

# Molekulare Erkennung von kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie



## Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. rer. nat.

Angefertigt im Fachbereich C, Mathematik und Naturwissenschaften  
der Bergischen Universität Wuppertal

Von

Peter Markus Düppe

geb. in

Gelsenkirchen (14.08.1979)

„Niemand kann, auch nicht unter Folter, genau definieren, was ein Tumor ist.“

J. Ewing, **1916**<sup>[1,2]</sup>



Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20141117-104956-5

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20141117-104956-5>]

Eingereicht am: 25. 06. 2014

Die mündliche Prüfung erfolgt am: 25. 08. 2014

Erster Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hans-Josef Altenbach

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 2008 bis Juni 2014 am Lehrstuhl für bioorganische Chemie des Fachbereichs C – Mathematik und Naturwissenschaften, Fachgruppe Chemie & Biologie, der Bergischen Universität Wuppertal angefertigt.

## Danksagung

Das Anfertigen der vorliegenden Dissertation wäre ohne das Mitwirken zahlreicher Personen nicht möglich gewesen, weshalb ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte:

Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck für die intensive Betreuung und konstruktiv kritische Diskussion dieser Dissertation. Zudem für seinen unermüdlichen Einsatz, die Finanzierung der Arbeitsgruppe sicherzustellen.

Prof. Dr. Raphael Stoll, Dr. Katharina Jockers und Miriam Schöpel für die jahrelange Kooperation und die zahllosen Kolloquien.

Des Weiteren gilt mein Dank all denjenigen, die mir aktiv im Laboratorium zur Seite standen und durch die Synthesen von Vorstufen oder z. B. der Durchführung von NMR-Titrationsen geholfen haben: Dr. Wolfgang Rudolf Christian Beyer, Dr. Sebastian Lüttenberg, Dr. Thao Tran Thi Phuong, Dr. Dong Sun, Michael Stolarski, Karolin Sembritzki sowie Jasmin Autzen.

Zudem bedanke ich mich bei allen Personen, die mir durch ihre technische Unterstützung sowie der Durchführung von Analysen und Recherchen geholfen haben: Andreas Siebert, Ilka Polanz, Simone Bettinger, Frank Sondermann, Jürgen Dönecke, Melanie Dausend und Sandra Pfeiffer.

Außerdem bei Prof. Dr. Dr. h. c. Reiner Sustmann, der meine Diplomarbeit betreute und hiermit den Beginn meiner Promotion erst ermöglichte.

Ebenso möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bei der Bergischen Universität Wuppertal und der Deutschen Krebshilfe bedanken.

## Abstract

In 30 % of all human tumors are point mutations of Ras proteins, which lead to a loss of the intrinsic and GAP-stimulated GTPase activity. Cause of the occurrence of oncogenic Ras mutations in these proteins encoding genes, these proteins become oncogene. In this work, two ways were chosen for the disturbance of the oncogene Ras: The identification of the ligands for the recognition of protein surfaces and the synthesis of artificial receptors for the C-termini of proteins.

The first part of this dissertation describes the development of a new head group for peptide receptor libraries (based on an published synthesis by Anslyn et al.). The association constants with carboxylate were determined in the range of 165-731 M<sup>-1</sup> (100% d<sub>6</sub>-DMSO). These constants decrease strongly with increasing water content of the solvent.

The second part deals with the synthesis and the screening of combinatorial libraries of artificial receptors as well as their characterisation. The head group of Schmuck et al. has a better affinity to carboxylates, for which reason this was used for the synthesis of the receptor libraries. The resulting receptors showed affinity to the target molecules, the C-terminal CaaX-peptides of the Ras proteins. The associated association constants are determined in an organic solvent as well as in an aqueous solvent.

The last part of this thesis consists of the screening and the identification of ligands for the surface of the Ras proteins. Through the investigation of less than 100 compounds, binding ligands of Rheb protein were identified in the lower millimolare range: bisphenol A and 4,4'-biphenol. These bind with a K<sub>D</sub> of **1800** +/- 500 and **1500** +/- 200 μM in one of the switch-II-region adjacent binding pocket. Bisphenol A binds with greater affinity to the K-Ras4B protein (K<sub>D</sub> = **600** +/- 200 μM).

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Krebs .....   | 1         |
| 1.2      | Die Bedeutung von Ras und Rheb für die Onkogenese.....  | 1         |
| <b>2</b> | <b>Allgemeiner Teil</b> .....   | <b>3</b>  |
| 2.1      | <b>Der Aufbau von Ras und Rheb und deren Interaktion mit Inhibitoren und Effektoren</b> .....                           | <b>3</b>  |
| 2.1.1    | Aufbau der Ras-Proteine .....   | 3         |
| 2.1.2    | K-Ras und Rheb.....   | 6         |
| 2.1.3    | Bindestellen der Effektoren .....   | 12        |
| 2.1.4    | Posttranslationale Modifikation durch Farnesyltransferase .....   | 13        |
| 2.2      | <b>Hintergrund der Dissertation</b> .....   | <b>15</b> |
| 2.2.1    | Molekulare Erkennung.....   | 15        |
| 2.2.2    | Bekannte, niedermolekulare Rezeptoren .....   | 17        |
| 2.2.3    | Literaturbekannte Identifikation eines Rezeptors der CaaX-Box von H-Ras .....   | 18        |
| <b>3</b> | <b>Zielsetzung</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....  | <b>20</b> |
| 4.1      | <b>Synthese und Charakterisierung einer neuen Pyridinkopfgruppe zur Erkennung von Carboxylatanionen.</b> .....          | <b>20</b> |
| 4.1.1    | Syntheseroute der Pyridinkopfgruppen .....  | 21        |
| 4.1.2    | NMR-Untersuchungen an der Pyridinkopfgruppe.....  | 24        |
| 4.1.3    | Monte-Carlo-Berechnungen der Pyridinkopfgruppen .....   | 33        |
| 4.1.4    | MINTA-Berechnungen der Pyridinkopfgruppen .....   | 38        |
| 4.1.5    | Einkristallröntgenstrukturanalyse der Pyridinkopfgruppe.....  | 38        |
| 4.2      | <b>Syntheschema der NBD-markierten CaaX-Box von Rheb</b> .....  | <b>40</b> |
| 4.3      | <b>Synthetische Rezeptoren der C-termini von K-Ras, H-Ras und Rheb, basierend auf der Schmuckschen Kopfgruppe</b> ..... | <b>43</b> |
| 4.3.1    | Syntheschema der Schmuckschen Kopfgruppe .....  | 43        |
| 4.3.2    | Syntheschema eines literaturbekannten Acetat-Rezeptors .....  | 44        |
| 4.3.3    | NMR-Titrationsen .....  | 45        |
| 4.3.4    | Verwendete Kopfgruppe und Zusammenstellung der Bibliotheken .....   | 50        |
| 4.3.5    | Synthese der 20 kombinatorischen Bibliotheken .....   | 53        |
| 4.3.6    | Voruntersuchungen zum Screening der Festphasenbibliotheken.....   | 54        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 4.3.7      | MS-Analyse der Testbibliothek (PMD-075) .....  | 56         |
| 4.3.8      | Synthetisierte Hits aus der Testbibliothek PMD-075-01 (54 bis 60).....   | 57         |
| 4.3.9      | <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC-Spektren von Rheb und Visualisierung der Interaktion mit<br>den Rezeptoren der Bibliothek PMD-075 (Testscreening) ..... | 57         |
| 4.3.10     | Ermittlung der optimalen Screening-Konzentration .....   | 67         |
| 4.3.11     | Screening der 20 Bibliotheken gegen markierte CaaX-Peptide.....  | 68         |
| 4.3.12     | Optimierung der Abspaltbedingungen für einzelne Beads.....   | 71         |
| 4.3.13     | MS <sup>n</sup> -Analyse der selektierten Beads .....  | 76         |
| 4.3.14     | Dreidimensionale Darstellung der Massenanalyse.....  | 79         |
| 4.3.15     | Verifizierung der Stereo- und Sequenzisomere (Nachscreening).....  | 83         |
| 4.3.16     | Fehlerbetrachtung des Screenings.....  | 95         |
| 4.3.17     | HPLC-Analyse der nachsynthetisierten Verbindungen (PMD-125-03) 96  |            |
| 4.3.18     | Synthetisierte Hits aus dem Screening der 20 Bibliotheken (PMD-132<br>bis PMD-142).....  | 98         |
| 4.3.19     | Optimierung der Titrationsbedingungen .....  | 99         |
| 4.3.20     | NMR-Titrationsen an den Rezeptoren 69 bis 79 .....   | 112        |
| 4.3.21     | NMR-Titrationsen mit dem 11- und 14-mer der Rheb-CaaX-Box.....   | 114        |
| 4.3.22     | UV-Titrationsen der Rezeptoren.....  | 115        |
| 4.3.23     | ESI-MS des Rezeptor-CaaX-Komplexes.....  | 117        |
| 4.3.24     | Molecular Modeling der Rezeptor-Substrat-Komplexe .....  | 118        |
| 4.3.25     | STD-Experiment am Rheb-Protein .....   | 121        |
| 4.3.26     | Farnesyltransferaseassay .....   | 122        |
| <b>4.4</b> | <b>Fragment-Screening (SAR by NMR) .....</b>   | <b>126</b> |
| 4.4.1      | Grundlagen des Fragment-Screenings (SAR by NMR) .....  | 126        |
| 4.4.2      | Fragment-Screenings am Rheb-Protein .....  | 127        |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>144</b> |
| 5.1        | Synthese einer neuen Kopfgruppe zur molekularen Erkennung von<br>Carbonsäuren .....  | 144        |
| 5.2        | Rezeptoren der CaaX-Box von Rheb, K-Ras4B und H-Ras.....   | 144        |
| 5.3        | Fragmentscreening .....  | 145        |
| <b>6</b>   | <b>Ausblick.....</b>   | <b>146</b> |
| 6.1        | Rezeptoren der CaaX-Box von Rheb, K-Ras4B und H-Ras.....   | 146        |
| 6.2        | Fragmentscreening .....  | 147        |
| <b>7</b>   | <b>Experimenteller Teil.....</b>   | <b>150</b> |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>7.1</b> | <b>Syntheseprotokolle für die Pyridinkopfgruppe.....</b>   | <b>150</b> |
| 7.1.1      | 1,3-Di- <i>tert</i> -butyloxycarbonylguanidin (20, PMD-007-02-01) .....  | 150        |
| 7.1.2      | <i>N</i> -Trifluormethansulfonyl-, <i>N'</i> , <i>N''</i> -di- <i>tert</i> -butyloxycarbonyl-guanidin (21, PMD-009-02-01).....   | 150        |
| 7.1.3      | 3,5-Dibenzyliden-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]-pyridin (13, PMD-001-03-01) .....  | 151        |
| 7.1.4      | 3,5-Dioxo-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin (14, PMD-004-12-01).....   | 152        |
| 7.1.5      | 3,5-Bis(hydroxyimino)-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin (15, PMD-008-03-01) .....  | 153        |
| 7.1.6      | 3,5-Diamino-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin (16, PMD-011-02-01, Gemisch aus <i>meso</i> - und <i>D,L</i> -Isomer) .....                        | 153        |
| 7.1.7      | 3,5-Bis{[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino}-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin (17, PMD-013-04-02 und 18, PMD-013-04-01) .....                   | 154        |
| 7.1.8      | <i>meso</i> -3,5-Diamino-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin (19, PMD-018-03-01) .....   | 155        |
| 7.1.9      | <i>D,L</i> -3,5-Diamino-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin (28, PMD-030-01-01, racemisch).....  | 155        |
| 7.1.10     | <i>syn</i> -3-{3,3'-Bis[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-guanidino}, 5-amino-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin (22, PMD-019-02-04, racemisch).....  | 156        |
| 7.1.11     | <i>anti</i> -3-{3,3'-Bis[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-guanidino}, 5-amino-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin (29, PMD-031-01-03, racemisch)..... | 157        |
| 7.1.12     | <i>syn</i> -5-Amino-3-guanidinium-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin-trifluoracetat (23, PMD-022-01-01, racemisch) .....                          | 158        |
| 7.1.13     | <i>anti</i> -5-Ammonium-3-guanidinium-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin-dipikrat (24, PMD-024-01-03, racemisch).....                             | 159        |
| 7.1.14     | <i>anti</i> -3-{3,3'-Bis[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-guanidino}, 5-acetamido-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin (30, PMD-033-01-02) .....       | 160        |
| 7.1.15     | <i>syn</i> -3-{3,3'-Bis[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-guanidino}, 5-acetamido-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]pyridin (25, PMD-028-                    |            |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
|            | 01-02).....  | 161        |
| 7.1.16     | <i>syn</i> -5-Acetamido-3-guanidinium-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]-pyridin-trifluoracetat (26, PMD-029-02-01) .....  | 162        |
| 7.1.17     | <i>syn</i> -5-Acetamido-3-guanidinium-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]-pyridin-dipikrat (27, PMD-032-02) .....   | 163        |
| 7.1.18     | <i>anti</i> -5-Acetamido-3-guanidinium-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[ <i>b,e</i> ]-pyridin-trifluoracetat (31, PMD-034-01-01) .....   | 164        |
| <b>7.2</b> | <b>Syntheseprotokolle für die Schmucksche Kopfgruppe .....</b>   | <b>165</b> |
| 7.2.1      | 5-[[[( <i>tert</i> -Butoxy)carbonyl]amino}methanimidoyl]carbamoyl]-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbonsäure-benzylester (48, PMD-062-01-01) .....  | 165        |
| 7.2.2      | Triethylammonium 5-[[[( <i>tert</i> -Butoxy)carbonyl]amino}methanimidoyl]-carbamoyl]-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carboxylat (49, PMD-065-01-02).....  | 166        |
| 7.2.3      | <i>tert</i> -Butyl <i>N</i> -{[(5-[(1 <i>S</i> )-1-carbamoyl-2-methylpropyl]carbamoyl]-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)form-amido]-methanimidoyl}carbamat (50, PMD-066-01-03) .....                          | 166        |
| 7.2.4      | 2- <i>N</i> -(Azaniumylmethanimidoyl)-5- <i>N</i> -[(1 <i>S</i> )-1-carbamoyl-2-methylpropyl]-1 <i>H</i> -pyrrole-2,5-dicarboxamid-trifluoracetat (51, PMD-067-02-03).....                           | 167        |
| 7.2.5      | 2- <i>N</i> -(Azaniumylmethanimidoyl)-5- <i>N</i> -[(1 <i>S</i> )-1-carbamoyl-2-methylpropyl]-1 <i>H</i> -pyrrole-2,5-dicarboxamid-2,4,6-trinitrobenzen-1-olat (32, PMD-068-01-01).....              | 168        |
| <b>7.3</b> | <b>Syntheseprotokolle für die NBD-markierte CaaX-Box von Rheb .....</b>  | <b>168</b> |
| 7.3.1      | 6-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexansäure (Hydrochlorid) (39, PMD-095-01-01).....  | 168        |
| 7.3.2      | (2 <i>S</i> )-2-[(2 <i>S</i> )-2-[(9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfanyl)butansäuremethylester (33, PMD-041-02-F2).....                              | 169        |
| 7.3.3      | (2 <i>S</i> )-2-[(2 <i>S</i> )-2-Amino-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfanyl)butansäuremethylester (34, PMD-045-02-01) .....   | 170        |
| 7.3.4      | (2 <i>S</i> )-3-( <i>tert</i> -Butoxy)-2-[(2 <i>R</i> )-2-[(9 <i>H</i> -fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-3-[(triphenylmethyl)sulfanyl]propanamido]propansäuremethylester (35, PMD-040-01-01)..... | 170        |
| 7.3.5      | (2 <i>S</i> )-3-( <i>tert</i> -Butoxy)-2-[(2 <i>R</i> )-2-[(9 <i>H</i> -fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-3-[(triphenylmethyl)sulfanyl]propanamido]propansäure (36, PMD-043-01-03).....            | 171        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 7.3.6      | (2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-3-( <i>tert</i> -Butoxy)-2-[(2R)-2-[(9 <i>H</i> -fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino]-3-[(triphenylmethyl)sulfanyl]propanamido]propanamido]-3-methylbutan-amido]-4-(methylsulfanyl)butansäuremethylester (37, PMD-046-02-03).....       | 172        |
| 7.3.7      | (2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-Amino-3-[(triphenylmethyl)sulfanyl]propanamido]-3-( <i>tert</i> -butoxy)propanamido]-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfanyl)butansäuremethylester (38, PMD-069-01-01) .....  | 173        |
| 7.3.8      | (2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-3-( <i>tert</i> -Butoxy)-2-[(2R)-2-{6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-amino]hexanamido}-3-[(triphenylmethyl)sulfanyl]propanamido]propanamido]-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfanyl)butansäuremethylester (40, PMD-070-01-12) ..... | 173        |
| 7.3.9      | (2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-3-( <i>tert</i> -Butoxy)-2-[(2R)-2-{6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-amino]hexanamido}-3-[(triphenylmethyl)sulfanyl]propanamido]propanamido]-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfanyl)butansäure (41, PMD-071-02-01).....             | 174        |
| 7.3.10     | (2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-3-Hydroxy-2-[(2R)-2-{6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-hexanamido}-3-sulfanylpropanamido]propanamido]-3-methylbutanamido]-4-(methyl-sulfanyl)butansäure (Trifluoracetat, 42, PMD-073-01-02).....                              | 175        |
| <b>7.4</b> | <b>Festphasensynthese der nachsynthetisierten Rezeptoren 54 bis 60 (PMD-098 bis PMD-104), allgemeines Syntheseprotokoll (Syro II).....</b>   | <b>176</b> |
| <b>7.5</b> | <b>Festphasensynthese der nachsynthetisierten Rezeptoren 69 bis 79 (PMD-132 bis PMD-142), allgemeines Syntheseprotokoll (Syro II).....</b>   | <b>179</b> |
| <b>7.6</b> | <b>Syntheseprotokolle für die TMA-Salze der CaaX-Peptide.....</b>  | <b>186</b> |
| 7.6.1      | [Ac-CSVM-O] <sup>2-</sup> [TMA] <sup>+</sup> <sub>2</sub> (169, PMD-154-02-01).....  | 186        |
| 7.6.2      | [Ac-CVIM-O] <sup>2-</sup> [TMA] <sup>+</sup> <sub>2</sub> (170, PMD-151-03-02) .....   | 187        |
| 7.6.3      | [Ac-CVLS-O] <sup>3-</sup> [TMA] <sup>+</sup> <sub>3</sub> (171, PMD-147-06-01).....  | 187        |
| <b>7.7</b> | <b>Synthese der (kombinatorischen) Bibliotheken .....</b>  | <b>188</b> |
| 7.7.1      | Synthese der Testbibliothek (400 Verbindungen, PMD-075-01).....  | 188        |
| 7.7.2      | Synthese der 20 kombinatorischen Bibliotheken (8000 Verbindungen) .....  | 190        |
| 7.7.3      | Parallele Synthese der Strukturvorschläge (74 Verbindungen, PMD-125) .....   | 191        |
| <b>7.8</b> | <b>Screening der festphasengebundenen Rezeptoren .....</b>   | <b>193</b> |



|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| 7.8.1       | Screening der kombinatorischen Testbibliothek (400 Verb.) .....  | 193        |
| 7.8.2       | Screening der 20 kombinatorischen Bibliotheken (8000 Verb.).....   | 193        |
| 7.8.3       | Screening der Strukturvorschläge (Nachscreening der 74<br>Verbindungen).....   | 195        |
| <b>7.9</b>  | <b>Single-Bead-Analyse .....</b>   | <b>196</b> |
| 7.9.1       | Direktinjektions-MS.....   | 196        |
| 7.9.2       | Direktinjektions-MS <sup>n</sup> .....   | 197        |
| <b>7.10</b> | <b>HPLC-Analyse der nachsynthetisierten Verbindungen (PMD-125-03)</b>  | <b>198</b> |
| <b>7.11</b> | <b>NMR-Titrationsen.....</b>   | <b>198</b> |
| 7.11.1      | Titrationsen der Pyridinkopfgruppen mit TMA-Acetat.....  | 198        |
| 7.11.2      | NMR-Titrationsen der Rezeptorpikrate mit den TMA-Salzen der CaaX-<br>Peptide .....                                       | 204        |
| 7.11.3      | NMR-Titrationsen der Rezeptorpikrate mit den CaaX-Peptiden (11- und<br>14-mer).....                                      | 206        |
| <b>7.12</b> | <b>Farnesyltransferaseassay.....</b>   | <b>206</b> |
| 7.12.1      | Chemische Synthese eines farnesylierten CaaX-Peptides von Rheb<br>(172, Ac-ASQGKSSC(Farn)SVM-OH*TFA, PMD-168-01-04)..... | 206        |
| 7.12.2      | Biochemische Farnesylierung und Durchführung der FTaseassays..   | 207        |
| <b>8</b>    | <b>Literaturangaben .....</b>  | <b>210</b> |

## Abkürzungsverzeichnis:

---

|                  |   |
|------------------|---|
| AC5C             | 1-Amino-1-cyclopentancarbonsäure (Zykloleucin)  |
| (aq)             | aqua, wässrige Lösung   |
| Äq.              | Äquivalent(e)   |
| AS               | Aminosäure(n)   |
| ber.             | berechnet, theoretisch zu erhaltender Messwert  |
| Boc              | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl   |
| CRD              | Cystein-reiche Domäne   |
| CyH              | Cyclohexan  |
| D                | Durchmesser   |
| DC               | Dünnschichtchromatografie   |
| DCAI             | 4,6-Dichlor-3-(2-aminoethyl)-2-methyl-indol   |
| DCM              | Dichlormethan   |
| DIC              | <i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid   |
| DIPEA            | Diisopropylethylamin  |
| DMAP             | 4-(Dimethylamino)pyridin  |
| DME              | 1,2-Dimethoxyethan  |
| DMF              | <i>N,N</i> -Dimethylformamid  |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid  |
| EC <sub>50</sub> | mittlere effektive Konzentration  |
| ESI              | Elektronensprayionisation   |
| EtOAc            | Ethylacetat   |
| Fmoc             | Fluorenylmethoxycarbonyl  |
| FPP              | Farnesylpyrophosphat  |
| FTase            | Farnesyltransferase   |
| G                | Gibbs-Energie   |
| GABA             | $\gamma$ -Aminobuttersäure  |
| GAP              | GTPase aktivierende Proteine  |
| gem.             | gemessen, experimenteller Messwert  |
| ges.             | gesättigt   |
| GTP              | Guanosintriphosphat   |
| GDP              | Guanosindiphosphat  |
| HBTU             | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium<br>hexafluorophosphat |

---

---

|                  |   |
|------------------|---|
| HeLa-Zellen      | Zelllinie des Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks <sup>[3]</sup>              |
| H-Ras            | Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog                                     |
| HMBA             | hydroxymethylbenzoic acid, Hydroxymethylbenzoesäure                           |
| HOBT             | 1-Hydroxybenzotriazol   |
| HRMS             | hochauflösende Massenspektrometrie  |
| HPLC             | Hochleistungsflüssigkeitschromatografie                                       |
| HSQC             | heteronuclear single-quantum coherence  |
| HV               | Hochvakuum  |
| IC <sub>50</sub> | mittlere inhibitorische Konzentration   |
| Inp              | 4-Piperidinylcarbonsäure (isonipectic acid)                                   |
| IR               | Infrarotspektroskopie   |
| ITC              | Isotherme Titrationskalorimetrie  |
| Konfig.          | Konfiguration   |
| K-Ras            | Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog                                    |
| $\lambda_{exc.}$ | excitation wavelength, Anregungswellenlänge                                   |
| $\lambda_{em.}$  | emission wavelength, Emissionswellenlänge                                     |
| $\lambda_{max.}$ | Absorbtionsmaximum  |
| MeOH             | Methanol  |
| m. p.            | Schmelzpunkt (melting point)  |
| MS               | Massenspektrometrie   |
| mTOR             | mammalian target of rapamycin   |
| Na-DSS           | Natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat, wasserlöslicher<br>NMR-Standard |
| NBD              | 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole-4-yl   |
| NMR              | Kernresonanzspektroskopie   |
| NORE-1           | novel Ras effector  |
| PI3K             | Phosphoinositid-3-Kinasen   |
| Pol              | Polymer (Trägermaterial der Festphasensynthese)                               |
| PyBOP            | (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium<br>hexafluorophosphat         |
| C <sub>q</sub>   | quartärneres Kohlenstoffatom  |
| Raf              | Rapid fibrosarcoma, eine Proteinkinase  |
| Rap1A            | Ras related protein   |

---

---

|                    |  |
|--------------------|--|
| Ras                | Rat sarcoma; fungiert zudem als Abkürzung für die Proteine der Ras-Superfamilie als auch (kleingeschrieben) für die zugehörigen Gene, die diese Proteine codieren. |
| RBD                | Ras bindende Domäne  |
| Rez.               | Rezeptor   |
| r. f.              | relative fluorescence: Dimensionslose, relative Fluoreszenz  |
| Rheb               | Ras homolog enriched in the brain  |
| RMSE               | root mean square error   |
| SPPS               | "solid phase peptide synthesis", Festphasenpeptidsynthese  |
| STD                | saturation transfer difference   |
| TFA                | Trifluoressigsäure (trifluoro acetic acid)   |
| Thz                | Thiazolidin-4-carbonsäure  |
| ThzMe <sub>2</sub> | 2,2-Dimethylthiazolidin-4-carbonsäure  |
| Tic                | 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure  |
| TIPS               | Triisopropylsilan  |
| TNF- $\alpha$      | Tumornekrosefaktor- $\alpha$   |
| Trt                | Triphenylmethyl  |
| u                  | unit, atomare Masseneinheit  |
| US                 | Ultraschall  |
| UV-VIS             | ultraviolettes-sichtbares Licht  |
| Verb.              | Verbindung(en)   |
| WT                 | Wildtyp  |

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs

Als Krebs wird eine bösartige Gewebeneubildung bezeichnet, bei der ausgehend von dem Primärtumor Metastasen in das umliegende Gewebe abgesiedelt werden. In Zellen bilden sich ständig, durch verschiedenste Einflüsse (Cancerogene, UV-Licht, radioaktive Strahlung, spezielle Infektionen etc.) Mutationen. Können diese Mutationen durch die zelleigenen Reparatursysteme nicht mehr repariert werden (was mit zunehmenden Alter oder durch äußere Einflüsse der Fall sein kann), kann es zur Bildung von Krebszellen kommen. Diese stimulieren ihre eigene Zellteilung und reagieren nicht auf wachstumshemmende Signale von außen. Prinzipiell können sich Krebszellen unendlich oft teilen und in wenigen Fällen, (unter Labormaßstab) geschieht dies sogar seit Jahrzehnten (HeLa-Zellen).<sup>[4]</sup>

Krebs gehört zu den weltweit häufigsten Todesursachen: 2008 verstarben 7.6 Millionen Menschen infolge dieser Erkrankung, was einem 13 %-igem Anteil an allen Todesursachen entspricht. Über 70 % der durch Krebs verursachten Todesfälle treten in Ländern mit niedrigen und mittleren Einkommen auf.<sup>[5]</sup> Krebs ist also ein globales Problem, das auch Entwicklungsländer trifft. 2008 waren jeweils zwei von vier der häufigsten Krebsarten bei Männern (Magen- und Leberkrebs) und Frauen (Cervix- und Magenkrebs) infektionsbedingt.<sup>[6]</sup>

## 1.2 Die Bedeutung von Ras und Rheb für die Onkogenese

In 30 % aller menschlichen Tumoren liegen Punktmutationen der Ras-Proteine vor, die zu einem Verlust der intrinsischen als auch GAP-stimulierten GTPase-Aktivität führen. Da Ras über seine Schalterfunktion entscheidend das Zellwachstum regulieren kann und onkogenes Ras ständig im "eingeschalteten" Zustand Wachstumssignale weiterleitet (dauerhafte Aktivierung der nachgeschalteten Effektorsignalwege), ist seine Bedeutung für das Krebsgeschehen enorm.<sup>[21,13]</sup>

Ursache für das Auftreten von onkogenem Ras sind Mutationen in den entsprechenden, diese Proteine codierenden Genen (Ras oder "Rat sarcoma" ist eine Abkürzung für die Superfamilie der Ras-Proteine. „ras“ für die zugehörigen Gene).

K-Ras spielt eine besonders entscheidende Rolle für die Entstehung von Krebs: Mutationen dieses Proteins erscheinen in vielen menschlichen Neoplasien und verursachen Lungen-, Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs. Zusammen mit H- und N-Ras finden sich diese in 33 % aller menschlichen Tumoren.<sup>[7]</sup>

Insbesondere Darmkrebs ist mit K-Ras-Mutationen assoziiert: In einer 2006 veröffentlichten Studie bei der Cetuximab (ein Antikörper der Rezeptor-Tyrosin-Kinase) zur Therapie von 30 Patienten mit metastasierenden, kolorektalen Tumoren eingesetzt wurde, sprachen nur 11 (37 %) Patienten auf die Therapie an (hier wurden keine K-Ras-Mutationen gefunden). Von den verbleibenden 19 Patienten zeigten 68 % Mutationen in K-Ras. Die Patienten, die K-Ras-Mutationen aufwiesen und entsprechend nicht auf Cetuximab ansprachen, überlebten durchschnittlich 7 Monate, diejenigen ohne Mutationen (der zugrunde liegenden Gene) 16 Monate.<sup>[8]</sup>

Das zur Ras-Superfamilie<sup>[9]</sup> gehörende Rheb-Protein spielt eine Rolle bei der Ausbildung der tuberösen Sklerose, einer Erbkrankheit, die zu Fehlbildungen und (Gehirn-)Tumoren führt. Diese wiederum verursachen Epilepsie und Behinderungen. Ursächlich für diese Erkrankung ist die Unfähigkeit den Hamartin-Tuberin-Komplex zu bilden. Hamartin (TSC1) und Tuberin (TSC2) sind Tumorsuppressorproteine, wobei Tuberin Homologien zu Rap (einem GTPase-aktivierenden Protein) aufweist und mit dem Rheb-Protein wechselwirkt.<sup>[10]</sup>

Der Hamartin/Tuberin-Komplex wiederum wirkt als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) auf Rheb. Die Inhibierung des Komplexes bzw. die Bildung von (bestimmten) Mutationen der zugehörigen Gene führt entsprechend zu einer Aktivierung von Rheb; also der bevorzugten Bildung von Rheb•GTP.<sup>[36,11,10]</sup>

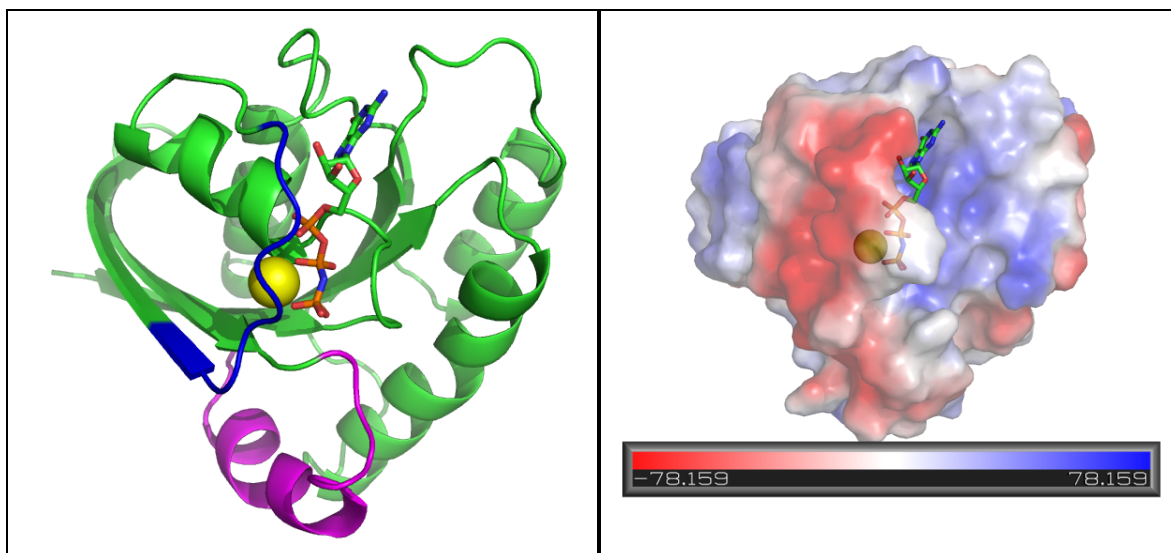
Eine gezielte Beeinflussung des Rheb-Proteins (durch synthetische Liganden oder Rezeptoren) könnte sich also positiv bei der Behandlung der tuberösen Sklerose auswirken. Synthetische Liganden könnten die Wechselwirkung mit den Effektoren stören (vermindern) und C-terminale Rezeptoren die Membraneinbindung verhindern (herabsetzen).

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Der Aufbau von Ras und Rheb und deren Interaktion mit Inhibitoren und Effektoren

#### 2.1.1 Aufbau der Ras-Proteine

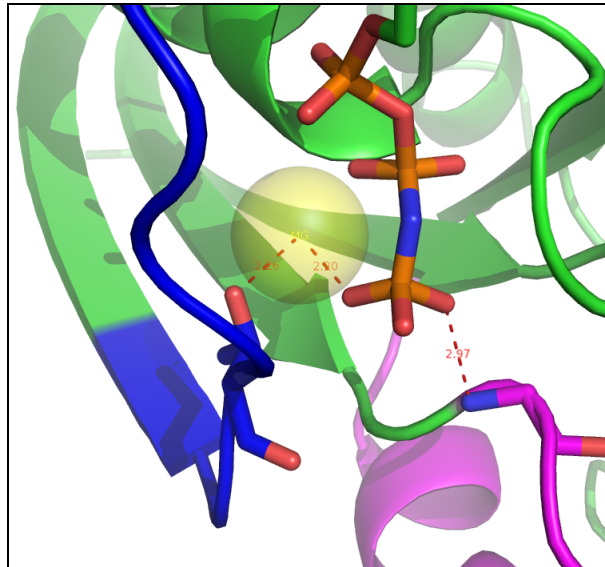
Ras-Proteine wirken als GTPasen, die GTP zu GDP hydrolysieren. In den beiden gebundenen Zuständen (Ras•GTP sowie Ras•GDP) nimmt Ras die Funktion eines molekularen Schalters ein. Hierzu ist eine drastische Änderung der Konformation des Proteins nötig, die durch die sogenannten Switch-Regionen (I und II) bewerkstelligt werden. Die Switch-I-Region von H-Ras (Abb. 1) umfasst die Aminosäuren (AS) 30-38, die Switch-II-Region ist bei den AS 60-76 lokalisiert. Die Konformationen der Switch-Regionen beider Zustände unterscheiden sich hierbei so stark, dass nur die GTP-gebundene Form mit Effektoren (RAF, PI3K u. a.) wechselwirkt (Schalterstellung „ein“).<sup>[12,13,14]</sup>



**Abb. 1:** Röntgenstruktur des Komplexes aus H-Ras und einer nicht hydrolysierbaren Form von GTP (H-Ras•GppNHp, pdb-Code: 5P21). Hierbei markiert der blaue Teil die Switch-I-, der magentafarbene die Switch-II-Region. Das durch GppNHp komplexierte Magnesiumion ist gelb markiert. Die rechte Abb. zeigt die berechnete (Oberflächen-)Verteilung des elektrostatischen Potentials (im Vakuum).

Hierzu interagieren (bei H-Ras•GppNHp) die AS des Ras (G13, G15, K16, S17, A18, F28, V29, T35, G60, K117, D119, S145, A146, K147) direkt mit dem Guanin-nucleotid(-Analogon). Die konservierten AS Threonin 35 und Glycin 60 spielen

hierbei eine besondere Rolle, da sie direkt, (bzw. über das Mg-Ion vermittelt) an dem zu hydrolysierenden  $\gamma$ -Phosphat binden.<sup>[15,13]</sup> Thr35 koordiniert an das Magnesiumion, Gly60 an das  $\gamma$ -Phosphat selbst (Abb. 2). Im Zuge der irreversiblen Hydrolyse erfahren diese AS eine starke konformative Veränderung und heben die „gespannte“ Konformation der Switch-Regionen auf. Hierbei verändert sich die Switch-I-Region so stark, dass keine Effektoren mehr binden können (inaktive Form).<sup>[16,13]</sup>



**Abb. 2:** Vergrößerung von H-Ras•GppNHp (pdb-Code: 5P21); die Abstände zwischen Thr35 und dem Magnesiumion sowie Gly60 und dem  $\gamma$ -Phosphat betragen lediglich 0,2 – 0,3 nm (Abstände zwischen den Atomkernen). Bei Betrachtung der sphärischen Van-der-Waals-Radien liegen die Atome im direkten Kontakt.

Die intrinsische Hydrolyseaktivität der Ras-Proteine ist jedoch für die Schalterfunktion von untergeordneter Bedeutung (geringe Reaktionsgeschwindigkeit von  $0,02 \text{ min}^{-1}$ ). Erst nach Interaktion mit aktivierenden Proteinen, den RasGAPs, steigt die Aktivität ungefähr um den Faktor  $10^5$ .<sup>[13,17,18,19]</sup>

Im GAP-Ras•GTP-Komplex ragt wahrscheinlich eine Arginin-Seitenkette des GAP-Proteins bis in das katalytische Zentrum der GTPase (Ras) und führt dort zu einer Stabilisierung des Übergangszustandes der Hydrolyse. Da eine Kristallisation mit GTP nicht möglich ist ( $t_{1/2} \sim 30 \text{ min}$ ), wurde ein Mimetikum des sich abspaltenden  $\gamma$ -Phosphatrestes benutzt (Tetrafluoroaluminat). Dieses weist die planare Konformation des Übergangszustandes auf, die das  $\gamma$ -Phosphat nach Angriff von nukleophilem Wasser und beginnender Abspaltung von dem verbleibenden GDP einnimmt.<sup>[20,21,22]</sup>



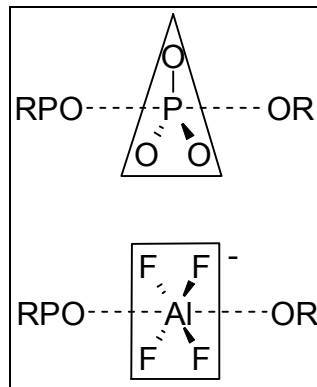


Abb. 3: Die Abbildung zeigt den Übergangszustand des  $\gamma$ -Phosphats (oben) und des mimetischen Tetrafluoroaluminats (unten).<sup>[20]</sup>

Abb. 4 zeigt den Komplex aus Ras und GAP und verdeutlicht die Interaktion der Argininseitenkette mit dem Übergangszustand. Diesen detaillierten Einblick in die Natur des ÜZ der GTPase-Reaktion ermöglichte die von Wittinghofer et al. erstellte Röntgenstruktur.<sup>[22]</sup>

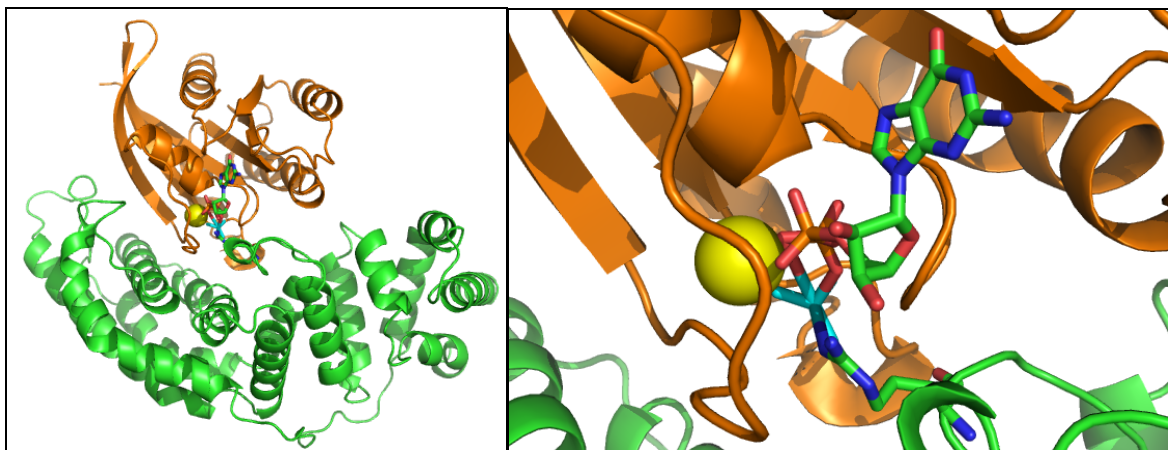


Abb. 4: GAP-334-Ras•GDP-Komplex (pdb-Code: 1WQ1). Die rechte Abbildung zeigt eine Vergrößerung, in der die Wechselwirkung von Arg789 mit dem Tetrafluoroaluminat besser sichtbar ist. Die grüne Markierung zeigt das GAF-334, die orange H-Ras. Das Magnesiumion ist gelb, Tetrafluoroaluminat cyan markiert.

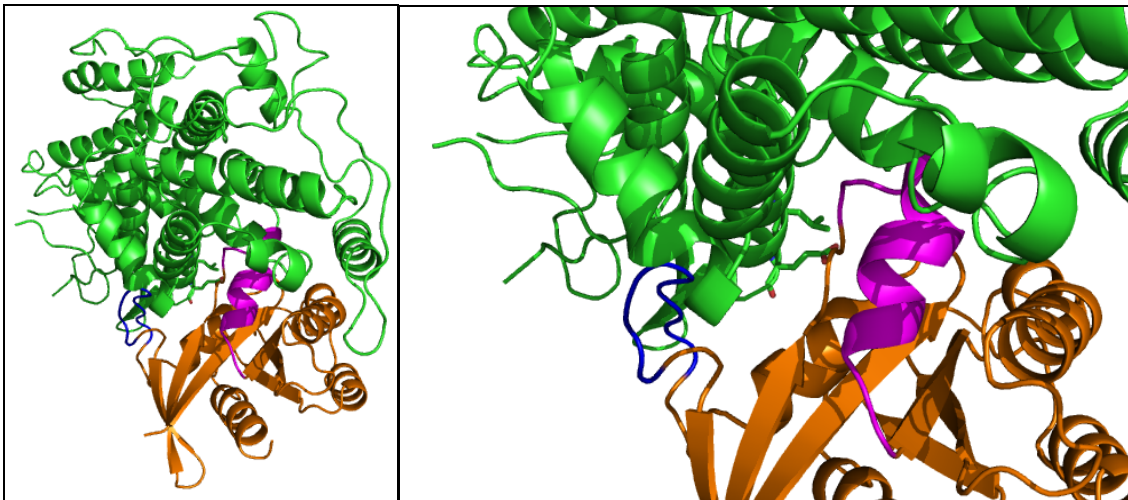
Im GAP-334-Ras•GDP-Komplex erreicht eine Seitenkette des GAP-334 (Arg789) das Tetrafluoroaluminat, das den Übergangszustand imitiert. Hieraus wird gefolgert, dass dieses Guanidiniumion einen negativen Ladungsüberschuss des Übergangszustandes aufnimmt und diesen dadurch stabilisiert. Experimente an ähnlichen Proteinen zeigten, dass die Mutation genau dieses Arginins zu einer Herabsetzung der katalytischen Aktivität um den Faktor 2000 führt.<sup>[13,23,21,22,24]</sup>

Der Austausch von Ras•GDP mit cytosolischem GTP zu Ras•GTP versetzt Ras in den aktiven, „eingeschalteten“ Zustand. GTPasen wie Ras binden jedoch die

Guaninnukleotide mit hoher Affinität, was den natürlichen Austausch von Ras mit dem im Zytosol im Überschuss vorhandenen GTP erschwert (außerhalb einer Zelle tauscht Ras•GDP mit GTP langsam aus).<sup>[25]</sup>

Der Wechsel Ras•GDP  $\rightleftharpoons$  Ras•GTP ist jedoch innerhalb einer Zelle schnell und wird durch Austauschproteine ermöglicht; den GEFs (Guanosin exchange factor). GEFs wie SOSs (son of sevenless), führen bei der Bindung an Ras zu einer Verdrängung des Nukleotids. Da der Prozess (über Zwischenstufen) reversibel ist und (zytosolisch) hauptsächlich GTP vorliegt, wird nach dem Auflösen des Ras-SOS-Komplexes überwiegend Ras•GTP gebildet.<sup>[13]</sup>

Die Struktur des Ras-SOS-Komplexes wurde von P. A. Boriack-Sjodin gelöst:<sup>[26]</sup>



**Abb. 5: Ras-SOS-Komplex (pdb-Code: 1BKD).** Die rechte Abb. zeigt die Vergrößerung der eigentlichen Bindetasche des Nukleotids, in der nun die AS Glu942 sowie Leu938 von SOS hineinragen. SOS ist grün, H-Ras orange, dessen Switch-I-Region blau und die Switch-II-Region magenta markiert.

Im Komplex mit SOS verändert sich die Struktur der Nukleotid-Bindetasche und Aminosäuren von SOS ragen in die Region der ursprünglichen Bindetasche. Hierbei verändert sich die Struktur der Switch-Regionen (siehe Abb. 1 und Abb. 2) enorm und die ursprünglich an der Bindung des Magnesiumions beteiligte AS Thr30 ist im Komplex weit entfernt.<sup>[13,26]</sup>

### 2.1.2 K-Ras und Rheb

**K-Ras** (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog): In der N-terminalen Domäne (K-Ras: 1-86) der Ras-Proteine finden sich Homologien (also ähnliche Sequenzen

bzw. Strukturen), während hingegen die C-terminale Domäne (K-Ras: 87-172) variable Regionen enthält. Bei K-Ras4B ist diese Eigenschaft besonders ausgeprägt, da sich hier eine Polylysinsequenz befindet: Die C-terminalen 14 AS beinhalten achtmal Lysin (nach posttranslationaler Modifikation sind es sogar acht von elf). Dieser sogenannte Polylysinstretch ermöglicht den Einbau des Proteins in die Plasmamembran (nach Farnesylierung), ohne dass eine zusätzliche, zweite Prenylierung stattfindet.<sup>[12,13]</sup>

Dies lässt sich durch ionische Interaktionen der protonierten Lysinseitenketten ( $R-NH_3^+$ ) mit den negativ geladenen Anteilen ( $R-CO_2^-$ ) der (membranlokalisierten) Phospholipide erklären.<sup>[13]</sup>

In den vergangenen zwei Dekaden wurden einige Verbindungen gefunden, die an verschiedene Positionen der K-Ras-Oberfläche binden und sogar in der Lage waren, Protein-Protein-Wechselwirkungen (hauptsächlich mit dem GEF SOS) zu inhibieren.<sup>[12,27,28,29,30,31,32,33]</sup>

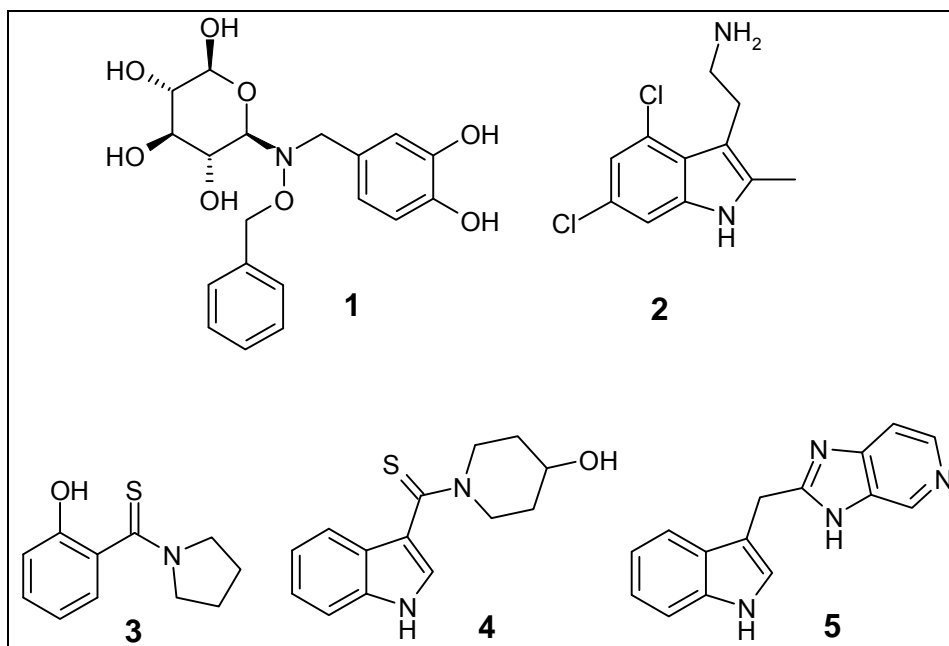
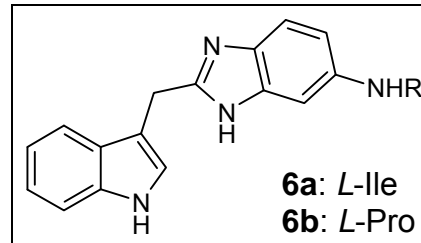


Abb. 6: Literaturbekannte Binder des K-Ras-Proteins.<sup>[12]</sup>

Die aufgeführten Verbindungen 1 bis 5 (Abb. 6) zeigen hierbei die gleiche Bindestelle, wobei stets ein Aromat (Benzolring oder Indol) in einer Bindenische (auf der Oberfläche) liegt.

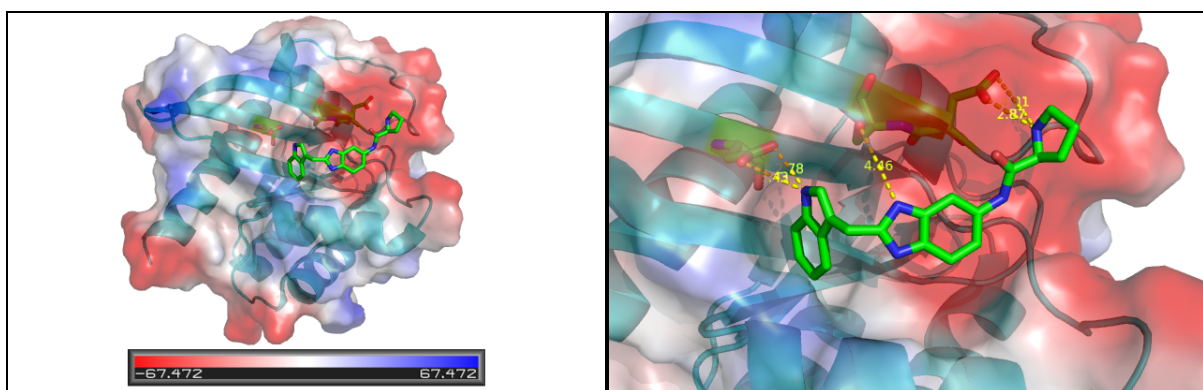
DCAI (Dichlormethylaminoethylindol) 2, das aus einem Screening von 3300 Verbindungen hervorgegangen ist, bindet lediglich mit einer moderaten  $K_D$  von 1.2 mM an K-Ras. Die Verbindung erwies sich in den aussagekräftigeren Assays

geringfügig wirkungsvoller: DCAI blockiert den Nukleotidaustausch mit einer  $IC_{50}$  von  $342 \mu\text{M}$  und verhindert die Aufnahme einer Ras-bindenden Domäne (Venus-RBD-CRD) in die Plasmamembran mit einer  $EC_{50}$  von  $15.8 \mu\text{M}$ .<sup>[34]</sup>



**Abb. 7:** Die Abbildung zeigt zwei optimierte, literaturbekannte Binder des K-Ras-Proteins.<sup>[33]</sup>

Optimierte Verbindungen, wie die Aminobenzimidazol-Derivate **6a** und **6b**, die von Fesik et al. durch ein Screening von 11000 Fragmenten gefunden wurden, zeigen für die Bindung an K-Ras Dissoziationskonstanten von  $190$  (*L-Ile*) und  $340 \mu\text{M}$  (*L-Pro*) und einen  $IC_{50}$ -Wert von  $\sim 1 \text{ mM}$  (**6b**) für die Inhibition der K-Ras-SOS-Wechselwirkung. Hierbei bindet sich das terminale Prolin bereits an einer Position, die in der Kristallstruktur aus Ras-SOS den Teilbereichen von SOS entspricht. Zudem bildet der Prolinrest eine zusätzliche ionische Wechselwirkung zu einer Carbonsäureseitenkette von K-Ras (Asp38, Abb. 8). Der Ligand ist hierbei, ausgehend von der kleinen Bindetasche, die die Aromaten einiger Liganden aufnimmt (**1** bis **5**), über einen kleinen Graben orientiert, in dem sich auch die Reste von **3** bis **6** ausrichten.<sup>[33]</sup>



**Abb. 8:** Die Abbildung zeigt die literaturbeschriebene Kokristallstruktur von Ligand **6** und KRas4B. Dargestellt ist eine Überlagerung der Bänderdarstellung mit dem elektrostatischen Potential der Oberfläche (im Vakuum). Rechts: Vergrößerung und Markierung der interagierenden Seitenketten Asp38, Ser39, Asp54. (pdb-Code: 4EPY)<sup>[33]</sup>

Generell sind Verbindungen mit Dissoziations- bzw. Inhibitionskonzentrationen im oberen  $\mu$ -molaren oder sogar millimolarem Bereich zu schlecht um als Therapeutikum in Frage zu kommen. Es gibt einige Beispiele für die Inhibition von

Protein-Protein-Wechselwirkungen am Ras-Protein, jedoch befinden sich die entsprechenden Werte ebenfalls in diesem Bereich.

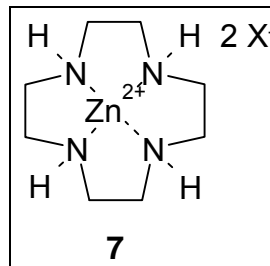


Abb. 9: Das von Kalbitzer et al. beschriebene Zinkzyklen (7).

Das von Kalbitzer et al. entwickelte Zinkzyklen **7** bindet mit millimolarer Affinität an Ras•GppNHp und zeigt keine direkte Wechselwirkung mit Effektoren. Es stabilisiert vielmehr eine inaktive Gleichgewichtskonformation des Proteins (Zustand 1), die eine geringere Affinität mit Effektoren aufweist. Ohne Zyklen **7** liegen zwei ausgeprägte Konformationen (Zustand 1 und 2) vor, die in einem Verhältnis (2)/(1) von 0.9 stehen. Zustand 1 wechselwirkt mit GEFs, Zustand 2 mit Effektoren; hierbei ist die Wechselwirkung von Zustand 2 mit Effektorproteinen um den Faktor 20 größer.

Durch NMR-Untersuchungen mit dem Zink- und Kupferzyklen konnte zum einen die Wechselwirkung mit den Phosphoratomen des Guaninnukleotids, zum anderen die Position der Bindung festgestellt werden. Hierbei wurde neben der Bindestelle am  $\gamma$ -Phosphat eine weitere Position in der Nähe des C- und N-Terminus (His166, Asp107) identifiziert. Die 2010 publizierte Kristallstruktur des Zink-Zyklens mit H-Ras zeigt jedoch nur eine Bindung an der zweiten (C- und N-terminalen) Position:

Die Bindung des Zyklens **7** stabilisiert selektiv den Zustand 1 des Proteins und mindert die Wechselwirkung mit einem Effektor: Mittels einer isothermen Titrationskalorimetrie konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Raf-RBD an Ras in Gegenwart des Zn-Zyklens gestört wird.<sup>[31]</sup>

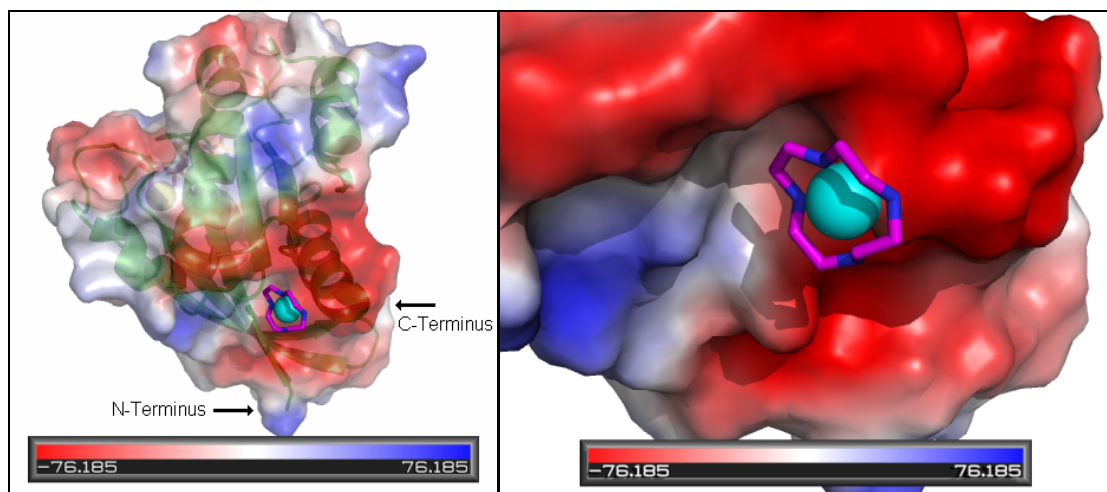


Abb. 10: Literaturbekannte Röntgenkristallstruktur des Zinkzyklus mit H-Ras (Ras•Mg<sup>2+</sup>•GppNHp); Dargestellt ist eine Überlagerung der Bänderdarstellung mit dem elektrostatischen Potential der Oberfläche (im Vakuum). Rechts: Vergrößerung der Potentialoberfläche (pdb-Code: 3L8Y).<sup>[31]</sup>

Sulindac (**8b**), das unter physiologischen Bedingungen zu dem eigentlichen Wirkstoff Sulindacsulfid metabolisiert wird, verhindert die durch Ras induzierte maligne Transformation und eine durch die Ras/Raf-RBD-Wechselwirkung bedingte, gesteigerte Genexpressionsrate. Sulindacsulfid (**8a**) vermindert zudem den Guanin-nukleotidaustausch und beschleunigt die durch p120GAP vermittelte GTP-Hydrolyse.<sup>[12,28]</sup>

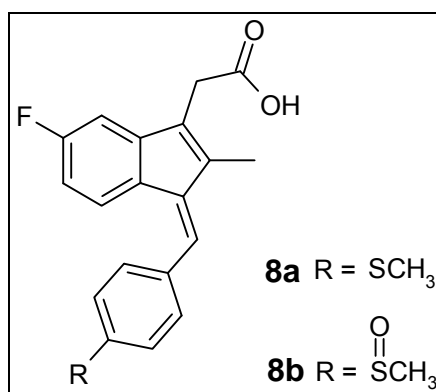


Abb. 11: Die Abbildung zeigt Sulindacsulfid (**8a**) und Sulindac (**8b**).

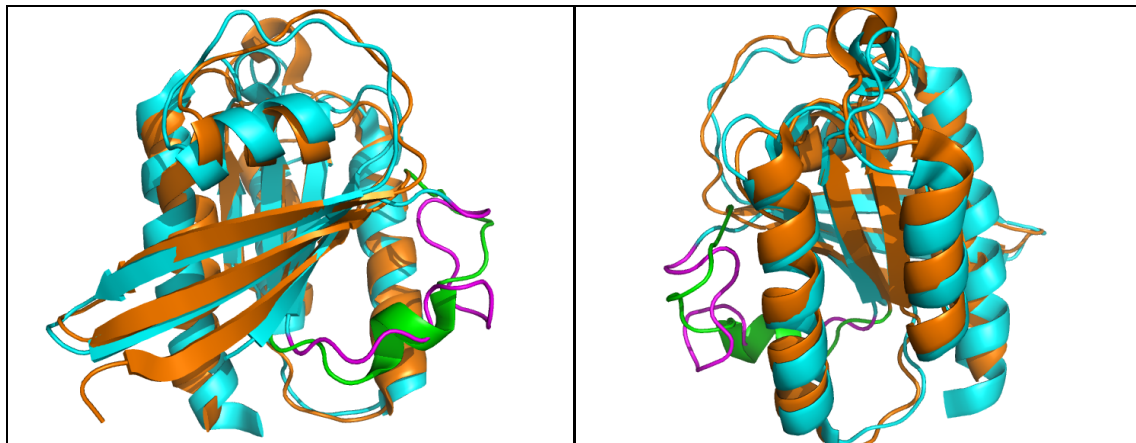
Sulindac ruft damit zwar einige wünschenswerte Effekte hervor, jedoch sind die bestimmten Affinitäten für die Wechselwirkung mit SOS und Raf im Bereich von 100-200 µM und damit eher moderat (ein von Sulindac abgeleiteter Inhibitor erreichte einen IC<sub>50</sub>-Wert von 30 µM).<sup>[12,29,28,29,35]</sup> Ein weiterer Nachteil des Sulindac besteht darin, dass noch keine Kristallstruktur vorliegt und der durch NMR bestimmte Ort der Bindung nicht exakt definiert ist (schwache Interaktionen wurden bei den AS Lys16,



Val29 und Tyr40 gefunden). Die genaue Lage und Orientierung des Moleküls ist jedoch für die Leitstrukturoptimierung essentiell.<sup>[12,29]</sup>

**Rheb** (Ras homolog enriched in the brain) ist eine kleine GTPase, die in vielen Bereichen Sequenzhomologien zu H-Ras und Rap1A sowie eine Ras-typische Faltung aufweist. Es reguliert unter anderem Zellwachstum, Proliferation und Regeneration. Stoll et al. publizierten 2010 den Apoptose-verstärkenden Effekt von Rheb: In Gegenwart von Apoptose-induzierenden Faktoren, wie Glutamat, Tunicamycin, TNF $\alpha$ /Cycloheximid und UV-Licht erhöht die Überexprimierung von Rheb(WT) signifikant den Anteil an apoptotischen Neuronen bzw. HeLa-Zellen. Eine verkürzte Variante von Rheb, Rheb $\Delta$ CaaX (bei dem die CaaX-Box nicht vorliegt und entsprechend nicht farnesyliert werden kann) zeigt diesen Effekt nicht, was ein Hinweis auf die nötige Membraneinbindung von Rheb ist.<sup>[36]</sup>

In der gleichen Publikation<sup>[36]</sup> ist auch die mittels NMR bestimmte Lösungsstruktur von Rheb beschrieben, die im Wesentlichen der Röntgenstruktur entspricht. Die Unterschiede in beiden Strukturen entstehen hauptsächlich durch die zwei verschiedenen Nukleotide (GppNHp und GDP):



**Abb. 12:** Die Überlagerung der NMR-Lösungsstruktur von Rheb•GDP (cyan, pdb-Code: 2L0X) mit der entsprechenden Röntgenstruktur von Rheb•GppNHp (orange, 1XTR). Die rechte Abbildung ist um 180° gedreht.<sup>[36,37]</sup>

Die Switch-Regionen sind in allen kleinen (20-25 kDa) GTPasen mit der Erkennung von GAPs, GEFs und Effektoren verbunden. Auch die Faltung vieler Guanin-nukleotid-bindender Proteine ist im Wesentlichen gleich. Die verbleibenden Unterschiede zeigen sich bevorzugt in der GTP-gebundenen Form.<sup>[36,38,39]</sup>

Bei Rheb erstreckt sich die Switch-I-Region bei Asp33 - Asn41 und die Switch-II-Region von Gly63 bis Asn79. Zudem liegt eine Phosphat-bindende Schleife bei

Gly13 - Ser20. Die Sekundärstrukturen bestehen aus sechs  $\beta$ -Strängen (davon einer mit antiparalleler Anordnung) und vier  $\alpha$ -Helices. C- und N-Terminus weisen kleine, unstrukturierte Bereiche auf, die auf eine hohe Beweglichkeit in Lösung hindeuten. Diese Bereiche erstrecken sich von Ser1 - Lys5 sowie Ser175 - Met184 (Terminus); dies führt dazu, dass der eigentliche Ort der Farnesylierung im NMR-Experiment ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC) nicht sichtbar ist.<sup>[36]</sup>

### 2.1.3 Bindestellen der Effektoren

Aktiviertes (GTP-gebundenes) Ras interagiert mit Effektorproteinen. Bekannte Effektoren sind Raf, PI3K, Ral-GEF und Ral-GD. Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) gehört zu den Serin/Threonin-Proteinkinasen und besitzt im Bereich des N-Terminus eine 80 AS große Ras bindende Domäne (RBD). Diese Domäne bindet auch im isolierten Zustand an Ras. Liegen in der Effektorregion von Ras bestimmte Mutationen vor, geht die bindende Wechselwirkung zur RBD verloren.<sup>[13,40,41,42,43,44]</sup> Die Wechselwirkung der RBD von Raf und ein dem Ras ähnlichem Protein (Rap) wurde 1995 mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt: An der Bildung des Komplexes ist nur die Switch-I und nicht die Switch-II-Region beteiligt. Die Bindung von Rap an Ras verläuft durch die Ausbildung einer intermolekularen  $\beta$ -Faltblattstruktur. Die Bildung der  $\beta$ -Faltblattstruktur wiederum basiert mehrheitlich auf ionischen Wechselwirkungen, bei denen die AS-Seitenketten von Rap überwiegend negativ und die der RBD von Raf hingegen positiv geladen sind.<sup>[13,45]</sup>

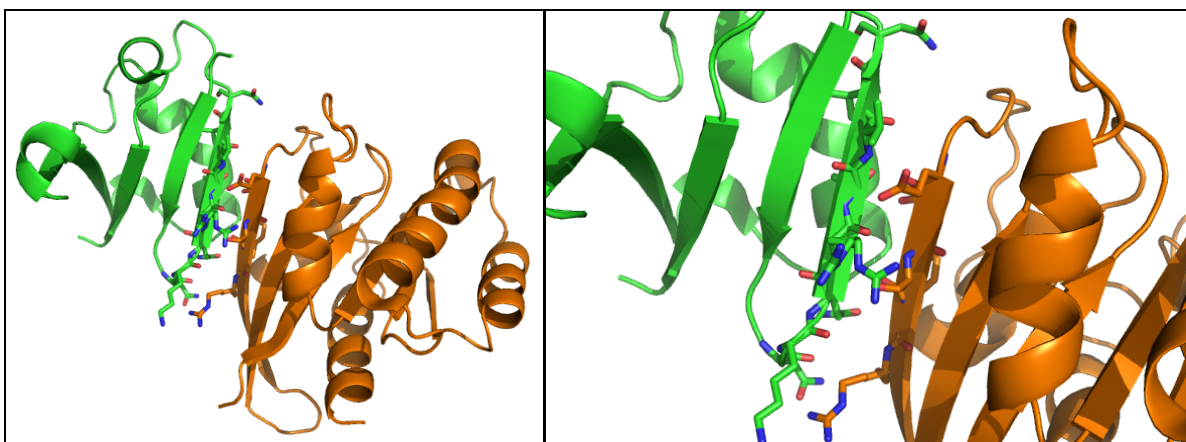


Abb. 13: Der Komplex aus der RBD von c-Raf1 und Rap1a•GppNHp (pdb-Code: 1C1Y). Die rechte Abbildung zeigt die Vergrößerung der intermolekularen  $\beta$ -Faltblattstruktur (GppNHp und Metallionen sind ausgeblendet).



Es wird vermutet, dass Ras durch die Bindung an Raf dieses in die Plasmamembran aufnimmt und Raf unter anderem durch Phosphorylierungen und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eine Kette von zellulären Ereignissen in Gang setzt.<sup>[13,46,47]</sup>

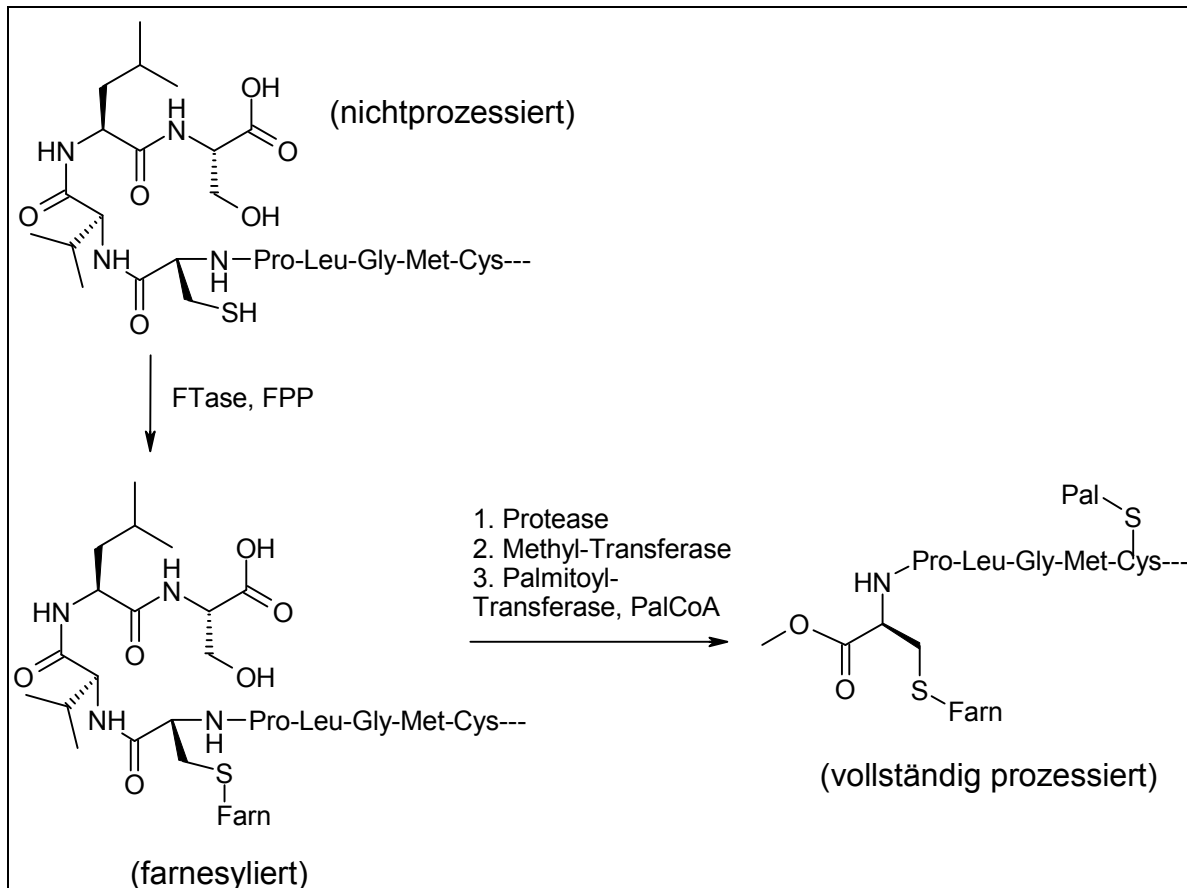
Auch das Rheb-Protein (Rheb•GppNHp) zeigt eine Bindung an die RBD von Raf, jedoch ist die Affinität (~ 200 µM) um den Faktor  $10^3$  geringer. Allerdings scheint diese eine gewisse Selektivität aufzuweisen, da NORE1-RBD unter den gleichen Bedingungen keine Assoziation zeigt.<sup>[36]</sup> NORE1 (novel Ras effector) ist ein nicht-katalytisches Protein und ein Effektor von Ras.<sup>[48,49]</sup>

Ral-GEFs weisen im Bereich des C-Terminus eine RBD auf, die in Analogie zu Raf über eine intermolekulare  $\beta$ -Faltblattstruktur binden. Obwohl keine Homologien in den Sequenzen der Domänen von Raf und Ral auftreten, weisen sie beide eine ähnliche Tertiärstruktur auf, was die gleichartige Bindung erklärt.<sup>[13]</sup>

PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) verfügt ebenfalls über eine Ras bindende Domäne, die mit der Effektorregion wechselwirkt. Diese wurde in der p110-Unterheit der PI3-Kinase identifiziert und zeigt Homologien zu den Domänen von Raf und Ral-GEF.<sup>[50,51,52]</sup>

#### **2.1.4 Posttranslationale Modifikation durch Farnesyltransferase**

Eine Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit von Ras-Proteinen ist die Verankerung in der Zellmembran. Dies wird durch ein- oder mehrfache Prenylierung des C-Terminus (CaaX-Box) erreicht. Die CaaX-Box (letzte vier C-terminale AS) eines Ras-Proteins weist stets eine ähnliche Aminosäureabfolge auf: C beinhaltet immer Cystein, aa steht für zwei aliphatische Aminosäuren, X ist prinzipiell variabel; kann also von jeder AS gebildet werden.<sup>[13,53]</sup> Für X werden jedoch auch die Aminosäuren Ala, Cys, Glu, Met, Ser und Val beschrieben.<sup>[54]</sup>



**Abb. 14:** Die Abbildung zeigt die posttranslationale Lipidierung am Beispiel des H-Ras (Farn: Farnesylrest, Pal: Palmitoylrest).<sup>[13]</sup>

Die Prozessierung des Ras-Proteins läuft zunächst so ab, dass an das Cystein der CaaX-Box ein Farnesylrest übertragen wird. Hierzu bildet sich ein Komplex aus den beiden Untereinheiten ( $\alpha$ - und  $\beta$ -) der Farnesyltransferase (FTase), Farnesylpyrophosphat (FPP), dem eigentlichen Substrat (der CaaX-Box des Ras-Proteins) und einem Zinkion, das durch das Thiolat des Cysteins gebunden wird. Die 2000 von Long publizierte Röntgenkristallstruktur eines solchen Komplexes, der jedoch ein unreaktives Mimetikum des FPPs und ein kurzes, C-terminales Peptid von K-Ras4B enthält, zeigt Abb. 15.<sup>[55]</sup>

Innerhalb der abgebildeten Bindetasche findet die Komplexierung des Zinkions durch das Thiolat der CaaX-Box statt. In unmittelbarer Nähe befindet sich das "terminale" Phosphat des FPP-Mimetikums.

Nach erfolgter Farnesylierung werden die letzten drei Aminosäuren abgespalten und die verbleibende Carbonsäure durch eine Methyltransferase in den entsprechenden Methylester umgewandelt (Abb. 14).<sup>[13]</sup>

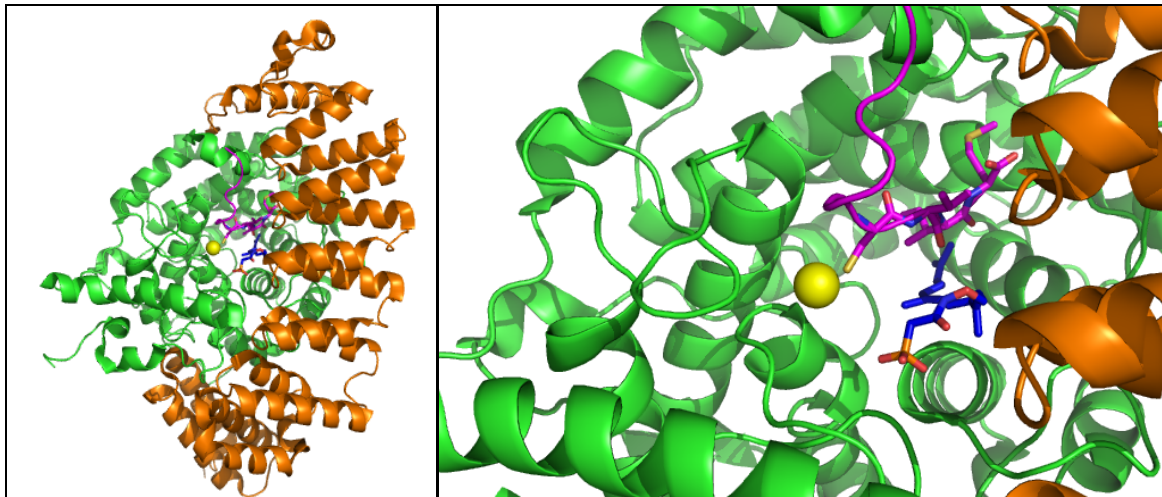


Abb. 15: Die  $\alpha$ - (orange) und  $\beta$ -Untereinheit (grün) der FTase (Ratte) im Komplex mit dem CaaX-Peptid KKKSCTKCVIM (magenta; nur Seitenketten von CVIM gezeigt), einem Zinkion (gelb) sowie einem unreaktivem Derivat des FPP (blau). pdb-Code: 1D8D.<sup>[55]</sup>

Anschließend erfolgt bei einem Teil der Ras-Proteine (z. B. H-Ras, N-Ras und KRas4A) noch eine weitere Modifikation an der Thiolgruppe des nächsten Cysteins, das sich in der Nachbarschaft befindet: Hier wird eine Palmitoyl-Gruppe übertragen. Beide Übertragungen sind für die vollständige biologische Funktion dieser Proteine essentiell. Durch genetische Experimente konnte gezeigt werden, dass die Palmitoyl-Gruppe eine untergeordnete Rolle spielt. Bei dem zur Ras-Superfamilie gehörigen Rheb-Protein findet keine zweite Lipidierung statt, K-Ras4B benötigt aufgrund seiner C-terminalen Polylysinregion ebenfalls keine zweite Lipidierung. Fehlt jedoch der Farnesylrest, kann Ras seine Funktion weder im "normalen" noch transformierten Zustand wahrnehmen.<sup>[13,53,56]</sup>

## 2.2 Hintergrund der Dissertation

### 2.2.1 Molekulare Erkennung

Die molekulare Erkennung unterteilt sich zunächst in die zwei Gebiete der intra- und der intermolekularen Wechselwirkung. Wichtigstes Beispiel einer intramolekularen Wechselwirkung ist die Selbstfaltung von Proteinen, die hochgeordnete Tertiärstrukturen hervorbringt.<sup>[57]</sup>

Die Bildung der DNA-Doppelhelix, die das bekannteste Beispiel einer intermolekularen Wechselwirkung liefert, basiert hauptsächlich auf Stapel-effekten (und nicht auf den Wasserstoffbrücken).<sup>[58]</sup> Von nicht minderer Bedeutung sind die Bildung

von Protein-Protein und Protein-Ligandkomplexen, da diese die biochemischen Grundlagen des Lebens bilden. Intermolekulare Wechselwirkungen können selbst zwischen zwei recht kleinen Molekülen von entscheidender Bedeutung sein, was am Beispiel des Vancomycins erläutert wird:

Das Antibiotikum Vancomycin (**9**, Abb. 16) ist ein Naturstoff, der von dem Bakterium *Amycolatopsis orientalis* gebildet wird. Vancomycin gehört zur Klasse der Glycopeptid-Antibiotika und wirkt gegen Methicillin-resistente Keime des Typs *Staphylococcus aureus* (MRSA), dessen Infektionen ohne Behandlung mit resistenzbrechenden Antibiotika oft letal verlaufen. Der entsprechende Wirkmechanismus ist bekannt und beruht auf der Störung der bakteriellen Zellwandbiosynthese.

Ein Schlüsselschritt bei der Zellwandsynthese erfolgt durch eine Transpeptidase, die die letzte C-terminale AS (*D*-Ala) der Mucopeptidkette abspaltet. Der nachfolgende Schritt, die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen dem neuem C-Terminus (*R*-*D*-Ala-OH) und einem Seitenketten-Amin eines weiteren Mucopeptids, ermöglicht die Quervernetzung der einzelnen Peptidketten. Ohne diese Quervernetzung geht die mechanische Festigkeit der bakteriellen Membran verloren.

Vancomycin bildet fünf Wasserstoffbrückenbindungen zu der Sequenz *L*-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala aus, die sich endständig an den Mucopeptidvorstufen der Zellwände befindet. Hierbei bildet das Vancomycin eine schalenförmige Überstruktur um die *D*-Ala-*D*-Ala-Einheit des Peptids aus. Der Angriff der Transpeptidase (und hiermit auch die nachfolgende Quervernetzung) wird durch die "maskierende" Wirkung des Vancomycins verhindert.

Die molekulare Erkennung der *D*-Ala-*D*-Ala-Einheit durch das Rezeptormolekül (Vancomycin) führt durch die Ausbildung schwacher, nichtkovalenter Wechselwirkungen zu einem stabilen Komplex. Hierbei verhalten sich die Assoziationskonstanten der Bindungsanteile multiplikativ (die Anteile der Bindungsenergien hingegen additiv). Eine überschaubare Anzahl von schwachen Wechselwirkungen kann so zu einem sehr stabilen Komplex führen.<sup>[59,60]</sup>

Vancomycin weist in wässrigen Lösungen extrem hohe Assoziationskonstanten zu Ac-*L*-Lys(Ac)-*D*-Ala-*D*-Ala-OH (**10**) auf ( $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Auch Ac-*D*-Ala-*D*-Ala-OH wird noch sehr gut gebunden ( $\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Das nicht acetylierte, (zwitterionische)  $\text{H}_2\text{N}$ -*D*-Ala-*D*-Ala-OH zeigt hingegen gar keine Affinität zu Vancomycin.<sup>[61,62]</sup>

Die Kristallstruktur eines Komplexes aus Vancomycin und der Vorstufe eines bakteriellen Zellwand-Analogons **10** wurde von Nitani und Aoki et al. bestimmt. Die

Komplexe bilden hierbei (unter anderen) dimere "back-to-back"-Strukturen aus, Abb. 16 (rechts) zeigt lediglich einen vereinfachten Ausschnitt der Kristallstruktur.<sup>[63]</sup>

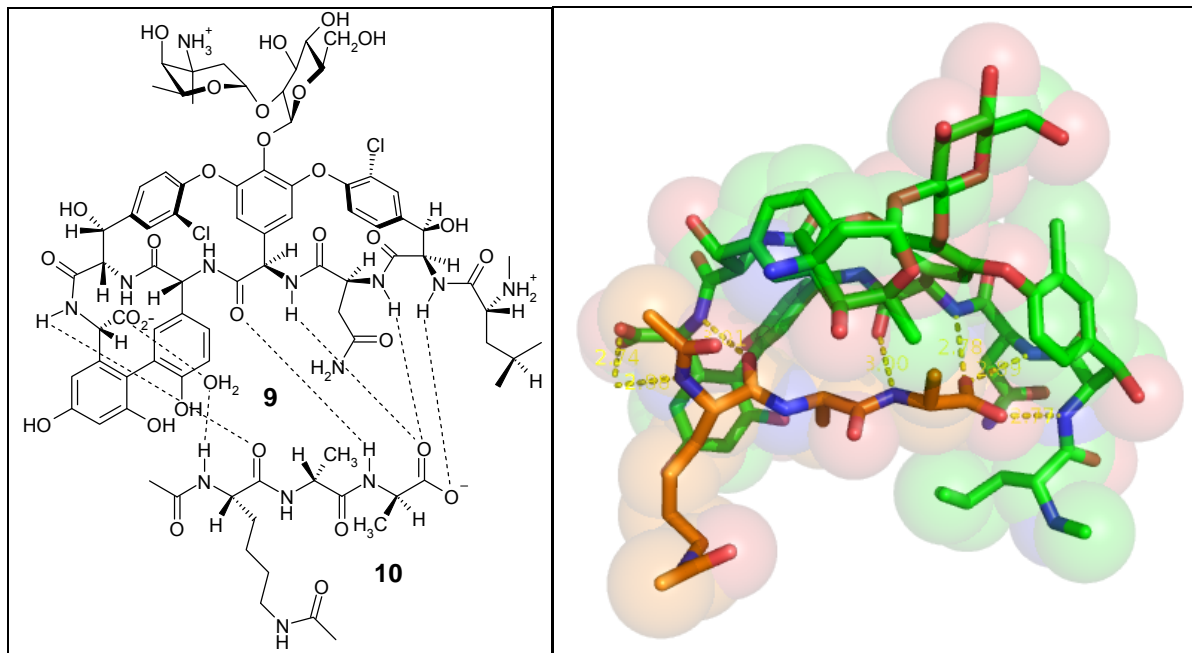


Abb. 16: Die Strukturformel des Vancomycins (links) und die Darstellung eines Teilbereichs der Röntgenstruktur (rechts). Vancomycin ist grün, Ac-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala-OH orange und die Wasserstoffbrücken zwischen Vancomycin und dem Gastmolekül sind gelb gekennzeichnet (pdb-Code: 1FVM).<sup>[63,61]</sup>

## 2.2.2 Bekannte, niedermolekulare Rezeptoren

Still et al. publizierten 1994 die sequenzselektive Erkennung eines tripeptidischen Substrats in einer  $\sim 5 \cdot 10^4$  Verbindungen umfassenden Bibliothek. Hierzu verwendeten sie einen halbschalenförmigen Rezeptor, der mit dem affinsten Substrat (*i*-PrCO-L-Ala-L-Pro-L-Ala) eine Assoziationskonstante von  $2.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  lieferte (in  $\text{CHCl}_3$ ) und eine ausgesprochene Sequenzselektivität für Prolin (an der zweiten Position) aufwies. Zudem war der Rezeptor stereoselektiv, da bevorzugt das vollständig L-konfigurierte Substrat gebunden wurde.<sup>[64]</sup>

Ansyn publizierte 1993 Untersuchungen an verschiedenen Rezeptoren für Dibenzylphosphat, wobei sich Rezeptor 11 (Abb. 17) mit einer  $K_A$  von  $4000 \text{ M}^{-1}$  (in 100 %  $d_6$ -DMSO) als bester herausstellte. Mit zunehmendem Wasseranteil nahm die Bindekonstante durch Zugabe von 5 %  $\text{D}_2\text{O}$  auf die Hälfte ab, bei einem Deuteriumoxidanteil von 50 % fiel der Wert auf  $K_A = 30 \text{ M}^{-1}$ . Dies zeigt recht eindrucksvoll, wie kompetitiv sich Wasser bei molekularen Erkennungsprozessen auswirkt.<sup>[65]</sup>

Da Phosphate und Carboxylate eine ähnliche Struktur aufweisen und die Synthese des Grundgerüsts von Rezeptor **11** bis zu den diastereomerenreinen Diaminen literaturbekannt ist,<sup>[65]</sup> könnte aus der Leitstruktur eine Kopfgruppe zur Erkennung von Carbonsäuren entwickelt werden.

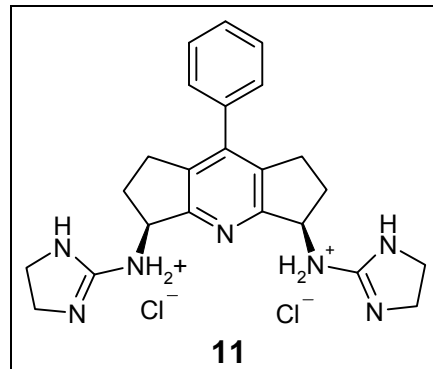
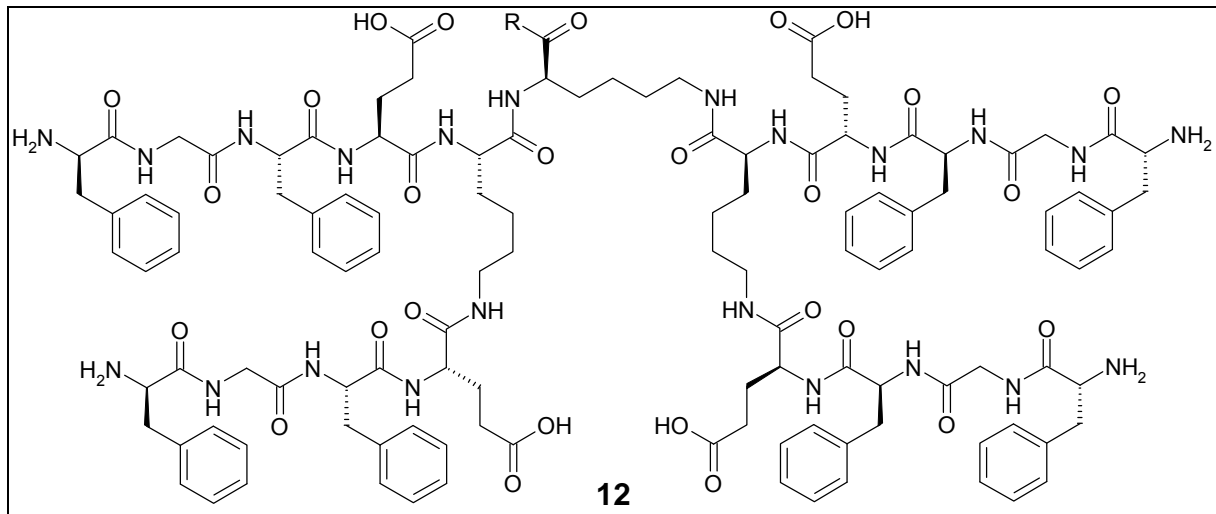


Abb. 17: Die Abbildung zeigt einen von Anslyn publizierten Rezeptor für Dibenzylphosphat; Die beiden zyklischen Guanidiniumreste nehmen an der molekularen Erkennung teil.<sup>[65]</sup>

### 2.2.3 Literaturbekannte Identifikation eines Rezeptors der CaaX-Box von H-Ras

Nestler konnte bereits 1998 durch die Synthese von peptidischen Bibliotheken einen geeigneten Rezeptor finden, der die Farnesylierung der CaaX-Box unterbindet. Die erzeugten Bibliotheken wiesen hierbei unterschiedliche Kopfgruppen auf: Gruppierungen die gezielt in die Rezeptoren eingebaut werden, damit bevorzugt der C-Terminus der CaaX-Box erkannt wird. Dies kann zum einen die Bindungsaffinität erhöhen, zum anderen erfolgt eine gewisse räumliche Vororientierung der Rezeptoren. Nach Screening von Teilmengen (6600 Beads; ungefähr 220 Verbindungen) einer umfassenden Rezeptorbibliothek (151875 Verbindungen) gegen markierte Derivate (mit Histidin- oder Fluoreszenzlabel), der CaaX-Box von H-Ras sowie dem Protein selbst, konnte der Rezeptor **12** identifiziert werden. Die maskierende Wirkung des Rezeptors **12** und die daraus resultierende, reduzierte Aktivität der Farnesyltransferase wurde in verschiedenen Tests nachgewiesen. Für den Rezeptor **12** (Abb. 18) wurde in wässrigem Puffer ein IC<sub>50</sub>-Wert von 100 µM bestimmt. Tests mit einer einfacheren, zweiarmigen Kopfgruppe oder den simplen Tetrapeptiden zeigten keinen Effekt. Rezeptor **12** erwies sich zudem als sequenzselektiv: Ein C-terminales Peptid von K-Ras wird bereits wesentlich schlechter erkannt (IC<sub>25</sub> = 500 nM), das C-terminale Peptid von Lamin A, das eben-

falls Cystein an der vierten, C-terminalen Position trägt, wird ohne erkennbare Beeinträchtigung (durch den Rezeptor **12**) farnesyliert.<sup>[66]</sup>



**Abb. 18:** Nestler identifizierte **12** als Rezeptor der CaaX-Box von H-Ras, mit R = -NH-Tentagel (für die Screenings der Beads) und R = -β-Ala-Glu(Ot-Bu)-Lys(Biotin)-β-Ala-OH (für den gelösten Rezeptor), IC<sub>50</sub> = 100 μM.

### 3 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation und ihre Zielsetzung gliedern sich in zwei Teile:

**1.:** Der Entwicklung von niedermolekularen Rezeptoren, die das CaaX-Motiv der Ras-Proteine K-Ras, Rheb und H-Ras binden. Da ein rationales Design eines solchen Rezeptors nicht möglich ist, sollen hierzu kombinatorische Bibliotheken erstellt werden, die gegen markierte Peptide gescreent werden.

Ein weiterer Schwerpunkt ist die Analyse der resultierenden Hits, wobei auf das chemische Tagging des Trägermaterials möglichst verzichtet werden soll; alternativ sollen moderne massenspektrometrische Methoden eingesetzt werden.

Die Erkennung sollte im Idealfall in physiologisch relevanten Medien, das heißt wässrigen Systemen, erfolgen. Eine für die jeweilige CaaX-Box sequenzselektive Erkennung ist hierbei wünschenswert. Die erstellten Rezeptoren sollten dem bekannten, durch Nestler beschriebenen Rezeptor in folgenden Punkten überlegen sein: Die von den Rezeptoren komplexierten CaaX-Boxen der C-termini entsprechen physiologisch relevanteren Proteinen. Dem für Darm- Lungen- und Pankreas-Krebs hoch interessanten KRas4B, sowie dem, für die tuberöse Sklerose relevantem Rheb. Onkogene Mutationen an H-Ras sind eher selten,<sup>[67,68]</sup> spielen jedoch eine Rolle bei

besonders gefährlichen Krebserkrankungen, wie Lungenkrebs.<sup>[69]</sup>

Sowohl die von Nestler verwendete Kopfgruppe (Lysin) als auch die in der Bibliothek vorkommenden Bausteine sind klassische AS. Durch Verwendung einer, auf Pyrrol basierenden Kopfgruppe als auch nicht-ribosomaler Aminosäuren als Bibliotheksbausteine sollen Rezeptoren getestet werden, die eher "druglike"<sup>[70]</sup> sind und damit ein größeres Potential besitzen, auch zur Anwendung zu kommen.

Zudem besteht durch die Verwendung der besten (literaturbekanntesten) Kopfgruppe zur Erkennung von Carboxylaten die Chance auf Rezeptoren, die sehr große Assoziationskonstanten aufweisen, wie es Schuck bereits in einigen Beispielen zeigen konnte.<sup>[73,84,85,86,87,88,89]</sup>

Die niedermolekularen CaaX-Box-Rezeptoren könnten (konzentrationabhängig) die Farnesylierung der entsprechenden Ras-Proteine verhindern bzw. verlangsamen und so den Anteil von membrangebundenem, onkogenem als auch Wildtyp-Ras herabsetzen. Hierdurch wechselwirken auch weniger Ras-Proteine mit ihren Effektoren, was wiederum zu einem geringeren Zellwachstum führen kann.

Das vorgestellte Wirkprinzip sollte mit einer geringeren Toxizität einhergehen als klassische Zytostatika, wie z. B. *cis*-Platin, das unspezifisch mit der DNA komplexiert und die Mitose sämtlicher Zellen stört. Der verhinderte Einbau der Ras-Proteine in die Zellmembranen stellt einen differenzierteren Prozess dar, der zudem genau die Proteine angreift, die wahrscheinlich das unkontrollierte Zellwachstum auslösen.

**2.:** Ein weiteres Ziel stellt die Entwicklung von niedermolekularen Liganden der Ras-Proteine dar: Hierzu sollen Fragmentbibliotheken (in Kooperation mit dem AK Stoll) gegen Rheb und das K-Ras-Protein (mittels NMR-Spektroskopie) gescreent werden. Die identifizierten Liganden stellen ein zur Blockierung der CaaX-Box komplementäres Konzept dar. Hier sollen die Wechselwirkungen mit den Effektoren und somit die nachfolgende Signaltransduktion blockiert werden.

Gegenstand der Arbeit sind somit: Weniger toxische Chemotherapeutika, die im Idealfall zu einer verbesserten Lebensqualität und vergrößerten Überlebensraten bei einigen der häufigsten Krebserkrankungen führen können.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

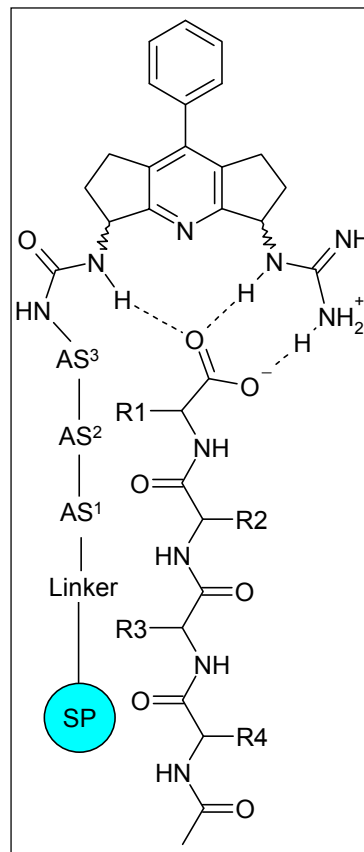
### 4.1 Synthese und Charakterisierung einer neuen Pyridinkopfgruppe zur



## Erkennung von Carboxylatanionen.

### 4.1.1 Syntheseroute der Pyridinkopfgruppen

Die Synthese und Charakterisierung der Pyridinderivate zielte auf die Entwicklung einer Kopfgruppe zur molekularen Erkennung von Carbonsäuren ab. Die Kopfgruppe sollte hierbei den C-terminalen Bereich einer CaaX-box erkennen und über ein Harnstoffderivat als Anknüpfungspunkt einer Peptidbibliothek dienen. Der Guanidiniumrest hingegen sollte hierbei maßgeblich das Carboxylat binden und dieses günstig zur Peptidkette einer kombinatorischen Bibliothek vororientieren. Da nicht von vornherein klar war, ob sich eine *syn*- oder *anti*-orientierte Konfiguration der beiden Reste (Amin und Guanidin) günstiger auf die molekulare Erkennung von Carboxylaten (bzw. C-termini der CaaX-boxen) ausübt, wurden beide diastereomeren Enantiomerenpaare untersucht (Kapitel 4.1.2-4.1.5).



**Abb. 19:** Die Abbildung zeigt das ursprüngliche Design der Rezeptorbibliotheken auf Basis der Pyridinkopfgruppe. AS<sub>1-3</sub>: Aminosäurebausteine der Bibliothek. R1-4: Aminosäureseitenketten der jeweiligen CaaX-Box. Auf die Verwendung der Pyridinkopfgruppe wurde letztendlich verzichtet und das Konzept unter Verwendung der Schmuckschen Kopfgruppe realisiert (Abb. 53).

Die Synthese der Pyridinkopfgruppen erfolgte über eine Eintopfsynthese des Dibenzylidens **13** aus Cyclopentanon, Benzaldehyd und Ammoniumacetat. Das entstehende Dibenzyliden fällt als Gemisch der *Z*-/*Z*-, *E*-/*E*- sowie *Z*-/*E*-Diastereomere an. Die Ausbeute betrug nur 25 %, jedoch liess sich die Reaktion in großem Maßstab durchführen (212 g limitierendes Edukt, 50 g Produkt). Eine Trennung der Diastereomere ist nicht nötig, da über die nächste Reaktion alle Isomere in das gleiche Produkt **14** der oxidativen Spaltung (Lemieux- von Rudloff-Reaktion) überführt werden. Die Aufarbeitung stellte ein großes Problem dar, da das entstehende Rohprodukt, ein Gemisch aus Benzaldehyd, Benzoesäure und dem Produkt, dem basischen Diketon, nicht chromatografiert werden konnte. Zahlreiche Versuche, das (schwach gefärbte) Rohprodukt chromatografisch zu reinigen,

schlugen fehl: Die erhaltenen Produktfraktionen waren nie rein und stets von geringer Ausbeute. Während der Chromatografie verfärbte sich das Säulenmaterial (farbloses Kieselgel) schwarz; vermutlich fanden hier Kondensationsreaktionen statt. Modifikationen der Chromatografien brachten keine Verbesserung (Desaktivierung des Kieselgels durch Wasser, Additive, Flashchromatografie innerhalb von 5 min). Die Reinigung des Rohprodukts gelang schliesslich durch mehrfaches Behandeln des Rohproduktes mit Diethylether im Ultraschallbad. Das reine Produkt fällt hierbei als farbloser, amorpher Feststoff an. Selbst das reine Produkt ist in Lösung nicht stabil: NMR-Proben (in  $\text{CDCl}_3$ ) des Diketons **14** verfärbten sich innerhalb von 6 h bei RT schwarz (vorher farblos). Die Reaktion mit Hydroxylamin liefert die diastereomeren Diketoxime **15**, die zu dem entsprechenden Gemisch der beiden diastereomeren Enantiomerenpaare des Diamins **16** reduziert wurden. Durch Umsetzung mit  $\text{Boc}_2\text{O}$  wurde das entsprechende Gemisch der geschützten Amine erhalten, das sich wesentlich einfacher chromatografisch trennen ließ.<sup>[65]</sup> Die getrennten Diastereomere, die selbst jeweils als Enantiomerenpaare vorliegen, wurden nun für die Synthesen der *syn*- sowie *anti*- orientierten Kopfgruppen auf zwei Synthesewege aufgespalten. Für die *syn*-Kopfgruppen (Abb. 20) wurde das entsprechende *meso*-Dibocdiamin **17** verwendet. Dieses wird zunächst durch TFA wieder in das entsprechende *meso*-Diamin **19** umgewandelt (Boc-Entschützung). Das erhaltene Diamin wurde dann mit einem Guanidinylierungsreagenz (*N*-Triflyl-*N',N'*-dibocguanidin) unter Hochverdünnungsbedingungen umgesetzt. Hierzu wurde eine Lösung des Reagenzes **21** mit einer Spritzenpumpe über Nacht zur Lösung des Diamins **19** hinzugefügt. Hierbei bildete sich hauptsächlich das einfach substituierte, Boc-geschützte Guanidin **22**. Als Nebenprodukt wurde das zweifach substituierte, Boc-geschützte Diguanidin erhalten. Die Synthese des Guanidinylierungsreagenzes erfolgte wie in der Literatur beschrieben aus Dibocguanidin und Triflylanhydrid. Dibocguanidin wiederum wurde aus Guanidiniumchlorid und Bocanhydrid erhalten.<sup>[71]</sup>

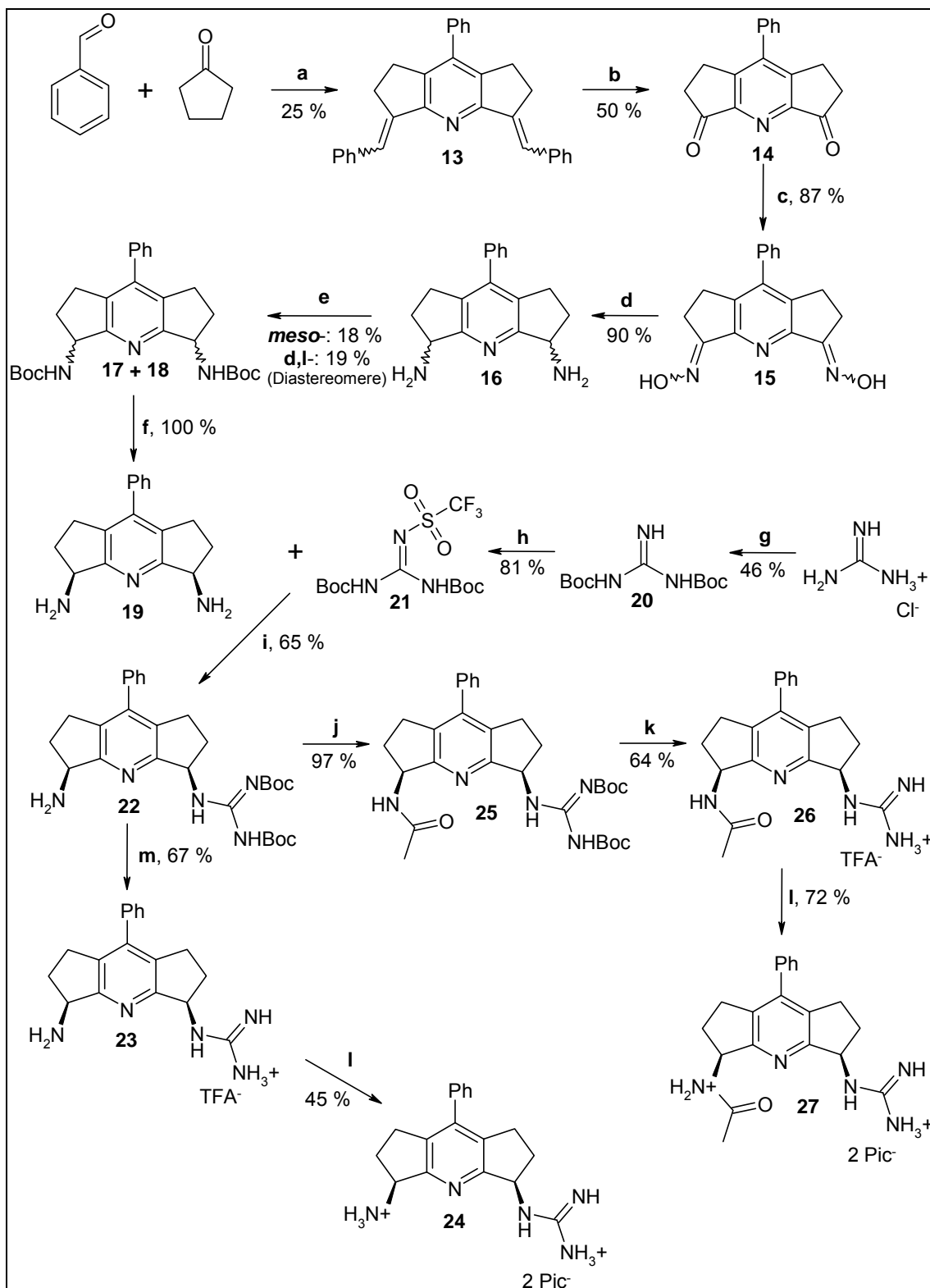


Abb. 20: Die Abbildung zeigt den Syntheseweg der *syn*-Kopfgruppen. (a)  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , EtOH, Rückfluss, 1 h;<sup>[65]</sup> (b)  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{NaIO}_4$ , DCM/ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 15 h; (c)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , DMF,  $80^\circ\text{C}$ , 1 h;<sup>[65]</sup> (d)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{TiCl}_4$ , DME, RT, 18 h;<sup>[65]</sup> (e)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{CHCl}_3$ , RT, 5 h;<sup>[65]</sup> (f)  $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}$ , RT, 15 h;<sup>[65]</sup> (g)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{NaOH}$ , Dioxan,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 2 h  $\rightarrow$  RT, 17 h;<sup>[71]</sup> (h)  $\text{Tf}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM,  $-78^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  RT, 6 h;<sup>[71]</sup> (i)  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM, RT, 20 h; (j)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin, DCM, RT, 14 h; (k)  $\text{TFA}$ , DCM,  $0^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  RT, 3 h, RT, 13 h; (l) 2,4,6-Trinitrophenol, MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 5 min; (m)  $\text{TFA}$ , DCM, RT, 16 h.

Das Monoguanidinderivat **22** wurde nun zum einen direkt zum Trifluoracetat **23**

entschützt und mit Pikrinsäure zum Pikratsalz **24** derivatisiert, zum anderen erfolgte auf einer weiteren Syntheseroute die Acylierung des verbliebenen Amins ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) zum *syn*-Acetamidoderivat **25**. Dessen Entschützung lieferte das Trifluoracetat **26** und nach erfolgreichem Umsalzen (Pikrinsäure) das entsprechende Pikrat **27**.

Für die *anti*-Kopfgruppen wurde das *D,L*-Dibocdiamin **18** verwendet, das zunächst zum *D,L*-Diamin **28** gespalten wird (TFA). Anschließend erfolgte die Guanidinylierung einer Aminfunktion zum Monoguanidinderivat **29**. Als Nebenprodukt entstand auch hier das zweifach guanidinylierte Produkt. Anschließende Umsetzung mit Acetanhydrid lieferte das Acetamid **30**. Dessen Boc-Entschützung führte zum Acetamidoderivat des Guanidiniumtrifluoracetats **31**.

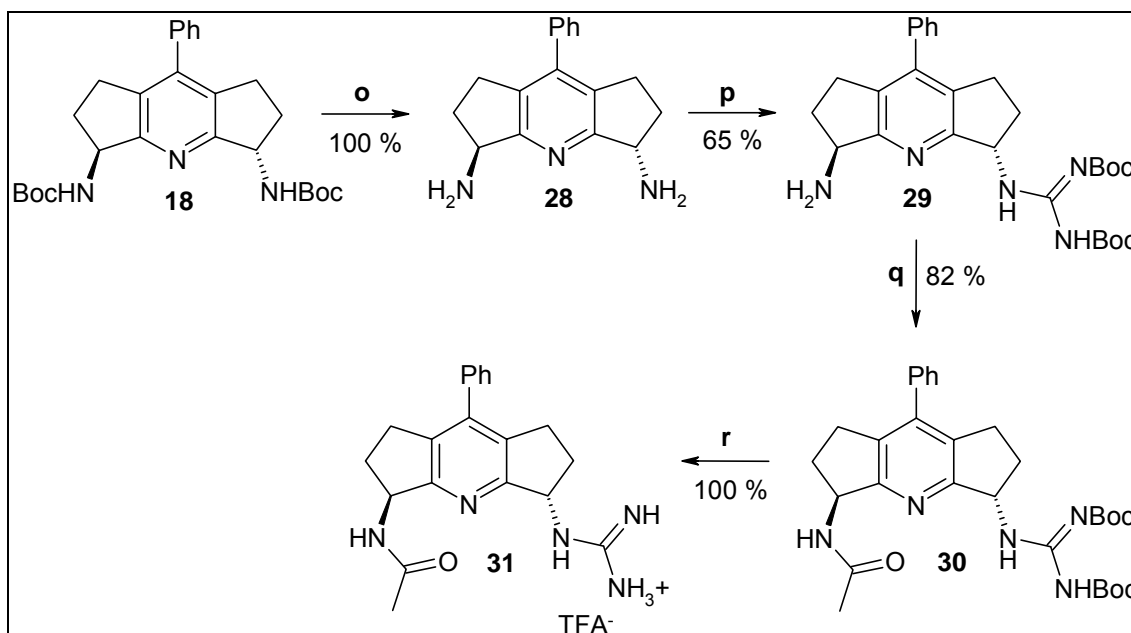


Abb. 21: Die Abbildung zeigt den Syntheseweg der *anti*-Kopfgruppen. (o) TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 15 h; (p) *N*-Triflyl-*N,N'*-dibocguanidin,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM, RT, 24 h; (q)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin, DCM, RT, 24 h (r) TFA, DCM,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 2 h, RT, 10 h.

## 4.1.2 NMR-Untersuchungen an der Pyridinkopfgruppe

### 4.1.2.1 Untersuchung der Pyridinkopfgruppe am Rheb-Protein

Für die Untersuchung wurde eine Lösung des ( $^{15}\text{N}$ -angereicherten<sup>[72]</sup>) Rheb-Proteins (350  $\mu\text{M}$  in NMR-Puffer (aq)) vorgelegt und 15  $\mu\text{L}$  einer Stammlösung (1.32 M in  $\text{d}_6$ -DMSO) der Kopfgruppe **23** hinzugefügt und die Probe homogenisiert.

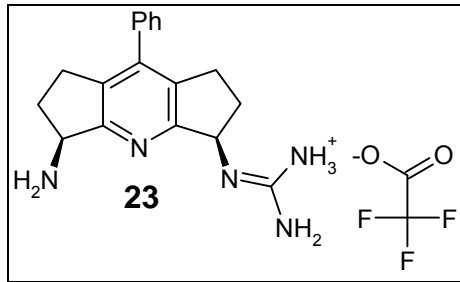


Abb. 22: Das Aminderivat der *syn*-Pyridinkopfgruppe (Trifluoracetat).

Hierauf erfolgte die Aufnahme eines  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperiments (HSQC) und eine Überlagerung des erhaltenen Spektrums mit der Referenz (Rheb ohne Kopfgruppe). Nach Bestimmung des Shifts (der Veränderung der chemischen Verschiebung der Signale) in  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ -Dimension wird eine gewichtete chemische Verschiebung berechnet, die die unterschiedlichen Dimensionen berücksichtigt.

Aus dem Experiment wurde auf die Veränderung der chemischen Verschiebung an jeder (zugeordneten) Aminosäure geschlossen, die Ausnahme bildeten die C-terminalen AS, die infolge ihrer freien Beweglichkeit im HSQC nicht sichtbar sind.

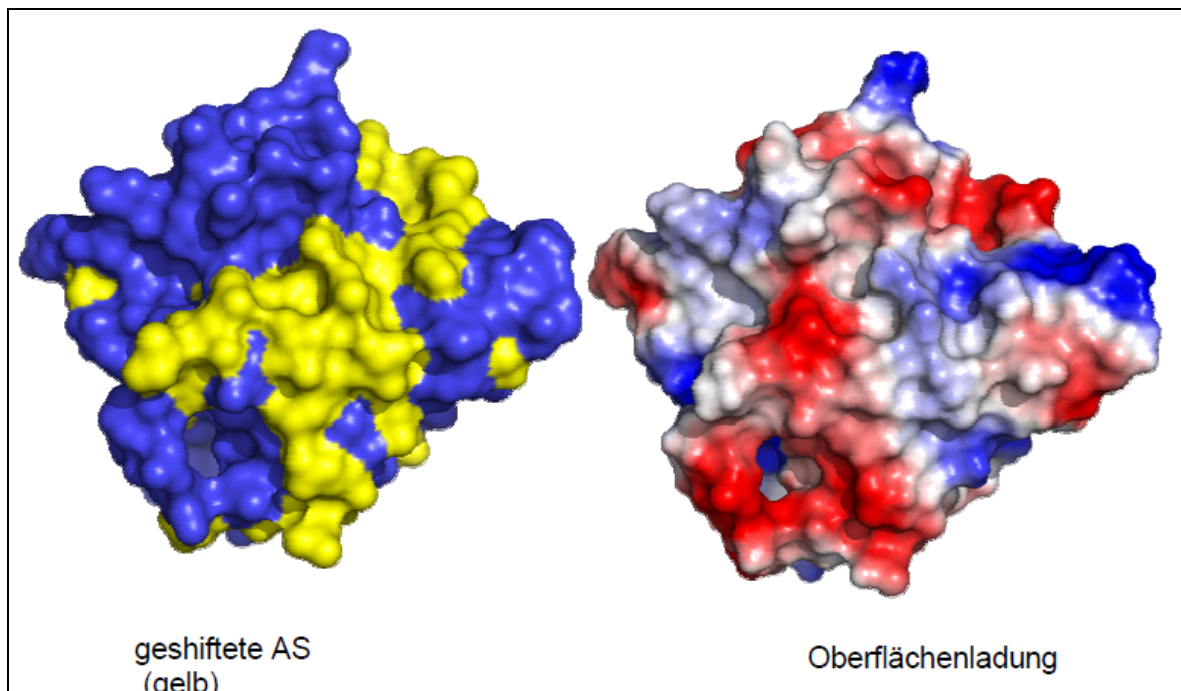


Abb. 23: Aus dem HSQC-Spektrum ermittelte Visualisierung der Bereiche, in denen es zu einer Veränderung der chemischen Verschiebung (linke Darstellung) kam. Die rechte Darstellung zeigt die Verteilung der Oberflächenladung: Negativ geladene Bereiche sind rot, positiv geladene blau dargestellt. (Durch die Zugabe der Kopfgruppe veränderte sich der pH-Wert um - 0.4.)<sup>[93]</sup>

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass bei einer genügend starken Bindung der Kopfgruppe an die CaaX-Box deren Beweglichkeit herabgesetzt wird und die

entsprechenden Aminosäuren sichtbar werden.

Die Protein- und Probenpräparation, die HSQC-Messungen und Auswertung der Shifts wurden (im Rahmen einer Kooperation) von der Arbeitsgruppe Stoll durchgeführt.<sup>[93]</sup>

Abb. 23 zeigt zwei Darstellungen: Zum einen die auf der Proteinoberfläche eingetretenen Shifts (gelb markiert, linke Darstellung) nach Zugabe der 15  $\mu$ L Stammlösung und zum anderen die Verteilung der Oberflächenladung des Proteins ohne Zugabe der Kopfgruppe (rot kennzeichnet den Bereich negativer, blau den Bereich positiver Ladung). Abb. 24 zeigt die Auftragung der gewichteten chemischen Verschiebung gegen die Abfolge der shiftenden Aminosäuren:

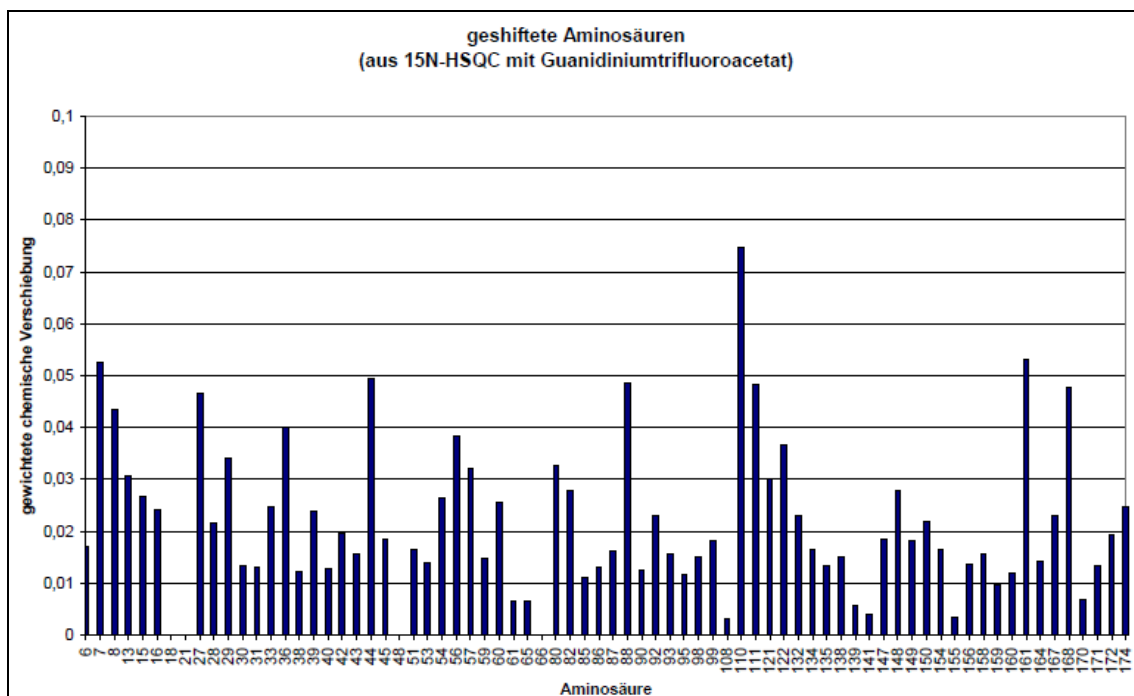


Abb. 24: Die Abbildung zeigt die Veränderung der chemischen Verschiebung ( $\Delta\delta$ ) für die Aminosäuren des Rheb-Proteins. (Durch die Zugabe der Kopfgruppe veränderte sich der pH-Wert um -0.4.)<sup>[93]</sup>

Abb. 25 zeigt die Aminosäureabfolge in der Primärstruktur des Rhebproteins:

```

MPQSKSRKIA10ILGYRSVGKS20SLTIQFVEGQ30FVDSYDPTIE40NTFTKLITVN50GQEYHLQLVD60
TAGQDEYSIF70PQTYSIDING80YILVYSVTSI90KSFEVIKVIH100GKLLDMVGKV110QIPIMLVGNK120
KDLHMERSVIS130YEEGKALAES140WNAAFLESSA150KENQTAVDVF160RRILEAEKM170
DGAASQGKSS180CSVM184

```

Abb. 25: Die Aminosäuresequenz von Rheb in der Ein-Buchstabennotierung. Der C-Terminus befindet sich bei Position 184.

#### 4.1.2.2 NMR-Titrationsen der Pyridinkopfgruppe 24 mit TMA-Acetat

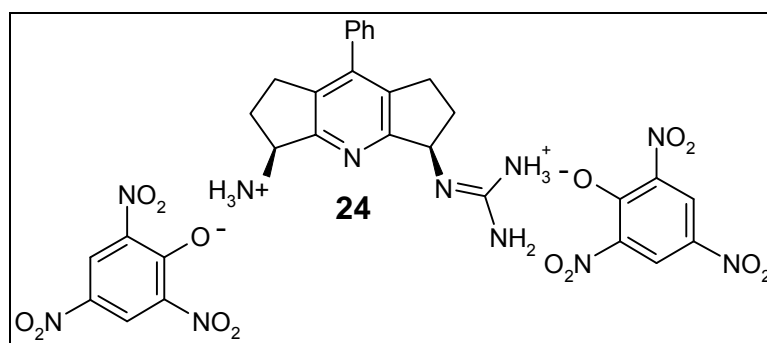


Abb. 26: Das Aminderivat der *syn*-Pyridinkopfgruppe (Pikrat).

Mit der in Kapitel 4.1.2.1 untersuchten Pyridin-Kopfgruppe wurden in Form des Pikratsalzes **24** (Abb. 26) NMR-Titrationsen mit TMA-Acetat durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war die Ermittlung der Affinität der Amino-funktionalisierten Kopfgruppe zu Carboxylationen. Hierbei wurde gezielt das schwach koordinierende TMA-Salz der Essigsäure verwendet, das auch von Schmuck verwendet wurde.<sup>[85]</sup> Insgesamt wurden sechs verschiedene Lösungsmittel ( $d_6$ -DMSO/ $H_2O$ -Gemische) untersucht. Für die Auswertung wurden (soweit möglich) die Signale der zwei Benzylständigen, methinischen H-Atome verwendet, die in der direkten Nachbarschaft zu den Ammonium- bzw. Guanidiniumionen liegen. Mit zunehmender Konzentration an TMA-Acetat kam es (bis zu einer Wasserkonzentration von 30 %) zu einem Shift beider Signale, die zudem ähnliche Bindungsisothermen aufwiesen (Abb. 27).

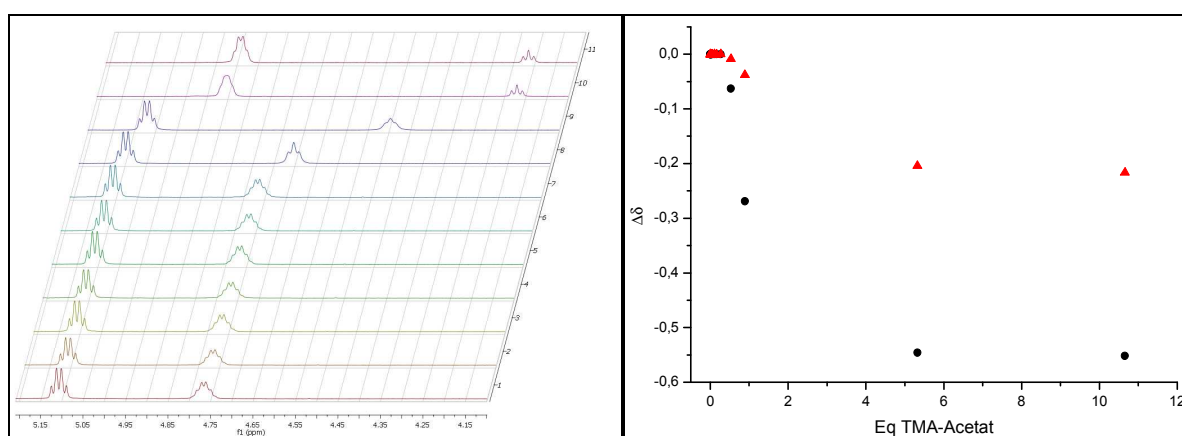


Abb. 27 (links): Die Ausschnittsvergrößerung der überlagerten NMR-Spektren von Verbindung **24** bei steigender Zugabe von TMA-Acetat in 100 %  $d_6$ -DMSO (OSPMD024010601). Rechts: Die Auftragung der Verschiebungsdifferenz ( $\Delta\delta$ ) gegen das Konzentrationsverhältnis von TMA-Acetat zu der Kopfgruppe.

Da hier beide Signale shiften, ist es wahrscheinlich, dass sowohl die Ammonium- als auch die Guanidiniumfunktion pinzettenartig das Acetatanion binden. Ab einer Wasserkonzentration von 40 % shiftet nur noch das zur Guanidiniumfunktion benachbarte H-Atom. Dieses deutet auf den Verlust der zweiten Bindestelle hin. Da Wasser für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken hervorragend geeignet ist, stört es die Ausbildung ionischer Wechselwirkungen. Es sind einige literaturbeschriebene Beispiele bekannt, bei denen eine höhere Wasserkonzentration zu kleineren Assoziationskonstanten führt.<sup>[85,65]</sup>

Die Auswertung der zwei shiftenden Signale führte zu widersprüchlichen Assoziationskonstanten (z. B. 700 und 120 M<sup>-1</sup> für 100 % d<sub>6</sub>-DMSO). Da die Messungen in Analogie zu Lit.<sup>[85]</sup> durchgeführt wurden, erfolgte keine pH-Kontrolle der Titration. Die unterschiedlichen Werte der K<sub>A</sub> können z. B. durch den unterschiedlichen Protonierungsgrad der Guanidinium- und Ammoniumfunktion hervorgerufen werden. Da bei der Messung in reinem d<sub>6</sub>-DMSO (024010601) zu wenige Datenpunkte zur Verfügung standen, ist hier der Fehler enorm hoch.

**Tab. 1: Assoziationskonstanten für die Titrations der Kopfgruppe 24 mit TMA-Acetat. \*<sup>1</sup> = Zum Guanidiniumion benachbartes, benzylisches CH-Atom. \*<sup>2</sup> = Zum Ammoniumion benachbartes, benzylisches CH-Atom.**

| Chiffre (PMD-) | [% d <sub>6</sub> -DMSO (aq)] | K <sub>A</sub> [M <sup>-1</sup> ] | verw. Signal [ppm]  |
|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 024010601      | 100                           | <b>698</b> +/- 390                | 4.766* <sup>1</sup> |
| 024010601      | 100                           | <b>119</b> +/- 82                 | 5.108* <sup>2</sup> |
| 024010602      | 90                            | <b>788</b> +/- 410                | 4.742* <sup>1</sup> |
| 024010602      | 90                            | <b>174</b> +/- 28                 | 5.079* <sup>2</sup> |
| 024010603      | 80                            | <b>273</b> +/- 31                 | 4.738* <sup>1</sup> |
| 024010603      | 80                            | <b>100</b> +/- 5                  | 5.060* <sup>2</sup> |
| 024010604      | 70                            | <b>115</b> +/- 11                 | 4.743* <sup>1</sup> |
| 024010604      | 70                            | <b>81</b> +/- 14                  | 5.048* <sup>2</sup> |
| 024010605      | 60                            | <b>23</b> +/- 4                   | 4.754* <sup>1</sup> |
| 024010606      | 50                            | <b>14</b> +/- 3                   | 4.769* <sup>2</sup> |

In direkten Vergleich mit dem von Schmuck beschriebenen Rezeptor **32** (Abb. 28) weist die Pyridin-Kopfgruppe (Abb. 26) eine 147-mal schlechtere Assoziationskonstante auf (3380 M<sup>-1</sup>/23 M<sup>-1</sup>). Deshalb fand auch keine weitere Verwendung der Pyridin-Kopfgruppe bei der "split and combine"-Synthese der Rezeptorbibliotheken statt.



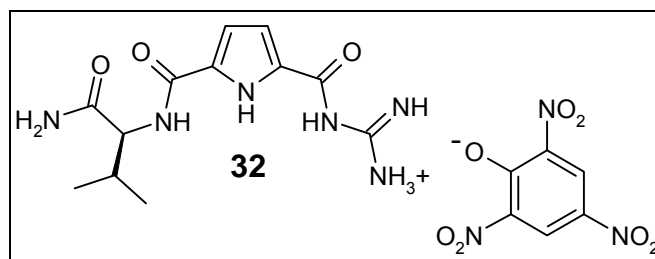


Abb. 28: Der von Schmuck beschriebene, Valinamid-substituierte Rezeptor (Pikrat).<sup>[85]</sup>

#### 4.1.2.3 NMR- Titrationsen der Pyridinkopfgruppe 26 (PMD-029-02) mit TMA-Acetat

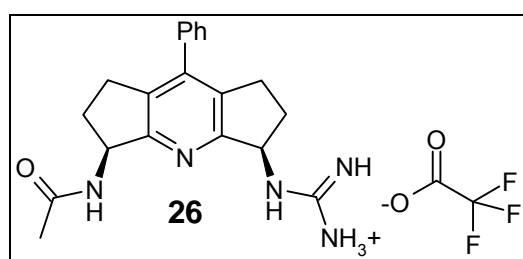


Abb. 29: Das Acetamidderivat der *syn*-Pyridinkopfgruppe (Trifluoracetat, Enantiomerenpaar).

Die in Rezeptor **24** (Abb. 26) vorhandene Ammoniumfunktion war für die Ankupplung an peptidische Festphasenbibliotheken vorgesehen (Abb. 19).

Tab. 2: Die berechneten Assoziationskonstanten für die Titrationsen der Kopfgruppe 26 (PMD-029-02) mit TMA-Acetat.

| Chiffre (PMD-) | [% d <sub>6</sub> -DMSO (aq)] | K <sub>A</sub> [M <sup>-1</sup> ] | verw. Signal [ppm] |
|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 029020401      | 100                           | <b>731</b> +/- 50                 | 8.397              |
| 029020401      | 100                           | <b>311</b> +/- 19                 | 5.043              |
| 029020401      | 100                           | <b>140</b> +/- 10                 | 8.280              |
| 029020402      | 90                            | <b>127</b> +/- 11                 | 7.995              |
| 029020402      | 90                            | <b>75</b> +/- 9                   | 5.014              |
| 029020402      | 90                            | <b>32</b> +/- 7                   | 8.274              |
| 029020403      | 80                            | <b>25</b> +/- 2                   | 8.009              |
| 029020403      | 80                            | <b>11</b> +/- 2                   | 8.356              |
| 029020403      | 80                            | <b>23</b> +/- 2                   | 5.001              |
| 029020404      | 70                            | <b>9</b> +/- 1                    | 7.997              |
| 029020404      | 70                            | <b>6</b> +/- 1                    | 8.389              |
| 029020404      | 70                            | <b>10</b> +/- 2                   | 4.995              |
| 029020405      | 60                            | <b>4</b> +/- 0.5                  | 7.995              |
| 029020405      | 60                            | <b>2</b> +/- 0.8                  | 8.404              |
| 029020406      | 50                            | <b>2</b> +/- 0.4                  | 7.905              |
| 029020406      | 50                            | <b>2</b> +/- 0.4                  | 8.405              |

Da die chemische Struktur der Kopfgruppe **24** als Amin- (bzw. Ammonium)-derivat von der in den geplanten Bibliotheken abweicht (Amid, bzw. Harnstoffderivat), wurde ein Acetamid synthetisiert und ebenfalls charakterisiert. In Analogie zu der vorangegangenen Untersuchung nahmen die Assoziationskonstanten mit zunehmendem Wasseranteil des Lösungsmittels stark ab. Hier war der Effekt sogar noch wesentlich ausgeprägter. Bei Vergleich der Werte für 70 % d<sub>6</sub>-DMSO (aq) waren die Assoziationskonstanten für Rezeptor **26** ~ achtmal schlechter als bei Rezeptor **31**.

#### 4.1.2.4 NMR-Titrationsen der Pyridinkopfgruppe **31** (PMD-034-01) mit TMA-Acetat

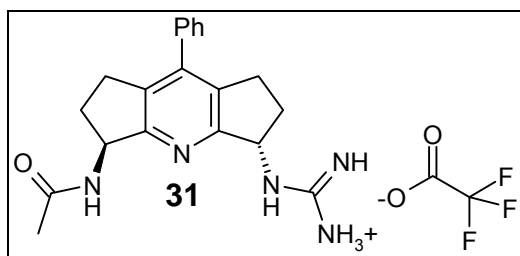


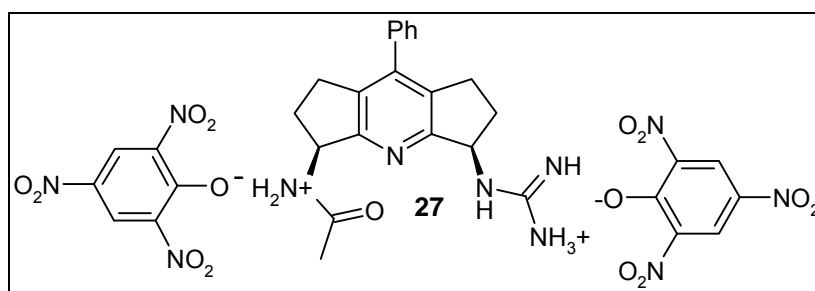
Abb. 30: Die Abbildung zeigt das Acetamidderivat der *anti*-Kopfgruppe (Trifluoracetat, Enantiomerenpaar).

Ausgehend von einer Vorstufe der *syn*-Kopfgruppe **26** wurde das hierzu diastereomere Enantiomerenpaar der *anti*-Kopfgruppe **31** hergestellt. In Analogie zu Rezeptor **24** wurden auch hier NMR-Titrationsen in sechs verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Die für Rezeptor **31** erhaltenen Assoziationskonstanten sind durchweg kleiner als bei Rezeptor **24** und durchschnittlich kleiner als bei dem zu **31** diastereomere Enantiomerenpaar **26** (*syn*-). Dieser Befund lässt sich durch die repulsive Wirkung des freien Elektronenpaares am Pyridin-N-Atom erklären: Wird ein Carboxylat von dem Guanidiniumion und der Acetamid-NH-Funktion komplexiert, bewirkt das freie Elektronenpaar am Acetatanion eine Abstoßung, da es genau auf den negativ geladenen Teil gerichtet ist. Zu einer analogen Erklärung kamen auch Schmuck et al., bei dem Versuch, das Pyrrol der Kopfgruppe durch ein Pyridin zu ersetzen (Lit. <sup>[73]</sup>).

**Tab. 3: Die berechneten Assoziationskonstanten für die Titrationsen der Kopfgruppe PMD-034-01 (Rez. 31) mit TMA-Acetat.**

| Chiffre (PMD-) | [% d <sub>6</sub> -DMSO (aq)] | K <sub>A</sub> [M <sup>-1</sup> ] | verw. Signal [ppm] |
|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 034010401      | 100                           | <b>32</b> +/- 6                   | 5.305              |
| 034010401      | 100                           | <b>165</b> +/- 37                 | 5.084              |
| 034010402      | 90                            | <b>50</b> +/- 3                   | 5.065              |
| 034010402      | 90                            | <b>26</b> +/- 3                   | 5.299              |
| 034010403      | 80                            | <b>13</b> +/- 1                   | 5.048              |
| 034010403      | 80                            | <b>9</b> +/- 1                    | 5.295              |
| 034010404      | 70                            | <b>5</b> +/- 0.6                  | 5.041              |
| 034010404      | 70                            | <b>5</b> +/- 0.6                  | 5.294              |
| 034010405      | 60                            | <b>2.5</b> +/- 0.4                | 7.935              |
| 034010406      | 50                            | <b>1.3</b> +/- 0.2                | 7.888              |
| 034010406      | 50                            | <b>3.2</b> +/- 1.1                | 7.170              |

#### 4.1.2.5 NMR- Titrationsen der Pyridinkopfgruppe **27** mit TMA-Acetat



**Abb. 31: Die Abbildung zeigt das Acetamidderivat der *syn*-Kopfgruppe (Pikrat, Enantiomerenpaar).**

Die in Kapitel 4.1.2.3 untersuchte Kopfgruppe **26** wurde in Form des Pikratsalzes **27** untersucht, das durch Umsalzen von Rezeptor **26** mit Pikrinsäure zugänglich war. Die NMR-Untersuchung dieser Kopfgruppe erfolgte nur in 100 % d<sub>6</sub>-DMSO, da nach der ersten Berechnung der Assoziationskonstanten klar war, dass die *syn*-Anordnung der Substituenten auch in Form des Pikrats keinen wesentlichen Vorteil gegenüber dem Trifluoracetatsalz erbrachte. Da bei allen untersuchten Pyridinkopfgruppen die Assoziationskonstanten recht moderat ausfielen, wurden bis zu dem Erreichen der entsprechenden Endpunkte der NMR-Titrationsen 10-23 Äquivalente des Acetats (hier: 23 Äq. TMA-Acetat) hinzugefügt. Zwei Signale zeigten durch die Zugabe Shifts, die zur Auswertung geeignet waren: Eines der benzyliischen CH-Atome sowie das Acetamido-NH-Atom.

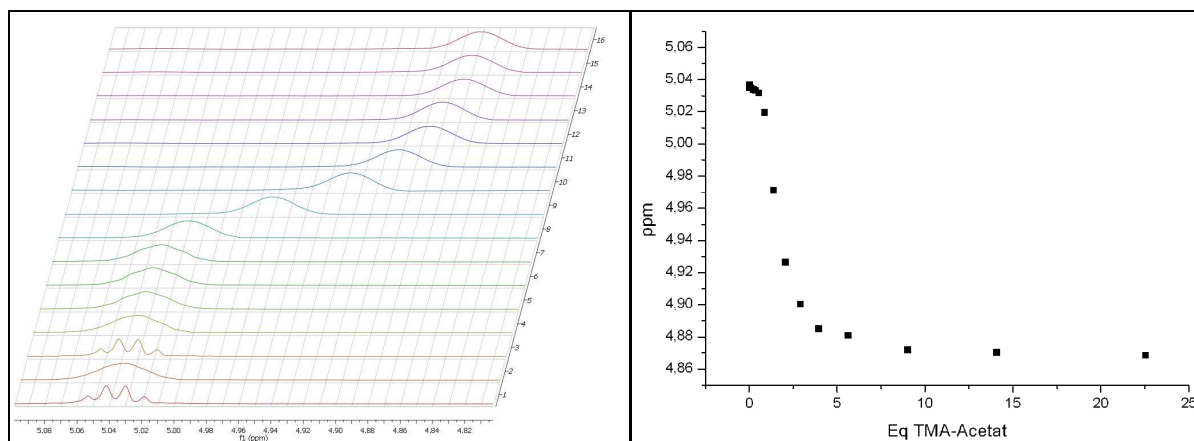


Abb. 32 (links): Die Ausschnittsvergrößerung der überlagerten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Titration von 27 (PMD-032-02) mit TMA-Acetat (in 100 %  $\text{d}_6$ -DMSO). Rechts: Die Auftragung der zugehörigen Bindungsisotherme (chemische Verschiebung gegen die zugegebenen Äquivalente an TMA-Acetat).

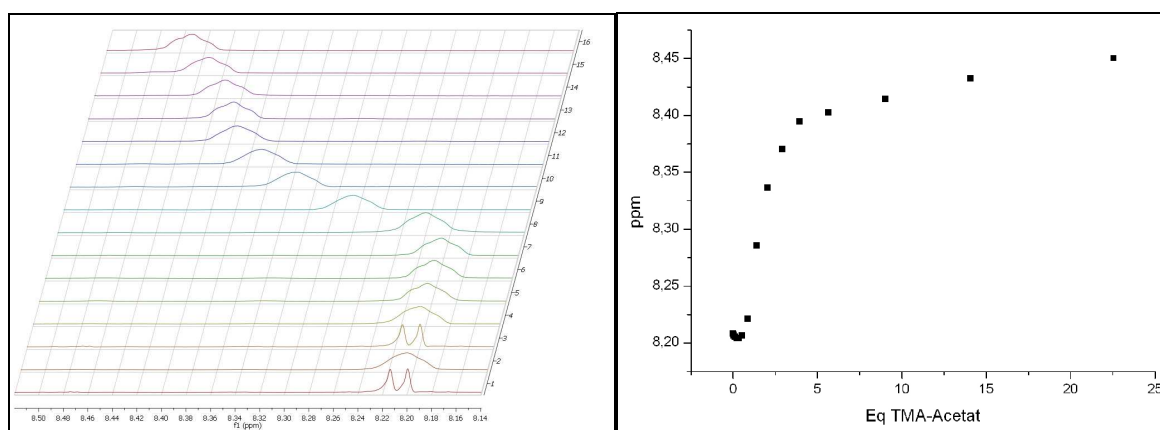


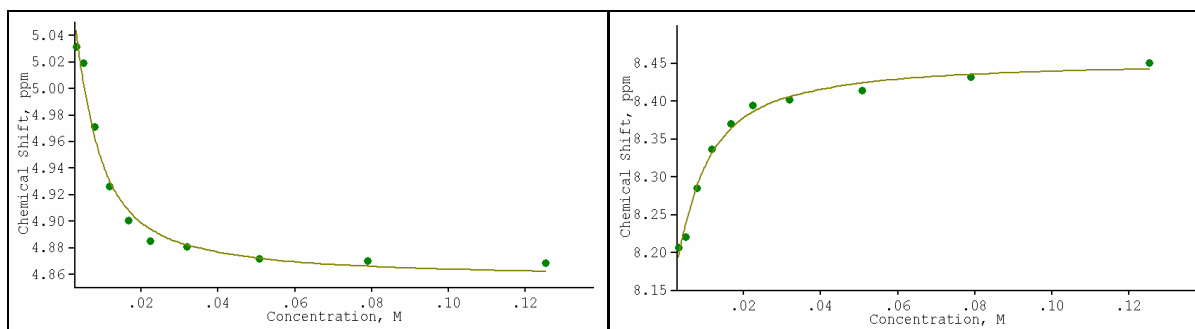
Abb. 33 (links): Die Ausschnittsvergrößerung für das Acetamido-NH-Signal. Rechts: Die Auftragung der zugehörigen Bindungsisotherme.

Die Auswertung beider Signale (benzylisches CH- und Acetamido-NH-Atom) ergaben ähnliche Assoziationskonstanten:

Tab. 4: Die Tabelle zeigt die berechneten Assoziationskonstanten für die Titration der Kopfgruppe PMD-032-02 (Rez. 27) mit TMA-Acetat.

| Chiffre (PMD-) | [% $\text{d}_6$ -DMSO] | $K_A$ [ $\text{M}^{-1}$ ] | verw. Signal [ppm] |
|----------------|------------------------|---------------------------|--------------------|
| 032020201      | 100                    | 349 +/- 97                | 5.036              |
| 032020201      | 100                    | 228 +/- 46                | 8.207              |

Die für beide Berechnungen erhaltenen Fitplots (Abb. 34) stimmten fast mit den Datenpunkten überein. Dies weist auf die Güte der Berechnung (und Titration) hin.



**Abb. 34:** Die Fitplots der mittels WINEQMR2 berechneten Assoziationskonstanten für die Titration von Rez. 27 mit TMAOAc (in 100 %  $d_6$ -DMSO).

### 4.1.3 Monte-Carlo-Berechnungen der Pyridinkopfgruppen

Von den mit TMAOAc titrierten Pyridinkopfgruppen (Verb. **31** und **26**, TFA-Salze) wurden Monte-Carlo-Multiple-Minimum-Berechnungen (MCMM) durchgeführt, um energieminierte Strukturen zu erhalten. Hierbei wurden Berechnungen in Chloroform (exemplarisch für die Titrationsen in 100 %  $d_6$ -DMSO), sowie in  $H_2O$  durchgeführt (exemplarisch für 60 %  $d_6$ -DMSO (aq)). Die Betrachtung der zugehörigen (minimierten) Strukturen ermöglicht eine Erklärung für die, durch die NMR-Titrationsen ermittelten (relativ kleinen) Assoziationskonstanten.

Die energieminierte Konformation (Berechnung in  $CHCl_3$ ) der *syn*-konfigurierten Kopfgruppe **26** (Abb. 35) weist vier H-Brücken auf, wovon zwei die Bindung des Guanidiniumions zum Carboxylat vermitteln. Weitere zwei H-Brücken sind intramolekularer Natur und verbinden das Guanidiniumion mit dem N-Atom des Pyridins sowie der Carbonylgruppe des Acetamids. Hierdurch wird die pinzettenartige Einbindung des Carboxylats erschwert, da hierfür zwei H-Brücken aufgebrochen werden müssen, um das Carboxylat in die Position zwischen Guanidiniumion und Amid-NH zu bringen.

Die Berechnung der gleichen Kopfgruppe in einem, für die Ausbildung von H-Brücken, kompetitiveren Lösungsmittel ( $H_2O$ ) führte zum Verlust der H-Brücke zum Pyridin-N-Atom (Abb. 36). Hieraus resultiert eine andere Orientierung des Guanidiniumions und entsprechend auch eine des hieran gebundenen Carboxylats. In beiden "Lösungsmitteln" ist das Carboxylat von der Kopfgruppe weg orientiert, in  $CHCl_3$  ist die Ausrichtung jedoch günstiger, da die Raumrichtung im wesentlichen dem Anknüpfungspunkt für eine kombinatorische Bibliothek entspricht, wie sie in dem Design peptidischer Rezeptorbibliotheken vorgesehen war (Abb. 19).

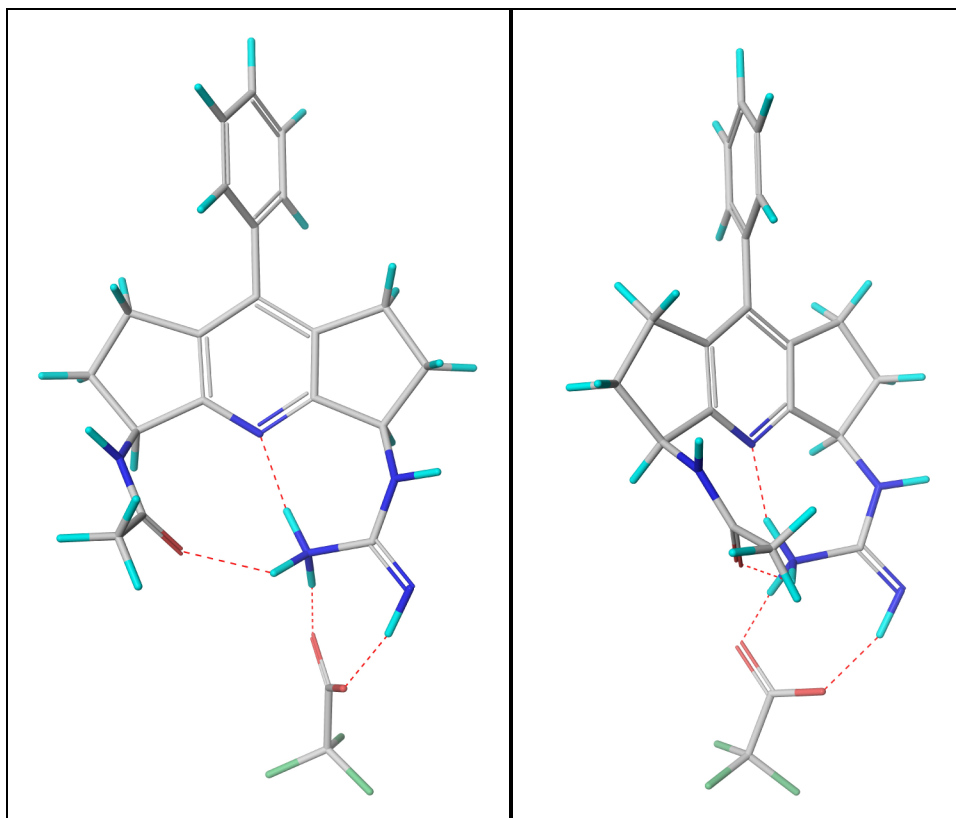


Abb. 35: Die Energie-minimierte (MCMM) Struktur der *syn*-konfigurierten Kopfgruppe (Rez. 26) in  $\text{CHCl}_3$  (rechte Abbildung um  $45^\circ$  gedreht).<sup>[74]</sup>

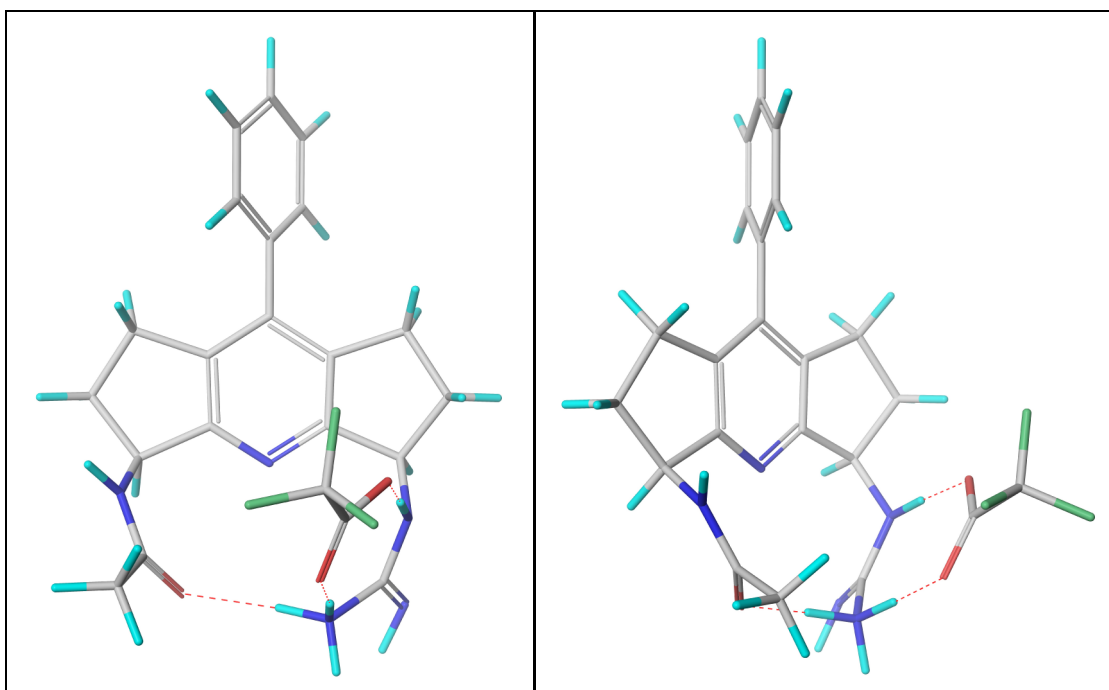


Abb. 36: Die Energie-minimierte (MCMM) Struktur der *syn*-konfigurierten Kopfgruppe (Rez. 26) in  $\text{H}_2\text{O}$  (rechte Abbildung um  $45^\circ$  gedreht).<sup>[74]</sup>

Die Berechnung der *anti*-konfigurierten Pyridinkopfgruppe **31** in  $\text{CHCl}_3$  ergab in Analogie zur *syn*-Kopfgruppe zwei intermolekulare H-Brücken zwischen Gua-

nidiniumion und Carboxylat sowie zwei intramolekulare zwischen Guanidiniumion und Pyridin-N-Atom sowie der Carbonylgruppe des Acetamids. Auch hier kommt es nicht zur Einbindung des Carboxylats zwischen die beiden Funktionalitäten (Guanidin und Acetamid). Die intramolekularen H-Brücken stabilisieren hingegen eine für diese Funktion ungünstige Konformation.

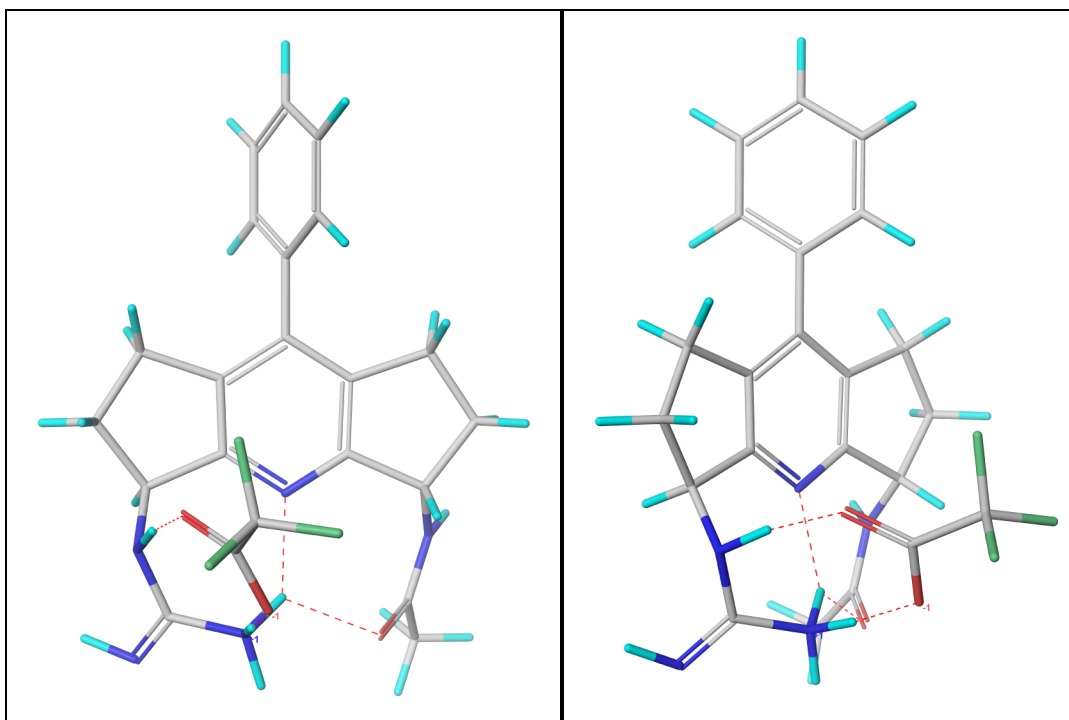


Abb. 37: Die Energie-minimierte (MCMM) Struktur der *anti*-konfigurierten Kopfgruppe (Rez. 31) in  $\text{CHCl}_3$  (rechte Abbildung um  $45^\circ$  gedreht).<sup>[74]</sup>

Die Berechnung der gleichen Verbindung in  $\text{H}_2\text{O}$  führte auch bei der *anti*-konfigurierten Kopfgruppe zu einem Verlust der intramolekularen H-Brücke zum Pyridin-N-Atom. Im Gegensatz zur *syn*-konfigurierten Kopfgruppe bewirkt eine wässrige Umgebung jedoch keine drastische Konformationsänderung: Beim Vergleich beider Komplexe (Abb. 37, Abb. 38) wird fast kein Unterschied ersichtlich. Auch die Orientierung des gebundenen Carboxylats ist in beiden Lösungsmitteln gleich und ungünstig für eine Anwendung in Rezeptorbibliotheken, da diese nicht zur Acetamidfunktion gerichtet ist.

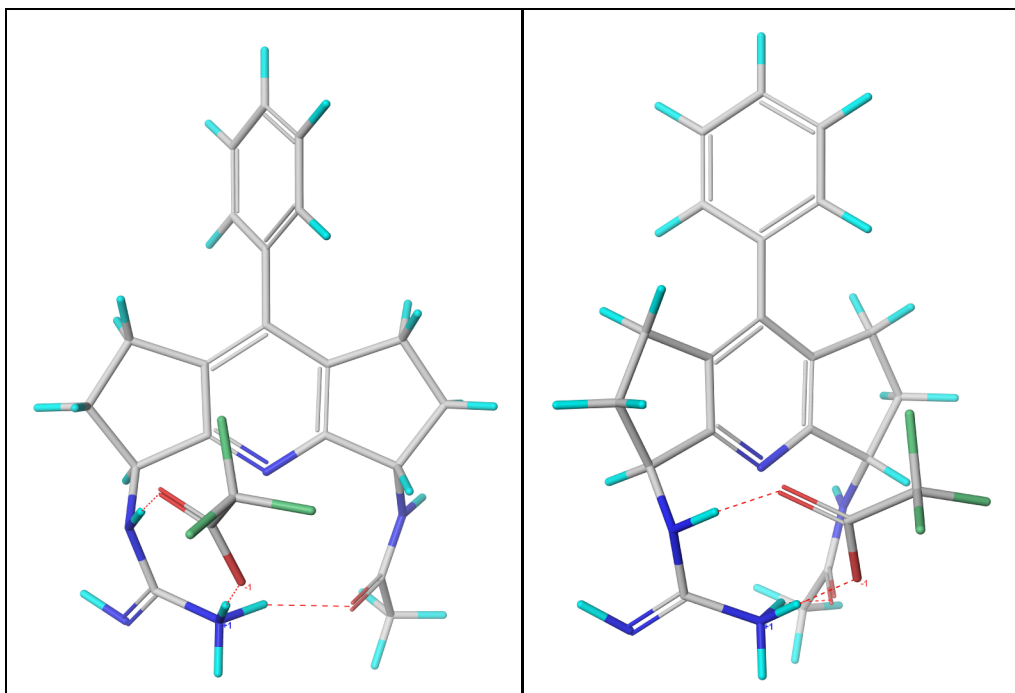


Abb. 38: Die Energie-minimierte (MCMM) Struktur der *anti*-konfigurierten Kopfgruppe (Rez. 31) in  $\text{H}_2\text{O}$  (rechte Abbildung um  $45^\circ$  gedreht).<sup>[74]</sup>

Die Doppelbindung einer Guanidiniumfunktion kann in mehrere Positionen tautomerisieren. Hierbei sind für die Startgeometrie einer Energieminimierung zwei Tautomere von besonderem Interesse: Das bereits berechnete Tautomer mit einer terminalen iminischen Doppelbindung und ein Tautomer mit Doppelbindung zur Benzylamin-Position, welche zusätzlich für beide Kopfgruppen (*syn*- und *anti*-) in  $\text{CHCl}_3$  berechnet wurde.

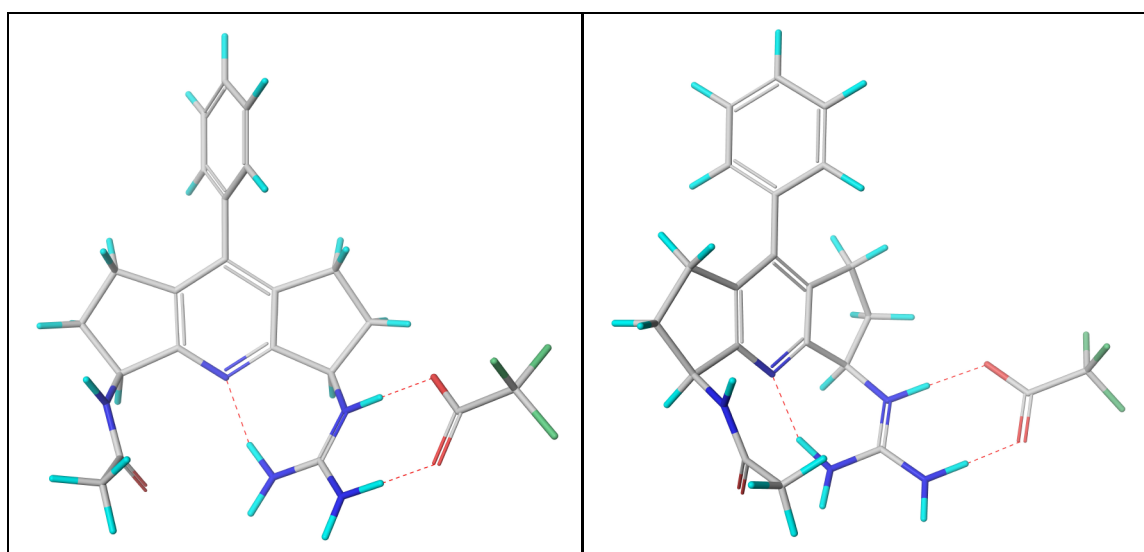


Abb. 39: Die Energie-minimierte (MCMM) Struktur der *syn*-konfigurierten Kopfgruppe (Tautomer, Rez. 26) in  $\text{CHCl}_3$  (rechte Abbildung um  $45^\circ$  gedreht).<sup>[74]</sup>



Bei diesem Tautomer ist die positive Ladung an der benzylaminischen Position des Guanidiniumions und bildet in den energieminierten Strukturen von sowohl *syn*- (Abb. 39) als auch *anti*-konfigurierter Kopfgruppe (Abb. 40) eine H-Brücke weniger aus als bei dem anderen Tautomer.

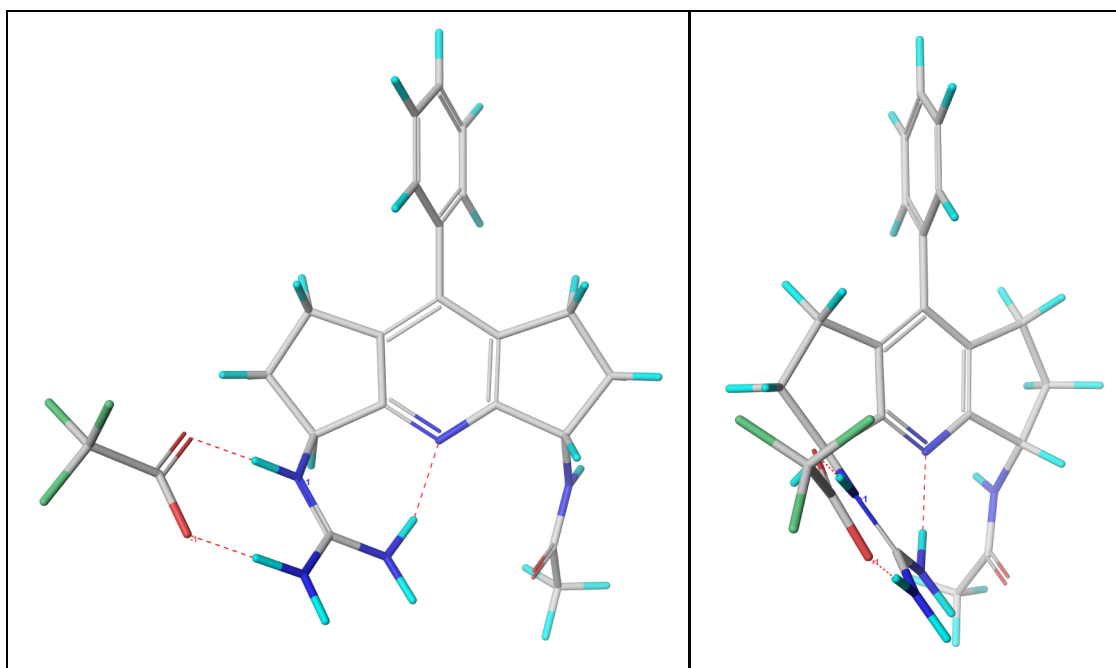


Abb. 40: Die Energie-minimierte (MCMM) Struktur der *anti*-konfigurierten Kopfgruppe (Tautomer, Rez. 31) in  $\text{CHCl}_3$  (rechte Abbildung um  $45^\circ$  gedreht).<sup>[74]</sup>

Intramolekular bildet sich nur die Brücke zum Pyridin-N-Atom aus, intermolekular zwei vom Guanidiniumion zum Carboxylat. Die Orientierung des Carboxylats zeigt für *syn*- und *anti*-Konfiguration von der eigentlichen Kopfgruppe weg.

Tab. 5: Die MCMM-Energieberechnung der *anti*- und *syn*-Pyridinkopfgruppen.

| Konfig., Lösungsmittel                             | Energie [kJ/mol] | Konfig., Lösungsmittel                            | Energie [kJ/mol] |
|--|------------------|---|------------------|
| <i>anti</i> -(Rez. 31), $\text{H}_2\text{O}$       | - 656.3          | <i>syn</i> -(Rez. 26), $\text{H}_2\text{O}$       | - 637.4          |
| <i>anti</i> -(Rez. 31), $\text{CHCl}_3$            | - 620.9          | <i>syn</i> -(Rez. 26), $\text{CHCl}_3$            | - 581.5          |
| <i>anti</i> -(Rez. 31), $\text{CHCl}_3$ , Tautomer | - 570.6          | <i>syn</i> -(Rez. 26), $\text{CHCl}_3$ , Tautomer | - 571.5          |

Zusammenfassend gilt für alle Kopfgruppen und berechneten Tautomere, dass diese in keiner minimierten Struktur das Carboxylat zwischen die Funktionalitäten (Guanidiniumion und Acetamid) einbinden und nur in einem Fall in eine günstige Raumrichtung positionieren (*syn*-Konfiguration in  $\text{CHCl}_3$ , Abb. 35). Eine entsprechende Einbindung ist also erschwert, da hierfür eine ( $\text{H}_2\text{O}$ ) bzw. zwei

(CHCl<sub>3</sub>) Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden müssen. Dies liefert einen Erklärungsansatz für die in den NMR-Titrationsen gefundenen, relativ kleinen Assoziationskonstanten. Die in den berechneten Strukturen ermittelte, intramolekulare H-Brücke (zum Pyridin-N-Atom) findet sich auch in den NMR-Spektren der entsprechenden Kopfgruppen und untermauert somit die minimierten Strukturen und die hieraus abgeleitete Erklärung.

#### 4.1.4 MINTA-Berechnungen der Pyridinkopfgruppen

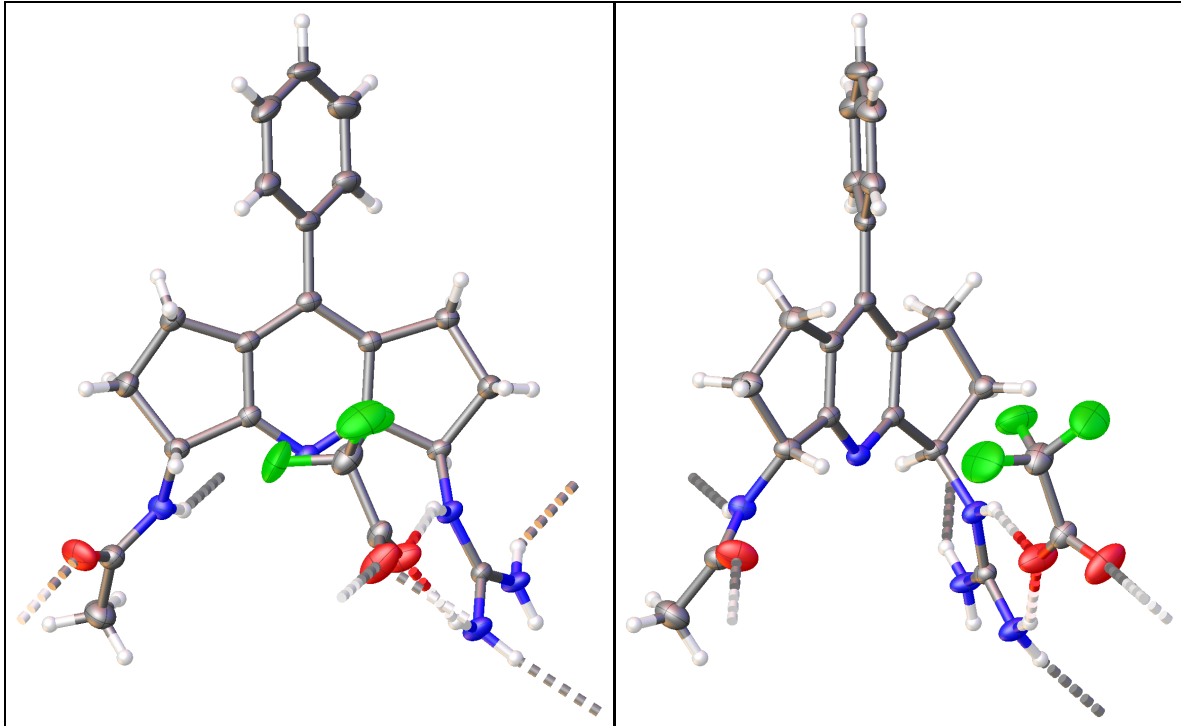
Die jeweils 20 stabilsten Strukturen der MCOMM-Konformationssuche wurden für eine MINTA-Berechnung verwendet. MINTA erlaubt die Berechnung der freien Bindungsenergie eines Rezeptor-Substrat-Komplexes.<sup>[75]</sup> Hierbei wurden für die *syn*-konfigurierten Kopfgruppen (in CHCl<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>O) höhere Werte (also stabilere Komplexe) gefunden. Hieraus lässt sich ableiten, dass die *syn*-Konfiguration besser für die Komplexbildung mit Carboxylaten geeignet ist. Dies wird durch die NMR-Titrationsen bestätigt, die tendenziell bessere Assoziationskonstanten für die *syn*-konfigurierten Kopfgruppen lieferten. Die Berechnung für ein weiteres Tautomer der Guanidiniumfunktion gab hingegen nur eine geringfügig größere Energie der *syn*-Kopfgruppe.

**Tab. 6: Die MINTA-Energieberechnung der *anti*- und *syn*-Pyridinkopfgruppen.**

| Konfiguration, Lösungsmittel                            | $\Delta G$ [kJ/mol] | Konfiguration, Lösungsmittel                           | $\Delta G$ [kJ/mol] |
|---|---------------------|--|---------------------|
| <i>anti</i> -( <b>31</b> ), H <sub>2</sub> O            | + 206 +/- 0.4       | <i>syn</i> -( <b>26</b> ), H <sub>2</sub> O            | + 227 +/- 0.5       |
| <i>anti</i> -( <b>31</b> ), CHCl <sub>3</sub>           | + 242 +/- 0.4       | <i>syn</i> -( <b>26</b> ), CHCl <sub>3</sub>           | + 293 +/- 0.4       |
| <i>anti</i> -( <b>31</b> ), Tautomer, CHCl <sub>3</sub> | + 293 +/- 0.5       | <i>syn</i> -( <b>26</b> ), Tautomer, CHCl <sub>3</sub> | + 295 +/- 0.4       |

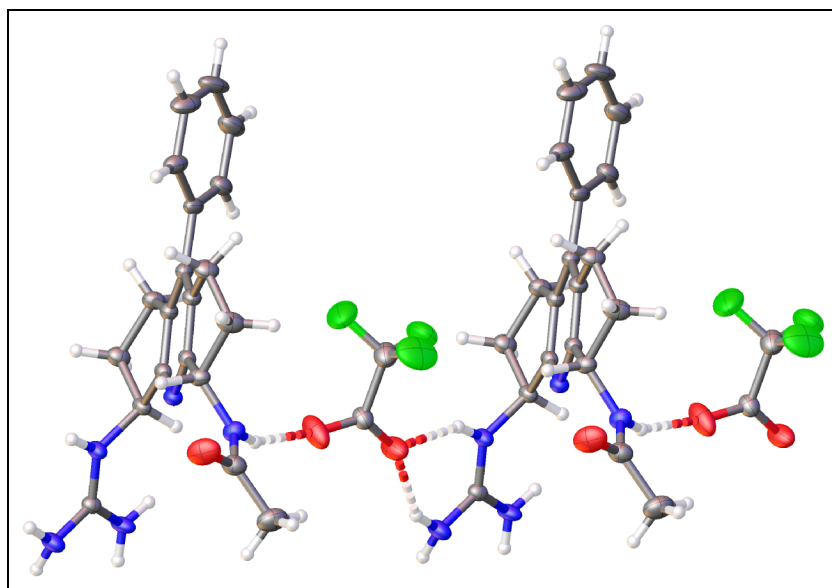
#### 4.1.5 Einkristallröntgenstrukturanalyse der Pyridinkopfgruppe

Von der Kopfgruppe **31** (*anti*-orientierte Konfiguration) konnten Einkristalle gezüchtet werden. Hierzu wurde eine filtrierte Lösung von 1 mg **31** in 1 mL MeOH in einem Vial innerhalb von 4 Tagen bei RT langsam eingedampft. Die Röntgenstrukturanalyse bestätigte zum einen die gewünschte Struktur, zum anderen ließ sie auch Rückschlüsse über die Fähigkeit der Verbindung zu, H-Brücken zu Acetaten auszubilden.



**Abb. 41 (links):** Die Abbildung zeigt die Röntgenkristallstruktur von Rez. 31 (PMD-034-01-01). Die H-Brücke zwischen Guanidiniumion und Trifluoracetat und weitere intermolekulare H-Brücken sind durch unterbrochene Linien markiert. Rechts: Die Ansicht der Abb. 41 wurde um 45° gedreht.

Durch Drehung von Abb. 41 wird ersichtlich, dass sich im Kristallgitter nicht die in Lösung vermutete Komplexbildung zwischen Guanidiniumion sowie Acetamido-NH der Kopfgruppe und dem Carboxylat ausbildet, sondern "intermolekular" von einer Kopfgruppe ausgehend, zu zwei weiteren Trifluoracetaten. Dies verdeutlicht Abb. 42:



**Abb. 42:** Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus der Kristallstruktur von Rez. 31 (PMD-034-01-01). Abgebildet sind die intermolekularen H-Brücken zwischen dem Guanidiniumion sowie Acetamido-NH und einem Sauerstoffatom des Trifluoracetats.

Die Röntgenstrukturanalyse liefert darüber hinaus noch die Information, dass die Substanz als Enantiomerenpaar kristallisiert (Abb. 43).

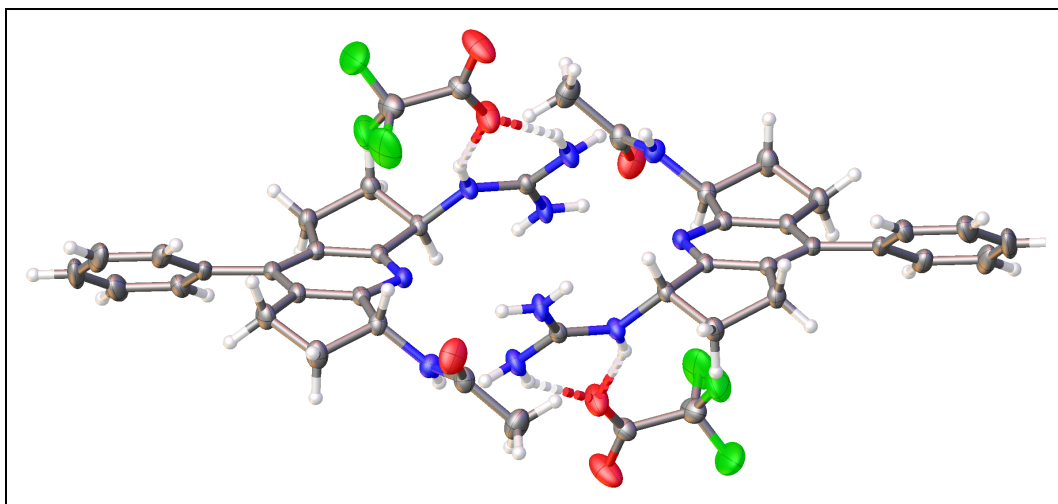


Abb. 43: Die Abbildung zeigt die Packung des Enantiomerenpaares von Rez. 31 (PMD-034-01-01) im Kristallgitter.

Die Kristallisation der *syn*-konfigurierten Kopfgruppe gelang nicht. Verschiedene Methoden (Verdunstung, Abkühlung, Diffusionskristallisation) an unterschiedlichen Salzen (Trifluoracetat, Pikrat, Trichloracetat) ergaben keine brauchbaren Einkristalle.

#### 4.2 Syntheschema der NBD-markierten CaaX-Box von Rheb

Die Synthese der Fluorophor-markierten Rheb-CaaX-Box erfolgte nach einigen fehlgeschlagenen Festphasensynthesen als konvergent verlaufende Lösungssynthese. Hierbei wurde als C-terminale Schutzgruppe ein Methylester verwendet, da für die Thiofunktion des Cysteins bereits die Tritylschutzgruppe Verwendung findet und hiermit sowohl sauer spaltbare Schutzgruppen (*tert*-Butylester) als auch hydrogenolytisch spaltbare Schutzgruppen (Benzyl) nicht kompatibel sind. Gängige Methoden der Methylesterspaltung, wie das Erhitzen mit Lil in DMF, oder LiOH funktionierten nicht, da diese auch zu einer Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe führten. Die Verwendung einer immobilisierten Lipase von *Candida antarctica*, führte zu keiner Umsetzung. Letztendlich konnte erfolgreich eine von Nicolaou et al. entwickelte Methode eingesetzt werden.<sup>[76]</sup> Hierzu wurde das kommerziell erhältliche Reagenz Trimethylzinnhydroxid verwendet, das aus dem kostengünstigen Trimethylzinnchlorid hergestellt wurde.<sup>[77]</sup>

Sämtliche Kupplungsreaktionen wurden mit HATU/DIPEA durchgeführt. Die jeweiligen, getrockneten Rohprodukte der freien Amine (nach Fmoc-Entschützung) wurden nicht gereinigt, sondern direkt eingesetzt, da diese (speziell bei den Dipeptiden) zu einer intramolekularen Zyklisierung (Diketopiperazinbildung) neigen.

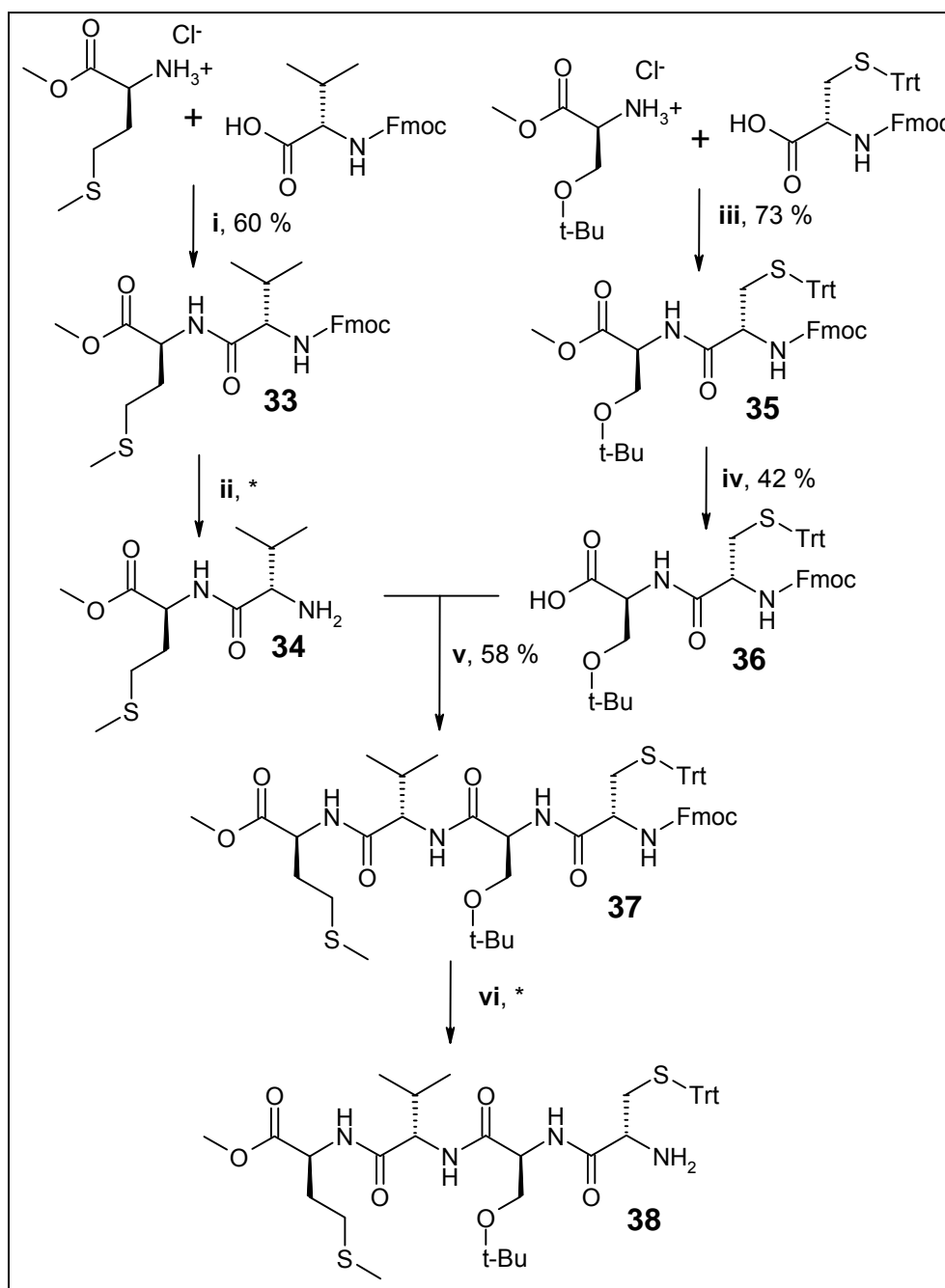


Abb. 44: Die Abbildung zeigt den Syntheseweg des Tetrapeptids. (i) HATU, DIPEA, DCM/DMF, 0 °C, 1h → RT, 10 h; (ii) Piperidin, ACN/DMF, RT, 1h; (iii) HATU, DIPEA, DCM/DMF, 0 °C, 1h → RT, 17 h; (iv) Me<sub>3</sub>SnOH, 1,2-Dichlorethan, 0 °C → 80 °C, 15 h; (v) HATU, DIPEA, DCM/DMF, 0 °C, 1h → RT, 13 h; (vi) Piperidin, ACN/DMF, RT, 1h. \* = Das jeweils entstehende freie Amin wurde als Rohprodukt eingesetzt.

Die Synthese des Dipeptids 33 erfolgte ausgehend von den beiden kommerziell

erhältlichen Aminosäurederivaten  $\text{H}_2\text{N-Met-OMe}\cdot\text{HCl}$  und  $\text{Fmoc-HN-Val-OH}$ . Auf dem zweiten Syntheseweg wurde  $\text{H}_2\text{N-Ser}(t\text{-Bu})\text{-OMe}$  und  $\text{Fmoc-HN-Cys-OH}$  zum Dipeptid **35** gekuppelt. Das Dipeptid **33** wurde dann *N*-terminal mit Piperidin zum freien Amin **34** entschützt, während das Dipeptid **35** *C*-terminal zur freien Carbonsäure **36** entschützt wurde. Die Kupplung beider Dipeptide lieferte das geschützte Tetrapeptid **37**. Dieses wurde zunächst Fmoc-entschützt und als Rohprodukt **38** direkt für die Synthese des Nitro-benzoxadiazoyl(NBD)-markierten Tetrapeptids **40** eingesetzt (Abb. 45).

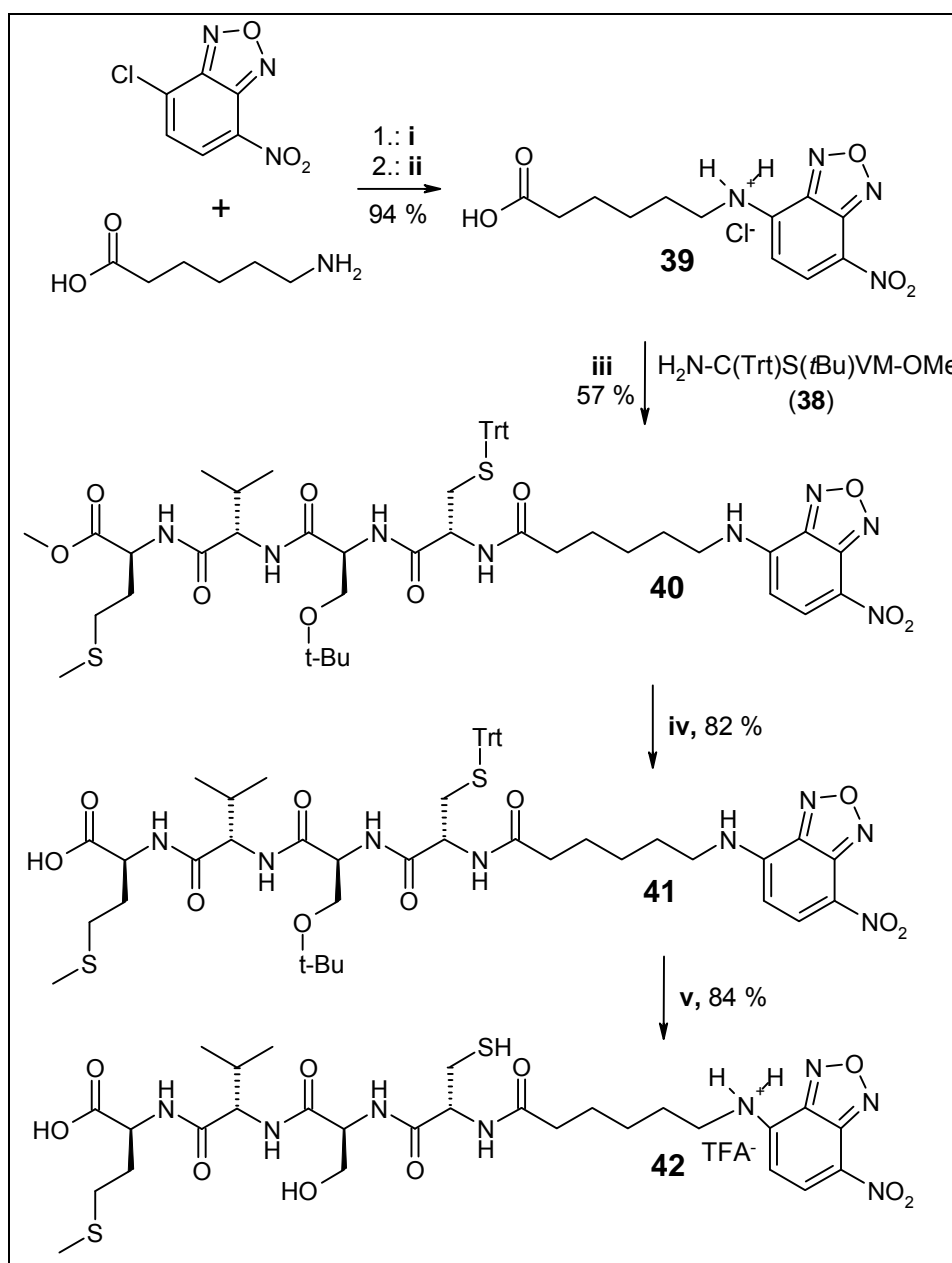


Abb. 45: Die Abbildung zeigt den Syntheseweg des NBD-markierten Tetrapeptids. (i)  $\text{NaHCO}_3$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 1h;<sup>[78]</sup> (ii) 2 M  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ;<sup>[78]</sup> (iii) Piperidin,  $\text{ACN/DMF}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 30 min; (iv)  $\text{Me}_3\text{SnOH}$ , 1,2-Dichlorethan,  $80^\circ\text{C}$ , 15 h; (v)  $\text{TFA/TIPS/H}_2\text{O}$ , RT, 2h.

Der hierfür nötige, NBD-markierte Linker **39** wurde zunächst aus NBD-Chlorid und 6-Aminohexansäure hergestellt.<sup>[78]</sup> Anschließend erfolgte die Kupplung des markierten Linkers **39** an das Rohprodukt des freien Amins **38** zum markierten, C-terminal- und seitenkettengeschützten Tetrapeptid **40**.

Nach Entschützung des Methylesters mit Trimethylzinnhydroxid wurde das seitenkettengeschützte Tetrapeptid **41** erhalten, das nach Entschützung mit TFA das voll entschützte Tetrapeptid **42** lieferte. Dieses liegt infolge des sekundären Amins als protoniertes Trifluoracetat vor.

### **4.3 Synthetische Rezeptoren der C-termini von K-Ras, H-Ras und Rheb, basierend auf der Schmuckschen Kopfgruppe**

#### **4.3.1 Syntheschema der Schmuckschen Kopfgruppe**

Die Synthese erfolgte nach Literaturvorschrift durch Acylierung des Pyrrols mit Trichloracetylchlorid zu Trichloracetylpyrrol **43**, anschließende Umsetzung mit Natriumbenzylalkoholat lieferte den Benzyl geschützten Ester **44**. Dieser wurde mittels einer Vilsmeier-Formylierung zum Aldehyd **45** substituiert. Die anschließende Oxidation mit Kaliumpermanganat lieferte die entsprechende Carbonsäure **46**. Diese wurde mit Monobocguanidin **47** unter Verwendung von PyBOP gekuppelt, wodurch die O-Benzyl- und N-Boc-geschützte Form der Kopfgruppe, **48** erhalten wurde. Nach hydrogenolytischer Spaltung der Benzylschutzgruppe wurde der eigentliche Baustein **49** (Triethylammoniumsalz) für die Festphasensynthese der kombinatorischen Bibliotheken sowie der präparativen Mengen der nachsynthetisierten Rezeptoren erhalten.

Die Synthese ist literaturbekannt<sup>[79]</sup> und erfolgte bis zu den Vorstufen **46** und **47** durch Dr. Thao Tran Thi Phuong. Die gesamte Synthese bis zur Kopfgruppe **49** wurde zudem im großen Maßstab (12.3 g Zielverbindung) von Dr. Wolfgang R. C. Beyer erneut durchgeführt, um ausreichend Edukt für die präparativen Mengen der Rezeptoren zu erhalten.

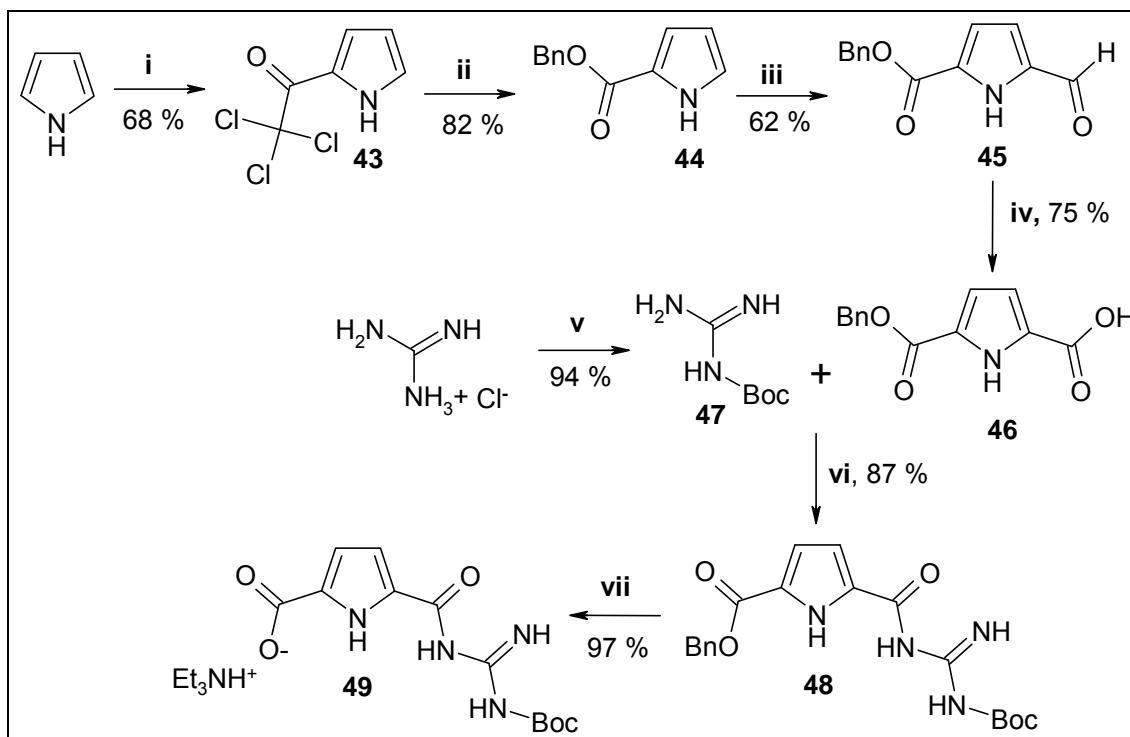


Abb. 46: Der Syntheseweg der *N*-Boc-5-(guanidinocarbonyl)1-*H*-pyrrol-2-carbonsäure. (i)  $\text{Cl}_3\text{C-COCl}$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , RT, 4 h;<sup>[79,80]</sup> (ii) Natriumbenzylalkoholat,  $\text{CHCl}_3$ , RT, 1 h;<sup>[79,80]</sup> (iii)  $\text{POCl}_3$ , DMF, 5-10 °C, 30 min, -15 °C, 15 min, 0 °C 3 h, RT, 24 h;<sup>[79,80]</sup> (iv)  $\text{KMnO}_4$ , Aceton/ $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 20 min, 40 °C 1 h;<sup>[79,80]</sup> (v)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , Dioxan, NaOH (aq), 0 °C, 30 min, RT, 20 h;<sup>[79,80]</sup> (vi) PyBOP, NMM, DMF, RT, 16 1/2 h;<sup>[79]</sup> (vii)  $\text{H}_2$ , Pd/C,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeOH, 40 °C, 3h.<sup>[79]</sup>

#### 4.3.2 Syntheschema eines literaturbekannten Acetat-Rezeptors

Das Guanidiniumpikrat **32** ist mit einer Assoziationskonstante von  $K_A = 3380 \text{ M}^{-1}$  ein literaturbekannter Rezeptor für Tetramethylammoniumacetat. Dieses bekannte System wurde verwendet, um die in dieser Dissertation verwendete Software WINEQNMR2 zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde das Guanidiniumpikrat **32** synthetisiert. Hierfür wurde *L*-Valinamid mit der Schmuckschen Kopfgruppe **49** gekuppelt. Das erhaltene Kupplungsprodukt **50** wurde mit TFA Boc-entschützt, was in der Bildung des Guanidiniumtrifluoracetates **51** resultierte. Das anschließende Umsalzen mit Pikrinsäure lieferte das entsprechende Guanidiniumpikrat **32**. Die Synthese entspricht nicht der Literaturvorschrift, da bei dieser, ausgehend von dem Boc-entschütztem Carbonsäurechlorid der Kopfgruppe, das Valinamid direkt gekuppelt wurde. Die Charakterisierung des Produkts ist mit den angegebenen Literaturwerten konform.<sup>[85]</sup>



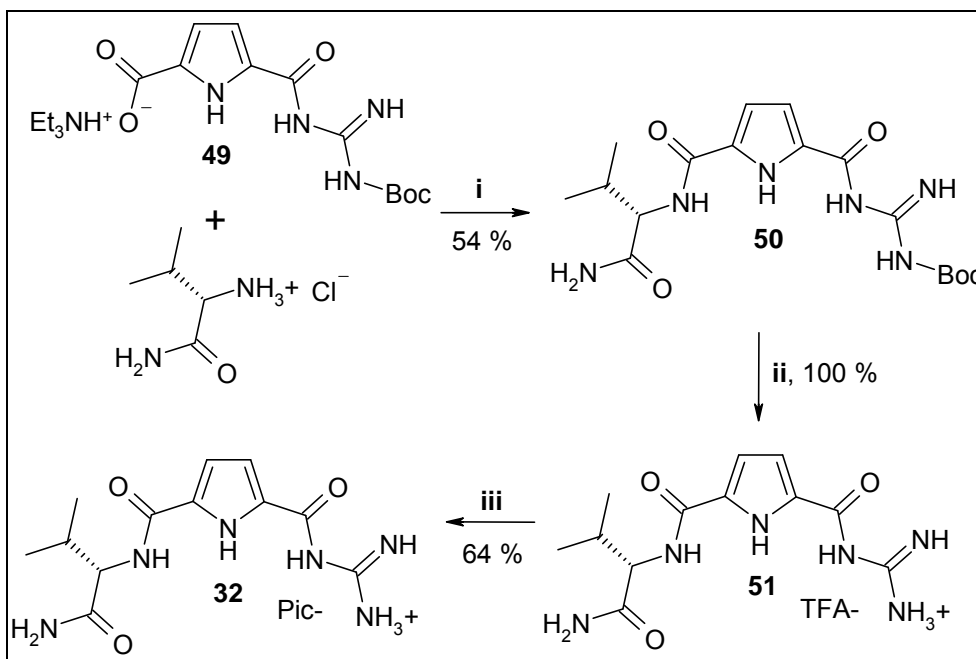
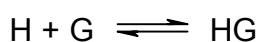


Abb. 47: Die Abbildung zeigt den Syntheseweg des literaturbeschriebenen Acetat-Rezeptors.<sup>[85]</sup>  
 (i) PyBop, DIPEA, 0 °C, 1 h, RT, 15 h; (ii) TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O, 0 °C, 1 h, RT, 4 h; (iii) 2,4,6-Trinitrophenol, MeOH/H<sub>2</sub>O, RT, 5 min.

### 4.3.3 NMR-Titrationsen

#### 4.3.3.1 Bestimmung von Assoziationskonstanten

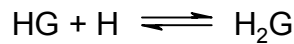
Die Assoziationskonstante beschreibt das Gleichgewicht einer sehr simplen Reaktion, bei der sich zwei Moleküle H = Wirtmolekül (host) und G = Gast (guest) reversibel zu einem Komplex HG zusammenlagern:<sup>[81]</sup>



Hierbei entspricht die Assoziationskonstante definitionsgemäß der Gleichgewichtskonstante des entsprechenden Prozesses: Also dem Verhältnis der Komplexkonzentration [HG] zu dem Produkt der Konzentrationen der (freien, nicht-komplexierten) Wirt [H] und Gastmoleküle [G]:

$$K_A = [HG] / ([H][G])$$

Verläuft die Bildung eines zweiten Komplexes wie H<sub>2</sub>G parallel, so ergibt sich eine zweite Assoziationskonstante K<sub>A2</sub>, die den folgenden Prozess beschreibt:



Entsprechend ergibt sich hierfür eine separate Gleichgewichtskonstante:

$$K_{A2} = [\text{H}_2\text{G}] / ([\text{H}][\text{HG}])$$

Die Bildung eines ternären Komplexes ( $\text{H}_2\text{G}$  oder  $\text{G}_2\text{H}$ ) wird also stets durch zwei Assoziationskonstanten  $K_A$  (bzw.  $K_{A1}$ ) und  $K_{A2}$  beschrieben. Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten eines solchen, ternären Systems erfolgt in der Regel durch Kurvenanpassung mit der Hilfe eines Computerprogramms (bspw. EQNMR oder ORIGIN), da die zugrundeliegenden, kubischen Gleichungen durch Variation von 4 Parametern angepasst werden. Die folgende Gleichung beschreibt den einfacheren, binären Prozess, bei dem durch Variation von zwei zunächst nicht bekannten Parametern ( $K_A$  und  $[\text{HG}]$ ), ein Fit der experimentellen Daten erstellt wird:<sup>[81]</sup>

$$[\text{HG}] = \frac{(K_A[\text{H}]_0 + K_A[\text{G}]_0 + 1) - \sqrt{\{(K_A[\text{H}]_0 - K_A[\text{G}]_0)^2 + 2 \cdot K_A[\text{H}]_0 + 2 \cdot K_A[\text{G}]_0 + 1\}}}{2 \cdot K_A}$$

Hierbei sind  $[\text{H}]_0$  und  $[\text{G}]_0$  die jeweils aus dem Experiment bekannten Konzentrationen des eingesetzten Wirt oder Gastmoleküls.

Wenn der einfachere Fall einer 1:1-Bindungsstöchiometrie betrachtet wird, sind auch wesentlich simplere, grafische Auswertungen möglich, die im Folgenden besprochen werden:

### **Benesi-Hildebrand-Auswertung:**

Die ursprünglich für UV-Vis-Titrationen ausgelegte Benesi-Hildebrand-Analyse wurde von Mathur et al. sowie Hannah und Ashbaugh auf NMR-Titrationen übertragen, woraus folgende Gleichung resultierte:<sup>[81]</sup>

$$1 / \Delta\delta = 1 / (K_A \Delta\delta_{\text{max}} [\text{H}]_0) + 1 / \Delta\delta_{\text{max}}$$

$\Delta\delta$  stellt hierbei die jeweilige Differenz zwischen der beobachteten chemischen Verschiebung  $\delta_{\text{obs}}$  des Gastmoleküls und dem Wert der freien, nichtkomplexierten

Spezies dar.  $\Delta\delta_{\max}$  ist der maximale Wert der chemischen Verschiebung (bei erreichter Sättigung) und entspricht damit der Differenz aus der chem. Verschiebung des Gastmoleküls und des Komplexes ( $\delta_{\text{HG}}$ ). Eine Auftragung von  $1/\Delta\delta$  gegen  $1/[H_0]$  ergibt (im Idealfall) eine Gerade mit der Steigung  $1/K_A \delta_{\max}$  und einem y-Achsenabschnitt von  $\Delta\delta_{\max}$ . Diese Auswertung funktioniert nur dann, wenn das Wirtmolekül mindestens in einem 10-fachen Überschuss vorliegt (Voraussetzung:  $[H] \sim [H]_0$ ) und die Erkennung nach einer 1:1-Bindungsstöchiometrie abläuft.<sup>[81]</sup>

### Scatchard (Foster-Fyfe)-Methode:

Foster und Fyfe entwickelten das NMR-Pendant der Scatchard Methode, die eine alternative Lösung für die Benesi-Hildebrand-Auswertung darstellt:

$$\Delta\delta / [H]_0 = -K_A \Delta\delta + K_A \Delta\delta_{\max}$$

Wird  $\Delta\delta$  gegen  $\Delta\delta / [H]$  aufgetragen, resultiert (im Idealfall) eine Gerade, dessen Steigung  $-K_A$ , also dem negativen Wert der Assoziationskonstante entspricht. Diese Methode ist der von Hannah und Ashbaugh überlegen, da hier eine, nicht von der  $K_A$  abhängige Extrapolation bei unendlicher Verdünnung durchgeführt wird.<sup>[81]</sup>

Moderne Methoden des Kurvenfittings durch Computerprogramme liefern jedoch qualitativ bessere Werte für Bindekonstanten. Ein Beispiel für solch ein Programm ist EQNMR (bzw. das Nachfolgeprogramm WINEQNMR2).<sup>[81,82,83]</sup> Zudem ist eine Auswertung über das Programm ORIGIN und der darin implementierten biophysikalischen Funktionen möglich.

WINEQNMR2 basiert auf folgender Gleichung:

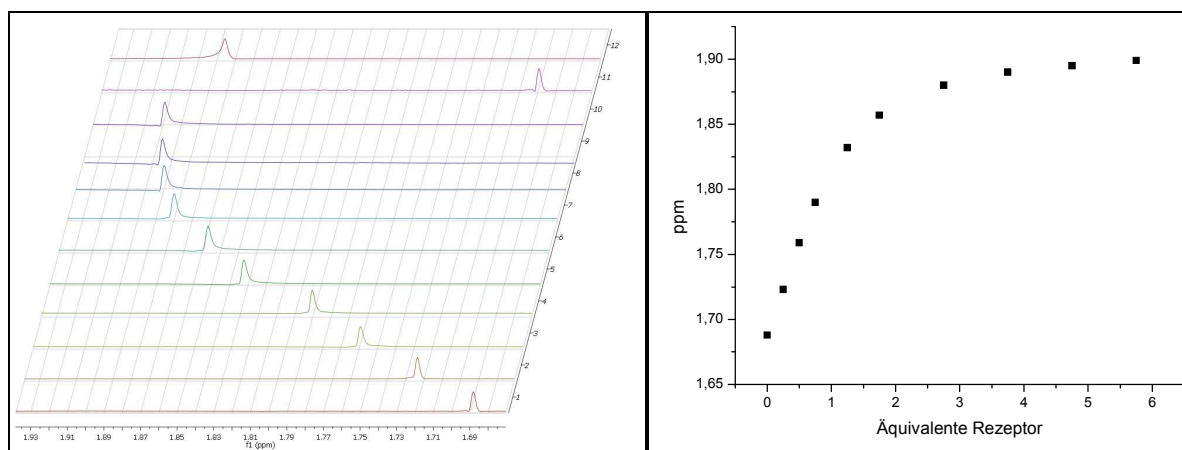
$$\delta_{\text{calc}} = \sum_{m=1}^{m=i} \sum_{n=0}^{n=j} \{(\delta_{mn} \beta_{mn} m [H]^m [G]^n) / [H]_{\text{total}}\}$$

Hierbei liegt folgende chemische Reaktion zugrunde:  $m H + n G = H_m G_n$ . Durch Variation der Parameter (chemische Verschiebung  $\delta_{mn}$  & Bindekonstanten  $\beta_{mn}$ ) gleicht sich die berechnete Funktion den experimentellen Daten durch Iterationen auf der Basis der "Methode der kleinsten Quadrate" bestmöglichst an.<sup>[83]</sup>

Die Verwendung der Gleichung ist stark abhängig vom entsprechenden Modell der Bindungsstöchiometrie; Eine Möglichkeit, diese Stöchiometrie zu bestimmen, ist der **Job plot**. Mathematische Voraussetzung für die Durchführung des Job Plots sind verschiedene Verhältnisse von  $[H]_0 / [G]_0$  bei konstanter Summe der Konzentrationen ( $[H]_0 + [G]_0$ ). Durch die Auftragung von  $\chi_G \Delta\delta$  ( $\chi_G$  = Molenbruch des Gastmoleküls) gegen  $\chi_H$  wird eine Kurve erhalten, dessen Maximum sich bei dem Molenbruch von H befindet, der auch im Komplex vorliegt. Liegt das Maximum bei  $\chi_H = 0.5$ , liegt eine 1:1-Bindungsstöchiometrie vor. Eine weitere Methode, die für große Bindekonstanten ( $>10^5$ ) geeignet ist, basiert in der Auftragung von  $\Delta\delta$  gegen  $[H]_0$  bei konstantem  $[G]_0$ : Hierdurch entstehen 2 Geraden die ihren Schnittpunkt im gleichen  $[H] / [G]$ -Verhältnis haben, der auch im Komplex vorliegt.<sup>[81]</sup>

#### 4.3.3.2 NMR-Titrationsen mit der Schmuckschen Kopfgruppe

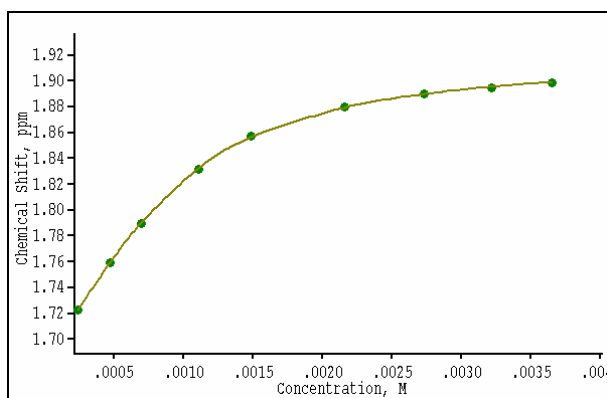
Zunächst wurde überprüft, ob mit dem Programm WINEQNMR2<sup>[82]</sup> verlässliche Assoziationskonstanten bestimmt werden. Hierzu wurde ein literaturbeschriebenes Titrationsexperiment nachvollzogen, bei dem ein Valinamid-substituierter Rezeptor eingesetzt wurde (Abb. 28).



**Abb. 48 (links):** Die Abbildung zeigt die NMR-Titration von Tetramethylammoniumacetat mit Verbindung 32. Spektrum 1: Hier erfolgte keine Zugabe, Spektrum 2-10: Es erfolgte eine stetige Zugabe der Verbindung 32 (bis 5.75 Äquivalente), Spektrum 11: Durch Zugabe von 0.5 M NaOH (aq) wird der pH-Wert (von Exp. 1) eingestellt. Spektrum 12: 10 mM  $NMe_4^+ \text{OAc}^-$  in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq), mit 0.1 M HCl (aq) auf den pH-Wert (von Exp. 10) eingestellt. Zu sehen ist das Methyl-Signal des Acetats. **Abb. 49 (rechts):** Die Abbildung zeigt die chemische Verschiebung in Abhängigkeit der insgesamt zugegebenen Äquivalente des Rezeptors 32.

Hierzu wurde eine 1 mM Lösung von Tetramethylammoniumacetat in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq) vorgelegt und bei jedem Titrationsschritt mit Aliquoten einer 10 mM Lösung von

Rezeptor **32** in 60 % d<sub>6</sub>-DMSO (aq) versetzt. Der Literaturwert der Assoziationskonstante wurde mit  $K_A = 3380 \text{ M}^{-1} \pm 338$  angegeben.<sup>[85]</sup> Für die Berechnung der Assoziationskonstante mittels WINEQNMR2 wurden die Daten der Exp. 1-10 verwendet. Es resultierte eine  $K_A$  von  $3096 \pm 65 \text{ M}^{-1}$ , was dem angegebenen Literaturwert (innerhalb seiner Fehlergrenzen) entspricht.



**Abb. 50: Fitplot der berechneten Bindungsisotherme für die Titration von Verbindung 31 mit TMA-Acetat (WINEQNMR2).**

Bei der Kontrolle des pH-Wertes vor und nach der Titration zeigte sich, dass dieser nach Zugabe der 5.75 Äquivalente um einen Wert von 2.2 gefallen war. Deshalb wurde ein Kontrollexperiment, bei dem die Probe nach erfolgter Titration durch Zugabe von 0.5 M NaOH (aq) auf den Anfangs-pH-Wert eingestellt war, durchgeführt: Hierbei fiel die chem. Verschiebung des beobachteten Signals auf den Anfangswert zurück. In einem weiteren Experiment wurde eine 1 mM Lösung von Tetramethylammoniumacetat mit 0.1 M HCl (aq) auf den pH-Wert eingestellt, der sich nach der Titration einstellte. Als Resultat wurde eine ähnliche, jedoch nicht identische Verschiebung beobachtet. Beide Kontroll-Experimente können zweideutig interpretiert werden: Zum einen kann durch die Zugabe von Base der Rezeptor-Acetat-Komplex durch Deprotonierung der Guanidiniumfunktion zerstört werden, da die Kopfgruppe im nichtprotonierten Zustand keine ionische Wechselwirkung mehr eingehen kann. Zum anderen wäre es denkbar, dass gar keine molekulare Erkennung der Carbonsäure stattfindet und der gefundene Shift lediglich eine Folge des sich verändernden pH-Wertes und der damit einhergehenden, stärkeren Protonierung des Acetats ist (Exp. 12 (Abb. 48)).

#### 4.3.4 Verwendete Kopfgruppe und Zusammenstellung der Bibliotheken

Die von C. Schmuck entwickelte Kopfgruppe zur molekularen Erkennung von Oxoanionen, speziell Carbonsäuren, bildet über das Guanidiniumion und den Pyrrolstickstoff drei Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Carboxylat aus:

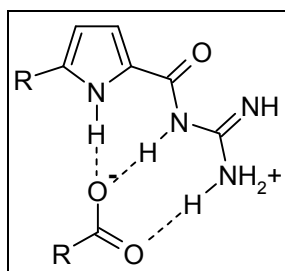


Abb. 51: Das Bindungsmotiv zur Erkennung von Carboxylationen (von Schmuck et al. beschrieben).

Auf Basis dieser Kopfgruppe gelang es Schmuck, Verbindungen zu synthetisieren, die Carbonsäuren, aber auch kleine Peptide (Di- sowie Tetrapeptide) sequenzselektiv erkennen. Dies gelingt sogar mit moderaten bis guten Affinitäten in wässrigen Lösungsmitteln und gepuffertem Wasser.<sup>[84,85,86]</sup> Rezeptor **52** gehört zu den besten Beispielen: Der Cyclotribenzylenrest formt hierbei eine Halbschale aus, der zum einen den Ort der Bindung gegen Wasser abschirmt, zum anderen nur für kleine Seitenketten des zu bindenden Peptids ausreichend Platz gewährt. Rezeptor **52** bindet *Ac-D-Ala-D-Ala-OH* (das Erkennungsmotiv des Vancomycins) in gepuffertem Wasser mit einer  $K_A$  von  $33100 \text{ M}^{-1}$ .<sup>[87]</sup>

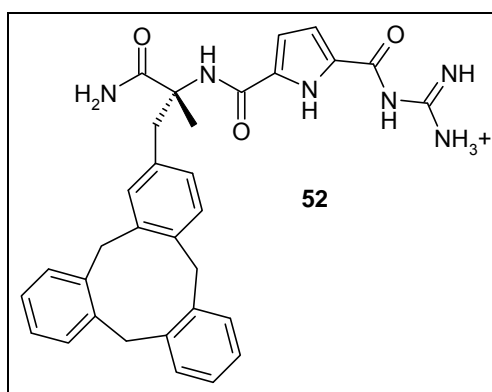
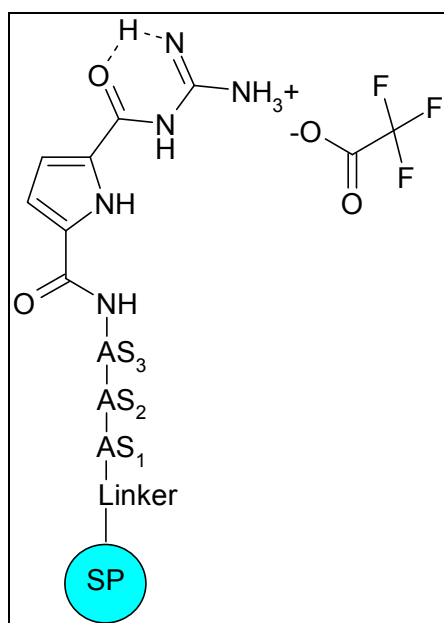


Abb. 52: Die Abbildung zeigt einen Rezeptor zur Sequenz-selektiven Erkennung von *Ac-D-Ala-D-Ala-OH* (literaturbeschrieben).<sup>[87]</sup>

Die Schmucksche Kopfgruppe wurde auch erfolgreich zur Synthese von Festphasen-

bibliotheken und dem Screenen gegen Fluorophor-markierte Peptide eingesetzt.<sup>[88]</sup> Diese Kopfgruppe wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt, um über die Synthese von kombinatorischen Festphasenbibliotheken sequenzselektive, niedermolekulare Rezeptoren der CaaX-Box von K-Ras, Rheb und H-Ras zu finden. Die Kopfgruppe soll hierbei das jeweils C-terminale Ende der CaaX-Box erkennen. Die Synthese der verwendeten Kopfgruppe erfolgte gemäß Abb. 46 und ist im Detail in Kapitel 4.3.1 beschrieben. Die verwendete Kopfgruppe sowie deren Synthese ist literaturbekannt.<sup>[79,89]</sup>



**Abb. 53:** Die Abbildung zeigt die synthetisierten Bibliotheken mit AS<sub>1</sub>, AS<sub>2</sub>, AS<sub>3</sub> = variierte Aminosäuren und SP = "solid phase", dem Festphasen-Trägermaterial (Tentagel-Makrobeads).

Durch Variation der Aminosäureabfolgen in diesen Tripeptiden bildet sich eine unterschiedliche Spezifität der Rezeptoren aus, da sich die jeweiligen Peptidsequenzen abstoßend oder anziehend auf die Aminosäuresequenz der CaaX-Box auswirken können. Eine direkte Vorhersage, welche tripeptidische Sequenz letzten Endes eine bevorzugt attraktive Wechselwirkung hervorruft, kann nicht ohne Weiteres getroffen werden und stellt immer noch eine der großen Herausforderungen auf dem Gebiet der Molekularen Erkennung dar. Es kann jedoch angenommen werden, dass zum Beispiel eine unpolare Aminosäure, wie Valin, eine geringe attraktive Wechselwirkung mit z. B. einer stark polaren Asparaginsäure eingeht. Hierdurch ergibt sich eine gewisse Vorselektierung, die in die Auswahl der Aminosäuren einfließt. Zudem wurde eine Vielzahl von nichtribosomalen Aminosäuren verwendet, die zum einen aus den *D*-Aminosäuren bestehen, da die zu

erkennenden Verbindungen (die CaaX-Boxen) aus jeweils reinen Enantiomeren bestehen und sich unterschiedlich starke (diastereomere) Komplexe ausbilden können. Weitere, nichtribosomale Aminosäuren bestanden aus Heterozyklen wie Tetrahydroisochinolin- und (Dimethyl-)Thiazolidinderivaten sowie Aminosäuren ungewöhnlicher Kettenlänge ( $\beta$ -Ala, GABA) und Seitenketten, wie der Spiroverbindung Zykloleucin (AC5C). Insgesamt wurden 20 Bibliotheken zu je 400 Verbindungen synthetisiert. Das Auftreten der AS 2 und 3 wurde in jeder Teilbibliothek permutiert, AS1 war jeweils vorgegeben. Tab. 7 fasst die Zusammenstellung der Teilbibliotheken sowie die zugehörigen Chiffren zusammen. Als Kopfgruppe (KG) wurde die von Schmuck entwickelte Guanidiniocarbonylpyrrolcarbonsäure verwendet (Abb. 51).

**Tab. 7: Die Tabelle zeigt die synthetisierten Rezeptorbibliotheken; In jeder der 20 Einzelbibliotheken ist die erste Aminosäure (AS1) festgelegt, die zweite und dritte Aminosäure besteht jeweils aus einer Iteration von 20 Aminosäuren, wodurch jede Einzelbibliothek aus 400 Tripeptiden besteht. KG = Guanidiniocarbonylpyrrolcarbonsäure; "Schmucksche Kopfgruppe".**

| AS1                            | AS2                            | AS3                            | AS4 | Chiffre |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----|---------|
| <i>L</i> -Asn                  | <i>L</i> -Ala                  | <i>L</i> -Ala                  | KG  | PMD-111 |
| <i>L</i> -Lys                  | <i>D</i> -Ala                  | <i>D</i> -Ala                  | KG  | PMD-084 |
| <i>L</i> -Arg                  | <i>L</i> -Val                  | <i>L</i> -Val                  | KG  | PMD-085 |
| <i>L</i> -His                  | <i>D</i> -Val                  | <i>D</i> -Val                  | KG  | PMD-086 |
| <i>L</i> -Leu                  | <i>L</i> -His                  | <i>L</i> -His                  | KG  | PMD-087 |
| <i>L</i> -Val                  | <i>L</i> -Ile                  | <i>L</i> -Ile                  | KG  | PMD-088 |
| <i>L</i> -Thz                  | <i>L</i> -Pro                  | <i>L</i> -Pro                  | KG  | PMD-089 |
| <i>L</i> -Thr                  | <i>D</i> -Pro                  | <i>D</i> -Pro                  | KG  | PMD-090 |
| <i>L</i> -Ser                  | <i>L</i> -Tyr                  | <i>L</i> -Tyr                  | KG  | PMD-091 |
| <i>L</i> -Ala                  | <i>L</i> -Phe                  | <i>L</i> -Phe                  | KG  | PMD-092 |
| <i>D</i> -Asn                  | <i>D</i> -Phe                  | <i>D</i> -Phe                  | KG  | PMD-112 |
| <i>D</i> -Lys                  | AC5C                           | AC5C                           | KG  | PMD-113 |
| <i>D</i> -Arg                  | Gly                            | Gly                            | KG  | PMD-114 |
| <i>D</i> -His                  | GABA                           | GABA                           | KG  | PMD-115 |
| <i>D</i> -Leu                  | <i>L</i> -Tic                  | <i>L</i> -Tic                  | KG  | PMD-116 |
| <i>D</i> -Val                  | Inp                            | Inp                            | KG  | PMD-117 |
| <i>L</i> -Thz(Me) <sub>2</sub> | $\beta$ -Ala                   | $\beta$ -Ala                   | KG  | PMD-118 |
| <i>D</i> -Thr                  | <i>L</i> -Thz(Me) <sub>2</sub> | <i>L</i> -Thz(Me) <sub>2</sub> | KG  | PMD-119 |
| <i>D</i> -Phe                  | <i>L</i> -Ser                  | <i>L</i> -Ser                  | KG  | PMD-120 |
| <i>D</i> -Ala                  | <i>L</i> -Lys                  | <i>L</i> -Lys                  | KG  | PMD-121 |

Die gesamte Bibliotheksgröße von 8000 Verbindungen ergibt sich aus zwei Voraussetzungen: Zum einen ist nicht vorhersagbar, welche der peptidischen



Strukturen letzten Endes an die CaaX-Boxen binden. Zum anderen sollen die bindenden Rezeptoren eine möglichst starke Assoziation mit den CaaX-Boxen eingehen. Dies ist aber nur möglich, wenn ein optimales Zusammenspiel von ionischen, polaren und unpolaren Wechselwirkungen vorliegt. Entsprechend muss die Zusammenstellung der Bibliothek möglichst divers sein, was notgedrungen mit einer großen Anzahl von Verbindungen einhergeht.

#### 4.3.5 Synthese der 20 kombinatorischen Bibliotheken

Zur Synthese der kombinatorischen Bibliotheken wurden zwei Methoden eingesetzt. Bei der Synthese der Testbibliothek PMD-075 (nur für Vorversuche benutzt, 1. AS: *L*-Ala) wurden für die parallele Anknüpfung (von jeweils 20 AS) Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet.<sup>[90]</sup> Bei den restlichen Bibliotheken wurde das Bohdan®-Miniblock-System (Abb. 54) verwendet, das die parallele Reaktionsführung, Entschützung, sowie das Waschen von bis zu 96 Reaktoren erlaubt. Hierdurch ist das parallele Arbeiten an bis zu 4 Bibliotheken (je 400 Verb.) möglich. Für die Synthese der Bibliotheken wird gemäß Abb. 55 zunächst die erste AS (als Ester) angeknüpft und Fmoc-entschützt, dann erfolgt eine parallele Kopplung von 20 AS (split).

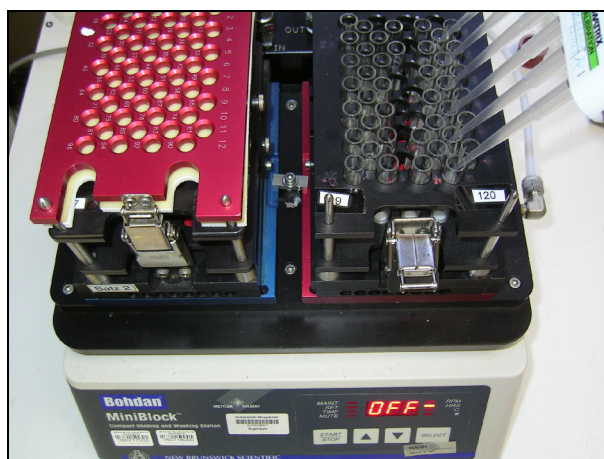
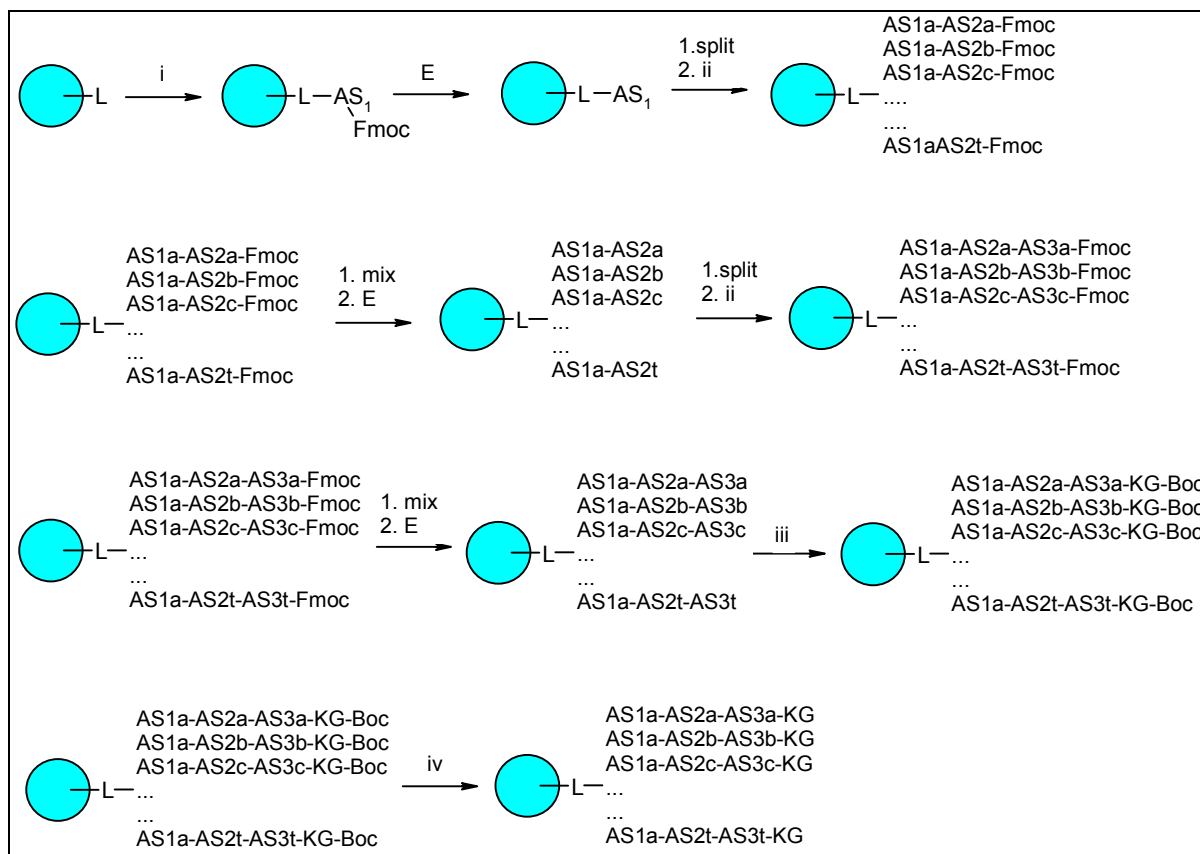


Abb. 54: Das Bohdan®-Miniblock-System mit 6-Kanal-Pipette.



**Abb. 55:** Die Abbildung zeigt das Beispiel einer Bibliothekssynthese. i: 3 Äq. Fmoc-AS, 3 Äq. DIC, 3 Äq. HOBT\*H<sub>2</sub>O, 0.12 Äq. DMAP, 0.01 Äq. 1-Methylimidazol, ii: 3 Äq. Fmoc-AS, 3 Äq. HBTU, 3 Äq. HOBT\*H<sub>2</sub>O, 4.5 Äq. DIPEA, iii: 3 Äq. Verb. 49 (PMD-065-01-02), 3 Äq. HBTU, 3 Äq. HOBT\*H<sub>2</sub>O, 4.5 Äq. DIPEA, iv: 95 % TFA, 2.5 % Triisopropylsilan 2.5 % H<sub>2</sub>O, E: 20 % Piperidin in DMF, L: HMBA-Linker. Die verwendeten Aminosäuren für die Positionen AS2a-t sowie AS3a-t können Tab. 7 entnommen werden. Split = Das Aufteilen des Harzes in 20 Einzelportionen und parallele Synthese, mix = Das Vereinigen der Einzelportionen. Die Kupplungsschritte i, ii, iii werden jeweils wiederholt, um vollständige Kupplung zu erreichen.

Hierauf werden die 20 Portionen gepoolt (mix) und Fmoc entschützt. Die entschützte Bibliothek (20 Dipeptide) wird erneut in 20 Portionen aufgeteilt und die nächsten 20 AS parallel angeknüpft. Nach erneutem Mischen und Entschützen der Bibliothek (nun 400 Tripeptide) wird die Schmucksche Kopfgruppe (PMD-065-01-02) angeknüpft. Als letzter Schritt erfolgt die simultane Boc-Entschützung der Kopfgruppe sowie aller Seitenkettenschutzgruppen.

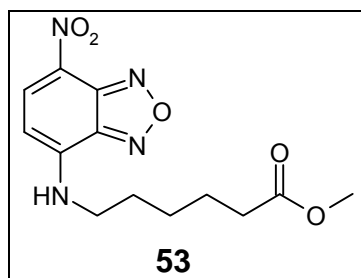
#### 4.3.6 Voruntersuchungen zum Screening der Festphasenbibliotheken

##### 4.3.6.1 Ausschluß der Farbstoffassoziation

Wennemers und Still konnten 1994 zeigen, dass zahlreiche Farbstoffe, wie z. B. Rhodamin oder Safranin O bereits zu einfachen (festphasengebundenen) tri-

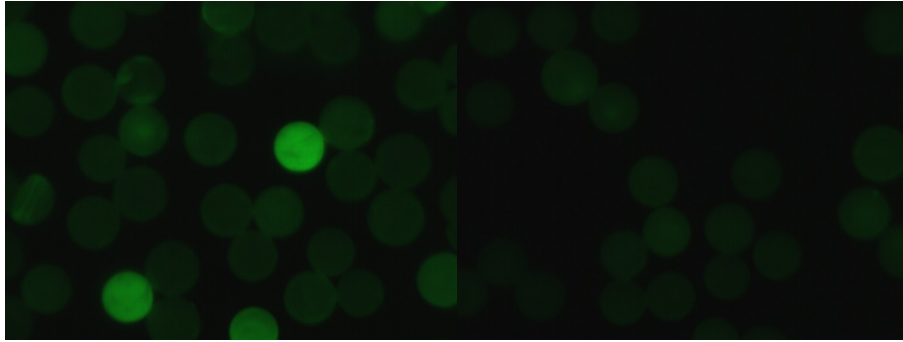
peptidischen Bibliotheken bindende Wechselwirkungen eingehen. Die gefundenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass dies "eher die Regel als die Ausnahme" ist. Auf Farbstoffen basierende Bindungs-Assays sollten also in jedem Fall auf eine, lediglich auf den Farbstoff zurückzuführende, Interaktion mit den zu screenenden Verbindungen überprüft werden. Andernfalls besteht die Gefahr, viel Zeit bei der Untersuchung von farbstoffinduzierten Artefakten zu verlieren. Hierbei ist auch darauf zu achten, dass die (für den Ausschluss der Farbstoffassoziation) benutzte Modellverbindung dem tatsächlichen Farbstofflabel möglichst ähnlich ist. So zeigten bereits Rhodamin und Rhodaminmethylester signifikante Unterschiede in ihrer Sequenzselektivität.<sup>[91]</sup>

Aus diesem Grund wurde der Methylester des in den Screenings verwendeten (Fluoreszenz-)Farbstofflinkers verwendet (Abb. 56). Da dieser eher der verwendeten Struktur der markierten CaaX-Peptide entspricht als die freie Säure bzw. nur der Fluorophor (NBD) selbst.



**Abb. 56: Das Methylesterderivat des eingesetzten Farbstofflinkers.**

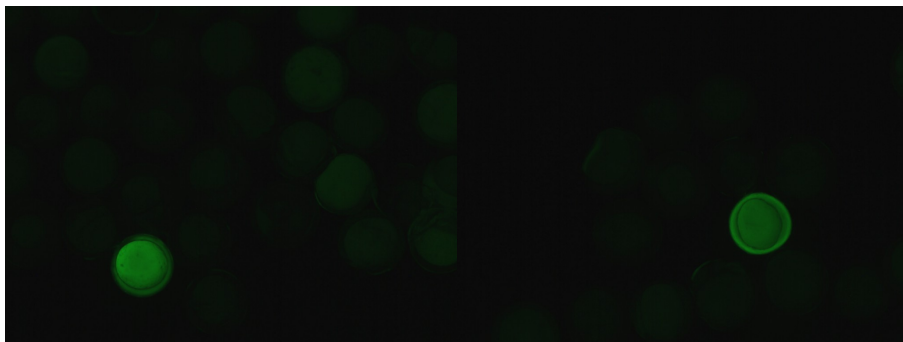
Alle 20 Bibliotheken (sowie die Testbibliothek PMD-075) wurden vor dem eigentlichen Screening gegen die NBD-markierten CaaX-Peptide auf ihre Assoziation zum Farbstofflabel (**53**) untersucht. Hierzu wurden jeweils 750  $\mu$ L einer 0.1  $\mu$ M (1  $\mu$ M bei der Testbibliothek PMD-075) Lösung von Fluorophor **53** in 10 % DMSO (aq) + 5  $\mu$ M BisTris mit Aliquoten (jeweils  $\sim$  50 mg, (ca. 5700 Beads)) der Bibliotheken für 16 h inkubiert. Die inkubierten Bibliotheken wurden nach dreimaligem Waschen (Puffer) mit einem Fluoreszenzmikroskop gesichtet und sämtliche fluoreszierenden Beads mittels einer Nadel entfernt. Insgesamt wurden für die 20 Bibliotheken ca. 110 000 Beads untersucht und die (falsch-positiven) Hits manuell entfernt.



**Abb. 57:** Der Ausschluss der Farbstoffassoziation durch Entfernen der falsch-positiven Hits. Links: 0.1  $\mu\text{M}$  der Verbindung 53, vor Entfernen der leuchtenden Beads. Rechts: 0.1  $\mu\text{M}$  der Verbindung 53, nach Entfernen der leuchtenden Beads. Die Abbildungen zeigen Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 480 \text{ nm}$ .

#### 4.3.6.2 Screening der Testbibliothek (PMD-075)

Vor dem eigentlichen Screening der 20 kombinatorischen Bibliotheken wurde eine Testbibliothek (PMD-075, AS1 = L-Ala) gegen die CaaX-Boxen von H-Ras und Rheb gescreent. Hierzu wurde zunächst eine Farbstoffassoziation der Rezeptoren (und des Tentagels) (gemäß Kapitel 4.3.6.1) ausgeschlossen (1  $\mu\text{M}$ ) und jeweils ein Teil mit der NBD-markierten CaaX-Box von Rheb und von H-Ras inkubiert (0.1  $\mu\text{M}$ ). Hierbei wurden sowohl für die Inkubation mit dem Rheb- als auch H-Ras-CaaX-Peptid fluoreszierende Beads gefunden (Abb. 58):



**Abb. 58:** Das Screening der Testbibliothek PMD-075 gegen die NBD-markierte CaaX-Box von Rheb (links) und H-Ras (rechts), beide 0.1  $\mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O} / \text{DMSO}, 9:1 + 5 \mu\text{M}$  BisTris (16 h Inkubation bei RT). Die Abbildungen zeigen Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 480 \text{ nm}$ .

#### 4.3.7 MS-Analyse der Testbibliothek (PMD-075)

Die fluoreszierenden Beads (und als Kontrollexperiment einige nichtfluoreszierende) wurden mit einer Nadel aus der inkubierten Mischungsbibliothek entfernt und bis zur

Analyse in 1.5 mL-Reaktionsgefäßen aus PE gelagert. Die Rezeptoren wurden mit 3 µL Ethylendiamin von den Beads abgespalten und nach Aufarbeitung mittels ESI-MS untersucht. Die ESI-MS-Analyse dieser Testbibliothek erfolgte aufgrund eines Schadens an der eigenen Anlage teilweise im AK Schmitz.

Die Bibliothek PMD-075 (erste AS *L*-Ala) wurde bei 0.1 µM zum einen mit der NBD-markierten CaaX-Box von H-Ras sowie der von Rheb inkubiert (zuvor wurde eine Farbstoffassoziation ausgeschlossen). Einzelne nichtfluoreszierende sowie fluoreszierende Beads wurden aus beiden Inkubationen (H-Ras & Rheb) selektiert, der gebundene Rezeptor abgespalten und mit ESI-MS untersucht. Hierbei wurden zunächst die molekularen Massen der Rezeptoren ermittelt, eine Sequenzanalyse fand mit diesen Proben später statt. Für die Inkubation mit der NBD-markierten CaaX-Box (Rheb) konnten, durch die Sequenzanalyse, drei Strukturvorschläge ermittelt werden (Tab. 8).

**Tab. 8: Erfolgreiche Sequenzanalysen der fluoreszierenden Beads aus dem Screening der Bibliothek PMD-075-01 gegen die Rheb-CaaX-Box (0.1 µM).**

|  |  |  |
|--|--|--|
| <i>L</i> -Ala- <i>L/D</i> -Val- <i>L/D</i> -Phe-KG | <i>L</i> -Ala- <i>L</i> -Lys- <i>L/D</i> -Phe-KG | <i>L</i> -Ala- <i>L</i> -Lys- <i>L</i> -Ile-KG |
| (M+H) <sup>+</sup> = 555.5                         | (M+H) <sup>+</sup> = 584.5                       | (M+H) <sup>+</sup> = 550.6                     |

#### 4.3.8 Synthetisierte Hits aus der Testbibliothek PMD-075-01 (54 bis 60)

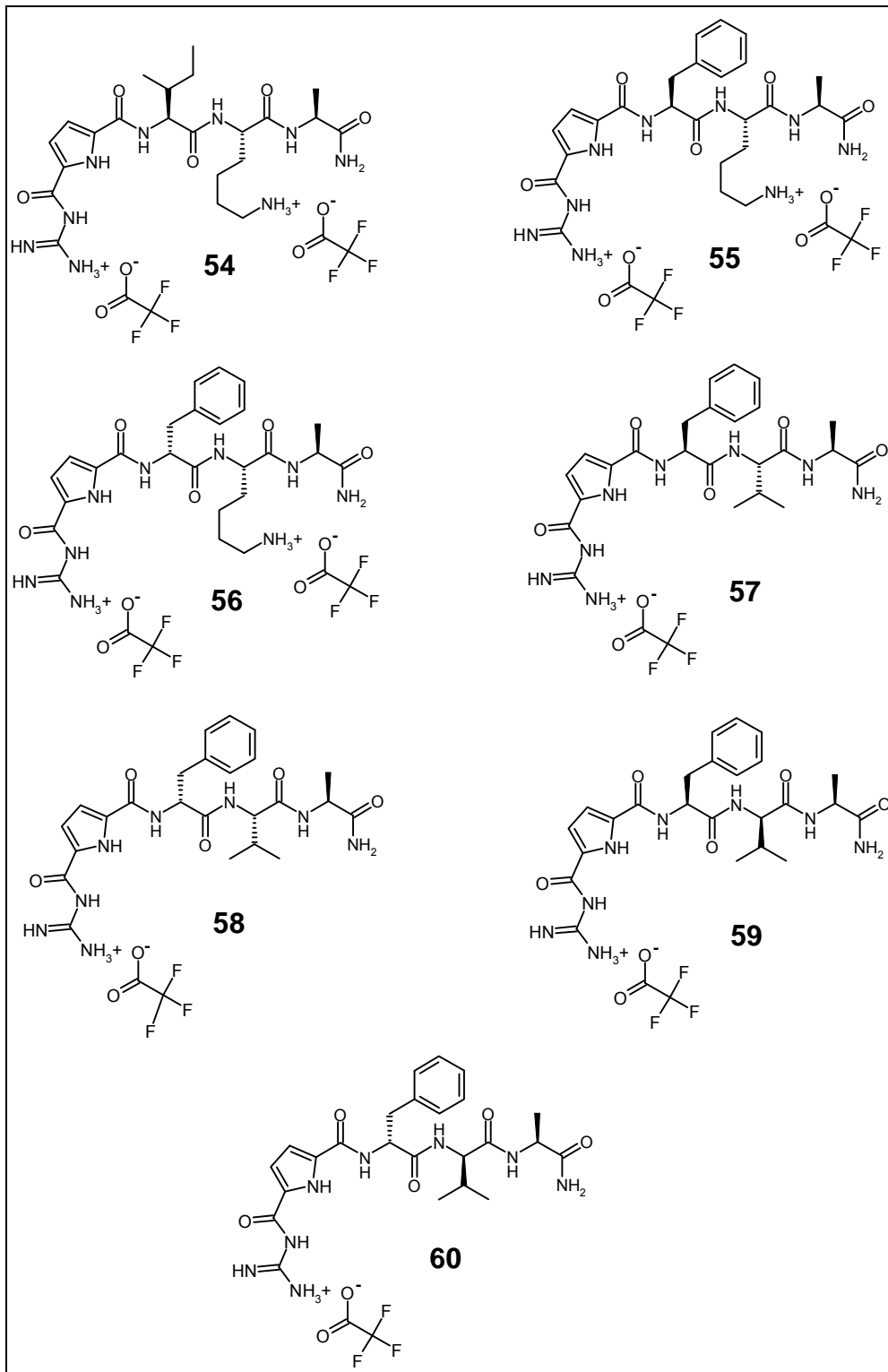
Die Hits aus dem Screening (der Testbibliothek PMD-075, 1. AS: *L*-Ala), insgesamt 7 Rezeptoren (Abb. 59), wurden unter Zuhilfenahme eines Syntheseroboters in präparativen Mengen nachsynthetisiert. Die erhaltenen Rohprodukte waren nach HPLC-UV-ESI-MS-Analyse > 90%ig (UV-Spur) und wurden in dieser Form direkt am Rheb-Protein untersucht.

#### 4.3.9 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren von Rheb und Visualisierung der Interaktion mit den Rezeptoren der Bibliothek PMD-075 (Testscreening)

Eigentliches Ziel der Nachsynthese (Kapitel 4.3.8) und dieser Untersuchungen (Spektren und Visualisierung) war die Anbindung der Rezeptoren an den C-Terminus des Rheb-Proteins, um eine daraus resultierende Strukturierung des ungefalteten Terminus zu erreichen. Dessen native konformative Flexibilität führt dazu, dass die

Signale des Terminus im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment nicht detektiert werden können. Durch Zugabe eines 10-fachen Überschusses der Rezeptoren konnte zwar das ursprüngliche Ziel (die Erfassung der terminalen NH-Atome des Rheb-Proteins im HSQC) nicht erreicht werden, jedoch wurden Bindungen auf der Oberfläche des Rheb-Proteins beobachtet, die von großem Interesse waren.

Die bei dem jeweiligen Experiment verwendeten Rezeptoren (Verbindung **54-60**) wurden mittels AutoDock Vina<sup>[92]</sup> an die Switch-II-Region des Rheb-Proteins gedockt. Die erhaltenen Strukturen wurden dann mit den shiftenden Bereichen überlagert. Alle 7 Rezeptoren liessen sich hierbei erfolgreich in die Bindetasche docken und die erhaltenen Strukturen (mit dem jeweils besten Score der Berechnung) korrelieren mit den experimentell erhaltenen Shifts. Durch Betrachtung der jeweils abgebildeten Strukturensamples der 4 besten (bezogen auf den Score) Berechnungen wird klar, dass die Rezeptoren nicht eine einzige besonders günstige Orientierung und Konformation in der Bindetasche einnehmen, sondern dass eine Vielzahl von denkbaren Orientierungen und Konformationen vorliegen. Vermutlich verursachen also mehrere überlagerte Strukturen die in den Experimenten beobachteten Verschiebungen im Bereich der Bindetasche.



**Abb. 59:** Die Abbildung zeigt die nachsynthetisierten Rezeptoren aus dem Screening der Rheb-CaaX-Box gegen die Testbibliothek PMD-075. Die Synthese erfolgte als Festphasensynthese am Syntheseroboter Syro II auf Rink-Säure-Amid-Harz.

Die folgenden von Dr. Katharina Jockers (AK Stoll) erstellten Verschiebungsdiagramme verdeutlichen den Ort der Oberflächenbindung:<sup>[93]</sup>

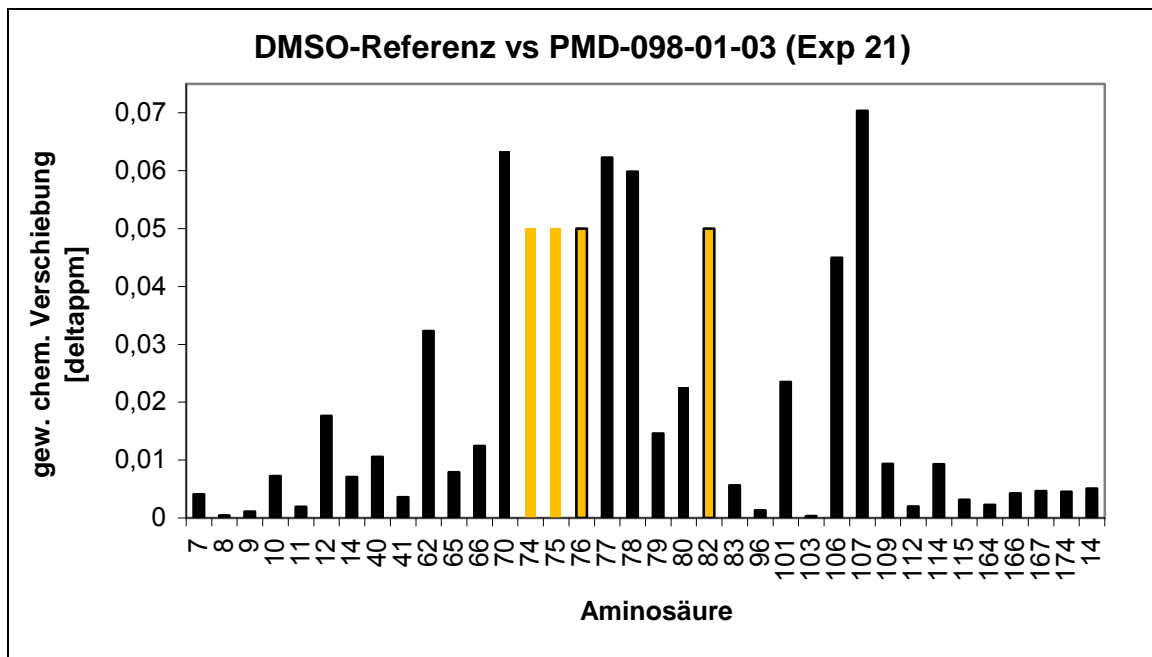


Abb. 60: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb unter Zugabe des Rezeptors H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-L-Lys-L-Ile-KG (54).<sup>[93]</sup>

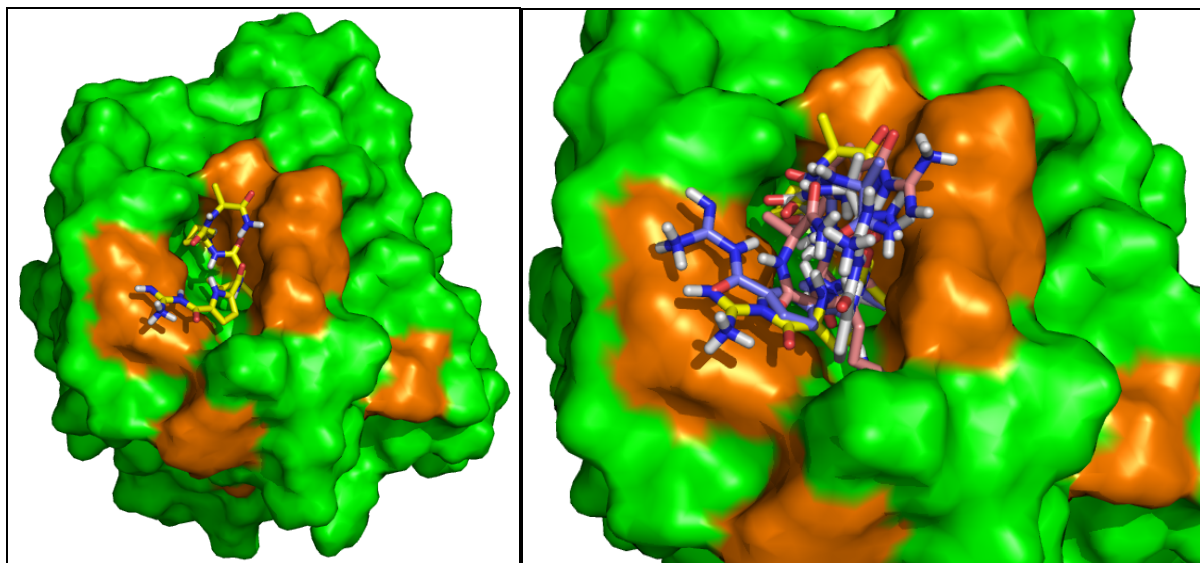


Abb. 61: Die linke Abbildung zeigt die gedockte Struktur (mit dem besten Score der Berechnung) des Rezeptors 54 an das Rheb-Protein. Die rechte Abbildung zeigt ein Strukturensemble (mit den 4 besten Scores der Berechnung). Markiert (orange) sind diejenigen AS des Proteins, die einen Shift  $\geq 0.01$  ppm zeigten. (pdb-Code des Proteins: 2L0X; 10 Äq. Verbindung 54).



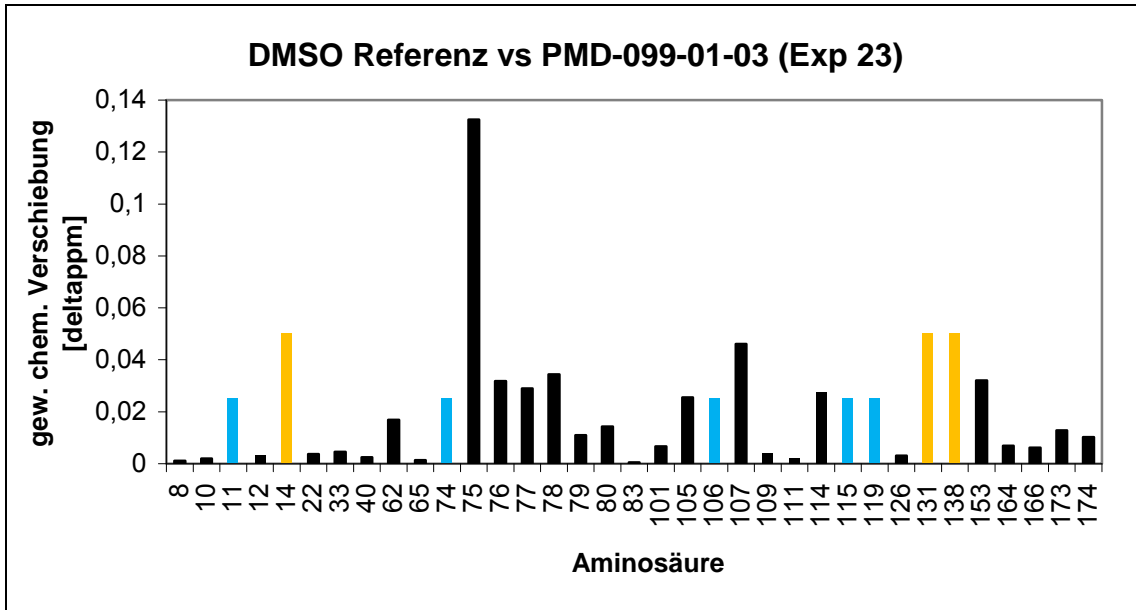


Abb. 62: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb unter Zugabe des Rezeptors H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-L-Lys-L-Phe-KG (55).<sup>[93]</sup>

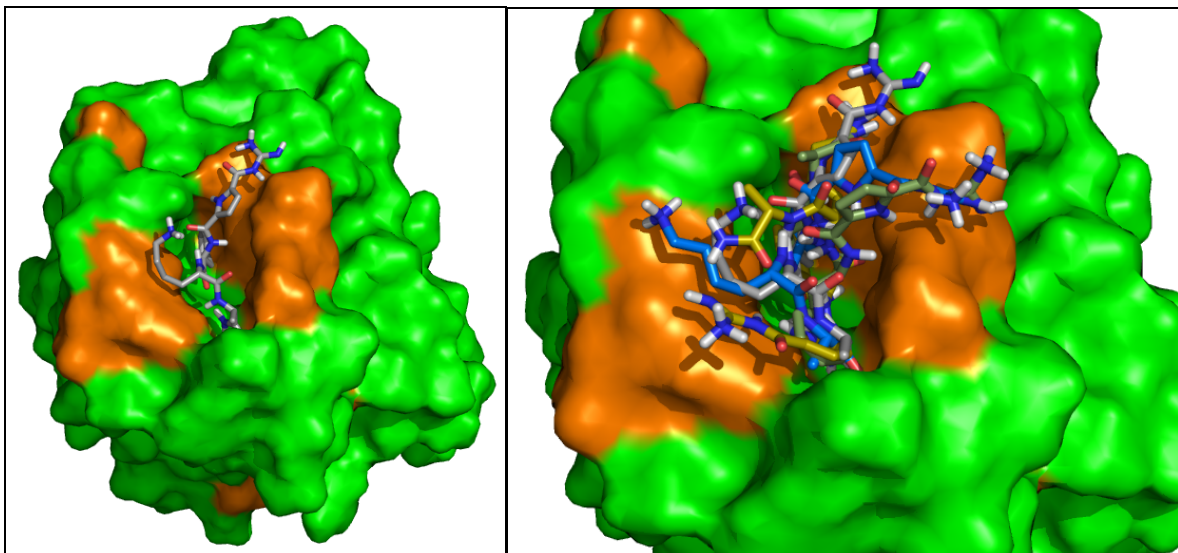


Abb. 63: Die linke Abbildung zeigt die gedockte Struktur (mit dem besten Score der Berechnung) des Rezeptors 55 an das Rheb-Protein. Die rechte Abbildung zeigt ein Strukturensemble (mit den 4 besten Scores der Berechnung). Markiert (orange) sind diejenigen AS des Proteins, die einen Shift  $\geq 0.01$  ppm zeigten. (pdb-Code des Proteins: 2LOX; 10 Åq. Verbindung 55).

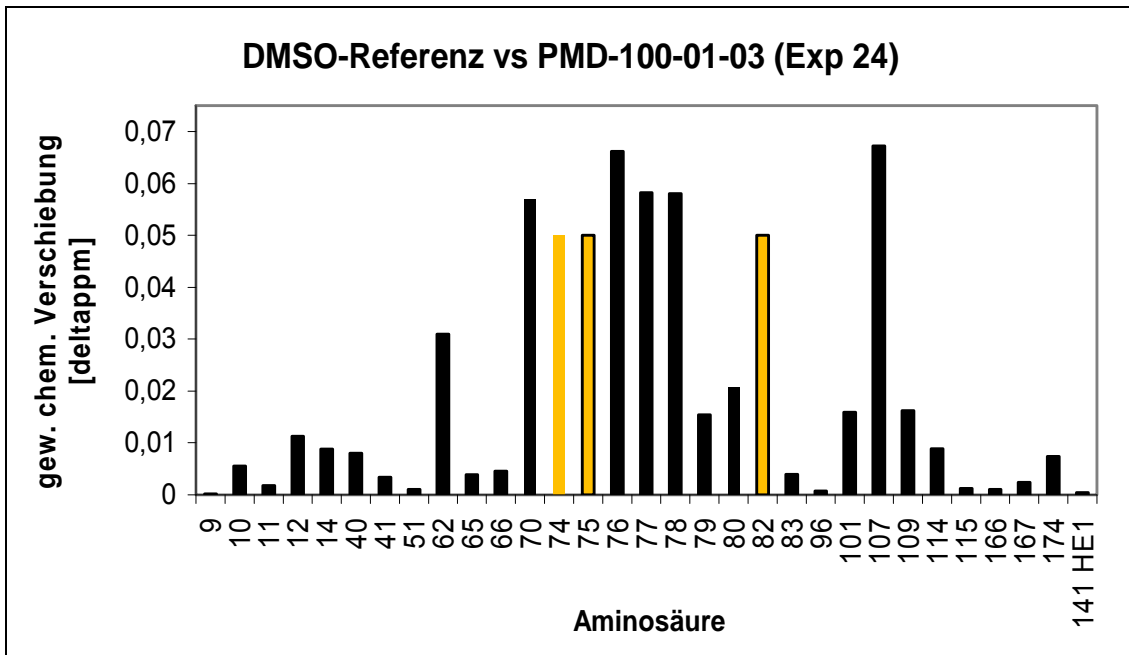


Abb. 64: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb unter Zugabe des Rezeptors H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-L-Lys-D-Phe-KG (56).<sup>[93]</sup>

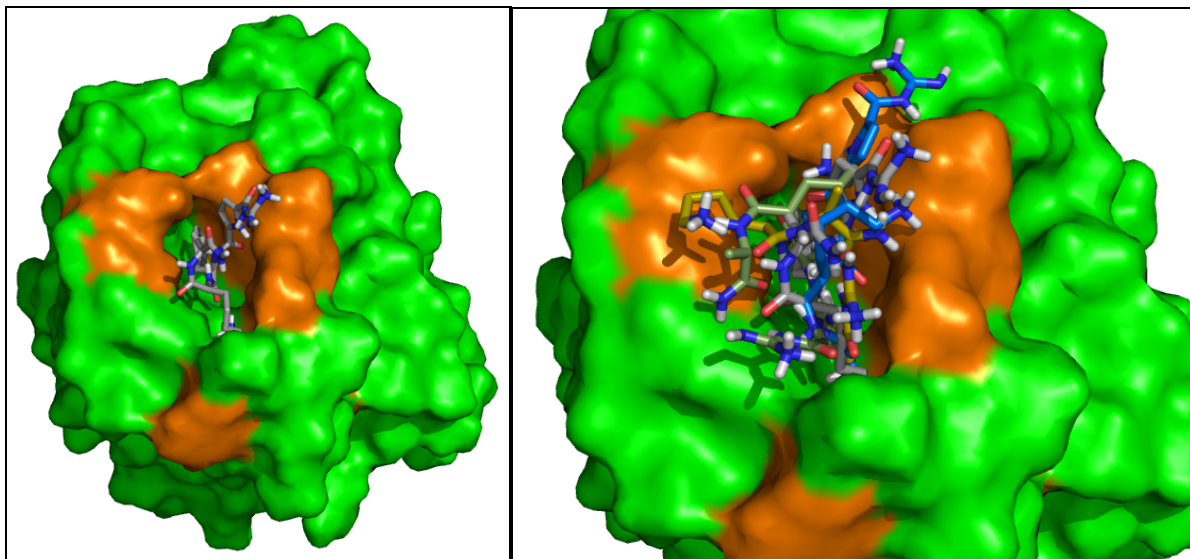


Abb. 65: Die linke Abbildung zeigt die gedockte Struktur (mit dem besten Score der Berechnung) des Rezeptors 56 an das Rheb-Protein. Die rechte Abbildung zeigt ein Strukturensemble (mit den 4 besten Scores der Berechnung). Markiert (orange) sind diejenigen AS des Proteins, die einen Shift  $\geq 0.01$  ppm zeigten. (pdb-Code des Proteins: 2L0X; 10 Äq. Verbindung 56).

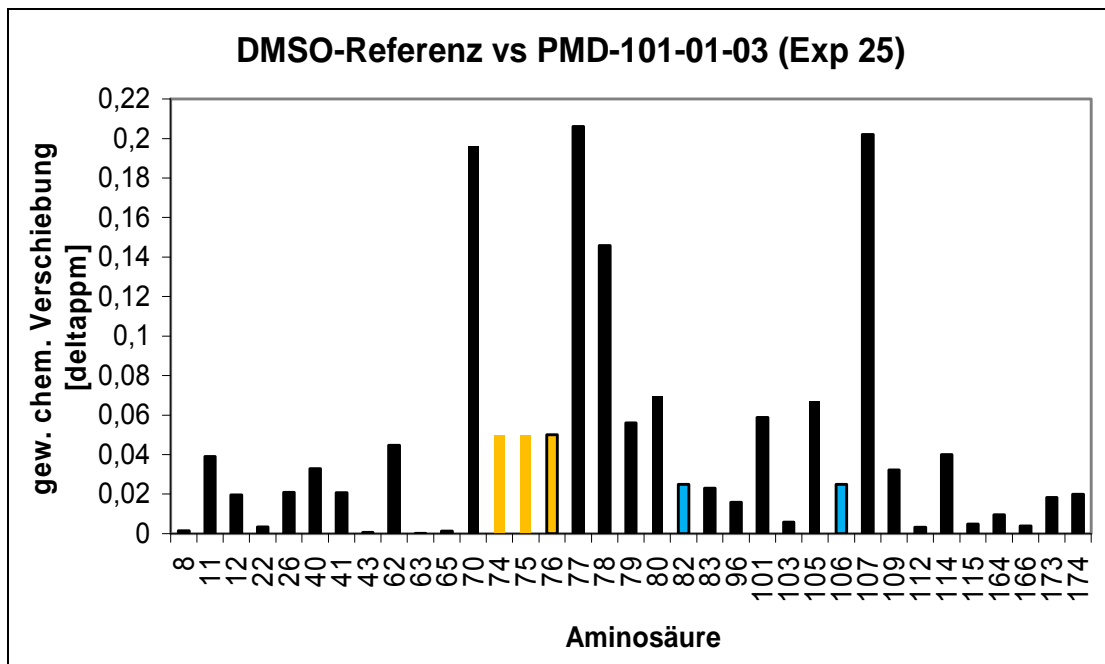


Abb. 66: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb unter Zugabe des Rezeptors H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-L-Val-L-Phe-KG (57).<sup>[93]</sup>

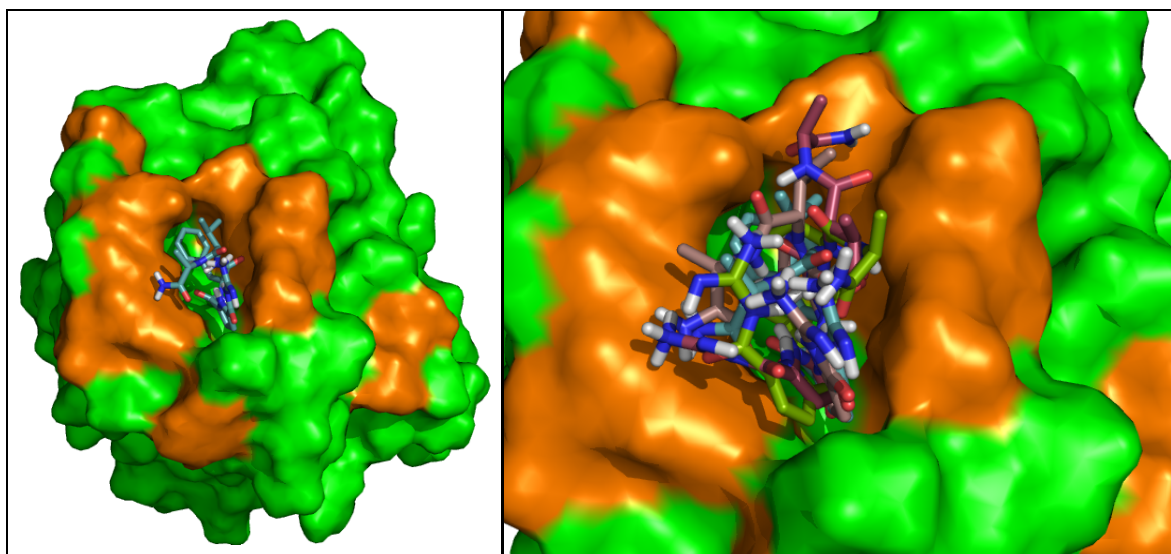


Abb. 67: Die linke Abbildung zeigt die gedockte Struktur (mit dem besten Score der Berechnung) des Rezeptors 57 an das Rheb-Protein. Die rechte Abbildung zeigt ein Strukturensemble (mit den 4 besten Scores der Berechnung). Markiert (orange) sind diejenigen AS des Proteins, die einen Shift  $\geq 0.01$  ppm zeigten. (pdb-Code des Proteins: 2L0X; 10 Åq. Verbindung 57).

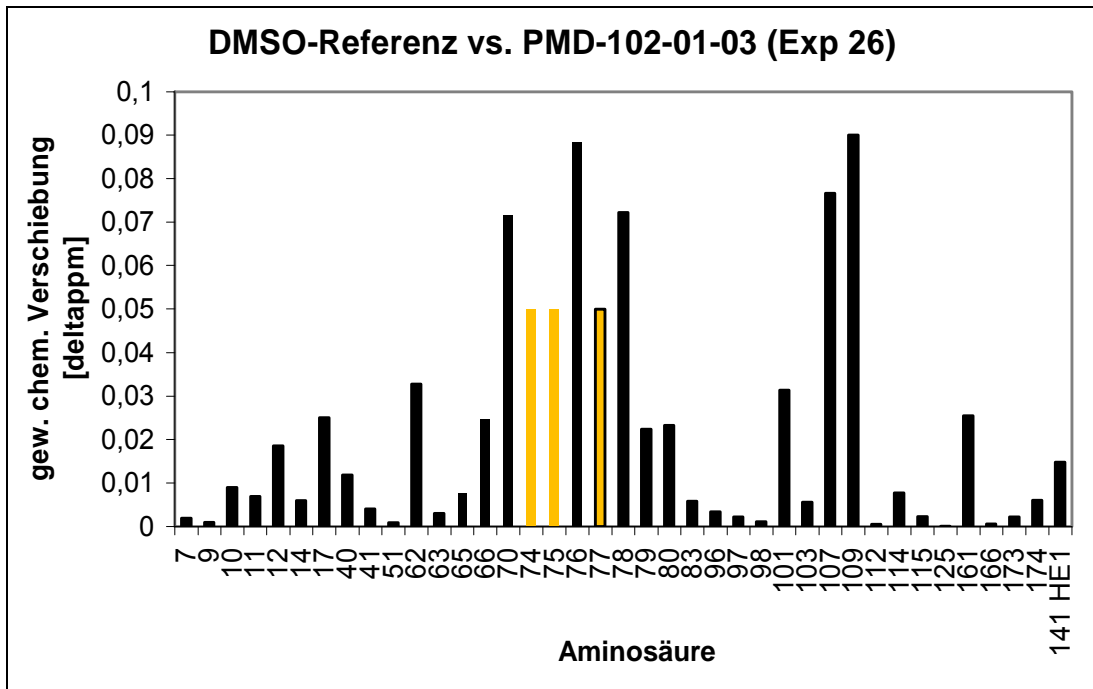


Abb. 68: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb unter Zugabe des Rezeptors H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-L-Val-D-Phe-KG (58).<sup>[93]</sup>

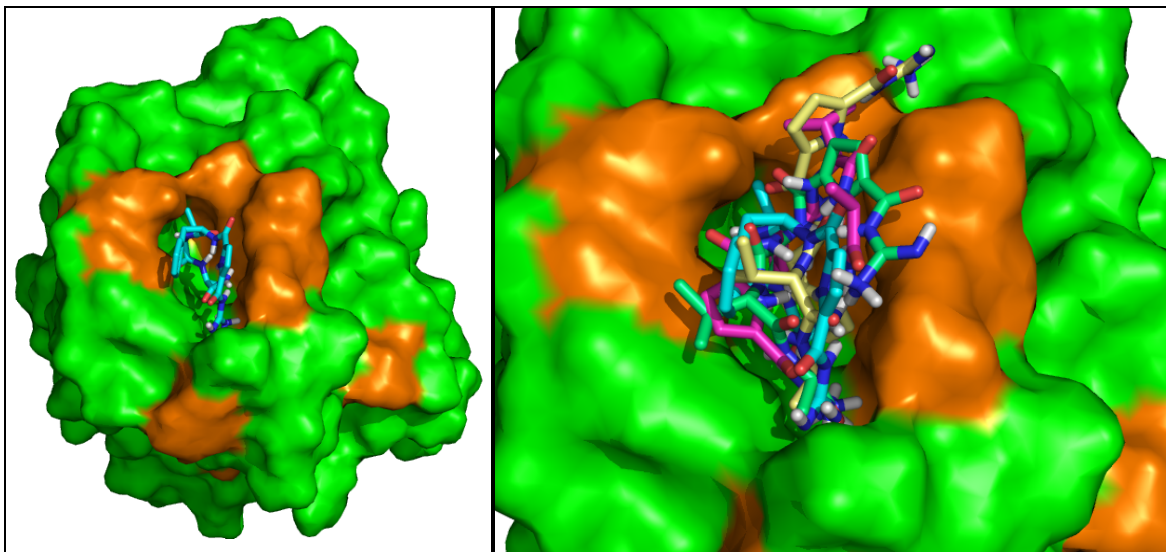


Abb. 69: Die linke Abbildung zeigt die gedockte Struktur (mit dem besten Score der Berechnung) des Rezeptors 58 an das Rheb-Protein. Die rechte Abbildung zeigt ein Strukturensemble (mit den 4 besten Scores der Berechnung). Markiert (orange) sind diejenigen AS des Proteins, die einen Shift  $\geq 0.01$  ppm zeigten. (pdb-Code des Proteins: 2L0X; 10 Åq. Verbindung 58).

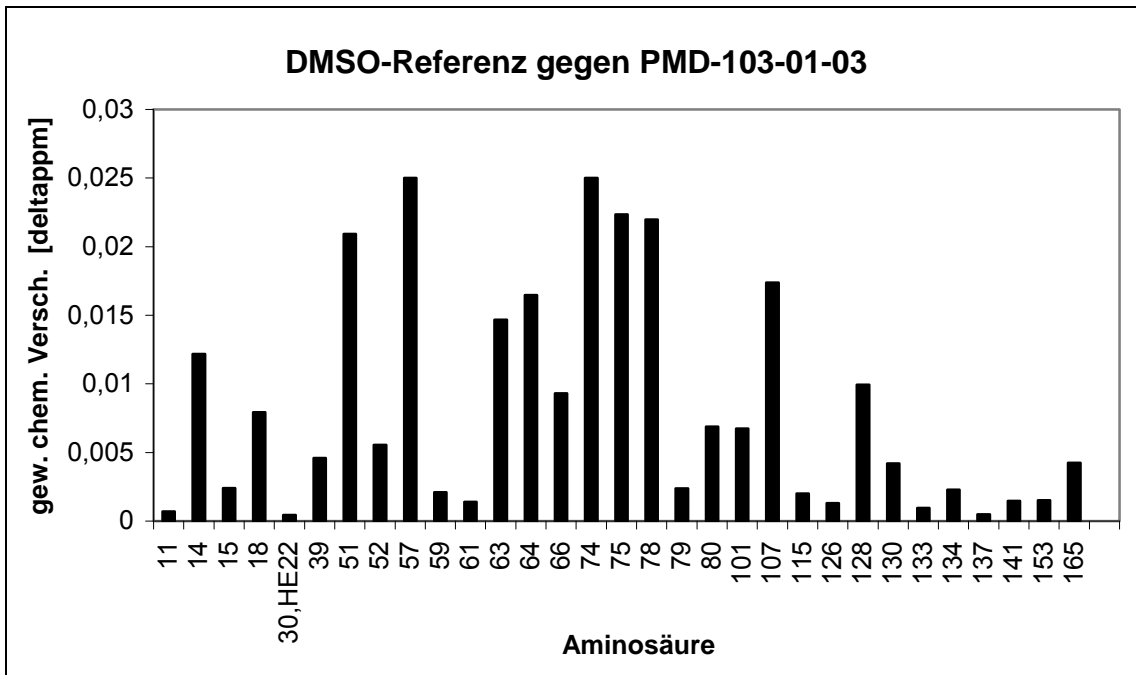


Abb. 70: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb unter Zugabe des Rezeptors H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-D-Val-L-Phe KG (59).<sup>[93]</sup>

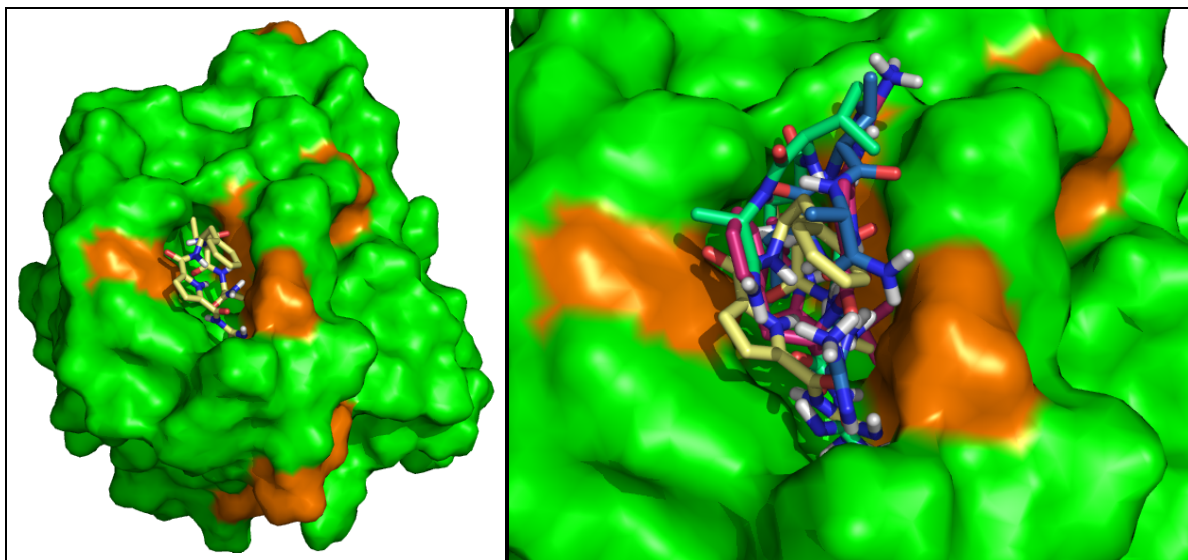


Abb. 71: Die linke Abbildung zeigt die gedockte Struktur (mit dem besten Score der Berechnung) des Rezeptors 59 an das Rheb-Protein. Die rechte Abbildung zeigt ein Strukturensemble (mit den 4 besten Scores der Berechnung). Markiert (orange) sind diejenigen AS des Proteins, die einen Shift  $\geq 0.01$  ppm zeigten. (pdb-Code des Proteins: 2L0X; 10 Äq. Verbindung 59).



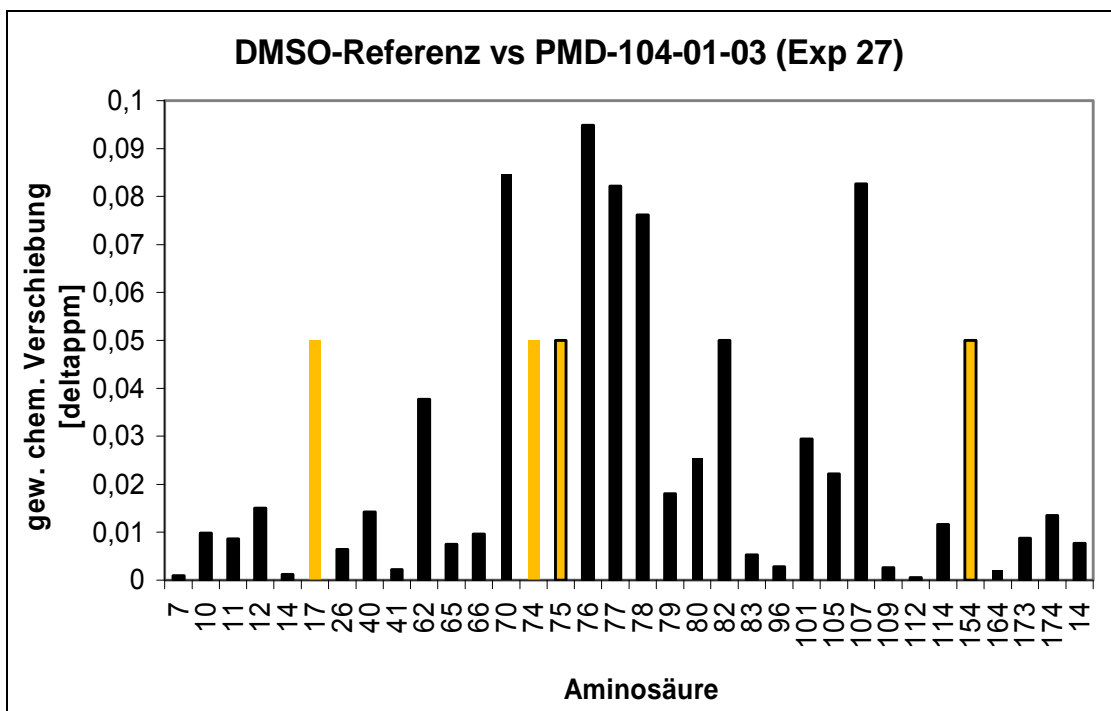


Abb. 72: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb unter Zugabe des Rezeptors H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-D-Val-D-Phe-KG (60).<sup>[93]</sup>

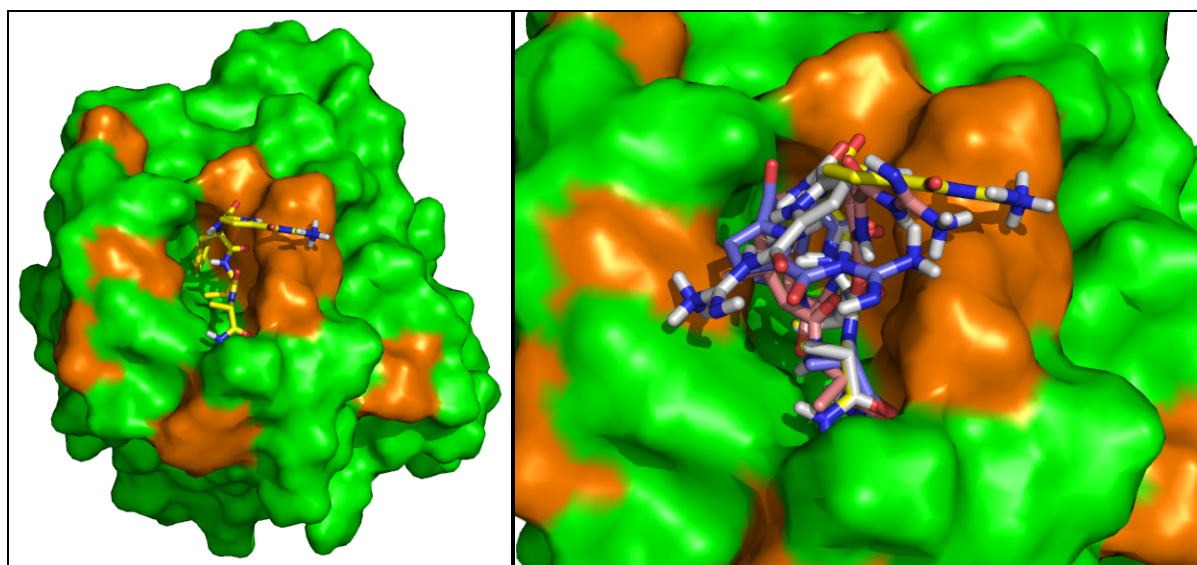


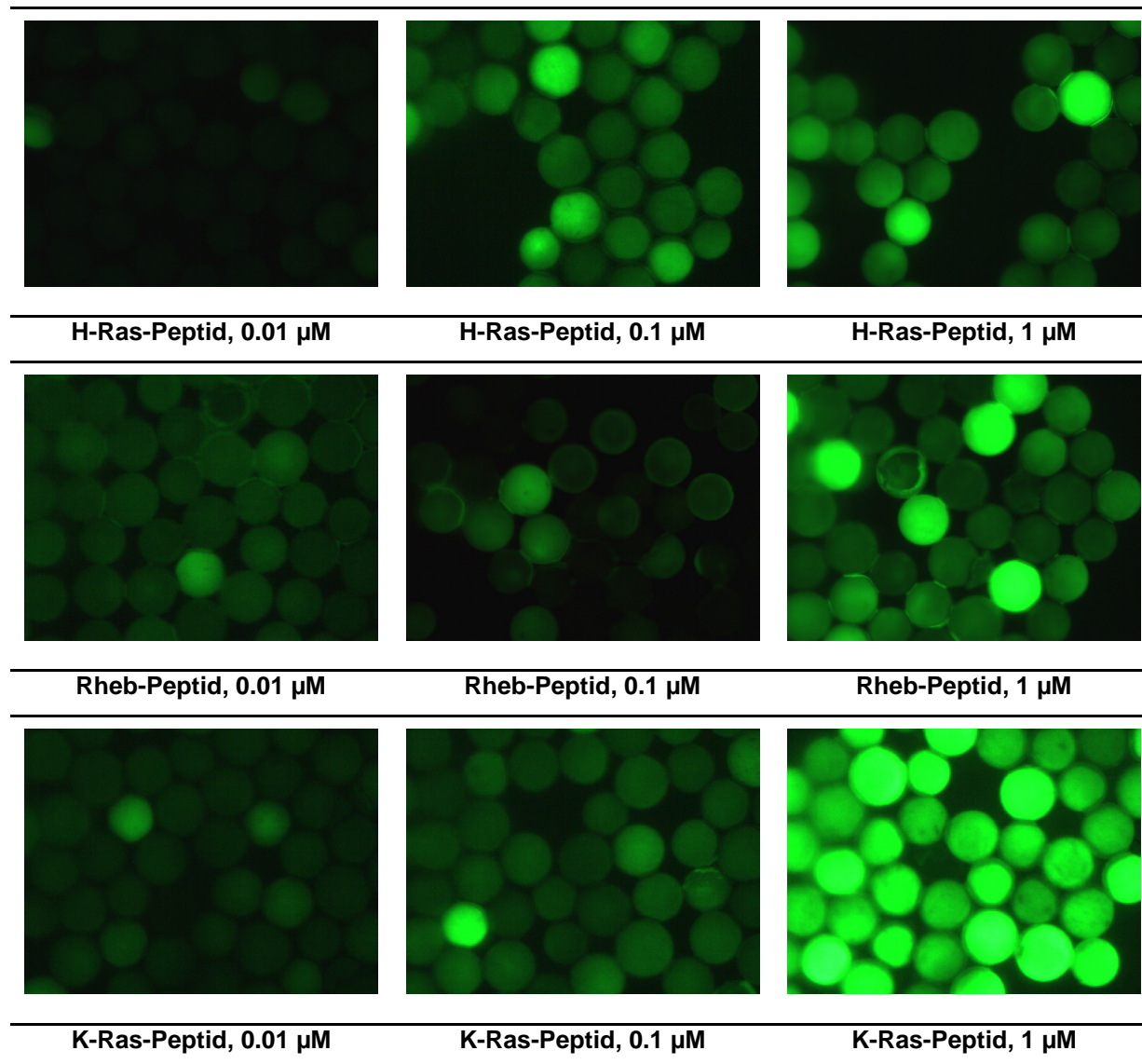
Abb. 73: Die linke Abbildung zeigt die gedockte Struktur (mit dem besten Score der Berechnung) des Rezeptors 60 an das Rheb-Protein. Die rechte Abbildung zeigt ein Strukturensemble (mit den 4 besten Scores der Berechnung). Markiert (orange) sind diejenigen AS des Proteins, die einen Shift  $\geq 0.01$  ppm zeigten. (pdb-Code des Proteins: 2L0X; 10 Äq. Verbindung 60).

Alle Verbindungen zeigten hierbei Wechselwirkungen mit der Switch-II-Region (AS 63-79), wobei sich die shiftenden AS im Bereich von 65 bis 83 erstreckten. Die Größe der chemischen Verschiebung ist hierbei ein Hinweis auf die Stärke der Komplexbildung (je größer der Wert ist, desto wahrscheinlicher ist eine starke Bindung; der Shift alleine lässt allerdings keine Bestimmung der Assoziations-

konstante zu). Während für die meisten Rezeptoren ein maximaler Shift von 0.07-0.09 gefunden wurde, führte der Rezeptor H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-L-Val-L-Phe-KG zu einem maximalen Shift von 0.2 ppm und zu einem "Verschwinden" von drei Signalen (74, 75, 76), was auf eine Verbreiterung der Signale oder einem Shift in (durch andere AS) verdeckte Bereiche hindeutet. Der gleiche Rezeptor verursacht zudem kleinere Verschiebungen bei den AS 40 und 41, die Teil der Switch-I-Region (33-41) sind.

#### 4.3.10 Ermittlung der optimalen Screening-Konzentration

Tab. 9: Die Tabelle zeigt die Verdünnungsreihe zur Ermittlung der optimalen Konzentration. Hierzu wurden Aliquote der Teilbibliothek PMD-092 (L-Ala, 400 Verb.) mit den entsprechenden NBD-markierten CaaX-Peptiden inkubiert.



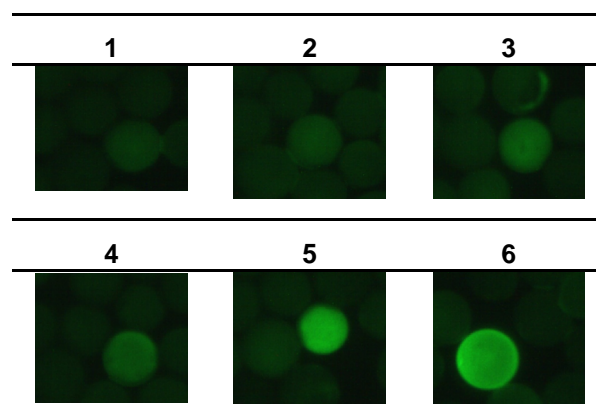
Ist die Konzentration des zu untersuchenden Targets zu groß, zeigen nahezu alle Beads eine Fluoreszenz. Ist sie zu gering, werden vielleicht nicht alle relevanten Beads erkannt. Um dieses Dilemma zu lösen, wurde eine Verdünnungsreihe der markierten CaaX-Boxen von H-Ras, Rheb und K-Ras untersucht.

Da jeweils ~ 8.5 mg Harz pro Inkubation verwendet wurden und bei der untersten Konzentration nur noch 4 (Rheb) bzw. 7 (H-Ras, K-Ras) fluoreszierende Beads gefunden wurden, wurde die Konzentration nicht weiter abgesenkt, da dies zu wenige Hits geliefert hätte. Für alle drei CaaX-Peptide war die Konzentration von 0.01  $\mu\text{M}$  ideal, da hier nur noch wenige Beads fluoreszierten. Durchschnittlich stieg mit wachsender Konzentration sowohl die Anzahl der fluoreszierenden Beads als auch deren Fluoreszenzintensität an. Für das H-Ras-Peptid war die Fluoreszenz bei 0.01  $\mu\text{M}$  am geringsten, während bei der Inkubation des K-Ras-Peptids und einer 1  $\mu\text{M}$  Konzentration nahezu alle Beads unselektiv fluoreszierten. Tab. 9 zeigt Abbildungen von Teilmengen der Bibliothek PMD-092 (erste AS *L*-Ala), die mit den drei CaaX-Peptiden bei drei verschiedenen Konzentrationen untersucht wurden.

#### 4.3.11 Screening der 20 Bibliotheken gegen markierte CaaX-Peptide

Zunächst wurden sämtliche Bibliotheken, wie unter 4.3.6.1 beschrieben, mit dem Farbstofflinker inkubiert und die fluoreszierenden Beads (falsch positive Hits) entfernt.

Tab. 10: Die Tabelle zeigt die Einteilung der relativen Fluoreszenz (r. f.); 1: schwach, 2: schwach-mittel, 3: mittel, 4: mittel-stark, 5: stark, 6: sehr stark. Die Abbildungen zeigen, für die jeweilige Leuchtstärke beispielhaft, Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der inkubierten Teilbibliotheken ( $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$ ).



Die 20 kombinatorischen Bibliotheken (zu je 400 Verbindungen) wurden in Aliquoten



von 8.5 mg mit jeweils einem CaaX-Peptid inkubiert, was insgesamt 60 Einzelinkubationen erforderte. Hierfür wurde das Bohdan®-Miniblock-System (Abb. 54) verwendet, wodurch eine parallele Inkubation und Bearbeitung der Proben möglich war. Die in den Teilbibliotheken gefundenen, fluoreszierenden Beads wurden in fünf verschiedene Leuchtstärken unterteilt (Tab. 10). Diese Unterteilung war rein subjektiv, bietet jedoch eine wesentlich bessere Unterscheidung als nur "fluoreszierend" oder "nichtfluoreszierend".

**Tab. 11: Die Tabelle zeigt die Anzahl und Leuchtstärke der aus den Teilbibliotheken entnommenen Beads: (H) für H-Ras, (R) für Rheb, (K) für K-Ras. \* = Das entnommene Bead zeigte die stärkste Fluoreszenz in der gesamten Bibliothek (8000 Verb.).**

| r. f. →              | 1              | 2              | 3              | 4    | 5    | 6          |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|------|------|------------|
| 1. AS. ↓             |                |                |                |      |      |            |
| L-Lys                | 5(H),2(R),5(K) |                |                |      |      |            |
| L-Arg                | 4(H),4(R),5(K) |                |                |      |      |            |
| L-His                | 4(H),5(R)      | 4(K)           |                |      |      |            |
| L-Leu                |                |                | 4(H),8(R),5(K) |      |      |            |
| L-Val                | 5(R)           | 5(K)           | 5(H)           |      |      |            |
| L-Thz                |                |                | 5(H),5(K)      | 5(R) |      |            |
| L-Thr                | 4(R),5(K)      | 4(H)           |                |      |      |            |
| L-Ser                | 5(R)           |                | 6(H),4(K)      |      |      |            |
| L-Ala                |                | 7(H)           | 4(R),7(K)      |      |      |            |
| L-Asn                | 4(K)           |                | 4(H),4(R)      |      |      |            |
| D-Asn                | 4(R)           |                | 5(H),5(K)      |      |      |            |
| D-Lys                |                | 5(K)           | 5(H),5(R)      |      | 2(R) | 2(K)       |
| D-Arg                |                | 5(R)           | 4(H),5(K)      |      | 1(K) |            |
| D-His                | 4(H),4(R)      |                |                | 4(K) |      |            |
| D-Leu                |                | 5(R)           | 4(K)           | 2(H) | 1(R) |            |
| D-Val                |                | 5(H),6(R),4(K) |                |      |      | 1(K)       |
| L-ThzMe <sub>2</sub> | 3(H),1(R)      | 1(K)           |                |      | 2(R) |            |
| D-Thr                | 2(H),3(R)      | 2(K)           |                |      |      | 1(H)*,1(R) |
| D-Phe                | 5(R)           | 4(H),4(K)      |                | 1(R) |      |            |
| D-Ala                |                | 5(H),4(R)      | 3(K)           |      |      |            |

Tab. 11 fasst zusammen, wie viele Beads mit ihrer zugehörigen Leuchtstärke aus den Teilbibliotheken entnommen wurden. Aus jeder Bibliothek wurden nur die am stärksten fluoreszierenden Beads entnommen. Wenn genug fluoreszierende Beads vorhanden waren, wurden mindestens fünf Beads entnommen, liegt die angegebene Anzahl darunter, war auch nur die entsprechende Anzahl vorhanden.

Aus der Verteilung der Leuchtstärke über alle Teilbibliotheken wird ersichtlich, dass nur vier Teilbibliotheken sehr stark fluoreszierende Beads aufwiesen und das von diesen im Regelfall nur ein, maximal zwei Beads gefunden wurden. Abb. 74 stellt die Ergebnisse noch einmal grafisch dar, wobei hier keine Anzahl einfließt, sondern nur die jeweils pro Teilbibliothek am stärksten fluoreszierenden Beads angegeben werden:

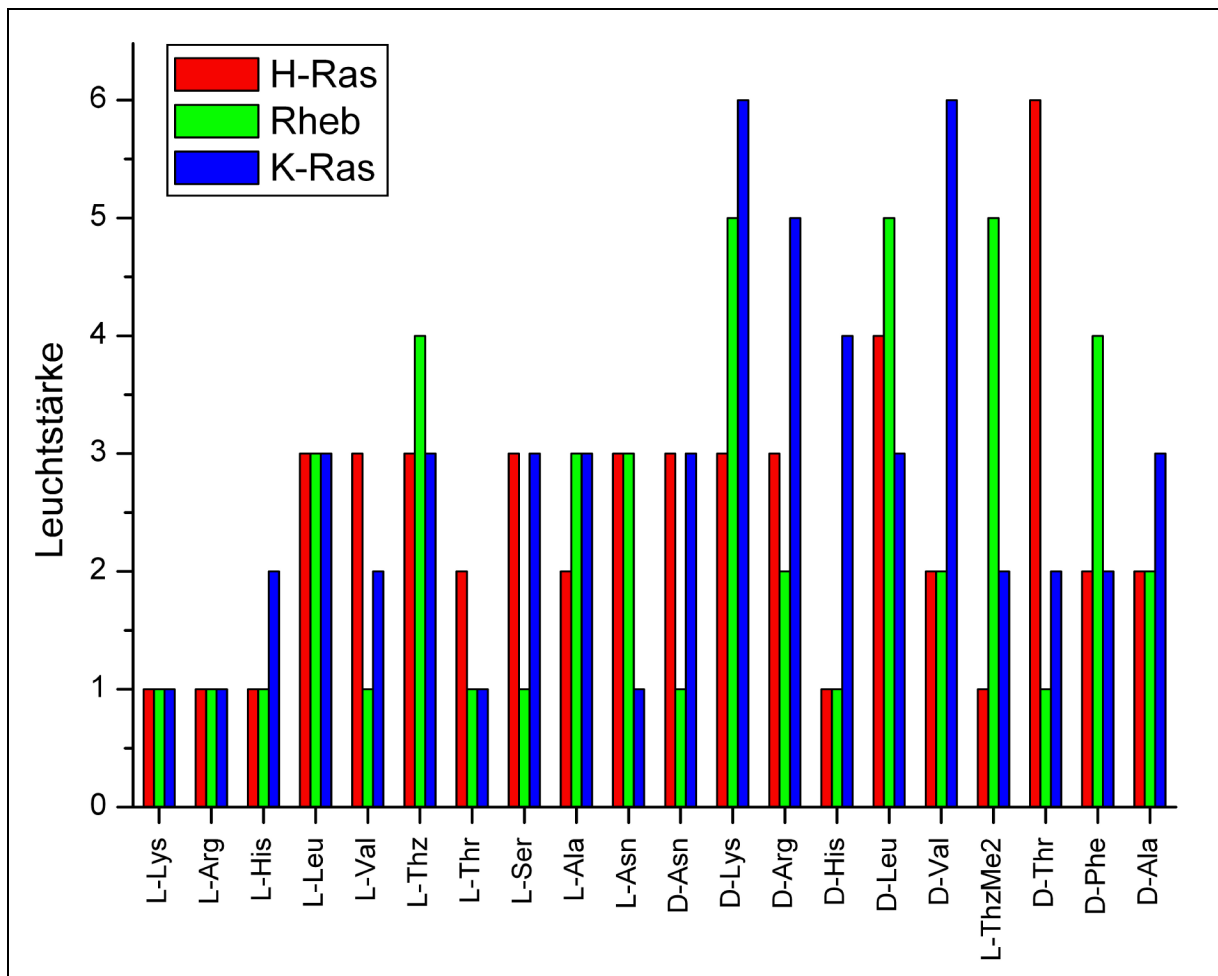
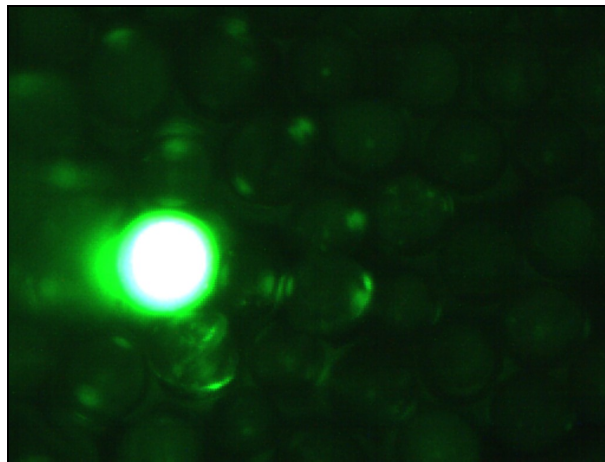


Abb. 74: Die Abbildung zeigt die Auftragung der größten gefundenen Fluoreszenz eines Beads gegen die erste Aminosäure der jeweiligen Teilbibliothek. (Der in der Teilbibliothek *D-Thr* gefundene Wert (Inkubation mit H-Ras-Peptid) war wesentlich stärker als r. f. = 6.)

Hieraus geht hervor, dass die Teilbibliotheken mit *L-Lys* und *L-Arg* an erster Position für alle drei CaaX-Peptide schlecht geeignet waren, hingegen waren die AS *D-Lys*, *D-Arg*, *D-Leu*, *D-Val*, *L-ThzMe<sub>2</sub>*, *D-Thr* eher geeignet, da sie für mindestens ein CaaX-Peptid eine starke Fluoreszenz (r. f.  $\geq 5$ ) lieferten. Besonders interessant sind hierbei die Teilbibliotheken mit den stärksten Fluoreszenzen (*D-Lys*, *D-Val* und *D-Thr*) sowie diejenigen, die auf eine Sequenzselektivität hindeuten. Besonders

sequenzselektiv erscheinen die Teilbibliotheken *D*-Val, *L*-ThzMe<sub>2</sub> und *D*-Thr. Auch *D*-His erscheint für K-Ras sequenzselektiv gegenüber den CaaX-Peptiden von H-Ras und Rheb zu sein.

Als generelle Schlussfolgerung ergibt sich, dass die Verwendung von nicht-ribosomalen Aminosäuren an der ersten Position zu besonders guten Rezeptoren führte. Das aus der Teilbibliothek *D*-Thr entnommene Bead wies eine Fluoreszenz auf, die weit über den in Tab. 10 gezeigten Leuchtstärken lag.



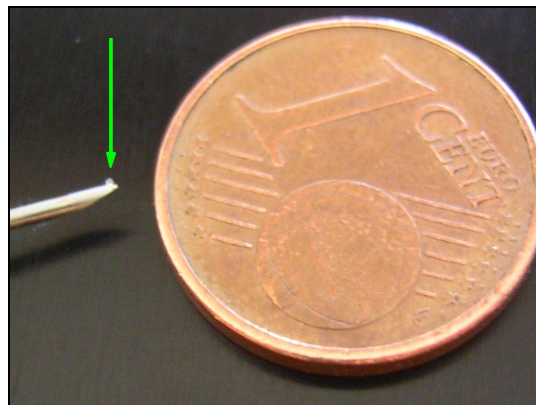
**Abb. 75:** Die Abbildung zeigt die Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme des am stärksten fluoreszierenden Beads aus der gesamten Bibliothek von 8000 Verbindungen ( $\lambda_{\text{exc.}} = 480 \text{ nm}$ ). Die Aufnahme stammt von der Teilbibliothek PMD-119 (*D*-Thr), die mit  $0.01 \mu\text{M}$  NBD-CVLS-OH +  $5 \mu\text{M}$  BisTris in 10 % DMSO (aq) 16 h inkubiert wurde.

#### 4.3.12 Optimierung der Abspaltbedingungen für einzelne Beads

Die Strukturaufklärung der Hits aus einer gescreenten Festphasenbibliothek ist keine triviale Problemstellung. Verschiedene Methoden wurden seit Jahrzehnten erforscht und die Entwicklung neuer Methoden ist immer noch Gegenstand der Forschung. So wurde im Jahr 2010 eine Methode vorgestellt, bei der jeweils eine, für ein Bead spezifische, 3-dimensionale Anordnung von fluoreszierenden Micropartikeln innerhalb der Beads realisiert wurde. Die so erzeugte 3-dimensionale Matrix aus Leuchtpunkten konnte über ein Computerprogramm analysiert werden und verlieh damit den Beads einen einzigartigen "fingerprint".<sup>[94]</sup> Die Methode ist damit dem Aufbringen eines optisch erfassbaren Labels, wie dem Einbrennen eines Barcodes (laser bleaching) ähnlich. In beiden Fällen muss eine gewisse Vorarbeit (die Markierung und Zuordnung der Beads) geleistet und kostspielige Geräte angeschafft werden. Die klassischen, von Gallop und Still eingeführten Methoden, welche das

chemische Tagging der Beads umfasst, markiert die Beads auf den jeweiligen Synthesestufen mit einer leicht zu analysierenden Verbindung. Gallop benutzte sekundäre Amine, welche nach Abspaltung von dem Bead dansyliert wurden. Die entsprechend dansylmarkierten Amine konnten mittels HPLC identifiziert werden.<sup>[95]</sup> Still verwendete hingegen unterschiedlich halogenierte Phenoether als chemisches Tags, die über ihre gaschromatografische Retention identifiziert wurden.<sup>[96]</sup> Die Methode des chemischen Taggings muss zunächst etabliert werden und gibt, wie alle vorgestellten Methoden, einen indirekten Hinweis auf die tatsächlich gebundene Struktur, da hier davon ausgegangen wird, dass die Syntheseprotokolle für das Erzeugen der Bibliothek in jeder denkbaren Kombination funktioniert. Die direkte Identifikation des eigentlichen Analyten stellt hierbei eine überlegene Methode dar, die mit weniger Aufwand einhergeht. In der vorliegenden Arbeit gelang die direkte Analyse durch Abspaltung des festphasengebundenen Rezeptors und seiner anschließenden Sequenzierung unter Zuhilfenahme eines ESI-Ionenfallen-Massenspektrometers.

Aufgrund der geringen Dimensionen selbst der "größten" käuflichen Tentagel-Makrobeads ( $D = 300 \mu\text{m}$ ), resultiert nur eine geringe maximale Beladung von 3 nmol pro Bead. Abb. 76 veranschaulicht das Problem:



**Abb. 76:** Die Abbildung zeigt einen in DCM gequollenen Tentagel-Makrobead (mit HMBA-Linker) auf einer Nadelspitze.

Jedes aus den Teilbibliotheken entnommene Bead weist also nur eine geringe Menge an Analyt auf. Bei einer durchschnittlichen molaren Masse von 500 g/mol resultieren bei quantitativer Ausbeute 1.5  $\mu\text{g}$  (3 nmol) des Rezeptors. Um eine angemessene Konzentration zu erreichen, wurde die gesamte Probe des Rohprodukts letztendlich in einem Volumen von 30  $\mu\text{L}$  konzentriert.

Hierzu wurden 1.1 mL Vials mit konischem Boden und teflondichteten Schraub-

kappen verwendet (Abb. 77). Zusammen mit einer 100  $\mu\text{L}$  GC-Spritze (Teflonstempel) ist so ein einwandfreies Probenhandling möglich. Von den einzelnen Beads wurde jeweils ein Massenspektrum (Direktinjektion über eine 5  $\mu\text{L}$  Probenschleife) aufgenommen, um die molekulare Masse des Rezeptors zu bestimmen. Zudem wurde die verbleibende Probe auf 200  $\mu\text{L}$  verdünnt und eine Sequenzanalyse mittels  $\text{MS}^n$  durchgeführt.



Abb. 77: Die für die Analysen verwendeten Vials mit konischem Boden.

Um die geringe Probenmenge eines einzelnen Beads zu analysieren, wurde zunächst die Abspaltung und Aufarbeitung für das Tentagel-HMBA-Harz optimiert. Hierzu wurde als Modellverbindung das Tripeptid  $\text{H}_2\text{N-L-Val-L-Ala-L-Phe-O-Pol}$  synthetisiert.

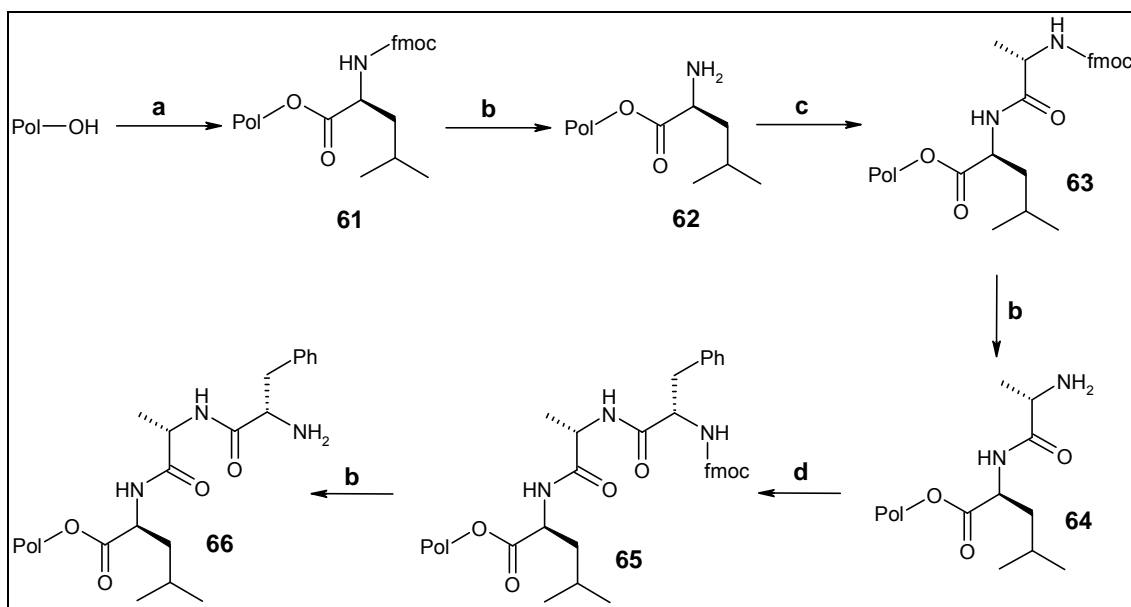


Abb. 78: Das Syntheseprotokoll zur Festphasensynthese des Tripeptids  $\text{H}_2\text{N-LAF-O-Pol}$ . a): 5 Äq. Fmoc-L-Leu-OH, 5 Äq. DIC, 5 Äq. HOBT\* $\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 Äq. DMAP, 0.01 Äq. Methylimidazol, DMF, RT, 15 h, b): 20 % Piperidin in DMF, RT, 30 min, c): 4 Äq. Fmoc-L-Ala-OH, 4 Äq. HBTU, 4 Äq. HOBT\* $\text{H}_2\text{O}$ , 6 Äq. DIPEA, DMF, RT, 15 h, d): 4 Äq. Fmoc-L-Phe-OH, 4 Äq. HBTU, 4 Äq. HOBT\* $\text{H}_2\text{O}$ , 6 Äq. DIPEA, DMF, RT, 15 h.

Durch Optimierung der bisherigen Probenpräparation (Protokoll von T. Tran) konnten eindeutige MS-Spektren von Einzelbeadabspaltungen erhalten werden. Das bisherige Protokoll wurde wie folgt optimiert:

- Die Verringerung des Abspaltreagenz von 50  $\mu\text{L}$  auf 3  $\mu\text{L}$ .
- Die Verringerung der Lösungsmittelmengen von 2 mL auf 300  $\mu\text{L}$ .
- Die Verringerung des Probenvolumens auf 100  $\mu\text{L}$ .<sup>[97]</sup>
- Der Verzicht auf PE-Reaktionsgefäße und Silikon- bzw. Gummisepten; lediglich Glas und Teflon wurde benutzt.

Hierbei wurde auch untersucht, ob andere Abspaltreagenzien in Frage kommen: Es wurden *n*-Propylamin, Ethylendiamin, 1,3-Diaminopropan, Hydrazinhydrat, 10 % Piperazin in MeOH versucht, wobei Ethylendiamin die besten Resultate lieferte. Ebenso wurden die entsprechenden Hydrochloride der Abspaltprodukte untersucht, indem den getrockneten Abspaltprodukten eine kleine Menge (5  $\mu\text{L}$ ) 10 %-iger Salzsäure hinzugefügt wurde und nach 15 min bei RT die Proben erneut getrocknet und dann untersucht wurden. Die Hydrochloride ließen sich nicht besser ionisieren (vergleichbare Counts bei gleicher Probenkonzentration) als die entsprechend un-behandelten Proben und wiesen zudem noch weitere Verunreinigungen auf.

Die folgende Abbildung zeigt ein Massenspektrum von einer Einzelbeadabspaltung; Als abundante Signale treten  $[\text{M} + \text{H}]^+$  und  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  auf. Verunreinigungen sind nur sehr geringfügig sichtbar.

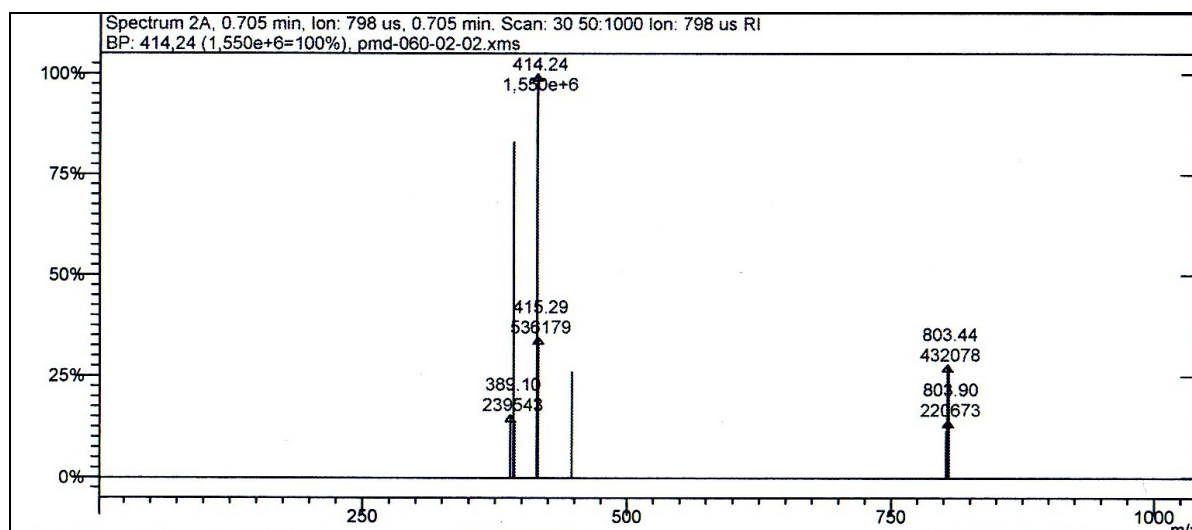
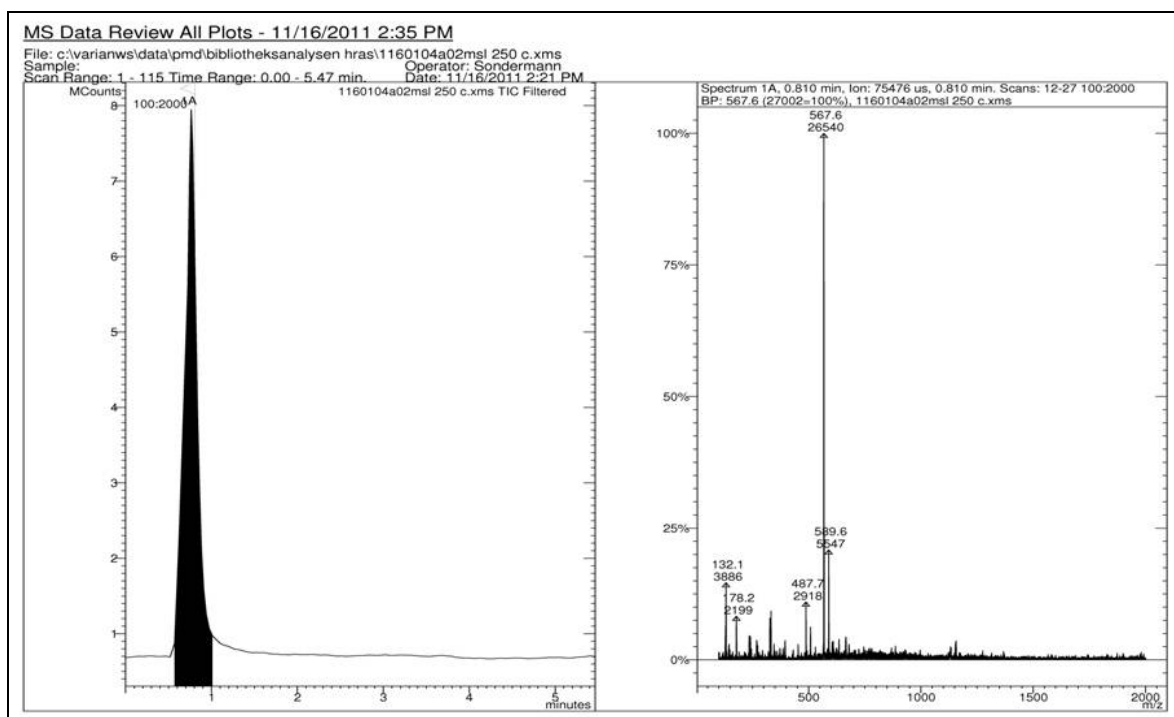


Abb. 79: ESI-MS-Spektrum (3 Direktion) von PMD-060-02-02 (Rohprodukt der vom Harz abgespaltenen Verbindung 60). Analyse einer Einzelbeadabspaltung mit 3  $\mu\text{L}$  Ethylendiamin ( $\text{M} + \text{H} = 392$ ,  $\text{M} + \text{Na} = 414$ ).

Die Ergebnisse der Optimierung konnten dann auf die selektierten Beads der gescreenten Rezeptorbibliotheken übertragen werden. Hierbei erwies sich *n*-Propylamin als etwas besser geeignet, da es sich leichter entfernen lässt und die durch Ethylendiamin zusätzlich entstehende Aminfunktion (die die Ionisierbarkeit verbessert) aufgrund des Guanidiniumions der Kopfgruppe nicht benötigt wurde.

Abb. 80 zeigt exemplarisch die Analyse eines Beads aus dem Screening gegen das 4er-Peptid von H-Ras (r. f. = 4). Hierbei findet sich als abundantes Signal das protonierte Molekülion ( $m/z = 567.9$ ). Bei dem zweitgrößten Signal handelt es sich um das Natriumionenaddukt des Rezeptors ( $m/z = 589.9$ ). Die verbleibenden, kleineren Signale werden von Verunreinigungen hervorgerufen. Nicht alle Einzelbeadanalysen ergaben so eindeutige Spektren wie bei Abb. 80, jedoch konnten selbst komplexe Rohprodukte über die anschließende  $MS^n$ -Analyse identifiziert werden.

Da jede Teilbibliothek einzeln gescreent wurde, beschränkt sich die Anzahl der möglichen Verbindungen auf 400. Alle 400 Molekülmassen der jeweiligen Teilbibliothek wurden mittels Excel berechnet und mit den aus den Massenspektren erhaltenen Daten abgeglichen.



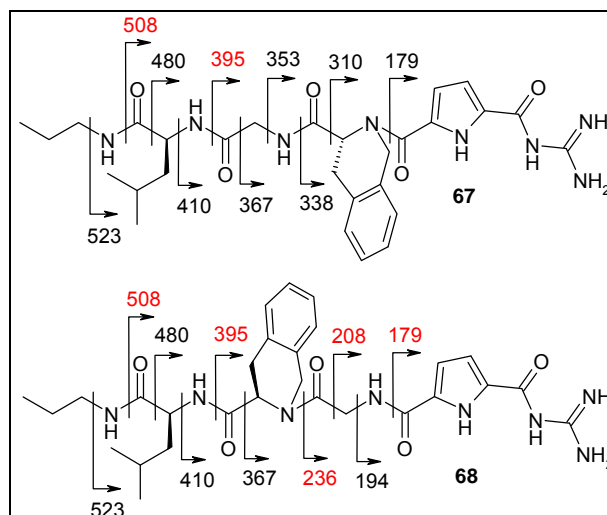
**Abb. 80:** Das Direktinjektions-Massenspektrum von 5  $\mu$ L der Rezeptorlösung eines Beads (Rohprodukt, 1/6 der gesamten Menge). Links: Totalionenspur der Direktinjektion (ohne Chromatografie), rechts: Integriertes (+)-ESI-Massenspektrum.

Für jede (aus einer Einzelbeadanalyse ermittelten) Molekülmasse resultieren hierbei nur noch einige Strukturvorschläge, die durch eine anschließende MS<sup>n</sup>-Analyse (Sequenzanalyse) auf wenige Verbindungen reduziert werden können.

Die verbleibenden Isomere bestehen dann in der Regel nur noch aus den Stereoisomeren infolge der Verwendung von *D*- und *L*-Aminosäuren. Durch den Verzicht auf stereoisomere Aminosäuren (als Bausteine der Bibliotheken) würde die Analyse der meisten Verbindungen problemlos bis auf eine einzige Verbindung (pro Bead) reduziert.

#### 4.3.13 MS<sup>n</sup>-Analyse der selektierten Beads

Aus dem in Abb. 80 gezeigten Massenspektrum ging die Molekülionenmasse von 567.6 u hervor. Auf Grundlage der bekannten 400 möglichen Rezeptoren in dieser Teilbibliothek kamen hierfür lediglich die beiden isobaren Strukturen *D*-Leu-Gly-*L*-Tic-KG bzw. *D*-Leu-*L*-Tic-Gly-KG in Frage. Durch Betrachtung der durch  $\alpha$ -Spaltung der Carbonylgruppe möglichen Fragmentationen (Abb. 81) werden die Unterschiede ab dem  $\alpha$ -C-Atom der zweiten, C-terminal angeknüpften Aminosäure sichtbar.



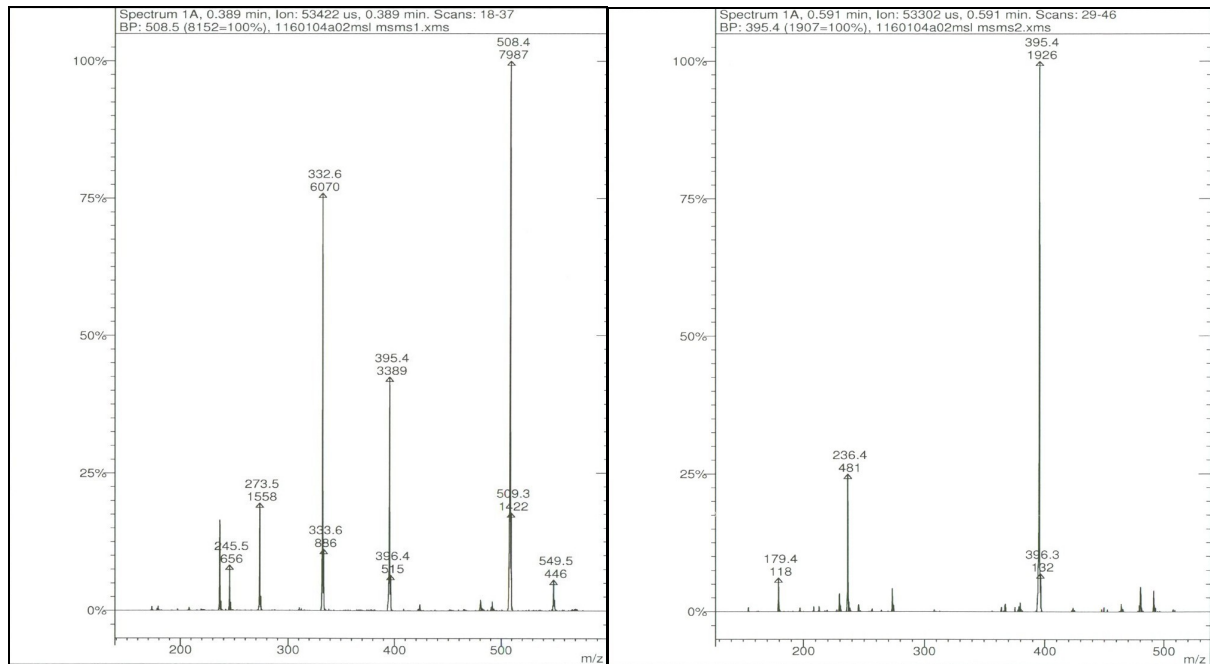
**Abb. 81:** Die Abbildung zeigt die möglichen (schwarze Zahlen) und nachgewiesene (rote Zahlen) Fragmentationen der beiden Strukturvorschläge.

Die Fragmentationen 353, 338, 310 wären hiermit für *D*-Leu-Gly-*L*-Tic-KG, die Ionen 236, 208, 194 für die Sequenz *D*-Leu-*L*-Tic-Gly-KG charakteristisch. Durch gezielte Stossionisation mit Heliumatomen konnte das selektierte Mutterion im MS-MS-Experiment eine  $\alpha$ -Spaltung des Propylamids eingehen ( $m = 508$ ). Bereits hier wurde



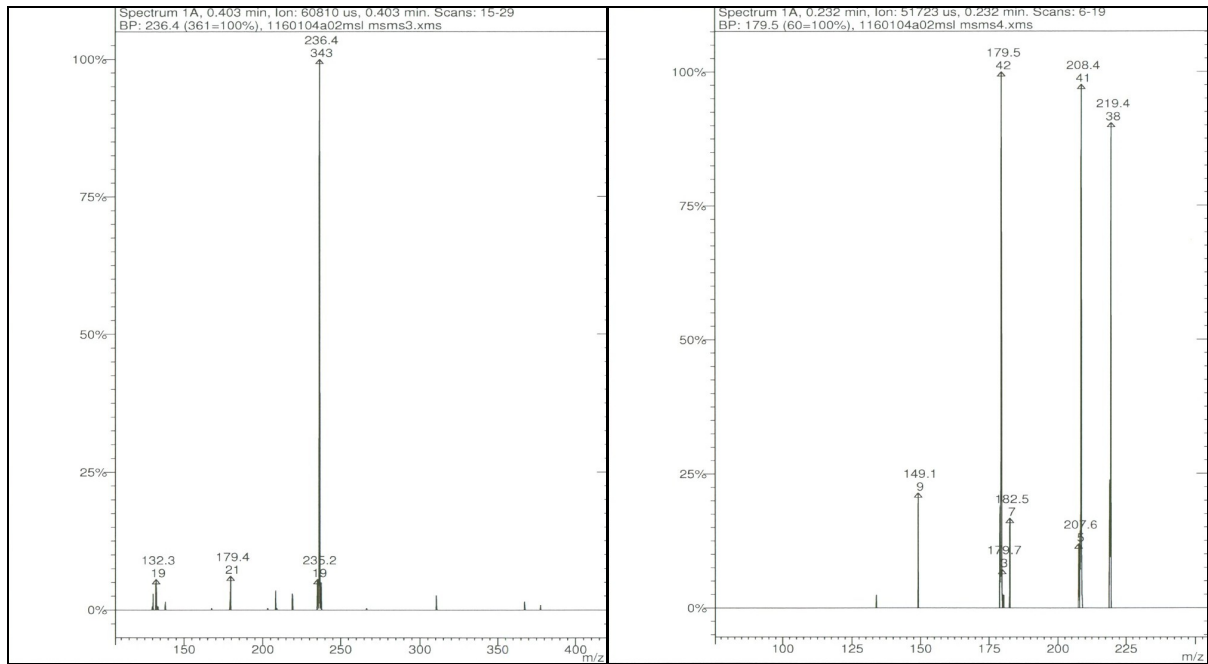
ein weiteres Tochterion der Masse 395 gebildet. Dieses kann sich durch eine weitere  $\alpha$ -Spaltung der Amidbindung am *D*-Leucin bilden.

Im anschließenden MS<sup>3</sup>-Experiment mit der selektierten Masse 508 kommt es genau zur eben beschriebenen Reaktion, die die Bildung des abundanten Ions mit dem  $m/z$  = 395.4 bewirkt. Auch hier zeigen sich bereits die zwei weiteren Tochterionen (236 und 179).



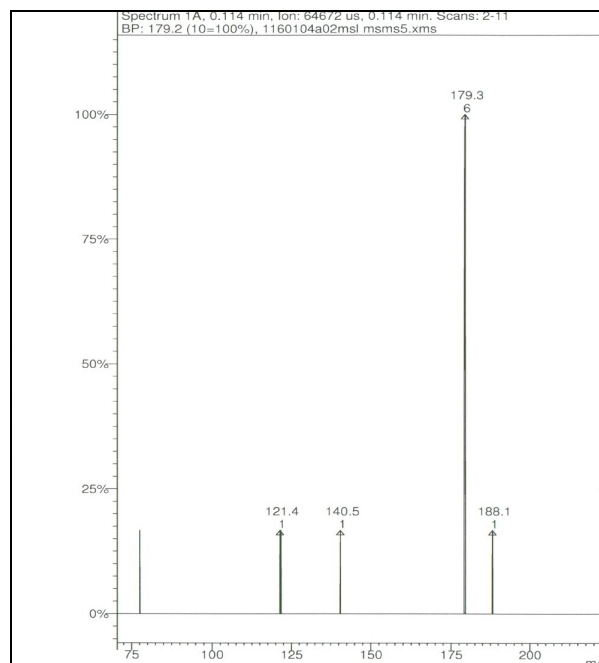
**Abb. 82:** Die MS<sup>n</sup>-Analyse eines Beads aus der Bibliothek PMD-116-01 (Screening gegen das H-Ras-Peptid, r. f. = 4). Links: Das MS-MS-Spektrum des Mutterions 567.6. Rechts: Das MS<sup>3</sup>-Spektrum (567.6 → 508.4).

Die Ionisation im MS<sup>4</sup>-Experiment des selektierten Ions mit der Masse 395 liefert ein Tochterion der Masse 236, das dem Verlust des *L*-Tetrahydroisochinolin-carbonäure-Fragments ( $\alpha$ -Spaltung der Amidbindung) entspricht. Die Masse 236 ist der erste Hinweis auf die Struktur *D*-Leu-*L*-Tic-Gly-KG. Das MS<sup>5</sup>-Experiment liefert, ausgehend vom Ion der Masse 236 die Fragmentationen der Masse 219, 208, 179 und 149. Die Masse 208 ist somit der zweite Hinweis für die Struktur von *D*-Leu-*L*-Tic-Gly-KG.



**Abb. 83:** Die MS<sup>n</sup>-Analyse eines Beads aus der Bibliothek PMD-116-01 (Screening gegen das H-Ras-Peptid, r. f. = 4). Links: Das MS<sup>4</sup>-Spektrum (567.6 → 508.4 → 395.4). Rechts: Das MS<sup>5</sup>-Spektrum (567.6 → 508.4 → 395.4 → 236.4).

Wenn es sich bei der Masse 208 um ein Fragment des Rezeptors handelt, sollte sich hieraus auch ein Fragment der Kopfgruppe generieren lassen: Genau dies ist mit dem MS<sup>6</sup>-Experiment gelungen, indem durch das selektierte Vorläuferion 208 das abundante Ion 179 gebildet wurde.



**Abb. 84:** Die MS<sup>n</sup>-Analyse eines Beads aus der Bibliothek PMD-116-01 (Screening gegen das H-Ras-Peptid, r. f. = 4). Die Abbildung zeigt das MS<sup>6</sup>-Spektrum (567.6 → 508.4 → 395.4 → 236.4 → 208.4).

Der Nachweis der für die Sequenz charakteristischen Fragmentationen und des hieraus gebildeten Kopfgruppenfragments beweist den Strukturvorschlag *D*-Leu-*L*-Tic-Gly-KG.

Generell erwies sich das Kopfgruppenfragment der Masse 179 als sehr stabil und konnte in vielen Analysen aus den Vorläuferionen generiert werden. Die Rezeptoren konnten meist selektiv vom C-Terminus aus um jede Aminosäure fragmentiert werden. Fragmentationen, die vom *N*-Terminus des Rezeptors gebildet wurden, entstanden hingegen nur selten. Ein Grund hierfür könnte die Stabilität der Kopfgruppe oder eine besondere elektronische Struktur der *N*-terminalen Amidbindung sein, die auf die Konjugation mit dem Pyrrolsystem zurückgeht.

Mit der in Kapitel 4.3.12 beschriebenen Methode, also der Abspaltung, MS- und MS<sup>n</sup>-Analyse der Rezeptorbeads, wurden die aus den Bibliotheken selektierten Beads untersucht. Dies waren insgesamt 136, wovon 36 Beads aus dem Screening gegen das Rheb-Peptid, 19 Beads gegen das H-Ras-Peptid und 81 Beads gegen das K-Ras-Peptid entstammen. Von diesen 81 waren 36 Beads mit schwacher Intensität (r. f. = 1 und 2).<sup>[98]</sup>

Von den 136 Analysen konnte von 11 Beads aus dem Rheb-Screening, 6 Beads aus dem H-Ras-Screening und 22 Beads aus dem Screening gegen das K-Ras-Peptid nicht analysiert werden, da die erhaltenen MS / MS<sup>n</sup>-Spektren nicht sinnvoll den in der jeweiligen Bibliothek vorkommenden Sequenzen zugeordnet werden konnten.

#### 4.3.14 Dreidimensionale Darstellung der Massenanalyse

Bei dem Screening der kombinatorischen Bibliotheken wurden durchschnittlich 5-7 Beads pro Teilbibliothek entnommen. Nicht alle der entnommenen Beads wurden gleich analysiert: Bevorzugt erfolgte die Analyse aller fluoreszierenden Beads aus dem K-Ras-Screening (r. f.  $\geq 1$ ), gefolgt von dem Rheb- (r. f.  $\geq 3$ ) und dem H-Ras-Peptid (r. f.  $\geq 3$ ). Abb. 85 zeigt die Verteilung der erhaltenen Strukturvorschläge für die Inkubation mit dem Rheb-Peptid: Bereits hier fällt auf, dass Strukturvorschläge mit einer großen relativen Fluoreszenz der zugehörigen Beads (r. f. = 4 bis 6) bevorzugt an der zweiten Position (AS 2) die AS *L*-Ile, *L*-Tic, Gly, *L/D*-Pro, *L/D*-Phe, *L*-Lys, *L*-Ser, *L*-His, *L*-ThzMe<sub>2</sub> enthalten. An Position 3 finden sich die AS *L*-Ile, *L*-Tic, Gly, *L*-His, *L/D*-Pro, *L/D*-Phe, *L*-Tyr, *L*-Lys, *L*-Ser, *L/D*/ $\beta$ -Ala.

Wie bereits aus Abb. 74 ersichtlich war, finden sich bei der ersten Position (AS 1) bevorzugt *D*-Thr, *D*-Lys, *L*-Thz und *L*-ThzMe<sub>2</sub>.

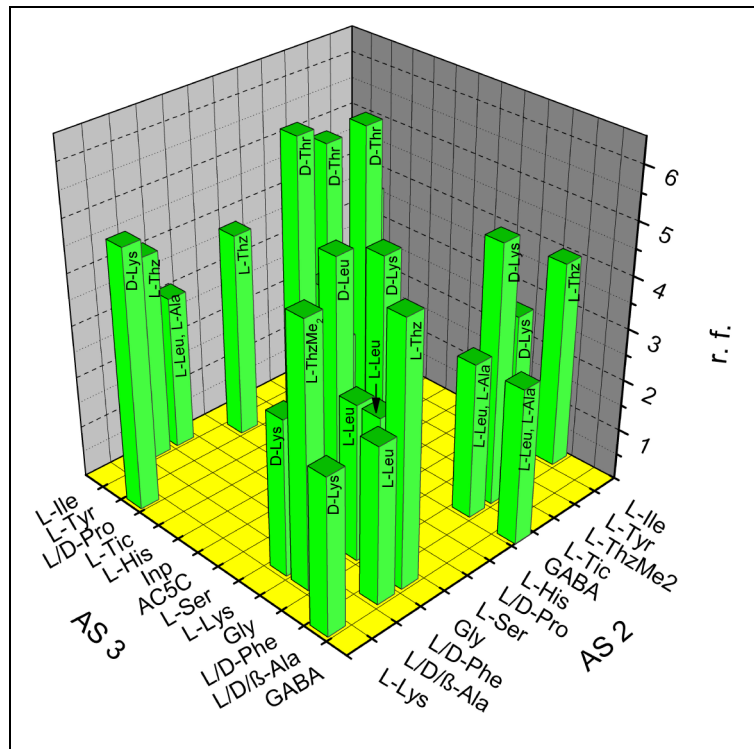


Abb. 85: Die 3D-Darstellung der aus der Massenanalyse resultierenden Strukturvorschläge für das Rheb-Peptid. Die Strukturvorschläge einer schlechten Analyse (r. f. = 3, 16 Strukturvorschläge) wurde wegen der besseren Übersicht nicht abgebildet. Die C-terminale, erste AS der Rezeptoren ist jeweils auf den Balken vermerkt.

Die Analyse der Inkubation des K-Ras-Peptids führte zu sehr vielen Strukturvorschlagen, da hier sämtliche Beads ab einer relativen Fluoreszenz von 1 untersucht wurden. Zum besseren Verständnis der Daten werden diese in zwei Abbildungen getrennt (r. f.  $\leq 3$  und r. f.  $\geq 4$ ). Bei den kleineren Werten (r. f.  $\leq 3$ ) findet sich ein bevorzugtes Auftreten der AS GABA, *L*-Lys und *L/D*-Phe an der zweiten Position (AS 2), bei Position 3 treten die AS *L*-Lys, *L/D/B*-Ala und *L/D*-Pro auf. Ein bevorzugtes Auftreten einer bestimmten AS an Position 1 konnte nicht festgestellt werden. Jedoch gab es für einige Fälle die gleichen Strukturvorschläge für die Positionen 2 und 3; insbesondere war dies bei den Rezeptoren X-*L*-Tic-*L/D/B*-Ala-KG der Fall. X steht hier für die AS *L*-Lys, *L*-Thr, *L*-Asn (r. f. = 1), *D*-Lys (r. f. = 2), *D*-Leu (r. f. = 3) und *D*-Arg (r. f. = 5).

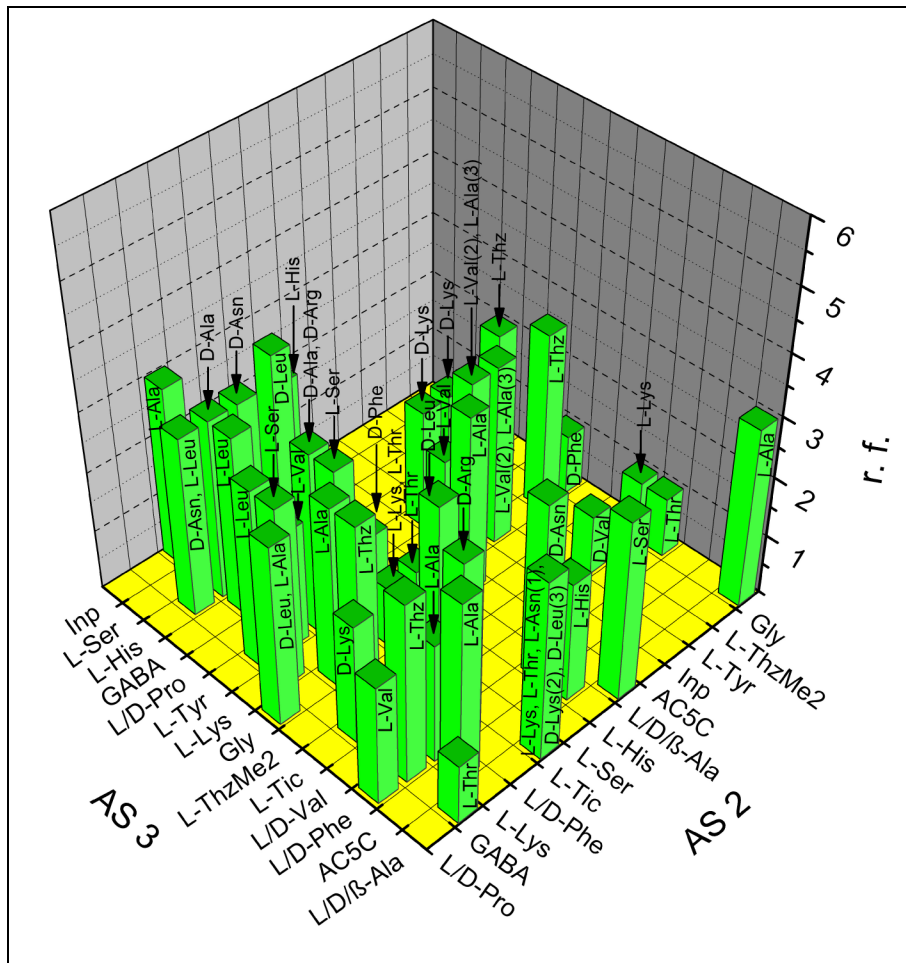


Abb. 86: Die Darstellung der aus der Massenanalyse resultierenden Strukturvorschläge (Beads mit r. f.  $\leq 3$ ) für das K-Ras4B-Peptid. Die Ergebnisse einiger schlechten Analysen (zahlreiche Strukturvorschläge) wurden wegen der besseren Übersicht nicht abgebildet. Die C-terminale, erste AS der Rezeptoren ist jeweils auf den Balken vermerkt.<sup>[98]</sup>

Diese Vielzahl an gleichartigen Strukturvorschlagen deutet darauf hin, dass *L-Tic* an Position 2 und ein isomeres Alanin an Position 3 eine besonders geeignete Kombination für die sequenzselektive Erkennung repräsentieren.

Bei der Auswertung der Strukturvorschläge der stärker fluoreszierenden Beads (r. f.  $\geq 4$ , Abb. 87) finden sich 3 Strukturvorschläge mit *L/D/β-Ala* an Position 3, was die vorangegangene Vermutung untermauert. Die stärksten fluoreszierenden Beads (r. f. = 6) lieferten die Strukturvorschläge *D-Val-L-ThzMe<sub>2</sub>-AC5C/Inp-KG* und *D-Val-AC5C/Inp-L-ThzMe<sub>2</sub>-KG* (*AC5C/Inp* sind isobare Aminosäuren und liessen sich generell im  $MS^n$ -Experiment nicht unterscheiden, zudem war hier keine eindeutige Sequenzaufklarung möglich, weshalb vier Strukturen resultieren).

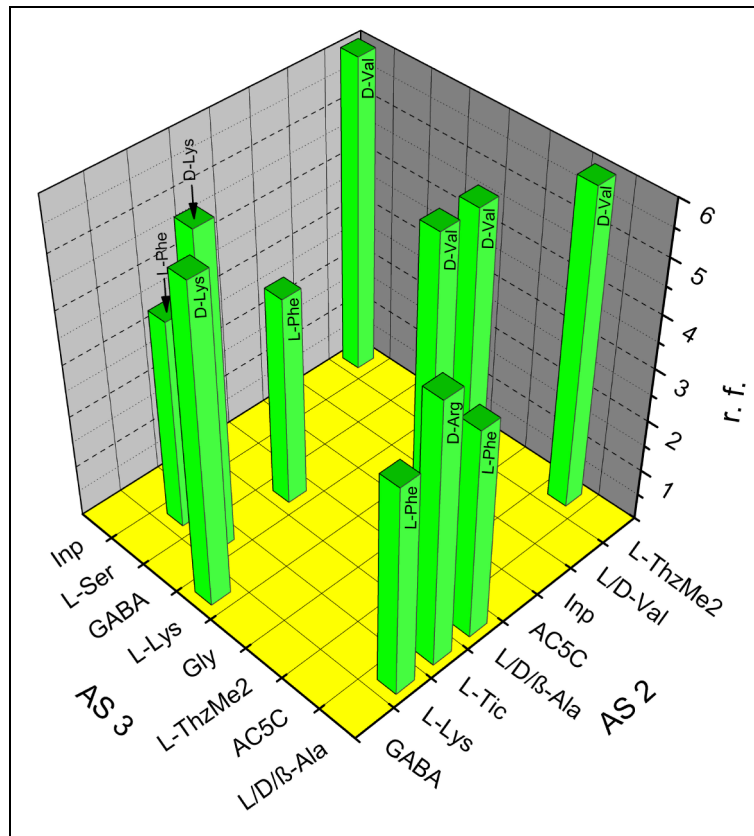


Abb. 87: Die Abbildung der aus der Massenanalyse resultierenden Strukturvorschläge (Beads mit r. f.  $\geq 4$ ) für das K-Ras4B-Peptid. Die C-terminale, erste AS der Rezeptoren ist jeweils auf den Balken vermerkt.

Ein weiteres Bead mit r. f. = 6 lieferte die Strukturvorschläge *D*-Lys-*L*-Lys-GABA-KG und *D*-Lys-GABA-*L*-Lys-KG; hier konnte ebenfalls (infolge einer ungünstigen Fragmentierung) die genaue Sequenzabfolge nicht bestimmt werden.

Die Massenanalyse des Screenings gegen das H-Ras Peptid wurde ab einer relativen Fluoreszenz von 3 durchgeführt. Bei der Verteilung der Strukturvorschläge fällt auf, dass die Sequenz X-*L*-Tic-Gly-KG mit X = *L*-Ser (r. f. = 3), *L*-Val (r. f. = 3) und *D*-Leu (r. f. = 4) dreimal vorkommt, also *L*-Tic für Position 2 und Gly für Position 3 bevorzugt erscheint. Dies ist nahezu in Übereinstimmung mit der Inkubation mit dem K-Ras-Peptid, wo jedoch die chemisch ähnlichen AS *L*/*D*/ $\beta$ -Ala für die Position 3 gefunden wurden.

Die Analyse des Beads mit der stärksten Fluoreszenz (Abb. 75) aus dem gesamten Screening der 8000 Verbindungen gegen die 3 markierten CaaX-Peptide lieferte 12 verschiedene Strukturvorschläge, da zwar die molekulare Masse ermittelt und über MS<sup>n</sup> bestätigt werden konnte, jedoch eine eindeutige Analyse der Sequenz nicht möglich war.

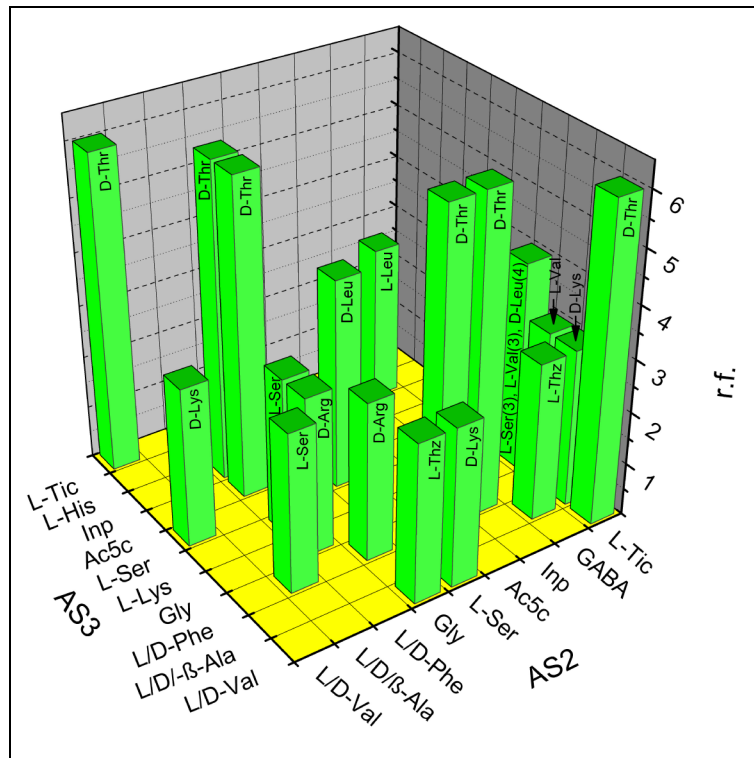


Abb. 88: Die 3D-Darstellung der aus der Massenanalyse resultierenden Strukturvorschläge für das H-Ras-Peptid. Die C-terminale, erste AS der Rezeptoren ist jeweils auf den Balken vermerkt.

Alle in Abb. 88 gezeigten Strukturvorschläge mit *D*-Thr an der ersten Position stammen von diesem Bead. Bemerkenswert ist auch hier der Rezeptor *D*-Leu-*L*-Ser-*L*-Ser-KG, der als signifikanter Strukturvorschlag (mit r. f. = 4) bei zwei Inkubationen (Rheb- und H-Ras-Peptid) vorkam. Zudem wurde die Struktur mit schwächerer Fluoreszenz (r. f. = 3) bei der Inkubation mit dem K-Ras-Peptid identifiziert. Die Analysen lieferte bei allen drei Inkubationen nur einen einzelnen Strukturvorschlag.

#### 4.3.15 Verifizierung der Stereo- und Sequenzisomere (Nachscreening)

Die Massenanalyse der Beads ergab nur in einigen Fällen (stereochemisch) eindeutige Strukturen. Die entsprechenden Strukturvorschläge, die aus der MS-Analyse der gescreenten Bibliotheken hervorgingen, mußten durch eine parallele Synthese der Rezeptoren und einem erneuten Screening dieser (festphasen-gebundenen) Rezeptoren ermittelt werden.

**Tab. 12: Die auf Tentagel-Makrobeads nachsynthetisierten Rezeptoren (Schreibweise vom C- zum N-Terminus, C-terminaler Ester). 10 Beads wurden jeweils mit 2 mL 0.01  $\mu$ M NBD-markierten CaaX-Peptid von Rheb (4-mer) in Puffer (5  $\mu$ M BisTris 10 % DMSO + 90 % H<sub>2</sub>O) inkubiert. \* = Die Zahl steht für die Chiffre des Versuchs PMD-125-03-. \*\* = Luminanzdifferenz. Pol = Tentagelpolymer mit HMBA-Linker.**

| Rezeptorsequenz                             | Chiffre* | $\Delta$ ** | Rezeptorsequenz                                   | Chiffre* | $\Delta$ ** |
|---|----------|-------------|---|----------|-------------|
| Pol-OC-D-Lys-L-Pro-AC5C-KG                  | 18       | 151         | Pol-OC-D-Lys-L-Tyr-Gly-KG                         | 17       | 82.5        |
| Pol-OC-D-Lys-D-Ala-L-Lys-KG                 | 27       | 147.5       | Pol-OC-L-Leu-L-Phe-D-Ala-KG                       | 09       | 80          |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys-D-Ala-KG                 | 24       | 146.5       | Pol-OC-L-Leu-L-Phe- $\beta$ -Ala-KG               | 10       | 70.5        |
| Pol-OC-D-Lys-D-Pro-L-Lys-KG                 | 32       | 142.5       | Pol-OC-D-Lys-L-Tic-L-Phe-KG                       | 33       | 67          |
| Pol-OC-L-Ala-Gly-L-Lys-KG                   | 41       | 140.5       | Pol-OC-L-Asn-L-Ile-L-Val-KG                       | 51       | 54.5        |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys-D-Pro-KG                 | 30       | 134.5       | Pol-OC-L-Thz-Gly-L-Ala-KG                         | 42       | 51          |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys-L-Pro-KG                 | 29       | 129.5       | Pol-OC-L-Asn-L-Ile-D-Val-KG                       | 52       | 47          |
| Pol-OC-D-Lys-D-Pro-Inp-KG                   | 21       | 129         | Pol-OC-L-Leu-Gly-D-Phe-KG                         | 02       | 47          |
| Pol-OC-L-Leu-L-Tyr-L-Val-KG                 | 14       | 127.5       | Pol-OC-L-Leu-D-Phe-L-Ala-KG                       | 11       | 44.5        |
| Pol-OC-D-Lys-L-Ala-L-Lys-KG                 | 26       | 126         | Pol-OC-L-Leu-GABA-GABA-KG                         | 07       | 39.5        |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys-L-Ala-KG                 | 23       | 125.5       | Pol-OC-L-Thz-Gly-D-Ala-KG                         | 43       | 31          |
| Pol-OC-D-Lys- $\beta$ -Ala-L-Lys-KG         | 28       | 122.5       | Pol-OC-L-Thz-Gly- $\beta$ -Ala-KG                 | 44       | 28.5        |
| Pol-OC-D-Lys-L-Pro-L-Lys-KG                 | 31       | 120.5       | Pol-OC-L-Leu-GABA-D-Phe-KG                        | 06       | 24          |
| Pol-OC-D-Lys-L-ThzMe <sub>2</sub> -L-Tyr-KG | 35       | 119         | Pol-OC-L-ThzMe <sub>2</sub> -D-Ala-Gly-KG         | 46       | 22          |
| Pol-OC-D-Lys-L-Tic-D-Phe-KG                 | 34       | 118.5       | Pol-OC-L-Leu-D-Phe-D-Ala-KG                       | 12       | 21          |
| Pol-OC-D-Lys-GABA-L-Tic-KG                  | 22       | 117         | Pol-OC-D-Thr-L-Tic-L-His-KG                       | 50       | 16.5        |
| Pol-OC-D-Lys-D-Pro-AC5C-KG                  | 20       | 114.5       | Pol-OC-L-Leu-GABA-L-Phe-KG                        | 05       | 15          |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys- $\beta$ -Ala-KG         | 25       | 114         | Pol-OC-D-Thr-L-His-L-Tic-KG                       | 49       | 15          |
| Pol-OC-L-Ala-L-Lys-Gly-KG                   | 40       | 113         | Pol-OC-L-Ala-GABA-GABA-KG                         | 39       | 10.5        |
| Pol-OC-L-Leu-D-Phe- $\beta$ -Ala-KG         | 13       | 111         | Pol-OC-L-Ala-Gly-L-Ile-KG                         | 38       | 9.5         |
| Pol-OC-L-Ala-GABA-D-Phe-KG                  | 37       | 110         | Pol-OC-L-Leu-Gly-Gly-KG                           | 04       | 9           |
| Pol-OC-L-Leu-L-Tyr-D-Val-KG                 | 15       | 107.5       | Pol-OC-L-Leu-Gly-L-Phe-KG                         | 01       | 8.5         |
| Pol-OC-D-Lys-L-Pro-Inp-KG                   | 19       | 100.5       | Pol-OC-L-ThzMe <sub>2</sub> - $\beta$ -Ala-Gly-KG | 47       | 4           |
| Pol-OC-D-Leu-L-Ser-L-Ser-KG                 | 48       | 92.5        | Pol-OC-L-ThzMe <sub>2</sub> -L-Ala-Gly-KG         | 45       | 2.5         |
| Pol-OC-L-Ala-GABA-L-Phe-KG                  | 36       | 92.5        | Pol-OC-L-Leu-Gly-L-Ile-KG                         | 03       | -4          |
| Pol-OC-L-Leu-L-Phe-L-Ala-KG                 | 08       | 83.5        | Pol-OC-L-Leu-L-ThzMe <sub>2</sub> -L-Tyr-KG       | 16       | -4.5        |

Für die Nachsynthese von 74 Rezeptoren wurden bevorzugt Strukturvorschläge aus dem Screening gegen die Rheb-CaaX-Box und eine geringere Anzahl aus dem Screening gegen die CaaX-Box von H- und K-Ras ausgewählt. Tab. 12 gibt die, für die Inkubation mit dem (NBD-markierten) Tetrapeptid der Rheb-CaaX-Box ausgewählten (52) Rezeptoren wieder. Die gleichen Rezeptoren wurden unter identischen Bedingungen mit dem (NBD-markierten) 11-mer des C-Terminus von Rheb inkubiert (Tab. 13).



**Tab. 13: Die auf Tentagel-Makrobeads nachsynthetisierten Rezeptoren (Schreibweise vom C- zum N-Terminus, C-terminaler Ester). 10 Beads wurden jeweils mit 2 mL 0.01  $\mu$ M NBD-markierten CaaX-Peptids von Rheb (11-mer) in Puffer (5  $\mu$ M BisTris 10 % DMSO + 90 % H<sub>2</sub>O) inkubiert. \* = Die Zahl steht für die Chiffre des Versuchs PMD-125-03-. \*\* = Luminanzdifferenz. Pol = Tentagelpolymer mit HMBA-Linker.**

| Rezeptorsequenz                             | Chiffre* | $\Delta$ ** | Rezeptorsequenz                                   | Chiffre* | $\Delta$ ** |
|---|----------|-------------|---|----------|-------------|
| Pol-OC-D-Lys-L-Tic-L-Phe-KG                 | 33       | 59          | Pol-OC-L-Ala-GABA-GABA-KG                         | 39       | 15          |
| Pol-OC-D-Lys-GABA-L-Tic-KG                  | 22       | 47.5        | Pol-OC-L-Thz-Gly-L-Ala-KG                         | 42       | 13.5        |
| Pol-OC-D-Lys-L-Pro-L-Lys-KG                 | 31       | 47.5        | Pol-OC-L-Leu-D-Phe- $\beta$ -Ala-KG               | 13       | 13          |
| Pol-OC-D-Lys-D-Pro-L-Lys-KG                 | 32       | 47          | Pol-OC-L-Leu-L-Phe-D-Ala-KG                       | 09       | 12.5        |
| Pol-OC-D-Lys-L-Tyr-Gly-KG                   | 17       | 45.5        | Pol-OC-L-Leu-D-Phe-L-Ala-KG                       | 11       | 12.5        |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys-D-Pro-KG                 | 30       | 44.5        | Pol-OC-D-Lys-L-Pro-Inp-KG                         | 19       | 12.5        |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys-L-Pro-KG                 | 29       | 44          | Pol-OC-L-Leu-L-Phe- $\beta$ -Ala-KG               | 10       | 11.5        |
| Pol-OC-D-Thr-L-His-L-Tic-KG                 | 49       | 39          | Pol-OC-D-Lys-D-Pro-AC5C-KG                        | 20       | 10.5        |
| Pol-OC-D-Lys-L-Tic-D-Phe-KG                 | 34       | 37.5        | Pol-OC-L-Ala-GABA-D-Phe-KG                        | 37       | 10.5        |
| Pol-OC-L-Ala-L-Lys-Gly-KG                   | 40       | 37          | Pol-OC-L-Ala-Gly-L-Ile-KG                         | 38       | 10.5        |
| Pol-OC-D-Lys-D-Ala-L-Lys-KG                 | 27       | 32          | Pol-OC-L-Leu-GABA-D-Phe-KG                        | 06       | 10          |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys-D-Ala-KG                 | 24       | 31          | Pol-OC-L-Ala-GABA-L-Phe-KG                        | 36       | 9.5         |
| Pol-OC-L-Thz-Gly-D-Ala-KG                   | 43       | 31          | Pol-OC-L-Leu-L-Phe-L-Ala-KG                       | 08       | 9.5         |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys-L-Ala-KG                 | 23       | 29          | Pol-OC-L-Leu-D-Phe-D-Ala-KG                       | 12       | 9.5         |
| Pol-OC-L-Ala-Gly-L-Lys-KG                   | 41       | 28.5        | Pol-OC-L-ThzMe <sub>2</sub> -D-Ala-Gly-KG         | 46       | 9           |
| Pol-OC-D-Lys- $\beta$ -Ala-L-Lys-KG         | 28       | 28.5        | Pol-OC-L-Leu-Gly-Gly-KG                           | 04       | 9           |
| Pol-OC-L-Thz-Gly- $\beta$ -Ala-KG           | 44       | 26          | Pol-OC-L-Leu-L-Tyr-D-Val-KG                       | 15       | 7.5         |
| Pol-OC-D-Lys-D-Pro-Inp-KG                   | 21       | 23.5        | Pol-OC-L-Asn-L-Ile-L-Val-KG                       | 51       | 6           |
| Pol-OC-D-Thr-L-Tic-L-His-KG                 | 50       | 20.5        | Pol-OC-L-Asn-L-Ile-D-Val-KG                       | 52       | 6           |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys- $\beta$ -Ala-KG         | 25       | 20.5        | Pol-OC-L-Leu-GABA-L-Phe-KG                        | 05       | 6           |
| Pol-OC-D-Lys-L-Pro-AC5C-KG                  | 18       | 17.5        | Pol-OC-L-Leu-Gly-D-Phe-KG                         | 02       | 5.5         |
| Pol-OC-L-ThzMe <sub>2</sub> -L-Ala-Gly-KG   | 45       | 17          | Pol-OC-L-ThzMe <sub>2</sub> - $\beta$ -Ala-Gly-KG | 47       | 5           |
| Pol-OC-D-Lys-L-Ala-L-Lys-KG                 | 26       | 16          | Pol-OC-L-Leu-GABA-GABA-KG                         | 07       | 4.5         |
| Pol-OC-D-Leu-L-Ser-L-Ser-KG                 | 48       | 16          | Pol-OC-L-Leu-Gly-L-Phe-KG                         | 01       | -3          |
| Pol-OC-L-Leu-L-Tyr-L-Val-KG                 | 14       | 15          | Pol-OC-L-Leu-Gly-L-Ile-KG                         | 03       | -4          |
| Pol-OC-D-Lys-L-ThzMe <sub>2</sub> -L-Tyr-KG | 35       | 15          | Pol-OC-L-Leu-L-ThzMe <sub>2</sub> -L-Tyr-KG       | 16       | -10         |

Für die Inkubation mit dem (NBD-markierten) Tetrapeptid von K-Ras wurden 9 weitere Strukturvorschläge (Tab. 14) ausgewählt, wobei Pol-OC-D-Leu-L-Ser-L-Ser-KG schon als Strukturvorschlag aus der Untersuchung der kombinatorischen Bibliotheken gegen das Rheb-Peptid hervorging.

**Tab. 14:** Die auf Tentagel-Makrobeads nachsynthetisierten Rezeptoren (Schreibweise vom C- zum N-Terminus, C-terminaler Ester). 10 Beads wurden jeweils mit 2 mL 0.01  $\mu$ M NBD-markierten CaaX-Peptids von K-Ras (4-mer) in Puffer (5  $\mu$ M BisTris 10 % DMSO + 90 % H<sub>2</sub>O) inkubiert. \* = Die Zahl steht für die Chiffre des Versuchs PMD-125-03-. \*\* = Luminanzdifferenz. Pol = Tentagelpolymer mit HMBA-Linker.

| Rezeptorsequenz                            | Chiffre*  | $\Delta$ ** | Rezeptorsequenz                            | Chiffre*  | $\Delta$ ** |
|--|-----------|-------------|--|-----------|-------------|
| Pol-OC-D-Lys-GABA-L-Lys-KG                 | <b>70</b> | 110.5       | Pol-OC-D-Val-Inp-L-ThzMe <sub>2</sub> -KG  | <b>74</b> | 31.5        |
| Pol-OC-D-Lys-L-Lys-GABA-KG                 | <b>69</b> | 91          | Pol-OC-D-Arg-L-Tic-D-Ala-KG                | <b>67</b> | 24          |
| Pol-OC-D-Val-L-ThzMe <sub>2</sub> -Inp-KG  | <b>73</b> | 90          | Pol-OC-D-Val-L-ThzMe <sub>2</sub> -AC5C-KG | <b>71</b> | 9.5         |
| Pol-OC-D-Val-AC5C-L-ThzMe <sub>2</sub> -KG | <b>72</b> | 46          | Pol-OC-D-Arg-L-Tic-L-Ala-KG                | <b>66</b> | 3.5         |
| Pol-OC-D-Arg-L-Tic- $\beta$ -Ala-KG        | <b>68</b> | 36.5        |  |           |             |

Für das entsprechende CaaX-Peptid der CaaX-Box von H-Ras wurden weitere 14 Strukturvorschläge untersucht (Tab. 15).

**Tab. 15:** Die auf Tentagel-Makrobeads nachsynthetisierten Rezeptoren (Schreibweise vom C- zum N-Terminus, C-terminaler Ester). 10 Beads wurden jeweils mit 2 mL 0.01  $\mu$ M NBD-markierten CaaX-Peptids von H-Ras (4-mer) in Puffer (5  $\mu$ M BisTris 10 % DMSO + 90 % H<sub>2</sub>O) inkubiert. \* = Die Zahl steht für die Chiffre des Versuchs PMD-125-03-. \*\* = Luminanzdifferenz. Pol = Tentagelpolymer mit HMBA-Linker.

| Rezeptorsequenz             | Chiffre*  | $\Delta$ ** | Rezeptorsequenz             | Chiffre*  | $\Delta$ ** |
|-----------------------------|-----------|-------------|-----------------------------|-----------|-------------|
| Pol-OC-D-Thr-L-Phe-Inp-KG   | <b>60</b> | 126.5       | Pol-OC-D-Thr-L-Phe-AC5C-KG  | <b>56</b> | 111         |
| Pol-OC-D-Leu-L-Ser-L-Ser-KG | <b>48</b> | 124         | Pol-OC-D-Thr-L-Tic-L-Val-KG | <b>62</b> | 61          |
| Pol-OC-D-Thr-Inp-L-Phe-KG   | <b>58</b> | 122         | Pol-OC-D-Thr-D-Val-L-Tic-KG | <b>65</b> | 27.5        |
| Pol-OC-D-Thr-Inp-D-Phe-KG   | <b>59</b> | 120         | Pol-OC-D-Leu-L-Tic-Gly-KG   | <b>53</b> | 25.5        |
| Pol-OC-D-Thr-AC5C-D-Phe-KG  | <b>55</b> | 119         | Pol-OC-D-Thr-L-Val-L-Tic-KG | <b>64</b> | 20          |
| Pol-OC-D-Thr-D-Phe-Inp-KG   | <b>61</b> | 117.5       | Pol-OC-D-Thr-L-Tic-D-Val-KG | <b>63</b> | 19          |
| Pol-OC-D-Thr-D-Phe-AC5C-KG  | <b>57</b> | 111.5       | Pol-OC-D-Thr-AC5C-L-Phe-KG  | <b>54</b> | -11         |

Hierbei mussten zunächst die Konditionen der Inkubation optimiert werden: Bei dem Versuch, die Bedingungen des Bibliothek-Screenings auf das Nachscreening der ausgewählten Strukturvorschläge zu übertragen (1 mg Beads wurden mit 500  $\mu$ L 0.01  $\mu$ M NBD-markiertem CaaX-Peptid inkubiert), wurden nur geringe Differenzen in der Leuchtstärke gefunden (vor und nach der Inkubation). Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei der Inkubation der Bibliotheken jeweils eine Mischung aus 400 (festphasengebundenen) Rezeptoren eingesetzt wurde, von denen nur wenige eine überdurchschnittliche Leuchtstärke aufwiesen (siehe Abb. 74 und Tab. 11). Hiermit waren auch nur wenige Rezeptoren (~1-5 Stück) mit einer hohen Affinität zugegen. Beim Nachscreening sind jedoch (fast) nur Rezeptoren mit hoher Affinität vorhanden, was dazu führt, dass sich die (geringe) Stoffmenge des NBD-markierten Peptids über alle Beads verteilt (~100 Stück). Hieraus lässt sich folgern, dass das Verhältnis

Rezeptor / CaaX-Peptid bei dieser Inkubation zu groß ist und dass eine Anpassung im Sinne einer höheren CaaX-Peptid-Konzentration oder einer geringeren Anzahl der Rezeptor-Beads die Differenz der Leuchtstärke erhöht. Zwei Testversuche mit drei (festphasengebundenen) Rezeptoren wurden durchgeführt:

1.: Inkubation von 1 mg Rezeptor-Beads mit 200  $\mu\text{L}$  0.1  $\mu\text{M}$  NBD-markierter CaaX-Peptid-Lösung.

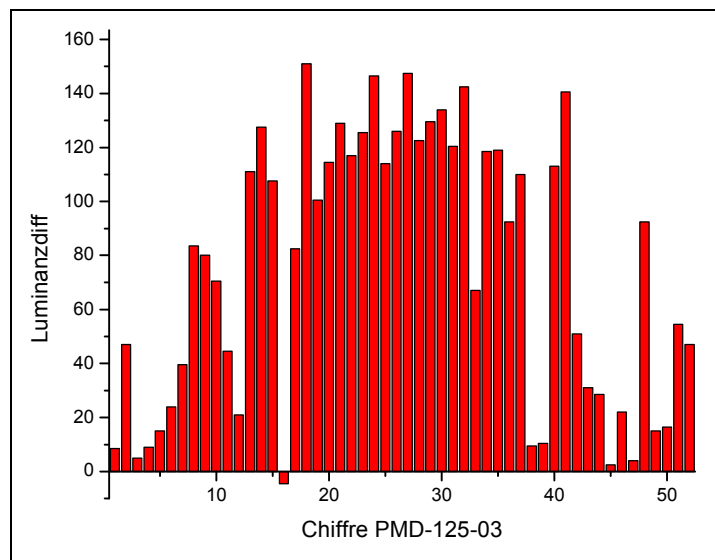
2.: Inkubation von 10 Rezeptor-Beads mit 2 mL 0.01  $\mu\text{M}$  NBD-markierter CaaX-Peptid-Lösung.

In beiden Fällen wurden Beads erhalten, die in Relation (vor und nach der Inkubation) einen eindeutigen Anstieg der Leuchtstärke (Fluoreszenz) aufwiesen. Damit war zum einen nachgewiesen, dass ausgewählte Strukturvorschläge, die aus der Analyse der inkubierten, kombinatorischen Rezeptorbibliotheken hervorgingen, vergleichbare Ergebnisse liefern. Zum anderen war hiermit auch die geringste, sinnvolle Konzentration für die Inkubation (des Nachscreenings) abgeschätzt worden: 0.01  $\mu\text{M}$ .

Zur Identifizierung der besten Rezeptoren werden die unterschiedlichen Leuchtstärken der fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen benutzt. Es bietet sich an, diese über ein "subjektives" Klassifizierungssystem (r. f. = 1-6) hinaus, zu quantifizieren. Hierzu wurden jeweils zwei Beads möglichst gleicher Größe unter Belichtung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$  fotografiert (Fluoreszenzmikroskop). Aus den so entstandenen, kreisförmigen Abbildungen der Beads werden dann rechteckige Ausschnitte kopiert und über eine Auswertung des Histogramms die Leuchtstärke der einzelnen Abbildungen bestimmt. Für die grafische Bestimmung der Leuchtstärke wurde ein Programm, das eigentlich zur Bildbearbeitung vorgesehen ist, benutzt (CorelPaintShopProX4). Dieses erlaubte die Analyse der Bildzusammensetzung und damit der Helligkeit der Abbildung. Bei der Bestimmung der Leuchtstärke einer Abbildung spielt die Größe des betrachteten Ausschnitts so gut wie keine Rolle. Testweise wurden größere und kleinere Bereiche eines Beads bestimmt: Die Abweichung in den numerischen Werten lag bei  $\leq 1$ . Unterschiede in der Größe der Abbildungen dürften also nur einen kleinen Einfluß haben.

Einige Beads zeigten bereits nach der Festphasensynthese, also vor der Inkubation mit den NBD-markierten Peptiden eine Fluoreszenz. Um eine klare Aussage bezüglich der unterschiedlichen Leuchtstärke zu treffen, wurde von allen

74 Rezeptoren zunächst ein Blindwert (vor der Inkubation) bestimmt. Die Blindwerte der jeweiligen Rezeptoren werden von den ermittelten Luminanzen nach Inkubation mit den NBD-markierten Peptiden abgezogen: Der erhaltene Wert wird im Folgenden als Luminanzdifferenz bezeichnet. Die nächste Abbildung zeigt die Verteilung der Luminanzdifferenz nach Inkubation mit dem NBD-markiertem 4er-Peptid von Rheb:

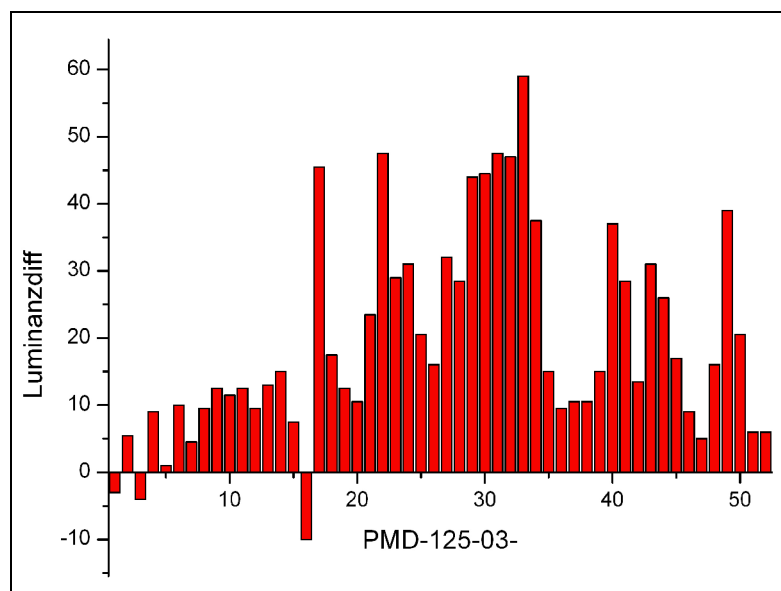


**Abb. 89:** Die Auftragung der ermittelten Luminanzdifferenzen gegen die Chiffre der festphasengebundenen Rezeptoren. Jeweils 10 Beads wurden mit 2 mL 0.01  $\mu\text{M}$  NBD-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CSVM-OH 16 h inkubiert.

Um die Ausbildung von Strukturclustern besser interpretieren zu können, wurden dreidimensionale Abbildungen der Luminanzdifferenz gegen die Aminosäuresequenz erstellt. Hierbei wurde die Abfolge der (C-terminal) zweiten und dritten Aminosäure (AS2, AS3) auf der Grundfläche abgebildet und die (C-terminal) erste AS auf dem jeweiligen Balken (Ordinate) markiert, dessen Größe den Wert der Luminanzdifferenz für einen Rezeptor angibt. Für das Screening der 4er- und 11er-CaaX-Box wurden 52 Rezeptoren untersucht, was in einer Abbildung zu einer unübersichtlichen Auftragung führt. Das Screening der 4er-CaaX-Box von Rheb wurde deshalb in zwei 3D-Diagrammen (Abb. 90, Abb. 91) wiedergegeben, die die Rezeptoren nach der Größe der Luminanzdifferenz ( $\leq 80$  und  $>80$ ) einteilt:



AC5C-KG (Chiffre **-18**) den größten Wert der Luminanzdifferenz (151). Der direkte Vergleich von *L/D*-Pro für die zweite Position (AS 2) lieferte für *L*-Pro den größeren Wert. Ebenso kann ein Vergleich von AC5C und Inp (Aminocyclopentancarbonsäure, 4-Piperidinyldicarbonsäure) gezogen werden, bei dem AC5C einen höheren Wert hervorrief. Ein weiterer Rezeptor, der einen relativ hohen Wert (147.5) hervorbrachte, war *D*-Lys-*D*-Ala-*L*-Lys-KG, bei dem *D*-Ala gegenüber den Kombinationen mit *L*- oder  $\beta$ -Ala an der zweiten Position (AS 2) zu besseren Werten führte. Bei den drei Rezeptoren *L*-ThzMe<sub>2</sub>-*L/D*/ $\beta$ -Ala-Gly-KG lieferte ebenfalls *D*-Ala an Position 2 den größten Wert (22) für die drei Sequenzen. Interessant sind auch die für die beiden Rezeptoren *L*-Leu-Gly-*L/D*-Phe-KG erhaltenen Werte, da *D*-Phe an der dritten Position (AS 3) zu einem moderaten Wert von 47 führte, *L*-Phe jedoch nur 8.5. Für die erste Position (AS 1) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Rezeptoren *L*-Leu-*L*-ThzMe<sub>2</sub>-*L*-Tyr-KG und *D*-Lys-*L*-ThzMe<sub>2</sub>-*L*-Tyr-KG ausgemacht werden, bei dem *D*-Lys einen Wert von 119 lieferte, *L*-Leu hingegen sogar einen negativen Wert von -4.5. Allgemein führte *D*-Lys an der ersten Position für das gesamte Screening zu besseren Werten als *L*-Leu, was bereits beim Betrachten der beiden Diagramme (Abb. 90, Abb. 91) offensichtlich wird. Die nächste Abbildung zeigt die Verteilung der Luminanzdifferenz nach Inkubation mit dem NBD-markiertem 11er-Peptid von Rheb:



**Abb. 92:** Die Auftragung der ermittelten Luminanzdifferenzen gegen die Chiffre der festphasengebundenen Rezeptoren. Jeweils 10 Beads wurden mit 2 mL 0.01  $\mu$ M NBD-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-ASQGKSSCSVM-OH 16 h inkubiert.

Die erhaltenen Werte waren bei diesem Screening durchweg kleiner als bei der

Inkubation mit dem entsprechenden 4er-Peptid von Rheb, was auf eine generelle, schwächere Bindung der Rezeptoren zum 11er-Peptid hindeutet. In Analogie zu dem zuvor beschriebenen Screening findet sich auch hier der Rezeptor *L*-Leu-ThzMe<sub>2</sub>-*L*-Tyr-KG mit dem kleinsten Wert, der mit -10 sogar noch ausgeprägter ist. Ebenso liefert *D*-Lys hier im direkten Vergleich den höheren Wert (15). Generell findet sich auch hier bei den Rezeptoren mit den größeren Werten fast ausschliesslich *D*-Lys an erster Position. Ebenso finden sich bei den Rezeptoren mit den tendenziell kleineren Werten bevorzugt *L*-Leu an erster Position.

Der Rezeptor *D*-Lys-*L*-Tic-*L*-Phe-KG lieferte bei diesem Screening den größten Wert (59).

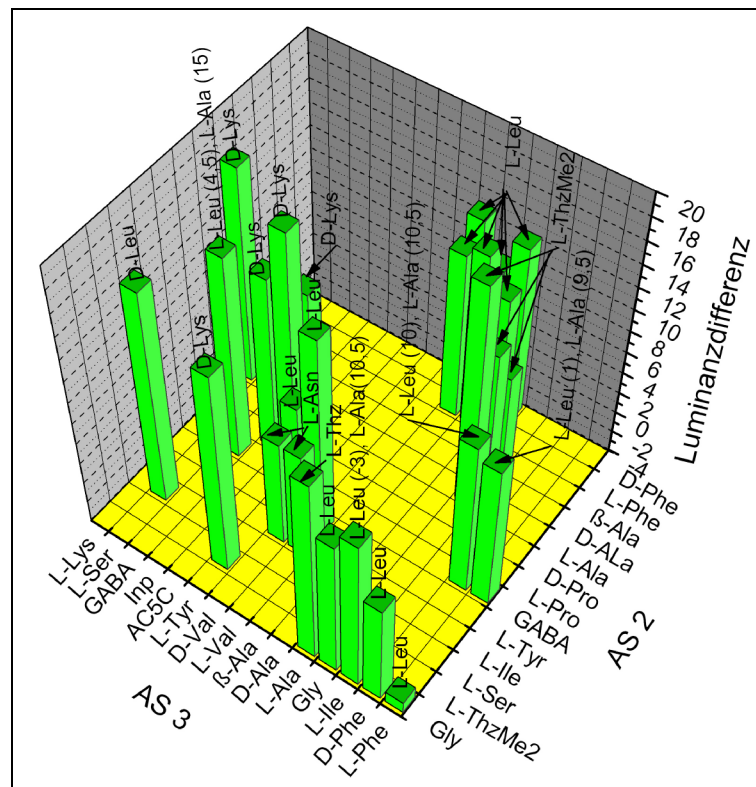


Abb. 93: Die 3D-Darstellung der Luminanzdifferenzen gegen die verwendeten AS der Rezeptoren (16 h Inkubation von 10 Beads mit jeweils 2 mL 0.01  $\mu$ M NBD-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-ASQGKSSCSVM-OH). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur Rezeptoren bis zu einer Luminanzdifferenz  $\leq 20$  gezeigt.

Wenn die Abweichung in den Screenings zwischen 4er- und 11er-Peptid lediglich auf eine generell schwächere Bindung zum 11er-Peptid zurückzuführen ist und die weiteren AS in der längeren Sequenz keinen Einfluss haben, sollte durch die Multiplikation der Werte für das Screening des 11er-Peptids eine Übereinstimmung mit denen des 4er-Peptids erreicht werden. Abb. 95 zeigt (links) den direkten Vergleich der beiden Inkubationen, in der rechten Abbildung wurden die Werte für

das 11er-Peptid mit dem Faktor 2.5 multipliziert.

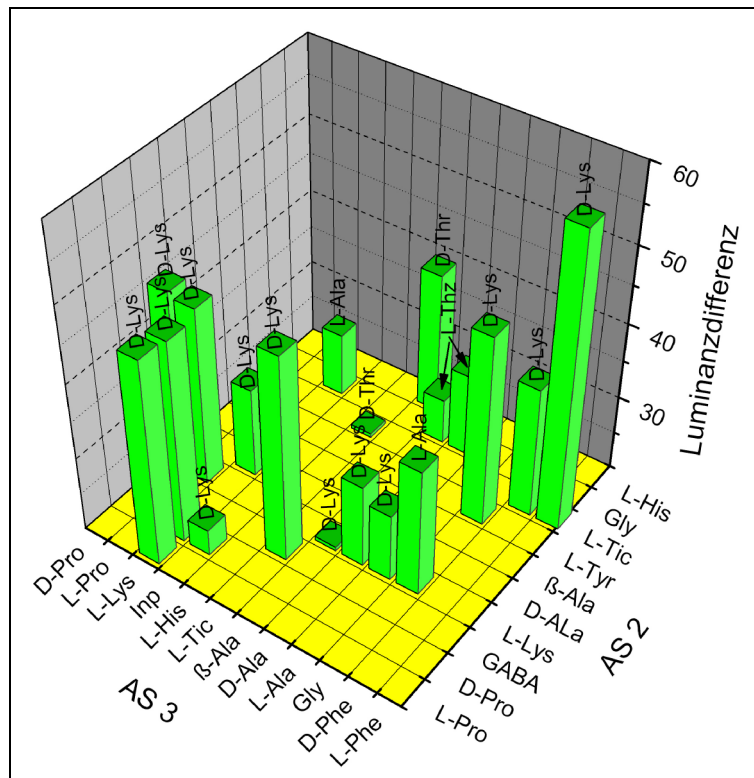


Abb. 94: Die 3D-Darstellung der Luminanzdifferenzen gegen die verwendeten AS der Rezeptoren (16 h Inkubation von 10 Beads mit jeweils 2 mL 0.01  $\mu\text{M}$  NBD-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-ASQGKSSCSVM-OH). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur Rezeptoren bis zu einer Luminanzdifferenz > 20 gezeigt.

Die erhaltenen Werte erweisen sich als nicht identisch, jedoch sind tendenziell viele Werte vergleichbar. Eine Erklärung für die Abweichungen könnten weitere Wechselwirkungen zwischen den Rezeptoren und den AS des 11er-Peptids ab Position 5 bis 11 (C-terminal) sein.

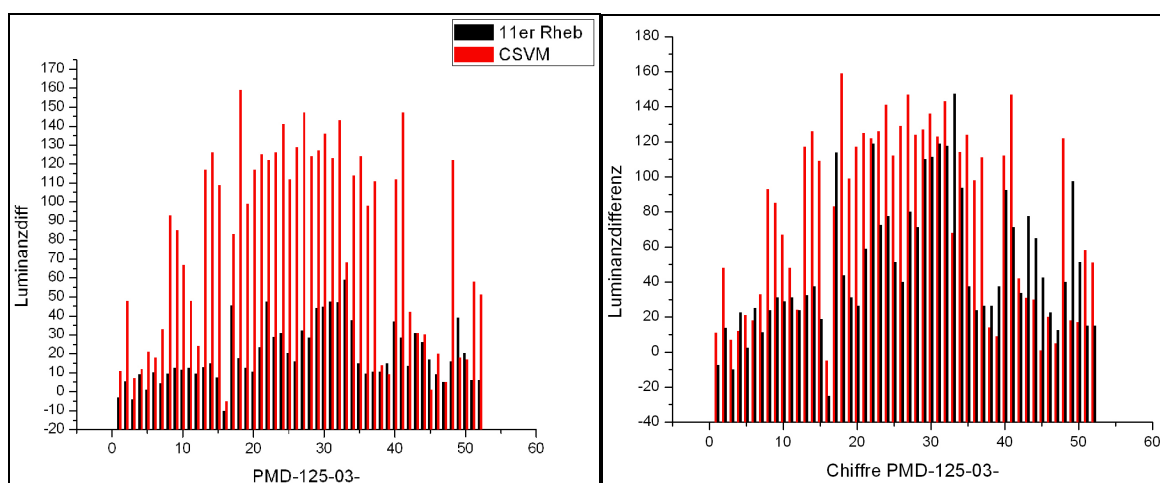
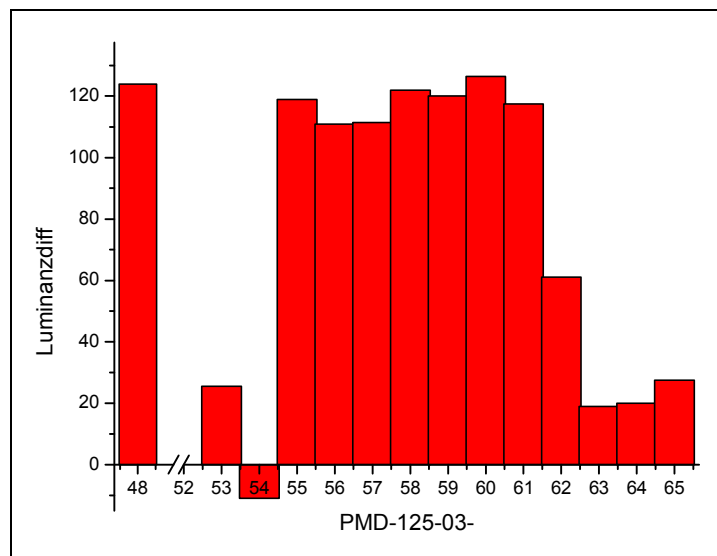


Abb. 95: Die vergleichenden Abbildungen der Luminanzdifferenzen aus den Inkubationen mit 0.01  $\mu\text{M}$  des NBD-markierten CaaX-Peptids (rot: 4er-Peptid schwarz: 11er-Peptid). In der rechten Abbildung sind die Werte für das 11er Peptid mit 2.5 multipliziert.



Denkbar wäre auch eine  $\pi$ -Kation-Wechselwirkung zwischen dem Lysin des CaaX-Peptids und dem NBD-Fluorophor, was eine veränderte Fluoreszenz zur Folge hat. Außerdem könnte die Guanidiniumfunktion der Kopfgruppe zum einen eine solche Wechselwirkung eingehen, zum anderen könnte sich ein Stapeleffekt ( $\pi$ - $\pi$ ) zwischen den beiden Aromaten (Kopfgruppe und NBD) ausbilden. Alle Fälle würden die lineare Struktur des CaaX-Peptids beeinflussen und die erhaltenen Unterschiede erklären. Die nächste Abbildung zeigt die Verteilung der Luminanzdifferenz nach Inkubation mit dem NBD-markiertem 4er-Peptid von H-Ras:



**Abb. 96:** Die Auftragung der ermittelten Luminanzdifferenzen gegen die Chiffre der festphasengebundenen Rezeptoren. Jeweils 10 Beads wurden mit 2 mL 0.01  $\mu$ M NBD-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CVLS-OH 16 h inkubiert.

Hierbei lieferte der Rezeptor *D*-Thr-*L*-Phe-Inp-KG den größten Wert (126.5). Generell ergaben die Rezeptoren PMD-125-03-55 bis -61 hohe Werte. Bei diesen findet sich stets *D*-Thr an Position 1 und Kombinationen von *L*/*D*-Phe und AC5C/*Inp* an Position 2 und 3. Bei den beiden diastereomeren Rezeptoren *D*-Thr-AC5C-*L*/*D*-Phe-KG führt *D*-Phe zu einem hohen Wert von 119, *L*-Phe verursacht an Position 3 einen negativen Wert von -11, scheint also für die Erkennung des CaaX-Peptids äußerst störend zu sein. Bei den beiden Diastereomeren *D*-Thr-*L*-Tic-*L*/*D*-Val-KG führt *L*-Val an der dritten Position zu einem höheren Wert (61) als *D*-Val (19).



Rezeptor aus dem Screening, verfügt aber über keine natürlich vorkommende Aminosäure, was ihn für eine eventuelle Anwendung unter physiologischen Gesichtspunkten hochinteressant macht.

Bei den drei Rezeptoren *D*-Arg-*L*-Tic-*L*/*D*/*β*-Ala-KG findet sich mit *β*-Ala an der dritten Position ein größerer Wert von 36.5 gegenüber *L*-Ala (3.5) und *D*-Ala (24).

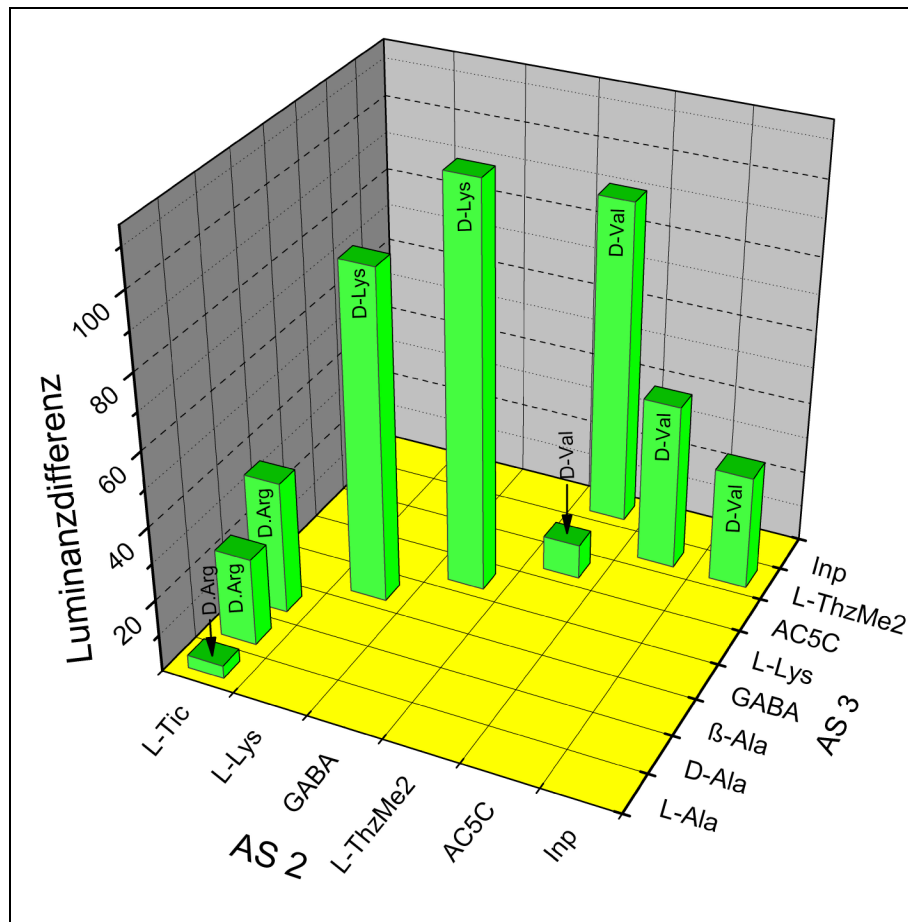


Abb. 99: Die 3D-Darstellung der Luminanzdifferenzen gegen die verwendeten AS der Rezeptoren (Inkubation von jeweils 10 Beads mit 2 mL 0.01  $\mu$ M NBD-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CVIM-OH).

Die erhaltenen Unterschiede (in allen vier Screenings) für die jeweiligen diastereomeren Rezeptoren deuten alle auf eine stereochemische Differenzierung zwischen den sich bildenden diastereomeren Komplexen aus den CaaX-Peptiden und den Rezeptoren hin.

#### 4.3.16 Fehlerbetrachtung des Screenings

Um für die Bestimmung der Luminanzdifferenz einen Fehler abzuschätzen, wurden von jeweils drei Rezeptoren drei Harzproben (je 10 Beads) mit der 4er-CaaX-Box von H-Ras sowie K-Ras inkubiert (0.01  $\mu$ M).

**Tab. 16: Die Tabelle zeigt die Fehlerbetrachtung am Beispiel von drei Rezeptoren:**

| Rezeptor (Chiffre)  | Mittelwert der Luminanz (+/- Standardabweichung) |
|---|--|
| <i>D</i> -Thr- <i>D</i> -Phe-AC5C-KG<br>(PMD-125-03-57)           | <b>139.5</b> +/- 2.2                             |
| <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -Phe-Inp-KG<br>(PMD-125-03-60)            | <b>148.8</b> +/- 4.4                             |
| <i>D</i> -Arg- <i>L</i> -Tic- <i>L</i> -Ala-KG<br>(PMD-125-03-66) | <b>144.7</b> +/- 3.7                             |

Nach Waschen der Proben mit Puffer wurde an 2 Beads jeder Harzprobe die Leuchtstärke bestimmt (6 Messwerte für jede Harzprobe). Hieraus läßt sich ein durchschnittlicher Fehler der Luminanzbestimmung von +/- 3.4 abschätzen. Da für die Luminanzdifferenz auch ein Blindwert gemessen wurde, multipliziert sich der Fehler mit 2, also folgt für den Fehler der Luminanzdifferenz ein Wert von +/- 6.8. Da in den vier durchgeführten Screenings auch ein negativer Wert von -11 vorkam (die Differenzen sollten keine negativen Werte annehmen), liegen die tatsächlich auftretenden Fehler höher als der Durchschnittswert von +/- **6.8**.

#### **4.3.17 HPLC-Analyse der nachsynthetisierten Verbindungen (PMD-125-03)**

Die insgesamt 74 parallel synthetisierten, festphasengebundenen Rezeptoren wurden auf ihre Reinheit hin untersucht: Hierzu wurde mit jeder Verbindung eine Testabspaltung von 10 mg des Harzes durchgeführt; Die erhaltenen 74 Rohprodukte wurden mittels HPLC-UV/ESI-MS untersucht. Tab. 17 fasst die gefunden, integralen Anteile der UV-Spuren der 74 Analysen zusammen. Da die Abpaltung mit *n*-Propylamin erfolgte, wurden hier die entsprechenden C-terminalen Propylamide erhalten.

Der Großteil der erhaltenen Rohprodukte wies hierbei einen Produktanteil über 50 % auf, 12 Rohprodukte besaßen eine Reinheit  $\geq 80$  %. Für einige der Verbindungen konnte die zugehörige Masse nicht gefunden werden (\*<sup>2</sup>): Dies waren bis auf zwei Ausnahmen die Schwefel-haltigen Thiazolidine, bzw. Dimethylthiazolidine.

**Tab. 17: Die integralen UV-Anteile der HPLC-UV/ESI-MS-Spektren. Angegeben ist jeweils die (C-terminal beginnende) AS-Sequenz, die Endung der Chiffre PMD-125-03- (fett markiert), sowie der integrale UV-Anteil. \* = 2 Signale mit gleicher Masse erhalten. \*<sup>2</sup> = Masse konnte nicht detektiert werden. \*<sup>3</sup> = schlecht zu integrierende Peakform; eventuell liegt ein geringerer Anteil vor.**

|   |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <i>L</i> -Leu-Gly- <i>L</i> -Phe-KG,<br><b>01</b> , 67 %                              | <i>L</i> -Leu-Gly- <i>D</i> -Phe-KG,<br><b>02</b> , 32 %                              | <i>L</i> -Leu-Gly- <i>L</i> -Ile-KG,<br><b>03</b> , 80 %   | <i>L</i> -Leu-Gly-Gly-KG,<br><b>04</b> , 59 %  |
| <i>L</i> -Leu-GABA- <i>L</i> -Phe-KG,<br><b>05</b> , 87 %                             | <i>L</i> -Leu-GABA- <i>D</i> -Phe-KG,<br><b>06</b> , 48 %                             | <i>L</i> -Leu-GABA-GABA-KG,<br><b>07</b> , 91 %  | <i>L</i> -Leu- <i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-KG,<br><b>08</b> , 82 %                    |
| <i>L</i> -Leu- <i>L</i> -Phe- <i>D</i> -Ala-KG,<br><b>09</b> , 71 %                   | <i>L</i> -Leu- <i>L</i> -Phe- $\beta$ -Ala-KG,<br><b>10</b> , 87 %                    | <i>L</i> -Leu- <i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-KG,<br><b>11</b> , 60 %                              | <i>L</i> -Leu- <i>D</i> -Phe- <i>D</i> -Ala-KG,<br><b>12</b> , 76 %                    |
| <i>L</i> -Leu- <i>D</i> -Phe- $\beta$ -Ala-KG,<br><b>13</b> , 85 %                    | <i>L</i> -Leu- <i>L</i> -Tyr- <i>L</i> -Val-KG,<br><b>14</b> , 63 %                   | <i>L</i> -Leu- <i>L</i> -Tyr- <i>D</i> -Val-KG,<br><b>15</b> , 69 %                              | <i>L</i> -Leu- <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> - <i>L</i> -Tyr-KG,<br><b>16</b> , 85 %    |
| <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Tyr-Gly-KG,<br><b>17</b> , 51 %                              | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro-AC5C-KG,<br><b>18</b> , 85 %                             | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro-Inp-KG,<br><b>19</b> , 53 %   | <i>D</i> -Lys- <i>D</i> -Pro-AC5C-KG,<br><b>20</b> , 75 %                              |
| <i>D</i> -Lys- <i>D</i> -Pro-Inp-KG,<br><b>21</b> , 76 %                              | <i>D</i> -Lys-GABA- <i>L</i> -Tic-KG,<br><b>22</b> , 65 %                             | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Lys- <i>L</i> -Ala-KG,<br><b>23</b> , 57 %                              | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Lys- <i>D</i> -Ala-KG,<br><b>24</b> , 51 %                    |
| <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Lys- $\beta$ -Ala-KG,<br><b>25</b> , 0 %* <sup>2</sup>       | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Ala- <i>L</i> -Lys-KG,<br><b>26</b> , 67 %                   | <i>D</i> -Lys- <i>D</i> -Ala- <i>L</i> -Lys-KG,<br><b>27</b> , 30 %                              | <i>D</i> -Lys- $\beta$ -Ala- <i>L</i> -Lys-KG,<br><b>28</b> , 54 %                     |
| <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Lys- <i>L</i> -Pro-KG,<br><b>29</b> , 66 %* <sup>3</sup>     | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Lys- <i>D</i> -Pro-KG,<br><b>30</b> , 52 %* <sup>3</sup>     | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Lys-KG,<br><b>31</b> , 53 %* <sup>3</sup>                | <i>D</i> -Lys- <i>D</i> -Pro- <i>L</i> -Lys-KG,<br><b>32</b> , 0 %* <sup>2</sup>       |
| <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Tic- <i>L</i> -Phe-KG,<br><b>33</b> , 45 %                   | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Tic- <i>D</i> -Phe-KG,<br><b>34</b> , 64 %                   | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> - <i>L</i> -Tyr-KG,<br><b>35</b> , 0 %* <sup>2</sup> | <i>L</i> -Ala-GABA- <i>L</i> -Phe-KG,<br><b>36</b> , 86 %                              |
| <i>L</i> -Ala-GABA- <i>D</i> -Phe-KG,<br><b>37</b> , 68 %                             | <i>L</i> -Ala-Gly- <i>L</i> -Ile-KG,<br><b>38</b> , 81 %                              | <i>L</i> -Ala-GABA-GABA-KG,<br><b>39</b> , 72 % oder 28 %*                                       | <i>L</i> -Ala- <i>L</i> -Lys-Gly-KG,<br><b>40</b> , 67 % oder 25 %*                    |
| <i>L</i> -Ala-Gly- <i>L</i> -Lys-KG,<br><b>41</b> , 15 %                              | <i>L</i> -Thz-Gly- <i>L</i> -Ala-KG,<br><b>42</b> , 0 %* <sup>2</sup>                 | <i>L</i> -Thz-Gly- <i>D</i> -Ala-KG,<br><b>43</b> , 0 %* <sup>2</sup>                            | <i>L</i> -Thz-Gly- $\beta$ -Ala-KG,<br><b>44</b> , 0 %* <sup>2</sup>                   |
| <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> - <i>L</i> -Ala-Gly-KG,<br><b>45</b> , 0 %* <sup>2</sup> | <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> - <i>D</i> -Ala-Gly-KG,<br><b>46</b> , 0 %* <sup>2</sup> | <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> - $\beta$ -Ala-Gly-KG,<br><b>47</b> , 0 %* <sup>2</sup>             | <i>D</i> -Leu- <i>L</i> -Ser- <i>L</i> -Ser-KG,<br><b>48</b> , 49 %                    |
| <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -His- <i>L</i> -Tic-KG,<br><b>49</b> , 65 %                   | <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -Tic- <i>L</i> -His-KG,<br><b>50</b> , 71 %                   | <i>L</i> -Asn- <i>L</i> -Ile- <i>L</i> -Val-KG,<br><b>51</b> , 66 %                              | <i>L</i> -Asn- <i>L</i> -Ile- <i>D</i> -Val-KG,<br><b>52</b> , 62 %                    |
| <i>D</i> -Leu- <i>L</i> -Tic-Gly-KG,<br><b>53</b> , 80 %                              | <i>D</i> -Thr-AC5C- <i>L</i> -Phe-KG,<br><b>54</b> , 39 %                             | <i>D</i> -Thr-AC5C- <i>D</i> -Phe-KG,<br><b>55</b> , 39 %  | <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -Phe-AC5C-KG,<br><b>56</b> , 92 %                              |
| <i>D</i> -Thr- <i>D</i> -Phe-AC5C-KG,<br><b>57</b> , 38 %                             | <i>D</i> -Thr-Inp- <i>L</i> -Phe-KG,<br><b>58</b> , 63 %                              | <i>D</i> -Thr-Inp- <i>D</i> -Phe-KG,<br><b>59</b> , 37 %   | <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -Phe-Inp-KG,<br><b>60</b> , 31 %                               |
| <i>D</i> -Thr- <i>D</i> -Phe-Inp-KG,<br><b>61</b> , 33 %                              | <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -Tic- <i>L</i> -Val-KG,<br><b>62</b> , 76 %                   | <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -Tic- <i>D</i> -Val-KG,<br><b>63</b> , 50 %                              | <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -Val- <i>L</i> -Tic-KG,<br><b>64</b> , 38 %                    |
| <i>D</i> -Thr- <i>D</i> -Val- <i>L</i> -Tic-KG,<br><b>65</b> , 56 %                   | <i>D</i> -Arg- <i>L</i> -Tic- <i>L</i> -Ala-KG,<br><b>66</b> , 20 %                   | <i>D</i> -Arg- <i>L</i> -Tic- <i>D</i> -Ala-KG,<br><b>67</b> , 20 %                              | <i>D</i> -Arg- <i>L</i> -Tic- $\beta$ -Ala-KG,<br><b>68</b> , 11 %                     |
| <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Lys-GABA-KG,<br><b>69</b> , 65 %                             | <i>D</i> -Lys-GABA- <i>L</i> -Lys-KG,<br><b>70</b> , 38 %                             | <i>D</i> -Val- <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> -AC5C-KG,<br><b>71</b> , 0 %* <sup>2</sup>           | <i>D</i> -Val-AC5C- <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> -KG,<br><b>72</b> , 0 %* <sup>2</sup> |
| <i>D</i> -Val- <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> -Inp-KG,<br><b>73</b> , 0 %* <sup>2</sup> | <i>D</i> -Val-Inp- <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> -KG,<br><b>74</b> , 0 %* <sup>2</sup> |  |  |

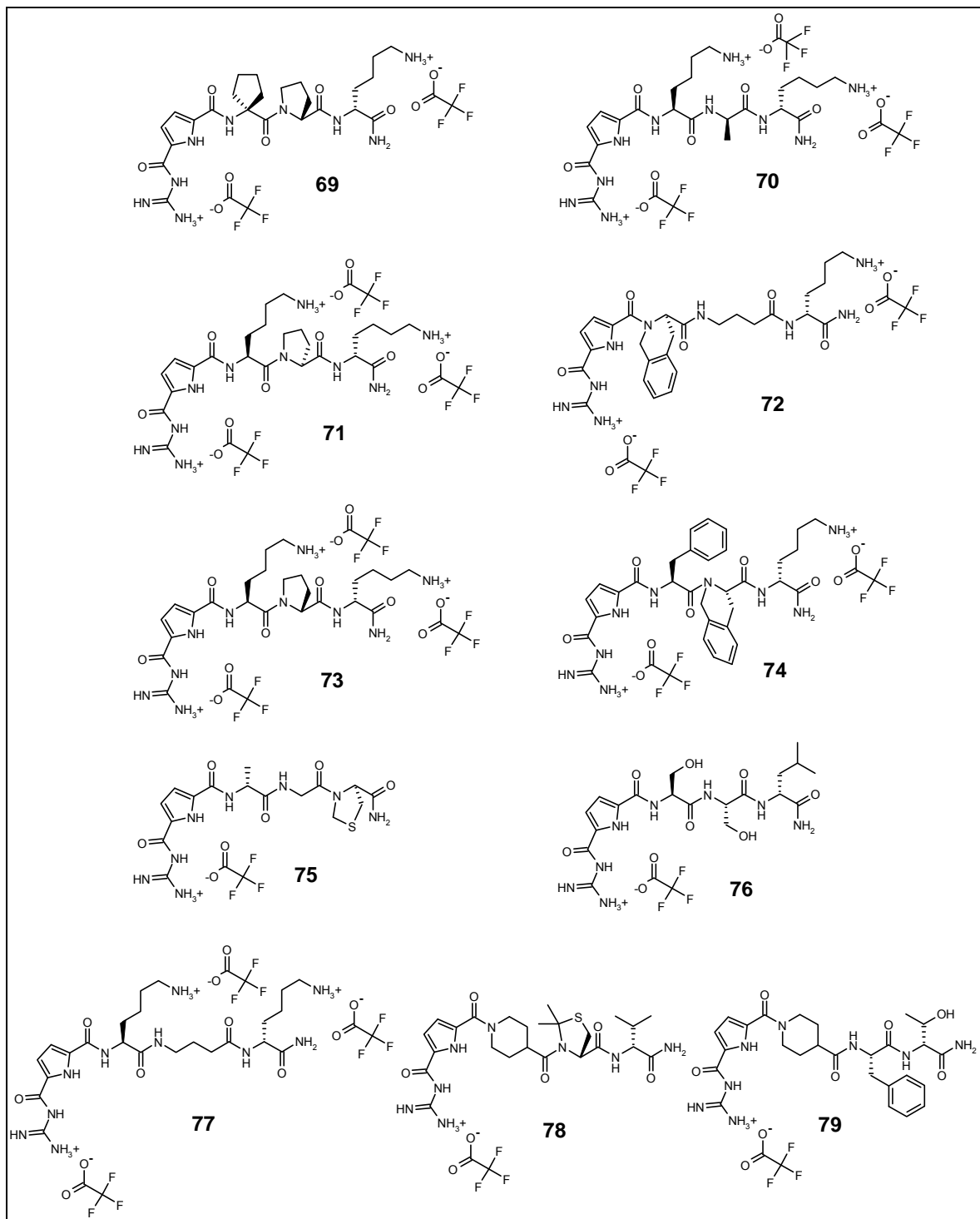
#### 4.3.18 Synthetisierte Hits aus dem Screening der 20 Bibliotheken (PMD-132 bis PMD-142)

Folgende elf Rezeptoren, die aus dem Screening der 20 Teilbibliotheken (insgesamt 8000 Verbindungen) resultierten, wurden in präparativen Mengen synthetisiert (durchschnittliche Menge pro Rezeptor: ~ 100 mg):

**Tab. 18: Die nachsynthetisierten Rezeptoren, die aus dem Screening (und der Analyse) der 20 kombinatorischen Bibliotheken (8000 Verb.) und dem Nachscreening der 74 Strukturvorschläge resultierten:**

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
| <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro-AC5C-KG<br>(Rheb)           | <i>D</i> -Lys- <i>D</i> -Ala- <i>L</i> -Lys-KG<br>(Rheb)       | <i>D</i> -Lys- <i>D</i> -Pro- <i>L</i> -Lys-KG<br>(Rheb) | <i>D</i> -Lys-GABA- <i>L</i> -Tic-KG<br>(Rheb)                   |
| <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Lys-KG<br>(Rheb) | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Tic- <i>L</i> -Phe-KG<br>(Rheb)       | <i>L</i> -Thz-Gly- <i>D</i> -Ala-KG<br>(Rheb)            | <i>D</i> -Leu- <i>L</i> -Ser- <i>L</i> -Ser-KG<br>(Rheb + H-Ras) |
| <i>D</i> -Lys-GABA- <i>L</i> -Lys-KG<br>(K-Ras)          | <i>D</i> -Val- <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> -Inp-KG<br>(K-Ras) | <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -Phe-Inp-KG<br>(H-Ras)           |  |

In Analogie zu Kapitel 4.3.9 wurden die präparativen Mengen der nachsynthetisierten Hits (elf Verbindungen) unter Verwendung eines Peptidsynthesizers hergestellt. Rohprodukte mit einer Reinheit  $\geq 95$  % (UV-Anteil) wurden direkt verwendet, in 3 von 11 Fällen mussten diese jedoch mittels präparativer HPLC gereinigt werden (nach Reinigung:  $\geq 95$  %).

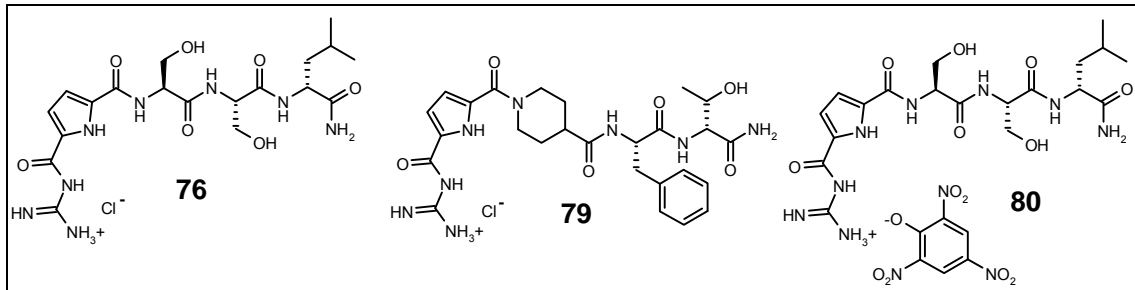


**Abb. 100:** Die nachsynthetisierten Rezeptoren aus dem Screening der CaaX-Peptide (Rheb, H-Ras, K-Ras) gegen 20 Bibliotheken zu je 400 Verbindungen. Die Synthese erfolgte als Festphasensynthese am Syntheseroboter Syro II auf Rink-Amid-Harz.

#### 4.3.19 Optimierung der Titrationsbedingungen

Den eigentlichen Bestimmungen der Assoziationskonstanten zwischen den Rezeptoren und den CaaX-Boxen gingen zunächst einige Optimierungen vorweg

(Vorexperimente). Hierbei wurde hauptsächlich der Rezeptor **76** benutzt, da dieser in den Fluoreszenzuntersuchungen (Nachscreening) sowohl für die K-Ras als auch H-Ras-CaaX-Box als geeignet erschien.



**Abb. 101: Die Rezeptoren, die für die Vorversuche verwendet wurden.**

OSPMD13901030 (Rez. **76**):

Zunächst wurde versucht, in Gegenwart von 6 mM BisTris-Puffer den Rezeptor **76** (Hydrochlorid) mit der als freien Säure vorliegenden CaaX-Box von H-Ras, Ac-CVLS-OH zu titrieren. Obwohl ein Puffer benutzt wurde, veränderte sich der pH-Wert, der Rezeptorlösung nach Zugabe der CaaX-Box von pH = 7.2 auf pH = 5.0. Durch die nachträgliche Zugabe von DIPEA (0.7  $\mu$ L) konnte der pH-Wert mit 7.35 wieder auf den annähernd ursprünglichen Wert eingestellt werden, jedoch verkleinerten sich die zuvor beobachteten Shifts von 0.25 auf verschwindend geringe 0.015 ppm. Das verwendete Lösungsmittel war 30 % d<sub>6</sub>-DMSO (aq).

OSPMD13901031 (Rez. **76**):

Der vorangegangene Versuch wurde mit einer höheren Puffer-Konzentration von 31 mM BisTris im gleichen Lösungsmittel wiederholt; hierbei zeigte sich jedoch nur, daß mehr Äquivalente der CaaX-Box nötig waren, um eine chemische Verschiebung der Signale hervorzurufen. Der ursprüngliche pH-Wert der Rezeptorlösung, der in diesem Experiment 8.06 betrug, wurde durch die Zugabe der CaaX-Box-Lösung auf pH = 6.51 erniedrigt. Durch das Zurückstellen mit DIPEA auf pH = 8.07 zeigte sich, dass die chemische Verschiebung der Signale wieder auf die Anfangswerte zurückfiel ( $\Delta\delta = 0.009$  ppm). In beiden Fällen ist es als wahrscheinlich anzusehen, dass die gefunden Verschiebungen lediglich auf pH-abhängige Effekte zurückzuführen sind, also die Protonierung der Kopfgruppe anzeigen und keine molekulare Erkennung durch die CaaX-Box.

OSPMD13901033 (Rez. **76**):



Als nächstes wurde versucht, die Messung mit einem höheren Anteil an  $d_6$ -DMSO durchzuführen, um so eine weniger kompetitive Umgebung für ionische Wechselwirkungen zu schaffen, was in höheren Assoziationskonstanten resultieren sollte. Zudem würde der Endpunkt der Titration mit weniger Äquivalenten erreicht werden, was zu einer kleineren Änderung des pH-Wertes führt.

Jedoch zeigte sich auch hier, dass sich der pH-Wert beim Erreichen des Endpunktes stark veränderte. Nachdem der pH-Wert wieder auf den Anfangswert nachgezogen wurde, war nur ein kleiner Shift von 0.055 ppm verblieben.

OSPMD13901034 (Rez. **76**):

Der Versuch OSPMD13901033 wurde invers durchgeführt: Die CaaX-Box wurde als gepufferte (6 mM BisTris, 60 %  $d_6$ -DMSO (aq)) Lösung vorgelegt und mit Aliquoten des Rezeptorchlorids versetzt. Da sonst immer die CaaX-Box zugegeben wurde, die als freie Säure vorliegt, sollte sich hier der pH-Wert durch die Titration wesentlich weniger verändern. Beide Lösungen wurden in gleichen Puffer angesetzt (6 mM BisTris in 60 %  $d_6$ -DMSO).

Der pH-Wert fiel durch die Titration von 7.13 auf 5.93 ( $\Delta\text{pH} = -1.2$ ). Auch nach dem Einstellen des pH-Werts (durch Zugabe von 0.5 M NaOH) auf die Anfangsbedingung (7.13) war ein Shift zu erkennen ( $\Delta\delta = 0.09$  ppm).

OSPMD13901035 (Rez. **76**):

In diesem Versuch wurde eine Lösung des Rezeptors vorgelegt und mit Aliquoten einer Lösung der CaaX-Box versetzt. Beide Lösungen waren in 6.22 mM BisTris in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq) und durch Zugabe von 0.1 M HCl (Rez.) bzw. 0.5 M NaOH (CaaX) vor der Titration auf pH = 6.0 eingestellt worden. Trotz vorher eingestellter pH-Werte kam es zu einer leichten Veränderung des pH-Wertes der Lösung von + 0.15. Hierbei konnten keinerlei Shifts des Rezeptors beobachtet werden. Auch durch Zugabe weiterer CaaX-Box und exaktem Einstellen des pH-Werts auf 6.0 (durch Zugabe von 0.1 M HCl) konnte kein Shift der Rezeptor-Signale beobachtet werden.

Dieses Ergebnis kann durch den Salzeffekt erklärt werden: Durch das Nachziehen, bzw. vorherige Einstellen der pH-Werte wurden insgesamt 31.9  $\mu\text{L}$  0.1 M HCl sowie  $\sim 10$   $\mu\text{L}$  0.5 M NaOH (von der CaaX-Lösung wurden 11.2  $\mu\text{L}$  zugegeben) gebraucht, was zur Bildung einer mindestens 5.8 mM NaCl-Lösung führt (überschüssige

Natriumsalze erhöhen ebenfalls die Ionenstärke). Es ist literaturbeschrieben, dass es durch den Salzeffekt zur einer Abnahme der Bindungskonstante kommen kann. Schmuck beschreibt, dass in einem Experiment durch die Gegenwart von 10 mM NaCl die  $K_A$  mindestens um Faktor 8 abnahm (von 7950 auf  $\leq 1000 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[99]</sup> Zudem kann sich die Präsenz des Puffers negativ auswirken. Titrationsexperimente, die mit einer erhöhten Pufferkonzentration durchgeführt werden, können zu schlechteren Assoziationskonstanten bei der molekularen Erkennung der Schmuckschen Kopfgruppe führen.<sup>[100]</sup>

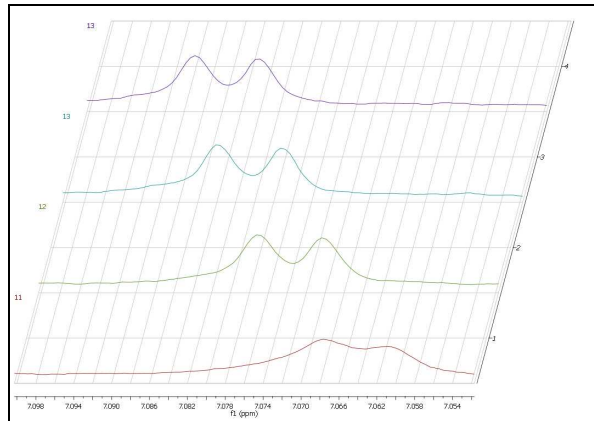
OSPMD13901036 (Rez. **76**):

Dieser Versuch wurde ohne die Verwendung eines Puffers durchgeführt. Die pH-Werte der vorgelegten Rezeptorlösung sowie der zugegebenen CaaX-Box wurden vor der Titration mit 0.5 M NaOH (Rez.) auf pH = 6.02 und 6.03 eingestellt. Nach erfolgter Titration stieg der pH auf 6.28. In diesem Versuch konnte keine Änderung der chemischen Verschiebungen der Rezeptorsignale beobachtet werden.

Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte der bereits vorher beschriebene Salzeffekt sein.

OSPMD14201031 (Rez. **79**):

Hierbei handelt es sich um ein Testexperiment, bei dem das Rezeptorchlorid **79** in einer gepufferten Lösung (6.2 mM BisTris in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq)) vorgelegt wurde und der pH-Wert durch Zugabe von 0.1 M HCl auf pH = 5.95 eingestellt wurde. Die Lösung des hinzutitrierten CaaX-Peptids wurde zuvor mit 0.5 M NaOH auf pH = 5.91 eingestellt. Der pH-Wert kann nach erfolgter Titration mit pH = 5.91 als nahezu unverändert angesehen werden. Die gemessene chemische Verschiebung des Signals (aromatisches Proton des Pyrrols) war mit 0.02 ppm relativ klein, aber durch den gleichgebliebenen pH-Wert signifikant. Da es sich hier um ein Testexperiment mit nur drei Zugaben handelte, erfolgte keine Berechnung einer  $K_A$ .

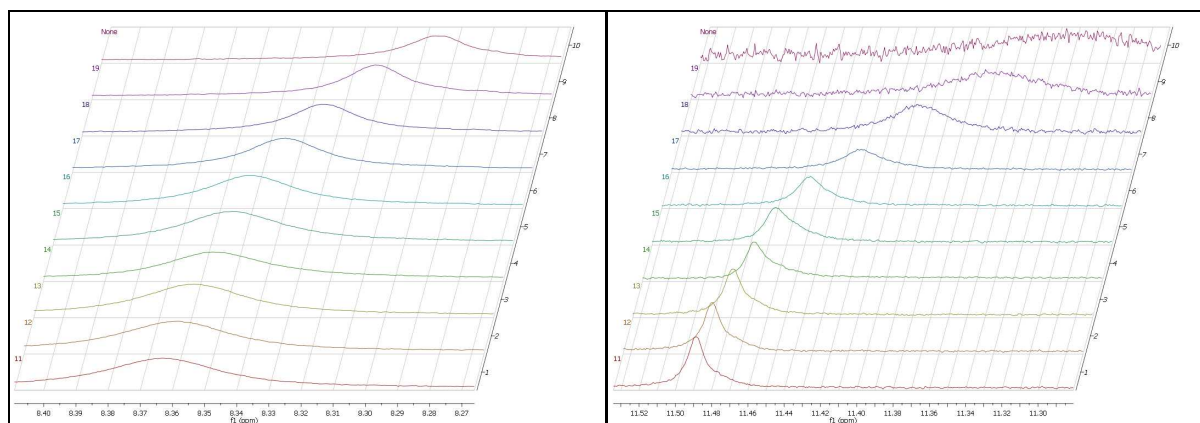


**Abb. 102: Die Testtitration OSPMD14201031 (Rez. 79):** Nach Einstellen der gepufferten Lösung auf pH = 6 kam es zu einem kleinen, aber eindeutigen Shift von 0.02 ppm.

OSPMD13901037 (Rez. 76):

Als nächstes wurden Versuche in reinem  $d_6$ -DMSO durchgeführt. Dieses weniger kompetitive Lösungsmittel ermöglicht hohe Assoziationskonstanten in Wirt-Gast-Komplexen von Carboxylaten mit der Schmuckschen Kopfgruppe ( $K_A > 10^5 \text{ M}^{-1}$  in 100 %  $d_6$ -DMSO und 90 %  $d_6$ -DMSO (aq)).<sup>[85,86]</sup>

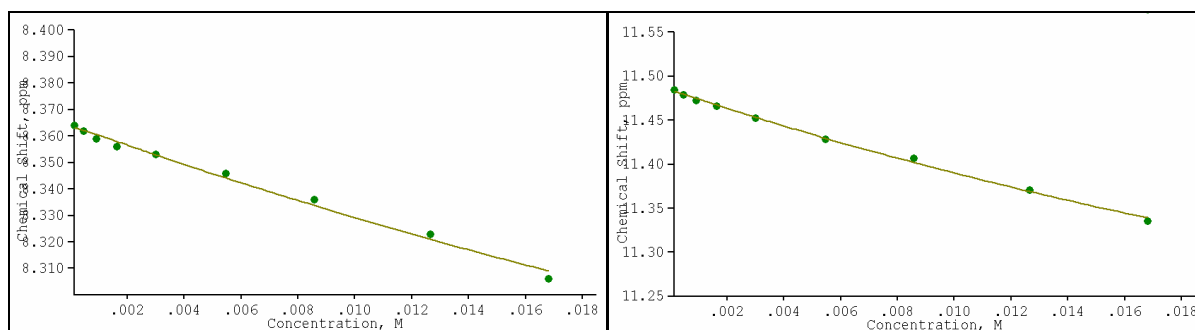
Für den Versuch wurde der Rezeptor als Chlorid vorgelegt und mit Aliquoten der CaaX-Box von H-Ras (Ac-CVLS-OH) als freie Säure versetzt (keine Verwendung von Puffer). Es konnte zwar eine Verschiebung der Rezeptorsignale beobachtet werden, jedoch konnte selbst durch die Zugabe von 19 Äquivalenten der CaaX-Box kein Endpunkt des Shifts erreicht werden. Dies deutet bereits auf eine sehr kleine Assoziationskonstante hin.



**Abb. 103 (links): Die Verschiebung des Guanidinium-Signals bei der NMR-Titration OSPMD13901037 ( $\text{H}_2\text{NRC}=\text{NH}$ )<sup>+</sup>. Rechts: Die Verschiebung des Guanidinamid-Signals bei der NMR-Titration von OSPMD13901037 (CO-NH)**

Unter diesen, offenbar sehr ungünstigen, Bedingungen konnte lediglich eine  $K_A$  von  $\sim 15 \text{ M}^{-1}$  berechnet werden. Für die Berechnung (Abb. 104) der Assoziationskonstante

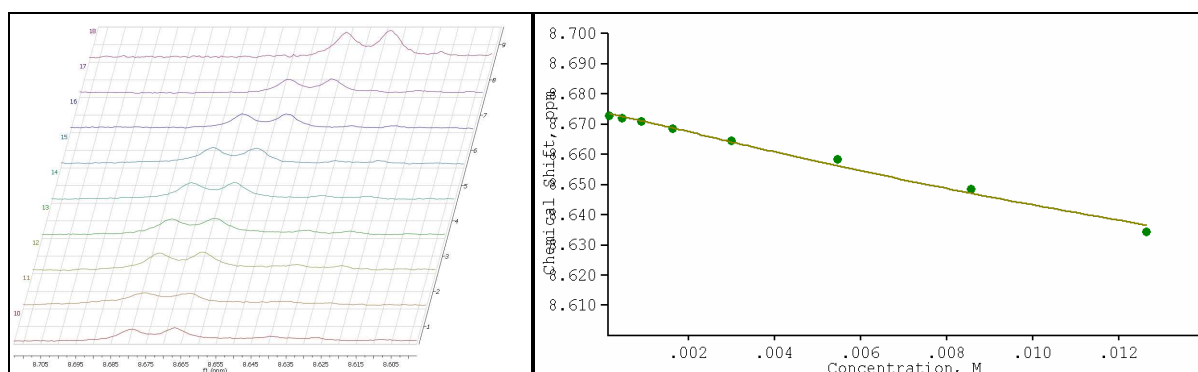
wurden die Verschiebungen (Abb. 103) des Guanidiniumions (8.35 ppm) sowie des Guanidiniumamid-Signals (CO-NH) der Kopfgruppe herangezogen.



**Abb. 104 (links):** Der Fitplot des Guanidinium-Signals bei der Berechnung mittels WINEQNMR2 (OSPMD13901037, H<sub>2</sub>NRC=NH)<sup>+</sup>; Ergebnis der Rechnung: 12 +/- 5 M<sup>-1</sup>. Rechts: Der Fitplot des Guanidinium-Amid-Signals der Berechnung mittels WINEQNMR2 (OSPMD13901037, H<sub>2</sub>NRC=NH)<sup>+</sup>; Ergebnis der Rechnung: 17 +/- 4 M<sup>-1</sup>.

OSPMD13901038 (Rez. 76):

Verbindung **76** ging aus den Fluoreszenzscreenings als Rezeptor für zwei CaaX-Boxen hervor. Der vorherige Versuch (OSPMD13901037) wurde deshalb mit der CaaX-Box von Rheb (Ac-CSVM-OH, als freie Säure) durchgeführt. In Folge der Titration "verschwanden" die Signale des Guanidiniumions sowie des Guanidiniumamids (konnten also nicht zur Auswertung herangezogen werden). Die Berechnung unter Verwendung eines Amid-NH-Signals ergab eine K<sub>A</sub> von ~ 20 M<sup>-1</sup>.

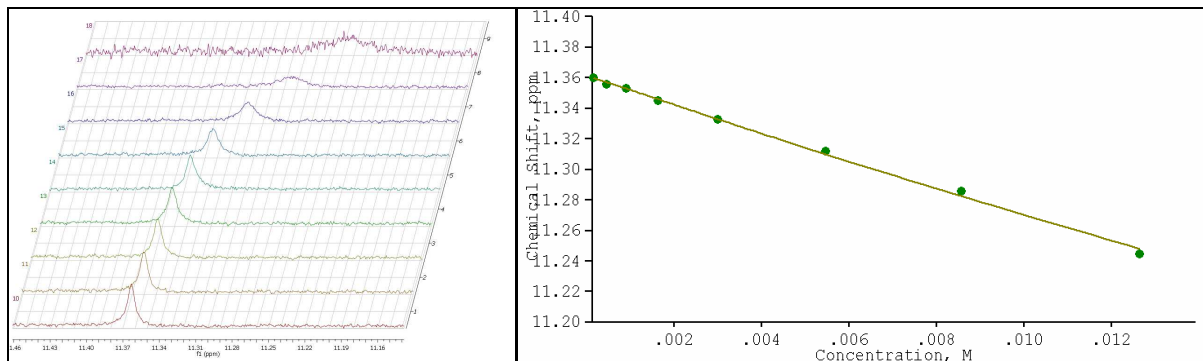


**Abb. 105 (links):** Der Shift des Amid-NHs -Signals bei der Titration OSPMD13901038. Rechts: Der Fitplot des Amid-NH-Signals der Berechnung mittels WINEQNMR2. Ergebnis der Berechnung: K<sub>A</sub> = 22 +/- 6 M<sup>-1</sup>.

OSPMD14201032 (Rez. 79):

Es wurde noch ein weiterer Rezeptor unter den gleichen Bedingungen wie bei OSPMD13901037 und OSPMD13901038 untersucht. Hierzu wurde der Rezeptor **79** (H<sub>2</sub>NOC-*D*-Thr-*L*-Phe-Inp-KG) (Abb. 10) als Hydrochlorid mit der CaaX-Box von

H-Ras (Ac-CVLS-OH, freie Säure) titriert. Infolge der Titration konnte ein Shift des Guanidiniumamids sowie des Guanidiniumkations beobachtet werden. Jedoch erwies sich das Signal des Kations als zu breit, um hiermit eine sinnvolle Auswertung durchzuführen. Die Auswertung des Guanidiniumamid-Signals lieferte eine Assoziationskonstante von  $K_A = 9 \pm 9 \text{ M}^{-1}$ .



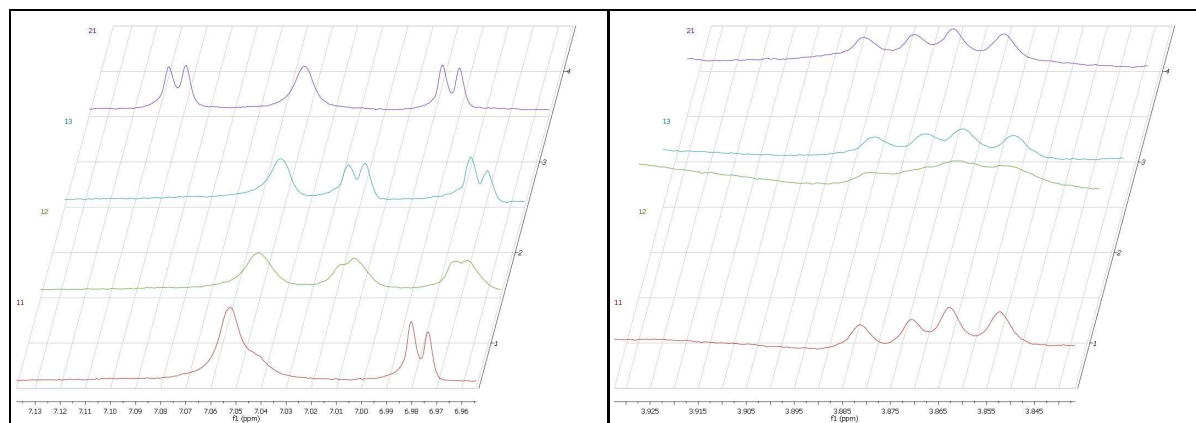
**Abb. 106 (links):** Der Shift des Guanidiniumamid-Signals bei der Titration OSPMD14201032. **Rechts:** Der Fitplot des Guanidiniumamid-Signals bei der Titration OSPMD14201032. Die Berechnung ergab eine  $K_A$  von  $9 \pm 9 \text{ M}^{-1}$ .

### Diskussion der Versuche OSPMD13901037, OSPMD13901038 und OSPMD-14201032:

Die Wechselwirkung zwischen dem jeweiligen C-terminalen Ende der CaaX-Peptide und der Kopfgruppe der Rezeptoren ist auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der protonierten Form des Guanidins sowie dem Carboxylat zurückzuführen. Durch Hinzufügen einer Lösung der freien Säure zu einer ungepufferten Lösung des protonierten Rezeptors liegt das Carboxylat zum einen durch Eigendissoziation der freien Säure vor ( $\text{RCO}_2\text{H} \rightleftharpoons \text{RCO}_2^- + \text{H}^+$ ). Zum anderen können auch die schwach basischen Amid-Stickstoffatome der Peptidbindungen und das NH des Pyrrols (der Kopfgruppe des Rezeptors) protoniert werden. Der  $\text{p}K_A$ -Wert von Essigsäure in DMSO ist  $12.6^{[101,102]}$ , der von Formamid (in DMSO) hingegen  $23.5^{[101,103]}$  und damit vergleichbar mit dem von Pyrrol (23 in DMSO<sup>[101,104]</sup>). Demzufolge liegt das zugegebene CaaX-Peptid überwiegend in Form der Säure vor und nur ein kleiner Teil des, im Gleichgewicht vorliegenden, Carboxylats kann zur molekularen Erkennung beitragen. Deshalb erscheinen die Assoziationskonstanten sehr klein: Das untersuchte System ist also zur Berechnung ungeeignet.

OSPMD14601071 (Rez. **80**):

Als nächstes wurde ein Testversuch durchgeführt, bei dem das Pikratsalz des Rezeptors **76**, PMD1460107 (Rez. **80**) in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq) vorgelegt wurde und mit Aliquoten des käuflichen TMA-Acetats versetzt wurde. Hierbei wurde auch nach dem Einstellen des pH-Werts (nach Zugabe von 4 Äq.  $\text{TMA}^+ \text{OAc}^-$ ) ein eindeutiger Shift von 0.06 ppm festgestellt (arom. Protonen des Pyrrols). Zudem zeigte sich ein kleiner Shift bei dem Methylen-Signal einer Ser-Seitenkette. Aufgrund dieses Vorversuchs wurden die weiteren Titrations mit den Pikratsalzen der Rezeptoren, sowie den TMA-Salzen der CaaX-Peptide durchgeführt (Kapitel 4.3.20). Ein ähnliches System, bestehend aus Rezeptorpikraten und TMA-Salzen *N*-Acetylierter Aminosäuren in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq), wurde bereits von Schmuck beschrieben.<sup>[85]</sup>



**Abb. 107 (links):** Die Testtitration OSPMD14601071 (Verbindung **80**): Durch Zugabe von TMAOAc zu einer Lösung des Rezeptorpikrats kam es nach Einstellen des pH-Wertes (Spektrum 4) zu einem signifikanten Shift von 0.06 ppm. Rechts: Das Methylen-Signal einer Ser-Seitenkette zeigt nach Einstellen des pH-Wertes (Spektrum 4) einen kleinen Shift (OSPMD14601071) (Verbindung **80**).

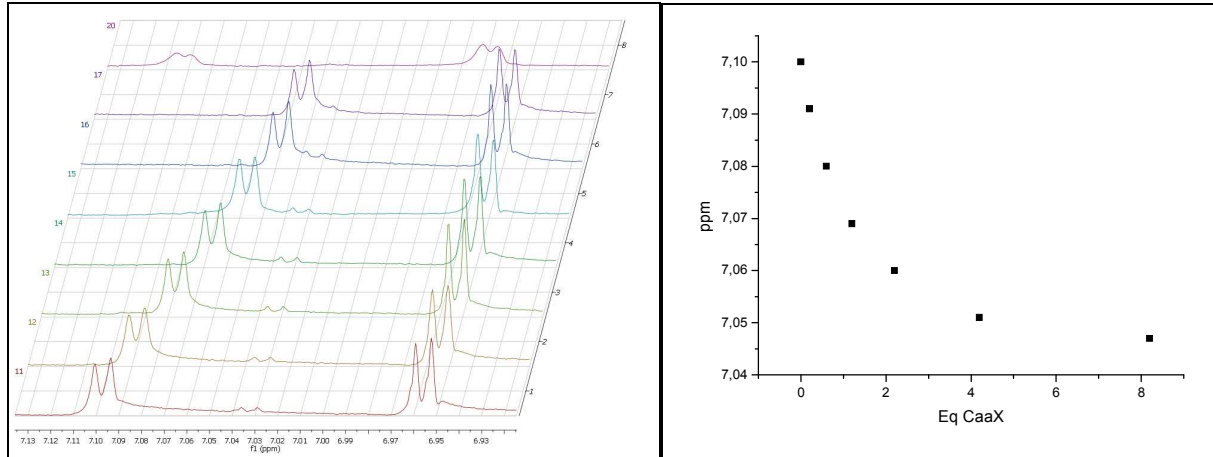
OSPMD15201011 (Rez. **81**):

Bei diesem Versuch wurde das Rezeptorpikrat in  $d_3$ -ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1 vorgelegt und mit Aliquoten einer TMA-CaaX-Box-Lösung versetzt. Kurz nach der letzten Messung (Exp. 17) der Titration fiel ein farbloser Feststoff aus der vorher homogenen Probenlösung aus.

Die Probe wurde anschließend mit kaltgesättigter Pikrinsäurelösung auf den Anfangs-pH-Wert gebracht (pH = 5.20). Beim anschließend gemessenen Spektrum (die Probe war eine Suspension) fielen die Signale fast auf die Werte des ersten Experiments zurück.

Da es sich bei dem ausgefallenen Feststoff um den Wirt-Gast-Komplex handeln konnte (der für weitere Untersuchungen hochinteressant ist), wurde dieser näher

untersucht: Die NMR-Probe wurde zentrifugiert, mit etwas ACN/H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und charakterisiert. Die Analyse ergab jedoch, dass es sich hierbei um das CaaX-Peptid handelte.



**Abb. 108 (links):** Die NMR-Spektren der Titration OSPMD15201011, Exp. 1: ohne Zugabe, Exp. 2-Exp. 7: steigender Anteil an CaaX-Box, Exp. 8: Probe nach Präzipitation und pH-Wert-Korrektur (durch Zugabe von Pikrinsäurelösung). Rechts: Die Bindungsisotherme der Titration OSPMD15201011.

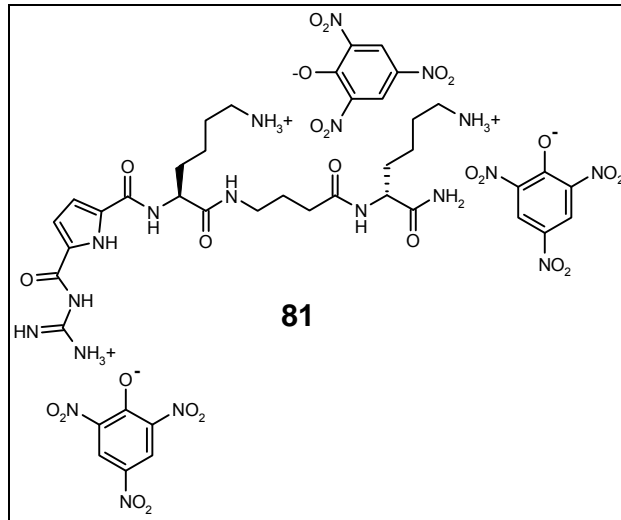
Die Berechnung der Assoziationskonstante ergab eine  $K_A$  von 990 +/- 85. Der Einfluss des pH-Wertes lässt sich hier schlecht einschätzen, da sich mit dem Ausfallen des CaaX-Peptids die Zusammensetzung der NMR-Probe änderte. Fällt das CaaX-Peptid aus, muß die chemische Verschiebung wieder dem Anfangswert ähneln, da weniger Äquivalente der CaaX-Box im Gleichgewicht vorliegen.

OSPMD15201012 (Rez. **81**):

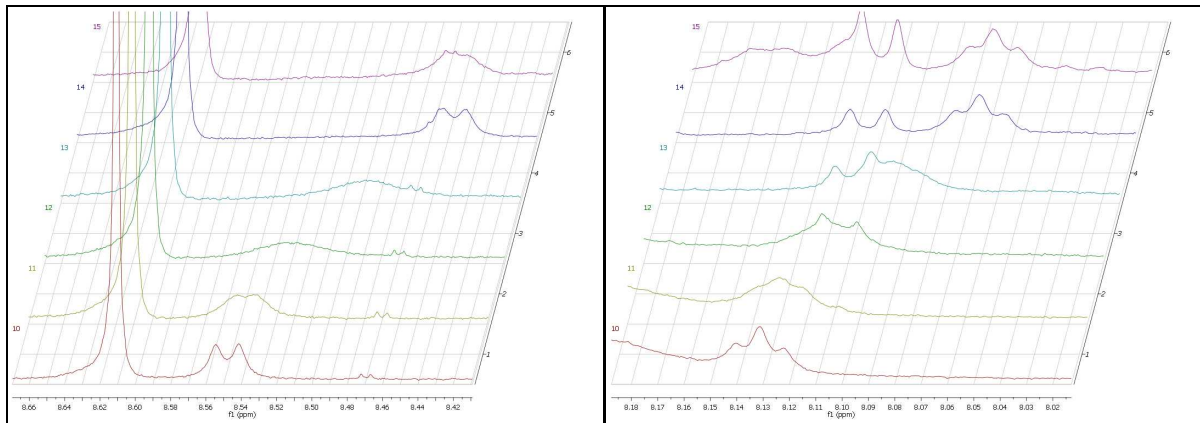
In diesem Versuch wurde das Pikratsalz des Rez. **77**, **81** und das zweifache TMA-Salz des K-Ras CaaX-Peptids in reinem d<sub>6</sub>-DMSO ohne Puffer eingesetzt. Durch die Zugabe von 2 Äq. der CaaX-Box kam es zu Shifts bei 4 Rezeptor-signalen um 0.08 (Amid-NH), 0.33 (arom. Pyrrol-CH), 0.06 (Amid-NH) und 0.03 ppm (H<sub>α</sub>-CH). Die folgenden Abbildungen zeigen eine Zusammenstellung der markant shiftenden Signale (Abb. 110, Abb. 111).

Durch Auftragung der chemischen Verschiebungen eines shiftenden NMR-Signals gegen das Verhältnis der Konzentrationen von CaaX-Box zu Rezeptor (Äq. CaaX) wurde die Bindungsisotherme der zugehörigen Titration erhalten.

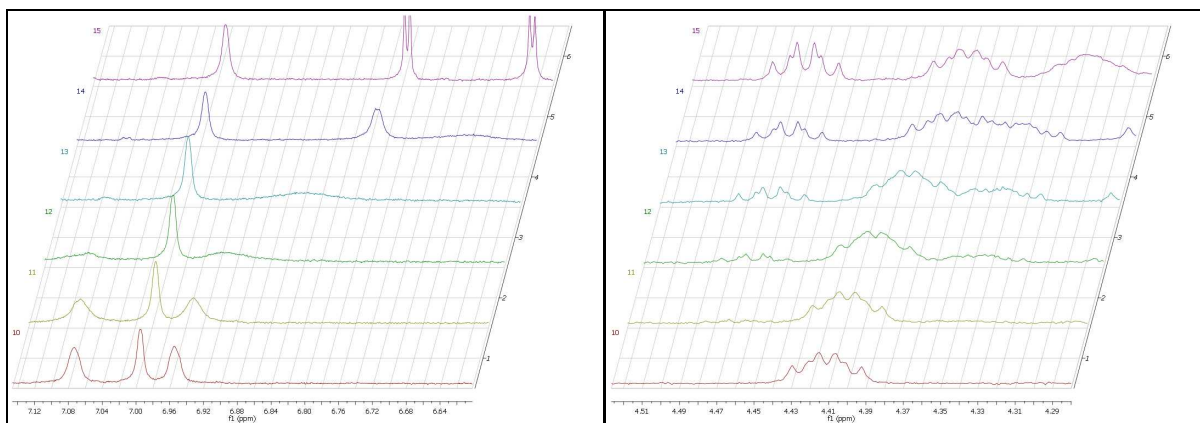




**Abb. 109: Das Rezeptor-Pikratsalz 81 (PMD-152-01-01).**



**Abb. 110 (links): Die Ausschnittsvergrößerung der NMR-Titration OSPMD15201012 (Rez. 81 in 100 %  $d_6$ -DMSO) für ein Amid-NH. Rechts: Die Vergrößerung der NMR-Titration für ein weiteres Amid-NH).**

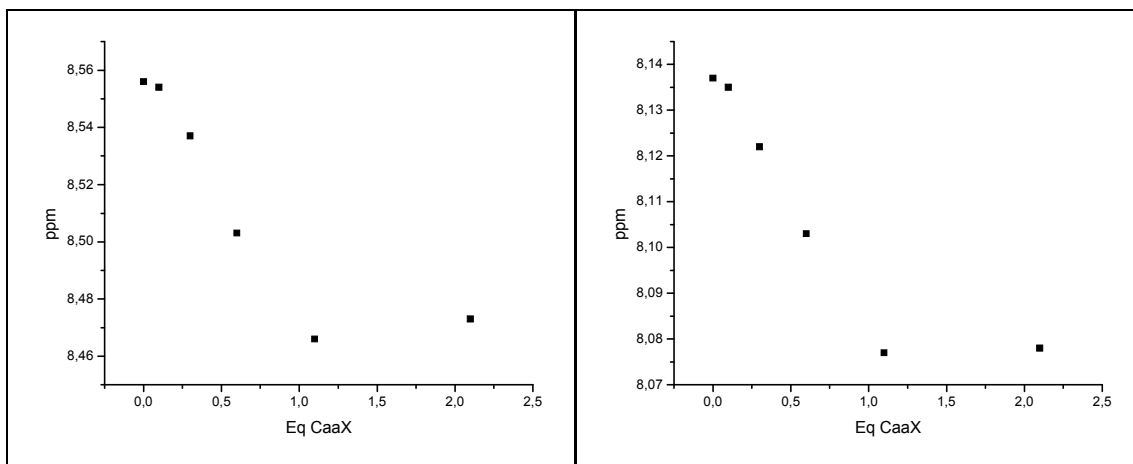


**Abb. 111 (links): Die Vergrößerung der NMR-Titration OSPMD15201012 (Rez. 81 in 100 %  $d_6$ -DMSO) für ein aromatisches CH (Pyrrol). Rechts: Die Vergrößerung der NMR-Titration für ein  $H\alpha$ -CH.**

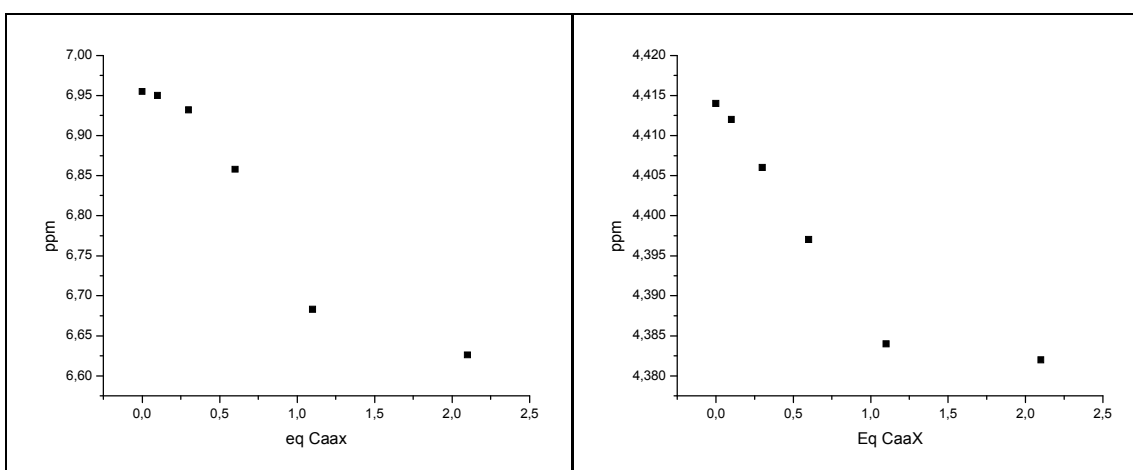
Aus den vier in Abb. 112 und Abb. 113 gezeigten Bindungsisothermen läßt sich der Endpunkt der Shifts mit 1 bis 1.5 Äquivalenten der CaaX-Box abschätzen. Dies ist



ein Hinweis auf die vermutete 1:1-Bindungsstöchiometrie des gebildeten Komplexes, zudem kann hier bereits auf eine recht große Assoziationskonstante geschlossen werden.



**Abb. 112 (links):** Die Bindungsisotherme für ein Amid-NH der Titration OSPMD15201012 (Rez. 81). **Rechts:** Die Bindungsisotherme für ein weiteres Amid-NH der Titration OSPMD15201012 (Rez. 81).



**Abb. 113 (links):** Die Bindungsisotherme für ein arom. CH der Titration OSPMD15201012 (Rez. 81). **Rechts:** Die Bindungsisotherme für ein H $\alpha$ -CH der Titration OSPMD15201012 (Rez. 81).

Aus drei der vier Bindungsisothermen ließ sich mittels WINEQNMR2 die zugehörige  $K_A$  berechnen (die erhaltenen Werte waren jedoch abhängig von den Startparametern und damit nicht verlässlich).

Die Vorgehensweise der Berechnung wird im Folgenden kurz erläutert: Für jede Messung muss ein input- und ein outputfile (Textdateien) generiert werden. Das inputfile enthält die zur Berechnung nötigen Daten. Hierzu zählt für jeden Schritt der Titration: Die Konzentration von Wirt und Gastmolekül (in mol/L) und die chemische Verschiebung eines beobachteten Signals (in ppm). Zudem müssen Startparameter

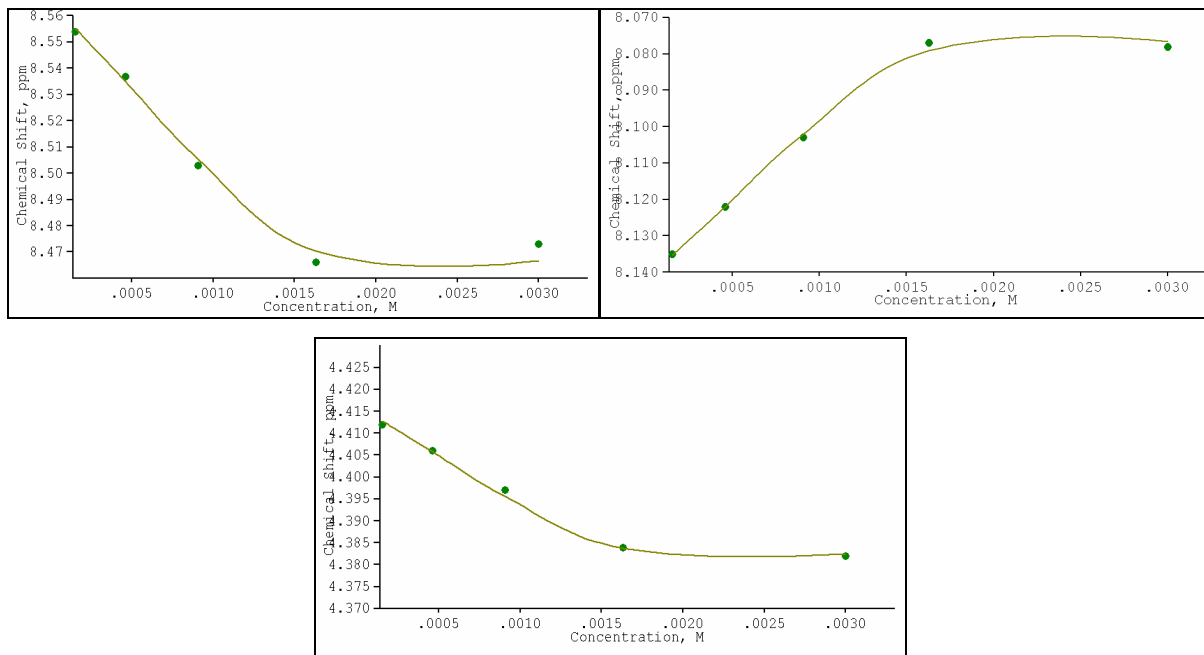
definiert werden, die eine abgeschätzte Assoziationskonstante ( $K_1$  in L/mol), die chemische Verschiebung der freien, unkomplexierten Spezies (Verschiebung des beobachteten Signals in ppm) und die chemische Verschiebung der (vollständig) komplexierten Spezies (den extrapolierten Endpunkt der Titration) in ppm enthalten. Das Programm berechnet die Werte durch Variation dieser drei Parameter. Sind die Parameter ungünstig (falsch) gewählt, kommt es zum Abbruch der Berechnung.<sup>[83]</sup> Zusätzlich erfolgt die Angabe der Gesamtzahl der Titrationsschritte, die Angabe der maximalen Iterationen (Standardeinstellung (NITER): 200), sowie die Toleranz der Quadratsummen (TOLSQ). TOLSQ definiert ebenfalls die maximal durchzuführenden Iterationen: Ist die, infolge der Kurvenanpassung, erreichte Änderung der Quadratsummen der letzten Iteration kleiner als TOLSQ, gilt die Berechnung als beendet (Standardeinstellung: 0.01, entsprechend einer 1%-igen Änderung der Quadratsummen).<sup>[83]</sup>

Im Bereich sehr großer Assoziationskonstanten ( $>10^5$ ) gestaltet sich die Berechnung aufgrund des steilen Kurvenverlaufs als sehr schwierig.<sup>[81]</sup> Wird die vermutete  $K_A$  (Startparameter) auf  $10^5$  gesetzt, resultieren folgende Ergebnisse:

**Tab. 19: Die berechnete  $K_A$  für die Titration OSPMD15201012 (Rez. 81). Für ein Signal (6.955 ppm) ist der berechnete Fehler 3-fach so groß wie der berechnete Wert; dieser wurde nicht mit in die Tabelle genommen.**

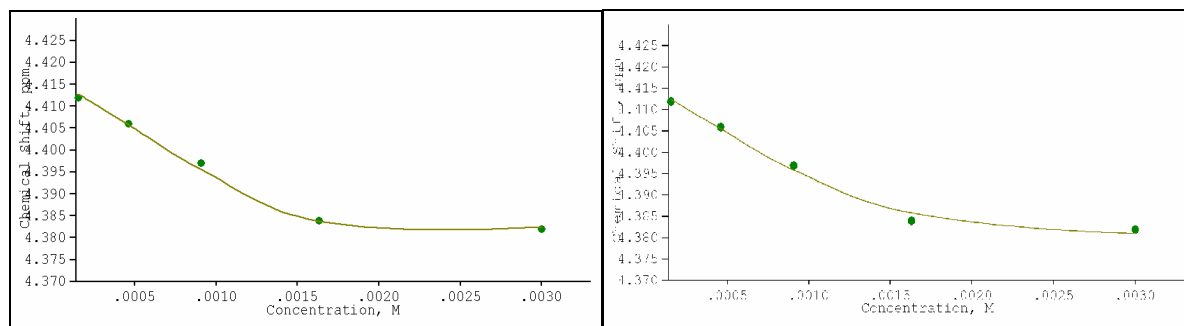
| Signal [ppm] | $K_A [M^{-1}]$                      |
|--------------|-------------------------------------|
| 8.556        | $9.9 \cdot 10^4 \pm 2.3 \cdot 10^3$ |
| 8.137        | $1 \cdot 10^5, \pm 2 \cdot 10^3$    |
| 6.955        | Fehler größer als Wert              |
| 4.414        | $1 \cdot 10^5 \pm 1.1 \cdot 10^3$   |

Nachfolgend sind die Fitplots der Rechnungen abgebildet, die Aufschluß darüber geben, wie gut sich der theoretische Kurvenverlauf (Linie) durch Iteration der Parameter (Endpunkt der Titration, Bindekonstante) an die Meßdaten (Punkte) anpassen ließ:



**Abb. 114 (links oben):** Der Fitplot der WINEQNMR2-Rechnung für das Amid-NH bei 8.556 ppm (Rez. 81). **Rechts oben:** Der Fitplot der WINEQNMR2-Rechnung für das Amid-NH bei 8.137 ppm. **Unten:** Der Fitplot der WINEQNMR2-Rechnung für das H<sub>α</sub>-CH bei 4.414 ppm.

Werden als Startparameter kleinere Werte der Assoziationskonstante ( $K_1$ ), z. B.  $10^4$  vorgegeben, resultiert zwar auch  $\sim 10^4$  als Ergebnis, jedoch ist der zugehörige Fitplot wesentlich schlechter und der Kurvenverlauf im Bereich des Endpunktes gekrümmt. Die  $K_A$  für diese Titration lässt sich also mit  $\geq 10^5$  abschätzen. Das beschriebene Problem trat bei 11 von 12 NMR-Titrationen in reinem d<sub>6</sub>-DMSO auf (Kapitel 4.3.20).



**Abb. 115:** Der Vergleich zweier Fitplots für die Titration OSPMD15201012 (Rez. 81). **Links:** Der Fitplot für eine Start- $K_A$  von  $10^5$  (aus Abb. 114). **Rechts:** Der Fitplot für eine Start- $K_A$  von  $10^4$ .

Das beschriebene Testsystem lieferte die besten Assoziationskonstanten, weshalb die restlichen Rezeptoren unter möglichst gleichen Bedingungen gemessen wurden. Hierzu war es nötig, die Rezeptoren in Form ihrer Pikratsalze zu erhalten. Um den Anteil an freier Pikrinsäure möglichst klein zu halten, sollte also jeder basischen, einfach positiv geladenen Funktion (Ammonium, Guanidinium) ein Äquivalent Pikrat

entsprechen. Ebenso sollten die CaaX-Peptide, entsprechend ihrer Anzahl an sauren Funktionen (Thiol, Carbonsäure) in Form ihrer (stöchiometrischen) Tetramethylammoniumsalze vorliegen. Die entsprechenden Salze wurden synthetisiert und die Ergebnisse der NMR-Titrationsen in Kapitel (4.3.20) zusammengefasst.

#### 4.3.20 NMR-Titrationsen an den Rezeptoren 69 bis 79

Auf Basis der in Kapitel 4.3.15 gezeigten Luminanzuntersuchungen wurden insgesamt 11 Rezeptoren für die Synthese von präparativen Mengen ausgewählt. Hierbei entfielen 7 auf das Screening der Rheb-CaaX-Box und jeweils zwei auf die Screenings der CaaX-Boxen von H-Ras und K-Ras. Die Auswahl erfolgte zum einen nach der größten Luminanzdifferenz für die jeweiligen Strukturvorschläge eines einzelnen Beads, zum anderen wurden auch Strukturen ausgewählt, die überwiegend nichtribosomale Aminosäuren enthielten und eine große Luminanzdifferenz aufwiesen. Die Titrationsen der 11 Rezeptorpikrate (Abb. 100) mit den TMA-Salzen der entsprechenden 4er-CaaX-Peptide wurden in reinem und 60 %  $d_6$ -DMSO (aq) durchgeführt. Hierbei ergab Rezeptor  $H_2NOC-D-Lys-L-Pro-AC5C-KG$  die besten Assoziationskonstanten in reinem und wässrigem  $d_6$ -DMSO ( $2-5 \cdot 10^6$  und  $2-3 \cdot 10^4 M^{-1}$ ) für das Rheb-Peptid. Auch Rezeptor  $H_2NOC-D-Lys-L-Pro-L-Lys-KG$  ergab sehr große Werte für das Rheb-Peptid ( $\geq 10^6$  und  $2 \cdot 10^4 M^{-1}$ ).

Für das H-Ras-Peptid wurden zwei Rezeptoren untersucht; zum einen der bereits in Optimierungsversuchen (Kapitel 4.3.19) verwendete Rezeptor  $H_2NOC-D-Leu-L-Ser-L-Ser-KG$ , der in reinem und wässrigem  $d_6$ -DMSO die besten Werte ergab ( $\geq 10^5$  und  $1147 M^{-1}$ ) und der Rezeptor  $H_2NOC-D-Thr-L-Phe-Inp-KG$ , für den nur in reinem  $d_6$ -DMSO ( $1360 M^{-1}$ ) eine Assoziationskonstante ermittelt wurde (in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq) war kein Shift erkennbar). Die Titration der zwei Rezeptoren für das K-Ras-Peptid ergab für  $H_2NOC-D-Lys-GABA-L-Lys-KG$  in wässrigem  $d_6$ -DMSO eine  $K_A$  von  $4100 M^{-1}$ , in reinem  $d_6$ -DMSO lag der Wert bei  $\geq 10^5 M^{-1}$ . Für den Rezeptor  $H_2NOC-D-Val-L-ThzMe_2-Inp-KG$  wurde nur in reinem  $d_6$ -DMSO ( $\geq 10^5 M^{-1}$ ) eine Assoziationskonstante ermittelt (in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq) war kein Shift erkennbar). Die mittels NMR bestimmten Assoziationskonstanten für die Rezeptoren der CaaX-Boxen entsprechen den bis dato besten ermittelten Werten. Nestler entwickelte einen Rezeptor für H-Ras, publizierte jedoch keine Assoziations- oder Dissoziationskonstanten.<sup>[66]</sup>

Tab. 20 stellt die Ergebnisse der NMR-Titrations mit den 4er-CaaX-Peptiden zusammen:

**Tab. 20:** Die berechnete Assoziationskonstanten der Rezeptoren (Pikrate) mit den 4er-CaaX-Peptiden (TMA-Salze) der jeweils zugehörigen Proteine (in Klammern). \*<sup>1</sup>: Aufgrund der Form der zugehörigen Bindungsisotherme kann auf einen grösseren Wert geschlossen werden, dieser lässt sich jedoch nicht berechnen. \*<sup>2</sup>: 10 mm Probenkopf verwendet (ansonsten: 5 mm).

| Rezeptor   | $K_A$ [ $M^{-1}$ ], in $d_6$ -DMSO,<br>ohne pH-Kontrolle  | $K_A$ [ $M^{-1}$ ], in 60 % $d_6$ -DMSO (aq)<br>unter pH-Kontrolle |
|--|---|--|
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro-AC5C-KG<br>(Rheb)                 | ~ <b>2 000 000 bis</b><br><b>5 000 000</b> * <sup>2</sup> | ~ <b>20 000 bis 30 000</b>   |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Lys- <i>D</i> -Ala- <i>L</i> -Lys-KG<br>(Rheb)       | ≥ <b>100 000</b> * <sup>1</sup>                           | <b>143 +/- 5</b>   |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Lys- <i>D</i> -Pro- <i>L</i> -Lys-KG<br>(Rheb)       | ≥ <b>100 000</b> * <sup>1</sup>                           | ~ <b>350</b>   |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Lys-GABA- <i>L</i> -Tic-KG<br>(Rheb)                 | ≥ <b>100 000</b> * <sup>1,2</sup>                         | ≤ <b>10</b>  |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Lys-KG<br>(Rheb)       | ≥ <b>100 000</b> * <sup>1,2</sup>                         | <b>19800 +/- 9400</b>  |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Tic- <i>L</i> -Phe-KG<br>(Rheb)       | ≥ <b>100 000</b> * <sup>1,2</sup>                         | ~ <b>500-600</b>   |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>L</i> -Thz-Gly- <i>D</i> -Ala-KG<br>(Rheb)                  | ≥ <b>100 000</b> * <sup>1,2</sup>                         | <b>371 +/- 345</b>   |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Leu- <i>L</i> -Ser- <i>L</i> -Ser-KG<br>(Rheb)       | ≥ <b>100 000</b> * <sup>1</sup>                           | <b>326 +/- 9</b>   |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Leu- <i>L</i> -Ser- <i>L</i> -Ser-KG<br>(H-Ras)      | ≥ <b>100 000</b> * <sup>1</sup>                           | <b>1147 +/- 562</b>  |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -Phe-Inp-KG<br>(H-Ras)                 | <b>1360 +/- 126</b>                                       | ≤ <b>10</b>  |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Lys-GABA- <i>L</i> -Lys-KG<br>(K-Ras)                | ≥ <b>100 000</b> * <sup>1</sup>                           | <b>4100 +/- 1899</b>   |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Val- <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> -Inp-KG<br>(K-Ras) | ≥ <b>100 000</b> * <sup>1</sup>                           | ≤ <b>10</b>  |

Die Titration des Rezeptors **80** (Pikrat) mit dem TMA-Salz der 4er-CaaX-Box von Rheb zeigte in 100 %  $d_6$ -DMSO Shifts der Rezeptorsignale an, die über die gesamte Länge des Rezeptormoleküls reichten. Hierbei zeigte zum Beispiel das  $\alpha$ -H-Atom eines der *L*-Serin-AS einen Shift (0.06 ppm). Das  $\alpha$ -H-Atom des *D*-Leucins zeigte ebenfalls einen Shift (0.07 ppm).

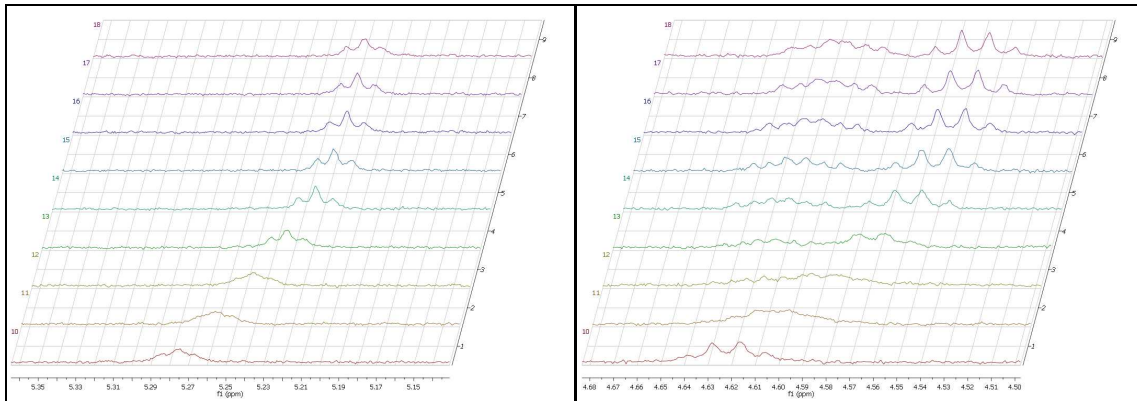


Abb. 116 (Links): Ein shiftendes  $\alpha$ -H-Atom eines *L*-Serins des Rezeptors 80. Rechts: Das shiftende  $\alpha$ -H-Atom des *D*-Leucins des Rezeptors 74 (100 %  $d_6$ -DMSO).

Beide aromatischen CH-Atome des Pyrrols (Kopfgruppe des Rezeptors) verschieben sich durch Zugabe der CaaX-Box um 0.17 und 0.32 ppm.

#### 4.3.21 NMR-Titrations mit dem 11- und 14-mer der Rheb-CaaX-Box

Der beste aus den NMR-Titrations hervorgegangene Rezeptor ( $H_2NOC$ -*D*-Lys-*L*-Pro-AC5C-KG) wurde mit dem 11- und 14-mer der CaaX-Box des Rheb-Proteins (C-terminales Peptid) titriert. Da von den Peptiden keine definierten TMA-Salze hergestellt werden konnten, wurde das CaaX-Peptid kurz vor Beginn der jeweiligen Titration mit TMA-OH-Lösung auf pH = 6 eingestellt und in dieser Form zum (in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq)) gelösten Rezeptor gegeben. Die Titration erfolgte unter pH-Kontrolle und entsprechender Korrektur der Lösung (Zugabe von TMA-OH bzw. Pikrinsäure-Lösung).

Die Datenpunkte der beiden Titrations liessen sich akzeptal anpassen, was durch die zugehörigen Fitplots beider Berechnungen verdeutlicht wird:

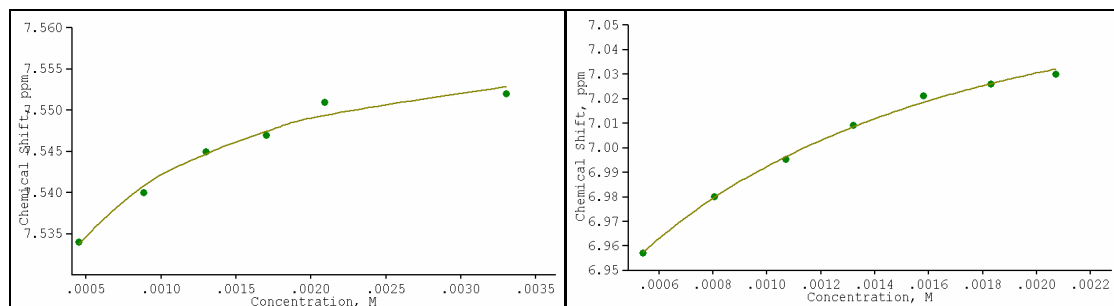


Abb. 117: Die linke Abbildung zeigt den Fitplot der Titration mit dem C-terminalen 14-mer des Rhebproteins (Datenpunkte und berechnete Bindungsisotherme). Die rechte Abb. zeigt den entsprechenden Fitplot für die Titration mit dem 11-mer des Rheb-Proteins.<sup>[105]</sup>

Die erhaltenen Assoziationskonstanten für beide Erkennungsprozesse sind wesentlich kleiner als für das entsprechende Tetrapeptid (~ Faktor 15). Zudem scheint die Assoziation mit zunehmender Kettenlänge des CaaX-Peptids abzunehmen.

**Tab. 21: Die berechnete Assoziationskonstanten für die Titrations des Rezeptors H<sub>2</sub>NOC-*D*-Lys-*L*-Pro-AC5C-KG (als Pikratsalz) mit dem 11- und 14-mer des Rheb-Proteins (mit TMA-OH auf pH = 6 gebracht).**

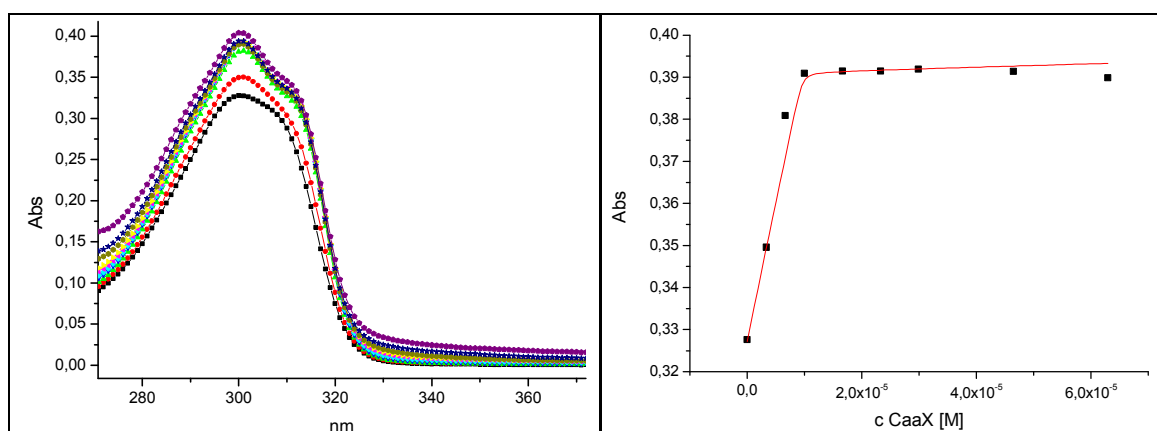
| Rezeptor   | CaaX-Peptid                      | K <sub>A</sub> [M <sup>-1</sup> ], Titration in 60 %<br>d <sub>6</sub> -DMSO (aq) unter pH-Kontrolle |
|--|----------------------------------|--|
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro-AC5C-KG<br>(69) | Ac-ASQGKSSCSVM-OH<br>(11-mer)    | <b>1667</b> +/- 297  |
| H <sub>2</sub> NOC- <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro-AC5C-KG<br>(69) | Ac-DGAASQGKSSCSVM-OH<br>(14-mer) | <b>1311</b> +/- 246  |

Die kleineren Werte, die für die Zugabe der längeren Peptide erhalten wurden, können vielleicht durch 1 Äquivalent Trifluoracetat erklärt werden, das sich aufgrund einer basischen Seitenkette (Lysin) in den Peptiden befand und auch nach dem Einstellen des pH-Wertes noch vorhanden war. Dies war bei den Tetrapeptiden nicht der Fall, da diese durch Ionenaustausch in Form der TMA-Salze vorlagen und keine Trifluoracetat-Gegenionen mehr enthielten. Die Titrations enthielten also beide mehr Salze, als es bei der Titration der Tetrapeptide der Fall war. Die Gegenwart von Salzen, wie zum Bsp. NaCl stört die Erkennung der Kopfgruppe.<sup>[99]</sup>

#### 4.3.22 UV-Titrations der Rezeptoren

Die aus den NMR-Titrations hervorgegangenen besten fünf Rezeptoren für die CaaX-Box von Rheb wurden mit UV-Titrations untersucht. UV-Titrations sind aufgrund der geringeren Konzentrationen auch für die Bestimmung von großen Assoziationskonstanten (bei geeigneten Chromophoren bis zu 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>) geeignet.<sup>[106]</sup> Hierzu wurde der jeweilige Rezeptor ~ 10 µM in DMSO vorgelegt und mit einer konzentrierten Lösung der CaaX-Box titriert. Durch Zugabe der CaaX-Box stieg das Absorptionsmaximum der Rezeptormoleküle um bis zu 30 % an (Abb. 118). Die zugegebene CaaX-Box zeigt keine messbare Absorption im beobachteten Bereich (λ<sub>max.</sub> = 300 nm) und verursacht aufgrund der hohen Konzentration (10 mM) und der

entsprechend kleinen, zugegebenen Volumina auch keine nennenswerte Verdünnung der Messlösung (das Volumen stieg maximal um 1.5 % an).



**Abb. 118:** Die linke Abbildung zeigt überlagerte UV-Spektren von  $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-L-Pro-AC5C-KG}$  bei Zugabe der CaaX-Box von Rheb (schwarz: 0 Äq. CaaX, violett: 11.6 Äq. CaaX-Box von Rheb). Die rechte Abbildung zeigt die Bindungsisotherme der Titration mit zugehörigem Fitplot (rot) für  $K_A = 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

Tab. 22 fasst die Ergebnisse der Titrations zusammen. Für den Rezeptor  $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-L-Pro-AC5C-KG}$  konnte auch unter den Bedingungen der empfindlicheren UV-Titration kein absoluter Wert ermittelt werden, da ab  $5 \cdot 10^7$  keine weitere Veränderung des Fitplots resultierte, anhand derer die Assoziationskonstante bestimmt werden könnte. Der Wert muss also mit  $> 5 \cdot 10^7$  abgeschätzt werden. Für die Rezeptoren  $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-D-Ala-L-Lys-KG}$  und  $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-L-Pro-L-Lys-KG}$  konnten nur ungefähre Werte ermittelt werden, da der Fitplot nicht optimal in die Datenpunkte angepasst werden konnte.

**Tab. 22: Berechnete Assoziationskonstanten für die UV-Titrations der Rezeptoren (als Hydrochloride) mit dem TMA-Salz der CaaX-Box von Rheb. Die Titrations wurden in DMSO durchgeführt.**

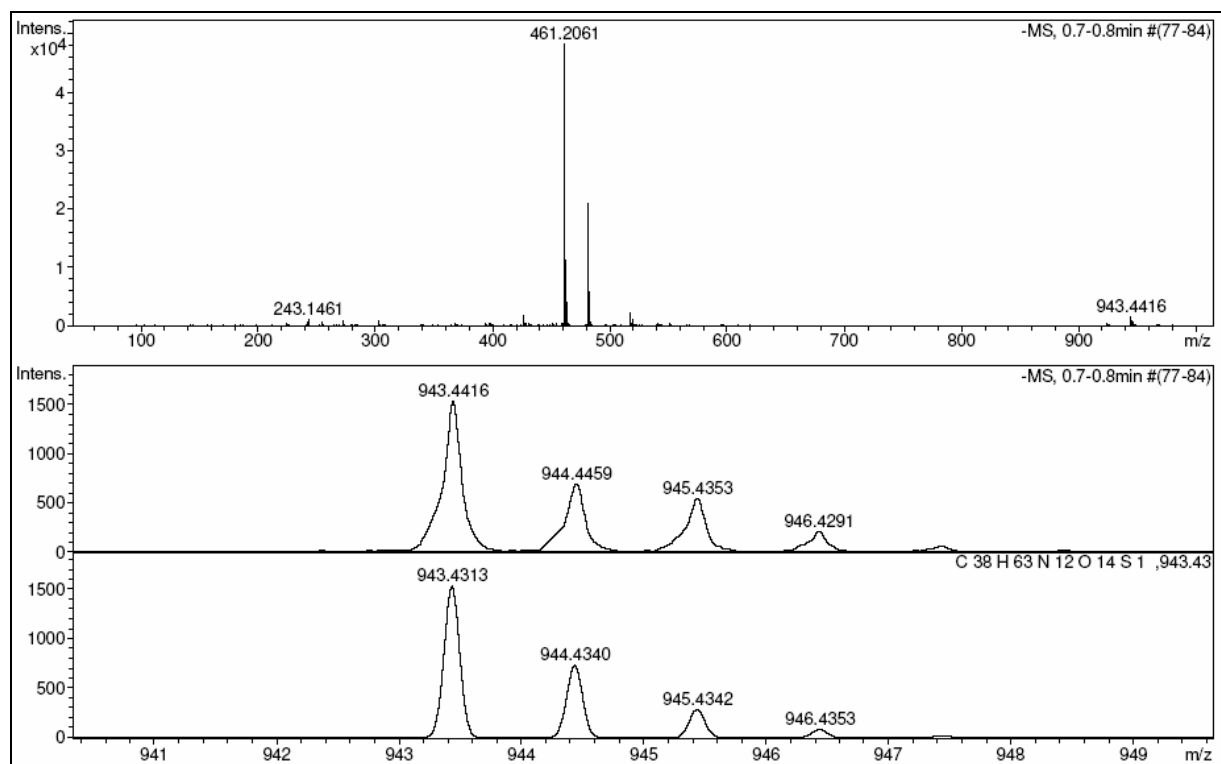
| Rezeptor  | $K_A [\text{M}^{-1}]$ (RMSE in %) |
|---|-----------------------------------|
| $\text{H}_2\text{NCO-D-Lys-L-Pro-AC5C-KG}$ ( <b>69</b> )  | $> 5 \cdot 10^7$ (0.38)           |
| $\text{H}_2\text{NCO-D-Lys-D-Ala-L-Lys-KG}$ ( <b>70</b> ) | $\sim 1 \cdot 10^7$ (2.44)        |
| $\text{H}_2\text{NCO-D-Lys-D-Pro-L-Lys-KG}$ ( <b>71</b> ) | $1.2 \cdot 10^6$ (0.36)           |
| $\text{H}_2\text{NCO-D-Lys-L-Pro-L-Lys-KG}$ ( <b>73</b> ) | $\sim 3.0 \cdot 10^5$ (6.18)      |
| $\text{H}_2\text{NCO-D-Leu-L-Ser-L-Ser-KG}$ ( <b>76</b> ) | $2.5 \cdot 10^5$ (1.62)           |

In Übereinstimmung mit den NMR-Titrations in reinem  $\text{d}_6\text{-DMSO}$  wurde auch hier  $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-L-Pro-AC5C-KG}$  als affinster Rezeptor identifiziert.



### 4.3.23 ESI-MS des Rezeptor-CaaX-Komplexes

Die Bildung stabiler Rezeptor-CaaX-Komplexe führt zu Ionenpaaren, die sich mittels Elektronensprayionisation nachweisen lassen sollten. Die Methode generiert jedoch bevorzugt einfach geladene Molekülionen  $[M+H]^+$  bzw.  $[M-H]^-$  und nicht Ionenkomplexe. Ein entsprechendes Massenspektrum wird also bevorzugt die Signale der Einzelkomponenten liefern. Die Bildung solch stabiler Ionenkomplexe aus der Schmuckschen Kopfgruppe und Carboxylaten ist literaturbekannt.<sup>[87]</sup>



**Abb. 119 (Oben):** Das Übersichtsspektrum der Direktinjektion einer äquimolaren Mischung von Rezeptor 76 und CaaX-Box (von H-Ras). **Mitte:** Die gefundene Isotopenverteilung des Ionenkomplexes. **Unten:** Die berechnete Isotopenverteilung des Ionenkomplexes.

Die Untersuchung einer äquimolaren Mischung des Rezeptors H<sub>2</sub>NOC-*D*-Leu-*L*-Ser-*L*-Ser-KG (**76**) und dem CaaX-Peptid Ac-CVLS-OH in reinem ACN sowie 95 % ACN (aq) lieferte im positiven wie auch negativen Modus ein (kleines) Signal des erwünschten Ionenkomplexes. Exemplarisch zeigt Abb. 119 ein erhaltenes Massenspektrum mit  $m/z = 461$  für die deprotonierte CaaX-Box,  $m/z = 481$  für das deprotonierte Rezeptormolekül und  $m/z = 943$  für den (einfach) deprotonierten Ionenkomplex beider Spezies. Die Methode wurde in der Routineanalytik durchgeführt; es fand also noch keinerlei Optimierung der Methode statt.

#### 4.3.24 Molecular Modeling der Rezeptor-Substrat-Komplexe

Von zwei ausgewählten Rezeptor-Substrat-Komplexen wurden Monte-Carlo-Konformationssuchen durchgeführt. Diese zielten auf die Berechnung von energie-minimierten Komplexen ab und damit auf die bevorzugten Konformationen der Komplexe. Für die Berechnungen wurde der Rezeptor H<sub>2</sub>NOC-*D*-Lys-*L*-Pro-*L*-Lys-KG mit der CaaX-Box von Rheb und H<sub>2</sub>NOC-*D*-Leu-*L*-Ser-*L*-Ser-KG mit der CaaX-Box von H-Ras ausgesucht. Die Berechnungen in CHCl<sub>3</sub> ergaben dichte Netzwerke aus Wasserstoffbrücken und elektrostatischen Wechselwirkungen. Die Berechnungen in H<sub>2</sub>O führten hingegen zu komplett umorientierten Konformationen, welche eine geringere Anzahl von Wasserstoffbrücken und elektrostatischen Wechselwirkungen aufwiesen. In H<sub>2</sub>O kam es zudem zu einem deutlichen Anstieg der unpolaren Kontaktfläche zwischen Rezeptor und CaaX-Box (hydrophober Kolaps). In guter Übereinstimmung mit der hohen Assoziationskonstanten ( $> 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) und den bei den NMR-Titrations gefundenen Shifts charakteristischer Signale (Pyrrol-NH, Guanidiniumamid, Ser- $\alpha$ -H, Ser-OH) finden sich in den minimierten Strukturen eine Vielzahl von H-Brücken und elektrostatischer Kontakte. So finden sich bei der Berechnung des Rezeptor-CaaX-Komplexes in CHCl<sub>3</sub> sechs intermolekulare und 2 intramolekulare H-Brücken (Abb. 120). Die CaaX-Box (von Rheb) nimmt hier im gebundenen Zustand eine  $\beta$ -turn-artige Struktur an, welche durch H-Brücken zwischen Cys-NH und Met-CO<sub>2</sub><sup>-</sup> sowie Cys-NHC<sub>O</sub> und Met-NH vermittelt werden (intramolekular). Die bindende Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Substrat wird durch H-Brücken zwischen Val-C<sub>O</sub> (CaaX) und Ser-NH (Rez.), Val-NH (CaaX) und Ser-OH (Rez.) vermittelt. Zwei weitere intermolekulare H-Brücken werden sowohl durch Val-NH (CaaX) als auch Ser-OH (CaaX) mit dem Pyrrol-NH gebildet. Die NMR-Titration des gleichen Rezeptors in d<sub>6</sub>-DMSO führte zu Shifts über den gesamten Bereich des Rezeptors (Kapitel 4.3.20), was die in CHCl<sub>3</sub> berechnete Konformation des Komplexes untermauert. Die Berechnung in H<sub>2</sub>O ergab eine stark reduzierte Anzahl an H-Brücken: Es traten lediglich 4 intermolekulare H-Brücken auf, wovon 3 auf eine Interaktion zwischen der Kopfgruppe (Guanidinium-NH, Pyrrol-NH) des Rezeptors und dem C-terminalen Carboxylat der CaaX-Box entfallen. Eine weitere Brücke bildete sich zwischen Val-NH (CaaX) und Pyrrol-C<sub>O</sub>. Intramolekulare H-Brücken traten bei dieser Berechnung im Gegenzug zu der in CHCl<sub>3</sub>, nicht auf.

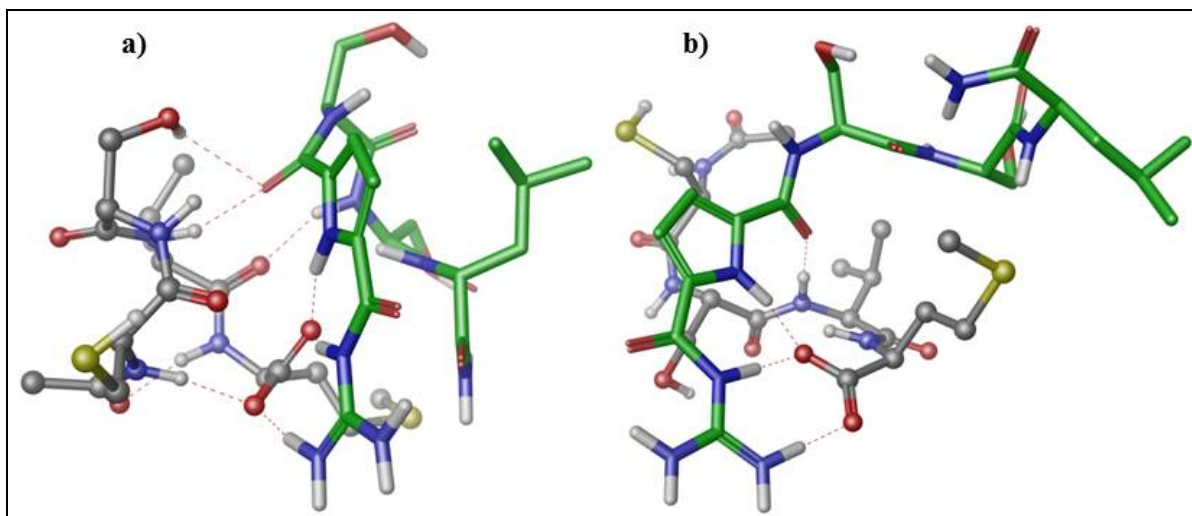


Abb. 120: Die Abbildung zeigt die MCMM-minimierten Konformationen des Komplexes aus  $\text{H}_2\text{NCO-D-Leu-L-Ser-L-Ser-KG}$  und  $\text{Ac-CSVM-OH}$  in  $\text{CHCl}_3$  (a) und  $\text{H}_2\text{O}$  (b).<sup>[107]</sup>

Die geringe Anzahl an H-Brücken im polareren Lösungsmittel ( $\text{H}_2\text{O}$ ) wird durch die experimentellen Befunde der NMR-Titration bestätigt: Zum einen ergab die Titration in 60 %  $\text{d}_6\text{-DMSO}$  (aq) eine wesentlich kleinere Assoziationskonstante ( $326 \text{ M}^{-1}$ ), zum anderen konnten nur Shifts an der Kopfgruppe festgestellt werden.

Die Berechnung des Rezeptors  $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-L-Pro-L-Lys-KG}$  führte, in Analogie zu Rez. **70**, zu einem dichten Netzwerk von intra- und intermolekularen Wechselwirkungen, die von der Bindung des C-terminus der CaaX Box dominiert werden. Das C-terminale Carboxylat (Met CaaX-Box) wird durch insgesamt fünf H-Brücken gebunden, wobei zwei auf intramolekulare H-Brücken mit Ser2-NH (CaaX) und der Seitenketten-OH-Gruppe mit Ser2 (CaaX) entfallen. Drei weitere H-Brücken werden intermolekular mit den zwei NH-Funktionen des Guanidiniumions und dem Pyrrol-NH der Kopfgruppe gebildet. Die Lys-Seitenkette des Rezeptors faltet sich zu dem N-terminalen Acetamid ( $\text{C}\underline{\text{O}}$ ) und bildet dort eine H-Brücke. Weitere vier intermolekulare und zwei intramolekulare H-Brücken stabilisieren den Komplex in Chloroform (Abb. 121, a). Die hieraus resultierende, rigide Rezeptor-Substrat Anordnung orientiert die zweite Lys-Seitenkette des Rezeptors weg von der CaaX-Box in Richtung des Lösungsmittels.

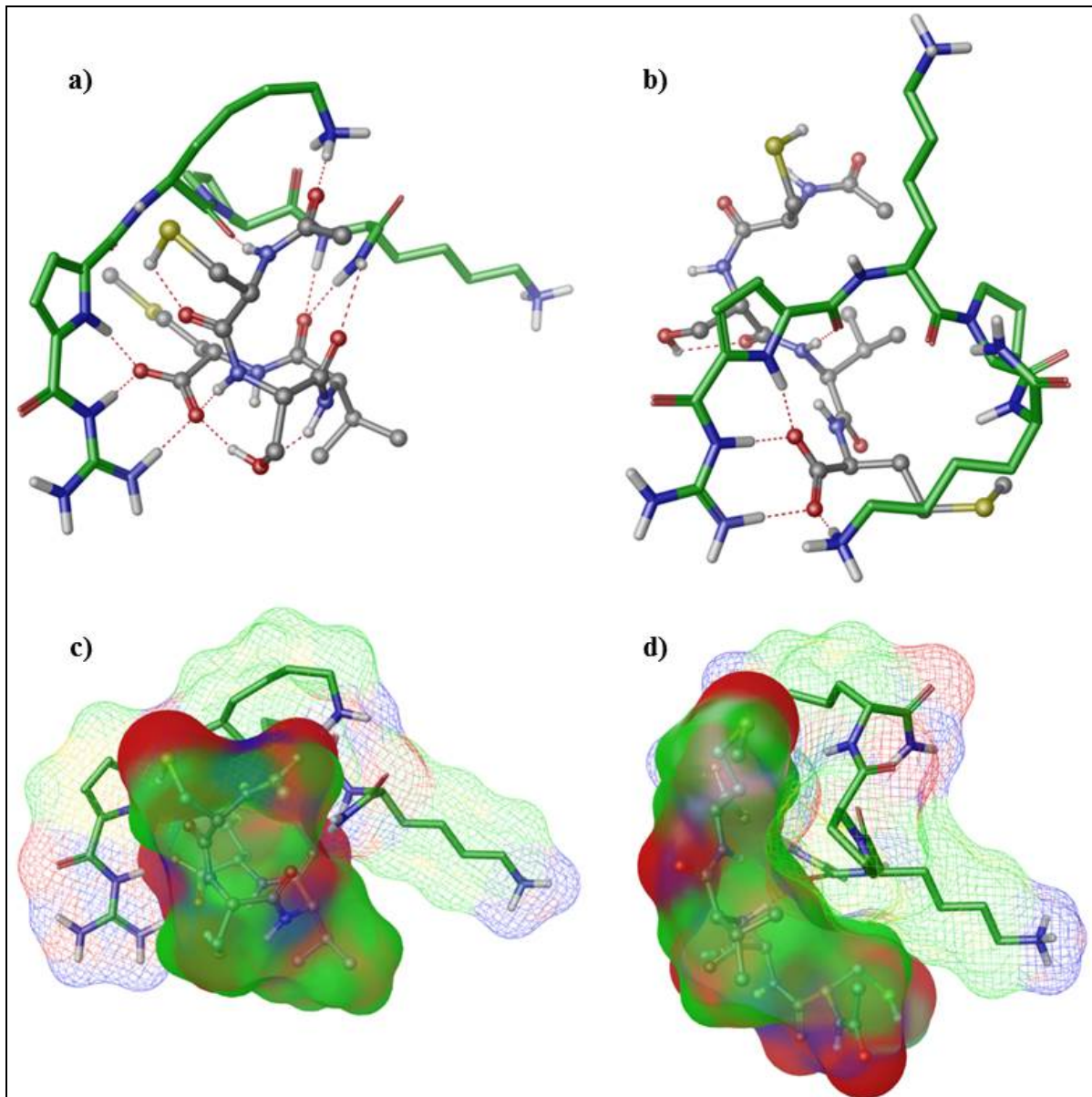


Abb. 121 (Oben): Die Abbildung zeigt die MCMM-minimierten Konformationen des Komplexes aus  $\text{H}_2\text{NCO-D-Lys-L-Pro-L-Lys-KG}$  und  $\text{Ac-CSVM-OH}$  in  $\text{CHCl}_3$  (a, c) und  $\text{H}_2\text{O}$  (b, d).<sup>[107]</sup>

Die Berechnung von  $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-L-Pro-L-Lys-KG}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  führte wieder zu einem enormen Verlust von H-Brücken: Lediglich eine intramolekulare (zwischen OH und  $\text{CQ}$  des Serins) und vier intermolekulare verblieben hier. Neben den drei NH-Funktionen (Guanidinium und Pyrrol) der Kopfgruppe bildete die Aminosäure eine zusätzliche Interaktion, die bei der Berechnung in  $\text{CHCl}_3$  von der CaaX-Box wegzeigte: Hier kam es zu einer Rückbindung des Lysin- $\text{NH}_3^+$  (Rezeptor) zum C-terminalen Carboxylat der CaaX-Box. Dieser Effekt wurde bereits von Schmuck an einem ähnlichen Beispiel beschrieben.<sup>[88]</sup>

Bei Betrachtung der Ladungsverteilung auf der Oberfläche von Rezeptor und CaaX-Box wird ersichtlich, dass in Wasser unpolare Wechselwirkungen die Struktur des

Komplexes stark beeinflussen und sich die Moleküle unter Vergrößerung der Kontaktfläche unpolarer Bereiche (Abb. 121, d) zusammenlagern (hydrophober Kollaps<sup>[108]</sup>).

#### 4.3.25 STD-Experiment am Rheb-Protein

STD (saturation transfer difference)-NMR-Experimente ermöglichen es, die Bindung eines kleinen Liganden an ein Makromolekül (z. B. ein Protein) nachzuweisen und den Ort der Bindung (am Liganden) zu lokalisieren.

Die Einstrahlung eines selektiven Sättigungspulses in einen Teilbereich des NMR-Spektrums, welches ausserhalb des Bereichs des Liganden liegt, sättigt letztendlich über Spindiffusion das gesamte Makromolekül (Protein), wodurch das Spektrum des Proteins verschwindet, bzw. die Signalintensität stark abschwächt wird. Ist der Ligand in Kontakt mit dem Protein, so überträgt dieses die Sättigung auf den Liganden. Hierdurch erniedrigen sich die entsprechenden Ligandensignale. Die Differenz zwischen "off"-Resonanz- und Resonanzspektrum ergibt das eigentliche STD-Differenzspektrum.<sup>[109]</sup>

Für die Untersuchung wurde das vollständige Rheb-Protein (inklusive C-Terminus) und der affinste Rezeptor aus dem NMR Screening, H<sub>2</sub>NOC-*D*-Lys-*L*-Pro-AC5C-KG verwendet. Das Experiment, welches in Kooperation mit dem AK Stoll durchgeführt wurde, bestätigte die Bindung des Rezeptors an das Rheb-Protein. Zudem kann über die Form des entstehenden Differenzspektrums eine Aussage über die mit dem Protein interagierenden (in direktem Kontakt stehenden) Gruppen des Rezeptors getroffen werden.

Insbesondere waren dies nahezu alle CH<sub>2</sub>-Gruppen des Rezeptors. Die  $\delta$ -CH<sub>2</sub>-Gruppen des *L*-Prolins zeigten nur einen geringen Sättigungstransfer und sind vermutlich in einem, für den Transfer ungünstigen Abstand zum Protein. Alle labilen Protonen des Rezeptors, also die der protischen funktionellen Gruppen, sind im Experiment nicht sichtbar, da diese mit Wasser austauschen.

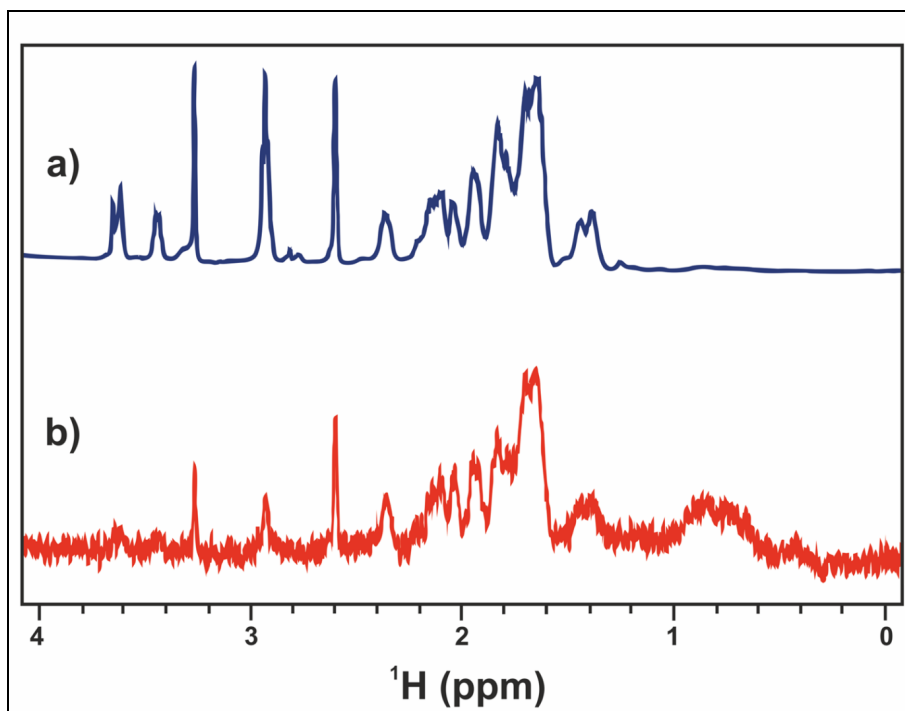


Abb. 122: Das obere Spektrum (a) zeigt einen Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums des Rezeptors 69 ( $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-L-Pro-AC5C-KG}$ ). Das untere Spektrum (b) zeigt das entsprechende STD-Differenzspektrum, welches durch einen 100-fachen Überschuß des Liganden zum Rheb(GDP)-Protein erhalten wurde.<sup>[107,110]</sup>

#### 4.3.26 Farnesyltransferaseassay

##### Synthese einer chemischen Referenz

Zur eindeutigen Referenzierung des Produktsignals des Farnesylierungsassays wurde auf chemischem Wege ein CaaX-Peptid farnesyliert. Hierzu wurde das 11-mer des C-terminus von Rheb verwendet und mit Farnesylbromid in Gegenwart von Zink und Trifluoressigsäure umgesetzt. Der Zusatz von Zink führt vermutlich zu einer Koordinierung an die Thiofunktion des Peptids. Das entsprechend hierbei gebildete Thiolatanion ist nukleophiler und wird so die nukleophile Substitution des Bromids beschleunigen. Die Zugabe von Säure (TFA) hingegen bewirkt eine Protonierung basischer Nukleophile, wie der Lysinseitenkette, welche unter diesen Bedingungen weniger Nukleophil werden. Die Reaktion sollte selektiv mit der Thiol-Funktion, also der Seitenkettenfunktionalität der AS Cystein stattfinden. Die Reaktion erfolgte in Anlehnung an eine bekannte Vorschrift.<sup>[111]</sup>

Eine eindeutige Zuordnung der Position der Farnesylgruppe im Produkt (mittels MS-MS und der gezielten Sequenzierung der Peptidkette) schlug fehl, da als erstes der

Farnesylrest fragmentiert. Dieser Effekt ist bekannt und ein entsprechender Strukturbeweis war so nicht zu führen.<sup>[112]</sup>

Das über die chemische Synthese charakterisierte Produkt (ein scharfes Signal bei der HPLC-Charakterisierung) verursachte ein Signal identischer Retention und Signalform wie das biochemische Produkt aus dem Farnesyltransferaseassay. Es kann also als erwiesen angesehen werden, dass es sich bei dem detektierten Produkt (FTase-assay) um ein einziges Produkt, das S-farnesylierte Peptid, handelt. (Das Produkt wurde aufgrund der geringen Menge ausschließlich mittels HPLC-UV/MS charakterisiert.)

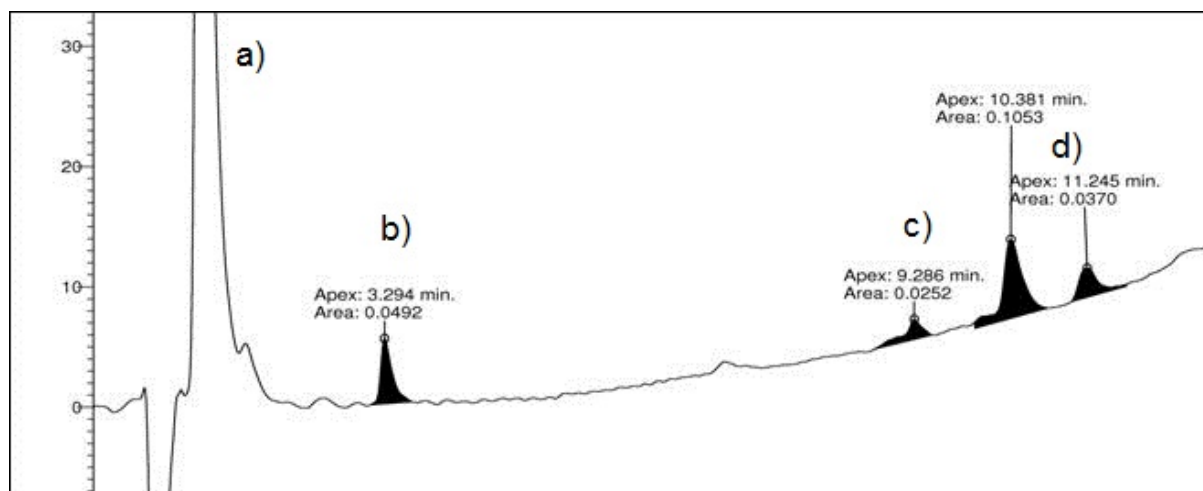
### **Biochemische Farnesylierung**

Für die biochemische Farnesylierung wurde zunächst das von Appels beschriebene Assay für das H-Ras-Protein (Lit. <sup>[113,114]</sup>) auf die einzelnen CaaX-Peptide übertragen. Hierbei konnten für nahezu alle (im Arbeitskreis) vorrätigen CaaX-Peptide optimierte Bedingungen gefunden werden, unter denen innerhalb von 30 min ein Umsatz von ~ 50 % stattfindet. Dieses Verhältnis ist optimal, da so eine möglichst geringe Konzentration der CaaX-Peptide untersucht werden kann. Die von Appels beschriebene Konzentration von 8  $\mu\text{M}$  Protein, welches bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  (Tryptophan) detektiert wurde, konnte ebenfalls verwendet werden, wobei diese Konzentration die untere Grenze der Messgenauigkeit markiert. Bei dieser geringen Konzentration bildet sich ein extrem starkes ramping aus und das Signalrauschen ist nur ~ 5-10 mal kleiner als die Signalintensität. Die geringe Signalintensität resultiert hierbei aus der kleineren molaren Absorption der Peptide (in Vergleich zum Protein) und der verwendeten Wellenlänge von  $\lambda = 220 \text{ nm}$ , da im Regelfall kein Tryptophan in den Peptiden enthalten ist.

### **FTase-Assay**

Die in den Kapiteln 4.3.20 und 4.3.21 beschriebenen NMR-Titrationsen führten zu einigen Verbindungen, die in der Lage waren, in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq) die CaaX-Boxen von Rheb, K-Ras und H-Ras zu erkennen. Hierbei stellte sich der Rezeptor  $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-L-Pro-AC5C-KG}$  als derjenige mit der größten Affinität heraus. Dieser und der beste für das K-Ras-Peptid ( $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-GABA-L-Lys-KG}$ ) wurden

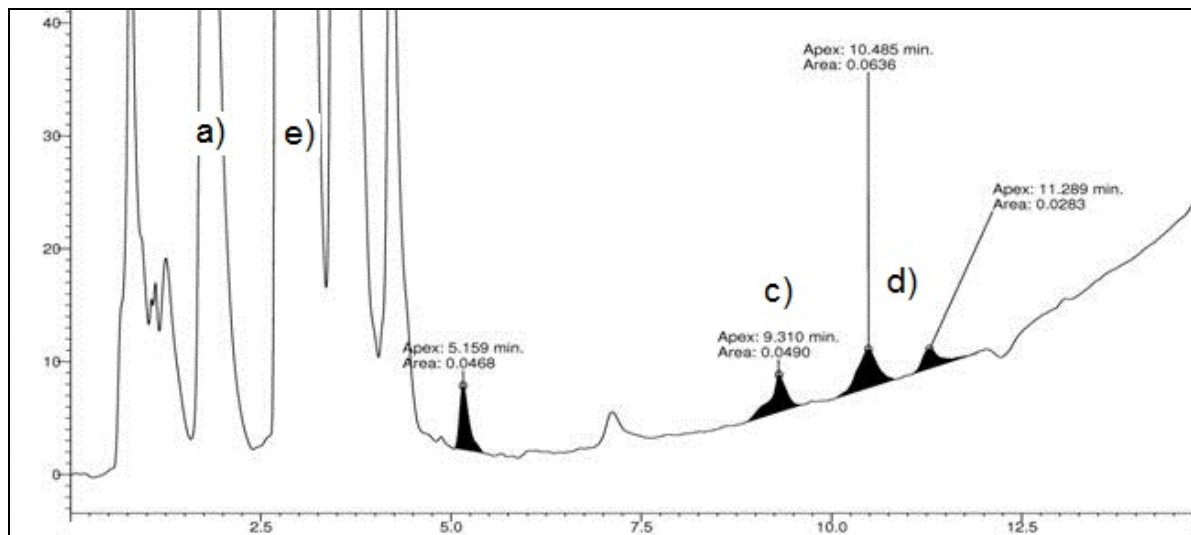
deshalb in einem HPLC-basierten FTase-Assay untersucht. Trotz zahlreicher Variationen der Versuchsbedingungen (Verringerung der Pufferkonzentration sowie der  $\text{ZnCl}_2$ - und  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration und dem Einsatz eines schwach koordinierenden Puffersystems) gelang es nicht, durch Gegenwart dieser Rezeptoren eine indirekte Inhibition der FTase nachzuweisen. Hierzu wurden Rezeptorkonzentrationen von bis zu 1mM verwendet. Abb. 123 und Abb. 124 zeigen exemplarisch ein entsprechendes Experiment mit dem 11er-Peptid von K-Ras und einer 1 mM Rezeptorkonzentration ( $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-GABA-L-Lys-KG}$ ). In einem optimierten Testsystem wurde ein Produkt/Edukt-Verhältnis von 0.5/1 erreicht. Edukt und Produkt trennen sich bei der HPLC-Chromatografie sehr gut, da die Kupplung mit dem Farnesylrest die Polarität des Moleküls stark herabsetzt und entsprechend die Retention erhöht. Die aus zwei Untereinheiten bestehende Farnesyltransferase trennt sich in zwei getrennte Signale auf (Abb. 123). Die Zugabe des Rezeptors (1mM) verursacht ein sehr großes Signal, welches den eigentlichen Edukt-Peak überlagert und eine direkte Auswertung unmöglich macht.



**Abb. 123:** Das HPLC-Spektrum der Reaktionsmischung ( $8 \mu\text{M}$  11-mer K-Ras) nach 30 min Inkubation bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und einem  $\text{pH} = 7.2$ . a): DTT (und weitere Salze), b): Edukt (11-mer K-Ras), c): Produkt (farnesyliertes 11-mer von K-Ras), d):  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der FTase.

In diesem Fall wird das Integralverhältnis zwischen Produkt und FTase verwendet. Da hier das Produkt/FTase-Verhältnis nicht herabgesetzt wurde, konnte auch keine indirekte Inhibition der FTase festgestellt werden. Auch der 125-fache Überschuss des Rezeptors lieferte keinen Hinweis auf eine indirekte Inhibition der Farnesyltransferase durch den Rezeptor.





**Abb. 124:** HPLC-Spektrum der Reaktionsmischung (8  $\mu\text{M}$  11-mer K-Ras) nach 30 min Inkubation bei 37  $^{\circ}\text{C}$ , einem pH = 7.2 und Gegenwart von 1 mM  $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-GABA-L-Lys-KG}$ . a): DTT (und weitere Salze), c): Produkt (farnesyliertes 11-mer von K-Ras), d):  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der FTase. e):  $\text{H}_2\text{NOC-D-Lys-GABA-L-Lys-KG}$ . Der Peak des Edukts (11-mer K-Ras) ist mit dem relativ großen Rezeptorsignal überlagert.

Der literaturbekannte Rezeptor<sup>[66]</sup>, (welcher zu diesem Zweck synthetisiert wurde) konnte die Farnesylierung unterdrücken: In zwei Experimenten kam es zu einer vollständigen Unterdrückung des Produktsignals (c(Rezeptor) = 469  $\mu\text{M}$ , 241  $\mu\text{M}$ ), weshalb unter den Bedingungen des Assays, auf einen  $\text{IC}_{95} < 240 \mu\text{M}$  geschlossen wurde (hier wurde das 11-mer von H-Ras untersucht).

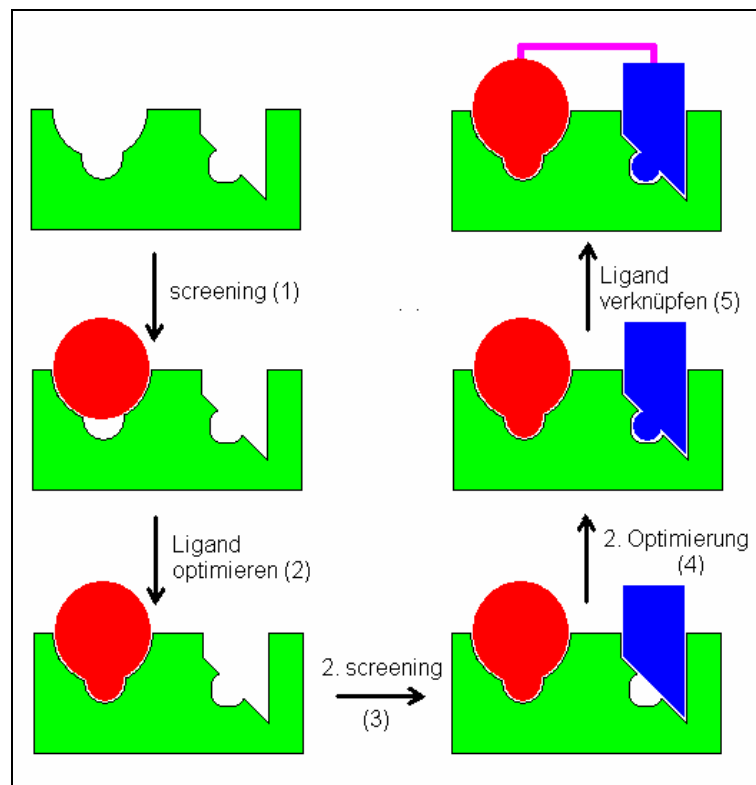
Für diesen Befund sind zwei Interpretationen denkbar: Die in 60 %  $\text{d}_6\text{-DMSO (aq)}$  bestimmten Assoziationskonstanten fallen in Wasser weiter herab und besitzen keine nennenswerte Affinität mehr, um mit der irreversibel durchgeführten Farnesylierung der FTase zu konkurrieren.

Eine weitere Interpretation liegt in dem Umstand, dass die Farnesylierung in Gegenwart einer großen Menge Puffer und Salze durchgeführt wurde und vermutlich der größte Bindungsanteil, welcher von der Schmuckschen Kopfgruppe resultiert und auf der Ausbildung von H-Brücken basiert, sich durch Gegenwart von Salzen verringert.<sup>[99]</sup> Die verbleibende Affinität ist dann vermutlich zu schwach, um einen sichtbaren Effekt hervorzurufen. Denkbar ist natürlich auch ein Zusammenspiel der in beiden Interpretationen beschriebenen Umstände.

## 4.4 Fragment-Screening (SAR by NMR)

### 4.4.1 Grundlagen des Fragment-Screenings (SAR by NMR)

Die von Fesik<sup>[115]</sup> beschriebene Methode des "fragmental screenings" ermöglicht die Konstruktion von hochaffinen Liganden durch das Screenen von Fragmentbibliotheken: Beim Screenen von Liganden für die erste Bindetasche eines Proteins werden meist nur Fragmente mit geringer Affinität identifiziert ( $\sim$  millimolare  $K_D$ ). Die gezielte Suche nach Liganden für eine der ersten Region benachbarten Bindetasche wird ohne Optimierung ebenfalls nur ein relativ schlecht bindendes Fragment liefern.



**Abb. 125:** Die Abbildung zeigt die Vorgehensweise beim "fragmental screening": Zunächst wird ein Fragment für die erste Bindestelle gesucht (1). Ist eine geeignete Verbindung identifiziert, wird dessen Struktur optimiert (2) und in einer räumlich benachbarten Bindestelle eine geeignete Verbindung gesucht (3) und diese ebenfalls optimiert (4). Das Verlinken beider Fragmente liefert einen Liganden, der beide Bindetaschen erkennt (5).<sup>[115]</sup>

Werden nun beide Fragmente mit einem Linker geeigneter Länge verknüpft, multiplizieren sich die Dissoziationskonstanten und es resultiert im Idealfall ein Ligand mit einer mikromolaren  $K_D$ . Auch Liganden mit nanomolarer  $K_D$  (mit besseren Fragmenten) konnten auf diesem Weg identifiziert werden.<sup>[115, 116]</sup>

#### 4.4.2 Fragment-Screenings am Rheb-Protein

Die Methode des "fragmental screenings" wurde zur Suche nach geeigneten Liganden für das Rheb-Protein angewendet. In Rahmen einer Kooperation erfolgten die Messungen der NMR-Spektren sowie die Auswertung der NMR-Verschiebungsdiagramme durch die Arbeitsgruppe Stoll (Ruhr-Universität Bochum).

Die Auswahl der Fragmente erfolgte nach Lipinskis rule of five: Ein potentieller Ligand sollte weniger als 5 Wasserstoffdonoren und 10 Wasserstoffakzeptoren, eine molare Masse kleiner 500 g/mol sowie einen berechneten  $\log P > 5$  aufweisen.<sup>[70]</sup>

Ausgewählt wurden bevorzugt kleine, (hetero)aromatische Verbindungen, die (mit Ausnahme der bekannten Kopfgruppe) maximal trizyklisch waren und über eine überschaubare Anzahl von funktionellen Gruppen verfügten. Hiermit wurde zum einen sichergestellt, dass die Moleküle nicht zu flexibel waren (aromatische Struktur), zum anderen konnten somit eventuelle Hits einfacher auf ihre Interaktion mit den Funktionalitäten des Proteins hin untersucht werden, da hierüber Hinweise auf die räumliche Anordnung der Liganden in der Bindetasche anfallen. Zu viele funktionelle Gruppen würden die Interpretation der Ligandenorientierung erschweren und zusätzliche Experimente erfordern (z.B. die Aufnahme von STD-Spektren<sup>[117]</sup> oder Einkristallröntgenstrukturen).

Die Fragmente sind damit nach den Gesichtspunkten einer hohen Bioverfügbarkeit ("druglike") ausgesucht, was die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Anwendung als potentiell Medikament erhöht.

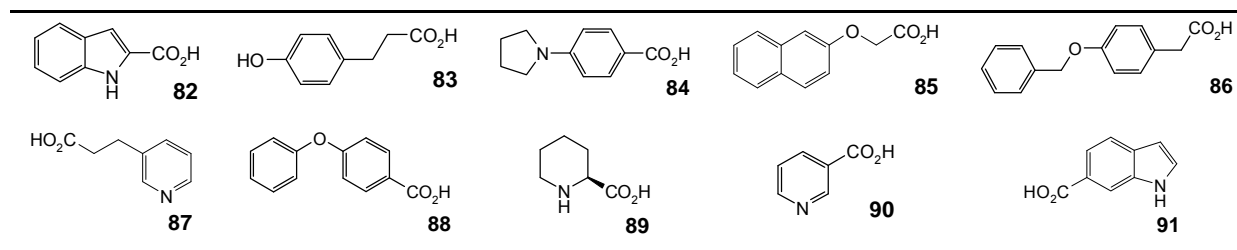
Für das Screening wurden zunächst acht kleine Mischungsbibliotheken (mit maximal zehn Verbindungen pro Mischung) am Rheb-Protein untersucht. Die Zusammenstellung der 8 Mischungen selbst erfolgte zunächst durch Gruppierung nach der Acidität der jeweiligen Verbindungen. Diejenigen mit überwiegend sauren funktionellen Gruppen (z. B.  $\text{CO}_2\text{H}$ ) wurden zusammen untersucht, analog wurden solche mit basischen Funktionalitäten (Amine) vereint. Verbindungen, die nur leicht basische (z. B. aromatische Imine wie Pyridin- oder Imidazolderivate) oder leicht saure (Phenole) Funktionalitäten aufwiesen, wurden in "neutralen" Gemischen zusammengeführt. Diese Vorgehensweise soll die Ausbildung von eventuellen intermolekularen Salzbrücken zwischen den Fragmenten verhindern, die die Interpretation der Ergebnisse stark erschweren würde. Die Gruppierung der Kopfgruppen (Gemisch 4) und des später untersuchten Biphenylgemisches erfolgte

hingegen nach einer gleichartigen Funktion (der Erkennung von Carboxylaten) bzw. einer identischen Leitstruktur (Biphenyle).

Zunächst wurden 8 Mischungen von potentiellen Liganden untersucht, bei denen bis zu 10 Komponenten vorlagen. Von jeder Komponente lag eine Konzentration von 40 mM vor. Für eine Untersuchung wurde ein Aliquot (25  $\mu$ L) der jeweiligen Mischung hinzugefügt (zu 500  $\mu$ L einer 0.2 mM Proteinlösung) und ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des Proteins aufgenommen (hierdurch resultiert ein 10-facher Überschuss jedes Liganden zum Protein). Die jeweiligen Signale der Wasserstoff- und Stickstoffatome der Peptidbindungen des Proteins sind vorher bereits zugeordnet worden und in einer Datenbank hinterlegt. Durch die Veränderung der chemischen Verschiebung der NH-Signale (Shifts) wird ersichtlich, welche Aminosäure des Proteins eine Wechselwirkung mit den Liganden der Mischung eingehen.

Die folgenden Tabellen zeigen die Strukturen der verwendeten Liganden (bzw. Fragmente), die in die drei Gruppen von sauren, basischen und neutralen Liganden eingeordnet wurden:

**Tab. 23: Die Verbindungen des Gemisches 1 (sauer).**



Bereits durch Zugabe des ersten Gemisches konnten Shifts in interessanten Bereichen des Proteins beobachtet werden. Ein typisches Spektrum und einen vergleichsweise starken Shift eines Korrelationssignals zeigt Abb. 126 und Abb. 127. Hierbei ist die Verschiebung der Aminosäure Ser75 besonders signifikant, welche um 2 ppm für die Stickstoff-, sowie 0.2 ppm für die Wasserstoff-Dimension shiftet. Für beide Werte wird nun eine gewichtete chemische Verschiebung (aufgrund der unterschiedlichen Sweepweiten des  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ -Spektrums) eingeführt; hierdurch wird die Visualisierung der Werte wesentlich einfacher (Ser75 hat hier den Wert 0.15 ppm).

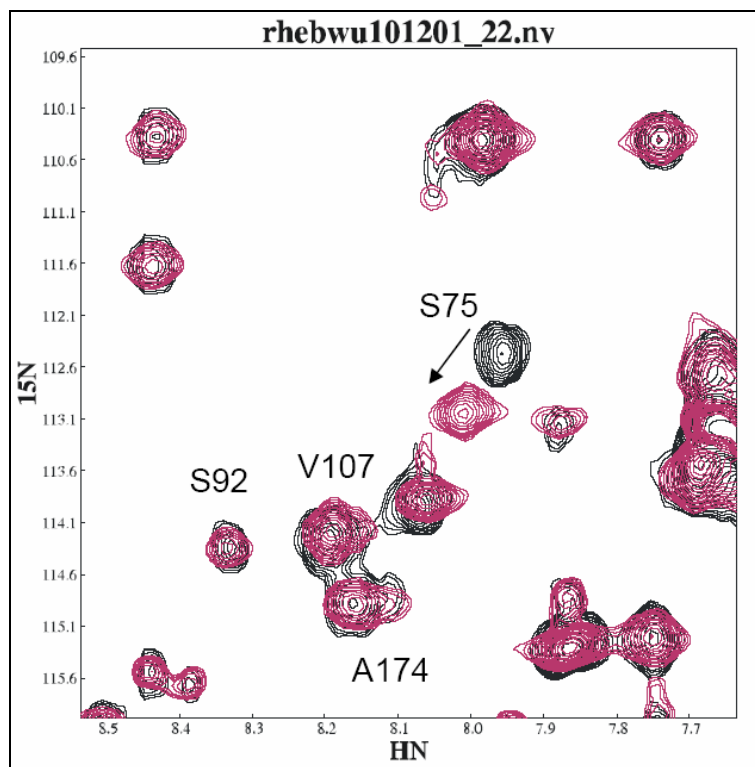


Abb. 126: Die Ausschnittsvergrößerung der überlagerten HSQC-Spektren nach Zugabe des Gemisches 1.<sup>[93]</sup>

Eine Auftragung sämtlicher (zugeordneter) shiftender AS des Rheb-Proteins liefert folgendes Verschiebungsdiagramm (Abb. 127).

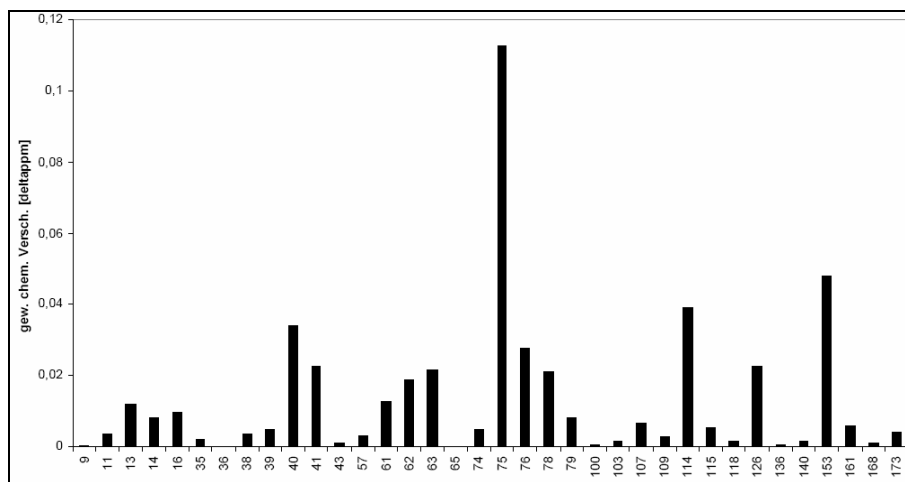


Abb. 127: Die Auftragung der gewichteten chemischen Verschiebung gegen die (shiftenden) AS des Proteins nach Zugabe von Gemisch 1. Die Dimension der Abszisse gibt lediglich die Position der AS in der Primärsequenz wieder (AS 153 hat sich als falsch zugeordnet herausgestellt; es handelt sich um AS 70).<sup>[93]</sup>

Bereits bei der Untersuchung des ersten Gemisches wurden Wechselwirkungen der Fragmente mit AS von interessanten Teilbereichen des Proteins sichtbar, der Switch-I- (33-41) und Switch-II-Region (63-79).<sup>[36]</sup> Im Bereich der Switch-I-Region shiften die

AS 35, 38, 39, 40, 41, im Bereich der Switch-II-Region die AS 63, 74, 75, 76, 78, 79. Diese Regionen stellen die Bindestellen für weitere Proteine dar. Eine Blockierung dieser Bereiche, durch einen geeigneten Liganden, kann im Erfolgsfall zu der Unterbrechung einer Signalkaskade führen.

Eine Visualisierung der Aminosäuren, die durch Zugabe der Gemische und Einzelverbindungen einen Shift erfahren, erfolgte durch das Programm Pymol. Über das NMR-Experiment ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC) hinaus, das zunächst nur Informationen über den Ort der Bindung auf bzw. in dem Protein liefert, kann die Lage eines Liganden in seiner Bindetasche über eine detaillierte Modellierung mittels Haddock erfolgen. Das Programm Haddock verwendet hierbei die Daten des NMR-Experiments und erzeugt Energie-minimierte Strukturen des Liganden an, bzw. im Protein.<sup>[118]</sup> Grundlage für beide Darstellungen bildet hierbei die NMR-Struktur des Proteins in Lösung (pdb-Code: 2L0X).

Shiftende Bereiche mit einer Verschiebung  $> 0.01$  ppm sind hier magentafarben dargestellt. Zusätzlich werden die Seitenketten der zugehörigen, shiftenden AS angezeigt:



**Abb. 128:** Die Markierung der shiftenden AS nach Zugabe von Gemisch 1. Markiert sind diejenigen AS, die mehr als 0.01 ppm shiften. Zusätzlich sind die, den AS zugehörigen, Seitenketten markiert. Grün: NMR-Lösungsstruktur (pdb-Code: 2L0X) , magenta: shiftende AS und Seitenketten.

Im Folgenden werden zunächst die erhaltenen Ergebnisse für alle 8 Gemische aufgelistet und dann zusammengefasst:

Tab. 24: Die Verbindungen des Gemisches 2 (neutral).

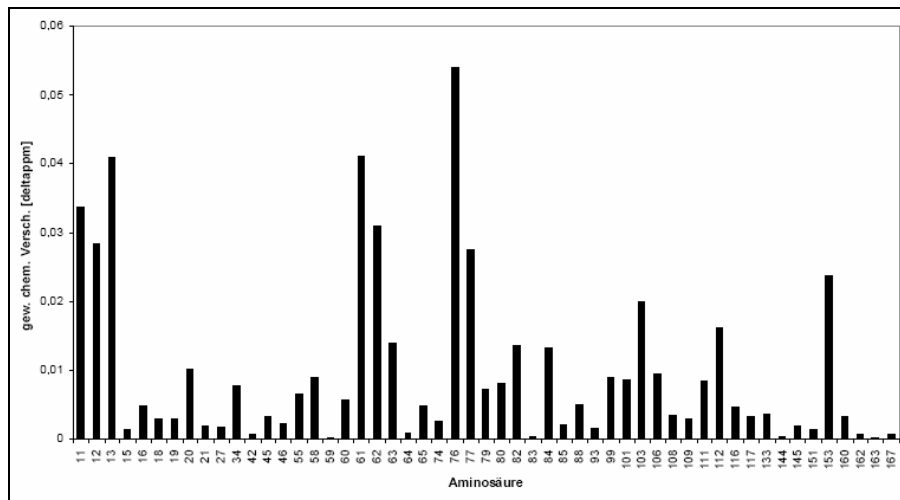
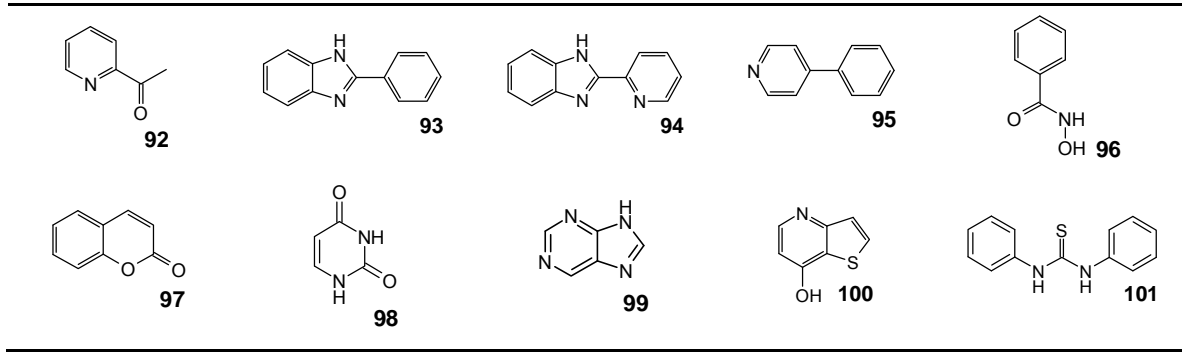
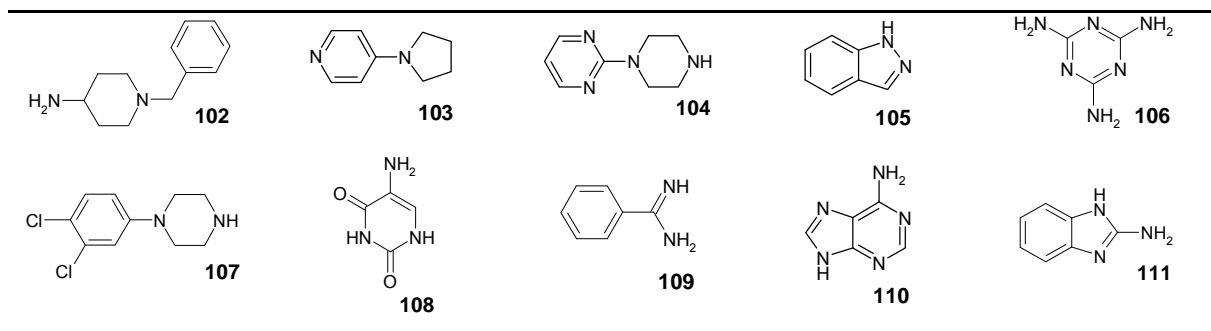


Abb. 129: Das Verschiebungdiagramm von Rheb durch Zugabe von Gemisch 2.<sup>[93]</sup>

Tab. 25: Die Verbindungen des Gemisches 3 (basisch).



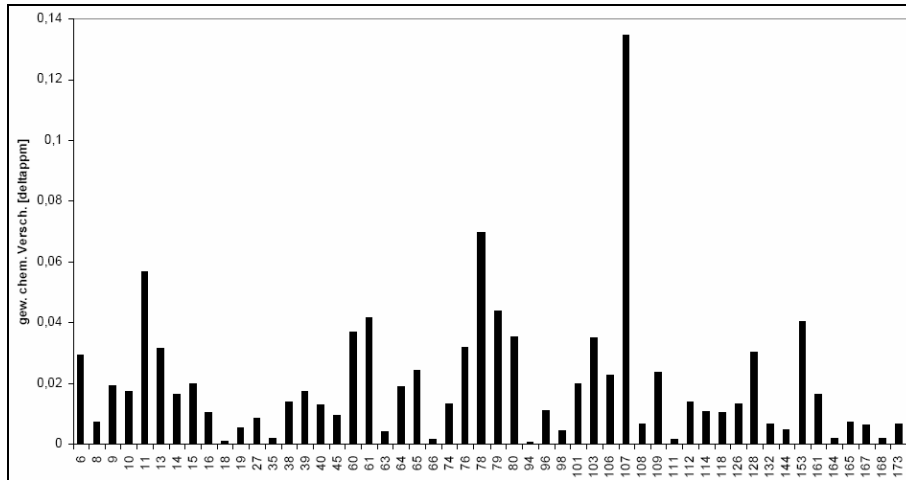


Abb. 130: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb durch Zugabe von Gemisch 3.<sup>[93]</sup>

Tab. 26: Die Verbindungen des Gemisches 4 (basisch).

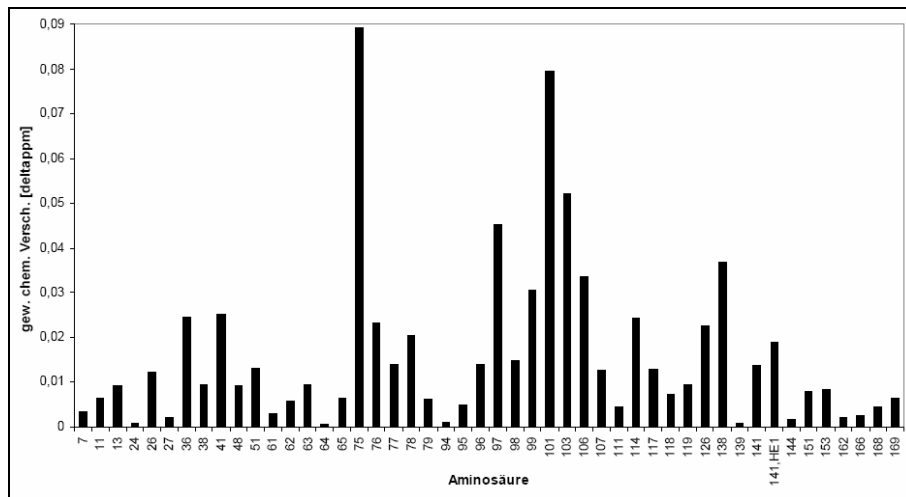
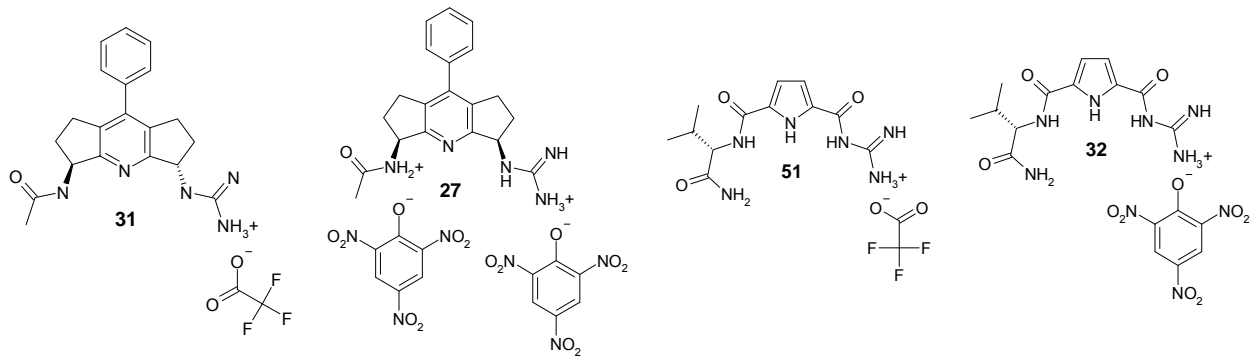


Abb. 131: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb durch Zugabe von Gemisch 4.<sup>[93]</sup>



Tab. 27: Die Verbindungen aus Gemisch 5 (sauer).

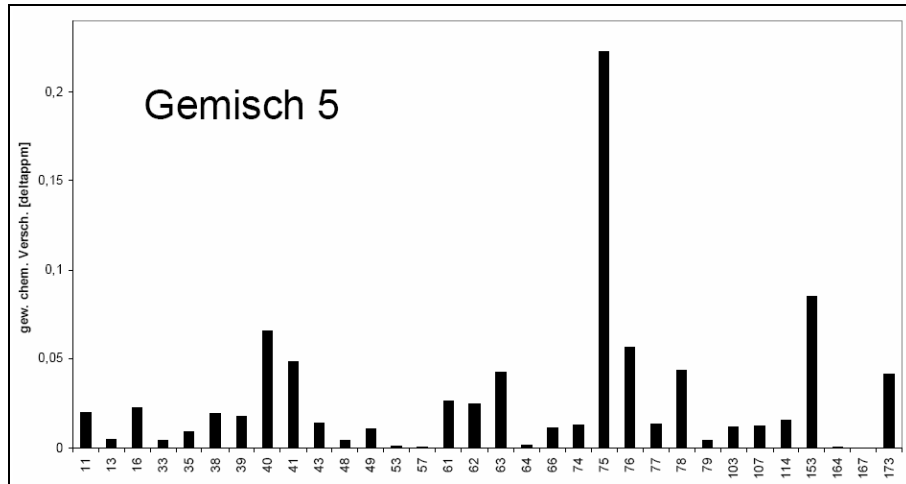
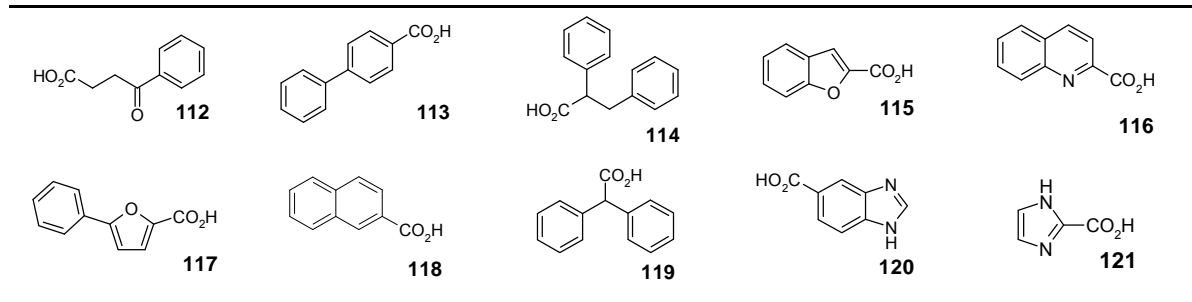


Abb. 132: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb durch Zugabe von Gemisch 5.<sup>[93]</sup>

Tab. 28: Die Verbindungen des Gemisches 6 (sauer).

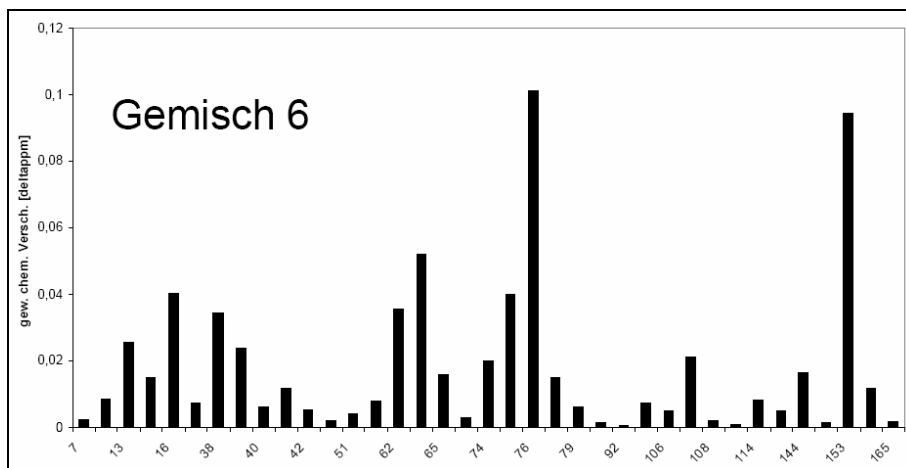
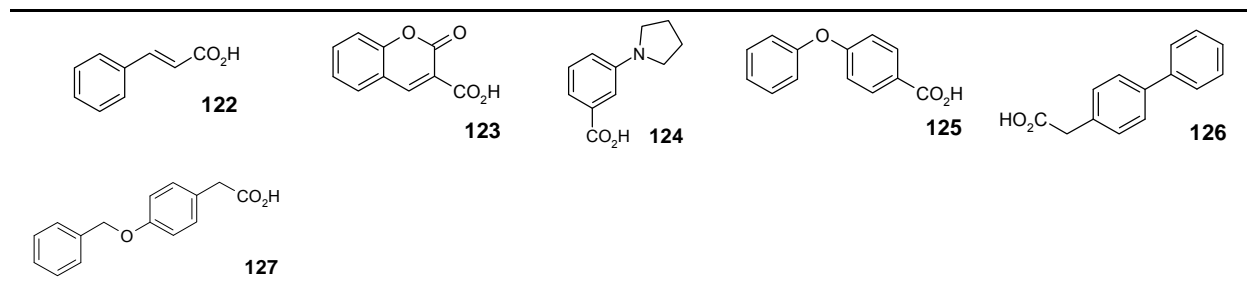


Abb. 133: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb durch Zugabe von Gemisch 6.<sup>[93]</sup>

Tab. 29: Die Verbindungen des Gemisches 7 (neutral).

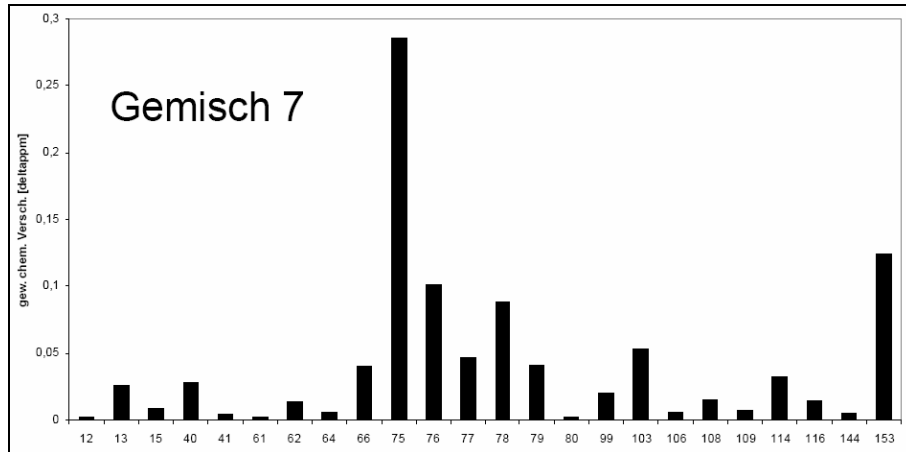
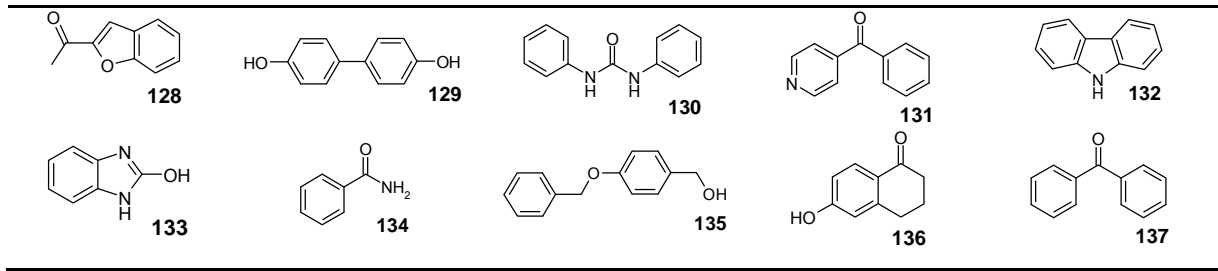


Abb. 134: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb durch Zugabe von Gemisch 7.<sup>[93]</sup>

Tab. 30: Die Verbindungen des Gemisches 8 (basisch).

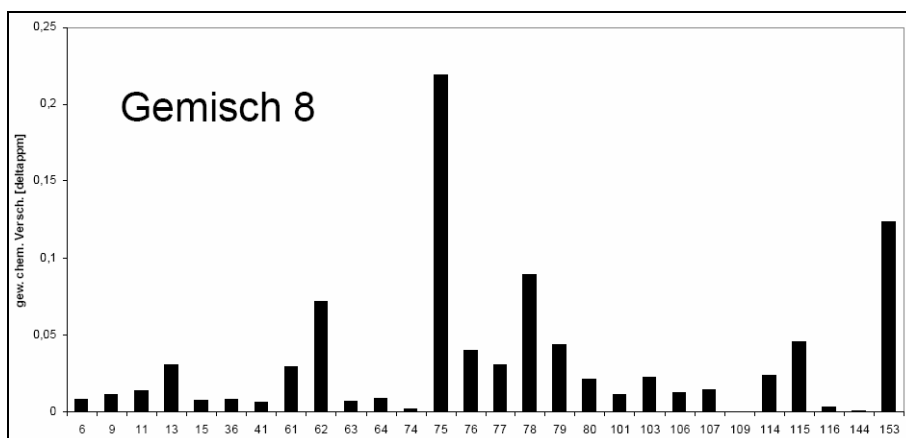
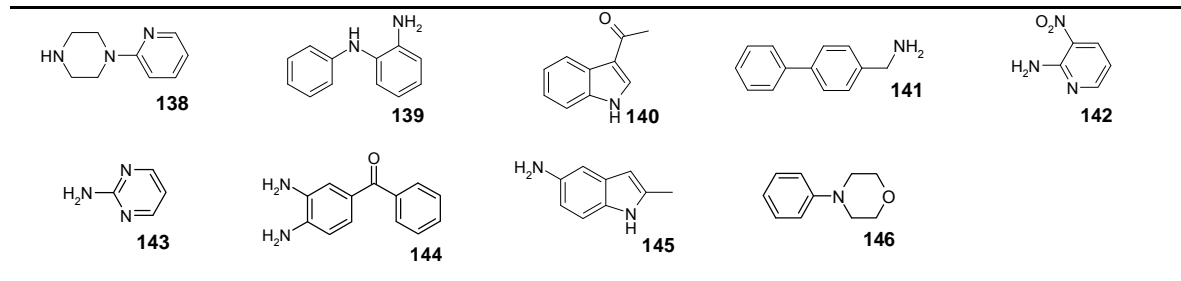


Abb. 135: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb durch Zugabe von Gemisch 8.<sup>[93]</sup>

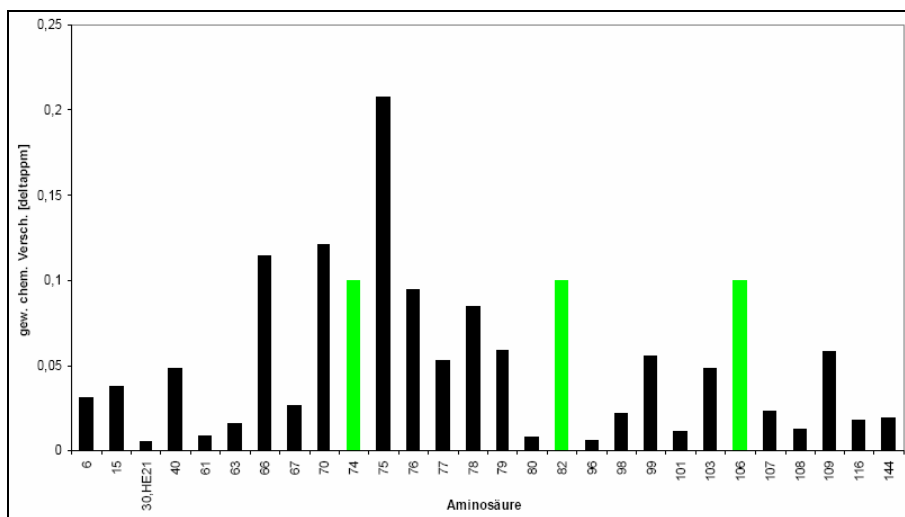
**Tab. 31: Die Zusammenfassung für die untersuchten Gemische 1 bis 8. Aufgelistet sind die in den Switch-Regionen (I und II) des Rheb-Proteins shiftenden AS, sowie der im Verschiebungsdiagramm maximal feststellbare Shift ( $\Delta\delta$ ) für eine der Switch-Regionen. \* = Der in Klammern gesetzte Wert für  $\Delta\delta$  befindend sich als einziger außerhalb der Switch-II-Region (AS 107).**

| Gemisch | shiftende AS von<br>Switch-I (33-41) | shiftende AS von<br>Switch-II (63-79) | Max. $\Delta\delta$ * |
|---------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| 1       | 35,38,39,40,41                       | 63,74,75,76,78,79                     | 0.11                  |
| 2       | 34                                   | 63,64,66,74,76,77,79                  | 0.055                 |
| 3       | 35,38,39,40                          | 63,64,65,66,74,76,78,79               | 0.07 (0.13)*          |
| 4       | 36,38,41                             | 63,64,65,75,76,77,78,79               | 0.09                  |
| 5       | 33,35,39,40,41                       | 63,64,66,74,75,76,77,78,79            | 0.25                  |
| 6       | 38,39,40,41                          | 63,74,75,76,77 o. 78,79               | 0.11                  |
| 7       | 40,41                                | 66,75,76,77,78,79                     | 0.28                  |
| 8       | 36,41                                | 63,64,74,75,76,77,78,79               | 0.22                  |

Als Maß für die Stärke der Wechselwirkung zwischen den jeweiligen Fragmenten und den AS des Proteins wird der Wert der gewichteten chemischen Verschiebung herangezogen. Diese Vorgehensweise liefert keine absoluten Werte, da nur eine Titration zur Bestimmung von Assoziationskonstanten herangezogen werden kann. Der Wert liefert jedoch einen Hinweis, welche Gemische stärker bindende Fragmente enthalten: Es kann also eine Vorselektierung der Bibliotheken durchgeführt werden, um die Anzahl der Einzeluntersuchungen zu reduzieren. Wenn die maximale chemische Verschiebung durch Zugabe eines Gemisches bereits klein ist, werden auch die Einzelverbindungen vermutlich nicht geeignet sein.

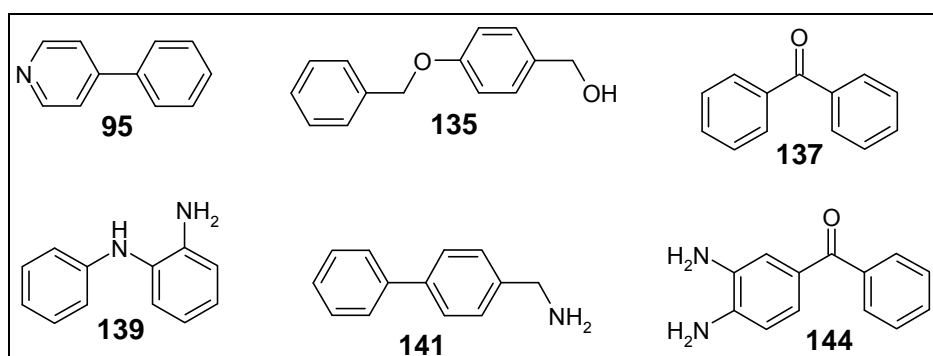
Gemisch 7 führte zu den größten Werten für  $\Delta\delta$ , zudem wurden AS geshiftet, die über die gesamte Switch-II-Region verteilt waren. Gemisch 7 wurde zunächst für die Untersuchung der Einzelverbindungen ausgewählt. Hierdurch wurde die Verbindung **129** (4,4'-Biphenol) identifiziert:

Mittels einer NMR-Titration wurde die Affinität von 4,4'-Biphenol mit dem Rheb-Protein bestimmt: 4,4'-Biphenol bindet mit einer  $K_D$  von **1500** +/- 200  $\mu\text{M}$  an das Protein bzw. in die, der Switch-II-Region benachbarten, Bindetasche.<sup>[122,93]</sup>



**Abb. 136:** Das Verschiebungsdiagramm von Rheb durch Zugabe von 4,4'-Biphenol. Die grünen Balken markieren jene AS, die infolge der Zugabe des 4,4'-Biphenols im HSQC nicht mehr zugeordnet werden konnten (z. B. durch Überlagerung mit anderen Signalen).<sup>[93]</sup>

Durch die Untersuchung der Einzelverbindungen aus den Gemischen 1, 2, 3, 5 und 8 konnten weitere Verbindungen identifiziert werden, die eine Wechselwirkung mit der Switch-II-Region verursachten.



**Abb. 137:** Die Abbildung zeigt die aus den Untersuchungen der Einzelkomponenten der Gemische 1-8 hervorgegangenen Verbindungen, die ebenfalls Shifts im Bereich der Switch-II-Region des Rheb-Proteins verursachten.<sup>[93]</sup>

Dieser erste Treffer (4,4'-Biphenol) bildete die Grundlage für die weitere Vorgehensweise. In den anderen Gemischen wurde nach Fragmenten gesucht, die in der Nähe der durch Verbindung **129** erkannten AS der Switch-II-Region binden. Zudem sollten die Verschiebungen in diesen Nachbarbereichen möglichst groß sein.

Hierbei waren besonders Gemisch 3 und Gemisch 5 interessant; durch Gemisch 3 wurden zusätzlich zu Teilen der Switch-II-Region (AS 63, 64, 65, 66, 74, 76, 78, 79) die AS 60, 61 und 80 geshiftet, die in direkter Nachbarschaft zu der erkannten Region von Verbindung **129** (4,4'-Biphenol) stehen.

Durch Einzeluntersuchung der Verbindungen des Gemisches wurde Verbindung **107** ((3,4-Dichlorphenyl)-piperazin) identifiziert:

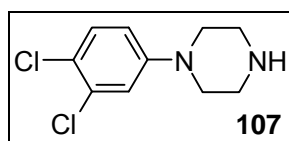


Abb. 138: Das (3,4-Dichlorphenyl)piperazin (**107**).

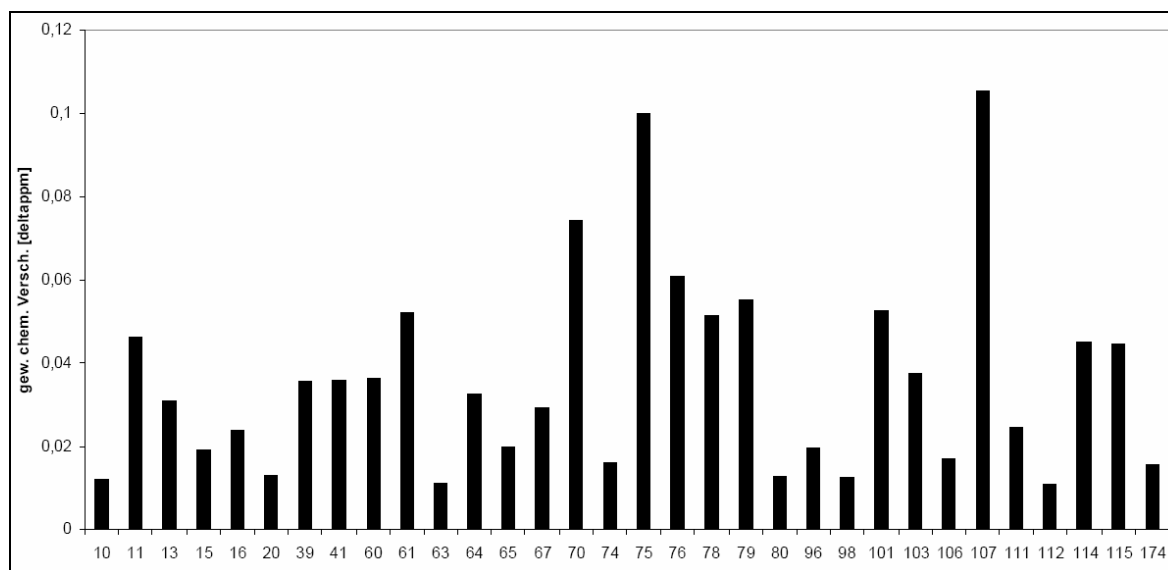


Abb. 139: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb durch Zugabe von (3,4-Dichlorphenyl)-piperazin.<sup>[93]</sup>

Die einzelne Verbindung zeigte hierbei markante Verschiebungen der AS 60 und 61 (0.04 und 0.05 pm), jedoch nur eine kleine für AS 80. Verbindung **107** und **129** binden in die gleiche Tasche (Switch-II), weshalb Hybridstrukturen beider Verbindungen vorgeschlagen wurden, um so eine Optimierung des Liganden zu erreichen. Hierbei wurden die beiden Aromaten des jeweiligen Biphenyls kombiniert. Biphenol ist symmetrisch: Entsprechend erfolgten die Kombinationen von 4-Hydroxyphenyl-, 3,4-Dichlorphenyl- und Piperazinylresten. Die einzelnen Reste wurden zum einen direkt (käufliche Verbindung), zum anderen über eine Carbonylgruppe verknüpft (Abb. 140).<sup>[119]</sup>

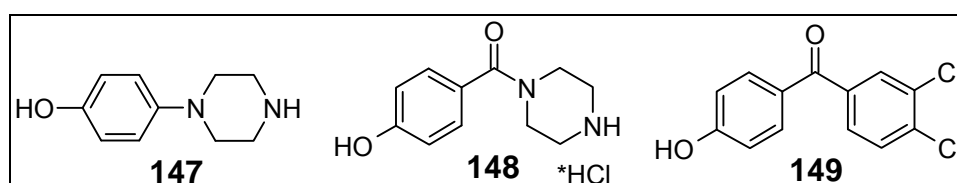


Abb. 140: Die Hybridverbindungen zur Optimierung des ersten Liganden.

Die Synthese des 4-(3,4-Dichlorbenzoyl)phenols **149** erfolgte durch Friedel-Crafts-Acylierung von Anisol mit 3,4-Dichlorbenzoylchlorid und anschließender Entschützung des Methylethers mit  $\text{BBr}_3$  (Abb. 141).<sup>[119]</sup>

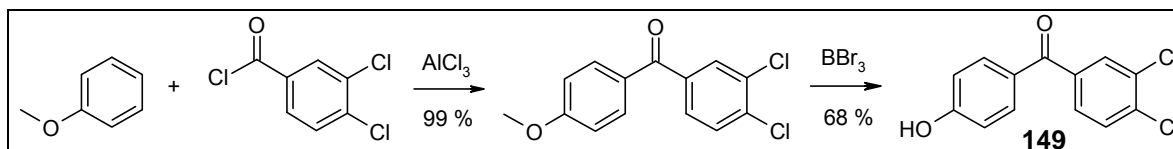


Abb. 141: Die Synthese der Carbonyl-verbrückten Hybridstruktur **149**.<sup>[119]</sup>

Die Synthese des (4-Piperazin-1-carbonyl)phenols **148** erfolgte ausgehend von 4-Hydroxybenzoesäure durch die Acylierung der OH-Gruppe und der anschließenden Chlorierung zum Säurechlorid **150**. In einem konvergenten Schritt wurde das Säurechlorid mit dem einfach *N*-Boc geschützten Piperazin **151** gekuppelt. Die anschließende Entschützung des Acetats und der *N*-Boc-Gruppe lieferte die zweite Hybridstruktur (**148**, Abb. 142).<sup>[119]</sup>

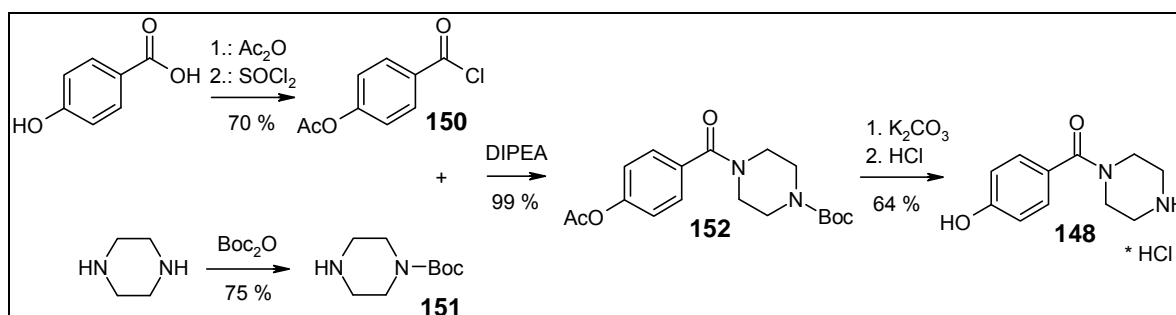


Abb. 142: Die Synthese der verbrückten Hybridstruktur **148**.<sup>[119]</sup>

Bei der Untersuchung der drei Liganden zeigte Verbindung **147** keine Bindung an das Rheb-Protein. Verbindung **148** ergab keine Verbesserung in Bezug auf die eigentliche Stammverbindung 4,4'-Biphenol. Die erhaltenen Verschiebungen sind im Durchschnitt wesentlich kleiner und es traten keine nennenswerten Verschiebungen in weiteren Bereichen auf (Abb. 143).

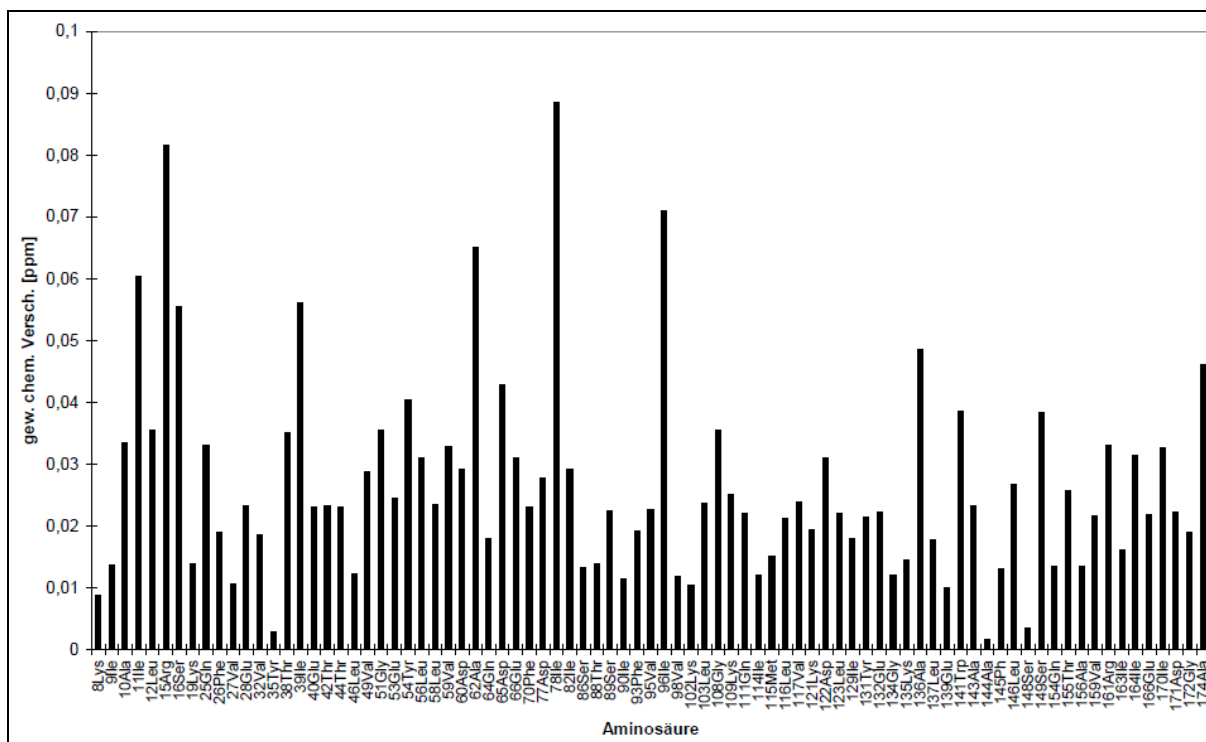


Abb. 143: Die Abbildung zeigt das Verschiebungsdigramm von Rheb durch Zugabe von (4-Piperazin-1-carbonyl)phenol (148).

Verbindung **149** war unter den Messbedingungen (5 %  $d_6$ -DMSO in wässrigem Puffer) nicht löslich und konnte entsprechend nicht am Rheb-Protein untersucht werden.

Bei der Untersuchung des 3,4-Dichlorphenylpiperazins **107** wurden moderate Verschiebungen im Bereich der Switch-I-Region detektiert (AS 39 und 41, jeweils 0.04 ppm). Da sich in diesem Bereich des Proteins das (von GDP komplexierte) Magnesiumion befindet, wurde ein Derivat synthetisiert, welches in der Lage sein sollte, zusätzlich am Magnesiumion zu koordinieren. Hierzu wurde das Dithioat **153** verwendet:

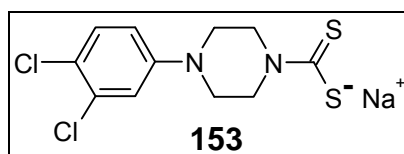


Abb. 144: Das Natriumdithioat **153**.

Das Dithioat **153** wies hierbei im direkten Vergleich zu der Stammverbindung **107** eine weitere shiftende AS (38, 39, 40) in der Switch-I-Region auf, zudem stiegen die chemischen Verschiebungen auf das 2-3-fache (bis 0.12 ppm).

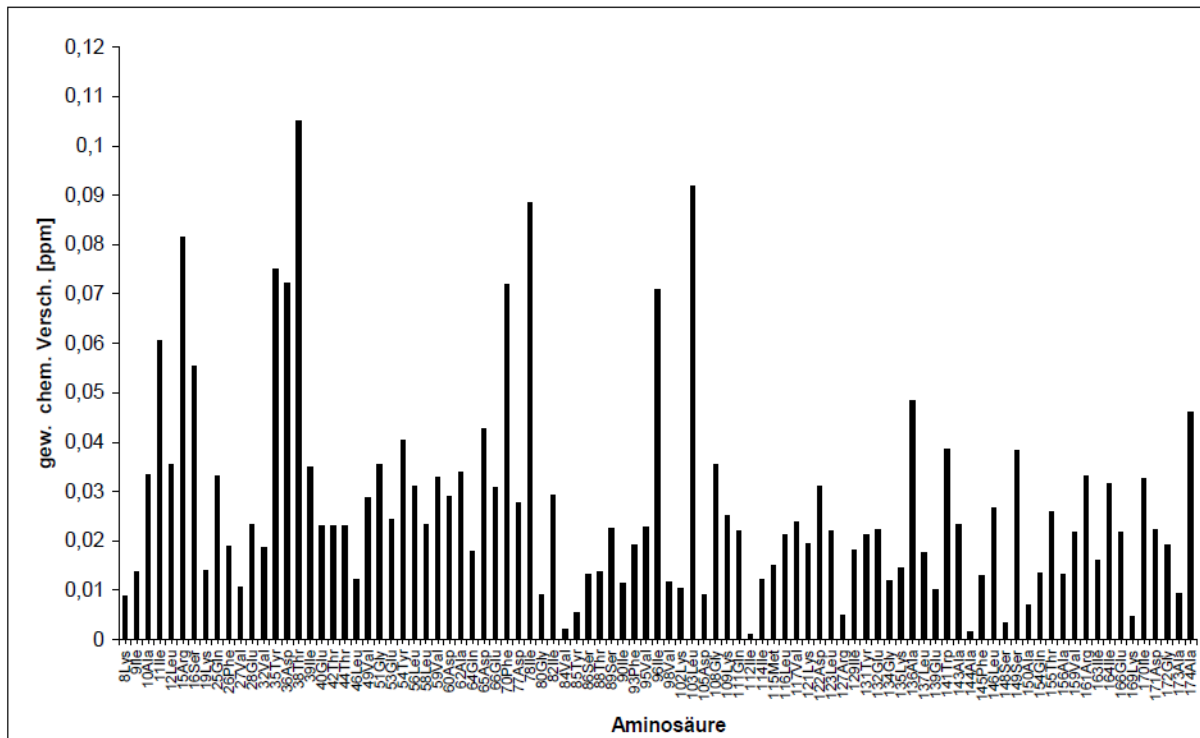


Abb. 145: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb durch Zugabe des Natriumdithioats 153 (MAS-010-04).

Die zusätzlich bei Verbindung 107 auftretenden Verschiebungen im Bereich der Switch-II-Region sind wesentlich schwächer als bei der ursprünglichen Stammverbindung.

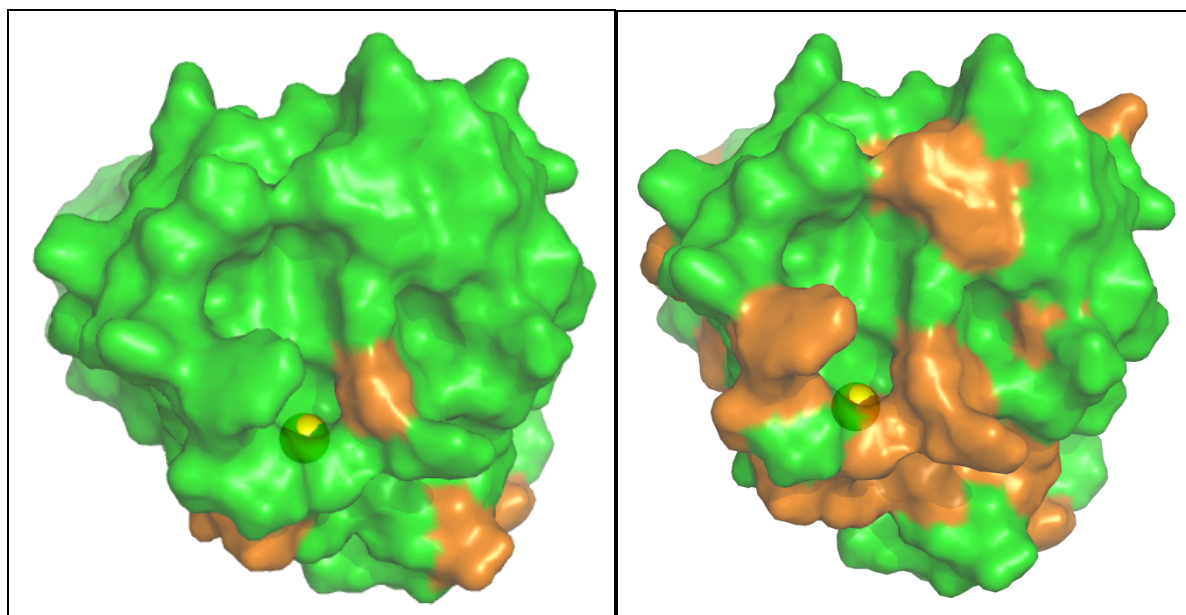


Abb. 146: Die linke Abbildung zeigt die shiftenden Bereiche durch Zugabe von 10 Äq. des (3,4-Dichlorphenyl)piperazins (107) zum Rheb-Protein. Die rechte Abbildung zeigt die shiftenden Bereiche durch Zugabe von 10 Äq. des Natriumdithioats 153 zum Rheb-Protein. Die orange markierten Bereiche kennzeichnen Shifts > 0.02 ppm. Das Magnesiumion ist gelb markiert (pdb-Code: 2L0X).<sup>[120]</sup>



Mit weiteren Derivatisierungen des Dithioats **153** ist es eventuell möglich, einen selektiven Binder der Switch-I-Region zu generieren. Den direkten Vergleich der shiftenden Bereiche auf der Proteinoberfläche zeigt Abb. 146. Durch Zugabe des Dithioats werden wesentlich mehr AS in Bereich des Magnesiumions erkannt.

Eine weitere Optimierung für die Switch-II-Region erfolgte durch die Einzeluntersuchung von verschiedenen Biphenylanaloga des 4,4'-Biphenols. Die untersuchten zwölf Verbindungen waren teilweise in der Form von Biphenylen starr verknüpft. In den restlichen Verbindungen wurden die Strukturelemente über eine kurze Brücke, wie einem Sauerstoffatom (Biphenylether), einer Carbonylgruppe (Biphenylketone) oder einer Methylen- bzw. 2,2-Propylenyl-einheit (Bisphenol A) verknüpft. Nicht funktionalisierte Verbindungen wie Biphenyl konnten aufgrund der geringen Löslichkeit (in 5 %  $d_6$ -DMSO (aq)) nicht untersucht werden.

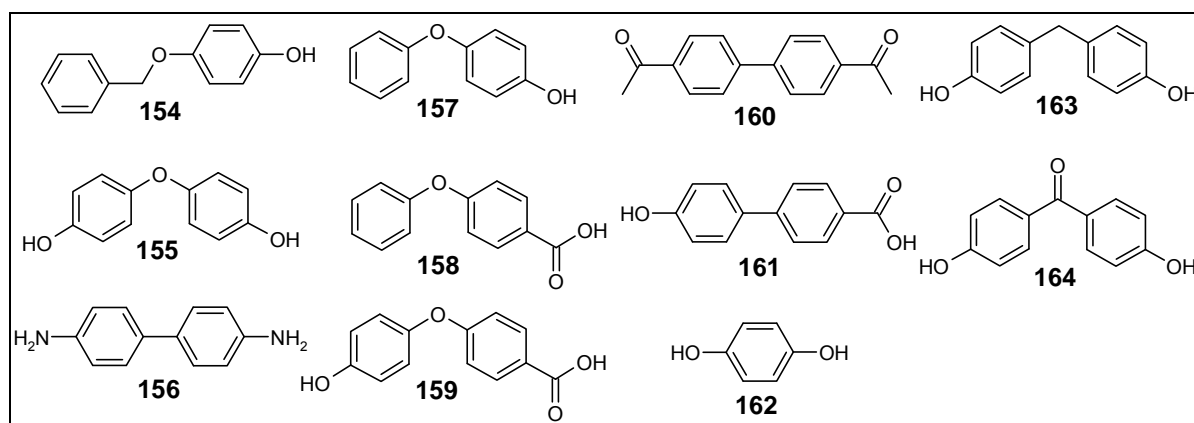


Abb. 147: Die Abbildung zeigt die untersuchten Biphenolanaloga.

Die entsprechenden Messungen wurden dann hinsichtlich ihrer Interaktion mit der Switch-II-Region bewertet. Hierzu wurden die Shifts markanter Aminosäuren (S75, F70, E66 und F69) qualitativ in Relation gesetzt (- < + < ++ < +++). Die Verbindungen **156**, **159**, **160** und **162** ergaben besonders kleine Shifts, zeigten also keine signifikante Bindung. Die aprotische Verbindung **160** ist nicht in der Lage H-Brücken einzugehen und Dihydrochinon (**162**) ist zu klein, um die Bindetasche adäquat auszufüllen.

Verbindung **159** weist eine Carboxylfunktion anstelle einer Hydroxylgruppe auf: Die schlechtere Bindung kann durch die gesteigerte Länge des Moleküls (das dann für die Tasche zu groß wird) und der veränderten Struktur der funktionellen Gruppe (gesteigerte Acidität im Vergleich zur Hydroxyfunktion) erklärt werden. Ob Benzidin (**156**) infolge der basischen Funktion oder aufgrund zu geringer Löslichkeit (0.4 mg /

mL in H<sub>2</sub>O<sup>[121]</sup>) nur eine kleine Verschiebung ergab, konnte nicht geklärt werden. Verbindung **155**, **157** und insbesondere **164** ergaben große Shifts der Proteinsignale. In allen drei Verbindungen sind beide Aromaten über einen ähnlichen, gewinkelten Spacer (Ether bzw. Keton) verknüpft, die zu einer besonders geeigneten Orientierung der beiden Aromaten innerhalb der Bindetasche führten.

**Tab. 32: Die Tabelle zeigt (qualitativ) die Verschiebungen markanter AS der Switch-II-Region des Rheb-Proteins durch Zugabe der Biphenolanaloga 154 bis 164 (Phe1 bis Phe11).**<sup>[93]</sup>

| Verbindung | AS S75 | AS F70 | AS R66 | AS F69 |
|------------|--------|--------|--------|--------|
| <b>154</b> | +      | -      | +      | -      |
| <b>155</b> | ++     | +      | +      | +      |
| <b>156</b> | -      | -      | -      | -      |
| <b>157</b> | ++     | +      | +      | +      |
| <b>158</b> | +      | +      | -      | -      |
| <b>159</b> | +      | -      | -      | -      |
| <b>160</b> | -      | -      | -      | -      |
| <b>161</b> | +      | +      | -      | -      |
| <b>162</b> | -      | -      | -      | -      |
| <b>163</b> | ++     | +      | -      | +      |
| <b>164</b> | +++    | ++     | +++    | +++    |

Der Einfluss dieser gewinkelten Struktur wurde näher untersucht und ein Analogon gewählt, indem diese stärker fixiert ist: Bisphenol A. Dieses ergab, neben 4,4'-Biphenol, die bisher stärksten Verschiebungen und somit wahrscheinlich auch einer der stärksten Assoziationen mit dem Rheb-Protein. Die entsprechende K<sub>D</sub> wurde in einem Titrationsexperiment bestimmt.<sup>[122]</sup>

Für Bisphenol A und das Rheb-Protein resultierte eine K<sub>D</sub> von **1800** +/- 500 µM. 4,4'-Biphenol bindet mit etwas größerer Affinität an das Rheb-Protein (K<sub>D</sub> = **1500** +/- 200 µM). Die Bindung von 4,4'-Biphenol an Rheb weist hierbei eine gewisse Selektivität auf, da das gleiche Molekül nicht an das K-Ras-Protein bindet, obwohl dieses über eine ähnliche, wenn auch kleinere Bindetasche in der Switch-II-Region verfügt. Bisphenol A bindet hingegen mit noch wesentlich besserer Affinität an das K-Ras-Protein: Die entsprechende NMR-Titration ergab eine K<sub>D</sub> von **600** +/- 200 µM.<sup>[122]</sup>

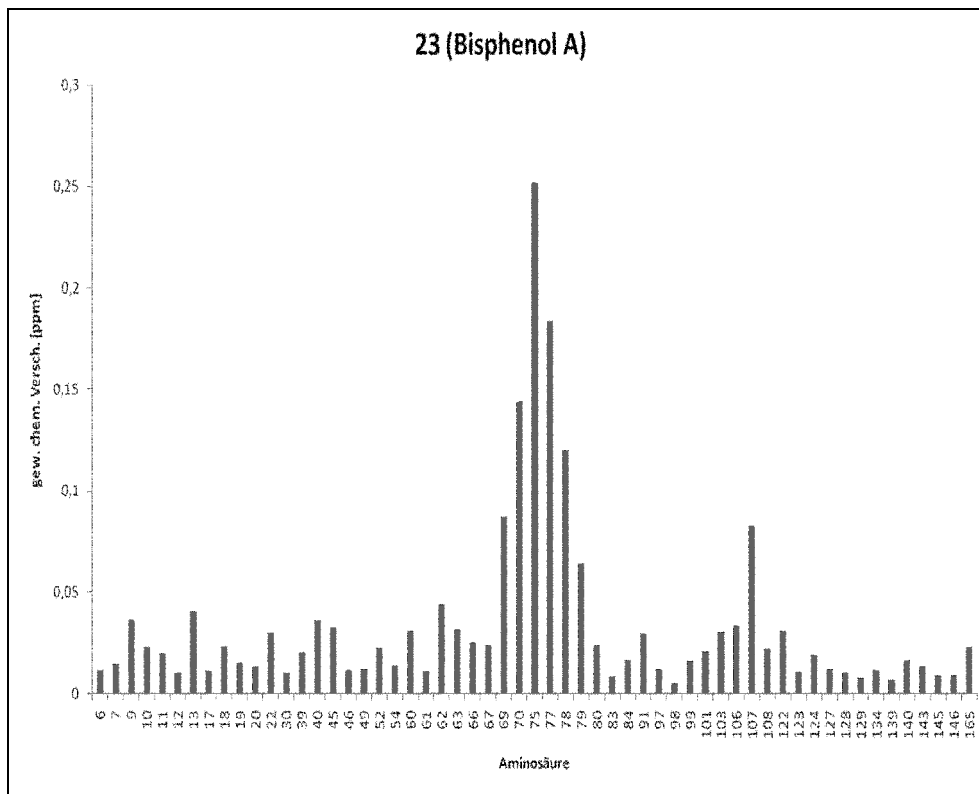


Abb. 148: Das Verschiebungsdiagramm von Rheb durch Zugabe von Bisphenol A.<sup>[93]</sup>

Über die NMR-Titrations hinaus, wurde die Wechselwirkung von Bisphenol A mit dem K-Ras-Protein in einem Nukleotid-Austausch-Assay untersucht: Bisphenol A (**165**) verringert (bei 1 mM Konzentration) den durch SOS (ein GEF) vermittelten Austausch von K-Ras•GDP zu K-Ras•GTP (Aktivierung von K-Ras) um den Faktor 1.6, bei dem H-Ras-Protein sogar um den Faktor 2.5.<sup>[122]</sup>

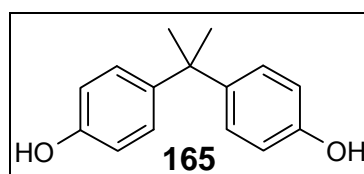


Abb. 149: Das Bisphenol A (**165**).

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Synthese einer neuen Kopfgruppe zur molekularen Erkennung von Carbonsäuren

Auf der Basis einer von Anslyn et al. publizierten Synthese wurde eine Kopfgruppe für peptidische Rezeptorbibliotheken entwickelt. Trotz günstiger geometrischer Anordnung der für die Komplexierung einer Carbonsäure benötigten Funktionalitäten, lagen die ermittelten Assoziationskonstanten der entsprechenden Derivate nur im Bereich von 165 bis 731 M<sup>-1</sup> (in 100 % d<sub>6</sub>-DMSO) und nahmen mit zunehmendem Wasseranteil des Lösungsmittels stark ab. Da die literaturbekannte Kopfgruppe von Schmuck et al. eine bessere Affinität zu Carbonsäuren aufweist, wurde diese für die Synthese der Bibliotheken verwendet.

### 5.2 Rezeptoren der CaaX-Box von Rheb, K-Ras4B und H-Ras

Durch die Synthese von 20 kombinatorischen Bibliotheken (unter Verwendung von *L*- und *D*-Aminosäuren) und anschließendem Screening gegen 3 markierte CaaX-Peptide konnten zahlreiche Hits (selektiv fluoreszierende Beads) gefunden werden. Durch die anschließende Massenanalyse dieser Beads wurden Rezeptoren identifiziert, bzw. die Hits auf wenige Strukturvorschläge reduziert. Geeignete Strukturen und Strukturvorschläge wurden erneut gescreent, um die Konfiguration der korrekten Stereoisomere zu ermitteln. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die Synthese (der geeignetsten) 11 Rezeptoren in präparativen Mengen (bis zu 160 mg). Diese wurden mittels NMR-Titrationen mit den CaaX-Peptiden charakterisiert. Hierbei wurden in reinem d<sub>6</sub>-DMSO für 10 von 11 Rezeptoren sehr große Assoziationskonstanten von  $\geq 10^5$  M<sup>-1</sup> ermittelt. Auch Schmuck et al. konnte sehr große Werte für die Erkennung in reinem d<sub>6</sub>-DMSO ( $> 10^6$ ) ermitteln, womit die erhaltenen Werte zwar herausragend für die CaaX-Boxen sind, jedoch nicht einzigartig in Bezug auf die bekannte Literatur der verwendeten Kopfgruppe.<sup>[85]</sup>

Für die Titrationen in 60 % d<sub>6</sub>-DMSO (aq), das ein wesentlich kompetitiveres Lösungsmittel ist, wurden sehr variable Werte erhalten, die für das Rheb-CaaX-Peptid maximal bis zu **20 000 – 30 000** M<sup>-1</sup> erreichten (Tab. 20). Für das K-Ras4B-CaaX-Peptid wurden zwei Rezeptoren untersucht, wobei nur ein Rezeptor eine

zufriedenstellende  $K_A$  von **4100** +/- 1900 lieferte. Für den weiteren Rezeptor konnte kein Shift durch Zugabe des CaaX-Peptids festgestellt werden ( $K_A \leq 10$ ). Für das H-Ras-CaaX-Peptid wurden ebenfalls zwei Rezeptoren untersucht. Auch hier ergab ein Rezeptor eine akzeptable  $K_A$  von **1150** +/- 560, für den zweiten konnte ebenfalls kein Shift festgestellt werden ( $K_A \leq 10$ ).

Für den besten Rezeptor (H<sub>2</sub>NOC-D-Lys-L-Pro-AC5C-KG) konnte zudem gezeigt werden, dass dieser auch die längeren C-terminalen Peptide (11- und 14-mer) des Rheb-Proteins erkennt (**1667** +/- 297 M<sup>-1</sup>, **1311** +/- 246 M<sup>-1</sup>).

### 5.3 Fragmentscreening

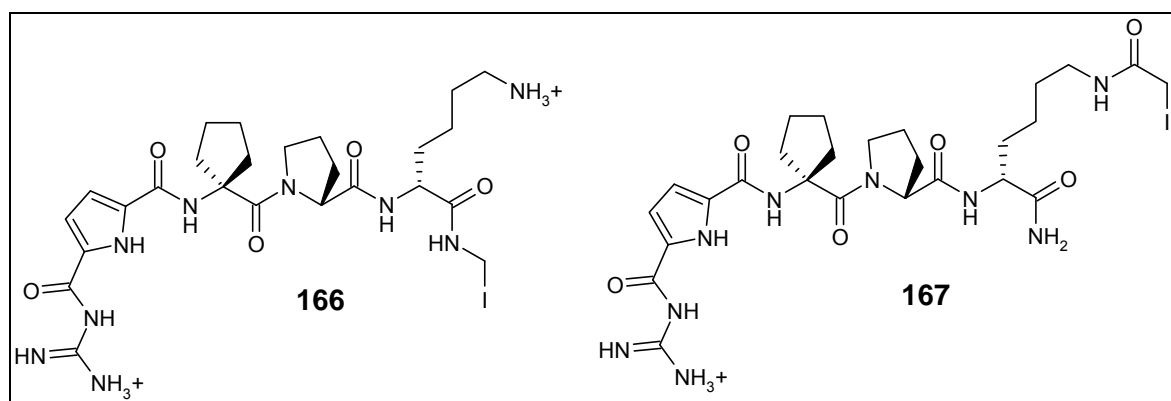
Durch die Untersuchung von weniger als 100 Verbindungen konnten zwei, im unteren millimolaren Bereich ( $K_D$ ) bindende Liganden des Rheb-Proteins identifiziert werden: Bisphenol A und 4,4'-Biphenol.<sup>[93]</sup> Diese binden mit einer  $K_D$  von **1800** +/- 500 und **1500** +/- 200  $\mu$ M in eine, der Switch-II-Region benachbarten Bindetasche. Bisphenol A bindet mit noch größerer Affinität an das K-Ras4B-Protein ( $K_D = 600$  +/- 200  $\mu$ M). Die gefundene Dissoziationskonstante liegt im Bereich literaturbekannter Inhibitoren des K-Ras-Proteins wie 190  $\mu$ M<sup>[33]</sup> und 1.1 mM<sup>[34]</sup>. Bisphenol A verringert (bei 1 mM Konzentration) zudem den durch SOS (ein GEF) vermittelten Austausch von K-Ras•GDP zu K-Ras•GTP um den Faktor 1.6, bei dem H-Ras-Protein sogar um den Faktor 2.5.<sup>[122]</sup>

## 6 Ausblick

### 6.1 Rezeptoren der CaaX-Box von Rheb, K-Ras4B und H-Ras

Die aus den NMR-Titrationsen der 11 Rezeptoren (Abb. 100) hervorgegangenen, besonders affinen Rezeptoren könnten durch geeignete Modifikation mit elektrophilen Reagenzien (wie Iodacetamid) zur selektiven, irreversiblen Derivatisierung der CaaX-Boxen (am Thiol des Cysteins) in den zugehörigen Proteinen dienen. Hierdurch könnte eine Membraneinbindung der Proteine unterbunden werden.

Die entsprechende Synthese kann zum einen von den festphasengebundenen Rezeptoren ausgehen, indem der Rezeptor mittels eines basisch spaltbaren Linkers, wie HMBA, synthetisiert wird. Der in diesen Fall als Ester (an der Festphase) vorliegende Rezeptor könnte dann durch Aminoiodmethan als Iodacetamidderivat **166** abgespalten werden. Eine weitere Synthese kann erfolgen, indem das bekannte Syntheseprotokoll (auf Rink-Amid-Harz) durch Verwendung der Cbz-geschützten Kopfgruppe<sup>[79]</sup> durchgeführt wird und der erhaltene Rezeptor nach saurer Abspaltung mit Iodessigsäure gekuppelt wird. Hierdurch kann das entsprechende Iodacetamidderivat erhalten werden, welches nach Abspaltung dem Strukturvorschlag **167** entspricht.



**Abb. 150:** Die Abbildung zeigt vorgeschlagene, modifizierte Rezeptoren zur irreversiblen Inhibition der CaaX-Box von Rheb (links: durch Abspaltung mit Aminoiodmethan, rechts: durch Kupplung mit Iodessigsäure).

Auch wäre eine Kombination der gefundenen Aminosäurekombination mit der sehr flexiblen, Lysinbasierenden Kopfgruppe von Nestler et al. (siehe Abb. 18) möglich, um durch den so erhaltenen (vierarmigen Rezeptor) die Affinität zu erhöhen. Da der

von Nestler in einem FTase-assay beschriebene Rezeptor selbst in einer Mischung aus 30 mM MgCl + 20 mM KCl (aq) noch einen IC<sub>50</sub> von ~ 100 µM<sup>[66]</sup> lieferte, sollte die dort verwendete Kopfgruppe, welche nur aus peptidisch verknüpften Aminosäuren besteht und somit weniger stark geladen ist, nicht durch die Gegenwart von Salzen gestört werden.

## 6.2 Fragmentscreening

Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen nach dem von Fesik vorgestellten Prinzip<sup>[115]</sup> (Abb. 125) im Wesentlichen der Identifikation und Optimierung der ersten Bindestelle. Eine zweite Bindestelle befindet sich in Form eines negativ geladenen Grabens in direkter Nachbarschaft:

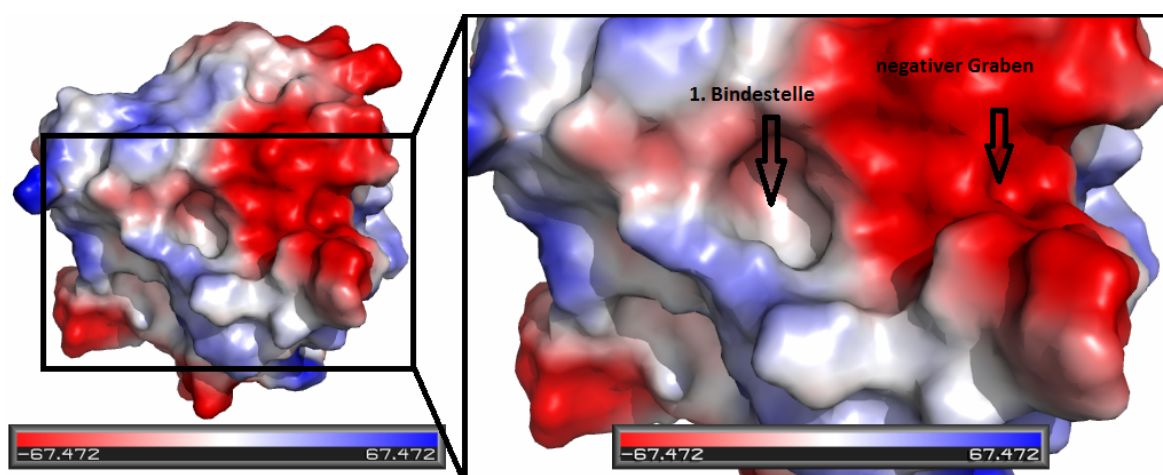
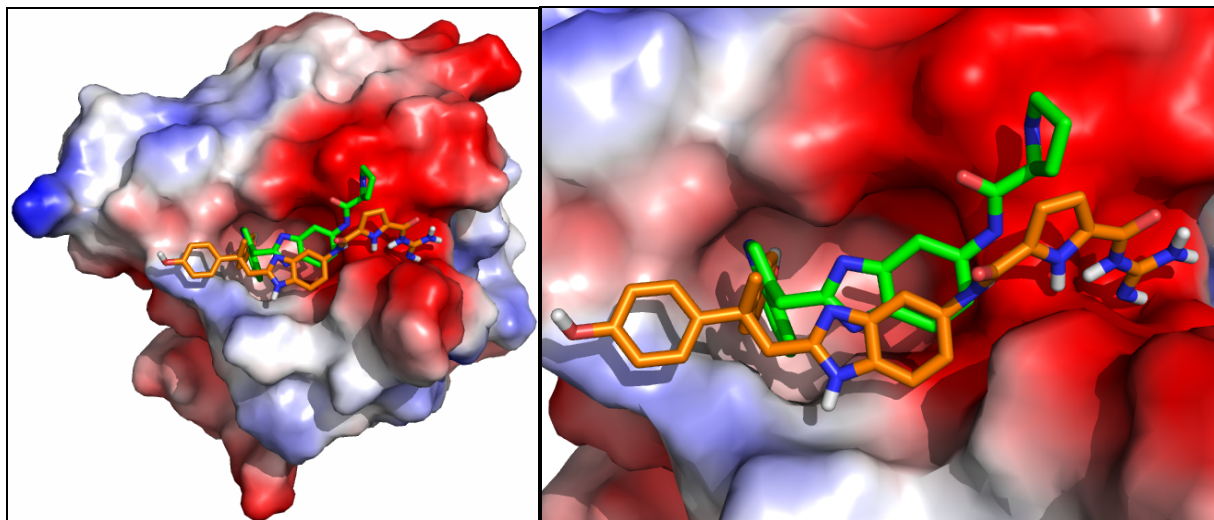


Abb. 151: Die von Fesik beschriebene Kokristallstruktur eines Liganden mit KRas4B. Dargestellt ist das elektrostatische Potential der Oberfläche (im Vakuum). Rechts: Die Vergrößerung und Markierung von Teilbereichen (pdb-Code: 4EPY).<sup>[33]</sup>

Weitere Liganden und Bindestellen des K-Ras4B-Proteins und deren Röntgenstrukturen sind literaturbekannt (Abb. 7, Abb. 8, Lit. <sup>[33]</sup>). Hierauf basierend, kann zusammen mit der ermittelten Bindung von Bisphenol A eine weitere Optimierung erfolgen. Der beschriebene, auf die gleiche Bindestelle optimierte Ligand **6a** weist eine K<sub>D</sub> von 190 µM auf. Es befindet sich jedoch nur ein kleiner Teil von **6a** in der von Bisphenol A erkannten Tasche, weshalb lediglich ein Teil der Bindungsaffinität hierauf zurückgeht. Durch das Verbinden beider Teilstrukturen (Bisphenol A und **6a**, bzw. **6b**, hier ist eine Cokristallstruktur bekannt) sowie dem Ersetzen einfacher

Amine (ionische Wechselwirkung zu Carbonsäureseitenketten des Proteins) durch die Schmucksche Kopfgruppe sollte die Affinität zum K-Ras4B-Protein gesteigert werden.

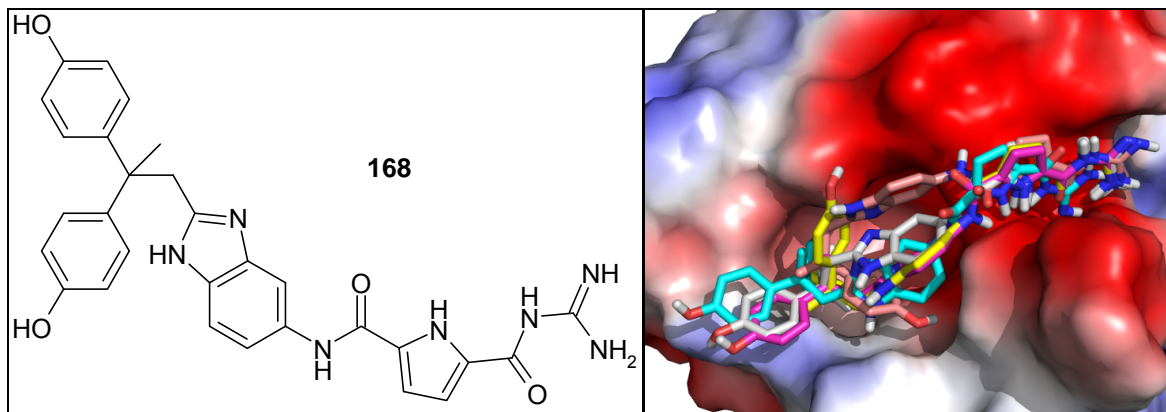
Ein entwickelter Strukturvorschlag, welcher die "Leitstruktur" des Bisphenols A mit einem kleinem Fragment von Fesiks Liganden **6b** ( $K_D$  von 340  $\mu\text{M}$ ) kombiniert und das von ihm verwendete Prolin durch die Schmucksche Kopfgruppe ersetzt, ergab in einem einfachen Modeling mittels AutoDock Vina einen besseren Score (Maß für die Güte der Bindung) als Bisphenol A, Fesiks Liganden **6b** sowie der einfachen Kombination aus Bisphenol A und Fesiks Liganden **6b**. Dies war sowohl an einer bereinigten Struktur von K-Ras4B der Fall, als auch an dem Protein-pdb der von Fesik publizierte Cokristallstruktur (4EPY). Beim Vergleich der bekannten Röntgenkristallstruktur und der berechneten Struktur (mit dem besten Score) des vorgeschlagenen Liganden ergibt sich zum einen die ähnliche Lage des bekannten Strukturelements aus **6b**, zum anderen binden weitere Bereiche (Phenolgruppe des Bisphenols A sowie die Schmucksche Kopfgruppe) zur Proteinoberfläche.



**Abb. 152:** Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich zwischen der Cokristallstruktur des Liganden **6b** (grün) und der mittels Modeling (AutoDock Vina<sup>[92]</sup>) an die Kristallstruktur des Proteins (pdb-Code: 4EPY) erstellten Struktur (orange). Abgebildet ist die Struktur mit dem besten Score der Berechnung.

Ein Vergleich der fünf besten (berechneten) Strukturen des vorgeschlagenen Liganden **168** liefert ein Ensemble vergleichbarer Strukturen (Abb. 153). Hierbei orientiert sich die Schmucksche Kopfgruppe in allen Fällen tief in den negativ geladenen Graben.





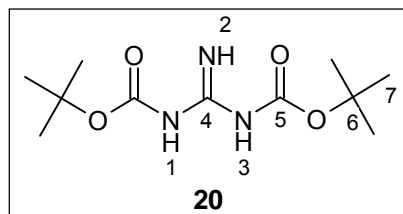
**Abb. 153 (links): Die Struktur des vorgeschlagenen Liganden. Rechts: Das Strukturensamble der mit AutoDock Vina<sup>[92]</sup> berechneten Strukturen (Abbildung der fünf besten Scores).**

Es soll an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, dass es sich hierbei um keine synthetisierte Verbindung handelt, sondern um einen ausgearbeiteten, berechneten Strukturvorschlag auf der Basis der publizierten Daten von Bisphenol A<sup>[122]</sup> und Fesiks Ligand<sup>[33]</sup> **6b**.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Syntheseprotokolle für die Pyridinkopfgruppe

#### 7.1.1 1,3-Di-*tert*-butyloxycarbonylguanidin (20, PMD-007-02-01)

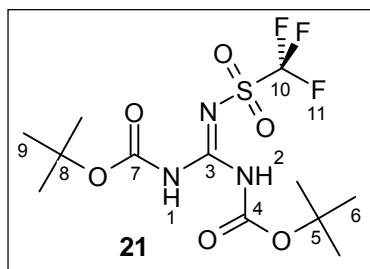


In einem 1-L-Einhalskolben werden 15.9 g (166 mmol) Guanidiniumchlorid vorgelegt und mit 167 mL VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Zu der Lösung werden 26.6 g (665 mmol) NaOH hinzugefügt und unter Rühren gelöst. Der erhaltenen Lösung werden 333 mL Dioxan hinzugefügt und die Mischung auf 0 °C abgekühlt. Nun werden

79.9 g Di-*tert*-butyldicarbonat zugegeben und die Reaktionsmischung zunächst innerhalb von 2 h auf RT gebracht, dann 17 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung wird diese zunächst am Rotationsverdampfer auf 1/3 ihres Volumens eingeeengt, dann mit 330 mL VE-Wasser versetzt und 3 x mit je 330 mL EtOAc im Scheidetrichter extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 2 x mit je 330 mL 10 %-iger Zitronensäure (aq) gewaschen, dann mit 330 mL H<sub>2</sub>O und als letztes mit 330 mL NaCl (aq, ges.). Die organische Phase wird mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wird mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH, 1:1 auf Isolute aufgezogen und zunächst mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dann mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH, 97:3 über Kieselgel chromatografiert. Die Chromatografie wird zweimal wiederholt, da Mischfraktionen entstehen. Reine Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und anschließend HV-getrocknet. Die Synthese der Verbindung ist literaturbeschrieben.<sup>[71]</sup>

**Ausbeute:** 19.7 g (1.63 mmol), 46 %. **Rf:** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH, 97:3) = 0.65, Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 0.09. **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 10.40 (s, 1H, 2-H), 8.46 (s, 2H, 1-H u. 3-H), 1.41 (s, 18H, 7-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 168.1 (4-C), 158.3 (5-C), 79.4 (6-C), 27.7 (7-C). **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 519 (100) [2 M + H]<sup>+</sup>, 260 (71) [M+H]<sup>+</sup>, 204 (51) [M - Isobuten]<sup>+</sup>, 148 (73) [M - 2 Isobuten]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** m/z = 260.1590, berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 260.1605. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3419 (ν N-H (C=N-H oder C-NH-Boc)), 3200-3050 (ν N-H (C=N-H oder C-NH-Boc)), 2979, 2935 (ν C-H (CH<sub>3</sub>)), 1727 (ν C=O (NH-Boc)).

#### 7.1.2 *N*-Trifluormethansulfonyl-,*N'*,*N''*-di-*tert*-butyloxycarbonyl-guanidin (21, PMD-009-02-01)



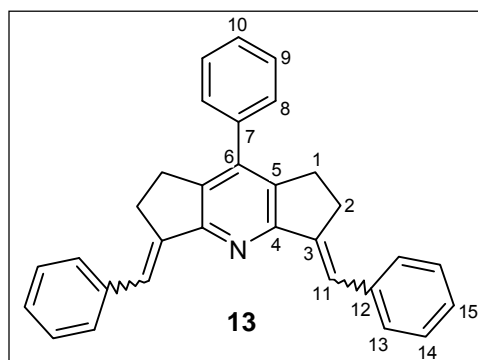
In einem 500 mL-3-Halskolben (mit Thermometer) wird (unter Ar-Atmosphäre) eine Lösung von 10.0 g (38.6 mmol) Dibocguanidin und 5.6 mL (40 mmol) Et<sub>3</sub>N (trocken, p. a.) in 200 mL DCM (trocken, p. a.) vorgelegt und auf -78 °C gebracht (Trockeneis/Aceton). Zu der gekühlten, gerührten Lösung wird 6.7 mL (39.9 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid innerhalb von 30 min zugetropft. Hierbei

wurde die Innentemperatur unter -65 °C gehalten. Nun wird die Reaktionsmischung innerhalb von 4 h auf RT gebracht und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit DC charakterisiert (Edukt fast vollständig umgesetzt) und im Scheidetrichter zunächst mit 290 mL 2 M

NaHSO<sub>4</sub>-Lösung, dann mit 290 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Die organische Phase wird mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird mit DCM auf 10 g Isolute aufgezogen und mit DCM über Kieselgel 60 chromatografiert. Die Produktfraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und anschließend HV-getrocknet (Mischfraktionen werden erneut chromatografiert). Es resultiert ein farbloser Feststoff. Die Synthese der Verbindung ist literaturbeschrieben.<sup>[71]</sup>

**Ausbeute:** 12.2 g (31.1 mmol), 81 %. **Rf:** (DCM/MeOH, 97:3) = 0.78. **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 11.05 (s, 2H, 1-H, 2-H), 1.46 (s, 18H, 6-H, 9-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 168.2 (3-C), 152.2, 150.0 (4-C, 7-C), 83.3 (5-C, 8-C), 27.5, 27.4 (6-C, 9-C). **<sup>19</sup>F-NMR** (376 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 79.5 (11-F). **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 392 (14) [M+H]<sup>+</sup>, 336 (48) [M - Isobuten]<sup>+</sup>, 280 (100) [M - 2 x Isobuten]. **HR-ESI-MS:** m/z = 414.0911, berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>6</sub>S<sup>+</sup>: 414.0917. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3304 (ν N-H (C-NH-Boc)), 2986 (ν C-H (CH<sub>3</sub>)), 1732 (ν C=O (NH-Boc)). Anmerkung: Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses der Messung konnte das Triflyl-C-Atom (8-C) nicht identifiziert werden. Da es sich um <sup>1</sup>H-Breitbandenkoppelte <sup>13</sup>C-Spektren handelte, ist für dieses Signal ein Quartett (Kopplung zu 3 <sup>19</sup>F-Kernen) zu erwarten, das entsprechend geringe Einzel-Signalintensitäten hervorruft.

### 7.1.3 3,5-Dibenzyliden-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[b,e]pyridin (13, PMD-001-03-01)



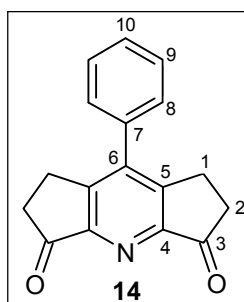
In einem 2 L-1-Halskolben werden 1 L EtOH (p. a.) vorgelegt und zunächst 10 min N<sub>2</sub> hindurchgeleitet. Unter N<sub>2</sub>-Gegenstrom werden 212 g (2.00 mol) Benzaldehyd (frisch destilliert), dann 84.2 g (1.00 mol) Cyclopentanon und als letztes 77.0 g (1.03 mol) Ammoniumacetat hinzugefügt. Die sich bereits nach wenigen Minuten gelb färbende Reaktionsmischung wird zum Rückfluss erhitzt (es entsteht eine orange Lösung). Anschließend wird 50 min unter

Rückfluss erhitzt und die erhaltene Suspension auf RT gebracht und dann im Eisbad gekühlt. Hierdurch fällt ein gelber Feststoff aus. Die überstehende Lösung wird dekantiert (Mutterlauge) und der Bodensatz mit 1.10 L CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zum Sieden erhitzt (es entsteht eine Lösung). Nach Erreichen der Siedehitze werden langsam 700 mL EtOAc hinzugefügt (beginnende Fällung) und nach der Zugabe langsam auf 0 °C gekühlt. Die entstandene Suspension wird kalt abgesaugt und der erhaltene, gelbe Feststoff im HV getrocknet. Das Produkt fällt als Isomerengemisch an (*E*-/*E*-, *E*-/*Z*-, *Z*-/*Z*-). Die Synthese der Verbindung ist literaturbeschrieben.<sup>[65]</sup>

**Ausbeute:** 50.6 g (123 mmol), 25 %.\*<sup>1</sup> **Rf:** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CyH, 1:1) = 0.47, 0.34 (2 Spots). **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.87-7.12 (m, 17H, H-8, H-9, H-10, H-11), 2.97 (m, 2H, 1-H o. 2-H), 3.18 (m, 2H, 1-H o. 2-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 160.9 (4-C), 143.7, 141.6, 138.0, 137.3, 136.8 (3-C, 5-C,

6-C, 7-C, 12-C), 129.1, 128.6, 128.4, 128.1, 128.0, 126.7, 122.0 (8-C, 9-C, 10-C, 11-C, 13-C, 14-C, 15-C), 29.4, 27.7 (1-C, 2-C). **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 412 (100) [M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** m/z = 412.2053, berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>N<sup>+</sup>: 412.2060. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3050, 3023 (ν C-H (arom.)), 2937, 2902, 2872, 2843 (ν C-H (CH<sub>2</sub>)), 914, 884 (ν C-H (R<sub>2</sub>C=CR-H)). **m.p.:** 205-206 °C (Zersetzung). \*<sup>1</sup> = Die komplette Charakterisierung erfolgte an der identischen Verbindung PMD-001-03-01, welche mit einer Ausbeute von 14 % (39.5 g, 96.0 mmol) gewonnen wurde.

#### 7.1.4 3,5-Dioxo-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[b,e]pyridin (**14**, PMD-004-12-01)

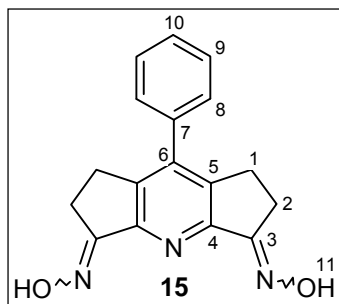


In einem 2 L-1-Halskolben werden 8.50 g (20.6 mmol) des Dibenzyliden-gemisches **13** vorgelegt und mit 425 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (p. a.) gelöst. Die Lösung wird mit 425 mL CH<sub>3</sub>CN (p. a.) sowie 640 mL VE-Wasser versetzt. Die resultierende 2-phasige Mischung wird zunächst mit 5.75 g (36.4 mmol) KMnO<sub>4</sub>, dann mit 35.3 g (165 mmol) NaIO<sub>4</sub> versetzt. Die erhaltene Suspension wird bei RT gerührt. Nach 15 h bei RT wird (nach DC-Kontrolle) die Reaktionsmischung zunächst über eine, mit Celite (1 cm hoch) gefüllten, Schlitzsiebnutsche

vakuumfiltriert. Der Filtrückstand wird mit 2 L CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen und die vereinigten Filtrate (2 Phasen) im Scheidetrichter getrennt. Die wässrige Phase (oben) wird anschließend mit 3 x 250 mL DCM extrahiert und die vereinigten org. Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und über einen Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt, bis ein gelbes, viskoses Öl entsteht. Dieses wird 2 h HV-getrocknet, wodurch ein hellbrauner Feststoff entsteht. Der Feststoff wird mit 200 mL Et<sub>2</sub>O für 45 min im Ultraschall(US)-Bad suspendiert (Eiskühlung) und vakuumfiltriert. Der Filtrückstand wird mit 50 mL Et<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend erneut mit 75 mL Et<sub>2</sub>O im US-Bad suspendiert (15 min) und vakuumfiltriert. Das erhaltene Rohprodukt (weißer Feststoff) wird über Nacht HV-getrocknet. Die Synthese der Verbindung ist literaturbeschrieben.<sup>[65]</sup>

**Ausbeute:** 2.71 g (10.3 mmol), 50 %. **Rf:** (EtOAc/CyH, 7:3) = 0.31. **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.58-7.50 (m, 3H, 9-H u. 10-H), 7.41 (d, J = 6.9 Hz, 2H, 8-H), 3.10 (t, J = 6.2 Hz, 4H, 1-H), 2.76 (t, J = 6.2 Hz, 4H, 2-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 204.0 (3-C), 155.7 (4-C), 150.5 (5-C), 148.2 (6-C), 133.4 (7-C), 129.3 (10-C), 129.2 (9-C), 127.8 (8-C), 35.6 (2-C), 31.2 (1-C). **HPLC-ESI-MS:** 264 (100) [M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** m/z = 264.1019, berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>: 264.1019. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3067, 3057 (ν C-H (arom.)), 2958, 2923, 2852 (ν C-H (CH<sub>2</sub>)), 1719 (ν C=O (Aryl-C=O)). **m.p.:** 180-181 °C.

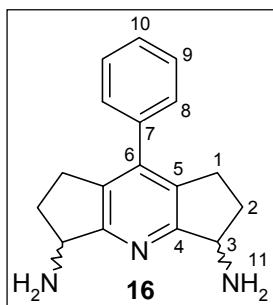
**7.1.5 3,5-Bis(hydroxyimino)-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[*b,e*]pyridin (15, PMD-008-03-01)**



In einem 50 mL 1-Hals-Rundkolben werden 2.50 g (9.50 mmol) des Diketons **14** vorgelegt und mit 20 mL DMF gelöst. Zu der erhaltenen Lösung werden zunächst 5.00 g (60.2 mmol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hinzugefügt, dann unter Rühren 2.50 g (36.5 mmol) NH<sub>2</sub>OH·HCl. Der Kolben wird mit einem Rückflusskühler (aufgesetzter Blasenähler) versehen und die Reaktionsmischung unter Rühren auf 80 °C gebracht. Nach 1 h bei 80 °C wird (nach DC-Kontrolle) das Lösungsmittel (DMF) im HV entfernt und das Rohprodukt über Nacht HV-getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird mit 50 mL H<sub>2</sub>O versetzt und im US-Bad 1 h suspendiert. Die Suspension wird im Eisbad gekühlt und anschließend vakuumfiltriert. Der Filtrerrückstand wird mit 25 mL EtOH (p. a.) für 15 min im US-Bad suspendiert und die Suspension im Eisbad abgekühlt und vakuumfiltriert. Der Filtrerrückstand wird mit 25 mL Et<sub>2</sub>O (p. a.) 15 min im US-Bad suspendiert, die Suspension im Eisbad abgekühlt und vakuumfiltriert. Der Filtrerrückstand wird HV-getrocknet; hierdurch resultiert ein weißer Feststoff. Die Synthese der Verbindung ist literaturbeschrieben.<sup>[65]</sup>

**Ausbeute:** 2.42 g (8.25 mmol), 87 % (Isomerengemisch). **Rf:** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH) = 0.29, 0.42. **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 11.18 (s, 2H, 11-H), 7.49 (m, 5H, 8-H, 9-H, 10-H), 2.84 (m, 8H, 1-H, 2-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 159.3 (3-C), 155.7 (6-C), 143.8, 140.3, 135.2 (4-C, 5-C, 7-C), 128.6, 128.3, 128.0 (8-C, 9-C, 10-C), 24.8, 24.7 (1-C, 2-C). **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 294 (100) [M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** m/z = 316.1033, berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub><sup>+</sup>: 316.1056. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3216, 3106 (ν O-H (C=N-O-H mit H-Brücke)), 3057 (ν C-H (arom.)), 2926 (ν C-H (CH<sub>2</sub>)), 1654 (ν C=N (C=N-OH)).

**7.1.6 3,5-Diamino-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[*b,e*]pyridin (16, PMD-011-02-01, Gemisch aus *meso*- und *D,L*-Isomer)**

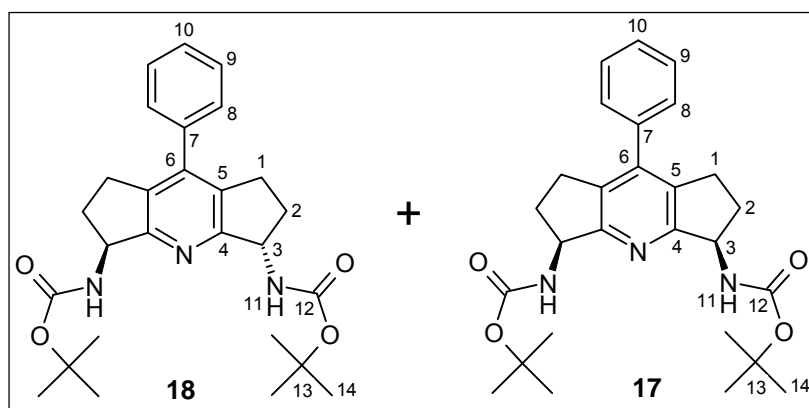


In einem 100 mL-Schlenkkolben werden 1.55 g (41.0 mmol) NaBH<sub>4</sub> vorgelegt und mit einem Septum verschlossen. Der Kolben wird 3 x evakuiert und Ar-belüftet. Nun wird 2.30 mL (21.0 mmol) TiCl<sub>4</sub> über eine Spritze hinzugefügt. Der Kolben wird auf 0 °C gebracht und mit 37.5 mL Dimethoxyethan (mit CaH<sub>2</sub> getrocknet und über Molekularsieb 4A gelagert) versetzt. Unter Gasentwicklung entsteht eine smaragdgrüne Lösung, die unter Ar-Gegenstrom mit 1.50 g (5.11 mmol) des Dioxims **15** (innerhalb von 10 min) versetzt wird. Bei der Zugabe schäumte die Lösung leicht auf und änderte die Farbe zunächst nach grünbraun, dann nach braunschwarz. Nach 30 min bei Eiskühlung wird die Reaktionsmischung auf RT gebracht und über Nacht gerührt. Anschließend wird (nach DC-Kontrolle), wie folgt aufgearbeitet: Die Reaktionsmischung wird mit 65 mL H<sub>2</sub>O gequench, mit 60 mL konz NH<sub>3</sub> (aq, 25 %) auf pH = 11 gebracht und 7 x mit 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und HV-getrocknet. Die

Synthese der Verbindung ist literaturbeschrieben.<sup>[65]</sup>

**Ausbeute:** 1.23 g (4.64 mmol), 90 %. **Rf:** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 4:1) = 0.09, 0.22 (2 Spots). **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.50-7.45 (m, 2H, 9-H), 7.43-7.37 (m, 3H, 1-H, 8-H), 4.25-4.15 (m, 2H, 3-H), 2.83-2.71 (m, 2H, 1-H o. 2-H), 2.68-2.57 (m, 2H, 1-H o. 2-H), 2.42-2.29 (m, 2H, 1-H o. 2-H), 2.06 (s, 4H, 11-H), 1.72-1.54 (m, 2H, 1-H o. 2-H). **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 266 (100) [M+H]<sup>+</sup>. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3345 (ν N-H (NH<sub>2</sub>)), 3053 (ν C-H (arom.)), 2949 (ν C-H (CH<sub>2</sub>)), 1572 (δ N-H (NH<sub>2</sub>)).\* Eine genaue Charakterisierung erfolgt auf der Stufe der jeweils getrennten, diastereomeren Diamine. \* = Die IR-Analyse erfolgte an dem identischen Produkt PMD-011-03-01.

### 7.1.7 3,5-Bis[[1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[b,e]pyridin (17, PMD-013-04-02 und 18, PMD-013-04-01)



In einem 100 mL-1-Halskolben werden 3.65 g (13.8 mmol) des Diamins vorgelegt und mit 30 mL HCCl<sub>3</sub> (p. a., durch Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> filtriert und über Molekularsieb 4A gelagert) versetzt. Zu dieser Lösung werden unter Rühren, innerhalb von 15 min, 9.00 g (41.3 mmol) Bocanhydrid hinzugefügt (Gasentwicklung). Anschließend wird der Reaktionskolben mit einem Gummiseptum verschlossen und ein Argon-Ballon aufgesetzt. Die Reaktionsmischung wird 14 h bei RT gerührt, mit DC kontrolliert, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und anschließend HV-getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird mit CyH/EtOAc, 7:3 über Kieselgel chromatografiert. Es muss zweimal chromatografiert werden, um die Diastereomere komplett zu trennen. Die Synthese der Verbindung ist literaturbeschrieben.<sup>[65]</sup>

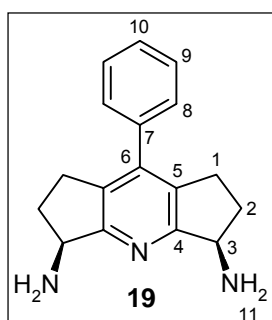
Das erhaltene Rohprodukt wird mit CyH/EtOAc, 7:3 über Kieselgel chromatografiert. Es muss zweimal chromatografiert werden, um die Diastereomere komplett zu trennen. Die Synthese der Verbindung ist literaturbeschrieben.<sup>[65]</sup>

**Ausbeute** (18, PMD-013-04-01, *D,L*-Isomer): 1.87 g (4.02 mmol), 28 %.\* **Rf:** (*D,L*-Isomer) (CyH/EtOAc, 7:3) = 0.5.\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.49-7.36 (m, 3H, 9-H, 10-H), 7.35-7.28 (m, 2H, 8-H), 5.30 (s, 2H, 11-H), 4.99 (s, 2H, 3-H), 2.93-2.65 (m, 6H, 1-H, 2-H) 1.89-1.74 (m 2H, 2-H), 1.50 (s, 18H, 14-H).\* **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 162.1 (4-C), 156.1 (12-C), 143.3 (6-C), 136.4 (7-C), 133.8 (5-C), 128.5, 128.4 (8-C, 9-C), 128.3 (10-C), 79.4 (13-C), 56.4 (3-C), 34.6 (2-C), 28.5 (14-C), 27.3 (1-C).\* **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 466 (100) [M+H]<sup>+</sup>.\* **HR-ESI-MS:** m/z = 466.2699, berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 466.2700.\* **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3322 (ν N-H), 2973, 2941 (ν C-H (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>)), 1684 (ν C=O (Urethan)).

**Ausbeute** (17, PMD-013-04-02, *meso*-Isomer): 1.60 g (3.44 mmol), 25 %. **Rf:** (CyH/EtOAc, 7:3) = 0.4.\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.49-7.36 (m, 3H, 9-H, 10-H), 7.34-7.28 (m, 2H, 8-H), 5.21 (s, 2H, 11-H), 4.97 (s, 2H, 3-H), 2.90-2.65 (m, 6H, 1-H, 2-H) 1.97-1.81 (m, 2H, 2-H), 1.50 (s, 18H, 14-H).\*

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 162.0 (4-C), 156.0 (12-C), 143.7 (6-C), 136.5 (7-C), 134.0 (5-C), 128.5, 128.2 (8-C, 9-C, 10-C), 79.5 (13-C), 56.3 (3-C), 33.8 (2-C), 28.4 (14-C), 27.0 (1-C).\* **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 466 (100) [M+H]<sup>+</sup>.\* **HR-ESI-MS**: m/z = 466.2699, berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 466.2700.\* **IR**: [cm<sup>-1</sup>] = 3325 (ν N-H), 2963, 2918 (ν C-H (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>)), 1705 (ν C=O (Urethan)). \* = Die Charakterisierung erfolgte an den identischen Verbindungen PMD-013-02-01 (*D,L*-) und PMD-013-02-02 (*meso*-).

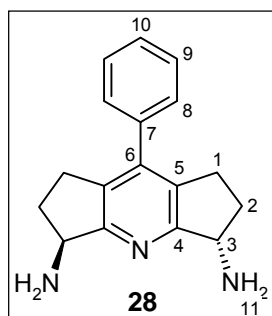
### 7.1.8 *meso*-3,5-Diamino-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[*b,e*]pyridin (**19**, PMD-018-03-01)



In einem 25 mL-Einhalskolben werden 1.00 g (2.15 mmol) *meso*-Dibocdiamin **17** vorgelegt und mit einer Mischung von 3.37 mL (45.4 mmol) TFA und 3.37 mL H<sub>2</sub>O versetzt und nach Aufsetzen eines Septums mit Ar-Ballon 15 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit DC charakterisiert (Edukt vollständig abgebaut). Die Reaktionsmischung wird mit 67 mL einer 1 M NaCl-Lösung in konz. NH<sub>3</sub> (aq) versetzt und 9 x mit 30 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und HV-getrocknet. Es resultiert ein farbloser Feststoff. Die Synthese der Verbindung ist literatur-beschrieben.<sup>[65]</sup>

**Ausbeute**: 600 mg (2.26 mmol), 100 %. **Rf**: (MeOH/NH<sub>3</sub> (aq, 25 %), 20:1) = 0.23. **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.44-7.37 (m, 2H, 9-H), 7.37-7.31 (m, 1H, 10-H), 7.30-7.24 (m, 2H, 8-H), 4.37 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, 3-H), 2.95-2.81 (m, 2H, 1-H), 2.77-2.63 (m, 2H, 1-H), 2.60-2.45 (m, 2H, 2-H), 1.78-1.68 (m, 2H, 2-H), 1.80 (s, 4H, 11-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.1 (4-C), 143.2 (6-C), 137.1 (7-C), 132.5 (5-C), 128.3, 128.2, 127.8 (8-C, 9-C, 10-C), 56.7 (8-C), 34.5 (9-C), 26.9 (10-C). **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 249 (100) [M-NH<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, 266 (82) [M+H]<sup>+</sup>.\* **HR-ESI-MS**: m/z = 288.1470, berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>: 288.1471. **IR**: [cm<sup>-1</sup>] = 3346 (ν N-H (NH<sub>2</sub>)), 2947, 2934 (ν C-H (CH<sub>2</sub>)), 1573 (δ NH<sub>2</sub>). \* = Die HPLC-Analyse erfolgte an der identischen Verbindung PMD-018-02-01.

### 7.1.9 *D,L*-3,5-Diamino-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[*b,e*]pyridin (**28**, PMD-030-01-01, racemisch)

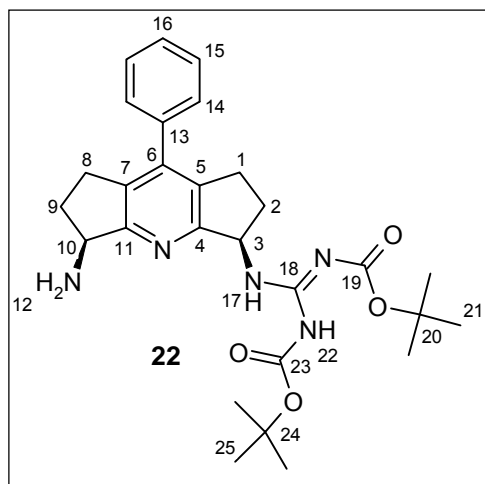


In einem 25 mL-Einhalskolben werden 1.40 g (3.00 mmol) *D,L*-Dibocdiamin **18** (PMD-013-04-01) vorgelegt und mit einer Mischung von 4.80 mL (64.6 mmol) TFA und 4.8 mL H<sub>2</sub>O versetzt und nach dem Aufsetzen eines Gummiseptums (mit Ar-Ballon) bei RT für 2 d gerührt. Nach DC-Charakterisierung der Reaktionsmischung (vollständiger Umsatz des Edukts) wird diese auf 100 mL einer 1 M NaCl-Lösung in NH<sub>3</sub> (konz., aq) gegeben und 9 x mit 40 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

Im Anschluss wird über Nacht HV-getrocknet. Es resultiert ein farbloser Feststoff. Die Synthese der Verbindung ist literaturbeschrieben.<sup>[65]</sup>

**Ausbeute:** 800 mg (3.02 mmol), 100 %. **Rf:** (MeOH/NH<sub>3</sub> (aq, 25 %), 30:1) = 0.25. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.41 (m, 2H, 9-H), 7.35 (m, 1H, 4-H), 7.28 (m, 2H, 6-H), 4.37 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, 3-H), 2.79-2.70 (m, 4H, 1-H), 2.55-2.49 (m, 2H, 2-H), 1.87 (s, 4H, 11-H) 1.69-1.63 (m, 2H, 2-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.2 (4-C), 142.9 (6-C), 136.9 (7-C), 132.3 (5-C), 128.3 (9-C, 8-C), 127.9 (10-C), 56.7 (3-C), 34.9 (2-C), 27.0 (1-C). **HPLC-ESI-MS:** *m/z* (%) = 249 (100) [M-NH<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, 266 (93) [M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** *m/z* = 288.1471, berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>: 288.1471. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3355 (ν N-H<sub>2</sub>), 2966, 2936 (ν C-H (CH<sub>2</sub>)), 1572 (δ N-H<sub>2</sub>).

### 7.1.10 *syn*-3-{3,3'-Bis[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-guanidino}, 5-amino-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenylidicyclopenta[*b,e*]pyridin (**22**, PMD-019-02-04, racemisch)



In einem 25 mL-Einhalskolben werden 350 mg (1.32 mmol) des *meso*-Diamins **6** vorgelegt und der Kolben mit einem Septum verschlossen (Ar-Ballon aufgesetzt). Das Diamin wird mit 10 mL DCM (p. a., trocken) gelöst und mit 120 mg (1.19 mmol) Triethylamin versetzt. Zu der gerührten Lösung wird bei RT innerhalb von 16 h eine Lösung von 413 mg (1.06 mmol) Triflyldibocguanidin (**21**) in 8 mL DCM (p. a., trocken) über eine Spritzenpumpe zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird noch weitere 4 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit DC charakterisiert (limitierendes Edukt abgebaut), am Rotationsverdampfer

vom Lösungsmittel befreit und anschließend HV-getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird über 80 g Kieselgel chromatografiert. Folgende Eluenten wurden verwendet: 1 L CyH/EtOAc (8:2), 500 mL CyH/EtOAc (7:3), 1.5 L EtOAc (+ 2 % Et<sub>3</sub>N), 1.5 L MeOH/konz. NH<sub>3</sub> (aq, 25 %) (20:1). Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und anschließend HV-getrocknet. Sowohl das zweifach guanidinylierte Produkt als auch das im Überschuss eingesetzte Edukt konnten isoliert werden.

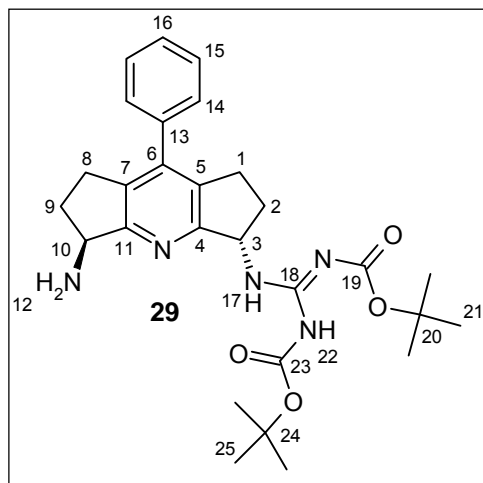
**Ausbeute** (PMD-019-02-04, monoguanidinyliertes Produkt): 380.2 mg (749 μmol), 57 %. **Ausbeute** (reisoliertes Edukt): 42 mg (158 μmol), 12 %. **Ausbeute** (PMD-019-02-02, diguanidinyliertes Produkt): 48 mg (65 μmol), 5 %. **Rf:** (monoguanidinyliertes Produkt) (EtOAc + 2 % Et<sub>3</sub>N) = 0.13. **Rf** (diguanidinyliertes Produkt) (CyH/EtOAc, 8:2) = 0.17. **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.55 (s, 1H, 22-H), 8.98 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, 17-H), 7.43 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 8.0 Hz, 2H, 15-H), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 16-H), 7.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, 14-H), 5.53 (dt, *J* = 7.6 Hz, *J* = 7.7 Hz, 1H, 3-H), 4.37 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, 10-H), 2.94-2.84 (m, 2H, 8-H, 2-H), 2.83-2.59 (m, 3H, 1-H, 8-H), 2.56-2.44 (m, 1H, 9-H), 1.88 (s, 2H, 12-H), 1.87-1.69 (m, 2H, 9-H, 1-H), 1.48 (s, 9H, 21-H o. 25-H) 1.50 (s, 9H, 11-H o. 12-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.6 (11-C), 163.7 (4-C), 161.5 (18-C), 156.3 (6-C), 153.1 (23-C o.



19-C), 143.4 (13-C), 136.8 (5-C), 133.4 (7-C), 128.5, 128.2 (14-C, 15-C), 128.0 (16-C), 82.8, 79.0 (20-C, 24-C), 56.6 (3-C), 56.1 (10-C), 34.2 (9-C), 34.0 (2-C), 28.4, 28.1 (21-C, 25-C), 27.0, 26.9 (1-C, 8-C). **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 508 (100) [M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** m/z = 530.2728, berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>4</sub><sup>+</sup>: 530.2738. \* **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3314, 3271 (ν N-H (amidisch)), 2975, 2932 (ν C-H (aliph.)), 1721, 1608 (ν C=O (Urethan)), 1581 (ν C=O (Acetamid)). \* = Die Analyse erfolgte an der identischen Verbindung PMD-019-02-01.

### 7.1.11 *anti*-3-{3,3'-Bis[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]guanidino},5-amino-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[*b,e*]pyridin (**29**, PMD-031-01-03, racemisch)

Die Synthese der *anti*-Verbindung verlief in Analogie zur *syn*-Verbindung. Auch hier wurde das Guanidinylierungsreagenz über eine Spritzenpumpe zudosiert. Da sich gezeigt hat, dass das Edukt nur verunreinigt wiedergewonnen werden kann, wurde hier auf einen Überschuss des Diamins verzichtet.



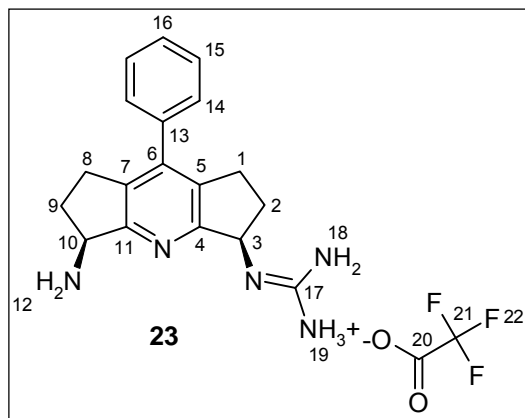
In einem 100 mL Einhalsrundkolben werden 760 mg (2.86 mmol) des *D,L*-Diamins **28** vorgelegt und der Kolben mit einem Septum verschlossen (Ar-Ballon aufgesetzt). Das Diamin wird mit 25 mL DCM (p. a., trocken) gelöst und mit 319 mg (3.15 mmol) Triethylamin versetzt. Zu der gerührten Lösung wird bei RT innerhalb von 18 h eine Lösung von 1.12 g Triflyldibocguanidin (**21**) in 10 mL DCM (p. a., trocken) über eine Spritzenpumpe zugetropft. Nach beender Zugabe wird die Reaktionsmischung noch 4 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung (vollständiger Umsatz des Edukts) wird die Reaktions-

mischung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und anschließend HV-getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird über Kieselgel chromatografiert. Folgende Eluenten werden verwendet: 1 L CyH/EtOAc (8:2), 500 mL CyH/EtOAc (7:3), 1.5 L EtOAc (+ 2 % Et<sub>3</sub>N), 1.5 L MeOH / konz. NH<sub>3</sub> (aq, 25 %) (20:1). Die DC-reinen Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und anschließend HV-getrocknet. Das zweifach guanidinylierte Produkt kann ebenfalls isoliert werden.

**Ausbeute** (PMD-031-01-03, monoguanidinyliertes Produkt): 941 mg (1.85 mmol), 65 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.57 (s, 1H, 22-H), 8.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, 17-H), 7.46-7.40 (m, 2H, 15-H), 7.38-7.34 (m, 1H, 16-H), 7.30-7.26 (m, 2H, 14-H), 5.57 (dd, *J* = 14.9 Hz, *J* = 7.5 Hz, 1H, 3-H), 4.37 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, 10-H), 2.94-2.70 (m, 5H, 1-H o. 2-H o. 8-H o. 9-H), 2.58-2.50 (m, 1H, 1-H o. 2-H o. 8-H o. 9-H), 2.38 (s, 2H, 12-H), 1.88-1.80 (m, 1H, 1-H o. 2-H o. 8-H o. 9-H), 1.74-1.65 (m, 1H, 1-H o. 2-H o. 8-H o. 9-H), 1.50 (s, 9H, 21-H o. 25-H) 1.47 (s, 9H, 21-H o. 25-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.7, 163.7 (4-C, 11-C), 161.4 (18-C), 156.2, 153.1 (19-C, 23-C), 143.2 (6-C), 136.7 (18-C), 133.3 (13-C), 128.4 (15-C), 128.3 (14-C), 128.1 (16-C), 82.9, 79.1 (20-C, 24-C), 56.7 (10-C), 56.1 (3-C), 34.5, 33.9 (2-C, 9-C), 28.3, 28.1 (21-C, 25-C), 27.1 (1-C, 8-C). **HPLC-ESI-MS** (monoguanidinylierte

Verbindung):  $m/z$  (%) = 530 (55)  $[M+Na]^+$ , 508 (77)  $[M+H]^+$ , 408 (50)  $[M-Boc+H]^+$ , 308 (100)  $[M-2 Boc+H]^+$ . **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 508.2915, berechnet für  $C_{28}H_{38}N_5O_4^+$ : 508.2918. **IR**:  $[cm^{-1}]$  = 3315 (ν N-H (amidisch)), 2963, 2928 (ν C-H (aliph.)), 1720, 1608 (ν C=O (Urethan)), 1579 (ν C=O (Acetamid)). **Ausbeute** (PMD-031-01-01, diguanidinyliertes Produkt): 374 mg (499 μmol), 17 %. **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 750 (100)  $[M+H]^+$ .

### 7.1.12 *syn*-5-Amino-3-guanidinium-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[*b,e*]pyridin-trifluoacetat (**23**, PMD-022-01-01, racemisch)

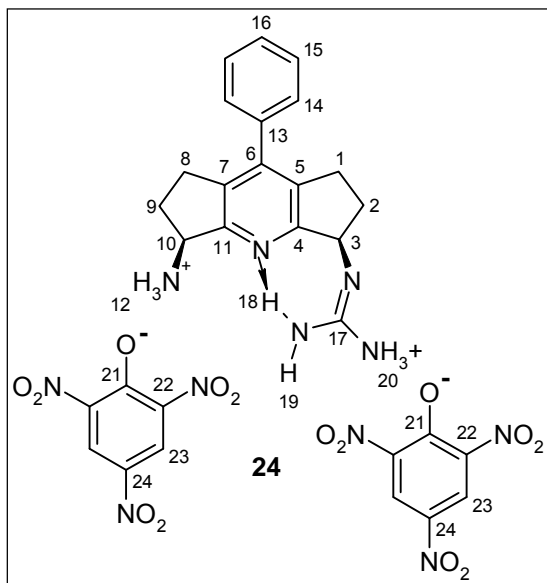


In einem 10 mL Einhalsrundkolben werden 100 mg (386 μmol) des Dibocguanidins **7** vorgelegt und in 5 mL DCM gelöst. Zu der gerührten Lösung wird bei 0 °C im Ar-Gegenstrom tropfenweise 2.5 mL (32.4 mmol) TFA hinzugefügt, anschließend wird ein Septum mit Ar-Ballon aufgesetzt. Die Lösung wird für 16 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mittels DC charakterisiert (Edukt abgebaut), mit 2 mL DCM versetzt und im Eisbad tropfenweise mit 5 mL  $NH_3$  (konz., aq) versetzt. Die zweiphasige Mischung wird in

einen Scheidetrichter überführt und mit weiteren 10 mL  $NH_3$  (konz., aq) sowie 8 mL DCM versetzt und extrahiert (pH der wässrigen Phase = 11). Die wässrige Phase wird 8 x mit 5 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit  $Na_2SO_4$  getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend über Nacht HV-getrocknet.

**Ausbeute**: 55.7 mg (132 μmol), 67 %.  **$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8.41 (s, 1H, 18-H (Wasserstoffbrücke)), 7.78 (s, 3H, 19-H), 7.45 (ψt, 2H, 15-H), 7.42-7.37 (m, 1H, 16-H), 7.29 (ψd, 2H, 14-H), 4.95 (m, 1H, 10-H), 4.35 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, 3-H), 3.17-3.01 (m, 1H, 8-H), 2.87-2.65 (m, 3H, 4-H, 8-H), 2.61-2.41 (m, 2H, 5-H, 9-H), 2.26-2.13 (m, 1H, 9-H), 1.91 (s, 2H, 12-H), 1.78-1.64 (m, 1H, 2-H).  **$^{13}C$ -NMR** (101 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 165.3 (17-C), 162.4 (q,  $J$  = 34.5 Hz, 20-C), 161.0, 159.0 (4-C, 11-C), 144.6 (6-C), 136.2 (13-C), 134.6, 134.0 (5-C, 7-C), 128.6 (15-C), 128.4 (16-C), 128.2 (14-C), 116.7 (q,  $J$  = 293 Hz, 21-C), 57.2 (10-C), 56.4 (3-C), 34.9 (2-C), 30.8 (9-C), 27.5 (4-C), 27.1 (1-C). **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 308 (100)  $[M+H]^+$ . **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 308.1872, berechnet für  $C_{18}H_{22}N_5^+$ : 308.1870. **IR**:  $[cm^{-1}]$  = 3152 (ν N-H ( $NH_3^+$ )), 1666, 1586 ( $\delta NH_3^+$ )).

**7.1.13 anti-5-Ammonium-3-guanidinium-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[b,e]-pyridin-dipikrat (24, PMD-024-01-03, racemisch)**

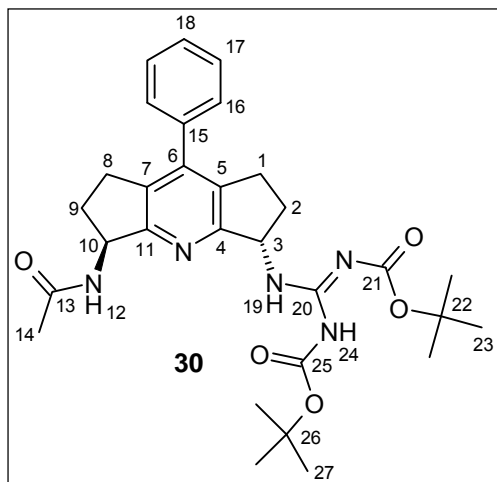


In einem 50 mL Einhalsrundkolben werden 95 mg (226  $\mu\text{mol}$ ) des Guanidiniumtrifluoracetats **23** vorgelegt und mit 17 mL MeOH (p. a.) gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 14 mL (798  $\mu\text{mol}$ ) einer gesättigten (13 mg/mL) Pikrinsäurelösung gegeben, der Kolben mit einem Septum (aufgesetzter Ar-Ballon) verschlossen und die Mischung über Nacht bei RT gerührt. Hierdurch fällt ein viskoser Feststoff aus. Der braungrüne Feststoff wird abgetrennt, mit 2 mL H<sub>2</sub>O gewaschen, mit DCM/MeOH (1:1) gelöst und die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die überstehende gelbe Lösung wird am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 5 mL

eingengt. Hierdurch fällt ein gelber feinkristalliner Feststoff aus. Dieser wird von der Mutterlauge abdekantiert, mit 1 mL H<sub>2</sub>O gewaschen, mit DCM/MeOH (1:1) gelöst und die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die so erhaltenen zwei Rohprodukte werden vereinigt, in der Siedehitze mit möglichst wenig DCM/MeOH, 5:1 gelöst (5 mL, Badtemp. 50 °C), dann am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von ~ 800  $\mu\text{L}$  einrotiert. Bei RT kristallisiert das Pikrat. Der mikrokristalline Feststoff wird abgetrennt und mit 1 mL DCM gewaschen. Anschließend wird der Feststoff über Nacht HV-getrocknet.

**Ausbeute:** 77.1 mg (101  $\mu\text{mol}$ ), 45 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 8.59 (s, 4H, 23-H), 8.41 (s, 3H, 12-H), 7.91 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, 18-H (Wasserstoffbrücke)), 7.56-7.50 (m, 2H, 15-H), 7.50-7.44 (m, 1H, 16-H), 7.44-7.37 (m, 2H, 14-H), 7.17 (s, 4H, 19-H, 10-H), 5.07 (dt,  $J$  = 13.5 Hz,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, 10-H), 4.97 (s, 3H, 12-H), 4.78-4.67 (m, 1H, 3-H), 3.07-2.93 (m, 1H, 8-H), 2.94-2.83 (m, 2H, 1-H und 8-H), 2.82-2.68 (m, 1H, 1-H), 2.09-1.90 (m, 2H, 9-H und 2-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 161.5 (17-C), 160.7 (21-C), 158.6, 157.1 (4-C, 11-C), 143.6 (6-C), 141.8 (22-C, 24-C), 135.3, 134.9 (5-C, 7-C), 128.7 (15-C), 128.1 (14-C), 125.1 (23-C), 124.3 (13-C), 56.0 (10-C), 54.1 (3-C), 31.2, 29.2 (2-C, 9-C), 26.8, 26.8 (1-C, 8-C). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 308 (100) [M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 308.1871, berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup>: 308.1870.

**7.1.14 anti-3-{3,3'-Bis[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-guanidino},5-acetamido-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[b,e]pyridin (30, PMD-033-01-02)**

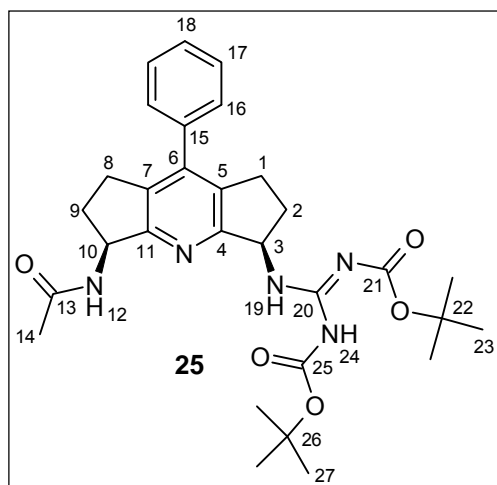


In einem 25 mL Einhalsrundkolben werden 150 mg (295  $\mu\text{mol}$ ) des Aminodibocguanidins **29** vorgelegt und mit 6 mL DCM (trocken, über  $\text{CaH}_2$  dest.) versetzt. Der Kolben wird mit einem Gummiseptum verschlossen (Ar-Ballon aufgesetzt). Nun werden 304  $\mu\text{L}$  (384  $\mu\text{mol}$ ) einer Pyridin-Lösung (100 mg/1 mL DCM), dann 332  $\mu\text{L}$  (325  $\mu\text{mol}$ )  $\text{Ac}_2\text{O}$ -Lösung (100 mg/1 mL DCM) (über  $\text{NaOAc}$  dest.) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung wird diese mit 10 mL  $\text{NaCl}$  (aq, ges.) versetzt und 5 x mit 6 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen

werden mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der resultierende Rückstand wird über Nacht HV-getrocknet.

**Ausbeute:** 133.2 mg (242  $\mu\text{mol}$ ), 82 %. **Rf:** (EtOAc/CyH, 7:3) = 0.33.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 11.54 (s, 1H, 24-H), 8.77 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H, 19-H), 7.45 (dd,  $J$  = 7.5 Hz,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, 17-H), 7.38 (m, 1H, 18-H), 7.34 (m, 2H, 16-H), 7.00 (s, 1H, 12-H), 5.34 (m, 1H, 3-H), 5.21 (m, 1H, 10-H), 2.94-2.67 (m, 6H, 1-H o. 2-H o. 8-H o. 9-H), 2.06 (s, 3H, 14-H), 1.84-1.77 (m, 2H, 1-H o. 2-H o. 8-H o. 9-H), 1.51 (s, 9H, 23-H o. 27-H), 1.49 (s, 9H, 23-H o. 27-H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.8 (13-C), 163.6, 162.3, 161.3 (4-C, 6-C, 11-C), 156.2, 153.1 (21-C, 25-C), 143.6 (20-C), 136.3, 134.9, 134.0 (5-C, 7-C, 15-C), 128.5 (17-C), 128.3 (18-C, 16-C), 83.1, 79.1 (22-C, 26-C), 55.7 (3-C, 10-C), 33.9, 33.7 (1-C, 2-C o. 8-C, 9-C), 28.3, 28.1 (23-C, 27-C), 27.4, 27.1 (1-C, 2-C o. 8-C, 9-C), 23.1 (14-C). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 550 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 572 (14)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 350 (28)  $[\text{M}-2 \text{ Boc}+\text{H}]^+$ . **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 572.2835, berechnet für  $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{NaO}_5^+$ : 572.2843. **IR:**  $[\text{cm}^{-1}]$  = 3317, 3256 ( $\nu$  N-H (amidisch)), 2981, 2932 ( $\nu$  C-H (aliph.)), 1606 ( $\nu$  C=O (Urethan o. Acetamid)). \* = Die HPLC-Analyse erfolgte am identischen Produkt PMD-033-01-01. \*\* = Die NMR-Analyse erfolgte an dem identischen Produkt PMD-033-01-02.

**7.1.15 syn-3-{3,3'-Bis[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-guanidino},5-acetamido-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[*b,e*]pyridin (25, PMD-028-01-02)**

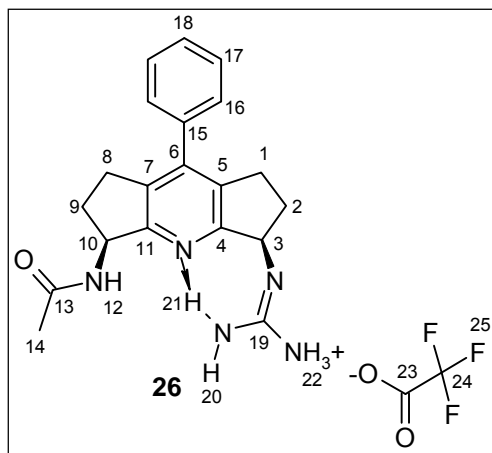


In einem 10 mL Einhalsrundkolben werden 80 mg (158  $\mu\text{mol}$ ) des Aminodibocguanidins **22** vorgelegt und mit 3 mL DCM (trocken, über  $\text{CaH}_2$  dest.) versetzt. Der Kolben wird mit einem Gummiseptum verschlossen (Ar-Ballon aufgesetzt). Nun werden 162  $\mu\text{L}$  (205  $\mu\text{mol}$ ) einer Pyridin-Lösung (100 mg/mL DCM), dann 177  $\mu\text{L}$  (173  $\mu\text{mol}$ )  $\text{Ac}_2\text{O}$ -Lösung (100 mg/mL DCM) (über  $\text{NaOAc}$  dest) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird 14 h bei RT gerührt. Nach DC-Charakterisierung der Reaktionsmischung (Edukt vollständig abgebaut) wird diese mit 5 mL  $\text{NaCl}$  (aq) versetzt und 4 x mit 3 mL DCM extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen werden mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der resultierende Rückstand wird HV-getrocknet.

**Ausbeute:** 84.2 mg (153  $\mu\text{mol}$ ), 97 %. **Rf:** (EtOAc/CyH, 7:3) = 0.27.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 11.57 (s, 1H, 24-H), 9.06 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, 19-H), 7.44 (m, 2H, 17-H), 7.38 (m, 1H, 18-H), 7.28 (m, 2H, 16-H), 6.32 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, 12-H), 5.43 (m, 1H, 3-H), 5.16 (m, 1H, 10-H), 2.99-2.94 (m, 1H, 2-H o. 9-H), 2.90-2.81 (m, 3H, 1-H o. 8-H), 2.77-2.71 (m, 2H, 1-H o. 8-H), 2.06 (s, 3H, 14-H), 1.89-1.80 (m, 2H, 2-H o. 9-H), 1.49 (s, 9H, 23-H o. 27-H), 1.48 (s, 9H, 23-H o. 27-H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.5 (13-C), 163.6 (20-C), 161.9, 161.6 (4-C, 11-C), 156.1 (21-C), 153.3 (25-C), 143.8 (6-C), 136.3 (15-C), 134.5, 134.4 (5-C, 7-C), 128.6 (17-C), 128.3 (18-C), 128.1 (16-C), 82.8, 79.2 (22-C, 26-C), 56.0 (3-C), 55.4 (10-C), 34.4, 33.9 (2-C, 9-C), 28.3, 28.0 (23-C, 27-C), 27.1 (1-C, 8-C). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 550 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 450 (49)  $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$ , 350 (65)  $[\text{M}-2 \text{ Boc}]^+$ . \* **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 572.2825, berechnet für  $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{NaO}_5^+$ : 572.2843. **IR:**  $[\text{cm}^{-1}]$  = 3397, 3333, 3248 ( $\nu$  N-H (amidisch)), 3064 ( $\nu$  C-H (arom.)), 2978, 2932 ( $\nu$  C-H (aliph.)), 1727, 1639 ( $\nu$  C=O (Urethan)), 1557 ( $\nu$  C=O (Acetamid)). **m.p.:** 250-255  $^\circ\text{C}$ . \* = Die HPLC-Analyse erfolgte an der identischen Verbindung PMD-028-01-01.

**7.1.16 syn-5-Acetamido-3-guanidinium-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[*b,e*]-pyridin-trifluoracetat (26, PMD-029-02-01)**

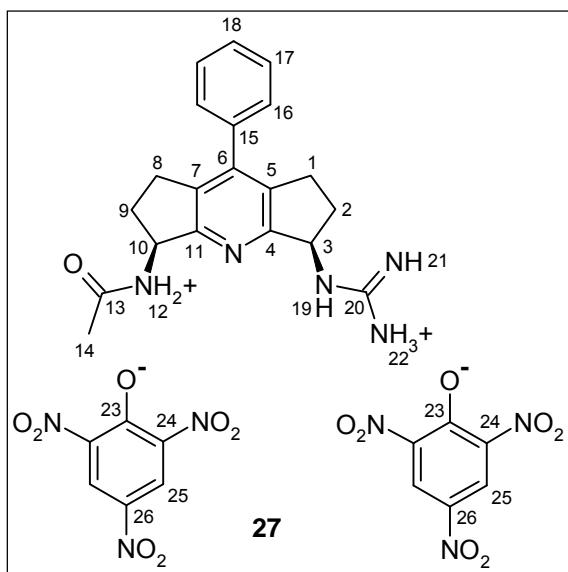


In einem 10 mL Einhalsrundkolben werden 38.3 mg (69.7  $\mu$ mol) des Acetamidodibocguanidins **25** vorgelegt und in 1.8 mL DCM gelöst. Zu der gerührten Lösung wird bei 0 °C im Ar-Gegenstrom 0.9 mL (11.7 mmol) TFA hinzugefügt und der Kolben locker mit einem Stopfen verschlossen. Die Lösung wird innerhalb von 3 h von 0 °C auf RT gebracht und anschließend 13 h bei RT gerührt. Nach DC-Charakterisierung der Reaktionsmischung (vollständiger Edukt-Umsatz) wird diese mit 1.5 mL DCM verdünnt und im Eisbad tropfenweise mit 4 mL NH<sub>3</sub> (konz.,

aq) versetzt. Die zweiphasige Mischung wird in einen Scheidetrichter überführt und mit weiteren 8 mL NH<sub>3</sub> (konz., aq) sowie 5 mL DCM versetzt und extrahiert (pH (wässrige Phase) = 11). Die wässrige Phase wird 8 x mit 4 mL DCM extrahiert. Bei der Zugabe des DCMs fiel ein farbloser Feststoff aus, welcher beim Extrahieren in der organischen Phase verblieb. Die vereinigten organischen Phasen werden über eine D4-Glasfritte filtriert und der Filtrerrückstand HV-getrocknet. Es resultiert ein farbloser Feststoff.

**Ausbeute:** 20.9 mg (45.2  $\mu$ mol), 64 %. **Rf:** (MeOH/NH<sub>3</sub> (25 %, aq)), 9:1 = 0.07. **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 8.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 12-H), 8.09 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, 21-H), 8.38 - 6.49 (s, 4H, 20-H, 22-H), 7.52 (m, 2H, 17-H) 7.46 (m, 1H, 18-H), 7.43 (m, 2H, 16-H), 5.24 (m, 1H, 3-H), 5.00 (m, 1H, 10-H), 2.98-2.91 (m, 1H, 1-H o. 8-H), 2.88-2.70 (m, 3H, 4-H, 8-H und 9-H), 2.56-2.46 (m, 1H, 1-H o. 8-H), 2.42-2.34 (m, 1H, 9-H), 1.98-1.78 (m, 2H, 2-H und 9-H), 1.88 (s, 3H, 14-H). Anmerkung: Die chemische Verschiebung von Proton 21-H ist konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration von 5 mg/0.7 mL d<sub>6</sub>-DMSO liegt das Signal bei 8.09 ppm, bei einer Konzentration von 40 mg/0.7 mL d<sub>6</sub>-DMSO bei 8.21 ppm. Im NOESY-Spektrum ist eine schwache Kopplung zwischen 21-H und 14-H sichtbar, was ein weiterer Hinweis auf die Existenz der H-Brücke zwischen Pyridin-N und dem Guanidinium-Proton 21-H ist. **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 168.8 (13-C), 162.9, 160.9 (4-C, 11-C), 158.7 (q, *J* = 31.2 Hz, 23-C), 157.5 (19-C), 143.0 (6-C), 135.8 (15-C), 134.3, 133.2 (5-C, 7-C), 128.6 (17-C), 128.4 (18-C), 128.2 (16-C), 117.0 (q, *J* = 299 Hz, 24-C), 56.1 (10-C), 55.4 (3-C), 31.8 (2-C), 30.9 (9-C), 26.7 (1-C, 8-C), 22.6 (14-C). **HPLC-ESI-MS:** *m/z* (%) = 350 (100) [M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** *m/z* = 350.1975, berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sup>+</sup>: 350.1975. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3271 ( $\nu$  N-H (amidisch)), 3065 ( $\nu$  C-H (arom.)), 1627 ( $\nu$  C=O (Urethan)), 1663 ( $\nu$  C=O (amidisch)).

**7.1.17 syn-5-Acetamido-3-guanidinium-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[b,e]-pyridin-dipikrat (27, PMD-032-02)**

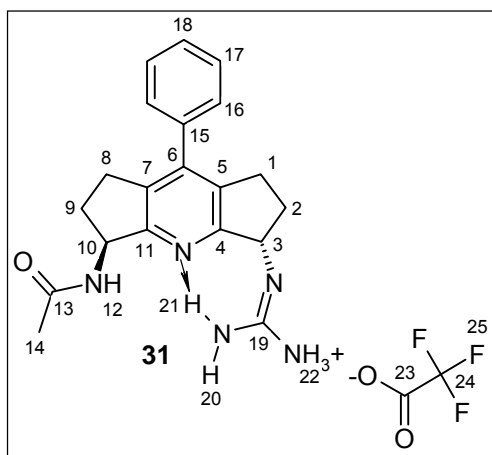


In einem 10 mL Einhalsrundkolben werden 80 mg (173  $\mu\text{mol}$ ) des Guanidiniumtrifluoracetats **26** (PMD-029-03-02) mit 2 mL MeOH gelöst und mit 3.04 mL (173  $\mu\text{mol}$ ) kaltgesättigter Pikrinsäurelösung (13 mg/mL) versetzt. Hierdurch wird ein hellgelber Feststoff gefällt. Die Mutterlauge wird abpipettiert und der Feststoff mit 1.2 mL DCM/MeOH, 5:1 gelöst, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und über Nacht HV-getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird aus MeOH/DCM umkristallisiert. Hierzu wird dieses mit 3 mL MeOH/DCM, 5:1 versetzt und zum Rückfluss er-

hitzt. In der Siedehitze werden dann 800  $\mu\text{L}$  DCM hinzugefügt. Es entsteht eine leicht trübe Lösung, die zunächst auf RT, dann auf  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  abgekühlt wird. Hierdurch entsteht ein hellgelber Feststoff, welcher dekantiert und über Nacht im HV getrocknet wird.

**Ausbeute:** 34.3 g (59.1  $\mu\text{mol}$ ), 34 %.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 8.60 (s, 4H, 25-H), 8.25 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, 12-H), 7.91 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H, 19-H), 7.54-7.52 (m, 2H, 16-H, 17-H o. 18-H), 7.49-7.45 (m, 1H, 16-H, 17-H o. 18-H), 7.45-7.43 (m, 2H, 16-H, 17-H o. 18-H), 7.34 (s, 4H, 21-H, 22-H), 5.29 (m, 1H, 3-H) 5.07 (m, 1H, 10-H), 2.99-2.94 (m, 1H, 8-H), 2.91-2.86 (m, 1H, 8-H), 2.82-2.74 (m, 2H, 1-H), 2.60-2.54 (m, 1H, 2-H), 2.43-2.38 (m, 1H, 9-H), 1.98-1.92 (m, 1H, 2-H), 1.90 (s, 3H, 14-H), 1.92-1.85 (m, 1H, 9-H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 169.0 (13-C), 162.4 (11-C), 160.7 (23-C), 159.9 (4-C), 157.2 (20-C), 144.1 (6-C), 141.8 (24-C, 26-C), 135.6 (15-C), 135.2 (7-C), 134.0 (5-C), 128.7 (17-C, 18-C), 128.2 (16-C), 125.2 (25-C), 124.4 (15-C), 56.0 (3-C), 53.3 (10-C), 31.8 (9-C), 31.3 (2-C), 26.9 (8-C), 26.9 (1-C), 22.8 (14-C). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 350 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 699 (3)  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ . **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 350.1975, berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}^+$ : 350.1975.

**7.1.18 anti-5-Acetamido-3-guanidinium-1,2,3,5,6,7-hexahydro-8-phenyldicyclopenta[b,e]-pyridin-trifluoracetat (31, PMD-034-01-01)**



In einem 10 mL Einhalskolben werden 100 mg (182  $\mu$ mol) des Acetamidodibocguanidins **30** vorgelegt und in 2.5 mL DCM gelöst. Zu der gerührten Lösung wird bei 0 °C im Ar-Gegenstrom tropfenweise 1.25 mL (16.2 mmol) TFA hinzugefügt, anschließend wird ein Glasstopfen lose aufgesetzt. Die Lösung wird 2 h bei 0 °C gerührt, dann 22 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung wird diese mit 2 mL DCM verdünnt und im Eisbad tropfenweise mit 5 mL NH<sub>3</sub> (25 %, aq) versetzt. Die zweiphasige Mischung wird in einen Scheidetrichter

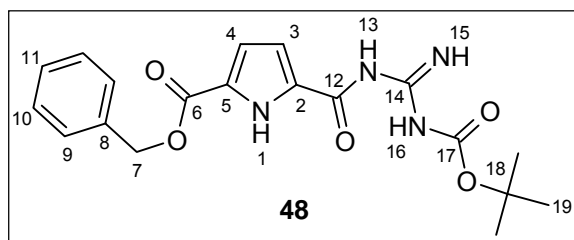
überführt und mit weiteren 10 mL NH<sub>3</sub> (25 %, aq) sowie 8 mL DCM versetzt und extrahiert (pH der wässrigen Phase = 11). Die wässrige Phase wird 8 x mit 5 mL DCM extrahiert. Bei der Zugabe des DCMs fiel ein farbloser Feststoff aus, welcher beim Extrahieren in der organischen Phase verblieb. Die vereinigten organischen Phasen werden über eine D4-Glasfritte filtriert und der Filtrerrückstand HV-getrocknet (der Filtrerrückstand ist 48.6 mg reines Produkt **31**, PMD-034-01-01, das Filtrat enthält kein Produkt). Die an der Glasfritte anhaftenden Rückstände werden mit Et<sub>2</sub>O/MeOH, 1:1 herausgespült, am Rotationsverdampfer eingeeengt und HV-getrocknet. (Bei dem resultierenden Rückstand handelt es sich um 35.5 mg reines Produkt **31**, PMD-034-01-03).

**Ausbeute:** 84.1 mg (182  $\mu$ mol), 100 %. **Rf:** (MeOH/NH<sub>3</sub> (25 %, aq)), 8:2 = 0.22. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 8.29 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, 12-H), 8.16 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, 21-H), 7.52 (m, 2H, 17-H), 7.44 (m, 3H, 18-H und 16-H), 8.50-6.50 (s, 4H, 20-H, 21-H), 5.27 (m, 1H, 10-H), 5.08 (m, 1H, 3-H), 2.90-2.84 (m, 2H, 1-H und 8-H), 2.77-2.69 (m, 2H, 1-H und 8-H), 2.66-2.61 (m, 1H, 2-H), 2.49-2.44 (m, 1H, 9-H), 1.89 (s, 3H, 14-H), 1.86-1.80 (m, 1H, 2-H), 1.77-1.71 (m, 1H, 9-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 168.9 (13-C), 163.0, 160.6 (4-C, 11-C), 158.8 (q,  $J$  = 31.4 Hz, 13-C), 157.2 (19-C), 142.7 (6-C), 135.8 (15-C), 134.1, 133.0 (5-C, 7-C), 128.6 (17-C), 128.4 (18-C), 128.3 (16-C), 117.0 (q,  $J$  = 298.8 Hz, 24-C), 55.2 (3-C), 53.7 (10-C), 32.5 (9-C), 31.9 (2-C), 26.7 (8-C, 1-C), 22.7 (14-C). **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 350 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 699 (14) [2 M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** m/z = 350.1974, berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sup>+</sup>: 350.1975. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3255, 3169 (v N-H (amidisch)), 3090 (v C-H (arom.)), 2974, 2915 (v C-H (aliph.)), 1637 (v C=O (Acetamid)).



## 7.2 Syntheseprotokolle für die Schmucksche Kopfgruppe

### 7.2.1 5-[[[*tert*-Butoxy]carbonyl]amino]methanimidoyl]carbamoyl]-1*H*-pyrrol-2-carbonsäurebenzylester (**48**, PMD-062-01-01)

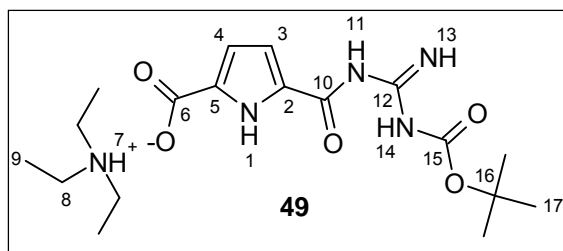


In einem 250 mL Einhalsrundkolben wird zunächst eine Mischung von 4.00 g (16.3 mmol) Pyrrol-dicarbon säuremonobenzylester (**46**, TPT-004-02) in 96 mL DMF (über CaH<sub>2</sub> destilliert) gelöst und mit 9.34 g (23.9 mmol) PyBOP, dann 3.63 g (35.9 mmol) *N*-Methylmorpholin versetzt. Der Kolben wird

mit einem Septum verschlossen und ein N<sub>2</sub>-Ballon aufgesetzt. Die erhaltene Lösung wird bei RT für 30 min gerührt und mit 5.19 g (32.6 mmol) Monobocguanidin (**47**, TPT-005-02) versetzt. Es wird erneut mit einem Septum verschlossen (N<sub>2</sub>-Ballon aufgesetzt) und 22 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung wird diese langsam in 400 mL Wasser eingerührt. Es bildet sich ein weisser Feststoff, der nach Zugabe von 400 mL Et<sub>2</sub>O in Lösung geht. Nach Phasentrennung wird die (DMF-haltige) wässrige Phase 2 x mit 400 mL Et<sub>2</sub>O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wird 2 h HV-getrocknet; es resultiert ein gelbes Öl. Das Öl wird mit EtOAc auf Isolute aufgezogen und über Kieselgel chromatografiert. Folgende Eluenten werden verwendet: 500 mL CyH, 500 mL CyH/EtOAc, 9:1, 2 L CyH/EtOAc, 7:3, 500 mL CyH/EtOAc, 2:8, 500 mL EtOAc. DC-reine Fraktionen werden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und über Nacht HV-getrocknet.

**Ausbeute:** 5.47 g (14.2 mmol), 87 %. **Rf:** (CyH/EtOAc, 7:3) = 0.30. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 11.62 (s, 1H, 1-H), 10.75 (s, 1H, 13-H, 15-H o. 16-H), 9.33 (s, 1H, 13-H, 15-H o. 16-H), 8.59 (s, 1H, 16-H, 15-H o. 16-H), 7.45 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, 9-H), 7.39 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 7.5 Hz, 2H, 10-H), 7.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, 11-H), 6.87-6.82 (m, 2H, 4-H und 3-H), 5.32 (s, 2H, 7-H), 1.46 (s, 9H, 19-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 159.7, 158.2, 155.1 (6-C, 12-C, 17-C), 136.1, 133.9 (2-C, 5-C), 128.3 (10-C), 127.9 (11-C), 127.8 (9-C), 124.4 (14-C), 115.7, 113.8 (3-C, 4-C), 81.0 (18-C), 65.4 (7-C), 27.6 (19-C). **HPLC-ESI-MS:** *m/z* (%) = 387 (33) [M+H]<sup>+</sup>, 773 (39) [2 M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** *m/z* = 409.1483, berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>5</sub><sup>+</sup>: 409.1482. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3393 (ν N-H (Pyrrol)), 3280, 3249 (ν N-H), 2977 (ν C-H (aliph.)), 1727 (C=O (Ester)), 1709 (C=O (Urethan)).

## 7.2.2 Triethylammonium 5-[[[*tert*-Butoxy]carbonylamino]methanimidoyl]carbamoyl]-1*H*-pyrrol-2-carboxylat (**49**, PMD-065-01-02)

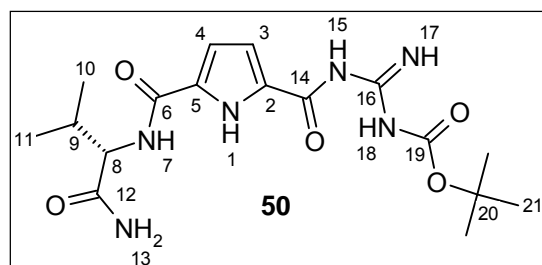


In einem 250 mL Dreihalskolben werden 530 mg (249  $\mu\text{mol}$ ) Palladium auf Aktivkohle (Pd 10 % + 50 %  $\text{H}_2\text{O}$  = 5 % Pd) vorgelegt und 3 x evakuiert und  $\text{N}_2$ -belüftet. Nun wird über eine Spritze eine Lösung von 5.20 g (13.5 mmol) des Benzylesters **48** (PMD-062-01-01) in 150 mL MeOH (p. a.) hinzugefügt. Es

wird etwas Vakuum gezogen und erneut  $\text{N}_2$ -belüftet. Die Apparatur wird mit einem Wasserstoffballon verbunden und die Suspension unter magnetischem Rühren 3 h bei 40 °C geheizt. Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung (das Edukt ist vollständig abgebaut) wird diese über eine D3-Glasfritte durch Celite filtriert, mit 100 ml MeOH gewaschen, anschließend mit 100 mL heißem MeOH gewaschen (Filtrate verworfen). Nun wird der Filtrerrückstand mit 300 mL MeOH + 3 %  $\text{Et}_3\text{N}$  suspendiert und erneut über Celite vakuumfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende, weisse Rückstand wird über Nacht HV-getrocknet.

**Ausbeute:** 4.59 g (11.5 mmol), 86 %. **Rf:** (DCM/MeOH/ $\text{Et}_3\text{N}$  8:2, 0.01 ) = 0.29.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 10.94 (s, 2H, 1-H und 11-H, 13-H o. 14-H), 9.34 (s, 1H, 11-H, 13-H o. 14-H), 8.57 (s, 1H, 11-H, 13-H o. 14-H), 6.77 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H, 4-H), 6.52 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H, 3-H), 2.88 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 6H, 8-H), 1.45 (s, 9H, 17-H), 1.12 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 9H, 9-H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 167.6, 163.4, 161.8, 158.3 (6-C, 10-C, 12-C, 15-C), 131.9, 129.4 (2-C, 5-C), 113.9 (4-C o. 3-C), 112.4 (4-C o. 3-C), 80.2 (16-C), 44.9 (8-C), 27.7 (17-C), 9.1 (9-C). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 295 (96) [ $\text{M-H}$ ] $^-$ . **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 295.1044, berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_5^-$ : 295.1048. **IR:** [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3386 ( $\nu$  N-H (Pyrrol)), 3154 ( $\nu$  N-H), 2980 ( $\nu$  C-H (aliph.)), 1718 ( $\nu$  C=O (Urethan)), 1526 ( $\nu$  C=O Carboxylat).

## 7.2.3 *tert*-Butyl *N*-[[[5-[[[(1*S*)-1-carbamoyl-2-methylpropyl]carbamoyl]-1*H*-pyrrol-2-yl]formamido]methanimidoyl]carbamate (**50**, PMD-066-01-03)



In einem 25 mL Einhalsrundkolben werden zunächst 500 mg (1.26 mmol) Triethylammonium *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-guanidiniocarbonylpyrrolcarboxylat (**49**) und 202 mg (1.33 mmol) *L*-Valinamid\*HCl bei 0 °C in 5 mL DMF (über  $\text{CaH}_2$  destilliert) gelöst und mit 720 mg (1.38 mmol) PyBOP, dann 650 mg (5.03 mmol)

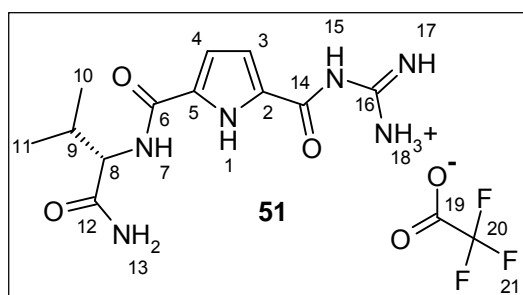
DIPEA versetzt und ein Ar-Ballon aufgesetzt. Die erhaltene Lösung wird bei 0 °C für 1 h gerührt und 14 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit DC charakterisiert (limitierendes Edukt vollständig abgebaut), mit  $\text{N}_2$  eingefroren und über Nacht im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wird das erhaltene Rohprodukt auf Isolute aufgezogen und über Kieselgel chromatografiert. Folgende Eluenten werden verwendet: 200 mL DCM, 200 mL DCM/2-Propanol,

80:1, 200 mL DCM/2-Propanol, 40:1, 200 mL DCM/2-Propanol, 20:1, 1 L DCM/2-Propanol, 9:1, 1 L DCM/2-Propanol, 17:3. DC-reine Produktfraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und über Nacht HV-getrocknet (PMD-066-01-03 + PMD-066-01-04).

**Ausbeute:** 267 mg (677  $\mu\text{mol}$ ), 54 %. **Rf:** (DCM/2-Propanol, 20:1) = 0.15.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta$  = 11.85 (s, 1H, 1-H), 10.93 (s, 1H, 15-H o. 17-H o. 18-H), 9.31 (s, 1H, 15-H o. 17-H o. 18-H), 8.57 (s, 1H, 15-H o. 17-H o. 18-H), 8.24 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, 7-H), 7.49 (s, 1H, 13-H), 7.05 (s, 1H, 13-H), 6.89-6.78 (m, 2H, 4-H u. 3-H), 4.33 (m, 1H, 8-H), 2.07 (m, 1H, 9-H), 1.45 (s, 9H, 21-H), 0.91 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, 10-H o. 11-H), 0.91 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, 10-H o. 11-H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta$  = 172.9 (12-C), 159.3 (6-C, 14-C), 158.4 (19-C), 131.2 (16-C), 129.5 (5-C, 2-C), 113.6, 113.1 (3-C, 4-C), 80.7 (20-C), 57.7 (8-C), 30.2 (9-C), 27.7 (21-C), 19.3, 18.2 (10-C, 11-C). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 789 (100) [2 M+H] $^+$  395 (19) [M+H] $^+$ . \* **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 417.1857, berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{NaO}_5^+$ : 417.1857.\* **IR:** [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3378 (v N-H (Pyrrol)), 3154 (v N-H), 2966 (v C-H (aliph.)), 1625 (v C=O (Amid)).\*

\* = Diese Charakterisierung erfolgte an dem identischen Produkt PMD-066-01-04.

#### 7.2.4 2-N-(Azaniumylmethanimidoyl)-5-N-[(1S)-1-carbamoyl-2-methylpropyl]-1H-pyrrole-2,5-dicarboxamid-trifluoracetat (51, PMD-067-02-03)

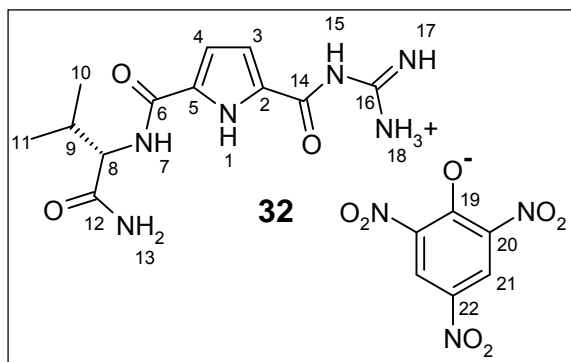


In einem 10 mL Einhalsrundkolben werden 190 mg (482  $\mu\text{mol}$ ) der Verbindung **50** (PMD-066-01-03) vorgelegt und unter Eiskühlung mit 1.21 mL TFA/DCM, 95:5 versetzt. Nach 1 h bei Eiskühlung wird die Mischung auf RT gebracht und weitere 16 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung wird diese zweimal mit 10 mL DCM versetzt und am

Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Es entsteht ein weißer Feststoff, der HV-getrocknet wird. Das erhaltene Rohprodukt wird aus MeOH umkristallisiert. Es resultiert ein weißer Feststoff.

**Ausbeute:** 116 mg (285  $\mu\text{mol}$ ), 59 % (PMD-067-02-03 + PMD-067-02-04). **Rf:** (DCM/MeOH, 9:1) = 0.1.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta$  = 12.7 (s, 1H, 1-H), 11.4 (s, 1H, 15-H), 8.63 (s, 1H, 17-H o. 18-H), 8.44 (s, 3H, 17-H o. 18-H), 8.38 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 7.56 (s, 1H, 13-H), 7.14 (s, 1H, 4-H o. 3-H), 7.09 (s, 1H, 13-H), 6.90 (s, 1H, 4-H o. 3-H), 4.35 (m, 1H, 8-H), 2.07 (m, 1H, 9-H), 0.91 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, 10-H o. 11-H), 0.90 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, 10-H o. 11-H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta$  = 172.7 (12-C), 160.0 (16-C), 159.4 (q,  $J$  = 32 Hz, 19-C), 158.7, 155.3 (6-C, 14-C), 132.4, 125.6 (5-C, 2-C), 116.8 (q,  $J$  = 117 Hz, 20-C), 114.4, 113.8 (3-C, 4-C), 57.7 (8-C), 30.3 (9-C), 19.3, 18.1 (10-C, 11-C). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 295 (100) [M+H] $^+$ , 589 (60) [2 M+H] $^+$ , 883 (16) [3 M+H] $^+$ . **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 295.1516, berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_3^+$ : 295.1513. **IR:** [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3302 (v N-H (Pyrrol)), 1721 (v C=O (TFA)), 1626 (v C=O (Amid)).

## 7.2.5 2-N-(Azaniumylmethanimidoyl)-5-N-[(1S)-1-carbamoyl-2-methylpropyl]-1H-pyrrole-2,5-dicarboxamid-2,4,6-trinitrobenzen-1-olat (32, PMD-068-01-01)



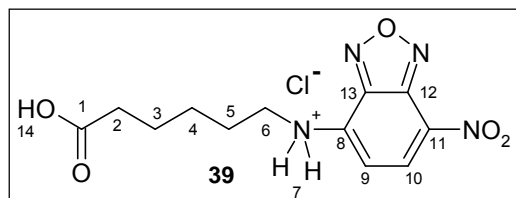
In einem 10 mL Einhalsrundkolben werden 77 mg (189  $\mu\text{mol}$ ) des Guanidiniumtrifluoracetats **51** (PMD-067-01-01) in 3 mL MeOH gelöst und mit 3.07 mL (175  $\mu\text{mol}$ ) kaltgesättigter Pikrinsäurelösung (13 mg/mL) versetzt. Die erhaltene Lösung wird am Rotationsverdampfer (40 °C) auf ein Volumen von 3 mL eingengt. Hierdurch wird ein hellgelber Feststoff gefällt. Dieser wird zunächst

abdekantiert. Das Dekantat wird zusätzlich zentrifugiert, um den Feststoff komplett abzutrennen. Das erhaltene Sediment wird mit 1 mL MeOH gewaschen und über Nacht HV-getrocknet. Es entsteht ein gelber Feststoff.

**Ausbeute:** 63.6 mg (122  $\mu\text{mol}$ ), 64 %.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 12.74 (s, 1H, 1-H), 10.95 (s, 1H, 15-H), 8.59 (s, 2H, 21-H), 8.36 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, 7-H), 8.17 (s, 4H, 17-H u. 18-H), 7.54 (s, 1H, 13-H), 7.08 (s, 1H, 13-H), 7.04 (dd,  $J$  = 4.0 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, 3-H o. 4-H), 6.93 (dd,  $J$  = 4.0 Hz,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, 3-H o. 4-H), 4.35 (dd,  $J$  = 8.70 Hz,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, 8-H), 2.07 (m, 1H, 9-H), 0.91 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, 10-H o. 11-H), 0.90 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, 10-H o. 11-H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 172.7 (12-C), 160.7 (19-C o. 22-C), 159.6 (14-C), 158.7 (6-C), 154.8 (19-C o. 22-C), 141.8 (20-C), 132.5 (16-C), 125.4 (2-C o. 5-C), 125.1 (21-C), 124.2 (2-C o. 5-C), 114.9, 113.8 (3-C, 4-C), 57.6 (8-C), 30.3 (9-C), 19.3, 18.1 (10-C, 11-C). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 295 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 295.1513, berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_3^+$ : 295.1513.

## 7.3 Syntheseprotokolle für die NBD-markierte CaaX-Box von Rheb

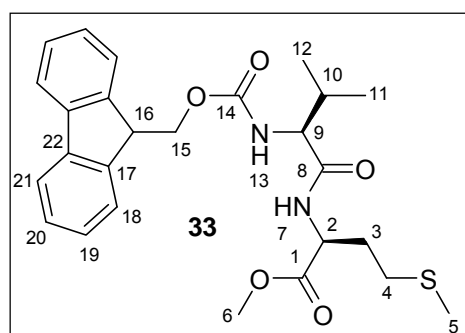
### 7.3.1 6-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexansäure (Hydrochlorid) (39, PMD-095-01-01)



In einem 100 mL Einhalsrundkolben werden 1.12 g (8.54 mmol) 6-Aminohexansäure und 2.15 g (25.6 mmol)  $\text{NaHCO}_3$  vorgelegt und in 22 mL  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Zu dieser Lösung wird eine Lösung von 1.70 g (8.52 mmol) NBD-Cl in 52 mL MeOH hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei 50 °C gerührt, auf RT gebracht und nach DC-Kontrolle mit 28 mL 1 M HCl (aq) auf pH = 1 eingestellt. Hierdurch entsteht ein Feststoff, der abdekantiert und im HV getrocknet wird (PMD-095-01-01).

**Ausbeute:** 1.16 g (3.49 mmol), 41 %. **Rf** (DCM + 1% MeOH) = 0.08. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 12.96 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.43 (m, 3H), 2.21 (m, 3H), 1.66 (m, 3H), 1.54 (m, 3H), 1.37 (m, 3H). **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 174.3 (C<sub>q</sub>), 145.0 (C<sub>q</sub>), 144.3 (C<sub>q</sub>), 144.0 (C<sub>q</sub>), 137.7 (CH), 120.4 (C<sub>q</sub>), 98.9 (CH), 43.2 (CH<sub>2</sub>), 33.5 (CH<sub>2</sub>), 27.2 (CH<sub>2</sub>), 25.9 (CH<sub>2</sub>), 24.0 (CH<sub>2</sub>). **HPLC-ESI-MS:** *m/z* (%) = 295 (100) [M+H]<sup>+</sup> 611 (17) [2 M+Na]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** *m/z* = 295.1037, berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 295.1037. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3075 (ν C-H (arom.)) 2940 (ν C-H (aliph.)), 1584 (ν N-H (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)), 1526 (ν C=O (Carboxylat)).

### 7.3.2 (2S)-2-[(2S)-2-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfanyl)butansäuremethylester (33, PMD-041-02-F2)



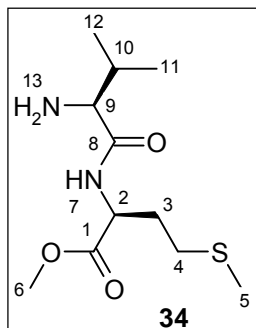
In einem 100 mL Schlenkcolben werden 2.00 g (10.0 mmol) Met-OMe \* HCl vorgelegt und mit 3.40 g (10.0 mmol) Fmoc-Val-OH versetzt. Die Mischung wird 3 x evakuiert und Ar-belüftet und im Eisbad auf 0 °C gebracht. Anschließend werden 53 mL DCM (p. a., durch Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> filtriert) und 5 mL DMF (p. a., trocken) hinzugefügt. Die erhaltene Lösung wird im Ar-Gegenstrom zunächst mit 5.15 mL (30.0 mmol) DIPEA, dann mit 2.10 g (11.0 mmol) HATU versetzt. Nach

1 h bei 0 °C wird die Mischung auf RT gebracht und 8 h weiter gerührt. Nach DC-Charakterisierung der Reaktionsmischung (Edukt nur noch in Spuren vorhanden) wird diese am Rotationsverdampfer eingengt und HV-getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird mit DCM auf 7 g Isolute aufgezogen und mit 3 L CyH/EtOAc (1:1) über Kieselgel chromatografiert. DC-reine Produktfraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und über Nacht HV-getrocknet.

**Ausbeute:** 2.93 g (6.05 mmol), 60 %. **Rf** (CyH/EtOAc, 7:3) = 0.2. **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 21-H), 7.59 (m, 2H, 18-H), 7.39 (m, 2H, 19-H o. 20-H), 7.30 (m, 2H, 19-H o. 20-H), 6.72 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, 7-H o. 13-H), 5.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 7-H o. 13-H), 4.72 (m, 1H, 2-H), 4.46-4.41 (m, 1H, 9-H), 4.39-4.31 (m, 1H, 15-H), 4.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, 16-H), 4.11-4.02 (m, 1H, 15-H), 3.74 (s, 3H, 6-H), 2.50 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, 4-H), 2.20-2.08 (m, 2H, 3-H), 2.05 (s, 3H, 5-H), 2.02-1.94 (m, 1H, 10-H), 0.97 (ψt, 6H, 11-H, 12-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.0, 171.2 (1-C, 8-C), 156.3 (14-C), 143.8, 141.2 (17-C, 22-C), 127.7, 127.0, 125.0, 119.9 (18-C, 19-C, 20-C, 21-C), 67.1 (15-C), 60.3 (9-C), 52.5, 51.5 (2-C, 6-C), 47.1 (2-C o. 6-C CH), 31.3 (3-C o. 4-C), 31.2 (10-C), 29.9 (3-C o. 4-C), 19.0 17.9 15.4 (5-C, 11-C, 12-C). **HPLC-ESI-MS:** *m/z* (%) = 485 (100) [M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** *m/z* = 507.1906, berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>S<sup>+</sup>: 507.1924. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3292 (ν N-H), 3065 (ν C-H (arom.)), 2956 (ν C-H (aliph.)), 1748 (C=O (Ester)), 1692 (C=O (Urethan)).

### 7.3.3 (2S)-2-[(2S)-2-Amino-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfonyl)butansäuremethylester (34, PMD-045-02-01)

In einem 25 mL Einhalskolben werden 1.18 g (2.44 mmol) Fmoc-HN-Val-Met-OMe (**33**, PMD-041-01-



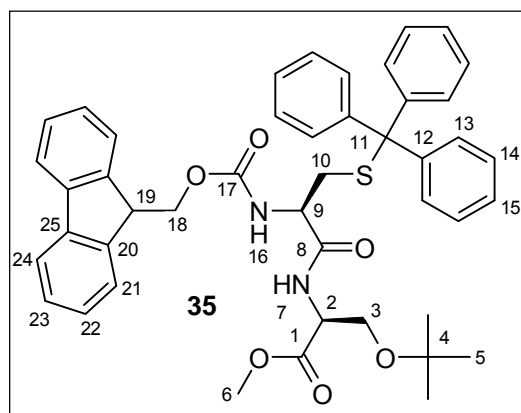
01) vorgelegt, mit 12 mL ACN (p. a., trocken) und 0.8 mL DMF suspendiert und bei 0 °C unter Rühren mit 284 µL (2.87 mmol) Piperidin (über CaH<sub>2</sub> dest.) versetzt. Anschließend wird 1 h bei RT gerührt. Hierdurch entsteht eine Suspension, welche durch 5 minütiges Behandeln im US-Bad zu einer klaren Lösung wird. Nach DC-Charakterisierung der Lösung (etwas Edukt vorhanden + Startfleck der mit Ninhydrin stark anfärbt) wird diese am Rotationsverdampfer (bei RT) vom Lösungsmittel befreit und anschließend 10 min HV-getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird direkt weiter eingesetzt,

da sonst das Produkt unter Bildung eines Diketopiperazins zyklisiert.

**Ausbeute:** 1.20 g\* (2.43 mmol), 100 %. **Rf:** (CyH/EtOAc, 1:1) = 0.06 (rote Färbung mit Ninhydrin). \* = Enthält Rohprodukt und Fmoc-Piperidin-Addukt.

### 7.3.4 (2S)-3-(tert-Butoxy)-2-[(2R)-2-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-3-[(triphenylmethyl)sulfonyl]propanamido]propan säuremethylester (35, PMD-040-01-01)

In einem 50 mL Einhalskolben werden 1.00 g (4.77 mmol) H-Ser(*t*-Bu)-OMe\*HCl und 2.77 g (4.73



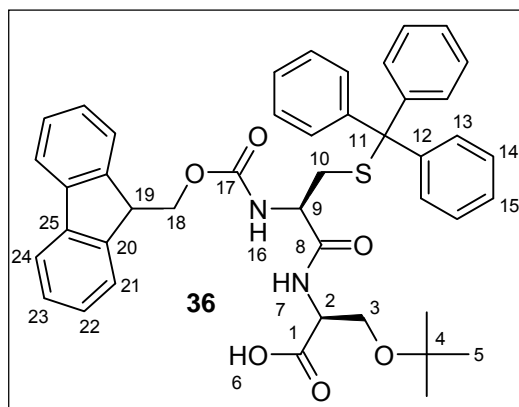
mmol) Fmoc-Cys(Trt)-OH vorgelegt und mit 35 mL DCM (p. a., trocken) und 3.5 mL DMF (p. a., trocken) gelöst. Anschließend werden bei 0 °C 1.83 g (14.2 mmol) DIPEA, dann 1.98 g (5.21 mmol) HATU hinzugefügt. Es wird ein Gummiseptum (mit Ar-Ballon) aufgesetzt und die Reaktionsmischung 1 h bei 0 °C, dann 17 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung wird diese am Rotationsverdampfer eingeeengt und über Nacht HV-getrocknet. Es resultiert ein gelbes Öl, das mit DCM auf Isolute aufgezogen und mit CyH/EtOAc (1:1)

über Kieselgel chromatografiert wird. DC-reine Produktfraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und über Nacht HV-getrocknet. Es resultiert ein farbloser Feststoff.

**Ausbeute:** 2.55 g (3.43 mmol), 73 %. **Rf:** (DCM + 1 % MeOH) = 0.19. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 24-H), 7.80 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, 16-H o. 7-H), 7.72 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, 21-H), 7.43-7.37 (m, 2H, 23-H), 7.35-7.22 (m, 17H, 13-H, 14-H, 15-H und 22-H), 4.38-4.34 (m, 1H, 9-H o. 2-H), 4.29 (m, 1H, 16-H o. 7-H), 4.24-4.20 (m, 2H, 18-H), 4.07-4.00 (m, 1H, 9-H o. 2-H), 3.60-3.56 (m, 1H, 3-H), 3.55 (s, 3H, 6-H), 3.45-3.42 (m, 1H, 3-H), 2.48-2.37 (m, 2H, 10-H), 1.04 (s, 9H, 5-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 170.1, 169.9 (1-C, 8-C), 155.5 (17-C), 144.1, 143.6, 140.6 (12-C, 20-C, 25-C), 129.0, 127.9, 127.5, 126.9, 126.6 (13-C, 14-C, 15-C, 22-C, 23-C), 125.1 (21-C),

119.9 (24-C), 72.8 (4-C), 65.9, 65.8, 61.1 (3-C, 11-C, 18-C), 53.5, 52.7 (9-C, 19-C), 51.7 (6-C), 46.4 (2-C), 33.6 (10-C), 26.9 (5-C). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 243.2 (100)  $[\text{Ph}_3\text{C}]^+$ , 765.6 (24)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 765.2964, berechnet für  $\text{C}_{45}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}^+$ : 765.2969. **IR:**  $[\text{cm}^{-1}]$  = 3285 (ν N-H (amidisch)), 3056 (ν C-H (arom.)), 2969 (ν C-H (aliph.)), 1738, 1654 (ν C=O (Urethan)).

### 7.3.5 (2S)-3-(*tert*-Butoxy)-2-[(2R)-2-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-3-[(triphenylmethyl)sulfanyl]propanamido]propansäure (36, PMD-043-01-03)

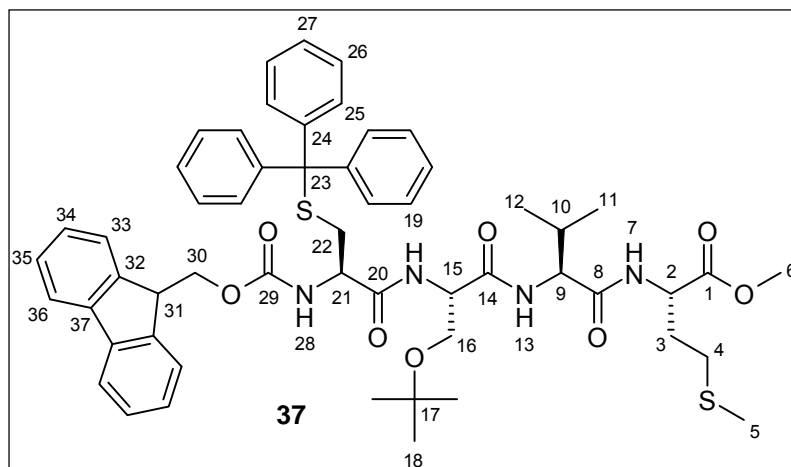


In einem 50 mL Schlenkkolben werden 526 mg (2.91 mmol) Trimethylzinnhydroxid vorgelegt, der Kolben 3 x evakuiert und mit Ar belüftet. Nun wird unter Eisbadkühlung und Ar-Gegenstrom eine Ar-begaste Lösung von 1.03 g (1.39 mmol) des Methylesters **35** (PMD-040-01-01) in 8 mL 1,2-Dichlorethan hinzugefügt. Nach Zugabe der Lösung wird die Suspension 5 min mit Ar begast (mit Kanüle eingeleitet). Anschließend wird ein Rückflusskühler mit Ar-Ballon aufgesetzt und die

Suspension unter magnetischem Rühren 15 h auf 80 °C, geheizt. Die Reaktionsmischung wird am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und das zunächst entstehende Öl im HV zu einem Feststoffschaum getrocknet. Der Feststoff wird mit 50 mL EtOAc gelöst und im Scheidetrichter 2 x mit 16 mL  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (ges., aq) gewaschen. Die vereinigten org. Phasen werden mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und anschließend über Nacht HV-getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wird auf Isolute aufgezogen und über Kieselgel chromatografiert. Folgende Eluenten werden verwendet: 1 L CyH/EtOAc (1:1), 300 mL EtOAc, 1 L EtOAc/DCM (1:1), 1 L EtOAc/MeOH (8:2), 1 L EtOAc/MeOH (1:1). DC-reine Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und über Nacht HV-getrocknet.

**Ausbeute:** 425 mg (583  $\mu\text{mol}$ ), 42 %. **Rf:** (EtOAc) = 0.19.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.76-7.74 (m, 2H, 24-H), 7.60-7.50 (m, 2H, 21-H), 7.43-7.20 (m, 19H, 13-H, 14-H, 15-H, 22-H und 23-H), 6.75 (s, 1H, 7-H o. 16-H), 5.18 (s, 1H, 7-H o. 16-H), 4.56 (s, 1H, 9-H), 4.41-4.32 (m, 2H, 18-H), 4.23-4.19 (m, 1H, 19-H), 3.89-3.77 (m, 2H, 3-H), 3.54-3.45 (m, 1H, 9-H o. 2-H), 2.76-2.63 (m, 2H, 10-H), 1.13 (s, 9H, 5-H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 173.4, 170.2 (1-C, 8-C), 155.9 (17-C), 144.3, 143.6 (12-C, 20-C), 141.3 (25-C), 129.6, 128.0, 127.7, 127.1, 126.9 (13-C, 14-C, 15-C, 19-C, 22-C, 23-C), 125.1 (21-C), 119.9 (24-C), 73.9 (4-C), 67.3 (11-C), 67.1 (18-C), 61.4 (3-C), 54.0, 53.1, 47.0 (2-C, 9-C, 19-C), 33.9 (10-C), 27.3 (5-C). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 243 (100)  $[\text{Ph}_3\text{C}]^+$ , 751 (8)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 751.2814, berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}^+$ : 751.2812. **IR:**  $[\text{cm}^{-1}]$  = 3392 (ν N-H (amidisch)), 3056 (ν C-H (arom.)), 2967, 2925 (ν C-H (aliph.)), 1717 (C=O (Ester)), 1651 (ν C=O (Urethan)).

**7.3.6 (2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-3-(*tert*-Butoxy)-2-[(2R)-2-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-amino]-3-[(triphenylmethyl)-sulfanyl]propanamido]propanamido]-3-methylbutan-amido]-4-(methylsulfanyl)butansäuremethylester (37, PMD-046-02-03)**



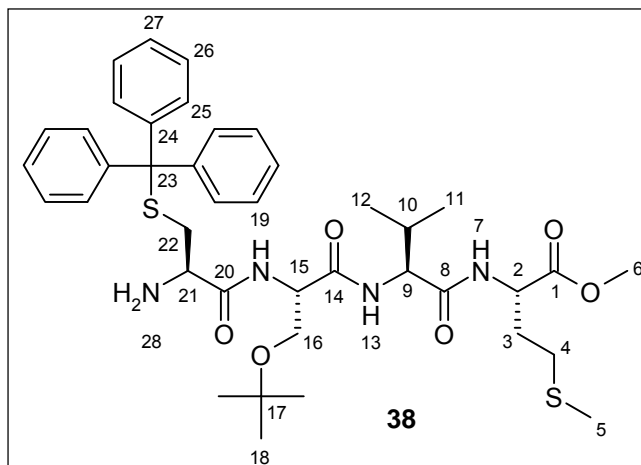
In einem 25 mL Einhalsrundkolben werden 1.60 g (2.20 mmol) der Carbonsäure **36** (PMD-043-04) vorgelegt und bei 0 °C mit 2.43 mmol einer Lösung des Rohprodukts **34** (PMD-045-02) in 20 mL DCM versetzt. Die Mischung wird 5 min Ar-begast, dann im Ar-Gegenstrom mit 2 mL DMF (p. a., durch Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> filtriert) versetzt. Die erhaltene

Lösung wird im Ar-Gegenstrom zunächst mit 1.13 mL (6.49 mmol) DIPEA, dann mit 918 mg (2.41 mmol) HATU versetzt. Anschließend wird ein Gummiseptum (mit Ar-Ballon) aufgesetzt. Nach 1 h bei 0 °C wird die Mischung auf RT gebracht und 13 h bei RT gerührt. Die erhaltene Reaktionsmischung wird mit DC charakterisiert (limitierendes Edukt fast vollständig abgebaut) und zunächst am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Hierauf wird über Nacht HV-getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird mit DCM auf 5 g Isolute absorbiert und über Kieselgel chromatografiert. Folgende Eluenten werden verwendet: 500 mL CyH, 500 mL CyH/EtOAc, 20 :1, 500 mL CyH/EtOAc, 10:1, 500 mL CyH/EtOAc, 7:3, 500 mL CyH/EtOAc, 1:1, 500 mL CyH/EtOAc, 3:7, 1 L EtOAc, 500 mL EtOAc/EtOH, 1:1 500 mL DCM/MeOH, 1:1 (Nachspülung). DC-reine Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und über Nacht HV-getrocknet.

**Ausbeute:** 1.24 g (1.27 mmol), 58 %. **Rf:** (CyH/EtOAc, 1:1) = 0.26. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 8.35 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, 7-H), 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 36-H), 7.72 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, 33-H), 7.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 19-H o. 13-H), 7.61 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 19-H o. 13-H), 7.40 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 7.5 Hz, 2H, 35-H), 7.32-7.22 (m, 18H, 25-H, 26-H, 27-H, 28-H, 34-H), 4.37-2.28 (m, 3H, 21-H, 9-H und 2-H), 4.24-4.20 (m, 3H, 30-H und 31-H), 4.01-3.96 (m, 1H, 15-H), 3.61 (s, 3H, 6-H), 3.43-3.40 (m, 1H, 22-H), 3.36-3.30 (m, 1H, 22-H), 2.51-2.40 (m, 4H, 16-H und 4-H), 2.01 (s, 3H, 5-H) 1.97-1.83 (m, 3H, 3-H und 10-H), 1.02 (s, 9H, 18-H), 0.83 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 12-H o. 11-H), 0.77 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 12-H o. 11-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 171.9, 170.8, 169.6, 168.9 (1-C, 8-C, 14-C, 20-C), 155.6 (29-C), 144.2, 143.6, 140.6 (24-C, 32-C, 37-C), 129.0, 127.9, 127.5, 127.0, 126.6 (25-C, 26-C, 27-C, 28-C, 34-C), 125.2 (33-C), 120.0 (36-C), 72.6 (17-C), 65.9 (23-C), 65.8, 61.5 (16-C, 30-C), 57.0, 53.8, 52.9, 51.7, 50.8, 46.5 (2-C, 6-C, 9-C, 15-C, 21-C, 31-C), 30.9 (10-C), 30.2, 29.4 (3-C, 4-C), 26.9 (18-C), 18.8, 17.8 (11-C, 12-C), 14.4 (5-C). **HPLC-ESI-MS:** *m/z* (%) = 243.1 (100) [Ph<sub>3</sub>C]<sup>+</sup>, 973.4 (72) [M+H]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** *m/z* = 995.4059, berechnet für C<sub>55</sub>H<sub>64</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>8</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup>: 995.4058. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3280 (ν N-H (amidisch)), 3058 (ν C-H (arom.)), 2966 (ν C-H (aliph.)), 1636 (ν C=O).



**7.3.7 (2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-Amino-3-[(triphenylmethyl)sulfanyl]propanamido]-3-(*tert*-butoxy)propanamido]-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfanyl)butansäuremethylester (38, PMD-069-01-01)**

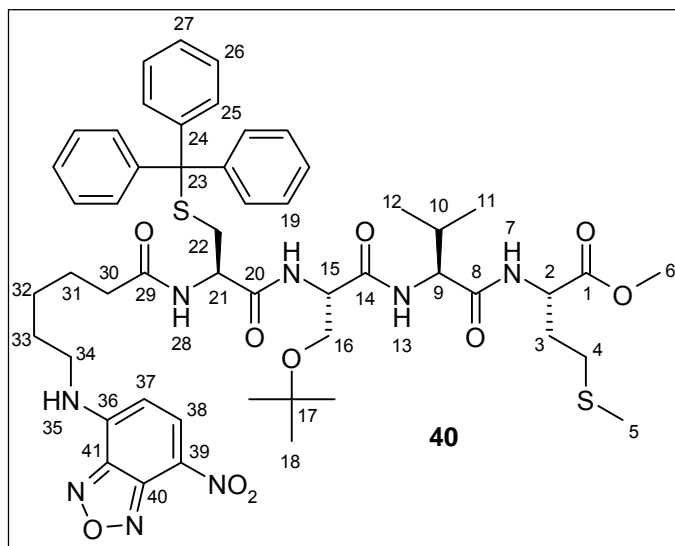


In einem 10 mL Rundkolben werden 250 mg (257  $\mu$ mol) Fmoc-Cys(Trt)-Ser(*t*Bu)-Val-Met-OMe (**37**, PMD-046-02-03) vorgelegt und in 1.3 mL ACN + 86  $\mu$ L DMF (über CaH<sub>2</sub> dest.) gelöst. Der Lösung wird bei 0 °C eine Lösung von 31  $\mu$ L (313  $\mu$ mol) + 200  $\mu$ L DMF Piperidin (über CaH<sub>2</sub> dest.) hinzugefügt. Es entsteht zunächst eine gelatinöse Suspension, die durch Zugabe von 1 mL DMF wieder in Lösung gebracht wird. Anschließend wird über eine Kanüle 5 min mit Argon begast und

die Lösung auf RT gebracht. Die Lösung wird 1 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung (das Edukt ist nur noch geringfügig vorhanden) wird diese am Rotationsverdampfer vom Großteil des Lösungsmittels befreit (30 °C, 100 mbar), dann mit N<sub>2</sub> eingefroren und 1 h HV-getrocknet. Anschließend wird das so erhaltene Rohprodukt direkt in der Synthese der Verbindung **40** (PMD-070-01) eingesetzt.

**Ausbeute:** 261 mg\* (257  $\mu$ mol), 100 %. **Rf:** (CyH/EtOAc, 1:1) = 0.16 (vermutetes freies Amin). \* = Enthält Rohprodukt und Fmoc-Piperidin-Addukt.

**7.3.8 (2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-3-(*tert*-Butoxy)-2-[(2R)-2-{6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-amino]hexanamido}-3-[(triphenylmethyl)sulfanyl]propanamido]propanamido]-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfanyl)butansäuremethylester (40, PMD-070-01-12)**



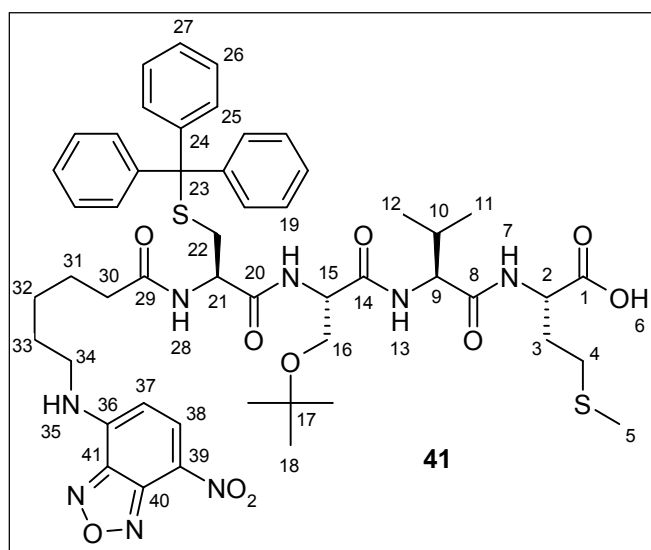
In einem 10 mL Einhalsrundkolben wird das komplette Rohprodukt **38** (257  $\mu$ mol, PMD-069-01) vorgelegt, bei 0 °C mit 3 mL DMF gelöst, mit 75.6 mg (229  $\mu$ mol) des NBD-Linkers **39** (TPT-007-02), dann mit 132  $\mu$ L (776  $\mu$ mol) DIPEA versetzt. Die gerührte Lösung wird zunächst 5 min mit Ar begast, dann werden 107.4 mg (283  $\mu$ mol) HATU hinzugefügt, erneut 5 min mit Ar begast, mit einem Septum (Ar-Ballon aufgesetzt) verschlossen und die Reaktionsmischung innerhalb von 1 h auf RT

gebracht. Anschließend wird 17 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung wird diese mit N<sub>2</sub> eingefroren und lyophilisiert. Das erhaltene Rohprodukt wird mehrfach mit EtOAc über Kieselgel chromatografiert. Reine Produktfraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und über Nacht HV-getrocknet.

**Ausbeute:** 134 mg (130 µmol), 57 %. **Rf** (EtOAc) = 0.23. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.46 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, 38-H), 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 6H, 25-H), 7.32-7.28 (m, 6H, 26-H), 7.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, 27-H), 7.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, 28-H o. 19-H o. 13-H o. 7-H), 7.04 (s, 1H, 28-H o. 19-H o. 13-H o. 7-H), 6.96 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 28-H o. 19-H o. 13-H o. 7-H), 6.89 (s, 1H, 28-H o. 19-H o. 13-H o. 7-H), 6.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, 37-H), 4.68 (m, 1H, 21-H o. 15-H o. 9-H o. 2-H), 4.39-4.33 (m, 2H, 21-H o. 15-H o. 9-H o. 2-H), 4.16-4.07 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.75 (s, 3H, 6-H), 3.58-3.40 (m, 3H, 34-H), 2.73 (m, 2H, 22-H), 2.51 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, 4-H), 2.27-2.12 (m, 4H, 30-H), 2.08 (s, 3H, 5-H), 2.06-1.96 (m, 2H), 1.79 (m, 2H, 33-H), 1.69 (m, 2H, 32-H), 1.50 (m, 2H, 31-H), 1.27 (m, 1H), 1.20 (s, 9H, 18-H). **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.9, 172.1, 170.7, 170.2 (1-C, 8-C, 14-C, 20-C, 29-C), 144.3, 144.2, 144.0 (24-C, 41-C, 40-C, 36-C), 136.5 (38-C), 129.4 (25-C), 128.1 (26-C), 127.0 (27-C), 98.5 (37-C), 74.3 (17-C), 67.4 (23-C), 60.9 (16-C), 58.6, 54.2, 52.6, 52.4, 51.4 (2-C, 6-C, 9-C, 15-C, 21-C), 43.7 (34-C), 35.7, 33.4, 31.4, 30.1, 29.9, 27.9 (3-C, 4-C, 10-C, 22-C, 30-C, 33-C), 27.4 (18-C), 26.3, 24.6 (31-C, 32-C), 19.3, 17.7 (11-C, 12-C), 15.3 (5-C). **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 1044 (100), [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. **HR-ESI-MS:** m/z = 1025.4272, berechnet für C<sub>52</sub>H<sub>65</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup>: 1025.4271. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3283 (ν N-H (amidisch)), 3061 (ν C-H (arom.)), 2963, 2928 (ν C-H (aliph.)), 1735 (C=O (Ester)), 1637 (ν C=O).

\* = Diese Charakterisierung erfolgte an der identischen Verbindung PMD-070-01-06.

### 7.3.9 (2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-3-(tert-Butoxy)-2-[(2R)-2-(6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-amino]hexanamido)-3-[(triphenylmethyl)sulfanyl]propanamido]propanamido]-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfanyl)butansäure (41, PMD-071-02-01)



In einem 10 mL Schlenkrohr werden 64.9 mg (63.2 µmol) des Methylesters **40** (PMD-070-01-12, reisoliertes Edukt) in 610 µL 1,2-Dichlorethan unter magnetischem Rühren suspendiert und 5 min mit Argon begast. Anschließend werden unter Eisbadkühlung 24.0 mg (133 µmol) Me<sub>3</sub>SnOH hinzugefügt und die Suspension 5 min mit Ar begast (über eine Kanüle eingeleitet). Anschließend wird ein Rückflusskühler mit Ar-Ballon aufgesetzt und die gerührte Suspension für 15 h auf 80 °C geheizt (hierdurch bildet sich

eine Lösung). Nach DC-Kontrolle der Reaktionsmischung wird diese am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, in (Ar-entgastem) ACN gelöst und über eine präparative RP18-Chromatographiesäule (0.5 bar N<sub>2</sub>-Überdruck) gereinigt. Hierzu wird der erste Spot (**41**, PMD-071-02-01) mit ACN

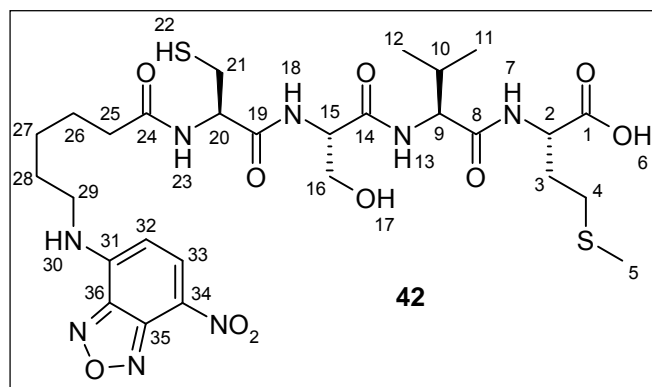
eluiert, der zweite Spot (PMD-071-02-02) mit ACN/MeOH, 3:1 eluiert. Für die Chromatografie werden ausschliesslich mit Argon entgaste Lösungsmittel (über eine Sinterfritte eingeleitet) benutzt. Produktfraktionen werden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und anschließend HV-getrocknet. Es entsteht sowohl das gewünschte Produkt (0710201), wie dessen Sulfoxid (PMD-071-02-02).

**Ausbeute** (41, PMD-071-02-01): 53 mg (52  $\mu\text{mol}$ ), 82 %.

**Ausbeute** (Sulfoxid, PMD-071-02-02): 4.5 mg (4.4  $\mu\text{mol}$ ), 7 %.

**Rf** (RP18, ACN / MeOH, 6:1) = 0.81.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{d}_3\text{-ACN}$ ):  $\delta$  = 8.47 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.47-7.43 (m, 1 H, 7-H o. 13-H o. 19-H o. 28-H), 7.40 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 6H, 25-H), 7.32 (dd,  $J$  = 7.7 Hz,  $J$  = 7.7 Hz, 6H, 26-H), 7.24 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, 27-H), 6.97 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, 7-H o. 13-H o. 19-H o. 28-H), 6.87 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, 7-H o. 13-H o. 19-H o. 28-H), 6.62 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, 37-H o. 38-H), 6.26 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 4.45-4.38 (m, 1H), 4.22 (dd,  $J$  = 8.8 Hz,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 4.17-4.13 (m, 1H), 4.00 (td,  $J$  = 6.6 Hz,  $J$  = 6.7 Hz, 1H), 3.72-3.64 (m, 1H), 3.47 (s, 2H, 35-H), 3.46-3.42 (m, 1H), 2.56 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 2.53-2.42 (m, 2H), 2.22-2.16 (m, 2H), 2.03 (s, 3H, 5-H), 1.76-1.69 (m, 2H), 1.67-1.57 (m, 2H), 1.48-1.38 (m, 2H), 1.13 (s, 9H), 0.88 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H), 0.83 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz,  $\text{d}_3\text{-ACN}$ ):  $\delta$  = 174.7 ( $\text{C}_q$ ), 173.1 ( $\text{C}_q$ ), 172.2 ( $\text{C}_q$ ), 171.7 ( $\text{C}_q$ ), 170.9 ( $\text{C}_q$ ), 145.4 ( $\text{C}_q$ ), 130.3 (CH), 129.1 (CH), 127.9 (CH), 76.3 ( $\text{C}_q$ ), 74.4 ( $\text{C}_q$ ), 67.8 ( $\text{C}_q$ ), 61.8 ( $\text{C}_q$ ), 60.3 ( $\text{C}_q$ ), 59.2 ( $\text{C}_q$ ), 58.1 ( $\text{C}_q$ ), 55.5 ( $\text{C}_q$ ), 54.4 (CH), 52.2 ( $\text{C}_q$ ), 36.2 ( $\text{CH}_2$ ), 33.7 ( $\text{CH}_2$ ), 31.2 ( $\text{CH}_2$ ), 30.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.6 (CH), 28.4 ( $\text{CH}_2$ ), 27.0 ( $\text{CH}_2$ ), 25.7 ( $\text{CH}_2$ ), 19.6 ( $\text{CH}_3$ ), 18.1 ( $\text{CH}_3$ ), 15.2 ( $\text{CH}_3$ ). **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 1030 (100)  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 1035.3847, berechnet für  $\text{C}_{51}\text{H}_{64}\text{N}_8\text{NaO}_{10}\text{S}_2^+$ : 1035.4079. **IR**:  $[\text{cm}^{-1}]$  = 3275 (v N-H (amidisch)), 3063 (v C-H (arom.)), 2965, 2927 (v C-H (aliph.)), 1632 (v C=O).

**7.3.10 (2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-3-Hydroxy-2-[(2R)-2-{6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-hexanamido]-3-sulfanylpropanamido]propanamido]-3-methylbutanamido]-4-(methylsulfanyl)butansäure (Trifluoracetat, 42, PMD-073-01-02)**



In einem 20 mL Schlenkrohr werden 8.5 mg (8.39  $\mu\text{mol}$ ) **41** (PMD-071-02-01) vorgelegt und unter Eiskühlung mit einer Ar-begasten Lösung von 767  $\mu\text{L}$  (9.96 mmol) TFA, 20  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (1.11 mmol) und 20  $\mu\text{L}$  (124  $\mu\text{mol}$ ) Triethylsilan gemischt und durch 5 minütiges Hindurchleiten von Ar (über eine Pasteurpipette eingeleitet) vom Sauerstoff befreit. Die Lösung wird dann bei RT 2 h gerührt.

Anschließend wird die Reaktionsmischung durch Glaswolle in einen eisgekühlten 10 mL Einhalsrundkolben filtriert, der Filter mit 2 mL eisgekühltem DCM gewaschen und die Filtrate am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur vom Großteil des Lösungsmittels befreit. Dann wird der Kolben mit  $\text{N}_2$  eingefroren und über Nacht HV-getrocknet. Der resultierende Rückstand wird 3 x mit 300  $\mu\text{L}$   $\text{Et}_2\text{O}$

(eiskalt, frisch destilliert) digeriert und die Waschlösung verworfen. Der gelbe Rückstand wird 2 h HV-getrocknet.

**Ausbeute:** 7.9 mg (9.2  $\mu\text{mol}$ ), 84 %.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{d}_3\text{-ACN}$ ):  $\delta$  = 8.50 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.51 ( $\psi\text{s}$ , 1H), 7.33-7.29 (m, 1 H), 7.19 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H), 7.16-7.13 (m, 1 H), 7.11 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 6.96 (8.6 Hz, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H), 6.31 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 4.48-4.42 (m, 1H), 4.40 (dd,  $J$  = 12.3 Hz,  $J$  = 6.3 Hz, 1H), 4.36-4.31 (m, 1H), 4.25 (dd,  $J$  = 8.5 Hz,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 3.84 (dd,  $J$  = 11.1 Hz,  $J$  = 4.7 Hz, 1H), 3.67 (dd,  $J$  = 11.1 Hz,  $J$  = 5.3 Hz, 1H), 3.52 ( $\psi\text{s}$ , 1H), 2.88 (s, 3H, 5-H), 2.78 ( $\psi\text{s}$ , 2H), 2.57-2.52 (m, 1H, 4-H), 2.51-2.45 (m, 1H, 4-H), 2.31-2.26 (m, 2H, 3-H), 1.78-1.72 (m, 4H, 25-H, 29-H), 1.70-1.62 (m, 4H, 26-H, 28-H), 1.55-1.50 (m, 2H), 1.49-1.41 (m, 4H), 1.31-1.29 (m, 2H, 27-H), 0.92 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, 11-H o. 12-H), 0.89 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, 11-H o. 12-H). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 713 (100) [M-H], **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 713.2392, berechnet für  $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}_2^-$ : 713.2393. **IR:** [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3272 ( $\nu$  N-H (amidisch)), 3066 ( $\nu$  C-H (arom.)), 2963, 2929 ( $\nu$  C-H (aliph.)), 1633 ( $\nu$  C=O).

#### 7.4 Festphasensynthese der nachsynthetisierten Rezeptoren 54 bis 60 (PMD-098 bis PMD-104), allgemeines Syntheseprotokoll (Syro II)

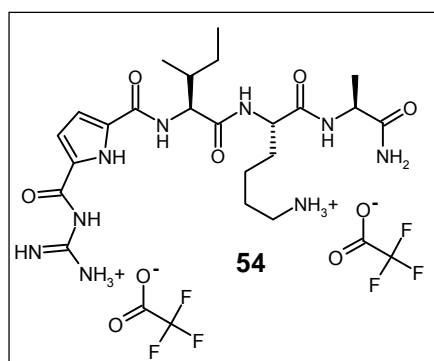
##### Fmoc-Entschützung:

In einem 10 mL Festphasenreaktor werden 100 mg Rink-Amid-Harz vorgelegt und mit 4 mL DMF versetzt und abgesaugt. Zu dem in DMF gequollenen Harz werden 4 mL 20 % Piperidin in DMF gegeben und das Harz 15 min gerührt. Anschließend wird abgesaugt und erneut 15 min mit 4 mL 20 %-igem Piperidin in DMF gerührt. Nach dem Absaugen wird das Harz 5 x mit DMF (4 mL), 3 x MeOH (4 mL), 5 x DCM (3 mL) gewaschen (bei jedem Waschvorgang wird 5 min gerührt).

##### Ankupplung der Fmoc-Aminosäure bzw. Kopfgruppe:

Das Harz wird zunächst mit 4 mL DMF versetzt und abgesaugt. In einem Reagenzglas werden 2.5 Äq. PyBOP, 2.5 Äq. HOBT, 2.5 Äq. Fmoc-AS (oder die Kopfgruppe 49 (PMD-065-01-02)) sowie 5 Äq. DIPEA in 2 mL DMF gelöst und zum Harz gegeben. Das Harz wird dann 4 h bei RT gerührt und anschließend abgesaugt. Die Kupplung wird wie beschrieben wiederholt und das Harz dann mit 5 x DMF (4 mL), 3 x MeOH (4 mL), 5 x DCM (3 mL) gewaschen (bei jedem Waschvorgang wird 5 min gerührt).

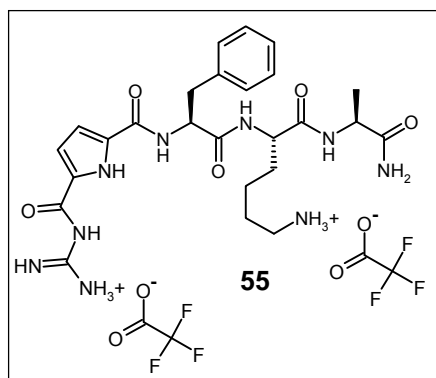
##### $\text{H}_2\text{NOC-L-Ala-L-Lys-L-Ile-KG}$ (54, PMD-098-01-03, TFA-Salz)



**Ausbeute:** 20.3 mg (27.6  $\mu\text{mol}$ ), 45 %.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta$  = 12.7 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.1 (s, 1H, Guanidinium-amid NH), 8.44 (d, 1H,  $J$  = 8.3 Hz, Amid NH), 8.29 (s, 4H, Guanidinium  $\text{NH}_2$ ), 8.21 (d, 1H,  $J$  = 7.9 Hz Amid NH), 7.76 (d, 1H,  $J$  = 7.3 Hz, Amid NH), 7.60 (s, 3H, Lysin  $\text{NH}_2$ ), 7.33 (s, 1H, Carbamoyl  $\text{NH}_2$ ), 7.08 (m, 1H, Pyrrol CH), 6.99 (s, 1H, Carbamoyl  $\text{NH}_2$ ), 6.91 (m, 1H, Pyrrol CH), 4.40 (t, 1H,  $J$  = 8.0

Hz,  $\alpha$ -H), 4.24 (m, 1H,  $\alpha$ -H), 4.19 (m, 1H,  $\alpha$ -H), 2.76-2.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.88-1.80 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.70-1.64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.58-1.42 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.38-1.28 (m, 3H, CH<sub>2</sub>), 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.20 (d, 3H,  $J$  = 7.06, CH<sub>3</sub>), 0.89 (d, 3H,  $J$  = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>). **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 508 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 508.2987, berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 508.2990. **IR**: [cm<sup>-1</sup>] = 3270 (v N-H (amidisch)), 3066 (v C-H (arom.)), 2964, 2931 (v C-H (aliph.)), 1630 (v C=O).

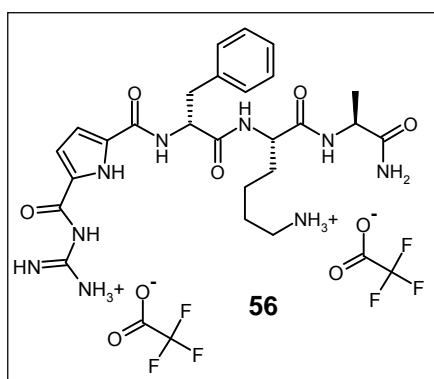
### H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-L-Lys-L-Phe-KG (55, PMD-099-01-03, TFA-Salz)



**Ausbeute**: 43.8 mg (56.9  $\mu$ mol), 93 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.4 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.2 (s, 1H, Guanidiniumamid NH), 8.66 (d, 1H,  $J$  = 8.3 Hz, Amid-NH), 8.37 (d, 1H,  $J$  = 7.9 Hz, Amid-NH), 8.5 (s, 4H, Guanidinium NH<sub>2</sub>), 7.86 (d, 1H,  $J$  = 7.3 Hz, Amid-NH), 7.64 (s, 3H, NH<sub>2</sub>), 7.35 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 7.32 (d, 2H,  $J$  = 7.4 Hz), 7.25 (t, 2H,  $J$  = 7.6 Hz), 7.16 (t, 1H,  $J$  = 7.3 Hz), 7.06 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.01 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 6.85 (m, 1H, Pyrrol-CH), 4.77 (m, 1H,  $\alpha$ -H), 4.26 (m,

1H,  $\alpha$ -H), 4.20 (q, 1H,  $J$  = 7.1 Hz,  $\alpha$ -H), 3.14 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.89-2.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.80-2.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.77-1.66 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.61-1.47 (m, 3H, CH<sub>2</sub>), 1.42-1.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.22 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 0.95 (t, 3H,  $J$  = 7.8 Hz, CH<sub>3</sub>). **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 542 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 542.2842, berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 542.2834. **IR**: [cm<sup>-1</sup>] = 3292 (v N-H (amidisch)), 3078 (v C-H (arom.)), 2944 (v C-H (aliph.)), 1634 (v C=O).

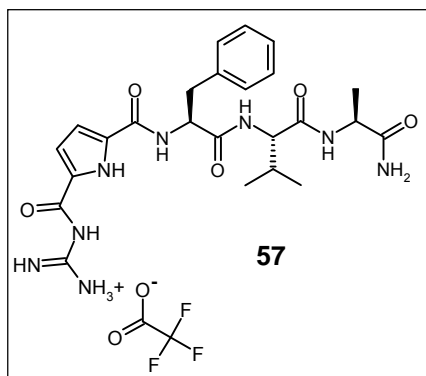
### H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-L-Lys-D-Phe-KG (56, PMD-100-01-03, TFA-Salz)



**Ausbeute**: 24.8 mg (32.2  $\mu$ mol), 52 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.5 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.0 (s, 1H, Guanidiniumamid NH), 8.76 (d, 1H,  $J$  = 7.3 Hz, Amid-NH), 8.41 (d, 1H,  $J$  = 7.9 Hz, Amid-NH), 8.25 (s, 4H, Guanidinium NH<sub>2</sub>), 7.91 (d, 1H,  $J$  = 7.6 Hz, Amid-NH), 7.60 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.30 (d, 2H,  $J$  = 7.2 Hz), 7.26 (t, 2H,  $J$  = 7.6 Hz), 7.18 (t, 1H,  $J$  = 7.6 Hz), 7.11 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 7.05 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.92 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 6.87-6.85 (m, 1H, Pyrrol-CH), 4.76 (m, 1H,  $\alpha$ -H),

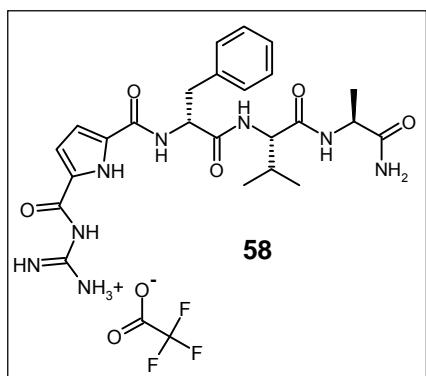
4.19-4.12 (m, 2H,  $\alpha$ -H), 3.03 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.95 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.66-1.58 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.49-1.40 (m, 3H, CH<sub>2</sub>), 1.39-1.32 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.23 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 0.95 (t, 3H,  $J$  = 8.3 Hz, CH<sub>3</sub>). **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 542 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 542.2834, berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 542.2834. **IR**: [cm<sup>-1</sup>] = 3307 (v N-H (amidisch)), 3066 (v C-H (arom.)), 2943 (v C-H (aliph.)), 1644 (v C=O).

### H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-L-Val-L-Phe-KG (57, PMD-101-01-03, TFA-Salz)



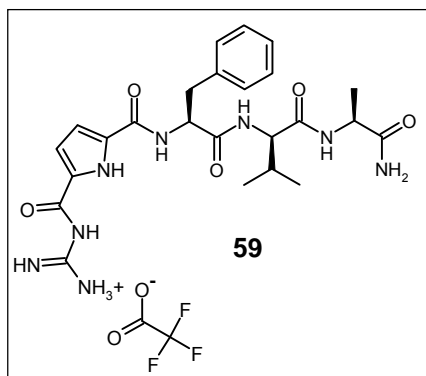
**Ausbeute:** 35.5 mg (56.7  $\mu\text{mol}$ ), 93 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.5 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.0 (s, 1H, Guanidinium-amid NH), 8.66 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, Amid-NH), 8.25 (s, 4H, Guanidinium NH<sub>2</sub>), 8.15 (d, 1H,  $J$  = 8.7 Hz, Amid-NH), 7.89 (d, 1H,  $J$  = 7.3 Hz, Amid-NH), 7.42 (d, 2H,  $J$  = 7.4 Hz), 7.27 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 7.24 (t, 2H,  $J$  = 7.6 Hz), 7.16 (t, 1H,  $J$  = 7.6 Hz), 7.03 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.98 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 6.87 (m, 1H, Pyrrol-CH), 4.85 (m, 1H,  $\alpha$ -H), 4.25-4.17 (m, 2H,  $\alpha$ -H), 3.16-3.09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.91-2.84 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.06-1.99 (m, 1H, CH), 1.22 (d, 3H,  $J$  = 7.1 Hz), 0.88-0.84 (m, 6H, CH<sub>3</sub>). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 513 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 535.2389, berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>5</sub><sup>+</sup>: 535.2388. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3272 (ν N-H (amidisch)), 1623 (ν C=O).

### H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-L-Val-D-Phe-KG (58, PMD-102-01-03, TFA-Salz)



**Ausbeute:** 34.7 mg (55.4  $\mu\text{mol}$ ), 91 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.5 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.0 (s, 1H, Guanidinium-amid NH), 8.71 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, Amid-NH), 8.28 (d, 1H,  $J$  = 8.7 Hz, Amid-NH), 8.25 (s, 4H, Guanidinium NH<sub>2</sub>), 7.97 (d, 1H,  $J$  = 7.3 Hz, Amid-NH), 7.33 (d, 2H,  $J$  = 7.4 Hz), 7.24 (t, 2H,  $J$  = 7.6 Hz), 7.16 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz), 7.13 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 7.05-7.02 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.91 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 6.88-6.84 (m, 1H, Pyrrol-CH), 4.93-4.87 (m, 1H,  $\alpha$ -H), 4.21-4.15 (m, 2H,  $\alpha$ -H), 3.10-3.03 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.94-2.86 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.02-1.94 (m, 1H, CH), 1.22 (d, 3H,  $J$  = 7.2 Hz), 0.80-0.76 (m, 6H, CH<sub>3</sub>). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 513 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 535.2390, berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>5</sub><sup>+</sup>: 535.2388. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3306 (ν N-H (amidisch)), 2967 (ν C-H (aliph.)), 1639 (ν C=O).

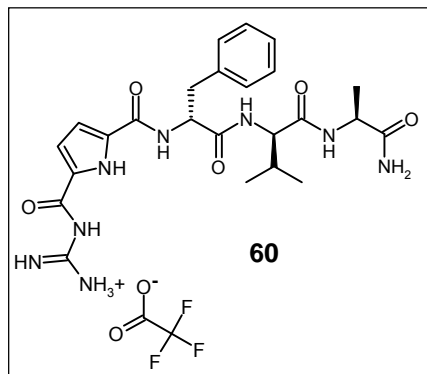
### H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-D-Val-L-Phe-KG (59, PMD-103-01-03, TFA-Salz)



**Ausbeute:** 11.6 mg (18.5  $\mu\text{mol}$ ), 30 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.5 (s, 1H, Pyrrol-NH), 10.9 (s, 1H, Guanidinium-amid NH), 8.70 (d, 1H,  $J$  = 8.2 Hz, Amid-NH), 8.27 (d, 1H,  $J$  = 8.6 Hz, Amid-NH), 8.18 (s, 4H, Guanidinium NH<sub>2</sub>), 8.08 (d, 1H,  $J$  = 7.7 Hz, Amid-NH), 7.33 (d, 2H,  $J$  = 7.2 Hz), 7.25 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 7.24 (t, 2H,  $J$  = 7.6 Hz), 7.16 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz), 7.03-6.99 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.97 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 6.88-6.85 (m, 1H, Pyrrol-CH), 4.93-4.85 (m, 1H,  $\alpha$ -H), 4.26-4.20 (m, 1H,  $\alpha$ -H), 4.20-4.14 (m, 1H,  $\alpha$ -H), 3.10-3.03 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.95-2.88 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.01-1.91 (m,

1H, CH), 1.19 (d, 3H,  $J = 7.1$  Hz), 0.79-0.74 (m, 6H, CH<sub>3</sub>). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 513 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS:**  $m/z = 513.2572$ , berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 513.2568. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3256 (ν N-H (amidisch)), 2961, 2928 (ν C-H (aliph.)), 1628 (ν C=O).

### H<sub>2</sub>NOC-L-Ala-D-Val-D-Phe-KG (60, PMD-104-01-03, TFA-Salz)



**Ausbeute:** 19.5 mg (31.2 μmol), 51 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 12.5 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.0 (s, 1H, Guanidinium-amid NH), 8.67 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, Amid-NH), 8.21 (s, 4H, Guanidinium), 8.18 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, Amid-NH), 8.07 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, Amid-NH), 7.33 (d, 2H,  $J = 7.4$  Hz), 7.27 (s, 1H, Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 7.24 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 7.15 (t, 1H,  $J = 7.3$  Hz), 7.05-7.00 (m, 2H, Pyrrol-CH u. Carbamoyl NH<sub>2</sub>), 6.89-6.85 (m, 1H, Pyrrol-CH), 4.88-4.78 (m, 1H, α-H), 4.29-4.20 (m, 1H, α-H), 4.20-4.12 (m, 1H, α-H), 3.12-3.06 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.91-2.84 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.01-1.93 (m, 1H, CH), 1.20 (d, 3H,  $J = 7.1$  Hz), 0.88-0.84 (m, 6H, CH<sub>3</sub>).

**HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 513 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS:**  $m/z = 535.2390$  berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>5</sub><sup>+</sup>: 535.2388. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3273 (ν N-H (amidisch)), 2966 (ν C-H (aliph.)), 1633 (ν C=O).

## 7.5 Festphasensynthese der nachsynthetisierten Rezeptoren 69 bis 79 (PMD-132 bis PMD-142), allgemeines Syntheseprotokoll (Syro II)

In 2 Reaktoren werden jeweils 150 mg Rinkamid-Harz eingewogen. Pro Reaktor wird folgendes Syntheseprotokoll verwendet:

Zunächst wird für die Syro-II-Synthese jeder Lösung, die über die linke Spritzenpumpe (Dilutor) pipettiert wird (AS-Lösung/DIPEA/PyBOP/HOBT\*H<sub>2</sub>O/Piperidin-Lösung) 0.1 % LiBr hinzugefügt, um die Leitfähigkeit zu erhöhen (Dies verringert die Pipettierfehler, da die Nadel über eine Leitfähigkeitsmessung den Flüssigkeitsstand innerhalb der Vorratsgefäße bestimmt).

### Quellen des Harzes:

Das Harz wird mit DMF (4 mL) gewaschen.

### Protokoll für die Fmoc-Abspaltung am Rinkamid-Linker und am N-Terminus des Peptids:

Das Harz wird für 15 min mit 4 mL 20 % Piperidin in DMF gerührt, dann abgesaugt. Es wird erneut für 15 min mit 4 mL 20 % Piperidin in DMF gerührt, dann abgesaugt. Nun wird das Harz gewaschen: 5 x DMF (4 mL), 3 x MeOH (4 mL), 5 x DCM (3 mL).

### Beladung des Rink-Amid-Harzes mit der 1. AS sowie der Kupplung mit der 2. und 3. AS:

Das Harz wird mit DMF (4 mL) gewaschen.

458 μL PyBOP-Lösung (0.5 M in DMF), 229 μL HOBT-Lösung (1 M in DMF), 458 μL Fmoc-AS-Lösung

(0.5 M in DMF) und 458  $\mu\text{L}$  DIPEA-Lösung (1 M in DMF) werden in einem 10 mL Reagenzglas 5 min gerührt und dann zum Harz gegeben. Die Kupplungslösung wird mit dem Harz 4 h gerührt (RT, Rührer Stufe 2) und anschließend abgesaugt. Die Kupplung wird wiederholt und das Harz anschließend wie folgt gewaschen: 5 x DMF (4 mL), 3 x MeOH (4 mL), 5 x DCM (3 mL).

#### **Kupplung mit der Schmuckschen Kopfgruppe:**

Die Kopfgruppe **49** löst sich schlecht in DMF, weshalb zunächst in einer Reagenzienflasche folgende Kupplungslösung (pro Reaktor) angesetzt wird:

91 mg\* Kopfgruppe werden in 4 mL DMF (dest.) vorgelegt und auf 0 °C gebracht. Es werden 238 mg\* PyBOP, 62 mg\* HOBT\*H<sub>2</sub>O, und 118 mg\* DIPEA hinzugefügt und 15 min gerührt. Die Mischung wird zum Harz gegeben und 4 h bei RT mit diesem gerührt. Anschließend wird abgesaugt und das Kupplungsprotokoll wiederholt.

*\* = Die Menge wird mit der Anzahl der zu verwendeten Reaktoren multipliziert und auf diese verteilt.*

Das Harz wird mit DMF (4 mL) gewaschen, die Kupplungslösung zum Harz pipettiert und dieses 4 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Harz wie folgt gewaschen:

5 x DMF (4 mL), 3 x MeOH (4 mL), 5 x DCM (3 mL).

Bevor die komplette Menge des Peptids abgespalten wird, erfolgt eine Testabspaltung von 10 mg Harz, um zu überprüfen, ob die Kopfgruppe vollständig gekuppelt wurde. Ist dies nicht der Fall, wird die Kupplung der Kopfgruppe wiederholt.

#### **Testabspaltung des Tetrapeptids:**

10 mg Harz werden in einem HPLC-Vial mit 200  $\mu\text{L}$  TFA/Triisopropylsilan/H<sub>2</sub>O, 95:2.5:2.5 versetzt und 2 h durchmischt (Orbitalschüttler). Anschließend wird über Glaswolle filtriert und der Filtrückstand mit 2 mL DCM gewaschen. Das erste Filtrat und die Waschlösung werden vereinigt, am Rotationsverdampfer (RT) vom Lösungsmittel befreit und über Nacht HV-getrocknet.

Der resultierende Rückstand mit 300  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O, 300  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O + 10 % ACN, 300  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O + 20 % ACN gelöst und jeweils in ein Vial filtriert. Die vereinigten Filtrate werden mittels HPLC-UV/ESI-MS untersucht.

#### **Komplette Abspaltung des Tetrapeptids:**

Das restliche Harz (~ 150 mg Harz) wird mit 4 mL einer Lösung von TFA/Triisopropylsilan/H<sub>2</sub>O, 95:2.5:2.5 versetzt und 2 h horizontal geschüttelt. Anschließend wird filtriert und der Filtrückstand mit 3 x 4 mL DCM gewaschen. Die vereinigten Filtrate (beide Fritten) werden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, bis eine geringe Menge (~ 1 mL) Öl verbleibt. Das Öl wird in 20 mL Et<sub>2</sub>O (dest.) eingetropf. Hierdurch wird ein weißer Feststoff gefällt, der durch Zentrifugation abgetrennt wird. Anschließend erfolgt Trocknung im Hochvakuum und Lagerung im Exsikkator über KOH.

Das verwendete Syntheseprotokoll erwies sich als recht effizient. Von den geplanten 11 Verbindungen waren 6 bereits als Rohprodukte (mit Ausbeuten von 88 bis 100 %) analytisch rein (UV-Anteil im

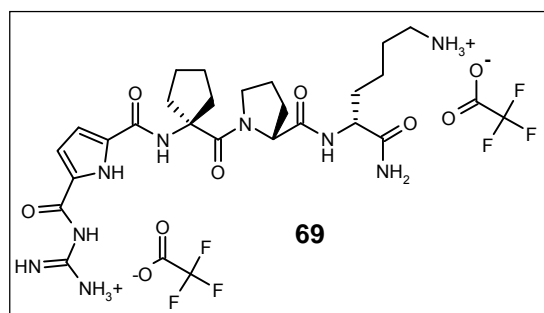


HPLC > 99 %). Eine Probe war mit 94 %-iger Reinheit noch akzeptal, die restlichen 4 Verbindungen wurden mittels präparativer HPLC gereinigt. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Synthese zusammen:

**Tab. 33: Syntheseresultate der parallelen Festphasensynthese (Syro-II). \* = In Klammern: Chiffre des Nachscreenings der festphasengebundenen Rezeptoren.**

| Chiffre*<br>PMD-    | Struktur   | Ausbeute<br>(Rohprodukt) | Reinheit<br>(Rohprodukt) | Anmerk.            |
|---------------------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------|
| 132-01<br>(1250318) | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro-AC5C-KG<br>(Rheb)                   | 108 mg<br>(76 %)         | 47 %                     | HPLC-<br>gereinigt |
| 133-01<br>(1250327) | <i>D</i> -Lys- <i>D</i> -Ala- <i>L</i> -Lys-KG<br>(Rheb)         | 134 mg<br>(85 %)         | 94 %                     |                    |
| 134-01<br>(1250332) | <i>D</i> -Lys- <i>D</i> -Pro- <i>L</i> -Lys-KG<br>(Rheb)         | 155 mg<br>(95 %)         | 99 %                     |                    |
| 135-01<br>(1250322) | <i>D</i> -Lys-GABA- <i>L</i> -Tic-KG<br>(Rheb)                   | 152 mg<br>(100 %)        | 99 %                     |                    |
| 136-01<br>(1250331) | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Lys-KG<br>(Rheb)         | 144 mg<br>(88 %)         | 99 %                     |                    |
| 137-02<br>(1250333) | <i>D</i> -Lys- <i>L</i> -Tic- <i>L</i> -Phe-KG<br>(Rheb)         | 150 mg<br>(96 %)         | 29 %                     | HPLC-<br>gereinigt |
| 138-01<br>(1250343) | <i>L</i> -Thz-Gly- <i>D</i> -Ala-KG<br>(Rheb)                    | 80 mg<br>(79 %)          | 99 %                     |                    |
| 139-01<br>(1250348) | <i>D</i> -Leu- <i>L</i> -Ser- <i>L</i> -Ser-KG<br>(Rheb + H-Ras) | 175 mg<br>(100 %)        | 99 %                     |                    |
| 140-01<br>(1250370) | <i>D</i> -Lys-GABA- <i>L</i> -Lys-KG<br>(K-Ras)                  | 159 mg<br>(99 %)         | 71 %                     | HPLC-<br>gereinigt |
| 141-02<br>(1250373) | <i>D</i> -Val- <i>L</i> -ThzMe <sub>2</sub> -Inp-KG<br>(K-Ras)   | 39 mg<br>(32 %)          | unbekannt                | HPLC-<br>gereinigt |
| 142-01<br>(1250360) | <i>D</i> -Thr- <i>L</i> -Phe-Inp-KG<br>(H-Ras)                   | 98 mg<br>(80%)           | 99 %                     |                    |

#### Charakterisierung von H<sub>2</sub>NOC-*D*-Lys-*L*-Pro-AC5C-KG (TFA-Salz), (69, PMD-132-01-03)

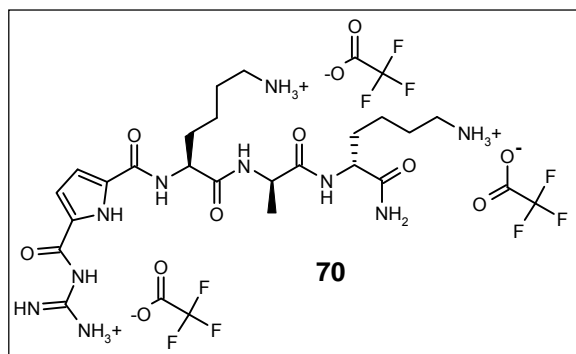


**Ausbeute:** 17.0 mg (22.4  $\mu$ mol), 12 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.4 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.4 (s, 1H, Guanidiniumamid NH), 8.82 (s, 1H), 8.51 ( $\psi$ d, 4H, Guanidiniumion), 7.69 (d, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.92 ( $\psi$ s, 1H), 4.27 (dd,  $J$  = 5.7 Hz,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 4.10-4.06 (m, 1H), 3.52-3.48 (m, 1H), 3.39-3.37 (m, 1H), 2.77 (m, 2H),

2.42-2.35 (m, 1H), 2.19-2.14 (m, 1H), 2.02-1.94 (m, 1H), 1.93-1.88 (m, 1H), 1.88-1.83 (m, 1H), 1.78-

1.59 (m, 8H), 1.59-1.48 (m, 2H), 1.45-1.38 (m, 1H), 1.37-1.29 (m, 1H). **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 532 (100)  $[M+H]^+$ , **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 554.2817, berechnet für  $C_{24}H_{37}N_9NaO_5^+$ : 554.2810. **IR**:  $[cm^{-1}]$  = 3291 (v N-H (amidisch)), 2959 (v C-H (aliph.)), 1636 (v C=O).

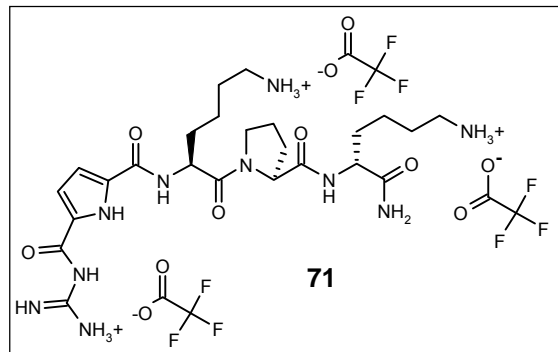
#### Charakterisierung von $H_2NOC-D-Lys-D-Ala-L-Lys-KG$ (TFA-Salz), (70, PMD-133-01-02)



**Ausbeute**: 134.2 mg (156  $\mu$ mol), 85%.  **$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 12.5 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.7 (s, 1H, Guanidiniumamid NH), 8.87 ( $\psi$ d, 4H, Guanidiniumion), 8.63 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 8.48 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 1H), 7.82 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.79 (s, 6H, Ammonium), 7.23 (dd,  $J$  = 4.0 Hz,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 7.08 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.86 (dd,  $J$  = 4.0 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 4.44-4.38 (s,

1H), 4.29-4.21 (m, 1H), 4.12-4.06 (m, 2H), 2.83-2.69 (m, 4H), 1.78-1.16 (m, 14H), 1.24 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H). **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 262 (100)  $[M+2H]^{2+}$  523 (93)  $[M+H]^+$ , **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 545.2921, berechnet für  $C_{22}H_{38}N_{10}NaO_5^+$ : 545.2919. **IR**:  $[cm^{-1}]$  = 3235 (v N-H (amidisch)), 3053 (v C-H (arom.)), 2945 (v C-H (aliph.)), 1656 (v C=O).

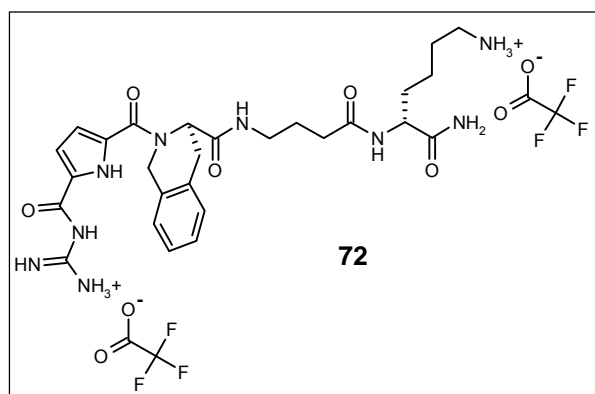
#### Charakterisierung von $H_2NOC-D-Lys-D-Pro-L-Lys-KG$ (TFA-Salz), (71, PMD-134-01-02)



**Ausbeute**: 155.4 mg (176  $\mu$ mol), (95%).  **$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 12.48 ( $\psi$ s, 1H, Pyrrol-NH), 11.72, 11.67 (s, 1H, Guanidiniumamid NH), 8.90, 8.66 ( $\psi$ d, 4H, Guanidiniumion), 8.81, 8.74 (d, 1H), 8.23, 7.89 ( $\psi$ s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.85, 7.80 ( $\psi$ s, 6H), 7.58 (d, 1H), 7.23, 7.22 (dd, 1H, Pyrrol-CH), 6.90 ( $\psi$ s, 1H), 6.86 ( $\psi$ s, 1H), 6.83 (dd, 1H, Pyrrol-CH), 4.90 (s, 6H, Ammonium), 4.86 (dd, 1H), 4.60

( $\psi$ q, 1H), 4.35-4.31 (m, 1H), 4.21-4.09 (m, 1H), 4.02-3.98 (m, 1H), 3.89-3.86 (m, 1H), 3.64-3.59 (m, 1H), 3.50-3.36 (m, 1H), 2.82-2.72 (m, 4H), 2.19-1.16 (m, 19H).\* **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 549 (100)  $[M+H]^+$ , **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 571.3075, berechnet für  $C_{24}H_{40}N_{10}NaO_5^+$ : 571.3075. **IR**:  $[cm^{-1}]$  = 3307 (v N-H (amidisch)), 3053 (v C-H (arom.)), 2946 (v C-H (aliph.)), 1629 (v C=O). \* = Alle separiert beobachtbaren Signale treten doppelt auf. Dies ist auf die Anwesenheit eines tertiären Amides (*D-Pro*) zurückzuführen, das zu *E/Z*-Isomeren dieser Peptidbindung führt.

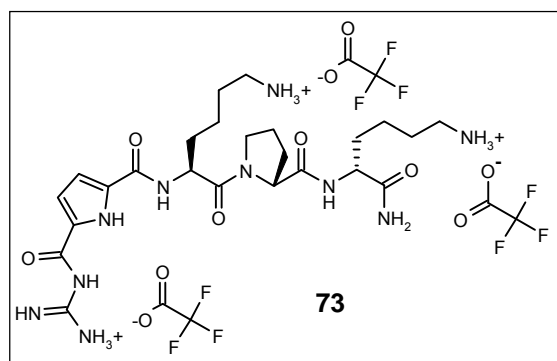
### Charakterisierung von H<sub>2</sub>NOC-*D*-Lys-GABA-*L*-Tic-KG (TFA-Salz), (72, PMD-135-01-02)



**Ausbeute:** 152.4 mg (193  $\mu\text{mol}$ ), (100 %). **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.38, 12.28 ( $\psi$ s, 1H, Pyrrol-NH), 11.60, 11.56 (s, 1H, Guanidiniumamid NH), 8.81, 8.60 ( $\psi$ d, 4H, Guanidiniumion), 8.20-7.92 (m, 2H), 7.79, 7.73 ( $\psi$ s, 5H), 7.40-7.13 (m, 7H), 6.98 ( $\psi$ s, 1H), 6.84, 6.42 ( $\psi$ s, 1H), 4.96-4.79 (m, 2H), 4.20-4.12 (m, 1H), 3.30-3.09 (m, 2H), 3.05-2.89 (m, 2H), 2.85-2.62 (m, 6H), 2.12-1.86 (m, 2H), 1.79-1.25 (m, 10H).\*

**MS:**  $m/z$  (%) = 568 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 590.2823, berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>N<sub>9</sub>NaO<sub>5</sub><sup>+</sup>: 590.2810. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3307 ( $\nu$  N-H (amidisch)), 3066 ( $\nu$  C-H (arom.)), 2943 ( $\nu$  C-H (aliph.)), 1663 ( $\nu$  C=O). \* = Im Spektrum treten mehrere Signalsätze auf. Dies ist auf die Anwesenheit eines tertiären Amides (*L*-Tic) zurückzuführen, das zu *E/Z*-Isomeren dieser Peptidbindung führt.

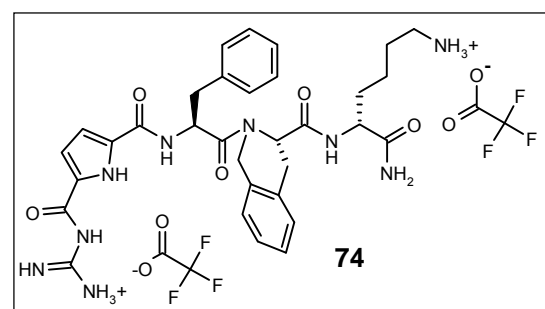
### Charakterisierung von H<sub>2</sub>NOC-*D*-Lys-*L*-Pro-*L*-Lys-KG (TFA-Salz), (73, PMD-136-01-02)



**Ausbeute:** 143.6 mg (161.2  $\mu\text{mol}$ ), 88 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.48 (s, 1H, Pyrrol-NH), 12.05, 11.62 (s, 1H, Guanidiniumamid NH), 11.66 (s, 1H) 8.86 (s, 3H), 8.70 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 8.63 (s, 3H), 8.28 ( $\psi$ t, 1H), 8.25-8.25 (m, 2H), 7.83 ( $\psi$ s, 11H), 7.31 (m, 7H), 4.78-3.20 (m, 27H), 2.76 ( $\psi$ s, 7H), 2.29-1.09 (m, 30H). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 549 (12) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 571.3075, berechnet

für C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>N<sub>10</sub>NaO<sub>5</sub><sup>+</sup>: 571.3075. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3324 ( $\nu$  N-H (amidisch)), 3056 ( $\nu$  C-H (arom.)), 2946 ( $\nu$  C-H (aliph.)), 1668 ( $\nu$  C=O).

### Charakterisierung von H<sub>2</sub>NOC-*D*-Lys-*L*-Tic-*L*-Phe-KG (TFA-Salz), (74, PMD-137-02-02)

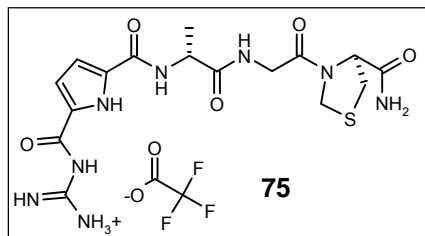


**Ausbeute:** 26.6 mg (31.0  $\mu\text{mol}$ ), 17 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.51, 12.39 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.43, 11.29 (s, 1H, Guanidiniumamid-NH), 8.48 ( $\psi$ s, 4H, Guanidiniumion), 8.02 ( $\psi$ s, 1H), 7.70, 7.64 (s, 3H), 7.39 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.78-6.84 (m, 10H), 6.88, 6.85 (d,  $J$  = 3.9 Hz u. dd,  $J$  = 3.7 Hz u.  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 5.36-5.22 (m, 1H), 5.08-5.03 (m,

1H), 4.88, 4.83 (m, 1H), 4.66, 4.39, 4.10, 3.95 (m, 1H), 3.17-2.94 (m, 3H), 2.75-2.66 (m, 1H), 1.77-1.58 (m, 1H), 1.53-1.29 (m, 3H), 1.28-0.95 (m, 2H).\* **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 630 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 652.2975, berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>N<sub>9</sub>NaO<sub>5</sub><sup>+</sup>: 652.2966. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3292 ( $\nu$  N-H (amidisch)), 3066 ( $\nu$  C-H (arom.)), 2964 ( $\nu$  C-H (aliph.)), 1629 ( $\nu$  C=O). \* = Im Spektrum treten zwei

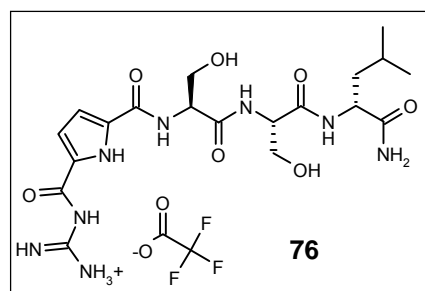
Signalsätze auf. Dies ist auf die Anwesenheit eines tertiären Amides (*L*-Tic) zurückzuführen, das zu *E/Z*-Isomeren dieser Peptidbindung führt.

#### Charakterisierung von H<sub>2</sub>NOC-*L*-Thz-Gly-*D*-Ala-KG (TFA-Salz), (75, PMD-138-01-02)



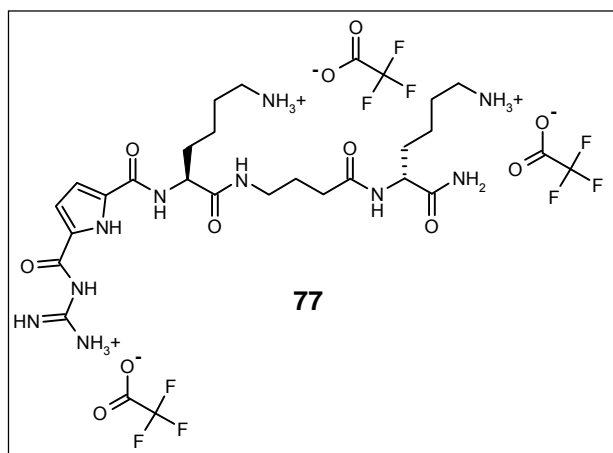
**Ausbeute:** 80.2 mg (145.2  $\mu$ mol), 79 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.50 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.39, (s, 1H, Guanidiniumamid-NH), 8.64 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 8.45 ( $\psi$ s, 4H, Guanidiniumion), 8.19-8.07, 8.11-8.07, 7.97-7.93 (m, 1H), 7.65, 7.35 ( $\psi$ s, 1H), 7.38, 7.17 ( $\psi$ s, 1H), 7.15 (dd,  $J$  = 3.9 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 6.91 (dd,  $J$  = 3.9 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 4.86-4.50 (m, 3H), 4.36-4.24 (m, 1H), 4.08 (m, 1H), 3.75-3.60 (m, 1H), 3.37-3.04 (m, 2H), 1.34, 0.98 ( $\psi$ s, 3H). \* **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 439 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 461.1326, berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>5</sub>S<sup>+</sup>: 461.1326. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3330 ( $\nu$  N-H (amidisch)), 1625 ( $\nu$  C=O). \* = Im Spektrum treten zwei Signalsätze auf. Dies ist auf die Anwesenheit eines tertiären Amides (*L*-Thz) zurückzuführen, das zu *E/Z*-Isomeren dieser Peptidbindung führt.

#### Charakterisierung von H<sub>2</sub>NOC-*D*-Leu-*L*-Ser-*L*-Ser-KG (TFA-Salz), (76, PMD-139-01-02)



**Ausbeute:** 175.8 mg (294.7  $\mu$ mol), 100 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.61 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.44 (s, 1H, Guanidiniumamid-NH), 8.65 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 8.58 ( $\psi$ d, 4H, Guanidiniumion), 8.19 (d,  $J$  = 8.19 Hz, 1H), 8.14 ( $\psi$ s, 1H), 7.83 (d,  $J$  = 8.4 Hz), 7.20-7.13 (m, 2H), 7.01 (s, 1H), 6.90 (dd,  $J$  = 3.9 Hz,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 4.59 (dd,  $J$  = 13.7 Hz,  $J$  = 6.5 Hz), 4.28-4.14 (m, 2H), 3.74-3.59 (m, 4H), 1.61-1.52 (m, 1H), 1.51-1.44 (m, 2H), 0.86 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H), 0.81 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H). **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 483 (100) [M+H]<sup>+</sup>, **HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 483.2317, berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>: 483.2310. **IR:** [cm<sup>-1</sup>] = 3306 ( $\nu$  N-H (amidisch)), 2960 ( $\nu$  C-H (aliph.)), 1654 ( $\nu$  C=O).

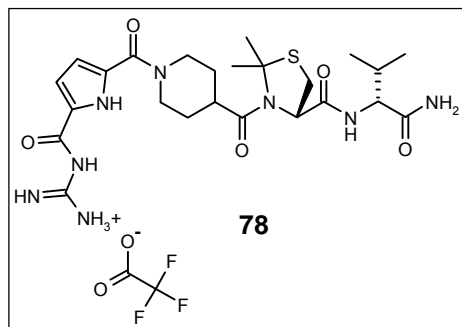
#### Charakterisierung von H<sub>2</sub>NOC-*D*-Lys-GABA-*L*-Lys-KG (TFA-Salz), (77, PMD-140-01-03)



**Ausbeute:** 98.2 mg (111.7  $\mu$ mol), 61 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.47 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.69 (s, 1H, Guanidiniumamid-NH), 8.77 ( $\psi$ d, 4H, Guanidiniumion), 8.55 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 8.12 ( $\psi$ t, 1H), 7.85 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.83 ( $\psi$ s, 6H, Ammoniumion), 7.35 (s, 1H), 7.22 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.90 (d,  $J$  = 3.8 Hz), 4.41-4.32 (m, 1H), 4.17-4.10 (m, 1H), 3.13-2.99 (m, 1H), 2.77 ( $\psi$ s, 4H), 2.20-2.09 (m, 2H), 1.79-1.69 (m, 1H), 1.69-1.59 (m, 4H), 1.59-1.43

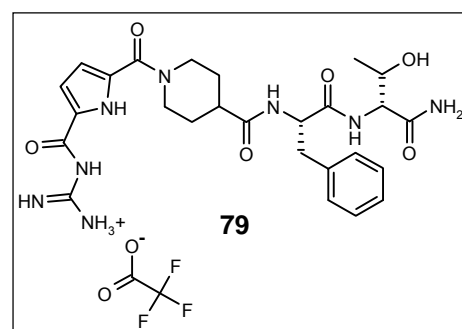
(m, 5H), 1.44-1.21 (m, 4H). **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 537 (100)  $[M+H]^+$ , **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 559.3075, berechnet für  $C_{23}H_{40}N_{10}NaO_5^+$ : 559.3075. **IR**:  $[cm^{-1}]$  = 3319 (ν N-H (amidisch)), 3055 (ν C-H (arom.)), 2946 (ν C-H (aliph.)), 1635 (ν C=O).

#### Charakterisierung von $H_2NOC-D-Val-L-ThzMe_2-Inp-KG$ (TFA-Salz), (**78**, PMD-141-02-02)



**Ausbeute**: 6.1 mg (9.2 μmol), 5 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 12.56, 12.48 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.08, 11.98 (s, 1H, Guanidiniumamid-NH), 8.23 (ψd, 4H, Guanidiniumion), 7.86 (dd,  $J$  = 17.1 Hz,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 7.44-7.37 (m, 2H), 7.09-7.07 (m, 3H), 6.52 (dd,  $J$  = 7.6 Hz,  $J$  = 4.0 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 4.71-4.61 (m, 1H), 4.20-4.12 (m, 2H), 3.22-2.88 (m, 6H), 2.58-2.53 (m, 2H), 2.03-1.96 (m, 2H), 1.83-1.68 (m, 2H), 1.64-1.47 (m, 2H), 0.90-0.78 (m, 12H). Die Molekülmasse der Verbindung **78** (PMD-141-02-02) konnte nicht gefunden werden (weder beim HPLC-ESI-MS noch beim HRMS-Experiment). Die Strukturzuordnung ist also fragwürdig.

#### Charakterisierung von $H_2NOC-D-Thr-L-Phe-Inp-KG$ (TFA-Salz), (**79**, PMD-142-01-02)



**Ausbeute**: 97.9 mg (146.4 μmol), 80 %. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 12.43 (s, 1H, Pyrrol-NH), 11.35 (s, 1H, Guanidiniumamid-NH), 8.53 (ψs, 4H, Guanidiniumion), 7.22 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.76 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.31-7.22 (m, 4H), 7.22-7.15 (m, 2H), 7.15-7.07 (ψs, 2H), 6.49 (dd,  $J$  = 3.6 Hz,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 4.63-4.55 (m, 1H), 4.08-4.01 (m, 2H), 3.09-3.00 (m, 1H), 2.88-2.79 (m, 1H), 2.48-2.42 (m, 1H), 1.69 (ψs, 1H), 1.61-1.52 (m, 1H), 1.52-1.42 (m, 1H), 1.43-1.30 (m, 1H), 0.88 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H). **HPLC-ESI-MS**:  $m/z$  (%) = 555 (100)  $[M+H]^+$ , **HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 555.2674, berechnet für  $C_{26}H_{35}N_8O_6^+$ : 555.2674. **IR**:  $[cm^{-1}]$  = 3325 (ν N-H (amidisch)), 2980, 2945 (ν C-H (aliph.)), 1625 (ν C=O).

#### Synthese der Rezeptorchloride (Umsalzen):

Für die Ermittlung der Inhibitionskonzentrationen sowie zur Durchführung von NMR-Untersuchungen (am Protein) mußten die Rezeptoren als Chloride vorliegen. Hierzu werden die entsprechenden Rezeptoren mit Methanol gelöst und zweimal mit 0.1 N HCl (aq) lyophilisiert. Die Methode ist literaturbeschrieben.<sup>[88]</sup>

#### Synthese der Rezeptorpikrate (Umsalzen):

Zur Bestimmung der Assoziationskonstanten wurden NMR-Titration mit Rezeptorpikraten und Tetramethylammoniumcarboxylaten durchgeführt, wie es bereits von Schmuck beschrieben wurde.<sup>[73,85]</sup>

Zur Synthese der Pikrat-Salze werden die entsprechenden Trifluoroacetate in Methanol gelöst und mit der 3-fachen Menge (Äquivalente) an kaltgesättigter Pikrinsäurelösung versetzt und über Nacht

gerührt. Die erhaltenen Rohprodukte wurden filtriert (bzw. dekantiert) und solange aus MeOH/H<sub>2</sub>O umkristallisiert, bis das zu erwartende stöchiometrische Verhältnis an Pikrat vorlag. Die Vorgehensweise entspricht der von Schmuck publizierten.<sup>[85]</sup>

Die Methode funktionierte nicht bei allen Rezeptoren. Wenn zuwenig Pikrat (als stöchiometrisch als Gegenionen zu erwarten wäre) durch die <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie detektiert wird, wird der, aufgrund der Integralverhältnisse (Pikrat/Rezeptorsignal) fehlende Anteil durch Zugabe von Pikrinsäurelösung (aq, kaltgesättigt) ergänzt und die Probe anschließend lyophilisiert. Gegebenenfalls musste das so erhaltene Produkt noch einmal umkristallisiert werden (MeOH/H<sub>2</sub>O).

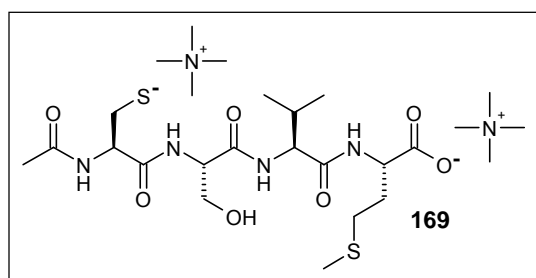
## 7.6 Syntheseprotokolle für die TMA-Salze der CaaX-Peptide

Für die Synthese der drei tetrapeptidischen TMA-Salze wird ein Ionenaustauscher verwendet. Hierzu wird zunächst eine mit 10 g DOWEX 50WX8-100 befüllte Säule in die präparative HPLC-Anlage (Gilson) eingebaut. Die Funktionalität des Harzes liegt in der kommerziell (Sigma-Aldrich) erhältlichen Form protoniert und damit als freie Sulfonsäure vor. Das Harz muss zunächst von farbigen Verunreinigungen befreit und anschließend mit Tetramethylammoniumionen beladen werden. Hierzu wurde folgendes Protokoll verwendet:

Zunächst wird mit 200 mL 1 M HCl (aq) gewaschen (der Eluent ist zunächst orange gefärbt, dann farblos). Anschließend wird mit 400 mL H<sub>2</sub>O annähernd säurefrei gewaschen (Eluent mit pH-Papier überprüft). Nun wird mit 300 mL 1 % Tetramethylammoniumhydroxidlösung (aq) eluiert, wodurch der Eluent nach erfolgter Beladung pH = 14 erreicht (Beladung der Sulfonatgruppen mit NMe<sub>4</sub><sup>+</sup>). Als nächstes wird die überschüssige Base durch Elution mit 400 mL H<sub>2</sub>O entfernt (der Eluent ist annähernd Basenfrei). Als letztes erfolgt die Konditionierung mit 40 mL H<sub>2</sub>O/ACN (9:1), welcher auch der Eluent für den Ionenaustausch ist.

Nach erfolgtem Ionenaustausch der Tetrapeptide (Unterkapitel 7.6.1, 7.6.2, 7.6.3) kann das Harz wie folgt regeneriert werden: Das Harz wird mit 50 mL 1 % Tetramethylammoniumhydroxidlösung (aq) eluiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O/ACN (9:1) konditioniert. Der Fluss für die Beladung des Harzes sowie für den anschließenden Ionenaustausch beträgt 1 mL/min. Die Detektion erfolgte bei λ = 220 nm (Einstellung des Spannungsschreibers = 50 mV).

### 7.6.1 [Ac-CSVM-O]<sup>2-</sup> [TMA]<sup>+</sup><sub>2</sub> (169, PMD-154-02-01)

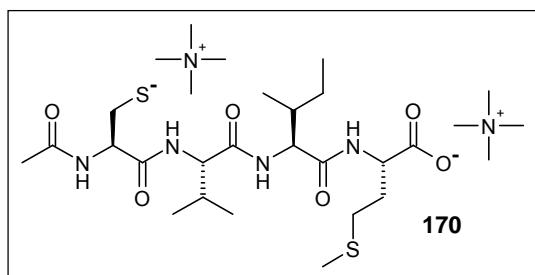


Zunächst werden 20 mg Ac-CSVM-OH (CC-167W, Auftragssynthese bei Chinapeptides) in 3 mL H<sub>2</sub>O/ACN (7:3) gelöst. Die Lösung wird in Portionen zu je 300 µL über den in Kapitel 7.6 beschriebenen, mit TMA-Ionen beladenen Kationentauscher eluiert (Laufmittel: H<sub>2</sub>O/ACN (9:1)). Die erhaltenen Produktfraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Es

resultiert ein farbloses Pulver.

**Ausbeute:** 18.8 mg (30.0  $\mu\text{mol}$ ), 80 %.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{d}_3\text{-ACN}$ ):  $\delta$  = 10.99 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 9.73 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 8.19 ( $\psi\text{s}$ , 1H), 6.44 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 4.69 (m, 1H), 4.24-4.19 (m, 1H), 4.16 (m, 1H), 3.93-3.90 (m, 1H), 3.87 (t,  $J$  = 10.6 Hz, 1H,) 3.75 ( $\psi\text{s}$ , 2H), 3.67 (dd,  $J$  = 13.8 Hz,  $J$  = 3.8 Hz, 1H), 3.08 (s, 24H), 2.46-2.39 (m, 4H), 1.32-1.25 (m, 2H), 1.27 (s, 3H), 0.93 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3 H), 0.84 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H). Aufgrund der geringen Löslichkeit in  $\text{d}_3\text{-ACN}$  war keine detaillierte Zuordnung möglich.

### 7.6.2 [Ac-CVIM-O] $^{2-}$ [TMA] $^+$ $_2$ (170, PMD-151-03-02)

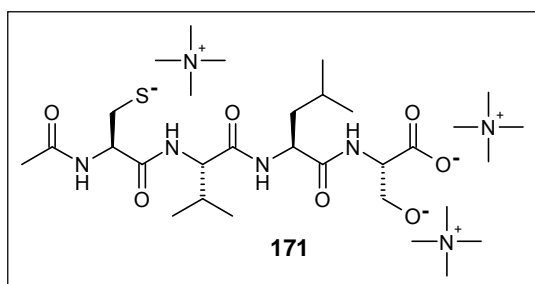


Zunächst werden 6 mg Ac-CVIM-OH (CC-169W, Auftragssynthese bei China-peptides) in 3 mL  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (1:1) gelöst. Die Lösung wird in Portionen zu je 750  $\mu\text{L}$  über den in Kapitel 7.6 beschriebenen, mit TMA-Ionen beladenen Kationentauscher eluiert (Laufmittel:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (9:1)). Nach Lyophilisation der

vereinigten Produktfraktionen wurden 12.1 mg eines Rohprodukts erhalten, welches zuviel TMA enthält. Das Rohprodukt wird mittels RP18-HPLC gereinigt (verwendeter Gradient:  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (9:1)) wodurch 2 Fraktionen erhalten wurden. Die Fraktion mit der größeren Retention enthielt zuwenig TMA (1.33 Äq.) und wurde nach Lyophilisation (4.1 mg) in 2 mL  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und unter Eiskühlung und Rühren mit 12.7  $\mu\text{L}$  2.5 %-iger TMAOH-Lösung (aq) versetzt (dies entspricht 0.67 Äq.). Nach 5 minütigem Rühren bei 0 °C wird die Probe mit flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Es resultiert ein farbloses Pulver.

**Ausbeute:** 4.9 mg (7.50  $\mu\text{mol}$ ), 47 %.  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{d}_3\text{-ACN}$ ):  $\delta$  = 11.54 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 10.10 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 8.13 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 6.42 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 4.81 (m, 1H), 3.96 ( $\psi\text{t}$ , 1H), 3.70 (dd,  $J$  = 7.9 Hz,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 3.64 (dd,  $J$  = 13.9 Hz,  $J$  = 3.5 Hz, 1H), 3.10 (s, 24H), 2.55 (dt,  $J$  = 4.4 Hz,  $J$  = 12.4 Hz, 1H), 2.40 (m, 2H), 2.21-2.15 (m, 2H), 1.52-1.45 (m, 1H), 0.99 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H), 0.94 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H), 0.92 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 0.84 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H). Aufgrund der geringen Löslichkeit in  $\text{d}_3\text{-ACN}$  war keine detaillierte Zuordnung möglich.

### 7.6.3 [Ac-CVLS-O] $^{3-}$ [TMA] $^+$ $_3$ (171, PMD-147-06-01) $^{[123]}$



Zunächst werden 10 mg Ac-CVLS-OH (CM-084W, Auftragssynthese bei Chinapeptides) in 3 mL  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (1:1) gelöst. Die Lösung wird in Portionen zu je 300  $\mu\text{L}$  über den in Kapitel 7.6 beschriebenen, mit TMA-Ionen beladenen Kationentauscher eluiert (Laufmittel:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (9:1)). Die erhaltenen Produktfraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Es resultiert ein farb-

loses Pulver.

**Ausbeute:** 11.6 mg (17.0  $\mu$ mol), 80 %. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, d<sub>3</sub>-ACN):  $\delta$  = 7.89 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.78 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.75 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 1H), 7.58 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 4.47-4.44 (m, 1H), 4.42-4.38 (m, 1H), 4.34-4.31 (m, 1H), 4.12 (dd,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 3.86 (dd,  $J$  = 11.8 Hz,  $J$  = 4.9 Hz, 1H), 3.75 (dd,  $J$  = 11.8 Hz,  $J$  = 3.5 Hz, 1H), 3.11 (s, 36H), 2.94-2.88 (m, 2H), 2.23-2.17 (m, 4H), 1.98 (s, 3H), 1.69-1.58 (m, 3H), 0.96 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 0.93 ( $\psi$ t, 6H), 0.87 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H). Aufgrund der geringen Löslichkeit in d<sub>3</sub>-ACN war keine detaillierte Zuordnung möglich.

## 7.7 Synthese der (kombinatorischen) Bibliotheken

Zunächst wurde eine kombinatorische Testbibliothek (400 Verb.) synthetisiert, die für die Optimierung des Screenings verwendet wurde (Kapitel 7.7.1). Im Anschluss erfolgte die Synthese von 20 Bibliotheken (Insgesamt 8000 Verbindungen, Kapitel 7.7.2). Zudem wurden 74 Verbindungen in einer parallelen Festphasensynthese hergestellt (Kapitel 7.7.3).

### 7.7.1 Synthese der Testbibliothek (400 Verbindungen, PMD-075-01)

#### Beladung mit der ersten AS:

Zunächst werden in einem 10 mL SPPS-Reaktor (Filterkartusche) 162 mg Tentagel Macrobeads (HMBA, MB 300, Beladung: 0.24 mmol/g) eingewogen, 45 min mit 2 mL DCM gequollen und filtriert. Für die Beladung mit der ersten AS werden 63.3 mg (202  $\mu$ mol, 5 Äq.) Fmoc-L-Alanin-OH in 1.6 mL DMF gelöst und auf 0 °C gebracht. Zu der Mischung werden 29.8 mg (221  $\mu$ mol, 6 Äq.) HOBT, 24.5 mg (194  $\mu$ mol, 5 Äq.) DIC, 1.0 mg (8.16  $\mu$ mol, 0.2 Äq.) DMAP, 0.03 mg (0.39  $\mu$ mol, 0.01 Äq.) *N*-Methylimidazol hinzugefügt und 15 min bei 0 °C gerührt. Die Mischung wird zum Harz gegeben und der Reaktor 5 h durchmischt (Orbitalschüttler). Die Reaktionsmischung wird abgesaugt (filtriert) und nacheinander mit jeweils 5 mL DCM, DMF, trockenem DMF gewaschen. Bei jedem Waschvorgang wird das Harz 5 min horizontal geschüttelt.

#### Entschützen der Fmoc-Gruppe:

Das Harz wird 30 min mit 6.5 mL 20 % Piperidin in DMF geschüttelt. Dann wird das Harz abgesaugt und nacheinander mit jeweils 5 mL DCM, DMF, trockenem DMF gewaschen (Bei jedem Waschvorgang wird das Harz 5 min horizontal geschüttelt). Anschließend wird das Harz über Nacht HV-getrocknet.

#### Aufteilen auf die Reaktoren (split):

Das Harz wird in 20 Portionen zu je  $\sim$  8 mg aufgeteilt: Hierzu wird das Harz in Eppendorf-Reaktionsgefäßen eingewogen.



### **Parallele Kupplung der jeweils zweiten AS:**

Die Vorschrift wird für jede der 20 Harz-Portionen durchgeführt, hierbei wird jeweils eine der folgenden AS pro Reaktor gekuppelt: Fmoc-*L*-Ala-OH, Fmoc-*D*-Ala-OH, Fmoc-*L*-Val-OH, Fmoc-*D*-Val-OH, Fmoc-*L*-His(Trt)-OH, Fmoc-*L*-Ile-OH, Fmoc-*L*-Pro-OH, Fmoc-*D*-Pro-OH, Fmoc-*L*-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-*L*-Phe-OH, Fmoc-*D*-Phe-OH, Fmoc-AC5C-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-GABA-OH, Fmoc-*L*-Tic-OH, Fmoc-Inp-OH, Fmoc- $\beta$ -Ala-OH, Fmoc-*L*-Thz(Me)<sub>2</sub>-OH, Fmoc-*L*-Ser(Trt)-OH, Fmoc-*L*-Lys(Boc)-OH.

Das Harz wird 45 min mit 1 mL DCM gequollen und die Waschlösung abgesaugt. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wird 7.8  $\mu$ mol (4 Äq.) der jeweiligen AS in 55  $\mu$ L DMF gelöst (20 Eppendorfgefäße) und auf 0 °C gebracht. Zu der Mischung wird 7.8  $\mu$ mol HBTU, 7.8  $\mu$ mol HOBT und 11.7  $\mu$ mol DIPEA hinzugefügt. Hierzu wird zunächst eine Stammlösung des Kupplungsreagenzes hergestellt: Bei 0 °C werden 118.3 mg HBTU, 47.7 mg HOBT und 60.5 mg DIPEA mit DMF auf 1 mL aufgefüllt und 25  $\mu$ L dieser Stammlösung zur jeweiligen AS-Lösung gegeben. Die so erhaltenen Kupplungslösungen der AS werden mit den 20 Harzportionen (in einer parallelen Synthese) vermischt und über Nacht suspendiert (Orbitalschüttler). Die Kupplungslösungen werden vom Harz abgetrennt und 2 x mit 1 mL DCM, DMF und trockenem DMF gewaschen. Anschließend werden alle 20 Harzportionen vereingt (combine-Schritt) und zusammen in einem 10 mL SPPS-Reaktor Fmoc-entschützt: Hierzu wird das oben beschriebene Protokoll verwendet.

### **Parallele Kupplung der jeweils dritten AS:**

Die Ankupplung der jeweils dritten AS erfolgt wie oben (für die zweite AS) beschrieben. Nach diesem Schritt liegt bereits eine kombinatorische Bibliothek von 400 Tripeptiden vor.

### **Ankupplung der Schmuckschen Kopfgruppe:**

Das Harz wird in einem 10 mL SPPS-Reaktor 45 min mit 5 mL DCM gequollen und filtriert. 62.0 mg (156  $\mu$ mol, 4 Äq.) Kopfgruppe **49** (PMD-065-01-02) werden in 1.6 mL DMF gelöst, auf 0 °C gebracht und mit 21.0 mg (156  $\mu$ mol, 4 Äq.) HOBT, 59.2 mg (156  $\mu$ mol, 4 Äq.) HBTU und 30 mg (233  $\mu$ mol, 6 Äq.) DIPEA versetzt. Die Suspension wird 15 min bei 0 °C gerührt und zum Harz gegeben. Die erhaltene Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT suspendiert (Orbitalschüttler). Das Harz wird abgesaugt und nacheinander mit jeweils 5 mL DMF, DCM, trockenem DMF gewaschen. Der Waschvorgang wird noch einmal wiederholt und das Harz anschließend über Nacht HV-getrocknet.

### **Abspaltung der AS-Seitenkettenschutzgruppen sowie der Boc-Schutzgruppe der Kopfgruppe:**

Das Harz wird mit 2.36 mL TFA/H<sub>2</sub>O/Trisopropylsilan (95:2.5:2.5) versetzt und 2 h horizontal geschüttelt. Anschließend wird abgesaugt und mit 5 mL DCM, DMF und trockenem DMF gewaschen. Anschließend wird über Nacht HV-getrocknet. Für die Abtrennung von Kupplungs- und Waschlösungen wird eine 2 mL Spritze mit verengter Kanüle verwendet (die Beads können nicht in die Kanüle eintreten). Bei jedem Waschvorgang wird das Harz 5 min horizontal geschüttelt.

## 7.7.2 Synthese der 20 kombinatorischen Bibliotheken (8000 Verbindungen)

### Parallele Versuchsdurchführung:

Unter Benutzung des Bohdan-Miniblock-Systems wurde die Beladung mit der ersten AS parallel für 10 Bibliotheken (in 10 mL SPPS-Glasreaktoren) durchgeführt. Die "split and combine"-Synthesen erfolgten an bis zu 4 Bibliotheken (in insgesamt 80 4 mL-SPPS-Glasreaktoren) ebenfalls parallel.

### Beladung mit der ersten AS:

342 mg Macrobeads (HMBA, MB 300, Beladung: 0.24 mmol/g) werden in einem SPPS-Reaktor vorgelegt, mit 5 mL DCM für 45 min gequollen und dann abgesaugt. 3 Äquivalente der Fmoc-AS werden in 3.4 mL trockenem DMF gelöst, auf 0 °C gebracht und mit 100 µL (250 µmol, 3 Äq.) einer DIC-Stammlösung (2.5 M in DMF), 100 µL (250 µmol, 3 Äq.) einer HOBT\*H<sub>2</sub>O-Stammlösung (2.5 M in DMF), 100 µL (9.9 µmol, 0.12 Äq.) einer DMAP-Lösung (0.1 M in DMF) und 100 µL (0.79 µmol, 0.01 Äq.) einer *N*-Methylimidazolösung (7.9 mM in DMF) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 15 min bei 0 °C gerührt und zum Harz gegeben. Anschließend wird das Harz über Nacht suspendiert (Orbitalschüttler), abgesaugt und mit folgenden Lösungsmitteln gewaschen: 5 mL DMF, 5 mL DCM, 5 mL trockenem DMF. Die Anknüpfung der ersten AS (inkl. dem Waschen) wird wiederholt (2-fache Kupplung).

### Aufteilen auf die Reaktoren (split):

Das Harz wird in 20 Portionen aufgeteilt: Hierzu werden 4 mL SPPS-Glasreaktoren des Bohdan-Miniblock-Systems verwendet.

### Entschützen der Fmoc-Gruppe:

Das auf die 20 Reaktoren verteilte Harz wird jeweils mit 2 mL Piperidin (20 % in DMF) 60 min geschüttelt, abgesaugt und wie folgt gewaschen: 2 mL DCM, DMF und trockenem DMF.

### Parallele Kupplung der jeweils zweiten AS:

Die Vorschrift wird für jede der 20 Harz-Portionen durchgeführt, hierbei wird jeweils eine der folgenden AS pro Reaktor gekuppelt: Fmoc-*L*-Ala-OH, Fmoc-*D*-Ala-OH, Fmoc-*L*-Val-OH, Fmoc-*D*-Val-OH, Fmoc-*L*-His(Trt)-OH, Fmoc-*L*-Ile-OH, Fmoc-*L*-Pro-OH, Fmoc-*D*-Pro-OH, Fmoc-*L*-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-*L*-Phe-OH, Fmoc-*D*-Phe-OH, Fmoc-AC5C-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-GABA-OH, Fmoc-*L*-Tic-OH, Fmoc-Inp-OH, Fmoc-β-Ala-OH, Fmoc-*L*-Thz(Me)<sub>2</sub>-OH, Fmoc-*L*-Ser(Trt)-OH, Fmoc-*L*-Lys(Boc)-OH. Hierzu werden 3 Äq. einer Fmoc-AS mit 1 mL trockenem DMF versetzt und auf 0 °C gebracht. Zu der Lösung werden 3 Äq. HBTU, 3 Äq. HOBT\*H<sub>2</sub>O und 4.5 Äq. DIPEA hinzugefügt und nach 15 min bei 0 °C zum Harz gegeben. Das Harz wird anschließend über Nacht suspendiert (Orbitalschüttler). Die 20 Reaktoren werden abgesaugt und mit folgenden Lösungsmitteln gewaschen: 2 mL DCM, DMF und trockenem DMF. Das gesamte Kupplungsprotokoll (inkl. dem Waschen) wird wiederholt (zweifache Ankupplung).

**combine:**

Nach der Kupplung werden alle 20 Harzportionen vereinigt und wieder auf 20 4 mL SPPS-Reaktoren verteilt.

**Entschützen der Fmoc-Gruppe:**

Das auf die 20 Reaktoren verteilte Harz wird jeweils mit 2 mL Piperidin (20 % in DMF) 60 min geschüttelt, abgesaugt und wie folgt gewaschen: je 2 mL DCM, DMF und trockenes DMF.

**Parallele Kupplung der jeweils dritten AS:**

Die Ankupplung der jeweils dritten AS erfolgt wie oben (für die zweite AS) beschrieben.

**combine:**

Nach der Kupplung werden alle 20 Harzportionen in einem 10 mL-SPPS-Reaktor vereinigt.

**Entschützen der Fmoc-Gruppe:**

Das Harz wird mit 5 mL Piperidin (20 %) 60 min geschüttelt, abgesaugt und wie folgt gewaschen: je 5 mL DCM, DMF und trockenes DMF.

**Ankuppeln der Kopfgruppe:**

3 Äquivalente der Kopfgruppe **49** (PMD-065-01-02) werden in 2 mL trockenem DMF suspendiert und auf 0 °C gebracht. Anschließend werden 3 Äq. HBTU, 3 Äq. HOBT\*H<sub>2</sub>O und 4.5 Äq. DIPEA hinzugefügt. Die erhaltene Suspension wird 15 min bei 0 °C gerührt und anschließend zum Harz gegeben. Das Harz wird über Nacht suspendiert (Orbitalschüttler), abgesaugt und wie folgt gewaschen: 5 mL DCM, 5 mL DMF, 5 mL trockenes DMF. Das gesamte Kupplungsprotokoll (inkl. dem Waschen) wird wiederholt (zweifache Ankupplung).

**Abspaltung der AS-Seitenkettenschutzgruppen sowie der Boc-Schutzgruppe der Kopfgruppe:**

Das Harz wird mit 5.6 mL einer Lösung von TFA/H<sub>2</sub>O/Triisopropylsilan (95:2.5:2.5) versetzt und 2 h suspendiert (Orbitalschüttler). Anschließend wird das Harz abgesaugt und 2 x mit jeweils 5 mL DCM und 5 mL DMF gewaschen und über Nacht HV-getrocknet.

### 7.7.3 Parallele Synthese der Strukturvorschläge (74 Verbindungen, PMD-125)

**Parallele Versuchsdurchführung:**

Das Harz wird in dieser Synthese nicht eingewogen, sondern mit Hilfe des Bohdan "resin dispensers" auf die einzelnen Reaktoren verteilt. In jedem Reaktor werden 40 µL des Harzes überführt, was einer durchschnittlichen Einwaage von 26.9 mg Harz entspricht. Die Synthese erfolgte parallel in 74 SPPS-Reaktoren (4 mL).

**Beladung mit der ersten AS:**

26.9 mg (40 µL) der Macrobeads (HMBA, MB 300, Beladung: 0.24 mmol/g) werden in einem 4 mL-

SPPS-Reaktor vorgelegt und mit 800  $\mu\text{L}$  DCM 45 min gequollen und anschließend abgesaugt. 137  $\mu\text{L}$  (3 Äq.) einer Fmoc-AS-Stammlösung (142 mM in DMF) werden auf 0 °C gebracht, mit 19.0  $\mu\text{L}$  (3 Äq.) einer DIC-Lösung (1 M in DMF), 19.0  $\mu\text{L}$  (3 Äq.) einer HOBT\*H<sub>2</sub>O-Lösung (1 M in DMF), 16.0  $\mu\text{L}$  (0.12 Äq.) einer DMAP-Lösung (50 mM in DMF) sowie 6.5  $\mu\text{L}$  (0.01 Äq.) einer *N*-Methylimidazol-Lösung (0.01 M in DMF) versetzt und nach 15 min bei 0 °C zum Harz gegeben. Das Harz wird über Nacht suspendiert (Orbitalschüttler), abgesaugt und wie folgt gewaschen: je 1 mL DMF, DCM, trockenes DMF.

#### **Entschützen der Fmoc-Gruppe:**

Das Harz wird (jeweils in einem der 74 Reaktoren) mit 1 mL Piperidin (20 %) 60 min suspendiert (Orbitalschüttler), abgesaugt und wie folgt gewaschen: je 1 mL DMF, DCM und trockenes DMF.

#### **Parallele Kupplung der jeweils zweiten AS:**

137  $\mu\text{L}$  (3 Äq.) einer Fmoc-AS-Stammlösung (0.142 M in DMF) werden auf 0 °C gebracht und mit 194  $\mu\text{L}$  (3 Äq.) einer HBTU-Lösung (0.1 M in DMF), 194  $\mu\text{L}$  (3 Äq.) HOBT\*H<sub>2</sub>O-Lösung (0.1 M in DMF) und 291  $\mu\text{L}$  (4.5 Äq.) DIPEA-Lösung (0.1 M in DMF) versetzt. Die erhaltene Reaktionslösung wird nach 15 min bei 0 °C zum Harz gegeben und mit diesem über Nacht suspendiert (Orbitalschüttler). Anschließend wird abgesaugt und wie folgt gewaschen: je 1 mL DMF, DCM, trockenes DMF.

#### **Entschützen der Fmoc-Gruppe:**

Dies erfolgte nach dem Protokoll der ersten Fmoc-Entschützung.

#### **Parallele Kupplung der jeweils dritten AS:**

Dies erfolgte nach dem Protokoll zum Kuppeln der zweiten AS.

#### **Entschützen der Fmoc-Gruppe:**

Dies erfolgte nach dem Protokoll der ersten Fmoc-Entschützung.

#### **Parallele Kupplung der Kopfgruppe:**

570 mg (222 Äq.) der Kopfgruppe (PMD-065-01-02) und 60 mL DMF werden auf 0 °C gebracht und unter Rühren mit 543 mg (222 Äq.) HBTU, 219 mg HOBT\*H<sub>2</sub>O (222 Äq.) sowie 277 mg DIPEA (333 Äq.) versetzt. Die erhaltene Reaktionslösung wird nach 15 min bei 0 °C in Portionen zu je 816  $\mu\text{L}$  zu den 74 Harzportionen gegeben und mit diesen über Nacht suspendiert. Anschließend wird abgesaugt und wie folgt gewaschen: je 1 mL DCM, DMF, trockenes DMF. Der gesamte Kupplungsschritt inkl. dem Waschen wird wiederholt.

#### **Abspaltung der AS-Seitenkettenschutzgruppen sowie der Boc-Schutzgruppe der Kopfgruppe:**

Die Vorschrift ist exemplarisch für einen der insgesamt 74 Reaktoren. Das Harz wird mit 1 mL einer Lösung von TFA/H<sub>2</sub>O/Triisopropylsilan (95:2.5:2.5) versetzt und 2 h suspendiert (Orbitalschüttler). Anschließend wird das Harz abgesaugt und zweimal mit jeweils 1 mL DCM und 1 mL DMF gewaschen und über Nacht HV-getrocknet.

## 7.8 Screening der festphasengebundenen Rezeptoren

Es wurden insgesamt drei Screenings durchgeführt: Das der Testbibliothek, der 20 Bibliotheken sowie der nachsynthetisierten Strukturvorschläge.

### 7.8.1 Screening der kombinatorischen Testbibliothek (400 Verb.)

Für das Screening werden 83 mg Harz (Bibliothek) zunächst wie folgt gewaschen: 3 x DCM, 3 x MeOH, 3 x DMF, 3 x H<sub>2</sub>O (jeweils 2.5 mL, für 5 min horizontal geschüttelt und abgesaugt). Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Methylester des Farbstofflinkers. Hierzu wird das Harz mit 320 µL einer 0.1 µM Lösung von AUJ-006-01<sup>[124]</sup> (Verbindung **53**, Abb. 56) in Puffer (bestehend aus 5 µM BisTris in 10 % DMSO (aq)) für 16 h inkubiert (Orbitalschüttler). Anschließend wird das Harz abgesaugt und viermal mit 2.5 mL Puffer (5 µM BisTris in H<sub>2</sub>O) jeweils 1 min gewaschen und abgesaugt. Das Harz wird im feuchten Zustand (mit 5 µM BisTris in H<sub>2</sub>O feucht gehalten) mittels Fluoreszenzmikroskopie (Motic BA 400) bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc.}} = 480$  nm untersucht und sämtliche fluoreszierenden Beads entfernt. Anschließend wurde die verbleibende Harz-Portion mit einer 0.1 µM Lösung von Verb. **42** (PMD-073-01-02) (der NBD-markierten CaaX-Box von Rheb) in Puffer (bestehend aus 5 µM BisTris in 10 % DMSO (aq)) für 16 h inkubiert (Orbitalschüttler). Leuchtende Beads werden mit einer Nadel entnommen und mittels ESI-MS untersucht (Kapitel 7.9.1).

In einer weiteren Untersuchung wurde der Farbstofflinker **39** (TPT-007-02<sup>[78]</sup>, Abb. 45) verwendet, der eine freie Carbonsäure trägt. Hierzu werden erneut 83 mg Harz (Bibliothek) zunächst wie folgt gewaschen: 3 x DCM, 3 x MeOH, 3 x DMF, 3 x H<sub>2</sub>O (jeweils 2.5 mL, für 5 min horizontal geschüttelt und abgesaugt). Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Farbstofflinker. Hierzu wird das Harz mit 320 µL einer 0.1 µM Lösung von Verb. **39** (TPT-007-02<sup>[125]</sup>) in Puffer (bestehend aus 5 µM BisTris in 10 % DMSO (aq)) für 16 h inkubiert (Orbitalschüttler). Anschließend wird das Harz abgesaugt und viermal mit 2.5 mL Puffer (5 µM BisTris in H<sub>2</sub>O) jeweils 1 min gewaschen und abgesaugt. Das Harz wird im feuchten Zustand (mit 5 µM BisTris in H<sub>2</sub>O feucht gehalten) mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc.}} = 480$  nm untersucht und sämtliche fluoreszierenden Beads entfernt. Im Anschluss wird die verbleibende Harz-Portion mit einer 0.1 µM Lösung von Verb. **42** (PMD-073-01-02, der NBD-markierten CaaX-Box von Rheb) in Puffer (bestehend aus 5 µM BisTris in 10 % DMSO (aq)) für 16 h inkubiert (Orbitalschüttler). Fluoreszierende Beads werden mit einer Nadel entnommen und mittels ESI-MS untersucht (Kapitel 7.9.1).

Es traten keine nennenswerten Unterschiede bei der Untersuchung der beiden Farbstofflinker (**53**, AUJ-006-01 und **39**, TPT-007-02) auf, weshalb bei den weiteren Untersuchungen (Kapitel 7.8.2 und 7.8.3) nur noch Verb. **53** (AUJ-006-01) für den Ausschluss der Farbstoffassoziation verwendet wird.

### 7.8.2 Screening der 20 kombinatorischen Bibliotheken (8000 Verb.)

**Vorversuche:** Mit der Bibliothek PMD-092, die als erste AS *L*-Ala trägt (identisch mit der

Testbibliothek PMD-075), werden die drei NBD-markierten CaaX-Boxen von Rheb, K-Ras und H-Ras bei 3 verschiedenen Konzentrationen untersucht.

Für das Screening werden 1/3 der Bibliothek (~ 130 mg) zunächst wie folgt gewaschen: 3 x DCM, 3 x MeOH, 3 x DMF, 3 x 5  $\mu\text{M}$  BisTris in  $\text{H}_2\text{O}$  (jeweils 2.5 mL, für 5 min horizontal geschüttelt und abgesaugt). Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Methylester des Farbstofflinkers. Hierzu wird das Harz mit 1.50 mL einer 0.1  $\mu\text{M}$  Lösung von AUJ-006-01 (Verbindung **53**, Abb. 56) in Puffer (bestehend aus 5  $\mu\text{M}$  BisTris in 10 % DMSO (aq)) für 16 h inkubiert (Orbitalschüttler). Nach Absaugen und dreimaligem Waschen mit 5  $\mu\text{M}$  BisTris (aq) wird das Harz im feuchten Zustand (mit 5  $\mu\text{M}$  BisTris (aq) feucht gehalten) mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc.}} = 480$  nm untersucht und sämtliche fluoreszierenden Beads entfernt. Von dem Harz werden anschließend 9 Teilmengen zu je 8.5 mg (jeweils ~ 950 Beads) portioniert und jede Teilmenge mit 500  $\mu\text{L}$  einer Lösung der NBD-markierten CaaX-Box von Rheb, K-Ras und H-Ras inkubiert (jeweils 3 Konzentrationen: 0.01, 0.1, 1  $\mu\text{M}$ ). Nach dreimaligem Waschen mit 5  $\mu\text{M}$  BisTris (aq) werden die Proben mittels Fluoreszenzmikroskopie ( $\lambda_{\text{exc.}} = 480$  nm) untersucht. Bei 0.01  $\mu\text{M}$  Konzentration fluoreszierten nur sehr wenige Beads (Tab. 9), weshalb diese Konzentration für alle weiteren Bibliotheken verwendet wurde. Fluoreszierende Beads (für die Inkubation bei 0.01  $\mu\text{M}$ ) werden mit einer Nadel entnommen und mittels ESI-MS untersucht (Kapitel 7.9.1 und 7.9.2).

#### **Untersuchung der verbleibenden 19 Bibliotheken:**

Für die verbleibenden Bibliotheken wird analog verfahren, jedoch werden hier ca. 70 mg (je Bibliothek) verwendet. Diese werden zunächst wie folgt gewaschen: 3 x DCM, 3 x MeOH, 3 x DMF, 3 x 5  $\mu\text{M}$  BisTris (aq) (jeweils 1 mL, für 5 min horizontal geschüttelt und abgesaugt). Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Methylester des Farbstofflinkers. Hierzu wird das Harz mit 750  $\mu\text{L}$  einer 0.1  $\mu\text{M}$  Lösung von AUJ-006-01 (Verbindung **53**, Abb. 56) in Puffer (bestehend aus 5  $\mu\text{M}$  BisTris in 10 % DMSO (aq)) für 16 h inkubiert (Orbitalschüttler).

Das Harz wird im feuchten Zustand mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc.}} = 480$  nm untersucht und sämtliche fluoreszierenden Beads entfernt. Anschließend wird das Harz erneut gewaschen: je 1 mL DMF, MeOH, DCM, MeOH, DMF, 3 x 5  $\mu\text{M}$  BisTris (aq). Die Probe wird in 3 Teilmengen zu je ~ 8.5 mg (~ 950 Beads) aliquotiert und mit jeweils 500  $\mu\text{L}$  einer Lösung von 0.01  $\mu\text{M}$  der NBD-markierten CaaX-Box von Rheb, K-Ras und H-Ras in Puffer (bestehend aus 5  $\mu\text{M}$  BisTris in 10 % DMSO (aq)) für 16 h inkubiert (Orbitalschüttler). Nach dreimaligem Waschen mit 5  $\mu\text{M}$  BisTris (aq) werden die Proben mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht ( $\lambda_{\text{exc.}} = 480$  nm) und fluoreszierende Beads werden mit einer Nadel entnommen und nach Abspaltung mittels ESI-MS untersucht (Kapitel 7.9.1 und 7.9.2).

#### **Parallele Versuchsdurchführung:**

Unter Benutzung des Bohdan-Miniblock-Systems werden die Inkubationen und Waschvorgänge parallel für 19 Bibliotheken (in 4 mL-SPPS-Glasreaktoren) und jeweils einem NBD-markierten CaaX-Peptid durchgeführt.

### 7.8.3 Screening der Strukturvorschläge (Nachscreening der 74 Verbindungen)

#### Optimierung des Screenings:

Um die erhaltenen Strukturvorschläge zu verifizieren, wurden die nachsynthetisierten, festphasengebundenen Verbindungen parallel mit den zugehörigen (NBD-markierten) CaaX-Peptiden inkubiert. Hierbei wurde zunächst versucht 1 mg Harz mit 1 mL der jeweils 0.01  $\mu\text{M}$  konzentrierten Lösung zu inkubieren. Hierbei zeigten die Beads jedoch nur eine schwache Fluoreszenz. Dies konnte durch folgenden Zusammenhang erklärt werden: Bei der Inkubation der 20 Mischungsbibliotheken variierte die Anzahl der stark leuchtenden (und damit auch mit dem meisten Fluorophor wechselwirkenden) Beads zwischen 1 und 4 Beads pro Inkubation. Die, in Relation zu allen festphasengebundenen Rezeptoren, im starken Unterschuß vorhandene Peptide verteilten sich nun hauptsächlich auf einige Beads. Werden nun lediglich Beads inkubiert, die eine starke Leuchtstärke aufweisen, verteilt sich das Peptid auf eine wesentlich größere Anzahl von Beads (1 mg entspricht  $\sim 110$  Beads): Die durchschnittliche Leuchtstärke pro Bead muss also abnehmen.

Um die Methode zu optimieren, wurde sowohl die Inkubation von 1 mg Harz bei 10-fach (0.1  $\mu\text{M}$ ) höherer Konzentration als auch die Inkubation von 10 Beads bei gleichbleibender Konzentration versucht. Beide Inkubationen lieferten fluoreszierende Beads, entschieden wurde sich dann für die Inkubation von 10 Beads bei geringer Konzentration, die ebenfalls mit dem Bohdan-System parallel durchgeführt wurde.

#### Generelle Vorgehensweise:

Die 74 Harzproben wurden jeweils zweimal untersucht. Zunächst wurde nach gleichem Waschprotokoll für 16 h nur mit Puffer inkubiert und dann fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dies liefert einen Blindwert für die Leuchtstärke. Dies ist nötig, weil einige Beads bereits vor der Inkubation eine geringe Fluoreszenz zeigten. Die jeweils 10 Beads werden unter dem Fluoreszenzmikroskop gesichtet, 2 möglichst gleichgroße Beads werden dann ausgesucht und fotografiert. Von den erhaltenen Aufnahmen der 2 Beads werden Rechtecke in den Abmessungen der kreisförmigen Beads ausgeschnitten und mit dem Programm CorelPaintShopProX4 die Helligkeit der Abbildung untersucht. Der erhaltene, numerische Wert wird als Blindwert verwendet. Nach der Inkubation mit den NBD-markierten CaaX-Peptiden wird erneut gemessen und der um den Blindwert korrigierte Wert als Luminanzdifferenz bezeichnet.

#### Ermittlung des Blindwertes der Luminanz:

10 Beads der jeweiligen Teilbibliothek werden in einen 4 mL SPPS-Reaktor überführt und wie folgt gewaschen: 3 x 1 mL DCM, 3 x 1 mL MeOH, 3 x 1 mL DMF, 3 x 1 mL 5  $\mu\text{M}$  BisTris (aq). Anschließend wird mit 1 mL 5  $\mu\text{M}$  BisTris in 10 % DMSO (aq) für 16 h inkubiert. Anschliesend wird abgesaugt und dreimal mit 1 mL 5  $\mu\text{M}$  BisTris (aq) gewaschen. Die Beads werden fluoreszenz-mikroskopisch betrachtet, fotografiert und mit CorelPaintShopProX4 ausgewertet. Hier wird jeweils der Mittelwert aus zwei Bestimmungen gebildet.

### **Ermittlung der Luminanzdifferenz:**

10 Beads der jeweiligen Teilbibliothek werden in einen 4 mL SPPS-Reaktor überführt und wie folgt gewaschen: 3 x 1 mL DCM, 3 x 1 mL MeOH, 3 x 1 mL DMF, 3 x 1 mL 5  $\mu$ M BisTris (aq). Anschließend wird mit einer Mischung aus 2 mL 0.01  $\mu$ M des jeweiligen, NBD-markierten CaaX-Peptids und 5  $\mu$ M BisTris in 10 % DMSO (aq) für 16 h inkubiert. Nach der Inkubation wird abgesaugt und dreimal mit 1 mL 5  $\mu$ M BisTris (aq) gewaschen. Die Beads werden fluoreszenzmikroskopisch betrachtet, fotografiert und mit CorelPaintShopProX4 ausgewertet. Hier wird jeweils der Mittelwert aus zwei Bestimmungen gebildet. Die Differenz der beiden numerischen Mittelwerte ( $\text{Luminanz}_{\text{Inkubation CaaX}} - \text{Luminanz}_{\text{Blindwert}}$ ) ergibt die Luminanzdifferenz.

## **7.9 Single-Bead-Analyse**

Zur Analyse der Beads, die aus den Inkubationen der 20 kombinatorischen Bibliotheken hervorgegangen waren, wurden die Beads gewaschen, die Rezeptoren abgespalten, gelöst und analysiert. Hierbei erfolgte zunächst die Analyse der Molekularmasse, anschließend wurde mit der verbleibenden Probe eine Sequenzanalyse durchgeführt. Die Protokolle für die Probenpräparation und der Analysen eines Beads werden in den folgenden zwei Unterkapiteln beschrieben (7.9.1, 7.9.2).

### **7.9.1 Direktinjektions-MS**

Zunächst wurde das selektierte Bead mittels einer Nadel in ein 2 mL-Vial überführt und mit jeweils 1 mL DMF, 1 mL MeOH und 0.5 mL DCM für 15 min im US-Bad behandelt. Das jeweils überstehende Lösungsmittel (Waschlösung) wurde mit einer Spritze entfernt. Hierfür wurde eine Kanüle mit verengtem Durchmesser aufgesetzt: Ein Bead kann so nicht in die Kanüle oder die Spritze eintreten. Das Bead wird nach Trocknung im Hochvakuum mit 3  $\mu$ L *n*-Propylamin versetzt (frisch über  $\text{CaH}_2$  destilliert) und über Nacht (in einem Orbitalschüttler) suspendiert, wodurch der entsprechende Rezeptor abgespalten wird. Die erhaltene Reaktionsmischung wird zunächst mit einer Membranpumpe bei 80 mbar vom größten Teil des überschüssigen Propylamins befreit. Anschließend erfolgt die weitere Trocknung der Proben im Hochvakuum über Nacht. Die erhaltenen Rohprodukte, (die an der Gefäßwandung und dem Trägermaterial anhaften) müssen anschließend vom Festphasenträgermaterial getrennt werden. Hierzu wird der Boden des Vials und das Bead mit 300  $\mu$ L MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (99:1) suspendiert und über gewaschene (Methanol) Glaswolle filtriert. Das Filtrat wird mit einer Membranpumpe bei 80 mbar vom Lösungsmittel befreit und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird dann mit 30  $\mu$ L Puffer, bestehend aus 65 %  $\text{H}_2\text{O}$ , 35 % MeOH und 0.1 %  $\text{NH}_4\text{OAc}$  gelöst. Die Lösung wird mittels einer 100  $\mu$ L-Spritze (mit Teflonstempel) in die 5  $\mu$ L-Probenschleife des Massenspektrometers (Varian MS-500) geladen und mit dem gleichen Puffer als Trägerlösung der ESI-Nadel zugeführt. Nach 2 Injektionen bei 350 und 250  $^{\circ}\text{C}$  Temperatur des Trocknungsstroms wird die verbleibende Probe mit Puffer auf ein Volumen von 200  $\mu$ L verdünnt und mittels  $\text{MS}^n$  untersucht (Kapitel 7.9.2). Für das verwendete Methanol und Wasser wurde der Reinheitsgrad "LC-MS" verwendet. Das Ammoniumacetat wies den Reinheitsgrad "zur Analyse" auf.



**Tab. 34: Die Einstellungen des Massenspektrometers für die Analyse einzelner Beads. \* = Die Temperatureinstellung betrug im Regelfall 250 sowie 350 °C (2 Injektionen).**

|                              |             |                             |  |
|------------------------------|-------------|-----------------------------|--|
| spray chamber temperature:   | 50 °C       | max ion time:               | 250 000 µs   |
| needle voltage:              | + 5000 V    | drying gas temperature:     | 150-350* Volt  |
| sprayshield voltage:         | + 600 Volt  | drying gas pressure:        | 20.0 psi   |
| capillary voltage:           | + 80 Volt   | nebulizer pressure:         | 50.0 psi   |
| electron multiplier voltage: | 1360 Volt   | nebulizer gas:              | nitrogen   |
| conversion dynode voltage:   | 15 000 Volt | trap damping gas-flow rate: | 0.8 mL/min   |
| polarity:                    | positive    | solvent:                    | H <sub>2</sub> O/MeOH/NH <sub>4</sub> OAc, (65:35:0.1) |
| scan mode:                   | 50-2000 m/z | solvent flow:               | 400 µL/min   |

**Verwendete Laufmittel:**

LC-MS-H<sub>2</sub>O: Fisher Scientific Water W6-212 Optima® LC/MS

LC-MS-MeOH: Fluka Methanol LC-MS CHROMASOLV®

### 7.9.2 Direktinjektions-MS<sup>n</sup>

Die aus der Untersuchung der Molekülmase (Kapitel 7.9.1) verbleibenden Probenlösungen wurden mit Puffer (65 % H<sub>2</sub>O, 35 % MeOH und 0.1 % NH<sub>4</sub>OAc) auf ein Volumen von 200 µL verdünnt und in eine 1 mL Spritze geladen. Diese wird in die integrierte Spritzenpumpe (Flussrate: 10 µL/min) des Spektrometers (Varian MS-500) eingebaut und über eine Kapillare direkt mit der ESI-Nadel verbunden.

Um in den MS<sup>n</sup>-Modus zu wechseln, wird im Bedienfeld der Methode der Scan Type auf "MS^n" gesetzt. Die Masse des zu fragmentierenden Mutterions (welches aus dem MS-Experiment bekannt ist), wird als erstes "precursor ion" gesetzt. Die Stärke mit der die Mutterionen beschleunigt werden und im Anschluss durch die Kollision mit Heliumatomen fragmentiert werden, ist proportional zur eingestellten Spannung ("excitation amplitude") und muss für jedes Experiment (und auch für die einzelnen Stufen der Fragmentierung) angeglichen werden. Ist der eingestellte Wert zu gering, werden keine Tochterionen erzeugt. Ist der Wert zu hoch, fragmentiert das Molekül eventuell zu stark und die erzeugten Ionen sind für die Strukturaufklärung ungeeignet.

Die verwendeten Einstellungen zur Erzeugung der Mutterionen sind die gleichen wie in Tab. (Tab. 34).

## 7.10 HPLC-Analyse der nachsynthetisierten Verbindungen (PMD-125-03)

Zunächst wird das Harz der 74 (festphasengebundenen) Verbindungen der Parallelsynthese PMD-125-03 erneut gewaschen: je 1 mL DMF, MeOH und DCM. Anschließend wird über Nacht HV-getrocknet.

Jeweils 10 mg des getrockneten Harzes werden in 2 mL Rollrandflaschen (HPLC-Vials) eingewogen und mit 37.5  $\mu\text{L}$  *n*-Propylamin (frisch über  $\text{CaH}_2$  dest.) 12 h horizontal geschüttelt (Vials mit Bördekkappe verschlossen). Anschließend wird das *n*-Propylamin aus der erhaltenen Reaktionsmischung bei 500 mbar (Membranpumpe) entfernt und der resultierende Rückstand (mit Harz) im HV getrocknet. Der Rückstand wird dann mit 125  $\mu\text{L}$  MeOH + 1 %  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt, 15 min horizontal geschüttelt und über gewaschene Glaswolle in HPLC-Vials filtriert. Der Filtrerrückstand wird zweimal mit 125  $\mu\text{L}$  MeOH + 1 %  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und filtriert. Die vereinigten Filtrate werden zunächst mit einer Membranpumpe bei 80 mbar vom Lösungsmittel befreit, anschließend wird über Nacht HV-getrocknet. Der Rückstand wird dann mit 500  $\mu\text{L}$  MeOH + 0.1 %  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Die so erhaltenen (insgesamt 74) Proben werden mittels HPLC-UV/ESI-MS untersucht.

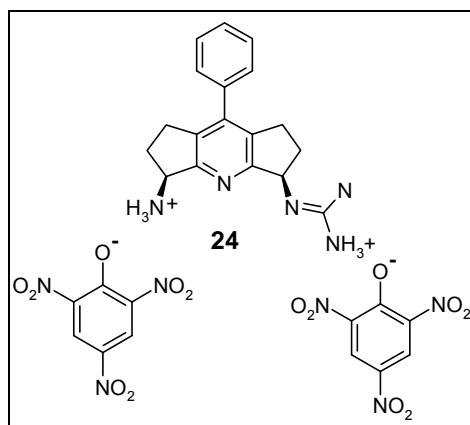
## 7.11 NMR-Titrationen

Es wurden drei verschiedene Arten von Titrationen durchgeführt. Zum einen die der verschiedenen Pyridinkopfgruppen, welche ausschliesslich mit TMAOAc ohne Kontrolle des pH-Werts durchgeführt wurden. Zum anderen wurden die aus dem Screening der 20 Bibliotheken hervorgegangen 11 Rezeptoren mit den TMA-Salzen der CaaX-Peptide in 100 %  $\text{d}_6$ -DMSO (ohne pH-Kontrolle) sowie 60 %  $\text{d}_6$ -DMSO (aq) (mit pH-Kontrolle) titriert. Darüber hinaus wurde der beste Rezeptor mit den 11- und 14-mer-CaaX-Peptid des Rheb-Proteins untersucht.

### 7.11.1 Titrationen der Pyridinkopfgruppen mit TMA-Acetat

#### NMR-Titrationen der Pyridinkopfgruppe 24 (PMD-024-01-03)

Den vorgelegten Lösungen der Kopfgruppe (PMD-024-01-03) in 495  $\mu\text{L}$   $\text{d}_6$ -DMSO bzw.  $\text{H}_2\text{O}$  in DMSO wird eine Lösung von 6  $\mu\text{g}$  Na-DSS (in  $\text{d}_6$ -DMSO) hinzugefügt. Hierdurch entsteht ein Verhältnis der Kopfgruppe zur Referenzsubstanz von 50:1, bzw. einen 2 mol-%-igen Anteil von Na-DSS. Dies entspricht einem 0.52-Massen-%-igen Anteil.



**Abb. 154: Die Struktur von Verbindung 24 (PMD-024-01-03, 2-faches Pikrat).**

In 6 NMR-Röhrchen werden jeweils ~ 2.2 mg der Kopfgruppe **24** (PMD-024-01-03) eingewogen. Folgende exakte Mengen werden verwendet:

**Tab. 35: Die Einwaagen der Pyridinkopfgruppe 24 (PMD-024-01-03).**

| Probe   | Einwaage [mg] | Einwaage [ $\mu\text{mol}$ ] | Anteil $\text{H}_2\text{O}$ in $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [%] |
|---------|---------------|------------------------------|---|
| 0240601 | 2.2           | 2.87                         | 0   |
| 0240602 | 2.4           | 3.13                         | 10  |
| 0240603 | 2.2           | 2.87                         | 20  |
| 0240604 | 2.2           | 2.87                         | 30  |
| 0240605 | 2.2           | 2.87                         | 40  |
| 0240606 | 2.2           | 2.87                         | 50  |

Von allen Proben (01 bis 06) wurden zunächst Nullmessungen durchgeführt (Exp. 10, Substanz im entsprechenden Lösungsmittel ohne Acetat). Dann werden Portionen aus verschiedenen Stammlösungen des TMAOAc (5 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M, 5 M) im entsprechenden Lösungsmittel) hinzugefügt. Nach jeder Zugabe wird homogenisiert (7 x geschüttelt) und ein Watergate-Wasserunterdrückungsspektrum (Pulsprogramm p3919gp) aufgenommen.

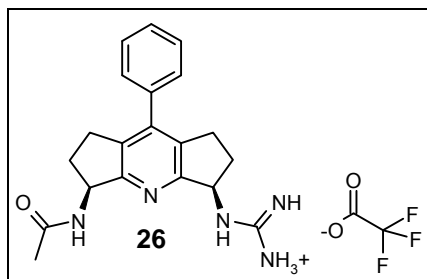
Folgende Aliquote der Stammlösungen des TMAOAc wurden jeder Messreihe hinzugefügt (Titration):

**Tab. 36: Die Zugaben an TMAOAc für die Titrationsen der Pyridinkopfgruppe 24 (PMD-024).**

| Nr | Exp | d <sub>6</sub> -DMSO (1) | 10 bis 30 % H <sub>2</sub> O in<br>d <sub>6</sub> -DMSO (2,3,4) | 40 bis 50 % H <sub>2</sub> O in<br>d <sub>6</sub> -DMSO (5,6) |
|----|-----|--------------------------|---|---|
| 1  | 10  | 0 µL                     | 0   | 0   |
| 2  | 11  | 2 µL* 0.005 M            | 5 µL* 0.01 M  | 7.5 µL*0.01 M   |
| 3  | 12  | 4 µL* 0.01 M             | 1 µL* 0.1 M   | 5 µL* 0.1 M   |
| 4  | 13  | 1 µL* 0.1 M              | 1.5 µL* 0.1 M   | 8 µL* 0.1 M   |
| 5  | 14  | 1.5 µL* 0.1 M            | 1.5 µL* 0.1 M   | 1 µL* 1 M   |
| 6  | 15  | 1.5 µL* 0.1 M            | 3 µL* 0.1 M   | 2 µL * 1 M  |
| 7  | 16  | 3 µL* 0.1 M              | 7.5 µL* 0.1 M   | 3 µL * 1 M  |
| 8  | 17  | 7.5 µL* 0.1 M            | 1 µL* 1 M   | 5 µL * 1 M  |
| 9  | 18  | 1 µL* 1 M                | 5 µL* 1 M   | 1.5 µL* 5 M   |
| 10 | 19  | 12.5 µL* 1 M             | 7.5 µL* 1 M   | 3 µL * 5 M  |
| 11 | 20  | 15 µL* 1 M               | 7.5 µL* 1 M   | 5 µL* 5 M   |
| 12 | 21  |                          | 8.0 µL* 1 M   | 8 µL * 5 M  |
|    |     | Σ (ΔV) = 49 µL           | Σ (ΔV) = 48.5 µL  | Σ (ΔV) = 49 µL  |

**NMR-Titrationsen der Pyridinkopfgruppe 26 (PMD-029-02-01)**

In Analogie zu Rez. 24, werden den Proben jeweils 6 µg Na-DSS (in d<sub>6</sub>-DMSO) als interner Standard hinzugefügt.



**Abb. 155: Die Struktur von Verbindung 26 (PMD-029-02-01).**

In 6 NMR-Röhrchen werden jeweils ~ 1.5 mg der Kopfgruppe PMD-029-02-01 eingewogen. Folgende exakte Mengen werden eingewogen:

**Tab. 37: Die Einwaagen der Pyridinkopfgruppe 26 (PMD-029-02-01).**

| Probe     | Einwaage [mg] | Einwaage [µmol] | Anteil H <sub>2</sub> O in d <sub>6</sub> -DMSO [%] |
|-----------|---------------|-----------------|---|
| 029020401 | 1.5           | 3.2             | 0   |
| 029020402 | 1.5           | 3.2             | 10  |
| 029020403 | 1.4           | 3.0             | 20  |
| 029020404 | 1.5           | 3.2             | 30  |
| 029020405 | 1.5           | 3.2             | 40  |
| 029020406 | 1.5           | 3.2             | 50  |

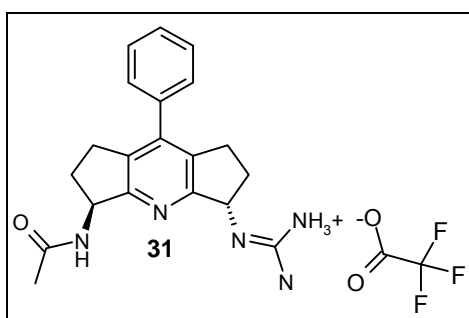
Die Durchführung der Messungen erfolgte wie bei der Pyridinkopfgruppe **24** beschrieben. Folgende Aliquote der Stammlösungen wurden jeder Messreihe hinzugefügt:

**Tab. 38: Die Zugaben an TMAOAc für die Titrations der Kopfgruppe 26 (PMD-029-02-01).**

| Nr | Exp | d <sub>6</sub> -DMSO (-01) | 10 bis 50 % H <sub>2</sub> O in d <sub>6</sub> -DMSO (-02,-03,-04,-05,-06) |
|----|-----|----------------------------|--|
| 1  | 10  | 0 µL                       | 0  |
| 2  | 11  | 4 µL * 0.01 M              | 1 µL * 0.1 M   |
| 3  | 12  | 1 µL * 0.1 M               | 2 µL * 0.1 M   |
| 4  | 13  | 2 µL * 0.1 M               | 5 µL * 0.1 M   |
| 5  | 14  | 3 µL * 0.1 M               | 1 µL * 1 M   |
| 6  | 15  | 4 µL * 0.1 M               | 1.5 µL * 1 M   |
| 7  | 16  | 5 µL * 0.1 M               | 2 µL * 1 M   |
| 8  | 17  | 1 µL * 1 M                 | 3 µL * 1 M   |
| 9  | 18  | 1.5 µL * 1 M               | 1 µL * 5 M   |
| 10 | 19  | 2 µL * 1 M                 | 1.5 µL * 5 M   |
| 11 | 20  | 2.5 µL * 1 M               | 2 µL * 5 M   |
| 12 | 21  | 3 µL * 1 M                 | 3 µL * 5 M   |
| 13 | 22  | 1 µL * 5 M                 | 4 µL * 5 M   |
| 14 | 23  | 2 µL * 5 M                 | 5 µL * 5 M   |
| 15 | 24  | 3 µL * 5 M                 | 6 µL * 5 M   |
| 16 | 25  | 5 µL * 5 M                 | 7.5 µL * 5 M   |
|    |     | Σ (ΔV) = 40 µL             | Σ (ΔV) = 45.5 µL   |

#### NMR-Titrations der Pyridinkopfgruppe **31** (PMD-034-01-01)

In Analogie zu Rez. 24, werden den Proben jeweils 6 µg Na-DSS (in d<sub>6</sub>-DMSO) als interner Standard hinzugefügt.



**Abb. 156: Die Struktur von Verbindung 31 (PMD-034-01-01).**

In 6 NMR-Röhrchen werden jeweils ~ 1.4 mg der Kopfgruppe **31** (PMD-034-01-01) eingewogen. Folgende exakte Mengen werden eingewogen:

**Tab. 39: Die Einwaagen der Pyridinkopfgruppe 31 (PMD-034-01-01).**

| Probe     | Einwaage [mg] | Einwaage [ $\mu\text{mol}$ ] | Anteil $\text{H}_2\text{O}$ in $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [%] |
|-----------|---------------|------------------------------|---|
| 034010401 | 1.4           | 3.0                          | 0   |
| 034010402 | 1.4           | 3.0                          | 10  |
| 034010403 | 1.4           | 3.0                          | 20  |
| 034010404 | 1.4           | 3.0                          | 30  |
| 034010405 | 1.4           | 3.0                          | 40  |
| 034010406 | 1.4           | 3.0                          | 50  |

Die Durchführung der Messungen erfolgte wie bei der Pyridinkopfgruppe **24** beschrieben. Folgende Aliquote der Stammlösungen wurden jeder Messreihe hinzugefügt:

**Tab. 40: Die Zugaben an TMAOAc für die Titrations der Kopfgruppe 31 (PMD-034-01-01).**

| Nr | Exp | $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (1)         | 10 bis 50 % $\text{H}_2\text{O}$ in $\text{d}_6\text{-DMSO}$<br>(-02,-03,-04,-05,-06) |
|----|-----|--------------------------------------|---|
| 1  | 10  | 0 $\mu\text{L}$                      | 0   |
| 2  | 11  | 4 $\mu\text{L}$ * 0.01 M             | 1 $\mu\text{L}$ * 0.1 M   |
| 3  | 12  | 1 $\mu\text{L}$ * 0.1 M              | 2 $\mu\text{L}$ * 0.1 M   |
| 4  | 13  | 2 $\mu\text{L}$ * 0.1 M              | 5 $\mu\text{L}$ * 0.1 M   |
| 5  | 14  | 3 $\mu\text{L}$ * 0.1 M              | 1 $\mu\text{L}$ * 1 M   |
| 6  | 15  | 4 $\mu\text{L}$ * 0.1 M              | 1.5 $\mu\text{L}$ * 1 M   |
| 7  | 16  | 5 $\mu\text{L}$ * 0.1 M              | 2 $\mu\text{L}$ * 1 M   |
| 8  | 17  | 1 $\mu\text{L}$ * 1 M                | 3 $\mu\text{L}$ * 1 M   |
| 9  | 18  | 1.5 $\mu\text{L}$ * 1 M              | 1 $\mu\text{L}$ * 5 M   |
| 10 | 19  | 2 $\mu\text{L}$ * 1 M                | 1.5 $\mu\text{L}$ * 5 M   |
| 11 | 20  | 2.5 $\mu\text{L}$ * 1 M              | 2 $\mu\text{L}$ * 5 M   |
| 12 | 21  | 3 $\mu\text{L}$ * 1 M                | 3 $\mu\text{L}$ * 5 M   |
| 13 | 22  | 1 $\mu\text{L}$ * 5 M                | 4 $\mu\text{L}$ * 5 M   |
| 14 | 23  | 2 $\mu\text{L}$ * 5 M                | 5 $\mu\text{L}$ * 5 M   |
| 15 | 24  | 3 $\mu\text{L}$ * 5 M                | 6 $\mu\text{L}$ * 5 M   |
| 16 | 25  | 5 $\mu\text{L}$ * 5 M                | 7.5 $\mu\text{L}$ * 5 M   |
|    |     | $\Sigma (\Delta V) = 40 \mu\text{L}$ | $\Sigma (\Delta V) = 45.5 \mu\text{L}$  |

**NMR-Titrations der Pyridinkopfgruppe 27 (PMD-032-02-02)**

In Analogie zu Rez. 24, werden den Proben jeweils 6  $\mu\text{g}$  Na-DSS (in  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ) als interner Standard hinzugefügt.

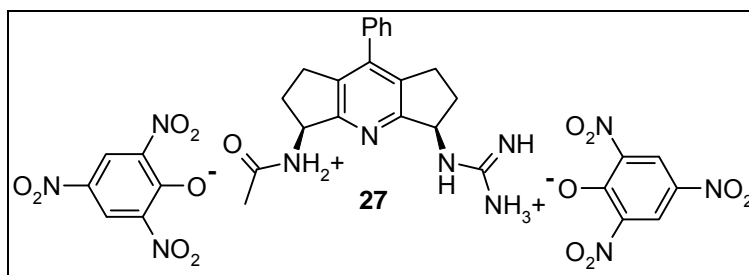


Abb. 157: Die Struktur von Verbindung 27 (PMD-032-02-02).

In einem NMR-Röhrchen werden 2.4 mg (3.0  $\mu\text{mol}$ ) der Kopfgruppe **27** (PMD-032-02-02) eingewogen. Die Durchführung der Messungen erfolgte wie bei der Pyridinkopfgruppe **24** beschrieben, jedoch wurde nur die Titration in 100 %  $d_6$ -DMSO untersucht. Folgende Aliquote der Stammlösungen wurden bei der Titration hinzugefügt:

Tab. 41: Die Zugaben an TMAOAc für die Titration der Pyridinkopfgruppe **27** (PMD-032-02-02).

| Nr | Exp | $d_6$ -DMSO (-01)                    |
|----|-----|--------------------------------------|
| 1  | 10  | 0 $\mu\text{L}$                      |
| 2  | 11  | 4 $\mu\text{L}$ * 0.01 M             |
| 3  | 12  | 1 $\mu\text{L}$ * 0.1 M              |
| 4  | 13  | 2 $\mu\text{L}$ * 0.1 M              |
| 5  | 14  | 3 $\mu\text{L}$ * 0.1 M              |
| 6  | 15  | 4 $\mu\text{L}$ * 0.1 M              |
| 7  | 16  | 5 $\mu\text{L}$ * 0.1 M              |
| 8  | 17  | 1 $\mu\text{L}$ * 1 M                |
| 9  | 18  | 1.5 $\mu\text{L}$ * 1 M              |
| 10 | 19  | 2 $\mu\text{L}$ * 1 M                |
| 11 | 20  | 2.5 $\mu\text{L}$ * 1 M              |
| 12 | 21  | 3 $\mu\text{L}$ * 1 M                |
| 13 | 22  | 1 $\mu\text{L}$ * 5 M                |
| 14 | 23  | 2 $\mu\text{L}$ * 5 M                |
| 15 | 24  | 3 $\mu\text{L}$ * 5 M                |
| 16 | 25  | 5 $\mu\text{L}$ * 5 M                |
|    |     | $\Sigma (\Delta V) = 40 \mu\text{L}$ |

#### NMR-Titration an der Schmuckschen Kopfgruppe (literaturbekannt)

In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß werden 10  $\mu\text{L}$  100 mM TMAOAc in 60 %  $d_6$ -DMSO (aq) vorgelegt und mit 990  $\mu\text{L}$  60 %  $d_6$ -DMSO auf eine Konzentration von 1 mM verdünnt. 500  $\mu\text{L}$  dieser Lösung werden in ein NMR-Röhrchen vorgelegt und mit Aliquoten einer 10 mM Lösung von Kopfgruppe **32** (PMD-068-01-01) in 60 %  $d_6$ -DMSO versetzt.

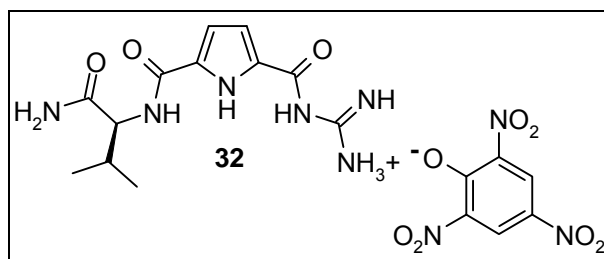


Abb. 158: Literaturbekannte Kopfgruppe von Schmuck<sup>[85]</sup>

Die Durchführung der Titration sowie die Konzentrationen beider Bindungspartner sind literaturbeschrieben.<sup>[85]</sup> Durch Berechnung mittels WINEQNMR2 konnte der Literaturwert der Bindungskonstante reproduziert werden.

Tab. 42: Die Zugaben der Kopfgruppe 32 (PMD-069-01-01) zu einer 1 mM TMAOAc-Lösung.

| Nr | Exp | 60 % d <sub>6</sub> -DMSO (aq) |
|----|-----|--------------------------------|
| 1  | 11  | 0 µL                           |
| 2  | 12  | 12.5 µL * 10 mM                |
| 3  | 13  | 12.5 µL * 10 mM                |
| 4  | 14  | 12.5 µL * 10 mM                |
| 5  | 15  | 25 µL * 10 mM                  |
| 6  | 16  | 25 µL * 10 mM                  |
| 7  | 17  | 50 µL * 10 mM                  |
| 8  | 18  | 50 µL * 10 mM                  |
| 9  | 19  | 50 µL * 10 mM                  |
| 10 | 20  | 50 µL * 10 mM                  |
|    |     | Σ (ΔV) = 287.5 µL              |

#### Verwendete Chemikalien:

TMAOAc: TCI, > 98.0 %

d<sub>6</sub>-DMSO: Chemotrade, 99.8 % D

Wasser: Carl Roth, Rotisolv (HPLC)

Na-DSS: Sigma-Aldrich, 97 %

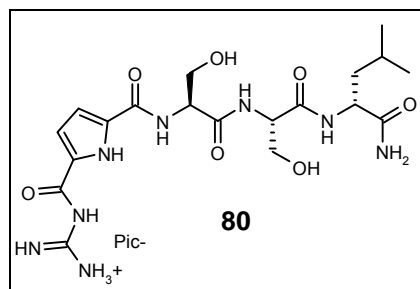
### 7.11.2 NMR-Titrationsen der Rezeptorpikrate mit den TMA-Salzen der CaaX-Peptide

Die Titration der Rezeptorpikrate erfolgt hierbei mit den in Kapitel 7.6 beschriebenen TMA-Salzen der CaaX-Peptide. Hierbei werden zunächst die Titrationsen (ohne pH-Kontrolle) in reinem d<sub>6</sub>-DMSO durchgeführt. Die Berechnung der Assoziationskonstanten erfolgte nach einem 1:1-Bindemodell mit dem Programm WINEQNMR2. Anschließend wurden die Titrationsen in 60 % d<sub>6</sub>-DMSO (aq) unter Kontrolle des pH-Werts durchgeführt. Dies erfolgte durch Korrektur des pH-Werts, indem nach jeder erfolgten Zugabe der CaaX-Box mit TMAOH bzw. Pikrinsäurelösung auf den pH-Wert vor der Zugabe



eingestellt wird. Für die Titrationsen wird (im Regelfall) 501.6  $\mu\text{L}$  einer 1.55 mM Lösung des Rezeptors (in  $\text{d}_6\text{-DMSO}$  bzw. 60 %  $\text{d}_6\text{-DMSO (aq)}$ ) und 31.9  $\mu\text{M}$  NaDSS in einem NMR-Röhrchen vorgelegt und mit Aliquoten einer (frisch hergestellten) 38.8 mM Lösung des CaaX-Peptids ( $\text{d}_6\text{-DMSO}$  bzw. 60 %  $\text{d}_6\text{-DMSO (aq)}$ ) versetzt. Exemplarisch werden in Tab. 43 und Tab. 44 die Konzentrationsverhältnisse für zwei Titrationsen wiedergegeben.

**Titration von Verbindung 80 ( $\text{H}_2\text{NOC-D-Leu-L-Ser-L-Ser-KG}$ ) mit  $[\text{Ac-CSVMO}]^{2-}$   $[\text{TMA}]^+_2$  in 100 %  $\text{d}_6\text{-DMSO}$  (Messung 14601073)**



**Abb. 159: Die Struktur von Verbindung 80 ( $\text{H}_2\text{NOC-D-Leu-L-Ser-L-Ser-KG}$ ).**

**Tab. 43: Die Konzentrationsverhältnisse von Rezeptor 80 ( $\text{H}_2\text{NOC-D-Leu-L-Ser-L-Ser-KG}$ ) und des CaaX-Peptids  $[\text{Ac-CSVMO}]^{2-}$   $[\text{TMA}]^+_2$  bei der Titration in 100 %  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ .**

| c CaaX-Peptid [M] | c Rezeptorpikrat [M] | $\delta$ beobachtetes NMR-Signal [ppm] |
|-------------------|----------------------|--|
| 0                 | 0.00155              | 6.947                                  |
| 0.0001926         | 0.00154              | 6.910                                  |
| 0.0003833         | 0.00153              | 6.864                                  |
| 0.0005722         | 0.00153              | 6.826                                  |
| 0.0007592         | 0.00152              | 6.800                                  |
| 0.0009444         | 0.00151              | 6.778                                  |
| 0.0011300         | 0.00150              | 6.772                                  |
| 0.0013100         | 0.00150              | 6.770                                  |
| 0.0014900         | 0.00149              | 6.769                                  |

Titration von Verbindung 80 (H<sub>2</sub>NOC-*D*-Leu-*L*-Ser-*L*-Ser-KG) mit [Ac-CVLS-O]<sup>3-</sup> [TMA]<sup>+</sup><sub>3</sub> in 100 % d<sub>6</sub>-DMSO (Messung 14601073)

Tab. 44: Konzentrationsverhältnisse von Rezeptor 80 (H<sub>2</sub>NOC-*D*-Leu-*L*-Ser-*L*-Ser-KG) und CaaX-Peptid [Ac-CVLS-O]<sup>3-</sup> [TMA]<sup>+</sup><sub>3</sub> bei der Titration in 100 % d<sub>6</sub>-DMSO.

| c CaaX-Peptid [M] | c Rezeptorpikrat [M] | δ beobachtetes NMR-Signal [ppm] |
|-------------------|----------------------|---------------------------------|
| 0                 | 0.00155              | 7.085                           |
| 0.0001926         | 0.00154              | 7.155                           |
| 0.0003833         | 0.00153              | 7.216                           |
| 0.0005722         | 0.00153              | 7.259                           |
| 0.0007592         | 0.00152              | 7.294                           |
| 0.0009444         | 0.00151              | 7.325                           |
| 0.00113           | 0.00150              | 7.345                           |
| 0.00131           | 0.00150              | 7.361                           |
| 0.00149           | 0.00149              | 7.366                           |
| 0.00167           | 0.00148              | 7.372                           |
| 0.00184           | 0.00148              | 7.373                           |
| 0.00202           | 0.00147              | 7.371                           |

### 7.11.3 NMR-Titrationen der Rezeptorpikrate mit den CaaX-Peptiden (11- und 14-mer)

In einem NMR-Röhrchen werden 621.6 µL einer 775 µM Lösung des Rezeptors **69**, (Pikrat, PMD-159-01-01) in 60 % d<sub>6</sub>-DMSO (aq) vorgelegt und durch Zugabe von TMAOH in 60 % d<sub>6</sub>-DMSO (aq) auf pH = 6 eingestellt. Die Titrationsen erfolgen durch Zugabe von Aliquoten (10.5 µL bis 35 µL) der Rheb-Peptid-Lösung (11- bzw. 14-mer). Nach jeder Zugabe wird der pH-Wert kontrolliert. Weicht der pH-Wert von 6 um mehr als 0.05 ab, wird dieser durch Zugaben von Pikrinsäure bzw. TMAOH (beide in 60 % d<sub>6</sub>-DMSO) korrigiert. Die zugegebene Rheb-Peptid-Lösung (11- und 14-mer) besteht aus einer mit TMAOH auf pH = 6 eingestellten Lösung des Peptids in 60 % d<sub>6</sub>-DMSO (aq). Die Konzentration des Peptids in der eingestellten Lösung beträgt 27.4 mM.<sup>[126]</sup>

## 7.12 Farnesyltransferaseassay

### 7.12.1 Chemische Synthese eines farnesylierten CaaX-Peptides von Rheb (172, Ac-ASQGKSSC(Farn)SVM-OH\*TFA, PMD-168-01-04)

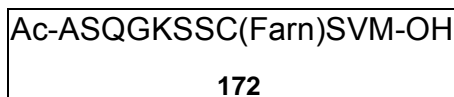


Abb. 160: Verbindung 172, PMD-168-01-04

2.0 mg des Peptids Ac-ASQGKSSCSVM-OH (1.61  $\mu\text{mol}$ ) werden in 2.4 mL (Argon-begastem) Lösungsmittel (DMF/1-Butanol/0.1 % TFA (aq), 2:1:1) gelöst und mit 80.6  $\mu\text{L}$  einer 100 mM  $\text{Zn}(\text{OAc})_2$  in 0.1 % TFA (aq)-Lösung versetzt. Hierzu werden 1.8  $\mu\text{L}$  (6.44  $\mu\text{mol}$ ) Farnesylbromid hinzugefügt. Die erhaltene Lösung wird 2 ½ Tage bei RT gerührt. (Zunächst wurde eine Testreinigung mit 15 % der Reaktionsmischung durchgeführt. Hierdurch wurde eine kleine Menge eines verunreinigten Produkts erhalten (PMD-168-01-03). Anschließend erfolgte die präparative HPLC-Reinigung der gesamten Restmenge von 2.05 mL unter Erhalt von 1.9 mg des analysenreinen Produkts PMD-168-01-04. Die erhaltenen Produktfraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

**Ausbeute:** 1.9 mg (1.32  $\mu\text{mol}$ ), 82 %. **HPLC-ESI-MS:**  $m/z$  (%) = 666 (100)  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , 1331 (75)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , **HR-ESI-MS:**  $m/z$  =1330.6738, berechnet für  $\text{C}_{58}\text{H}_{100}\text{N}_{13}\text{O}_{18}\text{S}_2^+$ : 1330.6745. Die Reaktion erfolgte in Anlehnung an eine bekannte Vorschrift.<sup>[111]</sup>

## 7.12.2 Biochemische Farnesylierung und Durchführung der FTaseassays

### Bedingungen für die Farnesylierung am C-terminalen 11-mer von K-Ras4B:

*Farnesylierungspuffer:* 974  $\mu\text{L}$  50 mM BisTris (auf pH = 7.2 eingestellt) werden mit 10  $\mu\text{L}$  100 mM DTT, 5  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  10 mM  $\text{ZnCl}_2$ , und 10  $\mu\text{L}$  800  $\mu\text{M}$  des 11-mer der K-Ras4B-CaaX-Box versetzt und gemischt.

*Optimierte Bedingungen für das Assay:* 400  $\mu\text{L}$  des Farnesylierungspuffers werden mit 2  $\mu\text{L}$  2.31 mM FPP versetzt und auf zwei Portionen aufgeteilt. Probe 1 wird mit maximal 4  $\mu\text{L}$  MeOH versetzt (pH-Wert der Probe: ~ 7.2). Probe 2 wird mit einer methanolischen Rez.-Lösung (gleiche Menge an MeOH wie in der Referenzprobe) versetzt und der pH-Wert durch Zugabe von 0.1 M NaOH auf pH = 7.2 korrigiert. Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe von jeweils 5  $\mu\text{L}$  FTase (0.1 mg/mL).

### Bedingungen für das FTaseassay am 4-mer von K-Ras4B:

*Farnesylierungspuffer:* 977  $\mu\text{L}$  5 mM BisTris (auf pH = 7.16 eingestellt) werden mit 10  $\mu\text{L}$  100 mM DTT, 2  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  und 10  $\mu\text{L}$  800  $\mu\text{M}$  des 4-mers der KRas4B-CaaX-Box (Ac-CVIM-OH) versetzt und gemischt.

*Inhibitionsassay:* 400  $\mu\text{L}$  des Farnesylierungspuffers werden mit 2  $\mu\text{L}$  2.31 mM FPP versetzt und der pH-Wert auf 7.17 eingestellt (Zugabe von 2.8  $\mu\text{L}$  0.1 M HCl). Die Probe wird auf zwei Portionen aufgeteilt: 200  $\mu\text{L}$  ftasezq1 und 200  $\mu\text{L}$  ftasezq2. Die Probe ftasezq1 wird mit 2  $\mu\text{L}$  MeOH versetzt (pH = 7.17). Die Probe ftasezq2 wird mit 2  $\mu\text{L}$  einer 100 mM Lösung von Rez. **77** (PMD-140-01, Hydrochlorid) in MeOH versetzt (pH = 7.17). Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe von jeweils 1  $\mu\text{L}$  FTase (1 mg/mL). Beide Proben werden jeweils durch 10-maliges pipettieren durchmischt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen, in einem Wasserbad, für 30 min bei 37 °C thermostatisiert. Beide Proben werden hierauf in eisgekühlte Microvials pipettiert. Die Probe ftasezq1 wird direkt mit HPLC gemessen, probe ftasezq2 wird bis zur Messung auf Eis gelagert.

Durch Gegenwart des Rezeptors **77** (PMD-140-01, Hydrochlorid) konnte keine Inhibition nachgewiesen werden (985  $\mu\text{M}$  Rezeptorkonzentration).

### **Bedingungen für das FTaseassay am Tryptophanderivat des 11-mers von Rheb (Ac-WASQGKSSCSVM-OH):**

*Farnesylierungspuffer:* 948 µL 5 mM BisTris (auf pH = 7.15 eingestellt) werden mit 10 µL 100 mM DTT, 20 µL 10 µM MgCl<sub>2</sub>, 10 µL 10 µM ZnCl<sub>2</sub> und 2 µL 800 µM des Derivats (Ac-WASQGKSSCSVM-OH) versetzt und gemischt. (Die eingesetzte Peptidkonzentration ist mit dem Tryptophanderivat 5-mal kleiner als bei allen anderen Assays.)

*Inhibitionsassay:* 400 µL des Farnesylierungspuffers werden mit 2 µL 2.31 mM FPP versetzt (pH = 7.22) und auf zwei Portionen aufgeteilt: 200 µL ftasezx1 und 200 µL ftasezx2. Die Probe ftasezx1 wird mit 2 µL MeOH versetzt (pH = 7.19). Die Probe ftasezx2 wird mit 2 µL einer 100 mM Lösung von Rez. **69** (PMD-132-01, Hydrochlorid) in MeOH versetzt (pH = 7.14). Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe von jeweils 1 µL FTase (1 mg/mL). Beide Proben werden jeweils durch 10-maliges pipettieren durchmischt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Wasserbad für 30 min bei 37 °C thermostatisiert. Beide Proben werden hierauf in eisgekühlte Microvials pipettiert. Die Probe ftasezx1 wird direkt mit HPLC gemessen, probe ftasezx2 wird bis zur Messung auf Eis gelagert.

Durch Gegenwart des Rezeptors **69** (PMD-132-01, Hydrochlorid) konnte keine Inhibition nachgewiesen werden (985 µM Rezeptorkonzentration).

### **Bedingungen für das FTaseassay am 11-mer von Rheb:**

*Ansetzen des Farnesylierungspuffers:*

974 µL 50 mM BisTris (auf pH = 7.2 eingestellt) werden mit 10 µL 100 mM DTT, 5 µL 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 µL 10 mM ZnCl<sub>2</sub> und 10 µL 806 µM des 11-mer der Rheb-CaaX-Box versetzt.

*Inhibitionsassay:* 400 µL des Farnesylierungspuffers werden mit 2 µL 2.31 mM FPP versetzt und auf pH = 7.20 eingestellt (Zugabe von 4.0 µL 0.1 M NaOH). Der Puffer wird auf zwei Portionen aufgeteilt: 150 µL ftaseu1 und 150 µL ftaseu2. Die Probe ftaseu1 wird mit 1.5 µL MeOH versetzt (pH = 7.10). Die Probe ftaseu2 wird mit 1.5 µL einer 50 mM Lösung von Rezeptor **69** (PMD-132-01, Hydrochlorid) in MeOH versetzt (pH = 7.12). Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von jeweils 7.5 µL FTase (0.01 mg/mL). Beide Proben werden jeweils durch 10-maliges Pipettieren durchmischt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Wasserbad 30 min bei 37 °C thermostatisiert. Die Proben werden hierauf in eisgekühlte Microvials pipettiert. Die Probe ftaseu1 wird direkt mit HPLC gemessen, probe ftaseu2 wird bis zur Messung auf Eis gelagert.

Durch Gegenwart des Rezeptors **69** (PMD-132-01, Hydrochlorid) konnte keine Inhibition nachgewiesen werden (472 µM Rezeptorkonzentration).

Es erfolgte eine Wiederholung in Versuch ftasev1 und ftasev2. Es wurden die gleichen Bedingungen (Puffer, pH = 7.2) eingehalten, jedoch wurde jeweils eine Zugabe von 1.5 µL FTase (0.1 mg/mL) verwendet. Auch hier erfolgte keine Inhibition durch Gegenwart des Rezeptors.

### **Bedingungen für das FTaseassay am 4-mer von Rheb:**

*Ansetzen des Farnesylierungspuffers:*

959 µL 5 mM BisTris (auf pH = 7.15 eingestellt) werden mit 1 µL 100 mM DTT, 20 µL 10 µM MgCl<sub>2</sub>, 10 µL 10 µM ZnCl<sub>2</sub> und 10 µL 800 µM des 4-mers der Rheb-CaaX-Box (Ac-CSVM-OH) versetzt und gemischt.

Inhibitionsassay: 400  $\mu\text{L}$  des Farnesylierungspuffers werden mit 2  $\mu\text{L}$  2.31 mM FPP versetzt und auf  $\text{pH} = 7.19$  eingestellt (Zugabe von 0.7  $\mu\text{L}$  5 mM  $\text{HBF}_4$ ) und dieser auf zwei Portionen aufgeteilt: 200  $\mu\text{L}$  ftasezzf1 und 200  $\mu\text{L}$  ftasezzf2. Die Probe ftasezzf1 wird mit 2  $\mu\text{L}$  MeOH versetzt ( $\text{pH} = 7.11$ ). Die Probe ftasezzf2 wird mit 2  $\mu\text{L}$  einer 100 mM Lösung von Rezeptor **69** (PMD-132-01, Hydrochlorid) in MeOH versetzt und der  $\text{pH}$ -Wert durch Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  5 mM  $\text{NMe}_4\text{OH}$  auf  $\text{pH} = 7.07$  korrigiert. Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe von jeweils 1  $\mu\text{L}$  FTase (1 mg/mL). Beide Proben werden jeweils durch 10-faches Pipettieren durchmischt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Wasserbad für 30 min bei 37 °C thermostatisiert. Beide Proben werden hierauf in eisgekühlte Microvials pipettiert. Die Probe ftasezzf1 wird direkt mit HPLC gemessen, die Probe ftasezzf2 wird bis zur Messung auf Eis gelagert.

Durch Gegenwart des Rezeptors PMD-132-01 (\*HCl) konnte keine Inhibition nachgewiesen werden (971  $\mu\text{M}$  Rezeptorkonzentration).

#### **Bedingungen für das FTaseassay am 11-mer von H-Ras (mit dem Nestler-Rezeptor):**

*Farnesylierungspuffer:* 974  $\mu\text{L}$  50 mM BisTris (auf  $\text{pH} = 7.2$  eingestellt) werden mit 10  $\mu\text{L}$  100 mM DTT, 5  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  10 mM  $\text{ZnCl}_2$  und 10  $\mu\text{L}$  800  $\mu\text{M}$  des 11-mers der H-Ras-CaaX-Box versetzt und gemischt.

*Inhibitionsassay:* 400  $\mu\text{L}$  des Farnesylierungspuffers werden mit 2  $\mu\text{L}$  2.31 mM FPP versetzt und auf zwei Portionen aufgeteilt: 200  $\mu\text{L}$  ftasezzh1 und 200  $\mu\text{L}$  ftasezzh2. Die Probe ftasezzh1 wird mit 8  $\mu\text{L}$  MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) versetzt ( $\text{pH} = 7.22$ ). Die Probe ftasezzh2 wird mit 8  $\mu\text{L}$  einer 12.5 mM Lösung des Rezeptors **12** (PMD-171-01-06, Hydrochlorid) in MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) versetzt und der  $\text{pH}$ -Wert durch Zugabe von 4  $\mu\text{L}$  0.1 M NaOH auf  $\text{pH} = 7.19$  korrigiert. Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe von jeweils 1  $\mu\text{L}$  FTase (1 mg/mL, Bochum). Beide Proben werden jeweils durch 10-faches Pipettieren durchmischt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Wasserbad für 30 min bei 37 °C thermostatisiert. Beide Proben werden hierauf in eisgekühlte Microvials pipettiert. Die Probe ftasezzh1 wird direkt mit HPLC gemessen, Probe ftasezzh2 wird bis zur Messung auf Eis gelagert.

Durch die Gegenwart des Nestler-Rezeptors **12** (PMD-171-01-06, Hydrochlorid) wurde die Farnesylierung vollständig inhibiert (469  $\mu\text{M}$  Rezeptorkonzentration).

Der Versuch wurde mit der Zugabe von 4  $\mu\text{L}$  12.5 mM Nestler-Rez. (PMD-171-01-06) wiederholt (241  $\mu\text{M}$  Rezeptorkonzentration). Auch hier kam es zu einer vollständigen Inhibition der Farnesylierung. Das Produktsignal wurde verifiziert, indem bei Farnesylierungen (ohne den Rezeptor) der Anstieg des Produkts durch Erhöhung der FTase-Konzentration festgehalten wurde.

#### **Verwendete Säule und Laufmittel:**

Varian Polaris 3 C18-Ether 50 x 2 mm (3  $\mu\text{M}$  Partikelgröße), LC-MS- $\text{H}_2\text{O}$ : Fisher Scientific Water W6-212 Optima® LC/MS, HPLC-ACN: Prolabo HiPerSolv CHROMANORM HPLC – SUPER GRADIENT, TFA: Iris Biotech, peptide grade, Ameisensäure: ACROS ORGANICS, p. a.

## 8 Literaturangaben

- <sup>1</sup>: M. F. Greaves, *KREBS – der blinde Passagier der Evolution*, Springer-Verlag **2003**, 10.
- <sup>2</sup>: J. Ewing, *J. Cancer Res.* **1916**, 1, 71-86.
- <sup>3</sup>: R. Skloot, *Die Unsterblichkeit der Henrietta Lacks*, Wilhem Goldmann Verlag, München **2013**, 12.
- <sup>4</sup>: [www.krebshilfe.de](http://www.krebshilfe.de)
- <sup>5</sup>: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/)
- <sup>6</sup>: *Global Cancer Facts & Figures*, American Cancer Society, Inc., **2008**, 2.
- <sup>7</sup>: A. T. Baines, D. Xu, C. J. Der, *Future Med. Chem.* **2011**, 3, 1787.
- <sup>8</sup>: A. Lièvre, J.-B. Bachet, D. L. Corre, V. Boige, B. Landi, J.-F. Emile, J.F. Côté, C. Tomasic, C. Penna, M. Ducreux, P. Rougier, F. Penault-Llorca, P. Laurent-Puig, *Cancer Res.* **2006**, 66, 3992-3995.
- <sup>9</sup>: K. Wennerberg, K. L. Rossman, C. J. Der, *J. Cell Sci.* **2005**, 118, 843-846.
- <sup>10</sup>: K. Inoki, Y. Li, T. Xu, K.-L. Guan, *Genes Dev.* **2003**, 17, 1829-1834.
- <sup>11</sup>: Y. Li, M. N. Corradetti, K. Inoki, K. L. Guan, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 32-38.
- <sup>12</sup>: W. Wang, G. Fang, J. Rudolph, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 5766-5776.
- <sup>13</sup>: A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4360.
- <sup>14</sup>: M. V. Milburn, L. Tong, A. M. deVos, A. Brünger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S.-H. Kim, *Science* **1990**, 247, 939-945.
- <sup>15</sup>: A. Wittinghofer, E. F. Pai, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 16, 382-387.
- <sup>16</sup>: A. Wittinghofer, N. Nassar, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 21, 488-491.
- <sup>17</sup>: L. Wiesmüller, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 10207-10210.
- <sup>18</sup>: P. Gideon, J. John, M. Frech, A. Lautwein, R. Clark, J. E. Scheffler, A. Wittinghofer, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, 12, 2050-2056.
- <sup>19</sup>: J. F. Eccleston, K. J. M. Moore, L. Morgan, R. H. Skinner, P. N. Lowe, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 27012-27019.
- <sup>20</sup>: M. Chabre, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, 15, 6-10.
- <sup>21</sup>: K. Scheffzek, A. Lautwein, W. Kabsch, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, *Nature* **1996**, 384, 591-596.
- <sup>22</sup>: K. Scheffzek, M.R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F. Schmitz, A. Wittinghofer, *Science* **1997**, 277, 333-338.
- <sup>23</sup>: M. R. Ahmadian, U. Hoffmann, R. S. Goody, A. Wittinghofer, *Biochemistry* **1997**, 36, 4535-4541.
- <sup>24</sup>: A. Sermon, P. N. Lowe, M. Strom, J. F. Eccleston, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 9480-9485.
- <sup>25</sup>: J. Downward, J. D. Graves, P. H. Warne, S. Rayter, D. A. Cantrell, *Nature* **1990**, 346, 719-723.
- <sup>26</sup>: P. A. Boriak-Sjodin, S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, *Nature* **1998**, 394, 337-343.
- <sup>27</sup>: A. G. Taveras, S. W. Remiszewski, R. J. Doll, D. Cesarz, E. C. Huang, P. Kirschmeier, B. N. Pramanik, M. E. Snow, Y.-S. Wang, J. D. del Rosario, B. Vibulbhan, B. B. Bauer, J. E. Brown, D. Carr, J. Catino, C. A. Evans, V. Girijavallabhan, L. Heimark, L. James, S. Liberles, C. Nash, L. Perkins, M. M. Senior, A. Tsarbopoulos, A. K. Ganguly, R. Aust, E. Brown, D. Delisle, D. Fuhrman, T. Hendrickson, C. Kissinger, R. Love, W. Sisson, E. Villafranca, S. E. Webber, *Bioorg. Med.*

- 
- Chem.* **1997**, *5*, 125-133.
- <sup>28</sup>: C. Herrmann, C. Block, C. Geisen, K. Haas, C. Weber, G. Winde, T. Möröy, O. Müller, *Oncogene* **1998**, *17*, 1769-1776.
- <sup>29</sup>: H. Waldmann, I.-M. Karaguni, M. Carpintero, E. Gourzoulidou, C. Herrmann, C. Brockmann, H. Oschkinat, O. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 454-458.
- <sup>30</sup>: A. Palmioli, E. Sacco, S. Abraham, C. J. Thomas, A. Di Domizio, L. De Gioia, V. Gaponenko, M. Vanoni, F. Peri, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4217-4222.
- <sup>31</sup>: I. C. Rosnizeck, T. Graf, M. Spoerner, J. Tränkle, D. Filchtinski, C. Herrmann, L. Gremer, I. R. Vetter, A. Wittinghofer, B. König, H. R. Kalbitzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3830-3833.
- <sup>32</sup>: A. Patgiri, K. K. Yadav, P. S. Arora, D. Bar-Sagi, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 585-587.
- <sup>33</sup>: Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. Burns, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6140-6143.
- <sup>34</sup>: T. Maurer, L. S. Garrenton, A. Oh, K. Pitts, D. J. Anderson, N. J. Skelton, B. P. Fauber, B. Pan, S. Malek, D. Stokoe, M. J. C. Ludlam, K. K. Bowman, J. Wu, A. M. Gianetti, M. A. Starovasnik, I. Mellman, P. K. Jackson, J. Rudolph, W. Wang, G. Fang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 5299-5304.
- <sup>35</sup>: I.-M. Karaguni, P. Herter, P. Debruyne, S. Chtarbova, A. Kasprzyński, U. Herbrand, M.-R. Ahmadian, K.-H. Glüsenkamp, G. Winde, M. Mareel, T. Möröy, O. Müller, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 1718-1723.
- <sup>36</sup>: S. Karassek, C. Berghaus, M. Schwarten, C. G. Goemans, N. Ohse, G. Kock, K. Jockers, S. Neumann, S. Gottfried, C. Herrmann, R. Heumann, R. Stoll, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 33979-33991.
- <sup>37</sup>: Y. Yu, S. Li, X. Xu, Y. Li, K. Guan, E. Arnold, J. Ding, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 17093-17100.
- <sup>38</sup>: I. R. Vetter, A. Wittinghofer, *Science* **2001**, *294*, 1299-1304.
- <sup>39</sup>: C. Herrmann, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 122-129.
- <sup>40</sup>: A. B. Vojtek, S. M. Hollenberg, J. A. Cooper, *Cell* **1993**, *74*, 205-214.
- <sup>41</sup>: H. Koide, T. Satoh, M. Nakafuku, Y. Kaziro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8683-8686.
- <sup>42</sup>: L. v. Aelst, M. Barr, S. Marcus, A. Polverino, M. Wigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6213-6217.
- <sup>43</sup>: S. A. Moodie, B. M. Willumsen, M. J. Weber, A. Wolfman, *Science* **1993**, *260*, 1658-1661.
- <sup>44</sup>: X.-F.-Zhang, J. Settleman, J. M. Kyriakis, R. Takeuchi-Suzuki, S. J. Elledge, M. S. Marshall, J. T. Bruder, U. R. Rapp, J. Avruch, *Nature* **1993**, *364*, 308-313.
- <sup>45</sup>: N. Nassar, G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick & A. Wittinghofer, *Nature* **1995**, *375*, 554-560.
- <sup>46</sup>: F. McCormick, A. Wittinghofer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 449-456.
- <sup>47</sup>: D. K. Morrison, R. E. Cutler, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 174-179.
- <sup>48</sup>: D. Vavvas, X. Li, J. Avruch, X.-F. Zhang, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5439-5442.
- <sup>49</sup>: Y. Aoyama, J. Avruch, X.-f. Zhang, *Oncogene* **2004**, *23*, 3426-3433.
- <sup>50</sup>: P. Rodriguez-Viciano, P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, J. Downward, *Nature* **1994**, *370*, 527-532.

- 
- <sup>51</sup>: T. Kodaki, R. Woscholski, B. Hallberg, P. Rodriguez-Viciano, J. Downward, P. J. Parker, *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 798-806.
- <sup>52</sup>: B. Stoyanov, S. Volinia, T. Hanck, I. Rubio, M. Loubtchenkov, D. Malek, S. Stoyanova, B. Vanhaesebroeck, R. Dhand, B. Nürnberg, P. Gierschik, K. Seedorf, J. J. Hsuan, M. D. Waterfield, R. Wetzker, *Science* **1995**, *269*, 690-693.
- <sup>53</sup>: J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*, 133-139.
- <sup>54</sup>: B. E. Chaplin, Y. Ohya, M. S. Marshall, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9472-9479.
- <sup>55</sup>: S. B. Long, P. J. Casey, L. S. Beese, *Structure* **2000**, *8*, 209-222.
- <sup>56</sup>: L. Brunsveld, H. Waldmann, D. Huster, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 273-288.
- <sup>57</sup>: S. H. Gellman, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1231-1232.
- <sup>58</sup>: P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 564-574.
- <sup>59</sup>: P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Quarterly Reviews of Biophysics* **1999**, *32*, 211-240.
- <sup>60</sup>: J. W. Moore, *Physical Chemistry* **1972**, 4. Auflage, Prentice-Hall, Inc.: Englewood Cliffs.
- <sup>61</sup>: D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1264-1286.
- <sup>62</sup>: M. Nieto, H. R. Perkins, *Biochem. J.* **1971**, *123*, 789-803.
- <sup>63</sup>: Y. Nitanaï, T. Kikuchi, K. Kakoi, S. Hanamaki, I. Fujisawa, K. Aoki, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1422-1432.
- <sup>64</sup>: A. Borchardt, C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7467-7468.
- <sup>65</sup>: D. M. Kneeland, K. Ariga, V. M. Lynch, C.-Y. Huang, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10042-10055.
- <sup>66</sup>: D. L. Dong, R. Liu, R. Sherlock, M. H. Wigler, H. P. Nestler, *Chem Biol.* **1999**, *6*, 133-141.
- <sup>67</sup>: K. Srinivasan, T. Subramanian, H. P. Spielmann, C. Janetopoulos, *Mol. Cell. Biochem.* **2014**, *387*, 177-186.
- <sup>68</sup>: J. Downward, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11-22.
- <sup>69</sup>: C. Mascaux, N. Iannino, B. Martin, M. Paesmans, T. Berghmans, M. Dusart, A. Haller, P. Lothaire, A.-P. Meert, S. Noel, J.-J. Lafitte, J.-P. Sculier, *Br. J. of Canc.* **2005**, *92*, 131-139.
- <sup>70</sup>: C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- <sup>71</sup>: K. Feichtinger, C. Zapf, H. L. Sings, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3804-3805.
- <sup>72</sup>: Im verwendeten Rheb-Protein liegt lediglich das Stickstoffisotop <sup>15</sup>N vor, da bei der Züchtung der Organismen entsprechende Nährmedien verwendet wurden.
- <sup>73</sup>: C. Schmuck, U. Machon, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1109-1118.
- <sup>74</sup>: Die Abbildung zeigt die energetisch günstigste Struktur der durchgeführten Berechnung.
- <sup>75</sup>: Macromodel 9.6 user manual, *Schrödinger Press*, **2008**.
- <sup>76</sup>: K. C. Nicolaou, A. A. Estrada, M. Z. S. H. Lee, B. S. Safina, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1378-1382.
- <sup>77</sup>: S. V. Rénamy, S. Bassène, C. A. K. Diop, M. Sidibé, L. Diop, M. F. Mahon, K. C. Molloy, *Appl. Organometal. Chem.* **2004**, *18*, 455-459.
- <sup>78</sup>: Die Synthese des verwendeten NBD-markierten Linkers **39 (TPT-007)** erfolgte durch Thao Tran Thi Phuong. Die Synthese dieses Linkers wurde durch den Autor reproduziert und lieferte eine Aubeute von 41 %.



- 
- <sup>79</sup>: C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2, 324-329.
- <sup>80</sup>: Für die von C. Schmuck literaturbeschriebene Synthese der Kopfgruppe wurden bereits vorhandene, von Dr. Thao Tran Ti Phuong synthetisierte Vorstufen verwendet. Bis zur Stufe der beiden Kupplungsprodukte Bocguanidin und Benzyloxycarbonylpyrrolcarbonsäure sind die Ausbeuten von Dr. Thao Tran Thi Phuong angegeben.
- <sup>81</sup>: L. Fielding, *Tetrahedron* **2000**, 56, 6151-6170.
- <sup>82</sup>: M. J. Hynes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 2, 311-312.
- <sup>83</sup>: M. J. Hynes, **2008**, *WINEQMR2*, Department of Chemistry, National University of Ireland, Galway.
- <sup>84</sup>: C. Schmuck, L. Geiger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8898-8899.
- <sup>85</sup>: C. Schmuck, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 709-718.
- <sup>86</sup>: C. Schmuck, M. Schwegmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3373-3379.
- <sup>87</sup>: C. Schmuck, D. Rupprecht, W. Wienand, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 9186-9195.
- <sup>88</sup>: C. Schmuck, M. Heil, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1232-1238.
- <sup>89</sup>: C. Schmuck, *Synlett* **2011**, 13, 1798-1815.
- <sup>90</sup>: Die Reaktionen wurden jeweils in einem 1.5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt und die Kupplungs- und Waschlösungen über eine Spritze mit verengter Kanüle abgesaugt. Der Durchmesser war hierbei so eingestellt, dass keine Beads in die Spritze gesaugt werden konnten.
- <sup>91</sup>: H. Wennemers, C. Still, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 6413-6416.
- <sup>92</sup>: O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 455-461.
- <sup>93</sup>: Die Präparation und Messung des Rheb-Proteins sowie die Erstellung der Verschiebungsdiagramme wurden im Rahmen der Kooperation von Dr. Katharina F. G. Jockers erstellt.
- <sup>94</sup>: M. Meldal, S. F. Christensen, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 3551-3554.
- <sup>95</sup>: Z.-J. Ni, D. Maclean, C. P. Holmes, M. M. Murphy, B. Ruhland, J. W. Jacobs, E. M. Gordon, M. A. Gallop, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1601-1608.
- <sup>96</sup>: M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10922-10926.
- <sup>97</sup>: Das Probenvolumen wurde bei der Analyse der kombinatorischen Bibliotheken weiter auf 30 µL reduziert.
- <sup>98</sup>: Die Analysen der Beads mit geringer Leuchtstärke (r. f. = 1 und 2) wurden von M. Stolarski durchgeführt.
- <sup>99</sup>: C. Schmuck, S. Graupner, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 1295-1298.
- <sup>100</sup>: D. Rupprecht, *Dissertation*, **2006**, 54-55.
- <sup>101</sup>: Bordwell pKa Table, <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/pkatable/index.htm>
- <sup>102</sup>: F. G. Bordwell, D. Algrim, *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 2507.
- <sup>103</sup>: F. G. Bordwell, J. E. Bartmess, J. A. Hautala, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3095-3100.
- <sup>104</sup>: F. G. Bordwell, G. E. Drucker, H. E. Fried, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 632.
- <sup>105</sup>: Die Messung des 11- und 14-mers wurde in Kooperation mit dem AK Stoll durch Dr. Katharina F. G. Jockers durchgeführt, die gezeigte Auswertung mittels WINEQMR2 wurde selbst angefertigt.
- <sup>106</sup>: P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1305-1323.

- 
- <sup>107</sup>: P. M. Düppe, T. T. T. Phuong, J. Autzen, M. Schöpel, K. T. Yip, R. Stoll, J. Scherkenbeck, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1755-1763.
- <sup>108</sup>: W. Blokzijl, B. F. N. Engberts, *Angew. Chem.* **1993**, *11*, 1610-1648.
- <sup>109</sup>: M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784-1788.
- <sup>110</sup>: Das STD-Experiment wurde von King Tuo Yip durchgeführt.
- <sup>111</sup>: J. D. Ochocki, U. Igbavboa, W. G. Wood, E. V. Wattenberg, M. D. Distefano, *Chem Biol Drug Des.* **2010**, *76*, 107-115.
- <sup>112</sup>: M. Wotske, Y. Wu, D. A. Wolters, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6848-6855.
- <sup>113</sup>: N. M. G. M. Appels, K.-O. Tung, H. Rosing, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, *Biomed. Chromatogr.* **2006**, *20*, 161-165.
- <sup>114</sup>: N. M. G. M. Appels, H. Rosing, T. C. Stephens, A. Hughes, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, *Anal. Biochem.* **2006**, *352*, 33-40.
- <sup>115</sup>: S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531-1534.
- <sup>116</sup>: S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3144-3150.
- <sup>117</sup>: B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864-890.
- <sup>118</sup>: C. Dominguez, R. Boelens, A. M. J. J. Bonvin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1731-1737.
- <sup>119</sup>: Die Verbindungen **148** und **149** (Hybridstrukturen aus 4,4'-Biphenol und (3,4-Dichlorphenyl)-piperazin) wurden von Dr. Dong Sun synthetisiert.
- <sup>120</sup>: Die Präparation und Messung des Rheb-Proteins sowie die Erstellung der Verschiebungsdigramme wurden im Rahmen der Kooperation von M. Schöpel erstellt.
- <sup>121</sup>: Eintrag in der GESTIS-Stoffdatenbank (Benzidin, CAS-Nr.: 92-87-5);  
[http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis\\_de/015310.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/015310.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0)
- <sup>122</sup>: M. Schöpel, K. F. G. Jockers, P. M. Düppe, V. N. Potheraveedu, J. Autzen, V. N. Potheraveedu, S. Ince, K. T. Yip, R. Heumann, C. Herrmann, J. Scherkenbeck, R. Stoll, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9664-9672.
- <sup>123</sup>: Die Durchführung erfolgte durch Dr. Sebastian Lüttenberg.
- <sup>124</sup>: Hergestellt von Jasmin Autzen.
- <sup>125</sup>: Hergestellt von Dr. Thao Tran Ti Phuong.
- <sup>126</sup>: Die NMR-Titration des 11- und 14-mers erfolgten durch Dr. Katharina F. G. Jockers. Die Auswertung wurde selbst durchgeführt.