereicht.
- [48] a) M. Christensen, O. Schou, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1978**, *12*, 121; b) Y. Song, A. D. Sercel, D. R. Johnson, N. L. Colbry, K. L. Sun, B. D. Roth, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8225; c) S. T. Cheung, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 906

- [49] a) G. Solladie, *Synthesis* **1981**, 185; b) G. H. Posner, *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 72; c) A. Griesbeck, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1320.
- [50] a) A. Griesbeck, D. Seebach, *Helvetica Chimica Acta* **1987**, *70*, 1326; b) T. Sato, K. Naruse, T. Fui Jisawa, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3587; c) T. Sato, T. Itoh, C. Hattori, T. Fujisawa, *Chem. Lett.* **1983**, 1391.
- [51] J. Urban, T. Vaisar, R. Shen, M. S. Lee, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, *47*, 182.
- [52] a) J. Coste, J. P. Ferot, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1967; b) J. Coste, J. P. Ferot, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437; c) L. Yet, *Albany molecular research, Inc., Technical reports* **1999**, *4* (1).
- [53] J. Coste, M. N. Durfour, A. Pantaloni, B. Castro, *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 669.
- [54] R. D. Tung, M. K. Dhaon, D. H. Rich, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3350..
- [55] F. Albericino, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, St. A. Kent, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 4853.
- [56] a) G. V. Reddy, G. V. Rao, D. S. Iyengar, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 1985; b) U. Kertscher, M. Bienert, E. Krause, N. F. Sepetov, B. Mehlis, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, *41*, 207; c) N. F. Sepetov, M. A. Krymsky, M. V. Ovchinnikov, Z. D. Bessalova, O. L. Isakova, M. Soucek, M. Lebel, *Peptide Res.* **1991**, *4*, 308.
- [57] Johnson, T.; Quibell, M.; Owen, D.; Sheppard, R. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 369.
- [58] Bedford, J.; Hyde, C.; Johnson, T.; Jun, W.; Owen, D.; Quibell, M.; Sheppard, R. C.; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *40*, 300.
- [59] M. F. Hoffmann, *Induktion von Sekundärstrukturen durch den Einbau von Alanyl-PNA in Peptiden und Proteinen*, Dissertation, Würzburg **2003**.
- [60] F. A. Syud, H. E. Stanger, H. Schenk Mortell, J. F. Espinosa, J. D. Fisk, C. G. Fry, S. H. Gellmann, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 553.
- [61] a) A. Thaler, D. Seebach, F. Cardinaux, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 617; b) D. Seebach, A. Thaler, A. K. Beck, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 857.

- [62] a) D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, 266, 243; b) F. Bordusa, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4817.
- [63] a) L. E. Canne, St. J. Bark, St. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5891; b) J. P. Tam, J. Xu, K. D. Ecom, *Biopolymers* **2001**, 60, 194.
- [64] a) S. Techertchian, O. Hartley, P. Botti, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 9208; b) P. Botti, M. R. Carrasco, St. B. H. Kent, *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 1831.
- [65] M. S. Searle, *Biopolymers* **2004**, 76, 185.
- [66] a) M. Mergler, J. P. Duriex, *The BACHEM practice of SPPS*, Bachem AG **2000**; b) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154; c) R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 801-812.
- [67] a) A. Griesbeck, D. Seebach, *Helvetica Chimica Acta* **1987**, 70, 1326; b) T. Sato, K. Naruse, T. Fui Jisawa, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 3587; c) T. Sato, T. Itoh, C. Hattori, T. Fujisawa, *Chem. Lett.* **1983**, 1391.

Lebenslauf

Name: Ružica Ranevski
Geboren am: 02.01.1977
Geboren in: Arnsberg/HSK
Staatsangehörigkeit: Deutsch

08. 1993 - 06. 1996 **Chemisch-Technische-Assistentin** Berufsschule
des HSK (Olsberg; Deutschland)

06. 1996 **Fachabitur** (Olsberg; Deutschland)

10. 1996 – 10. 1999 Universität Essen, Deutschland, **Vordiplom** in
Chemie **October 1999**

11. 1999 – 06. 2002 Universität Essen, Deutschland, **Diplom** in
Organischer Chemie **August 2002**
Diplomthema "*Bestimmung der Stabilität von Eisen-
Komplexen fluoreszierender 1,10-Phenantrolin-
Derivaten*", unter der Leitung von: Prof. Dr. Dr. R.
Sustmann und Prof. Dr. M. Matzik in Essen

10. 1996 – 08. 2002 Universität Essen, Deutschland

12. 2002 – 03. 2006 Georg-August-Universität am Institut für Organische
und Biomolekulare Chemie der Georg-August
Universität zu Göttingen, Deutschland
Dissertationsthema "*Synthese und Untersuchung von
Alanyl-PNA Oligomeren und deren Einfluß auf β -
Faltblatt Struktur*", unter der Leitung von: Prof. Dr. U.
Diederichsen in Göttingen